

产品组分

组分名称	组分编号	规格-1	规格-2
		12 μ L	48 μ L
pAG-Tn5 Transposome	RM20677	12 μ L	48 μ L

产品说明

pAG-Tn5 是将 Protein A/Protein G 与一种高活性、突变形式的 Tn5 转座酶进行融合, 同时具备 Tn5 转座酶和 Protein A/Protein G 的功能。pAG-Tn5 转座酶单体分子量约 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。Tn5 转座酶与 19 bp ME 序列结合形成 Transposome (转座体), 然后该转座体随机攻击并切割靶 DNA 的磷酸二酯键, 最后, Tn5 转座酶催化 ME 的 3'-OH 末端与靶 DNA 暴露的 5'-磷酸化末端形成磷酸二酯键, 即完成转座反应(DNA 片段化或者 DNA 插入)。转座反应会在转座位置的另一条 DNA 链上产生 9 bp 的 gap。

本产品融合的 Protein A/Protein G 主要通过免疫球蛋白 (Ig) 的 Fc 区相互作用, 可与大多数哺乳动物的 IgG 结合。本产品为已完成接头组装的 pAG-Tn5 转座酶复合体, 可直接应用于 CUT&Tag 实验中核心酶替换。

产品来源

pAG-Tn5 转座酶蛋白在大肠杆菌中重组表达并纯化获得。

保存温度

-20°C

应用

二代测序建库, ATAC-seq, CUT&Tag

分子量

75 kD

浓度

摩尔浓度: 4 μ M

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

加入 Termination Buffer, 转座反应可被终止。

操作说明

1. DNA 片段化

(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	加入量
5X Tagment Buffer (RM20250)	4 μ L
gDNA *	X μ L
pAG-Tn5 Transposome **	1 μ L
ddH ₂ O	Up to 20 μ L

*注：gDNA 根据实验需求进行投入。

**注：pAG-Tn5 Transposome 加入量需要根据模板入量进行计算，若后续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，可根据实验打断的片段大小需要进行滴定调整。

(2) 使用移液器上下吸打，充分混匀。

(3) 将 PCR 管放到 PCR 仪上（热盖温度 75°C），进行如下的反应程序：

反应温度	反应时间	循环数
55°C *	5-15 min **	1
12°C	Hold	1

*注：不同应用推荐的反应温度和反应时间不同，体外实验推荐 55°C 反应 15 min，体内实验推荐 37°C 反应 1 hr。

**注：可以根据实验需要，适当延长反应时间，确保充分反应。

2. 终止反应

(1) DNA 片段化反应结束，立即加入 2 μ L Termination Buffer (RM20251)，涡旋混匀或使用移液器上下吸打混匀。

(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。

3. 片段化产物扩增

(1) 在 PCR 管中配制以下组分：

试剂	加入量
片段化 DNA	22 μ L
PCR Mix *	23 μ L
N5 Primer (10 μ M)	2.5 μ L
N7 Primer (10 μ M)	2.5 μ L
ddH ₂ O	Up to 50 μ L

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

(2) 混匀，快速离心后放入 PCR 仪中开始循环程序（热盖温度 105°C）：

步骤	反应温度	反应时间	循环数
补齐 Gap	72°C	3 min *	1
预变性	98°C	30 s	1
变性	98°C	15 s	
退火	60°C	30 s	N **
延伸	72°C	1 min	
终延伸	72°C	5 min	1
Hold	4°C	Hold	--

*注：72°C 孵育 3 min 为缺口修复过程，此步骤不可省略。

**注：扩增循环数可根据起始 DNA 投入量和实验需求进行调整。1 ng--13-15 个循环；5 ng--11-12 个循环；50 ng--7-8 个循环。

产品推荐

ABclonal 公司提供文库 illumina 平台扩增配套 index 试剂盒，可以根据需要进行订购。

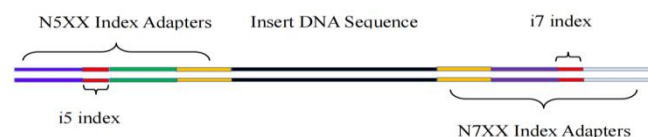
RK20290: Dual DNA Adapter 96 Kit for One-step DNA Lib Prep

RK20265: CUT&Tag Assay Kit (pAG-Tn5) for illumina

N5XX 和 N7XX 的序列

N5XX: 5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[XXXXXXXX]TCGTCGGCAGCGTC-3'

N7XX: 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[XXXXXXXX]GTCTCGTGGGCTCGG-3'



适配 illumina®测序平台的 Tn5 接头序列

MErev: 5'-phos-CTGTCTCTTATACATCT-3'

ME-A: 5'-TCGTCTCGGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3'

ME-B: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3'