

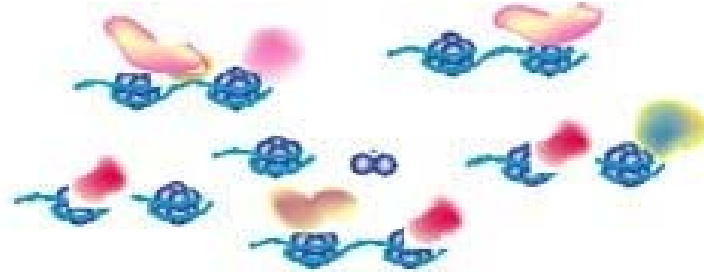


クロマチン免疫沈降法プロトコール

(ChIP Assay : Chromatin Immunoprecipitation Assay)

2

磁気ビーズを用いたクロマチン免疫沈降法



Dynabeads Protein G 等の磁気ビーズを用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法を紹介します。この方法では、特に転写因子等の DNA 結合蛋白に対する ChIP において、Protein G Sepharose に比べて高いシグナルが得られる傾向があります。

また ChIP の免疫沈降では、抗原と一次抗体を反応させてからビーズを加える方法 (後付け方式) と、一次抗体をビーズに結合させたものを抗原と反応させる方法 (先付け方式) があります。「クロマチン免疫沈降法プロトコール」では上記のうちの「後付け方式」を用いていましたが、この「クロマチン免疫沈降法プロトコール 2」では「先付け方式」を用いています。

※原理、トラブルシューティングは「クロマチン免疫沈降法プロトコール」を参照下さい。

※お問い合わせはコスモ・バイオ株式会社へお願いいたします。



コスモ・バイオ株式会社

〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル

営業部 TEL : (03)5632-9610・9620

FAX : (03)5632-9619

URL : <http://www.cosmobio.co.jp/>

1. 準備するもの

1) 機器

- ・ 密閉式超音波細胞破碎装置 コスモ・バイオ社 Bioruptor
UCD-300 など (1.5 ml チューブを同時に6本処理できます)
- ・ PCR DNA 増幅装置
- ・ 小型回転培養機(ローテーター) ATR 社 RKVSD ロータ・ミックスはチューブラックごと回転することができたいへん便利です。

2) 試薬

■ 1 x PBS(-) / 0.5% BSA (最終濃度)

1 x PBS(-)	497.5 mL	
bovine serum albumin	2.5 g	(0.5%)
<u>10% NaN₃</u>	<u>2.5 mL</u>	(0.05%)
total	500 mL	

BSA が完全に溶解するまでスターラーで攪拌後、4°C にて保存

■ 11 X fixation solution (最終濃度)

37% formaldehyde 3 mL (11.1%)

細胞培養用メディアウム 7mL

total 10 mL

用時調製のこと。

■ 1.5 M glycine

■ FACS solution (最終濃度)

1 x PBS(-)	487.5 mL	
bovine serum	10 mL	(2%)
<u>10% NaN₃</u>	<u>2.5 mL</u>	(0.05%)
total	500 mL	

4°C にて保存

■ SDS lysis buffer (最終濃度)

1 M Tris-HCl (pH 8.0)	2.5 mL	(50 mM)
0.5 M EDTA (pH 8.0)	1 mL	(10 mM)
10% SDS	5 mL	(1%)
<u>H₂O</u>	<u>41.5 mL</u>	
total	50 mL	

室温で保存。

使用時に Protease Inhibitor Cocktail を加えましょう。

■ ChIP dilution buffer		(最終濃度)
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	2.5 mL	(50 mM)
5 M NaCl	1.67 mL	(167 mM)
10% Triton X-100	5.5 mL	(1.1%)
10% sodium deoxycholate	0.55 mL	(0.11%)
<u>H₂O</u>	<u>39.78 mL</u>	
total	50 mL	

室温で保存。

使用時に Protease Inhibitor Cocktail を加えましょう。

■ 50% Protein G Sepharose/ 0.5% BSA slurry

Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE ヘルスケア社 Catalog# 17-0618) を 1X RIPA buffer/ 150 mM NaCl で2回洗浄します。その後、1X RIPA buffer / 0.5% BSA/0.05% NaN₃ に懸濁し、ローテーターを用いて 4°C にて一晩攪拌。50% slurry となるように分注し、4°C にて保存。

■ 2 X RIPA buffer		(最終濃度)
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	5 mL	(100 mM)
5 M NaCl	3 mL	(300 mM)
0.5 M EDTA (pH 8.0)	0.2 mL	(2 mM)
10% Triton X-100	10 mL	(2%)
10% SDS	1 mL	(0.2%)
10% sodium deoxycholate	1 mL	(0.2%)
<u>H₂O</u>	<u>29.8 mL</u>	
total	50 mL	

室温で保存。

■ 1 X RIPA buffer/ 150 mM NaCl (最終濃度)

2 X RIPA buffer	25 mL	(1 X)
<u>H₂O</u>	<u>25 mL</u>	
L total	50 mL	

NaCl 濃度は最終的に 150 mM。

■ 1 X RIPA buffer/ 500 mM NaCl (最終濃度)

2 X RIPA buffer	25 mL	(1 X)
-----------------	-------	-------

5 M NaCl	3.5 mL	(350 mM)
H ₂ O	21.5 mL	
total	50 mL	

NaCl 濃度は最終的に 500 mM。

■ LiCl wash solution (最終濃度)

1 M Tris-HCl (pH 8.0)	0.5 mL	(10 mM)
5 M LiCl	2.5 mL	(0.25 M)
0.5 M EDTA(pH 8.0)	0.1 mL	(1 mM)
10% NP40	2.5 mL	(0.5%)
10% sodium deoxycholate	2.5 mL	(0.5%)
H ₂ O	41.9 mL	
total	50 mL	

室温で保存。

■ ChIP direct elution buffer		(最終濃度)
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	0.5 mL	(10 mM)
5 M NaCl	3 mL	(300 mM)
0.5 M EDTA (pH8.0)	0.5mL	(5 mM)
10% SDS	2.5 mL	(0.5%)
<u>H₂O</u>	<u>43.5 mL</u>	
total	50 mL	

室温で保存。

- 1 x TE
- 4 mg/mL DNase-free RNase A
- 10 mg/mL proteinase K
- 20 mg/mL glycogen
- シリコナイズチューブ
- 1.5ml TPX tube (HTC 社 M50001)
- 1.5ml Eppendorf DNA LoBind tube
- フェノール/CIAA

2. プロトコール

1) 一次抗体と磁気ビーズの反応

Dynabeads Protein G (DYNAL/Invitrogen #100.03)をよく懸濁し、30 μ l をあらかじめ 1XPBS (-)/0.5% BSA 1ml を入れておいた 1.5ml Eppendorf DNA LoBind tube へ取り分けます。

↓

ローテーターにて 2~5 分間程度 室温で攪拌します。

↓

10,000 rpm 10 秒間程度 4 °Cにて遠心し、上清をアスピレーターで除きます。(通常 Dynabeads の洗浄には磁気スタンド(Dynal MPC-S DYNAL/Invitrogen #120.20)を用いることが多いですが、一部のビーズがチューブのふた内部に残ったり、アスピレーターで除く際にロスすることがあるため、遠心操作で上清を除いています。)

↓

1 mL の 1XPBS (-)/0.5% BSA を加え、ビーズをボルテックスにて懸濁したのち、ローテーターにて 2~5 分間程度 室温で攪拌します。

↓

10,000 rpm 10 秒間程度 4 °Cにて遠心し、上清をアスピレーターで除きます。

↓

200 μ l の 1XPBS (-)/0.5% BSA を加え、さらに一次抗体(1-10 μ g 程度)を加え、ボルテックスにてよく懸濁したのち、ローテーターにて 4時間以上 4 °Cでゆっくりと攪拌します(20-30 rpm/min 程度)。

2) 可溶性クロマチン分画の調整

10~50 $\times 10^6$ 細胞を 適当量(10~40 mL)の細胞培養用メディアウムに懸濁し、15 mL または 50 mL チューブに入れます。

↓

1/10 容量 の 11 X fixation solution を加え(formaldehyde 1% final)転倒混和したのち、5~20 分間 24 °C 水浴にて時折攪拌しインキュベートします。

↓

1/10 容量 の 1.5 M glycine を加え転倒混和したのち、直ちに氷水中に入れ反応を止めます。(メディアウムのフェノールレッドの色が黄色に変わります。Glycine は formaldehyde と反応し、クロスリンク反応を止めます。)

↓

Swing 式の遠心機で 1,500 rpm 5 分間 4 °Cにて遠心し、上清をアスピレーターで除き、細胞をボルテックスにて懸濁します。

↓

はじめの細胞懸濁液と等量の冷やした FACS solution を加え細胞を懸濁し、ローテーターにて 5~10 分間 4 °Cで攪拌します。

↓

Swing 式の遠心機で 1,500 rpm 5 分間 4 °Cにて遠心し、上清をアスピレーターで除き、細胞をボル

テックスにて懸濁します。

↓

SDS lysis buffer(直前に Protease Inhibitor Cocktail、例えば Nacalai Protease Inhibitor Cocktail, EDTA free, 100X SP 03969-21などを 1/100 容量加えます。on ice にすると SDS が析出するので室温で調製します。)を、 3×10^6 細胞あたり $60 \mu\text{l}$ (免疫沈降1反応分)の割合で加え、ピペットマンP-1000 を用いてチップの先をチューブの底につけ、10 回程度ピペッティングし細胞を懸濁・溶解します。(この時、泡を立てないようにしましょう。)懸濁液を 200-300 μl ずつ 1.5ml TPX チューブへ分注し、室温にて 10 分間静置します。(1.5ml TPX チューブは Polymethylpentene (PMP)で作られたチューブで、特に Bioruptor によるソニケーションと寸断効率を高めると言われています。)

↓

密閉式超音波細胞破碎装置 Bioruptor を用いて、Power Low または High, On 10 秒, Off 60 秒のサイクルで 4 サイクル程度、氷水で冷却しながら超音波処理を行います。(過剰な超音波処理は、免疫沈降の効率を下げますので注意しましょう。)

↓

15,000 rpm 10 分間 4°C (SDS が析出する場合は 8°C 程度に設定するとよい)にて遠心し、上清(約 200-300 μL X 分注した本数分)を、あらかじめ 9 倍量の ChIP dilution buffer (直前に 100X Protease Inhibitor Cocktail を 1/100 容量加え、氷上で冷やしておきます。)を入れておいた適当な容量のチューブ(2 mL チューブ、あるいは 5 mL~15 mL チューブ)に回収し、希釈します。

↓

Normal Rabbit IgG (Chromopure Rabbit IgG, whole molecule/Jackson Immuno Research 社 011-000-003)をクロマチン溶解液 1ml あたり 5-10 μg 程度加え、ローターにて 30 分間以上 4°C で攪拌します。

↓

50% ProteinG-Sepharose / 0.5% BSA slurry をクロマチン溶解液 1ml あたり 30 μL 程度加え、ローターにて 1 時間以上 4°C で攪拌します(preclear)。(preclear に Dynabeads Protein G を用いることもできますが、ここでは ProteinG-Sepharose を使用しています。)

↓

3,000 rpm 3 分間(5 mL~15 mL チューブの場合)または 10,000 rpm 10 秒間(2 mL チューブの場合) 4°C にて遠心し、上清を可溶性クロマチン分画とする。(上清 100-200 μL を Input 分画として 4°C で保存します。)

3) 一次抗体と可溶性クロマチン分画の反応

一次抗体と反応させた磁気ビーズを 10,000 rpm 10 秒間程度 4°C にて遠心し、上清をアスピレーターで除きます。

↓

1 mL の 1XPBS (-)/0.5% BSA を加え、ビーズをボルテックスにて懸濁したのち、ローターにて 3~5 分間程度 4°C で攪拌します。

↓

10,000 rpm 10 秒間程度 4°C にて遠心し、上清をアスピレーターで除きます。

↓

1 mL の 1 X RIPA buffer/ 150 mM NaCl を加え、ビーズをボルテックスにて懸濁したのち、ローテーターにて 3~5 分間程度 4 °C で攪拌します。

↓

10,000 rpm 10 秒間程度 4 °C にて遠心し、上清をアスピレーターで除きます。

↓

2 で調製した可溶性クロマチン分画を 600 μ L ずつ、一次抗体を結合させたビーズの入った 1.5ml Eppendorf DNA LoBind tube に分注します。ローテーターにて一晩(12~18 時間)4°C にて攪拌します(40-60 rpm/min 程度)。

↓

可溶性クロマチン分画と反応させたビーズを 1 mL の以下のバッファーで洗浄します。各段階は、バッファーを加えボルテックスにて懸濁した後、ローテーターにて 5 分間以上 4°C にて攪拌し、同様に遠心、上清を除く操作を行います。バッファーは ice-cold に冷やしたものを用いましょう。抗体によってはこの洗浄の条件を検討してください。

- (1) 1 X RIPA buffer/ 150 mM NaCl 1 回
- (2) 1 X RIPA buffer/ 500 mM NaCl 1 回
- (3) LiCl wash solution 1 回
- (4) 1 x TE 2 回(アングル式の遠心機だとビーズがチューブ内壁に付着し、上清を除く際に一部吸ってしまうことが多いので、最後の遠心はできれば swing 式の遠心機を用いるとよい。)

3) DNA の精製

200 μ L の ChIP direct elution buffer をビーズに加え、ボルテックスにて懸濁します。同様に遠心。ビーズはフェノール/CIAA 処理まで除く必要はありません。65°C にて 4 時間以上加熱し、クロスリンクをはずします。Input 分画もこの段階から併行して処理しましょう。

↓

1 μ L の 4 mg/mL RNase A を加え、ボルテックスにて攪拌し、同様に遠心後、37°C にて 30 分インキュベート。

↓

1 μ L の 10 mg/mL proteinase K を加え、ボルテックスにて攪拌し、同様に遠心後、55°C にて 1 時間以上インキュベート。

↓

1~2 μ L の 20 mg/mL Glycogen を加え、ボルテックスにて攪拌し、同様に遠心し、ビーズを残して上清を 1.5 mL シリコナイズチューブに移します。

↓

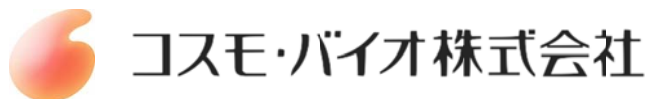
210 μ L のフェノール/CIAA を加え、ボルテックスにて攪拌し、15 krpm 3 分間室温にて遠心し、上清(約 200 μ L)を 1.5ml Eppendorf DNA LoBind tube に回収します。有機層に 180 μ L の 1 x TE- 200 mM NaCl を加え、ボルテックスにて攪拌し、15 krpm 3 分間室温にて遠心しましょう(back extract)。上清を回収し、先程の上清分画にプールし、ボルテックスにて攪拌後、軽く遠心します。

↓

800~900 μ L の 100% Ethanol を加え、tilting にてよく攪拌し、 -20°C にて 2 時間以上静置。15 krpm 30 分間以上 4°C にて遠心し、上清を除き、DNA の沈殿を ice-cold の 75% ethanol でリンスします。

15 krpm 5~10 分間 4°C にて遠心し、ピペットマンのチップにて上清を完全に除きましょう。2-5 分程度 air dry し、Input DNA、ChIP DNA は 50-200 μ L の 10mM TrisHCl (pH 8.0) に溶解します。 -20°C で保存。

※本資料は、滋賀医科大学 生化学・分子生物学講座 縣 保年 先生にご提供いただきました。
※お問い合わせはコスモ・バイオ株式会社へお願いいたします



〒135-0016 東京都江東区東陽2-2-20 東陽駅前ビル
営業部 TEL : (03)5632-9610・9620
FAX : (03)5632-9619
URL : <http://www.cosmobio.co.jp/>