
MGI Easy

MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备试剂

套装 V2.0 FAQ

货号：940-000886-00 (16 RXN, V2.0)

940-000884-00 (96 RXN, V2.0)

940-000882-00 (384 RXN, V2.0)

FAQ 版本号：1.0

1. Fast PCR-FREE 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 PCR-FREE 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, $2.0 \geq OD_{260}/OD_{280} \geq 1.8$, $OD_{260}/OD_{230} \geq 1.7$ 。对于中度降解或者纯度不达标的 DNA 可尝试建库, 但存在打断效果不理想或文库产量低的风险。对于中度降解的 DNA, 建议重新摸索打断条件; 对于高度降解的 DNA, 可尝试进行测试; 对于 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, DNA 的浓度建议控制在 50~100ng/ul 范围, 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. MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备模块 V2.0 对于样品溶解 buffer 有无特殊什么要求?

答: 酶切反应对于溶液的 pH 相对敏感, 溶解于 AE/EB/TE/H₂O 的 gDNA 可以按照说明书进行反应, 其它 buffer 溶解的 DNA 以 pH 值在 8.0 时, 打断时间 8.5 min 为基础, 缩短或延长打断时间。优先推荐打断时间范围为 7.5 min~15 min。

4. 影响酶切打断的因素有什么?

答: DNA 溶解 buffer 中 pH 值会影响酶切打断效果, 请根据 pH 值在 8.0 时的推荐打断条件进行调试。DNA 样本中若有蛋白质、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, 推荐以打断时间 8.5 min 为基础设置多个打断时间梯度, 测试摸索最佳打断时间。

5. 如何判断打断片段大小是合适的?

答: 初次进行 DNA 打断条件摸索时, 建议参考说明书中注意事项, 取 10 μ L 3.2.2 步骤 7 的酶切打断产物, 然后加入 8 μ L (0.8x) En-Beads 后进行磁珠纯化, 并用 8 μ L En-TE 溶解。取 1 μ L (约 2ng~8ng) 进行 Agilent 2100 高敏芯片质检, 片段大小集中在 200 bp~3000 bp, 主峰在 600 bp~850 bp 为合适, 大片段 (1000 bp ~ 3000 bp) 占比应小于 8%。

6. 能否获得更长或者更短插入片段的文库? 对结果有什么影响?

答: 可以通过调整打断反应的时间获得更长或更短的插入片段, 打断时间越长, 打断产物主峰越小, 如图 1 所示。但需注意用于 DNB 制备的连接产物文库或者单链环化文库投入量 (根据说明书 4.1.4 所述公式计

算结果) 进行调整。最终调整投入量标准为, 在该投入量时, 其对用 DNB 浓度为 10~15 ng/ μ L 合格。

片段变长: 需缩短打断时间和调整双选磁珠用量, 其它建库操作可参照说明书, 但需注意片段变长之后, 测序下机 reads 数会降低, 需根据实测结果调整混合测序的文库个数。

片段变短: 打断时间和纯化磁珠用量需要增加, 增加磁珠的比例会存在接头二聚体残留的风险, 导致一链 Unfilter Q30 曲线抖动以及测序下机 reads 数降低, 建议用少量样本先进行建库和测序测试。不建议使用打断后最小片段 < 120 bp 的 DNA 打断产物进行建库, 难以摸索出合适的磁珠比例实现既能目的片段回收率理想又能将残留接头去除干净。

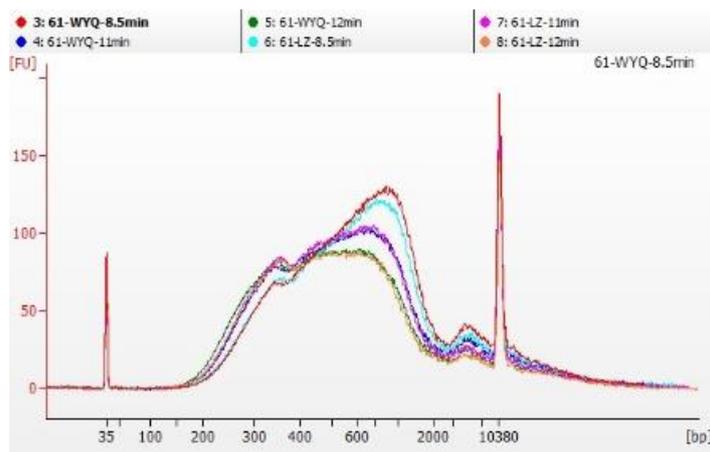


图1 200 ng 起始不同人不同打断时间 0.8x 磁珠纯化后的打断产物 Agilent 2100 片段分布图

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 300 ng。

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表 23 UDB PF Adapter 使用量。

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 DNB 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. 连接完成之后为什么要添加 En-TE，如果忘记加了会怎样？

答：En-TE 的添加可以在保证纯化效率的前提下，减少磁珠纯化时的小片段残余，从而减少体系中接头的残余。如果忘记添加 En-TE，可能会造成测序数据中的接头数据增加，降低可使用测序 reads 数，也可能导致文库串扰率增加。对于该问题，若纯化后连接产物产量足够（连接产物浓度大于 1.5 ng/ μ L），我们推荐使用 0.7x En-Beads 将连接产物进行二次纯化。详细操作方法参考 H-940-000883-00-00_MGIEasy_Fast_PCR-FREE 酶切文库制备试剂套装使用说明书 5.1.4 连接产物纯化 2。

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，在打断产物纯化或连接产物纯化时，每次都使用 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. 建库过程中，连接产物第二次纯化时忘记使用 80%乙醇清洗，会怎样？

答：文库纯度下降，长期保存，质量会进一步下降，导致测序下机 reads 数和 Q30 结果偏低，生信分析指标中接头比例残留偏多，Clean data rate 偏低，文库串扰率增加。若在纯化结束时，发现该问题，可使用 0.7x En-Beads 将连接产物进行二次纯化。操作方法参考 H-940-000883-00-00_MGIEasy_Fast_PCR-FREE 酶切文库制备试剂套装使用说明书 5.1.4 连接产物纯化 2。若长期保存后，发现该问题，建议重新构建文库。

18. 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：连接反应纯化步骤之后可做为暂存点，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。

19. 若用琼脂糖胶进行连接产物文库片段检测，琼脂糖胶需用什么浓度范围，文库上样量需要多少，文库分布范围是什么样的？

答：琼脂糖凝胶浓度 2%，每个文库上样量约 20 ng。结果如图 2 所示：

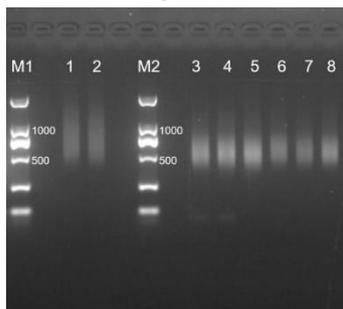


图 2 2%琼脂糖凝胶电泳检测连接产物文库条带分布图

M1, M2: D2000 ladder

1, 2: 200ng 起始单选建库，连接产物条带分布情况。

3-4: 900ng 起始双选建库，连接产物条带分布情况。

5-8: 500ng 起始双选建库，连接产物条带分布情况。

20. 不同起始量建库时（25~500 ng），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，但连接产物文库中接头污染风险提高。后续可能会影响测序质量，比如碱基分布图。解决方法为将连接产物文库进行二次纯化。操作方法参考 H-940-000883-00-00_MGIEasy_Fast_PCR-FREE 酶切文库制备试剂套装使用说明书 5.1.4 连接产物纯化 2。

21. 搭配 WGS 应用测试中，DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒进行测序，测序下机报告中碱基分布异常，有抖动现象，是什么问题？如何确认文库中是否有接头残留？

答：1) 碱基分布抖动（如图 3 左图所示），是文库中有较多接头残留引起的。解决方法为使用 0.7x En-Beads 将连接产物进行二次纯化。操作方法参考 H-940-000883-00-00_MGIEasy_Fast_PCR-FREE 酶切文库制备试剂套装使用说明书 5.1.4 连接产物纯化 2。

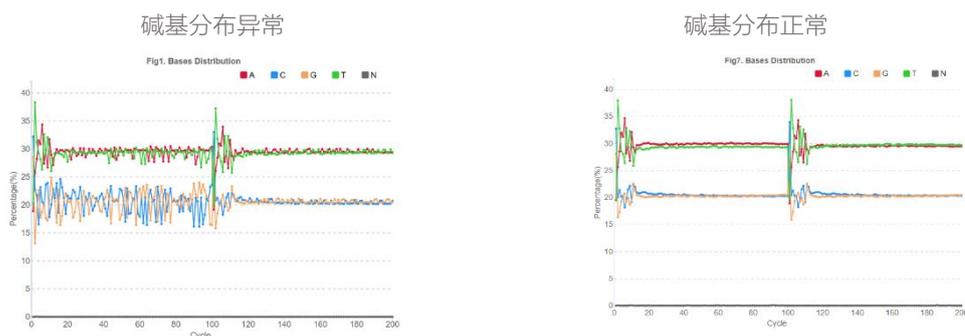


图3 DNBSEQ-T7 PE100 测序下机报告碱基分布异常及正常示意图

2) 取约 5 ng 连接产物文库进行 Agilent 2100 高敏芯片质检时, 2100 峰形图上会有明显的基线下沉或者凸出的小峰 (如图 4 左图所示)。注: 因受接头构型影响, 质检结果只能确认是否有接头残留, 不能准确判定文库插入片段大小。

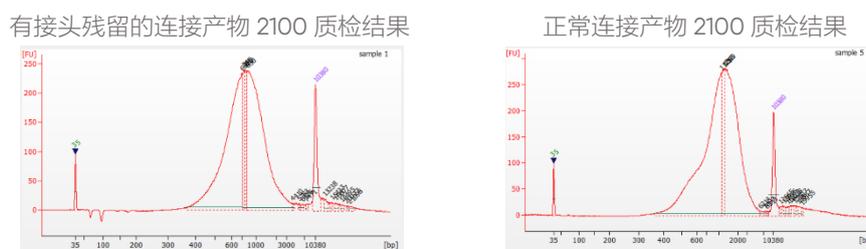


图4 连接产物文库 Agilent 2100 片段分布异常及正常示意图

22. 打断产物采用不同磁珠纯化方法 (磁珠双选和磁珠单选) 时, 对测序质量会有什么影响?

答: 单选文库的插入片段较双选片选文库弥散, 下机测序 Q30 和有效 reads 数会偏低, Unfilter Q30 二连抬升不明显或者不抬 (如图 5 右图所示)。

以 T7 PE100 测序为例: 双选文库 pooling 测序后下机 reads 数基本在 5000M 以上, 且 Unfilter Q30 二连正常抬升 (如图 5 左图所示)。单选文库根据 pooling 文库差异 (如不同建库起始量, 不同样本类型进行 pooling 测试时) 下机 reads 数会在 4500M~5100M 之间波动。

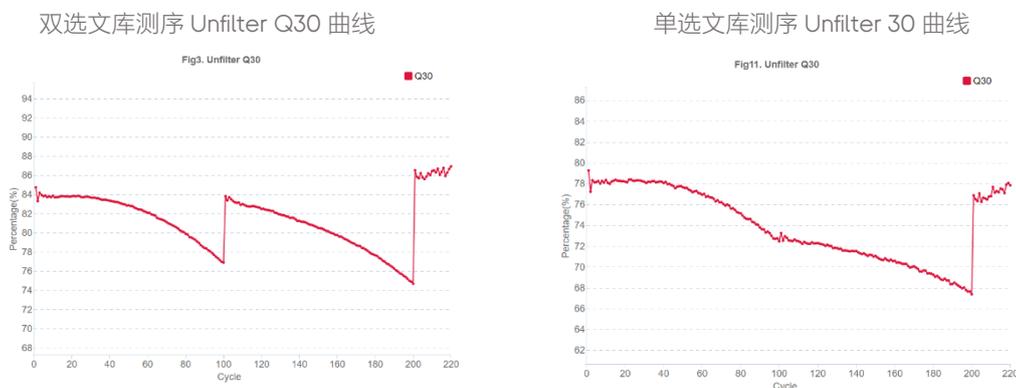


图5 DNBSEQ-T7 PE100+10+10 (E1 系列芯片) 双选文库和单选文库测序 Unfilter Q30 曲线分布示意图

23. 如何提高 pooling 均一性?

答: 384 个 barcode 经过精心挑选, 即使在不定量的情况下, 进行连接产物等体积 pooling, 也能够获得较好的拆分率和拆分均一性。下图为 384 个连接产物等体积 pooling 后的拆分结果 (样本来源: 56 个不同人血液 gDNA, 65 个不同人唾液 gDNA 和 18 个 NA12878), 整张芯片 Barcode CV 为 20.53%。但客户样本建库时可能会受样本间质量差异、定量偏差等影响, 导致拆分均一性波动。推荐以下方法以提高均一性:

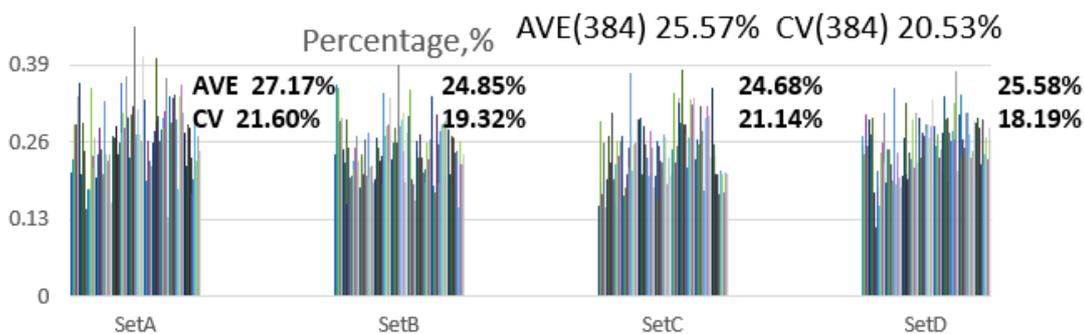


图 6 双 barcode Set A-D 连接产物文库上机 DNBSEQ-T7 PE100+10+10 (E1 系列芯片, 一步法 DNB 制备) 的单个 barcode 拆分率及 barcode CV 示意图

- 1) 将相同样本类型、相同起始量、相同建库条件的样本进行 pooling 测序;
- 2) 搭配 MGIEasy 双 barcode 环化试剂盒的样本, 选择在步骤 4.1.4 “消化产物质检”后, 取等质量 pooling, 均一性通常会好于在步骤 3.6 “连接产物质检”后 pooling;
- 3) 搭配 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0 或 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒的样本, 选择在 DNB 定量后等质量 pooling, 均一性通常会好于在步骤 3.6 “连接产物质检”后 pooling;
- 4) 不同样本类型或者不同起始量的样本进行 pooling, 均一性通常较差, 推荐在参照以上建议 2) 和 3), 或者在步骤 “连接产物纯化 2” 后取等质量 pooling, 可能提高 pooling 均一性。

24. 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)

25. 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。