Version 4

Code No. AG12566

AG12567

AccuNext ATAC 测序文库制备试剂盒III（Illumina）

AccuNext ATAC-seq Library Prep Kit III for Illumina

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.

ACCURATE BIOLOGY 艾科瑞生物

目录

- 产品概述 1
- 产品组成 1
- 保存及运输 2
- 实验原理及流程 2
- 产品优势 3
- 使用注意事项 3
- 实验前准备 4
- 操作方法 5

A. Nuclear Extraction Buffer 配制 5

B. 细胞核提取 5

a) 针对细胞样本 5

b) 针对动植物组织样本 5

C. 转座体片段化 6

D. DNA 纯化 7

E. 文库扩增 7

F. 文库纯化 8

G. 文库质量检测 9

- 附录 1：文库分选 10
- 附录 2：*AccuNext* 转座体建库适配接头引物（Illumina）的信息 11

➢ 产品概述

本产品是针对 Illumina 高通量测序平台研发的用于 ATAC-seq 文库构建的试剂盒，适用于 10^3~10^5个细胞起始量的样本建库。ATAC-seq（Assay for Transposase Accessible Chromatin with high-throughput sequencing）是一种通过转座酶介导的高通量测序技术，可快速检测全基因组范围内的染色质开放区域；它能揭示染色质可及性与基因表达调控的关联，为表观遗传研究提供关键线索；适用于染色体开放性图谱绘制、胚胎发育、疾病潜在标志物的预测、肿瘤发生等表观遗传学研究。

本产品使用含有部分 Illumina 测序接头的 Tn5 转座体，结合染色质开放区域，对裸露 DNA 进行切割的同时加上测序接头，经 PCR 扩增后可获得测序文库，具有细胞起始范围广、实验周期短、信噪比高、应用范围广等优势。

本产品的反应体系经过了精心优化，实验中所有试剂请使用本产品中提供的，不建议改变任何反应组分或用其他的等效产品替换本产品中组分，以免获得不好的实验结果。如需替换，请先进行验证。

➢ 产品组成

Package 3-1 组分如下（-80℃ 保存）：

组分名称	AG12566 （4 rxns）	AG12567 (12 rxns)
AccuNext Tn5 Transposome II	8 μl	24 μl

Package 3-2 组分如下（4℃ 保存）：

组分名称	AG12566 （4 rxns）	AG12567 (12 rxns)
DNA Clean Beads	864 μl	2.6 ml
Stop Buffer	80 μl	240 μl

Package 3-3 组分如下（-20℃ 保存）：

组分名称	AG12566 （4 rxns）	AG12567 (12 rxns)
Lysis Buffer	200 μl	600 μl
Wash Buffer	800 μl	1.2 ml X 2 pcs
Tn5 Reaction Buffer	200 μl	600 μl
1% Digitonin	4 μl	12 μl
AccuNext PCR Mix IV	100 μl	300 μl
Proteinase K (20 mg / ml)	4 μl	12 μl
Cell Suspension Buffer	200 μl	600 μl
Nuclease free water	1 ml	1 ml

注意：*AccuNext* 转座体建库适配接头引物（Illumina）（Code No. AG12532 / AG12533 / AG12534）为实验必须试剂，但本产品中未配置，需要单独购买。*AccuNext*** 转座体建库适配接头引物（Illumina）的信息见附录 2。

➢ 保存及运输

保存温度：Package 3-1　-80℃ 保存
　　Package 3-2　4℃ 保存（避免冻结）
　　Package 3-3　-20℃ 保存
运输温度：Package 3-1　干冰运输
　　Package 3-2　冰袋运输
　　Package 3-3　干冰运输或 -20℃ 冰袋运输

➢ 实验原理及流程

先在 Lysis Buffer 作用下分离细胞核；然后将 Transposome mix 与细胞核孵育，利用 Tn5 转座体识别染色质开放区域，转座时将转座体两端的 Adapter 1 和 Adapter 2 接头序列插入靶 DNA 的两端，形成两端带有 Adapter 的 DNA 产物；这种 DNA 产物经过 PCR 扩增、纯化后获得测序文库，经测序分析即可获得染色质开放区域的 DNA 信息。图 1 是原理过程，图 2 是最终获得的文库结构。

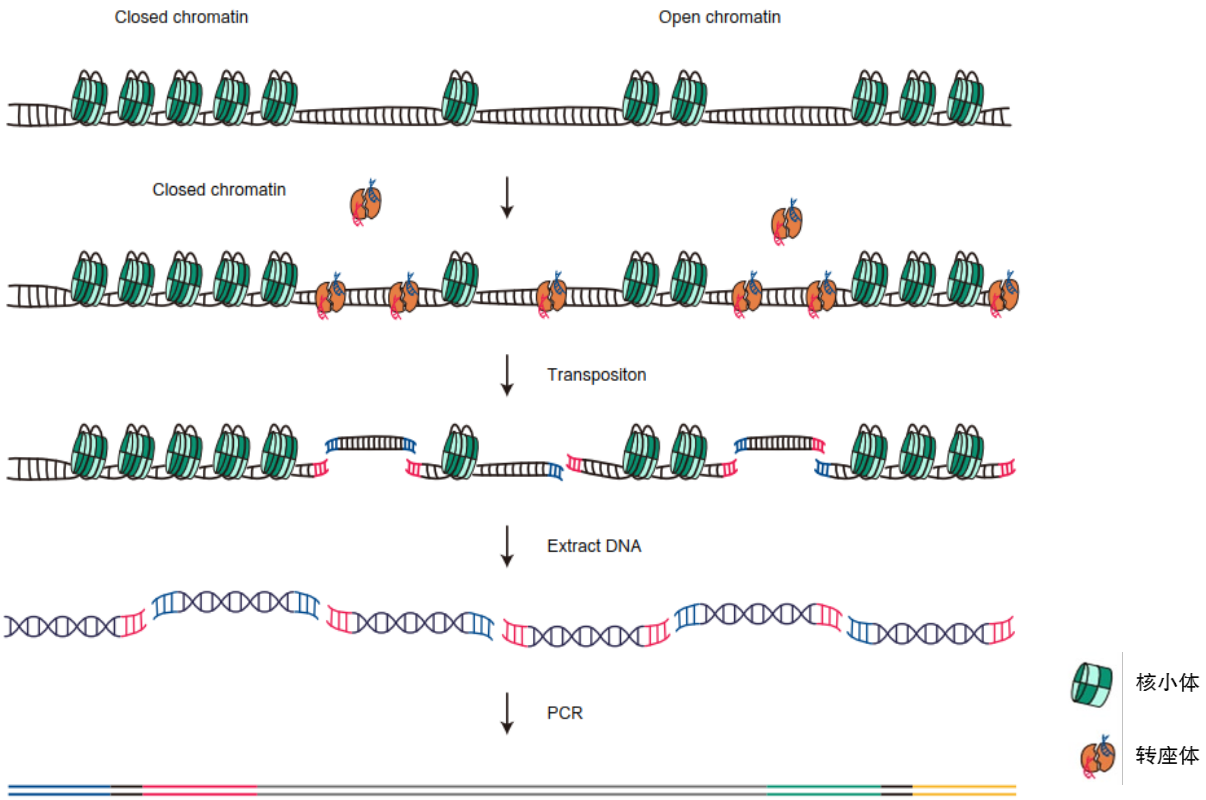


图 1：文库构建原理

5’-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-i5 index-TCGTCGGCAGCGTCAG ATGTGTATAAGAGACAG-NNNNNN-CTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCCACGA GAC-i7 index-ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3’

注：-NNNNNN-：表示插入序列。



图 2：文库结构

➢ 产品优势

1. 适用于 Illumina 测序平台：整合了 Index 和 Illumina 接头，构建的 DNA 文库可直接进行 NGS 测序。
2. 高通量：ATAC-seq 能够在短时间内分析大量样本，适合大规模基因组研究。
3. 低细胞需求：与传统方法相比，ATAC-seq 对细胞数量的需求较低，可从低至 1000 个细胞进行建库。
4. 细胞投入量适用范围广：适用于 10^3~10^5 个细胞起始量的样本建库。
5. 高重复性：实验结果具有较高的重复性和一致性。
6. 信噪比高：TSS 富集良好且信噪比高。

➢ 使用注意事项

1. 防污染要求

- ❖ 实验过程中，要穿实验服、戴一次性的口罩和手套防止污染。
- ❖ 本产品中的试剂，应保存在无核酸酶和核酸污染的环境中，避免试剂被污染。
- ❖ 要避免与其他实验的交叉污染。建议将实验区分区：试剂配制区（建议设置无菌正向气流）、模板添加区、PCR 扩增区、产物纯化区和电泳检测区。
- ❖ 实验过程中要避免讲话，每次实验前后使用 70%酒精擦拭清洁实验台面。实验过程中小心轻柔地打开和关闭样品管盖，避免样品飞溅或喷洒。若样品飞溅至手套，建议更换手套；若喷洒至桌面，立即用水或 70%的酒精擦拭。
- ❖ 每次实验，建议设置阴性对照（不加细胞）实验，确认实验是否有污染。

2. 细胞要求

- ❖ 本产品适用于 10^3~10^5 个细胞起始量的样本建库，因不同类型细胞及不同阶段的细胞染色质开放情况存在差异，因此，如果细胞量不受限制，建议使用 5 x 10^4 个细胞进行实验，以获得较好的实验结果。
- ❖ 本产品配制的细胞裂解液（Lysis Buffer）适用于哺乳动物细胞核分离，如果是组织样本、植物或真菌细胞，建议先通过合适的方法获得原生质体或细胞核，再使用本产品进行后续实验。

- 实验前，需要确认细胞活力，死亡的细胞染色质松散，DNA 会大量的暴露出来，暴露的 DNA 更容易被转座体识别切割造成较强的噪音信号，建议细胞活性不低于 90%（细胞活性可以用台盼蓝染色来鉴定）。

3. 分离细胞核

- 分离细胞核时，需要注意避免细胞核丢失，离心时可对管壁做标记并统一方向离心，弃上清时沿着沉淀的反方向吸取，不要吸干液体。
- 处理细胞或细胞核时，吹打要轻柔，不要剧烈震振荡，尽量不要起气泡，减少气泡破裂时损伤细胞核。

4. 纯化及分选时磁珠的使用

- 磁珠使用前应先平衡至室温，否则会导致回收率下降、分选效果不佳。
- 磁珠使用前应当充分振荡混匀，DNA 样品加入磁珠后应保证与磁珠充分混匀。
- 吸取上清时，应避免吸到磁珠，以免影响文库质量。
- 80%乙醇应现用现配，避免乙醇浓度降低而影响回收。
- 磁珠室温干燥时，80%乙醇干燥不充分会影响后续反应，干燥过度又会导致磁珠开裂而降低产物回收率。

5. 文库质检

- 文库浓度检测：推荐使用 qPCR 绝对定量的方法，对文库精确定量，也可以使用其他基于荧光染料的方法，如 Qubit、PicoGreen 等，请勿使用任何基于吸光度检测的方法。
- 文库大小检测：推荐使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测文库的长度分布。

➢ 实验前准备

1. 试剂 & 耗材：

- Illumina 测序接头引物：*AccuNext* 转座体建库适配接头引物（Illumina）（Code No. AG12532 / AG12533 / AG12534）或其他等效产品。
- DNA 评价：*AcuQ* 1X dsDNA（高灵敏度）定量试剂盒（AG12549 / AG12550）及 Agilent DNA 7500 Kit（Agilent，Code No. 5067-1056)或其他等效产品。
- 细胞核提取试剂：*SteadyPure* 动物组织细胞核分离试剂盒（Code No. AG21047）；*SteadyPure* 植物细胞核分离试剂盒（Code No. AG21048）。
- 其他材料：PBS、80%乙醇，0.2 ml RNase-free PCR 管，1.5 ml 离心管等。

2. 仪器：

- 离心机、光学显微镜、PCR 仪、Qubit 荧光计、Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer、移液器、涡旋振荡仪、小型桌面离心机。

➢ 操作方法

- 本产品适用于 10^3~10^5 个的细胞，在细胞量充足的情况下，推荐使用 5 x 10^4 个细胞进行实验。
- 提前将 Lysis Buffer、1% Digitonin、Wash Buffer、Tn5 Reaction Buffer 室温解冻，混匀后短暂离心。Stop Buffer 室温放置解冻，如有沉淀可室温或 37℃加热溶化。
- 将离心机提前预冷到 4℃。

A. Nuclear Extraction Buffer 配制

按照下表配制 Nuclear Extraction Buffer*a，用移液器吹打混匀，放置在冰上备用。

组分	反应体系
Lysis Buffer	49.5 μl
1% Digitonin	0.5 μl
Total	50 μl

*a：含有 Digitonin 的 Nuclear Extraction Buffer 不可长期保存，建议现配现用。

B. 细胞核提取

a) 针对细胞样本

1. 在室温下收集细胞，使用对应的培养基清洗细胞一次，进行细胞计数。
2. 取实验所需数量的细胞于 1.5 ml 离心管中，500 x g 4℃离心 5 min，弃上清。（**注意：细胞量较少时，可能看不到细胞沉淀，为避免弃上清时吸到沉淀，离心前可以在离心管底部做标记，吸上清时，沿着管壁，在沉淀的反方向吸取，可保留少量液体。**）
3. 加入 50 μl 预冷的 Cell Suspension Buffer 重悬细胞（轻弹管底混匀），500 x g 4℃离心 5 min，弃上清。
4. 加入 50 μl 配制好的 Nuclear Extraction Buffer，轻弹管底混匀，冰上放置 5 min，立即 700 x g 4℃离心 5 min，弃上清（可保留不超过 5 μl 的液体）（在此时可按照步骤 **＜C.转座体片段化＞** 配制 Transposome mix），直接进行后续的转座反应。

   （注意：处理好的细胞核应及时加入 ＜C. 转座体片段化＞ 步骤中配制的 Transposome mix，避免细胞核长时间暴露于空气中而损伤，造成后续建库出现高背景噪音。）

b) 针对动植物组织样本

- 本产品中不含有分离动植物组织细胞核的试剂，需要自备。

1. 针对动植物组织样本，建议使用合适的细胞核分离试剂盒或方法分离获得细胞核【比如，可使用本公司产品：*SteadyPure* 动物组织细胞核分离试剂盒（Code No.

AG21047）；*SteadyPure* 植物细胞核分离试剂盒（Code No. AG21048）提取动植物组织的细胞核。】，并对细胞核进行计数。

2. 取实验所需数量的细胞核于 1.5 ml 离心管中，加入 200ul Wash Buffer，700 x g 4℃离心 5 min，弃上清（保留不超过 5 μl 的液体）（在此时可按照步骤 **＜C.转座体片段化＞** 配制 Transposome mix），直接进行后续的转座反应。（注意：细胞核离心之后，一般无法看到沉淀，为避免弃上清时吸到沉淀，离心前可以在离心管底部做标记，吸上清时，沿着管壁，在沉淀的反方向吸取，可保留少量液体。）**（注意：处理好的细胞核应及时加入 ＜C. 转座体片段化＞ 步骤中配制的 Transposome mix，避免细胞核长时间暴露于空气中而损伤，造成后续建库出现高背景噪音。）**

C. 转座体片段化

- 将所需用的试剂在冰上解冻。融化后，短暂离心，混匀后放置在冰上备用。其中 *AccuNext* Tn5 Transposome II 用移液器轻柔吹打混匀，请勿涡旋。其余试剂可轻柔涡旋混匀。

1. 按照下表，配制 **Transposome mix**，轻柔混匀后放置于冰上备用。

组分	反应体系
Tn5 Reaction Buffer	47.5 μl
AccuNext Tn5 Transposome II	2 μl
1% Digitonin	0.5 μl
Total	50 μl

2. 加入 50 μl Transposome mix 到步骤 **＜B.细胞核提取＞** 处理好的细胞核中，使用移液器轻柔吹打混匀 5~10 次，然后将反应液转移至 PCR 管中，立即放入 PCR 仪中进行片段化反应。

（**注意：**吹打时要轻柔缓慢，不要产生气泡，避免对细胞核造成损伤。转移至 PCR 管后，不要离心，避免细胞核聚集，使片段化不充分。）

3. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中进行片段化反应，反应程序如下：

温度	时间
37℃	20 min
4℃	Hold

4. 按照下表配制 Stop Reaction Buffer，轻柔混匀后放置于冰上备用。

组分	反应体系
Stop Buffer	19 μl
Proteinase K (20 mg / ml)	1 μl

5. 将反应结束后的 PCR 管短暂离心，立即加入 20 μl 的 Stop Reaction Buffer，用移液器吹打 10 次混匀，室温静置 5 min。立即进行 **＜D. DNA 纯化＞** 步骤。

D. DNA 纯化

实验前准备：

- 每次实验前，可根据实验量，配制新鲜的 80%乙醇溶液，每个样品需要 400 μl。
- 实验前，将磁珠恢复至室温（15 ~ 25℃）（放置约 30 min），使用前将磁珠充分涡旋振荡混匀约 5 min。

实验步骤

1. 添加 126 μl DNA Clean Beads 至上述 70 μl 片段化产物中（磁珠：样品的比例为 1.8：1），涡旋混匀 5 ~ 10 sec 或使用移液器轻柔吸打混匀 10 次，充分混匀后，短暂离心，室温静置孵育 5 min。
2. 将 PCR 管置于磁力架上分离磁珠和液体，待溶液澄清后（约 2~5 min），小心移除上清（**勿吸到磁珠**）。
3. 保持 PCR 管始终处于磁力架上，加入 200 μl 80%乙醇漂洗，室温孵育 30 sec，小心移除上清。
4. 重复步骤 3）一次。
5. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，开盖干燥磁珠 3 ~ 5 min 至无乙醇残留。
   - 无乙醇残留时，磁珠表面无光泽；如果乙醇未干燥完全，可能会影响 DNA 的洗脱效率及影响下游实验。但注意不要过分干燥磁珠，避免磁珠表面开裂，降低 DNA 洗脱效率。
6. 磁珠晾干后，将 PCR 管从磁力架上取下，加入 22 μl Nuclease free water 覆盖磁珠，使用移液器吹打混匀磁珠，室温孵育 5 min（如果磁珠干燥开裂，适当延长孵育时间）。
7. 将 PCR 管短暂离心，置于磁力架上，分离磁珠和液体直到溶液澄清（2~5 min）。
8. 小心吸取 20 μl 上清转移到新的 PCR 管中（勿吸到磁珠），可直接进行后续的文库扩增或-20℃保存（建议尽快进行文库扩增，避免长期保存导致 DNA 降解）。

E. 文库扩增

1. 按照下表配制 PCR 扩增体系，轻柔混匀，短暂离心。

组分	反应体系
上述纯化产物	20 μl
N5 index Primer*a	2.5 μl
N7 index Primer*a	2.5 μl
AccuNext PCR Mix IV	25 μl

*a：N5 / N7 index Primer 可使用 *AccuNext* 转座体建库适配接头引物（Illumina）（Code No. AG12532 / AG12533 / AG12534）。

将 PCR 管置于 PCR 仪中，立即运行以下反应程序（提前设置反应程序）。

温度	时间		循环数
72℃[*a]	3 min		1
98℃	30 sec		1
98℃	15 sec	}	X[*b]
63℃	10 sec		
72℃	2 min		1
4℃	Hold		1

*a：**此步不可省略**，片段化产物并非完整的双链 DNA，72℃ 孵育 3 min 用于补齐双链 DNA。

*b：下表为推荐的文库扩增循环数，实验前建议对循环数进行摸索，在满足文库产量的前提下，尽量选用少的循环数，确保得到高质量文库。

起始细胞量	扩增循环数（cycles）
100000	11~13
50000	12~14
10000	13~15
1000	15~17

F. 文库纯化

一般情况下，PCR 扩增完成后可直接进行文库纯化，如果有大片段，可参考**<附录 1：文库分选>** 步骤直接进行文库分选。

实验前准备：

- 每次实验前，可根据实验量，配制新鲜的 80%乙醇溶液，每个样品需要 400 μl。
- 实验前，将磁珠恢复至室温（15 ~ 25℃）（放置约 30 min），使用前将磁珠充分涡旋振荡混匀约 5 min。

实验步骤：

1. 添加 90 μl 平衡至室温的 DNA Clean Beads 至 50 μl PCR 产物中（磁珠：DNA=1.8：1），涡旋混匀或移液器吹打混匀 10 次，室温静置孵育 5 min。
2. 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（**勿吸到磁珠**）。
3. 保持 PCR 管始终处于磁力架中，加入 200 μl 80%乙醇漂洗，室温孵育 30 sec 后小心移除上清。
4. 重复步骤 3 一次。
5. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，开盖干燥磁珠 3 ~ 5 min 至无乙醇残留。
   - 无乙醇残留时，磁珠表面无光泽；如果乙醇未干燥完全，可能会影响 DNA 的洗脱效率及影响下游实验。但注意不要过分干燥磁珠，避免磁珠表面开裂，降低 DNA 洗脱效率。

6. 将 PCR 管从磁力架中取出，加 21 μl Nuclease free water 洗脱。涡旋混匀或移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置孵育 5 min。
7. 将 PCR 管短暂离心，置于磁力架上，分离磁珠和液体直到溶液澄清（约 2~5 min）。
8. 小心转移 20 μl 上清至低吸附 tube 管中（勿吸到磁珠），-20℃保存。

G. 文库质量检测

1. 取 2 μl 纯化后的文库，使用 Qubit 荧光计和 *AcuQ* 1X dsDNA（高灵敏度）定量试剂盒（Code No. AG12549 / AG12550）检测文库浓度。具体操作请参照说明书。
2. 取 1 μl 纯化后的文库，使用 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 和 Agilent DNA 7500 Kit（Agilent，Code No. 5067-1056）检测文库的分布范围。具体操作请参照说明书。
3. 成功的 ATAC 文库会呈现典型的 ladder 状条带（核小体分布），文库浓度会在 10 ~ 50 ng / μl，如下图 3 所示。产物可直接用于 illumina 平台测序。

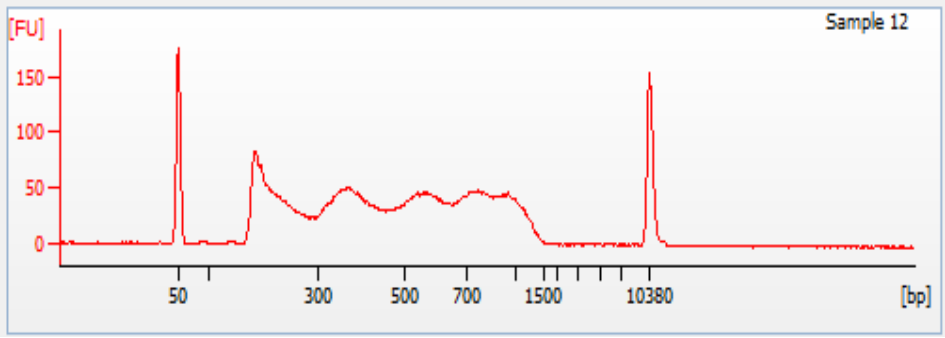


图 3. Agilent 2100 Bioanalyzer 文库长度检测

可看到呈现明显的核小体分布，第一个峰分布在 170~200 bp 左右，为核小体 Free 模型；后面出现的的第二个峰为一个核小体模型；第三个峰为两个核小体模型。

➢ 附录 1：文库分选

如果需要去除大片段，获得 200~700 bp 左右片段，可通过磁珠分选，以下是以磁珠分选的步骤。

实验前准备：

- 每次实验前，可根据实验量，配制新鲜的 80%乙醇溶液，每个样品需要 400 μl。
- 实验前，将磁珠恢复至室温（15 ~ 25℃）（放置约 30 min），使用前将磁珠充分涡旋振荡混匀约 5 min。

实验步骤：

1. 添加 27.5 μl 平衡至室温的 DNA Clean Beads 至 50 μl PCR 产物中（磁珠：DNA=0.55：1），涡旋混匀或移液器吹打混匀 10 次，室温静置孵育 5 min。
2. 短暂离心，将 PCR 管置于磁力架上静置 5 min，待溶液澄清后，小心转移上清至新的 PCR 管中（可留 2.5 μl，避免吸到磁珠）。
3. 向上清液中加入 60 μl DNA Clean Beads（磁珠：DNA=1.2：1），涡旋混匀或移液器轻轻吹打混匀，室温孵育 5 min。
4. 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（**勿吸到磁珠**）。
5. 保持 PCR 管始终处于磁力架中，加入 200 μl 80%乙醇漂洗，室温孵育 30 sec 后小心移除上清。
6. 重复步骤 5 一次。
7. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，开盖干燥磁珠 3 ~ 5 min 至无乙醇残留。
   - 无乙醇残留时，磁珠表面无光泽；如果乙醇未干燥完全，可能会影响 DNA 的洗脱效率及影响下游实验。但注意不要过分干燥磁珠，避免磁珠表面开裂，降低 DNA 洗脱效率。
8. 将 PCR 管从磁力架中取出，加 21 μl Nuclease free water 洗脱。涡旋混匀或移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置孵育 5 min。
9. 将 PCR 管短暂离心，置于磁力架上，分离磁珠和液体直到溶液澄清（约 2~5 min）。小心转移 20 μl 上清至低吸附 tube 管中（勿吸到磁珠），-20℃保存。

➢ 附录 2：*AccuNext* 转座体建库适配接头引物（Illumina）的信息

N5 index Primer

5’-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC **[i5 Index]** TCGTCGGCAGCGTC- 3’

N7 index Primer

5’-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT **[i7 Index]** GTCTCGTGGGCTCGG- 3’

[i5 Index] 表示 8 bp 的 i5 Index 序列，[i7 Index] 表示 8 bp 的 i7 Index 序列。

具体序列见下表：

组分		引物 Index 序列	Sample Sheet 输入 / 测序时 Index 序列	
			NovaSeq 6000 v1.0 reagents, MiSeq, HiSeq 2000 / 2500	NovaSeq 6000 v1.5 reagents，MiniSeq, NextSeq, HiSeq 3000 / 4000
N5 index Primers	N501	TAGATCGC	TAGATCGC	GCGATCTA
	N502	CTCTCTAT	CTCTCTAT	ATAGAGAG
	N503	TATCCTCT	TATCCTCT	AGAGGATA
	N504	AGAGTAGA	AGAGTAGA	TCTACTCT
	N505	GTAAGGAG	GTAAGGAG	CTCCTTAC
	N506	ACTGCATA	ACTGCATA	TATGCAGT
	N507	AAGGAGTA	AAGGAGTA	TACTCCTT
	N508	CTAAGCCT	CTAAGCCT	AGGCTTAG
N7 index Primers	N701	TAAGGCGA	TCGCCTTA	
	N702	CGTACTAG	CTAGTACG	
	N703	AGGCAGAA	TTCTGCCT	
	N704	TCCTGAGC	GCTCAGGA	
	N705	GGACTCCT	AGGAGTCC	
	N706	TAGGCATG	CATGCCTA	
	N707	CTCTCTAC	GTAGAGAG	
	N708	CAGAGAGG	CCTCTCTG	
	N709	GCTACGCT	AGCGTAGC	
	N710	CGAGGCTG	CAGCCTCG	
	N711	AAGAGGCA	TGCCTCTT	
	N712	GTAGAGGA	TCCTCTAC	