

一、产品介绍

目前常用的 Bulk-ATAC 大都采用酶解的方法获得细胞悬浮液进行建库，但是酶解时间较长，且需要 37℃ 孵育，试验条件具有细胞类型偏好性且会影响部分内源基因的表达，导致最终试验结果有偏差。为了避免这些问题，武汉影子科技有限公司开发了一套基于细胞核的 Bulk-ATAC 建库的方案，让 ATAC-seq 建库更简单，更高效。

产品适用平台： Illumina 平台

二、产品成分

表 1 ATAC-seq 建库试剂盒组份表

组份	6 rxns	12 rxns
YZ-A1 buffer	6 ml	12 ml
YZ-A1 Tn5	6 μ l	12 μ l
YZ-A1 TB	60 μ l	120 μ l
YZ-A1 PE	150 μ l	300 μ l

注释：rxns 为反应次数

三、保存条件

除 YZ-A1 buffer 需 4℃ 保存，其余成分均 -20℃ 保存， $\leq 0^\circ\text{C}$ 运输。

四、适用范围

本产品适用于动物新鲜组织、冰冻组织、细胞 Bulk-ATAC 建库。

五、自备仪器耗材及试剂

仪器

电子天平、匀浆器（可选）、低温离心机、倒置显微镜、ThermoMixer C、PCR 仪、Aglient 2100 分析仪

耗材

1.5 ml 离心管、细胞计数板、盖玻片、计数器、计时器、40 μ m 细胞筛、磁力架、一次性称量勺。

试剂

50 x PI（蛋白酶抑制剂）、DPBS、10% Tween-20、0.4% 台盼蓝、NF-H₂O、DNA 纯化试剂盒、YZ Tn5 index kit、KaPa beads、Aglient 2100 试剂盒

六、注意事项

- 1、组织越新鲜效果越好，采样过程防止样品降解。
- 2、实验前预冷离心机，酶切前预热 ThermoMixer C。
- 3、提取细胞核时充分吹散粉末，尽量不要产生气泡。
- 4、酶切时间不宜超过 1 h。
- 5、若组织难裂解或出核少，可以选择使用灭菌后的匀浆器。

七、实验步骤

7.1 细胞核提取

- 1、在液氮中将组织充分研磨成粉末状，粉末可放在 -80℃ 保存。（研磨全程保持低温）
- 2、称取 0.01-0.02g 的组织粉末于 1.5 ml 离心管中（称量勺和 EP 管使用前液氮预冷）。
- 3、取 1 ml 预冷 DPBS 加入到组织粉末中，并用枪头充分吹散。
- 4、4℃，500 g，离心 5 min。（离心期间在冰上配制含 1 x PI 的 YZ-A1 buffer）。
- 5、小心遗弃上清，用 1 ml 含 1 x PI 的 YZ-A1 buffer 重悬。

（对于难裂解的组织，可以将上一步的液体转移至匀浆器中，在冰上用研磨棒上下研磨 6 次，该步骤可选）

- 6、冰上裂解 5-15 min，间歇颠倒混匀。
- 7、4℃，500 g，离心 5 min。
- 8、弃上清，用 1 ml 预冷的 DPBS 轻轻重悬。用 40 μ m 细胞筛过滤，收集滤液至 1.5 ml 的 EP 管中。

注：组织冰上孵育的时间根据组织类型而定，可参考说明书末的表格。

7.2 细胞核镜检计数

- 1、用移液枪吹匀过滤后的细胞核悬浮液，吸取 8 μ l 悬浮液与 2 μ l 0.4% 台盼蓝，充分混匀。
- 2、将染色后的 10 μ l 悬浮液加载到细胞计数板上计数，在显微镜下用 40 倍物镜观察
- 3、读取 4 个 16 小方格里的细胞核数目，采用计上不计下，计左不计右的原则，细胞核数目 = $n/4 \times 10$ 即为每微升的细胞核数，其中 n 代表 4 个 16 小方格细胞核数目总和。

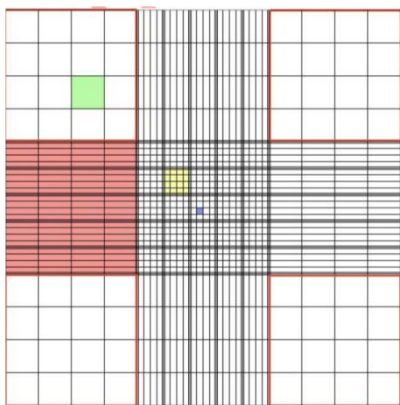


图 1：细胞核计数示意图

例：4 个小方格内的细胞核总数为 100 个，则每微升细胞核数目为：100/4*10=250 个，那么取 5w 细胞核需取 50000/250=200 μ l 细胞核悬浮液。

7.3 Bulk-ATAC 建库

- 1、根据台盼蓝计数结果，取 5W 细胞核，体积不足 200 μ l 的用预冷的 DPBS 补充。
- 2、4℃，1000g，离心 5 min。
- 3、冰上配制酶切体系（50 μ l）。

表 2：酶切 Mixs 组分

YZ-A1 TB	10 μ l
10% Tween-20	0.5 μ l
YZ-A1 Tn5	1 μ l
H ₂ O	38.5 μ l

注：最后加 YZ-A1 Tn5，加之前混匀其他成分，吸取 YZ Tn5 时先用移液枪轻轻混匀，加完 YZ-A1 Tn5 后再用移液枪轻轻吹打 10 下。

- 4、离心后用 200 μ l 枪头弃上清，可以留少许液体，切勿触碰到沉淀。
- 5、用酶切 mixs 轻轻重悬沉淀，轻轻吹打 15 下。
- 6、在 ThermoMixer C 上 37℃酶切 1h, 1000 rpm。
- 7、推荐使用 DNA 纯化试剂盒进行纯化：按照试剂盒纯化步骤操作，最后用 18 μ l 水溶解。

8、配制 PCR 体系

表 3：PCR 体系组分

纯化样品	15 μ l
N5	2.5 μ l
N7	2.5 μ l
YZ-A1 PE	25 μ l
NF-H ₂ O	5 μ l

9、PCR 扩增

表 4：PCR 扩增程序

72 °C	5 min	1 cycle
98 °C	2 min	1 cycle
98 °C	30 s	9 cycle
60 °C	30 s	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	1 cycle
4 °C	∞	

10、用 1.2x KaPa beads 纯化，20 μ l 水溶解，Qubit 测浓度（注：纯化后洗脱水用量为 20ul）。

注：通常无需进行片段分选即可上机测序，如需去除基因组大片段，可以用 DNA Clean Beads 进行两步法分选。

11、选择 Agilent 4200 或者 Agilent 2100 检测文库片段分布。

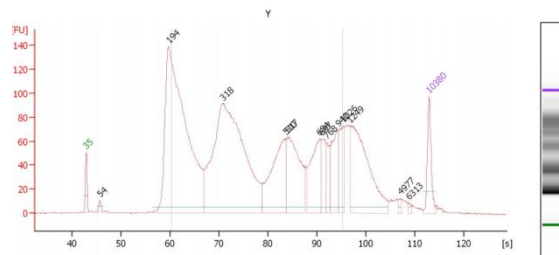


图 2：脑 ATAC 文库 2100 检测示意图

附表 1 不同组织推荐裂解时间

组织	裂解时间	组织	裂解时间
肝脏	5 min	软骨	10 min
脾脏	5 min	皮肤	10 min
胃脏	5 min	眼睛	10 min
胰脏	10 min	肺脏	10 min
脑	10 min	肌肉	15 min
肾脏	10 min	脂肪	15 min
十二指肠	10 min	心脏	15 min

注：以上测试的条件仅供参考，具体条件根据样本情况而定（裂解时镜检出核情况），细胞样本推荐裂解 3-5 min。本产品已测试过样本包括但不限于以上组织类型，可联系销售获取其他组织裂解推荐时间。