

修订日期:2024 年 12 月 ⑥ 华大智造 版权所有

### 文库制备

**DNB** 制备

测序及生信分析

# 概述

本快速操作指南用于指导快速使用微生物组靶向宏条形码测序组合产品。详细信息和操作参考相应试剂套装说明书和自动化产品说明书。

试剂盒种类	名称	规格
	ATOPlex 16S V3V4 rDNA 引物池(96 人份)	940-001260-00,96 RXN
	ATOPlex 16S V3V4 rDNA 引物池(576 人份)	940-000724-00,576 RXN
	ATOPlex 16SV4 rDNA 引物池(96 人份)	940-002492-00,96 RXN
	ATOPlex 16SV4 rDNA 引物池(576 人份)	940-002490-00,576 RXN
	ATOPlex ITS1 rDNA 引物池(96 人份)	940-001536-00,96 RXN
立定制冬	ATOPlex ITS1 rDNA 引物池(576 人份)	940-001532-00,576 RXN
又件前田	ATOPlex ITS2 rDNA 引物池(96 人份)	940-002489-00,96 RXN
	ATOPlex ITS2 rDNA 引物池(576 人份)	940-002491-00,576 RXN
	ATOPlex 高保真 PCR 扩增模块 (96 人份)	950-000138-00,96 RXN
	ATOPlex 高保真 PCR 扩增模块 (576 人份)	950-000137-00, 576RXN
	MGIEasy 双 barcode 环化试剂盒	1000020570,16 RXN
	ATOPlex E450 双标签平衡文库试剂	940-000637-00,40 ng
DNB 制备	DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒	1000026466, 4 RXN

# 文库制备

## 样本准备

建库 DNA 起始量决定目标群体各物种检出丰富度,推荐起始量如下表所示:

测序引物池	样本类型	起始量范围	推荐起始量
	细菌高含量样本:粪便、唾液等人 体样本	10-100 ng	10 ng
16SV3V4、16SV4	<ul> <li>细菌低含量样本:</li> <li>皮肤拭子、舌苔拭子等人体样本</li> <li>酒糟等真菌发酵物样本</li> <li>叶片表面等农业样本</li> </ul>	/	10 µL
	真菌高含量样本:酒糟等真菌发酵 物样本	10-100 ng	10 ng
ITS1、ITS2	真菌低含量样本:      粪便、唾液、皮肤舌苔拭子等     人体样本      叶片表面等农业样本	/	10 µL

## 第一轮 PCR 反应

- 1. 准备 ATOPlex 高保真 PCR 扩增模块和 ATOPlex 宏条形码文库制备引物池 16SV3V4/16SV4/ITS1/ITS2 待用。
- 2. 取出 PCR Clean Enzyme 和 PCR HiFi Enzyme Mix 瞬时离心后置于冰盒上待 用。其他组分于室温解冻。所有试剂解冻后充分振荡混匀,瞬时离心后置于冰盒上 待用。
- 3. 取新的 96 孔 PCR 板,将 PCR 板置于冰盒上,根据下表在新 PCR 板中配制第一轮 PCR 反应液。

组分	单个反应体积
DNA	V
PCR HiFi Enzyme Mix	12.5 µL

文库制备

**DNB** 制备

<b>NEW</b>		4	<u> </u>	1.	1
2000	子 パ	ΖΞ	E	77	ŝ
	13.00				

组分	单个反应体积
16SV3V4/16SV4/ITS1/ITS2 PCR Primer Pool	2 µL
PCR Clean Enzyme	0.5 μL
TE Buffer	10 µL-V
总量	25 μL

- 4. 使用 96 孔板塑料封膜对配制好的第一轮 PCR 反应液 PCR 板进行封膜,涡漩振荡 使其充分混合后,使用板式离心机瞬时离心,将混合液收集至板底。
- 5. 将配制好的第一轮 PCR 反应体系(每孔 25 μL)置于 PCR 仪上,按照下表设置 PCR 反应条件。

温度	时间	循环数
热盖(104 ℃)	on	/
37 °C	5 min	1 个征环
95 ℃	10 min	
95 ℃	20 s	
55 °C	30 s	20~35 个循环
72 °C	30 s	
12 ℃	hold	/

### 🕂 注意

根据样本的不同,可能需要优化 PCR 循环的次数以达到所需的 PCR 产物浓度。不同引物池和样本类型的推荐 PCR 循环数参见下表。

引物池	样本类型	推荐 PCR 循环数
16SV3V4、16SV4	细菌高含量样本:粪便、唾液等人体样本	20

引物池	样本类型	推荐 PCR 循环数
6SV3V4、16SV4	细菌低含量样本:	
	■ 皮肤、舌苔拭子等人体样本	70
	■ 酒糟等真菌发酵物样本	30
	■ 叶片表面等农业样本	
TS1、ITS2	真菌高含量样本: 酒糟等真菌发酵物样本	25
	真菌低含量样本:	
	■ 粪便、唾液、皮肤、舌苔拭子等人体样本	35
	■ 叶片表面等农业样本	

- 6. 反应结束后,取出 PCR 板,瞬时离心将反应液收于板底,得到第一轮 PCR 反应产物。
- 7. 由于不同片段需要不同的退火温度和循环次数,因此建议将需要不同 PCR 条件的 反应体系置于不同的 96 孔 PCR 板或 PCR 八联管中,然后在第一轮 PCR 完成后将 反应产物转移到同一个 PCR 板中进行第一轮 PCR 反应产物的纯化。

## 第二轮 PCR 反应体系配制和第一轮 PCR 产物纯化

#### 配制第二轮 PCR 反应体系

- 1. 准备试剂和耗材:
  - 1) 提前 30 min 从 MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒取出 DNA Clean Beads 和 TE Buffer,充分振荡混匀待用。
  - 2) 配制新的 80% 乙醇溶液待用。
  - 3) 准备 4 个新的 1.3 mL 96 孔圆形孔 U 型底深孔板,分别标记为"磁珠"、"TE Buffer"、"80%乙醇"和"废液板"待用。



#### 文库制备

**DNB** 制备

#### 测序及生信分析

- 4) 准备1个新的硬框薄壁全裙边96 孔 PCR 板,标记为"第二轮 PCR 反应试剂" 待用。
- 2. 按照下表添加相应的液体,完成后将三个深孔板封膜待用。

孔板标记名称	添加试剂	体积
【磁珠】	DNA Clean Beads	80 µL/ 孔
【TE Buffer】	TE Buffer	40 µL/ 孔
【80% 乙醇】	80% 乙醇	750 µL/ 孔

3. 按照下表,在标记为"第二轮 PCR 反应试剂"的硬框薄壁全裙边 96 孔 PCR 板中 配制第二轮 PCR 反应液。

组分	单个反应体积
PCR HiFi Enzyme Mix	12.5 µL
Barcode 1	2 µL
Barcode 2	2 µL
PCR Clean Enzyme	0.5 µL
PCR Additive	0.5 µL
16SV3V4/16SV4/ITS1/ITS2 PCR Block	1 μL
总量	18.5 μL

## <u> 注</u>意

如果使用 ATOPlex 双标签引物模块(01-96)V1.0(货号:1000021626),需要添 加 4 μL PCR Dual Barcode Primer Mix。如果使用 ATOPlex 双标签引物模 (48×96) (货号:1000024935),需分别加入 2 μL Barcode 1 (01~96)和 2 μL Barcode 2 (01~48)。

4. 将步骤 3 的 PCR 板进行封膜,进行涡漩振荡混匀,瞬时离心将反应液收集于板 底。

#### 进行第一轮 PCR 产物纯化

# 1 注意

- 本节操作在 MGISP-960RS 高通量自动化样本制备系统-订制化配置 9 上进行。
- 详细操作参考 MGISP-100 和 MGISP-960 应用脚本安装说明书。
- 1. 双击桌面控制软件图标,进入登录界面,选择【真实】,点击【登录】。
- 2. 在控制软件主界面,点击右上角图标,选择【WDesigner】。
- 进入流程编辑器,点击【导入方案】,导入【JB-A09-145 ATOPlex 宏条形码文 库制备\_step1 第一轮纯化\_RV1.0\_SV1.0.wfex】和【JB-A09-145 ATOPlex 宏 条形码文库制备\_step2 第二轮纯化\_RV1.0\_SV1.0】应用方案。
- 4. 在 WDesigner 中,点击 MGISP-960 控制软件按钮,进入控制软件。
- 5. 在控制软件主界面,点击【初始化】。初始化时间约为 2 min,当页面显示【初始 化成功】,则表明仪器正常连接,可进行下一步操作。
- 6. 打开左侧导航栏,选择【运行向导】。
- 7. 在运行向导界面,点击【应用方案】下拉列表,选择【JB-A09-145 ATOPlex 宏 条形码文库制备\_RV1.0\_SV1.0】。
- 8. 点击【脚本】下拉列表选择【ATOPlex 宏条形码文库制备\_step1 第一轮纯化.py】,界面下方【操作台】处将出现台面布局图。
- 9. 将准备好的样本、试剂和耗材按下图放置完成并确认无误后关闭仪器门窗。

修订日期: 2024 年 12 月 ⑥ 华大智造 版权所有

#### 文库制备

### DNB 制备

#### 测序及生信分析

操作台						
POS1	POS5	HigherPosition	POS9 PCR	POS13	POS17	POS21 Temp
250µL 带建这自动化现头 TipGERAE250A		-	-	-	80% Z38 750µL/well	EIR 80µL/well
POS2	POS6		POS10 PCR	POS14	POS18	POS22 Temp
250µL 带体芯目的化现象 TipGEBAF250A			-		R-SPCR#10 PCRBioRadHSP9601	TE Buffer 40µL/well DeepwellPlateDT7350504
POS3	POS7	LowerPosition	POS11 PCR	POS15 Magnet	POS19 Magnet	POS23
250pL 带体态自动化限头 TipGEBAF250A		-	-	-	-	度液带 DeepwellPlateDT7350504
POS4	POS8		POS12	POS16	POS20 Shaker	POS24 Trash
250µL 带建芯自动化限头 TipGEBAF250A		1	M=SPCR851174 18.5µL/well PCR8ioRadHSP9601	2	:	-

名称	耗材	位置
【250 µL 带滤芯自动化吸头】	250 μL 带滤芯自动化吸头	Pos1~Pos4
【第二轮 PCR 反应试剂】	硬框薄壁全裙边 96 孔 PCR 板	Pos12
【80%乙醇】	1.3 mL 96 孔圆形孔 U 型底深孔板	Pos17
【第一轮 PCR 产物】	硬框薄壁全裙边 96 孔 PCR 板	Pos18
【磁珠】	1.3 mL 96 孔圆形孔 U 型底深孔板	Pos21
【TE Buffer】	1.3 mL 96 孔圆形孔 U 型底深孔板	Pos22
【废液板】	1.3 mL 96 孔圆形孔 U 型底深孔板	Pos23

▲ 注意

带有封膜的耗材在运行前需手工将膜撕掉。

- 10. 点击【开始】按钮后,软件界面将出现弹窗,点击【开始】运行实验流程。 预 计运行 25 min 后,第一轮 PCR 产物纯化结束。
- 11. 点击【继续】按钮,取出板位 Pos16 的产物,对其进行封膜和离心,手工进行第 二轮 PCR 反应。
- 12. 将 Pos1-Pos4、Pos12 的耗材与试剂板取出并丢弃,保留 Pos17 位置【80% 乙醇】板、 Pos21 位置的【磁珠】板、Pos22 位置的【TE Buffer】板和 Pos23 的 【废液板】,将 Pos17、Pos21 和 Pos22 板位试剂进行封膜,待第二轮 PCR 产物 纯化使用。

## 第二轮 PCR 反应

1. 将*第 3 页"进行第一轮 PCR 产物纯化*"步骤 10 的第一轮 PCR 反应纯化产物置于 PCR 仪上,按照下表进行反应。

温度	时间	循环数
热盖(104 ℃)	on	/
37 ℃	5 min	1 个征环
95 °C	10 min	
95 ℃	20 s	
55 ℃	30 s	8 个循环
72 ℃	30 s	
12 °C	hold	/

2. 反应结束后,取出 PCR 板,瞬时离心将反应液收集至板底,并立即进行下一步的 实验操作。

😧 提示

第二轮 PCR 产物在 12 ℃下不宜超过 30 min。



测序及生信分析

• 版本: 1.0

修订日期: 2024 年 12 月
 ⑥ 华大智造 版权所有

DNB 制备

## 第二轮 PCR 产物纯化、定量及质检

- 1. 在 MGISP-96ORS【运行向导】界面,点击【应用方案】下拉列表,选择【JB-A09-145 ATOPlex 宏条形码文库制备\_RV1.0\_SV1.0】。
- 2. 点击【脚本】下拉列表选择【ATOPlex 宏条形码文库制备\_step2 第二轮纯化.py】,界面下方【操作台】处将出现台面布局图。
- 将准备阶段备好的样本、试剂和耗材按下图放置,完成并确认无误后关闭仪器视 窗。



## 1 注意

- 带有封膜的耗材在运行前需手工将膜撕掉。
- Pos17、Pos21、Pos22 和 Pos23 均使用第一轮 PCR 产物纯化试剂,该4 个板位无需变动且无需添加试剂。

名称	耗材	位置
【250 µL 带滤芯自动化吸头】	250 μL 带滤芯自动化吸头	Pos1~Pos4
【第二轮 PCR 纯化产物】	硬框薄壁全裙边 96 孔 PCR 板	Pos13
【第二轮 PCR 产物】	硬框薄壁全裙边 96 孔 PCR 板	Pos14
【80%乙醇】	1.3 mL 96 孔圆形孔 U 型底深孔板	Pos17
【磁珠】	1.3 mL 96 孔圆形孔 U 型底深孔板	Pos21
【TE Buffer】	1.3 mL 96 孔圆形孔 U 型底深孔板	Pos22
【废液板】	1.3 mL 96 孔圆形孔 U 型底深孔板	Pos23

- 4. 点击【开始】按钮后,软件界面将出现弹窗,点击【开始】运行实验流程。预计运行 30 min 后,第二轮 PCR 产物纯化结束。
- 5. 取出板位 Pos13 的产物,每个孔的体积约为 23 µL,进行封膜和离心。点击【继续】结束该流程。
- 处理废弃的深孔板、PCR 板、废料袋,投放至指定废品区域。如当天不再进行实验,使用纯水和 75%酒精清洁仪器台面,并按照 MGISP-100 和 MGISP-960 设备清洁说明书 进行后期清洁。
- 7. 使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 或 Quant-iT PicoGreen<sup>®</sup> dsDNA Assay Kit 等双链 DNA 荧光定量试剂盒,按照定量试剂盒操作说明对第二轮 PCR 纯化产物进 行定量。纯化后的样本文库浓度要求≥5 ng/µL。
- 8. 使用 Bioanalyzer、Tapestation (Agilent Technologies)等基于电泳分离原理 的设备对第二轮 PCR 纯化产物进行片段分布检测,不同引物池 PCR 纯化产物主峰 片段大小参见下表:

引物池	PCR 纯化产物主峰片段大小范围	
16S V3V4	550 bp~650 bp	
ITS1	300 bp~600 bp	



文库制备

DNB 制备

测序及生信分析

引物池	PCR 纯化产物主峰片段大小范围	
ITS2	300 bp~600 bp	
16SV4	400 bp~500 bp	

# 文库混合

#### 定量质检合格后,根据使用的引物池和测序策略选择对应的文库混合及环化方案。

引物池	测序仪	推荐读长
16S V3V4, ITS1, ITS2	DNBSEQ-G99	PE300
16SV4	DNBSEQ-G99	PE150
16SV4	DNBSEQ-E25	PE150

### PCR Primer Pool 为 16S V3V4、ITS1、或 ITS2 的文库混合及环化

PCR 产物定量质检合格后,按照所需测序数据量比例取相应体积文库进行混合。建议 混合后总质量≥500 ng,总体积≤48 µL。

- 1. 取出 MGIEasy 双 barcode 环化试剂盒待用。 取 500 ng 混合文库 DNA 至 0.2 mL PCR 管中, 用 TE Buffer 补充至总体积 48 μL。
- 2. 将 PCR 管置于 PCR 仪上,按照下表条件进行变性反应:

温度	时间
热盖(105 ℃)	on
95 ℃	3 min

- 3. 反应结束后,立即将 PCR 管转移至冰盒上,放置 2 min。
- 4. 按下表在冰盒上配制单链环化反应液:

组分	体积
Dual Barcode Splint Buffer	11.6 µL
DNA Rapid Ligase	0.5 μL
总量	12.1 µL

5. 将上述 12.1 µL 单链环化反应液加入变性反应后(步骤 3)的 PCR 管中,涡漩振荡 6 次,每次 3 s,瞬时离心将反应液收集至管底。

### 6. 将 PCR 管置于 PCR 仪上,按照下表中的条件进行反应:

温度	时间
热盖(105 ℃)	on
37 ℃	30 min
4 ℃	hold

#### 7. 反应结束后,取出 PCR 管,按下表在冰盒上配制酶切消化反应液:

组分	体积	
Digestion Buffer	1.4 µL	
Digestion Enzyme	2.6 µL	
总量	4 µL	

8. 将上述 4 μL 酶切消化反应液加入单链环化反应后(步骤 6)的 PCR 管中,涡漩振 荡 6 次,每次 3 s,瞬时离心将反应液收集至管底。

### 9. 将 PCR 管置于 PCR 仪上,按下表中的条件进行反应:

温度	时间
热盖(105 ℃)	on
37 ℃	30 min
4 °C	hold



修订日期: 2024 年 12 月
 ⑥ 华大智造 版权所有

**DNB** 制备

#### 测序及生信分析

- 10. 反应结束后,向每个反应中加入 7.5 μL Digestion Stop Buffer,涡漩振荡 6 次,每次 3 s。瞬时离心将反应液收集至管底。所有反应液转移到新的 1.5 mL EP 管中。
- 11. 提前 30 min 取出 DNA Clean Beads 置于室温,使用前充分振荡混匀。
- 12. 吸取 170 μL DNA Clean Beads,并加至步骤 10 的产物中,用移液器轻轻吹打至 少 10 次至完全混匀,最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入 1.5 mL EP 管中。室温孵育 10 min。
- 13. 瞬时离心,将 1.5 mL EP 管置于磁力架,静置 2 min-5 min 至液体澄清,用移液 器小心吸取并丢弃上清。
- 14. 保持 1.5 mL EP 管置于磁力架上,加入 5OO μL 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠及 管壁, 孵育 30 s。小心吸取并丢弃上清。
- 15. 重复步骤 14 一次,尽量吸干管内液体。
- 16. 保持 1.5 mL EP 管固定于磁力架上,打开 1.5 mL EP 管管盖,室温干燥,直至磁 珠表面无反光、无开裂。
- 将 1.5 mL EP 管从磁力架上取下,加入 22 μL TE Buffer 进行 DNA 洗脱,用移液 器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀。室温下孵育 10 min。
- 18. 瞬时离心,将 1.5 mL EP 管置于磁力架上,静置 2 min-5 min 至液体澄清,将 20 μL 上清液转移到新的 1.5 mL EP 管中。
- 停止点

纯化后的环化产物可置于-20 ℃冰箱中储存。

19. 使用 Qubit ssDNA Assay Kit 单链 DNA 荧光定量试剂盒,按照定量试剂盒的操作说明对环化纯化后产物进行定量。要求最终环化产物(ssDNA)产量≥10 ng。

PCR Primer Pool 为 16SV4 的文库混合

文库按所需测序数据量比例取相应体积进行混合,混合后总质量≥25 ng,总体积≤20 μL,需满足至少1次 DNB 的制备。

▲ 注意 PCR Primer Pool 为 16SV4 的文库混合后无需进行环化。

# DNB 制备

## 16S V3V4、ITS1、ITS2 文库的 DNB 制备

- 取出 DNBSEQ-G99RS 高通量测序试剂套装(G99 App-D FCL PE300)的 TE 缓冲液、DNB 制备缓冲液、DNB 高效聚合酶混合液 V和 DNB 终止缓冲液,置于 冰盒上约 0.5 h。待融化后,用涡漩振荡器振荡混匀 5 s 后,短暂离心置于冰盒上 备用。
- 2. 取出环化纯化后的样本文库 ssDNA、ATOPlex E450 双标签平衡文库试剂置于冰 盒上待用。
- 分别取 6 ng 样本文库和 6 ng 平衡文库置于两个新的 0.2 mL PCR 管中,并分别 用 TE 缓冲液补充至总体积 10 μL。

### 1 注意

样本文库和平衡文库需分别制备 DNB,切勿加到同一个 PCR 管中。

4. 取用 0.2 mL PCR 管,在冰盒上按下表体系配制 DNB 体系 1:

组分	加入量	
DNB 制备缓冲液	10 µL	
样本文库或平衡文库	10 µL	



文库制备	文库制备 DNB 制备 DNB 制备			测序及生信分析
5. 用涡漩振荡器需振荡混匀 DNB 体	本系 <b>1</b> ,混匀后用迷你离 <sup>,</sup>	心机离心 5 s,按照下表的	▲ 注意	
条件进行反应:			部分品牌	早PCR 仪的热盖升降温速度慢,在热盖升降温过程中,加热模块处于室温状态
温度	时间		且程序未	运行。对于这种类型的 PCR 仪,需提前进行热盖预热,确保在进 DNB 反应
热盖(105 ℃)	on		时,热量	
95 ℃	1 min		9. 当 PCR	12 温度达到 4 ℃后,立即加入 10 μL DNB 终止缓冲液,用阔口吸头缓慢 目标 5
65 ℃	1 min		地叭们/	
40 °C	1 min			词口吸头缓慢吹打混勾 DNB 切勿离心 振荡及剧列吹打
4 °C	hold			
6. 取出 DNB 聚合酶混合液 II (LC);	,短暂离心 5 s,置于冰	盒上备用。	取田21	u DNB, 使用 Oubit ssDNA Assay Kit 和 Oubit 荧光定量仪进行浓度检
⊋ 提示			测。浓度≥12 ng/uL 为合格,若浓度超过 40 ng/uL,需使用 TE 缓冲液稀释到 30	
す かい 请勿将 DNB 聚合酶混合液 Ⅱ (LC) 置于室温,请勿长时间触碰管壁。		管壁。	ng/µL。将浓度合格的 DNB 保存在 4 ℃,并于 48 h 内使用。	
7. 当 PCR 仪达到 4 ℃后取出 PCR	管,迷你离心机离心5	s 后,在冰盒上将下表组分	0.1	
加入 PCR 管中,制备 DNB 体系	2.		16SV4	文库的 DNB 制备
组分	加入量			
DNB 高效聚合酶混合液 V	20 µL		DNDSLQ- 京平台洗掉	G99ARS 和 DNDSLQ-L25RS 十日工机的 DND 的目流程不问,咱很掂测 到下任一流程。
DNB 聚合酶混合液 II(LC)	0.8 µL		11.1 1.2.1	
8. 用涡漩振荡器需振荡混匀反应混	合液,混匀后用迷你离心	心机离心 5 s,即刻置于	使用 DNB	SEQ-G99ARS 测序仪
PCR 仪中,按照下表的条件进行	反应(总体积为 41 µL)	:	<b>1</b> . 取出样	本文库( 需确保已按照 <i>第 7 页 "PCR Primer Pool 为 16SV4 的文库混</i>
温度	时间		<i>合"</i> 进行	亍了混合)、 ATOPlex E450 双标签平衡文库试剂和 DNBSEQ 一步法
热盖(35 ℃)	on		DNB 制	备试剂盒(OS-DB)V1.O 中的 TE 缓冲液、DNB 制备缓冲液 (OS-DB)、
30 ℃	30 min		DNB 聚	合酶混合液 I(OS)和 DNB 终止缓冲液,置于冰盒上约 0.5 h。
4 ℃	hold		2. 待融化的	后,用漩涡振荡器振荡混匀 5 s,混匀后短暂离心置于冰盒上备用。
			3. 分别取	13 ng 样本文库和 6 ng 平衡文库置于两个新的 0.2 mL PCR 管中,并分别

用 TE 缓冲液补充至总体积 10 µL。



文库制备	DNB 制备		测序及生信分析	
取 0 2 ml PCR 管、在冰倉上坡下表休系配制标	在本文库 DNB 休系 1:	泪麻	中 词	
		温度 30 ℃	رمان 25 min	
DNB 制备缓冲液(OS) 10 uL		4 °C	hold	
		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		
. 用涡漩振荡器振荡混匀 DNB 体系 1,混匀后用边 中,按照下表的条件进行反应:		在态 部分品牌 PCR 仪的热盖升降 且程序未运行。对于这种类型	温速度慢,在热盖升降温过程中,加热模块处于室温状态 型的 PCR 仪,需提前进行热盖预热,确保在进 DNB 反应 ~	
温度时间				
热盖 (105 ℃) on	9.	<ul> <li>9. 当 PCR 仪温度达到 4 ℃后,立即加入 10 µL DNB 终止缓冲液,用阔口吸</li> <li>地吹打混匀 5-8 次。</li> <li>●</li></ul>		
95 ℃ 3 min				
40 °C 3 min				
4 ℃ hold	10.	测定 DNB 浓度。		
<ul> <li>. 取出 DNB 聚合酶混合液 Ⅱ(OS),短暂离心 5</li> <li>注意 请勿将 DNB 聚合酶混合液 Ⅱ(LC)置于室温,请勿+</li> </ul>	s,置于冰盒上备用。	取用 2 µL DNB,使用 Qu 测。浓度≥8 ng/µL 为合构 ng/µL。将浓度合格的 DI	ubit ssDNA Assay Kit 和 Qubit 荧光定量仪进行浓度 各,若浓度超过 40 ng/µL,需使用 TE 缓冲液稀释到 2 NB 保存在 4℃,并于 48 小时内使用。	
1. 当 PCR 仪达到 4 ℃后取出 PCR 管,迷你离心机 分加入到 PCR 管中(总体积为 42 μL):	l离心 5 s 后,在冰盒上将下表组    使用 使用	用 DNBSEQ-E25RS 基因	]测序仪	
组分 加入量	1. 1	取出样本文库(需确保已	按照 <i>第 7 页 "PCR Primer Pool 为 16SV4 的文库混</i> 文店试到(PCR 音物) V4 0 中的平衡文店署王文会上	
DNB 聚合酶混合液 I (OS)         20 μL           DNB 聚合酶混合液 II (OS)         2 μL			文件成前(FCR)初)V4.0中的十国文件直于小盖上	
□NB 業目時混合液 IT (OS) 2 μL 2 μ	迷你离心机离心 5 s,即刻置于	取出 DNBSEQ-E25RS 高 制备缓冲液(OS-V2.0-E 液,置于冰盒上约 0.5 h。	通量测序试剂套装(FCL PE150)中的 TE 缓冲液、DN DB)、DNB 聚合酶混合液 l(OS)和 DNB 终止缓冲	
	3. 7	待融化后,用漩涡振荡器	振荡混匀 5 s,混匀后短暂离心置于冰盒上备用。	



文库制备	DNB 制备		测序及生信分析
<ul> <li>4. 分别取 25 ng 样本文库(dsDNA)和 25 ng 并分别用 TE 缓冲液补充至总体积 20 µL。</li> <li>注意 样本文库和平衡文库需分别制备 DNB,切勿加到區</li> <li>5. 在冰盒上按如下体系配制反应混合液 1:</li> <li><u>组分</u>加入 DNB 制备缓冲液(OS-V2.0-DB)20 样本文库或平衡文库20</li> <li>6. 用涡漩振荡器需振荡混匀反应混合液 1,混匀, 仪中进行引物杂交,反应条件如下表:</li> </ul>	平衡文库置于两个新的 PCR 管中, 可一个 PCR 管中。 <u>1</u> 11 后用迷你离心机离心 5 s,置于 PCR	<ul> <li>9. 用涡漩振荡器需振荡混</li> <li>PCR 仪中,反应条件如</li> <li>温度</li> <li>热盖 (35 ℃)</li> <li>30 ℃</li> <li>4 ℃</li> <li>ジ 提示</li> <li>部分品牌 PCR 仪的热盖升</li> <li>且程序未运行。对于这种时,热盖处于工作温度 3</li> <li>10. 当 PCR 仪温度达到 4</li> <li>地吹打混勾 5-8 次 第</li> </ul>	控匀反应混合液,混匀后用迷你离心机离心 5 s,即刻置于 □下表:           时间           On           25 min           hold   件降温速度慢,在热盖升降温过程中,加热模块处于室温状态 类型的 PCR 仪,需提前进行热盖预热,确保在进行 DNB 反应 5 ℃。 ℃后,立即加入 20 µL DNB 终止缓冲液,用阔口吸头缓慢 第天 4 ℃ 保存并于 48 b 内使用.
热盖 (105 ℃)       on         95 ℃       3 m         57 ℃       3 m         4 ℃       hold         7. 取出 DNB 聚合酶混合液 II (OS) ,短暂离心         注意         请勿将 DNB 聚合酶混合液 II (LC) 置于室温,请结         8. 当 PCR 仪达到 4 ℃后取出 PCR 管,迷你离应         组分加入到 PCR 管中(总体积为 84 µL):	iin iin d 5 s,置于冰盒上备用。 勿长时间触碰管壁。 心机离心 5 s,混匀后在冰盒上将下表	<ul> <li></li></ul>	z打混匀 DNB。切勿离心、振荡及剧烈吹打。 Qubit ssDNA Assay Kit 和 Qubit 3.0 荧光定量仪进行浓 /µL~40 ng/µL 之间为合格,浓度不合格的需重新制备。将 4 ℃保存,并于 48 h 内使用。
组分     加入       DNB 聚合酶混合液 I (OS)     40       DNB 聚合酶混合液 II (OS)     4 µI	≢ بد 	新建测序+分析任务及 ② 提示 ・ 如需使用分析服务器实现	<b>&amp;录入样本</b> 观自动化分析,使用前请确认测序仪是否与分析服务器连接。



修订日期:2024年12月 ⑥ 华大智造版权所有

文库制备	DNB 制备			测序及生信分析
<ul> <li>如使用 DNBSEQ-E25RS 基因测序仪进行测序,需在3 器。详细操作,参考 DNBSEQ-E25RS 高通量测序试;</li> <li>在使用 DNBSEQ-G99ARS 进行测序时,如通过点击;</li> <li>进入 ZLIMS Lite,后续操作参考相关说明书。</li> <li>打开 Chrome 浏览器,输入下述 IP 地址,按【E</li> <li>输入授权账号 <i>lite</i> 与密码 <i>lite123456</i>,点击【登录</li> <li>在主界面点击【测序+分析】,进入新建测序+分析</li> <li>分析产品选择【MetaSIS】, DNB 样本信息填写;</li> </ul>	登录 MGI ZLIMS 前启动分析服务 的套装使用说明书。 则序仪控制软件界面上的 교 图标 nter】键: <i>127.0.0.1</i> . 专了界面。 行界面。	= -  , 	【样本编号】:一般采用"字母+ 【样本名称】:样本名称不可重复 【样本类型】:仅可选择【DNA】 【引物类型】:引物类型必须是 》的组合。填写时不区分大小写, 们 开头,而不是字母 L/L 或数字 顾序,但不可重复填写,如,可 【16SV3V4: ITS; 16SV3V4】。	▶数字"的组合形式,必须唯一。 夏。 】。 16SV3V4、16SV4、ITS、ITS2 中的一个或多 ,但需确保引物类型输入正确,如 ITS 以字母 1。多个引物类型以英文分号(:)分隔,无关 真写【16SV3V4: ITS】,不可填写 引物类型和对应的试剂名称参见下表:
号】,点击【新建】,进入导入测序+分析界面。			名称	引物类型
5. 点击【Excel 模板】或【CSV 模板】,下载 <i>.xlsx</i>	或.csv格式的 DNB 样本模板文	-	ATOPlex 16SV3V4 rDNA 引物池	16SV3V4
14.			ATOPlex 16SV4 rDNA 引物池	16SV4
6. 打开模板,填写 DNB 样本模板,示例如下。		-	ATOPlex ITS1 rDNA 引物池	ITS
F       G       H         F       A       B       C       B         I       F       A       B       C       H         I       F       B       C       H       F       C       H         I       F       A       B       C       H       F       F       G       H       F		<ul> <li>【分组】:根据需要设定样本的分组信息,同一个组别的样本(一个组的样本)</li> <li>【分组】:根据需要设定样本的分组信息,同一个组别的样本(一个组的样本)</li> <li>量必须大于等于 3)填写相同的字符,如一个批次样本分为三组,可填写</li> <li>【A,B,C】:无分组时不输入或输入【NA】。</li> <li>7.回到测序+分析界面,点击【选择文件】,在弹框中选择已填写完成的 DNB 样本 模板文件。</li> </ul>		
■ 填写项包括下拉选项和输入项,不同的字段类型	则对应不同的格式。	8. 点击	;【上传】。当界面出现提示【」	上传】,表示多个样本信息已成功导入 ZLIMS
<ul> <li>【DNB ID】: 一般采用"字母 + 数字"的组合录入的 DNB ID 重复。</li> <li>【Barcode】: 一个样本编号对应多个 Barcode号(.)分隔,若为多个连续 Barcode,以波浪</li> </ul>	形式,不可与 ZLIMS Lite 中已 le 时,多个 Barcode 以英文逗 线(~)连接。	Lite 9. DNI 务】	3 样本信息录入完成后,自动回题,在新弹窗点击【确定】。	到新建测序+分析界面,点击【确认生成任



© 华大智造 版权所有

**DNB** 制备

#### 测序及生信分析

## (可选)使用 DNBSEQ-G99ARS 进行测序

准备载片和测序试剂槽

- 1. 从-25 ℃~-15 ℃冰箱中的试剂套装中取出载片。此时请勿拆开真空包装袋。
- 2. 将载片在室温环境下放置 0.5 h~24 h。
- 3. 取出测序试剂槽于常温水浴解冻,或者提前一天将其置于2℃~8℃冰箱解冻,解 冻后置于2℃~8℃冰箱备用,不同型号试剂槽水浴解冻时间见下表:

型号	解冻方式			
	室温下水浴解冻(h)	2 ℃~8 ℃冰箱过夜后室 温水浴(h)	2 ℃ ~8 ℃冰箱(h)	
G99 SM FCL PE150	3.0	0.5	24.0	
G99 SM FCL PE300	4.5	0.5	24.0	

- 4. 颠倒混匀试剂槽5次。撕掉包装袋,使用无尘纸擦净盖板及孔位处的冷凝水。
- 5. 将配套的按压器对准柱塞,用手掌将四个柱塞按压到位。



- 6. 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。试剂槽混匀不充分可能会影响实验结果。
- 7. 使用洁净的1mL枪头戳破试剂槽上标注的 MDA 孔位。
- 8. 从测序试剂套装中取出 MDA 试剂和 MDA 聚合酶混合液,用 200 µL 移液器吸取 125 µL MDA 聚合酶混合液加入到 MDA 试剂的试剂管中。
- 9. 颠倒混匀上一步配制好的 MDA 试剂管 4~6 次,使其充分混匀。
- 10. 将上一步的混合液全部加入到 MDA 孔中,试剂槽即准备完成。
- ⑦ 提示

加入 MDA 混合液时吸头紧贴 MDA 孔凹侧一面,倾斜加入,避免产生气泡。缓慢加入 MDA 混合液,避免溢出到其它孔位。



#### 文库制备

### **DNB** 制备

#### 测序及生信分析

#### 开始测序

- 确保电源开关处于关闭状态。连接电源线。将电源按钮拨至 位置,仪器进入计算 机登录界面。
- 2. 选择用户名,输入密码,仪器开始自检。如自检成功,屏幕进入主界面。如自检失败,参考 DNBSEQ-G99RS&DNBSEQ-G99ARS 基因测序仪产品说明书进行处理。
- 3. 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。
- 4. 在主界面任选空闲状态下的 A/B 边进行测序,点击【测序】,如需双边测序点击 【测序 A&B】。
- 5. 点击【测序】,执行如下任一操作:
  - 如果废液仓门自动弹出,根据界面提示放置空的废液桶,放置后轻按以关闭废液 仓门。系统自动进入测序前自检。
  - 如果废液仓门没有打开,系统自动进入测序前自检。
- 6. 自检完成后,点击【下一步】,流程类型选择【测序&信息传输】,BBS 选择 【否】,输入 DNB 信息(需确保和 ZLIMS Lite 上创建的测序+分析任务的 DNB ID 完全一致)。

1.目位 2.測序信息填与 3.放宣试剂槽 4.放 流程类型 ◎ 测序 & 信息传	(直報斤 5.测序信息回顾 6.测序
流程类型	
	输 〇 只测序
BBS O 是	<ul><li>• 否</li></ul>
DNB ID XXXXXX	
测序方案 PE150+10+10	▼
	1-64
高级设置 ≫	1-128 501-596
拆分 Barcode <ul> <li>● 是</li> </ul>	eDNADBG99
自动清洗 ③ 是	barcode 其他

- 7. 在【测序方案】下拉菜单中选择【PE300+10+10】(16S V3V4、ITS1、ITS2 引物池)或【PE150+10+10】(16SV4 引物池)。
- 点击标签序列,选择【eDNADBG99】。拆分 barcode 和自动清洗均选择 【是】。有关导入标签序列的详情,参考 DNBSEQ-G99 系列基因测序仪软件操 作指南。
- 点击【下一步】,等待升降屏到指定位置。将准备好的测序试剂槽推入试剂仓,系统会自动识别测序试剂槽 ID 信息。如系统无法自动识别试剂槽 ID 信息,可按提示手动输入试剂槽上 SN 后的 ID 信息。

10. 点击【试剂预载】,选择【是】,开始测序预处理。屏幕上会显示预处理进度。



文库制备	DNB 制备		
加載 DNB 日NB 加载体系需要现配现用。 每张载片需要 10 μL DNB 加载体系。 切勿离心、振荡及剧烈吹打 DNB,混匀必须使用	阔口、不带滤芯的吸头。 进行混合。使用阔口枪头缓慢吹打混 n 至融化。使用涡漩振荡器振荡混匀 加载体系。 加载体系。 加载体系。 加载体系。 加载体系。 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2	9. 一况过10 (1)2)3 (1)放 1. 二人过10 (1)2)3 (1)将 置 测片点误点面手,程。可保取按示轻出加 片 序插击。击。固若中 选持一压位轻尖样 、 预入【 3. [3]	A         B           (1)         (1)           (2)         (2)           (2)
	!		1



修订日期: 2024 年 12 月 © 华大智造 版权所有

DNB 制备

#### 测序及生信分析

4. 测序完成后点击【完成】,根据提示取出载片、测序试剂槽和废液桶。

5. 清空废液后将废液桶放回废液仓,关闭废液仓门,然后点击【返回主页】。

#### ☑ 提示

测序仪界面实时显示测序阶段和步骤。ZLIMS Lite 监控及查看样本所处阶段。 如果在设置参数界面已勾选【自动清洗】,测序完成后系统将执行自动清洗流程。 如未勾选,参考 DNBSEQ-G99RS 高通量测序试剂套装说明书对仪器进行清洗。

### (可选)使用 DNBSEQ-E25RS 进行测序

准备载片和测序试剂槽

- 1. 取出载片盒,然后从盒中取出载片。
- 2. 使用前,打开载片外塑料包装,并于 24 小时内使用载片。
- 3. 取出测序试剂槽,标签朝上竖直放置。15 ℃~25 ℃室温解冻试剂槽 4.5 h~5 h 或 将其置于 2 ℃~8 ℃冰箱解冻 10 h。取出信号因子缓冲液置于 2 ℃~8 ℃冰箱解 冻备用。
- 4. 取出信号因子 1、信号因子 2 置于冰盒上 10 min 解冻备用。取出 MDA T- 试剂和 MDA 测序酶混合液置于冰盒备用。
- 5. 试剂槽解冻完成后,摇晃试剂槽,检查是否已无冰块。若有碎冰的声音,需将其置 于室温直至冰块完全融化,并用无尘纸擦干试剂槽表面的冷凝水。
- 6. 完全解冻后,双手握住试剂槽两侧,上下颠倒 20 次并拍击桌面 10 次,再上下颠倒 10 次并拍击桌面 10 次。握住试剂槽底部中间用力甩 10 次。剪开试剂槽外包装袋。

7. 用涡漩振荡器振荡混匀融化后的信号因子1和信号因子2约5s。短暂离心4s~5s 后备用。根据下表,将相应体积的信号因子1和信号因子2加入到信号因子缓冲液 中,制备成信号因子混合液。

组分	体积
信号因子 1	31.5 µL
信号因子 2	21 µL
信号因子缓冲液	21 mL

盖上信号因子混合液瓶的盖子,上下颠倒 10~15 次,混匀试剂。过程中勿剧烈振荡,避免气泡产生。

- 9. 将漏斗放在 MSP 孔上,将混好的信号因子混合液全部加入孔中。
- 10. 取出 MDA T- 试剂和 MDA 测序酶混合液。
- 11. 上下颠倒混匀 MDA 测序酶混合液,瞬时离心。
- 12. 用移液器取 5O μL MDA 测序酶混合液,加至 MDA T-试剂中,用枪头吹吸 10~15 次,混匀试剂。过程中勿剧烈振荡,避免气泡产生。
- 13. 用干净的吸头戳破 MDA 孔,将混匀后的 MDA 混合液全部加入 MDA 孔中。加入时确保不引入气泡。

☑ 提示

MDA 混合液加入试剂槽后,需尽快上机,否则可能影响测序质量。

14. 用尖头镊子夹取1号、2号和3号孔上的胶塞。



文库制备 **DNB** 制备 测序及生信分析 10. 点击【测序方案】下拉列表,测序方案选择【PE150】。点击【Barcode】下拉列 表,选择【eDNADBE25】。关于 Barcode 导入详细操作,请参考 DNBSEO-E25RS & DNBSEO-E25ARS 基因测序仪产品说明书。 11. 确认方案无误后,点击 🕥 进入下一步。 OOOO $\bigcirc$ 装载载片、试剂槽与废液槽 1. 用扫码枪扫描或手动输入载片序列号和有效期至时间。 2. 撕开载片包装, 检查载片完整性并确认载片二维码信息与标签上的序列号一致。 23 1 3. 托架卸载完成后,手捏旋转阀,将测序载片上的定位孔对准载片装载架上的定位柱 开始测序 讲行安装。 1. 将电源线一端与仪器的电源接口连接,另一端与电源插座连接。 2. 将电源线一端与计算模块连接,另一端与电源插座连接。 3. 用网线连接主机和计算模块。 4. (可选)如使用 UPS,将 UPS 电源线一端与仪器连接,另一端与电源插座连接。 5. 将仪器电源按钮拨至 位置。 6. 打开计算模块。状态指示灯亮起。 7. 确保测序仪主机和计算模块均已接通电源,测序仪主机与计算模块之间网线连接正 常。

- 8. 打开测序仪主机电源,系统进入登录界面。输入用户名 user 和密码 123, 点击 【登录】进入主界面。
- 9. 点击 (ĕ) ,进入定制测序方案界面。此时,试剂仓进行初始化,即仓门自动打 开,托架自动弹出。



行日期:2024年12月 © 华大智造版权所有





文库制备	DNB 制备	测序及生信分析
<ul> <li>提示 如发现 DNB 加载缓冲液 II 中有结晶,使用涡漩振 至沉淀重新溶解,短暂离心后方可使用。</li> <li>3. 将样本文库和平衡文库 DNB 按照质量比 2: 1 匀 5~8 次后备用。</li> <li>4. 取出一个新的 0.2 mL 离心管,按下表所示器</li> </ul>	荡器持续剧烈振荡约1 min~2 min 1 进行混合。使用阔口枪头缓慢吹打混 记制 DNB 加载混合液。	<ul> <li>提示</li> <li>测序仪界面实时显示测序阶段和步骤。ZLIMS Lite 监控及查看样本所处阶段。</li> <li>有关移除测序载片、试剂槽与废液盒的详细操作,可参考相关说明书或环境 DNA 宏 条形码测序组合产品说明书。</li> <li>每次测序完成后,仪器自动清洗。</li> </ul>
组分体和	Я	启动分析
DNB 加载缓冲液 II 34	μL	样本测序完成后,MetaSIS 软件会自动启动数据分析。
DNB 102	2 μL	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
总体积 136	δμL	理】,可进入任务管理界面查看样本状态。
5. 用阔口吸头(不带滤芯)缓慢吹打 DNB 加载	混合液 5~8 次。	
6. 用阔口吸头将制备好的 DNB 加载混合液加入	到测序载片的 DNB 加载口。确认加载	查看分析报告
		1. 在主界面点击【今日报告】下方的数字,进入分析报告界面。
7. 手动关闭仓门。点击()进入下一步。		
同顾矣数与测定		<ul> <li>若数字为【O】,表示无今日报告,且分析报告界面默认显示其他日期生成的所有报告。</li> </ul>
1. 仔细核对每一项信息,核对无误后,确认计算	算模块已连接,点击 💿 > 【确定】	<ul> <li>若数字大于 O,表示今日的报告数,且分析报告界面默认显示今日生成的所有报告。</li> </ul>
进行测序。		2. 在查询区域设置查询条件(如输入目标样本的编号),点击 🔍 ,定位到待查看
		报告所在记录行。
🕶 如有误,点击 🕢 返回相应界面修改。但此时返回定制测序方案界面后,点击 🕢		3. 点击【报告】列的 📄 ,或点击【分析类型】列的【Analysis】,并在弹出的结果
取消测序会导致已装载的试剂槽和载片报废。		
2. 测序完成后,移除测序载片、试剂槽与废液盘	含至指定垃圾桶。	
		4.



© 华大智造 版权所有

文库制备	DNB 制备	测序及生信分析
下载报告结果		
1. 在分析报告界面的查询条件区域输入目标样本的编号,点击 Q ,定位到目标样		
本所在记录行。		
2. 点击【结果路径】列的 🦳 ,打开结果目录。		
3. 点击【Result】打开 Result 文件夹。		
4. 点击" <i>*.tar.gz</i> ",下载报告结果至默认路径。		

---此页有意留白---