
MGIEasy

MGIEasy Fast 酶切文库制备试剂套装 V2.0

FAQ

货号: 940-001193-00 (16 RXN, V2.0)

940-001194-00 (96 RXN, V2.0)

940-001196-00 (192 RXN, V2.0)

FAQ 版本号: 1.0

1. Fast 酶切文库制备试剂套装 V2.0 对于样品浓度和样本质量有什么要求?

答: Fast 酶切文库制备试剂套装 V2.0 要求起始 DNA 的完整度及纯度符合试剂盒说明书要求。通常要求 DNA 完整或轻微降解, 无明显蛋白质和 RNA 污染, $2.0 \geq OD_{260}/OD_{280} \geq 1.8$, $OD_{260}/OD_{230} \geq 1.7$ 。对于降解或者纯度不达标的 DNA 可尝试建库, 可能需重新摸索打断条件, 但仍存在打断效果不理想或文库产量低的风险; OD 值纯度不达标或存在明显蛋白污染的 DNA 样本, 推荐使用 1.8x~2x 磁珠纯化后进行文库构建; 对于有明显 RNA 污染的 DNA 样本, 需进行 RNA 消化处理后重新定量, 否则会导致 DNA 定量不准或打断效果不理想。投入 DNA 需要确保定量浓度准确, 推荐 Qubit® dsDNA HS Assay Kit 定量。

2. 客户手工建库的时候, 需要准备什么特殊的仪器设备吗?

答: 推荐使用 0.2 mL PCR 管适配的磁性较强的磁力架 (如: ALPAQUA, Part#A000400), 以达到最大的回收效率。

3. 影响酶切打断的因素有什么?

答: 酶切反应对于溶液的 pH 相对敏感, 溶解于 EB/TE/H₂O 的 gDNA 可以按照说明书进行反应, 其它 buffer 溶解的 DNA 请根据说明书推荐的打断条件进行调试, 缩短或延长打断时间。DNA 样本中若有蛋白质、RNA、酚类等杂质残留 (通过 DNA 凝胶电泳及 OD 值结果判断), 可能会影响酶切打断效果, 建议使用磁珠纯化、RNase 消化或酚氯仿重新提纯。当打断样本为长扩增子 DNA 时, 由于不同应用的扩增子片段长度、片段范围和 GC 含量等有差异, 建议以说明书推荐的打断时间为基础, 测试多个打断时间梯度, 摸索最佳打断时间。

4. 如何判断打断片段大小是合适的?

答: gDNA 投入 $\geq 100\text{ng}$ 的样品, 可以打断反应结束后取出 5 μL , 用 1x En-Beads 进行纯化, 用 5 μL TE 回溶, 通过 Agilent 2100 高敏芯片对打断纯化后产物进行片段分布检测, 片段范围为 100 ~ 2000 bp, 且主峰范围为 400 ~ 700 bp; 也可以对 PCR 纯化后产物进行片段分布检测。gDNA 投入 $< 100\text{ng}$ 的样品, 建议对 PCR 纯化后产物进行片段分布检测。PCR 纯化后产物: 磁珠单选文库的片段范围为 300 ~ 2000 bp, 且主峰范围为 500 ~ 750 bp, 磁珠双选文库的片段范围为 300 ~ 2000 bp, 且主峰范围为 450 ~ 550 bp。

5. 打断的样本或短扩增子 (<200bp), 能否用 MGIEasy Fast 酶切文库制备试剂套装建库?

答: 对于无需打断的样本, 我们推荐 MGIEasy 双端独立标签通用文库制备试剂套装 (货号: 1000022803、1000022804) 或 MGIEasy 通用 DNA 文库制备试剂套装 (货号: 1000006985、1000006986 或 1000017571)

6. 如果样本质量达不到要求, 是否可以建库?

答: 可以尝试风险建库, 建议客户根据实际情况调整打断参数、延长连接反应时间、增加 PCR 循环数, 第一次建库过程中增加质控点, 例如: 打断反应结束后取出 5-10 μL 进行磁珠纯化, 用 5 μL TE 回溶,

进行片段质检、浓度质检等，在接头连接纯化后浓度质检等。

7. 双选建库搭配 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒的最低 gDNA 起始量是多少？

答：优先推荐 500 ng，可尝试降低至 200 ng，建议增加 1~2 个 PCR 循环数。

8. Fast FS Enzyme II 是否能进行涡旋混匀？

答：不能。请按说明书进行轻弹底部混匀 10 次以上，轻弹时管底无试剂残留，瞬时离心后置于冰上备用。若不小心对 Fast FS Enzyme II 进行了涡旋，涡旋次数应控制在 3 次以内，若多次反复涡旋混匀后，请进行重新验证测试后再使用。

9. 配制好的接头连接反应液可放置多久？

答：配好的接头连接反应液可放在冰上备用，并于 30 min 内使用。使用前请确认反应液颜色正常，若配制好的接头连接反应混合液颜色变深（由浅黄色变成棕色或者棕褐色后）不能继续使用，请重新配制。

10. 接头使用有哪些注意事项？

答：1) 只能使用说明书推荐货号对应的接头试剂盒。

2) 接头试剂盒使用前需充分混匀和离心。

3) 根据建库起始量需对接头进行稀释，稀释倍数参考说明书。

4) 推荐使用 TE 对接头进行稀释，稀释后的接头不建议长时间保存，推荐现配现用。

11. 配制连接接头反应体系时，能否将接头和连接 mix 先混合，再加入样本里？或者先将连接 mix 加入样本，再加入接头？

答：不可以。这两种操作会导致接头自连或者样本自连的比例增高，接头和样本连接的比例降低，导致正确连接文库的产量变低，对文库浓度或测序质量有不良的影响。操作时务必先将接头加入样本，然后再加入连接 mix。

12. PCR 产物里有引物二聚体，如何解决？

答：PCR 产物中有引物二聚体，可能会造成测序数据中的引物数据增加，降低可使用测序 reads 数，也可能导致文库串扰率增加。解决办法：1) gDNA 投入量为 1~25 ng 时，按照说明书对接头进行稀释；2) 配置接头反应时，务必先将接头加入样本，然后再加入连接 mix；3) 确保接头连接产物纯化时，加入 22 μ L En-TE 后再用磁珠进行纯化；4) 用 0.7x En-Beads 对产物进行二次纯化。

13. 为什么要使用 Elute Enhancer，如未使用会有什么后果？

答：Elute Enhancer 可以减少在纯化过程中的 DNA 损失，提高纯化效率。若在纯化过程中未使用 Elute Enhancer 可能会造成文库产量偏低。

14. **Ligation Enhancer 是一个室温放置的试剂，把它冻-20℃了会有什么影响？**

答：推荐使用者收到第一次使用后即放置于室温，并注意避光保存。1-2 次的冻融的文库产量无明显影响，多次冻融会造成文库产量偏低。若出现颗粒状物质析出现象，需停止使用该试剂。

15. **建库纯化过程中，是否有其他品牌磁珠推荐？**

答：目前只推荐试剂盒套装中的磁珠。其他品牌磁珠需客户自行测试验证。替代测试过程中需注意文库片段大小以及分布范围以及文库产量需和对照组一致。

16. **建库过程中，在打断产物纯化时，使用 80%乙醇清洗，会怎样？**

答：除产量略偏低外，无其他影响，仍可继续进行后续建库操作。

17. **建库过程是否有暂存点？每个暂存点的产物可保持时间是多久？单链环文库在测序前是否可以保存？如何保存？可以保存多久？是否可以运输等？**

答：连接反应纯化和 PCR 产物纯化之后可做为暂存点，纯化的连接产物在-20℃可至少保存 6 个月。单链环文库测序前-20℃可至少保存 3 个月。可以使用干冰运输。

18. **gDNA 投入为 1~25 ng 建库时，忘记对接头进行稀释使用，会产生什么影响？**

答：建库产量无明显差异，但可能存在引物二聚体，可能会造成测序数据中的引物数据增加，降低可使用测序 reads 数，也可能导致文库串扰率增加。解决方法：用 0.7x En-Beads 对产物进行二次纯化。

19. **PCR 产物浓度特别高(>100ng/ul)怎么办？正常吗？可以往下建库吗？**

答：PCR 产物浓度一般为 10 ~ 50 ng/ul，当浓度特别高时，1) 重测浓度；2) 使用 2100 等检测片段，若片段符合预期，可以继续进行建库。

20. **Pooling 测序推荐哪一步进行 pooling 操作？**

答：推荐在“PCR 产物质检”、“消化产物质检”或 DNB 质检之后进行 pooling 操作。

21. **DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0 (OS-DB)和 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒使用场景和区别？**

答：V2.0 基于 V1.0 进行了组分优化，对高 GC 区域覆盖更友好。基于此，二者场景推荐应用如下：

- 1) 根据测序平台或者已有应用推荐的一步法 DNB 制备试剂盒版本，进行选择使用。
- 2) 若是新应用或者 WGS 测序，优先推荐 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0 (OS-DB)

22. **如果 DNB 制备体系减半，文库投入量是否应该对应减半？**

答：是的。