

Version 1

Code No. AG12572

AG12573

# *AccuNext* MNase 核小体 DNA 文库制备 试剂盒

## *AccuNext* MNase-mediated Nucleosome DNA Fragmentation Kit

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.





## 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. Cell Lysis Buffer 配制 .....	5
B. 细胞核提取 .....	5
C. MNase Enzyme 片段化 .....	5
D. DNA 纯化 .....	6
E. DNA 质量检测 .....	7
➤ 实验例 .....	7
➤ 附录 1: MNase Enzyme 滴定实验 .....	9

## ➤ 产品概述

本产品是以微球菌核酸酶（Micrococcal Nuclease, MNase）为基础研发的试剂盒，适用于核小体定位与占位分析、基因转录调控机制研究、表观遗传与染色质重塑研究、疾病机制探索、进化与发育生物学应用等方面。本产品样本起始量可低至  $10^4 \sim 10^5$  个细胞。

它利用微球菌核酸酶的特性，选择性消化裸露的 DNA，保留核小体（nucleosome）包裹的 DNA 片段，便于后续建库与高通量测序分析。

本产品的反应体系经过精心优化，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使用其他的等效产品替换本产品中组分，以免获得不良的实验结果。如需替换，请先进行验证。

## ➤ 产品组成

Package 2-1 组分如下（4℃保存）:

组分名称	AG12572 ( 4 rxns )	AG12573 ( 12 rxns )
DNA Clean Beads	540 $\mu$ l	1.7 ml

Package 2-2 组分如下（-20℃保存）:

组分名称	AG12572 ( 4 rxns )	AG12573 ( 12 rxns )
RNase A ( 10 mg/ml )	6 $\mu$ l	20 $\mu$ l
Proteinase K ( 20 mg/ml )	20 $\mu$ l	60 $\mu$ l
Lysis Buffer	200 $\mu$ l	600 $\mu$ l
Wash Buffer I	1 ml x 2 pcs	1.5 ml x 4 pcs
1% Digitonin	4 $\mu$ l	12 $\mu$ l
Dilution Buffer	300 $\mu$ l	1 ml
MNase Enzyme ( 200 U/ $\mu$ l )	4 $\mu$ l	12 $\mu$ l
Exonuclease III Enzyme ( 5 U/ $\mu$ l )	4 $\mu$ l	12 $\mu$ l
MNase Digestion Buffer	200 $\mu$ l	600 $\mu$ l
MNase Stop Buffer	24 $\mu$ l	75 $\mu$ l
10% SDS	24 $\mu$ l	75 $\mu$ l
Nuclease free water	1 ml	1 ml x 2 pcs

注意：建议使用 *AccuNext* DNA 文库制备试剂盒（Illumina）（Code No. AG12535 / AG12536）进行后续建库，同时可搭配购买 *AccuNext* CD1 接头引物（Illumina，适用于 DNA 文库）（Code No. AG12529 / AG12530 / AG12531）、*AccuNext* 短接头引物（Illumina，适用于 DNA 文库）（Code No. AG12537 / AG12538）。

## ➤ 保存及运输

保存温度：Package 2-1 4℃ 保存（避免冻结）

Package 2-2 -20℃ 保存

运输温度：Package 2-1 冰袋运输

Package 2-2 干冰运输或-20℃冰袋运输

稳定性：未开封试剂有效期 12 个月，开封后按组分要求保存（如 MNase Enzyme (200 U/μl) 分装后-20℃保存 ≤6 个月）。

## ➤ 实验原理及流程

本产品利用 MNase 切割染色质并获得核小体的能力，切割染色质上未被组蛋白保护的核小体区域，在 Proteinase K 的作用下消化组蛋白，经纯化后获得核小体 DNA，所获得的 DNA 片段不仅包含单核小体 DNA（~150 bp），还包含少量双核小体或多核小体 DNA。经过文库制备后得到的建库产物可用于测序。

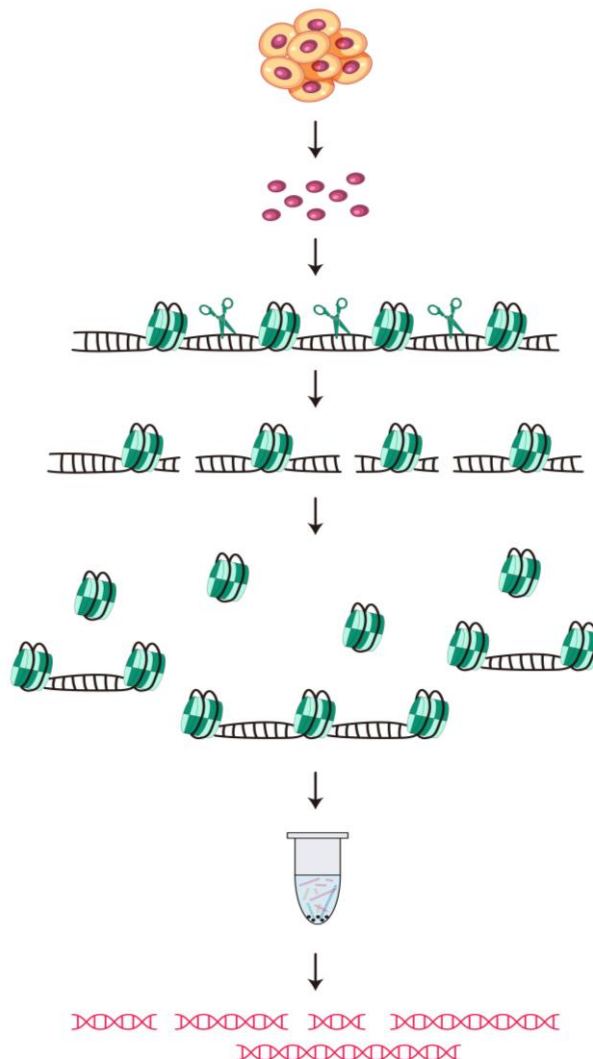


图 1：实验原理图

## ➤ 产品优势

1. 高特异性：MNase Enzyme 精准消化裸露 DNA，保留完整核小体 DNA 片段（~150bp 大小的单体峰显著）。
2. 双酶协同消化：MNase Enzyme + Exonuclease III Enzyme 联合使用，减少背景噪音，提升核小体定位分辨率。
3. 全流程优化：预混缓冲液确保消化效率，DNA Clean Beads 纯化替代酚氯抽提，操作更安全、纯化回收率更高。

## ➤ 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。

### 2. 细胞要求

- ❖ 本产品适用于  $10^4 \sim 10^5$  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，如果细胞量不受控制，建议使用  $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$  个细胞进行实验，以获得较好的实验结果。
- ❖ 原则上，所有的细胞类型均适用本产品，但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，死亡的细胞由于内源性核酸酶被激活、染色质结构改变及核膜完整性受损，其 MNase 消化结果通常不如活细胞理想，表现为：DNA 降解严重、核小体 ladder 模糊、背景噪音高。故建议样品细胞的活性不低于 95%（细胞活性可以用台盼蓝染色来鉴定），以确保实验成功率和重复性。

### 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，不要剧烈振荡，尽量不要起气泡，避免气泡破裂时损伤细胞核。

#### 4. MNase Enzyme 酶量选择

- ❖ 表 1 是 K562 细胞与 MNase Enzyme 酶量的关系表，具有一定参考性，但因不同细胞对 MNase Enzyme 的敏感性不一样，染色质的凝集程度不同，建议通过预实验进行滴定以确定最佳酶量。
- ❖ 具体方案详见<附录 1: MNase Enzyme 滴定实验>。

表 1. MNase Enzyme 推荐表

起始细胞量	MNase Enzyme
$1 \times 10^5$	200 U/ $\mu$ l * 1 $\mu$ l
$5 \times 10^4$	100 U/ $\mu$ l * 1 $\mu$ l
$1 \times 10^4$	60 U/ $\mu$ l * 1 $\mu$ l

#### 5. DNA Clean Beads 的使用

- ❖ DNA Clean Beads 使用前应先平衡至室温，否则会导致回收率下降。
- ❖ DNA Clean Beads 使用前应当充分振荡混匀，DNA 样品加入 DNA Clean Beads 后应保证与 DNA Clean Beads 充分混匀。
- ❖ 吸取上清时，应避免吸到 DNA Clean Beads，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。
- ❖ DNA Clean Beads 经 80%乙醇洗涤后，若干燥不充分会影响后续反应，干燥过度又会导致 DNA Clean Beads 开裂而降低产物回收率。

### ➤ 实验前准备

#### 1. 试剂 & 耗材：

- ❖ DNA 评价：AcuQ 1X dsDNA (高灵敏度) 定量试剂盒 (Code No.AG12549 / AG12550) 或其他等效产品。
- ❖ 其他材料：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、水浴锅、Qubit 荧光计、涡旋振荡仪、桌面离心机、移液器。

## ➤ 操作方法

- 提前将 Lysis Buffer、1% Digitonin、Wash Buffer I、MNase Digestion Buffer、10% SDS 室温解冻，混匀后短暂离心。实验期间，10% SDS、1% Digitonin 可室温放置，如有沉淀可室温或 37°C 加热溶化，混匀后使用。
- 将离心机提前预冷到 4°C。

### A. Cell Lysis Buffer 配制

按照下表配制 Cell Lysis Buffer<sup>a</sup>，配好后用移液器吹打混匀，放置于冰上备用。

组分	体积
Lysis Buffer	49.5 $\mu$ l
1% Digitonin	0.5 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

<sup>a</sup>: 含有 Digitonin 的 Cell Lysis Buffer 不可长期保存，建议现配现用。

### B. 细胞核提取

- 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。
- 取实验所需数量的细胞于 1.5 ml 离心管中，2300 rpm ( 500 x g ) 4°C 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细胞，离心前可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，并保留少量液体。)
- 加入 50  $\mu$ l Cell Lysis Buffer，轻轻吹打混匀，冰上放置 5 min。
- 加入 500  $\mu$ l Wash Buffer I，轻轻吹打混匀，冰上放置 5 min。
- 2300 rpm ( 500 x g ) 4°C 离心 5 min，弃上清 ( 可先用 1 ml 的移液器去除 450  $\mu$ l 上清，然后使用 100  $\mu$ l 移液器去除 95  $\mu$ l 上清，保留不超过 5  $\mu$ l 的液体 )。
- 加入 48  $\mu$ l MNase Digestion Buffer 重悬细胞核沉淀。

### C. MNase Enzyme 片段化

- 所需用的试剂在冰上解冻。融化后，短暂离心，轻柔混匀后放置在冰上备用。其中 MNase Enzyme( 200 U/ $\mu$ l )需根据细胞量、细胞类型等因素 ( 可参考表 1.MNase Enzyme 推荐表 )，稀释到合适酶量后使用。
  - 为保证反应时间的准确性，水浴锅需提前预热到所需温度后再加酶液。
- 冰上加入 1  $\mu$ l MNase Enzyme 和 1  $\mu$ l Exonuclease III Enzyme( 5 U/ $\mu$ l )到装有 **<B.细胞核提取>**重悬溶液的**离心管管壁**上，轻柔振荡或上下颠倒 10 次混匀并瞬离。
    - 注意：使用 Dilution Buffer 将 MNase enzyme( 200 U/ $\mu$ l )稀释至合适酶量。

- ✚ 若是单个样品、且冰上快速操作，可直接将酶液加至重悬液中；但若是多个样品，需打在离心管管壁上，因为 MNase Enzyme 酶活较强，2 min 的时间误差就可能会导致实验结果的差异，且冰上或 4°C 低温并不能完全停止反应。
- 2. 放入 37°C 水浴锅开始计时，反应 10 min ( 需精确计时 )，反应结束后必须立即拿出并插在冰上，急剧降温以减缓 MNase Enzyme 的反应效率。
- 3. 立即加入 6  $\mu$ l MNase Stop Buffer 以终止 MNase Enzyme 反应。
- 4. 加入 1.5  $\mu$ l RNase A 至反应液中，轻柔振荡或上下颠倒 10 次混匀并瞬离；放入 45°C 水浴锅中，反应 30 min。
- 5. 反应结束后，加入 6  $\mu$ l 10% SDS 和 5  $\mu$ l Proteinase K 至反应液中，轻柔振荡或上下颠倒 10 次混匀并瞬离；放入 65°C 水浴锅中，反应 15 min。
- 6. 反应结束后，取上述反应液 67.5  $\mu$ l 转至 0.2 ml RNase-free PCR 管中。

#### 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  $\mu$ l。
- ✚ 实验前，将恢复至室温 ( 15 ~ 25°C ) 的 DNA Clean Beads 充分涡旋振荡混匀约 5 min。

##### 实验步骤：

1. 添加 135  $\mu$ l DNA Clean Beads 至 67.5  $\mu$ l 片段化产物中 ( DNA Clean Beads : DNA=2 : 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，待溶液澄清后 ( 约 2 ~ 5min )，小心移除上清 ( 勿吸到 DNA Clean Beads )。
3. 保持 PCR 管始终处于磁力架中，加入 200  $\mu$ l 80% 乙醇漂洗 DNA Clean Beads，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 DNA Clean Beads 3 ~ 5 min 至无乙醇残留。  
✚ 无乙醇残留时，DNA Clean Beads 表面无光泽且管壁上无明显液体；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 DNA Clean Beads，避免 DNA Clean Beads 表面开裂，降低 DNA 洗脱效率。
6. 将 PCR 管从磁力架中取出，加 28  $\mu$ l Nuclease free water 洗脱。使用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，待溶液澄清后 ( 约 2 ~ 5min )。

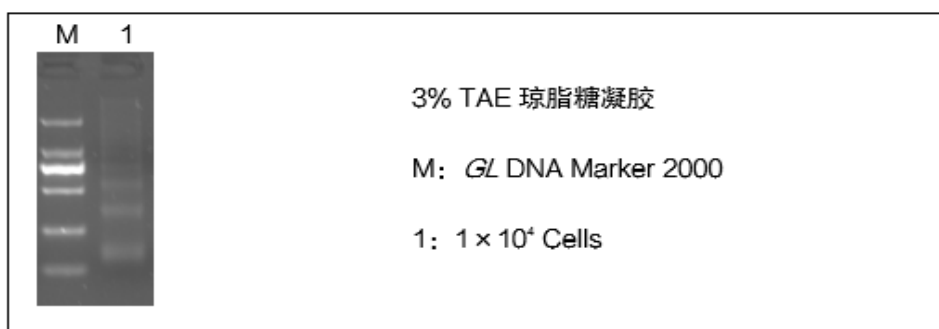
- 小心转移 27  $\mu$ l 上清至低吸附 tube 管中 ( 勿吸到 DNA Clean Beads ),  $-20^{\circ}\text{C}$  保存或继续进行文库构建。

## E. DNA 质量检测

- 使用 Qubit 荧光计和 *AcuQ* 1X dsDNA ( 高灵敏度 ) 定量试剂盒 ( Code No. AG12549 / AG12550 ) 检测浓度, 具体操作请参照说明书。
- 反应结束后, 取适量纯化产物进行琼脂糖凝胶电泳, 成功的实验结果会呈现 ladder 状条带。

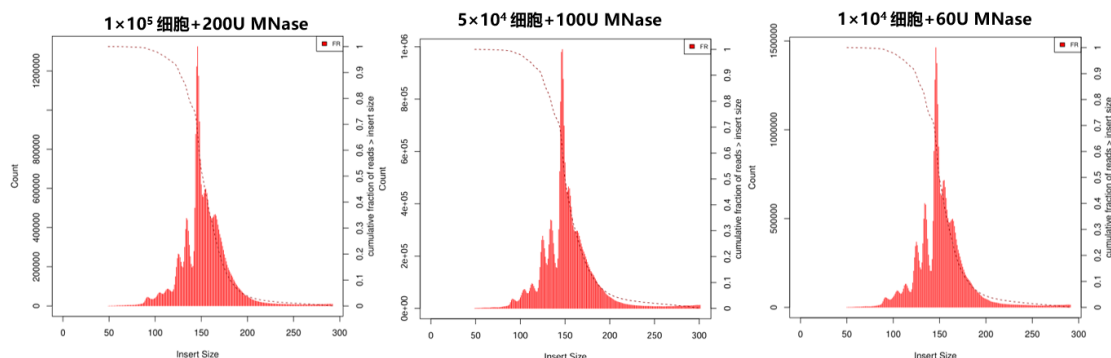
## ➤ 实验例

- 使用本产品对  $1 \times 10^4$  K562 Cells 进行 MNase 片段化, 琼脂糖凝胶电泳检测结果如下:



- 使用本产品对不同的细胞量 K562 Cells (  $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^4$  ) 进行文库构建, 结果显示不同细胞量均可获得较好的测序数据, 片段长度分布较集中、TSS 富集正常、平行样本的相关性较好以及 IGV 覆盖图有清晰的峰谷对比, 如下图所示:

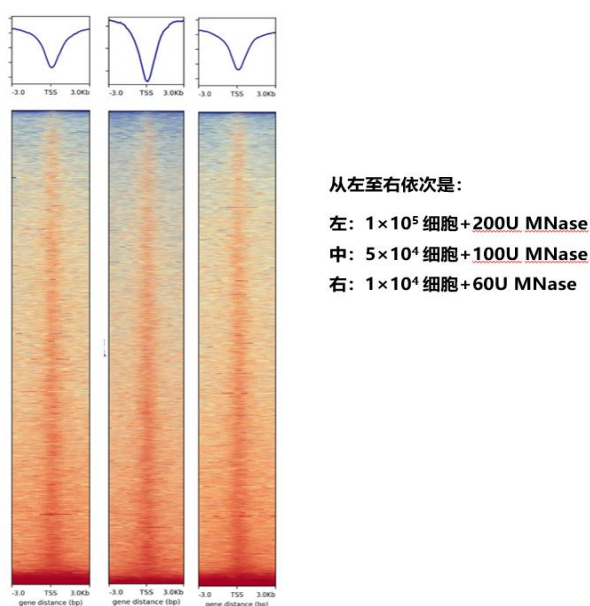
- 文库片段长度分布图: 片段长度集中在~150 bp 大小



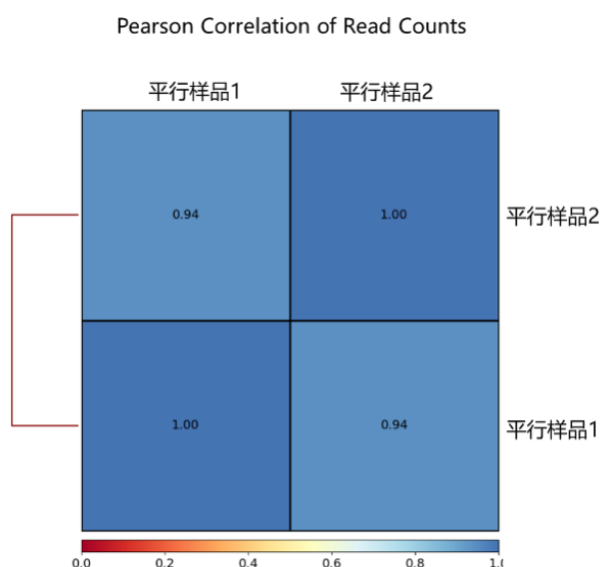
b) TSS 区域 ( 转录起始位点附近 ): 呈现 “倒置” 或 “凹陷” 形态

原因: 启动子区域的核小体排布在大多数经典基因的启动子区域, 存在一种非常保守的核小体组织模式。

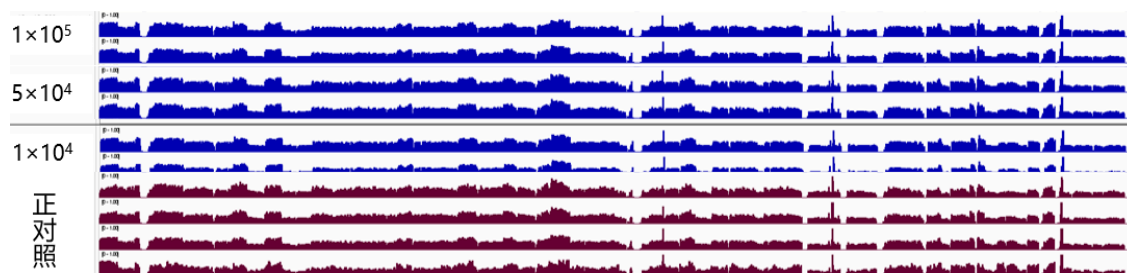
- ✧ 核小体空缺区 ( Nucleosome-Free Region, NFR ): 基因的转录起始位点 ( TSS ) 附近通常存在一个缺乏核小体的区域。这个开放区域为转录机器 ( 如 RNA 聚合酶 II ) 和各类转录因子提供了结合位点, 是启动基因转录的关键。
- ✧ flanking nucleosomes: 在这个核小体空缺区的上下游两侧, 则规律地排列着被核小体保护的 DNA 区段。紧邻 NFR 下游的第一个核小体常被称为+1 核小体, 上游的第一个则称为-1 核小体。



c) 样本相关性分析: 以  $5 \times 10^4$  细胞+100 U MNase 组为例



d) IGV 覆盖图：正对照来自 <https://ngdc.cncb.ac.cn/nucmap/samples>.



## ➤ 附录 1: MNase Enzyme 滴定实验

🚦 哺乳动物细胞的染色质状态存在差异, 为避免消化不足或过度, 建议进行 MNase Enzyme 滴定实验, 以获取清晰、特异的单核小体条带, 确保数据质量。

### 实验操作:

1. 同一细胞量, 请至少使用三个酶量梯度。

表 2. MNase Enzyme 酶量推荐表

起始细胞量	MNase Enzyme
$1 \times 10^5$	200 U/ $\mu$ l * 1 $\mu$ l
	150 U/ $\mu$ l * 1 $\mu$ l
	100 U/ $\mu$ l * 1 $\mu$ l
$5 \times 10^4$	150 U/ $\mu$ l * 1 $\mu$ l
	100 U/ $\mu$ l * 1 $\mu$ l
	80 U/ $\mu$ l * 1 $\mu$ l
$1 \times 10^4$	100 U/ $\mu$ l * 1 $\mu$ l
	60 U/ $\mu$ l * 1 $\mu$ l
	40 U/ $\mu$ l * 1 $\mu$ l

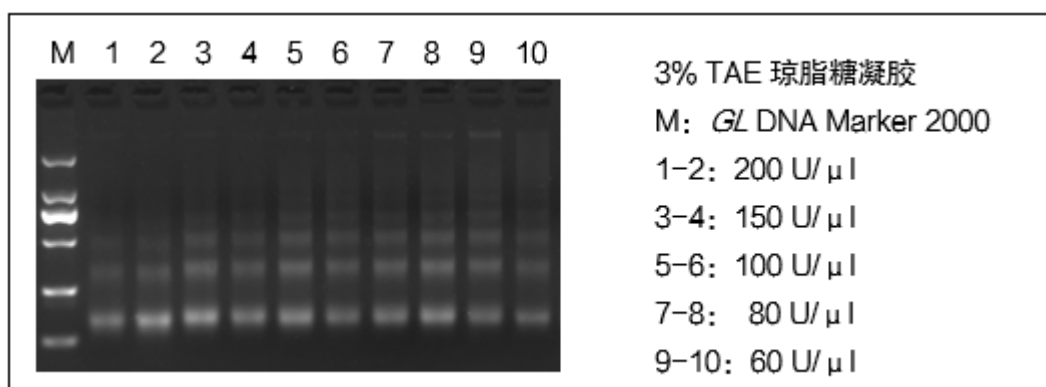
2. 具体实验操作请参见上述<操作方法>。
3. 根据琼脂糖凝胶电泳结果, 选择最适 MNase Enzyme 酶量, 用于后续实验。
4. 若首轮滴定结果显示 MNase Enzyme 的最适工作浓度与推荐参考值存在显著偏离, 则应根据该结果调整酶的浓度梯度设置, 以进行第二轮滴定验证。

**实验例：**

1. 现有目的细胞 GM12878, 需要绘制核小体图谱, 在正式实验前, 通过 MNase Enzyme 滴定实验, 选择实验中最适的 MNase Enzyme 酶量。

起始细胞量	MNase Enzyme
$5 \times 10^4$	200 U/ $\mu$ l * 1 $\mu$ l
	150 U/ $\mu$ l * 1 $\mu$ l
	100 U/ $\mu$ l * 1 $\mu$ l
	80 U/ $\mu$ l * 1 $\mu$ l
	60 U/ $\mu$ l * 1 $\mu$ l

2. 琼脂糖凝胶电泳检测结果如下：



3. 根据 MNase Enzyme 滴定结果, 初步认为 GM12878 细胞,  $5 \times 10^4$  细胞量的最适 MNase Enzyme 酶量为 150 U/ $\mu$ l ~ 100 U/ $\mu$ l。