

Code No. 6137

研究用

Takara

DNA Fragmentation Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 试剂盒外必备试剂与仪器	1
● 使用注意	1
● 使用方法	1
● 实验例	3
● Q&A	5
● 关联产品	5

● 制品说明

本制品是不需使用超声波破碎仪等特殊仪器、在酶的作用下对基因组 DNA 等长链 DNA 随机片段化、并对 DNA 片段进行末端平滑化处理的试剂盒。使用本试剂盒处理的 DNA 片段可直接与平滑末端载体进行连接。如不需要进行末端平滑化处理，可以在 DNA 片段化反应后终止反应。本制品还适用于甲基化 DNA 的浓缩和快速 DNA 序列分析的预处理。

● 制品内容 (20 次量)

1. Enzyme-1	20 μ l
2. Dilution Buffer-1	1,040 μ l
3. A solution	20 μ l
4. B solution	50 μ l
5. Stop solution	400 μ l
6. 150 mM MgCl ₂	40 μ l
7. Dilution Buffer-2	200 μ l
8. Enzyme-2	20 μ l
9. 0.5 M EDTA	50 μ l
10. dH ₂ O	1 ml \times 10 支

● 保存: -20℃。

注意: 组份3、4、6、9、10可于4℃存放。

● 试剂盒外必备试剂与仪器

1. 试剂

电泳上样缓冲液

Loading Buffer中的指示剂 (Dye) 应选择与DNA片段 (100~1,000 bp) 不重叠的指示剂, 推荐使用 Orange G。

由于溴酚蓝 (BPB) 和二甲苯青 (Xylene Cyanol) 与DNA片段重叠, 应避免使用。

2. 仪器

Thermal Cycler PCR扩增仪 (至少1台, 2台更好)。

● 使用注意

以下为使用本试剂盒时的注意事项, 使用前请一定认真阅读。

1. 使用的试剂要在冰上放置, 混合液的配制也须在冰上操作, 避免反应管内温度上升。

2. 使用的 DNA 必须是经 RNaseA、酚/氯仿等精制的高纯度 DNA。如有 RNA 污染, 不能正确判断片段化 DNA 的分布。

可使用 NucleoSpin Tissue (Code No. 740901.50) 或 NucleoSpin Blood (Code No. 740951.50) 等试剂盒制备基因组 DNA。

3. 使用的 DNA 溶液中所含 EDTA 的浓度不要超过 1 mM。

● 使用方法

1. 基因组DNA片段化反应

A) 确定反应体积。

基因组DNA在100 ng以下: 10 μ l反应体系;

基因组DNA在100 ng~1 μ g之间: 20 μ l反应体系。

注意：基因组DNA超过1 μg 时，以1 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ 的反应体系增加反应管数或扩大反应体系，很好地为5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 。

B) 将2台Thermal Cycler PCR仪的温度分别设定为16°C和70°C。只有1台仪器时设定为16°C。

C) 在冰上将基因组DNA以外的下列试剂添加到0.2 ml Microtube中，配制混合液，充分混匀后再加入基因组DNA。用移液枪轻轻吸打或用手轻弹管壁，离心后使用，避免产生气泡，不能使用振荡器混匀。

Dilution Buffer-1	1.9 μl
A solution	1 μl
B solution	1 μl
基因组 DNA	1 μg
dH ₂ O	up to 19 μl

注意：以上为基因组DNA 1 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ 反应体系；如果基因组DNA量少，那么要调整为适合的体系。

D) Enzyme-1 的稀释（使用前调制）。

注意：稀释后的Enzyme-1请在10分钟内使用，不能保存。

【稀释方法】

在冰上按下列顺序在1.5 ml Microtube中配制混合液，充分混匀。

dH ₂ O	450 μl
Dilution Buffer-1	50 μl

轻轻振荡离心。

将1 μl 的Enzyme-1加入到配好的混合液中，然后将200 μl 的移液枪调到100 μl 刻度后，轻轻吸打10次左右，避免产生气泡。再上下颠倒混匀（5次以下），离心。不能使用振荡器混匀。

E) 确认Thermal Cycler PCR仪的温度在16°C后，将1 μl 稀释后的Enzyme-1添加到C)的混合液中。吸打数次后，立即在16°C条件下进行反应。推荐反应时间5-8分钟。

注意：在冰上进行试剂添加和混匀的操作。

F) 不要移动反应管，在Thermal Cycler PCR仪上直接加入20 μl 的Stop solution终止反应。用移液枪吸打2-3次后，再转移到冰上吸打数次。

G) 确认Thermal Cycler PCR仪温度为70°C后，将F)的0.2 ml Microtube转移到PCR仪上。

H) 70°C反应5分钟后，转移到冰上。

注意：在冰上放置2分钟以上。

I) 只进行DNA片段化反应时，在H)的0.2 ml Microtube中加入1 μl 的0.5 M EDTA，用移液枪吸打，充分混匀后，进行DNA片段的精制。

2. 末端平滑化反应

A) 将两台扩增仪分别设定为16°C和70°C。如果只有一台，则设定为16°C。

B) Enzyme-2 的稀释（使用前调制）

【稀释方法】

在冰上准备0.2 ml Microtube，试剂按下述的比例配成混合液后，轻轻吸打，充分混匀，避免产生气泡。

Dilution Buffer-2 : Enzyme-2 = 9 : 1

C) 在1-H)的0.2 ml Microtube中加入2 μl 的150 mM MgCl₂，移液枪吸打，充分混匀，避免产生气泡。不能使用振荡器混匀。

D) 将2 μl 稀释后的Enzyme-2添加到0.2 ml Microtube中，吸打数次混匀后，立即在16°C反应10分钟。

注意：此步操作在冰上进行。

E) 反应结束后，把0.2 ml Microtube转移到冰上，只有一台扩增仪时，把温度调至70°C。

F) 加入1 μl 的0.5 M EDTA，吸打，充分混匀后离心。

G) 确认 Thermal Cycler PCR 仪设定的温度为 70°C后，将 0.2 ml Microtube 转移到 Thermal Cycler PCR 仪上反应 5 分钟。

H) 将0.2 ml Microtube转移到冰上。

片段化 DNA 的确认

取相当于 200~250 ng 量基因组 DNA [2-H] 的反应液约 10 μl 进行 1.5% Agarose 凝胶电泳。

片段化 DNA 的精制实验例

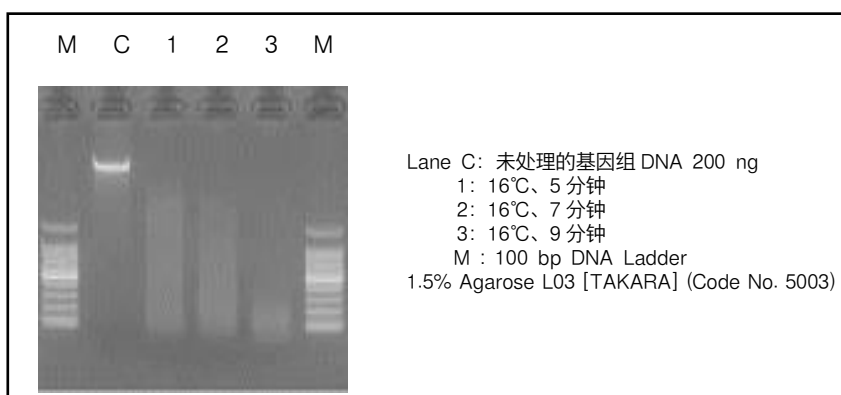
反应液经苯酚/氯仿或 DNA 纯化试剂盒纯化，除去短链 DNA、dNTP、酶等杂质。

注意：乙醇沉淀时请使用核酸共沉剂（例如 Dr.GenTLE Precipitation Carrier (Code No. 9094)）。

● 实验例

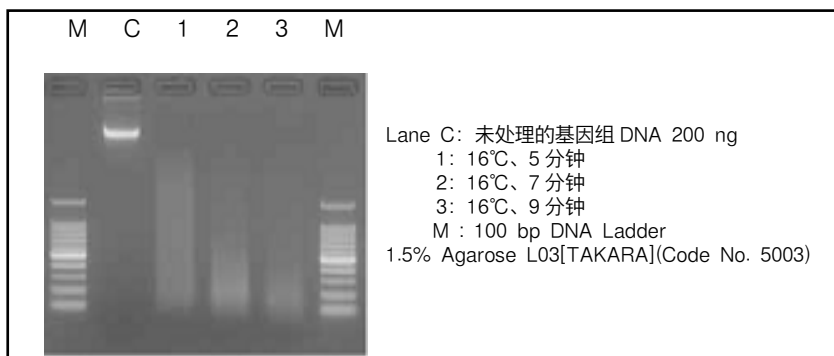
1. 使用 1 μg 大肠杆菌 (W3110) 基因组 DNA 进行片段化反应

按照“操作方法”进行片段化反应（16°C：5 分钟、7 分钟、9 分钟）及末端平滑化反应后，取各反应液 11 μl 进行 Agarose 凝胶电泳，确认 DNA 片段化情况。

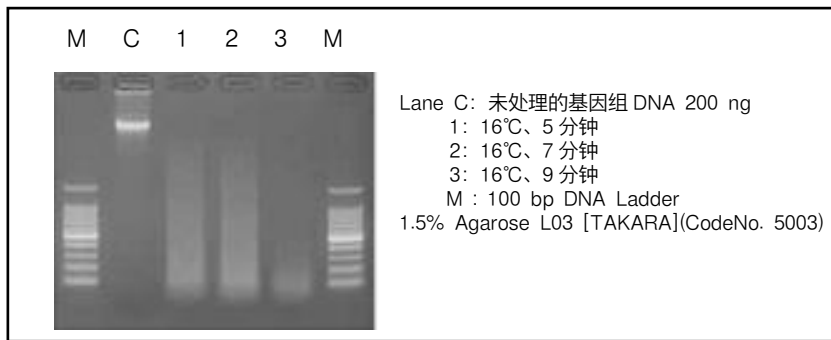


2. GC 含量偏低和偏高的基因组 DNA 片段化反应例

A) 取1 μg *Pyrococcus furiosus* DSM 3638基因组DNA (GC含量40%) ,按照“操作方法”进行片段化反应（16°C：5分钟、7分钟、9分钟）及末端平滑化反应后，取各反应液11 μl进行Agarose凝胶电泳，确认DNA片段化情况。



B) 取 500 ng *Thermus thermophilus* HB8 Genomic DNA Solution (Code No. 3071) (GC 含量 69%) , 按“操作方法”进行片段化反应 (16°C: 5 分钟、7 分钟、9 分钟) 及末端平滑化反应后, 各取反应液 11 μl 进行 Agarose 凝胶电泳, 确认 DNA 片段化情况。



3. 片段化DNA在平滑末端载体pUC118 *Hinc* II/BAP中的克隆及插入片段的确认

样品: 大肠杆菌 (W3110) 基因组DNA 1 μg

片段化反应条件: 16°C, 8分钟

末端平滑化反应后, 反应液经柱纯化回收, 得到25 μl DNA溶液。取5 μl DNA溶液与25 ng pUC118 *Hinc* II/BAP (Code No. 3322) 载体, 使用Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Code No. 6027) 进行连接反应。16°C 30分钟连接反应后, 在100 μl *E. coli* JM109 Competent Cells (Code No. 9052) 中加入一半连接反应液进行转化。转化后, 添加900 μl的SOC培养液, 振荡培养后, 取25–50 μl培养液在LB+Amp的L-琼脂平板培养基上培养, 菌落计数显示, 白色菌落为150–300个/plate, 蓝色菌落为35–70个/plate。

使用下列试剂和引物确认载体中插入片段的大小。

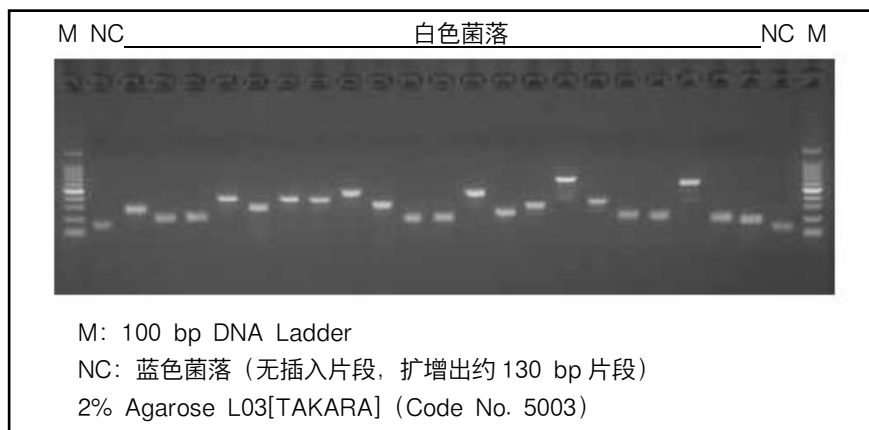
SapphireAmp Fast PCR Master Mix (Code No. RR350A)

M13 Primer M4 (Code No. 3832A)

Ladderman Sequencing Primer RV-M

反应条件:

94°C	1	min	} 30 cycles
98°C	5	sec	
55°C	5	sec	
72°C	10	sec	



● Q&A

Q1. 片段化反应后的 DNA 片段太小，怎么办？

A1. Enzyme-1 是一种对温度非常敏感的酶，全部操作应在冰上进行。添加酶时，反应管不要从冰上移开，手不要触摸到反应液部分，否则反应管内温度上升，容易使 DNA 片段化程度过大。另外，也可以缩短片段化反应时间，以解决 DNA 片段化程度过大的问题。

Q2. DNA 片段化不充分，为什么？

A2. 有可能是反应液没有充分混匀。

注意：在进行 1-C) 和 2-C) 操作步骤时，一定要将混合液充分混匀。

● 关联产品

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient (Code No. TP600)

Agarose L03 [TAKARA] (Code No. 5003)

100 bp DNA Ladder (Code No. 3407)

Thermus thermophilus HB8 Genomic DNA Solution (Code No. 3071)

Alkaline Phosphatase (*E. coli* C75) (Code No. 2120A/B)

Alkaline Phosphatase (Calf intestine) (Code No. 2250A/B)

pUC118 *Hinc* II/BAP (Code No. 3322)

Dr. GenTLE™ Precipitation Carrier (Code No. 9094)

Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Code No. 6027)

E. coli JM109 Competent Cells (Code No. 9052)

SapphireAmp® Fast PCR Master Mix (Code No. RR350A)

M13 Primer M4 (Code No. 3832A)

NucleoSpin Tissue (Code No. 740901.10/.50/.250)

NucleoSpin Blood (Code No. 740951.10/.50/.250)

SapphireAmp is a registered trademark of Takara Bio Inc.

Dr. GenTLE and Thermal Cycler Dice are trademarks of Takara Bio Inc.

注意

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。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>