

CUT&Tag试剂盒

使用说明书

一、产品介绍

CUT&Tag技术是一种新兴研究蛋白质-DNA互作的方法。Protein A/G融合Tn5转座酶，与目标抗体结合后，能够靶向目标蛋白，在目标位点附近发挥酶切作用，同时引入接头序列，经过DNA产物提取与PCR建库可得到适配二代测序的文库。CUT&Tag技术与传统ChIP-Seq技术相比，不需要经过超声打断，操作更简单，实验周期更短，且具有细胞投入量少、信噪比高和可重复性好等优势。

二、产品成分

组分	保存条件	6次	12次	24次
ConA Beads	4℃保存	70 μL	140 μL	280 μL
Tagment Beads	4℃保存	1.3 mL	2.6 mL	5.2 mL
0.5M EDTA	4℃保存	100 μL	200 μL	400 μL
10% SDS	4℃保存	25 μL	50 μL	100 μL
YZ-A1 buffer	4℃保存	6 mL	12 mL	24 mL
5% Digitonin	-20℃保存	75 μL	150 μL	300 μL
10xBinding Buffer	-20℃保存	200 μL	400 μL	800 μL
10xWash Buffer	-20℃保存	2.5 mL	5 mL	10 mL
10xDig-300 Buffer	-20℃保存	2.5 mL	5 mL	10 mL
30% BSA	-20℃保存	10 μL	20 μL	40 μL
1M MgCl2	-20℃保存	25 μL	50 μL	100 μL
YZ-A1 PE	-20℃保存	155 μL	310 μL	620 μL
pA/G-Tn5	-20℃保存	8 μL	16 μL	32 μL

三、适用范围

本产品适用于动物新鲜组织、冰冻组织和细胞样品的CUT&Tag建库。

四、自备仪器耗材及试剂

仪器：移液器、磁力架、细胞计数相关仪器、电子天平、小型台式离心机、冷冻离心机、倒置显微镜、涡旋振荡仪、旋转混合仪、ThermoMixer C、生化培养箱或其他可控温替代仪器、PCR仪、Qubit荧光计、Aglient 2100分析仪或替代仪器等

耗材:适宜规格EP管、细胞计数板、盖玻片、计时器、40 μm细胞筛、一次性称量勺等

试剂:蛋白酶抑制剂 (推荐cOmplete Tablets, Mini, EDTA-free,EASYpack, Roche, Cat.No.4693159001, 1片溶于1mL灭菌超纯水中,即为50×PI)、DPBS/PBS、0.4% 台盼蓝、灭菌超纯水、无水乙醇、YZ Tn5 index kit、DNA Clean beads (推荐KAPA Pure Beads, KAPA BIOSYSTEMS, Cat.No.KS8002)、Aglient 2100试剂盒或替代仪器配套试剂等。

五、试剂配制

以下配方均按照单个样本计算，操作中请按照实际样本个数等比例配制

1× Binding Buffer试剂配制：

试剂名称	储存浓度	终浓度	体系
10×Binding Buffer	10×	1×	30 μL
dH ₂ O	-	-	270 μL
Total	-	-	300 μL

1× Wash Buffer试剂配制：

试剂名称	储存浓度	终浓度	体系
10×Wash Buffer	10×	1×	200 μL
50×PI (蛋白酶抑制剂, 下同)	50×	1×	40 μL
dH ₂ O	-	-	1.76 mL
Total	-	-	2 mL

Dig-Wash Buffer试剂配制：

试剂名称	储存浓度	终浓度	体系
1×Wash Buffer	1×	1×	990 μL
5% Digitonin	5%	0.05%	10 μL
Total	-	-	1 mL

Antibody Buffer试剂配制：

试剂名称	储存浓度	终浓度	体系
Dig-Wash Buffer	-	-	49.6 μL
0.5M EDTA	0.5M	0.002M	0.2 μL
30% BSA	30%	0.12%	0.2 μL
Total	-	-	50 μL

1×Dig-300 Buffer试剂配制：

试剂名称	储存浓度	终浓度	体系
10×Dig-300 Buffer	10×	1×	200 μL
5% Digitonin	5%	0.01%	4 μL
50×PI	50×	1×	40 μL
dH ₂ O	-	-	1.756 mL
Total	-	-	2 mL

注：使用前请将各组分(除pA/G-Tnp和YZ-A1 PE)置于室温解冻，所有组分使用前均需充分混合均匀。**ConA Beads**需提前15-30 min平衡室温，配置好的试剂中，1×**Binding Buffer**需平衡室温，其余试剂可放置于冰上使用。5% **Digitonin**在冰上易再次凝固，建议使用中室温放置。

六、实验步骤

CUT&Tag实验中孵育步骤较多，孵育方式可以根据条件进行选择：ThermoMixer C孵育、旋转混合孵育、静置孵育。ThermoMixer C孵育适配1.5 mL的EP管，可设置温度和振动幅度，推荐振动幅度900 rpm，振动15 s静置2 min模式，期间可能会有液体黏附在管壁，可轻弹管壁并进行100 g的瞬时离心再继续孵育。旋转混合孵育适配不同容量EP管，若使用200 μL的PCR管或8连排，旋转过程中液体上下流动对实验结果影响较小，孵育期间不需要额外处理。若使用1.5 mL的EP管，建议加体系时用移液器小心加到新的EP管底部，由于表面张力的作用，体系会保留在EP管底部，不会随旋转在管中上下流动，有利于获得较稳定的实验结果。若清洗后浸湿EP管侧壁，旋转孵育时液体会随管壁上下流动，磁珠细胞可能黏附在管壁和管盖上造成损失，可将样品转移至新的EP管中，

小心加入管底继续孵育。静置孵育适配不同容量EP管，体系中细胞与ConA磁珠结合后没有明显的聚团和沉降时，可采用静置孵育的方法，由于孵育时间较长，间隔15 min-30 min可重悬一次体系。25℃孵育可在室温条件下进行，当气温变化较大时，可以选择将旋转混合孵育或静置孵育体系放置于生化培养箱中25℃恒温孵育。ThermoMixer C可根据情况调节温度。本实验步骤以1.5 mL EP管为例。

6.1 ConA磁珠与细胞结合流程

6.1.1 细胞样品

- 1、对新鲜细胞样品进行质检：细胞数量检测，建议投入细胞数量在 5×10^4 - 1×10^5 个；细胞活性检测，建议投入细胞活性 $\geq 80\%$ ；
- 2、细胞样品无需裂解，根据细胞数量检测结果，取包含 5×10^4 - 1×10^5 个活细胞的悬液体积，若体积不足200 μL ，可以补适当DPBS使体积大于200 μL ，25℃，500 rcf，离心5 min；
- 3、吸弃上清，加入300 μL 1×Wash Buffer，用移液器轻轻吹打混匀，25℃，500 rcf，离心5 min；
- 4、吸弃上清，加入100 μL 1×Wash Buffer，用移液器轻轻吹打混匀，放置常温备用；
- 5、取1个1.5 mL离心管，向其中加入100 μL 1×Binding Buffer，加入10 μL ConA Beads，用移液器轻轻吹打混匀，置于磁力架上，静置1 min；
- 6、吸弃上清，加入100 μL 1×Binding Buffer，用移液器轻轻吹打混匀，置于磁力架上，静置1 min；
- 7、吸弃上清，加入10 μL 1×Binding Buffer，用移液器轻轻吹打混匀，置于常温备用；
- 8、向清洗好的细胞样品中加入清洗好的10 μL ConA Beads，用移液器轻轻吹打混匀，25℃孵育15 min；

注：补体积到200 μL 以上更有利于离心收集细胞；为防止样本丢失，在离心时，将离心管统一方向并标记细胞沉积位置，吸取上清时，在沉淀对立面轻轻吸去上清，担心损失细胞可留少许液体（5 μL 以内）。

6.1.2 组织样品

- 1、组织样品需要提取细胞核，对液氮研磨好的组织样品进行称重，每样取0.01-0.02 g，加入1 mL 预冷DPBS，吹打混匀后，4℃，500 rcf，5 min；
- 2、吸弃上清，每样加入980 μL 的YZ-A1 buffer和20 μL 的50×PI，吹打混匀，冰上裂解5-15 min，间歇颠倒混匀；
- 3、时间到后，4℃，500 rcf，离心5 min；
- 4、吸弃上清，每样加入1 mL预冷DPBS，吹打混匀，取1个40 μm 细胞筛，将混匀的组织裂解液过细胞筛，收集滤液于1个1.5 mL离心管中；
- 5、将滤液吹打混匀后，取8 μL ，加入2 μL 台盼蓝，吹打混匀后用细胞计数板于显微镜视野下计数

根据计数结果,取包含 5×10^4 - 1×10^5 个细胞核的悬液体积,若体积不足200 μ l,可以补适当DPBS使体积大于200 μ l, 25 $^{\circ}$ C, 500 rcf, 离心5 min;

6、吸弃上清,加入300 μ L 1 \times Wash Buffer,用移液器轻轻吹打混匀,4 $^{\circ}$ C, 500 rcf, 离心5 min;

7、吸弃上清,加入100 μ L 1 \times Wash Buffer,用移液器轻轻吹打混匀,放置冰上备用;

8、取1个1.5 mL离心管,向其中加入100 μ L 1 \times Binding Buffer,加入10 μ L ConA Beads,用移液器轻轻吹打混匀,置于磁力架上,静置2 min;

9、吸弃上清,加入100 μ L 1 \times Binding Buffer,用移液器轻轻吹打混匀,置于磁力架上,静置2 min;

10、吸弃上清,加入10 μ L 1 \times Binding Buffer,用移液器轻轻吹打混匀,置于常温备用;

11、向清洗好的细胞核样品中加入清洗好的10 μ L ConA Beads,用移液器轻轻吹打混匀,25 $^{\circ}$ C旋转孵育15 min。

注:补体积到200 μ l以上更有利于离心收集细胞核;为防止样本丢失,在离心时,将离心管统一方向并标记细胞核沉积位置,吸取上清时,在沉淀对立面轻轻吸去上清,担心损失细胞核可留少许液体(5 μ l以内)。组织冰上孵育裂解的时间根据组织类型而定,可参考说明书末的表格。

6.2一抗孵育流程(细胞样品和组织样品从该步骤起操作相同)

1、一抗体系配制:

试剂名称	储存浓度	终浓度	体系
一抗	-	-	0.5 μ L
Antibody Buffer	-	-	49.5 μ L
Total	-	-	50 μ L

2、磁珠与细胞(核)孵育结合完成后,取出离心管轻轻瞬离,置于磁力架上,静置1 min;

3、吸弃上清,加入50 μ L一抗体系,用移液器轻轻吹打混匀,25 $^{\circ}$ C孵育2-3 h, 或者4 $^{\circ}$ C孵育过夜。

注:一抗:对于组蛋白相关的研究,推荐H3K27ac使用Anti-Histone H3(acetyl k27) 抗体 ChIP Grade, abcam , Cat.No.ab4729;推荐 H3K4me3 使用 anti-trimethyl-histone H3(lys4) antibody, millipore, Cat.No.04-745;推荐 IgG 使用 Rabbit Contral IgG, ABclonal , Cat.No.AC005。对于其他一抗,推荐尽可能使用经过ChIP-seq或CUT&RUN验证的抗体,如果没有合适的 ChIP 级抗体,可以尝试 Immune Fluorescence(IF)级别的抗体。常见的组蛋白抗体推荐1:100稀释使用,其他未知抗体因浓度和效价不一,初次实验时,可根据相应说明书设计测试梯度,摸索最佳使用浓度。

一抗孵育及后续体系中均含有Digitonin成分,容易起泡沫,实验中尽量轻柔吹打,且透化后的细胞膜相对较为脆弱,如果有液体在管壁,可进行100 g的瞬时离心,避免进行剧烈吹打、震荡。同时操作过程中要避免ConA磁珠长时间脱离溶液处于干燥状态,防止细胞与磁珠脱离造成损失。

6.3 二抗孵育流程

1、二抗体系配制：

试剂名称	储存浓度	终浓度	体系
二抗	-	-	0.5 μL
Dig-Wash Buffer	-	-	49.5 μL
Total	-	-	50 μL

2、一抗孵育结束后,取出离心管轻轻瞬离,置于磁力架上,静置1 min;

3、吸弃上清,加入50 μL二抗体系,用移液器轻轻吹打混匀,25℃孵育1 h。

注：二抗：扩大信号作用,可根据一抗种属来源选择。如以上推荐的3种一抗均为兔源抗体,相应二抗可使用抗兔的Goat pAb to Rb IgG, abcam, Cat.No.ab6702, 推荐1:100稀释使用,其他未知二抗因浓度和效价不一,初次实验时,可根据相应说明书设计测试梯度,摸索最佳使用浓度。

6.4 pA/G-Tn5酶孵育流程

1、pA/G-Tn5体系配制：

试剂名称	储存浓度	终浓度	体系
pA/G-Tn5	-	-	0.5 μL
1×Dig-300 Buffer	1×	1×	49.5 μL
Total	-	-	50 μL

2、二抗孵育结束后,取出离心管轻轻瞬离,置于磁力架上,静置1 min;

3、吸弃上清,加入300 μL Dig-Wash Buffer,用移液器轻轻吹打混匀,置于磁力架上,静置1 min;

4、吸弃上清,加入300 μL Dig-Wash Buffer,用移液器轻轻吹打混匀,置于磁力架上,静置1 min;

5、吸弃上清,加入300 μL Dig-Wash Buffer,用移液器轻轻吹打混匀,置于磁力架上,静置1 min;

6、吸弃上清,加入50 μL pGA-Tn5体系,用移液器轻轻吹打混匀,25℃孵育1 h。

注：本试剂盒推荐pA/G-Tn5转座酶复合物1:100稀释使用,不同的实验研究对象,体系中转座酶的切割活性可能不同,可根据实际情况,摸索最佳使用浓度。

6.5 pAG-Tn5酶切体系激活流程

1、Tagmentation Buffer配制：

试剂名称	储存浓度	终浓度	体系
1×Dig-300 Buffer	1×	1×	99 μL
1M MgCl ₂	1 M	0.01 M	1 μL
Total	-	-	100 μL

- 2、pA/G-Tn5体系孵育结束后，取出离心管轻轻瞬离，置于磁力架上，静置1 min；
- 3、吸弃上清，加入300 μL 1×Dig-300 Buffer，用移液器轻轻吹打混匀，置于磁力架上，静置1 min；
- 4、吸弃上清，加入300 μL 1×Dig-300 Buffer，用移液器轻轻吹打混匀，置于磁力架上，静置1 min；
- 5、吸弃上清，加入300 μL 1×Dig-300 Buffer，用移液器轻轻吹打混匀，置于磁力架上，静置1 min；
- 6、吸弃上清，加入100 μL Tagmentation Buffer体系，用移液器轻轻吹打混匀，37℃孵育1 h。

6.6 CUT&Tag DNA提取流程

- 1、激活反应结束后，取出离心管轻轻瞬离，向其中加入2 μL 10% SDS，55℃孵育10 min；
- 2、取出平衡至室温，向体系中加入200 μL Tagment Beads (体系：Tagment Beads=1:2)，涡旋混匀后，25℃孵育5 min；
- 3、孵育结束后，取出离心管轻轻瞬离，置于磁力架上，静置1 min；
- 4、吸弃上清，加入500 μL 80%乙醇，静置1 min；
- 5、吸弃上清，加入500 μL 80%乙醇，静置1 min；
- 6、吸弃上清，换小量程移液器吸弃残余，晾干磁珠上残余的乙醇；
- 7、30 μL ddH₂O洗脱收集DNA产物，存放于-20℃保存。

注：Tagment Beads提前15-30 min取出，平衡室温并混匀；80%乙醇清洗时从磁珠对侧加，避免冲刷磁珠导致产物损失；磁珠干燥时间不易过长，避免磁珠龟裂导致产物损失；加入ddH₂O溶解时，充分涡旋振荡，保证充分溶解，瞬时离心后于磁力架上收集。

6.7 PCR扩增

1、PCR体系：

试剂名称	体系
DNA产物	15 μL
N7	2.5 μL
N5	2.5 μL

试剂名称	体系
YZ-A1 PE	25 μ L
ddH ₂ O	5 μ L
Total	50 μ L

注:本试剂盒推荐30 μ L ddH₂O溶解DNA产物, 配制PCR体系时可先取一半, 根据后续产量再对体系和PCR程序进行调整。

2、PCR程序:

温度	时间	Cycles	体积
72°C	3 min	1×	50 μ L
98°C	30 s	1×	50 μ L
98°C	15 s	10-25×	50 μ L
60°C	30 s		50 μ L
72°C	30 s		50 μ L
72°C	5 min	1×	50 μ L
4°C	10 min	Hold	50 μ L

注:对于PCR循环数的确定, 原则上文库总量在满足上机测序的前提下, 应尽量降低扩增循环数, 特别是少量细胞和低丰度蛋白, 通常20 ng分布在 200~1000 bp 区间的文库, qPCR 浓度1~3 nmol, 已经满足上机需求。循环数过多会导致过度扩增, 引起文库偏好性增强、序列重复比例升高。按照本试剂盒建议的 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 个细胞(核)投入量, 当研究对象为组蛋白时, 建议PCR循环数选择10-12×, IgG建议15-18×, 转录因子建议15-25×。因物种、组织、细胞类型以及研究蛋白间的差异, 可根据实际情况, 摸索最佳PCR循环数。

3、用1.2x (60 μ L) 推荐的 KaPa beads对扩增PCR产物进行纯化, 30 μ L水溶解, Qubit测浓度;

注:通常文库不需进行片段分选即可上机测序, 如果需要去除小片段污染和基因组大片段, 可以用 KaPa beads对纯化产物进行两步分选, 两步磁珠用量推荐为:0.5×/0.8×。由于物种、组织、细胞类型以及研究蛋白间的差异, 文库大小可能存在不同模式的分布, 可根据建好的文库大小自行决定是否需要进行磁珠分选。

4、选择Agilent 2100或者等效替代仪器对文库进行片段分布检测。

附表1 不同组织推荐裂解时间

组织	裂解时间
肝脏	5 min
脾脏	5 min
胃脏	5 min
胰脏	10 min
脑	10 min
肾脏	10 min
十二指肠	10 min
软骨	10 min
皮肤	10 min
眼睛	10 min
肺脏	10 min
肌肉	15 min
脂肪	15 min
心脏	15 min

注：以上组织提核测试的条件仅供参考，具体条件根据样本情况而定（裂解时镜检出核情况）。活细胞样本不需裂解。本产品已测试过样本包括但不限于以上组织类型，可联系销售获取其他组织裂解推荐时间。

基因科技 影领未来

武汉影子基因科技有限公司
Wuhan Yingzi Gene Technology Co., Ltd

官网: www.yingzigen.com

电话: 027-5921-6838

邮箱: market@yingzigen.com

地址: 湖北省武汉市武汉软件新城3期D5栋4楼

