(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2022 年 3 月 24 日 (24.03.2022)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2022/056704 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/6806 (2018.01) *C40B 50/06* (2006.01)
C12Q 1/6869 (2018.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/115499

(22) 国际申请日: 2020 年 9 月 16 日 (16.09.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳华大生命科学研究院 (BGI SHENZHEN) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(72) 发明人: 王春青 (WANG, Chunqing); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 吴靓 (WU, Liang); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 李子豪 (LI, Zihao); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 钟裕 (ZHONG, Yu); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 黄亚灵 (HUANG, Yaling); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 袁月 (YUAN, Yue); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 刘传宇 (LIU, Chuanyu); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(74) 代理人: 北京纪凯知识产权代理有限公司 (JEEKAI&PARTNERS); 中国北京市丰台区广安路9号5号楼15A层, Beijing 100055 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告 (条约第21条 (3))。
— 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

(54) **Title:** METHOD FOR ANALYZING CELL EPIGENOMICS FROM MULTIPLE DIMENSIONS

(54) **发明名称:** 多维度解析细胞表观基因组学的方法

(57) **Abstract:** A method for analyzing cell epigenomics from multiple dimensions. The method comprises the following steps: by using ChiTag transposase and conventional Tn5 transposase in cells, respectively embedding different linker sequences, and achieving common analysis of information of a chromatin open region and information of a specific protein binding sequence on a cellular level. The method has important application prospects in aspects such as study of development and/or disease related cell population heterogeneity, drawing of a cell map, analysis of tumor cells having different clinical characteristics, and clinical study of evolution and/or metastasis of tumor cells.

(57) **摘要:** 一种多维度解析细胞表观基因组学的方法，该方法包括如下步骤：在细胞中利用ChiTag转座酶和常规Tn5转座酶，分别包埋不同的接头序列，在细胞水平上实现染色质开放区信息和特定蛋白结合序列信息的共同解析。该方法在研究与发育和/或疾病相关的细胞群体异质性和绘制细胞图谱、解析不同临床表征的肿瘤细胞、临床上研究肿瘤细胞演化和/或转移等方面具有重要应用前景。

WO 2022/056704 A1

多维度解析细胞表观基因组学的方法

技术领域

本发明涉及生物信息学领域，特别涉及一种多维度解析细胞表观基因组学的方法。

背景技术

表观组学技术是解析表观组学的重要工具，与仅能描述整体细胞群平均表观基因组特征的技术相比，表观基因组方法正在成为研究细胞可塑性和异质性的新技术。目前，已经开发了许多表观基因组学技术，来描述异源肿瘤组织在单细胞以及多细胞水平上发生的表观基因组。

CUT&Tag技术利用ChiTag酶特异性地将目的蛋白附近地DNA打断并连上接头，随后利用打断酶上的接头序列进行扩增，从而得到特异性蛋白互作DNA文库，进行高通量测序。CUT&Tag方法示意图见图1，参考文献：https://doi.org/10.1038/s41467-019-09982-5。

ATAC-seq技术利用常规Tn5转座酶将染色体开放区DNA打断并连上接头，随后利用打断酶上的接头序列进行扩增，从而得到染色体开放区DNA文库，进行高通量测序。ATAC-seq方法示意图见图2，参考文献：doi:10.1002/0471142727.mb2129s109。

目前，虽然CUT&Tag和ATAC-seq这两种技术都相对比较成熟，但是，没有一种技术可以共同剖析同一细胞的特定蛋白质互作DNA信息和染色体开放区的信息。

发明公开

本发明需要解决的问题是：1）同时捕获特定蛋白互作DNA序列信息和染色体开放区信息。2）利用idrop平台实现高通量建库测序。

第一方面，本发明要求保护一种多维度解析细胞表观基因组学的方法。

本发明所要求保护的多维度解析细胞表观基因组学的方法，可包括如下步骤：在细胞中利用ChiTag转座酶（ProteinA蛋白与Tn5转座酶的融合蛋白）和常规Tn5转座酶（仅为Tn5转座酶），分别包埋不同的接头序列，在细胞水平上实现染色质开放区信息和特定蛋白结合序列信息的共同解析。

其中，所述方法可为方法A或方法B。

所述方法A为多维度解析单细胞表观基因组学的方法，具体可包括如下步骤：

（A1）改变供试细胞的通透性；

（A2）向步骤（A1）处理后的细胞中加入特定蛋白对应抗体（一抗）进行孵育；

（A3）向步骤（A2）处理后的细胞中加入二抗（抗所述特定蛋白对应抗体的抗体）进行孵育；

（A4）向步骤（A3）处理后的细胞中加入ChiTag转座酶进行孵育；

（A5）向步骤（A4）处理后的细胞中加入反应试剂进行孵育，孵育后加入常规 Tn5 转座酶；该步骤实现 DNA 片段化处理。

（A6)在步骤(A5)反应后，利用油包水结构生成单细胞液滴（如利用 DNBelab C4 便携式单细胞系统完成），进行液滴内扩增；

（A7）进行破乳并扩增和纯化；

（A8）进行酶切，得到最终文库；

（A9）对步骤（A8）所得最终文库进行测序，从而解析单细胞水平上的染色质开放区信息和某一特定蛋白结合序列信息。

所述方法 B 为多维度解析多细胞表观基因组学的方法，具体可包括如下步骤：

（B1）改变供试细胞的通透性；

（B2）向步骤（B1）处理后的细胞中加入特定蛋白对应抗体进行孵育；

（B3）向步骤（B2）处理后的细胞中加入二抗进行孵育；

（B4）向步骤（B3）处理后的细胞中加入 ChiTag 转座酶进行孵育；

（B5）向步骤（B4）处理后的细胞中加入反应试剂进行孵育，孵育后加入常规 Tn5 转座酶；

（B6）扩增和纯化；

（B7）进行酶切，得到最终文库；

（B8）对步骤（B7）所得最终文库进行高通量测序，从而解析多细胞水平上的染色质开放区信息和特定蛋白结合序列信息。

在所述方法的步骤（A1）和（B1）中，在改变所述供试细胞通透性之前还可包括按照如下对所述供试细胞进行预处理的步骤：收集所述供试细胞后 600g 离心 3min，弃上清；用至少一倍体积的基础洗涤缓冲液（Wash Buffer）重悬细胞后 600g 离心 3min，弃上清。此处操作均在室温（23-28℃，下同）下进行，以使细胞受到的压力最小化。

在所述方法的步骤（A1）和（B1）中，所述改变供试细胞的通透性可通过将所述供试细胞重悬于 NP40-地高辛洗涤缓冲液中实现。

进一步地，所述（A1）和（B1）包括：先将每 50 万-100 万个细胞重悬于 1ml 所述 NP40-地高辛洗涤缓冲液中（即第一次重悬），然后 600g 离心 3min，弃上清，加入 49μl 添加有 1.5-2.5mM（如 2mM） EDTA 的所述 NP40-地高辛洗涤缓冲液重悬（即第二次重悬）。

所述 NP40-地高辛洗涤缓冲液（NP40-Digitonin Wash Buffer）为在基础洗涤缓冲液（Wash Buffer）中额外添加 0.01%（体积百分含量）NP40 和 0.01%地高辛后所得。

在本发明的具体方式中，所述地高辛为 BN2006#Digitonin (5%)/品牌&Invitrogen/规格&1，其 weigt-%为 5。所述 NP40-地高辛洗涤缓冲液中地高辛的浓度等同于将该商品进行了 500 倍体积稀释后其中地高辛的浓度。

前文所述基础洗涤缓冲液（Wash Buffer）组成如下：20mM HEPES, pH 7.5；

150mM NaCl；0.5mM 亚精胺；1×蛋白酶抑制剂（Protease inhibitor cocktail，Sigma-Aldrich，Cat. No. 11873580001）。

在所述方法的步骤（A2）和（B2）中，所述特定蛋白对应抗体（一抗）直接加入到步骤（A1）和（B1）所得的第二次细胞重悬液中。

该步骤中加入一抗比例大约为：每49μL所述细胞重悬液中加入1μL所述一抗。

在本发明的具体实施方式中，步骤（A2）和（B2）中，所述特定蛋白对应抗体（一抗）为H3K27me3抗体。相应的，二抗为抗H3K27me3抗体的抗体。

在所述方法的步骤（A2）和（B2）中，所述孵育可为室温孵育2h或者4℃孵育过夜（10-12h，下同）。

在所述方法的步骤（A3）和（B3）中，在加入所述二抗前还可包括洗涤和离心的步骤；所述洗涤可为用前文所述的NP40-地高辛洗涤缓冲液（NP40-Digitonin Wash Buffer）洗涤；所述离心可为600g离心3min。

在本发明的具体实施方式中，所述离心和所述洗涤顺次交替进行，共一次洗涤一次离心；离心后弃上清。

在离心后还包括向沉淀中加入前文所述的NP40-地高辛洗涤缓冲液（NP40-Digitonin Wash Buffer）重悬细胞的步骤。

该步骤中的所述重悬具体可为：约每50万-100万个细胞重悬于98μL前文所述的NP40-地高辛洗涤缓冲液（NP40-Digitonin Wash Buffer）。

在所述方法的步骤（A3）和（B3）中，所述二抗可加入到该步骤所得的细胞重悬液中。

加入二抗比例大约为：每98μl所述的细胞重悬液加入1-2μL（如2μL）二抗。

在所述方法的步骤（A3）和（B3）中，所述孵育可为室温孵育30min。

在所述方法的步骤（A3）和（B3）中，进行所述孵育后还可包括离心和洗涤的步骤；所述离心可为600g离心3min；所述洗涤为前文所述的NP40-地高辛洗涤缓冲液（NP40-Digitonin Wash Buffer）洗涤。

在本发明的具体实施方式中，所述离心和所述洗涤顺次交替进行，共3次离心3次洗涤（离心和洗涤次数相同）；每次离心后均弃上清。

在所述方法的步骤（A4）和（B4）中，在加入所述ChiTag转座酶前还可包括依次进行离心和重悬细胞的步骤；所述离心可为600g离心3min；所述重悬细胞可为用NP40-Dig-med-buffer（chitag酶孵育缓冲液）重悬。

所述NP40-Dig-med-buffer（chitag酶孵育缓冲液）组成如下：0.01%（体积百分含量）NP40；0.01%地高辛；20mM HEPES，pH 7.5；300mM NaCl；0.5mM 亚精胺；1×蛋白酶抑制剂（Protease inhibitor cocktail，Sigma-Aldrich，Cat. No. 11873580001）。

重悬细胞的比例大约为：约每50000个细胞加入NP40-Dig-med-buffer重悬

至99μL。

在所述方法的步骤（A4）和（B4）中，加入所述ChiTag转座酶的同时还加入了PrimerA、ChIP-Tn5-PrimerB和ChIP-Tn5-PrimerC。

所述PrimerA为5'端修饰有磷酸基团的SEQ ID No.1所示单链DNA；所述ChIP-Tn5-PrimerB为SEQ ID No.2、SEQ ID No.3、SEQ ID No.4和SEQ ID No.5所示四条单链DNA的混合物；所述ChIP-Tn5-PrimerC为SEQ ID No.6、SEQ ID No.7、SEQ ID No.8和SEQ ID No.9所示所示四条单链DNA的混合物。

在所述方法的步骤（A4）和（B4）中，所述ChiTag转座酶可加入到重悬后的细胞悬液中。

ChiTag转座酶的加入比例大约为：99μL细胞悬液中加入1μL的pA-Tn5 adapter complex；所述pA-Tn5 adapter complex是ChiTag转座酶与ChIP双链接头混合物按照摩尔比1:1混合均匀后，25℃孵育1h后所得，其中ChiTag转座酶在所述pA-Tn5 adapter complex中的终浓度为5.75 pmol/μl。所述ChIP双链接头混合物中含有所述PrimerA、所述ChIP-Tn5-PrimerB和所述ChIP-Tn5-PrimerC。

进一步地，所述ChIP双链接头混合物可按照包括如下步骤的方法制备得到：第一步，配制如下反应体系：反应体系I：所述Primer A和所述ChIP-Tn5-Primer B等摩尔混合，具体如Primer A（100μM）10 μl；ChIP-Tn5-Primer B（100μM，每条引物终浓度是25μM）10 μl。反应体系II：所述Primer A和所述ChIP-Tn5-Primer C等摩尔混合，具体如Primer A（100μM）10 μl；ChIP-Tn5-Primer C（100μM，每条引物终浓度是25μM）10 μl。第二步，分别将反应体系I和反应体系II进行如下反应程序（热盖温度105℃）：75℃ 15min；60℃ 10min； 50℃ 10min；40℃ 10min；25℃ 30min。第三步，反应结束后，将反应体系I和反应体系II等体积混合，即得所述ChIP双链接头混合物。

在所述方法的步骤（A4）和（B4）中，所述孵育可为室温孵育1h。

在所述方法的步骤（A4）和（B4）中，进行所述孵育后还可包括离心和洗涤的步骤；所述离心可为300g离心3min；所述洗涤可为用前文所述的NP40-Dig-med-buffer（chitag酶孵育缓冲液）洗涤。

在本发明的具体实施方式中，所述离心和所述洗涤顺次交替进行，共4次离心3次洗涤；每次离心后均弃上清。

在所述方法的步骤（A5）和（B5）中，所述反应试剂可直接加入到步骤（A4）最后一次离心后所得的细胞沉淀中。

在所述方法的步骤(A5)和(B5)中，所述反应试剂可为Tagmentation Buffer（chitag酶打断缓冲液）。

所述Tagmentation Buffer（chitag酶打断缓冲液）为在前文所述的NP40-Dig-med-buffer(chitag酶孵育缓冲液)中添加10mM $MgCl_2$后所得的溶液。

在所述方法的步骤（A5）和（B5）中，所述孵育可为37℃孵育60min。

在所述方法的步骤（A5）和（B5）中，37℃孵育60min后300g离心3min，然后加入常规Tn5转座酶，37℃ 500rpm反应30min。

在所述方法的步骤（A5）和（B5）中，加入所述常规 Tn5 转座酶的同时还加入了primerA、ATAC-Tn5-primerB和ATAC-Tn5-PrimerC；

所述PrimerA为5’端修饰有磷酸基团的SEQ ID No.1所示单链DNA；所述ATAC-Tn5-primerB为SEQ ID No.10、SEQ ID No.11、SEQ ID No.12和SEQ ID No.13所示四条单链DNA的混合物；所述ATAC-Tn5-PrimerC为SEQ ID No.14、SEQ ID No.15、SEQ ID No.16和SEQ ID No.17所示四条单链DNA的混合物。

进一步地，所述Tn5转座酶可以ATAC 转座混合试剂的形式加入；每25μl所述 ATAC 转座混合试剂中含有 5μl 5X TAG Buffer（BGE005B01），16μl 1%BSA/PBS（A0332）和4μl Tn5 adaptor complex；所述Tn5 adaptor complex是Tn5转座酶与Tn5双链接头混合物按照摩尔比1:1混合均匀后，25℃孵育1h后所得，其中Tn5转座酶在所述Tn5 adaptor complex中的终浓度为0.875U/μl；所述Tn5双链接头混合物中含有所述PrimerA、所述ATAC-Tn5-primerB和所述ATAC-Tn5-PrimerC。

更进一步地，所述 Tn5 双链接头混合物可按照包括如下步骤的方法制备得到：第一步，配制如下反应体系：反应体系 I：所述 Primer A 和所述ATAC-Tn5-primerB 等摩尔混合，具体如 Primer A（100μM）10 μl；ATAC-Tn5-primerB（100μM，每条引物终浓度是25μM）10 μl；反应体系II：所述Primer A和所述ATAC-Tn5-PrimerC等摩尔混合，具体如Primer A（100μM）10 μl；ATAC-Tn5-PrimerC（100μM，每条引物终浓度是25μM）10 μl；第二步，分别将反应体系I 和反应体系II进行如下反应程序（热盖温度105℃）：75℃ 15min；60℃ 10min；50℃ 10min；40℃ 10min；25℃ 30min；第三步，反应结束后，将反应体系I 和反应体系II等体积混合，即得所述Tn5双链接头混合物。

所述反应试剂（Tagmentation Buffer）和所述 ATAC 转座混合试剂的加入比例大约可为：每 50000 个细胞加入 300μL 所述反应试剂（Tagmentation Buffer）和/或25μL所述ATAC 转座混合试剂。

在所述方法的步骤（A6）中，所述利用油包水结构生成单细胞液滴具体可利用华大基因DNBelab C4 便携式单细胞系统生成单细胞液滴。

在所述方法的步骤（A6）中，进行所述液滴内扩增时采用的引物有：Tn-Primer、183+C Primer。所述Tn-Primer为SEQ ID No.18所示单链DNA，所述183+C Primer为SEQ ID No.19所示单链DNA。

在本发明的具体实施方式中，进行所述扩增时的反应程序为：72℃ 30min；98℃ 30s；98℃ 10s，63℃ 30s，72℃ 1min，10 个循环；72℃ 5min；4℃保温。

在所述方法的步骤（A7）中，所述破乳可按照包括如下步骤实现：将（A6）中扩增完成的液滴转移至低吸附离心管中，加入 Additive B

（Perfluoro-1-octnaol，A63881），颠倒混匀，1000g，离心 1min 后置于磁力架上，静置 1min，去除液体。

进一步地，还可包括如下步骤：加入 Wash Buffer F（10ml TE Buffer，10μl 10% Tween-20，AM9820），颠倒混匀，1000g 离心 1min 后置于磁力架上，静置 1min，去除上清液。可重复此步骤 1 次。去上清后进行 ATAC Enzyme Ⅱ处理，置于金属浴中孵育 45min：37℃ 1000rpm。

更进一步地，在酶处理结束后，还可包括以下步骤：短暂离心，加入 Wash Buffer E（9.75ml TE Buffer，0.25ml 20% SDS，AM9820），颠倒混匀，终止反应；1000g 离心 1min 后，放置在磁力架上，静置 1min，去除液体。

再进一步地，之后还可包括清洗磁珠的步骤：加入 Wash Buffer F，颠倒混匀，1000g，离心 1min 后置于磁力架上，静置 1min，去除上清液。可重复此步骤 2 次。

在所述方法的步骤（A7）中，进行所述扩增时采用的引物为 Tn-Primer 和 183-pho Primer；所述 Tn-Primer 为 SEQ ID No.18 所示单链 DNA，所述 183-pho Primer 为 5'端修饰有磷酸基团的 SEQ ID No.20 所示单链 DNA 所示单链 DNA。

进一步地，进行所述扩增具体可按照包括如下步骤的方法进行：前面清洗磁珠去上清后加入 PCR Ready Mix（含有 ATAC Enzyme Ⅲ（2×KAPA HiFi HotStart Ready Mix，KK2602）、Tn-Primer、183-pho Primer、60% Optiprep Density Gradient Medium（D1556-250ML） 、NF-H_2O），吹打磁珠混匀均分到八连管中，再次使用 PCR Ready Mix 清洗离心管，均分到八连管中（4℃操作，避免 PCR Ready Mix 失活）。

在本发明的具体实施方式中，进行所述扩增时的反应程序为：98℃ 30s；98℃ 10s，63℃ 30s，72℃ 1min，15-20 个循环（如 15 个循环）；72℃ 5min；4℃保温。

在所述方法的步骤（A7）中，所述纯化可为向扩增产物中加入 1.2 倍体积的磁珠进行纯化（即 1.2×磁珠纯化）。

在所述方法的步骤（A7）中，所述磁珠可为 AgencourtAMPure XP 磁珠。

在所述方法的步骤（B6）中，进行所述扩增时采用的引物有 Bulk-N5 Primer 和 183+C-pho Primer；所述 Bulk-N5 Primer 为 SEQ ID No.22 所示的单链 DNA；所述 183+C-pho Primer 为 5'端修饰有磷酸基团的 SEQ ID No.23 所示的单链 DNA。

进一步地，进行所述扩增时的反应程序为：72℃ 5min；98° C 30s；98° C 10s，63° C 30s，72° C 5s ，15 个循环；72° C 1min；12° C 保温。

在所述方法的步骤（A8）和（B7）中，在酶切之前还可包括环化的步骤。进一步地，可借助 153+181 Splint oligo 实现所述环化。

所述 153+181 splint oligo 为 SEQ ID No.21 所示单链 DNA。

进一步地，先进行单链热变性反应，再进行环化反应。

在所述单链热变性反应的反应体系中加入所述 153+181 Splint oligo。

在本发明的具体实施方式中，所述单链热变性的反应体系为：纯化后的 DNA 混合物 200-400ng、浓度为 20μM 的所述 153+181 Splint oligo3μL；NF-H_2O 补足到 50μL。

在本发明的具体实施方式中，所述单链热变性的反应条件为：95℃ 3min；4℃保温。

在本发明的具体实施方式中，所述环化反应的反应体系为：50μL 上述单链热变性反应后产物；6μL 10×TA buffer（EPICENTRE TA6160）；0.6μl 浓度为 100mM 的 ATP；0.6μL 浓度为 400U/μL 的 T4 DNA 连接酶；TE Buffer2.8μL。

在本发明的具体实施方式中，所述环化反应的反应条件为：37℃ 45min；4℃保温。

在所述方法的步骤（A8）和（B7）中，进行所述酶切时采用的酶可为 EXO I 酶（NEB M0293L）和 EXO III 酶（NEB M0206L）。

在本发明的具体实施方式中，所述酶切的反应体系为：60μL 上述环化反应所得连接产物；0.4μL 10×TA buffer（EPICENTRE TA6160）；1.95μL 浓度为 20U/μL 的 EXO I 酶；0.65μL 浓度为 100U/μL 的 EXO III 酶；1μL TE Buffer。

在本发明的具体实施方式中，所述酶切的反应条件为：37℃ 30min；4℃保温。反应结束后加入 4μl 0.1mM EDTA（AMBION AM9260G）终止反应。

在所述方法的步骤（A8）和（B7）中，进行所述酶切后还可包括对酶切产物进行磁珠纯化的步骤。

在所述方法的步骤（A8）和（B7）中，对酶切产物进行纯化时采用的所述磁珠可为 PEG32 beads。

进一步地，向 64μL 上述酶切产物中加入 90μL PEG32 beads，然后进行如下操作：涡旋震荡混匀，室温孵育 10 分钟；置于磁力架中分离磁珠和液体；待溶液澄清后移除上清；保持反应管始终处于磁力架中，加入 80%乙醇漂洗磁珠；室温孵育 30 秒后移除上清；保持反应管始终处于磁力架中，开盖空气干燥磁珠 3 分钟；将反应管从磁力架中取出，加入灭菌超纯水洗脱；混匀；将反应管置于磁力架中分离磁珠和液体；待溶液澄清后吸取上清至灭菌管中，于-20℃保存（此处所得即为最终文库）。

在所述方法的步骤（A9）和（B8）中，所述测序为高通量测序，具体可为双端测序，测序方式具体可为 PE50+26+10（双端测序，每端测 50bp，barcode1 序列测 26bp，barcode2 序列测 10bp）。

在所述方法中，供试细胞具体可为肿瘤细胞 K562。

第二方面，本发明要求保护一种构建用于多维度解析细胞表观基因组学的 DNA 文库的方法。

本发明所要求保护的构建用于多维度解析单细胞表观基因组学的 DNA 文库的方法，具体可包括前文第一方面中所述方法 A 的步骤（A1）-（A8）或所述方法 B 的

步骤（B1）-（B7）。

第三方面，本发明要求保护一种试剂盒。

本发明所要求保护的试剂盒可含有 ChiTag 转座酶、常规 Tn5 转座酶，以及 CUT&Tag 技术和/或 ATAC-seq 技术的其他相关试剂。所述试剂盒用于：

（B1）多维度解析细胞表观基因组学；或者

（B2）构建用于多维度解析细胞表观基因组学的 DNA 文库。

进一步地，所述 CUT&Tag 技术和/或 ATAC-seq 技术的其他相关试剂可选自如下中的全部或部分：前文所述的添加有 1.5-2.5mM（如 2mM） EDTA 的 NP40-地高辛洗涤缓冲液；前文所述的 NP40-地高辛洗涤缓冲液（NP40-Digitonin Wash Buffer）；前文所述的基础洗涤缓冲液（Wash Buffer）；前文所述的特定蛋白对应抗体；前文所述的二抗；前文所述的 NP40-Dig-med-buffer（chitag 酶孵育缓冲液）；前文所述的 Tagmentation Buffer（chitag 酶打断缓冲液）；前文所述的终止反应液（4× Stop Buffer）；前文所述的 PrimerA（5'端修饰有磷酸基团，SEQ ID No.1）；前文所述的 ATAC-Tn5-PrimerB（SEQ ID No.10-13）；前文所述的 ATAC-Tn5-PrimerC（SEQ ID No.14-17）；前文所述的 ChIP-Tn5-PrimerB（SEQ ID No.2-5）；前文所述的 ChIP-Tn5-PrimerC（SEQ ID No.6-9）；前文所述的 Tn-Primer（SEQ ID No.18）；前文所述的 183+C Primer（SEQ ID No.19）；前文所述的 183-pho Primer（5'端修饰有磷酸基团，SEQ ID No.20）；AgencourtAMPure XP 磁珠；前文所述的 Bulk-N5 Primer（SEQ ID No.22）；前文所述的 183+C-pho Primer（SEQ ID No.23）；前文所述的 153+181 Splint oligo（SEQ ID No.21）；EXO I 酶；EXO III 酶；PEG32 beads。

更进一步地，所述试剂盒中还可含有记载有前文第一方面或第二方面所述方法的可读性载体（如纸张，或者光盘、U 盘等数据存储设备）。

第四方面，本发明要求保护一种系统。

本发明所要求保护系统由前文所述的试剂盒，以及 CUT&Tag 技术和/或 ATAC-seq 技术相关仪器设备组成。所述系统用于：

（B1）多维度解析细胞表观基因组学；或者

（B2）构建用于多维度解析细胞表观基因组学的 DNA 文库。

进一步地，所述 CUT&Tag 技术和/或 ATAC-seq 技术相关仪器设备可选自如下中的全部或部分：高通量测序仪（例如 BGISEQ500 测序仪）；PCR 仪；DNBelab C4 便携式单细胞系统；离心机；摇床；显微镜；细胞计数板。

第五方面，本发明要求保护前文所述试剂盒或所述系统在如下任一中的应用：

（B1）多维度解析细胞表观基因组学；

（B2）构建用于多维度解析细胞表观基因组学的 DNA 文库。

第六方面，本发明要求保护前文所述方法或所述试剂盒或所述系统在如下任一中的应用：

（C1）研究与发育和/或疾病相关的细胞群体异质性；

（C2）绘制细胞图谱；

（C3）解析不同临床表征的肿瘤细胞；

（C4）临床上研究肿瘤细胞演化和/或转移。

在本发明中，所述多维度解析细胞表观基因组学既可以为多维度解析单细胞表观基因组学，也可为多维度解析多细胞表观基因组学。

附图说明

图 1 为 CUT&Tag 方法示意图。

图 2 为 ATAC-seq 方法示意图。A 为 Tn5 转座酶结合染色质开放区域打断基因组序列示意图；B 为 ATAC-seq 文库制备结构示意图。

图 3 为单细胞所获得的 DNA 产物的质检结果图。

图 4 为多细胞所获得的 DNA 产物的质检结果图。

图 5 为单细胞 CUT&Tag 数据得到的 unique reads number。

图 6 为单细胞 ATAC-seq 数据得到的 unique reads number。

图 7 为单细胞组学 CUT&Tag 获取片段分布。

图 8 为单细胞组学 ATAC-seq 获取片段分布。

图 9 为多细胞组学 CUT&Tag 获取片段分布。

图 10 为多细胞组学 ATAC-seq 获取片段分布。

图 11 为 CUT&Tag 部分数据的 peak 分布图。

图 12 为 ATAC-seq 部分数据的 peak 分布图。

实施发明的最佳方式

以下的实施例便于更好地理解本发明，但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料，如无特殊说明，均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验，均设置至少三次重复实验，结果取平均值。

实施例 1、多维度解析细胞表观基因组学

一、多维度解析单细胞表观基因组学

供试细胞：K562 细胞。

1、细胞预处理（0.5-1h）

注意：在细胞渗透前的所有步骤都在室温下进行，以使细胞受到的压力最小化。建议避免重悬过程中的空化和剧烈的涡旋振动。

1.1 室温下收集新鲜细胞并计数（50 万-100 万个细胞），室温（23-28℃，下同）下低速离心（600×g 离心 3min），吸去液体；

1.2 加入至少 1 倍体积的 Wash Buffer 重悬细胞，室温下低速离心（600×g 离心 3min），吸去液体；

Wash Buffer: 20mM HEPES, pH 7.5; 150mM NaCl; 0.5mM Spermidine（亚

精胺）；1× Protease inhibitor cocktail（Sigma-Aldrich, Cat. No. 11873580001）。

注：开始的洗涤和孵育步骤离心 600g、3min，结合 pA-Tn5 后离心 300g、3min。

2、改变细胞通透性

通过 NP40-Digitonin Wash Buffer 改变细胞通透性分离细胞核，细胞重悬在 1ml NP40-Digitonin Wash Buffer 中。

NP40-Digitonin Wash Buffer: 在 wash buffer 中额外添加 0.01%（体积百分含量）NP40 和 0.01%地高辛后所得溶液。其中，地高辛为 BN2006#Digitonin (5%)/品牌&Invitrogen/规格&1，其 weigt-%为 5。所述 NP40-Digitonin Wash Buffer 中地高辛的浓度等同于将该商品进行了 500 倍体积稀释后其中地高辛的浓度。下文涉及 0.01%地高辛，其含义同此。

600g 离心 3min，弃上清，加入 49μl 添加 2mM EDTA 的 NP40-Digitonin Wash Buffer 重悬。

3、结合一抗（CUT&Tag）

3.1 向上述样品中以 1：50 的体积比加入 1μl 一抗（H3K27me3 抗体，Cell Signaling Technology, 9733, Lot 14)），轻柔涡旋振荡（默认使用 1:50-1:100 体积比或说明书中推荐的免疫浓度）。

3.2 将所有样品管置于摇床上室温孵育 2h（或者 4℃孵育过夜）。摇动时，液体应保持在管的底部和侧面。

4、结合二抗

4.1 将所有样品管从摇床上取下，再加入 1ml NP40-Digitonin Wash buffer 冲洗一次，600g 离心 3min，吸去上清，加入 98μl NP40-Digitonin Wash buffer 重悬细胞；

4.3 向每管样品中以 1:50 的体积比加入二抗(Guinea Pig anti-Rabbit IgG (Heavy & Light Chain) antibody (Antibodies-Online ABIN101961)（2μl）至 98μl NP40-Digitonin Wash buffer 中，轻柔涡旋振荡，使液体混合均匀；

4.4 将所有样品管置于摇床上，室温孵育 30min；

4.5 将所有样品管从摇床上取下，600g 离心 3min 沉淀，吸去上清；

4.6 向每管样品中加入 1ml NP40-Digitonin Wash buffer，上下颠倒 10 次或轻柔涡旋振荡，使液体混合均匀，移除没有结合的抗体；

4.7 重复步骤 4.5 和 4.6 两次。

5、结合 ChiTag 转座体

5.1 将所有样品管进行离心沉淀 600g 3min，吸去上清；

5.2 加入 100μl NP40-Dig-med-buffer 重悬细胞，进行计数，根据计数结果取 5 万细胞加入 NP40-Dig-med-buffer 重悬至 99ul，加入 pA-Tn5 adapter complex 1μl；

其中，ChiTag转座酶与ChIP双链接头混合物按照摩尔比1:1混合均匀后，25℃孵育1h得到pA-Tn5 adaptor complex，反应体系示例，如表1所示。

表1 pA-Tn5 adaptor complex 反应体系示例

ChIP双链接头混合物（50pmol/μl）	1μl
ChiTagTM（6.5pmol/μl ）	7.7μl

注：ChiTag转座酶的厂家货号为Novoprotein M058-YH01。

其中，ChIP双链接头混合物配制如下：

a、使用Annealing Buffer（配方：100μl浓度为1M Tris-HCl，pH 7.8；20μl 浓度为0.5 M EDTA，pH 8.0；100μl浓度为 5M NaCl；9.78ml NF-H_2O）溶解PrimerA、ChIP-Tn5-PrimerB、 ChIP-Tn5-PrimerC 至100 μM。

PrimerA：5’-Pho-CTGTCTCTTATACACATCT-3’（SEQ ID No.1）；

ChIP-Tn5-PrimerB：（4条引物稀释至100μM以后等体积混合）

5’-TCGTCGGCAGCGTCAGGCGAAGGCGATCGAGGACGGCAGATGTGTATAAGAGACAG-3’（SEQ ID No.2）；

5’-TCGTCGGCAGCGTCTAATCTTAGCGATCGAGGACGGCAGATGTGTATAAGAGACAG-3’（SEQ ID No.3）；

5’-TCGTCGGCAGCGTCCAGGACGTGCGATCGAGGACGGCAGATGTGTATAAGAGACAG-3’（SEQ ID No.4）；

5’-TCGTCGGCAGCGTCGTACTGACGCGATCGAGGACGGCAGATGTGTATAAGAGACAG-3’（SEQ ID No.5）。

ChIP-Tn5-PrimerC：（4条引物稀释至100μM以后等体积混合）

5’-GTCTCGTGGGCTCGGAATCTATCAACACCGTCTCCGCCTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3’（SEQ ID No.6）；

5’-GTCTCGTGGGCTCGGACCAGGAAGGCACCGTCTCCGCCTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3’（SEQ ID No.7）；

5’-GTCTCGTGGGCTCGGGAGAGATATTCACCGTCTCCGCCTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3’（SEQ ID No.8）；

5’-GTCTCGTGGGCTCGGGGGAAACATGCACCGTCTCCGCCTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3’（SEQ ID No.9）。

b、分别配制如下反应体系：

反应体系I：Primer A（100μM）10 μl；ChIP-Tn5-Primer B（100μM）10 μl。

反应体系II：Primer A（100μM）10 μl；ChIP-Tn5-Primer C（100μM）10 μl。

c、分别将反应体系I 和反应体系II 涡旋震荡充分混匀，并短暂离心使溶液回到管底。置于PCR 仪内，进行如下反应程序（热盖温度105℃）：75℃ 15min；60℃ 10min； 50℃ 10min；40℃ 10min；25℃ 30min。

d、反应结束后，将反应体系I 和反应体系II 等体积混合，混匀，即得所述 ChIP双链接头混合物，-20℃保存。

5.3 将所有样品管置于摇床上室温孵育 1h；

5.4 将所有样品管从摇床上取下，300g 离心 3min，吸去上清；

5.5 向每管样品中加入 NP40-Dig-med-buffer，上下颠倒 10 次或轻柔涡旋振荡，以使溶液混合均匀；

5.6 重复步骤 5.4 和 5.5 两次,然后 300g 离心 3min，吸去上清，移除多余没有结合的 pA-Tn5 adapter complex。

NP40-Dig-med-buffer: 0.01%（体积百分含量）NP40；0.01% 地高辛；20mM HEPES, pH 7.5； 300mM NaCl；0.5mM Spermidine（亚精胺）；1× Protease inhibitor cocktail（Sigma-Aldrich, Cat. No. 11873580001）。

6、片段化（1h）

6.1 向每管样品中加入 300μl Tagmentation Buffer，在加入的同时轻柔涡旋振荡；

6.2 37°C 200rpm 孵育 60min，然后 300g 离心 3min，吸去上清。

6.3 向样本管中加入 25μl ATAC 转座混合试剂（5μl 5X TAG Buffer(BGE005B01)，16μl 1% BSA/PBS(A0332)，4μl Tn5 adaptor complex）,37℃ 500rpm 反应 30min。

其中，Tn5 转座酶与 Tn5 双链接头混合物按照摩尔比 1:1 混合均匀后，25℃ 孵育 1h 得到 Tn5 adaptor complex，反应体系示例，如表 2 所示。

表 2 Tn5 adaptor complex 反应体系示例

Tn5 双链接头混合物（50pmol/μl）	1μl
Tn5 转座酶(0.875U/μl 华大自产，货号 BGE005)	7.7μl

其中，Tn5 酶双链接头混合物配制如下：

a、使用 Annealing Buffer（配方：100μl 浓度为 1M Tris-HCl，pH 7.8；20μl 浓度为 0.5 M EDTA，pH 8.0；100μl 浓度为 5M NaCl；9.78ml NF-H_2O）溶解 PrimerA、ATAC-Tn5-PrimerB、 ATAC-Tn5-PrimerC 至 100 μM。

PrimerA：5’-Pho-CTGTCTCTTATACACATCT-3’（SEQ ID No.1）；

ATAC-Tn5-Primer B：(4 条引物稀释至 100μM 以后等体积混合)

5’-TCGTCGGCAGCGTCTATAGCCTGCGATCGAGGACGGCAGATGTGTATAAGAGACAG-3’（SEQ ID No.10）；

5’-TCGTCGGCAGCGTCATAGAGGCGCGATCGAGGACGGCAGATGTGTATAAGAGACAG-3’（SEQ ID No.11）；

5’-TCGTCGGCAGCGTCCCTATCCTGCGATCGAGGACGGCAGATGTGTATAAGAGACAG-3’（SEQ ID No.12）；

5’-TCGTCGGCAGCGTCGGCTCTGAGCGATCGAGGACGGCAGATGTGTATAAGAGACAG-3’（SEQ ID No.13）。

ATAC-Tn5-Primer C：(4 条引物稀释至 100μM 以后等体积混合)

5’-GTCTCGTGGGCTCGGATTTATGACACACCGTCTCCGCCTCAGATGTGTATAAGAGACAG-

3’（SEQ ID No.14）；

5’-GTCTCGTGGGCTCGGCCTTAATTAACACCGTCTCCGCCTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3’（SEQ ID No.15）；

5’-GTCTCGTGGGCTCGGTCAGTGAGTCCACCGTCTCCGCCTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3’（SEQ ID No.16）；

5’-GTCTCGTGGGCTCGGACTGCCTTATCACCGTCTCCGCCTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3’（SEQ ID No.17）。

b、分别配制如下反应体系：

反应体系 I：Primer A（100μM）10 μl；ATAC-Tn5-Primer B（100μM）10 μl。

反应体系 II：Primer A（100μM）10 μl；ATAC-Tn5-Primer C（100μM）10 μl。

c、分别将反应体系 I 和反应体系 II 涡旋震荡充分混匀，并短暂离心使溶液回到管底。置于 PCR 仪内，进行如下反应程序（热盖温度 105℃）：75℃ 15min；60℃ 10min； 50℃ 10min；40℃ 10min；25℃ 30min。

d、反应结束后，将反应体系 I 和反应体系 II 等体积混合，混匀，即得所述 Tn5 双链接头混合物，-20℃保存。

7. 液滴生成&PCR

7.1 磁珠准备

7.1.1 参考华大所发表的文章 stLFR 的磁珠制备方法（Efficient and unique co-barcoding of second-generation sequencing reads from long DNA molecules enabling cost effective and accurate sequencing, haplotyping, and de novo assembly，https://genome.cshlp.org/content/early/2019/04/02/gr.245126.118）对磁珠（美国 Spherotech 公司，货号 SVM-200-4，https://www.spherotech.com/coa_mag_par.htm）进行表面寡核苷酸包埋，获得表面带有寡核苷酸的磁珠 Tn-Beads。

7.1.2 吸取 30 万 Tn-Beads 至 0.2ml 低吸附 PCR 管中，在磁力架上静置 2min，去除上清；

7.1.3 从磁力架上取下 PCR 管，加入 200 μl 1×Wash Buffer A（（1mM EDTA，AM9260，9mg/ml 85% KOH，P5958-250G））， 使用 200 μl 低吸附枪头吹打混匀磁珠，室温孵育 5min；

7.1.4 孵育结束后将 PCR 管放在磁力架上静置 2min，去除上清；

7.1.5 从磁力架取下 PCR 管加入 200 μl 1×Wash Buffer A，使用 200 μl 低吸附枪头吹打混匀磁珠，将 PCR 管放在磁力架上静置 2min，去除上清；

7.1.6 从磁力架取下 PCR 管加入 200 μl Wash Buffer B（500 μl 1M Tris-HCl，15567027，300 μl 5M NaCl，S5150，50 μl 10% Tween-20，9.15ml H_2O），使用 200 μl 低吸附枪头吹打混匀磁珠，将 PCR 管放在磁力架上静置 2min，去除上清；重复以上操作一次；

7.1.7 加入 200μl Wash Buffer B，待细胞核制备完成，去除上清（该步骤尽可能去干净上清）；

7.1.8 从磁力架上取下 PCR 管，加入 100μl Beads Resuspension Buffer，悬浮磁珠，冰上放置，等待上机；

7.1.9 按照下表 2 制备 Beads Resuspension Buffer：

表 2 Beads Resuspension Buffer 配制体系

组成	用量(μl)
0.1%SDS	40
ATAC Bead Buffer	58
Tn Primer(20μM)	1
183+C Primer(20μM)	1
总体积	100

ATAC Bead Buffer：20μl 5x Fidelity Buffer(KK2102),3μl 10mM dNTP Mix(18427013),7 μl 25mM $MgCl_2$(20303),16.7ul 60% Optiprep Density Gradient Medium（D1556-250ML），11.3μl NF-H_2O。

Tn Primer：5’-CGTAGCCATGTCGTTCTG-3’（SEQ ID No.18）；

183+C Primer：5’-GAGACGTTCTCGACTCAGCAGAGTCTCGTGGGCTCGG-3’（SEQ ID No.19）。

7.2 细胞核准备

7.2.1 取 6.3 步骤中转座结束的细胞核进行计数，根据细胞核浓度，吸取 10,000 个细胞核，加入到 Nuclei Resuspension Buffer

7.2.2 按照下表 3 准备 Nuclei Resuspension Buffer

表 3 Nuclei Resuspension Buffer 配制体系

组成	用量(μl)
细胞核	n
KAPA Hifi DNA polymerase（KK2102）	8
ATAC Nuclei Buffer	46.7
NF-H_2O	45.3-n
总体积	100

ATAC Nuclei Buffer：20μl 5x Fidelity Buffer(KK2102),3μl 10mM dNTP Mix(18427013),7 μl 25mM $MgCl_2$(20303),16.7 μl 60% Optiprep Density Gradient Medium（D1556-250ML）。

7.3 液滴生成（利用华大基因 DNBelab C4 便携式单细胞系统生成液滴）

7.3.1 撕掉芯片（道康宁 184 型）表面保护膜，放置于液滴发生装置的芯片槽区域；

7.3.2 向收集管加入 100μl Bio-rad Oil（1864006），旋紧收集盖子，并

将收集管竖直放置于固定架上；

7.3.3 将盖子上的连接管 A 端（接触收集管底部的连接管）插入芯片的 Outlet 孔；

7.3.4 调节 50ml 注射器活塞的初始位置到 28 ml 刻度，并放置在固定架上。用针头连接注射器和收集管盖子上的连接管 B 端(非接触收集管底部的连接管)；

7.3.5 使用移液器轻轻吹打混匀细胞，向芯片的 cells 孔加入 100μl 细胞悬液，确保孔底未出现气泡；

7.3.6 轻轻吹打混匀磁珠，向芯片 beads 孔加入 100μl 磁珠，确保孔底未出现气泡；

7.3.7 快速添加 Bio-rad Oil（先加 400μl，实验过程中需添加油）到芯片的 Oil 孔；

7.3.8 快速将注射器的活塞拉到 30 ml 刻度，并将注射器固定在固定支架上；

7.3.9 启动计时器计时，收集液滴(测试阶段可以等液体跑完)，注意补油；

7.3.10 液滴生成结束后，立即拧松收集管上的收集盖子，拔出芯片 outlet 孔的连接管，竖直拉伸连接管，让管中的液滴流入收集管中，然后换上普通的收集管盖子；

7.3.11 转移液滴至八连管中，注意液滴液面不超过 100μl，后在液滴表面加 100μl 矿物油覆盖，盖上八连管盖根据下表 4 进行 PCR：

表 4 液滴内 PCR 程序

循环	变性	退火	延伸	终止
1			72° C, 30min	
1	98° C, 30s			
10	98° C, 10s			
		63° C, 30s		
			72° C, 1min	
1			72° C, 5min	
1				12° C, hold

停止点：PCR 结束后，可在 4℃下放置 72h。

8、破乳&液滴外扩增

8.1 破乳

8.1.1 PCR 结束后转移液滴到新低吸附的 1.5ml 离心管中，加入 100μl Additive B（Perfluoro-1-octnaol，A63881），颠倒混匀，1000g，离心 1min 后放置在磁力架上，静置 1min，去除液体；

8.1.2 加入 500μl Wash Buffer F（10ml TE Buffer，10μl 10% Tween-20，AM9820），颠倒混匀，1000g，离心 1min 后放置在磁力架上，静置 1min，去除上清液；

8.1.3 重复上述步骤 1 次，去上清后加入下述酶处理反应体系。

8.2 酶处理

8.2.1 按照下表 5 提前配制酶处理反应体系：

表 5 酶处理反应体系

组成	用量(μl)
NF-H_2O	170
ATAC Enzyme Ⅱ	10
ATAC Reaction Buffer	20
总体积	200

ATAC Enzyme Ⅱ：EXO Ⅰ（M0293S）

ATAC Reaction Buffer：10x EXO Ⅰ Buffer（B0293s）

8.2.1 吸取 200μl 反应体系，加到装有磁珠的 PCR 管中（无需吹打）；

8.2.3 在金属浴 37℃，1000rpm 孵育 45min；

8.2.4 反应结束后，短暂离心，加入 1ml Wash Buffer E（配方：9.75ml TE Buffer，0.25ml 20% SDS，AM9820），颠倒混匀，终止反应；

8.2.5 1000g 离心 1min 后，放置在磁力架上，静置 1min，去除液体；

8.2.6 重新加入 500μl Wash Buffer F（配方：10ml TE Buffer，10μl 10% Tween-20，AM9820），颠倒混匀，1000g 离心 1min 后，放置在磁力架上，静置 1min，去除液体，重复上述步骤 2 次；

8.2.7 保持磁珠吸附状态，加入 400μl PCR Ready Mix，吹打磁珠混匀均分到八联管中，再次使用 400μl PCR Ready Mix 清洗离心管，均分到八联管中；（注意：该步骤应保持在 4℃条件下操作，避免 PCR Ready Mix 失活）。

8.3 PCR 扩增

8.3.1 按照下表 6 配制 PCR Ready Mix：

表 6 PCR Ready Mix 配制体系

组成	用量(μl)
ATAC Enzyme Ⅲ(2×KAPA HiFi HotStart Ready Mix,KK2602)	50
Tn Primer（20μM）	2
183-pho Primer（20μM）	2
60% Optiprep Density Gradient Medium	16.7
NF-H_2O	29.3
总体积	100

Tn Primer：5’-CGTAGCCATGTCGTTCTG-3’（SEQ ID No.18）；

183-pho Primer：5’-pho GAGACGTTCTCGACTCAGCAGA-3’（SEQ ID No.20）。

8.3.2 根据 8.2.7 操作完成分装，Vortex 混匀反应悬液，并短暂离心；

8.3.3 按下表 7 条件在 PCR 仪上反应，热盖温度设置为 105℃。

表 7 PCR 程序

循环	变性	退火	延伸	终止
1	98° C, 30s			
15	98° C, 10s			
		63° C, 30s		
			72° C, 1min	
1			72° C, 5min	
1				12° C, hold

注意：针对不同样本，PCR 循环数可相应改变；

停止点：PCR 产物可在 4℃条件下保存 24h，PCR 结束后使用 Qubit 定量确定前期处理是否存在问题，若浓度<2ng/μl 则说明样本处理失败，无需继续后续操作。

9、1.2×磁珠纯化

9.1 提前取出 AgencourtAMPure XP，置于室温平衡至少 30min，使用前充分震荡混匀；

注意： PCR 反应过程中存在液体蒸发现象，如果液体蒸发明显，需要重新定量液体体积 V，并用 H_2O 补充至 800μl。

9.2 转移 PCR 产物至新的 2ml 离心管中，用移液器吸取 960μl AgencourtAMPure XP 至管中，Vortex 至完全混匀，室温孵育 8min；

9.3 放到磁力架上，静置 5min，磁珠被吸附，液体变澄清；

9.4 弃上清，不要吸到磁珠；

9.5 加入 200μl 80%乙醇，静置 30s，弃上清，此步骤重复两次；

9.6 样本放置在磁力架上晾干至磁珠表面不反光（约 2-5min）；

9.7 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 50-100μl NF-H_2O 溶解，吹打 10 次混匀，室温静置 5min；

9.8 上磁力架，静置 3min，液体澄清；

9.9 将上清回收，避免吸到磁珠；

9.10 取 1μl 测 qubit 浓度；按照浓度将产物稀释至 2ng/μl 左右，然后取 1μl 样品进行 2100HS 检测，文库片段长度在 200bp-600bp。

10、单链热变性反应（每个反应投入 200-400ngDNA）

反应体系如表 8 所示，参数设置如表 9 所示。

表 8 单链热变性的反应体系

成分	体积
DNA mix	X μl
153+181 Splint oligo（20μM）	3 μl
NF-H_2O	补足到 50 μl
总体积	50 μl

其中，DNA mix 为上一步纯化所得混合 DNA 样品。153+181 Splint oligo: 5’-CGAGAACGTCTCCGTAGCCATGTC -3’（SEQ ID No.21）。

表 9 单链热变性反应参数设置

循环次数	温度	时间
1	95℃	3 min
1	4℃	Forever

10、环化反应

环化反应的反应体系如表 10 所示。

表 10 环化反应的反应体系

成分	体积
上一步骤所得的 DNA mix	50μl
10×TA buffer	6μl
100mM ATP	0.6μl
T4 DNA 连接酶(400U/μl)	0.6μl
TE Buffer	2.8μl
总体积	120μl

其中，10×TA buffer 的厂家货号为 EPICENTRE TA6160。

配制好上述反应液后，涡旋震荡，离心 5 s；37℃孵育 45min，4℃保温。

11、酶切

酶切反应体系如表 11 所示。

表 11 酶切反应体系

成分	体积
上一步骤的连接产物 mix	60μl
10×TA buffer	0.4μl
EXO I(20U/μl)	1.95μl
EXO III(100U/μl)	0.65μl
TE Buffer	1μl
总体积	64μl

其中，10×TA buffer 的厂家货号为 EPICENTRE TA6160。

配制好上述反应液后，涡旋震荡，轻甩 5 s；37℃孵育 30 min，4℃保温。反应结束后加入 4μl 0.1mM EDTA（AMBION AM9260G）终止反应。

12、磁珠纯化

12.1 取 90μl PEG32 beads，加入到上述反应液，涡旋震荡混匀，室温孵育 10 分钟；

12.2 将反应管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体。待溶液澄清(约 5 分钟)，小心移除上清；

12.3 保持 EP 管始终处于磁力架中，加入 200μl 新鲜配制的 80%乙醇漂洗

磁珠。室温孵育 30 秒后小心移除上清；

12.4 重复上步，总计漂洗两次；

12.5 保持 EP 管始终处于磁力架中，开盖空气干燥磁珠 3 分钟；

12.6 将 EP 管从磁力架中取出，加入 32μl 灭菌超纯水洗脱。涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀。将反应管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体。待溶液澄清(约 2 分钟)小心吸取上清至灭菌 EP 管中，于-20℃保存（此处所得即为最终文库）；

12.7 纯化后产物取 1μl 测 ssDNA 浓度；

结果显示：2.89 ng/μl（*经验值：ssDNA 浓度 0.6-3.0ng/ul，总产量 80-100ng）

13、高通量测序

利用 BGI-SEQ500 对样本进行测序（双端测序），测序方式 PE50+26+10。

14、数据分析

二、多维度解析多细胞表观基因组学

1、 步骤 1-6 均同步骤一种多维度解析单细胞表观基因组学的步骤 1-6。

7、柱纯化（用到 QIAamp DNA Mini Kit（货号 51304）试剂盒，其中包括了下文所述 PB Buffer、PE Buffer 以及离心柱）

7.1 向步骤 6.3 中反应结束样本中加入 125μl （5 倍体积）PB Buffer，吹打混匀。

7.2 放置一个过滤柱在 2ml 离心管中，并将步骤 7.1 中的混合物加入到柱子中。

7.3 将柱子连同离心管一起放入离心机中，以 13000rpm 的速度离心 1 分钟，直到所有样品全部过柱，弃掉废液。

7.4 添加 750μl PE Buffer 至离心柱中，以 13000rpm 的速度离心 1 分钟，弃掉废液。

7.5 空离离心柱 1 分钟，完全移除残留的酒精。

7.6 将离心柱放置在一个干净的 1.5ml 离心管内。

7.7 添加 20μl TE Buffer（AM9858）洗脱 DNA，放置 1 分钟后，以 13000rpm 的速度离心 1 分钟，收集液体。

8、PCR 扩增

8.1 按照下表 12 配制 PCR Ready Mix：

表 12 PCR Ready Mix 配制体系

组成	用量(μl)
2X KAPA Ready Mix	25
Bulk-N5 Primer（20μM）	2
183+C-pho Primer（20μM）	2
7.7 步骤 DNA	19

NF-H_2O	2
总体积	50

Bulk-N5 Primer：5’-CGTAGCCATGTCGTTCTGCGTCGTCGGCAGCGTC-3’（SEQ ID No.22）；

183+C-pho Primer：5’-pho GAGACGTTCTCGACTCAGCAGAGTCTCGTGGGCTCGG-3’（SEQ ID No.23）。

8.2 Vortex 混匀反应悬液，并短暂离心；

8.3 按下表 13 条件在 PCR 仪上反应，热盖温度设置为 105℃。

表 13 PCR 程序

循环	变性	退火	延伸	终止
1	72℃，5min			
1	98° C，30s			
15	98° C，10s			
		63° C，30s		
			72° C，5s	
1			72° C，1min	
1				12° C，hold

注意：针对不同样本，PCR 循环数可相应改变；

停止点：PCR 产物可在 4℃条件下保存 24h，PCR 结束后使用 Qubit 定量确定前期处理是否存在问题，若浓度 5ng/μl 则说明样本处理失败，无需继续后续操作。

9、步骤 9-14 均同步骤一多维度解析单细胞表观基因组学的步骤 9-14。

三、结果及分析

单细胞所获得的 DNA 产物的质检结果如图 3 所示。多细胞所获得的 DNA 产物的质检结果如图 4 所示。由图 3 和图 4 可知，单细胞以及多细胞两个实施例都富集到 200-500bp 的片段，证明实验是可行的。

单细胞多组学经过测序分析，结果如下表 13 和图 5、图 6 所示。图 5 为单细胞 CUT&Tag 数据得到的 unique reads number。图 6 为单细胞 ATAC-seq 数据得到的 unique reads number。由表 13 和图 5、图 6 可知：表 13 展示了实施例 1 中所得到的单细胞数据，获取到的细胞数量和总体的读段数，以支撑后面的分析。图 5、图 6 分别展示实施例 1 中每个细胞的 CUT&Tag 数据以及 ATAC-seq 数据可以捕获到的读段数，CUT&Tag 部分数据有一百多个细胞可以捕获到 1000 条以上读段数，ATAC-seq 部分大部分细胞可以捕获到 5000 条以上读段数，捕获到的有效读段数支持后面的分析。

表 13 单细胞多组学测序结果

	CUT&Tag	ATAC-seq
细胞数	376	2308
全部读段数	12308078	586454498

比对上的读段数	12008982	571379934
读段数比对概率	97.57%	97.43%
Q30	91.5%	93.4%

图 7 和图 8 分别为单细胞组学 CUT&Tag 数据以及 ATAC-seq 两部分数据，得到的片段分布，图 7 展示了单细胞组学 CUT&Tag 得到不同片段大小的峰表示核小体的周期性变化。证明可以获取不同核小体数目，验证了实验的准确性。图 8 单细胞组学展示了 ATAC-seq 数据，主峰在第一个，表示 ATAC 主要捕获染色体开放区的 DNA。

单细胞多组学经过测序分析，结果如下表 14 所示。由表 14 可知，表 14 展示了实施例 2 中所得到的多细胞数据，获取到的细胞数量和总体的读段数，以支撑后面的分析。

表 14 多细胞多组学测序结果

	CUT&Tag	ATAC-seq
全部读段数	3982091	472527602
比对上的读段数	8821920	571379934
比对上读段数比对率	99.19%	98.63%

图 9 展示了多细胞 CUT&Tag 获取片段分布，图 10 展示了多细胞 ATAC-seq 获取片段分布。由图 9 和图 10 可知，图 9 和图 10 分别为多细胞 CUT&Tag 数据以及 ATAC-seq 两部分数据，得到的片段分布，图 9 展示了多细胞 CUT&Tag 得到不同片段大小的峰表示核小体的周期性变化。证明可以获取不同核小体数目，验证了实验的准确性。图 10 展示了多细胞 ATAC-seq 数据，主峰在第一个，表示 ATAC 主要捕获染色体开放区的 DNA。

图 11 显示了 CUT&Tag 部分数据的 peak 分布图，第一条红色（single cell CUT&Tag）代表本发明实施例 1 的步骤一所获得的数据，中间第二条黑色（cells CUT&Tag）代表是步骤二所获得的数据，第三条绿色（Henikoff CUT&Tag）为参考文献（https://doi.org/10.1038/s41467-019-09982-5）中单组学 CUT&Tag 所得到的数据，第四条蓝色（ChIP-seq）为数据库 ChIP-seq 的数据，四份数据的 peak 分布基本一致，证明本发明实施例 1 的步骤一和步骤二中所获取的 CUT&Tag 数据真实有效。

图 12 显示了 ATAC-seq 部分数据的 peak 分布图，第一条红色（single cell ATAC-seq)为本发明实施例 1 的步骤一中所得到的 ATAC 数据,第二条黑色(cells ATAC-seq）为步骤二中得到得 ATAC 数据，第三条蓝色（K562 ATAC-seq）为数据库中 K562 细胞的 ATAC-seq peak 分布，三份数据的 peak 分布基本一致，证明本实施例中所获取的 ATAC 数据真实有效。

工业应用

本发明在细胞中同时实现 ChIP-seq 和 ATAC-seq 测序，ATAC-seq 可以提供细胞染色质开放区的信息，ChIP-seq 可以提供特定蛋白结合序列信息，二者的

结合可以得到更为丰富的表观基因学信息，有利于科研人员研究发育与疾病相关细胞群体异质性和绘制细胞图谱。

该方法将表观基因组学的两个维度 ATAC-seq 和 ChIP-seq 两种方法结合起来，在细胞中利用 pA-Tn5 融合蛋白（即 ChiTag 转座酶）和常规 Tn5 转座酶，分别包埋不同的接头序列，在单细胞水平分别解析染色质开放区信息以及特定蛋白结合序列信息。实现了单细胞水平两个维度的表观基因组学共同解析，得到更丰富的表观基因组学信息。

本发明可以用于开发针对于肿瘤样本以及发育与疾病样本的高通量的 ATAC-seq 和 ChIP-seq 组合建库试剂盒，在科研应用方面，可应用于科研人员研究发育与疾病相关细胞群体异质性和绘制细胞图谱，并且在表观调控方面提供更多的信息。在临床方面也有广阔的应用前景，相较于目前基于 mRNA 的转录组测序检测方法，本方法基于细胞核内的染色质基因组，检测对象相对不容易降解，对于样本质量的包容程度更高。本方法可以解析不同临床表征的肿瘤细胞，对于临床上研究肿瘤细胞演化和转移的具有重要意义。本发明可以分别从单细胞水平以及多细胞水平捕获特定蛋白互作 DNA 序列信息，以及染色体开放区的信息，由此可以多方面解析细胞表观基因组，用于研究发育与疾病相关细胞的表观调控机制。

权利要求

1、一种多维度解析细胞表观基因组学的方法，包括如下步骤：在细胞中利用ChiTag 转座酶和 Tn5 转座酶，分别包埋不同的接头序列，在细胞水平上实现染色质开放区信息和特定蛋白结合序列信息的共同解析。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述方法为方法 A 或方法 B；

所述方法 A 为多维度解析单细胞表观基因组学的方法，包括如下步骤：

（A1）改变供试细胞的通透性；

（A2）向步骤（A1）处理后的细胞中加入特定蛋白对应抗体进行孵育；

（A3）向步骤（A2）处理后的细胞中加入二抗进行孵育；

（A4）向步骤（A3）处理后的细胞中加入 ChiTag 转座酶进行孵育；

（A5）向步骤（A4）处理后的细胞中加入反应试剂进行孵育，孵育后加入Tn5 转座酶；

（A6）在步骤（A5）反应后，利用油包水结构生成单细胞液滴，进行液滴内扩增；

（A7）进行破乳并扩增和纯化；

（A8）进行酶切，得到最终文库；

（A9）对步骤（A8）所得最终文库进行高通量测序，从而解析单细胞水平上的染色质开放区信息和特定蛋白结合序列信息；

所述方法 B 为多维度解析多细胞表观基因组学的方法，包括如下步骤：

（B1）改变供试细胞的通透性；

（B2）向步骤（B1）处理后的细胞中加入特定蛋白对应抗体进行孵育；

（B3）向步骤（B2）处理后的细胞中加入二抗进行孵育；

（B4）向步骤（B3）处理后的细胞中加入 ChiTag 转座酶进行孵育；

（B5）向步骤（B4）处理后的细胞中加入反应试剂进行孵育，孵育后加入Tn5 转座酶；

（B6）纯化和扩增；

（B7）进行酶切，得到最终文库；

（B8）对步骤（B7）所得最终文库进行高通量测序，从而解析多细胞水平上的染色质开放区信息和特定蛋白结合序列信息。

3、根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于：步骤（A1）和（B1）中，所述改变供试细胞的通透性是通过将所述供试细胞重悬于 NP40-地高辛洗涤缓冲液中实现的；

所述 NP40-地高辛洗涤缓冲液为在基础洗涤缓冲液中额外添加 0.01% NP40 和 0.01%地高辛后所得；

所述基础洗涤缓冲液组成如下：20mM HEPES, pH 7.5；150mM NaCl；0.5mM 亚精胺；1×蛋白酶抑制剂。

4、根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于：所述（A1）和（B1）包括：先将每 50 万-100 万个细胞重悬于 1ml 所述 NP40-地高辛洗涤缓冲液中，然后离心弃上清，加入 49μl 添加有 1.5-2.5mM EDTA 的所述 NP40-地高辛洗涤缓冲液重悬；

步骤（A2）和（B2）中，所述特定蛋白对应抗体直接加入到步骤（A1）和（B1）所得第二次细胞重悬液中。

5、根据权利要求 2-4 中任一所述的方法，其特征在于：步骤（A2）和（B2）中，所述特定蛋白对应抗体为 H3K27me3 抗体。

6、根据权利要求2-5中任一所述的方法，其特征在于：步骤（A2）和（B2）中，所述孵育为23-28℃孵育2h或者4℃孵育10-12h。

7、根据权利要求2-6中任一所述的方法，其特征在于：步骤（A3）和（B3）中，在加入所述二抗前还包括洗涤和离心的步骤；所述洗涤为用权利要求3中所述的NP40-地高辛洗涤缓冲液洗涤；所述离心为600g离心3min。

8、根据权利要求7所述的方法，其特征在于：步骤（A3）和（B3）中，最后一次离心后还包括向沉淀中加入权利要求3中所述的NP40-地高辛洗涤缓冲液重悬细胞的步骤；所述二抗加入到所得细胞重悬液中。

9、根据权利要求 2-8 中任一所述的方法，其特征在于：步骤（A3）和（B3）中，所述孵育为 23-28℃孵育 30min。

10、根据权利要求2-9中任一所述的方法，其特征在于：步骤（A3）和（B3）中，进行所述孵育后还包括离心和洗涤的步骤；所述离心为600g离心3min；所述洗涤为用权利要求3中所述的NP40-地高辛洗涤缓冲液洗涤。

11、根据权利要求 2-10 中任一所述的方法，其特征在于：步骤（A4）和（B4）中，在加入所述 ChiTag 转座酶前还包括依次进行离心和重悬细胞的步骤；所述离心为 600g 离心 3min；所述重悬细胞为用 chitag 酶孵育缓冲液重悬；

所述 chitag 酶孵育缓冲液组成如下：0.01%（体积百分含量）NP40；0.01%地高辛，20mM HEPES，pH 7.5；300mM NaCl；0.5mM 亚精胺；1×蛋白酶抑制剂。

12、根据权利要求 2-11 中任一所述的方法，其特征在于：步骤（A4）和（B4）中，加入所述 ChiTag 转座酶的同时还加入了 PrimerA、ChIP-Tn5-PrimerB 和 ChIP-Tn5-PrimerC；

所述 PrimerA 为 5’端修饰有磷酸基团的 SEQ ID No.1 所示单链 DNA；所述 ChIP-Tn5-PrimerB 为 SEQ ID No.2、SEQ ID No.3、SEQ ID No.4 和 SEQ ID No.5 所示四条单链 DNA 的混合物；所述 ChIP-Tn5-PrimerC 为 SEQ ID No.6、SEQ ID No.7、SEQ ID No.8 和 SEQ ID No.9 所示所示四条单链 DNA 的混合物。

13、根据权利要求 11 或 12 所述的方法，其特征在于：步骤（A4）和（B4）中，所述 ChiTag 转座酶加入到用所述 chitag 酶孵育缓冲液重悬后的细胞悬液中；

所述 ChiTag 转座酶的加入比例为：99μL 所述细胞悬液中加入 1μL 的

pA-Tn5 adapter complex；所述 pA-Tn5 adapter complex 是 ChiTag 转座酶与 ChIP 双链接头混合物按照摩尔比 1:1 混合均匀后，25℃孵育 1h 后所得；其中所述 ChiTag 转座酶在所述 pA-Tn5 adapter complex 中的终浓度为 5.75 pmol/μl；所述 ChIP 双链接头混合物中含有所述 PrimerA、所述 ChIP-Tn5-PrimerB 和所述 ChIP-Tn5-PrimerC。

14、根据权利要求 13 所述的方法，其特征在于：步骤（A4）和（B4）中，所述 ChIP 双链接头混合物按照包括如下步骤的方法制备得到：

第一步，配制如下反应体系：

反应体系 I：所述 Primer A 和所述 ChIP-Tn5-Primer B 等摩尔混合；

反应体系 II：所述 Primer A 和所述 ChIP-Tn5-Primer C 等摩尔混合；

第二步，分别将所述反应体系 I 和所述反应体系 II 进行如下反应程序：75℃ 15min；60℃ 10min； 50℃ 10min；40℃ 10min；25℃ 30min；

第三步，反应结束后，将所述反应体系 I 和所述反应体系 II 等体积混合，即得所述 ChIP 双链接头混合物。

15、根据权利要求 2-14 中任一所述的方法，其特征在于：步骤（A4）和（B4）中，所述孵育为 23-28℃孵育 1h。

16、根据权利要求 2-15 中任一所述的方法，其特征在于：步骤（A4）和（B4）中，进行所述孵育后还包括离心和洗涤的步骤；所述离心为 300g 离心 3min；所述洗涤为用权利要求 11 中所述的 chitag 酶孵育缓冲液洗涤。

17、根据权利要求 2-16 中任一所述的方法，其特征在于：步骤（A5）和（B5）中，所述反应试剂直接加入到步骤（A4）离心后所得的细胞沉淀中。

18、根据权利要求 2-17 中任一所述的方法，其特征在于：步骤（A5）和（B5）中，所述反应试剂为 chitag 酶打断缓冲液；

所述 chitag 酶打断缓冲液为在权利要求 11 中所述的 chitag 酶孵育缓冲液中添加 10mM $MgCl_2$ 后所得的溶液。

19、根据权利要求 2-18 中任一所述的方法，其特征在于：步骤（A5）和（B5）中，所述孵育为 37℃孵育 60min。

20、根据权利要求 19 所述的方法，其特征在于：步骤（A5）和（B5）中，在所述孵育后 300g 离心 3min，然后加入 Tn5 转座酶，37℃ 500rpm 反应 30min。

21、根据权利要求 2-20 中任一所述的方法，其特征在于：步骤（A5）和（B5）中，加入所述 Tn5 转座酶的同时还加入了 primerA、ATAC-Tn5-primerB 和 ATAC-Tn5-PrimerC；

所述 PrimerA 为 5’端修饰有磷酸基团的 SEQ ID No.1 所示单链 DNA；所述 ATAC-Tn5-primerB 为 SEQ ID No.10、SEQ ID No.11、SEQ ID No.12 和 SEQ ID No.13 所示四条单链 DNA 的混合物；所述 ATAC-Tn5-PrimerC 为 SEQ ID No.14、SEQ ID No.15、SEQ ID No.16 和 SEQ ID No.17 所示四条单链 DNA 的混合物。

22、根据权利要求 20 或 21 所述的方法，其特征在于：步骤（A5）和（B5）

中，所述 Tn5 转座酶是以 ATAC 转座混合试剂的形式加入的；每 25μl 所述 ATAC 转座混合试剂中含有 5μl 5X TAG buffer、16μl 含有 1%BSA 的 PBS 和 4μl Tn5 adaptor complex；所述 Tn5 adaptor complex 是 Tn5 转座酶与 Tn5 双链接头混合物按照摩尔比 1:1 混合均匀后，25℃孵育 1h 后所得，其中 Tn5 转座酶在所述 Tn5 adaptor complex 中的终浓度为 0.875U/μl；所述 Tn5 双链接头混合物中含有所述 PrimerA、所述 ATAC-Tn5-primerB 和所述 ATAC-Tn5-PrimerC。

23、根据权利要求 22 所述的方法，其特征在于：所述 Tn5 双链接头混合物按照包括如下步骤的方法制备得到：

第一步，配制如下反应体系：

反应体系 I：所述 Primer A 和所述 ATAC-Tn5-primerB 等摩尔混合；

反应体系 II：所述 Primer A 和所述 ATAC-Tn5-PrimerC 等摩尔混合；

第二步，分别将反应体系 I 和反应体系 II 进行如下反应程序：75℃ 15min；60℃ 10min；50℃ 10min；40℃ 10min；25℃ 30min；

第三步，反应结束后，将反应体系 I 和反应体系 II 等体积混合，即得所述 Tn5 双链接头混合物。

24、根据权利要求 2-23 中任一所述的方法，其特征在于：步骤（A6）中，进行所述液滴内扩增时采用的引物有：Tn-Primer、183+C Primer。所述 Tn-Primer 为 SEQ ID No.18 所示单链 DNA，所述 183+C Primer 为 SEQ ID No.19 所示单链 DNA。

25、根据权利要求 2-24 中任一所述的方法，其特征在于：步骤（A7）中，进行所述扩增时采用的引物有：Tn Primer、183-pho Primer；所述 Tn-Primer 为 SEQ ID No.18 所示单链 DNA，所述 183-pho Primer 为 5’端修饰有磷酸基团的 SEQ ID No.20 所示单链 DNA 所示单链 DNA。

26、根据根据权利要求 2-25 中任一所述的方法，其特征在于：步骤（A7）中，所述纯化为向扩增产物中加入 1.2 倍体积的磁珠进行纯化。

27、根据权利要求 26 所述的方法，其特征在于：步骤（A7）中，所述磁珠为 AgencourtAMPure XP 磁珠。

28、根据根据权利要求 2-27 中任一所述的方法，其特征在于：步骤（B6）中，进行所述扩增时采用的引物有 Bulk-N5 Primer 和 183+C-pho Primer；所述 Bulk-N5 Primer 为 SEQ ID No.22 所示的单链 DNA；所述 183+C-pho Primer 为 5’端修饰有磷酸基团的 SEQ ID No.23 所示的单链 DNA。

29、根据根据权利要求 2-28 中任一所述的方法，其特征在于：步骤（A8）和（B7）中，在所述酶切之前还包括环化的步骤；

所述环化借助 153+181 Splint oligo 实现；

所述 153+181splint oligo 为 SEQ ID No.21 所示单链 DNA。

30、根据根据权利要求 2-29 中任一所述的方法，其特征在于：步骤（A8）和（B7）中，进行所述酶切时采用的是 EXO I 酶和 EXO III 酶。

31、根据根据权利要求 2-30 中任一所述的方法，其特征在于：步骤（A8）和（B7）中，进行所述酶切后还包括对酶切产物进行磁珠纯化的步骤。

32、根据根据权利要求 31 所述的方法，其特征在于：步骤（A8）和（B7）中，对酶切产物进行纯化时采用的所述磁珠为 PEG32 beads。

33、根据根据权利要求 2-32 中任一所述的方法，其特征在于：步骤（A9）和（B8）中，所述测序为高通量测序。

34、根据根据权利要求 33 所述的方法，其特征在于：所述高通量测序为双端测序，测序方式为 PE50+26+10。

35、构建用于多维度解析细胞表观基因组学的 DNA 文库的方法，包括权利要求 2-33 中任一所述方法 A 的步骤（A1）-（A8）或权利要求 2-34 中任一所述方法 B 的步骤（B1）-（B7）。

36、试剂盒，含有 ChiTag 转座酶、Tn5 转座酶，以及 CUT&Tag 技术和/或 ATAC-seq 技术的其他相关试剂；所述试剂盒用于：

（B1）多维度解析细胞表观基因组学；或者

（B2）构建用于多维度解析细胞表观基因组学的 DNA 文库。

37、根据权利要求 36 所述的试剂盒，其特征在于：所述 CUT&Tag 技术和/或 ATAC-seq 技术的其他相关试剂选自如下中的全部或部分：权利要求 2-34 任一中所述的添加有 1.5-2.5mM EDTA 的 NP40-地高辛洗涤缓冲液；权利要求 2-34 任一中所述的 NP40-地高辛洗涤缓冲液；权利要求 2-34 任一中所述的基础洗涤缓冲液；权利要求 2-34 任一中所述的特定蛋白对应抗体；权利要求 2-34 任一中所述的二抗；权利要求 2-34 任一中所述的 chitag 酶孵育缓冲液；权利要求 2-34 任一中所述的 chitag 酶打断缓冲液；权利要求 2-34 任一中所述的 PrimerA；权利要求 2-34 任一中所述的 ATAC-Tn5-PrimerB；权利要求 2-34 任一中所述的 ATAC-Tn5-PrimerC；权利要求 2-34 任一中所述的 ChIP-Tn5-PrimerB；权利要求 2-34 任一中所述的 ChIP-Tn5-PrimerC；权利要求 2-34 任一中所述的 Tn-Primer；权利要求 2-34 任一中所述的 183+C Primer；权利要求 2-34 任一中所述的 183-pho Primer；AgencourtAMPure XP 磁珠；权利要求 2-34 任一中所述的 Bulk-N5 Primer；权利要求 2-34 任一中所述的 183+C-pho Primer；权利要求 2-34 任一中所述的 153+181 Splint oligo；EXO I 酶；EXO III 酶；PEG32 beads。

38、根据权利要求 36 或 37 所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒中还含有记载有权利要求 1-33 中任一所述方法的可读性载体。

39、系统，由权利要求 34-38 中任一所述的试剂盒，以及 CUT&Tag 技术和/或 ATAC-seq 技术相关仪器设备组成；所述系统用于：

（B1）多维度解析细胞表观基因组学；或者

（B2）构建用于多维度解析细胞表观基因组学的 DNA 文库。

40、根据权利要求 39 所述的系统，其特征在于：所述 CUT&Tag 技术和/或 ATAC-seq 技术相关仪器设备选自如下中的全部或部分：高通量测序仪；PCR 仪；

摇床、DNBelab C4 便携式单细胞系统、离心机、摇床、显微镜、细胞计数板。

41、权利要求 34-38 中任一所述试剂盒或权利要求 39 或 40 所述系统在如下任一中的应用：

（B1）多维度解析细胞表观基因组学；

（B2）构建用于多维度解析细胞表观基因组学的 DNA 文库。

42、权利要求 1-35 中任一所述方法或权利要求 36-38 中任一所述试剂盒或权利要求 39 或 40 所述系统在如下任一中的应用：

（C1）研究与发育和/或疾病相关的细胞群体异质性；

（C2）绘制细胞图谱；

（C3）解析不同临床表征的肿瘤细胞；

（C4）临床上研究肿瘤细胞演化和/或转移。

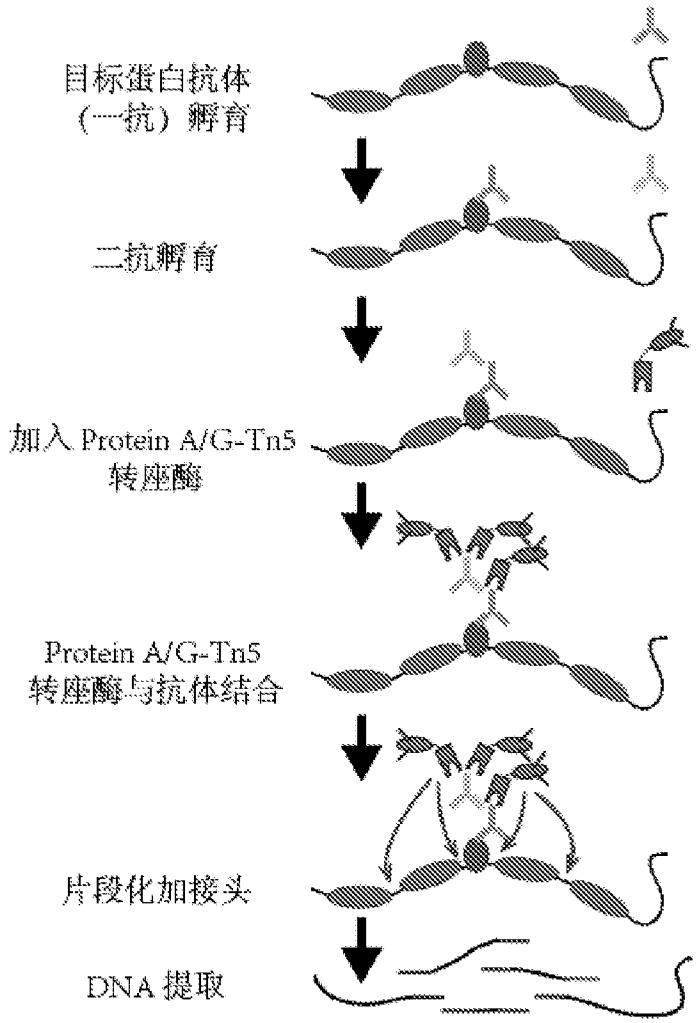

目标蛋白抗体
（一抗）孵育
二抗孵育
加入 Protein A/G-Tn5
转座酶
Protein A/G-Tn5
转座酶与抗体结合
片段化加接头
DNA 提取

图 1

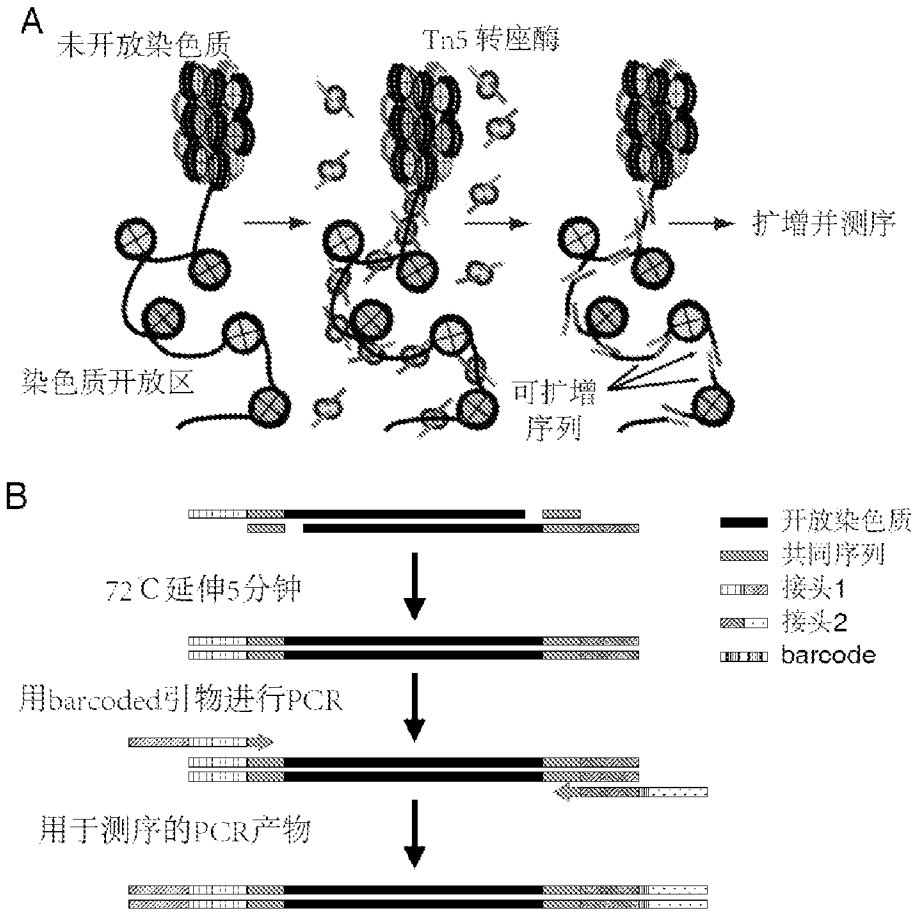

A
未开放染色质
Tn5 转座酶
扩增并测序
染色质开放区
可扩增
序列
B
开放染色质
共同序列
接头1
接头2
barcode
72 C 延伸5分钟
用barcoded引物进行PCR
用于测序的PCR产物

图 2

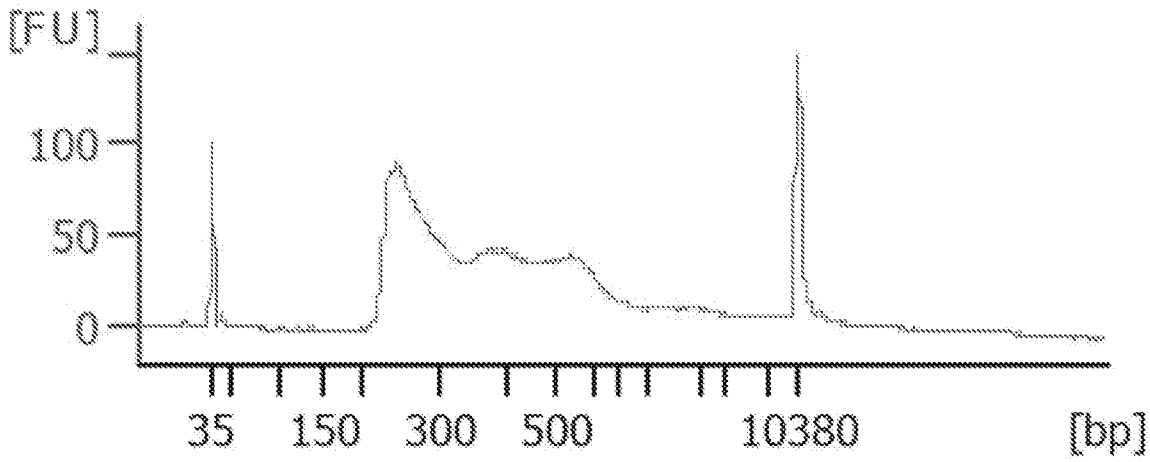

[FU]
100
50
0
35
150
300
500
10380
[bp]

图 3

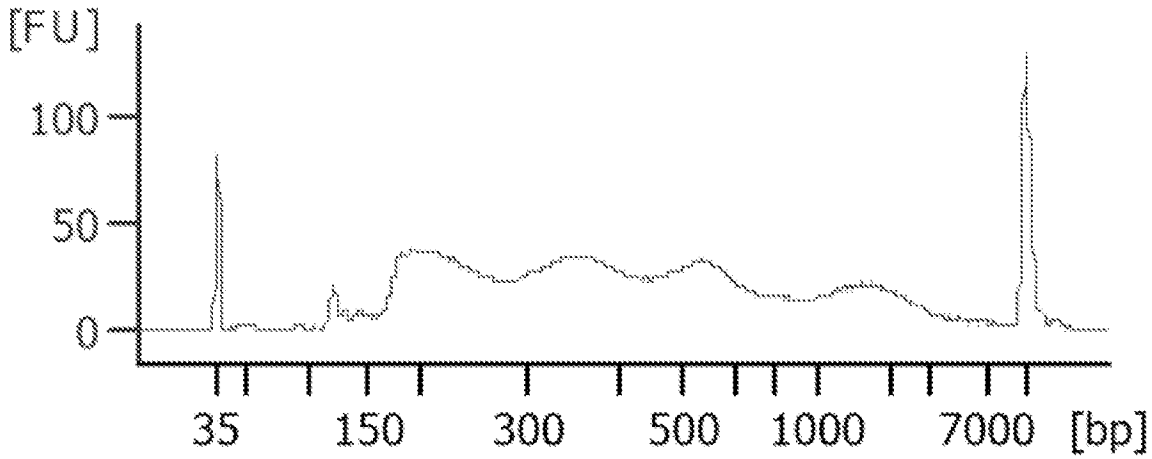

[FU]
100
50
0
35
150
300
500
1000
7000
[bp]

图 4

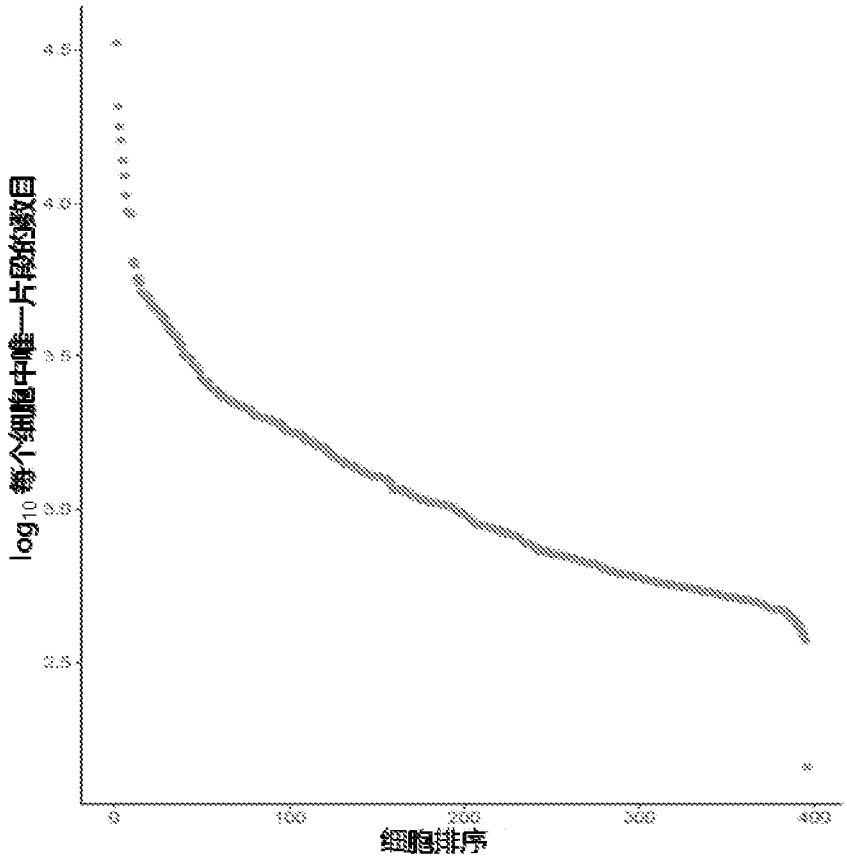

log10 每个细胞中唯一片段的数目
细胞排序

图 5

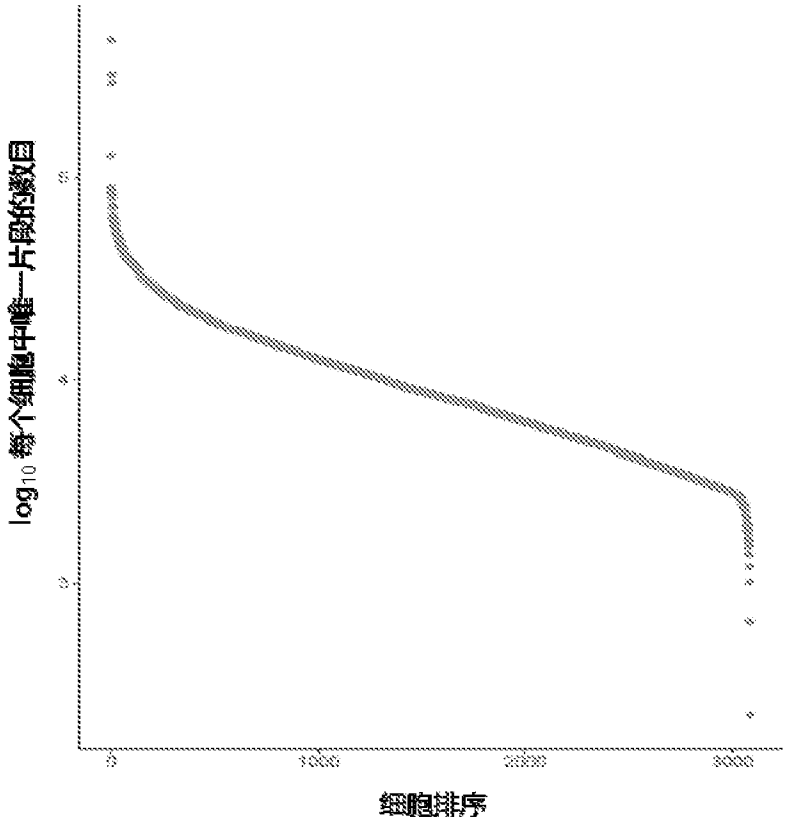

log10 每个细胞中唯一片段的数目
细胞排序

图 6

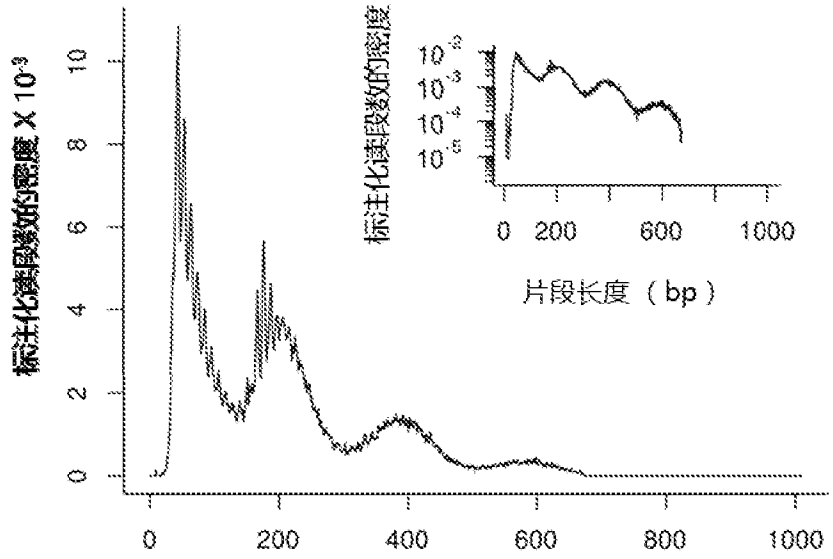

标注化读段数的密度 X 10-3
0
2
4
6
8
10
0
200
400
600
800
1000
标注化读段数的密度
片段长度（bp）

图 7

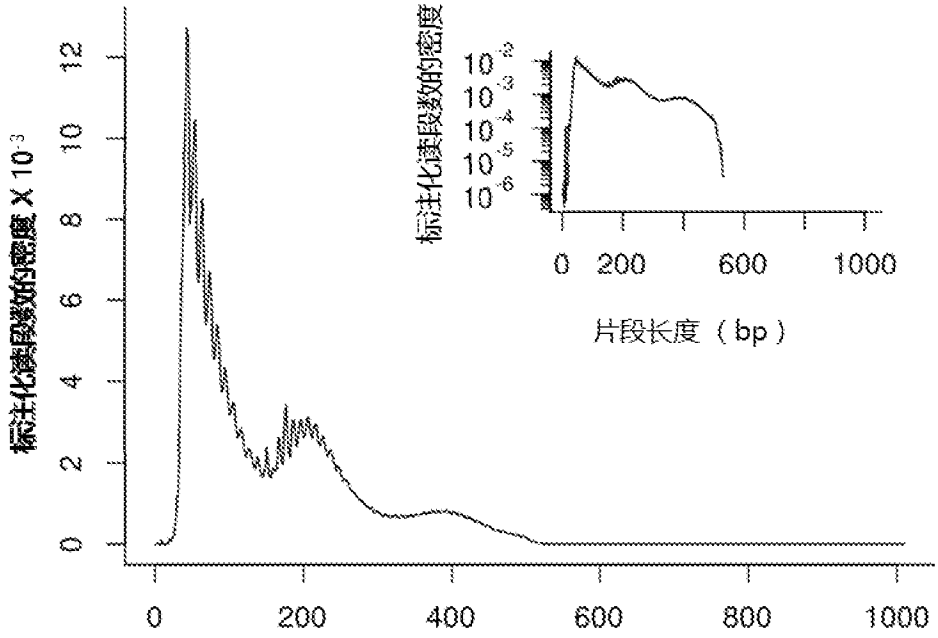

标注化读段数的密度 X 10⁻³
0
2
4
6
8
10
12
0
200
400
600
800
1000
标注化读段数的密度
片段长度（bp）

图 8

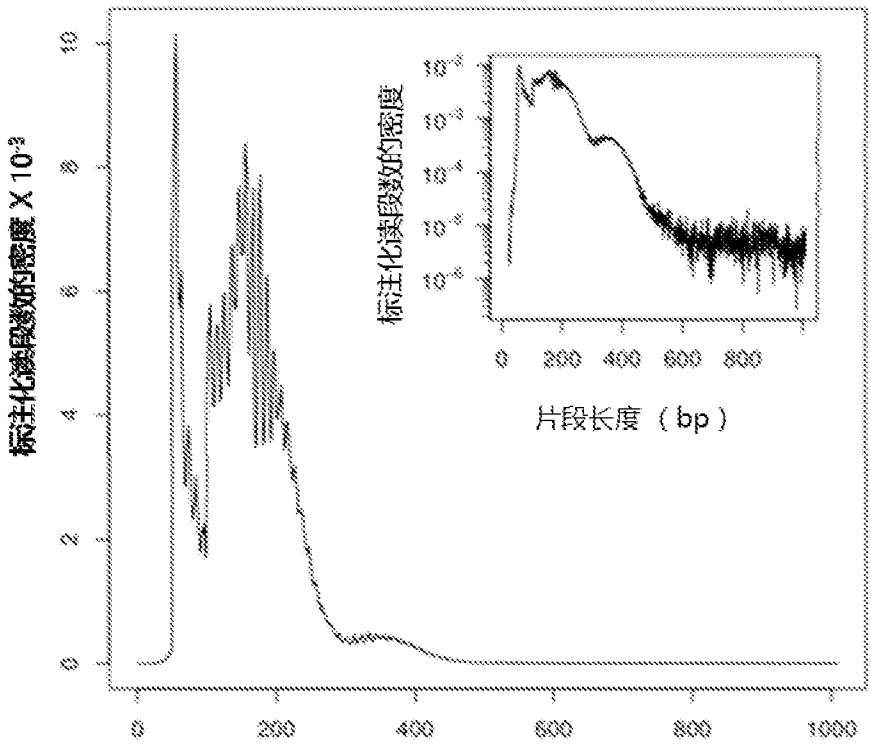

标注化读段数的密度 X 10⁻³
0
2
4
6
8
10
0
200
400
600
800
1000
标注化读段数的密度
片段长度（bp）

图 9

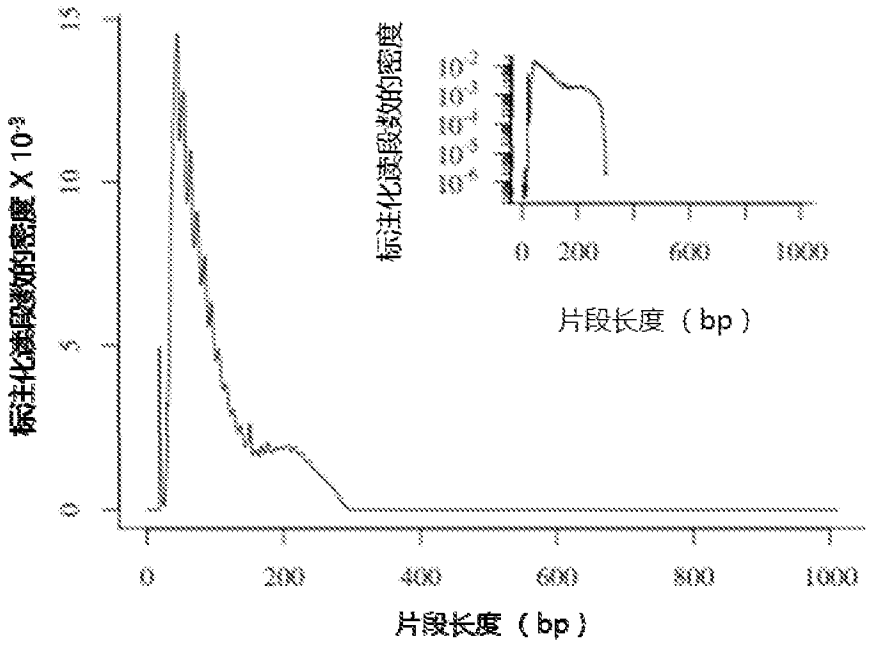

标注化读段数的密度 X 10⁻³
15
10
5
0
0
200
400
600
800
1000
片段长度（bp）
标注化读段数的密度
片段长度（bp）

图 10

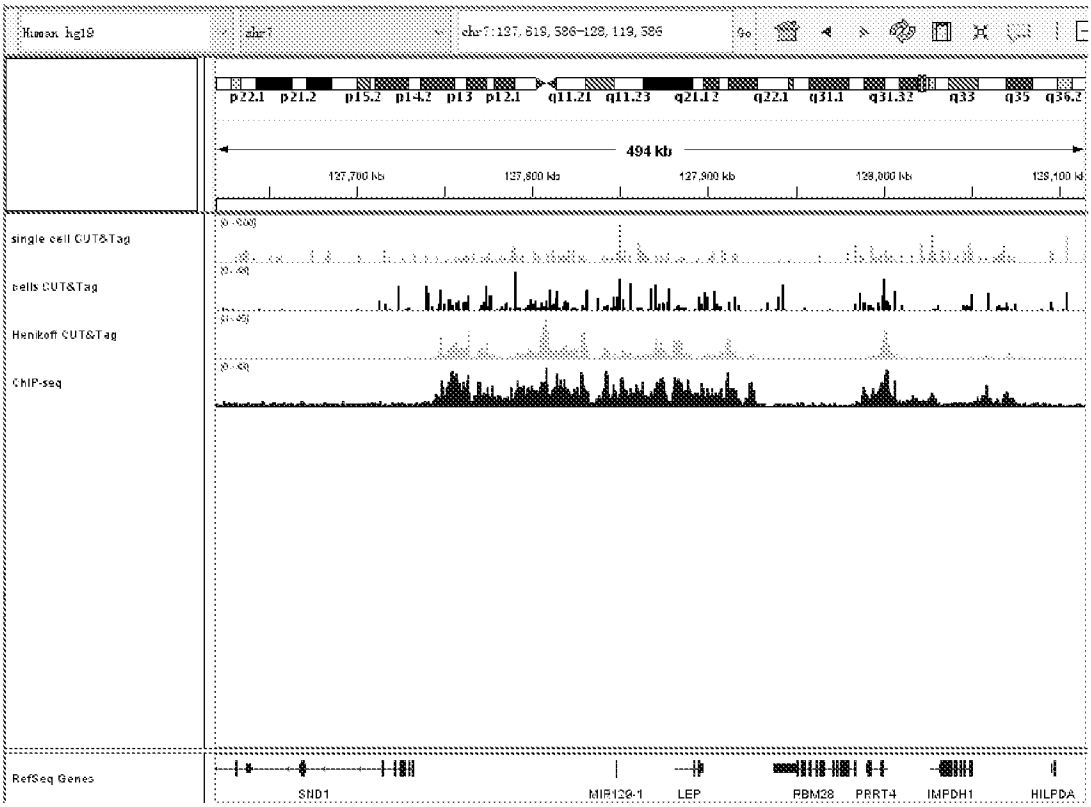

Human hg19
chr7:127,619,586-128,119,586
494 kb
single cell CUT&Tag
bells CUT&Tag
Henikoff CUT&Tag
ChIP-seq
RefSeq Genes
SND1
MIR129-1
LEP
PBM28
PRRT4
IMPDH1
HILPDA

图 11

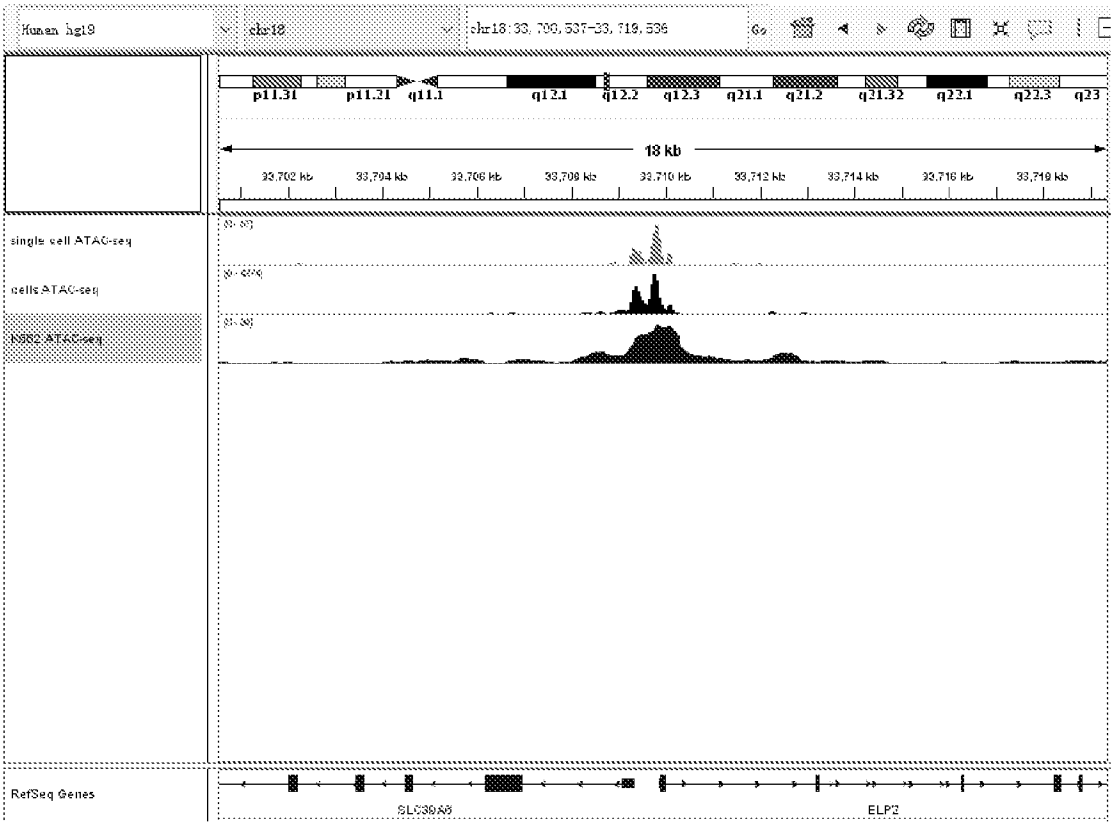

Human hg19
chr18
chr18:33,700,537-33,719,536
p11.31
p11.21
q11.1
q12.1
q12.2
q12.3
q21.1
q21.2
q21.32
q22.1
q22.3
q23
18 kb
33,702 kb
33,704 kb
33,706 kb
33,708 kb
33,710 kb
33,712 kb
33,714 kb
33,716 kb
33,718 kb
single cell ATAC-seq
cells ATAC-seq
NSC ATAC-seq
RefSeq Genes
SLC39A6
ELP2

图 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/115499

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6806(2018.01)i; C12Q 1/6869(2018.01)i; C40B 50/06(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q; C40B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

VEN; CNABS; NCBI; ISI web of science; CNKI; 万方数据库; NCBI; STN: inventor, ATAC-seq, ATAC, ChIP-seq, protein A, Tn5, ChiTag, 转座酶, 测序, 文库, 表观遗传, 表观基因组, epigenomic, CUT&Tag, sequence search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 111154835 A (GUANGZHOU GENE DENOVO BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 15 May 2020 (2020-05-15) entire document	1-41
A	WO 2019184044 A1 (SHANGHAI SINOBIO BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 03 October 2019 (2019-10-03) entire document	1-41
A	KAYA-OKUR, H.S. et al. "CUT&Tag for efficient epigenomic profiling of small samples and single cells" *Nature Communications,* Vol. 10, 29 April 2019 (2019-04-29), article no. 1930, abstract, page 2 left-hand column, pages 8-9, figure 1	1-41
A	BUENROSTRO, J.D. et al. "ATAC-seq: a method for assaying chromatin accessibility genome-wide" *Curr. Protoc. Mol. Biol.,* Vol. 109, 31 January 2015 (2015-01-31), abstract, pages 21.29.1-21.29.6, figure 21.29.1	1-41
A	KAYA-OKUR, H.S. et al. "Efficient low-cost chromatin profiling with CUT&Tag" *Nature Protocols,* Vol. 15, 10 September 2020 (2020-09-10), pp. 3264-3283	1-41

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
02 June 2021	**16 June 2021**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088** **China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/115499

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LHOUMAUD, P. et al. "EpiMethylTag: simultaneous detection of ATAC-seq or ChIP-seq signals with DNA methylation" *Genome Biology,* Vol. 20, 21 November 2019 (2019-11-21), article no. 248, pages 1-12	1-41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/115499

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2020/115499

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 111154835 A	15 May 2020	None	
WO 2019184044 A1	03 October 2019	CN 108219006 A	29 June 2018

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/115499

A. 主题的分类

C12Q 1/6806(2018.01)i; C12Q 1/6869(2018.01)i; C40B 50/06(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12Q; C40B

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

VEN;CNABS;NCBI;ISI web of science; CNKI;万方数据库; NCBI;STN:发明人，ATAC-seq，ATAC，ChIP-seq，protein A，Tn5，ChiTag，转座酶，测序，文库，表观遗传，表观基因组，epigenomic，CUT&Tag,序列检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 111154835 A (广州基迪奥生物科技有限公司) 2020年 5月 15日 (2020-05-15) 全文	1-41
A	WO 2019184044 A1 (上海欣百诺生物科技有限公司) 2019年 10月 3日 (2019-10-03) 全文	1-41
A	KAYA-OKUR, H.S.等. "CUT&Tag for efficient epigenomic profiling of small samples and single cells" Nature Communications, 第10卷，2019年 4月 29日 (2019-04-29), 文章1930的摘要、第2页左栏、第8-9页、图1	1-41
A	BUENROSTRO, J.D.等. "ATAC-seq: a method for assaying chromatin accessibility genome-wide" Curr. Protoc. Mol. Biol., 第109卷，2015年 1月 31日 (2015-01-31), 摘要、第21.29.1-21.29.6页、图21.29.1	1-41
A	KAYA-OKUR, H.S.等. "Efficient low-cost chromatin profiling with CUT&Tag" Nature Protocols, 第15卷，2020年 9月 10日 (2020-09-10), 第3264-3283页	1-41

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2021年 6月 2日	2021年 6月 16日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 罗洋 电话号码 86-(10)-53961959

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/115499

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	LHOUMAUD, P.等. "EpiMethylTag: simultaneous detection of ATAC-seq or ChIP-seq signals with DNA methylation" Genome Biology, 第20卷, 2019年 11月 21日 (2019-11-21), 文章248的第1-12页	1-41

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/115499

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2020/115499

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 111154835 A	2020年 5月 15日	无	
WO 2019184044 A1	2019年 10月 3日	CN 108219006 A	2018年 6月 29日