DNA 特征识别组合产品 (DNBSEQ-G99RS&DNBSEQ-G99ARS) 快速操作指南 华大智造 『GIGI

|--|

概述			推荐耗材清单				
话配试剂含/试剂套装			名称	DNA 样本所需数量	血卡样本所需数量	货号	品牌
			250 µL 带滤芯自 动化吸头	1盒	1盒	100000723	
ろ称 MGIFasy 个体识别文库制备试剂盒(48 RXN)	货号	品牌	1.3 mL 96 孔圆形 孔 U 型底深孔板	1块	1块	1000004644	_
		-	0.2 mL 96 孔全裙 边 PCR 板	1块	1块	091-000165-00	_
MGIEasy 个体识别文库制备试剂盒(576 RXN)	940-001338-00	MGI -	可掰开 PCR 八联管	3 条 × 8 (样本量 ≤8)	2条 × 8 (样本量 ≤ 8)	100 000010 00	MGI
DNBSEQ-G99RS 高通量测序试剂套装(G99 SM FCL SE400)	940-000417-00		及管盖	6条 × 8 (样本量 >8)	4 条 × 8 (样本量 > 8)	100-000016-00	
			0.5 mL 冻存管, PCR 级	2个	2个	1000001558	_
			2 mL 冻存管, PCR 级	2个	2个	1000001553	-

华大智造 DNA 特征识别组合产品(DNBSEQ-G99RS&DNBSEQ-G99ARS) 図 G 快速操作指南



适配仪器/软件

• 组合产品方案一

仪器 / 软件型号	货号	品牌
MGISP-100RS	900-000070-00	
MGIDL-G99RS	510-003112-00	MGI
DNBSEQ-G99ARS	900-000560-00	
DNA 特征识别软件	970-000139-00(搭配生信分析服务器使用)	_

• 组合产品方案二

货号	品牌
900-000070-00	
510-003112-00	MCI
900-000561-00	
900-000441-00	
	<u>货</u> 号 900-00070-00 510-003112-00 900-000561-00 900-000441-00

个体识别建库

准备样本

MGISP-100RS支持1~16个基因组DNA样本或血卡样本的建库,根据样本类型执行以下其中一种操作准备样本:

 基因组DNA样本:稀释待测样本,推荐浓度范围为0.15 ng/μL~1.5 ng/μL。每 个样本分别取10 μL转移至可掰开PCR八联管中。

γ 提示

- 样本数量小于等于8时,需1条可掰开PCR八联管。
- 样本数量大于等于9时,需2条可掰开PCR八联管。
- 血卡样本:将直径1mm~1.2mm的血卡按顺序加入到Pos3的PCR板中,加样时确保血卡始终在孔位底部。若环境较干燥,先添加1µLTE缓冲液到对应孔位中。
 提示
 - 样本数量小于等于 8 时,依次加入孔位 3A~3H。
 - 样本数量不大于等于 9 时,依次加入孔位 3A~3H 和 4A~4H。

准备试剂

- 1. 提前 30 分钟取出 DNA Clean Beads, 置于室温平衡。
- 2. 从 MGIEasy 个体识别文库制备试剂盒中取出 PCR Primer Pool、PCR Block、 PCR Enzyme Mix、PCR Dual Barcode Primer、Clean Buffer、TE 缓冲液, 解冻后,混匀离心,置于冰上待用。
- **3.** 按下表取出相应规格的耗材,根据试剂分类在耗材上做好标记,用带滤芯吸头配制 好试剂。混匀离心,置于冰上待用。

试剂分类	试剂名称	自动化试剂体积	耗材规格
第一於 PCP 反应流 Mix	PCR Primer Pool	6 µL×(样本数 +2)	
第 [−] 北 FCR 反应/仪 IVIIX	PCR Enzyme Mix	12.5 µL ×(样本数 +2)	- 0.3 IIIL 凉什官
	PCR Block	3.6 µL × (样本数 +2)	
第二轮 PCR 反应液 Mix	PCR Enzyme Mix	15 µL ×(样本数 +2)	0.5 mL 冻存管
	TE 缓冲液	6.6 µL × (样本数 +2)	-
DNA Clean Beads	DNA Clean Beads	46 µL × (样本数 +3)	2 mL 冻存管
		样本数量<7	
TE 缓冲液	TE 缓冲液	80 µL × (样本数 +2)	2 mL 冻存管
		样本数量 ≥7:720 µL	

华大智造 DNA 特征识别组合产品 (DNBSEQ-G99RS&DNBSEQ-G99ARS) 「「」」 快速操作指南



- 4. 参照 MGIEasy 个体识别文库制备试剂盒使用说明书中"附录 B 关于 PCR Dual Barcode Primer 的使用",分别吸取 2.4 µL/样本的 PCR Dual Barcode Primer F 和 2.4 µL/样本的 PCR Dual Barcode Primer R,依次加入位于孔位 A~H 的八联管中(或直接加入4.8 µL PCR Dual Barcode Primer Mix),盖上 管盖。做好标记及记录,混匀离心,置于冰上备用。
- 5. 使用 Milli-Q 水配制 25 mL 80% 乙醇。

😧 提示

80%乙醇现配现用。

- 6. 取一个深孔板,并执行如下操作:
 - 对于 DNA 样本,根据样本数量依次在孔位 7A-7H、8A-8H 添加 80% 乙醇, 每孔添加 550 uL。
 - 对于血卡样本,根据样本数量依次在孔位 7A-7H、8A-8H 添加 80% 乙醇,每 孔添加 550 uL,并依次在孔位 9A~9H、10A~10H 添加 Clean Buffer,每孔 添加 145 µL。
- 7. 使用涡旋仪充分混匀 DNA Clean Beads,并短暂离心。
- ♀ 提示

放置耗材前,确保所有试管底部无气泡,侧壁无挂液,且所有管盖均已打开。

8. 根据下图放置耗材。

DNA 样本



Clean Buffer: 145 μ L/孔, lane 9 & lane 10

华大智造 DNA 特征识别组合产品(DNBSEQ-G99RS&DNBSEQ-G99ARS) 「別C」 快速操作指南

个体识别建库



概述



测序与分析

在MGISP-100RS上建库

- 1. 在MGISP-100RS 运行向导界面,设置【应用方案】为【JB-A06-067 MGIEasy Signature Identification Library Prep Kit_RV2.1_SV3.0】。
- 2. 根据样本设置对应的脚本:
 - DNA样本:【1.Library preparation DNA.py】
 - 血卡样本: 【2.Library preparation Card.py】
- 😧 提示

使用前,请确保自动化脚本与 PCR 程序已成功导入,再运行相应脚本。具体操作,参考相关产品说明书。

- 3. 运行前确保所有位置放置正确的耗材和试剂,确保所有的冻存管和 PCR 管的管盖都已打开后,关闭视窗。
- 4. 点击【运行】,出现Sample_Num弹窗,按需选择样本数量。
- 5. 点击【继续】,出现PCR_CycleNum弹窗,按需选择PCR循环数方案,点击【继续】。自动化建库正式开始。

若为血卡样本建库,流程运行**20~25**分钟后出现提示弹窗,请按照弹窗提示添加标准品,完成后点击【继续】。

- - 若样本起始量较低,可适当增加循环数。
 - 整个流程预计运行 3~4 小时。运行过程中,可根据需要暂停或恢复实验。
- 6. 流程完成后,按照弹窗提示取出 Pos1 位置的第二轮 PCR 产物,每管体积为 21 μL,用8联管盖盖住PCR管。
- 7. 使用双链DNA定量试剂对第二轮PCR产物进行定量,要求最终PCR产物浓度不低于4 ng/µL。
- 停止点
 - 第二轮PCR产物可置于-20 ℃冰箱储存。

- 8. 处理废弃的样本管、不重复使用的试剂管、深孔板、废料袋,投放至指定废品区域。
- 9. 如当天不再进行实验,使用纯水和75%乙醇清理仪器台面,并运行后期清洁流程。具体操作,请参考*MGISP-100RS 自动化样本制备系统产品说明书*。

DNB制备

环化

1. 将第二轮 PCR 产物等质量混合至 500 ng 后移至新的 0.2 mL PCR 管中,用 TE 缓冲液补充至总体积 48 μL,按下表条件进行变性反应:

温度	时间
105 ℃(热盖)	On
95 ℃	5 min

2. 反应结束后, 立即将 PCR 管转移到冰上, 静置 3 分钟后瞬时离心, 加入如下试剂:

组分	体积(µL)
T Buffer	6
S Enzyme	1
总体积	7

华大智造 DNA 特征识别组合产品 (DNBSEQ-G99RS&DNBSEQ-G99ARS) 「別 **C**」 快速操作指南

概述	个体识别建库	DNB制备	测序与分析

3. 涡旋振荡 **3** 次,每次 **3** 秒,瞬时离心将酶切消化产物收集至管底后,按下表条件进行环化预处理反应:

温度	时间
45 ℃(热盖)	On
37 °C	10 min
4 ℃	Hold

4. 反应结束后,瞬时离心,将 PCR 管转移到冰上,立即加入如下试剂:

组分	体积(µL)
Splint Buffer	5.6
DNA Rapid Ligase	0.5
总体积	6.1

5. 涡旋振荡 3 次,每次 3 秒,瞬时离心将反应液收集至管底后,按下表条件进行单 链环化反应:

温度	时间
45 ℃(热盖)	On
37 °C	30 min
4 ℃	Hold

6. 反应结束后,将 PCR 管瞬时离心并置于冰上,立即进行下一步反应。

酶切消化

1. 单链环化反应结束后,在 PCR 管中加入如下试剂:

组分	体积(µL)
Digestion Buffer	1.4
Digestion Enzyme	2.6
总体积	4

2. 涡旋振荡 3 次,每次 3 秒,瞬时离心将反应液收集至管底后,按下表条件进行酶 切消化反应:

温度	时间	
45 ℃ (热盖)	On	
37 °C	30 min	

- 3. 反应结束后向 PCR 管中加入 7.5 µL Digestion Stop Buffer。涡旋振荡 3 次,每次 3 秒,瞬时离心将酶切消化产物收集至管底。吸取全部酶切消化产物转移到新的 1.5 mL 离心管中。
- 4. 吸取 170 μL DNA Clean Beads 至 1.5 ml 离心管中, 混匀后瞬时离心, 室温孵育 10 分钟。
- 5. 将离心管置于磁力架上,静置2~5分钟至液体澄清,用移液器小心吸取并丢弃上清。
- 6. 加入两次 500 µL 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠及管壁。静置 30 秒后小心吸取 并丢弃上清。晾干至磁珠无反光,无开裂。

₩ 提示

应尽量吸干管底液体。

7. 从磁力架取下离心管,加入 25 µL TE 缓冲液进行 DNA 洗脱。完全混匀后室温孵 育 5 分钟后瞬时离心。

华大智造 DNA 特征识别组合产品(DNBSEQ-G99RS&DNBSEQ-G99ARS) 図 G 快速操作指南



- 8. 将离心管置于磁力架上,静置 2~5 分钟至液体澄清。吸取 23 μL 上清转移到新的
 1.5 mL 离心管中。
- 9. 使用单链 DNA 定量试剂对酶切消化纯化产物进行定量,要求最终产物浓度不小于 0.5 ng/µL。

酶切消化纯化后的产物可置于-20℃冰箱储存。

DNB制备

1. 从 DNBSEQ-G99RS 高通量测序试剂套装 (G99 SM FCL SE400)中取出 DNB 制备试剂,按照样本类型投入对应体积的酶切消化纯化产物,按下表配制 DNB 制 备反应液 I:

组分	体积 (µL)	
文库	V	
TE 缓冲液	10-V	
DNB 制备缓冲液	10	
总体积	20	

投示

- 文库投入体积 V 需根据样本类型进行计算:
 - ◆ 对于 DNA 样本, 文库投入体积 V 的计算公式为: V=10 ng/ 文库浓度。
 - ◆ 对于血卡样本, 文库投入体积 V 的计算公式为: V=5 ng/ 文库浓度。
 - ◆ DNA 和血卡混合样本:分别计算两种样本的文库投入体积,最终投入体积 取占比高的样本投入体积。
- 若计算出的投入体积大于 10 µL,则按照 10 µL 投入。

2. 混匀后按下表条件进行反应:

温度	时间
105 ℃(热盖)	On
95 °C	1 min
65 °C	1 min
40 °C	1 min
4 °C	Hold

3. 反应结束后加入如下试剂并混匀离心:

组分	体积(µL)	
DNB 聚合酶混合液 V	30	
DNB 聚合酶混合液 II(LC)	2	

4. 将反应液置于 PCR 仪按如下条件进行反应:

温度	时间
35 ℃(热盖)	On
30 °C	25 min
4 °C	Hold

5. 反应完成后,立即加入10 µL DNB终止缓冲液,用阔口吸头缓慢地吹打混匀5~8次。

♀ 提示

切勿振荡或剧烈吹打。

● 停止点

DNB产物可在4 ℃条件下储存48小时。

6. 使用单链 DNA 定量试剂对 DNB 产物进行定量,浓度 8 ng/µL 以上为合格,浓度 不合格时需重新制备。

[●] 停止点

测序与分析

关于测序仪、加样器和分析软件的具体操作,参考相关说明书。

录入样本

- 1. 双击测序仪桌面 ZLIMS 图标 📐 ,进入 ZLIMS 登录界面。
- 2. 输入授权的账号(lite)与密码(lite123456),点击【登录】,进入 ZLIMS 主界面。
- 3. 在主界面点击【测序+分析】,进入新建测序+分析界面。
- 4. 分析产品选择【FIS】或【FIS_SNP】,根据实际情况选择 DNB 样本信息填写方 式。例如,选择【表格导入样本编号】,点击【新建】。
- 提示

分析产品 FIS 适用于分析 SE400 测序数据, FIS_SNP 适用于分析 SE50 测序数据。

- 5. 在弹出的导入测序+分析界面点击【Excel模板】或【CSV模板】,下载样本模板 文件。
- 6. 打开模板,填写【DNB 样本录入】工作表,完成后保存至指定路径。

产品名称(*)	DNB ID(*)	Barcode(*)	样本编号(*)	样本名称	样本类型(*)	组别
FIS	MGI	1-1	MG199		DNA	

₩ 提示

- 红色带*号字段为必填项,不带*号字段为选填项。
- Excel 表格中不能合并单元格,单元格内填写内容的前后不能有空格。
- 填写项包括下拉选项和输入项,不同的字段类型对应不同的格式。
- 【DNB ID】:一般采用"字母+数字"的组合形式,不可与 ZLIMS 系统中已 录入的 DNB ID 重复。且该 DNB ID 必须与测序时对应的 Lane 输入的 DNB ID 保持一致。
- 【Barcode】: 一个样本编号对应多个Barcode时,多个Barcode以英文逗号 (,)隔开。若为多个连续且不含字母的Barcode,可以用波浪线(~)连接。
- 【样本编号】:一般采用"字母+数字"的组合形式,不可与 ZLIMS 系统中已录入的样本编号重复。
- 【 样本类型】: 默认为 DNA 数据, 暂不支持 RNA 数据。
- 7. 返回导入测序+分析界面,点击【选择文件】,在弹框中选择填写完成的【DNB 样本录入】工作表,点击【上传】。DNB 样本信息录入完成后,返回新建测序+ 分析界面。
- 8. 点击【确认生成任务】,在弹窗点击【确定】。

准备载片

取出载片在室温环境下放置至少30分钟,但不超过24小时,以进行DNB加载。



此时请勿拆开真空包装袋。

准备测序试剂槽

- 1. 取出测序试剂槽,常温水浴解冻4小时,或提前一天将测序试剂槽置于2 ℃~8 ℃ 冰箱解冻。解冻后的试剂槽置于 2 ℃~8 ℃ 的冰箱中备用。
- 2. 撕掉包装袋,使用无尘纸擦干盖板及孔位处的冷凝水。

华大智造 DNA 特征识别组合产品(DNBSEQ-G99RS&DNBSEQ-G99ARS) 「記 」 快速操作指南

概述	个体识别建库	DNB制备	测序与分析

3. 使用按压工具按压试剂槽 M1、M2、M3、M4 孔位。



4. 按照试剂槽上的标识,双手握住试剂槽 A、B 两侧,上下、左右摇晃混匀 10~20 次, 保证试剂充分混匀。轻轻用测序试剂槽敲打桌面,以去除试剂中的气泡。



5. 用枪头戳破试剂槽上标识的 MDA 孔。

开始测序

- 1. 点击测序仪控制软件主界面右上角的 🦳 输入用户名(user)与密码(123),点击【登录】。登录后,返回控制软件主界面。
- 2. 选择空闲状态下的 A 边或 B 边进行测序,点击界面上的【测序】。如需双边测序, 点击【测序 A&B】。

3. 点击【测序】后,废液仓门会自动弹出。根据界面提示放置废液桶,放置后关闭废 液仓门。系统自动进入测序前自检。

😧 提示

上机测序前清空废液桶或确保废液桶内废液液面低于液位上线。

4. 自检完成后点击【下一步】,填写测序信息。

默认情况下,测序类型选择【测序&生信分析】,BBS选择【否】,在【DNB ID】输入框输入 DNB 信息。

♀ 提示

确保输入的 DNB ID 与 ZLIMS 【DNB 样本录入】 工作表中的 DNB ID 完全一致。

- 5. 在【测序方案】下拉菜单中选择【SE10+10+400】(适用于 FIS)或【SE50+10+10】 (适用于 FIS_SNP),并点击 barcode 列表,选择【ID-Dualbarcode】。
- 6. 在高级设置中,【拆分 Barcode】和【自动清洗】流程都选择【是】。
- 7. 点击【下一步】, 升降屏自动上升。
- 8. 将准备好的测序试剂槽推入试剂仓,系统将自动识别测序试剂槽 ID,并显示在【试剂槽 ID】输入框中。

₩ 提示

如无法自动识别,可手动输入。

9. 点击【试剂预载】,选择【是】,开始加载试剂,升降屏自动下降并开始加载试剂。

在MGIDL-G99RS加载DNB

1. 提前取出DNB加载缓冲液II,置于冰盒上约30分钟至融化,用涡旋仪振荡混匀, 短暂离心5秒后,置于冰盒上备用。

华大智造 DNA 特征识别组合产品 (DNBSEQ-G99RS&DNBSEQ-G99ARS) 「別C」 快速操作指南

概述	个体识别建库	DNB制备	测序与分析

2. 取出新的 0.2 mL 管,按下表所示配制 DNB 加载体系。

组分	加入量(µL)	
DNB 加载缓冲液 II	7	
	1	
DNB	21	
总体积	29	

- 3. 用阔口吸头缓慢混匀 DNB 加载体系 5~8 次, 混匀后放置于 4 ℃备用。 ♀ 提示
 - DNB 加载体系需现配现用。
 - 切勿离心、振荡及剧烈吹打。
- **4.** 从底部按压取出加样器内现有的密封圈。左手握住加样器,打开盖板。拆开载片真空包装袋,安装载片至加样器,盖紧盖板。

检查密封圈中心是否透光,如透光则载片安装到位。翻转加样器,将其放置于水 平桌面。

5. 用 200 µL 尖口吸头吸取 10 µL DNB 加载体系,垂直插入载片进液口密封圈。左 手固定住吸头,按下移液器上相应按钮卸载吸头。



♀ 提示

- 请勿按下移液器的控制按钮。
- DNB 加载过程中,请勿转动尖口吸头或者移动载片,以免气泡进入载片。
- 不可用移液器将 DNB 文库注入载片。
- 6. 静置 3 秒,等待 DNB 文库流过载片。

通过观察孔查看是否过液。如有液面反光,则过液成功。

7. 确保样本加载完成后,逆时针旋转拔出尖口吸头。将载片正面朝上,即刻转移到测 序仪上使用。

放置载片与复核信息

- 1. 测序预载完成后,点击【下一步】,升降屏自动上升。
- 2. 将准备好的载片插入载片平台,系统将自动识别载片 ID。
- 😧 提示

如无法自动识别,可手动输入载片 ID。

 点击【下一步】,回顾测序信息。确认各项信息无误后,点击【测序】。在弹出的 对话框中选择【是】,开始测序。
 控制软件界面实时显示测序阶段和步骤。

启动分析

样本测序完成后,分析软件会自动启动数据分析。

在ZLIMS主界面,点击【任务状态】区域任一数字或点击左侧导航栏【任务管理】, 可进入任务管理界面查看样本状态。

^{华大智造} DNA 特征识别组合产品(DNBSEQ-G99RS&DNBSEQ-G99ARS) 「計G」 快速操作指南

4. e ποί			
概还	/ 1110000000000000000000000000000000000	ノ DNB制备	测序与分析

查看并下载报告

- 1. 在 ZLIMS 系统主界面点击【今日报告】下方的数字,进入分析报告界面。
- 2. 在查询区域设置查询条件,点击 Q, ,定位到指定样本所在记录行,点击该记录 行在【分析】列的链接。
- 3. 点击【报告】列的 📑 , 可查看样本报告。
- 4. 点击【结果路径】列的 🎦 ,可下载结果文件。