pAG-Tn5 Transposase for CUT&Tag

产品目录号：RK20550

产品组分

组分名称	组分编号	规格-1 20 μg	规格-2 100 μg
pAG-Tn5 Transposase (2 mg/mL)	RM21313	10 μL	50 μL
1X Tn5 Dilution Buffer	RM20188	1 mL	2 × 1 mL
Assemble Buffer	RM20187	200 μL	1 mL
5X Tagment Buffer	RM20250	200 μL	1 mL
Termination Buffer	RM20251	200 μL	1 mL
Annealing Buffer	RM20821	200 μL	1 mL

产品说明

pAG-Tn5 Transposase for CUT&Tag 是将 Protein A/G 与一种高活性、突变形式的 Tn5 转座酶进行融合，形成同时具备 Tn5 转座酶和 Protein A/G 活性功能的新型融合酶。pAG-Tn5 Transposase 单体分子量约 75 kD，可识别 Tn5 转座子酶序列的内端（inside end，IE）、外端（outside end，OE）和嵌合端（mosaic end，ME）序列，但识别 ME 序列片段的转座效率最高。

本产品融合的是突变形式的 Tn5 转座酶，识别 ME 序列，在体外转座效率比野生型高 1000 倍。融合的 Protein A/G 主要通过与免疫球蛋白（Ig）的 Fc 区相互作用，可与大多数哺乳动物的 IgG 结合，可适用于蛋白质-基因组互作研究的 CUT&Tag 技术。

产品来源

pAG-Tn5 Transposase 基因在大肠杆菌中重组表达并纯化获得。

保存温度

-20℃

应用

二代测序建库，ATAC-seq，CUT&Tag

分子量

75 kD

浓度

pAG-Tn5 Transposase 质量浓度 2 mg/mL，摩尔浓度约 26 pmol/μL。

反应条件

在 1X Tagment Buffer 反应内，37°C 或 55°C*反应（针对不同应用使用不同反应温度）。

***注：不同应用推荐的反应温度不同，体外实验推荐 55°C反应，体内实验推荐 37°C反应。**

终止反应

在 Termination Buffer 中，转座反应可被终止。

操作说明

1. 接头制备

1.1. 合成适配 illumina 测序平台的 Tn5 接头序列：

MErev: 5′-phos-CTGTCTCTTATACACATCT-3′

ME-A: 5′-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3′

ME-B: 5′-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3′

1.2. 使用 1X TE Buffer（10 mM Tris-HCl，1mM EDTA，pH 8.0）分别将引物稀释至 100 μM。

1.3. 分别配制如下反应体系：

MixA	10 μL	MixB	10 μL
Annealing Buffer	2 μL	Annealing Buffer	2 μL
ME-A(100 μM)*	4 μL	ME-B(100 μM)*	4 μL
MErev(100 μM)	4 μL	MErev(100 μM)	4 μL

***注：可根据试剂使用更改反应体系，设计 ME-A 和 ME-B 的接头序列。**

1.4. 将 MixA 和 MixB 涡旋震荡充分混匀，短时离心收集溶液于 PCR 管底，按照如下反应程序：

温度	时间	变温速度	循环数
95℃	2 min	1℃/s	1
22℃	5 min	0.1℃/s	1
4℃	hold	1℃/s	1

1.5. 反应结束后，将 MixA 和 MixB 等体积混合均匀，得到 Adapter mix（40 μM），-30℃ ~ -15℃保存。

2. 转座体制备

2.1. 配制如下反应体系（以 5 uM 转座体组装为例，可根据实际投入量进行放大或缩小）。

试剂名称	30 μL
Adapter mix (40 μM)	6 μL
pAG-Tn5 Transposase (2 mg/mL)*	5.77 μL
Assemble Buffer	10.5 μL
ddH_2O	Up to 30 μL

***注：pAG-Tn5 蛋白浓度约为 26 uM；可以根据实验需求调整蛋白与接头的组装比例。**

这个转座体是高浓度转座体，使用时可根据 gDNA 的投入量，将转座体进行稀释使用。

2.2. 移液枪吸打混匀，置于金属浴或 PCR 仪中，35℃组装 2 hr，至于冰上，该组装产物可用于后续 DNA 片段化反应。

2.3. 若需要-20℃长期保存，可以将组装产物中的甘油终浓度调整到 50%，其中 Assemble Buffer 甘油浓度 20%，Tn5 Transposase 储存在 50%甘油 buffer 中。

3. 转座子活性检测

3.1. DNA 片段化

3.1.1. 在无菌 PCR 管中准备如下 DNA 片段化体系（可以根据需要等比例放大/缩小打断体系）：

试剂名称	加入量
5X Tagment Buffer	4 μL
gDNA *	X μL
Transposome/assembly product *	1 μL
ddH_2O	Up to 20 μL

***注：组装产物的投入量需要根据模板投入量与转座复合体组装时的添加量进行综合考虑添加。若后期结果出现打断片段偏大则表明模板过多转座复合体投入过少，反之亦然，需要根据实验打断的片段大小需要来进行滴定调整。**

3.1.2. 使用移液器上下吸打，充分混匀。

3.1.3. 将 PCR 管放到 PCR 仪上（热盖温度 75℃），进行如下的反应程序。

温度	时间	循环数
55℃	5-15 min *	1
12℃	hold	1

*注：可以根据实验需要，适当延长反应时间，确保充分反应。

3.2. 终止反应

3.2.1. 片段化反应结束后，立即加入 2 μL Termination Buffer (RM20251)，涡旋混匀或使用移液器上下吸打混匀。

3.2.2. 室温孵育 5 min，避免片段大小有波动。

注：此步骤是终止打断反应，使转座酶和 DNA 片段相互分离；若不进行此步骤会导致文库产量降低。

4. 片段化产物扩增

4.1. 在 PCR 管中配制以下组分：

试剂名称	加入量
片段化 DNA	22 μL
2X PCR Mix*	23 μL
N5 Primer（10 μM）	2.5 μL
N7 Primer（10 μM）	2.5 μL
ddH_2O	Up to 50 μL

*注：2X PCR mix 需用非热启动的 Taq 酶，比如 ABclonal 的 RM20239，RM20242，RM20727。

4.2. 混匀，快速离心后放入 PCR 仪中开始循环程序（热盖 105℃）

步骤	温度	时间	循环数
补齐 Gap	**72℃**	**3 min***	**1**
预变性	98℃	30 s	1
变性	98℃	15 s	
退火	60℃	30 s	N**
延伸	72℃	1 min	
终延伸	72℃	5 min	1
Hold	4-12℃	hold	1

*注：72℃孵育 3 min 为缺口修复过程，此步骤不可省略；

**注：扩增循环数根据起始 DNA 投入量调整。1 ng--13 个循环；5 ng--11 个循环，50 ng--7 个循环。

建库优化策略

1. 片段化反应结果不理想（如片段较大/较小），可以在转座体组装步骤调整组装接头和 Tn5 转座酶的用量，或者在片段化反应步骤调整转座体的用量。
2. 建库片段偏大：提高组装酶与接头用量。
3. 建库片段偏小：减少组装产物加入量。