

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	
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

RNA 建库

准备样本

1. 推荐RNA建库起始量为100 ng/样本，并用TE Buffer将总体积补充至10 μ L。

提示

- 如有特殊需求，RNA 建库起始量可在 10 ng~1 μ g 范围内调整，并用 TE Buffer 将总体积补充至 10 μ 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 ≥ 7 ，当 RIN < 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 ≥ 2 。

2. 将准备好的 10 μ 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 板第一列。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，于室温备用。

3. 在进行连接反应时，根据 RNA 样本投入量，用 TE Buffer 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。

RNA 建库

OS DNB 制备

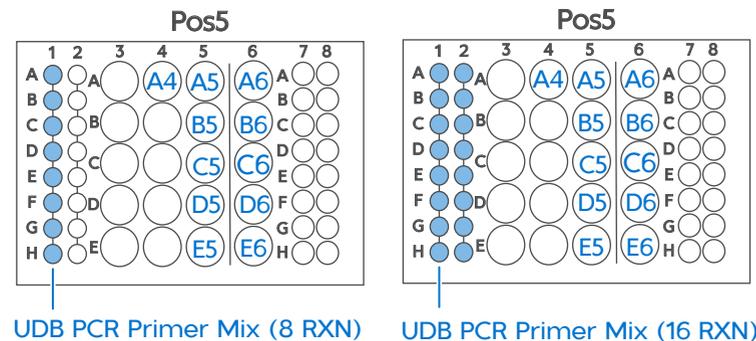
进行测序

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

- 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。
- 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-10ORS。

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
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

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
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



- 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。

- 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 Buffer 和 80% 乙醇。

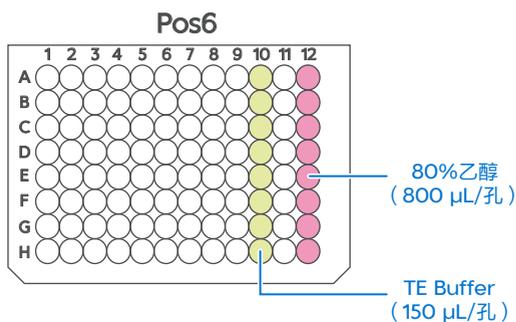
RNA 建库

OS DNB 制备

进行测序

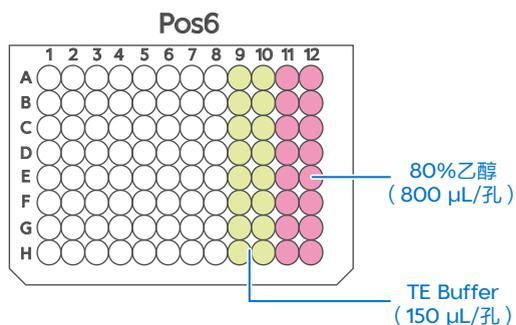
8 RXN:

- 第 10 列每孔各加入 150 μ L En-TE。
- 第 12 列每孔各加入 800 μ L 80% 乙醇。



16 RXN:

- 第 9 列和 10 列每孔各加入 150 μ L En-TE。
- 第 11 列和 12 列每孔各加入 800 μ 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-A06-101 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。

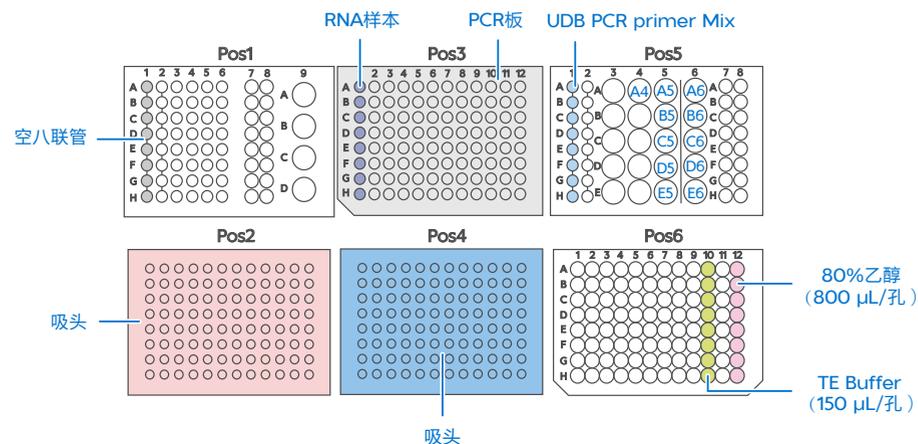
提示

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:

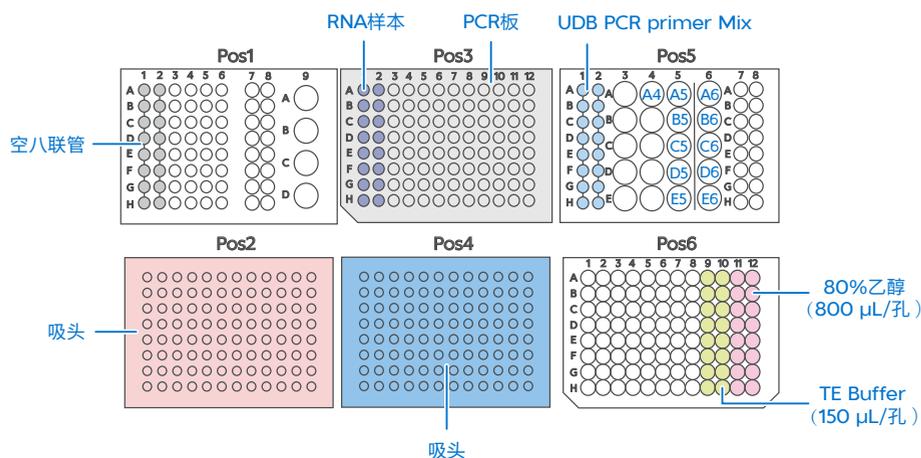


RNA 建库

OS DNB 制备

进行测序

16 RXN:



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 μL。
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 ≥ 3 ng/μL。



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



RNA 文库推荐单样本数据量 ≥ 20 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。



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



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。



请勿振荡及剧烈吹打 PCR 管。



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。



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

RNA 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。

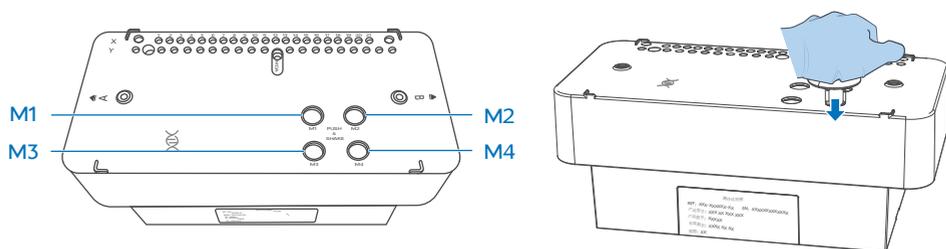
提示

- 载片不可静置超过 24 h。
- 此时切勿拆开载片真空包装袋。

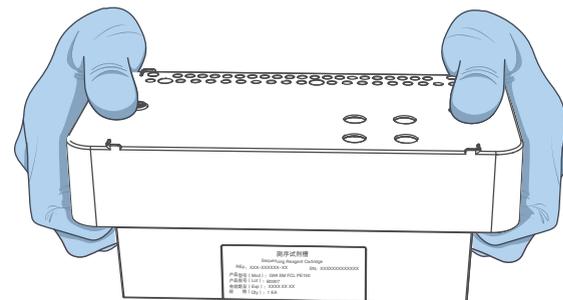
2. 取出测序试剂槽并置于常温水浴解冻, 或提前一天将测序试剂槽置于 2 °C ~8 °C 冰箱解冻。解冻后置于 2 °C ~8 °C 冰箱备用。

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

- 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。
- 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

- 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
- 输入授权的账号 *lite* 与密码 *lite123456*, 点击【登录】。
- 在主界面点击【测序 + 分析】, 进入【新建测序 + 分析】界面。
- 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。

- 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。
- 打开模板, 填写【DNB 样本录入】工作表, 完成后点击【保存】。

RNA 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	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，【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】。
- 根据需要点击 A 边或 B 边的【测序】，如需双边测序点击【测序 A&B】。选择【新建测序】进入测序前的自检。

提示

上机测序前需确保废液桶已清空。

- 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 0.5 mL 空管，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

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

RNA 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”。

10. 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。



提示

如无法自动识别，可按提示手动输入。

11. 点击【下一步】，对填写的信息进行复核。
12. 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。
13. 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。



提示

- 可点击报告页面左上方的  以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*。