

ChIP-seq 受託サービスガイドライン

最良の結果を得るため、サンプル調製（細胞採取と固定）のガイドラインを遵守してください。また、プロジェクト固有のガイドラインを担当者からご案内させていただきます。

1 回の ChIP 実験に必要な標準細胞数*

- 対象を転写因子とした場合：4,000,000 個以上の細胞
- 対象をヒストンとした場合：1,000,000 個以上の細胞
- 低細胞数（対象はヒストンのみ）：20,000~500,000 個の細胞

*お客様のプロジェクトに応じて、必要な細胞数を決定するためのサポートをさせていただきます。お気軽にお問い合わせください。

ChIP-seq ワークフロー

1. サンプル/抗体バリデーションサービス

代表的なサンプル（各細胞/組織）を用いて検証を行います。

1.1. クロマチン剪断のバリデーション

- ・ Bioruptor® を使用して、2 回の剪断を 2 重に行うテスト
- ・ 剪断プロファイルを評価するための DNA 分析

1.2. ChIP バリデーション

iDeal ChIP-seq キット（標準量）または True MicroChIP キット（低インプット）を用いて、2 種類の抗体量で ChIP のバリデーションテストを、各ターゲットに実施します。

qPCR

もしご用意が可能であれば、コントロール領域に対するプライマー（陽性と陰性それぞれ 1 つずつ）を提供してください。提供が難しい場合は、お客様から提供された公開データベースや出版物のデータに基づいたプライマー設計を行います。

- ・ H3K4me3/PolII および IgG を使用したコントロール IP の実施
- ・ gDNA の連続希釈による qPCR プライマーのバリデーション
- ・ qPCR にてインプットの割合の測定、特異的濃縮率の算出

もしくは

シーケンス

- ・ 定量および MicroPlex Kit を使用したライブラリー調製
- ・ イルミナシーケンスを使用し、ペアエンド 2x50 bp のシーケンス
- ・ クオリティチェック、リファレンスゲノムへのアライメント、濃縮領域の同定（ピークコール）

2. ChIP-seq サービス

試験を行うサンプルは、2つの生物学的レプリケートが必要になります。

2.1. クロマチン剪断

- ・ 本資料 1 ページ目のバリデーション実験に基づき、Bioruptor® を用いた最適な剪断条件にて実施
- ・ 剪断プロファイルを評価するための DNA 分析

2.2. ChIP

- ・ バリデーション実験または過去の実験に基づく最適な抗体量を使用
- ・ H3K4me3/PoIII および IgG を使用したコントロール IP の実施
- ・ コントロール領域用のプライマー（お客様から提供されたもの、またはバリデーションで実施したシーケンス結果に基づいて設計されたもの）を用いた qPCR により、ChIP の効率を評価

2.3. ライブラリー調製

MicroPlex Kit（初発サンプルは、500 pg 以下の DNA）を使用

- ・ コントロール ChIP DNA を含む
- ・ 調製したライブラリーは、定量およびサイズ評価を実施

2.4. シーケンス

イルミナシーケンサーを使用して、ペアエンド 2x50 bp にて実施します。
これ以外のシーケンシング条件のご要望があれば、お問い合わせください。

マーク	マークカテゴリー	リード数 (x1,000,000) ヒト、マウス、ラット)
Input	Input	30/50 (as respective IP)
Non-histone protein	TF	30
Histone	Narrow (H3K4me3,...)	30
Histone	Broad (H3K27me3,...) / Ubiquitous(H3PanAc,..)	50

2.5. バイオインフォマティクス解析

クオリティチェック、リファレンスゲノムへのアライメント、濃縮領域の同定（ピークコール）を含みます。

納品データ：

- ・ シーケンス解析レポート
- ・ FASTQ 形式の生データ
- ・ FastQC レポート
- ・ BAM 形式のアライメントファイル
- ・ BED 形式のピークファイル

2.6. ご要望に応じた追加のバイオインフォマティクス解析

- **Differential binding analysis** : 以前に同定された ChIP-seq ピークに基づくサンプル間の差異結合の同定とアノテーション(ヒト、マウス、ラット、ショウジョウバエ)を行います。

納品データ:

- Differential binding analysis とプロットの Summary を含むレポート
- 異なる結合部位またはユニークなピークとアノテーションされた領域における解析結果を含むファイル:ヒト、マウス、ラット、ショウジョウバエのイントロン、エクソン、プロモーター、1-5 kb上流 TSS 領域、遺伝子間領域

- **Annotation in genomic regions** : ChIP-seq ピークのゲノム領域へのアノテーション: ヒト、マウス、ラット、ショウジョウバエのイントロン、エクソン、プロモーター、1-5 kb上流 TSS 領域、遺伝子間領域

- **Gene ontology terms analysis**: 遺伝子セットのエンリッチメント解析。結合領域または差異結合領域で過剰発現された遺伝子オントロジー (GO) term は、その根底にある生物学的プロセスを示している可能性があります。

- **Pathway analysis**: 結合領域または差異結合領域に関連する遺伝子が過剰発現している可能性のある生化学的経路を同定します。

- **Visualization of specific genomic regions**: 特定のゲノム領域 (遺伝子、プロモーターなど) の結果 (シーケンスデータ、ピークなど) を、論文に掲載可能な画像で可視化します(ヒト、マウス、ラット)。

2.7. その他の注意事項

サンプル調製・送付については必ず Diagenode 社のガイドラインに従ってください。ご提供いただいたサンプルの QC が基準に満たない場合、再度新しいサンプルをご提供いただき、追加の QC を行います。ただし、再提供および QC にかかる追加料金はお客様負担となります。サンプル提供が遅れますと、納期に影響する可能性があります。

解析結果データは、Diagenode WEB サイトよりダウンロード可能です。解析終了後、Diagenode SA (ベルギー) よりログイン及びダウンロード方法についてご連絡いたしますので、1 ヶ月以内にダウンロードをお願いいたします。また、予備期間として3 ヶ月間はサーバー上に保存されていますが、それ以降は削除されますので、長期間の保存を希望される場合は早めにご連絡ください。

お客様からお預かりしたサンプルは、Diagenode 施設にて解析終了から 4 ヶ月間保管した後、順次廃棄いたします。お客様のご要望に応じて、サンプルのご返却も可能です。ただし、追加費用が必要となります。

ご依頼いただいた内容の範囲外となる追加サービスの料金はお客様負担となります。