



ChIP-IT High Sensitivity[®]

(version A6)

(商品コード53040)

日本語版プロトコル

日本語プロトコルを利用するにあたっての注意事項：

この日本語プロトコルは ChIP-IT High Sensitivity[®] の英語版製品プロトコル（version A6）をもとに作製しました。最新の情報については、必ず英語版の製品プロトコルをホームページでご確認ください。

(<http://www.activemotif.com/documents/1842.pdf>)



始める前にお読みください：

ChIP-IT High Sensitivity[®] キットは、サンプル量が少ない場合や低存在量の転写因子ターゲットを使用する際に、最高レベルの感度と低バックグラウンドで結果を得られるように最適化されたプロトコルとバッファーシステムを含んでいます。従来のChIPプロトコルとは異なる手順が多いため、マニュアル全体を通して当社のプロトコルと推奨事項に従っていただくことが重要です。特に、クロマチン免疫沈降反応前のアガロースゲル解析用インプットクロマチンの処理に関する注意事項にご注意ください。

アクティブ・モティフ株式会社

〒162-0824東京都新宿区揚場町 2-21

TEL: 03-5225-3638 FAX: 03-5261-8733

www.activemotif.com

E-mail: japantech@activemotif.com

目次

概要	3
作業工程のフローチャート	4
ChIP-IT High Sensitivity [®] の性能と利点	5
プロトコルの概要と所要時間	6
キットの内容物と保存条件	
ChIP-IT High Sensitivity [®] キットの内容物	7
キットに含まれていない試薬と器具	8
プロトコール：実験準備	
細胞培養についての推奨事項	9
バッファー調製	9
推奨事項	11
プロトコール：断片化クロマチンの調製	
Section A : 培養細胞を使用した場合の細胞固定	12
Section B : 培養細胞のクロマチン超音波処理	13
Section C : 新鮮組織または凍結組織を使用した場合の細胞固定	15
Section D : 組織のクロマチン超音波処理	16
プロトコール：クロマチン免疫沈降	
Section E : 免疫沈降	19
プロトコール：ChIP済みDNAの精製	
Section F : 脱架橋と DNA 精製	21
プロトコール：ChIP済みDNAの分析	
Section G : 定量的PCR (qPCR)	22
Section H : ChIP-Seq	23
Appendix 補足説明	
Section I : qPCRプライマーデザインおよびデータ解析	25
Section J : トラブルシューティング	27

概要

クロマチン免疫沈降（ChIP）は、特定のDNA領域に結合しているタンパク質の位置を明らかにできるため、タンパク質/DNA相互作用（転写因子、共調節タンパク質、修飾されたヒストン、クロマチン修飾酵素、ポリメラーゼなど）の研究に使える強力なツールです。ChIP-SeqやChIP-chipなどのように全ゲノム解析と組み合わせると、遺伝子制御、遺伝子発現、クロマチン修飾機構、および経路解析に関する見識を得ることができます。

しかし、ChIPには高度な技術が要求されることがあります。ChIPには、標的DNAと結合した固定状態の対象タンパク質を認識する高品質の抗体と、抗体/クロマチン複合体を沈降させる効率的な方法（通常、プロテインAまたはG ビーズ）が必要です。また、非特異的濃縮を最小限に抑え、タンパク質分解を低減させるため、特別なバッファー、阻害物質カクテルおよびブロッキング試薬が必要です。

Active MotifのChIP-IT High Sensitivity[®]キットは、このような技術的な要求を満たして最高品質のChIP濃縮DNAが得られるように設計されています。ChIP-IT High Sensitivity[®]のプロトコルは、従来のChIPキットではシグナルが得られない困難な抗体にも使用でき、存在量の少ない転写因子の特異的結合でも検出できる高い感度を擁しています。高い感度をもたらす重要な要因の一つは、組成が最適化されたChIPバッファーです。これにより非特異的DNAを減らしてバックグラウンドレベルが低下したため、より良好な濃縮解析が可能となりました。さらに、このキットの再現性は、多数のタイプのサンプルを使った検証において実証されています。わずか1,000個の細胞から免疫沈降反応が行えます。ChIP-IT High Sensitivity[®]の高い感度とバックグラウンドレベルの低下は、ChIP-Seqでの使用に理想的です。コストのかかる下流のゲノム解析に時間と資金を費やす前に、確実に最高の品質のChIP濃縮DNAを取得することができます。

ChIP-IT High Sensitivity[®]キットには、16回のクロマチン調製と免疫沈降反応を行うのに十分な試薬が含まれています。1回分のクロマチン調製物は、15 cm細胞培養プレート1枚分または組織サンプル100 mg分を想定しています。完全なデータ解析のためには、Active MotifのChIP-IT[®] qPCR Analysis KitとChIP-IT High Sensitivity[®]を組み合わせることを推奨します。ChIP-IT[®] Control Kit、コントロール qPCRプライマーセット、ChIP-Seq検証済み抗体、Active Motifの超音波処理装置EpiShear[™]などのChIPアクセサリ製品については、当社のウェブサイト www.activemotif.com/chip をご覧ください。

製品名	反応回数	商品コード
ChIP-IT High Sensitivity [®]	16 rxns	53040
ChIP-IT [®] qPCR Analysis Kit	10 rxns	53029

作業工程のフローチャート

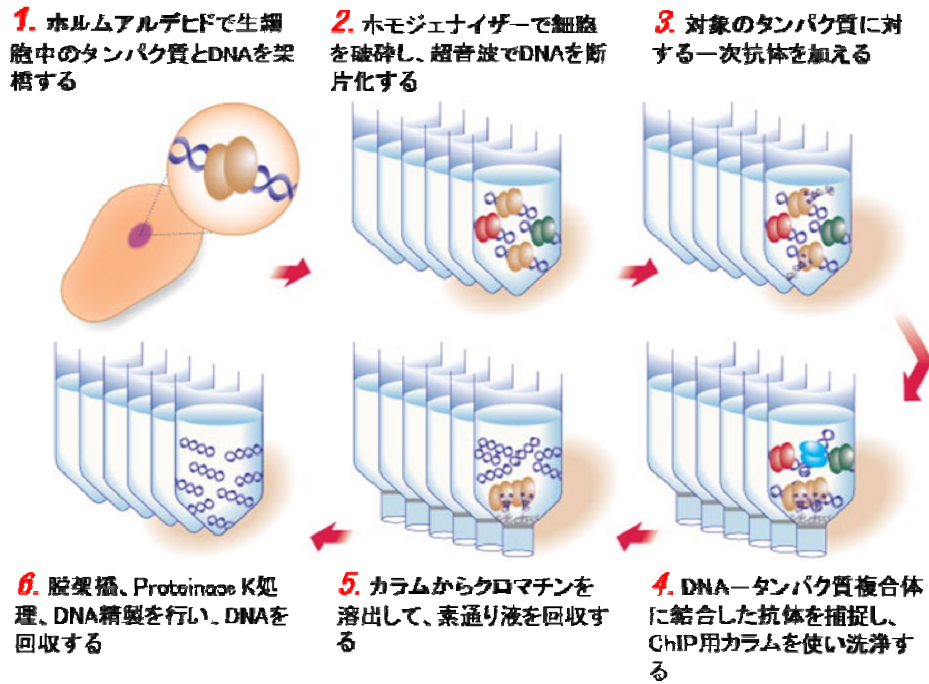


図 1: ChIP-IT High Sensitivity[®] Assay のフローチャート

ChIP-IT High Sensitivity[®]では、特別に調製したホルムアルデヒドバッファーで細胞を固定します。このバッファーはタンパク質/DNA相互作用を架橋して保持します。次に超音波処理によりDNAを短く断片化し、実験対象とするDNA結合タンパク質に対する抗体と共にインキュベートします。抗体と結合したタンパク質/DNA複合体を、プロテインGアガロースビーズを用いて免疫沈降し、カラムを用いて洗浄します。免疫沈降後、脱架橋し、Proteinase Kでタンパク質を除去して、DNAを回収して精製します。ChIP濃縮DNAは、遺伝子特異的解析にも全ゲノム解析にも使用できます。

ChIP-IT High Sensitivity® の性能と特長

ChIP-IT High Sensitivity® の特長

- 存在量の少ない転写因子や結合親和性の低い抗体に最適
- 存在量の多い標的タンパク質ならわずか 1,000個の細胞から、存在量の少ない転写因子でも 50,000個の細胞から、高感度の DNA 濃縮が可能
- 最適化した試薬で非特異的結合によるバックグラウンドレベルを低減
- フィルターカラムを使った洗浄法により、複数サンプルの実験間における一貫性が向上
- 様々な種類のサンプルを使ったqPCRやChIP-Seq解析により、プロトコルを検証済み

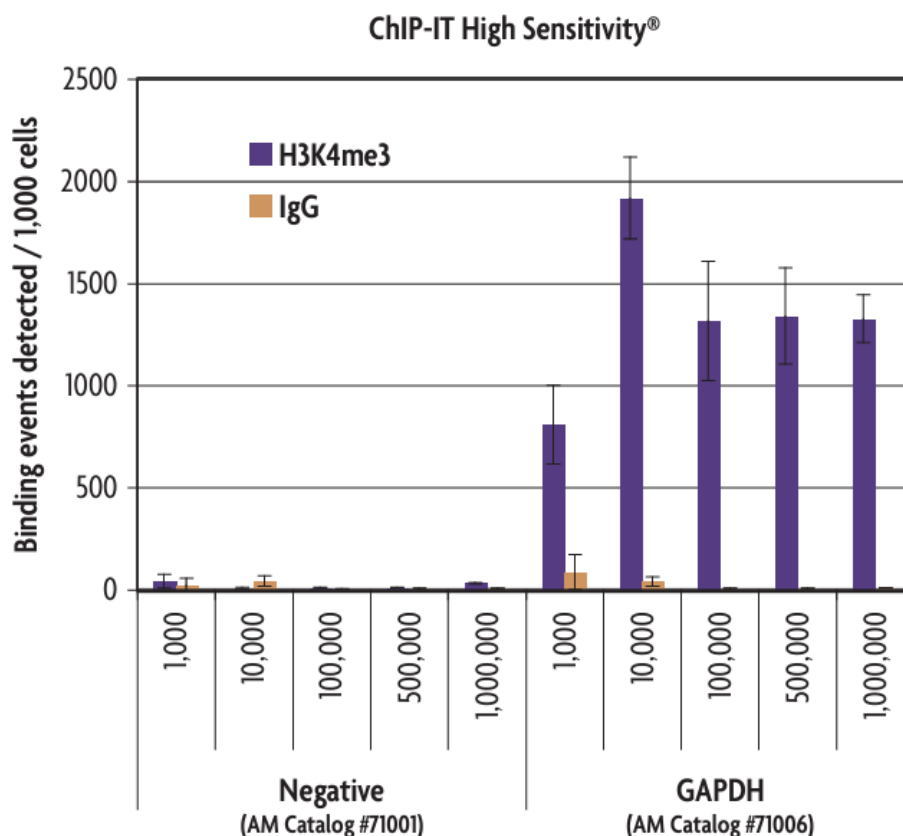


図 1 : ChIP-IT High Sensitivity® キットの免疫沈降感度

クロマチン調製1回ごとに10万~100万個の細胞を用いて、プロトコル通りにMCF-7細胞からクロマチンを調製しました。表示されている数の細胞とアクティブ・モチーフのヒストンH3K4me3抗体 (商品コード 39915) およびネガティブコントロール IgGを用いて、免疫沈降反応を行いました。データを正規化し、結果を直接比較できるようにするため、濃縮後、ChIP-IT® qPCR Analysis Kit (商品コード 53029) を用いてqPCRを行いました (Negative Control Primer Set 1 (商品コード 71001) とPositive Control Primer Set GAPDH-2 (商品コード 71006)を使用)。ChIP-IT High Sensitivity® キットは、わずか 1,000個の細胞から、H3K4me3-DNA結合を高度に濃縮しました。一方で、ネガティブコントロール IgGでは非特異的結合がほとんどまたは全く検出されませんでした。Untr12 (Negative) は、抗H3K4me3抗体で濃縮されない12番染色体の遺伝子砂漠 (gene desert) の部分です。GAPDHは、H3K4me3 の存在下で活発に転写されている遺伝子です。データは、反応中のクロマチン量、再懸濁液の体積、およびプライマー効率で補正したトリプレートの生データの平均値であり、細胞1,000個ごとに検出された結合イベント数として示しています。この算出結果は、データ解析の一貫性を提供しており、サンプル間・実験間での直接比較が可能です。このスケールをChIPインプットの回収率に換算するには、1,000で割ってください。

存在量の少ない転写因子を標的とした ChIP キットの比較

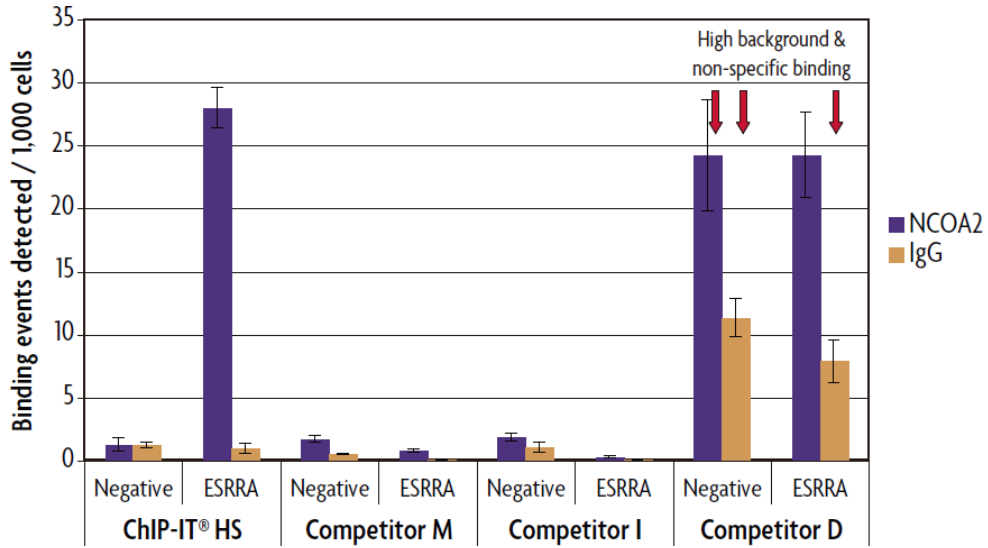


図 2： ChIP-IT High Sensitivity® キットによる存在量の少ない標的タンパク質の検出

MCF-7細胞由来のクロマチンを、 1.5×10^6 個の細胞から各メーカーのChIP アッセイキットの推奨するプロトコールに従って調製しました。各メーカーのプロトコールの指示通りの最適量のクロマチンを用いて、存在量の少ない核内受容体コアクチベーター2 (Nuclear co-activator2: NCOA2) タンパク質に対する抗体およびネガティブコントロール IgGを用いてChIPを行いました。クロマチン量とChIP量についてデータを正規化し、比較キットの結果と直接比較できるようにするため、濃縮後、ChIP-IT® qPCR Analysis Kit (商品コード 53029) を用いてqPCRを行いました。NCOA2は、ChIPにとって困難な抗体であると考えられていますが、ChIP-IT High Sensitivity®を使用すれば、エストロゲン関連受容体 α (estrogen-related receptor alpha: ESRRA) プロモーター上にNCOA2の結合が検出され、濃縮はネガティブコントロールプライマーセットとIgGよりも約20倍高値でした。他社のChIP キットでは、NCOA2が全く濃縮されなかった (比較キット M および I) か、濃縮が非特異的でネガティブプライマーセットとIgGにおいて高いバックグラウンドがみられました (比較キット D)。データは、細胞1,000個ごとに検出された結合イベント数として示した、トリPLICATEの値です。このスケールをChIPインプットの回収率に換算するには、1,000で割ってください。

プロトコールの概要と所要時間

作業工程	所要時間
細胞または組織の固定と溶解	1.5時間
超音波処理によるクロマチン断片化	1サンプルあたり15分
断片化クロマチンのサイズの評価*	4.5時間 (培養細胞サンプル) オーバーナイト (組織サンプル)
免疫沈降	オーバーナイトでインキュベート
プロテインGアガロースビーズの結合	3時間
免疫複合体の洗浄	20分
脱架橋	2.5時間
DNAの精製	15分
qPCR解析	2時間

*スタートサンプルの種類 (培養細胞または組織) によって、所要時間が変わります。

キットの内容物と保存条件

下の表にある保存温度に従って各構成成品を適切な温度で保存してください。

(重要) Protein G Agarose Beadsの再凍結は避け、一度解凍した後は、4℃で保管してください。

試薬名	容量	保存温度
RNase A (10 µg/µl)	40 µl	-20℃
Proteinase K (10 µg/µl)	200 µl	-20℃
Blocker	100 µl	-20℃
5M NaCl	400 µl	RT
100 mM PMSF	500 µl	-20℃
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	500 µl	-20℃
Precipitation Buffer	1.5 ml	-20℃
Carrier	35 µl	-20℃
TE pH 8.0	2 x 1.5 ml	RT
Detergent	25 ml	RT
10X PBS	120 ml	-20℃
Fixation Buffer	2 x 1.5 ml	4℃
Stop Solution	20 ml	RT
Chromatin Prep Buffer	85 ml	RT
ChIP Filtration Columns	16 ea	RT
ChIP Buffer	35 ml	RT
Wash Buffer AM1	100 ml	RT
Elution Buffer AM4	2 x 1.5 ml	RT
Protein G Agarose Beads*	500 µl	4℃
DNA Purification Binding Buffer	50 ml	RT
3 M Sodium Acetate	500 µl	RT
DNA Purification Wash Buffer**	10 ml	RT
DNA Purification Elution Buffer	5 ml	RT
DNA Purification Columns	16 ea	RT

* Protein G Agarose Beads はドライアイス保存で出荷します。初回使用時まで冷凍保存が可能です。一度解凍したら、再凍結は避けて、4℃で冷蔵保存してください。

** 使用前にエタノールを添加してください。

キットに含まれていない試薬と器具

- ChIP実験検証済みの対象のタンパク質に直接結合する抗体
- ダウンス型ホモジェナイザーと微調整用ペッスル（Active Motif 商品コード 40401または40415、隙間の狭いペッスル Aを使用）。ホモジェナイザーの使用はクロマチン断片化時には必須です。
- 37%ホルムアルデヒド溶液（重合防止の 10-15%メチルアルコール添加済）（Sigma Aldrich 商品コード252549）、パラホルムアルデヒドは使用しないでください。
- （組織サンプル使用時） 飽和フェノール（DNA 精製用、分子生物学用）
- （組織サンプル使用時） クロロホルム/イソアミルアルコール（24:1）（DNA 精製用、分子生物学用）
- 100%エタノール（無水）
- 70%エタノール
- DNase フリー-H₂O
- 培養プレート用シーソー式シェイカー
- チューブを4℃で回転培養する装置（Labquake from Barnstead/Thermolyne with a tube holder for 1.5 ml microcentrifuge tubes）
- 微量遠心機（卓上、4℃で遠心可）と微量遠心用チューブ
- 250 µlのPCRチューブ
- サーマサイクラー
- 15 mlと50 mlのコニカルチューブ
- DNA定量用の分光光度計
- ピペットとチップ（フィルター付きを推奨）
- 超音波発生装置（Active Motif EpiShear™ Sonicator with a 1/8" probe（商品コード 53051））
- アガロースゲル電気泳動用装置
- （組織サンプル使用時） カミソリ
- （組織サンプル使用時） ハンドヘルドホモジェナイザー（例：Biospec Products Tissue-Tearor）
- セルスクレイパー（ラバーポリスマン）
- （オプション） ChIP-IT[®] qPCR Analysis Kit（Active Motif 商品コード 53029）
- （オプション） Gene-specific qPCR primer pairs（Appendix Section I 参照）
- （オプション） SYBR Green qPCR master mix（Bio-Rad 商品コード 170-8882）

プロトコール：実験準備

プロトコール全体をよく読んでから実験を始めてください。

細胞培養についての推奨事項

実験を計画する際は、必要なクロマチン調製物の量を計算し、各クロマチン調製時に、実施予定のChIP反応回数を決定してください。適切なポジティブコントロールおよびネガティブコントロールChIP反応を、必ず反応回数に含めてください。また、特定の化合物や培養条件が転写因子/DNA相互作用に与える影響を解析する場合は、参照サンプルとして、コントロール（未処理）細胞からもクロマチンを調製する必要があります。クロマチン調製に使用する最低推奨細胞数は100,000個です。

	24-well plate	12-well plate	6-well plate	60 mm dish	100 mm dish	150 mm dish
播種密度	0.05×10^6	0.1×10^6	0.3×10^6	0.8×10^6	2.2×10^6	5.0×10^6
培養密度 70~80%時の 細胞数	0.15×10^6	0.3×10^6	0.9×10^6	2.4×10^6	6.6×10^6	15.0×10^6
増殖培地体積	1 ml	2 ml	3 ml	5 ml	10 ml	20 ml
Cell Fixation Solution	100 μ l	200 μ l	300 μ l	500 μ l	1 ml	2 ml
Stop solution	55 μ l	110 μ l	165 μ l	275 μ l	550 μ l	1.1 ml
PBS Wash Buffer (洗浄 1 回あたり)	500 μ l	500 μ l	1 ml	2 ml	5 ml	10 ml
Chromatin Prep Buffer	500 μ l	500 μ l	1 ml	2 ml	5 ml	5 ml
ChIP Buffer	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l

*コンフルエントプレートまたはディッシュ上の細胞数は、細胞のタイプによって異なります。この表では、HeLa細胞を例としています。必要があれば、細胞種に基づいて、細胞数を調整してください。

**バッファー調製に関する完全な詳細については以下をご覧ください。

バッファー調製

Complete Cell Fixation Solution

バッファーは、各実験前に用事調製してください。細胞増殖培地20 mlあたり、2.5 mlのComplete Cell Fixation Solutionを調製します。15 mlのコニカルチューブに入れた滅菌水1.57 mlにFixation Buffer 180 μ lを添加し、適切な安全対策（保護メガネ、手袋、白衣）を使用して、37%ホルムアルデヒド750 μ lを加え、ボルテックスして混合します。プレート1枚あたり増殖培地の1/10量を使用してください。Complete Cell Fixation Solutionは、血清の有無にかかわらず増殖培地に添加できます。

Complete Tissue Fixation Solution

バッファーは、各実験前に用事調製してください。処理する組織サンプルあたり10 mlのComplete Tissue

Fixation Solutionを調製します。15 mlのコニカルチューブに入れた滅菌水8.7 mlに10×PBS 1 mlを添加し、適切な安全対策（保護めがね、手袋、白衣）を使用して37%ホルムアルデヒド280 µlを加え、ボルテックスして混合します。

Stop Solution

そのままお使い頂けます。細胞培養プレート1枚あたり培地体積の1/20またはComplete Tissue Fixation Solution10 mlあたり515 µlを使用してください。

PBS Wash Buffer

15 cmプレートまたは組織サンプルごとに25 mlのPBS Wash Bufferを調製します。50mlのコニカルチューブに、滅菌水21.25 ml、10×PBS 2.5 ml、Detergent 1.25 mlを加え、転倒混合します。PBS Wash Bufferは氷上で冷やしてください。PBS Wash Bufferは、4℃で6ヵ月保存可能のため、大量に調製しておくことも可能です。

100mM PMSFおよびProtease Inhibitor Cocktail (PIC)

PMSFとPICを室温で解凍し、完全に溶解します。これには約30分かかります。穏やかにボルテックスし、使用前に軽くスピンドウンして、使用直前にバッファーに加えてください。

Chromatin Prep Buffer

そのままお使いください。

ChIP Buffer

そのままお使いください。

DNA Purification Wash Buffer

DNA Purification Wash Bufferは、使用前にエタノールを添加する必要があります。新鮮な100%エタノール 40 mlをDNA Purification Wash Bufferのボトルに加え、繰り返し転倒混合します。エタノール添加後、バッファーは室温で保管できます。エタノールの最終濃度は80%になります。エタノールを加える必要があるのは初回のみで、以後、DNA Purification Wash Bufferはそのままお使い頂けます。

3 M Sodium Acetate (酢酸ナトリウム)

使用前に酢酸ナトリウム塩が沈殿していないことを確認することが重要です。酢酸ナトリウムを溶解した後は、室温で保管してください。

Protein G Agarose Beads

ビーズは使用前に洗浄する必要があります。プロトコールの指示に従って、ChIP反応で使用する前にビーズを洗浄してください。ビーズを事前にブロッキングしたり、サンプルを事前に洗浄したりする必要はありません。最良の結果を得るためには、チューブを穏やかに振盪して転倒させ、ビーズを再懸濁してください。ビーズは沈殿しやすいので、ピペットで吸う直前に再懸濁する必要があります。ピペットで吸う前にチップの先端を2 mm切断して、先端が詰まらないようにすることを推奨します。

Protein G Agarose Beadsはドライアイスを入れて出荷し、初回使用まで凍結保存できます。解凍した後は、ビーズの再凍結は避けてください。解凍後のProtein G Agarose Beadsは4℃で保存してください。

推奨事項

ChIP検証済み抗体

ChIP反応1回ごとに、最大体積30 μ lで4 μ gの抗体を使用することを推奨します。しかし、これは抗体の親和性とクロマチンの質によって異なります。使用する抗体によってはより多くの量が必要となるかもしれません。ChIP抗体は、DNAに結合しているか、他のタンパク質と複合体を形成している固定された非変性タンパク質を認識する必要があります。他のアプリケーションでよく機能する抗体が必ずしもChIPに使用できるとは限りません。したがって、ChIP検証済みではない抗体を用いてChIPを行う際は、クロマチン調製およびChIPの実験手技を検証するために、適切なコントロールを利用する必要があります（Active Motif の ChIP-IT[®] Control qPCR Kit、商品コード 53026、53027、53028など）。Active Motifで提供しているChIP検証済み抗体のリストは www.activemotif.com/chipabs をご覧ください。

クロマチン断片化のコツ

ChIP-IT High Sensitivity[®]キットで使用するクロマチンの調製には、直接的に超音波を照射するプローブソニケーター（例：Active Motif の EpiShear[™] プローブソニケーター）の利用をお勧めします。間接的な超音波処理システムでは、クロマチンを適切な長さに断片化するために、より長時間の超音波処理が必要となる場合があります。通常、ChIP実験では、200～1,200 bpの長さに断片化されたクロマチンが必要です。一般的に、断片化の効率は、断片化処理時の体積を小さくし、丸底チューブよりもV字型の底のチューブを使用した方が良好です（例：商品コード 53071）。また、クロマチンを含むサンプルが気泡で乳化すると断片化効率は低下します。サンプルの適切な断片化条件を決定するためには、ChIP bufferのみを入れた「練習用」チューブを準備してください。泡立ち始めるまで、超音波の振幅を徐々に増加させてください。わずかに振幅設定を弱め、この設定を泡立たせずに使用できる最高強度として記録してください。クロマチン調製物が乳化してしまった場合は、断片化を中断し、サンプルを微量遠心機で、最大速度で4℃にて4分間遠心分離し、含まれている空気を取り除いてください。最後に、クロマチンの加熱と変性を防ぐため、断片化中はサンプルをできるだけ氷上に置き、断片化は断続的に行ってください（20秒間超音波処理、30秒間氷上/水上に置く、再度20秒間超音波処理、など）。できるだけ、サンプル温度が高くならないようにしてください。

クロマチンの量

IP反応1回ごとに、10～30 μ gのクロマチン（150～450 万細胞）を使用することを推奨します。しかし、ChIP-IT High Sensitivity[®]キットでは高品質のDNAが得られるため、クロマチン量が限られている場合には、その量を減らすこともできます。存在量の多い標的分子についてはIPあたり細胞1,000個以上、存在量の少ない標的分子についてはIPあたり細胞50,000個以上（細胞 1.5×10^6 個でクロマチン10 μ gが得られると仮定）を推奨しています。濃縮後にChIP-Seqを行う場合は、プロトコルを開始する前にSection H (23ページ)の推奨事項をお読みください。

安全対策

ホルムアルデヒドとPMSFは非常に毒性の高い化学物質です。適切な安全対策（保護めがね、手袋、白衣の着用）を行ってください。また、ホルムアルデヒドは吸引毒性が非常に高いため、ドラフト内でのみ使用してください。クロマチンをバイオハザードまたは感染性サンプルから抽出する場合は、クロマチンの超音波処理を安全キャビネット内で行ってください。

プロトコール： 断片化クロマチンの調製

Section A : 培養細胞を使用した場合の細胞固定

本プロトコールでは、15 cmプレート1枚（細胞約 1.5×10^7 個）からの細胞固定とクロマチン調製について述べます。15 cm プレート1枚当たり増殖培地20 mlを使用することを推奨します。細胞数を変更したときのプロトコールのスケールアップ・ダウンについては9ページを参照してください。クロマチン調製に使用する細胞の最低数は100,000個です。

1. 試験する各細胞株を15 cmプレート上に用意します。細胞を70~80%コンフルエントまで培養します。必要に応じて、実験対象の経路を活性化するように細胞に刺激を加えます。
2. それぞれの15 cmプレート用に、Complete Cell Fixation Solutionを新しく調製します。以下に示すバッファの体積は、15 cmプレート1枚を処理するのに十分な量です。溶液量のスケールアップ・ダウンについては9ページのチャートを参照してください。
3. 細胞を固定するため、増殖培地の1/10量の、用事調製したComplete Cell Fixation Solutionを、細胞の既存の培地に加えます（例：20 mlの増殖培地には2 mlのComplete Cell Fixation Solutionを加えます）。室温で15分間、穏やかに振盪します。
4. 培地の1/20量のStop Solutionを細胞培地に加えて固定反応を停止させます（例：20 mlの増殖培地から始めた場合には1.1 mlのStop Solutionを加えます）。プレートをゆっくりと回して混合し、室温で5分インキュベートします。
5. インキュベーション後、プレートを斜めに傾けて、ラバーポリスマンで細胞を剥がしとり、プレートの底の端に細胞を集めます。ピペットを使って氷上で冷却した50 mlのコニカルチューブに細胞を移します。
6. ステップ5の細胞を 1,250×g、4℃で3分間遠心分離し、ペレットにします。
7. 上清を取り除いて廃棄します。ピペッティングによりペレットを10 mlの氷冷したPBS Wash Bufferに再懸濁します。残りの手順では、常時サンプルを氷冷してください。
8. 1,250×g、4℃で3分間遠心分離します。上清を取り除いて廃棄します。ピペッティングにより10 mlの氷冷したPBS Wash Bufferでペレットを再度洗浄します。1,250×g、4℃で3分間遠心分離します。上清を取り除いて廃棄します（細胞ペレットはこの段階で-80℃で保存できます）。
9. それぞれのペレットを、PIC 5 μlおよび100 mM PMSF 5 μlを添加したChromatin Prep Buffer 5 mlに再懸濁します。ピペッティングで混合します。
10. 氷上で10分間インキュベートします。
11. 再懸濁したペレットを、それぞれ、氷上で冷却したダウンス型ホモジェナイザーに移します。微調整用ベッスル（Type A）を用いて、サンプルを30ストローク、ホモジェナイズします。内容物を新しい15 mlのコニカルチューブに移し、1,250×g、4℃で3分間遠心分離します。

細胞溶解のモニタリング： 確実に細胞を溶解するため、ダウンス型ホモジェナイザーから細胞溶解物を10 μlを採取し、血球計数板を用いて位相差顕微鏡で観察し、核が放出されていることを確認します。細胞全体と比較すると核は見分けるのが容易なため、多くの場合、溶解操作の前後に細胞を観察することが有用です。無傷の細胞は、中央部に、密度が薄いハロー状に見える細胞質に囲まれた暗い部分（核）があります。溶解された細胞では、核が、非対称な破片に囲まれた粒子に見えます。細胞が溶解されていない場合、氷上でさらに10ストロークまたは細胞が溶解するまでホモジェナイズしてください。

12. 上清を取り除いて廃棄します。各ペレットを、PIC 5 μ lおよび100 mM PMSF 5 μ lを加えたChIP buffer500 μ lに再懸濁します。内容物を新しい2 mlの微量遠心チューブに移します。
13. 氷上で10分間インキュベートし、Section B：培養細胞のクロマチン超音波処理に進みます。

Section B：培養細胞のクロマチン超音波処理

本セクションでは、超音波処理を用いたクロマチンの断片化について説明します。超音波処理の結果は、細胞のタイプと使用する超音波処理装置によって異なります。本プロトコルは、Active MotifのEpiShear™ プローブソニケーターを利用して検証したものです。含有細胞数が100,000個未満のサンプルや体積が350 μ l未満のサンプルの超音波処理は推奨できません。

Chromatin Prep Bufferは、免疫沈降に最適化していますが、独自の組成のため、超音波処理条件の最適化が必要な場合があります。高いアッセイ感度を維持するため、当社のバッファー系を使用し、超音波処理システムの超音波処理時間や振幅を変えて望ましい断片化条件を設定することを推奨します（例：一部のシステムでは、クロマチンの断片化を改善するために、超音波処理時間を3倍増加させる必要があることもあります）。クロマチン免疫沈降反応前のアガロースゲル解析用のインプットクロマチンの処理に関するプロトコルには特に注意してください。いくつかの操作は通常のChIPプロトコルとは異なる場合があります。手順に従わないと、電気泳動後に15ページの図3に示すようなアーティファクトが生じる恐れがあります。

1. クロマチンを入れた2 mlの微量遠心チューブを、チューブクーラーまたは氷上に置きます。チューブの蓋を開け、マイクロチップをチューブの底から約5 mmの位置までマイクロチップを液に沈めます。使用する細胞タイプに最適な設定に従って超音波処理します（11ページの推奨事項を参照）。培養細胞について推奨される開始範囲は、振幅25%、30秒オンおよび30秒オフのパルス、総超音波処理「オン」時間10分（または所要時間20分）です。
2. 微量遠心機で、最大速度で4℃にて2分間チューブを遠心し、細胞断片をペレットにします。
3. 各クロマチン調製物（上記2.の上清）から25 μ lを250 μ lのPCRチューブに分取し、これを断片化効率の分析とクロマチン濃度定量を行います。このサンプルからインプットDNAを作製します。
4. 各クロマチン調製物の残りを1.5 ml微量遠心チューブに分注します。150 μ lずつ分注し、-80℃で保存することを推奨します。

注：クロマチン超音波処理物のサイズは、免疫沈降に進む前に確認しておいてください。

インプットの調製

5. 前述のステップ3で調製した断片化クロマチン25 μ lに、TE pH8.0 175 μ lとRNase A 1 μ lを加えます。PCRチューブの蓋をして、ボルテックスして混合します。
6. サーマサイクラー内で、37℃で30分インキュベートします。
7. 各チューブにProteinase K 2 μ lを加え、ボルテックスします。サーモサイクラー内でチューブを55℃で30分インキュベートし、その後温度を上げて80℃で2時間インキュベートします。
8. それぞれのクロマチンインプットを1.5 ml微量遠心チューブに移します。Precipitation Buffer 83 μ l、Carrier 2 μ l、100%エタノール 750 μ lを加えます。ボルテックスして混合し、-80℃で30分～一晩冷却します。
9. 微量遠心機でチューブを最大速度で4℃で15分遠心します。

10. ペレットを壊さないよう気をつけて上清を慎重に除去します。ペレットを70%エタノール 500 μ lで洗浄し、微量遠心機で、最大速度で4℃、5分間遠心します。
11. ペレットを乱さないよう気をつけて上清を慎重に除去します。ピペットチップを使って残りのエタノールを除去します。チューブの蓋を開けたまま放置し、10～15分自然乾燥させます。
12. ペレットが乾燥したら、各チューブにDNA Purification Elution Buffer 25 μ lを加えます。室温で10分インキュベートします。ボルテックスしてペレットを完全に再懸濁します。この溶液はインプットDNAを含んでいます。
13. NanoDropまたはその他の分光光度計で、260 nmの吸光度を測定し、各クロマチン調製物のDNA濃度を決定します。ステップ14に記載するとおり、500 ngのDNAを、解析のため分取しておきます。残りのインプットDNAは-20℃で保存します。
14. 以下の手順に従い、各クロマチン調製物をアガロースゲルで分析します。
 - a. 滅菌水 18 μ lに5 M NaCl 2 μ lを加えて500 mM NaClを作製し、ボルテックスして混合します。
 - b. インプットDNA 500 ngを250 μ lのPCRチューブに移し、500 mM NaCl 1 μ lを加えます。必要に応じて滅菌水で体積を10 μ lに合わせます。
 - c. サーマサイクラーで100℃で20分サンプルを加熱し、温度を50℃まで徐々に下げます。
 - d. サーマサイクラーからチューブを取り出し、室温で5分インキュベートします。
 - e. 各サンプルにゲルローディングバッファーを加え、1.5%アガロースゲルで泳動します。100 bpおよび1 kb DNAラダーも泳動して、クロマチンのサイズを解析します。DNAは、200～1,200 bpの間のいずれかの場所にスメアな状態で見えます。クロマチン調製が成功であれば、Section B ステップ4で-80℃で保存した分注物を用いて、Section EのChIP反応を行います。
15. クロマチン調製が精巧であれば、Section Bステップ4で、-80℃で保存した分注物を用いて、Section EのChIP反応を行います。

注：ChIP-IT High Sensitivity[®] プロトコールで調製したクロマチンは、アガロースゲル上では通常のChIP法で調製したクロマチンとは異なって見えます。しかし、これはアッセイ感度には影響を与えず、バックグラウンドシグナルを増加させることはありません。インプットDNAの調製に関しては前述のプロトコールに従ってください。別の脱架橋法を使用する、NaClを加えて100℃で20分間インキュベーションする過程を省く、などは推奨しません。DNAのサイズが大きく見えるアーティファクトを生じさせるためです。クロマチンが推奨される200～1,200 bpの範囲である場合は、ChIP反応に進んでください。断片がこの範囲内でない場合は、超音波処理条件をさらに最適化させる必要があります。

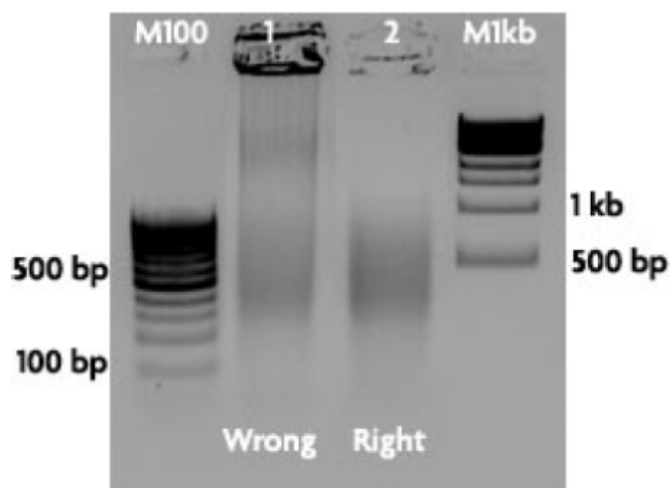


図 3：80℃で2時間の脱架橋後のクロマチン断片化効率の検証

MCF-7細胞のクロマチン調製物を固定し、Active MotifのEpiShear™プロソニケーターを用いて超音波処理しました。インプット DNAを、プロトコルの Section B、ステップ 5～13に従い、デュプリケートで調製しました。サンプル1では、ステップ14を行わず、NaCl を添加した 100℃でのインキュベーションを行わずに、500 ngのインプットDNAを直接1.5%アガロースゲルにロードしました。ステップ14を省略すると、ゲル上のDNAが大きく見えるアーティファクトが生じました。デュプリケートのサンプルであるサンプル2は、プロトコルの指示通り処理し、ステップ14 に示されているとおりNaCl を添加して100℃でインキュベーションを行いました。このインプット DNA 500 ngを1.5%アガロースゲルで分析すると、200～1,200 bpの予想通りの断片化が認められました。2つのサンプル間のゲルでのDNAの大きさの差は、クロマチン免疫沈降前のアガロースゲル分析用のインプットクロマチンの処理に関するプロトコルの推奨に従うことが重要であることを示しています。重要なステップを省略すると、クロマチン断片化効率の分析が不正確になることがあります。プロトコルのステップ通り行ってもDNA断片が推奨範囲外となった場合は、超音波処理条件をさらに最適化させてください。

Section C：新鮮組織または凍結組織を使用した場合の細胞固定

本プロトコルでは、100～400 mgの新鮮動物組織または凍結動物組織からの細胞固定およびクロマチン調製について記載します。多数の組織サンプルのクロマチン調製を行う場合は、それぞれのサンプルのステップ1～7を済ませてから次のサンプルを処理することを推奨します。

1. 組織を固定するため、10 mlのComplete Tissue Fixation Solution（9ページのバッファー調製参照）を、60 mm ペトリ皿に入れます。ペトリ皿を氷上に置きます。
2. 100～400 mgの新鮮または凍結組織サンプルをペトリ皿に入れ、サンプルを完全に沈めます。剃刀で組織サンプルを刻んで小片にします（約 1mm 角）。
3. サンプルとComplete Tissue Fixation Solutionを15 mlのコニカルチューブに移し、室温で15分ゆっくりと回転させながらインキュベートします。
4. コニカルチューブにStop Solution 515 μ lを加えて室温で5分ゆっくりと回転させながらインキュベートし、固定反応を停止させます。
5. コニカルチューブを氷上に置き、内容物を30,000 rpmに設定したハンドヘルド組織ホモジェナイザーで45秒ホモジェナイズします。
6. ステップ5の細胞を1,250 \times g、4℃で3分間遠心分離し、細胞をペレットにします。
7. 上清を取り除いて廃棄します。ピペティングによりペレットを10 mlの氷冷したPBS Wash Bufferに再懸濁します。以下のステップは、サンプルを氷冷しながら実施してください。

8. 1,250×g、4℃で3分間遠心分離します。上清を取り除いて廃棄します。ピペティングにより10 mlの氷冷したPBS Wash Bufferでペレットを再度洗浄します。1,250×g、4℃で3分間遠心分離します。上清を取り除いて廃棄します（細胞ペレットはこの段階で−80℃で保存できます）。
9. それぞれのペレットを、PIC 5 μlおよび100 mM PMSF 5 μlを添加したChromatin Prep Buffer 5 mlに再懸濁します。
10. 氷上で10分インキュベートします。
11. 再懸濁したペレットをそれぞれ、氷上で冷却したダウンス型ホモジェナイザーに移します。微調整用ペッスル（Type A）を用いて、サンプルを30ストロークホモジェナイズします。終了したら、内容物を新しい15 ml コニカルチューブに移します。

細胞溶解のモニタリング：確実に細胞を溶解させるため、ダウンス型ホモジェナイザーから細胞溶解物10 μlをとり、血球計数板を用いて位相差顕微鏡で観察し、核が放出されていることを確認します。細胞全体と比較して核を見分けるのが容易なため、多くの場合、溶解操作の前後に細胞を観察することが有用です。完全な細胞は、中央部に、密度が薄い細胞質のハローで囲まれた暗い部分（核）があります。溶解された細胞では、核が、非対称な破片に囲まれた点々に見えます。細胞が溶解されていない場合、氷上でさらに10ストロークまたは細胞が溶解するまでホモジェナイズしてください。

12. 1,250×g、4℃で3分間遠心分離します。
13. 上清を取り除いて廃棄します。ペレットを、PIC および 100 mM PMSF を添加した ChIP buffer 500 μl~1 mlに再懸濁します（500 μlの場合はPIC 5 μlおよびPMSF 5 μlを添加。1 mlの場合は PIC 10 μlおよびPMSF 10 μlを添加）。内容物を新しい2 mlの微量遠心チューブに移します。
14. 氷上で10分間インキュベートし、Section D：組織のクロマチン超音波処理に進みます。

Section D：組織のクロマチン超音波処理

本セクションでは、超音波処理を用いたクロマチンの断片化について述べます。動物組織ではタンパク質と細胞断片の濃度が高いため、このプロトコールに従って組織からクロマチンとインプットDNAの調製を行うことを推奨します。超音波処理の結果は、組織のタイプと使用する超音波処理装置によって異なる場合があります。本プロトコールは、Active MotifのEpiShear™ プローブソニケーターを用いて検証したものです。含む組織の量が50 mg未満のサンプルや体積350 μl未満のサンプルの超音波処理は推奨できません。

Chromatin Prep Bufferは、免疫沈降に最適化していますが、独自の組成のため、超音波処理条件の最適化が必要な場合があります。高いアッセイ感度を維持するため、当社のバッファー系を使用し、超音波処理システムの超音波処理時間や振幅を変えて望ましい断片化条件を決めるを推奨します（例：一部のシステムでは、クロマチン断片化を改善するために超音波処理時間を3倍増加させる必要があることもあります）。クロマチン免疫沈降反応前に行うアガロースゲル電気泳動用のインプットクロマチンの処理に関するプロトコールには特に注意してください。多くの操作が、通常のChIPプロトコールとは異なる場合があります。18ページの図4に示すようにゲル解析画像にアーティファクトが生じる場合があるため、プロトコールの手順に従って実験をしてください。

1. クロマチンを入れた2 mlの微量遠心チューブを、チューブクーラーまたは氷上に置きます。蓋を開け、マイクロチップがチューブの底から約5 mmのところになるまで、マイクロチップを液に沈めます。使用する組織タイプに最適な設定に従って超音波処理します（11ページの推奨事項を参照）。組織サンプルについて推奨される開始範囲は、振幅25%、30秒オンおよび30秒

オフのパルス、総超音波処理「オン」時間10分（または所要時間20分）です。

2. 微量遠心機で、最大速度で 4℃にて2分間チューブを遠心し、細胞断片をペレットにします。
3. 各クロマチン調製物のうち25 µlを250 µlのPCR チューブに移し、断片化効率の分析とクロマチン定量を行います。このサンプルをインプットDNAの作製に使用します。
4. 各クロマチン調製物の残りを1.5 ml 微量遠心チューブに分注します。150 µlずつ分注し、-80℃で保存することを推奨します。

注：クロマチン超音波処理物のサイズは、免疫沈降に進む前に確認しておいてください。

インプット DNA の調製

5. 前述のステップ3の25 µlのクロマチン調製物に、TE pH8.0 175 µlとRNase A 2 µlを加えます。PCRチューブの蓋をして、ボルテックスして混合します。
6. サーマサイクラー内で、37℃で1時間インキュベートします。
7. 各チューブにProteinase K 5 µlを加え、ボルテックスし、さらにサーモサイクラー内で、37℃で3時間インキュベートします。
8. 5 M NaCl 10 µlを加え、ボルテックスして65℃で6～16時間インキュベートして脱架橋します。
9. サーマサイクラーからチューブを取り出し、フェノール 250 µlとクロロホルム：イソアミルアルコール（24：1）125 µlを加えます。激しくボルテックスし、チューブを微量遠心機で、最大速度で室温にて2分遠心します。
10. 上部の水層を新しい 1.5 ml 微量遠心チューブに移し、クロロホルム：イソアミルアルコール（24：1）250 µlを加えます。激しくボルテックスし、チューブを微量遠心機で、最大速度で室温にて2分遠心します。
11. 上部の水層を新しい 1.5 ml 微量遠心チューブに移します。Precipitation Buffer 83 µl、Carrier 2µl、無水エタノール900 µlを加えます。ボルテックスして混合し、-80℃で30分～一晩冷却します。
12. 微量遠心機で、最大速度で 4℃で15分遠心します。
13. ペレットを壊さないよう気をつけて上清を慎重に除去します。ペレットを70%エタノール500 µlで洗浄し、微量遠心機で、最大速度で4℃、5分遠心します。
14. ペレットを壊さないよう気をつけて上清を慎重に除去します。ピペットチップを使って残りのエタノールを除去します。チューブの蓋を開けたまま放置し、10～15分自然乾燥させます。
15. ペレットが乾燥したら、各チューブにDNA Purification Elution Buffer 25 µlを加えます。室温で10分インキュベートします。ボルテックスしてペレットを完全に再懸濁します。この溶液はインプットDNAを含んでいます。
16. NanoDropまたはその他の分光光度計で、260 nmの吸光度を測定し、各クロマチン調製物のDNA濃度を決定します。ステップ17に記載するとおり、500 ngのDNAを、解析のため分取しておきます。残りのインプットDNAは-20℃で保存します。
17. 以下の手順に従い、各クロマチン調製物をアガロースゲルで分析します。
 - a. 滅菌水18 µlに5 M NaCl 2 µlを加えて500 mM NaClを作製し、ボルテックスして混合します。
 - b. インプットDNA500 ngを250 µlのPCRチューブに移し、500 mM NaCl 1 µlを加えます。必要に応じて滅菌水で最終体積を10 µlに合わせます。
 - c. サーマサイクラーを使い、100℃で20分サンプルを加熱し、温度を50℃まで徐々に下げます。
 - d. サーマサイクラーからチューブを取り出し、室温で5分インキュベートします。
 - e. 各サンプルにゲルローディングバッファーを加え、1.5%アガロースゲルで泳動します。100 bpおよび 1 kb DNA ラダーも泳動して、クロマチンのサイズを解析します。DNAは 200～1,200 bpの間のいずれかの場所にスミアな状態で見えます。

注：ChIP-IT[®] High Sensitivity プロトコルで調製したクロマチンは、アガロースゲルでは通常のChIP法で調製したクロマチンとは異なって見えます。しかし、これはアッセイ感度には影響を与えず、バックグラウンドシグナルを増加させることはありません。インプットDNAの調製に関しては前述のプロトコルに従ってください。別の脱架橋法を使用する、NaClを加えて100℃で20分間インキュベーションする過程を省く、などは推奨しません。DNAサイズが大き見えるアーティファクトを生じさせるためです。クロマチンが推奨される200～1,200 bpの範囲である場合は、ChIP反応に進んでください。断片がこの範囲内でない場合は、超音波処理条件をさらに最適化させる必要があります。

18. クロマチン調製が成功であれば、Section D ステップ4で -80℃で保存した分注物を用いて、Section EのChIP反応を行います。

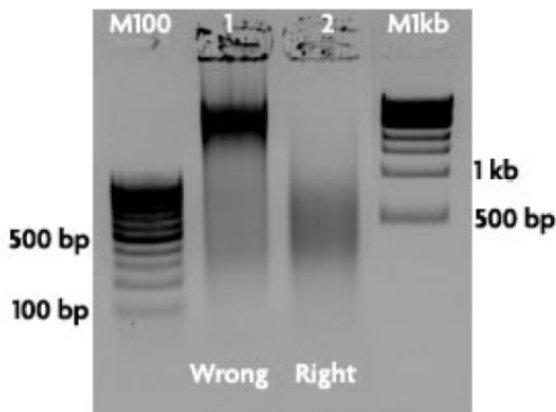


図 4：65℃で一晩の脱架橋後のクロマチン断片化効率の検証

クロマチン調製物を固定し、Active MotifのEpiShear[™]プローブソニケーターを用いて超音波処理しました。インプットDNAを、プロトコルのSection D、ステップ5～16に従い、Duplicateで調製しました。サンプル1では、ステップ17を行わず、NaClを添加した100℃でのインキュベーションを行わずに、500 ngのインプットDNAを直接1.5%アガロースゲルにロードしました。ステップ17を省略すると、ゲル上のDNAが大き見えるアーティファクトが生まれました。デュプリケートのサンプルであるサンプル2は、プロトコルの指示通り処理し、ステップ17に示されているとおりNaClを添加して100℃でインキュベーションを行いました。このインプットDNA 500 ngを1.5%アガロースゲルで分析すると、200～1,200 bpの予想通りの断片化が認められました。二つのサンプル間のゲルでのDNAの大きさの差は、クロマチン免疫沈降前のアガロースゲル分析用のインプットクロマチンの処理に関するプロトコルの推奨に従うことが重要であることを示しています。重要なステップを省略すると、クロマチン断片化効率の分析が不正確になることがあります。プロトコルのステップ通り行ってもDNA断片が推奨範囲外となった場合は、超音波処理条件をさらに最適化させてください。

プロトコール：クロマチン免疫沈降

Section E：免疫沈降

クロマチン免疫沈降の成功は、ChIP抗体の質と標的タンパク質の存在量に依存しています。存在量の多いタンパク質の場合は、免疫沈降反応をわずか1,000個の細胞から行えます。存在量が少ないタンパク質の場合は、50,000個の細胞を免疫沈降反応に使用できます（細胞 1.5×10^6 個は10 μg のクロマチンに相当します）。

1. 超音波処理したクロマチンを氷上で解凍します。微量遠心機で、最大速度で4℃、2分、クロマチンを遠心します。
2. 1.5 ml微量遠心チューブに以下の表1に示す順序で試薬を加え、ChIP反応系を準備します。使用する体積は、超音波処理したクロマチンサンプルで決定したDNA濃度を元にして決定してください。ChIP反応1回につきクロマチン10～30 μg （150～450 万細胞）を使用することを推奨します。しかし、クロマチン量が限られている場合はより少量を使用することもできます。
3. 1.5 ml 微量遠心チューブ内に、ChIP反応に使用する抗体を準備します。抗体ごとに別のチューブを使用してください。チューブに、Blocker 5 μl とChIP抗体4 μg を加えます（抗体量は反応1回当たり30 μl を超えないようにしてください）。抗体/Blocker 混合物を室温で1分インキュベートしてから、ChIP反応に加えます。

表 1

試薬（上から順に加える）	1 ChIP反応
断片化クロマチン（10 - 30 μg ）	X μl
ChIP Buffer	200 μl になるように調整
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	5 μl
Antibody/Blocker混合物（step3で作成）	35 μl 以下
許容される最大体積	240 μl

4. チューブに蓋をして、ローテーター（end-to-end rotator）で、一晚4℃でインキュベートします。
5. Protein G Agarose Beadsは使用前に洗浄する必要があります。IP反応1回あたりProtein G Agarose Beads 30 μl を1.5 mlの微量遠心チューブに移します。等量のTE pH8.0を加え、転倒混合します。微量遠心機で1,250 $\times g$ で1分遠心します。Protein G Agarose Beadsに加えたTEと等量の上清を取り除きます。

注：Protein G Agarose Beadsをピペットで吸う前に、チューブを転倒させて完全に再懸濁してください。ビーズをピペットで吸う際は、詰まらないように、ピペットチップの先端を2 mm切り落としてください。

6. 同量のTE pH8.0で再度ビーズを洗浄します。転倒混合し、微量遠心機で1,250 $\times g$ 、1分遠心します。ビーズに加えたTEと同量の上清を取り除きます。これでビーズが使える状態になります。
7. ChIP反応物を1,250 $\times g$ で1分遠心し、蓋内部の液体を集めます。
8. 先端を切り落としたピペットチップを用いて、洗浄済みProtein G Agarose Beads 30 μl を各免疫沈降反応物に加えます。チューブに蓋をしてローテーター（end-to-end rotator）で4℃にて3時間インキュベートします。
9. ChIP反応毎にChIP Filtration Columnsを用意して、識別できるようにラベルします。カラムの底のタブを取り除き、空の1 ml ピペットチップの箱をホルダーにして置きます（図5参照）。

10. ChIP反応物を回転培養機から取り出し、 $1,250\times g$ で1分遠心して、蓋内部の液体を集めます。
11. 各ChIP反応物にChIP buffer 600 μ lを加えて、反応物全体（Protein G Agarose Beadsを含む）を、ラベルしたカラムに移します。重力でフロースルーを排出させます。
12. 重力でフロースルーさせている間、ChIP反応ごとにElution Buffer AM4 100 μ lを1.5 mlの微量遠心チューブに入れ、洗浄段階の間、 37°C で予熱します。
13. 各カラムをWash Buffer AM1 900 μ lで洗浄し、3分間放置します。
14. ステップ13をさらに 4回繰り返し、全部で5回洗浄を行います。
15. カラムを新しい1.5 ml微量遠心チューブに移し、室温で、微量遠心機で $1,250\times g$ 、3分遠心し、残っているWash Bufferを除去します。
遠心後、ChIP Filtration Columnsを新しい1.5 ml 微量遠心チューブに移します。 37°C のElution Buffer AM4 50 μ lを各カラムに加えます。室温で5分インキュベートします。微量遠心機で $1,250\times g$ 、室温にて3分遠心します。
16. 微量遠心チューブに入ったままのカラムに、 37°C の Elution Buffer AM4をさらに 50 μ l加えます。室温で5分インキュベートし、微量遠心機で $1,250\times g$ 、室温にて3分遠心します。
17. ChIP Filtration Columnsを廃棄します。フロースルー（体積約 100 μ l）にChIP DNAが含まれています。Section F DNA精製に進みます。

図 5 : ChIP Filtration Columnsの使用



ChIP Filtration Columnsの底からタブを外し、カラムを空の1 mlピペットチップの箱に置き、洗浄を行います。

プロトコール： ChIP済みDNAの精製

Section F：脱架橋とDNA精製

1. 抽出したChIP DNAをそれぞれ250 μ lのPCRチューブに移し、Proteinase K 2 μ lを加えます。ボルテックスして混合し、サーモサイクラーで、55℃で30分加熱した後、温度を上昇させ、80℃で2時間加熱します。
2. DNAを1.5 mlの微量遠心チューブに移し、5倍量（500 μ l）のDNA Purification Binding Bufferを各チューブに加え、ボルテックスして混合します。3 M Sodium Acetate(酢酸ナトリウム) 5 μ lでpHを調整します。正しいpHだと、サンプルの色は鮮やかな黄色になります。サンプルが鮮やかな黄色でない場合は、サンプルを精製カラムにロードする前にpHを調整してください。pHの調整方法の詳細については、27ページのトラブルシューティングガイドを参照してください。
3. サンプルごとに、回収チューブにDNA Purification Columns（ラベル表示 AM #103928）を入れ、pH調整済みサンプルをそれぞれのカラムに加えます。カラムの蓋を閉め、回収チューブと共に微量遠心機に入れ、14,000 rpmで1分遠心します。
4. 回収チューブからカラムを取り出し、回収チューブのフロースルーを取り出して廃棄します。カラムを回収チューブに戻します。
5. 初回使用前は、DNA Purification Wash Buffer（ラベル表示 AM #103497）を調製します。10ページの指示に従い、溶液の使用前にエタノールを添加します。DNA Purification Wash Buffer 750 μ lを各カラムに加え、カラムの蓋をします。
6. 微量遠心機で 14,000 rpm、1分遠心します。
7. カラムを回収チューブから取り出し、回収チューブのフロースルーを取り出して廃棄します。カラムを回収チューブに戻します。
8. カラムの蓋を開けたまま、微量遠心機で 14,000 rpm、2 分遠心し、残っている洗浄バッファーをカラムから取り除きます。
9. カラムをきれいな微量遠心チューブに移します。ChIP濃縮DNAの下流での解析に使用する方法に基づいた適切な溶出液量を使用します。ChIP-SeqまたはChIP-chipアプリケーションでは、使用前に必要なバッファー量を 37℃で5分予熱しておくことを推奨します。
- a. qPCR解析用：DNA Purification Elution Buffer（ラベル表示 AM #103498）100 μ lをカラムマトリックスの中央に加え、室温で1分インキュベートします。微量遠心機14,000 rpm、1分で遠心します。DNA Purification Elution Bufferをさらに100 μ lカラムに加えて、室温で1分インキュベートします。微量遠心機で14,000 rpm、1分遠心します。総溶出液量は 200 μ lです。
- b. ChIP-SeqまたはChIP-chip解析用：37℃のDNA Purification Elution Buffer（ラベル表示 AM #103498）36 μ lをカラムマトリックスの中央に加え、室温で1分インキュベートします。微量遠心機 14,000 rpm、1分で遠心します。
10. カラムを廃棄します。精製済みDNAは、-20℃で保存して今後使用できます。

プロトコール： ChIP済みDNAの分析

Section G：定量的PCR (qPCR)

ChIP DNAは、定量的PCR (qPCR) を用いて遺伝子特異的な解析ができます。すべての解析において、ポジティブコントロールおよびネガティブコントロールPCRプライマーを使用して、濃縮率を決定してください。ネガティブコントロールプライマーとは、対象分子用の抗体が結合しないゲノム領域を増幅するプライマーです。Active MotifはqPCRデータの解析にChIP-IT[®] qPCR Analysis Kit(カタログ番号53029) を使用することを推奨します。ChIP-IT[®] qPCR Analysis Kitには、解析結果を算出するためのポジティブコントロールおよびネガティブコントロールプライマーセット、検量線用 DNA、検量線用プライマー、qPCR解析スプレッドシートが含まれています。Active Motif の解析手法によりプライマー効率を決定できます。このキットで算出される ChIPサンプル値は、インプット、プライマー効率、ChIP反応に用いたクロマチン量、再懸濁溶液の体積に基づいて正規化されます。ChIP-IT[®] qPCR Analysis Kitを使用すると、一貫したデータ解析手法によって、サンプルおよび実験間での直接的な比較が可能となります。ChIP-IT[®] qPCR Analysis Kitを使用しない場合には、qPCR データ正規化とグラフ化は、Section I に記載した方法で実施します。

1. 以下は、qPCR反応例です。それぞれのqPCR機器の指示に従ってください。市販のSYBR Green qPCRマスターミックス (例：Bio-Rad Cat # 1708880) を使用し、反応をトリプリケートで準備することを推奨します。

試薬	20 μ l PCR反応
2X SYBR Green master mix	10 μ l
Primer mix (各プライマー2.5 μ M)*	4 μ l
Sterile water	1 μ l
DNA sample (ChIP済みまたはInput DNA)	5 μ l
総量	20 μ l

* すべてのqPCR反応を同一の条件で行うため、アニーリング温度58°Cのプライマーをデザインすることを推奨します。アンプロン長は75~150 bpを推奨します。Active Motifは、これらの推奨事項に基づいて設計し、なおかつqPCR実験で検証済みの種特異的qPCR プライマーを提供しています (www.activemotif.com/chipprimers) 。

2. リアルタイムPCR装置にチューブを入れ、以下の通り反応サイクルを入力します。
3. 95°C 2分 → (95°C 15秒、58°C 20秒、72°C 20秒) を 40 サイクル
4. ChIP-IT[®] qPCR Analysis Kitを使用する場合、データ処理に関しては製品のプロトコールを参照してください。あるいは、Section I の推奨に従ってください。

注：核酸を増幅するためのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) プロセスは、Hoffmann-La Rocheの米国特許番号 4,683,195 および 4,683,202 がカバーしています。他の国では特許出願中です。

Section H : ChIP-Seq

ChIP-IT High Sensitivity[®]キットは、ChIP-Seqに基づく全ゲノム解析によって有効性が検証されています。このプロセスには、DNA断片末端へのアダプター配列の付加によるChIP DNAからのライブラリー調製が含まれます。このライブラリーは、配列決定前に、PCRで増幅して検証します。

配列決定用ChIP DNAライブラリー調製には、Illumina[®] ChIP-Seq DNA Sample Prep Kit（商品コード IP-102-1001）などの市販のキットを使用します。使用するシーケンサーに適した適切なライブラリー調製法を選択してください。

A. 一般的な推奨事項

- ChIP反応にはクロマチンを30 µg使用することを推奨していますが、クロマチン量が限られている場合や、非常に含有量の多いヒストンタンパク質の濃縮を行う場合は、その量を減らすこともできます。
- ライブラリー作製には、通常、10 ngのChIP濃縮DNAが必要です。しかし、存在量の少ない転写因子について研究している場合、ChIP-IT High Sensitivity[®] キットを使用すれば、少量でもChIP-Seq解析に適した高品質なChIP濃縮DNAが得られます（詳細は以下のB. ChIP-Seqのサンプル条件をご覧ください）。
- ChIP-Seq 解析用のライブラリーの収量は、1～2 µgの範囲です。
- 一般的な転写因子およびヒストン修飾を解析する場合、3,000万配列リードで十分です。
- ユニークなマッピングおよび良好な ChIP-Seq データには 36 bpのシングルエンドリードで十分ですが、長いリードも使用できます。
- 偽の「ピーク」を認識し、重複したゲノム領域を明らかにするために、コントロール反応としてインプットDNAをサンプルとしてシーケンス解析を行ってください。実験サンプルのピークからインプットDNAのピークの差分をとることで、偽データを排除できます。ライブラリー作製には50 ngのインプットDNA（培養細胞サンプルについてはSection B ステップ 12から、組織サンプルについては Section D ステップ 15から）を使用してください。

B. ChIP-Seqのサンプル条件

ChIP DNAのライブラリー作製には、通常、10 ngのChIP濃縮DNAを用いることが一般的に推奨されています。存在量の多いヒストン修飾に対する良好な抗体を使用すると、10 ngのChIP DNAの取得は達成できます。しかし、配列特異性のある DNA 結合転写因子が対象分子の場合には、10 ngという量は非現実的な量です。得られるDNAが高品質なため、Active Motif では ChIP-IT High Sensitivity[®] キットを用いて、ナノグラム未満の少量の ChIP DNA からでも高品質のライブラリーを日常的に作製しています。良好な ChIP-Seqデータのためには、回収されたDNAの総量以上に、DNAが低バックグラウンドで高品質に濃縮されているかという点が重要です。したがって、DNAを定量するよりも、既知の結合部位に関してqPCRを行い、ChIP-IT[®] qPCR Analysis Kit（商品コード 53029）を用いて、ネガティブコントロールプライマーセットに対する濃縮レベルを確認することで、ChIP DNAの品質を確認することを推奨します。

C. ChIP-Seq前のqPCR

濃縮されたChIP DNAの質を確認する目的でqPCRを行う場合、以下のようにプロトコルを変更したうえで、22ページのSection GのqPCRの指示に従ってください。ChIP DNAは溶出体積を減らしているため、qPCRで使用する前に希釈する必要があります。ChIP DNA 6 µlを、DNA Purification Elution Buffer（ラベル表示 AM #103498）94 µlで希釈してください。qPCR反応1回あたり、希釈したChIP DNAを 5 µl使用してください。

ChIP-Seqでの使用に適した高品質のDNAは、ネガティブコントロールプライマーセットと比較して既知の結合部位における濃縮率が5倍になっています（以下の図6参照）。qPCR濃縮が十分な場合は、残りの30 μ lのChIP DNAを使用してライブラリーを作製できます。

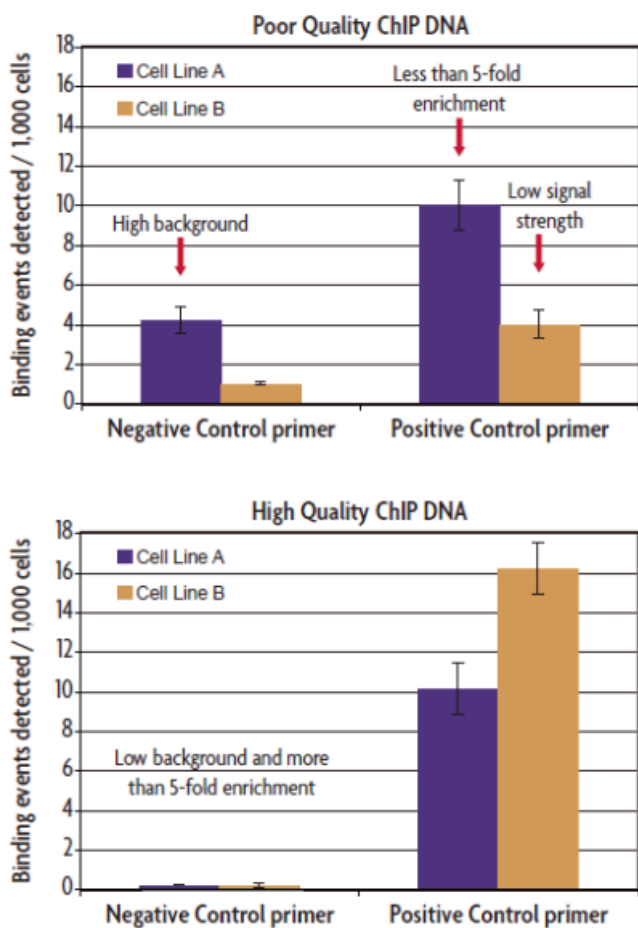


図 6：ネガティブコントロールプライマーと比較して良好な濃縮および不良な濃縮を示す qPCR結果の比較

データは、ヒトネガティブコントロールプライマーを基準とし、遺伝子特異的ポジティブコントロールプライマーを用いてChIP-IT qPCR Analysis Kitを用いて分析したqPCRの結果です。上の図では、細胞株Aのネガティブコントロールプライマーセットは、細胞1,000個あたりの結合イベントの検出値が2を超えており、バックグラウンドが高いと判定されます。一方、細胞株Bは、細胞1,000個あたりの結合イベントのポジティブコントロールシグナルレベルが5未満です。下の図では、細胞1,000個あたりの検出された結合イベントの値が2未満で、ネガティブコントロールプライマーセットのバックグラウンドレベルが低いことがわかります。ポジティブコントロールプライマーセットの濃縮率は5倍を超えています。ChIP-Seqに推奨できるのは下のサンプルのChIP DNAのみです。

D. ライブラリー作製

ChIP-IT High Sensitivity[®]キットで作製したChIP DNAは、Illumina[®] platformを用いてChIP-Seqについて十分に検証をしています。ChIP DNAは、標準的なIllumina[®]ライブラリー調製プロトコルを用いて、シングルエンドまたはペアドエンドライブラリーの作製に使用できます。その他の市販のライブラリー調製キットも使用できます。使用するシーケンスプラットフォームに適合するライブラリー調製キットを選択してください。

Appendix 補足説明

Section I : qPCRプライマーデザインおよびデータ解析

A. プライマーのデザイン

- in silico PCRプログラム (Primer3 [<https://primer3.org/>] またはUCSC Genome Browser [<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>]) を用いて、プライマーセットの候補を設計して評価してください。
- プライマー二量体はSYBR Greenに結合するため、二量体化しうるプライマー設計は避けてください。正確な定量が妨げられます。
- 理想的なアンプリコンの長さは75~150 bpです。
- ChIP-IT[®] qPCR Analysis Kitで使用するためには、プライマーは、58℃で最適にアニールするようデザインしてください。推奨する長さは18~22 bpです。
- Active Motifは、ChIP-IT[®] qPCR Analysis Kitで検証済みのChIP Control qPCRプライマーセットを提供しています。入手可能な種特異的プライマーのリストは、<http://www.activemotif.com/chipprimers>をご覧ください。

B. データ解析

Active MotifのChIP-IT[®] qPCR Analysis Kitを使ってデータ解析を行う以外のシンプルな二つの解析法を以下に示します。ここに示した方法は、両方とも実験で使用する各プライマーセットに対して、既知量のDNAを含む検量線の作成が必要です。

方法1 : ネガティブコントロールプライマーに対するポジティブプライマーの濃縮率

1. プライマーセットを用いてDNA量が既知のインプットDNA (培養細胞サンプルはSection B ステップ12、組織サンプルはSection D ステップ15) を使ってqPCRをトリプリケートで行い、検量線を作成します。10倍希釈の3~5サンプル (例 : 0.005 ng, 0.05 ng, 0.5 ng, 5 ng, 50 ng) を反応させます。
2. ChIPおよびIgGサンプルとインプットDNAスタンダード希釈系列を、ポジティブコントロールプライマー (結合部位がわかっている) およびネガティブコントロールプライマー (実験対象とするタンパク質が結合しないゲノム領域) の両方を用いて反応させます。
3. qPCR機器が検量線に基づいて、各qPCR反応の値 (ng) を決定します。トリプリケートの平均値を自動で算出しない機種を使用する場合は、平均値を計算する必要があります。
4. ポジティブコントロールプライマーセットの平均値を、ネガティブコントロールプライマーセットの平均値で除して、濃縮率の値を算出します。

方法2 : インプットの割合としてデータを表現

1. プライマーセットを用いてDNA量がわかっているインプットDNA (培養細胞サンプルはSection B ステップ12、組織サンプルはSection D ステップ15) のqPCRをトリプリケートで行い、検量線を作成します。10倍希釈の3~5サンプル (例 : 0.005 ng, 0.05 ng, 0.5 ng, 5 ng, 50 ng) を反応させます。
2. ChIPおよびIgGサンプルとインプットDNAのスタンダード希釈系列を、ポジティブコントロールプライマー (結合部位がわかっている) およびネガティブコントロールプライマー (実験対象とするタンパク質が結合しないゲノム領域) の両方を用いて反応させます。
3. qPCR機器が検量線に基づいて、各qPCR反応の値 (ng) を決定します。トリプリケートの平均値を自動で算出されない機種を使用する場合は、平均値を算出する必要があります。

4. qPCR反応ごとに、ChIP DNAのうち一定の量をqPCRに供与しているはずですが、全反応での量を算出するため、全ChIP反応での溶出体積を、qPCR反応に使用した体積で除します（例：ChIP DNAを200 μ lで溶出し、5 μ lをqPCR反応に使用した場合は、式は $200/5 = 40$ ）。次に、平均qPCR量にこの数を掛けます（例：qPCR量 ng x 40）。
5. データをインプットに対する割合に換算するため、前述のステップ4で補正した値を、ChIP反応に使用したDNA量で除して、100%を掛けます（例：ChIP反応に20 μ gを使用した場合は、20,000 ngクロマチンに相当します。計算は20,000 ngで除して100を掛けたステップ4の調整した値になります）。典型的な回収インプット割合(%Input)は0.05%~1%です。

Section J. トラブルシューティング

問題／疑問	推奨
プロトコルのどの時点で中断することができるか？	以下の時点で、プロトコルを中断できます。表示した温度でサンプルを保存してください。 <ul style="list-style-type: none"> ホルムアルデヒド固定および遠心分離後（完全な細胞のペレット）、-80℃ クロマチン断片化後、-80℃ DNA洗浄後、-20℃
超音波処理による断片化と遠心分離の後、クロマチン中に粘性のあるまたは濁った層が見える	遠心分離後、細胞種によっては、脂質やグリコーゲンの層が見えることがあります。例えば、脂肪組織では脂質層が見えることがあります。このような層は避けて、上清を回収してください。しかし、上清全体が濁っている場合は、IP反応に干渉することはありません。
断片化済みクロマチンの収量が少ない	使用した細胞数が不十分です。細胞数を増やして再度クロマチン調製を行ってください。
	核が放出されていません。超音波で断片化する場合においても、ダウンス型ホモジェナイザーで事前にホモジェナイズすることを強く推奨します。微調整用ベッスルとダウンス型ホモジェナイザー（Active Motif 商品コード40401および40415）を使用してください。顕微鏡下で細胞溶解の様子を観察してください。一般的に、溶解した細胞数が増えると、断片化済みクロマチン量が増えます。
	超音波処理サンプルが乳化しています。ソニケーターの出力を調整して、乳化しないようにしてください。クロマチン調製物が乳化してしまった場合は、超音波処理を中断し、微量遠心機でサンプルを8,000rpm、4℃で4分間遠心分離し、含まれている空気を取り除いてください。
	Complete Cell Fixation SolutionとComplete Tissue Fixation Solutionを調製するときは新鮮なホルムアルデヒドを使用してください。
	バッファーがサンプルサイズに比例してスケールアップされていません。使用する細胞数とバッファー量のチャートを参照して、クロマチン調製時の反応スケールを適切に調節してください。
断片化クロマチンの収量が悪い	核が放出されていない可能性があります。酵素による断片化時には、ダウンス型ホモジェナイザーの使用は決定的に重要です（超音波による断片化の場合にも強く推奨されます）。隙間の狭いダウンス型ホモジェナイザーを使用してください。プロトコルに記載したように、破碎後は細胞の溶解を顕微鏡を用いて確認してください。一般的に、細胞が溶解すればするほど、断片化クロマチンの収量は多くなります。
	固定時間を短縮してください。固定しすぎた細胞は細胞破碎や断片化が難しくなることがあります。過剰な固定処理によって、架橋による巨大な凝集物を形成されるおそれがあります。これを効率的な断片化に悪影響を及ぼします。ホルムアルデヒド固定ステップにおけるインキュベーション時間を5分に短縮してください。
	Fixation Solution調製時に新鮮なホルムアルデヒドを使用してください。
	バッファー量が、サンプルサイズに比例して適切にスケールアップ/ダウンされていません。Appendix-Section Dの表に従って、クロマチン断片化時の反応スケールを調節してください。
電気泳動をしてゲルを見ても断片化効率がわからない	ウェル内に物質が固着しており、レーンの上から下までスミアまたはストリークが見られます。断片化されたクロマチンを、脱架橋し、タンパク質を除去し（Proteinase K、RNAを除去（RNase）してから、DNA精製を行う必要があります。
	分子量が大きすぎます。サンプルを再度超音波処理して、断片を小さくしてください。別の脱架橋法を使用した場合、または分析のためにアガロースゲルで泳動する前にNaClを加えて100℃で20分間インキュベーションしていない場合は、インブットクロマチン調製を再度行い、マニュアルの指示に従ってください。
大容量のクロマチンを使ってChIPを実施したい	これは推奨できません。大量のサンプルを1回のChIP反応で処理するよりも、少量のChIP反応を複数回（それぞれ240μl）行って、最終的にサンプルを集めることを推奨します。キャプチャー効率が低くなるため、スケールアップした反応を1回で行わないでください。

問題/疑問	推奨
3M酢酸ナトリウム添加後、ChIP DNAが鮮やかな黄色にならない	明るいオレンジ色や紫の場合は、pHが高すぎます。鮮やかな黄色になるまで、3M酢酸ナトリウムを5 μlずつ追加し、添加後は混合してください。このステップはDNA結合および精製の成功に重要です。フルカラー画像は、Active Motifのウェブサイト (www.activemotif.com) で入手できます。または、Active MotifのクロマチンIP DNA精製キット (商品コード58002) のマニュアルをご覧ください。
バックグラウンドが高い	クロマチンの断片化が不十分です。DNAの断片化において、染色体上で近傍にある DNA配列に由来するバックグラウンドを排除できるほどには断片化する必要がありますが、PCRで増幅する領域が切断されるほど断片化する必要はありません。200～1,200 bpの断片を推奨します。DNA断片が大きすぎる場合、バックグラウンドが増加するので、超音波処理のパルス数を増やすことを検討してください。断片化効率を評価するため、ゲル上で断片サイズを確認してください
	抗体の問題です。ChIP反応系内のクロマチン量に対して抗体が多すぎます。抗体量が過剰だと非特異的結合が多くなり、高いバックグラウンドが検出されます。
標的分子に対する抗体でほとんどまたは全く濃縮されない	クロマチンが少なすぎます。一般的に、ChIP反応1回あたり10～30 μgのクロマチンを使用することを推奨します。ヒストンなどの非常に存在量の多いDNA結合性の標的分子においては、最低でも細胞1,000個または6.7 ng以上のクロマチン量でもChIPが可能です。非常に存在量の少ない転写因子の場合は、50,000細胞または333 ng以上のクロマチンを使用してください。クロマチン量は、ChIP反応1回あたり50 μgを超えないようにしてください。ChIP用の断片化済みクロマチンサンプルの濃度は必ず定量し、確実に、サンプルごとに適切なクロマチンを使用し、各ChIP反応において等質量のクロマチンを使用するようにしてください。
	抗体がChIPで使用できるかが十分検証されていません。抗体が固定されたタンパク質を十分に認識できていません。固定によってエピトープが破壊された、または、大型の複合体形成によってエピトープが他のタンパク質に覆い隠されたためです。抗体のChIP検証を行うためには、ヒストンH3K4me3 (商品コード39915) などのポジティブコントロール抗体および同種のネガティブIgG、および使用するタイプのPCRで機能することが既知のプライマーを使用することが非常に有用です。Active Motifは、抗体検証用の動物種特異的なChIP-IT Control qPCRキット (商品コード 53026、53027、53028) を提供しています。
	抗体の親和性が低いです。別の抗体を使用してください。
	プロテインGに対する抗体の親和性が弱いです。モノクローナル抗体ごとに、プロテインGへの結合親和性が異なり、その結合親和性はpH依存にします。最適 pHは各Igで異なる場合があります。親和性が低～中の抗体では、当社のBridging Antibody (商品コード53017) を使用することでプロテインGによる捕捉効率が劇的に改善する可能性があります。この抗体はすべてのサブクラスのマウス免疫グロブリンを認識するウサギ抗マウスpAbです。使用するIgGのプロテインAまたはGへの親和性が弱い/中等度である場合は、Bridging Antibodyにより、バックグラウンドを増加させることなく、ビーズがより効率的に抗体を補足するようになる可能性があります。
	PCRに問題があります。抗体の標的分子が確実に結合しているDNA配列を増幅するように、ポジティブコントロールプライマーセットが設計されていることを確認してください。または、別の結合配列を見つけてください。
ChIPしたサンプルのPCR産物が確認できない (しかしインプットDNAでは正しいPCR産物がある)	ChIP反応に使用するクロマチンの量または抗体量あるいはその両方を増やしてください。
	別の抗体を使ってください。
リアルタイムPCRでPCR産物がない	プライマーの種特異性と増幅効率を確認してください。プライマーを再度設計しなおす必要があるかもしれません。エンドポイントPCRで機能するプライマーが常にqPCRで機能するとは限りません。
	DNA Purification Wash Buffer にエタノールが入っていません。初回使用前にDNA Purification Wash Bufferにエタノールを入れたことを確認してください。