

クロマチン免疫沈降の流れ

クロマチン免疫沈降とは・・・

細胞内でのタンパク質-DNA間の相互作用を解析するための手法のひとつ。特定のヒストン(およびその修飾)や転写因子などのタンパク質に対する特異的な抗体を使用して免疫沈降を行い、それらタンパク質に相互作用しているDNAを回収することにより、そのタンパク質と相互作用しているDNA領域を解析することができる。

ヒストンとDNAの複合体の構造を特に、クロマチンと呼ぶ。

STEP1)クロスリンク(架橋)

細胞の可溶化や免疫沈降の操作時に、タンパク質-DNA複合体の相互作用が解けてしまわないように、一番最初に細胞にホルムアルデヒドを添加することによって、タンパク質とDNAの相互作用を可逆的な結合でクロスリンク(架橋)する。

STEP2)DNAの断片化

クロスリンク終了後、細胞をLysis bufferで可溶化し、DNAを含むライセート画分に対して超音波または酵素の添加を行い、DNAの断片化を行う。これにより、あるタンパク質に特異的に結合(架橋)しているDNAを、そのタンパク質との複合体として分離することができる。

STEP3)免疫沈降

ヒストン(およびその修飾)や転写因子などに対する抗体を用いて、タンパク質-DNA複合体の精製を行う。ProteinAビーズ、ProteinGビーズ、二次抗体ビーズなどが用いられる。

STEP4)DNAの精製・解析

加熱やProteaseの添加などにより、タンパク質-DNA複合体の脱クロスリンクを行い、DNA溶液を得る。必要に応じて精製操作を行う。得られたDNA溶液に対して定量PCRやシーケンスを行うことにより、そのタンパク質との特異性の評価や、DNA配列の決定を行う。

