

仅供研究使用，不可用于临床诊断
适用于 Illumina 测序平台

如有问题，请联系：

🌐 www.igenetech.com/support

📞 010-89146623

✉ support@igenetech.com

AnchorSeq™ Library Prep Kit (for Illumina) 使用说明书

适用于 2022 年新产品体系

版本号：A.0，2022 年 6 月

文档号：PROT220618

样本提取

文库制备

靶向扩增

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

本说明书适用于艾吉泰康 AnchorSeq 锚定多重扩增子测序技术，针对 cfDNA 样本的低频突变检测产品。使用前请仔细阅读本说明书，并严格按照说明书内容进行实验。

概述

本说明书针对艾吉泰康 AnchorSeq 锚定多重扩增子测序技术的试剂盒，适用于 Illumina 高通量测序平台，可以对模板 DNA 进行高效连接，搭配分子标签（UMI）技术，并通过特异性引物富集目标区域，可满足 cfDNA 低频突变检测的需求。

更新信息

使用说明书名称	修订日期	修订内容摘要
A.0	2022 年 6 月	首次发布

试剂盒组成

文库构建所需的试剂包括 AnchorSeq™ Library Prep Kit, AnchorSeq™ UMI Adapter & UDI Primer (for Illumina) 和 AnchorSeq™ Primer Pool。

AnchorSeq™ Library Prep Kit

产品名称	组成	储存温度
AnchorSeq™ Library Prep Kit (for Illumina)	AnchorSeq™ Library Prep Kit (Module A)	-20°C ± 5°C
	AnchorSeq™ Library Prep Kit (Module B, for Illumina)	

AnchorSeq™ Library Prep Kit (Module A)

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	

AnchorSeq™ Library Prep Kit (Module B, for Illumina)

管盖颜色	组分	总量		储存温度
		16 rxn	96 rxn	
黄色	AnchorSeq™ PCR Master Mix	800 µL	4.8 mL	-20°C ± 5°C
白色	AnchorSeq™ Anchored Primer (for Illumina)	128 µL	768 µL	

AnchorSeq™ UMI Adapter & UDI Primer (for Illumina)

管盖颜色	组分	总量		储存温度
		16*1 rxn	96*1 rxn	
蓝色	AnchorSeq™ UMI Adapter (15 µM, for Illumina)	88 µL	540 µL	-20°C ± 5°C
白色或板装	AnchorSeq™ UDI Primer N (10 µM each, for Illumina)	16*4 µL	8 µL each	

AnchorSeq™ Primer Pool

管盖颜色	组分	总量		保存温度
		16 rxn	96 rxn	
黄色	AnchorSeq™ Outer Primer Pool (X, for Illumina/MGI DI)*	36 µL	216 µL	-20°C ± 5°C
白色	AnchorSeq™ Inner Primer Pool (X, for Illumina/MGI DI)**	36 µL	216 µL	

*AnchorSeq™ Outer Primer Pool 为半巢式 PCR 第一轮扩增使用的外侧引物。

**AnchorSeq™ Inner Primer Pool 为半巢式 PCR 第二轮扩增使用的内侧引物。

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	试剂名称	推荐试剂	推荐品牌和货号
1	无水乙醇	无水乙醇	北京化工分析纯
2	Nuclease-Free Water	Nuclease-Free Water	Ambion (Cat # AM9930)
3	纯化磁珠（任选一种使用）	Agencourt AMPure XP Kit	Beckman Coulter (Cat # A63880)
		IGT™ Pure Beads	iGeneTech (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)

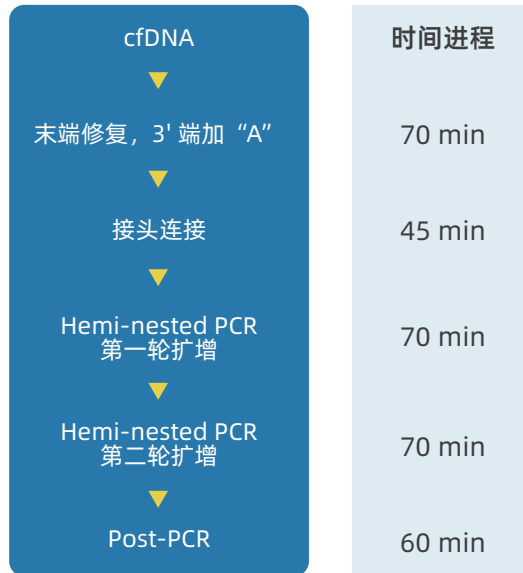
自备仪器

序号	仪器名称	推荐仪器	推荐品牌和货号
1	96 孔 PCR 管磁力架	DynaMag -96 Side	Thermo Fisher (Cat # 12331D)
2	涡旋振荡器	市面主流品牌	市面主流品牌
3	Qubit 荧光计	Qubit 4.0 Fluorometer	Thermo Fisher (Cat # Q33226)
4	片段分析仪（任选一种使用）	Agilent 2100 Bioanalyzer system	Agilent (Cat # G2939AA)
		Qsep 100	BiOptic
5	微型离心机	市面主流品牌	市面主流品牌
6	冰盒	市面主流品牌	市面主流品牌
7	PCR 扩增仪	市面主流品牌	市面主流品牌

自备耗材

序号	耗材名称	推荐耗材	推荐品牌和货号
1	0.6 mL 离心管	0.6 mL MaxyClear Snaplock Microcentrifuge Tube	Axygen (Cat # MCT-060-C)
2	Qubit 定量管 (0.5 mL)	市面主流品牌	市面主流品牌
3	0.2 mL PCR 管	市面主流品牌	市面主流品牌
4	0.2 mL 八连管	市面主流品牌	市面主流品牌
5	10 μ L 移液器枪头	市面主流品牌	市面主流品牌
6	200 μ L 移液器枪头	市面主流品牌	市面主流品牌

操作流程摘要



使用前说明

欢迎选购艾吉泰康，在使用前请仔细阅读以下注意事项：

- 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 30 ng cfDNA 以尽可能保证检测突变的敏感性。如果 cfDNA 投入量不能达到 30 ng，可以投入低至 20 ng cfDNA。cfDNA 投入量和测序数据量将直接影响突变的检测灵敏度。
- 请使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 进行浓度定量。
- 建议在冰盒上配制反应体系。
- 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。

如果以上均满足，即可以开始实验

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：

- PCR 仪

- 1.1 提前将试剂盒中的 End Repair & A-Tailing 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。
- 1.2 将试剂盒中的 End Repair & A-Tailing Enzyme Mix 从 -20°C 冰箱中取出，颠倒混匀并瞬时离心，置于冰盒上备用。
- 1.3 在冰盒上按下表配制反应体系：

试剂	体积
cfDNA	X μ L
End Repair & A-Tailing Buffer	7 μ L
End Repair & A-Tailing Enzyme Mix	3 μ L
Nuclease-Free Water	50-X μ L
总体积	60 μ L

- 1.4 使用移液器吸打混匀（避免剧烈振荡混匀），瞬时离心。
- 1.5 设置 PCR 仪参数如下，将反应液置于 PCR 仪上，运行程序：

温度	时间
	热盖温度 75°C
30°C	30 min
65°C	30 min
4°C	hold

- 1.6 程序结束后，立即进行 STEP 2。



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
- AnchorSeq™ UMI Adapter (15 μM, for Illumina)
- Nuclease-Free Water

需要使用到的仪器：

- PCR 仪

2.1 提前将 AnchorSeq™ UMI Adapter (15 μM, for Illumina) 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 cfDNA 量，将 AnchorSeq™ UMI Adapter (15 μM, for Illumina) 提前稀释到合适的浓度：

cfDNA 投入量	AnchorSeq™ UMI Adapter (15 μM, for Illumina) 浓度	稀释倍数
50 ng~1 μg	15 μM	不稀释
25 ng	7.5 μM	稀释 2 倍
10 ng	3 μM	稀释 5 倍



AnchorSeq™ UMI Adapter (15 μM, for Illumina) 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 将 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 反应结束后的样品	60 μL
AnchorSeq™ UMI Adapter (稀释后)	5 μL
Nuclease-Free Water	10 μL
Ligation Buffer	30 μL
DNA Ligase	5 μL
总体积	110 μL



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 AnchorSeq™ UMI Adapter 进行预混合。最佳操作方式是先将 AnchorSeq™ UMI Adapter 和 STEP 1 反应结束后的样品进行混合后，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），将反应液置于 PCR 仪上，运行程序：

温度	时间
	关闭热盖或不加盖
22°C	15 min
4°C	hold

2.8 程序结束后，立即进行 STEP 3。



此步骤为不可暂停步骤，完成后立即进行下一步。

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：

- 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 完成后的产物中，加入 0.8 倍体积的纯化磁珠 (88 μL) 的磁珠，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 3~5min，晾干磁珠，使残留的乙醇彻底挥发。
- 3.9 加入 13 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 11 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。

STEP 4 Hemi-nested PCR 第一轮扩增

实验备注区

需要使用到的试剂：

- AnchorSeq™ PCR Master Mix
- AnchorSeq™ Anchored Primer (for Illumina)
- AnchorSeq™ Outer Primer Pool (for Illumina)
- Nuclease-Free Water

需要使用到的仪器：

- PCR 仪

- 4.1 提前将试剂盒中的 AnchorSeq™ PCR Master Mix 从 -20℃ 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 AnchorSeq™ Anchored Primer (for Illumina)、AnchorSeq™ Outer Primer Pool (for Illumina) 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。在冰盒上按下表配制反应体系：

试剂	体积
来自 STEP 3 反应结束的样品	11 μL
AnchorSeq™ PCR Master Mix	15 μL
AnchorSeq™ Anchored Primer (for Illumina)	2 μL
AnchorSeq™ Outer Primer Pool (for Illumina)	2 μL
总体积	30 μL

- 4.3 使用移液器吸打混匀（避免剧烈振荡混匀），然后瞬时离心。
- 4.4 设置 PCR 仪程序如下，将反应液置于 PCR 仪上，运行程序：

温度	时间		
热盖温度 105℃			
95℃	3 min	10 个循环	
95℃	20 s		
65℃ ~ 60℃	1 min(ΔT= -0.5℃ / 循环)		
95℃	20 s		
60℃	2 min		
72℃	5 min		
4℃	hold		
5 个循环			

- 4.5 程序运行完成后进行 STEP 5。

STEP 5 第一轮扩增后纯化

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：

- 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 0.9 倍体积的纯化磁珠 (27 μL)，吸打混匀或涡旋混匀，室温静置 5 min。
- 5.3 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上 3 min 至溶液澄清。
- 5.4 保持 PCR 管在磁力架上，小心移弃上清，向 PCR 管内加入 200 μL 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 μL 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 3~5 min，晾干磁珠使残留的乙醇彻底挥发。
- 5.8 加入 14 μL 的 Nuclease-Free Water，将 PCR 管从磁力架取下，吸打混匀或涡旋混匀，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 12 μL 上清于新的 PCR 管中，做好标记。
- 5.11 取 1 μL 文库使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 进行文库浓度测序，记录文库浓度。

STEP 6 Hemi-nested PCR 第二轮扩增

实验备注区

需要使用到的试剂：

- AnchorSeq™ PCR Master Mix
- AnchorSeq™ Anchored Primer (for Illumina)
- AnchorSeq™ Inner Primer Pool (for Illumina)
- Nuclease-Free Water

需要使用到的仪器：

- PCR 仪

6.1 提前将试剂盒中的 AnchorSeq™ PCR Master Mix 从 -20℃ 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。

6.2 提前将试剂盒中 AnchorSeq™ Anchored Primer (for Illumina)、AnchorSeq™ Inner Primer Pool (for Illumina) 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。在冰盒上按下表配制反应体系：

试剂	体积
来自 STEP 5 反应结束的样品	11 μL
AnchorSeq™ PCR Master Mix	15 μL
AnchorSeq™ Anchored Primer (for Illumina)	2 μL
AnchorSeq™ Inner Primer Pool (for Illumina)	2 μL
总体积	30 μL

6.3 使用移液器吸打混匀（避免剧烈振荡混匀），瞬时离心。

6.4 设置 PCR 仪程序如下，将反应液置于 PCR 仪上，运行程序：

温度	时间
热盖温度 105℃	
95℃	3 min
95℃	20 s
65℃ ~60℃	1 min(ΔT= -0.5℃ / 循环)
95℃	20 s
60℃	2 min
72℃	5 min
4℃	hold

10 个循环

5 个循环

6.5 程序运行完成后进行 STEP 7。

STEP 7 第二轮扩增后纯化

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：

- 磁力架

- 7.1 将纯化磁珠平衡至室温，涡旋混匀后备用。
- 7.2 将 STEP 6 的 PCR 产物中，加入 0.9 倍体积的纯化磁珠 (27 μL)，吸打或涡旋混匀，室温静置 5 min。
- 7.3 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上 3 min，待溶液澄清。
- 7.4 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。
- 7.5 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。
- 7.6 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。
- 7.7 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。
- 7.8 加入 15 μL 的 Nuclease-Free Water，将 PCR 管从磁力架取下，吸打或涡旋混匀，室温静置 2 min。
- 7.9 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上 2 min，待溶液澄清。
- 7.10 用移液器吸取 13 μL 上清于新的 PCR 管中，做好标记。

STEP 8 Post-PCR 扩增

实验备注区

需要使用到的试剂：

- AnchorSeq™ PCR Master Mix
- AnchorSeq™ UDI Primer

需要使用到的仪器：

- PCR 仪

- 8.1 提前将试剂盒中的 AnchorSeq™ PCR Master Mix 从 -20℃ 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。
- 8.2 提前将试剂盒中 AnchorSeq™ UDI Primer 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。
- 8.3 根据所选择的 Index 类型的不同，按照对应体系在冰盒上进行配制 PCR 反应液，请记录好所使用的 Index 号：

试剂	体积
来自 STEP 7 反应结束样品	13 μL
AnchorSeq™ PCR Master Mix	15 μL
AnchorSeq™ UDI Primer	2 μL
总体积	30 μL

- 8.4 使用移液器吸打混匀（避免剧烈振荡混匀），瞬时离心。
- 8.5 设置 PCR 仪程序如下，将反应液置于 PCR 仪上，运行程序：

温度	时间
热盖温度 105°C	
95°C	1 min
98°C	20 s
60°C	30 s
72°C	1 min
72°C	5 min
4°C	hold

10 个循环

- 8.6 程序运行完成后进行 STEP 9。

STEP 9 Post-PCR 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：

- 磁力架

- 9.1 将已经平衡至室温的纯化磁珠，涡旋混匀后备用。
- 9.2 在 STEP 8 的 PCR 产物中，加入 0.9 倍体积的纯化磁珠 (27 μL)，吸打混匀或涡旋混匀，室温静置 5 min。
- 9.3 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上 3 min，待溶液澄清。
- 9.4 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。
- 9.5 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。
- 9.6 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乙醇，注意不要吸到磁珠。
- 9.7 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。
- 9.8 加入 52 μL 的 Nuclease-Free Water，将 PCR 管从磁力架取下，吸打混匀或涡旋混匀，室温静置 2 min。
- 9.9 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上 2 min，待溶液澄清。
- 9.10 用移液器吸取 50 μL 上清液，转移到新的 PCR 管中，做好标记。
- 9.11 取 1 μL 文库使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 进行文库浓度测序，记录文库浓度。
- 9.12 取 1 μL 文库使用片段分析仪进行片段长度测定。

实验结束，可以安排上机测序！



网址: www.igenetech.com
邮箱: support@igenetech.com
电话: 010-89146623

总部地址: 北京市昌平区中关村生命科学园生命园路8号院一区9号楼A座3层
嘉兴子公司地址: 浙江省嘉兴市嘉善县大云镇宏业路371号2号楼

仅供研究使用, 不可用于临床诊断。

版权声明: 本手册版权属于艾吉泰康生物科技(北京)有限公司及其子公司所有, 未经本公司书面许可, 任何其他个人或组织不得以任何形式将本手册中的各项内容进行复制、拷贝、编辑或翻译成其他语言。本手册中所有商标或标识均属于艾吉泰康生物科技(北京)有限公司、其子公司及其所有者所有。

版本号: A.0, 2022年6月
文档号: PROT220618

官方微信

