

CUT&Tag-IT™ Assay Kit 说明书

目录号 53160 (16 次)
版本 B2

Active Motif 中国
地址：上海市闵行区万康路 290 号
电话：(86)-21-20926090

目录

概览	3
试剂盒组成及存储条件	4
CUT&Tag-IT™ Assay Kit 试剂	4
额外所需材料	5
CUT&Tag 检测试剂盒实验方法	6
Section A. 准备新鲜细胞 (30 分钟)	6
Section B. ConA Beads 与细胞结合 (30 分钟)	6
Section C. 结合一抗 (2 小时至过夜)	6
Section D. 结合二抗 (60 分钟)	7
Section E. 结合 CUT&Tag-IT™ Assembled pA-Tn5 转座子 (60 分钟)	7
Section F. DNA 片段化 (60 分钟)	8
Section G. DNA 提取 (60 分钟)	8
Section H. PCR 扩增	9
Index 引物和测序信息	11
参考文献 :	11

本手册中的信息如有更改，恕不另行通知，也不构成 Active Motif, Inc. 的承诺。本手册按“原样”提供，无任何明示或暗示的担保。本手册中的信息可随时更改或更新。

未经 Active Motif, Inc. 事先书面同意，不得复制、转让、复制、披露或复制本文件的全部或部分内容。本文件为专有信息，受美国版权法和国际条约的保护。

本文件的制造商为 Active Motif, Inc.

豚鼠抗兔二级抗体是根据 Rockland 的许可证提供的
© 2016 Active Motif, Inc., 地址 :1914 Palomar Oaks Way, Suite 150 ;Carlsbad, CA 92008。
版权所有。

此处引用的所有商标、商号、服务标志或徽标均属于其各自的公司。

概览

CUT&Tag 是一种研究组蛋白修饰和一些转录因子的基因组定位的方法，揭示蛋白和 DNA 之间的相互作用，也能识别感兴趣的蛋白的 DNA 结合位点。

MNase-Seq 或 ATAC-Seq 靶向开放染色质，因此依赖于染色质的可及性。CUT&Tag 不同于这两种方法，利用基于抗体的酶靶向特定的组蛋白修饰或蛋白，以此来揭示这些感兴趣的位点或蛋白的染色质结合信息。

CUT&Tag 基于与 ChIP-Seq 相同的原理，对实验方法做出了一些有利的修改。不同于 ChIP-Seq 实验方法中的染色质固定，超声打断及免疫沉淀步骤，在 CUT&Tag 中，新鲜的未固定的细胞与刀豆蛋白 A 磁珠结合，抗体孵育是在细胞自生状态下进行的。结合抗体后，染色质被剪切，NGS 建库所用的接头已经预先装载于 pA-Tn5 转座酶上，一步就能完成建库反应。

CUT&Tag-IT™ 检测试剂盒每个反应可以使用 50,000 至 500,000 个细胞。该试剂盒提供了优化好的试剂和方案，可产生 16 种独特的 illumina®平台测序文库。

产品优势：

- 单次实验最少可使用 5,000 个细胞
- 测序背景低，测序深度也可降低
- 没有甲醛交联造成的假阳性结果

产品	规格	目录号
CUT&Tag-IT™ Assay Kit	16 次反应	53160

试剂盒组成及存储条件

试剂盒内包含足够 16 个 CUT&Tag 反应的试剂，其中不同的试剂有不同的储存条件，请参照下表进行存储。从收到之日起所有试剂保证 6 个月内稳定。

CUT&Tag-IT™ Assay Kit 试剂

试剂	数量	存储条件
5% Digitonin	610 µL	-20°C
Concanavalin A Beads	320 µL	4°C
CUT&Tag-IT™ Assembled pA-Tn5 Transposomes	16 µL	-20°C
Tagmentation Buffer	2 mL	-20°C
1X Binding Buffer	55 mL	4°C
1X Wash Buffer	40 mL	4°C
Dig-Wash Buffer	50 mL	4°C
Antibody Buffer	800 µL	4°C
Dig-300 Buffer	50 mL	4°C
Guinea Pig Anti-Rabbit Antibody	16 µL	-20°C
Protease Inhibitor Cocktail	1.42 mL	-20°C
0.5M EDTA	68 µL	RT
10% SDS	20 µL	RT
10 µg/µL Proteinase K	18 µL	-20°C
DNA Purification Columns	16 columns	RT
DNA Purification Binding Buffer	10 mL	RT
DNA Purification Wash Buffer	12 mL	RT
DNA Purification Elution Buffer	5 mL	RT
3M Sodium Acetate	128 µL	RT
10 mM dNTPs	16 µL	-20°C
5 X Q5 Buffer	160 µL	-20°C
Q5 High Fidelity DNA Polymerase (2U/µL)	8 µL	-20°C
i5 Indexed Primer 1	10 µL	-20°C
i5 Indexed Primer 2	10 µL	-20°C
i5 Indexed Primer 3	10 µL	-20°C
i5 Indexed Primer 4	10 µL	-20°C
i7 Indexed Primer 1	10 µL	-20°C
i7 Indexed Primer 2	10 µL	-20°C
i7 Indexed Primer 3	10 µL	-20°C
i7 Indexed Primer 4	10 µL	-20°C
SPRI Beads	880 µL	4°C

额外所需材料

- 无核酸纯水
- 100%乙醇
- 80%乙醇
- 1.5/2 ml EP 管用磁力架
- 200 μ L 八连排 PCR 管用磁力架
- 旋转摇床
- 涡旋仪
- Thermocycler
- Illumina®NextSeq®测序仪
- 1.5mL 低吸附离心管
- 2mL 低吸附离心管
- 八连排适用的离心机或者 0.2mL 和 1.5mL 离心管适用的离心机
- 多通道移液器 (20-200 μ L)
- 滤芯吸头

CUT&Tag 检测试剂盒实验方法

本试剂盒适用于 50,000 至 500,000 细胞

注意：此方法适用于非贴壁细胞。如果要使用贴壁细胞，避免使用胰蛋白酶或细胞消化液，防止细胞膜蛋白被消化。细胞膜蛋白是实验过程中细胞与刀豆蛋白 A 磁珠链接的关键。请使用无酶解离的方法收集贴壁细胞。

注:实验过程请使用低吸附的离心管和低吸附枪头

Section A. 准备新鲜细胞 (30 分钟)

注意：在步骤 3 使用 1x Wash Buffer 之前，必须在 1x Wash Buffer 中添加 Protease Inhibitor Cocktail。每 1 mL 1x Wash Buffer 中都要添加 10 μ L Protease Inhibitor Cocktail。每个样品一共需要用 2.5 mL。置于冰上。一旦加入 Protease Inhibitor Cocktail，Wash Buffer 在 4°C 只能存放一周。

1. 室温下收集细胞并计数。将足够量的细胞收集于 1.5 mL 离心管中。
2. 室温 600 x g 离心 3 分钟，弃上清。
3. 室温下用 1 mL 1 x Wash buffer 重悬，再次 600 x g 离心 3 分钟，弃上清。
4. 用 1.5 mL 1 x Wash buffer 重悬后，将细胞转移至 2 mL 离心管中。置于冰上等待后续使用。

Section B. ConA Beads 与细胞结合 (30 分钟)

5. 轻柔重悬足够量的 ConA Beads 悬浊液（每个样品准备 20 μ L，每 20 μ L beads 可结合 500,000 个细胞，之后的实验步骤均假设一个反应使用 500,000 个细胞）。
6. 在 2 mL 离心管中将 20 μ L ConA bead 悬浊液加入 1.6 mL 1 \times Binding buffer 中并吹打混匀。静置于磁力架上，待液体澄清后，弃上清（30 秒-2 分钟）。
7. 完全弃上清，将离心管从磁力架上移出。加入 1.5 mL 1 \times Binding buffer，吹打混匀后快速离心。
8. 将离心管置于磁力架上，待液体澄清后，弃上清（30 秒-2 分钟）。20 μ L 1 \times Binding Buffer 重悬（每 500,000 细胞使用 20 μ L），室温放置，等待细胞准备好后使用。
9. 将步骤 8 的 ConA Bead 悬浊液缓缓加入装有细胞的离心管中，颠倒离心管以混匀。将离心管置于摇床室温孵育 10 分钟。

Section C. 结合一抗 (2 小时或过夜)

注意：在步骤 11 使用 Antibody buffer 之前，必须添加 Protease Inhibitor Cocktail 和 Digitonin。每 1 mL buffer 加入 10 μ L Protease Inhibitor Cocktail 和 10 μ L 5% Digitonin，置于冰上。加

入 Protease Inhibitor Cocktail 和 Digitonin 后 Antibody buffer 在 4°C 最多保存 2 天。每个反应需要 50 μ L 添加 0.5 μ L Protease Inhibitor Cocktail 和 0.5 μ L 5% Digitonin 的 Antibody buffer。

10. 快速离心 ($<100 \times g$) 后, 将离心管置于磁力架上, 待液体澄清后, 弃上清 (30 秒-2 分钟)。
11. 50 μ L 预冷的 Antibody Buffer 重悬细胞, 轻柔涡旋。置于冰上。
12. 每个样品中加入 1 μ L (或者至少 1 μ g) 兔一抗, 轻柔涡旋或用枪头吹打混匀。
注意: 添加兔一抗的时候, 我们推荐使用 1:50-1:100 的稀释比例或者使用制造商推荐的应用于免疫荧光的稀释比例。可以使用 H3K27me3 (Cat.No.39157) 作为阳性对照。
13. 4°C 孵育 2 小时, 请保持液体始终在离心管的底部或壁上。

Section D. 结合二抗 (60 分钟)

注意: 在步骤 15 使用 Dig-Wash Buffer 之前, 必须添加 Protease Inhibitor Cocktail 和 Digitonin。每 1 mL buffer 加入 10 μ L Protease Inhibitor Cocktail 和 10 μ L 5% Digitonin。每个反应需要 3.1 mL buffer, 置于冰上。加入 Protease Inhibitor Cocktail 和 Digitonin 后 Dig-Wash Buffer 在 4°C 最多保存 2 天。

14. 快速离心 ($<100 \times g$) 后, 将离心管置于磁力架上, 待液体澄清后, 弃上清 (30 秒-2 分钟)。
15. 将豚鼠抗兔二抗以 1:100 稀释于 Dig-Wash Buffer 中。每个反应需要使用 100 μ L 稀释液。将 100 μ L 稀释液加入每个样品中, 并轻柔涡旋。
16. 将试管放置在水平摇床上, 室温孵育 60 分钟。
17. 快速离心后, 将离心管置于磁力架上, 待液体澄清后, 弃上清 (30 秒-2 分钟)。
18. 每个离心管中加入 1 mL Dig-Wash Buffer。轻柔涡旋或用枪头轻轻吹散聚成团的 beads。
19. 重复步骤 17-18, 一共需要洗三次。

Section E. 结合 CUT&Tag-IT™ Assembled pA-Tn5 转座子 (60 分钟)

注意: 在步骤 20 使用 Dig-300 Buffer 之前, 必须添加 Protease Inhibitor Cocktail 和 Digitonin。每 1 mL buffer 加入 10 μ L Protease Inhibitor Cocktail 和 2 μ L 5% Digitonin。每个反应需要 3.1 mL buffer, 置于冰上。加入 Protease Inhibitor Cocktail 和 Digitonin 后 Dig-300 Buffer 在 4°C 最多保存 2 天。

20. 将 CUT&Tag-IT™ Assembled pA-Tn5 转座子以 1:100 稀释于 Dig-300 Buffer 中。例如, 将 1 μ L CUT&Tag-IT™ Assembled pA-Tn5 转座子添加于 100 μ L Dig-300 Buffer 可应用

- 于 1 个反应。
21. 快速离心 ($<100 \times g$) 后, 将离心管置于磁力架上, 待液体澄清后, 弃上清 (30 秒-2 分钟)。
 22. 每个离心管中加入 100 μL 步骤 20 稀释的 CUT&Tag-IT™ Assembled pA-Tn5 转座子, 枪头轻柔吹打混匀。
 23. 置于摇床, 室温下反应 60 分钟。
 24. 快速离心 ($<100 \times g$) 后, 将离心管置于磁力架上, 待液体澄清后, 弃上清 (30 秒-2 分钟)。
 25. 加入 1 mL Dig-300 Buffer, 轻柔涡旋或枪头轻轻吹散聚成团的 beads。
 26. 重复步骤 24-25, 一共需要洗三次。

Section F. DNA 片段化 (60 分钟)

注意: 在使用 Tagmentation Buffer 之前, 必须添加 Protease Inhibitor Cocktail 和 Digitonin。每 1 mL buffer 加入 10 μL Protease Inhibitor Cocktail 和 2 μL 5% Digitonin。

27. 快速离心 ($<100 \times g$) 后, 将离心管置于磁力架上, 待液体澄清后, 弃上清 (30 秒-2 分钟)。
28. 每个离心管中加入 125 μL Tagmentation Buffer, 轻柔涡旋或用枪头吹打混匀。
29. 37°C 孵育 60 分钟。

Section G. DNA 提取 (60 分钟)

30. 将下列试剂添加进每个离心管中以停止片段化反应:

- 4.2 μL 0.5M EDTA
- 1.25 μL 10% SDS
- 1.1 μL Proteinase K (10mg/mL)

31. 最大速涡旋 2 秒, 55°C 孵育 60 分钟以消化。

注意: 由于 DNA 的粘弹性, 在与蛋白酶 K 和 SDS 的孵育过程中, beads 通常会聚成一团。但是对于大量的全基因组表位来说, 基因组的大规模片段化通常会导致结块减少, beads 悬浮于 buffer 中, 相较于阴性对照而言液体呈褐色。

32. 快速离心 ($<100 \times g$) 后, 将离心管置于磁力架上, 待液体澄清后 (30 秒-2 分钟), 将上清转移至新的 1.5mL 离心管中。
33. 每个离心管中加入 625 μL DNA Purification Binding Buffer, 并用枪头吹打混匀。如果颜色指示变为紫色或者橙色, 请加入 8 μL 3M 醋酸钠。
34. 将对应标记每个样本的 DNA 纯化柱放入收集管中。
35. 将样品转移至对应的标记好的 DNA 纯化柱中, 17,000 $\times g$ (约 14,000 rpm) 室温离心 1 分钟。
36. 弃废液, 将纯化柱放回收集管中。

注意：在第一次使用之前需要在 DNA Purification Wash Buffer 中加入无水乙醇，使终浓度为 80%（向装有 DNA Purification Wash Buffer 的瓶中添加 40mL 无水乙醇）

37. 纯化柱中加入 750 μ L DNA Purification Wash Buffer（添加好无水乙醇的），17,000 x g（约 14,000 rpm）室温离心 1 分钟。
38. 弃废液，将纯化柱放回收集管中。17,000 x g 空离 2 分钟以弃尽 DNA Purification Wash Buffer。
39. 将 DNA 纯化柱转移至新的离心管中，在柱中心加入 35 μ L DNA Purification Elution Buffer，室温孵育 1 分钟。
40. 17,000 x g（约 14,000 rpm）室温离心 1 分钟，移除纯化柱。纯化后的 DNA 可以保存于 -20°C 或者直接进行下一步 PCR 扩增。

Section H. PCR 扩增

41. 请按照下面的表格来进行 PCR 反应。如果建库样品较多，请保证每个样品的 i5 和 i7 端 index 都是唯一的。
 PCR 反应中每个样品都需要 1 个 i7 端 index 引物和 i5 端 index 引物。我们的试剂盒中提供了 4 x 4=16 种不同组合的 i7/i5 引物，可以用于 16 个样品。这些引物都是基于 Illumina 的测序平台接头。

PCR 反应前：

使用 1 个 i7 端 index 引物

i7 Indexed Primer 1 = i7 N701
 i7 Indexed Primer 2 = i7 N702
 i7 Indexed Primer 3 = i7 N703
 i7 Indexed Primer 4 = i7 N704

使用 1 个 i5 端 index 引物

i5 Indexed Primer 1 = i5 N501
 i5 Indexed Primer 2 = i5 N502
 i5 Indexed Primer 3 = i5 N503
 i5 Indexed Primer 4 = i5 N504

每个 CUT&Tag 样品所需要的试剂	体积 (50 μ L)
片段化的 DNA	30 μ L
i7 端引物	2.5 μ L
i5 端引物	2.5 μ L
dNTPs (10 mM)	1.0 μ L
5x Q5 Reaction buffer	10 μ L
灭菌蒸馏水	3.5 μ L
Q5 Polymerase	0.5 μ L

42. 在 PCR 仪中进行如下反应：

72 °C	5 min
98 °C	30 sec

98 °C	10 sec	循环 13 次
63 °C	10 sec	
72 °C	1 min	
10 °C	Hold	

43. 使用 SPRI 磁珠进行回收, 每个样品需要 55 μ L SPRI 磁珠 (1.1 倍体积), 最后使用 20 μ L DNA Purification Elution Buffer 洗脱, 每个样品还需要准备 400 μ L 80%新鲜配置的乙醇。
- 每个样品加入 55 μ L SPRI 磁珠 (提前放置于室温)。
 - 涡旋混匀, 室温下孵育 5 分钟。
 - 将样品管置于磁力架上分离磁珠和液体。
 - 溶液澄清后, 小心移除上清。
 - 保持样品管始终在磁力架上, 加入 180 μ L 80%乙醇进行漂洗。
 - 室温孵育 30 秒。
 - 小心移除上清。
 - 重复漂洗步骤, 总计漂洗 2 次。
 - 将样品管置于室温干燥 (2-5 分钟)。
 - 干燥后, 将样品管取下, 加入 20 μ L DNA Purification Elution Buffer 洗脱。
 - 盖上管盖后涡旋混匀。
 - 室温下孵育 5 分钟。
 - 将样品管置于磁力架上分离磁珠和液体。
 - 溶液澄清后, 小心吸取上清转移至新的 EP 管中。
44. 回收完的 DNA 可用于定量或测序。

Index 引物和测序信息

Index 1 (i7) Primers

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT[i7]GTCTCGTGGGCTCGG

Index 2 (i5) Primers

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[i5]TCGTCCGGCAGCGTC

i7 Index	i7 Sequence	测序信息
N701	TCGCCTTA	TAAGGCGA
N702	CTAGTACG	CGTACTAG
N703	TTCTGCCT	AGGCAGAA
N704	GCTCAGGA	TCCTGAGC

i5 Index	i5 Sequence	测序信息 (NovaSeq, MiSeq, HiSeq2000/2500)
N501	TAGATCGC	TAGATCGC
N502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
N503	TATCCTCT	TATCCTCT
N504	AGAGTAGA	AGAGTAGA

i5 Index	i5 Sequence	测序信息 (NovaSeq v1.5 Reagent Kits, iSeq, MiniSeq, NextSeq, HiSeq3000/4000)
N501	TAGATCGC	GCGATCTA
N502	CTCTCTAT	ATAGAGAG
N503	TATCCTCT	AGAGGATA
N504	AGAGTAGA	TCTACTCT

Read1 和 Read2 测序接头序列：CTGTCTCTTATACACATCT。

注意：推荐测序 2-10 兆 reads，根据我们的质控测试，10 兆 reads 可产生 20,000 peak。

参考文献：

1. Kaya-Okur, H.S. et al. (2019) Nature comm. 10:1930 (1).

常见问题指南

问题	建议
文库检测峰值低	在 CUT&Tag 实验中，这种情况比较常见，特别是研究转录因子的时候。几乎看不见的文库仍然可以很好的获得测序结果。库丰度的 qPCR 分析（如 KAPA Library Quantification）可以帮助测量库的量。如果你的实验阳性对照有效，这些低量的文库仍然值得测序。如果您的阳性对照不起作用，您可能在试验过程中丢失了细胞。如果是这种情况，请在 B 部分末尾对与珠子结合的细胞进行计数，以确保细胞不会丢失。