

diagenode

A Hologic Company

iDeal ChIP-seq kit for Histones

Cat. No. C01010050 (10 rxns)



Ordering information

diagenode headquarters

Diagenode s.a. BELGIUM | EUROPE

LIEGE SCIENCE PARK
Rue Bois Saint-Jean, 3
4102 Seraing - Belgium
Tel: +32 4 364 20 50
Fax: +32 4 364 20 51
orders@diagenode.com
info@diagenode.com

Diagenode Inc. USA | NORTH AMERICA

400 Morris Avenue, Suite #101
Denville, NJ 07834
Tel: +1 862 209-4680
Fax: +1 862 209-4681
orders.na@diagenode.com
info.na@diagenode.com

For a complete listing of Diagenode's international distributors
visit:

<http://www.diagenode.com/company/distributors.php>

For rest of the world, please contact Diagenode sa.

Diagenode website: www.diagenode.com

目次

| | |
|-----------------------------------|----|
| はじめに..... | 4 |
| 概要..... | 5 |
| 構成品..... | 5 |
| キット以外に必要なもの..... | 6 |
| 始める前の注意点..... | 7 |
| 簡略版プロトコル..... | 9 |
| 詳細版プロトコル..... | 13 |
| STEP 1a: 細胞採取と DNA-タンパク質架橋 | |
| 反応（培養細胞）..... | 13 |
| STEP 1b: 組織分離と DNA-タンパク質架橋 | |
| 反応（新鮮組織および凍結組織）..... | 14 |
| STEP 2a: 細胞溶解とクロマチン断片化（培養細胞）..... | 15 |
| STEP 2b: 細胞溶解とクロマチン断片化（組織）..... | 15 |
| STEP 3: 磁気ビーズを用いた免疫沈降..... | 15 |
| STEP 4: 溶出、脱架橋、DNA精製..... | 16 |
| STEP 5: 定量PCR解析..... | 18 |
| 定量PCRデータ解析 | 19 |
| ChIPシーケンシング..... | 21 |
| その他のプロトコル..... | 24 |
| トラブルシューティング..... | 26 |

はじめに

タンパク質とDNAは、遺伝子転写およびエピジェネティックなサイレンシングなど、細胞機能において多くの主要な働きを担っています。そのためこれらの相互作用、および遺伝子調節経路や細胞増殖を制御および誘導する機構を理解することは重要です。クロマチン免疫沈降 (ChIP) は、特定のゲノム領域とのタンパク質の会合を分析する技術です。ChIPは、エピジェネティック特性、特定のゲノム部位へのクロマチン再構成および転写調節因子補充の変化を研究するために使用することができます。

ChIPアッセイは、細胞固定 (クロスリンク)、クロマチン断片化、免疫沈降、脱架橋、DNA精製そして沈降したDNAの分析という流れで行われます。

ChIPでは、生きた細胞をまず可脱的架橋剤で固定して、タンパク質-DNA相互作用を安定化させます。細胞固定に最も使用されている試薬は、タンパク質および核酸のアミノまたはイミノ基間に共有結合を生成するホルムアルデヒドです。ホルムアルデヒド処理により、DNA-タンパク質複合体およびタンパク質-タンパク質複合体の両方を架橋します。

交差結合後、クロマチンを免疫沈降 (IP) に続いて使用できるように、均一な小さな断片に効率よく断片化する必要があります。本キットでは、現在最も広く使用されているクロマチン断片化システムであるPicoruptor®断片化装置を用いることで、高品質の断片化クロマチンを準備することが出来ます。断片化は、当社の断片化キットを用いて行うこともでき、これにより任意の細胞種に対して容易かつ再現性の高い断片化が可能となります。断片化後、断片化クロマチンを、目的のタンパク質に対する特異的抗体 (AB) で沈殿させます。次にこのクロマチン-AB複合体を、磁気ビーズを用いて単離します。最後に沈殿したDNAフラグメントをABから放出させ分析します。沈殿した (IP'd) DNA中の特定の配列が濃縮されていれば、これらの配列がインピボで目的のタンパク質と会合したことを示します。この特定領域の分析は、定量ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) によって行うことができます。近年、ハイスループットの次世代シーケンシング (ChIP-seq) と組み合わせられたChIPは、タンパク質-DNA相互作用の全ゲノムマッピングにおいて、最も信頼できる標準的な方法として広く用いられています。

このようにChIP-seqは効果的なツールである一方で、その過程においていくつかの反応条件の最適化が必要であり、時間およびコストの無駄に繋がる可能性もあります。当社の最適化された試薬とプロトコルにより、これらの煩雑なステップを減らしChIP-seqの成功に繋がります。新しいiDeal ChIP-seqキットプロトコルは、ChIPとIllumina®GAIIxおよびIon Torrent™ PGM™システムを用いたハイスループットシーケンシング用にDiagenode社が徹底的に最適化を行いました。

当社ではChIP分析を助ける様々なツールも提供しています。例えばクロマチン剪断および核酸断片化に使うPicoruptor®、自動ChIPおよびDNAメチル化解析に用いるSX-8G IP-Star®などが挙げられます。また当社の0.2または1.5 mlチューブの磁気ラックを用いることで、最適な条件 (4°C) で磁性ビーズを扱うことができます。加えて多くのエピジェネティックターゲットに対応するChIPおよびChIP-seq用抗体も取り揃えています。更に磁気ビーズ、ネガティブIPコントロール (マウスおよびウサギIgG)、プロテアーゼ阻害剤および脱アセチル化酵素阻害剤 (酪酸ナトリウム) などの試薬も提供しています。IP DNAの分析のためのqPCRプライマーや、プロッティング実験に使用するためのペプチド (ネガティブChIPコントロール) を購入することも可能です。

当社の製品は様々なターゲットのChIPで広く使われているため、確実な実験の成功のためにはキット、試薬、および機器を全て揃えることを強く推奨しております。

概要

Table 1: プロトコル概略と所要時間

| Step | | 所要時間 | 日数 |
|------|---------------------------------------------|--------|-----|
| 1a | 細胞採取と DNA-タンパク質架橋反応 (培養細胞) | 1~2 時間 | 1 |
| 1b | 組織分離と DNA-タンパク質架橋反応 (新鮮組織および凍結組織) | | |
| 2a | 細胞溶解とクロマチン断片化 (培養細胞) | 1~2 時間 | 1 |
| 2b | 細胞溶解とクロマチン断片化 (組織) | | |
| 3 | 磁気ビーズを用いた免疫沈降 | 一晚 | 1~2 |
| 4 | 溶出、脱架橋、DNA精製 | 6 時間 | 2 |
| 5 | 定量PCRおよびデータ解析 (ライブラリー作成および次世代シーケンシングの準備のため) | 2~3 時間 | 3 |

構成

このキットには 10 回分のChIPアッセイを行うのに十分な試薬が入っています。構成品の詳細については、表 2 を参照してください。製品到着後、試薬はそれぞれ表 2 に示した温度で保管してください

Table 2: iDeal ChIP-seq キット構成

| 試薬名 | 構成量 (x10) | 保管 |
|--------------------------------------------------|---------------|--------------|
| Glycine | 200 µl | 4°C |
| Lysis buffer iL1 | 20 ml | 4°C |
| Lysis buffer iL2 | 20 ml | 4°C |
| Shearing buffer iS1 | 3.6 ml | 4°C |
| Protease inhibitor cocktail | 35 µl | -20°C |
| 5x ChIP buffer iC1 | 950 µl | 4°C |
| 5% BSA (DNA free) | 60 µl | -20°C |
| Protein A-coated magnetic beads P | 200 µl | 4°C ※凍結不可 |
| Wash buffer iW1 | 3.5 ml | 4°C |
| Wash buffer iW2 | 3.5 ml | 4°C |
| Wash buffer iW3 | 3.5 ml | 4°C |
| Wash buffer iW4 | 3.5 ml | 4°C |
| Elution buffer iE1 ※使用前に室温に戻す | 1.5 ml | 4°C |
| Elution buffer iE2 | 64 µl | 4°C |
| Rabbit IgG | 8 µg (1µg/µl) | -20°C |
| ChIP-seq 用 対H3K4me3抗体 | 8 µg (1µg/µl) | -20°C |
| ChIP-seq 用 ヒト GAPDH TSS プライマー対 (ポジティブコントロール) | 45 µl | -20°C |
| ChIP-seq 用 ヒト ミオグロブリン エキソン2 プライマー対 (ネガティブコントロール) | 45 µl | -20°C |
| ChIP-seq grade water | 3 ml | 室温 |

Table 3: IPure キット構成物品物

| 試薬名 | 構成品量 | 保管 |
|----------------------------------------|--------|-------|
| Wash buffer 1 w/o iso-propanol (IPure) | 700 ml | 4°C |
| Wash buffer 2 w/o iso-propanol (IPure) | 700 ml | 4°C |
| Buffer C (IPure) | 700 ml | 4°C |
| Magnetic beads (IPure) | 140 µl | 4°C |
| Carrier (IPure) | 28 µl | -20°C |



DiaMag Protein Aコーティング済み磁気ビーズとIPure磁気ビーズは必ず4°Cで保存してください。磁気ビーズが壊れる可能性があるため、凍らせないでください。また乾燥すると性能が低下するので、懸濁液の中にビーズが含まれるように保存してください。

本キット以外に必要なもの

試薬

- 手袋
- ホルムアルデヒド 37% (分子生物学用)
- Phosphate buffered saline (PBS) バッファー
- 1 M ブチル化ナトリウム (NaBu) (Cat. No. C12020010) (オプション)
- 100% isopropanol
- トリプシン-EDTA
- RNase/DNase-free 1.5 ml チューブ
- qPCR SYBR[®] Green Mastermix
- ライブラリー調製用試薬; cluster generation (Illumina[®]) または ePCR (Ion TorrentTM PGMTM) とシーケンシング
- Quant-IT dsDNA HS アッセイキット (Invitrogen)

ライブラリー調製 (推奨)

- iDeal Library Preparation kit x24 (incl. Index Primer Set 1), (Cat. No. C05010020)
- MicroPlex Library Preparation kit (Cat. No. C05010010, 12 reactions, 12 indices) (Cat. No. C05010011, 48 reactions, 12 indices)

装置

- オプション: ChIPettor(tm) System for Histones (Cat. No. C01010162)
- Diagenode DiaMag1.5 magnetic rack (Cat. No. B04000003)
- Diagenode Picoruptor[®] sonication device (Cat. No. B01060010)
- 冷却機能付き遠心機 (1.5 ml, 15 ml, チューブ用)
- セルカウンター
- DiaMag ローテータ (回転培養機) (Cat. No. B05000001)
- ボルテックス
- サーモミキサー
- Qubit システム (Invitrogen)

- qPCR 装置
- 組織用:
 - ダウンス型ホモジナイザー (緩い乳棒とタイトな乳棒)
 - 外科用メス
 - ペトリ皿

始める前の注意点

1a. 細胞数 (培養細胞)

このプロトコルは、300 μ LのChIP反応で、約100万個の細胞のChIPを行えるように最適化されています。より多くの細胞を使用することも可能ですが、最適な効率で実験を行うためには、精製前に別々のChIPを行い、IP化されたDNAをプールのことを推奨します。

1b. 組織量 (新鮮細胞および凍結細胞)

このプロトコルは、新鮮細胞または凍結した哺乳動物組織からChIPを行えるように最適化されています。一般的に30~40mgの組織より調製されたクロマチンから、約18個のChIPサンプル (1つのIPあたり約1.5~2mgの組織) ができます。しかし、ChIP-seqに必要な組織の正確な量は、タンパク質の存在量、抗体の親和性などに依存して変化するため、各組織の種類ごとに異なります。そのため、パイロット実験を行うことをお勧めします。

2. クロマチン断片化の条件最適化とその解析

ChIPを開始する前に、クロマチンを100~600 bpの断片に切断する必要があります。当社のキットおよびプロトコルは、Picoruptor®を用いてクロマチン断片化を行うように最適化されています。Picoruptor®による断片化の最大量は、1.5 mL Microtubeあたり300 μ Lです。Picoruptor®のキャップ付マイクロチューブ (C30010016) 1.5 mlを使用することをお勧めします。プロトコル上の断片化条件は、様々な細胞種に適応します。しかし、細胞種が異なる場合は、大量の細胞またはサンプルを処理する前に、各細胞種の超音波処理条件を最適化することをお勧めします。クロマチンの断片化の効率は、最初の超音波処理時間に依存します。断片化効率を評価する詳しいプロトコルは、「追加プロトコル」セクションを参照してください。

3. 磁気ビーズ

このキットには、DiaMag Protein Aでコーティングされた磁気ビーズが含まれています。ビーズが乾燥すると性能が低下するため、実験中にビーズが乾燥しないよう注意してください。加えてビーズ量の変動は、再現性を低下させるため、ピペティングするときはいつも懸濁液中でビーズ量が均一に保たれるようにしてください。またビーズを凍らせないでください。

1回のIPあたりに必要とされるビーズの量は、使用される抗体の量に依存します。以下のプロトコルで20 μ Lのビーズを使用した場合、約5 μ gの抗体に結合できます。当社の高品質ChIP-seqグレード抗体を使用する際、ほとんどの場合でIP1回あたりの使用推奨量は1~2 μ gです。しかし1回あたり5 μ g以上の抗体を使用する場合は、それに応じてビーズの量を増やすことをお勧めします。

4. ネガティブおよびポジティブコントロール (IgG と コントロール Ab)

キットには、ネガティブ (IgG) およびポジティブ (H3K4me3) コントロール抗体が含まれています。ChIP反応の各回ごとに1つのIgGネガティブIPコントロールを含めることをお勧めします。また、ポジティブコントロールとしてChIP-seq用H3K4me3抗体を少なくとも1回は使用することを推奨します。またこのキットにはH3K4me3を標的とするポジティブコントロールおよびネガティブコントロール (GAPDH-TSSおよびミオグロブリン エクソン2) をそれぞれ増幅するためのqPCRプライマー対も含まれています。

5. 定量

Invitrogen社のQubitシステム「Quant-IT dsDNA HSアッセイキット」のように高感度な手法を用いて、ChIP後のIP化DNAの濃度を決定します。PicoGreenも適していますが、NanoDropなどのUV分光光度法は、通常、感度があまりよくありません。多くの場合、IP化された物質の約10%を定量に使用すれば十分です。予想されるDNA収量は細胞の種類、

使用される抗体の品質および抗体標的などの異なる因子に依存すると考えられています。例えば100万個のHeLa細胞において、ポジティブコントロールとしてH3K4me3抗体を用いたとき、予想されるDNA収量は約10ngです。

6. 定量PCR

サンプルの配列決定をする前に、少なくとも1つのポジティブコントロールおよび1つのネガティブコントロールを使用して、qPCRによってIP'd DNAを分析することを推奨します。このキットには、SYBR®Green qPCRアッセイでH3K4me3ポジティブコントロール抗体に使用できるポジティブおよびネガティブコントロールプライマー対が含まれています。お使いの抗体が標的とするコントロールに合わせて、適切な方法を選択して使用してください。

シーケンシングに十分なDNAを残しておくために、qPCRにはIP'd DNA全体の10%以上を使用しないことを推奨します。PCR反応にはDNAを1/10またはそれ以上に希釈することもできます。PCR反応は少なくとも2回、異常値を同定するためには、3回実施することが推奨されています。

7. 定量PCR

特定のゲノム遺伝子座のクロマチン免疫沈降の効率は、インプットのパーセンテージ（インプット DNAと比較した免疫沈降DNAの相対量）として計算されたその遺伝子座の回収として表すことができます。インプットに使用された量がChIPに使用された量の1%であった場合、回収は次のように計算できます。

$$\% \text{ recovery} = 2^{(Ct_{\text{input}} - Ct_{\text{sample}})}$$

Ct_{sample} と Ct_{input} は、それぞれIPサンプルのDNAサンプルとインプットに対するqPCRの指数関数的な段階からの閾値サイクルです。この方程式は、PCRが100%効率的であると仮定しています（増幅効率= 2）。正確な結果を得るためには、既知の場合は実際の増幅効率を使用する必要があります。

ポジティブコントロール抗体（例えば、H3K4me3）では、ポジティブコントロールターゲット（GAPDH TSS座）の回収率は10~20%であると予想されますが、これは使用する細胞種に依存します。ネガティブコントロールターゲット（ミオグロビンエクソン2遺伝子座）の回収率は1%未満であるべきです。

サンプルがシーケンシングに十分適しているかどうかを判断する基準は、主にターゲットに依存します。以下は一般的なガイドラインです。

- ポジティブコントロールターゲットの回収率は少なくとも5%
- ネガティブコントロールターゲットの回収率は1%以下
- ポジティブコントロールとネガティブコントロールの比率は5以上

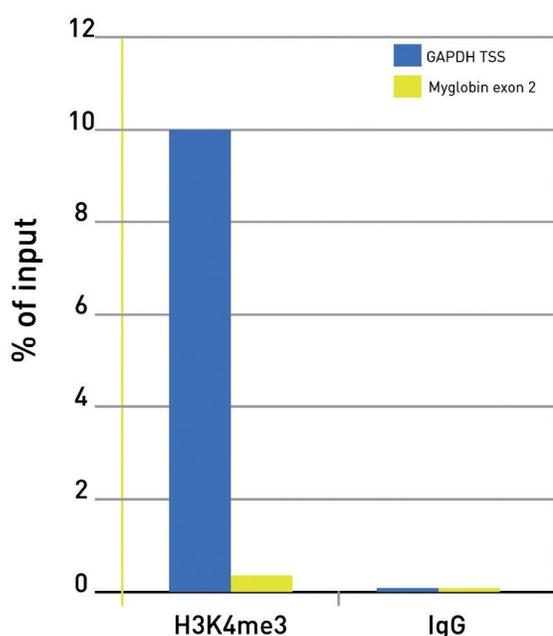


Figure 1: iDeal ChIP-seqキットコントロール抗体を用いて、ヒトHeLa細胞上でChIPを実施した結果。100万細胞からのクロマチンを断片化し、1μlのポジティブコントロール抗体および2μlのネガティブIgGコントロールをそれぞれのIPで使用した。その後ポジティブコントロールGAPDH-TSSおよびネガティブコントロールミオグロビンエクソン2プライマー対を用いて、定量PCRを実施した。インプットの%（qPCR分析後のインプットDNAと比較した免疫沈降したDNAの相対量）として表した回復率。

簡略版プロトコル

STEP 1a. 細胞採取とDNA-タンパク質架橋反応（培養細胞）

- トリプシン処理により細胞を回収し、PBSで2回洗浄します
- 細胞数をカウントし、500 μ LのPBS中に最大1000万個の細胞が含まれるように再懸濁します。得られた500 μ L細胞懸濁液を1.5mLチューブに分注します。
- ホルムアルデヒド37%を13.5 μ L添加します。穏やかにボルテックスして混合し、室温で8分間インキュベートして細胞を固定します。
- 4.57 μ LのGlycine溶液を加えて架橋反応を停止させます。穏やかにボルテックスして混合し、室温で5分間インキュベートする。
※この時点から氷上で作業を行ってください
- 4 $^{\circ}$ C, 1,600 rpm (500 x g) で5分間遠心分離後、細胞ペレットを乱さないように注意して上清を静かに吸引します。
- 1mLのPBSで細胞を2回洗浄する

> Step2a.細胞溶解およびクロマチン断片化（培養細胞）へ

Step1b. 組織分離とDNA-タンパク質架橋反応（新鮮組織および凍結組織）

- ペトリ皿上で新鮮組織または凍結組織30~40mgを測り取ります
※サンプルは常に氷上に置き、劣化を防ぐために操作時間を最小限に抑えてください。
- 外科用メスを用いて組織を小片（1~3mm³）に切り分けます
- プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む氷冷PBS 1mLを加え、ダウンス型ホモジナイザー（緩い乳棒）を用いて組織を破壊し、均一な懸濁液を得ます。
- 組織懸濁液を1.5 mLチューブに移し、4 $^{\circ}$ C, 1300 rpmで5分間遠心します。遠心後、ペレットに触れないように注意して静かに上清を捨てます。
- 室温にて1%ホルムアルデヒドを含む1 mL PBS中で、ペレットを再懸濁します。
- チューブを室温で8~10分間ローテートします
※時間は検討が必要な場合があります。一般的に、ヒストン修飾は、転写因子（10~15分）より短い固定（8分）で行われます。より強く固定すると、超音波処理をしても断片化されにくいクロマチンに繋がる恐れがあります。
- 100 μ LのGlycineを加えて架橋反応を停止し、その後室温で5分間ローテートします。
- 4 $^{\circ}$ C, 低速（1,300 rpm）でサンプルを遠心分離します。
- 上清を静かに吸引し、ペレットを1 mLのプロテアーゼ阻害剤を含む氷冷PBS中で再懸濁します。
- 16 $^{\circ}$ C, 低速（1300rpm）でサンプルを遠心分離し、上清を捨てます。
- 15.-16. の過程をもう一度繰り返します。

> Step2b.細胞溶解およびクロマチン断片化（組織）へ

STEP 2a.細胞溶解およびクロマチン断片化（培養細胞）

- 10万個の細胞に対応する細胞ペレットに10mLの氷冷Lysis buffer iL1を加えます。数回ピペティングを行い、細胞を再懸濁し、穏やかに混合しながら4 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートします。
※より少ない細胞を使用する場合は、それに応じてバッファーの量を減らしてください。
- 4 $^{\circ}$ C, 1,600rpm (500xg) で5分間遠心分離し、上清を捨てます。

20. 10mLの氷冷Lysis buffer iL2を細胞ペレットに加えます。ピペッティングを数回行い、細胞を再懸濁し、穏やかに混合しながら4°Cで10分間インキュベートします。
21. 4°C, 1,600 rpm (500 x g) で5分間遠心分離し、上清を捨てます。
22. 氷上で、200xProtease inhibitor cocktailをShearing buffer iS1に加えます。
23. 1000万個の細胞にプロテアーゼ阻害剤を含む1 mLのShearing buffer iS1を加えまピペッティングを行い再懸濁し、氷上で10分間インキュベートします。
24. Picoruptor®を用いた超音波処理によってクロマチンを断片化します。事前に適切な超音波処理時間を検討するためのタイムコース実験を行うことをお勧めします
 - Picoruptor®の場合、1回当たり30秒ON、30秒OFFのセッションを5~15サイクル行います。操作の間にボルテックスをする必要はありません。
25. 13,000rpm (16,000xg) で10分間遠心分離し、断片化クロマチンを含む上清を回収します。

> Step3.磁気ビーズを用いた免疫沈降へ

STEP 2b. 細胞溶解とクロマチン断片化 (組織)

26. 30~40mgの組織から得られたペレットに10mlの氷冷Lysis buffer iL1を加えます。ピペッティングでペレットを再懸濁し、4°Cで10分間インキュベートします。
27. 4°C, 1300 rpmで5分間遠心分離し、上清を捨てます。
28. ペレットに10mLの氷冷Lysis buffer iL2を加えます。ピペッティングでペレットを再懸濁し、4°Cで10分間インキュベートします。
29. 4°C, 1300rpmで5分間遠心分離し、上清を捨てます。
30. プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む1.8mLのshearing buffer iS1でペレットを再懸濁し、ダウンス型ホモジナイザー (タイトな乳棒) を用いてホモジナイズします。
31. サンプルを、1.5mLソニケーションチューブへそれぞれ300μLずつ分注し、氷上で10分間インキュベートします。チューブは以下に示す推奨チューブのみを使用してください:
 - Picoruptor®, 1.5 ml Microtubes with Caps (Cat. No. C30010016)
32. Picoruptor®を用いた超音波処理によってクロマチンを断片化します。事前に適切な超音波処理時間を検討するためのタイムコース実験を行うことをお勧めします
 - Picoruptor®の場合、1回当たり30秒ON、30秒OFFのセッションを5~15サイクル行います。操作の間にボルテックスをする必要はありません。
33. サンプルを新しい1.5 mLチューブに移し、13,000 rpmで10分間遠心します。
34. 断片化クロマチンを含む上清を回収します。
35. クロマチン断片化効率の評価のために100μLのサンプルを採取します (「追加プロトコル」参照)。残りのクロマチンは、免疫沈降に使用するために、-80°Cで最大2ヶ月間保存することができます。

> Step3.磁気ビーズを用いた免疫沈降へ

STEP 3. 磁気ビーズを用いた免疫沈降



免疫沈降工程はまた、セミオート ChIPettor®システムを用いて行うことができます。その場合は、この製品に同梱されているプロトコルを参照してください。プロトコルはウェブサイト www.diagenode.com からダウンロードすることもできます。

36. 5x ChIP buffer iC1をChIP-seqグレードの水で希釈して、1x ChIP buffer iC1を作成します。作成後は氷上に置いてください。
37. 必要量（IP1回あたり20μl）の DiaMag Protein A コーティング済み磁気ビーズを採取し、2倍量の氷冷1xChIP ChIP buffer iC1で4回洗浄します。
38. 最後の洗浄後、本来のビーズの必要量（IP1回あたり20μl）と同量の1x ChIP buffer iC1を取り、ビーズを再懸濁します。
39. 断片化クロマチン1μL（1%）をインプットサンプルとして取り分けておき、4°Cで保存します。
40. 以下に示すようにChIP mixを用意します(IP1回あたり):
 - 5% BSA 6 μL
 - 200x protease inhibitor cocktail 1.5 μL
 - 5x ChIP buffer iC1 56 μl
 - 断片化クロマチン 100 μL
 - DiaMag Protein A コーティング済み 磁気ビーズ 20 μl
 - ChIP-seq grade antibody 必要量
 - ChIP-seq 用H2O で合計 300 μL になるまでメスアップ
 ※必要に応じて、NaBu（HDAC阻害剤、最終濃度20mM）または他のHDAC阻害剤を添加することもできます。
41. ローテータを用いて4°Cで一晩インキュベートします。
42. 翌日、チューブを軽くスピンドウンし、氷冷磁気ラックに入れ、上清を捨てます。
43. 350μLの氷冷Wash buffer iW1を添加し、ローテータ上で4°Cで5分間インキュベートします。Diagenode磁気ラックを用いて洗浄バッファーを捨てます。
44. Wash buffer iW2、iW3およびiW4を用いて、それぞれステップ42および43をそれぞれ1回ずつ繰り返します。

STEP 4. 溶出、脱架橋、DNA精製

45. 最後の洗浄バッファーを除去した後、100μLのElution buffer iE1をビーズに加え、室温にてローテータ上で30分間インキュベートします。
46. チューブを軽く回転させ、Diagenode磁気ラックに入れます。上清を新しいチューブに移し、4μLのElution buffer iE2を添加します。また、99μLのbuffer iE1と4μLのbuffer iE2を1μLのインプットサンプルに加えます。65°Cで4時間もしくは一晩インキュベートします。
47. IPureキットを用いてDNAを精製します。
48. 各IPおよびインプットサンプルに2μLのCarrier (IPure)を加えます。
49. 各IPおよびインプットサンプルに100μLの100%isopropanolを加えます。

注意：isopropanolの添加後、溶液が曇ることがあります。これは実験に有害ではなく、精製されたDNAの品質や量に影響を与えません。
50. IPure beads v2を再懸濁し、各IPおよびインプットサンプルに10μLずつ加えます。
51. 室温にてローテータ（40 rpm）上でIPおよびインプットサンプルを10分間インキュベートします。
52. 50%isopropanolを含有するWash buffer 1 (IPure)を次に示すように準備します:

| Wash buffer 1(IPure) | |
|---------------------------------------|-------------|
| Wash buffer 1 w/o isopropanol (IPure) | 700 μ L |
| isopropanol (100%) | 700 μ L |
| 合計 | 1.4 mL |

53. チューブを静かにスピンドウンし、**DiaMag 1.5磁気ラック**に置き、1分後バッファーを捨てます。ビーズはチューブに残したまま、100 μ Lの**Wash buffer 1 (IPure)** を加え、室温にてローテータ (40 rpm) 上で5分間インキュベートします。
54. 次に示すように、50%isopropanolを含有する**Wash buffer 2(IPure)**を準備します:

| Wash buffer 2(IPure) | |
|-------------------------------|-------------|
| Wash buffer 2 w/o isopropanol | 700 μ L |
| isopropanol (100%) | 700 μ L |
| 合計 | 1.4 mL |

55. チューブを静かにスピンドウンし、**DiaMag 1.5-磁気ラック**に置き、1分後バッファーを捨てます。ビーズはチューブに残したまま、100 μ Lのを加え、室温にてローテータ (40 rpm) 上で5分間インキュベートします。
56. チューブを軽くスピンドウンし、**DiaMag1.5-磁気ラック**に入れ、1分後バッファーを捨てる。ビーズをチューブに残したまま、1チューブにつき25 μ Lの**Buffer C (IPure)**を加えます。溶出の必要に応じて量を増やしても構いません。チューブを閉じ、室温にてローテータ (40 rpm) 上で15分間インキュベートします。その後ピペットを使用して、ビーズのペレットをチューブの底に落とすように再懸濁します。
57. チューブを回転させて**DiaMag 1.5-磁気ラック**に入れ、1分後IPおよびインプットサンプルの上清を回収し1.5 mLチューブに入れます。ビーズは捨てます。
58. 回収したDNAを含む上清を氷上に置き、実験を続けます。すぐに使わない場合は-20°Cまたは-80°Cで保存することもできます。

STEP 5. 定量PCR解析

59. 以下のようにqPCR mixを調製する (付属のコントロールプライマーを使用し、反応量を20 μ Lとした場合)
- a 2x SYBR[®] Green qPCR master mix 10 μ L
 - primer mix 1 μ L
 - water 4 μ L
 - IP'd or input DNA 5 μ L
60. 次のPCRプログラムを使用します: 95°Cで3~10分の変性ステップ (Taqポリメラーゼの活性化時間に関するサプライヤーの推奨事項をよく確認してください)、95°C 30秒、60°C 30秒、72°C 30秒。
- これらの条件は、使用されるマスターミックスまたはqPCRシステムのタイプに応じて最適化が必要な場合があります。

詳細版プロトコル

STEP 1a.細胞採取とDNA-タンパク質架橋反応 (培養細胞)

以下のプロトコルは、接着細胞を対象としています。浮遊細胞の場合は、プロトコル手順6.遠心分離による細胞の回収から開始してください。

1. PBS、培地およびトリプシン-EDTAを予め37°Cに温めておきます
2. 培地を除去し、予め温めておいたPBS（75cm²培養ディッシュの場合は10mL）で細胞をすすぎます。2分間ディッシュをゆっくりと振とうさせ、全体にPBSが行き渡るようにします。
3. PBSを除去し、滅菌トリプシン-EDTAをディッシュに加えて接着細胞を底から分離します。それぞれの細胞数に対して必要なトリプシンの量は表4を参考にしてください。細胞が剥がれ始めるまで、ディッシュを1~2分間静かに振とうします。必要な時間は、細胞の種類によって異なる場合があります。長時間のトリプシン処置は細胞を損傷する可能性があるため、必要以上にトリプシン処理を継続しないように、細胞が剥がれ始めるのを定期的に確認してください。

表4

| 細胞数 | 3x 10e6 cells | 10e7 cells | 5x 10e7 cells |
|------------|---------------|------------|---------------|
| トリプシン-EDTA | 1 mL | 3 mL | 15 mL |

4. 細胞が剥がれはじめたらトリプシンを不活性化するため、すぐに新しい培地を細胞に添加します。加える培地の量は表5を参考にしてください。得られた細胞懸濁液を50mlチューブへ移します。

表5

| 細胞数 | 3x 10e6 cells | 10e7 cells | 5x 10e7 cells |
|-----|---------------|------------|---------------|
| 培地 | 2 mL | 6 mL | 30 mL |

5. 10mlのPBSをディッシュに加えずすいだ後、4.の細胞懸濁液を含む50 mlチューブにこれを加えます。
6. 4°C, 1600 rpmで5分間遠心分離し、上清を除去します。
7. 20 mlのPBSで細胞を再懸濁し、細胞数を数えます。4°C, 1600 rpmで5分間遠心分離し、細胞を回収します。
8. 細胞をPBSで再懸濁し、500μLのPBSあたり最大1000万細胞までとなるような濃度にします。必要に応じて、細胞濃度を500μLあたり100万個まで減らすことができます。1.5 mLチューブにラベルを付け、各チューブに500μLの細胞懸濁液を分注します。
9. 500μLの細胞懸濁液を含む各チューブに13.5μLのホルムアルデヒド37%を加えます。穏やかにボルテックスして混合し、室温で8分間インキュベートして細胞固定が起こるようにします。
10. 57μLのGlycineを細胞に添加して固定反応を停止します。穏やかにボルテックスして混合し、室温で5分間インキュベートします。この時点以降、細胞を氷上に置いて作業してください。
11. 4°C, 1600 rpmで5分間遠心分離して細胞を回収します。細胞ペレットに触れないように注意して上清を捨てます。
12. 1mLの氷冷PBSで細胞ペレットを2回洗浄します

> Next: Step2a.細胞溶解およびクロマチン断片化（培養細胞）へ

STEP 1b.組織分離とDNA-タンパク質クロスリンク反応 (新鮮組織および凍結組織)

13. ペトリ皿上で新鮮組織または凍結組織30~40mgを秤量します。サンプルは常に氷上に置き、劣化を防ぐために操作時間を最小限に抑えます。
14. 外科用メスを使用して組織を小片（1~3mm³）に切り分けます。
15. プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む氷冷PBS1mLを加え、ダウンス型ホモジナイザー（緩い乳棒）を用いて組織を破壊し、均一な懸濁液にします。

16. 組織懸濁液を1.5 mLチューブに移し、4°C, 1300 rpmで5分間遠心します。ペレットに触れないように注意して、静かに上清を捨てます。
17. 室温にてペレットを1%ホルムアルデヒドを含有する1mLのPBSに再懸濁します。
18. 室温にてローテータ上で8~10分間インキュベーションします
19. 注意；固定時間は検討が必要な場合があります。一般に、ヒストン修飾は、転写因子（10~15分）よりも短い固定時間（8分）で行われます。より強い固定を行うと、超音波処理されにくいクロマチンになる恐れがあります。
20. 100µLのGlycineを加えて架橋反応を停止し、室温にて5分間ローテートします。
21. 4°C, 低速（1300rpm）で遠心分離し、上清を捨てます。
22. 細胞ペレットを氷冷PBSで洗浄します。上清を吸引し、ペレットを1 mLのプロテアーゼ阻害剤を含む氷冷PBSで再懸濁します。
23. 4°C, 低速（1300rpm）で遠心分離し、上清を捨てます。
24. 22.-23. のステップをもう一度繰り返します。

> Next: Step2a.細胞溶解およびクロマチン断片化（培養細胞）へ

STEP 2a. 細胞溶解およびクロマチン断片化（培養細胞）



25. 1mLの氷冷Lysis buffer iL1を、1000万個の細胞を含む1.5mLチューブに加えます。ピペットで上下に数回細胞を再懸濁し、15 mLチューブに移します。穏やかに混合しながら、更に9mLのbuffer iL1を追加し、4°Cで10分間インキュベートします。細胞の開始量が1000万未満だった場合、それに応じてスケールダウンしてください（例えば、500万個の細胞に対しては合計5mLのbuffer iL1を用います）。
26. 4°C, 1,600 rpmで5分間遠心分離し、細胞をペレット化して上清を捨てます。
27. 1mLの氷冷Lysis buffer iL2を添加し、ピペッティングし細胞を数回再懸濁します。更に9mLのbuffer iL2を添加し、穏やかに混合しながら4°Cで10分間インキュベートします。1000万個未満の細胞を使用する場合は、それに応じて添加量を減らしてください。
28. 4°C, 1,600rpm（500xg）で5分間遠心分離して細胞を再びペレット化し、上清を捨てます。
29. 200x protease inhibitor cocktailをShearing buffer iS1に添加します。1チューブあたり1000万個の細胞に対し断片化バッファー1 mLを加えるように調製します。この操作は氷上で行ってください。
30. 1mLの用意したShearing buffer iS1を1000万個の細胞に加え、ピペットで上下に数回細胞を再懸濁します。最終的な細胞の濃度は、100µLのbuffer iS1あたり100万個の細胞が含まれるようにしてください。懸濁後1.5 ml Picoruptor Microtubes with Caps（カタログ番号C30010016）に100~300µLずつ分注し、氷上で10分間インキュベートします。その後サンプルをボルテックスしてスピンドウンします。
31. サンプルを、1.5mLソニケーションチューブへそれぞれ300µLずつ分注し、氷上で10分間インキュベートします。以下に示す推奨チューブのみを使用してください：
 - Picoruptor®: 1.5 ml Picoruptor® Microtubes with caps (Cat. No. C30010016)

32. 13,000 rpm（16,000xg）で10分間遠心分離し、断片化クロマチンを含む上清を回収します。免疫沈降ですぐにクロマチンを使用するか、そうでない場合は-80°Cで2ヶ月まで保存することができます。必要に応じて、この工程でクロマチン断片化効率を分析することもできます（「追加プロトコル」参照）。

> Next ; Step3. 磁気ビーズを用いた免疫沈降へ

STEP 2b. 細胞溶解とクロマチン断片化（組織）



33. 30~40mgの組織から得られたペレットに10mlの氷冷溶解 Lysis buffer iL1を加えます。ピペッティングしペレットを再懸濁し、4°Cで10分間インキュベートします。
34. 4°C, 1300 rpmで5分間遠心分離し、上清を捨てます。
35. 10mlの氷冷Lysis buffer iL2をペレットに加えます。ピペッティングしペレットを再懸濁し、4°Cで10分間

インキュベートします。

36. 35°C, 1300rpmで5分間遠心分離し、上清を捨てます。
37. Protease inhibitor cocktailを含有するshearing buffer iS1を1.8ml加えペレットを再懸濁し、ダウンス型ホモジナイザー（タイトな乳棒）を用いてホモジナイズします。
38. サンプルを、1.5mLソニケーションチューブへそれぞれ300 μ Lずつ分注し、氷上で10分間インキュベートします。以下に示す推奨チューブのみを使用してください：
 - Picoruptor®の場合、1.5 ml Picoruptor Microtubes with Caps (Cat. No. C30010016)
39. Picoruptor®を用いた超音波処理によるクロマチンの断片化を行います。はじめに適切な処理時間を検討するためのタイムコース実験をすることを強くお勧めします。
 - Picoruptor®の場合、1回当たり30秒ON、30秒OFFのセッションを5~15サイクル行います。操作の間にボルトテックスをする必要はありません。
40. サンプルを新しい1.5 mlチューブに移し、13,000 rpmで10分間遠心分離します。
41. 断片化クロマチンを含む上清を集めます。
42. クロマチン断片化率の評価のために、100 μ Lのサンプルとして取り分けておきます（「追加プロトコル」参照）。残りのクロマチンは免疫沈降で使用するために、-80°Cで最大2ヶ月間保存することができます。

STEP3.磁気ビーズを用いた免疫沈降



免疫沈降工程はまた、セミオート ChIPettor（商標）システムを用いて行うことができます。その場合は、この製品に同梱されているプロトコルを参照してください。プロトコルはウェブサイト www.diagenode.com からダウンロードすることもできます。

このプロトコルは、ChIPあたり100万個の細胞に対して最適化されています。より多くの細胞を使用することも可能ですが、DNAを精製する前に別々のChIP反応を実行し、サンプルをプールしておくことを推奨します。

43. 最初に実験中のIPの総数を決定します。各実験に1つのネガティブコントロールを含めることを推奨します（IgGネガティブコントロールIP）。DiaMag Protein Aコート磁気ビーズ（IP1回につき20 μ L）を必要な量だけ取りります。5x ChIP buffer iC1をChIP-seqグレードの水で希釈して、1x ChIP buffer iC1を作成します。必要な1xChIP buffer iC1の合計量は、実験に用いるビーズの量の9倍です。希釈したChIP buffer iC1は氷上に置いてください。
44. ビーズの2倍量の氷冷1xChIP buffer iC1で、ビーズを4回洗浄します。1xChIP buffer iC1を加え、数回上下にピペティングしてビーズを再懸濁し、チューブを1.5 ml Diagenode磁気ラック（カタログ番号 B04000003）に入れます。1分間待つてビーズを磁石に捕捉させ、上清を除去します。これを3回繰り返します。磁気ラックを使わない場合は、チューブを1300rpmで5分間遠心分離し、ビーズペレットが剥がれないように注意して上清を捨てます。
45. 最後の洗浄後、ビーズの必要量と同じ量（IP1回につき20 μ L）の1x ChIP buffer iC1で再懸濁します。
46. 表6に従ってChIP反応混合物を調製します。必要に応じて、HDAC阻害剤であるNaBu（最終濃度20mM）または他のHDAC阻害剤を添加することもできます。ネガティブコントロールIPには2 μ LのウサギIgGコントロール抗体を使用します。ポジティブコントロールIPが実験に含まれている場合は、H3K4me3 ChIP-seq用コントロール抗体1 μ Lを使用してください。なお、断片化クロマチンのうち1 μ Lは、翌日にインプットサンプルとして使用するため、ChIP反応混合物と混ぜることなく、取り分けておいてください。

| 表6 ChIP 反応混合物 | | | | | | | |
|---------------|-------------|---------------------|----------------------|----------------------------|------------|---------------------|---------|
| IP総数 | 5% BSA (μL) | 200x プロテアーゼ阻害剤 (μL) | 5x ChIPバッファ iC1 (μL) | 断片化クロマチン (1e10 cells) (μL) | 磁気ビーズ (μL) | ChIP-seq 用 H2O (μL) | 抗体 (μL) |
| 1 | 6 | 1.5 | 56 | 100 | 20 | 116.5-x | x |
| 2 | 12 | 3 | 112 | 200 | 40 | 233-x | x |
| 4 | 24 | 6 | 224 | 400 | 80 | 466-x | x |
| 6 | 36 | 9 | 336 | 600 | 120 | 699-x | x |
| 8 | 48 | 12 | 448 | 800 | 160 | 932-x | x |

47. 4°C、40 rpmのローテータ上で一晩インキュベートします。
48. 翌朝、一晩のインキュベーション後、チューブを軽くスピンドウンした後磁気ラックに入れ、1分後に上清を除去します。ビーズの洗浄として、wash buffer iW1を350μL加え、チューブを静かに振とうしてビーズを再懸濁し、4°Cにてローテータ上で5分間インキュベートします。
49. Wash buffer iW2、iW3およびiW4をそれぞれ350μLずつ用いて、上記の洗浄を1回ずつ繰り返します。

STEP 4. 溶出、脱架橋、DNA精製

50. 最後の洗浄バッファを除去した後、100μLのElution buffer iE1をビーズに加え、室温にてローテータ上で30分間インキュベートします。
51. チューブを軽く回転させ、Diagenode 磁気ラックに入れます。新しいチューブに上清を移し、4μLのElution buffer iE2を加えます。また、99μLのElution buffer iE1および4μLのElution buffer iE2を1μLのインプットサンプルに加えます。65°Cにて4時間または一晩インキュベートします。
52. 必要に応じてサンプルをプールします。
注：2つまでのサンプルは簡単にプールできます。3つ以上のサンプルをプールする必要がある場合、各サンプル精製を個別に処理し、IPure精製および濃縮終了後に最終溶出液をプールします（例: Microcon[®]など）
53. 各IPおよびインプットサンプルに2μLのCarrier (IPure)を加えます。
54. 各IPおよびインプットサンプルに100μLの100%isopropanolを加えます。
注: isopropanolの添加後、溶液は濁ることがありますが、これは実験に有害ではなく、精製されたDNAの品質や量に影響を与えません。
55. IPure beads v2を再懸濁し、各IPおよびインプットサンプルにそれぞれ10μLずつ加えます。
 - 4°Cでの保管中およびすべての段階で、IPure beads v2は液体懸濁液に浸かるように保存してください。乾燥すると性能が低下します。
 - 最終容量は、1回のIPure反応あたり216□Lになります

56. 室温にて40 rpmのローテータ上で10分間IPおよびインプットサンプルをインキュベートします。50%isopropanolを含むWash buffer 1を準備します：

| Wash buffer 1 | |
|-------------------------------|--------|
| Wash buffer 1 w/o isopropanol | 700 μL |
| isopropanol (100%) | 700 μL |
| 全量 | 1.4 mL |

- 蒸発を避けるために、ボトルを開けたままにしないでください

57. チューブを軽くスピンドウンし、DiaMag1.5に入れ、1分後にバッファを捨てます。捕捉されたビーズを残しておいたまま、100μLの洗浄バッファAを加えます。チューブの蓋を閉じ、8チューブストリップを転倒混和してビーズを再懸濁させ、室温にて40rpmのローテータ上で5分間インキュベートします。

- チューブの壁に付着したビーズには触れないでください。
- チューブを軽くスピンドウンし、蓋についた液体を落としてから、Diagenode磁気ラックに入れます。次のように50%isopropanolを含有するWash buffer 2を調製します。

Wash buffer 2

| | |
|-------------------------------|-------------|
| Wash buffer 2 w/o isopropanol | 700 μ L |
| isopropanol (100%) | 700 μ L |
| 全量 | 1.4 mL |

- 蒸発を避けるために、ボトルを開けたままにしないでください。

58. 次のようにIPおよびインプットサンプルをWash buffer 2で洗浄します。チューブを軽くスピンドウンし、DiaMag1.5に入れ、1分待ってバッファーを捨てます。捕捉されたビーズを残したまま、100 μ LのWash buffer 2を加えます。ビーズを再懸濁するため、8チューブストリップをスピンドウンし、室温にて40rpmのローテータ上で5分間インキュベートします。

- チューブの壁に付着したビーズには触れないでください。
- DiaMagラックに入れる前に、チューブを軽くスピンドウンして蓋に溜まった液体を落としてください。

注：この溶出バッファー（Buffer C）は、ダイレクトqPCR分析、全ゲノム増幅、チップハイブリダイゼーション、および次世代シーケンシングに適しています。

59.

- a. チューブを軽くスピンドウンしDiaMag1.5に入れ、1分待ってバッファーを捨てます。チューブを再びスピンドウンし、DiaMag1.5磁気ラックに置きます。Wash buffer 2がまだ残っているようであれば捨てます。25 μ Lのbuffer Cでビーズペレットを再懸濁し、室温にて40rpmのローテータ上で15分間インキュベートします。
- b. チューブをスピンドウンしてDiaMag1.5に入れ、1分待って上清を新しくラベルした1.5 mLチューブに移し、ビーズを捨てます。
- c. DNAを氷上に置き、次に続くプロトコルに進みます。すぐに実験をしない場合は、次回の使用まで-20°Cまたは-80°Cで保存します。

60. Qubitシステムまたはそれと同様の方法を使用して、IP-dDNA5 μ L（10%）を取り、「Quant-IT dsDNA HSアッセイキット」で濃度を測定します。

61. qPCRまたはハイスループットシーケンシングで分析する準備が整うまで、-20°CでDNAを保存しておきます。

STEP 5. 定量PCR分析

サンプルを配列決定する前に、少なくとも1つのポジティブコントロールおよび1つのネガティブコントロールのターゲットを使用して、qPCRによって免疫沈降したDNAを分析することを推奨します。このキットには、ポジティブ（GAPDH TSS）およびネガティブ（ミオグロビンエクソン2）コントロールプライマーペアが含まれています。これは以下に示すプロトコルを用いて、SYBR®Green qPCRアッセイでキットに含まれているポジティブコントロール抗体（H3K4me3 ChIP-seq 用抗体）として使用することができます。関心のある抗体の適切なコントロールターゲットを分析するために、独自の選択方法を使用してください。

62. 以下のようにqPCRミックスを調製します（付属のコントロールプライマー対を使用して20 μ Lの反応量で行う場合）

- 2x SYBR®Green qPCR master mix 10 μ L
- primer mix 1 μ L
- water 4 μ L
- IP DNA または input DNA

以下のPCRプログラムを使用してください：95°Cで3~10分間の変性ステップ（Taqポリメラーゼの活性化時間に関するサプライヤーの推奨事項をよく確認してください）、続いて95°Cで30秒、60°Cおよび30秒で30秒 72°C。これらの条件は、使用されるマスターミックスまたはqPCRシステムのタイプに応じて最適化が必要な場合があります。

定量PCRデータ解釈

特定のゲノム遺伝子座のクロマチン免疫沈降の効率は、インプットのパーセンテージ（インプットDNAと比較した免疫沈降DNAの相対量）として計算されたその遺伝子座の回復として表すことができます。インプットに使用された量がChIPに使用された量の1%であった場合、回復は次のように計算できます。

$$\% \text{回復} = 2^{-(Ct_{\text{input}} - Ct_{\text{sample}})}$$

Ct_{sample} と Ct_{input} は、それぞれIPサンプルのDNAサンプルとインプットサンプルに対するqPCRの指数関数的な段階からの閾値サイクルです。この方程式は、PCRが100%効率的であると仮定しています（増幅効率= 2）。正確な結果を得るため、実際の増幅効率がわかっている場合は考慮に入れる必要があります。

ポジティブコントロール抗体（例えば、H3K4me3）では、ポジティブコントロール標的（GAPDH TSS座）の回収率は10~20%であると予想されますが、これは使用する細胞種に依存します。ネガティブコントロール標的（Myoglobinエクソン2遺伝子座）の回収率は1%未満であるべきです。

サンプルがシーケンシングに十分適しているかどうかを判断する基準は、主にターゲットに依存します。以下は一般的なガイドラインです。

- ポジティブコントロール標的の回収率は少なくとも5%
- ネガティブコントロール標的の回復率は1%以下
- ポジティブコントロールとネガティブコントロールの比率は、少なくとも5以上

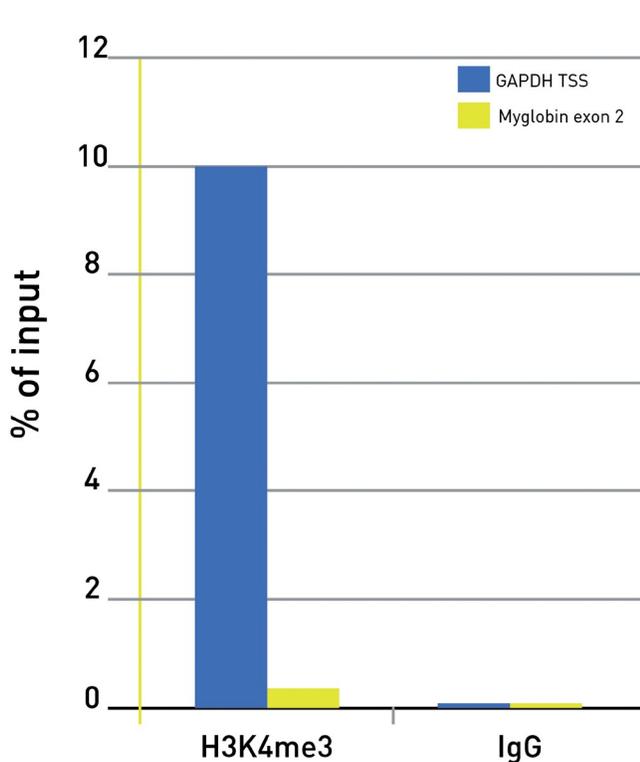


図2：iDeal ChIP-seqキットのコントロール抗体を用いてヒトHeLa細胞上でChIPを実施した。100万細胞からの断片化クロマチン、1 μ Lのポジティブコントロール抗体および2 μ LのネガティブコントロールIgGを各IPごとに使用した。キットに含まれるポジティブコントロール標的GAPDH-TSSおよびネガティブコントロール標的ミオグロビンエクソン2プライマーセットを用いて、定量PCRを実施した。回復率はインプットの%（qPCR分析後のインプットDNAと比較した沈殿DNAの相対量）として表される。

ChIP-シーケンシング

iDealプロトコルは、Illumina®GAIIxおよびIon Torrent™ PGMTM Next-GenシーケンサーでChIP-seqに最適化されていますが、Illumina®HiSeqまたはLife Technologies SOLiDTMシステムのような他の配列決定システムも使用することができます。



**ASK THE
EXPERTS**

ChIP-seq実験やバイオインフォマティクスデータ分析の設計に関するご質問がある場合は、当社カスタマーサポートチームまでお気軽にお問い合わせください。

アジア、ヨーロッパ、オセアニア、アフリカ地域:

custsupport@diagenode.com

北米および南米地域:

custsupport.na@diagenode.com

ChIP-seqデータ分析の推奨事項

シーケンシング後にゲノムのキャプチャ領域を見つけるには、a) リファレンスアライメント、b) ピークコール、c) さらにデータ分析（アノテーション、ビジュアライゼーションなど）を行うと、探しているものを見つけるのに役立ちます。同じ問題に対し様々なアプローチをとるソフトウェアツールがありますので、実験のデータセットと目的に合わせて、豊富な種類の中から選ぶことができます。シーケンサーごとに固有の読み取りセット（短いものまたは長いもの、固定長または可変長、ヌクレオチドまたはカラーコードなど）があるため、異なるシーケンサーのワークフローは基本的にアライメントステップでのみ異なります。

a) ChIP-seq実験（イルミナ®の場合はELAND、PGMの場合はTMAP）では、デフォルト設定のビルトインアライナーが非常にうまく機能しました。アクセスできない場合は、オープンソースツールも利用できます。私たちはBWAに肯定的な経験を持っています：<http://bio-bwa.sourceforge.net>。多目的アライナーを使用する場合は、データセットに適した設定を使用することを忘れないでください。ソフトウェアのマニュアルを参照してください

b) ピーク呼出の目的は、豊富な領域を整理させることです。使用しているソフトウェアとその設定によって結果が大きく異なる可能性があるため、ピーク時の発信者を選択して設定する際は、細心の注意を払ってください。比較文献やソフトウェアマニュアルを読んで、特定のプログラムの仕組みを十分に理解することをお勧めします。データの重要な機能の1つは、濃縮領域の予想される長さです。転写因子は短くて鋭いピークを生成する傾向があり、ヒストンマークは豊富な領地を形成する。シャープなピーク検出のための注目すべきツールはMACSですが、SICERはヒストンマーク専用ですが、ZINBAのようなツールはどちらも良い結果を得るために使用できます。MACS 2は、以前のバージョンよりもヒストンマークに適していると報告されています。

利用可能なソフトウェア:

- MACS: <http://liulab.dfci.harvard.edu/MACS>
- MACS 2: <https://github.com/taoliu/MACS/tree/master/MACS2>
- SICER: <http://home.gwu.edu/~wpeng/Software.htm>
- ZINBA: <http://code.google.com/p/zinba>

実験にはMACS 1.4.1を広く使用しています。ピークが短くなるための重要なツールですが、幅広い領域では困難な場合がありますので、必要に応じてヒストグラムを幅を広げ、pvalue cutoffを下げることをお勧めします。場合によっては、局所ラムダ計算をオフにすると、豊富な領地がよりよくカバーされますが、これにより誤った正のピークが検出される可能性があります。パラメータを調整する方法がわからない場合は、MACSマニュアル（<http://liulab.dfci.harvard.edu/MACS/README.html>）を参照してください。

c) ピークを持つことでエピジェネティックコードの解読を開始することができます。

目視検査は一般的な最初のステップです。特に、実験の目的が特定の遺伝子に特定のヒストン修飾/転写因子が付いているかどうかを確認する場合や、ポジティブ/ネガティブコントロール部位のいくつかを濃縮して確認する場合があります。ピーク時の発信者の出力形式と設定に従って、適切なビューアソフトウェアを選択します。

アノテーションは、ピークに関連する生物学的特徴を特定することができるため、または活性遺伝子のプロモーター領域におけるH3K4me3濃縮物のような予想される遺伝子座にピークを有するかどうかを調べることができるので、非常に有用です。ピーク関連遺伝子の遺伝子オンロジー/経路解析でアノテーションを拡張することで、転写因子/ヒストン修飾が細胞または生物全体の生命にどのように関与しているかを発見することができます。モチーフ検索は配列特異的転写因子のほとんど必須の分析ですが、ヒストン修飾部位の共通モチーフもありますので、理論上プロモーター特異的濃縮物にプロモーター特異的モチーフがあるかどうかを確認できます。

d) ピークコーラーを含む多くのプログラムは、ピークの記述統計を出力し、例えばそれらの濃縮比、有意性、幅、高さ、ピークにおける読み取り値を測定します。この特徴付けは、ほとんどのアプリケーションに不可欠なデータをよりよく理解するのに役立ちます。典型的な例は、異なるサンプル調製プロトコルまたは異なるシーケンサー設定の性能の比較です。最終的に推奨される分析タイプは、比較分析です。私たちは実験で複製物を使用することを推奨します。共通ではないピークを除去することで、偽陽性を効果的に低減することができます。また、比較のために検証済みの参照ピークセットを使用することもできますが、ほとんど利用できません。さらに、サンプルから生物学的に関連する他のデータがある場合は、

それらを比較して統合することが賢明です。例えば、RNA-seqデータセットは、遺伝子発現を制御するはずのヒストンマークの検証の大きな源です。

以下はピーク解析に推奨されるフリーソフトです：

- IGV (visualization): <http://www.broadinstitute.org/igv>
- UCSC Genome Browser (visualization): <http://genome.ucsc.edu>
- HOMER (motif search, annotation, gene ontology, comparison, statistics): <http://biowhat.ucsd.edu/homer>
- PinkThing (annotation, conservation, comparison, gene ontology, statistics): <http://pinkthing.cmbi.ru.nl>
- GREAT (annotation, statistics): <http://great.stanford.edu>

ChIP-seqを解析する際は、シーケンシングの品質と解析に使用するソフトウェアツールの性能に常に注意してください。例えば、多くの読み取りエラーを伴う低品質シーケンシングでは、優れたIP DNAにもかかわらず、探しているピークを見つけるのが難しくなります。品質を制御するには、GA IIのIllumina®パイプラインで利用可能なソフトウェアやメトリックを使用してください。オープンソースのツールも使用できます。Babraham InstituteによるFastQC：<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc>。この章では、誰もがアクセス可能で、ほとんどのものをテストしたので、いくつかの無料ツールを推奨しました。同じ目的のための商用ソフトウェアもあり、そのほとんどはいくつかのタスクを実行することができ、あるいは完全なChIP-seqワークフローも可能です。私たちが知っているいくつかの例がありますが、それらを検証はしていません：

- CLC Genomics Workbench: <http://clcbio.com>
- Partek Genomics Suite : <http://www.partek.com/partekgs>
- NextGENe: <http://www.softgenetics.com/NextGENe.html>
- Avadis NGS : <http://www.avadis-ngs.com>
- Geneious: <http://www.geneious.com/web/geneious/geneious-pro>
- GenoMiner: <http://www.astridbio.com/genominer.html>
- GenoMatix: <http://www.genomatix.de>

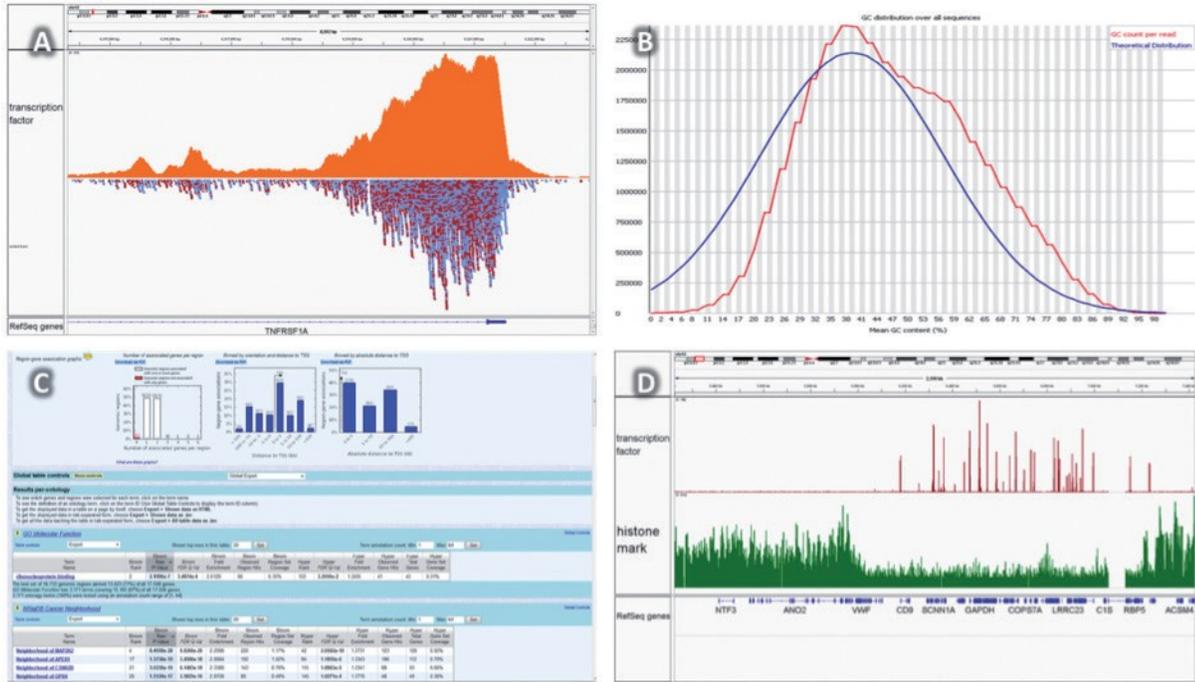


Figure 5

バイオインフォマティクスデータ分析の様々な段階

ChIP-seqデータのバイオインフォマティクス解析中に作成された代表的な画像

A:読み取りは、カバレッジグラフ内にピークのような構造を形成するために結合部位の周りに蓄積している。ピークコーラーは、これらのピークを検出するために使用される。

B:FastQCのような品質管理ソフトウェアは、シーケンシングの良さを評価するのに役立つ多くのパラメータを評価する。ここでは、GCのコンテンツの配分をモニタリングすることができる。

C: GREATによる記述統計と注釈出力。

D:転写因子は鋭いピーク（上部赤色バンド）を生成する傾向があるが、幅広い濃縮は多くのヒストン修飾（低い緑色バンド）の特徴である。

追加プロトコル

断片化クロマチン解析

本キットに含まれていない試薬類

- RNase cocktail (e.g. Ambion, AM 2286 A)
- フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1)
- クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1)
- 100% エタノール
- 70% エタノール
- DNA precipitant (Cat. No. C03030002)
- DNA co-precipitant (Cat. No. C03030001)

1. 断片化クロマチン50 μ lのアリコートを取り、4°Cで12,000 rpmで10分間スピンをします。クロマチン分析用の新しいチューブに上清を移します。
2. RNaseカクテル希釈液を用意します。例えば、Ambion、AM 2286A : 150 μ lのChIP-seqグレードの水に1 μ lのカクテルを希釈します。
3. 希釈したRNasecocktailを2 μ l加えます。
4. 37°Cで1時間インキュベートします。
5. 50 μ lの elution buffer iE1を加えます。
6. 4 μ lの elution buffer iE2を加えよく混ぜます。
7. サンプルを65°Cで4hもしくは一晩インキュベートします。
8. サンプルと等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) でDNAを1回抽出します。サンプルを室温10分間回転ホイール上でインキュベートします。
9. 室温で13,000rpmで2分間遠心分離し、上にある水層を新しい1.5 mlチューブに移します。
10. サンプルと等量のクロロホルム/イソアミルアルコール (24 : 1) を加えます。サンプルを室温10分間回転ホイール上でインキュベートします。
11. 室温で13,000rpmで2分間遠心分離します。上にある水層を新しい1.5 mlチューブに移します。
12. 12.10 μ lのDNAprecipitant、5 μ lのco-precipitant、および500 μ lの冷100%エタノールをサンプルに加えることによってDNAを沈殿させます。 -80°Cで30分間インキュベートします。
13. 4°C、13,000rpmで25分間遠心分離します。慎重に上清を除去し、氷冷した70%エタノール500 μ lをペレットに加えます。
14. 14,000rpm、4°Cで10分間遠心分離します。慎重に上清を除去し、室温で30分間チューブを開いたままにして、残りのエタノールを蒸発させます。
15. ペレットを20 μ lのTE緩衝液で再懸濁します。
16. 1.5%アガロースゲル中でサンプル (20 μ lのDNA +4 μ lの6 \times ローディング色素) を流します。

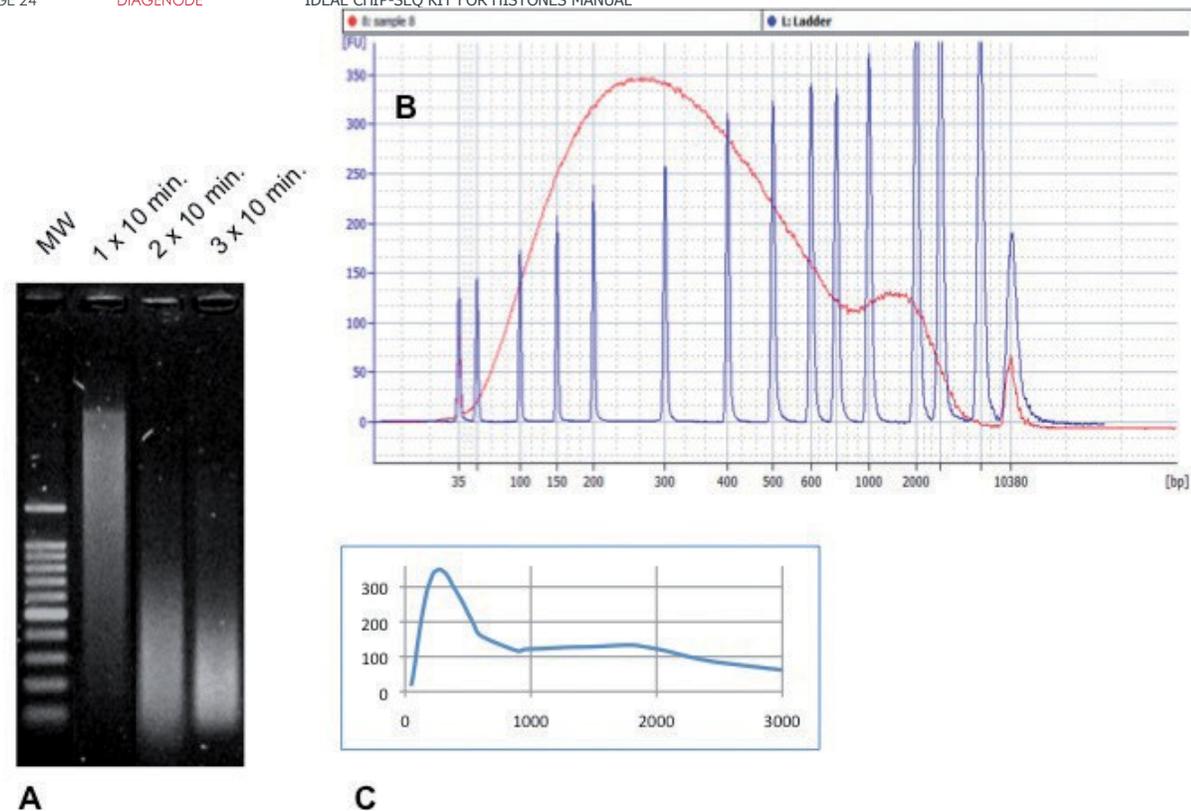


Figure 6

Diagenode iDeal ChIP-seqキットのバッファーとプロトコルを使用したBioruptorによる優れたクロマチン断片化の結果

Diagenode iDeal ChIP-seqキット（カタログ番号C01010050）のバッファーを使用して500万個の新鮮なまたは凍結した（-80°Cで保存した）細胞の核を単離し、次いでクロマチン断片化の前に200 μ lのシアリングバッファーiS1に再懸濁させた。

BioruptorとWater coolerを組み合わせた高出力設定（Position H）で、30秒ON / 30秒OFFの10サイクルの1,2回または3回の間にサンプルを断片化する。最適な結果を得るために、サンプルを10回の超音波処理サイクルの前後にボルテックスし、その後4°Cで短時間遠心分離する。全ての試料をRNaseで処理した（「Additional Protocols」参照）。

Panel A: 10 μ lのDNA（300ngに相当）を1.5%アガロースゲルで分析した結果

Panel B and C: 試料3（3x10分）をDNA高感度チップを用いてBioanalyzer 2100で分析した。パネルAでは、デフォルトの対数分析によるバイオアナライザーのアウトプットを見ることができるが、パネルCは、より良く可視化するための線形変換を表している。範囲外のフラグメントはこのグラフには表示されなかった。この例では、最適な断片化条件は3サイクルの10サイクル（30秒ON / 30秒OFF）に相当する

トラブルシューティング

| ステップ | トラブル、その解決策、およびコメント | |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 架橋反応 | 架橋が弱すぎる | 正確なホルムアルデヒド濃度で、適切な時間、適切な温度で固定ステップを実行してください。例えば、1%ホルムアルデヒド最終濃度（重量/容量）で室温で8分間インキュベートしてください。また、高品質でフレッシュなホルムアルデヒドを使用してください。 |
| | 架橋が強すぎる | |
| | タンパク質はDNAと相互作用するユニークな性質を持っています。いくつかのタンパク質はDNAに直接結合するのではなく、他のDNA関連タンパク質と相互作用します。 | 架橋時間が短すぎる、または長過ぎる場合、DNA消失または高いバックグラウンドをもたらさるため、問題が生じる場合は何度かタイムコース実験をして最適な架橋時間を最適化してください。 |
| | 架橋時間とホルムアルデヒド濃度の両方が重要です。 | 架橋は、クロマチン断片化の効率および特異的抗原免疫沈降の効率の両方に影響する可能性があります。架橋結合時間（5～10分）またはホルムアルデヒド濃度（1%、重量/体積）が低いほど、断片化効率が向上する可能性があります。DNAに直接結合しないタンパク質は沈降したクロマチンの収量を減少させる。 |
| | 架橋の最適な持続時間は、細胞種類や目的のタンパク質によって異なります。 | 異なるインキュベーション時間、例えば10,20および30分などのように時間を変えて試験することによって固定工程を最適化することが可能です。30分以上の架橋反応は効率的に切断できないため、30分以上架橋しないでください。 |
| | In vivoでのタンパク質のクロマチンへの効率的な固定は、ChIPにとって重要なステップです。架橋の程度は最も重要なパラメータです。 | その後の免疫沈降工程に関する2つの大きな問題を考慮に入れる必要があります。第一に過剰の架橋は、材料の損失またはクロマチンの抗原利用可能性の低下、またはその両方をもたらします。もう一つはホルムアルデヒドにより、抗原エピトープの感受性の低下です。架橋工程は注意深く行うことが不可欠です。 |
| | ホルムアルデヒドの反応を必ず終わらせてください。 | 固定を停止するためにGlycineを使用してください。ホルムアルデヒドを室温5分間125mMGlycineでクエンチします（513.5μlのサンプルあたり57μlの1.25MGlycineを加える、手順2を参照）。あるいは、固定された細胞を適切に洗浄し、ホルムアルデヒドをすべて除去するようにしてください。 |
| 細胞溶解 | 温度は重要です。 | 4°C（冷暗所）または氷上で細胞溶解を行います。細胞溶解中はサンプルを常に氷冷状態に保ち、氷冷バッファーを使用する場合はSTEP 3を参照してください。 |
| | 溶解中のタンパク質分解が起こる可能性があります。 | 使用直前にプロテアーゼ阻害剤を溶解緩衝液に添加してください。 |
| 細胞種 | キットのプロトコル検証に用いた細胞種 | HeLa、NCCIT 293T、軟骨細胞、P19、ASC（脂肪幹細胞）およびケラチン細胞は、磁気免疫沈降プロトコルを検証するために使用されました。 |
| 免疫沈降反応1回につき必要な細胞数 | ChIP実験に必要とされる細胞の量は、細胞型、目的のタンパク質および使用される抗体によって決定されます。 | 1IPあたり100万～1000万の細胞を使用できます。 |
| クロマチン断片化 | 最適な断片化条件はChIPの効率にとって重要です。 | 各細胞タイプの断片化条件は、細胞収集、固定、そして断片化の方法（超音波装置の設定）から最適化する必要があります。 |

| | | |
|------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 断片化クロマチン分析 | 断片化最適化の重要ポイント | <p>1) あまりにも多量の細胞で始まらないようにしてください (1x10⁶もしくはそれ以下で始める)</p> <p>2) サンプルを冷やした状態で保ってください (4°C)</p> <p>3) 高いパーセンテージのSDSは超音波処理の効率をあげますが、免疫選択を阻害します (最適範囲: 0.1~1%)。希釈は、免疫選択の前に適合させる必要があります。最終的なSDS濃度は0.15~0.20%を超えないようにしてください (例えば、断片化緩衝液が0.75%SDSを含む場合、断片化クロマチンは[P.I.-ChIP緩衝液1x]で3.5~4.0倍に希釈される)</p> |
| | 当社のPioruptor®を使用してクロマチンのサンプルを切断します。 | 0°Cに近いサンプルの温度を維持してください。クロマチン剪断は、各細胞タイプに対して最適化する必要があります。Pioruptor-chromatinシャーリングのトラブルシューティングガイドは当社ホームページ (https://www.diagenode.com/jp/protocols/bioruptor-pico-chromatin-preparation-guide) で入手できます。 |
| | 断片化を分析するために、キットプロトコルに記載されているように断片化クロマチンからDNAを精製します。 | 断片化クロマチンのアリコートから全DNAを抽出し、1%アガロースゲル (EtBrで染色) 上で泳動します。ゲル上で剪断されたクロマチンを分析するために、STEP3で調製した断片化クロマチンインプットからDNAを精製します。断片化されていないクロマチンもゲル上で分析することができます。インプットサンプルで行ったように精製することもできます (「6.追加プロトコル」を参照)。10万から100万個以上の細胞に相当するクロマチンは、ゲル上で確実に可視化することができます。 |
| | ゲル上に多量のDNAの載せないでください。 | アガロースゲル上に多量のDNAをロードすると、実際のDNA断片化を反映していない画質が悪くなる可能性があります。負荷するDNAの量は、ウェルのサイズおよびゲルの大きさに合わせてください。 |
| | アガロースの濃度 | 1~1.5%以上のアガロースゲルを使用せず、ゆっくりと実行してください (電圧および時間はゲルの大きさに依存します)。 |
| | 泳動バッファの濃度 | 1xTAEまたはTBEは0.5xTAEよりも好ましく、これはアガロースゲル上のスミアなバンドの防止につながります。 |
| 断片化クロマチン量 | 必要な断片化クロマチン量 | 断片化クロマチンの大部分はChIP実験で使用されるが、断片化クロマチンの一部は、ChIP実験のインプットサンプルに対応するのでコントロールとして必要であり、アガロースゲルでもチェックすることができることを考慮にいれておいてください。 |
| 抗体結合ビーズ | インキュベーションのためにChIPバッファ中で断片化クロマチンを希釈する。 | 断片化したクロマチンを、免疫選択インキュベーションの前に完全なバッファAで希釈します (STEP3: 断片化クロマチン130µlに870µlの完全なバッファAを添加する)。断片化クロマチンを少なくとも7倍希釈し、それに応じてクロマチンに加えられるChIP緩衝液量を調節してください。 |
| | ビーズは懸濁液中にあります。 | 提供されたビーズはプロテインAでコーティングされています。各使用前に均一な懸濁液に再懸濁してください。 |
| | ビーズの遠心分離 | ビーズを高速で回転させないでください。マニュアルプロトコルに記載されているように、穏やかな遠心分離 (500 x gで2~3分間) を使用してください。g = 11.18 x r (rpm / 1000) ^ 2; rが回転半径 (mm) で表されます。 (http://www.msu.edu/~venkata1/gforce.htm)。1.5mlチューブを1,000~2,000gで20秒間遠心分離することが可能です。 |
| | ビーズの保存 | 4°Cで保管し、凍らせないでください。 |
| プロテアーゼ阻害剤 | 抗体の結合能力 | ウサギ、モルモット、ブタ、ヒトIgG由来のpAb。マウス (IgG2)、ヒト (IgG1,2および4) からのMAb; およびラット (IgG2c)。 |
| | 保管 | いくつかの阻害剤は溶液中で不安定です。そのため提供されたプロテアーゼ阻害剤ミックスは-20°Cで凍結したままにし、使用前に解凍する必要があります |
| その他酵素阻害剤 | 特定の酵素阻害剤、例えばホスファターゼ阻害剤などはキットには含まれていません。 | 必要に応じて、ホスファターゼ阻害剤または他の酵素阻害剤をバッファAおよびBに添加します。これは、研究分野およびChIP対象のタンパク質に依存します またヒストンChIPにはNaBuを加えてください。 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|------|---|-----|------|-----|-----|------|---------------|--|------|---|---|-----|------|---|-----|-------|-----|-----|-------|----|----|------|---|---|------|---------------|--|-----|------|---|---|-------|---|-----|-------|---|----|-------|---|----|----|-----|---|----|----|-----|----|-----|----|-----|---|----|-------|-----|-----|----|-------|-----|---|----|----|-----|----|-----|----|-----|---|----|-----|-----|-----|----|----|-----|---|
| Negative ChIP control(s)ネガティブChIPコントロール | IPインキュベーションミックスで非免疫IgGを使用する場合 | 抗体が産生されたのと同じ種の非免疫IgG画分を使用してください。 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | IPに抗体を添加しないでください。 | 抗体で被覆されていないビーズとのインキュベーションもまた、負のChIP対照ならびに非免疫IgGとして使用することができた。STEP4では、IPインキュベーションミックスに断片化クロマチンとビーズが含まれていますが、抗体は含まれていません。 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 抗体と特異的にブロックされた抗体を並行して使用する場合 | ChIPおよび特定のペプチドでブロックされた抗体を使用してください。1つの抗体を特異的にブロックするには、IPインキュベーションミックスで使用する前に、抗体を飽和量のそのエピトープ特異的ペプチドと室温で約30分間プレインキュベートします。ブロックされていない抗体と並行してネガティブコントロールとしてブロックされた抗体をChIPで使用してください。 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Antibody in IP | ネガティブコントロールの必要な個数 | 同じ種の複数の抗体が同じクロマチン調製物とともに使用される場合、使用されるすべての抗体に対し、ネガティブChIPコントロールは一つで十分です。 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 手持ちの抗体がChIPで機能しない場合 | 抗体-抗原認識は、エピトープ接近可能性および認識の喪失をもたらす架橋工程によって著しく影響されることがあります。 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ChIPにどのような種類の抗体を使うべきですか？ | ChIP級抗体を使用してください。利用できない場合は、同じタンパク質の異なるエピトープに対する複数の抗体を使用することが推奨されます。まず抗体が新鮮な細胞抽出液でIPで直接作用できることを確認します。また、新しい抗体を試験する場合、ChIPアッセイのポジティブコントロールとして既知のChIPグレードの抗体を含めます。 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ChIPの抗体はどのように決定すれば良いですか？ | 抗体の交差反応性に注意してください。ウエスタンブロット分析により抗体特異性を確認してください。抗原親和性精製を用いて、ポリクローナル抗体の力価および特異性を増加させることができます。 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 手持ちの抗体がプロテインAまたはプロテインGに結合するかわからない。 | <p>さまざまなタイプの免疫グロブリンとプロテインAまたはGとの親和性には大きな違いがあります。したがって、ChIPに使用される抗体の機能には、プロテインAまたはプロテインGでコートされたビーズのいずれかを選択することをお勧めします。</p> <p>種 イムノグロブリンアイソタイプ プロテインA プロテインG</p> <table border="1"> <tbody> <tr> <td rowspan="6">ヒト</td> <td>IgG1</td> <td>+++</td> <td>+++</td> </tr> <tr> <td>IgG2</td> <td>+++</td> <td>+++</td> </tr> <tr> <td>IgG3</td> <td>-</td> <td>+++</td> </tr> <tr> <td>IgG4</td> <td>+++</td> <td>+++</td> </tr> <tr> <td>IgGM</td> <td colspan="2">抗Human IgMを使う</td> </tr> <tr> <td>IgGF</td> <td>-</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td rowspan="6">マウス</td> <td>IgG1</td> <td>+</td> <td>+++</td> </tr> <tr> <td>IgG2a</td> <td>+++</td> <td>+++</td> </tr> <tr> <td>IgG2b</td> <td>++</td> <td>++</td> </tr> <tr> <td>IgG3</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>IgGM</td> <td colspan="2">抗Mouse IgMを使う</td> </tr> <tr> <td rowspan="4">ウサギ</td> <td>IgG1</td> <td>-</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>IgG2a</td> <td>-</td> <td>+++</td> </tr> <tr> <td>IgG2b</td> <td>-</td> <td>++</td> </tr> <tr> <td>IgG2c</td> <td>+</td> <td>++</td> </tr> <tr> <td>トリ</td> <td>すべて</td> <td>-</td> <td>++</td> </tr> <tr> <td>ウシ</td> <td>すべて</td> <td>++</td> <td>+++</td> </tr> <tr> <td>ヤギ</td> <td>すべて</td> <td>-</td> <td>++</td> </tr> <tr> <td>モルモット</td> <td>すべて</td> <td>+++</td> <td>++</td> </tr> <tr> <td>ハムスター</td> <td>すべて</td> <td>+</td> <td>++</td> </tr> <tr> <td>ウマ</td> <td>すべて</td> <td>++</td> <td>+++</td> </tr> <tr> <td>ブタ</td> <td>すべて</td> <td>+</td> <td>++</td> </tr> <tr> <td>ウサギ</td> <td>すべて</td> <td>+++</td> <td>++</td> </tr> <tr> <td>ヤギ</td> <td>すべて</td> <td>-</td> <td>++</td> </tr> </tbody> </table> | ヒト | IgG1 | +++ | +++ | IgG2 | +++ | +++ | IgG3 | - | +++ | IgG4 | +++ | +++ | IgGM | 抗Human IgMを使う | | IgGF | - | + | マウス | IgG1 | + | +++ | IgG2a | +++ | +++ | IgG2b | ++ | ++ | IgG3 | + | + | IgGM | 抗Mouse IgMを使う | | ウサギ | IgG1 | - | + | IgG2a | - | +++ | IgG2b | - | ++ | IgG2c | + | ++ | トリ | すべて | - | ++ | ウシ | すべて | ++ | +++ | ヤギ | すべて | - | ++ | モルモット | すべて | +++ | ++ | ハムスター | すべて | + | ++ | ウマ | すべて | ++ | +++ | ブタ | すべて | + | ++ | ウサギ | すべて | +++ | ++ | ヤギ | すべて | - |
| ヒト | IgG1 | +++ | | +++ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | IgG2 | +++ | | +++ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | IgG3 | - | | +++ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | IgG4 | +++ | | +++ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | IgGM | 抗Human IgMを使う | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | IgGF | - | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| マウス | IgG1 | + | +++ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | IgG2a | +++ | +++ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | IgG2b | ++ | ++ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | IgG3 | + | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | IgGM | 抗Mouse IgMを使う | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ウサギ | IgG1 | - | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IgG2a | | - | +++ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IgG2b | | - | ++ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IgG2c | | + | ++ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| トリ | すべて | - | ++ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ウシ | すべて | ++ | +++ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ヤギ | すべて | - | ++ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| モルモット | すべて | +++ | ++ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ハムスター | すべて | + | ++ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ウマ | すべて | ++ | +++ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ブタ | すべて | + | ++ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ウサギ | すべて | +++ | ++ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ヤギ | すべて | - | ++ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 免疫選択インキュベーション | 超音波ウォーターバスを使用した免疫選択のための最良のインキュベーション時間は何時間ですか？ | 断片化クロマチンを抗体と15~30分間インキュベートすることは、多くの抗体において有効であるが、エピトープ-抗体結合の平衡に達する速度は、抗体および標的ごとに異なります。最適化することで結果を改善できる可能性があります（例えば、いくつかの抗体についてインキュベーション時間を増加させる必要があり得ます）。 |
| | 超音波ウォーターバスを用いた免疫選択はどのように機能するのですか？ | 多くのイムノアッセイにおける律速段階は、マクロ分子抗原の抗体への結合速度が遅いことと関連しています。液体/固体界面を通じた物質輸送を高めるための超音波エネルギーの使用は、抗体への抗原結合を劇的に加速することができることが実証されています。 |
| | どのような水浴の仕様ですか？ | 130 WモデルMT-3510。容量：5.5リットル。サイズ (LxWxH) : 29x15x15cm。周波数：42kHz。最大電力要件：130 W RF電力：130 W |
| | 超音波ウォーターバスなしでキットを使用することはできますか？ | できますが4°Cで長時間インキュベートする必要があります。ChIPする抗体および標的に依存して、インキュベーション時間は2~16時間の範囲であり、各抗体について経験的に決定してください。 |
| PCR | プライマーデザイン | プライマー長：18~24ヌクレオチド/プライマーTm：60°C (+/- 3.0°C) / GC%：50% (+/- 4%) |
| | ネガティブおよびポジティブコントロール | ネガティブPCRコントロール：非免疫抗体（陰IgG）を用いたIP'd試料由来のDNAによるPCR。あるいは、ChIPサンプル由来のDNAを用いたPCRおよび目的の抗原が結合していないDNA領域に特異的なプライマー。ポジティブPCRコントロール：インプットDNAを用いたPCR。 |
| | PCRシグナルが見えない | PCRミックス（プライマー、dNTPおよびマスターミックス）がきちんと動作するかどうかを見るため、ポジティブPCRコントロールとして、インプットDNAまたは同じ起源のDNAサンプルを使用して、シグナルが出るかどうかを確認してください。 |
| | Ct値が高い | インプットクロマチン量を増加させてください。 |
| | ネガティブコントロールのCt値と標的Ct値の比 | 標的IPとネガティブコントロールIPとの間の比は、使用される抗体に依存します。 |
| | バックグラウンドが高い | 次の手順を正しく実行していることを確認します。 抗体結合ビーズおよびDNA精製用懸濁液は、チューブに添加しながら懸濁液中に保管してください。ビーズとスラリーの等しいペレットが各チューブに存在することを目視で確認してください。洗浄（ステップ5）は重要です。 |
| 定量PCRではなくエンドポイントPCRを使用する場合 | ゲル電気泳動を用いてPCR産物の強度を推定する場合、座位における因子の相対的占有率を求めるには、標的IPバンドの強度とネガティブコントロールIPバンドの強度を比べてください | |
| 凍結 | サンプルはプロトコルのいくつかの段階で凍結することができます。 | ホルムアルデヒド固定細胞のペレットは、少なくとも一年間は-80°Cで保存することができます。切断されたクロマチンは、ChIPされる目的のタンパク質に応じて、数ヶ月間、-80°Cで保存することができます。ChIPからの精製DNAおよびインプットサンプルは、-20°Cで何ヶ月にも渡って保存できます。 |
| | 何度も凍結融解をすることは避けてください。 | 固定された細胞ペレットおよび断片化クロマチンは、氷上で素早く凍結融解させてください。 |

研究用途にのみ使用してください。
いかなる動物またはヒトの治療または診断用途にも使用しないでください

© 2014 Diagenode SA. 全著作権所有。本書のいかなる部分も、電子的、機械的、磁氣的、光学的、化学的、手動、またはその他の方法で複製、送信、転載、検索システムへの保存、または任意の言語またはコンピュータ言語への翻訳を禁じます。 Diagenode SA (以下「Diagenode」といいます)の書面による事前の許可なく行うことはできません。このガイドの情報は予告なしに変更されることがあります。 Diagenodeおよび/またはその関連会社は、最新の技術開発を組み込むために、いつでも製品およびサービスを変更する権利を留保します。このガイドは、正確性を保証するためのあらゆる注意を払って作成されていますが、Diagenodeおよび/またはその関連会社は、間違いや不作為、またはこの情報の適用または使用に起因する損害について一切責任を負うものではありません。 Diagenodeは、改善のための訂正や提案に対する顧客の意見を歓迎します。

NOTICE TO PURCHASER

LIMITED LICENSE

The information provided herein is owned by Diagenode and/or its affiliates. Subject to the terms and conditions that govern your use of such products and information, Diagenode and/or its affiliates grant you a nonexclusive, nontransferable, non-sublicensable license to use such products and information only in accordance with the manuals and written instructions provided by Diagenode and/or its affiliates. You understand and agree that except as expressly set forth in the terms and conditions governing your use of such products, that no right or license to any patent or other intellectual property owned or licensable by Diagenode and/or its affiliates is conveyed or implied by providing these products. In particular, no right or license is conveyed or implied to use these products in combination with any product not provided or licensed to you by Diagenode and/or its affiliates for such use.

Limited Use Label License: Research Use Only The purchase of this product conveys to the purchaser the limited, non-transferable right to use the product only to perform internal research for the sole benefit of the purchaser. No right to resell this product or any of its components is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for internal research purposes only and is not for use in commercial applications of any kind, including, without limitation, quality control and commercial services such as reporting the results of purchaser's activities for a fee or other form of consideration. For information on obtaining additional rights, please contact info@diagenode.com.

TRADEMARKS

The trademarks mentioned herein are the property of Diagenode or their respective owners. Bioruptor is a registered trademark of Diagenode SA.

Bioanalyzer is a trademark of Agilent Technologies, Inc. Agencourt and AMPure are registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. Microcon is a registered trademark of Millipore Inc. Illumina is a registered trademark of Illumina Inc. Ion Torrent and Personal Genome Machine are trademarks of Life Technologies Corporation. Qubit is a registered trademark of Life Technologies Corporation.

**DIAGENODE
HEADQUARTERS**

DIAGENODE S.A.
BELGIUM | EUROPE
LIEGE SCIENCE PARK
Rue Bois Saint-Jean, 3
4102 Seraing - Belgium
Tel: +32 4 364 20 50
Fax: +32 4 364 20 51
orders@diagenode.com
info@diagenode.com

DIAGENODE INC.
USA | NORTH AMERICA
400 Morris Avenue, Suite #101
Denville, NJ 07834
Tel: +1 862 209-4680
Fax: +1 862 209-4681
orders.na@diagenode.com
info.na@diagenode.com

FOR A COMPLETE LISTING OF
DIAGENODE'S INTERNATIONAL
DISTRIBUTORS VISIT:
[http://www.diagenode.com/company/
distributors.php](http://www.diagenode.com/company/distributors.php)
Forrest of the world, please contact
Diagenode sa.
www.diagenode.com