

# *TransNGS*® ATAC-Seq Library Prep Kit for Illumina®

使用前请仔细阅读说明书

版本号: Version 1.0



目录号: KP171

保存: -20°C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,50-50000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50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。

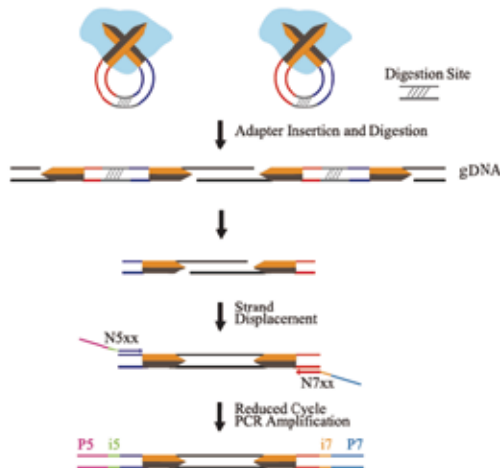
### 试剂盒组成

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

### 起始材料要求

推荐使用50-50000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]ATCTCGTATGCCGCTCTCTGCTTG-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*<sup>®</sup> Size Selection DNA Beads (目录号: EC401), *TransNGS*<sup>®</sup> Tn5 Index Kit for Illumina<sup>®</sup> (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°C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°C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°C水浴30分钟。
- (3) 加入10 μl 4×Tn5 Digestion Buffer终止片段化反应, 50°C水浴30分钟。

### 3、片段化产物纯化

推荐使用*MagicPure*<sup>®</sup> Size Selection DNA Beads (目录号: EC401) 进行产物纯化, 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88 μl磁珠(2.2×)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  $\mu$ 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  $\mu$ 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*Trans*NGS ATAC-Seq Library Amplification SuperMix I (2 $\times$ )。

Component	Volume
片段化产物	20 $\mu$ l
<i>Trans</i> NGS ATAC-Seq Library Amplification SuperMix I (2 $\times$ )	25 $\mu$ l
N5xx*	2.5 $\mu$ l
N7xx*	2.5 $\mu$ l
Total volume	50 $\mu$ l

\**Trans*NGS<sup>®</sup> Tn5 Index Kit for Illumina<sup>®</sup> (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*	} 13-15 cycles
98 $^{\circ}$ C	3 min	
98 $^{\circ}$ C	8 sec	
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<sup>®</sup> 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  $\mu$ l磁珠 (0.55 $\times$ ) 加入50  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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21  $\mu$ l 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  $\mu$ l洗脱液转移至干净EP管中，进行测序，或于-20°C保存。

#### 操作步骤 (≤5000细胞)

自备试剂：新鲜配制的80%乙醇，*MagicPure*<sup>®</sup> Size Selection DNA Beads (目录号：EC401)，*TransNGS*<sup>®</sup> Tn5 Index Kit for Illumina<sup>®</sup> (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  $\mu$ l，置于冰上暂放。

(2) 配制裂胞试剂。首先，各吸取1 $\mu$ l Cell Lysis Buffer和Lysis Enhancer，分别稀释10倍（即各添加9 $\mu$ l 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 $\mu$ l
Diluted Lysis Enhancer	1 $\mu$ l
Nuclease-free Water	2 $\mu$ l
Total volume	5 $\mu$ l

(3) 加入上述配制好的预冷裂胞试剂至管中，使总体积达5  $\mu$ l（例如细胞体积为1  $\mu$ l，则加入4  $\mu$ l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 $\mu$ l
Insertion Enhancer 1*	0.15 $\mu$ l
Insertion Enhancer 2*	0.15 $\mu$ l
Tn5-50 Enzyme Mix*	2 $\mu$ l
Nuclease-free Water	3.95 $\mu$ l
Total volume	10 $\mu$ l

\*当仅配制一个体系时，由于吸取体积较小，建议先各吸取1  $\mu$ l 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  $\mu$ l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

(2) 加入上述片段化Mix，总体积15  $\mu$ l。吹吸混匀，于PCR仪中37°C孵育30分钟。

(3) 加入5  $\mu$ l 4×Tn5 Digestion Buffer终止反应，总体积20  $\mu$ l。吹吸混匀，于PCR仪中68°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*TransNGS* ATAC-Seq Library Amplification SuperMix II (2×)。



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

\*TransNGS® Tn5 Index Kit for Illumina® (目录号: K1101)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。

\*如若起始细胞量较少, 可以适当延长扩增循环数。

#### 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 $\times$ 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°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  $\mu$ l磁珠 (0.55 $\times$ ) 加入50  $\mu$ 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, 否则影响最终产量。

(5) 往上清中加入60  $\mu$ 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  $\mu$ 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, 否则会显著影响实验结果。

(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  $\mu$ l 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  $\mu$ l洗脱液转移至干净EP管中, 进行测序, 或于-20°C保存。

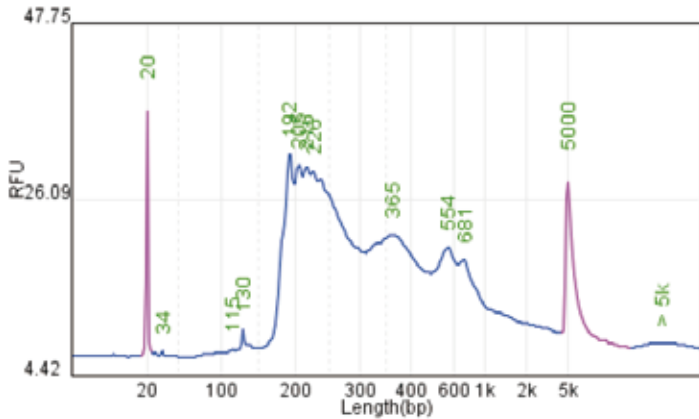


附录

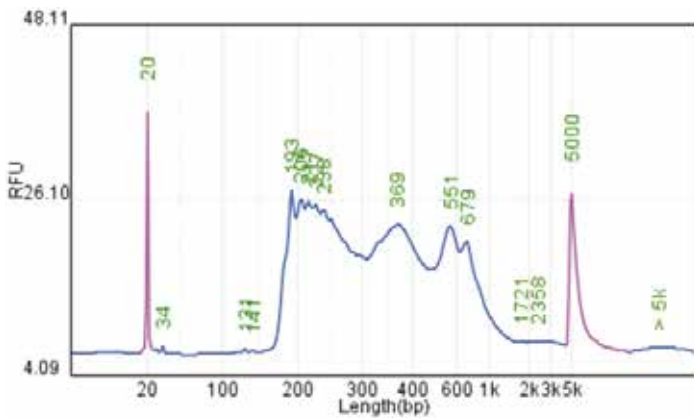
文库产出参照表 (Hela细胞, 无片段分选)

起始细胞数	50000	10000	5000	1000	500	100	50
Tn5-50稀释倍数	/			5-10		50-100	
PCR循环数	15 cycles			20 cycles		25 cycles	
文库产出 (ng)	>1200	>800	>800	>1200	>1100	>1600	>1200

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

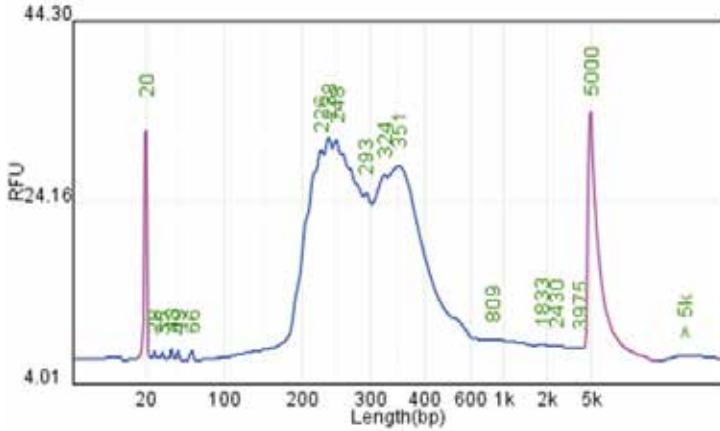


图一: 50000细胞文库峰型

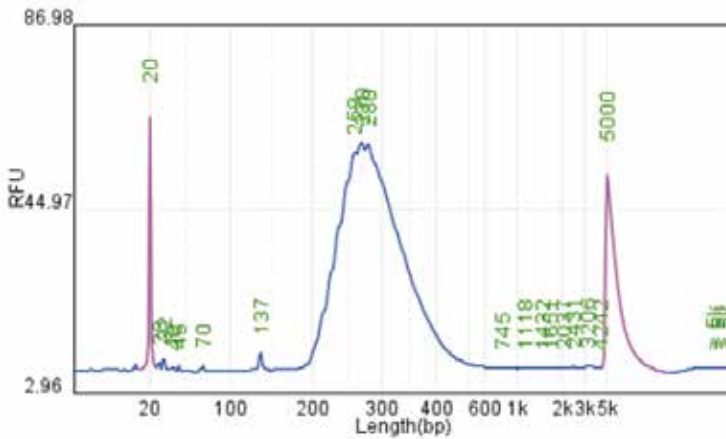


图二: 10000细胞文库峰型





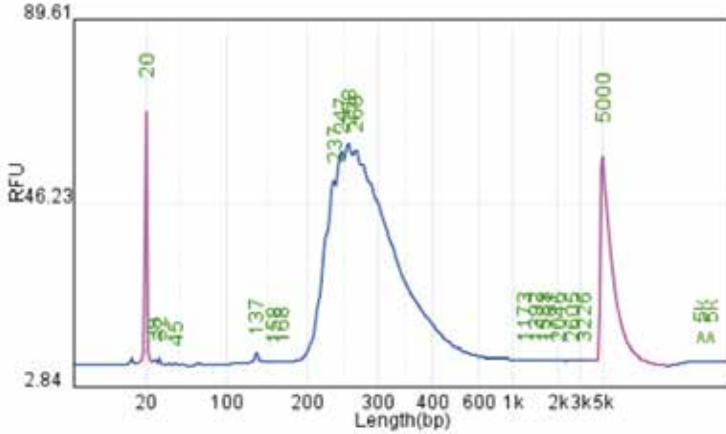
图三：5000细胞文库峰型



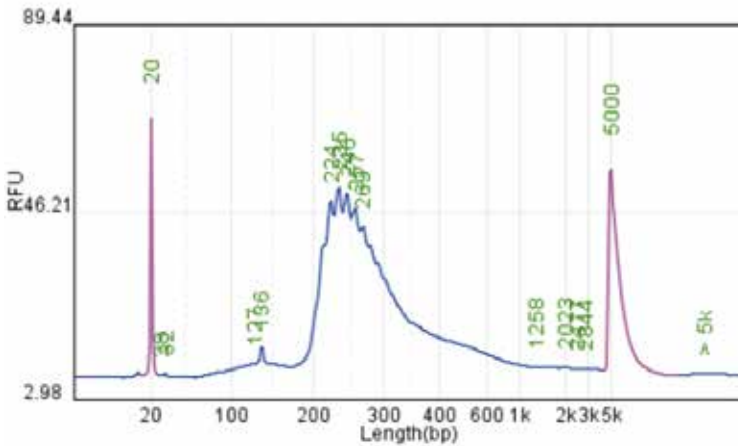
图四：1000细胞文库峰型（Tn5-50稀释5倍）





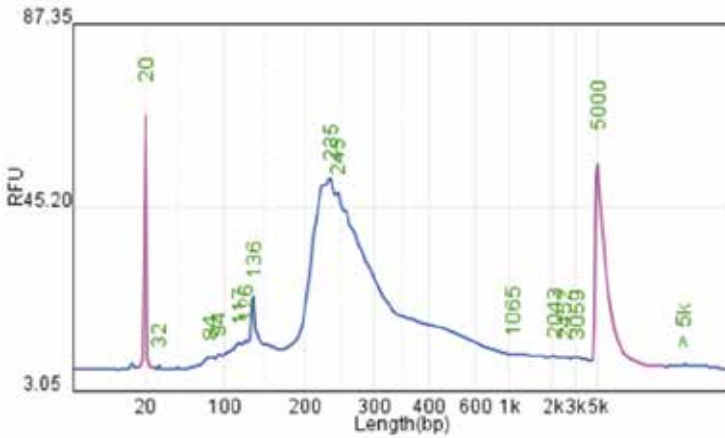


图五：500细胞文库峰型（Tn5-50稀释10倍）



图六：100细胞文库峰型（Tn5-50稀释50倍）





图七：50细胞文库峰型（Tn5-50稀释100倍）

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号：V1-202304

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen

