

CUT&Tag-IT™ Assay Kit – Tissue

货号 53170 (16 rxns)

相关专利号 US Pat. No. 10,689,643, EP Pat. No. 2999784

版权所有 2023 Active Motif, Inc.

版本 1

本手册中的信息如有更改，恕不另行通知，也不构成 Active Motif, Inc.的承诺。本手册按“原样”提供，无任何明示或暗示的担保。本手册中的信息可随时更改或更新。未经 Active Motif, Inc.事先书面同意，不得复制、转让、复制、披露或复制本文件的全部或部分内容。本文件为专有信息，受美国版权法和国际条约的保护。本文件的制造商为 Active Motif, Inc。

相关专利号 US Pat. No. 10,689,643, EP Pat. No. 2999784

© 2023 Active Motif, Inc.地址 1914 Palomar Oaks Way, Suite 150; Carlsbad, CA, 92008。
版权所有。

此处引用的所有商标、商号、服务标志或徽标均属于其各自的公司。

豚鼠抗兔二抗经 Rockland 许可提供。
pluriStrainer® 是 PuriSelect 的注册商标。

仅供科研实验使用，不可用于医学诊断。允许使用；禁止转售。
在没有明确书面协议的情况下，Active Motif 公司销售的所有产品和提供的服务 (a) 仅用于内部体外研究，不得用于服务或任何其他商业目的 (b) 仅供原始购买者使用，不得转售。您同意不对产品或服务交付品进行反向工程或以其他方式试图发现其结构或组成。除非我们另有书面约定。

目录

概览.....	4
试剂盒组分和存储条件.....	5
配套试剂.....	5
额外所需试剂和耗材.....	6
组织 CUT&Tag Assay Kit 实验流程.....	7
组织速冻方案.....	7
第一部分 制备 Concanavalin A 磁珠.....	7
第二部分 从组织样品中提取细胞核.....	8
第三部分 一抗结合.....	13
第四部分 二抗结合.....	13
第五部分 CUT&Tag-IT™ Assembled pA-Tn5 Transposomes 结合.....	14
第六部分 片段化 (60 分钟).....	15
第七部分 提取 DNA (60 分钟).....	15
第八部分 PCR 扩增.....	16
Index 引物和测序信息.....	17
参考文献.....	18
常见问题指南.....	19
技术支持.....	21

概览

CUT&Tag(Cleavage Under Targets and Tagmentation)是一种研究组蛋白修饰和一些转录因子的全基因组分布的方法，并能够揭示蛋白与 DNA 相互作用或者鉴定靶蛋白的 DNA 结合位点。

MNase-Seq 和 ATAC-Seq 靶向开放染色质，并依赖于染色质的可及性。而 CUT&Tag 与这两种方法不同，CUT&Tag 利用一种基于抗体的酶的栓系作用，从而靶向特定的组蛋白修饰或某些蛋白，以此揭示特定位点或靶蛋白的染色质结合信息。

CUT&Tag 与 ChIP-Seq 原理相同，但是在实验流程上，CUT&Tag 有许多优于 ChIP-Seq 的地方。与 ChIP-Seq 中需要超声固定后的染色质和免疫沉淀步骤不同，在 CUT&Tag 中，新鲜或冷冻的未固定的细胞或组织被偶联到 concanavalin A 磁珠上，且是在细胞未变性的条件下孵育抗体。在抗体结合之后，只需用已预先装配了测序接头的 protein A-Tn5 (pA-Tn5)转座酶就可一步实现片段化和 NGS 建库接头连接。

CUT&Tag-IT™ Assay Kit-Tissue 的每个反应只需 10 mg 组织，该试剂盒提供优越的试剂和实验方案，能够产生 16 个独特的 Illumina®测序文库。该试剂盒已被验证并推荐用于心脏、脑、脾、肾和肝组织研究。

组织 CUT&Tag-IT™ Assay Kit 的优势：

- 2 mg 至 30 mg 组织均适用。
- 可用于心脏、脑、脾、肾和肝组织研究。
- 背景信号低，所需测序深度低。
- 没有甲醛交联引起的假阳性结果。

产品	规格	货号
组织 CUT&Tag-IT™ Assay Kit	16 个反应	53170

试剂盒组分和存储条件

该试剂盒包含足量 16 个 CUT&Tag 反应的试剂，这些试剂储存温度不同，请参照下表存储各组分，从收到之日起所有试剂保证 6 个月内稳定。

组织 CUT&Tag-IT™ Assay Kit 试剂

试剂	容量	储存条件
5% Digitonin	610 µL	-20 °C
CUT&Tag-IT™ Lysis Buffer – Tissue	16 mL	RT
40 µm Strainer	16 Strainers	RT
Concanavalin A 磁珠	320 µL	4 °C
CUT&Tag-IT™ Assembled pA-Tn5 Transposomes	16 µL	-20 °C
Tagmentation Buffer	2×2 mL	-20 °C
1× Binding Buffer	55 mL	4 °C
1× Wash Buffer	40 mL	4 °C
Dig-Wash Buffer	50 mL	4 °C
Antibody Buffer	800 µL	4 °C
Dig-300 Buffer	50 mL	4 °C
Guinea Pig Anti-Rabbit Antibody	16 µL	-20 °C
Rabbit Anti-Mouse Antibody	16 µL	-20 °C
Protease Inhibitor Cocktail	3×500 µL	-20 °C
0.5M EDTA	290 µL	RT
10% SDS	490 µL	RT
10 µg/µL Proteinase K	490 µL	-20 °C
DNA Purification Columns	16 columns	RT
DNA Purification Binding Buffer	50 mL	RT
DNA Purification Wash Buffer	10 mL	RT
DNA Purification Elution Buffer	5 mL	RT
3M Sodium Acetate	500 µL	RT
10 mM DNTPs	40 µL	-20 °C
5× Q5 Buffer	2 vials of 140 µL	-20 °C
Q5 High Fidelity DNA Polymerase (2U/µL)	8 µL	-20 °C
i5 Indexed Primer 1	10 µL	-20 °C
i5 Indexed Primer 2	10 µL	-20 °C

i5 Indexed Primer 3	10 µL	-20 °C
i5 Indexed Primer 4	10 µL	-20 °C
i7 Indexed Primer 1	10 µL	-20 °C
i7 Indexed Primer 2	10 µL	-20 °C
i7 Indexed Primer 3	10 µL	-20 °C
i7 Indexed Primer 4	10 µL	-20 °C
SPRI 磁珠	880 µL	4 °C

额外所需试剂和耗材：

- 目标组蛋白的鼠或兔的一抗
- Douncer 匀浆器 (Active Motif 货号: 40401 或 40415, 或其他相似的工具)
- 直径 30 mm 至 60 mm 的培养皿, 用以放置组织样品
- 处理组织的手术钳
- 处理组织的刀片
- 可称组织重量的天平
- 实验室用擦拭纸 (比如 Kimwipes)
- 干冰, 用以保存组织, 且在处理组织前要将工具预冷
- 冰块, 在准备细胞核时需保持组织处于低温
- 细胞核计数方案, 比如 Countess II 等自动细胞计数仪, 或台盼蓝染色后用血细胞计数器计数。对于该实验, 建议使用 Thermo Fisher Scientific 的 Countess II 自动细胞计数仪或其他相似产品。
- 分子生物学无核酸水
- 100%乙醇
- 80%乙醇
- 1.5/2 mL 离心管用磁力架
- 200 µL 八联排 PCR 管用磁力架
- 摇床或旋转混匀仪
- 旋转仪
- 涡旋仪
- 热循环仪
- Illumina®测序平台
- 1.5 mL 低吸附微量离心管
- 2 mL 低吸附微量离心管
- 适用于带盖 8 联排、0.2 mL 或 1.5 mL 离心管的离心机
- 20-200 µL 多通道移液器和 1 mL 移液器
- 带滤芯吸头

组织 CUT&Tag Assay Kit 实验流程

该试剂盒适用于 3 mg 至 30 mg 组织，且已针对 10 mg 组织（心、脑、肝、肾或脾）样品进行了优化。

新鲜或经过干冰或液氮速冻的组织均可，若要速冻组织样品进行后续实验，请遵循下面液氮速冻或干冰速冻的方案。

液氮速冻

1. 剪下组织并置于离心管中。
2. 在液氮中浸没 2 分钟。
3. 储存于 -80 °C。

干冰速冻

1. 剪下组织并置于离心管中。
2. 将离心管在干冰/乙醇浴 15 分钟。
3. 储存于 -80 °C。

第一部分 制备 Concanavalin A 磁珠（30 分钟）

1. 每个反应需要 20 μ L Concanavalin A 磁珠，最多可满足 30 mg 组织使用。该试剂盒已针对 10 mg 组织样品的反应进行了优化。下列步骤是针对 1 个样品而言的，可以在一个离心管中同时制备多个样品的 Concanavalin A 磁珠。取出本次实验需要的 Concanavalin A 磁珠后，未使用的 Concanavalin A 磁珠请置于 4 °C 储存。
2. 取 20 μ L Concanavalin A 磁珠转移至 1.6 mL 1 \times Binding Buffer 中并用移液枪吹吸混匀（在 2 mL 离心管中进行），将离心管置于磁力架上等待沉淀（30 s 至 2 min）。
3. 除尽上清，不要取到磁珠，然后把离心管从磁力架上拿下。向离心管中加入 1.5 mL 1 \times Binding Buffer，用移液器混匀，短暂离心收集管壁和管盖上的液体。
4. 将离心管置于磁力架上等待沉淀（30 s 至 2 min），用移液器吸走上清，不要吸到磁珠。用 20 μ L 1 \times Binding Buffer 重悬（每 10 mg 样品需要 20 μ L），将 Concanavalin A 磁珠置于室温，直到组织样品备好。

第二部分 从组织样品中提取细胞核

首先：用新鲜的 Protease Inhibitor Cocktail 配制 CUT&Tag-IT™ Lysis Buffer–Tissue。在 990 μ L CUT&Tag-IT™ Lysis Buffer–Tissue 中加入 10 μ L Protease Inhibitor Cocktail, 使得最终体积为 1ml, 置于冰上保存。

用新鲜的 Protease Inhibitor Cocktail 配制 1 \times Wash Buffer。对于每个样品, 将 7 μ L Protease Inhibitor Cocktail 加入到 743 μ L 1 \times Wash Buffer 使得最终体积为 750 μ L, 置于冰上保存。

5. 将杜恩斯匀浆器置于冰上冷却。
6. 将培养皿置于天平上并设置去皮, 以备称量组织。
7. 将培养皿置于干冰上以备放置组织。
8. 将手术钳用酒精喷湿并置于干冰上冷却。
9. 将手术刀片用酒精喷湿并用干净的实验室用擦拭纸擦干。
10. 将组织置于培养皿上并称量, 切取 10 mg 组织进行实验。如果同一个组织样本需要进行多个实验, 可以批量处理这些组织, 例如, 如果同一个组织需要进行 4 个反应, 可以在同一个培养皿中处理 40 mg 组织。
 - a. 切取组织时, 要将盛有组织的培养皿放在干冰上。



- b. 牢牢地握住培养皿, 将组织用手术刀片切成小块儿。这是为了满足下一步称取每个反应 10 mg 组织样品的要求, 并且切碎组织有利于后续第 12 步中组织裂解。



c. 将盛有已切好的组织的培养皿称重，并确认其重量，若组织量不达标则再加入或减少组织量。

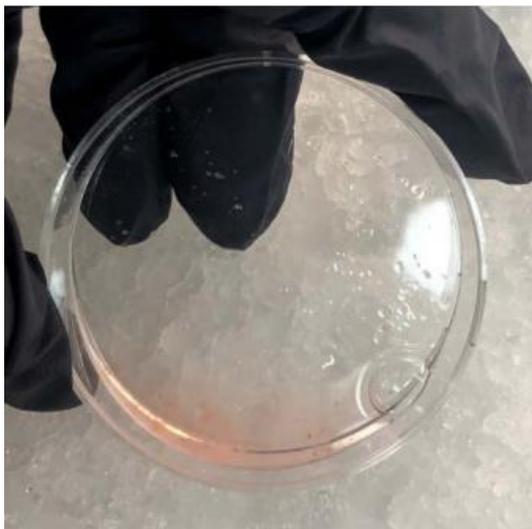
11. 将盛有组织样品的培养皿放在冰上，向 10 mg 组织中加入 1 mL 新鲜的 CUT&Tag-IT Lysis Buffer-Tissue，托起培养皿的一边让组织和缓冲液可以流向另一边，且组织能够浸没于缓冲液中，保持 1 分钟。如果是准备用于多个反应的大量组织，请加入足量的 CUT&Tag-IT Lysis Buffer 以确保组织块能够浸没于缓冲液中。



12. 倾斜培养皿让组织和缓冲液流向皿的一边，使组织浸没于 CUT&Tag-IT™ Lysis Buffer-Tissue 中，用手术刀片将组织尽量切的更碎。



13. 将培养皿放平，用刀片将组织尽量切碎，直到组织碎片可以被 1000 μ L 移液器轻松吸出。



14. 用刀片将 CUT&Tag-IT™ Lysis Buffer 中的细碎组织推到培养皿边缘, 使样本更容易收集。
15. 用干净无菌的剪刀将 1 mL 吸头的尖端剪掉一些, 并用该吸头将组织从培养皿中转移至 Douncer 匀浆器中。



16. 用 Douncer 匀浆器的较紧的研磨杵研磨组织 30 次, 注意研磨时杵不要超过球形结构, 以防产生泡沫。如果研磨杵过紧使得研磨困难, 可先用较松的研磨杵研磨 20 次, 再用较紧的研磨杵研磨 10 次。
17. 将 40 μm 筛网放在离心管中并将离心管置于冰上, 每 1 mL 样品需要一个 40 μm 筛网和一个配套的离心管, 这些筛网适配于 1.5 mL、2 mL 离心管和 15 mL 锥形底离心管。
18. 用移液器将匀浆好的组织转移至放在离心管中的 40 μm 筛网中, 务必小心不要让大的组织堵塞, 轻柔地上下移动离心管中的筛网使得样品流过。可以一只手拿着离心管, 另一只手上下移动筛网, 为溶解的组织创造流入的空隙, 但不要将筛网完全从离心管中拿出, 样品完全从筛网中流出后, 丢弃筛网。



19. 将样品离心以沉淀细胞核 ($500 \times g$, 5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) 。
20. 弃去上清。
21. 在 1.5 mL 离心管中以 375 μL 冰的 $1 \times$ Wash Buffer 重悬细胞核沉淀，得到细胞核悬浮液。如果有用于多个反应的相同样品的需要处理，将这些样品收集在一起对细胞核计数。

注：每毫克细胞核的数量与组织类型有关，我们的数据显示细胞核数量平均为 150,000 个/mg。计数精确性是很重要的，相比血细胞计数器，我们更推荐自动细胞计数的方法。

22. 取一部分细胞核悬浮液并计数，计算细胞核浓度并调整每个样品浓度至每 375 μL $1 \times$ Wash Buffer 中含 250,000 个细胞核，如果有需要，要补加新鲜配制的 $1 \times$ Wash Buffer 来调整。

注：如果您希望每个反应都使用相同用量的细胞核，我们建议 CUT&Tag 反应中细胞核数量在 100,000 至 500,000 之间。

注：如果有多的细胞核，可以补加 10%DMSO 将其储存在冻存管中。将样品放在异丙醇程序降温盒中并置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。如果细胞核要储存 1 个月以上，请将冻存管转移至液氮中保存。

23. 在每个样品中加入 20 μL 在第一部分中制备的 Concanavalin A 磁珠。室温下在旋转仪上孵育 10 分钟。

第三部分 一抗结合 (2 小时至过夜)

首先：在使用步骤 26 中的 Antibody Buffer 前，必须添加 Protease Inhibitor Cocktail 和 Digitonin。每使用 1 mL 缓冲液，加入 10 μ L Protease Inhibitor Cocktail 和 10 μ L 5% Digitonin，并放在冰上保存。Antibody Buffer 中加入 Protease Inhibitor Cocktail 和 Digitonin 后，可在 4 $^{\circ}$ C 下保存 2 天。每个反应需要 50 μ L 配好的缓冲液。

24. 短暂离心 ($<100 \times g$) 去除盖子上的液体，将离心管置于磁力架上 30 s - 2 min。
25. 在冰上准备一些新的离心管 (每个样品需要一个)，用移液器将上一步中的上清液转移至新备的离心管中。每个样品大约有 395 μ L 上清，含有未结合的不参与反应的细胞核，用血细胞计数器统计未结合的细胞核。
26. 用步骤 22 中每个反应的细胞核总数减去未结合的细胞核数，计算出结合的细胞核数。这是为了确定反应中被结合的细胞核数量。在每 250,000 - 500,000 个细胞核的反应中，未结合细胞核的数量通常在 0 - 4938 个之间。将步骤 25 中已结合的细胞核的磁珠重悬于新鲜制备的冰冷的 Antibody Buffer 中，使每个样品的体积为 50 μ L，确保每 50 μ L 至少有 100,000 个细胞核。轻轻涡旋，将离心管放在冰上。
27. 每个样品中加入 1 μ L (或至少 1 μ g) 未稀释的一抗，轻轻涡旋或移液器吹吸混匀。

重要提示：请使用兔或鼠的一抗，建议稀释比为 1:50 至 1:100，或遵循抗体说明书中免疫荧光实验的使用稀释比。通常使用组蛋白 H3K27me3 (货号 39157) 作为阳性对照。

28. 在 4 $^{\circ}$ C 旋转混匀仪上孵育过夜，确保液体保持在离心管底部，以便充分混匀。

第四部分 二抗结合 (1.5 小时)

首先：在步骤 30 中使用 Dig-Wash Buffer 之前，必须添加 Protease Inhibitor Cocktail 和 Digitonin。每 1 mL 缓冲液加入 10 μ L Protease Inhibitor Cocktail 和 10 μ L 5% Digitonin，并于冰上保存。每个样品需使用 3.1 mL Dig-Wash Buffer。加入 Protease Inhibitor Cocktail 和 Digitonin 的 Dig-Wash Buffer 可在 4 $^{\circ}$ C 下保存 2 天。

重要提示：一定要选择正确的二抗！

如果使用鼠的一抗，那么应该使用兔抗鼠的二抗。

如果使用兔的一抗，那么应该使用豚鼠抗兔的二抗。

29. 短暂离心 ($<100 \times g$)，将离心管置于磁力架上 30 s - 2 min，用移液器去除上清。
30. 用 Dig-Wash Buffer 稀释二抗（稀释比为 1:100），每个反应需要 100 μ L 已稀释的二抗。向每个样品中加入 100 μ L 稀释的二抗后（确保使用合适的二抗），轻轻涡旋，以分散聚集在离心管一侧的磁珠。
31. 将离心管置于摇床上，室温孵育 60 分钟。
32. 短暂离心，将离心管置于磁力架上 30 s - 2 min，用移液器去除上清。
33. 向每个反应中加入 1 mL Dig-Wash Buffer，轻轻涡旋或用移液器分散聚集在一起的磁珠。
34. 重复第 32, 33 步两次，一共漂洗 3 次。

第五部分 CUT&Tag-IT™ Assembled pA-Tn5 Transposomes 结合 (1.5 小时)

首先：在使用第 35 步的 Dig-300 Buffer 前，必须添加 Protease Inhibitor Cocktail 和 Digitonin。每 1 mL 缓冲液加入 10 μ L Protease Inhibitor Cocktail 和 2 μ L 5% Digitonin，并于冰上保存。每个样品需使用 3.1 mL Dig-300 Buffer。加入 Protease Inhibitor Cocktail 和 Digitonin 的 Dig-Wash Buffer 可在 4 °C 下保存 2 天。

35. 用 Dig-300 Buffer 稀释 CUT&Tag-IT™ Assembled pA-Tn5 Transposomes（稀释比为 1:100），每个反应需要 100 μ L 已稀释的 CUT&Tag-IT™ Assembled pA-Tn5 Transposomes，比如：对于一个反应，加 1 μ L CUT&Tag-IT™ Assembled pA-Tn5 Transposomes 至 100 μ L Dig-300 Buffer 中即可。
36. 短暂离心 ($<100 \times g$)，将含免疫沉淀样品的离心管置于磁力架上 30 s - 2 min，用移液器去除上清。
37. 加入 100 μ L 第 35 步中稀释的 CUT&Tag-IT™ Assembled pA-Tn5 Transposomes，移液器轻轻吹吸以确保混合均匀。
38. 在摇床上室温孵育 60 分钟。
39. 短暂离心 ($<100 \times g$)，将含免疫沉淀样品的离心管置于磁力架上 30 s - 2 min，用移液器去除上清。
40. 加 1 mL Dig-300 Buffer，轻轻涡旋或用移液器分散聚集在一起的磁珠。
41. 重复第 39, 40 步两次，一共漂洗 3 次。

第六部分 片段化 (60 分钟)

首先：在使用第 43 步的 Tagmentation Buffer 前，必须添加 Protease Inhibitor Cocktail 和 Digitonin，每 1 mL Tagmentation Buffer 中加入 10 μ L Protease Inhibitor Cocktail 和 2 μ L 5% Digitonin。

42. 短暂离心 ($<100 \times g$)，将含免疫沉淀样品的离心管置于磁力架上 30 s - 2 min，用移液器去除上清。
43. 加 125 μ L Tagmentation Buffer，轻轻涡旋或用移液器分散聚集在一起的磁珠。
44. 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟。

第七部分 提取 DNA (60 分钟)

45. 向每个样品中加入以下试剂，以终止片段化和溶解 DNA 片段：

- 4.2 μ L 0.5 M EDTA
- 1.25 μ L 10% SDS
- 1.1 μ L Proteinase K (10 mg/mL)

46. 高速涡旋 2 秒以混合均匀，于 55 $^{\circ}$ C 消化 60 分钟。

注：由于 DNA 的黏性，与 Proteinase K 和 SDS 孵育时，磁珠易结团，然而，对于丰度高的全基因组表位，大规模的基因组破碎会减少磁珠结块和并产生磁珠释放到悬浮液中的情况，导致相对于阴性对照而言，液体变成褐色。

47. 短暂离心 ($<100 \times g$)，将离心管置于磁力架上 30 s - 2 min，用移液器将液体转移至新的 1.5 mL 离心管。
48. 每个样品中加 625 μ L DNA Purification Binding Buffer，移液器吹吸混匀，如果颜色指示剂变成蓝紫色或橘色，加 8 μ L 3 M Sodium Acetate。
49. 将标记好的 DNA Purification Column 放入收集管中，每个样品准备一个。
50. 将样品转移至对应的 DNA Purification Column 中，盖上盖子，17,000 $\times g$ ($\sim 14,000$ rpm) 离心 1 分钟。
51. 弃去收集管中的液体，将 DNA Purification Column 放回收集管中。

注：DNA Purification Wash Buffer 在第一次使用前必须添加 100%乙醇，使终浓度为 80% (在 DNA Purification Wash Buffer 试剂瓶中加入 40 mL 100%乙醇)。

52. 在 DNA Purification Column 中加入 750 μL 已按上述配好的 DNA Purification Wash Buffer, 盖好后 $17,000 \times g$ 离心 1 分钟。
53. 弃去收集管中的液体, 将 DNA Purification Column 放回收集管中, $17,000 \times g$ 离心 2 分钟去除剩下的 DNA Purification Wash Buffer。
54. 将 DNA Purification Column 放入新的离心管中, 向柱子中央加入 35 μL DNA Purification Elution Buffer, 盖上盖子并于室温静置 1 分钟。
55. $17,000 \times g$ 离心 1 分钟, 弃去 DNA Purification Column, DNA 纯化已完成, 可以将 DNA 储存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或直接用于 PCR 扩增。

第八部分 PCR 扩增

56. 按以下顺序加各组分, 进行 PCR 反应。如果建库样品较多, 请保证每个样品的 i5 和 i7 端 index 都是唯一的。

PCR 反应中每个样品都需要 1 个 i7 端 index 引物和 i5 端 index 引物。我们的试剂盒中提供了 $4 \times 4 = 16$ 种不同组合的 i7/i5 引物组合, 可以用于 16 个样品。这些引物基于 Illumina 的 Nextera 接头。

对于每个反应:

使用一种 i7 Indexed Primer	且使用一种 i5 Indexed Primer
i7 Indexed Primer 1 = i7 N701	i5 Indexed Primer 1 = i5 N501
i7 Indexed Primer 2 = i7 N702	i5 Indexed Primer 2 = i5 N502
i7 Indexed Primer 3 = i7 N703	i5 Indexed Primer 3 = i5 N503
i7 Indexed Primer 4 = i7 N704	i5 Indexed Primer 4 = i5 N504

每个 CUT&Tag 样品需要的组分	体积 (50 μL)
已加标签的 DNA	30 μL
i7 Indexed Primer	2.5 μL
i5 Indexed Primer	2.5 μL
dNTPs (10 mM)	1.0 μL
5 \times Q5 Buffer	10 μL
Molecular grade nuclease-free water	3.5 μL
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0.5 μL
(总体积 = 50 μL)	

57. 在 PCR 仪中进行如下反应：

72 °C	5 min	
98 °C	30 s	
98 °C	10 s	} 12 个循环
63 °C	10 s	
72 °C	1 min	
10 °C	Hold	

58. 使用 SPRI 磁珠进行回收，每个样品需要 55 μ L SPRI 磁珠（1.1 倍样品体积），最后用 20 μ L DNA Purification Elution Buffer 洗脱，每个样品还需要 400 μ L 现配的 80% 乙醇。

- 向每个样品中加入 60 μ L 已混匀、室温的 SPRI 磁珠。
- 稍稍涡旋混匀，室温孵育 5 分钟以充分结合磁珠。
- 将样品管置于磁力架上分离磁珠和液体。
- 当溶液变澄清后，吸弃上清。
- 保持样品管始终在磁力架上，每个样品加入加 180 μ L 80%乙醇漂洗，不要混匀。
- 室温下孵育 30 秒。
- 吸弃上清。
- 重复步骤 e-g，乙醇漂洗总计两次。
- 开盖，室温下静置离心管，以去除残留的乙醇。当磁珠从光滑变为哑光后（2-5 分钟），进行下一步。
- 将样品管从磁力架上拿下来，加 20 μ L DNA Purification Buffer。
- 盖上管盖，涡旋混匀。
- 样品在室温孵育 5 分钟。
- 将样品管置于磁力架上分离磁珠和液体。
- 当溶液变澄清后，转移包含洗脱 DNA 的上清至干净的离心管。

59. 这时，文库已可被用于定量和测序。

Index 引物和测序信息

Index 1 (i7) Primers

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT[i7]GTCTCGTGGGCTCGG

Index 2 (i5) Primers

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[i5]TCGTCGGCAGCGTC

i7 Index	i7 Sequence	测序信息
N701	TCGCCTTA	TAAGGCGA
N702	CTAGTACG	CGTACTAG
N703	TTCTGCCT	AGGCAGAA
N704	GCTCAGGA	TCCTGAGC

i5 Index	i5 Sequence	测序信息(NovaSeq v1.0 Reagent Kits, MiSeq, HiSeq 2000/2500)
N501	TAGATCGC	TAGATCGC
N502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
N503	TATCCTCT	TATCCTCT
N504	AGAGTAGA	AGAGTAGA

i5 Index	i5 Sequence	测序信息(NovaSeq v1.5 Reagent Kits iSeq, MiniSeq, NextSeq, HiSeq 3000/4000)
N501	TAGATCGC	GCGATCTA
N502	CTCTCTAT	ATAGAGAG
N503	TATCCTCT	AGAGGATA
N504	AGAGTAGA	TCTACTCT

Read1 和 Read2 测序接头序列: CTGTCTCTTATACACATCT.

注: 推荐测序读长为 2M-10M, 根据我们的质控测试, 10M 读长通常产生 20,000 个峰。

参考文献

1. Kaya-Okur, H.S. et al. (2019) Nature comm. 10:1930 (1)

常见问题指南

问题	建议
CUT&Tag 实验对照组如何设置?	对于试剂和实验流程, 一个比较好的技术性阳性对照是抗体 H3K27me3 (货号: 39157)。我们建议加二抗但不加一抗来作为阴性对照, 这样可以排除您样品中因二抗和 pA-Tn5 产生的背景。
是否需要 IgG 对照?	CUT&Tag 中设 IgG 对照的目的是判断 pA-Tn5 是否特异靶向在抗体结合的基因组区域。与 ChIP-Seq 中的 INPUT 对照不同, 此阴性对照不是用于分析。Active Motif 的 R&D 团队发现加入 IgG 对照没有增加任何有价值的信息, 因为 pA-Tn5 已显示出很好的特异性。然而, 您加入 IgG 对照也是可以的。
建议如何做质控?	文库生成后, 成功的文库制备质量应通过 TapeStation 或 Bioanalyzer 来评估。一个理想文库的片段大小大部分是低于 500 bp 的。我们建议使用 KAPA 文库定量试剂盒测定文库浓度。
CUT&Tag 也和 ChIP-Seq 一样需要 input 对照吗?	CUT&Tag 不需要 input 对照。
哪些抗体已被证明可用于 CUT&Tag-IT Assay Kit?	Active Motif 验证可用于 CUT&Tag-IT™ Assay Kit 的抗体可访问网页: https://www.activemotif.com/catalog/1319/cut-tag-validated-antibodies
被验证可用于 ChIP-Seq 的抗体可用于 CUT&Tag 吗?	CUT&Tag 和 ChIP-Seq 的实验流程不一样, 适用于 ChIP-Seq 的抗体不一定适用于 CUT&Tag。
单克隆抗体和多克隆抗体都可以用于 CUT&Tag 吗?	是的, 但一定确保使用的二抗的种属是正确的。

问题	建议
Active Motif 的标准化 Spike-In 可以	不可以, 我们标准化的 ChIP-Seq Spike-In 方法不适用于 CUT&Tag-IT Assay Kit。

用于 CUT&Tag-IT Assay Kit 吗?	
可以用 CUT&Tag-IT™ Assay Kit 同时处理 16 个以上的样本吗?	CUT&Tag-IT™试剂盒为 16 个独特的样本提供了 4×4 个独特的 i5 和 i7 index。该试剂盒中的 index 引物与 Illumina Nextera 引物相同，对应 N701-N704 和 N501-N504。如果你想获得 16 个以上的组合用于更多的样品，我们的 Nextera™-Compatible Multiplex Primers (96 plex) 试剂盒 (货号 53155) 可以提供多达 96 个反应的 index 组合。这些引物的浓度为 25 μM，可直接用于我们的试剂盒。你也可以购买并结合其它与本试剂盒中的引物相同浓度 (25 μM) 的 Illumina Nextera 引物产品。
CUT&Tag-IT Assay Kit 是否与测序之前的 qPCR 兼容?	可以兼容，但结果不一定准确。由于 Tn5 插入测序接头的随机性，它使得设计引物来扩增一个特定的基因成为问题，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。
CUT&Tag-IT Assay Kit 文库是单 index 还是双 index?	CUT&Tag 文库是双 index 文库。
CUT&Tag-IT Assay Kit 文库包含分子识别码?	CUT&Tag-IT Assay Kit 文库不包含分子识别码。
CUT&Tag-IT Assay Kit 文库该采用单端测序还是双端测序?	CUT&Tag-IT™ Assay Kit 文库应该采用双端测序。
CUT&Tag-IT Assay Kit 推荐的读长为多少?	我们建议读长为 2 × 38 (PE38)，这比 Henikoff 文章中报导的读长更短，然而，我们没有看到对数据质量或 mapping 率的影响。如果你愿意，可以使用更高的读长。
如何分析 CUT&Tag-IT Assay Kit 产生的测序样本数据?	CUT&Tag 的数据分析与 ChIP-Seq 是一样的。我们使用 BWA 算法和 MACS2 进行序列比对和信号峰鉴定。

问题	建议
看不见任何文库	在 CUT&Tag 实验中，这种情况比较常见，特别是研究转录因子的时候。即使文库几乎看不见，也能在测序中得到比较好的结果。库丰度的 qPCR 分析（比如 KAPA Library Quantification）可以帮助测量库的量。如果您的阳性对照是有效的，这些低量的文库仍然值得测序。如果您的阳性对照不起作用，您可能是在实验过程中丢失了细胞核，如果是这种情况，请在第二部分末尾对与磁珠结合的细胞进行计数，以确保细胞不会丢失。

技术支持

如果您在任何时候需要帮助，请致电或发送电子邮件到 Active Motif 技术服务，地址如下所列。

北美	免费客服电话：877 222 9543 直拨电话：760 431 1263 传真：760 431 1351 E-mail: tech_service@activemotif.com
欧洲	免费客服电话（英国）：0800/169 31 47 免费客服电话（法国）：0800/90 99 79 免费客服电话（德国）：0800/181 99 10 直拨电话：+32 (0)2 653 0001 传真：+32 (0)2 653 0050 E-mail: eurotech@activemotif.com
日本	直拨电话：+81 (0)3 5225 3638 传真：+81 (0)3 5261 8733 E-mail: japantech@activemotif.com
中国	直拨电话：(86)-21-20926090 手机：18521362870 E-mail: techchina@activemotif.com