

TransNGS[®] CUT&Tag Library Prep Kit for Illumina[®]

CUT&Tag建库试剂盒 适配illumina平台

使用前请仔细阅读说明书

版本号: Version 2.0



目录号: KP172

保存: Box 1于2°C-8°C保存1年, Box 2于-18°C及其以下温度下保存1年。

产品说明

TransNGS[®] CUT&Tag Library Prep Kit for Illumina[®]是针对Illumina高通量测序平台开发的, 适用于哺乳动物细胞的CUT&Tag文库构建试剂盒, 所构建的文库可用于单端或双端测序。CUT&Tag (Cleavage Under Target & Tagmentation)是一种新型的DNA-蛋白质互作研究方法, 其技术原理是使用融合了protein A/G的Tn5与靶蛋白通过抗体的桥联形成免疫复合体, 并通过Mg²⁺激活Tn5的切割活性, 使Tn5将含有接头的短序列插入与靶蛋白结合的DNA片段两端, 最终通过PCR扩增构建文库。本试剂盒适用于转录因子、共调节因子等DNA结合蛋白的互作DNA研究。与传统的ChIP-seq相比, 能够在低起始量细胞的投入下获得更精确、更稳定的蛋白-DNA互作信息。

适用范围

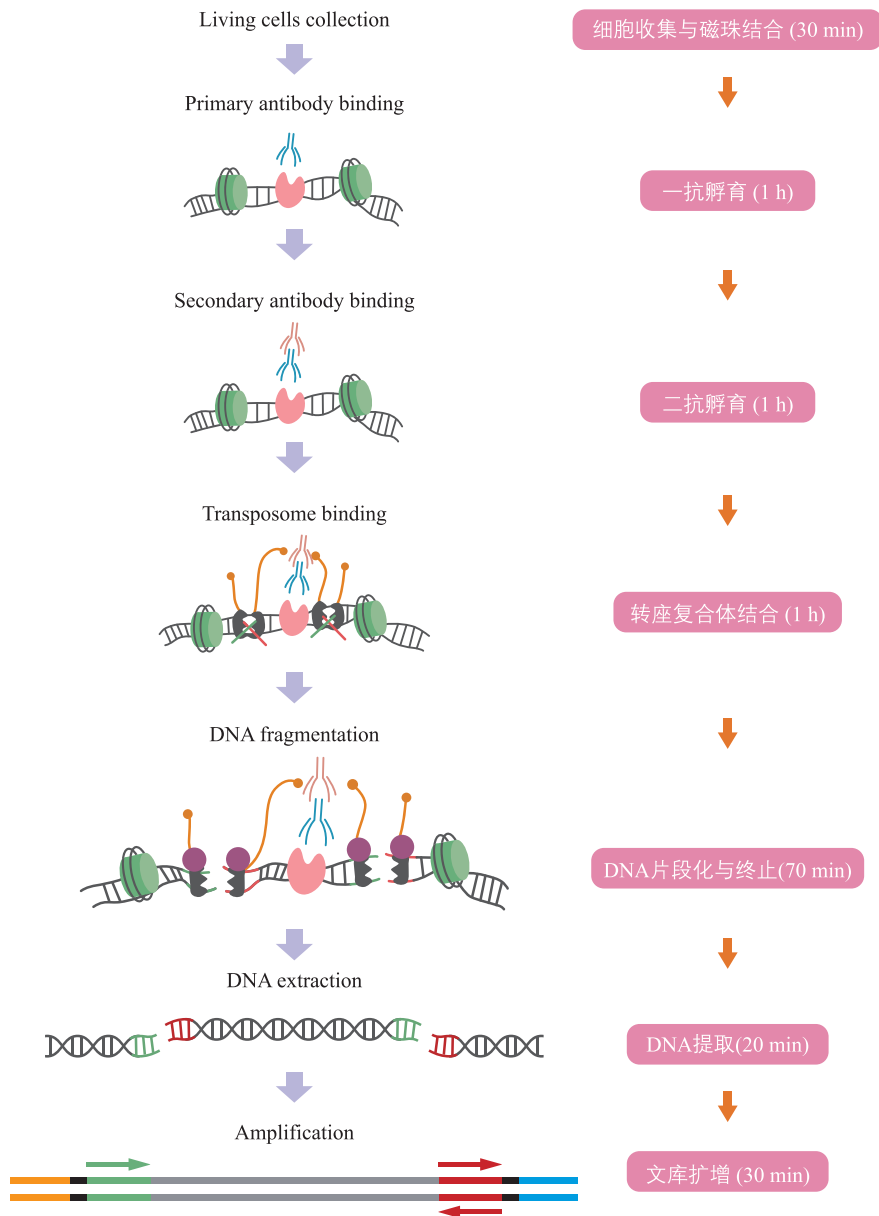
10-10⁶个哺乳动物细胞, 或经过处理的细胞核, 以及无细胞壁结构的真核细胞(如植物细胞原生质体等)。

推荐自备试剂

- 一抗 (ChIP Grade)。
- 二抗: Goat Anti-Rabbit IgG H&L (目录号: HS001) 和Goat Anti-Mouse IgG H&L (目录号: HS002)。
- *TransNGS*[®] Tn5 Index Kit for Illumina[®] (目录号: KI101)。
- *TransNGS*[®] Spike-in DNA Controls for CUT&Tag (目录号: KS201)。
- 预冷1×PBS溶液, 无水乙醇, 灭菌超纯水等。
- 低吸附的离心管, 包括1.5 ml离心管以及PCR管等。
- 如需做动物或植物组织的细胞核建库, 推荐使用伯优品牌的细胞核分离试剂盒(人或动物样本, 52009-10; 植物样本, 52305-10)。



实验原理示意图



试剂盒组成

	Component	KP172-01 (12 rxns)	KP172-02 (48 rxns)
Box 1	ConA Magnetic Beads II	60 μ l	240 μ l
	CUT&Tag DNA Clean Beads	2 ml	4 ml $\times$ 2
Box 2	ConA Beads Binding Buffer	660 μ l $\times$ 2	2.7 ml $\times$ 2
	Cell Wash Buffer	10 ml $\times$ 3	40 ml $\times$ 3
	Nuclear Extraction Buffer	6 ml	6 ml $\times$ 4
	1 $\times$ Pro-Wash Buffer	10 ml	40 ml
	pAG-Tn5	12 μ l	48 μ l
	Tagmentation Buffer	600 μ l	2.4 ml
	Protease Inhibitor	420 μ l	840 μ l $\times$ 2
	Ab Enhancer	20 μ l	80 μ l
	Binding Enhancer	80 μ l	320 μ l
	500 mM EDTA	30 μ l	120 μ l
	Lysis Enhancer	20 μ l	80 μ l
	Proteinase K (20 mg/ml)	20 μ l	80 μ l
	2 $\times$ CUT&Tag Library Amplification Mix	300 μ l	600 μ l $\times$ 2
	Nuclease-free Water	1 ml	4 ml

起始样品准备

初次试验推荐使用 10^4 - 10^5 个细胞进行本试剂盒的CUT&Tag建库，试验成功后可按说明书调整细胞用量。确保活细胞比例大于90%，死细胞可以用台盼蓝染色鉴定。贴壁细胞和组织块应尽量消化成单细胞状态，重悬于PBS中。对于难以消化成单细胞状态的样品，也可以提取细胞核后再建库，详见附录中常规细胞提核操作指导。若物种类型特殊、细胞数不在上述范围内或是目的蛋白在样品中的表达丰度不高等情况，需对试验条件做出适当调整。细胞悬液中应尽量去除胰酶、EDTA等杂质，以免干扰后续建库反应。

文库结构

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[i5]TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-XXX
XXXXX-CTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCCACGAGAC[i7]ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

操作步骤

1、细胞收集与磁珠结合

(1) 取室温平衡好的5 μ l ConA Magnetic Beads II *至PCR管中，置于磁力架上，待液体澄清后，小心弃上清。

*提前将ConA Magnetic Beads II从4 $^{\circ}$ C冰箱取出，于室温平衡30分钟后吹吸混匀备用。如有多份样本，可以在八连排中操作。

(2) 加入50 μ l ConA Beads Binding Buffer后轻弹混匀，在磁力架上收集磁珠并弃上清。重复此步骤一次。

(3) 加入10 μ l ConA Beads Binding Buffer重悬ConA Magnetic Beads II。



(4) 按下表配制**细胞洗涤液**，每个样本1.2 ml。

Component	Volume
Cell Wash Buffer	1.2 ml
Protease Inhibitor	12 μ l
Total volume	~1.2 ml

(5) 收集所需数量的新鲜细胞于1.5 ml离心管中。若细胞体积超过100 μ l，则600 g室温离心3分钟，并小心弃去上清；若细胞体积不及100 μ l，则直接进行第(6)步反应。

(6) 每管加入1 ml第(4)步配制的细胞洗涤液，轻柔吹打重悬细胞*，室温600 g离心3分钟，并小心弃去上清。

(7) 每管加入90 μ l第(4)步配制的细胞洗涤液，轻柔吹打重悬细胞*。

(8) 将各管重悬细胞分别转移至第(3)步准备好的10 μ l ConA Magnetic Beads II中，轻柔吹打10次混匀后*，立即置于旋转混合仪上，室温孵育10分钟。

注：切记不可振荡混匀。推荐轻弹管壁混匀。

2、孵育一抗、二抗、pA/G-Tn5并进行打断反应

一抗孵育：

(1) 配制**一抗孵育液**，每个样本50 μ l。涡旋混匀后冰浴**预冷**待用。如果有多个样品，配制 (N+1) $\times$ 50 μ l即可。

Component	Volume
Cell Wash Buffer	47.8 μ l
Protease Inhibitor	0.5 μ l
Ab Enhancer	1 μ l
Binding Enhancer	0.5 μ l
500 mM EDTA	0.2 μ l
Total Volume	50 μ l

(2) 将孵育好的ConA Magnetic Beads-细胞结合体轻柔点甩离心后置于磁力架上静置2分钟，待液体澄清后小心弃上清。用50 μ l一抗孵育液稀释一抗*后（一抗的稀释比例请严格按照抗体说明书的推荐比例，一般为1:50或1:100），重悬ConA Magnetic Beads-细胞结合体，轻弹管壁混匀，**室温旋转孵育1小时****。

*选用已经验证过的适用于ChIP或CUT&Tag实验的抗体，如无对应级别的抗体时，可选用IP级别的抗体，但需进一步摸索该抗体的最佳用量。**一抗请勿反复冻融**，反复冻融10次以上会严重影响建库结果。

**此步骤也可以替换成4℃旋转孵育过夜。

二抗孵育：

(3) 配制**二抗孵育液**，每个样本500 μ l。请现配现用。

Component	Volume
Cell Wash Buffer	490 μ l
Protease Inhibitor	5 μ l
Binding Enhancer	5 μ l
Total Volume	500 μ l



(4) 对每一份样品，用100 μ l二抗孵育液稀释二抗*，二抗的终浓度为10 μ g/ml。

*请选用无修饰、无标记且与Protein A/G亲和力高的二抗。推荐使用本公司的Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HS001) 和Goat Anti-Mouse IgG H&L (HS002)。

(5) 将孵育完一抗的离心管轻柔点甩离心后，置于磁力架上静置2分钟，待液体澄清后小心弃上清。每管中加入100 μ l稀释好的二抗溶液重悬ConA Magnetic Beads-细胞结合体，轻弹管壁混匀，室温旋转孵育1小时。

(6) 将孵育完二抗的离心管轻柔点甩离心后置于磁力架上2分钟后，待溶液澄清后小心的弃上清，加入150 μ l二抗孵育液，轻弹管壁混匀后，室温静置5分钟。轻柔点甩离心后，置于磁力架上2分钟，待液体澄清后小心弃上清。

(7) 再次洗涤：加入150 μ l二抗孵育液，轻弹管壁混匀后，室温静置5分钟。

转座复合体的结合：

(8) 提前配制以下转座反应液，每个样本500 μ l。

Component	Volume
1 $\times$ Pro-Wash Buffer	494 μ l
Protease Inhibitor	5 μ l
Binding Enhancer	1 μ l
Total volume	500 μ l

(9) 轻柔点甩离心后，将离心管置于磁力架上2分钟，待液体澄清后小心弃上清。每管加入99 μ l 转座反应液和1 μ l pAG-Tn5，重悬ConA Magnetic Beads-细胞结合体，小心轻弹管壁混匀后，室温旋转孵育1小时。

(10) 将孵育完pAG-Tn5的离心管轻柔点甩离心后置于磁力架上2分钟，待溶液澄清后小心弃上清，加入150 μ l 转座反应液，轻弹管壁混匀后，室温静置5分钟。轻柔点甩离心后，置于磁力架上2分钟，待液体澄清后小心弃上清。

(11) 再次洗涤：加入150 μ l 转座反应液，轻弹管壁混匀后，室温静置5分钟。

DNA转座与终止

(12) 将步骤(11)的离心管轻柔点甩后置于磁力架上2分钟，待溶液澄清后小心弃上清，每管加入50 μ l Tagmentation Buffer重悬ConA Magnetic Beads-细胞结合体，轻弹管壁混匀，37°C振荡孵育1小时。

*可以用PCR仪进行此步操作，在轻弹PCR管壁后，轻柔点甩一下再上机。

(13) 将反应完的离心管轻柔点甩离心后，先使用移液器吹吸将磁珠混匀，再往各管加入1.5 μ l 500 mM EDTA和0.5 μ l Lysis Enhancer，轻柔的涡旋混匀*；然后加入0.5 μ l Proteinase K涡旋混匀后，将离心管于70°C孵育10分钟终止转座反应。终止反应结束立即进行DNA提取。

*如需定量，可在加入EDTA与Lysis Enhancer之后，加入Spike-in DNA (KS201)，再一起混匀。Spike-in DNA的推荐添加量为1 pg/100,000细胞，根据实际细胞投入量将DNA Spike-in梯度稀释后添加。

3. DNA提取

提前将CUT&Tag DNA Clean Beads从4°C冰箱取出，于室温平衡30分钟。

(1) 往上述各离心管中加入120 μ l (2.4 $\times$) CUT&Tag DNA Clean Beads，涡旋混匀，室温静置5分钟。

(2) 将离心管置于磁力架上2分钟，待溶液澄清，小心弃上清。加入200 μ l新鲜配制的80%乙醇，室温静置30秒后，小心移除上清。



(3) 保持离心管在磁力架上，重新加入200 μ l新鲜配制的80%乙醇，室温静置30秒后，小心移除上清。点甩离心后将离心管置于磁力架上待磁珠与残留乙醇分离，使用10 μ l枪头小心的将残留液体彻底吸干，勿吸到磁珠。

(4) 室温晾干磁珠2~3分钟后*，取出离心管并加入22 μ l Nuclease-free Water，涡旋混匀并室温静置3分钟后置于磁力架上，小心吸取20 μ l上清至新的PCR管中，此即为Tag DNA**。

*磁珠不可干燥过度。

**Tag DNA样品可于-20°C保存或是用来进行如下扩增反应，避免反复冻融。

4、文库扩增及片段筛选

(1) 冰上配制如下扩增体系。

Component	Volume
Tag DNA	20 μ l
N5XX Primer*	2.5 μ l
N7XX Primer*	2.5 μ l
2×CUT&Tag Library Amplification Mix	25 μ l
Total volume	50 μ l

*N5XX/N7XX Primer属于自备试剂盒KI101中的组分。

(2) 移液枪吹吸混匀或涡旋混匀，最后点甩离心。

(3) PCR扩增程序如下。

58°C 5 min
72°C 5 min
98°C 30 sec
98°C 10 sec
60°C 10 sec } N cycles*
72°C 1 min
4°C Hold

*根据不同起始量细胞，推荐如下不同的扩增循环数。

Input Cell	PCR Cycles
100,000	9-11
50,000	10-12
10,000	12-14
1,000	15-17
500	16-18
100	17-19
50	19-21
10	23-25



- (4) 提前从2-8℃取出CUT&Tag DNA Clean Beads，室温静置30分钟后备用。
- (5) 往PCR产物中加入65 μ l (1.3 $\times$) CUT&Tag DNA Clean Beads，涡旋振荡混匀后，室温静置5分钟。将PCR管置于磁力架上，待液体澄清后小心弃上清。
- (6) 保持PCR管于磁力架上，加入200 μ l新鲜配制的80%乙醇，室温静置30秒后，小心移除上清。
- (7) 保持PCR管在磁力架上，重新加入200 μ l新鲜配制的80%乙醇，室温静置30秒后，小心移除上清。点甩离心后将PCR管置于磁力架上待磁珠与残留乙醇分离，使用10 μ l枪头小心的将残留液体彻底吸干，勿吸到磁珠。
- (8) 室温晾干磁珠2~3分钟后*，取出PCR管并加入22 μ l Nuclease-free Water，涡旋混匀并室温静置3分钟后将管子置于磁力架上，小心吸取20 μ l上清至新的离心管中，此即为Library DNA**。

*磁珠不可干燥过度。

**Library DNA样品可于-20℃保存或是直接送测序鉴定，避免反复冻融。

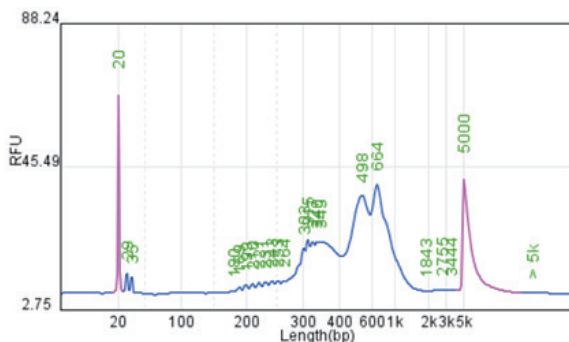
附录

1、细胞核提取步骤

- 1.1 收集所需数量的新鲜细胞于1.5 ml离心管中，室温离心，600 g，3 分钟，然后小心弃去上清。
- 1.2 加入500 μ l PBS重悬细胞，室温离心，600 g，3 分钟，然后小心弃去上清。
- 1.3 加入500 μ l预冷的Nuclear Extraction Buffer，轻柔混匀后冰浴10 分钟。
- 1.4 于4℃离心，1300 g，4分钟，倒掉上清，并在纸巾上倒扣几秒钟。
- 1.5 加入500 μ l PBS重悬细胞核，4℃离心，1300 g，4 分钟，倒掉上清，并在纸巾上倒扣几秒钟。
- 1.6 加入90 μ l配制好的细胞洗涤液重悬细胞核，并进入“1、细胞收集与磁珠结合”的步骤（8）。

2、文库峰型示意图

以293T细胞为例，使用H3K4me3抗体，扩增13个循环的CUT&Tag文库峰型如下。



图一：1万个293T细胞所得文库Qseq峰图

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V2.0-202406

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

