

版本号: NG170208

TIANSeq Fragmentation/End Repair/ dA-Tailing Module

TIANSeq 快速DNA片段化/末端修复/ dA添加模块

目录号: NG301

产品内容

产品组成	NG301-01 (24 rxn)	NG301-02 (96 rxn)
5 × FEA Enzyme Mix	240 μl	960 μl
10 × FEA Reaction Buffer	120 μl	480 μl
FEA Enhance	120 μl	480 μl
Nuclease-Free ddH ₂ O	1 ml	4 × 1 ml

储存条件

请将试剂盒置于-25~-15℃保存，避免反复冻融。保质期为一年。

产品简介

TIANSeq Fragmentation/End repair/dA-tailing module是专门针对于illumina高通量测序平台所优化的预混酶模块，包含了DNA片段化、末端修复以及3'端dA尾添加所需的所有酶类，可将双链DNA片段化为小片段，并分别在片段化DNA两端添加5'-P和3'端dA，所得产物无需纯化，可直接通过TIANSeq Fast Ligation module (NG303-01/02)用于adapter的连接。该模块采用一步法的反应流程，省去了多步纯化步骤，可对微量DNA样本进行高效、快速的片段化、末端修复及dA尾添加，操作更加简便，文库转化效率更高。

适用范围：用于双链DNA的片段化、末端修复及3'端添加dA，适用于illumina高通量测序平台DNA文库构建。

适用样本量：1 ng~1 µg DNA

推荐使用的其他试剂

1. TIANseq Fast Ligation Module (NG303-01/02)
2. TIANSeq NGS Library Amplification Module (NG304-01/02)
3. TIANSeq Single-Indexed Adapter (Illumina® Platforms) (NG214-01/02/03)
4. BECKMAN Agencourt AMPure XP磁珠

产品特点

1. 单管酶促反应，一步完成双链DNA的片段化、末端修复、dA添加反应。
2. 高文库转化效率，DNA样本起始量可低至1 ng。

注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

1. 操作过程请注意避免核酸样品和产物之间的交叉污染。
2. 请使用不含RNA酶或DNA酶的枪头、EP管进行试验。
3. 试验开始前，请清洁操作台，并使用RNA酶及DNA酶清除试剂，如RNase Away (Molecular BioProducts, Inc) 处理台面。确保没有RNA酶和DNA的污染。
4. 进行文库扩增前，请确保PCR仪已经调试好并处于稳定的状态。
5. 试验前请仔细阅读说明书，如果需要暂停试验，或者无需立即进行下游试验。可根据说明书推荐将试验产物保存于-20℃并安排后续试验。
6. 由于使用本品所进行的片段化过程为酶促反应，故片段化过程对反应温度、反应时间、体系配制以及DNA上样量等因素较为敏感。强烈推荐用户按照本说明书所述步骤及优化的反应参数（如反应时间等）进行试验。

操作步骤

(一) 试验准备:

1. 在开始实验前, 明确核酸的浓度及纯度至关重要, 推荐上样量1 ng~1 µg DNA。DNA需溶解于以下溶液中: 去离子水、10mM Tris、Buffer EB或LoTE (0.1×TE) 等。

注意:

- 确定上样DNA浓度至关重要, 尤其在上样量低于100 ng时。推荐使用Qubit、Picogreen或者其他染料法对DNA浓度进行准确定量。
 - 请确认DNA溶液中不含阳离子及螯合剂。如果DNA溶解于1×TE或不确定DNA溶液中的EDTA浓度, 请参照附录 I 所述步骤, 使用BECKMAN公司的Agencourt AMPure XP磁珠进行纯化或参照附录III进行片段化处理。
2. 将各试剂置于冰上, 5×FEA enzyme Mix融化后用手指后轻弹混匀, 不要涡旋。其余试剂可短暂涡旋混匀。

(二) 试验步骤

1. 照下表设置PCR仪反应程序。开启热盖, 热盖温度设置为70℃。

反应步骤	反应温度	反应时间
1	4℃	1 min
2	32℃	3-24 min*
3	65℃	30 min
4	4℃	保持

*注: 确切的片段化反应时间需要根据DNA的实际上样量进行优化。下表1中列出10 ng、100 ng和1000 ng上样量DNA片段化所需的时间, 用户可以依据此时间进行调整。调整过程中, 我们推荐额外设置一个反应时间延长3 min以及一个缩短3 min的对照。这样有助于确定切割至所需片段大小时所需要的准确反应时间。关于片段化时长的更多建议, 请参考附录II。

表1 片段化时间选择表

片段化时间 (min) (32℃)				
DNA主峰大小	250 bp	350 bp	450 bp	550 bp
10 ng DNA上样量	24	16	14	10
100 ng DNA上样量	16	10	8	6
1000 ng DNA上样量	14	8	6	4

2. 请按下表配制反应体系，冰上操作，各组分加入后，请轻柔吸打混匀，注意不要涡旋。

当DNA上样量 > 10 ng	
组分名称	体积 (μl)
10 × FEA Reaction Buffer	5
DNA样本	X
Nuclease-Free ddH ₂ O	(35-X)
总体积	40

当DNA上样量 ≤ 10 ng	
组分名称	体积 (μl)
10 × FEA Reaction Buffer	5
DNA样本	X
FEA Enhancer	2.5
Nuclease-Free ddH ₂ O	(32.5-X)
总体积	40

注：对于多个反应，请计算所需试剂的总体积并在此基础上增加体系10%，以避免因溶液转移过程中挂壁损失而造成分装反应数不足的问题。

- 取1个新的200 μl薄壁管置冰上，向管中加入10 μl 5 × FEA enzyme Mix，随后将（2）中反应体系转移40 μl至同一薄壁管中，轻柔吸打混匀6-8次。
- 瞬时离心薄壁管，立刻置于已预冷至4℃的PCR仪中，并启动反应程序。
- 当反应程序结束后，将薄壁管从PCR仪中取出并置冰上。
- 立即进入接头连接步骤，为保证连接效率，推荐使用TIANSeq Fast Ligation Module (NG303-01/02)。

附录I: DNA样品溶液中二价盐离子以及EDTA的去除

请参照供应商提供的步骤进行纯化。

1. 若DNA溶液体积小于50 μl ，请用无核酸酶的去离子水补足体积至50 μl 。
2. 加入90 μl （1.8倍体积）完全涡旋混匀的Agencourt AMPure XP磁珠至DNA溶液中，吸打混匀。若DNA溶液体积大于50 μl ，请根据DNA溶液的实际体积，加入1.8倍体积完全涡旋混匀的Agencourt AMPure XP磁珠。
3. 室温孵育5 min后，将反应管置于磁力架上2~4 min收集磁珠，小心去除上清液。
4. 用200 μl 80%乙醇洗涤磁珠，将反应管置于磁力架上收集磁珠，弃去上清。重复此洗涤步骤一次。
5. 将反应管置于磁力架上，打开离心管盖于室温条件下晾置10 min或至磁珠干燥为止。
6. 加入45 μl 10 mM Tris-HCl (pH8.0) 使磁珠完全悬浮后，置磁力架上2 min。待磁珠贴壁后小心转移42.5 μl 上清至新的离心管。
7. 使用Quibit、Picogreen或其他荧光定量方法测定纯化后的DNA浓度。

附录II: 优化片段化处理时间

片段化反应时间需要根据DNA上样量进行优化，参考图1所示曲线选择反应时间。优化过程请使用将实际用于测序的DNA样品，这将有助于在测序时保证片段化过程的可重复性。初次优化时，我们推荐添加2个额外的反应时间，即依据图中曲线选择反应时间后，在此时间基础上分别延长和缩短3 min。若对片段大小有较精确的要求，可在此基础上继续对反应时间进行微调。在实际操作中，若DNA上样量 ≥ 10 ng，用户可在片段化步骤完成后即对反应效果进行评价。具体方法为使用1.8倍体积AMPure[®]XP磁珠对反应产物进行纯化，并将其溶解于10 μl Tris溶液或去离子水。然后使用Bioanalyzer High Sensitivity试剂盒确定片段分布。

对于上样量 < 10 ng的片段化反应，为了节省反应时间，我们推荐在每个反应体系中（50 μl ）添加2.5 μl 的FEA Enhancer。反应时间则推荐使用图1中将10 ng DNA切割至特定片段大小所需时间的一半。例如：若期望DNA片段集中于350 bp，则加入FEA Enhancer后反应10 min左右即可。

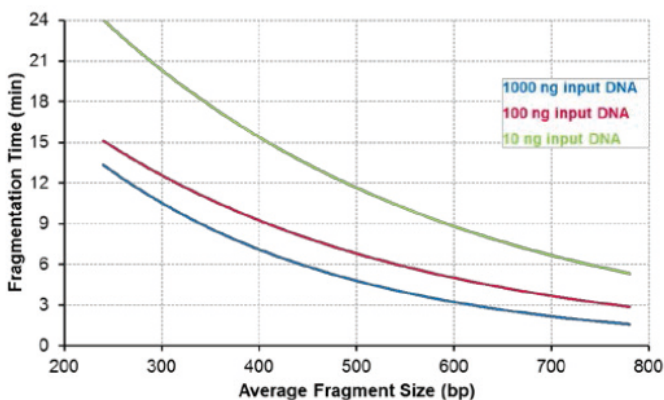


图1 不同DNA上样量经片段化后产出片段大小与反应时间对应曲线

附录III：1×TE溶液中DNA的片段化/末端修复/A尾添加

当DNA溶解于1×TE溶液中时，请参照以下步骤进行DNA的片段化/末端修复/A尾添加反应。

1. 按照下表设置PCR仪反应程序。请确认在反应中开启热盖。如有可能，请将热盖温度设置为70℃。

DNA上样量为1-1000 ng		
反应步骤	反应温度	反应时间
1	4℃	1 min
2	32℃	5-35 min*
3	65℃	30 min
4	4℃	保持

*注：反应时间需根据DNA的实际上样量进行优化。若DNA上样量≥10 ng，反应体系中加入2.5 μl FEA Enhancer，推荐使用25 min作为起始反应时间，此时产生的片段主要集中于300-500 bp；若DNA上样量<10 ng，反应体系中加入5 μl FEA Enhancer，则推荐使用15 min作为起始时间，此时片段集中于300 bp。若需要进行调整，则请以3 min为单位，在原反应时间基础上进行增减，直至得到所需要的片段大小。

2. 为了保证良好的试验效果，请严格按照以下说明进行操作。在一个新的薄壁管中参照下表配制反应体系，此步请于冰上操作，配置好的反应体系经轻柔吸打混匀，注意不要涡旋震荡。

当DNA上样量≥10ng	
组分名称	体积 (μl)
10×FEA Reaction Buffer	5
DNA样本	X
FEA Enhancer	2.5
Nuclease-Free ddH ₂ O	(32.5-X)
总体积	40

当DNA上样量<10ng	
组分名称	体积 (μl)
10×FEA Reaction Buffer	5
DNA溶液	X
FEA Enhancer	5
Nuclease-Free ddH ₂ O	(30-X)
总体积	40

1. 取新的PCR薄壁管置冰上，加入10 μl 5×FEA Enzyme Mix。随后将上一步准备好的反应体系转移40 μl至同一薄壁管中。轻柔吸打混匀6-8次。注意操作过程中请保持反应管置于冰上。
2. 将薄壁管瞬时离心后，立刻转移至已预冷至4℃的PCR仪中，并启动反应程序。
3. 当反应程序结束，PCR仪温度降至4℃后，将薄壁管从PCR仪中取出并置冰上。立即进入接头连接步骤，为保证连接效率，推荐使用TIANSeq Fast Ligation Module (NG302-01/02)。

浓缩国际权威精华， 铸就TIANGEN优秀品质！

TIANGEN为您提供国际化标准的生物学产品和服务

- PCR、RT-PCR系列
- 核酸DNA、RNA分离纯化系列
- DNA分子量标准
- 克隆载体、感受态细胞
- 细胞生物学产品
- 蛋白分子量标准
- 蛋白质染色、检测及定量相关产品