

製品コード 5333

研究用

Takara

**EpiScope[®] Nucleosome
Preparation Kit**

説明書

v202204Da

真核生物の核内に存在するクロマチンの構成単位であるヌクレオソーム (nucleosome) は、ヒストンコアにゲノム DNA が巻き付いた構造をしています。ヌクレオソームはゲノム DNA 上に一定間隔で存在しているのではなく、その位置はクロマチン構造や転写制御に密接に関わっていることが知られています。そのため、遺伝情報発現制御研究での重要な分野であるエピジェネティクス研究において、ヌクレオソームは重要な解析対象のひとつとなっています。すなわち、転写が活性化されている遺伝子では、プロモーター領域にヌクレオソームが存在せず、転写開始に必要な因子が結合可能な状態になっています。一方、この領域の DNA がメチル化されると、そこにヌクレオソームが形成され、それらの転写因子が結合できなくなり転写が抑制されると考えられています。

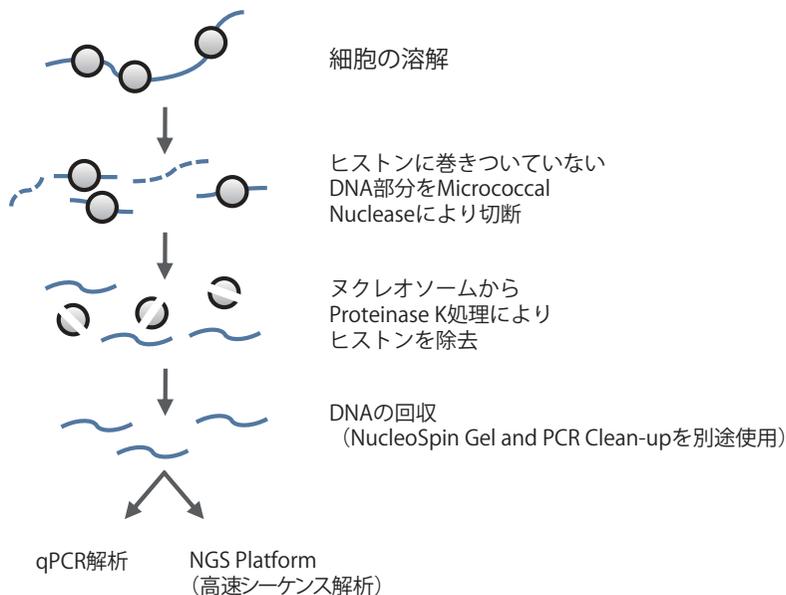
本製品は、動物培養細胞からヌクレオソームを調製するためのキットです。調製ヌクレオソームから抽出された DNA をリアルタイム PCR、高速シーケンスで解析することにより、ゲノム上でのヌクレオソーム位置を解析することができます。

本製品による操作の概要は、以下の通りです。

1. 細胞の穏やかな溶解と核の遠心沈降
2. ヒストンに巻きついていない DNA 部分を Micrococcal Nuclease により切断
3. ヌクレオソームから Proteinase K 処理によりヒストンを除去
4. DNA 回収 (別売の NucleoSpin Gel and PCR Clean-up などの DNA 精製キットを使用)

回収された DNA はヌクレオソームを形成していたゲノム DNA 領域に該当し、ヒストンに巻き付いていなかったゲノム DNA 領域は Micrococcal Nuclease により切断されます。

[注意] 本キットは、クロスリンク処理した細胞のクロマチン断片化には適していません。



I. 内容 (50 回)

Package 1 :

3. Micrococcal Nuclease (20 U/ μ l)	50 μ l
4. Micrococcal Nuclease Buffer (10 \times)	1 ml
5. RNase A (20 mg/ml)	100 μ l
6. 0.5 M EDTA	100 μ l
7. Proteinase K	200 μ l
8. LINE-1 qPCR Primer (10 μ M each)*	50 μ l

Package 2 :

1. Cytoplasmic Lysis Buffer	25 ml \times 2
2. Protease Inhibitor Cocktail (100 \times)	550 μ l

* : リアルタイム PCR で相対定量解析する際に、ゲノム DNA 量を補正するための Reference として使用します。ヒトゲノム DNA 検出用プライマーのため、他の生物種では使用できません。

本製品以外に必要なもの (主なもの)

サーマルサイ클ラー

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (製品コード TP600) など

DNA 精製キット

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250) など

電気泳動装置

Mupid-exU (製品コード EXU-1) など

II. 保存

Package 1 : -20°C

Package 2 : 4°C

III. 使用上の注意

本製品を使用する時の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

1. 酵素類は使用前に軽くスピンドウンし、氷上で取り扱ってください。
2. Protease Inhibitor Cocktail、Micrococcal Nuclease Buffer (10 \times)、0.5 M EDTA は、使用前に室温で溶かして軽く混合後、スピンドウンし、使用時は室温で取り扱ってください。使用后、各保存温度へ戻してください。
3. Micrococcal Nuclease 反応液のマスターミックスは室温で調製し、最後に Micrococcal Nuclease を添加してください (氷上で調製すると塩が析出します。析出した場合は 37°C で融解します)。

IV. 操作方法

A. 細胞回収と溶解

1. 培養プレートから細胞を回収し、約 1×10^6 cells/ml となるように適量の PBS を加え懸濁し、1.5 ml マイクロチューブに 1 ml ずつ分注する。
※ 1 反応あたり約 $0.5 \sim 2 \times 10^6$ cells の処理を推奨します。
2. 3,000 rpm、4°C、3 分間遠心し、細胞を回収する。
3. 上清を除去し、Protease Inhibitor Cocktail を 10 μ l 加える。
4. Cytoplasmic Lysis Buffer を 1 ml 加え、ピペッティングにより十分に懸濁する。
5. 氷上で 10 分間静置する。
6. 5,200 rpm、4°C、10 分間遠心する。遠心の間に、10 \times Micrococcal Nuclease Buffer を滅菌精製水で希釈して、1 \times Micrococcal Nuclease Buffer を 100 μ l 調製する。
7. 遠心上清を除去し、遠心沈渣（細胞核を含む）に 1 \times Micrococcal Nuclease Buffer を 50 μ l 添加後、ピペッティングにより十分に懸濁し、細胞核懸濁液とする。
※ Micrococcal Nuclease Buffer 添加後、ピペッティングを十分行い、遠心沈渣を出来る限り懸濁してください。十分懸濁を行った後も沈渣の塊が多少残る場合がありますが、これらを完全に懸濁する必要はありません。

B. Micrococcal Nuclease 処理

1. 反応数 + α 分のマスターミックスを室温で調製する。

試薬	1 反応あたり使用量
Micrococcal Nuclease (20 U/ μ l)	0.2 μ l
Micrococcal Nuclease Buffer (10 \times)	5.0 μ l
RNaseA (20 mg/ml)	2.0 μ l
Protease Inhibitor Cocktail (100 \times)	1.0 μ l
滅菌精製水	41.8 μ l
合計	50 μ l

(注)・氷上で調製すると塩が析出するため、必ず室温で調製してください。

・Micrococcal Nuclease は反応開始直前に添加してください。

2. 0.2 ml マイクロチューブにマスターミックスを 50 μ l 分注し、A-7 の細胞核懸濁液を 50 μ l 加えて混合する。
3. 37°C で 30 分間インキュベートする（サーマルサイクラー使用）。
4. マイクロチューブへ 0.5 M EDTA を 2 μ l 加え、反応を停止する。
5. Proteinase K を 4 μ l 加え、37°C で 30 分間インキュベートする（サーマルサイクラー使用）。引き続き、C. DNA 抽出の操作を行う。

C. DNA 抽出

1. B-5 で調製した Proteinase K 処理サンプルから、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up を用いて DNA を抽出する。
 - (1) Proteinase K 処理サンプル 106 μ l に Binding Buffer NT1 を 212 μ l 加える。
 - (2) NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column を Collection Tube (2 ml) にセットする。
(1) の溶液をカラムに添加し、11,000 $\times g$ 、1 分間遠心する。
ろ液を捨てた後、同じ Collection Tube にカラムをセットする。
 - (3) Wash Buffer NT3 (エタノール含) を 700 μ l カラムに添加し、11,000 $\times g$ で 1 分間遠心する。
ろ液を捨てた後、同じ Collection Tube にカラムをセットする。
 - (4) カラムを、11,000 $\times g$ で 2 分間遠心する。
 - (5) カラムをマイクロチューブ (1.5 ml : 各自で用意) にセットする。
Elution Buffer NE を 50 μ l 加え、室温で 1 分間インキュベートした後、11,000 $\times g$ で 1 分間遠心する。
2. 得られた DNA 溶液の一部 (約 5 μ l) を用いてアガロースゲル電気泳動を行い、DNA サイズを確認する。(V-2 参照)

V. Appendix

1. リアルタイム PCR によるヌクレオソーム DNA 解析法

本製品により調製されたヌクレオソーム DNA をリアルタイム PCR で解析する場合は、IV-C のステップにおいて NucleoSpin Gel and PCR Clean-up を用いて DNA 抽出を行う際に、約 50 μl の溶出液 (Buffer NE) で溶出を行う。通常、溶出液 2 μl をリアルタイム PCR の鋳型として使用する。以下に、リアルタイム PCR 用キット TB Green® *Premix Ex Taq*™ GC (Perfect Real Time) と Thermal Cycler Dice Real Time System II (終売) を使用したリアルタイム PCR 実施例を示す。

- 以下の反応液を氷上で調製する。

試薬	使用量
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> GC (2 ×)	12.5 μl
Forward Primer (10 μM)	0.5 μl
Reverse Primer (10 μM)	0.5 μl
Template	2.0 μl
滅菌精製水	9.5 μl
合計	25 μl

- 反応を開始する。

始めは、以下の標準プロトコールで反応を行う。必要に応じて PCR 条件を至適化する。
95°C 30 秒 → (95°C 5 秒 / 60°C 30 秒) × 40 サイクル → 融解曲線分析

2. Micrococcal Nuclease の使用量と DNA サイズ

【方法】

1 × 10⁶ cells の HeLa 細胞を本製品の操作法に従って処理した。ただし、Micrococcal Nuclease 使用量を 0.02 μl 、0.05 μl 、0.2 μl と変化させた。続いて NucleoSpin Gel and PCR Clean-up による DNA 抽出を行い、得られた DNA 溶液 50 μl のうち、5 μl をアガロースゲル電気泳動に供した。

【結果】

Micrococcal Nuclease 量が少ない場合、モノヌクレオソームの他、ジヌクレオソーム、トリヌクレオソーム由来の DNA バンドの割合が増加した。また、Micrococcal Nuclease 使用量が多いほどモノヌクレオソーム由来の DNA サイズが小さくなった。この結果は、DNA 両端からの削り込みが進んだためと考えられる (*J Biomol Struct Dyn.* (2010) 27(6):781-793. 参照)。

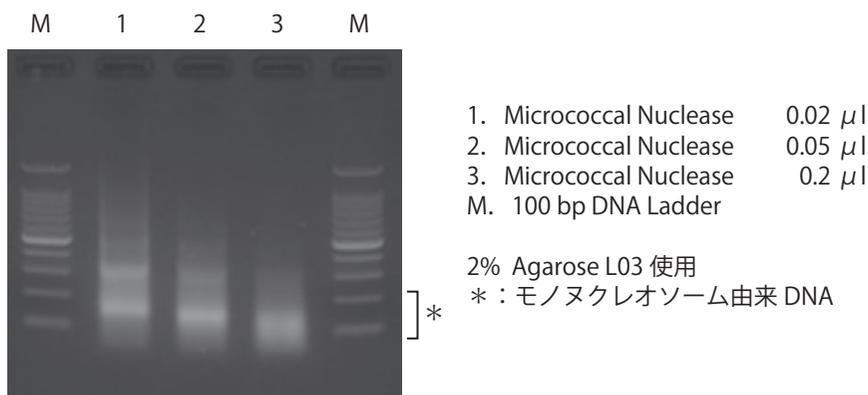


図 2. ヌクレオソームのサイズ分布確認

VI. トラブルシューティング

操作方法に従い調製した DNA のヌクレオソーム化が不十分な場合には、以下の原因が考えられます。

1. 使用する Micrococcal Nuclease の量が少ない。
「B. Micrococcal Nuclease 処理」の Micrococcal Nuclease 使用量を確認してください。Micrococcal Nuclease の使用量が少ない場合は DNA のヌクレオソーム化が不十分となります (V. Appendix 2 参照)。
2. 遠心沈渣の 1 × Micrococcal Nuclease Buffer への分散が不十分。
「IV. 操作方法、A-7」では、遠心沈渣に 1 × Micrococcal Nuclease Buffer を添加後、ピペティングにより遠心沈渣を出来る限り懸濁してください。

VII. 関連製品

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ GC (Perfect Real Time) (製品コード RR071A/B)
Micrococcal Nuclease (製品コード 2910A)

VIII. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- EpiScope、Thermal Cycler Dice、TB Green はタカラバイオ株式会社の登録商標です。*Premix Ex Taq* はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995
ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社