

クロマチン免疫沈降 (ChIP)

SimpleChIP™ Enzymatic Chromatin IP Kit



2 クロマチン断片化: 酵素 VS 超音波

3 マウス繊維芽細胞m5Sを用いたHistone H3のChIP解析

4 従来法とCST社プロトコールのChIPアッセイ比較検討

6 **F**REQUENTLY **A**SKED **Q**UESTIONS

7 Appendix A: クロマチン断片化の最適化

8 Appendix B: トラブルシューティングガイド

クロマチン断片化: 酵素 VS 超音波

クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイは、細胞内のタンパク質-DNA相互作用の解明に役立つ強力かつ汎用性の高い手法で、ヒストン修飾や、転写因子、DNA複製因子およびDNA修復タンパク質が結合しているゲノムの解析に用いられます。ChIPアッセイでは、タンパク質-DNA相互作用を保持するために、まず始めにホルムアルデヒドで細胞を固定します。その後細胞を可溶化してクロマチンを回収し、酵素消化あるいはソニケーションのどちらかでクロマチンを断片化します。断片化したクロマチンは、目的のタンパク質あるいはヒストン修飾に特異的な抗体を用いて免疫沈降します。免疫沈降後DNAを精製し、目的のDNA配列あるいはゲノム領域が得られたかどうかを様々な手法で確認します。

ここでは、CST社のSimpleChIP™ Enzymatic Chromatin IP Kitと他社のソニケーション法を採用しているChIP Kitを用いて、micrococcal nuclease酵素によるクロマチン消化とソニケーションによるクロマチン断片化の比較検討を行いました。ソニケーションは従来からのクロマチン断片化の方法ですが、ソニケーターのパワー調節によるばらつきや、サンプルの乳化などの問題が生じることがあります。ソニケーションが不足するとクロマチンは十分に断片化されません。その一方で、過度のソニケーションやサンプルの乳化は、タンパク質の変性や分解を引き起こします。これにより、エピトープが損傷し、抗原抗体反応を妨げることがあります。これに対し、ソニケーションよりも穏やかな酵素消化によってクロマチンを断片化すると、ChIPアッセイの免疫沈降効率を劇的に向上させることをCST社は確認しています。

ヒストン修飾といくつかの遺伝子座にあるTCF4、 β -catenin、RNA polymerase (Rpb1) の局在を解析するために、HCT116細胞からクロマチンを調製し、両方のキットを用いてクロマチン免疫沈降を行いました。その結果、SimpleChIP™ Enzymatic ChIP Kitを用いた場合、他社のキットに比べてTri-methyl-Histone H3 (Lys4) (C42D8) Rabbit mAb #9751とAcetyl-Histone H3 (Lys9/Lys14) Antibody #9677で活性遺伝子 (GAPDHとc-MYC) の2-3倍の増幅が確認されました (Figure 2A)。また、不活性MYT-1遺伝子の増幅は両キット共にわずかでしたが、SimpleChIP™ Enzymatic ChIP Kitを用いた場合のRpb1 CTD (4H8) Mouse mAb #2629では、活性遺伝子GAPDHの増幅は11倍、c-MYCは13倍でした (Figure 2A)。さらに、TCF4と β -cateninの解析において、酵素消化とソニケーションをそれぞれ採用しているキットの違いが最も顕著に表れました。SimpleChIP™ Enzymatic ChIP Kitを用いた場合、TCF4 (C48H11) Rabbit mAb #2569でCAMK2Dとc-MYCの増幅は、他社のキットに比べてそれぞれ4.5倍と12.5倍、また、 β -Catenin Antibody #9562ではそれぞれ34倍と4倍でした (Figure 2B)。

本比較検討では、CST社のSimpleChIP™ Enzymatic Chromatin IP Kitは、他社のソニケーション法を採用しているChIP Kitより良好な結果が得られ、micrococcal nucleaseによるクロマチンの断片化により、免疫沈降の効率が向上しました。これにより、非特異的なバックグラウンドの軽減と目的遺伝子座の高い増幅が実現しました。この傾向は、特に転写因子や補因子と結合したDNAの解析で顕著に見られ、酵素消化がソニケーションより穏やかにクロマチンを断片化し、クロマチンと抗体エピトープを最適に保つことを示唆しています。

Figure 1.

Enzyme-based and sonication-based ChIP kits produce chromatin fragments of a similar size. Chromatin was prepared from 4×10^7 HCT116 human colorectal carcinoma cells according to the protocols included with the SimpleChIP™ Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads) #9003 or a competitor's sonication-based ChIP kit. DNA was purified from each chromatin sample and DNA fragment size was determined by electrophoresis on a 1% agarose gel. Both enzymatic digestion with the SimpleChIP™ Kit (lane 1) and sonication with the competitor's kit (lane 2) produced chromatin fragments ranging from 150 to 700 bp, corresponding to one to five nucleosomes in length. The experiment was repeated at least three times with similar results.

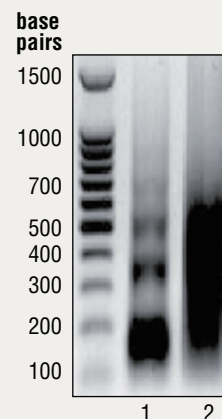
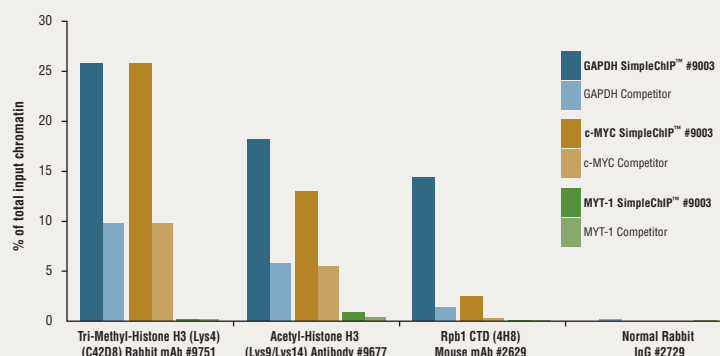


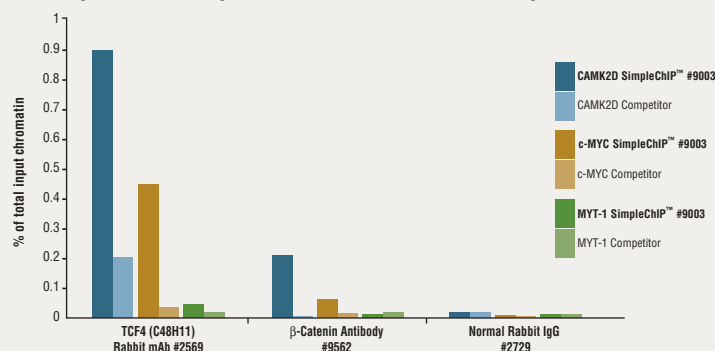
Figure 2.

SimpleChIP™ digested chromatin is more conducive to immunoprecipitation than sonicated chromatin. Chromatin immunoprecipitations were performed with 10 μ g of cross-linked HCT116 chromatin and the indicated antibodies, using SimpleChIP™ Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads) #9003 or a competitor's sonication-based ChIP Kit. The enriched DNA was quantified by qPCR. The amount of immunoprecipitated DNA in each sample is presented as a percent of the total input chromatin. The experiment was repeated at least three times with similar results.

A. PCR primers are specific for the transcriptionally active GAPDH and c-MYC genes and the inactive MYT-1 gene.



B. PCR primers are specific for known TCF4 binding sites in the CAMK2D and c-MYC genes, and a region of the MYT-1 gene that does not contain a TCF4 binding site.



New ChIP Kits

SimpleChIP™ Enzymatic Chromatin IP Kit (Agarose Beads) #9002
SimpleChIP™ Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads) #9003

New Companion Products

6-Tube Magnetic Separation Rack #7017
ChIP-Grade Protein G Magnetic Beads #9006
ChIP-Grade Protein G Agarose Beads #9007

マウス繊維芽細胞m5Sを用いたHistone H3のChIP解析

使用製品 #9003: SimpleChIP™ Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads)
#9006: ChIP-Grade Protein G Magnetic Beads

プロトコール

CST社 #9003 ChIP Kitに添付の推奨プロトコールに従って行った。(real-time PCRの反応組成のみ異なる)

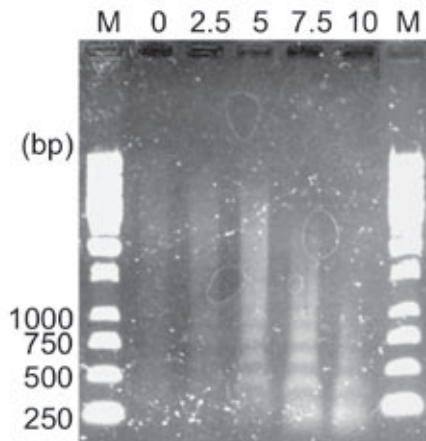
- 1) 8×10^6 個のマウス繊維芽細胞m5Sを用い、Micrococcal Nuclease溶液0-10 μ Lを加え、37°Cで20分間クロマチンを消化する。
- 2) DNAを精製後、アガロースゲル電気泳動によりクロマチンDNAのサイズを確認する。
- 3) 1/4量のクロマチン調製液 (2×10^6 個相当)と各種修飾ヒストンに対するマウスモノクローナル抗体(非売品、共同研究者より分与して頂いたもの) 2 μ Lを用いてChIPを行う。
- 4) 転写活性遺伝子 β -tubulinのプロモーター領域、転写不活性ヘテロクロマチン領域major satellite repeats, minor satellite repeats領域に対するプライマーを用いてreal-time-PCR解析を行う。

考察

ChIPに必要なほぼ全ての試薬が揃っているので、初めてChIPをする研究者には大変便利であると思われる。クロマチン断片化についてもnuclease処理を採用しているので、失活さえ気をつければ再現性の良い断片化クロマチンDNAを得ることができて良い。さらに、beadsもmagnetic beadsを採用しており、サンプルのロスをあまり心配すること無く操作ができる。これまで蓄積されたChIPに関するプロトコールの集大成といえるのではないかな。

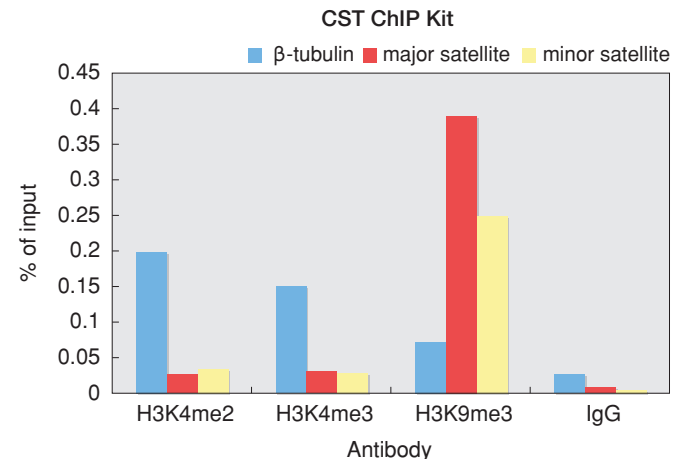
結果

クロマチンDNA断片化の確認



この検討により、nuclease溶液を7.5 μ L使用することにした。

real-Time PCRによるChIP解析



転写活性遺伝子に高頻度で見られるヒストンH3リシン4のジメチル化、トリメチル化は β -tubulinのプロモーター領域で見られ、転写不活性なヘテロクロマチン領域に特徴的なヒストンH3リシン9トリメチル化はmajor satellite repeats, minor satellite repeats領域でレベルが高かった。

従来法とCST社プロトコールのChIPアッセイ比較検討

NIH3T3細胞 (1×10^7) を用いて、#9003に付属の抗Histone H3抗体によるChIPアッセイを行い、これまで独自に条件設定した方法 (Conventional method)^(1, 2) と比較検討を行った。

使用製品 #9003 : SimpleChIP™ Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads)
#9006 : ChIP-Grade Protein G Magnetic Beads

プロトコール

従来法 (Conventional method)^(1, 2)

- 1) 1% Formaldehydeにて室温で10分間、タンパク質とDNAをクロスリンクさせる。
- 2) PBSで2回洗浄する。
- 3) Lysis buffer (25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 140 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 3 mM EDTA, 1 mM PMSF) で細胞を溶解し、氷上で10分間インキュベートする。
- 4) 超音波処理後、遠心分離し、上清にMicrococcal Nucleaseを加えてクロマチンを断片化し、再度超音波処理する。
- 5) クロマチン溶液にSalmon sperm DNAとプロテインA-Sepharoseを加え、2時間インキュベート後、抗Histone H3抗体と一晩反応させる。
- 6) プロテインA-Sepharoseビーズを加え、4℃で2時間インキュベートする。
- 7) 遠心分離後、wash buffer 1 (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA)、wash buffer 2 (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA)、およびwash buffer 3 (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.25 M LiCl, 1% Nonidet P-40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA) で4℃で各10分間、1回ずつ洗浄後、さらに、TEバッファで3回洗浄する。
- 8) 1% SDS + 0.1 M NaHCO で免疫沈降物を溶出後、65℃で4時間脱クロスリンクさせる。

CST社プロトコール

- 1) 1% Formaldehydeにて室温で10分間、タンパク質とDNAをクロスリンクさせる。
- 2) PBSで2回洗浄する。
- 3) バッファーA + DTT + プロテアーゼ阻害剤カクテル + PMSF混合液に懸濁し、氷上で10分間インキュベートする。
- 4) 超音波処理後、遠心分離し、沈殿物をバッファーB + DTT混合液で1回洗浄後、再懸濁し、Micrococcal Nucleaseを加えて37℃で20分間クロマチンを断片化する。
※CST社オリジナルプロトコールでは、Micrococcal Nuclease処理後、超音波処理を行います。
- 5) 抗Histone H3抗体と4℃で4時間から一晩反応させる。
- 6) プロテインG磁気ビーズ#9006を加え、4℃で2時間インキュベートする。
- 7) Low salt wash (1×ChIPバッファ) で4℃で各5分間、3回洗浄後、さらに、High salt wash (1×ChIPバッファ + 5 M NaCl) で1回洗浄する。
- 8) 1×ChIP溶出バッファで溶出後、5 M NaCl + Proteinase Kで65℃で2時間脱クロスリンクさせる。

結果

Lysate作製

調製したLysateのうち、1/100を用いてDNAの解析を行ったところ、共に1 kb以下の断片化したDNAが得られていることが確認された(図1)。また、回収されたDNAはCSTの方法(CST)が1.6倍近く高率であった(表1)。これは、CSTの方法が、核を単離した後に回収するため、従来法(Conv.)に比べて回収率が良くなったのではないかと予想される。

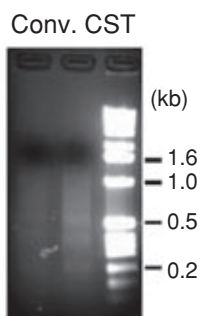


図1. 2%アガロース電気泳動による解析

表1. Lysateの分光学的解析

Method	Conc. (ng/μl)	Total (μg)	260/280
Conv.	9.47	47.4	1.78
CST	15.21	76.1	2.1

ChIP解析

#9003に付属の抗Histone H3抗体ならびにコントロールIgGを用いてChIPアッセイを行い、RPL30プライマーを用いた通常のPCRおよび定量PCRにより解析を行った。CSTの方法は磁気ビーズによるIPのため、プロテインGビーズを用いた従来法に比べて非常にバックグラウンドが低く(図2)、またビーズ洗浄の時間も短縮できた。さらに、抗Histone H3抗体によるChIPは、共に同じレベル結果が得られた(図3)。

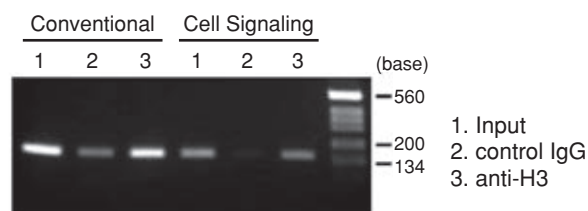


図2. Standard PCRによるChIP解析

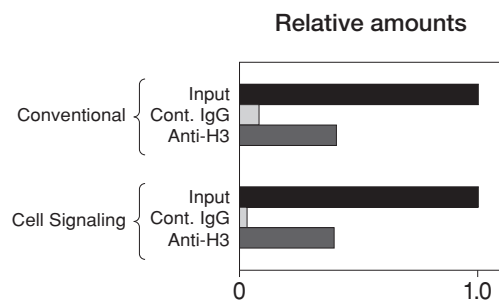


図3. Real-time PCRによるChIP解析

考察

Cell Signaling Technology の#9003 kitを用いることにより、回収率が高くなるとともに、バックグラウンドが低下し、本kitが非常に有用であることが判明した。(コメント：今後、是非本kitを導入していきたいと考えている。)

参考文献：1) Y. Onishi and R. Kiyama, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 8163-8171.

2) Y. Onishi et. al., *Mol. Cell. Biol.*, 2008, 28, 3477-3488.

資料提供：産業技術総合研究所 生物機能工学研究部門 生物時計研究グループ 大西芳秋様

細胞数とmicrococcal nucleaseの量

クロマチン調製には、細胞数が大変重要です。CST社では 4×10^7 個の細胞からクロマチン1.0 mLを調製し、micrococcal nuclease 5 μ Lで消化します。クロマチン消化に用いるmicrococcal nuclease量と細胞数の比率は、クロマチンの適切サイズ (150-1000塩基対) への断片化に重要です。この比率は細胞の種類によって若干異なりますが、 1×10^7 の細胞数に対し、micrococcal nuclease 1.25 μ Lの割合がクロマチン消化に最適で、かつ再現性の高いことが社内試験から分かっています。

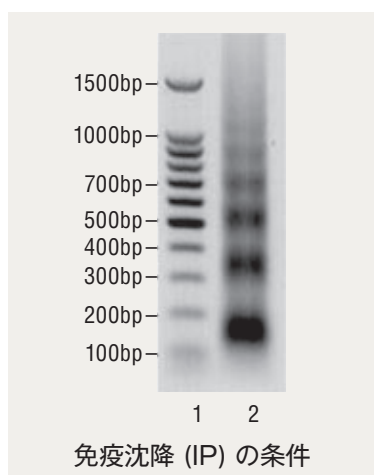
少ない細胞数で適切な断片化を模索中ですが、現在推奨している最小細胞数は 1×10^7 個です。(2009年4月時点)

ソニケーション (micrococcal nuclease処理後)

Cell Lysis Buffer AとBではクロスリンクした細胞は完全には可溶化しません。さらに、ヌクレアーゼ消化はとても穏やかで、核膜を十分に可溶化しません。従って、クロマチンを溶液に放出するために、核膜を破碎させるわずかなソニケーションが必要です。

クロマチン濃度と泳動結果

下図はエチジウムブロマイドで染色した1%アガロースゲルにおけるクロマチンの泳動結果です。レーン1はDNAマーカー、レーン2はクロマチンDNAサンプルです。クロマチンDNAはモノ (mono-)、ジ (di-)、トリ (tri-)、テトラ (tetra-)、ペンタ (penta-) スクレオソーム単位 (150-1000塩基対) にせん断されます。Chromatin/DNA濃度をOD₂₆₀で測定したところ、様々な細胞種で大体125-250 μ g/mLになりました。クロマチンの泳動に問題がある場合は、プロトコールのAppendix Aをご参照ください。



CST社では全ての標的タンパク質に対し、IP反応一回につき 4×10^6 の細胞数相当、あるいは10-20 μ gのクロマチンを使用しています。しかし、ヒストンのIPの場合、 1×10^6 の細胞数相当、あるいは2.5-5 μ gのクロマチンでも可能です。一般的に、IPの準備をするとき、IP反応用500 μ Lを調製するのに、クロマチンを1 \times ChIP Bufferで希釈し、抗体と一晩インキュベートしますが、CST社のプロトコールではクロマチンを希釈する必要はございません。希釈しないクロマチンをご使用いただけます。

抗体のコンディションについて

CST社でChIP用に検証済みの抗体のデータシートには、IPに必要な量が記載されています。CST社のSimpleChIP™ Enzymatic Chromatin IP Kitと共に使用される場合の抗体希釈率が“Recommended Antibody Dilutions”の下にございます。また、バリデーションに使用した抗体の正確な量とクロマチン量をデータシートのChIPデータの説明文に記載しています。CST社内試験では、 4×10^6 の細胞数 (10-20 μ gのクロマチン) に対して最適な抗体量を決定するため、抗体のタイトレーションを必ず行います。

もし抗体がCST社でChIP用に検証済みでない場合、ChIPアッセイでの抗体性能を保証できません。未検証の抗体をChIPアッセイで試したい場合、通常のIPで検証済みの抗体を使用されることをお勧めします。また、ChIP反応一回につき、1-5 μ gの抗体で始めることをお勧めします。CST社内でChIP用としてまだ未検証の抗体をChIPに試して成功された場合は、ぜひお知らせください。

プロテインG アガロースとプロテインG 磁気ビーズ

両ビーズ共にSimpleChIP™ Enzymatic Chromatin IP Kitでご使用いただけます。両ビーズの比較実験では、どちらも低バックグラウンドで特異的バンドが得られています。アガロースビーズは従来よりIPに使われてきたビーズですが、磁気ビーズはより利便性が高いビーズです。磁気ビーズは磁石側のチューブ側面に付着するので、洗浄バッファの吸引除去時のロスがなく、遠心分離も必要ありません。但し、6-Tube Magnetic Separation Rack #7017 が必要です。

PCR

SimpleChIP™ Enzymatic Chromatin IP Kitのコントロール用Histone H3 Antibody #2650とRPL30プライマーをご使用いただいた場合、全インプットクロマチンの0.5-2%の間でRPL30プロモーターの増加がみられます。PCRの結果は用いるPCRプライマーと抗体により変わります。実験でPCR反応が適切に行われ、得られたシグナルが妥当なものかを確認するために、適切なポジティブコントロールとネガティブコントロールをご使用ください。

CST社内試験では、全インプットクロマチンの2%で開始し、定量リアルタイムPCRと4ポイント、5倍希釈系列を用いて抗体をバリデートします。この希釈系列 (2%、0.4%、0.08%、0.016%インプット) でC_T値の標準曲線をそれぞれのインプットクロマチンqPCRサンプルごとに作成し、これによりDNA増幅をIPサンプルごとに全インプットクロマチンのパーセンテージとして表示された値に測定したC_T値を返還することによって算出できます。

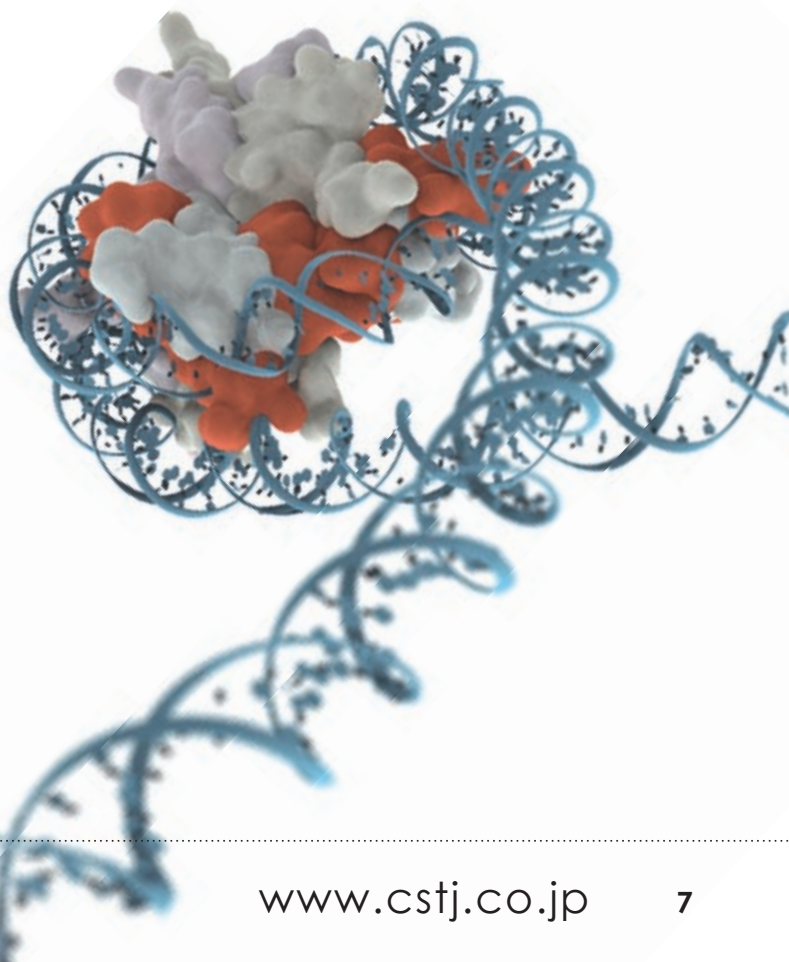
組織サンプルでの使用

SimpleChIP™ Enzymatic Chromatin IP Kits (#9002、#9003) は、現時点では組織サンプルでの使用を推奨しておりません。共同研究者から提供された大変期待が持てる予備データはありますが、プロトコール上の変更があります。現在CST社は、組織サンプルに最適化したChIP Kitの開発に取り組んでいます。

Appendix A: クロマチン断片化の最適化

クロスリンクされたDNAを150-900 bpの長さに断片化するための最適条件は、細胞タイプと細胞濃度、およびMicrococcal Nucleaseの濃度に依存します。下記は、特定の細胞タイプと細胞濃度に対する、クロマチン断片化の最適条件を決定するためのプロトコールです。

- 1 CST社推奨プロトコールのSection Bのステップ1-6に従い、 4×10^7 個の細胞を用いてクロスリンクされた細胞核を調製してください。
- 2 Section Bのステップ6の細胞核調製液200 μ Lを遠心用チューブ5本に分注し、氷上に置いてください。
- 3 Micrococcal Nuclease 5 μ Lを1×バッファー-B + DTT混合液20 μ Lに加えてください (酵素を5倍に希釈します)。
- 4 ステップ2の各チューブに、希釈したMicrococcal Nuclease 0 μ L、2.5 μ L、5 μ L、7.5 μ L、10 μ Lを加え、チューブを数回転倒混合し、37°Cでよく混ぜ合わせながら、20分間インキュベートしてください。
- 5 0.5M EDTA 20 μ Lを加えることで断片化を停止し、チューブを氷上に置いてください。
- 6 13,000 rpm、4°Cで1分間遠心して細胞核を沈澱させ、上清を除去してください。
- 7 細胞核を1×ChIPバッファー + PIC + PMSF混合液200 μ Lに再懸濁し、氷上で10分間インキュベートしてください。
- 8 溶解物を数回超音波処理し、核膜を破碎してください。超音波処理の間隔は、サンプルを氷上で30秒間インキュベートしてください。
 - 細胞核を完全に溶解するための最適条件は、超音波処理の前後に光学顕微鏡でサンプルを観察することで決定できます。
 - VirTis Virsonic 100 Ultrasonic Homogenizer/Sonicatorを6に設定し (1/8-inch probe)、20秒間の超音波処理を3回行うことで、HeLa細胞核は完全に溶解されます。
 - Dounce homogenizerで20回処理を行っても細胞核は溶解されますが、完全な溶解でない可能性があります。
- 9 10,000 rpm、4°Cで10分間遠心してください。
- 10 超音波処理した各溶解物50 μ Lを新しい遠心用チューブに移してください。
- 11 各サンプル50 μ Lに、nuclease-free water 100 μ L、5M NaCl 6 μ L、RNase A 2 μ Lを加えてください。ボルテックスして、37°Cで30分間インキュベートしてください。
- 12 RNase Aで消化した各サンプルに、Proteinase K 2 μ Lを加えてください。ボルテックスして、65°Cで2時間インキュベートしてください。
- 13 1 kb DNAマーカートともに、各サンプル20 μ Lを1%アガロースゲルで電気泳動し、DNAフラグメントサイズを測定してください。
- 14 DNAサイズ150-900 bpが得られた断片化の条件を確認してください (ヌクレオソーム1-5個; データシートFigure 1参照)。本プロトコールによる目的サイズのDNAフラグメントを産出したMicrococcal Nucleaseの量は、目的サイズのDNAフラグメントを得るために 4×10^7 個の細胞に加える量と同量となっています。例えば、本プロトコールで希釈したMicrococcal Nuclease 5 μ Lが150-900 bpサイズのDNAフラグメントを産出したとすると、Section Bのステップ7においても、5 μ LのMicrococcal Nucleaseを 4×10^7 個の細胞に加えてクロマチンを断片化することになります。
- 15 目的サイズのDNAフラグメントが得られなかった場合は、Micrococcal Nucleaseの量を調整しながら本プロトコールを繰り返してください。



Appendix B: トラブルシューティングガイド

問題	原因	推奨する対応策
断片化したクロマチンの濃度が極めて低い。	クロマチン断片化の際に、十分な細胞が加えられていない、または断片化後、細胞核が完全に溶解していない。	クロマチンの濃度が200 µg/mL程度の場合は、20 µg/IPになるまでクロマチンを加えてください。 クロスリンクの前にカウント用に別途用意したプレートの細胞数を数えてください。必要に応じて、超音波処理の前後に光学顕微鏡で観察し、細胞核が完全に溶解していることを確認してください。
クロマチンの断片化が不十分で、フラグメントが大きすぎる (900 bp以上)。	クロスリンクが過剰である。10分以上のクロスリンク処理は、クロマチン断片化を阻害する恐れがある。 細胞数が多すぎる、またはMicrococcal Nucleaseの量が足りない。	クロスリンク処理の時間を10分間に短縮してください。 クロスリンクの前に、カウント用に別途用意したプレートの細胞数を数え、Appendix Aに従ってクロマチン断片化の最適化をしてください。
クロマチンの断片化が進行しすぎており、フラグメントが小さすぎる (全てヌクレオソーム1個分に相当する150 bp)。クロマチンがヌクレオソーム1個分のサイズに完全に断片化されると、特に150 bp以上のアンプリコンの定量PCRシグナルを減少させる。	細胞数が少ない、またはMicrococcal Nucleaseの量が多い。	クロスリンクの前に、カウント用に別途用意したプレートの細胞数を数え、Appendix Aに従ってクロマチン断片化の最適化をしてください。
PCR産物が得られない、または非常に僅かである。	PCR反応液に十分なDNAが加えられていない。または、PCR条件が最適でない。 増幅領域がヌクレオソーム・フリー領域に渡っている。 十分なクロマチンがIPに加えられていない。または、クロマチンの断片化が進行しすぎている。	PCR反応液にDNAを追加してください。または、PCRサイクル数を増やしてください。 クロスリンクし、断片化したクロマチンから精製したDNAを用いて、PCR条件をプライマーに対して最適化してください。異なるプライマーを設計し、アンプリコンの長さが150 bp以下になるようにしてください (CST社推奨プロトコールSection Hのプライマー設計に対する推奨を参照してください)。 上記で同じ問題を取り扱っているので、そちらを参照してください。
ポジティブコントロールのHistone H3-IP RPL30のPCR産物が得られない。	IP反応液に十分なクロマチンまたは抗体が加えられていない。または、IPのインキュベーションが短すぎる。 Protein Gビーズからのクロマチン溶出が不完全である。	各IP反応液に、少なくともクロマチン20 µg、抗体10 µLを加え、一晩インキュベートした後、Protein Gビーズを加え、さらに2時間インキュベートしてください。 65°Cでビーズの懸濁状態を保つよう頻りに攪拌しながら、Protein Gビーズからクロマチンを溶出してください。
ネガティブコントロールのRabbit IgG-IPとポジティブコントロールのHistone H3-IPのPCR産物が同量。	IP反応液にクロマチンまたは抗体を加えすぎている。 PCR反応液にDNAを加えすぎている。または、PCRサイクル数が多すぎる。	クロマチン50 µg、抗体10 µLを上限に各IP加えてください。クロマチンまたは抗体をIP反応液に加えすぎると、バックグラウンドが高くなります。 PCR反応液に加えるDNAを少なくするか、PCRサイクル数を減らしてください。線形増幅領域でPCR産物の分析を行わないと、希釈系列を作成しても、濃度依存性を正確に調べることができません。
抗体-IPのPCR反応液からPCR産物が得られない。	PCR反応液にDNAが十分に加えられていない。 IP反応液に抗体が十分に加えられていない。 IPに不適切な抗体である。	PCR反応液にDNAを追加するか、PCRサイクル数を増やしてください。 通常はIP反応液に1-10 µgの抗体を加えますが、実際に必要な量は抗体によって大きく異なります。IPに加える抗体の量を増やして再検討してください。 通常のIP反応で抗体が使えることを確認してください。

最新のCST社ChIP用抗体はwww.cstj.co.jpでご確認ください。

Antibody and Related Reagents for Signal Transduction Research

■ 輸入販売元

 **CST ジャパン株式会社**
Cell Signaling Technology®

〒103-0015

東京都中央区日本橋箱崎町20-7 ITOビル2階

TEL : 03-5652-0213 / FAX : 03-3249-1170

URL : www.cstj.co.jp E-mail : info@cstj.co.jp

■ 取扱店