# ATAC-Seq Library Prep Kit for Illumina

## RK21509



**使用说明书**

Version:N18K25V1.1

# 目录

目录 ..... 1
1. 产品概述 ..... 1
2. 产品组分 ..... 1
3. 保存及运输条件 ..... 1
4. 其他自备材料 ..... 1
5. 实验流程 ..... 2
6. 操作注意事项 ..... 3
7. 文库构建步骤 ..... 4

## 1. 产品概述

ATAC-Seq Library Prep Kit for Illumina 是针对 Illumina 高通量测序平台定向开发的用于研究染色质可及性/开放性的试剂盒。ATAC-Seq 全称 Assay for Transposase Accessible Chromatin with high-throughput sequencing，是利用转座酶研究染色质可及性的高通量测序技术。其原理是利用转座酶 Tn5 识别并可切割开放染色质区域的特性，对 Tn5 酶切割后的 DNA 提取并进行 PCR 扩增，完成对捕获到的开放染色质区域 DNA 序列进行测序。

本试剂盒优化了实验反应体系和建库流程，具有细胞投入量兼容范围广、实验周期短、信噪比高、应用范围广等优势，尤其适用于肿瘤疾病、生物发育、衰老等表观遗传学研究。试剂盒中的每种试剂都经过了严格的质量控制，且每一批次的试剂盒都经过了建库和上机测序的验证，保证每一批次的试剂盒性能稳定。

## 2. 产品组分

| | 试剂管名称与颜色 | | 24 RXN |
|---|---|---|---|
| RK21509(2-1) | 🔴 | 2X RS Buffer | 1.5 mL*2 |
| | ⚪ | 10% NP40 | 12 μL |
| | 🟤 | 1% Digitonin | 24 μL |
| | ⚪ | 10% Tween-20 | 72 μL |
| | 🟠 | Tn5 Transposome | 48 μL |
| | 🟢 | 5X Tagment Buffer | 240 μL |
| | 🟣 | 2X PCR Mix | 600 μL |
| | ⚪ | 1X PBS | 20 mL |
| | 🟢 | Termination Buffer | 240 μL |
| RK21509(2-2) | ⚪ | AFTMag NGS DNA Clean Beads | 4.692 mL |

⚪ 代表管盖颜色。

备注：1：收到试剂盒后，Box 2-1 试剂放在-20℃保存；Box 2-2 放在 4℃保存，不能放到-20℃。

2：Digitonin 具有中度毒性，避免直接接触皮肤。

## 3. 保存及运输条件

RK21509(2-1)：试剂盒长途运输：尽量采用干冰运输，或者干冰结合冰袋方式，在-40～-20℃温度条件下进行运输。

试剂盒保存：-20℃冰箱。

RK21509(2-2)：0℃运输。2～8℃保存，根据不同目的地调整运输方式。

## 4. 其他自备材料

### 4.1. DNA质控

Qubit 荧光定量仪

ABQubit 双链 DNA 定量试剂盒(ABclonal, Cat.NO. RK30140)或 Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher

SCIENTIFIC, Cat. Q32854)

Agilent 2100 bioanalyzer

Agilent high sensitivity DNA Chips (Agilent #5067-4626)

Agilent DNA 1000 chip (Agilent #5067-1504)

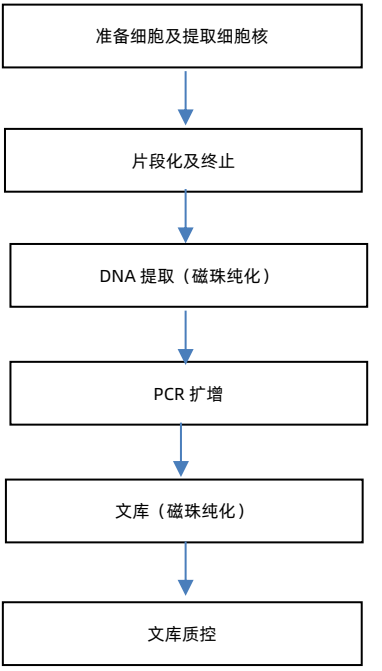
### 4.2. 连接接头

Illumina 平台完整接头：Cat.NO. RK20290，请按照样本数量选择相应的接头试剂盒。

### 4.3. 其他试剂与耗材

80%乙醇、Nuclease-free dd$H_2O$、低吸附 EP 管、PCR 管、磁力架、PCR 热循环仪。

## 5. 实验流程



# 6. 操作注意事项

## 6.1. 样品准备

6.1.1. 若使用活细胞进行实验，对于常见的悬浮细胞系，离心后弃去上层培养基收集细胞即可用于实验。对于大部分贴壁细胞，使用胰蛋白酶消化后，收集细胞悬液，离心后弃去上层培养基收集细胞即可。

6.1.2. 用于ATAC实验的细胞，可以使用台盼蓝染色，进行细胞活力检测，细胞活性最好>90%，实验过程中对细胞的操作应尽量轻柔，以保持细胞活性。生长状态不佳或死亡的细胞中，蛋白质与DNA结合的状态会发生改变，甚至蛋白质脱落，变成裸露的DNA，转座子随机切割可能产生较强的背景噪音，影响实验结果。

6.1.3. 凋亡的细胞核小体会松散，蛋白脱落DNA游离出来，导致Tn5打断有较多的基因组背景；所以ATAC样本需要是新鲜培养的细胞，最好细胞活性在90%以上；

## 6.2. 磁珠使用原则

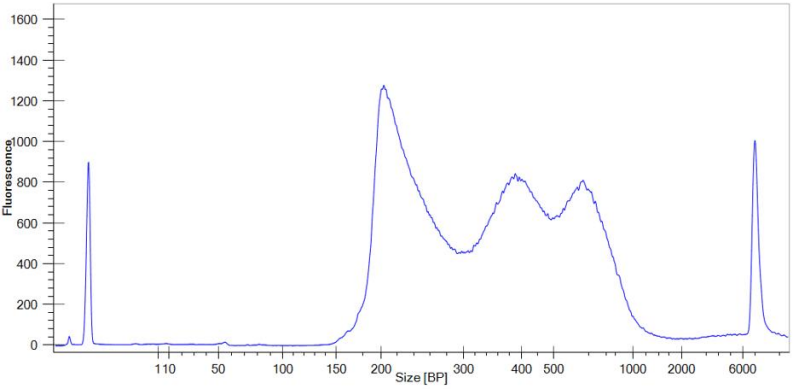
6.2.1. 磁珠在使用前请提前半小时拿出，放置于室温平衡。

6.2.2. AFTMag NGS DNA Clean Beads避免放入-20℃保存，冷冻会引起磁珠团聚而无法再分散，导致磁珠性能失效。（如果磁珠被冷冻，建议另行购买）

6.2.3. AFTMag NGS DNA Clean Beads纯化过程中，必须待酒精完全挥发后再加入Nuclease-Free Water洗脱，即磁珠颜色从光亮褐色变为磨砂褐色，酒精未挥发完全或者磁珠过分干燥（变龟裂）均会影响文库产量。

## 6.3. 文库质控

6.3.1. 使用100,000个A431细胞，进行ATAC实验获得的文库，长度分布检测如下图所示：




## 6.4. 操作规范

6.4.1. 使用带有index的接头或者index PCR primer时应小心，避免试剂与样本间的交叉污染。

# 7. 文库构建步骤

## 7.1. 细胞裂解液准备和配制

7.1.1. 细胞裂解液配制（单个样品）

取出相关试剂，放冰上融解，冰上配制如下体系，裂解液需要新鲜配置，配置好后置于冰上备用；

| | 试剂 | 体积 |
|---|---|---|
| | 2X RS Buffer | 25 μL |
| | 10% Tween 20 | 0.5 μL |
| | 10% NP40 | 0.5 μL |
| | 1% Digitionin | 0.5 μL |
| | Nuclease Free Water | 23.5 μL |
| | 总体积 | 50 μL |

**注：可以提前配制，按照 1.1 倍样本数进行配制，避免因损耗而致体积不够。**

7.1.2. Nucleus Wash buffer配制（单个样品）

| | 试剂 | 体积 |
|---|---|---|
| | 2X RS Buffer | 100 μL |
| | 10% Tween 20 | 2 μL |
| | Nuclease Free Water | 98 μL |
| | 总体积 | 200 μL |

## 7.2. 细胞收集

7.2.1. 将细胞从培养瓶中倒置于50 mL离心管中，室温，500 g，5 min离心。

7.2.2. 移除上清液，注意请勿触碰底部细胞沉淀。

7.2.3. 加入1 mL培养基，缓慢吹打重悬细胞并全部转移至1.5 mL离心管中。

7.2.4. 4℃，500 g，离心5 min。移除上清液，注意请勿触碰底部细胞沉淀。

7.2.5. 加入1 mL预冷的1X PBS，缓慢吹打混匀后4℃，500 g，离心5 min。

7.2.6. 移除上清液，注意请勿触碰底部细胞沉淀。

7.2.7. 加入200 μL预冷的1X PBS，使用移液器缓慢吹打混匀后进行细胞计数。

## 7.3. 细胞裂解提细胞核

7.3.1. 取一定数量的细胞，4℃，500 g，离心5 min。移除上清液，注意请勿触碰底部细胞沉淀。

7.3.2. 加入50 μL预冷的新鲜配置的细胞裂解液（含NP40及Digitionin）。

7.3.3. 冰上裂解放置3-5 min。加入200 uL Nucleus Wash buffer后使用移液器吹打混匀。4℃，500 g，10 min离心。

7.3.4. 移除上清液，注意请勿触碰底部细胞沉淀。

### 7.4. 片段化

7.4.1. 细胞核离心富集的时候，按照下表冰上配置打断预混体系；

| | 试剂 | 体积 |
|---|---|---|
| | 5X Tagment Buffer | 10 μL |
| | Nuclease Free Water | 20.5 μL |
| | 1X PBS (cold) | 16.5 μL |
| | 1% Digitonin | 0.5 μL |
| | 10% Tween 20 | 0.5 μL |
| | Tn5 Transposome | 2 μL |
| | 总体积 | 50 μL |

**注：按照 1.1 倍样本数进行配制，避免因损耗而致体积不够。**

7.4.2. 吹打混匀之后，按照50 μL/样本，将打断预混液加到每个离心好的细胞核中，吹打混匀；

7.4.3. 将打断体系置于PCR仪上，进行如下反应程序。

| | 温度 | 时间 |
|---|---|---|
| | 37℃ | 30 min |
| | 4℃ | ∞ |

7.4.4. 反应结束，立即取出PCR管，加入10 μL Termination Buffer，涡旋混匀或使用移液枪上下吸打，充分混匀后室温孵育5 min。

### 7.5. 磁珠纯化

7.5.1. 提前至少30 min将AFTMag NGS DNA Clean Beads从2-8℃取出，静置平衡至室温，使用前涡旋或者振荡混匀。

7.5.2. 反应结束后，在产物中加108 μL AFT Mag NGS DNA clean Beads（1.8X），使用移液器上下吹打，充分混匀，室温静置5 min。

7.5.3. 转移离心管或PCR管至磁力架上，静置5 min或直至溶液变澄清，小心弃除上清，注意不到碰到磁珠。

7.5.4. 将离心管保持在磁力架上，加入200 μL 80%乙醇，静置30 s，弃除全部上清。

7.5.5. 重复步骤7.5.4。

7.5.6. 短暂离心后将离心管或PCR管放回至磁力架，用10 μL枪头将残留液体彻底吸干。

7.5.7. 干燥磁珠2-3 min，待酒精挥发完全后（磁珠颜色从光亮褐色变为磨砂褐色），加入22 μL Nuclease-Free Water，吹打混匀，室温静置2 min。

7.5.8. 转移离心管或PCR管至磁力架上，静置5 min或直到溶液变澄清，小心吸取20 μL上清至另一全新的PCR管中备用。

### 7.6. 文库扩增

7.6.1. 根据PCR体系配制

| | 试剂 | 体积 |
|---|---|---|
| | Tagment Products | 20 μL |
| | 2X PCR Mix | 25 μL |
| | N5xx（Index Primers） | 2.5 μL |
| | N7xx（Index Primers） | 2.5 μL |
| | 总体积 | 50 μL |

7.6.2. 枪头吹打混匀，瞬时离心，将样本置于PCR仪中按照如下程序进行PCR扩增（热盖温度105℃）

| 温度 | 时间 | Cycles |
|---|---|---|
| 72℃ | 3 min | 1 |
| 98℃ | 30 s | 1 |
| 98℃ | 15 s | |
| 60℃ | 30 s | N cycles |
| 72℃ | 1 min | |
| 72℃ | 5 min | 1 |
| 4℃ | Hold | |

7.6.3. PCR循环数选择推荐：

| 实验细胞数 | PCR 循环数 |
|---|---|
| 100, 000 | 10-12 cycles |
| 10,000 | 13-15 cycles |
| 1000 | 16-18 cycles |
| 100 | 19-21 cycles |

### 7.7. 扩增产物纯化

7.7.1. 提前至少30 min将AFTMag NGS DNA Clean Beads从2-8℃取出，静置平衡至室温，使用前涡旋或者振荡混匀。

7.7.2. 反应结束后，向每个反应管中加入27.5 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads（0.55X），吹打混匀，室温静置5 min。

7.7.3. 转移离心管或PCR管至磁力架上，静置5 min或直至溶液变澄清，转移上清至新的PCR管中。

7.7.4. 向上清中加入60 μL AFTMag NGS DNA clean Beads，使用移液器上下吹打，充分混匀，室温静置5 min。

7.7.5. 将PCR管放置于磁力架上，待溶液澄清后移除上清液。

7.7.6. 将离心管或PCR管保持在磁力架上，加入200 μL 80%乙醇，静置30 s，弃除全部上清。

7.7.7. 重复步骤7.7.6。

7.7.8. 短暂离心后将离心管或PCR管放回至磁力架上，用10 μL枪头将残留液体彻底吸干。

7.7.9. 干燥磁珠2-3 min，待酒精挥发完全后（磁珠颜色从光亮褐色变为磨砂褐色），加入22 μL Nuclease-Free Water，吹打混匀，室温静置2 min。

7.7.10. 转移离心管或PCR管至磁力架上，静置5 min或直到溶液变澄清，小心吸取20 μL文库至另一新的离心管中，留存备用。

**武汉爱博泰克生物科技有限公司**

电话：400-999-6126

邮箱：cn.market@abclonal.com

网址：www.abclonal.com.cn

地址：湖北省武汉市江夏区东湖高新区高科园 3 路精准医疗产业基地项目一期 5 号楼