蝴蝶 Hi-C 文库构建

Construction of Hi-C Library for Butterfly

万雯婷^{1,2}, 常洲¹, 董志巍¹, 王文^{1,2}, 李学燕^{1*}

¹ 遗传资源与进化国家重点实验室, 中国科学院昆明动物研究所, 昆明; ² 西北工业大学, 西安

*通讯作者邮箱: lixxy@mail.kiz.ac.cn

引用格式: 万雯婷, 常洲, 董志巍, 王文, 李学燕. (2021). 蝴蝶 Hi-C 文库构建. *Bio-101* e1010654. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010654.

How to cite: Wan, W.T., Chang, Z., Dong, Z.W., Wang, W. and Li, X.Y. (2021). **Construction of Hi-C Library for Butterfly**. *Bio-101* e1010654. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010654. (in Chinese)

摘要: Hi-C 技术源于染色体构象捕获 (Chromosome Conformation Capture, 3C) 技术, 用于分析染色质三维空间结构的一种测序方法。将三维基因组用甲醛交联固定, 用内切酶进行酶切后在 DNA 末端加生物素标记, 使 DNA 与蛋白、蛋白与蛋白分开, 然后, 提取 DNA 并打断成小片段, 用磁珠捕获带生物素标记的片段进行建库测序, 对测序数据进行分析即可揭示染色体的远程相互作用, 阐述染色体的三维构象和可能的基因之间的调控关系。该技术广泛用于分化发育机制、突变机制、疾病的发生发展等研究, 也是近年来解析染色体水平的参考基因组的一个关键环节。

以枯叶蛱蝶属蝴蝶为例, 利用 Hi-C 技术获得蝴蝶特定发育时期的基因组序列, 结合生物信息分析方法, 研究全基因组范围内整个染色质 DNA 在空间位置上的关系, 从而获得高分辨率的染色质三维结构信息, 为组装蝴蝶的染色体水平的参考基因组提供重要的数据。

关键词: 蝴蝶, Hi-C, 染色质, 三维结构

研究背景: Hi-C (High-through chromosome conformation capture) 技术 (Dekker *et al.*, 2002) 源于染色体构象捕获 (conformation capture, 3C) 技术, 以整个细胞核为研究对象, 利用高通量测序技术, 结合生物信息分析方法, 研究全基因组范围内整个染

色质 DNA 在空间位置上的关系，通过对染色质内部全部 DNA 相互作用模式进行捕获，获得高分辨率的染色质三维结构信息。2009 年，Job Dekker 研究团队 (Lieberman-Aiden *et al.*, 2009) 首次提出了 Hi-C 测序的概念，并利用该技术得到人类正常淋巴细胞基因组的三维结构图。通过 Hi-C 技术可以获得全基因组范围内的互作信息，得到染色体三个层级的三维结构，即常染色质/异染色质 (A/B compartment)、拓扑相关结构域 (TAD)、染色质环 (loop)；通过 Hi-C 技术可建立基因组折叠模型，研究染色体之间相互作用；Hi-C 技术可应用于基因组组装、单体型构建等，并可以与 RNA-seq、ChIP-seq 等数据进行联合分析，从基因调控网络和表观遗传网络来阐述生物体性状形成的相关机制。Hi-C 技术在蝴蝶中的应用也越来越广泛，例如，中国科学院昆明动物研究所进化基因组学与基因起源研究团队于 2019 年利用 Hi-C 技术结合三代长读长测序技术 (Pacbio) 完成了染色体水平的碧凤蝶 (*Papilio bianor* Cramer, 1777) 基因组组装 (29 条常染色体和 1 条性染色体)，这是首个利用 Hi-C 技术完成的染色体水平的蝴蝶基因组 (Lu *et al.*, 2019)；并于 2020 年利用 Hi-C 技术结合三代长读长测序技术 (Pacbio) 和核型实验成功解析了枯叶蛱蝶 (*Kallima inachus* Doyère, 1840) 染色体水平的高质量基因组 (30 条常染色体及 Z 和 W 两条性染色体)，这是首个组装了 W 染色体的蝴蝶参考基因组，也是至今组装得最完整的蝴蝶参考基因组 (Yang *et al.*, 2020)。

本文参考 Belton 等 (Belton *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2015; Nagano *et al.*, 2015; van Berkum *et al.*, 2010) 的方法对非模式动物蝴蝶幼虫进行了 Hi-C 文库的构建。

材料与试剂

1. 移液吸头
2. 离心管
3. 一次性培养皿
4. 解剖刀
5. 解剖剪
6. 镊子
7. 血球计数板
8. Corning cell strainer 40 μ m Nylon (BD)
9. DynaMagTM-2 磁力架 (Invitrogen, catalog number: 12321D)

10. MilliQ ddH₂O
11. Tris 饱和酚 (Solarbio, catalog number: T0250-250)
12. 氯仿 (Mecklin, catalog number: C2432-500ML)
13. 异戊醇 (Aladdin, catalog number: M116198-500ml)
14. 琼脂糖 (Biowest, catalog number: 111860)
15. EDTA (Solarbio, catalog number: E8040-500g)
16. 1 M Tris-HCl (pH 8.0) (Coolaber, catalog number: SL3080-100mL)
17. 3 M Sodium acetate (pH 5.2) (Thermo, catalog number: R1181)
18. 2.5 M Glycine (Biofroxx, catalog number: 1275)
19. NaCl (Solarbio, catalog number: S8210-500g)
20. KCl (生工, catalog number: 231-211-8)
21. Na₂HPO₄·12H₂O (Sigma-Aldrich, catalog number: 1065790500)
22. KH₂PO₄ (Macklin, catalog number: P815662-500g)
23. NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, catalog number: S8875-500G)
24. 酚红 (Macklin, catalog number: P6066-100g)
25. 0.2% Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich, catalog number: I8896-100ML)
26. 100% Ethanol (Merck, catalog number: 459844-2.5 L)
27. TE Buffer (pH 8.0) (Solarbio, catalog number: T1120)
28. BSA (Solarbio, catalog number: A8010-5g)
29. 10% (w/v) Triton X-100 (Tiandz, catalog number: 25-07910)
30. 10% (w/v) SDS (Simgen, catalog number: 9021100)
31. RNase A (康为世纪, catalog number: CW0601S)
32. Tween-20 (Coolaber, catalog number: CT11551-100ml)
33. 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco, catalog number: 25200-072)
34. Calf serum (ExCell, catalog number: NCD100)
35. DMEM (BI, catalog number: 14417)
36. 1× Phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.2) (Cell Signaling, catalog number: 9872L)
37. 37% Formaldehyde (Sigma Aldrich, catalog number: 1040031000)
38. Proteinase K (10 mg/ml) (Coolaber, catalog number: SL2074-1mL)

39. Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100×) (Thermo Scientific, catalog number: 87786)
40. Klenow DNA Polymerase I (NEB, catalog number: M0210S)
41. Klenow Fragment (3' → 5' exo⁻) (NEB, catalog number: M0212S)
42. T4 DNA Ligase (NEB, catalog number: M0202V)
43. T4 DNA Polymerase (NEB, catalog number: M0203L)
44. T4 Polynucleotide Kinase (NEB, catalog number: M0201V)
45. Dpn II (NEB, catalog number: R0543S)
46. NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (NEB, catalog number: E7535S)
47. 10× NEBuffer 3.1 (NEB, catalog number: B7203S)
48. 5× Ligation Buffer (Invitrogen, catalog number: 46300-018)
49. 10× NEBuffer 2.1 (NEB, catalog number: B7202V)
50. 10× Ligation Buffer (NEB, catalog number: B0202S)
51. User Enzyme (NEB, catalog number: M5505S)
52. Agencourt AMPure XP Beads (Beckman Coulter, catalog number: A63881)
53. VAHTS Adapter for Illumina (Vazyme, catalog number: ND104-01-AM)
54. VATHS Universal PCR Primer for Illumina (Vazyme, catalog number: ND104-01-AN)
55. VATHS Index Primer for Illumina (Vazyme, catalog number: ND104-01)
56. Dynabeads MyOne™ Streptavidin C1 beads (Invitrogen, catalog number: 65001)
57. 25 mM dNTP mix (TaKaRa, catalog number: SD0304)
58. 10 mM dATP, 10 mM dGTP, 10 mM dCTP, 10 mM dTTP (Invitrogen, catalog number: 18252015, 18254011, 18253013, 18255018)
59. 0.4 mM biotin-14-dATP (Invitrogen, catalog number: 19524-016)
60. Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, catalog number: Q32851)
61. Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, catalog number: Q32850)
62. Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent, catalog number: 5067-4626)
63. Phusion DNA Polymerase (Stratagene, catalog number: 600670-51)

64. 10× PfuUltra Buffer (Stratagene, 600670-52)

65. D-Hanks 缓冲液

试剂	1,000 ml
NaCl	8 g
KCl	0.4 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.06 g
KH ₂ PO ₄	0.06 g
NaHCO ₃	0.35 g
酚红	0.02 g

66. 1× Lysis 缓冲液

试剂	保存液	50 ml
10 mM Tris-HCl (pH 8.0)	1 M	500 µl
10 mM NaCl	5 M	100 µl
0.2% Igepal CA-630	10%	1,000 µl
MilliQ ddH ₂ O	to 50 ml	~ 48.4 ml

--- Stored at 4 °C

67. Tween Wash Buffer (TWB)

试剂	保存液	100 ml
5 mM Tris-HCl (pH 8.0)	1 M	500 µl
0.5 mM EDTA	500 mM	100 µl
1 M NaCl	5 M	20 ml
0.05% Tween-20	100%	50 µl
MilliQ ddH ₂ O	to 100 ml	~ 79.4 ml

68. 2× Binding Buffer (BB)

试剂	保存液	100 ml
10 mM Tris-HCl (pH 8.0)	1 M	1 ml
1 mM EDTA	500 mM	200 µl
2 M NaCl	5 M	40 ml
MilliQ ddH ₂ O	to 100 ml	~ 58.8 ml

仪器设备

1. 恒温水浴摇床 (GFL, model: 1092)
2. 冷冻离心机 (Eppendorf Centrifuge, model: 5810 R)
3. 体视显微镜 (Nikon, model: SMZ745)
4. 超声波 DNA 破碎仪 (Covaris, model: M220)
5. ThermoMixerF 1.5 精巧型恒温混匀仪 (Eppendorf, model: 5384000071)
6. ProFlex PCR System (Thermofisher, model: 4484075)
7. Qubit™ 4 荧光计 (Invitrogen, catalog number: Q33238)
8. Agilent 2100 Bioanalyzer System (Agilent, model: G2939BA)

实验步骤

1. 分离细胞 (Cell Separation)

- 1) 根据实验设计，取末龄枯叶蛱蝶幼虫一只 (取样的个体数量根据可获得的细胞数量决定)，剔除肠道内的内容物，用解剖剪将组织剪成小块 (1 mm²)，用 D-Hanks 缓冲液洗涤三次 (洗去组织表面的杂质)，转移至离心管中；
- 2) 加入适量 0.25% Trypsin-EDTA (以淹没过组织为准)，置于 37 °C 恒温水浴摇床中消化 1 h，使细胞分离；
- 3) 将样品置于超净台工作台进行后续的实验操作，加 D-Hanks 缓冲液洗涤三次，转移至新离心管中，加入适量 0.25% Trypsin-EDTA (以淹没过组织为准)，置于 37 °C 恒温水浴摇床中消化 20 min，消化后的组织使用 Corning cell strainer 40 µm Nylon 过滤收集滤液，并加入一滴 Calf serum 抑制 Trypsin-EDTA 的作用；

重复上述消化、收集步骤 1–2 次；

- 4) 加入 3-5 ml DMEM (含 10% Calf serum) 以终止 Trypsin-EDTA 消化作用；
- 5) 4 °C 300 × *g* 离心 10 min，收集细胞颗粒，弃上清液；
- 6) 加入 5 ml D-Hanks 缓冲液，用移液器轻轻吹散细胞沉淀，4 °C 300 × *g* 离心 10 min，收集细胞颗粒，弃上清液；
- 7) 加入 1-2 ml 1× PBS (视细胞量)，重悬细胞颗粒，用血球计数板计数约 1×10^6 – 10^8 个细胞后，即可继续进行后续的实验。

注：不同物种分离细胞所获得的细胞量不同，在正式实验之前应进行分离细胞预实验，以便评估可获得的细胞数量。若细胞量远大于 1×10^8 时，则加入 2 ml 1× PBS，减少因细胞量过多而引起的细胞计数误差；若细胞量低于 1×10^8 时，则加入 1 ml 左右的 1× PBS，以便更好的进行后续实验。

2. 细胞交联 (Crosslinking of Cells)

- 1) 4°C 300 × *g* 离心 5 min 细胞悬液，收集细胞颗粒，加入 1ml 1× PBS 轻轻吹打重悬细胞，加入 30 μl 37% Formaldehyde 溶液 (终浓度大约 1%)，轻轻混匀，置于垂直混匀仪上室温孵育 10 min (此步骤会影响内切酶对 DNA 序列的消化效率，需要严格控制甲醛浓度和孵育时间)；
- 2) 加入 120 μl 2.5M Glycine，轻轻混匀，置于垂直混匀仪上室温孵育 5 min，冰上静置 15 min，以终止交联反应；
- 3) 4°C 300 × *g* 离心 5 min 收集细胞颗粒；
- 4) 加入 1.5 ml 预冷的 1× PBS，用移液器轻轻吹打混匀，4°C 300 × *g* 离心 5 min 收集细胞颗粒。

以上即为交联后样品，可用于接下来的实验，或者 -80 °C 冻存，冻存样品 3 个月内使用。

3. 细胞裂解和染色体消化 (Cell Lysis and Chromatin Digestion)

- 1) 用 1 ml 预冷的 1× Lysis 缓冲液悬浮交联的细胞颗粒，并加入 10 μl Halt™ Protease Inhibitor Cocktail；
- 2) 冰上静置 15 min；
- 3) 4 °C 2,500 × *g* 离心 5 min；
- 4) 弃上清液，用 500 μl 预冷的 1× NEBuffer 3.1 (使用 10 × NEBuffer 3.1 稀释 10

倍) 洗涤两次, 4°C 2500 × *g* 离心 5 min;

5) 用 360 µl 1 × NEBuffer 3.1 悬浮细胞颗粒;

可选做: 吸取 18 µl 裂解物到一个新的 0.2 ml 离心管中, 作为核染色质完整性对照:

- a) 加入 50 µl 的 1× NEBuffer 3.1 和 10 µl 的 Proteinase K (10 mg/ml);
- b) 65°C 孵育 30 min;
- c) 苯酚-氯仿抽提一遍: 加入 50 µl 的 Tris 饱和酚, 振荡混匀 10 min, 4 °C 12,000 *rpm* 离心 10 min, 小心的吸取上层液体加入至新的 1.5 ml 离心管中; 再加入等体积的 Tris 饱和酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1), 振荡混匀 10 min, 4°C 12,000 *rpm* 离心 10 min, 小心的吸取上层液体加入至新的 1.5 ml 离心管中; 加入等体积的氯仿:异戊醇 (24:1), 4 °C 12,000 *rpm* 离心 10 min, 小心的吸取上层液体加入至新的 1.5 ml 离心管中; 加入 2.5 倍体积的预冷的 Ethanol, -20°C 过夜; 4 °C 12,000 *rpm* 离心 10 min, 小心的弃上清; 加入 400 µl 预冷 75% Ethanol, 反复吹打溶解, 4 °C 12,000 *rpm* 离心 10 min, 小心的弃上清; 再加入 400 µl 预冷 75% Ethanol, 反复吹打溶解, 4 °C 12,000 *rpm* 离心 10 min, 小心的弃上清; 室温晾干 10 min, 加入 20 µl TE Buffer 溶解 DNA。
- d) 加入 1 µl RNase A (1 mg/ml) 37°C 孵育 15 min;
- e) 提取的 DNA 用 0.75%的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 当 DNA 完整无拖尾降解, 即可进行后续实验。

6) 加入 38 µl 1% SDS (终体积为 380 µl), 用移液器轻轻地吹打混匀, 避免产生气泡;

7) 65°C 孵育 10 min, 孵育完后立即置于冰上;

8) 加入 43 µl 10% Triton X-100 (总体积 423 µl) 以终止 SDS 的作用 (Triton 终浓度为 1%), 用移液器轻轻地吹打混匀, 避免产生泡沫;

9) 37°C 孵育 15 min;

10) 加入 12 µl 10× NEBuffer 3.1 (总体积 435 µl);

11) 加入 400 U (40 µl, 10,000 units/ml) *Dpn* II (总体积 475 µl), 置于 ThermoMixer Comfort 恒温混匀仪中 37 °C 过夜 (8-11 h)。

4. 末端加生物素标记 (Marking of DNA Ends with Biotin-14-dCTP)

1) 65°C 孵育 20 min 使限制性内切酶失活;

选做: 吸取 10 µl 到一个新的 0.2 ml 离心管中作为对照, 处理方法如 3 的步骤 5)。

2) 准备下表所示反应液:

试剂	1 个反应
MilliQ ddH ₂ O	2 µl
10× NEBuffer 3.1	6 µl
10 mM dCTP	1.5 µl
10 mM dGTP	1.5 µl
10 mM dTTP	1.5 µl
0.4 mM biotin-14-dATP	37.5 µl
5 U/µl Klenow DNA Polymerase I	10 µl
终体积	60 µl

注: 按表中的顺序依次加入。

3) 孵育完后将离心管置于冰上冷却至室温;

4) 将 60 µl 的反应液加入至裂解产物中, 此时总体积为 535 µl;

5) 用移液器轻轻地吹打混匀, 避免产生气泡;

6) 置于 ThermoMixer Comfort 恒温混匀仪中 23 °C 反应 4 h (900 rpm, 每 5 min 振荡 10 s), 完后立即置于冰上冷却。

5. 平端连接 (Blunt End Ligation)

1) 准备下表所示反应液:

2)

试剂	1 个反应
MilliQ ddH ₂ O	242 µl
5× Ligation Buffer	240 µl
10% Triton X-100	120 µl
10 mg/ml BSA	12 µl
T4 DNA Ligase	50 µl

终体积	665 μ l

- 3) 将 665 μ l 反应液加入至含生物素的产物中, 此时总体积为 1,200 μ l;
- 4) 置于 ThermoMixer Comfort 恒温混匀仪中 16 $^{\circ}$ C 反应 4 h, 间隔振荡。

6. 反交联 (Reverse Crosslinking)

- 1) 加入 50 μ l proteinase K (10 mg/ml), 65 $^{\circ}$ C 孵育 2 h;
- 2) 加入 50 μ l proteinase K 于 65 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 此时总体积为 1,300 μ l。

7. DNA 纯化 (DNA Purification)

- 1) 将反交联产物室温冷却后分成 2 管, 各 750 μ l, 各加入 1.2 ml 的 100% Ethanol 和 75 μ l 3 M Sodium acetate;
- 2) 翻转混匀后, -80 $^{\circ}$ C 孵育 15 min;
- 3) 12,000 *rpm*, 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 置于冰上, 并小心弃去上清液;
- 4) 加入 800 μ l 新鲜配制的 70% Ethanol 洗涤, 12,000 *rpm*, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 弃去上清液;
- 5) 再用 800 μ l 新鲜配制的 70% Ethanol 洗涤, 12,000 *rpm*, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 弃去上清液;
- 6) 室温晾干;
- 7) 加入 130 μ l TE Buffer 溶解 (必要时 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min 加速溶解);
- 8) 使用 Qubit™ dsDNA BR Assay Kit 检测 DNA 浓度 (<https://www.thermofisher.cn/order/catalog/product/Q32850?SID=srch-srp-Q32850#/Q32850?SID=srch-srp-Q32850>), 当 DNA 总量>5 μ g 即可继续后续实验。

注: 所获得的 DNA 样品可于-20 $^{\circ}$ C 保存。

8. 去除末端未连接生物素 (Removal of Biotin from Un-ligated Ends)

- 1) 准备如下反应液:

试剂	1 个反应
Hi-C DNA sample	~ 5 μ g
10 $\times$ NEBuffer 2.1	5 μ l

10 mM dATP	0.125 μ l
10 mM dGTP	0.125 μ l
3,000 U/ml T4 DNA Polymerase	5 μ l
MilliQ ddH ₂ O	加至终体积 50 μ l

- 2) 20 °C 下孵育 4 h;
- 3) 75 °C 下孵育 20 min 终止反应;
- 4) 置于冰上冷却。

9. DNA 打断 (DNA Sonication)

- 1) 用 MilliQ ddH₂O 将步骤 8 中获得的混合液补至 130 μ l;
- 2) 用超声波破碎仪将 DNA 打断至 200-300 bp, 超声波 DNA 破碎仪参数设置如下表所示:

参数	M220
Peak Incident Power (Watt)	50
Duty Cycle/Duty factor (%)	10
Cycles per Burst	200
Treatment time (seconds)	220

10. DNA 片段筛选 (Size Fractionation)

- 1) 将 Agencourt AMPure XP Beads 提前于室温中平衡 30 min;
- 2) 每个离心管中加入 500 μ l Agencourt AMPure XP Beads, 磁力架上静置 5 min, 弃 250 μ l 上清液, 混匀备用;
注: 此步将磁珠浓缩一倍, 以确保充分沉淀 DNA;
- 3) 将打断后的样品体积补至 200 μ l;
- 4) 加入 160 μ l Agencourt AMPure XP Beads (0.8 $\times$), 用移液器吹打混匀;
- 5) 室温下孵育 10 min, 置于磁力架上待溶液澄清后, 将上清液转移至新的离心管中;
- 6) 加入 40 μ l Agencourt AMPure XP Beads (0.2 $\times$) 至上一步所得上清液中, 用移

液器吹打混匀；

- 7) 室温下孵育 10 min，置于磁力架上待溶液澄清后，弃去上清液；
- 8) 加入 1 ml 新鲜配制的 70% Ethanol 洗涤磁珠两次；
- 9) 室温晾干，使 Ethanol 充分蒸发；
- 10) 加入 50 μ l TE Buffer 溶解 DNA。

(可选做) 取样品使用 2%琼脂糖凝胶检测打断及片段选择的片段大小范围。

11. 磁珠捕获携带生物素片段 (Biotin Pulldown with Streptavidin Coated Beads)

- 1) 取 150 μ l 10 mg/ml Dynabeads MyOne™ Streptavidin C1 beads 至 1.5 ml 离心管中；
- 2) 加入 400 μ l TWB 清洗磁珠，用移液器吹打混匀，置于振荡装置上室温孵育 3 min，然后，置于磁力架上回收磁珠，弃去上清液；
- 3) 加入 400 μ l TWB 重悬磁珠，转移至新的离心管中，置于磁力架上回收磁珠，弃去上清液；
- 4) 加入 300 μ l BB 重悬磁珠；
- 5) 加入 250 μ l TE Buffer 和 50 μ l Hi-C 样品；
- 6) 室温下孵育 15 min；
- 7) 将离心管置于磁力架上，待溶液澄清后弃去上清液；
- 8) 加入 600 μ l TWB 洗涤磁珠，转移至新的离心管中；
- 9) 将离心管置于 Thermomixer Comfort 恒温混匀仪上，55 °C 振荡孵育 2 min，置于磁力架上回收磁珠，弃去上清液；
- 10) 重复洗涤一次；
- 11) 用 100 μ l 1× Ligation Buffer (10× Ligation Buffer 稀释 10 倍) 重悬磁珠，将产物及磁珠转移至一个新的离心管中，置于磁力架上回收磁珠，弃去上清液；
- 12) 用 50 μ l 1× Ligation Buffer 重悬磁珠。

12. 末端补平 (End Repair)

- 1) 配制如下反应液：

试剂	

---

	1 个反应

Hi-C DNA bound to streptavidin beads in 1× Ligation Buffer	50 µl
10× Ligation Buffer	2 µl
25 mM dNTP mix	0.7 µl
3 U/µl T4 DNA Polymerase	2.5 µl
10 U/µl T4 Polynucleotide Kinase	2.5 µl
5 U/µl Klenow DNA Polymerase I	0.5 µl
MilliQ ddH ₂ O	11.8 µl
终体积	70 µl

- 2) 20 °C 孵育 30 min;
- 3) 将离心管置于磁力架上，待溶液澄清后弃去上清液；
- 4) 加入 600 µl TWB 清洗磁珠，转移至新的离心管中，将离心管置于 Thermomixer Comfort 恒温混匀仪上，55 °C 振荡孵育 2 min。置于磁力架上回收磁珠，弃去上清液；
- 5) 重复步骤 4) 一次，加入 600 µl TWB 清洗磁珠，转移至新的离心管中，将离心管置于 Thermomixer Comfort 恒温混匀仪上，55 °C 振荡孵育 2 min。置于磁力架上回收磁珠，弃去上清液；
- 6) 用 100 µl 1× NEBuffer 2.1 (10× NEBuffer 2.1 稀释 10 倍) 重悬磁珠，将产物及磁珠转移至一个新的离心管中，置于磁力架上回收磁珠，弃去上清液；
- 7) 最后用 40 µl 1× NEBuffer 2.1 重悬磁珠。

13. 末端加 “A” (A-Tailing)

- 1) 配制如下反应液：

试剂	1 个反应
Hi-C DNA bound to streptavidin beads in 1 × NEBuffer 2.1	40 µl
10× NEBuffer 2.1	1 µl
10 mM dATP	1 µl
5 U/ µl Klenow Fragment (3' → 5' exo ⁻)	3 µl

MilliQ ddH ₂ O	5 µl
终体积	70 µl

- 2) 37 °C 孵育 30 min;
- 3) 将离心管置于磁力架上, 待溶液澄清后弃去上清液;
- 4) 加入 600 µl TWB 清洗磁珠, 转移至新的离心管中, 将离心管置于 Thermomixer Comfort 恒温混匀仪上, 55 °C 振荡孵育 2 min; 置于磁力架上回收磁珠, 弃去上清液;
- 5) 重复洗涤一次;
- 6) 用 100 µl 1× Ligation Buffer (5× Ligation Buffer 稀释 5 倍) 重悬磁珠, 将产物及磁珠转移至一个新的离心管中, 置于磁力架上回收磁珠, 弃去上清液;
- 7) 用 40 µl 1× Ligation Buffer 重悬磁珠。

14. 接头连接 (Adaptor Ligation)

- 1) 配制如下反应液:

试剂	1 个反应
Hi-C DNA bound to streptavidin beads in 1 × Ligation Buffer	40 µl
15 µM VAHTS Adapter for Illumina	5 µl
5× T4 Ligation Buffer	2 µl
T4 DNA Ligase	3 µl
终体积	50 µl

- 2) 37 °C 下孵育 30 min;
- 3) 将离心管置于磁力架上, 待溶液澄清后弃去上清液;
- 4) 加入 600 µl TWB 清洗磁珠, 转移至新的离心管中, 将离心管置于 Thermomixer Comfort 恒温混匀仪上, 55 °C 振荡孵育 2 min, 置于磁力架上回收磁珠, 弃去上清液;
- 5) 重复洗涤一次;
- 6) 用 100 µl 1× Ligation Buffer (5× Ligation Buffer 稀释 5 倍) 重悬磁珠, 将产物

及磁珠转移至一个新的离心管中，置于磁力架上回收磁珠，弃去上清液；

- 7) 用 40 μ l 1 $\times$ Ligation Buffer 重悬磁珠。

15. User 酶处理 (User Enzyme)

- 1) 配制如下反应液：

试剂	1 个反应
Hi-C DNA bound to streptavidin beads in 1 $\times$ Ligation Buffer	40 μ l
5 $\times$ Ligation Buffer	2 μ l
User Enzyme	3 μ l
MilliQ ddH ₂ O	5 μ l
终体积	70 μ l

- 2) 37 $^{\circ}$ C 下孵育 20 min；
- 3) 将离心管置于磁力架上，待溶液澄清后弃去上清液；
- 4) 加入 600 μ l TWB 清洗磁珠，转移至新的离心管中，将离心管置于 Thermomixer Comfort 恒温混匀仪上，55 $^{\circ}$ C 振荡孵育 2 min，置于磁力架上回收磁珠，弃去上清液；
- 5) 重复洗涤一次；
- 6) 用 100 μ l 1 $\times$ NEBuffer 2.1 (10 $\times$ NEBuffer 2.1 稀释 10 倍) 重悬磁珠，将液体及磁珠转移至一个新的离心管中，置于磁力架上回收磁珠，弃去上清液；
- 7) 用 40 μ l 1 $\times$ NEBuffer 2.1 重悬磁珠。

16. PCR 扩增 (PCR Amplification)

- 1) 配制如下反应液：

试剂	1 个反应
Bead-bound Hi-C DNA	40.5 μ l
VATHS Universal PCR Primer for Illumina	0.5 μ l
VATHS Index Primer for Illumina	0.5 μ l

25 mM dNTP	5 μ l
10 $\times$ PfuUltra Buffer	3 μ l
PfuUltra DNA Polymerase	0.5 μ l
终体积	50 μ l

2) PCR 扩增程序如下:

步骤	温度	时间
1	95 $^{\circ}$ C	2 min
2	95 $^{\circ}$ C	20 s
3	65 $^{\circ}$ C	20 s
4	72 $^{\circ}$ C	15 s
5	Go to 2 N times	6–14 cycles
6	72 $^{\circ}$ C	3 min
7	20 $^{\circ}$ C	10 min

17. PCR 产物纯化及片段筛选 (Production PCR and Size Selection)

- 1) 将 Agencourt AMPure XP beads 提前于室温中平衡 30 min;
- 2) 将 PCR 产物体积补至 250 μ l;
- 3) 将离心管置于磁力架上, 待溶液澄清后弃去磁珠;
- 4) 加入 175 μ l Agencourt AMPure XP Beads (0.7 $\times$), 用移液器吹打混匀;
- 5) 室温下孵育 5 min, 置于磁力架上待溶液澄清后, 将上清液转移至新的离心管中;
- 6) 加入 50 μ l Agencourt AMPure XP Beads (0.2 $\times$) 至上一步所得上清液中, 用移液器吹打混匀;
- 7) 室温下孵育 5 min, 置于磁力架上待溶液澄清后, 弃去上清液;
- 8) 加入 700 μ l 新鲜配制的 70% Ethanol 洗涤磁珠两次;
- 9) 室温晾干, 使 Ethanol 充分蒸发;
- 10) 加入 30 μ l TE Buffer 溶解 DNA。

18. Hi-C 文库质控 (Quality Control of Hi-C Library)

- 1) 使用 Qubit™ dsDNA HS Assay Kit 对文库的浓度进行初步定量 (<https://www.thermofisher.cn/order/catalog/product/Q32851?SID=srch-hj-Q32851#/Q32851?SID=srch-hj-Q32851>)。
- 2) 使用 Agilent High Sensitivity DNA Kit 检测文库 DNA 片段的完整性及插入片段的大小 (https://www.agilent.com.cn/cs/library/usermanuals/public/HighSensitivity_DNA_KG.pdf.pdf)。

当文库浓度>5 µg/µl, 体积>20 µl; 文库片段大小集中在 500-600 bp 即可将文库送测序公司进行上机测序。

- 3) qPCR 法对文库的有效浓度进行精确定量 (测序公司对文库进行 qPCR 质控)。

19. Hi-C 文库测序 (Hi-C Sequencing)

所获得的 Hi-C 文库使用 Illumina HiseqXten (PE150) 平台进行上机测序, 测序深度根据物种的基因组大小和项目的设计进行确定。在蝴蝶基因组研究中数据量通常按物种基因组大小的 100× 进行测序。

致谢

感谢国家自然科学基金委员会创新研究群体 (31621062)、国家自然科学基金委员会面上项目 (32070482)、中国科学院西部之光项目 (A 类) 对中国科学院昆明动物研究所遗传资源与进化国家重点实验室的支持。

参考文献

1. Belton, J. M., McCord, R. P., Gibcus, J. H., Naumova, N., Zhan, Y. and Dekker, J. (2012). [Hi-C: a comprehensive technique to capture the conformation of genomes.](#) *Methods* 58 (3): 268–276.
2. Dekker, J., Rippe, K., Dekker, M. and Kleckner, N. (2002). [Capturing chromosome conformation.](#) *Science* 295 (5558): 1306–1311.
3. Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., et al. (2009). [Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome.](#) *Science* 326: 289–293.

4. Lu, S., Yang, J., Dai, X., Xie, F., He, J., Dong, Z., Mao, J., Liu, G., Chang, Z., Zhao, R., Wan, W., Zhang, R., Li, J., Wang, W. and Li, X. (2019). [Chromosomal-level reference genome of Chinese peacock butterfly \(*Papilio bianor*\) based on third-generation DNA sequencing and Hi-C analysis](#). *GigaScience* 8: 128.
5. Ma, W., Ay, F., Lee, C., Gulsoy, G., Deng, X., Cook, S., Hesson, J., Cavanaugh, C., Ware, C.B., Krumm, A., Shendure, J., Blau, C. A., Disteche, C. M., Noble, W. S. and Duan, Z. (2015). [Fine-scale chromatin interaction maps reveal the cis-regulatory landscape of human lincRNA genes](#). *Nat Methods* 12: 71–78.
6. Nagano, T., Lubling, Y., Yaffe, E., Wingett, S.W., Dean, W., Tanay, A. and Fraser, P. (2015). [Single-cell Hi-C for genome-wide detection of chromatin interactions that occur simultaneously in a single cell](#). *Nat Protoc* 10: 1986–2003.
7. van Berkum, N.L., Lieberman-Aiden, E., Williams, L., Imakaev, M., Gnirke, A., Mirny, L.A., Dekker, J. and Lander, E.S. (2010). [Hi-C: a method to study the three-dimensional architecture of genomes](#). *J Vis Exp* (39): 1869.
8. Yang, J., Wan, W., Xie, M., Mao, J., Dong, Z., Lu, S., He, J., Xie, F., Liu, G., Dai, X., Chang, Z., Zhao, R., Zhang, R., Wang, S., Zhang, Y., Zhang, W., Wang, W. and Li, X. (2020). [Chromosome-level reference genome assembly and gene editing of the dead-leaf butterfly *Kallima inachus*](#). *Mol Ecol Resour* 20(4): 1080–1092.