CUT&Tag Assay Kit (pAG-Tn5) V3 for Illumina

RK21513

使用说明书

Version:N19I08V1.0

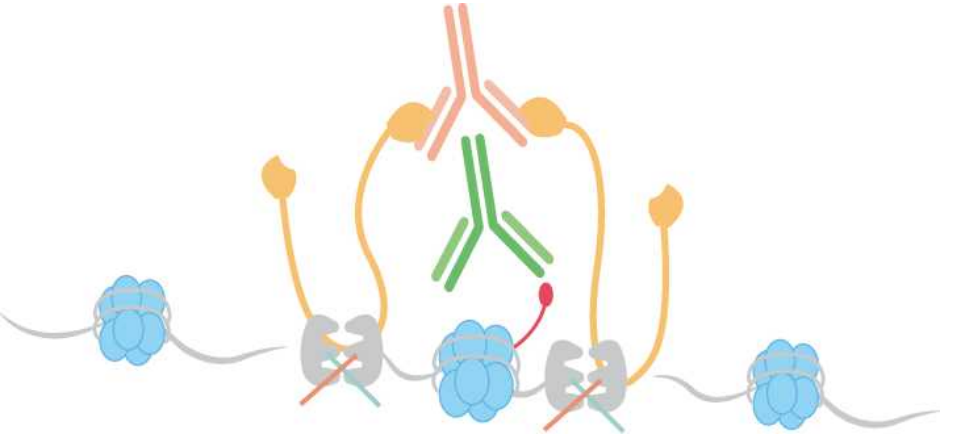
目录

1.产品概述 1
2.产品组分 2
3.保存及运输条件 3
4.使用条件 3
5.其他自备材料 3
6.实验流程 4
7.操作注意事项 5
8.文库构建步骤 7
9.常见问题 12
10.附录 13

1. 产品概述

CUT&Tag Assay Kit (pAG-Tn5) V3 for Illumina（RK21513）是一款针对 Illumina 测序平台，用于研究 DNA-蛋白质互作的文库构建试剂盒。适用于哺乳动物细胞，组织或植物样品经特殊处理后也可用本试剂盒进行相关实验。

Cleavage Under Target & Tagmentation (CUT&Tag)是一种新兴的研究 DNA-蛋白质互作的方法，克服了传统 ChIP-Seq 技术的很多缺点，省时，操作简便，数据信噪比高，需要的细胞起始量低。本试剂盒使用与 Protein A/G 融合的 Tn5 转座酶，该融合蛋白能与抗体结合，并在目的靶标附近切割 DNA，从细胞中回收 DNA 后直接进行 PCR 扩增即可完成文库构建。试剂盒内组分均经过严格的质量控制，保证产品稳定性和可重复性。



基本原理：细胞被固定在刀豆蛋白磁珠（ConA 磁珠）表面，加入洋地黄皂苷（Digitonin）透化细胞膜，依次进行一抗、二抗、转座体的孵育，随后加入 Mg2+激活转座酶进行片段化反应，反应产物经过 DNA 提取、PCR 扩增完成二代测序文库的构建。对于人源细胞常规的组蛋白修饰，仅需 3-5 M reads 的测序量就能得到高分辨率的全基因组图谱。

CUT&Tag Assay Kit (pAG-Tn5) for Illumina 提供了简便快速的建库流程，一般在 1-2 天内即可完成正常建库，主要实验步骤包括：

1）预处理：分别处理 ConA Beads 和细胞，并将 ConA Beads 和细胞结合；

2）一抗孵育：将一抗加入细胞悬浮液中，一抗进入细胞，与目的蛋白结合，室温孵育 2 h 或者 4℃孵育过夜；

3）二抗孵育：将二抗加入细胞悬浮液中，二抗进入细胞，与一抗结合，室温孵育 1 h；

4）转座体孵育：将转座体加入细胞悬浮液中，转座体进入细胞，与二抗结合，室温孵育 1 h；

5）DNA 片段化及提取：将转座体激活，对目的蛋白附近的 DNA 进行打断，37℃孵育 1 h，用磁珠进行 DNA 提取，省时省力；

6）文库构建：提供了高保真、低偏向性、高产量的 PCR 反应液。

2. 产品组分

模块		试剂管名称与颜色	6 次	24 次
RK21513(2-1)	🟢	pAG-Tn5 Transposome	6 μL	24 μL
	⚪	10X CT Wash Buffer[2]	1.2 mL	4.8 mL
	🔵	Antibody Buffer[2]	300 μL	1.2 mL
	⚪	10X Dig-300 Buffer[2]	360 μL	1.44 mL
		B&W Buffer	6 mL	24 mL
	⚪	NE1 Buffer	1.5 mL × 2	12 mL
	⚪	MgCl2 (1 M)	50 μL	50 μL
	⚪	rHSA (100 mg/mL)	3 μL	12 μL
	🟤	5% Digitonin[3]	48 μL	192 μL
	🔴	Protease Inhibitor Cocktail (100X，EDTA-Free)	150 μL	600 μL
	🟡	10% SDS	30 μL	120 μL
	⚪	500 mM EDTA	50 μL	50 μL
	⚪	Spike-in DNA (5 ng/μL)	6 μL	24 μL
	🟣	Gloria Nova 2X PCR Mix for NGS	150 μL	600 μL
RK21513(2-2)	🟡	ConA Beads	60 μL	240 μL
	⚪	AFTMag NGS DNA Clean Beads	600 μL	1.2 mL × 2
	⚪	Streptavidin Beads	60 μL	240 μL
	⚪	1X ConA Bind Buffer	1.26 mL	5.04 mL

⚪ 代表管盖颜色。

备注:

1. 收到试剂盒后，RK21513(2-1)中的10% SDS室温保存，RK21513(2-1)中其他试剂放在-20℃保存；RK21513(2-2)放在4℃保存，不能放到-20℃。
2. 需在使用前按照提示添加其他组分。
3. Digitonin具有中度毒性，避免直接接触皮肤。
4. 本试剂盒提供的Buffer可满足大体系操作流程，具体操作变动见附录部分。
5. ConA Beads由于运输问题，有挂壁现象，需要瞬时离心后将试剂直立保存好。6000转/分钟，离心2~3秒。
6. 500 mM EDTA沉淀，在室温25度正常放置几分钟或者移液器轻轻吹打10次即可溶解，不影响试剂性能。
7. Protease Inhibitor Cocktail (100X，EDTA-Free)试剂4℃即凝固，使用前注意混匀。

3. 保存及运输条件

RK21513(2-1)长途运输：尽量采用干冰运输，或者干冰结合冰袋方式，在-40 ~ -20℃温度条件下进行运输。保存在-20~-10℃冰箱。

RK21513(2-2)长途运输：4℃方式运输。保存在 4 ~ 8℃。

4. 使用条件

产品操作：使用前，应保证所有试剂溶液完全融解，无沉淀或结晶，瞬时离心至管底部。试剂盒溶液组分可以在室温下进行充分融解，10% SDS 若不溶解，可以置于 37℃加热至完全溶解。使用时，将 5% Digitonin、Protease Inhibitor Cocktail (100X，EDTA-Free)、10% SDS、1X ConA Bind Buffer、10X CT Wash Buffer 和 10X Dig-300 Buffer 置于室温，其余试剂均需放置于冰上。产品组分使用完毕后，请尽快在-25 ~ -15℃条件下保存。磁珠应保存在 4 ~ 8℃。

5. 其他自备材料

5.1. 连接接头

DNA Index Kit：Dual DNA Adapter 96 Kit for One-step DNA Lib Prep (ABclonal, Cat: RK20290)

5.2. 文库质控

Qubit 荧光定量仪

ABQubit 双链 DNA 定量试剂盒 (ABclonal, Cat.NO. RK30140) 或 Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher SCIENTIFIC, Cat. Q32854)

Agilent 2100 bioanalyzer

Agilent high sensitivity DNA Chips (Agilent #5067-4626)

Agilent DNA 1000 chip (Agilent #5067-1504)

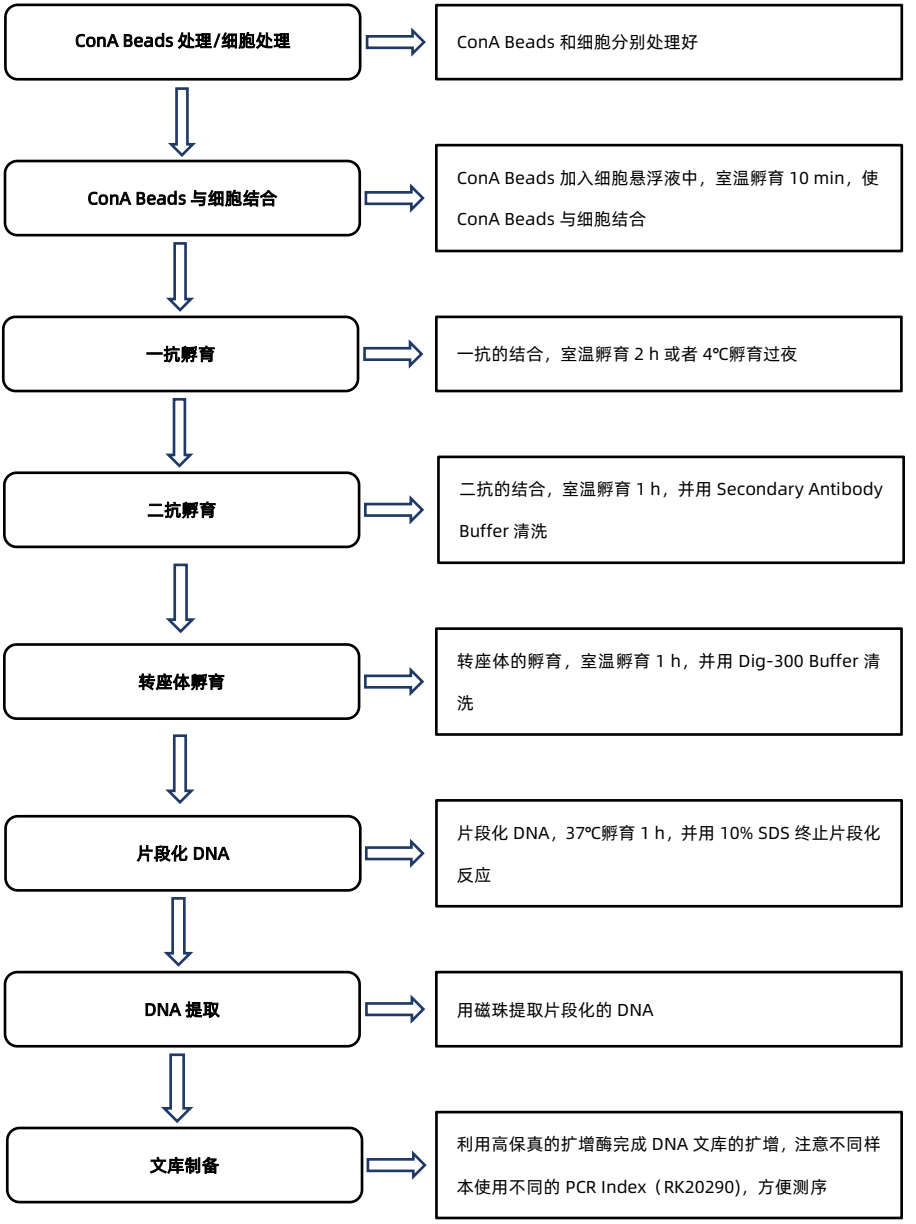
5.3. 其他试剂与耗材

一抗，二抗，80%乙醇（新鲜配制）、Nuclease-free Water；

其他耗材：低吸附 EP 管、移液吸头，低吸附薄壁 PCR 管（200 μL），磁力架，单道和多道移液器。

其他仪器：PCR 仪器、（漩涡）振荡器、桌面微型离心机、旋转混匀仪。

6. 实验流程


ConA Beads 处理/细胞处理
ConA Beads 和细胞分别处理好
ConA Beads 与细胞结合
ConA Beads 加入细胞悬浮液中，室温孵育 10 min，使 ConA Beads 与细胞结合
一抗孵育
一抗的结合，室温孵育 2 h 或者 4℃孵育过夜
二抗孵育
二抗的结合，室温孵育 1 h，并用 Secondary Antibody Buffer 清洗
转座体孵育
转座体的孵育，室温孵育 1 h，并用 Dig-300 Buffer 清洗
片段化 DNA
片段化 DNA，37℃孵育 1 h，并用 10% SDS 终止片段化反应
DNA 提取
用磁珠提取片段化的 DNA
文库制备
利用高保真的扩增酶完成 DNA 文库的扩增，注意不同样本使用不同的 PCR Index（RK20290），方便测序

7. 操作注意事项

7.1. 关于试剂使用

1) 请按照说明书，在合适的条件下保存试剂；**RK21513(2-2)中磁珠绝对不能误放到-20℃**。

2) 各试剂使用前，请确保试剂完全融化或溶解，并充分混匀。

3) pAG-Tn5 Transposome 取出后冰上操作，使用前建议吹打混匀或轻弹混匀，使用后尽快放回冰箱。

4) 配制试剂中若加入 Digitonin，建议现配现用，配制好的试剂可存放于 4℃不超过 2 天。

7.2. ConA Beads使用

1) ConA Beads 请保存于 2-8℃条件下，切勿保存于 0℃以下。

2) ConA Beads 使用前半小时放置于室温条件，平衡至室温，并充分混匀后使用。

3) ConA Beads 与细胞结合后请勿涡旋震荡或移液器剧烈吹打，需轻柔吸打，以免降低结合细胞效率。

4) 切勿将 ConA Beads 或 ConA Beads-细胞结合体长时间置于空气中，磁珠干结将影响后续实验。

5) 切勿将 ConA Beads 或 ConA Beads-细胞结合体高速离心或长时间置于磁力架上，避免造成磁珠聚集。

6) 孵育过程中出现部分磁珠聚集或沾壁是正常现象，只要保证 ConA Beads-细胞结合体处于溶液浸润范围内即可。

7.3. Streptavidin Beads使用

1) Streptavidin Beads 请保存于 2-8℃条件下，切勿保存于 0℃以下。

2) Streptavidin Beads 使用前半小时放置于室温条件，平衡至室温，并充分混匀后使用。

3) 使用 Streptavidin Beads 进行 DNA 提取时需要用 B&W Buffer 进行预处理。

4) 吸取上清时请勿吸取到磁珠。

5) 磁珠应避免过度干燥。

7.4. AFTMag NGS DNA Clean Beads使用

1) AFTMag NGS DNA Clean Beads 请保存于 2-8℃条件下，切勿保存于 0℃以下。

2) AFTMag NGS DNA Clean Beads 使用前半小时放置于室温条件，平衡至室温，并充分混匀后使用。

3) 吸取上清时请勿吸取到磁珠。

4) 磁珠洗涤使用的 80%乙醇现用现配，否则将影响回收效率。

5) 磁珠应避免过度干燥。

7.5. 关于样品处理

1) 若使用活细胞进行实验，对于常见的悬浮细胞系，离心后弃去上层培养基收集细胞即可用于实验。对于贴壁细胞，请勿使用胰蛋白酶进行消化，这样会损伤细胞与 ConA Beads 结合表位，可以使用胶原酶进行消化。

2) 若使用冻存细胞进行实验，可以参考附录 10.2 中冻存细胞复苏操作指导。

3) 若使用细胞核进行实验，本试剂盒中提供了一种适用于常规细胞的裂解液 NE1 Buffer，详见附录 10.3 中细胞提核操作指导；不同的样本类型需选择合适的细胞裂解液，具体的提核方法，可以参考相关领域文献资料。

4) 实验过程中对细胞的操作应尽量轻柔，以保持细胞活性。生长状态不佳或死亡的细胞中，蛋白质与 DNA 结合的状

态会发生改变，甚至蛋白质脱落，变成裸露的 DNA，转座子随机切割可能产生较强的背景噪音，影响实验结果。

7.6. 关于抗体的选择

关于一抗，建议选择 CUT&Tag 或者 CUT&RUN 级别抗体。

实验中建议设置阳性对照，用于判断整个实验过程中是否存在异常，阳性对照推荐使用样本中表达丰度较高的组蛋白；阴性对照推荐使用非特异性 IgG，阴性对照不是必须的，在测序分析中并未提供有价值的信息，可以根据实验需要，自行选择是否添加。

本试剂盒提供的是 Protein A/G 与转座酶的融合蛋白，对各种抗体的兼容性强，但务必选择与 Protein A/G 亲和力高且不带修饰的二抗。

另外，使用不同的抗体，所得峰形有差异，请客户参考文献或自己的经验。

7.7. 建库循环数

1) 在使用本试剂盒实验过程中，受到细胞种类、抗体种类的影响，循环数会发生改变。

2) 建库过程中，应尽量减少扩增循环数，达到上机要求即可，过多的循环数将导致偏好性增加、重复性增加等。

3) 寻找合适的循环数时，需要客户根据预实验结果进行增减。

7.8. 细胞投入量

本试剂盒测试细胞 K562，能兼容细胞数量 100 - 100,000 个。早期实验时建议投入 10,000 - 50,000 个细胞。

备注：不同种细胞及不同类抗体将影响试剂盒兼容细胞数量。

7.9. 文库质控

构建好的文库，可以通过浓度检测和片段分布情况来进行质量评估。

以 K562 细胞为例，使用中高丰度表达的组蛋白（如 H3K4me3 抗体，13 cycles）进行 CUT&Tag 实验

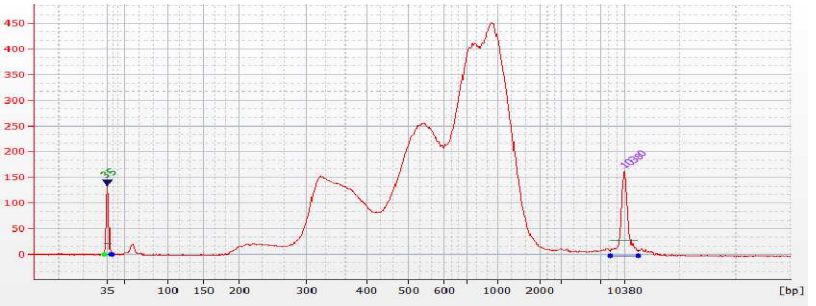


图 1. 10 万 K562 细胞所得文库 Agilent 2100 分析图

8. 文库构建步骤

8.1. 细胞与ConA Beads结合

➢ **ConA 磁珠的准备：**

8.1.1. 将ConA Beads从4℃冰箱取出，室温平衡30 min后吸吹混匀，取N × 10 μL磁珠于1.5 mL EP管，将1.5 mL EP管置于磁力架上静置2 min，至溶液变澄清，弃上清；如果N超过10，分成2管。

备注：N表示实验样本个数。

8.1.2. 向1.5 mL EP管中加入10倍原磁珠体积的1X ConA Bind Buffer重悬磁珠，吹打混匀后置于磁力架上静置2 min，待溶液变澄清，弃上清。

8.1.3. 从磁力架上取下1.5 mL EP管，重复步骤8.1.2一次。

8.1.4. 向1.5 mL EP管中加入原磁珠体积的1X ConA Bind Buffer重悬ConA Beads。

8.1.5. 将重悬的ConA Beads按照每个样本10 μL分装到八连排管中。

备注：ConA Beads分装过程中会沉降，请注意分装过程中吸吹混匀。

➢ **细胞的准备：**

8.1.6. 配制Cell Wash Buffer：按照每个样本1.25 mL配制。

	试剂	体积
○	10X CT Wash Buffer	125 μL
●	Protease Inhibitor Cocktail（100X）	12.5 μL
	Nuclease-free Water	1112.5 μL
	总体积	约 1.25 mL

涡旋混匀。如果有多个样本，配制 N × 1.25 mL 即可。

备注：下划线部分表示试剂配制方法。

8.1.7. 室温下收集新鲜细胞并计数，取所需数量的细胞于新的1.5 mL EP管中（建议收集细胞体积不超过1 mL），室温600 g离心5 min，小心弃去上清。

8.1.8. 加入1 mL Cell Wash Buffer轻柔吹打重悬细胞，室温600 g离心3 min，小心弃去上清。

8.1.9. 向每个1.5 mL EP管中加入90 μL Cell Wash Buffer轻柔吹打重悬细胞。

➢ **细胞与磁珠的结合：**

8.1.10. 将每管重悬细胞分别转移入已加入处理好的10 μL ConA Beads的八连排管中，轻柔吹打5-10次混匀，立即置于旋转混合仪上，室温孵育10 min（孵育过程中可以配制下一步实验Buffer）。

备注：所有涉及到细胞重悬的操作步骤，请轻柔操作，切记不可振荡。操作过程中不要使用10 μL移液吸头吹打细胞或细胞-Beads结合体，尽量使用1 mL移液吸头轻柔操作，或者使用阔口吸头进行细胞操作。

8.2. 一抗的结合

试剂准备：至少提前 10 min 配制好 Primary Antibody Buffer，备用。

Primary Antibody Buffer 配制：每个样本按照 50 μL 配制。

	试剂	体积
🔵	Antibody Buffer	50 μL
○	500 mM EDTA	0.2 μL
○	rHSA (100 mg/mL)	0.5 μL
🟤	5% Digitonin	0.5 μL
🔴	Protease Inhibitor Cocktail（100X）	0.5 μL
	总体积	51.7 μL

涡旋混匀，冰浴预冷。如果有多个样本，需配制（N+1）× 50 μL。Primary Antibody Buffer 易产气泡，动作轻柔。

8.2.1. 将一抗稀释于配制好的Primary Antibody Buffer中，每个样本需50 μL Primary Antibody Buffer。稀释比例根据抗体的具体情况进行调整，我们推荐的一抗稀释体积比例为1:50 - 1:100。稀释一抗后，吹打混匀，冰上预冷；

备注：建议选择经过CUT&Tag验证的抗体，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。

8.2.2. 将孵育好的ConA Beads-细胞轻柔瞬离后置于磁力架上静置2 min，待液体澄清后，小心弃去上清。从磁力架上取下八连排管，每管加入50 μL预冷的已加入一抗的Primary Antibody Buffer，轻柔吹打5-10次混匀；

8.2.3. 混匀的样本立即移至旋转混合仪上，室温孵育2 h或4℃孵育过夜。

备注：在孵育过程中，特别是在4℃的条件下可能部分样本会发生磁珠聚集现象，该现象不会影响实验结果，也不需要在孵育过程中反复的吹打混匀。ConA Beads在静置条件下容易沉淀聚集，因此混匀后的一抗/二抗/转座体/片段化体系应立即移至旋转混合仪上。

8.3. 二抗的结合

试剂准备：至少提前 10 min 配制好 Secondary Antibody Buffer，备用。

Secondary Antibody Buffer 配制：每个样本按照 600 μL 配制。

	试剂	体积
○	10X CT Wash Buffer	60 μL
🟤	5% Digitonin	6 μL
🔴	Protease Inhibitor Cocktail（100X）	6 μL
	Nuclease-free Water	528 μL
	总体积	600 μL

涡旋混匀，如果有多个样本，配制 N × 600 μL 即可。Secondary Antibody Buffer 易产气泡，动作轻柔。

试剂准备：至少提前 5 min 将 1 μL 二抗与 100 μL Secondary Antibody Buffer 预混（或按照抗体说明书推荐使用），吹打混匀，每个样本用量为 100 μL。

8.3.1. 取下孵育好一抗的八连排管轻柔瞬离后，置于磁力架上静置2 min，待液体澄清后，小心弃去上清；

8.3.2. 从磁力架上取下八连排管，加入100 μL加入二抗的Secondary Antibody Buffer，重悬全部ConA Beads-细胞，轻柔吹打混匀；

备注：务必选择与Protein A/G亲和力高且不带修饰的二抗。

8.3.3. 混匀的样本立即移至旋转混合仪上，室温孵育1 h；

8.3.4. 取下孵育好二抗的八连排管轻柔瞬离后，置于磁力架上静置2 min，待液体澄清后，小心弃去上清；

8.3.5. 从磁力架上取下八连排管，加入200 μL Secondary Antibody Buffer，用移液器轻柔吹打5-10次混匀，重悬全部ConA Beads-细胞，室温静置5 min；

8.3.6. 置于磁力架上静置2 min，待液体澄清后，小心弃去上清；

8.3.7. 从磁力架上取下八连排管，加入200 μL Secondary Antibody Buffer，用移液器轻柔吹打5-10次混匀，重悬全部ConA Beads-细胞，室温静置5 min。

备注：多个样本同时操作时，在二抗洗脱、转座体孵育洗脱过程中，请依次进行，加入后续试剂前，请先吸出上清，加入后一步骤的试剂，再对下一样本进行相同的操作，吸吹混匀ConA Beads-细胞结合体时请使用排枪一起吸吹，切勿使磁珠干燥。

8.4. 转座体的结合

试剂准备：

Dig-300 Buffer 配制：每个样本按照 600 μL 配制。

	试剂	体积
○	10X Dig-300 Buffer	60 μL
●	5% Digitonin	1.2 μL
●	Protease Inhibitor Cocktail（100X）	6 μL
	Nuclease-free Water	532.8 μL
	总体积	600 μL

涡旋混匀。如果有多个样本，配制 N × 600 μL 即可。

Dig-300 转座体稀释液：将 1 μL pAG-Tn5 Transposome 稀释于 100 μL Dig-300 Buffer 中，吹打混匀，每个样本用量为 100 μL。

备注：不同的实验环境，转座子的切割活性可能不同，请根据实际情况，在此基础上调整转座子的使用浓度。

8.4.1. 将步骤8.3.7中静置后的样品置于磁力架上静置2 min，待液体澄清后，小心弃去上清；

8.4.2. 从磁力架上取下八连排管，加入100 μL Dig-300转座体稀释液，重悬全部ConA Beads-细胞，轻柔吹打混匀；

8.4.3. 将混匀后的样品立即置于旋转混合仪上，室温孵育1 h；

8.4.4. 取下孵育好转座体的八连排管轻柔瞬离后，置于磁力架上静置2 min，待液体澄清后，小心弃去上清；

8.4.5. 从磁力架上取下八连排管，向每管样品中加入200 μL Dig-300 Buffer，用移液器轻柔吹打混匀，重悬全部ConA Beads-细胞，室温静置5 min；

8.4.6. 置于磁力架上静置2 min，待液体澄清后，小心弃去上清；

8.4.7. 从磁力架上取下八连排管，加入200 μL Dig-300 Buffer，用移液器轻柔吹打混匀，重悬全部ConA Beads-细胞，室温静置5 min。

8.5. DNA片段化及终止

Tagmentation Buffer 配制：取步骤 8.4 中配制好的 Dig-300 Buffer 50 μL，加入 0.5 μL MgCl2 (1 M)，涡旋混匀，每个样本按照 50 μL 配制。如果有多个样本，需配制（N+1）× 50 μL。

备注：Tagmentation Buffer需新鲜配制。

8.5.1. 将步骤8.4.7中静置后的样品置于磁力架上静置2 min，待液体澄清后，小心弃去上清；

8.5.2. 从磁力架上取下八连排管，加入50 μL Tagmentation Buffer，重悬全部ConA Beads-细胞，轻柔吹打混匀；

8.5.3. 将混匀后的样品立即置于旋转混合仪上，37℃孵育1 h。可通过将旋转混合仪移至37℃培养箱/烘箱中实现；

8.5.4. 将孵育好的样品从旋转混匀仪上取下，轻柔瞬离后，每个样品管加入5 μL 10% SDS和**适量稀释好的**Spike-in DNA（根据样本中目的蛋白丰度以及细胞投入量进行调整），上下颠倒混匀。短暂离心后置于PCR仪中70℃孵育10 min，终止片段化反应，PCR仪Hold温度设置为12℃，低温会造成SDS析出；

备注：

- **本试剂盒中提供的Spike-in DNA浓度为5 ng/μL，推荐添加量为5 pg/100,000细胞，根据实际细胞投入量将Spike-in DNA梯度稀释后添加，比如细胞量少，或者靶点丰度低的时候，可以提高稀释比例。**
- **DNA Spike-in为非必需添加组分，可根据实际情况进行选择是否添加**
- **当加入SDS时，如果磁珠已经沉淀在管底，则可能会出现结团不易吹散的现象，为了避免此现象，可以先用移液器将磁珠混匀后再加SDS混匀。**

8.5.5. 瞬时离心，将8联管置于磁力架上，静置约2 - 3 min，小心转移上清至新的8联管中，丢弃磁珠。

8.6. Streptavidin Beads处理

8.6.1. 使用移液器充分重悬Streptavidin Beads，取10 μL Streptavidin Beads至PCR管中，加入200 μL B&W Buffer，用移液器轻轻吹打混匀，置于磁力架上，待液体澄清后，小心弃上清。

8.6.2. 将PCR管从磁力架上取下，加入200 μL B&W Buffer，用移液器轻轻吹打混匀。将PCR管置于磁力架上，待液体澄清后，小心弃上清。加入150 μL B&W Buffer重悬Streptavidin Beads，备用。

8.7. DNA提取

8.7.1. 向步骤8.5.5转移出来的上清中加入150 μL处理后的Streptavidin Beads，充分混匀，室温孵育20 min，其间颠倒混匀2 - 3次。

8.7.2. 瞬时离心，将8联管置于磁力架上，静置约2 - 3 min，小心移除上清。

8.7.3. 保持PCR管始终在磁力架上，加入200 μL B&W Buffer，室温孵育30 s，小心移除上清。

8.7.4. 重复步骤8.7.3一次，瞬离后将PCR管移至磁力架上静置，待磁珠与溶液分离后，用10 μL枪头将残留液体彻底吸干。

8.7.5. 室温晾干2 - 3 min，直至管内无液体残留，磁珠表面无反光。切记磁珠不可干燥过度。

8.7.6. 将上述样本从磁力架上取下，加入20 μL ddH_2O重悬Streptavidin Beads，重悬后的样本可储存于-30 ~ -15℃或直接进行PCR扩增。

备注：

- **文库扩增过程中需带磁珠扩增，请勿丢弃磁珠。**

➢ 若需进行CUT-TAG qPCR 检测，需将DNA从Streptavidin Beads上进行释放，DNA释放的步骤见附录10.5。

8.8. Amplification

8.8.1. 按照下表配制PCR反应体系：

	试剂	体积
	重悬后的产物（步骤 8.7.6）	20 μL
●	Gloria Nova 2X PCR Mix for NGS	25 μL
●	N5 Primer*	2.5 μL
●	N7 Primer*	2.5 μL
	总体积	50 μL

*，注：不同的样本应使用不同的PCR Index Primer进行样本标记，在操作PCR Index Primer时，一定要小心操作，避免样本与Primer之间的交叉污染。

8.8.2. 涡旋震荡混匀，然后瞬时离心使得反应液至管底，放置到PCR仪中；

8.8.3. 按照如下程序进行PCR反应：

温度	时间	Cycles
58℃	5 min	1
72℃	5 min	1
98℃	45 s	1
98℃	15 s	N*
63℃	10 s	
72℃	1 min	1
4℃	Hold	

*，注：PCR cycles 可以参考下表（表1）推荐设置，但是靶点和样本起始量不同，PCR cycles最适合的循环数会有差异，可以通过预扩增的方法进行摸索。

表 1 不同起始量 DNA 对应的 PCR 循环数推荐

Input Cell	PCR Cycles
100,000	12-13
10,000	14-15
1,000	17-18
100	18-19

8.8.4. 提前将AFTMag NGS DNA Clean Beads从4℃冰箱中取出，室温平衡30 min，涡旋振荡混匀磁珠，备用；

8.8.5. 向PCR结束后的样品中加入100 μL(2X)的AFTMag NGS DNA Clean Beads，涡旋振荡混匀；

8.8.6. 室温静置5 min，将PCR管移至磁力架上静置，待液体澄清后，小心弃去上清；

8.8.7. 保持PCR管在磁力架上，加入200 μL新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠，室温静置30 s后，小心弃去上清；

备注：漂洗需使用新鲜配置的80%乙醇。

8.8.8. 重复步骤8.8.7一次，瞬离后将PCR管移至磁力架上静置，待磁珠与溶液分离后，用10 μL枪头将残留液体彻底吸干；

8.8.9. 室温晾干2-3 min，使乙醇充分挥发，切记磁珠不可干燥过度；

备注：环境温湿度不同，晾干时间会有差异。判断标准：磁珠表面由湿润的明亮变为暗淡、50%的磁珠由褐黄色变为干黄色、管壁无明显的液体残留。

8.8.10. 将PCR管从磁力架上取下，加入22 μL 1X TE Buffer，涡旋振荡混匀后室温放置3 min；

8.8.11. 将PCR管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清，小心吸取20 μL上清至新的无菌PCR管内，-20℃保存。

9. 常见问题

9.1. CUT&Tag试剂盒适用于什么物种?

A：CUT&Tag 技术广泛适用于常规哺乳动物细胞，植物可以通过制备原生质体或细胞核的方式，也可使用本试剂盒。

9.2. 起始材料用量和细胞数多少合适?

A：本试剂盒可用于 100-10 万个细胞或细胞核的检测，如果客户无法精确对细胞数进行定量，需要通过预实验确定起始材料用量。

9.3. ConA磁珠主要作用是什么?

A：ConA 磁珠是将伴刀豆球蛋白 A 高密度共价偶联在超顺磁性纳米微球表面，能与细胞膜上的糖蛋白结合，从而吸附细胞，减少在后续实验过程中的细胞的损失。

9.4. CUT&Tag技术是只适用于组蛋白修饰吗?

A：CUT&Tag 技术是近几年发展起来的新技术，组蛋白修饰的文章比较多，但也有实验室在转录因子上获得了成功的结果。

9.5. CUT&Tag试剂盒是不是只能用Illumina平台测序?

A：本试剂盒提供的 pAG-Tn5 的接头是针对 Illumina 平台设计的，如果需要使用其他测序平台，可以联系 ABclonal 公司销售，提供 pAG-Tn5 裸蛋白，客户自行合成相应平台的接头和 Index 扩增引物即可。

9.6. 对于贴壁细胞，如何进行消化处理?

A：对于贴壁细胞，请勿使用胰蛋白酶进行消化，这样会损伤细胞与 ConA Beads 结合表位。可以使用胶原酶进行消化。

9.7. CUT&Tag实验一抗推荐使用什么抗体?

A：进行 CUT&Tag 实验推荐使用经过 CUT&Tag 验证的抗体，其次可以选择 IF 或 ChIP 级别抗体，但不一定所有 ChIP 级别抗体都适用于 CUT&Tag 实验。此外，ABclonal 也有经过 CUT&Tag 验证的单抗（节选），详见官网。

产品应用	产品名称	产品货号
CUT&Tag 抗体	Histone H3 Rabbit mAb	A17562
CUT&Tag 抗体	Acetyl-Histone H3-K27 Rabbit mAb	A2771
CUT&Tag 抗体	CTCF Rabbit mAb	A19588

CUT&Tag 抗体	[KO Validated]CDK9 Rabbit mAb	A11145
CUT&Tag 抗体	[KO Validated]c-Myc Rabbit mAb	A19032

9.8. CUT&Tag实验二抗可以使用带有标记（如HRP）的抗体吗？

A：不可以。带有标记的抗体比较大，不容易进出细胞，也可能干扰 pAG-Tn5 Transposome 的切割，此外，还可能造成非特异性吸附，增加背景信号。推荐使用 ABclonal 自产不带修饰二抗：抗兔用 AS070；鼠抗用 AS071

9.9. CUT&Tag实验需要IgG对照吗？

A：理论上 CUT&Tag 技术背景信号很低，实验不需要加入 IgG 作为阴性对照，但客户想加入验证也是可以的。

10. 附录

10.1.文库结构

5-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-Index2(i5)-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-xxxxxxxxx-CTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCCACGAGAC-Index1(i7)-ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3

其中-xxxxxxxxx-为插入序列，两端为文库结构。

10.2.冻存细胞处理

10.2.1. 将金属浴或水浴锅预热到37℃。

10.2.2. 迅速将从-80℃冰箱取出的冻存细胞放入已经预热的金属浴或水浴锅中，迅速解冻。

10.2.3. 将解冻好的细胞转移入新的1.5 mL EP管中（建议解冻细胞体积不超过1 mL）或保持在原本的1.5 mL EP管中，600 g离心5 min，轻轻吸去上清。

10.2.4. 向收集细胞的1.5 mL EP管中加入1 mL细胞培养基，轻柔吹打重悬细胞。

10.2.5. 放入离心机中，600 g离心3 min，轻轻吸去上清。

10.2.6. 向收集细胞的1.5 mL EP管中加入1 mL Cell Wash Buffer，轻柔吹打重悬细胞。

10.2.7. 放入离心机中，600 g离心3 min，轻轻吸去上清。

10.2.8. 向每个1.5 mL EP管中加入90 μL Cell Wash Buffer，轻柔吹打重悬细胞。后续进入细胞与ConA磁珠结合的8.1.10步骤。

10.3.细胞核提取

10.3.1. 室温下收集新鲜细胞并计数，取所需数量的细胞于新的1.5 mL EP管中（建议收集细胞体积不超过1 mL），室温下600 g离心5 min，小心弃去上清。

10.3.2. 室温加入等体积PBS缓冲液，轻柔吸吹重悬细胞。

10.3.3. 室温600 g离心3 min，弃上清。

10.3.4. 加入1/2体积预冷NE1 Buffer（起始培养基体积的1/2），轻柔混匀，冰浴10 min。

10.3.5. 4℃条件1,300 g离心4 min，倒出上清，在纸巾上倒扣几秒钟。

10.3.6. 加入1/2体积PBS（起始培养基体积的1/2）。

备注：如不进行交联，直接进行步骤10.3.9即可。

10.3.7. 同时轻柔混匀，加入16%的甲醛（自备）至终浓度为0.1%，室温孵育2 min（手动轻微混匀）。

10.3.8. 加入25 μL的10X甘氨酸溶液（自备）终止交联，室温孵育2 min（手动轻微混匀）。

备注：具体的交联和终止条件，请自行参考相关文献。

10.3.9. 4℃条件1,300 g离心4 min，倒出上清，在纸巾上倒扣几秒钟。

10.3.10. 加入90 μL Cell Wash Buffer重悬细胞核。后续进入细胞与ConA磁珠结合的8.1.10步骤。

10.4.Spike in 序列以及qPCR引物

10.4.1 Spike in 序列：
CAACAGCCAGTTCCATTGCAAGTCTGAGCCAACATGGTGATGATTCTGCTGCTTGATAAATTTTCAGGTATTCGTCAGCCGTAA
GTCTTGATCTCCTTACCTCTGATTTTGCTGCGCGAGTGGCAGCGACATGGTTTGTTGTTATATGGCCTTCAGCTATTGCCTCTCGG
AATGCATCGCTCAGTGTTGATCTGATTAACTTGGCTGACGCCGCCTTGCCCTCGTCTATGTATCCATTGAGCATTGCCGCAATTT
CTTTTGTGGTGATGTCTTCAAGTGGAGCATCAGGCAGACCCCTCC

10.4.2 Spike in qPCR 检测引物：

F：GGCAGCGACATGGTTTGTTG

R：CGGCGTCAGCCAAGTTAATC

10.5 CUT TAG qPCR DNA从Streptavidin Beads上释放：

10.5.1 将8.7.5中样本从磁力架上取下，加入15 μL ddH2O重悬Streptavidin Beads，重悬的样本中加入5 μl Stop Buffer （ RM21073，本试剂盒中不包含），充分混匀，95℃孵育5 min

10.5.2 瞬时离心，将PCR管置于磁力架上，待溶液澄清后将上清液转移至新的PCR管中用于qPCR定量检测

10.5.大体系操作流程(只对更改部分进行描述)（详情咨询ABclonal技术支持）

10.5.1. 将处理好的ConA Beads分装到1.5 mL EP管中，每管10 μL。

10.5.2. 将处理好的细胞加入已有ConA Beads的1.5 mL EP管中，每管90 μL，轻柔吹打混匀，迅速置于旋转混匀仪上进行孵育。

10.5.3. 旋转孵育结束后，将1.5 mL EP管置于磁力架上静置，待溶液澄清后弃上清。

10.5.4. 向步骤3中弃去上清的样品中加入50 μL加入一抗的Primary Antibody Buffer，用移液器轻柔吹打5-10次混匀，重悬全部ConA Beads-细胞后，转移至新的1.5 mL EP管，切勿浸湿侧壁，迅速置于旋转混匀仪上进行孵育，在孵育过程中需保持混合物在1.5 mL EP管底部，若出现样品的上下流动，则需将样品转移至新的1.5 mL EP管中。二抗孵育，转座体孵育及片段化过程要求相同。

10.5.5. 二抗孵育结束后，每管中加入500 μL Secondary Antibody Buffer，用移液器轻柔吹打5-10次混匀，重悬全部ConA Beads-细胞，室温静置5 min。

10.5.6. 转座体孵育结束后，每管中加入500 μL Dig-300 Buffer，用移液器轻柔吹打5-10次混匀，重悬全部ConA Beads-细胞，室温静置5 min。

10.5.7. 片段化结束后，将加入终止Buffer后的ConA Beads-细胞混匀液转入八连排管中操作即可。

武汉爱博泰克生物科技有限公司

电话：400-999-6126

邮箱：cn.market@abclonal.com

网址：www.abclonal.com.cn

地址：湖北省武汉市江夏区东湖高新区高科园 3 路精准医疗产业基地项目一期 5 号楼