

EasyPrep Cut&Tag Assay Kit for Illumina

Cat: QY301

● 产品介绍:

EasyPrep Cut&Tag Assay Kit for Illumina 是用来检测目标蛋白在染色体上结合位置的试剂盒。本试剂盒具有试验周期短, 操作简便, 背景噪音低, 数据质量更高, 应用场景更加广泛等特点, 可为您的实验提供更加有效帮助。

● 实验准备

实验人员应备齐如下试剂和设备:

ddH₂O、无水乙醇、磁力架、PCR 仪、旋转混匀仪、目标抗体以及不带修饰的二抗

● 试剂盒试剂如下:

Box1		QY301-11 (6rxns)	QY301-21 (12rxns)
ConA Beads		60μL	120μL
Binding buffer		1.3mL	1.3mL x2
DNA Clean beads		0.85mL	1.7mL

Box1 试剂, 4°C保存, 4°C运输。

Box2		QY301-12 (6rxns)	QY301-22 (12rxns)
10x CW buffer		900μL	1.8mL
5% Digitonin		61μL	122μL
Enhancer		6μL	12μL
Protease Inhibitor		138μL	276μL
Active buffer		300μL	600μL
Dig-300 buffer		6mL	12mL
pAG-Tn5		6μL	12μL
Stop buffer		24μL	48μL
Proteinase K		6μL	12μL
2x PCR Mix		150μL	300μL

Box2 试剂, -20°C保存, <-20°C运输。

- 适用范围:

本产品仅供科学研究使用，不得用于临床医学诊断及其他非合理用途

- 实验步骤如下:

A. ConA Beads 处理

- 1) 将 ConA Beads 从 4°C 冰箱取出，振荡混匀后室温平衡 30min，取 10μL 磁珠于 PCR 管，将 PCR 管置于磁力架上静置~2min，至溶液变澄清，弃上清；
- 2) 加入 100μL Binding buffer 重悬磁珠，吹打混匀后置于磁力架上静置~2min，待溶液变澄清，弃上清；
- 3) 重复步骤 2) 一次；
- 4) 加入 10μL Binding buffer 重悬 ConA Beads。

B. 细胞处理

- 1) 按照如下方法配制 Wash buffer:

 10x CW buffer	70μL
 Protease Inhibitor	7μL
ddH ₂ O	623μL
Total	700μL

注意：若有 N 样品，可以配制 N 倍数量的 Wash buffer

- 2) 收集新鲜的细胞并计数，取合适数量的细胞，室温 500g 离心 5min；

注意：推荐选择 5 万细胞做 Cut&Tag，细胞量太多反而可能会影响实验结果

- 3) 加入 500μL Wash buffer 重悬细胞，600g 离心 5min，弃上清；
- 4) 加入 90μL Wash buffer 重悬细胞。

C. 细胞与 ConA Beads 孵育

- 1) 将重悬细胞加入到含有 10μL ConA Beads 的 PCR 管中，轻柔吹打 5-10 次混匀，立即置于旋转混合仪上，

室温孵育 10min。

D. 一抗孵育

- 1) 按照如下方法配制 Primary Antibody buffer，置于冰上待用：

Wash buffer	50μL
 5% Digitonin	0.5μL
 Enhancer	1μL
Total	51.5μL

注意：若有 N 样品，可以配制 N 倍数量的 Primary Antibody buffer

- 2) 将孵育好的 Beads-细胞瞬离后置于磁力架上静置~2min，待液体澄清后，小心弃去上清；
- 3) 加入 50μL Primary Antibody buffer 和一抗（一般为 1μL），轻轻吹打混匀，4℃旋转孵育过夜。

E. 二抗结合

- 1) 按照如下方法配制 Secondary Antibody buffer，置于冰上待用；

CW buffer	80μL
 5% Digitonin	8μL
 Protease Inhibitor	8μL
ddH ₂ O	704
Total	800μL

注意：若有 N 样品，可以配制 1x N 倍数量的 Secondary Antibody buffer

- 2) 取 100μL Secondary Antibody buffer，加入 1μL 二抗轻轻吹打均匀，形成 Secondary Antibody Mixture；

注意：二抗不能带有修饰，二抗类型需要根据一抗来选择，比如一抗为兔抗，二抗应选择抗兔的抗体

- 3) 取下 PCR 管进行瞬离，然后置于磁力架上静置~2min，待液体澄清后，小心弃去上清；
- 4) 加入 100μL Secondary Antibody Mixture，轻轻吹打重悬 Beads-细胞；
- 5) 置于旋转混匀仪上，室温旋转孵育 1h；

- 6) 取下 PCR 管瞬离后, 置于磁力架上静置~2min, 待液体澄清后, 小心弃去上清;
- 7) 从磁力架上取下 PCR 管, 加入 200 μ L Secondary Antibody buffer, 轻轻吹打重悬 Beads-细胞;
- 8) 置于磁力架上静置~2min, 待液体澄清后, 小心弃去上清;
- 9) 重复 7) 和 8) 两次, 共三次, **最后一次待配置好 Transposome buffer 后再弃去上清。**

F. 转座体结合

- 1) 按照如下方法配置 Transposome buffer:

Dig-300 buffer	790 μ L
 5% Digitonin	1.6 μ L
 Protease Inhibitor	8 μ L
Total	800 μ L

注意: 若有 N 样品, 可以配制 N 倍数量的 Transposome buffer

- 2) 取 100 μ L Transposome buffer, 加入 1 μ L pAG-Tn5, 轻轻吹打均匀, 形成 Transposome Mixture;
- 3) 将 Beads-细胞样品置于磁力架上静置~2min, 待溶液澄清后小心去掉上清;
- 4) 从磁力架取下 PCR 管, 加入 100 μ L Transposome Mixture 重悬 Beads-细胞, 轻轻吹打均匀;
- 5) 将混匀后的样品立即置于旋转混匀仪上, 室温旋转孵育 1h;
- 6) 将 PCR 管瞬离后, 置于磁力架上静置~2min, 待液体澄清后, 小心弃去上清;
- 7) 从磁力架上取下 PCR 管, 加入 200 μ L Transposome buffer, 轻轻吹打混匀, 重悬 Beads-细胞;
- 8) 将 PCR 管置于磁力架上静置~2min, 待液体澄清后, 小心弃去上清;
- 9) 重复 7) 和 8) 两次, 共三次, **最后一次待配置好 Active buffer 后再弃去上清。**

G. DNA 片段化

- 1) 将样品置于磁力架上静置~2min, 待溶液澄清后小心去掉上清;
- 2) 从磁力架取下 PCR 管, 加入 25 μ L Active buffer 重悬 Beads-细胞, 轻轻吹打均匀;
- 3) **37°C**旋转或者 PCR 仪上孵育 1h;

- 4) 将 PCR 管瞬离后，立即按照如下方法混合试剂：

Beads-细胞	25μL
 Stop buffer	4μL
 10mg/mL Proteinase K	1μL
Total	27μL

- 5) 涡旋混匀，将 PCR 仪的热盖调整为 105°C，按照如下程序在 PCR 仪上进行孵育：

60°C	10min
12°C	Hold

H. DNA 纯化

- 1) 提前将 DNA Clean Beads 从 4°C 冰箱中取出，室温平衡 30min，涡旋振荡混匀磁珠，备用；
- 2) 加入 75μL (~2.5X) DNA Clean Beads，涡旋混匀；
- 3) 室温静置 5min，将 PCR 管移至磁力架上静置，待液体澄清后，小心弃去上清；
- 4) 保持离心管在磁力架上，加入 200μL 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠，室温静置 30s 后，小心弃去上清；
- 5) 重复步骤 4) 一次，用 10μL 枪头将残留液体彻底吸干；
- 6) 室温晾干 2-3min，使乙醇充分挥发，当磁珠失去光泽，干燥已经完成，切记磁珠不可干燥过度；
- 7) 将 PCR 管从磁力架上取下，每管中加入 21μL ddH₂O，吹打混匀后室温放置 3min；
- 8) 将 PCR 管置于磁力架上，待溶液澄清，小心吸取 20μL 上清至新的 PCR 管内，样品在 -20°C 储存或直接进行下一步 PCR 扩增。

I. 文库扩增

- 1) 按照如下方法配置 PCR 反应体系：

DNA	20μL
 2x PCR Mix	25μL
 N5xx Primer	2.5μL
 N7xx Primer	2.5μL
Total	50μL

注：实验人员可选择本公司产品 EasyPrep Index for Illumina (QY201) 里的 N5xx 和 N7xx Primer 进行实验，也可以根据实验设计自主选择引物。

2) 轻轻吹打均匀，将 PCR 管置于 PCR 仪（热盖 105℃）中，进行 PCR 反应；

温度	时间	PCR循环数
72℃	5min	
98℃	30s	
98℃	10s	10-20
60℃	5s	
72℃	1min	
4℃	Hold	

对于不同数量的细胞，可按如下方案选择 PCR 循环数：

细胞数	PCR 循环数
100	18-20
1000	16-18
10,000	13-15
100,000	10-12

J. 文库纯化

- 1) 提前将 DNA Clean Beads 从 4℃冰箱中取出，室温平衡 30min，涡旋振荡混匀磁珠，备用；
- 2) PCR 反应结束后，加入 65μL DNA Clean Beads (1.3X) 到 PCR 反应产物，吹打混匀；

- 3) 室温静置 5min, 然后将 PCR 管转移至磁力架上~3min, 直至溶液变澄清, 小心弃除上清;
- 4) 将 PCR 管保持在磁力架上, 加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇, 静置 30s, 弃除全部上清;
- 5) 重复 4) 一次, 最后用 10 μ L 枪头将残留液体彻底吸干;
- 6) 室温晾干 2-3min, 使乙醇充分挥发, 当磁珠失去光泽, 干燥已经完成, 切记磁珠不可干燥过度;
- 7) 将 PCR 管移除磁力架, 加入 16 μ L ddH₂O, 吹打混匀;
- 8) 室温静置 2min, 置于磁力架上~1min, 直到溶液变澄清, 小心吸取 15 μ L 至另一新的离心管中, 测量文库浓度, 并送测序。