



RUISBIO | 睿锶生物

CUT&Tag Assay Kit 说明书

Version 2.2

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是一种新的实验方法，用于研究组蛋白修饰和一些转录因子的基因组定位，从而揭示蛋白与DNA之间的相互作用或者鉴定感兴趣蛋白的DNA结合位点。

MNase-Seq和ATAC-Seq是把开放染色质作为研究对象，因此相当依赖于染色质的开放性。不同于这两个方法，CUT&Tag利用基于抗体的酶靶向特定的组蛋白修饰或蛋白，以揭示特定于这些感兴趣位点或蛋白的染色质结合信息。

CUT&Tag基于与ChIP-Seq相同的原理，但是对实验方法进行了一些相应的修改。在CUT&Tag中，新鲜的(未冷冻的)未固定的细胞与刀豆蛋白A磁珠结合，在细胞的原生状态下 (native state) 进行抗体孵育，不需要ChIP-Seq实验中固定染色质，超声处理和免疫沉淀的步骤。抗体结合后，染色质被消化，NGS建库通过使用预先接好adapter的protein A/G - Tn5 (pA/G-Tn5)转座酶进行标记，一步完成。

与ChIP-Seq相比，CUT&Tag的起始材料更少，所需要的时间更短，产生结果更快，质量更高，而且能够以更低的测序深度进行稳健的分析，从而节省时间和金钱。

该试剂盒是一种高效、快速、准确的基因组染色质免疫沉淀 (ChIP) 试剂盒，用于检测染色质上的蛋白质-DNA 相互作用。该试剂盒包含了多种化学试剂和材料，用于从细胞或组织中提取染色质，并进行免疫共沉淀。通过该试剂盒，可以高效地进行CUT&Tag实验，从而研究基因调控、表观遗传学和疾病发生机制等方面的问题。

CUT&Tag Assay试剂盒每个反应可以使用 50,000 至 500,000 个细胞。该试剂盒提供了优化好的试剂和方案，可产生高质量illumina平台测序文库。

产品优势：

- 单次实验最少可使用 5,000 个细胞
- 测序背景低，测序深度也可降低
- 没有甲醛交联造成的假阳性结果

应用场景：

- 研究抗逆性基因调控：利用 ConA Beads 结合 CUT&Tag 技术，研究耐旱、耐盐、耐除草剂、抗病、抗虫等抗逆性基因的表现遗传调控机制，筛选关键调控因子，为作物改良提供依据。
- 植物组织特异性表现遗传研究：用于研究不同作物组织（根、茎、叶、种子）中的表现遗传调控模式，助力精准育种。
- 非模式植物的功能基因组学研究：可在水稻、小麦、玉米等主粮作物以外的植物（如药用植物、经济作物等）中，探索其基因表达调控网络。

2. 试剂盒组成及保存条件

试剂盒 模块	试剂管名称	8 次	24 次	保存 条件
Box A	Binding Buffer (10X)	1.8 mL	5.3 mL	4°C
	Low Salt Buffer (10X)	1.5 mL	4.3 mL	4°C
		1 ml	1 ml	4°C
	Hight Salt Buffer(10X)	1 mL	2.6 mL	4°C
		1.8 mL	5.3 mL	4°C
	pG-Tn5 Transposon	1 ml	1 ml	4°C
	1 M Mgcl	1ml	1ml	4°C
	30% BSA	200 μL	580 μL	4°C
	5% Digitonin	1.4 mL	4 mL	4°C
	EB Buffer	100 μL	320 μL	4°C
Proteinase K (20 mg/mL)	35 μL	110 μL	-20°C	
Box B	ConA Beads	40 μL	150 μL	-20°C
	0.5 M EDTA	10 μL	20 μL	-20°C

*，注：1. 该试剂提供的量仅供测试用，不是 8 或 24 次的足量，如需更多，可自行采购。

2. 对照抗体不要反复冻融超过 10 次。

3. 请严格按照存放条件保存试剂，以防影响实验效果。

BOX A : ConA beads , 2 ~ 8°C保存 , 其余组分室温保存 , 根据不同目的地调整运输方式。BOX B : 5% Digitonin , -30 ~ -15°C保存 , 室温下可保存1周 ;
10 × Binding Buffer , -30 ~ -15°C保存 , 2 ~ 8°C下可保存6个月 ; 其余组分 , -30 ~ -15°C保存 , ≤0°C运输。

3. 自备材料

◇ 试剂

抗体(一抗、二抗) ;
Tris饱和酚 ; 氯仿 ;
无水乙醇 ;
ddH₂O。

◇ 仪器及耗材

DNA Clean Beads ; 旋转混合仪 ;
磁力架 ;
PCR热循环仪 ;
低吸附EP管、PCR管 ;
单端Index ; 双端Index ;
请按照样本数量选择相应的接头试剂盒。

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°C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。

DNA纯化磁珠操作注意事项

使用前将磁珠平衡至室温 , 所有磁珠操作都应于室温进行 , 请勿将磁珠置于0°C以下存放 ; 每次吸取磁珠前都应涡旋振荡充分混匀 , 样品加入磁珠后应保证与磁珠充分混匀 ;

移取上清时应在磁珠被彻底吸附后小心进行 , 避免吸到磁珠而影响后续实验 ; 纯化PCR产物时 , 80%乙醇应现配现用 , 漂洗磁珠后应尽量吸干残留乙醇 ;

磁珠在洗脱前应充分干燥(表面由光亮褐色变为磨砂褐色) , 以免乙醇残留影响后续实验 ,

但也需避免磁珠过分干燥开裂而影响DNA样品洗脱效率。

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。

Binding Buffer：取30 μ l 10 \times Binding Buffer，加ddH₂O至300 μ l，混匀。

Wash Buffer：取0.4 ml 10 \times Wash Buffer (-)，加入80 μ l 50 \times 蛋白酶抑制剂，加ddH₂O至4 ml混匀。

▲ 50 \times 蛋白酶抑制剂：取一片蛋白酶抑制剂混合片剂(Sigma-Aldrich, 5056489001)溶于1 ml ddH₂O中，-20 $^{\circ}$ C保存。

Dig-wash Buffer：取2.97 ml步骤2中配制的Wash Buffer，加入30 μ l 5% Digitonin，混匀。

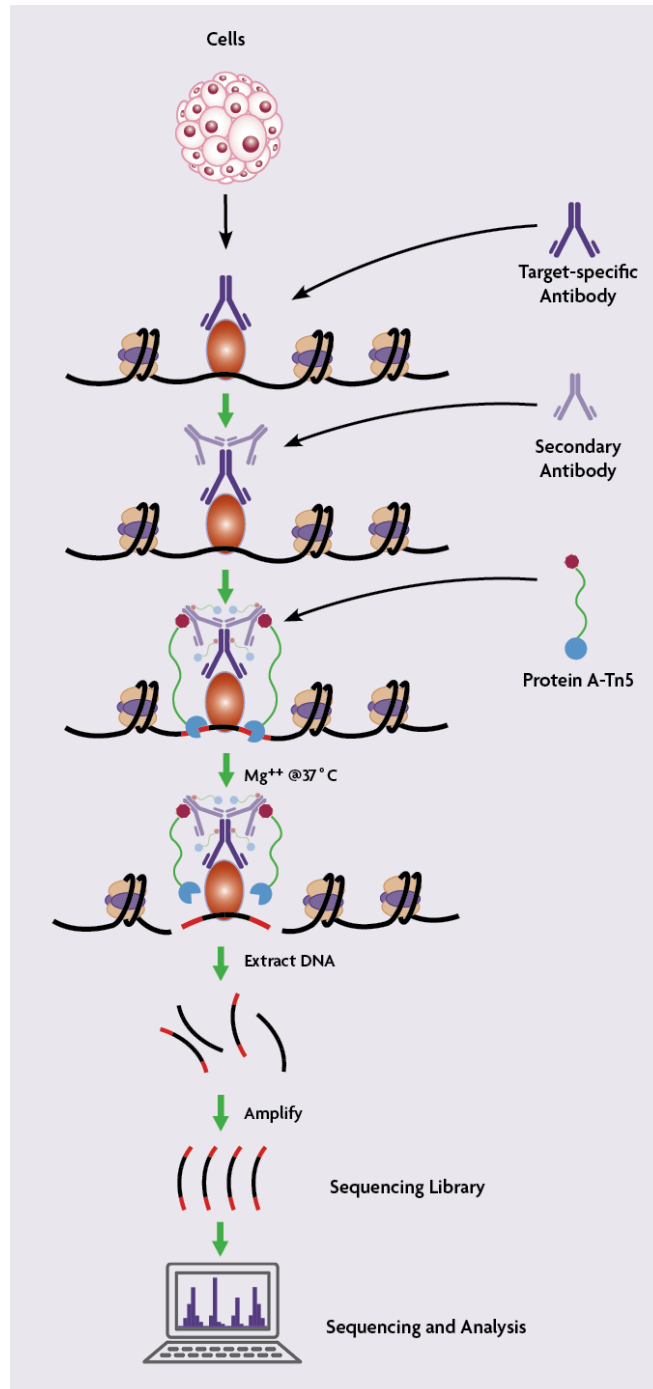
▲ Digitonin有毒性，在溶液配制过程中请做好个人防护，加入Digitonin后缓冲液不可长期保存，现配现用。

Antibody Buffer：混合1 μ l 0.5 M EDTA，0.8 μ l 30% BSA和250 μ l Dig-wash Buffer，置于冰上冷却，现配现用。

Dig-300 Buffer：取0.4 ml 10 \times Dig-300 Buffer (-)，加8 μ l 5% Digitonin和80 μ l 50 \times 蛋白酶抑制剂，加ddH₂O至4 ml，混匀。

Tagmentation Buffer：取300 μ l步骤5中配制的Dig-300 Buffer，加入3 μ l 1 M MgCl₂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苷进行细胞膜通透；通过针对靶蛋白的一抗、相应二抗和 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

ConA beads处理

- 1.取一支1.5 ml EP管，按照100 μ l/样本加入Binding Buffer。
- 2.使用移液器轻轻重悬ConA beads，按照10 μ l ConA beads/样本取出ConA beads至步骤1的EP管中，轻轻混合均匀，将EP管置于磁力架上，待溶液澄清后(约2 min)，弃尽上清。
- 3.将EP管从磁力架上取下，按照100 μ l/样本加入Binding Buffer，用移液器轻轻吹打混匀(请勿振荡混匀)，短暂离心收集反应液于管底。
- 4.将EP管置于磁力架上，待液体澄清后(约2 min)，弃尽上清，按照10 μ l/样本加入Binding Buffer重悬磁珠。

细胞收集

- ▲ 本Protocol适用的细胞投入量为60 - 100,000个。
 - ▲ 在细胞通透之前的所有步骤都在室温下进行，使细胞受到的应力最小化，实验操作过程中需要避免剧烈的涡旋振荡。
- 1.室温收集细胞并计数。
 - 2.室温下2,500 rpm (600 \times g)低速离心3 min，弃上清。
- ▲ 对于大小不同的细胞，请根据实际情况调整离心力。
- 3.室温条件下加入500 μ l Wash Buffer重悬细胞，2,500 rpm (600 \times g)低速离心3 min，弃尽上清。

细胞与ConA beads孵育

- 1.按照100 μ l/样本加入Wash Buffer重悬细胞，并将细胞转移至新的1.5 ml EP管中，一边低速涡旋混匀，一边加入处理好的ConA beads悬液，室温旋转孵育5 - 10 min。
- 2.短暂离心收集反应液于管底，将EP管置于磁力架上，待溶液澄清后(约2 min)，弃尽上清。

一抗孵育

- ▲ 磁珠与细胞结合后的操作，若部分磁珠聚集，请勿用移液器反复吹打混匀，可轻弹管底混匀。
- 1.按照50 μ l/样本加入预冷的Antibody Buffer重悬细胞，轻轻涡旋混匀并置于冰上。
 - 2.参照抗体说明书推荐的免疫浓度向EP管中加入抗体，轻轻涡旋混匀。
 - 3.室温下旋转孵育2 h。
- ▲ 实验中建议设置阳性对照组与阴性对照组。

二抗孵育

- 1.短暂离心收集反应液于管底，将EP管置于磁力架上，待溶液澄清后(30 sec - 2 min)，弃尽上清。
- 2.用Dig-wash Buffer按照一定比例稀释二抗(常规推荐使用1:100比例稀释)，每管样品中加入50 μ l稀释后的抗体，轻轻振荡，使抗体与ConA beads混合均匀。
- 3.室温下旋转孵育30 - 60 min。
- 4.短暂离心收集反应液于管底，将EP管置于磁力架上，待溶液澄清后(30 sec - 2 min)，弃尽上清。
- 5.向EP管中加入800 μ l Dig-wash Buffer，上下颠倒10次或轻轻振荡混匀，确保Buffer与ConA beads充分混合。
- 6.重复步骤4、5两次，最后一次洗涤后，请勿去除Dig-wash Buffer，防止ConA beads暴露在空气中过分干燥。

pG-Tn5/pA-Tn5 Transposon孵育

- 1.将Hyperactive pG-Tn5/pA-Tn5 Transposon与Dig-300 Buffer混合，终浓度为0.04 μ M，每个样品100 μ l (Kit中提供的转座子的浓度为6.88 μ M，按照参考文献推荐的终浓度，每个样本加入0.58 μ l)。
▲ 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。
- 2.短暂离心收集09-5/二抗孵育后的反应液于管底，将EP管置于磁力架上，待溶液澄清后(30 sec - 2 min)，弃尽上清。
- 3.每个样本加入100 μ l步骤1中稀释好的Hyperactive pG-Tn5/pA-Tn5转座子混合物，轻轻涡旋，使转座子与ConA beads混合均匀。
- 4.室温旋转孵育1 h。
- 5.短暂离心，将EP管置于磁力架上，待液体澄清后(30 sec - 2 min)，弃尽上清。
- 6.向EP管中加入800 μ l Dig-300 Buffer，上下颠倒10次或轻轻涡旋混匀，确保Buffer与ConA beads充分混合。
- 7.重复步骤 5、6 两次。

片段化

- 1.短暂离心，将EP管置于磁力架上，待液体澄清后(30 sec - 2 min)，弃尽上清。
- 2.向EP管中加入300 μ l Tagmentation Buffer，上下颠倒10次或轻轻振荡混匀。
- 3.37°C孵育1 h。

DNA提取

1. 室温下，每个反应中加入10 μ l 0.5 M EDTA，3 μ l 10% SDS和2.5 μ l 20 mg/ml Proteinase K，终止片段化反应。
2. 轻轻涡旋振荡混合均匀后，短暂离心收集液体于管底，50°C孵育1 h (或者37°C孵育过夜)。
3. 向EP管中加入150 μ l Tris饱和酚和150 μ l 氯仿，高速振荡2 sec。
▲ 不需要弃掉beads，直接加入Tris饱和酚和氯仿进行DNA片段提取。
4. 12,900 rpm (16,000 \times g)，室温离心5 min。
5. 用移液器小心吸取上层水相至新的EP管中，加入300 μ l 氯仿，上下颠倒10次(请勿涡旋振荡)，12,900 rpm (16,000 \times g)室温离心3 min。
6. 吸取上层水相至含有750 μ l 100%乙醇的EP管中，吹打混匀，置于冰上。
7. 冰上冷却后，4°C 12,900 rpm (16,000 \times g)离心15 min。
8. 用移液器沿液面缓慢吸取，小心弃尽液体。
▲ 这一步通常看不到白色的斑块，弃液体时，尽量轻柔，减少DNA片段损失。
9. 向EP管中加入1 ml 100%乙醇漂洗，4°C 12,900 rpm (16,000 \times g)离心1 min。
10. 用移液器沿液面缓慢吸取，小心弃尽液体后，在空气中晾干。
11. 待EP管干燥后，加入16 - 20 μ l 1 \times TE，将样本于-30 ~ -15°C下储存或直接进行PCR扩增。
▲ 纯化后的片段化DNA可使用Qubit 3.0进行浓度测定，根据提取产量判断提取操作是否异常。

文库扩增

1. 取50-100 ng纯化的DNA于灭菌PCR管，置于冰上，配制如下反应体系：

组分	体积
纯化 DNA	x μ l
5 \times TAB	10 μ l
TAE	1 μ l
N5	5 μ l
N7	5 μ l
H2O	(29-x) μ l
总体积	50 μ l

可根据样品数量和Index选择策略自行选择。若使用自配接头，将接头定量后稀释至10 μ M，分别加入2 μ l，其余体积用ddH₂O补齐。

2.使用移液枪充分吸打混匀，将PCR管置于PCR仪，运行如下反应程序：

温度	时间	循环数
105°C	热盖	
72°C	3 min	
98°C	30 s	
98°C	15 s	13~15
60°C	30 s	13~15
72°C	40 s	13~15
72°C	5 min	
25°C	2 min	

PCR产物纯化

1.涡旋振荡混匀DNA纯化磁珠并吸取60 μ l (1.2 \times)至上述PCR反应产物中，涡旋振荡或使用移液器吹打10次保证整个体系均匀，室温孵育5 min。

▲ DNA纯化磁珠比较粘稠，用移液枪确保取到足够的体积并缓慢打出。

2.将反应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)，小心移除上清，注意不要扰动磁珠。

3.保持PCR管始终在磁力架上，加入200 μ l新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育30 sec，小心移除上清。

4.重复步骤3，总计漂洗两次。

5.保持PCR管始终处于磁力架上，开盖空气干燥3 - 5 min。

▲ 不同地区环境干湿程度有差别，磁珠晾干时间不一，磁珠刚好晾干，表面由光亮褐色变为磨砂褐色。过度干燥会导致洗脱困难，未完全晾干会有酒精残留影响后续实验反应。

6.磁珠晾干后，将PCR管从磁力架上取出，加入22 μ l ddH₂O洗脱，涡旋振荡或使用移液器吹打10次充分混匀磁珠，室温孵育5 min。

7.将PCR管短暂离心收集置于磁力架上分离磁珠和液体，待溶液澄清后(约5 min)小心吸取20 μ l上清转移到新的EP管中，-30 ~ -15°C保存。

文库质量检测

文库浓度检测使用基于特异性识别双链DNA的荧光染料法(如Qubit或荧光染料PicoGreen)检测文库产量。

文库片段分布检测将制备好的文库在Agilent 2100 Bioanalyzer上进行文库长度分布检测(或用2%琼脂糖凝胶电泳代替)。

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。