

**Hieff NGS[®] Multi-CUT&Tag Library Prep
Kit for Illumina[®] V2**
多靶标 CUT&Tag 试剂盒 (Nanobody-Tn5 款)

12592ES

产品使用说明书

Ver. CN20241220

目录

产品简介	1
产品信息	1
组分信息	2
储存条件	2
使用说明	3
附录	7
注意事项	10

产品简介

Hieff NGS® Multi-CUT&Tag Library Prep Kit for Illumina® V2 是针对 Illumina® 高通量测序平台研发的用于 Multi-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。Multi-CUT&Tag 是研究蛋白与 DNA 互作的技术,相较于传统的 CUT&Tag,该技术使用 nanobody-Tn5 (Anti-mouse Tn5 和 Anti-rabbit Tn5),可实现一份细胞,两种靶标的研究,同时,该技术实验中无需再添加二抗。经过细胞捕获、一抗孵育、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® Multi-CUT&Tag Library Prep Kit for Illumina® V2 多靶标 CUT&Tag 试剂盒 (Nanobody-Tn5 款)	12592ES04	4 T
	12592ES12	12 T
	12592ES48	48 T

组分信息

组分编号		组分名称	12592ES04	12592ES12	12592ES48
BOX-I	12592-A	ConA Beads	40 μ L	120 μ L	480 μ L
	12592-B	DNA Extract Beads	280 μ L	840 μ L	3.36 mL
	12592-C	DNA Selection Beads	400 μ L	1.2 mL	4.8 mL
BOX-II	12592-D	10 \times Binding Buffer	120 μ L	360 μ L	1.44 mL
	12592-E	10 \times Wash Buffer	360 μ L	1.08 mL	4.32 mL
	12592-F	5% Digitonin	12 μ L	36 μ L	144 μ L
	12592-G	50 \times PB Buffer	6 μ L	18 μ L	72 μ L
	12592-H	10 \times Dig-300 Buffer	400 μ L	1.2 mL	4.8 mL
	12592-I	Anti-mouse Tn5	8 μ L	24 μ L	96 μ L
	12592-J	Anti-rabbit Tn5	8 μ L	24 μ L	96 μ L
	12592-K	33 \times Activating Buffer	6 μ L	18 μ L	72 μ L
	12592-L	15 \times Terminate Solution	20 μ L	60 μ L	240 μ L
	12592-M	30 \times Proteinase K	10 μ L	30 μ L	120 μ L
	12592-N	DNA Spike-in Mix (5 ng/ μ L)	4 μ L	12 μ L	48 μ L
	12592-O	2 \times HiFi Amplification Mix	100 μ L	300 μ L	1.2 mL
	12592-P	i5 Universal Primer	8 μ L	/	/
	12592-Q	i7 Index Primer (T701)	8 μ L	/	/

【注】：*12592ES12/48 试剂盒不含 Index Primer，需搭配 Cat#12417 进行完整建库；

*12592ES04 中，index 信息为 i5 index GCCTTATG（对应 mouse 来源抗体数据）、AGGATATG（对应 rabbit 来源抗体数据）、i7 index TAAGGCGA（不同测序平台，i5 端对应的序列可能需要反向，具体见参考第六部分：文库结构）。

***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°C保存, BOX-II: -25~-15°C保存, 有效期 1 年。

使用说明

一、自备材料

1. 抗体: 靶蛋白的一抗 (鼠源或者兔源)、蛋白酶抑制剂: 推荐使用 InStab™ Protease Cocktail, EDTA-free, mini, tablet-form (Yeasen cat#20123) 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. 接头: Hieff NGS® Tagment Index Kit for Multi-CUT&Tag (Cat#12417) 。

二、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。
3. 植物或真菌细胞可通过特殊处理获得原生质体或细胞核进行实验, 方法可参考附录。
4. 新鲜或者冻存的动物组织可通过特殊处理获得细胞/细胞核悬液进行实验, 方法可参考附录。

三、操作原理及实验流程图

实验原理: 利用 Con A 磁珠捕获细胞并利用 5% Digitonin 对细胞膜进行穿孔, 选择鼠源一抗和兔源一抗实现同一细胞双靶标研究。之后, 鼠源一抗结合 Anti-mouse Tn5、兔源一抗结合 Anti-rabbit Tn5 从而定向切割不同靶标结合的 DNA 序列, 再经过一步法 PCR 完成二代测序文库的构建。对文库进行测序后的数据进行 barcode 拆分, 即可获得双靶标的高分辨率靶蛋白结合的染色质图谱。

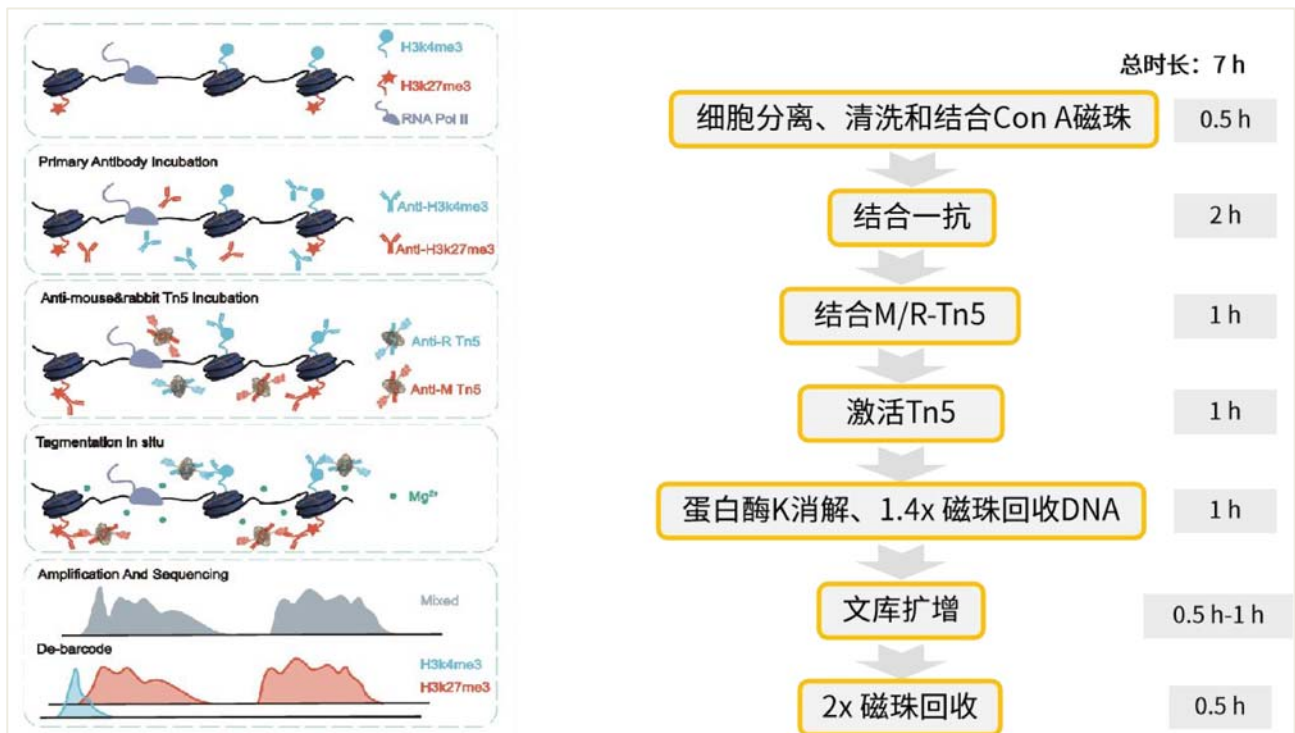


图: Multi-CUT&Tag 实验流程图

四、操作步骤

4.1 溶液配制 (0.5 h) (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**: 650 μL/样本, 单样本配制: 取 90 μL **10 × Wash Buffer**, 加入 36 μL **25 × 蛋白酶抑制剂**, 加入 774 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. **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) 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。其他品牌蛋白酶抑制剂的片剂, 需要参考对应说明书进行试剂配置。

4.2 细胞捕获 (0.5 h)

1. 磁珠活化:

a) 取一支 8 联管, 根据实验所需的样本数量, 每孔加入 100 μL **1 × Binding Buffer**。

b) 使用移液器充分重悬 ConA Beads, 取出 10 μL ConA Beads 至步骤 a) 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。

c) 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。

d) 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 4.2.3 活化后的磁珠与细胞结合步骤时再分装入 8 联管中即可。

2. 细胞准备:

a) 在室温下收获细胞*并计数, 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。

b) 加入 500 μL **1 × Wash Buffer**, 轻轻吹打重悬, 室温 600 × g 离心 5 min, 弃净管内溶液;

c) 加入 100 μL **1 × Wash Buffer**, 轻轻吹打重悬, 转移至 PCR 管中。

【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;

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** 一起重悬, 到步骤 4.2.3 活化后的磁珠与细胞结合步骤时再分装即可。

3. 活化后的磁珠与细胞结合:

a) 将 100 μL 细胞 (细胞核) 转移至含有活化 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. 请提前准备好下一步骤所需的预冷 Primary Antibody Buffer。

b) 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，立即进入步骤 4.3 结合一抗和转座酶 (请提前准备好 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。

4.3 结合一抗和转座酶 (3 h)

【注】*：本试剂盒的一抗只能是鼠源或者兔源，在做双靶标研究时，一抗需一支来源于鼠，一支来源于兔。若做单靶标实验时，步骤 5 中， $1 \times \text{Dig-300 Buffer}$ 加入 98 μL ，一抗使用鼠源一抗，则需使用 2 μL Anti-mouse Tn5，若一抗使用兔源一抗，则需使用 2 μL Anti-rabbit Tn5。

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 (若不确定抗体的加入量，可先加入 0.5 μL 抗体看看情况，如果实验时，加入两种抗体，则每种抗体各加 0.5 μL)，上下颠倒混匀。

【注】：本实验无需加入二抗，且本试剂盒不建议设置阴性对照。

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)，室温下旋转孵育 2 h 或者 4°C 旋转孵育过夜，最好水平旋转，保证液体在管底。每隔 30 min 可轻弹底部混匀，避免磁珠聚集干结。

4. 将与一抗结合好的磁珠取下，瞬时离心($<100 \times g$)，静置于磁力架至磁珠贴壁上，待溶液澄清 (约 2 min)，弃净管内溶液。

注：为了降低非特异影响，一抗孵育完后，推荐使用 $1 \times \text{wash buffer}$ 进行清洗 3 次，再进行步骤 5 实验。

5. 将 8 联管从磁力架上取下，加入 96 μL $1 \times \text{Dig-300 Buffer}$ 后，再加入 2 μL Anti-mouse Tn5 和 2 μL Anti-rabbit Tn5 (两种 Transposome 的浓度都为 0.17 mg/mL)，用移液器吹打或上下颠倒数次混匀 (若样品较多，Transposome 结合液可一起提前配制)。

【注】：*不同的实验环境，转座酶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酶的使用浓度。

**若做单靶标实验，则此步骤修正为：加入 98 μL $1 \times \text{Dig-300 Buffer}$ 后，再加入 2 μL Anti-mouse Tn5 或 2 μL Anti-rabbit Tn5 (根据使用一抗为鼠源或者兔源进行选择)，用移液器吹打或轻轻点动涡旋混匀 10 次。

6. 室温下旋转孵育 1 hour，最好水平旋转，保证液体在管底。每隔 30 min 轻弹底部混匀，避免磁珠聚集干结。

【注】：转座酶孵育可能会导致轻微的磁珠板结。孵育太久 (超过 3 h) 会造成转座酶非特异性结合到 DNA 上，增强了背景噪音。

7. 瞬离 ($<100 \times g$)，静置于磁力架至磁珠贴壁，待溶液澄清 (约 2 min)，弃净管内溶液，加入 200 μL $1 \times \text{Dig-300 Buffer}$ ，轻轻点动涡旋或移液器吹打 10 次，充分分离磁珠及细胞。

8. 重复步骤 7 两次 (共清洗磁珠 3 次)。

9. 立即进行步骤 4.4 (转座酶激活)。

4.4 转座酶激活 (1 h)

1. 提前 10 min 将 33 x Activating Buffer 室温解冻，混匀备用。

2. 配置 $1 \times \text{Activating Buffer}$: 取 48.5 μL $1 \times \text{Dig-300 Buffer}$ (见 Step4.1 中配制试剂) + 1.5 μL 33 x Activating Buffer，混匀。

3. 将 4.3.9 中的 8 联管瞬离 ($<100 \times g$) 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 $1 \times \text{Activating Buffer}$ ，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。

4.5 蛋白酶 K 消化和基因组 DNA 回收 (1 h)

1. 向每个样品中加入 3.3 μL **15 \times Terminate Solution**、1 μL 浓度为 **1 pg/ μL 的 DNA Spike-in mix V2** (试剂盒中的浓度为 5 ng/ μL) 和 1.7 μL **30 \times Proteinase K** (此时磁珠会板结) (若样品较多, 可一起提前配制)。全速涡旋样品约 10 sec, 混匀后瞬离, 将样品置于 PCR 仪, 55 $^{\circ}\text{C}$ 消化 30 min (热盖不低于 70 $^{\circ}\text{C}$)。

2. 短暂离心 (<100 $\times g$), 将 PCR 管置于磁力架上静置 5 min, 取 50 μL 上清。

【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, 可将步骤 4.5.1 中 3.3 μL 15 \times Terminate Solution, 1.7 μL 30 \times 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。

3. 加入 70 μL 室温下平衡的 **DNA Extract Beads**, 涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀, 室温静置孵育 5 min。

4. 短暂离心 (<100 $\times g$), 将 PCR 管置于磁力架上静置 3 min, 待磁珠完全贴壁后吸净管内溶液。

5. 保持 PCR 管始终处于磁力架上, 从另一侧加入 200 μL 80%乙醇, 避免直接冲刷磁珠, 静置 30-60 sec, 弃净管内溶液。

6. 保持 PCR 管始终处于磁力架上, 再次加入 200 μL 80%乙醇, 静置 30-60 sec, 弃净管内溶液。

7. 保持 PCR 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 PCR 管, 加入 23 μL ddH₂O, 并充分涡旋, 室温静置 5 min。

9. 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), 小心转移 21 μL 上清至新的 EP 管中, 继续进行步骤 4.6 文库扩增步骤或者放置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

4.6 文库扩增

1. 将表 1 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 1 所示反应体系。

表 1 PCR 扩增反应体系

名称	体积 (μL)
步骤 4.5 纯化产物	21
i5 Universal Primer	2
i7 Index Primer (T7XX)	2
2 \times HiFi Amplification Mix	25
ddH ₂ O	Up to 50 μL

【注】: *Hieff NGS[®] Tagment Index Kit for Multi-CUT&Tag (Cat#12417) 中提供 i5 Universal Primer 和多种 i7 Index Primer (T7XX), 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 2 所示反应程序, 进行 PCR 扩增。

表 2 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。

4.7 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 4.6 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。
3. 短暂离心 (<100 $\times g$)，将离心管置于磁力架上静置 3 min，待磁珠完全贴壁后吸净 PCR 管中溶液。
4. 保持 PCR 管始终处于磁力架上，从另一侧加入 200 μL 80%乙醇，避免直接冲刷磁珠，静置 30-60 sec，弃净上清。
5. 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，弃净上清。
6. 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）。
7. 从磁力架上取下 PCR 管，加入 21 μL ddH₂O，并充分涡旋，室温静置 5 min。
8. 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。
9. 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。

4.9 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。

附录

一 植物组织细胞核的分离。

1.1 溶液配制 (0.5 h) (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 \times Binding Buffer、10 \times Wash Buffer、10 \times Dig-300 Buffer、5% Digitonin、50 \times PB Buffer 室温融化，混匀备用。
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**: 650 μL /样本，单样本配制：取 90 μL **10 \times Wash Buffer**，加入 36 μL **25 \times 蛋白酶抑制剂**，加入 774 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 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. 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（无需一起配制, 等待转座酶孵育时再进行配制即可）。

【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 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。

1.2 植物细胞核分离和捕获 (2 h)

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, 非必要情况, 不建议用液氮研磨)。

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, 分选后的细胞核 4 $^{\circ}$ C 2000 \times g 离心 5 min, 去掉上清。用 90 μ L 核提取缓冲液 D 重悬沉淀并转移到 PCR 管中。之后按照操作步骤 4.3 开始进行实验。

4. 不能进行流式分选时, 将步骤 2 中样品 4 $^{\circ}$ C 12000 \times g 离心 5 min, 弃净管内液体。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 $^{\circ}$ 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 μ L 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 2000 \times g 离心 5 min, 弃掉上清。重复三次后, 取 100-100,000 个细胞核用 100 μ L 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:

a) 取一支 8 联管, 根据实验所需的样本数量, 每孔加入 100 μ L **1 \times Binding Buffer**。

b) 使用移液器充分重悬 ConA Beads, 取出 10 μ L ConA Beads 至步骤 a) 的 **1 \times 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。

c) 将 8 联管从磁力架上取下, 加入 100 μ L **1 \times Binding Buffer**, 用移液器轻轻吹打混匀。

d) 将 8 联管置于磁力架上, 待液体澄清后, 弃上清, 加入 10 μ L **1 \times 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 \times Binding Buffer** 清洗磁珠), 在 4.2.3 活化后的磁珠与细胞结合步骤时再分装入 8 联管中即可。

1.4 磁珠与细胞核结合:

a) 将 100 μ L 细胞 (细胞核) 转移至含有活化 ConA beads 的 8 联管中, 上下颠倒 (轻柔) 混匀后, 瞬时离心 (<100 \times 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.请提前准备好下一步骤所需的预冷 Primary Antibody Buffer。

b) 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，立即进入步骤4.3 结合一抗和转座酶(请提前准备好 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。

按照4.3开始进行实验(不需要进行4.2步骤)。

二 动物组织细胞的分离。

2.1 溶液配制 (0.5 h) (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**: 650 μL/样本，单样本配制：取90 μL **10 × Wash Buffer**，加入36 μL **25 × 蛋白酶抑制剂**，加入774 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，配制中所需试剂足量，无需考虑试剂配制不足问题)。

5. **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(无需一起配制，等待转座酶孵育时再进行配制即可)。

【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(Yeasen cat#20123ES)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。

2.2 动物细胞分离和捕获 (1 h)

1. 称取0.2 g新鲜动物组织(黄豆粒大小)，用组织匀浆器Dounce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，非必须情况，不建议用液氮研磨)。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悬液/细胞核悬液分装至1.5 mL离心管中，每管1 mL，4℃ $600 \times g$ 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 $600 \times g$ 离心5 min，弃净管内溶液；

【注】：对于大小不同的细胞，请根据实际情况调整离心力

【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，使得NP40的浓度在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 $600 \times g$ 离心5 min，弃除上清。

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

2.3 磁珠活化步骤：

a) 取一支8联管，根据实验所需的样本数量，每孔加入100 μL **1 × Binding Buffer**。

b) 使用移液器充分重悬 ConA Beads, 取出 10 μ L ConA Beads 至步骤 a) 的 **1 \times 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。

c) 将 8 联管从磁力架上取下, 加入 100 μ L **1 \times Binding Buffer**, 用移液器轻轻吹打混匀。

d) 将 8 联管置于磁力架上, 待液体澄清后, 弃上清, 加入 10 μ L **1 \times 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 \times Binding Buffer** 清洗磁珠), 在 4.2.3 活化后的磁珠与细胞结合步骤时再分装入 8 联管中即可。

2.4 磁珠与细胞/细胞核结合:

a) 将 100 μ L 细胞 (细胞核) 转移至含有活化 ConA beads 的 8 联管中, 上下颠倒 (轻柔) 混匀后, 瞬时离心 ($<100 \times g$), 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. 请提前准备好下一步骤所需的预冷 Primary Antibody Buffer。

b) 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, 立即进入步骤 4.3 结合一抗和转座酶 (请提前准备好 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。

按照 4.3 开始进行实验 (不需要进行 4.2 步骤)。

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. 试剂盒中试剂使用前需颠倒混匀, 实验中配置 Buffer 需要上下颠倒混匀或是旋转仪混匀瞬间后使用。
7. 本试剂盒的一抗只能是鼠源或者兔源, 在做双靶标研究时, 一抗需一支来源于鼠, 一支来源于兔。若做单靶标实验时, 一抗使用鼠源一抗, 则只使用 Anti-mouse Tn5, 若一抗使用兔源一抗, 则只使用 Anti-rabbit Tn5。
8. 本试剂盒适用于 100-100,000 个细胞起始量的样本建库, 但是最佳细胞起始量为 10,000-100,000。
9. 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 (最佳细胞起始量为 10,000-100,000)。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 (如组织样本的单细胞悬液制备、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, 具体推荐见附录。本试剂盒也能应用于单细胞研究。

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. 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。
4. 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。
5. 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）。
6. 本产品仅用作科研用途!

四、关于 DNA Selection Beads 纯化与分选 DNA

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（磁珠表面不反光即可）足以让磁珠充分干燥。
8. 文库如需保存，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，在 4°C 放置不超过 2 天。

六、文库结构

Index 2 (i5)

5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[||||||]TCGTTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-NNNNNN-CTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCCACGAGAC[||||||]ATCTCGTATGCCGCTTCTGCTTG-3'

Index 1 (i7)

||||||: Index 2 (i5), 7 bases; |||||||: Index 1 (i7), 8 bases; -NNNNNN-: 插入序列。

本试剂盒中专用接头（Cat#12417ES）共提供包含 i5 通用引物以及 24 种 i7 Index Primer，用于高通量测序时区分不同样品。Index Primer 序列如下表所示：

名称	序列
i5 Universal Primer	5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACA -3'
T7XX	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[]GTCTCGTGGGCTCGG-3'

【注】：|||||| 表示 8 bp Index 序列，测序前根据测序平台在 Sample Sheet 中输入所使用的 Index 对应序列。

数据拆分时 index 信息：

组分	Sample Sheet 输入/测序时 Index 序列		
		NovaSeq 6000 v1.0 reagents, MiSeq, HiSeq 2000/2500	NovaSeq 6000 v1.5 reagents, MiniSeq, NextSeq, HiSeq 3000/4000
Index 2 (i5)	Anti-mouse Tn5	ATAAGGCT	GCCTTATG
	Anti-rabbit Tn5	ATATCCTT	AGGATATG
Index 2 (i7)	*	*	*

【注】：数据拆分时，i5 端 index 根据选择的抗体填写序列（鼠抗对应 Anti-mouse Tn5 序列，兔抗对应 Anti-rabbit Tn5 序列），i7 端 index 根据 Cat#12417ES 中不同的 i7 引物来填写。

七、关于抗体选择

Multi-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。本试剂盒不需要添加二抗。

一抗推荐：Tri-Methyl-Histone H3 (Lys27) (C36B11) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology Cat#9733)

Histone H3K4me3 antibody (pAb) (Active Motif Cat# B_2615077)

Histone H3K36me3 antibody (pAb) (Active Motif Cat# 61902)

兔源一抗

Histone H3K9me3 antibody (mAb) (Active Motif Cat# 61014)

Histone H3K27me3 antibody (mAb) (Active Motif Cat# 61018)

Histone H3K27me2me3 antibody (mAb) (Active Motif Cat# 39435)

鼠源一抗

八、关于文库扩增

1. 本试剂盒中的文库扩增组分使用高保真 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 Multi-CUT&Tag (Yeasen Cat#12417) 模块进行文库扩增，该模块提供了 24 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. 文库扩增步骤需要严格控制扩增循环数。循环数不足，将导致文库产量低；循环数过多，又将导致文库偏好性增加、重复度增加、嵌合产物增加、扩增突变积累等多种不良后果。故我们建议在满足上机的条件下应尽可能减少文库扩增数，特别是研究低投入量细胞和低丰度蛋白质。表 3 列举了在 293T 细胞中，使用 Histone H3K27me3 antibody (mAb) (Active Motif Cat# 61018) 和 Histone H3K4me3 antibody (pAb) (Active Motif Cat# B_2615077) 和本试剂盒进行文库扩增，细胞投入量与相应扩增循环数的推荐。

表 3 细胞投入量与扩增循环数推荐表 (H3K27me3/H3K4me3) *

细胞投入量	PCR 循环数	文库产量
100,000	13-15	10-50 ng/μL
10,000	15-17	10-50 ng/μL
1,000	18-20	10-50 ng/μL
100	20-23	10-50 ng/μL

【注】：*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，满足上机需求即可

九、关于 DNA 标准品

DNA spike-in mix (5 pg/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)。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:

```
GTTCCACTCCTGAAGTGTCAAGTACATCGCAAAGTCTCCGCAATTACACGCAAGAAAAACCGCCATCAGGCGGCTTGGTGTTCC
TTTCAGTTCTTCAATTGAAATATTGGTTACGTCTGCATGTGCTATCTGCGCCCATATCATCCAGTGGTCGTAGCAGTCGTTGATG
TTCTCCGCTTCGATAACTCTGTTGAATGGCTCTCCATTCCATTCTCCTGTGACTCGGAAGT
```

Spike-in-2:

```
AGTCGGTGTGAATCCCATCAGCGTTACCGTTTTGCGGGTGC
TTCTTCAGTACGCTACGGCAAATGTCATCGACGTTTTTAT
CCGGAAACTGCTGTCTGGCTTTTTTTGATTTGAGAATTAG
CCTGACGGGCAATGCTGCGAAGGGCGTTTTCTGCTGAG
GTGTCATTGAACAAGTCCCATGTCGGCAAGCATAAGCACA
CAGAATATGAAGCCCCTGCCAGAAAAATGCATTCCGTGG
TTGTCATACCT
```

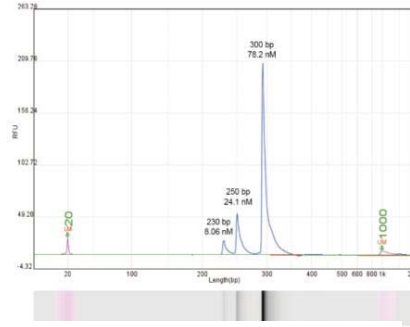


图 1 DNA spike-in mix 长度以及摩尔浓

Spike-in-3:

```
CCTTACTGGAATCGATGGTGTCTCCGGTGTGAAAGAACACCAACAGGGGTGTTACCACTACCGCAGGAAAAGGAGGACGTGTG
GCGAGACAGCGACGAAGTATCACCGACATAATCTGCGAAAACGCAAATACCTTCCAACGAAACGCACCAGAAATAAACCCAAGC
CAATCCCAAAGAATCTGACGTAAAAACCTTCAACTACACGGCTCACCTGTGGGATATCCGGTGGCTAAGACGTCGTGCGAGGA
AAACAAGGTGATTGACCAAATCGAAGTTACGAACAAGAAAGCGTCTCGA
```

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。



帮助客户创造价值，让世界更健康更快乐