
楽ちっぷキット

マウスモノクローナル抗体用

(Ver 1.3)

MAB Institute, Inc.

楽ちっぷ キット

(マウスモノクローナル抗体専用)

クロマチン免疫沈降（ChIP）は、細胞内のクロマチン関連タンパク質がゲノム上に結合している状態を解析する方法です。従来熟練者が2～3日かかっていたこの実験を、磁気ビーズを使った免疫沈降自動化装置（Auto ChIP System）とその試薬キットを用いれば誰にでも簡単に行う事が出来ます。操作が終了したサンプルはその後30分程度の Proteinase K 処理、脱クロスリンク処理の後に直接 qPCR で解析することが出来、1日のうちに一連の操作を完了する事も出来ます。

MABI マウスモノクローナル抗体に最適化した、楽ちっぷキットを用いれば、クロマチン免疫沈降法用に開発された種々の MABI モノクローナル抗体の性能を最大限に引き出す事ができます。このキットでは anti-mouse IgG beads を採用しており、Protein A や Protein G beads の様なマウス IgG サブタイプによるアフィニティーの違いがなく、安定した実験結果を得る事ができます。

本キットは Auto ChIP system での操作に必要なすべての試薬が24反応分含まれています。ただし、クロマチンサンプル調整用の試薬は8回分です。

冷凍輸送の Package 1 と冷蔵輸送の Package 2 の2種類があります。Anti-mouse IgG beads は凍結しないで下さい。

バッファーは冷凍で出荷されますが室温保存も可能です。ただし防腐剤は入っていません。

Package 1 (-20℃出荷)

1. Quenching Solution	20 ml
2. Cell Wash Buffer	40 ml
3. Cytoplasmic Lysis Buffer	8 ml
4. Chromatin Lysis Buffer	5 ml
5. Chromatin Dilution Buffer	20 ml
6. IP buffer	15 ml
7. Wash Buffer 1	5 ml
8. Wash Buffer 2	5 ml
9. Wash Buffer 3	5 ml
10. DNA elution Buffer	3 ml
11. Proteinase Inhibitor Cocktail	130 µl
12. Beta Globin promoter primer (10uM)	10 µl
13. GAPDH promoter primer (10uM)	10 µl
14. シリコナイズド8連チューブ	6 本

Package 2 (4℃出荷)

15. Proteinase K	50 µl
16. Anti mouse IgG Magnetic Beads	0.5 ml
17. Normal mouse IgG	10 µl
18. Anti-dimethyl Histone H3(K4)antibody	10 µl
19. Anti-dimethyl Histone H3(K9)antibod	10 µl

1~10 までの試薬は常温保存が可能です、防腐剤は入っていません。

3. キット以外に必要な主なもの

- ホルムアルデヒド (4% パラホルムアルデヒド水溶液が使い勝手が良い)
- セルスクレーパー
- 微量冷却高速遠心機
- 超音波破碎機 (Bioruptor が便利)
- 0.2 ml PCR チューブ用サーマルサイクラー
- 8 連 PCR チューブ用遠心機 (スイングタイプが望ましい。200ul の反応時はアングルタイプではフタに溶液が付いたままになります)
- 8 連 PCR チューブ用マグネットスタンド
- RNaseA (DNA 精製が必要な時)

4. 操作

クロマチンサンプル調整

1. 細胞培養液 10ml (100mm dish で $\sim 5 \times 10^6$ Cell 以下が目安) に対し 4%パラフォルムアルデヒド溶液 3.3 ml (最終濃度が 1%になる) を加え、室温で 5 分間静置する。
2. 2ml の Quenching Solution を加え、室温で 5 分間静置する。
3. 溶液を十分に除去し、Cell Washing Solution 5ml を加えてすすぐ。ただしはがれやすい細胞の場合は PBS を用いて洗浄し、1 ml の Cell Washing Solution を用いて細胞を回収し、遠心して上清を除去する。
4. 溶液を除去し Protease Inhibitor を 1/100 量加えた Cytoplasmic Lysis Buffer 1ml 加え、細胞を集めて 1.5 ml チューブに集める。
5. 良くピペッティング (径の細いロングタイプのチップを使うとこぼれにくい) して細胞を分散させた後 4°C、5000rpm で 1 分遠心する。
6. 上清を捨て、沈殿に Protease Inhibitor を 1/100 量加えた Chromatin Lysis Buffer 200 μ l を加えて 10 回程度ピペッティングする。細胞数が多い時 (5×10^6 以上) はこの量を増やして下さい。
7. 超音波破碎機でクロマチンを分断する。Bioruptor を使用する場合は専用チューブに移し替えた方が効率が良い。以下 Bioruptor の条件。
8. 4°Cに冷却して、30" ON, 30" Off で 8 サイクル行った後、器壁の溶液を落とすために非常に軽くスピンドウン。
9. これを 2 回 (計 16 サイクル)、あるいは 3 回 (計 24 サイクル) 繰り返す。電気泳動でサイズを確認する事をお勧めします。抗ヒストン抗体では 300bp~500bp 程度が良く、長いと非特異的なシグナルの割合が増え、短すぎると特異的なシグナルも弱くなります。
10. 15,000 rpm、4°Cで 10 分間遠心。
11. 上清を回収し、800 μ l (Lysis buffer の 4 倍量) の ChIP dilution buffer を加え良く混合しこれをクロマチンサンプルとする。モノクローナル抗体は detergent 濃度に敏感ですからこの割合は守って下さい。
12. 直ちに使わないときは、-80°C保存。

免疫沈降反応

1. 反応用 0.2 ml PCR チューブにはシリコナイズドチューブを用いる。
2. 反応チューブに 180 μ l の IP buffer と 20 μ l の anti-mouse IgG beads を入れる。
3. 洗浄、磁気分離の後、上清を吸引除去する。
4. 200 μ l の IP buffer で洗浄、磁気分離、上清除去。(省略可能)

5. 100 μ l のクロマチンサンプル、97 μ l の IP buffer、2 μ l の Protease Inhibitor、1 μ l の mouse monoclonal antibody を加え（モノクローナル抗体は detergent 濃度に敏感ですからこの割合は守って下さい。）、4°C で 1~2 時間、ローテーター等で反応（必要に応じて反応時間は長くして下さい）。このとき Input コントロール用にクロマチンサンプル 10 μ l を別の PCR チューブに取り分けておく。
 6. 磁気分離、上清除去。
 7. Wash Buffr 1 を 200 μ l 加え洗浄、磁気分離、上清除去。
 8. Wash Buffr 2 を 200 μ l 加え洗浄、磁気分離、上清除去。
 9. Wash Buffr 3 を 200 μ l 加え洗浄、磁気分離、上清除去。
- 以下 DNA 精製が必要ないとき
10. 2 μ l の Proteinase K 添加 DNA elution buffer を 100 μ l 加え、新しいシリコンチューブに移す。
これ以降 Input コントロールサンプルも同様の処理を行う必要がある。10 μ l のクロマチンサンプルに Proteinase K 添加 DNA elution buffer 90 μ l を加え、以下同様に反応させる。
 11. 65°C 15 分、95°C 10 分反応させる。
 12. 良く混合した後に遠心し、上清を qPCR に用いる。この時に使用する ChIP sample の量は PCR 反応溶液の 1/10 容量を目安にする。コントロールサンプルではこれ以上の容量では阻害がかかる事がある。

DNA 精製が必要な時

RNaseA 及び DNA 精製バッファーは別途用意して下さい。キットの DNA elution buffer も使えますが、0.5%程度の SDS 入りのモノ(10mM Tris-HCl(pH8.0), 300mM NaCl, 5mM EDTA, 0,5% SDS 等)をおすすめします。

10. DNA 精製バッファーを加え新しいシリコンチューブに移す。これ以降 Input コントロールサンプルも同様の処理を行う必要がある。10 μ l のクロマチンサンプルに DNA 精製バッファー90 μ l を加え、以下同様に反応させる。
11. 65°C 6 時間以上脱クロスリンク処理。
12. 2 μ l の Proteinase K 及び RNase A を添加し 65°C 15 分反応させる。
13. 8 連 PCR チューブ用マグネットスタンドで磁気分離、上清を回収する。
14. DNA をフェノールクロロホルム、エタ沈等により精製する。カラムや磁気ビーズによる精製も可。いずれにせよ微量の DNA を精製する事になるので取り扱いには注意が必要。

リアルタイム PCR

標準的な試薬、キットを使う場合は反応溶液の 1/10 容量を目安にサンプルを加える。
添付のプライマーを使用する時は以下の条件で行う。

95℃ 30 秒

↓

95℃ 5 秒

60℃ 30 秒

40~45 サイクル

↓

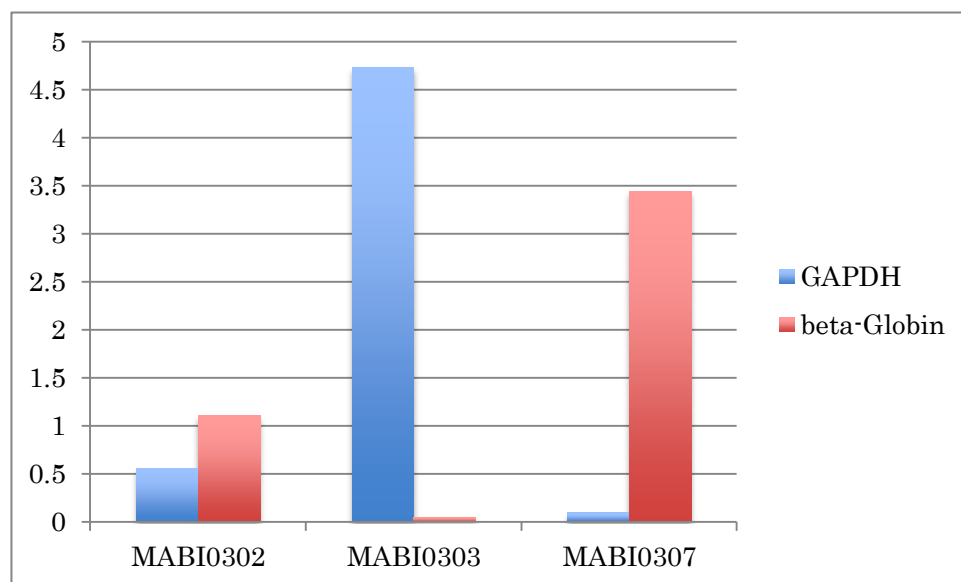
Dissociation Curve

反応終了後、解析を行う。

コントロールサンプルを Input の 10% として、回収された DNA 量の Input サンプル
に対する割合を求める。

通常 Input に対して数パーセント程度のシグナルが得られる事が多い。

リアルタイム PCR による解析例



anti-dimethyl Histone H3 (Lys9) antibody (MABI0307)は beta-Globin 遺伝子領域を特異的に沈降させている。一方、anti-dimethyl Histone H3 (Lys4) antibody (MABI0303)は GAPDH 遺伝子領域を特異的に沈降させており、非常に特異的なデータが得られている。