

---

# MGI Easy

## 酶切 PCR-Free DNA 文库制备套装 FAQ

---

货号：1000013454 (16 RXN), 1000013455 (96 RXN)

试剂盒版本号：V1.2 (16 RXN), V1.3 (96 RXN)

FAQ 版本号：A1

### 1, 酶切 PCR-Free 建库试剂盒对于样品浓度和样本质量有什么要求?

答: 酶切 PCR-Free 建库试剂盒要求投入打断的 DNA 的完整度及纯度要相对较好, DNA 完整或轻微降解,  $2.0 \geq OD_{260}/OD_{280} \geq 1.8$ ,  $OD_{260}/OD_{230} \geq 1.7$ 。对于降解或者纯度不达标的 gDNA 可以尝试建库, 但文库产量会存在风险。对纯度不达标的样本 DNA 推荐使用 2 倍体积的磁珠纯化后进行文库构建。投入 DNA 需要确保定量浓度准确, 手工建库最高起始量不得超过 1000ng, 自动化建库最高起始量不得超过 900ng。

### 2, 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 管适用的磁性较强的磁力架 (如: ALPAQUA, Part#A000400), 以达到更好的回收效果。

### 3, 酶切 PCR-Free 建库试剂盒对于样品溶解 buffer 有无特殊什么要求?

答: 由于 DNA 溶解 buffer 的成分和 pH 会影响 FS Enzyme Mix II 的反应时效, 我们推荐使用 1x TE buffer (PH8.0) 或 H<sub>2</sub>O 进行 DNA 溶解, 若 DNA 溶解 buffer 为 AE buffer (PH 8.5), 10 mM Tris (PH6.8-8.0) 或 0.1xTE (PH8.0), 请参考说明书中 3.2 的打断方案进行小试测试; 若 DNA 为其他特殊 buffer 溶解, 请先做小试。我们建议使用 pH7.0-8.5 的 DNA 溶解 buffer 进行测试。以 pH8.0 打断时间 11 min 为基础, 随着 pH 的降低而减少打断时间, 增加而延长打断时间。如若结果不合适, 请重新纯化样本 gDNA, 并用 1x TE buffer (PH 8.0) 溶解。

### 4, 影响酶切打断的因素有什么?

答: DNA 溶解 buffer 中 pH 含量会影响酶切打断效果, 请根据说明书中 pH8.0 的推荐打断条件进行调试。此外, DNA 样本中若有蛋白质、酚类等杂质残留, 可能会影响酶切打断效果, 如样品杂质过多, 请使用磁珠纯化或酚氯仿提纯。

### 5, 如何判断打断片段大小是合适的?

答: 我们推荐在打断反应完成加入 20  $\mu$ L En-TE 后, 取出 5  $\mu$ L 反应产物, 加入 10  $\mu$ L En-Beads 进行纯化后, 进行 Agilent2100 片段测试, 如果主要片段分布在 300-800 bp 范围内 (峰型详见说明书中所示) 即为合适, 以推荐条件进行片段选择 (两步磁珠纯化), 测序完成后数据分析显示的 insert 主峰约为 380 bp, 若为一步磁珠纯化, 测序完成后数据分析显示的 insert 主峰约为 320 bp。

### 6, 酶切 PCR-Free 建库试剂盒对于片选后产物样品浓度有什么要求?

答: 以 1000 ng gDNA 进行文库构建, 一般片选产物浓度大于 3 ng/ $\mu$ L, 总量大于 120 ng。若片选产物浓度在 1.5-3 ng/ $\mu$ L 范围, 总量大于 60 ng 可进行风险建库, 但文库产量会受到一定影响。末端修复前投入的打断纯化 DNA 的总量需要严格控制在 80-200ng 范围。

### 7, 在 MGISP-960 上进行酶切 PCR-Free 自动化建库, 对投入量有何要求?

答: MGISP-960 上有两个酶切 PCR-Free 建库脚本: 分别对应打断后的片段选择流程( 两步磁珠纯化 )( JB-A09-102 脚本 )和纯化流程( 一步磁珠纯化 )( JB-A09-104 脚本 )。使用片段选择流程( JB-A09-102 脚本 )时, gDNA 投入量为 900 ng/48  $\mu$  L, 以保证较高的成功率。使用纯化流程( JB-A09-104 脚本 ), 推荐使用 320 ng/48  $\mu$  L 进行文库投入, 能得到较好的建库成功率。

#### **8, 在 MGISP-960 上运行酶切 PCR-Free 建库时, 文库如何质检?**

答: MGISP-960 上有两个酶切 PCR-Free 建库脚本: JB-A09-102 脚本( 对应打断后的片段选择流程( 两步磁珠纯化 ))和 JB-A09-104 脚本( 对应打断后的纯化流程( 一步磁珠纯化 ))。针对不同建库脚本, 请按照各脚本对应说明书中的对应说明操作进行文库质检。质检需要另外手工操作。

对 JB-A09-102 脚本, 按照说明书要求, 在打断之后, 屏幕出现弹窗提示, 取出对应的深孔板, 将深孔板放置在 96 孔磁力架上 取 1ul 上清进行 qubit 定量, 并取 1ul 上清, 使用 agilent 2100 进行片段大小检测。

对 JB-A09-104 脚本, 在阶段 1( 打断纯化 )完成后, 请按说明书要求进行质检。

#### **9, 酶切 PCR-Free 建库的质检中间产物可以丢弃吗?**

答: 当文库构建成功甚至测序成功, 无明显需要进行重复质检的时候即可丢弃质检中间产物。

#### **10, 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。

#### **11, 建库过程中是否有建库操作安全中止节点? 每个安全中止节点产物可保存多久? 单链环文库是否可以运输等?**

答: 具体安全中止点详见说明书。建库过程中的每次纯化步骤之后可做为安全暂存点, 纯化的 DNA 中间产物在-20 $^{\circ}$ C可至少保存 6 个月。最终的单链环文库在-20 $^{\circ}$ C可至少保存 3 个月。单链环文库可以使用干冰运输。

#### **12, 说明书内对 PCR 仪热盖温度有明确要求, 如果 PCR 仪的热盖不可调节怎么办?**

答: 在热盖只能保持在 105 $^{\circ}$ C的情况下, 我们推荐在 25 $^{\circ}$ C及以下反应温度时, 不盖或不扣紧 PCR 仪的热盖, 其他温度条件可使用 105 $^{\circ}$ C热盖。

#### **13, 可否使用 MGIEasy DNA Adapters 试剂盒里接头代替?**

答: 不可以, 若使用 MGIEasy DNA Adapters, 将导致建库失败。

#### **14, Ligation Enhancer 是一个室温放置的试剂, 但其为-20 $^{\circ}$ C运输, 使用时将其错误的放置到-20 $^{\circ}$ C保存, 会有什么影响?**

答：-20℃运输对其功能并无影响。推荐收到后取出放置室温，或在第一次使用后即放置于室温，并注意避光保存。2-3次的反复冻融对文库产量无明显影响，但多次冻融可能会造成文库产量偏低。若出现颗粒状物质析出，需停止使用该试剂。

#### **15, Ad-Lig Buffer 很粘稠，如何保证 Buffer 是均匀的？**

答：Ad-Lig Buffer 从冰箱取出室温溶解后，请务必在涡旋仪上混匀 6 次以上，每次 6 秒以上，保证液体充分振荡混匀。也可盖紧管盖，颠倒进行涡旋，保证试剂均匀。在加入 DNA 样品后，若反应液仍然较粘稠，请务必在涡旋仪上混匀 6 次以上，每次 6 秒以上，保证液体充分震荡混匀，保证整个连接体系是均匀的浅黄色，可在白色背景下观察整体体系颜色的均匀度。此步骤是否混匀关系到后续产量。

#### **16, 为什么需要 75 fmol 的单链环进行测序，如果投入过少会如何？**

答：75 fmol 是优化测试得到的 PCR-free 单链环上机测序相对最佳投入量，如果投入过少，会导致测序质量差和下机 reads 数偏少的问题。

#### **17, MGIEasy 酶切 PCR Free DNA 文库制备试剂盒和 MGIEasy PCR Free DNA 文库制备试剂盒的差别是什么？**

答：与 PCR Free DNA 文库制备试剂盒 DNA 相比，酶切 PCR Free DNA 文库制备试剂盒还包含打断酶及配套打断缓冲液的试剂，适用于无打断仪的实验室和/或基因组 DNA 起始的自动化建库。

#### **18, 做 pooling 测序推荐哪一步进行 pooling 操作？**

答：推荐在“酶切消化产物质检”这步之后进行 pooling 操作。不推荐在“连接产物纯化”这步之后进行 pooling 操作，以避免未纯化干净的少量接头残留物参与下一步反应，造成样本间的轻微污染。若在“连接产物纯化”这步之后进行 pooling 操作，需要 pooling 之后用 0.8x En-Beads 再纯化一次。

#### **19, 新版本试剂盒对测序质量是否有影响？**

答：升级至新版本后，如果发生了测序前 1-2bp unfilter Q30 有所下降，而后又回升的现象的话，是正常的现象。该现象是由于前两个 bp 测序时，测序信号仍处在抬升阶段导致，对后续的数据分析没有影响。