

**Dynabeads Protein A/Protein G/Mouse IgG を用いた ChIP 法 研究者の声【6】**  
東京大学 岸雄介先生 ご執筆

**5. プロトコル紹介**

**【1】 IP されやすい抗原に対するプロトコル (抗原量が多い、DNA との結合が強い、免疫反応が強い、非特異反応が多いなど)**

抗体例：H3K27me3 抗体 (Millipore, #07-449)、H3K27ac 抗体 (MBL, MABI0309)

**<Fixation>**

- ↓細胞を培地、PBS などで懸濁
- ↓Add PFA (final 0.5%)
- ↓室温 10 min
- ↓Spin, 3000 rpm, 5 min
- ↓PBS wash
- ↓Spin, 3000 rpm, 5 min
- ↓Remove sup
- ↓Freeze with Liquid N<sub>2</sub>
- ↓-80°C

**Day 1**

**<Beads の blocking>**

- ↓Beads 20 μl/IP (×sample 数) μl + pre-clear 用 20 μl Beads/sample を low-binding tube へ
- ↓0.5% BSA/PBS で wash×1
- ↓250 μl の 0.5% BSA/PBS で suspend
- ↓4°C, rotation, 1 h (~O/N)

**<Antibody beads 作製>**

- ↓Blocking した beads に抗体を添加 (pre-clear 用は別にとっておく)
- ↓4°C, rotation, O/N

**Day2**

**<Sonication>**

- ↓ChIP Lysis buffer で suspend
  - \*容量は sonicator によって変える
- ↓Sonication
  - \*Sonicator に合わせて強度を検討する必要あり
  - <- Agarose gel electrophoresis で fragment size をチェック
- ↓Dilute with Dilution buffer
  - \*容量は sonication で使った容量の 10 倍以上

**<pre-clear>**

- ↓Blocking 済みの beads 20 μl/IP 添加
- ↓4°C, rotation > 1h
- ↓Magnetic stand に立てて sup のみ回収

**<抗体を結合させた beads の wash>**

- ↓Ab binding beads を magnetic stand (invitrogen 社製) に立てる
- ↓0.5% BSA/PBS 500 μl × 3回 wash
- ↓0.5% BSA/PBS 20 μl/IP で suspend

**<クロマチンと抗体を結合させた beads の反応 (Immunoprecipitation)>**

- ↓Sup を実験に合わせて分注  
例)  
Input 用: 50 μl

IP 用: 500  $\mu$ l  
(Input は-20°C保存)  
↓ Ab beads を 20  $\mu$ l/IP で添加  
  
↓ 4°C, rotation, O/N

### Day3

#### <Wash>

Buffer 類は全て 4°Cに冷やしておく。全てのステップで magnetic stand 使用。

↓ Wash buffer wash 500  $\mu$ l  $\times$  8  
↓ TE + 50 mM NaCl wash 500  $\mu$ l  $\times$  1

#### <Elution>

↓ Direct elution buffer 200  $\mu$ l 添加して 65°C, 15 min

\*Input (忘れないように!) にも Direct elution buffer (150  $\mu$ l) を加え、final 200  $\mu$ l になるようにする。

#### <ProK 処理>

↓ Proteinase K (10 mg/ml) 5  $\mu$ l 添加して 37°C, 6 h~O/N

### Day3 or 4

#### <脱リンク>

↓ 65°C incubate 6 h~O/N

### Day4

#### <DNA 精製>

↓ フェノール(25)・クロロホルム(24)・イソアミルアルコール(1) mix を等量(~200  $\mu$ l) 添加し激しく mix  
↓ Spin, 15000rpm, 15min, 室温  
↓ Sup (~200  $\mu$ l 程度) 回収  
↓ +1/10 量の 3M NaOAc, + 2.5×量の EtOH + glycogen, 1  $\mu$ l  
↓ Spin 15000rpm, > 30 min, 4°C  
↓ 70%EtOH で wash  $\times$  1  
↓ ddH<sub>2</sub>O で suspend

**【2】 IP されにくい抗原に対するプロトコル (抗原量が少ない、DNA との結合が弱い、免疫反応が弱い、特異性が高いなど)**

抗体例 : H2Aub 抗体 (Millipore, #05-678)、Ring1B 抗体 (Cell Signaling Technology, #5694)、Mbd3 抗体 (Santa Cruz, sc-9402)、Mbd3 抗体 (abcam, ab157464)

#### <Fixation>

- ↓細胞を培地、PBS などで懸濁
- ↓ Add FA (final 1%)
- ↓ 室温, 10 min
- ↓ Add glycine (final 125 mM)
- ↓ Spin, 3000 rpm, 5 min
- ↓ PBS wash
- ↓ Spin, 3000 rpm, 5 min
- ↓ Remove sup
- ↓ Freeze with Liquid N2
- ↓ -80°C

#### Day 1

##### <Beads の blocking>

- ↓ Beads 20  $\mu$ l/IP ( $\times$  sample 数)  $\mu$ l + pre-clear 用 20  $\mu$ l Beads/sample を low-binding tube へ
- ↓ 0.5% BSA/PBS で wash  $\times$  1
- ↓ 250  $\mu$ l の 0.5% BSA/PBS で suspend
- ↓ 4°C, rotation, 1 h (~O/N)

##### <Antibody beads 作製>

- ↓ Blocking した beads に抗体を添加 (pre-clear 用は別にとっておく)
- ↓ 4°C, rotation, O/N

#### Day2

##### <Sonication>

- ↓ Koseki RIPA buffer で suspend
  - \*容量は sonicator によって変える
- ↓ Sonication
  - \*Sonicator に合わせて強度を検討する必要あり
  - <- Agarose gel electrophoresis で fragment size をチェック
- ↓ Dilute with Abcam RIPA

##### <pre-clear>

- ↓ Blocking 済みの beads 20  $\mu$ l/IP 添加
- ↓ 4°C, rotation > 1h
- ↓ Magnetic stand に立てて sup のみ回収

##### <抗体を結合させた beads の wash>

- ↓ Ab binding beads を magnetic stand (invitrogen 社製) に立てる
- ↓ Abcam RIPA buffer 500  $\mu$ l  $\times$  3回 wash
- ↓ Abcam RIPA buffer 20  $\mu$ l/IP で suspend

##### <クロマチンと抗体を結合させた beads の反応 (Immunoprecipitation)>

- ↓ Sup を実験に合わせて分注
  - 例)
  - Input 用: 50  $\mu$ l
  - IP 用: 500  $\mu$ l
  - (Input は-20°C保存)
- ↓ Ab beads を 20  $\mu$ l/IP で添加

↓ 4°C, rotation, O/N

### Day3

#### <Wash>

Buffer 類は全て 4°Cに冷やしておく。全てのステップで magnetic stand 使用。

↓ Low buffer wash, 500  $\mu$ l  $\times$  3

↓ High buffer wash, 500  $\mu$ l  $\times$  1

#### <Elution>

↓ Direct elution buffer 200  $\mu$ l 添加して 65°C, 15 min

\*Input (忘れないように!) にも Direct elution buffer (150  $\mu$ l) を加え、final 200  $\mu$ l になるようにする。

#### <ProK 処理>

↓ Proteinase K (10 mg/ml) 5  $\mu$ l 添加して 37°C, 6 h~O/N

### Day3 or 4

#### <脱リンク>

↓ 65°C, 6 h~O/N

### Day4

#### <DNA 精製>

↓ フェノール(25)・クロロホルム(24)・イソアミルアルコール(1) mix を等量(~200  $\mu$ l) 添加し激しく mix

↓ Spin, 15000rpm, 15min, 室温

↓ Sup (~200  $\mu$ l 程度) 回収

↓ +1/10 量の 3M NaOAc, + 2.5×量の EtOH + glycogen, 1  $\mu$ l

↓ Spin 15000rpm, > 30 min, 4°C

↓ 70% EtOH で wash  $\times$  1

↓ ddH<sub>2</sub>O で suspend

---

### Buffer

- Koseki RIPA buffer

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

1 mM EDTA 140 mM NaCl

1% TritonX-100

0.1% SDS

0.1% sodium deoxycholate (DOC)

- Abcam RIPA buffer (RIPA buffer in Abcam protocol)

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

150 mM NaCl

2 mM EDTA (pH 8.0)

1% NP-40

0.5% Sodium Deoxycholate

0.1% SDS

- Low buffer (Wash buffer in Abcam protocol)

0.1% SDS

1% Triton X-100

2 mM EDTA (pH 8.0)

150 mM NaCl

20 mM Tris-HCl (pH 8.0)

- High buffer (Final wash buffer in Abcam protocol)

0.1% SDS

1% Triton X-100

2 mM EDTA (pH 8.0)

500 mM NaCl

20 mM Tris-HCl (pH 8.0)

- Direct elution buffer

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

5 mM EDTA

300 mM NaCl

0.5% SDS

- Wash buffer

50 mM Hepes-KOH (pH 7.6)

500 mM LiCl

1 mM EDTA (pH 8.0)

1% NP-40

0.7% Na-Deoxycholate

- ChIP Lysis Buffer

1% SDS

10 mM EDTA

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

- ChIP Dilution Buffer

0.01% SDS

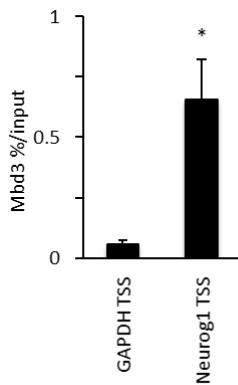
1.1% Triton X-100

1.2 mM EDTA

16.7 mM Tris-HCl (pH 8.0)

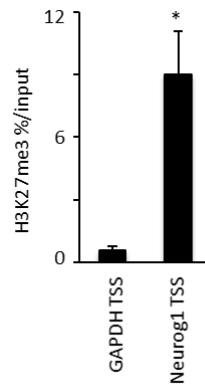
167 mM NaCl

## 6. 実験結果



(Means +/- SEM, n = 4, \*p < 0.05\_Student non-paired t-test)

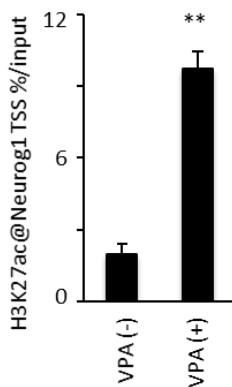
(A) マウス大脳新皮質神経幹細胞in vitro初代培養細胞（胎生11日目から採取し、その後9日間培養）にてChIP  
Dynabeads Protein GとSanta Cruz, anti-Mbd3, sc-9402を使用



(Means +/- SEM, n = 3, \*p < 0.05\_Student non-paired t-test)

(B) CD133強陽性のマウス大脳新皮質神経幹細胞を胎生11日目あるいは12日目にFACSにて採取し、ChIP  
Dynabeads Protein AとMillipore, anti-H3K27me3, 07-499を使用

### Kishi et al., 未発表データ



(Means +/- SEM, n = 3, \*\*p < 0.01\_Student non-paired t-test)

マウス大脳新皮質神経幹細胞in vitro初代培養細胞（胎生12日目から採取し、その後9日間培養し、培養皿に播種後、VPAで処理）にてChIP  
Dynabeads Mouse IgGとMBL, anti-H3K27ac, MABI0309を使用  
Tsuboi et al., Dev. Cell, 2018を改変

### Tsuboi et al., *Developmental Cell*, 2018

## 7. 今回ご紹介いただいた手法を用いた論文を教えてください。

(いずれも若干のプロトコル変更あり)

1. Hirabayashi, Y., Suzki, N., Tsuboi, M., Endo, T. A., Toyoda, T., Shinga, J., Vidal, M. and Gotoh, Y. (2009). Polycomb limits the neurogenic competence of neural precursor cells to promote astrogenic fate transition. *Neuron* 63, 600–613. doi:10.1016/j.neuron.2009.08.021.
2. Morimoto-Suzki, N., Hirabayashi, Y., Tyssowski, K., Shinga, J., Vidal, M., Koseki, H. and Gotoh, Y. (2014). The polycomb component Ring1B regulates the timed termination of subcerebral projection neuron production during mouse neocortical development. *Development* 141, 4343–4353. doi:10.1242/dev.112276.
3. Tsuboi, M., Kishi, Y., Kyojuka, W., Koseki, H., Hirabayashi, Y. and Gotoh, Y. (2018). Ubiquitination-independent repression of PRC1 targets during neuronal fate restriction in the developing mouse neocortex. *Developmental Cell* 47(6), 758-772. doi: 10.1016/j.devcel.2018.11.018.

株式会社ベリタス 〒105-0013 東京都港区浜松町 1-10-14 住友東新橋ビル 3 号館 5F  
TEL 03-5776-0078 FAX 03-5776-0076  
技術的なお問い合わせは：TEL 03-5776-0040 E-mail [techservice@veritastk.co.jp](mailto:techservice@veritastk.co.jp)