

**Hieff NGS[®] ATAC-Seq Library Prep Kit
for Illumina[®]
ATAC 建库试剂盒**

12208ES

产品使用说明书

Ver. CN20240618

目录

产品简介	1
产品信息	1
组分信息	1
使用说明	1
注意事项	6

产品简介














Hieff NGS® ATAC-Seq Library Prep Kit for Illumina®是针对 Illumina®高通量测序平台研发的用于 ATAC-Seq 实验的文库构建试剂盒，适用于 100-100,000 个细胞起始量的样本建库。ATAC-Seq(Assay for Transposase Accessible Chromatin with high-throughput sequencing)技术能够利用 Tn5 转座酶识别染色质开放区域，快速有效的反映表观遗传状态。经过细胞收集及裂解、转座酶片段化、磁珠回收片段化 DNA、文库扩增和磁珠分选等步骤，DNA 片段最终转化为适用于 Illumina®平台测序的文库。

本试剂盒包含两个独立模块：BOX-I 和 BOX-II。BOX-I 为提取 DNA 的 DNA Extract Beads 和回收文库的 DNA Clean Beads，BOX-II 包含细胞裂解、片段化以及后续文库扩增所需的所有试剂。此外，本试剂盒已在不同种类样本(如 K562、MCF-7 细胞，小鼠肝脏等)中进行了验证，均具有良好的建库效率和建库产量。本试剂盒提供的所有试剂都经过严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了文库的稳定性和重复性。

产品信息

货号	12208ES04 / 12208ES12 / 12208ES48
规格	4 T / 12 T / 48 T

组分信息

组分编号	组分名称	12208ES04	12208ES12	12208ES48
BOX I	12208-A  Wash Buffer	266 μL	798 μL	3192 μL
	12208-B  Terminate Solution	20 μL	60 μL	240 μL
	12208-C  DNA Extract Beads	520 μL	1560 μL	6.24 mL
	12208-D  DNA Clean Beads	310 μL	930 μL	3.72 mL
BOX II	12208-E  Suspension Buffer	194 μL	582 μL	2.328 mL
	12208-F  1% Digitonin	4 μL	12 μL	48 μL
	12208-G  10% Tween-20	4 μL	12 μL	48 μL
	12208-H  10% NP40	2 μL	6 μL	24 μL
	12208-I  Reaction Buffer	100 μL	300 μL	1.2 mL
	12208-J  Transposome Mix	8 μL	24 μL	96 μL
	12208-K  Canace® Pro Amplification Mix	100 μL	300 μL	1.2 mL
	12208-L  N5 (N501)*	4 μL	-	-
	12208-M  N7 (N701)*	4 μL	-	-

注意：*测序时 Index 序列 N501-ATAGAGAG，N701-TAAGCGCA。

储存条件

BOX-I: 2~8°C保存，BOX-II: -25~-15°C保存，**切不可弄错!** 有效期 1 年。

使用说明

一、细胞准备

1. 在室温条件下收集细胞并计数，死亡的细胞染色质松散，暴露出大量的裸 DNA，这些 DNA 更容易被转座酶复合物识别转座，随机切割会造成比较强的噪音信号，建议样本细胞活性不低于 90% (细胞活性可以用台盼蓝染色来鉴定)。

2. 贴壁较紧的细胞如 Hela 细胞等可用 Accutase 或者 Trypsin 部分消化获得。
3. 植物或真菌细胞可通过特殊处理获得原生质体或细胞核进行实验。

二、操作流程

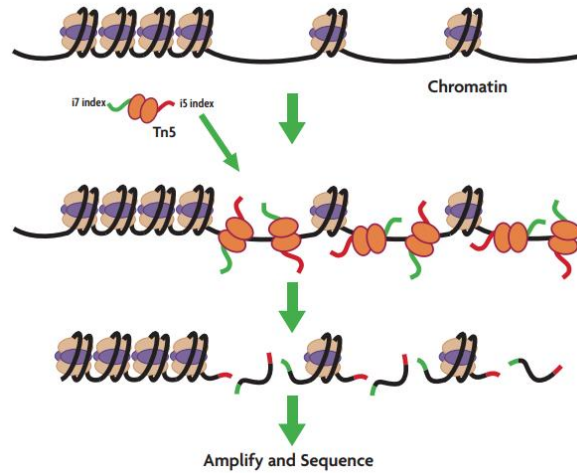


图 1 ATAC-seq 试剂盒原理

ATAC-seq 技术是通过转座酶识别开放染色质，转座时将转座子两端的接头序列 Adapter 1 和 Adapter 2 插入靶 DNA 的两端，形成一端带有 Adapter 1，一端带有 Adapter 2 的 DNA，之后利用 DNA 聚合酶将转座形成的切口补齐。这种产物经 N5 (N5XX) 和 N7 (N7XX) 引物扩增，产物经纯化和分选后即可为可测序文库。对文库进行测序后的数据分析即可得到开放染色质区域的全基因组图谱。

三、操作步骤

3.1 溶液配制 (0.5 h)

【注】：含有 Digitonin 的缓冲液不可长期保存，请根据实际样本数量现配现用，配制的 buffer 4°C 放置。本操作中溶液配制量为单个样本单次实验所需的 buffer 用量，请根据实际样本数调整 buffer 配制量。

1. 提前 10 min 取出 Suspension Buffer、10 % Tween-20、10 % Nonidet P40 Substitute 和 1 % Digitonin、Reaction Buffer 室温解冻，混匀后瞬离。Terminate Solution 室温放置，确保使用前无沉淀，若有沉淀，37°C 加热混匀。
2. 将离心机提前 4°C 预冷。
3. Lysis Buffer：于无菌 PCR 管中，依据表 1 所示体系配制 Lysis Buffer，配制好后冰上放置。

表 1 Lysis Buffer 体系

名称	体积 (μL)
Suspension Buffer	48.5 μL
10 % Tween-20	0.5 μL
10 % NP40	0.5 μL
1 % Digitonin	0.5 μL
Total	50 μL

3.2 细胞收集及裂解 (0.5 h)

1. 在室温下收获细胞并计数，取实验所需数量的细胞于 1.5 mL EP 管中，4°C 2,300 rpm (500 × g) 离心 5 min，吸净管内溶液。

【注】：对于大小不同的细胞，请根据实际情况调整离心力。

2. 每个样本加入 50 μL 预冷的 Wash Buffer 重悬细胞，4°C 2,300 rpm (500 × g) 低速离心 5 min，吸净管内溶液。

3. 每个样本中加入 50 μ L Lysis Buffer, 轻轻吹打重悬, 冰上放置 5 min, 4 $^{\circ}$ C, 2,300 rpm (500 \times g)离心 5 min, 去除上清。

【注】: 此步很关键, 需要注意小心的去除 Lysis Buffer, 不要造成细胞核的损失, 建议不要完全吸干净液体, 可保留不超过 5 μ L 的液体。可以在这步配制后续的 Transposition Mix。

4. 直接进行后续的转座反应。

【注】: 处理好的细胞核应及时加入 Transposition Mix 进行片段化反应, 否则细胞核长时间暴露于空气中, 可能会导致细胞核损伤, 后续建库出现高的背景噪音。

3.3 转座酶片段化 (0.5 h-1 h)

于无菌 PCR 管中配制表 2 所示反应体系, 配制好后冰上放置。

表 2 Transposition Mix 反应体系

名称	体积 (μ L)
Reaction Buffer	25 μ L
Transposome Mix	2 μ L
Wash Buffer	16.5 μ L
1% Digitonin	0.5 μ L
10% Tween-20	0.5 μ L
Nuclease-free ddH ₂ O	Up to 50 μ L

2. 将配制好的 Transposition Mix 加入到处理好的细胞核中, 使用移液器轻轻吹打 5-8 次混匀。

【注】: 吹打时尽量轻柔缓慢, 不要产生气泡, 否则会对细胞核造成损伤。也不要离心, 否则会导致细胞核聚集, 导致片段化不充分。

3. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中, 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 $^{\circ}$ C	On
37 $^{\circ}$ C	30 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

4. 将反应结束后的 PCR 管瞬离, 立即向每个样本中加入 5 μ L 的 Terminate Solution, 用移液器轻柔吹打 20 次混匀, 室温静置 5 min。

3.4 基因组 DNA 回收 (0.5 h)

1. 将平衡至室温的 DNA Extract Beads 磁珠, 涡旋振荡混匀。

2. 吸取 130 μ L DNA Extract Beads 至 55 μ L 终止后的片段化产物中, 涡旋混匀或用移液器吹打混匀 10 次, 室温静置孵育 5 min。

2. 短暂离心, 将离心管置于磁力架上静置 3 min, 待磁珠完全贴壁后吸净 PCR 管中溶液。

3. 保持 PCR 管始终处于磁力架上, 从另一侧加入 200 μ L 80%乙醇, 避免直接冲洗磁珠, 静置 30-60 sec, 吸净 PCR 管中溶液。

4. 保持 PCR 管始终处于磁力架中, 再次加入 200 μ L 80%乙醇, 静置 30-60 sec, 吸净 PCR 管中溶液。

5. 保持 PCR 管始终处于磁力架中, 开盖空气干燥至磁珠刚刚出现龟裂(不超过 3 min)。

6. 从磁力架上取下 PCR 管, 加入 25 μ L ddH₂O, 并充分涡旋, 室温静置 5 min。

7. 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 3-5 min), 小心转移 23 μ L 上清至新的 PCR 管中, 进行后续的文库扩增或者-20 $^{\circ}$ C保存。

3.5 文库扩增 (0.5 h-1h)

1. 将表 4 中试剂解冻后颠倒混匀，瞬离后置于冰上备用。
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 (μL)
步骤 3.4 纯化产物	23
N5XX*	1
N7XX*	1
Canace® Pro Amplification Mix	25

【注】：*Hieff NGS® Tagment Index Kit for Illumina® (Cat#12416) 中提供多种 N5XX 和 N7XX，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*	---
98°C	1 min	---
98°C	10 sec	n cycles**
60°C	25 sec	
72°C	1 min	---
4°C	Hold	---

【注】：*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。

**实验中需根据建库起始细胞量、细胞类型和样本处理情况适当调整扩增循环数。不同起始量的细胞所使用的 PCR 循环数可参考表 6。

3.6 文库分选 (0.5 h)

由于起始细胞量以及不同种类细胞的染色质开放状态差异，文库大小可能存在不同的分布模式。通过磁珠分选，文库中的大片段可以有效去除，使得文库片段分布在 200-700 bp 左右。

1. 进行双轮分选的比例推荐 0.55×/1.0×，吸取 27.5 μL (0.55×，Beads:DNA=0.55:1) 平衡至室温的 DNA Clean Beads 至步骤 3.5 的 PCR 反应产物中，涡旋混匀或用移液器吹打混匀 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(残留 3-5 μL，避免吸到磁珠)。
3. 涡旋振荡混匀 DNA Clean Beads 并吸取 50 μL (1.0×，Beads:DNA=1:1) 至上清中，涡旋混匀或移液器吹打混匀 10 次，室温静置孵育 5 min。
4. 短暂离心，将 PCR 管置于磁力架上静置 3 min，待磁珠完全贴壁后吸净 PCR 管中溶液。
5. 保持 PCR 管始终处于磁力架上，从另一侧加入 200 μL 80%乙醇，避免直接冲刷磁珠，静置 30-60 sec，吸净 PCR 管中溶液。
6. 保持 PCR 管始终处于磁力架上，再次加入 200 μL 80%乙醇，静置 30-60 sec，吸净 PCR 管中溶液。
7. 保持 PCR 管始终处于磁力架上，开盖空气干燥至磁珠刚刚出现龟裂(不超过 3 min)。
8. 从磁力架上取下 PCR 管，加入 21 μL ddH₂O，并充分涡旋，室温静置 5 min。

9. 将 PCR 管短暂离心，置于磁力架上分离磁珠和液体，待溶液澄清后(约 3-5 min)，小心转移 20 μ L 上清至新的 EP 管中，于-20 $^{\circ}$ C保存。

3.7 文库质量控制

通常情况下，对构建好的文库进行浓度和长度分布检测，具体请参见注意事项，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。

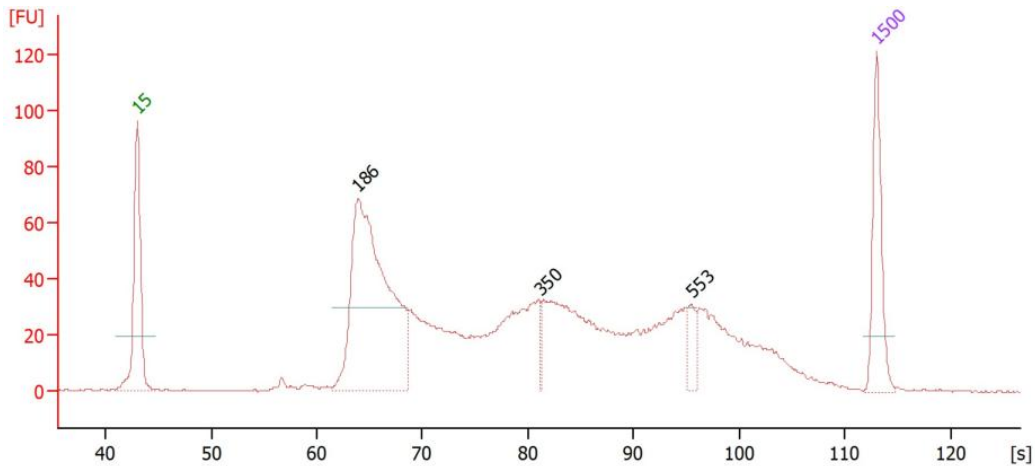


图 2 ATAC 文库 Agilent 2100 检测结果

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 170-200bp 左右，为核小体 Free 模型；后面出现的第二个峰为一个核小体模型，可能会出现两个核小体模型。如果酶量相对细胞过量，则文库可能只有核小体 Free 模型，即只有一个主峰。

注意事项

一、关于操作

1. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
2. 推荐在带热盖的 PCR 仪中进行各步骤反应，使用前应预热 PCR 仪至反应温度附近。
3. PCR 产物因操作不当极易产生气溶胶污染，进而影响实验结果准确性。推荐将 PCR 反应体系配制区和 PCR 产物纯化检测区进行强制性的物理隔离、配备文库构建专用移液器等设备以及定时对各实验区域进行清洁(推荐使用 ThermoFisher 公司的 DNAzap™ 高效核酸去除喷雾)，以保证实验环境的洁净度。
4. 操作细胞应尽量轻柔以保持细胞活性。
5. 试剂盒中试剂使用前需颠倒混匀，实验中配置 Buffer 需要上下颠倒混匀或是旋转仪混匀瞬间后使用。
6. 本产品仅用作科研用途。

二、应用范围

本试剂盒适用于细胞投入量为 100-100,000 个的 ATAC-Seq 研究。原则上，所有真核生物的新鲜样本或冻存样本都能适用于本试剂盒，但不同的样本类型需要进行不同的样本前处理(如组织样本、植物样本或者真菌样本的细胞核悬液制备)。

三、DNA Extract Beads 操作注意事项

1. 使用前将磁珠平衡至室温，请勿将磁珠置于 0°C 以下存放。
2. DNA Extract Beads 较粘稠，操作时请注意。
3. 高细胞投入量(超过 5 万细胞)在磁力架静置时，磁珠吸附较分散为正常现象，只要保证磁珠被充分洗脱，一般不会影响后续的建库实验。
4. DNA Extract Beads (DNA 提取)与下面的 DNA Clean Beads(文库纯化、分选)不同，在使用前请注意区分。
5. 其他注意事项同下(DNA Clean Beads)。

四、关于 DNA Clean Beads 分选 DNA

1. 磁珠使用前应先平衡至室温，否则会导致得率下降、分选效果不佳。
2. 请勿将磁珠置于 0°C 以下存放。
3. 磁珠每次使用前都应充分振荡混匀或使用移液器上下吹打充分混匀。
4. 转移上清时，请勿吸取到磁珠，即使枪头吸取微量磁珠都将影响后续文库质量。
5. 磁珠洗涤使用的 80%乙醇应现用现配，否则将影响回收效率。
6. 产物洗脱前应将磁珠置于室温干燥。干燥不充分容易造成无水乙醇残留影响后续反应；过分干燥又会导致磁珠开裂进而降低纯化得率。通常情况下，**室温干燥 3 min 足以让磁珠充分干燥。**
7. DNA 纯化或分选产物如需保存，可使用 0.1×TE Buffer 洗脱，产物于 2-8°C 可保存 2 天，-20°C 可保存 1 个月。

五、关于试剂

1. 不同的 Buffer 试剂应注意保存条件，避免失效。
2. Digitonin 有细胞毒性，且容易降解。在溶液配制过程中请做好个人防护。加入 Digitonin 的溶液应现配现用，在 4°C 放置不超过 2 天。

六、文库结构

Index 2 (i5)

5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC||||||TCGTTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-NNNNNN-CTGTCTCTTATACACATC
TCCGAGCCACGAGAC||||||ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

Index 1 (i7)

||||||: Index 2 (i5), 8 bases; |||||: Index 1 (i7), 8 bases; -NNNNNN-: 插入序列。

七、关于文库扩增

1. 本试剂盒中的文库扩增组分由本公司高保真 DNA 聚合酶所组成，大大增强了扩增的均一性，即使是低拷贝的基因，也能进行无偏好性地扩增。
2. 推荐使用本公司的 Hieff NGS[®] Tagment Index Kit for Illumina[®] (Yeasen Cat#12416) 模块进行文库扩增，该模块提供了 384 种不同组合的双端 index 文库制备引物，最大程度上保证了文库构建的稳定性和重复性。
3. 文库扩增步骤需要严格控制扩增循环数。循环数不足，将导致文库产量低；循环数过多，又将导致文库偏好性增加、重复度增加、大片段增多、嵌合产物增加、扩增突变积累等多种不良后果。表 6 列举了用 K562 细胞进行文库扩增时，细胞投入量、扩增循环数以及文库产量之间的关系。

表 6 细胞投入量与扩增循环数推荐表*

细胞投入量	PCR 循环数	文库产量 (ng/μL)
100,000	12-14	20-70
50,000	13-15	
10,000	14-16	
1,000	20-22	
100	21-23	

【注】：*建议在早期实验时，可以先投入 50,000 个细胞，摸索细胞数量与扩增循环数之间的关系，此外，不同类型细胞的产量也会有所区别。

八、关于文库质检

1. 通常情况下，构建好的文库可通过长度分布检测和浓度检测来进行质量评价。
2. 文库浓度检测可使用：基于双链 DNA 荧光染料的方法，如 Qubit[®]、PicoGreen[®] 等以及基于 qPCR 绝对定量的方法。
3. 文库长度分布检测，可通过 Qsep、Agilent Bioanalyzer 2100 等基于毛细管电泳或微控流原理的设备进行检测。

九、自备材料

1. 文库质检：Agilent 2100 Bioanalyzer DNA 1000 Chip/ High Sensitivity Chip 或其他等效产品、文库定量试剂。
2. 其他材料：无水乙醇、无菌超纯水、台盼蓝、常温离心机、低温冷冻离心机、显微镜、血球计数板、1.5mL 离心管、移液器及对应的低吸附枪头、PCR 管、磁力架、PCR 仪等。40 μm 细胞筛、无菌刀片、5cm 培养皿、PBS、组织匀浆器（用于组织样本）。
3. Hieff NGS[®] Tagment Index Kit for Illumina[®] (Cat#12416) 或其他替代引物。

十、问题解决指南

问题	可能的原因	建议
文库构建失败	实验过程中细胞核丢失	细胞核丢失：离心的时候将离心管的方向都调整为统一方向，弃上清时沿着沉淀的对侧面缓慢吸去，注意液体不要完全吸干。
测序结果背景噪音高	细胞活性低	用 DNase I 对细胞进行处理，可消化死细胞或者活性差的细胞释放出来的游离 DNA 或开放 DNA，降低背景噪音。
	实验过程中细胞核破裂	在处理细胞或者细胞核时，吹打要轻柔，可以用宽口枪头或者将枪头前端剪去 1cm 左右，不要剧烈涡旋振荡。实验中试剂尽量不要产生气泡，气泡破裂时会损伤细胞核，可能会导致最终的文库片段不呈典型的核小体分布。
线粒体 Reads 占比高	有些细胞裂解后，释放大 量线粒体 DNA，未弃干净	可以用含有 0.1% Tween-20 的 wash buffer 漂洗细胞核。



帮助客户创造价值，让世界更健康更快乐