蝴蝶 ATAC-seq 文库构建

Construction of ATAC-seq Library for Butterfly

万雯婷^{1,2}, 常洲¹, 董志巍¹, 王文^{1,2}, 李学燕^{1,*}

¹遗传资源与进化国家重点实验室, 中国科学院昆明动物研究所, 昆明; ²西北工业大学, 西安

*通讯作者邮箱: lixxy@mail.kiz.ac.cn

引用格式: 万雯婷, 常洲, 董志巍, 王文, 李学燕. (2021). 蝴蝶 ATAC-seq 文库构建. *Bio-101* e1010647.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010647.

How to cite: Wan, W.T., Chang, Z., Dong, Z.W., Wang, W. and Li, X.Y. (2021). Construction of ATAC-seq library for butterfly. *Bio-101* e1010647. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010647. (in Chinese)

摘要: ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high throughput sequencing) 是 2013 年由斯坦福大学 William J. Greenleaf 实验室开发的测定开放染色质区域的实验技术。本课题以蝴蝶为研究对象, 使用 ATAC-seq 方法获得了蝴蝶特定发育时期的开放染色质区域信息。实验流程如下: 样本进行核质分离后, 将细胞核单独收集在一起, 利用超活性 Tn5 转座酶随机插入并切割核内暴露的染色质 DNA, 同时连接上特异的测序 adaptors, 连接上 adaptors 的 DNA 片段被分离出来用于高通量测序和分析, 从而获得全基因组开放染色质区域的信息, 并通过分析开放染色质区域的 motif, 可以获得潜在的活跃转录因子及其靶基因。

关键词: ATAC-seq, 开放染色质, Tn5 转座酶, 高通量测序, 蝴蝶

研究背景: 真核细胞通过将基因组 DNA 与组蛋白折叠形成核小体, 核小体再进行不同层次的折叠组装成染色质, 这些精密的组装信息在基因转录调控中起决定性作用。染色质区域的开放性是特异性反式作用因子和顺式调控元件相互作用的前提, 基因表达的异常或染色质调控因子的改变都将对细胞的命运产生深远的影响 (Schwartzentruber *et al.*, 2012; Tsompana and Buck, 2014)。美国 William J. Greenleaf 开发的 ATAC-seq 技术 (Buenrostro *et al.*, 2015) 是鉴定转录调控序列有效方法。该技术所需的生物样本量小 (只需大约 50,000 个细胞)、建库流程简单 (约 4 h)、重复性高、灵敏度高、并能

一次性获得全基因组开放染色质的信息等优点，因此，该技术在昆虫研究中的应用也越来越广泛；例如，帝王蝶大脑调节昼夜转录节律的基因调控模式 (Lugena *et al.*, 2019)、鹿眼蛱蝶翅膀变态发育过程中染色质动态变化 (van der Burg *et al.*, 2019)、蚊子的染色质结构和功能 (Lezcano *et al.*, 2020)、果蝇神经元活性调控基因的鉴定 (Chen *et al.*, 2016) 等。

本研究参考 William J. Greenleaf 等 (Buenrostro *et al.*, 2013; Buenrostro *et al.*, 2015; Lewis and Reed, 2019) 的方法对非模式动物蝴蝶幼虫进行了 ATAC-seq 文库的构建。

材料与试剂

1. 移液吸头
2. 离心管
3. 一次性培养皿
4. Corning cell strainer 40 μ m Nylon (BD, catalog number: 352340)
5. 无水乙醇 (Merck, catalog number: 459844-2.5 L)
6. TE buffer (pH 8.0) (Solarbio, catalog number: T1120)
7. Nuclease-Free water (NEB, catalog number: B1500S)
8. DEPC H₂O (Invitrogen, catalog number: AM9915G)
9. 1×Phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.2) (Cell Signaling, catalog number: 9872L)
10. 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco, catalog number: 25200056)
11. Calf serum (ExCell, catalog number: NCD100)
12. TruePrep™ DNA Library Prep Kit V2 for Illumina (Vazyme, catalog number: TD501-01/502-01/503-01)
13. MinElute PCR purification kit (Qiagen, catalog number: 28004)
14. Agencourt AMPure XP Beads (Beckman Coulter, catalog number: A63881)
15. Qubit dsDNA HS Assay kit (Invitrogen, catalog number: Q32851)
16. Agilent High Sensitivity DNA kit (Agilent, catalog number: 5067-4626)
17. Lysis 缓冲液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 (Merck, catalog number: T2694), 10 mM NaCl (Diamond, catalog number: A100241-0500), 0.2% IGEPAL CA-630 (Merck, catalog number: I8896))

仪器设备

1. 解剖刀
2. 解剖剪
3. 镊子
4. 血球计数板
5. DynaMag™-2 磁力架 (Invitrogen, catalog number: 12321D)
6. 恒温水浴摇床 (GFL 1092, Germany)
7. 冷冻离心机 (Eppendorf, catalog number: 5810 R)
8. 体视显微镜 (Nikon, catalog number: SMZ745)
9. ProFlex PCR System (Thermofisher, catalog number: 4484075)
10. Qubit™ 4 荧光计 (Invitrogen, catalog number: Q33238)
11. Agilent 2100 Bioanalyzer System (Agilent, catalog number: G2939BA)

实验步骤

1. 获取细胞核

- 1) 以蝴蝶样品为例, 取适龄幼虫一只, 剔除肠道内的内容物, 用解剖剪剪成 1 mm² 的小块; 然后, 用 1×PBS 缓冲液洗涤三次 (洗去组织表面的杂质), 加入 0.25% Trypsin-EDTA (没过组织) 置于 37 °C 恒温水浴摇床中消化 1 h; 消化后的组织使用 40 μm Nylon 过滤收集滤液, 并加入一滴 Calf serum 抑制 Trypsin 的作用; 收集的消化液 4 °C 300× g 离心 5-10 min, 弃上清, 获得的细胞颗粒使用 1×PBS 缓冲液洗涤两次, 并离心收集干净的细胞颗粒; 使用 1×PBS 缓冲液悬浮细胞, 计数 25,000-75,000 个细胞进行接下来的实验 (使用太少或太多的细胞会导致消化过度或消化不足, 从而降低文库的质量)。
- 2) 将步骤 1) 中的细胞悬液 4 °C 500× g 离心 5-10 min (视沉淀情况而定) 收集细胞颗粒, 弃去上清。
- 3) 用预冷的 1×PBS 缓冲液洗涤细胞颗粒, 4 °C 500× g 离心 5-10 min 收集细胞颗粒, 弃去上清。
- 4) 加入 50 μl 预冷的 Lysis 缓冲液 (使细胞在去离子洗涤剂中裂解), 用移液器轻

轻地吹打细胞，重悬细胞。

- 5) 冰上静置 10 min, 4 °C 500× *g* 离心 5-10 min 收集细胞颗粒，弃去上清，立刻进行转座反应。

2. 转座反应

使用 TruePrep™ DNA Library Prep Kit V2 for Illumina 试剂盒配置转座反应混合液(如下表), 使用转座反应混合液重新悬浮细胞颗粒, 37 °C 水浴 30 min, 进行转座反应。

试剂	1 个反应
TTBL	5 µl
TTE mix	2.5 µl
DEPC H2O	17.5 µl
共计	25 µl

3. 纯化转座产物

使用 Qiagen MinElute PCR purification kit 对步骤 2 中的转座产物进行纯化。

- 1) 25 µl 转座产物转移到 1.5 ml Nuclease-Free 离心管中。
- 2) 加入 125 µl PB Buffer, 混匀。
- 3) 把混合的样品加入柱子中, 室温 13,000 rpm 离心 60 s, 弃去废液, 柱子放回离心管中。
- 4) 加入 PE Buffer, 室温 13,000 rpm 离心 60 s, 弃去废液, 柱子放回离心管中。
- 5) 室温 13,000 rpm 离心 60 s, 把柱子放入新的 1.5 ml Nuclease-Free 离心管中, 晾干 2 min。
- 6) 加入 20 µl Nuclease-Free water, 室温 13,000 rpm 离心 60 s, 收集纯化产物。
- 7) 使用 Qubit dsDNA HS Assay kit 对纯化产物进行浓度检测, 此纯化产物可于-20 °C 保存待用。

4. PCR 扩增

PCR 扩增纯化后的转座产物, 在 PCR 离心管中混合扩增体系。

- 1) 配制 PCR 反应液:

试剂	1 个反应
Transposed DNA	14.5 µl

5xTAB Buffer	5 μ l
N5 $\times\times$	2.5 μ l
N7 $\times\times$	2.5 μ l
TAE Buffer	0.5 μ l
共计	25 μ l

2) PCR 扩增程序:

步骤	温度	时间
1	105 °C	热盖
2	72 °C	3 min
3	98 °C	30 s
4	98 °C	15 s
5	60 °C	30 s
6	72 °C	3 min
7	Go to 4 N times	6-14 cycles
8	72 °C	5 min
9	4 °C	∞

注: 为了减少 GC 和 PCR 反应中片段长度偏好性, 合适的 PCR 反应的循环数需要通过 qPCR 来确定, 在饱和之前停止扩增反应。

5. PCR 产物纯化

PCR 产物使用预先在室温平衡 30 min 的 Agencourt AMPure XP Beads 进行纯化。

- 1) 吸取 15 μ l AMPure XP Beads 至 PCR 产物中, 混匀, 室温孵育 5 min。
- 2) 置于磁力架上静置 5 min, 转移上清液至新的离心管中, 弃去磁珠。
- 3) 吸取 3.75 μ l AMPure XP Beads 至步骤 2) 的上清液中, 混匀, 室温孵育 5 min。
- 4) 置于磁力架上静置 5 min, 澄清后弃去上清液。
- 5) 加入新鲜配制的 75%乙醇, 静置 30 s 澄清后, 弃去上清液。
- 6) 重复步骤 5) 一次。
- 7) 加入 20 μ l TE buffer, 混匀, 室温孵育 5 min。
- 8) 置于磁力架上静置 5 min, 收集上清液, 即为 ATAC-seq 文库, 可于 -20 °C 保持待用。

6. ATAC-seq 文库质控

- 1) 使用 Qubit dsDNA HS Assay kit 对文库的浓度进行初步定量。
- 2) 使用 Agilent High Sensitivity DNA kit 检测文库 DNA 片段的完整性及插入片段的大小。
- 3) qPCR 法对文库的有效浓度进行精确定量。

7. ATAC-seq 文库测序

所获得的 ATAC-seq 文库使用 Illumina HiSeqXten (PE150) 平台进行上机测序，测序深度根据项目的设计进行确定。我们在蝴蝶的研究中一般每个样品获取 10-12 Gb 的数据量。

致谢

感谢国家自然科学基金委员会创新研究群体 (31621062)、国家自然科学基金委员会面上项目 (32070482)、中国科学院西部之光项目 (A 类) 对中国科学院昆明动物研究所遗传资源与进化国家重点实验室的支持。

参考文献

1. Buenrostro, J. D., Giresi, P. G., Zaba, L. C., Chang, H. Y. and Greenleaf, W. J. (2013). [Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position](#). *Nat methods* 10 (12): 1213-1218.
2. Buenrostro, J. D., Wu, B., Chang, H. Y. and Greenleaf, W. J. (2015). [ATAC-seq: a method for assaying chromatin accessibility genome-wide](#). *Curr Protoc Mol Biol* 109: 21-29.
3. Chen, X., Rahman, R., Guo, F. and Rosbash, M. (2016). [Genome-wide identification of neuronal activity-regulated genes in *Drosophila*](#). *Elife* 5: e19942.
4. Lewis, J. J. and Reed, R. D. (2019). [Genome-wide regulatory adaptation shapes population-level genomic landscapes in *Heliconius*](#). *Mol Biol Evol* 36: 159-173.
5. Lezcano, O. M., Sanchez-Polo, M., Ruiz, J. L. and Gomez-Diaz, E. (2020). [Chromatin structure and function in Mosquitoes](#). *Front Genet* 11: 602949.

6. Luga, A. B., Zhang, Y., Menet, J. S. and Merlin, C. (2019). [Genome-wide discovery of the daily transcriptome, DNA regulatory elements and transcription factor occupancy in the monarch butterfly brain](#). *PLoS Genet* 15 (7): e1008265.
7. Schwartzenuber, J., Korshunov, A., Liu, X. Y., Jones, D. T., Pfaff, E., Jacob, K., Sturm, D., *et al.* (2012). [Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma](#). *Nature* 482 (7384): 226-231.
8. Tsompana, M. and Buck, M. J. (2014). [Chromatin accessibility: a window into the genome](#). *Epigenetics Chromatin* 7(1): 33.
9. van der Burg, K. R. L., Lewis, J. J., Martin, A., Nijhout, H. F., Danko, C. G. and Reed, R. D. (2019). [Contrasting roles of transcription factors spineless and EcR in the highly dynamic chromatin landscape of butterfly wing metamorphosis](#). *Cell Rep* 27: 1027-1038.