华大智造 **NG**

呼吸道微生物测序组合产品 (DNBSEQ-E25RS&DNBSEQ-E25ARS) 快速操作指南

手工扩增RT-PCR	纯化RT-PCR产物)制备Fast PCR-FREE文库	制备DNB	准备测序试剂槽与载片	进行测序	查看报告

手工扩增RT-PCR

样本要求

本产品适用于从培养毒株、咽拭子样本等多种类型样本中提取而来的总RNA。 推荐使用完整度较好的RNA样本,且样本Ct值≤32,起始体积为10 µL。

手工耗材信息

- 0.2 mL PCR 管
- 冰盒
- 移液器及适配的带滤芯吸头

进行RT-PCR扩增

1. 从 MGIEasy 呼吸道微生物基因组扩增试剂盒中取出如下试剂,在冰上配制 RT-PCR 反应液。充分混匀后转移至新的 0.2 mL PCR 管中。

RT-PCR 反应液		
试剂	体积 (µL)	
Flu A/B Primer Pool	2	
Flu Control Primer	2	
RT-PCR buffer	25	
RT-PCR Enzyme Mix	2.5	
Nuclease-Free water	8.5	
总体积	40	

- 2. PCR 管中加入 10 µL RNA 提取产物,此时 RT-PCR 反应液总体系为 50 µL。
- 3. 用移液器将该反应体系吹打混匀 10 次, 瞬时离心将反应液集中于管底。

☑ 提示

- 切勿对该反应体系进行振荡操作。
- 建议在每批次实验中增加一份阴性对照样本。单管反应投入 10 µL 无核酸酶 水以替代 RNA 提取产物,并全程参与各环节以评估每批次实验过程中是否存 在交叉污染的风险。若分析报告中阴性对照为流感病毒阴性,则交叉污染风险 低。否则交叉污染风险高。
- 4. 将 PCR 管置于 PCR 仪中, 按下表的条件讲行反应。

循环数	时间	温度
	On	105 ℃(热盖)
1	30 分钟	45 °C
I	15 分钟	55 ℃
	3 分钟	95 °C
	30 秒	95 °C
5	30 秒	55 ℃
	3 分钟	68 °C
	30 秒	95 °C
38	30 秒	64 °C
	3 分钟	68 °C
1	5 分钟	68 °C
I	Hold	12 °C

☑ 提示

- 根据样本 Ct 值大小设置 PCR 仪的循环数。若 20 < RNA 样本 Ct 值 ≤ 32, 推 荐设置 PCR 仪循环数为 38。
- **RT-PCR**扩增反应需在后区进行。
- 5. 扩增反应结束后,将产物瞬时离心后置于冰上备用。

华大智造 MG

呼吸道微生物测序组合产品 (DNBSEQ-E25RS&DNBSEQ-E25ARS) 快速操作指南

纯化RT-PCR产物 手工扩增RT-PCR 制备Fast PCR-FREE文库 制备DNB 准备测序试剂槽与载片 查看报告 纯化RT-PCR产物 准备样本 转移50 µL RT-PCR产物至八联管,确保底部无气泡、侧壁无挂液后置于冰上待用。 准备仪器 ☑ 提示 ● 提示 ■ 样本量为8时,需1排八联管。样本量为16时,需2排八联管。 ■ 当样本量不足8或16时,可用Milli-O水补齐空余的八联管,试剂耗材仍按照 推荐使用 V1.0 及以上版本的 MGISP-100RS 进行自动化操作。

- 仪器使用前,确保自动化脚本与 PCR 程序已成功导入。
- 1. 启动 MGISP-100RS 仪器与电脑,双击桌面 MGISP-100RS 控制软件图标,运行 控制软件。
- 2. 选择【Real】模式,点击【创建】,点击【操作员进入】进入软件主页。
- 3. 点击初始化界面上方的【初始化】, 仪器开始初始化。 初始化成功后,界面出现提示信息。
- 4. 按下列步骤进行一次前期清洁:
 - ① 点击【前后期清洁】>【前期清洁】>【开始】。
 - 2) 根据弹窗提示完成各项操作,点击【继续】。

准备耗材

在实验开始前准备以下自动化耗材与试剂:

- 250 µL 带滤芯自动化吸头
- 1.3 mL 96 孔深孔板
- 可掰开 PCR 八联管及管盖(文中提到的八联管均为此耗材)
- 2 mL 冻存管, PCR 级
- MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒
- 无水乙醇
- Milli-Q水

8或16份样本的标准准备。

准备试剂

1. 从 MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒中取出以下试剂,并充分振荡混匀。

2十 女儿	体积 (µL)		
120° LU	8 RXN	16 RXN	
DNA Clean Beads	380	660	
TE Buffer	500	900	

● 提示

提前 **30** 分钟取出 DNA Clean Beads 并置于室温,使用前注意充分振荡混匀。

- 2. 取新的 2 mL 冻存管,根据样本数量的不同,分别吸取对应的体积到管中,盖上管 盖,分别标记为 "DNA Beads1" 和 "TE"。
- 3. 用无水乙醇和 Milli-Q 水按比例配制 25 mL 80% 乙醇。

该试剂现配现用。

华大智造 呼吸道微生物测序组合产品 (DNBSEQ-E25RS&DNBSEQ-E25ARS)快速操作指南 ・编号: H-020-000794-00 ・修订日期: 2023 年 9 月 **NG** ・版本: 1.0 © 华大智造 版权所有 手工扩增RT-PCR 纯化RT-PCR产物 制备Fast PCR-FREE文库 制备DNB 准备测序试剂槽与载片 查看报告 4. 取1块96孔深孔板,按下图加入80%乙醇。 3. 根据下图放置耗材。 ■ 8 RXN: 450 µL/ 孔 空八联管(纯化后的产物) (8RXN: 第1列, 16RXN: 第1~2列) ■ 16 RXN: 750 µL/ 孔 八联管(RT-PCR产物) 34567 8 9 10 11 12 2 (8RXN: 第5列, 16RXN: 第5~6列) Α Pos 3 Pos 1 Pos 5 1 2 5 6 R

80%乙醇



运行RT-PCR产物纯化流程

C

D

F

F

G

н

😧 提示

仪器使用前,确保自动化脚本与 PCR 程序已成功导入。

1. 按下表设置 MGISP-100RS 运行向导界面。

【应用方案】 JB-A06-087 MGI Respiratory Microorganisma RV1.0_SV1.0		JB-A06-087 MGI Respiratory Microorganisms Genome Sequencing Package_ RV1.0_SV1.0
	【脚本】	1.ATOPlex_RNA_RespMulti_PCR_Purification_step1.py
2.	放置耗材前,	使用涡旋振荡器充分混匀磁珠并短暂离心。

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。



- 确认无误后关闭视窗。点击【运行】。在弹窗中选择合适的样本数量【8】或【16】, 点击【继续】。
- 5. 运行完成后,按照弹窗提示在 Pos1 位置取出纯化后的 RT-PCR 产物,体积为 30 μL。
- 6. 点击【继续】结束流程。
- 7. 按照定量试剂盒Qubit[®] dsDNA HS Assay Kit或Quant-iT[™] PicoGreen[™] dsDNA Assay Kit 的操作说明对纯化后的产物进行定量,纯化产物浓度需不小于 5 ng/µL。

😧 提示

该浓度要求不适用于阴性对照样本的纯化产物。

华大智造 『GIGI

呼吸道微生物测序组合产品 (DNBSEQ-E25RS&DNBSEQ-E25ARS)快速操作指南

手工扩增RT-PCR	纯化RT-PCR产物	制备Fast PCR-FREE文库	制备DNB 准	备测序试剂槽与载片	进行测序	查看报告
停止点 RT-PCR 纯化后产物可置于 将废弃的样本管、PCR 板、深 (可选)若当天不再进行实验 洁流程。	20 ℃冰箱储存,并于 系孔板和废料袋投放至排 2、用纯水和 75% 乙酯 文库	两周内使用。 皆定废品区域。 『清理仪器台面,并运行后期清	 若阴性对照样本 至总体积 48 µ 转移 48 µL 样本雪 待用。 提示 样本量为8时, 当样本量不足8 8或16份样本的 	的纯化产物量低于 150 r L。 至准备好的八联管中,确信 需1排八联管。样本量为1 3或16时,可用Milli-Q水和	ng,投入全部体积并 呆底部无气泡,侧壁 6时,需2排八联管 补齐空余的八联管,	并用 TE Buffer 達无挂液并置于 。 试剂耗材仍按
备试剂盒			准备试剂			
下表准备试剂盒:			1. 按下表配制 1× Elu	te Enhancer,En-TE 和	EN-Beads。配制穿	完成后 7 天内可
试剂含名称		组分	试剂	组分	体积 (µL)	储存条件
		20× Elute Enhancer	_	20× Elute Enhancer	1.5	室温
		Fast FS Buffer	1× Elute Enhancer	Nuclease-Free Water	28.5	
		Fast FS Enzyme		总体积	30	
MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制	1备模块	Ligation Enhancer	-	1× Elute Enhancer	5.4	
		Fast Ligation Buffer	En-TE	TE Buffer	2694.6	4 °C
		Ad Ligase		总体积	2700	
		TE Buffer	-	1× Elute Enhancer	20	
MGIEasy DNA 纯化磁珠		DNA Clean Beads	En-Beads	DNA Clean Beads	1980	4 ℃
MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试		UDB Adapters		总体积	2000	
备样本			 将En-Beads充分; 盖上管盖,标记为 ■ 8 RXN: 950 μ 	昆匀,按照以下要求,分约 P ["] DNA Beads2" : IL	装相应体积至新的2	2 mL冻存管中
推荐每份样本的建库起始量为	1215 ng, 并田 TF Bur	ffer 将总体和补充至 48 山	16 RXN: 1800	μL		

- 1. 推荐每份样本的建库起始量为 215 ng, 并用 TE Buffer 将总体积补充至 48 µL。
 - 若纯化产物量为 150 ng~215 ng,投入全部体积进行建库并用 TE Buffer 补充
 至总体积 48 µL。
- 3. 取出下表中的试剂并解冻,混匀离心后,置于冰上待用。再取出5个(8 RXN)或7 个(16 RXN或96 RXN)0.5 mL冻存管,分装文库制备试剂。

华大智造 『GIGI

呼吸道微生物测序组合产品 (DNBSEQ-E25RS&DNBSEQ-E25ARS) 快速操作指南

制备Fast PCR-FREE文库 手工扩增RT-PCR 纯化RT-PCR产物 制备DNB

准备测序试剂槽与载片

查看报告

计划	体积 (µL)		
נוראש	8 RXN	16 RXN	
Fast FS Buffer	102	200	
Fast FS Enzyme	47.5	110	
Ligation Enhancer	25	48	
Fast Ligation Buffer	220	430	
Ad Ligase	45	105	

☑ 提示

- 若使用 MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备试剂套装(16 RXN)进行16 RXN 的文库制备,原管试剂解冻混匀离心后可直接放入 MGISP-100RS 使用, 无需单独分装,但需额外准备2个0.5 mL空冻存管备用。
- 若使用 96 RXN 试剂套装进行 16 RXN 的文库制备,试剂套装中的 2 个冻存 管不分装试剂。
- 4. 将无水乙醇和 Milli-Q 水按比例配制 25 mL 80% 乙醇。

● 提示

该试剂现配现用。

- 5. 取1块96孔深孔板,按下图加入试剂。
 - 8 RXN



16 RXN



6. 从 MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试剂盒中取出接头并充分混匀离心后, 以每孔 10 µL 的体积加入准备好的八联管。

制备Fast PCR-FREE文库

1. 按下表设置 MGISP-100RS 运行向导界面。

	【应用方案】 JB-A06-087 MGI Respiratory Microorganisms Genome Sequencing Package RV1.0_SV1.0			
	【脚本】	1.ATOPlex_RNA_RespMulti_PCR_Purification_step1.py		
Ŷ	····································			
	仪器使用前,确保自动化脚本与 PCR 程序已成功导入。			
2.	放置耗材前,使用涡旋振荡器充分混匀磁珠并短暂离心。			
	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。			

华大智造 MG

呼吸道微生物测序组合产品 (DNBSEQ-E25RS&DNBSEQ-E25ARS) 快速操作指南

・编号: H-020-000794-00 ・修订日期: 2023 年 9 月 ・版本:1.0



Assay Kit 的操作说明对文库制备产物进行定量, Fast PCR-FREE 文库制备产物 浓度需不小于 0.8 ng/µL。

😡 提示

该浓度要求不适用于阴性对照样本的纯化产物。

信号因子缓冲液

呼吸道微生物测序组合产品 (DNBSEQ-E25RS&DNBSEQ-E25ARS) 快速操作指南

毛工扩增 PT-PC P	幼化PT_PCP产物	制各Fast PCR-ERFF文库	制各DNB	准各测定试刻描与裁片	进行测定	杏看坭生
					ינונאונן בא	
试剂盒名称		组分	6. 取出 DN	ⅠB 聚合酶混合液 Ⅱ (OS) 并置	置于冰上,短暂离心 5	秒后置于冰上备用。
		MDA T- 试剂				
	CL DE450)	MDA 测序酶混合液				
DNBSEQ-E25RS 局通重测序试剂盒 (F	CL PE150)	废液盒	- 『 『 『 『 『 [(OS) 』] 主/』。 ■ 清勿长时间触碰管壁。			
		漏斗				
DNBSEQ-E25RS 集成测序载/	÷	测序载片	- 7. PCR 仪1	达到4℃后,取出PCR管,到	开离心 5 秒,在冰上打	安卜表配制反应混合波2。
				组分		体积 (µL)
2. 从 DNBSEQ-E25RS 高通量》	则序试剂盒(FCL PE	150) 中取出 TE 缓冲液、DNB 制]	DNB聚合酶混合液 I (OS)		40
备缓冲液 (OS-V2.0-DB)、I	DNB 聚合酶混合液 I	(OS) 和 DNB 终止缓冲液,置于		DNB 聚合酶混合液 II (OS)		4

8. 将 PCR 管内的试剂进行涡旋振荡混匀, 离心 5 秒后, 置于 PCR 仪中进行引物杂交, 反应条件如下表。

温度	时间
35 ℃(热盖)	On
30 °C	
4 °C	Hold

9. PCR 仪达到 4 ℃后, 立即加入 20 µL DNB 终止缓冲液, 并用不带滤芯的阔口吸 头缓慢吹打混匀 5~8次。

₩ 提示

- 切勿离心、振荡或剧烈吹打 DNB。
- 制备好的 DNB 可置于 4 ℃条件下储存 48 小时。
- 10. 取 2 µL DNB, 按照定量试剂盒 Qubit ssDNA Assay Kit 的操作说明对 DNB 进 行定量。DNB 浓度范围需在 4 ng/µL~40 ng/µL 之内,否则需要重新制备。

DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂盒 (FCL PE150)		MDA I- 证剂	
		MDA 测序酶混合液	
	DNBSEQ-E2SRS 高速重测序试剂显 (FCL PEISO) -		
	_	漏斗	
DNBSEQ-E25RS 集成测序载片		测序载片	
2			

备缓冲液 (OS-V2.0-DB)、DNB 聚合酶混合液 I (OS) 和 DNB 终止缓冲液, 置于 冰盒上解冻约30分钟。

☑ 提示

注意不要误取为 DNB 制备缓冲液 (OS-V2.0-SB)。

- 3. 融化后, 涡旋振荡 5 秒混匀并短暂离心后置于冰上备用。
- 4. 取 0.2 mL 八联管或 PCR 管,在冰上按下表配制反应混合液 1。

组分	体积 (µL)
TE 缓冲液	20-V
dsDNA 文库	V
DNB 制备缓冲液 (OS-V2.0-DB)	20
总体积	40

● 提示

dsDNA 文库投入量 V (μL) = 15 ng / 混合后的文库浓度 (ng/μL)。

5. 将反应混合液1涡旋振荡混匀,并离心5秒,置于PCR 仪中进行引物杂交,反应 条件如下表。

温度	时间
105 ℃(热盖)	On
95 °C	3 分钟
57 ℃	3 分钟
4 °C	Hold

呼吸道微生物测序组合产品 (DNBSEQ-E25RS&DNBSEQ-E25ARS)快速操作指南

手工扩增RT-PCR

准备测序试剂槽与载片

准备测序试剂槽

1. 将带外包装的测序试剂槽竖直放置(标签朝上),置于2 ℃~8 ℃冰箱中解冻12小时, 或将其置于15 ℃~25 ℃中解冻4.5 小时~5 小时。

፼ 提示

禁止对试剂槽进行水浴解冻。

- 2. 取出信号因子缓冲液,置于冰上解冻备用。
- 3. 将信号因子1和信号因子2置于冰上约10分钟。
- **4.** 试剂槽解冻完成后,摇晃试剂槽,检查是否已无冰块。若有,将试剂槽置于室温直 至冰块完全融化。
- 5. 双手握住试剂槽两侧,将其上下颠倒混匀 20 次并拍击桌面 10 次,再上下颠倒 10 次并拍击桌面 10 次。竖直握住试剂盒并上下摆动 10 次,剪开试剂槽外包装袋。
- 6. 将融化后的信号因子1和信号因子2振荡混匀5秒, 短暂离心4秒~5秒后备用。
- 7. 根据下表将对应体积的信号因子1和信号因子2加入至信号因子缓冲液中。

信号因子混合液				
组分	体积			
信号因子1	31.5 µL			
信号因子2	21 µL			
信号因子缓冲液	21 mL			

8. 盖上信号因子混合液的管盖后,上下颠倒 10~15 次以混匀试剂。

2 提示

混匀过程中勿剧烈振荡,避免气泡产生。

9. 按照下图放置试剂槽,将漏斗放在 MSP 孔上,将混好的信号试剂混合液全部加入 MSP 孔中。



- 10. 取出 MDA T- 试剂和 MDA 测序酶混合液,上下颠倒混匀,用移液枪取 50 μL MDA 测序酶混合液,加至 MDA T- 试剂中,上下颠倒 6 次。
- 11. 用干净的吸头戳破试剂槽上的 MDA 孔,将混匀后的 MDA 混合液全部加入 MDA 孔中。加入时确保不引入气泡。

₩ 提示

MDA 混合液加入试剂槽后,需在 20 分钟内尽快上机,否则可能影响测序质量。

12. 用尖头镊子夹取1号、2号和3号孔上的胶塞,并丢入指定垃圾桶。



呼吸道微生物测序组合产品 (DNBSEQ-E25RS&DNBSEQ-E25ARS) 快速操作指南

・编号: H-020-000794-00 ・修订日期: 2023 年 9 月 ・版本: 1.0



呼吸道微生物测序组合产品 (DNBSEQ-E25RS&DNBSEQ-E25ARS) 快速操作指南

手工扩增RT-PCR) 纯化RT-PCR产物	制备Fast PCR-FREE文库	制备DNB	准备测序试剂槽与载片	进行测序	查看报告

- 7. 撕开载片包装, 检查载片完整性, 确认载片二维码信息是否与标签序列号一致。确 认无误后安装载片。
- 8. 取出准备好的测序试剂槽,用扫码枪扫描测序试剂槽上的二维码,或在界面右侧文 本框内手动输入试剂槽上的信息。
- 9. 卸下试剂槽底部保护盖,将试剂槽对准载架定位柱,安装试剂槽。确保废液盒胶塞 已打开,并将其卡入限位装置,安装完成后,点击()>(确定]>()。
- 10. 用扫码枪扫描样本管上的二维码,或手动输入样本信息。
- 11. 讲行 DNB 加载·
 - ① 将解冻后的DNB 加载缓冲液 II 振荡混匀 5 秒并短暂离心后置于冰盒上备用。
 - ② 按下表配制 DNB 加载体系。

组分	体积 (µL)
DNB 加载缓冲液 II	34
DNB	102
总体积	136

- ③ 用阔口吸头将 DNB 加载体系缓慢吹打混匀 8 次。
- ④ 用阔口吸头将制备完的 DNB 加载体系缓慢加入到测序载片的 DNB 加载口中, 避免产生气泡。

● 提示

DNB 加载体系需现配现用,切勿离心、振荡及剧烈吹打。

- 12. 关闭仓门,点击 ()) ,进行信息复核。
- 13. 各项信息确认无误后,确认计算模块已连接,点击 >【确定】,测序开始。 在 ZLIMS 系统的样本管理界面可查看样本状态。

14. 测序完成后,打开仪器仓门,移除测序试剂槽、载片与废液盒,点击 返回主 界面。

查看报告

- 1. 在 ZLIMS 的任务管理界面,点击任务名称,进入分析报告界面。
- 2. 点击【报告】列的 可杳看样本报告。

● 提示

可在报告预览页面中预览或查看报告,也可点击报告最上方的 (土),下载同批 次所有样本的报告与结果。