

ATAC-Seq 实验操作指南

Vazyme 您身边的建库专家

南京诺唯赞生物科技有限公司
Nanjing Vazyme Biotech Co.,Ltd.

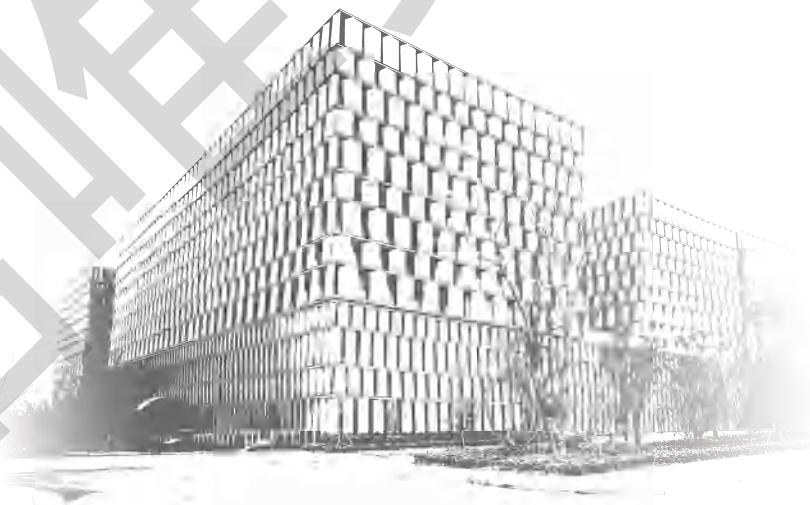
www.vazyme.com

A large, faint watermark of the Chinese characters '读书乐' (Reading Joy) is repeated diagonally across the page. The characters are rendered in a light gray color that is semi-transparent, allowing the underlying text to be partially visible. The watermark is oriented at approximately a 45-degree angle from the bottom-left towards the top-right.



南京诺唯赞生物科技有限公司 (Vazyme Biotech Co.,Ltd) 致力于酶和抗体的研发和生产，产品涵盖体外诊断、高通量测序和生命科学研究等领域。公司坐落于六朝古都南京，背靠风景秀丽的栖霞山，依托国家级南京经济技术开发区的区域辐射力，以先进的研发能力和领先的技术力量，书写全新的民族生物科技格局。

InnoVation in Enzyme Technology



Vazyme 订购指南

◆ 销售渠道

南京总部

地址：江苏省南京经济技术开发区科创路红枫科技园 C2 栋

电话：400-600-9335

邮箱：sales@vazyme.com

北京办事处

地址：北京市昌平区北清路 1 号院珠江摩尔大厦 6 号楼 1 单元 812 室

电话：17372772080

邮箱：caoxiaobiao@vazyme.com

上海办事处

地址：上海市浦东新区创新西路 76 号 44 栋

电话：021-50703332

邮箱：sales_sh@vazyme.com

广州办事处

地址：广东省广州市天河区车陂路 330 号 M1501 室

电话：15920598727

邮箱：laidongmei@vazyme.com

杭州办事处

地址：浙江省杭州市西湖区古墩路 673 号瑞博国际 A 座 906

电话：13381348270

邮箱：guxiaolu@vazyme.com

南京办事处

地址：江苏省南京市秦淮区大行宫日月大厦 2804

电话：15850550176

邮箱：wangdan@vazyme.com

武汉办事处

地址：湖北省武汉市洪山区珞喻路 1 号鹏程国际 A 座 1517 室

电话：15850796526

邮箱：liuchangkun@vazyme.com

福建办事处

地址：福建省福州市仓山区闽江大道 20 号中联水岸名居 1#1003

电话：18850755845

邮箱：linyuxiang@vazyme.com

山东办事处

地址：山东省济南市华能路 138 号 3 号楼 6 单元 902 室

电话：17372772182

邮箱：wangdandan@vazyme.com

扬州办事处

地址：江苏省扬州市维扬区东方百合园 33 栋 501

电话：18652408582

邮箱：songqin@vazyme.com

苏州办事处

地址：江苏省苏州市工业园区莲花新村五区 113 栋

电话：18115486826

邮箱：liudeli@vazyme.com

代理商渠道

地址：江苏省南京经济技术开发区科创路红枫科技园 C2 栋

电话：18112951766

邮箱：xiaoyunxiao@vazyme.com

海外事业部

Mobile: +86-18616767852

Email: wangdong@vazyme.com

Vazyme 您身边的建库专家

◆ NGS 文库系列产品

DNA-seq

VAHTS™ Universal DNA Library Prep Kit for Illumina V3 (ND607)
 TruePrep™ DNA Library Prep Kit V2 for Illumina (TD501/502/503)
 VAHTS™ AmpSeq Library Prep Kit V2 (NA201)
 VAHTS™ AmpSeq General Library Prep Kit V2 (NA203)
 VAHTS™ AmpSeq Cancer HotSpot Panel (NA102)
 VAHTS™ Mate Pair Library Prep Kit for Illumina (ND104)

传统快速流程 DNA 文库构建
 转座酶超快速 DNA 文库构建
 多重靶向扩增子文库构建 (修饰引物)
 多重靶向扩增子文库构建 (非修饰引物)
 癌症热点 panel (50 个热点癌基因位点)
 Mate Pair 文库构建 (De novo 测序)

RNA-seq

VAHTS™ mRNA-seq V3 Library Prep Kit for Illumina (NR611)
 VAHTS™ Stranded mRNA-seq Library Prep Kit for Illumina V2 (NR612)
 VAHTS™ Total RNA-seq (H/M/R) Library Prep Kit for Illumina (NR603)
 VAHTS™ Small RNA Library Prep Kit for Illumina (NR801)

常规 mRNA 文库构建
 链特异性 mRNA 文库构建
 探针法去除 rRNA 全转录组文库构建
 小 RNA 文库构建

单细胞扩增

Discover-sc® Single Cell Kit (N601)
 Discover-sc® Single Cell Kit V2 (N602)
 Discover-sc® WTA Kit V2 (N711)

单细胞基因组 / 微量 DNA 扩增试剂盒
 单细胞基因组 / 微量 DNA 扩增试剂盒 (含人基因组检测模块)
 单细胞转录组 / 微量 RNA 扩增试剂盒

分离与检测

VAHTS™ DNA Clean Beads (N411)
 VAHTS™ RNA Clean Beads (N412)
 VAHTS™ Library Quantification Kit for Illumina (NQ101-106)
 VAHTS™ Human Genomic DNA Quantification and QC Kit (NQ201)
 Equalbit™ dsDNA HS Assay Kit (EQ111)
 Equalbit™ RNA HS Assay Kit (EQ211)
 Equalbit™ RNA BR Assay Kit (EQ212)
 VAHTS™ Blood Collection Tube for cell-free DNA Preservation (N901)
 VAHTS™ Serum/Plasma Circulating DNA Kit (N902)

DNA 纯化分选磁珠
 RNA 纯化磁珠
 文库 qPCR 绝对定量
 人基因组 DNA 质量评价试剂盒
 Qubit DNA 高敏检测试剂
 Qubit RNA 高敏检测试剂
 Qubit RNA 宽泛检测试剂
 游离 DNA 保存管
 游离 DNA 提取试剂

模块与单酶原料

VAHTS™ Universal End preparation Module for Illumina (N203)
 VAHTS™ Universal Adapter Ligation Module for Illumina (N204)
 VAHTS™ HiFi Amplification Mix (N616)
 VAHTS™ mRNA Capture Beads (N401)
 VAHTS™ 2 × Frag/Prime Buffer (N402)
 Ribo-off™ rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) (N406)
 Ribo-off™ rRNA Depletion Kit (Bacteria) (N407)
 Phanta® Uc Super-Fidelity DNA Polymerase for Library Amplification (P507)
 T4 DNA polymerase (N101)
 T4 Polynucleotide Kinase (N102)
 T4 DNA ligase (Rapid) (N103)
 DNA polymerase I Klenow fragment (N104)
 DNA polymerase I Klenow fragment exo- (N105)
 Phi29 MAX DNA Polymerase (N106)

DNA 末端修复及加 A 模块
 接头连接模块
 文库扩增模块
 mRNA 抓取磁珠
 RNA 打断 buffer
 真核 rRNA 去除模块 (探针)
 原核 rRNA 去除模块 (探针)
 耐 U 高保真 DNA 聚合酶
 T4 DNA 聚合酶
 T4 多聚核苷酸激酶
 T4 DNA 连接酶
 DNA 聚合酶 I (Klenow) 大片段
 Klenow 片段 (3'-5' exo-)
 Phi29 DNA 聚合酶



学霸就要自己建库

Vazyme 实验指南，带你玩转 NGS !

目录

01 测序背景知识	9
二代测序发展简史	9
Illumina 测序简介	10
文库的基本结构	10
测序芯片结构	10
Illumina 测序过程	11
文库质控	12
常规文库测序参数	13
02 ATAC-seq	14
染色体结构	14
染色质可接近性概念	15
转录因子及基因表达调控	15
全基因组染色质可接近性研究	15
ATAC-seq	17
ATAC-seq 基本操作流程	18
Vazyme 推荐流程	19
线粒体去除	22
测序技术参数推荐	23
ATAC-seq 技术关键	23
A、细胞核提取	23
B、线粒体 DNA 污染	23
特殊样本流程	23
特殊样本流程摘要	24
冰冻组织	24
植物 ATAC-seq	24
单细胞 ATAC-seq	25
酵母 ATAC-seq	25
ATAC-seq 联合分析策略	26
ATAC-seq 与转录组数据联合分析	26
ATAC-seq 和 ChIP-seq 联合分析	27
案例分析	28
动物	28
植物	29
03 文库纯化和分选	30
磁珠结构	30
磁珠纯化原理	30
磁珠纯化操作过程	31
磁珠分选原理	31
磁珠分选操作过程	32

目录

04 常见问题及解决方案	33
05 参考文献	34
参考文献	34
参考文献·关联产品	34
06 明星产品	36

诺唯赞

01 测序背景知识

◆ 二代测序发展简史

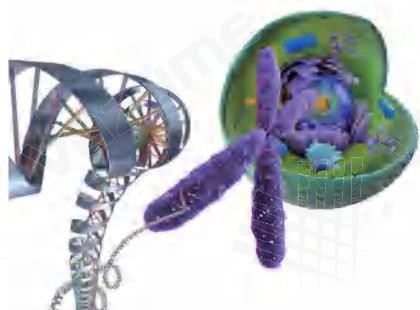


图 1: 染色体与 DNA 结构

早在 20 世纪 20 年代，人们就开始对遗传物质进行探索，随后科学家发现 DNA 是由四种碱基构成的长链分子。这四种碱基的排列顺序决定了遗传信息的多样性，造就了生物个体之间的千差万别。解密 DNA 排列组合的密码可以帮助人们进行育种改造以及疾病检测。

测序技术最早可以追溯到 20 世纪 50 年代，1953 年沃森和克里克揭示了 DNA 双螺旋结构，次年就出现了关于早期测序技术的报导。1977 年 Sanger 等发明了双脱氧核苷酸末端终止法。随后，ABI 公司在双脱氧末端终止法基础上推出了第一台核酸自动测序仪，自此进入了以人类基因组计划为代表的一代测序的黄金时期。

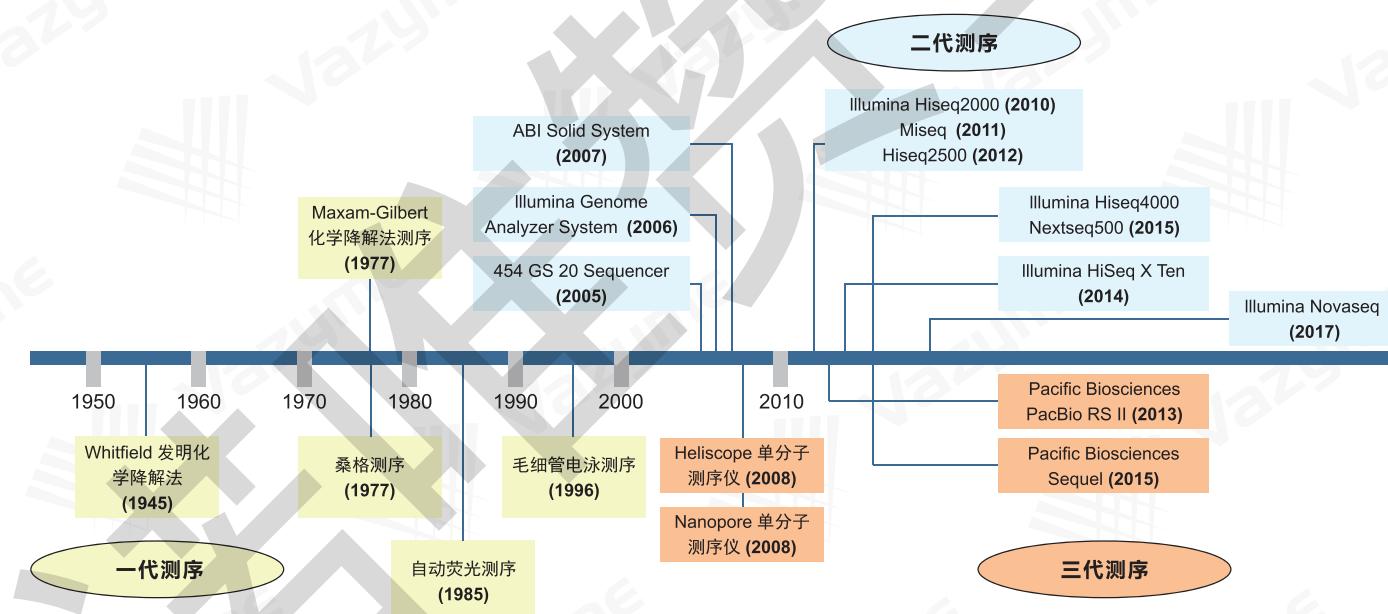


图 2: 测序的发展历程

2005 年，一代测序技术的通量低局限性催生了二代测序技术的发展，并在 2010 年前后形成了以 Roche 的 454 技术，Life 的 Ion Torrent 平台，Illumina 的 solexa 技术为代表的三足鼎立的局面，最后由于 Illumina 平台通量高市场接受度广等优势成就了其二代测序的绝对领导地位。二代测序通量高，成本低，极大程度上降低了测序费用，成为目前市面上的主流测序技术。

二代测序读长短，信息分析拼接难等缺点，又促进了以太平洋生物科技公司和牛津纳米科技公司为代表的单分子长读长测序技术的发展，即“三代测序技术”。三代测序技术由于目前通量低，成本高，错误率高使得其市场推广受到限制，但若其能突破自身的这些限制因素，未来的市场将不可限量。测序市场目前以二代测序为主，一代、三代测序并存的局面。总之，测序技术的发展正在向着高通量、低成本、长读长的方向发展。

◆ Illumina 测序简介

◇ 文库的基本结构

文库的结构一般如下图所示，中间蓝色部分为待测 DNA 片段，两边红色区域是测序过程中待测 DNA 序列的引物互补序列，黄色和黑色区域是 6/8 个碱基的 index 序列，index 的作用是用来区别不同的文库样本，末端的绿色和橘黄色序列与测序芯片上互补，用于生成 DNA 测序簇。简而言之，建库即在 DNA 片段两端加上测序的接头。一般文库针对 Illumina 测序仪的接头序列是一样的，除转座酶文库及小 RNA 文库在 read1 和 read2 序列上有所不同外，其余的序列都是相同的。Illumina 的测序试剂中包含有传统文库，转座酶及小 RNA 文库的引物，无需另外添加。

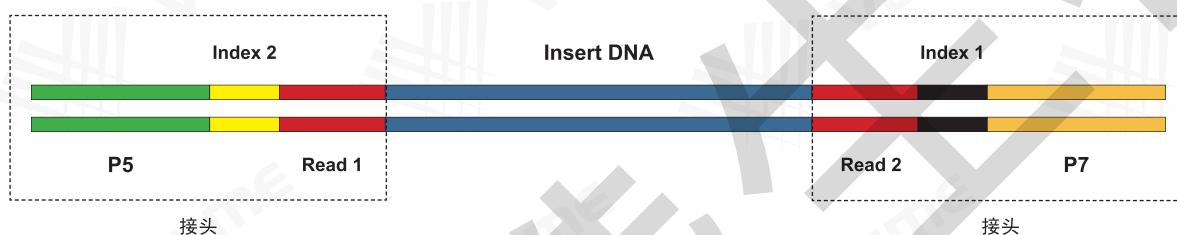


图 3：完整的文库结构

一般文库结构：

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC|||||||ACACTCTTCCCTACACGACGCTTCCGATCT-NNNNNNN-AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAA
CTCCAGTCAC|||||||ATCTCGTATGC CGTCTTCTGCTTG-3'

转座酶文库结构：

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC|||||||TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-NNNNNNN-CTGCTCTTACACATCTCCGAG
CCCACGAGAC|||||||ATCTCGTATGCCGTCTCTGCTTG-3'

小 RNA 文库结构：

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATC-NNNNNNN-AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACCTCCAGTC
A|||||||ATCTCGTATGCCGTCTCTGCTTG-3'

|||||||: index 2 (i5)

-NNNNNN-: 待测 DNA 序列

|||||||: index 1 (i7)

◇ 测序芯片结构

芯片又叫 flowcell，以下图 Illumina X ten 测序仪的芯片为例，可看到芯片表面有 8 条通道，在每个通道的上下表面做了专门的化学修饰，即共价键的方式将 2 种 DNA 引物（即文库两端 P5 和 P7 的相同 / 互补序列）种在玻璃表面。一条通道即为一个 lane，每个通道的两端有小孔，供测序时的酶、dNTP 及 Buffer 等流过。

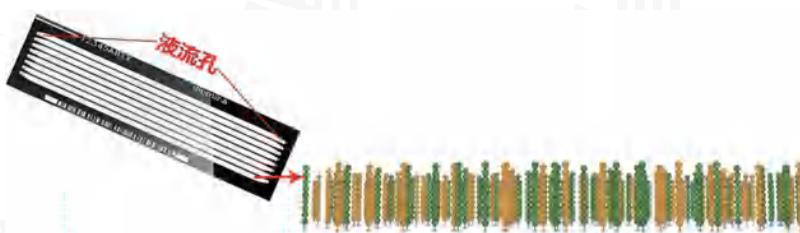


图 4：Illumina 测序芯片图示

◇ Illumina 测序过程

DNA 成簇

构建好的 DNA 文库，需要通过芯片上的引物将文库 DNA 分子种到芯片上，然后通过桥式 PCR 的方式将单分子信号放大成 DNA 簇。

成簇的过程，首先是把变性的单链文库加入到芯片上，文库两端的 DNA 序列与芯片上的引物发生互补配对，这时加入 dNTP 和聚合酶。聚合酶会从引物开始，延着模板合成出一条全新的 DNA 链。接下来，加入 NaOH 碱溶液。DNA 双链就会在 NaOH 碱溶液的作用下，发生解链，经液流冲洗，原来的那条没有和芯片共价连接的链被冲走了，而和芯片共价连接的链被保留下来。然后，再在液流池里加入中性液体，DNA 新链上的另外一端，与玻璃板上的第二种引物发生互补杂交。接下来，加入酶和 dNTP，聚合酶就延着第二个引物，合成出第二条链来；然后，再加入 NaOH 溶液，把 DNA 双链解链；连续重复上述过程，DNA 链的数量就会以指数方式增长。经过一系列的桥式 PCR 后，一个文库分子就形成了上千个拷贝的 DNA 分子簇，这样在测序过程中放大的荧光信号就会被仪器检测到。

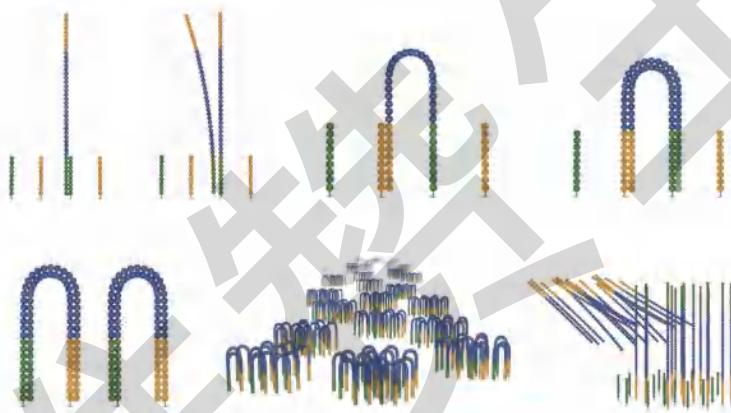


图 5: Illumina DNA 成簇过程

Illumina 测序原理

Illumina 测序技术基本原理是基于可终止的荧光标记 dNTP 来进行的“边合成、边测序”工作。其中可终止的荧光标记 dNTP 就是一个脱氧核糖 3 号位加入叠氮基团封闭了羟基，保证每次只能够在序列上添加 1 个碱基；另一方面是，碱基部分加入了荧光基团，可以激发出不同的颜色，每一轮反应结束后，进行激光扫描，根据发出来的荧光来判断它是哪个碱基。一个循环完成之后，加入一些化学试剂，把叠氮基团和旁边标记的荧光基团切掉，然后 3' 端的羟基就暴露出来，再加入新的 dNTP 和酶，反应一个循环后，又延长一个碱基。不断重复这个过程就可以把上百个碱基，甚至更多碱基的序列读出来。

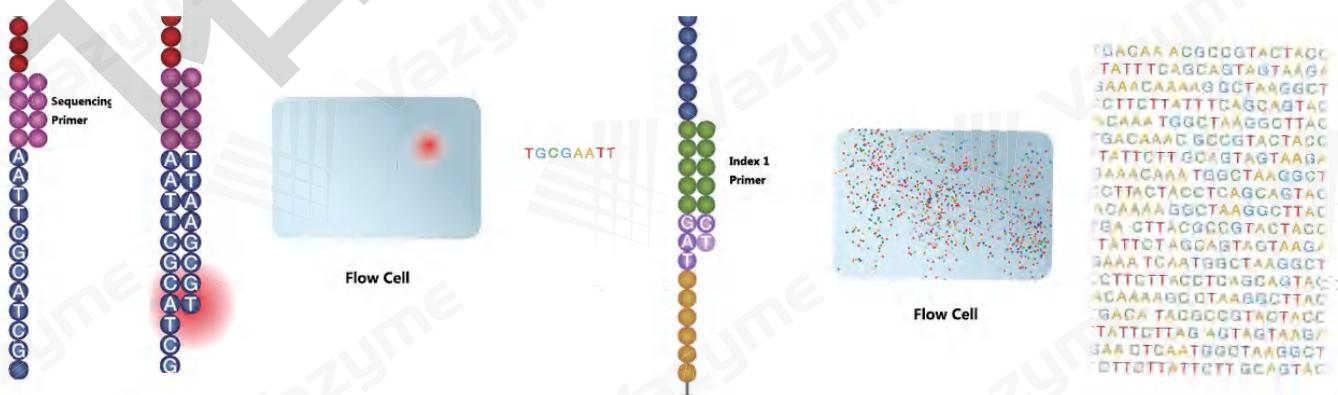


图 6: Illumina 读取过程

◆ 文库质控

上机测序前，对文库进行质控是非常重要的环节。质控过程一般包括三个方面：总核酸定量，文库片段分布检测，有效文库定量。

文库构建完后，首先测定文库的浓度，检测文库的量是否能够上机测序。核酸定量的方式有很多种，但是基于紫外分光光度的测定方法都不准确，比如 Nanodrop 或酶标仪，我们推荐使用染料法来进行核酸定量，文库构建比较常用的核酸定量仪器是 Thermo 的 Qubit 仪器。



图 7: Qubit 3.0 仪器



图 8: Agilent 2100 Bioanalyzer 仪器

如果文库浓度符合上机要求，接下来再检测文库片段分布，文库的片段检测可用 Agilent 2100 Bioanalyzer 或其它等效仪器。Illumina 测序平台有不同的测序仪及测序方案，比如单端测 100 bp (SE100)，单端 150 bp (SE150)，单端 250 bp (SE250)，双端 150 bp (PE150)，双端 250 bp (PE250) 等，多长的文库符合上机，这都是基于上机测序的仪器来决定的。文库掺入片段太短则测序时会测通读到接头，含接头的 reads 一般都会被过滤掉（小 RNA 文库除外），这样会造成数据浪费；而插入片段太长则测序时 DNA 成簇效率会降低，同时过长的文库也会造成测序质量下降。以 PE150 为例，双端各测 150 bp，读长即为 300 bp，文库两端的测序接头在 120-136 bp 之间，那么分选时就可以选择文库主峰在 400-500 bp 之间的片段。文库在分选过程中由于操作原因，文库实际片段大小可能会与预期有一定的偏差。一般情况下，除 ATAC、cfDNA 和 Small RNA 等特殊文库外，文库中小于 280 bp 和大于 1000 bp 的片段占比不要过大（如大于 20%）都可上机测序。

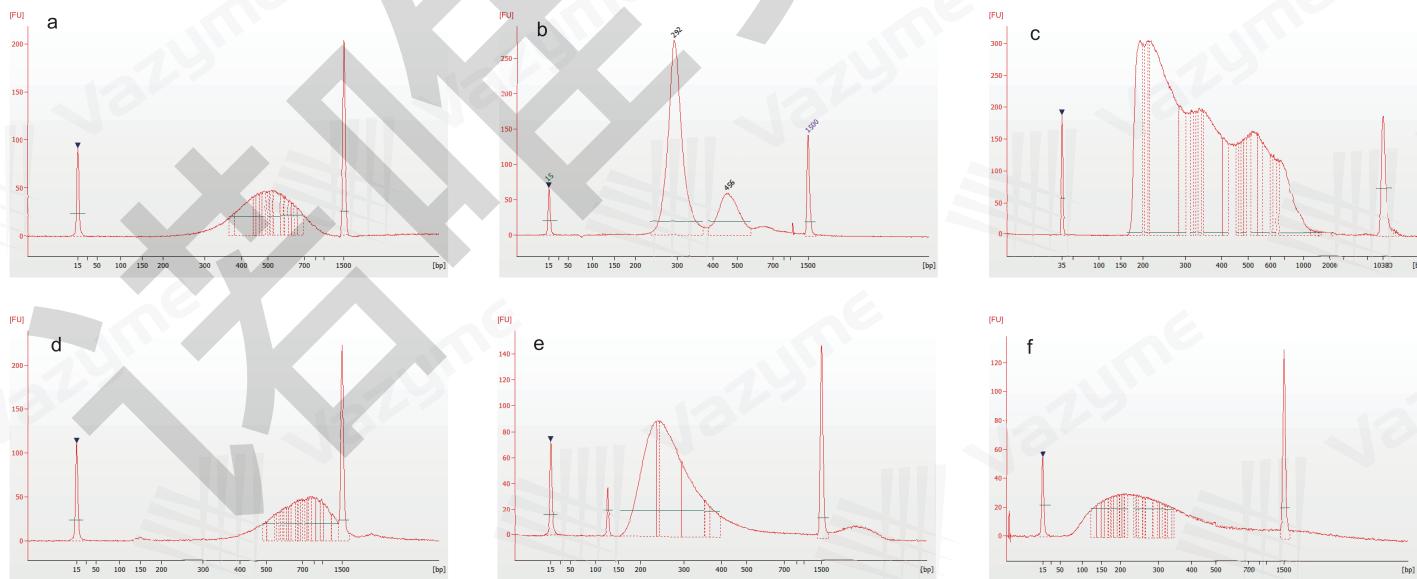


图 9: 文库 2100 质控图。

a 为常规 DNA 文库，b 为 cfDNA 文库，c 为 ATAC 文库，三者为合格的文库；d 为分选偏大的文库，e 为分选偏小且含接头残留的文库，f 为分选偏小的文库，后三者为不合格的文库。

如果文库片段分布符合上机要求，接下来就是对有效文库进行绝对定量。构建的文库，其末端修复效率、加 A 尾效率、接头连接效率等都会导致总文库中含有不带测序接头或单端带接头的文库，即无效文库。无效文库无法进行桥式 PCR 产生测序的 DNA 簇，因此需要在混样前测定有效的文库浓度。有效文库的绝对定量，即 qPCR 的绝对定量，是以芯片上的 P5 和 P7 序列做引物来进行 qPCR 的。

◆ 常规文库测序参数

◇ Raw reads

Raw reads 指下机的初始数据，不同类型的文库需要的测序数据量不同。以人为例，一般全基因组测序需要 90G 左右（30× 测序深度），mRNA 转录组文库测 6G 数据，如果混样不准确会导致测序数据量的偏差。

◇ Clean reads

在初始数据 Raw reads 的基础上，去除其中带接头的 Reads 及低质量（含 N）的 Reads 就是 Clean reads，后续的实验分析都是在 Clean reads 的基础上进行的，有些实验后续分析过程的 Clean reads 也含 Duplication reads 去除。Clean reads 跟上机测序过程和文库大小有关。

◇ Q20/ Q30

Q20/Q30 指测序时每条 Read 中每个碱基正确率大于 99%/99.9% 的数据占比，它是评价测序过程的重要指标，Illumina 不同的测序仪对 Q20 和 Q30 的值要求不同，如 Hiseq 3000/4000, Hiseq X ten 的 Q30 要求大于 75%。

◇ Adapter rate

Adapter rate 即接头残余率，其结果跟文库插入片段大小、测序长度有关。例如，基因组 DNA 文库分选片段主峰为 350 bp，但是文库中小于 280 bp 左右的片段会测到接头，造成 Adapter rate 偏高，Mapping rate 偏低，所以需要将含接头的 Reads 去除后再比对。

◇ Mapping rate

Mapping rate 指 Clean reads 比对到参考基因组的占比。若 Mapping rate 偏低，可从文库污染、标签跳跃上排查，另外含接头的序列未在 Mapping 前去除也是导致比对率低的重要原因。

◇ Coverage rate

Coverage rate 即覆盖度，指 Clean reads 所覆盖到的参考基因组或者扩增子区域的范围，其结果跟测序深度、物种基因组复杂程度、建库试剂有关。

◇ Sequencing depth

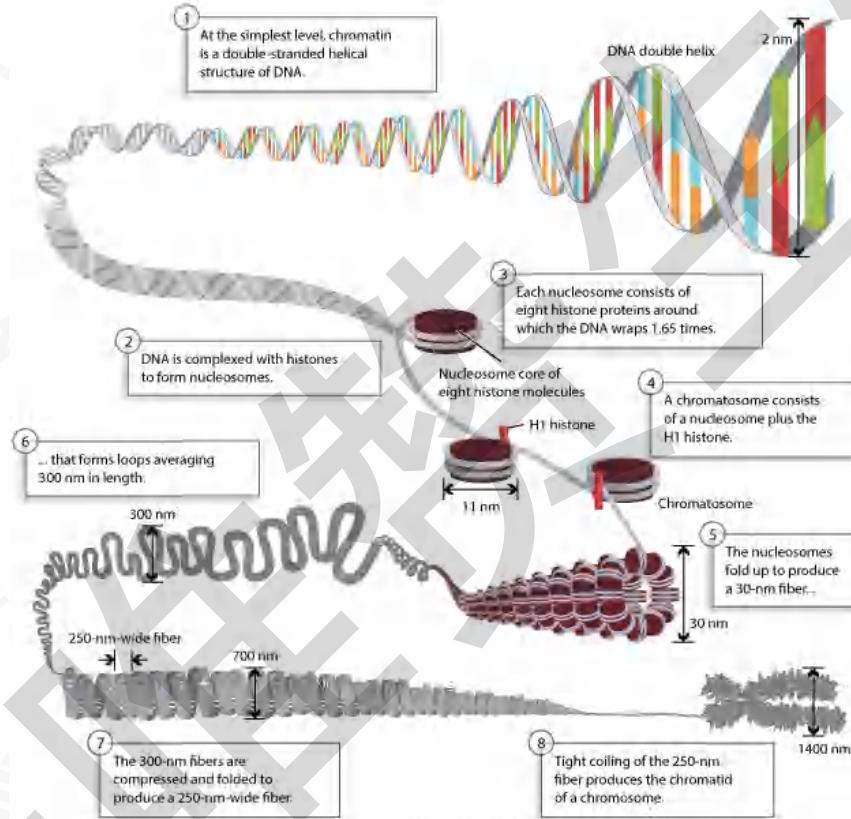
Sequencing depth 即测序深度，指数据量测到的碱基总量与该物种基因组大小的比值，跟测序数据量和基因组大小有关。

◇ Duplication rate

Duplication rate (Dup rate) 即冗余率，指测序时读到的完全相同的分子数的百分比。Dup rate 跟很多因素有关，比如测序深度，Dup rate 会随着测序深度的增加而变大；其次模板分子多样性及复杂性对 Dup rate 的影响也非常大，比如扩增子文库，16s 文库，cfDNA 及 Chip-DNA 这类多样性小的文库其 Dup rate 比均衡的基因组文库要大得多；再次在建库过程中会进行 PCR 富集，如果扩增循环数很大或者建库体系 PCR 偏好性也会使得 Dup rate 增大；另外文库接头连接效率如果很低，文库转化率降低，影响文库的多样性也会让 Dup rate 增大；此外，上机过程中测序簇密度，Cluster PCR 等对 Dup rate 影响很大，这就是为什么 PCR-Free 的文库也会有 Dup rate 的原因。

02 ATAC-seq

◆ 染色体结构



Nature Education, 2008, 1(1): 26.

图 1：染色体包装示意图

人类基因组 DNA 直线长度接近 2 m，而细胞的平均直径一般在几十 μm ，要保证 DNA 的复制和基因表达调控能够准确、高效的进行，需要将细胞核中的 DNA 经过多个水平高度有序的包装。

2 个 H3-H4 二聚体和 2 个 H2A-H2B 二聚体形成约 11 nm 的组蛋白八聚体，DNA 缠绕其上形成核小体，每个核小体上大约含有 146 bp 的 DNA，核小体相互串联成为 30 nm 水平纤丝状染色质。细胞周期的不同时期，染色质浓缩程度不同，在分裂间期，染色质相对松散，具有转录活性的同时 DNA 暴露区域也可被特定的核酸酶接近并切割，而在分裂期，染色质进一步包装为结构紧密的染色体状态，此时呈现出转录惰性。

◆ 染色质可接近性概念

染色质分为常染色质和异染色质，在结构上常染色质折叠压缩程度低，处于伸展状态。DNA 复制、基因转录时，DNA 的致密高级结构变为松散状态，这部分打开的染色质，称之为开放染色质（open chromatin）。染色质一旦被打开，就允许一些调控蛋白，比如转录因子和辅因子与之相结合，染色质的这一特性，就叫做染色质可接近性（chromatin accessibility）。这一特性反映了染色质转录活跃程度。特定条件下的染色质开放性变化可以提供大量的基因表达调控信息。



◆ 转录因子及基因表达调控

真核生物转录调控过程是大量的顺式作用元件与反式作用因子相互作用的结果，具有调控功能的反式作用因子通过结合染色质开放区域控制真核生物转录调控。转录因子识别并结合转录起始位点上游序列或远端增强子元件，通过 DNA- 蛋白质相互作用而调节转录活性，并决定不同基因的时间、空间特异性表达。转录因子与基因组结合时，取代了核小体的位置，暴露出 DNA，使其对酶的切割更为敏感。在此基础上，利用染色质对 DNase 的敏感性，鉴定活化的调控序列。基因表达调控是一个动态平衡的过程，在转录和翻译中，染色体三维结构也会处于动态变化中。

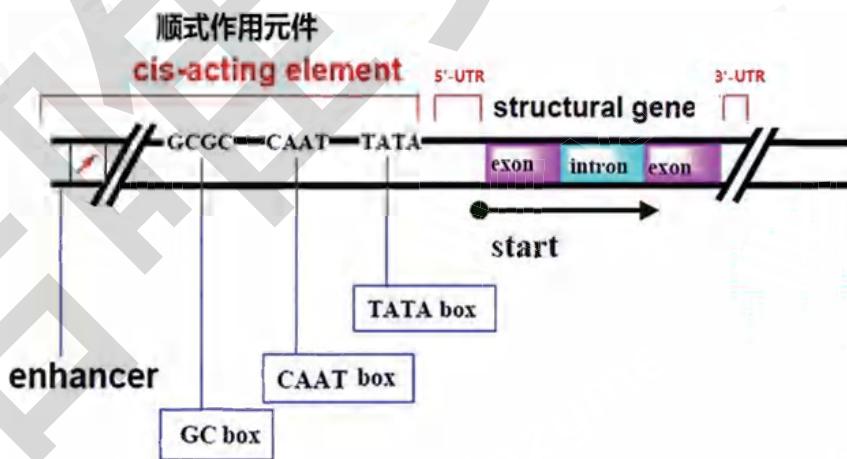


图 3：顺式作用元件示意图

◆ 全基因组染色质可接近性研究

染色质免疫共沉淀技术(chromatin immunoprecipitation, ChIP)与二代测序相结合的 ChIP-seq 技术，能够高效地在全基因组范围内检测与组蛋白修饰、转录因子等相互作用的 DNA 区段。但一次测序只能检测细胞中数百个处于活跃状态转录因子中的一个，检出效率低。

目前染色质可接近性的研究方法主要通过酶解或者化学方法来分离可接近区域或者受保护区域的 DNA 序列，然后再经过高通量分析。转座酶引入高通量测序之前，基因组范围内染色质可接近性的研究方法主要包括 MNase-seq, DNase-seq 和 FAIRE-seq，这些方法可以帮助我们在大量的细胞系和组织样本中鉴定出转录因子的结合位点、转录活性开始的位置、核小体和核小体修饰、增强子和绝缘子等。

MNase-seq: 微球菌核酸酶 (Micrococcal nuclease, MNase) 是一种限制性外切酶, 进行片段化处理时, 将 DNA 切成缺口后, 逐个切除寡核苷酸, 直到获得被核小体包裹或者被转录因子绑定的区域为止。目前 MNase 消化法和二代测序联合使用, 通过定性和定量的方式来识别基因组范围内的平均核小体占据率以及定位。

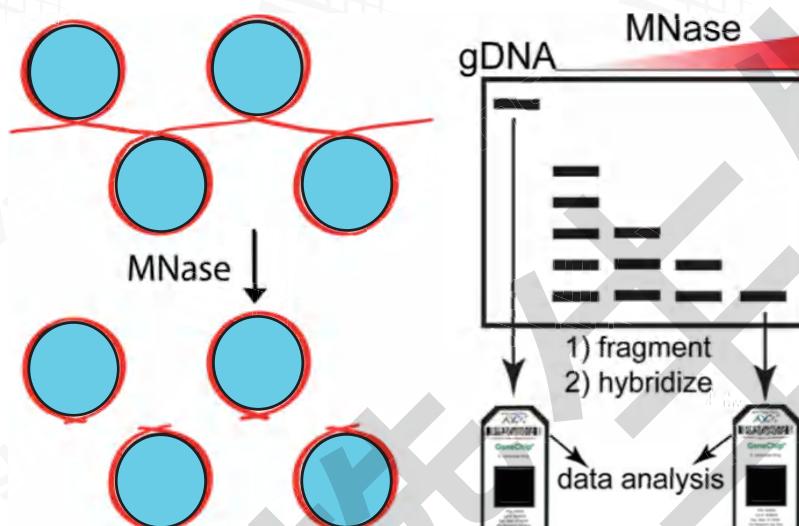
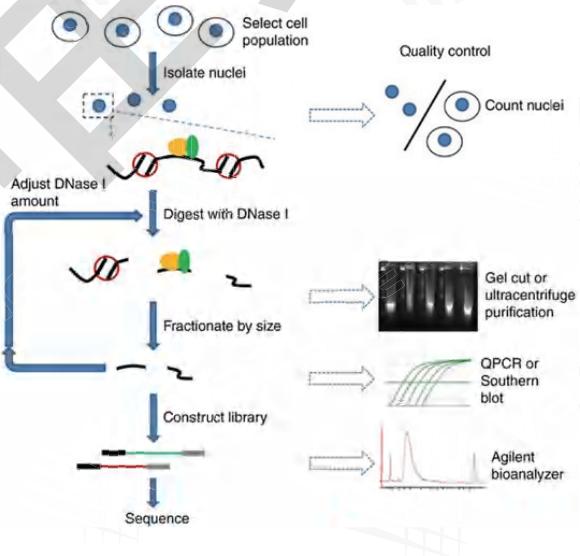


图 4: MNase-Seq 原理图

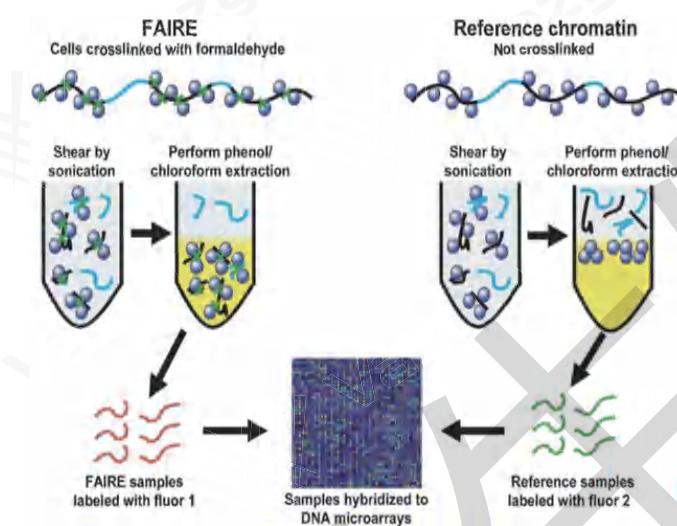
DNase-seq: DNase I 优先切割核小体缺失性基因组位点, 也就是调控元件如启动子、增强子、绝缘子和转录因子结合位点。该技术刚好和 MNase-seq 技术互补。利用 DNase I 优先切割核小体被取代的 DNA 序列, 再对生成的片段进行测序。该方法可用于检测特定转录因子的结合位点。



Nature immunology, 2012, 13(9): 802.

图 5: DNase-Seq 原理图

FAIRE-seq: 是在全基因组范围内鉴定染色质可接近性、检测与调节活性相关的 DNA 序列的方法。用甲醛处理后的细胞与蛋白质-DNA 复合体相互作用相交联, 并对细胞或分离的细胞核进行声波处理来剪切染色质。在声波处理后, 样品被用酚-氯仿抽提。其中, 不与蛋白质 (“开放” 染色质) 相交联的 DNA 在水相中得到恢复, 而蛋白质-DNA 复合体则存留在界面中, 然后用微阵列杂交或高通量测序对水相中的 DNA 进行分析。



Genome research, 2007, 17(6): 877-885.

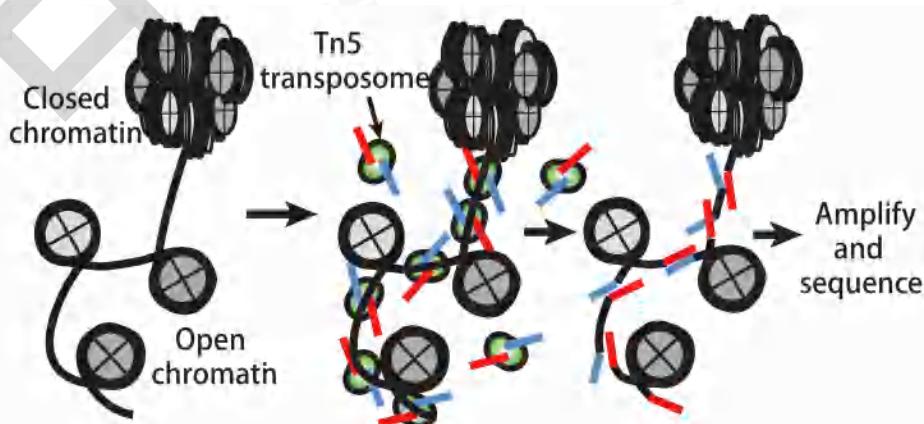
图 6: FAIRE-Seq 原理图

这些研究染色质可接近性、核小体定位、转录因子占位或者染色质生物学“状态”高级的注释方法都涉及多个试验流程，操作复杂，需要数万个细胞作为研究样本，并且样本准备过程非常繁琐。

为了解决这些问题，2013 年 Standford 大学 William Greenleaf 实验室的 Buenrostro 等发布了一项整合的、多维的遗传学分析方法——ATAC-seq，这种方法通过 Tn5 转座酶将测序的 adapters 插入到基因组上的“可接近”区域来标记调控区域。

◆ ATAC-seq

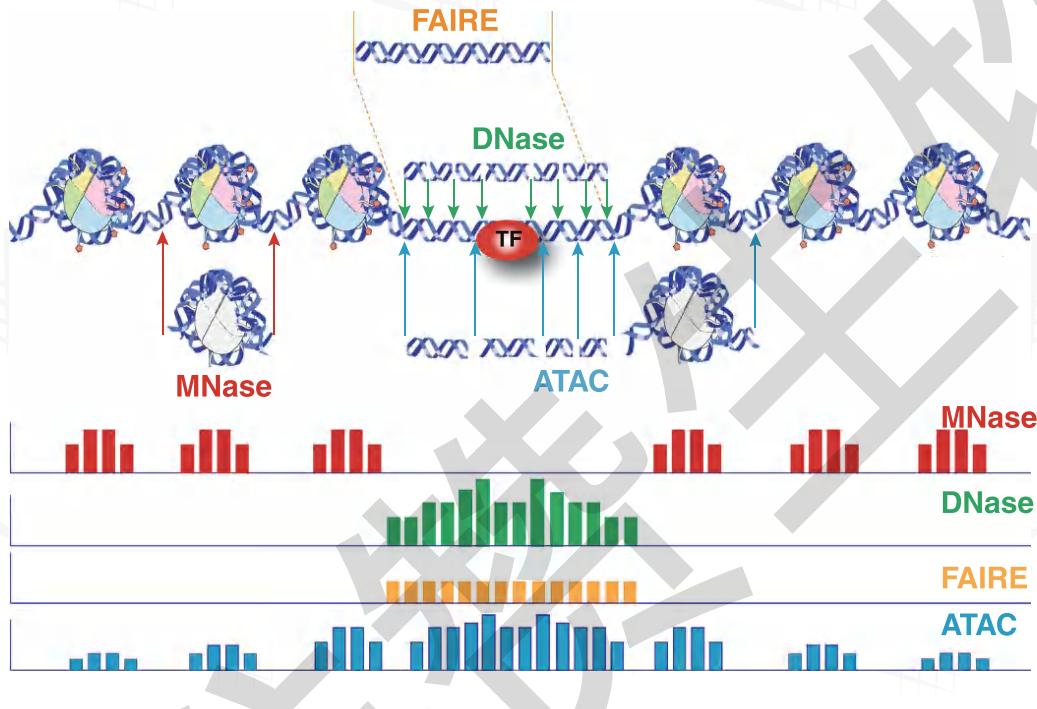
ATAC-seq 全称 Assay for Transposase Accessible Chromatin with high-throughput sequencing，是利用转座酶研究染色质可接近性的高通量测序技术。其原理是利用转座酶 Tn5 容易与开放染色质结合的特性，对 Tn5 酶捕获到的 DNA 序列进行测序。DNA 转座，是把 DNA 序列从染色体的一个区域搬运到另外一个区域的现象，由 DNA 转座酶来实现。前提是需要插入位点的染色质是开放的，否则就会被高级结构所阻拦。只要人为地将携带已知 DNA 序列标签的转座复合物（即下图中带红/蓝色序列标签的转座酶 Tn5 复合物）与细胞核一起孵育，再利用转座插入的序列标签进行 PCR 成为文库，经过测序就可以得到开放染色质的区域。



Nature Methods 10, 1213–1218 (2013)

图 7: ATAC-seq 原理图

ATAC-seq 最少可利用大约 500 个细胞就可以快速的得到调控的多维信息，比其他方法要节省了几个数量级的细胞。并且由于 ATAC-seq 的实验流程中没有片段选择的步骤，所以这种方法可以同时获得“开放”染色质的位置、转录因子的结合位点、核小体的调控区域和染色质状态等信息。



Epigenetics & chromatin, 2014, 7(1): 33.

图 8：4 种研究方法比较图

相对于其他三种染色质开放区域研究，ATAC-seq 经过一次实验，能够获得染色体在某个特定时空条件下所有开放染色质区域，并不仅仅局限于某个转录因子的结合位点，或者某个特定的组蛋白乙酰化区域。

◆ ATAC-seq 基本操作流程

Prepare nuclei Transpose and purify PCR

图 9: ATAC-seq 操作流程图

◇ Vazyme 推荐流程^[7]

适用范围

本方案为 ATAC-seq 文库构建的一般实验流程，若细胞类型或数目较特殊须自行在此基础上进行调整。

必备材料

1、转座酶试剂

TruePrep™ DNA Library Prep Kit V2 for Illumina® (Vazyme #TD501/TD502/503)

2、建库接头

单端 96 种接头（每个货号对应 24 种接头）：

TruePrep™ Index Kit V4 for Illumina® (Vazyme #TD204/TD205/TD206/TD207)

双端 96 种接头：

TruePrep™ Index Kit V2 for Illumina® (Vazyme #TD202)

双端 384 接头：

TruePrep™ Index Kit V3 for Illumina® (Vazyme #TD203)

3、磁珠

VAHTS DNA Clean Beads (Vazyme #N411)

4、其他

Qubit 试剂 (Vazyme #EQ111)、PCR 仪、磁力架、低吸附 EP 管、PCR 管、无水乙醇

5、裂解液

参考裂解液配方 1^[5]：

10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.1% (v/v) Igepal CA-630

参考裂解液配方 2^[7]：(适用于胚胎等较难裂解的细胞)

10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.5% NP-40

▲ 不同的细胞适用的去污剂类型和浓度有所差异，需要根据自己实验细胞做对应的调整。较强的裂解液会影响调控区域的打开与关闭；裂解强度不够则影响细胞破裂，影响酶进入到细胞核内。

注意事项

1. 细胞活性：死亡的细胞组蛋白可能会从核小体上脱落下来，变成裸露的 DNA，转座酶随机切割造成比较强的背景噪音，推荐样本细胞活性 > 95%，最低接受细胞活性 > 80%。细胞活性可用台盼蓝染色鉴定。
2. 成块的细胞对后续的裂解与转座酶进入细胞有很大影响，我们推荐在消化后在显微镜下观察确认细胞离散的状态。
3. 转座酶的使用量与细胞数量有一定的关系，需根据细胞数量选择相应的试剂盒，建议当细胞数量在 $1 \times 10^4 - 5 \times 10^4$ 选用 TD501，当细胞数量在 $1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ 使用 TD502，细胞数目在 1000 个以下建议使用 TD503。
4. 本方案中细胞裂解方式无法有效裂解细胞壁。

▲ 以上细胞数目与试剂盒对应的关系为一般情况的经验推荐，由于具体的细胞类型和操作习惯，具体的比例还需预实验确定。

实验方案

1、细胞收集

- (1) $500 \times g$ 离心 5 min 收集细胞，弃上清，PBS 将细胞沉淀重悬。
- (2) 血球计数板计数。
- (3) 取含目标细胞数目的单细胞悬液， $500 \times g$ 离心 5 min 收集细胞，弃尽上清。
- (4) 用 50 μl 预冷的 Lysis buffer 重悬细胞，冰上放置 10 min 裂解细胞。

- (5) 在 4°C 下， $500 \times g$ 离心 5 min 收集细胞核。

- (6) 弃尽上清，在下一步实验开始前置于冰上。

▲ 若样本体积在 5 μl 以内，可直接加入裂解液裂解细胞。

▲ 为了防止样本丢失，可在离心时，在细胞聚集的管壁方向做好标记，吸取上清时，在沉淀对立面轻轻吸取液体。

2、转座酶打断

(1) 预混打断 Mix

(1)-a、以 TD501 试剂盒为例

预混以下 Mix，用于重悬 & 片段化

组分	体积
5×TTBL	10 μl
TTE Mix V50	5 μl
ddH ₂ O	35 μl
总体积	50 μl

(1)-b、以 TD502/503 试剂盒为例

预混以下 Mix，用于重悬 & 片段化

组分	体积
5 × TTBL	4 μl
TTE Mix V5/V1	5 μl
ddH ₂ O	11 μl
总体积	20 μl

▲ 根据细胞数量选择相应的试剂盒，建议当细胞数量在 $1 \times 10^4 - 5 \times 10^4$ 选用 TD501。

▲ 当细胞数量在 $1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ 之间使用 TD502。

▲ 细胞数目在 1000 个以下建议使用 TD503。

(2) 用打断 Mix 重悬细胞核，并使用移液器轻轻吹打混匀

(3) 将反应管置于 PCR 仪中，进行如下反应

温度	时间
37°C	30 min
4°C	Hold

3、片段化产物纯化

使用 2 × 磁珠纯化酶切产物

- 使用 TD501 时加 100 μ l 磁珠
- 使用 TD502/TD503 时加 40 μ l 磁珠

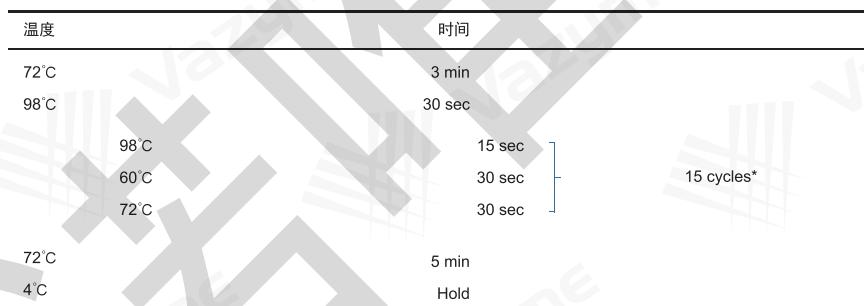
磁珠化步骤见 P31

4、PCR 富集

(1) 在灭菌 PCR 管中配制以下组分

组分	TD501	TD502/503
纯化后的片段化 DNA	24 μ l	24 μ l
ddH ₂ O	-	5 μ l
5 × TAB	10 μ l	10 μ l
PPM	5 μ l	-
P5 Primer X*	5 μ l	5 μ l
P7 Primer X *	5 μ l	5 μ l
TAE	1 μ l	1 μ l
总体积	50 μ l	50 μ l

(2) 使用移液器轻轻吹打混匀，在 PCR 仪中进行如下反应



5、PCR 产物纯化

使用 60 μ l (1.2 x) VAHTS DNA Clean Beads 进行纯化

磁珠化步骤见 P32

▲ 若购买 TruePrep™ Index Kit V4 for Illumina (TD204/TD205/TD206/TD207) 的引物，则其中 P5 Primer X 都为 N101, P7 Primer X 对应为 N9XX;

▲ 若购买 TruePrep™ Index Kit V3 for Illumina (TD203) 的引物，则对应的 P5 Primer X 为 N6XX, P7 Primer X 为对应 N8XX;

▲ 若购买 TruePrep™ Index Kit V2 for Illumina (Vazyme #TD202) 的引物，则对应的 P5 Primer X 为 N5XX, P7 Primer X 对应为 N7XX，可根据样品数量和 Index 选择策略自行选择。

▲ 不同细胞起始对应的循环数有差别，15 个 cycles 对应的为 10^4 个细胞的一般经验值，不同的样本需要做一些调整。

6、文库质控

1、用 Qubit 仪器和对应的试剂测文库浓度

2、安捷伦 2100 检测文库片段分布

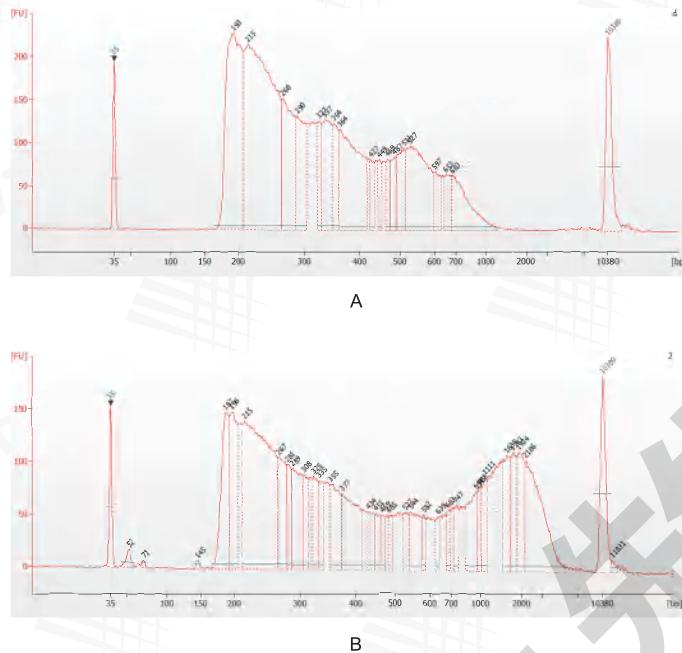
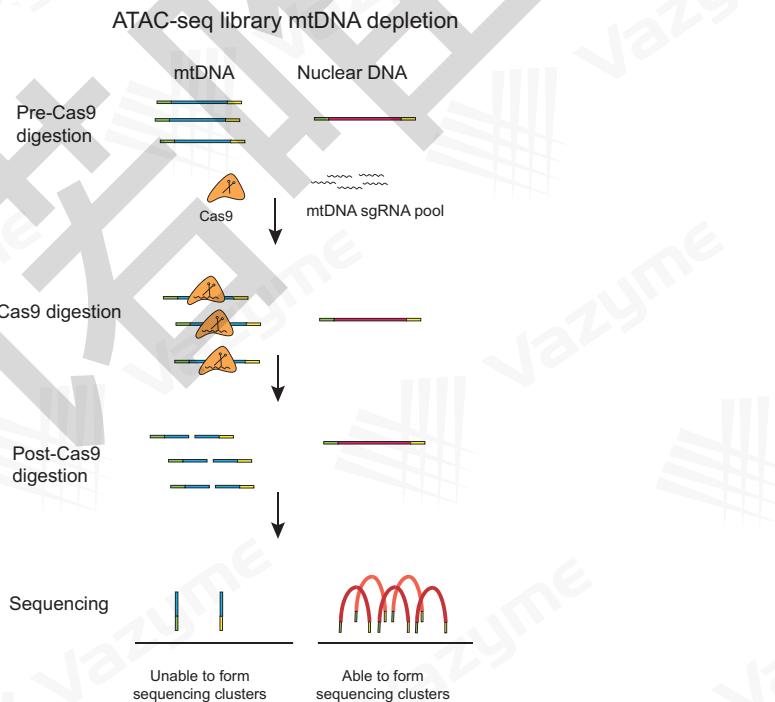


图 10: ATAC-seq 文库 2100 检测图

▲ 转座酶切割核小体模型最小单位约为 40 bp, 因此 ATAC 第一个峰值在 180-200 bp 左右, 后面的小峰为两个, 三个核小体模型, 如果酶量相对细胞过量, 则文库可能只有一个核小体模型, 即只有一个主峰。

▲ 如果出现图 B 的大片段残留, 可用磁珠将大片段分选去除, 若分选 200-700 bp 的文库, 推荐 $0.55 \times / 1 \times$ 的方案进行分选 (步骤参见 P29), 也可直接上机测序(大片段成簇效率低)。

◇ 线粒体去除^[7]



1、将 sgRNA 克隆进载体

2、质粒转化与培养

3、线性化质粒 PCR 反应

A、用带有 T7 promoter 的引物进行 PCR 扩增

B、磁珠纯化

C、体外转录

D、sgRNA 纯化

4、Cas9 消化

Nature, 2016, 534(7609): 652-7.

图 11: ATAC-seq 线粒体去除流程图

经过 Cas9 消化后的文库, 在进行测序时, 被切割的分子无法长簇, 从而达到去除线粒体的目的。

◇ 测序技术参数推荐

- 1、测序策略: Illumina 平台 , PE 150
- 2、推荐数据量: 开放染色质区域的差异鉴定, 不低于 30 M reads/ 样本
若不进行线粒体 DNA 去除, 推荐不低于 50 M reads/ 样本

◆ ATAC-seq 技术关键

◇ A、细胞核提取

ATAC-Seq 和 RNA-Seq 一样, 样本具有时空特异性, 建库时需要对细胞进行裂解提取细胞核, 再通过转座酶对细胞核正在转录的染色质进行酶切, 所以对细胞核的提取有一定的要求。

◇ B、线粒体 DNA 污染

转座酶对 DNA 序列进行切割时, 只要是转座酶可以接近的区域都可以进行切割, 所以数据中会存在有线粒体的 DNA 序列。需要将线粒体 DNA 进行去除, 若不去除则需增加测序数据量。

◆ 特殊样本流程

表 1 : 特殊样本简要流程图

实验步骤	材料						
	细胞		组织			单细胞 ^[13]	酵母 ^[14]
slow-cooling cryopreservation ^[8]	培养细胞 ^[7]	Fresh 动物组织 ^[9]	冰冻组织 ^[10]	植物组织 不带标签 ^{[11][12]}	植物组织 带标签 ^[11]		对数期酵母细胞
细胞核获取	37°C 解冻后, 加入裂解液进行裂解, 离心收集细胞核	细胞液裂解	取小块新鲜组织, 加入裂解 Buffer 移液器吹打, 注射器吹打, 离心	细胞核提取	细胞核提取	使用链霉素和素进行拉取	制备细胞悬液, 使用 C1 仪器, 进行单细胞 loading 酵母裂解酶裂解
细胞核计数	/		DAPI 染色细胞核计数			/	/
转座酶打断	37°C 30 min						
预扩增	/	/	/	/	/	/	使用不带 index 的引物在芯片上进行 5 个循环的扩增
片段化产物纯化	磁珠纯化 / 柱纯化					/	磁珠纯化 / 柱纯化
PCR 富集	带有 index 的引物进行 PCR 扩增					每个反应取 10 μl C1 上下来的产物进行 50 μl 体系扩增	PCR 扩增

◆ 特殊样本流程摘要

特殊样本的核提取以及操作流程均摘自文献，没有经过诺唯赞研发部测试，请大家参考时慎重！

◇ 冰冻组织^[10]

相比于 ATAC-seq 做了以下改动：

- 1、去污剂的使用，NP40, Tween-20, digitonin 可增加各类细胞的通透性，在转座反应时去掉线粒体；
- 2、裂解之后用 Tween-20 清洗，可以进一步的去除线粒体，增加文库的复杂度；
- 3、转座反应时加入 PBS 可以增加信噪比。

Omni-ATAC（改进）

确保细胞活力在 90%-95%；

- 1、如果细胞含 5%-15% 的死细胞，在培养基中加入一定浓度的 DNase I，37°C 孵育，用 PBS 进行清洗，去除 DNase I 后进行 ATAC 反应；
- 2、如果细胞含 15%-20% 的死细胞，使用 ficoll 分离出活细胞；
- 3、如果细胞含大于 20% 的死细胞将细胞进行分裂或者使用基于 Annexin V 的磁珠法进行抓取。

冰冻组织细胞核提取：

- 1、将冰冻组织与研磨液置于预冷的匀浆仪中；
- 2、使用研磨杵研磨、过滤；
- 3、离心去除剩余的大块组织，转移至 EP 管中；
- 4、使用碘克沙醇梯度离心分离细胞核；
- 5、将细胞核转移至新的管子中；
- 6、使用 DAPI 进行细胞核计数。

Omni-ATAC：转座条件

- 1、离心收集细胞；
- 2、加入预冷的 ATAC-Resuspension Buffer，移液器吹打混匀；
- 3、冰上孵育；
- 4、加入预冷的 ATAC-RSB，用移液器轻轻混匀；
- 5、离心收核，弃上清；
- 6、加入转座体系 mix，轻轻混合；
- 7、37°C 孵育 30min，纯化；
- 8、PCR 扩增。

◇ 植物 ATAC-seq^{[11][12]}

A、Purification of Tagged Nuclei Using INTACT

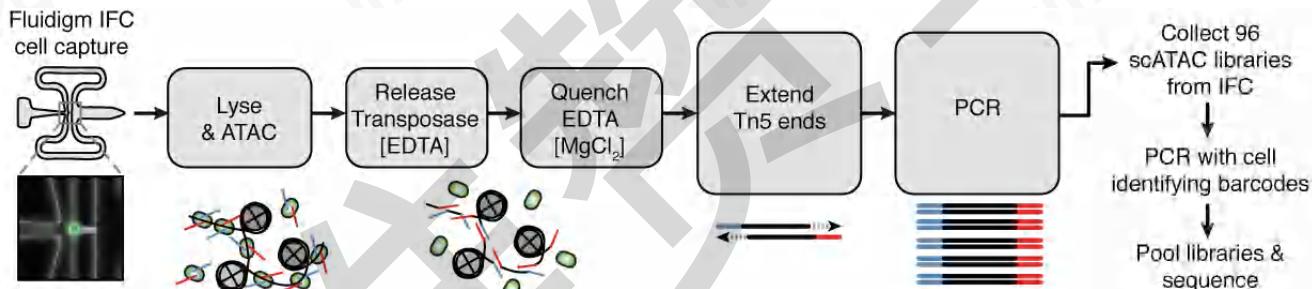
- 1、称取根或者叶子，进行液氮研磨，将粉末转移到核提取 buffer 中；
- 2、将组织悬液转移出，用细胞过滤器进行过滤；
- 3、离心弃上清；
- 4、使用核提取 Buffer 重悬沉淀，将核粗提取物转移到 1.5 ml 的管子；
- 5、清洗链霉亲和素 M280；
- 6、使用链霉亲和素 M280 进行抓取；
- 7、抓取的细胞核计数。

B、Purification of Total Nuclei Using Sucrose Sedimentation

- 1、液氮研磨植物组织至粉末状；
- 2、转移粉末至预冷的核纯化 Buffer 中研磨；
- 3、将组织重悬物用细胞过滤器过滤；
- 4、离心，弃上清；
- 5、使用核提取 Buffer2 重悬，将悬液转移到新管，离心；
- 6、小心移除上清并用核提取 Buffer3 进行重悬；
- 7、加预冷的核提取 Buffer3 于一个新的 EP 管中，小心的转移上步重悬的微球至新鲜的核提取 Buffer3 的顶部，离心；
- 8、小心移除上清，预冷的核纯化 Buffer 重新细胞核团，置于冰上；
- 9、取部分进行 DAPI 染色；
- 10、使用血球计数板对 DAPI 染色的细胞核进行计数；
- 11、取细胞核进行 ATAC-seq 反应。

◇ 单细胞 ATAC-seq^[13]

Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation



Nature, 2015, 523(7561): 486.

图 12: 单细胞 ATAC-seq 流程图

1、细胞捕获：

细胞捕获使用 C1 Single-Cell Auto Prep IFC microfluidic chips，运行 ATAC-seq；细胞捕获完后，进行镜检。

2、片段化以及预扩增：

使用 ATAC-seq 程序加样；
Tn5 转座酶在含有 NP40 的体系中 37°C 反应 30 min；
转座完以后，加入 EDTA 使 Tn5-DNA 复合物从染色体上脱落；
添加 MgCl₂ 中和过量的 EDTA；
使用 PCR Mix 进行不含 index 引物进行预扩增，收集样本；
进行带有 index 的引物扩增。纯化后进行 qPCR 定量。

◇ 酵母 ATAC-seq^[14]

- 1、取对数中期细胞，进行计数；
- 2、用山梨醇 Buffer 进行洗涤细胞；
- 3、加入酵母裂解酶，震荡孵育；
- 4、使用山梨醇 Buffer 清洗两次；
- 5、加入转座酶反应 Mix 37°C，30 min 打断；
- 6、PCR 扩增。

◆ ATAC-seq 联合分析策略

◇ ATAC-seq 与 RNA-seq 联合分析

ATAC-seq 与 RNA-seq 联合分析，可以获得生物体的转录调控机制。通过 ATAC-seq 获得细胞在某一特定时空下染色质展开区域的信息，可用于检测在该条件下发生转录的基因及顺式作用元件。通过 RNA-seq 技术可获得细胞在该特定时空下所有转录本信息。将两者数据相整合，则可以推断相关基因上游的顺式调控序列，宏观分析细胞在特定时空下整个基因组的调控网络。同时 ATAC-seq 数据可以更好的支撑 RNA-seq 数据，更为精确地探索基因高表达和低表达的转录调控机制。这一策略广泛应用于不同类型的细胞分化，肿瘤发生发展以及胚胎发育等生物学研究过程。

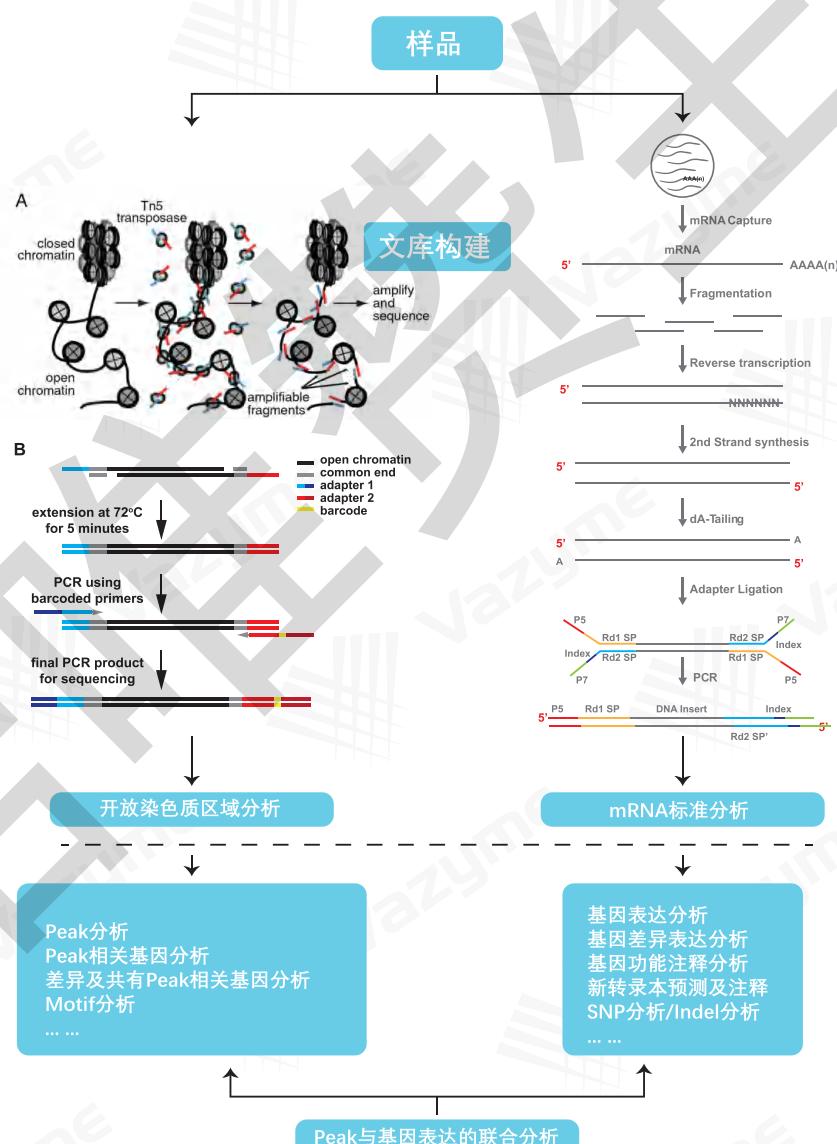


图 13: ATAC-seq 与 RNA-seq 联合分析图

◇ ATAC-seq 和 ChIP-seq 联合分析

ATAC-seq 和 ChIP-seq 联合分析，可以对 ATAC-seq 得到的一些转录因子结合区进行验证。从 ATAC-seq 我们可以了解到染色质的可接近性的动态变化，由于由于染色质的可及性与调控元件或转录因子的结合密切相关，在转录调控中发挥着重要的作用。ChIP-seq 整合分析可以进一步探究调控某一生物学过程的关键因子（包括顺式调控元件和转录因子），以及哪个转录因子调控了感兴趣的基因，以及感兴趣的转录因子的靶基因等。

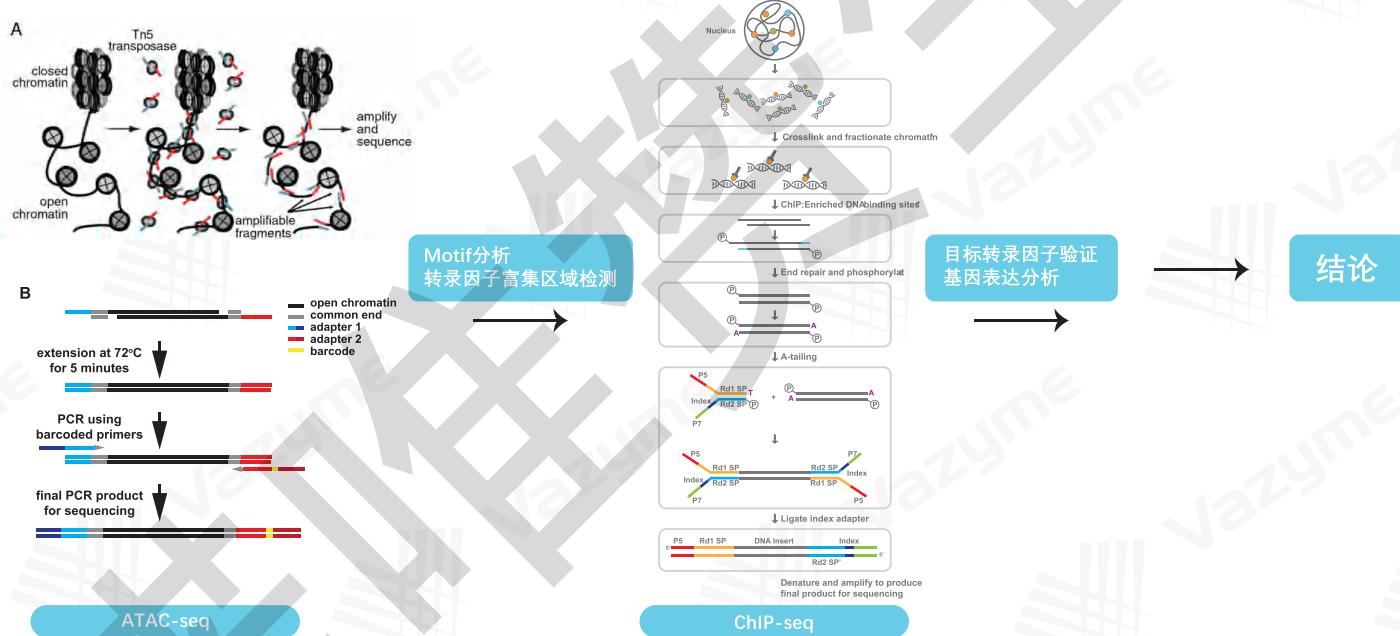


图 14: ATAC-seq 与 ChIP-seq 联合分析图

◆ 案例分析

◇ 动物

ARTICLE

doi:10.1038/nature18606

The landscape of accessible chromatin in mammalian preimplantation embryos

该研究通过将 ATAC-seq 与 CRISPR/Cas9 辅助线粒体去除技术相结合，绘制出了小鼠着床前胚胎中全基因组易接近染色质图谱。通过将 ATAC-seq 鉴定出的顺式调控元件和单细胞转录组图谱相整合，构建出了早期发育的调控网络，帮助确定了一些重要的谱系专项分化调控因子。发现在小鼠胚胎发育的不同阶段，被激活的基因的启动子区域均处于开放状态。最后，该研究提出在主要合子基因组激活之前一些顺式调控元件及相关开放染色质的活性下降。总体看来，这些研究数据揭示出了伴随早期哺乳动物发育的一些独特的时空染色质结构和基因表达模式。由此可见，多组学联合分析在研究胚胎发育和细胞分化方面具有广阔的发展前景^[7]。

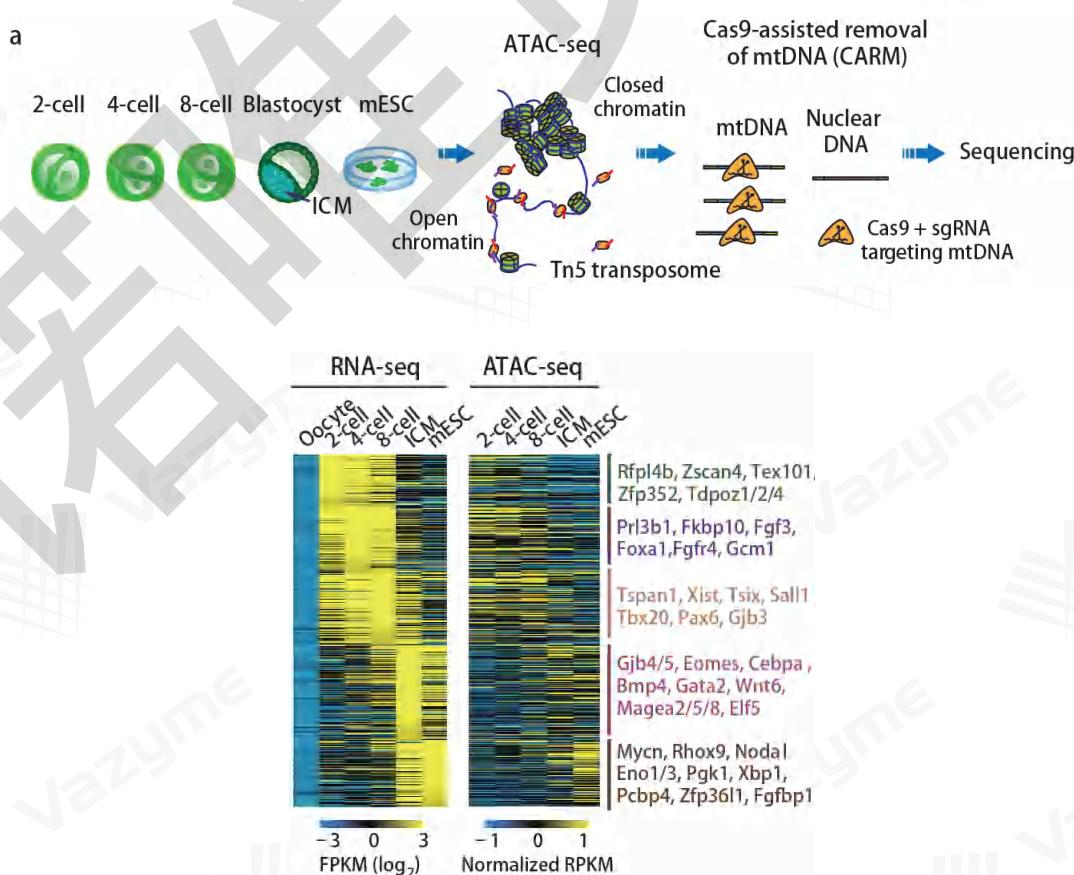


图 15：小鼠着床前胚胎易接近染色质图谱

◇ 植物

Published online 28 November 2016

Nucleic Acids Research, 2017, Vol. 45, No. 6 e41
doi: 10.1093/nar/gkw1179

Combining ATAC-seq with nuclei sorting for discovery of cis-regulatory regions in plant genomes

Zefu Lu¹, Brigitte T. Hofmeister², Christopher Vollmers³, Rebecca M. DuBois³ and Robert J. Schmitz^{1,*}

为了探究可接近区域的生物学功能，该研究鉴定了拟南芥整株幼苗 (Col-0 50000seedling replicate 1) 和根 (Col-0 50000 root replicate 1) 的组织特异性区域，进而在 TSS 上游 1kb 的 peak 中和基因区找出 1265 个整株幼苗特异性基因和 808 个根特异性基因。对这些基因进行 GO 功能分析，发现幼苗特异性基因主要与光合作用有关，而根特异性基因主要与环境应激有关，这与不同组织的主要功能一致。同时为了探究 FANS-ATAC-seq 是否也可以用来检测 TF-binding 位点，研究者比较了已发表的 7 个转录因子的 ChIP-seq 数据与 FANS-ATAC-seq 结果，结果显示大部分的 ChIP-seq peak 与可接近区域相关。这表明，FANS-ATAC-seq 是寻找基因组范围的 DNA-TF 互作的一种有效手段^[12]。

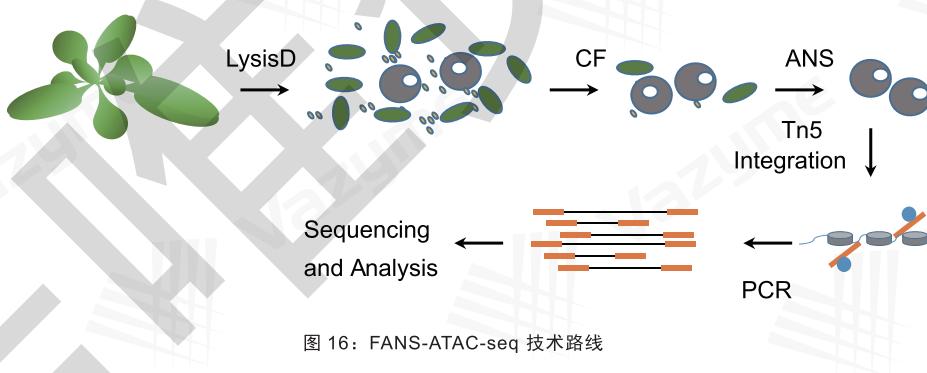


图 16: FANS-ATAC-seq 技术路线

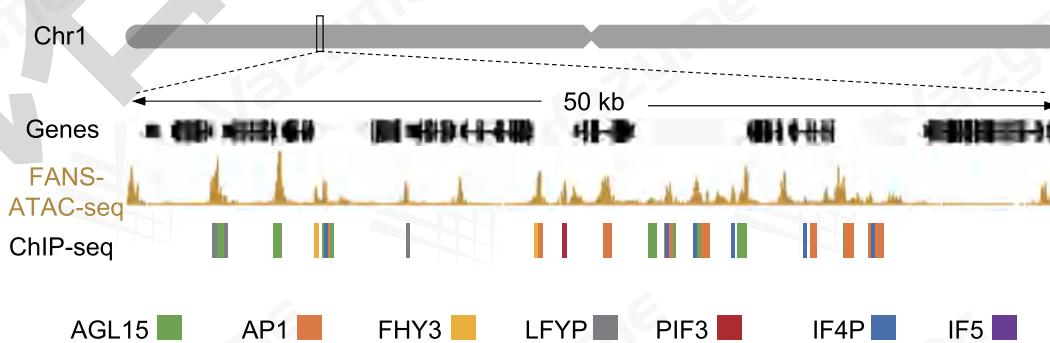


图 17: FANS-ATAC-seq 和 ChIP-seq 结果对比

03 文库纯化和分选

◆ 磁珠结构

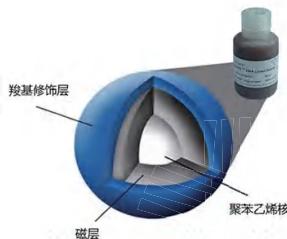


图 1：磁珠的一般结构

磁珠一般分为三层结构，最内层为支撑材料，比如聚苯乙烯做的内核；中间层为磁层，磁层通常的材料是 Fe_3O_4 ，主要作用是与磁力架上的磁铁相互吸附，从而分离核酸与反应溶液；最外层是修饰层，不同公司的最外层材料有所区别，但一般都是一些带负电的基团，比如常见的羧基材料。磁珠一般保存在 4°C 条件下，低温，如 -20°C 会破坏磁珠的结构从而导致回收效率降低。此外由于磁珠的 buffer 比较粘稠，使用前需要将磁珠上下颠倒或震荡混合后再使用。

▲ 分选磁珠的作用原理是基于一种固相载体可逆化固 (SPRI) 的分离纯化方法。磁珠可分为 DNA 磁珠和 RNA 磁珠，二者的差别在于 RNA 磁珠中含有 RNA 保护成分以防止 RNA 降解，其纯化和分选原理相同 (Vazyme)。

▲ 磁珠在使用前一定要平衡至室温且震荡混匀，目的是使磁珠中的 buffer 和 beads 均一化，否则容易造成文库纯化和分选效果的偏差。

◆ 磁珠纯化原理

在文库扩增完或者建库过程中常会遇到纯化过程，由于核酸量较少，且为了节约纯化时间，一般都是采用磁珠法纯化反应体系。核酸在磁珠 buffer 的环境下，DNA 分子会由线性压缩成球状，暴露出核酸骨架上大量的负电基团，在 buffer 体系中的阳离子连接核酸和磁珠形成“阴离子 - 阳离子 - 阴离子”的盐桥结构，使 DNA 被特异性吸附到磁珠表面。当 buffer 被去除之后，加入水性分子，会快速充分水化 DNA，解除其三者之间的离子相互作用，使得吸附到磁珠的 DNA 被纯化出来。在分选体系中，磁珠与反应体系的体积比例越高，抓取的 DNA 量就多，能抓到的片段就越小，因此，对于纯化的 DNA 片段比较小时，所加的磁珠量就要提高。

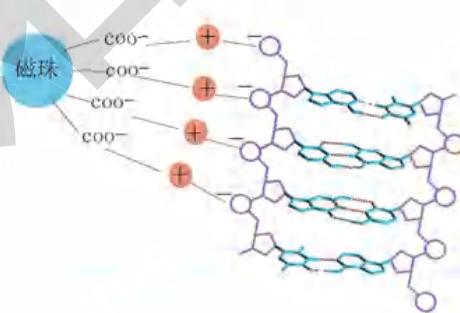


图 2：核酸与磁珠之间的盐桥结构图示

在磁珠纯化中会用到 80% 的乙醇，在这个浓度下，核酸不会溶解，用乙醇可以将体系中残留的酶和 buffer 洗一遍使得到的文库更纯。80% 的乙醇需要新配置，久置的乙醇会挥发，最终导致乙醇的有效浓度下降，这样在洗磁珠的过程中会有部分核酸溶解，导致最终的文库产量偏低。

▲ 在纯化或分选过程中常会遇到用多少乘的磁珠量这个概念，这里的乘数是指加入的磁珠与待纯化或者分选的溶液的体积比，例如需要纯化或分选的 PCR 产物体积是 $50 \mu\text{l}$ ，加入 $50 \mu\text{l}$ 的磁珠到体系中即为 $1 \times$ 。

▲ 在纯化或分选过程中 80% 的乙醇清洗后，有一个晾干的过程，残留的乙醇可能会对后续的实验造成影响，所以需要将乙醇挥发完，但过度干燥会影响水洗脱的水化过程，使文库得率降低，可在晾干的过程中注意观察磁珠的表面，刚好晾干的磁珠状态是表面灰暗没有水光。

◆ 磁珠纯化操作过程

◇ 操作过程

- 1、磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀。
- 2、吸取所需磁珠量至产物中，涡旋振荡混匀，或使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀。
- 3、室温孵育 5 min。
- 4、将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清后（约 5 min），小心移除上清。
- 5、保持 PCR 管始终置于磁力架中，加入 200 μ l 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。
- 6、重复步骤 5，总计漂洗两次。
- 7、保持 PCR 管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠 5-10 min 至无乙醇残留。
- 8、将 PCR 管从磁力架中取出，加入水或者 Buffer 进行洗脱，室温静置 5 min。
- 9、PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后，小心移取上清转移至新的 PCR 管中。

▲ 磁珠必须先进行室温静置 30 min 以上，使用前进行涡旋振荡混匀，否则会对抓取效率造成影响。

▲ 所谓磁珠的乘数，都是按照原始的样本体积进行计算，假设样本体积为 50 μ l，那么 1.8 \times ，则加入的磁珠量为 80 μ l。

▲ 80% 乙醇需要新鲜配制，否则有可能会影响磁珠的抓取效率。

▲ 磁珠晾干时一定要刚刚好，磁珠表面没有光泽，过干则会影响洗脱效率，晾干不充分则会有酒精残留，影响后续实验。

◆ 磁珠分选原理

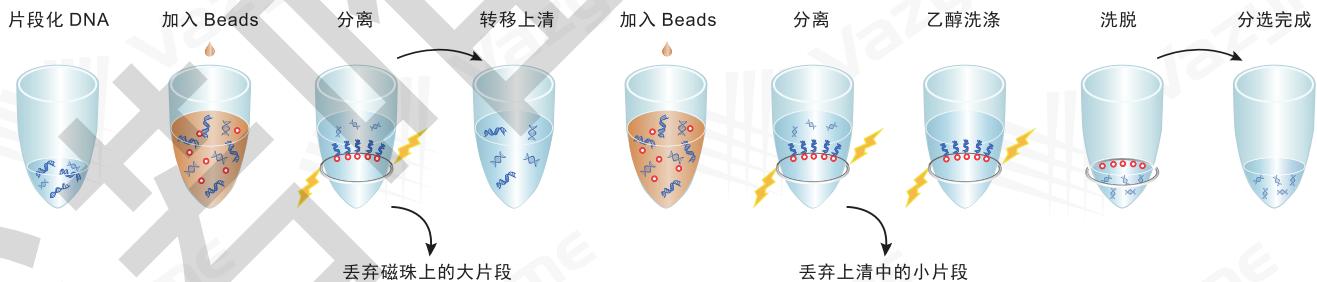


图 3：磁珠分选图示

磁珠会优先抓取较大的核酸片段，在分选过程中，是通过控制两轮磁珠的加入量来分选到所要大小的文库片段的。第一轮加入磁珠，先结合了体系中的大片段，在这一步弃磁珠，丢掉大片段，再加一轮磁珠，磁珠与余下体积中的大片段核酸结合，这一步弃上清，丢掉小片段，两轮磁珠后就抓取到了中间片段的核酸。

▲ 磁珠在分选过程中比较容易造成文库大小与理论大小有偏差，原因有以下三点：

- 1、体系在 PCR 过程中会蒸发，使得分选时实际体积比理论体积小，得到的文库也会偏小，可以在分选前将体积补齐。
- 2、枪头有磁珠挂壁或者没有完全将磁珠加入体系中，由于磁珠溶液比较粘稠，在分选过程中请使用低吸附耗材，注意操作。
- 3、移液器不准，移液器日常保养中要定期校正，不准确的移液器对分选过程影响会很大。

◆ 磁珠分选操作过程

◇ 分选操作

- 1、磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀。
- 2、准确量取需纯化样本的体积。
- 3、准确吸取 X 乘磁珠至产物中，涡旋震荡或者用移液器轻轻吹打混匀，室温孵育 5 min。
- 4、将反应管短暂离心并置于磁力架上，使磁珠和液体分离，待溶液澄清后（约 5 min），转移上清至新的灭菌 PCR 管中，丢弃磁珠。
- 5、涡旋振荡磁珠，并吸取 Y 乘至上清中，涡旋振荡或是用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，室温孵育 5 min。
- 6、将反应管短暂离心并置于磁力架上，加入 200 μ l 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。
- 7、重复步骤 6，总计漂洗两次。
- 8、保持反应管始终处于磁力架上，开盖晾干，时间约为 (5-10 min)。
- 9、将反应管从磁力架去除，加上一定体积无菌水洗脱，涡旋震荡或使用移液器充分混匀，室温孵育 5 min。
- 10、将反应管短暂离心置于磁力架上，使磁珠和液体分离，待溶液澄清后（约 5 min），小心吸取一定体积上清至新的灭菌 PCR 管中，-20°C 保存。

▲ 磁珠必须先进行室温静置 30 min 以上，使用前进行涡旋振荡混匀，否则会对抓取效率造成影响。

▲ 磁珠比较粘稠，量取的磁珠体积要准确，否则可能导致分选片段的长度与预期不一致。

主峰	350 bp	450 bp	550 bp
X	0.7 ×	0.6 ×	0.5 ×
Y	0.15 ×	0.15 ×	0.15 ×

▲ 分选 550 bp 主峰，R¹ 为 0.5 ×，R² 为 0.15 ×。
 $R^1=0.5*50=25 \mu\text{l}$, $R^2=0.15*50=7.5 \mu\text{l}$ 。

▲ 转移上清，弃掉磁珠，这一点跟纯化刚好相反，不要弄混。

▲ 磁珠晾干时一定要刚刚好，磁珠表面没有光泽，过干则会影响洗脱效率，晾干不充分则会有酒精残留，影响后续实验。

04 常见问题及解决方案

◇ 客户重复之前的 ATAC 实验操作，发现酶切效果不好。

建议对以下点进行排查：

- 1、外源核酸污染：替换所有耗材并做 Control DNA 测试。
- 2、细胞状态与细胞数量：进行台盼蓝染色鉴定与计数。要求细胞数目合适，死细胞比例不超过 5%。
- 3、细胞不易获得的情况下，可以尝试将文库上机先预测 1-2G 数据，视数据质量再补测数据量。

◇ ATAC 文库在进行质检时，文库呈现什么样的分布是正常的分布？

转座酶会容易与核小体间隔部分的 DNA 接触，发生打断反应。构建成功的 ATAC 文库在 2100 峰图上会呈现明显的核小体的 pattern 特征峰，其中：

第一个在 180-200 bp 的位置，属于核小体之间的区域 (40+136) bp

第二个在 300-400 bp

第三个在 500 bp 左右

如果有第四个会在 700 bp 附近

核小体全长一般在 180~200 bp，平均 200 bp。其中，140 多 bp 是直接盘绕在组蛋白八聚体核心外面，这些 DNA 不易被核酸酶消化；其余为核小体间区。不同组织、细胞，同一细胞染色体的不同区段，盘绕在组蛋白八聚体核心外面的 DNA 长度是不同的，如：真菌的可短至 154 bp、海胆精子的可长达 260 bp。

◇ 培养细胞进行 ATAC-seq 时支原体污染严重，使用支原体清除剂后，细胞是否能够继续进行建库？

支原体是原核生物，DNA 呈裸露状态，当细胞被支原体感染，进行 ATAC-seq 实验时，裸露的 DNA 会被切割，扩增。使用支原体清除剂清除后，仍会有 DNA 残留，进行 ATAC-seq 实验捕获的开放区域占比少。存在污染时，污染会被放大。

05 参考文献

◆ 参考文献

- [1] Annunziato A. DNA packaging: nucleosomes and chromatin[J]. *Nature Education*, 2008, 1(1): 26.
- [2] Shlyueva D, Stampfel G, Stark A. Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2014, 15(4): 272.
- [3] Zeng W, Mortazavi A. Technical considerations for functional sequencing assays[J]. *Nature immunology*, 2012, 13(9): 802.
- [4] Giresi P G, Kim J, McDaniell R M, et al. FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) isolates active regulatory elements from human chromatin[J]. *Genome research*, 2007, 17(6): 877-885.
- [5] Buenrostro J D, Giresi P G, Zaba L C, et al. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position[J]. *Nature methods*, 2013, 10(12): 1213.
- [6] Tsompana M, Buck M J. Chromatin accessibility: a window into the genome[J]. *Epigenetics & chromatin*, 2014, 7(1): 33.
- [7] Wu Jingyi, Huang Bo, Chen He, et al. The landscape of accessible chromatin in mammalian preimplantation embryos. *Nature*, 2016, 534(7609): 652-7.
- [8] Milani P, Escalante-Chong R, Shelley B C, et al. Cell freezing protocol suitable for ATAC-Seq on motor neurons derived from human induced pluripotent stem cells[J]. *Scientific reports*, 2016, 6: 25474.
- [9] ATAC-Seq protocol for fresh tissue Wold Lab, Caltech
- [10] Corces M R, Trevino A E, Hamilton E G, et al. An improved ATAC-seq protocol reduces background and enables interrogation of frozen tissues[J]. *Nature methods*, 2017, 14(10): 959.
- [11] Bajic M, Maher K A, Deal R B. Identification of open chromatin regions in plant genomes using ATAC-Seq[M]//Plant Chromatin Dynamics. Humana Press, New York, NY, 2018: 183-201.
- [12] Lu Z, Hofmeister B T, Vollmers C, et al. Combining ATAC-seq with nuclei sorting for discovery of cis-regulatory regions in plant genomes[J]. *Nucleic acids research*, 2016, 45(6): e41-e41.
- [13] Buenrostro J D, Wu B, Litzenburger U M, et al. Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation[J]. *Nature*, 2015, 523(7561): 486.
- [14] Schep A N, Buenrostro J D, Denny S K, et al. Structured nucleosome fingerprints enable high-resolution mapping of chromatin architecture within regulatory regions[J]. *Genome research*, 2015.

◆ 参考文献·关联产品

- Wu J, Xu J, Liu B, et al. Chromatin analysis in human early development reveals epigenetic transition during ZGA[J]. *Nature*, 2018: 1. IF:41.577 [【Vazyme #TD502】](#)
- Cao S, Yu S, Li D, et al. Chromatin accessibility dynamics during chemical induction of pluripotency[J]. *Cell stem cell*, 2018, 22(4): 529-542. e5. IF: 23.290 [【Vazyme #ND102/NQ101】](#)
- Huang X, Yang S, Gong J, et al. Genomic architecture of heterosis for yield traits in rice.[J]. *Nature*, 2016, 537(7622):629-633.. IF:41.577 [【Vazyme #TD501】](#)

05 参考文献

Wu J, Huang B, Chen H, et al. The landscape of accessible chromatin in mammalian preimplantation embryos.[J]. *Nature*, 2016, 534(7609):652. IF: 41.577 【Vazyme #TD501】

Zheng C, Zheng L, Yoo J K, et al. Landscape of Infiltrating T Cells in Liver Cancer Revealed by Single-Cell Sequencing[J]. *Cell*, 2017, 169(7):1342. IF: 30.41 【Vazyme #TD503】

Li X, Meng D, Chen S, et al. Single nucleus sequencing reveals spermatid chromosome fragmentation as a possible cause of maize haploid induction[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1):991. IF: 12.124 【Vazyme #TD501/503】

Han X P, Wang R Y, Zhou Y C, et al. Mapping the Mouse Cell Atlas by Microwell-Seq[J]. *Cell*, 2018, 172(5):1091. IF: 31.398 【Vazyme #TD513/ P515】

Jin C, Luo T, Fu Z, et al. Chronic exposure of mice to low doses of imazalil induces hepatotoxicity at the physiological, biochemical, and transcriptomic levels[J]. *Environmental toxicology*, 2018, 33(6): 650-658. IF: 2.491 【Vazyme #NR601】

Qin X, Liu S, Lu Q, et al. Heterotrimeric G Stimulatory Protein α Subunit Is Required for Intestinal Smooth Muscle Contraction in Mice.[J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(5):1114. IF: 18.187 【Vazyme #NR601】

Shen C, Wang J, Shi X, et al. Transcriptome Analysis of Differentially Expressed Genes Induced by Low and High Potassium Levels Provides Insight into Fruit Sugar Metabolism of Pear[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8:938. IF: 4.298 【Vazyme #NR601/qPCR】

Song L, Ma Q, Zou Z, et al. Molecular Link between Leaf Coloration and Gene Expression of Flavonoid and Carotenoid Biosynthesis in *Camellia sinensis*Cultivar 'Huangjinsha'[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8. IF: 4.298 【Vazyme #NR602】

He YM, Li X, Perego M, et al. Transitory presence of myeloid-derived suppressor cells in neonates is critical for control of inflammation. *Nature medicine*. 2018.01.15. IF: 32.621 【Vazyme #NR603】

Yang L, Wang W H, Qiu W L, et al. A single-cell transcriptomic analysis reveals precise pathways and regulatory mechanisms underlying hepatoblast differentiation.[J]. *Hepatology*, 2017, 66(5):1387. IF: 14.079 【Vazyme #N411/TD502】

Li D W, Liu J, Yang X J, et al. Chromatin Accessibility Dynamics during iPSC Reprogramming[J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 21(6):819. IF: 23.29 【Vazyme #NQ101/ND102】

Zhou Z, Yang X, He J, et al. Kdm2b Regulates Somatic Reprogramming through Variant PRC1 Complex-Dependent Function.[J]. *Cell Reports*, 2017, 21(8):2160-2170. IF: 8.282 【Vazyme #NQ101/ND102】

Zhang M Y, Dong Y, Hu F X, et al. Transcription factor Hoxb5 reprograms B cells into functional T lymphocytes[J]. *Nature Immunology*, 2018, 19(2). IF: 21.809 【Vazyme #ND604,N601】

Zhang Q, Hu H, Liu H, et al. RNA sequencing enables systematic identification of platelet transcriptomic alterations in NSCLC patients[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 105:204-214. IF: 3.457 【Vazyme #N711/TD503】

06 明星产品

◆ TruePrep™ DNA Library Prep Kit V2 for Illumina (Vazyme #TD501/502/503)

基于转座酶 (Tn5) 的超快速 DNA 文库制备试剂盒

流程极简

一步酶促反应替代繁琐的 DNA 片段化、末端修复、末端加 A 和接头连接步骤，降低了起始模板的投入量并缩短了文库构建时间

应用广泛

适用于常规基因组测序、单细胞转录组测序、表观遗传测序（如 ATAC-seq 等）以及其他前沿研究应用



◆ VAHTS™ Universal DNA Library Prep Kit for Illumina V3 (Vazyme #ND607)

通用型 DNA 文库制备试剂盒

操作简便

优化的未修 buffer，高效整合未修，5' 磷酸化和 3' 加 A 一步完成，提高文库转化率，简化流程

文库产出量高

全新优化的扩增酶和 buffer，实现扩增平台期和扩增灵敏度的双提升，提高文库产出



◆ VAHTS™ AmpSeq Library Prep Kit V2 (Vazyme #NA201)

扩增子靶向测序制备试剂盒

超多重 PCR 扩增技术

在超多重 PCR 的基础上引入扩增子末端引物消化技术，实现在单管内完成多重扩增、引物消化、接头连接等多步反应，同时兼容 Ion Torrent 和 Illumina 测序平台

极高的 On-Target Rate

On-Target 比例均高于 95%，且多次实验结果的一致性良好



◆ VAHTS™ Stranded mRNA-seq Library Prep Kit for Illumina V2 (Vazyme #NR612)

链特异性转录组文库制备试剂盒

物种适应性广

适用于人、动物、植物、真菌等真核生物

文库大小控制精准

基于温度和时间的控制提供 4 种片段打断方案以及基于磁珠用量提供的 4 种文库分选方案



06 明星产品

◆ VAHTS™ Small RNA Library Prep Kit for Illumina (Vazyme #NR801)

小 RNA 文库制备试剂盒

样本兼容类型广

动、植物细胞 / 组织总 RNA，分离纯化的 Small RNA，以及其他类型 RNA，如外泌体 RNA 均可作为起始模板

文库丰度高

接头污染少，有效文库比例高，miRNA 比例高、覆盖种类多，文库数据质量可靠



◆ Discover-sc® WTA Kit (Vazyme #N711)

单细胞全转录组扩增试剂盒

全长 cDNA 扩增产物

利用 Discover-sc Reverse Transcriptase 的 Template-switching 活性，获取全长的 cDNA，保留整个 mRNA 信息，从而避免了 5' 或 3' 端的偏好性

扩增灵敏度高

使用 LNA 技术及精心优化的反应体系，大幅度增加了低表达基因的检出量



◆ VAHTS™ HiFi Amplification Mix (Vazyme #N616)

重新打造的新型高保真 PCR 扩增预混液

高保真度

扩增错配率仅是 Taq DNA Polymerase 的 1/52，是 Pfu DNA Polymerase 的 1/6，有效保障了文库扩增的真实性

高扩增效率

极大提高扩增平台期和灵敏度



◆ VAHTS™ DNA Clean Beads (Vazyme #N411)

高通量测序建库首选磁珠

集纯化与分选于一体

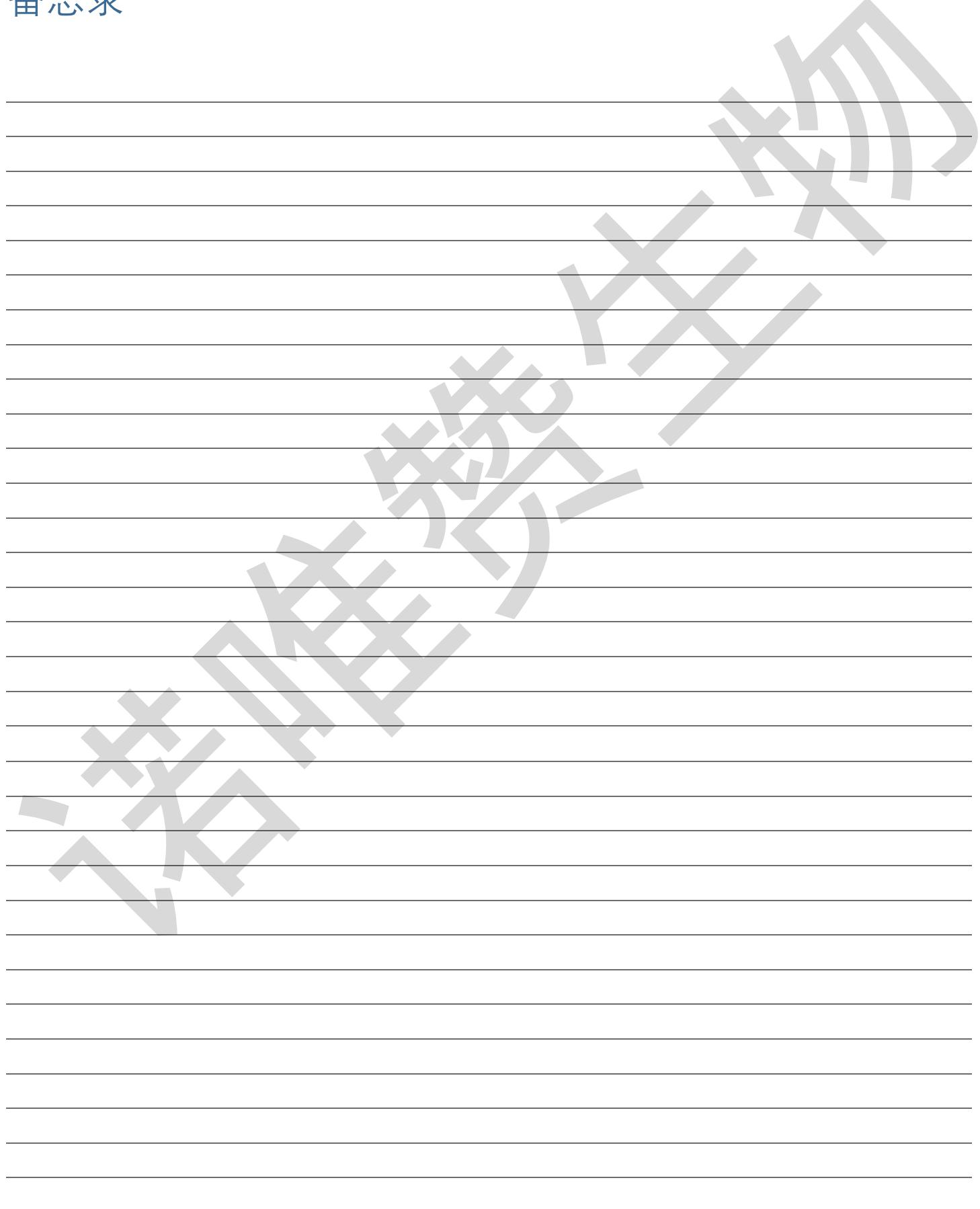
基于 SPRI (Solid Phase Reverse Immobilization) 原理，适合于高通量测序文库构建中 DNA 纯化与片段大小分选

无缝替代 AMPure XP Beads

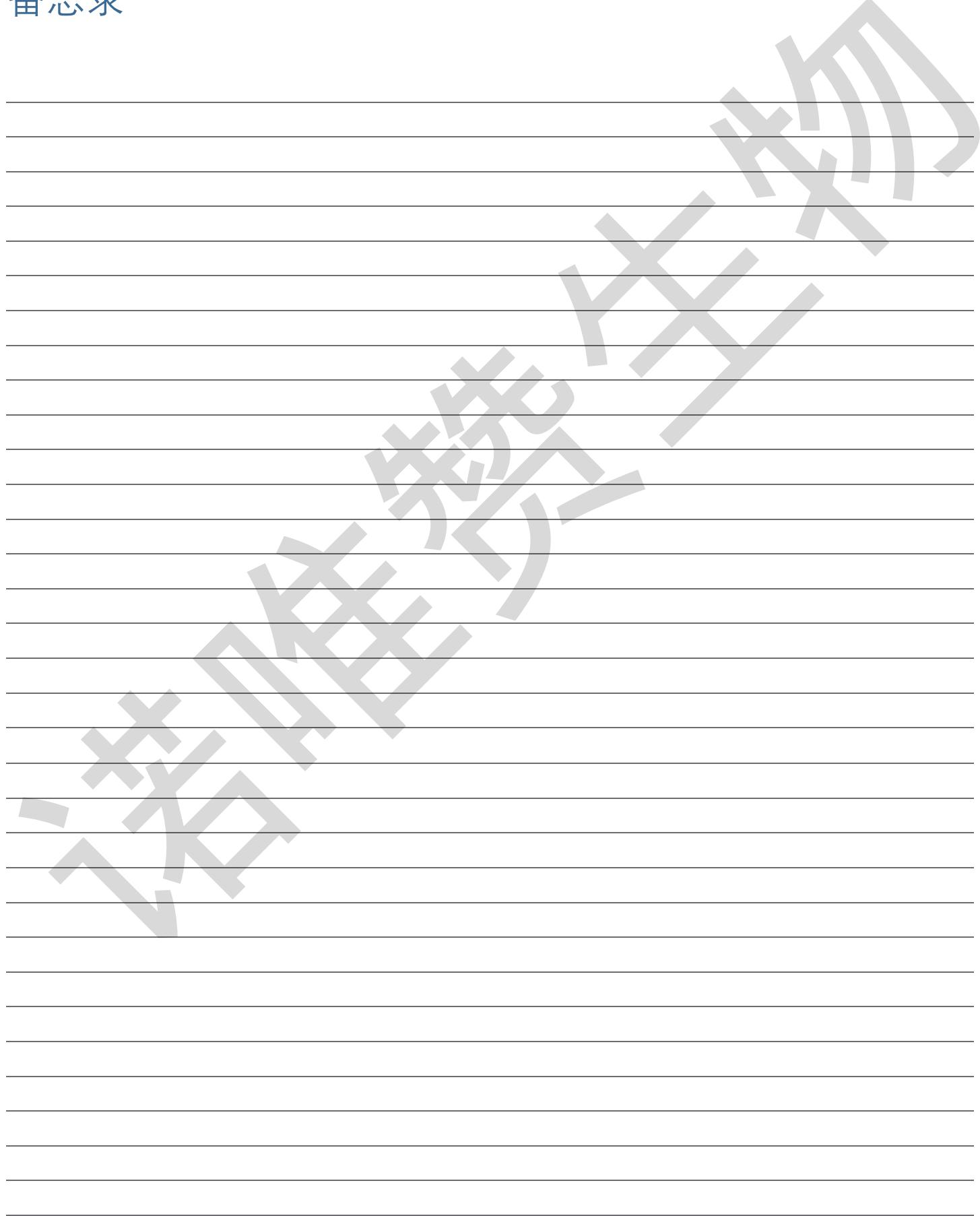
使用方式相同，无需要做任何改变



备忘录



备忘录



Vazyme Online

了解更多产品和服务信息, 请登录我们的网站 www.vazyme.com

InnoVation in enzyme technology



南京诺唯赞生物科技有限公司

销售咨询: sales@vazyme.com

电话: 400-600-9335

技术支持: support@vazyme.com

网址: www.vazyme.com

技术服务: service@vazyme.com

地址: 江苏省南京经济技术开发区科创路红枫科技园C2栋

