

diagenode

A Hologic Company

iDeal ChIP-qPCR kit

Cat. No. C01010180 (24 rxns)

USER GUIDE

Version 2 10_06_2017



実験を始める前に、このマニュアル
をよくお読み下さい

目次

はじめに	4
キットの概要と所要時間	5
構成品	6
本キット以外に用意するもの	7
始める前の注意点	9
プロトコル	15
実験結果の例	32
断片化クロマチンの分析プロトコル	34
FAQ	36
関連製品	39



はじめに

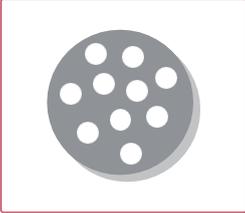
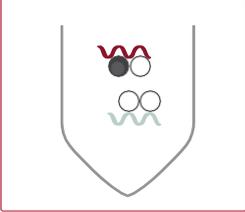
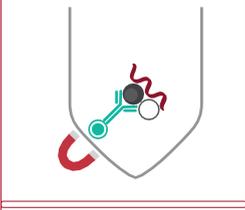
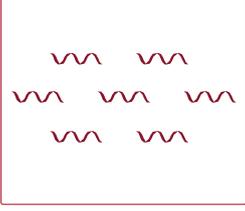
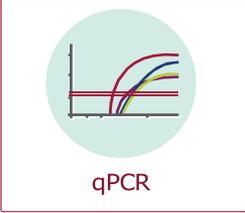
タンパク質とDNAは、遺伝子転写、エピジェネティックサイレンシング、および多くの重要な細胞機能を制御する機構に大きな影響を与えています。そのためこれらの相互作用、およびそれらが遺伝子調節経路および細胞増殖を制御または誘導する機構を理解することは重要です。クロマチン免疫沈降（ChIP）は、特定のゲノム領域とのタンパク質の相互作用を分析する技術です。ChIPは、エピジェネティックな特性やクロマチン再構成、特定のゲノム領域に結合する転写調節因子の変化などを研究するために使用することができます。

iDeal ChIP-qPCRキットは、細胞や組織をサンプルとし、ヒストンおよびクロマチンに作用する転写因子などのタンパク質を研究するために適した実験キットです。このプロトコルでは、まずはホルムアルデヒドによりタンパク質とDNAを架橋し、細胞溶解の後、架橋されたクロマチンの断片化を行います。その後のクロマチンの免疫沈降は、標的タンパク質に特異的な抗体（ユーザーが指定する）を用います。プロテインA磁気ビーズを用いて目的のタンパク質-DNA複合体を単離し、その後、免疫沈降したDNAを溶出します。溶出されたDNAはqPCR分析に適しています。

本キットが持つ優れた点は以下の通りです：

- 細胞および組織どちらからでも、迅速かつ高感度にChIP-qPCRができるようなプロトコルを提供します
- 磁気ビーズを使用することで、高速で再現性の高い簡単なChIPを行うことができます
- 当社のChIP用抗体を組み合わせることにより、優れた特異性と感度で高い収量を得ることができます
- qPCR分析に適したDNAを溶出できます

キットの概要と所要時間

			所要時間	日数
STEP 1		細胞および組織採取、DNA-タンパク質架橋反応	30分	1
STEP 2		細胞溶解およびクロマチンの断片化	1—2時間	1
STEP 3		磁気免疫沈降	一晚	1-2
STEP 4		DNA精製および脱架橋	30分	2
STEP 5	 qPCR	ライブラリー調製および次世代シーケンシングの前に行う定量PCRおよびデータ解析	2—3時間	2

LEGEND

	Protein of interest		DNA		Magnetic bead
	Other protein		Antibody		Magnet



構成品

iDeal ChIP-qPCRキットには、4種類のクロマチン調製、24種類のクロマチン免疫沈降、32種類のDNA分離を行うのに十分な試薬が含まれています。

キットの内容は表1に記載されています。本キットを受け取った後は、示された温度にて構成品を保管してください。

表1. 本キットの構成品

内容	容量	保管温度
Protease inhibitor cocktail	80 µl	-20°C
5% BSA (DNA free)	784 µl	-20°C
Proteinase K	32 µl	-20°C
Rabbit IgG	8 µg	-20°C
Glycine	8.8 ml	4°C
Shearing Buffer iS1b	9 ml	4°C
DiaMag protein A-coated magnetic beads	720 µl	4°C, 凍結不可
Wash Buffer iW1	8.4 ml	4°C
Wash Buffer iW2	8.4 ml	4°C
Wash Buffer iW3	8.4 ml	4°C
Wash Buffer iW4	8.4 ml	4°C
ChIP-seq grade water	26.6 ml	4°C
Fixation Buffer	8 ml	4°C
DNA isolation Buffer (DIB)	3.2 ml	4°C
5x ChIP Buffer iC1b	6.9 ml	4°C
Lysis Buffer iL1b	100 ml	4°C
Lysis Buffer iL2	60 ml	4°C
Elution Buffer iE1	220 µl	4°C
Elution Buffer iE2	20 µl	4°C

本キット以外に用意するもの

道具および試薬類

- 手袋 (すべての段階で着用すること)
- RNase/DNase-free 1.5 ml チューブ
- ホルムアルデヒド 37% (分子生物学用)
- Phosphate buffered saline (PBS)
- qPCR SYBR® Green マスターミックス
- ChIP用抗体 - www.diagenode.com
- ChIP用プライマー - www.diagenode.com
- スクレーパー (接着細胞用)
- Reagents for DNA purification, required for chromatin shearing assessment DNA精製用試薬: クロマチンの断片化評価に必要 (eg. IPure kit v.2, Diagenode, Cat. No. C03010014 or MicroChIP DiaPure columns, Diagenode Cat. No. C03040001)

組織採取を行う場合に必要なもの:

- Protease 阻害剤カクテル (Diagenode, Cat. No. C12010011 or C12010012) (100 µl per chromatin preparation)
- 外科用メス
- ペトリ皿

装置類

- DiaMag 1.5 magnetic rack (Diagenode, Cat. No. B04000003)
 - Picoruptor (Diagenode, Cat. No. B01060001) と 1.5 ml Picoruptor® Microtubes with Caps (Cat. No. C30010016)
- 冷却遠心機 : 1.5 ml と 15 ml チューブ
- DiaMag Rotator (Rotating wheel) (Diagenode, Cat. No. B05000001)
- Vortex
- Thermomixer
- qPCR cyclers



オプション

- Chromatin Shearing Optimization kit - Low SDS (iDeal Kit for TFs) (Diagenode, Cat. No. C01020013)
- 1M Sodium butyrate (NaBu) (Diagenode, Cat. No. C12020010)
- ChIP Cross-link Gold (Diagenode, Cat. No. C01019027)
- RNase カクテル (e.g. Ambion, AM2286A) ; クロマチンの断片化評価に必要
- 蛍光原理を用いたDNA濃度測定機器
例. Qubit dsDNA BR Assay Kit (Life Technologies #Q32853)
- Qubit® Fluorometer (ThermoFisher Scientific)



始める前の注意点

1. 細胞数

このプロトコルでは、6回分のIP反応と、インプットサンプルおよび断片化クロマチンの評価を各1サンプルずつ行うために十分なクロマチンサンプルのバッチ調製量を記載しています。1バッチあたりに必要なスタートサンプルの細胞数は、研究対象となる標的に依存します（ヒストンマークは、転写因子よりも少ない細胞数を必要とします）。ターゲットに応じて、以下の量の細胞数で作業することをお勧めします。

標的	1バッチあたりの細胞数	1IPあたりの細胞数	IP数
転写因子	25,000,000	~ 4,000,000	6 IPs + 1 INPUT + 1 shearing assessment
ヒストン	7,000,000	1,000,000	6 IPs + 1 INPUT + 1 shearing assessment

1バッチあたりの細胞数は実験計画に合わせて調整します。

記載されたプロトコルでは、細胞培養プレートにて細胞を直接固定する方法を使用していることに注意してください。この場合、固定細胞とスクレイプされた細胞は正確にはカウントできません。これは、接着細胞の場合、プレートあたりの細胞数の概算を使用する必要があることを意味します。あるいは、固定前に計数のための追加の平行板を準備して懸濁細胞を数えることもできます。

標的の存在量、抗体の特異性、および利用可能な細胞数に依存して、IPあたりの細胞数をスケールアップまたはスケールダウンすることができます。もしくはより小さいまたはより大きなバッチの細胞数で開始することも可能です。

IPあたりの細胞数をより少なくするには、推奨バッチで開始し、クロマチン断片化ステップまで行います。次に、IP反応に進む前に、

Shearing Buffer iS1bで断片化されたクロマチンを希釈します。最適な細胞数が含まれる希釈クロマチンの最終容量は、1IP反応あたり250 μ lでなければならないことに留意してください。

標準プロトコルと異なる量の細胞数で開始する場合、またはIPごとにより多くの細胞を使用する場合は、最初にIPごとに使用する細胞数とIPの総数を決定します。標準プロトコルで説明されているように細胞を固定します。細胞の回収および溶解のために、100万個の細胞当たり1mLのiL1bと0.6mlのiL2bを目安にして、iL1bおよびiL2バッファの容量をスケールアップまたはスケールダウンしてください。Shearing Buffer iS1bの量は、以下が必要であることを考慮して決定してください：

- 1IPごとに250 μ l の断片化クロマチン(最適な量の細胞が含まれる)
- 1インプットごとに2.5 μ l の断片化クロマチン
- 断片化クロマチン分析のための50 μ l の断片化クロマチン
- 5% のiS1b余剰量

必要量のShearing Buffer iS1bに細胞を再懸濁し、標準プロトコルに従います。

Shearing Buffer中の細胞濃度が増加または減少すると、断片化効率に影響を及ぼします。そのため、断片化条件のさらなる最適化が必要とされる可能性があります。

同じバッチでヒストンと転写因子の両方を研究する場合は、TFの推奨事項を参照してください。次いで、ヒストンマークについては、Shearing Buffer iS1b中のサンプルを希釈して、1IPあたり細胞数が100万個になるように調整してください。

このプロトコルは、総量350 μ lのChIP反応において、断片化されたクロマチン250 μ lを使用するように最適化されています。最適な結果を得るためには、これらのボリュームを一定に保つことが重要です。

2. 組織量

このプロトコルでは、6回分のIP反応と、インプットサンプルおよび断片化クロマチン評価を各1サンプルずつ行うために十分なクロマチンサンプルの

バッチ調製量を記載しています。1バッチあたりに必要な組織のスタート量は、研究対象となる標的に依存します：一般にヒストンマークは、転写因子よりも少ないスタート量で行うことができます。ターゲットに応じて、以下の組織量で作業することをお勧めします。

標的	1バッチあたりの組織量	1IPあたりの組織量	IP数
転写因子	200 mg	~30 mg	6 IPs + 1 INPUT + 1 shearing assessment
ヒストン	40 mg	~7 mg	6 IPs + 1 INPUT + 1 shearing assessment

1バッチあたりの組織量は実験計画に合わせて調整します。

標的の存在量、抗体の特異性、および利用可能な組織量に依存して、IPあたりの組織量をスケールアップまたはスケールダウンすることができます。もしくはより小さいまたはより大きなバッチの組織量で開始することも可能です。

IPあたりの組織量をより少なくするには、推奨された組織量で開始し、クロマチン断片化ステップまで行うことができます。次に、IP反応に進む前に、Shearing Buffer iS1bで断片化されたクロマチンを希釈します。最適な組織量が含まれる希釈クロマチンの最終容量は、1IP反応あたり250µlでなければならないことに留意してください。

標準プロトコルと異なる量の組織量で開始する場合、またはIPごとにより多くの組織を使用する場合は、最初にIPごとに使用する組織量とIPの総数を決定します。

標準プロトコルに記載されているように組織を固定します。組織の固定、採取および溶解は標準プロトコルに従ってください。使用する組織量に関わらず、Lysis Buffer iL1bおよびiL2は標準プロトコルと同量を使ってください。Shearing Buffer iS1bの量は、以下が必要であることを考慮して決定してください：

- 1IPごとに250 µl の断片化クロマチン(最適な量の細胞が含まれる)
- 1インプットごとに2.5 µl の断片化クロマチン
- 断片化クロマチン分析のための50 µl の断片化クロマチン

- 5% の iS1b 余剰量

必要量の Shearing Buffer iS1b に組織を再懸濁し、標準プロトコールに従います。

Shearing Buffer 中の組織濃度が増加または減少すると、断片化効率に影響を及ぼします。そのため、断片化条件のさらなる最適化が必要とされる可能性があります。

組織サンプルから架橋クロマチンを採取する場合、クロマチンの収量は組織タイプによって大きく異なる可能性があります。ヒストンマークの 1 IP あたりのクロマチン量は、0.5~3 μ g の範囲にあるべきですが、転写因子にはより高い量 (3~10 μ g) が必要です。パイロット実験を行い、組織の最適量を決定することを推奨します。一度量を決定したら、その量を実験間で一定に保ってください。

このプロトコールは、総量 350 μ l の ChIP 反応において、断片化クロマチン 250 μ l を使用するよう最適化されています。最適な結果を得るためには、これらのボリュームを一定に保つことが重要です。

3. 固定最適化

ホルムアルデヒドは、直接相互作用する 2 分子を固定する際、最も一般的に使用される理想的な架橋試薬です。固定時間はターゲットに依存するため、追加の最適化が必要な場合があります。一般的に、標準的な固定プロトコールを使用した場合、転写因子 (10~20 分) よりもヒストンマーク (8~10 分) の方が固定時間は短くなります。固定時間が長くなると、超音波処理をしてもクロマチンが断片化されにくくなるため、注意してください。

しかしながら、より高次の相互作用、または動的な相互作用については、効率的なタンパク質 - タンパク質固定化のために他の架橋剤を考慮する必要があります。その場合、革新的なデュアルクロスリンク ChIP 固定試薬である、Diagenode ChIP Cross-link Gold (Diagenode、カタログ番号 C01019027) をおすすめします。

4. 断片化の最適化

クロマチン断片化は、ChIP手順における最も重要なステップの1つです。ChIP実験に理想的なのは100～600bpの間のクロマチン断片です。最適な超音波処理時間は、細胞型、細胞密度、試料量、固定時間などの多くの要因に依存します。したがって、新しいChIPプロジェクトごとに超音波処理条件を最適化することが重要です。

本キットは、クロマチン断片化を最適化するための十分な試薬を含有しておりません。断片化条件を最適化するには、iDeal ChIP-qPCR kitに適合するクロマチン調製に必要なすべてのバッファーを含むLow SDS (iDeal Kit for TFs) (カタログ番号C01020013) を使用することをお勧めします。このキットに含まれる試薬を使うことで、最適化された断片化条件でクロマチンを調製することができます。

Picoruptorを使用する場合は、超音波処理の最初のタイムコース実験を5-10-15回の30 "ON / 30" OFFサイクルで行うことををお勧めします。詳しくはPicoruptor

(<https://www.diagenode.com/files/protocols/bioruptor-pico-chromatin-preparation-guide.pdf>) のクロマチン調製についてのガイドを参照してください。

なるべく短い時間で、効率的にクロマチンを断片化するように超音波処理を行ってください。過剰な超音波処理はChIPの効率を低下させる可能性があります。

5. 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。乾燥すると性能が低下するため、実験中にビーズが乾かないようにしてください。ピペッティングするときにはいつも懸濁液中でビーズが均一になるように注意してください。ビーズの量の変動は再現性を低下させます。また、ビーズを凍らせないでください。

DiaMag Protein A-coated magnetic beads は、ウサギ、モルモット、イヌおよびブタポリクローナルおよびモノクローナルAb、

マウスIgG2a、IgG2bおよびIgAおよびヒトIgG1、IgG2およびIgG4の免疫沈降に適しています。

6. CHIP用抗体

CHIPで使用される抗体の品質は、実験の成功に大きく影響します。CHIP検証済み（妥当性確認）で、標的を特異的に認識する抗体のみを使用することをお勧めします。当社では、CHIP / CHIP-seqで特異性が確認されている、広範に検証された高性能抗体を提供しています。各バッチで検証され、バッチ固有のデータはウェブサイト www.diagenode.com で入手できます

7. インプット

インプットサンプルは、免疫選択を行わずに、全てのCHIP手順を経たサンプルで、完全なゲノムDNAに対応します。インプットサンプルは、CHIP手順の終了時に回収率を計算するための基準として使用されます。CHIP実験ごとに1つのインプットサンプルを含めることをお勧めします。

8. ネガティブコントロール

このキットにはネガティブIgG抗体が含まれています。CHIP反応の各シリーズに1つのネガティブIgGコントロールを含めることを推奨します。

9. 定量PCR 分析

当社では少なくとも1つの陽性対照領域および1つの陰性対照領域を用いてSYBR®Green qPCRによりインプットおよび免疫沈降したサンプルを分析して濃縮度を決定することを推奨しています。各特異的抗体は、ユーザーによって設計された特異的プライマーを必要とします。各プライマー対について、免疫沈降した試料と並行してインプットDNAを使用します。異常値同定するために triplicate の PCR 反応が推奨されますが、少なくとも duplicate で PCR 反応を行うことをおすすめします。

PROTOCOL



CELLS	STEP 1-細胞採取およびDNA-タンパク質架橋反応（培養細胞）	17
	STEP 2-細胞溶解およびクロマチン断片化（培養細胞）	18
TISSUES	STEP 1-組織解離およびDNA-タンパク質架橋反応（組織）	21
	STEP 2-細胞溶解およびクロマチン断片化（組織）	23
CELLS & TISSUES	STEP 3-磁気免疫沈降	26
	STEP 4-DNA精製および脱架橋	28
	STEP 5-定量PCR解析	30

プロトコル

iDeal ChIP-qPCRkit は、染色体の調製や、細胞や組織からの免疫沈降や、転写因子や転写因子に適しています。ステップ1「DNA-タンパク質架橋」およびステップ2「細胞溶解およびクロマチン断片化」のプロトコルは、細胞および組織で異なります。それぞれ対応するセクションを参照してください。ステップ3「磁気免疫沈降」以降は、両方のサンプルタイプについて同じプロトコルです。プロトコルは、6回分のIP反応と、インプットサンプルおよび断片化クロマチンの評価を各1サンプルずつ行うために十分なクロマチンサンプルのバッチ調製量を記載しています。スタートサンプルの正確な量は、標的タンパク質に依存します。以下の表では、ヒストンおよび非ヒストンタンパク質の1バッチあたりおよび1 IPあたりの推奨される細胞または組織の量を示します。それに応じて1バッチあたりの細胞/組織の量を実験計画に合わせてください。

Table 2. 推奨細胞数

標的	1バッチあたりの細胞数	1IPあたりの細胞数	IP数
転写因子	25,000,000	~ 4,000,000	6 IPs + 1 INPUT + 1 shearing assessment
ヒストン	7,000,000	1,000,000	6 IPs + 1 INPUT + 1 shearing assessment

Table 3. 推奨組織量

標的	1バッチあたりの組織量	1IPあたりの組織量	IP数
転写因子	200 mg	~30 mg	6 IPs + 1 INPUT + 1 shearing assessment
ヒストン	40 mg	~7 mg	6 IPs + 1 INPUT + 1 shearing assessment



STEP 1

細胞採取

およびDNA-タンパク質架橋反応



Day 1



30 minutes

培養細胞を使用する場合

- 1.1. 使用前にFixation Bufferを室温に戻します。
- 1.2. Cross-Linking Solutionを調製します。ヒュームフード内で、ホルムアルデヒドが最終濃度**11%**になるように、**Fixation buffer**に添加します。例えば、37%ホルムアルデヒド0.6mlを**Fixation buffer**1.4mlに加えます。次にCross-Linking Solutionを1:10の割合で細胞培養培地に直接加えます。例えば20 mlの細胞培養には、2 mlのCross-Linking Solutionを添加します。
- 1.3. 穏やかに振とうしながら室温で**10分間**細胞をインキュベートします。
NOTE: 固定時間は、さらに最適化が必要な場合があります。「始める前の注意点」を参照してください。
- 1.4. 1: 10の割合で**Glycine**を細胞培養培地に添加して固定を停止します（例えば、20mlの細胞培養液で開始したときに2.2mlの**Glycine**を加える）。穏やかに振とうしながら室温で**5分間**インキュベートします。その後すぐに次のステップに進んでください。

NOTE: ChIPの前に行う断片化クロマチンの調製には、新しく固定した細胞を使用することを強くお勧めします。それが難しい場合、固定細胞は80℃で最大4ヶ月間保存することができます。細胞を凍結するために、培地を除去し、20mlのPBSで細胞を1回洗浄します。次に別の5mlのPBSを添加し、スクレイピングまたは500xgで5分間、4℃で遠心分離し上清を捨て細胞を回収し、細胞ペレットを-80℃で保存します。



STEP 2

細胞溶解

およびクロマチン断片化



Day 1



1 to 2 hours

培養細胞を使用する場合

接着細胞の場合:

- 2.1. 培地を除去し、**20mlのPBS**で細胞を1回洗浄して、PBSを捨てます。
4°Cまたは氷上ですべてを保管してください。
- 2.2. **5mlの氷冷 Lysis buffer iL1b**をプレートに加えます。細胞をスクレイピングして収集し、50mlチューブに移す。
- 2.3. 下の表で推奨する量の**Lysis Buffer iL1b**でフラスコをすすぎ、これを50 mlチューブに加えます。

	Buffer iL1b
転写因子(25.000.000 cells)	20 ml
ヒストン (7.000.000 cells)	2 ml

(スケールアップまたはダウンする際は、100万個の細胞あたり1mlの Lysis Buffer iL1bを目安にして使用してください)

すぐにStep2.4へ進んでください。

浮遊細胞の場合:

- 2.1. 細胞を50mlチューブに移します。500×gおよび4°Cで5分間遠心分離して細胞をペレット化し、上清の細胞培養培地を捨てます。

2.2. 氷冷PBS 20 mlに細胞を再懸濁し、500 x gおよび4°Cで5分間遠心分離し、上清を静かに捨てます。4°Cまたは氷上ですべてを保管してください。

2.3. 氷冷したLysis Buffer iL1b 1 mlに細胞を数回上下にピペティングして再懸濁します。以下の表に示す量のLysis Buffer iL1bを追加します。その後すぐにStep 2.4に進んでください。

	Buffer iL1b
転写因子(25,000,000 cells)	24 ml
ヒストン(7,000,000 cells)	6 ml

(スケールアップまたはダウンするには、100万個の細胞あたり1mlのiL1bを使用してください)

2.4. DiaMag Rotatorで穏やかに混合しながら4°Cで20分間インキュベートします。500×gおよび4°Cで5分間遠心分離して細胞をペレット化し、上清を捨てます。

2.5. 1mlの氷冷Lysis Buffer iL2に細胞ペレットを再懸濁させ、数回ピペティングします。下の表にしめす量のLysis Buffer iL2を追加します。

	Buffer iL2
転写因子(25,000,000 cells)	14 ml
ヒストン(7,000,000 cells)	3.2 ml

スケールアップまたはダウンするには、100万個の細胞あたり600µlのbuffer iL2を使用してください。

2.6. DiaMag Rotatorで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。細胞を500×gおよび4°Cで5分間遠心分離して再度ペレット化し、上清を捨てます。

2.7. 1.67mlのShearing Buffer iS1bに8.4µlの200xprotease inhibitor cocktailを加えます。氷上においてください。

2.8. 調製したShearing Buffer iS1bを細胞ペレットに加えます。Shearing Buffer中の細胞濃度は以下のようになるように調整してください：

転写因子	1.5 million cells per 100 µl iS1b
ヒストン	420,000 cells per 100 µl iS1b



2.9. ピペットで上下に数回細胞を再懸濁し、氷上で10分間インキュベートします。細胞懸濁液を最大300 μ lずつ、適切な超音波破碎用マイクロチューブに分注します。

- Picoruptorを使用する場合は、1.5 mlのPicoruptor Microtubes with Caps (カタログ番号 C30010016) を使用してください。

NOTE: Picoruptor®による断片化の最大容量は、1.5mlのマイクロチューブあたり300 μ lです。超音波処理の効率を上げるために、必ず正しいタイプのマイクロチューブを使用してください。

2.10. Picoruptorを用いた超音波処理でクロマチンを断片化します。お使いのデバイスに適合したプロトコルを選択してください：

- 30秒間 "ON"、30秒間 "OFF"で5~12回の断片化処理を行ってください。

NOTE: Chromatin Shearing Optimization kit – Low SDS (iDeal Kit for TFs) (カタログ番号C01020013) を使用して、新しいサンプルタイプごとにパイロット実験を行うことをお勧めします。

2.11. サンプル中の液体を15秒間短くスピンドウンします。サンプルを新しい1.5 mlチューブに移し、16,000 x g、4°Cで10分間遠心します。断片化されたクロマチンを含む上清をプールします。

2.12. 別のセクション「クロマチン断片化分析のプロトコル」に記載されているように、断片化評価のために断片化クロマチン50 μ lを取り分けておきます。

NOTE: クロマチンの各バッチの断片化解析をお勧めします。このステップは、目的の実験条件に対する最適な超音波処理設定（細胞型、細胞数および固定）が以前に確立されている場合は省くことができます。

2.13. 免疫沈降（Step3 磁気免疫沈降）に進みます。すぐに使用しない場合、クロマチンは-80°Cで最大二ヶ月間保存することができます。





STEP 1

組織解離および DNA-タンパク質架橋反応



Day 1



30 minutes

組織を使用する場合

- 1.1. 使用前にFixation Bufferを室温に戻します。
- 1.2. ヒュームフード内で、**37%ホルムアルデヒド54 μ l**を、最終濃度1%になるように、**2mlのFixation Buffer**に添加し、Cross-Linking Solutionを調製します。1つのクロマチン調製に**2 mlのFixation Buffer**を使用します。
- 1.3. 氷上でペトリ皿に新鮮または凍結組織（200mgまで）を必要量入れます。サンプルは常に氷上に置き、サンプルの劣化を防ぐために操作時間を最小限に抑えてください。
- 1.4. メスの刃を使用して組織を小さな断片（1~3 mm³）に切り、ダウンス型ホモジナイザーに移します。**Fixation Buffer**で希釈したホルムアルデヒド**1 ml**を加えます。
- 1.5. 均一な懸濁液を得るために、ダウンス型ホモジナイザーを用いて組織を直ちにホモジナイズします。総固定時間**10分間**のタイマーを設定します。この時点から固定時間の計測を開始します。

NOTE: 固定時間は、さらに最適化が必要な場合があります。「始める前の注意点」を参照してください。



- 1.6. 組織懸濁液を15mlチューブに移します。ダウンス型ホモジナイザーに希釈したホルムアルデヒド1 mlを追加して洗い流し、同じ15 mlチューブにサンプルをプールします。
- 1.7. 室温で、DiaMag Rotatorで穏やかに回転させながら、Step 1.5から開始した固定時間が合計で10分間になるまでインキュベートします。
- 1.8. 組織懸濁液に**200µlのGlycine**を加えて固定を停止します。DiaMag Rotatorで穏やかに混合しながら室温で**5分間**インキュベートします。すぐに次のステップに進んでください。

NOTE: 断片化クロマチンの調製には、新しく固定した組織を使用することを強くお勧めします。それが難しい場合、固定組織は-80℃で最大4ヶ月間保存することができます。組織を凍結するには、培地を除去し、2mlのPBSで組織を1回洗浄し、組織ペレットを-80℃で保存します



STEP 2

細胞溶解

およびクロマチン断片化



Day 1



1 to 2 hours

組織を使用する場合

NOTE: 本キットとは別に、1つのクロマチン調製物につき100 μ lのプロテアーゼ阻害剤カクテルが必要です

- 2.1. サンプルを4°Cで5分間、850 x gで遠心分離します。静かに上清を捨てペレットを残しておきます。
- 2.2. ペレットを10 mlの氷冷PBSで洗浄し、4°Cで5分間850 x gで遠心し、静かに上清を捨てます。4°Cまたは氷上ですべてを保管してください。
- 2.3. **200x protease inhibitor cocktail 50 μ l**を10mlの氷冷Lysis Buffer **iL1b**に添加します。
- 2.4. 氷冷したLysis Buffer iL1b 1mlをペレットに添加し、数回ピペットで再懸濁します。その後残りの9mLのiL1bを追加します。
- 2.5. DiaMag Rotatorで穏やかに混合しながら4°Cで20分間インキュベートします。
- 2.6. 4°Cで850 x gで5分間遠心分離して細胞をペレット化し、上清を捨てます。



- 2.7. **200x protease inhibitor cocktail 50 μ l**を**10ml**の氷冷**Lysis Buffer iL2**に添加します。氷冷した**Lysis Buffer iL2 1ml**を細胞ペレットに添加し、数回ピペッティングすることにより細胞を再懸濁します。その後残りの**9mL**の**Buffer iL2**を追加します。
- 2.8. DiaMag Rotatorで**10分間**穏やかに混合しながら**4°C**でインキュベートします。
- 2.9. **4°C**で**850 x g**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。
- 2.10. **1.67ml**の**Shearing Buffer iS1b**に**8.4 μ l**の**200xprotease inhibitor cocktail**を加えます。氷上で操作してください。
- 2.11. ペレットに完成した**Shearing Buffer iS1b**を添加します。ピペットで上下に数回細胞を再懸濁し、バウンスホモジナイザー（タイトなペッスル）を用いてホモジナイズします。氷上で**10分間**インキュベートしてください。
- 2.12. 細胞懸濁液を最大**300 μ l**ずつ、適切な超音波破碎用マイクロチューブに分注します。
- Picoruptorを使用する場合は、**1.5 ml**の**Picoruptor Microtubes with Caps**（カタログ番号 **C30010016**）を使用してください。
- NOTE: Picoruptor®によるせん断の最大容量は、**1.5ml**のマイクロチューブあたり**300 μ l**です。超音波処理の効率を上げるために、必ず正しいタイプのマイクロチューブを使用してください。
- 2.13. Picoruptorを用いた超音波処理でクロマチンを切断します。お使いのデバイスに適合したプロトコルを選択してください：
- Picoruptorを使用する場合、**30秒間 "ON"**、**30秒間 "OFF"**で**5~12回**の断片化処理を行ってください。
- NOTE: Chromatin Shearing Optimization kit - Low SDS (iDeal Kit for TFs)（カタログ番号**C01020013**）を使用して、新しいサンプルタイプごとにパイロット実験を行うことをお勧めします。

- 2.14. サンプル中の液体を15秒間短くスピンドウンします。サンプルを新しい1.5 mlチューブに移し、16,000 x gで4°C、10分間遠心します。断片化されたクロマチンを含む上清をプールします。
- 2.15. (オプション) この段階で上清中のDNA濃度を定量することができます。蛍光定量 (例えば、Qubitアッセイ、ThermoFischer Scientific) を使用することを推奨します。
- 2.16. 断片化評価のために、断片化したクロマチン50 μ Lを取り分けておきます。クロマチン断片化分析のプロトコルは、別セクション「クロマチン断片化分析のプロトコル」を参照してください。
- NOTE:** クロマチンの各バッチの断片化解析をお勧めします。所定の実験条件 (細胞型、細胞数および固定) に対する最適な超音波処理の設定が以前に行われている場合、このステップを省略することができます。
- 2.17. 免疫沈降 (Step 3 磁気免疫沈降) に進みます。すぐに使用しない場合、クロマチンは-80°Cで最大2ヶ月間保存することができます。





STEP 3

磁気免疫沈降



1-2 Day 1-2



Overnight

培養細胞および組織（共通）

- 3.1. ネガティブコントロールIP (IgG) を含む、IP反応の総数を決定します。1IPあたり **30 μ l**のDiaMag Protein A-coated magnetic beadsを取り、新しい1.5 mlチューブに移します。
- 3.2. 以下の試薬を混合して**1x ChIP Buffer iC1b 4 ml**を調製します：
 - 3.2 ml ChIP-seq gradewater
 - 0.8 ml 5x ChIP Buffer iC1b
 - 80 μ l of 5% BSA希釈した1x ChIP Buffer iC1b は氷上に置いてください。
NOTE : 1x ChIP Buffer iC1b 4 ml で最大6IP分のビーズを洗浄できます
- 3.3. **1mlの氷冷1xChIP Buffer iC1b**でビーズを3回洗浄します。ビーズを洗浄するには、ビーズ懸濁液に直接1x ChIP Buffer iC1b 1 mlを加え、ピペットで数回上下させてビーズを再懸濁し、**4 $^{\circ}$ C**で5分間振とうしながらインキュベートします。チューブをスピンドウンさせ、1.5 ml Diagenode磁気ラック (DiaMag1.5) に入れます。1分間待ってビーズを磁石に捕捉させ上清を除去します。これを2回繰り返します。
- 3.4. 最後の洗浄後、ビーズの元の容量 (IPあたり30 μ l) を加えて**1x ChIP Buffer iC1b**にビーズを再懸濁します。
- 3.5. 必要な数の1.5mlチューブ (1 IPあたり1本) に、**30 μ l**の洗浄したビーズを各チューブに加えます。



3.6. 以下に1IP分の**ChIP reaction mix**の調製法を記載します。[必要なIP数+0.5]回のようにIP数を設定し、スケールアップしてください。

NOTE: 異なる抗体または異なる量の抗体を使用する場合は、それぞれ別々の**ChIP reaction mix**を準備してください。

- 6 μ l of BSA
- 1.8 μ l 200x protease inhibitor cocktail
- 20 μ l 5x iC1b Buffer
- (42.2 μ l $-x$ μ l) water
- Add x μ l of ChIP-grade antibody

The total volume of the ChIP reaction mix per IP is 70 μ l

NOTE: IPあたりの抗体の必要量は変わることがあります。サプライヤーの推奨をチェックするか、抗体の量を変えて滴定曲線を作成してください。ネガティブコントロールIPには1 μ gのIgG (ネガティブコントロール抗体)を使用します。必要に応じて、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。

3.7. **70 μ l**の**ChIP reaction mix**を**30 μ l**の洗浄した**Protein A-coated magnetic beads**が分注されたそれぞれのチューブに加えます。チューブを**4 $^{\circ}$ C**で**2~4時間**インキュベートし、DiaMag Rotatorで一定回転下でインキュベートします。

3.8. **ChIP reaction mix**を入れたチューブを軽くスピンドウンし、断片化したクロマチン**250 μ l**を加えます。チューブを**4 $^{\circ}$ C**で一晩DiaMag Rotatorで回転させ、インキュベートします。また、Step 4.3から始まるインプットサンプルとして使用するために、断片化したクロマチン**2.5 μ l**を取り分け**4 $^{\circ}$ C**で保存してください。

3.9. 以下のように洗浄を行います：チューブを短くスピンドウンさせてDiaMag1.5に入れます。**1分間**待つて上清を除去します。**Wash Buffer iW1 350 μ l**を加えます：ビーズを再懸濁するためにチューブを静かに振とうし、**4 $^{\circ}$ C**でDiaMag Rotatorで**5分間**インキュベートします。

3.10. **Wash Buffer iW2、iW3**および**iW4**をそれぞれ用いて、上記の洗浄工程を1回ずつ繰り返します。



STEP 4

DNA精製および 脱架橋



Day 2



30 minutes

培養細胞および組織（共通）

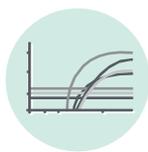
- 4.1. **100 μ l**の**DIB Buffer**に**1 μ l**の**Proteinase K**を加えて、完全な**DIB Buffer**を調製します。インプットサンプルを含むサンプル数に応じてスケールアップまたはダウンします（IPサンプルあたり**100 μ l**、インプットには**97.5 μ l**必要です）。
- 4.2. IPサンプルが入っているチューブをスピンドウンし、DiaMag1.5にセットします。1分間待って上清を除去します。
- 4.3. インプットサンプルを軽く遠心分離し、この時点以降のIPサンプルと並行して処理します。
- 4.4. 磁気ラックからチューブを取り外し、**100 μ l**の完全な**DIB Buffer**をIPサンプルに加えます。ピペットで上下に数回ビーズを再懸濁します。並行して**97.5 μ l**の完全な**DIB Buffer**をインプットサンプルに加えます。
- 4.5. **55 $^{\circ}$ C**で**15分間**インキュベートし、続いて**100 $^{\circ}$ C**で**15分間**インキュベートします。
- 4.6. チューブを短くスピンドウンして、蓋についた液体を落とします。
- 4.7. チューブをDiaMag1.5にセットし、1分間待ちます。

4.8. DNAを含む上清を、ラベルした新しいチューブに移します。各サンプルについてqPCRによって分析される領域の総数を決定し、qPCR分析に必要な量をとります。

NOTE: 使用したマスターミックスおよびqPCRサイクラーの感度に応じて、サンプルはPCR前に希釈することができ、PCRあたりの容量は変わることがあります

4.9. その後の使用まで-20°Cで残りのDNAを保存します。





STEP 5

定量PCR解析



Day 2



2 to 3 hours

培養細胞および組織（共通）

NOTE: 各プライマー対について、免疫沈降した試料およびネガティブIgGコントロールと一緒にINPUT DNAを流してください。

5.1. 免疫沈降したDNAと対応するインプットサンプルを取り分けます
(Step 4.8参照)

5.2. 次のように**qPCR mix**を調製します。ユーザーが用意するプライマー対を使用して20µlの反応量となります：

- 10 µl of a 2x SYBR® Green qPCR master mix
- 1 µl of primer pair
- 4 µl of PCR-grade water
- 5 µl of IP'd or INPUT DNA

5.3. 次のようにPCRプログラムを設定します：

NOTE: これらの条件は、マスターミックスの種類、使用するqPCRシステムおよびユーザーが準備するプライマー対の種類に応じて最適化が必要な場合があります。

ステップ	時間/サイクル数		温度
1. 熱変性	3-10 min*		95°C
2. 増幅	30 seconds	40 cycles	95°C
	30 seconds		60°C
	30 seconds		72°C (acquire fluorescence data)
3. 融解曲線**	製造会社の推奨事項に従ってください		

* Taqポリメラーゼ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。

**プライマー対が単一の特定の産物のみを増幅することを確実にするために、qPCR機器メーカーが推奨するプロトコルに基づいて融解曲線を含め解析してください。

5.4. IP DNAサンプルおよびインプット、それぞれのプライマーについて、qPCRの指数関数的増幅域から閾値サイクル (Ct値) を記録します

5.5. 以下の式を使用して、対照領域のINPUT DNAと比較した免疫沈降したDNAの相対量 (回収率) を計算します :

$$\% \text{ recovery} = 2^{((Ct_{\text{input}} - 6.64) - Ct_{\text{sample}})} * 100\%$$

- Ct_{sample} と Ct_{input} は、それぞれIPサンプルのDNAサンプルとINPUTのqPCRの指数関数的増幅域から得られる閾値サイクルです。
- 2 は増幅効率です。
- 6.64 は入力希釈を補正するための補正係数です

NOTE: 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)。正確な結果を得るには、所定のプライマー対を用いた増幅効率は100%に近くなければならず、各サイクルにおいて生成物の量は2倍 (E=2) であることを意味しています。実際の増幅効率が既知の場合は、その数値を使用する必要があります。この式では、INPUTの1%がプロトコルで示唆されているように使用されていることが考慮されています (2.5 μ l INPUTとIPあたり250 μ lのクロマチン)。使用されるINPUTの量が1%と異なる場合、以下のように入力希釈 (x) を補正するために、式に補正係数を導入する必要があります :

$$\% \text{recovery} = 2^{[(Ct_{\text{input}} - \log_2(X) - Ct_{\text{sample}})]} \times 100\%$$

Where: $\log_2(X)$ accounts for the INPUT dilution

Example: 1IPあたり250 μ lのクロマチンから5 μ lのINPUTを使用する場合は、50倍希釈に相当します。補正係数は $\log_2(50) = 5.64$ に等しく、回収を計算する四季は次のようになります :

$$\% \text{recovery} = 2^{[(Ct_{\text{input}} - 5.64 - Ct_{\text{sample}})]} \times 100\%.$$



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、弊社の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。

Contact for Europe, Asia, Oceania and Africa:
custsupport@diagenode.com

Contact for North and South America:
custsupport.na@diagenode.com



実験結果の例

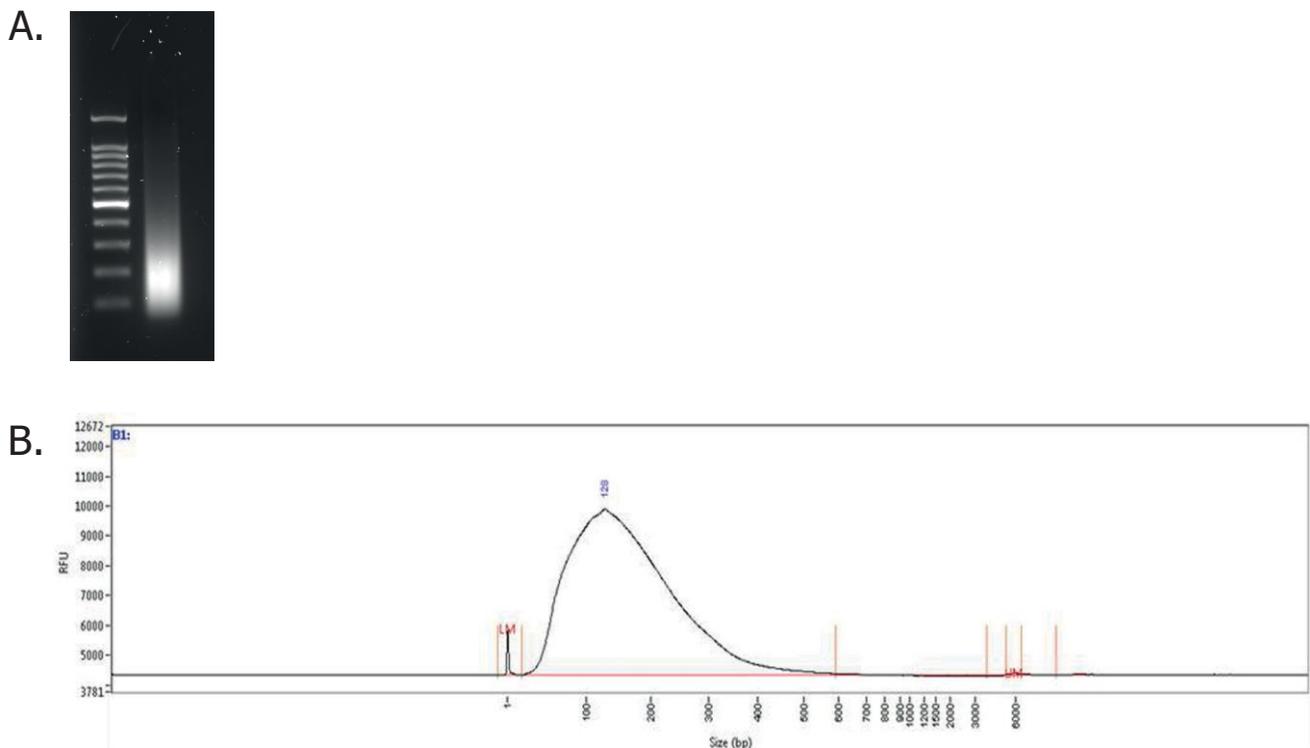


Figure 1. PicoruptorおよびiDeal ChIP-qPCR kitを使用しクロマチン断片化に成功した例

HeLa細胞をホルムアルデヒドで固定し、iDeal ChIP-qPCRプロトコルに従って染色体を調製した。 Picoruptorを使用して、30サイクルON / 30秒OFFの8サイクルにわたってサンプルを超音波処理した。 100bpのはしごをサイズ標準として装填した。 パネルA：アガロースゲル電気泳動による断片サイズ評価。 パネルB：フラグメント分析装置（Advanced Analytical）を用いたフラグメントサイズ評価。

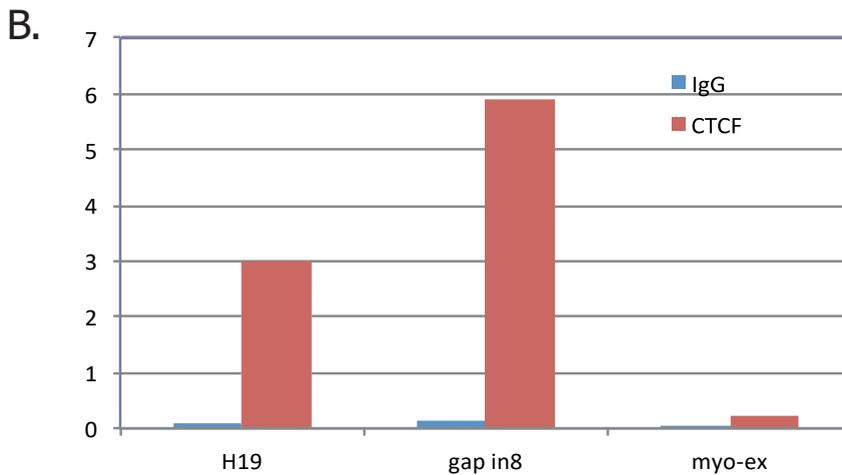
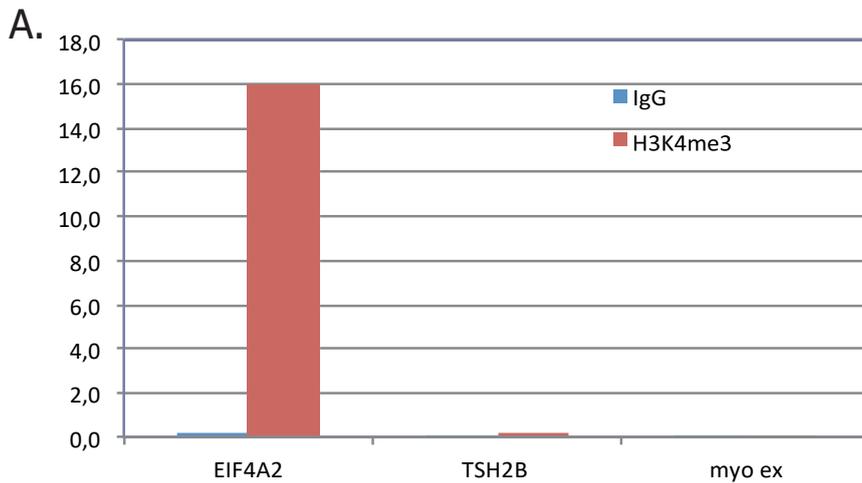


Figure 2. H3K4me4 (A) およびCTCF抗体 (B) を用いたクロマチン免疫沈降分析

ChIPは、H3K4me4（カタログ番号C15410003）およびCTCF（カタログ番号C15410210）抗体を用いてヒトHeLa細胞上で実施した。IgGをネガティブコントロールとして使用した。IP化されたDNAは、陽性対照として使用されるEIF4A2、およびH3K4me3の陰性対照として使用されるTSH2Bおよびミオグロビンエクソン2を用いてqPCRによって分析された。H19インプリンティングコントロール領域およびGAPDHイントロン8（ポジティブコントロールとして使用）、およびMyoglobinエクソン2（CTCFのネガティブコントロールとして使用）。図は、入力の%（qPCR分析後の入力DNAと比較した免疫沈降したDNAの相対量）として表される回収を示す。



クロマチン断片化分析プロトコル

概要

断片化サイズを評価するために、アガロースゲル分析またはフラグメントアナライザー (Advanced Analytical) の使用を推奨します。クロマチン断片の正確なサイズ決定のために、RNase処理およびその後のDNA精製を含む脱架橋が推奨されます。脱架橋をしない場合、クロマチン断片のサイズ推定は正確ではありません。架橋の存在は、電気泳動移動を遅らせるので、フラグメントサイズの誤解を招きます。RNase処理は、分解されたRNAに起因するバックグラウンドを有意に減少させ、断片化の視覚的評価を改善するでしょう。

ワークフロー:

- RNase処理 (1時間、オプションですが、正確なサイズ評価に強く推奨されます)
- 脱架橋 (4時間または一晩)
- 選択した方法 (例: IPure beads (v.2))
- DiaPureカラムまたはフェノール-クロロホルム抽出) を使用したDNA精製。試薬はキットに含まれていません
- フラグメントサイズ分析 (アガロースゲルまたはフラグメントアナライザー) (1時間)

RNase treatment

NOTE: 本キットには、RNase カクテル (Ambion, AM2286A など) は付属していません。

1. 断片化したクロマチン**50 μ l** (細胞についてはステップ2.12、プロトコルでは組織についてはステップ2.16) を採取し、1.5mlマイクロチューブに移します。
2. **1 μ l**のRNaseカクテル (例えばAmbion、AM2286A) を**150 μ l**の**ChIP grade water**中に希釈します。

3. 希釈した**RNase**カクテル**2μl**を分注した断片化クロマチンに加えます。
4. 37°Cで1時間インキュベートします。

脱架橋

5. **50 μl**の **Elution Buffer iE1** を加えます。
6. **4 μl**の **Elution Buffer iE2** を加え、よく混ぜます。
7. サンプルを 65°C で **4時間** (もしくは **一晩**) インキュベートします。

DNA 精製

選択した方法（例えば、IPurekit v.2、DiaPureカラムまたはフェノール - クロロホルム抽出）を用いてDNAを精製し、精製DNAを1.5%アガロースゲルで分析します。最適な分離および可視化のために約300ngのDNAをロードします。また、フラグメントアナライザー（Advanced Analytical、標準感度NGSフラグメント分析キット（DNF-473））を使用することもできます。



FAQ

IP後に沈殿するDNA量はどれくらいですか？

沈殿するDNAの量は、使用する抗体と細胞の種類によって大きく異なります。一般に、ヒストン修飾に対する抗体は、他の標的に対する抗体よりも多くの量のDNAを沈殿させます。CTCF抗体の場合、その量は4百万個のHeLa細胞から約20ngです。転写因子の典型的な収量は、1～5ngの範囲内であると推定されています。

1IPにつきどれくらいの量の抗体が必要ですか？

必要とされる抗体の量は、幾つかの要因によって変わりますが、主に抗体自身に依存します。Diagenode ChIPグレードの抗体のほとんどは、最適な量を決定するために異なる濃度で試験されており、抗体の推奨量はデータシートに記載されています。ただし、これはアッセイに依存する可能性があり、実験設定ごとに最適化する必要があるかもしれないことに注意してください。抗体が他の会社の抗体である場合は、対応する技術データシートを参照してください。必要量の抗体が与えられない場合は、滴定実験を行うことを推奨します。最も低いバックグラウンドシグナルを与える抗体の量を選択することが重要です。

DiaMag Protein A-coated magnetic beads の結合能力はどれくらいですか？

30µlのビーズで、10µgまでの抗体に結合することができます。

ビーズは何に特異性がありますか？

ウサギ、モルモット、イヌおよびブタのポリクローナルおよびモノクローナル抗体、マウスIgG2a、IgG2bおよびIgAならびにヒトIgG1、IgG2およびIgG4を効率的に捕捉します。目的の抗体が異なるクラスの免疫グロブリン（マウスIgG1およびIgG3、ラットまたはヤギポリクローナルAbおよびヒトIgG3）に属する場合、プロテインAでコーティングしたビーズの代わりにDiaMagプロテインGコーティング磁性ビーズを使用する必要があります。これらのビーズは別売です（C03010021）。

ChIP実験にモノクローナル抗体を使うことができますか？

ChIPは、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のいずれかを用いて行うことができます。一般に、ポリクローナル抗体集団は、単一エピトープを認識するモノクローナル抗体とは対照的に、多数の異なるエピトープを認識するでしょう。モノクローナルは標的タンパク質上の単一のエピトープを認識するので、高レベルの特異性、低い非特異的結合および低いバックグラウンドシグナルを提供することが多いです。モノクローナル抗体の主な欠点は、1つのエピトープのみの認識であり、これは架橋によって隠蔽され、免疫沈降の効率を低下させます。

なぜアガロースゲルとバイオアナライザーで異なるDNAサイズのせん断したクロマチンが観察されるのですか？

せん断されたクロマチンの正確なサイズ評価には、アガロースゲルまたはフラグメントアナライザー（Advanced Analytical）の使用を推奨します。

Agilent BioAnalyzer 2100はNGSのライブラリー作製前にDNA断片のサイズ評価に広く使用されていますが、この技術はせん断されたクロマチンの分析にはあまり適していません。例えば、アガロースゲルとBioAnalyzer 2100プロファイルの間にいくつかの不一致が記録されています。それはマイクロ流体チップが残留分子（イオン、SDS、タンパク質、DNA沈殿などに使用される担体等）に対して反応性が高いこと、オーバーロード、もしくは、固定反応および脱架橋で完全には緩和されていないDNA分子の構造/空間構造が関係している可能性も考えられます。

更に、BioAnalyzer 2100のトレースはログに基づいているため、大きな分子量のフラグメントの分布は、小さなサイズのフラグメントと比較してトレースのより小さな領域に圧縮され、フラグメント分布の視覚的誤解を招きます。

別の重要なポイントは、BioAnalyzer 2100ピークの定量に関するものです。特定の範囲内の分子数を表すモル濃度を用いて各領域を計算すると、低分子量領域ではかなり高いレベルの分子が見出されます（下記の図を参照）。



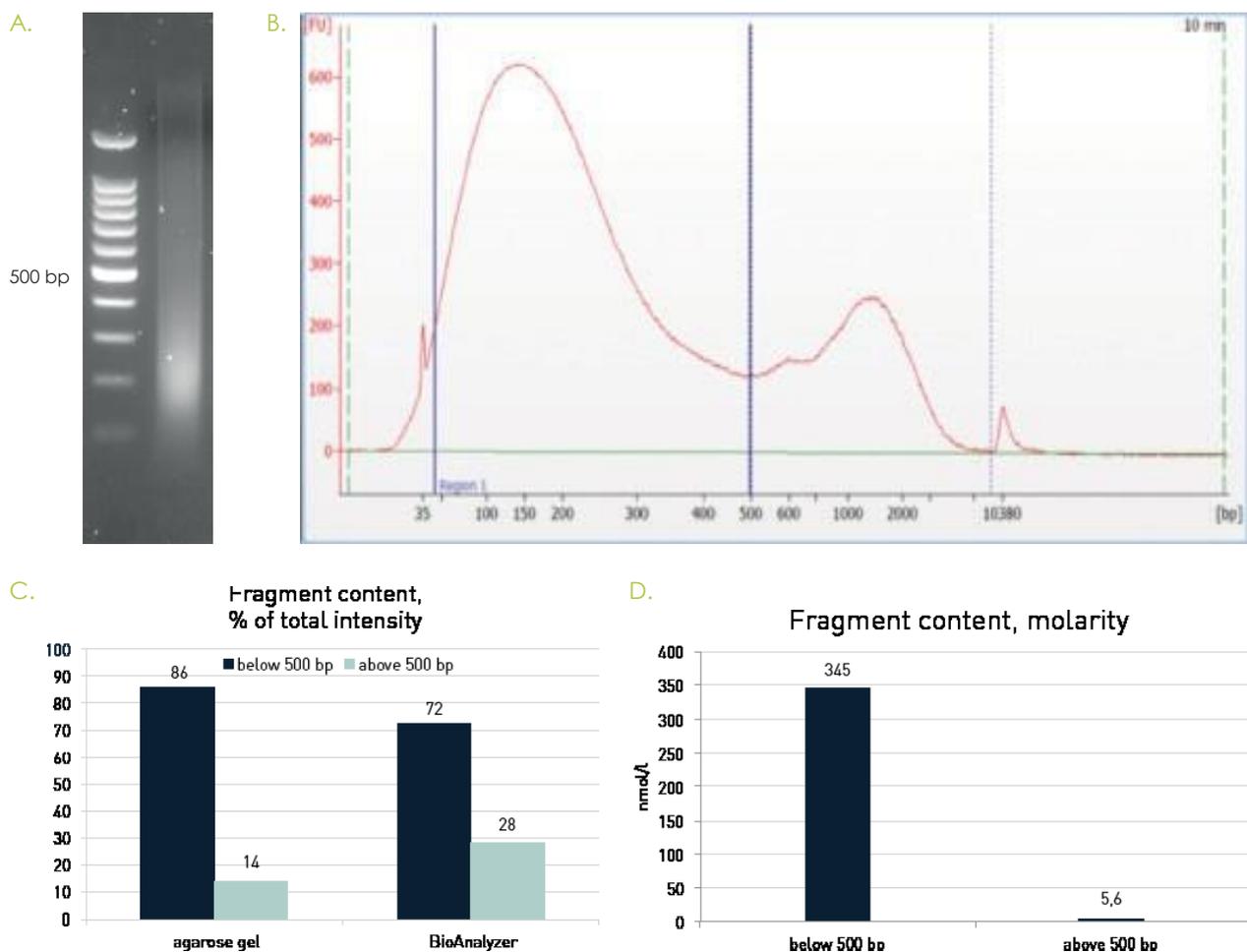


Figure 3. アガロースゲルおよびBioAnalyzerを用いた断片化クロマチンのサイズ評価。

HeLa細胞をホルムアルデヒドで固定し、染色体をDiagenodeのプロトコールに従って調製した。サンプルを、Picoruptorの30サイクル ON / 30秒 OFF で 1.5 ml Picoruptor Microtubes with Caps (C30010016) を用いて超音波処理し、アガロースゲルA)、またはBioAnalyzer、High Sens Agilent DNAキット (パネルB) によって測定した。500bp以下および500bp超のフラグメント含有量を全表面積のパーセンテージとして算出した (パネルC)。パネルDはモル濃度として計算されたフラグメント含有量を示す (BioAnalyzerトレースのみ)。

キットに含まれる緩衝液の組成は何ですか？

バッファの構成は独自のものです。

関連製品

製品	カタログ番号	用量
ChIP Cross-link Gold	C01019027	600 µl
Chromatin shearing optimization kit – Low SDS (iDeal Kit for TFs)	C01020013	100 million cells
iDeal ChIP-seq kit for Transcription Factors	C01010054	10 rxns
iDeal ChIP-seq kit for Transcription Factors	C01010055	24 rxns
iDeal ChIP-seq kit for Transcription Factors	C01010170	100 rxns
iDeal ChIP-seq kit for Histones	C01010050	10 rxns
iDeal ChIP-seq kit for Histones	C01010051	24 rxns
iDeal ChIP-seq kit for Histonesh	C01010059	100 rxns
MicroChIP DiaPure columns	C03040001	50 rxns
IPure kit v2	C03010014	24 rxns
IPure kit v2	C03010015	100 rxns
Picoruptor	B01060001	

check out the complete list at www.diagenode.com

ChIP用 抗体	カタログ番号
AML1-ETO polyclonal antibody	C15310197
Pol II mAb	C1520000
CTCF pAb	C15410210
TBP mAb	C15200002
ER alpha mAb	C15100066
ETO pAb	C15310001
FOXA1 pAb	C15410231
FOXM1 pAb	C15410232
GR mAb	C15200010
GTF2E2 pAb	C15410264

ChIP用 抗体	カタログ番号
H3K4me3 pAb	C15410003
H3K27me3 pAb	C15410069
H3pan mAb (clone 1B1B2)	C15200011
H3R8me2(asym) pAb	C15410286
H3K27ac pAb	C15410196
H3K9me3 pAb	C15410193
H3K4me1 pAb	C15410194
H4K20me3 pAb	C15410207
H2A.Z pAb	C15410201
H4K5ac pAb	C15410025



研究用途にのみ使用してください。

いかなる動物および人の治療または診断用途に使用しないでください。

©2017 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」という）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予防措置を講じていますが、Diagenode およびそのアフィリエイトは、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いかなる損害に対しても責任を負いません。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, non-transferable, 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. Bioanalyzer is a trademark of Agilent Technologies, Inc. Agencourt and AMPure® are registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. Illumina® is a registered trademark of Illumina® Inc; Qubit is a registered trademark of Life Technologies Corporation.



www.diagenode.com