

商品コード 53165

CUT&Tag-IT™ Assay Kit, Anti-Mouse

日本語簡易プロトコール 英語版 version A2
(最新版の英語マニュアルも必ずご確認ください)

このキットは、1 反応あたり 50,000~500,000 細胞に最適化されています。

注意： このキットは非接着細胞に最適化されています。もし、接着細胞を用いる場合は細胞膜タンパク質を消化するトリプシンやその他の剥離剤の使用は避けてください。細胞膜のタンパク質は、セクション B において Concanavalin A Beads に吸着させるのに必要です。培養プレートから細胞をはがす際はシリコンラバーなどのついたセルスクレーパーの利用など、酵素処理を伴わない方法を用いてください。また、サンプルロスやビーズの吸着を防ぐため、低吸着チューブの利用を推奨します。

A. 細胞の調製 (30 分)

注意： 実験を始める前に、Protease Inhibitor Cocktail を-20℃の冷凍庫から取り出して室温で溶解してください。溶けたら転倒混和して氷上で維持してください。

下記のステップ 3 で使用する 1x Wash Buffer には、Protease Inhibitor Cocktail を加えてください。1x Wash Buffer は 1 サンプルあたり 2.5 mL 使用しますので、サンプル数に応じて 1 mL あたり 10 μ L の Protease Inhibitor Cocktail を加えた溶液を調製し、氷上で維持してください。この Protease Inhibitor Cocktail を加えた 1x Wash Buffer は、4℃で 1 週間まで保存できます。

1. 細胞を室温で回収し、細胞数をカウントして、必要量を 1.5 mL の遠心チューブに移します。
2. 600 xg で 3 分間、室温で遠心し上清を除去します。
3. 室温で 1 mL の 1x Wash Buffer に再懸濁し、600 xg で 3 分間、室温で遠心して上清を除去します。
4. 細胞に 1.5 mL の 1x Wash Buffer を加えて再懸濁し、2 mL の遠心チューブに移します。細胞は以降のステップでビーズの準備をする間、氷上に静置します。

B. Concanavalin A Beads への細胞の吸着 (30 分)

5. 各サンプルに均等に分注できるように Concanavalin A Beads を緩やかに撹拌します。Concanavalin A ビーズは 500,000 細胞までの場合 20 μ L 使用します。これ以降、本マニュアルでは細胞数が 1 サンプルあたり 500,000 個あることを前提として記述します。
6. 2 mL チューブに 20 μ L の Concanavalin A Beads および 1.6 mL の 1 \times Binding Buffer を移し、ピペッティングにより混合します。ビーズが沈み、チューブ内が透明になるまで磁気スタンド上に静置します (30 秒~2 分)。
7. 上清を完全に除去し、チューブを磁気スタンドから降ろします。1.5 mL の 1 \times Binding Buffer を加えてピペッティングしたのち、小型微量遠心機で軽く遠心してチューブ側面の液体を集めます。
8. チューブを再び磁気スタンドに静置 (30 秒~2 分) してビーズが吸着されたら、上清をピペットで除去します。ビーズに 20 μ L の 1 \times Binding Buffer を加えて再懸濁し、室温に静置します。
9. ステップ 4 で調製した細胞にステップ 8 で用意した Concanavalin A Beads を緩やかに加えて転倒混和した後、各サンプルをチューブローテーターに載せて 10 分間インキュベーションします。

C. 一次抗体の結合 (2 時間~オーバーナイト)

注意： 以下の ステップ 11 で使用する Antibody Buffer には Protease Inhibitor Cocktail と Digitonin を添加します。Antibody Buffer は 1 サンプルあたり 50 μ L となるよう計算して 1.5 mL チューブに分取し、Protease Inhibitor Cocktail と 5% Digitonin を Buffer 量の 1/100 ずつ加えます (1 サンプルの場合、50 μ L の Antibody Buffer に 0.5 μ L ずつ Protease Inhibitor Cocktail と 5% Digitonin を加えます)。ピペッティングにより撹拌したのち、氷上に静置します。Protease Inhibitor Cocktail と Digitonin を添加した Antibody Buffer は 4°C で 2 日間保存可能です。

10. ローテーターから外したチューブを小型微量遠心機で軽く遠心 (<100 xg) してキャップに付着した液体を集め、磁気スタンドに静置します (30 秒~2 分)。ビーズが吸着して溶液が透明になったら、ピペットを用いて上清を除去します。
11. 1 サンプルあたり 50 μ L の氷冷した Antibody Buffer を加え、緩やかに Vortex して氷上に静置します。
12. 緩やかに Vortex またはピペッティングしながら 1 μ L (または最低 1 μ g) の希釈していない抗体を各サンプルに加えて混合します。

重要： マウスの一次抗体をご使用ください。1:50~1:100 の希釈または抗体製造元が免疫蛍光染色法に推奨する濃度を推奨します。Histone H3K27me3 (Cat. No.61018) は共通の指標となるため、ポジティブコントロールとして使用できます。

13. 旋回シェーカーを用いて 4℃で 2 時間～オーバーナイトでインキュベートします。チューブの底に一定量の液が残るように設定して、全体が混ざるようにしてください。

D. 二次抗体の結合 (60 分)

注意： 以下のステップ 15 で使用する Dig-Wash Buffer には Protease Inhibitor Cocktail と 5% Digitonin を添加します。Dig-Wash Buffer は、1 サンプルあたり 3.1 mL となるよう計算して 15 mL または 50 mL チューブに分取し、Protease Inhibitor Cocktail と 5% Digitonin を Buffer 量の 1/100 ずつ加えます (1 サンプルの場合、3.1 mL の Dig-Wash Buffer に 31 μ L ずつ Protease Inhibitor Cocktail と 5% Digitonin を加えます)。Protease Inhibitor Cocktail と 5% Digitonin を添加した Dig-Wash Buffer は 4℃で 2 日間保存可能です。

14. 小型微量遠心機で軽く遠心 (<100 xg) した後、チューブを磁気スタンドに静置します (30 秒～2 分)。透明になったらピペットを用いて上清を除去します。
15. 1 サンプルあたり 100 μ L となるよう Rabbit Anti-Mouse secondary antibody を Dig-Wash Buffer で 1 : 100 に希釈します。上清を除去したステップ 14 の各サンプルに、この二次抗体を 100 μ L ずつ加え、緩やかに Vortex してチューブ側面に付着した細胞とビーズのペレットをはがします。
16. 旋回シェーカーにサンプルを載せて室温で 60 分間インキュベートします。
17. 軽く遠心してからチューブを磁気スタンドに静置し (30 秒～2 分)、透明になったら上清をピペットで除去します。
18. 各サンプルに 1 mL の Dig-Wash Buffer を加え、緩やかに Vortex またはピペッティングして凝集したビーズをほぐします。
19. ステップ 17、18 を 2 回繰り返し、合計 3 回洗浄します。

E. 抗体に対する CUT&Tag-IT™ Assembled pA-Tn5 Transposomesの結合 (60分)

注意： 以下のステップ 20 で使用する Dig-300 Buffer には Protease Inhibitor Cocktail と 5% Digitonin を添加します。Dig-300 Buffer は、1 サンプルあたり 3.1 mL となるよう計算して 15 mL または 50 mL チューブに分取し、Protease Inhibitor Cocktail は Dig-300 Buffer 量の 1/100 を、5% Digitonin は Dig-300 Buffer 量の 1/500 を加えます (1 サンプルの場合、3.1 mL の Dig-300 Buffer に 31 μ L の Protease Inhibitor Cocktail と 6.2 μ L の 5% Digitonin を加えます)。Protease Inhibitor Cocktail と 5% Digitonin を添加した Dig-300 Buffer は 4℃で 2 日間保存可能です。

20. CUT&Tag-IT™ Assembled pA-Tn5 Transposomes を Dig-300 Buffer で 1:100 に希釈します。
1 サンプルあたり 100 μ L の Dig-300 Buffer に、1 μ L の CUT&Tag-IT™ Assembled pA-Tn5 Transposomes を加え、ピペティングしてよく混ぜます。
21. ステップ 19 のサンプルを小型微量遠心機で軽く遠心し (<100 xg)、磁気スタンドに静置します (30 秒~2 分)。透明になったらピペットを用いて上清を除去します。
22. 各サンプルにステップ 20 で調製した Transposomes を 100 μ L ずつ加え、緩やかにピペティングしてよく混ぜます。
23. 旋回シェーカーにサンプルを載せて室温で 60 分間インキュベートします。
24. サンプルを小型微量遠心機で軽く遠心し (<100 xg)、磁気スタンドに静置します (30 秒~2 分)。透明になったらピペットを用いて上清を除去します。
25. 緩やかに Vortex またはピペティングしながら、各サンプルに 1 mL の Dig-300 Buffer を加え、凝集したビーズをほぐします。
26. ステップ 24、25 を 2 回繰り返し、合計 3 回洗浄します。

F. タグメンテーション (60 分)

注意： 以下で使用する Tagmentation Buffer には、Protease Inhibitor Cocktail と 5% Digitonin を加えます。Tagmentation Buffer は 1 サンプルあたり 125 μ L となるよう計算して適切なサイズのチューブに分取し、Protease Inhibitor Cocktail は Tagmentation Buffer 量の 1/100 を、5% Digitonin は Tagmentation Buffer 量の 1/500 を加えます (1 サンプルの場合、125 μ L の Tagmentation Buffer に 1.25 μ L の Protease Inhibitor Cocktail と 0.25 μ L の 5% Digitonin を加えます)。

27. サンプルを小型微量遠心機で軽く遠心し (<100 xg)、磁気スタンドに静置します (30 秒~2 分)。透明になったらピペットを用いて上清を除去します。
28. 緩やかに Vortex またはピペティングしながら、各サンプルに 125 μ L ずつ Tagmentation Buffer を加えてよく混ぜます。
29. サンプルの入ったチューブを 37°C で 60 分インキュベートします。

G.DNA 抽出 (60 分)

30. タグメンテーション反応を止めて DNA 断片を溶出しやすくするため、各サンプルに以下を加えます。

4.2 μ L 0.5 M EDTA

1.25 μ L 10% SDS

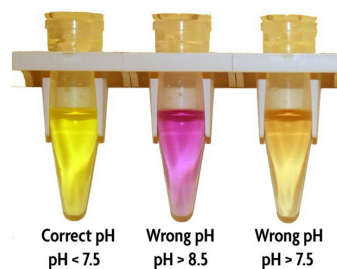
1.1 μ L Proteinase K (10 mg/mL)

31. 最大速で約 2 秒間 Vortex して攪拌した後、55°C で 60 分間インキュベーションして消化します。

注意： 一般に、Proteinase K および SDS を加えると DNA の粘弾性のため、ビーズが大きな凝集塊を形成します。しかし、ゲノムワイドに広く分布するエピトープ部位で断片化されたゲノムでは、凝集塊の形成が抑制されてビーズが溶液中に放出されるため、溶液はネガティブコントロールに比べて茶色みがかった色となります。

32. サンプルを微量遠心機で軽く遠心し (<100 xg)、磁気スタンドに静置します (30 秒~2 分)、透明になったら上清を新しい 1.5 mL チューブに移します。

33. 各サンプルに 625 μ L の DNA Purification Binding Buffer を加え、ピペッティングにより混合します。このときバッファーに含まれる pH 指示薬が黄色になることを確認します。もし、紫色またはオレンジ色になった場合は 3 M Sodium Acetate を 8 μ L 加えてください。



34. サンプルと同数の DNA Purification Column を用意し、それぞれ 1.5 mL チューブに入れます。

35. 各サンプルをカラムに移してフタを閉じ、17,000 xg (~14,000 rpm) で 1 分間遠心します。

36. フロースルーを捨て、カラムをチューブに戻します。

注意： キット開封後、初めて使用する場合は、DNA Purification **Wash** Buffer に 40 mL の 100% エタノールを加えてください (エタノールの終濃度 : 80%)。

37. カラムに 750 μ L の DNA Purification **Wash** Buffer を加えてフタを閉じ、17,000 xg で 1 分間遠心します。

38. フロースルーを捨て、カラムをチューブに戻します。カラムに残った DNA Purification **Wash** Buffer を除去するため、17,000 xg で 2 分間遠心します。

39. カラムを新しい 1.5 mL チューブに移し、カラムの中心に 35 μ L の DNA Purification **Elution** Buffer を加えて 1 分間室温で静置します。

40. 17,000 xg で 1 分間遠心し、カラムを捨てます。溶出された DNA は、以降の PCR による増幅ステップに進むまで -20°C で保存可能です。

H. PCR による増幅

注意： 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。

41. 以下の内容で試薬類を混合して PCR の準備をします。もし、マルチプレックスでシーケンシングする場合、各反応で異なる i5 と i7 インデックスを組み合わせます。

各サンプルには i5 Indexed Primer および i7 Indexed Primer をそれぞれ 1 種類ずつ組み合わせて PCR を行います。各プライマーは 4 種ずつあるので、 $4 \times 4 = 16$ 通りの異なる組み合わせでマルチプレックスが可能です。これらの Indexed Primer は Illumina 社の Nextera アダプターに適合します。

1 反応あたり：

1 種類の i7 Indexed Primer を使用

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

1 種類の i5 Indexed Primer を使用

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

CUT&Tag 1 サンプルあたりの試薬	量 (50 µL)
Tagmented DNA	30 µL
i7 Indexed Primer	2.5 µL
i5 Indexed Primer	2.5 µL
dNTPs (10 mM)	1.0 µL
5× Q5 Reaction Buffer	10 µL
Molecular grade nuclease-free water	3.5 µL
Q5 polymerase	0.5 µL
	(総量 = 50 µL)

42. リッドヒーター付きサーマルサイクラーに以下のプログラムを適用して PCR を行います。

72°C for 5 minutes

98°C for 30 seconds

14 cycles of: 98°C for 10 seconds, 63°C for 10 seconds

72°C for 1 minute

Hold at 10°C

43. 以下のステップでは、SPRI ビーズを用いた精製を行います。1 サンプルあたり 55 μ L (サンプルの 1.1 倍量) の SPRI ビーズを使用し、20 μ L の DNA Purification **Elution** Buffer で溶出します。1 サンプルあたり 400 μ L の用時調製された 80%エタノールも必要です。

- a. 各サンプルに、よく混ぜた 55 μ L の SPRI ビーズを加えます。
- b. 軽く Vortex して混合し、室温で 5 分間インキュベートしてビーズに DNA を結合させます。
- c. チューブに磁石を当ててビーズを吸着します。
- d. 溶液が透明になったら上清を除去します。
- e. 磁石をサンプルに当てたまま各サンプルに 180 μ L の 80%エタノールを加えます (攪拌しないでください)。
- f. 室温で 30 秒間静置します。
- g. 磁石をあてたまま上清を除去します。
- h. e~g を繰り返し、2 回目のエタノール洗浄を行います。
- i. 残ったエタノールを揮発させるため、室温に静置します。ビーズが光沢のある状態からくすんだ状態に変わったら (この間 2~5 分)、次のステップに進みます。
- j. チューブから磁石を離し、20 μ L の DNA Purification **Elution** Buffer を加えます。
- k. フタを閉じて Vortex します。
- l. サンプルを 5 分間室温に静置します。
- m. 磁石を当ててビーズを集めます。
- n. DNA を含む溶液が透明になったら上清を新しいチューブに移します。

44. ライブラリー調製は以上で完了です。このサンプルは、定量にもシーケンシングにも使用可能です。

Index Primers および Sample Sheet の情報

Index 1 (i7) Primers CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[i7]GTCTCGTGGGCTCGG

Index 2 (i5) Primers AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[i5]TCGTCGGCAGCGTC

i7 Index	i7 Sequence	Sample Sheet
N701	TCGCCTTA	TAAGGCGA
N702	CTAGTACG	CGTACTAG
N703	TTCTGCCT	AGGCAGAA
N704	GCTCAGGA	TCCTGAGC

i5 Index	i5 Sequence	Sample Sheet (NovaSeq v1.0 Reagent Kits, MiSeq, HiSeq 2000/2500)
N501	TAGATCGC	TAGATCGC
N502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
N503	TATCCTCT	TATCCTCT
N504	AGAGTAGA	AGAGTAGA

i5 Index	i5 Sequence	Sample Sheet (NovaSeq v1.5 Reagent Kits, iSeq, MiniSeq, NextSeq, HiSeq 3000/4000)
N501	TAGATCGC	GCGATCTA
N502	CTCTCTAT	ATAGAGAG
N503	TATCCTCT	AGAGGATA
N504	AGAGTAGA	TCTACTCT

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

NOTE: 2 Million to 10 Million sequencing reads are recommended. 10 Million reads typically yield 20,000 peaks in our quality control testing.

References

1. Kaya-Okur, H.S. et al. (2019) Nature comm. 10:1930 (1).

トラブルシューティングガイド

問題	対処法
ライブラリーが見えない	CUT&Tagのライブラリー、特に転写因子では珍しいことではありません。ほとんど目に見えないライブラリーでも、問題なくシーケンスできることが示されています。ライブラリーの量を調べるためのqPCR (例: KAPA Library Quantification) 解析は、どのくらいライブラリーが存在するか測定するのに役立ちます。もし、ポジティブコントロール (例: H3K27me3) が有効であればシーケンスをする価値があります。ポジティブコントロールが有効でない場合は、実験過程で細胞が失われた可能性があります。