



# CUT&Tag Assay Kit 说明书

Version 2.4

RK9002

# 目录

1. 产品简介.....	1
2. 试剂盒组成及保存条件.....	2
3. 自备材料.....	3
4. 注意事项.....	3
5. 试剂准备.....	4
6. 实验原理.....	5
7. 实验操作步骤.....	6
8. 常见问题与解决方案.....	10

## 1. 产品简介

CUT&Tag Assay Kit是开发的用于研究蛋白质-DNA相互作用的试剂盒。

CUT&Tag(Cleavage Under Target & Tagmentation)技术是一种研究蛋白质-DNA相互作用的方法，使用Protein G融合的转座酶，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。本试剂盒优化了实验反应体系和建库流程，与传统的ChIP-Seq相比，具有细胞投入量低、实验周期短、信噪比高、可重复性好等优势，尤其适用于早期胚胎发育、干细胞、肿瘤以及植物表观遗传学等研究领域。试剂盒中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构建的稳定性和重复性。

## 2. 试剂盒组成及保存条件

模块 A	试剂管名称	8 次	24 次	保存条件
	ConA Beads	250μl	800μl	4 度

模块 B	试剂管名称	8 次	24 次	保存条件
	Binding Buffer	3ml	9ml	-20 度
	Low Salt Buffer	6ml	18ml	-20 度
	High Salt Buffer	8ml	23ml	-20 度
	Tagmentation Buffer	30ml	8ml	-20 度
	Antibody Buffer	1ml	3ml	-20 度
	pG-Tn5	8μl	25μl	-20 度
	5% Digitonin	10μl	30μl	-20 度
	Proteinase K	50μl	130μl	-20 度
	0.5M EDTA	100μl	300μl	-20 度

BOX A: ConA beads, 2 ~ 8℃保存，根据不同目的地调整运输方式。

BOX B: Binding Buffer, -30 ~ -15℃保存，2 ~ 8℃下可保存6个月；其余组分，-30 ~ -15℃保存，≤0℃运输。

## 3. 自备材料

抗体（建议使用ChIP级别的）、蛋白酶抑制剂、无水乙醇、灭菌超纯水、低吸附EP管、PCR管、旋转混合仪、磁力架、PCR仪等。

## 4. 注意事项

### ConA Beads操作注意事项

使用前将磁珠平衡至室温，请勿将磁珠置于0℃以下存放；用移液器轻柔吹打重悬ConA Beads，避免过度剧烈地振荡；

ConA Beads与细胞结合后，应避免剧烈振荡磁珠-细胞复合物或使磁珠-细胞复合物离开液体在空气中长时间放置导致磁珠干结；

长时间孵育过程中出现部分磁珠聚集为正常现象，可以轻弹管底使磁珠重悬，应避免实验过程中反复开盖吹打磁珠-细胞复合物；

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。

### 样品交叉污染注意事项

吸取不同样品时应更换枪头；使用带滤芯的枪头。

### 细胞操作注意事项

操作细胞应尽量轻柔以保持细胞活性。

### 试剂使用注意事项

不同的Buffer试剂应注意保存条件，避免失效。

### PCR产物污染注意事项

将PCR反应体系配制区和PCR产物纯化区进行强制性的物理隔离；使用专用的移液器等设备；

定时对各实验区域进行清洁(使用0.5%次氯酸钠或10%漂白剂进行擦拭清理)。

## 5. 试剂准备

### Buffer配制

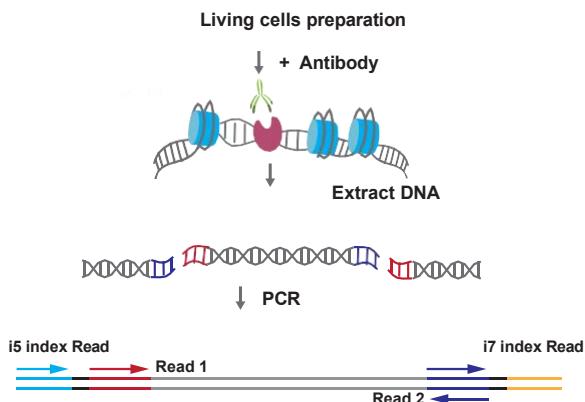
▲ 此处按单个样本计算，请根据实际样本数量等比例配制。

▲ Digitonin有毒性，在溶液配制过程中请做好个人防护，加入Digitonin后缓冲液不可长期保存，现配现用。

Dig-Antibody Buffer：取99 ul Antibody Buffer，加入1ul 5% Digitonin混合。置于冰上冷却，现配现用。

Dig-Tagmentation Buffer：取297 μl Tagmentation Buffer，加入3 μl 5% Digitonin混合均匀，现配现用。

## 6. 实验原理



### CUT&Tag基本原理

利用刀豆蛋白A包被的磁珠(Concanavalin A-coated magnetic beads, ConA beads)结合细胞，并使用非离子去污剂洋地黄皂昔进行细胞膜通透；通过针对靶蛋白的抗体和 Protein A/Protein G的介导，使得与Protein A/Protein G融合的转座子精准靶向切割靶蛋白附近的DNA序列；并在被切割的片段两端加上接头序列，经PCR扩增后即可形成直接用于高通量测序的文库。

## 7. 实验操作步骤

### pG-Tn5蛋白与抗体结合反应

1. 提前孵育pGT蛋白和抗体。取1.5 ml离心管加入100  $\mu$ l 预冷的Low Salt Buffer，加入5  $\mu$ l抗体和0.6-1ul 的 pG-Tn5，吸打混匀，轻甩管壁液体至管底，于4°C 旋转孵育1 h。

备注：Binding Buffer、Low Salt Buffer和High Salt Buffer，使用前均加入 蛋白酶抑制剂。

### 细胞核与磁珠结合

1. 加入1 ml预冷的1xPBS，用刀片完全切碎材料。

2. 取30  $\mu$ l ConA Beads置于磁力架上，弃掉上清缓冲液，用300  $\mu$ l Binding Buffer重悬磁珠。

3. 在磁力架上去掉上清液，用30  $\mu$ l Binding Buffer重悬磁珠。

4. 向上述细胞核裂解液（约1ml，未过滤，可能有样品杂质）中加入步骤3中活化的磁珠。

5. 将上述混合液置于4°C 旋转孵育10–15 min，使细胞核结合在磁珠上。

### pGT蛋白-抗体复合物与细胞核结合反应

1. 在磁力架上弃掉上清（及样品杂质），向结合上细胞核的磁珠中加入300  $\mu$ l 预冷的Low Salt Buffer，吸打混匀磁珠使细胞核重悬。置于磁力架上，小心移除上清，去除未结合的细胞核及碎片。

2. 重复上述步骤一次。

3. 每个样本加入50  $\mu$ l预冷的Dig-Antibody Buffer重悬细胞(细胞核)-磁珠复合物。

4. 将孵育后的pGT蛋白-抗体反应液加入结合有细胞核的磁珠，混匀。于4°C 旋转孵育2 h。

### 转座反应

1. 孵育结束后，1.5 ml离心管置于磁力架上，小心移除上清，保留磁珠。

2. 加入300  $\mu$ l 预冷的High Salt Buffer，吸打混匀磁珠使细胞核重悬，1.5 ml离心管置

于磁力架上，小心移除上清，去除未结合的pGT-抗体复合物。

3.重复上述步骤两次（总计洗三次）。

4.加入300  $\mu$ l Dig-Tagmentation Buffer，吸打混匀磁珠使细胞核重悬，离心管置于37°C 水浴1 h。

## DNA纯化回收

1.反应后，向1.5 ml离心管中加入10  $\mu$ l 0.5 M EDTA和3  $\mu$ l 10% SDS，吸打混匀。

2.加入5  $\mu$ l 20 mg/ $\mu$ l蛋白酶K，吸打混匀，置于50°C 水浴过夜(> 6 h)。

终止片段化反应。

3.向EP管中加入2倍体积的DNA纯化磁珠，混匀，静置吸附5min，将EP管放置磁力架中，待溶液澄清，弃上清。

4.加入280 $\mu$ l 80%乙醇清洗，弃上清。

5.重复步骤4，晾干磁珠后，加入20 $\mu$ l EB，用枪洗吹混匀，室温静置5min。

6.将EP管放置磁力架上，待溶液澄清，吸取上清至新的EP管，标记。

7.取1 $\mu$ l进行定量，剩余放置-20°C保存。

▲ 纯化后的片段化DNA可使用Qubit 4.0进行浓度测定，根据提取产量判断提取操作是否异常。

## 8. 常见问题与解决方案

CUT&Tag适用于什么物种？

CUT&Tag Protocol广泛适用于常规哺乳动物细胞的蛋白质-DNA互作研究，酵母、植物等细胞可以经过特殊的处理(破除细胞壁或者提取细胞核)来进行实验，操作可以参照CUT&RUN技术的前端处理方式。

ConA磁珠主要作用是什么？

ConA磁珠经过刀豆蛋白A包被，能与细胞膜上的糖蛋白结合，从而吸附细胞，使细胞处理操作可视化，从而减少在后续实验过程中的细胞的损失。

CUT&Tag是不是只能用Illumina平台测序？

提供的转座子是针对Illumina平台定向设计的，如果需要使用其他测序平台，可更换适配相应平台的接头和Index扩增引物即可。