Nanobody-Tn5 Transposase

产品目录号：RK20598

产品组分

组分名称	组分编号	规格 40 μg
Anti-Rabbit Tn5 Transposase（2mg/ml）	RM20581	20 μL
Anti-Mouse Tn5 Transposase（2mg/ml）	RM20582	20 μL
1X Tn5 Dilution Buffer	RM20188	1 mL
Assemble Buffer	RM20187	1 mL
5X Tagment Buffer	RM20250	1 mL
Termination Buffer	RM20251	1 mL
Annealing Buffer	RM20821	1 mL

产品说明

Anti-Rabbit Tn5 Transposase 和 Anti-Mouse Tn5 Transposase 是将纳米二抗和 Tn5 转座酶融合改造而成，可以分别结合兔和小鼠的一抗，同时也能够切割 DNA 并插入接头序列；Anti-Rabbit Tn5 Transposase 和 Anti-Mouse Tn5 Transposase 单体分子量分别为 73.01 kD 和 73.9 kD，在组装带有不同 index 接头后，可以用来同时进行双靶点 CUT&TAG 以及 ATAC-seq 实验，是一种高效的染色质分析工具。Nanobody Tn5 转座酶与 19 bp ME 序列结合形成 Transposome（转座体），然后该转座体随机攻击并切割靶 DNA 的磷酸二酯键，最后，Nanobody Tn5 转座酶催化 ME 的 3’-OH 末端与靶 DNA 暴露的 5’-磷酸化末端形成磷酸二酯键，即完成转座反应（DNA 片段化或者 DNA 插入）。转座反应会在转座位置的另一条 DNA 链上产生 9 bp 的 gap。

产品来源

在大肠杆菌中重组表达并纯化获得。

保存温度

-20℃

应用

二代测序建库

CUT&TAG

ATAC-seq

分子量

73.01 kD/73.9 kD

反应条件

在 1X Tagment Buffer 反应内，37℃ 或 55℃*反应（针对不同应用使用不同反应温度）

***注：不同应用推荐的反应温度不同，体外实验推荐 55℃反应，体内实验推荐 37℃反应。**

终止反应

在 Termination Buffer 中，转座反应可被终止。

E-mail:cn.market@abclonal.com
TEL:400-999-6126

For research purposes only. Not for therapeutic or diagnostic purposes.
Please visit http://abclonal.com.cn for a complete listing of recommended products.

操作说明

1. 接头制备

1.1. 合成适配 illumina 测序平台的 Tn5 接头序列

MErev：5'-phos-CTGTCTCTTATACACATCT-3'

ME-A：5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3'

ME-B：5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[**i5 index X**]TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3'

***注：index 序列需自行设计**

1.2. 使用 1X TE Buffer（10 mM Tris-HCl，1 mM EDTA，pH 8.0）分别将引物稀释至 100 μM。

1.3. 分别配制如下反应体系：

MixA	**10 μL**	**MixB**	**10 μL**
Annealing Buffer	2 μL	Annealing Buffer	2 μL
ME-A (100 μM)*	4 μL	ME-B (100 μM)*	4 μL
MErev (100 μM)	4 μL	MErev (100 μM)	4 μL

***注：可根据试剂使用更改反应体系，设计 ME-A 和 ME-B 的接头序列。**

1.4. 将 MixA 和 MixB 涡旋震荡充分混匀，短时离心收集溶液于 PCR 管底，按照如下反应程序。

温度	**时间**	**变温速度**	**循环数**
95 ℃	2 min	1℃/s	1
22 ℃	5 min	0.1℃/s	1
4 ℃	hold	1℃/s	1

1.5. 反应结束后，将 MixA 和 MixB 等体积混合均匀，得到 Adapter mix（40 μM），-30℃~-15℃保存。

2. 转座体制备

2.1. 配制如下反应体系（根据实际投入量进行放大或缩小）。

试剂名称	**30 μL**
Adapter mix (40 μM)	3 μL
Anti-Rabbit Tn5 Transposase*	4.38 μL
1X Tn5 Dilution Buffer	3.87 μL
Assemble Buffer	10.5 μL
ddH_2O	Up to 30 μL

试剂名称	**30 μL**
Adapter mix (40 μM)	3 μL
Anti-Mouse Tn5 Transposase*	4.43 μL
1X Tn5 Dilution Buffer	3.82 μL
Assemble Buffer	10.5 μL
ddH_2O	Up to 30 μL

***注：Anti-Rabbit Tn5 Transposase 蛋白浓度约为 27.39 μM；Anti-Mouse Tn5 Transposase 蛋白浓度约为 27.06 μM；可以根据实验需求调整蛋白与接头的组装比例。**

2.2. 移液枪吸打混匀,置于金属浴或 PCR 仪中，35℃组装 2 hr，至于冰上，该组装产物可用于后续 DNA 片段化反应。

2.3. 若需要-20℃长期保存，可以将组装产物中的甘油终浓度调整到 50%，其中 Assemble Buffer 甘油浓度 20%，Tn5 Transposase 储存在 50%甘油 buffer 中。

3. 转座子活性检测

3.1. DNA 片段化

3.1.1. 无菌 PCR 管中准备如下 DNA 片段化体系（可以根据需要等比例放大/缩小打断体系）：

试剂名称	加入量
5X Tagment Buffer	4 μL
gDNA *	50-100 ng
Transposome/assembly product *	1 μL
ddH_2O	Up to 20 μL

***注：组装产物的投入量需要根据模板投入量与转座复合体组装时的添加量进行综合考虑添加。若后期结果出现打断片段偏大则表明模板过多转座复合体投入过少，反之亦然，需要根据实验打断的片段大小需要来进行滴定调整。**

3.1.2. 使用移液器上下吸打，充分混匀。

3.1.3. 将 PCR 管放到 PCR 仪上（热盖温度 75℃），进行如下的反应程序：

温度	时间	循环数
55 ℃	5-15 min *	1
12 ℃	hold	1

***注：可以根据实验需要，适当延长反应时间，确保充分反应。**

3.2. 终止反应

3.2.1. 片段化反应结束后，立即加入 2 μL Termination Buffer (RM20251)，涡旋混匀或使用移液器上下吸打混匀。

3.2.2. 室温孵育 5 min，避免片段大小有波动。

注：此步骤是终止打断反应，使转座酶和 DNA 片段相互分离；若不进行此步骤会导致文库产量降低。

4. 片段化产物扩增

4.1. 在 PCR 管中配制以下组分：

试剂名称	加入量
片段化 DNA	22 μL
PCR Mix *	23 μL
N5 Primer（10 μM）**	2.5 μL
N7 Primer（10 μM）	2.5 μL
ddH_2O	Up to 50 μL

***注：PCR Mix 需用非热启动的聚合酶，比如 ABclonal 的 RM20239，RM20242。**

****注：如使用 ABclonal 商品化 Tn5 index RK20290，N7 Primer 可以正常使用，N5 Primer 请用 5'-AATGATACGGCGACCACCGAGA-3'（需自行合成）代替**

4.2. 混匀，快速离心后放入 PCR 仪中开始循环程序（热盖 105℃）

步骤	温度	时间	循环数
补齐 Gap	**72 ℃**	**3 min***	**1**
预变性	98 ℃	30 s	1
变性	98 ℃	15s	
退火	60 ℃	30 s	N**
延伸	72 ℃	1min	
终延伸	72 ℃	5 min	1
Hold	4-12 ℃	hold	1

***注：72℃孵育 3 min 为缺口修复过程，此步骤不可省略；**

****注：扩增循环数根据起始 DNA 投入量调整。**

建库优化策略

1. 片段化反应结果不理想（如片段较大/较小），可以在转座体组装步骤调整组装接头和 Tn5 转座酶的用量，或者在片段化反应步骤调整转座体的用量。
2. 建库片段偏大：提高组装酶与接头用量。
3. 建库片段偏小：减少组装产物加入量。