

概述

适配试剂盒/ 试剂套装

名称	货号	品牌
ATOplex MTB 建库试剂盒套装 (96RXN)	940-001601-00	MGI
ATOplex MTB 建库试剂盒套装 (576RXN)	940-001599-00	
DNBSEQ-G99RS 高通量测序试剂套装	940-001269-00	
DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V4.0	940-001654-00	

适配仪器/ 软件

仪器 / 软件型号	货号	品牌
DNBSEQ-G99ARS	900-000608-00	MGI
MTB-Explorer 软件	970-000385-00	

MTB样本文库制备

样本要求

本试剂盒适用于结核分枝杆菌培养物或者混合样本微生物群落（例如，唾液、痰液）中的基因组DNA，样本推荐浓度和投入质量如下：

- 对于细菌培养物提取物，推荐 DNA 样本浓度大于等于 0.1 ng/ μ L，建议投入样本质量在 1 ng~10 ng 之间。
- 对于混合微生物提取样本，推荐浓度大于等于 1 ng/ μ L，建议投入样本质量在 1 ng~10 ng 之间。

投入质量根据实际应用需求确定，要求投入DNA样本体积 \leq 9.5 μ L。

第一轮PCR扩增

- 从 ATOplex MTB 引物池中取出 MTB PCR Primer Pool。从 ATOplex 多重 PCR Spike-in 质控品中取出 Spike-in Control PCR Primer Pool。将两种 primer pool 置于室温解冻，涡旋混匀离心后冰上暂存。
- 从 ATOplex DNA 多重 PCR 扩增模块中取出 PCR Enzyme Mix 及 PCR Clean Enzyme，颠倒或轻弹底部混匀后离心，置于冰上暂存。
- 根据所需反应数，按照下表配置 PCR 反应液 I：

试剂	体积 (μ L)
PCR Enzyme Mix	12.5
PCR Clean Enzyme	0.5
MTB PCR primer Pool	2
Spike-in Control PCR Primer Pool	0.5
总体积	15.5

警告

- 在前区配置第一轮 PCR 反应液，在中区进行第一轮 PCR 反应和第二轮 PCR 反应液配制。
 - 为避免样本交叉污染，推荐使用带滤芯吸头。
 - PCR 反应结束后应立即进行下一步纯化操作，请勿将 PCR 产物置于 PCR 仪器中过夜。
- 按照所需投入量用移液器吸取待测 DNA 或质控品 (9.5 μ L Spike-in Control PCR Primer Pool，根据需求使用) 至一个新的 0.2 mL PCR 管中，加入 TE 缓冲液补齐至 9.5 μ L。用移液器吸取 15.5 μ L 配制好的 PCR 反应液 I，并加入到 PCR 管中，涡旋振荡 3 次，每次 3 秒，瞬时离心将反应液收集至管底。
 - 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按照下表的条件进行第一轮 PCR 反应：

MTB样本文库制备

DNB制备

测序与分析

温度	时间	循环数
105 °C (热盖)	On	/
37 °C	5 min	1
95 °C	5 min	
95 °C	20 s	20
62 °C	1 min	
58 °C	1 min	
72 °C	30 s	
72 °C	1 min	
4 °C	Hold	/

6. 反应结束后, 将 PCR 管瞬时离心。产物在 PCR 管中进行下一步纯化。

第一轮PCR产物纯化

1. 提前从 MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒中取出 DNA Clean Beads, 置于室温解冻 30 分钟, 充分涡旋混匀。
2. 用移液器吸取 32.5 μ L DNA Clean Beads, 并加入到第一轮 PCR 反应后的产物中。轻轻吹打至少 10 次至所有磁珠悬浮, 最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入离心管中。
3. 室温孵育 5 分钟。
4. 将 PCR 管瞬时离心, 再置于磁力架上静置 2~5 分钟至液体澄清, 用移液器小心吸取上清并丢弃。
5. 保持 PCR 管固定于磁力架上, 加入 160 μ L 80% 乙醇漂洗磁珠及管壁。轻轻吹打 3 次后静置 30 秒, 小心吸取上清并丢弃。
6. 重复步骤 5 一次。尽量吸干管内液体, 有少量残留在管壁时可将 PCR 管瞬时离心。在磁力架上分离后, 用小量程移液器将管底液体吸干。
7. 保持 PCR 管固定于磁力架上, 打开管盖, 室温干燥, 直至磁珠表面无反光、无开裂。



提示

磁珠过度干燥 (开裂) 将导致产量降低。

8. 将 PCR 管从磁力架上取下, 加入 6 μ L TE 缓冲液进行 DNA 洗脱。用移液器轻轻吹打至少 10 次至所有磁珠悬浮。
9. 室温孵育 5 分钟。
10. 将 PCR 管瞬时离心, 备用。



停止点

产物纯化后可置于 -20 °C 冰箱中储存 7 天。

第二轮PCR扩增



提示

第二轮 PCR 需带磁珠进行反应, 无需进行磁珠吸附及转移上清。

1. 从 ATOplex MTB 引物池中取出 MTB PCR Block, 从 ATOplex 多重 PCR Spike-in 质控品中取出 Spike-in Control PCR Block 及取出 ATOplex 双标签引物模块。将取出的试剂置于室温解冻, 涡旋混匀离心后置于冰上暂存。
2. 从 ATOplex DNA 多重 PCR 扩增模块中取出 PCR Enzyme Mix、PCR Additive 及 PCR Clean Enzyme, 颠倒或轻弹底部混匀后离心, 置于冰上暂存。
3. 按照 ATOplex MTB 多重 PCR 文库说明书附录, 从 ATOplex 双标签引物模块 (O1-96) 中分别吸取 4 μ L PCR Dual Barcode Primer Mix (O1-96) 加入到纯化后的第一轮 PCR 反应产物中。或从 ATOplex 双标签引物模块 (48*96) 中分别吸取 2 μ L Barcode 1 (O1-96) 和 2 μ L Barcode 2 (O1-48) 到对应样本中。
4. 根据所需反应数, 按照下表在冰上配制 PCR 反应液 II。涡旋混匀, 瞬时离心后置于冰上暂存。

MTB样本文库制备

DNB制备

测序与分析

试剂	体积 (μL)
PCR Enzyme Mix	12.5
PCR Clean Enzyme	0.5
PCR Additive	0.5
MTB PCR Block	1.0
Spike-in Control PCR Block	0.5
总体积	15.0

- 吸取 15 μL PCR 反应液 II，并加入到至步骤 3 中的各样本管中。涡旋混匀 3 次，每次 3 秒，瞬时离心将液体收集至管底。
- 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

温度	时间	循环数
105 °C (热盖)	On	/
37 °C	5 min	1
95 °C	5 min	
95 °C	20 s	15
62 °C	1 min	
58 °C	1 min	
72 °C	30 s	
72 °C	1 min	
4 °C	Hold	/



警告

- 在后区进行第二轮 PCR 反应。
- PCR 反应结束后应立即进行下一步纯化操作，请勿将 PCR 产物置于 PCR 仪器中过夜。

- 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心。产物在 PCR 管中进行下一步纯化。

第二轮PCR产物纯化

- 提前取出DNA Clean Beads，置于室温平衡至少30分钟，涡旋混匀后使用。用移液器吸取25 μL DNA Clean Beads，加入到第二轮PCR反应产物中。轻轻吹打至少10次至所有磁珠悬浮。最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入离心管中。室温孵育 5 分钟。
 - 将 PCR 管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 分钟至液体澄清，用移液器小心吸取上清并丢弃。
 - 保持PCR管固定于磁力架上，加入160 μL 80%乙醇漂洗磁珠及管壁，轻轻吹打3次后静置30秒，小心吸取上清并丢弃。
 - 重复步骤3一次。尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将PCR管瞬时离心。在磁力架上分离后，用小量程移液器将管底液体吸干。
 - 保持 PCR 管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 提示**
磁珠过度干燥（开裂）将导致产量降低。
- 将PCR管从磁力架上取下，加入25 μL TE缓冲液进行DNA洗脱，用移液器轻轻吹打至少10次至所有磁珠悬浮。
 - 室温孵育5分钟。
 - 将PCR管瞬时离心，置于磁力架上，静置2~5分钟至液体澄清。用移液器吸取 23 μL 上清液转移到新的PCR管中。
 - 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10 ng/μL。
- 停止点**
产物纯化后可置于 -20 °C 冰箱中储存。

MTB样本文库制备

DNB制备

测序与分析

DNB制备

- 从 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V4.0 (OS-Dual Barcode) 中取出 TE 缓冲液、DNB 制备缓冲液 (OS-DB-V4.0)、DNB 终止缓冲液和 DNB 聚合酶混合液 I (OS-V4.0)，置于冰盒上约 0.5 小时。融化后，使用涡旋振荡器振荡混匀 5 秒，短暂离心置于冰盒上备用。
- 将第二轮 PCR 产物 (文库) 等质量混合后取 50 ng 于新的 0.2 mL PCR 管中，按照下表制备 DNB 反应液 I:

组分	加入量
文库	V
TE 缓冲液	10 μ L-V
DNB 制备缓冲液 (OS-DB-V4.0)	10 μ L
总体积	20 μ L



提示

$V=50/X$, X 为文库的浓度 (ng/ μ L)。

- 涡旋混匀离心，置于 PCR 仪中，进行如下反应:

温度	时间
105 $^{\circ}$ C (热盖)	On
95 $^{\circ}$ C	3 min
40 $^{\circ}$ C	3 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

- 取出 DNB 聚合酶混合液 II (OS-V4.0)，轻弹管底混匀后离心，置于冰上备用。
- 反应结束后加入如下试剂并混匀离心，制备 DNB 反应液 II:

组分	体积 (μ L)
DNB 聚合酶混合液 I (OS-V4.0)	20
DNB 聚合酶混合液 II (OS-V4.0)	1

- 将反应液 (总体积为 41 μ L) 置于 PCR 仪按如下条件进行反应:

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

- 反应完成后，立即加入 10 μ L 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。
- DNB 产物可在 4 $^{\circ}$ 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/ μ L 以上为合格，浓度不合格时需重新制备。

测序与分析

关于测序仪和分析软件的具体操作，参考相关说明书。

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：
192.168.1.5
- 输入授权的账号 (【lite】) 与密码 (【lite123456】)，点击【登录】，进入 ZLIMS 主界面。
- 在主界面点击【测序 + 分析】，进入新建测序 + 分析界面。
- 分析产品选择【MTB-Explorer_ATOplex】，选择【表格导入样本编号】，点击【新建】。
- 在弹出的导入测序+分析界面点击【Excel模板】或【CSV模板】，下载 .xlsx或.csv样本模板文件。

MTB样本文库制备

DNB制备

测序与分析

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。

	A	B	C	D	E	F	G
1	产品名称(*)	DNB ID(*)	Barcode(*)	样本编号(*)	样本名称	样本类型(*)	
2	MTB-Explorer_ATOplex					DNA	
3							
4							
5							

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。
 - **【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，可以与 ZLIMS 系统中已录入的样本编号重复。样本编号相同代表同一个样本。对于同一批次中样本编号和样本类型均相同的样本，将合并数据进行分析。
 - **【样本名称】**：(可选) 填写样本名称。
 - **【样本类型】**：仅可选择 **【DNA】**。
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】。
- 如无需修改分析参数，在弹窗点击【确定】。如需修改分析参数，点击【如需修改分析参数，请展开设置】，并修改所需参数，修改完成后点击【确定】。

提示

修改分析参数后，请勿点击【收起】，即生成任务界面需保持展开状态。否则，参数修改失败。

准备载片

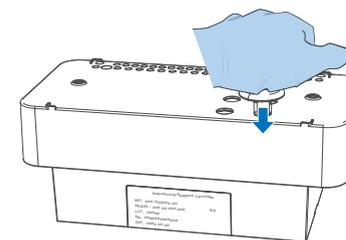
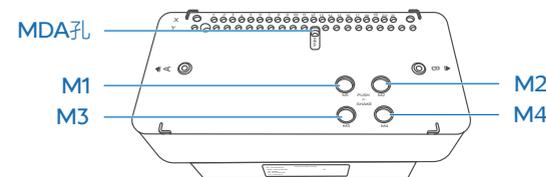
取出载片在室温环境下放置至少30分钟，但不超过24小时，以进行DNB加载。

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. 颠倒混匀试剂槽 5 次。撕掉包装袋，使用无尘纸擦净盖板及孔位处的冷凝水。
3. 将配套的按压器对准柱塞，用手掌将四个柱塞按压到位。

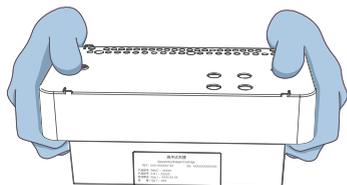


4. 按照试剂槽上的标识，双手握住试剂槽 A、B 两侧，上下、左右摇晃混匀 20 次，保证试剂充分混匀。

MTB样本文库制备

DNB制备

测序与分析



5. 用洁净的 1 mL 吸头戳破试剂槽上标识的 MDA 孔。
6. 从测序试剂套装中取出 MDA 试剂和 MDA 聚合酶混合液，用 200 μL 移液器吸取 125 μL MDA 聚合酶混合液加入到 MDA 试剂的试剂管中。
7. 颠倒混匀 6 次，使其充分混匀。
8. 将混匀后的混合液全部加入到 MDA 孔中，试剂槽即准备完成。

提示

- 加入 MDA 混合液时吸头紧贴 MDA 孔凹侧一面，倾斜缓慢加入，避免产生气泡或溢出到其它孔位。
- 准备好的试剂槽可放 4 $^{\circ}\text{C}$ 暂存，24 小时内使用。

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】。如果废液仓门自动弹出，根据界面提示放置空的废液桶，放置后轻按以关闭废液仓门。系统自动进入测序前自检。如果废液仓门没有打开，系统自动进入测序前自检。
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 & 信息传输】，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【PE150+10+10】测序方案，并点击 Barcode 列表，选择建库试剂盒对应 Barcode 列表。具体对应列表，请咨询技术支持。如仪器中没有该 Barcode 列表，可点击  导入 Barcode 方案。
6. 确认高级设置中的【拆分 Barcode】和【自动清洗】流程均选择【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。
10. 试剂预载完成后，升降屏自动上升。

加载 DNB

1. 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。
2. 取出新的 0.5 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	7.0
DNB 聚合酶混合液 II (OS-V4.0)	1.0
DNB	21.0
总体积	29.0

MTB样本文库制备

DNB制备

测序与分析

- 用非滤芯阔口吸头缓慢混匀 DNB 加载体系 5~8 次，混匀后放置于 4 °C 备用。
- 取出载片，检查载片完整性。
- 用 200 μ L 非滤芯尖口吸头吸取 10 μ L DNB 加载体系并轻轻插入载片流路入口中（靠近载片外沿的小孔），按下移液器上的吸头脱卸按钮，样本自动流入载片中。

提示

DNB 加载体系需现配现用。切勿离心、振荡及剧烈吹打。

- 确保样本加载完成后，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

- 将载片带有标签的一面朝上，按该面箭头指示方向，插入载片平台，系统将自动识别载片 ID。如扫描失败，可手动输入 ID。
- 点击【下一步】，升降屏自动关闭。
- 在测序信息回顾界面，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。刷新 ZLIMS 样本管理界面后，可查看样本状态。
- 测序完成后，点击【完成】，结束测序流程。系统自动打开升降屏和废液仓门。

仪器清洗与维护

如果在设置参数界面已勾选【自动清洗】，测序完成后系统将执行自动清洗流程。具体操作，参考 DNBSEQ-G99RS 高通量测序试剂套装说明书。

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。

查看和下载分析报告

- 在主界面点击【今日报告】下方的数字，进入分析报告界面。
 - 若数字为【0】，表示无今日报告，且分析报告界面默认显示其他日期生成的所有报告。
 - 若数字大于 0，表示今日的报告数，且分析报告界面默认显示今日生成的所有报告。
- 在查询区域设置查询条件，点击 ，定位到待查看报告所在记录行。
- 点击【报告】列的 ，或点击【分析类型】列的【Analysis】，并在弹出的结果详情界面点击【报告】列的 ，查看单样本报告。
- 在分析报告界面，勾选所有待下载报告所在的记录行。
- 点击右上角【下载报告】，下载勾选报告。
- （可选）在分析报告界面，点击【结果路径】列的  打开结果目录。在结果目录，点击【Report】>【Summary】，查看汇总报告。
- （可选）在结果目录，点击“All.Report.tar.gz”，可下载所有报告结果至默认路径。

MTB样本文库制备

DNB制备

测序与分析

(可选) 关闭测序仪

1. 点击  > 【关机】，在弹出的对话框中选择【关机】。
2. 将电源按钮拨至  位置。
3. 将电源线从插座或UPS上拔出。