

Universal CUT&Tag Assay Kit for Illumina

使用说明书

【产品名称】

Universal CUT&Tag Assay Kit for Illumina

【货号/规格】

KE001-A (12 rxns) ; KE001-B (48 rxns)

【产品简述】

Universal CUT&Tag Assay Kit for Illumina是针对Illumina高通量测序平台开发的用于研究蛋白质与DNA相互作用的试剂盒。CUT&Tag (Cleavage Under Targets and Tagmentation) 技术是一种研究蛋白质与DNA相互作用的先进技术,使用Protein A/G融合的转座酶在抗体引导下精准靶向目的蛋白,并在目的位点附近进行DNA的片段化,同时插入测序接头,最终通过PCR扩增形成用于高通量测序的文库。与传统的ChIP-Seq技术相比,免去了繁琐的步骤,节省了实验材料,具有细胞投入量低、信噪比高、可重复性好、实验周期短等优势。本品适用于表观遗传学、早期胚胎发育、干细胞、肿瘤等研究,用于检测特定转录因子的结合位点或特定组蛋白修饰的发生位点等。本品经过严格的质量检测,从而确保文库制备的质量和效率。

【组成成分及储存条件】

组分	KE001-A	KE001-B	储存条件
ConA Beads Pro	130 μ l	520 μ l	2-8°C
DNA Extract Beads Pro	350 μ l	700 μ l $\times$ 2	
2X B&W Buffer	10 ml	40 ml	
pA/G-Tnp Pro (2 μ M)	24 μ l	96 μ l	-20°C
5% Digitonin	150 μ l	600 μ l	
10X Binding Buffer	400 μ l	800 μ l $\times$ 2	
NE Buffer	1.2 ml	1.2 ml $\times$ 4	
10X Wash Buffer	1 ml $\times$ 2	8 ml	
10X Dig-300 Buffer	1.2 ml	1.2 ml $\times$ 4	
Antibody Buffer (-)	1 ml	1 ml $\times$ 4	
5X TTBL	150 μ l	600 μ l	
10% SDS	50 μ l	200 μ l	
2X CAM	600 μ l	1.2 ml $\times$ 2	

DNA Spike-in (5 ng/ μ l)	12 μ l	48 μ l	
------------------------------	------------	------------	--

【适用范围】

适用于哺乳动物细胞的蛋白质-DNA互作研究,可兼容细胞投入量为10 - 100,000个,植物组织、细胞等通过特殊的处理也可以使用该试剂盒进行相关实验。

【注意事项】

1. 关于磁珠的使用

- 实验过程中涉及使用三种磁珠,试剂盒中包含ConA Beads Pro(用于结合细胞/细胞核)和 DNA Extract Beads Pro(用于DNA提取)两种磁珠,文库纯化过程推荐使用GDSPure DNA Selection Magbeads (GDSBio #NC1011),不同的磁珠在使用前请注意区分。
- 磁珠操作通用注意事项:
 - 磁珠均置于2 ~ 8°C保存,切勿置于-30 ~ -15°C冻存。
 - 磁珠使用前应先平衡至室温(室温放置),所有磁珠操作都应在室温进行。
 - 每次吸取磁珠前需使用移液器上下吹打充分混匀。
- ConA Beads Pro操作注意事项:
 - ConA Beads Pro与细胞结合后,请勿剧烈振荡或使用移液器剧烈吹打混匀,避免细胞从磁珠上脱落。
 - 请勿将磁珠或磁珠-细胞复合物离开液体在空气中长时间放置,避免因磁珠干结而影响后续实验。
 - 在处理磁珠或磁珠-细胞复合物时,请勿高转速离心或长时间置于磁力架上,避免人为因素造成磁珠聚集。
 - 孵育过程中出现部分磁珠沾壁/聚集是正常现象,只要保证磁珠-细胞复合物处于溶液浸润的范围内,并不会影响后续的实验结果。对于不同类型的细胞,与磁珠结合后,发生沾壁/聚集的程度不同;对于同一种类型的细胞,随着样本投入量的增加,沾壁/聚集的现象更加明显。如果遇到沾壁/聚集现象,可以轻弹管底混匀磁珠-细胞复合物,应避免实验过程中反复开盖和使用移液器吹打混匀磁珠-细胞复合物。

2. 关于样本准备与抗体选择

- 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。对于大部分贴壁细胞,使用胰蛋白酶消化后,收集细胞悬液,离心后弃去上层培养基收集细胞即可。对于部分细胞系,使用胰蛋白酶消化可能会影响细胞与ConA Beads Pro的结合效果,需要根据实际情况进行判断。
- 用于CUT&Tag实验的细胞,可以使用台盼蓝染色,进行细胞活力检测,细胞活性最好>90%,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。
- 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,对于胚胎等难裂解的细胞,需要根据样本类型选择合适的细胞裂解液。
- 若使用动/植物组织进行实验,建议提取组织细胞核,需要根据不同的组织类型摸索合适的提核条件。
- 对于样本中表达丰度较低的目的蛋白,以及一些特殊的转录因子,可以对细胞或细胞核进行轻度交联,以获得更好的实验结果。

- 实验中建议设置阳性对照与阴性对照组，阳性对照推荐使用样本中表达丰度较高的组蛋白，阴性对照推荐使用不加入一抗而正常加入二抗和转座子的实验组，用于判断整个实验过程中是否存在异常，加入非特异性IgG的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。
- 实验中一抗建议使用ChIP级别的抗体，若针对目的蛋白无在售ChIP级别的抗体，可以尝试使用适用于Immune Fluorescence(IF)实验的抗体进行测试。
- 建议选择与Protein A/G亲和能力高且不带修饰的二抗，可以参照以下表格：

Species	Antibody subtype	Protein A/G
Human	Total IgG/IgG1/IgG2/IgG3/IgG4	+++
	IgM/IgA1/IgA2/Fab/scFv	+
	IgD	-
Mouse	Total IgG/IgG2a/IgG2b/IgG3	+++
	IgG1	++
	IgM	-
Rat	IgG2a/IgG2c	+++
	Total IgG/IgG1	++
	IgG2b	+
Rabbit	Total IgG	+++
Goat	Total IgG	+++
Sheep	Total IgG	+++
Guinea pig	Total IgG	+++
Hamster	Total IgG	++
Donkey	Total IgG	+++
Pig	Total IgG	+++
Dog	Total IgG	+++
Cat	Total IgG	+++
Chicken	Total IgY	-
Cow	Total IgG	+++
Horse	Total IgG	+++

+++ , strong binding; ++ , medium binding; + , weak binding; - , no binding.

3. 关于细胞投入量和扩增循环数

- 试剂盒适用的细胞投入量为10 - 100,000个，受细胞类型、抗体选择、以及目的蛋白表达丰度的影响，实验中可以兼容的最低细胞投入量并不是固定的，早期实验时建议投入10,000 - 50,000个细胞，摸索针对目的蛋白的CUT&Tag实验所需的细胞投入量与扩增循环数之间的关系。
- 以293细胞为例，使用中高丰度表达的组蛋白(如H3K4me3、H3K27me3)进行CUT&Tag实验，细胞投入量、扩增循环数与文库产量之间的关系如下表所示：

细胞投入量	扩增循环数	文库产量
10	24-26	10-40 ng/μl
60	18-20	
1,000	15-17	

10,000	12-14	
50,000	10-12	
100,000	9-11	

- CUT&Tag实验所需的细胞用量少，为极低细胞起始量和单细胞实验提供了可能性，但是常规并不推荐使用过低的细胞起始量进行CUT&Tag实验，若进行单细胞实验，为了获得较理想的实验结果，需要优化实验流程。
- 进行PCR扩增时，文库产出只要满足上机需求即可，无需为了获得更高的文库产量，而设置过高的扩增循环数。循环数过多会导致过度扩增、偏好性增加、重复度增加等多种不良后果。

4. 关于DNA Spike-in的使用

- DNA Spike-in作为参照标准，主要用于不同样本间测序数据相互标准化，以达到不同样本间可相互比较的目的，可一定程度上减少从样本制备到数据分析的操作流程中产生的误差。试剂盒中提供的DNA Spike-in 是大肠杆菌λDNA的一段序列，浓度为5 ng/μl，推荐添加量为1 pg/100,000细胞，可根据样本中目的蛋白丰度以及细胞投入量进行调整，DNA Spike-in为非必需添加组分，可根据实际情况选择是否添加。

- DNA Spike-in标准品序列如下：

ATAACTCAATGTTGGCCTGTATAGCTTCAGTGATTGCGATTCGCCTGTCTCTGCCTAATC
 CAAACTCTTTACCCGTCCTTGGGTCCCTGTAGCAGTAATATCCATTGTTCTTATATAAA
 GGTTAGGGGGTAAATCCCGCGCTCATGACTTCGCCTTCTCCCATTTCTGATCCTCTT
 CAAAAGGCCACCTGTTACTGGTCGATTAAAGTCAACCTTTACCGCTGATTTCGTGGAACA
 GATACTCTCTCCATCCTTAACCGGAGGTGGGAATA TCCTGCATTCCCGAACCCATCGA
 CGA

- 数据分析流程为原始数据过滤掉不合格的Reads后，进行DNA Spike-in校正。

【实验流程】

1. Buffer配制

此处按单个样本计算，请根据实际样本数量等比例配制。

1. Binding Buffer: 取30 μl 10X Binding Buffer，加入270 μl ddH₂O，混匀。
2. Wash Buffer: 取150 μl 10X Wash Buffer，加入30 μl 50X 蛋白酶抑制剂，加入1,320 μl ddH₂O，混匀。
- 50X 蛋白酶抑制剂配制：取一片蛋白酶抑制剂混合片剂(Sigma-Aldrich, 5056489001)溶于1 ml ddH₂O中，-20℃保存。
3. Antibody Buffer: 取50 μl Antibody Buffer (-)，加入0.5 μl 5% Digitonin，混匀后置于冰上预冷。
4. Dig-wash Buffer: 取792 μl步骤2中配制的Wash Buffer，加入8 μl 5% Digitonin，混匀。
5. Dig-300 Buffer: 取100 μl 10X Dig-300 Buffer，加入2 μl 5% Digitonin和20 μl 50X 蛋白酶抑制剂，加入878 μl ddH₂O，混匀。

Digitonin有接触毒性，在溶液配制过程中请做好个人防护，避免直接接触，加入Digitonin后缓冲液不可长期保存，现配现用。

6. 1X B&W Buffer: 取500 μl 2X B&W Buffer，加入500 μl ddH₂O，混匀。

2. ConA Beads Pro处理

1. 取一支8联管，每个样本加入100 μl Binding Buffer。
2. 使用移液器充分重悬ConA Beads Pro，取出10 μl ConA Beads Pro至步骤1的Binding Buffer中，混合均匀，置于磁力架上，待溶液澄清后(约2 min)，弃尽上清。
3. 将8联管从磁力架上取下，加入100 μl Binding Buffer，用移液器轻轻吹打混匀(请勿振荡混匀)。

4. 将8联管置于磁力架上, 待液体澄清后(约2 min), 弃尽上清, 加入10 μ l Binding Buffer重悬ConA Beads Pro。

3. 细胞收集

• 在细胞通透之前的所有步骤都在室温下进行, 使细胞受到的应力最小化。实验操作过程中避免剧烈的涡旋振荡。

1. 室温收集细胞并计数。
2. 取实验所需数量的细胞于1.5 ml 离心管中, 室温下2,500 rpm(600 $\times$ g)低速离心5 min, 弃上清。
3. 室温条件下加入500 μ l Wash Buffer重悬细胞, 2,500 rpm(600 $\times$ g)低速离心5 min, 弃尽上清。
4. 每个样本加入100 μ l Wash Buffer重悬细胞。

• 可选步骤——获取细胞核

1. 室温收集细胞并计数。
2. 取实验所需数量的细胞于1.5 ml 离心管中, 室温下2,500 rpm(600 $\times$ g)低速离心5 min, 弃上清。
3. 每个样本加入100 μ l预冷的NE Buffer, 用移液器轻轻吹打重悬细胞, 冰上孵育10 min。
4. 室温下2,500 rpm(600 $\times$ g)低速离心5 min, 弃尽上清。
5. 每个样本加入100 μ l Wash Buffer重悬细胞核。

4. 细胞(细胞核)与ConA Beads Pro孵育

1. 将100 μ l细胞(细胞核)转移至含有活化ConA Beads Pro的8联管中, 上下颠倒混匀后, 室温孵育10 min, 期间颠倒混匀2 - 3次。
 2. 瞬时离心(<100 $\times$ g)收集反应液, 将8联管置于磁力架上, 待溶液澄清后(约2 min), 弃尽上清。
- 切忌因离心时间过长, 导致磁珠聚集在管底。

5. 一抗孵育

1. 每个样本加入50 μ l预冷的Antibody Buffer重悬细胞(细胞核)-磁珠复合物。
2. 参照抗体说明书推荐的浓度向8联管中加入抗体, 上下颠倒混匀。
3. 瞬时离心收集液体于管底(切忌因离心时间过长, 导致磁珠聚集在管底), 将8联管置于4 $^{\circ}$ C静置过夜。

• 实验中建议设置阳性对照与阴性对照。

6. 二抗孵育

1. 用Dig-wash Buffer按照一定的比例稀释二抗(常规推荐使用1:100比例稀释), 每个样本50 μ l。
2. 取一抗孵育中的8联管, 瞬时离心收集反应液, 将8联管置于磁力架上, 待溶液澄清后(30 sec - 2 min), 弃尽上清。
3. 加入二抗孵育步骤1中稀释好的二抗, 上下颠倒数次, 使抗体与细胞(细胞核)-磁珠复合物混合均匀, 室温下旋转孵育30 - 60 min。
4. 瞬时离心收集反应液, 将8联管置于磁力架上, 待溶液澄清后(30 sec - 2 min), 弃尽上清。
5. 向8联管中加入200 μ l Dig-wash Buffer, 上下颠倒数次, 确保Buffer与细胞(细胞核)-磁珠复合物充分混合。
6. 重复步骤4 - 5两次(共3次)。

7. pA/G-Tnp Pro孵育

1. 取2 μ l pA/G-Tnp Pro加入98 μ l Dig-300 Buffer混合, 终浓度为0.04 μ M, 每个样本100 μ l。
- 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。
2. 取二抗孵育中的8联管, 瞬时离心收集反应液, 将8联管置于磁力架上, 待溶液澄清后(30 sec - 2 min), 弃尽上清。
 3. 每个样本加入100 μ l pA/G-Tnp Pro孵育步骤1中稀释好的pA/G-Tnp Pro转座子, 上下颠倒数次,

使转座子与细胞(细胞核)-磁珠复合物混合均匀。

4. 室温下旋转孵育1 h。
5. 瞬时离心, 将8联管置于磁力架上, 待液体澄清后(30 sec - 2 min), 弃尽上清。
6. 向8联管中加入200 μ l Dig-300 Buffer, 上下颠倒数次, 确保Buffer与细胞(细胞核)-磁珠复合物充分混合均匀。
7. 重复步骤5 - 6两次(共3次)。

8. 片段化

1. 取40 μ l Dig-300 Buffer, 加入10 μ l 5X TTBL, 混合均匀。
 2. 取pA/G-Tnp Pro孵育中的8联管, 瞬时离心收集反应液, 将8联管置于磁力架上, 待液体澄清后(30 sec - 2 min), 弃尽上清。
 3. 每个样本加入50 μ l 片段化步骤1中稀释的TTBL, 混合均匀。
 4. 将8联管置于PCR仪中37 $^{\circ}$ C孵育60 min。
- 注意不需要设置热盖, 可使PCR仪保持开盖状态。
5. 瞬时离心, 向片段化步骤4片段化后的样本中加入2 μ l 10% SDS和适量DNA Spike-in (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, 55 $^{\circ}$ C孵育10 min, 其间颠倒混匀2 - 3次。

• 若样品较多, DNA Spike-in可与10% SDS预混为Mix后添加;

• 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;

• 本试剂盒中提供的DNA Spike-in浓度为5 ng/ μ l, 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。

6. 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。

• 转移上清过程中, 尽可能将上清转移干净, 且请勿吸到磁珠。

9. DNA Extract Beads Pro处理

1. 使用移液器充分重悬DNA Extract Beads Pro, 取25 μ l DNA Extract Beads Pro至1.5 ml离心管, 加入200 μ l 1X B&W Buffer, 用移液器轻轻吹打混匀, 置于磁力架上, 待溶液澄清后(约2 min), 弃尽上清。
2. 将1.5 ml离心管从磁力架上取下, 加入200 μ l 1X B&W Buffer, 用移液器轻轻吹打混匀。
3. 将1.5 ml离心管置于磁力架上, 待液体澄清后(约2 min), 弃尽上清, 加入50 μ l 2X B&W Buffer重悬DNA Extract Beads Pro, 备用。

• 注意活化后的DNA Extract Beads Pro需用2X B&W Buffer重悬!

10. DNA提取

1. 向片段化步骤6转移出来的上清中加入50 μ l DNA Extract Beads Pro处理步骤3处理后的DNA Extract Beads Pro, 充分混匀, 室温孵育20 min, 其间颠倒混匀2 - 3次。
 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。
- 请勿吸走磁珠, 尽量将上清去除干净。
3. 保持PCR管始终在磁力架上, 加入200 μ l 1X B&W Buffer, 室温孵育30 sec, 小心移除上清。
 4. 重复步骤3一次。
 5. 开盖室温晾置2 - 5 min, 直至管内无液体残留, 磁珠表面无反光。
 6. 将上述样本从磁力架上取下, 加入15 μ l ddH₂O重悬DNA Extract Beads Pro, 重悬后的样本可储存于-30 ~ -15 $^{\circ}$ C或直接进行PCR扩增。

• 扩增过程中需带磁珠扩增, 请勿丢弃磁珠。

11. 文库扩增

1. 将试剂解冻后颠倒混匀，于灭菌200 μ l PCR管中配制如下反应：

试剂	体积
重悬的DNA Extract Beads Pro	15 μ l
2X CAM	25 μ l
N5XX	5 μ l
N7XX	5 μ l
Total	50 μ l

2. 用移液枪小心吹打混匀，短暂离心将所有液体移至管底。

3. 在热循环仪中进行如下反应：

温度	时间	循环数
72 $^{\circ}$ C	3 min	-
95 $^{\circ}$ C	3 min	-
98 $^{\circ}$ C	10 sec	9~20
60 $^{\circ}$ C	5 sec	
72 $^{\circ}$ C	1 min	-
4 $^{\circ}$ C	∞	-

a. 72 $^{\circ}$ C 孵育步骤用于进行链置换反应，请勿删除该步骤；

b. 请根据实际情况自行选择合适的扩增循环数，参考“关于细胞投入量和扩增循环数”。

12. PCR产物纯化

1. 涡旋振荡混匀GDSPure DNA Selection Magbeads (GDSBio #NC1011)并吸取100 μ l至上述PCR反应产物中，涡旋振荡或使用移液器吹打10次，保证整个体系均匀，室温孵育5 min。

2. 将反应管短暂离心并置于磁力架上分离磁珠和液体，待溶液澄清后(约5 min)，小心移除上清，注意不要扰动到磁珠。

3. 保持PCR管始终置于磁力架上，加入200 μ l新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育30 sec，小心移除上清。

4. 重复步骤3，总计漂洗两次。

5. 保持PCR管始终置于磁力架上，开盖空气干燥3 - 5 min。

6. 磁珠晾干后，将PCR管从磁力架上取下，加入22 μ l ddH₂O洗脱，涡旋振荡或使用移液器吹打10次充分混匀磁珠，室温孵育5 min。

7. 将PCR管短暂离心，置于磁力架上分离磁珠和液体，待溶液澄清后(约5 min)，小心吸取20 μ l上清转移至新的离心管中，-30 ~ -15 $^{\circ}$ C 保存。

13. 文库质控

文库浓度检测：基于双链DNA荧光染料的方法，如PicoGreen等；基于qPCR绝对定量的方法。

文库长度分布检测：文库长度分布可通过LabChip GX、GXII、GX Touch (PerkinElmer)，

Bioanalyzer、Tapestation (Agilent Technologies)，Fragment Analyzer (Advanced Analytical) 等基于电泳分离原理的设备进行检测。

图1 CUT&Tag基本流程图

