

Hieff[®] DNA Fragmentation Reagent for NanoporeSEQ

产品简介

Hieff[®] DNA Fragmentation Reagent for NanoporeSEQ 是针对三代 Nanopore 测序平台设计的 DNA 酶切法建库试剂，本品采用高质量的片段化酶，摆脱了繁琐的超声过程，同时简化了操作流程，将片段化模块与末端修复/加 A 模块合二为一，极大的降低了建库的时间和成本。可应用于 50 ng-1 μg 常规动植物基因组、微生物基因组等样本，在单管内实现 DNA 的片段化、末端修复和 A 尾添加反应。

产品信息

货号	13309ES08	13309ES24	13309ES96
规格	8 T	24 T	96 T

组分信息

组分编号	组分名称	13309ES08	13309ES24	13309ES96
13309-A	Smearase [®] Buffer	80 μL	240 μL	960 μL
13309-B	Smearase [®] Enzyme	40 μL	120 μL	480 μL

储存条件

-25~-15°C保存，有效期 1 年。

注意事项

1. 本产品仅作科研用途。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
3. 请提前购置适配 Nanopore 平台的成套试剂，以便开展实验。
4. 本试剂盒兼容范围为 50 ng - 1 μg Input DNA。应尽可能使用 A260/A280 = 1.8-2.0 的高质量 Input DNA。
5. 对于常规的高质量基因组 DNA，酶切时间参考表 1。本试剂盒片段化偏好低，耐受各种 GC 含量的模板。

表 1 常规基因组 DNA 片段化时间推荐表

插入片段主峰大小	片段化时间	优化范围
6-8 kb	3 min	2-4 min
3-5 kb	5 min	4-6 min
2-3 kb	8 min	6-9 min
1.5-2 kb	10 min	9-11 min
1-1.5 kb	15 min	12-18 min
1kb	20 min	18-20 min
750 bp	25 min	22-25 min

【注】：以上为推荐时间，需客户在自己的实验体系中进行微调，以达到最佳效果。

6. 参照片段化步骤推荐条件可将 DNA 酶切为所需大小，为保证优质稳定的片段化效果，片段化过程请于冰上操作。

使用说明

DNA 片段化/末端修复/dA 尾添加 (DNA Fragment/End Preparation/dA-Tailing)

该步骤将基因组 DNA 片段化，同时进行末端修复及 dA 尾添加。

1. 将表 2 中试剂解冻后，颠倒混匀，置于冰上备用。
2. 于冰上配制表 2 反应体系。

表 2 基因组 DNA 打断反应体系

名称	体积 (μL)
gDNA	X
Smearase [®] Buffer	10
Smearase [®] Enzyme	5
ddH ₂ O	Up to 60

3. 使用移液器轻轻吹打混匀（请勿震荡），并短暂离心将反应液离心至管底。
4. 将 PCR 管至于 PCR 仪器中，按照表 3 程序进行设定 PCR 反应程序：

表 3 基因组打断反应程序

温度	时间
4°C	1min
30°C	3-25 min*
65°C	20 min
4°C	hold

【注】：*DNA 片段化过程为有效控制片段化效果，避免过度酶切，反应程序可预先设置 4°C，待模块温度降至 4°C 时，将 PCR 管放入 PCR 仪即可。

**对于完整的基因组 DNA，酶切时间参考表 1。

5. 产物如需纯化，推荐使用 Hieff NGS[®] DNA Selection Beads V2 (Cat#12418)，步骤如下。
 - I. 准备工作：将 Hieff NGS[®] DNA Selection Beads V2 磁珠提前取出，室温平衡 30 min。配制 80%乙醇。
 - II. 磁珠使用前请涡旋振荡或充分颠倒混匀。
 - III. 片段全回收推荐使用 1.0-1.2× 纯化比例，即吸取 60-72 μL 磁珠至片段化反应产物中，若只保留大片段，可根据片段大小适当降低磁珠比例，最低至 0.3× 磁珠比例，可以回收 4K 以上片段，移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，室温孵育 10 min。
 - IV. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后（约 5 min），小心移除上清。
 - V. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。
 - VI. 重复步骤 5，总计漂洗两次。
 - VII. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠至无乙醇残留（建议不超过 5 min）。
 - VIII. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 23 μL Nuclease-free ddH₂O 或洗脱液(10 mM Tris-HCl, pH 8.0 -8.5)，覆盖磁珠，使用移液器吹打混匀，37°C 下孵育 10 min。如果磁珠干燥开裂，请适当延长孵育时间。
 - IX. 将 PCR 管置于磁力架中，分离磁珠和液体直到溶液澄清(约 5 min)。
 - X. 吸取 21 μL 上清转移至新的 PCR 管中，取 1 μL 进行 Qubit 定量。
5. 纯化产物或未纯化产物均可驳接 Hieff Barcode Ligation Module for ONT(Cat#13303)进行 Barcode 连接，或者驳接 Hieff Adapter Ligation Module for ONT(Cat#13304)进行 Adapter 连接，详细说明请见后者的说明书。