

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](http://www.igenetech.com/support)  
📞 010-89146623  
✉ [support@igenetech.com](mailto:support@igenetech.com)

# IGT™ Methyl 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：B.2，2022 年 8 月

文档号：PROT220802

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™ Methyl 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™ Methyl Fast Library Prep Kit v2.0 是一款通用型甲基化文库构建试剂盒。本试剂盒基于 A-T 连接原理，通过连接相应的甲基化接头，重亚硫酸盐处理后并扩增可构建 Illumina 或 MGI 测序平台的甲基化文库，适用于 20 ng~1 μg DNA 起始的全基因组甲基化测序和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
B.2	2022 年 8 月	内容修订
B.1	2022 年 7 月	内容修订
B.0	2022 年 6 月	修改格式
A.0	2022 年 5 月	首次发布

## 试剂盒组成

完整的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模块, 可根据需求配套艾吉泰康的接头模块, 重亚硫酸盐处理模块请自行订购。

### IGT™ Methyl Fast Library Prep Kit v2.0

管盖颜色	组分	总量		保存温度
		16 rxn	96 rxn	
黄色	End Repair & A-Tailing Buffer	124 $\mu$ L	744 $\mu$ L	-20°C $\pm$ 5°C
黄色	End Repair & A-Tailing Enzyme Mix	54 $\mu$ L	320 $\mu$ L	
蓝色	Ligation Buffer	540 $\mu$ L	2*1584 $\mu$ L	
蓝色	DNA Ligase	88 $\mu$ L	540 $\mu$ L	
白色	U+ PCR Master Mix	450 $\mu$ L	2*1350 $\mu$ L	

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

管盖颜色	组分	总量		保存温度
		96*1 rxn	96*10 rxn	
蓝色	Methyl Adapter (10 $\mu$ M)	540 $\mu$ L	4*1350 $\mu$ L	-20°C $\pm$ 5°C
板装或白色	UDI Primer N (10 $\mu$ M each)*	8 $\mu$ L each	96*75 $\mu$ L	

\*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)

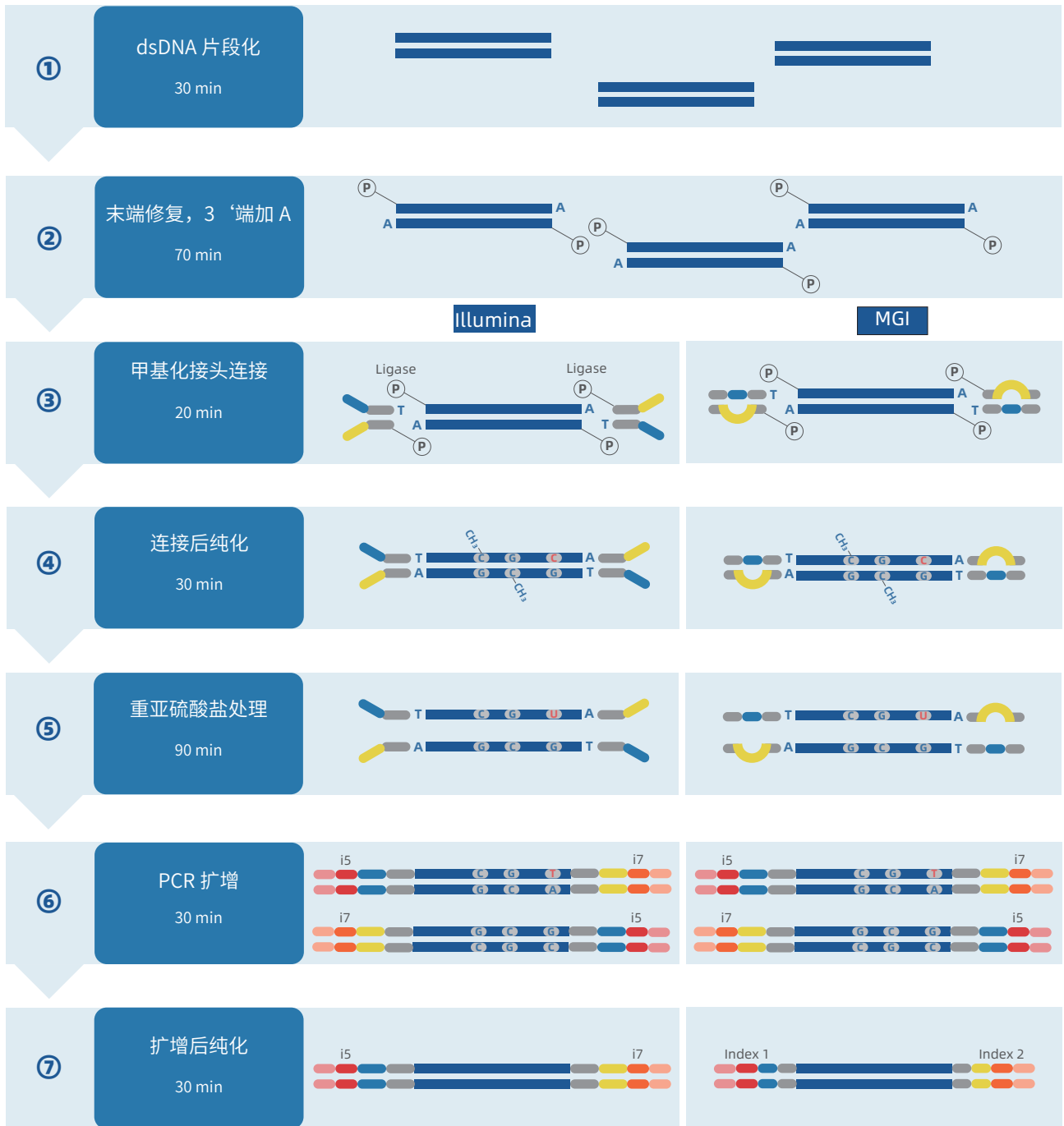
### 自备仪器

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	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

## 工作原理及流程图



## 使用前注意事项

欢迎选购艾吉泰康 IGT™ Methyl 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。
- 需要用到适配 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。
- 重亚硫酸盐处理推荐使用 EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit 试剂盒。

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 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。在冰盒上按下表配制反应体系：

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 甲基化接头连接

## 实验备注区

需要使用到的试剂：

- Ligation Buffer
- DNA Ligase
- Nuclease-Free Water
- Methyl Adapter (10 μM)

需要使用到的仪器：

- PCR 仪

2.1 提前将 Methyl Adapter 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。

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

DNA 投入量	Methyl Adapter 浓度	稀释倍数
50 ng ~1 μg	10 μM	不稀释
25 ng	10 μM	不稀释
10 ng	5 μM	稀释 2 倍
5 ng	2.5 μM	稀释 4 倍
2.5 ng	1.25 μM	稀释 8 倍
1 ng	625 nM	稀释 16 倍



Methyl Adapter 投入量过高可能会导致 Methyl 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℃ 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℃ 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 μL
Methyl Adapter (稀释后)	5 μL
Ligation Buffer	30 μL
DNA Ligase	5 μL
Nuclease-Free Water	10 μL
<b>总体积</b>	<b>110 μL</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 Methyl Adapter 进行预混合。最佳操作方式是先将 Methyl Adapter (稀释后) 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（关闭热盖或不加盖热盖），将 PCR 管置于 PCR 仪上，运行程序：



如有任何疑问，请联系：

www.igenetech.com/support 010-89146623 support@igenetech.com

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 Methyl 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 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 重亚硫酸盐处理

## 实验备注区

需要使用到的试剂：

- EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit
- 无水乙醇

需要使用到的仪器：

- 离心机
- PCR 仪



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

4.1 根据下表配置重亚硫酸盐转化反应体系：

试剂	体积
来自 STEP 3 结束的样品	20 μL
Bisulfite Solution	85 μL
DNA Protect Buffer	35 μL
总体积	140 μL

4.2 PCR 管内液体加入 DNA Protect Buffer 后变为蓝色，移液器吹打混匀 6 次，然后分成两管置于 PCR 仪上（注意：做好标记）。



由于反应液体积比较大，需要分装成 2 个 PCR 管，置于 PCR 仪上进行反应。

4.3 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
热盖温度 105℃	
95℃	5 min
60℃	10 min
95℃	5 min
60℃	10 min
20℃	Hold

4.4 纯化：

4.4.1 将上步反应结束后的两管样品混合，向 EP 管内加入 310 μL Buffer BL 和 1 μL Carrier RNA (1 μg/μL)（注：DNA 投入大于 200 ng 则可以不加 Carrier RNA），加入 250 μL 无水乙醇及全部样品，震荡混匀，瞬时离心后加入离心柱。



对于少量 DNA 的纯化，加入 Carrier RNA 可提高 DNA 回收效率。

## 实验备注区

- 4.4.2 室温静置 1 min 后 12,000 r/min 离心 1 min，将收集管中的液体重新转移至离心柱中，室温静置 1 min，相同转速再离心 1 min，将离心柱从离心管内取出，弃去管内废液后将离心柱放回离心管内。
- 4.4.3 向离心柱内加入 500  $\mu$ L Buffer BW（注意是否已加乙醇），12,000 r/min 离心 1 min，将离心柱从离心管内取出，弃去管内废液后将离心柱放回离心管内。
- 4.4.4 向离心柱内加入 500  $\mu$ L Buffer BD（注意是否已加乙醇），室温静置孵育 15 min，12,000 r/min 离心 1 min，将离心柱从离心管内取出，弃去管内废液后将离心柱放回离心管内。
- 4.4.5 向离心柱内加入 500  $\mu$ L Buffer BW（注意是否已加乙醇），12,000 r/min 离心 1 min，将离心柱从离心管内取出，弃去管内废液后将离心柱放回离心管内。
- 4.4.6 重复 4.4.5 步骤一次。
- 4.4.7 向离心柱内加入 250  $\mu$ L 无水乙醇，12,000 r/min 或离心机最大转速离心 1 min，将离心柱从离心管内取出，弃去离心管内废液；将离心柱放回离心管中，再次 12,000 r/min，离心 1 min，用 10  $\mu$ L 移液器将离心柱中圆圈上的残留液体吸出（离心柱应严格避免乙醇残留）。
- 4.4.8 将离心柱转移至新的 1.5 mL 离心管内，加入 22  $\mu$ L Nuclease-Free Water，静置 2 min 后 12,000 r/min 离心 1 min；将离心管中的液体重新转移至离心柱中，室温放置 1 min，相同转速再离心 1 min，用 10  $\mu$ L 移液器将离心柱中圆圈上的残留液体吸出转入 1.5 mL 离心管内。
- 4.4.9 弃去离心柱，保留离心管内纯化产物，做好标记，准备 STEP 5 反应。

## STEP 5 PCR 扩增

## 实验备注区

需要使用到的试剂:

- U+ PCR Master Mix
- UDI Primer

需要使用到的仪器:

- PCR 仪

5.1 提前将试剂盒中的 U+ 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。

5.2 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。

5.3 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 4 反应结束的样品	20 $\mu$ L
U+ PCR Master Mix	25 $\mu$ L
UDI Primer	5 $\mu$ L
<b>总体积</b>	<b>50 <math>\mu</math>L</b>

5.4 使用移液器吸打混匀 (避免剧烈振荡混匀), 瞬时离心。

5.5 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 1 $\mu$ g)
热盖温度 105°C			1 $\mu$ g	7~8
98°C	2 min	1	500 ng	8~9
98°C	20 s	N cycles	250 ng	10~11
60°C	30 s		100 ng	11~12
72°C	30 s		50 ng	12~13
72°C	1 min		10 ng	16~17
4°C	Hold	1	5 ng	18~19
			2.5 ng	19~20

5.6 程序结束后进行 STEP 6 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 6 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

- 6.1 将已经平衡至室温的纯化磁珠，涡旋混匀后备用。
- 6.2 在 STEP 5 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。
- 6.3 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上 3 min，待溶液澄清。
- 6.4 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。
- 6.5 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；
- 6.6 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。
- 6.7 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。
- 6.8 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。
- 6.9 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上 2 min，待溶液澄清。
- 6.10 用移液器吸取 28  $\mu$ L 上清液，转移到新的 PCR 管中，做好标记。
- 6.11 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。
- 6.12 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 bp~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°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。



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。

