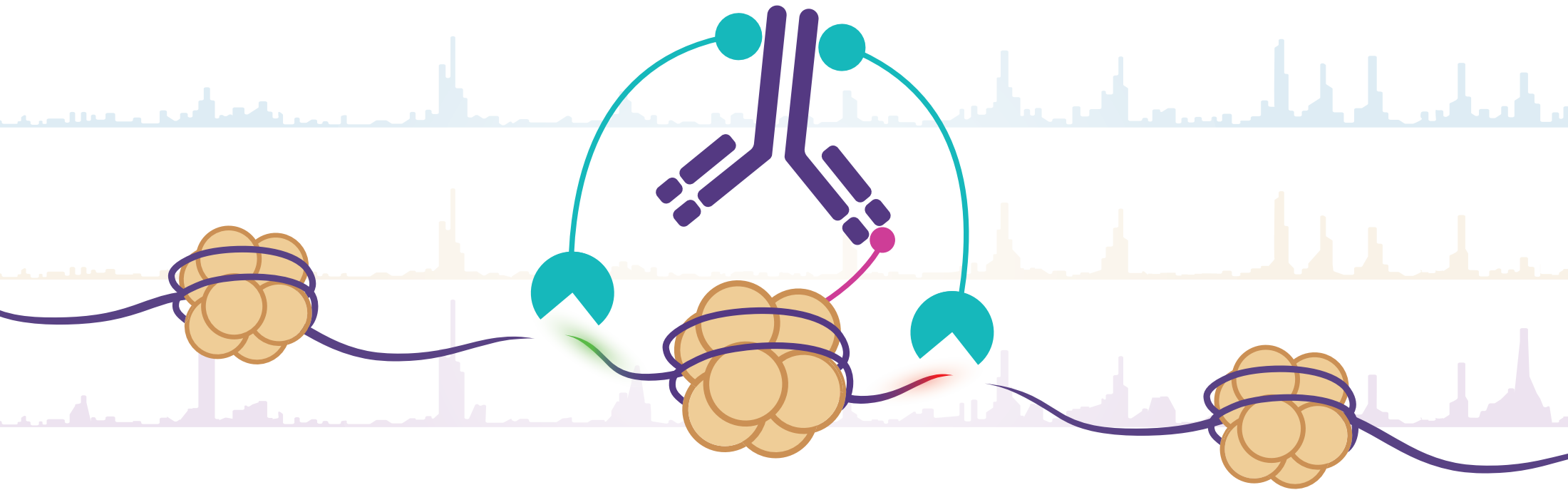


CUT&Tag 完全指南

技术概述，实验方法，研究工具



ACTIVE  MOTIF®

Enabling Epigenetics Research

CUT&Tag 完全指南

技术概述，实验方法，研究工具

CUT&Tag (Cleavage Under Target and Tagmentation) 方法是Active motif 专利技术TAM-ChIP™技术的一个变形。CUT&Tag 是基于ChIP (Chromatin immunoprecipitation) 原理的一项技术，与ChIP的免疫沉淀步骤相比，同样是利用抗体识别并结合目标蛋白和修饰的组蛋白，但CUT&Tag是抗体孵育后直接剪切染色质和制备文库。

CUT&Tag利用Tn5转座酶与proteinA的融合蛋白，将酶引导至与目标染色质结合的抗体。Tn5转座酶预先加上adapter (生成组装的pA-Tn5转座体) 以进行抗体靶向标记。

CUT&Tag用于研究组蛋白修饰和一些转录因子的基因组定位，是一种非常有价值的方法，进而揭示蛋白质和DNA之间的相互作用，或者识别感兴趣蛋白质的DNA结合位点。

与MNase-Seq或ATAC-Seq方法不同，MNase-Seq或ATAC-Seq方法以开放染色质为靶点，依赖于染色质可及性。而CUT&Tag技术则是利用抗体引导Tn5酶特异靶向组蛋白修饰位点或特定蛋白，揭示特定位点或蛋白质的染色质信息。

CUT&Tag可以用比ChIP-Seq更少的起始样品快速产生高质量的结果，并且能够从较低的测序深度进行可靠的分析，节省时间和金钱。

目录

CUT&Tag 概述

- CUT&Tag vs. CUT&RUN vs. ChIP-seq
- 单细胞CUT&Tag (scCUT&Tag)
- CUT&Tag 的优势
- CUT&Tag 的局限性

CUT&Tag-IT™ Assay试剂盒

- 试剂盒组分
- 实验流程
- 数据示例

更多研究工具

- CUT&Tag 验证抗体
- CUT&Tag 技术服务
- 已发表文章
- 常见问题

US Pat. No. 10,689,643, EP Pat. No. 2999784 and related patents and applications

Permitted Use; Resale Prohibited

In the absence of an express written agreement to the contrary, all products are sold and services deliverables are provided by Active Motif for (a) internal in vitro research purposes only and may not be used for services or any other commercial purpose (b) the exclusive use of the original purchaser, and are not to be resold. You agree not to reverse engineer or otherwise attempt to discover the structure or composition of products or services deliverables unless we otherwise agree in writing.

CUT&Tag概述

CUT&Tag (Cleavage Under Targets and Tagmentation) 是一种分子生物学的实验技术，用于证明蛋白与DNA的相互作用关系，以及识别目标蛋白与DNA的结合位点。虽然CUT&Tag在某些方面与ChIP技术有相似之处。但CUT&Tag起始所用样本是经透化后的活细胞或者分离得到的细胞核，而不是ChIP使用的经固定后的细胞或组织。

在CUT&Tag实验方法中，细胞首先经透化处理，并将其与刀豆蛋白 A 一起孵育，以便于后续的清洗步骤。下一步，细胞相继与目标蛋白特异的一级抗体和二级抗体孵育，然后将细胞与转座体一起孵育，转座体由带有NGS接头 (adaptor) 的Tn5转座酶和蛋白A (protein A) 融合而成。孵化后，将未结合的转座体清洗干净。Tn5是一种依赖 Mg^{2+} 的酶，因此需添加 Mg^{2+} 以激活反应，从而使染色质被切割到接近蛋白质结合位点的位置，同时链接上NGS测序接头DNA序列。这使得染色质裂解和文库制备只需一步完成。

CUT&Tag实验方法是非常灵敏的，据报道它能够在60个细胞量水平检测到组蛋白的修饰。使用ChIP技术，超声波随机剪切染色质，抗体免疫沉淀不同长度的DNA，通常有几百个碱基对。然而，使用CUT&Tag时，转座酶仅在靠近蛋白质结合位点的位置切割染色质，导致DNA测序长度缩短，这允许较低的测序深度 (3-5M reads) 生成可靠的数据，背景信号比大多ChIP-seq更低。因为CUT&Tag方法使用完整的细胞作为起始样本，而不是超声处理的染色质，所以它可以适用于单细胞实验 (scCUT&Tag)。

CUT&Tag vs. CUT&RUN vs. ChIP-Seq

许多实验技术旨在优化ChIP (X-ChIP) 方法从而达到从极少的样本量中获取高质量的数据结果。特别是一些方法，如ChEC和DamID，基于核酸酶或DNA修饰酶在实验过程中剪切或修饰结合位点局部附近的DNA，从而获得DNA与蛋白相互作用的相关数据。

2011年, Active Motif开发出分析蛋白与DNA相互作用的TAM-ChIP技术。如ChIP技术一样, TAM-ChIP使用经过交联和超声处理后的染色质, 不一样的是, TAM-ChIP技术使用了偶联Tn5和NGS测序接头的二级抗体。在染色质被凝胶微珠捕获后, Mg^{2+} 激活Tn5转座酶活性在蛋白结合位点进行切割并链接上NGS测序接头, 提供更高分辨率的蛋白质结合位点识别。

2016年, Skene 和 Henikoff开发出CUT&RUN (Cleavage Under Targets and Release Using Nuclease) 技术, 类似于ChEC技术, CUT&RUN应用MNase酶的内切酶和外切酶活性。在CUT&RUN的技术实现过程中, 蛋白A与MNase形成融合蛋白, 引导MNase酶切割抗体识别的目标蛋白与DNA的结合位点区域。CUT&RUN起始于活细胞分离得到的细胞核, 将其固定在凝集素包被 (lectin-coated) 的磁珠上。随后将细胞核与感兴趣的蛋白质特异性抗体和pA-MNase试剂一起孵育, 酶促反应通过添加 Ca^{2+} 激活, 蛋白质-DNA复合物经分离纯化后直接用于文库制备。

2019年, Henikoff教授实验室通过改进CUT&RUN技术, 发展出了CUT&Tag这一新的实验技术。CUT&RUN技术可以从100-1000个活细胞生成高质量的测序数据, 但是这种方法仍然需要在制备库之前进行额外的接头连接步骤, 因此很难适应单细胞应用。CUT&Tag使用Tn5转座酶, 就像TAM-ChIP一样, 在切割染色质的同时插入NGS测序接头序列以方便制备NGS文库。这减少了实验时间, 也有助于CUT&Tag能够适用于更少的起始样本量。总之, CUT&Tag像CUT&RUN一样能够分析原始状态的染色质, 并像TAM-ChIP一样实现了抗体引导的转座反应。

	CUT&Tag-IT™ Assay Kit	CUT&RUN	ChIP-seq
是否需要交联	否	否	是
染色质片段化方法	Tn5 的转座反应	MNase的酶切	超声片段化
所需细胞数量	0.5-50万	50万	100-1000万
所需测序深度*	2 M Reads **	8 M Reads	20-50 M Reads
是否整合建库过程	是, 通过片段化加adaptor	否, 需要另外的建库步骤	否, 需要另外的建库步骤
适用的靶点	主要适用于组蛋白修饰, 少许转录因子与辅因子	广泛适用于组蛋白修饰, 转录因子和辅因子	广泛适用于组蛋白修饰, 转录因子与辅因子
所需时长	1-2天	1-2天	2-3天

* Kaya-Okur et al. Nature Communications (2019) 10:1930

**对于丰度较低的靶点, 建议测序深度8-10M reads

单细胞CUT&Tag (scCUT&Tag)

在最初的CUT&Tag文章中，来自Henikoff实验室的研究团队将CUT&Tag用于单细胞分析。相较于CUT&RUN，CUT&Tag更适用于单细胞是因其实验过程从抗体结合到文库构建，整个实验反应都是在完整的细胞或细胞核中完成的。

为了适用于单细胞分析，CUT&Tag的基础步骤需有所改变，不用磁珠固定细胞，而是在清洗过程中对细胞进行离心。在转座反应步骤之后，细胞以单个细胞分配到纳米孔中，在测序之前进行条形码（barcode）编码。

CUT&Tag的优势

CUT&Tag适用于更低的细胞量

最初的CUT&Tag文章中，研究者使用60个细胞分析了H3K27me3在整个基因组中的修饰图谱。因为CUT&Tag利用pA-Tn5直接在抗体结合位点切割DNA，不需要染色质制备和可能导致样品丢失的超声处理步骤，所以CUT&Tag可使用更低的细胞量。

对于研究特定细胞类型的研究人员来说，处理少量细胞的能力是一个优势，例如罕见的神经元群体、胰岛或干细胞，这些样本很难获得足够的细胞量用于ChIP实验。

CUT&Tag不需要固定和超声

CUT&Tag使用自然状态（未经固定）下的细胞或细胞核，避免了标准ChIP工作流程中的固定、染色质制备和超声处理步骤。超声波片段化染色质的条件优化非常具有挑战性，需要昂贵的专用设备。此外，过度固定和过度超声处理可破坏阻止其免疫沉淀的蛋白质表位，有些抗体在自然条件下效果更好。

CUT&Tag更快

与耗时且步骤繁琐的ChIP实验相比，CUT&Tag显然更加简单快捷。细胞被固定在磁珠上，整个过程在一个试管中进行。转座反应过程同时涉及染色质剪切和NGS测序接头序列的插入，也使得高通量实验不再是问题。

CUT&Tag所需测序量更少

使用CUT&Tag，在方案的最后一步获得的染色质更集中于感兴趣蛋白质结合位点的附近。通过CUT&Tag分离的较短的DNA序列意味着它没有与ChIP-Seq相同的深度测序要求。

按照CUT&Tag实验方案，3-5M reads足以生成可靠的数据，这比ChIP-Seq分析（每个样本通常需要30-50M reads）测序大约少10倍。为比较X-ChIP、CUT&RUN、和CUT&Tag的信噪比，使用相同的抗体进3个独立实验，并8M reads深度进行测序，三种方法得到的总体结果非常相似。但ChIP-Seq显示出比CUT&Tag更高的背景，需要更深的测序深度。

CUT&Tag的局限性

CUT&Tag的自然状态并不适合所有研究

未经固定（自然状态）的细胞并不适用于所有实验。在CUT&Tag最初的文章中，此技术只用于组蛋白修饰，NPAT，和CTCF。许多转录因子并不大量表达，且与DNA的结合是微弱，瞬时的，甚至有时还是通过间接的方式与染色质相结合。对于这些情况，染色质交联和超声处理是检测蛋白质-DNA相互作用的必要步骤。

大多数ChIP级抗体经验证可用于交联条件下，然而无法在自然状态下具有好的作用，因为交联条件下的蛋白质表位可能不同于自然条件下的蛋白质表位。因此从X-ChIP转换到CUT&Tag需要进行抗体验证，以确定抗体在不固定条件下的特异性和敏感性。

CUT&Tag技术还太新

尽管CUT&Tag似乎已经存在了很久，且很快就流行起来，但它只是在2019年4月首次发表。因此，在同行评议期刊上发表的包含CUT&Tag结果的论文并没有很多。尽管Henikoff实验室的关于此技术的发表已相当完整，包含大量CUT&Tag、CUT&RUN和ChIP-Seq进行比较的数据，但由于实验流程与ChIP-Seq差异太大，使用该方法得到的实验数据可能难以与之前ChIP数据进行比较，包括ENCODE中的结果。

CUT&Tag可能引入偏差

用于CUT&Tag的Tn5转座酶对开放染色质区域具有高度亲和力。因此，CUT&Tag可能优先适用于分析组蛋白修饰或与基因组活跃转录区域相关的转录因子，而不是非常适合于分析沉默或含有异染色质的基因组区域。消化时间和pA-Tn5使用量需要针对每个目标仔细优化，以避免任何不特异的转座反应。

CUT&Tag是一种很有前途的技术，时间将会告诉我们它是否能像ChIP-Seq那样被广泛应用。就像每一个新技术初始一样，缺陷还未一一暴露，因此CUT&Tag优化必须小心进行，并且每一步都应该通过适当质控检测。

CUT&Tag-IT™ Assay试剂盒

此试剂盒可完成16个样本的CUT&Tag实验。试剂盒包含实验所需的一切试剂，包括组装的pA-Tn5转座体。额外需要的物料均是实验室的标配设备和试剂，这些设备和试剂列在产品说明书“额外所需材料”列表中。

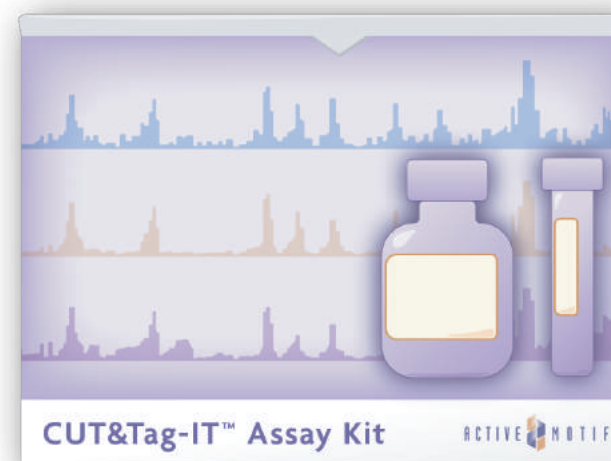
CUT&Tag-IT Assay试剂盒的优势

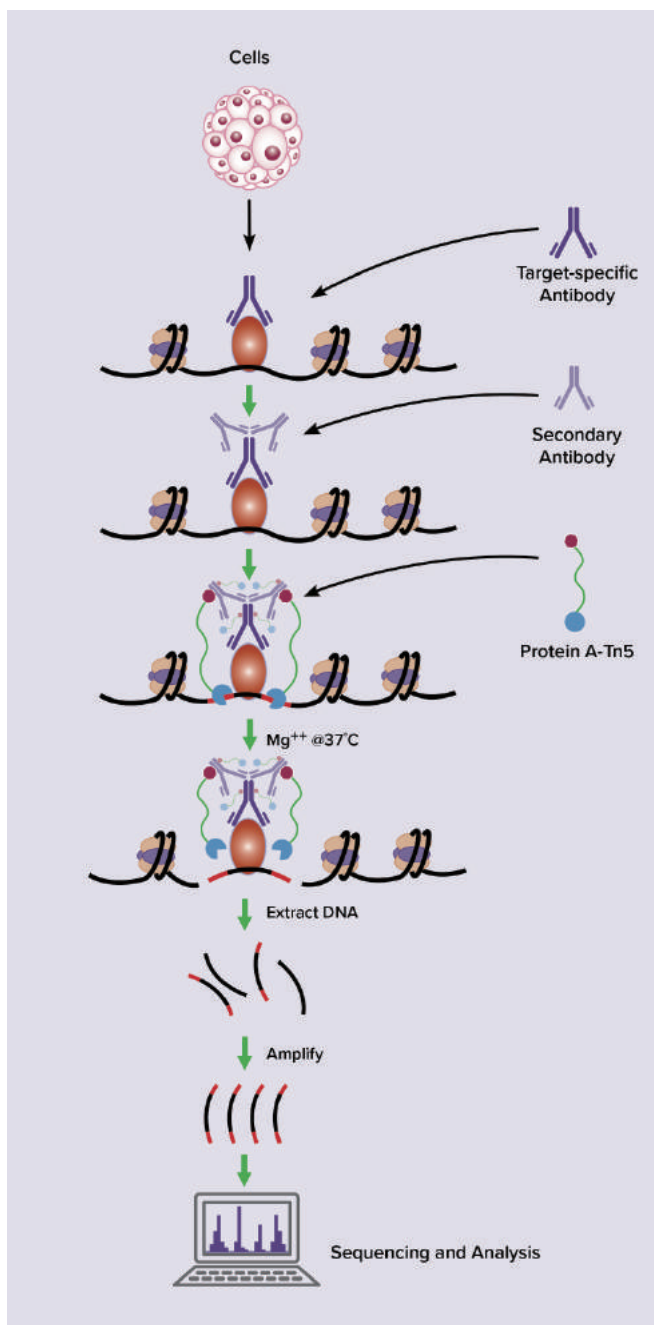
- 单次实验最少只需5,000个细胞
- 提供完整的试剂和优化方案
- 适用于组蛋白标记和一些转录因子
- 建库步骤简单，成本降低
- 较低的测序深度就能得到高质量的结果
- 没有甲醛交联造成的假阳性结果

品名	规格	货号
CUT&Tag-IT™ Assay试剂盒	16 rxns	53160

试剂盒组分

- 5%Digitonin, -20℃ 储存
- Concanavain A Beads, 4℃ 储存
- CUT&Tag-IT™ Assembled pA-Tn5 Transposomes, -20℃ 储存
- Tagmentation Buffer, -20℃ 储存
- 1X Binding Buffer, 4℃ 储存
- 1X Wash Buffer, 4℃ 储存
- Dig-Wash Buffer, 4℃ 储存
- Antibody Buffer, 4℃ 储存
- Dig-300 Buffer, 4℃ 储存
- Guinea Pig Anti-Rabbit Antibody, -20℃ 储存
- Protease Inhibitor Cocktai, -20℃ 储存
- 0.5M EDTA, 常温储存
- 10% SDS, 常温储存
- 10 µg/µl Proteinase K, -20℃ 储存
- DNA Purification Coumns, 常温储存
- DNA Purification Binding Buffer, 常温储存
- DNA Purification Wash Buffer, 常温储存
- DNA Purification Eution Buffer, 常温储存
- 3M Sodium Acetate, 常温储存
- 10 mM dNTPs, -20℃ 储存
- 5X Q5 Buffer, -20℃ 储存
- Q5 High Fidelity DNA Poymerase (2U/µl), -20℃ 储存
- i5 Indexed Primer 1, -20℃ 储存
- i5 Indexed Primer 2, -20℃ 储存
- i5 Indexed Primer 3, -20℃ 储存
- i5 Indexed Primer 4, -20℃ 储存
- i7 Indexed Primer 1, -20℃ 储存
- i7 Indexed Primer 2, -20℃ 储存
- i7 Indexed Primer 3, -20℃ 储存
- i7 Indexed Primer 4, -20℃ 储存
- SPRI Beads, 4℃ 储存





实验流程

- 收获细胞-30 min
- 结合细胞核-30 min
- 一抗的孵育-2 h或者过夜
- 二抗的孵育-1 h
- 结合CUT&Tag-IT 转座体
- pA-Tn5转座酶-1.5 h
- 转座反应-1 h
- DNA的提取-1 h
- PCR扩增-1 h
- NGS测序

不同点	优势
不需要超声处理	更高的分辨率，无固定交联产生的假阳性
使用自然态，非固定细胞	低耗，更少的细胞要求，更低的测序深度
	1-2 天完成测序前所有实验

数据示例

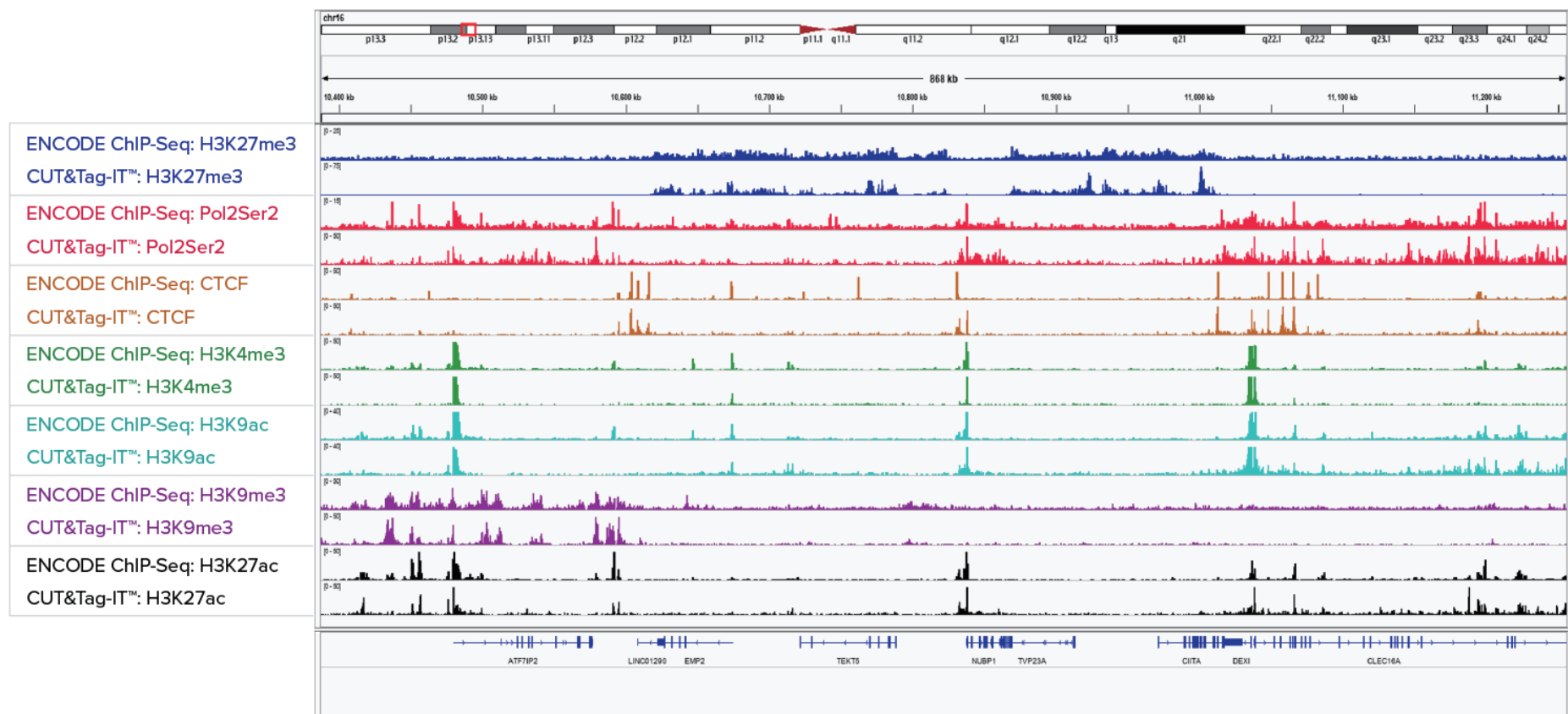


图1: CUT&Tag-IT™ Assay试剂盒测试数据与ENCODE数据关联对比

我们采用K562细胞进行实验，使用了几种不同的抗体：H3K27me3(深蓝色)，phospho-Pol2Ser2(红色)，CTCF(橙色)，H3K4me3(绿色)，H3K9ac(浅蓝色)，H3K9me3(紫色)，H3K27ac(黑色)来进行检测。与ENCODE的数据进行比对，CUT&Tag-IT™ Assay Kit仅仅使用10,000个细胞却能与ENCODE至少1,000,000细胞的数据有高度一致性。CUT&Tag实验中所用到的抗体：H3K27me3 (货号39155)，CTCF (货号61311)，H3K4me3 (货号39159)，H3K9ac (货号39917)，H3K9me3 (货号39161)，H3K27ac (货号39133)。

更多研究工具

CUT&Tag验证抗体

Active Motif专注于针对组蛋白、组蛋白修饰、染色质蛋白和其他因子的高质量抗体的研发生产，在我们内部也有越来越多的抗体通过了实验验证，在CUT&Tag分析中效果良好。可在[activemotif.com](https://www.activemotif.com)上查看CUT&Tag验证抗体的完整列表。

- Histone PTMs
- CTCF, RNA pol II
- AbFlex Recombinant Antibodies

CUT&Tag技术服务

使用我们的CUT&Tag技术服务，您无需担心方法优化或测试多种抗体来尝试找到一种有效的抗体，因为我们会为您解决所有这些问题。也没有必要学习生物信息学，因为我们的技术服务包含了NGS数据的分析和结果的解释。

让我们的专家团队从较少的起始样本中产生高质量的CUT&Tag结果，为您节省时间和资源，让您专注于更大的蓝图。使用我们的CUT&Tag技术服务很简单。您只需将样本提交给Active Motif，就可以在几周内收到分析数据。

Active Motif的CUT&Tag技术服务包含：

1. 细胞制备
2. ConA的孵育&抗体的结合
3. 利用pA-Tn5转座反应产生测序文库
4. NGS测序
5. 生信分析
6. 可供发表的图片

欢迎联系我们，了解更多详情。

已发表文章

我们可以提供应用Active Motif已验证抗体和CUT&Tag试剂盒所发表文章的最新列表，请联系techchina@activemotif.com获取。

常见问题

Q. CUT&Tag-IT™ Assay Kit是否包含进行CUT&Tag的所有试剂？

A. 是的，这个试剂盒包含了所有需要的试剂，包括组装好的pA-Tn5转座体。唯一需要的其他材料是实验室的常用设备和试剂，这些设备和试剂在产品说明书中“其他需要的材料”中可以找到。

Q. 如何准备进行CUT&Tag-IT™ Assay Kit的细胞？

A. 按照CUT&Tag-IT™ Assay Kit手册的步骤准备细胞。对于贴壁细胞来说，关键是不要用胰蛋白酶分离细胞，因为它会破坏细胞与刀豆球蛋白A结合的表位。使用无酶分离法收集细胞，如使用细胞刮刀。

Q. CUT&Tag-IT™ Assay Kit可以使用冷冻细胞吗？

A. 细胞必须按照冻存步骤保存，速冻细胞与方案不兼容。为了冷冻保存细胞，我们建议遵循我们的技术服务样品制备方法。

Q. 我需要加入IgG对照吗？

A. 在CUT&Tag实验中包括IgG对照的目的是确定pA-Tn5是否特异性的定位于抗体所在/富集的基因组区域。与ChIP-Seq中使用的input对照不同，此阴性对照不用于分析。ActiveMotif R&D团队发现添加IgG对照不会增加任何有价值的信息，因为pA-Tn5已经被证明是特异的。但是，如果您希望添加IgG作为对照，这也是可以的。

Q. CUT&Tag-IT™ Assay Kit是否有任何建议的质量控制步骤？

A. 文库生成后，成功的文库制备质量应通过TapeStation或Bioanalyzer来评估。一个理想文库的片段大小大部分是低于500bp的。我们建议使用KAPA文库定量试剂盒测定文库浓度。

Q. CUT&Tag是否需要像ChIP-Seq一样的Input对照?

A. 不需要。

Q. ChIP-Seq验证的抗体是否可以用于CUT&Tag-IT™ Assay Kit?

A. CUT&Tag和ChIP-Seq有不同的工作流程。如果一个抗体对ChIP-Seq有效，那并不一定意味着它适用于CUT&Tag。我们建议使用Active Motif CUT&Tag-IT™ Assay Kit验证的抗体，或者尝试ChIP级别或者经过ChIP实验验证的抗体。

Q. 使用CUT&Tag-IT™ Assay Kit建议使用什么对照?

A. 试剂和流程的技术性阳性对照推荐使用抗体H3K27me3 (货号 39157)。阴性对照我们建议仅使用二抗而不使用一抗，这将显示二抗和pA-Tn5在你的样本中的背景。

Q. CUT&Tag-IT™ Assay Kit是否兼容单克隆和多克隆抗体?

A. 是的，它与兔源性抗体兼容。

Q. CUT&Tag是否可以用于标签蛋白?

A. 我们尚未使用CUT&Tag-IT™ Assay Kit验证标签蛋白。然而理论上是可以的。

Q. Active Motif标准的ChIP-Seq Spike-In方法是否可以用于CUT&Tag-IT™ Assay Kit?

A. 不可以。我们的Spike-In方法与CUT&Tag-IT™ Assay Kit不兼容。

Q. 我可以用CUT&Tag-IT™ Assay试剂盒同时处理 16个以上的样本吗?

A. CUT&Tag-IT™ Assay试剂盒提供4x4独特的双index序列。我们目前没有其他可用的index引物。然而，试剂盒中的index引物与对应于N701-N704和N501-N504的Illumina Nextera引物相同。如果您想对超过16个样品进行实验，您可以购买引物与试剂盒中的引物进行组合。组合时需保证引物浓度与试剂盒中引物浓度一致，试剂盒中引物浓度为25uM。

Q. CUT&Tag-IT试剂盒是否与测序前的qPCR分析兼容？

A. 可以兼容，但结果不一定准确。由于Tn5插入测序接头的随机性，它使得设计引物来扩增一个特定的基因成为问题，因为引物结合位置的序列可能会被切断。因此，qPCR结果可能并不准确，因为引物结合位点可能被切断导致引物无法结合。

Q. CUT&Tag-IT™ Assay Kit构建的文库是单index还是双index？

A. CUT&Tag是双index文库。

Q. CUT&Tag-IT™ Assay Kit构建的文库是否包含分子识别码？

A. 不包含，CUT&Tag文库不包含分子识别码。

Q. CUT&Tag-IT™ Assay Kit构建文库应该采用单端还是双端测序？

A. CUT&Tag文库应该采用双端测序。

Q. CUT&Tag-IT™ Assay Kit推荐的测序读长是多少？

A. 我们建议读长为2x38（PE38）。这比Henikoff论文中描述的读长要短。但是，我们没有看到对数据质量或mapping率的影响。如果你愿意，可以使用更高的读长。

Q. 使用CUT&Tag-IT™ Assay Kit之后怎么分析测序数据？

A. CUT&Tag的数据分析与ChIP-Seq是一样的。我们使用BWA算法和MACS2进行序列比对和信号峰鉴定。

登录ActiveMotif.com 查看更多资源



表观遗传学博客



表观遗传学电子书



科学海报



表观遗传学网络研讨会

关注我们



表观遗传研究专家

中国

Mobile: +86 185 2136 2870

Direct: +86 21 2092 6090

Add: 上海市静安区万航渡路889广场1602B

techchina@activemotif.com

欧洲

GERMANY 0800/181 99 10

UNITED KINGDOM 0800/169 31 47

FRANCE 0800/90 99 79

OTHER COUNTRIES, DIRECT +32 (0)2 653 0001

Fax: +32 (0)2 653 0050

eurotech@activemotif.com

北美

Toll Free: 877 222 9543

Direct: 760 431 1263

Fax: 760 431 1351

sales@activemotif.com

tech_service@activemotif.com

日本

Direct: +81 (0)3 5225 3638

Fax: +81 (0)3 5261 8733

japantech@activemotif.com