

# CUT&Tag 试剂盒

CUT&Tag Kit

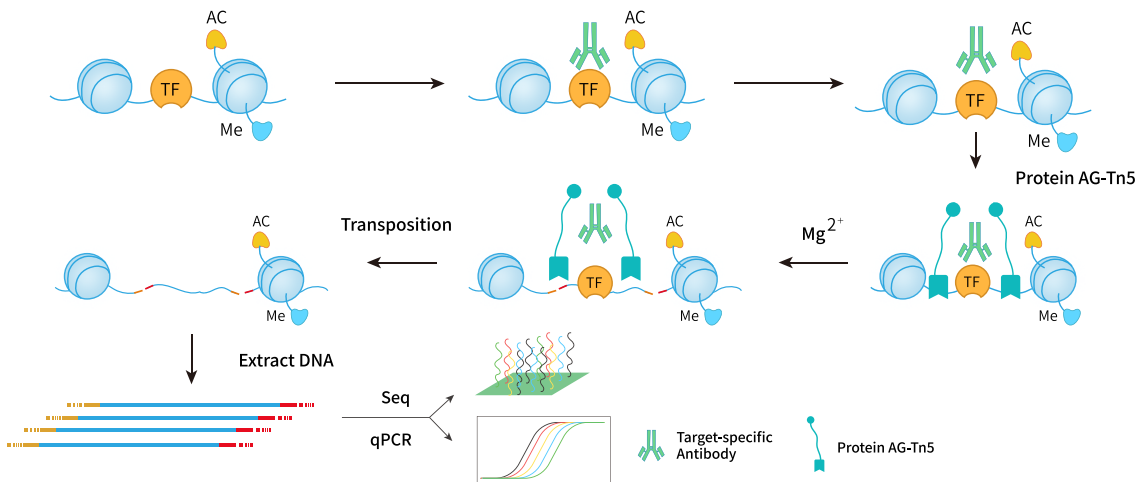
注:本产品干冰运输;试剂按说明书分别保存于4°C及-20°C,保质期12个月。

序号	试剂	货号及规格			储存
		IRP022 (6T)	IRP022M (12T)	IRP022L (40T)	
01	ConA Beads	60μL	0.12mL	0.24mL	4°C
02	Bind Buffer	1.26mL	2.52mL	5.04mL	4°C
03	Wash Buffer	10.75mL	21.5mL	43mL	4°C
04	5% Digitonin	78μL	0.16mL	0.32mL	4°C
05	0.5M EDTA	20μL	40μL	80μL	4°C
06	Buffer 1	1.8mL	3.6mL	7.2mL	4°C
07	ddH <sub>2</sub> O	1.86mL	3.72mL	7.44mL	4°C
08	0.5 M MgCl <sub>2</sub>	6μL	12μL	24μL	4°C
09	10% SDS	17μL	34μL	68μL	4°C
10	NGS DNA Clean Beads	1.05mL	2.1mL	4.2mL	4°C
11	1xTE Buffer	0.13mL	0.26mL	0.53mL	4°C
12	Protease inhibitor	0.14mL	0.29mL	0.58mL	4°C
13	PAG-Tn5 adapter complex	3μL	6μL	12μL	-20°C

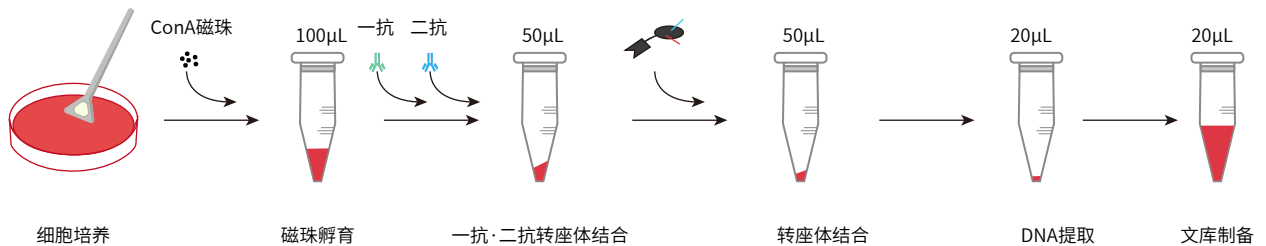
14	Proteinase K	3 $\mu$ L	6 $\mu$ L	12 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C
15	2x PCR Mix	0.15 mL	6 $\mu$ L	0.6 mL	-20 $^{\circ}$ C
16	Primer F	15 $\mu$ L	30 $\mu$ L	60 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C
17	Primer R	15 $\mu$ L	30 $\mu$ L	60 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C

## 技术路线/Technology mapping

### 1. 原理流程图



### 2. 实验操作流程



## 使用流程/Procedure

### 1. 平衡 ConA Beads

- ①取 10  $\mu$ L ConA Beads 于 1.5 mL EP 管，室温平衡 30 min 后轻轻吹打混匀，将 1.5 mL EP 管置于磁力架上静置至溶液变澄清，弃上清；
- ②向 EP 管中加入 100  $\mu$ L (10 倍原磁珠体积) Bind Buffer 重悬磁珠，轻轻吹打混匀后置于磁力架上静置至溶液变澄清，弃上清；
- ③从磁力架上取下 EP 管，重复步骤②一次；
- ④向 EP 管中加入 10  $\mu$ L (原磁珠体积) Bind Buffer 重悬 ConA Beads。

- 注意：** 1. 若同时进行 N 个样本则取  $N \times 10 \mu\text{L}$  ConA Beads；  
 2. ConA Beads 请保存于 2-8 $^{\circ}$ C 条件下，切勿保存于 0 $^{\circ}$ C 以下。

## 2. 细胞准备

- ①收集 100-100,000 个细胞，室温下 600 g 离心 3 min，弃上清；
- ②细胞加入 0.5 mL Wash Buffer、10  $\mu$ L Protease inhibitor，重悬混匀细胞，室温下 600 g 离心 3 min，弃上清
- ③ 重复步骤②一次；
- ④ 向 EP 管中加入 90  $\mu$ L Wash Buffer、1  $\mu$ L Protease inhibitor 轻吹打重悬细胞。

## 3. 磁珠孵育

- ①上述重悬的细胞加入到平衡后 ConA Beads 里，放在垂直混匀器上温和旋转（20 r/min）室温孵育 15 min；
- ②瞬时离心后磁力架收集磁珠并去上清。

## 4. 一抗、二抗结合

- ①配制 700  $\mu$ L Dig-wash Buffer (686  $\mu$ L Wash Buffer、7  $\mu$ L Protease inhibitor、7  $\mu$ L 5% Digitonin 混合均匀)
- ②结合 ConA Beads 的细胞加入 50  $\mu$ L Dig-wash Buffer、0.2  $\mu$ L 0.5M EDTA 和 1  $\mu$ L 一抗；
- ③放在垂直混匀器上温和旋转（20 r/min），室温孵育 2 小时或 4°C 过夜孵育，样品瞬时离心后磁力架收集磁珠并去上清；
- ④样品加入 50  $\mu$ L Dig-wash Buffer、1  $\mu$ L 合适的二抗，放在垂直混匀器上温和旋转（20r/min），室温孵育 30 min；
- ⑤瞬时离心后磁力架收集磁珠并去上清；
- ⑥加入 0.2 mL Dig-wash Buffer 洗涤样品，放在垂直混匀器上温和旋转（20 r/min）5 min，瞬时离心后磁力架收集磁珠并去上清，洗涤 3 次，去除游离抗体。

### 注意：

1. 配制试剂中若加入 Digitonin，建议现配现用，配制好的试剂可存放于 4°C 不超过 2 天；
2. 我们推荐的一抗稀释体积比例为 1:50-1:100；
3. 抗体孵育时建议更换新的 EP 管，让样品只存在于底部，不要让管壁沾有液体，会影响混匀；
4. 如一抗为兔，则二抗可使用羊 / 鼠抗兔 IgG 抗体。
5. 务必选择与 Protein A/G 亲和力高且不带修饰的二抗；
6. 洗涤时配制 Dig-med Buffer。

## 5. 转座体的结合

- ①配制 Dig-med Buffer（300  $\mu$ L Buffer 1、6  $\mu$ L 5% Digitonin、6  $\mu$ L Proteaseinhibitor、288  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O）；
- ②取 50  $\mu$ L Dig-med Buffer 加入 0.5  $\mu$ L PAG-Tn5 adapter complex，混匀后瞬时离心，并加入到细胞中，轻轻旋转，在室温下孵育 1 h；
- ③取下孵育好转座体的 EP 管轻柔瞬时离心后，置于磁力架上静置，待液体澄清后，小心弃去上清；
- ④加入 0.2 mL Dig-med Buffer 洗涤细胞，放在垂直混匀器上温和旋转（20 r/min）5 min，瞬时离心后磁力架收集磁珠并去上清，洗涤 2 次，去除未结合的 pAG-Tn5 蛋白。

## 6. DNA 片段化及终止

- ①将细胞悬浮在 50  $\mu$ L Dig-med Buffer、1  $\mu$ L 0.5 M MgCl<sub>2</sub>，37°C 水浴孵育 1 h；
- ②为停止标记，在样品中加入 2.25  $\mu$ L 0.5 M EDTA、2.75  $\mu$ L 10% SDS 和 0.5  $\mu$ L Proteinase K，在 55°C 孵育 30 min 或 37°C 过夜；
- ③在 70°C 作用 20 min，灭活 Proteinase K。

### 注意：

1. 试剂盒溶液组分可以在室温下进行充分融解，10% SDS 若不溶解，可以置于 37°C 加热至完全溶解；
2. 样品可直接进行下一步实验，也可以在 4°C 保存一夜，第二天继续实验。

## 7. DNA 提取

- ①提前将 110  $\mu$ L NGS DNA Clean Beads（NGS DNA Clean Beads: 样本 =2.2: 1）从 4°C 冰箱中取出，室温平衡 20 min，涡旋振荡混匀磁珠，备用；

- ②将 NGS DNA Clean Beads 加入样品中，使用移液枪吹打混匀，室温孵育 5 min；
- ③将样品移至磁力架上静置，待液体澄清后，小心弃去上清；
- ④保持样品始终在磁力架上，加入 500  $\mu$ L 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠，室温静置 30 S 后，小心弃去上清；
- ⑤重复步骤④一次；
- ⑥EP 管瞬时离心后将 EP 管移至磁力架上静置，待磁珠与溶液分离后，用 10  $\mu$ L 枪头将残留液体彻底吸干；
- ⑦室温晾干 2-3 min，使乙醇充分挥发，切记磁珠不可干燥过度；
- ⑧将 EP 管从磁力架上取下，每管中加入 22  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O，涡旋混匀后室温放置 3 min；
- ⑨将 EP 管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清，小心吸取 20  $\mu$ L 上清至新的无菌 PCR 管内，样品在 -20 $^{\circ}$ C 储存或直接进行下一步 PCR 扩增。

**注意：**

1. 漂洗需使用新鲜配置的 80% 乙醇；
2. 明显的乙醇残留会干扰后续的扩增反应；
3. 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。

**8. 文库制备**

- ①纯化后的产物 20 $\mu$ L，2 $\times$ PCR Mix 25 $\mu$ L，Primer F 2.5 $\mu$ L，Primer R 2.5 $\mu$ L 配制 PCR 反应体系。
- ②涡旋震荡混匀，然后瞬时离心使得反应液至管底，放置到 PCR 仪中；
- ③按照如下程序进行 PCR 反应：

温度	时间	Cycles
58 $^{\circ}$ C	5min	1
72 $^{\circ}$ C	5min	1
98 $^{\circ}$ C	45s	1
98 $^{\circ}$ C	15s	N
63 $^{\circ}$ C	10s	
72 $^{\circ}$ C	1min	1
4 $^{\circ}$ C	Hold	

- ④提前取 65  $\mu$ L NGS DNA Clean Beads(NGS DNA Clean Beads: 样本=1.3: 1) 从 4 $^{\circ}$ C 冰箱中取出，置于 EP 管中，涡旋振荡混匀磁珠，备用；
- ⑤将 PCR 结束后的样品中加入到上述的 NGS DNA Clean Beads，室温旋转孵育 10-15 分钟；
- ⑥将 EP 管移至磁力架上静置，待液体澄清后，小心弃去上清；
- ⑦EP 管加入 200  $\mu$ L 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠，旋转混匀后置于磁力加上室温静置，待液体澄清后，小心弃去上清；
- ⑧重复步骤④一次；
- ⑨EP 管瞬时离心后将 EP 管移至磁力架上静置，待磁珠与溶液分离后，用 10  $\mu$ L 枪头将残留液体彻底吸干；
- ⑩室温晾干 2-3 min，使乙醇充分挥发，切记磁珠不可干燥过度；将离心管从磁力架上取下，加入 22  $\mu$ L 1 $\times$ TE Buffer，涡旋振荡混匀后室温放置 3min。将离心管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清，小心吸取 20  $\mu$ L 上清至新的无菌 EP 管内，-20 $^{\circ}$ C 保存。

**注意：**1. 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；

2. 寻找合适的循环数时，客户可以根据预实验结果进行增减循环数。

3. 为防止磁力架磁性不强导致最后的上清液中有磁珠残留，可以进行 4 $^{\circ}$ C 16000g 高速离心 10 min，转移上清液到新的 EP 管。

## 注意事项/Notes

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内；
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

