

概述

个体识别建库

DNB制备

测序与分析

概述

适配试剂盒/试剂套装

名称	货号	品牌
MGIEasy 个体识别文库制备试剂盒 (48 RXN)	940-000343-00	
MGIEasy 个体识别文库制备试剂盒 (576 RXN)	940-001338-00	MGI
DNBSEQ-G99RS 高通量测序试剂套装 (G99 SM FCL SE400)	940-000417-00	

推荐耗材清单

名称	DNA 样本所需数量	血卡样本所需数量	货号	品牌
250 μ L 带滤芯自动化吸头	1 盒	1 盒	1000000723	
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	
可掰开 PCR 八联管及管盖	3条 * 8 (样本量 \leq 8) 6条 * 8 (样本量 $>$ 8)	2条 * 8 (样本量 \leq 8) 4条 * 8 (样本量 $>$ 8)	100-000016-00	MGI
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	

概述

个体识别建库

DNB制备

测序与分析

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	MGI
MGIDL-G99RS	510-003112-00	
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

仪器 / 软件型号	货号	品牌
MGISP-100RS	900-000070-00	MGI
MGIDL-G99RS	510-003112-00	
DNBSEQ-G99RS	900-000561-00	
DNA 特征识别系统	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。

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 1 mm~1.2 mm 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 1 μL TE 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

- 提前 30 分钟取出 DNA Clean Beads，置于室温平衡。
- 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。
- 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
第一轮 PCR 反应液 Mix	PCR Primer Pool	6 μL × (样本数 + 2)	0.5 mL 冻存管
	PCR Enzyme Mix	12.5 μL × (样本数 + 2)	
第二轮 PCR 反应液 Mix	PCR Block	3.6 μL × (样本数 + 2)	0.5 mL 冻存管
	PCR Enzyme Mix	15 μL × (样本数 + 2)	
	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
TE 缓冲液	TE 缓冲液	样本数量 < 7	2 mL 冻存管
		80 μL × (样本数 + 2)	
		样本数量 ≥ 7: 720 μL	

概述

个体识别建库

DNB制备

测序与分析

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 μL 。
- 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 μL ，并依次在孔位 9A~9H、10A~10H 添加 Clean Buffer，每孔添加 145 μL 。

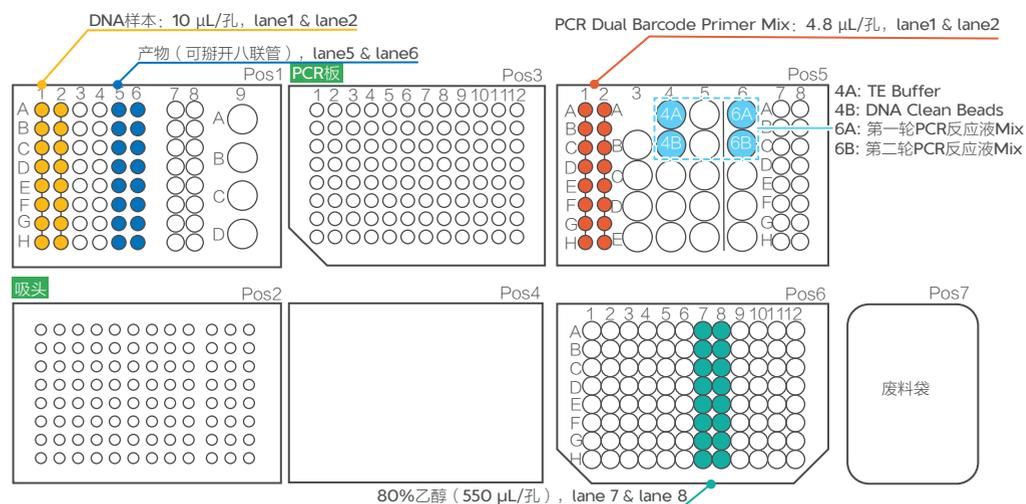
7. 使用涡旋仪充分混匀 DNA Clean Beads，并短暂离心。

提示

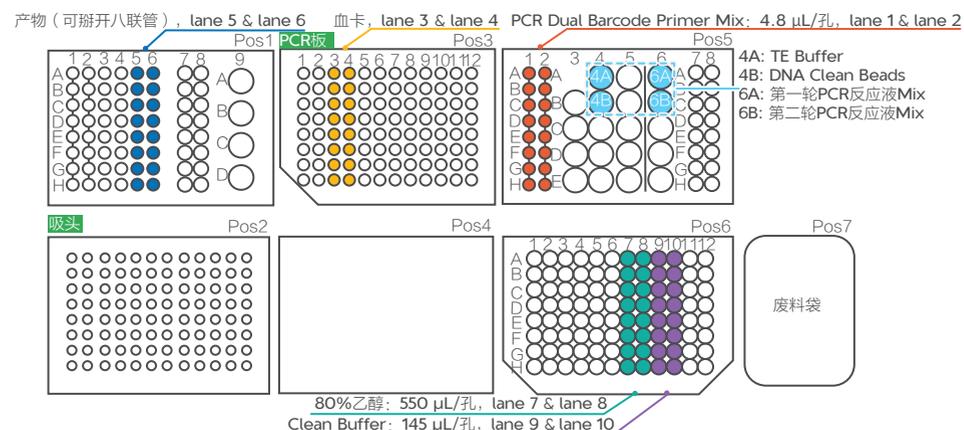
放置耗材前，确保所有试管底部无气泡，侧壁无挂液，且所有管盖均已打开。

8. 根据下图放置耗材。

■ DNA 样本



■ 血卡样本



概述

个体识别建库

DNB制备

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】。

提示

- 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 °C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 °C (热盖)	On
95 °C	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

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 °C (热盖)	On
37 °C	10 min
4 °C	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 °C (热盖)	On
37 °C	30 min
4 °C	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 °C (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。

概述

个体识别建库

DNB制备

测序与分析

- 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。
- 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 。

II 停止点

酶切消化纯化后的产物可置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存。

DNB制备

- 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

💡 提示

- 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: $V=10 \text{ ng}/\text{文库浓度}$ 。
 - 对于血卡样本，文库投入体积 V 的计算公式为: $V=5 \text{ ng}/\text{文库浓度}$ 。
 - 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。

- 混匀后按下表条件进行反应:

温度	时间
105 $^{\circ}\text{C}$ (热盖)	On
95 $^{\circ}\text{C}$	1 min
65 $^{\circ}\text{C}$	1 min
40 $^{\circ}\text{C}$	1 min
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

- 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

- 将反应液置于 PCR 仪按如下条件进行反应:

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

- 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。

II 停止点

DNB 产物可在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下储存 48 小时。

- 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。

概述

个体识别建库

DNB制备

测序与分析

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	MGI99		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。

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。解冻后的试剂槽置于 2 °C ~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。

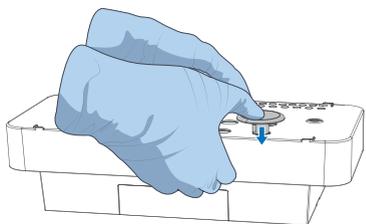
概述

个体识别建库

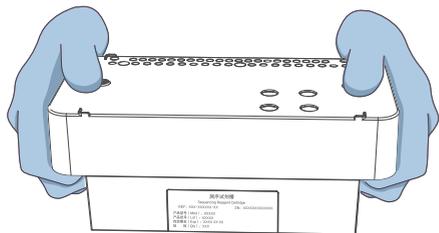
DNB制备

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。

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
DNB 聚合酶混合液 II (LC)	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 °C 备用。

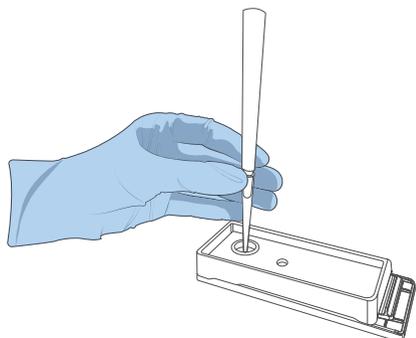
提示

- DNB 加载体系需现配现用。
- 切勿离心、振荡及剧烈吹打。

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。

3. 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。

概述

个体识别建库

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 ，定位到指定样本所在记录行，点击该记录行在【分析】列的连接。
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。