

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

山根美穂 020617

◆調整する試薬類◆

11 % Formaldehyde Solution

Formaldehyde*	11 % (v/v)
NaCl	100mM
EDTA-Na (pH 8.0)	1mM
EGTA-Na	0.5mM
Tris-Cl (pH 8.0)	50mM

*use 16 % Formaldehyde (Methanol free) (PSI/コスモバイオ/18814)

Buffer I *フィルター滅菌後、室温保存

Hepes/KOH (pH 7.5)	50 mM
NaCl	140mM
EDTA (pH7.5)	1mM
Triton X-100	1% (v/v)
Sodium deoxycholate	0.1% (w/v)

Protease inhibitor を加える場合、100 μ M PMSF、10 μ g/ml aprotinin、10 μ g/ml leupeptin

Buffer II *フィルター滅菌後、室温保存

Hepes/KOH (pH 7.5)	50 mM
NaCl	500mM
EDTA (pH 7.5)	1mM
Triton X-100	1% (v/v)
Sodium deoxycholate	0.1% (w/v)

Buffer III *フィルター滅菌後、室温保存

Tris-Cl (pH 8.0)	10 mM
LiCl	250mM
EDTA (pH 7.5)	1mM
NP-40	0.5% (v/v)
Sodium deoxycholate	0.1% (w/v)

1 mg/ml Proteinase K Solution *分注後、-20°Cで保存

Proteinase K	1 mg/ml
Tris-Cl (pH 8.0)	50mM
CaCl ₂	1mM

◆プロトコール◆

*以下のプロトコールは Mis6-HA を抗 HA 抗体 3F10 (Anti-HA High Affinity ; Roche / 1 867 423) を用いて免疫沈降を行うために最適化したものです。他の蛋白質、抗体を用いる場合は、抗体濃度、PCR に用いる際の template 濃度などの再検討が必要です。

Formaldehyde Cross-Linking in Vivo

1. 100 ml の YES あるいは適切な合成培地中、 $2 \sim 10 \times 10^6$ cells/ml まで細胞を培養する。
2. 細胞培養液に 10 ml の 11 % formaldehyde solution を加える (final conc., 1 %)。
3. 26°C にておだやかに攪拌しながら 10 分間インキュベートする。
4. 培養液を氷水上にうつし、時々攪拌しながら 50 分間インキュベートする。
5. 2500 rpm、4°C で 5 分間遠心し細胞を回収する。
6. 細胞を 1 ml の ice-cold Buffer I で洗浄する (このステップを 4 回繰り返す)。
7. 2500 rpm、4°C で 5 分間遠心し細胞を回収する。
8. 細胞を液体窒素にて凍結後、使用まで -80°C で保存する。

Preparation of Whole-Cell extracts

*以下の操作は全て氷上で行う。

**Fast Prep にて細胞を破碎する場合、経験的に、 3×10^8 cells あたり溶液 25 μ l、ビーズ 750 mg で行うのが最も効率がよいように思われます。したがって、回収した細胞数が多い場合は、破碎時の液量とビーズの量を増やすか、あらかじめ 1 チューブあたり 3×10^8 cells になるように細胞を回収するかしたほうが良いかもしれません。ただし、細胞数が少なすぎると、最終的に得られる蛋白濃度が薄くなってしまいますので、 3×10^8 cells 以上であるほうがのぞましいです (6×10^8 cells くらいを液量 50 μ l、ビーズ 900 mg くらいでつぶすなど)。いずれにしても、sonication 時の条件をなるべくそろえるために、4 のステップ以降の液量は変えないほうがよいと思われます。

1. 細胞を 25 μ l の ice-cold buffer I (protease inhibitors を含む) に懸濁し、1.5 ml のスクリューキャップチューブにうつす。
2. 750 mg の glass beads を加える。
3. FastPrep (speed 6、15 sec.) にて細胞を破碎する。
4. チューブの底に針で穴を開け、新しいチューブと2段重ねにして 4°C で 3000 rpm、1 分間遠心。
5. 上段のチューブに 500 μ l の ice-cold buffer I (protease inhibitors を含む) を加え入れる。
6. 再び 4°C で 3000 rpm、3 分間遠心する。
7. 上段のチューブを捨て、下段に回収された細胞のペレットと溶液を再懸濁し、15 ml チューブにうつす。
8. 氷上にて 30 秒間超音波処理、1分間氷上放置の操作を5回繰り返す (Branson、Sonifier 250 sonicator にて、output 3 強、duty cycle 30%)。この処理によりゲノム DNA のサイズを 0.5 から 1.0kb に分断する。超音波処理時に溶液を泡立てないため、sonicator のチップの先は常に溶液の底のほうに位置するよう注意する。
9. 超音波処理後の細胞懸濁液を新しいエッペンチューブにうつし、14,000 rpm、4°C で 15 分間遠心。
10. 上清 (whole cell extract; WCE) を新しいチューブにうつし、蛋白濃度を測定する (Bio-Rad の protein assay にて)。
11. 20 mg/ml になるように希釈し、200 μ l ずつ分注して液体窒素で凍結後、使用まで -80°C で保存する。また、20 μ l も別に取り分けて保存しておく (WCE からの DNA 回収用)。

Immunoprecipitation

*以下のステップで用いる Protein-G beads (Protein G Sepharose 4 Fast Flow ; Amersham Biotech /

17-0618-01)は、以下の手順により Buffer I にて平衡化しておく(ビーズは 20 %エタノールの状態で保存されています)。

- Protein-G beads の入った容器を中身が均一になるよう混ぜる
 - はさみで先端を切ったチップを用いて、必要量より少し多めのビーズをエッペンにとる
 - 5000 rpm、4℃で 20 秒間遠心し、エタノールを除く
 - ice-cold Buffer I を 300 μ l 加え軽く混ぜ、その後、上記と同様に遠心して上清をのぞく
 - もう一度 ice-cold Buffer I を 300 μ l を加え、遠心して、上清をのぞく
 - はじめに分取した 80 %量の Buffer I を加え、50 % slurry の Protein-G beads とする
1. 200 μ l (4mg 相当量)の WCE に、Buffer I で平衡化した 50 % slurry の Protein-G beads を 20 μ l 加える。
 2. 4℃にて 1 時間、回転混和。
 3. 12,000 rpm、4℃で 20 秒間遠心する。
 4. 上清を新しいチューブにうつす。(これらのステップにより、ビーズに非特異的に吸着するものを除く)
 5. 2 μ l の抗 HA 抗体、3F10 (0.1 mg/ml)を加える。
 6. 4℃にて 1~2 時間、回転混和。
 7. Buffer I で平衡化した 50 % slurry の protein-G beads を 20 μ l 加える。
 8. 4℃にて 2 時間、回転混和。
 9. 5000 rpm、4℃で 20 秒間遠心する。
 10. 上清をきれいこのぞき、1 ml の ice-cold Buffer I を加える。(上清を除く時には、先細の gel loading tip などを使うとよい。以下の洗いのステップでも同様である)
 11. 4℃にて 10 分間、回転混和。
 12. 5000 rpm、4℃で 20 秒間遠心する。
 13. 上清をきれいこのぞき、1 ml の ice-cold Buffer I を加える。
 14. 5000 rpm、4℃で 20 秒間遠心する。
 15. 上清をきれいこのぞき、1 ml の ice-cold Buffer II を加えた後、5000 rpm、4℃で 20 秒間遠心する。このステップを 2 回行う。
 16. 上清をきれいこのぞき、1 ml の ice-cold Buffer III を加えた後、5000 rpm、4℃で 20 秒間遠心する。このステップを 2 回行う。
 17. 上清をきれいこのぞき、1 ml の ice-cold TE を加えた後、5000 rpm、4℃で 20 秒間遠心する。このステップを 2 回行う。
 18. 100 μ l の TE (10 μ g/ml の RNase A を含む)に懸濁し、36℃で 15 分間インキュベート。20 μ l の WCE にも同様に 100 μ l の TE (10 μ g/ml の RNase A を含む)を加え、36℃で 15 分間インキュベート。

Purification of the Coimmunoprecipitated DNA

1. RNase 処理を行った溶液に 2.5 μ l の 10% SDS、2.5 μ l の proteinase K (1mg/ml) を加え、36℃で 8 時間以上インキュベートする。
2. 65℃で 6 時間以上インキュベートする。
3. 10 μ l の 3M NaOAc (pH5.2) 、100 μ l のフェノール/クロロフォルムを加えてよく混合し、室温で 14,000 rpm、5 分間遠心する。
4. 水層を新しいチューブにうつす。この時、各サンプル間で同じ液量をとること。WCE のサンプルのみ、もう一度フェノール/クロロフォルム処理を行う。
5. 1 μ l の 20 mg/ml glycogen (glycogen for mol.biol. ; Roche / 901 393)、250 μ l の氷冷エタノールを加えてよく混合し、-20℃にて 30 分間冷却する。
6. 14,000 rpm、4℃で 15 分間遠心する。
7. 沈澱を 70 %エタノール 1 ml にて洗浄。14,000 rpm、4℃で 5 分間遠心する。
8. 沈澱を風乾させ、50 μ l の TE に溶解する (template DNA solution)。-20℃にて保存。

PCR Amplification of the Coimmunoprecipitated DNA

<反応組成> total 20 μ l

template DNA solution*	10 μ l
10 \times ExTaq PCR buffer	2 μ l
2.5mM dNTP Mix.	1.6 μ l
Primer A (10pmol/ μ l)**	1 μ l
Primer B (10pmol/ μ l)	1 μ l
Ex Taq DNA polymerase	0.1 μ l
H2O	4.3 μ l

<反応サイクル>

1 cycle	94 $^{\circ}$ C	3 min
25 cycle	94 $^{\circ}$ C	1 min
	52 $^{\circ}$ C	1 min
	72 $^{\circ}$ C	30 sec
1 cycle	72 $^{\circ}$ C	5 min

反応後、2.5 % Agarose gel 電気泳動を行う。

*PCR に用いる template DNA solution は、何段階かに希釈して最適な条件を検討する必要がある。例えば、WCE DNA solution の場合は、1/50、1/150、1/450、1/1350、の4段階に希釈したものをを用いて、また、IP DNA solution の場合は、1/2、1/6、1/18、1/54、の4段階に希釈したものをを用いて検討してみる。(Mis6-HA の場合は、WCE が 1/150、IP が 1/6 希釈したものをを用いた場合が最適なようです)

**primer 配列

cnt 5' primer : 5'-aac aat aaa cac gaa tgc ctc-3'
3' primer : 5'-ata gta cca tgc gat tgt ctg-3'

imr 5' primer : 5'-aat aaa act tct ccg tca gg-3'
3' primer : 5'-cgt tta cat ctc aat tgc ac-3'

lys 5' primer : 5'-ctt gtt cga cgt gat aag g-3'
3' primer : 5'-cgt ata tcc ctt tca gtg g-3'

◆追記◆

mis6-GFP 発現細胞の WCE より Roche 社の Anti-GFP 抗体 (Car. No. 1 814 460) を用いて ChIP を行った場合にも同様の結果が得られました。その場合、200 μ l の WCE に対して 2 μ l の Anti-GFP 抗体 (0.4 mg/ml) を加えます。

◆お断り◆

このプロトコールは以下の文献をもとに作成しました。実験を行う際にはそちらのほうも熟読されることをお勧めいたします。

◆参考文献◆

Kohta Takahashi, Shigeaki Saitoh, and Mitsuhiro Yanagida (2000). Application of the Chromatin Immunoprecipitation Method to Identify in Vivo Protein-DNA Associations in Fission Yeast. *Sci. STKE* **2000** (56), PL1