Version 1

Code No. AG12716

AG12717

AccuNext ATAC-cFOOT-seq 单链 DNA 建库试剂盒（Illumina）

AccuNext ATAC-cFOOT-seq ssDNA Library Prep Kit 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 5
- 使用注意事项 5
- 实验前准备 6
- 操作方法 7

A. Nuclear Extraction Buffer 配制 7

B. 细胞核提取 7

a) 针对细胞样本 7

b) 针对动植物组织样本 7

C. 转座体片段化 8

D. 脱氨 9

E. 细胞核裂解与 DNA 提取 9

F. ssDNA 文库构建 10

G. 文库质量检测 15

- 参考文献 15
- 附录 1：1.0X 磁珠纯化方法 16
- 附录 2：*AccuNext* CDI 接头引物（Illumina，适用于 DNA 文库）的信息 17

➢ 产品概述

本产品是针对 Illumina 高通量测序平台研发的用于 ATAC-cFOOT-seq 文库构建的试剂盒，适用于起始量从 10^3~5×10^4 个细胞样本的转录因子（Transcription Factor）占位与染色质可及性联合分析。ATAC-cFOOT-seq 是将基于胞嘧啶脱氨酶的足迹检测技术 cFOOT-seq（**c**ytosine deaminase-based genomic **foot**printing assay by **seq**uencing）与 基于 Tn5 转座体的染色质可及性高通量测序技术 ATAC-seq（**A**ssay for **T**ransposase **A**ccessible **C**hromatin with high-throughput **seq**uencing） 联用的工作流程[1]，先通过 Tn5 转座体对开放染色质进行片段化并加上接头，再利用胞嘧啶脱氨酶将开放区域中未被转录因子或核小体保护的胞嘧啶（C）转化为尿嘧啶（U）；建库测序后，脱氨位点被读取为 C→T 转换，而 TF 结合区域因受到保护而呈现脱氨信号“凹陷”，从而在染色体开放区域内以接近单碱基的分辨率定位转录因子结合位点。该策略在保留稳健染色质可及性信息的同时实现转录因子足迹绘制，显著降低了足迹分析所需的测序深度，兼顾了成本与灵敏度。

本产品采用与 ATAC 兼容的脱氨酶足迹建库策略，实验流程为开放染色质富集、胞嘧啶脱氨酶脱氨反应、DNA 提取与单链 DNA 建库及测序等步骤。本产品具有起始量需求低、开放区富集稳健、测序成本可控等优势，适用于转录因子占位定量、染色质调控机制解析、细胞类型特异性调控网络比较以及单细胞水平应用等表观遗传学研究场景。

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	AG12716（4 rxns）	AG12717(12 rxns)
AccuNext Tn5 for cFOOT（Single）	8 μl	24 μl

Package 3-2 组分如下（4℃ 保存）：

组分名称	AG12716（4 rxns）	AG12717(12 rxns)
Protease Inhibitor Cocktail	4 μl	12 μl
DNA Clean Beads	1.2 ml	3.6 ml
10% SDS	20 μl	60 μl

Package 3-3 组分如下（-20℃ 保存）：

	组分名称	AG12716（4 rxns）	AG12717 (12 rxns)
ATAC 试剂	Cell Suspension Buffer	600 μl	900 μl X 2 pcs
	Lysis Buffer	200 μl	600 μl
	1% Digitonin	2 μl	6 μl
	Wash Buffer	800 μl	1.2 ml X 2 pcs
	2X Tn5 Reaction Buffer	100 μl	300 μl
	NSB Buffer	80 μl	240 μl
	Stop Buffer	1 ml X 2 pcs	1.5 ml X 4 pcs
cFOOT 试剂	DEA Enzyme Mix	16 μl	48 μl
	10X DEA Buffer	20 μl	60 μl
	CE Buffer	170 μl	510 μl
	Proteinase K（20 mg/ml）	10 μl	30 μl
	Nuclease free water	1 ml	1 ml
ssDNA 建库试剂	3' ssDNA Ligation Buffer	140 μl	420 μl
	3' ssDNA Ligase	28 μl	84 μl
	3' ssDNA Adapter	32 μl	96 μl
	ssDNA Extension Buffer	72 μl	216 μl
	ssDNA Extension Enzyme	8 μl	24 μl
	2X ATAC-cFOOT PCR Mix	200 μl	600 μl
	Bridge Primer F	10 μl	30 μl
	Bridge Primer R	10 μl	30 μl
	Nuclease free water	1 ml	1 ml

注意：*AccuNext* CDI 接头引物（Illumina，适用于 DNA 文库）（Code No. AG12529 / AG12530 / AG12531）为实验必须试剂，但本产品中未配置，需要单独购买，*AccuNext* CDI 接头引物（Illumina，适用于 DNA 文库）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

本产品在 Lysis Buffer 的作用下裂解细胞膜并透化细胞核，随后利用 Tn5 转座体优先在开放染色质区域进行片段化并连接接头，完成开放染色质区域的富集。紧接着，利用胞

嘧啶脱氨酶（cytosine deaminase）对富集后的开放区域进行脱氨标记，脱氨酶可特异性地将开放染色质中暴露的胞嘧啶（C）转化为尿嘧啶（U），而由转录因子结合或核小体占据所保护的 DNA 区域，其胞嘧啶不被脱氨。

脱氨反应完成后，经提取纯化 DNA，并构建单链 DNA 文库，使其成为两端带有 Illumina 平台可识别序列的文库结构。测序后，通过比对基因组位置（Genomic position）并计算各区域的“Conversion rate（转化率）”，由于转录因子结合处呈现明显的低转化率“足迹（footprint）”，可通过分析这一单碱基分辨率的胞嘧啶转化模式，精准推断转录因子（TF）的占据情况及染色质的高级结构。

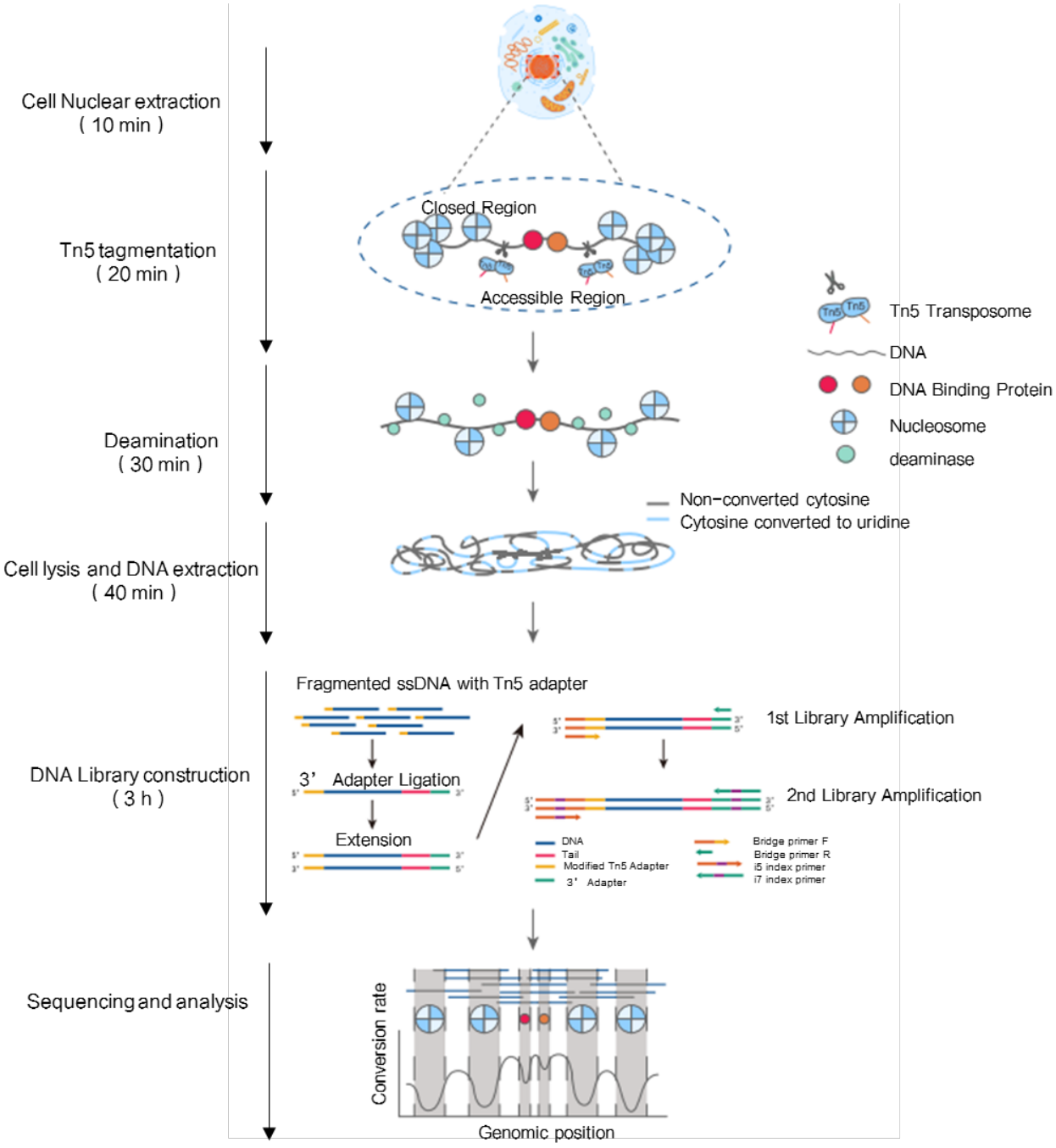


图 1 文库构建原理图

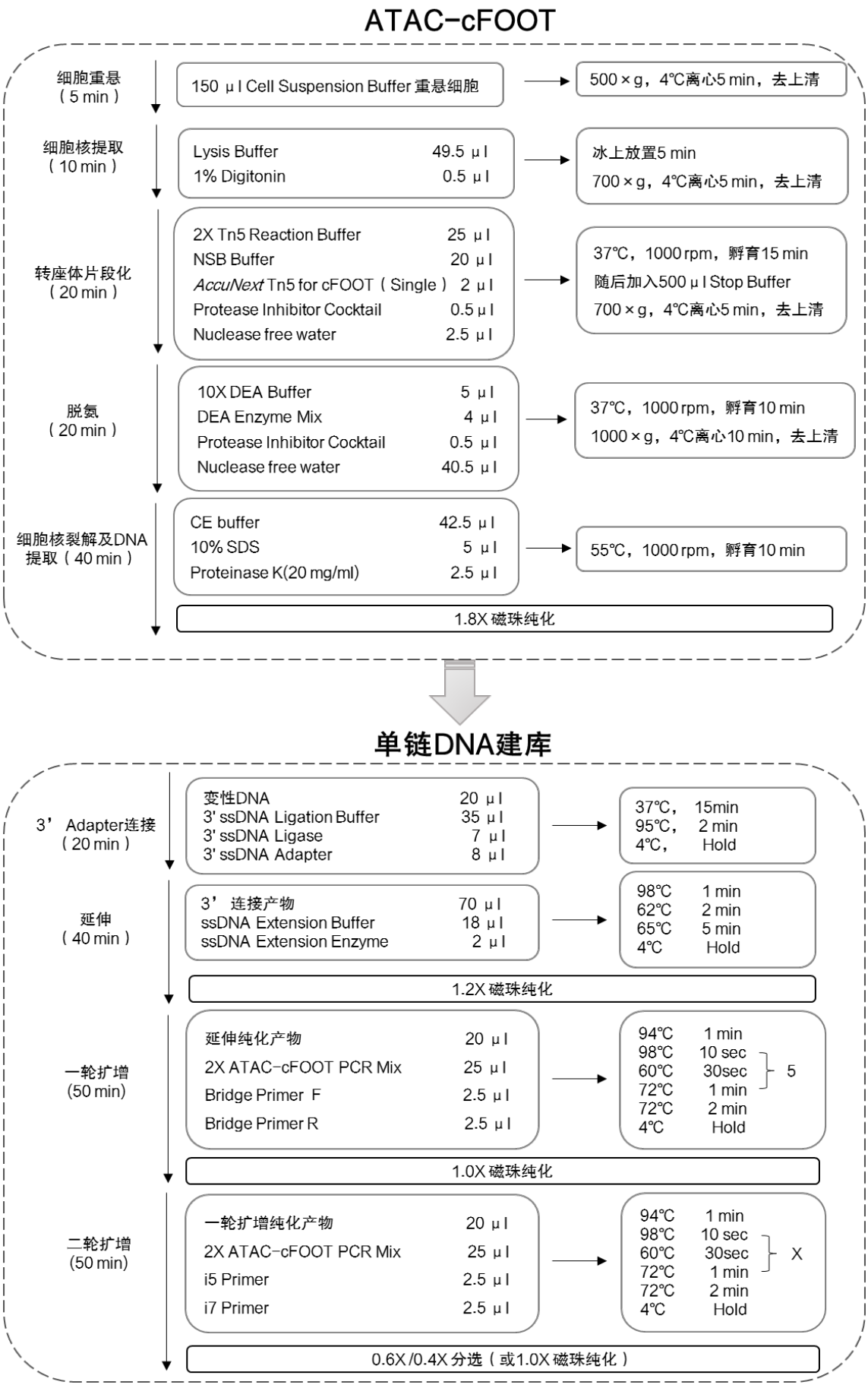

ATAC-cFOOT
细胞重悬
（5 min）
150 μl Cell Suspension Buffer 重悬细胞
500×g，4℃离心5 min，去上清
细胞核提取
（10 min）
Lysis Buffer 49.5 μl
1% Digitonin 0.5 μl
冰上放置5 min
700×g，4℃离心5 min，去上清
转座体片段化
（20 min）
2X Tn5 Reaction Buffer 25 μl
NSB Buffer 20 μl
AccuNext Tn5 for cFOOT（Single） 2 μl
Protease Inhibitor Cocktail 0.5 μl
Nuclease free water 2.5 μl
37℃，1000 rpm，孵育15 min
随后加入500 μl Stop Buffer
700×g，4℃离心5 min，去上清
脱氨
（20 min）
10X DEA Buffer 5 μl
DEA Enzyme Mix 4 μl
Protease Inhibitor Cocktail 0.5 μl
Nuclease free water 40.5 μl
37℃，1000 rpm，孵育10 min
1000×g，4℃离心10 min，去上清
细胞核裂解及DNA提取（40 min）
CE buffer 42.5 μl
10% SDS 5 μl
Proteinase K(20 mg/ml) 2.5 μl
55℃，1000 rpm，孵育10 min
1.8X 磁珠纯化
单链DNA建库
3’ Adapter连接
（20 min）
变性DNA 20 μl
3' ssDNA Ligation Buffer 35 μl
3' ssDNA Ligase 7 μl
3' ssDNA Adapter 8 μl
37℃， 15min
95℃， 2 min
4℃， Hold
延伸
（40 min）
3’ 连接产物 70 μl
ssDNA Extension Buffer 18 μl
ssDNA Extension Enzyme 2 μl
98℃ 1 min
62℃ 2 min
65℃ 5 min
4℃ Hold
1.2X 磁珠纯化
一轮扩增
(50 min)
延伸纯化产物 20 μl
2X ATAC-cFOOT PCR Mix 25 μl
Bridge Primer F 2.5 μl
Bridge Primer R 2.5 μl
94℃ 1 min
98℃ 10 sec
60℃ 30sec
72℃ 1 min
72℃ 2 min
4℃ Hold
5
1.0X 磁珠纯化
二轮扩增
(50 min)
一轮扩增纯化产物 20 μl
2X ATAC-cFOOT PCR Mix 25 μl
i5 Primer 2.5 μl
i7 Primer 2.5 μl
94℃ 1 min
98℃ 10 sec
60℃ 30sec
72℃ 1 min
72℃ 2 min
4℃ Hold
X
0.6X/0.4X 分选（或1.0X 磁珠纯化）

图 2 实验流程图

➢ 产品优势

1. **单碱基分辨率：**可实现单碱基分辨率，用于精细解析开放染色质区域，识别调控元件与转录因子结合位点。
2. **ssDNA 单链建库方案：**采用 ssDNA 单链建库方案，提升数据有效性与文库质量。
3. **多物种适配：**适用于多物种开放染色质与转录因子足迹研究，应用范围广。
4. **多组学信息获取：**可同时获取染色质开放性与转录因子足迹等信息。
5. **低样本起始量：**可支持低至 1000 个细胞起始量的样本建库，适用于稀有样本研究。
6. **高重复性：**实验结果具有高度的重复性与一致性，批次差异较小，数据稳定可靠。
7. **Illumina 测序平台适配：**已整合 Index 与 Illumina 接头，构建的 DNA 文库可直接用于 Illumina 平台 NGS 测序。

➢ 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 10^3~5×10^4 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 5×10^4 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 会大量暴露出来，这些暴露的 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. 实验操作要求

- 进行细胞核提取、转座体片段化及脱氨操作时，需要注意避免细胞核丢失，离心时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，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率。
- 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 进行文库长度分布检测。

6. 测序数据分析

- 建议测序先测 1G 数据量，初步分析胞嘧啶（C）脱氨率和 TSS 区域脱氨率确认数据质量，一般建议胞嘧啶（C）脱氨率 20%-50%。若满足要求，后续再加测 30G 数据量。

➢ 实验前准备

1. 试剂 & 耗材：

- Illumina 测序接头引物：*AccuNext* CDI 接头引物（Illumina，适用于 DNA 文库）（Code No. AG12529 / AG12530 / AG12531）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）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。
- 其他材料：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、热振荡仪。

➢ 操作方法

- 本产品适用于 10^3~5×10^4 起始量的细胞，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 Cell Suspension Buffer、Lysis Buffer、1% Digitonin 室温解冻，混匀后短暂离心。
- 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，500x g 4℃离心 5 min，弃上清，轻弹管底混匀。

   （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 150 μl 预冷的 Cell Suspension Buffer 重悬细胞（轻弹管底混匀），2300rpm（500 x g）4℃离心 5 min，弃上清。
4. 轻弹管底混匀细胞沉淀，加入预冷的 50 μl Nuclear Extraction Buffer，轻弹管底混匀，冰上放置 5 min，700 x g，4℃离心 5 min，弃上清（可先用 100 μl 的移液器去除 45 μl 上清，保留不超过 5 μl 的液体，此时可按照步骤 **< C. 转座体片段化 >** 配制 **Transposome mix**），后续直接进行转座体片段化反应。

   （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提取试剂盒或方法提取获得细胞核【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. 取实验所需对应数量的细胞核（如果量足够的情况下，建议使用 1×10^4~5×10^4 个细胞核）于 1.5 ml 离心管中，加入 200 µl Wash Buffer，500 x g 4℃离心 5 min，弃上清（保留不超过 5 µl 的液体，此时可按照步骤 **< C. 转座体片段化 >** 配制 Transposome mix），后续直接进行转座体片段化反应。

（注意：细胞核离心之后，一般无法看到沉淀，因此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进行< C. 转座体片段化 > 步骤，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 for cFOOT（Single）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
2X Tn5 Reaction Buffer	25 µl
NSB Buffer	20 µl
AccuNext Tn5 for cFOOT（Single）	2 µl
Protease Inhibitor Cocktail	0.5 µl
Nuclease free water	2.5 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 次，立刻放置于预热好的热振荡器中，37℃、1000 rpm 反应 15 min，进行片段化反应。

（注意：1.吹打时要轻柔缓慢，不要产生气泡，避免对细胞核造成损失；2.可在反应期间进行 Deamination mix 配制，步骤详见<D. 脱氨>。）

3. 反应结束后立即取出，先置于冰上，抑制酶活反应。
4. 加入 500 µl 预冷的 Stop Buffer，颠倒混匀数次，700 × g、4℃ 的离心 5 min，去上清，轻弹管底。

（注意：为减少样本损失，可先用 1 ml 的移液器去除 450 µl 上清，再 700 × g、4℃ 的离心 1 min，用 100 µl 移液器去尽上清。）

5. 立即进行 **< D. 脱氨>** 步骤。

D. 脱氨

- 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 DEA Enzyme Mix 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 **Deamination mix**，轻柔混匀后放置于冰上备用。

组分	反应体系
10X DEA Buffer	5 μl
DEA Enzyme Mix	4 μl
Protease Inhibitor Cocktail	0.5 μl
Nuclease free water	40.5 μl
Total	50 μl

2. 加入 50 μl Deamination Mix，轻弹管底混匀。
3. 立刻放置于预热好的热振荡器中，37℃、1000 rpm 反应 10 min。
4. 反应结束后，立即置于冰上，随后 1000×g，4℃离心 10 min，去上清。

（注意：可保留少量液体，减少细胞核损失。）

5. 立即进入<E. 细胞核裂解与 DNA 提取>。

E. 细胞核裂解与 DNA 提取

实验前准备：

- 将 CE Buffer、10% SDS 短暂离心并混匀，室温放置备用（确认 10% SDS 无沉淀再使用）；Proteinase K 短暂离心，使用移液器轻柔吹打混匀，冰上放置备用。
- 每次实验前，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 DNA Clean Beads 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. 按照下表室温配制细胞核裂解液：

组分	反应体系
CE Buffer	42.5 μl
10% SDS	5 μl
Proteinase K（20 mg / ml）	2.5 μl
Total	50 μl

（注意：配制好的细胞核裂解液室温放置备用，请勿冰上放置，否则会有沉淀析出。若有沉淀析出，可 37℃加热或手握化至沉淀完全溶解再用于后续步骤。）

2. 取 50 μl 上述配制好的细胞核裂解液加入到<D. 脱氨>结束后的细胞沉淀中，放入热振荡器中，55℃、1000 rpm 反应 10 min（或者室温孵育 30 min）。
3. 孵育结束后，加入 90 μl DNA Clean Beads（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。

（注意：随着样本投入量的增加，加入磁珠后可能出现絮状物，这属于正常现象，只要保证磁珠被充分洗脱，并不会影响后续的实验结果。）

4. 将离心管置于磁力架上，待溶液澄清后（约 2~5 min），小心移除上清（**勿吸到磁珠**）。
5. 保持离心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。
6. 重复步骤 5）一次。
7. 保持离心管始终置于磁力架上，开盖干燥磁珠 3 ~ 5 min 至无乙醇残留。
   (注意：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. 磁珠晾干后，将离心管从磁力架上取下，加入 21 μl Nuclease free water 覆盖磁珠，使用移液器吹打 10 次充分混匀磁珠，室温孵育 5 min（如果磁珠干燥开裂，适当延长孵育时间）。
9. 将离心管短暂离心，置于磁力架上，直到溶液澄清 (2~5 min)。
10. 小心吸取 20 μl 上清转移到新的 PCR 管中（勿吸到磁珠），直接进行后续的 ssDNA 文库构建或-20℃短暂保存（建议尽快进行文库扩增，避免长期保存导致 DNA 降解）。

F. ssDNA 文库构建

1. DNA 变性

1）将 **< E. 细胞核裂解与 DNA 提取 >** 步骤 10）中的 20 μl DNA 使用 95℃加热 2 min，结束后立刻放到冰上至少 2 min 备用。

2. 3' Adapter 连接

1）室温解冻 3' ssDNA Ligation Buffer 和 3' ssDNA Adapter，上下颠倒混匀后备用。3' ssDNA Ligase 放在冰上备用。

2）按照下表配制 3' Adapter Ligation Mix：

组分	反应体系
3' ssDNA Ligation Buffer	35 μl
3' ssDNA Ligase	7 μl
3' ssDNA Adapter	8 μl
Total	50 μl

3）将配制好的 50 μl 的 3' Adapter Ligation Mix 加入已变性的 20 μl DNA 中，用移液器轻轻吹打混匀后短暂离心，将反应液收集至管底。

4）将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行下述反应：

温度	时间
37℃	15 min
95℃	2 min
4℃	Hold

3. 延伸

1） 室温解冻 ssDNA Extension Buffer 上下颠倒混匀后备用。ssDNA Extension Enzyme 放在冰上备用。

2） 按照下表配制延伸 Mix：

组分	反应体系
2.4 连接后的产物	70 μl
ssDNA Extension Buffer	18 μl
ssDNA Extension Enzyme	2 μl
Total	90 μl

3）使用移液器轻轻吹打混匀后短暂离心，将反应液收集至管底。

4）将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行下述反应：

温度	时间
98℃	1 min
62℃	2 min
65℃	5 min
4℃	Hold

5）反应完成后，使用 1.2X DNA Clean Beads 对反应产物进行纯化。

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

a. 加入 108 μl DNA Clean Beads 于 90 μl 延伸产物中（磁珠：样品的比例为 1.2：1），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。

b. 将 PCR 管置于磁力架上，待溶液澄清后（约 2~5 min），小心移除上清（**勿吸到磁珠**）。

c. 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。

d. 重复步骤 c）一次。

e. 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。

(注意：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。)

f. 磁珠晾干后，将 PCR 管从磁力架上取下，加入 21 μl Nuclease free water 覆盖磁珠，使用移液器吹打 10 次充分混匀磁珠，室温孵育 5 min（如果磁珠干燥开裂，适当延长孵育时间）。

g. 将 PCR 管短暂离心，置于磁力架上，直到溶液澄清 (2~5 min)。

h. 小心吸取 20 μl 上清转移到新的 PCR 管中（勿吸到磁珠），直接进行后续的一轮扩增。

4. Bridge 引物扩增（一轮扩增）

1）将 2X ATAC-cFOOT PCR Mix 解冻后颠倒混匀。

2）按照下表配制 PCR Mix：

组分	反应体系
3.5 纯化产物	20 μl
2X ATAC-cFOOT PCR Mix	25 μl
Bridge Primer F	2.5 μl
Bridge Primer R	2.5 μl
Total	50 μl

3）用移液器吹打混匀后短暂离心，将反应液收集至管底。

4）将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行下述反应：

温度	时间	循环数
94℃	1 min	1
98℃	10 sec	5
60℃	30 sec	
72℃	1 min	
72℃	2 min	1
4℃	Hold	-

5）反应完成后，使用 1X DNA Clean Beads 对反应产物进行纯化。

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

a. 加入 50 μl DNA Clean Beads 于 50 μl PCR 产物中（磁珠：样品的比例为 1：1），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。

b. 将 PCR 管置于磁力架上，待溶液澄清后（约 2~5 min），小心移除上清（**勿吸到磁珠**）。

c. 保持 PCR 管始终处于磁力架上，加入 200μl 80%乙醇漂洗，室温孵育 30 sec，小心移除上清。

d. 重复步骤 c）一次。

e. 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。**(注意：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。)**

f. 磁珠晾干后，将 PCR 管从磁力架上取下，加入 21μl Nuclease free water 覆盖磁珠，使用移液器吹打 10 次充分混匀磁珠，室温孵育 5 min（如果磁珠干燥开裂，适当延长孵育时间）。

g. 将 PCR 管短暂离心，置于磁力架上，直到溶液澄清 (2~5 min)。

h. 小心吸取 20μl 上清转移到新的 PCR 管中（勿吸到磁珠），直接进行后续的二轮扩增。

5. Index 引物扩增（二轮扩增）

1）按照下表配制 PCR Mix：

组分	反应体系
上一步纯化产物	20μl
2X ATAC-cFOOT PCR Mix	25μl
i5 Index Primer（25μM）*	2.5μl
I7 Index Primer（25μM）*	2.5μl
Total	50μl

*：i5 / i7 Index Primer 是带有 illumina 测序接头的引物【可使用 *AccuNext* CDI 接头引物（Illumina，适用于 DNA 文库）（Code No. AG12529 / AG12530 / AG12531）】。

2）用移液器吹打混匀后短暂离心，将反应液收集至管底。

3）将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行下述反应：

温度	时间	循环数
94℃	1 min	1
98℃	10 sec	X*
60℃	30 sec	
72℃	1 min	
72℃	2 min	1
4℃	Hold	-

*：下表 1 是根据 K562 细胞摸索出的细胞量与文库扩增循环数关系表，不同细胞，建议实验前对循环数进行摸索，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，避免过度扩增导致偏好性增加、重复性增加、嵌合体增加等不良效果。

表 1. PCR 循环数推荐表

起始细胞量	扩增循环数（cycles）
50000	6~8
10000	7~9
5000	8~10
1000	11~13

4）反应完成后，使用磁珠进行 DNA 片段分选，以下步骤是以本试剂盒中的 DNA Clean Beads 为例，按照 **0.6X 和 0.4X 磁珠**比例进行 2 轮分选，获得 200~700 bp 的片段【若扩增产物无明显大片段残留，为了方便，也可进行 1.0X 磁珠纯化。步骤可参考**<附录 1：1.0X 磁珠纯化>**】。

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

a. 取 30 μl DNA Clean Beads 于 50 μl PCR 产物中（磁珠：样品的比例为 0.6：1），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。

b. 将 PCR 管置于磁力架上，待溶液澄清后（约 2~5 min），小心将上清转移至新的 PCR 管中（**勿吸到磁珠**），丢弃磁珠。

c. 向上清中加入 20 μl DNA Clean Beads（磁珠：样品的比例为 0.4：1），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。

d. 将 PCR 管置于磁力架上，待溶液澄清后（约 2~5 min），小心移除上清（**勿吸到磁珠**）。

e. 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。

f. 重复步骤 e）一次。

g. 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。**(注意：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。）

h. 磁珠晾干后，将 PCR 管从磁力架上取下，加入 21 μl Nuclease free water 覆盖磁珠，使用移液器吹打 10 次充分混匀磁珠，室温孵育 5 min（如果磁珠干燥开裂，适当延长孵育时间）。

i. 将 PCR 管短暂离心，置于磁力架上，直到溶液澄清（2~5 min)。

j. 小心吸取 20 μl 上清转移到低吸附 1.5 ml tube 中（勿吸到磁珠），进行文库质量检测或-20℃保存，产物可直接送测序。

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. 5067-1506）检测文库的分布范围。具体操作请参照说明书。
3. 成功的 ATAC-cFOOT 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。

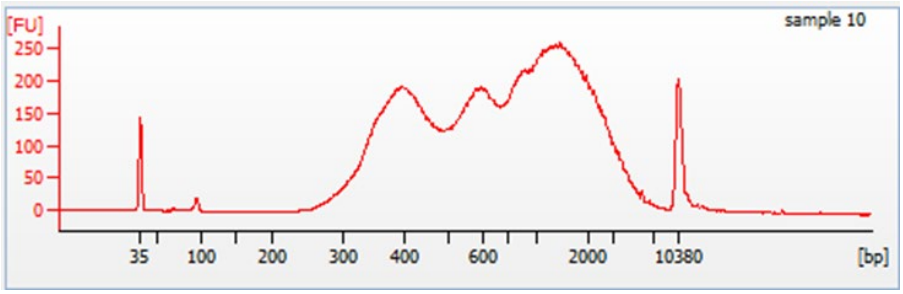


图 3. Agilent 2100 Bioanalyzer 文库长度检测

➢ 参考文献

[1] Wang, H., Wu, A., Yang, M.C., Zhou, D., Chen, X., Shi, Z., Zhang, Y., Liu, Y.X., Chen, K., Wang, X., et al. (2025). Genome-wide investigation of transcription factor footprints and dynamics using cFOOT-seq. Protein Cell 16, 932-952.

➢ 附录 1：1.0X 磁珠纯化方法

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 400μl。
- 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. 加入 50μl DNA Clean Beads 于 50μl PCR 产物中（磁珠：样品的比例为 1：1），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，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 200μl 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。
   (注意：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 21μl Nuclease free water 覆盖磁珠，使用移液器吹打 10 次充分混匀磁珠，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，直到溶液澄清 (2~5 min)。小心转移 20μl 上清到低吸附 1.5 ml tube 中（勿吸到磁珠），进行文库质量检测或-20℃保存，产物可直接送测序。

➢ 附录 2：*AccuNext* CDI 接头引物（Illumina，适用于 DNA 文库）的信息

i5 Index Primer

5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC **[i5 Index]** ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT- 3'

i7 Index Primer

5' -CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT **[i7 Index]** GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT- 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
i5 index Primers	D501	TATAGCCT	TATAGCCT	AGGCTATA
	D502	ATAGAGGC	ATAGAGGC	GCCTCTAT
	D503	CCTATCCT	CCTATCCT	AGGATAGG
	D504	GGCTCTGA	GGCTCTGA	TCAGAGCC
	D505	AGGCGAAG	AGGCGAAG	CTTCGCCT
	D506	TAATCTTA	TAATCTTA	TAAGATTA
	D507	CAGGACGT	CAGGACGT	ACGTCCTG
	D508	GTACTGAC	GTACTGAC	GTCAGTAC
i7 index Primers	D701	CGAGTAAT	ATTACTCG	
	D702	TCTCCGGA	TCCGGAGA	
	D703	AATGAGCG	CGCTCATT	
	D704	GGAATCTC	GAGATTCC	
	D705	TTCTGAAT	ATTCAGAA	
	D706	ACGAATTC	GAATTCGT	
	D707	AGCTTCAG	CTGAAGCT	
	D708	GCGCATTA	TAATGCGC	
	D709	CATAGCCG	CGGCTATG	
	D710	TTCGCGGA	TCCGCGAA	
	D711	GCGCGAGA	TCTCGCGC	
	D712	CTATCGCT	AGCGATAG	