

## DNA建库

## OS DNB制备

## 进行测序+分析

### 试剂盒信息

试剂套装 / 试剂盒名称	货号	品牌
MGIEasy Fast 酶切 DNA 文库制备模块	940-000029-00 (16 RXN)/	MGI
	940-000027-00 (96 RXN)	
MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒	1000022800 (16 RXN)/	
	1000022802 (96 RXN)	
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒	1000005278 (8 mL)/	
	1000005279 (50 mL)	
DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 (OS-DB)	1000026466 (4 RXN)	
DNBSEQ-G99RS 高通量测序试剂套装	940-000410-00	

### 耗材信息

耗材名称	货号	品牌
0.5 mL 冻存管	1000001558	MGI
2 mL 冻存管	1000001553	
96 孔深孔板	1000004644	
96 孔 PCR 板	1000012059	
可掰开 PCR 八联管	100-000016-00	

### 仪器/软件信息

仪器 / 软件型号	货号	品牌
MGISP-100RS	900-000070-00	MGI
DNBSEQ-G99ARS	900-000560-00	
FTAT-miniloader	510-003112-00	
MTB-Explorer 软件	970-000385-00 (搭配生信分析服务器使用)	

### DNA建库

#### 适用范围

仅适用于经培养的结核分枝杆菌单菌提取的 DNA 样本。提取试剂盒推荐 MGIEasy 微生物 DNA 提取试剂盒 (货号: 1000027955) 或具有同等功能的其他提取试剂盒。

#### 准备样本

- 选择以下其中一种操作准备样本混合液:
  - 取出不低于 10 ng 的 gDNA 样本, 并用 TE Buffer 将总体积补充至 48  $\mu$ L。
  - 如有特殊需求, 取出 1.1 ~ 110 ng 的 gDNA 样本, 并用 TE Buffer 将总体积补充至 48  $\mu$ L。

#### 提示

同一轮建库只能选择其中一种起始量进行实验。

- 将 48  $\mu$ L 转移至准备好的八联管 (可掰开 PCR 八联管) 中, 置于冰上待用。确保底部无气泡, 侧壁无挂液。

## DNA建库

## OS DNB制备

## 进行测序+分析

### 提示

- 样本数量为 4 或 8 时, 需 1 排八联管。
- 样本数量为 16 时, 需 2 排八联管。
- 如实际样本数量不足于 4, 8 或 16 时, 可将多余孔位用水补齐。试剂耗材依然按照所选择的数量准备。

### 准备试剂

1. 从【MGIEasy Fast 酶切 DNA 文库制备试剂套装】中取出试剂, Enzyme 上下颠倒充分混匀, 瞬时离心后置于冰上待用。其他 Buffer 于室温解冻后用涡旋仪充分混匀, 瞬时离心后置于冰上待用。
2. 根据样本数, 按照下表分装试剂。

试剂	分装容器	分装体积 (μL)		
		4 RXN	8 RXN	16 RXN
Fast FS Buffer	0.5 mL 冻存管	65	105	215
Fast FS Enzyme	0.5 mL 冻存管	30	45	105
Ligation Enhancer	0.5 mL 冻存管	12	18	55
Fast Ligation Buffer	0.5 mL 冻存管	143	225	450
Ad Ligase	0.5 mL 冻存管	33	50	100
PCR Enzyme Mix	2 mL 冻存管	300	470	955

### 提示

使用 16 RXN 规格套装对 16 个样本进行建库时, PCR Enzyme Mix 需手动转移到 2 mL 冻存管中, 其他试剂请使用 MGIEasy Fast 酶切 DNA 文库制备试剂盒中的试剂管进行自动化建库。

3. 按照下表配制 1x Elute Enhancer, En-TE 和 En-Beads。

### 提示

- 提前取出 DNA Clean Beads 并置于室温平衡至少 30 min 以上。使用前需充分混匀。
- 1x Elute Enhancer 可室温储存, En-TE 和 En-Beads 需放置 4 °C 条件下储存, 以上试剂配置后 7 天内可用。

#### 1x Elute Enhancer

组分	体积 (μL)
20x Elute Enhancer	2.5
Nuclease-Free Water	47.5
<b>总体积</b>	<b>50</b>

#### En-TE

组分	体积 (μL)
1x Elute Enhancer	8
TE Buffer	3992
<b>总体积</b>	<b>4000</b>

#### En-Beads

组分	体积 (μL)
1x Elute Enhancer	15
DNA Clean Beads	1485
<b>总体积</b>	<b>1500</b>

4. 将 En-Beads 和 DNA Clean Beads 分别充分混匀, 按照以下要求, 分装至新的 2 mL 冻存管中, 并盖上管盖。

标记	耗材	分装体积 (μL)		
		4 RXN	8 RXN	16 RXN
En-Beads	2 mL 冻存管	350	700	1300
DNA Clean Beads	2 mL 冻存管	500	1000	1800

5. 使用 Milli-Q 水配制 25 mL 80% 乙醇。

### 提示

80% 乙醇现配现用。

6. 取1块96孔深孔板, 按下图加入试剂。

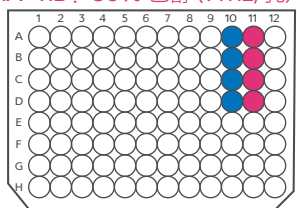
## DNA建库

## OS DNB制备

## 进行测序+分析

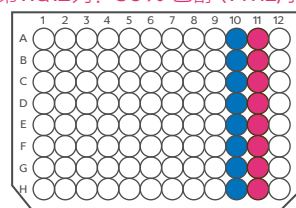
### 4 RXN

10A~10D: En-TE (220  $\mu$ L/孔)  
11A~11D: 80% 乙醇 (1 mL/孔)



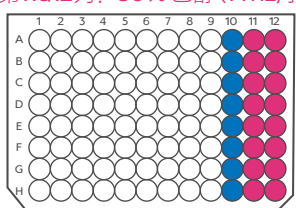
### 8 RXN

第10列: En-TE (220  $\mu$ L/孔)  
第11&12列: 80% 乙醇 (1 mL/孔)



### 16 RXN

第10列: En-TE (400  $\mu$ L/孔)  
第11&12列: 80% 乙醇 (1 mL/孔)



7. 按照下表和实际基因组DNA用量, 确定相应的adapter稀释倍数, 用试剂盒中的TE Buffer进行稀释。若稀释倍数大于1, 确保稀释后的adapter溶液体积不小于100  $\mu$ L, 并转移至一个干净的0.5 mL冻存管, 混匀离心后放置冰上备用。

#### 提示

Adapter的质量和用量直接影响建库效率和文库质量。

基因组 DNA (ng)	MGI adapter	稀释后 0.5 mL 冻存管投入量 ( $\mu$ L)		
	稀释倍数	4 RXN	8 RXN	16 RXN
50-200	不稀释	35	55	100
25	2x	35	55	100
10	5x	35	55	100
5	10x	35	55	100
2.5	15x	35	55	100
1	45x	35	55	100

8. 将PCR Primer分装至1条 (4或8 RXN) 或2条 (16 RXN) 八联管, 当样本量为4时, 仅需分装至八联管的前4孔, 每孔分装的体积不少于15  $\mu$ L。

#### 提示

八联管为可掰开式PCR八联管。

## 运行MGISP-100RS流程

1. 在MGISP-100RS 运行向导界面, 设置【应用方案】为【JB-A06-079 MGIEasy Fast FS DNA Library Prep Set\_RV1.0\_SV2.0】。

#### 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。

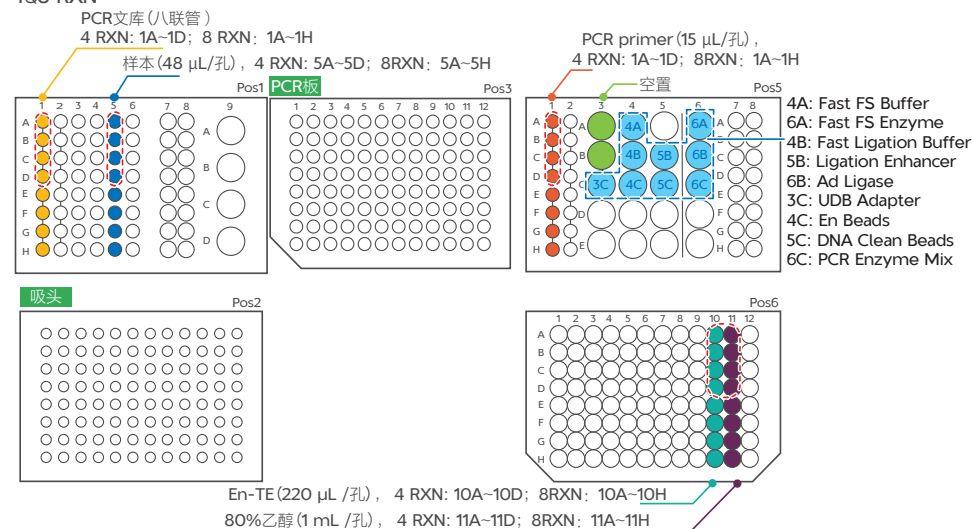
2. 放置耗材前, 使用涡涡仪, 充分混匀磁珠并短暂离心。

#### 提示

确保其余试管管底无气泡, 侧壁无挂液, 且所有管盖均已打开。

3. 根据下图放置耗材。

### 4&8 RXN

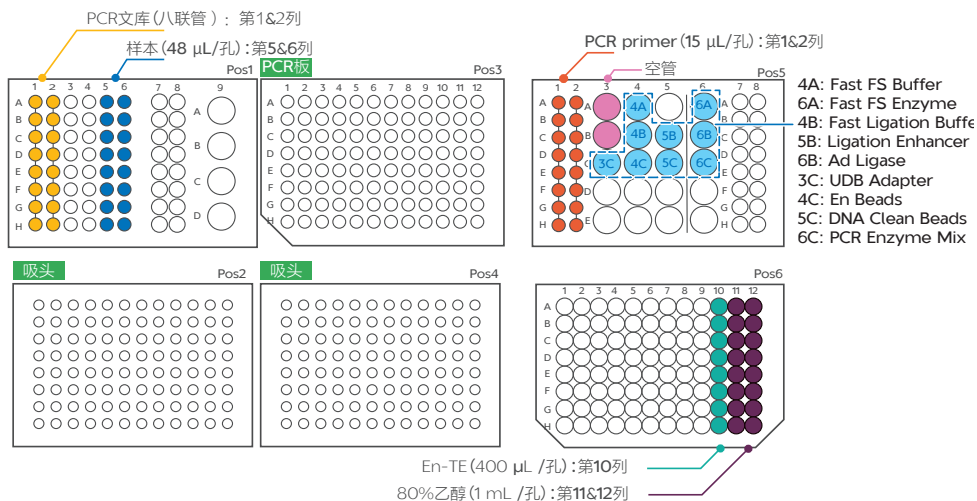


DNA建库

OS DNB制备

进行测序+分析

16 RXN



提示

- 当样本数量为4时, 仅需在八联管及深孔板每列前4孔内加入试剂, 文库产物将收集在八联管前4孔中。
- Ligation Enhancer 首次使用后, 置于 10 °C - 30 °C 避光储存。

- 点击【运行】按钮后, 若运行4 RXN & 8 RXN脚本, 出现Sample\_Num弹窗, 按需选择样本数量。
- 按照下表选择打断时间, 点击【继续】。

建库起始量 (ng)	自动化投入量 (ng)	PE150 测序打断时间 (min)
200	220	12
100	110	12
50	55	12
5	5.5	8
1	1.1	8

- 按照下表选择PCR循环数, 所有数值下面的横线不填。选择好所有条件后, 点击【继续】, 实验正式开始。

基因组 DNA (ng)	对应产量所需循环数	
	300 ng	1 μg
≥ 100	3-4	5-6
50	5-6	6-7
5	7-9	10-11
1	11-12	13-15

提示

整个流程预计运行 3 h 10 min - 3 h 50 min。运行过程中, 可根据需要暂停或恢复实验。

- 运行完成后, 取出 Pos 1 位置第 1、2 列的 PCR 文库 (体积为 30 μL)。
- 按照定量试剂盒的操作说明对文库进行定量, PCR 文库的浓度需不小于 1 ng/μL。定量试剂盒为 Qubit dsDNA HS Assay Kit 或 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit。
- 提示  
文库浓度应大于 1 ng/μL。
- 停止点  
PCR 文库可置于 -20 °C 冰箱储存。
- (可选) 使用纯水和 75% 乙醇清理仪器台面, 并运行后期清洁流程。
- 将废弃的样本管、不需重复使用的试剂管、深孔板以及废料袋投放至指定废品区域。

DNA建库

OS DNB制备

进行测序+分析

## OS DNB制备

### 提示

使用同一张载片进行测序时请保证文库对应的 barcode 碱基平衡。

### 准备样本

- 取 0.2 mL PCR 管，根据测序数据量要求将待测序文库按照相应比例的混合，混合后文库 DNA 的质量为 20 ng，体积不大于 10  $\mu\text{L}$ 。

### 提示

若总体积不足 10  $\mu\text{L}$ ，用 TE buffer 补充至 10  $\mu\text{L}$ 。

- 从【DNBSEQ一步法DNB制备试剂盒(OS-DB)】中取出如下试剂配制反应混合液。

组分	体积 ( $\mu\text{L}$ )
混合后文库	V
TE 缓冲液	10-V
DNB 制备缓冲液 (OS-DB)	10
总体积	20

- 将 PCR 管涡旋振荡并瞬时离心，将反应液集中于管底。
- 将 PCR 管置于 PCR 仪中，按下表的条件进行反应：

温度	时间
105 $^{\circ}\text{C}$ (热盖)	on
95 $^{\circ}\text{C}$	3 min
40 $^{\circ}\text{C}$	3 min
4 $^{\circ}\text{C}$	hold

- 反应结束后，取出 PCR 管在冰上加入如下试剂：

组分	体积 ( $\mu\text{L}$ )
DNB 聚合酶混合液 I	20
DNB 聚合酶混合液 II (OS)	2
总体积	22

- 将 PCR 管涡旋振荡并瞬时离心，将反应液集中于管底。
- 将 PCR 管置于 PCR 仪中，按下表进行反应 (总体积为 42  $\mu\text{L}$ )。

### 提示

建议热盖温度设置为 35  $^{\circ}\text{C}$ ，或接近 35  $^{\circ}\text{C}$  的最低温度。

温度	时间
35 $^{\circ}\text{C}$ (热盖)	on
30 $^{\circ}\text{C}$	20 min
4 $^{\circ}\text{C}$	hold

- 反应结束后，向 PCR 管中加入 10  $\mu\text{L}$  DNB 终止缓冲液。用阔口吸头缓慢吹打混匀 5-8 次。

### 提示

请勿振荡及剧烈吹打。

### 停止点

DNB 可置于 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下储存 48 小时。

- 取 2  $\mu\text{L}$  DNB，按照定量试剂盒 Qubit ssDNA Assay Kit 的操作说明对 DNB 进行定量，最终 DNB 浓度需不小于 8 ng/ $\mu\text{L}$ 。

### 提示

若 DNB 浓度超过 40 ng/ $\mu\text{L}$ ，需用 TE 缓冲液稀释至 20 ng/ $\mu\text{L}$ 。

DNA建库

OS DNB制备

进行测序+分析

## 进行测序+分析

### 提示

关于软件、测序仪和加样器的具体操作，参考相关说明书。

## 录入样本

1. 双击桌面 ZLIMS 快捷方式 ，进入 MGI ZLIMS 登录界面。
2. 输入授权的账号与密码，点击【登录】。
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【MTB-Explorer\_WGS】，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】。
5. 在弹窗中点击【Excel 模板】/【CSV 模板】，下载 .xlsx 或 .csv 格式的样本模板文件。
6. 打开模板，填写【DNB 样本录入】工作表，完成后点击【保存】。

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	产品名称(*)	DNB ID(*)	Barcode(*)	样本编号(*)	样本名称	样本类型(*)	性别	年龄
2	MTB-Explorer_WGS						Unknow	
3								

### 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，不可与系统中已录入的 DNB ID 重复。
- 【Barcode】一个样本编号对应多个 Barcode 时，多个 Barcode 以英文逗号(,) 隔开，多个连续 Barcode 可用波浪线(~) 连接。
- 【样本编号】：一般采用“字母 + 数字”的组合形式，可以和系统中已录入的样本编号重复。
- 【样本名称】：如果样本名称相同且样本类型相同，将合并数据进行分析。

7. 返回导入测序 + 分析界面，点击【选择文件】，在弹框中选择要导入的 Excel 文件，点击【上传】。
8. DNB 样本信息录入完成后，返回新建测序 + 分析界面，点击【确认生成任务】，在新弹窗点击【确定】。

## 准备载片

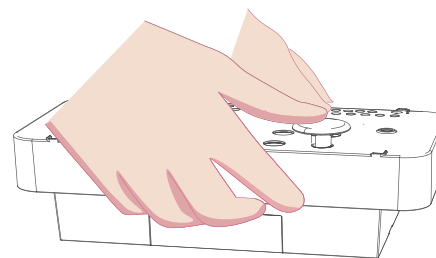
取出载片在室温环境下放置至少30分钟，但不超过24小时，用于DNB加载备用。

### 提示

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 3~4 小时，或提前一天将测序试剂槽置于 2~8 °C 冰箱解冻。解冻后的试剂槽置于 2~8 °C 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。
3. 使用按压工具按压试剂槽 M1、M2、M3、M4 孔位。



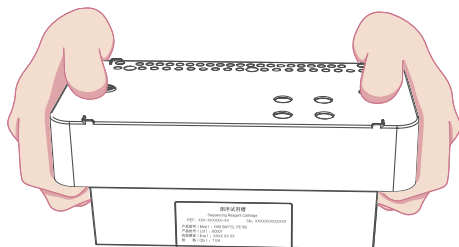
4. 按照试剂槽上的标识，双手握住试剂槽 A、B 两侧，上下、左右摇晃混匀 10~20 次，保证试剂充分混匀。轻轻敲打测序试剂槽，以去除试剂中的气泡。
5. 用 200 μL 移液器吸取 125 μL MDA 聚合酶混合液加入到 MDA 试剂的试剂管中。颠倒混匀 4-6 次，使其充分混匀。

DNA建库

OS DNB制备

进行测序+分析

- 用枪头戳破试剂槽上标识 MDA 的孔位，将全部混合液缓慢加入到 MDA 孔中，加入时确保试剂不溢出到其它孔位。



## 开始测序

- 输入用户名“user”与密码“123”，点击【登录】，进入主界面。
- 选择空闲状态下的 A 边或 B 边进行测序，点击界面中的【测序】，选择【新建测序】。如需双边测序，点击【测序 A&B】。
- 点击【新建测序】后进入测序前的自检，废液仓门会自动弹出，根据界面提示检查废液桶是否到位，放入废液桶后关闭废液仓门。

**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系统检测线。

- 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。

- 在【测序方案】下拉菜单中选择【PE150+10+10】的测序方案，并点击右侧的下拉菜单按钮，选择对应的 UDB 标签序列【UDB (1~480)】。
- 在高级设置中，【拆分 Barcode】和【自动清洗】流程都选择【是】。
- 点击【下一步】，升降屏自动上升。

- 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。

- 点击【试剂预载】，选择【是】，开始测序预处理，软件界面会显示预处理进度。

## 加载 DNB

- 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。
- 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
DNB 聚合酶混合液 II (LC)	1
DNB	21
<b>总体积</b>	<b>29</b>

- 用阔口吸头缓慢混匀 DNB 加载体系 5~8 次，混匀后放置 4 °C 备用。

**提示**

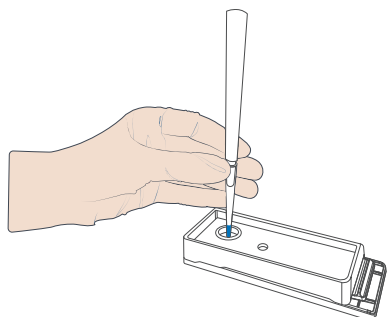
- DNB 加载体系需现配现用。
- 切勿离心、振荡及剧烈吹打。

- 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。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。
- 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，按下移液枪上相应按钮卸载吸头。

DNA建库

OS DNB制备

进行测序+分析



**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 s, 待 DNB 文库流过载片。
7. 通过观察孔查看是否过液。如有液面反光, 则过液成功。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。

3. 点击【下一步】, 回顾测序信息, 各项信息确认无误后, 点击【测序】, 在弹出的对话框中选择【是】, 开始测序。

**提示**

软件界面实时显示测序阶段和步骤。刷新 ZLIMS 系统的样本管理界面后, 可查看样本状态。

**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 , 定位到指定样本所在记录行, 点击该记录行在【任务名称】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。