

实验 1.3 上机测序

一、实验材料

◇ 试剂/套装:

Qubit® ssDNA Assay Kit (用于定量 DNB)

DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂套装 (FCL SE100, 包含 makeDNB 试剂+上机测序试剂+配套芯片)

◇ 设施设备:

移液器 (0.1-2.5 μ L、0.5-10 μ L、2-20 μ L、10-100 μ L、20-200 μ L、100-1000 μ L)、涡旋混匀仪、96 孔 PCR 板、PCR 仪、冰盒、小型离心机、Qubit® 4.0 荧光定量仪、测序仪。

◇ 耗材 (无菌级别):

200 μ L 阔口枪头、0.2mL PCR 管、枪头 (10 μ L、200 μ L、1000 μ L)、Qubit 专用薄壁 EP 管、医疗垃圾袋、口罩、无粉乳胶手套、尖头镊子或回形针。

二、实验步骤

第一部分 make DNB

3.1.1. 计算文库投入体积

文库投入量为 30 ng, 根据混库定量浓度 c , 需投入文库 $v=30/c$

3.1.2. 取出 TE 缓冲液、DNB 制备缓冲液 (OS-V2.0-DB)、DNB 聚合酶混合液 I (OS) 和 DNB 终止缓冲液, 置于冰盒上约 30 分钟。按照以下表 5 配制第一步反应体系 (冰上进行):

表 5 make DNB 第一部环化反应体系

组分	体积 (μ l)
双链 DNA 文库	v
DNB 制备缓冲液 (OS-V2.0-DB)	20
TE 缓冲液	$20-v$
Total	40

按上表配制好反应体系后, 震荡混匀 10~15s, 后瞬时离心 5s。放入 PCR 仪中进行引物杂交。温控设置: 95°C, 3mins; 57°C, 3mins; 4°C, ∞ 。此步热盖温度设定为 105°C。

第二部分 滚环扩增

3.2.1. 上述反应结束后，取出 DNB 聚合酶混合液 II (OS) 置于冰上后，短暂离心 5 秒，置于冰上备用。在表 6 反应体系中按下表依次加入试剂 (冰上进行)：

表 6 滚环扩增反应体系

组分	体积 (μl)
上述反应体系	40
DNB 聚合酶混合液 I (OS)	40
DNB 聚合酶混合液 II (OS)	4
Total	84

按上表配制好反应体系后，震荡混匀 10~15s，后瞬时离心 5s。放入 PCR 仪。温控设置：30°C，25 min;4°C， ∞ 。此步 PCR 反应需要设定热盖温度为 35°C 或者 PCR 开盖进行。

注意事项：1) 请勿将 DNB 聚合酶混合液 II (OS) 置于室温。请勿长时间触碰管壁，避免高温导致酶失活

2) 部分品牌 PCR 仪的热盖升降温速度慢。在热盖升降温过程中，加热模块处于室温状态，且程序未运行。对于这种类型的 PCR 仪，需提前进行热盖预热，确保在进行 DNB 反应时热盖处于工作温度。热盖温度建议设置为 35 °C，或尽可能设置成接近 35 °C 的最低温度。

此环节 PCR 等待时间做以下准备：

- (1) 准备阔口吸头；
- (2) 将 stop buffer 试剂提前置于冰盒上解冻。

3.2.2. 终止反应

在上述反应结束后，上述反应稳定降到 4°C 立刻在反应体系中加入 20 μl stop buffer，用阔口吸头缓慢吹打混匀 5~8 次 (悬滴)，终止反应。

注意事项：一定要用阔口吸头 (不带滤芯) 缓慢吹打混匀 DNB，切勿离心、振荡及剧烈吹打。

制备好的 DNB 可置于 4 °C 保存备用，并在 48 小时内使用。

3.2.3. DNB 浓度测定

DNB 制备完成后，取用 2 μL DNB，使用 Qubit ssDNA Assay Kit 和 Qubit Fluorometer

仪器进行浓度检测。该步骤采用 ssDNA 定量试剂测定 DNB 浓度，步骤与实验一 DNA 提取操作步骤中的定量步骤相似。对于 MGI 接头文库，浓度的合格标准为 4 ng/ μL ~40 ng/ μL

【教学重点】在反应体系中加入 stop buffer 终止反应时，使用扩口枪头的过程中需注意，枪头尽量勿触底，同时吹打要缓慢，避免破坏 DNB 球状结构。定量实验环节需采用 ssDNA 定量试剂进行浓度测定，此环节添加 DNB 样本时也许注意使用扩口枪头，保护 DNB 结构。

三、实验后处理和预期结果

提取后所得样本须保存在-20℃条件下，可长期保存。

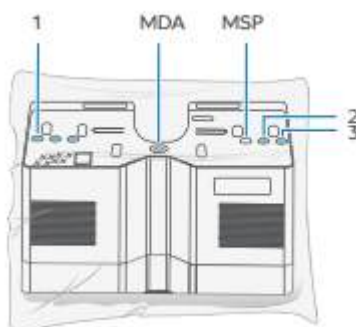
四、上机测序操作步骤

3.3.1 试剂槽准备

(1) 请提前一晚在冰箱冷藏层解冻（4℃）测序试剂盒中铝箔纸包装的测序试剂槽。盒中的三管试剂（信号因子 I、信号因子 II 和 DNB 加载缓冲液 II）保持-20℃冷冻，请勿提前解冻。摇晃试剂槽时如无碎冰，表示试剂槽已完全融化。**禁止水浴解冻试剂槽**。解冻时间参考如下：

型号	解冻方式	
	2 °C - 8 °C 冰箱 (h)	15 °C - 25 °C 室温 (h)
FCL SE100	6	3.5 - 4.5

(2) 取出试剂槽，**标签朝上**，竖直向上放置在桌面上。试剂槽解冻完成后，摇晃试剂槽，检查是否已无冰块。若有，需置于室温直至冰块完全融化，并用无尘纸擦干试剂槽表面的冷凝水。

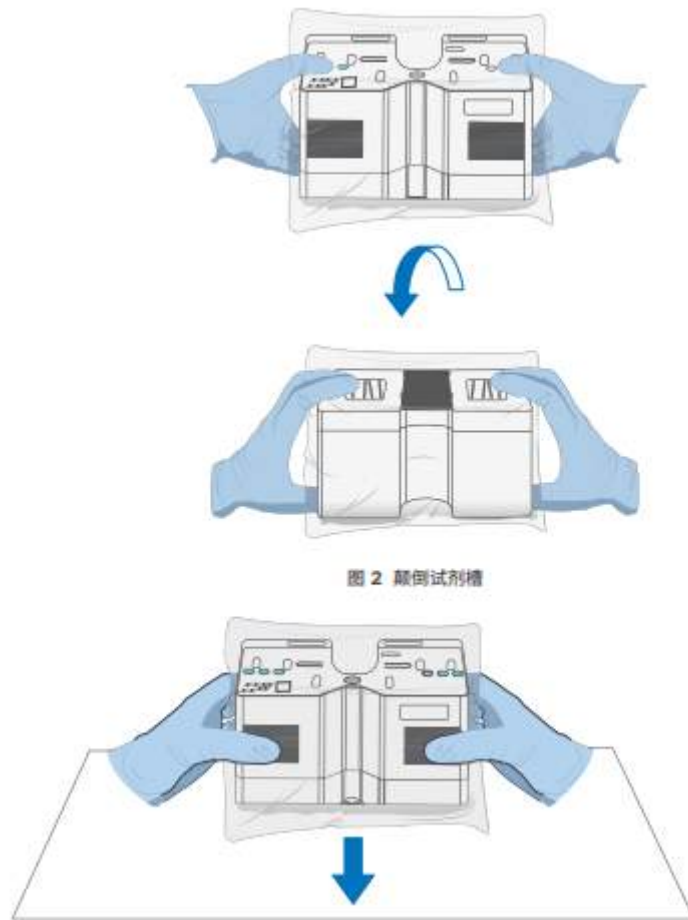


注意事项：A. 出现包装袋鼓起、试剂槽上端包装破损或试剂泄漏（非冷凝水情况）时，切勿使用该试剂槽，并迅速转移至指定垃圾桶。

B. 如是试剂泄漏，液体明显呈现颜色，液体从试剂槽底部，尤其是从底部盖板流出，或流出的液体会浸湿整个试剂槽底部。

C. 如是冷凝水，液体一般出现在试剂槽的侧面和四个底角周围。此时，可用无尘纸擦干。

(3) 完毕后，双手握住试剂槽两侧，上下颠倒 20 次并拍击桌面 10 次，再上下颠倒 10 次并拍击桌面 10 次。

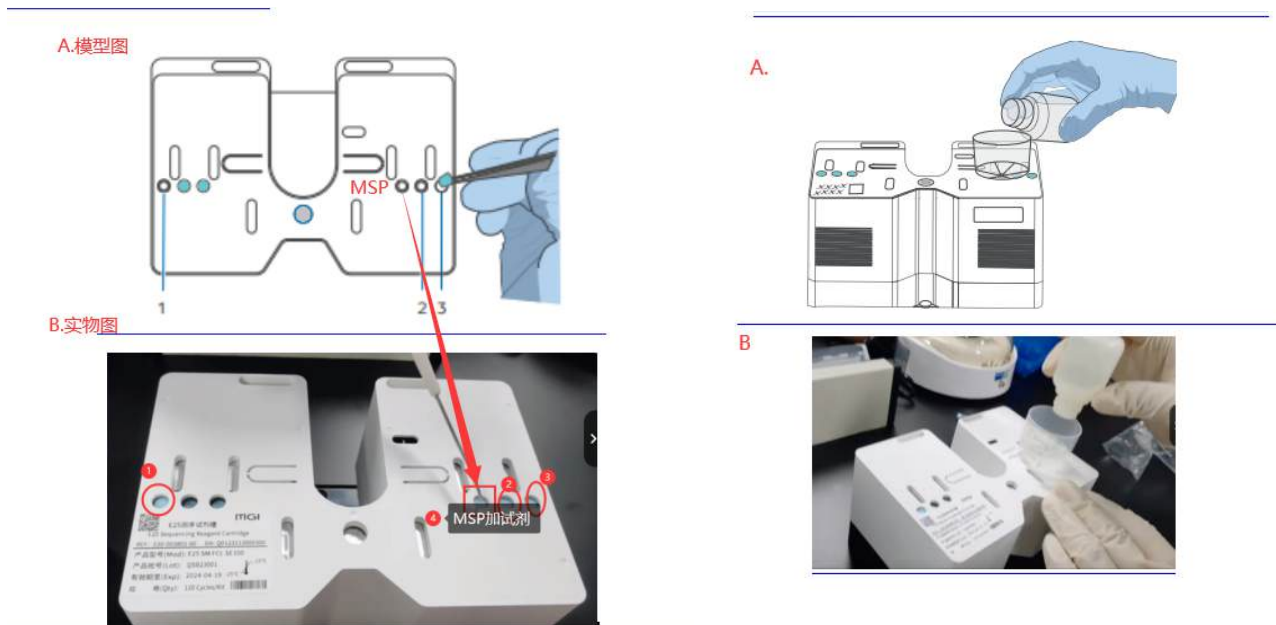


(4) 握住试剂槽底部中间用力甩 1 次。剪开试剂槽外包装袋。

(5) 将信号因子 1 和信号因子 2 置于冰上 10 分钟解冻备用。将 DNB 加载缓冲液 II 置于冰上解冻备用。用涡旋振荡器振荡混匀融化后的信号因子 1 和信号因子 2 约 5 秒。短暂离心 4~5 秒后备用。

(6) 将相应体积的信号因子 1 (15ul) 和信号因子 2 (10ul) 加入到信号因子缓冲液中 (10ml)，制备成信号因子混合液。盖上信号因子混合液瓶的盖子，上下颠倒 10~15 次，混匀试剂。过程中勿剧烈振荡，避免气泡产生

(7) 按照下图放置试剂槽，用尖头镊子夹取 MSP (MSP 孔，正放试剂槽，从右到左第三个孔) 孔上的胶塞。将漏斗放在 MSP 孔上，将混好的信号因子混合液全部加入孔中。然后用尖头镊子夹取 1 号、2 号和 3 号孔上的胶塞。




3.3.2 准备载片

- 1) 取出载片盒，然后从盒中取出载片。此时请勿打开塑料外包装。
- 2) 使用前，打开载片外塑料包装，并于 24 小时内使用载片。

3.3.3 开始测序

1) 登录系统：确保测序仪主机和计算模块均已接通电源，测序仪主机与计算模块之间网线连接正常。-》打开测序仪主机电源，系统进入登录界面。=》输入用户名和密码后，点击【登录】。

账号类型	默认用户名	默认密码
管理员账号	admin	123456
普通用户账号	user	123

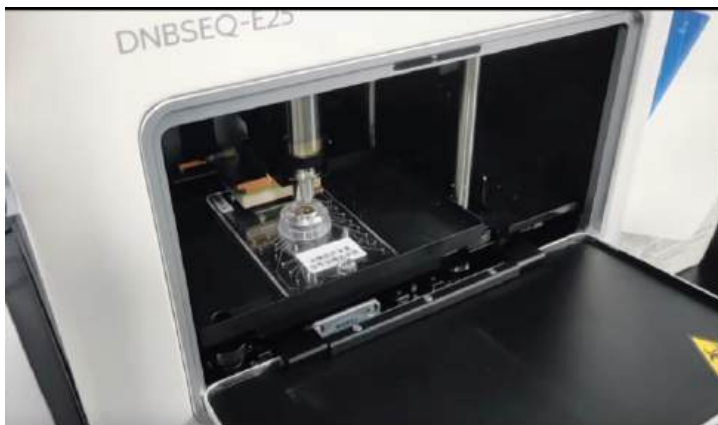
2) 选择测序方案： 点击  (主界面中央)，进入定制测序方案界面。此时，试剂仓进行初始化，即仓门自动打开，托架自动弹出(说明：在测序开始前，切勿手动关上仓门)。=》点击【测序方案】下拉列表，以人趣味基因检测为例，方案：S100，读长 1:50，读长 2: /,Barcode: MGI single，然后执行“>”按钮。



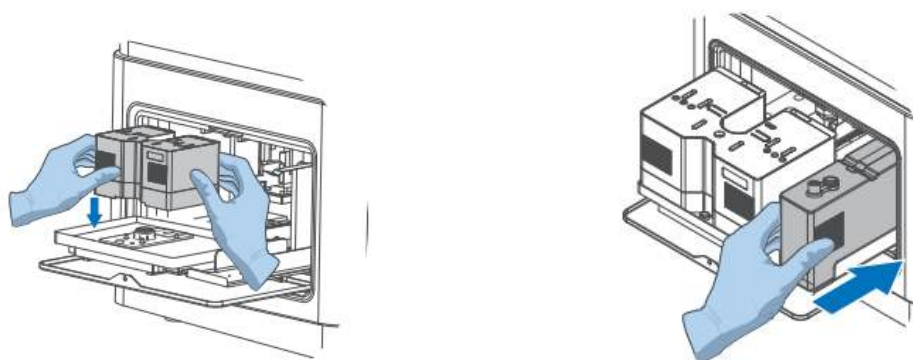
3) 装载载片、试剂槽与废液盒:

A. 用扫码枪扫描测序载片塑料包装上的二维码，【载片序列号】、【通量】、和【有效期至】信息自动显示。如扫码失败，可点击文本框，在弹出的软键盘上手动输入外包装标签上的信息。打开测序载片的包装，去除导热贴上的透明保护膜（若有），请不要用手触摸载片上侧（有突起阀门的一侧）的任何位置。将测序载片放置于测序仪的载片平台上，注意对准定位销的位置。





B.取出准备好的测序试剂槽，用扫码枪扫描试剂槽上的二维码。【试剂盒序列号】、【测序方案】和【有效期至】信息自动显示。卸下试剂槽底部保护盖，检查确认试剂槽底的 21 个橡胶塞未脱落。将试剂槽对准定位柱，放在测序载片上。过程中切勿摇晃或翻转试剂槽。确保废液盒胶塞处于打开状态，按照下图方向将废液盒放在托架上，并卡入限位装置。点击测序仪显示界面的“>”，测序仪会自动收起载片平台。





4.2.4 装载样本

使用 200 μL 的移液器与阔口枪头，按照 DNB: DNB 加载缓冲液 II = 3:1 (102ul+34ul) 的比例混合，缓慢吹吸混匀 8 次后，全部吸取，加入测序载片的 DNB 加载口。注意尽量避免气泡产生。

在测序仪显示界面输入 DNB ID 后点击“>”，检查测序方案，确认后手动关闭测序仪仓门，点击“RUN”启动程序。设备进入测序进度界面。



4.2.5 回顾参数，开始测序

请仔细核对每一项信息。如有误，点击“<”返回至相应界面进行修改。



注：取消测序会导致已装载的试剂槽和载片报废。如无误，确认计算模块已连接，点击运行 >【确定】进行测序。

测序前请确保仓门处于关闭状态。如未关闭，确认仓门处无障碍物后关闭仓门。

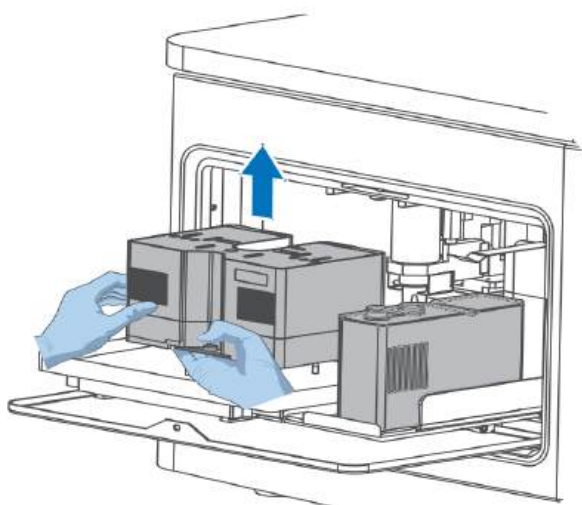
测序过程中请勿操作仪器的仓门，以免影响测序结果。

及时留意界面图标、状态指示灯或弹出的对话框。如发现异常，请根据提示排查。

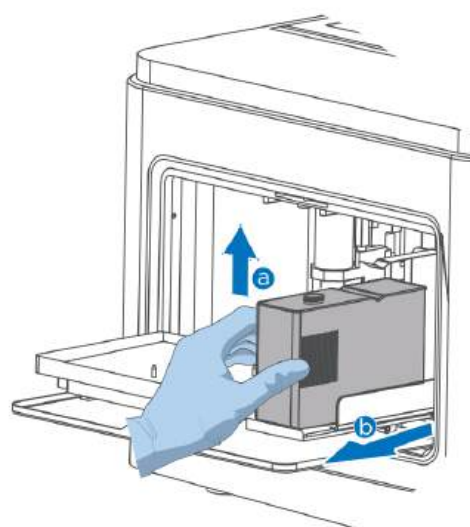
说明：测序流程的前 50 min 为 DNB 加载和准备过程，随后将输出第一轮测序循环的数据指标。测序过程中，任何时候都可以通过显示界面终止测序，请小心使用该功能，防止误碰。E25 的 SE50 的测序流程约 4 小时。

3.3.9 测序完成

测序完成后，报告会自动显示，关闭报告后会提示可移除测序载片、试剂槽与废液盒。移除载片和试剂槽时，试剂槽与载片需保持扣合状态，试剂槽保持水平状态，取出后转移至指定垃圾桶。塞住废液盒胶塞，向上微微抬起废液盒，再向外拖出废液盒，取下废液盒至指定垃圾桶。移除过程中请防止液体沾染皮肤。



移除测序载片、试剂槽



移除废液盒