

## RNA 建库

## OS DNB 制备

## 进行测序

### 适用范围

名称	货号	
MGIEasy Fast RNA 文库制备试剂套装 (16 RXN) 货号: 940-000890-00	MGIEasy Fast RNA 文库制备试剂	940-000887-00
	MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒	1000022800
	MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒	940-001176-00
MGIEasy Fast RNA 文库制备试剂套装 (96 RXN) 货号: 940-000889-00	MGIEasy Fast RNA 文库制备试剂	940-000888-00
	MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 B	1000022802
	MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒	940-001174-00
DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 (OS-DB)	1000026466	
(可选) 标准文库试剂 (PCR 产物) V4.0, (UDB57-64)	1000027585	
MGISEQ-200RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS SE100)	940-001626-00	
MGISEQ-200RS 高通量测序试剂套装 (FCL SE100)	940-001640-00	
病媒物种及微生物识别软件	970-000331-00	

### 耗材信息

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

### RNA 建库

#### 准备样本

1. 推荐 RNA 建库起始量为 100 ng/样本, 并用 TE 缓冲液将总体积补充至 10  $\mu$ L。

#### 提示

- 如有特殊需求, RNA 建库起始量可在 10 ng~1  $\mu$ g 范围内调整, 并用 TE 缓冲液将总体积补充至 10  $\mu$ L, 同一轮建库只能选择其中一个起始量进行实验。
- 用 Agilent 2100 Bioanalyzer 对提取的 total RNA 样本进行质控, 要求 RIN 值  $\geq 7$ , 当 RIN 值  $< 7$  时, 可适当提高投入量并提高 PCR cycles。
- RNA 纯度:  $1.8 \leq OD260/OD280 \leq 2.0$ ,  $OD260/OD230 \geq 2.0$ 。

2. 将准备好的 10  $\mu$ L 溶液转移至 96 孔 PCR 板。当建库样本数为 8 时, 转移到准备好的 96 孔 PCR 板第 1 列。当建库样本数为 16 时, 转移到第 1 列和第 2 列。样本不够时用 Nuclease-free water (NF 水) 补齐, 置于冰上待用。

#### 准备试剂

1. 从 MGIEasy Fast RNA 文库制备试剂套装中取出试剂, 将 Enzyme 上下颠倒充分混匀, 瞬时离心后置于冰上待用。其他 Buffer 于室温解冻后涡旋充分混匀, 瞬时离心后置于冰上待用。

#### 提示

使用 Second Strand Buffer (with dNTP) 进行文库制备。

2. 提前 30 min 从 MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒中取出大管磁珠, 使用涡旋混匀仪将磁珠充分混匀, 短暂离心, 置于室温备用。

### RNA 建库

### OS DNB 制备

### 进行测序

3. 在进行连接反应时, 根据 RNA 样本投入量, 用 TE 缓冲液将 UDB Adapters 稀释相应倍数, 涡旋混匀 3 次, 每次 3 s, 瞬时离心后置于冰上。

总 RNA (ng)	UDB Adapter	
	稀释倍数	稀释后投入量 (μL)
201-2500	不稀释	5
51-200	5	5
10-50	10	5

4. 取 1~2 条可掰开 PCR 八联管及管盖 (MGI, 货号: 100-000016-00)。当建库数量为 8 时, 转移 8 个 UDB PCR Primer Mix 到 1 条八联管内。当建库数量为 16 时, 转移 16 个 UDB PCR Primer Mix 到 2 条八联管内, 每管转移 8 μL。

#### 提示

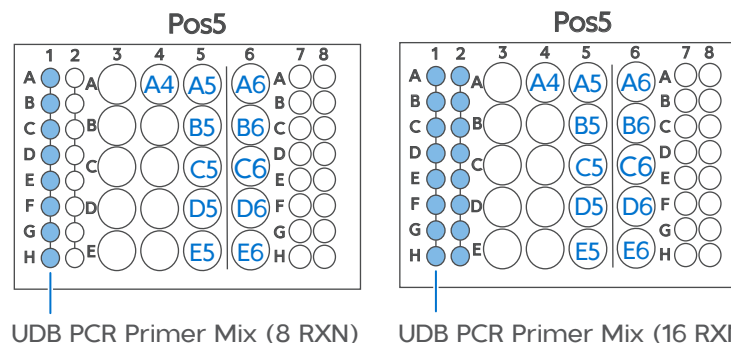
使用同一张载片进行测序时请保证文库对应的 barcode 碱基平衡。若 barcode 碱基不平衡, 请参考以下两种方案:

- 可从标准文库试剂 (PCR 产物) V4.0, (UDB57~64, 货号: 1000027585) 中单独取 30 ng 制备 DNB, 并将待测文库制备的 DNB 与标准文库制备的 DNB 按照质量比 4:1 混合, 作为待测序 DNB。
- 待测样本建库时, 混合 UDB PCR Primer Mix 保证同载片的所有待测样本 barcode 碱基平衡, 但需同步调整测序仪上的 barcode 拆分文件, 具体可咨询本地技术支持人员。

5. 取出 9 个 0.5 mL 冻存管 (MGI, 货号: 1000001558) 和 2 个 2 mL 冻存管 (MGI, 货号: 1000001553), 根据所需建库样本数量 (8 RXN 或 16 RXN) 和所需建库插入片段长度 (推荐 270 bp), 按照下表和图示在 0.5 mL 和 2 mL 冻存管中加入不同试剂装量。准备好后试剂置于冰上待用, 磁珠置于室温待用, 待自动化开始前按照台面图放入 MGISP-100RS 自动化样本制备系统。

试剂	耗材	位置	不同样本量的试剂投入 (μL)			
			200 bp		270 bp	
			8 RXN	16 RXN	8 RXN	16 RXN
Fragmentation Buffer	0.5 mL 冻存管	Pos5 A4	65	130	65	130
RT Buffer	0.5 mL 冻存管	Pos5 A5	55	110	55	110

试剂	耗材	位置	不同样本量的试剂投入 (μL)			
			200 bp		270 bp	
			8 RXN	16 RXN	8 RXN	16 RXN
RT Enzyme Mix	0.5 mL 冻存管	Pos5 A6	11	22	11	22
Second Strand Buffer (with dNTP)	0.5 mL 冻存管	Pos5 B5	240	480	240	480
Second Strand Enzyme Mix	0.5 mL 冻存管	Pos5 B6	42.3	84.6	42.3	84.6
Ligation Buffer	0.5 mL 冻存管	Pos5 C5	235	470	235	470
DNA Ligase	0.5 mL 冻存管	Pos5 C6	14.8	30.4	14.8	30.4
UDB Adapter	0.5 mL 冻存管	Pos5 D5	55	110	55	110
PCR Enzyme Mix	0.5 mL 冻存管	Pos5 D6	240	480	240	480
DNA Clean Beads-1	2.0 mL 冻存管	Pos5 E5	300	620	360	720
DNA Clean Beads-2	2.0 mL 冻存管	Pos5 E6	400	780	390	780



UDB PCR Primer Mix (8 RXN)

UDB PCR Primer Mix (16 RXN)

6. 使用准备好的无水乙醇和 Milli-Q 水按比例配制 8 mL (8 RXN) 或 16 mL (16 RXN) 80% 乙醇。

#### 提示

80% 乙醇须现配现用。

RNA 建库

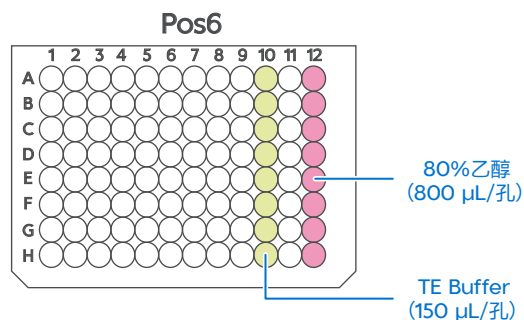
OS DNB 制备

进行测序

7. 取出 1 块 96 孔深孔板 (MGI, 货号: 1000004644), 根据建库样本数量, 按照图示分装 TE 缓冲液和 80% 乙醇。

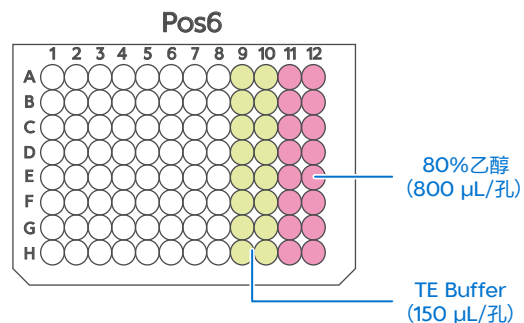
8 RXN:

- 第 10 列每孔各加入 150  $\mu\text{L}$  En-TE。
- 第 12 列每孔各加入 800  $\mu\text{L}$  80% 乙醇。



16 RXN:

- 第 9 列和 10 列每孔各加入 150  $\mu\text{L}$  En-TE。
- 第 11 列和 12 列每孔各加入 800  $\mu\text{L}$  80% 乙醇。



运行 MGISP-100RS 流程

1. 按下表设置 MGISP-100RS 运行向导界面。

应用方案	JB-AO6-101 MGIEasy Fast RNA Library Prep Set_RV1.0_SV5.0
脚本	MGIEasy Fast RNA Library Prep Set (8RXN)_RV1.0_SV5.0.py 或 MGIEasy Fast RNA Library Prep Set (16RXN)_RV1.0_SV5.0.py



提示

仪器使用前, 确保自动化脚本与 PCR 程序已成功导入, 再运行相应脚本。

2. 放置耗材前, 使用涡旋振荡器充分混匀磁珠并短暂离心。



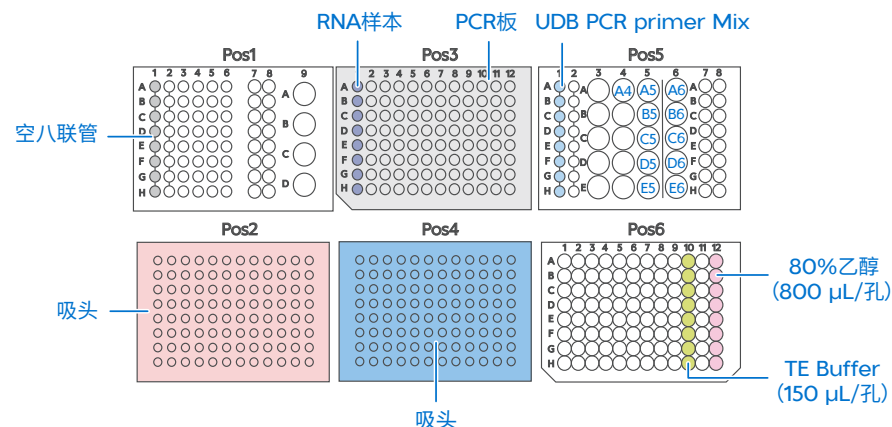
提示

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。

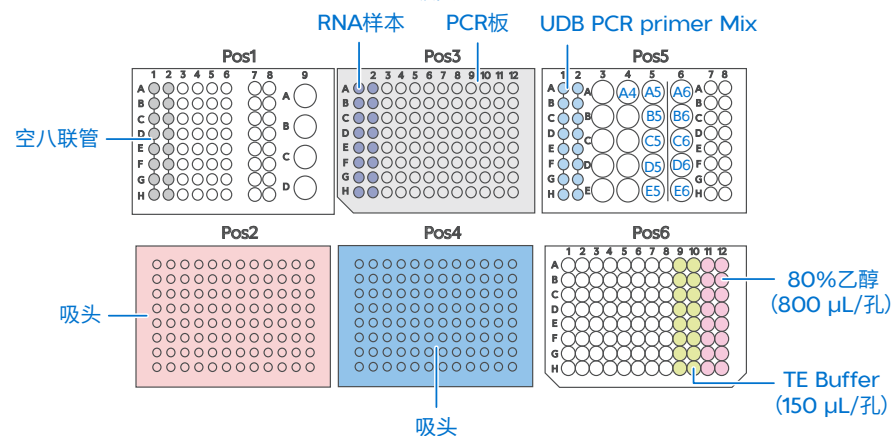
3. 将准备好的 96 孔 PCR 板置于板式离心机短暂离心。确保底部无气泡, 侧壁无挂液。

4. 按下图放置耗材。

8 RXN:



16 RXN:



## RNA 建库

## OS DNB 制备

## 进行测序

5. 点击【运行】后，出现选择插入片段与样本片段化条件（推荐 270 bp）、PCR 循环数以及样本前处理方式（选择【Other】）的弹窗。参考下表依次选择对应参数后，点击【继续】。

插入片段	片段化温度	片段化时间
200 bp	94 °C	6 min
270 bp	87 °C	6 min

总 RNA (ng)	扩增循环数
10	16-18
50	15-16
100	14-15
200	13-14
1000	11-12

6. 如果建库数量为 16 RXN，当流程运行 2 h 后，会出现弹窗，如下图所示。按照弹窗内容在 Pos2 更换一盒新的吸头，然后点击【继续】，流程继续运行。  
当建库数量为 8 RXN 时，无需更换台面，等待程序运行结束即可。



提示

建议在 10 min 内处理弹窗，否则会导致建库时间延长。



7. 整个流程预计运行约 4 h~4 h 40 min（根据样本数量，插入片段长度以及 PCR 时间而定）。流程运行结束后，取出 Pos1 Col 1 (8 RXN) 或者 Pos1 Col 1~Col 2 (16 RXN) 位置的 dsDNA 产物，体积为 30  $\mu$ L。
8. 使用双链 DNA 荧光定量试剂盒，按照定量试剂盒的操作说明对 PCR 纯化后产物进行定量。要求最终 PCR 产物的质量浓度  $\geq 3$  ng/ $\mu$ L。
- II 停止点**  
PCR 文库可置于 -20 °C 冰箱储存。
9. （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。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。

### RNA 建库

### OS DNB 制备

### 进行测序

## OS DNB 制备

### 准备样本

#### 提示

RNA 文库推荐单样本数据量  $\geq 20$  M reads。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。

- 取 0.2 mL PCR 管，根据测序数据量要求将待测序文库进行相应比例的混合，混合后文库 RNA 的质量为 30 ng，体积不大于 20  $\mu$ L。

#### 提示

若总体积不足 20  $\mu$ L，用 TE 缓冲液补充至 20  $\mu$ 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 ( $\mu$ L)
混合后文库	V
TE 缓冲液	20-V
DNB 制备缓冲液 (OS-DB)	20
总体积	40

- 将 PCR 管涡旋震荡并瞬时离心，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 $^{\circ}$ C (热盖)	On
95 $^{\circ}$ C	3 min
40 $^{\circ}$ C	3 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

- 反应结束后，取出 PCR 管，在冰上加入如下试剂。

组分	体积 ( $\mu$ L)
DNB 聚合酶混合液 I	40
DNB 聚合酶混合液 II (OS)	4
总体积	44

- 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 84  $\mu$ L)。

温度	时间
35 $^{\circ}$ C (热盖)	On
30 $^{\circ}$ C	25 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

#### 提示

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

- 反应结束后，向 PCR 管中加入 20  $\mu$ L DNB 终止缓冲液。用阔口吸头缓慢吹打混匀 10 次。

#### 提示

请勿振荡及剧烈吹打。

#### 停止点

DNB 可置于 4  $^{\circ}$ C 条件下储存 48 h。

- 取 2  $\mu$ L DNB，按照定量试剂盒 Qubit<sup>®</sup> 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/ $\mu$ L。

#### 提示

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

## 进行测序

### 准备 DNB 加载体系

- 从 MGISEQ-200RS 高通量测序试剂盒中取出 DNB 加载缓冲液 I 和 DNB 加载缓冲液 II，置于室温解冻约 30 min。
- 使用涡旋振荡器振荡混匀 5 s，短暂离心后置于冰盒上备用。
- 取新的 0.5 mL 冻存管，按下表加入试剂：

DNB 体积 ( $\mu$ L)	DNB 加载缓冲液 I ( $\mu$ L)	DNB 加载缓冲液 II ( $\mu$ L)	DNB 聚合酶混合液 II (LC) ( $\mu$ L)
100	50	50	1

- DNB 加载体积用阔口吸头缓慢混匀 10 次，混匀后放置 4  $^{\circ}$ C 备用。

#### 提示

- 请勿离心、震荡及剧烈吹打。
- 所有 DNB 加载体积需现配现用。

RNA 建库

OS DNB 制备

进行测序

准备测序试剂槽

1. 根据不同情况选择相应测序策略。



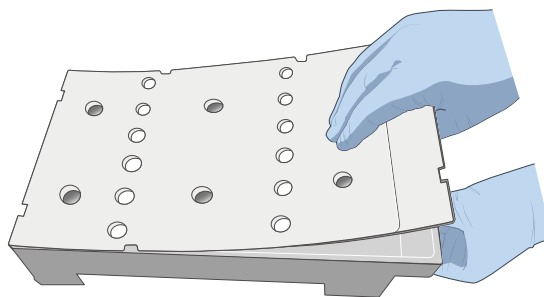
使用同一张载片进行测序时请保证文库对应的 barcode 碱基平衡。

- RNA 文库数量小于或等于 4 份时, 建议采用 FCS SE100 测序策略。
- RNA 文库数量小于或等于 20 份时, 建议采用 FCL SE100 测序策略。

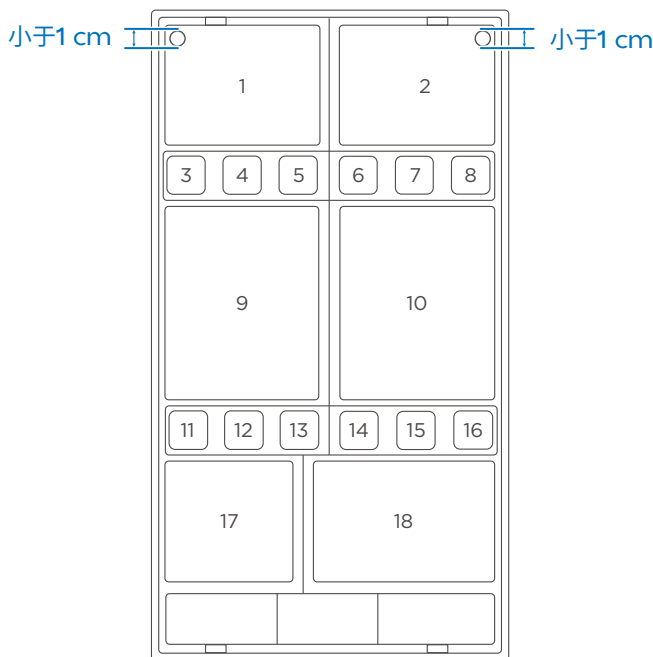
2. 进行前期准备。

- 取出测序试剂槽, 于常温水浴解冻 3 h~4 h 后, 置于 2 °C ~8 °C 冰箱备用。
- 提前 1 h 取出 dNTPs 混合液 III 和 dNTPs 混合液 II, 室温融化后置于 4 °C 备用。
- 使用前将测序试剂槽颠倒混匀 3 次, 然后将试剂槽置于正前方, 前后左右剧烈晃动 20 次, 确保试剂充分混匀, 尤其是 17 号孔和 18 号孔内的试剂。

3. 打开试剂槽盖板, 用无尘纸擦干冷凝水。



4. 使用洁净的 1 mL 吸头在 1 号和 2 号孔边缘位置, 轻轻戳出一个直径小于 1 cm 的加样孔位:



5. 取 1 mL 移液器, 按照下表加入试剂。

▪ FCS SE100

试剂	加样体积 (mL)	
	1 号孔	2 号孔
dNTPs 混合液 III	0.320	/
dNTPs 混合液 II	/	0.560
DNA 聚合酶混合液	0.320	0.280

▪ FCL SE100

试剂	加样体积 (mL)	
	1 号孔	2 号孔
dNTPs 混合液 III	0.440	/
dNTPs 混合液 II	/	0.760
DNA 聚合酶混合液	0.440	0.380

RNA 建库

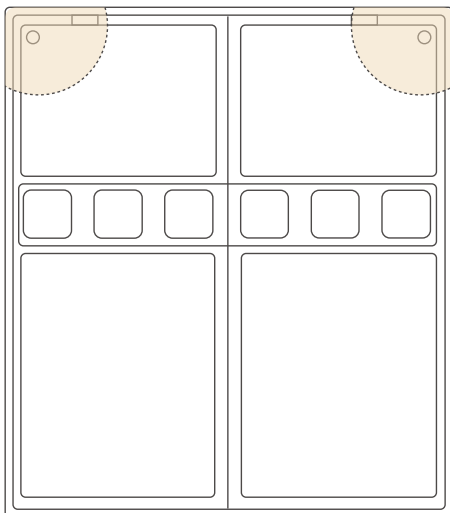
OS DNB 制备

进行测序

6. 使用配套的透明封口膜将加样孔封住。

提示

切勿盖住孔位中心位置，避免影响试剂针下降。



7. 水平放置试剂槽，双手握住两侧，顺时针摇晃 20 次，再逆时针摇晃 20 次。

提示

摇晃试剂槽时要用力但不要过于剧烈，请勿上下摇晃或倾斜拿放试剂槽，以防槽中试剂溢出。

### 录入样本

1. 打开 Chrome™ 浏览器，在地址栏中输入 IP 地址 127.0.0.1，点击【Enter】。
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. 将【选择分析产品】设置为【VMI】，填写【DNB 样本信息】为【表格导入样本编号】，点击【新建】，弹出【导入测序 + 分析】窗口。

提示

仅以表格导入样本编号为例进行说明，详细的软件操作，参考病媒物种及微生物识别系统产品说明书。

5. 在弹窗内点击【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(*)	宿主(*)	
2	VMI	DNB20240808	UDB-1	test1		RNA	NA	
3								

< > DNB样本录入 表格填写注意事项 +

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，不可与系统中已录入的样本编号重复。
- 样本名称相同代表同一个样本。如果样本名称与样本类型皆相同，将合并数据进行分析。
- 进行病媒物种及微生物识别全流程分析时，在【宿主】列填写【NA】。软件将根据病媒物种识别结果中的宿主信息进行信息过滤。


7. 返回【导入测序 + 分析】窗口，点击【选择文件】，在弹窗中选择要导入的 Excel 文件。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】。

RNA 建库

OS DNB 制备

进行测序

## 开始测序

1. 点击主界面的 ，输入账号 *user*，密码 *Password123*，点击【登录】。
2. 点击主界面的【测序】，进入样本信息输入界面，在【DNB ID】待写区输入 DNB 信息。



### 提示



确保输入的 DNB ID 与 ZLIMS DNB 样本录入工作表中的 ID 一致。


3. 测序方案选择【Customize】，按下图设置读长和 Barcode。

自定义测序参数

开始阶段:  DNB加载     Post loading     测序预处理     测序




一链读长:      Barcode:  

二链读长:      Dual barcode:       Dual barcode测序

拆分Barcode:  Lane1    Barcode类型:  



一链暗反应:  -  读长

二链暗反应:  -  读长

4. 将盛有 DNB 加载体系的冻存管放入试剂仓的样本管座中，点击 。
5. 取出准备好的试剂槽，使用扫码枪扫描或手动输入测序试剂槽 ID。
6. 将测序试剂槽放入试剂仓内，关闭试剂仓门，点击 。
7. 使用扫码枪扫描或手动输入载片 ID。
8. 按下载片吸附按钮，将载片安装到载片平台上，并关闭载片仓门，点击 。
9. 仔细核对测序参数，确认无误后，点击【开始】。弹窗提示【是否要测序?】，点击【是】开始测序。

测序仪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. 点击 ZLIMS 系统主界面内【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后，点击该记录行在【任务名称】列上的链接。
3. 点击【报告】列的  可查看样本报告。

### 提示

- 可点击报告页面左上角的  下载同批次所有样本的报告与结果。
- 详细的软件操作说明，参考病媒物种及微生物识别系统产品说明书。