

# クロマチン免疫沈降法プロトコール

(ChIP Assay : Chromatin Immunoprecipitation Assay)

## 【目次】

1. はじめに
2. 原理とストラテジー
3. 準備するもの
4. プロトコール
5. トラブルシューティングガイド
6. 実験例
7. おわりに
8. 参考文献
9. メモ



※お問い合わせはビーエム機器株式会社へお願いいたします。

**BMBio**  **ビーエム機器株式会社**

〒135-0016 東京都江東区東陽2丁目2番20号 東陽駅前ビル

商品の仕様・在庫・ご注文についてのお問い合わせ

TEL : 03-6666-5902 FAX : 03-5677-4081

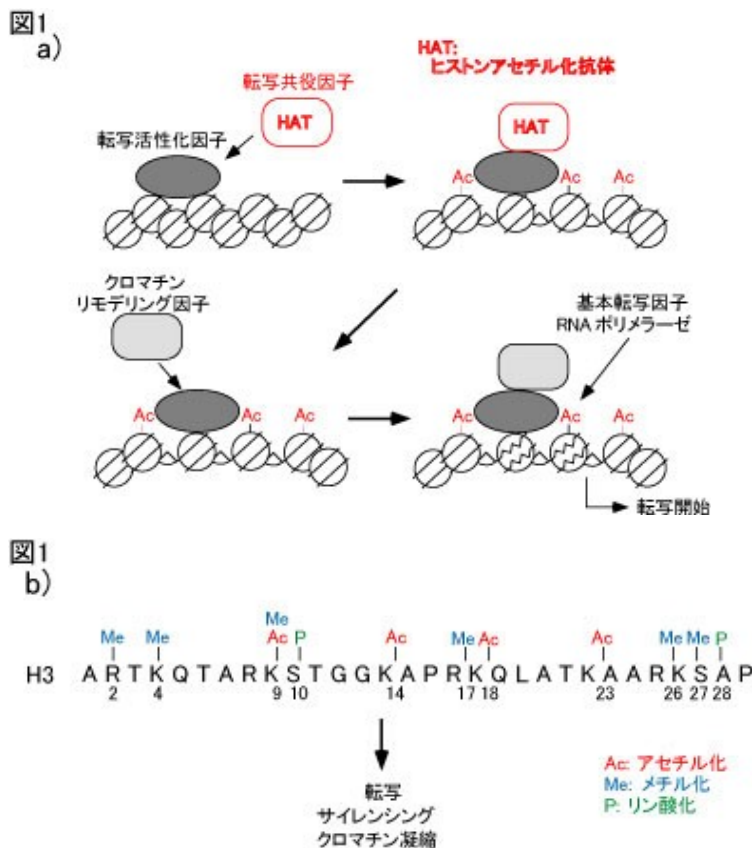
WEB: [www.bmbio.com/](http://www.bmbio.com/)

# 1. はじめに

クロマチン免疫沈降法 (chromatin immunoprecipitation: ChIP) は個々のタンパク質と特定のゲム領域との結合を検出するための強力な汎用性の高い方法です。クロマチン免疫沈降法は、当初、開いたクロマチン状態と相関するヒストンのアセチル化を検出するのに多用されました。しかしながら、現在では、さまざまな DNA 結合性転写因子や非結合性タンパク質のクロマチン上での局在を解析するのにも用いられており、遺伝子発現調節・クロマチン構造変換などの研究を進める上で不可欠な方法となっています。本技術情報では、動物細胞を用いたクロマチン免疫沈降法について、原理と方法をご紹介します(他のプロトコールも参照してください<sup>1) 2)</sup>)。

# 2. 原理とストラテジー

近年、転写誘導の際に、ヒストン修飾によるクロマチン構造変換が重要な働きをすることが知られています(図1a)。DNA 結合性転写活性化因子が標的遺伝子に結合すると、転写共役因子がリクルートされます。転写共役因子はヒストン・アセチル基転移酵素活性を持っており、周辺のヒストンをアセチル化します。これが引き金となりクロマチン・リモデリング因子がリクルートされ、クロマチンのリモデリングが誘導され、基本転写因子とRNAポリメラーゼによる転写が開始します。ヒストンはアセチル化以外にもメチル化やリン酸化などの修飾を受け、転写の制御・サイレンシング・クロマチン凝縮などを引き起こすことが知られています(ヒストン暗号仮説; 図1b)。



## 図1. ヒストンの修飾とその機能

### a) ヒストン修飾とクロマチン構造変換による転写制御

DNA 結合性転写活性化因子が標的遺伝子に結合すると、転写共役因子がリクルートされます。転写共役因子はヒストン・アセチル基転移酵素活性を持っており、周辺のヒストンをアセチル化します。これが引き金となりクロマチン・リモデリング因子がリクルートされ、クロマチンのリモデリングが誘導され、基本転写因子とRNA ポリメラーゼによる転写が開始します。

### b) ヒストン H3 の N 末端の修飾。

ヒストンの N 末端のさまざまなアミノ酸残基はアセチル化・メチル化・リン酸化の修飾を受けます。ここではヒストン H3 を例として挙げました。それぞれの修飾は別個の分子により認識され、転写の制御・サイレンシング・クロマチン凝縮などを引き起こします。

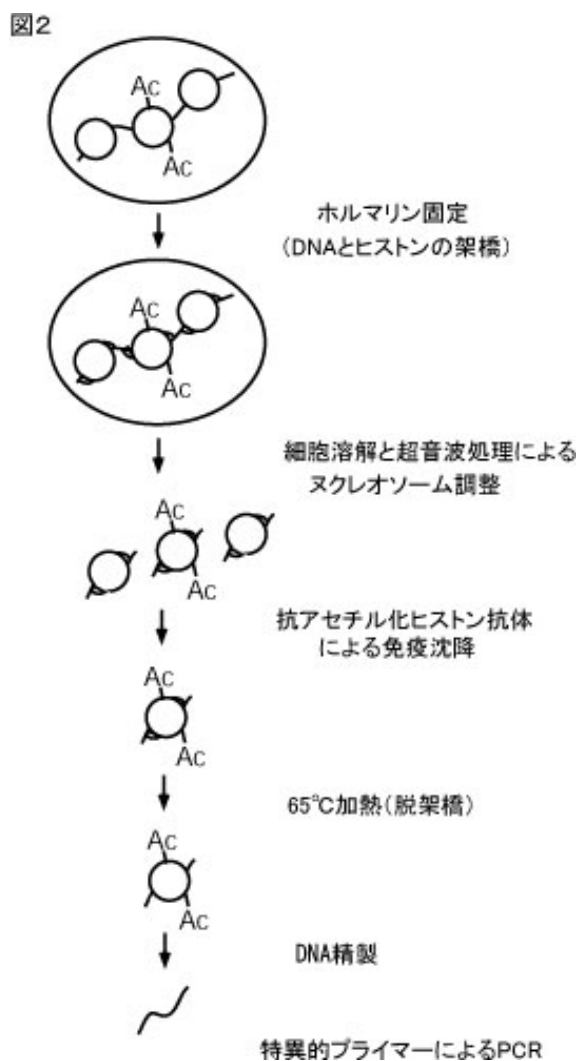


図2. クロマチン免疫沈降法の原理

### 3. 準備するもの

#### 1) 機器

- ・ 小型回転培養機(ローテーター)
- ・ 密閉式超音波細胞破碎装置 [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

#### 2) 試薬

##### ■ 使用した抗体

- ・ [抗アセチル化ヒストン H3 抗体](#) Upstate 社 [Catalog\(#06-599\)](#)  
ヒストン H3 の 1-20 アミノ酸残基のアセチル化ペプチド(K9,K14 のアセチル化)
- ・ [抗アセチル化ヒストン H4 抗体](#) Upstate 社 [Catalog\(#06-866\)](#)  
ヒストン H4 の 2-19 アミノ酸残基のアセチル化ペプチド(K4,K7,K11,K15 のアセチル化)
- ・ [Normal rabbit IgG](#) Santa Cruz Biotechnology 社 ([Catalog#sc-2027](#))  
ChIP のコントロール抗体として用います

##### ■ 11 X fixation solution (最終濃度)

37% formaldehyde	3 mL	(11.1%)
1 M HEPES (pH 8.0)	0.5 mL	(50 mM)
5 M NaCl	0.2 mL	(100 mM)
0.5 M EDTA (pH 8.0)	20 $\mu$ L	(1 mM)
0.1 M EGTA (pH ?)	50 $\mu$ L	(0.5 mM)

H <sub>2</sub> O	6.23 mL
total	10 mL

formaldehyde 抜きの溶液を作っておき、使用時に formaldehyde を加えます。室温で保存。

##### ■ 1.5 M glycine

##### ■ FACS solution (最終濃度)

1 x PBS(-)	487.5 mL
bovine serum	10 mL (2%)
10% NaN <sub>3</sub>	2.5 mL (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%)

PMSF

aprotinin

leupeptin

H<sub>2</sub>O 41.5 mL

total 50 mL

PMSF、aprotinin、leupeptin を除いたものを室温で保存。

PMSF、aprotinin、leupeptin は使用時に加えましょう。

■ 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%)

PMSF

aprotinin

leupeptin

H<sub>2</sub>O 39.78 mL

total 50 mL

PMSF、aprotinin、leupeptin を除いたものを室温で保存。

PMSF、aprotinin、leupeptin は使用時に加えましょう。

■ 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%)

H<sub>2</sub>O 29.8 mL

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>H<sub>2</sub>O</u>	<u>25 mL</u>	
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)
<u>H<sub>2</sub>O</u>	<u>21.5 mL</u>	
total	50 mL	

NaCl 濃度は最終的に 500 mM。

■ 1 X RIPA buffer/ salmon sperm DNA (最終濃度)

2 X RIPA buffer	25 mL	(1 X)
5 mg/ml salmon sperm DNA	1 mL	(100 μg/ml) (超音波処理+加熱処理済のもの)
10% NaN <sub>3</sub>	250 μL	(0.05%)
<u>H<sub>2</sub>O</u>	<u>23.75 mL</u>	
total	50 mL	

4°C にて保存。

■ 50% Protein G Sepharose/ salmon sperm DNA slurry

Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences 社 Catalog#17-06 18)を 1 X RIPA buffer/ 150 mM NaCl で2回洗浄します。その後、1 X RIPA buffer/ salmon sperm DNA 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、シリコナイズチューブに分注し、4°C にて保存。

■ 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%)
<u>H<sub>2</sub>O</u>	<u>41.9 mL</u>	
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>H<sub>2</sub>O</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
- フェノール/CIAA

## 4. プロトコール

### 1) 可溶性クロマチン分画の調整

1~5 x 10<sup>6</sup> 細胞<sup>※1</sup>を 1 mL の細胞培養用メディウム<sup>※2</sup>に懸濁し、1.5 mL シリコナイズチューブに入れます。

↓

100 μL の 11 X fixation solution を加え<sup>※3</sup>(formaldehyde 1% final) 、ローテーターにて 5~10 分間室温で<sup>※4</sup>攪拌します。

↓

100 μL の 1.5 M glycine を加え、ローテーターにて 5~10 分間室温で攪拌。メディ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。

↓

3000 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。

↓

1 mL の 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。

↓

3000 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。

↓

200 μL の SDS lysis buffer (細胞を懸濁・溶解する前に on ice にすると SDS が析出するので注意)を加え、ピペットマン P-1000 を用いて 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。

↓

氷上に 10~20 分間静置。

↓

密閉式超音波細胞破碎装置 Bioruptor を用いて、power high, on 30 秒, off 1 分のサイクルで 7.5 分間(5~6 サイクル)氷水で冷却しながら超音波処理を行います<sup>※5</sup>。

↓

15 krpm 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 μL)を 2 mL シリコナイズチューブに回収。1800 μL の ChIP dilution buffer (ice-cold)を加え希釈します。この内 200 μL を Input 分画として 4°Cで保存します。

### 2) 免疫沈降

上記の可溶性クロマチン分画(約 1800 μL)に 60-120 μL の 50% Protein G Sepharose/salmon sperm DNA slurry を加え、ローテーターにて 2~6 時間 4 °Cにて攪拌します。



10 krpm 10 秒間 4°Cにて遠心し、上清を回収し、約 580  $\mu$ L ずつ 3本の 1.5 mL シリコナイズチューブに分注します。

↓

それぞれに、(1) normal rabbit IgG(コントロール抗体)、(2) 抗アセチル化ヒストン H3 抗体、(3) 抗アセチル化ヒストン H4 抗体を 2~4  $\mu$ L ずつ加え<sup>※6</sup>、ローテーターにて一晚(12~16時間)4°Cにて攪拌します。

↓

それぞれに 20  $\mu$ L の 50% Protein G Sepharose/ salmon sperm DNA slurry<sup>※7</sup>を加え、ローテーターにて2~3時間4°Cにて攪拌します。

↓

同様に(10 krpm 10 秒間 4°Cにて)遠心し、上清を回収し、Unbound 分画として 4°Cで保存します。

↓

Sepharose 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、バッファーを加えた後、ローテーターにて 5 分間 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

### 3) DNA の精製

200  $\mu$ L の ChIP direct elution buffer を Sepharose ビーズに加え、ボルテックスにて懸濁します。同様に遠心。Sepharose ビーズはフェノール/CIAA 処理まで除く必要はありません<sup>※8</sup>。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分画とUnbound 分画もこの段階から平行して処理しましょう。

↓

1  $\mu$ 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  $\mu$ 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 時間インキュベート。

↓

1~2  $\mu$ 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、Sepharose 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  $\mu$ 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  $\mu$ L)を 1.5 mL シリコナイズチューブに回収します。有機層に 180  $\mu$ 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、同様に遠心します。

↓

800~900  $\mu$ 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。5~10 分程度 air dry し、Input DNA は 50  $\mu$ L、Unbound DNA と ChIP DNA は 20  $\mu$ L の 1XTE に溶解します。-20°Cで保存。

#### 4) PCR 反応と定量化

##### ■ PCR プライマーの設計

ヒストンのアセチル化はプロモーター領域等に局限して起こる可能性があるので、PCR プライマーはこの領域で設計します。PCR プライマーは 20~ 30 base、 $T_m$  値が 55~60°Cに、PCR の target size は 150~250 bp に。PCR プライマーは Input DNA を用いて増幅効率や非特異的増幅がないことなどを確認しておきましょう。

##### ■ ChIP のコントロール

免疫沈降のコントロールは normal rabbit IgG 等のコントロール抗体で取りましょう。

DNA 組換え等が起こり DNA 量に変化する場合には、Input DNA のコントロールが有効です。また、ChIP DNA と Unbound DNA の PCR 産物の量比を比較する場合があります。

ChIP のポジコン locus は、GAPDH や HPRT などの house keeping 遺伝子を用いましょう(ただし、これらの遺伝子座は X染色体上にあるので、定量化した時に性差が生じてしまいます)。ネガコン locus は解析予定の細胞で発現されていない遺伝子を用いましょう(例えば、T 細胞では CD19 を、B 細胞では CD3)。

##### ■ PCR のコントロール

PCR プライマーによる反応効率の違いを補正するために、standard DNA (我々の場合には Ba/F3 細胞の Input DNA) の3倍~ 5倍の段階希釈列 (50, 10, 2, 0.4, 0.08 ng 等) を PCR 反応のコントロールに置きます。これにより、異なる PCR プライマー間の結果を比較することが可能となります。Input DNA、ChIP DNA とともに、この段階希釈列のうち定量性が保たれている範囲に入るように希釈が必要となる場合があります。

## ■ PCR 反応

H <sub>2</sub> O	4.9	μL
10 x PCR buffer	1	μL
2.5 mM each dNTP	1	μL
10 mM forward primer	1	μL
10 mM reverse primer	1	μL
Input /ChIP DNA	1	μL
Taq polymerase	0.1	μL
total	10	μL

PCR サイクルは、94°C 3分 → (94°C 20秒、55~60°C 1分、72°C 1分+2秒 x サイクル数) x 25~30 サイクル、72°C 10分、4°C。

## ■ アガロースゲル電気泳動

5~8 μL の PCR 反応物を 2%アガロースゲルにて電気泳動します。ゲルの写真をそのまま結果とするか、CCD カメラで取り込み画像解析ソフト(Fuji Film, Image Gauge 等)で PCR 産物を定量します。さらに定量性と特異性を高めるためには、サザン法にてバイオイメージアナライザーにて定量します。

## ■ Real-time PCR

TaqMan 法あるいは SYBR green を用いて real-time PCR を行い、PCR 産物を定量します。

### プロトコールの注意点

- ※1 細胞数はあらかじめチェックしましょう。使用する抗体の数に応じて増減させます。抗体3種類の場合には、1~2 x 10<sup>6</sup> 細胞程度で行います。転写因子に対する抗体の場合には、細胞数は多めにします。
- ※2 FACS solution でも構いません。
- ※3 formaldehyde 原液を直接メディウムに加えることもあります。アセチル化ヒストンの場合には final 0.7~1%で固定する。
- ※4 固定条件はあらかじめチェックします。固定時間・温度は、アセチル化ヒストンの場合で 5 分間室温、転写因子や転写共役因子の場合は 5 分間室温~1 時間 4°C~overnight 4°Cとなります。
- ※5 超音波細胞破碎装置の水槽をあらかじめ氷が浮かんだ水で満たし(氷を入れすぎない)、装置を冷やしておきましょう。超音波処理の強度はあらかじめチェックしておきます。Input DNA と同じ処理をした後にアガロースゲル電気泳動を行い、DNA の平均長が 500 bp 位になるようにしましょう。特に、大きなサイズの DNA が残らないことを確認します。また、固定時間を長くした時は、超音波処理の強度も強くする必要があります。この場合には、DNA の平均長が 1000 bp を越えることもあります。非密閉式の超音波細胞破碎装置を用いても可能ですが、この場合には容器などの工夫が必要です。

※6 抗体量は、S/N 比が最大となるようにあらかじめ titration しましょう。

※7 Protein G Sepharose と Protein A Sepharose の 1:1 mixture を用いることもあります

※8 Sepharose ビーズを除かないで処理すると回収率が上がります。



## 5. トラブルシューティング

問題	考えられる原因	解決法
ネガコン locus でシグナルが出る	細胞数が多い	細胞数を titration しましょう
	超音波処理が弱い	Input DNA の平均長が 500bp 位になるように条件を検討しましょう
	抗体量が多い	抗体量を titration しましょう
	PCR 増幅が強すぎる	PCR のサイクル数を少なくしましょう
	本当はネガコン locus でない	他のネガコン locus を探しましょう
ポジコン locus でシグナルが出ない	細胞数が少ない	細胞数を titration しましょう
	固定条件が弱い	固定時間を長くしましょう
	抗体が不適當	抗体を変えてみましょう
	抗体量が少ない	抗体量を titration しましょう
	PCR プライマーが不適當	PCR プライマーの設定を変えましょう
コントロール抗体でのシグナルが弱く、実験系のシグナルとの差がでない	細胞数が多い	細胞数を titration しましょう
	抗体量が多い	抗体量を titration しましょう
	PCR 増幅が強すぎる	PCR のサイクル数を少なくしましょう
実験系でシグナルが出ない	細胞数が少ない	細胞数を titration しましょう
	固定条件が弱い	固定時間を長くしましょう
	抗体が不適當	抗体を変えましょう
	抗体量が少ない	抗体量を titration しましょう
	PCR プライマーが不適當	PCR プライマーの設定を変えましょう

## 6. 実験例

マウス T 細胞抗原受容体(TCR)  $\gamma$  鎖遺伝子座の V(D)J 組換えはインターロイキン7レセプター(IL-7R)により制御されています。IL-7R により活性化された転写因子の Stat5 が J  $\gamma$  プロモーター領域に結合し、転写共役因子の p300 や CBP をこの領域にリクルートし、転写共役因子の持つ内在性のヒストン・アセチル基転移酵素活性によって、周辺クロマチンのヒストンのアセチル化が誘導されることを ChIP 法にて解析しました<sup>3)</sup>(図3a)。

マウス Ba/F3 細胞をサイトカインで刺激すると、J  $\gamma$  領域に Stat5 と CBP/p300 がすみやかに結合し、同時にヒストンのアセチル化も誘導されました(図3a, b) 。さらに、抗 Stat5 抗体でクロマチン免疫沈降した後、抗 CBP/p300 抗体で再度免疫沈降すると(ChIP re-IP)、J  $\gamma$  領域が特異的に検出されたことより、同じ J  $\gamma$  クロマチン断片に Stat5 と CBP/p300 が結合していることを確認しました(図3c)。

また、マウス TCR  $\gamma$  遺伝子座の V  $\gamma$  領域についても、ヒストンのアセチル化によって V(D)J 組換えが制御されることを確認しています<sup>4)</sup>。

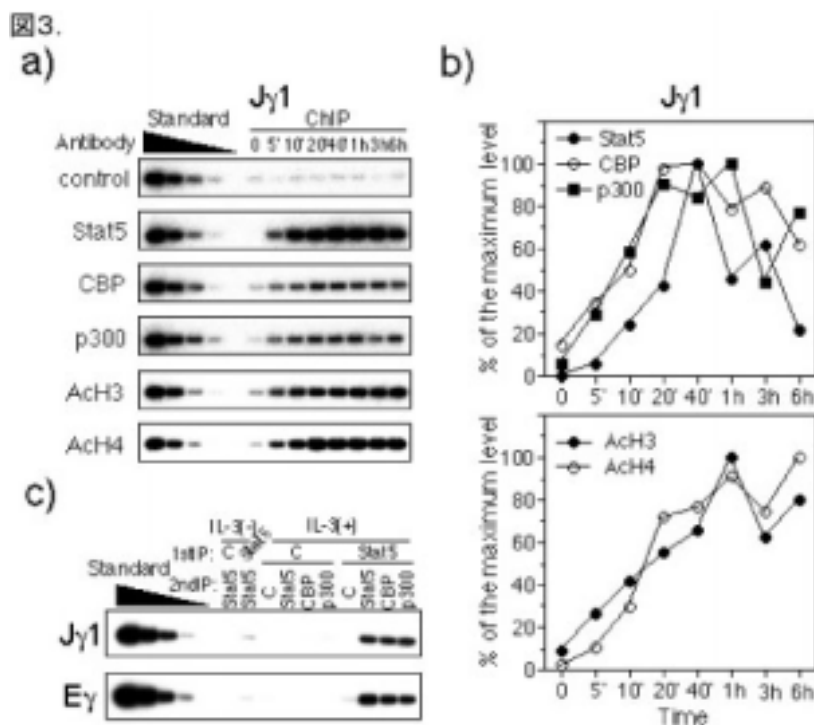


図3. マウス TCR  $\gamma$  遺伝子座のヒストン・アセチル化の誘導

a) Ba/F3 細胞をサイトカイン刺激後経時的に細胞を回収し、Stat5転写共役因子(CBP, p300)・アセチル化ヒストンに対する抗体でクロマチン免疫沈降を行いました。これらのタンパク質の J $\gamma$  領域への結合を PCR 法により解析しました。

b) 上記の結果をサザン法と画像解析ソフトにより定量化。

c) 抗 Stat5 抗体によるクロマチン免疫沈降の後(1st IP)、DTT 存在下で溶出し、Stat5 や転写共役因子に対する抗体で再度免疫沈降(2nd IP)(ChIP re-IP 法)。

## 7. 終わりに

クロマチン免疫沈降法は、細胞の「内在性」クロマチン領域に特定のタンパク質が結合しているかどうかを同定する方法です。一方、数倍～数十倍の違いをPCR 増幅により検出するので、条件の設定を慎重におこなう必要があります。クロマチン免疫沈降法は electrophoresis mobility shift assay (EMSA)や DNase I footprinting 法などの *in vitro* 情報と相補することにより、強力な実験方法となるでしょう。一方、クロマチン免疫沈降法はタンパク質の結合領域を同定することにも使用されており(酵母でのChIP-chip 法など)、今後もさまざまな用途に用いられる可能性があります。

## 8. 参考文献

- 1) Frederick M. Ausubel et al. : Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., unit 21.3, 2003
- 2) Upstate 社 Anti-acetyl-Histone H4 (Catalog#06-86 6) の Certificate Analysis に添付のプロトコール
- 3) Ye, S.K. et al. : Immunity, 15 : 813-823, 2001
- 4) Agata, Y., et al. : J. Exp. Med., 193 : 873-879, 2001

## 9. メモ

クロマチン免疫沈降法実験が成功するか否かは、特異的な免疫沈降ができていないかどうかにかかります。そのためには、特異的な抗体を使用し、常にコントロール抗体と比較すること、免疫沈降のポジコン、ネガコン locus を設定すること、等が重要です。特に抗体が特異的で、かつクロマチン免疫沈降に使えるものでなければ上手く行くはずがないので、まず文献的に使用可能である抗体か調べることはもちろん、なんらかの方法で抗体の特異性や力価を確認することをお勧めします。1つの方法として、免疫沈降したクロマチン分画に本当に目的の蛋白が沈降されているか Western blot で確認する方法は有効です。またクロマチン免疫沈降法に使えるとされている市販の抗体の中にも、個々に様々な問題があることが知られています。例えば、某 U 社の抗メチル化ヒストン H3K9 抗体は抗体量が非常に低いとか、Abcam 社の抗メチル化ヒストン H3K9 抗体はメチル化ヒストン H3K27 にもクロスすることなどが挙げられます。またヒストンのメチル化については、mono-, di-, tri-methyl 化の特異性が問題になって来ています。このような問題は、ケースバイケースで適宜解決していかなければいけません。

クロマチン免疫沈降法の手技的な問題として多く経験するのは、超音波処理によるクロマチン調整のステップです。試料が比較的少量であるため（上記プロトコールでは 200  $\mu$ L）、一般的なプローブ式の超音波破碎装置では出力を上げ過ぎると泡立ってしまったり、逆に出力を抑え過ぎると発振しなかったりすることがあります。筆者がこれまで試した中で、少量のサンプルを処理し易いという点では、TOMY 精工のハンディタイプのもの（UR-20P）が使い易く、サンプルがある程度の量であれば（400  $\mu$ L 以上）、Branson の Sonifier が非常に効率良い結果が得られました。プロトコールの項で紹介したコスモ・バイオ社の密閉式超音波細胞破碎装置 Bioruptor UCD-200TM は、処理効率もプローブ式と遜色ない上に、6本のチューブを同時に処理できることや、水を介して超音波処理するためサンプル間のクロスコンタミネーションを気にしなくていいことなどからたいへん便利です。

一方、クロマチン免疫沈降法のデータの解析や解釈の上で常に問題になるのは、PCR の定量性です。10 倍以上の差を示す場合はアガロースゲルの EtBr 染色像でいい場合もあるが、その場合でも画像を取り込み、解析ソフトで PCR 産物を定量することをお勧めします。（定量してみると、EtBr 染色像がいかにバックグラウンドが高く、シグナルが低いか、すなわち S/N 比が低いかを実感できるし、希釈系列の中で、ある程度びしっと出たバンドは既に飽和していることが理解できます。）さらに数倍の差を示すためには、どうしてもサザンブロット等で検出感度や定量性を上げてやる必要があります。この点では、最近かなり一般的になって来た SYBR green を用いた real-time PCR を利用することも有効でしょう。

※この資料は、生田 宏一 1)、 縣 保年 2) 先生ご提供いただきました。

- 1) 京都大学ウイルス研究所 成体応答学研究部門 生体防御研究分野
- 2) 京都大学大学院医学研究科 先端領域融合医学研究機構

※お問い合わせはビーエム機器株式会社へお願いいたします。



ビーエム機器株式会社

〒135-0016 東京都江東区東陽2丁目2番20号 東陽駅前ビル

商品の仕様・在庫・ご注文についてのお問い合わせ

TEL : 03-6666-5902 FAX : 03-5677-4081

WEB: [www.bmbio.com/](http://www.bmbio.com/)