

QKGEN® 双链 DNA 片段化试剂盒

产品简介:

QKGEN® 双链 DNA 片段化试剂盒采用时间依赖型的片段化酶, 能根据不同作用时间将双链 DNA 切割成 50~1,000 bp 的片段。本试剂盒酶系由两种酶组成, 一种酶随机的在双链 DNA 上产生切口, 另一种酶则能识别该切口处并在对侧链进行切割, 产生双链 DNA 片段。所得 DNA 片段含有极短的突出末端, 5 端含磷酸基, 3 端含羟基。经过文库制备及测序验证, QKGEN® 双链 DNA 片段化试剂具有随机切割特性。比较使用该酶与使用机械法制备的基因组 DNA 文库, 测序结果无明显偏好性, 测序覆盖也无区别。

产品组分

试剂名称	【QF0020】20RXN	【QF0250】250RXN
10× 反应缓冲液	40 μL	0.5 mL
10× 片段化酶系	40 μL	0.5 mL
200 mM MgCl ₂	50 μL	0.5 mL
Stop Solution	100 μL	1.25 mL

保存条件

-30 ~ -15°C 保存, ≤0°C 运输。

注意事项

1. 适用范围

5 ng–3 μg 的纯化 DNA 样品 (A₂₆₀/A₂₈₀ = 1.8-2.0), 建议 DNA 溶于灭菌或以上级别的超纯水中

2. 样品准备

高质量的 DNA 投入是获得准确的反应条件和可靠的实验数据的关键。样品处理和 DNA 分离程序对于实验的成功至关重要。蛋白质、盐或其他污染物的残留会降解 DNA 或降低片段化酶的反应效率。因此, 建议使用灭菌超纯水或无核酸酶水洗脱 DNA 样品, 不建议使用含有 EDTA 的 TE 溶液溶解 DNA。

若不能确定样品 DNA 中是否含有 EDTA 或其他蛋白污染成分，建议对样品 DNA 进行磁珠法纯化，并用灭菌超纯水或无核酸酶水洗脱 DNA 样品。

DNA 投入量与片段化酶的反应比例为常数，对于低于 100ng 的 DNA 量，推荐使用 Qubit 或荧光染料 PicoGreen 对 DNA 样品进行浓度测定，以确保精准定量，请勿使用其他基于吸光度测量为基础的测定方法。

对于一些难以进行片段化的 DNA 样品，可添加 1 μ L 200 mM MgCl₂ 增强酶活性，提高片段化反应效率。必要时，MgCl₂ 也可增加至 2 μ L。

3. 自备材料

纯化试剂盒 Beckman 的 Agencourt AMPure XP reagent 或齐凯基因磁珠分选试剂、磁力架、无水乙醇、无核酸酶水/ddH₂O、EP 管和 PCR 管（DNase/RNase free）、各规格移液器、各规格枪头、PCR 仪等

操作步骤

1. 提前将 10×反应缓冲液取出，于冰上溶解。充分溶解后，涡旋振荡 5 秒后，瞬时离心，置于冰上待用；取出 10×片段化酶系置于冰上待用。
2. 按照下表，在洁净的 PCR 管中配制反应液，涡旋混匀，瞬时离心：

组分	体积
dsDNA (5 ng–3 μg)	1-16 μL
10× 反应缓冲液	2 μL
ddH ₂ O	补充至 18 μL
总体积	18 μL

3. 将 10×片段化酶系涡旋振荡 3 秒，瞬时离心，缓慢吸取 2 μL 到以上反应管中，涡旋混匀 5 秒，瞬时离心。在冰上孵育 5min。

注：10×片段化酶系比较粘稠，吸液时应注意缓慢吸取。使用前应充分混匀，加入到反应液中时也要充分混匀，否则影响片段化效果。同时注意在冰上操作，切勿长时间放于室温。

4. 提前按照下表设置片段化反应程序，并运行程序。待热盖温度和反应温度达到时，将反应管放上去进行反应。

50°C	热盖
37°C	X (*)

* X: 片段化反应时间根据样品 DNA 的质量和所要片段大小而定，以 100ng 的高纯度 DNA 为例，反应 8min 可以得到 200-300bp 为主带的片段。以下表格根据所需片段大小给出大概的反应时间，实际所需反应条件还要进行时间梯度的摸索来确定。

预期片段大小 (bp)	反应时间 (min)
50-200	25-35
200-1000	15-25
1000-2000	10-15

5. 片段化反应结束后立即加入 5 μL Stop Solution 终止反应。
6. 根据下游应用，对片段化产物进行不同的处理或质检：
 - 1) 如要进行琼脂糖凝胶电泳检测，可直接取部分反应产物进行检测；
 - 2) 如要使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 或者 Qseq-100 生物片段分析仪进行检测，需要对反应产物进行纯化，再取纯化产物进行检测，纯化步骤参考附录 1。
 - 3) 如要进行二代测序文库构建，需要对反应产物进行纯化或者片段筛选，再取纯化产物进行末端修复及加 A 反应，纯化步骤参考附录 1。

附录 1 片段化反应产物纯化

1. 提前 30min 将纯化磁珠置于室温平衡。
2. 向片段化反应产物中加入 25 μL 无核酸酶水，补足至 50 μL 。
3. 然后加入 1.8 倍（90 μL ）的纯化磁珠，用移液器轻柔吹打混匀，室温孵育 5min。
4. 孵育完成后，将离心管置于磁力架上，室温静置 2min，直至溶液完全变澄清。
5. 小心吸弃上清液，保留磁珠。
6. 加入 200 μL 80%乙醇溶液（现配现用），室温静置 30s，小心吸弃上清液。
7. 重复步骤 6 一次。
8. 尽可能将残留的乙醇吸弃，注意不要吸到磁珠。保持离心管在磁力架上，打开离心管管盖，室温晾干至磁珠看不到反光（约 1-3 min）。（注意磁珠不能太干，不能出现干裂，否则影响得率）
9. 加入 21 μL 无核酸酶水重悬磁珠，室温孵育 3 min，将离心管置于磁力架上，待溶液完全变澄清，小心移取 20 μL 至新的 PCR 管中，准备下一步反应。