

G4-CUT&Tag 试剂盒

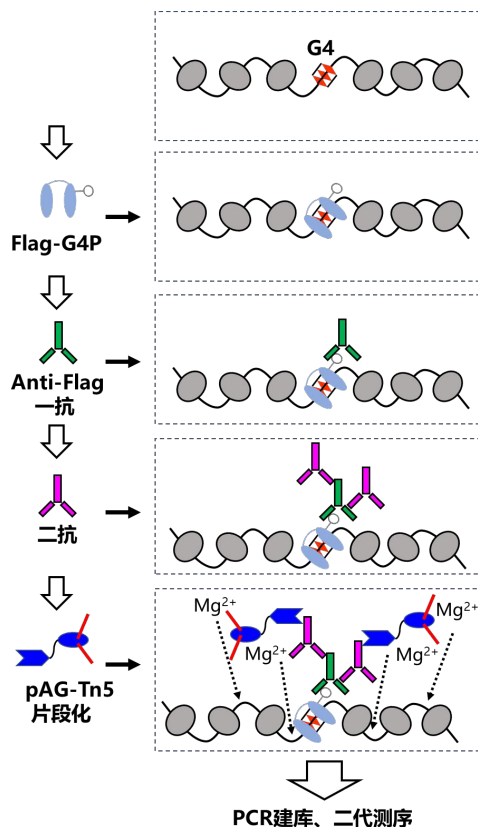
目录号: GCT-01

G-四链体 (G-quadruplex, G4) 是染色质 DNA 上一种重要的核酸二级结构, 参与 DNA 复制起始、基因转录调控等事件。

G4P 是一种高亲和力、高特异性结合 G4 结构的人工蛋白。其包含了两段来自天然 G4 解旋酶 G4 结合结构域, 可以像发夹一样结合 G4 的两个末端 G 平面。G4P 的 C 末端有一段 3*FLAG 标签, 可以被 Anti-FLAG 的抗体特异性识别。

本试剂盒在 CUT&Tag 的基础上引入了 G4P, 用于细胞水平上检测染色质 DNA 上的 G4。G4-CUT&Tag 实验条件温和, 无需甲醛固定, 最大程度维持细胞内天然 G4 结构, 数据信噪比高; 试剂盒操作简单, 无需超声片段化, 也无需传统的末端修复和接头连接反应; 时间短, 重复性好。推荐初始细胞量 1 万到 10 万。

G4-CUT&Tag 实验原理图如右图所示:



本试剂盒组成

组分 A, -20°C 储存

名称	体积
10×ConA buffer	400 μL
10×Wash buffer	1.8 mL×5
2×HG Library Mix	1 mL
2×qPCR Mix	1 mL
pAG-Tn5+ME (100×)	15 μL
5% Digitonin (100×)	800 μL
Goat anti-Mouse 二抗 (100×)	15 μL
Goat anti-Rabbit 二抗 (100×)	15 μL
G4P (50 μM) 非卖品, 赠送	15 μL
Protease Inhibitor Cocktail (100×)	800 μL
BSA (50×)	200 μL
0.5 M EDTA	100 μL
1M MgCl ₂	20 μL
蛋白酶 K, 20 mg/mL	15 μL
TE buffer	800 μL

组分 B: 引物组合 1, -20°C 储存

(GCT-01 仅配引物组合 1 或者 2, 随机配套)

名称	体积	Index 序列 (Nova V1.0)
N501 Primer	30 μL	TAGATCGC
N502 Primer	30 μL	CTCTCTAT
N503 Primer	30 μL	TATCCTCT
N504 Primer	30 μL	AGAGTAGA
N505 Primer	30 μL	GTAAGGAG
N506 Primer	30 μL	ACTGCATA
N701 Primer	30 μL	TAAGGCGA
N702 Primer	30 μL	CGTACTAG
N703 Primer	30 μL	AGGCAGAA
N704 Primer	30 μL	TCCTGAGC
N705 Primer	30 μL	GGACTCCT
N706 Primer	30 μL	TAGGCATG

For Research Only

Application Key: WB - Western Blot | IHC - Immunohistochemistry | ICC - Immunocytochemistry | FCM
Flow Cytometry | ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay | IP - Immunoprecipitation

组分 B：引物组合 2，-20℃储存

名称	体积	Index 序列 (Nova V1.0)
N507 Primer	30 μL	AAGGAGTA
N508 Primer	30 μL	CTAAGCCT
N509 Primer	30 μL	TGGAAATC
N510 Primer	30 μL	AACATGAT
N511 Primer	30 μL	TGATGAAA
N512 Primer	30 μL	GTCGGA CT
N707 Primer	30 μL	CTCTCTAC
N708 Primer	30 μL	CAGAGAGG
N709 Primer	30 μL	GCTACGCT
N710 Primer	30 μL	CGAGGCTG
N711 Primer	30 μL	AAGAGGCA
N712 Primer	30 μL	G TAGAGGA

组分 C，4℃储存

ConA beads	65 μL
DNA 纯化磁珠	1.5 mL×2

G4-CUT & Tag 操作说明

1. 缓冲液制备

按照下表顺序和配制后续实验需要的溶液。下表是 1 个样品的溶液用量，如果有多个样品，相应溶液体积需要乘以样品数量。

名称	体积	配制方法
1× ConA 缓冲液	200 μL	取 20 μL ConA buffer (10×) 与 180 μL 超纯水混合
1×细胞悬浮缓冲液	300 μL	取 30 μL Wash buffer (10×) 与 270 μL 超纯水混合，加入 3 μL 蛋白酶抑制剂

1×Dig binding buffer	0.8 mL	取 80 μL Wash buffer (10×) 与 720 μL 超纯水混合，加入 8 μL 蛋白酶抑制剂，8 μL 5% Digitonin，16 μL BSA，3.2 μL 0.5 M EDTA，充分混匀
1×Dig wash buffer	5.5 mL	取 550 μL Wash buffer (10×) 与 4950 μL 超纯水混合，加入 55 μL 蛋白酶抑制剂，55 μL 5% Digitonin 充分混匀
Fragmentation buffer	50 μL	取 50 μL 1×Dig wash buffer，加入 0.5 μL 1M MgCl ₂ ，充分混匀

2. ConA beads 活化

1) 取 5 μL ConA beads 加入到 1.5 mL EP 管底，加入 100 μL 1× ConA 缓冲液到 EP 管中，使用移液器小心吹吸重悬磁珠，放置磁力架上静置 2-3 分钟，吸去上清溶液；

2) 加入 100 μL 1× ConA 缓冲液到 EP 管中，使用移液器小心吹吸重悬磁珠，放置在 EP 管架待用（不要放磁力架上）。

3. 细胞前处理

1) 培养细胞或者分散的组织细胞使用 PBS 洗三遍（300-500 g 离心，吸去上清液，使用 PBS 重悬），取约 1×10^5 - 2×10^5 个细胞每个样，500g 离心 2 分钟，吸去上清液；

2) 使用 1×细胞悬浮缓冲液重悬（每一个样品 100 μL），500g 离心 2 分钟，吸去上清液；

3) 重复上述步骤 1 次；

4) 使用 1×细胞悬浮缓冲液重悬细胞（每一个样品 100 μL），放置在 EP 管架待用。

4. 细胞与 ConA beads 结合

1) 将含有 ConA beads 的 EP 管放置磁力架上静置 2-3 分钟，吸去 95 μL 上清溶液（不用完全吸干净）；

2) 将步骤 3 中的 100 μL 细胞悬液与磁珠混合，使用移液器小心吹吸使磁珠充分悬浮，将 EP 管插入到水平混匀仪或者振荡金属浴，室温结合 10 分钟。

5. G4P 的结合

1) 使用 100 μL 1×Dig binding buffer 稀释 G4P，稀释体积比例一般为 1:100，终浓度 0.5 μM；（待用）

2) 将上一步结合了细胞的磁珠置于磁力架上静置 2 min，待磁珠与液体完全分离后，吸去上清；

3) 加入 100 μL 的 1×Dig binding buffer 重悬磁珠，轻轻吹打混匀后，室温静置 3 min；

4) 将上述磁珠置于磁力架上静置 2 min，待磁珠与液体完全分离后，吸去上清；

5) 加入 100 μL G4P 稀释液重悬磁珠，将磁珠转移到新的 1.5 mL EP 管，室温水平旋转孵育 2h。

6. 一抗的结合

- 1) 使用 100 μ L 1 $\times$ Dig binding buffer 稀释一抗 (anti-Flag), 稀释体积比例一般为 1:50-1:100; (待用)
- 2) 将上述磁珠置于磁力架上静置 2 min, 待磁珠与液体完全分离后, 吸去上清;
- 3) 加入 500 μ L 的 1 $\times$ Dig wash buffer 重悬磁珠, 轻轻吹打混匀后, 室温静置 3 min;
- 4) 将上述磁珠置于磁力架上静置 2 min, 待磁珠与液体完全分离后, 吸去上清;
- 5) 加入 100 μ L 的 1 $\times$ Dig binding buffer 重悬磁珠, 轻轻吹打混匀后, 室温静置 3 min;
- 6) 将上述磁珠置于磁力架上静置 2 min, 待磁珠与液体完全分离后, 吸去上清;
- 7) 加入 100 μ L 抗体稀释液重悬磁珠, 将磁珠转移到新的 1.5 mL EP 管, 室温水平旋转孵育 1h。

7. 二抗的结合

- 1) 使用 100 μ L 1 $\times$ Dig binding buffer 稀释二抗, 稀释体积比例为 1:100; (待用)
- 2) 将上述磁珠置于磁力架上静置 2 min, 待磁珠与液体完全分离后, 吸去上清;
- 3) 加入 100 μ L 的 1 $\times$ Dig binding buffer 重悬磁珠, 轻轻吹打混匀后, 室温静置 3 min;
- 4) 将上述磁珠置于磁力架上静置 2 min, 待磁珠与液体完全分离后, 吸去上清;
- 5) 加入 100 μ L 二抗稀释液重悬磁珠, 将磁珠转移到新的 1.5 mL EP 管, 室温水平旋转孵育 1h。

8. 转座体的结合

- 1) 使用 100 μ L 1 $\times$ Dig binding buffer 稀释 pAG-Tn5+ME, 稀释体积比例为 1:100; (待用)
- 2) 将上述磁珠置于磁力架上静置 2 min, 待磁珠与液体完全分离后, 吸去上清;
- 3) 加入 500 μ L 的 1 $\times$ Dig wash buffer, 重悬 beads, 轻轻吹打混匀后, 室温静置 3 min;
- 4) 将上述磁珠置于磁力架上静置 2 min, 待磁珠与液体完全分离后, 吸去上清;
- 5) 重复步骤 3-4 两次;
- 6) 加入 100 μ L pAG-Tn5+ME 稀释液重悬磁珠, 将磁珠转移到新的 1.5 mL EP 管, 室温水平旋转孵育 1h。

9. 片段化

- 1) 将上述磁珠置于磁力架上静置 2 min, 待磁珠与液体完全分离后, 吸去上清;
- 2) 保持 EP 管在磁力架上, 加入 200 μ L 的 1 $\times$ Dig wash buffer, 室温静置 2 min, 吸去上清;
- 3) 加入 500 μ L 的 1 $\times$ Dig wash buffer, 重悬 beads, 轻轻吹打混匀后, 室温静置 3 min;
- 4) 将上述磁珠置于磁力架上静置 2 min, 待磁珠与液体完全分离后, 吸去上清;
- 5) 重复步骤 3-4 四到五次; (中途换一次新的 EP 管)

- 6) 加入 50 μ L Fragmentation buffer 重悬磁珠, 将磁珠转移到新的 1.5 mL EP 管, 37 $^{\circ}$ C 旋转孵育 1h。

10. 终止片段化反应

在上述 50 μ L 磁珠中加入 2.5 μ L EDTA, 将磁珠吹打均匀后转移到 200 μ L PCR 管中, 加入 1 μ L 蛋白酶 K 混合均匀, 在 PCR 仪中 55 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 然后 70 $^{\circ}$ C 20 min 灭活蛋白酶。

11. DNA 提取

- 1) DNA 纯化磁珠提前取出室温放置 5-10 min, 使用前涡旋混匀。每个片段化反应的样品加入 2.2 倍体积磁珠, 使用移液器充分混匀后转移至新的 1.5 mL EP 管, 室温结合 5 min;
- 2) 将 EP 管转移至磁力架上静置 5 min, 使磁珠与液体分离, 小心吸去上清;
- 3) 加入 500 μ L 新鲜配置的 80%乙醇漂洗磁珠, 室温静置 1min 后, 小心吸去上清, 此过程仍保持反应管置于磁力架上;
- 4) 重复步骤 3 两次;
- 5) 如果吸去上清后管壁残留液体太多, 可以短暂离心后将 EP 管转移至磁力架上, 小心吸去上清液体。然后将 EP 管放在 EP 管架上, 打开管盖, 室温晾干 (3-5 min), 使乙醇充分挥发。切记磁珠不可干燥过度 (环境不同, 晾干时间会有差异。判断标准: 磁珠表面光泽消失, 或磁珠颜色变化, 或管壁无明显的液体残留);
- 6) 每管加入 37 μ L TE buffer, 将磁珠吹打混匀后室温静置 2 min;
- 7) 将 EP 管置于磁力架上, 使磁珠与液体完全分离 (约 2-5 min, 这一步可以通过 10000-13000 g 离心 1 min 来替代), 小心吸取 35 μ L 上清至新的无菌的 PCR 管中。样品可在 -20 $^{\circ}$ C 储存或进行下一步 PCR 扩增。

12. DNA 文库预扩增

预扩增用来初步评估实验结果, 以及预估文库扩增的 PCR 循环数, 可以大大降低实验失败的风险;

预扩增 PCR 体系如下所示:

2 $\times$ qMix	25 μ L
(任选一条 i5 Primer 10 μ M)	2.5 μ L
(任选一条 i7 Primer 10 μ M)	2.5 μ L
纯化后的 DNA	2 μ L
H ₂ O	18 μ L

qPCR 程序如下:

- 1) 72 $^{\circ}$ C 5 min;
- 2) 95 $^{\circ}$ C 3 min;
- 3) 95 $^{\circ}$ C 30 sec;
- 4) 65 $^{\circ}$ C 30 sec;

程序 3-4 进行 40 次循环, 程序 4 收集 SYBR Green 通道荧光。

典型预扩增结果如下图所示。

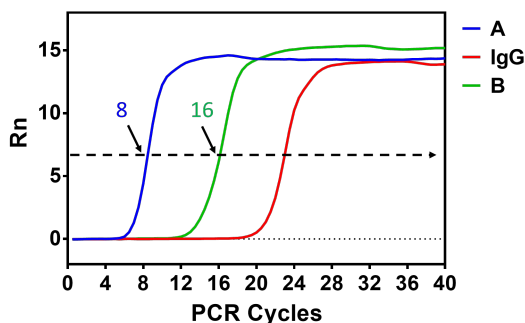


图. 典型的文库预扩增定量 PCR 曲线。IgG 组样品的扩增曲线一般在 20 个循环以后出现，如果出现过早说明 pAG-Tn5+ME 漂洗不充分；目标样品曲线出现的越早说明靶标丰度高或者抗体效率高。正式扩增时一般选取荧光信号达到曲线平台大约一半时对应的循环数作为文库扩增 PCR 的循环数。图中 A、B 可以分别采用 8 和 16 个循环来扩增文库。使用 $2-5 \times 10^5$ 个细胞，G4 CUT&Tag 扩增曲线达到平台值一半对应的循环数一般不超过 20。超过 20 不推荐建库，除非是阴性对照组或者初始细胞数比较少。

13. 文库扩增

50 μ L PCR 体系如下所示：

2×HG Library Mix	25 μ L
i5 Primer 10 μ M	2.5 μ L
i7 Primer 10 μ M	2.5 μ L
纯化后的 DNA	8-16 μ L
H ₂ O	Up to 50 μ L

PCR 程序如下：

- 1) 72°C 5 min;
- 2) 95°C 3 min;
- 3) 95°C 30 sec;
- 4) 65°C 30 sec;
- 5) 72°C 5 min.

程序 3-4 进行 N 次循环；循环数根据预扩增曲线确定。

14. 文库 PCR 产物纯化

1) DNA 纯化磁珠提前取出室温放置 5-10 min，使用前涡旋混匀。每个片段化反应的样品加入 1.2 倍体积磁珠（60 μ L），使用移液器充分混匀后转移至新的 1.5 mL EP 管，室温结合 5 min；

2) 将 EP 管转移至磁力架上静置 5 min，使磁珠与液体分离，小心吸去上清；

3) 加入 500 μ L 新鲜配置的 80%乙醇漂洗磁珠，室温静置 1min 后，小心吸去上清，此过程仍保持反应管置于磁力架上；

4) 重复步骤 3 两次；

5) 如果吸去上清后管壁残留液体太多，可以短暂离心后将 EP 管转移至磁力架上，小心吸去上清液体。然后将 EP 管放在 EP 管架上，打开管盖，室温晾干 (3-5 min)，使乙醇充分挥发。切记磁珠不可干燥过度 (环境不同，晾干时间会有差异。判断标准：磁珠表面光泽消失，或磁珠颜色变化，或管壁无明显的液体残留)；

6) 每管加入 20 μ L TE buffer，将磁珠吹打混匀后室温静置 2 min；

7) 将 EP 管置于磁力架上，使磁珠与液体完全分离 (约 2-5 min，这一步可以通过 10000-13000 g 离心 1 min 来替代)，小心吸取 18 μ L 上清至新的无菌的 PCR 管中。样品可在 -20°C 储存。制备好的文库可以通过 nanodrop 测浓度，通常浓度大于 15 ng/ μ L。安捷伦 2100 检测文库片段分布一般在 200-1000 bp。

CUT&Tag 文库结构：

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-
Index(i5)-
TCGTCTGCGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-
XXXXXXXXXX-
CTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCCACGAGAC-
Index(i7)-ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'，其中 XXXXXXXXXX 为插入序列

注意事项：

- 1) 需自备 anti-Flag M2 antibody (推荐：Sigma, F1804)；
- 2) 细胞和磁珠结合后室温旋转混匀不宜太过剧烈，以免磁珠流至管盖带来损失；
- 3) 细胞数量不要超过 5×10^5 ，细胞过多会导致磁珠更容易聚集沉淀。