

■■■ クロマチン免疫沈降法 (ChIP)-PCR ■■■

■ クロマチン免疫沈降法 (ChIP) と PCR を組み合わせた解析 (ChIP-PCR) は転写調節解析の強力なツールですが、解析結果を得るまでの段階が多く、各段階での条件の違いが実験結果に影響を及ぼします。今回は、細胞をホルマリン固定する段階での条件検討の結果をお示しします。

■ この実験は、ヒストンのアセチル化の検出を目的としたホルマリン固定時間の決定でしたので、トリコスタチン A (TSA) 処理有無の条件下で抗アセチル化ヒストン H4 抗体による免疫沈降を行いました。

■ 以下に手順をお示ししますが、用いる機器、細胞、抗体、標的遺伝子あるいは用いる試薬のロット等によって条件が異なる場合があります。

■ クロマチンサンプルの調製

1. F9 細胞を 6-cm ディッシュに培養し、そこに TSA を 100 ng/ml となるように添加した。
2. 24 時間後、培地にホルマリンを 1% になるように添加し、細胞を室温で固定した。固定時間は 30 分、10 分、3 分とした。
3. 固定した細胞を PBS-p (proteinase inhibitor 入) で 2 回洗った。
4. 細胞を 800  $\mu$ l の PBS-p と共に 1.5 ml マイクロチューブに回収した。
5. 3,000 rpm、1 分の遠心により細胞を上清と分離した。
6. 細胞を 150  $\mu$ l の Lysis buffer に再けん濁した。
7. [30 秒/30 秒] インターバル 30 サイクルの超音波により細胞を超音波破碎した。DNA のサイズは 0.5-2 kb 程度であった。
8. 15,000 rpm、4°C、5 分の遠心により上清を分離した。

9. 上清 20  $\mu$ l を DNA 量検定のために分取し、残りを -80°C に保存した。
10. 分取した 20  $\mu$ l に 162  $\mu$ l の TE、18  $\mu$ l の 10% SDS を混和した。
11. 65°C、8 時間、保温した。
12. Proteinase K を 0.1 mg/ml になるように加え 37°C、2.5 時間、保温した。
13. フェノール-フェノールクロロホルム-クロロホルム抽出の後、DNA を 20  $\mu$ l の TE に溶解した。
14. 吸光度により DNA 量を求めた。

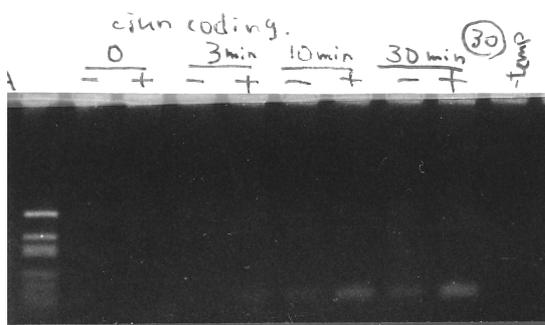
TSA 処理	固定時間 (分)	濃度 ( $\mu$ g/ $\mu$ l)
無	0	0.42
無	3	0.40
無	10	0.50
無	30	0.41
有	0	0.23
有	3	0.25
有	10	0.17
有	30	0.19

■ DNA 収量に注目して下さい。播き込み細胞数は同一で培養を始めましたが、TSA 処理の有無で差があるようです。すなわち、播き込み細胞数をそろえて ChIP をして得た値は、実は同じインプット量に対して落ちてきた DNA の量を示しているのではなく、インプットで使用した DNA の量を反映しているだけかもしれません。

■ ChIP サンプルの調製

1. 10  $\mu$ g DNA 相当量のクロマチンサンプルに Lysis buffer を加え、60  $\mu$ l にした。
2. 540  $\mu$ l の Dilution buffer を加えた。
3. 1  $\mu$ l の anti-acetyl histone H4 antibody (Upstate, 06-866) を加えた。
4. ローテーターで回転しながら 4°C、15 時間、保温した。

5. 25 ul の proteinA sepharose 4FF (Amarsham: treated with 200 ug/ml salmon sperm DNA and 0.5 mg/ml BSA) を加えた。
  6. ローテーターで回転しながら 4°C、1 時間、保温した。
  7. Wash buffers A, B, LiCl でそれぞれ 1 回、TE で 2 回、ビーズを洗浄した。
  8. 100 ul の Elution buffer をビーズに加え、65°C、10 分間、保温した。
  9. 遠心により上清を分離し、新しいチューブに取り分けた。
  10. 150 ul の TE+0.67% SDS をビーズに加え、65°C、10 分間、保温した。
  11. 遠心により上清を分離し、先に新しいチューブに取り分けた上清と混和し、65°C、6.5 時間、保温した。
  12. 一旦、4°C で保存した。
  13. エタノール沈澱のキャリアを加えた 0.4 mg/ml proteinase K を 50 ul 加えた。
  14. 37°C、一晩保温した。
  15. フェノール-フェノール/クロロホルム-クロロホルム抽出の後、DNA を 20 ul の TE に溶解した。
- PCR は 20 ul の系で、1.0 ul の ChIP DNA を鋳型とし、c-Jun coding 領域を増幅した。



- TSA 処理の有無によりアセチル化状態の差が明確に分かるのは、10分ないし30分固定のサンプルでした。また、30分固定の方が10分固定よりシグナル強度差が明確でした。

■ ChIP に関してはネット上でも様々なプロトコールを入手することができます。いくつかのプロトコールを参照したところ、ヒストンは DNA との結合が強いので、「ホルマリン固定なしに ChIP ができる」という記事を見つけましたが、今回の実験では固定なしあるいは 3 分間の固定ではアセチル化ヒストンは検出できませんでした。また、固定時間を 10 分間と記述しているプロトコールがあったり 30 分間とするプロトコールがあったりと様々ですが、今回の実験のなかでは 30 分間が最適でした。ただし、「どんな場合でも 30 分間固定が最適」ということではなく、細胞の種類や状態や用いる試薬に依存して最適の固定時間は異なりますので、予備実験を行って、実験を個別に最適化する必要があります。(T.M.)

(Mail News 2006.04.24 掲載記事)

発行

理化学研究所・バイオリソースセンター

遺伝子材料開発室

dnabank@brc.riken.jp

<http://www.brc.riken.jp/lab/dna/ja/>

**Reagents**Protein A/G beads for ChIP

Either ProteinA agarose for ChIP (Upstate)

or ProteinA sepharose 4FF (Amarsham), treated in 200 ug/ml sonicated salmon sperm DNA and 0.5 mg/ml BSA.

<u>Lysis buffer</u>	final	<u>20 ml</u>	<u>Wash-buffer-B</u>	final	<u>50 ml</u>
10% SDS	1%	2 ml	1 M Hepes, pH 7.9	50 mM	2.5 ml
0.25 M EDTA, pH 8.0	10 mM	0.8 ml	10% SDS	0.1%	0.5 ml
1 M Tris, pH 8.1	50 mM	1.0 ml	10% Triton X-100	1.0%	5.0 ml
			1% Deoxycholate-Na	0.1%	5.0 ml
			0.25 M EDTA, pH 8.0	1.0 mM	0.2 ml
<u>Dilution buffer</u>	final	<u>40 ml</u>	5 M NaCl	500 mM	5.0 ml
10% SDS	0.01%	40 ul			
10% Triton X-100	1.1%	4.4 ml	<u>Wash-buffer-LiCl</u>	final	<u>50 ml</u>
0.25 M EDTA, pH 8.0	1.2 mM	192 ul	1 M Tris, pH 8.0	20 mM	1.0 ml
1 M Tris pH 8.1	16.7 mM	668 ul	10% NP-40	0.5%	2.5 ml
5M NaCl	167 mM	1.336 ml	1% Deoxycholate-Na	0.5%	25.0 ml
			0.25 M EDTA, pH 8.0	1.0 mM	0.2 ml
			4 M LiCl	250 mM	3.125 ml
<u>Wash-buffer-A</u>	final	<u>50 ml</u>			
1 M Hepes, pH 7.9	50 mM	2.5 ml	<u>TE buffer</u>	final	<u>10 ml</u>
10% SDS	0.1%	0.5 ml	1 M Tris, pH 8.0	10 mM	100 ul
10% Triton X-100	1.0%	5.0 ml	0.25 M EDTA, pH 8.0	1.0 mM	40 ul
1% Deoxycholate-Na	0.1%	5.0 ml			
0.25 M EDTA, pH 8.0	1.0 mM	0.2 ml	<u>Elution buffer</u>	final	<u>10 ml</u>
5 M NaCl	140 mM	1.4 ml	1 M Tris, pH 8.0	50 mM	500 ul
			10% SDS	1.0%	1000 ul
			0.25 M EDTA, pH 8.0	1.0 mM	40 ul

References

Gang Wang et al., Mol Cell 17, 683, 2005.

"Chromatin and gene regulation" in Abcam homepage

(<http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=5>)

Upstate ChIP Assay Kit (cat. # 17-295)

<http://www.upstate.com/browse/productdetail.q.ProductID.e.17-295>)