

商品コード 53150

# ATAC-Seq Kit

日本語簡易プロトコル 英語版 version B4  
(最新の英文プロトコルも必ず確認してください)

## 細胞サンプル (Cell Sample Preparation)

\* 実験を始める前に、SPRI beads を 4°C の冷蔵庫から取り出して室温に戻してください。

1. 1.5 ml の遠心チューブに 50,000-100,000 細胞を用意します。
2. チューブを遠心します。500 x g, 5 min, 4°C。ペレットを確認しやすいように、ペレットが集まる向きがわかるようにしてから遠心してください。ペレットが観察されない場合には、さらに 1,000 x g, 5 min, 4°C を行います。
3. 上清を除き、100  $\mu$ l の氷冷した PBS を加え、500 x g, 5 min, 4°C で遠心して細胞を回収します。
4. ペレットが崩れないように上清を丁寧に除き、100  $\mu$ l の ATAC Lysis Buffer を加えて、細胞を懸濁します。
5. 懸濁したサンプルを氷上の PCR チューブに移し、素早く遠心します。500 x g, 10 min, 4°C。この間に Tagmentation Master Mix を用意します。
6. ペレットを崩さないように上清を丁寧に除き、速やかに Tagmentation 反応と精製ステップへ進みます。(ポイント！ペレットを崩さずに余分な ATAC Lysis buffer を除くことは非常に重要な作業です)

## Tagmentation Master Mix (per sample)

Reagent	Volume
2X Tagmentation Buffer	25 $\mu$ l
10X PBS	2.0 $\mu$ l
0.5% Digitonin	0.5 $\mu$ l
10% Tween 20	0.5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	12 $\mu$ l
Assembled Transposomes	10 $\mu$ l

## 組織サンプル (Tissue Sample Preparation)

\*このプロトコルは、20-30 mg の組織の処理を想定しています。

実験を始める前に、SPRI beads を 4°C の冷蔵庫から取り出して室温に戻してください。

1. 15 ml のチューブに 5 ml の氷冷した PBS を入れたものと、氷上に 5 cm のペトリディッシュを用意してください。
2. サンプルをペトリディッシュに取り出し、カミソリ刃を用いて、細かく裁断し、先端を切ったピペットを用意して、1 ml の PBS を使って PBS の入った 15 ml チューブに移してください。
3. 15 ml チューブを遠心します。500 x g, 5 min, 4°C
4. 上清の PBS を除き、1 ml ATAC Lysis Buffer を加えます。
5. 先端を切るなどして穴を大きくしたチップを使って、サンプルを 1 ml の dounce homogenizer (例: #40401 Dounce Homogenizer, 1 ml) に移し、氷冷しながら、ゆっくりと 30 ストロークします。このとき、small-clearance, type B をお使いください。
6. ホモジナイズしたサンプルは、40  $\mu$ m の mesh strainer (例: Falcon #352340) を使って夾雑物を除き、1.5 ml のエッペンドルフチューブに回収します。回収したらすぐに 10  $\mu$ l を取り出し、細胞数を計測します。
7. トリパンブルー(0.4%)を加えて細胞数を計測します。核が染色されているものだけを計測します。
8. 回収したチューブを混和後、50,000-100,000 細胞を別の 1.5 ml チューブに移します。
9. 遠心して細胞を回収します。500 x g, 5 min, 4°C。遠心している間に、Tagmentation Master Mix を用意します。
10. 上清を除き、速やかに Tagmentation 反応と精製ステップへ進みます。

### Tagmentation Master Mix (per sample)

Reagent	Volume
2X Tagmentation Buffer	25 $\mu$ l
10X PBS	2.0 $\mu$ l
0.5% Digitonin	0.5 $\mu$ l
10% Tween 20	0.5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	12 $\mu$ l
Assembled Transposomes	10 $\mu$ l

## Tagmentation Reaction and Purification

このプロトコルは、50,000-100,000 細胞、20-30 mg の組織の処理を想定しています。

1. 50  $\mu$ l の Tagmentation Master Mix を各チューブに加えます。細胞を懸濁します。氷冷せずに室温で良いです。
2. 800 rpm で攪拌しながら 37°C、30 分間反応します。
3. 1.5 ml のチューブに移し替えます。
4. 250  $\mu$ l の DNA Purification Binding Buffer と 5  $\mu$ l の **3 M Sodium Acetate** をそれぞれのサンプルに加えて混合します。このときの溶液の色を確認します。
5. DNA Purification Binding Buffer には、pH 指示薬が含まれます。図 1 の左のチューブのように黄色であれば次のステップに進みます。紫色やオレンジ色の場合は pH が高い状態を示していますので、一度に 5  $\mu$ l ずつ **3M Sodium Acetate** を色が黄色くなるまで加えて、混合します。

※このステップをしっかりとおこなわないと DNA の精製がうまくいなくなるので注意すること。手順に従って、適切な pH に溶液を調整すること。

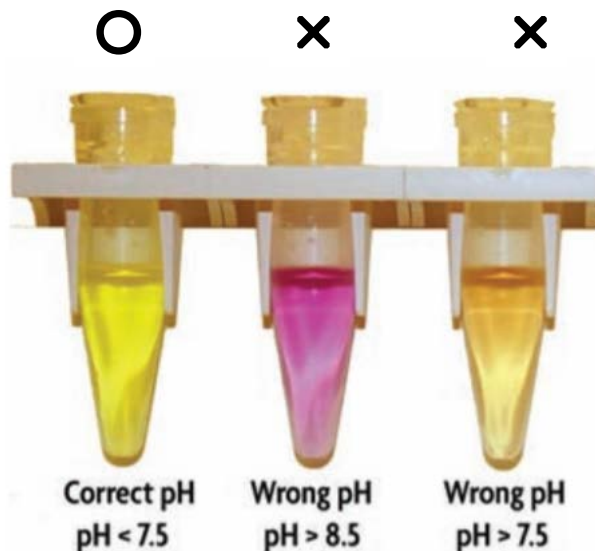


図 1: pH に対応する溶液の色。

6. ピペッティングしてよく攪拌します。
7. DNA purification column を、サンプル名を記載した付属の遠心チューブに取り付けます。
8. サンプル DNA purification column に加え、蓋を閉めて 17,000 x g (14,000 rpm)

- で1分間遠心します。
9. Flow-through した溶液を除き、カラムを再びチューブにセットします。
  10. 2.4 ml の Wash Buffer に 9.6 ml 100% EtOH を加えて調製した Wash Buffer (最終エタノール濃度 80%) を用意し、750  $\mu$ l を DNA purification column に加えて蓋を閉めます。
  11. 17,000 x g (14,000 rpm) で 1 分間遠心します。
  12. Flow-through した溶液を除き、カラムを再びチューブにセットします。
  13. その後、DNA purification column のキャップを開けたままで、17,000 x g (14,000 rpm) で 2 分間遠心します。
  14. カラムを新しい遠心チューブにセットします。
  15. 35  $\mu$ l の DNA Purification Elution Buffer をカラムの真ん中のフィルターに滴下して、キャップをして1分間室温で放置します。
  16. 17,000 x g (14,000 rpm) で 1 分間遠心します。
  17. チューブに DNA が精製されます。DNA purification column は捨ててください。
  18. 精製された DNA は、-20°C で保管可能です。もしくはこのまま PCR Amplification of Tagmented DNA のステップに進むこともできます。

## PCR Amplification of Tagmented DNA

注) KAPA Real-Time Library Amplification Kit などを使用する場合、最初の 72°Cの伸長反応ステップは不要です。

1. PCR 反応液を用意します。マルチプレックスシーケンスを実施する場合には、適切なプライマーの組み合わせを利用してください。各サンプルは、一つの i7 Indexed Primer と一つの i5 Indexed Primer の組み合わせが必要です。キットには 4 種類ずつ Primer が用意されているので、 $4 \times 4 = 16$  種類の組み合わせが可能で、16 サンプルのマルチプレックスが可能です。この Indexed Prime は、illumina 社の Nextera adapters を元にしています。

### Use one i7 Indexed Primer

i7 Indexed Primer 1 = i7 N701  
 i7 Indexed Primer 2 = i7 N702  
 i7 Indexed Primer 3 = i7 N703  
 i7 Indexed Primer 4 = i7 N704

### And use one i5 Indexed Primer

i5 Indexed Primer 1 = i5 N501  
 i5 Indexed Primer 2 = i5 N502  
 i5 Indexed Primer 3 = i5 N503  
 i5 Indexed Primer 4 = i5 N504

Reagent	Volume
Tagmented DNA	33.5 $\mu$ l
i7 Indexing Primer (25 $\mu$ M)	2.5 $\mu$ l
i5 Indexing Primer (25 $\mu$ M)	2.5 $\mu$ l
dNTPs (10 mM)	1 $\mu$ l
5X Q5 Reaction Buffer	10 $\mu$ l
Q5 Polymerase (2 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l

2. ヒートリッドのある PCR 機器を用いて、次のようなプログラムで行います。

72°C 5 minutes

98°C for 30 seconds

10 cycles of: 98°C for 10 seconds, 63°C for 30 seconds, 72°C for 1 minute

Hold at 10°C.

3. SPRI ビーズを使ったライブラリーDNA の精製を行います。
  - (ア) PCR 反応液に、室温に戻した SPRI beads solution を、よく混ぜてから、60  $\mu$ l (1.2X Sample Volume) を加えます。
  - (イ) ボルテックスで攪拌し、5 分間室温で放置します。
  - (ウ) マグネットを使ってビーズを集めます。
  - (エ) 溶液を除きます。
  - (オ) (ビーズはマグネットに集められたまま) 80%エタノール溶液を 180  $\mu$ l 加えます。
  - (カ) 室温で 30 秒放置します。
  - (キ) 上清を除きます。
  - (ク) 再び 80%エタノール溶液を 180  $\mu$ l 加え、同様の操作をします (オキ)。
  - (ケ) チューブの蓋を開けて、残存するエタノールを蒸発させます (約 2-5 分間)。ビーズの色がつつやつやした感じからつつや消しになったら、次のステップにいきます。
  - (コ) チューブをマグネットから離して、20  $\mu$ l DNA Purification Elution Buffer を加えます。
  - (サ) 蓋をしてボルテックスします。
  - (シ) 室温で 5 分間静置します。
  - (ス) マグネットでビーズを集めます。
  - (セ) ビーズが回収し上清が透明になったら、上清を新しいチューブに移し替えます。
4. ライブラリーDNA が回収できました。ライブラリーは、Bioanalyzer, TapeStation などを使ってサイズの確認をするか、NGS 用の定量キット (例: KAPA Biosystems, Catalog No. KR0405) を使って定量してください。

## Index Primers and Sample Sheet information

Index 1 (i7) Primers

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT[i7]GTCTCGTGGGCTCGG

Index 2 (i5) Primers

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[i5]TCGTCCGGCAGCGTC

<b>i7 Index</b>	<b>i7 Sequence</b>	<b>Sample Sheet</b>
N701	TCGCCTTA	TAAGGCCGA
N702	CTAGTACG	CGTACTAG
N703	TTCTGCCT	AGGCAGAA
N704	GCTCAGGA	TCCTGAGC

<b>i5 Index</b>	<b>i5 Sequence</b>	<b>Sample Sheet (NovaSeq, MiSeq, HiSeq 2000/2500)</b>
N501	TAGATCGC	TAGATCGC
N502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
N503	TATCCTCT	TATCCTCT
N504	AGAGTAGA	AGAGTAGA

<b>i5 Index</b>	<b>i5 Sequence</b>	<b>Sample Sheet (iSeq, MiniSeq, NextSeq, HiSeq 3000/4000)</b>
N501	TAGATCGC	GCGATCTA
N502	CTCTCTAT	ATAGAGAG
N503	TATCCTCT	AGAGGATA
N504	AGAGTAGA	TCTACTCT

Sequence for Read 1 and Read 2 adapter trimming: CTGTCTCTTATACACATCT.

## Section B. Troubleshooting Guide

Problem/question	Possible cause	Recommendation
High background in sequencing data	Cell viability may be the issue. Apoptotic cells release unprotected DNA that is much more accessible to Tn5 than DNA in compacted chromatin, leading to high background signal.	Optional treatment with DNase I can improve results. This treatment is only an option of cells that are viable and able to exclude the enzyme <sup>3</sup> .
No library produced	Sample loss is possible throughout the protocol, especially when working with small numbers of cells as the pellet may be difficult or impossible to see.	Be sure to orient tubes so you know where the cell pellet will be, and pipette from the side of the tube that is opposite from the pellet in all centrifugation steps except for the removal of lysis buffer where a few microliters of supernatant can be left behind.
	Incompatible amplification program used.	An initial 72°C extension step before denaturation is essential for ATAC-Seq libraries because the 5' ends of adapters' non-transferred strands are not ligated to insert DNA by the enzyme. The extension is therefore required in order to produce the anchor site for the index primers. There is no real recovery from this, unfortunately.

### References

1. Buenrostro, J. D., et al. (2013) Nat. Methods 10: 1213-1218.
2. Adley, A., et al. (2010) Genome Biol. 11.
3. Corces, M. R. et al. (2017) Nat. Methods 14: 959-962.

---

お問い合わせ先：

アクティブ・モティフ株式会社

テクニカルサポート

japantech@activemotif.com

162-0824 東京都新宿区揚場町 2-21

TEL: 03-5225-3638 FAX: 03-5261-8733