

高效ATAC-seq 建库试剂盒

AT4110-11/12/13 使用说明书 3.0 版

产品简介

高效 ATAC-seq 建库试剂盒是利用转座酶研究染色质可及性/开放区域的高通量测序试剂盒,适用于 Illumina 高通量测序平台。其原理是利用转座酶可切割染色质开放区域的性质,对切割标记后的染色质开放区域的 DNA 进行富集后测序,全称为 Assay for Transposase Accessible Chromatin with high-throughput sequencing。与传统的表观遗传研究技术相比,该方法具有效率高,细胞投入量兼容范围广、周期短等优势。试剂盒操作简单,极大的避免了繁杂操作带来的误差,构建的文库均一性高、重复性好。

试剂盒组成

产品成分	AT4110-11 (6 次)	AT4110-12 (24 次)	AT4110-13 (96 次)	保存条件
TW Buffer	700μL	3mL	12mL	-20°C
RS Buffer	300μL	1.2mL	4.7mL	-20°C
N4 Buffer	3μL	12μL	48μL	-20°C
T2 Buffer	6μL	24μL	96μL	-20°C
DG Buffer	6μL	24μL	96μL	-20°C
5x Tagment Buffer	60μL	240μL	960μL	-20°C
TnZ V3	15μL	60μL	240μL	-20°C
Stop Solution	120μL	480μL	2mL	-20°C
Tn5-Universal Primer	30μL	120μL	480μL	-20°C
2x Amplification Mix for Tn5	180μL	720μL	2.9mL	-20°C

注意事项

1. 试验前请仔细阅读本说明书,注意每个组分的保存温度,确保实验顺利完成。
2. 操作过程请注意避免核酸样品和产物之间的交叉污染。
3. 请使用不含 RNA 酶或 DNA 酶的枪头、EP 管进行实验。
4. 细胞(核)悬液浓度需精准测定,测定不准确,会影响文库得率。
5. 实验所用磁珠应提前 30 分钟自 4°C 环境中取出,平衡至室温。所有磁珠操作均需置于室温。
6. Stop Solution 在使用前,请确保其平衡室温,如有沉淀析出,请放置 37°C 加热混匀,使沉淀溶解。
7. 80%乙醇需现配现用,用其清洗磁珠后,需清除干净,避免对后续反应产生影响。
8. DG Buffer 最好保存在-80°C 冰箱,分装备用,避免多次冻融。

需自备试剂和耗材

无水乙醇; Nuclease-free H₂O; ATPure Plus beads (DNA 片段分选纯化磁珠) 或效果相同的纯化磁珠
 200 μL PCR 管; 1.5mL 离心管; 磁力架;

实验原理图

操作步骤

一. 细胞悬液质控

若样本为细胞悬液，直接进行镜检：吸取 10 μ L 细胞悬液，1:1 加入 0.4% 台盼蓝溶液，吹匀后在血细胞计数板上观察细胞活率并计数。

*若样本为液氮速冻组织，可进行细胞核提取，评估提取结果后直接进行细胞洗涤和裂解步骤。细胞核提取方案需客户自行摸索。

镜检结果及处理：台盼蓝染色评估细胞活率需达到 80% 且离散均匀，合格可进行下一步实验；若低于 80% 可用 Ficoll 或碘克沙醇去除死细胞和碎片后重新镜检。

细胞投入量要求：由于细胞实验受样本类型和物种影响较大，本试剂盒建库标准投入量要求是 50000-100000 细胞，可在此基础上摸索具体细胞量与循环数的范围。经过实验室验证的细胞投入量，以 HEK293 细胞系为例可兼容范围为 100-100000 个，循环数为 11-22。

二. 细胞洗涤和裂解

1. 洗涤细胞：取所需数量的细胞于无核酶 1.5mL EP 管中，500g 4 $^{\circ}$ C 离心 5min；
2. 小心彻底移除上清，加入 50 μ L 预冷的 TW Buffer 重悬细胞，500g 4 $^{\circ}$ C 离心 5min，小心移除上清；
3. 重复步骤 2，共洗涤 2 遍。注意需防止样本损失，离心时放置于离心机的方向需固定，在沉淀的对面轻轻吸取液体；

RS Buffer	48.5 μL
N4 Buffer	0.5 μL
T2 Buffer	0.5 μL
DG Buffer	0.5 μL
Total Volume	50 μL

- 小心去除洗涤离心后样本管中的上清液，加入预冷的 50 μL 细胞裂解液 Lysis Buffer，用移液器轻柔吹打混匀后冰上孵育 5min；
- 裂解后，500g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10min，小心移除上清。此时沉淀下来的细胞核较难观察，为防止样本损失，可在管中留不超过 5 μL 的液体。

三. 片段化反应

- 裂解产物离心过程中可进行打断 Mix 的制备，制备后冰上放置：

Tagmentation Mix	Volume (μL)
5x Tagment Buffer	10 μL
TW Buffer	16.5 μL
T2 Buffer	0.5 μL
DG Buffer	0.5 μL
TnZ V3	2.5 μL
Nuclease-free H_2O	20 μL
Total Volume	50 μL

移液器吹打混匀片段化 Mix 并重悬细胞，放置于水浴锅上，37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 45min。

- 终止反应：确认 Stop Solution 是否置于室温，若有沉淀需 37 $^{\circ}\text{C}$ 加热至沉淀溶解混匀后使用。在 50 μL 片段化产物中加入 20 μL Stop Solution，吹打混匀，室温放置 5min。
- 用磁珠纯化片段化产物，步骤如下：
 - 将室温放置的 30min 后的 ATPure Plus beads 涡旋震荡混匀，并吸取 128 μL 至 70 μL 片段化产物中，移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，室温孵育 5min；
 - 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架上，放置 5min，待溶液澄清，移除上清；
 - 保持 PCR 管始终处于磁力架中，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30s 后移除上清；

分混匀；

- 7) 将反应管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体。待溶液澄清吸取 20 μL 上清至新的 PCR 管中进行后续实验。

四. PCR 扩增

在新的 PCR 管中配制如下反应：

Reaction Mix	Volume (μL)
上一步纯化产物	20 μL
Tn5-Universal Primer	5 μL
Tn5-Primer8 Index N*	5 μL
2x Amplification Mix for Tn5	30 μL
总体积	60 μL

*Tn5-DNAseq Library Index kit 提供多种 index，可根据样本数量选购。

充分混匀后在 PCR 仪中，进行如下反应：

温度	时间	循环数
72°C	3min	1 Cycle
95°C	3min	1 Cycle
98°C	10s	} 10-21 Cycles
60°C	5s	
72°C	1min	1 Cycle
4°C	∞	-

*细胞数为 10000-100000 区间内可使用 13-15 循环数，其他细胞数应进行预实验测试后根据实际情况进行选择。

反应结束后取出，进行片段筛选。

五. 文库片段大小筛选：

文库片段大小筛选采用两轮磁珠捕获操作，本方案实验结果的文库目的片段大小约为 190~650bp。

- 1) 使用 Nuclease-free H_2O 将 PCR 产物补足至 60 μL ；

注意：因 PCR 反应中会使反应体系发生变化，此步骤非常重要，体积不准确会导致筛选后的片段长度范围有偏差。

- 2) 将室温放置 30min 后的 ATPure Plus beads 涡旋震荡混匀，吸取 33 μL (0.55x) 加入到 60 μL PCR 产物，移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，室温放置 5min；
- 3) 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，室温放置 5min，待溶液澄清转移上清 88 μL 至新的 PCR 管中，丢弃磁珠；

上清；

- 7) 重复步骤 6，总计漂洗两次；
- 8) 保持 PCR 管始终处于磁力架上，开盖空气干燥磁珠 5min，直至磁珠表面无液体；将 PCR 管从磁力架中取出，加入 16μL Nuclease-free H₂O 洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温孵育 5min；
- 9) 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清，吸取 15μL 上清至新的 PCR 管中，-20℃ 长期保存。

六、文库质检

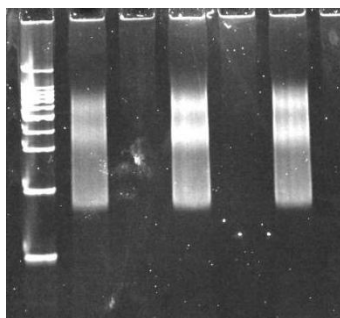
1. 文库的浓度测定

推荐使用 Realtime PCR 对文库进行绝对定量，也可使用特异性识别 DNA 双链的荧光染料法对文库进行定量，如 Qubit。

2. 文库片段长度分布检测

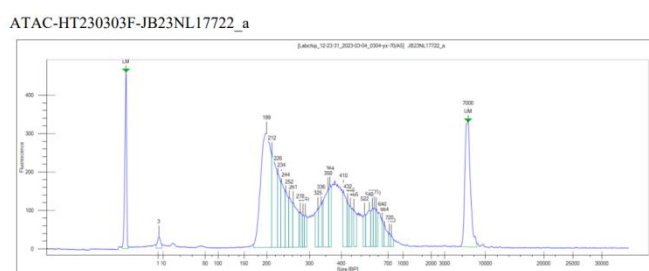
推荐使用 Agilent 2100 BioAnalyzer、Qsep100 对文库进行检测，也可使用凝胶电泳检测。

正确的文库分布应如下图所示：



Sample: 40000 个 HEK293T 细胞构建 ATAC 文库，PCR 循环数 15

电泳条件：6% PAGE Gel, 200V, 25min



七、文库结构

5'-AATGATACGGCGACCAACGAGATCTACACTCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-nnnnnn
n-CTGTCTCTTATACATCTCCGAGCCACGAGACXXXXXXXXATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

注：nnnnnnn 为插入序列

XXXXXXXX 为 index 序列