

**Hyperactive<sup>®</sup> In-Situ ChIP  
Library Prep Kit for Illumina**

**TD901-TD902**



---

**使用说明书**

Version 21.1

# 目录 Contents

01/产品概述	02
02/产品组分	02
03/保存条件	02
04/适用范围	03
05/自备材料	03
06/注意事项	03
07/样品准备	04
08/实验原理与流程概要	05
09/实验流程	06
09-1/ConA beads处理	06
09-2/细胞收集	06
09-3/细胞与ConA beads孵育	06
09-4/一抗孵育	07
09-5/二抗孵育	07
09-6/Hyperactive pG-Tn5/pA-Tn5 Transposon孵育	07
09-7/片段化	08
09-8/DNA提取	08
09-9/文库扩增	09
09-10/PCR产物纯化	09
09-11/文库质量检测	10
10/常见问题与解决方案	10

\*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

## 01/产品概述

Hyperactive In-Situ ChIP Library Prep Kit for Illumina是针对CUT&Tag技术定向开发的专用试剂盒。CUT&Tag技术是一种研究蛋白质-DNA互作的新方法，通过将Protein G或Protein A与经过工程学改造的超高活性Tn5转座酶融合，形成兼具双重活性的新型融合酶(Hyperactive pG-Tn5/pA-Tn5 Transposase)，在抗体引导下精准靶向切割目的蛋白附近的DNA序列。与传统的ChIP-Seq相比，该技术具有细胞投入量低、实验周期短、信噪比高、可重复性好等优势，尤其适用于早期胚胎发育、干细胞、肿瘤以及表观遗传学等研究领域。试剂盒中所有试剂都经过严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了文库构建的稳定性和重复性。

## 02/产品组分

组分		TD901-01/02 12/48 rxns	TD902-01/02 12/48 rxns
BOX 1	■ ConA beads	130/520 $\mu$ l	130/520 $\mu$ l
	■ 0.5 M EDTA	200/800 $\mu$ l	200/800 $\mu$ l
	■ 10% SDS	50/200 $\mu$ l	50/200 $\mu$ l
BOX 2	■ Hyperactive pG-Tn5 Transposon (6.88 $\mu$ M)	8/32 $\mu$ l	-----
	■ Hyperactive pA-Tn5 Transposon (6.88 $\mu$ M)	-----	8/32 $\mu$ l
	■ 5% Digitonin	0.5/2 ml	0.5/2 ml
	■ 10 $\times$ Binding Buffer	1/4 ml	1/4 ml
	■ 10 $\times$ Wash Buffer (-)	5/20 ml	5/20 ml
	■ 10 $\times$ Dig-300 Buffer (-)	5/20 ml	5/20 ml
	■ 30% BSA	20/80 $\mu$ l	20/80 $\mu$ l
	■ 1 M MgCl <sub>2</sub>	50/200 $\mu$ l	50/200 $\mu$ l
	■ Proteinase K (20 mg/ml)	40/160 $\mu$ l	40/160 $\mu$ l
	□ 1 $\times$ TE (pH 8.0)	0.5/2 ml	0.5/2 ml
	■ 5 $\times$ TAB	120/480 $\mu$ l	120/480 $\mu$ l
■ TAE	12/48 $\mu$ l	12/48 $\mu$ l	

▲ 产品组分表中标注的颜色代表各组分管盖颜色。

▲ ConA beads = Concanavalin A-coated magnetic beads。

▲ TAE = TruePrep Amplify Enzyme; TAB = TruePrep Amplify Buffer。

## 03/保存条件

BOX 1: ConA beads 2 ~ 8°C保存，其余组分室温保存，根据不同目的地调整运输方式。

BOX 2: 5% Digitonin, -30 ~ -15°C保存，室温下可保存1周；

10  $\times$  Binding Buffer, -30 ~ -15°C保存，2 ~ 8°C下可保存6个月；

其余组分-30 ~ -15°C保存， $\leq$ 0°C运输。

## 04/适用范围

本产品适用于哺乳动物细胞的蛋白质-DNA互作研究，针对的细胞投入量为60 - 100,000个；酵母、植物等细胞通过特殊的处理也可以使用该试剂盒进行相关实验。

## 05/自备材料

### ◇ 试剂

抗体（一抗、二抗）；

蛋白酶抑制剂（推荐使用Roche Complete Protease Inhibitor EDTA-Free Tablets, Sigma-Aldrich, 5056489001）；

Tris饱和酚；

氯仿；

无水乙醇；

灭菌超纯水。

### ◇ 仪器及耗材

VAHTS DNA Clean Beads (Vazyme #N411)；

旋转混合仪；

磁力架；

PCR热循环仪；

低吸附EP管、PCR管；

单端Index: TruePrep Index Kit V4 for Illumina (Vazyme #TD204/TD205/TD206/TD207)；

双端Index: TruePrep Index Kit V2/V3 for Illumina (Vazyme #TD202/TD203)；

请按照样本数量选择相应的接头试剂盒。

## 06/注意事项

### 1. ConA beads操作注意事项

使用前将磁珠平衡至室温，请勿将磁珠置于0℃以下存放；

用移液器轻柔吹打重悬ConA beads，避免过度剧烈地振荡；

ConA beads与细胞结合后，应避免剧烈振荡磁珠-细胞复合物或使磁珠-细胞复合物离开液体在空气中长时间放置导致磁珠干结；

长时间孵育过程中出现部分磁珠聚集为正常现象，可以轻弹管底使磁珠重悬，应避免实验过程中反复开盖吹打磁珠-细胞复合物；

在处理磁珠溶液时应尽量避免高转速离心或长时间置于磁力架上，人为造成磁珠凝集。

### 2. DNA纯化磁珠操作注意事项

使用前将磁珠平衡至室温，所有磁珠操作都应于室温进行，请勿将磁珠置于0℃以下存放；

每次吸取磁珠前都应涡旋振荡充分混匀，样品加入磁珠后应保证与磁珠充分混匀；

移取上清时应在磁珠被彻底吸附后小心进行，避免吸到磁珠而影响后续实验；

纯化PCR产物时，80%乙醇应现配现用，漂洗磁珠后应尽量吸干残留乙醇；

磁珠在洗脱前应充分干燥(表面由光亮褐色变为磨砂褐色), 以免乙醇残留影响后续实验, 但也需避免磁珠过分干燥开裂而影响DNA样品洗脱效率。

### 3. 样品交叉污染注意事项

吸取不同样品时应更换枪头;  
使用带滤芯的枪头。

### 4. 细胞操作注意事项

操作细胞应尽量轻柔以保持细胞活性。

### 5. 试剂使用注意事项

不同的Buffer试剂应注意保存条件, 避免失效。

### 6. PCR产物污染注意事项

将PCR反应体系配制区和PCR产物纯化区进行强制性的物理隔离;  
使用专用的移液器等设备;  
定时对各实验区域进行清洁(使用0.5%次氯酸钠或10%漂白剂进行擦拭清理)。

## 07/样品准备

### Buffer配制

▲ 此处按单个样本计算, 请根据实际样本数量等比例配制。

1. Binding Buffer: 取30  $\mu$ l 10  $\times$  Binding Buffer, 加ddH<sub>2</sub>O至300  $\mu$ l, 混匀。
2. Wash Buffer: 取0.4 ml 10  $\times$  Wash Buffer(-), 加入80  $\mu$ l 50  $\times$ 蛋白酶抑制剂, 加ddH<sub>2</sub>O至4 ml混匀。  
▲ 50  $\times$ 蛋白酶抑制剂: 取一片蛋白酶抑制剂混合片剂(Sigma-Aldrich, 5056489001)溶于1 ml ddH<sub>2</sub>O中, -20 $^{\circ}$ C保存。
3. Dig-wash Buffer: 取2.97 ml步骤2中配制的Wash Buffer, 加入30  $\mu$ l 5% Digitonin, 混匀。  
▲ Digitonin有毒性, 在溶液配制过程中请做好个人防护, 加入Digitonin后缓冲液不可长期保存, 现配现用。
4. Antibody Buffer: 混合1  $\mu$ l 0.5 M EDTA, 0.8  $\mu$ l 30% BSA和250  $\mu$ l Dig-wash Buffer, 置于冰上冷却, 现配现用。
5. Dig-300 Buffer: 取0.4 ml 10  $\times$  Dig-300 Buffer(-), 加8  $\mu$ l 5% Digitonin和80  $\mu$ l 50  $\times$ 蛋白酶抑制剂, 加ddH<sub>2</sub>O至4 ml, 混匀。
6. Tagmentation Buffer: 取300  $\mu$ l步骤5中配制的Dig-300 Buffer, 加入3  $\mu$ l 1 M MgCl<sub>2</sub>混合均匀, 现配现用。

### 细胞准备

室温下收集细胞并计数, 死亡的细胞组蛋白(或兴趣蛋白)可能会从DNA上脱落下来, 变成裸露的DNA, 转座子随机切割造成比较强的背景噪音, 建议样本细胞的活性至少>90%(细胞活性可以用台盼蓝染色来鉴定)。

## 08/实验原理与流程概要

收集细胞 (0.5 - 1 h)



结合一抗 (2 h)



结合二抗 (1 h)



Hyperactive pA/pG-Tn5  
Transposon结合 (1.5 h)



片段化 (1 h)



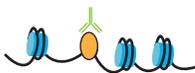
DNA提取 (1 h)



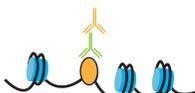
文库扩增 (1.5 h)

Living cells preparation

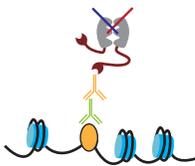
↓ +1st Antibody



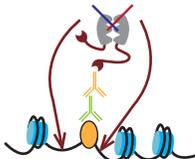
↓ +2nd Antibody



↓ +pA/pG-Tn5



↓ +Mg<sup>2+</sup>



↓ Transposition



↓ Extract DNA



↓ PCR



### CUT&Tag基本原理

利用刀豆蛋白A包被的磁珠 (Concanavalin A-coated magnetic beads, ConA beads) 结合细胞, 并使用非离子去污剂洋地黄皂苷 (Digitonin) 进行细胞膜通透; 通过针对靶蛋白的一抗、相应二抗和Protein A/Protein G的介导, 使得与Protein A/Protein G融合的Tn5转座子精准靶向切割靶蛋白附近的DNA序列; Tn5在切割的时候, 会在被切割的片段两端加上接头序列, 通过使用P5、P7引物进行PCR扩增后即可形成直接用于高通量测序的文库。

## 文库结构

Index 2 (i5)

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC||||||TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAG  
AGACAG-NNNNNN-CTGTCTCTTATACATCTCCGAGCCCACGAGAC||||||ATCTCGTATGC  
CGTCTTCTGCTTG-3' Index 1 (i7)

||||||: Index 2 (i5), 8 bases;

||||||: Index 1 (i7), 8 bases;

-NNNNNN-: 插入序列。

## 09/实验流程

### 09-1/ConA beads处理

1. 取一支1.5 ml EP管，按照100  $\mu$ l/样本加入Binding Buffer。
2. 使用移液器轻轻重悬ConA beads，按照10  $\mu$ l ConA beads/样本取出ConA beads至步骤1的EP管中，轻轻混合均匀，将EP管置于磁力架上，待溶液澄清后(约2 min)，弃尽上清。
3. 将EP管从磁力架上取下，按照100  $\mu$ l/样本加入Binding Buffer，用移液器轻轻吹打混匀(请勿振荡混匀)，短暂离心收集反应液于管底。
4. 将EP管置于磁力架上，待液体澄清后(约2 min)，弃尽上清，按照10  $\mu$ l/样本加入Binding Buffer重悬磁珠。

### 09-2/细胞收集

- ▲ 本Protocol适用的细胞投入量为60 - 100,000。
  - ▲ 在细胞通透之前的所有步骤都在室温下进行，使细胞受到的应力最小化，实验操作过程中需要避免剧烈的涡旋振荡。
1. 室温收集细胞并计数。
  2. 室温下2,500 rpm (600  $\times$  g)低速离心3 min，弃上清。
    - ▲ 对于大小不同的细胞，请根据实际情况调整离心力。
  3. 室温条件下加入500  $\mu$ l Wash Buffer重悬细胞，2,500 rpm (600  $\times$  g)低速离心3 min，弃尽上清。

### 09-3/细胞与ConA beads孵育

1. 按照100  $\mu$ l/样本加入Wash Buffer重悬细胞，并将细胞转移至新的1.5 ml EP管中，一边低速涡旋混匀，一边加入处理好的ConA beads悬液，室温旋转孵育5 - 10 min。
2. 短暂离心收集反应液于管底，将EP管置于磁力架上，待溶液澄清后(约2 min)，弃尽上清。

## 09-4/一抗孵育

▲ 磁珠与细胞结合后的操作，若部分磁珠聚集，请勿用移液器反复吹打混匀，可轻弹管底混匀。

1. 按照50  $\mu\text{l}$ /样本加入预冷的Antibody Buffer重悬细胞，轻轻涡旋混匀并置于冰上。
2. 参照抗体说明书推荐的免疫浓度向EP管中加入抗体，轻轻涡旋混匀。
3. 室温下旋转孵育2 h。  
▲ 平行实验需要包括阳性对照抗体和阴性对照抗体。

## 09-5/二抗孵育

1. 短暂离心收集反应液于管底，将EP管置于磁力架上，待溶液澄清后(30 sec - 2 min)，弃尽上清。
2. 用Dig-wash Buffer按照一定比例稀释二抗(常规推荐使用1:100比例稀释)，每管样品中加入50  $\mu\text{l}$ 稀释后的抗体，轻轻振荡，使抗体与ConA beads混合均匀。
3. 室温下旋转孵育30 - 60 min。
4. 短暂离心收集反应液于管底，将EP管置于磁力架上，待溶液澄清后(30 sec - 2 min)，弃尽上清。
5. 向EP管中加入800  $\mu\text{l}$  Dig-wash Buffer，上下颠倒10次或轻轻振荡混匀，确保Buffer与ConA beads充分混合。
6. 重复步骤4、5两次，最后一次洗涤后，请勿去除Dig-wash Buffer，防止ConA beads暴露在空气中过分干燥。

## 09-6/Hyperactive pG-Tn5/pA-Tn5 Transposon孵育

1. 将Hyperactive pG-Tn5/pA-Tn5 Transposon与Dig-300 Buffer混合，终浓度为0.04  $\mu\text{M}$ ，每个样品100  $\mu\text{l}$  (Kit中提供的转座子的浓度为6.88  $\mu\text{M}$ ，按照参考文献推荐的终浓度，每个样本加入0.58  $\mu\text{l}$ )。  
▲ 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。  
▲ 按照Vazyme #S602或#S603说明书推荐的反应体系生成的转座子浓度为4  $\mu\text{M}$ 。
2. 短暂离心收集09-5二抗孵育后的反应液于管底，将EP管置于磁力架上，待溶液澄清后(30 sec - 2 min)，弃尽上清。
3. 每个样本加入100  $\mu\text{l}$ 步骤1中稀释好的Hyperactive pG-Tn5/pA-Tn5转座子混合物，轻轻涡旋，使转座子与ConA beads混合均匀。
4. 室温旋转孵育1 h。
5. 短暂离心，将EP管置于磁力架上，待液体澄清后(30 sec - 2 min)，弃尽上清。

6. 向EP管中加入800  $\mu\text{l}$  Dig-300 Buffer，上下颠倒10次或轻柔涡旋混匀，确保Buffer与ConA beads充分混合。
7. 重复步骤 5、6 两次。

### 09-7/片段化

1. 短暂离心，将EP管置于磁力架上，待液体澄清后(30 sec - 2 min)，弃尽上清。
2. 向EP管中加入300  $\mu\text{l}$  Tagmentation Buffer，用移液器轻轻混合均匀。
3. 37°C 孵育1 h。

### 09-8/DNA提取

1. 室温下，每个反应中加入10  $\mu\text{l}$  0.5 M EDTA，3  $\mu\text{l}$  10% SDS和2.5  $\mu\text{l}$  20 mg/ml Proteinase K，终止片段化反应。
2. 轻轻涡旋振荡混合均匀后，短暂离心收集液体于管底，50°C 孵育1 h(或者37°C 孵育过夜)。
3. 向EP管中加入150  $\mu\text{l}$  Tris饱和酚和150  $\mu\text{l}$  氯仿，高速振荡2 sec。  
▲ 不需要弃掉beads，直接加入Tris饱和酚和氯仿进行DNA片段提取。
4. 12,900 rpm (16,000  $\times$  g)，室温离心5 min。
5. 用移液器小心吸取上层水相至新的EP管中，加入300  $\mu\text{l}$  氯仿，上下颠倒10次(请勿涡旋振荡)，12,900 rpm (16,000  $\times$  g) 室温离心3 min。
6. 吸取上层水相至含有750  $\mu\text{l}$  100%乙醇的EP管中，吹打混匀，置于冰上。
7. 冰上冷却后，4°C 12,900 rpm (16,000  $\times$  g) 离心15 min。
8. 用移液器沿液面缓慢吸取，小心弃尽液体。  
▲ 这一步通常看不到白色的斑块，弃液体时，尽量轻柔，减少DNA片段损失。
9. 向EP管中加入1 ml 100%乙醇漂洗，4°C 12,900 rpm (16,000  $\times$  g) 离心1 min。
10. 用移液器沿液面缓慢吸取，小心弃尽液体后，在空气中晾干。
11. 待EP管干燥后，加入25 - 30  $\mu\text{l}$  1  $\times$  TE，将样本于-30 ~ -15°C 下储存或直接进行PCR扩增。

## 09-9/文库扩增

1. 在灭菌PCR管中配制以下组分：

组分	体积
纯化后的片段化DNA	24 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	5 $\mu$ l
5 × TAB	10 $\mu$ l
P5 Primer X*	5 $\mu$ l
P7 Primer X*	5 $\mu$ l
TAE	1 $\mu$ l
总体积	50 $\mu$ l

\* 推荐直接使用Vazyme #TD202-TD207，可根据样品数量和Index选择策略自行选择。

若使用自配接头，将接头定量后稀释至10  $\mu$ M，分别加入2  $\mu$ l，其余体积用ddH<sub>2</sub>O补齐。

2. 使用移液器轻轻吹打混匀，在PCR仪中进行如下反应：

温度	时间	循环数
105°C	热盖	
72°C <sup>a</sup>	3 min	
98°C	30 sec	
98°C	15 sec	
60°C	30 sec	15 - 20 cycles <sup>b</sup>
72°C	30 sec	
72°C	5 min	
4°C	Hold	

a. 72°C孵育步骤用于进行链置换反应，请勿删除该步骤。

b. 请根据实际情况自行选择合适的扩增循环数，当细胞数量较高时(10,000 - 100,000)，推荐使用15 - 17 cycles，当细胞数量较低时(60 - 10,000)，推荐使用17 - 20 cycles。

## 09-10/PCR产物纯化

1. 涡旋振荡混匀DNA纯化磁珠并吸取60  $\mu$ l (1.2 ×) 至上述PCR反应产物中，涡旋振荡或使用移液器吹打10次保证整个体系均匀，室温孵育5 min。

▲ DNA纯化磁珠比较粘稠，用移液枪确保取到足够的体积并缓慢打出。

2. 将反应管短暂离心并置于磁力架上分离磁珠和液体，待溶液澄清后(约5 min)，小心移除上清，注意不要扰动磁珠。
3. 保持PCR管始终在磁力架上，加入200  $\mu$ l新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育30 sec，小心移除上清。
4. 重复步骤3，总计漂洗两次。
5. 保持PCR管始终处于磁力架上，开盖空气干燥3 - 5 min。

▲ 不同地区环境干燥程度有差别，磁珠晾干时间不一，磁珠刚好晾干，表面由光亮褐色变为磨砂褐色。过度干燥会导致洗脱困难，未完全晾干会有酒精残留影响后续实验反应。

6. 磁珠晾干后，将PCR管从磁力架上取出，加入22  $\mu$ l灭菌超纯水洗脱，涡旋振荡或使用移液器吹打10次充分混匀磁珠，室温孵育5 min。

7. 将PCR管短暂离心收集置于磁力架上分离磁珠和液体，待溶液澄清后(约5 min)小心吸取20  $\mu$ l 上清转移到新的EP管中，-30 ~ -15 $^{\circ}$ C保存。

## 09-11/文库质量检测

### 文库浓度检测

使用基于特异性识别双链DNA的荧光染料法(如Qubit或荧光染料PicoGreen)检测文库产量。

### 文库片段分布检测

将制备好的文库在Agilent 2100 Bioanalyzer上进行文库长度分布检测(或用2%琼脂糖凝胶电泳代替)。

## 10/常见问题与解决方案

### ◇ CUT&Tag适用于什么物种?

CUT&Tag Protocol广泛适用于常规哺乳动物细胞的蛋白质-DNA互作研究，酵母、植物等细胞可以经过特殊的处理(破除细胞壁或者提取细胞核)来进行实验，操作可以参照CUT&RUN技术的前端处理方式。

### ◇ ConA磁珠主要作用是什么?

ConA磁珠经过刀豆蛋白A包被，能与细胞膜上的糖蛋白结合，从而吸附细胞，使细胞处理操作可视化，从而减少在后续实验过程中的细胞的损失。

### ◇ CUT&Tag是不是只能用Illumina平台测序?

TD901和TD902提供的转座子是针对Illumina平台定向设计的，如果需要使用其他测序平台，可以使用Vazyme #S602和#S603，更换适配相应平台的接头和Index扩增引物即可。

### ◇ TD901与TD902如何选择?

TD901试剂盒提供的是Protein G与Tn5融合的转座子，TD902提供的是Protein A与Tn5融合的转座子，可以直接用于CUT&Tag实验；实验时若使用二抗，请根据二抗种属来源与Protein G或者Protein A的亲和能力进行选择，可以参照以下表格：

Species	TD901 pG-Tn5	TD902 pA-Tn5
<b>Human</b>		
IgA	-	variable
IgD	-	-
IgE		
IgG <sub>1</sub>	++++	++++
IgG <sub>2</sub>	++++	++++
IgG <sub>3</sub>	++++	-
IgG <sub>4</sub>	++++	++++
IgM*	-	variable
<b>Avian egg yolk</b>		
IgY*	-	-
<b>Cow</b>	++++	++
<b>Dog</b>	+	++
<b>Goat</b>	++	-
<b>Guinea Pig</b>		
IgG <sub>1</sub>	++	++++
IgG <sub>2</sub>	++	++++
<b>Hamster</b>	++	+
<b>Horse</b>	++++	++
<b>Koala</b>	+	-
<b>Llama</b>	+	-
<b>Monkey (rhesus)</b>	++++	++++
<b>Mouse</b>		
IgG <sub>1</sub>	++++	+
IgG <sub>2a</sub>	++++	++++
IgG <sub>2b</sub>	+++	+++
IgG <sub>3</sub>	+++	++
IgM*	-	variable
<b>Pig</b>	+++	+++
<b>Rabbit</b>	+++	++++
<b>Rat</b>		
IgG <sub>1</sub>	+	-
IgG <sub>2a</sub>	++++	-
IgG <sub>2b</sub>	++	-
IgG <sub>3</sub>	++	+
<b>Sheep</b>	++	+/-

++++ represents strong binding; ++ represents medium binding; - represents weak or no binding









**Vazyme Biotech Co., Ltd.**

Web: [www.vazyme.com](http://www.vazyme.com)

Tel: 400-600-9335

Sales: [sales@vazyme.com](mailto:sales@vazyme.com)

Support: [support@vazyme.com](mailto:support@vazyme.com)

Service: [service@vazyme.com](mailto:service@vazyme.com)

