产品概述

AlNoVar™ Enzyme Library Prep Kit 酶学片段化建库试剂盒 V1 是一款兼容 Illumina、MGI 及铭毅智造高通量测序平台开发设计的基于酶切片段化的建库试剂盒。本试剂盒采用高质量片段化酶，摆脱了繁琐的超声过程，将 DNA 片段化、末端修复与加 A 合并为一步，大幅简化实验流程，减少建库时间。本产品对不同物种和不同投入量的 DNA 样本具有良好的兼容性，并通过体系优化，提高文库产量和测序准确性。

产品货号

MS2001-24、MS2001-96

试剂盒组成

管盖颜色	组分	装量		
		规格	货号	装量
红色	FERA Buffer	24T/盒	MS2001-24	240 μL
橙色	FERA Enzyme Mix			240 μL
蓝色	T4 Ligation Buffer			720 μL
白色	T4 DNA Ligase			72 μL
黄色	2×PCR Mix			600 μL
红色	FERA Buffer	96T/盒	MS2001-96	960 μL
橙色	FERA Enzyme Mix			960 μL
蓝色	T4 Ligation Buffer			1.44mL*2
白色	T4 DNA Ligase			288 μL
黄色	2×PCR Mix			1.2mL*2

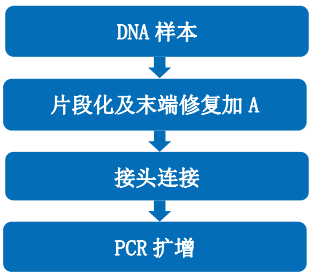
储存条件及有效期

-20±5℃保存。试剂盒在正确储存条件下有效期为 12 个月。

长途运输应采用干冰运输条件，或者冰袋结合干冰的形式。

产品特点

- 兼容性强，适用于不同起始量 1ng-1 μg 的样本建库
- 高质量片段化酶，可随机切割双链 DNA，酶切片段无偏好性
- 文库转化效率高，数据表现好
- 可应用于全基因测序、杂交捕获测序
- 自动化建库的首选



（图为 AlNoVar™ Enzyme Library Prep Kit 建库流程）

其他材料

(1) 自备试剂

名称	推荐产品	供应商
无水乙醇	市面主流产品	市面主流品牌
无酶水	市面主流产品	市面主流品牌
纯化磁珠	AlNoVar™ DNA Clean Beads 纯化磁珠	铭毅制造
片段分析	Agilent DNA 1000 Kit	Agilent
	S2 Cartridge (Standard Cartridge)	Bioptic
核酸定量	dsDNA HS Assay Kit for Qubit	翊圣
接头及引物	AlNoVar™ UDI Adapter Kit for Illumina 通用接头试剂盒	铭毅制造
	AlNoVar™ UDI Adapter Kit for MGI 通用接头试剂盒	

(2) 自备仪器

名称	推荐产品	供应商
96 孔磁力架	OSE-MF-03	天根
片段分析仪	Agilent 2100 Bioanalyzer system	Agilent
	Qsep 100	Bioptic
荧光计	Qubit ™ 4.0 Fluorometer	Thermo Fisher
	MGN-FX2	铭毅智造
涡旋振荡器	市面主流产品	市面主流品牌
微型离心机	市面主流产品	市面主流品牌
冰盒	市面主流产品	市面主流品牌
PCR 仪	市面主流产品	市面主流品牌

(3) 自备耗材

名称	推荐产品	供应商
0.5mL Qubit 管	Qubit® Assay Tubes	Thermo Fisher
0.2mL PCR 八排管	市面主流产品	市面主流品牌
1.5mL 离心管	市面主流产品	市面主流品牌
10μL 移液器吸头	市面主流产品	市面主流品牌
200μL 移液器吸头	市面主流产品	市面主流品牌
1000μL 移液器吸头	市面主流产品	市面主流品牌

注意事项

（1）DNA 样本及片段化

- 本试剂盒适用于血液、唾液、组织、FFPE 等样本形式提取的 gDNA。DNA 样本建议用 Qubit 或其他基于荧光法定量仪器对 Input DNA 定量。
- gDNA 投入量范围为 1ng-1μg，A260/A280 = 1.8-2.0，溶于 10mM Tris-HCl (PH=8.0)或去离子水中。
- DNA 提取时，不建议使用 Buffer EB、Buffer TE 或其他带有 EDTA 的试剂溶解 DNA，因为 EDTA 会对片段化酶造成影响，导致性能降低；建议用 DNA：磁珠=1:2 进行纯化。
- 酶切片段化对酶切时间控制，PCR 仪温度要求比较严格，实验中请严格遵守操作说明。片段大小孵育时间参考如下：

DNA 片段化时间推荐

Fragment Peak Size	孵育参考时间			
	150bp	200bp	300bp	300bp-500bp
200ng gDNA	30min	25min	15min	10min
200ng FFPE	20min	15min	10min	-

注：1）片段化时间建议实验室自行测试，可以在±5min 的范围内进行测试。

2）FFPE 由于降解程度的影响，导致不同样本间片段化时间有一定差异。

（2）文库扩增

文库扩增步骤需要严格控制 PCR 循环数。循环数不足，会导致文库产量低；循环数过高，会导致偏好性增加，扩增突变累积等问题。建议 PCR 循环数如下：

DNA 投入量	推荐扩增循环数
1μg	3-4
500ng	4-6
250ng	5-7
100ng	6-8
50ng	7-9
10ng	9-12
1ng	12-14

（3）样本交叉污染

- 注意避免核酸样品和产物之间的交叉污染，吸取不同的样本应更换枪头。
- 请使用无核酸酶的枪头、EP 管进行试验。
- 试验开始前，请清洁操作台，确保无核酸酶的污染。
- PCR 反应配置区和产物纯化区进行物理隔离，定时对各实验区域进行清洁。

（4）关于磁珠使用

- 磁珠纯化时，请先将磁珠从 4℃冰箱取出，混匀后室温平衡 30min 后使用。
- 磁珠漂洗时请使用新鲜配置的 80%乙醇，避免由于乙醇挥发影响使用效果。
- 产物洗脱前磁珠应充分干燥，干燥不充分导致乙醇残留可能会影响后续实验，干燥过度会导致磁珠开裂，降低回收效率。
- 连接体系含有高浓度的 PEG，不建议直接进行分选，推荐纯化之后进行分选。

（5）试剂使用

- 试剂组分避免反复冻融，使用前请将试剂盒各组分置于冰上融化。解冻后充分混匀，短暂离心后置于冰上待用，建议冰盒上配置反应体系。
- 实验中用到的 buffer、引物等试剂，建议采用涡旋或移液器吸打的方式混匀。酶建议上下颠倒混匀或移液器吸打混匀，避免剧烈振荡混匀。

（6）其他注意事项

- 试验前请仔细阅读说明书，根据说明书推荐温度保存产物。
- 推荐带热盖的 PCR 仪中进行各步骤反应，使用前预热至反应温度附近。

操作流程

1. 核酸片段化

1.1. 在 PCR 管中配置以下反应体系：

组分	体积
FERA Buffer	10μL
FERA Enzyme Mix	10μL
gDNA	XμL
无酶水	(40-X) μL
总体积	60μL

注意：片段化酶在 4℃会有微弱的酶切活性，因此请在冰盒上配制反应体系，并缩短片段化酶与 DNA 在 PCR 仪外面的接触时间。

1.2. 用移液器吹吸混匀（避免剧烈震荡混匀），瞬时离心。

1.3. 运行 PCR 仪，热盖打开（设置 95℃），反应程序如下：

温度	时间
32℃	25 min*
65℃	30min
4℃	HOLD

注：*根据实验室条件自行测试。片段化时间建议实验室自行测试。

1.4. 反应完成后，立即放在冰上，进行后续实验。（备注：此步骤不可暂停，请立即进行下一步。）

2. 接头连接

2.1. 准备反应体系：

组分	体积
上一步产物	60μL
T4 Ligation Buffer	30μL
T4 DNA Ligase	3μL
Truncated Adapter*	5μL
无酶水	2μL
总体积	100μL

注：“*”Truncated Adapter 浓度为 15μM，需要单独准备（铭毅智造 AlNoVar™ UDI Adapter Kit for Illumina 通用接头试剂盒/ AlNoVar™ UDI Adapter Kit for BGI 通用接头试剂盒）

2.2. 用移液器吹吸混匀，瞬时离心。

2.3. 运行 PCR 仪，热盖关闭。反应程序如下：

温度	时间
20℃	15min
4℃	HOLD

2.4. 结束后反应体系中加入 80μL 的纯化磁珠，吹打或涡旋混匀，室温孵育 5min。

2.5. 瞬时离心，置于磁力架上 5min 至完全澄清，小心移弃上清。

2.6. 保持 PCR 管在磁力架上，加入 180μL 80%乙醇，静置 30s 后移弃上清。重复步骤 1 次，总计 2 次。

2.7. 室温静置 5min，至乙醇挥发完全。

2.8. 移出 PCR 管，加入 22μL 的无酶水，充分混匀，室温静置 3min。

2.9. 将 PCR 管置于磁力架上，室温放置 2min，转移 20μL 上清液至新的 PCR 管，进行后续实验。

（备注：纯化后的连接产物可以暂时放置 4℃/-20℃保存 1-2 周。）

3. PCR 反应

3.1. 准备反应体系：

组分	体积
上一连接产物 DNA	20 μL
2×PCR Mix	25 μL
UDI Primer*	5 μL
总体积	50 μL

注：“*”UDI Primer 浓度为 10 μM，需要单独准备（铭毅智造 AlNoVar™ UDI Adapter Kit for Illumina 通用接头试剂盒/AlNoVar™ UDI Adapter Kit for BGI 通用接头试剂盒）

3.2. 用移液器吹吸混匀，瞬时离心。

3.3. 运行 PCR 仪，热盖打开（设置 105℃），反应程序如下：

温度	时间	循环数
98℃	2min	1
98℃	20s	3-12
60℃	30s	
72℃	30s	
72℃	5min	1
4℃	HOLD	

3.4. 结束后反应体系中加入 50 μL 的纯化磁珠，吹打或涡旋混匀，室温孵育 5min。

3.5. 瞬时离心，置于磁力架上 5min 至完全澄清，小心移弃上清。

3.6. 保持 PCR 管在磁力架上，加入 180 μL 80%乙醇，静置 30s 后移弃上清。重复步骤 1 次，总计 2 次。

3.7. 室温静置 5min，至乙醇挥发完全。

3.8. 移出 PCR 管，加入 52 μL 的无酶水，充分混匀，室温静置 3min。

3.9. 将 PCR 管置于磁力架上，室温放置 2min，转移 50 μL 上清液至新的 PCR 管，进行后续实验。

备注：纯化后的 PCR 产物可以暂存 4℃一周，如需长期保存，置于-20℃。

4. 文库质控

推荐使用 Qubit 进行文库定量质检。

推荐使用 Qsep100 进行文库片段分布质检。

历史版本

版本号	内容描述	日期
V1.0	原版	2024.07.25