

访问我们的官网: www.yeasen.com, 了解更多信息.....

YEASEN

CUT&Tag实验操作指南

翌圣生物科技（上海）股份有限公司
Yeasen Biotechnology (shanghai) Co., Ltd.

上海市浦东新区国际医学园区天雄路166号1号楼402室

Service Hotline: 400-6111-883

Web: www.yeasen.com

Technical Support: techserv@yeasen.com

Product consultation: marketing@yeasen.com



翌圣生物科技(上海)股份有限公司

CUT&Tag技术介绍

CUT&Tag可以做什么？

★完美替代ChIP-Seq

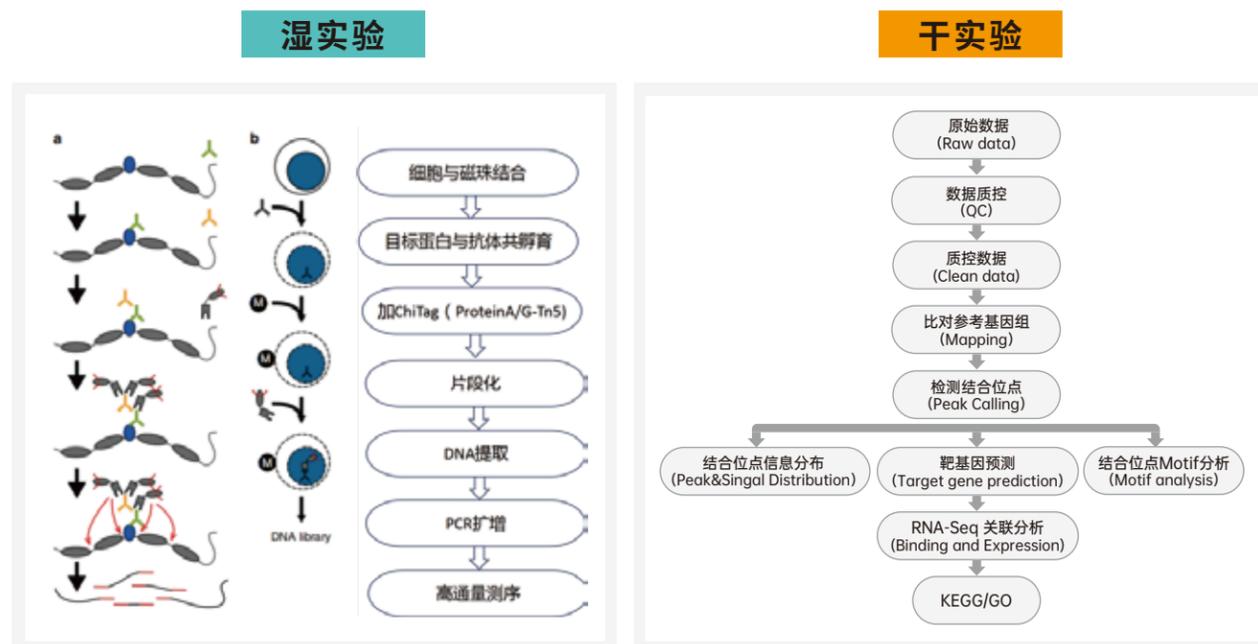
新一代ChIP-Seq技术,其技术核心为 Hyperactive pA-Tn5 Transposase,该酶是将 Protein A (Protein A/G) 与经过工程学改造的超高活性 Tn5 转座酶进行融合,形成同时具备转座酶与 Protein A 活性的新型融合酶--ChiTag酶。Protein A/G代替protein A, PAG-Tn5代替pA-Tn5。

★基因表达、调控、复制、重组和修复, RNA 的转运、翻译和调控

 <p>组蛋白修饰 表观遗传的特征和生物学功能</p>	 <p>转录因子结合位点 转录因子作用通路信息</p>	 <p>核小体定位图谱 DNA, 转录因子, 组蛋白修饰酶和染色质重塑复合体之间的相互作用</p>	 <p>DNA甲基化 基因表达情况</p>
---	---	---	---

CUT&Tag怎么做？

技术原理: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- 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。对于人源细胞的组蛋白修饰,仅需3-5 M reads的数据即可得到高分辨率靶蛋白结合的基因组图谱。



技术优势

<p>操作简便 无需甲醛交联、超声打断、免疫共沉淀,无需补平,加A和接头。</p>	<p>1</p>	<p>性价比高 无需ChIP级别抗体,背景噪音低,所需测序深度少。</p>
<p>特异性好 抗体与靶蛋白特异性结合进行目标区域定位。</p>	<p>2</p>	<p>重复性好 实验重复结果一致性好。</p>
<p>样品起始量低 所需细胞数10^7下降到10^2,甚至可以做单细胞水平研究。</p>	<p>3</p>	<p>实验周期短 一天之内即可完成实验。</p>
	<p>4</p>	
	<p>5</p>	
	<p>6</p>	

产品简介

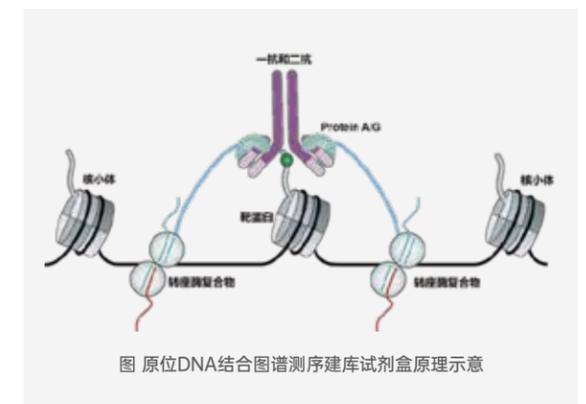
Hieff NGS® A/G-Type In-Situ DNA Binding Profiling Library Prep Kit for Illumina®

Hieff NGS® A/G-Type In-Situ DNA Binding Profiling Library Prep Kit for Illumina®是针对Illumina®高通量测序平台专门研发的用于原位靶蛋白DNA结合图谱测序文库转座酶法构建试剂盒,适用于100-1,000,000个细胞起始量的样本建库,也提供了应用于单细胞的可能性。相较于传统的ChIP-seq、CUT&RUN和CUT&TAG,本试剂盒优化了反应体系和建库流程,具有文库构建时间更短(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、细胞裂解、磁珠回收gDNA、文库扩增和磁珠分选,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。

产品名称	货号	规格
Hieff NGS® A-Type In-SituDNA Binding Profiling Library Prep Kit for Illumina® 原位DNA结合图谱测序建库试剂盒(Protein A亲和抗体)	12597ES04/12/48	4/12/48T
Hieff NGS® G-Type In-Situ DNA Binding Profiling Library Prep Kit for Illumina® 原位DNA结合图谱测序建库试剂盒(Protein A/G亲和抗体)	12598ES04/12/48	4/12/48T

产品特点

- **磁珠回收:**磁珠回收基因组DNA,精简流程;
- **精准定位:**一抗与靶蛋白特异性结合定位目标序列;
- **流程简便:**在片段化时加上接头,整个实验操作流程 < 7h;
- **可视化操作:**利用Con A beads结合细胞,操作可视化;
- **细胞内反应:**洋地黄皂苷通透,靶蛋白的抗体进入细胞;
- **抗体选择广:**两种融合转座酶,可根据二抗种属来源与亲和力选择;
- **样本适用广:**适用于动物细胞,动植物组织、植物或真菌细胞通过特殊处理也可以使用,也提供了应用于单细胞的可能性。



操作流程与时间



建库流程详解

01 细胞收集

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. 对于新鲜或者冻存的动物组织, 推荐参考CUT&RUN的方法分离获得细胞(<https://www.protocols.io/view/cut-run-with-drosophila-tissues-umfeu3n>)。
4. 植物或真菌细胞可通过特殊处理获得原生质体进行实验。

02 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® (96 Index) (Cat#12610) 或其他替代引物。

03 细胞捕获 (0.5h)

1. 提前10 min取ConA bind buffer、Cell wash buffer、Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-free) 和5% Digitonin, 待化冻后, 颠倒10次混匀后分离。
2. 取900 μ L Cell wash buffer中加入9 μ L Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-free)。标为Cell wash buffer(-), 混匀后分离。
3. 取250 μ L Cell wash buffer(-), 加入2.5 μ L 5% Digitonin。标记为Cell wash buffer(+), 混匀后分离。
4. 取400 μ L Cell wash buffer(-), 加入0.8 μ L 5% Digitonin和20 μ L 3M NaCl。标记为Tag buffer(+), 混匀后分离。



5% Digitonin



Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-free)



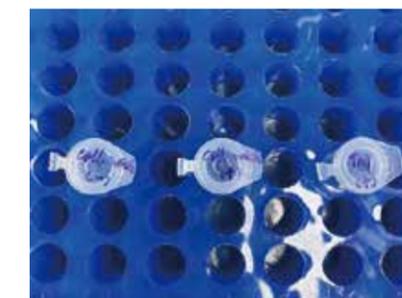
3M NaCl



Cell wash buffer



ConA bind buffer



配置好的3管buffer (Cell wash buffer(-), Cell wash buffer(+), Tag buffer(+))

5. 在室温下收获细胞并计数。取100-1,000,000个细胞。室温, 600x g离心3 min, 吸除上清。加入140 μ L Cell wash buffer(-), 轻轻吹打重悬; 室温, 600x g离心3 min, 吸除上清; 加入90 μ L Cell wash buffer(-), 轻轻吹打重悬, 转移至PCR管中。

6. 颠倒或轻轻旋涡振荡混匀Con A珠浆, 对于每个约100-1,000,000个细胞的样品, 吸取10 μ L Con A磁珠即可。

注:

- 对于大小不同的细胞, 请根据实际情况调整离心力;
- 多次颠倒或轻轻涡旋, 保证磁珠混匀后再加入。



收集的细胞



离心3min的细胞液, 细胞聚集



吸除离心的上清液



加入Cell wash buffer(-), 吹打重悬细胞



混匀Con A磁珠, 吸取磁珠匀浆



细胞离心

7. 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; 取管内全部溶液, 取下EP管, 加入10 μ L ConA bind buffer, 吹吸混合。

8. 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。

注:

- 枪头吸吹时要缓慢, 避免产生过多气泡; 避免用10ul小枪头吹吸细胞;
- 吸吹时避免样品吹出;
- 吸除管内液体时, 枪头远离磁珠一端, 避免枪头粘连带出磁珠。

图片见下页 >>



Con A磁珠加入ConA bind buffer



枪头吹吸混匀



磁力架吸附



吸除管内全部液体



加入ConA bind buffer
并吹吸混匀



加入ConA bind buffer,
重悬匀浆



重悬匀浆加入细胞悬液



50x Protein blocker



一抗



推荐使用的二抗



04 结合一抗、二抗

1. 取48.5 μL Cell wash buffer (+), 加入1 μL 50x Protein blocker, 和0.5 μL 一抗, 混匀后瞬离。
2. 将与细胞结合好的磁珠取下, 瞬离(< 100x 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50 μL 含一抗的 Wash buffer(+), 轻轻涡旋或轻弹底部混匀。
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。

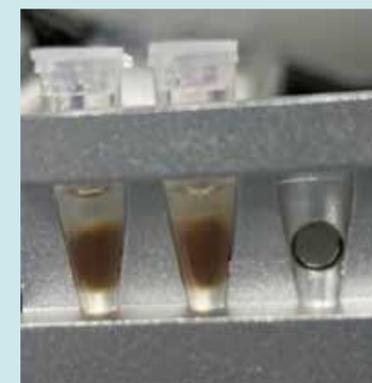
注:

- 一抗: 按说明书推荐免疫荧光IF抗体使用浓度, 对照抗体用IgG;
- 二抗: 扩大信号作用, 推荐选用图片中, 若有其它选择, 也可根据说明书中, 推荐表格选择;
- 50x Protein blocker: 主要成分BSA/EDTA, 用作封闭抗体非特异性结合位点, 抑制金属离子依赖性蛋白酶和核酸酶活性;
- 加一抗混匀: 轻轻涡旋混匀, 避免枪头洗吹产生气泡;
- 水平旋转时定时轻弹底部混匀, 细胞量较多时易聚集干结。

图片见下页 >>



细胞与磁珠结合, 瞬离



磁力架吸附



吸除液体

4. 提前5 min取49.5 μL Cell wash buffer (+), 加入0.5 μL 二抗(1:100稀释) 混匀后瞬离。
5. 将与一抗结合好的磁珠取下, 瞬离(< 100x 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50 μL 含二抗的 Cell wash buffer(+), 轻轻涡旋或轻弹底部混匀。
6. 室温下旋转孵育0.5 h-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。
7. 将与二抗结合好的磁珠取下, 瞬离(< 100x 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65 μL Cell wash buffer (+), 轻轻颠倒离心管10次, 充分分离磁珠及细胞; 重复一次。

注:

- Cell wash buffer (+)用前涡旋混匀, 避免久置沉淀;
- 加入含二抗的Cell wash buffer (+): 注意沿管壁轻轻冲下壁上磁珠, 有少量大气泡无影响;
- 涡旋仪开关不易开较大(尽量不超过4档);
- 混匀时注意不要将液体或磁珠粘在管壁上, 造成损失。

图片见下页 >>



加入含二抗的Cell wash buffer(+)



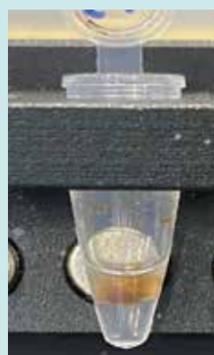
轻轻涡旋混匀



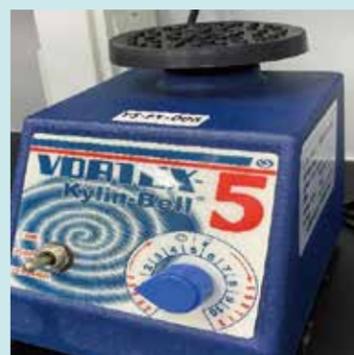
磁珠少量聚集
(旋转时定时轻弹底部混匀)



二抗结合好的磁珠



磁力架吸附
二抗结合的磁珠



涡旋混匀仪



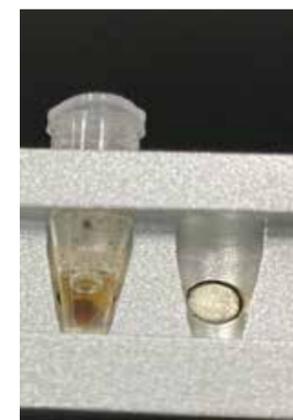
pA/G-Transposome Mix
提前解冻混匀



加入65 μ L Cell wash buffer (+)
的样品磁力架吸附



加入含pA/G-Transposome Mix
的Tag buffer(+)
混匀



孵育后磁力架吸附



吸除上清



加入Tag buffer(+), 混匀

8. 取49 μ L Tag buffer(+), 加入1 μ L pA/G-Transposome Mix 混匀后孵育。

9. 将磁珠孵育 (<100x g), 静置于磁力架至磁珠贴壁。吸去PCR管中全部液体。加入 50 μ L 含Mix的Tag buffer(+), 轻轻涡旋或轻弹底部混匀。

10. 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。

11. 孵育 (<100x 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 μ L Tag buffer(+), 轻轻倒置离心管10次, 充分分离磁珠及细胞。

注:

- 磁力架吸附小于2min, 过度吸附造成磁珠板结;
- 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 μ M);
- 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;
- 孵育: 离心时间过长, 造成磁珠聚集。

图片见下页 >>

05 转座酶激活

1. 取30 μ L Tag buffer(+), 加入1 μ L 30x Activating buffer, 混匀后孵育。

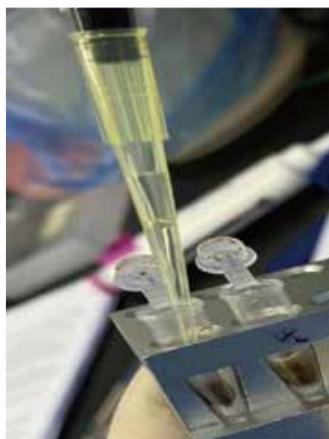
2. 将磁珠孵育 (<100x g), 静置于磁力架至磁珠贴壁 (不超过2 min)。吸去PCR管中全部液体。加入 30 μ L 预加Activating buffer的Tag buffer(+), 轻轻涡旋或轻弹底部混匀。

3. 37 $^{\circ}$ C旋转孵育1 h。最好水平旋转, 保证液体在管底。

注:

- 吸除上清避免枪头粘连磁珠, 若有少量粘连, 可将液体打出重新吸出;
- 涡旋混匀若有挂壁, 可瞬间甩下再涡旋混匀, 避免损失;
- 孵育时: 每隔30 min轻弹底部混匀, 避免磁珠聚集干结;
- PCR仪提前预热。

图片见下页 >>



磁力架吸附, 吸除液体



加入预加Activating buffer的Tag buffer(+), 混匀



37°C孵育

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(<100x g), 将离心管置于磁力架上静置3 min, 待磁珠完全贴壁后吸除PCR管中溶液, 从另一侧加入200 μL 80%乙醇, 避免直接冲刷磁珠。吸除液体, 再次加入200 μL 80%乙醇。吸除干净液体, 保持PCR管始终处于磁力架中, 开盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂(不超过5 min)。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。

5. 将PCR管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体。待溶液澄清后(约5 min), 小心转移20 μL上清至干净的管中, 于-20°C保存。

注:

- DNA Selection Beads提前平衡室温并混匀;
- 乙醇加入从另一侧, 避免冲刷磁珠, 造成样品损失;
- 磁珠干燥时间不易过长, 过度干燥样品量损失;
- 加入ddH2O溶解, 充分涡旋静置, 保证充分溶解;

06 蛋白酶K消解, 磁珠回收DNA

1. 向每个样品中加入2 μL 15x Terminate Solution和1 μL 30x Proteinase K (此时磁珠会板结)。全速转速涡旋样品约10 sec, 混匀后静置, 将样品置于PCR仪, 在55 °C消化30 min (热盖不低于70 °C)或者37 °C过夜。

2. 短暂离心(<100x g), 将离心管置于磁力架上静置3 min, 取30 μL上清。加入1 μL DNA Spike-in mix, 混匀。

注:

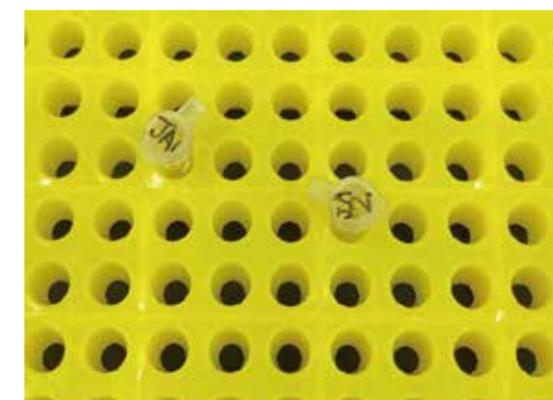
- Terminate Solution: 主成分为SDS和EDTA, 终止转录酶反应;
- 30x Proteinase K: 消解蛋白成分, 释放核小体包裹的DNA;
- DNA Spike-in mix主要用于不同处理条件或者细胞状态下的测序数据标准化和定量分析, 为非必须 加入的组分。客户可根据实验需要判断是否加入DNA Spike-in mix。每10万投入量细胞加入1uL即可, 也可根据靶蛋白的结合DNA能力和丰度自行调整;
- DNA Spike-in mix: 加入前混匀。



15x Terminate Solution



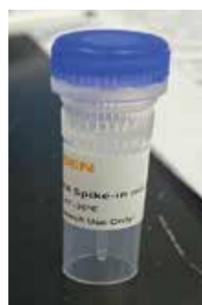
加入平衡的DNA Selection Beads



室温静置孵育



30x Proteinase K



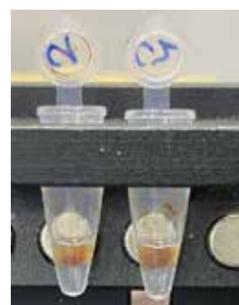
DNA Spike-in mix



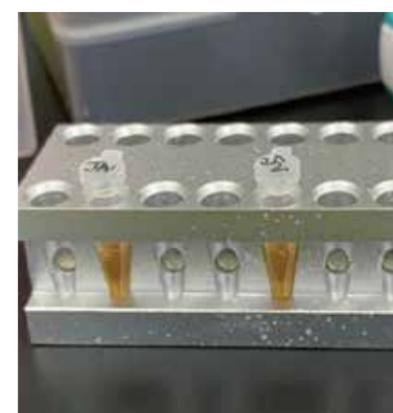
加入30x Proteinase K后磁珠板结现象



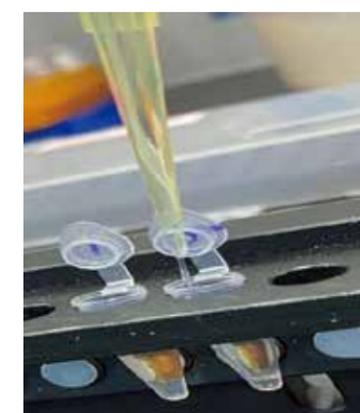
PCR孵育



磁力架吸附



磁力架静置吸附



酒精洗涤



干燥龟裂

07 文库扩增和纯化

文库扩增:

1. 将说明书表4中试剂解冻后颠倒混匀,置于冰上备用。
2. 于无菌PCR管中配制说明书表4所示反应体系。
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,设置说明书表5所示反应程序,进行PCR扩增。

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。加入60 μL (1.2x) 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。
2. 短暂离心 (<100x g),将离心管置于磁力架上静置3 min,待磁珠完全贴壁后吸除溶液,从另一侧加入200 μL 80%乙醇,避免直接冲刷磁珠。吸除液体,再次加入200 μL 80%乙醇。吸除干净液体。保持PCR管始终处于磁力架中,开盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂(不超过5 min)。从磁力架上取下离心管,加入21 μL ddH₂O,并充分涡旋,室温静置5 min。
3. 将PCR管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体。待溶液澄清后(约5 min),小心转移20 μL 上清至干净的管中,于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。



反应体系混匀



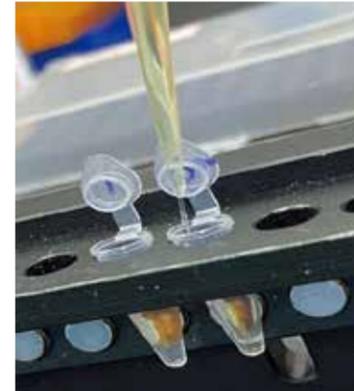
PCR扩增



扩增产物加磁珠



颠倒混匀



磁珠吸附移除上清后加80%乙醇



ddH₂O溶解

08 文库分选与质检

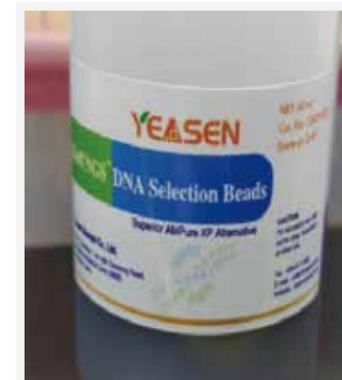
1. 进行二轮分选时,需将初始DNA样本用灭菌蒸馏水补齐至100 μL ,加入60 μL (0.6x)室温下平衡的DNA Selection Beads,涡旋混匀或移液器吹打10次混匀,室温静置孵育5 min。
2. 短暂离心 (<100x g),将PCR管置于磁力架上静置5 min,待溶液澄清后,小心转移上清到干净的离心管中(残留3-5 μL ,避免吸到磁珠)。加入50 μL (0.5x)室温下平衡的DNA Selection Beads,涡旋混匀或移液器吹打10次混匀,室温静置孵育5 min。
3. 短暂离心 (<100x g),将离心管置于磁力架上静置3 min,待磁珠完全贴壁后吸除溶液,从另一侧加入200 μL 80%乙醇,避免直接冲刷磁珠。吸除液体,再次加入200 μL 80%乙醇。吸除干净液体。保持PCR管始终处于磁力架中,开盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂(不超过5 min)。从磁力架上取下离心管,加入21 μL ddH₂O,并充分涡旋,室温静置5 min。
4. 将PCR管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体。待溶液澄清后(约5 min),小心转移20 μL 上清至干净的管中,于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。此外,如需获得长度分布更集中的文库扩增产物,可使用胶回收方式进行长度分选和纯化;如对文库长度分布范围等无特殊要求,扩增产物也可不进行长度分选,直接使用磁珠或柱纯化试剂盒进行纯化。

注:

- 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状态差异,文库大小可能存在不同模式的分布。
- 我们推荐一种磁珠分选的方法,可以有效去掉文库中的大片段,使得文库大小主峰约520bp左右,即两个核小体保护DNA长度的插入片段。
- 客户可根据建好的文库大小自行决定是否需要进行磁珠分选。



扩增产物加磁珠



文库分选磁珠



浓度检测



Agilent 2100 Bioanalyzer

注:

如需获得长度分布更集中的文库扩增产物,可使用胶回收方式进行长度分选和纯化;如对文库长度分布范围等无特殊要求,扩增产物也可不进行长度分选,直接使用磁珠或柱纯化试剂盒进行纯化。文库大小可使用Agilent 2100 Bioanalyzer、Qseq或者凝胶电泳进行检测。

