

# ChIC/CUT&RUN Assay Kit

货号： 53180

Active Motif 中国

地址： 上海市闵行区浦江镇万康路 290 号

电话： (86)-21-20926090

邮箱： [techchina@activemotif.com](mailto:techchina@activemotif.com)

版权所有 2023 Active Motif, Inc

## 目录

概览.....	4
试剂盒组成及存储条件.....	5
额外所需材料.....	6
ChIC/CUT&RUN Assay Kit 实验流程.....	7
需要的缓冲液.....	7
第一天（大约 3 小时）.....	8
准备 Concanavalin A 磁珠（20-30 分钟）.....	8
准备细胞（10 分钟）.....	8
准备细胞核（推荐，可选步骤）（15 分钟）.....	8
漂洗细胞/细胞核（30 分钟）.....	9
抗体孵育（过夜）.....	9
第二天（约 5 小时）.....	10
漂洗（10 分钟）.....	10
ChIC/CUT&RUN pAG-MNase 结合（20 分钟）.....	10
消化目标染色质（3 小时）.....	10
ChIC/CUT&RUN DNA 分离和纯化（45 分钟）.....	11
NGS 文库制备（3 小时）.....	11
参考文献.....	13
常见问题指南.....	13
技术服务.....	14

本手册中的信息如有更改，恕不另行通知，也不构成 Active Motif, Inc.的承诺。本手册按“原样”提供，无任何明示或暗示的担保。本手册中的信息可随时更改或更新。

未经 Active Motif, Inc.事先书面同意，不得复制、转让、复制、披露或复制本文件的全部或部分内容。本文件为专有信息，受美国版权法和国际条约的保护。

本文件的制造商为 Active Motif, Inc。

© 2023 Active Motif, Inc.地址 1914 Palomar Oaks Way, Suite 150; Carlsbad, CA, 92008。  
版权所有。

此处引用的所有商标、商号、服务标志或徽标均属于其各自的公司。

仅供科研实验使用，不可用于医学诊断。

## 概览

CUT&RUN (Cleavage Under Targets & Release Using Nuclease) 是一种研究各种染色质相关蛋白及其修饰的全基因组分布的表观遗传学方法<sup>1</sup>。类似于 ChIP (chromatin immunoprecipitation)，CUT&RUN 也是利用抗体靶向染色质相关修饰和蛋白，但其所需细胞量和测序深度比 ChIP 更低<sup>1-3</sup>。

在 CUT&RUN 中，抗体靶向目标蛋白从而结合在完整细胞中的染色质上，然后微球菌核酸酶(MNase)在目标蛋白结合位点特异性地剪切 DNA。MNase 与 Protein A, Protein G 或 Protein AG 融合，它们可以结合在已与目标蛋白结合的抗体上。随即在体系中加入的钙离子可以激活 MNase，释放片段化 DNA 至上清中。所释放的 DNA 片段被纯化、测序并定位到参考基因组序列上，就可推断出蛋白在 DNA 上的结合位点。

相对于 ChIP-Seq，CUT&RUN 有诸多优点：流程较简单，不需超声样品；从少量细胞即可得出可信的结果（对于组蛋白修饰，5000 个细胞即可；对于转录因子，25000 个细胞即可）；所需测序深度更低（较稳定的修饰只需 2M reads；转录因子平均需 25 reads）<sup>3</sup>。

作为研究染色质相关蛋白的极佳工具，CUT&RUN 灵敏、特异性高且所需细胞量比 ChIP 更少，是研究转录因子等染色质相关蛋白的结合方式和全基因组的组蛋白修饰的理想方法。染色质相关蛋白在调控诸如基因表达、DNA 复制、DNA 修复和细胞分化等过程中发挥很重要的作用，研究这些蛋白的结合方式可以为这些细胞活动的调控提供潜在思路。

产品	规格	目录号
ChIC/CUT&RUN Assay Kit	24 次反应	53180



## 试剂盒组成及存储条件

请参照下表存储各组分，从收到之日起所有试剂保证 6 个月内稳定。

试剂	数量	存储条件
5% Digitonin	600 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C
RNase A (10 $\mu$ g/ $\mu$ L)	40 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C
Protease Inhibitor Cocktail, 500 $\mu$ L	2 $\times$ 500 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C
ChIC/CUT&RUN pAG-MNase	70 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C
Glycogen 20 mg/mL	12 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C
Histone H3K4me3 pAb, 10 $\mu$ g, 1 mg/mL	8 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C
Negative Control IgG, Rabbit	8 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C
1 M Spermidine	28 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C
Nuclei Isolation Buffer	2.7 mL	4 $^{\circ}$ C
Concanavalin A 磁珠	300 $\mu$ L	4 $^{\circ}$ C
0.1 M CaCl <sub>2</sub>	45 $\mu$ L	4 $^{\circ}$ C
Stop Solution	1.1 mL	4 $^{\circ}$ C
1 $\times$ Binding Buffer	6 mL	4 $^{\circ}$ C
Dig-Wash Buffer	55 mL	4 $^{\circ}$ C
0.5 M EDTA	250 $\mu$ L	RT
DNA Purification Wash Buffer*	10 mL	RT
DNA Purification Elution Buffer	5 mL	RT

DNA Purification Binding Buffer**	6 mL	RT
3M Sodium Acetate	500 µl	RT
DNA Purification Columns SF	24	RT
0.2 mL Strip Tubes, Attached Caps	7 strips	RT

\*DNA Purification Wash Buffer 在使用前必须加入 40 mL 100%乙醇，配制成乙醇最终浓度为 80% 的溶液。

\*\*DNA Purification Binding Buffer 在使用前必须加入 9 mL 100%异丙醇，配制成异丙醇最终浓度为 60% 的溶液。

## 额外所需材料

- 目标蛋白的抗体
- 100%乙醇
- 100%异丙醇
- 小型离心机
- 涡旋仪
- 磁条或 200 µL 八连排 PCR 管用磁力架
- 200 µL PCR 管
- 1.5/2 ml EP 管
- 冰及冰盒
- 旋转混匀仪或摇床
- 可置于 4 °C 的旋转混匀仪或摇床
- 适用于小片段的 NGS 建库试剂盒例如 NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina: 货号 E7645L
- 接头引物, 例如适用于 Illumina 测序系统的 NEBNext Multiplex Oligos (接头引物 1): 货号 E7335S
- 接头引物, 例如适用于 Illumina 测序系统的 NEBNext Multiplex Oligos (接头引物 2): 货号 E7500S

## ChIC/CUT&RUN Assay Kit 实验流程

### 需要的缓冲液:

配制 DNA Purification Binding Buffer: 使用前在 DNA Purification Binding Buffer 试剂瓶中加入 9 mL 100%异丙醇, 配制成异丙醇最终浓度为 60%的溶液。

配制 DNA Purification Wash Buffer: 使用前在 DNA Purification Wash Buffer 试剂瓶中加入 40 mL 100%乙醇, 配制成乙醇最终浓度为 80%的溶液。

配制 Stop Solution: 在 Stop Solution 小瓶中加入 11  $\mu$ L Glycogen, 在 Stop Solution 中加入 22  $\mu$ L RNase A, 每个反应需要 40  $\mu$ L Stop Solution。溶液在 4 °C 下可稳定 6 个月。

开始前, 请准备好 Complete Wash Buffer、Cell Permeabilization Buffer 和 Antibody Buffer。每种缓冲液的一部分将作为下表中依次列出的下一种缓冲液的基本成分。每种缓冲液的剩余部分将按下表所示储存, 并按下表所示使用。

缓冲液名称	组分	1 个反应	8 个反应	24 个反应	储存条件
Complete Dig-Wash Buffer	Dig-Wash Buffer	1.8 mL	14.4 mL	43.2 mL	4 °C, 于第 一天使用
	Protease Inhibitor Cocktail	18 $\mu$ L	144 $\mu$ L	432 $\mu$ L	
	1 M Spermidine	0.9 $\mu$ L	7.2 $\mu$ L	21.6 $\mu$ L	
Cell Permeabilization Buffer	Complete Dig-Wash Buffer	1.4 mL	11.2 mL	33.6 mL	4 °C, 于第 二天使用
	5% Digitonin	2.8 $\mu$ L	22.4 $\mu$ L	67.2 $\mu$ L	
	Antibody Buffer	100 $\mu$ L	800 $\mu$ L	2.4 mL	
Antibody Buffer	Cell Permeabilization Buffer				置于冰上, 于第一天 使用
	0.5 M EDTA	0.4 $\mu$ L	3.2 $\mu$ L	9.6 $\mu$ L	

对于分离细胞核, (第 13 步, 可选但推荐) 配制 Complete Nuclei Isolation Buffer: 每个样品需要 100  $\mu$ L 该缓冲液。在 Nuclei Isolation Buffer 中加入 1.4  $\mu$ L 1 M Spermidine, 在使用前每 1 mL Nuclei Isolation Buffer 中加入 10  $\mu$ L 100 $\times$  Protease Inhibitor Cocktail (PIC)。

## 第一天 (大约 3 小时)

### 准备 Concanavalin A 磁珠 (20-30 分钟)

**注:** 在准备磁珠、细胞或细胞核时, 缓冲液需置于冰上, 样品放在实验台上置于室温以便使用。

1. 涡旋以重悬 Concanavalin A 磁珠。
2. 以每个样品 10  $\mu$ L 的量将 Concanavalin A 磁珠分装至 0.2 mL 带盖离心管中, 如果同时处理多个样品, 分装时需要重悬混匀磁珠以确保分装至每个样品的磁珠是等量的。
3. 将离心管置于磁条或磁力架上。
4. 弃去上清, 保留磁珠。
5. 每个样品加入 100  $\mu$ L 1 $\times$  Binding Buffer 。
6. 用 1 $\times$  Binding Buffer 重悬 Concanavalin A 磁珠, 期间移液器轻柔吹吸。
7. 将离心管放回磁力架上以吸附磁珠, 弃上清。
8. 重复 5-7 步 1 次, 即总共漂洗 2 次。
9. 每个样品中加入 10  $\mu$ L Binding Buffer, 置于冰上备用。

### 准备细胞 (10 分钟)

10. 准备 5,000-500,000 个生长中或冻存的细胞(每个反应需细胞量 5,000-500,000 个)。对于贴壁细胞, 推荐用 TrypLE Express 酶将细胞消化下来; 对于冻存的细胞, 可以置于实验台上解冻, 也可以置于 37  $^{\circ}$ C 水浴锅或加热块上解冻。
11. 将细胞离心 (600  $\times$  g, 室温, 3 分钟) 。
12. 弃上清。

### 准备细胞核 (可选但推荐) (15 分钟)

13. 制备 Complete Nuclei Isolation Buffer: 每个反应需要 100  $\mu$ L Complete Nuclei Isolation Buffer, 由每 1 mL Nuclei Isolation Buffer 中加入 10  $\mu$ L Protease Inhibitor Cocktail 和 0.5  $\mu$ L 1 M Spermidine 配制而成。

**注:** 也可以选择在整个 Nuclei Isolation Buffer 中加入 1.4  $\mu$ L 1 M Spermidine, 注意加入 Spermidine 后的 Nuclei Isolation Buffer 可以在 4  $^{\circ}$ C 存放 6 个月。然后在开始实验前, 再

在每 1 mL Complete Nuclei Isolation Buffer 中加入 10  $\mu$ L 新鲜的 Protease Inhibitor Cocktail。每个样品需要 100  $\mu$ L Complete Nuclei Isolation Buffer。

14. 在 100  $\mu$ L Complete Nuclei Isolation Buffer 中轻柔重悬细胞（细胞量上限为 500,000 个），如果细胞量低于 500,000，使用的剂量也不必减少，移液器轻轻吹吸或轻弹离心管以确保沉淀完全重悬。
15. 将细胞核样品置于冰上 10 分钟。
16. 将细胞核离心（600  $\times$  g，室温，3 分钟）。
17. 弃上清。

### 漂洗细胞/细胞核（30 分钟）

18. 每个细胞或细胞核样品用 100  $\mu$ L Complete Dig-Wash Buffer 轻轻重悬(每个样品 500,000 个细胞或细胞核)，移液器轻轻吹吸或轻弹离心管以确保沉淀完全重悬。
19. 将细胞或细胞核离心（600  $\times$  g，室温，3 分钟）。
20. 弃上清。
21. 重复 18-20 步 1 次，总计漂洗 2 次。

**注：**当细胞数量有限或沉淀不容易看到时，可省略第二次漂洗。

22. 每个样品用 100  $\mu$ L Complete Dig-Wash Buffer 轻轻重悬，移液器轻轻吹吸或轻弹离心管以确保沉淀完全重悬。
23. 将 100  $\mu$ L 漂洗好的细胞/细胞核转移至准备好的 Concanavalin A 磁珠中。
24. 移液器轻轻吹吸以重悬磁珠。
25. 室温静置 10 分钟。
26. 将离心管置于磁条或磁力架上。
27. 弃上清。
28. 每个样品中加入 50  $\mu$ L Antibody Buffer。

### 抗体孵育（过夜）

29. 每样品中加入 1  $\mu$ g 或 1  $\mu$ L 抗体。

**注：**建议设置阳性对照（组蛋白 H3K4me3）和阴性对照（兔源 IgG）。

30. 移液器轻轻吹吸以重悬。

31. 将样品置于 4 °C 的旋转混匀仪或摇床上，转速 20-30 RPM，确保管盖稍微抬高，以避免磁珠卡在盖子中。

## 第二天 (约 5 小时)

### 漂洗 (10 分钟)

1. 快速颠倒离心管并将离心管置于磁条或磁力架上并置于室温。
2. 弃上清。
3. 每个样品加入 200 µL Cell Permeabilization Buffer，不要扰动沉淀。
4. 弃上清。
5. 重复 3-4 步 1 次，总计漂洗 2 次。

### ChIC/CUT&RUN pAG-MNase 结合 (20 分钟)

6. 每个样品加入 50 µL Cell Permeabilization Buffer。
7. 每个样品加入 2.5 µL ChIC/CUT&RUN pAG-MNase。
8. 把离心管从磁力架上取下，移液器轻轻吹吸重悬磁珠。
9. 室温静置 10 分钟。
10. 将离心管置于磁条或磁力架上。
11. 弃上清。
12. 每个样品加入 200 µL Cell Permeabilization Buffer，不要扰动沉淀。
13. 弃上清。
14. 重复 12-13 步 1 次，总计漂洗 2 次。
15. 每个样品加入 50 µL Cell Permeabilization Buffer。
16. 将离心管置于冰上 2 分钟以冷却样品进行后续的步骤。

### 消化目标染色质 (3 小时)

17. 每个样品中加入 1 µL 0.1 M CaCl<sub>2</sub>。
18. 移液器轻轻吹吸重悬磁珠，并放回冰上。
19. 置于 4 °C 的旋转混匀仪或摇床上 2 小时，转速 20-30 RPM。
20. 从旋转混匀仪或摇床上取下样品置于冰上。
21. 每个样品中加入 40 µL Stop Solution。
22. 移液器轻柔吹吸混匀。

23. 将样品置于 37 °C 热循环仪中孵育 10 分钟，设置盖子温度为 65 °C，这一步目的是将染色质片段释放入上清中。
24. 将离心管置于磁力架上至少 30 秒。

## ChIC/CUT&RUN DNA 分离和纯化 (45 分钟)

25. 小心地将样品转移到新的 1.5 mL 离心管中，避免取到磁珠。

**注：**最好将上清转移至新离心管中并置于磁条或磁力架上以确保在后续的步骤中没有磁珠/细胞。

26. 在进行后续步骤前，请确保在 DNA Purification Binding Buffer 试剂瓶中加入新鲜的异丙醇，使得异丙醇终浓度为 60%。每个样品需要 450 µL DNA Purification Binding Buffer。
27. 稍稍涡旋并于室温静置 1 分钟。
28. 将样品和缓冲液转移至 DNA Purification Columns SF。
29. 离心 (16,000 × g, 1 分钟)。
30. 弃去收集管中废液。
31. 在每个纯化柱中加 200 µL DNA Purification Wash Buffer。
32. 将纯化柱以最高转速离心 (16,000 × g, 1 分钟)。
33. 重复第 31-32 步 1 次，总计漂洗 2 次。
34. 弃去收集管中废液。
35. 将纯化柱离心 (16,000 × g, 1 分钟) 以除尽残留的 DNA Purification Wash Buffer。
36. 将纯化柱置于新的收集管中 (收集管可以是去除盖子后的 1.5 mL 离心管)。
37. 在每个纯化柱中加 55 µL DNA Purification Elution Buffer。
38. 室温静置 1 分钟。
39. 离心 (16,000 × g, 1 分钟)。
40. 将洗脱的 ChIC/CUT&RUN DNA 转移到新的离心管中，样品现在已经可用于 NGS 文库制备。如不立即用于建库，可在 -80 °C 保存一周。

## NGS 文库制备 (3 小时)

1. 对于 NGS 文库制备，我们建议使用试剂盒，如 NEBNext® Ultra™ II for DNA Library Preparation for Illumina。以下说明是基于 NEBNext® Ultra™ II for DNA Library Preparation for Illumina 试剂盒开发的。按照 NEBNext® Ultra™ II for DNA Library Preparation for Illumina 的说明进行以下附加步骤，您还需要用于 Illumina 的

NEBNext Multiplex Oligos。

2. 以 1:25 的比例稀释接头引物至 0.6  $\mu\text{M}$ ，然后依照 NEBNext®Ultra™II 的建库试剂盒说明书的 Step2 进行。
3. 对于 Step3，使用 SPRI 磁珠进行双轮分选，首先以 0.4 $\times$ 磁珠/样品的比例分选，然后再以 1.5 $\times$ 磁珠/样品的比例分选。对于第一次分选，磁珠体积为样品体积的 0.4 倍。对于第二次 SPRI 分选，加入的磁珠体积应为样品初始体积的 1.1 倍，最终体系中磁珠体积为初始样品的 1.5 倍。操作 Step 3.A1 到 3.A9，不需操作 Step 3B。

**重要提示！** 在 SPRI 漂洗之前测量样品体积，因为高粘度会导致预期体积有偏差。

4. Step 3A.10 中需要快速旋转离心管。
5. Step 3A.12 中，用 17  $\mu\text{L}$  DNA Purification Elution Buffer 洗脱磁珠上的 DNA。
6. 按照 NEBNext®Ultra™II 的说明 Step 4 进行 DNA 文库制备，12 个 PCR 循环，对 CUT&RUN 文库进行 PCR 富集，并按照 Multiplex Oligos Primer Set 的说明操作。
7. PCR 富集后，对 PCR 产物进行双轮 SPRI 磁珠分选。对于第一次分选，磁珠体积为样品体积的 0.4 倍。对于第二次 SPRI 分选，加入的磁珠体积应为原样品体积的 1.2 倍。
  - 7A 50  $\mu\text{L}$  PCR 产物中加入 20  $\mu\text{L}$  SPRI 磁珠(0.4 $\times$ 磁珠/原样品)，移液器上下吹吸 10 次混匀。
  - 7B 室温孵育 5 分钟。
  - 7C 置于磁力架上 5 分钟以吸附磁珠。
  - 7D 上清转移至新离心管，弃去磁珠。
  - 7E 第二次漂洗：将 40  $\mu\text{L}$  SPRI 磁珠加入到离心管中(1.2 $\times$ 磁珠/原样品)，移液器上下吹吸 10 次混匀。
  - 7F 室温孵育 5 分钟然后置于磁力架上 5 分钟以吸附磁珠。
  - 7G 弃上清。
  - 7H 不要将离心管从磁力架上取下，用 200  $\mu\text{L}$  80%乙醇轻柔地漂洗磁珠。
  - 7I 吸出上清并弃去。
  - 7J 重复步骤 7H-7I，再次漂洗。
  - 7K 使用 10 $\mu\text{L}$  移液器，去除管中剩余的乙醇，在室温下晾干约 5 分钟，不要过度干燥(磁珠从光亮变至哑光即可)。
  - 7L 从磁力架上取下离心管，用 22  $\mu\text{L}$  的 DNA Purification Elution Buffer 洗脱磁珠上的 DNA。
  - 7M 室温孵育 1 分钟。
  - 7N 将离心管置于磁力架，并室温放置 5 分钟以充分吸附磁珠。
  - 7O 吸取 20  $\mu\text{L}$  洗脱的溶液，将其转移到新的联排管中。储存在 -20°C 或直接进行

Illumina NGS 测序。

## 参考文献

1. Schmid, M. et al. (2004) Mol. Cell., 16(1): 147-157
2. Skene, P.J. et al. (2017) Elife 6, e21856
3. Skene, P.J. et al. (2018) Nat. Protoc., 13, 1006-1019

## 常见问题指南

问题	建议
看不见细胞核沉淀	沉淀可能是看不见的。 确保带盖子的离心管在离心机中朝向是确定的，这样才能知道沉淀应该处于离心管的什么位置，并且在之后的操作中也需要小心。
推荐的测序深度是多少？	对于转录因子，我们推荐测序深度为 25M reads；对于一些组蛋白修饰，测序深度达 2M reads 即可。
检测转录因子需要的细胞量是多少？	我们推荐 500,000 个细胞用于 CUT&RUN 实验，且需使用已被验证可用于 CUT&RUN 的抗体。
背景太高	确保一开始使用的是活细胞。 可以使用以下方法检查细胞是否受损：Coutess II 等自动细胞计数方法，或台盼蓝染色后用血细胞计数器计数。
阴性对照可以产生文库吗？	阴性对照 IgG 可以产生文库。
SPRI 磁珠没有办法沉淀或者沉淀所需时间太长	首先用磁条将 SPRI 磁珠聚集在离心管的顶部，然后逐渐向离心管的底部移动，最后把管子放在磁力架上。

## 技术服务

如果您在任何时候需要帮助，请致电或发送电子邮件到 Active Motif 技术服务，地址如下所列。

北美	免费客服电话：877 222 9543 直拨电话：760 431 1263 传真：760 431 1351 E-mail: tech_service@activemotif.com
欧洲	免费客服电话（英国）：0800/169 31 47 免费客服电话（法国）：0800/90 99 79 免费客服电话（德国）：0800/181 99 10 直拨电话：+32 (0)2 653 0001 传真：+32 (0)2 653 0050 E-mail: eurotech@activemotif.com
日本	直拨电话：+81 (0)3 5225 3638 传真：+81 (0)3 5261 8733 E-mail: japantech@activemotif.com
中国	直拨电话：(86)-21-20926090 手机：18521362870 E-mail: techchina@activemotif.com