

版本号: NG230911

# TIANSeq Fragment/Repair/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<br>(24 rxn) | NG301-02<br>(96 rxn) |
|----------------------------------|----------------------|----------------------|
| 5×FEA Enzyme Mix                 | 240 µl               | 960 µl               |
| 10×FEA Reaction Buffer           | 120 µl               | 480 µl               |
| FEA Enhancer                     | 120 µl               | 480 µl               |
| Nuclease-Free ddH <sub>2</sub> O | 1 ml                 | 4×1 ml               |

### 储存条件

请将试剂盒置于-30~-15℃保存，避免反复冻融。保质期为一年。

---

## 产品简介

TIANSeq Fragment/Repair/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 Dual-Index Adapter (Illumina) (NG216)
4. TIANSeq Size Selection DNA Beads (NG316-01/02/03)

## 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. 进行操作前，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TIANSeq Size Selection DNA Beads（NG316）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融化后用手指轻弹后混匀，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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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系并在此基础上增加体系10%，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。
3. 取1个新的200 μl薄壁管置于冰上，向管中加入10 μl 5×FEA enzyme Mix，随后将步骤2中反应体系转移40 μl至同一薄壁管中，轻柔吸打混匀10次。
4. 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。
5. 当反应程序结束后，将薄壁管从PCR仪中取出并置于冰上。
6. 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

**推荐使用TIANSeq Size Selection DNA Beads (NG316)进行样本纯化。**

1. 将磁珠置于室温平衡20 min。
2. 涡旋使磁珠充分悬浮，吸取适量体积（根据样品情况而定，可参考所能收集到的最小片段条件，加入磁珠）磁珠结合液MB，加入DNA样品中，使用移液器轻柔吸打10次充分混匀。
- 1) 200 bp以上的目的片段建议使用1×磁珠结合液进行纯化；

---

2) 200 bp以下的目的片段建议使用2×磁珠结合液进行纯化；

**注：若DNA样品体积小于50 μl，请用无核酸酶的去离子水补足体积至50 μl。**

3. 室温孵育5 min后，将反应管置于磁力架上5 min。待磁珠完全贴壁后，用移液器小心吸弃上清。
4. 将反应管置于磁力架上，用200~500 μl（没过磁珠即可）80%乙醇（现用现配）洗涤磁珠，用移液器轻轻吹打3~5次（不要吹散磁珠）。磁力架上静置30 sec后，用移液器小心吸弃上清。
5. 重复步骤4一次。
6. 将反应管置于磁力架上，打开离心管盖于室温条件下晾置5~10 min或至磁珠干燥为止。

**注：不要过分干燥磁珠，否则会造成得率降低。**

7. 将离心管从磁力架中取出，加入适量体积洗脱缓冲液TB进行洗脱，使用移液器吹打充分混匀10次。室温静置5 min后，置于磁力架上5 min，待磁珠完全贴壁后，转移上清至新的离心管中，用于后续实验。

## 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 $\geq 100$  ng，用户可在片段化步骤完成后即对反应效果进行评价。具体纯化方法可参照TIANSeq Size Selection DNA Beads（NG316）DNA纯化步骤。

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8min左右即可。

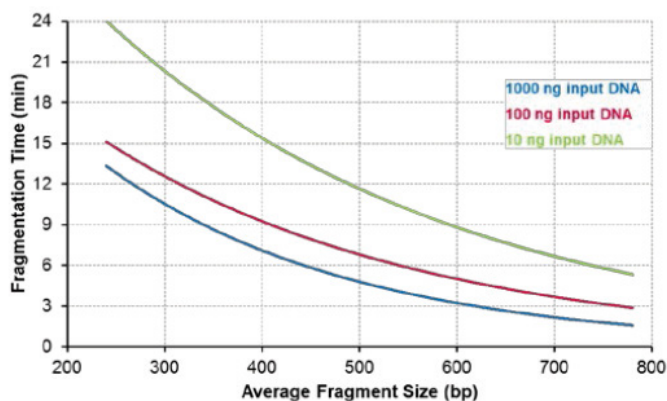


图1 不同DNA上样量经片段化后产出片段大小与反应时间对应曲线

### 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。

- 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. 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≥10ng                     |          |
|----------------------------------|----------|
| 组分名称                             | 体积 (μl)  |
| 10×FEA Reaction Buffer           | 5        |
| DNA样本                            | X        |
| FEA Enhancer                     | 2.5      |
| Nuclease-Free ddH <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> O | (30-X)  |
| 总体积                              | 40      |

- 注：对于多个反应，请计算所需试剂的总体系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。**
3. 取1个新的200 μl薄壁管置于冰上，向管中加入10 μl 5×FEA enzyme Mix，随后将步骤2中反应体系转移40 μl至同一薄壁管中，轻柔吸打混匀10次。
  4. 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。
  5. 当反应程序结束后，将薄壁管从PCR仪中取出并置于冰上。
  6. 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)。



TIANGEN 官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

# 坚持“CUSTOMER FIRST”理念 秉承“质量为天，服务为根”宗旨！

TIANGEN为您提供从样本处理，  
核酸纯化到下游检测的整体解决方案

## 科研试剂

- 样本保护与处理
- 磁珠法外泌体系列
- 基因组 DNA 提取
- 质粒提取
- 总 RNA 提取
- DNA 产物纯化 / 胶回收
- PCR 系列
- NGS 文库制备
- 表观遗传学
- RT-PCR 系列
- 荧光定量 PCR 系列
- 克隆和点突变
- DNA 分子量标准
- 蛋白表达和检测

## 科研解决方案

- 快速分子克隆整体解决方案
- 基因表达分析快速解决方案
- 环境微生物解决方案
- 复杂样本 RNA 解决方案