

ATAC-seq 实验方案

1. 适用范围

本方案适用细胞类型样本的 ATAC-seq 实验流程。若为特殊样本，须自行在此基础上调整。

2. 试剂耗材

2.1 试剂

试剂	
Tris-HCl(pH7.4)	MinElute PCR Purification Kit (Qiagen Cat#28004)
NaCl	AMPure XP Beads (Beckman Cat#A63880/A63881)
MgCl ₂	Qubit 试剂
Tween-20	无水乙醇
NP40 /Igepal CA-630	PBS 缓冲液
Digitonin	安捷伦 2100 DNA 检测试剂盒
ddH ₂ O	Tn5 转座 DNA 建库试剂盒(Cat#12207)
台盼蓝溶液	接头(Cat#12610)

2.2 仪器耗材

仪器耗材	
水浴锅	低吸附 EP 管
冷冻离心机	PCR 管
显微镜	针头式过滤器(0.22 μM)
血球计数板	2100 生物分析仪
盖玻片	DNA 纯化磁珠
Qubit 仪	磁力架
基因扩增仪	一次性无菌注射器

2.3 裂解液配方

表 1: Lysis Buffer 配方

成分	Lysis Buffer(2mL)
1.0 M Tris-HCl(pH7.4)	20μL
2.5 M NaCl	8μL
1.0 M MgCl ₂	6μL
10 % Tween-20	20μL
10 % NP40 /Igepal CA-630	20μL
5 % Digitonin	4μL
ddH ₂ O	1922μL

2.4 注意事项

- a. 所有试剂需放置在冰上预冷，Lysis Buffer 配制需要在冰上进行。
- b. Lysis Buffer 现用现配，配制完成后使用 0.22 μ M 针头式过滤器对 Lysis Buffer 过滤除菌。
- c. 细胞/细胞核重悬操作尽可能轻柔，防止细胞/细胞核破裂。

3. 实验步骤

3.1 样本处理

- a. 冻存细胞从-80取出后,立即在 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中轻摇冷冻管快速解冻, (减少细胞损伤)。细胞活性要求大于 80%，死细胞中染色质容易呈裸露状态，造成后续较强的背景噪音。
- b. 将解冻后细胞悬液转移至 EP 管中，4 $^{\circ}$ C，300g 离心 3 min 去除上清。
- c. 向 EP 管中加入 1 mL 预冷的 PBS 缓冲液，吹打混匀后，4 $^{\circ}$ C，300 g(根据细胞数量调整离心力)离心 3 min 去除上清。
- d. 用 800 μ L 预冷的 Lysis Buffer 重选细胞，冰上孵育 7 min，4 $^{\circ}$ C，300 g 离心 3 min 去除上清(加入 Lysis Buffer 体积：细胞浓度约 1000 个/ μ L)。
- e. 加入 1 mL PBS 缓冲液吹打混匀重选细胞核，取 18 μ L 细胞核悬液，加入 2 μ L 0.4% 台盼蓝溶液染色，显微镜下镜检，用血球计数板计算细胞核的浓度(加入 PBS 缓冲液体积：细胞核浓度 1000~3000 个/ μ L)。
- f. 根据所需细胞核数量取对应体积的细胞核悬液，加 600 μ L 预冷的 PBS，4 $^{\circ}$ C，300g 离心 3min 去除上清，收集细胞核。
- g. 处理好的细胞核立即进行 Tn5 转座法 DNA 建库。

3.2 文库构建

3.2.1 Tn5 酶转座

- 1) 于无菌 PCR 管中配制表 2 所示反应体系。

表 2 片段化反应体系

名称	体积 (μ L)
Input nucleus	x
5 \times Reaction Buffer	10
Transposome Mix V50	5
ddH ₂ O	Up to 50

- 2) 将配制好的溶液加入到处理好的细胞核中，使用移液器轻轻吹打混匀。
- 3) 将上述 PCR 管置于 PCR 仪，设置表 3 所示反应程序，进行片段化反应。

表 3 片段化反应程序

温度	时间
热盖 55 °C	On
37 °C	30 min
4 °C	Hold

3.2.2 纯化（纯化含两种方案，选择其中一种方案即可）

纯化方案一(推荐: MinElute PCR Purification Kit (Qiagen Cat#28004))

- 1) 加入 5 倍体积 Buffer PB 至 1 倍体积的片段化产物中混匀。
- 2) 将 MinElute 柱放置于 2 mL 收集管中。
- 3) 将待纯化样本加入 MinElute 柱，离心 1 min，弃掉收集管中的液体，MinElute 柱放回到同一个收集管中。
- 4) 向 MinElute 柱中加入 750 μ L Buffer PE，离心 1 min，弃掉收集管中的液体，MinElute 柱放回到同一个收集管中。
- 5) 将置于 2 mL 收集管中的 MinElute 柱离心 1 min，去除残留液体。
- 6) 取出 MinElute 柱并放置于干净的 1.5 mL 离心管中。
- 7) 向 MinElute 柱中加入 20 μ L ddH₂O，（确保 ddH₂O 直接加入到膜的中央，以便于将结合的 DNA 全部洗脱下来）静置 1min，随后将置于 1.5 mL 离心管中的 MinElute 柱离心 1 min，收集过滤液。

（注：此方法适用于回收 PCR 产物 $\leq 5 \mu$ g（70 bp-4 kb），Buffer PE 使用前加入无水乙醇，所有离心步骤均在室温（15-25°C），13000 rpm 条件下进行）

纯化方案二：使用磁珠纯化

- 1) 将平衡至室温的 AMPure XP Beads（Beckman Cat#A63880/A63881）磁珠，振荡或上下颠倒混匀；
- 2) 将 100 μ L 磁珠加入步骤 2 反应体系中，使用移液枪轻轻吹打混匀，室温孵育 5 min；
- 3) 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架上分离磁珠和液体，待溶液澄清后（约 5 min），小心移除上清；
- 4) 保持 PCR 管始终处于磁力架中，加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室

温孵育 30 sec 后小心移除上清；

5) 重复步骤 4)，总计漂洗两次；

6) 保持 PCR 管始终处于磁力架中，开盖干燥磁珠至刚刚出现龟裂（约 5 min）；

7) 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 21 μ L 灭菌超纯水洗脱。涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置孵育 5 min；

8) 将反应管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清（约 5 min）后小心吸取 20 μ L 上清至干净的灭菌 PCR 管中。

3.2.3 文库扩增

1) 将表中试剂解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。

2) 于无菌 PCR 管中配制表 4 所示反应体系。

表 4 PCR 扩增反应体系

名称	体积 (μ L)
上步骤产物	20
PCR Primer Mix	3
N5**	1
N7**	1
2×Ultima Amplification Mix	25
ddH ₂ O	Up to 50

注意：*Hieff NGS® Tagment Index Kit for Illumina® (48/96/384 Index) (Cat#I2416ES24/96/384) 中提供 384 种 index，可根据样品数量和 Index 选择策略自行选择。

3) 使用移液器轻轻吹打或振荡混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。

4) 将 PCR 管置于 PCR 仪中，设置表 5 所示反应程序，进行 PCR 扩增。

表 5 PCR 扩增反应程序

温度	时间	循环数
热盖 105°C	on	-
72°C	3 min*	-
95°C	30 sec	-
95°C	10 sec	12 cycles

55°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 min	-
4°C	Hold	-

注意：*此步不可省略。转座反应产物并非完整的双链 DNA，72°C 孵育 3 min 用于生成成熟的 PCR 模板。

3.2.4 文库纯化

1) 将 Hieff NGS® DNA Selection Beads 磁珠从冰箱中取出，室温平衡至少 30 min。配制 80%乙醇。

2) 将平衡至室温的磁珠涡旋振荡或充分颠倒以保证充分混匀。

3) 吸取 100 μL 磁珠(2.0×, Beads:DNA=2:1)至扩增产物中，涡旋振荡或移液器吹打 10 次混匀，室温孵育 5 min。

4) 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清后(约 3-5 min)，小心移除上清。

5) 保持 PCR 管始终置于磁力架中，加入 200 μL 新配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec 后，小心移除上清，总计漂洗两次。最后使用 10 μL 吸头去除残余液体。

6) 保持 PCR 管始终置于磁力架中，打开管盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂(不超过 5min)。

7) 将 PCR 管从磁力架中取出，进行洗脱：直接加入 52 μL ddH₂O，涡旋混匀或使用移液器轻轻吹打至充分混匀，室温静置 5 min。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后(约 3-5 min)，小心移取 50 μL 上清至新 PCR 管中，切勿触碰磁珠。

3.2.5 文库分选

1) 向 50 μL 文库纯化产物中加入第一轮分选磁珠 27.5 μL (0.55×, Beads:DNA=0.55:1)，涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀，室温孵育 5 min。

2) 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清后(约 3-5 min)，小心转移上清至新的 PCR 管。

3) 吸取 50 μL 磁珠(1.0×, Beads:DNA=1:1)至文库产物中，涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀，室温孵育 5 min。

4) 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清后(约 3-5 min)，小

心移除上清。

5) 保持 PCR 管始终置于磁力架中, 加入 200 μL 新配制的 80%乙醇漂洗磁珠, 室温孵育 30 sec 后, 小心移除上清, 总计漂洗两次。最后使用 10 μL 吸头去除残余液体。

6) 保持 PCR 管始终置于磁力架中, 打开管盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂 (不超过 5min)。

7) 将 PCR 管从磁力架中取出, 进行洗脱: 直接加入 52 μL ddH₂O, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀, 室温静置 5 min。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置, 待溶液澄清后(约 3-5 min), 小心移取 50 μL 上清至新 PCR 管中, 切勿触碰磁珠。

8) 重复步骤 1)~7), 对文库进行第二轮 0.55 \times /1.0 \times 分选。

9) 将 PCR 管从磁力架中取出, 进行洗脱: 直接加入 15 μL ddH₂O, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀, 室温静置 5 min。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置, 待溶液澄清后(约 3-5 min), 小心移取 14 μL 上清至新 PCR 管中, 切勿触碰磁珠。

3.2.6 文库质检

对纯化好的文库进行浓度和质量检测, 主要包括:

- 浓度检测: 用 Qubit 对文库的浓度进行检测。
- 质量检测: 用 Qsep 或者安捷伦 2100 检测文库片段分布。

注: 转座酶切割核小体时, ATAC 文库需要有明显的核小体模型分布, ATAC 文库第一个文库分布在 170-200 bp 左右, 为一个核小体模型; 后面出现的第二个峰为两个核小体模型, 可能会出现三个核小体模型。如果酶量相对细胞过量, 则文库可能只有一个核小体模型, 即只有一个主峰。

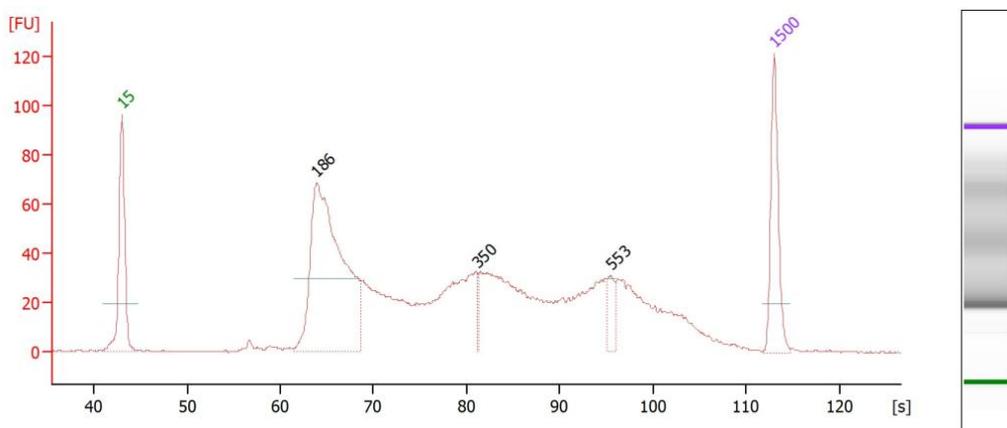


图 1 文库片段检测示例图