



DNA Frag Module

RK20260

www.abclonal.com.cn

Version: N16D20v2.1

目录

1.产品概述.....	1
2.产品组分.....	1
3.产品保存.....	2
4.其它自备材料.....	2
5.注意事项.....	2
6.操作步骤.....	5
7.附录.....	7

1. 产品概述

DNA Frag Module 是一款酶法打断 DNA 的试剂盒模块, 可将完整的 DNA 样本根据不同片段化时间打断成不同大小片段的 DNA。打断的 DNA 可适用于后续的 DNA 文库构建。本试剂盒对不同物种的 DNA 样本具有良好的兼容性。对于 FFPE 样本, 使用本试剂盒打断以后, 在后续建库中展现出了卓越的性能。模块包含了 DNA Frag Reaction Buffer、DNA Frag Enzyme Mix 与 1X TE Buffer 反应补充液以及 500 mM EDTA。

2. 产品组分

试剂盒中的组分在适当的贮存条件下可以保存一年, 所有试剂需要在-20℃保存。

表格 1. 试剂盒组分表

	组分名称	8 RXN	24 RXN	96 RXN
●	DNA Frag Reaction Buffer	32 μ L	96 μ L	384 μ L
●	DNA Frag Enzyme Mix	32 μ L	96 μ L	384 μ L
●	1X TE Buffer	320 μ L	960 μ L	3840 μ L
●	500 mM EDTA	40 μ L	120 μ L	480 μ L

3. 产品保存

运输与保存：DNA Frag Module 试剂盒必须保存在-15~-25℃条件下。该试剂盒对温度比较敏感，长途运输尽量采用干冰运输条件，或者干冰结合冰袋方式。

4. 其它自备材料

磁珠：AFTMag NGS DNA Clean Beads（ABclonal， Cat. No. RK20257）。

质检：Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 或其他等效 DNA 质检产品，ABQubit 双链 DNA 定量试剂盒（ABclonal, Cat.NO. RK30140）。

其他材料：Nuclease-Free Water、10X TE Buffer（ABclonal, Cat.NO. RM20728）、无水乙醇(80%的乙醇需现配现用)、低吸附 EP 管、PCR 管、磁力架、带滤芯移液器吸头、PCR 热循环仪、微型离心机、漩涡混匀仪、单道移液器和多道移液器等。

5. 注意事项

5.1 关于 Input DNA 样本

5.1.1 为了得到良好的 DNA 打断结果，**推荐样本溶于 1X TE Buffer（重要！）**

5.1.2 DNA 样本建议用 Qubit®或其他基于荧光法定量仪器对 Input DNA 定量。

5.1.3 样本中的杂质，如：微量残留的 RNA、核苷酸、单链 DNA 以及其它污染物都可能会对 DNA 的打断产生影响。可以在实验前，使用 1.8X 磁珠进行纯化，纯化后的样本**推荐溶于 1X TE Buffer（重要！）**。

5.2 关于片段化

5.2.1 必须使用 1X TE Buffer（10 mM Tris-HCl，1mM EDTA, pH8.0）补齐片

片段化体系，如使用水补齐，会导致文库长度严重偏短。

5.2.2 如果 DNA 溶液已经溶于不含 EDTA 溶剂，可以使用 10X TE Buffer (ABclonal, Cat. No. RM20728) 将 DNA 及补充体系调整至 1X TE Buffer 体系，具体体系如下表所示。

表格 2. 片段化体系（样本溶于不含 EDTA 溶剂）

试剂	体积
Input DNA(溶于不含 EDTA 溶剂)	X μ L
● DNA Frag Reaction Buffer	4 μ L
● DNA Frag Enzyme Mix	4 μ L
10X TE Buffer	3.2 μ L
Nuclease-Free Water	Up to 40 μ L
总体积	40 μL

5.2.3 如样本中 EDTA 浓度 > 1 mM 等金属螯合剂，片段化结果可能会较理论值偏长，建议可以进行一次 2.2X 的磁珠纯化后，纯化后的样本溶于 1XTE Buffer。

5.2.4 FFPE 样本推荐使用 FFPE DNA QC Kit (ABclonal, Cat. No. RK20229) 进行质检评级。质量较好的 FFPE 样本（FFPE1-2 级）可以按照正常样本条件进行片段化。质量较差的 FFPE 样本（FFPE3-5 级），根据其降解程度不同，推荐片段化时间为 5-10 min。

5.2.5 片段化酶对温度较敏感，实验时请在冰上操作。反应体系配置完成后，请立即放入 PCR 仪进行反应。产品组分使用完后，请尽快放置于 -15~-25°C 条件下进行保存。

5.3 关于磁珠使用

5.3.1 磁珠在使用前，需室温平衡 30min。否则可能影响回收效率和分选效果。

5.3.2 磁珠在使用前，需充分震荡或移液器吹打混匀。

5.3.3 磁珠漂洗用的 80%乙醇应新鲜配制。

5.3.4 产物洗脱前应将磁珠充分干燥。干燥不充分导致乙醇残留，可能影响后续实验。干燥过度会导致磁珠开裂，降低回收效率。

5.4 关于打断后不纯化直接建库

如果打断后立刻衔接 DNA 建库，如 Rapid Plus DNA Lib Prep Kit for Illumina V2 (ABclonal, Cat. No. RK20255)，可以在片段化反应后，省略磁珠纯化步骤，立即进行 75°C 15min 的热变性，然后直接开始建库流程-末端修复步骤。但此流程与磁珠纯化后建库相比，文库大小稍有差异。反应时间与目的片段建议可以参考下表：

表格 3. 片段化时间 (32°C)：根据需要的目标插入片段大小调整

目标插入片段大小	片段化时间	时间优化范围
150 bp	20 min	18-25 min
200 bp	15 min	13-17 min
250 bp	10 min	8-12 min
300 bp	8 min	6-10 min
400-600 bp	5 min	4-6 min

6. 操作步骤

第一步 片段化

- 1.1 在置于冰上的无菌 PCR 管中准备如下反应体系（DNA Frag Enzyme Mix 最后加入）：

表格 4. 片段化反应体系

试剂	体积
模板 DNA(溶于 1X TE Buffer 中)	X μ L
● DNA Frag Reaction Buffer	4 μ L
● DNA Frag Enzyme Mix	4 μ L
○ 1X TE Buffer	Up to 40 μ L
总体积	40 μ L

注： Input DNA 溶解于 1X TE Buffer（10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0）。如溶解与水或其他不含 EDTA 的溶剂，请参考 5. 注意事项的实验体系。

- 1.2 使用移液器上下吹打，充分混匀，或使用振荡器涡旋混匀。

- 1.3 将 PCR 管放到 PCR 仪上，反应程序见表 5， PCR 仪热盖设置为 75℃；之后 4℃保存。

表格 5. 片段化反应程序

温度	时间
32℃	5-30 min
4℃	∞

表格 6. 片段化时间 (32°C) : 根据需要的目标插入片段大小调整

目标插入片段大小	片段化时间	时间优化范围
150 bp	30 min	25-35 min
180 bp	20 min	18-25min
200 bp	15 min	13-17 min
270 bp	10 min	8-12min
320 bp	8 min	6-10 min
400-600 bp	5min	4-6min

1.4 反应结束后, 立即取出置于冰上, 进行终止反应。之后在常温进行磁珠纯化操作。具体纯化步骤如下:

第二步 磁珠纯化

2.1 每个样本中加入 5 μ L 500 mM EDTA, 快速涡旋混匀, 瞬时离心。

2.2 向每个样本中加入 90 μ L (2X) AFTMag NGS DNA Clean Beads, 充分混匀, 室温孵育 5 min。

2.3 将 PCR 管置于磁力架上静置 2 min, 待溶液澄清后, 移除上清 (注意不要碰到磁珠)。

2.4 保持 PCR 管在磁力架上, 加入 200 μ L 80%的乙醇漂洗磁珠, 孵育 30s 后移除上清。

2.5 重复步骤 2.4。

2.6 保持 PCR 管在磁力架上, 使用 10 μ L 移液器移除管底残留的乙醇, 打开管盖干燥至无乙醇残留。

2.7 将 PCR 管从磁力架上取出, 再加入 21 μ L Nuclease-Free Water 重悬磁珠,

室温静置 1 min，使磁珠上的 DNA 充分释放。

2.8 将 PCR 管于磁力架上静置 2 min，转移 20 μ L 上清液至一个新 PCR 管中保存，可用于后续实验。纯化后的 DNA 片段化产物可以放置 -20 $^{\circ}$ C 长期保存，也可以直接衔接常规 DNA 建库试剂盒进行建库实验，详细试剂盒选用可参看附录 7.4。

7. 附录

7.1 不同片段化时间打断大小

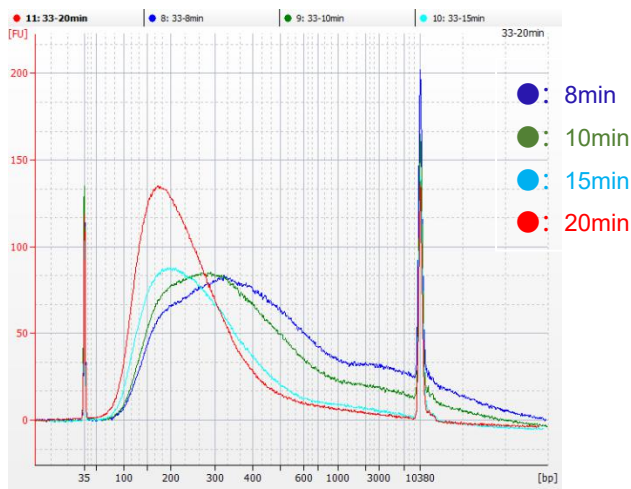


图 1. 投入 100 ngHuman Blood gDNA, 32 $^{\circ}$ C 条件分别进行 8 min、10 min、15 min、20 min 打断处理，打断结束后立即加入 500 mM EDTA 终止反应，然后使用 2X 比例的 AFTMag NGS DNA Clean Beads 对产物进行纯化，Nuclease-free Water 进行洗脱，取 1 μ L 样本进行 Agilent Bioanalyzer 2100 Highsensitivity Chip 进行片段大小分析。

7.2 不同物种样本打断大小

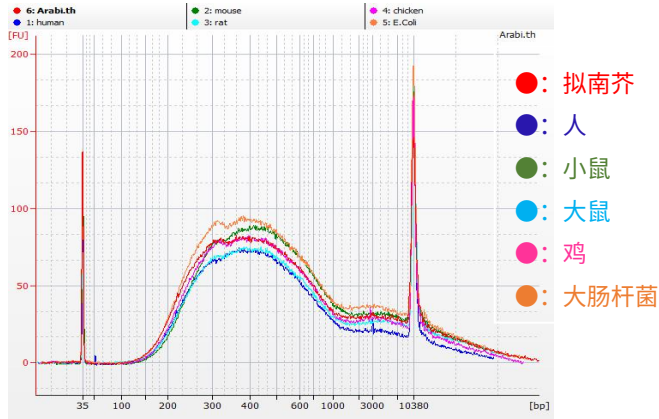


图 2. 投入 100 ngDNA，物种分别为人、大鼠、小鼠、鸡、大肠杆菌、拟南芥。32℃条件进行 8 min 打断处理，打断结束后立即加入 500 mM EDTA 终止反应，然后使用 1X 比例的 AFTMag NGS DNA Clean Beads 对产物进行纯化，Nuclease-free Water 进行洗脱，取 1 μ L 样本进行 Agilent Bioanalyzer 2100 Highsensitivity Chip 进行片段大小分析。

7.3 FFPE 样本打断大小

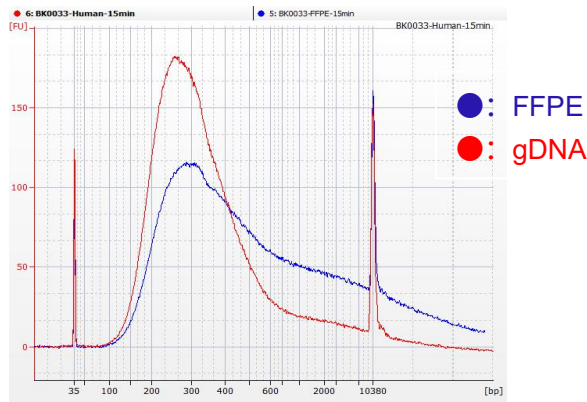


图 3. 投入 100 ngDNA, 样本分别为人 gDNA 和 FFPE 样本。32℃条件进行 15 min 打断处理, 打断结束后立即加入 500 mM EDTA 终止反应, 然后使用 1X 比例的 AFTMag NGS DNA Clean Beads 对产物进行纯化, Nuclease-free Water 进行洗脱, 取 1 μ L 样本进行 Agilent Bioanalyzer 2100 Highsensitivity Chip 进行片段大小分析。

7.4 打断后不纯化直接建库片段大小

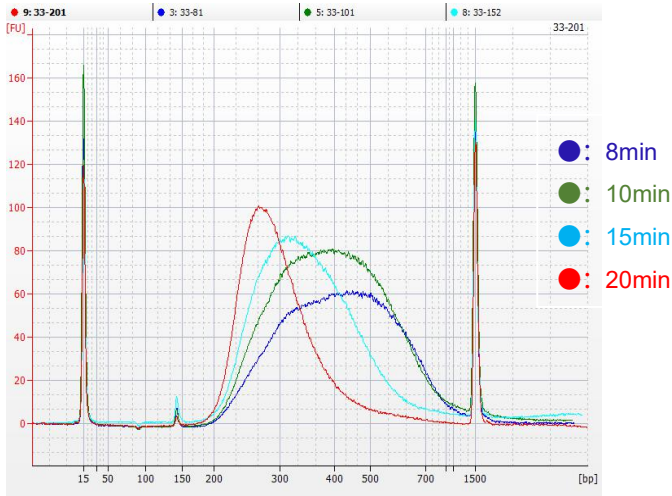


图 1. 投入 100 ngHuman Blood gDNA, 32℃条件分别进行 8 min、10 min、15 min、20 min 打断处理, 添加 75℃15min 的热变性, 省略磁珠纯化步骤, 直接衔接 RK20255 开始建库。取 1 μ L 样本进行 Agilent DNA 1000 Chip 进行片段大小分析。

7.5 建库试剂盒选择

ABclonal 推出多款 DNA 建库试剂盒，可用于片段化后 DNA 后续建库，详细试剂盒名称及货号信息参看下表：

表格 7. 后续建库可选择的试剂盒名称及货号

试剂盒名称	货号
Rapid Plus DNA Lib Prep Kit for Illumina V2	RK20255
Rapid CE DNA Lib Prep Kit for Illumina V2	RK20254
Rapid Plus DNA Lib Prep Kit for MGI V2	RK20256
Scale ssDNA-seq Lib Prep Kit for Illumina V2	RK20228

注：建库试剂盒需搭配相应的接头试剂盒使用。具体操作流程参看对应的说明书。
关于试剂盒其他详细事项请咨询技术支持。

中国

www.abclonal.com.cn

中国总部：湖北省武汉市江夏区东湖高新区高科园 3 路精准医疗产业基地项目
一期 5 号楼

上海分子研发中心：上海市闵行区园美路 58 号紫竹新兴产业技术研究院 2 号
楼 4 楼

美国研发中心：86 Cummings Park Dr ,Woburn,MA 01801, United States

电话： 400-999-6126

邮箱： cn.market@abclonal.com