

ChIP-Seq 文库构建

前言

实验材料

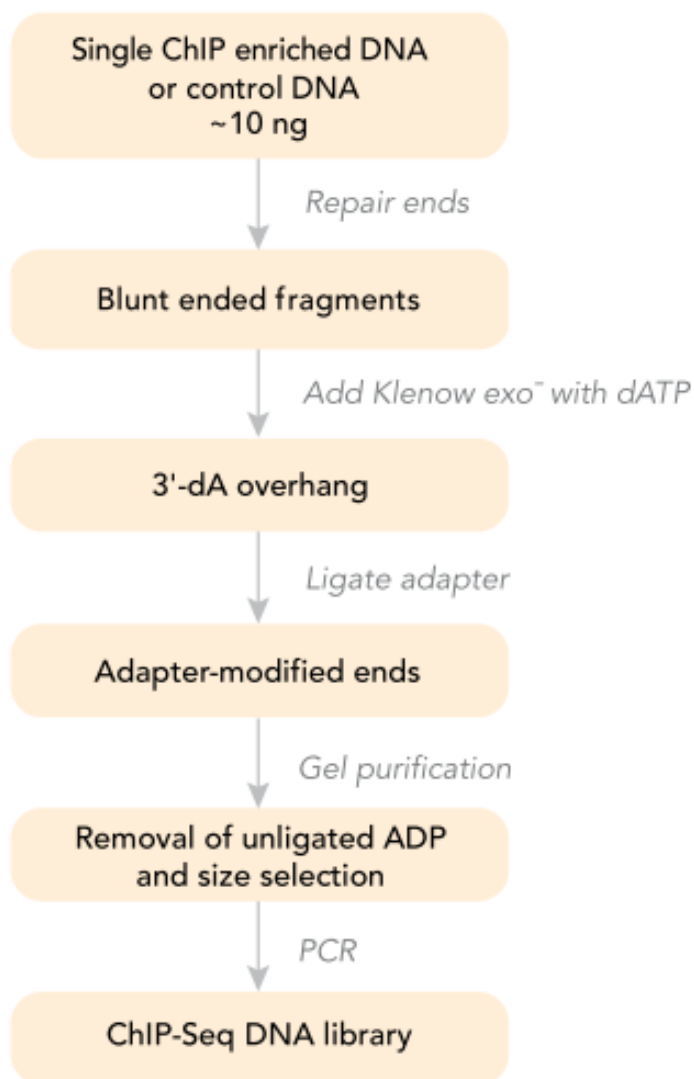
- 一、实验材料
- 二、主要设备仪器

实验方法

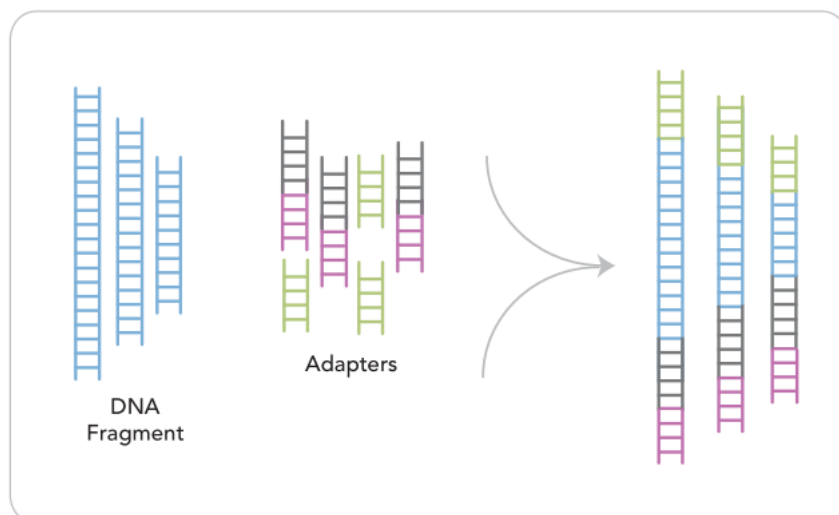
- 一、末端补平与纯化
- 二、3'加 A 和纯化
- 三、加接头
- 四、胶回收
- 五、PCR 富集回收的 DNA
- 六、胶回收

前言

本材料描述了免疫共沉淀下来的DNA如何建立高通量测序文库的方法。总的来说是需要将adaptor序列加到即将要进行测序的DNA片段末端，如下图所示，适用于Illumina高通量测序要求。



Sample Preparation Workflow



实验材料

一、实验材料

1. DNA Repair Kit (NEB)
2. PCR Purification Kit (Qiagen)
3. 10X NEBuffer 2 (NEB)
4. 10 mM dNTP or dATP
5. Klenow DNA Polymerase (3' to 5' exo minus) (NEB)
6. Adaptor
7. Gel extraction Kit (Qiagen)
8. T4 DNA Ligase Buffer with 10 mM ATP (NEB)
9. T4 DNA Ligase (NEB)
10. 5x Phusion* buffer
11. Phusion* Polymerase
12. PCR primer and barcode
13. Ultra Pure Water
14. Ultra Pure Agarose
15. TAE buffer

二、主要仪器设备

台式离心机 (Thermo scientific); 电泳仪以及附件;

涡旋混合器 vortex (其林贝尔); -80°C冰箱 (Thermo scientific); 20°C冰箱 (海尔公司); 4°C冷库 (上海冰泉制冷);

电子天平-JA5002(METTLER TOLEDO); PCR 仪;

移液器; 紫外投射仪; 水浴锅; 金属加热器;

实验方法

1. 末端补平与纯化

这一步是用 T4 DNA 聚合酶和 Klenow DNA 聚合酶将 DNA 的末端补平。这些酶的 3' → 5'核酸外切酶的活性能够将 3'的突出末端移去, 聚合酶的活性能够补平 5'突出端。

1.1 补平:

DNA	42.5 ul
10X Buffer	5 ul
Repair Mix	2.5 ul

轻轻混匀, 瞬时离心。20°C 30min

1.2 纯化:

QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, part # 28104)

- (1) 加入 5 倍体积 (250ul) bufferPB, 轻弹充分混匀, 瞬离, 转至柱子中, 13000rpm 离心 1min, 2 次转柱。去除洗脱液体, 可倒置于纸上。加入 750ul bufferPE (注意已加乙醇), 13000rpm 离心 1min, 同上去除液体, 再加入 500ul bufferPE, 再次洗涤一次。去除液体, 盖上盖子, 空转 2min, 打开盖子, 静置、晾干。
- (2) 先加 30ul EB (膜中央, 但不能戳破膜, 管壁上有液体, 要吸到中央), 静置 1-2min, 13000rpm 离心 1min, 再加入 12ul EB, 同上静置离心。

1.3 3'加 A 和纯化

这一步是利用 Klenow exo-(3' → 5' exo-)的聚合酶活性在磷酸化的平端 DNA 的 3'端加 A，得到的 DNA 可以和 3'端带有单个 T 碱基的接头进行连接。

1.4 3'加 A:

- (1) 准备：事先取出 buffer 等，用手捂使其融化，轻弹，瞬离。
- (2) 10×NEB buffer2 (5ul)
- (3) 10mM dATP (1.5ul)
- (4) Klenow exo- (3ul)
- (5) 样品 (40ul 左右)
- (6) 合计共 50ul 体系（封好管子），37°C水浴 30min。

1.5 纯化:

MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN, part # 28004)

- (1) 加入 5 倍体积（250ul）bufferPB，轻弹充分混匀、瞬离，转至柱子中，13000rpm 离心 1min。去除洗脱液体，可倒置于纸上。加入 750ul buffer PE（注意已加乙醇），13000rpm 离心 1min，同上去除液体，再加入 500ul buffer PE，再次洗涤一次。去除液体，盖上盖子，空转 2min，打开盖子，静置，晾干。
- (2) 10ul EB（65°C）洗脱，静置 1-2min，13000rpm 离心 1min，保存于一个新的离心管中，做好标记。

2. 加接头

连 Adaptor, 20ul 体系:

Adaptor	1ul
Ligase Buffer	2ul
DNA	16 ul
Ligase	1ul
ATP	0.2ul

3. 胶回收

1) 配胶

专用锥形瓶和百洁布，电泳槽和梳子清洗干净（每次用之前用去离子水洗 2 遍，用超纯水洗 1 遍），80-90ml 的 TAE 缓冲液配制 2% 的 agarose(溶解要充分，对着光摇晃没有亮点)，充分混匀、倒板。

2) 样品中加入 6ul 10×loading buffer，准备 50bp,100bp,D2000 marker，中间加样品，注意隔开一个孔加样，防止交叉污染。

电泳条件：150V，40min

3) 放在加有 EB 的 TAE 缓冲液中浸泡 10min 左右，然后割胶准备：专用的一次性刀片，保鲜膜，15ml 进口的离心管。先用将凝胶成像仪的载物台用纸擦拭干净，铺上保鲜膜。尽量减少凝胶暴露在紫外下的时间，记录凝胶在切割前后的照片。

4) 先称取 15ml 离心管的重量，记录；切胶的范围选取 200-900bp 的片段，此步可长些。

割胶后放入离心管中，称量、记录。

5) 胶回收：QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, part # 28704)

(1) 100mg=100ul 体积，加入 3 倍体积的 buffer QG，42°C 10min,每隔 2~3min 混匀，务必保证胶完全溶解（胶块完全溶解时，溶液为黄色），瞬离。加入凝胶样品 1 倍体积的异丙醇，瞬离，每次取 750ul 至 Elute 柱，13000rpm 离心 1min。

(2) 加入 500ul Buffer QG，离心 1min。加入 750ul Buffer PE，离心 1min;再一次加入 500ul buffer PE 洗涤，空转 1 次 2-3min。

(3) 30ul EB(预先放置 65°C 预热)洗脱，静置 1-2min，13000rpm 离心 1min。

4. PCR 富集回收的 DNA

这一步是通过 PCR 扩增上步纯化的 DNA，PCR 所用的两个引物可以和接头两端退火。

200ul PCR 管：

PCR Primer PE1.0 (1ul)

PCR Primer Barcode (1ul)

10mM dNTP Mix (1.5ul)

5X Phusion Buffer (10ul)

Phusion DNA Polymerase (0.8ul)

DNA 样品 (10ul)

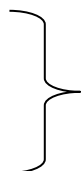
dd H₂O 补齐 50ul 反应体系

98°C 30s

98°C 10s

65°C 30s

72°C 30s



16 cycles

72°C 5min

大约 1h

5. 胶回收

MinElute Gel Extraction Kit

(1) 100mg=100ul 体积, 加入 3 倍体积 BufferQG, 42°C 10min, 每隔 2-3min 混匀, 直至完全溶解, 瞬离。加入 1 倍胶体积的异丙醇, 瞬离, 每次取 750ul 至 Elute 柱, 13000rpm 离心 1min。

(2) 加入 500ul Buffer QG, 离心 1min。加入 750ul Buffer PE, 离心 1min。再一次加入 500ul buffer PE 洗涤, 空转 1 次 2-3min。

(3) 10ul EB(预先放置 65°C 预热)洗脱, 静置 1-2min, 13000rpm 离心 1min, 10ul EB 再洗脱一次。