

TransNGS[®] CUT&RUN Library Prep Kit for Illumina[®]

CUT&RUN建库试剂盒 适配Illumina平台

使用前请仔细阅读说明书

版本号: Version 1.0



目录号: KP173

保存: Box 1于2°C-8°C温度下保存1年, Box 2于-18°C及其以下温度下保存1年。

产品说明

TransNGS[®] CUT&RUN Library Prep Kit for Illumina[®]是针对Illumina高通量测序平台开发的,适用于哺乳动物细胞的CUT&RUN文库构建试剂盒,所构建的文库可用于单端或双端测序。CUT&RUN (Cleavage Under Target & Release Using Nuclease)是一种新型的DNA-蛋白质互作研究方法,其技术原理是使用融合了protein A/G的MNase与靶蛋白通过抗体的桥联形成免疫复合体,并通过Ca²⁺激活MNase的切割活性,使MNase切割与靶蛋白结合的DNA片段两端,最终通过构建文库来捕获与靶蛋白结合的DNA区域。本试剂盒适用于转录因子、共调节因子等DNA结合蛋白的互作DNA研究。与传统的ChIP-seq相比,能够在低起始量细胞的投入下获得更精确、更稳定的蛋白-DNA互作信息。

适用范围

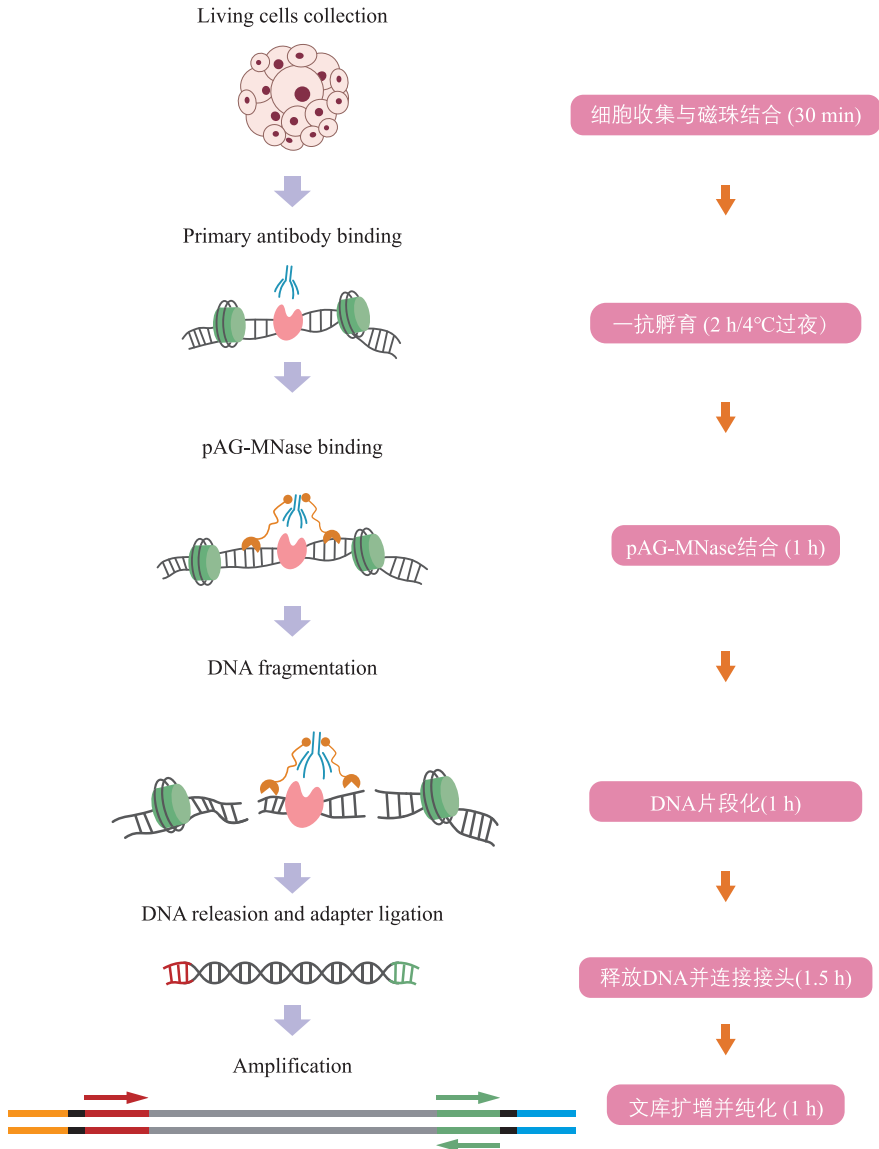
10³-5×10⁵个哺乳动物细胞,或经过处理的细胞核,以及无细胞壁结构的真核细胞(如植物细胞原生质体等)。

推荐自备试剂

- 一抗 (ChIP Grade)。
- *TransNGS*[®] Index Primers (384) Kit for Illumina[®] (目录号: KI241)。
- *TransNGS*[®] Spike-in DNA Controls for CUT&Tag (目录号: KS201-V1)。
- 预冷1×PBS溶液,无水乙醇,灭菌超纯水等。
- 低吸附的离心管,包括1.5 ml离心管以及PCR管等。
- 如需做动物或植物组织的细胞核建库,推荐使用伯优品牌的细胞核分离试剂盒(人或动物样本, 52009-10; 植物样本, 52305-10)。



实验原理示意图



试剂盒组成

	Component	KP173-01 (12 rxns)	KP173-02 (48 rxns)
Box 1	ConA Magnetic Beads II	120 μ l	480 μ l
	CUT&RUN DNA Clean Beads	2 ml	2 \times 4 ml
Box 2	ConA Beads Binding Buffer	2 \times 660 μ l	5.28 ml
	Cell Wash Buffer	3 \times 10 ml	3 \times 40 ml
	Nuclear Extraction Buffer	6 ml	3 \times 8 ml
	pAG-MNase	12 μ l	48 μ l
	pAG-MNase Dilution Buffer	120 μ l	480 μ l
	Protease Inhibitor	240 μ l	960 μ l
	RNaseA (20 mg/ml)	12 μ l	48 μ l
	Binding Enhancer	108 μ l	432 μ l
	500 mM EDTA	5 μ l	20 μ l
	Fragmentation Enhancer	6 μ l	24 μ l
	STOP Enhancer	40 μ l	160 μ l
	End-repair and A-tailing Reaction Mix	120 μ l	480 μ l
	End-repair and A-tailing Enzyme Mix	60 μ l	240 μ l
	<i>Trans</i> NGS [®] Adapter for Illumina [®] (16 μ M)	60 μ l	240 μ l
	Adapter Dilution Buffer	600 μ l	2.5 ml
	Adapter-ligation Buffer III	360 μ l	2 \times 720 μ l
	Adapter-ligation Enzyme II	60 μ l	240 μ l
	2 \times CUT&RUN Library Amplification Mix	300 μ l	2 \times 600 μ l
Nuclease-free Water	1 ml	4 ml	

起始样品准备

初次试验推荐使用 10^4 - 10^5 个细胞进行本试剂盒的CUT&RUN建库。确保活细胞比例大于90%，死细胞可以用台盼蓝染色鉴定。贴壁细胞和组织块应尽量消化成单细胞状态，重悬于PBS中。对于难以消化成单细胞状态的样品，也可以提取细胞核后再建库，详见附录中常规细胞提核操作指导。若物种类型特殊、细胞数不在上述范围内或是目的蛋白在样品中的表达丰度不高等情况，需对试验条件做出适当调整。细胞悬液中应尽量去除胰酶等杂质，以免干扰后续建库反应。

文库结构

本试剂盒使用*Trans*NGS[®] Index Primers (384) Kit for Illumina[®] (目录号: KI241)进行扩增，所得文库结构如下：
 5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[i5]ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-XXXX
 XXXX-AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC[i7]ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'



操作步骤

1、细胞收集与磁珠结合

(1) 将ConA Magnetic Beads II从4°C冰箱取出，室温平衡30分钟并吹吸混匀。对于细胞（核）起始量 $<10^6$ 的组别，取5 μl ConA Magnetic Beads II至PCR管*中；对于细胞（核）起始量 $\geq 10^6$ 的组别，取10 μl ConA Magnetic Beads II至PCR管*中。将管子置于磁力架上，待液体澄清后，小心弃上清。

*如有多份样本，可以在八连排中操作。

(2) 加入50 μl ConA Beads Binding Buffer后轻弹混匀，在磁力架上收集磁珠并弃上清。重复此步骤一次。

(3) 加入10 μl ConA Beads Binding Buffer重悬ConA Magnetic Beads II。

(4) 按下表配制**Preserving Buffer**，每个样本1.2 ml。

Component	Volume
Cell Wash Buffer	1.2 ml
Protease Inhibitor	12 μl
Total volume	~1.2 ml

(5) 收集所需数量的新鲜细胞于1.5 ml离心管中。若细胞体积超过100 μl ，则600 g室温离心3分钟，并小心弃上清；若细胞体积不及100 μl ，则直接进行第(6)步反应。

(6) 每管加入1 ml第(4)步配制的Preserving Buffer，轻柔吹打重悬细胞*，室温600 g离心3分钟，并小心弃上清。

(7) 每管加入90 μl 第(4)步配制的Preserving Buffer，轻柔吹打重悬细胞*。

(8) 将各管重悬细胞分别转移至第(3)步准备好的10 μl ConA Magnetic Beads II中，轻柔吹打10次混匀后*，立即置于旋转混合仪上，室温孵育10分钟。

*切记不可振荡混匀。推荐轻弹管壁混匀。

2、孵育一抗与pAG-MNase并进行打断反应

Dig-Wash Buffer配制:

(1) 首先配制Dig-Wash Buffer，每个样本800 μl 。如果有多个样品，配制 $(N+1) \times 800 \mu\text{l}$ 即可。

Component	Volume
Cell Wash Buffer	784 μl
Protease Inhibitor	8 μl
Binding Enhancer	8 μl
Total volume	800 μl

(2) 配制完成后请振荡混匀，该溶液可在4°C稳定保存一周时间。

一抗孵育:

(3) 配制**一抗孵育液**，每个样本50 μl 。涡旋混匀后冰浴预冷待用。如果有多个样品，配制 $(N+1) \times 50 \mu\text{l}$ 即可。



Component	Volume
Dig-Wash Buffer	50 μ l
500 mM EDTA	0.2 μ l
Total Volume	50 μ l

(4) 将孵育好的ConA Magnetic Beads-细胞结合体轻柔点甩离心后置于磁力架上静置2分钟，待液体澄清后小心弃上清。用50 μ l一抗孵育液稀释一抗*后（一抗的稀释比例请严格按照抗体说明书的推荐比例，一般为1:50或1:100），重悬ConA Magnetic Beads-细胞结合体，轻弹管壁混匀，**室温旋转孵育2小时****。

*选用已经验证过的适用于ChIP实验的抗体，如无对应级别的抗体时，可选用IP级别的抗体，但需进一步摸索该抗体的最佳用量。**一抗请勿反复冻融。**

**此步骤也可以替换成4°C旋转孵育过夜。

pAG-MNase的结合:

(5) 轻柔点甩离心后，将离心管置于磁力架上2分钟，待液体澄清后小心弃上清。

(6) 加入150 μ l Dig-Wash Buffer，轻弹管壁混匀后，室温静置5分钟。轻柔点甩离心后，置于磁力架上2分钟，待液体澄清后小心弃上清。重复上述洗涤步骤1次，总共洗涤2次。

(7) 加入100 μ l Dig-Wash Buffer重悬细胞-beads复合物，用pAG-MNase Dilution Buffer将pAG-MNase稀释10倍后，每个反应加入1 μ l稀释好的该酶，抽吸混匀，4°C旋转孵育1小时。

pAG-MNase的激活:

(8) 将步骤(7)的离心管轻柔点甩后置于磁力架上2分钟，待溶液澄清后小心弃上清。

(9) 加入150 μ l Dig-Wash Buffer，轻弹管壁混匀后，室温静置5分钟。轻柔点甩离心后，置于磁力架上2分钟，待液体澄清后小心弃上清。重复上述洗涤步骤1次，总共洗涤2次。

(10) 配制如下1 \times pAG-MNase Reaction Mix，每个反应需要24 μ l。涡旋混匀后冰浴预冷待用。如果有多个样品，配制 (N+1) \times 24 μ l即可。

Component	Volume
Dig-Wash Buffer	23.52 μ l
Fragmentation Enhancer	0.48 μ l
Total Volume	24 μ l

(11) 往洗涤后的各管中加入24 μ l提前预冷的1 \times pAG-MNase Reaction Mix，抽吸混匀后请立即置于冰上孵育60分钟。

(12) 在上述孵育过程中配制如下4 \times STOP Buffer，每个反应需要8 μ l。涡旋混匀后置于冰上待用。如果有多个样品，配制 (N+1) \times 8 μ l即可。为配制方便，请提前各取1 μ l Binding Enhancer和RNaseA(20mg/ml)，并分别各自加入2管9 μ l Nuclease-free Water中，均稀释10倍待用。



Component	Volume
STOP Enhancer	3.2 μ l
Diluted Binding Enhancer	0.8 μ l
Diluted RNaseA	0.4 μ l
Nuclease-free Water	3.6 μ l
Total volume	8 μ l

(13) 往(11)步骤反应后的各管中加入8 μ l 4 \times STOP Buffer，总体积达32 μ l*。抽吸混匀后置于PCR仪中，37 $^{\circ}$ C 孵育30分钟。

*如需定量，可先加入Spike-in DNA (KS201-V1)，再加入4 \times STOP Buffer一起混匀。Spike-in DNA的推荐添加量为1 pg/100,000细胞，根据实际细胞投入量将DNA Spike-in梯度稀释后添加。

(14)将上述反应完成后的离心管轻柔点甩后置于磁力架上2分钟，待溶液澄清后，吸取30 μ l上清进入下面的建库反应。

3、DNA末端修复、加A与接头连接

末端修复和加A反应:

(1) 将无菌PCR管置于冰上，加入如下反应试剂。

Component	Volume
Fragmented DNA	30 μ l
Nuclease-free Water	15 μ l
End-repair and A-tailing Reaction Mix	10 μ l
End-repair and A-tailing Enzyme Mix	5 μ l
Total volume	60 μ l

(2) 移液枪吹吸混匀，点甩离心收集管壁上的液体。

(3) 将反应管置于PCR仪中，进行以下孵育步骤(盖子温度 \geq 80 $^{\circ}$ C)。

28 $^{\circ}$ C 15 min

68 $^{\circ}$ C 15 min

\leq 4 $^{\circ}$ C Hold

接头连接:

(4) 冰上溶化TransNGS[®] Adapter for Illumina[®]，并参考下表使用Adapter Dilution Buffer将Adapter原液稀释至合适浓度。

细胞起始投入量	Adapter稀释倍数	稀释后Adapter浓度
10 ³ cells	稀释100倍	0.16 μ M
\geq 10 ⁴ cells	稀释25倍	0.64 μ M

(5) 将第(3)步反应结束的PCR管置于冰上，依次加入如下试剂*。



Component	Volume
合适浓度的Adapter	5 μ l
Adapter-ligation Buffer III	30 μ l
Adapter-ligation Enzyme II	5 μ l
Total volume	100 μ l

*切勿将Adapter与缓冲液、酶提前混为mix，可能会导致大量接头峰产生。

(6) 移液枪吹吸混匀，点甩离心收集管壁上的液体。

(7) 将反应管置于PCR仪中，20°C孵育15分钟(盖子不加热)。连接产物可立即进行纯化，或于-20°C保存。

接头连接产物纯化:

推荐使用0.8×CUT&RUN DNA Clean Beads 进行产物纯化。具体操作如下:

(8) 从2-8°C取出磁珠，室温静置30分钟后备用。

(9) 振荡磁珠使其充分混匀*，吸取80 μ l磁珠(0.8×)加入上步产物中。

(10) 移液枪吹吸混匀，室温静置5分钟。

*混匀不充分会显著影响实验结果。

(11) 将反应管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清(约5分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上，弃上清*。

*管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，务必使磁珠全部吸附在管壁上。切勿吸到磁珠，否则会影响最终产量。

(12) 保持反应管在磁力架上，向管中加入200 μ l新鲜配制*的80%乙醇，不要吹吸磁珠，室温静置30秒，弃上清。

*一定要使用新鲜配制的乙醇，否则会影响实验结果。

(13) 重复步骤(12)一次。

(14) 保持反应管在磁力架上，室温晾干磁珠*。

*切勿加热晾干，否则会影响最终产量。

(15) 将反应管移出磁力架，加入22 μ l Nuclease-free Water。移液枪吹吸或涡旋充分混匀磁珠，室温静置2分钟。

(16) 将反应管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清(约2分钟)。使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上*。

*管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，室温静置时间可延长至5分钟，务必使磁珠全部吸附在管壁上。

(17) 小心吸取20 μ l洗脱液转移到干净PCR管中，进行下步文库扩增反应，或于-20°C保存。



4、文库扩增

(1) 将无菌PCR管置于冰上，加入如下反应试剂。此处所用i5/i7 primer来自TransNGS® Index Primers (384) Kit for Illumina® (目录号: KI241)

Component	Volume
上步纯化产物	20 μ l
2×CUT&RUN Library Amplification Mix	25 μ l
i5 Primer	2.5 μ l
i7 Primer	2.5 μ l
Total volume	50 μ l

(2) 移液枪吹吸混匀，点甩离心收集管壁上的液体。

(3) PCR仪中进行以下扩增程序。

95°C	3 min	
98°C	10 sec	} 12-20 cycles*
60°C	5 sec	
72°C	1 min	
≤4°C	Hold	

*针对不同的细胞起始量，推荐不同的扩增循环数。以HeLa细胞为例， 5×10^5 个细胞对应12-13个循环； 10^6 个细胞对应13-14个循环； 10^4 个细胞对应14-16个循环； 10^3 个细胞对应17-20个循环。不同细胞类型和不同抗体对应文库的扩增循环数可根据需要微调。

5、文库扩增产物纯化

推荐使用1.0× CUT&RUN DNA Clean Beads 进行产物纯化。具体操作如下：

(1) 从2-8°C取出磁珠，室温静置30分钟后备用。

(2) 振荡磁珠使其充分混匀，吸取50 μ l磁珠(1.0×)加入上步产物中。

(3) 移液枪吹吸混匀*，室温静置5分钟。

*混匀不充分会显著影响实验结果。

(4) 将反应管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清(约5分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上*，弃上清。

*管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，务必使磁珠全部吸附在管壁上。切勿吸到磁珠，否则会影响最终产量。

(5) 保持反应管在磁力架上，向管中加入200 μ l新鲜配制*的80%乙醇，不要吹吸磁珠，室温静置30秒，弃上清。

*一定要使用新鲜配制的乙醇，否则会影响实验结果。

(6) 重复步骤(5)一次。

(7) 保持反应管在磁力架上，室温晾干磁珠*。

*切勿加热晾干，否则会影响最终产量。



- (8) 将反应管移出磁力架，加入22 μ l Nuclease-free Water。移液枪吹吸或涡旋充分混匀磁珠，室温静置2分钟。将反应管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清(约2分钟)。使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上*。
*管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，室温静置时间可延长至5分钟，务必使磁珠全部吸附在管壁上。
- (10) 小心吸取20 μ l洗脱液转移到干净1.5 ml离心管中，产物可于-20°C保存或直接上机测序。

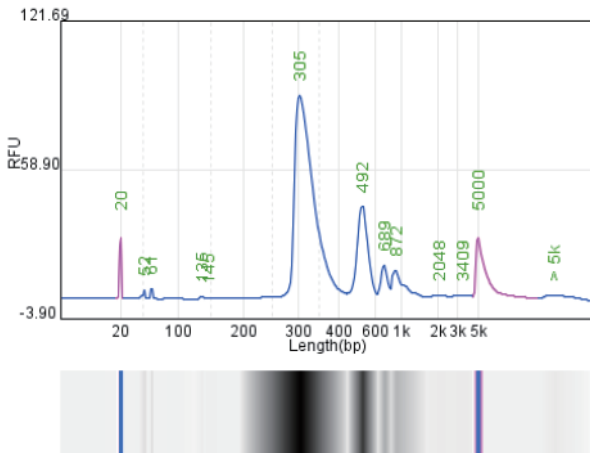
附录

1、细胞核提取步骤

- 1.1 收集所需数量的新鲜细胞于1.5 ml离心管中，室温离心，600 g，3分钟，然后小心弃去上清。
- 1.2 加入500 μ l PBS重悬细胞，室温离心，600 g，3分钟，然后小心弃去上清。
- 1.3 加入500 μ l预冷的Nuclear Extraction Buffer，轻柔混匀后冰浴10分钟。
- 1.4 于4°C离心，1300 g，4分钟，倒掉上清，并在纸巾上倒扣几秒钟。
- 1.5 加入500 μ l PBS重悬细胞核，4°C离心，1300 g，4分钟，倒掉上清，并在纸巾上倒扣几秒钟。
- 1.6 加入90 μ l配制好的细胞洗涤液重悬细胞核，并进入“1、细胞收集与磁珠结合”的步骤（8）。

2、文库峰型示意图

以10⁵个HeLa细胞为例，使用H3K27me3抗体，扩增13个循环的CUT&RUN文库峰型如下。



本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1.0-202604

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

