

真菌 HIC 实验方法及数据分析方法

目录

- 一、DNA 提取方法
- 二、建库测序流程
- 三、数据分析

一、DNA 提取方法

1. 固定（甲醛交联）：

1.1 植物组织

1.1.1 配制固定 Buffer：

试剂名称	终浓度
Hepes (pH 8)	20 mM
Sucrose	250 mM
MgCl ₂	1 mM
KCl	5 mM
glycerol	40%(V/V)
Triton X-100	0.25%(V/V)
PMSF	0.1 mM
2-mercapto-ethano	0.1%(V/V)

1.1.2 实验步骤

- 收集 0.5g 菌体于 50ml 离心管中，并置于冰上；
- 往 50ml 离心管中添加提前预冷的 35ml 固定 buffer 和 2ml 的 36% 甲醛溶液，室温条件下，旋转杂交炉或其它可旋转设备中旋转反应 90min。
- 加 2.5ml 2M 的甘氨酸，连续轻柔手摇 5mins。
- 室温 2000g 离心 5min，弃上清；
- 将沉淀置于液氮中研磨；
- 将研磨好的菌体粉末转移至预冷的 50ml 离心管中，并将离心管置于自封袋中，在-80℃保存备用；

2. 细胞裂解和酶切：

- 细胞裂解：配制适当裂解体系冰上裂解细胞；
- 提取细胞核：用梯度离心法从裂解好的细胞中提取细胞核；
- 酶切：用限制性内切酶酶切细胞核

3. 末端标记和平端连接

- 末端标记：配制适当标记体系对末端标记生物素；
- 平端连接：将补平的末端用 T4 DNA 连接酶进行平末端连接；

4. DNA 纯化（解交联）

- 抽提 DNA，并对其进一步纯化，得到合格的 DNA 产物；

二、建库测序流程

取 1-4ug DNA 用 Covaris S220 打断仪打断，回收 300-700 bp 片段，并利用链霉亲和素磁珠捕获含有互作关系的 DNA 片段进行文库构建；

文库构建完成后，分别使用 Qubit3.0 和 GX 平台对文库的浓度和插入片段大小 (Insert Size) 进行检测，使用 Q-PCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量，以保证文库质量。

1. 剪切、选择片段

1.1 DNA 打断：Covaris 打断仪将 DNA 打断成合适大小；

1.2 末端修复：配制反应体系，修复 DNA 末端；

1.3 回收 DNA：琼脂糖电泳，切胶回收 DNA；

1.4 对得到的生物素标记 DNA 产物进行纯化；

2. 文库扩增与纯化：

2.1 末端加 A；

2.2 加连接头

2.3 文库扩增及纯化：对文库进行扩增，并纯化；；

2.4 出库；

3. 上机测序

三、数据分析

真菌 Hi-C:

软件：LACHESIS

参数：

-enzyme ^GATC

-CLUSTER_MAX_LINK_DENSITY 2 -CLUSTER_MIN_RE_SITES 5 -ORDER_MIN_N_RES_IN_TRUNK

5 -ORDER_MIN_N_RES_IN_SHREDS 5 -CLUSTER_NONINFORMATIVE_RATIO 2