*Trans*NGS® 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 1.0

北京全式金生物技术股份有限公司
www.transgen.com
trans@transgen.com
+86-400 898 0321
北京市海淀区中关村东升国际科学园4号楼

目录号： KP171

保存： -18℃及其以下温度下保存一年。

产品说明

*Trans*NGS® 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。

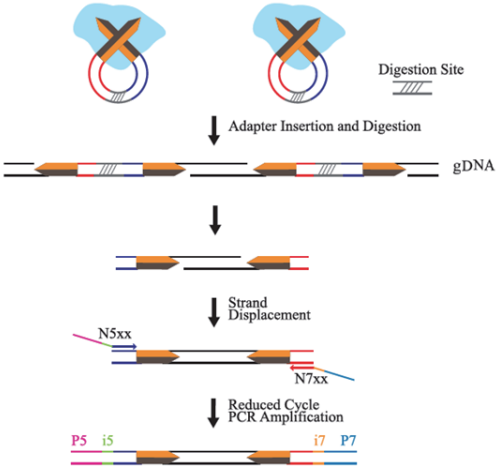
试剂盒组成

Component	KP171-01(12 rxns)	KP171-02(96 rxns)
Cell Lysis Buffer	24 μl	192 μl
Lysis Enhancer	12 μl	96 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'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[i5]TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG
-XXXXXXXX-CTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCCACGAGAC[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)，*Trans*NGS® 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	1 μl
Nuclease-free Water	47 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21 µl 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 µl洗脱液至干净PCR管中，进行下步扩增反应，或于-20℃保存。

4、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 I（2×）。

Component	Volume
片段化产物	20 µl
*Trans*NGS ATAC-Seq Library Amplification SuperMix I（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：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℃ 3 min*
98℃ 3 min
98℃ 8 sec
60℃ 5 sec
} 13-15 cycles
72℃ 1 min
≤10℃ Hold

*此步不可省略。转座反应产物并非完整的双链DNA，72℃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0.8×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℃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2.5 µl磁珠 (0.5×) 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，否则影响文库峰型。
(5) 往上清中加入15 µl磁珠 (0.3×)，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。
(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21 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℃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)，*Trans*NGS® 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1μl Cell Lysis Buffer和Lysis Enhancer，分别稀释10倍（即各添加9μl 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	1 μl
Nuclease-free Water	2 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×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
5000	不稀释
1000	稀释5倍
500	稀释10倍
100	稀释50倍
50	稀释100倍
10	稀释500倍

(2) 加入上述片段化Mix，总体积15 μl。吹吸混匀，于PCR仪中37℃孵育30分钟。

(3) 加入5 μl 4×Tn5 Digestion Buffer终止反应，总体积20 μl。吹吸混匀，于PCR仪中68℃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
TransNGS 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：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℃ 3 min*
98℃ 3 min
98℃ 5 sec
60℃ 10 sec
} 18-25 cycles*
72℃ 1 min
≤10℃ Hold

*此步不可省略。转座反应产物并非完整的双链DNA，72℃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0.8×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℃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2.5 μl磁珠 (0.5×) 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15 μl磁珠 (0.3×)，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。

(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21 μl Library Elution Buffer。移液枪吹吸混匀或涡旋混匀，室温静置3分钟。

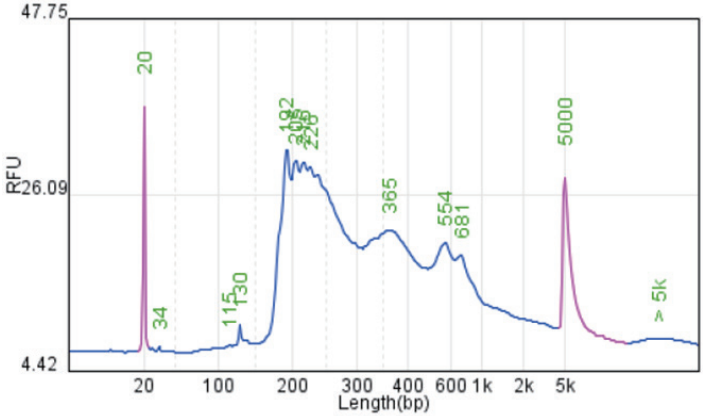
(11) 将PCR管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清 (约2分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。

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。

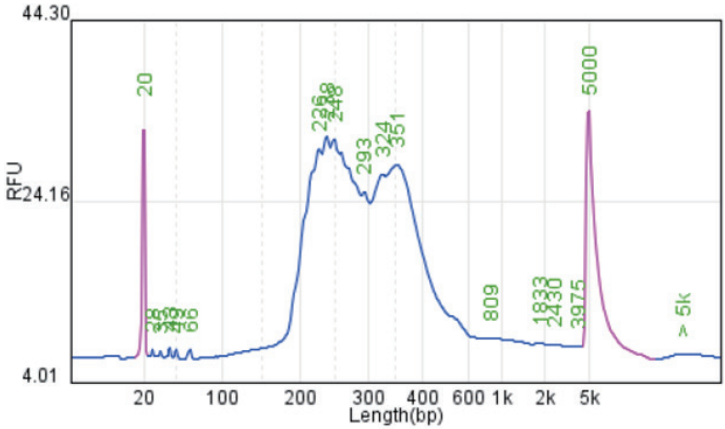
(12) 小心吸取20 μl洗脱液转移至干净EP管中，进行测序，或于-20℃保存。

附录

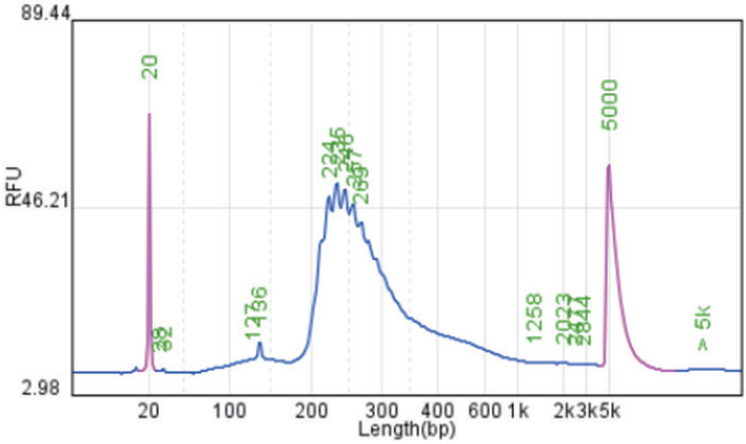
文库片段长度分布示意图（Hela细胞，未分选，Qsep100dna-CE DNA Fragment Analyzer检测）



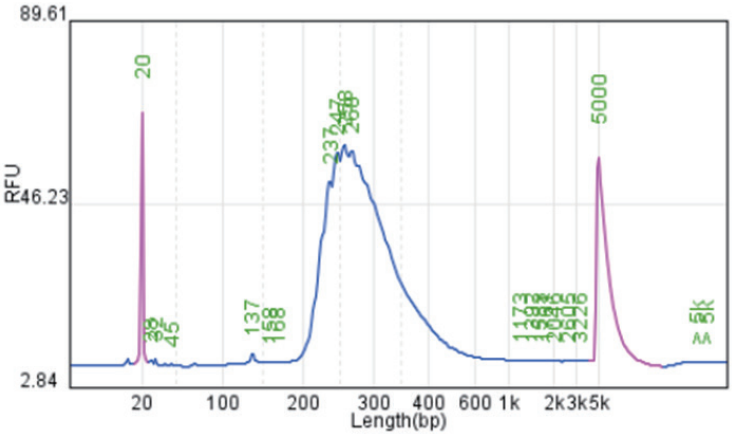
图一：10000细胞文库峰型



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：V1-202503

服务电话 +86-10-57815020
服务邮箱 complaints@transgen