

仅供研究使用，不可用于临床诊断
适用于 Illumina 和 MGI 测序平台
兼容全基因组甲基化文库和杂交捕获甲基化文库构建

如有问题，请联系：
🌐 www.igenetech.com/support
📞 010-89146623
✉ support@igenetech.com

IGT™ ssDNA Library Prep Kit 使用说明书

适用于 2022 年新产品体系

版本号：A.0，2022 年 8 月

文档号：PROT220801

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™ ssDNA Library Prep Kit，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™ ssDNA Library Prep Kit 是一款通用型单链 DNA 建库试剂盒，可用于低起始量甲基化文库构建，适用于 1 ng~50 ng DNA 起始的全基因组甲基化测序和目标区域 DNA 甲基化杂交捕获测序。

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 8 月	首次发布

试剂盒组成

完整的甲基化文库构建实验流程需要建库模块、接头模块和重亚硫酸盐处理试剂盒, 可根据需求选择配套的艾吉泰康的接头模块。实验所需的重亚硫酸盐处理试剂盒请自行订购。

IGT™ ssDNA Library Prep Kit

管盖颜色	组分	总量		保存温度
		16 rxn	96 rxn	
黄色	Polishing Buffer	20 µL	120 µL	-20°C ± 5°C
黄色	Polishing Enzyme	20 µL	120 µL	
蓝色	Adapter Ligation Enzyme	54 µL	320 µL	
蓝色	First Adapter Ligation Buffer	80 µL	480 µL	
白色	Extension Mix	370 µL	2*1110 µL	
蓝色	Second Adapter Ligation Buffer	80 µL	480 µL	
白色	PCR Master Mix	450 µL	2*1350 µL	

IGT™ ssDNA Adapter & UDI Primer (for Illumina)

管盖颜色	组分	总量		保存温度
		16*1 rxn	96*1 rxn	
蓝色	First Adapter (20 µM, for Illumina)	32 µL	192 µL	-20°C ± 5°C
蓝色	Second Adapter (20 µM, for Illumina)	32 µL	192 µL	
蓝色	Extension Primer (10 µM, for Illumina)	32 µL	192 µL	
白色或板装	UDI Primer N (10 µM each, for Illumina)*	16*8 µL	8 µL each	

*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	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	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)
6	重亚硫酸盐处理试剂盒	EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (50)	QIAGEN (Cat # 59824)

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 (Cat # Qsep100)
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 仪	市面主流品牌	市面主流品牌
8	室温高速离心机	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 μL 移液器枪头	市面主流品牌	市面主流品牌
6	200 μL 移液器枪头	市面主流品牌	市面主流品牌

工作流程图

	Library Preparation Workflow	Time
	Sample Preparation: cfDNA or sheared DNA	
STEP 1	Bisulfite Treatment	1.5 h
	▼	
STEP 2	Polishing	0.75 h
	▼	
STEP 3	First Adapter Ligation	0.7 h
	▼	
STEP 4	Extension	1.2 h
	▼	
STEP 5	Post Extension Purification	0.5 h
	▼	
STEP 6	Second Adapter Ligation	0.7 h
	▼	
STEP 7	PCR Amplification	0.5 h
	▼	
STEP 8	Post PCR Amplification Purification	0.5 h

使用前注意事项

欢迎选购艾吉泰康 IGT™ ssDNA Library Prep Kit，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 进行 cfDNA 质检。
- 建议投入 5 ng 以上 cfDNA 进行 DNA 甲基化建库，尽可能保证检测甲基化水平的准确性。
- 建议在冰盒上配制反应体系。
- 建议使用适配 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。
- 建议纯化磁珠采用 IGT™ Pure Beads 或 Agencourt AMPure XP Beads。
- 推荐使用 EpiTech Fast DNA Bisulfite Kit 试剂盒进行重亚硫酸盐处理。

如果以上均满足，即可以开始实验

STEP 1 Bisulfite Treatment

实验备注区

需要使用到的试剂：

- EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit
- 无水乙醇
- Nuclease-Free Water

需要使用到的仪器：

- PCR 仪
- 离心机

本试剂盒操作流程主要针对 1~50 ng 起始量的 cfDNA。

如果样本类型为基因组 DNA 或 FFPE DNA，在进行实验之前，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。

请严格按照 EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit 说明书进行 Bisulfite Treatment 实验操作，为方便使用，本说明书提供了可参考的操作说明。

EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit 使用注意事项：

- a. DNA Protect Buffer、Buffer BD、Spin Columns 保存于 4°C，其余 Buffer 保存于室温。
- b. Buffer BD、Buffer BW 使用前加入无水乙醇。
- c. Carrier RNA 请使用 Nuclease-Free Water 进行溶解，溶解后的 Carrier RNA 放置在 -20°C 保存。
- d. 使用前应检查试剂是否有结晶，如有结晶可 37°C 预热溶解。
- e. 实验过程中，环境温度应在 20°C 以上，温度过低易导致实验失败。

1.1 提前将试剂盒中的 Bisulfite solution 从 EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit 中取出，涡旋混匀并瞬时离心，置于室温备用。

1.2 将 DNA Protect Buffer 从 4°C 冰箱中取出，短暂涡旋混匀并瞬时离心，置于室温备用。

1.3 在室温按下表配制 Bisulfite Treatment 反应体系：

试剂	体积
cfDNA 或 Fragmented DNA	X μ L
Nuclease-Free Water	(20-X) μ L
Bisulfite solution	85 μ L
DNA Protect Buffer	35 μ L
总体积	140 μL

1.4 涡旋混匀并瞬时离心，将 140 μ L 反应体系平均分成两管（注意：做好标记）。

1.5 设置 PCR 仪参数如下，将 Bisulfite Treatment 反应体系置于 PCR 仪上，运行程序：

实验备注区

温度	时间
热盖温度 105°C	
95°C	5 min
60°C	10 min
95°C	5 min
60°C	10 min
20°C	Hold

1.6 Bisulfite Treatment 反应结束后，立即进行产物纯化回收：

- 1.6.1 Bisulfite 处理结束后，将 PCR 管瞬时离心，将两管 Bisulfite 处理产物加入 1.5 mL 的离心管中，并向离心管内加入 310 μ L Buffer BL, 1 μ L Carrier RNA (1 μ g/ μ L) 和 250 μ L 无水乙醇，涡旋混匀并瞬时离心。将混匀的液体加入吸附柱中（吸附柱放入收集管中）。（当室温较低时 Buffer BL 容易结晶，使用前请确保无结晶，如有结晶，请置于 37°C 水浴锅中进行加热溶解）。
- 1.6.2 室温静置 2 min，12,000 r/min 离心 1 min。将收集管中的液体重新转移至吸附柱中，静止 2 min，12,000 r/min 离心 1 min，将吸附柱从收集管中取出，弃去收集管中的废液后将吸附柱放回收集管中。
- 1.6.3 向吸附柱内加入 500 μ L Buffer BW（Buffer BW 已提前加入无水乙醇），12,000 r/min 离心 1 min，将吸附柱从收集管中取出，弃去收集管中的废液后将吸附柱放回收集管中。
- 1.6.4 向吸附柱内加入 500 μ L Buffer BD（Buffer BD 已提前加入无水乙醇），室温静置孵育 15 min，12,000 r/min 离心 1 min，将吸附柱从收集管中取出，弃去收集管中的废液后将吸附柱放回收集管中。（注意 Buffer BD 储存时间久了可能会出现沉淀，使用前请确保无沉淀，如果有沉淀，请吸取 Buffer BD 到离心管中，12,000 r/min 离心 3 min 后，取上清使用）
- 1.6.5 向吸附柱内加入 500 μ L Buffer BW（Buffer BW 已提前加入无水乙醇），12,000 r/min 离心 1 min，将吸附柱从收集管中取出，弃去收集管中的废液后将吸附柱放回收集管中。
- 1.6.6 重复步骤 1.6.5 一次。
- 1.6.7 向吸附柱内加入 250 μ L 无水乙醇，12,000 r/min 离心 1 min，将吸附柱从收集管中取出，弃去收集管中的废液后将吸附柱放回收集管中。再次 12,000 r/min 离心 1 min，用 10 μ L 的移液器将吸附柱中橡胶圆圈上的残留液体吸出。（吸附柱应避免乙醇残留，如有乙醇残留，需要离心后去除）
- 1.6.8 将吸附柱转移至新的 1.5 mL 离心管中，加入 12 μ L Nuclease-Free Water，室温静置 2 min，12,000 r/min 离心 1 min。将离心管中的液体重新转移至吸附柱中，室温静置 1 min，12,000 r/min 离心 1 min，用 10 μ L 的移液器将吸附柱中橡胶圆圈上的残留液体吸出转移至 1.5 mL 离心管内。
- 1.6.9 弃掉吸附柱，保留离心管的纯化产物，做好标记，准备 STEP2 反应。



如果不立即进行后续实验，纯化后的 Bisulfite 处理产物，请置于 -80°C 冰箱中保存。

STEP 2 Polishing

实验备注区

需要使用到的试剂：

- Polishing Buffer
- Polishing Enzyme

需要使用到的仪器：

- PCR 仪

2.1 提前将 Polishing Buffer 从 -20℃ 冰箱中取出，置于冰盒上融化，涡旋混匀并瞬时离心，置于冰盒上备用。

2.2 将 Polishing Enzyme 从 -20℃ 冰箱中取出，上下颠倒混匀，瞬时离心，置于冰盒上备用。

2.3 在冰盒上按下表配制 Polishing 反应体系：

试剂	体积
来自 STEP 1 反应结束的样品	11 μ L
Polishing Buffer	1 μ L
Polishing Enzyme	1 μ L
总体积	13 μL

2.4 使用移液器吸打混匀（避免剧烈振荡混匀），瞬时离心。

2.5 设置 PCR 仪参数如下，将 PCR 管置于 PCR 仪上，运行程序：

温度	时间
热盖温度 85℃	
37℃	30 min
65℃	5 min
4℃	Hold

2.6 程序结束后，立即进行下一步反应。

STEP 3 First Adapter Ligation

实验备注区

需要使用到的试剂:

- First Adapter Ligation Buffer
- Adapter Ligation Enzyme
- First Adapter
- Nuclease-Free Water

需要使用到的仪器:

- PCR 仪

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

3.2 根据建库投入的 DNA 量, 将 First Adapter (20 μM) 提前稀释到合适的浓度:

DNA 起始量	First Adapter 浓度	First Adapter 稀释倍数
50 ng	4 μM	5 倍
10~20 ng	2 μM	10 倍
1~5 ng	0.2 μM	100 倍

3.3 提前将 First Adapter Ligation Buffer 从 -20°C 冰箱中取出, 置于冰盒上融化, 涡旋混匀并瞬时离心, 置于冰盒上备用。

3.4 将 Adapter Ligation Enzyme 从 -20°C 冰箱中取出, 上下颠倒混匀, 瞬时离心, 置于冰盒上备用。

3.5 在冰盒上按下表配制 First Adapter Ligation 反应体系:

试剂	体积
来自 STEP 2 反应结束的样品	13 μL
First Adapter Ligation Buffer	4.5 μL
First Adapter	1 μL
Adapter Ligation Enzyme	1.5 μL
总体积	20 μL

3.6 使用移液器吸打混匀 (避免剧烈振荡混匀), 瞬时离心。

3.7 设置 PCR 仪参数如下, 将 PCR 管置于 PCR 仪上, 运行程序:

温度	时间
热盖温度 105°C	
37°C	30 min
95°C	2 min
4°C	Hold

3.8 程序结束后, 立即进行下一步反应。

STEP 4 Extension

实验备注区

需要使用到的试剂：

- Extension Primer
- Extension Mix

需要使用到的仪器：

- PCR 仪

4.1 提前将 Extension Primer 从 -20°C 冰箱中取出，置于冰盒上融化，涡旋混匀并瞬时离心，置于冰盒上备用。

4.2 根据建库投入的 DNA 量，将 Extension Primer (10 μM) 提前稀释到合适的浓度：

DNA 起始量	Extension Primer 浓度	Extension Primer 稀释倍数
10~50 ng	10 μM	不稀释
1~5 ng	5 μM	2 倍

4.3 提前将 Extension Mix 从 -20°C 冰箱中取出，置于冰盒上融化，上下颠倒混匀，瞬时离心，置于冰盒上备用。

4.4 在冰盒上按下表配制 Extension 反应体系：

试剂	体积
来自 STEP 3 反应结束样品	20 μL
Extension Primer	1 μL
Extension Mix	21 μL
总体积	42 μL

4.5 使用移液器吸打混匀（避免剧烈振荡混匀），瞬时离心。

4.6 设置 PCR 仪程序如下，将 Extension 反应体系置于 PCR 仪上，运行程序：

温度	时间	循环数
热盖温度 105°C		
95°C	1 min	12 cycles
98°C	20 s	
60°C	30 s	
72°C	1 min	
72°C	5 min	
4°C	Hold	

4.7 程序结束后，立即进行下一步磁珠纯化。

STEP 5 Post Extension Purification

实验备注区

需要使用到的试剂:

- 纯化磁珠 (IGT™ Pure Beads)
- 80% 乙醇
- 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。

- 5.1 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。
- 5.2 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; 将平衡至室温的纯化磁珠, 涡旋混匀后备用。
- 5.3 在 STEP 4 完成后的 42 μL 反应体系中加入 120 μL 磁珠, 吸打或涡旋混匀, 室温静置 5 min。
- 5.4 瞬时离心, 将 PCR 管置于磁力架上 3 min, 待溶液澄清。
- 5.5 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。
- 5.6 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。
- 5.7 瞬时离心, 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。
- 5.8 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。
- 5.9 加入 14 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。
- 5.10 瞬时离心, 将 PCR 管置于磁力架上 2 min, 待溶液澄清。
- 5.11 用移液器吸取 13 μL 上清液, 转移到新的 PCR 管中, 做好标记。

STEP 6 Second Adapter Ligation

实验备注区

需要使用到的试剂：

- Second Adapter Ligation Buffer
- Adapter Ligation Enzyme
- Second Adapter

需要使用到的仪器：

- PCR 仪

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

6.2 根据建库投入的 DNA 量，将 Second Adapter (20 μM) 提前稀释到合适的浓度：

DNA 起始量	Second Adapter 浓度	Second Adapter 稀释倍数
50 ng	20 μM	不稀释
10~20 ng	4 μM	5 倍
1~5 ng	0.4 μM	50 倍

6.3 提前将 Second Adapter Ligation Buffer 从 -20°C 冰箱中取出，置于冰盒上融化，涡旋混匀并瞬时离心，置于冰盒上备用。

6.4 将 Adapter Ligation Enzyme 从 -20°C 冰箱中取出，上下颠倒混匀，瞬时离心，置于冰盒上备用。

6.5 在冰盒上按下表配制 Second Adapter Ligation 反应体系：

试剂	体积
来自 STEP 5 反应结束的样品	13 μL
Second Adapter Ligation Buffer	4.5 μL
Second Adapter	1 μL
Adapter Ligation Enzyme	1.5 μL
总体积	20 μL

6.6 使用移液器吸打混匀（避免剧烈振荡混匀），瞬时离心。

6.7 设置 PCR 仪参数如下，将 PCR 管置于 PCR 仪上，运行程序：

温度	时间
热盖温度 105°C	
37°C	30 min
95°C	2 min
4°C	Hold

6.8 程序结束后，立即进行下一步反应。

STEP 7 PCR Amplification

实验备注区

需要使用到的试剂：

- UDI Primer
- PCR Master Mix

需要使用到的仪器：

- PCR 仪

7.1 提前将试剂盒中的 PCR Master Mix 从 -20℃ 冰箱中取出，置于冰盒上融化，上下颠倒混匀，瞬时离心，置于冰盒上备用。

7.2 提前将试剂盒中 UDI Primer 从 -20℃ 冰箱中取出，置于冰盒上融化，短暂涡旋混匀并瞬时离心，置于冰盒上备用。

7.3 在冰盒上配制 PCR 反应体系（请记录好所使用的 Index 号）：

试剂	体积
来自 STEP 6 反应结束的样品	20 μL
UDI Primer	5 μL
PCR Master Mix	25 μL
总体积	50 μL

7.4 使用移液器吸打混匀（避免剧烈振荡混匀），瞬时离心。

7.5 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
热盖温度 105℃		
95℃	1 min	1
98℃	20 s	N cycles
60℃	30 s	
72℃	1 min	
72℃	5 min	1
4℃	Hold	1

DNA 起始量	PCR 循环数 N (文库产出 1 μg)
50 ng	5
20 ng	7
10 ng	8
5 ng	9~10
1 ng	11~12

7.6 程序结束后，立即进行下一步磁珠纯化。

STEP 8 Post PCR Amplification Purification

实验备注区

需要使用到的试剂：

- 纯化磁珠 (IGT™ Pure Beads)
- 80% 乙醇
- Nuclease-Free Water

需要使用到的仪器：

- 磁力架

- 8.1 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。
- 8.2 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；将平衡至室温的纯化磁珠，涡旋混匀后备用。
- 8.3 在 STEP 7 完成后的 50 μ L 反应体系中加入 1.2 倍体积的磁珠 (60 μ L)，吸打或涡旋混匀，室温静置 5 min。
- 8.4 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上 3 min，待溶液澄清。
- 8.5 保持 PCR 管在磁力架上，小心移弃上清，向 PCR 管内加入 200 μ L 80% 乙醇溶液，静置 30 s。
- 8.6 保持 PCR 管在磁力架上，移弃上清，再次向 PCR 管内加入 200 μ L 80% 乙醇溶液，静置 30 s，移弃上清。
- 8.7 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上，小心使用 10 μ L 移液器移弃底部残留的乙醇，注意不要吸到磁珠。
- 8.8 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。
- 8.9 加入 30 μ L 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。
- 8.10 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上 2 min，待溶液澄清。
- 8.11 用移液器吸取 28 μ L 上清液，转移到新的 PCR 管中，做好标记。
- 8.12 取 1 μ L 文库使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 试剂在 Qubit 4.0 Fluorometer 上进行文库浓度检测，记录文库浓度。
- 8.13 取 1 μ L 文库使用片段分析仪进行文库片段长度检测。
- 8.14 请将文库置于 -20°C 冰箱中保存。

实验结束!

附录一 基因组 DNA 片段化方案

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。

【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 bp~200 bp。

【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°C ~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 bp~200 bp。

【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°C 条件短暂存储。

实验备忘录

如有任何疑问，请联系：

🌐 www.igenetech.com/support ☎ 010-89146623 ✉ support@igenetech.com



实验备忘录



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8月
文档号: PROT220801

官方微信

