



(21) 申请号 202111605188.9

C12Q 1/6869 (2018.01)

(22) 申请日 2021.12.25

C12Q 1/6806 (2018.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 114395638 A

(56) 对比文件

CN 109880887 A, 2019.06.14

CN 111763721 A, 2020.10.13

(43) 申请公布日 2022.04.26

CN 111154835 A, 2020.05.15

(73) 专利权人 武汉爱基百客生物科技有限公司

地址 430000 湖北省武汉市东湖新技术开发区高新大道888号高农生物园总部B区1栋第3层

Fu-Xiang Wang等. Protocol for assaying chromatin accessibility using ATAC-seq in plants. STAR Protocols. 2021, 第100289篇, 第1-13页.

(72) 发明人 李泽卿 刘梦佳

审查员 陈中伟

(74) 专利代理机构 北京中济纬天专利代理有限公司

11429

专利代理师 陈银

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

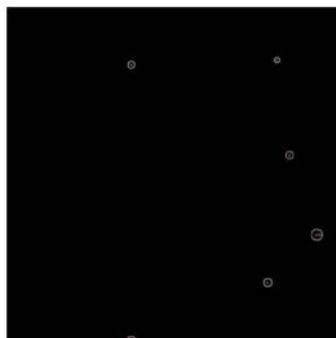
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

适用于高淀粉果实的ATAC-seq方法

(57) 摘要

本发明公开了一种适用于高淀粉果实的ATAC-seq方法,包括以下步骤:S1、取一定量的果实进行液氮研磨;S2、细胞裂解提取完整细胞核;S3、转座反应和纯化;S4、PCR扩增;S5、文库质检;S6、上机测序。本发明能够从淀粉含量高的植物组织中获得较为纯净的细胞核,且样品消耗少,实验耗时短。



1. 一种适用于高淀粉果实的ATAC-seq方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、取一定量的果实进行液氮研磨;

S2、细胞裂解提取完整细胞核;

S3、转座反应和纯化;

S4、PCR扩增;

S5、文库质检;

S6、上机测序;

所述S2中细胞裂解采用核提取缓冲液NEB2;

所述核提取缓冲液NEB2由10mM PBS、0.4 M蔗糖、1%~2%多聚甲醛、1% TritonX-100、5mM β -巯基乙醇和1 \times cocktail组成。

2. 如权利要求1所述的适用于高淀粉果实的ATAC-seq方法,其特征在于,所述S2细胞裂解过程中先经过核提取缓冲液NEB1处理,再经过核提取缓冲液NEB2处理;

所述核提取缓冲液NEB1由10mM Tris-HCl、200mM KCl、10mM EDTA、10mM MgCl₂、50%甘油、0.4 M蔗糖、1 M DTT、5mM β -巯基乙醇 和1 \times cocktail组成。

3. 如权利要求2所述的适用于高淀粉果实的ATAC-seq方法,其特征在于,所述S2细胞裂解过程中经过核提取缓冲液NEB2处理后,再经过核提取缓冲液NEB3处理;

所述核提取缓冲液NEB3由10mM Tris-HCl、1.7 M蔗糖、10mM MgCl₂、1% TritonX-100、5mM β -巯基乙醇和1 \times cocktail组成。

4. 如权利要求1~3任一所述的适用于高淀粉果实的ATAC-seq方法,其特征在于,所述S2中细胞裂解处理完成后进行核清洗缓冲液WB清洗

所述核清洗缓冲液WB由10mM PBS、0.4 M蔗糖、1% TritonX-100 和1 \times cocktail组成。

5. 如权利要求3所述的适用于高淀粉果实的ATAC-seq方法,其特征在于,步骤S2中需要经过核提取缓冲液NEB1和核提取缓冲液NEB2的裂解,再经过40 μ m的细胞筛过滤,之后进行离心,离心后的粗核经过核提取缓冲液NEB3的离心和核清洗缓冲液WB的清洗;

所述核清洗缓冲液WB由10mM PBS、0.4 M蔗糖、1%TritonX-100 和1 \times cocktail组成。

6. 如权利要求1所述的适用于高淀粉果实的ATAC-seq方法,其特征在于,步骤S4中,所述PCR扩增的反应程序为:105 $^{\circ}$ C热盖,72 $^{\circ}$ C延伸3min;98 $^{\circ}$ C变性30s;再按以下参数扩增12个循环:98 $^{\circ}$ C 15s,63 $^{\circ}$ C 15s,72 $^{\circ}$ C 15s;最后72 $^{\circ}$ C延伸2min。

适用于高淀粉果实的ATAC-seq方法

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学领域,具体涉及一种适用于高淀粉果实的ATAC-seq方法。

背景技术

[0002] 染色质的可及性是指细胞核内一些转录因子和非转录因子蛋白与开放染色质区域的结合程度。染色质开放程度随着外部环境和发育过程的变化而变化,细胞核内染色质可接近性的动态平衡通过转录因子与组蛋白或非组蛋白之间的竞争性结合调控元件调节的。基因组范围内对染色质可接近性的研究,可在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。因此,获得处于开放状态的DNA序列可用于研究基因表达的调控机制,是表观遗传学的研究热点。

[0003] ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high throughput sequencing) 技术是Tn5转座酶将测序的adapters插入到基因组上的“可接近”区域来标记调控的区域,通过高通量测序的方法可以鉴定整个染色质的开放性。ATAC-seq相比其他研究开放染色质的方法(如MNase-seq,FAIRE-seq和DNase-seq),重复性更强,操作起来更加简单,而且只需要很少的细胞或组织量,就能得到很好的信噪比,目前已经是研究染色质开放性首选的技术方法。

[0004] 香蕉是重要的热带水果,采收后需要经过保鲜及物流运输到销售地,是我国南果北运的主要水果之一。因此,香蕉采后处理及贮运保鲜技术对于保持果实最佳的商品性和减少采后损失具有重要作用。香蕉果实发育过程中以淀粉积累为主,研究香蕉果实抗性淀粉的代谢规律,特别是抗性淀粉与其他类型淀粉之间的相关关系,为提高香蕉果实抗性淀粉含量,并提供一种适于糖尿病、肥胖等特殊人群食用的保健食品奠定理论基础。

[0005] 目前为止,ATAC-seq技术的相关研究很多,特别是在细胞系和动物组织中的应用较广,而植物样本由于存在细胞壁结构和代谢物质较多,其抽核相对困难,因此,限制了该技术的应用。特别是果实这类物质的淀粉含量较多,更是较难获得完整的细胞核,通过优化提核的方法获得高质量的细胞核,是研究植物组织ATAC-Seq技术的重中之重。

发明内容

[0006] 本发明的一个目的是提供一种适用于高淀粉果实的ATAC-seq方法,该方法能够从淀粉含量高的植物组织中获得较为纯净的细胞核,且样品消耗少,实验耗时短。

[0007] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:一种适用于高淀粉果实的ATAC-seq方法,包括以下步骤:

[0008] S1、取一定量的果实进行液氮研磨;

[0009] S2、细胞裂解提取完整细胞核;

[0010] S3、转座反应和纯化;

[0011] S4、PCR扩增;

[0012] S5、文库质检;

[0013] S6、上机测序。

[0014] 优选的是,所述S2中细胞裂解过程需要经过不同的核提取缓冲液和清洗缓冲液处理,细胞裂解采用核提取缓冲液NEB2;

[0015] 所述核提取缓冲液NEB2包括10mM PBS (pH=7.4)、0.4M蔗糖、1%~2%多聚甲醛、1% Triton·X·100、5mM β -巯基乙醇和1 \times cocktai (蛋白酶抑制剂)。核提取缓冲液NEB1、核提取缓冲液NEB2、核提取缓冲液NEB3中的配方涉及分数的均为体积分数。

[0016] 优选的是,所述S2细胞裂解过程中先经过核提取缓冲液NEB1处理,再经过核提取缓冲液NEB2处理;

[0017] 所述核提取缓冲液NEB1包括10mM Tirs-HCl (pH 7.5)、200mM KCl、10mM EDTA、10mM MgCl₂、50%甘油、0.4M蔗糖、1M DTT、5mM β -巯基乙醇和1 \times cocktai。

[0018] 优选的是,所述S2细胞裂解过程中经过核提取缓冲液NEB2处理后,再经过核提取缓冲液NEB3处理;

[0019] 所述核提取缓冲液NEB3包括10mM Tirs-HCl (pH7.5)、1.7M蔗糖、10mM MgCl₂、1% tritonX-100、5mM β -巯基乙醇和1 \times cocktail。

[0020] 优选的是,所述S2中细胞裂解处理完成后进行核清洗缓冲液WB清洗

[0021] 所述核清洗缓冲液WB包括10mM PBS (PH=7.4)、0.4M蔗糖、1% Triton·X·100和1 \times cocktail。

[0022] 优选的是,所述核提取缓冲液NEB2和核清洗缓冲液WB中,PBS和蔗糖的混合溶液可进行灭菌处理,4 $^{\circ}$ C保存,使用前再加入Triton-X、多聚甲醛和/或cocktail

[0023] 优选的是,步骤S2中需要经过核提取缓冲液NEB1和核提取缓冲液NEB2的裂解,再经过40 μ m的细胞筛过滤,之后进行离心,离心后的粗核经过核提取缓冲液NEB3的离心和核清洗缓冲液WB的清洗;

[0024] 所述核清洗缓冲液WB包括10mM PBS (PH=7.4)、0.4M蔗糖、1% Triton·X·100和1 \times cocktail。

[0025] 优选的是,步骤S3中,所述转座反应的具体操作为:立即向步骤S2提取的完整细胞核中加入2 μ L Tn5转座酶、25 μ L TD转座缓冲液、0.5 μ L 1% Digitonin和22.5 μ L无酶水,37 $^{\circ}$ C孵育30min。

[0026] 优选的是,步骤S4中,所述PCR扩增的反应体系为:35 μ L步骤S3纯化得到的DNA,10 μ L 5 \times Ampli Mix (扩增酶,主要是具有链置换功能的聚合酶),2.5 μ L N5,2.5 μ L N7。

[0027] 优选的是,步骤S4中,所述PCR扩增的反应程序为:105 $^{\circ}$ C热盖,72 $^{\circ}$ C延伸3min;98 $^{\circ}$ C变性30s;再按以下参数扩增12个循环:98 $^{\circ}$ C 15s,63 $^{\circ}$ C 15s,72 $^{\circ}$ C 15s;最后72 $^{\circ}$ C延伸2min。

[0028] 与现有技术相比,本发明具有的有益效果是:

[0029] (1) 本发明方法能够在香蕉果实中完成ATAC-seq,通过提取果实中的细胞核并结合二代建库测序,从而实现果实中染色质开放性的研究。

[0030] (2) 本发明方法用不同的核提取缓冲液裂解植物细胞,特别是NEB2中的多聚甲醛的使用可以降低细胞核中的淀粉含量,经过40 μ m的细胞筛过滤可以降低细胞碎片的比率,同时采用密度梯度离心,可以有效去除粉蕉果实中叶绿体等细胞器及糖类物质,减少其对后续建库、测序分析结果的影响;

[0031] (3) 本发明方法在香蕉果实中的稳定性好、也可适用其他淀粉含量高的物种。

附图说明

- [0032] 图1为通过本发明的方法获得香蕉果实(S_16B)的细胞核质检图
- [0033] 图2为通过本发明的方法获得ATAC文库(S_16B)的质检图
- [0034] 图3为通过本发明的方法测序获得的peaks的富集情况(S_16B)示意图;
- [0035] 图4为核提取缓冲液NEB2加入1%多聚甲醛获得的香蕉果实细胞核A0/PI染色质检图
- [0036] 图5为核提取缓冲液NEB2未加入多聚甲醛获得的香蕉果实细胞核A0/PI染色质检图
- [0037] 图6为核提取缓冲液NEB2加入3%多聚甲醛获得的香蕉果实细胞核A0/PI染色质检图

具体实施方式

- [0038] 以下结合附图及实施例对本发明作进一步详细说明。
- [0039] 实施例1香蕉果实(S_16B)ATAC-seq技术方法,包括:
- [0040] S1、液氮研磨植物组织
- [0041] 取干净香蕉果实样本3g,进行液氮研磨。
- [0042] S2、完整细胞核的捕获
- [0043] (1) 溶液配制
- [0044] 配制NEB1缓冲液,其中包括:10mM Tris-HCl (pH 7.5)、200mM KCl、10mM EDTA、10mM MgCl₂、50%甘油、0.4M蔗糖、1M DTT、5mMβ-巯基乙醇和1×cocktail;
- [0045] 配制NEB2缓冲液,其中包括:10mM PBS (PH=7.4)、0.4M蔗糖、1%多聚甲醛、1% Triton • X • 100、β-巯基乙醇和1×cocktail;
- [0046] 配制NEB3缓冲液,其中包括:10mM Tris-HCl (pH7.5)、1.7M蔗糖、10mM MgCl₂、1% tritonX-100、β-巯基乙醇和1×cocktail;
- [0047] 配制WB缓冲液,其中包括:10mM PBS (PH=7.4)、0.4M蔗糖、1%Triton • X • 100和1×cocktail;
- [0048] (2) 转移研磨后的样本到15mL预冷的NEB1缓冲液中,裂解10min;
- [0049] (3) 4℃,1500g离心10min;
- [0050] (4) 弃上清,沉淀中加入NEB2抽核液20ml,用力混匀,冰上10min;
- [0051] (5) 用40μm的细胞筛过滤,并收集液体于新的离心管中,4℃,5000rpm低速离心10min,快速倒掉上清;
- [0052] (6) 用500μL的NEB3缓冲液重悬沉淀,并将其加入到500μL预冷的NEB3缓冲液上,1600g、4℃离心45min,移去上清;
- [0053] (7) 用1mL预冷的WB缓冲液重悬沉淀;
- [0054] (8) 对细胞核进行A0/PI染色,在显微镜下进行细胞核计数;
- [0055] (9) 取10000细胞核对应体积的细胞悬液于新的EP管中,500g、4℃离心10min,弃上清,得到处理好的细胞核。
- [0056] S3、转座反应和纯化
- [0057] 向细胞核中立即加入2μLTn5转座酶、25μLTD转座缓冲液、0.5μL 1%Digitonin和

22.5 μ L无酶水,37 $^{\circ}$ C孵育30min;

[0058] 转座反应后立即用Qiagen MinElute PCR Purification Kit进行纯化,并加入35 μ L Elution Buffer洗脱DNA。

[0059] S4、PCR扩增

[0060] 配制PCR反应体系:上述洗脱的35 μ L纯化得到的DNA,10 μ L 5 \times Ampli Mix,2.5 μ LN5,2.5 μ LN7;其中,所用引物N5核苷酸序列为5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [TAGATCGC]TCGTCGGCAGCGTC-3',引物N7核苷酸序列为5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [GCCAATGT]GTCTCGTGGGCTCGG-3'。

[0061] PCR反应程序:105 $^{\circ}$ C热盖,72 $^{\circ}$ C延伸3min;98 $^{\circ}$ C变性30s;再按以下参数扩增12个循环:98 $^{\circ}$ C15s,63 $^{\circ}$ C15s,72 $^{\circ}$ C15s;最后72 $^{\circ}$ C延伸2min。

[0062] 用XP磁珠进行文库纯化,文库最终用20 μ L Elution Buffer进行洗脱。

[0063] S5、文库质检

[0064] 对纯化好的文库进行浓度和质量检测,主要包括:

[0065] 浓度检测:用Life Invitrogen Qubit[®]3.0对文库的浓度进行检测;

[0066] 质量检测:用Q-seplanalys对文库的质量进行检测。

[0067] S6、上机测序

[0068] 对构建好的文库用Nova 6000平台进行PE150测序。

[0069] 如图1~3所示,香蕉果实(S_16B)在实施例1的方法中的测试结果图。如图4所示,NEB2缓冲液配制时采用1%多聚甲醛,杂质较少,细胞核数目较多。

[0070] 实施例2香蕉果实(S_16W)ATAC-seq技术方法

[0071] S1、液氮研磨植物组织

[0072] 取干净香蕉果实样本3g,进行液氮研磨。

[0073] S2、完整细胞核的捕获

[0074] (1)溶液配制

[0075] 配制NEB1缓冲液,其中包括:10mM Tris-HCl (pH 7.5)、200mM KCl、10mM EDTA、10mM MgCl₂、50%甘油、0.4M蔗糖、1M DTT、 β -巯基乙醇和1 \times cocktail;

[0076] 配制NEB2缓冲液,其中包括:10mM PBS (PH=7.4)、0.4M蔗糖、1%多聚甲醛、1% Triton • X • 100、 β -巯基乙醇和1 \times cocktail;

[0077] 配制NEB3缓冲液,其中包括:10mM Tris-HCl (pH7.5)、1.7M蔗糖、10mM MgCl₂、1% tritonX-100、 β -巯基乙醇和1 \times cocktail;

[0078] 配制WB缓冲液,其中包括:10mM PBS (PH=7.4)、0.4M蔗糖、1% Triton • X • 100和1 \times cocktail;

[0079] (2)转移研磨后的样本到15mL预冷的NEB1缓冲液中,裂解10min;

[0080] (3)4 $^{\circ}$ C,1500g离心10min;

[0081] (4)弃上清,沉淀中加入NEB2抽核液20ml,用力混匀,冰上10min;

[0082] (5)用40 μ m的细胞筛过滤,并收集液体于新的离心管中,4 $^{\circ}$ C,5000rpm低速离心10min,快速倒掉上清;

[0083] (6)用500 μ L的NEB3缓冲液重悬沉淀,并将其加入到500 μ L预冷的NEB3缓冲液上,1600g、4 $^{\circ}$ C离心45min,移去上清;

- [0084] (7) 用1mL预冷的WB缓冲液重悬沉淀;
- [0085] (8) 对细胞核进行A0/PI染色,在显微镜下进行细胞核计数;
- [0086] (9) 取10000细胞核对应体积的细胞悬液于新的EP管中,500g、4℃离心10min,弃上清,得到处理好的细胞核。
- [0087] S3、转座反应和纯化
- [0088] 向细胞核中立即加入2 μ L Tn5转座酶、25 μ L TD转座缓冲液、0.5 μ L 1% Digitonin和22.5 μ L 无酶水,37℃孵育30min;
- [0089] 转座反应后立即用Qiagen MinElute PCR Purification Kit进行纯化,并加入35 μ L Elution Buffer洗脱DNA。
- [0090] S4、PCR扩增
- [0091] 配制PCR反应体系:上述洗脱的35 μ L纯化得到的DNA,10 μ L 5 \times Ampli Mix,2.5 μ L LN5,2.5 μ L N7;其中,所用引物N5核苷酸序列为5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [TAGATCGC]TCGTCGGCAGCGTC-3',引物N7核苷酸序列为5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT [TGTTGTT]GTCTCGTGGGCTCGG-3'。
- [0092] PCR反应程序:105℃热盖,72℃延伸3min;98℃变性30s;再按以下参数扩增12个循环:98℃15s,63℃15s,72℃15s;最后72℃延伸2min。
- [0093] 用XP磁珠进行文库纯化,文库最终用20 μ L Elution Buffer进行洗脱。
- [0094] S5、文库质检
- [0095] 对纯化好的文库进行浓度和质量检测,主要包括:
- [0096] 浓度检测:用Life Invitrogen Qubit® 3.0对文库的浓度进行检测;
- [0097] 质量检测:用Q-sep1analys对文库的质量进行检测。
- [0098] S6、上机测序
- [0099] 对构建好的文库用Nova 6000平台进行PE150测序。
- [0100] 对比例1缓冲液没有多聚甲醛
- [0101] 其与实施例1香蕉果实(S_16B)ATAC-seq技术方法相同,唯一不同点在于步骤S2中配制NEB2缓冲液,其中包括:10mM PBS (PH=7.4)、0.4M蔗糖、1% Triton·X·100、 β -巯基乙醇和1 \times cocktail。如图5所示,未加入多聚甲醛,提取出来的核悬液在显微镜下观察,细胞核的数量较少,几乎不能够看出很完整的细胞核,视野中碎片残渣较多,且聚团严重,不能够满足ATAC-seq的实验要求。
- [0102] 对比例2
- [0103] 其与实施例1香蕉果实(S_16B)ATAC-seq技术方法相同,唯一不同点在于步骤S2中配制NEB2缓冲液,其中包括:10mM PBS (PH=7.4)、0.4M蔗糖、3%多聚甲醛、1% Triton·X·100、 β -巯基乙醇和1 \times cocktail。如图6所示,随着多聚甲醛的加入比例增大,当多聚甲醛的浓度为3%时,与1%多聚甲醛相比,提取出来的核悬液在显微镜下观察,细胞核较为完整,结团率较低且背景较为干净,但细胞核的数量会明显减少,对于后期的ATAC-seq的实验会造成较大风险。

	对比例 1	实施例 1	对比例 2
[0104]	背景	碎片多	碎片较少
	细胞核完整性	不完整, 结团	完整
	细胞核数量	36 个/ μL	748 个/ μL

[0105] 本发明不局限于上述实施方式,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也视为本发明的保护范围之内。本说明书中未作详细描述的内容属于本领域专业技术人员公知的现有技术。

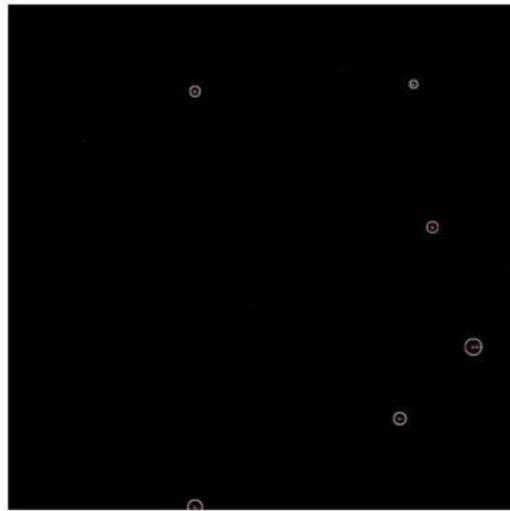


图1

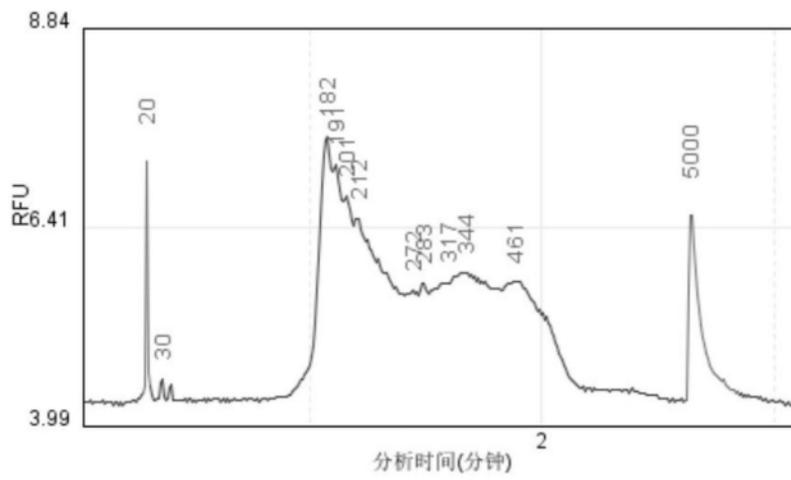


图2

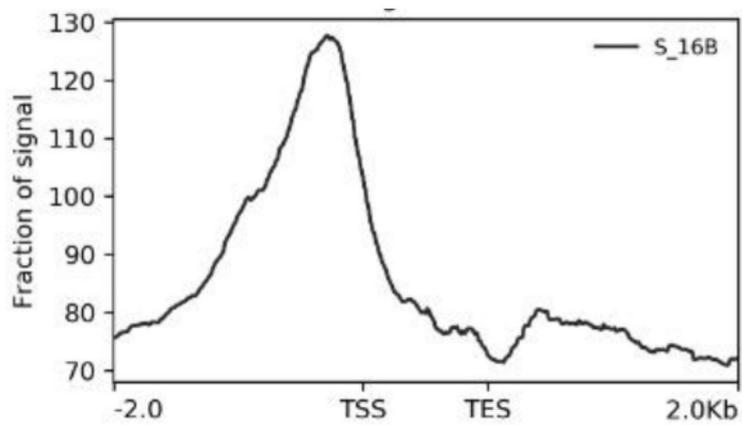


图3



图4

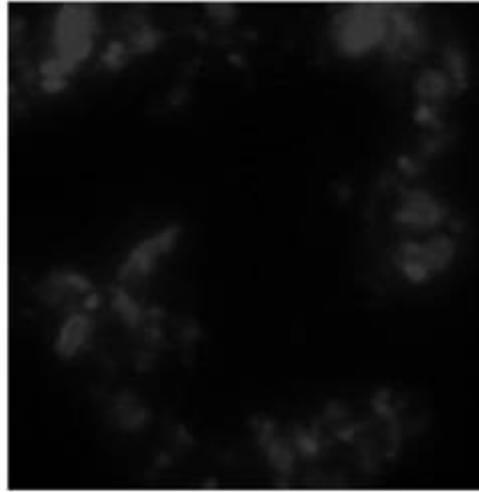


图5



图6