

< 購入試薬リスト >

- Paraformaldehyde 16% (PFA) Nacalai #11850-14
- Blocking One-P Nacalai #05999-84
- T4 DNA ligase buffer NEB cat# B0202S
- T4 DNA ligase (400U/ul) NEB cat# M0202
- T4 DNA polymerase (3U/ul) NEB cat# M0203
- 100mM ATP TaKaRa cat# 4041
- 100mM GTP TaKaRa cat# 4042
- 100mM CTP TaKaRa cat# 4043
- 100mM UTP TaKaRa cat# 4044
- RNase Inhibitor (40U/μL) TaKaRa cat# 2313A
- T7 RNA Polymerase (200U) TOYOBO cat# TRL-201
- SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing (Takara/Clontech # 634888, 634889, 634890 or 634891)
- Agencourt AMPure XP beads BECKMAN #A63881
- Agencourt RNAClean XP beads BECKMAN #A63987
- **PCR indexing UDI Primer (Ad1/Ad2)**
IDT for Illumina - DNA/RNA UD Indexes Set A (#20027213)
IDT for Illumina - DNA/RNA UD Indexes Set B (#20027214)
- **Read2 Primer**
5'- GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNNNNNNN -3'
* N = ランダム配列。合成依頼シートには"N"のままの記載にすること。
- **MEDS-B**
5' - GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG - 3'
5' Ph - CTGTCTCTTATACACATCT - 3' *Ph: リン酸基
- **Tn5 (精製の場合)**
実験医学別冊 自分でできる！最先端クロマチン構造解析プロトコール 第1章-4 mini Protocolを参照

Picelli, S. et al. Tn5 transposase and tagmentation procedures for massively scaled sequencing projects. *Genome Res.* 24, 2033-2040 (2014).
- **Tn5 (購入の場合)**
Tagmentase (Tn5 transposase) - unloaded Diagenode, #C01070010-500
diagenode Tn5を使用の際は0.5uL/sample使用する

< 実験室試薬リスト >

- PBS
- 0.2% SDS

< buffer類 >

- **2x Tn5 dialysis buffer**

HEPES-KOH (pH7.2)	100 mM
NaCl	200 mM
EDTA	0.2 mM
Glycerol	20%
TritonX-100	0.20%
DTT	2 mM
- **MEDS-B**
5' - GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG - 3'
5' Ph - CTGTCTCTTATACACATCT - 3'
1x annealing bufferで等モル(100uM)をアニーリングし、10uMに希釈して使用。

10x annealing buffer	
NaCl	1 M
Tris-HCl (pH7.4)	100 mM
EDTA	10 mM

annealing cycles	
95°C	5分
ramp down	0.1°C / 秒
20°C	-

-30°Cにて保管
- **5x TAPS-DMF**

TAPS-NaOH (pH8.5)	50mM
MgCl ₂	25mM
DMF (N,N-dimethylformamide)	50%
- **PCR indexing UDI Primer (Ad1/Ad2)**
IDT for Illumina - DNA/RNA UD Indexes Set A (#20027213)
IDT for Illumina - DNA/RNA UD Indexes Set B (#20027214)
- **Read2 Primer**
5'- GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNNNNNNN -3'
N = ランダム配列。合成依頼シートには"N"のままの記載にすること。

< 細胞の準備 >

任意の細胞(<10,000)を96well ibidi plate(ibidi # ib89626)で培養する。(初回は1000細胞程度を推奨)

- 各サンプルの各抗体の動物種毎に、1次抗体なし(ChIL probeのみ)のコントロールサンプルを置くことを推奨する。
- 抗体サンプルはn=2以上のreplicateを用意することが望ましい。
- 一次抗体の濃度は、通常の蛍光色素で染色する際と同様の希釈濃度を使用して問題ない。

< 免疫染色 >

- 培地を除き、100 μ Lの1% paraformaldehyde/DMEM を加え、室温で5分静置する。
- PFA溶液を除き、PBS 200 μ Lで洗う。
- PBSを除き、150 μ Lの1% Triton/PBS溶液を加え、室温で20分ゆっくり振とうする。
- Triton溶液を除き、PBS 200 μ Lで洗う。
- PBSを除き、100 μ LのBlocking One-P(Nacalai #05999-84)を加え、室温で20分ゆっくり振とうする。
- Blocking One-Pを除き、PBS 200 μ Lで洗う。
- PBSを除き、0.1 \times Blocking One-P in PBSで希釈した一次抗体を100 μ L加え、室温で6時間ゆっくりと振とうする。
- 一次抗体溶液を除き、PBSを200 μ L加え、室温で5分ゆっくりと振とうする。(これを合計3回繰り返す。)
- 3回目のPBSを除き、0.1 \times Blocking One-P in 0.5M NaCl / PBS で希釈したChIL probe (1 μ g/mL)を100 μ L加える。(氷上作業)
- 蒸発を防ぐために蓋・シールし、蛍光観察を行う場合はアルミホイルにて遮光も行い、4°Cで一晩ゆっくりと振とうする。
- ChIL probe溶液を除き、予め氷冷しておいたPBSを200 μ L加え、4°Cで20分ゆっくりと振とうする。(これを合計3回繰り返す。)
- PBSを200 μ L加え、蛍光顕微鏡でChIL probeの染色像を観察する。

< ChIL反応 >

- PBSを除き、50 μ LのTn5 溶液(Tn5 90 ng/well in 1x Tn5 dialysis buffer)を加え、室温で10分ゆっくり振とうする。
- Tn5溶液を残したまま、50 μ LのMEDS-B* (10 μ M, 0.1 μ L/well) in 1x Tn5 dialysis buffer を入れ、室温で1時間ゆっくり振とうする。
- Tn5-MEDS-B溶液を除き、PBSを100 μ L加え、室温で5分ゆっくりと振とうする。(これを合計3回繰り返す。)
- 3回目のPBSを除き、100 μ Lの1x Tn5 dialysis bufferを加えbuffer置換を行う。
- 1x Tn5 dialysis bufferを除き、100 μ Lの1x TAPS-DMF buffer*を加え、37°Cで1時間ゆっくりと振とうする。
- 1x TAPS-DMF bufferを除き、0.2% SDSを100 μ L加え、室温で10分間静置する。
- これ以降は細胞が剥がれやすくなるのでゆっくりと溶液の出し入れをする。
- SDS溶液を除き、100 μ LのPBSで合計3回洗う。
- PBSを除き、100 μ Lの、1x T4 DNA ligase buffer を100 μ L加えてbuffer置換を行う。
- 以下のfill-in溶液を調整し、1x T4 DNA ligase bufferを除いたwellへ加えて室温で30分ゆっくりと振とうする。

Nuclease-free water	43.5 μ L	
10x T4 DNA Ligase buffer	5 μ L	NEB cat# B0202S
dNTP mix (2.5 mM each)	0.5 μ L	
T4 DNA ligase (400U/ul)	0.5 μ L	NEB cat# M0202
T4 DNA polymerase (3U/ul)	0.5 μ L	NEB cat# M0203
Total	50 μ L (well)	

- fill-in溶液を除き、0.2% SDSを100 μ L加え、室温で10分間静置する。
- SDS溶液を除き、100 μ LのPBSで合計3回洗う。
- PBSを除き、100 μ Lの、1x T7 RNA Polymerase buffer を100 μ L加えてbuffer置換を行う。
- 以下のin situ transcription反応液を調整し、1x T7 RNA Polymerase bufferを除いたwellへ加える。

Nuclease-free water	80 μ L	
10 \times T7 RNA polymerase buffer	10 μ L	
100mM ATP	2 μ L	TaKaRa cat# 4041
100mM GTP	2 μ L	TaKaRa cat# 4042
100mM CTP	2 μ L	TaKaRa cat# 4043
100mM UTP	2 μ L	TaKaRa cat# 4044
RNase Inhibitor (40U/ μ L)	1 μ L	TaKaRa cat# 2313A
T7 RNA Polymerase (200U)	1 μ L	TOYOBO cat# TRL-201
Total	100 μ L (well)	

- 蒸発を防ぐために蓋・シールし、37°Cで一晩ゆっくりと振とうする。
- Recombinant DNaseI(TaKaRa cat# 2270A) を0.5 μ L加え、37°Cで30分ゆっくりと振とうする。
- ChIL RNA溶液を \times 1.8 volume のAgencourt RNAClean XP beads (BECKMAN #A63987)で精製し、10 μ LのNuclease-free waterで溶出する。(beadsは除く)

< library作製 >

- 1 逆転写用primer溶液を調整する。酵素反応のセットアップは全て氷上で行う。
SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing (Takara/Clontech # 634888, 634889, 634890 or 634891)

10x Lysis buffer (SMART-seq v4 kit)	4.75 μ L
Read2 primer (12 μ M)*	5 μ L
RNase Inhibitor	0.25 μ L
10 サンプル分	10 μ L

- 2 ChIL RNAに逆転写用prime溶液を加えて懸濁する。(0.2ml PCR tube)

ChIL RNA	5.25 μ L
primer溶液	1 μ L
Total	6.25 μ L (sample)

- 3 サーマルサイクラーにて72°C 3分加熱後、すぐに氷上へ戻す。
4 以下の逆転写反応溶液を製し、各サンプルへ加えて混ぜる。

5x Ultra Low First-Strand Buffer	2 μ L
SMART-Seq v4 Oligonucleotide	0.5 μ L
RNase Inhibitor	0.25 μ L
SMARTscribe Reverse Transcriptase	1 μ L
Total	3.75 μ L (sample)

- 5 サーマルサイクラーにて反応を行う。

42°C	1 時間半
70°C	10分
4°C	-

- 6 PCR反応溶液を調整する。

2x SeqAmp PCR Buffer	12.5 μ L	TaKaRa #638504
Ad1 primer (10 μ M)*	0.5 μ L	
SeqAmp DNA Polymerase	0.5 μ L	
Nuclease-free water	1 μ L	
Total	14.5 μ L (sample)	

- 7 PCR反応溶液とcDNA、Ad2 index primerを加え、懸濁する。

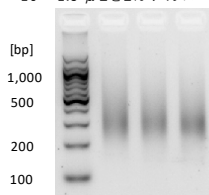
ChIL cDNA	10 μ L
Ad2 primer (10 μ M)*	0.5 μ L
PCR反応溶液	14.5 μ L
Total	25 μ L (sample)

- 8 サーマルサイクラーにてPCR反応を行う。

95°C	1分	
98°C	10秒	
65°C	30秒	12-17サイクル
68°C	3分	
72°C	10分	
4°C	-	

- 9 等量の AMPure XP beads での精製を 2 回行い、15 μ L 程度の 10mM Tris もしくは Nuclease-free water に懸濁し、beads は除く。
(BECKMAN #A63881)

- 10 1.5 μ L を 2% アガロースゲルで電気泳動し、ライブラリーを確認する。



- 11 250bp~500bpをピークとするスメア像が得られれば、ライブラリーを定量しシーケンスに持ち込む。
12 2000万リード(20Million read) / sample 程度読む。