

製品コード 6137

研究用

TaKaRa

DNA Fragmentation Kit

説明書

v202408Da

本製品は、超音波破碎装置などの特殊な装置を使用せず、酵素処理によってゲノム DNA 等の長鎖 DNA をランダムに断片化し、さらに平滑化するためのキットです。平滑化した断片はそのまま平滑末端ベクターに組み込むことができます。また、平滑化を必要としない場合は、断片化までで反応を止めることもできます。

メチル化 DNA 濃縮や高速シーケンス解析のための前処理にも、本製品を利用可能です。

I. 内容 (20 回分)

1. Enzyme-1	20 μ l
2. Dilution Buffer-1	1,040 μ l
3. A solution	20 μ l
4. B solution	50 μ l
5. Stop solution	400 μ l
6. 150 mM MgCl ₂	40 μ l
7. Dilution Buffer-2	200 μ l
8. Enzyme-2	20 μ l
9. 0.5 M EDTA	50 μ l
10. dH ₂ O	1 ml \times 10

II. 保存

− 20°C

コンポーネント 3、4、6、9、10 は、4°C 保存も可能

III. 本製品以外に必要なもの (主なもの)

- ・ サーマルサイクラー 2 台 (1 台でも可)
- ・ 電気泳動用 Loading Buffer
Loading Buffer に含まれる Dye は断片化サイズ (100 ~ 1,000 bp) と重ならない位置に泳動されるもの (例: Orange G など) をお勧めします。BPB や Xylene Cyanol は断片化されたサイズと重なるため、使用の際にはご注意ください。

IV. 使用上の注意

本製品を使用する際の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

1. 試薬類は全て氷上で取り扱ってください。また、反応溶液の混合作業も氷上で行ない、反応チューブ内の温度が上昇しないようにご注意ください。
2. 反応には、RNaseA 処理を行った後、フェノール/クロロホルム処理などで十分に精製した DNA をご使用ください。断片化サイズ確認の際、RNA が混入していると断片化の分布が正確に判断できなくなります。
ゲノム DNA 調製には NucleoSpin Tissue (製品コード 740952.10/.50/.250) などの使用をお勧めします。
3. 使用する DNA 溶液に含まれる EDTA 濃度は 1 mM 以下としてください。

V. 操作方法

1. 断片化

- (1) 0.2 ml PCR チューブを用意する。

【推奨する反応容量】

ゲノム DNA 100 ng 以下の場合 : 10 μ l 反応系

ゲノム DNA 100 ng ~ 1 μ g の場合 : 20 μ l 反応系

※ 1 μ g 以上の場合は、1 μ g/20 μ l を反応単位として反応チューブを増やしてください。あるいは最大 5 μ g/100 μ l 反応系までのスケールアップも可能です。

- (2) 2 台のサーマルサイクラーをそれぞれ 16°C、70°C に設定する。1 台で行う場合は 16°C に設定する。

以下に、ゲノム DNA 1 μ g/20 μ l 反応×チューブ 1 本の場合の操作を示します。

- (3) 氷上で、0.2 ml PCR チューブにゲノム DNA 以外の以下の試薬を入れ良く混合した後、ゲノム DNA を添加する。泡立えないようにピペティングもしくはタッピングでよく混合後、スピンドウンする。ボルテックスは使用しない。

試薬	使用量
Dilution Buffer-1	1.9 μ l
A solution	1 μ l
B solution	1 μ l
ゲノム DNA	1 μ g (x μ l)
dH ₂ O	(15.1 - x) μ l (up to 19 μ l)

- (4) Enzyme-1 を希釈する(用時調製)。希釈した Enzyme-1 は、調製後 10 分以内に使用し、保存しない。

【希釈方法】

氷上で、1.5 ml マイクロチューブに以下の順序で試薬を添加し混合する(反応チューブが複数の場合は同じ希釈酵素を用いる)。

試薬	使用量
dH ₂ O	450 μ l
Dilution Buffer-1	50 μ l

軽くボルテックスしてスピンドウンする。

次に Enzyme-1 を 1 μ l 加える。200 μ l 用マイクロピペットの目盛を 100 μ l 程度にセットし、泡立えないように穏やかなピペティングで 10 回程度混合する。さらにゆっくり転倒混和 (5 回以内) した後、スピンドウンする。タッピング、ボルテックスは行わない。

- (5) サーマルサイクラーが 16°C で安定していることを確認する。(3) の混合液に (4) の希釈済 Enzyme-1 を 1 μ l 添加する。数回ピペティング後、直ちに 16°C へ移し反応を行う(推奨反応時間 5 ~ 8 分)。

※ 氷上近くで添加し、反応液部分を触らないように注意してください。添加後はできるだけ速やかに 16°C に移し、推奨時間を守って反応を行ってください。

- (6) 反応を停止するため、チューブをサーマルサイクラーに立てた状態で Stop solution を 20 μ l 添加する。ピペティングで 2 ~ 3 回混合後、氷上に移してさらに数回混合する。

- (7) もう 1 台のサーマルサイクラー (1 台で行う場合は 70°C に設定する) が 70°C で安定していることを確認後、(6) のチューブをセットする。

-
- (8) 5 分間反応後、氷上に移す。
※ 氷上で 2 分以上放置してから次の試薬を加えてください。
 - (9) 断片化のみ（平滑化不要）を行う場合は、(8) のチューブに 0.5 M EDTA を 1 μ l 加え、ピペティングでよく混合したのち精製処理を行う。

2. 平滑化

- (1) Enzyme-2 を希釈する（用時調製）。
【希釈方法】
0.2 ml PCR チューブを氷上に置き、以下の試薬を下記の割合で混合する。泡立てないようにゆっくりピペティングにて混合する。
Dilution Buffer-2 : Enzyme-2 = 9 : 1
- (2) 1- (8) のチューブに 150 mM MgCl₂ を 2 μ l 加え、泡立てないようにピペティングでよく混合する。ボルテックスは使用しない。
- (3) サーマルサイクラーが 16°C で安定していることを確認して（1 台で行う場合は 16°C に設定する）、2- (2) に (1) の希釈済 Enzyme-2 を 2 μ l 添加する。ピペティングで数回混合後、直ちに 16°C へ移し、10 分間反応を行う。
※ 作業はできるだけ氷上近くで行ってください。
- (4) 反応終了後、氷上に移す。
- (5) 0.5 M EDTA を 1 μ l 加えてピペティングでよく混合し、スピンドウンする。
- (6) サーマルサイクラーが 70°C で安定していることを確認して（1 台で行う場合は 70°C に設定する）、チューブを移し、5 分間反応を行う。
- (7) チューブを氷上に移す。

断片化の確認

ゲノム DNA 200 ~ 250 ng 相当量 [2- (7) の反応液約 10 μ l] を 1.5% Agarose L03「TAKARA」(製品コード 5003/5003B) で電気泳動する。

反応後の精製 (例)

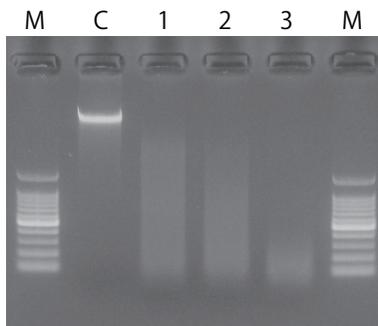
フェノール/クロロホルム処理、あるいは汎用カラムにて反応液を精製し、短鎖、dNTP、酵素の除去および DNA の濃縮を行う。

※ エタノール沈殿を行なう場合は、共沈剤 [Gen とるくん™ エタ沈キャリア (製品コード 9094) など] を使用してください。

VI. 実験例

実験例 -1：大腸菌 W3110 株のゲノム DNA 1 μg を用いた断片化例

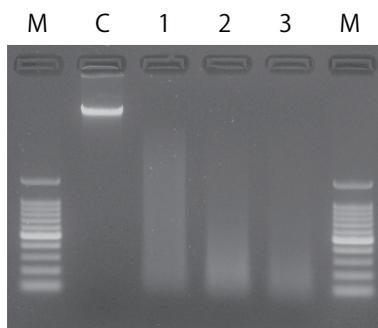
操作方法に従って断片化反応 (16°C ; 5 分、7 分、9 分) および平滑化反応を行った後、最終反応液をそれぞれ 11 μl 用いてアガロースゲル電気泳動を行い、断片化を確認した。



レーン C : 未処理のゲノム DNA 200 ng
1 : 16°C 5 分
2 : 16°C 7 分
3 : 16°C 9 分
M : 100 bp DNA Ladder
1.5% Agarose L03 「TAKARA」

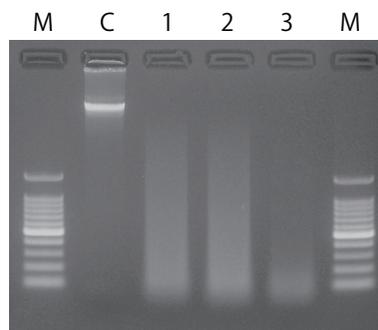
実験例 -2：GC 含量に偏りがあるゲノム DNA を使用した断片化例

1) *Pyrococcus furiosus* DSM 3638 のゲノム DNA (GC 含量 : 40%) を 1 μg 使用し、操作方法に従って断片化反応 (16°C ; 5 分、7 分、9 分) および平滑化反応を行った後、最終反応液をそれぞれ 11 μl 用いてアガロースゲル電気泳動を行い、断片化を確認した。



レーン C : 未処理のゲノム DNA 200 ng
1 : 16°C 5 分
2 : 16°C 7 分
3 : 16°C 9 分
M : 100 bp DNA Ladder
1.5% Agarose L03 「TAKARA」

2) *Thermus thermophilus* HB8 Genomic DNA Solution (製品コード 3071) (GC 含量 69%) を 500 ng 分使用し、操作方法に従って断片化反応 (16°C ; 5 分、7 分、9 分) および平滑化反応を行った。最終反応液をそれぞれ 11 μl 用いてアガロースゲル電気泳動を行い、断片化を確認した。



レーン C : 未処理のゲノム DNA 100 ng
1 : 16°C 5 分
2 : 16°C 7 分
3 : 16°C 9 分
M : 100 bp DNA Ladder
1.5% Agarose L03 「TAKARA」

実験例 -3：平滑末端ベクター pUC118 *Hinc* II へのクローニングとインサートチェック

- ・ 使用サンプル：大腸菌 W3110 株ゲノム DNA 1 μ g
- ・ 断片化反応時間：16°C 8 分

操作方法に従って断片化および平滑化を行った反応液を汎用カラムにて精製し、抽出溶液 25 μ l を得た。その 5 μ l と pUC118 *Hinc* II/BAP (製品コード 3322) 25 ng とを、Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (製品コード 6027) を用いて 16°C 30 分間ライゲーションした。ライゲーション反応液の半分を *E. coli* JM109 Competent Cells (製品コード 9052) 100 μ l へ形質転換した。900 μ l の SOC 培地を添加後、25 ~ 50 μ l を LB+Amp プレートに播種した結果、白色コロニー 150 ~ 300 個/plate、青色コロニー 35 ~ 70 個/plate (白色コロニー率：約 80%) が得られた。

各コロニーのインサートチェックには以下の試薬とプライマーを使用した。

- ・ SapphireAmp® Fast PCR Master Mix (製品コード RR350A)
- ・ M13 Primer M4 (終売)
- ・ *Bca*BEST® Sequencing Primer RV-M (終売)

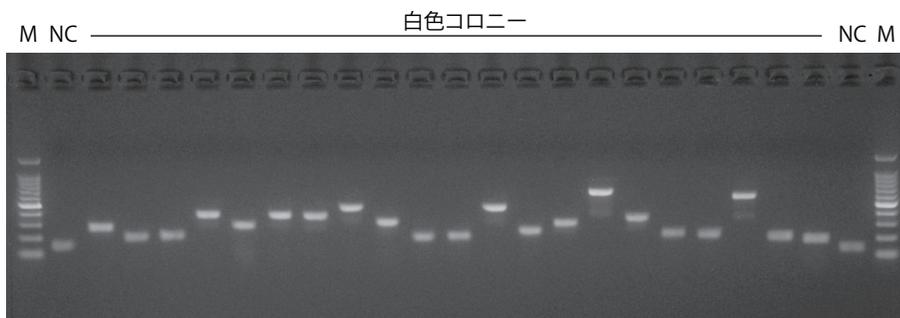
反応条件：

94°C 1 min.
↓
98°C 5 sec.] 30 cycles
55°C 5 sec.]
72°C 10 sec.]

M : 100 bp DNA Ladder

NC : 青色コロニー (no insert = 約 130 bp を増幅)

2% Agarose L03「TAKARA」



VII. Q & A

Q1. 断片化サイズが小さくなりすぎる。どうすればよいか？

A1. Enzyme-1 は非常に温度に敏感な酵素のため、できるだけ氷上で作業を行なってください。酵素添加の際、チューブを氷上から離してしまったり、チューブの反応液部分を手で触れると試薬の温度が上がり、断片化が進み過ぎる場合があります。なお、断片化の反応時間を短くすることで改善される場合もあります。

Q2. 切れ残りがあるが、何故か？

A2. 反応液の混合が不十分であった可能性が考えられます。操作方法の 1- (3) や 2- (2) など、酵素添加の前のステップはよく混合してください。

VIII. 関連製品

NucleoSpin Tissue (製品コード 740952.10/.50/.250)
Agarose L03「TAKARA」(製品コード 5003/5003B)
100 bp DNA Ladder (Dye Plus) (製品コード 3422A/B)
Thermus thermophilus HB8 Genomic DNA Solution (製品コード 3071)
Alkaline Phosphatase (*E. coli* C75) (製品コード 2120A/B)
Alkaline Phosphatase (Calf intestine) (製品コード 2250A/B)
pUC118 *Hinc* II/BAP (製品コード 3322)
Gen とるくん™ エタ沈キャリア (製品コード 9094)
Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (製品コード 6027)
E. coli JM109 Competent Cells (製品コード 9052)
SapphireAmp® Fast PCR Master Mix (製品コード RR350A)

IX. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- SapphireAmp、*Bca*BEST はタカラバイオ株式会社の登録商標です。Gen とるくんはタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995
ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社