

产品概述

CUT&Tag Assay Kit for Illumina 是针对 Illumina 高通量测序平台开发的，用于研究蛋白质-DNA 互作的文库构建试剂盒。CUT&Tag (Cleavage Under Targets and Tagmentation) 是一种新型蛋白质-DNA 互作研究技术：在染色质蛋白被特异性抗体原位结合后，使用 Protein A-Tn5 融合蛋白靶向结合并精准切割，可有效地产生具有高分辨率和极低背景的片段文库。

相较于传统的 ChIP-Seq，本试剂盒提供的 CUT&Tag 方法具有细胞使用量低、操作简单、周期短、信噪比高等优点。适用于检测特定转录因子结合位点或特定组蛋白修饰的发生位点等，可应用在表观遗传学、早期胚胎发育、干细胞、肿瘤等研究领域。

试剂组成

产品名称	货号	规格
CUT&Tag Assay Kit for Illumina	BR3E101-51	8 T
	BR3E101-54	48 T

组分编号	管盖颜色与组分名称	BR3E101-51	BR3E101-54
BOX 1	 ConA Beads	80 μ L	480 μ L
	 DNA Clean Beads	1,650 μ L	9.9 mL
	 Stop Buffer	40 μ L	240 μ L
	 Proteinase K	40 μ L	240 μ L
	 Tnp Activator	40 μ L	240 μ L
BOX 2	 pA-Tnp	8 μ L	48 μ L
	 5% Digitonin	80 μ L	480 μ L
	 10 $\times$ Binding Buffer	176 μ L	1,056 μ L
	 10 $\times$ Wash Buffer	1,150 μ L	1,150 μ L $\times$ 6
	 25 $\times$ Antibody Buffer	20 μ L	120 μ L
	 10 $\times$ Dig-300 Buffer	800 μ L	1.2 mL $\times$ 4
	 Tag Amplification Mix	200 μ L	1.2 mL

注：收到试剂盒后，请将 BOX 1 置于 2~8°C 存储；BOX 2 置于 -20 $\pm$ 5°C 存储。

运输与保存条件

BOX 1: 冰袋方式运输, 置于 2~8°C 存储;

BOX 2: -30~-15°C 运输, 置于 -20±5°C 存储。

适用范围

适用于 100~100,000 个哺乳动物完整细胞或细胞核的蛋白质-DNA 互作研究。哺乳动物组织、植物组织、植物细胞经特定处理也可以使用本试剂盒进行实验。

自备材料

试剂: 无水乙醇、灭菌超纯水、Qubit dsDNA 定量试剂。

仪器: 片段分析仪、Qubit 荧光计、PCR 仪、旋转混匀仪等。

耗材: 低吸附离心管、0.2 mL 薄壁管、0.5 mL 薄壁管、磁力架等。

抗体: 一抗、二抗。

蛋白酶抑制剂: 需使用无 EDTA 的蛋白酶抑制剂。

文库扩增引物: 推荐使用 NGS Tagment Index Kit for Illumina (货号: BR3N108)

注意事项

文库构建过程受样本类型、仪器型号、操作、靶标丰度等影响, 需对部分参数进行调整。使用过程中如遇到任何问题, 可联系技术支持获取帮助。

1. 磁珠使用

1.1 本试剂盒提供 ConA 磁珠 (用于结合细胞) 和 DNA 纯化磁珠 (用于基因组提取和文库纯化) 两种磁珠, 使用前请注意区分。

1.2 磁珠切勿在低于 0°C 的环境中储存, 结冰会导致磁珠聚沉, 导致实验失败。

1.3 磁珠使用前应先平衡至室温 (室温放置约 30 min), 操作过程全程保持室温。

1.4 ConA 磁珠表面偶联伴刀豆蛋白 A, 使用前请勿剧烈震荡, 推荐轻柔吹打混匀或上下颠倒混匀后瞬时离心。

1.5 ConA 磁珠与细胞结合后, 请勿剧烈震荡或猛烈吹打, 以免细胞脱落或损伤细胞。

1.6 避免 ConA 磁珠或其与细胞的复合物长时间暴露在空气中, 以免磁珠干燥开裂。

1.7 避免 ConA 磁珠或其与细胞的复合物长时间高速离心或长时间置于磁力架上, 以免磁珠聚集。

1.8 ConA 磁珠在操作过程中会出现轻微聚集, 聚集程度因细胞类型和细胞数量而不同。出现聚集后可轻弹离心管壁, 并上下颠倒冲散团块, 并不会影响实验结果。请避免剧烈震荡或猛烈吹打。

2. 样本准备

2.1 若使用完整细胞进行实验,因不同细胞表面修饰差异较大,所以与 ConA 磁珠的亲合力也会有明显差异。在进行实验前可先进行了解,避免使用低亲合力细胞系进行低投入量实验。

2.2 对于常见悬浮细胞系,可直接离心收集细胞进行实验。对于大部分贴壁细胞,经胰蛋白酶消化成悬浮细胞后,离心去除上清,也可以正常进行实验。但部分细胞系经胰蛋白酶处理后,会影响与 ConA 磁珠的结合效率。

2.3 用于进行 CUT&Tag 实验的细胞,建议进行台盼蓝染色鉴定活细胞比例。推荐使用活细胞大于 90% 的材料进行实验,实验过程的操作应尽量轻柔,以避免细胞损伤。当细胞死亡后,部分蛋白质的表面修饰会发生变化,甚至会从 DNA 上脱落,此时实验结果的背景信号会加深,且可能出现假阴性。

2.4 若使用哺乳动物组织或植物组织进行实验,推荐先提取组织中的细胞核。对于不同来源、不同种类的细胞,应采用相应的细胞核提取条件,以获得高质量细胞核。

2.5 对于低丰度表达的目的蛋白或瞬时互作的转录因子,可在实验前,先进行轻度紫外交联或甲醛交联,以获得更好的实验结果。

3. 抗体选择

3.1 关于一抗,建议选择 CUT&Tag 或者 CUT&RUN 级别的抗体,如果没有经过 CUT&Tag 验证的抗体,建议依次选择 ChIP 级别抗体、IP 级别抗体、IF 级别抗体、WB 级别抗体。

3.2 关于二抗,因本试剂盒提供的是 Protein A-Tn5 融合蛋白,所以应选择与 Protein A 具有高亲和力、且不带修饰的二抗。

3.3 因 CUT&Tag 操作较复杂、不易判断成功与否,所以建议加入阳性对照和阴性对照来监测实验过程。对于阳性对照,推荐使用表达丰度高的组蛋白。对于阴性对照,推荐不加一抗、正常加入二抗和转座子。

4. 细胞投入量和文库扩增

4.1 为尽量减少大片段 DNA 和过量引物的影响,建议最少进行 12 个热循环。

4.2 在选择扩增循环数时,文库浓度只需达到上机需求量即可,无需追求过高的文库产量。过多循环数会导致扩增偏倚、突变积累、大片段污染、重复度和嵌合产物增加等。

4.3 由本试剂盒构建的 CUT&Tag 文库,主峰分布于 200~1,500 bp,测序前无需分选,可直接上机。

4.4 本试剂盒适用于 100~100,000 个完整细胞或细胞核的蛋白质-DNA 互作研究。受细胞类型、抗体选择、目的蛋白表达丰度的影响,实际能兼容的细胞数量略有差异。一般来说,5,000~50,000 个细胞是合适的范围,后续实验可根据经验和所需数据,自行调整细胞投入量和文库扩增循环数之间的关系。

以 293T 细胞为例, 一抗使用 H3K4me3, 细胞投入量、文库扩增循环数、文库产量之间的关系如下:

细胞投入量	扩增循环数	文库浓度 (Qubit)
100	18~20	10~40 ng/ μ L
1,000	15~17	
10,000	12~14	
100,000	10~12	

5. 文库质检

5.1 构建好的文库需进行文库浓度和片段分布两个方面的质检。

5.2 对于文库浓度检测, 可用双链 DNA 荧光染料法 (Qubit、PicoGreen 等) 或 qPCR 法 (文库定量试剂盒)。染料法简单易操作, 但对于过度扩增文库无法准确定量; qPCR 法耗时较长, 但可对所有类型的文库进行绝对定量。推荐使用 qPCR 法。

5.3 对于片段分布检测, 可用 2% 琼脂糖凝胶或片段分析仪 (Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 等)。2% 琼脂糖凝胶价格便宜, 但无法准确判断文库主峰位置, 只能作为定性手段; 生物分析仪价格昂贵, 但可以准确判断文库主峰位置。若要用于上机测序前的文库定量分析, 必须使用生物分析仪。

6. 其他注意事项

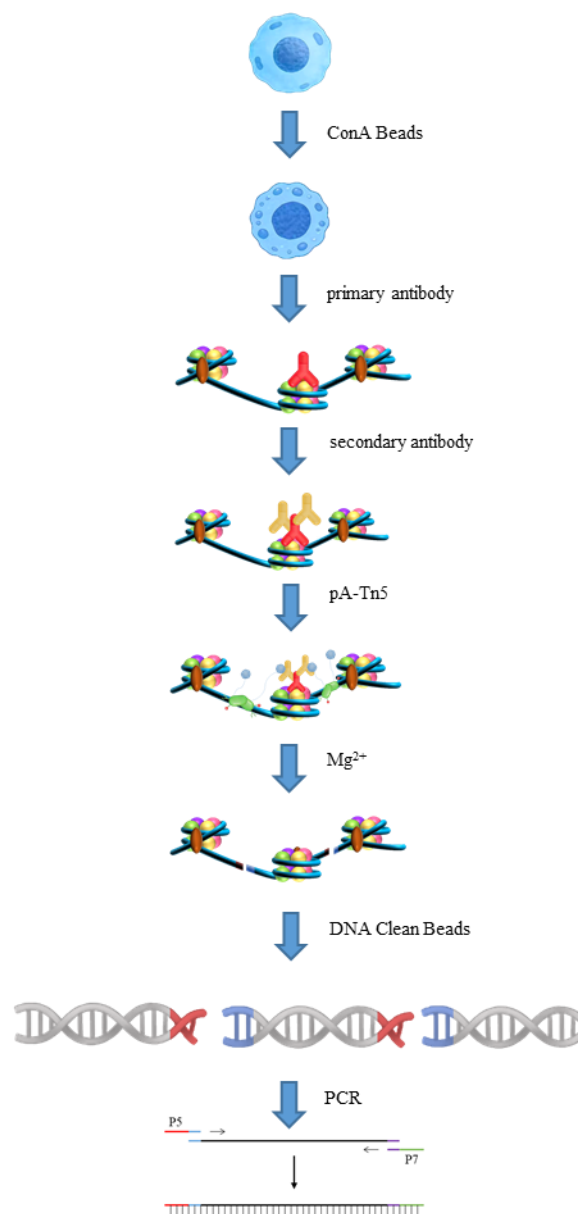
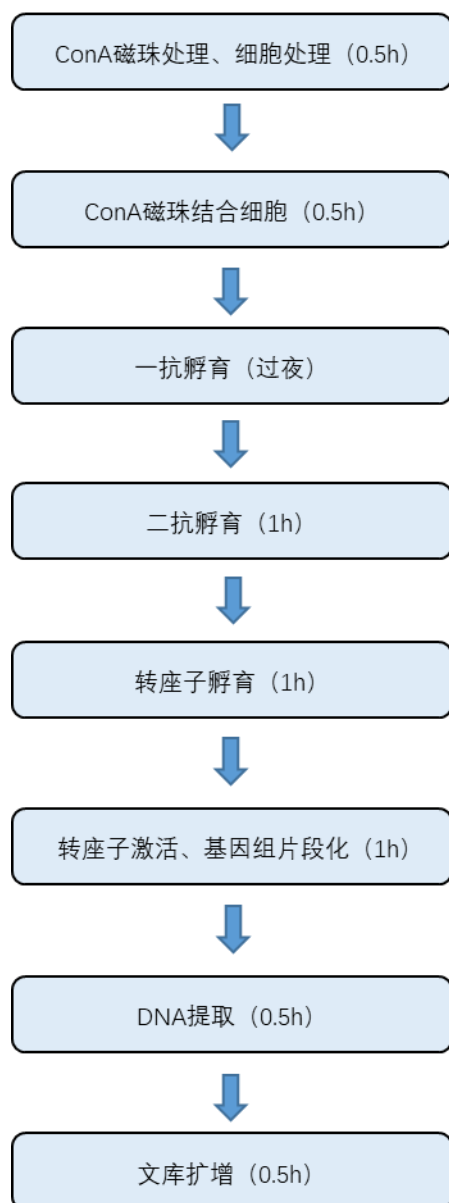
6.1 试剂盒分为 BOX 1 和 BOX 2 两个部分, 请注意两个部分的储存温度。

6.2 Digitonin 有接触毒性, 在溶液配制过程中请做好个人防护, 避免直接接触。加入 Digitonin 后, 缓冲液可在 2~8°C 暂存一天, 但尽量现配现用。5% Digitonin 可在 2~8°C 暂存一周。

6.3 为保证实验的重复性, 建议使用带热盖的 PCR 仪, 并在开始反应前, 提前预热至反应温度。

6.4 为避免交叉污染和气溶胶污染, 推荐在实验操作时使用带滤芯的吸头, 在实验结束后, 使用含氯消毒剂或 DNA 清除剂对实验区域进行清洁。

实验原理流程图



CUT&Tag 原理及流程

使用偶联伴刀豆球蛋白 A 的磁珠固定细胞，利用洋地黄皂苷进行细胞透化，使得一抗、二抗、pA-Tn5 可以顺利进入细胞核。在抗体的精确导向下，pA-Tn5 特异性切割靶蛋白附近的基因组，并连接测序接头。经 PCR 扩增后，即可富集与靶蛋白互作的 DNA 片段。

文库结构: 5' -AATGATACGGCGACCAACGAGATCTACAC [Barcode 2] TCGTCGGCAGCGTCAGATGT
 GTATAAGAGACAGNNNNNNNNNNCTGTCTCTTATACATCTCCGAGCCCACGAGAC [Barcode 1] A
 TCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG- 3'

其中 N 为插入序列, Barcode 为 8 碱基标签序列。

实验步骤

1. 试剂配制

此处列举单个反应所需的试剂量, 可根据实验需要, 在此基础上按比例放大。

- 1.1 Binding Buffer: 取 22 μL 10 $\times$ Binding Buffer, 加入 198 μL ddH₂O, 共 220 μL 。
- 1.2 Wash Buffer: 取 140 μL 10 $\times$ Wash Buffer, 加入 28 μL 50 $\times$ 蛋白酶抑制剂, 加入 1,232 μL ddH₂O, 共 1,400 μL 。
- 1.3 Dig-wash Buffer: 取 792 μL 1.2 配制的 Wash Buffer, 加入 8 μL 5% Digitonin, 共 800 μL 。
- 1.4 Antibody Buffer: 取 48 μL 1.3 配制的 Dig-wash Buffer, 加入 2 μL 25 $\times$ Antibody Buffer, 共 50 μL 。
- 1.5 Dig-300 Buffer: 取 100 μL 10 $\times$ Dig-300 Buffer, 加入 20 μL 50 $\times$ 蛋白酶抑制剂, 加入 2 μL 5% Digitonin, 加入 878 μL ddH₂O, 共 1,000 μL 。
- 1.6 Tagment Buffer: 取 45 μL 1.5 配制的 Dig-300 Buffer, 加入 5 μL Tnp Activator, 共 50 μL 。
- 1.7 80%乙醇: 取 800 μL 无水乙醇, 加入 200 μL ddH₂O, 共 1,000 μL 。

2. ConA Beads 激活

- 2.1 轻柔吹打重悬 ConA Beads, 将 10 μL ConA Beads 转移到 0.2 mL 管中, 加入 100 μL Binding Buffer, 用移液器吹打混匀。将 0.2 mL 管放在磁力架上吸附 2 分钟。
- 2.2 完全去除液体, 并将其从磁铁架上取下。加入 100 μL Binding Buffer, 用移液器吹打混匀, 用微量离心仪瞬时离心收集液体。
- 2.3 放在磁力架上吸附 2 分钟, 完全去除液体, 重悬在 10 μL Binding Buffer 中, 待用。

3. 细胞收集与吸附

- 3.1 室温收集细胞并计数。
- 3.2 取所需数量细胞, 在室温下 600 $\times$ g 离心 3 分钟, 弃尽液体。
- 3.3 重新悬浮于 500 μL 的 Wash Buffer 中, 在室温下 600 $\times$ g 离心 3 分钟, 弃尽液体。
- 3.4 重新悬浮于 100 μL 的 Wash Buffer 中, 并转移到激活后的 ConA Beads 中, 上下颠倒混匀, 室温孵育 10 分钟。
- 3.5 瞬时离心收集液体, 将 0.2 mL 管放在磁力架上静置 2 分钟, 弃尽液体。

4. 一抗孵育

4.1 使用 50 μ L 预冷的 Antibody Buffer 重悬细胞-ConA Beads 复合物, 加入 1 μ L 一抗, 上下颠倒混匀, 瞬时离心收集液体。

4.2 在 2~8°C 下孵育过夜至数天。或者, 在室温下孵育 2 小时。

5. 二抗孵育

5.1 以 1: 100 的比例用 Dig-wash Buffer 稀释二抗, 每个样品 100 μ L。

5.2 取 4.2 步骤的一抗-细胞-ConA Beads 复合物, 瞬时离心收集液体, 将 0.2 mL 管放在磁力架上静置 2 分钟, 弃尽液体。

5.3 加入 100 μ L 稀释好的二抗, 上下颠倒混匀重悬, 置于旋转混匀仪上, 室温旋转孵育 1 小时。

5.4 瞬时离心收集液体, 将 0.2 mL 管放在磁力架上静置 2 分钟, 弃尽液体。

5.5 加入 200 μ L Dig-wash Buffer, 上下颠倒混匀重悬。

5.6 重复步骤 5.4~5.5 两次 (二抗孵育结束后, 用 200 μ L Dig-wash Buffer 洗涤 3 次)。

6. pA-Tn5 转座子复合体孵育

6.1 取 1 μ L pA-Tn5 转座子复合体, 加入 99 μ L Dig-300 Buffer 中, 每个样品 100 μ L。

6.2 取 5.6 步骤的二抗-一抗-细胞-ConA Beads 复合物, 瞬时离心收集液体, 将 0.2 mL 管放在磁力架上静置 2 分钟, 弃尽液体。

6.3 加入 100 μ L 稀释好的 pA-Tn5 转座子复合体, 上下颠倒混匀重悬, 置于旋转混匀仪上, 室温旋转孵育 1 小时。

6.4 瞬时离心收集液体, 将 0.2 mL 管放在磁力架上静置 2 分钟, 弃尽液体。

6.5 加入 200 μ L Dig-300 Buffer, 上下颠倒混匀重悬。

6.6 重复步骤 6.4~6.5 两次 (pA-Tn5 转座子复合体孵育结束后, 用 200 μ L Dig-300 Buffer 洗涤 3 次)。

7. 片段化

7.1 取 6.6 的 0.2 mL 管, 瞬时离心收集液体, 在磁力架上静置 2 分钟, 弃尽液体。

7.2 加入 50 μ L Tagment Buffer, 上下颠倒混匀重悬, 置于 37°C 下孵育 1 小时。

7.3 瞬时离心收集液体, 加入 5 μ L Stop Buffer 和 5 μ L Proteinase K, 涡旋混匀, 55°C 孵育 10 分钟。

8. 核酸提取

8.1 提前将 DNA Clean Beads 平衡至室温，取 120 μ L DNA Clean Beads (2.0 $\times$ 比例) 加入 7.3 的细胞裂解液中，涡旋混匀，室温孵育 5 分钟。

8.2 瞬时离心收集液体，在磁力架上静置 2 分钟，弃尽液体。

8.3 加入 200 μ L 80%乙醇，室温静置 30 秒，弃尽液体。

8.4 加入 200 μ L 80%乙醇，室温静置 30 秒，弃尽液体。

8.5 在室温下开盖静置 2~5 分钟，直至磁珠表明无反光。

8.6 加入 25 μ L ddH₂O 重悬磁珠，在室温下孵育 5 分钟，瞬时离心收集液体，在磁力架上静置吸附磁珠，收集核酸洗脱液。

9. 文库扩增

9.1 按下表，预热 PCR 仪：

温度	时间	循环数
105°C	/	/
72°C	3 min	1
98°C	1 min	1
98°C	10 sec	12~20
60°C	10 sec	
72°C	1 min	1
4°C	∞	1

注：扩增循环数需根据细胞投入量调整。参考>注意事项 4. 细胞投入量和文库扩增。

9.2 拿出 Tag Amplification Mix，以及与接头配套的扩增引物，冰上解冻后上下颠倒混匀，瞬时离心并置于冰上备用。

9.3 按下表，配置文库扩增反应体系：

组分名称	体积 (μ L)
步骤 8.6 洗脱的核酸	20
N5XX	2.5
N7XX	2.5
Tag Amplification Mix	25
总计	50

9.4 用移液器轻轻吹打混匀或振荡混匀，并瞬时离心将反应液收集至管底。

9.5 放入 9.1 步骤预热好的 PCR 仪中，立即开始文库扩增反应。

10. 产物纯化

10.1 取出平衡至室温的 DNA Clean Beads, 充分颠倒、振荡混匀, 用移液器吸取 85 μ L 磁珠 (1.7 $\times$ 比例) 加入到扩增产物中, 充分颠倒、振荡混匀, 室温孵育 5 min。

10.2 瞬时离心, 收集磁珠至管底, 置于磁力架上分离磁珠和液体, 待液体清澈后 (大约 3 min), 小心移弃液体, 可在管底残留约 5~10 μ L 液体, 以免损失磁珠。

10.3 加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇溶液, 室温孵育 30 s 后, 弃尽乙醇。

10.4 加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇溶液, 室温孵育 30 s 后, 弃尽乙醇。

10.5 保持薄壁管在磁力架上, 开盖使乙醇充分挥发, 此时可见磁珠表面逐渐失去光泽, 此过程大约持续 2 min。(如磁珠表面出现龟裂, 则表明磁珠过度干燥, 此时回收效率将下降。)

10.6 从磁力架上取下薄壁管, 加入 21 μ L ddH₂O, 充分振荡混匀, 室温静置 2 min 洗脱扩增产物。

10.7 瞬时离心, 置于磁力架上分离磁珠和液体, 待液体清澈后 (大约 30 s), 小心移取 20 μ L 液体至新 EP 管中。请勿触碰磁珠。

11. 文库质检

见>注意事项 5. 文库质检。