

仅供研究使用，不可用于临床诊断  
适用于 Illumina 和 MGI 测序平台

如有问题，请联系：

🌐 [www.igenetech.com/support](http://www.igenetech.com/support)

📞 010-89146623

✉ [support@igenetech.com](mailto:support@igenetech.com)

# IGT<sup>®</sup> Fast Library Prep Kit v2.0

## 使用说明书

适用于 2022 年新产品体系

通用型文库构建试剂盒，兼容多种样本类型

版本号：C.1，2023 年 9 月

文档号：PROT220610

样本提取

文库制备

靶向捕获

上机测序

数据分析

## 版本说明

生产公司：艾吉泰康（嘉兴）生物科技有限公司

### 使用说明

本说明书适用于 IGT®Fast Library Prep Kit v2.0，使用前请仔细阅读本说明书，并且严格按照说明书内容进行实验操作。

### 试剂盒概述

IGT®Fast Library Prep Kit v2.0 是一款通用型 DNA 文库构建试剂盒。本试剂盒基于 A-T 连接原理，通过连接相应的接头，可构建 Illumina 或 MGI 测序平台的文库，适用于 1 ng~1 µg DNA 起始的全基因组测序或探针杂交捕获测序。搭配分子标签（UMI）技术，可满足 cfDNA 低频突变检测的需求。

### 更新信息

使用说明书版本号	修订日期	修订内容摘要
C.1	2023 年 9 月	主要修改了商标、流程图、文字描述
C.0	2022 年 6 月	修改适配新产品体系
B.0	2022 年 4 月	优化了样式
A.0	2022 年 2 月	首次发布

## 试剂盒组成

文库构建所需的试剂包括 IGT® Fast Library Prep Kit v2.0 和 IGT® Adapter & Primer。

### IGT® Fast Library Prep Kit v2.0

管盖颜色	组分	总量		储存温度
		16 rxn	96 rxn	
黄色	End Repair & A-Tailing Buffer	124 µL	744 µL	-20°C ± 5°C
黄色	End Repair & A-Tailing Enzyme Mix	54 µL	320 µL	
蓝色	Ligation Buffer	540 µL	2*1584 µL	
蓝色	DNA Ligase	88 µL	540 µL	
白色	PCR Master Mix	450 µL	2*1350 µL	

### IGT® Adapter & Primer

请根据需求选择下列 IGT® Adapter & Primer 中的一种。

#### IGT® Adapter & Single-Indexed Primer (for MGI)

管盖颜色	组分	总量	储存温度
		96*1 rxn	
蓝色	Adapter (15 µM, for MGI SI)	540 µL	-20°C ± 5°C
白色	TPE 1.0 Primer (20 µM, for MGI)	264 µL	
板装	TPE 2.0 Indexed Primer N (20 µM, for MGI)*	4 µL each	

\*N 为 index 编号。

#### IGT® Adapter & UDI Primer (for Illumina/MGI)

管盖颜色	组分	总量		储存温度
		96*1 rxn	96*10 rxn	
蓝色	Adapter (15 µM)	540 µL	4*1350 µL	-20°C ± 5°C
板装或白色	UDI Primer N (10 µM each)*	8 µL each	96*75 µL	

\*N 为 index 编号。

#### IGT® UMI Adapter & UDI Primer (for Illumina/MGI)

管盖颜色	组分	总量		储存温度
		96*1 rxn	96*10 rxn	
蓝色	Insert UMI Adapter (15 µM)	540 µL	4*1350 µL	-20°C ± 5°C
板装或白色	UDI Primer N (10 µM each)*	8 µL each	96*75 µL	

\*N 为 index 编号。

## 自备的试剂、仪器和耗材



以下为艾吉泰康推荐品牌，也可以使用已有满足实验要求的替代试剂和耗材。

### 自备试剂

序号	名称	推荐产品	供应商
1	无水乙醇	市面主流品牌	市面主流品牌
2	无核酸酶水	Nuclease-Free Water	Ambion (Cat # AM9930)
3	纯化磁珠	Agencourt AMPure XP Kit	Beckman (Cat # A63880)
		IGT® Pure Beads	艾吉泰康 (Cat # C80661)
4	文库片段质检试剂（请根据仪器选择对应的试剂盒使用）	Agilent DNA 1000 Kit	Agilent (Cat # 5067-1504)
		S2 Cartridge (Standard Cartridge)	BiOptic (Cat # C105101)
5	Qubit 定量试剂	Qubit dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher (Cat # C47257)

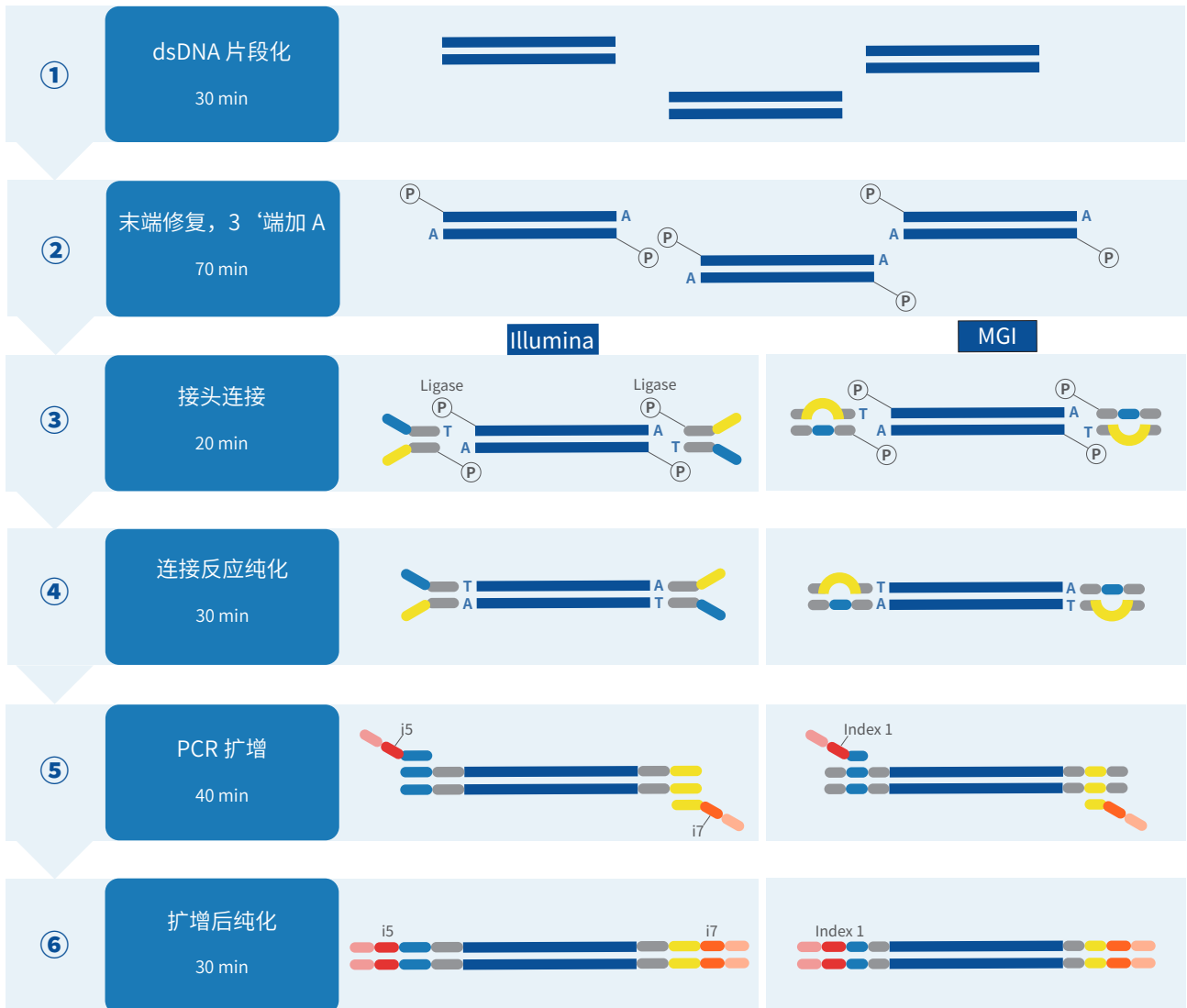
### 自备仪器

序号	名称	推荐产品	供应商
1	96孔 PCR 管磁力架	DynaMag-96 Side	Thermo Fisher (Cat # 12331D)
2	片段分析仪（任选一种使用）	Agilent 2100 Bioanalyzer system	Agilent (Cat # G2939AA)
		Qsep 100	BiOptic (Cat # Qsep100)
3	核酸定量	Qubit® 4.0 Fluorometer	Thermo Fisher (Cat # Q33226)
4	涡旋振荡器	市面主流产品	市面主流品牌
5	微型离心机	市面主流产品	市面主流品牌
6	冰盒	市面主流产品	市面主流品牌
7	PCR 仪	市面主流产品	市面主流品牌

### 自备耗材

序号	名称	推荐产品	供应商
1	0.5 mL Qubit 管	Qubit® assay tubes	Thermo Fisher (Cat # Q32856)
2	0.2 mL PCR 管	市面主流产品	市面主流品牌
3	0.2 mL 八联排 PCR 管	市面主流产品	市面主流品牌
4	10 µL 移液器吸头	市面主流产品	市面主流品牌
5	200 µL 移液器吸头	市面主流产品	市面主流品牌

## 工作原理及流程图



## 使用前注意事项：

欢迎选购艾吉泰康 IGT®Fast Library Prep Kit v2.0，在使用前请仔细阅读以下注意事项：

- 应尽可能使用 A260/A280 在 1.8~2.0 范围的高质量基因组 DNA，如果 DNA A260/A280 远小于 1.8，可能存在较多的蛋白质污染。如果 A260/A230 远小于 2.0，可能存在较多的胍盐等物质残留。如果存在污染，建议先对 DNA 样本进行一轮磁珠纯化，再进行后续的建库实验。
- 为了保证 cfDNA 提取质量，推荐使用 QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit，也可使用其他 cfDNA 提取方案，推荐使用片段分析仪和 Qubit 4.0 进行 cfDNA 质检。
- 建议投入 20 ng 以上 cfDNA 进行建库，尽可能保证检测突变的灵敏性。cfDNA 投入量和测序数据量将直接影响突变的检测灵敏性。
- 建议在冰盒上配制反应体系。
- 建议适配 0.2 mL PCR 管的磁力架。
- 建库过程中需要用到片段分析仪，文库片段分析是文库构建过程中重要的质控步骤。
- 建议纯化磁珠为 IGT® Pure Beads 或 Agencourt AMPure XP 磁珠，如用其他品牌磁珠，请提前摸索磁珠用量。

如果以上均满足，即可开始实验

## STEP 1 末端修复，3' 端加“A”

实验备注区

需要使用到的试剂：

- End Repair & A-Tailing Buffer
- End Repair & A-Tailing Enzyme Mix
- Nuclease-Free Water

需要使用到的仪器：

- 涡旋振荡器
- 微型离心机
- PCR 仪

1.1 在进行本步骤的实验之前，需要将基因组 DNA 或 FFPE DNA 进行片段化处理，片段大小为 150~200 bp，DNA 片段化方法请参考附录一。如果投入的 DNA 是 cfDNA 或严重降解到很小片段的 FFPE DNA，则不需要进行片段化处理。

1.2 提前将试剂盒中的 End Repair & A-Tailing Buffer 从 -20℃ 冰箱中取出，置于冰盒上融化，融化后短暂涡旋混匀并瞬时离心，置于冰盒上备用。

1.3 将 End Repair & A-Tailing Enzyme Mix 从 -20℃ 冰箱中取出，颠倒混匀并瞬时离心，置于冰盒上备用。

1.4 在冰盒上按下表配制反应体系：

试剂	体积
Fragmented DNA	X $\mu$ L
Nuclease-Free Water	(50-X) $\mu$ L
End Repair & A-Tailing Enzyme Mix	3 $\mu$ L
End Repair & A-Tailing Buffer	7 $\mu$ L
总体积	60 $\mu$ L

1.5 使用移液器吸打混匀（避免剧烈振荡混匀），瞬时离心。

1.6 设置 PCR 仪参数如下，将反应体系置于 PCR 仪上，运行程序：

温度	时间
热盖温度 75℃	
30℃	30 min
65℃	30 min
4℃	Hold

1.7 程序结束后，立即进行 STEP 2 的接头连接反应。

 此步骤为不可暂停步骤，完成后请立即进行下一步。

## STEP 2 接头连接

## 实验备注区

### 需要使用到的试剂:

- Ligation Buffer
- DNA Ligase
- Nuclease-Free Water
- Adapter(15  $\mu$ M)

### 需要使用到的仪器:

- 涡旋振荡器
- 微型离心机
- PCR 仪

2.1 提前将 Adapter 从 -20°C 冰箱中取出, 置于冰盒上融化, 融化后短暂涡旋混匀并瞬时离心, 置于冰盒上备用。

2.2 根据建库投入的 DNA 量, 将 Adapter (15  $\mu$ M) 提前稀释到合适的浓度:

DNA 投入量	Adapter 浓度	稀释倍数
50 ng~1 $\mu$ g	15 $\mu$ M	不稀释
25 ng	7.5 $\mu$ M	稀释 2 倍
10 ng	3 $\mu$ M	稀释 5 倍
5 ng	1.5 $\mu$ M	稀释 10 倍
2.5 ng	750 nM	稀释 20 倍
1 ng	300 nM	稀释 50 倍



Adapter 投入量过高可能会导致 Adapter 自连; 投入量不足时会影响连接效率, 导致文库产出降低。

2.3 提前将试剂盒中的 Ligation Buffer 从 -20°C 冰箱中取出, 置于冰盒上融化, 融化后短暂涡旋混匀并瞬时离心, 置于冰盒上备用。

2.4 将 DNA Ligase 从 -20°C 冰箱中取出, 颠倒混匀并瞬时离心, 置于冰盒上备用。

2.5 在冰盒上按下表配制反应体系:

试剂	体积
来自 STEP 1 反应结束的样品	60 $\mu$ L
Adapter (稀释后)	5 $\mu$ L
Ligation Buffer	30 $\mu$ L
DNA Ligase	5 $\mu$ L
Nuclease-Free Water	10 $\mu$ L
<b>总体积</b>	<b>110 <math>\mu</math>L</b>



如果一次操作样本量比较多, 需要对反应试剂进行预混合, 请不要将 Adapter 进行预混合。最佳操作方式是先将 Adapter 和 STEP 1 反应结束的样品进行混合后, 再将预混合反应试剂加入, 这样可以有效降低接头自连。

2.6 使用移液器吸打混匀 (避免剧烈振荡混匀), 瞬时离心。

2.7 设置 PCR 仪参数如下 (关闭热盖或不加盖), 将 PCR 管置于 PCR 仪上, 运行程序:



温度	时间
关闭热盖或不加盖热盖 (开盖)	
22°C	15 min
4°C	Hold

## 实验备注区



为了提高连接反应效率，尤其是低投入量的样本，可以考虑增加连接反应时间，最高可以增加为 4 h，或者 4°C 过夜连接；但是连接时间过长也会增加 Adapter 自连。

2.8 程序结束后，立即进行 STEP 3 的磁珠纯化。



**此步骤为不可暂停步骤，完成后请立即进行下一步。**

## STEP 3 连接后纯化

## 实验备注区

需要使用到的试剂：

- 纯化磁珠 (IGT® Pure Beads)
- 80% 乙醇 (新配制)
- Nuclease-Free Water

需要使用到的仪器：

- 涡旋振荡器
- 微型离心机
- 磁力架



纯化使用磁珠为 IGT® Pure Beads 或 Agencourt AMPure XP，若选用其它品牌纯化磁珠，需咨询对应供应商，并通过预实验摸索合适的磁珠比例，避免纯化失败。

- 3.1 提前用无水乙醇和 Nuclease-Free Water 配制 80% 乙醇，并置于室温备用，请尽量使用新鲜配制的 80% 乙醇用于磁珠纯化。
- 3.2 提前从 4°C 冰箱中取出纯化磁珠，混匀并置于室温平衡 30 min；将已经平衡至室温的纯化磁珠，涡旋混匀后备用。
- 3.3 在 STEP 2 完成后的 110 μL 反应体系中加入 0.8 倍体积的磁珠 (88 μL)，吸打或涡旋混匀，室温静置 5 min。
- 3.4 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上 3 min，待溶液澄清。
- 3.5 保持 PCR 管在磁力架上，小心移弃上清，向 PCR 管内加入 200 μL 80% 乙醇溶液，静置 30 s。
- 3.6 保持 PCR 管在磁力架上，移弃上清，再次向 PCR 管内加入 200 μL 80% 乙醇溶液，静置 30 s，移弃上清。
- 3.7 盖上管盖，瞬时离心，将残留乙醇离心至管底，将 PCR 管置于磁力架上，小心使用 10 μL 移液器移弃底部残留的乙醇，注意不要吸到磁珠。
- 3.8 保持 PCR 管在磁力架上，室温静置 3~5 min，晾干磁珠，使残留的乙醇彻底挥发。
- 3.9 加入 22 μL Nuclease-Free Water，将 PCR 管从磁力架上取下，吸打或涡旋混匀，室温静置 2 min。
- 3.10 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上 2 min，待溶液澄清。
- 3.11 用移液器吸取 20 μL 上清液，转移到新的 PCR 管中，做好标记，准备 STEP 4 反应。



此步骤为可暂停步骤，可于 -20°C 冰箱中保存 1 个月。

## STEP 4 PCR 扩增

## 实验备注区

需要使用到的试剂：

- PCR Master Mix
- UDI Primer

需要使用到的仪器：

- 涡旋振荡器
- 微型离心机
- PCR 仪

4.1 提前将试剂盒中的 PCR Master Mix 从 -20°C 冰箱中取出，置于冰盒上融化，融化后颠倒混匀并瞬时离心，置于冰盒上备用。

4.2 提前将试剂盒中 UDI Primer (Index primer) 从 -20°C 冰箱中取出，置于冰盒上融化，融化后短暂涡旋混匀并瞬时离心，置于冰盒上备用。

4.3 在冰盒上配制 PCR 反应体系，请记录好所使用的 Index 号：

试剂	预混 Index 体积	非预混 Index 体积
来自 STEP 3 反应结束样品	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L
PCR Master Mix	25 $\mu$ L	25 $\mu$ L
UDI Primer N (10 $\mu$ M each)	5 $\mu$ L	/
TPE 1.0 Primer (20 $\mu$ M, for MGI)	/	2.5 $\mu$ L
TPE 2.0 Indexed Primer N (20 $\mu$ M, for MGI)	/	2.5 $\mu$ L
总体积	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L

4.4 使用移液器吸打混匀（避免剧烈振荡混匀），瞬时离心。

4.5 设置 PCR 仪程序如下，将反应体系置于 PCR 仪上，运行程序：

温度	时间	PCR 循环数	样本投入量	PCR 循环数 N (文库产出 100 ng)	PCR 循环数 N (文库产出 1 $\mu$ g)
热盖温度 105°C			1 $\mu$ g	3-4	3-4
98°C	2 min	N cycles	500 ng	3-4	3-4
98°C	20 s		250 ng	3-4	4-6
60°C	30 s		100 ng	3-4	6-7
72°C	30 s		50 ng	4-5	7-8
72°C	1 min		10 ng	6-7	9-10
72°C	1 min		5 ng	7-8	10-12
4°C	hold		2.5 ng	9-11	13-15



cfDNA 样本扩增循环数推荐使用 10~12，以尽量使每条连接接头后的 cfDNA 分子得到充分扩增，有利于提高检测变异的灵敏性。

4.6 程序结束后进行 STEP 5 的磁珠纯化。



PCR 反应产物可以短暂保存于 -20°C 冰箱中，请尽量立刻进行产物纯化，以保证文库质量。

## STEP 5 扩增后纯化

## 实验备注区

### 需要使用到的试剂：

- 纯化磁珠 (IGT® Pure Beads)
- 80% 乙醇 (新配制)
- Nuclease-Free Water

### 需要使用到的仪器：

- 涡旋振荡器
- 微型离心机
- 磁力架

- 5.1 将已经平衡至室温的纯化磁珠，涡旋混匀后备用；
- 5.2 在 STEP 4 的 PCR 产物中，加入 1 倍体积的磁珠 (50  $\mu$ L)，吸打或涡旋混匀，室温静置 5 min。
- 5.3 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上 3 min，待溶液澄清。
- 5.4 保持 PCR 管在磁力架上，小心移弃上清，向 PCR 管内加入 200  $\mu$ L 80% 乙醇溶液，静置 30 s。
- 5.5 保持 PCR 管在磁力架上，移弃上清，再次向 PCR 管内加入 200  $\mu$ L 80% 乙醇溶液，静置 30 s，移弃上清。
- 5.6 盖上管盖，瞬时离心，将残留的乙醇离心至管底，将 PCR 管置于磁力架上，小心使用 10  $\mu$ L 移液器移弃底部残留的乙醇，注意不要吸到磁珠。
- 5.7 保持 PCR 管在磁力架上，室温静置 3~5min，晾干磁珠，使残留的乙醇彻底挥发。
- 5.8 加入 30  $\mu$ L 的 Nuclease-Free Water，将 PCR 管从磁力架上取下，吸打或涡旋混匀，室温静置 2 min。
- 5.9 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上 2 min，待溶液澄清。
- 5.10 用移液器吸取 28  $\mu$ L 上清液，转移到新的 PCR 管中，做好标记。
- 5.11 取 1  $\mu$ L 文库使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 进行文库浓度检测，记录文库浓度。
- 5.12 取 1  $\mu$ L 文库使用片段分析仪进行片段文库长度检测。

**实验结束!**

## 附录一 基因组 DNA 片段化

运用以下三种方案得到的片段化 DNA，均可使用本试剂盒进行基因组 DNA 文库构建。cfDNA 和严重降解成小片段的 FFPE DNA 无需进行基因组 DNA 片段化操作。本试剂盒不包含打断所需试剂和耗材，打断试剂和耗材具体使用方法，请参照试剂和耗材生产商的使用说明。



本说明书提供的 DNA 片段化参数和条件，仅针对完整的基因组 DNA。对于 FFPE DNA 和其他因素降解的 DNA，可根据 DNA 降解程度，对 DNA 片段化条件进行调整。对于 FFPE DNA，为提高文库质量和产出，可以考虑先对 FFPE DNA 进行修复，再做 DNA 片段化处理和文库构建，值得注意的是，FFPE DNA 的修复会导致突变检测假阳性率升高。

### 【方案一】采用 Bioruptor Pico 超声仪进行 DNA 片段化

1. 将 1 ng~1 μg 基因组 DNA 加入到 0.6 mL 离心管中，加入 Nuclease-Free Water 补齐至总体积为 35 μL，充分混匀，瞬时离心后置于冰上待用。
2. 提前打开 Bioruptor Pico 超声仪，开启冷循环待循环水温降至 4°C。Bioruptor Pico 超声仪工作前，请务必确认循环水温在 4°C 左右，防止温度过高。
3. 设置参数 ON 30 s，OFF 30 s 为 1 个循环，每 10 cycles 为一轮，共进行 3 轮超声循环，每轮结束后将样本置于涡旋振荡器上充分混匀，瞬时离心后进行下一轮超声循环（混匀越充分，DNA 片段分布越集中）。每一轮超声循环结束后，如果循环水温过高，请等待水温降至 4°C 后再使用。
4. 取 1 μL 样品使用片段分析仪进行片段检测，片段化后 DNA 主峰约在 150~200 bp。



DNA 片段化结束后，如不能立刻进行下一步实验，可将片段化的 DNA 在 -20°C 条件短暂存储。

### 【方案二】采用 Covaris 超声仪进行 DNA 片段化

1. 往水槽中加入新的去离子水至 FILL 10~15 刻度，确保液面没过 Covaris 打断管玻璃部分，设置冷却装置温度为 4°C。
2. 打开 SonoLab 软件，打开软件界面上的排气按钮进行排气，待软件界面显示水槽内水温降至 5°C。
3. 在离心管中将基因组 DNA 用 1×Low TE Buffer 稀释到 35 μL，将 35 μL DNA 加入 Covaris 打断管中，避免产生气泡。
4. 将 Covaris 打断管固定在样本支架上，放入水槽中，设置如下参数，进行 DNA 超声片段化处理。

设置	参数
Duty Factor	10%
Peak Incident Power	175
Cycles per Burst	200
Treatment Time	360 s
Bath Temperature	4~8°C

5. 取 1 μL 样品使用片段分析仪进行片段检测，片段化后 DNA 主峰约在 150~200 bp。



DNA 片段化结束后，如不能立刻进行下一步实验，可将片段化的 DNA 在 -20°C 条件短暂存储。

### 【方案三】 采用片段化酶进行 DNA 片段化

1. 若使用酶切试剂盒进行基因组 DNA 片段化处理，请选用合适的酶切试剂盒，例如：KAPA Frag Kit for Enzyme Fragmentation；根据需要条带大小按照说明书中的建议设置酶切反应参数，实验流程请按照酶切法建库试剂盒说明书操作。
2. 使用酶切试剂盒时需注意 DNA 样品中是否含有 EDTA，如果有 EDTA，建议建库前对样本进行纯化，溶于 DNA 中含有 EDTA 时需要使用 KAPA Frag Conditioning Solution，具体参照 KAPA Frag Conditioning Solution 说明书。
3. 酶切片段化反应完成后需要对 DNA 片段进行纯化，去除反应体系中的酶和 Buffer，避免影响下一步反应。



DNA 片段化结束后，如不能立刻进行下一步实验，可将片段化的 DNA 在-20℃ 条件短暂存储。

## 附录二 cDNA 样本和文库质控

### cfDNA 质控

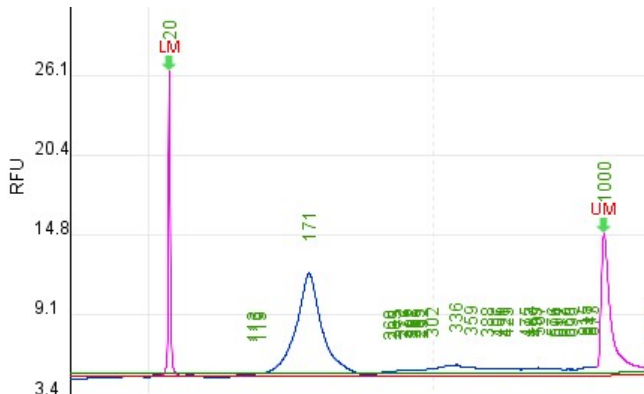


图 1. 典型的 cfDNA 样本毛细管电泳分析图谱

通过毛细管电泳 (Qsep 100) 分析 cfDNA，主峰在 166 bp 左右，也可能在 332 bp 左右有一个次峰，偶尔在 498 bp 左右有另一次峰。提取高质量 cfDNA 应尽量避免发生溶血，造成基因组 DNA 污染 (> 2000 bp)。

### Pre-library 文库质控

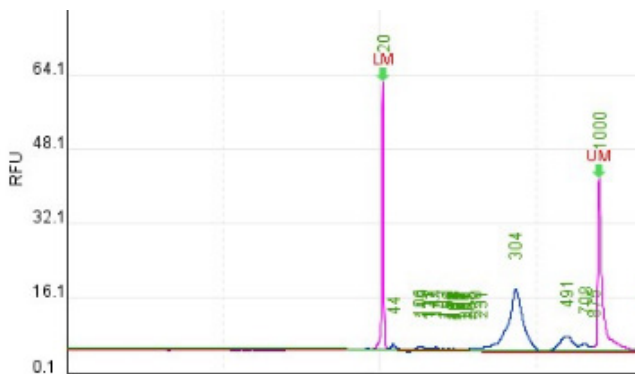


图 2. 典型的 cfDNA 文库 (Pre-library) 毛细管电泳分析图谱

毛细管电泳 (Qsep 100) 分析 cfDNA 接头后构建的 Pre-library，主峰在 300 bp 左右；另外，在 >300 bp 处，有两个次峰。高质量文库应没有或尽量减少接头自连，接头自连主峰在 150 bp 左右。

### 杂交捕获文库质控

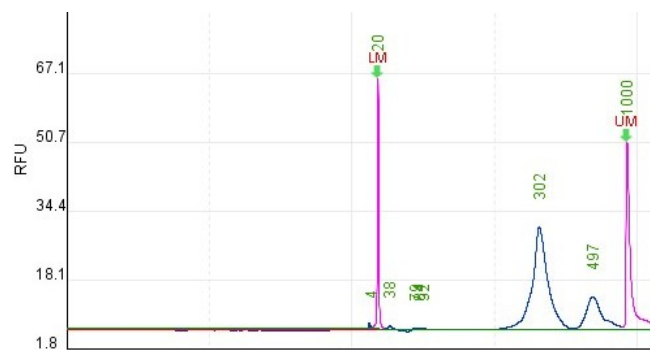


图 3. 典型的 Cap-library 毛细管电泳分析图谱

高质量的 cfDNA 构建的最终捕获文库主峰在 300 bp 左右，无接头自连二聚体。在 >300 bp 处有若干次峰。



## 附录三 cfDNA 建库常见问题排查

问题类别	问题	原因	可能的解决方案
样本问题	cfDNA 中有 gDNA 污染	低质量血浆	抽取全血后，尽快进行血浆分离，避免发生溶血。
			确保充分离心，以有效分离血浆。
			离心后收集血浆时，避免吸到血沉棕黄层。
			血浆若暂存于 -20°C 或 -80°C，解冻后需要再次离心，去除剩余细胞碎片。
建库问题	Pre-PCR 后的文库中，接头自连严重	接头连接步骤操作不当	确保按照推荐顺序加入试剂，避免接头自连。
		投入 cfDNA 的总量少	确保 cfDNA 准确定量。
			投入更多 cfDNA。
		磁珠样品比例太大	确保 cfDNA 没有被 gDNA 污染。
	Pre-PCR 后的文库片段分析图异常	存在大片段文库	确保投入纯化磁珠体积与样品体积比例合适。
			确保 cfDNA 中无 gDNA。
			选择合适的片段选择方法去掉大分子 DNA。
	Pre-PCR 后文库产量低	连接效率低	过度扩增导致出现大片段，建议降低循环数。
			投入合适比例的 cfDNA 和接头。
		PCR 扩增效率低	适当延长连接时间。
			避免出现高比例接头自连片段，会影响有效片段扩增。

