

TransNGS® ATAC-Seq Library Prep Kit for Illumina®

ATAC文库构建试剂盒 适配Illumina平台

使用前请仔细阅读说明书

版本号: Version 2.0



目录号: KP171

保存: -18°C及其以下温度下保存一年。

产品说明

TransNGS® ATAC-Seq Library Prep Kit for Illumina®是针对Illumina高通量测序平台开发的,适用于普通哺乳动物细胞的ATAC文库构建试剂盒,所得文库可用于单端或双端测序。该试剂盒采用新型的转座酶技术,针对染色质开放区域建库测序,仅需3个小时即可完成实验。所需细胞量少,10-50000细胞的起始量均可以获得高分辨率的测序图谱。

特点

- 建库时间短、操作简便。
- 所需细胞量少,仅10个细胞即可完成建库。

适用范围

将染色质开放区域片段制备成适用于Illumina高通量测序平台的短片段文库。

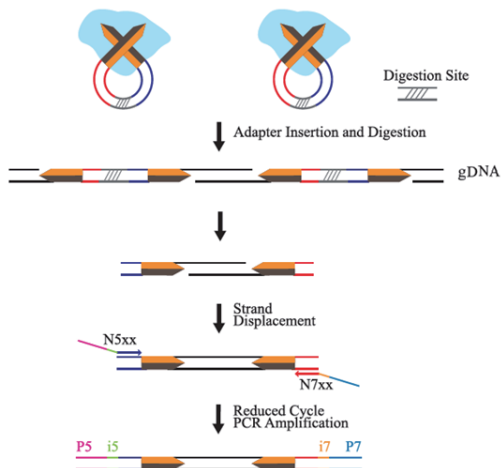
试剂盒组成

Component	KP171-01(12 rxns)	KP171-02(96 rxns)
Cell Lysis Buffer	24 µl	192 µl
Lysis Enhancer II	18 µl	144 µl
4×Insertion Buffer	90 µl	720 µl
Insertion Enhancer 1	12 µl	96 µl
Insertion Enhancer 2	12 µl	96 µl
Tn5-50 Enzyme Mix	48 µl	384 µl
4×Tn5 Digestion Buffer	120 µl	960 µl
TransNGS ATAC-Seq Library Amplification SuperMix I (2×)	300 µl	4×600 µl
TransNGS ATAC-Seq Library Amplification SuperMix II (2×)	300 µl	4×600 µl
Library Elution Buffer	600 µl	5 ml
Nuclease-free Water	1 ml	2 × 5 ml
Tn5 Storage Buffer	600 µl	5 ml

起始材料要求

推荐使用10-50000个细胞进行本试剂盒的ATAC-seq建库试验。确保活细胞比例大于95%,死细胞可以用台盼蓝染色鉴定。贴壁细胞和组织块应尽量消化成单细胞状态,若物种类型特殊或细胞数不在上述范围内,需对裂胞体系和转座酶插入量做出适当调整。

文库构建原理示意图



文库结构

5'-AATGATACGCGCACCACCGAGATCTACAC[i5]TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG
-XXXXXXXX-CTGTCTCTTATACATCTCCGAGCCACGAGAC[i7]ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

i5: Index 2, 8 bases;

i7: Index 1, 8 bases;

-XXXXXXXX-: 插入序列。

操作步骤 (5000-50000细胞)

自备试剂: 1×PBS溶液, 新鲜配制的80%乙醇, *MagicPure*® Size Selection DNA Beads (目录号: EC401), *TransNGS*® Tn5 Index Kit for Illumina® (目录号: KI101)。

1、细胞收集与裂解

- (1) 对处理后的单细胞悬液计数, 取所需数量的细胞于新的1.5 ml EP管。
- (2) 加入50 µl预冷1×PBS溶液, 4℃离心, 500 g, 5分钟, 小心弃上清, 尽量不要吸到细胞沉淀。
- (3) 重复步骤 (2) 一次, 共计洗涤2次。
- (4) 在上述洗涤过程中配制裂胞试剂 (现配现用, 冰浴放置)。

Component	Volume
Cell Lysis Buffer	2 µl
Lysis Enhancer II	1.5 µl
Nuclease-free Water	46.5 µl
Total volume	50 µl

- (5) 加入上述配制好的50 µl预冷裂胞试剂至细胞沉淀中, 用移液器轻柔吹吸混匀, 冰上放置5分钟。
- (6) 4℃离心, 500 g, 10分钟, 小心弃上清。

2、片段化及终止

- (1) 在上述离心过程中配制片段化Mix, 现配现用, 冰浴放置。

Component	Volume
4×Insertion Buffer	7.5 µl
Insertion Enhancer 1*	0.3 µl
Insertion Enhancer 2*	0.3 µl
Tn5-50 Enzyme Mix	4 µl
Nuclease-free Water	17.9 µl
Total volume	30 µl

*当仅配制一个体系时, 由于吸取体积较小, 建议先各吸取1 µl Insertion Enhancer 1、Insertion Enhancer 2并用Nuclease-free Water分别稀释10倍, 再各添加3 µl稀释完的溶液至反应体系中, 注意Nuclease-free Water的用量相应减少。注意 Insertion Enhancer 1、Insertion Enhancer 2需要在室温完全化冻后使用。

- (2) 将这30 µl片段化Mix加至细胞核沉淀中, 吹吸混匀, 37℃水浴30分钟。
- (3) 加入10 µl 4×Tn5 Digestion Buffer终止片段化反应, 50℃水浴30分钟。

3、片段化产物纯化

推荐使用*MagicPure*® Size Selection DNA Beads (目录号: EC401) 进行产物纯化, 具体操作如下:

- (1) 从2-8℃取出磁珠, 室温静置30分钟后备用。
- (2) 振荡磁珠使其充分混匀, 吸取80 µl磁珠 (2×) 加入40 µl上步产物中。
- (3) 移液枪吹吸混匀, 室温静置5分钟。

注意: 混匀不充分会显著影响实验结果。

- (4) 将1.5 ml离心管置于磁力架上, 室温静置至溶液澄清 (约5分钟), 使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上, 弃上清。
注意: 管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上, 务必使磁珠全部吸附在管壁上。切勿吸到磁珠, 否则影响最终产量。
- (5) 保持1.5 ml离心管在磁力架上, 向管中加入200 µl新鲜配制的80%乙醇, 不要吹吸磁珠, 室温静置30秒, 弃上清。
注意: 一定要使用新鲜配制的乙醇, 否则会影响实验结果。



(6) 重复步骤 (5) 一次。

(7) 保持1.5 ml离心管在磁力架上，室温晾干磁珠。

注意：切勿加热晾干，否则会影响最终产量。

(8) 将1.5 ml离心管移出磁力架，加入22 μ l Library Elution Buffer。移液枪吹吸混匀或涡旋混匀，室温静置3分钟。

(9) 将1.5 ml离心管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清 (约2分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。

注意：管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，室温静置可延长至5分钟。

(10) 小心吸取20 μ l洗脱液至干净PCR管中，进行下步扩增反应，或于-20 $^{\circ}$ C保存。

4. 文库扩增

(1) 冰上加入以下体系，请注意使用的是TransNGS ATAC-Seq Library Amplification SuperMix I (2 $\times$)。

Component	Volume
片段化产物	20 μ l
TransNGS ATAC-Seq Library Amplification SuperMix I (2 $\times$)	25 μ l
N5xx*	2.5 μ l
N7xx*	2.5 μ l
Total volume	50 μ l

*TransNGS[®] Tn5 Index Kit for Illumina[®] (目录号：KI101)中提供8种N5xx和12种N7xx，请根据需要自行选择。

(2) 移液枪吹吸混匀或涡旋混匀，最后点甩离心。

(3) PCR扩增程序 (两步法) 如下。

72 $^{\circ}$ C	3 min*	
98 $^{\circ}$ C	3 min	
98 $^{\circ}$ C	8 sec	} 13-15 cycles
60 $^{\circ}$ C	5 sec	
72 $^{\circ}$ C	1 min	
$\leq 10^{\circ}$ C	Hold	

*此步不可省略。转座反应产物并非完整的双链DNA，72 $^{\circ}$ C孵育3分钟用于生成完整的PCR模板。

5. 文库扩增产物纯化或片段分选

如对文库长度分布无特殊要求，可直接使用1.2 $\times$ 磁珠纯化文库扩增产物。

如需对文库扩增产物进行片段分选，推荐使用MagicPure[®] Size Selection DNA Beads (目录号：EC401) 进行产物片段分选，具体操作如下：

(1) 从2-8 $^{\circ}$ C取出磁珠，室温静置30分钟后备用。

(2) 振荡磁珠使其充分混匀，吸取27.5 μ l磁珠 (0.55 $\times$) 加入50 μ l PCR产物中。

(3) 移液枪吹吸混匀，室温静置5分钟。

注意：混匀不充分会显著影响实验结果。

(4) 将PCR管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清 (约5分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。将上清转移至一个新的PCR管中，弃磁珠。

注意：管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，务必使磁珠全部吸附在管壁上。切勿吸到磁珠，否则影响文库峰型。

(5) 往上清中加入60 μ l磁珠 (1.2 $\times$)，移液枪吹吸混匀，室温静置5分钟。

注意：混匀不充分会显著影响实验结果。

(6) 将PCR管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清 (约5分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。弃上清。

注意：管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，务必使磁珠全部吸附在管壁上。切勿吸到磁珠，否则影响最终产量。

(7) 保持PCR管在磁力架上，向管中加入200 μ l新鲜配制的80%乙醇，不要吹吸磁珠，室温静置30秒，弃上清。

注意：一定要使用新鲜配制的乙醇，否则会影响实验结果。

(8) 重复步骤 (7) 一次。



(9) 保持PCR管在磁力架上，室温晾干磁珠。

注意：切勿加热晾干，否则会影响最终产量。

(10) 将PCR管移出磁力架，加入22 μl Library Elution Buffer。移液枪吹吸混匀或涡旋混匀，室温静置3分钟。

(11) 将PCR管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清(约2分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。

注意：管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，室温静置可延长至5分钟。

(12) 小心吸取20 μl 洗脱液转移至干净EP管中，进行测序，或于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

操作步骤 (<5000细胞)

自备试剂：新鲜配制的80%乙醇，*MagicPure[®] Size Selection DNA Beads* (目录号：EC401)，*TransNGS[®] Tn5 Index Kit for Illumina[®]* (目录号：KI101)。

1、细胞收集与裂解

(1) 对处理后的单细胞悬液计数，取所需数量的细胞于新的0.2 ml PCR管，体积不超过1 μl ，置于冰上暂放。

(2) 配制裂胞试剂。首先，各吸取1 μl Cell Lysis Buffer和Lysis Enhancer II，分别稀释10倍（即各添加9 μl Nuclease-free Water）。然后按照下表配制1份样品所需的裂胞试剂，现配现用，冰浴放置。

Component	Volume
Diluted Cell Lysis Buffer	2 μl
Diluted Lysis Enhancer II	1.5 μl
Nuclease-free Water	1.5 μl
Total volume	5 μl

(3) 加入上述配制好的预冷裂胞试剂至管中，使总体积达5 μl （例如细胞体积为1 μl ，则加入4 μl 配制好的裂胞试剂）。用移液器轻柔吹吸混匀，冰上放置5分钟。

2、片段化及终止

(1) 在上述冰浴过程中配制片段化Mix，现配现用，冰浴放置。

Component	Volume
4 $\times$ Insertion Buffer	3.75 μl
Insertion Enhancer 1*	0.15 μl
Insertion Enhancer 2*	0.15 μl
Tn5-50 Enzyme Mix*	2 μl
Nuclease-free Water	3.95 μl
Total volume	10 μl

*当仅配制一个体系时，由于吸取体积较小，建议先各吸取1 μl Insertion Enhancer 1、Insertion Enhancer 2并用Nuclease-free Water分别稀释10倍，然后再各添加1.5 μl 稀释完的溶液至反应体系中，注意Nuclease-free Water对应的用量相应减少。注意 Insertion Enhancer 1、Insertion Enhancer 2需要在室温完全化冻后使用。

*当起始细胞数远低于5000时，可以根据试验需求，使用试剂盒自带的Tn5 Storage Buffer对Tn5-50 Enzyme Mix进行稀释后使用。不同细胞数对应的Tn5-50 Enzyme Mix稀释倍数详见下表。

起始细胞数	推荐Tn5-50稀释倍数
1000	稀释20倍
500	稀释40倍
100	稀释200倍
50	稀释400倍
10	稀释2000倍

(2) 加入上述片段化Mix，总体积15 μl 。吹吸混匀，于PCR仪中37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30分钟。

(3) 加入5 μl 4 $\times$ Tn5 Digestion Buffer终止反应，总体积20 μl 。吹吸混匀，于PCR仪中68 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30分钟。



3、文库扩增

(1) 冰上加入以下体系。请注意使用的是*Trans*NGS ATAC-Seq Library Amplification SuperMix II (2×)。

Component	Volume
片段化产物	20 µl
<i>Trans</i> NGS ATAC-Seq Library Amplification SuperMix II (2×)	25 µl
N5xx*	2.5 µl
N7xx*	2.5 µl
Total volume	50 µl

**Trans*NGS® Tn5 Index Kit for Illumina® (目录号: KI1101)中提供8种N5xx和12种N7xx, 请根据需要自行选择。

(2) 移液枪吹吸混匀或涡旋混匀, 最后点甩离心。

(3) PCR扩增程序(两步法)如下。

```

72°C   3 min*
98°C   3 min
98°C   5 sec
60°C   10 sec  } 18-25 cycles*
72°C   1 min
≤10°C  Hold
    
```

*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分钟用于生成成熟的PCR模板。

*一般推荐500-1000个细胞扩增20个循环; 10-100个细胞扩增25个循环。可根据细胞种类和大小自行调节扩增循环数。

4、文库扩增产物纯化或片段分选

如对文库长度分布无特殊要求, 可直接使用1.2×磁珠纯化文库扩增产物。

如需对文库扩增产物进行片段分选, 推荐使用*MagicPure*® Size Selection DNA Beads (目录号: EC401) 进行产物片段分选, 具体操作如下:

(1) 从2-8°C取出磁珠, 室温静置30分钟后备用。

(2) 振荡磁珠使其充分混匀, 吸取27.5 µl 磁珠 (0.55×) 加入50 µl PCR产物中。

(3) 移液枪吹吸混匀, 室温静置5分钟。

注意: 混匀不充分会显著影响实验结果。

(4) 将PCR管置于磁力架上, 室温静置至溶液澄清 (约5分钟), 使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。将上清转移至一个新的PCR管中, 弃磁珠。

注意: 管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上, 务必使磁珠全部吸附在管壁上。切勿吸到磁珠, 否则影响最终产量。

(5) 往上清中加入60 µl 磁珠 (1.2×), 移液枪吹吸混匀, 室温静置5分钟。

注意: 混匀不充分会显著影响实验结果。

(6) 将PCR管置于磁力架上, 室温静置至溶液澄清 (约5分钟), 使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。弃上清。

注意: 管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上, 务必使磁珠全部吸附在管壁上。切勿吸到磁珠, 否则影响最终产量。

(7) 保持PCR管在磁力架上, 向管中加入200 µl 新鲜配制的80%乙醇, 不要吹吸磁珠, 室温静置30秒, 弃上清。

注意: 一定要使用新鲜配制的乙醇, 否则会影响实验结果。

(8) 重复步骤 (7) 一次。

(9) 保持PCR管在磁力架上, 室温晾干磁珠。

注意: 切勿加热晾干, 否则会影响最终产量。

(10) 将PCR管移出磁力架, 加入22 µl Library Elution Buffer。移液枪吹吸混匀或涡旋混匀, 室温静置3分钟。



(11) 将PCR管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清（约2分钟），使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。

注意：管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，室温静置可延长至5分钟。

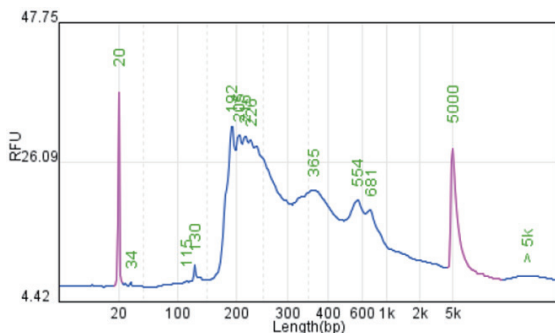
(12) 小心吸取20 μ l洗脱液转移至干净EP管中，进行测序，或于-20 $^{\circ}$ C保存。

附录

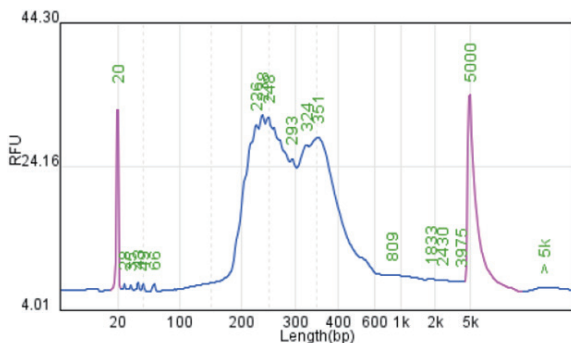
文库产出参照表（Hela细胞，无片段分选）

起始细胞数	50000	10000	5000	1000	500	100	50	10
Tn5-50稀释倍数	/			5-10		50-500		
PCR循环数	15 cycles			20 cycles		25 cycles		
文库产出 (ng)	>1200	>800	>800	>600	>300	>400	>300	>100

文库片段长度分布示意图（Hela细胞，未分选，Qsep100dna-CE DNA Fragment Analyzer检测）

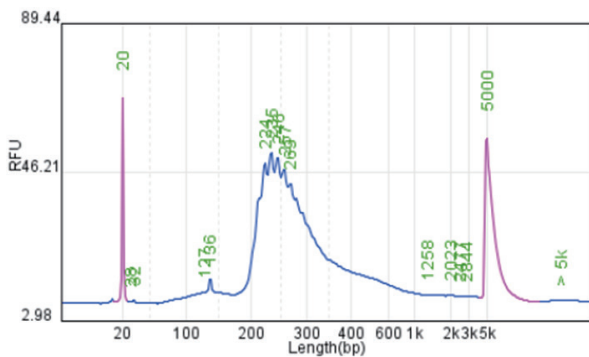


图一：10000细胞文库峰型

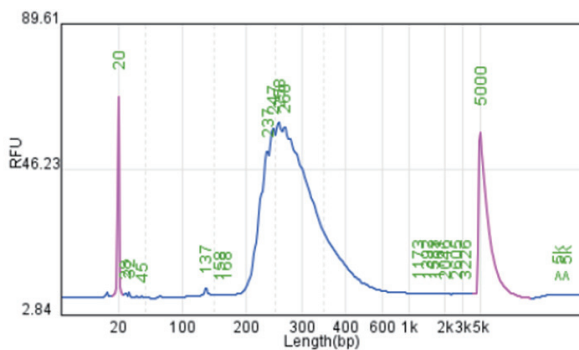


图二：1000细胞文库峰型





图三：100细胞文库峰型



图四：10细胞文库峰型

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V2.0-202507

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen

