

华大智造自动化系统搭载DNBSEQ平台赋能病原微生物的检测与溯源

ATOPlex技术平台搭配MGISP-Smart 8及DNBSEQ-G99在SARS-CoV-2研究中的应用

本研究基于ATOPlex技术，采用华大智造MGISP-Smart 8 & MGISP-100自动化系统完成目标病原体(SARS-CoV-2)的靶向扩增，后利用DNBSEQ测序平台完成测序工作，并基于相关生信分析软件完成目标病原体的检测、溯源等工作，此外，本方案也可用于猴痘病毒的检测与分型研究。华大智造为感染性病原体检测提供了一套完整的组合产品。

推荐应用：病原微生物-特定病原检测

推荐机型：MGISP-Smart 8, MGISP-100, MGISP-960(自动化平台)

DNBSEQ-G99ARS, DNBSEQ-T7RS, MGISEQ-2000RS(测序平台)

• ATOPlex可赋能病原检测与溯源

华大智造独有的ATOPlex多重PCR技术平台可为不同病原微生物检测设计特异性引物，检测灵敏度高(SARS-CoV-2的LOD为10 copies/mL)，组装覆盖度佳，满足多类样本的检测与溯源等需求。

• 自动化系统可高度匹配样本处理与建库全流程

华大智造自主开发的MGISP-Smart 8 & MGISP-100自动化系统可灵活实现8-40样本/轮的任意建库通量，还可以准确、稳定、高效地完成从核酸提取、均一化、文库构建、pooling至DNB制备的全流程工作，并保证文库样本的均一性和准确性。

• 测序数据产出高效且质量高

DNBSEQ测序技术具有高准确性，低重复序列率以及低标签跳跃等重要特性；而DNBSEQ-G99测序速度快，内置计算模块，测序生信一体化，4.5小时即可完成SE100+10+10测序，数据产出高效且优质。

• 完整的病原检测与溯源组合产品

此组合产品涵盖核酸提取与文库构建试剂盒、自动化系统、DNBSEQ测序平台、生信分析软件，全方位赋能病原微生物研究。



背景介绍

大规模平行测序(MPS, massively parallel sequencing)的迅猛发展助力其在科学研究和临床诊疗中的广泛应用,该技术在提高测序精度及检测速度的同时,也显著降低了测序成本¹。靶向测序可特异性识别并扩增特定的DNA序列,是一种更具成本效益的MPS测序方法,其具备更高的测序深度、覆盖率、准确度和灵敏性,被普遍应用在病原检测、临床诊断研究、疾病筛查及遗传分析等领域中²。华大智造自主开发的ATOPlex靶向测序定制产品平台以超高重PCR技术为核心,具备高灵敏度、高准确性,操作简单和成本低廉等特点,其卓越的技术特点得到了研究人员的广泛认可,并应用于众多的研究领域和临床应用中:如个体识别与亲属关系分析³,无创产前检测(NIPT)研究⁴,环境检测⁵及新冠病毒的溯源及研究⁶等。

MPS文库制备的实验步骤繁琐冗长,人工操作成本高,出错率及污染风险大,在大样本量情况下尤为明显⁷。而自动化设备可有效规避相关问题,其在节省人工成本的前提下,也保证了实验的准确可靠性,因此,越来越多的医院和实验室主动选择自动化系统以解放医生及研究人员的双手⁸。华大智造自主研发的自动化系统布局完善,涵盖多个系列。其中,MGISP-Smart 8作为自动化平台新推出的样本制备系统,拥有独立可控的八通道移液器,不仅可以灵活实现1-48样本/轮的建库通量,还可自动化覆盖从样本分装、核酸提取、文库构建、pooling至DNB制备全流程的工作。不仅如此,华大智造还拥有另一款专注于MPS领域的MGISP-100自动化系统,它是一款小巧紧凑的小型通量样本制备系统,可快速、稳定、高效地完成核酸提取、文库构建等一系列实验操作。因此,本研究利用MGISP-Smart 8搭配MGISP-100组建的自动化平台进行文库的制备工作,此平台可保证文库制备的均一性,进而提高测序结果的准确度与一致性,降低实验室MPS运行成本,在真正意义上做到无人值守。

华大智造基于DNBSEQ技术推出的测序平台拥有高准确度和灵敏度、超低重复率、低标签跳跃率等优势。主流测序仪有DNBSEQ-G99、MGISEQ-2000、DNBSEQ-T7等,可满足医学、科研、公卫、食品安全等相关领域的研究需求。

病毒是世界上致死率最高的传染性病原体之一⁹。结核病、脊髓灰质炎、天花和白喉等疾病的广泛传播造成了高发病率和死亡率;牛瘟等动物疾病沿着贸易路线和随行军队传播,对牲畜和依赖人口造成了巨大破坏¹⁰,近年来的埃博拉、艾滋病、甲型流感、中东呼吸综合征(MERS)、严重急性呼吸系统综合症(SARS)及新冠病毒更是导致了全球数百万人乃至数千万人死亡¹¹。而及时对感染病原体的诊断、治疗、干预可有效遏制病毒的传播。因此,对病毒进行快速精准的检测、诊断和研究无疑至关重要⁹。华大智造为感染性病原体的检测开发了一整套的组合产品,即基于ATOPlex技术在自动化平台(MGISP-Smart 8 & MGISP-100)上完成猴痘、HIV、流感和SARS-CoV-2等目标病原体的靶向扩增,后在DNBSEQ平台上完成测序工作,并提供相关生信分析软件完成目标病原体的检测、溯源等工作。

研究描述

本研究使用SARS-CoV-2标准品来评估该组合产品，利用 ATOplex RNA多重PCR建库试剂盒完成病毒的靶向扩增，并基于MGISP-100和MGISP-Smart8完成自动化建库工作，后在DNBSEQ-G99基因测序仪上完成测序工作，以MGI metargetCOVID软件完成新冠病毒的检测、溯源工作。结果表明基于华大智造自动化系统构建的文库质量较高，测序结果较好，病原体鉴定分型结果准确。此外，此方案也可用于猴痘病毒的检测与分型研究中。

材料与amp;方法

样本制备与提取

本研究利用来自菁良科技 (GeneWell) 的商业标准品 COVID-19 RNA 质控品 (高拷贝)-L(货号: TEST09, 规格: 4×10^8 copies/RNA 干粉) 开展实验, 此 RNA 标准品与 SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1(GenBank: MN908947.3) 序列相同。华大智造 ATOplex RNA 多重 PCR 建库试剂盒套装的最低检测限为 10 copies/mL。本研究将病毒 RNA 标准品梯度稀释后选取 4×10^4 和 4×10^5 copies/mL 的样本, 分别命名为 GW 4 和 GW 5 来开展后续的实验工作。由于本研究选择了标准品作为样本进行测试, 故未涉及样本提取操作。针对真实样本, 推荐研究者们选择 MGIEasy 核酸提取试剂盒搭配 MGISP-100 完成自动化提取工作 (图 1)。

文库制备与测序

本研究中每个样本投入 10 μ L 以进行后续的建库工作, 为避免多轮 PCR 反应产生的气溶胶污染, 本实验利用 MGISP-100 和 MGISP-Smart 8 形成两个物理隔离区, 来完成自动化建库工作, 过程包括: (1)前区: 手工准备反转录试剂、多重PCR扩增试剂, 在MGISP-100上进行RNA反转录试剂分

液、反转录反应及多重PCR扩增试剂分液; (2)后区: 在MGISP-Smart 8上进行从纯化、建库试剂配制、PCR扩增、PCR产物纯化、文库制备到DNB制备的全流程工作, MGISP-Smart 8不仅可以自动化完成多重PCR扩增(35个循环)、纯化、打断末修、接头连接、DNB制备等反应, 而且, 其拥有的灵活的独立八通道移液器一次吸排液还可完成8个不同体积的样本移液, 替代手工快速完成pooling、均一化及定量体系配制等灵活移液工作(图1)。

本研究可实现8-40样本/轮的灵活通量建库。建库实验中MGISP-Smart 8的台面布局如图2所示, 台面包含30个SBS标准板位及1个垃圾桶位, 在后区进行纯化步骤时, MGISP-Smart 8所含的带盖单孔槽可以防止大体积乙醇自动化分装时的试剂挥发问题; 在接头连接步骤时, MGISP-Smart 8所选配的PCR板适配器C可支持UDB-Barcode试剂在封膜状态下的自动化移液步骤, 而无需手工介入撕膜; 在DNB制备前, MGISP-Smart 8亦可完成样本的pooling、均一化及定量等操作, 建库过程中自动化平台操作时长占比高达90.5%, 这表明此建库流程实现了高度自动化(图3)。此外, 本次测试还平行进行了手工建库以评估自动化建库方案的可行性, 手工建库实验操作具体可参考相关说明书(https://www.mgi-tech.com/Home/Products/reagents_info/id/71.html), 随后上机至DNBSEQ-G99, 采用SE100+10+10策略进行测序。

数据分析

测序数据下机后, 本研究利用华大智造自主开发的MGI metargetCOVID软件进行相应的生信分析。此软件可安装在DNBSEQ-G99测序仪中, 分析流程包括: FASTQ数据质控、序列比对、病毒含量检测、链偏矫正、变异检测、结果分型和报告产出。



图1. 样本提取、建库、测序以及生信分析全流程



图2. MGISP-Smart 8台面布局展示

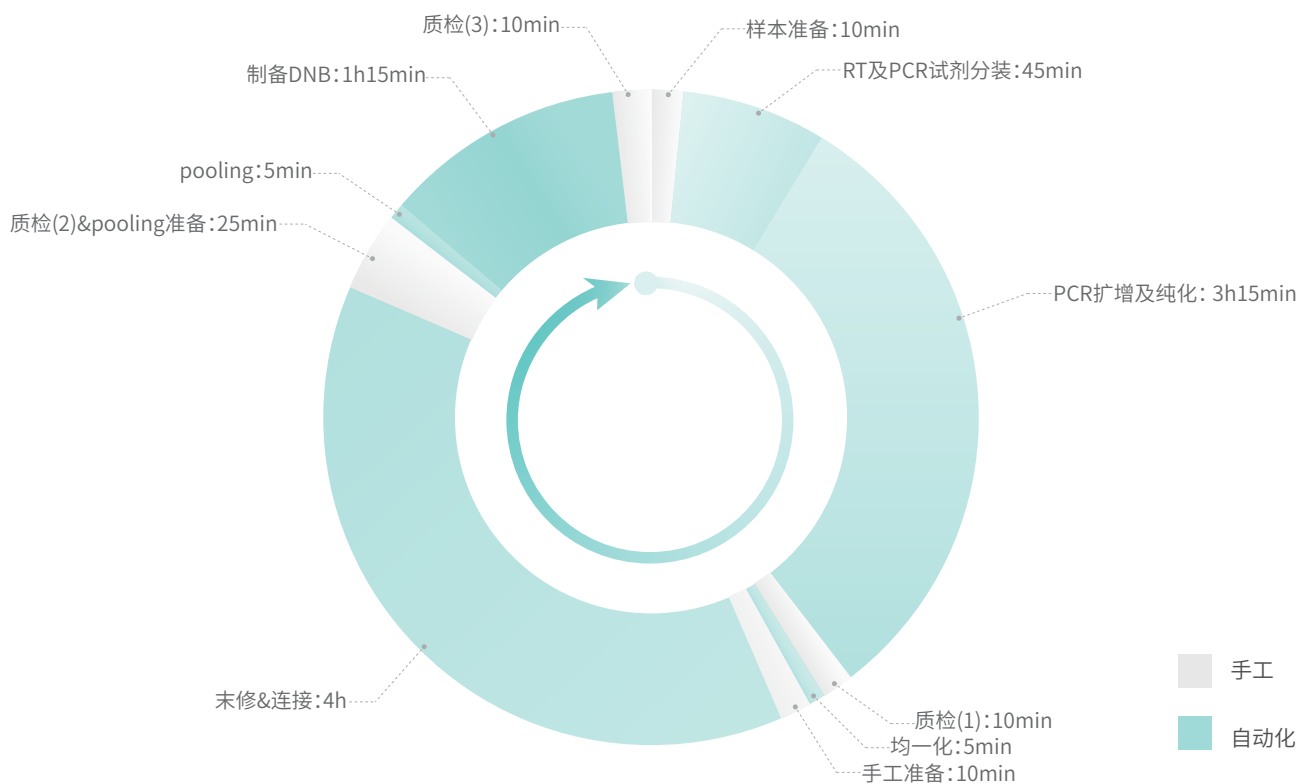


图3. 基于自动化系统开展8样本建库时，自动化与人工所需时间展示

结果

MGISP自动化系统可制备高质量文库

本研究使用SARS-CoV-2标准品以及ATOplex RNA多重PCR建库试剂盒并基于自动化设备(MGISP-100和MGISP-Smart 8)完成文库制备工作，实验流程如图1所示。在相同的投入量下(10 μ L RNA标准品)，自动化建库方案的RT-PCR产量均

>150ng，文库产量均满足>20ng的要求(表1)；将所有自动化建库的文库产物等摩尔混合后制备成DNB，其浓度为21.6ng/ μ L，手工建库得到的DNB浓度为14.0ng/ μ L，均满足质检浓度>8 ng/ μ L的要求，并且自动化各质检环节的文库质量均略优于手工建库。

样本名称	自动化/手工建库	投入量(μ L)	RT-PCR产物产量(ng)	文库产量(ng)
GW 4-1	手工	10	1356.0	30.8
	自动化	10	2226.0	47.5
GW 5-1	手工	10	3000.0	32.3
	自动化	10	6480.0	44.8

表1. 自动化与手工方案构建文库的初步情况对比

基于华大智造自动化系统所得文库的测序质量高

为了评估华大智造自动化建库的测序质量，研究者们对来自于GW 4和GW 5文库的测序数据进行了分析比较，结果发现，无论是GW 4还是GW 5样本，自动化建库得到的测序数据Q30值均高于93%，Mapping rate均达到了98%以上，Target coverage (% bp ≥ 100×)均高于99%，自动化建库

得到的数据质量与手工建库相当 (图4)。此外，将GW 4-自动化文库的测序结果比对至参考基因组中各基因区域的覆盖深度也较高，各区域的覆盖深度lg转换值均在4.8左右，覆盖均一性较好(图5)。

以上这些结果说明ATOplex建库方案搭配华大智造自动化系统与DNBSEQ测序平台开展病原体研究时，得到的测序数据质量较高，覆盖度和测序深度也较高。

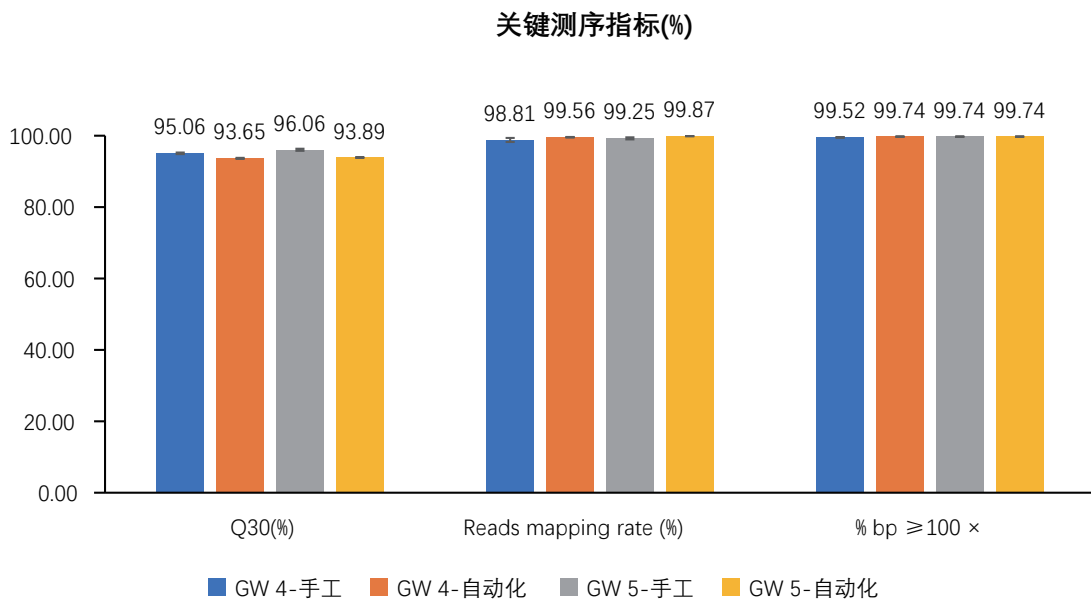


图4. 自动化建库与手工建库的关键测序质量指标比较。GW4-自动化表示利用自动化系统对GW 4进行文库构建的样本，其他名称含义依次类推，各类初级测序指标显示自动化与手工建库无差别。

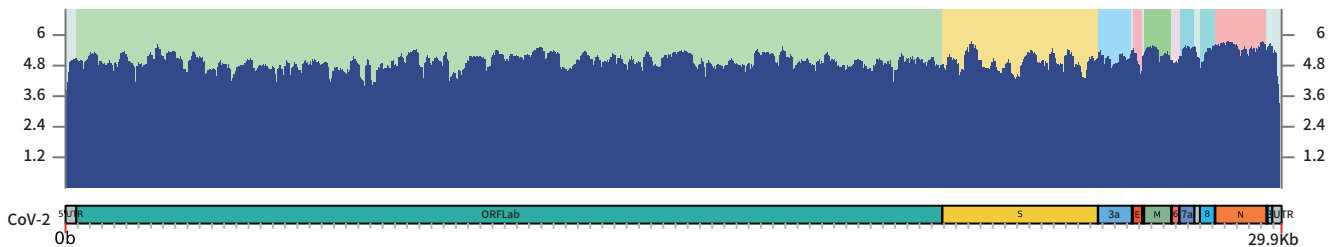


图5. GW 4-1-自动化文库中质控合格的reads在参考基因组各基因区域的深度覆盖图。“深度覆盖图”展示了每个染色体/基因组片段的reads深度覆盖情况，X轴为染色体/基因组片段的碱基坐标，Y轴为reads深度的lg转换值。

为病原微生物的检测与溯源提供了完整的组合产品

对自动化建库得到的测序数据进一步分析发现，从GW 4样本中检测到的SARS-CoV-2病毒浓度为 10^4 数量级，新冠病毒reads占比到了80%以上，从GW 5样本中检测到的SARS-CoV-2病毒浓度为 10^5 数量级，新冠病毒reads占比达到了90%以上，鉴定结果均为阳性，检测数值均符合预期，且与手工建库得到的结果几乎无异(表2)。进一步的变异分析发现，GW 4-自动化文库无任何的SNP与Indel变

异(表3)，将获得的SARS-CoV-2病毒一致性序列通过算法分配到已完成株型区分的SARS-CoV-2病毒进化树后，分配一致性序列的进化枝ID信息，借助Pangolin工具计算得出SARS-CoV-2病毒谱系，发现GW 4-自动化文库的分型信息与SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1完全一致(图6)，表3和图6为GW 4-1-自动化文库的结果。

这些结果都证明ATOPlex建库方案完美适配华大智造自动化系统和DNBSEQ平台，搭配相应的生信分析软件能够快速准确地对病原微生物进行检测。

建库	样本编号	新冠浓度(copies/mL)	新冠病毒reads占比(%)	鉴定结果
手工建库	GW 4-1	3977.92	83.9	Positive
	GW 4-2	3750.55	83.25	Positive
	GW 4-3	3850.27	83.54	Positive
	GW 5-1	13609.1	93.41	Positive
	GW 5-2	14692	93.78	Positive
	GW 5-3	12122.78	92.8	Positive
自动化建库	H ₂ O-1	0.00	0.02	Negative
	H ₂ O-2	0.00	0.03	Negative
	GW 4-1	5514.85	87.18	Positive
	GW 4-2	4491.04	85.19	Positive
	GW 4-3	4289.13	84.71	Positive
	GW 5-1	17626.61	94.59	Positive
	GW 5-2	19764.91	95.05	Positive
	GW 5-3	16341.06	94.27	Positive

表2. 自动化建库与手工建库方案的SARS-CoV-2病毒检测结果比较

组装序列大小(bp)	N碱基数目	SNPs数目	INSSs数目	DELS数目	进化枝编号	谱系编号
29903	75(0.25%)	0	0	0	19A	B

表3. GW 4-1-自动化文库的变异分析及分型结果

仅供研究使用，不适用于临床诊断

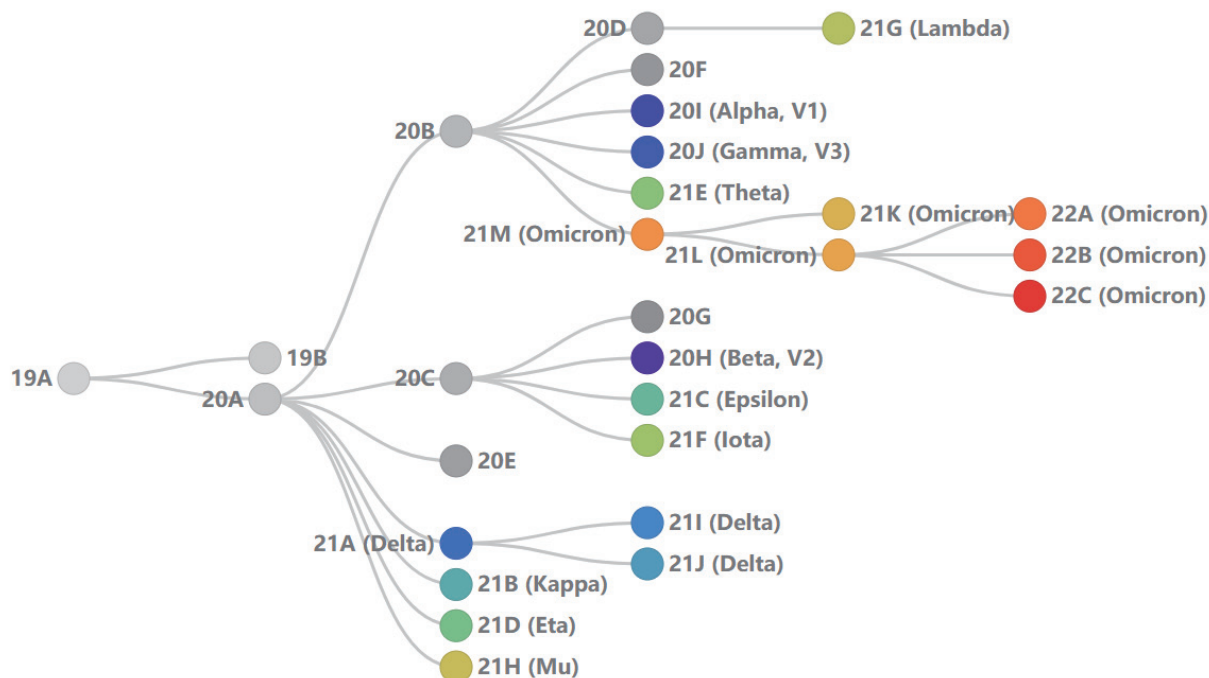


图6. GW 4-1-自动化文库的病毒分型结果

总结

本研究利用ATOplex RNA多重PCR建库试剂盒搭配华大智造MGISP-Smart 8 & MGISP-100自动化系统以及DNBSEQ-G99测序平台完成文库构建和测序工作，利用MGI metargetCOVID软件对SARS-CoV-2病毒序列进行鉴定和溯源，相关的实测数据表明，此组合方案得到的数据质量较高，覆盖度广，测序深度深，对病原微生物的鉴定和分型结果准确，且与手工建库方案得到的结果不相上下。

本研究所涉及的ATOplex技术平台能够对极低含量的病毒进行上百万倍的扩增富集，此外，实验采用的MGISP-Smart 8 & MGISP-100自动化系统不仅可以实现8-40样本/轮的灵活建库通量，而且还可以实现pooling、均一化及定量体系配制的操

作，在自动化效率提高的同时，确保了结果的准确性，节约了人工成本；同时，后续测序采用的DNBSEQ-G99基于DNBSEQ™专利技术，可稳定获得高质量的测序数据，其单张载片的通量为80M reads，最多可同时运行两张载片，4.5小时内即可完成SE100+10+10测序全流程，内置计算模块，测序生信一体化，将测序效率提升到极致。

华大智造ATOplex建库方案搭载自动化系统以及DNBSEQ测序平台，再搭配自主研发的数据处理系统进行分析，为病原微生物的识别、鉴定与溯源提供了一套完整可靠的组合产品，让病原微生物的监测更加快捷、简易，全面助力各类传染病研究。

参考文献



MGISP-Smart 8自动化样本制备系统



DNBSEQ-G99基因测序仪

1. McCombie W R, McPherson J D, Mardis E R. Next-generation sequencing technologies[J]. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2019, 9(11).
2. Suwinski P, Ong C K, Ling M H T, et al. Advancing personalized medicine through the application of whole exome sequencing and big data analytics[J]. *Frontiers in genetics*, 2019, 10: 49.
3. Li R, Shen X, Chen H, et al. Developmental validation of the MGIEasy Signature Identification Library Prep Kit, an all-in-one multiplex system for forensic applications[J]. *International Journal of Legal Medicine*, 2021, 135: 739-753.
4. Yang L, Wu Y, Hu Z, et al. Simultaneous detection of fetal aneuploidy, de novo FGFR3 mutations and paternally derived β -thalassemia by a novel method of noninvasive prenatal testing. *Prenat Diagn*. 2021 Mar;41(4):440-448.
5. Ni G, Lu J, Maulani N, et al. Novel multiplexed amplicon-based sequencing to quantify SARS-CoV-2 RNA from wastewater[J]. *Environmental Science & Technology Letters*, 2021, 8(8): 683-690.
6. Temerozo J R, Fintelman-Rodrigues N, Santos M C, et al. Human endogenous retrovirus K activation in the lower respiratory tract of severe COVID-19 patients associates with early mortality[J]. 2021.
7. Hess J F, Kohl T A, Kotrová M, et al. Library preparation for next generation sequencing: A review of automation strategies[J]. *Biotechnology advances*, 2020, 41: 107537.
8. Holland I, Davies J A. Automation in the life science research laboratory[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 571777.
9. Kang J, Tahir A, Wang H, et al. Applications of nanotechnology in virus detection, tracking, and infection mechanisms[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2021, 13(4): e1700.
10. Baker R E, Mahmud A S, Miller I F, et al. Infectious disease in an era of global change[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(4): 193-205.
11. Goud K Y, Reddy K K, Khorshed A, et al. Electrochemical diagnostics of infectious viral diseases: Trends and challenges[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 180: 113112.

仅供研究使用，不适用于临床诊断

推荐订购信息

产品类型	产品名称	产品货号
仪器	DNBSEQ-G99ARS基因测序仪	900-000560-00
	MGISP-100RS自动化样本制备系统	900-000070-00
	MGISP-Smart 8RS自动化样本制备系统	900-000504-00
软件	MGI metargetCOVID软件	970-000228-00
提取试剂	MGIEasy核酸提取试剂(T-1728)	1000020261
	MGIEasy核酸提取试剂(T-96)	1000020471
建库试剂	ATOPlex RNA多重PCR建库试剂盒套装V3.1(16 RXN)	940-000132-00*
	DNBSEQ一步法 DNB 制备试剂盒(OS-DB)	1000026466
测序试剂	DNBSEQ-G99RS高通量测序试剂套装(G99 SM FCL SE100/PE50)	940-000409-00

*更多ATOPlex定制化产品可前往华大智造官网查阅：<https://www.mgitech.cn/products/atoplex/>

深圳华大智造科技股份有限公司

深圳市盐田区北山工业区综合楼11栋

☎ 4000-688-114

🌐 www.mgi-tech.com

✉ MGI-service@mgi-tech.com

股票简称：华大智造

股票代码：688114



仅供研究使用

版权声明：本手册版权属于深圳华大智造科技股份有限公司所有,未经本公司书面许可,任何其他个人或组织不得以任何形式将本手册中的各项内容进行复制拷贝、编辑或翻译为其他语言。本手册中所有商标或标识均属于深圳华大智造科技股份有限公司及其提供者所有。

版本：2024年4月版

撰稿：韩婉茹 张含菲

责任编辑：王其伟

审稿：江遥