

In situ Hi-C 3.5 Manual

● 实验技术路线

In situ Hi-C 3.5 是在以前的步骤上进行优化，使得实验过程更为简单，得到的结果更为优良。细胞首先通过甲醛和 DSG 交联进行固定，然后染色体被 DdeI 和 DpnII 内切酶消化形成粘性末端，通过末端补平加入 Biotin 标记的腺嘌呤 (A)，通过 T4 连接酶连接将邻近的 DNA 连接起来，biotin 标记 DNA 被链霉亲和素磁珠富集，通过 Tn5 将 DNA 片段化，同时添加接头序列，在磁珠上完成建库构建。

● 实验准备

实验人员应备齐如下试剂和设备：

37%甲醛

3M NaAc pH5.2

1x PBS

DMSO

ddH₂O

1%SDS

无水乙醇

75%乙醇

酚氯仿

200μl PCR 管磁力架

1.5/2ml 磁力架

PCR 仪

旋转混匀仪

震荡金属浴

● 试剂盒试剂如下：

Box1 试剂, 6rxns	体积	保存条件
甘氨酸 2M	9mL	4°C
Hi-C Lysis buffer	9mL	4°C
10% Triton X-100	1.5mL	4°C
DNA Clean beads	2mL	4°C
Streptavidin 磁珠	145μL	4°C
2x Bind buffer	900μL	4°C
Wash buffer	13mL	4°C
10mM Tris-HCl pH7.5	8mL	4°C

Box2 试剂, 6 rxns	体积	保存条件
DSG	200mg	-20°C
Protease inhibitor	80μL	-20°C
BSA (10mg/mL)	90μL	-20°C
Digestion buffer	10mL	-20°C
Digestion Enzyme Mix	220μL	-20°C
Label Mix	305μL	-20°C
Klenow Fragment	72μL	-20°C
10x T4 DNA ligase buffer	900μL	-20°C
T4 DNA ligase	95μL	-20°C
Proteinase K	400μL	-20°C
2x TD Buffer	80μL	-20°C
Tn5 transposome	40μL	-20°C
2x PCR Mix	180μL	-20°C

● 实验步骤

A. 细胞交联

- 1) 待细胞生长到约 80%的饱和度, 500g 离心 5min, 收集约 5×10^6 细胞;
- 2) 取 10mg DSG 溶于 102.2μL DMSO 中, 配制 0.3M 的 DSG 溶液, 用后即弃, 不可保存;
- 3) 用 10mL 1x PBS 重悬细胞, 加入 278μL 37%的甲醛和 100μL 刚配制的 DSG 溶液, 颠倒混匀, 室温缓慢旋转孵育 10min;
- 4) 加入 685μL 2M 的甘氨酸溶液, 至终浓度 0.125M, 室温旋转孵育 5min, 终止反应;
- 5) 4°C 1000g 离心 10min, 弃上清;
- 6) 用 1mL 预冷的 1x PBS 重悬细胞, 4°C 1000g 离心 10min, 弃上清;
- 7) 液氮速冻, 置于-80°C待用。

B. 裂解及限制酶消化

注意: 实验前取适量的 Hi-C Lysis buffer, 加入 Protease inhibitor

- 1) 往细胞 (5×10^6) 里加入 500μL 冰上预冷的 Hi-C Lysis buffer, 4°C 旋转孵育 30min;
- 2) 4°C 2500g 离心 5min, 弃上清;
- 3) 加入 200μL Hi-C Lysis buffer 洗涤细胞核一次, 4°C 2500g 离心 5min, 弃上清;
- 4) 加入如下试剂:

10x Digestion buffer	20μL
1% SDS	20μL
ddH2O	160μL
Total volume	200μL

- 5) 轻轻吹打均匀, 金属浴 65°C 静止孵育 10min;
- 6) 加入 23μL 10% Triton X-100 以终止反应, 轻轻混和均匀, 避免产生大量气泡;

- 7) 室温 2500g 离心 5min, 弃上清;
- 8) 加入如下试剂, 轻柔吹打均匀, 金属浴 900rpm 37°C 消化过夜。

10x Digestion buffer	20μL
Digestion Enzyme Mix	15μL
ddH ₂ O	165μL
Total volume	200μL

C. DNA 末端标记、片段连接和解交联

- 1) 65°C 孵育 20min 灭活内切酶, 冷至室温;
- 2) 室温 2500g 离心 5min, 弃上清;
- 3) 为了填平内切酶造成的末端突出, 用生物素标记 DNA 末端, 现加入以下试剂:

10x T4 DNA Ligase Reaction Buffer	20μL
Label Mix	20μL
Klenow Fragment	10μL
ddH ₂ O	150μL
Total volume	200μL

- 4) 轻轻吹打混匀, 金属浴 900rpm 37°C 孵育 1h;
- 5) 室温 2500g 离心 5min, 弃上清;
- 6) 加入以下试剂进行 DNA 连接:

ddH ₂ O	1236μL
10x T4 DNA ligase buffer	140μL
10mg/mL BSA	14μL
T4 DNA Ligase (400U/μl)	10μL
Total volume	1.4mL

- 7) 轻轻吹打混匀, 室温旋转孵育 4h。

D. 去除末端标记

- 1) 室温 2500g 离心 5min, 弃上清;
 - 2) 加入如下试剂去除末端标记:
- | | |
|---------------------------|-------|
| 10x NEB buffer 1 | 10μL |
| Exonuclease III (100U/μL) | 2μL |
| ddH ₂ O | 88μL |
| Total | 100μL |
- 3) 在 PCR 仪中 37°C 孵育 5min;
 - 4) 加入 50μL ddH₂O、25μL Proteinase K 和 25μL 10% SDS, 1000rpm 65°C 孵育过夜。

E. DNA 沉淀回收

- 1) 加入 500 μ l 酚氯仿溶液，剧烈震荡 45s；
- 2) 室温下 14,000g 离心 5min，取上层水相 200 μ L 转移到新 2mL 离心管中；
- 3) 加入 20 μ L 的 3M NaAc pH5.2，500 μ L 预冷无水乙醇，震荡均匀后放到-80 $^{\circ}$ C 孵育 30min；
- 4) 2 $^{\circ}$ C 最大转速离心 30min，弃上清；
- 5) 用 800 μ L 75%乙醇重悬两个管 DNA，最大转速离心 5min，吸弃上清；
- 6) 加入 50 μ L 10mM Tris-HCl buffer pH7.5 溶解 DNA；
- 7) 测量 DNA 浓度，-20 $^{\circ}$ C 储存 DNA 溶液。

F. 富集 Biotin 标记 DNA

- 1) 取 10 μ L Streptavidin beads 加入 PCR 管中，用 200 μ L Tween Wash Buffer 洗涤一次；
- 2) 用 100 μ L 2x Bind Buffer 重悬磁珠，加入上述 50 μ L 去标记 DNA，并加入 50 μ L 10mM Tris-HCl pH7.5，轻轻吹打均匀，室温旋转孵育 30min；
- 3) 放到磁力架上，待溶液澄清，弃去上清；
- 4) 加入 200 μ L Tween Wash Buffer 洗涤磁珠，转移到 1.5mL EP 管中，55 $^{\circ}$ C 1000rpm 振荡孵育 2min，重复一次，共清洗两次；
- 5) 用 200 μ L 10mM Tris-HCl pH7.5 洗涤磁珠一次；
- 6) 用 19 μ L ddH₂O 重悬磁珠；
- 7) 用 Qubit 检测 DNA 浓度。

G. DNA 片段化和扩增

- 1) 加入如下试剂，轻轻吹打均匀：

磁珠-DNA	18 μ L
2x TD buffer	20 μ L
Tn5 transposome	1 μ L
Total	40 μ L

- 2) 在 PCR 仪上 55 $^{\circ}$ C 孵育 10min；
- 3) 放到磁力架上，待溶液澄清，弃去上清；
- 4) 加入 200 μ L Tween Wash Buffer 重悬磁珠，转移到 1.5mL EP 管中，55 $^{\circ}$ C 1000rpm 振荡孵育 2min，重复一次，共清洗两次；
- 5) 用 200 μ L 10mM Tris-HCl pH7.5 洗涤磁珠一次；
- 6) 用 20 μ L ddH₂O 重悬磁珠。

H. PCR 扩增

- 1) 直接用 Streptavidin 磁珠结合的 DNA 文库，PCR 扩增 4~12 循环。加入以下试剂混合均匀

DNA-beads	20μL
2x PCR Mix	25μL
N50x	2.5μL
N70x	2.5μL
Total volume	50μL

- 2) 按以下程序扩增:

温度	时间	循环数
72°C	3min	1
98°C	2min	1
98°C	10s	2-12
60°C	30s	
72°C	30s	
72°C	5min	1
4°C	∞	1

- 扩增完成后，放在磁力架上，待溶液澄清，将上清转至新管中，弃除磁珠；
- 加 27.5μL (0.55x) DNA Clean beads，用枪吹打混匀，室温孵育 5min；
- 将上清转移到新的 PCR 管，加入 22.5μL (0.45x) DNA Clean beads，用枪吹打混匀，室温孵育 5min；
- 将 PCR 管放置在磁力架上，待溶液澄清，弃除上清；
- 加入 200μL 80%乙醇溶液，室温放置 30s，然后移去乙醇溶液；
- 重复 7) 一次，最后一次用 10μL 枪头小心移除剩余所有 80%乙醇溶液；
- 室温下干燥磁珠约 5min，当磁珠变成磨砂色时干燥已经完成，不要过度干燥；
- 加入 20μL ddH₂O 洗脱 DNA，吹打混匀，室温孵育 5min，置于磁力架上，上清转至新的标记好的管中；
- 测 DNA 浓度，并取 3μL 样品在 2%琼脂糖凝胶检测 DNA 片段分布，合格后即可以上机测序。