

DNA 建库

OS DNB 制备

进行测序

适用范围

名称	货号	
MGIEasy Fast 酶切文库制备试剂套装 V2.0 (16 RXN) 货号: 940-001193-00	MGIEasy Fast 酶切 DNA 文库制备模块 V2.0	940-001197-00
	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 酶切文库制备试剂套装 V2.0 (96 RXN) 货号: 940-001194-00	MGIEasy Fast 酶切 DNA 文库制备模块 V2.0	940-001195-00
	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	
DNBSEQ-G99RS 高通量测序试剂套装 (G99 FCL SE100/PE50)	940-001268-00	
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 μ 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

DNA 建库

准备样本

1. 推荐 DNA 建库起始量为 110 ng gDNA/ 样本, 并用 TE Buffer 将总体积补充至 48 μ L。

提示

- 如有特殊需求, DNA 建库起始量可在 1.1 ng~220 ng 范围内调整, 并用 TE Buffer 将总体积补充至 48 μ L, 同一轮建库只能选择其中一种起始量进行实验。
- 推荐使用完整度较好 (无明显降解或轻微降解) 且纯度良好 ($1.8 \leq OD260/OD280 \leq 2.0$, $OD260/OD230 \geq 1.7$) 的基因组 DNA 进行打断。
- 若样本 DNA 提取过程中带入高浓度金属离子螯合剂或其他盐, 可能会影响打断步骤的效率及片段大小。

2. 将 48 μ L 转移至准备好的八联管 (可掰开 PCR 八联管) 中, 盖上透明平盖, 涡旋振荡 3 次, 每次 3 s, 离心后确保底部无气泡, 侧壁无挂液。置于冰上备用。

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。
- 如实际样本数量少于 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。

DNA 建库

OS DNB 制备

进行测序

准备试剂

- 从 MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒中取出 UDB Adapter。根据起始量，按照下表，在 0.5 mL 冻存管中添加 TE Buffer 稀释 UDB Adapter。

DNA 手工起始量 (ng)	DNA 自动化投入量 (ng)	稀释倍数	稀释后的 UDB Adapter 体积 (μL)		
			4 RXN	8 RXN	16 RXN
200	220	/			
100	110	2×			
50	55	4×			
25	27.5	8×	≥35	≥52	≥100
10	11	20×			
5	5.5	40×			
1	1.1	100×			

- 从 MGIEasy Fast 酶切 DNA 文库制备试剂套装 V2.0 中取出试剂，上下颠倒充分混匀 Fast FS Enzyme II，瞬时离心后置于冰上待用。其他组分于室温解冻后涡旋充分混匀，瞬时离心后置于冰上待用。
- 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 II	0.5 mL 冻存管	65 μL	105 μL	原管
Fast FS Enzyme II	0.5 mL 冻存管	25 μL	45 μL	原管
Ligation Enhancer	0.5 mL 冻存管	25 μL	25 μL	原管
Fast Ligation Buffer	0.5 mL 冻存管	125 μL	225 μL	原管
Ad Ligase	0.5 mL 冻存管	25 μL	45 μL	原管
PCR Enzyme Mix	0.5 mL 冻存管	125 μL	225 μL	原管
UDB Adapter	0.5 mL 冻存管	35 μL	52 μL	100 μL

提示

- 使用 16 RXN 规格套装对 16 个样本进行建库时，无需单独分装文库制备试剂。从试剂盒中取出对应试剂，解冻混匀离心后，置于冰上待用，原管试剂可直接放置于 MGISP-100RS 上使用。
- Fast FS Enzyme II 不可涡旋混匀，请上下颠倒 10 次并轻弹底部混匀。轻弹时保证管底无试剂残留。混匀不充分会影响打断效果，请严格按照说明操作。

- 配制 1× Elute Enhancer, En-TE 和 En-Beads。

名称	组分	体积 (μL)	总体积 (μL)	储存要求	有效期
1× Elute Enhancer	20× Elute Enhancer	2	40	室温	7 天
	Nuclease-Free Water	38			
En-TE	1× Elute Enhancer	5.4	2700	2 °C ~8 °C	7 天
	TE Buffer	2694.6			
En-Beads	1× Elute Enhancer	24	2400	2 °C ~8 °C	7 天
	DNA Clean Beads	2376			

- 将 En-Beads 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	500	1000	1000×2 管

- 配制 15 mL 80% 乙醇。

提示

使用无水乙醇和 Milli-Q 水按比例配制，现配现用。

- 取 1 块 96 孔深孔板，按下图加入试剂。

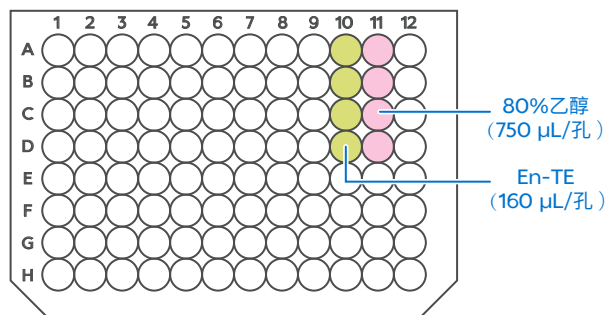
DNA 建库

OS DNB 制备

进行测序

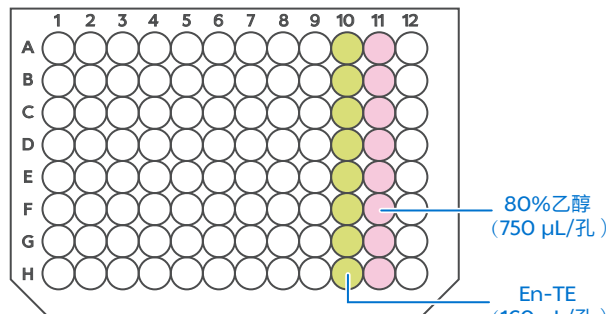
4 RXN:

- 第 10 列前 4 孔分别加入 160 μL En-TE。
- 第 11 列前 4 孔分别加入 750 μL 80% 乙醇。



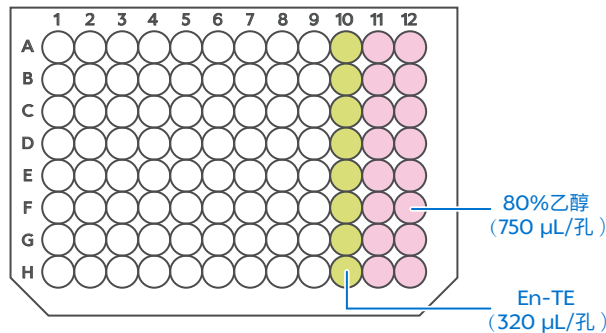
8 RXN:

- 第 10 列每孔分别加入 160 μL En-TE。
- 第 11 列每孔分别加入 750 μL 80% 乙醇。



16 RXN:

- 第 10 列每孔分别加入 320 μL En-TE。
- 第 11 列和 12 列每孔分别加入 750 μL 80% 乙醇。



8. 从MGIEasy双端独立标签引物接头试剂盒中取出引物，充分混匀离心后，加入准备好的八联管。每孔加入10 μL 。

提示

- 八联管为可掰开式PCR八联管。
- 当样本量为4时，仅需分装至八联管的前4孔。

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-A06-116 MGIEasy Fast FS DNA Library Prep_RV2.0_SV4.0
脚本	<ul style="list-style-type: none"> Fast_FS_Library_Prep_4RXN.py Fast_FS_Library_Prep_8RXN.py Fast_FS_Library_Prep_16RXN.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。

DNA 建库

OS DNB 制备

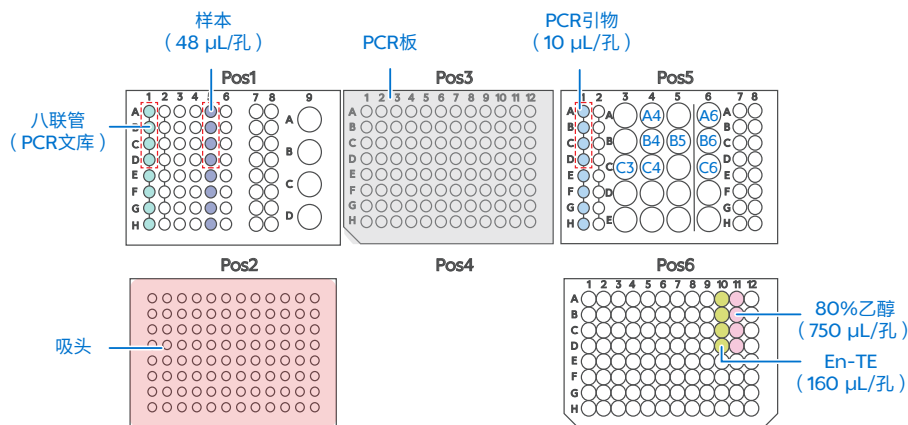
进行测序

3. 根据下图放置耗材。

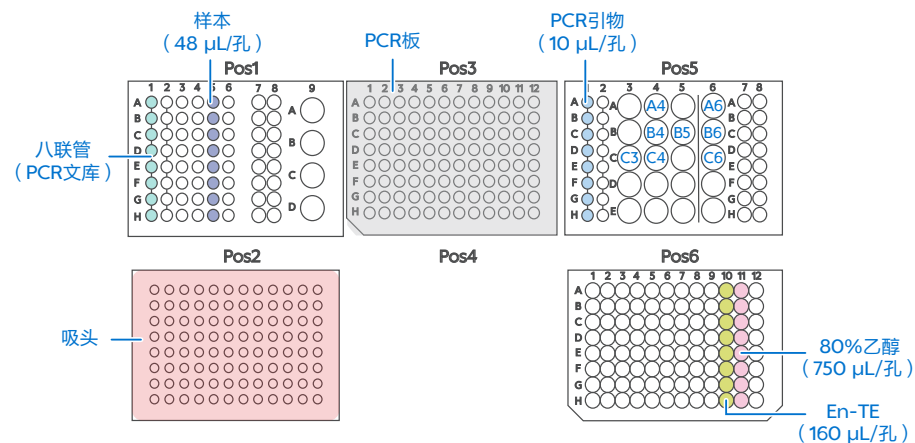
提示

- 当样本数量为 4 时，八联管及深孔板每列仅需在前 4 孔内加入试剂 / 样本，文库产物将收集在八联管前 4 孔中。
- 磁珠需使用涡旋震荡仪充分混匀、短暂离心后，放入 MGISP-100RS。其他试剂放入 MGISP-100RS 前，需确保管底无气泡，侧壁无挂液，并保证所有试剂管盖打开。

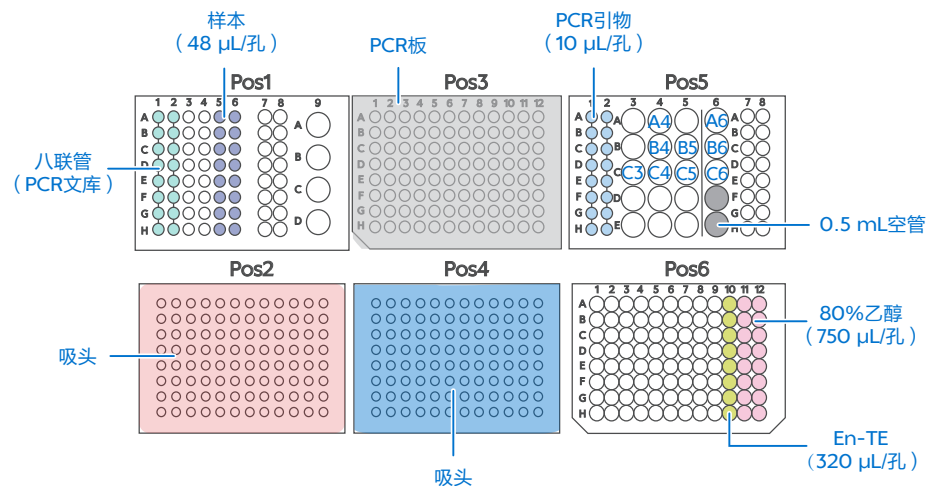
4 RXN:



8 RXN:



16 RXN:



DNA 建库

OS DNB 制备

进行测序

Pos 5 各孔试剂加载说明如下:

孔位	试剂名称
A4	Fast FS Buffer II
A6	Fast FS Enzyme II
B4	Fast Ligation Buffer
B5	Ligation Enhancer
B6	Ad Ligase
C3	UDB Adapter
C4	En-Beads
C5	En-Beads (16RXN)
C6	PCR Enzyme Mix
D6	0.5 mL 空管 (16RXN)
E6	0.5 mL 空管 (16RXN)

4. 点击【运行】按钮后, 出现选择酶切打断时间和PCR循环数的弹窗。根据下表依次选择对应参数后, 点击【继续】。

DNA 手工起始量 (ng)	DNA 自动化投入量 (ng)	酶切打断时 (min)	PCR 循环数 (cycles)
200	220	12	4
100	110	14	5
50	55	16	6
25	27.5	16	7
10	11	18	9
5	5.5	20	10
1	1.1	22	12

提示

整个流程预计运行 2 h 40 min ~ 3 h 30 min。运行过程中, 用户可根据需要点击【暂停】或【恢复】以暂停或恢复实验。

5. 运行完成后, 取出 Pos 1 位置第 1 列或第 1、2 列的 PCR 文库 (体积为 30 μ L)。

6. 按照定量试剂盒的操作说明对文库进行定量, 要求PCR文库浓度不小于3 ng/ μ L。定量试剂盒为 Qubit[®] dsDNA HS Assay Kit 或 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit。

停止点

PCR 文库可置于 -20 °C冰箱储存。

7. (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。

提示

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

OS DNB 制备

准备样本

提示

DNA 文库推荐单样本数据量 ≥ 10 M reads。

- 取 0.2 mL PCR 管，等质量混合待测文库并将其振荡混匀，取 30 ng 混合后的文库以制备 DNB，要求体积不大于 10 μ L。

提示

若总体积不足 10 μ L，用 TE buffer 补充至 10 μ 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 (μ 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	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 (μ 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	时间
35 $^{\circ}$ C (热盖)	On
30 $^{\circ}$ C	20 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

提示

建议将热盖温度设置为 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 10 μ 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 PCR 管。

停止点

DNB 可置于 4 $^{\circ}$ C 条件下储存 48 h。

- 取 2 μ 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/ μ L。

提示

若 DNB 浓度超过 40 ng/ μ L，需用 TE 缓冲液稀释至 20 ng/ μ L。

DNA 建库

OS DNB 制备

进行测序

进行测序

准备载片与测序试剂槽

1. 取出载片并置于室温下放置至少 30 min, 用于后续 DNB 加载。

提示

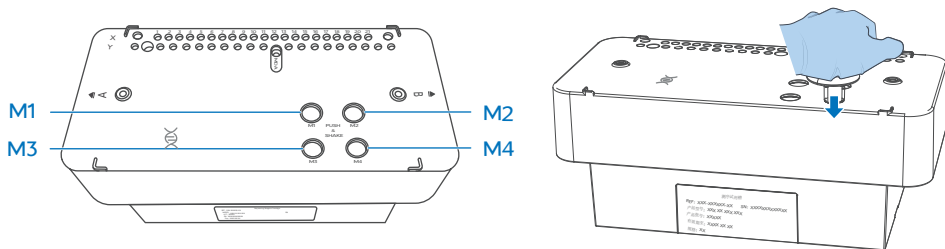
载片不可静置超过 24 h, 此时切勿拆开载片真空包装袋。

2. 取出测序试剂槽并置于常温水浴解冻, 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。

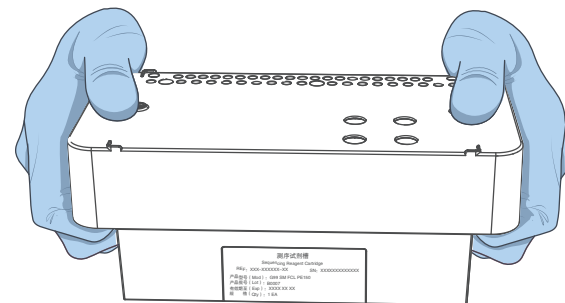
型号	解冻方式		
	室温下水浴解冻 (h)	2 °C ~ 8 °C 冰箱过夜后室温水浴 (h)	2 °C ~ 8 °C 冰箱 (h)
G99 FCL SE100/PE50	2.0	0.5	8.0

3. 颠倒混匀试剂槽 5 次, 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、左右摇晃试剂槽 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。



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:

- 使用 DNBSEQ-G99ARS 服务器: 192.168.1.5
- 使用 PFI 服务器: 127.0.0.1

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. 设置【选择分析产品】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】。

DNA 建库

OS DNB 制备

进行测序

	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	DNB20240809	UDB-1	test1		DNA	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，【宿主】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。
- 返回【导入测序 + 分析】窗口，点击【选择文件】，在弹框中选择要导入的 Excel 文件。点击【上传】，软件自动回到【新建测序 + 分析】界面。
 - 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】。

开始测序

- 在测序仪主界面点击 ，进入登录界面。
- 输入用户名 *user* 和密码 *123*，点击【登录】。
- 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

上机测序前需确保废液桶内废液液面低于系统检测线，或清空废液桶。

- 点击【下一步】，选择【测序 & 信息传输】，在【DNB ID】待写区输入 DNB 信息。

提示

确保输入的 DNB ID 与 ZLIMS 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【SE100+10+10】，并点击右侧的下拉菜单按钮，选择标签序列【UDB_1-192】。
- 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 信息。

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】，开始测序预处理。屏幕上会显示预处理进度。
- 进行 DNB 加载：
 - 提前取出 DNB 加载缓冲液 II，置于冰盒上约 30 min 至融化，使用涡旋振荡器振荡混匀 5 s 并短暂离心后置于冰盒上备用。
 - 取出测序试剂套装中的 0.5 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

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

DNA 建库

OS DNB 制备

进行测序



提示

DNB 加载体系需现配现用，切勿离心、振荡及剧烈吹打。

- ④ 用便携式加样器进行 DNB 的加载，具体操作参考 *MGIDL-G99 便携式加样器快速操作指南* “加载 DNB”。
11. 测序预处理完成后，升降屏会上升到载片加载位置。将上一步骤中准备好的载片插入载片平台。系统自动识别载片 ID 信息（如无法自动识别，可按提示手动输入）。
12. 点击【下一步】，对填写的信息进行复核。
13. 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。
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。
14. 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】。

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。



- 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。

--- 此页有意留白 ---