

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
● 试剂盒外必备试剂与仪器	1
● 保 存	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 $\mu$ l
2. Dilution Buffer-1	1,040 $\mu$ l
3. A solution	20 $\mu$ l
4. B solution	50 $\mu$ l
5. Stop solution	400 $\mu$ l
6. 150 mM MgCl <sub>2</sub>	40 $\mu$ l
7. Dilution Buffer-2	200 $\mu$ l
8. Enzyme-2	20 $\mu$ l
9. 0.5 M EDTA	50 $\mu$ l
10. dH <sub>2</sub> O	1 ml $\times$ 10 支

---

## ● 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)。

## ● 保存: -20℃。

注意: 组份3、4、6、9、10可于4℃存放。

## ● 使用注意

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. 740952.10/.50/.250) 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  $\mu$ l反应体系;

基因组DNA在100 ng~1  $\mu$ g之间: 20  $\mu$ l反应体系。

**注意:** 基因组DNA超过1  $\mu$ g时，以1  $\mu$ g/20  $\mu$ l的反应体系增加反应管数或扩大反应体系，很好地为 5  $\mu$ g/100  $\mu$ 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 $\mu$ l
A solution	1 $\mu$ l
B solution	1 $\mu$ l
基因组 DNA	1 $\mu$ g
dH <sub>2</sub> O	up to 19 $\mu$ l

**注意：**以上为基因组 DNA 1  $\mu$ g/20  $\mu$ 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 <sub>2</sub> O	450 $\mu$ l
Dilution Buffer-1	50 $\mu$ l

轻轻振荡离心。

将 1  $\mu$ l 的 Enzyme-1 加入到配好的混合液中，然后将 200  $\mu$ l 的移液枪调到 100  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 的 150 mM MgCl<sub>2</sub>，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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 进行 1.5% Agarose 凝胶电泳。

### 片段化 DNA 的精制实验例

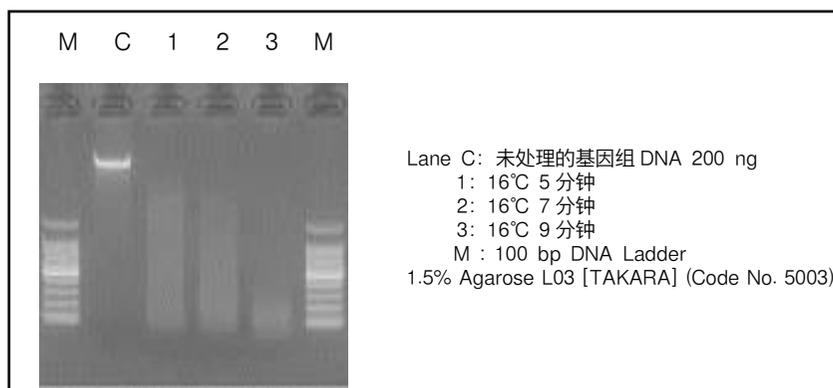
反应液经苯酚/氯仿或 DNA 纯化试剂盒纯化，除去短链 DNA、dNTP、酶等杂质。

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

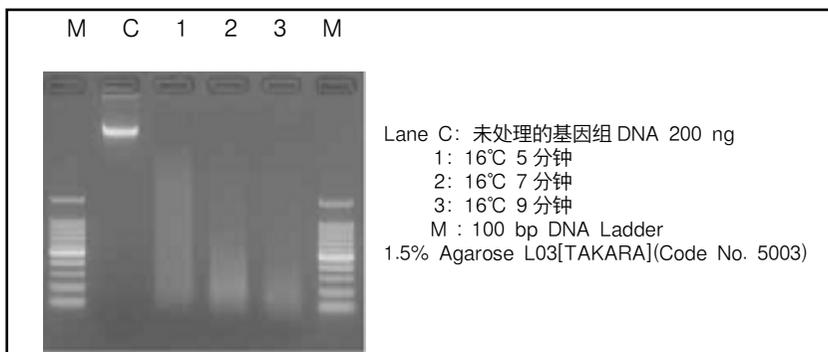
### 1. 使用 1 $\mu$ g 大肠杆菌 (W3110) 基因组 DNA 进行片段化反应

按照“操作方法”进行片段化反应（16 $^{\circ}$ 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  $\mu$ l 进行 Agarose 凝胶电泳，确认 DNA 片段化情况。

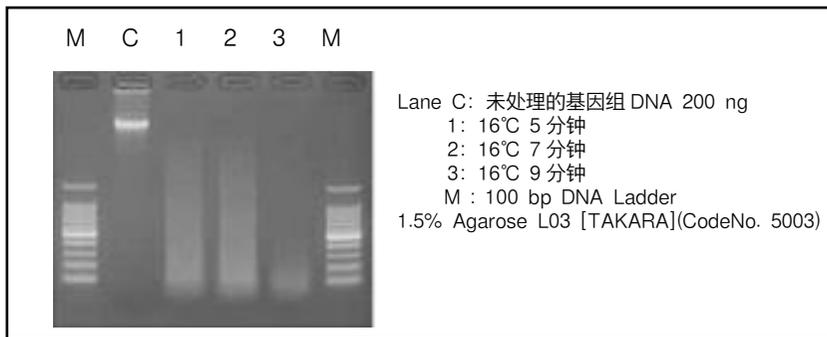


### 2. GC 含量偏低和偏高的基因组 DNA 片段化反应例

A) 取 1  $\mu$ g *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 $^{\circ}$ 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  $\mu$ l 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。

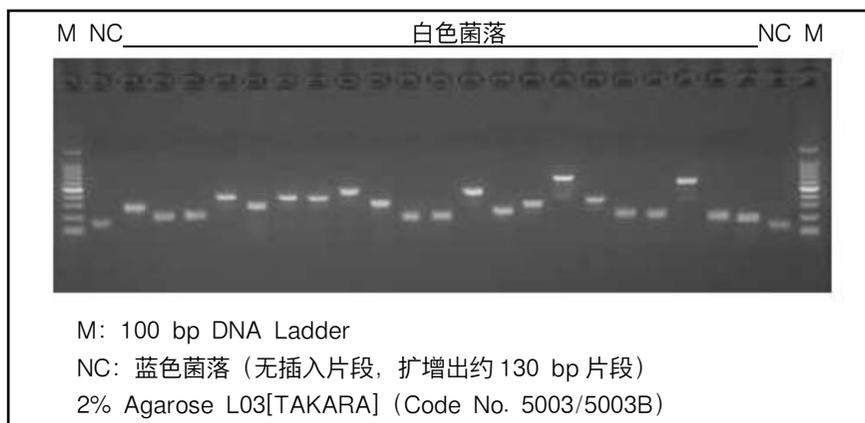
SapphireAmp Fast PCR Master Mix (Code No. RR350A)

M13 Primer M4 (终卖)

Ladderman Sequencing Primer RV-M (终卖)

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

Agarose L03 (Code No. 5003/5003B)

100 bp DNA Ladder (Dye Plus) (Code No. 3422)

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

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

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

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)

NucleoSpin Tissue (Code No. 740952.10/.50/.250)

SapphireAmp is a registered trademark of Takara Bio Inc.

Dr. GenTLE is a trademark 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](http://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>