# AlNoVar™ RNA&DNA Library Prep Kit

产 品 说 明 书 • PRODUCT DESCRIPTION

ME Instruments Inc.
铭 毅 智 造

## 产品概述

本试剂盒适用于 Illumina、MGI 及铭毅智造等多款 NGS 测序平台，由逆转录、双链 cDNA 合成、片段化、末端修复，接头连接和高保真 PCR 富集所需的预混酶模块组成，搭配不同测序平台接头以及测序引物试剂盒，可将提取的 RNA&DNA 样本制备成适配多款 NGS 测序平台使用的 DNA 文库。试剂盒操作简便，文库产量稳定，可提供高质量的 DNA 文库。

## 产品货号

MEK0867-24T、MEK0867-96T

## 来源

试剂盒中单个酶组分均来自于携带基因工程酶的大肠杆菌菌株。

## 纯度

单个酶组分纯度≥95%

## 产品组成及规格

| 组分名称 | 规格 | | | 使用说明 |
|---|---|---|---|---|
| | MEK0867-8T（S） | MEK0867-24T | MEK0867-96T | |
| Random Primer Mix (A 管) | 16 μL×1管 | 48 μL×1管 | 192 μL×1管 | 2 μL/反应 |
| 1st Strand Buffer (B 管) | 40 μL×1管 | 120 μL×1管 | 480 μL×1管 | 5 μL/反应 |
| 1st Strand Enzyme Mix (C 管) | 40 μL×1管 | 120 μL×1管 | 480 μL×1管 | 5 μL/反应 |
| 2nd Strand Buffer (D 管) | 40 μL×1管 | 120 μL×1管 | 480 μL×1管 | 5 μL/反应 |
| 2nd Strand Enzyme Mix (E 管) | 40 μL×1管 | 120 μL×1管 | 480 μL×1管 | 5 μL/反应 |
| FEA Pro Buffer (F 管) | 40 μL×1管 | 120 μL×1管 | 480 μL×1管 | 5 μL/反应 |
| FEA Enzyme Pro Mix (G 管) | 40 μL×1管 | 120 μL×1管 | 480 μL×1管 | 5 μL/反应 |
| Rapid Ligation Buffer (H 管) | 240 μL×1管 | 720 μL×1管 | 720 μL×4管 | 30 μL/反应 |
| Rapid DNA Ligase (I 管) | 40 μL×1管 | 120 μL×1管 | 480 μL×1管 | 5 μL/反应 |
| 2× Amplification Mix (J 管) | 200 μL×1管 | 600 μL×1管 | 600 μL×4管 | 25 μL/反应 |

## 储存条件及有效期

-20±5℃储存，有效期 18 个月。

## 参考流程

**自备仪器，设备和耗材：**

1. DNA 纯化回收试剂盒（磁珠纯化）及配套设备耗材；

2. DNA 建库试剂盒：AlNoVar™ DNA Library Prep Kit with E-Fragmentation（铭毅智造 #MEK0877）、AlNoVar™ General DNA Library Prep Kit（铭毅智造 #MEK0845）；

3. 其他材料：80%乙醇（新鲜配制）、无核酸酶水；PCR 管、PCR 仪、磁力架、枪头等。

**实验前准备：**

- 请使用无 RNase 污染，并对实验区域进行清理；
- 所有组分和反应装置应保持在冰上；
- 将酶 Mix 和扩增反应液在冰上解冻并轻轻涡旋 10~15 秒以充分混合，短暂离心，备用。

**实验流程**

**1. 第一链 cDNA 合成**

- 按照下表配制反应体系：

| 组分名称 | 1个反应用量 |
|---|---|
| Total RNA & DNA 模板 | X (1 ng-1 μg) |
| Random Primer Mix (A 管) | 2 μL |
| 无核酸酶水 | (8-X) μL |
| Total | 10 μL |

- 使用移液器轻轻吸打充分混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。
- 在 PCR 仪上运行如下程序：

| 反应温度 | 反应时间 |
|---|---|
| 65℃ | 5 min |
| 4℃ | ∞ |

- 向第一步的 PCR 管中加入以下组分：

| 组分名称 | 1个反应用量 |
|---|---|
| 1st Strand Buffer (B 管) | 5 μL |
| 1st Strand Enzyme Mix (C 管) | 5 μL |
| Total | 20 μL |

- 在 PCR 仪上运行如下程序：

| 反应温度 | 反应时间 |
|---|---|
| 25℃ | 5 min |
| 50℃ | 10 min |
| 80℃ | 5 min |
| 4℃ | ∞ |

**2. 第二链合成**

• 按照下表继续向 PCR 管中加入以下组分，配制第二链合成反应体系：

| 组分名称 | 1个反应用量 |
|---|---|
| 2nd Strand Buffer (D 管) | 5 μL |
| 2nd Strand Enzyme Mix (E 管) | 5 μL |
| Total | 30 μL |

• 在 PCR 仪上进行第二链合成反应，运行如下程序：

| 反应温度 | 反应时间 |
|---|---|
| 热盖 105℃ | Off |
| 16℃ | 5 min |
| 4℃ | ∞ |

**3. 二链合成产物纯化**

• 提前将所需磁珠涡旋混匀后，在室温平衡至少 30 min；

• 建议体系内加入 50 μL 磁珠，用移液器吸打混匀 10 次，室温孵育 5 min；

• 将 PCR 管置于磁力架上静置 5 min，小心移除上清液，枪头不要碰到磁珠；

• 将 PCR 管保持在磁力架上，加入 200 μL 现用现配 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 s 后小心移除上清液，枪头不要碰到磁珠；

• 重复 80%乙醇漂洗步骤一次；

• 保持 PCR 管在磁力架上，使用 10 μL 移液器小心移除剩余的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留；

• 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 21 μL 无核酸酶水重悬磁珠，静置 5 min；

• 将 PCR 管置于磁力架上静置 3~5 min，吸取 20 μL 至一个新 PCR 管；

• 将纯化后的产物保存在-20℃。

**4. 片段化/末端修复**

• 使用无核酸酶的洁净 PCR 管，在冰浴上配制反应体系：

| 组分名称 | 1个反应用量 |
|---|---|
| 上一步反应产物 | 20 μL |
| FEA Pro Buffer (F 管) | 5 μL |
| FEA Enzyme Pro Mix (G 管) | 5 μL |
| Total | 30uL |

• 密封 PCR 管并短暂离心，轻轻涡旋震荡，使试剂混匀后，再次短暂离心，避免产生气泡。

• 将 PCR 管从冰上转移到 PCR 扩增仪上，PCR 仪 95℃热盖，程序设置如下：

| 反应步骤 | 循环数 | 反应温度 | 反应时间 |
|---|---|---|---|
| 预冷 | 1 cycle | 4℃ | +∞ |
| 酶切 | 1 cycle | 32℃ | 20min* |
| 终止酶切反应 | 1 cycle | 65℃ | 30 min |
| 结束 | 1 cycle | 4℃ | ∞ |

*根据实验室条件自行测试。

DNA 片段化时间推荐

| Fragment Peak Size | 孵育参考时间 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 200bp | 250bp | 300bp | 300-500bp |
| 基因组 DNA（10ng-1ug） | 30min（28-33min） | 25min（22-28min） | 20min（17-23min） | 5-15min（—） |
| 基因组 DNA（0.1ng-10ng） | 20min（17-23min） | 15min（13-17min） | 10min（8-13min） | —— |

**5． 快速接头连接**

• 使用无 DNA 酶的洁净 PCR 管，在冰浴上配制反应体系：

| 组分名称 | 1 个反应用量（片段化 DNA） |
|---|---|
| 上一步产物 | 30 μL |
| Rapid Ligation Buffer（H 管） | 30 μL |
| Rapid DNA Ligase（I 管） | 5 μL |
| 通用接头[a] | 5 μL |
| Total | 100μL |

a：请参考表 1 的连接接头建议浓度，对接头进行稀释。

• 密封 PCR 管并短暂离心，轻轻涡旋震荡，使试剂混匀后，再次短暂离心，避免产生气泡。
• 将 PCR 管从冰上转移到 PCR 扩增仪上，程序设置如下：

| 反应步骤 | 循环数 | 反应温度 | 反应时间 |
|---|---|---|---|
| 接头连接 | 1 cycle | 20℃ | 15 min |
| 结束 | 1 cycle | 4℃ | ∞ |

表1：连接接头建议浓度

| 片段DNA投入量 | 连接接头浓度(μM) |
|---|---|
| 10~100 ng | 2.0 |
| 1~10 ng | 0.2 |

**5．连接产物纯化**

• 提前将所需磁珠涡旋混匀后，在室温平衡至少 30 min；
• 建议在连接后 100 μL 体系内加入 80 μL(0.8×)磁珠（使用前需充分混匀），用移液器吸打混匀 10 次，室温孵育 5 min；
• 将 PCR 管置于磁力架上静置 5 min，小心移除上清液，枪头不要碰到磁珠；
• 将 PCR 管保持在磁力架上，加入 200 μL 现用现配 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 s 后小心移除上清液，枪头不要碰到磁珠；
• 重复 80% 乙醇漂洗步骤一次；
• 保持 PCR 管在磁力架上，使用 10 μL 移液器小心移除剩余的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留；
• 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 21 μL 无核酸酶水重悬磁珠，静置 5 min；
• 将 PCR 管置于磁力架上静置 3-5 min，吸取 20 μL 至一个新 PCR 管中，准备下一步实验；
• 如需进行两步片段分选，请参照 PCR 产物回收试剂盒（磁珠纯化）说明书进行。

**6．高保真 PCR富集**

• 使用无核酸酶的洁净 PCR 管，在冰浴上配制反应体系：

| 组分名称 | 1 个反应用量 |
|---|---|
| 2× Amplification Mix (J 管) | 25 μL |
| 纯化后连接产物 | 20 μL |
| Primer mix [b] | 5 μL |
| Total | 50 μL |

b: 请选择与测序平台适配的 Primer mix

• 密封 PCR 管并短暂离心，轻轻涡旋震荡，使试剂混匀后，再次短暂离心，避免产生气泡。

• 将 PCR 管从冰上转移到 PCR 扩增仪上，PCR 仪 105℃热盖，程序设置如下：

| 反应步骤 | 循环数 | 反应温度 | 反应时间 |
|---|---|---|---|
| 预变性 | 1 cycle | 98℃ | 45 sec |
| 退火延伸 | 6-17 cycles[c] | 98℃ | 15 sec |
| | | 60℃ | 30 sec |
| | | 72℃ | 30 sec |
| 循环外延伸 | 1 cycle | 72℃ | 60 sec |
| 结束 | 1 cycle | 4℃ | ∞ |

c: 建议文库循环数见表 2

表 2：建议文库扩增循环数

| DNA投入量 | 1μg 文库产出量建议循环数[d] |
|---|---|
| 100 ng | 6-7 |
| 50 ng | 7-9 |
| 10 ng | 9-11 |
| ＜5 ng | 11-17 |

d: FFPE 样本建议在此基础上增加 1~3 个循环数；如果在连接接头产物纯化时进行片段分选，建议在此基础上增加 1~2 个循环数。

**7．高保真 PCR富集产物纯化**

• 提前将所需磁珠涡旋混匀后，在室温平衡至少 30 min；

• 建议 PCR 富集体系 50uL 内加入 50uL（1x）磁珠（使用前需充分混匀），用移液器吸打混匀 10 次，室温孵育 5 min；

• 将 PCR 管置于磁力架上静置 5 min，小心移除上清液，枪头不要碰到磁珠；

• 将 PCR 管保持在磁力架上，加入 200 μL 现用现配 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 s 后小心移除上清液，枪头不要碰到磁珠；

• 重复 80%乙醇漂洗步骤一次；

• 保持 PCR 管在磁力架上，使用 10 μL 移液器小心移除剩余的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留；

• 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 31 μL 无核酸酶水重悬磁珠，静置 5 min；

• 将 PCR 管置于磁力架上静置 3 ~ 5 min，吸取 30 μL 至一个新 PCR 管；

• 将纯化后的文库保存在-20℃。