

Hieff NGS[®] In-Situ DNA Binding Profiling Library Prep Kit for Illumina[®] V2 CUT&Tag 试剂盒 (pA/G-Tn5 版)

12597ES

产品使用说明书

Ver. CN20241211

目录

产品简介	1
产品信息	1
组分信息	2
注意事项	2
使用说明	6
附录	10

产品简介


















Hieff NGS® In-Situ DNA Binding Profiling Library Prep Kit for Illumina® V2 是针对 Illumina® 高通量测序平台研发的用于 CUT&Tag 实验的文库构建试剂盒，适用于 100-100,000 个细胞起始量的样本建库。CUT&Tag 是研究蛋白与 DNA 互作的技术，相较于传统的 ChIP-seq、CUT&RUN，该技术具有文库构建时长更短（仅需 7 小时）、操作更简单、对起始样本要求更低、抗体投入量更少、文库产量更高等优点。经过细胞捕获、一抗孵育、二抗孵育、转座酶孵育、转座酶激活、掺入 DNA 标准品、细胞裂解、磁珠回收 gDNA、文库扩增和磁珠分选等步骤，靶蛋白结合的 DNA 片段最终转化为适用于 Illumina® 平台测序的文库。

本试剂盒包含两个独立模块：BOX-I 和 BOX-II。BOX-I 包含结合细胞的 ConA Beads、提取 DNA 的 DNA Extract Beads 以及文库纯化的 DNA Selection Beads，BOX-II 包含细胞透化剂、抗体结合 buffer、转座酶结合 buffer、蛋白酶 K 以及后续文库扩增所需的所有试剂。此外，本试剂盒已在不同种类细胞（如 293T、K562、CHO、ESC 细胞等）中进行了验证，均具有良好的建库效率和建库产量。本试剂盒提供的所有试剂都经过严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了文库的稳定性和重复性。

产品信息

产品名称	产品编号	规格
Hieff NGS® In-Situ DNA Binding Profiling Library Prep Kit for Illumina® V2 CUT&Tag 试剂盒（pA/G-Tn5 版）	12597ES04	4 T
	12597ES12	12 T
	12597ES48	48 T

组分信息

组分编号	组分名称	12597ES04	12597ES12	12597ES48	
BOX-I	12597-A 	ConA Beads	40 μ L	120 μ L	480 μ L
	12597-B 	DNA Extract Beads	280 μ L	840 μ L	3.36 mL
	12597-C 	DNA Selection Beads	400 μ L	1.2 mL	4.8 mL
BOX-II	12597-D 	10 \times Binding Buffer	120 μ L	360 μ L	1.44 mL
	12597-E 	10 \times Wash Buffer	600 μ L	1.8 mL	7.2 mL
	12597-F 	5% Digitonin	45 μ L	135 μ L	540 μ L
	12597-G 	50 \times PB Buffer	6 μ L	18 μ L	72 μ L
	12597-H 	10 \times Dig-300 Buffer	400 μ L	1.2 mL	4.8 mL
	12597-I 	pA/G-Transposome Mix	8 μ L	24 μ L	96 μ L
	12597-J 	33 \times Activating Buffer	6 μ L	18 μ L	72 μ L
	12597-K 	15 \times Terminate Solution	20 μ L	60 μ L	240 μ L
	12597-L 	30 \times Proteinase K	10 μ L	30 μ L	120 μ L
	12597-M 	DNA Spike-in Mix (5 ng/ μ L)	4 μ L	12 μ L	48 μ L
	12597-N 	2 \times HiFi Amplification Mix	100 μ L	300 μ L	1.2 mL
	12597-O 	Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)*	2 μ L	6 μ L	24 μ L
	12597-P 	N5 (N501)**	4 μ L	/	/
	12597-Q 	N7 (N701)**	4 μ L	/	/

注意:*本试剂盒中包含的二抗为山羊抗兔二抗,适用于使用一抗来源于兔源的研究,若需要一抗来源于鼠源的研究,需客户自行准备抗鼠二抗(Yeasen cat#34851ES)或其他等效产品。

**测序时 Index 序列 填写时,测序平台为 NovaSeq 6000 v1.0 reagents, MiSeq, HiSeq 2000/2500, 则 N501-CTCTCTAT, N701-TAAGCGGA。测序平台为 NovaSeq 6000 v1.5 reagents, MiniSeq, NextSeq, HiSeq 3000/4000, 则 N501-ATAGAGAG, N701-TAAGCGGA。

***本试剂盒在实验前需自备蛋白酶抑制剂 Cocktail (Yeasen Cat#20123ES) 或其他等效产品。

储存条件

BOX-I: 2-8 $^{\circ}$ C保存, BOX-II: -25~-15 $^{\circ}$ C保存, 有效期 1 年。

注意事项

一、关于操作

1. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
2. 为避免样品交叉污染, 推荐使用带滤芯的枪头, 吸取不同样品时请更换枪头。
3. 推荐在带热盖的PCR仪中进行各步骤反应, 使用前应预热PCR仪至反应温度附近。
4. PCR产物因操作不当极易产生气溶胶污染, 进而影响实验结果准确性。推荐将PCR反应体系配制区和PCR产物纯化检测区进行强制性的物理隔离、配备文库构建专用移液器等设备以及定时对各实验区域进行清洁(推荐使用ThermoFisher公司的DNAZapTM高效核酸去除喷雾), 以保证实验环境的洁净度。
5. 操作细胞应尽量轻柔以保持细胞活性。
6. 本产品仅用作科研用途!

二、应用范围

本试剂盒适用于细胞投入量为 100-100,000 个的 CUT&Tag 研究。原则上，所有真核生物的新鲜样本或冻存样本都能适用于本试剂盒，但不同的样本类型需要进行不同的样本前处理（如组织样本的细胞/细胞核悬液制备、植物样本或者真菌样本的原生质体制备或细胞核悬液制备）后才能按照本实验操作流程进行实验。

三、ConA beads 操作注意事项

1. 使用前将磁珠平衡至室温，请勿将磁珠置于 0°C 以下存放。
2. ConA beads 与细胞结合后，应避免剧烈震荡或用力吹打磁珠-细胞复合物使细胞应力损伤导致磁珠与细胞分离。
3. 在处理磁珠溶液时应尽量避免高转速离心或长时间置于磁力架上，人为造成磁珠凝集。
4. 避免磁珠长时间暴露在空气中使得磁珠干裂或者磁珠-细胞复合物损伤（不超过 3 min）。
5. 孵育过程中出现部分磁珠沾壁/聚集是正常现象，只有保证磁珠-细胞复合物处于溶液浸润的范围内，不会影响后续的实验结果。
6. 本产品仅用作科研用途!

四、关于 DNA Extract Beads 及 DNA Selection Beads 操作注意事项

1. DNA Extract Beads 用于转座反应后的基因组 DNA 提取，DNA Selection Beads 在文库纯化过程中使用，切勿弄错。
2. 磁珠使用前应先平衡至室温，否则会导致得率下降、分选效果不佳。
3. 请勿将磁珠置于 0°C 以下存放。
4. 磁珠每次使用前都应充分振荡混匀或使用移液器上下吹打充分混匀。
5. 转移上清时，请勿吸取到磁珠，即使枪头吸取微量磁珠都将影响后续文库质量。
6. 磁珠洗涤使用的 80%乙醇应现用现配，否则将影响回收效率。
7. 产物洗脱前应将磁珠置于室温干燥。干燥不充分容易造成无水乙醇残留影响后续反应；过分干燥又会导致磁珠开裂进而降低纯化得率。通常情况下，室温干燥 3 min 足以让磁珠充分干燥。
8. DNA 纯化或长度分选产物如需保存，可使用 0.1×TE Buffer 洗脱，产物于 4°C 可保存 1~2 周，-20°C 可保存 1 个月。

五、关于试剂

1. 不同的 Buffer 试剂应注意保存条件，避免失效。
2. Digitonin 有细胞毒性，且容易降解。在溶液配制过程中请做好个人防护。加入 Digitonin 的溶液应现配现用。

六、文库结构

Index 2 (i5)

5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC■■■■■TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-NNNNNN-CTGTCTCTTATACACATC
TCCGAGCCACGAGAC■■■■■ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

Index 1 (i7)

■■■■■: Index 2 (i5), 8 bases; ■■■■■: Index 1 (i7), 8 bases; -NNNNNN-: 插入序列。

七、关于抗体选择

1. CUT&Tag 实验中使用的一抗，建议使用 ChIP 级别或者 CUT&Tag、CUT&RUN 实验验证过的抗体，若无法达到抗体要求级别，可以使用 IF 级别抗体进行实验尝试。
2. 实验中建议设置阳性对照和阴性对照组，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。
3. CUT&Tag 实验中使用的二抗，建议根据一抗种属以及 Protein A/G 的亲和能力选择无任何标记或修饰（HRP、FITC 等）的二抗，二抗种属来源以及与 Protein A/G 的亲和能力进行选择，可以参照以下表格：

物种	抗体亚型	Protein A	Protein A/G(Cat#12597)
Human	Total IgG	+++++	+++++
	IgG1	+++++	+++++
	IgG2	+++++	+++++
	IgG3	++	+++++
	IgG4	+++++	+++++
	IgM	++	++
	IgA1	++	++
	IgA2	++	++
Mouse	Total IgG	+++++	+++++
	IgM	-	-
	IgG1	++	++++
	IgG2a	+++++	+++++
	IgG2b	+++++	+++++
	IgG3	+++++	+++++
Rat	Total IgG	++	++++
	IgG1	+	+++
	IgG2a	-	+++++
	IgG2b	-	+++
	IgG2c	+++++	+++++
	IgG3	++	++++
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	+++++	+++++
Cow	Total IgG	++	+++++
Horse	Total IgG	++	+++++
Monkey	Total IgG	+++++	+++++

【注】：+++++代表亲和能力非常强，+++代表亲和能力中等，+代表亲合能力很弱，-代表没有亲合能力。

二抗推荐： Guinea Pig anti-Rabbit IgG (Heavy & Light Chain) antibody (antibodies-online Cat#ABIN101961)

- 驴抗兔 IgG H&L (Abcam #ab6701)
- 山羊抗兔 IgG H&L (Abcam #ab6702)
- 山羊抗兔 IgG H&L (Yeasten #34850ES)

抗兔二抗

Rabbit anti-Mouse IgG (Heavy & Light Chain) Antibody (antibodies-online Cat#ABIN101785)

山羊抗小鼠 IgG H&L (Abcam #ab6708)

山羊抗小鼠 IgG H&L (Yeasen #34851ES)

抗鼠二抗

八、关于文库扩增

1. 本试剂盒中的文库扩增组分由本公司高保真 DNA 聚合酶所组成，大大增强了扩增的均一性，即使是低拷贝的基因，也能进行无偏好性地扩增。
2. 推荐使用本公司的 Hieff NGS® Tagment Index Kit for Illumina® (Yeasen Cat#12416)模块进行文库扩增，该模块提供了 384 种不同组合的双端 index 文库制备引物，最大程度上保证了文库构建的稳定性和重复性。
3. 对于 PCR 循环数，原则上在满足上机的前提下，尽量降低扩增循环数。特别是少量细胞和低丰度蛋白，循环数不足，将导致文库产量低；循环数过多，将导致文库偏好性增加、重复度增加、大片段增多、嵌合产物增加、扩增突变累积等多种不良后果。表 2 以 293T 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 (对于丰度较低的转录因子，可以在表 2 的基础上适当增加 2-4 个 cycle)：

表 2 细胞投入量与扩增循环数推荐表 (H3K4me3/H3K27me3) *

细胞投入量	PCR 循环数	文库产量
100,000	12-14	10-50 ng/μL
10,000	14-16	
1,000	17-19	
100	20-22	

【注】：*由于不同靶蛋白的表达量、DNA 结合能力差异较大。实验中需根据建库起始细胞量、蛋白类型、细胞类型和样本处理情况适当调整扩增循环数。如何确定扩增循环数，具体请参考附录 A。

4. 本试剂盒适用的细胞投入量为 100-100,000 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 10,000-100,000 个细胞，待获得较理想的结果后，再探索低起始细胞量，细胞量低于 10 K 时，由于细胞容易损失，实验成功率会降低，建议增加重复组数量。

九、关于 DNA 标准品

DNA Spike-in Mix (5 ng/μL) 是来源于大肠杆菌 Lambda DNA 的三段序列，长度分别为 230 bp、250 bp 和 300 bp，摩尔浓度比约为 1: 3: 10(见图 1)。标准品主要用于在不同处理条件下或者不同细胞状态下测序数据 Normalization 和定量分析。本试剂盒中提供的 DNA Spike-in 浓度为 5 ng/μL，推荐添加量为 1 pg/10 万，根据实际细胞投入量将 DNA Spike-in 梯度稀释后添加，也可根据靶蛋白的结合 DNA 能力和丰度自行调整。标准品序列：

Spike-in-1: GTTCCACTCCTGAAGTGCAAGTACATCGCAAAGTCTCCGCAA

TTACACGCAAGAAAAACCGCCATCAGCGCGCTTGGTGTCTTTCAGTTCTT

CAATTGCAATATTGGTTACGCTGCTGCTATCTGCGCCATATCATCCAGT

GGTCGTAGCAGCTGTTGATGTTCTCCGCTTCGATAACTCTGTTGAATGGCTCT

CCATTCCATTCTCCTGTGACTCGGAAGT

Spike-in-2: AGTCGGTGTGAATCCCATCAGCGTTACCGTTTTGCGGGTGCTTC

TTCAGTACGCTACGGCAAATGTCATCGACGTTTTTATCCGGAAACTGCTGTCT

GGCTTTTTTTGATTTGAGAATTAGCCTGACGGGCAATGCTGCGAAGGGCGTTT

TCCTGCTGAGGTGTCATTGAACAAGTCCCATGTCGGCAAGCATAAGCACACA

GAATATGAAGCCCGCTGCCAGAAAAATGCATTCCGTGGTTGTCATACCT

Spike-in-3:

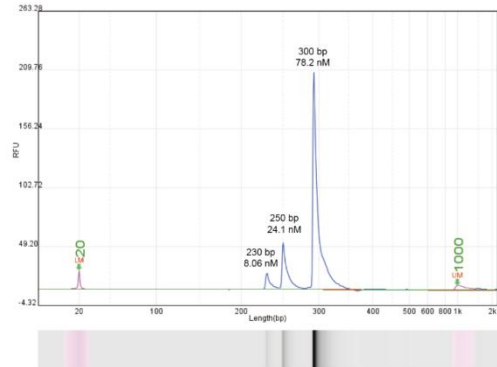


图 1 DNA spike-in mix 长度以及摩尔浓度比

十、关于文库质检

1. 通常情况下，构建好的文库可通过长度分布检测和浓度检测来进行质量评价。
2. 文库浓度检测可使用：基于双链 DNA 荧光染料的方法，如 Qubit®、PicoGreen®等以及基于 qPCR 绝对定量的方法。
3. 文库长度分布检测，可通过 Qsep、Agilent Bioanalyzer 2100 等基于毛细管电泳或微控流原理的设备进行检测。

使用说明

一、实验前准备

自备材料

1. 抗体：靶蛋白的一抗和相对应的二抗（本试剂盒提供抗兔的二抗，若需要抗鼠二抗，推荐使用 Yeasen cat#34851ES 或其他等效产品）。
- 蛋白酶抑制剂:推荐使用 InStab™ Protease Cocktail,EDTA-free,mini,tablet-form (Yeasen cat#20123ES) 或其他等效产品。
2. 文库质检：Agilent 2100 Bioanalyzer DNA 1000 Chip/ High Sensitivity Chip 或其他等效产品、文库定量试剂。
3. 其他材料：无水乙醇、无菌超纯水、低吸附枪头、PCR 管、磁力架、PCR 仪等。
4. Hieff NGS® Tagment Index Kit for Illumina® (Cat#12416ES) 或其他替代引物。

细胞准备

1. 在室温条件下收集细胞并计数，死亡的细胞染色质松散，暴露出大量的裸 DNA，转座酶复合物随机切割会造成比较强的噪音信号，建议样本细胞活性不低于 80% (细胞活性可以用台盼蓝染色来鉴定)。
2. 贴壁较紧的细胞如 Hela 细胞等可用 Accutase 或者 Trypsin 部分消化获得。对于部分细胞系,使用 Accutase 或者 Trypsin 消化可能会影响细胞与 ConA Beads 的结合效果，需要根据实际情况进行判断。
3. 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。
4. 对于一些转录因子及表达丰度较低的目的蛋白，可以对细胞及细胞核进行轻度交联，以获得更好的实验效果。

二、实验流程

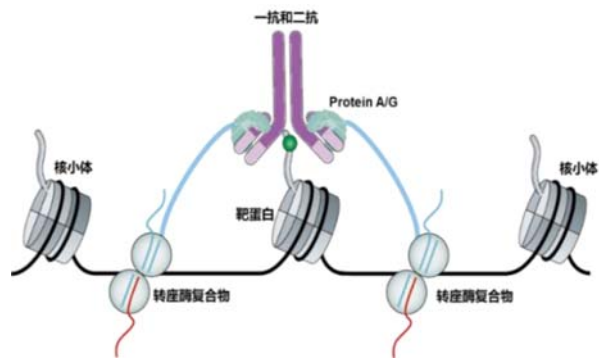
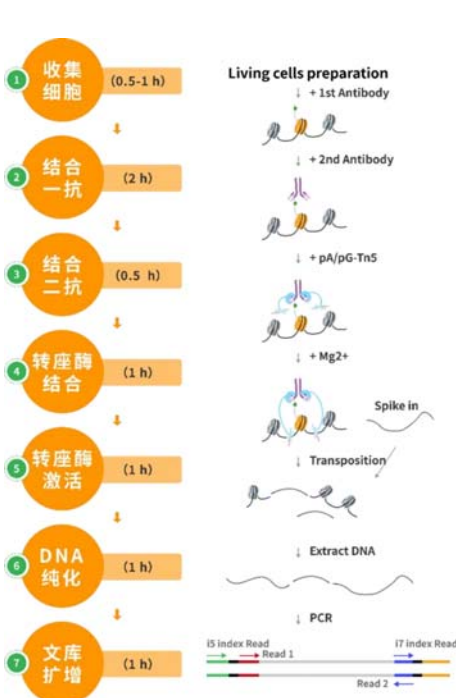


图 1 CUT&Tag 建库试剂盒操作流程及转座原理

原理:利用 Con A 磁珠捕获细胞并利用 5% Digitonin 对细胞膜进行穿孔,通过结合一抗、二抗和 Protein A/G- Transposome 来靶向切割目标蛋白结合的 DNA 序列,再经过 PCR 完成二代测序文库的构建。对文库进行测序后的数据分析即可得到高分辨率靶蛋白结合的基因组图谱。对于人源细胞的组蛋白修饰,仅需 3-5 M reads。

三、操作步骤

3.1 溶液配制（以下配置的体积为**单个样本单次反应的用量**，若有多个样本同时实验，需根据样本量修改配置体积，本试剂配置量已考虑了试剂损耗，多样本配置无需额外计算损耗。）

1. 提前 10 min 取出 10 × Binding Buffer、10 × Wash Buffer、10 × Dig-300 Buffer 、5% Digitonin，50 × PB Buffer 室温融化，混匀备用。

2. **1×Binding Buffer**: 210 μL/样本，单样本配制：取 30 μL **10 × Binding Buffer**，加入 270 μL ddH₂O，混匀。

3. **1× Wash Buffer**: 1440 μL/样本，单样本配制：取 150 μL **10 × Wash Buffer**，加入 60 μL **25×蛋白酶抑制剂**，加入 1290 μL ddH₂O，混匀。

4. **Primary Antibody Buffer**: 50 μL/样本，单样本配制：取 48.5 μL 步骤 3 中配制的 **1× Wash Buffer**+0.5 μL **5% Digitonin**+1 μL **50 × PB Buffer**，混匀后置于冰上预冷（此配置未计算损耗量，多样本配置可多配置 0.5 个反应）。

5. **Secondary Antibody Buffer**: 650 μL/样本，单样本配制：取 792 μL 步骤 3 中配制的 **1× Wash Buffer**，加入 8 μL **5% Digitonin**，混匀。

6. **1× Dig-300 Buffer**: 700 μL/样本，单样本配制：取 100 μL **10 × Dig-300 Buffer**，加入 2 μL **5% Digitonin** 和 40 μL **25×蛋白酶抑制剂**，加入 858 μL ddH₂O，混匀（**推荐现配现用**）。

【注】：1、含有 Digitonin 的缓冲液不可长期保存，请根据实际样本数量现配现用，配制的 buffer 室温放置。

2、**25×蛋白酶抑制剂**：取一片蛋白酶抑制剂混合片剂（Yeast cat#20123ES）或其他等效片剂蛋白酶抑制剂溶于 400 μL ddH₂O 中，上下颠倒混匀，-20℃保存，蛋白酶抑制剂液体状保存时间较短，从溶解之日起，勿超过 3 个月，否则影响实验效果。充分溶解后溶液可能呈现微弱浑浊或存在小颗粒，属于正常现象。其他品牌的蛋白酶抑制剂，需要参考试剂的说明书配置。

3.2 ConA Beads 处理

1. 取一支 8 联管，每个样本加入 100 μL **1× Binding Buffer**。

2. 使用移液器充分重悬 ConA Beads，取出 10 μL ConA Beads 至步骤 1 的 **1× Binding Buffer** 中，用移液器轻轻吹打均匀，置于磁力架上，待溶液澄清后，弃上清。

3. 将 8 联管从磁力架上取下，加入 100 μL **1× Binding Buffer**，用移液器轻轻吹打混匀。

4. 将 8 联管置于磁力架上，待液体澄清后，弃上清，加入 10 μL **1× Binding Buffer** 重悬 ConA Beads。

注：若样本较多，可在 EP 管中一起处理 ConA beads（10 倍于原磁珠体积的 **1× Binding Buffer** 清洗磁珠），在步骤 3.4 细胞（细胞核）与 ConA Beads 孵育步骤时再分装入 8 连管中即可。

3.3 细胞收集（若为细胞核，步骤参见附录 B）

1. 在室温下收集细胞并计数。

2. 取实验所需数量的细胞于 1.5 mL EP 管中，室温下 2500 rpm(600 × g)离心 5 min，弃上清。

3. 室温条件下加入 500 μL **1× Wash Buffer** 重悬细胞，室温下 2500 rpm(600 × g)离心 5 min，弃上清。

4. 每个样本加入 100 μL **1× Wash Buffer** 重悬细胞。

【注】：1. 对于大小不同的细胞，请根据实际情况调整离心力。

2. 可选步骤-获取细胞核，详见附录 B。

3. 对于一次实验需要较多细胞，可在一管 EP 管中收集，用 **1× wash buffer** 一起重选，到步骤 3.4 细胞（细胞核）与 ConA Beads 孵育步骤时再分装即可。

3.4 细胞（细胞核）与 ConA Beads 孵育

1. 将 100 μL 细胞（细胞核）转移至含有 10 μL 活化 ConA beads 的 8 联管中，上下颠倒（轻柔）混匀后，瞬时离心（<100 × g），室温水平旋转孵育 10 min（亦可室温桌面放置 10 min，期间颠倒混匀 2-3 次）。

【注】：1. 离心管需低吸附。

2. 旋转孵育转速根据仪器情况调整，保持管中液体能轻微晃动即可，避免试剂碰到管盖。

3. 请提前做好下一步骤所需的预冷 Primary Antibody Buffer。

2. 瞬时离心($<100 \times g$)，将 8 联管置于磁力架上，待溶液澄清后 (约 2 min)，弃上清后取下 8 联管，立即进入下一步 3.5 (请提前做好 Primary Antibody Buffer)。

【注】：1. **结合细胞后的磁珠需要轻柔操作，避免剧烈涡旋导致细胞损伤。**建议颠倒、轻弹底部或者用平口枪头轻轻吹吸等方式混匀，避免产生大量气泡，避免磁珠在磁力架上放置过长时间和直接暴露在空气中时间过长 (不超过 3 min) 造成磁珠结块及细胞破裂。

2. 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。

3. 接下来的实验涉及多步上下颠倒混匀步骤，需轻柔，如果磁珠聚集在底部，可以倒置轻轻拨动管底，使其混匀。

3.5 结合一抗、二抗和转座酶 (5 hour)

1. 结合一抗

1) 每个样本加入 50 μL 预冷的 Primary 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($<100 \times g$)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 联管置于室温水平旋转 2 hour 或 4°C 水平旋转孵育过夜 (本试剂盒最长测试过夜孵育时长为 17 hour，更长的孵育时间需自行测试)**，保证液体在管底。

2. 二抗孵育

1) 提前 10 min 将 Digitonin 室温化冻，混匀备用。配置 Secondary Antibody Buffer: 650 μL /样本，单样本配制: 取 792 μL 步骤 3.1-3 中配置的 1 \times Wash Buffer，加入 8 μL 5% Digitonin，混匀。

2) 用 Secondary Antibody 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 μL 。

3) 取 3.5.1/结合一抗步骤 3 中的 8 联管，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(约 2 min)后，弃上清。

4) 将 8 联管从磁力架上取下，加入 3.5.2/二抗孵育步骤 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，室温下水平旋转孵育 60 min。

5) 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(约 2 min)后，弃上清。

6) 将 8 联管从磁力架上取下，加入 200 μL Secondary Antibody 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。

7) 重复步骤 5~6 两次(共 3 次)。

3 转座酶孵育

1) 提前 10 min 将 10 \times Dig-300 Buffer、25 \times 蛋白酶抑制剂、5% Digitonin 室温解冻，混匀备用。

2) 配置 1 \times Dig-300 Buffer: 700 μL /样本，单样本配制: 取 100 μL 10 \times Dig-300 Buffer，加入 2 μL 5% Digitonin 和 40 μL 25 \times 蛋白酶抑制剂，加入 858 μL ddH₂O，混匀。

3) 取 2 μL pA/G-Tnp 加入 98 μL 1 \times Dig-300 Buffer 混合，每个样本 100 μL 。

【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。

4) 取 3.5.2/二抗孵育中的 8 联管，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(约 2 min)后，弃上清。

5) 将 8 联管从磁力架上取下，每个样本加入 100 μL 步骤 1 中稀释好的 pA/G-Tnp 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。

6) 室温下水平旋转孵育 60 min。

7) 瞬时离心($<100 \times g$) 收集反应液，将 8 联管置于磁力架上，待液体澄清(约 2 min)后，弃上清。

8) 将 8 联管从磁力架上取下，加入 200 μL 1 \times 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。

9) 重复步骤 7~8 两次(共 3 次)。

3.6 转座酶激活

- 1) 提前 10 min 将 33 x Activating Buffer 室温解冻, 混匀备用。
- 2) 配置 **1× Activating Buffer**: 取 48.5 μL **1× Dig-300 Buffer** + 1.5 μL **33 x Activating Buffer**, 混匀。
- 3) 将 3.5 中的 8 联管瞬离 (<100 × g) 后置于磁力架上, 待液体澄清(约 2 min)后, 弃上清。
- 4) 将 8 联管从磁力架上取下, 每个样本加入 50 μL 步骤 2 中稀释的 **1× Activating Buffer**, 混合均匀。
- 5) 将 8 联管置于 PCR 仪中 37 °C 孵育 60 min 。

【注】: 无需设置热盖, 可使 PCR 仪保持开盖状态。

3.7 蛋白酶 K 消化和基因组 DNA 回收

1. 向转座酶激活后的样品中加入 3.3 μL **15× Terminate Solution**, 1.7 μL **30× Proteinase K** 和适量的 DNA Spike-in Mix。充分涡旋混匀, 混匀后瞬离, 将样品置于 PCR 仪, 55 °C 消化 30 min (热盖不低于 70 °C)。

【注】: 1. DNA Spike-in Mix 主要用于不同处理条件或者细胞状态下的测序数据 Normalization 和定量分析, 为非必需加入的组分。客户可根据实验需要判断是否加入 DNA Spike-in Mix。本试剂盒中提供的 DNA Spike-in 浓度为 5 ng/μL, 推荐添加量为 1 pg/10 万, 根据实际细胞投入量将 DNA Spike-in 梯度稀释后添加, 也可根据靶蛋白的结合 DNA 能力和丰度自行调整 (**DNA Spike-in Mix 需稀释后使用**)。

2. 如果样本较多, 可将 15× Terminate Solution, 30× Proteinase K 及 DNA spike-in Mix 配置预混液, 预混液应该在配置完 5 min 内使用, 不宜放置过久。

2. 短暂离心 (<100 × g) 收集反应液, 将 8 联管置于磁力架上静置 5 min, 取 50 μL 上清。
3. 加入 70 μL (1.4x) 室温下平衡的 **DNA Extract Beads**, 涡旋混匀, 室温静置孵育 5 min。
4. 短暂离心 (<100 × g) 收集反应液, 将 8 联管置于磁力架上静置 3~5min, 待磁珠完全贴壁后吸净管内溶液。
5. 保持 8 联管始终处于磁力架上, 加入 200 μL 80%乙醇, 避免直接冲刷磁珠, 静置 30-60 sec, 吸净管内溶液。
6. 保持 8 联管始终处于磁力架上, 再次加入 200 μL 80%乙醇, 静置 30~60 sec, 吸净管内溶液。
7. 保持 8 联管始终处于磁力架上, 开盖空气干燥至磁珠刚刚出现龟裂 (不超过 3 min) 。

【注】: 1. 移除上清后, 可以短暂离心再置于磁力架上, 使用 10 μL 移液器将残留液体吸干净, 缩短干燥时间。

2. 避免磁珠过分干燥 (龟裂) 而降低回收效率。

8. 从磁力架上取下 8 联管, 加入 25 μL ddH₂O, 并充分涡旋, 室温静置 5 min。
9. 将 8 联管短暂离心, 置于磁力架上分离磁珠和液体, 待溶液澄清后 (约 3~5 min), 小心转移 23 μL 上清至新 EP 管中。

【注】: 可以在-20°C过夜放置。

3.8 文库扩增

1. 将表 4 中试剂解冻后颠倒混匀, 瞬离后置于冰上备用。
2. 于无菌 PCR 管中配制表 3 所示反应体系。

表 3 PCR 扩增反应体系

名称	体积 (μL)
步骤 3.7 纯化产物	23
N5XX*	1
N7XX*	1
2× HiFi Amplification Mix	25

【注】: *HiEff NGS® Tagment Index Kit for Illumina® (Cat#12416ES) 中提供多种 N5XX 和 N7XX, 可根据样品数量和 Index 选择策略自行选择。

3. 使用移液器轻轻吹打或振荡混匀, 并短暂离心将反应液收集至管底。
4. 将 PCR 管置于 PCR 仪中, 设置表 4 所示反应程序, 进行 PCR 扩增。

表 4 PCR 扩增反应程序

温度	时间	循环数
热盖 105°C	On	---
72°C	3 min*	---
95°C	3 min	---
98°C	10 sec	n cycles**
60°C	15 sec	
72°C	1 min	---
4°C	Hold	---

【注】：*此步不可省略。转座反应产物并非完整的双链 DNA，72°C 孵育 3 min 用于生成成熟的 PCR 模板。

**由于不同靶蛋白的表达量、DNA 结合能力差异较大。实验中需根据建库起始细胞量、蛋白类型、细胞类型和样本处理情况适当调整扩增循环数。

3.9 文库纯化

1. 将平衡至室温的 **DNA Selection Beads** 磁珠，振荡或上下颠倒混匀。
2. 吸取 100 μL ($2\times$) DNA Selection Beads 至步骤 3.10 的 PCR 反应产物中，涡旋混匀或用移液器吹打混匀 10 次，室温静置孵育 5 min。
2. 短暂离心 ($<100 \times g$)，将离心管置于磁力架上静置 5 min，待磁珠完全贴壁后吸净 PCR 管中溶液。
3. 保持 PCR 管始终处于磁力架上，加入 200 μL 80%乙醇，避免直接冲刷磁珠，静置 30-60 sec，弃上清。
4. 保持 PCR 管始终处于磁力架中，再次加入 200 μL 80%乙醇，静置 30~60 sec，弃上清。
5. 保持 PCR 管始终处于磁力架中，开盖空气干燥至磁珠刚刚出现龟裂（不超过 3 min）。

【注】：1. 移除上清后，可以短暂离心再置于磁力架上，使用 10 μL 移液器将残留液体吸干净，缩短干燥时间。

2. 避免磁珠过分干燥（龟裂）而降低回收效率。

6. 从磁力架上取下 PCR 管，加入 22 μL ddH₂O，并充分涡旋，室温静置 5 min。
7. 将 PCR 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），小心转移 20 μL 上清至新的 EP 管中，于 -20°C 保存。
8. 如需获得长度分布更集中的文库扩增产物，可使用胶回收或者磁珠分选的方式进行长度分选和纯化。文库大小可使用 Agilent 2100 Bioanalyzer、Qsep 或者凝胶电泳进行检测。

3.10 文库质量控制

通常情况下，构建好的文库可通过浓度检测和长度分布检测来进行质量评价，具体请参见注意事项。

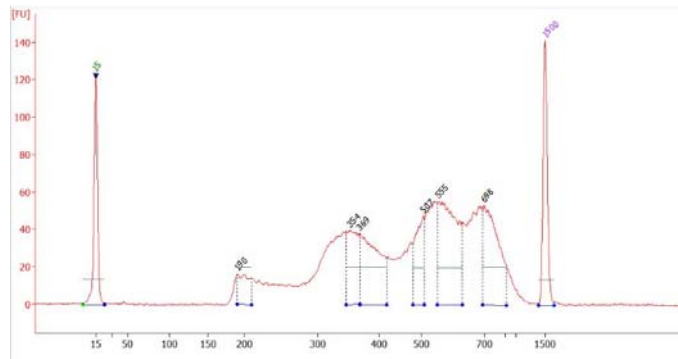


图 2. 使用此 CUT&Tag® 试剂盒对 10w 数量的 293 细胞进行 H3K4me3 抗体的检测建库，Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 检测文库片段长度分布如上图所示。

附录

附录 A: PCR 循环数的确定

1. 用步骤 3.7 提取的 DNA 打断产物作为 PCR 检测底物；

2. 分别取 1 μ L 提取的 DNA 产物，参照步骤 3.8-2 配制 50 μ L 的 PCR 扩增体系（1 μ L DNA 产物+1 μ L N5 引物+1 μ L N7 引物 + 22 μ L ddH₂O +25 μ L HIFI Amplification Mix），做 PCR 循环梯度测试。

注：试剂盒中 HIFI Amplification Mix 体积不够进行 PCR 循环数确定时，推荐使用 Yeasen cat#12620ES。

3. 以 10 万 Kr293 细胞、组蛋白 H3K4me3 为例，分别扩增 15、17、19 个循环（1.5%-2%琼脂糖电泳，135V，20~25 min，上样 5-10 μ L），电泳有微弱条带即可。如果 15 个循环就能看到微弱条带，那么将剩下的 20 μ L 打断产物配置一个 50 μ L 的 PCR 体系，扩增 11 个循环即可，计算方法为： $2^4=16, 15-4=11$ ，大体上扩增模板量或细胞数量增加一倍，减少一个循环，如果是转录因子，由于其丰度一般较低，建议 PCR 循环数梯度设为 17、19、21 个循环进行模式。

注：可以使用一台 PCR 仪进行循环梯度测试，先扩增 15 个循环，取出扩增好的样品，剩余样品一起加 3 个循环，后面以此类推。

附录 B：动植物组织细胞核的制备

1、植物组织细胞核的分离。

1.1 溶液配制（本试剂配置量已考虑了试剂损耗，多样本配置根据样本数增加配置体积时，无需额外计算损耗）

1. 提前将所需试剂冰上解冻。

2. **1 \times Binding Buffer**: 210 μ L/样本，单样本配制：取 30 μ L **10 \times Binding Buffer**，加入 270 μ L ddH₂O，混匀。

3. **1 \times Wash Buffer**: 1440 μ L/样本，单样本配制：取 150 μ L **10 \times Wash Buffer**，加入 60 μ L **25 \times 蛋白酶抑制剂**，加入 1290 μ L ddH₂O，混匀。

4. **Primary Antibody Buffer**: 50 μ L/样本，单样本配制：取 48.5 μ L 步骤 3 中配制的 **1 \times Wash Buffer**+0.5 μ L **5% Digitonin**+1 μ L **50 \times PB Buffer**，混匀后置于冰上预冷（此配置未计算损耗量，多样本配置可多配置 0.5 个反应，配制中所需试剂足量，无需考虑试剂配制不足问题）。

5. **Secondary Antibody Buffer**: 650 μ L/样本，单样本配制：取 792 μ L 步骤 3 中配制的 Wash Buffer，加入 8 μ L 5% Digitonin，混匀（选择 3.5-A 步骤时，无需配制此试剂，选择 3.5-B 步骤时，推荐现配现用）。

6. **1 \times Dig-300 Buffer**: 700 μ L/样本，单样本配制：取 100 μ L **10 \times Dig-300 Buffer**，加入 2 μ L **5% Digitonin** 和 40 μ L **25 \times 蛋白酶抑制剂**，加入 858 μ L ddH₂O，混匀（选择 3.5-B 步骤时，推荐现配现用）。

【注】：1、含有 Digitonin 的缓冲液不可长期保存，请根据实际样本数量现配现用，配制的 buffer 室温放置。

2、**25 \times 蛋白酶抑制剂**：取一片蛋白酶抑制剂混合片剂（Yeasen cat#20123ES）溶于 400 μ L ddH₂O 中，上下颠倒混匀，-20 $^{\circ}$ C 保存，蛋白酶抑制剂液体状保存时间较短，从溶解之日起，勿超过 3 个月，否则影响实验效果。充分溶解后溶液可能呈现微弱浑浊或存在小颗粒，属于正常现象。

7. 核提取液缓冲液 A: 10 mM Tris pH 8.0、10 mM KCl、0.5 mM spermidine。

8. 核提取液缓冲液 B: 0.25 M 蔗糖、10 mM Tris pH 8.0、10 mM MgCl₂、1% Triton X-100、5 mM β -巯基乙醇、0.1% Protease Inhibitor Cocktail。

9. 核提取液缓冲液 C: 1.8 M 蔗糖、10 mM Tris pH 8.0、2 mM MgCl₂、0.15% Triton X-100、5 mM β -巯基乙醇、0.1% Protease Inhibitor Cocktail。

10. 核提取液缓冲液 D: 10 mM Tris pH 8.0、150 mM NaCl、0.5 mM spermidine、0.1% Protease Inhibitor Cocktail。

1.2 植物细胞核分离和捕获（2 hour）

为避免叶绿体或线粒体等细胞器 DNA 产生的数据背景，我们建议对植物组织进行细胞核提取处理。

1. 称取 0.2 g 新鲜植物组织（如叶片等），用剪刀将样品剪成碎片后置于 5 cm 塑料培养皿中，加入核提取缓冲液 A（不能加太多缓冲液，刚刚能浸湿样品即可），用刀片轻而快的切样品直至样品看不见颗粒为止（泥状或卵状）（若样本冻存时间较长，需要进行液氮研磨，即称取 0.2 g 冻存样本，加入液氮充分研磨成冻干粉末，将研磨好的粉末用 6 mL 预冷的核提取液 A 重悬并转移至 15 mL 离心管中，颠倒震荡混匀）。

2. 用 40 μ m 滤器（建议尽量用能适配 15 mL EP 管的滤器，过大会造成样品损失）过滤步骤 1 中的溶液，步骤 1 培养皿

中有剩余样品可以吸取核提取缓冲液 A 少量多次冲洗并将冲洗液继续过滤。

3. **(可选) 流式分选:** 有流式分选条件的单位, 用 DAPI 对核悬液进行染色后, 流式分选细胞核, 之后按照操作步骤 3.3 开始进行实验。

4. 不能进行流式分选时, 将步骤 2 中样品 4°C $12000 \times g$ 离心 5 min, 吸净管内液体。若步骤 2 中样品有很多色素, 用 1 mL 核酸提取液 B 重悬后, 4°C $12000 \times g$ 离心 5 min, 重复多次, 直至无色素或色素颜色较弱。

5. 用核酸提取液 C 重悬步骤 4 中沉淀。

6. 另取一个新的 1.5 mL EP 管, 在 EP 管中加入 500 μL 核酸提取液 C。

7. 将步骤 5 中重悬液沿着步骤 6 中 EP 管管壁缓缓加入使步骤 5 中悬液置于步骤 6 悬液上方, 避免两步骤中溶液混合。

8. 4°C $12000 \times g$ 离心 45 min。

9. 弃上清, 加入 1 mL 核提取缓冲液 D 重悬沉淀后, 4°C $2000 \times g$ 离心 5 min, 去掉上清。重复三次后, 取 100-100,000 个细胞核用 90 μL 核提取缓冲液 D 重悬沉淀并转移到 PCR 管中。

[注] *: 收集的细胞核在实验前, 建议用台盼蓝染色进行细胞核完整性鉴定, 细胞核完整性不低于 80%, 细胞核完整性过低, 容易导致背景噪音。

1.3 磁珠活化步骤: 取 10 μL Con A 磁珠于已预加 100 μL **1 \times binding buffer** 的 PCR 管中吹吸混合, 静置于磁力架至磁珠贴壁, 吸除管内全部溶液; 取下 PCR 管, 加入 100 μL **1 \times binding buffer**, 吹吸混合, 静置于磁力架至磁珠贴壁; 吸除管内全部溶液, 取下 PCR 管, 加入 10 μL ConA bind buffer, 吹吸混合。

1.4 磁珠与细胞核结合: 将重悬在 ConA bind buffer 中的珠浆轻轻滴加在细胞核悬液中, 颠倒 5 次混匀后, 将 PCR 管置于旋转仪上混匀 5-10 min。

按照 3.4 开始进行实验 (**不需要进行 3.3 步骤**)。

2、动物组织细胞的分离。

2.1 溶液配制 (0.5 hour) (本试剂配置量已考虑了试剂损耗, 多样本配置根据样本数增加配置体积时, 无需额外计算损耗)

1. 提前 10 min 将所需试剂冰上解冻。

2. **1 \times Binding Buffer**: 210 μL /样本, 单样本配制: 取 30 μL **10 \times Binding Buffer**, 加入 270 μL ddH₂O, 混匀。

3. **1 \times Wash Buffer**: 1440 μL /样本, 单样本配制: 取 150 μL **10 \times Wash Buffer**, 加入 60 μL **25 \times 蛋白酶抑制剂**, 加入 1290 μL ddH₂O, 混匀。

4. **Primary Antibody Buffer**: 50 μL /样本, 单样本配制: 取 48.5 μL 步骤 3 中配制的 **1 \times Wash Buffer**+0.5 μL **5% Digitonin**+1 μL **50 \times PB Buffer**, 混匀后置于冰上预冷 (此配置未计算损耗量, 多样本配置可多配置 0.5 个反应, 配制中所需试剂足量, 无需考虑试剂配制不足问题)。

5. **Secondary Antibody Buffer**: 650 μL /样本, 单样本配制: 取 792 μL 步骤 3 中配制的 **1 \times Wash Buffer**, 加入 8 μL **5% Digitonin**, 混匀 (选择 3.5-A 步骤时, 无需配制此试剂, 选择 3.5-B 步骤时, 推荐现配现用)。

6. **1 \times Dig-300 Buffer**: 700 μL /样本, 单样本配制: 取 100 μL **10 \times Dig-300 Buffer**, 加入 2 μL **5% Digitonin** 和 40 μL **25 \times 蛋白酶抑制剂**, 加入 858 μL ddH₂O, 混匀 (选择 3.5-B 步骤时, 推荐现配现用)。

[注]: 1、含有 Digitonin 的缓冲液不可长期保存, 请根据实际样本数量现配现用, 配制的 buffer 室温放置。

2、**25 \times 蛋白酶抑制剂**: 取一片蛋白酶抑制剂混合片剂 (Yeasten cat#20123ES) 溶于 400 μL ddH₂O 中, 上下颠倒混匀, -20°C 保存, 蛋白酶抑制剂液体状保存时间较短, 从溶解之日起, 勿超过 3 个月, 否则影响实验效果。充分溶解后溶液可能呈现微弱浑浊或存在小颗粒, 属于正常现象。

7. **细胞缓冲液 A**: 20 mM HEPES-KOH pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM spermidine。

5.2 动物细胞分离和捕获 (1 hour)

1. 称取 0.2 g 新鲜动物组织 (黄豆粒大小), 用研磨杵 (Yeasten Cat#80411 或其他等效产品) 匀浆至无明显肉眼可见固体 (或在研钵中加入液氮充分碾磨成冻干粉末)。将碾磨好的样品使用 6 mL 预冷的细胞缓冲液 A 悬浮并转移至 15 mL 离心管中, 颠倒震荡混匀。

2. 使用 100-200 目筛网对细胞悬液进行过滤处理（若起始材料较少，可以不经过此操作步骤）。
3. 使用平口或者剪刀剪平的移液枪头将细胞核悬液分装至 1.5 mL 离心管中，每管 1 mL，4°C 600 × g 离心 5 min，弃除管内全部溶液。使用细胞缓冲液 A 重悬沉淀后，对细胞*进行计数。取 100-100,000 个细胞**于 1.5 mL EP 管中，室温 600 × g 离心 5 min，弃净管内溶液；

【注】*：收集的细胞在实验前，建议用台盼蓝染色进行细胞活性鉴定，细胞活性不低于 80%，细胞活性过低，容易导致背景噪音。

【注】**：若为冻存组织，需要在细胞缓冲液 A 中加入 NP40，NP40 的终浓度在 0.5-1% 之间来裂解细胞膜，获取细胞核。

4. 用 500 μL 1× Wash Buffer 重悬全部沉淀，室温 600 × g 离心 5 min，吸除上清。

【注】：对于大小不同的细胞，请根据实际情况调整离心力。

5. 加入 100 μL 1× Wash Buffer，轻轻吹打重悬，转移至 PCR 管中。

5.3 磁珠活化步骤：取 10 μL Con A 磁珠于已预加 100 μL 1× binding buffer 的 PCR 管中吹吸混合，静置于磁力架至磁珠贴壁，吸除管内全部溶液；取下 PCR 管，加入 100 μL 1× binding buffer，吹吸混合，静置于磁力架至磁珠贴壁；吸除管内全部溶液，取下 PCR 管，加入 10 μL ConA bind buffer，吹吸混合。

5.4 磁珠与细胞（细胞核）结合：将重悬在 ConA bind buffer 中的珠浆轻轻滴加在细胞核悬液中，颠倒 5 次混匀后，将 PCR 管置于旋转仪上混匀 5-10 min。按照 3.4 开始进行实验（不需要进行 3.3 步骤）。



帮助客户创造价值，让世界更健康更快乐