

pG-MNase CUT&RUN Assay Kit for qPCR

使用说明书

【产品名称】

pG-MNase CUT&RUN Assay Kit for qPCR

【货号/规格】

KE002-A (24 rxns) ; KE002-B (48 rxns)

【产品简述】

pG-MNase CUT&RUN Assay Kit for qPCR是用于研究蛋白质与DNA相互作用的试剂盒。CUT&RUN (Cleavage Under Targets and Release Using Nuclease)技术是一种研究蛋白质与DNA相互作用的先进技术,使用Protein G融合的MNase核酸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。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、检测成功率高、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,适合分析多种目标蛋白,包括组蛋白修饰、转录因子和染色质重塑酶等。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	KE002-A	KE002-B	储存条件
ConA Beads Pro	260 μ l	520 μ l	2-8 $^{\circ}$ C
FastPure gDNA Mini Columns	24 pcs	48 pcs	15-25 $^{\circ}$ C
Buffer GDP	24 pcs	48 pcs	
Buffer GW	24 ml	48 ml	
pG-MNase Enzyme	4 ml	8 ml	
MNase Dilution Buffer	30 μ l	60 μ l	-20 $^{\circ}$ C
5% Digitonin	1.3 ml $\times$ 2	1.3 ml $\times$ 4	
10X Binding Buffer	1.3 ml	1.3 ml $\times$ 2	
10X Wash Buffer	12 ml	24 ml	
Antibody Buffer (-)	1.2 ml $\times$ 2	1.2 ml $\times$ 4	
CaCl ₂	48 μ l	96 μ l	
2X Stop Buffer (-)	1.2 ml $\times$ 2	1.2 ml $\times$ 4	
Spike in DNA (5 ng/ μ l)	24 μ l	48 μ l	
2X Universal SYBR qPCR Master Mix	800 μ l $\times$ 2	800 μ l $\times$ 4	

Spike in Primer F (10 μ M)	40 μ l	80 μ l
Spike in Primer R (10 μ M)	40 μ l	80 μ l
Positive Control Primer F (10 μ M) *	15 μ l	30 μ l
Positive Control Primer R (10 μ M) *	15 μ l	30 μ l
RNase-free ddH ₂ O	500 μ l	1 ml

* Positive Control是针对人源细胞中组蛋白H3K4me3设计的qPCR引物。

【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5,000 - 500,000个,植物组织、酵母等组织或细胞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

- ConA Beads Pro(用于结合细胞/细胞核)操作注意事项:
- 磁珠置于2 ~ 8 $^{\circ}$ C保存,切勿置于-30 ~ -15 $^{\circ}$ C冻存。
- 每次吸取磁珠前需使用移液器上下吹打充分混匀。
- 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&RUN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。
- 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,例如H3K4me3;阴性对照推荐使用IgG,用于判断整个实验过程中是否存在异常,加

入非特异性IgG的阴性对照不是必需的，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、IgG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Immunofluorescence(IF)实验的抗体进行测试。

3. 关于柱式提取试剂的使用

● 首次使用前按Buffer GW试剂瓶标签所示，加入对应体积的无水乙醇进行稀释并进行标注，放置于室温保存。

● 若低温储存时，Buffer GDP容易产生沉淀，使用前可室温放置一段时间，必要时可放置于37℃水浴锅预热至沉淀完全溶解，混匀后再使用。

● 提取流程均在室温(15 ~ 25℃)条件下进行。

4. 关于Spike in DNA的使用

● 本试剂盒提供的Spike in DNA片段来源于大肠杆菌ADNA，片段长度为300 bp。该片段可以用于不同处理条件或者不同细胞状态下，对实验数据进行均一化校准，有利于对测试结果进行均一化定量分析。Spike in DNA片段可以使用ddH₂O稀释，低浓度Spike in DNA现用现稀释，应避免低浓度长期存放。建议稀释前进行浓度定量，以实际定量浓度进行稀释，保证Spike in DNA准确添加。

● Spike in DNA序列如下：

ATAACTCAATGTTGGCCTGTATAGCTTCAGTGATTGCGATTGCGCTGTCTCTGCCTAATC
 CAAACTCTTTACCCGTCCTTGGGTCCCTGTAGCAGTAATATCCATTGTTTCTTATATAAA
 GGTTAGGGGGTAAATCCCGGCGCTCATGACTTCGCCTTCTTCCATTCTGATCCTCTT
 CAAAAGGCCACCTGTTACTGGTTCGATTTAAGTCAACCTTTACCGCTGATTCGTGGAACA
 GATACTCTCTCCATCCTTAACCGGAGGTGGGAATATCCTGCATTCCCGAACCCATCGA
 CGA

5. 关于数据处理

● 数据处理采用2^{-ΔΔCT}算法，具体处理流程如下：

统计实验组、对照组、阴性对照组中目的基因与Spike in DNA的CT值；

以Spike in DNA为内参，计算各组ΔCT值，如下：

实验组：ΔCT_{treatment} = CT_{treatment} - CT_{treatment Spike in DNA}

对照组：ΔCT_{control} = CT_{control} - CT_{control Spike in DNA}

阴性对照：ΔCT_{IgG} = CT_{IgG} - CT_{IgG Spike in DNA}

以阴性对照IgG为参照，计算各组2^{-ΔΔCT}值，如下：

Relative Enrichment fold_{treatment} = 2^{-(ΔCT_{treatment} - ΔCT_{IgG})}

Relative Enrichment fold_{control} = 2^{-(ΔCT_{control} - ΔCT_{IgG})}

Relative Enrichment fold_{IgG} = 2^{-(ΔCT_{IgG} - ΔCT_{IgG})} = 1

【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500 μl 10X Wash Buffer，加入100 μl 50X 蛋白酶抑制剂，加入4.4 ml ddH₂O，混匀。可4℃过夜保存。

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100 μl Antibody Buffer (-)，加入1 μl 5% Digitonin，混匀后置于冰上预冷。

4. Dig-wash Buffer: 取3.8 ml步骤2中配制的Wash Buffer，加入38 μl 5% Digitonin，混匀。

5. Stop Buffer: 取100 μl 2X Stop Buffer (-)，加入1 μl 5% Digitonin，按照细胞投入量加入对应使用量的Spike in DNA，混匀后置于冰上预冷。

Spike in DNA片段可以使用ddH₂O稀释，尽量现用现稀释，-20℃保存。

Spike in DNA片段可以用于实验测试的均一化校准，以K562细胞检测H3K4me3为例，Spike in DNA推荐使用量如下表所示：

细胞投入量	Spike in DNA投入量
5,000-10,000	1 pg
100,000	10 pg
500,000	50 pg

6. 按照瓶上标签向Buffer GW中加入指定量的无水乙醇：KE002-A，20 ml；KE002-B，40ml。

2. ConA Beads Pro处理

1. 取一支1.5 ml离心管，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. 将离心管从磁力架上取下，加入100 μl Binding Buffer，用移液器轻轻吹打混匀(请勿振荡混匀)。

4. 将离心管置于磁力架上，待液体澄清后(约2 min)，弃尽上清，加入10 μl 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 × g)低速离心5 min，弃上清。

3. 室温条件下加入500 μl Wash Buffer重悬细胞，2,500 rpm(600 × g)低速离心5 min，弃尽上清。

4. 每个样本加入100 μl Wash Buffer重悬细胞。

4. 细胞与ConA Beads Pro孵育

1. 将100 μl细胞转移至含有活化ConA Beads Pro的离心管中，轻甩混匀后，室温孵育10 min，期间轻甩混匀2 - 3次。勿使用移液器吹打混匀或涡旋振荡。

2. 瞬时离心(<100 × g)收集反应液，将离心管置于磁力架上，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100 μl预冷的Antibody Buffer重悬细胞-磁珠复合物。

2. 参照抗体说明书推荐的浓度向离心管中加入抗体，轻甩混匀。

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)，将离心管置于4℃静置过夜。

● 实验中建议设置阳性对照。

6. pG-MNase Enzyme孵育

1. 取1 μl pG-MNase Enzyme加入至100 μl MNase Dilution Buffer中，稀释后取1 μl加入至100 μl Dig-wash Buffer中，制成pG-MNase Enzyme预混液，上下颠倒混匀并放置于冰上。

● pG-MNase Enzyme现用现稀释，保证pG-MNase Enzyme处于最适切割状态；为了保证试剂pG-MNase Enzyme的稳定性，建议初次使用该组分时，进行分装并严格放置于-30 ~ -15℃保存。

2. 取一抗孵育中的离心管，瞬时离心收集反应液，将离心管置于磁力架上，待溶液澄清后(30 sec - 2 min)，弃尽上清。
3. 向离心管中加入800 μ l Dig-wash Buffer，上下颠倒数次，确保Buffer与细胞-磁珠复合物充分混合均匀。
4. 瞬时离心收集反应液，将离心管置于磁力架上，待溶液澄清后(30 sec - 2 min)，弃尽上清。
5. 重复步骤3 - 4(共2次)。
6. 加入步骤1中的100 μ l pG-MNase Enzyme预混液，上下颠倒数次，确保Buffer与细胞-磁珠复合物充分混合均匀。
7. 4°C条件下旋转孵育1 h。

7. 片段化

1. 取2 μ l CaCl₂加入98 μ l Dig-wash Buffer，上下颠倒混匀并放置于冰上。
2. 取pG-MNase Enzyme孵育中的离心管，瞬时离心收集反应液，将离心管置于磁力架上，待溶液澄清后(30 sec - 2 min)，弃尽上清。
3. 向离心管中加入800 μ l Dig-wash Buffer，上下颠倒数次，确保Buffer与细胞-磁珠复合物充分混合均匀。
4. 瞬时离心收集反应液，将离心管置于磁力架上，待溶液澄清后(30 sec - 2 min)，弃尽上清。
5. 重复步骤3 - 4(共2次)。
6. 加入步骤1中的100 μ l CaCl₂预混液，上下颠倒数次，确保Buffer与细胞-磁珠复合物充分混合均匀。
7. 由于不同目的蛋白表达丰度存在差异，对应的MNase最适切割条件不同，可以参考下表选择合适的消化温度及消化时间。也可根据实际情况调整消化温度及消化时间，过度消化会导致不必要的背景释放。

靶点丰度	消化温度	消化时间
常规组蛋白体系如H3K4me3等	冰上	1 h
表达丰度较高的转录因子体系如CTCF等	冰上	1.5 h
表达丰度较低的转录因子体系如Bmi1等	4°C	1-4 h

8. 片段化终止和释放

1. 向片段化中的离心管中加入100 μ l Stop Buffer，上下颠倒混匀。
2. 将离心管放置于37°C水浴锅，静置孵育10 - 30 min。
- 期间请勿振荡，保证DNA片段静置释放。
3. 4°C，12,900 rpm (16,000 $\times$ g)，离心5 min。
4. 将离心管置于磁力架上，待溶液澄清后(30 sec - 2 min)将上清液转移至新的1.5 ml 离心管中。
- 步骤4获得的上清液即染色质富集产物，可在-30 ~ -15°C保存7天。

9. DNA提取

1. 向片段化终止和释放中的1.5 ml 离心管中加入1 ml Buffer GDP，充分涡旋混匀，室温孵育10 min，其间颠倒混匀2 - 3次。
2. 瞬时离心收集管壁上的液滴。将FastPure gDNA Mini Columns吸附柱置于Collection Tubes 2 ml 收集管中，将650 μ l样本溶液转移至吸附柱中，12,000 rpm (13,400 $\times$ g)离心60 sec。
3. 弃滤液，把吸附柱置于收集管中。将剩余的全部样本溶液转移至吸附柱中，12,000 rpm (13,400 $\times$ g) 离心60 sec。
4. 弃滤液，把吸附柱置于收集管中。加入700 μ l Buffer GW(已加入无水乙醇)至吸附柱中。12,000

rpm (13,400 $\times$ g) 离心60 sec。

- 请沿吸附柱壁四周加入Buffer GW，或加入Buffer GW后盖盖颠倒混匀2 - 3次有助于完全冲洗沾附于管壁上的残留液体。
- 5. 弃滤液，把吸附柱置于收集管中。12,000 rpm (13,400 $\times$ g)离心2 min。
- 6. 开盖室温晾置2 - 5 min。
- 为保证DNA纯度，吸附膜需要充分晾干。
- 7. 将吸附柱置于新的1.5 ml 离心管中，加入20 μ l ddH₂O至吸附柱中央，放置2 min。
- 8. 12,000 rpm (13,400 $\times$ g)离心2 min，弃去吸附柱，将提取产物保存于-30 ~ -15°C。
- 步骤8获得的产物即目的基因片段，可在-30 ~ -15°C保存7天。

10. qPCR定量检测

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
2X Universal SYBR qPCR Master Mix	10 μ l
Primer F (10 μ M)	0.5 μ l
Primer R (10 μ M)	0.5 μ l
提取的DNA	2 μ l
RNase-free ddH ₂ O	7 μ l
Total	20 μ l

- DNA投入范围为2 - 9 μ l，对于低丰度的目的蛋白可以适当增加提取产物DNA投入量，并注意实验组和对照组投入的提取产物体积保持一致。
 - 引物终浓度为0.2 μ M通常可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在终浓度0.1 - 1.0 μ M范围内调整引物浓度。
 - qPCR灵敏度极高，因此请准确加入对应体积的模板，并保证枪头内的液体全部转移至反应体系中。
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：

阶段	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 sec	-
循环扩增	95°C	10 sec	40
	60°C	30 sec	
溶解曲线	95°C	15 sec	-
	60°C	60 sec	
	95°C	15 sec	

- a. 如果模板结构复杂，可以将预变性时间延长至3 min。
- b. 不同qPCR仪器溶解曲线采集的程序相同，使用仪器默认的溶解曲线采集程序即可。

11. qPCR结果分析

1. CT值、- $\Delta\Delta$ CT值与Relative Enrichment fold:

以使用 10,000 和 100,000 个 *Hela* 细胞，进行组蛋白 *H3K4me3* 和 *H3K27me3* 的 CUT&RUN-qPCR 实验为例，分别从各自的 IGV 上选择不同基因位点设计引物，使用这些引物和 *Spike in DNA* 引物进行目的基因相对富集程度检测。

2. 阳性对照示例：

以 100,000 个 *Hela* 细胞，进行组蛋白 *H3K4me3* 的 CUT&RUN-qPCR 实验为例，取 2 μ l 提取产物作为模板，使用阳性对照引物进行 *TBP* 基因相对富集程度检测。

图1 CUT&RUN基本流程图

