

RT-PCR 及多重扩增 (手工)

多重扩增产物纯化

Fast PCR-FREE 文库制备

DNB 制备

测序与分析

## 适用范围

- ATOplex HIV-1 建库试剂盒套装 (16 RXN)

名称	组分	货号
ATOplex HIV-1 扩增试剂盒	ATOplex HIV-1 Drug Resistance Primer Pool	940-000722-00
	RT-PCR Buffer	
	RT-PCR Enzyme Mix	
MGIEasy Fast PCR -FREE 酶切文库制备试剂套装 (16RXN) (940-000019-00)	20× Elute Enhancer	940-000017-00
	Fast FS Buffer	
	Fast FS Enzyme	
	Ligation Enhancer	
	Fast Ligation Buffer	
	Ad Ligase	
MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试剂盒	UDB Adapters	940-000018-00
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒	TE Buffer	1000005278
	DNA Clean Beads	

- ATOplex HIV-1 建库试剂盒套装 (96 RXN)

名称	组分	货号
ATOplex HIV-1 扩增试剂盒 × 6	ATOplex HIV-1 Drug Resistance Primer Pool	940-000722-00
	RT-PCR Buffer	
	RT-PCR Enzyme Mix	
MGIEasy Fast PCR -FREE 酶切文库制备试剂套装 (96RXN) (940-000021-00)	20× Elute Enhancer	940-000020-00
	Fast FS Buffer	
	Fast FS Enzyme	
	Ligation Enhancer	
	Fast Ligation Buffer	
	Ad Ligase	
MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试剂盒 A	UDB Adapters A	940-000023-00
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒 × 2	TE Buffer	1000005278
	DNA Clean Beads	
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒	TE Buffer	1000005278
	DNA Clean Beads	

## RT-PCR 及多重扩增 (手工)

## 多重扩增产物纯化

## Fast PCR-FREE 文库制备

## DNB 制备

## 测序与分析

- DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 (OS-DB) (货号: 1000026466)

名称	规格及数量
TE 缓冲液	300 $\mu$ L $\times$ 1 支
DNB 制备缓冲液 (OS DB)	80 $\mu$ L $\times$ 1 支
DNB 聚合酶混合液 I (OS)	160 $\mu$ L $\times$ 1 支
DNB 聚合酶混合液 II (OS)	16 $\mu$ L $\times$ 1 支
DNB 终止缓冲液	100 $\mu$ L $\times$ 1 支

- 测序试剂套装

名称	货号
DNBSEQ-G99RS 高通量测序试剂套装 (G99 SM FCL PE150)	940-000410-00
DNBSEQ-G99RS 高通量测序试剂套装 (G99 FCL PE150)	940-001269-00

## 耗材信息

名称	货号	品牌
0.5 mL 冻存管	1000001558	MGI
2 mL 冻存管	1000001553	
250 $\mu$ L 带滤芯自动化吸头	1000000723	
0.2 mL 96 孔全裙边 PCR 板	091-000165-00	
1.3 mL 96 孔圆形孔 U 型底深孔板	1000004644	
可掰开 PCR 八联管及管盖	100-000016-00	

## RT-PCR 及多重扩增 (手工)

### 准备样本

准备总RNA样本, 包括血浆、血清样本等。推荐使用完整度较好的RNA样本且CT值小于或等于32。推荐起始体积为20  $\mu$ L, 但不大于20.5  $\mu$ L。



提示

RNA 提取过程中, 使用不含有 EDTA 的缓冲液溶解 RNA。

### 进行 RT-PCR 及多重扩增

1. 从 ATOplex HIV-1 扩增试剂盒中取出如下试剂, 在冰上配制 RT-PCR 及多重扩增反应液:

试剂	体积 ( $\mu$ L)
RT-PCR Buffer	25
RT-PCR Enzyme Mix	2.5
ATOplex HIV-1 Drug Resistance Primer Pool	2
Nuclease-Free Water	0.5
<b>总体积</b>	<b>30</b>

2. 将反应液充分混匀, 分装至新的 0.2 mL PCR 管中。
3. 向 PCR 管中加入 20  $\mu$ L RNA 提取产物, 总体积为 50  $\mu$ L。
4. 用移液器将 PCR 管的溶液吹打混匀 10 次, 瞬时离心, 将反应液集中于管底。



提示

请勿振荡及剧烈吹打 PCR 管中的溶液。

5. 将 PCR 管置于 PCR 仪中, 按下表的条件进行反应:

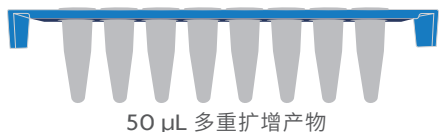
温度	时间	循环数
热盖 (105 °C)	On	/
50 °C	30 min	1
94 °C	3 min	
94 °C	30 s	
58 °C	45 s	42
72 °C	2 min	
72 °C	5 min	
12 °C	Hold	1

6. 反应结束后, 瞬时离心, 将产物置于冰上待用。

## 多重扩增产物纯化

### 准备样本

转移 50  $\mu$ L 多重扩增产物至八联管, 确保底部无气泡、侧壁无挂液后置于冰上待用。



#### 提示

- 样本数量为 8 份时, 需 1 排八联管。样本数量为 16 份时, 需 2 排八联管。
- 样本数量不足 8 或 16 时, 可用水补齐多余管, 试剂耗材仍按照 8 份或 16 份样本准备。

## 准备试剂

1. 从 MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒中取出如下试剂, 充分振荡混匀。

试剂	体积 ( $\mu$ L)	
	8 RXN	16 RXN
DNA Clean Beads	380	660
TE Buffer	500	900

#### 提示

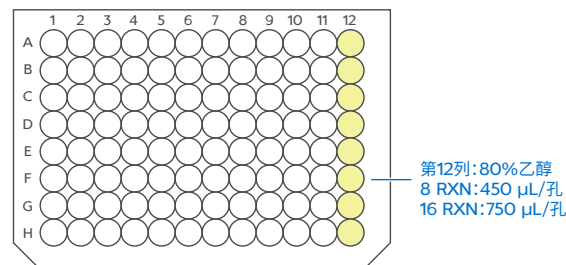
DNA Clean Beads 需提前 30 min 取出置于室温, 使用前需充分振荡混匀。

2. 取新的 2 mL 冻存管, 按照样本数量分别吸取上表所列体积的 DNA Clean Beads 和 TE Buffer 到管中, 盖上管盖, 分别标记为 “DNA Beads 1” 和 “TE”。
3. 将无水乙醇和 Milli-Q 水按比例配制 25 mL 80% 乙醇。

#### 提示

该试剂现配现用。

4. 取 1 块 1.3 mL 96 孔深孔板, 将配制好的 80% 乙醇按下图加入深孔板第 12 列孔位:



## 初始化 MGISP-100RS

1. 打开计算机, 进入电脑桌面软件, 双击图标打开软件。
2. 选择【Real】模式, 点击【创建】。
3. 点击【操作员进入】, 进入主界面。
4. 点击界面上方【初始化】, 仪器开始初始化。  
初始化成功后, 界面出现提示信息。

## 前期清洁

### 提示

每天首次进行实验前, 需进行前期清洁。

1. 点击左侧菜单, 选择【前后期清洁】。
2. 在【清洁】下拉菜单中, 选择【前期清洁】, 点击【开始】。
3. 根据弹窗提示完成相应操作。点击【继续】。
4. 系统开始对仪器内部进行紫外照射和空气过滤。

## 运行多重扩增产物纯化流程

1. 在 MGISP-100RS 运行向导界面进行设置:

【应用方案】	【JB-A06-117 MGI HIV-1 Drug Resistance Sequencing Package_RV1.0_SV1.0】
【脚本】	【1.ATOPllex_RNA_HIVDR_PCR_Purification_step1】

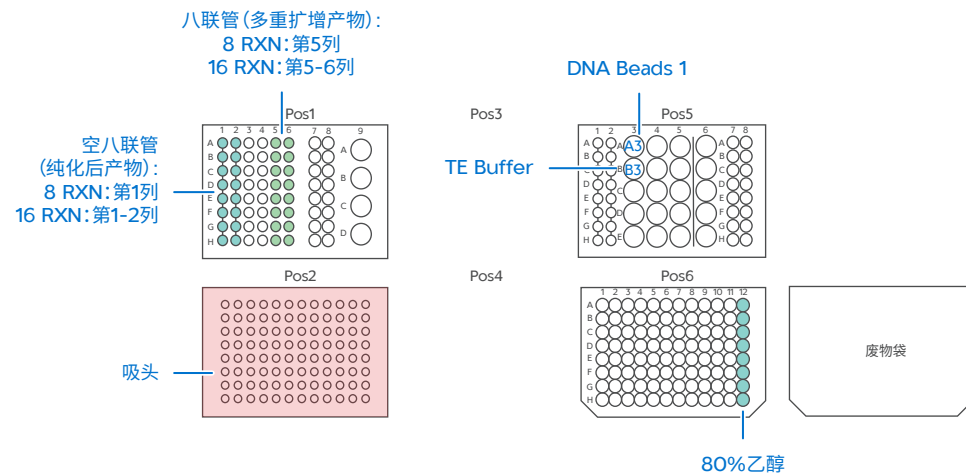
### 提示

首次运行前, 确认应用脚本和 PCR 程序已按照 *MGISP-100 MGI HIV-1 耐药测序组合产品自动化操作说明书* 导入仪器中。

2. 使用涡旋振荡器充分混匀 DNA Clean Beads, 并短暂离心。
3. 打开 MGISP-100RS 视窗, 根据下图放置耗材:

### 提示

确保试管管底无气泡, 侧壁无挂液, 且所有管盖均已打开。



4. 确认无误后关闭视窗。
5. 点击【运行】, 界面出现弹窗提示, 选择合适的样本数量【8】或【16】, 点击【继续】。
6. 运行完成后, 按照弹窗提示取出 Pos 1 位置多重扩增纯化后产物, 每管体积为 30  $\mu$ L。

样本数量	产物位置
8 RXN	第 1 列
16 RXN	第 1-2 列

7. 点击【继续】结束流程。

RT-PCR 及多重扩增 (手工)

多重扩增产物纯化

Fast PCR-FREE 文库制备

DNB 制备

测序与分析

8. 按照定量试剂盒 Qubit® dsDNA HS Assay Kit 或 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit 的操作说明对多重扩增纯化后产物进行定量, 产物浓度需大于或等于 2 ng/μL。

## II 停止点

多重扩增纯化后产物可置于 -20 °C 冰箱储存, 并于两周内使用。

9. 将废弃的样本管、无需使用的试剂管、深孔板、废料袋投放至指定废品区域。

10. (可选) 若当天不再进行实验, 用纯水和 75% 乙醇清理仪器台面, 并运行后期清洁流程。

## Fast PCR-FREE 文库制备

### 准备样本

1. 推荐每份样本的建库起始量为 215 ng, 用 TE Buffer 补充至总体积 48 μL。如建库起始量不足 215 ng, 投入全部样本, 并用 TE Buffer 补充至总体积 48 μL。

2. 转移 48 μL 至准备好的八联管中, 确保底部无气泡、侧壁无挂液后置于冰上待用。

## 💡 提示

- 样本数量为 8 份时, 需 1 排八联管。样本数量为 16 份时, 需 2 排八联管。
- 样本数量不足 8 或 16 时, 可用水补齐多余管, 试剂耗材仍按照 8 或 16 份样本准备。

### 准备试剂

1. 配制 1× Elute Enhancer、En-TE 和 En-Beads。

## 💡 提示

1× Elute Enhancer 置于室温储存, En-TE 和 En-Beads 置于 4 °C 条件下储存。以上溶液 7 天内可用。

### ■ 1× Elute Enhancer

组分	体积 (μL)
20× Elute Enhancer	1.5
Nuclease-Free Water	28.5
总体积	30

### ■ En-TE

组分	体积 (μL)
1× Elute Enhancer	5.4
TE Buffer	2694.6
总体积	2700

### ■ EN-Beads

组分	体积 (μL)
1× Elute Enhancer	20
DNA Clean Beads	1980
总体积	2000

2. 将 En-Beads 充分混匀, 按照以下要求, 分装至新的 2 mL 冻存管中, 盖上管盖, 标记为 “DNA Beads 2”。

标记	耗材	分装体积 (μL)	
		8 RXN	16 RXN
DNA Beads 2	2 mL 冻存管	950	1800

3. 按照下表取出试剂并解冻, 将试剂分别混匀离心后, 置于冰上待用。再取出 0.5 mL 冻存管, 分装文库制备试剂。

**提示**

- 若进行 8 RXN 通量的文库制备, 取出 5 个 0.5 mL 冻存管, 分装文库制备试剂。
- 若使用 16 RXN 试剂套装进行 16 RXN 通量的文库制备, 取出 2 个 0.5 mL 冻存管备用。直接使用原管试剂, 无需分装。
- 若使用 96 RXN 试剂套装进行 16 RXN 通量的文库制备, 取出 5 个 0.5 mL 冻存管, 分装文库制备试剂。再取出 2 个 0.5 mL 冻存管备用。

试剂	分装体积 (μL)	
	8 RXN	16 RXN
Fast FS Buffer	102	200
Fast FS Enzyme	47.5	110
Ligation Enhancer	25	48
Fast Ligation Buffer	220	430
Ad Ligase	45	105

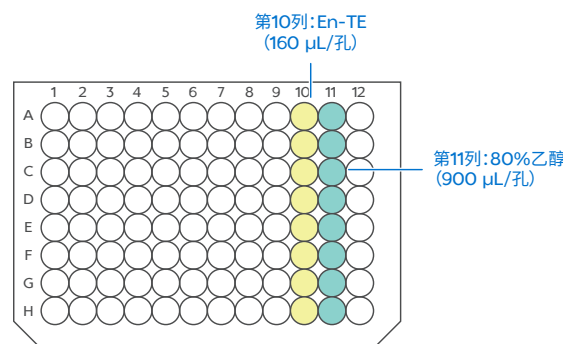
4. 将无水乙醇和 Milli-Q 水按比例配制 25 mL 80% 乙醇。

**提示**

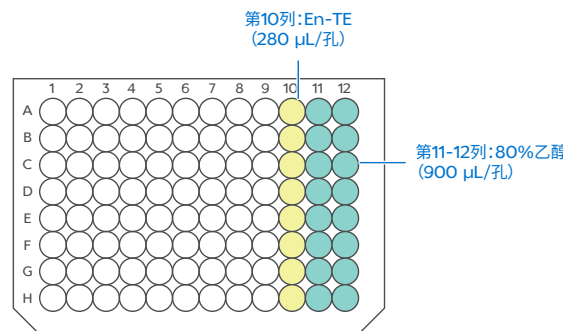
该试剂现配现用。

5. 取 1 块 1.3 mL 96 孔深孔板, 按下图加入试剂:

- 8 RXN



- 16 RXN



6. 取出接头 Adapters, 充分混匀离心后, 加入准备好的八联管中, 每管 10 μL。

## 运行 Fast PCR-FREE 文库制备流程

1. 在MGISP-100RS运行向导界面进行设置:

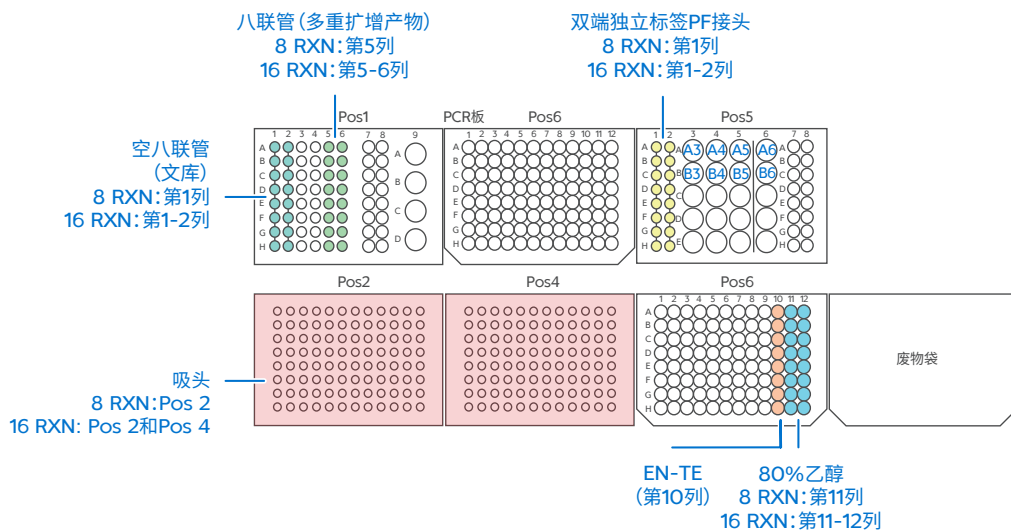
【应用方案】	【JB-A06-117 MGI HIV-1 Drug Resistance Sequencing Package_RV1.0_SV1.0】
【脚本】	【2.ATOPlex_Fast_PCR_FREE_DNA_8RXN_step2】 或 【2.ATOPlex_Fast_PCR_FREE_DNA_16RXN_step2】

2. 使用涡旋振荡器充分混匀 DNA Clean Beads 并短暂离心。

3. 打开 MGISP-100RS 视窗, 根据下图放置耗材:

### 提示

- 如无特殊备注, 8 或 16 份样本时均需准备。
- 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。



Pos 5 各孔试剂加载说明如下:

孔位	试剂名称
A3	DNB Beads 2
A4	Fast FS Buffer
A5&B5	空 0.5 mL 冻存管 (16 RXN)
A6	Fast FS Enzyme
B3	Ligation Enhancer
B4	Fast Ligation Buffer
B6	Ad Ligase

4. 确认无误后关闭视窗。
5. 点击【运行】。
6. 运行完成后, 按照弹窗提示取出 Pos 1 位置 Fast PCR-FREE 文库制备产物, 体积为 25  $\mu$ L。

样本数量	产物位置
8 RXN	第 1 列
16 RXN	第 1-2 列

7. 点击【继续】结束流程。
8. 按照定量试剂盒 Qubit dsDNA HS Assay Kit 或 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit 的操作说明对 Fast PCR-FREE 文库进行定量, 最终文库浓度需大于或等于 0.8 ng/ $\mu$ L。该浓度要求不适用于阴性对照文库。

### 停止点

Fast PCR-FREE 文库可置于 -20  $^{\circ}$ C 冰箱储存。

9. 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。
10. (可选) 如果当天不再进行实验, 使用纯水和 75% 乙醇清理仪器台面, 并运行后期清洁流程。

RT-PCR 及多重扩增 (手工)

多重扩增产物纯化

Fast PCR-FREE 文库制备

**DNB 制备**

测序与分析

## DNB 制备

### 提示

若使用同一张载片进行测序, 确保文库对应的 Barcode 碱基平衡。

- 取 0.2 mL PCR 管, 等质量混合待测文库并将其振荡混匀, 取 15 ng 混合后的文库制备 DNB, 要求文库体积不大于 10  $\mu\text{L}$ 。

### 提示

若总体积不足 10  $\mu\text{L}$ , 用 TE 缓冲液补充至 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, 按下表进行反应。

温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	时间 (min)
105	On
95	3
40	3
4	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。

温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	时间 (min)
35	On
30	20
4	Hold

### 提示

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

- 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 PCR 管中的溶液。

### 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 浓度需不低于 8 ng/ $\mu\text{L}$ 。

### 提示

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



## 测序与分析

### 录入样本

1. 打开 Chrome 浏览器, 在地址栏中输入如下 IP 地址, 按【Enter】键: 192.168.1.5
2. 输入授权的账号【lite】与密码【lite123456】, 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. 选择分析产品为【HIV\_Drug\_Resistance】, 选择【表格导入样本编号】, 导入 DNB 样本信息 (以此为例), 点击【新建】。
5. 在弹出的导入测序 + 分析界面, 点击【Excel 模板】/【CSV 模板】, 下载 .xlsx 或 .csv 格式的样本模板文件。

产品名称 (*)	DNB ID (*)	Barcode (*)	样本编号 (*)	样本类型 (*)
HIV_Drug_Resistance	DNB20231205	UDB-385	test1	RNA

DNB样本录入

6. 打开模板, 填写 DNB 样本录入工作表, 完成后点击【保存】。

#### 提示

- 红色带 \* 号字段为必填项, 该部分不得为空。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。
- 一个样本编号对应多个 Barcode 时, 可用英文逗号 (,) 隔开多个 Barcode, 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, 可与系统中已录入的样本编号重复。
- 样本类型为 RNA。

7. 返回导入测序 + 分析界面, 点击【选择文件】, 在弹框中选择填写好的 DNB 样本录入工作表。点击【上传】, 软件自动回到新建测序 + 分析界面。
8. 确认导入的样品信息无误后, 点击【确认生成任务】, 再在弹窗内点击【确定】。

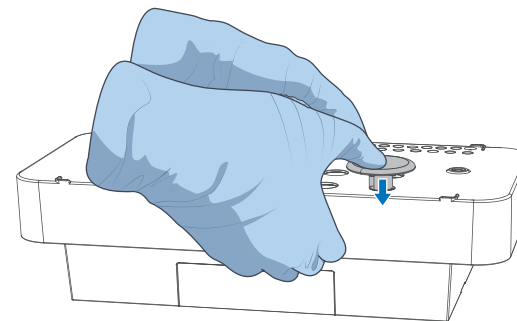
### 准备测序试剂槽

1. 取出载片并置于室温下放置至少 30 分钟, 用于后续 DNB 加载。

#### 提示

载片不可静置超过 24 小时, 此时切勿拆开载片真空包装袋。

2. 取出测序试剂槽并置于常温水浴解冻 3~4 小时, 或提前一天将测序试剂槽置于 2 °C ~8 °C 冰箱解冻。解冻后置于 2 °C ~8 °C 冰箱备用。
3. 撕掉试剂槽包装袋, 用无尘纸擦干盖板及孔位处的冷凝水。
4. 使用按压工具按压试剂槽孔位 M1、M2、M3 与 M4。



5. 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。使用洁净的 1 mL 枪头将 MDA 孔位戳破, 轻轻敲打测序试剂槽, 以减少试剂中的气泡。

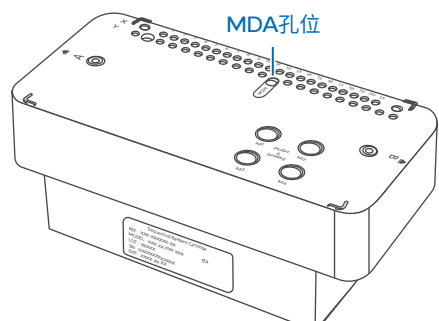
RT-PCR 及多重扩增 (手工)

多重扩增产物纯化

Fast PCR-FREE 文库制备

DNB 制备

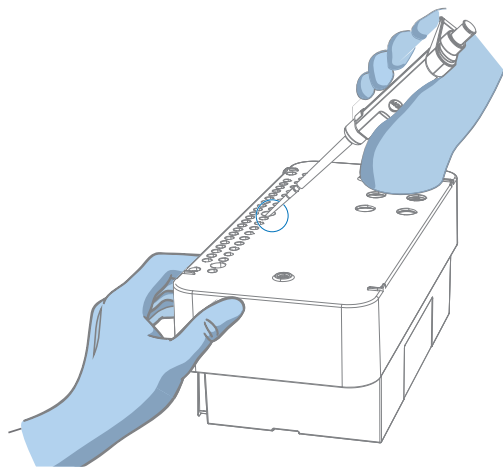
测序与分析




- 从测序试剂套装中取出 MDA 试剂和 MDA 聚合酶混合液，用 200  $\mu\text{L}$  移液器吸取 125  $\mu\text{L}$  MDA 聚合酶混合液加入到 MDA 试剂的试剂管中，进行 PE 测序。
- 上下、左右摇晃 6 次，使其充分混匀，将混合液全部加入到 MDA 孔中。

**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。



## 开始测序与分析

- 点击测序仪控制软件主界面右上角的 。
- 输入用户名【user】和密码【123】，点击【登录】，进入主界面。
- 任选空闲状态下的 A/B 进行测序，点击界面上的【测序】，选择【新建测序】。如需双边测序点击【测序 A&B】。
- 进行测序前的自检，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**

上机测序前需确保废液桶内废液液面低于系统检测线，清空废液桶。

- 点击【下一步】，选择【测序 & 信息传输】，在【DNB ID】待写区输入 DNB 信息，确保输入的 DNB ID 与 ZLIMS 中导入的 DNB 样本录入工作表中的 ID 一致。
- 在【测序方案】下拉菜单中选择测序方案【PE150+10+10】，并点击右侧的下拉菜单按钮，选择标签序列【UDB (1-480)】。

**提示**

有关自定义标签序列的导入，参考相关说明书。

- 在【拆分 Barcode】和【自动清洗】选项中分别选择【是】，点击【下一步】。
- 等待升降屏移动到指定位置，将准备好的测序试剂槽放入试剂仓，系统自动识别测序试剂槽 ID。

**提示**

如无法自动识别，可按提示手动输入。

- 点击【试剂预载】，选择【是】，开始测序预载，屏幕上会显示预载进度。
- 进行 DNB 加载：
  - 提前取出 DNB 加载缓冲液 II，置于冰盒上约 0.5 小时至融化，使用涡旋振荡器振荡混匀 5 秒并短暂离心后置于冰盒上备用。

② 取出新的 0.2 mL 管，按下表配制 DNB 加载体系。

组分	体积 (μL)
DNB 加载缓冲液 II	7
DNB 聚合酶混合液 II (LC)	1
DNB	21
总体积	29

③ 用阔口吸头将 DNB 加载体系缓慢混匀 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。

11. 取出载片，检查载片完整性。用 100 μL 吸头吸取 10 μL DNB 加载体系，轻轻插入载片流路入口中，按下移液器上的吸头脱卸按钮，样本会自动流入载片中。



提示

- 不要按下移液器的控制按钮。
- 在 DNB 加载过程中请勿转动吸头或者移动载片，避免气泡进入载片。

12. 测序预载完成后，升降屏会上升到载片加载位置。将准备好的载片插入到载片平台中。系统自动识别载片 ID。



提示

如无法自动识别，可按提示手动输入。

13. 点击【下一步】，对填写的信息进行复核。

14. 各项信息确认无误后，点击【测序】，选择【是】。此时升降屏会下降到指定位置，屏幕上显示测序界面，测序开始。

控制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。

15. 测序完成后，点击【完成】。待仪器自动升屏，取出测序试剂槽和载片，点击【返回主页】。

16. 测序完成后，系统将自动启动分析流程。

## 查看并下载报告

1. 在 ZLIMS 系统主界面点击【今日报告】，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。
3. 点击分析批次编号，进入项目详情。
4. 点击【结果路径】列的 打开结果目录。
5. 点击【Result】打开 Result 文件夹，可查看样本报告，或下载报告结果至默认路径。

