用于酶促片段化的 KAPA Frag 试剂盒

KR1141 – v4.17

本技术数据表为用于酶促片段化的 KAPA Frag 试剂盒提供了产品信息和一份详细的实验方法。

目录

产品描述 2
产品应用 2
产品规格 2
货运和储存 2
处理 2
质量控制 2
重要参数 3
起始 DNA 3
片段化参数 3
片段化后处理 4
反应纯化/片段选择 4
反应优化 5
起始 DNA 的定量 5
处理含有 EDTA 的 DNA 样品 5
片段化时间的优化 5
片段化温度的优化 6
片段化后处理和文库制备 7
片段化结果分析 7
片段化实验方法 8
附录：片段化结果的示例 11
限制和责任 12
买方须知：有限的产品保证 12
买方须知：有限许可 12

Kapa/Roche 试剂盒编码和组分		
KK8600 7962495001 8 次反应	KAPA Frag 酶	100 µL
	KAPA Frag 缓冲液（10X）	50 µL
	Conditioning 溶液	580 µL
	终止液	580 µL
KK8601 7962509001 24 次反应	KAPA Frag 酶	270 µL
	KAPA Frag 缓冲液（10X）	140 µL
	Conditioning 溶液	580 µL
	终止液	580 µL
KK8602 7962517001 96 次反应	KAPA Frag 酶	1,270 µL
	KAPA Frag 缓冲液（10X）	640 µL
	Conditioning 溶液	580 µL
	终止液	580 µL

快捷提示

- 该试剂盒专为 1 ng - 1 µg 双链 DNA 的酶促片段化而设计，用于构建高质量的 NGS 文库。
- 此实验方法提供的片段化参数仅供参考，用于您特定类型和起始量的样本时可能需要优化。相关操作指南请参阅反应优化章节。
- 片段化后，需要进行基于磁珠的纯化或片段选择。推荐将 KAPA 纯化磁珠用于此应用，KAPA 纯化磁珠是单独出售的。
- 对于含有 EDTA 的 DNA 制剂，我们建议在酶促片段化之前进行 3X 的 KAPA 纯化磁珠纯化。或者，可使用 Conditioning 溶液。请参阅重要参数：起始 DNA。
- KAPA DNA HyperPlus 文库构建试剂盒将结合 KAPA Frag 和 KAPA HyperPrep 化学方法，在同一个试管中对您的样本进行片段化/文库构建的操作可为您提供最高的文库产量。欲了解更多信息，请登录 www.sequencing.roche.com。

产品描述

用于酶促片段化的 KAPA Frag 试剂盒可对多种不同类型和起始量（1 ng - 1 µg）的双链 DNA（dsDNA）进行稳定可重复的酶促片段化，还可以整合入任何需要起始投入片段化 dsDNA 的 NGS 文库构建工作流程中。

该工作流程可实现自动化，与机械性剪切不同，该流程不需要任何专门的设备或耗材。片段化的程度（DNA 片段的主峰大小和大小分布）是由片段化时间和温度来控制的。最佳的片段化参数在某种程度上取决于起始 DNA 的数量和性质，但 KAPA Frag 系统对 DNA 起始量和质量的灵敏度要低很多，因此比其他酶促片段化技术（包括标记）的可重复性更高。

使用 KAPA Frag 系统进行片段化的 DNA 生成的文库，在功能上等同于通过 Covaris 片段化的 DNA 制备的文库。

产品应用

KAPA Frag 试剂盒非常适合于对用于 NGS 文库构建的 dsDNA 进行低通量和高通量的片段化。它兼容高复杂度的基因组 DNA，也兼容低复杂度样本，如小病毒基因组、质粒、cDNA 和长扩增子，以及低质量 DNA，如 FFPE 样本片段化 DNA 可用于不同的 NGS 应用，包括：

- 全基因组鸟枪法测序
- 全外显子组测序或靶向测序，使用 Roche SeqCap EZ、Agilent SureSelect、Illumina TruSeq、IDT xGen Lockdown™探针或其他杂交捕获系统
- 长扩增子的测序
- 选择的 RNA 测序应用。

KAPA DNA HyperPlus 文库构建试剂盒将结合 KAPA Frag 和 KAPA HyperPrep 化学方法，在同一个试管中对您的样本进行片段化/文库构建的操作，可为您提供更高的文库产量。请访问 www.sequencing.roche.com 获取更多信息。

产品规格

货运和储存

该试剂盒中提供的酶对温度敏感，在运输和储存期间应采取适当的措施。用于酶促片段化的 KAPA Frag 试剂盒是在干冰上运输。收货后，需立即将酶和反应缓冲液储存在-15°C 至-25°C 的恒温冰箱中。如果能够在这些条件下储存并进行正确的处理，试剂盒组件将保持完全活性，直至试剂盒标签上标明的失效日期。

处理

需始终确保试剂盒组分在使用前已完全解冻并彻底混合。在处理和制备过程中，需尽可能将所有酶组分和反应预混液保存在冰上。

质量控制

所有试剂盒组分都经过了严格的功能性的质量控制，并没有可检测到的污染性外切及内切核酸酶活性，并且符合 DNA 污染的严格要求。若需要更多信息，请通过 sequencing.roche.com/support 联系技术支持。

重要参数

起始 DNA

- 这一实验方法适用于从 1 ng - 1 µg 的双链 DNA 进行片段化。
- ***酶促片段化反应对 EDTA 存在的灵感度很高，必须在片段化之前除去或中和 EDTA。*** DNA 制备过程中的 EDTA 通常是通过在 DNA 提取或纯化过程的最后阶段中使用的洗脱缓冲液带入的。
- 建议在片段化之前从 DNA 样本中去除 EDTA，以确保一致性的结果。可以使用 KAPA 纯化磁珠进行一次 3X 的基于磁珠的纯化来实现。有关详细的 DNA 纯化实验方法，请参阅 KAPA 纯化磁珠（KAPA 纯化磁珠）技术数据表。为获得最佳的片段化结果，在纯化后用 10 mM Tris-HCl（pH 8.0 - 8.5）洗脱 DNA。
- 据报道，从血液样本中分离的 DNA 含有抑制剂，会影响片段化的效率。建议在片段化之前进行一次 3X 的基于磁珠的纯化。
- 而对于从福尔马林处理-石蜡包埋样本的 DNA 样本中去除 EDTA，基于磁珠的纯化可能不会产生相当的效果。福尔马林处理-石蜡包埋样本的 DNA 回收量可能较低，且并不总是与 DNA 质量成正比。对于福尔马林处理-石蜡包埋样本的 DNA，建议首选使用 Conditioning 溶液（见下文）中和 EDTA。
- 如果 DNA 纯化不可行，则可通过在片段化反应中添加适当终浓度的 Conditioning 溶液，来减少 EDTA 的抑制作用。
- 为了方便反应体系配制，将 Conditioning 溶液预稀释至表 1 中概述的适当工作浓度，并且在片段化反应中添加固定的体积（5 µL）。请注意，需要根据片段化反应中 EDTA 的最终浓度（一旦起始 DNA 是在 50 µL 的反应体积中被稀释）来进行 Conditioning 溶液的稀释，而不是根据 DNA 制剂中的 EDTA 浓度。
- 准备至少 100 µL 的稀释 Conditioning 溶液（如表 1 所示），或使用以下公式计算所需的体积：

  （反应次数×5 µL）+ 10%过量

- *如果您的 DNA 样本不含 EDTA，或者如果 Conditioning 溶液的最终浓度与反应中的最终 EDTA 浓度不匹配，则在片段化反应中添加 Conditioning 溶液将导致次优的结果。*
- 如果您不确定 DNA 样本中是否存在 EDTA 或其相应的浓度，请参阅反应优化章节（第 5 页）。

表 1. 针对含 EDTA 的 DNA 样本的 Conditioning 溶液稀释液

50 µL rxn 中的最终 EDTA 浓度	稀释倍数	Conditioning 溶液的体积（每 100 µL）	PCR 级水的体积（每 100 µL）
0.02 – 0.05 mM	32.0	3.1 µL	96.9 µL
0.1 mM	15.4	6.5 µL	93.5 µL
0.2 mM	7.4	13.5 µL	86.5 µL
0.3 mM	4.8	21.0 µL	79.0 µL
0.4 mM	3.3	30.0 µL	70.0 µL
0.5 mM	2.6	38.8 µL	61.2 µL
0.6 mM	2.2	46.5 µL	53.5 µL
0.7 mM	1.8	56.0 µL	44.0 µL
0.8 mM	1.6	64.0 µL	36.0 µL
0.9 mM	1.4	72.0 µL	28.0 µL
1.0 mM	1.3	80.0 µL	20.0 µL

片段化参数

- “片段化实验方法”（第 1 步，第 8 页）中提供的片段化参数，适用于高质量基因组 DNA 的片段化。
- 片段化的程度（DNA 片段的主峰大小和大小分布）是由片段化时间和温度来控制的，可以通过调节这两个因素来获得所需的结果。
- FFPE DNA 的质量会影响段化效果。参照片段化实验方法（步骤 1，第 8 页）中的指南来处理 Q129/Q41 比率约为 0.4（使用 KAPA 人类基因组 DNA 定量及 QC 试剂盒的测定结果）或更高的 FFPE 样本，是一个不错的开始。但是，对于低质量的 FFPE 样本，很短的的片段化时间即可能会得到较短的片段化结果。较长的片段化时间通常会增加起始 DNA 转化为 150-250 bp 的片段的比例，从而减少残留的高分子量 DNA，这在文库构建过程中也与提高产量相关。
- 标准片段化参数可能会导致低复杂度样本的过度片段化，例如小病毒基因组 DNA、质粒、长扩增子和 cDNA。对于这些样本类型，片段化时间可能必须减少到 5 分钟甚至更短，以获得所需的主峰片段长度。这使得对反应的控制难度加大，特别是需要手动处理大量样本时。为了获得更稳定和可重复的结果，可以降低片段化温度（至 30°C 或 25°C）以降低酶活性，从而增加获得所需片段长度的所用时间。
- 有关如何系统地优化特定样本的片段化参数的指南，请参阅反应优化章节（第 5 页）。
- 对于相同的样本和起始量，不同的装置（例如，热循环仪与加热锅，或者集成到自动液体处理系

统中的不同帕尔贴装置）可能不会产生相同的片段化结果，并且在不同装置之间转移样本时可能必须对片段化时间稍作修改。随着片段化时间的增加，用于片段化孵育的装置产生的相应影响可能愈加不明显。

片段化后处理

- 使用终止液终止片段化反应。终止液中含有 EDTA，而该物质与用于 Illumina 和 Ion Torrent 测序的文库构建实验方法中的初始酶促步骤（末端修复和/或加 A 尾）不兼容。残留的片段化酶还可能会干扰文库构建的效率。因此，需在文库制备之前，使用基于磁珠的纯化或使用 KAPA 纯化磁珠进行双侧片段选择，来纯化片段化反应产物。
- 片段化实验方法（步骤 2，第 8 页）中描述的 2X 的基于磁珠的纯化，是设计用于优化回收（70 - 80%）片段化 DNA，仅会排除非常小的片段（~50 bp 或更少）。在文库构建之前，可以降低磁珠与 DNA 的体积比，以排除更大长度范围的小片段。
- 片段化实验方法（步骤 3，第 9 页）中描述的双侧片段选择，是设计用于排除小片段和大片段。当片段化起始量> 100 ng，且所需的主峰片段长度≥ 350 bp 和/或您的测序应用偏向于需要更窄的片段分布时，推荐选择双侧片段选择。标准实验方法可产生长度为 250 - 450 bp 的 DNA 片段，但可能需要调整以获得更短或更长的片段。本文档包括了修改实验方法的指南。
- 可采用电泳片段选择法或仪器（如，Sage Science Pippin Prep），代替实验方法中描述的基于磁珠的片段选择。
- 片段选择不可避免地会导致较多样本的损失。通常情况下，有意排除小分子和大分子以及片段选择技术的固有低效率，可能会导致 60 - 95%的起始 DNA 丢失。因此，应该将片段选择的潜在优势与样本复杂性的潜在损失进行权衡，特别是当起始 DNA 有限时。
- 当整合的 KAPA DNA HyperPlus 工作流程中使用了 KAPA Frag 系统时，本文档所述的片段化后操作流程就不再适用。有关详细信息，请参阅 KAPA DNA HyperPlus 文库构建试剂盒的技术数据表。

反应纯化/片段选择

- 该实验方法已经过验证，即可使用 KAPA 纯化磁珠，也可使用 Agencourt AMPure XP（Beckman Coulter）磁珠。如果使用其他磁珠，DNA 结合和片段选择的解决方案和条件可能不同。
- 阅读 KAPA 纯化磁珠或 AMPure XP 的所有存储和处理推荐。对于获得特定的片段大小分布和 DNA 产量来说，平衡到室温是必不可少的。
- 磁珠会逐渐沉淀；需要始终确保在使用前进行了完全重悬。
- 为了确保最佳的 DNA 回收率，在 DNA 结合孵育之前，必须彻底混合 DNA 和 KAPA 纯化磁珠（通过涡旋或大量上下移液）。
- 磁珠孵育时间仅是指导，可以根据当前实验方法、既往经验、特定设备和样本进行改变/优化，以获得最高的文库构建效率和通量。
- 完全捕获磁珠所需的时间根据使用的不同反应容器和磁力架而变化。重要的是，不要随着去除或转移上清液而丢弃或转移任何磁珠。相应地，也应该优化捕获时间。
- 可以调整用于磁珠清洗的 80%乙醇的体积，以适应较小的反应容器和/或有限的移液能力，但重要的是在清洗步骤期间磁珠需要被完全浸没。需要始终使用新鲜配制的 80%乙醇。
- 在进行后续反应之前，去除所有乙醇是很重要的。然而，磁珠的过度干燥可能使其难以重悬，导致 DNA 大量丢失。通过优化乙醇挥发，在室温下干燥磁珠 3 - 5 分钟即已足够。不建议在 37°C 下干燥磁珠。
- 使用适当体积的洗脱缓冲液（10mM Tris-HCl，pH 8.0 - 8.5）把 DNA 从磁珠上洗脱下来。不推荐在 PCR 级水中洗脱 DNA，因为 DNA 在非缓冲溶液中不稳定。纯化后的片段化 DNA 在洗脱缓冲液中，可于 2°C 至 8°C 下稳定保存 1 - 2 周，或在-15°C 至-25°C 下长期保存。DNA 在-15°C 至-25°C 的长期稳定性取决于许多因素，包括浓度。需要始终使用低 DNA 吸附管进行长期储存，避免反复冻融。

反应优化

片段化实验方法（步骤 1，第 8 页）中提供的片段化指南，可能无法从您的特定 DNA 样本生成最佳的片段化结果。因此，当首次评价该试剂盒时，不应使用珍贵的样本。相反，而应使用大量非珍贵 DNA 样本来优化片段化参数，选择的样本要能够代表待处理的实际样本。

在为评价用于酶促片段化的 KAPA Frag 试剂盒进行实验设计时，应考虑本章节中的信息。

起始 DNA 的定量

对于 DNA 起始量的灵敏度，尽管 KAPA Frag 酶促片段化系统不如基于标记的文库构建法，但仍建议对起始 DNA 进行定量。推荐将 PicoGreen/Qubit 用于高质量 DNA 的定量，而 KAPA 人类基因组 DNA 定量及 QC 试剂盒，则为 FFPE DNA 提供了浓度和质量信息。

处理含有 EDTA 的 DNA 样品

如果 DNA 样本含有 EDTA，则使用 KAPA 纯化磁珠进行基于 3X 磁珠的纯化，以在片段化之前去除 EDTA。有关详细的 DNA 纯化实验方法，请参阅 KAPA 纯化磁珠（KAPA 纯化磁珠）技术数据表。

或者，可将 Conditioning 溶液用于在片段化之前中和 EDTA。对于质量不一的珍贵的福尔马林处理-石蜡包埋样本的 DNA，推荐首选这一策略。

由于 DNA 制剂中的 EDTA 通常是通过 DNA 提取或纯化过程的最后阶段中使用的洗脱缓冲液带入的，所以 EDTA 的浓度通常是已知的（例如，标准 TE 缓冲液中为 1 mM，“低 EDTA”TE 缓冲液中为 0.1 mM）。如果是这种情况，并且您的样品具有相似的浓度（即，使用恒定体积的 DNA 用于文库构建），则请参阅表 1（第 3 页）以适当稀释 Conditioning 溶液，并遵照片段化实验方法（步骤 1）。

如果您知道用于 DNA 纯化的含 EDTA 缓冲液的组成，但您的样本浓度范围很宽（即，为获得想要的文库构建起始量，所用的体积将存在变化），所以应该在用于 DNA 纯化的相同的含 EDTA 缓冲液中，对样本进行标准化。

例如：

- 如果您的 DNA 样本在 TE 缓冲液中，并且您用于文库构建的起始量为 100 ng，则使用 TE 缓冲液将每份 100 ng 的样本稀释至最终体积为 30 µL（即，稀释至 3.33 ng/µL）。
- 一旦稀释至 50µL，则现在所有样本将包含相同的最终 EDTA 浓度，以进行片段化。这一浓度是：

  TE 缓冲液中的 EDTA 浓度 x（30 µL/50 µL）
  = 1 mM x（30 µL/50 µL）= 0.6 mM

- 对 Conditioning 溶液进行 2.2 倍稀释（根据第 3 页的表 1），并遵循片段化实验方法（步骤 1.1 的后半部分）。

如果您不确定 DNA 样本中是否存在 EDTA 或其相应的浓度：

- 用适量起始 DNA 和不同终浓度的 Conditioning 溶液来设置一系列的测试反应。
- 保证其中至少有一个反应的相同起始量的质控 DNA 是已知不含 EDTA 的。质控 DNA 应优选与测试样本具有相同的类型和质量。
- 使用适当的参数对 DNA 进行片段化，如“片段化实验方法”（步骤 1，第 8 页）中所述：执行片段化后纯化（步骤 2），并使用电泳系统比较测试样本和对照样本的片段化结果 - 请参阅片段化结果的分析（第 7 页）。
- 滴定反应中 Conditioning 溶液的最终浓度，直到测试样本产生与不含 EDTA 的质控样本相似的片段化结果。
- 两步策略可能是最好的。从 3-4 个最终 Conditioning 溶液浓度范围较广的测试样本开始，然后在更窄的浓度范围内进行更精细的滴定。

片段化时间的优化

片段化实验方法中的片段化指南（步骤 1，第 8 页）对于高质量基因组 DNA 是不错的参考。当首次评价 KAPA Frag 试剂盒时，建议您按以下步骤操作：

- 设置至少三次重复反应，其中所用的量多的量多的非珍贵起始样本，并能够代表待处理的实际样本。
- 从“片段化实验方法”的第三个表中选择最合适的片段化时间（以获得所需的主峰片段长度）（步骤 1，第 8 页）。采用此时间进行一次反应，再在优选范围内进行一次片段化时间稍短或稍长的反应。建议延长 3 - 5 分钟。
- 执行片段化后基于磁珠的纯化（片段化实验方法的第 2 步），并通过电泳评估片段化结果。
  - 如果主峰片段长度太长，则以 2 - 5 分钟的增量增加片段化时间，直到达到最佳的片段分布。

- 如果主峰片段长度太短，则以 2 - 5 分钟的增量减少片段化时间，直到达到最佳的片段分布。

- 如果片段化时间相对较短（≤10 分钟），则可能需要进一步微调（延长或减少 1 - 2 分钟）。如果是这种情况，请考虑优化片段化温度（见下文）。

可以采用类似的策略来优化 FFPE 样本的片段化时间，记住较低质量的样本可能需要稍长的片段化时间。对于 FFPE 样本：

- 设置 4-5 次重复反应，其中所用的量多的非珍贵起始样本能够代表待处理的实际样本。可能需要通过收集一些独立样本来生成该样本。

- 根据所需的主峰片段长度，从“片段化实验方法”（步骤 1，第 8 页）的第三个表中选择最合适的片段化时间。采用其作为最短片段化时间，并且对于每一次额外的重复反应，将孵育时间在 37°C 下增加 5 分钟。

- 执行片段化后纯化（片段化实验方法的第 2 步），使用您首选的试剂和实验方法继续文库构建，并在获得最终文库的片段分布之后，评估片段化反应的结果。 如上所述，需要时可以微调片段化的时间。

关于 FFPE 样本，请注意以下事项：

- 在片段化之前的样品质控期间产生的 FFPE 样品的电泳图谱，并不总是文库和序列质量的良好预测因子。看似由高分子量 DNA 组成的样本，不一定能比看似降解的样本产生质量更好的文库。KAPA 人类基因组 DNA 定量及 QC 试剂盒提供了基于实时定量 PCR 的检测，用于评价福尔马林处理-石蜡包埋样本的 DNA 的质量。已表明，采用该测定法确定的质量评分（Q-比率）与文库构建的成功率相关。

- 基于片段化后的片段大小分布和接头长度，扩增的 FFPE 文库的主峰片段长度通常短于预期。这是一种常见现象，原因可能是在文库扩增中使用的高保真度 DNA 聚合酶不能有效扩增受损的 DNA，尤其是对于含有脱氨基或氧化碱基的模板。因此，在使用 KAPA HyperPlus 工作流程时，独立的尝试优化片段化参数，而不优化其他文库构建步骤的参数，效果并不好。

片段化温度的优化

标准片段化温度为 37°C。如果您是将高质量基因组 DNA、任何其他高复杂性 DNA 样本或福尔马林处理-石蜡包埋样本的 DNA 片段化为长度<500 bp 的主峰片段，则您不太可能需要更改或优化片段化温度。

然而，即使孵育时间较短，低复杂度样品（例如，小病毒基因组、质粒、长扩增子和 cDNA）也可能在 37°C 下被过度片段化。发生过度片段化的可能性取决于起始 DNA 的性质、分子量/长度、片段化后所需的片段大小分布，还在较小的程度上取决于用以片段化的起始量。例如，当在 37°C 下片段化 10 分钟时，100 ng 的 1.8 kb PCR 产物将产生与 100 ng 大肠杆菌或人类基因组 DNA 相似的主峰片段长度（~300 bp），而采用相同的参数 1 ng 的 1 kb PCR 产物将会被片段化成主峰大小<250 bp。

当期望的主峰片段长度> 500 bp 时，为低复杂度样本或高复杂性样本确定最佳片段化参数：

- 用量多的非珍贵样本能够代表待处理的实际样本设置 4 次重复反应。

- 将两份样本分别在 37°C 下片段化 5 分钟和 10 分钟。用另外两份样本重复这些片段化反应，但温度选择 30°C。

- 执行片段化后纯化（片段化实验方法的第 2 步），并通过电泳评估片段化结果。

  - 如果在 37°C 下孵育 10 分钟获得的主峰片段长度太长，则继续优化（增加）37°C 下的片段化时间。

  - 如果在 30°C 下孵育 10 分钟获得的主峰片段长度太长，但 37°C 下孵育 5 分钟导致了过度片段化，则继续优化（增加）30°C 下的片段化时间。

  - 如果在 30°C 下孵育 5 分钟导致过度片段化，则在 25°C 下进行第二组反应（例如，5 分钟、10 分钟、15 分钟和 20 分钟），并在需要时微调片段化时间。

片段化后延伸和文库制备

一旦优化了片段化参数，就需要检查片段化结果，以确认连接后纯化或片段选择（双侧基于磁珠或其他方法）是否最适合于您的特定样本和测序应用。请参阅重要参数：片段化后延伸章节（第 4 页），或通过 sequencing.roche.com/support 联系技术支持。

片段化 DNA 可结合下列试剂盒用于 NGS 文库构建，包括用于 Illumina 平台的 KAPA DNA HyperPrep 文库构建试剂盒、KAPA HTP 或 LTP 文库制备试剂盒，以及用于 Ion Torrent 平台的 KAPA 文库制备试剂盒。

为在 Illumina 自动化平台中（包括所有的 DNA 样本类型和起始量）获得最佳的文库构建效率，强烈建议使用 KAPA DNA HyperPlus 文库构建试剂盒。该试剂盒将结合 KAPA Frag 和 KAPA HyperPrep 化学方法，在同一个试管中对您的样本进行片段化/文库构建。欲了解更多信息，请登录 www.sequencing.roche.com。

片段化结果分析

通过电泳法分析片段化结果。建议使用 Bioanalyzer 或 TapeStation（安捷伦科技），或者 LabChip GX、GXII 或 GX Touch（PerkinElmer）等仪器，而不是传统凝胶。

- 必须在分析反应产物之前，进行片段化后纯化或片段选择。如果没有将片段化酶从反应产物中完全除去，则它将降解分子量标记物，并在分析过程中导致出现其他假象。
- 分析所需的纯化片段化 DNA 的量，取决于所使用的系统，并在使用高灵敏度检测方法时可将这个量限制在 1 - 2 µL。如果片段化的起始量> 500 ng，则在分析前可能需要对其进行稀释，以避免过载。
- 即使使用高灵敏度检测方法，低起始样本的片段化结果（< 10 ng 加入片段化）也可能无法提供很多信息。在这种情况下，最好根据从片段化 DNA 生成的扩增文库的片段分布，来评估片段化的结果。
- 使用 KAPA Frag 试剂盒片段化的 DNA 通常生成的图谱存在略微正偏态。本文档中提及的主峰（最为常见）片段长度对应于“峰顶”（如图 1 所示），并且可显著区别于中位数（中间）或平均片段长度。
- 使用 KAPA Frag 试剂盒生成的片段化结果示例参见附录。

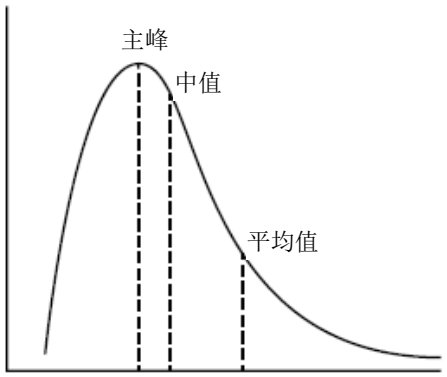

图 1. 主峰片段长度 vs 中位数和平均片段长度

片段化实验方法

1. 酶促片段化

如果 DNA 样本含有 EDTA，则使用 KAPA 纯化磁珠进行基于 3X 磁珠的纯化，以在片段化之前去除 EDTA。有关详细的 DNA 纯化实验方法，请参阅 KAPA 纯化磁珠（KAPA 纯化磁珠）技术数据表。

或者，准备足够体积的适当稀释的 Conditioning 溶液（每个 DNA 样本准备 5 µL，再加上过量的部分）。有关稀释 Conditioning 溶液的指导，请参阅表 2（第 4 页）。

1.1 参照如下方法，稀释用于文库构建的 dsDNA 量：

- 如果 DNA 制剂不含 EDTA，则在 35 µL 的总体积中用 10 mM Tris-HCl（pH 8.0-8.5）进行稀释
- 如果 DNA 制剂确实含有 EDTA，则在 30 µL 的总体积中，用含有 EDTA、且样本目前悬浮其中的缓冲液进行稀释。对每一个包含 30 µL 含 EDTA 的 DNA 的反应，加入 5 µL 稀释的 Conditioning 溶液。

1.2 通过轻轻涡旋或上下移液进行混合

1.3 按以下顺序添加剩余组分，在冰上配制每一个片段化反应：

组分	体积
双链 DNA（必要时带有 Conditioning 溶液）	35 µL
KAPA Frag 缓冲液（10X）*	5 µL
KAPA Frag 酶*	10 µL
总量：	**50 µL**

* 可以将 KAPA 片段化缓冲液和酶预先混合，并在反应体系配制之前保存在冰上请注意，酶的体积大于此反应中的缓冲液体积。

1.4 轻轻涡旋并瞬时离心沉降。将 PCR 板/管放回冰上。立即继续下一步。

1.5 在 PCR 仪中进行孵育，预冷却至 4°C，并按下述方法进行程序设置。将盖子的温度设置为 ≤50°C。

步骤	温度	时间
模块预冷	4°C	N/A
片段化	37°C	参见下表
保持	4°C	∞

主峰片段长度	孵育时间为 37°C *	优化范围
600 bp	5 分钟	3 – 10 分钟
350 bp	10 分钟	5 – 20 分钟
200 bp	20 分钟	10 – 25 分钟
150 bp	30 分钟	20 – 40 分钟

* 这些参数对于高质量基因组 DNA 是一个不错的开始。有关如何优化片段化时间和温度的指南，参见反应优化章节（第 5 页）。如果需要孵育时间的长度超过推荐范围，则样本可能会含有影响片段化效率的抑制剂。建议在片段化之前进行基于磁珠的 DNA 纯化，而不是增加片段化的时间。

1.6 将反应转移至冰上，并立即添加 5 µL 终止液。轻轻涡旋，并直接进行片段化后纯化（步骤 2）或片段化后片段选择（步骤 3）。

2. 片段化后纯化

2.1 结合以下方法，进行一次基于磁珠的纯化：

组分	体积
片段化反应产物（带终止液）	55 µL
KAPA 纯化磁珠	110 µL
总量：	**165 µL**

* 标准实验方法适用于 2X 的磁珠与 DNA 比率。有关更多详细信息以及有关如何修改纯化参数的指南，请参阅重要参数（第 3 - 4 页）。

2.2 通过涡旋和/或多次上下移液进行彻底混合。

2.3 将板/管在室温下孵育 5 - 15 分钟以将 DNA 结合到磁珠上。

2.4 将板/管置于磁力架上以捕获磁珠。孵育直至液体澄清。

2.5 小心吸出并丢弃上清液。

2.6 将板/管置于磁力架上，加入 200µL 80%乙醇。

2.7 在室温下将板/管于磁力架上孵育≥30 秒。

2.8 小心吸出并丢弃上清液。

2.9 将板/管置于磁力架上，加入 200µL 80%乙醇。

2.10 在室温下将板/管于磁力架上孵育≥30 秒。

2.11 小心吸出并丢弃上清液。在不影响磁珠的情况下，尝试去除所有残留的乙醇。

2.12 在室温下将磁珠干燥 3-5 分钟，或直至所有乙醇挥发。注意：过度干燥磁珠可能会导致产量降低。

2.13 从磁力架上取下板/管。

2.14 将磁珠重悬于适当体积的洗脱缓冲液（10 mM Tris-HCl，pH 8.0 - 8.5）中：

- 如果加入片段化的起始量在 1 - 100 ng 的范围内，则重悬于 10 - 25 µL 的体积中。最小体积取决于所用磁力架的性质。
- 如果加入片段化的起始量>100 ng，则重悬于 30 - 55 µL 的体积中。

2.15 通过涡旋和/或上下移液进行彻底混合。

2.16 将板/管在室温下孵育 2 分钟以从磁珠上洗脱 DNA。

2.17 将板/管置于磁力架上以捕获磁珠。孵育直至液体澄清。

2.18 将澄清的上清液转移到新的 PCR 板/管中。将片段化的文库在 2℃至 8℃下储存 1-2 周，或在 -15°C 至-25°C 储存。

3. 片段化后双侧片段选择

为了获得片段化 DNA 的较窄片段分布，尤其是当片段化起始量> 100 ng 时，和/或所需主峰片段长度超过 350 bp 时，在片段化后建议使用任何常用的片段选择技术（例如，此处介绍的双侧片段选择，或电泳法）。

本章节中概述的双侧片段选择实验方法，是设计用于选择范围在 250 - 450 bp 的 DNA 片段。为了获得更短或更长的片段，可以按照如下方式修改实验方法：

片段大小上限	修改
升高	减少第一次分离的比例
降低	增加第一次分离的比例

片段大小下限	修改
升高	减少第二次分离的比例*
降低	增加第二次分离的比例*

* 第二次片段分离应使用至少 0.2 个体积的 AMPure XP。

请注意，第二次分离所需的 KAPA 纯化磁珠的体积是相对于片段选择过程开始时的 DNA 体积计算得来的，而不是第一次分离后转移的含 DNA 上清液的体积。如果第一次和第二次分离之间的差异小于~0.2 个体积，则 DNA 回收量显著降低。为了增加 DNA 回收量，可以使用> 0.2 体积的 KAPA 纯化磁珠用于第二次分离，但是注意这可能导致文库片段回收偏小和/或片段大小分布更宽。

有关双侧片段选择的更多信息，请参阅 KAPA NGS 文库制备技术指南，或通过 sequencing.roche.com/support 联系技术支持。

3.1 结合下述方法，进行第一次（0.6X）片段大小分离（以去除大于~450 bp 的片段）：

组分	体积
片段化反应产物（带终止液）	55 µL
KAPA 纯化磁珠	33 µL
总量：	**88 µL**

3.2 通过涡旋和/或多次上下移液进行彻底混合。

3.3 将板/管在室温下孵育 5 - 15 分钟，以将大于~450 bp 的 DNA 片段结合到磁珠上。

3.4 将板/管置于磁力架上以捕获磁珠。孵育直至液体澄清。

3.5 仔细地将含有小于~450 bp 的 DNA 片段的 85 µL 上清液移液到新的板/管中。重要的是，不要将磁珠与上清液一起转移。如果板/管中的磁珠结合了大于~450 bp 的 DNA 片段，则丢弃这部分板/管。

3.6 结合下述方法进行第二次片段分离（0.8X，以保留>250 bp 的片段）：

组分	体积
第一次片段分离时的上清液	85 µL
KAPA 纯化磁珠	11 µL
总量：	**96 µL**

3.7 通过涡旋和/或多次上下移液进行彻底混合。

3.8 将板/管在室温下孵育 5 - 15 分钟，以将大于~250 bp 的 DNA 片段结合到磁珠上。

3.9 将板/管置于磁力架上以捕获磁珠。孵育直至液体澄清。

3.10 仔细地去除并丢弃含有小于~250 bp 的 DNA 片段的上清液。

3.11 将板/管置于磁力架上，加入 200µL 80%乙醇。

3.12 在室温下将板/管于磁力架上孵育≥30 秒。

3.13 小心吸出并丢弃上清液。

3.14 将板/管置于磁力架上，加入 200µL 80%乙醇。

3.15 在室温下将板/管于磁力架上孵育≥30 秒。

3.16 小心吸出并丢弃上清液。在不影响磁珠的情况下，尝试去除所有残留的乙醇。

3.17 在室温下将磁珠干燥 3-5 分钟，或直至所有乙醇挥发。注意：过度干燥磁珠可能会导致产量降低。

3.18 从磁力架上取下板/管。

3.19 将磁珠彻底重悬于所需体积的洗脱缓冲液（10mM Tris-HCl，pH 8.0-8.5）。

3.20 将板/管在室温下孵育 2 分钟以从磁珠上洗脱 DNA。

3.21 将板/管置于磁力架上以捕获磁珠。孵育直至液体澄清。

3.22 将进行了片段选择的 DNA 转移到新的板/管中，并将 DNA 在 2°C 至 8°C 下保存 1 至 2 周，或保存在-15°C 至-25°C。

附录：片段化结果的示例

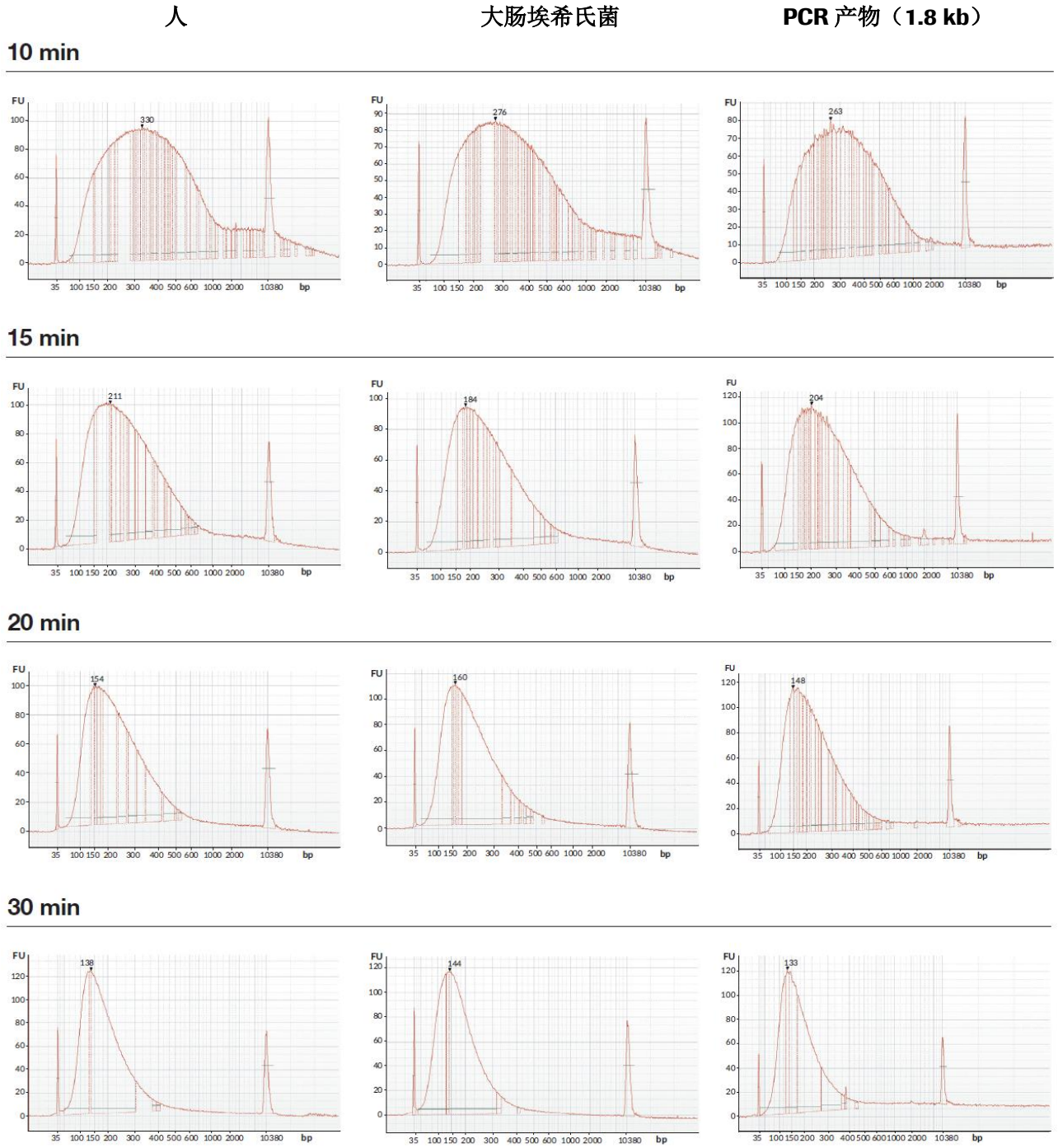

图 2. 片段化结果的示例。100 ng 人类基因组 DNA（左）、100 ng 大肠杆菌基因组 DNA（中）和 100 ng 1.8 kb PCR 产物（右）的片段化结果，在 37°C 下分别孵育 10 分钟、15 分钟、20 分钟或 30 分钟。用终止液终止反应，之后如片段化实验方法（步骤 2）章节所述，对 DNA 进行纯化。在 20 µL 洗脱缓冲液（10 mM Tris-HCl，pH 8.0 - 8.5）中重悬纯化 DNA。使用 Bioanalyzer 2100 高灵敏度 DNA 测定法（Agilent Technologies）分析样本（各 1 µL），无需进一步稀释。

限制和责任

本技术数据表“以原文”提供，且 Kapa Biosystems 对任何印刷问题、技术问题或其他不准确之处不承担任何责任。该文档在将来的版本中如有更改，恕不另行通知。

在适用法律允许的最大范围内，Kapa Biosystems 对本技术数据表及此处包含的任何信息（包括但不限于适销性和适用于特定用途的暗示保证）不做任何明示或暗示的保证。Kapa Biosystems 不对因提供、使用或执行本文档或此处包含的任何信息而导致的错误、偶然或间接损失承担责任。

本文档可能包含对第三方信息来源、硬件或软件、产品、或服务和/或第三方网站（统称为“第三方信息”）的引用。Kapa Biosystems 不控制任何第三方信息，也不对其负责。在本文档中包含第三方信息，并不意味着 Kapa Biosystems 以任何方式认可第三方信息或第三方本身。

Kapa Biosystems 对您使用并非由 Kapa Biosystems 提供，但与您使用 Kapa Biosystems 产品有关的任何软件或设备不承担任何责任，也不对之负责。

Kapa Biosystems 不以任何方式保证或表示您使用本文所述的 Kapa Biosystems 产品将获得满意的结果。提供给您的唯一保修服务包含在本文档随附的有限保修证书中。您将承担与使用 Kapa Biosystems 产品相关的所有风险。

买方须知：有限的产品保证

任何不符合产品规格表中规定的性能标准的产品将可以免费更换。这一保修服务限制了我们更换产品的责任。Kapa Biosystems 不提供任何明示或暗示的保证，包括但不限于适销性或适用于特定用途的暗示担保。Kapa Biosystems 对因使用，使用结果或无法使用任何产品而导致的任何直接、间接、后果性或附带损害不承担任何责任。

买方须知：有限许可

用于酶促片段化的 KAPA Frag 试剂盒的开发、设计和销售仅用于研究目的和体外使用。本产品或任何单个组件均未经过测试用于诊断或药物开发，也不适用于人类或动物。请参阅 MSDS，可根据要求提供。

本产品的某些应用采用了 Kapa Biosystems 之外的其他团体发布的专利，这些专利在某些国家适用。购买此产品并不意味着获得执行任何此类应用的许可。因此，根据使用本产品的特定应用和使用国家，可能要求本产品的用户获得专利许可。

KAPABIOSYSTEMS

制造，研发
南非开普敦
电话：+27.21.448.8200
传真：+27.21.448.6503

技术支持
sequencing.roche.com/support

© 2017 KAPA 是罗氏公司的商标。其他所有产品名称或商标均属于其所有者。