



ATAC-Seq 建库试剂盒

(For Illumina®)

目录号: ATS-01

Assay for Transposase-Accessible Chromatin (ATAC) 是一种检测开放染色质区域的技术。结合二代测序, ATAC-seq 可以在全基因组范围内检测染色质的开放程度。本试剂盒利用磁珠结合细胞, 无需离心步骤, 减少漂洗过程导致的细胞丢失。本试剂盒包含高活性 Tn5 转座酶, 可以在 37°C 下 30 分钟完成片段化反应。

本试剂盒组成

组分 A, -20°C 储存

名称	体积
10×ConA buffer	400 μL
2×HG Library Mix	1 mL
2×qPCR Mix	1 mL
Tn5 (+ME)	30 μL
5% digitonin (100×)	50 μL
Protease Inhibitor Cocktail (100×)	100 μL
BSA	50 μL
Stop buffer (10×)	100 μL
2×TD buffer	400 μL
TE buffer	800 μL
10×Wash buffer (Na ⁺)	1 mL

组分 B: 引物组合, -20°C 储存

名称	体积	Index 序列 (Nova V1.0)
N507 Primer	30 μL	AAGGAGTA
N508 Primer	30 μL	CTAAGCCT
N509 Primer	30 μL	TGGAAATC
N510 Primer	30 μL	AACATGAT

N511 Primer	30 μL	TGATGAAA
N512 Primer	30 μL	GTCGGACT
N707 Primer	30 μL	CTCTCTAC
N708 Primer	30 μL	CAGAGAGG
N709 Primer	30 μL	GCTACGCT
N710 Primer	30 μL	CGAGGCTG
N711 Primer	30 μL	AAGAGGCA
N712 Primer	30 μL	GTAGAGGA

组分 C, 4°C 储存

ConA beads	65 μL
DNA 纯化磁珠	1.8 mL×2

操作说明

1. 缓冲液制备

按照下表顺序和配制后续实验需要的溶液。下表中是 1 个样品的溶液用量, 如果有多个样品, 相应溶液体积需要乘以样品数量。

名称	体积	配制方法
1×ConA 缓冲液	200 μL	取 20 μL ConA buffer (10×) 与 180 μL 超纯水混合
1×细胞悬浮缓冲液	300 μL	取 30 μL 10×Wash buffer 以及 3 μL Protease Inhibitor Cocktail 加入到 270 μL 超纯水中
1×Dig buffer	200 μL	180 μL 超纯水中加入: 20 μL 10×Wash buffer 2 μL Protease Inhibitor Cocktail 2 μL 5% Digitonin 2 μL BSA

2. ConA beads 活化

1) 取 5 μL ConA beads 加入到 1.5 mL EP 管底, 加入 100 μL 1× ConA 缓冲液到 EP 管中, 使用移液器小心吹吸重悬磁珠, 放置磁力架上静置 2-3 分钟, 吸去上清溶液;

2) 加入 100 μL 1 \times ConA 缓冲液到 EP 管中, 使用移液器小心吹吸重悬磁珠, 放置在 EP 管架待用 (不要放磁力架上)。

3. 细胞前处理

1) 培养细胞或者分散的组织细胞使用 PBS 洗三遍 (300-500 g 离心, 吸去上清液, 使用 PBS 重悬), 取约 10^4 - 10^5 个细胞每个样, 500g 离心 2 分钟, 吸去上清液;

2) 使用 1 \times 细胞悬浮缓冲液重悬 (每一个样品 100 μL), 500g 离心 2 分钟, 吸去上清液;

3) 重复上述步骤 1 次;

4) 使用 1 \times 细胞悬浮缓冲液重悬细胞 (每一个样品 100 μL), 放置在 EP 管架待用。

4. 细胞与 ConA beads 结合

1) 将含有 ConA beads 的 EP 管放置磁力架上静置 2-3 分钟, 吸去 95 μL 上清溶液 (不用完全吸干净);

2) 将步骤 3 中的 100 μL 细胞悬液与磁珠混合, 使用移液器小心吹吸使磁珠充分悬浮, 将 EP 管插入到水平混匀仪或者振荡金属浴, 室温结合 10 分钟。

5. 转座反应

1) 加入 100 μL 的 1 \times Dig buffer 重悬磁珠, 轻轻吹打混匀后, 室温水平旋转孵育 30min;

2) 配制转座体反应 mix: 25 μL 2 \times TD buffer, 23 μL 1 \times Dig buffer, 2 μL Tn5, 混匀。

2) 将上述磁珠置于磁力架上静置 2 min, 待磁珠与液体完全分离后, 吸去上清。将转座体反应 mix 加入到上述磁珠中, 轻轻吹打混匀后, 将磁珠转移到新的 1.5 mL EP 管, 37 $^{\circ}\text{C}$ 旋转孵育 30 min。

4) 将上述磁珠重悬分散均匀, 加入 5 μL Stop buffer (10 \times), 使用移液器混合。

6. DNA 提取

1) DNA 提取前, 将 DNA 纯化磁珠在室温放置 5-10 min, 使用前涡旋混匀。

2) 在上述样品中加入 121 μL 磁珠, 使用移液器充分混匀后室温结合 5 min; 将 EP 管转移至磁力架上静置 5 min, 使磁珠与液体分离, 小心吸去上清;

3) 加入 500 μL 新鲜配置的 80% 乙醇漂洗磁珠, 室温静置 1min 后, 小心吸去上清, 此过程仍保持反应管置于磁力架上;

4) 重复步骤 3) 两次;

5) 如果吸去上清后管壁残留液体太多, 可以短暂离心后将 EP 管转移至磁力架上, 小心吸去上清液体。然后将 EP 管放在 EP 管架上, 打开管盖, 室温晾干 (3-5 min), 使乙醇充分挥发。切记磁珠不可干燥过度 (环境不同, 晾干时间会有差异。判断标准: 磁珠表面光泽消失, 或磁珠颜色变化, 或管壁无明显的液体残留);

6) 每管加入 37 μL TE buffer, 将磁珠吹打混匀后

室温静置 2 min;

7) 将 EP 管置于磁力架上, 使磁珠与液体完全分离 (约 2-5 min, 这一步可以通过 10000-13000 g 离心 1 min 来替代), 小心吸取 35 μL 上清至新的无菌的 PCR 管中。样品可在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 储存或进行下一步 PCR 扩增。

7. DNA 文库预扩增

预扩增用来初步评估实验结果, 以及预估文库扩增的 PCR 循环数, 可以大大降低实验失败的风险;

预扩增 PCR 体系如下所示:

2 \times qMix	25 μL
(任选一条 i5 Primer 10 μM)	2.5 μL
(任选一条 i7 Primer 10 μM)	2.5 μL
纯化后的 DNA	2 μL
H ₂ O	18 μL

qPCR 程序如下:

1) 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;

2) 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;

3) 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec;

4) 63 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec.

程序 3-4 进行 40 次循环, 程序 4 收集 SYBR Green 通道荧光。典型预扩增结果如下图所示。

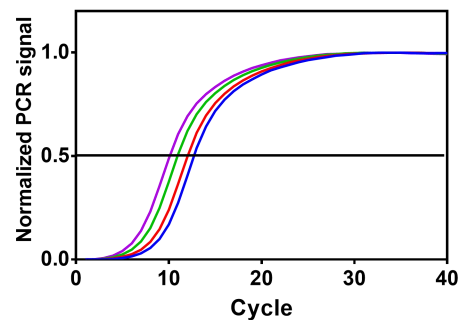


图. 典型的文库预扩增定量 PCR 曲线。正式扩增时一般选取荧光信号达到曲线平台大约一半时对应的循环数作为文库扩增 PCR 的循环数。

8. 文库扩增

50 μL PCR 体系如下所示:

i5 Primer 10 μM	2.5 μL
i7 Primer 10 μM	2.5 μL
纯化后的 DNA	8-16 μL
H ₂ O	Up to 50 μL



PCR 程序如下:

- 1) 72°C 5 min;
- 2) 95°C 3 min;
- 3) 95°C 30 sec;
- 4) 63°C 30 sec;
- 5) 72°C 5 min.

程序 3-4 进行 N 次循环; 循环数根据预扩增曲线确定。

9. 文库 PCR 产物纯化

1) DNA 纯化磁珠提前取出室温放置 5-10 min, 使用前涡旋混匀。每个片段化反应的样品加入 1.2 倍体积磁珠 (60 μ L), 使用移液器充分混匀后转移至新的 1.5 mL EP 管, 室温结合 5 min;

2) 将 EP 管转移至磁力架上静置 5 min, 使磁珠与液体分离, 小心吸去上清;

3) 加入 500 μ L 新鲜配置的 80% 乙醇漂洗磁珠, 室温静置 1min 后, 小心吸去上清, 此过程仍保持反应管置于磁力架上;

4) 重复步骤 3 两次;

5) 如果吸去上清后管壁残留液体太多, 可以短暂离心后将 EP 管转移至磁力架上, 小心吸去上清液体。然后将 EP 管放在 EP 管架上, 打开管盖, 室温晾干 (3-5 min), 使乙醇充分挥发。切记磁珠不可干燥过度 (环境不同, 晾干时间会有差异。判断标准: 磁珠表面光泽消失, 或磁珠颜色变化, 或管壁无明显的液体残留);

6) 每管加入 20 μ L TE buffer, 将磁珠吹打混匀后室温静置 2 min;

7) 将 EP 管置于磁力架上, 使磁珠与液体完全分离 (约 2-5 min, 这一步可以通过 10000-13000 g 离心 1 min 来替代), 小心吸取 18 μ L 上清至新的无菌的 PCR 管中。样品可在 -20°C 储存。制备好的文库可以通过 nanodrop 测浓度, 通常浓度大于 15 ng/ μ L。安捷伦 2100 检测文库片段分布一般在 200-1000 bp。

文库结构:

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-
Index(i5)-
TCGTCCGCGAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-
XXXXXXXXXX-
CTGTCTCTTATACATCTCCGAGCCCACGAGAC-
Index(i7)-ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3', 其中
XXXXXXXXXX 为插入序列

注意事项:

1) 细胞和磁珠结合后保持旋转混匀, 以免磁珠聚集导致反应不充分;

2) 细胞数量不要超过 2×10^5 , 细胞过多会导致磁珠更容易聚集沉淀。



微信公众号

网址: www.ruoyubio.com

邮箱: service@ruoyubio.com

湖南若鱼生物科技有限公司

Hunan Ruoyu Biotech Co., Ltd.