

DNA Fragmentation Kit

使用说明书

TaKaRa Code : D6137

制品说明

本制品是不需使用超声波破碎等特殊仪器、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

【试剂盒之外所需准备的仪器和试剂】

Thermal Cycler PCR仪

电泳用Loading Buffer*

* 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) 和二甲基菁 (Xylene Cyanol) 与DNA片段重叠, 应避免使用。

保 存 : -20°C

试剂盒中组份3、4、6、9、10也可于4°C保存。

注意事项

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。
3. 使用的DNA溶液中所含EDTA的浓度不要超过1 mM。

操作方法

A. 基因组DNA片段化反应

1. 准备0.2 ml Microtube。

【推荐反应体系】

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。

基因组DNA超过1 μ g时, 以1 μ g/20 μ l的反应体系增加反应数。反应体系最大限为5 μ g/100 μ l。

2. 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。

* 以下为基因组DNA 1 μ g/20 μ l反应体系的操作方法。

3. 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 μ l
A solution	1 μ l
B solution	1 μ l
基因组 DNA	1 μ g (x μ l)
dH ₂ O	(15.1 - x) μ l (up to 19 μ l)

4. Enzyme-1的稀释 (使用前调制)。
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。(多个反应管时使用同一个稀释的酶)。

dH ₂ O	450 μ l
Dilution Buffer-1	50 μ l

轻轻振荡离心后, 将1 μ l的Enzyme-1加入到配好的混合液中, 然后将200 μ l的移液枪调到100 μ 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。

5. 确认Thermal Cycler PCR仪的温度在16°C后, 将1 μ l稀释后的Enzyme-1添加到3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)

* 在冰上进行操作 避免触摸到反应液部分 稀释后的Enzyme-1添加后立即进行16°C反应。

6. 不要移动反应管, 在Thermal Cycler PCR仪上直接加入20 μ 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。

7. 确认Thermal Cycler PCR仪温度为70°C后, 将6的0.2 ml Microtube转移到PCR仪上。

8. 70°C反应5分钟后, 转移到冰上。

* 在冰上放置2分钟以上, 再添加以下试剂。

9. 只进行DNA片段化反应时, 在8的0.2 ml Microtube中加入1 μ 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。

B. 末端平滑化反应

1. Enzyme-2的稀释(使用前调制)

【稀释方法】

在冰上准备0.2 ml Microtube 试剂按下记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

2. 在A-8的0.2 ml Microtube中加入2 μ l的150 mM MgCl₂, 用移液枪吸打, 充分混匀, 避免产生气泡。不能使用振荡器混匀。

3. 确认Thermal Cycler PCR仪设定的温度稳定在16°C后, 将2 μ l稀释后的Enzyme-2添加到2的0.2 ml Microtube中, 吸打数次混匀后, 立即在16°C反应10分钟。

* 此步操作在冰上进行。

4. 反应结束后, 把0.2 ml Microtube转移到冰上。

5. 加入1 μ l的0.5 M EDTA, 吸打, 充分混匀后离心。

6. 确认Thermal Cycler PCR仪设定的温度稳定在70°C后, 将0.2 ml Microtube转移到Thermal Cycler PCR仪上反应5分钟。

7. 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[B-7]的反应液约 10 μ l 进行 1.5% Agarose 凝胶电泳。

片段化 DNA 的精制(例)

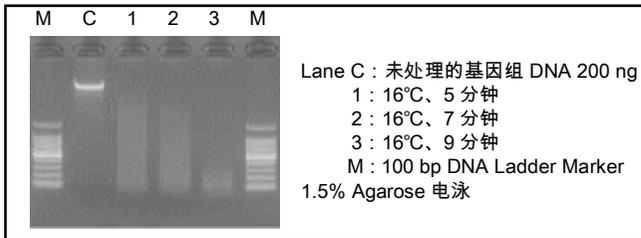
反应液经苯酚/氯仿或 Column 纯化, 除去短链 DNA、dNTP、酶等杂质后进行 DNA 的浓缩。

* 乙醇沉淀时请使用核酸共沉剂 (TaKaRa Code : D605A) 。

实验例

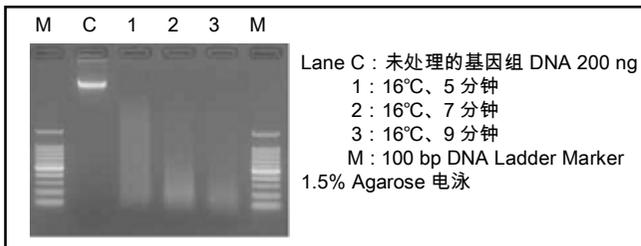
实验例-1 : 使用 1 μ g 大肠杆菌 (W3110) 基因组 DNA 进行片段化反应

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 μ l 进行 Agarose 凝胶电泳, 确认 DNA 片段化情况。

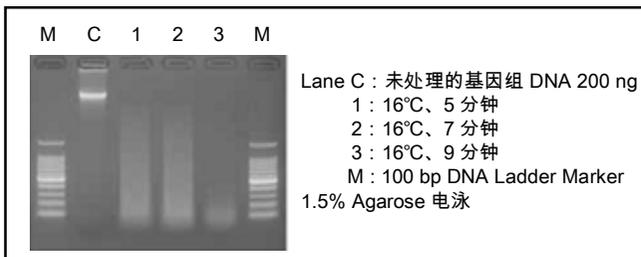


实验例-2 : GC 含量偏高和偏低的基因组 DNA 片段化反应例

1. 取 1 μ 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 μ l 进行 Agarose 凝胶电泳, 确认 DNA 片段化情况。



2. 取 500 ng *Thermus thermophilus* HB8 Genomic DNA Solution (GC 含量 69%), 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, 各取反应液 11 μ l 进行 Agarose 凝胶电泳, 确认 DNA 片段化情况。



实验例-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。

使用Sample : 大肠杆菌 (W3110) 基因组DNA 1 μ g

片段化反应时间 : 16 $^{\circ}$ C、8分钟

末端平滑化反应后, 反应液经Column精制回收, 得到25 μ l溶液。

取5 μ l DNA与25 ng pUC118 *Hinc* II/BAP (TaKaRa Code : D3322) 载体, 使用TaKaRa BKL Kit (TaKaRa Code : D6127) 进行连接反应。16 $^{\circ}$ C 30分钟连接反应后, 在100 μ l *E.coli* Competent Cells JM109 (TaKaRa Code : D9052) 中加入一半连接反应液进行转化。转化后, 添加900 μ l的SOC培养液, 振荡培养后, 取25-50 μ l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, 白色菌落数约占80%。

使用下列试剂和引物确认载体中插入片段的大小。

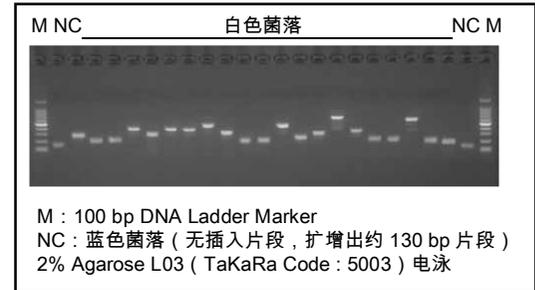
SapphireAmp[®] Fast PCR Master Mix (TaKaRa Code : DRR350A)

M13 Primer M4 (TaKaRa Code : D3832)

*Bca*BEST Sequencing Primer RV-M (TaKaRa Code : D3880)

反应条件 :

94 $^{\circ}$ C	1 min	} 30 Cycles
98 $^{\circ}$ C	5 sec	
55 $^{\circ}$ C	5 sec	
72 $^{\circ}$ C	10 sec/kbp	



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。在进行 A.-3. 和 B-2. 操作步骤时, 需将混合液充分混匀。