

Version 3

Code No. AG12561

AG12562

AccuNext CUT & RUN DNA 建库试剂盒 (Illumina)

AccuNext CUT & RUN Library Prep Kit for Illumina

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



目录

➤ 产品概述	1
➤ 产品组分	1
➤ 保存及运输	2
➤ 实验原理及流程	2
➤ 产品优势	3
➤ 使用注意事项	3
➤ 实验前准备	5
➤ 操作方法	5
A. 试剂配制	5
B. ConA 磁珠活化	6
C. 细胞准备	7
D. ConA 磁珠-细胞结合	7
E. 一抗孵育	7
F. pAG-Mnase 结合与洗涤	8
G. 片段化	8
H. DNA 提取	9
I. DNA 文库构建	10
(一) 末端修复 / dA 尾添加	10
(二) 接头连接	11
(三) 连接产物纯化	12
(四) PCR 文库扩增	13
(五) 文库纯化	13
J. 文库质量检测	14
➤ 实验例	15
➤ 产品注意事项	16
➤ 附录 1: <i>AccuNext</i> CDI Oligos for DNA Library Kit (Illumina) 的信息	17
➤ 附录 2: 细胞核的制备	19

➤ 产品概述

本产品是针对 Illumina 高通量测序平台定向开发的，基于 CUT&RUN (Cleavage Under Targets and Release Using Nuclease) 技术原理研究蛋白质与 DNA 相互作用的试剂盒。本产品优化了实验反应体系和建库流程，与传统的 ChIP-Seq 相比，具有实验成功率高、抗体兼容性强、实验周期短、操作简单、信噪比高等优势，尤其适用于早期胚胎发育、干细胞、肿瘤发生等表观遗传学研究领域。

CUT&RUN 是一种研究蛋白质-DNA 相互作用的新方法，使用 Protein A/G 融合的 MNase 核酸酶，在抗体引导下精准靶向定位到目的蛋白，并在目的位点附近进行 DNA 的片段化切割，提取后的 DNA 可直接用于 DNA 文库构建，经测序后即可获得靶标位点的 DNA 信息。

本产品的反应体系经过了精心优化，实验中所有试剂请使用本产品中提供的，不建议改变任何反应组分或用其他的等效产品替换本产品中组分，以免获得不好的实验结果。如需替换，请先进行验证。

➤ 产品组分

Package 2-1 组分如下 (4°C 保存) :

组分名称	AG12562 (4 rxns)	AG12561 (12 rxns)
ConA Beads Pro	20 μ l	60 μ l
DNA Clean Beads	470 μ l	1.5 ml
10% SDS	8 μ l	24 μ l

Package 2-2 组分如下 (-20°C 保存) :

组分名称	AG12562 (4 rxns)	AG12561 (12 rxns)
Lysis Buffer	400 μ l	1.2 ml
10X ConA Binding Buffer	100 μ l	300 μ l
10X Wash Buffer	700 μ l	1 ml X 2 pcs
5% Digitonin Solution	8 μ l	24 μ l
10X Dig-300 Buffer	220 μ l	660 μ l
BE Buffer	14 μ l	42 μ l
pAG-Mnase	4 μ l	12 μ l
CaCl ₂ Solution	8 μ l	24 μ l
Stop Buffer	6 μ l	18 μ l
Proteinase K (20 mg / ml)	4 μ l	12 μ l

➤ 保存及运输

保存温度：Package 2-1 4°C保存（避免冻结）

Package 2-2 -20°C保存

运输温度：Package 2-1 冰袋运输

Package 2-2 干冰或者-20°C 冰袋运输

➤ 实验原理及流程

首先利用刀豆蛋白磁珠（ConA Beads Pro）将细胞固定在磁珠表面（刀豆蛋白能够识别细胞膜或细胞核膜表面的糖蛋白），然后利用洋地黄皂苷（5% Digitonin Solution）使细胞透化，经孵育、洗涤后使一抗及 pAG-Mnase 结合在靶标位点，加入 Ca^{2+} 激活 pAG-Mnase 酶活性，使靶标 DNA 被片段化，最后经过 DNA 提取获得目的 DNA。搭配 DNA 建库试剂盒构建测序文库，经测序可获得靶标位点的 DNA 信息。原理过程如下图 1 所示。

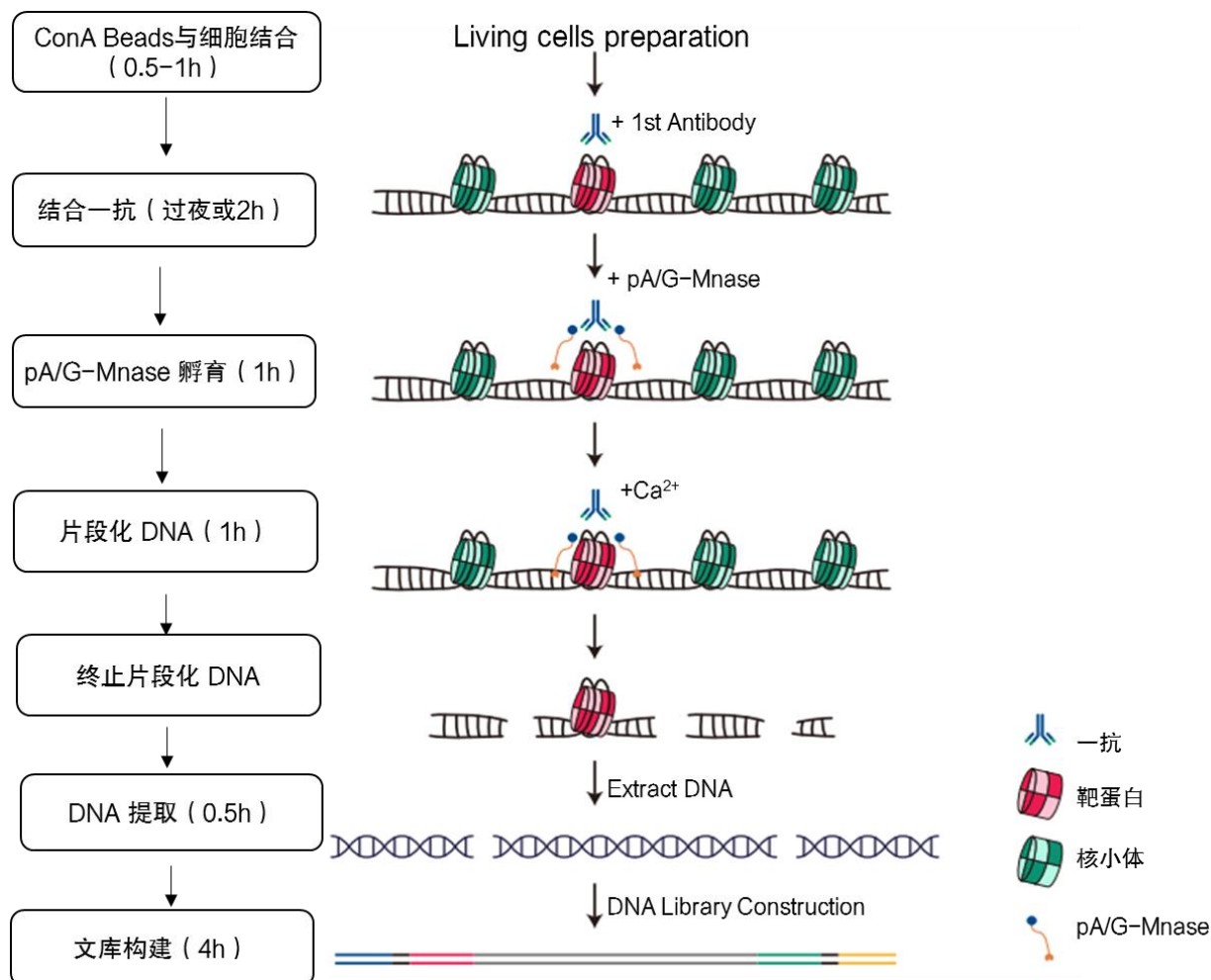


图 1：文库构建原理

➤ 产品优势

1. 适用于 Illumina 测序平台：整合了 Index 和 Illumina 接头，构建的 DNA 文库可直接进行 NGS 测序。
2. 兼容性高：可从 $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞起始量进行实验。
3. 信噪比高：背景噪声信号低，实验重复性好。
4. 操作简单：全程磁珠提取纯化，操作简单迅速。
5. pAG-Mnase 性能强：pAG 结构域对兔、鼠等多种来源的抗体具有广谱的亲合性，靶向精准；优化的 Mnase 酶能够高效、准确切割靶 DNA。
6. 测序质量高：优化的 PCR 扩增体系，测序数据质量高。

➤ 使用注意事项

1. 防污染要求

- ❖ 实验过程中，要穿实验服、戴一次性的口罩和手套防止污染。
- ❖ 本产品中的试剂，应保存在无核酸酶和核酸污染的环境中，避免试剂被污染。
- ❖ 要避免与其他实验的交叉污染。建议将实验区分区：试剂配制区（建议设置无菌正向气流）、模板添加区、PCR 扩增区、产物纯化区和电泳检测区。
- ❖ 实验过程中要避免讲话，每次实验前后使用 70% 酒精擦拭清洁实验台面。实验过程中小心轻柔地打开和关闭样品管盖，避免样品飞溅或喷洒。若样品飞溅至手套，建议更换手套；若喷洒至桌面，立即用水或 70% 的酒精擦拭。
- ❖ 每次实验，建议设置阴性对照（不加细胞）实验，确认实验是否有污染。

2. 细胞的选择

- ❖ 本产品适用于哺乳动物细胞。实验前需要确认细胞活力，死亡的细胞染色质松散，蛋白质与 DNA 结合的状态会发生改变，甚至蛋白质脱落，DNA 会大量的暴露出来，暴露的 DNA 更容易被 MNase 核酸酶随机切割造成较强的背景噪音信号，影响实验结果的判定。建议细胞活力不低于 90%（细胞活性可以用台盼蓝染色来鉴定），实验过程中尽可能轻柔的处理细胞。
- ❖ 本产品适用于 $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^5$ 起始量的细胞，细胞类型不同、抗体选择不同、靶蛋白丰度不同等均会影响实验结果，因此，实验中能兼容的最低细胞用量并不固定，在细胞量充足的情况下，建议使用 $10^4 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞进行实验。
- ❖ CUT&RUN 实验，一般直接使用完整的哺乳动物细胞进行实验，也可以使用细胞核进行实验。如需分离细胞核，本产品中提供了一种适用于常规哺乳动物细胞分离细胞核的裂解液 Lysis Buffer【可参考 < 附录 2：细胞核的制备 > 方法分离细胞核】，对于难裂解的细胞，需要根据样本类型选择合适的裂解细胞分离细胞核的方法。

- ✚ 若是新鲜的哺乳动物细胞，建议直接使用完整的细胞进行实验。
- ✚ 若是冻存的哺乳动物细胞，建议先进行细胞核分离，然后使用细胞核进行实验。
- ✚ 若是植物细胞，建议分离原生质体后，分离细胞核进行实验。

3. 抗体的选择

- ❖ 对于一抗：尽量选择 ChIP 级抗体，最好是经过 ChIP-seq、CUT&RUN 或 CUT&Tag 验证过的抗体，若无针对目的蛋白的 ChIP 级抗体，可以尝试 Immune Fluorescence (IF) 级别的抗体。
- ❖ 在实验过程中应该设置一组阴性对照，通常可设置不加一抗，正常加入 pAG-Mnase 的实验组别，用来判定整个实验过程是否存在非特异性切割。

4. ConA 磁珠

- ❖ ConA 磁珠容易干裂，避免长时间直接暴露在空气中。

5. 细胞处理注意事项

- ❖ 实验过程中涉及多个孵育步骤，可以选择：摇床孵育或静置孵育。
 - 1) 一般建议摇床孵育：水平摇床的孵育转速 100 rpm/min，温和摇晃孵育即可，避免剧烈震荡；如果有液体在管壁，可进行短暂离心。
 - 2) 静置孵育：样品吹散混匀之后，室温静置即可；如果 ConA 磁珠-细胞复合物没有明显的聚团，可采取静置孵育，间隔 30 min 需轻轻混匀一次。
- ❖ 一抗孵育可根据实验安排选择 4°C 静置过夜（不超过 18h）或者转速 100 rpm/min 的水平摇床室温孵育 2-5 h。
- ❖ 经过 Digitonin Solution 透化后的细胞膜较为脆弱，因此在加入该溶液后对细胞的处理应该轻柔，离心选择低转速短暂离心，避免剧烈吹打振荡。同时，Digitonin Solution 容易起气泡，实验过程中应该轻柔吹打混匀，避免产生大量气泡。

6. 提取及纯化磁珠的使用

- ❖ 磁珠使用前应先平衡至室温，否则可能会导致回收率下降。
- ❖ 磁珠使用前应当充分振荡混匀，DNA 样品加入磁珠后应保证与磁珠充分混匀。
- ❖ 吸取上清时，应避免吸到磁珠，而影响文库质量。
- ❖ 80%乙醇应现用现配，避免乙醇浓度降低而影响回收。
- ❖ 磁珠室温干燥时，80%乙醇干燥不充分会影响后续反应，干燥过度又会导致磁珠开裂而降低产物回收率。

7. PCR 循环数的选择

- ❖ 对于 PCR 循环数，原则上在满足上机的前提下，尽量降低扩增循环数，循环数越高，可能会导致背景越强，偏好性越大。
- ❖ 不同的细胞、抗体及 DNA 建库试剂盒对应的循环数均可能不同，需要根据实际情况

摸索循环数。下表是以 293T 和 K562 细胞，使用中高丰度表达的组蛋白（H3K4me3 和 H3K27me3）进行实验，使用 *AccuNext* DNA Library Prep Kit for Illumina（Code No. AG12535 / AG12536）建库试剂盒摸索所得的细胞量与扩增循环数关系表，可参考。

细胞投入量	扩增循环数 (Cycles)
1000	14 ~ 16
10000	11 ~ 13
100000	9 ~ 11
500000	9 ~ 10

➤ 实验前准备

1. 试剂 & 耗材：

- ❖ DNA 建库相关试剂：本产品需要搭配完整的 DNA 建库试剂盒使用。可使用本公司接头法 DNA 建库试剂盒 *AccuNext* DNA Library Prep Kit for Illumina（Code No. AG12535 / AG12536）、*AccuNext* Short Adapter for DNA Library Kit（Illumina）（Code No. AG12537 / AG12538）、*AccuNext* CDI Oligos for DNA Library Kit（Illumina）（Code No. AG12529 / AG12530 / AG12531）或其他等效产品。
- ❖ 蛋白酶抑制剂：Protease Inhibitor Cocktail（Code No. AG21501）或其他等效产品。
- ❖ 磁珠纯化：本产品搭配的 DNA Clean Beads 仅用于 DNA 提取步骤，DNA 建库所需磁珠需要单独准备，如 *MagSpherix* DNA 磁珠（Code No. AG12546 / AG12547 / AG12548）或其他等效产品。
- ❖ DNA 评价：Agilent DNA 1000 Kit（Agilent, Code No. 5067-1054）及 *AcuQ* 1X dsDNA（高灵敏度）定量试剂盒（Code No. AG12549 / AG12550）或其他等效产品。
- ❖ 实验所需要的一抗。
- ❖ 其他材料：80%乙醇，RNase free water，0.2 ml RNase-free PCR 管，1.5 ml 离心管等。

2. 仪器：

- ❖ PCR 仪、Qubit 荧光计、Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer、移液器、涡旋振荡仪、小型桌面离心机、光学显微镜。

➤ 操作方法

A. 试剂配制

- ✚ 此处按照单个反应计算，根据实际情况进行等比例配制。

试剂准备：请提前将 10X Wash Buffer、5% Digitonin Solution、BE Buffer、ConA Beads Pro、10X ConA Binding Buffer 和 Protease Inhibitor Cocktail 取出，室温融化并混匀后备用；

- 1X Wash Buffer 配制：**按照下表配制，轻柔涡旋混匀，短暂离心，放冰上静置备用。（1X Wash Buffer 除洗涤稀释细胞外，1 个反应需要使用 50 μ l；细胞的洗涤与稀释，处理一管细胞需要 1~2 ml；因此每次试剂所需量=50 μ l X 样本数+2 ml X 细胞管数）。

组分	反应体系
10X Wash Buffer	10 μ l
Protease Inhibitor Cocktail	1 μ l
RNase free water	89 μ l
Total	100 μ l

- 1X ConA Binding Buffer 配制：**按照下表配制，轻柔涡旋混匀，短暂离心，放冰上静置备用。

组分	反应体系
10X ConA Binding Buffer	25 μ l
RNase free water	225 μ l
Total	250 μ l

- Primary Antibody Buffer 配制：**按照下表配制，轻柔涡旋混匀，短暂离心，放冰上静置备用。

组分	反应体系
1X Wash Buffer	46 μ l
BE Buffer	3.5 μ l
5% Digitonin Solution	0.5 μ l
Total	50 μ l

B. ConA 磁珠活化

- 从 4 $^{\circ}$ C 取出 ConA Beads Pro，使用移液器充分混匀重悬，使磁珠分布均匀，无结块；吸取 5 μ l ConA Beads Pro 置于 PCR 管中，放置在磁力架上，使磁珠与上清液分离（约 2 min），弃上清。
- 从磁力架上取下 PCR 管，加入 100 μ l 1X ConA Binding Buffer，轻柔吹打混匀。
- 将 PCR 管置于磁力架上，待溶液澄清后（约 2 min），弃上清。
- 重复步骤 2~3）一次。
- 从磁力架上取下 PCR 管，加入 10 μ l 1X ConA Binding Buffer 重悬 ConA Beads Pro，吹打混匀，室温放置备用。

(注意：以上是单个样本的操作方法，如果准备多个样本的磁珠，可将所需的磁珠在一管操作。)

C. 细胞准备

✚ 一般推荐使用培养的完整哺乳动物细胞进行实验，如需要分离细胞核，可参考<附录 2: 细胞核的制备> 方法分离细胞核。首次使用推荐使用 10^5 个细胞进行实验。

✚ 以下是按照单样本的操作方法，如相同细胞的多个样本同时操作，可合管操作。

1. 室温收集细胞并计数，取所需的细胞量于新的 1.5 ml 离心管中。
2. 室温 2500 rpm (600 x g) 离心 5 min，小心去除上清。
3. 取 1 ml 1X Wash Buffer 加入装有细胞的离心管中，轻柔吹打混匀。
(注意：如果是多个样本合管操作，可不增加 1X Wash Buffer 用量。)

4. 室温 2500 rpm (600 x g) 离心 5 min，小心去除上清。
5. 加入 90 μ l 1X Wash Buffer，轻柔吹打混匀，重悬细胞。
(注意：如果是多个样本合管操作，需要按比例增加 1X Wash Buffer 用量，使每 90 μ l 溶液中含有所需的细胞量。)

D. ConA 磁珠-细胞结合

1. 取 90 μ l 细胞样本加入至活化的 10 μ l ConA Beads Pro 中，轻柔吹打混匀。
2. 在水平摇床上室温孵育 10 min，转速 100 rpm/min【注：若进行静置孵育，则需要每隔 3 min 进行颠倒混匀。在孵育过程中，可参照步骤 <E. 一抗孵育> 稀释一抗放冰上备用】。

E. 一抗孵育

1. 用 Primary Antibody Buffer 稀释一抗，轻柔吹打混匀后，放在冰上备用。

组分	反应体系
Primary Antibody Buffer	50 μ l
一抗	0.5 μ l
Total	50.5 μ l

*a: 一抗的推荐加入量 0.5~1 μ g，请参照抗体说明书推荐的使用浓度加入一抗的量。大部分市售的一抗可按照 1 : 50 ~ 1 : 100 比例稀释，一般常见组蛋白修饰一抗可按照 1 : 100 稀释，转录因子等一抗按照 1 : 50 进行稀释。

2. 将孵育结束的 ConA 磁珠-细胞复合物轻柔吹打混匀，短暂离心将溶液收集至管底。
3. 将 PCR 管置于磁力架上静置 2 min，待磁珠与液体完全分离后，小心去除上清。
4. 从磁力架上取下 PCR 管，加入 50 μ l 稀释好的预冷的一抗，轻柔吹打混匀，置于摇床室温孵育 2~5 h，100 rpm/min 或者 4 $^{\circ}$ C 静置，过夜孵育(不超过 18 h)。

注：长时间的静置孵育，磁珠-细胞复合物容易沉底，不利于磁力架吸附，所以进行下一步操作前需轻柔吹打混匀 ConA 磁珠-细胞复合物。

F. pAG-Mnase 结合与洗涤

1. **1X Dig-300 Buffer 配制**：按照下表格配制，轻柔涡旋混匀，短暂离心，放冰上静置备用。

组分	反应体系
10X Dig-300 Buffer	55 μ l
5% Digitonin Solution	1.1 μ l
Protease Inhibitor Cocktail	5.5 μ l
RNase free water	488.4 μ l
Total	550 μ l

2. 用 1X Dig-300 Buffer 稀释 pAG-Mnase，用移液器轻柔吹打混匀后，冰上放置备用。

组分	反应体系
1X Dig-300 Buffer	99 μ l
pAG-Mnase	1 μ l
Total	100 μ l

3. 将一抗孵育完成的 ConA 磁珠-细胞复合物轻柔吹打混匀，短暂离心将溶液收集至管底。

4. 将 PCR 管置于磁力架上静置 2 min，待磁珠与液体完全分离后，小心去除上清。

5. 从磁力架上取下 PCR 管，加入 100 μ l 预冷的稀释后的 pAG-Mnase，轻柔吹打混匀，短暂离心将溶液收集至管底，置于摇床 100 rpm/min，4°C 孵育 1 h。

【注意：在此步骤可配制 < G. 片段化 > 步骤的 Tagmentation Buffer。】

6. 将 pAG-Mnase 孵育完成的 ConA 磁珠-细胞复合物轻柔吹打混匀，短暂离心将溶液收集至管底，置于磁力架上 2 min，待磁珠与液体完全分离后，小心去除上清。

7. 加入 200 μ l 的 1X Dig-300 Buffer，重悬 ConA 磁珠-细胞复合物，轻柔吹打混匀，室温孵育 3 min。

8. 将 PCR 管置于磁力架上 2 min，待磁珠与液体完全分离后，小心去除上清。

9. 重复步骤 7) 一次。

【注意：在 < G. 片段化 > 步骤的 Tagmentation Buffer 配好之前，不要去除上清。】

G. 片段化

1. **Tagmentation Buffer 配制**：按照下表格配制，轻柔涡旋混匀，短暂离心，放冰上静置备用。


组分	反应体系
1X Dig-300 Buffer	38 μ l
CaCl ₂ Solution	2 μ l
Total	40 μ l

- 将 pAG-Mnase 孵育完成的 ConA 磁珠-细胞复合物轻柔吹打混匀，短暂离心将溶液收集至管底。
- 将 PCR 管置于磁力架上静置 2 min，待磁珠与液体完全分离后，小心去除上清。
- 从磁力架上取下 PCR 管，加入 40 μ l 预冷的 **Tagmentation Buffer**，轻柔吹打混匀，短暂离心，将 PCR 管置于冰上反应 1 h（每隔 20 min 进行颠倒混匀）。
- Stop Reaction Buffer 配制**：按照下表配制，轻柔涡旋混匀，短暂离心，放冰上静置备用。

组分	反应体系
Stop Buffer	1.5 μ l
10% SDS	2 μ l
Proteinase K (20 mg / ml)	1 μ l
RNase free water	5.5 μ l
Total	10 μ l

- 待片段化结束后，用移液器轻柔吹打混匀，短暂离心，加入 10 μ l Stop Reaction Buffer 至 PCR 管中，轻柔吹打混匀，短暂离心。
- 按照以下程序在 PCR 仪中进行片段化终止反应。

程序	时间
37°C	30 min
4°C	Hold

 安全暂停点：样本可在 -20°C 保存过夜。

H. DNA 提取

实验前准备：

- 每次实验前，可根据实验量，配制新鲜的 80%乙醇溶液，每个样品需要 400 μ l。
- 实验前，将磁珠恢复至室温（15 ~ 25°C）（放置约 30 min），使用前将磁珠充分涡旋振荡混匀约 5 min。

操作步骤：

- 将 50 μ l 终止片段化的样品短暂离心，加入 27.5 μ l DNA Clean Beads（磁珠：样品 = 0.55 : 1），涡旋混匀 5 ~ 10 sec 或使用移液器轻柔吸打混匀 10 次，充分混匀后，短暂离心，室温静置孵育 5 min。
- 将 PCR 管置于磁力架上分离磁珠和液体，待溶液澄清后（约 2 ~ 5 min），小心吸取上清至新的 PCR 管中（勿吸到磁珠）。

3. 向上清液中加入 90 μ l DNA Clean Beads (磁珠 : DNA=1.8 : 1), 涡旋混匀或移液器吹打混匀 10 次, 室温静置 5 min。
4. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中, 待溶液澄清后 (约 2 ~ 5 min), 小心移除上清 (勿吸到磁珠)。
5. 保持 PCR 管始终处于磁力架中, 加入 200 μ l 80%乙醇溶液, 室温孵育 30 sec, 小心移除上清。
6. 重复步骤 5) 一次。
7. 保持 PCR 管始终置于磁力架上, 开盖干燥磁珠 3 ~ 5 min 至无乙醇残留。
✦ 无乙醇残留时, 磁珠表面无光泽; 如果乙醇未干燥完全, 可能会影响 DNA 的洗脱效率及影响下游实验。但注意不要过分干燥磁珠, 避免磁珠表面开裂, 降低 DNA 洗脱效率。
8. 磁珠晾干后, 将 PCR 管从磁力架上取下, 加入 21 μ l Nuclease free water 覆盖磁珠, 使用移液器吹打混匀磁珠, 室温孵育 5 min (如果磁珠干燥开裂, 适当延长孵育时间)。
9. 将 PCR 管短暂离心, 置于磁力架上分离磁珠和液体, 直到溶液澄清 (约 2 ~ 5 min)。
10. 小心吸取 20 μ l 上清至新的 PCR 管中 (勿吸到磁珠), 可直接进行后续的文库构建, 或 -20°C 保存 (建议尽快进行文库扩增, 避免长期保存导致 DNA 降解)。
⊘ 安全暂停点: 样本可在 -20°C 保存过夜。

I. DNA 文库构建

以本公司接头法 DNA 建库试剂盒 *AccuNext* DNA Library Prep Kit for Illumina (Code No. AG12535 / AG12536) 为例, 对提取获得的 DNA 进行文库构建。如果使用其他 DNA 建库产品, 需要先摸索条件。

(一) 末端修复 / dA 尾添加

- ✦ 将此步骤所用的试剂在冰上融化。融化后, 短暂离心, 混匀后放置在冰上备用。其中 End Repair Enzyme Mix 用移液器轻柔吹打混匀, 请勿涡旋。其余试剂可轻柔涡旋混匀。
 - ✦ 10X End Repair Buffer 可能会形成沉淀, 使用前请振荡混匀使沉淀充分溶解。
1. 在冰上配制末端修复 / dA 尾添加反应液:

组分	反应体系
10X End Repair Buffer	6 μ l
End Repair Enzyme Mix	2 μ l
上述片段化 DNA ^{*a}	15 ~ 20 μ l
Nuclease free water	up to 60 μ l

*a: 推荐 DNA 加入量是 15 ~ 20 μ l, 如果细胞量在 50000~500000 范围内,

<H.DNA 提取>后可取 5 μl 样本进行琼脂糖凝胶电泳, 判定前面实验是否成功 (此步骤非必需, 且细胞量较少时, 可能看不到电泳条带)。

- 使用移液器轻柔吹打混匀, 短暂离心, 立即放入 PCR 仪中进行反应。反应程序如下 (可提前设置反应程序):

温度	时间
20°C	30 min
65°C	30 min
4°C	Hold

(二) 接头连接

- ✚ 将此步骤所需用的试剂在冰上融化, 短暂离心, 用移液器轻柔吹打混匀 (不建议用涡旋振荡), 离心后放置于冰上备用。
- ✚ 根据投入的细胞量, 提前将 Adapter 稀释至合适的浓度备用。

- 按下表在冰上配制接头连接反应体系:

组分	体积
上述 DNA 末端修复 / dA 尾添加产物	60 μl
Ligation Buffer	25 μl
T4 DNA Ligase (350 U / μl)	1 μl
Adapter ^{*a}	5 μl
Nuclease free water	up to 100 μl

} ^{*b}

*a: 使用 *AccuNext* Short Adapter for DNA Library Kit (Illumina) (Code No. AG12537 / AG12538), 不同细胞量按照下表稀释 Adapter, 然后每个反应加入 5 μl。

细胞投入量	稀释倍数 (Adapter : RNase free Water)
1000	2 : 18
10000	2 : 18
100000	3 : 7
500000	3 : 7

*b: 将这 4 个组分先配制成预混液 (在末端修复产物加入前, 添加 Adapter, 避免接头自连) 轻柔混匀后, 取 40 μl 预混液加入至上述 <(一). 末端修复 / dA 尾添加 > 反应液中, 用移液器轻柔混匀并离心。

- 使用移液器轻柔吹打混匀, 短暂离心, 立即放入 PCR 仪中进行反应, 反应程序如下 (可提前设置反应程序):

温度	时间
16°C	30 min
4°C	Hold

- ⊘ 安全暂停点：样本可在 -20°C 保存过夜（为避免 DNA 降解，建议尽快进行后续纯化步骤）。

(三) 连接产物纯化

使用磁珠纯化 DNA 产物，推荐使用 1.0 X（磁珠：DNA=1：1）*MagSpherix* DNA Beads（Code No. AG12546 / AG12547 / AG12548）进行纯化，步骤如下：

（如使用其他磁珠，建议摸索合适的磁珠比例。）

实验前准备：

- ✚ 每次实验前，可根据实验量，配制新鲜的 80%乙醇溶液，每个样品需要 $400\ \mu\text{l}$ 。
- ✚ 实验前，将磁珠恢复至室温（ $15\sim 25^{\circ}\text{C}$ ）（放置约 30 min），使用前将磁珠充分涡旋振荡混匀约 5 min。

操作步骤：

1. 添加 $100\ \mu\text{l}$ 已恢复至室温的磁珠至上述 $100\ \mu\text{l}$ DNA 产物中（磁珠体积：样品体积 = 1：1），涡旋混匀 5 ~ 10 sec 或使用移液器轻柔吸打混匀 10 次，充分混匀后，短暂离心。室温孵育 5 min。
2. 将 PCR 管置于磁力架上分离磁珠和液体，待溶液澄清后（约 2~5 min），小心移除上清（勿吸到磁珠）。
3. 保持 PCR 管始终处在磁力架上，加入 $200\ \mu\text{l}$ 80%乙醇溶液，室温孵育 30 sec，小心移除上清。
4. 重复步骤 3）一次。
5. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，开盖干燥磁珠 3 ~ 5 min 至无乙醇残留。
 - ✚ 无乙醇溶液残留时，磁珠表面无光泽；如果乙醇溶液未干燥完全，可能会影响 DNA 的洗脱效率及影响下游实验。但注意不要过分干燥磁珠，避免磁珠表面开裂，降低 DNA 洗脱效率。
6. 磁珠晾干后，将 PCR 管从磁力架上取下，加入 $21\ \mu\text{l}$ Nuclease free water 覆盖磁珠，使用移液器吹打混匀磁珠，室温孵育 5 min（如果磁珠干燥开裂，适当延长孵育时间）。
7. 将 PCR 管短暂离心，置于磁力架上，分离磁珠和液体直到溶液澄清（约 2 ~ 5 min）。
8. 小心吸取 $20\ \mu\text{l}$ 上清转移到新的 PCR 管中（勿吸到磁珠），直接进行步骤 < (四) PCR 文库扩增 > 或 -20°C 保存。

(四) PCR 文库扩增

- 将此步骤所需用的试剂在冰上融化，融化后短暂离心，用移液器轻柔吹打混匀，离心后放置于冰上备用。

- 按下表在冰上配制 PCR 反应体系：

组分	体积
上述纯化的 DNA 产物	20 μ l
2X <i>AccuNext</i> PCR Mix III	25 μ l
i5 index Primer ^{*a}	2.5 μ l
i7 index Primer ^{*a}	2.5 μ l
Total	50 μ l

*a: i5 / i7 index Primer 可使用 *AccuNext* CDI Oligos for DNA Library Kit (Illumina) (Code No. AG12529 / AG12530 / AG12531) 或其他等效产品。

- 使用移液器轻柔吹打混匀，短暂离心，立即放入 PCR 仪中进行反应，反应程序如下（可提前设置反应程序）：

温度	时间	循环数
95°C	1 min	1
98°C	10 sec	X ^a
63°C	30 sec	
72°C	2 min	1
4°C	Hold	-

*a: 下表为推荐的文库扩增循环数，实验前建议对循环数进行摸索，在满足文库产量的前提下，尽量选用少的循环数，确保得到高质量文库。

细胞投入量	扩增循环数 (Cycles)
1000	14 ~ 16
10000	11 ~ 13
100000	9 ~ 11
500000	9 ~ 10

- 反应结束后可立即进行后续纯化步骤，也可将扩增产物-20°C过夜保存或-80°C保存一个月（为避免 DNA 降解，建议尽快进行纯化步骤）。

(五) 文库纯化

使用磁珠纯化 DNA 产物，推荐使用 1.0 X (磁珠 : DNA=1 : 1) *MagSpherix* DNA Beads (Code No. AG12546 / AG12547 / AG12548) 进行纯化，步骤如下（如使用其他磁珠，建议摸索合适的磁珠比例）。

实验前准备：

- 每次实验前，可根据实验量，配制新鲜的 80%乙醇溶液，每个样品需要 400 μ l。

- ✦ 实验前，将磁珠恢复至室温（15 ~ 25°C）（放置约 30 min），使用前将磁珠充分涡旋振荡混匀约 5 min。

操作步骤：

1. 将 PCR 扩增产物短暂离心，加入 50 μ l DNA Clean Beads 磁珠至 50 μ l 的 PCR 扩增产物中（磁珠：DNA=1：1），涡旋混匀 5 ~ 10 sec 或使用移液器轻柔吸打混匀 10 次，充分混匀后，短暂离心，室温静置孵育 5 min。
2. 将 PCR 管置于磁力架上分离磁珠和液体，待溶液澄清后（约 2~5 min），小心移除上清（勿吸到磁珠）。
3. 保持 PCR 管始终在磁力架上，加入 200 μ l 80%乙醇，室温孵育 30 sec，小心移除上清。
4. 重复步骤 3）一次。
5. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，开盖干燥磁珠 3 ~ 5 min 至无乙醇残留。
 - ✦ 无乙醇残留时，磁珠表面无光泽；如果乙醇未干燥完全，可能会影响 DNA 的洗脱效率及影响下游实验。但注意不要过分干燥磁珠，避免磁珠表面开裂，降低 DNA 洗脱效率。
6. 磁珠晾干后，将 PCR 管从磁力架上取下，加入 21 μ l Nuclease free water 覆盖磁珠，使用移液器吹打混匀磁珠，室温孵育 5 min（如果磁珠干燥开裂，适当延长孵育时间）。
7. 将 PCR 管短暂离心，置于磁力架上，分离磁珠和液体直到溶液澄清（约 2 ~ 5 min）。
8. 小心吸取 20 μ l 上清转移到新的 PCR 管中（勿吸到磁珠），-20°C 保存。

J. 文库质量检测

1. 取 2 μ l 纯化后的文库，使用 Qubit 荧光计和 *AcuQ* 1X dsDNA（高灵敏度）定量试剂盒（Code No. AG12549 / AG12550）检测文库浓度。具体操作请参照说明书。
2. 取 1 μ l 纯化后的文库，使用 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 和 Agilent DNA 1000 Kit（Agilent, Code No. 5067-1054）检测文库的分布范围。具体操作请参照说明书。
3. 成功的实验反应，会产生浓度大于 10 ng / μ l 的文库产物，片段大小分布在 200 ~ 1000 bp 范围内，产物可直接用于 Illumina 平台测序。
 - 1) 组蛋白修饰的文库通常为核小体周期性的 ladder 状条带分布，转录因子的核小体周期性的 ladder 状条带不明显，文库的产量和核小体的周期性分布会因为不同的靶蛋白而有差异。
 - 2) 对于二代测序获得的数据，可通过生信分析，在 IGV（Integrative Genomics Viewer）软件上直观获得信号分布位置和信号强度。

实验例

1. 使用本产品对 K562 Cells 进行文库构建，细胞量是 10^4 个，扩增循环数是 13，使用 H3K27me3 抗体，对文库进行 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测，结果文库峰型呈现典型的 Ladder 状分布，如下图所示：

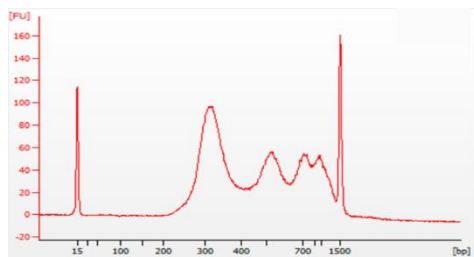


图 2: Agilent 2100 Bioanalyzer 文库长度检测

2. 使用本产品对不同的细胞量 (1×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 Cells) K562 Cells 进行文库构建，使用 H3K27me3 抗体，结果显示不同细胞量均可获得较好的测序数据，TSS 富集以及 IGV 视图信噪比高，对目的基因位点有明显富集，如下图所示：

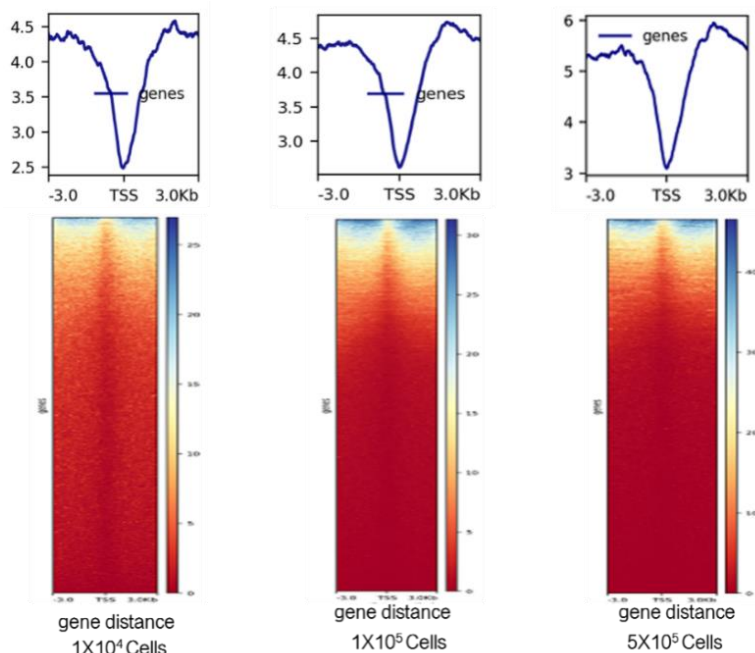


图 3: TSS 富集图

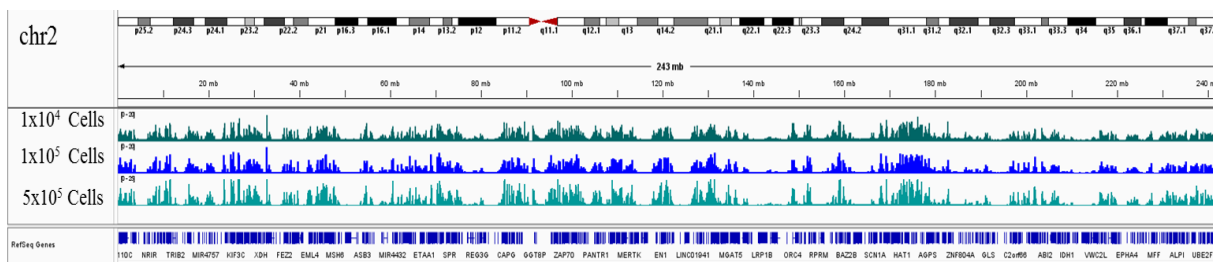


图 4: chr2 IGV 全局视图

► 产品注意事项

1. CUT & RUN 适用范围

- ❖ 与 ChIP-seq 相同，CUT&RUN 主要用于全基因组范围内的 DNA-蛋白质结合位点分析和组蛋白修饰研究，包括存在于异染色质区域的蛋白，如存在于染色质压缩缠绕区的 H3K27me3。当用于研究转录因子时，转录因子的丰度较低会导致其文库产量也相比组蛋白修饰研究的水库产量低，但同样可以获得好的测序及数据分析结果。

2. ConA Beads Pro 结合细胞的原理

- ❖ ConA Beads Pro 表面的刀豆蛋白可以结合细胞膜和细胞核膜表面的糖蛋白，从而固定细胞，防止在后续实验过程中细胞被洗掉。

3. DNA 提取

- ❖ DNA 提取时尽可能将所有被切割的 DNA 回收且去除基因组 DNA 的残留，所以推荐按照磁珠分选的方法进行实验。不建议使用乙醇沉淀法进行 DNA 提取，因为乙醇沉淀法提取的 DNA 操作过于繁琐，耗时长且无法去除基因组 DNA、容易丢失小片段。

4. PCR 扩增循环数及引物选择

- ❖ 选择最佳的循环数，确保仍然在扩增的指数期。在水库产量足够的前提下循环数越少越好。
- ❖ 扩增循环数过高，可能会因为 PCR 扩增的偏好性导致文库质量下降。
- ❖ 扩增循环数过低，会导致文库产量不足，影响后续的测序结果。
- ❖ 可参考本说明书推荐的循环数进行实验，若文库产量不足，可增加 2~3 个 PCR 循环进行测试。

5. CUT & RUN 的水库分布范围

- ❖ 本产品可做组蛋白修饰、转录因子等，对于组蛋白修饰来说，因为有核小体的阻隔，文库偏长，目前生信分析时普遍选用 20~700 bp 的 insert 片段，加上两端的测序引物序列约 140 bp，文库片段区间为 160~840 bp；转录因子的文库片段偏短，生信分析时可以侧重 20~550 bp 的 insert 片段；对于大型的复合蛋白，因空间位阻的存在，可能会存在更大片段；故文库片段的大小跟靶蛋白的特性相关。

6. 二代测序与数据分析

- ❖ 一般推荐双端测序 (2×50 bp、2×100 bp、2×150 bp 均可)，数据量 3~20 M reads (1~6 G 数据量)，可根据物种基因组大小调整。例如人源细胞常规的组蛋白修饰，选择双端测序 2×150 bp，3~5 M reads 就能得到高分辨率的全基因组图谱。细胞数量偏少或靶蛋白丰度较低时，可适当提高测序数据量。
- ❖ CUT&RUN 贡献信息的主要为单核小体与无核小体片段，因此建议序列比对时尽量选择小片段，如 <700 bp，在数据量足够时可以只采用 <350 bp 的片段。

- ❖ 使用 Bowtie2 进行序列比对。推荐 Bowtie2 参数: bowtie2 --very-sensitive --no-unal --no-mixed --no-discordant --phred33 -l 10 -X 700 -x [索引] -1 [R1] -2 [R2]。
- ❖ Call peak 时, 由于没有 Input 对照, 且背景低, 推荐使用 MACS2 参数为 callpeak -t [treatment.bam] -f BAMPE -g [有效基因组大小] -p 1e-5 -n [输出前缀] --keep-dup all。同时也推荐专门为低背景设计的程序 SEACR, 可以在 GitHub 上下载 (<https://github.com/FredHutch/SEACR/>), 在线版见 <https://seacr.fredhutch.org>。
- ❖ 获得的 peak 文件可用于后续的基因组注释、Motif 分析、可视化等。可使用 HOMER 软件套件进行分析, 如 annotatePeaks.pl 和 findMotifsGenome.pl 工具。

➤ 附录 1: *AccuNext* CDI Oligos for DNA Library Kit (Illumina) 的信息

用途	品名	AG12529 (12 rxns)	AG12530 (48 rxns)	AG12531 (96 rxns)	管盖颜色
i5 Index Primer (D501-D508)	D501	30 μ l	30 μ l	30 μ l	●
	D502	-	30 μ l	30 μ l	●
	D503	-	30 μ l	30 μ l	●
	D504	-	30 μ l	30 μ l	●
	D505	-	-	30 μ l	●
	D506	-	-	30 μ l	●
	D507	-	-	30 μ l	●
	D508	-	-	30 μ l	●
i7 Index Primer (D701-D712)	D701	5 μ l	10 μ l	20 μ l	●
	D702	5 μ l	10 μ l	20 μ l	●
	D703	5 μ l	10 μ l	20 μ l	●
	D704	5 μ l	10 μ l	20 μ l	●
	D705	5 μ l	10 μ l	20 μ l	●
	D706	5 μ l	10 μ l	20 μ l	●
	D707	5 μ l	10 μ l	20 μ l	●
	D708	5 μ l	10 μ l	20 μ l	●
	D709	5 μ l	10 μ l	20 μ l	●
	D710	5 μ l	10 μ l	20 μ l	●
	D711	5 μ l	10 μ l	20 μ l	●
	D712	5 μ l	10 μ l	20 μ l	●

AccuNext CDI Oligos for DNA Library Kit (Illumina)序列信息如下:
i5 Index Primer for Illumina

5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5 Index] ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT- 3'

i7 Index Primer for Illumina

5' -CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT [i7 Index] GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT- 3'

[i5 Index] 表示 8 bp 的 i5 Index 序列, [i7 Index] 表示 8 bp 的 i7 Index 序列。

组分		引物 Index 序列	Sample Sheet 输入 / 测序时 Index 序列	
			NovaSeq 6000 v1.0 reagents, MiSeq, HiSeq 2000 / 2500	NovaSeq 6000 v1.5 reagents, MiniSeq, NextSeq, HiSeq 3000 / 4000
i5 index Primers	D501	TATAGCCT	TATAGCCT	AGGCTATA
	D502	ATAGAGGC	ATAGAGGC	GCCTCTAT
	D503	CCTATCCT	CCTATCCT	AGGATAGG
	D504	GGCTCTGA	GGCTCTGA	TCAGAGCC
	D505	AGGCGAAG	AGGCGAAG	CTTCGCCT
	D506	TAATCTTA	TAATCTTA	TAAGATTA
	D507	CAGGACGT	CAGGACGT	ACGTCCTG
	D508	GTA CTGAC	GTA CTGAC	GTCAGTAC
i7 index Primers	D701	CGAGTAAT	ATTACTCG	
	D702	TCTCCGGA	TCCGGAGA	
	D703	AATGAGCG	CGCTCATT	
	D704	GGAATCTC	GAGATTCC	
	D705	TTCTGAAT	ATTCAGAA	
	D706	ACGAATTC	GAATTCGT	
	D707	AGCTTCAG	CTGAAGCT	
	D708	GCGCATT A	TAATGCGC	
	D709	CATAGCCG	CGGCTATG	
	D710	TTCGCGGA	TCCGCGAA	
	D711	GCGCGAGA	TCTCGCGC	
	D712	CTATCGCT	AGCGATAG	

➤ 附录 2：细胞核的制备

1. 在室温下收集细胞，使用对应的培养基清洗细胞一次，进行细胞计数。
2. 取实验所需数量的细胞于 1.5 ml 离心管中，2500 rpm (600 x g) 室温离心 5 min，弃上清。（注意：细胞量较少时，可能看不到细胞沉淀，为避免弃上清时吸到细胞，离心前可以在离心管底部做标记，吸上清时，沿着管壁，在沉淀的反方向吸取，并保留少量液体。）
3. 每个样本加入 100 μ l Lysis Buffer (可选择加入 0.2 μ l 的 5% Digitonin Solution) ，轻弹管壁混匀，冰上放置 5 min。
4. 2500 rpm (600 x g) 室温离心 5 min，弃上清（注意不要吸到细胞核）。
5. 加入 90 μ l 1X Wash Buffer 重悬细胞核，轻弹管壁混匀后加入至活化的 ConA Beads Pro 中【活化步骤见 <B. ConA 磁珠活化 >】。
6. 水平摇床室温孵育 10 min，转速 100 rpm/min。
7. 按照步骤 <E. 一抗孵育 > 进行实验。