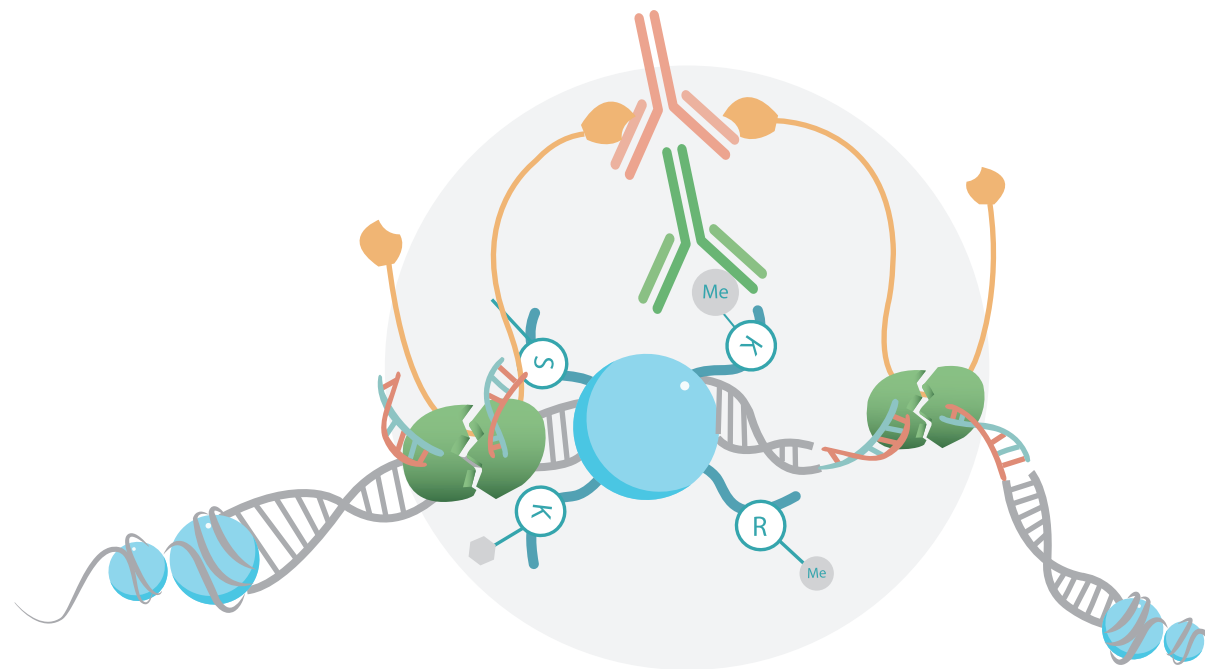




中国
湖北省武汉市江夏区高新二路高科园三路9号武汉精准医疗产业基地
WEB: www.abclonal.com.cn
TEL: 400-999-6126
E-mail: cn.market@abclonal.com

USA
ABclonal Technology Co., Ltd.
500W Cummings Park, Ste. 6500 Woburn,
MA 01801
WEB: www.abclonal.com
TEL: 888-754-5670
E-mail: info@abclonal.com



HC-M-2022Jun23-CN01

CUT&Tag Assay Kit (pAG-Tn5) For Illumina 技术操作手册

COMPANY PROFILE

Antibody | Protein | ELISA Kits | Enzyme | NGS | Service

公司简介

武汉爱博泰克 (ABclonal) 生物科技有限公司是全球抗体与分子酶试剂核心供应商。ABclonal旨在为生命科学基础研究、转化医学、诊断与制药等多个领域提供专业可靠的产品与服务。公司主营业务包括科研抗体与分子酶试剂产品、NGS建库试剂及自动化解决方案、体外诊断原料、蛋白与核酸的分析检测设备、抗体发现服务等。公司总部位于中国武汉,目前在波士顿和上海设立有三个抗体与分子酶研发中心、武汉光谷生物城建设有抗体与分子酶大生产基地,并在美国、英国、日本、新加坡、中国台湾等国家和地区建立有营销中心。

2020年起,爱博泰克先后并购美国优睿赛思,投资莫纳生物、苏州极瞳、湖北新纵科,立志打造成中国生命科学工具解决方案全球领导品牌。过去的10年中,全球超过100,000客户选择ABclonal。

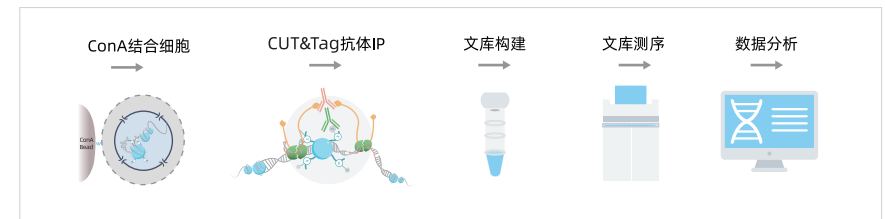
CUT&Tag Assay Kit (pAG-Tn5) for Illumina技术操作手册

目 录

一、引言	1
二、ABclonal CUT&Tag 全流程解决方案	2
三、ABclonal CUT&Tag产品性能和结果展示	3
四、实验流程和注意事项	6
4.1 实验原理和流程概要	6
4.2 注意事项	7
4.3 实验操作流程	8
4.3.1 细胞与ConA磁珠结合	9
4.3.2 一抗结合	10
4.3.3 二抗结合	11
4.3.4 pAG-Tn5结合	12
4.3.5 片段化及终止反应	12
4.3.6 提取 DNA	12
4.3.7 文库扩增及产物纯化	13
五、文库QC和送测序	15
六、数据分析	15
附录1: 冻存细胞处理	17
附录2: 细胞核制备及甲醛交联	17
附录3: 拟南芥细胞核制备	18
附录4: Index选择策略	18
附录5: 转座体序列	19
附录6: 文库结构	20
附录7: 常见问题及解决方案	20
附录8: ABclonal CUT&Tag精品抗体推荐	26

二、ABclonal CUT&Tag 全流程解决方案

为最大程度帮助研究者顺利完成CUT&Tag实验、解决CUT&Tag实验环节中可能出现的各种问题，ABclonal开发了CUT&Tag全流程实验相关产品，包括 CUT&Tag Assay Kit (pAG-Tn5) for Illumina (RK20265) 试剂盒，CUT&Tag级别抗体、CUT&Tag DNA qPCR检测试剂、CUT&Tag DNA文库PCR扩增试剂盒，可为研究者提供一体化的CUT&Tag实验解决方案。



一、引言

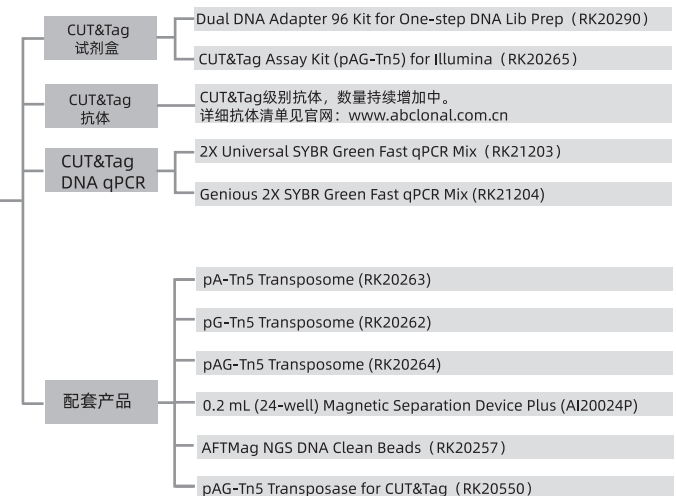
生物体内的蛋白质和 DNA 的互作是普遍存在的，基因表达、复制、重组和修复都涉及到 DNA 与蛋白质之间的相互作用。研究结果显示，高等动植物中 DNA 结合蛋白占到了总蛋白数量的 10%。

早在十九世纪后期，科学家们就通过显微镜观察到了蛋白质与 DNA 之间存在相互作用。随后，研究者开始深入探索蛋白质与 DNA 互作的机制和生物学意义，并发明了一系列的蛋白与 DNA 互作研究方法，如凝胶阻滞实验、DNase I 足迹实验、酵母单杂交等。但是，这些方法不能真实地反映体内的情况，假阳性太高。1980 年染色质免疫共沉淀技术（Chromatin immunoprecipitation assay, ChIP）技术被提出，用于富集并研究特定蛋白质所结合的 DNA 片段。2000 年基因微阵列技术（Microarray）被用来分析这些被特定蛋白所富集的 DNA，这一技术称为 ChIP-on-chip。随着二代测序技术的发展，ChIP-seq (Chromatin immunoprecipitation followed by sequencing) 技术在 2007 年被提出，并被很多大型跨国研究计划，如 ENCODE 广泛采用，从而成为了研究 DNA- 蛋白质互作的金标准。

ChIP-seq 需要投入大量细胞 (10^7)，同时甲醛交联会产生假阳性，整体实验步骤复杂且周期长，测序数据背景信号高，数据重复性差等。这些问题和局限性使得低投入量、低丰度的靶蛋白、弱结合 DNA- 蛋白质的研究变得较为困难。2017 年，美国 Fred Hutchinson 癌症研究中心的 Steven Henikoff 团队开发了一种新的研究技术——CUT&RUN (Cleavage Under Targets and Release Using Nuclease)，和 ChIP-seq 技术一样，CUT&RUN 是一项研究 DNA 和蛋白质相互作用的技术。通过伴刀豆球蛋白 A 磁珠固定细胞，然后用洋地黄皂苷通透细胞膜，加入一抗和 pAG-MNase (Protein A-Protein G - 微球菌核酸酶)，一抗募集 pAG-MNase 到靶蛋白上，0 度条件下添加 Ca^{2+} 激活 pAG-MNase，并切割靶蛋白两侧的 DNA，使其从基因组中释放出来，扩散到上清中。上清中的 DNA 纯化后进行 qPCR 或 NGS 检测。

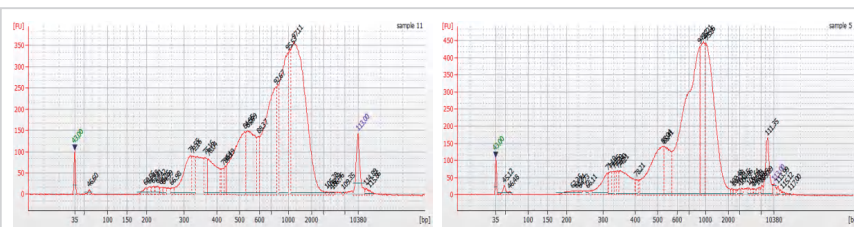
2019 年，Steven Henikoff 团队使用 pA-Tn5 替代 pA-MNase，推出了 CUT&Tag (Cleavage Under Targets and Tagmentation) 技术。其原理与 CUT&RUN 类似，通过刀豆蛋白 A 包被的磁珠 (ConA beads) 吸附细胞 (与细胞膜上的糖蛋白结合)，使用洋地黄皂苷在细胞膜上“打孔”，pA-Tn5 识别抗体进而精准靶向目的蛋白。转座酶对目的蛋白附近的 DNA 进行片段化的同时会加上二代测序所需的部分接头序列，经过 PCR 扩增即可获得直接用于测序的文库。相较于 ChIP-seq 技术，CUT&Tag 所需的细胞起始量低 (10 万以下，甚至单细胞)、操作简单 (不需要交联、超声片段化及免疫沉淀)、实验周期短、数据信噪比高、重复性好等优势，成为众多表观遗传学研究者的首选。

CUT&Tag全流程解决方案产品



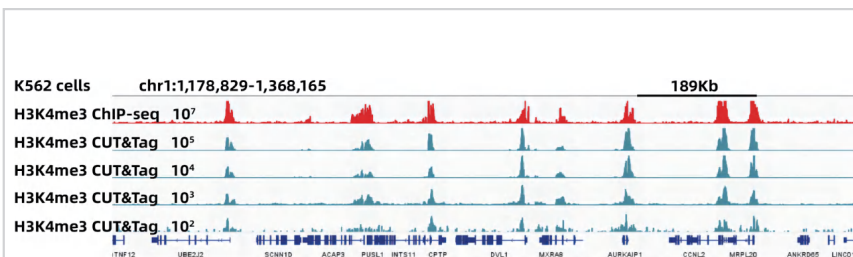
三、ABclonal CUT&Tag相关产品性能和结果展示

3.1 不同细胞量的文库结果



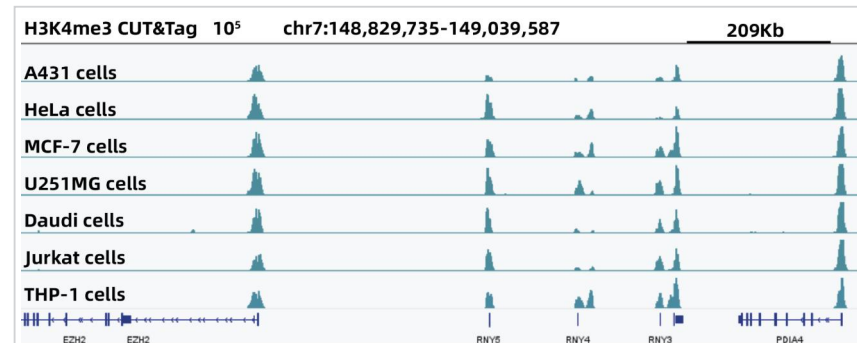
针对不同起始量的 K562 细胞（10,000 左图、100,000 cells 右图），使用 RK20265 进行 H3K4me3 抗体的 CUT&Tag 实验，通过 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行文库分布检测。结果显示对于不同细胞投入量，均可构建出相似的 ladder 状的文库，说明 RK20265 能够兼容不同细胞起始量。

3.2 不同细胞数量的H3K4me3 CUT&Tag peak结果



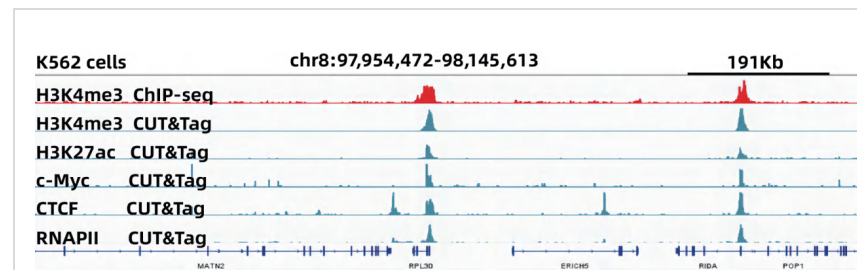
使用 CUT&Tag 试剂盒 RK20265 对 10^5 和 10^4 数量的 K562 细胞进行 H3K4me3 抗体的 CUT&Tag 实验，结果与 Encode 上的 H3K4me3 ChIP-seq 结果对比。图片展示了 1 号染色体上一段代表性区域，结果显示不同细胞投入量染色体图谱基本一致，可提供与 ChIP-Seq 结果一致的覆盖图谱。

3.3 不同细胞系的H3K4me3 CUT&Tag peak结果



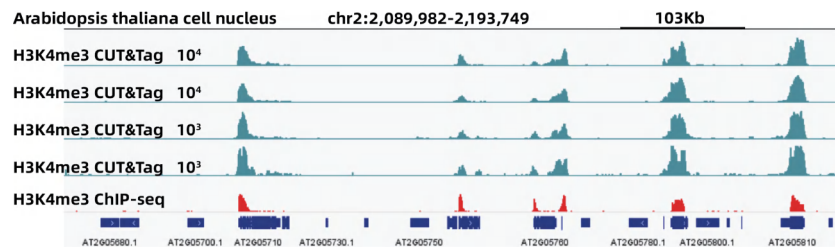
使用 CUT&Tag 试剂盒对 10^5 数量的 A341 细胞、HeLa 细胞、MCF-7 细胞、U251MG 细胞、Daudi 细胞、Jurkat 细胞及 THP-1 细胞进行 H3K4me3 抗体的 CUT&Tag 实验。图片展示了 7 号染色体上一段代表性区域，结果显示不同细胞系染色体图谱基本一致，显示 RK20265 适用于多种细胞系的 DNA-蛋白质相互作用研究。

3.4 不同抗体的 CUT&Tag peak结果



使用 CUT&Tag 试剂盒对 10^5 数量的 K562 细胞分别进行 H3K4me3 (ABclonal, #A2357)、H3K27ac (ABclonal, #A2771)、c-Myc (ABclonal, #A19032)、CTCF (ABclonal, #A19588) 及 RNA Pol II (Thermo, #1862243) 抗体的 CUT&Tag 实验。图片展示了 8 号染色体上一段代表性区域，结果显示不同抗体所产生的组蛋白修饰和转录因子图谱，显示 RK20265 适用于多种靶蛋白的 DNA-蛋白质相互作用研究。

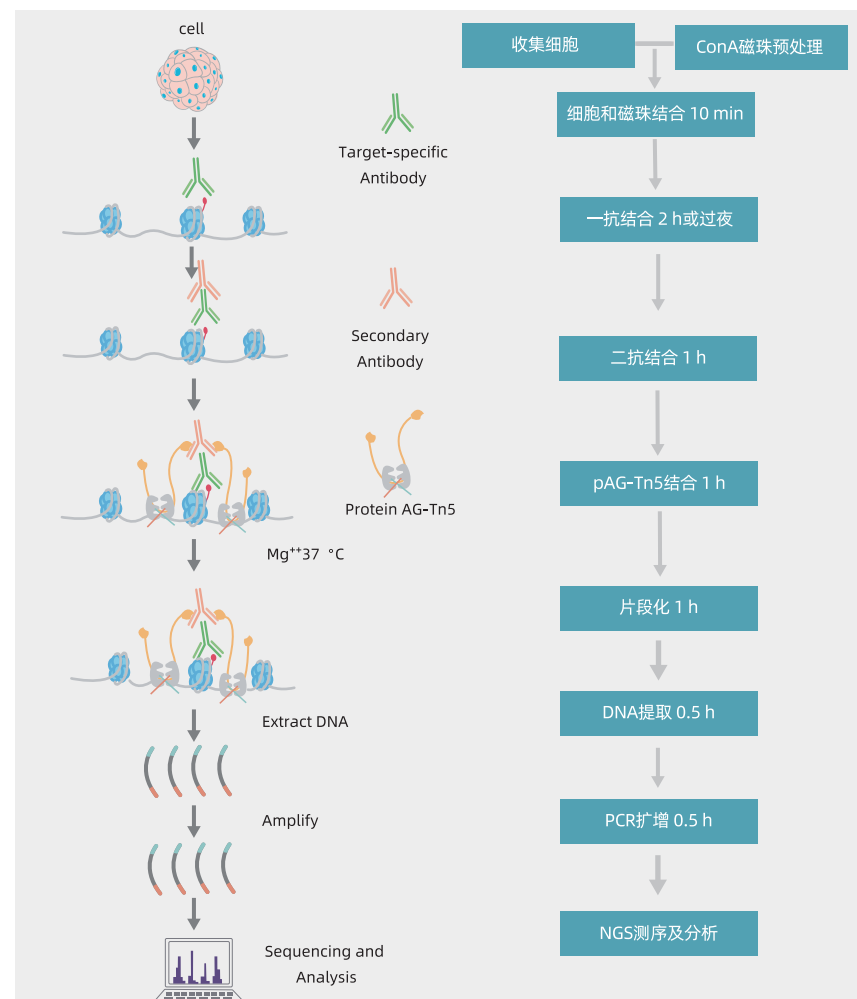
3.5 拟南芥细胞核的H3K4me3 CUT&Tag peak结果



使用CUT&Tag试剂盒RK20265对 10^4 和 10^3 数量的拟南芥根细胞核进行H3K4me3抗体的CUT&Tag实验，结果与GEO数据库上的H3K4me3 ChIP-seq结果对比。图片展示了2号染色体上一段代表性区域，结果显示不同细胞投入量染色体图谱基本一致，可提供与ChIP-Seq结果一致的覆盖图谱。

四、实验流程和注意事项

4.1 实验原理和流程概要



4.2 注意事项

4.2.1 ConA磁珠

- ConA Beads 请保存于 2-8°C 条件下，切勿保存于 0°C 以下。使用前半小时放置于室温条件，平衡至室温，并充分混匀后使用。
- ConA Beads 与细胞结合后请勿涡旋震荡或移液器剧烈吹打，需轻柔吸打，以免降低结合细胞效率。ConA Beads- 细胞结合体避免长时间置于空气中，磁珠干结将影响后续实验。同时不要高速离心或长时间置于磁力架上，避免造成磁珠聚集。
- 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。孵育过程中出现部分磁珠沾壁 / 聚集是正常现象，只要保证 ConA Beads- 细胞结合体处于溶液浸润范围内即可，可以轻弹管底混匀 ConA Beads- 细胞结合体，避免使用移液器吹打混匀 ConA Beads- 细胞结合体。

4.2.2 样本选择

- CUT&Tag 试剂盒适用于 100-100,000 起始量的细胞，常规条件下，不推荐过低的起始细胞量，建议每个反应至少 10,000 个细胞起始量以获得较理想的结果。早期实验时建议投入 10,000 - 50,000 个细胞。
- 对 CUT&Tag 实验的细胞，建议使用台盼蓝染色，检测细胞活力，细胞活性最好 >90%。活性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。
- 若使用活细胞进行实验，对于悬浮细胞系，离心后弃去上层培养基收集细胞即可用于实验。对于贴壁细胞，请勿使用胰蛋白酶进行消化，这样会损伤细胞与 ConA Beads 结合表位，可以使用胶原酶进行消化。
- 若使用冻存细胞进行实验，可以参考附录 1 冻存细胞复苏操作指导。
- 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 NE1 Buffer，详见附录 2 中细胞提核操作指导；不同的样本类型需选择合适的细胞裂解液，具体的提核方法，可以参考相关领域文献资料。
- 对于表达丰度较低的目的蛋白，或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，详见附录 2 甲醛交联操作指导。
- 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。拟南芥组织细胞核提取详见附录 3。

4.2.3 抗体选择

- 实验中一抗建议使用 CUT&Tag 级别的抗体，若针对兴趣蛋白无在售 CUT&Tag 级别的抗体，可以尝试使用适用于 ChIP/IP 实验的抗体进行测试。

- 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修饰（如 H3K4me3、H3K27me3 等），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。

- 建议选择与 Protein A/G 亲和能力高且不带修饰的二抗，可以参考以下表格：

物种	抗体亚型	Protein A/G亲和力
Human	Total IgG	+++++
	IgG1	+++++
	IgG2	+++++
	IgG3	+++++
	IgG4	+++++
	IgM	+
	IgD	-
	IgA1	+
	IgA2	+
	Fab	+
	scFv	+
Mouse	Total IgG	+++++
	IgM	-
	IgG1	+++
	IgG2a	+++
	IgG2b	+++
Rat	IgG3	+++
	Total IgG	+++
	IgG1	+++
	IgG2a	+++++
	IgG2b	+
	IgG2c	+++++
Rabbit	Total IgG	+++++
Cow	Total IgG	+++++
Goat	Total IgG	+++++
Sheep	Total IgG	+++++
Horse	Total IgG	+++++
Guinea pig	Total IgG	+++++
Hamster	Total IgG	+++
Pig	Total IgG	+++++
Donkey	Total IgG	+++++
Cat	Total IgG	+++++
Dog	Total IgG	+++++
Monkey	Total IgG	+++++

【注】+++++代表亲和力非常强，+++代表亲和力中等，++代表亲和力很弱，-代表没有亲和力。

CUT&Tag Assay Kit (pAG-Tn5) for Illumina

4.2.4 PCR循环数

在使用本试剂盒实验过程中, 受到细胞种类、抗体种类的影响, 循环数会发生改变。建库过程中, 应尽量减少扩增循环数, 达到上机要求即可, 过多的循环数将导致偏好性增加、重复性增加等。

以K562细胞为例, 使用高丰度表达的组蛋白修饰 (如H3K4me3) 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	PCR循环数
100,000	12-13
10,000	14-15
1,000	17-18
100	18-19

4.3 实验操作流程

4.3.1 细胞与ConA磁珠结合

刀豆蛋白A (Concanavalin A, 缩写ConA), 是一种植物凝集素, 具有独特的糖结合特性。ConA共价修饰吸附于功能化的磁珠表面, ConA磁珠在免疫学、生物化学及医学等领域内应用广泛, 如分离细胞或组织裂解液或血清中的糖蛋白等糖基化分子, 以及在CUT&Tag方法中用于细胞的原位固定。磁珠的使用替代了传统的离心方法, 可降低实验过程中DNA的损失。

实验前准备

- 1X ConA Bind Buffer、1X CT Wash Buffer、Protease Inhibitor Cocktail提前取出解冻。
- ConA磁珠提前30 min平衡至室温。
- Cell Wash Buffer配制: 取1.25 mL 1X CT Wash Buffer加入12.5 μ L 100X Protease Inhibitor Cocktail。

准备ConA磁珠

- 取N $\times$ 10 μ L磁珠于1.5 mL EP管, 将1.5 mL EP管置于磁力架上静置2 min, 至溶液变澄清, 弃上清; 如果N超过10, 分成2管。N表示实验反应次数。
- 向1.5 mL EP管中加入10倍原磁珠体积的1X ConA Bind Buffer重悬磁珠, 吹打混匀后置于磁力架上静置2 min, 待溶液变澄清, 弃上清。
- 从磁力架上取下1.5 mL EP管, 重复漂洗磁珠一次。
- 向1.5 mL EP管中加入原磁珠体积的1X ConA Bind Buffer重悬ConA 磁珠。
- 将重悬的ConA 磁珠按照每个样本10 μ L分装到八连排管中。

CUT&Tag Assay Kit (pAG-Tn5) for Illumina

收集细胞

- 取所需数量的新鲜细胞于新的1.5 mL EP管中 (建议收集细胞体积不超过1 mL), 室温600 xg离心5 min, 小心弃去上清。
- 加入1 mL Cell Wash Buffer轻柔吹打重悬细胞, 室温600 xg离心3 min, 小心弃去上清。
- 向每个1.5 mL EP管中加入90 μ L Cell Wash Buffer轻柔吹打重悬细胞。

所有涉及到细胞重悬的操作步骤, 请轻柔操作, 切记不可涡旋振荡。

ConA磁珠结合细胞

- 将90 μ L 重悬细胞转移至处理好的10 μ L ConA Beads的八连排管中, 轻柔吹打5-10次或上下颠倒混匀, 立即置于旋转混合仪上, 室温孵育10 min (孵育过程中可以配制下一步实验Buffer)。
- 本步骤及后续的操作中, 对于结合细胞后的磁珠应避免反复多次吹打, 或剧烈吹打, 有可能造成细胞从磁珠上脱落, 导致细胞样本损失。

4.3.2 一抗结合

利用洋地黄皂苷进行细胞膜通透, 抗体穿过细胞膜和核膜进入细胞核识别靶蛋白。优先选择 CUT&RUN 或 CUT&Tag验证过的抗体, 也可以使用ChIP/IP级别的抗体进行测试。

实验前准备

- 5% Digitonin、500 mM EDTA、100 mg/mL BSA提前取出解冻。
- Secondary Antibody Buffer配制: 取735 μ L 1X CT Wash Buffer加入7.5 μ L 100X Protease Inhibitor Cocktail和7.5 μ L 5% Digitonin。
- Primary Antibody Buffer配制: 取50 μ L Second Antibody Buffer加入0.2 μ L 500 mM EDTA和0.5 μ L 100 mg/mL BSA (冰上备用)。

一抗孵育

- 将孵育结束的细胞-磁珠复合物瞬间离置于磁力架上静置2 min, 待液体澄清后, 小心弃去上清。从磁力架上取下八连排管, 每管加入50 μ L预冷的Primary Antibody Buffer重悬细胞-磁珠复合物。加入相应的抗体, 上下颠倒混匀。我们推荐的一抗稀释体积比例为1:50-1:100, 可以根据具体情况进行调整。
- 细胞-磁珠复合物立即移至旋转混合仪上, 室温孵育2 h或4 $^{\circ}$ C孵育过夜。

在孵育过程中, 特别是在4 $^{\circ}$ C的条件下可能会发生磁珠聚集现象, 该现象不会影响实验结果, 也不需要孵育过程中反复地吹打混匀。

CUT&Tag Assay Kit (pAG-Tn5) for Illumina

// // 4.3.3 二抗结合

CUT&Tag实验中使用的二抗需靶向一抗，充当桥接抗体并且可以增加蛋白A/G结合位点的数量，以增加和放大信号。需要注意，抗体类别不同，蛋白A/G的结合效率也不同，因此需要事先检查二抗与蛋白A/G的结合效率。

//实验前准备

- Protease Inhibitor Cocktail、5% Digitonin提前取出解冻。
- Secondary Antibody Buffer配制：取735 μL 1X CT Wash Buffer加入7.5 μL 100X Protease Inhibitor Cocktail和7.5 μL 5% Digitonin。

//二抗孵育

- ① 提前5 min将1 μL二抗与100 μL Secondary Antibody Buffer预混（常规推荐使用1:100比例稀释或按照抗体说明书推荐使用），混匀备用。
- ② 取下一抗孵育结束的八连排管瞬时离心，置于磁力架上静置2 min，待液体澄清后，小心弃尽上清。
- ③ 从磁力架上取下八连排管，加入稀释好的二抗，上下颠倒数次，使抗体与磁珠-细胞复合物混合均匀。室温旋转孵育1 h。
- ④ 取下二抗孵育结束的八连排管瞬时离心，置于磁力架上静置2 min，待液体澄清后，小心弃尽上清。
- ⑤ 从磁力架上取下八连排管，加入200 μL Secondary Antibody Buffer，用移液器轻柔吹打5-10次混匀或上下颠倒混匀，确保重悬全部ConA Beads-细胞，室温静置5 min。置于磁力架上静置2 min，待液体澄清后，小心弃尽上清。
- ⑥ 重复步骤5一次。

▶ 操作多个样本时，每一个样本在上一步溶液弃尽后，立马加入下一步需要使用的溶液，避免磁珠长时间暴露在空气中。

// // 4.3.4 pAG-Tn5结合

将蛋白A/G与经过工程学改造的超高活性Tn5转座酶进行融合，形成同时具备转座酶与蛋白A/G活性的pA/G-Tn5融合酶。将Illumina或MGI平台接头序列包装到pAG-Tn5酶中，形成转座体。转座体中的蛋白A/G结合二抗，将Tn5转座子引导至靶蛋白-DNA附近。

//实验前准备

- 1X Dig-300 Buffer、Protease Inhibitor Cocktail、5% Digitonin提前取出解冻。
- Dig-300 Buffer配制：取741 μL 1X Dig-300 Buffer加入7.5 μL 100X Protease Inhibitor Cocktail和1.5 μL 5% Digitonin。

CUT&Tag Assay Kit (pAG-Tn5) for Illumina

//pAG-Tn5孵育

- ① 取1 μL pAG-Tn5 Transposome加入99 μL Dig-300 Buffer混匀备用，每个样本用量为100 μL。
- ② 从磁力架上取下八连排管，加入100 μL Dig-300转座体稀释液，轻柔吹打5-10次混匀或上下颠倒数次，使转座体和磁珠-细胞复合物充分混合均匀。
- ③ 将混匀后的样品立即置于旋转混合仪上，室温孵育1 h。
- ④ 取下孵育结束的八连排管瞬时离心，置于磁力架上静置2 min，待液体澄清后，小心弃尽上清。
- ⑤ 从磁力架上取下八连排管，向每管样品中加入200 μL Dig-300 Buffer，用移液器轻柔吹打或上下颠倒混匀，室温静置5 min。置于磁力架上静置2 min，待液体澄清后，小心弃尽上清。
- ⑥ 重复步骤5一次。

// // 4.3.5 片段化及终止反应

pAG-Tn5转座体在添加Mg²⁺离子的高盐洋地黄皂苷缓冲液中，并在37°C下孵育，激活Tn5活性，打断DNA并加上接头序列。

//实验前准备

- 1X Dig-300 Buffer、Protease Inhibitor Cocktail、5% Digitonin、1 M MgCl₂、500 mM EDTA提前取出解冻。
- Dig-300 Buffer配制：取741 μL 1X Dig-300 Buffer加入7.5 μL 100X Protease Inhibitor Cocktail和1.5 μL 5% Digitonin。

//片段化及终止反应

- ① 配制Tagmentation Buffer，取49.5 μL Dig-300 Buffer，加入0.5 μL 1 M MgCl₂，涡旋混匀备用。每个样本按照50 μL配制。
- ② 从磁力架上取下八连排管，加入50 μL Tagmentation Buffer，用移液器轻柔吹打或上下颠倒混匀。
- ③ 37°C孵育1 h。
- ④ 孵育结束的样品瞬时离心，每个样品加入1.5 μL 500 mM EDTA终止反应。

// // 4.3.6 提取DNA

SDS和蛋白酶K裂解细胞核后，可以通过多种方式提取DNA。磁珠与核酸的特异性结合使得提取的核酸纯度高、浓度大。不使用传统方法中的苯、酚类、氯仿等有毒试剂，能够实现自动化、高通量操作，操作简单、耗时短，安全无毒。

//实验前准备

- 10% SDS、20 mg/mL Proteinase K提前取出解冻。
- AFTMag NGS DNA Clean Beads提前30 min室温平衡。
- 准备新鲜配制的80%无水乙醇

CUT&Tag Assay Kit (pAG-Tn5) for Illumina

//DNA提取

- ① 终止反应的体系中加入0.5 μL 10% SDS，涡旋混匀。再加入0.4 μL 20 mg/mL Proteinase K，涡旋混匀。短暂离心后置于PCR仪中70℃孵育10 min，PCR仪Hold温度设置为12℃，低温会造成SDS析出。
- ▶ 当加入SDS时，如果磁珠已经沉淀在管底，则可能会出现结团不易吹散的现象，为了避免此现象，可以先将磁珠混匀后再加SDS混匀。
- ② AFTMag NGS DNA Clean Beads涡旋振荡混匀，取110 μL (2.2X) 加至上一步反应产物中，吹打混匀。
- ③ 室温静置5 min，将八连排管移至磁力架上静置，待液体澄清后，小心弃尽上清。
- ④ 保持八连排管在磁力架上，加入200 μL新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠，室温静置30 s后，小心弃尽上清。重复漂洗一次。
- ⑤ 瞬时离心后将八连排管移至磁力架上静置，待磁珠与溶液分离后，用10 μL枪头将残留液体彻底吸干。
- ⑥ 室温晾干2-3 min，使乙醇充分挥发，切记磁珠不可干燥过度。

▶ 环境温湿度不同，晾干时间会有差异。判断标准：磁珠表面由湿润的明亮变为暗淡、50%的磁珠由褐黄色变为干黄色、管壁无明显的液体残留。

- ⑦ 将八连排管从磁力架上取下，每管中加入22 μL Nuclease-free Water，涡旋混匀后室温放置3 min，通常情况下磁珠均匀的分布于水相中。如果细胞数量比较多，可能会出现小粒状磁珠沉积于管底，涡旋振荡混匀之后，静置2 min，再次涡旋振荡混匀。
- ⑧ 将八连排管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清，小心吸取20 μL上清至新的无菌PCR管内。样品在-20℃下储存或直接进行下一步PCR扩增。

// // 4.3.7 文库扩增及产物纯化

由于 Tn5 在片段化过程中会在 DNA 片段中引入兼容序列，所以使用带Index的 N5 引物和 N7 引物进行简单 PCR 反应就可以生成测序文库，让 DNA 文库的制备变得极为快速简便。

//实验前准备

- 接头Kit中试剂在冰上解冻。
- AFTMag NGS DNA Clean Beads提前30 min室温平衡。
- 准备新鲜配制的80%无水乙醇。

CUT&Tag Assay Kit (pAG-Tn5) for Illumina

//文库扩增

- ① 按照下表配制PCR反应体系：
- | 试剂 | 体积 |
|--------------------------------|--------|
| 提取的DNA | 20 μ |
| Gloria Nova 2X PCR Mix for NGS | 25 μL |
| N5 Primer | 2.5 μL |
| N7 Primer | 2.5 μL |
| 总体积 | 50 μL |
- ② 涡旋震荡混匀，瞬时离心，放置到PCR仪中。按照如下程序进行PCR反应：

温度	时间	Cycles
58℃	5min	1
72℃	5min	1
98℃	45s	1
98℃	15s	12-19
63℃	10s	
72℃	1min	1
4℃	hold	

▶ 请根据实际情况选择合适的扩增循环数，参考4.3注意事项中PCR循环数。

//产物纯化

- ① AFTMag NGS DNA Clean Beads涡旋振荡混匀，向PCR结束后的样品中加入65 μL(1.3X)的AFTMag NGS DNA Clean Beads，涡旋振荡混匀。室温静置5 min，将PCR管移至磁力架上静置，待液体澄清后，小心弃尽上清。
- ② 保持PCR管在磁力架上，加入200 μL新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠，室温静置30 s后，小心弃尽上清。重复漂洗一次。
- ③ 瞬时离心后将PCR管移至磁力架上静置，待磁珠与溶液分离后，用10 μL枪头将残留液体彻底吸干。
- ④ 室温晾干2-3 min，使乙醇充分挥发，切记磁珠不可干燥过度。
- ▶ 环境温湿度不同，晾干时间会有差异。判断标准：磁珠表面由湿润的明亮变为暗淡、50%的磁珠由褐黄色变为干黄色、管壁无明显的液体残留。
- ⑤ 将PCR管从磁力架上取下，加入22 μL 1X TE Buffer，涡旋振荡混匀后室温放置3 min。
- ⑥ 将PCR管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清，小心吸取20 μL上清至新的无菌PCR管内，-20℃保存。

五、文库QC和送测序

测序前对文库进行QC是保证测序数据质量的重要环节。文库QC一般包括使用Qubit确定文库浓度，通过微流控片段分析仪 (Qseq或Agilent 2100) 确认文库的大小分布。

//实验前准备

- 准备Qubit检测试剂
- 安捷伦2100检测试剂冰上解冻

//文库定量和片段大小检测

- ① 用Qubit对文库进行定量，若文库浓度大于3 ng/μL以上，可以上机测序。若文库浓度低于3 ng/μL，是否可以上机测序，需咨询测序服务供应商。
- ② 用安捷伦2100和Agilent High Sensitivity DNA Chip (Cat# 5067-4626) 进行文库片段大小检测。通常对于组蛋白修饰类抗体合格的文库2100结果应该呈现出ladder状的文库。
- ③ 为了节省费用可以将测序所需数据量相同的文库和文库平均长度接近的文库进行混库。文库送样体积≥15 μL，混合文库浓度≥3ng/μL。文库类型为DNA文库，数据量每个样本2M以上Reads。

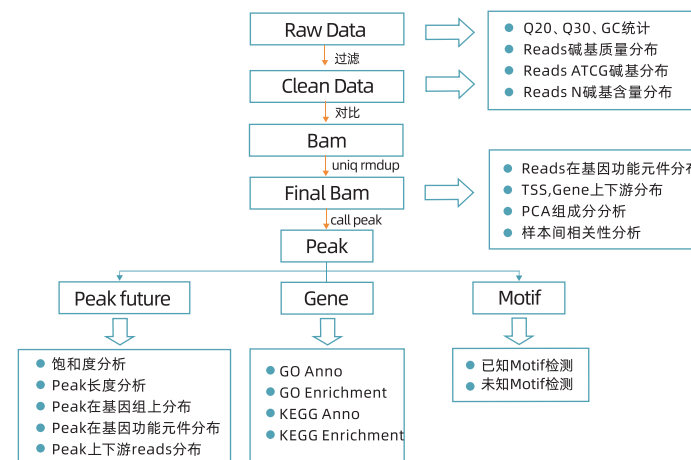
六、数据分析

CUT&Tag的数据分析一般包括fastQC, mapping, peak-calling, peaks注释等，高性能计算机平台、专业的分析软件和高质量的大样本数据库是有效分析数据的三要素。

//分析前准备

- 测序原始数据
- 服务器
- 分析流程

//分析



//分析流程图

- ① 数据预处理：去接头序列、污染序列、低质量碱基，获得 clean data 序列，并进行相关数据统计。
- ② clean data 定位到参考基因组上，得到 bam 文件，并去除重复序列，保留唯一比对的序列。
- ③ 将 bam 文件进行 Peak 检测，得到富集区域的信息，并进行 Peak 在基因功能元件的分布，最近基因寻找及 motif 预测。
- ④ 统计 Peak 分布情况，对 Peak 最近基因进行 GO、KEGG 功能注释与富集及转录因子预测等。
- ⑤ 对多组别样本差异分析，统计差异 Peak 分布情况，对差异 Peak 最近基因进行 GO、KEGG 功能注释与富集，转录因子预测，motif 预测等。

附录1：冻存细胞处理

1. 提前将金属浴或水浴锅预热到37℃。
2. 迅速将从-80℃冰箱取出的冻存细胞放入已经预热的金属浴或水浴锅中，迅速解冻。
3. 将解冻好的细胞转移入新的1.5 mL EP管中 (建议解冻细胞体积不超过1 mL) 或保持在原本的1.5 mL EP管中，600 xg离心5 min，轻轻吸去上清。
4. 向收集细胞的1.5 mL EP管中加入1 mL细胞培养基，轻柔吹打重悬细胞。
5. 放入离心机中，600 xg离心3 min，轻轻吸去上清。
6. 向收集细胞的1.5 mL EP管中加入1 mL Cell Wash Buffer，轻柔吹打重悬细胞。
7. 放入离心机中，600 xg离心3 min，轻轻吸去上清。
8. 向每个1.5 mL EP管中加入90 μL Cell Wash Buffer，轻柔吹打重悬细胞。后续进入细胞与ConA磁珠结合实验。

附录2：细胞核制备及甲醛交联

1. 取所需数量的细胞于新的1.5 mL EP管中 (建议收集细胞体积不超过1 mL)，室温下600 xg离心5 min，小心弃去上清。
2. 室温加入等体积PBS缓冲液，轻柔吸吹重悬细胞。
3. 室温600 xg离心3 min，弃上清。
4. 加入1/2体积预冷NE1 Buffer (起始培养基体积的1/2)，轻柔混匀，冰浴10 min。
5. 4℃，1,300 xg离心4 min，倒出上清，在纸巾上倒扣几秒钟。
6. 加入1/2体积PBS (起始培养基体积的1/2) 轻柔混匀。
7. 加入16%的甲醛 (自备) 至终浓度为0.1%，室温孵育2 min (手动轻微混匀)。
8. 加入25 μL的10X甘氨酸溶液 (自备) 终止交联，室温孵育2 min (手动轻微混匀)。
9. 4℃，1,300 xg离心4 min，倒出上清，在纸巾上倒扣几秒钟。
10. 加入90 μL Cell Wash Buffer重悬细胞核。后续进入细胞与ConA磁珠结合的实验。

附录3：拟南芥细胞核制备

1. 取新鲜的拟南芥叶片或根部组织，放于新的培养皿中，用UP水清洗两遍，擦干水分。
2. 加入1 mL预冷的Lysis buffer，在冰上用刀片切割 (大约5 min)，释放细胞核。
3. 提前将15 mL离心管在冰上预冷，将溶解了细胞核的Lysis buffer用40 μm的过滤器过滤到预冷的15 mL离心管中，用1 mL Lysis buffer冲洗培养皿，并过滤到相同的15 mL离心管中。
4. 4℃，1,000 xg离心10 min，弃上清。

▶ 由于离心后看不到管底部的颗粒，请留下约50 μL液体，以免丢弃上清液时细胞核丢失。

5. 加入1 mL Cell Wash Buffer加入离心管中。4℃，1,000 xg离心10 min，弃上清。
6. 加入90 μL Cell Wash Buffer重悬细胞核，待与ConA Beads结合。

Lysis buffer		
组分	终浓度	体积
Tris-HCl pH 7.5 (1 M)	15 mM	0.75 mL
NaCl (5 M)	20 mM	0.2 mL
KCl (2.5 M)	80 mM	1.6 mL
2-Mercaptoethanol (14.3 M)	5 mM	17.5 μL
Spermine (1 M)	0.5 mM	25 μL
Cocktail (100X) 13	1X	0.5 mL
Triton X-100 (100%)	0.2%	0.1 mL
ddH2O		47.3 mL
Total		50 mL

附录4：Index选择策略

Illumina测序平台使用绿色荧光标记dG/dT，红色荧光标记dC/dA。为了保证测序能顺利进行，每个循环里绿色和红色两种荧光信号都必须存在。因此在Index使用数量比较少时需要考虑Index内部各位置碱基绿色信号和红色信号的平衡，下面为一些推荐的Index组合：

样品数量	N7XX 选择 [Index 1 (i7)]	N7XX 选择 [Index 1 (i7)]
1	任意 N7XX	任意 N5XX
2	选择 1: N701 和 N702	任意 N5XX
	选择 2: N702 和 N704	任意 N5XX
3	选择 1: N701、N702 和 N704	任意 N5XX
	选择 2: N703、N705 和 N706	任意 N5XX
4 - 5	选择 1: N701、N702、N704 及其他任意 N7XX	任意 N5XX
	选择 2: N703、N705、N706 及其他任意 N7XX	任意 N5XX
6	N701、N702、N703、N704、N705 和 N706	任意 N5XX
7 - 12	选择 1: N701-N706 及其他任意 N7XX	任意 N5XX
	选择 2: N701、N702、N704 及其他任意 N7XX	选择 1: N501 和 N502
		选择 2: N503 和 N504
		选择 3: N505 和 N506
	选择 3: N703、N705、N706 及其他任意 N7XX	选择 1: N501 和 N502
		选择 2: N503 和 N504
		选择 3: N505 和 N506
>12	N701 - N706 及其他任意 N7XX	选择 1: N501、N502 及其他任意 N5XX
		选择 2: N503、N504 及其他任意 N5XX
		选择 3: N505、N506 及其他任意 N5XX

附录5：转座体序列

ME: 5'-phos-CTGTCTCTTATACACATCT-NH2-3'

Adapter 1: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3'

Adapter 2: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3'

附录6：文库结构

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-Index2(i5)-TCGTCGGCAGCG

TCAGATGTGTATAAGAGACAG-xxxxxxx-CTGTCTTATACACATCTCCGAGC

CCACGAGAC-Index1(i7)-ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3', 其中-xxxxxxx-为插入序列, 两端为文库结构。

附录7：常见问题及解决方案

1、ChIP-seq、CUT&RUN、CUT&Tag 技术有什么区别？

	ChIP-seq	CUT&RUN	CUT&Tag
是否需要交联	是	否	否
染色质片段化方法	超声片段化	MNase 酶切	Tn5 的转座反应
所需细胞量	>10 ⁶ 级别	一般100-10 ⁵	一般100-10 ⁵
是否需要建库	单独加接头后建库	单独加接头后建库	直接PCR即可
适用的靶点	广泛适用于组蛋白修饰, 转录因子与辅因子	广泛适用于组蛋白修饰, 转录因子与辅因子	主要适用于组蛋白修饰, 少许转录因子与辅因子
测序深度	20-50 M Reads	8 M Reads	2-8 M Reads
实验周期	3-4 天	1-2 天	1-2 天

2. CUT&Tag 可以用于哪些蛋白的研究？

CUT&Tag 可以用于组蛋白的研究，也有用于转录因子和辅因子的研究。另外，对于非活跃转录的转录因子、结合较弱的转录因子、辅因子等可以使用轻微甲醛交联增加实验成功率。

3. CUT&Tag 实验只适用于细胞吗？动物和植物组织样本可以进行 CUT&Tag 实验吗？

CUT&Tag 不仅适用于细胞研究，也适用于动物和植物组织样本的研究。新鲜组织样本，建议进行组织匀浆或研磨后获得单个细胞，也可以参照单细胞实验制备方法。植物样本需要先提核后再进行 CUT&Tag 实验。

4. 冻存的细胞或组织样本可以做 CUT&Tag 实验吗？

冻存的样本也可以进行 CUT&Tag 实验。对于冻存细胞，建议从-80℃冰箱取出后立即置于 37℃水浴锅进行复苏，复苏后建议分出一份用台盼蓝染色，计算一下存活细胞数量再进行实验。对于冻存动物组织，融化后建议用匀浆仪进行匀浆，再用胰蛋白酶处理成单细胞，再进行细胞核提取，即可进行实验；对于冻存植物组织，建议刀片切割叶片，使之释放出细胞核即可进行实验。原则上，我们推荐冻存样本和植物样本提核后再进行 CUT&Tag 实验。另外，关于细胞活性要求，细胞存活率≥90%，如果进行细胞核提取，建议细胞核完整性≥90%（可以用台盼蓝染色，显微镜下观察细胞核状态，可见细胞核边界）。

5. 进行 CUT&Tag 实验时，是否需要加入阳性对照和阴性对照样本呢？

与 ChIP 实验不同，CUT&Tag 实验是否加入阳性对照和阴性对照不是必须的，但对于新手来说，可以加入阳性对照（H3K4me3）和阴性对照（IgG）来检测实验操作是否规范，对于熟练操作者，想要加入阳性对照（H3K4me3）和阴性对照（IgG）也是可以的。

6. 进行 CUT&Tag 实验时，阳性对照一定要用 H3K4me3 吗？

目前没有明确要求阳性对照的种类。只是 H3K4me3 在细胞中表达量较高，通常我们将其用作阳性对照，如果客户有其它的表达量高且稳定的抗体也可以用来用作阳性对照。

7. 进行 CUT&Tag 实验时，磁珠的处理有哪些注意事项？

CUT&Tag 实验中用到 2 种磁珠——ConA Beads 和 AFTMag NGS DNA Clean Beads，两种磁珠存放时均需要放在 4℃条件下，请勿存放于-20℃。

ConA Beads 使用前平衡至室温，该磁珠与细胞表面糖蛋白结合抓取细胞，在实验过程中便于查看细胞状态，与实验原理无关，另外，请吸吹混匀 ConA Beads，反复涡旋可能降低其与细胞的结合效率（涡旋可能导致刀豆球蛋白脱落）。此外，ConA Beads 对不同种细胞的结合能力不同，需要适当的调整。如果使用过程中出现凝聚的现象，用移液器轻吹即可吹散，那么通常不影响实验结果；如果凝聚后不易吹散，那么说明细胞和磁珠的结合能力较强，可适当减少磁珠用量；反之，如果细胞和磁珠结合能力较弱，需要更换结合能力较强的磁珠进行实验。AFTMag NGS DNA Clean Beads 使用前平衡至室温，分别用来提取 DNA 和文库纯化。

8. ConA Beads 和细胞的结合效率如何检测？

取 10 万细胞、5 μL ConA 磁珠，分别洗涤之后，重悬至 90 μL、5 μL 相应的 buffer 中，取 45 μL 细胞与 5 μL 磁珠混匀孵育 10 min 后，分离上清、磁珠。用显微镜镜检结合前、结合后上清中残余的细胞数量，从而计算出结合在磁珠上的细胞结合比例。通常悬浮细胞结合效率 95% 左右，消化过的组织、贴壁细胞可能会出现结合率偏低的情况，如果结合效率低于 60%，可更换结合效率更高的 ConA 磁珠。

9. CUT&Tag 实验所需抗体有哪些要求呢？

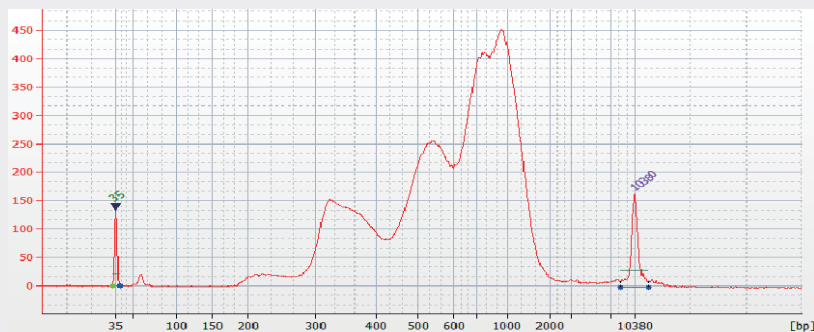
对于一抗，建议采用经过 CUT&Tag 验证的抗体进行实验，如果没有验证的抗体，那么建议按照如下顺序选择合适抗体：CUT&Tag/CUT&RUN> ChIP> IP> IF，另外购买抗体时请参照抗体说明书。使用多抗进行实验时，不同批次间差异可能较大，会影响实验结果，大家可以在多个批次间选择效果最好的批次实验，也可以选择单抗进行实验，单抗批间差较小。对于二抗，选择与一抗相匹配的抗体，并选择不带修饰的二抗进行实验。有客户选择 HRP 修饰的二抗，是非常不推荐的，会造成实验失败、文库产量低、信号弱等一系列后果。

10. 一抗和二抗的稀释比例是怎样的？

推荐的一抗稀释比例为 1:50，二抗的稀释比例为 1:100，但这是可以调整的，对于没有 CUT&Tag 实验参考的抗体，建议按照说明书推荐比例使用。

11. CUT&Tag 文库质检标准是什么样的？

通常对于建库产量的要求是达到上机要求即可 (20 ng)，原则上达到上机要求的前提下，尽量降低 PCR 循环数。对于组蛋白修饰的抗体，我们所得的文库是 Ladder 状为建库成功，否则为建库失败。组蛋白文库呈 ladder 状与核小体大小有关，而 Tn5 Transposome 只切割裸露的 DNA，包围在核小体周围的 DNA 则不被切割，因此其文库峰形呈现阶梯式大小。(如下图，为使用 H3K4me3 抗体所得文库)。



而对于转录因子和辅因子，其文库峰形一般不是 Ladder 状，而是一个峰。

12. Digitonin 的作用是什么？

Digitonin 的作用是透化细胞膜或者核膜，增加细胞膜的通透性 (Digitonin 可以溶解细胞膜上的甾醇类物质)，方便一抗、二抗、转座体进入细胞，但加入 Digitonin 的试剂容易起泡，使用过程中注意轻柔吹打，以免产生更多气泡影响实验结果。

13. Digitonin 在所有细胞中使用浓度都一样吗？

不是的。不同的细胞渗透压不一样，我们推荐的浓度只是在 K562 细胞中最适的，不一定适用于所有细胞，遇到不适用的细胞，需要客户自行测试 Digitonin 使用浓度。

14. CUT&Tag 实验提取 DNA 后可以进行 qPCR 检测吗？

理论上抽提 DNA 后进行 qPCR 检测是可行的，但结果不一定准确。由于 Tn5 转座的随机性，使得设计引物检测一个特定的基因位点有些问题，因为引物结合位置的序列可能会被切断。因此，qPCR 结果可能并不准确，因为引物结合位点可能被切断导致引物无法结合。

15. Primary Antibody Buffer 中 EDTA 和 BSA 的作用是什么，为什么要放在冰上？

在一抗结合目的蛋白的过程中，需要尽量减少细胞内的各种活动（如染色质重构）。Primary Antibody Buffer 中含有的 EDTA 可以实现这个目的，但 EDTA 穿过细胞膜和细胞核膜起作用需要一定时间。所以增加预冷 Primary Antibody Buffer 的步骤使得在 EDTA 胞内外平衡期间快速降低细胞的活动。

BSA 的作用是封闭抗体非特异性结合位。

16. CUT&Tag 实验需要交联吗？

通常情况下是不需要交联的，但是如果研究一些结合能力太弱转录因子、辅因子时，是可以进行交联的，交联所需甲醛终浓度需客户自行测试，此外，甲醛交联会掩盖一些抗原表位，可能导致文库产量降低。

17. 目前 CUT&Tag 测序数据量是多少呢？

对于组蛋白的研究，通常我们推荐 2M 数据量即可，对于丰度较低的靶点建议 8-10M Reads，但是现在通常科研服务公司测序数据量是 6G (20M)，增加测序深度以便深度挖掘数据。

18. 二抗的作用是什么？

二抗结合一抗，对一抗进行信号放大，增加转座体的结合位点。如果不进行二抗孵育，所得文库产量将大大降低，这与我们的测试结果是一致的。

19. CUT&Tag 实验中 Dig-300 Buffer 中所用 Digitonin 终浓度为 0.01%，而 Wash Buffer 中所用 Digitonin 终浓度为 0.05%，为什么降低浓度呢？

Dig-300 Buffer 中盐离子浓度较高，若还用 0.05% 的 Digitonin 会造成细胞破碎。

20. CUT&Tag 实验中所用 PCR 程序为两步法，与普通程序不同，有什么优势吗？

CUT&Tag 实验中所用 PCR 程序将退火、延伸步骤合并，是为了获得合适大小的文库，之前我们也有测试过，平时用的 PCR 程序用于 CUT&Tag 实验时，所得峰形偏大，不利于测序。另外，磁珠分选的方式我们不太推荐，因为经过磁珠分选会降低产量，增加循环数可以弥补产量的降低，但也增加了 PCR 偏好性。另外磁珠分选也可能丢失部分基因丰度。

21. CUT&Tag 构建的文库可以用于 Illumina 平台测序，那么是否可以用于其它平台的测序呢？

CUT&Tag Assay Kit (pAG-Tn5) for Illumina 试剂盒中提供的转座体是适用于 Illumina 平台的，如果客户需要使用其它平台测序，可以根据自己的需要自行组装接头，单独购买 pA-Tn5 Transposase, pG-Tn5 Transposase 和 pAG-Tn5 Transposase 即可，我们有提供相应产品。

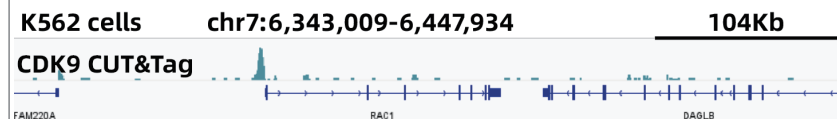
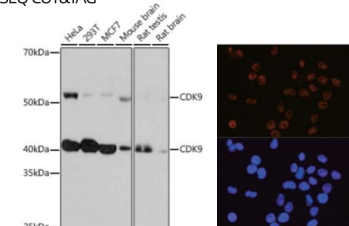
附录8：ABclonal CUT&Tag精品抗体推荐

精品抗体推荐

A11145 CDK9 Rabbit mAb

反应物种：HUMAN, MOUSE, RAT

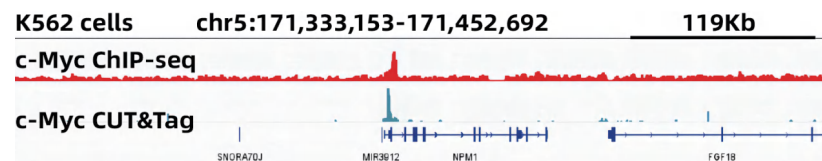
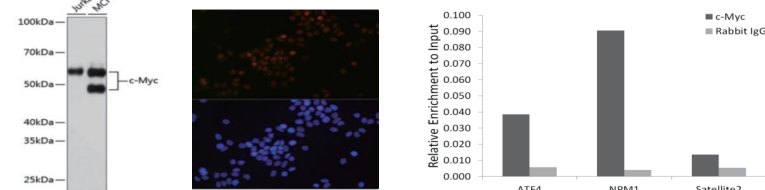
验证实验：DB WB IHC IF CHIP-SEQ CUT&TAG



A19032 c-Myc Rabbit mAb

反应物种：HUMAN, MOUSE

验证实验：WB IF CHIP CUT&TAG

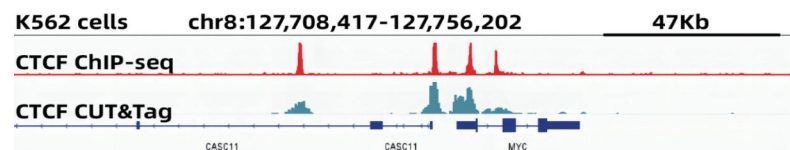
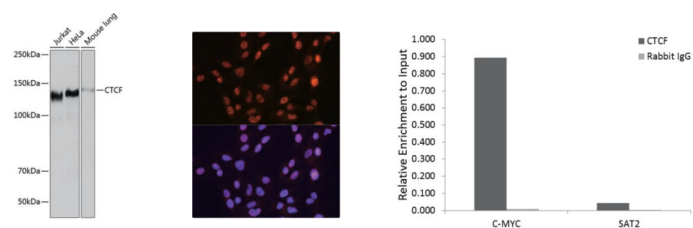


精品抗体推荐

A19588 CTCF Rabbit mAb

反应物种: HUMAN, MOUSE, RAT

验证实验: WB IF IP CHIP CUT&TAG



A2771 Acetyl-Histone H3-K27 Rabbit mAb

反应物种: HUMAN, MOUSE, RAT

验证实验: DB WB IF IHC CHIP CUT&TAG

