
GenSeq® Hi-C Kit

GS-EG-003

Instruction Manual Version 1.01

试剂盒组分 (6 次反应)	体积/数量	保存条件
Box 1		
Buffer A	1.5 mL	-20°C
Buffer B	700 µL	-20°C
Buffer C	70 µL	-20°C
Buffer D	250 µL	-20°C
Buffer E	3 mL	-20°C
Buffer F	117 µL	-20°C
Buffer G	130 µL	-20°C
Mix A	52 µL	-20°C
Mix B	270 µL	-20°C
Mix C	320µL	-20°C
Enzyme 1	13 µL	-20°C
Enzyme 2	13 µL	-20°C
Enzyme 3	33 µL	-20°C
Enzyme 4	70 µL	-20°C
Enzyme 5	7 µL	-20°C
Enzyme 6	13 µL	-20°C
Enzyme 7	13 µL	-20°C
Adaptor	20 µL	-20°C
PCR Mix	170 µL	-20°C
Primer Mix 1	6 µL	-20°C
Primer Mix 2	6 µL	-20°C
Primer Mix 3	6 µL	-20°C
Primer Mix 4	6 µL	-20°C

Primer Mix 5	6 μ L	-20°C
Primer Mix 6	6 μ L	-20°C
Box 2		
DNA Purification Columns	12 Preps	Room Temperature
DNA Binding Buffer	1.5 mL	Room Temperature
Buffer PE	10 mL	Room Temperature
Buffer EB	1.5 mL	4°C
Wash Buffer 1	700 μ L	4°C
Wash Buffer 2	700 μ L	4°C
Resuspension Buffer	2.5 mL	4°C
Streptavidin Beads	65 μ L	4°C
DNA Purification Beads	300 μ L	4°C

自备材料

.....

- ✓ 磁力架(适配 1.5mL 管)
- ✓ 移液枪及吸头(无核酸酶)
- ✓ 无核酸酶离心管 (1.5mL)
- ✓ PCR 仪
- ✓ 桌面微离心机
- ✓ 涡旋振荡器
- ✓ 无核酸酶水
- ✓ PBS 溶液
- ✓ 37% 甲醛
- ✓ 1.25 M Glycine
- ✓ 3M 醋酸钠 (pH5.2)
- ✓ 异丙醇
- ✓ 80%乙醇 (用无核酸酶水和无水乙醇新鲜配置)
- ✓ DNA 质控: Agilent 公司 2100 Bioanalyzer 等生物分子分析仪与耗材试剂进行 DNA 大小分析; Life 公司 Qubit 核酸定量仪器与试剂进行 DNA 浓度测定

实验方案： 使用培养的细胞进行染色质交联

.....

本实验方案的内容为培养细胞的染色质交联，是 Hi-C 实验前的准备工作。

实验开始前的注意事项

- (1) 甲醛溶液避光保存，其中不可有可见白色沉淀物。
- (2) 使用甲醛时，一定要在化学通风柜中操作。
- (3) 不要使用被细菌或真菌污染的细胞。
- (4) 实验进行前，将细胞培养基置于室温下，以保证交联条件的可复现性。
- (5) 如果交联后不立即进行 Hi-C 实验，需在 -80°C 冰箱储存，且储存时间勿超 6 个月。
- (6) 如果在交联后立即进行 Hi-C 实验，一定要在开始操作过程之前回顾本实验方案以及《实验方案：使用交联的细胞制备 Hi-C 文库 (Hi-C 第 1 部分)》章节。

实验开始前的准备工作

- (1) 将完整的细胞培养基(即含血清的培养基)放入室温($15-25^{\circ}\text{C}$)环境。
- (2) 在实验开始前至少 30 分钟，将 50 ml PBS 置于冰上。
- (3) 准备 1.5 ml 规格的微量离心管。
- (4) 如果实验样品在交联后需在 -80°C 储存，应准备液氮来快速冷冻样品。

实验步骤

- 1) 在适当的培养基中培养细胞达到所需的密度。

注：对于长度为 $10\ \mu\text{m}$ 的细胞，在 25 或 75 平方厘米的培养瓶中生长至汇合，一般足以提供用于多次 Hi-C 实验的细胞(3×10^6 至 1×10^7 个细胞)。然而，因为动物细胞的长度可以从 10 到 $100\ \mu\text{m}$ 不等，实际的细胞数量会有所不同。

- 2) 如果使用悬浮细胞系，则直接进入步骤 4。
- 3) 如果使用粘附细胞系，根据标准程序使用胰蛋白酶温和处理细胞，然后进行步骤 4。
- 4) 将细胞转移到圆锥形离心管中，并在常温下以 $450 \times g$ 离心 10 分钟。
- 5) 吸弃上清液，再将细胞轻轻重悬于 10 ml 新鲜培养液中。
- 6) 加入 270 μL 37% 甲醛(使得最终甲醛浓度为 1%)，通过倒置 5 次彻底混合。

重要提示：甲醛应在化学通风柜内使用，佩戴防护手套和眼镜，遵守废物处理指南。

- 7) 在常温下孵育 10 分钟。
- 8) 加入 1 mL 1.25 M Glycine 溶液。

- 9) 倒置 5 次，彻底混匀。
- 10) 在常温下孵育 5 分钟。
- 11) 4°C，800 x g 条件下，离心细胞 10 分钟。
- 12) 用 10 mL 冰上预冷过的 PBS 溶液重悬细胞。
- 13) 使用血细胞计数器或自动化细胞计数仪来测定细胞密度。
- 14) 4°C，800 x g 条件下，离心 5 分钟，随后吸出上清液。
- 15) 将细胞重悬于冰上预冷过的 PBS 中，调整至所需浓度。
- 16) 吸取 5×10^5 个细胞放入 1.5 ml 离心管中，每个离心管代表一个 Hi-C 样本。
注：每管样品的细胞数可以在 1×10^5 到 1×10^6 个细胞之间。
- 17) 4°C，800 x g 条件下，离心 5 分钟，随后吸出 上清液。
- 18) 立即按照下面的“Hi-C 第 1 部分”的实验方案进行下一步实验。如不立即进行 Hi-C 实验，需将冷冻管插入液氮中速冻后转移至 -80 °C 冰箱贮存，贮存时间不超过 6 个月。

实验方案：使用交联的细胞制备 Hi-C 文库（Hi-C 第 1 部分）

.....

本实验方案的内容为 Hi-C 实验的前半部分，起始于已经用甲醛固定的细胞样本（详见《实验方案：使用培养的细胞进行染色质交联》一节）。每个 Hi-C 试剂盒包含足以处理 6 个样品的试剂。

实验开始前的注意事项

- (1) 使用血细胞计数仪或自动细胞计数仪进行细胞计数，以确保各个重复组中的细胞数目得到正确分配。
- (2) 酶和解冻的反应缓冲液需要一直放在冰上。
- (3) 在整个方案中使用标准的 1.5 或 2 mL 离心管。
- (4) 除非另有说明，离心是在室温下进行的。
- (5) 小心地进行细胞裂解、Hi-C 消化、Hi-C 末端标记和 Hi-C 连接等一系列操作，否则将会增加随机的、与生物现象无关的染色体间相互作用的频率。必须注意轻柔地移取样品，并在各个孵育步骤中避免摇晃。

实验开始前的准备工作

- (1) 将 PBS、无核酸酶水在冰上冷却 30 分钟。
- (2) 在冰上解冻各试剂。
- (3) Buffer C 置于室温解冻至沉淀完全溶解。

1. 细胞裂解

- 1) 在一个离心管中，小心地将 5×10^5 个交联的人或小鼠细胞（或相当于 $5 \mu\text{g}$ DNA）重悬于 $200 \mu\text{L}$ 冰上预冷的 Buffer A 中，用移液枪轻轻地吹打。

注：(1)细胞数量只需在 5×10^4 到 5×10^5 范围之内（或相当于 $0.5-5 \mu\text{g}$ DNA）。

(2)为获得足够的细胞起始量，可以将多管交联的细胞汇集起来一次性处理。首先，在一个离心管中使用 $50 \mu\text{L}$ 冰 PBS 将交联细胞重悬浮，并用移液枪将重悬后的混合物全部转移到下一个含有交联细胞的离心管中。重复以上步骤，直到有足够所需数量的细胞被重悬于 PBS 中为止。

- 2) 在冰上孵育 10 分钟。
- 3) 在 4°C , $2500 \times g$ 离心 5 分钟。
- 4) 小心地吸出上清液，留下离心管底部松散的细胞核沉淀。
- 5) 将细胞核小心地重悬于 $100 \mu\text{L}$ 冰上预冷的 Buffer B 中，并用移液枪轻柔地上下吹打 3-4 次进行混合。
- 6) 在 4°C , $2500 \times g$ 离心 5 分钟。

- 7) 小心地吸出上清液，留下离心管底部松散的细胞核沉淀。
- 8) 立即进入下面的 "Hi-C 消化"步骤。

2. Hi-C 消化

- 9) 加入 10 μ L Buffer C, 并用移液枪轻柔地上下吹打 3-4 次进行混合, 并将细胞核悬液转移至 250 μ L PCR 管。
- 10) 在 65°C 下孵育 10 分钟。
重要提示: 孵育过程中切勿摇晃。
- 11) 孵育后立即将离心管放在冰上。
- 12) 加入 38 μ L Buffer D, 并用移液枪轻柔地上下吹打 3-4 次进行混合, 在 37°C 下孵育 15 分钟。
- 13) 加入 2 μ L Enzyme 1, 并用移液枪轻柔地上下吹打 3-4 次进行混合。
- 14) 将离心管置于温度为 37°C 的热涡旋混合器中, 以 600 rpm 的速度振荡过夜, 以消化染色质。
- 15) 在 65°C 下孵育 20 分钟。
重要提示: 孵育过程中切勿摇晃。
- 16) 将离心管放在冰上, 立即进入下面的 "Hi-C 末端标记"步骤。

3. Hi-C 末端标记

- 17) 将离心管置于冰上, 加入 8 μ L Mix A 和 2 μ L Enzyme 2 到含有消化染色质的离心管中。
- 18) 用移液枪轻柔地上下吹打 3-4 次进行混合。
- 19) 在 37°C 下孵育 1 小时, 使带有生物素的核苷酸为染色质添上标记。
- 20) 将离心管放在冰上, 立即进入下面的 "Hi-C 连接"步骤。

4. Hi-C 连接

- 21) 将所有已完成末端标记的染色质转移至 1.5 mL 离心管中, 加入 425 μ L of Buffer E 和 5 μ L of Enzyme 3。轻轻颠倒 5 次进行混合。
- 22) 将离心管在 16°C 的热涡旋混合器中, 以 600 rpm 的速度振荡孵育 4 小时, 连接在空间上接近的 DNA 片段。
重要提示: 连接温度不建议高于 16°C。
- 23) 将离心管放在冰上, 立即进入下面的 "染色质脱交联"步骤。
注: 此处可暂停实验, 将离心管暂时保存在 -20°C 冰箱中。

5. 染色质脱交联

- 24) 将 50 μL Mix C 及 10 μL Enzyme 4 加入已连接的染色质中。轻轻颠倒 5 次进行混合。
- 25) 在 56°C 的热涡旋混合器中，以 600 rpm 的速度振荡孵育 30 分钟，然后在 68°C 下振荡孵育 4 小时。
- 26) 低速短暂离心离心管，收集盖子上的冷凝物。将反应混合物冷却至室温，立即进入下面的"脱交联后的 DNA 纯化"步骤。

注：此处可暂停实验，将离心管暂时保存在 -20°C 冰箱中。

6. 脱交联后的 DNA 纯化

- 27) 在脱交联后的 DNA 中加入 55 μL 3M 醋酸钠。短暂地涡旋震荡以混合。
- 28) 在离心管中加入 385 μL 异丙醇。短暂地涡旋震荡以混合。
- 29) 将 DNA Purification Column（包括其提供的收集管）固定在支架上。
- 30) 将前述混合物的一半（495 μL ）加入 DNA Purification Column 中，然后在 14,900 $\times g$ 下离心 1 分钟，以结合 DNA。
- 31) 弃置过柱的液体，然后将 DNA Purification Column 放回同一收集管中。
- 32) 将剩余的一半混合物（约 495 μL ）加入 DNA Purification Column 中，14,900 $\times g$ 离心 1 分钟。

注意：为了达到最大的回收率，应将所有的样品转移到柱中。

- 33) 弃置过柱的液体，然后将 DNA Purification Column 放回同一收集管中。
- 34) 在 DNA Purification Column 中加入 0.75 ml Buffer PE 以洗涤，然后以 14,900 $\times g$ 离心 1 分钟。
- 35) 弃置过柱的液体，然后将 DNA Purification Column 放回同一收集管中。
- 36) 将 DNA Purification Column 以 14,900 $\times g$ 离心 1 分钟。
- 37) 将 DNA Purification Column 放入一个新的 1.5 ml 离心管中。
- 38) 在 DNA Purification Column 的膜中心加入 64 μL 预热到 65°C 的 Buffer EB 以洗脱 DNA。
- 39) 在室温下孵育 1 分钟。
- 40) 以 14,900 $\times g$ 离心 1 分钟。
- 41) 将纯化的 DNA 储存在 -20°C，或继续后续 Hi-C 末端处理。

7. Hi-C 末端处理

- 42) 将 40 μL Mix B 和 1 μL Enzyme 5 加入 60 μL 纯化的 DNA 中。并用移液枪轻柔地上下吹打 3-4 次进行混合。
- 43) 在 20°C 下孵育 1 小时。
- 44) 立即在离心管中加入 210 μL DNA Binding Buffer。短暂地涡旋震荡以混合并短暂离心收集液体。
- 45) 将 DNA Purification Column (包括其提供的收集管) 固定在支架上。
- 46) 将前述混合物加入 DNA Purification Column 中, 然后在 14,900 $\times g$ 下离心 1 分钟, 以结合 DNA。
- 47) 弃置过柱的液体, 然后将 DNA Purification Column 放回同一收集管中。
- 48) 在 DNA Purification Column 中加入 0.75 ml Buffer PE 以洗涤, 然后以 14,900 $\times g$ 离心 1 分钟。
- 49) 弃置过柱的液体, 然后将 DNA Purification Column 放回同一收集管中。
- 50) 将 DNA Purification Column 以 14,900 $\times g$ 离心 1 分钟。
- 51) 将 DNA Purification Column 放入一个新的 1.5 ml 离心管中。
- 52) 在 DNA Purification Column 的膜中心加入 130 μL 预热到 65°C 的 Buffer EB 以洗脱 DNA。
- 53) 在室温下孵育 1 分钟。
- 54) 以 14,900 $\times g$ 离心 1 分钟。
- 55) 将纯化的 DNA 储存在 -20°C, 或继续进入 DNA 片段化

8. DNA 片段化

- 56) 末端处理后纯化得到的 DNA, 使用超声仪进行物理片段化。您需要预先优化方案, 使片段化产物的长度中位数落在 300-500 bp 的范围之内。

注: 表 3 的 Hi-C 片段化方案可供参考。请结合您实验的实际情况, 使片段化产物的长度中位数落在 300-500bp 的范围之内。

变量	详情
超声仪	Covaris® S220
超声试管	microTUBE AFA Fiber Snap-Cap 6x16mm
超声试管支架	S-series Holder microTUBE
体积	130 μl (含 EB 缓冲液)
超声仪参数设置	
Water level	12
Peak incident power	140 W
Duty factor	10%
Cycles per burst	200
时长	80 s

表 3. Hi-C 片段化方案。

57) DNA 片段化后可储存在 -20°C ，或继续进行《实验方案：从 Hi-C 文库到 NGS 测序文库（Hi-C 第 2 部分）》。

注：为了确保 DNA 片段长度适宜，可用 5% 的片段化产物进行毛细管电泳或琼脂糖凝胶电泳。如果片段过大，则需继续片段化至中位数在 300-500bp 范围内为止；如果片段过小，则 NGS 文库的质量可能较差。

实验方案：从 Hi-C 文库到 NGS 测序文库（Hi-C 第 2 部分）

.....

本实验方案的内容为 Hi-C 实验的后半部分，起始于片段化的 DNA（详见《实验方案：使用交联的细胞制备 Hi-C 文库（Hi-C 第 1 部分）》一节）。

1. Hi-C 片段 Pull-down

- 1) 涡旋振荡，以彻底重悬 Streptavidin Beads。
- 2) 将 $10\ \mu\text{L}$ 的 Streptavidin Beads 转移到一个新的离心管中。
- 3) 按照图 1 的步骤，用 $200\ \mu\text{L}$ 的 Resuspension Buffer 清洗磁珠。

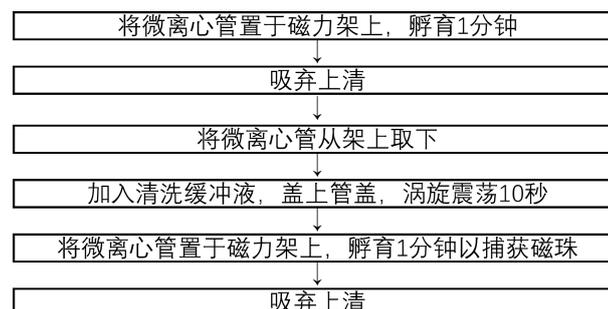


图 1.磁珠清洗的标准流程

- 4) 将 Streptavidin Beads 重悬于 $130\ \mu\text{L}$ Resuspension Buffer 中。
- 5) 将 $130\ \mu\text{L}$ 片段化的 DNA 样品加入磁珠中。
- 6) 在室温下，在设置为 $1000\ \text{rpm}$ 的涡旋混合器中孵育 120 分钟。
- 7) 按照图 1 的步骤，用 $100\ \mu\text{L}$ Wash Buffer 1 清洗磁珠。
- 8) 按照图 1 的步骤，用 $100\ \mu\text{L}$ Wash Buffer 2 清洗磁珠。
- 9) 按照图 1 的步骤，用 $100\ \mu\text{L}$ 无核酸酶水清洗磁珠。
- 10) 立即进入测序文库构建

2. DNA on-beads 测序文库构建

试剂	储存条件	使用说明
Buffer F	-20°C	使用前冰上解冻后涡旋混匀，离心后使用
Enzyme 6	-20°C	使用前短暂离心使用（冰上放置）
Buffer G	-20°C	使用前冰上解冻后涡旋混匀，离心后使用
Adaptor	-20°C	使用前冰上解冻后涡旋混匀，离心后使用
Enzyme 7	-20°C	使用前短暂离心使用（冰上放置）

表 4.试剂与样品准备。

试剂	用量
Buffer F	18 μL
Enzyme 6	2 μL

表 5.DNA 末端修复体系配方。

- 11) 按照表 5 的配方，在无菌 PCR 管中准备反应体系。
- 12) 使用移液枪上下吸打，充分混匀，用于重悬富集了 DNA 的 Streptavidin 磁珠。
- 13) 将离心管放到 PCR 仪上，按照表 6 进行如下的反应程序：

反应温度	时间
105°C 热盖	
20°C	30 分钟
72°C	15 分钟
12°C	保持

表 6.DNA 末端修复反应程序。

注：反应过程中，每隔 5 分钟，涡旋振荡 PCR 管 2 秒重悬 Streptavidin 磁珠。

- 14) 反应结束，立即取出 PCR 管置于冰上，按照表 7 的配方，依次加入各组分，涡旋混匀或使用移液枪上下吸打充分混匀。

试剂	用量
Buffer G	25 μL
Adaptor	3 μL
Enzyme 7	2 μL

表 7.文库接头连接体系配方。

15) 将离心管放到 PCR 仪上, 按照表 8 进行如下的反应程序:

反应温度	时间
20°C	45 分钟
12°C	保持

表 8. 文库接头连接反应程序。

注: 反应过程中, 每隔 5 分钟, 涡旋振荡 PCR 管 2 秒重悬 Streptavidin 磁珠, 可适当延长连接时间增加连接效率。

16) 反应结束, 按照图 1 的步骤, 用 100 μ L 无核酸酶水清洗磁珠,

3. PCR 文库扩增

试剂	储存条件	使用说明
PCR Mix	-20°C	冰上解冻后涡旋混匀, 离心后使用
Primer Mix xxx	-20°C	冰上解冻后涡旋混匀, 离心后使用

表 9. PCR 文库富集样品与试剂准备。

注: 加样过程中需注意更换枪头, 避免不同样品或 Index 引物之间的相互污染, 影响后续测序与结果分析。

17) 配制 PCR 反应液如下:

试剂	使用量
PCR Mix	25 μ L
Primer Mix xxx	5 μ L
ddH ₂ O	20 μ L

表 10. PCR 文库富集反应体系。

18) 向每管清洗好的 Streptavidin Beads 中, 分别加入 50 μ L PCR 反应液, 并用移液器吹打混匀。

注: 盖紧 PCR 反应管盖子, 避免高温反应中样品挥发导致的文库产量下降以及反应体积变化导致后期片段筛选不符合预期。

反应温度	时间	循环数
105°C热盖	----	----
72°C	5 分钟	1
98°C	30 秒	1
98°C	15 秒	8-12
60°C	30 秒	
72°C	75 秒	
72°C	5 分钟	1
4°C	保持	---

表 11. PCR 反应程序。

19) PCR 反应结束后, 将 PCR 管放到合适的磁力架上静置 2-5 分钟。

20) 转移上清到一个新的离心管中, 按下面的“扩增产物纯化”步骤进行纯化。

4. 扩增产物纯化 (0.9 x DNA Purification Bead 纯化)

提前半小时将 DNA Purification Beads 放到室温平衡, 振荡混匀后使用, 具体步骤如下:

21) 向扩增产物中加入 45 μ L DNA Purification Beads, 使用移液枪上下吸打, 充分混匀, 室温静置 5 分钟。

22) 将离心管放到磁力架上, 待溶液澄清后, 移除上清液。

23) 保持离心管在磁力架上, 加入 200 μ L 的 80%的乙醇漂洗磁珠, 孵育 30 s 后移除上清液。

24) 重复步骤 23 一次。

25) 保持离心管在磁力架上, 用 10 μ L 移液枪移除管底残留的乙醇, 并打开离心管盖干燥至管中不再有残留乙醇。

注: 磁珠变成褐色即为无明显乙醇残留, 乙醇残留会影响后续的实验。

26) 取出干燥的离心管, 加入 30 μ L 超纯水, 充分混匀, 室温孵育 2 分钟。

27) 重新将离心管置于磁力架上, 待溶液澄清后, 吸取 27 μ L 上清液转移至新的离心管中。

28) 洗脱下来的 DNA 可以在 -20°C 冰箱长期保存, 用于后续的质控、测序等。

注: 如文库中有引物二聚体残留, 可用 0.9x DNA Purification Beads 重复纯化一次。

Index 引物信息

1. 文库结构

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCG
ATCT-NNNNN-AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC- (i7, 6nt index)-
ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

注: NNNNN 代表待测目标序列

2. i7 index 序列

本试剂盒接头采用 i7 单 index，其具体参考下表：

引物编号	i7 序列
Primer Mix 1	CGTGAT
Primer Mix 2	ACATCG
Primer Mix 3	GCCTAA
Primer Mix 4	TGGTCA
Primer Mix 5	CACTGT
Primer Mix 6	ATTGGC