

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

12598ES

产品使用说明书

Ver. CN20231208

A large, decorative orange wavy shape at the bottom of the page, consisting of several overlapping, rounded, wave-like forms in various shades of orange, creating a modern and organic aesthetic.

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	2
附录	8
注意事项	12

产品简介

Hieff NGS® G-Type In-Situ DNA Binding Profiling Library Prep Kit for Illumina®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 100-1,000,000 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 的核心为结合细胞的 ConA 磁珠和回收 DNA 的磁珠，BOX-II 包含细胞透化剂、蛋白酶抑制剂、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® G-Type In-Situ DNA Binding Profiling Library Prep Kit for Illumina® CUT&Tag 试剂盒 (pA/G-Tn5 版)	12598ES04	4 T
	12598ES12	12 T
	12598ES48	48 T

组分信息

组分编号	组分名称	12598ES04	12598ES12	12598ES48	
BOX-I	12598-A ○	ConA Beads	40 μL	120 μL	480 μL
	12598-B ○	DNA Selection Beads	400 μL	1.2 mL	4.8 mL
	12598-C ◌	Cell wash buffer	3.6 mL	10.8 mL	43.2 mL
	12598-D ○	ConA bind buffer	400 μL	1.2 mL	4.8 mL
BOX-II	12598-E ●	Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-free)	40 μL	120 μL	480 μL
	12598-F ●	5% Digitonin	15 μL	45 μL	180 μL
	12598-G ●	3 M NaCl	80 μL	240 μL	960 μL
	12598-H ●	50x Protein blocker	4 μL	12 μL	48 μL
	12598-I ●	pA/G-Transposome Mix	4 μL	12 μL	48 μL
	12598-J ●	30x Activating buffer	4 μL	12 μL	48 μL
	12598-K ●	15x Terminate Solution	8 μL	24 μL	96 μL
	12598-L ●	DNA Spike-in mix (5 pg/uL)	4 μL	12 μL	48 μL
	12598-M ●	30x Proteinase K	4 μL	12 μL	48 μL
	12598-N ◌	Primer Mix	12 μL	36 μL	144 μL
	12598-O ◌	2×Ultima Amplification Mix	100 μL	300 μL	1.2 mL
	12598-P ○	N5(N501) *	4 μL	NA	NA
	12598-Q ○	N7(N701) *	4 μL	NA	NA

【注】：*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-TAAGCGCA。
测序平台为 NovaSeq 6000 v1.5 reagents, MiniSeq, NextSeq, HiSeq 3000/4000, 则 N501-ATAGAGAG, N701-TAAGCGCA。

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、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。
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。
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，方法可参考附录四。
4. 新鲜或者冻存的动物组织可通过特殊处理获得细胞悬液进行实验，方法可参考附录四和附录五。

二、实验流程

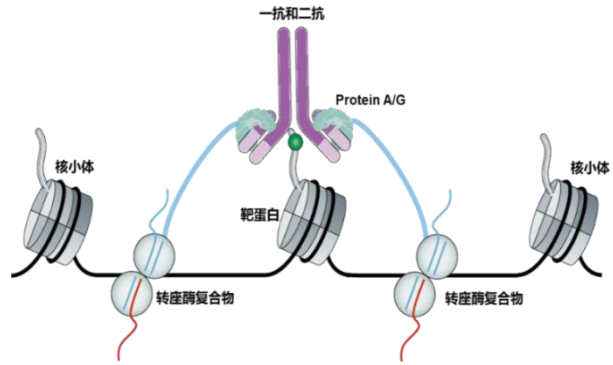
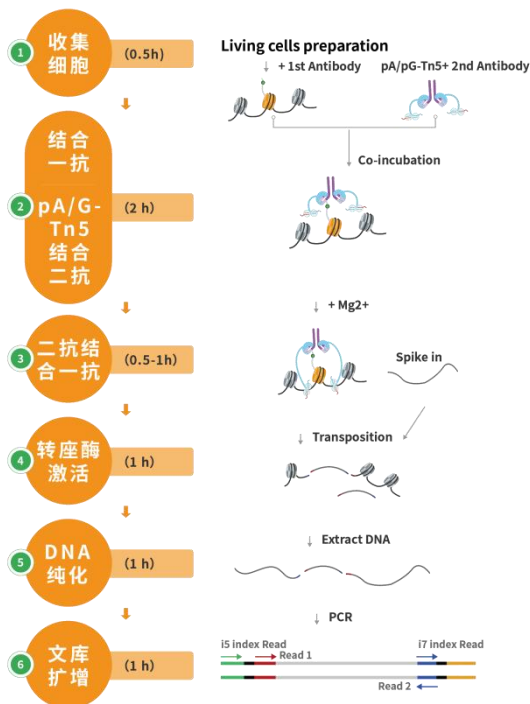


图1 CUT&Tag 建库试剂盒操作流程及转座原理
原理：利用 Con A 磁珠捕获细胞并利用 5% Digitonin 对细胞膜进行穿孔，通过结合一抗、二抗和 Protein A/G- Transposome 来靶向切割目标蛋白结合的 DNA 序列，再经过 PCR 完成二代测序文库的构建。对文库进行测序后的数据分析即可得到高分辨率靶蛋白结合的基因组图谱。对于人源细胞的组蛋白修饰，仅需 3-5 M reads。

三、操作步骤

请在实验前仔细阅读本操作说明，本试剂盒在步骤 3.3（结合一抗、二抗和转座酶）提供两种操作方法：操作方法 3.3-A 和 3.3-B。操作方法 3.3-A 将二抗与 pA/G-Tn5 提前孵育，整体实验时长缩短为 6 h；操作方法 3.3-B 为常规实验流程，整体实验时长为 7.5 h。两种实验流程都经过了长期测试，结果产出稳定，可以选择任一实验流程进行实验操作。

3.1 溶液配制 (0.5 h)（以下配置的体积为单个反应的用量，若有多个反应同时实验，需根据样本量修改配置体积）

- 提前 10 min 取出 ConA bind buffer、Cell wash buffer、Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-free) 和 5% Digitonin，待恢复到室温后，颠倒 10 次混匀后瞬离。
- BF1**: 取 900 μ L Cell wash buffer，加入 9 μ L Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-free)，混匀后瞬离。
- BF2**: 取 250 μ L **BF1**，加入 2.5 μ L 5% Digitonin，混匀后瞬离。
- BF3**: 取 400 μ L **BF1**，加入 0.8 μ L 5% Digitonin 和 20 μ L 3M NaCl，混匀后瞬离。
- BF4: 实验组 BF4+**: 取 48.5 μ L **BF2**，加入 1 μ L 50 \times Protein blocker 和 0.5 μ L 一抗(按抗体说明书推荐使用浓度进行稀释，本配方为 1: 100 稀释比)，混匀后瞬离。

阴性对照组 BF4-: 取 49 μ L **BF2**，加入 1 μ L 50 \times Protein blocker (或取 48.5 μ L **BF2**，加入 1 μ L 50 \times Protein blocker 和 0.5 μ L IgG 一抗)，混匀后瞬离。

【注】：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。如需过夜，则存储在 4 $^{\circ}$ C，使用时需至少提前 10 min 取出恢复至室温。本操作中溶液配制量为单个反应所需要的试剂用量（阴性对照组也需计入试剂反应次数），请根据实际样本数调整 buffer 配制量。

3.2 细胞捕获 (0.5 h)

1. 细胞准备:

- 在室温下收获细胞并计数，取 100-1,000,000 个细胞*于 1.5 mL EP 管中，室温 600 \times g 离心 5 min，吸净管内溶液；

【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。

- 加入 140 μ L **BF1**，轻轻吹打重悬，室温 600 \times g 离心 5 min，吸净管内溶液；

- 加入 90 μ L **BF1**，轻轻吹打重悬，转移至 PCR 管中。

【注】：对于大小不同的细胞，请根据实际情况调整离心力。

2. **磁珠活化**：颠倒或轻轻旋涡振荡混匀 Con A Beads (4T 小包装磁珠体积较小，可以瞬离后用移液枪吹吸 10 次混匀)。
 - a) 取 10 μL Con A Beads 于已预加 40 μL ConA bind buffer 的 PCR 管中吹吸混匀，静置于磁力架至磁珠贴壁，吸净管内溶液；
 - b) 取下 PCR 管，加入 50 μL ConA bind buffer，吹吸混匀，静置于磁力架至磁珠贴壁，吸净管内溶液；
 - c) 再次取下 PCR 管，加入 10 μL ConA bind buffer，吹吸混匀。
3. **活化后的磁珠与细胞结合**：将重悬在 ConA bind buffer 中的 ConA beads 轻轻滴加在细胞悬液中，颠倒 5 次混匀后，将 PCR 管置于旋转仪上混匀 5-10 min。

3.3-A 结合一抗、二抗和转座酶 (2.5 h)

【注】：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时间过长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。

1. 将与细胞结合好的磁珠取下，瞬离($< 100 \times g$)，静置于磁力架至磁珠贴壁（不超过 2 min），吸净管内溶液。
2. 加入 50 μL BF4+/BF4-，用移液器轻轻吹打或轻弹底部混匀。
3. 室温下旋转孵育 2 h 或者 4 $^{\circ}\text{C}$ 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。

【注】：需同时完成步骤 4 的操作

4. 在一抗孵育的同时，配制二抗与转座酶预孵育的 mix：48.5 μL BF3 加入 0.5 μL 二抗再加入 1 μL 转座酶 mix（常规推荐二抗稀释比例为 1: 100），轻轻涡旋或轻弹底部混匀，室温下旋转孵育 1.5-2 h。
 5. 将步骤 3 中与一抗结合好的磁珠取下，瞬离($< 100 \times g$)，静置于磁力架至磁珠贴壁（不超过 2 min），吸净管内溶液。
 6. 用步骤 4 中的转座酶-二抗结合液重悬步骤 5 中磁珠，室温旋转孵育 0.5 h，最好水平旋转，保持液体在管底。
 - a) 将结合好的磁珠取下，瞬离 ($< 100 \times g$)，静置于磁力架至磁珠贴壁（不超过 2 min），吸去 PCR 管中全部液体。加入 100 μL BF3，轻轻颠倒或用移液器吹打 10 次，充分分离磁珠及细胞；
 - b) 瞬离 ($< 100 \times g$)，静置于磁力架至磁珠贴壁（不超过 2 min），吸去 PCR 管中全部液体。加入 100 μL BF3，轻轻颠倒或用移液器吹打 10 次，充分分离磁珠及细胞；
 - c) 瞬离 ($< 100 \times g$)，静置于磁力架至磁珠贴壁（不超过 2 min），吸去 PCR 管中全部液体。加入 100 μL BF3，轻轻颠倒或用移液器吹打 10 次，充分分离磁珠及细胞；
- 一共清洗磁珠 3 次。

7. 立即进行步骤 3.4 (转座酶激活)。

3.3-B 结合一抗、二抗和转座酶 (3.5 h)

【注】：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。

1. 将与细胞结合好的磁珠取下，瞬离($< 100 \times g$)，静置于磁力架至磁珠贴壁（不超过 2 min），吸净管内溶液。
2. 加入 50 μL BF4+/BF4-，用移液器轻轻吹打或轻弹底部混匀。
3. 室温下旋转孵育 2 h 或者 4 $^{\circ}\text{C}$ 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，瞬离($< 100 \times g$)，静置于磁力架至磁珠贴壁（不超过 2 min），吸净管内溶液。
5. 加入 49.5 μL BF2 后，再加入 0.5 μL 二抗(常规推荐二抗稀释比例为 1: 100)，轻轻涡旋或轻弹底部混匀（若样品较多，二抗结合液可一起提前配制）。
6. 室温下旋转孵育 0.5-1 h，最好水平旋转，保证液体在管底。每隔 30 min 轻弹底部或者用移液器轻轻吹打，避免磁珠聚集干结。

- a) 将与二抗结合好的磁珠取下，瞬离($< 100 \times g$)，静置于磁力架至磁珠贴壁（不超过 2 min），吸净管内溶液。
- b) 加入 65 μL **BF2**，轻轻颠倒或用移液器吹打 10 次，充分分离磁珠及细胞。
- c) 瞬离($< 100 \times g$)，静置于磁力架至磁珠贴壁（不超过 2 min），吸净管内溶液。再次加入 65 μL **BF2**，轻轻颠倒或用移液器吹打 10 次，充分分离磁珠及细胞。

一共清洗磁珠两次。

7. 将磁珠瞬离 ($< 100 \times g$)，静置于磁力架至磁珠贴壁（不超过 2 min），吸净管内溶液。
8. 加入 49 μL **BF3** 后，再加入 1 μL pA/G-Transposome Mix，用移液器吹打或轻弹底部混匀（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。本试剂盒中转座酶复合物的浓度为 2.5 μM 。

9. 室温下旋转孵育 1 h，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。

- a) 瞬离 ($< 100 \times g$)，静置于磁力架至磁珠贴壁（不超过 2 min），吸净管内溶液，加入 100 μL **BF3**，轻轻颠倒或移液器吹打 10 次，充分分离磁珠及细胞。
- b) 瞬离 ($< 100 \times g$)，静置于磁力架至磁珠贴壁（不超过 2 min），吸净管内溶液，加入 100 μL **BF3**，轻轻颠倒或移液器吹打 10 次，充分分离磁珠及细胞。
- c) 瞬离 ($< 100 \times g$)，静置于磁力架至磁珠贴壁（不超过 2 min），吸净管内溶液，加入 100 μL **BF3**，轻轻颠倒或移液器吹打 10 次，充分分离磁珠及细胞。

一共清洗磁珠 3 次。

10. 立即进行步骤 **3.4 (转座酶激活)**。

3.4 转座酶激活 (1 h)

1. 将磁珠瞬离 ($< 100 \times g$)，静置于磁力架至磁珠贴壁（不超过 2 min），吸净管内溶液，加入 30 μL **BF3** 后，再加入 1 μL 30 \times Activating buffer，轻轻吹打或轻弹底部混匀（若样品较多，激活缓冲液可一起提前配制）。
2. 37 $^{\circ}\text{C}$ 旋转孵育 1 h，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。

3.5 蛋白酶 K 消化和基因组 DNA 回收 (1 h)

1. 向每个样品中加入 2 μL 15 \times Terminate Solution、1 μL DNA Spike-in mix 和 1 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 $^{\circ}\text{C}$ ）或者 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。

2. 短暂离心 ($< 100 \times g$)，将 PCR 管置于磁力架上静置 3 min，取 30 μL 上清。

（【注】：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。每 10 万投入量细胞加入 1 μL 即可，也可根据靶蛋白的结合 DNA 能力和丰度自行调整。具体请参见注意事项。）

3. 加入 40 μL 室温下平衡的 DNA Selection 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，吸净管内溶液。
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 s，吸净管内溶液。
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）。
8. 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。
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 20 μL 上清至新的 EP 管中，

-20°C保存。

3.6 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 4 所示反应体系。

表 4 PCR 扩增反应体系

名称	体积 (μL)
步骤 3.5 纯化产物	20
PCR Primer Mix	3
N5XX*	1
N7XX*	1
2× Ultima Amplification Mix	25
ddH ₂ O	Up to 50 μL

【注】：*Hieff NGS® Tagment Index Kit for Illumina® (96 Index) (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 5 所示反应程序，进行 PCR 扩增。

表 5 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。推荐在 PCR 之前使用 qPCR 的方法对转座酶插入的片段进行初步定量判断再决定循环数。组蛋白修饰作为靶蛋白所使用的 PCR 循环数可参考表 2 和表 3。

3.7 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 60 μL (1.2×) DNA Selection Beads 至步骤 3.6 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。
2. 短暂离心 (<100 × 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。
3. 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，吸净 PCR 管中溶液。
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，吸净 PCR 管中溶液。
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）。
6. 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。

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。

3.8 文库分选（根据靶蛋白抗体选择）

由于抗体的结合效率、不同靶蛋白在染色质上结合区域的差异以及不同种类细胞的染色质开放状态差异，文库大小可能存在不同的分布模式。通过磁珠分选，文库中的大片段可以有效去除，使得文库主峰约 520 bp，即两个核小体保护 DNA 长度的插入片段。客户可根据构建的文库分布情况自行决定是否需要进行磁珠分选。

1. 进行双轮分选时，需将初始 DNA 样本用 ddH₂O 补齐至 100 μL 并转移至新的 PCR 管中，加入 60 μL (0.6 \times) 室温下平衡的 DNA Selection Beads，涡旋混匀或移液器吹打混匀 10 次，室温静置孵育 5 min。
3. 短暂离心 ($<100 \times g$)，将 PCR 管置于磁力架上静置 5 min，待溶液澄清后，小心转移上清至新的 PCR 管中（残留 3-5 μL ，避免吸到磁珠）。
4. 加入 50 μL (0.5 \times) 室温下平衡的 DNA Selection Beads，涡旋混匀或移液器吹打混匀 10 次，室温静置孵育 5 min。
5. 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 PCR 管中溶液。
6. 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，吸净 PCR 管中溶液。
7. 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，吸净 PCR 管中溶液。
8. 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）。
9. 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。
10. 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 20 μL 上清至新的 EP 管中，于 -20°C 保存。

3.9 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、组蛋白修饰 H3K27me3 和 H3K4me3 的 DNA 结合图谱建库

分别使用 Tri-Methyl-Histone H3 (Lys27) (C36B11) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology Cat#9733)、Histone H3K4me3 antibody (pAb) (Active Motif Cat# B_2615077) 和 Normal Rabbit IgG (Cell Signaling Technology Cat#2729) 作为一抗、Guinea Pig anti-Rabbit IgG (Heavy & Light Chain) antibody 作为二抗 (antibodies-online Cat#ABIN101961)，使用 Hieff NGS® G-Type In-Situ DNA Binding Profiling Library Prep Kit for Illumina®对 100-1,000,000 个 293T 细胞投入量样本建库，并分别使用 1.2×磁珠进行纯化，再使用 0.6×和 0.4×磁珠分选，文库大小结果使用 Qsep 和 2%琼脂糖凝胶电泳进行检测。

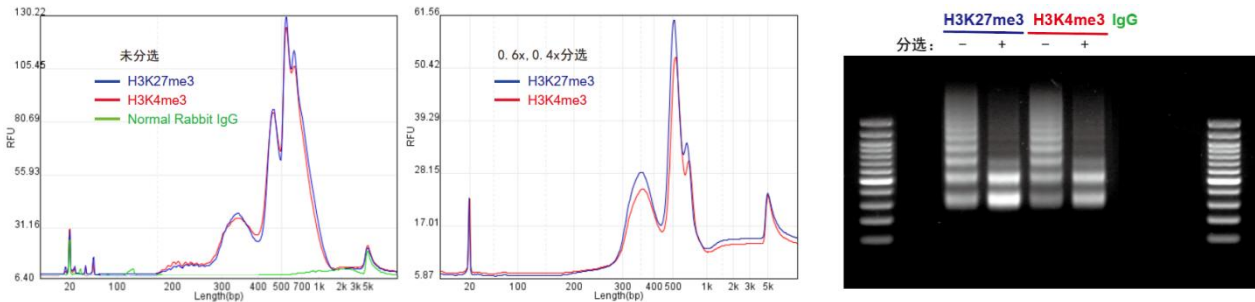


图2 Qsep 和琼脂糖凝胶电泳进行文库质量分析

二、不同细胞投入量的 H3K27me3 的 DNA 结合图谱建库测序

使用 Tri-Methyl-Histone H3 (Lys27) (C36B11) Rabbit mAb 作为一抗 (Cell Signaling Technology Cat#9733)、Guinea Pig anti-Rabbit IgG (Heavy & Light Chain) antibody 作为二抗 (antibodies-online Cat#ABIN101961)，使用 Hieff NGS® G-Type In-Situ DNA Binding Profiling Library Prep Kit for Illumina®对 100-1,000,000 个 293T 细胞投入量样本建库，并分别使用 1.2×磁珠进行纯化，结果使用 Qsep 进行检测。文库测序后与 ENCODE 中的 H3K27me3 ChIP-seq 数据进行比较。

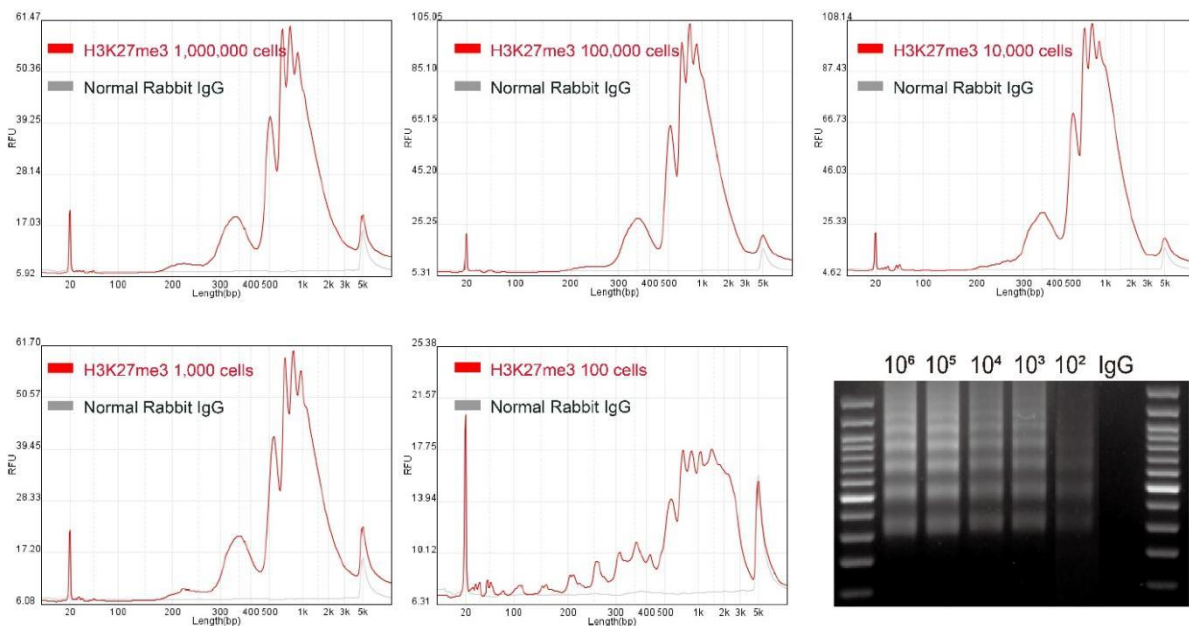


图3 Qsep 对不同细胞投入量文库质量分析

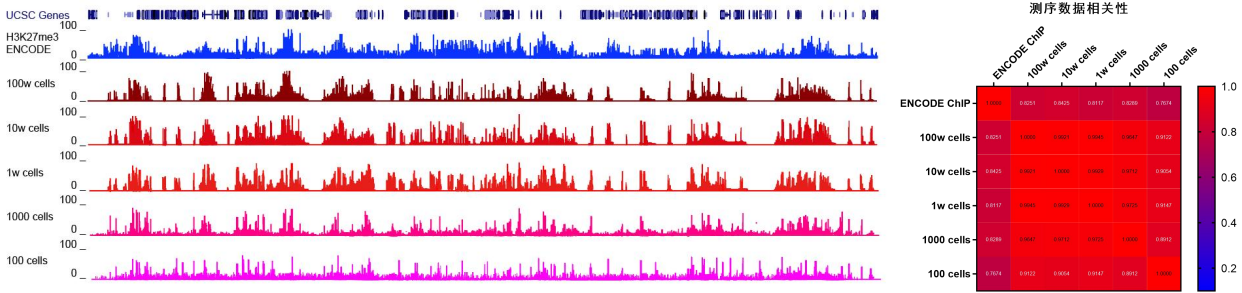


图 4 利用本试剂盒鉴定不同细胞投入量条件下 H3K27me3 在染色质上的信号分布和相关性

三、不同细胞投入量的 H3K4me3 的 DNA 结合图谱建库测序

使用 Histone H3K4me3 antibody (pAb) 作为一抗 (Active Motif Cat# B_2615077)、Guinea Pig anti-Rabbit IgG (Heavy & Light Chain) antibody 作为二抗 (antibodies-online Cat#ABIN101961)，使用 Hieff NGS® G-Type In-Situ DNA Binding Profiling Library Prep Kit for Illumina® 对 100-1,000,000 个 293T 细胞投入量样本建库，并分别使用 1.2×磁珠进行纯化，结果使用 Qsep 进行检测。文库测序后与 ENCODE 中的 H3K4me3 ChIP-seq 数据进行比较。

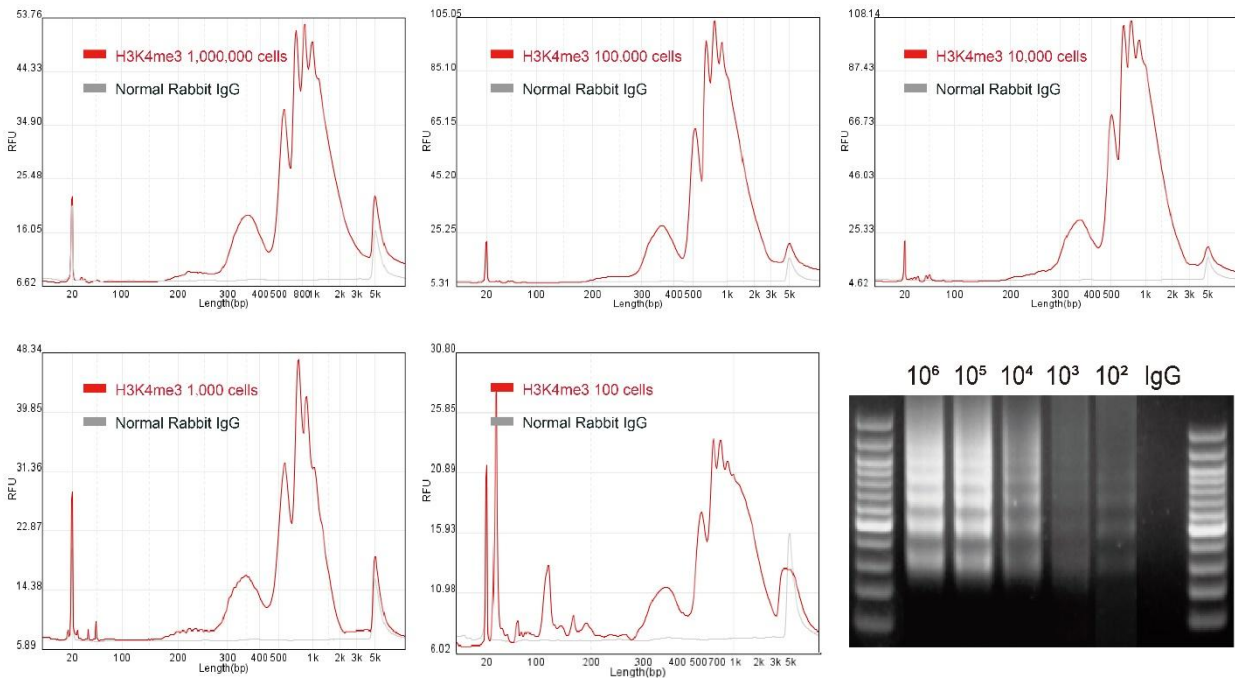


图 5 Qsep 对不同细胞投入量文库质量分析

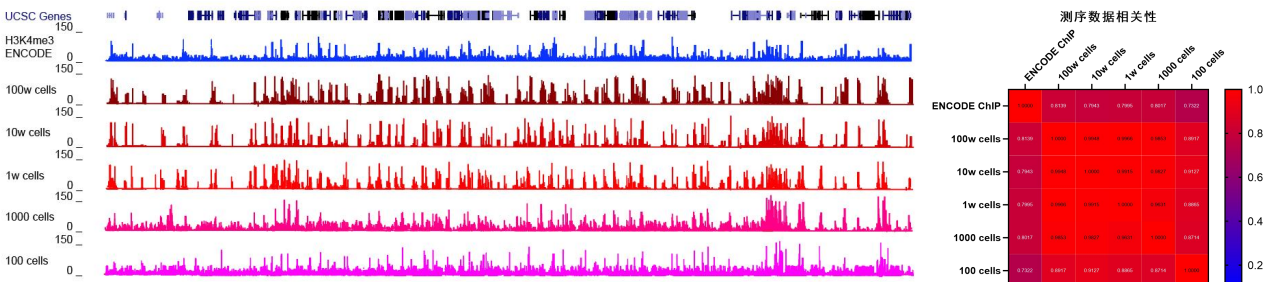


图 6 利用本试剂盒鉴定不同细胞投入量条件下 H3K4me3 在染色质上的信号分布和相关性

四、植物组织细胞核的分离。

4.1 溶液配制 (0.5 h) (以下配置的体积为单个样本的用量, 若有多个样本同时实验, 需根据样本量修改配置体积)

1. 提前 10 min 取出 ConA bind buffer、Cell wash buffer、Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-free) 和 5% Digitonin, 待恢复到室温后, 颠倒 10 次混匀后瞬离。
2. BF1: 取 900 μ L Cell wash buffer, 加入 9 μ L Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-free), 混匀后瞬离。
3. BF2: 取 250 μ L BF1, 加入 2.5 μ L 5% Digitonin, 混匀后瞬离。
4. BF3: 取 400 μ L BF1, 加入 0.8 μ L 5% Digitonin 和 20 μ L 3M NaCl, 混匀后瞬离。
5. BF4: **实验组 BF4+**: 取 48.5 μ L BF2, 加入 1 μ L 50 \times Protein blocker 和 0.5 μ L 一抗(按抗体说明书推荐使用浓度进行稀释, 本配方为 1: 100 稀释比), 混匀后瞬离。

阴性对照组 BF4-: 取 49 μ L BF2, 加入 1 μ L 50 \times Protein blocker (或取 48.5 μ L BF2, 加入 1 μ L 50 \times Protein blocker 和 0.5 μ L IgG 一抗), 混匀后瞬离。

6. 核提取液缓冲液 A: 10 mM Tris pH 8.0、10 mM KCl、0.5 mM spermidine。
7. 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。
8. 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。
9. 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。

4.2 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)。
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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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, 去掉上清。重复三次后, 取 100-100,000 个细胞核用 90 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。

- 4.3 **磁珠活化步骤**: 取 10 μ L Con A 磁珠于已预加 40 μ L ConA bind 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 50 μ L ConA bind 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 μ L ConA bind buffer, 吹吸混合。

4.4 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 3.3 开始进行实验（**不需要进行 3.2 步骤**）。

五、动物组织细胞的分离。

5.1 溶液配制 (0.5 h)（以下配置的体积为**单个样本的用量**，若有多个样本同时实验，需根据样本量修改配置体积）

1. 提前 10 min 取出 ConA bind buffer、Cell wash buffer、Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-free) 和 5% Digitonin，待恢复到室温后，颠倒 10 次混匀后瞬离。
2. BF1：取 900 μ L Cell wash buffer，加入 9 μ L Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-free)，混匀后瞬离。
3. BF2：取 250 μ L BF1，加入 2.5 μ L 5% Digitonin，混匀后瞬离。
4. BF3：取 400 μ L BF1，加入 0.8 μ L 5% Digitonin 和 20 μ L 3M NaCl，混匀后瞬离。
5. BF4：**实验组 BF4+**：取 48.5 μ L BF2，加入 1 μ L 50 \times Protein blocker 和 0.5 μ L 一抗(按抗体说明书推荐使用浓度进行稀释，本配方为 1: 100 稀释比)，混匀后瞬离。

阴性对照组 BF4-：取 49 μ L BF2，加入 1 μ L 50 \times Protein blocker (或取 48.5 μ L BF2，加入 1 μ L 50 \times Protein blocker 和 0.5 μ L IgG 一抗)，混匀后瞬离。

6. 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 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）。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 $^{\circ}$ C 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】*：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 140 μ L BF1 重悬全部沉淀，室温 600 \times 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 90 μ L BF1，轻轻吹打重悬，转移至 PCR 管中。

5.3 磁珠活化步骤：取 10 μ L Con A 磁珠于已预加 40 μ L ConA bind 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 50 μ L ConA bind 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 μ L ConA bind buffer，吹吸混合。

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

按照 3.3 开始进行实验（**不需要进行 3.2 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. 请于使用前将试剂盒各组份置于室温解冻。解冻后上下颠倒数次充分混匀，短暂离心后置于冰上待用。
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DNAZap™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 100-1,000,000 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，具体推荐见附录四和附录五。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. 高细胞投入量（超过 50 万细胞）在长时间孵育过程中出现部分磁珠聚集为正常现象，可以轻弹管底或轻轻吹打使磁珠重悬。
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. 建库过程中有多个步骤需要使用 DNA 纯化磁珠，我们推荐使用 Hieff NGS® DNA Selection Beads (Yeasen Cat#12601) 或 AMPure® XP 磁珠(Beckman Cat#A63880)进行 DNA 纯化和分选。
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 2 天，-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' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACIIIIIIITCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-NNNNNN-CTGTCTCTTATACATC
TCCGAGCCACGAGACIIIIIIATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

Index 1 (i7)

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

七、关于抗体选择

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。

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#12598)
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	+++++	+++++

物种	抗体亚型	Protein A	Protein A/G(Cat#12598)
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) } 抗兔二抗
 驴抗兔 IgG H&L (Abcam #ab6701)
 山羊抗兔 IgG H&L (Abcam #ab6702)
 Rabbit anti-Mouse IgG (Heavy & Light Chain) Antibody (antibodies-online Cat#ABIN101785) } 抗鼠二抗
 山羊抗小鼠 IgG H&L (Abcam #ab6708)

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® (96 Index) (Yeasten 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. 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、大片段增多、嵌合产物增加、扩增突变积累等多种不良后果。表 2 和表 3 列举了在 293T 细胞中，使用 H3K27me3 和 H3K4me3 进行文库扩增时，细胞投入量、扩增循环数以及文库产量之间的关系。

表 2 细胞投入量与扩增循环数推荐表 (H3K27me3) *

细胞投入量	PCR 循环数	文库产量
1,000,000	10	700 ng
100,000	13	700 ng
10,000	16	500 ng
1,000	20	500 ng
100	24	500 ng

表 3 细胞投入量与扩增循环数推荐表 (H3K4me3) *

细胞投入量	PCR 循环数	文库产量
1,000,000	10	500 ng
100,000	13	500 ng
10,000	17	500 ng
1,000	21	500 ng
100	25	500 ng

【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。推荐在 PCR 之前使用 qPCR 的方法对转座酶插入的片段进行初步定量判断再决定循环数。

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)。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。每 10 万投入量细胞加入 1 μ L 即可，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

TTACACGCAAGAAAAACCGCCATCAGGCGGCTTGGTGTCTTTCAGTTCTT

CAATTGCAATATTGGTTACGTCTGCATGTGCTATCTGCGCCATATCATCCAGT

GGTCGTAGCAGTCGTTGATGTTCTCCGCTTCGATAACTCTGTTGAATGGCTCT

CCATTCCATTCTCCTGTGACTCGGAAGT

Spike-in-2: AGTCGGTGTGAATCCCATCAGCGTTACCGTTTCGCGGTGCTTC

TTCAGTACGCTACGGCAAATGTCATCGACGTTTTTATCCGGAAACTGCTGTCT

GGCTTTTTTTGATTTTCAGAATTAGCCTGACGGGCAATGCTGCGAAGGGCGTTT

TCCTGCTGAGGTGTCATTGAACAAGTCCCATGTCGGCAAGCATAAGCACACA

GAATATGAAGCCCGCTGCCAGAAAAATGCATTCCGTGGTTGCATACCT

Spike-in-3:

CCTTACTGGAATCGATGGTGTCTCCGGTGTGAAAGAACACCAACAGGGGTGTTACCACTACCGCAGGAAAAGGAGGACGTGTGGC

GAGACAGCGACGAAGTATCACCGACATAATCTGCGAAAACGCAAATACCTTCCAACGAAACGCACCAGAAATAAACCCAAGCCAAT

CCCAAAGAATCTGACGTAAAACCTTCAACTACACGGCTCACCTGTGGGATATCCGGTGGCTAAGACGTCGTGCGAGGAAAACAA

GGTGATTGACCAAAATCGAAGTTACGAACAAGAAAGCGTCTCGA

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。

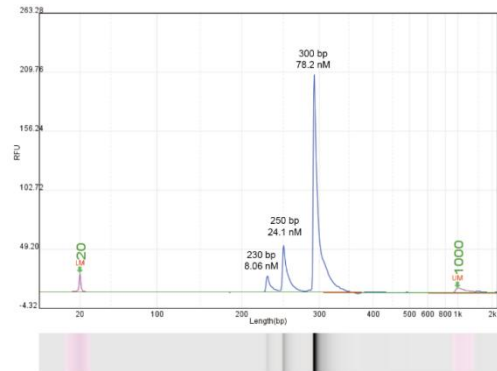


图 1 DNA spike-in mix 长度以及摩尔浓度比



帮助客户创造价值，让世界更健康更快乐