

仅供研究使用，不可用于临床诊断。

版本号：A.0（2023年3月）

文档号：PROT230303

产品技术支持与设备维保请联系：

网站：www.igenetech.com/support

邮箱：support@igenetech.com

IGT™ Fast Library Prep Kit v2.0

文库构建自动化流程实验操作指南

适用于：IGT-AS12 自动化液体工作站（配置 2）

样本制备

文库构建

杂交捕获

基因测序

生信分析





艾吉泰康生物科技（北京）有限公司

本手册中的信息如有更改，恕不另行通知。

免责声明：在法律允许的范围内，艾吉泰康生物科技（北京）有限公司和/或其附属公司对与本文件有关或由此产生的特殊、偶然、间接、惩罚性、多重或后果性损害不承担责任，包括您对本文件的使用。

版本号	更新日期	更新内容
A.0	2023 年 3 月	全新用户手册

©2023 艾吉泰康生物科技（北京）有限公司·版权所有

概览

操作指南简介

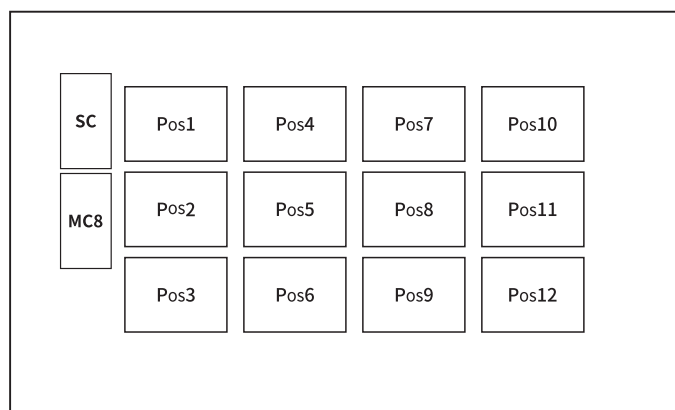
本应用说明书仅适用于 IGT™ Fast Library Prep Kit v2.0 试剂盒，适用于 Illumina 和 MGI 高通量测序平台，操作指南主要是指导使用人员在 IGT-AS12 自动化液体工作站（配置 2）上完成自动化文库构建实验操作，其中需要热循环仪（PCR 仪）部分需要在线下完成。该套流程已经过重复性测试，最大程度上保证了自动化操作的稳定性和重复性。

IGT-AS12 自动化液体工作站

IGT-AS12 自动化液体工作站是艾吉泰康自主研发的一款面向 NGS 实验室开发的自动化液体处理系统，可进行高效、稳定的自动化移液，能够满足中等通量下的各种复杂应用，兼容多种耗材和吸头，同时支持艾吉泰康全系列建库及捕获试剂。配套控制软件界面整洁，功能强大，提供经过验证的流程模板，支持个性化编辑。系统具有良好的灵活性和扩展性，实验结果稳定性好、重复性高。

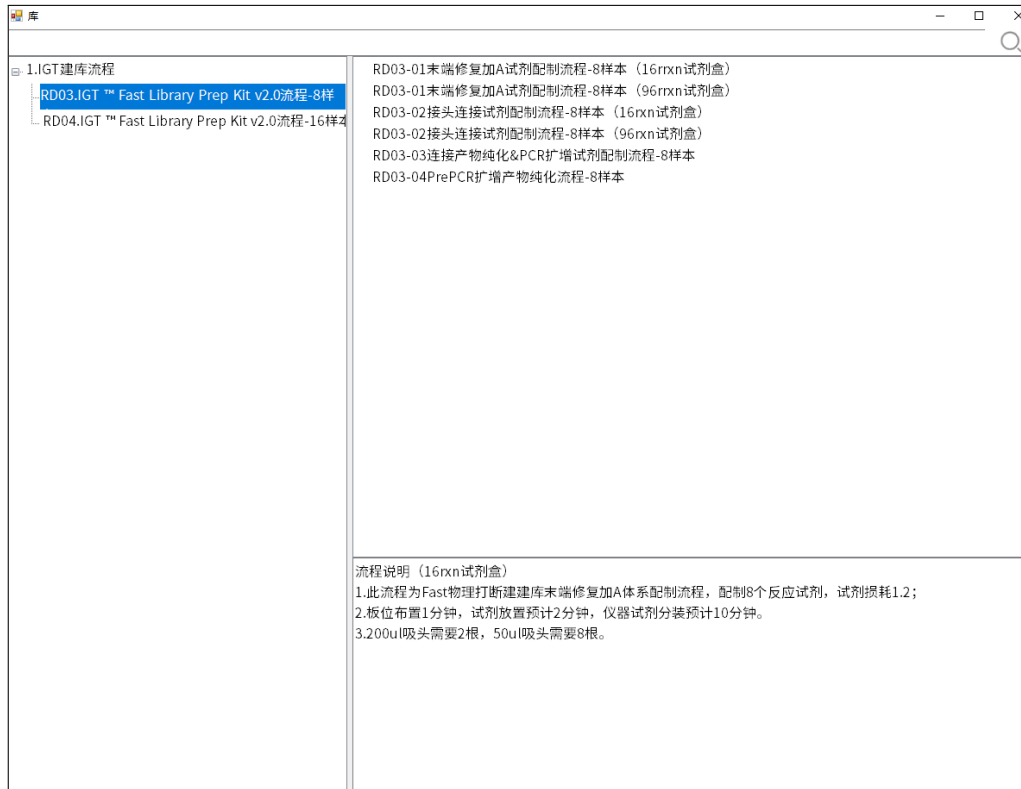
板位说明

IGT-AS12 自动化液体工作站拥有单通道（SC）和 8 通道（MC8）双移液器，并拥有 Pos1 ~ Pos12 共 12 个可自定义的 SBS 标准板位，各板位命名请详见下图。配置 2 版本为磁珠纯化版本，其中 Pos4 为温控模块（不可拆卸），Pos8 为磁分离模块（可拆卸），Pos12 为震荡模块（不可拆卸）。



流程说明

艾吉泰康提供针对 IGT™ Fast Library Prep Kit v2.0 建库实验流程的 8 样本/轮和 16 样本/轮的两套实验流程。实验流程适用于 16 rxn 和 96 rxn 两种规格的试剂盒，不可混用，请在实验中注意选择，避免使用错误。



实验所需试剂、仪器与耗材

IGT™ Fast Library Prep Kit v2.0 建库实验流程试剂盒及其组成

用于本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	
●	End Repair & A-Tailing Buffer	124 µL	744 µL	-20 °C±5 °C
●	End Repair & A-Tailing Enzyme Mix	54 µL	320 µL	
●	Ligation Buffer	540 µL	2 × 1584 µL	
●	DNA Ligase	88 µL	540 µL	
Ⓜ ¹	PCR Master Mix	450 µL	2 × 1350 µL	

¹ 管盖颜色Ⓜ标识该试剂组分管盖颜色为白色。

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 (96*1 rxn)	储存温度
●	Adapter (15 µM, for MGI SI)	540 µL	-20 °C±5 °C
Ⓜ	TPE 1.0 Primer (20 µM, for MGI)	264 µL	
Ⓟ ¹	TPE 2.0 Indexed Primer N (20 µM, for MGI) ²	4 µL each	

¹ 管盖颜色Ⓟ标识该试剂组分为板装。

² N 为 index 编号。

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

管盖颜色	组分	总量 (96*1 rxn)	储存温度
●	Adapter (15 µM, for Illumina/MGI)	540 µL	-20 °C±5 °C
Ⓟ	UDI Primer N (10 µM each, for Illumina/MGI) ¹	8 µL each	

¹ N 为 index 编号。

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

管盖颜色	组分	总量 (96*1 rxn)	储存温度
●	Insert UMI Adapter (15 μM, for Illumina/MGI)	540 μL	-20 °C±5 °C
Ⓟ	UDI Primer N (10 μM each, for Illumina/MGI) ¹	8 μL each	

¹ N 为 index 编号。

自备试剂、仪器与耗材

以下为 IGT™ Fast Library Prep Kit v2.0 文库构建流程试剂盒之外的用于完成实验的，需要用户自备的试剂、仪器与耗材。表中为经过艾吉泰康测试的推荐品牌型号，除 IGT-AS12 自动化液体工作站专用耗材外，可根据实验室具体情况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	品牌货号
1	无水乙醇	市面主流品牌	市面主流品牌
2	Nuclease-Free Water	Nuclease-Free Water	Ambion (AM9930)
3	纯化磁珠 ¹	IGT™ Pure Beads	iGeneTech (C80663)
		Agencourt AMPure XP Kit	Beckman Coulter (A63880)
4	片段分析仪试剂 ¹	S2 Cartridge (Standard Cartridge) ²	BiOptic (C105101)
		Agilent DNA 1000 Kit ²	Agilent (5067-1504)
5	核酸定量试剂	Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher (C47257)

¹ 推荐的纯化磁珠和片段分析仪试剂均经过艾吉泰康验证，请根据实验室具体情况选择一种使用。

² S2 Cartridge (Standard Cartridge) 需搭配 Qsep100/Qsep400 使用，Agilent DNA 1000 Kit 需搭配 2100 Bioanalyzer 使用。

自备仪器

序号	名称	推荐产品	品牌货号
1	核酸定量仪	Qubit™ 4.0 Fluorometer	Thermo Fisher (Q33238)
2	片段分析仪 ¹	Qsep100/Qsep400	BiOptic (Qsep100/Qsep400)
		2100 Bioanalyzer	Agilent (G2939AA)
3	涡旋振荡器	市面主流品牌	市面主流品牌
4	微型离心机	市面主流品牌	市面主流品牌
5	冰盒	市面主流品牌	市面主流品牌
6	96 孔热循环仪 (PCR 仪)	市面主流品牌	市面主流品牌

¹ 推荐的片段分析仪均经过艾吉泰康验证，请根据实验室具体情况选择一种使用。

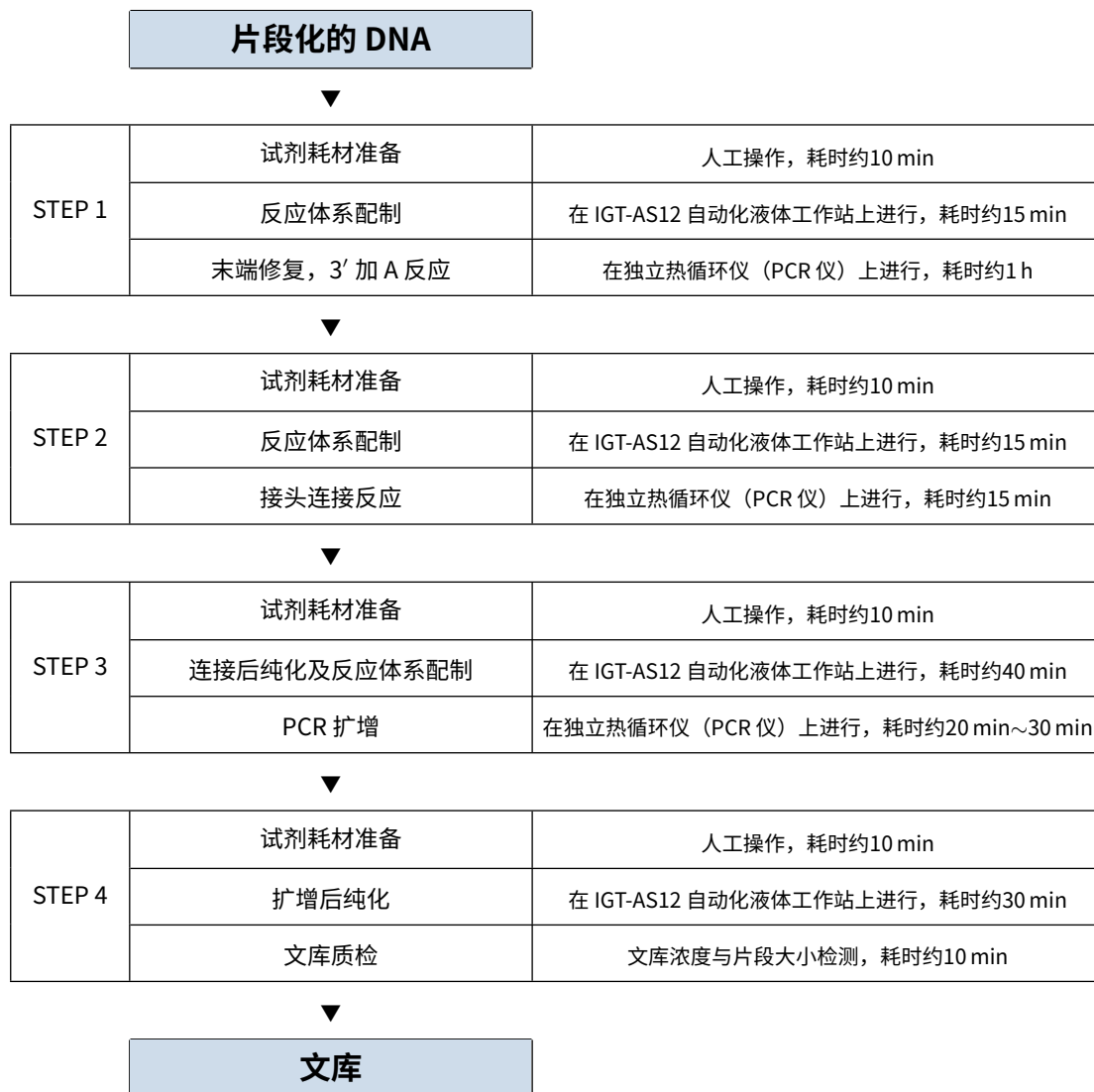
自备耗材

注意：

IGT-AS12 自动化液体工作站需使用艾吉泰康指定耗材。

序号	名称	推荐产品	品牌货号
1	0.5 mL Qubit 管	Qubit™ Assay Tubes	Thermo Fisher (Q32856)
2	0.2 mL 8 联排 PCR 管	市面主流品牌	市面主流品牌
3	1.5 mL 离心管	市面主流品牌	市面主流品牌
4	200 μ L 96 孔半裙边 PCR 板 (SBS)	市面主流品牌	市面主流品牌
5	50 μ L 盒装专用移液吸头 (SBS)	50 μ L 盒装透明移液吸头	iGeneTech (Q96021)
6	200 μ L 盒装专用移液吸头 (SBS)	200 μ L 盒装透明移液吸头	iGeneTech (Q96023)
7	1.2 mL 深孔板 (SBS)	1.2 mL 深孔板	iGeneTech (Q96013)
8	12 道储液槽 (SBS)	12 道储液槽	iGeneTech (Q96014)

实验流程图



* 本流程图展示实验耗时以 16 样本/轮为例

使用前说明

仪器运行

- ❑ 首次使用前，请联系艾吉泰康产品技术支持进行脚本应用的安装和仪器校准调试；
- ❑ 务必严格按照本操作指南中指导进行试剂的存储及使用；
- ❑ IGT-AS12 自动化液体工作站（配置 2）最多支持 16 个反应/轮的文库构建实验，本操作指南以 16 个反应/轮为例；
- ❑ 如有其他需求详询艾吉泰康以获得产品技术支持。

使用前请确认

- ❑ 提前联系艾吉泰康产品技术支持将建库流程导入软件，并测试 IGT-AS12 自动化液体工作站建库流程；
- ❑ IGT-AS12 自动化液体工作站需使用艾吉泰康推荐耗材；
- ❑ 加样建议使用无核酸酶的耗材和器械，最好可以对环境进行核酸酶灭活；
- ❑ 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，再进行后续的文库实验。
- ❑ 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。

实验条件控制

- ❑ 环境温度：20°C~25°C，环境湿度：40%~60%；
- ❑ 请穿戴个人防护装置，注意实验室安全；
- ❑ 试剂盒组分应避免反复冻融，严格根据各温度要求存放；
- ❑ 为避免交叉污染，样本、各试剂组分在溶解、充分混匀后，应离心确保全部液体置于管底且无气泡状态再开盖；
- ❑ IGT-AS12 自动化液体工作站使用前后应严格进行水、75% 乙醇全面清洁，并进行紫外消毒；
- ❑ 在 IGT-AS12 自动化液体工作站运行过程中，如无意外及程序设置需要，请勿暂停及打开仪器门。

如果以上条件均满足，即可开始进行实验。

STEP 1

末端修复，3' 端加 A

需要用到的试剂：

- End Repair & A-Tailing Enzyme Mix
- End Repair & A-Tailing Buffer

需要用到的设备：

- IGT-AS12 自动化液体工作站（配置 2）
- 热循环仪（PCR 仪）


1.1 试剂准备：

- 1.1.1 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。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。
- 1.1.2 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。
- 1.1.3 提前将试剂盒中的 **End Repair & A-Tailing Enzyme Mix** 从 -20℃ 冰箱中取出，置于冰盒上融化，颠倒混匀（避免剧烈振荡混匀），瞬时离心，置于冰盒上备用。

1.2 IGT-AS12 设备及控制软件开启：

- 1.2.1 依次打开 IGT-AS12 自动化液体工作站主机和控制电脑的电源开关，并将温控模块和振荡模块通电；



- 1.2.2 双击桌面控制软件快捷方式 ，打开控制软件，在在登录界面输入账号密码登录控制软件，点击登录界面程序。默认用户名为“User”，默认初始密码为“1”。

1.3 自动化操作流程

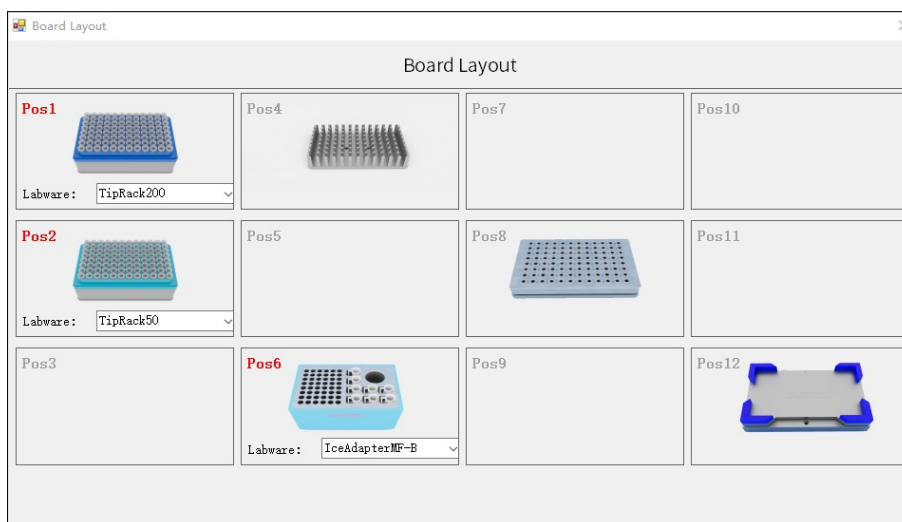
- 1.3.1 在程序界面菜单栏点击 **Libraries**，选择 **IGT 建库流程 IGT™ Fast Library Prep Kit v2.0 流程-16 样本**，选择 **末端修复加 A 试剂配制流程-16 样本**；

提示：流程末端修复加 A 试剂配制流程-16 样本针对 16 rxn 和 96 rxn 试剂盒有两个版本，请根据实际情况选择，错误使用将导致实验失败。

- 1.3.2 进入程序后，按照下表与布置图在 IGT-AS12 台面放置相应的适配器与耗材；

适配器/耗材	标识	放置位置
200 μL 盒装透明移液吸头	TipRack200	Pos1
50 μL 盒装透明移液吸头	TipRack50	Pos2
多功能冰盒适配器	IceAdapterMF	Pos6

具体位置如下图所示：

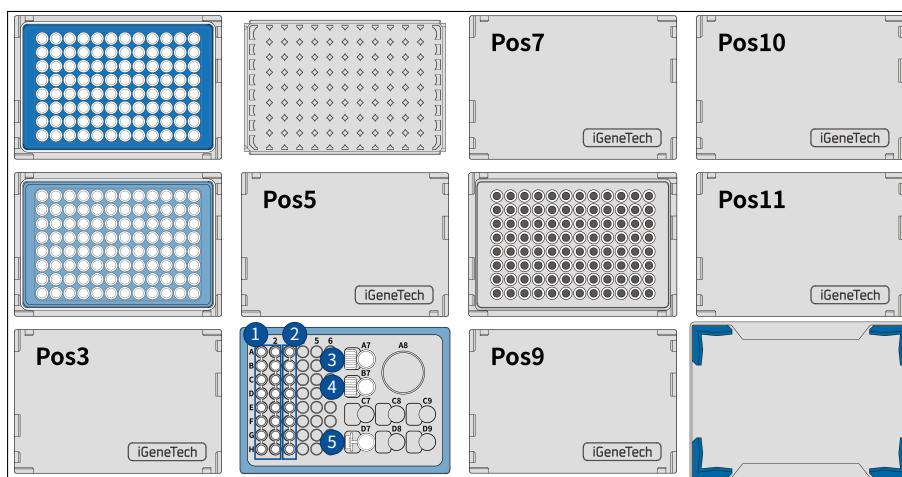


1.3.3 按照下图所示放置相关试剂组分和耗材，放置完成后根据提示打勾，点击 **Next** 进入程序界面；

序号	组分名称	分装体积	使用耗材	放置位置
1	均一化后的 DNA	50 μ L	8 联排 PCR 管	Pos6:A1-H2
2	分装 Mix 空管	-	8 联排 PCR 管	Pos6:A3-H3
3	End Repair & A-Tailing Enzyme Mix	60 μ L	螺帽管 ¹	Pos6:A7
4	End Repair & A-Tailing Buffer	140 μ L	螺帽管	Pos6:B7
5	配置 Mix 空管	-	1.5 mL 离心管	Pos6:D7

¹ 螺帽管均为试剂盒原管，无需单独准备。

具体位置如下图所示（图中数字对应上表序号，可单独使用附件 A 中的大图进行核对）：



1.3.4 试剂放置结束后，在程序界面右下角勾选 **Emulate** 后点击 **Run** 进行预跑，预跑成功后，取消勾选，并进行正式流程；

提示： 点击 **Run** 仪器开始自检，会有弹窗提示，需要人工核验机械臂是否装载移液器，默认为未装载移液器，若仪器装有移液器请先进行移液器卸载操作，卸载后，弹窗全部点击“否”。

1.3.5 程序结束后，取出 **Pos6:A1-H2** 位置的 8 联排 PCR 管，扣盖振荡混匀并离心，然后放入热循环仪 (PCR 仪) 中进行反应。

1.4 设置热循环仪 (PCR 仪) 程序如下, 将 1.3.5 步骤反应液置于热循环仪 (PCR 仪) 上, 运行程序;

热盖温度75℃			
步骤	循环数	温度	时间
1	1	30℃	30 min
2	1	65℃	30 min
3	1	4℃	Hold

1.5 按照如下步骤清理台面:

- (1) 将 **Pos6:A7** 位置的 **End Repair & A-Tailing Enzyme Mix** 和 **Pos6:B7** 位置的 **End Repair & A-Tailing Buffer** 试剂扣盖并按照管标签上的温度储存;
- (2) 将 **Pos6:D7** 位置的1.5 mL离心管和 **Pos6:A3-H3** 位置的 8 联排 PCR 管丢弃;
- (3) 其它耗材保持不动。

1.6 PCR 结束后, 取出产物立即进行 STEP 2 的接头连接。

STEP 2

接头连接

需要用到的试剂：

- Ligation Buffer
- DNA Ligase
- Nuclease-Free Water
- Adapter (15 μ M)

需要用到的设备：

- IGT-AS12 自动化液体工作站（配置 2）
- 热循环仪（PCR 仪）

2.1 试剂准备：

2.1.1 提前将 **Adapter (15 μ M)** 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。

2.1.2 根据建库投入的 DNA 量，将 **Adapter (15 μ M)** 用 **Nuclease-Free Water** 提前稀释成合适的浓度（仅限当次使用）：

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

2.1.3 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。

2.1.4 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。

2.2 自动化操作流程

2.2.1 在程序界面菜单栏点击 **Libraries**，选择 **IGT 建库流程 IGT™ Fast Library Prep Kit v2.0 流程-16 样本**，选择 **接头连接试剂配制流程-16 样本**；

提示：流程接头连接试剂配制流程-16 样本对 16 rxn 和 96 rxn 试剂盒有两个版本，请根据实际情况选择，错误使用将导致实验失败。

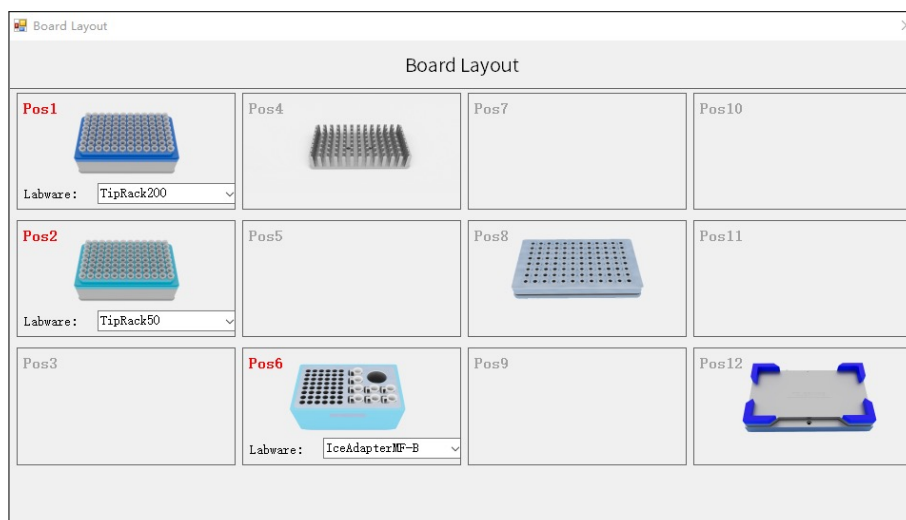
2.2.2 进入程序后，按照下表与布置图在 IGT-AS12 台面放置相应的适配器与耗材；

适配器/耗材	标识	放置位置
200 μ L 盒装透明移液吸头 ¹	TipRack200	Pos1
50 μ L 盒装透明移液吸头 ²	TipRack50	Pos2
多功能冰盒适配器	IceAdapterMF	Pos6

¹ Pos1 位置的 200 μ L 盒装透明移液吸头为上一步剩余移液吸头，无需更换；

² Pos2 位置的 50 μ L 盒装透明移液吸头为上一步剩余移液吸头，无需更换。

具体位置如下图所示：



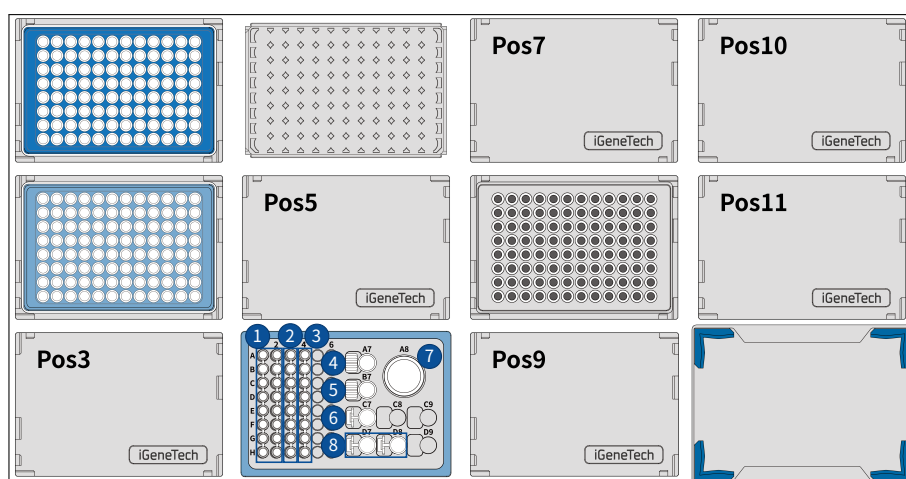
2.2.3 按照下图所示放置相关试剂组分和耗材，放置完成后根据提示打勾，点击 **Next** 进入程序界面；

序号	组分名称	分装体积	使用耗材	放置位置
1	1.6 步骤产物	-	8 联排 PCR 管	Pos6:A1-H2
2	分装 Mix 空管	-	8 联排 PCR 管	Pos6:A3-H3
3	分装 Adapter 空管	-	8 联排 PCR 管	Pos6:A4-H4
4	Ligation Buffer	528 μ L	螺帽管 ¹	Pos6:A7
5	DNA Ligase	88 μ L	螺帽管	Pos6:B7
6	稀释后的 Adapter ($X \mu$ M) ²	104 μ L	1.5 mL离心管	Pos6:C7
7	Nuclease-Free Water	2 mL	8 mL或15 mL窄口瓶	Pos6:A8
8	配制 Mix 空管	-	1.5 mL离心管	Pos6:D7-D8

¹ 螺帽管均为试剂盒原管，无需单独准备；

² $X \mu$ M 为稀释后的 Adapter 浓度。

具体位置如下图所示（图中数字对应上表序号，可单独使用附件 A 中的大图进行核对）：



2.2.4 试剂放置结束后，在程序界面右下角勾选 **Emulate** 后点击 **Run** 进行预跑，预跑成功后，取消勾选，并进行正式流程；

提示： 点击 **Run** 仪器开始自检，会有弹窗提示，需要人工核验机械臂是否装载移液器，默认为未装载移液器，若仪器装有移液器请先进行移液器卸载操作，卸载后，弹窗全部点击“否”。

2.2.5 程序结束后，取出 **Pos6:A1-H2** 位置的 8 联排 PCR 管，扣盖振荡混匀并离心，然后放入热循环仪 (PCR 仪) 中进行反应。

2.3 设置热循环仪 (PCR 仪) 参数如下 (关闭热盖或不加盖热盖)，将 PCR 管置于热循环仪 (PCR 仪) 上，运行程序：

关闭热盖或不加盖热盖			
步骤	循环数	温度	时间
1	1	22°C	15 min
2	1	4°C	Hold

2.4 按照如下步骤清理台面：

- (1) 将 **Pos6:A3-H4** 位置的 8 联排 PCR 管直接丢弃，**Pos6:D7-D8** 孔的 1.5 mL 离心管丢弃；
- (2) 将 **Pos6:A7** 位置的 **Ligation Buffer**、**Pos6:B7** 位置的 **DNA Ligase**、**Pos6:C7** 位置的**稀释后的 Adapter (X μ M)** 和 **Pos6:A8** 位置的 **Nuclease-Free Water** 扣盖并按照管标签上的温度储存；
- (3) 其它耗材与适配器保持不动。

2.5 PCR 结束后，取出连接产物立即进行 STEP 3 的磁珠纯化。

STEP 3

连接产物纯化 & PCR 扩增反应

需要用到的试剂：

- 纯化磁珠 IGT™ Pure Beads
- 无水乙醇
- Nuclease-Free Water
- PCR Master Mix
- UDI Primer N (10 μM each)

需要用到的设备：

- IGT-AS12 自动化液体工作站（配置 2）
- 热循环仪（PCR 仪）

3.1 试剂准备：

- 3.1.1 提前用无水乙醇和 **Nuclease-Free Water** 配制 80% 乙醇，并置于室温备用，请使用新鲜配制 80% 乙醇用于磁珠纯化。
- 3.1.2 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。
- 3.1.3 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。
- 3.1.4 提前将试剂盒中的 **UDI Primer N (10 μM each)** 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。

3.2 自动化操作流程

- 3.2.1 在程序界面菜单栏点击 **Libraries**，选择 **IGT 建库流程 IGT™ Fast Library Prep Kit v2.0 流程-16 样本**，选择 **连接产物纯化 & PCR 扩增试剂配制流程-16 样本**；

提示：流程**连接产物纯化 & PCR 扩增试剂配制流程-16 样本**针对 16 rxn 和 96 rxn 试剂盒有两个版本，请根据实际情况选择，错误使用将导致实验失败。

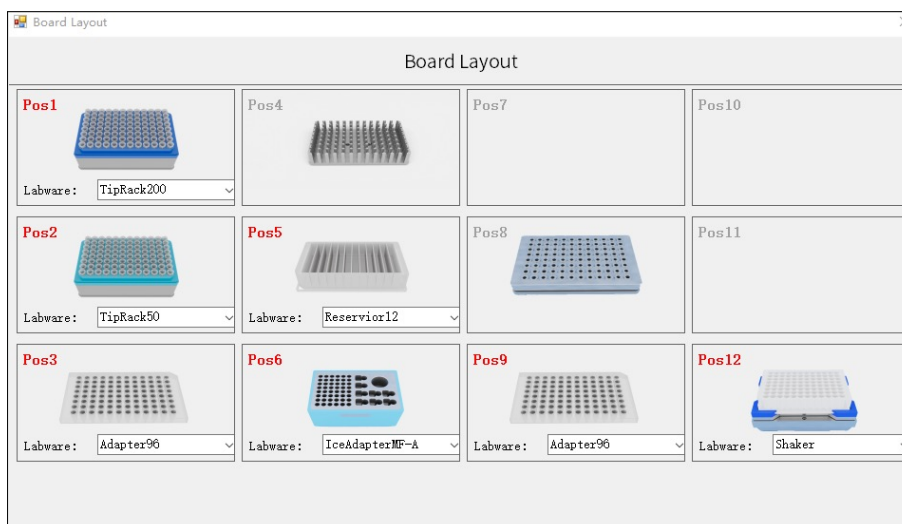
- 3.2.2 进入程序后，按照下表与布置图在 IGT-AS12 台面放置相应的适配器与耗材；

适配器/耗材	标识	放置位置
200 μL 盒装透明移液吸头 ¹	TipRack200	Pos1
50 μL 盒装透明移液吸头 ²	TipRack50	Pos2
96 孔 PCR 板适配器	Adapter96	Pos3
12 道储液槽	Reservior12	Pos5
多功能冰盒适配器	IceAdapterMF	Pos6
磁分离模块	MagneticStand	Pos8
96 孔 PCR 板适配器	Adapter96	Pos9
1.2 mL 深孔板	DWP1200	Pos12

¹ Pos1 位置的 200 μL 盒装透明移液吸头为上一步剩余移液吸头，无需更换；

² Pos2 位置的 50 μL 盒装透明移液吸头为上一步剩余移液吸头，无需更换。

具体位置如下图所示：



3.2.3 按照下图所示放置相关试剂组分和耗材，放置完成后根据提示打勾，点击 **Next** 进入程序界面；

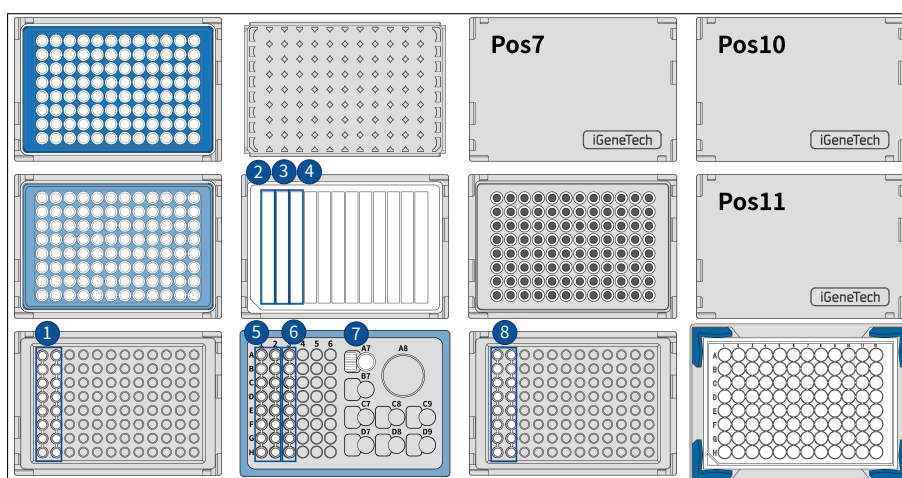
序号	组分名称	分装体积	使用耗材	放置位置
1	UDI Primer N (10 μ M each) ¹	8 μ L/孔	8 联排 PCR 管	Pos3:A1-H2
2	纯化磁珠 IGT™ Pure Beads ²	2.5 mL	12 道储液槽	Pos5:A1-H1
3	80% 乙醇	12 mL		Pos5:A2-H2
4	Nuclease-Free Water	2.5 mL		Pos5:A3-H3
5	产物收集管	-	8 联排 PCR 管	Pos6:A1-H2
6	分装 Mix 空管	-	8 联排 PCR 管	Pos6:A3-H3
7	PCR Master Mix	480 μ L	螺帽管 ³	Pos6:A7
8	2.5 连接产物	-	8 联排 PCR 管	Pos9:A1-H2

¹ 根据实验所需，从 **UDI Primer N (10 μ M each)** 板中取出对应数量的试剂转移至 8 联排 PCR 管，并记录 index 号；

² 使用磁珠为 **IGT™ Pure Beads**，若选用其它品牌纯化磁珠，需咨询对应供应商，并通过预实验自行摸索合适的磁珠用量；

³ 螺帽管均为试剂盒原管，无需单独准备。

具体位置如下图所示（图中数字对应上表序号，可单独使用附件 A 中的大图进行核对）：



3.2.4 试剂放置结束后，在程序界面右下角勾选 **Emulate** 后点击 **Run** 进行预跑，预跑成功后，取消勾选，并进行正式流程；

提示： 点击 **Run** 仪器开始自检，会有弹窗提示，需要人工核验机械臂是否装载移液器，默认为未装载移液器，若仪器装有移液器请先进行移液器卸载操作，卸载后，弹窗全部点击“否”。

3.2.5 程序结束后，取出 **Pos6:A1-H2** 位置的 8 联排 PCR 管，扣盖振荡混匀并离心，然后放入热循环仪（PCR 仪）中进行反应。

3.3 设置热循环仪（PCR 仪）参数如下，将 PCR 管置于热循环仪（PCR 仪）上，运行程序：

热盖温度 105 °C				样本投入量	PCR 循环数 N	
步骤	循环数	温度	时间		文库产出 100 ng	文库产出 1 µg
1	1	98 °C	2 min	1 µg	3~4	3~4
2	N, 见右表	98 °C	20 s	500 ng	3~4	3~4
		60 °C	30 s	250 ng	3~4	4~6
		72 °C	30 s	100 ng	3~4	6~7
3	1	72 °C	1 min	50 ng	4~5	7~8
4	1	4 °C	Hold	10 ng	6~7	9~10
				5 ng	7~8	10~12
				2.5 ng	9~11	13~15

3.4 按照如下步骤清理台面：

- (1) 将 **Pos5:A1-H1** 位置的纯化磁珠 IGT™ Pure Beads 吹吸混匀后回收，放室温暂存；
- (2) 将 **Pos6:A7** 位置的 PCR Master Mix 扣盖并按照管标签上的温度储存；
- (3) 将 **Pos3:A1-H2** 位置的装有 **UDI Primer N (10 µM each)** 的 8 联排 PCR 管丢弃；
- (4) 将 **Pos6:A3-H3** 位置的 8 联排 PCR 管丢弃；
- (5) 取下 **Pos3** 位置的 96 孔 PCR 板适配器 Adapter96 和 **Pos6** 位置的多功能冰盒适配器 IceAdapterMF；
- (6) 其它耗材与适配器保持不动。

3.5 PCR 扩增结束后，取出扩增产物，进行 STEP 4 磁珠纯化。

STEP 4

扩增产物磁珠纯化

需要用的试剂：

- 纯化磁珠 IGT™ Pure Beads

需要用的设备：

- IGT-AS12 自动化液体工作站（配置 2）

4.1 在程序界面菜单栏点击 **Libraries**，选择 **IGT 建库流程 IGT™ Fast Library Prep Kit v2.0 流程-16 样本**，选择 **扩增产物纯化流程-16 样本**；

4.2 进入程序后，按照下表与布置图在 IGT-AS12 台面放置相应的适配器与耗材；

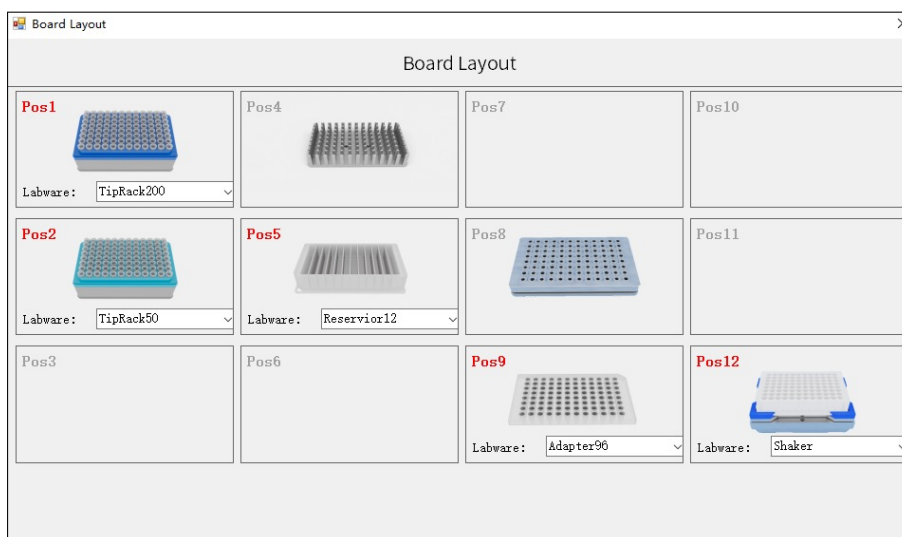
适配器/耗材	标识	放置位置
200 μ L 盒装透明移液吸头 ¹	TipRack200	Pos1
50 μ L 盒装透明移液吸头 ²	TipRack50	Pos2
12 道储液槽	Reservior12	Pos5
磁分离模块	MagneticStand	Pos8
96 孔 PCR 板适配器	Adapter96	Pos9
1.2 mL 深孔板 ³	DWP1200	Pos12

¹ Pos1 位置的 200 μ L 盒装透明移液吸头为上一步剩余移液吸头，无需更换；

² Pos2 位置的 50 μ L 盒装透明移液吸头为上一步剩余移液吸头，无需更换。

³ Pos12 位置的 1.2 mL 深孔板为上一步所用耗材，无需更换。

具体位置如下图所示：



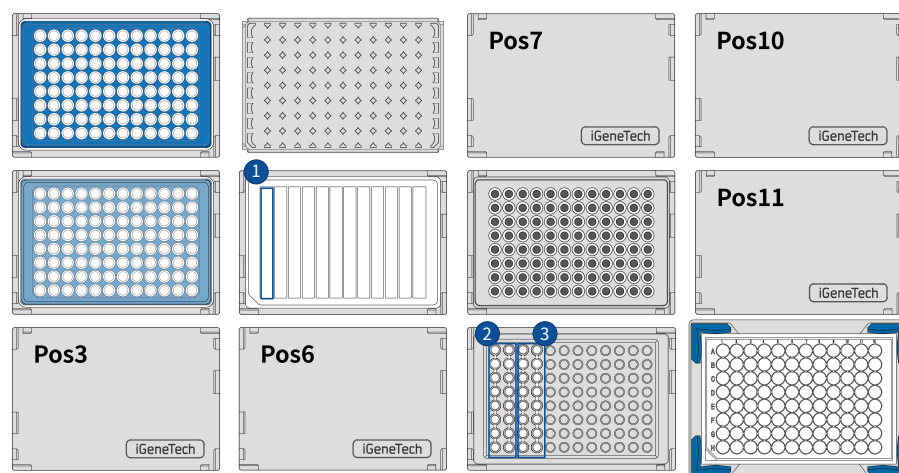
4.3 按照下图所示放置相关试剂组分和耗材，放置完成后根据提示打勾，点击 **Next** 进入程序界面；

序号	组分名称	分装体积	使用耗材	放置位置
1	纯化磁珠 IGT™ Pure Beads ¹	2.5 mL	12 道储液槽	Pos5:A1-H1
2	3.5 扩增产物	-	8 连 PCR 管	Pos9:A1-H2
3	文库收集管	-	8 连 PCR 管	Pos9:A3-H4

¹ 使用磁珠为 IGT™ Pure Beads，若选用其它品牌纯化磁珠，需咨询对应供应商，并通过预实验自行摸索合适的磁珠用量。

提示：磁珠纯化所需的 80% 乙醇和 Nuclease-Free Water 上步连接纯化步骤已分装，此步纯化无需再准备。

具体位置如下图所示（图中数字对应上表序号，可单独使用附件 A 中的大图进行核对）：



4.4 试剂放置结束后，在程序界面右下角勾选 **Emulate** 后点击 **Run** 进行预跑，预跑成功后，取消勾选，并进行正式流程；

提示：点击 **Run** 仪器开始自检，会有弹窗提示，需要人工核验机械臂是否装载移液器，默认为未装载移液器，若仪器装有移液器请先进行移液器卸载操作，卸载后，弹窗全部点击“否”。

4.5 程序结束后，取出 **Pos9:A3-H4** 位置的 8 联排 PCR 管，即为纯化后产物；

4.6 取出 1 μL 文库使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 试剂在 Qubit 4.0 Fluorometer 上进行文库浓度测定，记录文库浓度；

4.7 取 1 μL 文库使用片段分析仪进行片段质检；

4.8 按照如下步骤清理台面：

- (1) 将 **Pos5:A1-H1** 位置的纯化磁珠 IGT™ Pure Beads 回收，按照管标签上的温度储存；
- (2) 剩余耗材直接丢弃；
- (3) 清理台面其余适配器。

文库构建实验结束。

附录 A

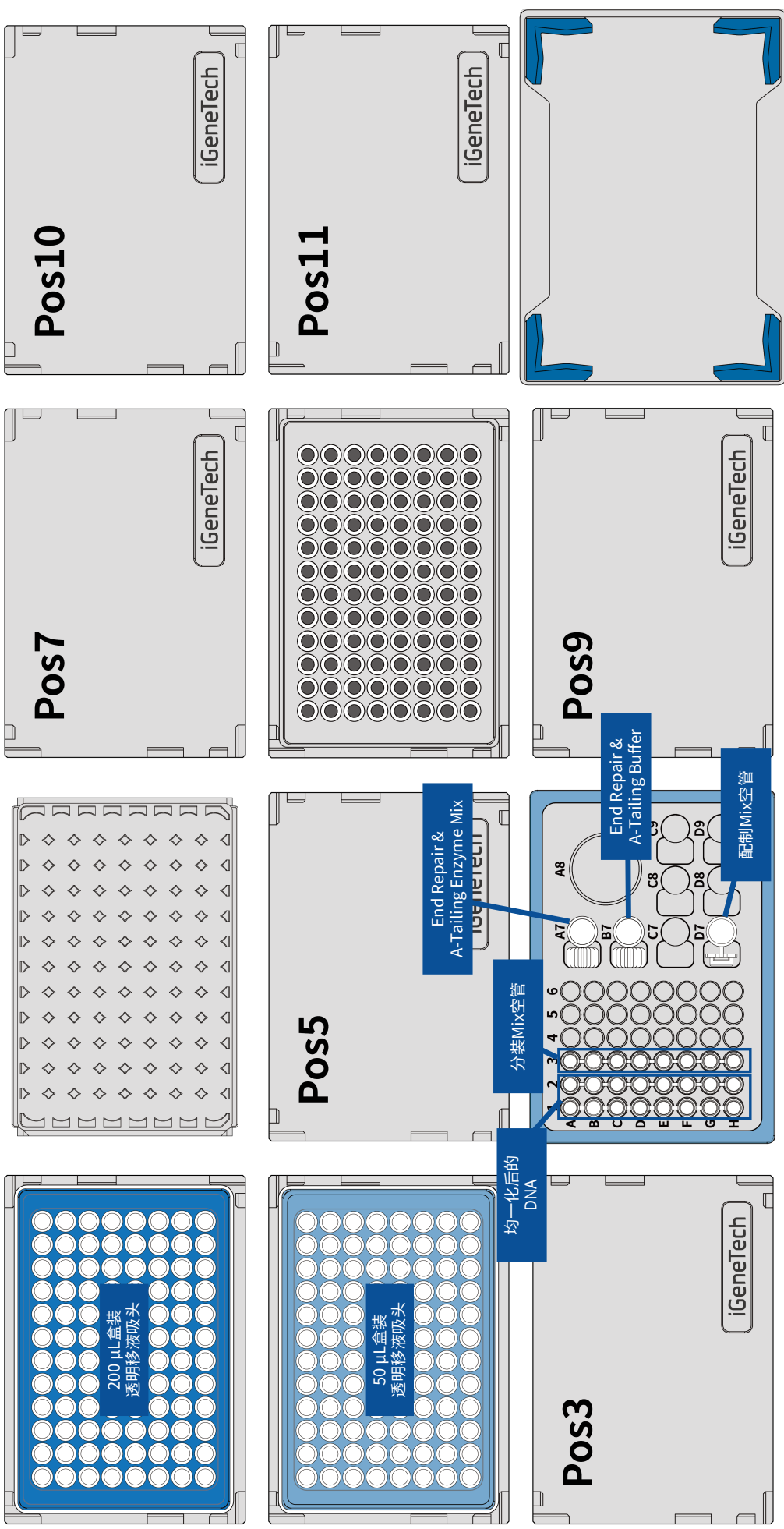
板位布置大图

以下为本操作流程所使用的供实验核对使用的三个板位布置图大图：

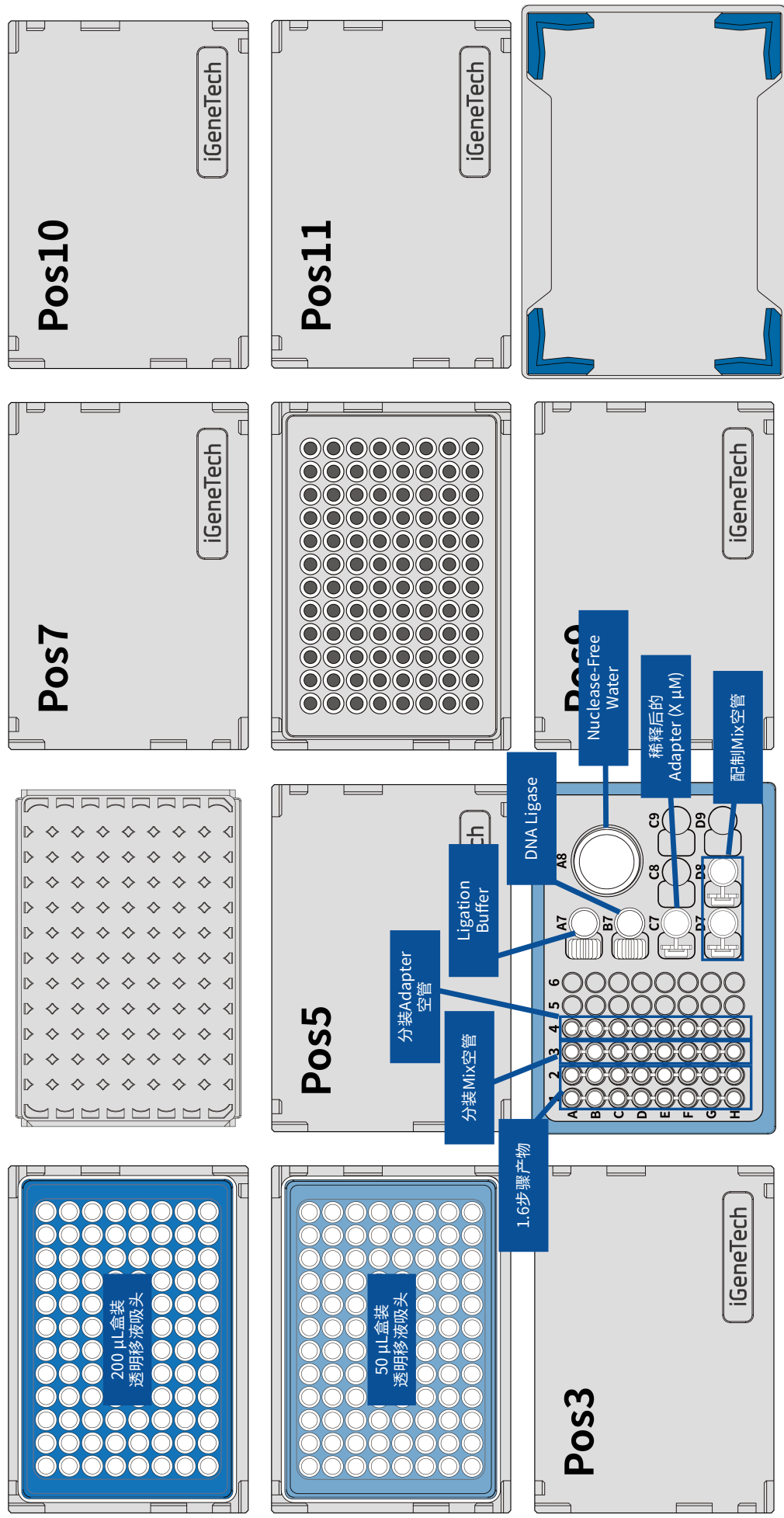
1. STEP1 末端修复，3' 端加 A 板位布置图
2. STEP2 接头连接板位布置图
3. STEP3 连接产物纯化 & PCR 扩增反应板位布置图
4. STEP4 扩增产物磁珠纯化板位布置图

大图请见后页。

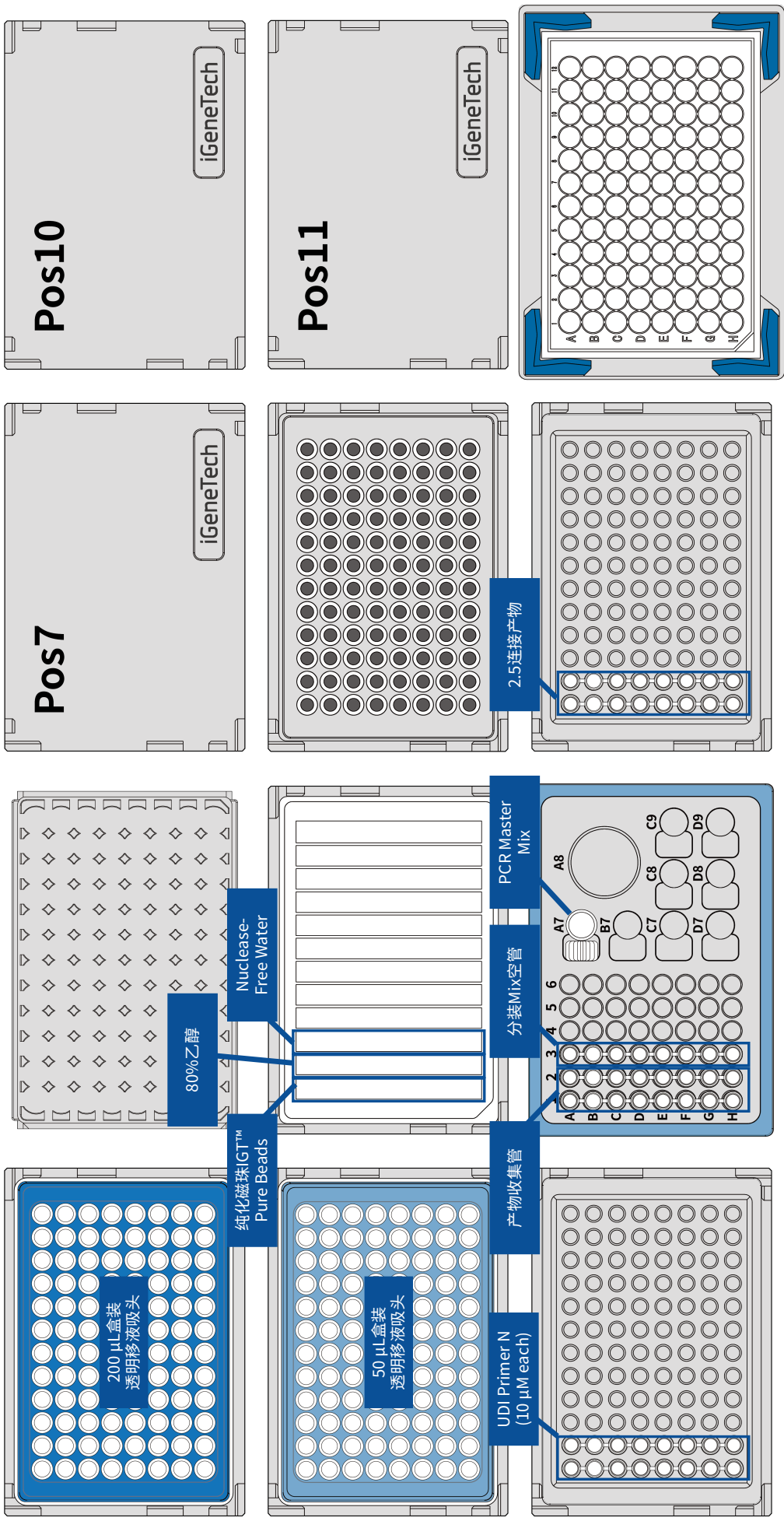
IGT™ Fast Library Prep Kit v2.0 文库构建自动化流程 (PROT230303, Rev A.0)
 STEP1 末端修复, 3'端加 A 板位布置图



IGT™ Fast Library Prep Kit v2.0 文库构建自动化流程 (PROT230303, Rev A.0)
STEP2 接头连接板位布置图

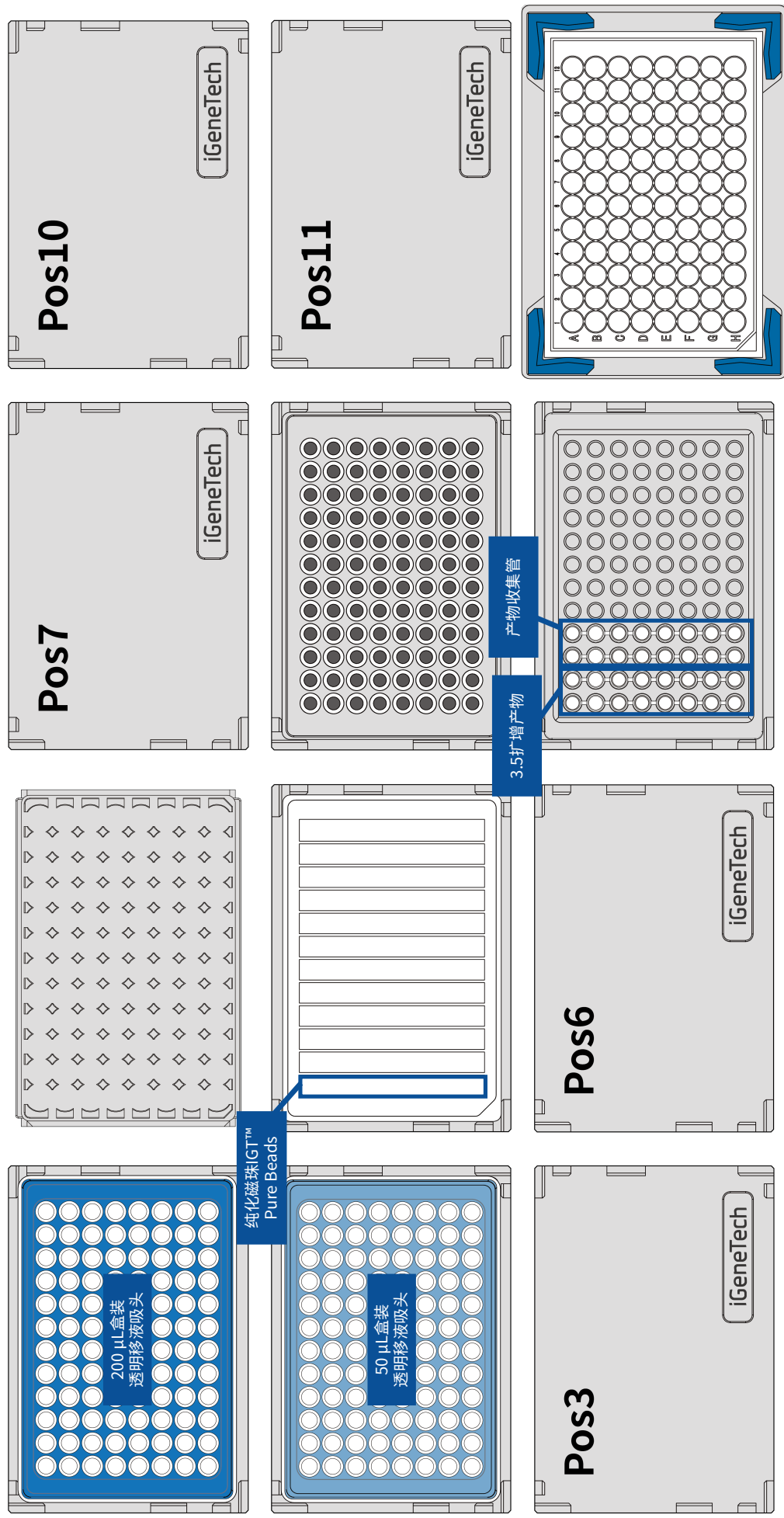


IGT™ Fast Library Prep Kit v2.0 文库构建自动化流程 (PROT230303, Rev A.0)
STEP3 连接产物纯化和 PCR 扩增反应板位布置图



IGT™ Fast Library Prep Kit v2.0 文库构建自动化流程 (PROT230303, Rev A.0)

STEP4 扩增产物磁珠纯化板位布置图





网址：www.igenetech.com/support

邮箱：support@igenetech.com

总部地址：北京市昌平区中关村生命科学园 8 号院一区 9 号楼 A 座 3 层

嘉兴子公司：浙江省嘉兴市嘉善县大云镇宏业路 371 号 2 号楼

官方微信



仅供科研使用，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（2023 年 3 月）

PROT230303