

ATAC-Seq Kit Manual

(B6 版本)

货号: **53150**

Active Motif 中国

地址: 上海市静安区万渡航路 889 号

电话: (86)-21-20926090

邮箱: techchina@activemotif.com

版权所有 2020 Active Motif. Inc

本手册中的信息如有更改，恕不另行通知，也不构成 **Active Motif, Inc.** 的承诺。本手册按“原样”提供，无任何明示或暗示的担保。本手册中的信息可随时更改或更新。

未经 **Active Motif, Inc.** 事先书面同意，不得复制、转让、再复制、披露或复制本文件的全部或部分内容。本文件为专有信息，受美国版权法和国际条约的保护。

本文件的制造商为 **Active Motif, Inc.**

© 2020 **Active Motif, Inc.**，地址：1914 Palomar Oaks Way, Suite 150; Carlsbad, CA 92008。版权所有。

此处引用的所有商标、商号、服务标志或徽标均属于其各自的公司。

仅供科研实验使用，不可用于医学诊断。

目录

概述.....	1
试剂组分及储藏条件.....	2
ATAC-Seq Kit 试剂种类.....	2
额外所需耗材	3
ATAC-Seq 实验方法.....	4
组织样本的制备.....	4
细胞样本的制备.....	5
转座反应和纯化.....	5
转座后 DNA 的 PCR 扩增.....	7
Index 引物和 Sample sheet 信息.....	9
参考文献.....	9
故障排除指南	10

概述

2013 年首次报道染色质转座酶可及性测序（Transposase-Accessible Chromatin via Sequencing, ATAC-Seq）技术^[1]，该技术能够通过识别染色质开放区域快速有效的反映表观遗传状态。在这个过程中，经突变改造过的 Tn5 转座酶作用于完整的细胞核，Tn5 在转座（tagmentation）的过程中，能够片段化 DNA 的同时将测序接头连接在靶 DNA 的两头。

因为 ATAC-Seq 检测的快速性，简单性，敏锐性，以及样品的广泛适用性，现已是表观遗传学研究的重要实验技术，进一步，可为深入详细分析表观遗传学提供支持。ATAC-Seq Kit 试剂盒提供的试剂足够生产出 16 个独一无二的，适用于 illumina® 测序平台的文库。每一个 ATAC-Seq 文库的起始样本量可以是 20-30mg 组织或者 50,000-100,000 细胞。

ATAC-Seq 的优点：

- 评估染色质开放区域的表观特征
- 数小时内便能完成 NGS 的样本准备工作
- 简单且快速的三步法

产品名称	规格	货号
ATAC-Seq Kit	16rxn	53150

注意：此试剂仅限适用于科研实验，不可用于医学检测。

illumina® 是 illumina, Inc. 注册商标

试剂组分及储藏条件

此试剂所含试剂足够完成 16 个样本的 ATAC-Seq 实验对应的 NGS 文库构建。这些试剂涉及多种保存条件。ATAC-Seq 试剂盒分两个盒子两种温度运输，其中一个 -20°C 保存的盒子由干冰运输，另一个 4°C 保存的盒子常温运输。请依据本试剂盒推荐温度保存各试剂（详见下表），请妥善保管所有试剂，自收货之日起六个月稳定。

ATAC-Seq Kit 试剂种类

试剂名称	容量	储存条件
ATAC Lysis Buffer	17 ml	RT
Assembled Transposomes	170 µl	-20°C
2 × Tagmentation Buffer	425 µl	-20°C
1 × PBS	2 × 1 ml	-20°C or RT
10 × PBS	500 µl	RT
10% Tween 20	10 µl	RT
1 % Digitonin	10 µl	-20°C
DNA Purification Columns	16 个	RT
DNA Purification Binding Buffer	4.5 ml	RT
DNA Purification Wash Buffer	10 ml	RT
DNA Purification Elution Buffer	5 ml	RT
3 M Sodium Acetate	450 µl	RT
10 mM dNTPs	40 µl	-20°C
5 × Q5 Buffer	2 × 130 µl	-20°C
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (2U/µl)	10 µl	-20°C
i7 Indexed Primer1	10 µl	-20°C
i7 Indexed Primer2	10 µl	-20°C
i7 Indexed Primer3	10 µl	-20°C
i7 Indexed Primer4	10 µl	-20°C
i5 Indexed Primer1	10 µl	-20°C
i5 Indexed Primer2	10 µl	-20°C
i5 Indexed Primer3	10 µl	-20°C
i5 Indexed Primer4	10 µl	-20°C
SPRI Beads	1 ml	4°C

额外所需耗材

- 100% 乙醇
- 去离子水
- 台盼蓝
- 移液器及其相应的枪头
- 离心机
- 水平台式离心机
- 1.5 ml 离心管
- 300 μ l PCR 管
- 磁力架（或磁力条）
- 40 μ l 细胞筛（用于组织样本）
- 无菌手术刀片（用于组织样本）
- 5 cm 培养皿（用于组织样本）
- 15 ml 锥形管（用于组织样本）
- 预冷的 PBS（用于组织样本）
- Dounce 组织匀浆研磨器（用于组织样本）

ATAC-Seq 实验方法

注意：此实验方法适用于 20-30 mg 组织，或 50,000-100,000 个细胞。

组织样本的制备

此方法适用于单次 20-30 mg 组织样本。

SPRI 磁珠在使用前，请从 4°C 中取出，平衡至室温后使用。

1. 对于每个样品，将标记好的 5 cm 培养皿放置在冰上，同时准备 5 ml 预冷的 PBS 在 15 ml 离心管中。
2. 将样品转移至对应的培养皿中，用干净无菌的刀片将组织切碎后，用 1 ml 移液器转移切碎后的组织至含有 5 ml 预冷 PBS 的 15 ml 离心管中（枪头可用宽口枪头，或剪掉枪头前端 2 mm 左右，以防止堵塞）。
3. 4°C 下 500 × g 离心 5 min。
4. 吸出 PBS，加入 1 ml ATAC Lysis Buffer。
5. 用宽口枪头（或修剪过的枪头）转移匀浆样本至 1 ml Dounce 匀浆研磨器中，使用紧密配合的杵（B 型）缓慢均质化样品 30 次
6. 利用 40 μm 细胞筛过滤上一步的匀浆至 1.5 ml 离心管中，并立即取出 10 μl 过滤后的液体检测细胞数量。
7. 利用台盼蓝染液（细胞体积：0.4% 台盼蓝 = 1 : 1）在光学显微镜下检测细胞核数量和状态，只有细胞核能被台盼蓝着色。
8. 轻柔颠倒混匀细胞核悬液，吸取 50,000-100,000 的细胞核至新 1.5 ml 管中。
9. 4°C 下 500 × g 离心 5 min。在离心的过程中，请依据下表配制 Tagmentation Master Mix。

Tagmentation Master Mix(一个样品的用量)

试剂名称	用量
2 × Tagmentation Buffer	25 μl
10 × PBS	2 μl
1 % Digitonin	0.5 μl
10% Tween 20	0.5 μl
H ₂ O	12 μl
Assembled Transposomes	10 μl

10. 吸除上层液体，并立即开始转座反应（Tagmentation Reaction）和纯化步骤。

细胞样本的制备

SPRI 磁珠在使用前，请从 4°C 中取出，平衡至室温后使用。

1. 经计数后的细胞悬液，每个样品吸取 50,000-100,000 个细胞分别转移至新的 1.5 ml 离心管中。
2. 4°C 下 500 × g 离心 5 min。通常离心后能够看到细胞聚集在管底，若未见细胞聚集物，可再在 4°C 下 1000 × g 离心 5 min。
3. 轻柔的移除上层液体后，加入 100 μl 预冷的 PBS。不要重悬或扰动底层细胞团聚物。4°C 下 500 × g 离心 5 min。
4. 小心的移除上层液体，确保不要扰动底层细胞团聚物。加入 100 μl 预冷的 Lysis Buffer，并用移液枪完全吹打重悬细胞。
5. 转移重悬后的细胞至提前放在冰上的 PCR 管中。在 4°C 下 500 × g 离心 10 min。在离心的过程中，请依据下表配制 Tagmentation Master Mix。

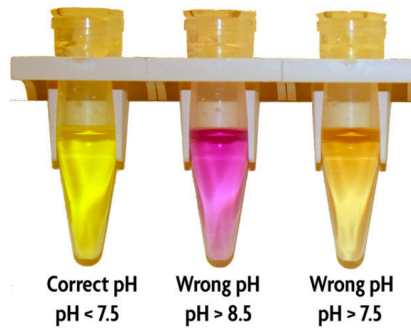
Tagmentation Master Mix(一个样品的用量)

试剂名称	用量
2 × Tagmentation Buffer	25 μl
10 × PBS	2 μl
1 % Digitonin	0.5 μl
10% Tween 20	0.5 μl
H ₂ O	12 μl
Assembled Transposomes	10 μl

6. 离心后，小心的移除上清，确认细胞核团聚物未被扰动（这步是关键步骤，需格外小心的去除 ATAC Lysis Buffer 但不造成细胞核的损失）。立即开始转座反应（Tagmentation Reaction）和纯化步骤。

转座反应（Tagmentation Reaction）和纯化

1. 每个样品中加入 50 μl Tagmentation Master Mix（不需要放置在冰上）。轻柔的吹打重悬细胞核在 Tagmentation Master Mix 中（样本多的情况下，可用排枪）。
2. 设置恒温混匀仪（或类似仪器）温度 37°C，转速 800 rpm，将样品放置在恒温混匀仪上孵育反应 30 min。
3. 反应结束后，立即将样品转移至干净的 1.5 ml 离心管中。
4. 每个样品各加入 250 μl DNA Purification Bind Buffer 和 5 μl 3 M 乙酸钠（sodium acetate）。
5. 若样品的颜色是亮黄色以外的颜色，请再加入 5 μl 3 M 乙酸钠直至样品变为亮黄色。请看下图（图一）。



图一 不同 pH 情况下的液体颜色

DNA Purification Binding Buffer 含有 pH 指示染料，所以样品溶液的 pH 很容易被分辨出来。只有当液体颜色是亮黄色时(图示左边管)，才说明 pH 在 7.5 以下。当 pH 高于 7.5 时，DNA 不能与纯化柱结合。注意：全彩图片可从 Active Motif 官网获得。

6. 吹打混匀各样品。
7. 对于每个样品，在收集管中放置一个 DNA 纯化柱。
8. 转移样品至对应的纯化柱中，关闭管盖， $17,000 \times g$ ($14,000 \text{ rpm}$) 离心 1 min。
9. 从收集管上取下纯化柱，弃废液后，将纯化柱放回收集管中。
注意：Wash Buffer 第一次使用时需要加入 100%乙醇，终浓度为 80% (DNA Purification Buffer 瓶中加入 40 ml 100%乙醇)。
10. 每管加入 750 μl Wash Buffer，并盖好管盖。
11. $17,000 \times g$ 离心 1 min。
12. 从收集管上取下纯化柱，弃废液后，将纯化柱放回收集管中。
13. 打开纯化柱的盖子， $17,000 \times g$ 离心 2 min 去除残留的 Wash Buffer。
14. 转移纯化柱至新的离心管中。
15. 在纯化柱的中心位置加入 35 μl DNA Purification Elution Buffer，关闭管盖，室温放置 1 min。
16. $17,000 \times g$ 离心 1 min。
17. 丢弃纯化柱，DNA 纯化步骤完成。
18. 纯化后的 DNA 可保存在 -20°C ，或直接进行下一步，转座后 DNA 的 PCR 扩增。

转座后 DNA 的 PCR 扩增

注意：若需使用类似 KAPA Real-Time Library Amplification Kit 的试剂，下面步骤中最开始的 72°C 延伸是必不可少的。

1. 按下表组分配制 PCR 反应体系。若建库后的文库测序在同一 flow cell 上，需要确认每一个样本都链接了独一无二的 i5 和 i7 index 序列。

每一个样本均需要通过 PCR 反应链接 i7 index 和 i5 index 各一个。这里我们提供 $4 \times 4 = 16$ 种组合方式的 i7/i5 index 引物，供 16 个样本使用。这些 index 引物基于 Illumina's Nextera adapters 设计。

每个反应：

使用一个 i7 indexed 引物

i7 Indexed Primer1 = i7 N701

i7 Indexed Primer2 = i7 N702

i7 Indexed Primer3 = i7 N703

i7 Indexed Primer4 = i7 N704

和一个 i5 indexed 引物

i5 Indexed Primer1 = i5 N501

i5 Indexed Primer2 = i5 N502

i5 Indexed Primer3 = i5 N503

i5 Indexed Primer4 = i5 N504

试剂名称	用量
Tagmented DNA	33.5 μ l
i7 Indexed Primer (25 μ M)	2.5 μ l
i5 Indexed Primer (25 μ M)	2.5 μ l
10% Tween 20	0.5 μ l
dNTPs (10 mM)	1 μ l
5 \times Q5 Reaction Buffer	10 μ l
Q5 Polymerase(2 U/ μ l)	0.5 μ l

2. 使用下方程序运行 PCR（需要热盖）：

72°C 5 min

98°C 30 s

10 个循环：98°C 10 s, 63°C 30 s, 72°C 1 min

保持 10°C。

3. 操作 SPRI Clean-up 过程时，每个样本需要 60 μ l SPRI 磁珠溶液（ $1.2 \times$ 样品体积），20 μ l DNA Purification Elution Buffer，400 μ l 新鲜配制的 80%乙醇溶液。
 - a. 室温下，每个样本加入 60 μ l 完全混匀的 SPRI 磁珠。
 - b. 短暂涡旋混匀后室温孵育 5 min 使 beads 能充分绑定。

- c. 使用磁力架吸附 **beads** 于管壁上。
 - d. 当溶液清亮后，吸除上清。
 - e. 保持磁力吸附状态，每个样本加入 **180 μ l 80%乙醇**，不可吹打混匀。
 - f. 室温保持 **30 s**。
 - g. 吸除酒精。
 - h. 重复 **e** 到 **g** 的步骤。
 - i. 室温放置使残余酒精液体挥发，当磁珠由光滑明亮转变为哑光粗糙时 (**2-5 min**)，开始执行下一步。
 - j. 从磁力架上取下样品管，加入 **20 μ l DNA Purification Elution Buffer**。
 - k. 关上管盖，并涡旋混匀。
 - l. 室温保持 **5 min**。
 - m. 用磁力架再次吸附磁珠。
 - n. 当溶液澄清后，转移含有 **DNA** 的上清至新管。
4. 到了这一步，文库已经可以用于定量和测序了。用 **NGS 文库定量试剂**（如：**Kapa Biosystems, Catalog No.KR0405**）检测文库质量。文库也可用 **Bioanalyzer, TapeStation**，或类似仪器分析文库大小分布情况。

Index 引物和 Sample sheet 信息

Index1 (i7) Primers

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[i7]GTCTCGTGGGCTCGG

Index2 (i5) Primers

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[i5]TCGTCCGGCAGCGTC

i7 Index	i7 序列信息	sample sheet 信息
N701	TCGCCTTA	TAAGGCGA
N702	CTAGTACG	CGTACTAG
N703	TTCTGCCT	AGGCAGAA
N704	GCTCAGGA	TCCTGAGC

i5 Index	i5 序列信息	sample sheet 信息 (NovaSeq v1.0 Reagent Kits, MiSeq, HiSeq2000/2500)
N501	TAGATCGC	TAGATCGC
N502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
N503	TATCCTCT	TATCCTCT
N504	AGAGTAGA	AGAGTAGA

i5 Index	i5 序列信息	sample sheet 信息 (NovaSeq v1.5 Reagent Kits, iSeq, MiniSeq, NextSeq, HiSeq3000/4000)
N501	TAGATCGC	GCGATCTA
N502	CTCTCTAT	ATAGAGAG
N503	TATCCTCT	AGAGGATA
N504	AGAGTAGA	TCTACTCT

为 Read1 和 Read2 adapter 剪切的序列为: CTGTCTCTTATACACATCT.

参考文献

1. Buenrostro, J. D., et al. (2013) *Nat. Methods* 10: 1213-1218.
2. Adley, A., et al. (2010) *Genome Biol.* 11.
3. Corces, M. R. et al. (2017) *Nat. Methods* 14:959-962.

故障排除指南

问题	可能原因	建议
测序结果中高背景	细胞活性可能是主要问题，死亡的细胞释放了未受保护的 DNA，这些 DNA 更易被 Tn5 识别转座，所以使得背景值高	可选择在细胞处理时加入 DNase I 使结果被优化。这种处理方式是针对活细胞且酶能够被去除。
文库构建失败	在实验过程中样本丢失，特别是在处理极小数量细胞时，离心后的细胞聚团很难，甚至不能被肉眼看见。	离心时确认离心管的方向，以便预测细胞聚团在离心管中将会聚集的位置，除吸取 lysis buffer 时可留少许液体以外，在吸取上层液体时，在聚团对侧吸取。
	不兼容的扩增程序	ATAC-Seq 建库前 72°C 的延伸步骤是基础步骤，因为 5'端 adapter 序列与插入 DNA 的连接并不是依赖于酶。延伸步骤可产生 index primers 的锚点。不幸的是，这并不能真正的修复问题。

