

仅供研究使用，不可用于临床诊断。

版本号：A.0（2023年2月）

文档号：PROT230202

产品技术支持与设备维保请联系：

网站：www.igenetech.com/support

邮箱：support@igenetech.com

MultipSeq[®] 多重扩增子建库自动化流程 实验操作指南

适用于：IGT-AS12 自动化液体工作站（配置 2）

注意：

本操作指南适用于单管和双管的标准及定制 MultipSeq[®] Panel，但不适用于包含高 GC 区域的特殊版本。如需使用，请参考专用操作指南。

样本制备

文库构建

基因测序

生信分析





艾吉泰康生物科技（北京）有限公司

本手册中的信息如有更改，恕不另行通知。

免责声明：在法律允许的范围内，艾吉泰康生物科技（北京）有限公司和/或其附属公司对与本文件有关或由此产生的特殊、偶然、间接、惩罚性、多重或后果性损害不承担责任，包括您对本文件的使用。

版本号	更新日期	更新内容
A.0	2023 年 2 月	全新用户手册

©2023 艾吉泰康生物科技（北京）有限公司·版权所有

目录

1	概览	1
1.1	操作指南简介	1
1.2	IGT-AS12 自动化液体工作站	1
2	实验流程说明	3
2.1	实验所需试剂、仪器与耗材	3
2.2	实验流程图	7
2.3	使用前说明	8
3	两管多 Panel 流程	9
STEP 1	第一轮 PCR 反应	9
STEP 2	磁珠纯化 & 第二轮 PCR 反应	12
STEP 3	第二轮 PCR 产物磁珠纯化	15
A	板位布置大图	18

第 1 章

概览

1.1 操作指南简介

MultipSeq® 是通过多重 PCR 进行二代测序扩增子文库构建的实验流程，适用于 Illumina 和 MGI 高通量测序平台。本操作指南主要是指导使用人员在 IGT-AS12 自动化液体工作站（配置 2）上完成基于 MultipSeq® 流程的自动化扩增子文库构建实验操作，其中需要热循环仪（PCR 仪）部分需要在线下完成。该套流程已经过重复性测试，最大程度上保证了自动化操作的稳定性和重复性。

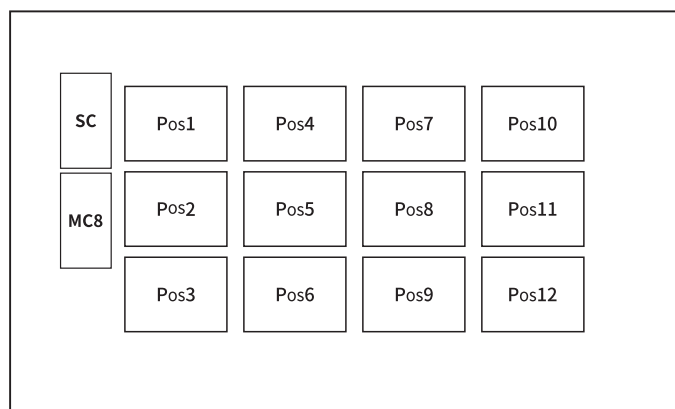
本操作指南适用于单管和双管的标准及定制 MultipSeq® Panel，但不适用于包含高 GC 区域的特殊版本。如需使用，请参考专用操作指南。

1.2 IGT-AS12 自动化液体工作站

IGT-AS12 自动化液体工作站是艾吉泰康自主研发的一款面向 NGS 实验室开发的自动化液体处理系统，可进行高效、稳定的自动化移液，能够满足中等通量下的各种复杂应用，兼容多种耗材和吸头，同时支持艾吉泰康全系列建库及捕获试剂。配套控制软件界面整洁，功能强大，提供经过验证的流程模板，支持个性化编辑。系统具有良好的灵活性和扩展性，实验结果稳定性好、重复性高。

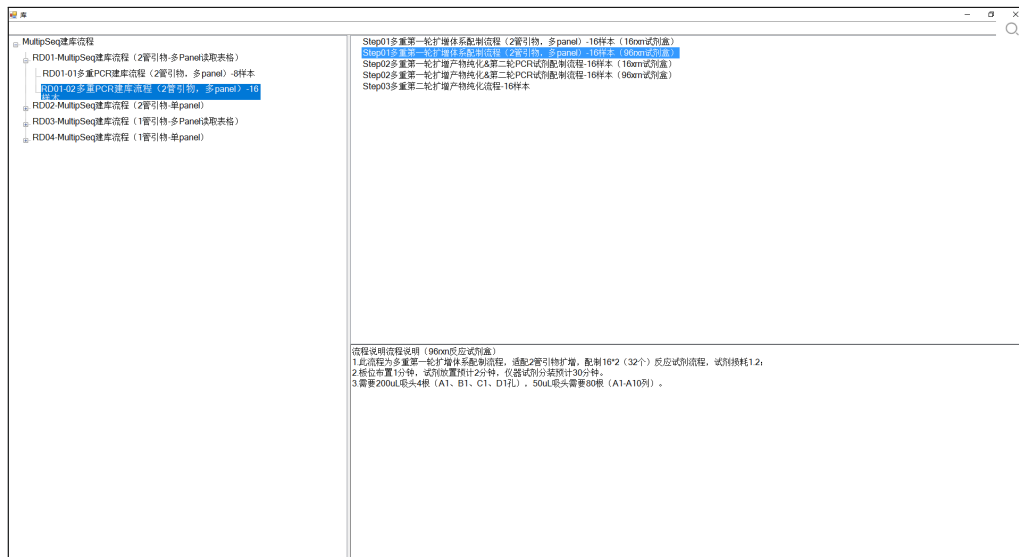
1.2.1 板位说明

IGT-AS12 自动化液体工作站拥有单通道（SC）和 8 通道（MC8）双移液器，并拥有 Pos1 ~ Pos12 共 12 个可自定义的 SBS 标准板位，各板位命名请详见下图。配置 2 版本为磁珠纯化版本，其中 Pos4 为温控模块（不可拆卸），Pos8 为磁分离模块（可拆卸），Pos12 为震荡模块（不可拆卸）。



1.2.2 流程说明

艾吉泰康提供针对 MultipSeq® 多重扩增子建库实验流程的 8 样本/轮和 16 样本/轮的两套实验流程。实验流程适用于 16 rxn 和 96 rxn 两种规格的试剂盒，不可混用，请在实验中注意选择，避免使用错误。



第 2 章

实验流程说明

2.1 实验所需试剂、仪器与耗材

2.1.1 MultipSeq® 多重扩增子建库流程试剂盒及其组成

适用于本 MultipSeq® 多重扩增子建库实验流程的试剂盒包括：

- 多重扩增子建库试剂盒：MultipSeq® Library Prep Kit
- 特异性引物池：MultipSeq® Primer Pool
- 接头引物：MultipSeq® Indexed Primer

注意：

1. MultipSeq® Library Prep Kit 拥有多个版本，MultipSeq® Primer Pool 有固定搭配的 MultipSeq® Library Prep Kit，不能混用，请根据 Panel 说明选择正确的对应版本。
2. 本操作指南适用于单管和双管的标准及定制 MultipSeq® Panel，但不适用于包含高 GC 区域的特殊版本。即本操作指南仅适用于 Panel 配套的 MultipSeq® Library Prep Kit 中 Module A 仅为 Module A Universal 且数量为 1 或 2 的版本。
3. 本操作指南适用于规格为 16 rxn 和 96 rxn 的 MultipSeq® Library Prep Kit，不适用于 960 rxn 规格大包装试剂盒。
4. MultipSeq® Primer Pool 和 MultipSeq® Indexed Primer 为测序平台特异性产品，不能混用。请根据 MultipSeq® Primer Pool 的测序平台信息选择正确的 MultipSeq® Indexed Primer 版本搭配。

2.1.1.1 多重扩增子建库试剂盒 MultipSeq® Library Prep Kit

MultipSeq® Library Prep Kit 共包含 A 和 B 两个模块。请注意，存在多个不同版本的 Module A，且不同试剂盒版本配套的 Module A 数量不同。

产品名称	组成	数量	储存温度
MultipSeq® Library Prep Kit	MultipSeq® Library Prep Kit (Module A Universal)	1 或 2*	-20°C±5°C
	MultipSeq® Library Prep Kit (Module B)	1	

* 本操作指南适用于仅包含 Module A Universal 且数量为 1 或 2 的版本。

· **MultipSeq® Library Prep Kit (Module A Universal)**

管盖颜色	组分	体积		储存温度
		16 rxn	96 rxn	
●	IGT™ EM808 Polymerase Mixture	180 μL	1080 μL	-20 °C±5 °C
●	Enhancer Buffer NB (1N)	72 μL	432 μL	
●	Enhancer Buffer M*	44 μL	264 μL	2 °C~8 °C

* **Enhancer Buffer M** 的建议保存条件为 2 °C~8 °C，亦可保存于 -20 °C±5 °C，收到后建议将 **Enhancer Buffer M** 取出单独存放于 2 °C~8 °C 以便节约实验前准备时间。

· **MultipSeq® Library Prep Kit (Module B)**

管盖颜色	组分	体积		储存温度
		16 rxn	96 rxn	
●	IGT™ EM808 Polymerase Mixture	180 mL	1080 mL	-20 °C±5 °C
●	Enhancer Buffer M ¹	44 mL	264 mL	2 °C~8 °C
多种	YF Buffer B ¹	● 2 × 880 μL	Ⓣ ² 10.8 mL	

¹ **Enhancer Buffer M** 和 **YF Buffer B** 的建议保存条件为 2 °C~8 °C，亦可保存于 -20 °C±5 °C，收到后建议将 **Enhancer Buffer M** 和 **YF Buffer B** 取出单独存放于 2 °C~8 °C 以便节约实验前准备时间。

² 管盖颜色 Ⓣ 标识试剂组分为瓶装。

2.1.1.2 特异性引物池 MultipSeq® Primer Pool

管盖颜色	组分	体积		储存温度
		16 rxn	96 rxn	
多种 ¹	MultipSeq® Primer Pool N (X, for Illumina/MGI DI) ²	88 μL	540 μL	-20 °C±5 °C

¹ 管盖颜色根据不同分管包括 T1 黄色 ● 和 T2 白色 Ⓣ。

² X 为 Panel 编号，用于区分不同的 **MultipSeq® Primer Pool**，完整引物信息请查看标签 Panel ID 字段。本操作指南适用于分管为 1 管或 2 管 Panel，N 为分管标识，根据分管设计，**MultipSeq® Primer Pool** 包括 T1、T1~T2 两种不同组合。总量为每个分管特异性引物池的总量。

2.1.1.3 接头引物 MultipSeq® Indexed Primer

注意：

不同测序平台 **MultipSeq® Indexed Primer** 不通用。请根据 **MultipSeq® Primer Pool** 产品对应的测序平台信息，选择对应的 **MultipSeq® Indexed Primer** 进行实验。

艾吉泰康提供多种规格及 Index 号段的接头引物。各接头引物产品 Index 号对应板位信息、Index 序列信息和试剂体积信息请参考对应产品的产品信息单 (PIS)。

· **MultipSeq® CDI Primer 1-16 (5 μM each, for Illumina, tube)**

管盖颜色	组分	体积	储存温度
Ⓣ*	MultipSeq® CDI Primer 1-16 (5 μM each, for Illumina, tube)	16 × 4 μL	-20 °C±5 °C

* 管盖颜色 Ⓣ 标识试剂组分管盖颜色为白色。

· **MultipSeq® CDI Primer 1-96/97-192/193-288/289-384 (5 μM each, for Illumina, plate)**

管盖颜色	组分	体积	储存温度
Ⓐ ¹	MultipSeq® CDI Primer N (5 μM each, for Illumina, plate) ²	4 μL each	-20 °C±5 °C

¹ 管盖颜色 Ⓐ 标识试剂组分为板装。

² N 根据试剂盒分为 1-96、97-192、193-288、289-384 四种组合。

· **MultipSeq® Dual-Indexed Primer 1-96*1-10 (10 μM each, for Illumina, tube)**

管盖颜色	组分	体积	储存温度
Ⓜ	MultipSeq® i7 Indexed Primer 1-96 (10 μM, for Illumina, tube)	96 × 20 μL	-20 °C±5 °C
Ⓜ	MultipSeq® i5 Indexed Primer 1-10 (10 μM, for Illumina, tube)	10 × 192 μL	

· **MultipSeq® UDI Primer 1-16 (5 μM each, for MGI, tube)**

管盖颜色	组分	体积	储存温度
Ⓜ	MultipSeq® UDI Primer 1-16 (5 μM each, for MGI, tube)	16 × 4 μL	-20 °C±5 °C

· **MultipSeq® UDI Primer 1-96/97-192/193-288/289-384 (5 μM each, for MGI, plate)**

管盖颜色	组分	体积	储存温度
Ⓐ	MultipSeq® UDI Primer N (5 μM each, for MGI, plate)*	4 μL each	-20 °C±5 °C

* N 根据试剂盒分为 1-96、97-192、193-288、289-384 四种组合。

· **MultipSeq® Dual-Indexed Primer 1-96*1-10 (10 μM each, for MGI, tube)**

管盖颜色	组分	体积	储存温度
Ⓜ	MultipSeq® TPE 2.0 Indexed Primer 1-96 (10 μM, for MGI, tube)	96 × 20 μL	-20 °C±5 °C
Ⓜ	MultipSeq® TPE 1.0 Indexed Primer 1-10 (10 μM, for MGI, tube)	10 × 192 μL	

2.1.2 自备试剂、仪器与耗材

以下为 MultipSeq® 流程试剂盒之外的用于完成实验的，需要用户自备的试剂、仪器与耗材。表中为经过艾吉泰康测试的推荐品牌型号，除 IGT-AS12 自动化液体工作站专用耗材外，可根据实验室具体情况使用已有满足实验要求的替代试剂、仪器与耗材。

2.1.2.1 自备试剂

序号	名称	推荐产品	品牌货号
1	无水乙醇	市面主流品牌	市面主流品牌
2	Nuclease-Free Water	Nuclease-Free Water	Ambion (AM9930)
3	纯化磁珠 ¹	IGT™ Pure Beads	iGeneTech (C80663)
		Agencourt AMPure XP Kit	Beckman Coulter (A63880)
4	片段分析仪试剂 ¹	S2 Cartridge (Standard Cartridge) ²	BiOptic (C105101)
		Agilent DNA 1000 Kit ²	Agilent (5067-1504)
5	核酸定量试剂	Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher (C47257)

¹ 推荐的纯化磁珠和片段分析仪试剂均经过艾吉泰康验证，请根据实验室具体情况选择一种使用。

² S2 Cartridge (Standard Cartridge) 需搭配 Qsep100/Qsep400 使用，Agilent DNA 1000 Kit 需搭配 2100 Bioanalyzer 使用。

2.1.2.2 自备仪器

序号	名称	推荐产品	品牌货号
1	核酸定量仪	Qubit™ 4.0 Fluorometer	Thermo Fisher (Q33238)
2	片段分析仪 *	Qsep100/Qsep400	BiOptic (Qsep100/Qsep400)
		2100 Bioanalyzer	Agilent (G2939AA)
3	涡旋振荡器	市面主流品牌	市面主流品牌
4	微型离心机	市面主流品牌	市面主流品牌
5	冰盒	市面主流品牌	市面主流品牌
6	96孔热循环仪 (PCR 仪)	市面主流品牌	市面主流品牌

* 推荐的片段分析仪均经过艾吉泰康验证，请根据实验室具体情况选择一种使用。

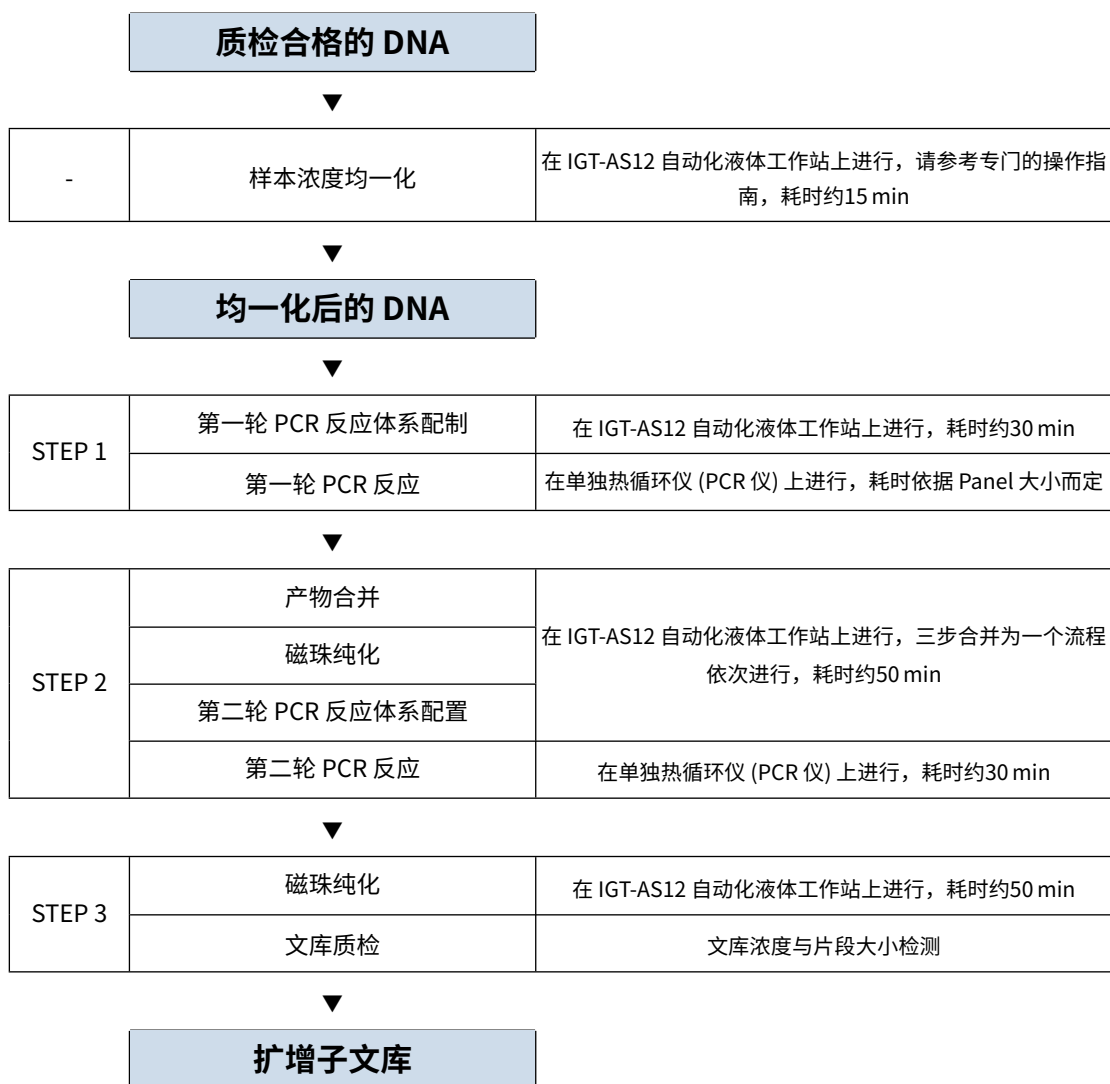
2.1.2.3 自备耗材

注意：

IGT-AS12 自动化液体工作站需使用艾吉泰康指定耗材。

序号	名称	推荐产品	品牌货号
1	0.5 mL Qubit 管	Qubit™ Assay Tubes	Thermo Fisher (Q32856)
2	0.2 mL 8 联排 PCR 管	市面主流品牌	市面主流品牌
3	1.5 mL 离心管	市面主流品牌	市面主流品牌
4	8 mL 或 15 mL 窄口瓶	市面主流品牌	市面主流品牌
5	50 μL 盒装专用移液吸头 (SBS)	50 μL 盒装透明移液吸头	iGeneTech (Q96021)
6	200 μL 盒装专用移液吸头 (SBS)	200 μL 盒装透明移液吸头	iGeneTech (Q96023)
7	1.2 mL 深孔板 (SBS)	1.2 mL 深孔板	iGeneTech (Q96013)

2.2 实验流程图



* 本流程图展示实验耗时以两管引物多 Panel 流程 16 样本/轮为例

2.3 使用前说明

2.3.1 仪器运行

- ❑ 首次使用前，请联系艾吉泰康产品技术支持进行脚本应用的安装和仪器校准调试；
- ❑ 务必严格按照本操作指南中指导进行试剂的存储及使用；
- ❑ IGT-AS12 自动化液体工作站（配置 2）最多支持 16 个反应/轮的多重扩增子建库实验，本操作指南以 16 个反应/轮为例；
- ❑ 如有其他需求详询艾吉泰康以获得产品技术支持。

2.3.2 使用前请确认

- ❑ 文库构建及捕获过程中请使用 RNase-free 的器材。
- ❑ 实验前请确认自备试剂（如无水乙醇）是否满足实验条件，按需订购。
- ❑ 实验前请确认 **MultipSeq® Library Prep Kit**、**MultipSeq® Primer Pool** 和 **MultipSeq® Indexed Primer** 的版本是匹配的，且符合本操作指南要求。
- ❑ 各接头引物 **MultipSeq® Indexed Primer** 产品 Index 号对应板位信息、Index 序列信息和试剂体积信息请参考对应产品的产品信息单（PIS）。
- ❑ 基因组质量必须严格控制，纯度、完整度等不满足实验条件的，不能保证实验结果。

2.3.3 实验条件控制

- ❑ 环境温度：20 °C~25 °C，环境湿度：40%~60%；
- ❑ 请穿戴个人防护装置，注意实验室安全；
- ❑ 试剂盒组分应避免反复冻融，严格根据各温度要求存放；
- ❑ 为避免交叉污染，样本、各试剂组分在溶解、充分混匀后，应离心确保全部液体置于管底且无气泡状态再开盖；
- ❑ IGT-AS12 自动化液体工作站使用前应严格进行纯水、75% 乙醇全面清洁，并进行紫外消毒；
- ❑ 在 IGT-AS12 自动化液体工作站运行过程中，如无意外及程序设置需要，请勿暂停及打开仪器门。

如果以上条件均满足，即可开始进行实验。

第 3 章

两管多 Panel 流程

STEP 1 第一轮 PCR 反应

需要用到的试剂：

- IGT™ EM808 Polymerase Mixture
- Enhancer Buffer NB (1N)
- Enhancer Buffer M
- MultipSeq® Primer Pool


需要用到的设备：

- IGT-AS12 自动化液体工作站（配置 2）
- 热循环仪（PCR 仪）

1.1 试剂准备：

- 1.1.1 提前将 **MultipSeq® Library Prep Kit (Module A Universal)** 中的 **IGT™ EM808 Polymerase Mixture** 和 **Enhancer Buffer NB (1N)** 从 -20 °C 冰箱中取出，置于冰盒上融化，融化后短暂涡旋混匀并瞬时离心，置于冰盒上备用；
- 1.1.2 提前将 **MultipSeq® Primer Pool** 从 -20 °C 冰箱中取出，置于冰盒上融化，融化后短暂涡旋混匀并瞬时离心，置于冰盒上备用；
- 1.1.3 将 **MultipSeq® Library Prep Kit (Module A Universal)** 中的 **Enhancer Buffer M** 从 4 °C 冰箱中取出，室温融化；
- 1.1.4 提前将样本进行均一化处理，终体积为 20 μL（用于 2 管扩增）。

1.2 IGT-AS12 设备及控制软件开启：

- 1.2.1 依次打开 IGT-AS12 自动化液体工作站主机和控制电脑的电源开关，并将温控模块和振荡模块通电；
- 1.2.2 双击桌面控制软件快捷方式  打开控制软件，在登录界面输入账号密码登录控制软件，点击登录界面程序。默认用户名为“User”，默认初始密码为“1”。

1.3 自动化操作流程：

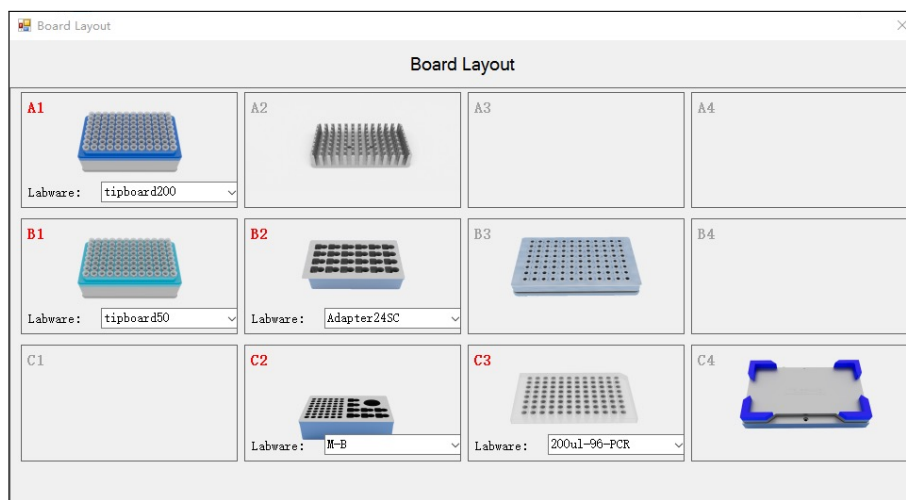
- 1.3.1 在程序界面菜单栏点击 **Libraries**，选择 **MultipSeq 建库流程-RD01-MultipSeq 建库流程（2 管引物-多 Panel 读取表格）**，选择 **RD01-02 多重 PCR 建库流程（2 管引物-多 Panel）-16 样本**，选择 **Step01 多重第一轮扩增体系配制流程-16 样本**；

提示：流程 **Step01 多重第一轮扩增体系配制流程-16 样本** 针对 16 rxn 和 96 rxn 试剂盒有两个版本，请根据实际情况选择，错误使用将导致实验失败。

1.3.2 进入程序后，按照下表与布置图在 IGT-AS12 台面放置相应的适配器与耗材；

适配器/耗材	标识	放置位置
200 μ L 盒装透明移液吸头	TipRack200	Pos1
50 μ L 盒装透明移液吸头	TipRack50	Pos2
24 孔螺帽管适配器	Adapter24SC	Pos5
多功能适配器	AdapterMF	Pos6
磁分离模块	MagneticStand	Pos8
96 孔 PCR 板适配器	Adapter96	Pos9

具体位置如下图所示：



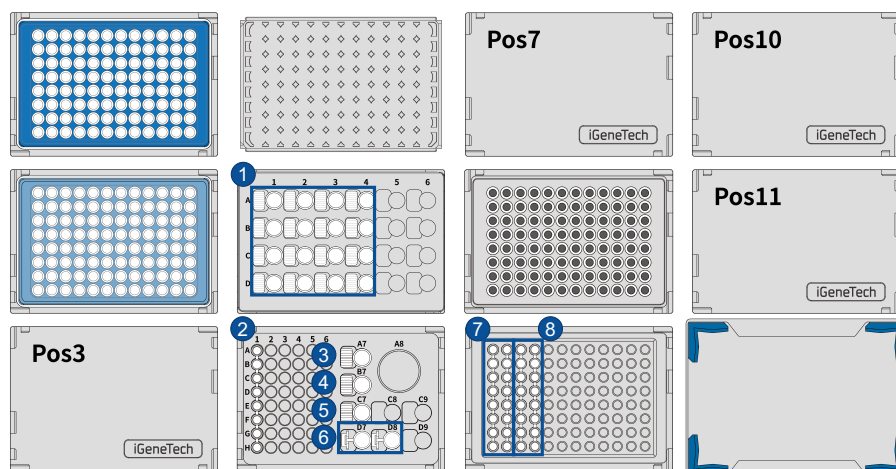
1.3.3 按照下图所示放置相关试剂组分和耗材，放置完成后根据提示打勾，点击 **Next** 进入程序界面；

序号	组分名称	分装体积	使用耗材	放置位置
1	MultipSeq® Primer Pool	$N \times 5 \mu\text{L}^1$	螺帽管 ²	Pos5:A1-D4
2	分装 Mix 空管	-	8 联排 PCR 管	Pos6:A1-H1
3	IGT™ EM808 Polymerase Mixture	384 μL	螺帽管 ²	Pos6:A7
4	Enhancer Buffer NB (1N)	135 μL	螺帽管 ²	Pos6:B7
5	Enhancer Buffer M	96 μL	螺帽管 ²	Pos6:C7
6	配置 Mix 空管	-	1.5 mL 离心管	Pos6:D7-D8
7	均一化后的 DNA	20 μL	8 联排 PCR 管	Pos9:A1-H2
8	PCR 反应空管	-	8 联排 PCR 管	Pos9:A3-H4

¹ N 为用到该 MultipSeq® Primer Pool 的样本数；

² 螺帽管均为试剂盒原管，无需单独准备。

具体位置如下图所示（图中数字对应上表序号，可单独使用附件 A 中的大图进行核对）：



1.3.4 试剂放置结束后，在程序界面右下角勾选 **Emulate** 后点击 **Run** 进行预跑，预跑成功后，取消勾选并进行正式流程；

提示： 点击 **Run** 仪器开始自检，会有弹窗提示，需要人工核验机械臂是否装载移液器，默认为未装载移液器，若仪器装有移液器请先进行移液器卸载操作，卸载后，弹窗全部点击“否”。

1.3.5 流程结束后，取出 **Pos9:A1-H4** 位置的 8 联排 PCR 管，扣盖振荡混匀并离心，然后放入热循环仪 (PCR 仪) 中准备进行反应；

1.3.6 按照如下步骤清理台面：

- (1) 将 **Pos5** 上所有 **MultipSeq® Primer Pool** 和 **Pos6:A7** 上的 **IGT™ EM808 Polymerase Mixture**、**Pos6:B7** 上的 **Enhancer Buffer NB (1N)**、**Pos6:C7** 上的 **Enhancer Buffer M** 扣盖按照管标签上的温度储存；
- (2) 将 **Pos5** 板位的 24 孔螺帽管适配器取下；
- (3) 将 **Pos2** 板位上的 50 μ L 盒装透明移液吸头、**Pos6:A1-H1** 上的 8 联排 PCR 管以及 **Pos6:D7-D8** 的 1.5 mL 离心管直接丢弃；
- (4) 其他耗材保持不动。

1.4 设置热循环仪 (PCR 仪) 程序如下，将 1.3.5 步骤的第一轮 PCR 反应液置于热循环仪 (PCR 仪) 上，运行程序；

热盖温度 105 °C			
步骤	循环数 *	温度	时间
1	1	95 °C	3 min 30 s
2	X, 见下表	98 °C	20 s
		55 °C	N1, 见下表
		60 °C	N2, 见下表
		65 °C	N3, 见下表
3	1	72 °C	5 min
4	1	4 °C	Hold

其中，PCR 循环数 X 和延伸时间 N1、N2、N3 与单管重数相关，请参照下表调整。定制 Panel 的循环数和延伸时间可参照 Panel 优化报告，MultipSeq® Primer Pool 管身标签也标有循环数（PCR Cycle）。

单管重数	循环数 X*	延伸时间		
		N1 (55°C)	N2 (60°C)	N3 (65°C)
小于 500 重	26	1 min	1 min	2 min
500 至 1000 重	22	1 min 30 s	1 min 30 s	3 min
大于 1000 重	18	2 min	2 min	4 min

* 适用于10 ng~40 ng的标准模板投入量，如果模板投入量低于10 ng，可在推荐循环数基础上增加3个循环。

1.5 PCR 程序结束后立即进行 STEP 2。

STEP 2 磁珠纯化 & 第二轮 PCR 反应

需要用到的试剂：

- IGT™ EM808 Polymerase Mixture
- Enhancer Buffer M
- YF Buffer B
- MultipSeq® Indexed Primer (根据需求选择)
- 纯化磁珠 IGT™ Pure Beads
- 无水乙醇
- Nuclease-Free Water

需要用到的设备：

- IGT-AS12 自动化液体工作站（配置 2）

2.1 试剂准备：

2.1.1 提前将 MultipSeq® Library Prep Kit (Module B) 中的 IGT™ EM808 Polymerase Mixture 和 Enhancer Buffer M 从 -20°C 冰箱中取出，置于冰盒上融化，融化后短暂涡旋混匀并瞬时离心，置于冰盒上备用；

2.1.2 提前将对应的 MultipSeq™ Indexed Primer 从 -20°C 冰箱中取出，置于冰盒上融化，融化后短暂涡旋混匀并瞬时离心，置于冰盒上备用；

注意：

不同测序平台 MultipSeq® Indexed Primer 不通用。请根据 MultipSeq® Primer Pool 产品对应的测序平台信息，选择对应的 MultipSeq® Indexed Primer 进行实验。

2.1.3 提前将 MultipSeq® Library Prep Kit (Module B) 中的 YF Buffer B 从 4°C 冰箱中取出，充分混匀并置于室温平衡 30 min；

2.1.4 提前将纯化磁珠 IGT™ Pure Beads 从 4°C 冰箱中取出，充分混匀并置于室温平衡 30 min；

2.1.5 提前用无水乙醇和 Nuclease-Free Water 配制 80% 乙醇，置于室温条件下暂存。

2.2 自动化操作流程:

2.2.1 在程序界面菜单栏点击 **Libraries**, 选择 **MultipSeq 建库流程-RD01-MultipSeq 建库流程 (2 管引物-多 Panel 读取表格)**, 选择 **RD01-02 多重 PCR 建库流程 (2 管引物-多 Panel) -16 样本**, 选择 **Step02 多重第一轮扩增产物纯化 & 第二轮 PCR 试剂配制流程-16 样本**;

提示: 流程 **Step02 多重第一轮扩增产物纯化 & 第二轮 PCR 试剂配制流程-16 样本** 针对 16 rxn 和 96 rxn 试剂盒有两个版本, 请根据实际情况选择, 错误使用将导致实验失败。

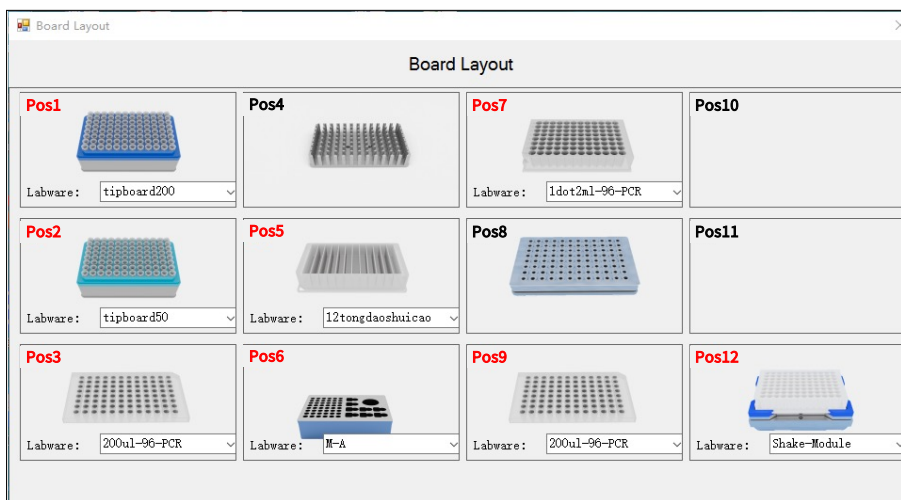
2.2.2 进入程序后, 按照下表与布置图在 IGT-AS12 台面放置相应的适配器与耗材;

适配器/耗材	标识	放置位置
200 μ L 盒装透明移液吸头 ¹	TipRack200	Pos1
50 μ L 盒装透明移液吸头 ²	TipRack50	Pos2
96 孔 PCR 板适配器	Adapter96	Pos3
12 道储液槽	Reservior12	Pos5
多功能适配器	AdapterMF	Pos6
1.2 mL 深孔板	DWP1200	Pos7
磁分离模块	MagneticStand	Pos8
96 孔 PCR 板适配器	Adapter96	Pos9
1.2 mL 深孔板	DWP1200	Pos12

¹ **Pos1** 上的 200 μ L 盒装透明移液吸头为 STEP1 剩余移液吸头;

² **Pos2** 上的 50 μ L 盒装透明移液吸头为全新移液吸头。

具体位置如下图所示:



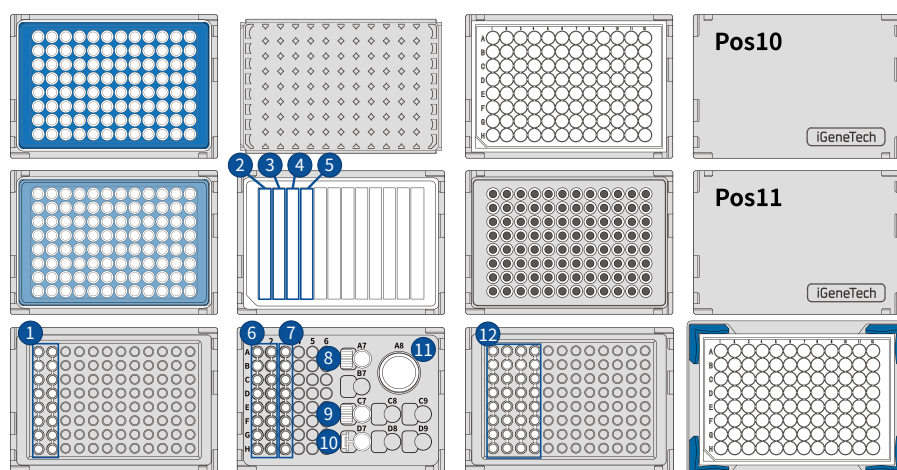
2.2.3 按照下图所示放置相关试剂组分和耗材，放置完成后根据提示打勾，点击 **Next** 进入程序界面；

序号	组分名称	分装体积	使用耗材	放置位置
1	MultipSeq® Indexed Primer	4 μL/孔	8 联排 PCR 管	Pos3:A1-H2
2	纯化磁珠 IGT™ Pure Beads ¹	2.5 mL	12 道储液槽	Pos5:A1-H1
3	YF Buffer B	2.6 mL		Pos5:A2-H2
4	80% 乙醇	12 mL		Pos5:A3-H3
5	Nuclease-Free Water	2.5 mL		Pos5:A4-H4
6	产物收集管	-	8 联排 PCR 管	Pos6:A1-H2
7	分装 Mix 空管	-	8 联排 PCR 管	Pos6:A3-H3
8	IGT™ EM808 Polymerase Mixture	192 μL	螺帽管 ²	Pos6:A7
9	Enhancer Buffer M	48 μL	螺帽管 ²	Pos6:C7
10	配置 Mix 空管	-	1.5 mL离心管	Pos6:D7
11	Nuclease-Free Water	2 mL	8 mL或15 mL窄口瓶	Pos6:A8
12	1.5 步骤扩增产物	-	8 联排 PCR 管	Pos9:A1-H4

¹ 使用磁珠为 IGT™ Pure Beads，若选用其它品牌纯化磁珠，需咨询对应供应商，并通过预实验自行摸索合适的磁珠用量。

² 螺帽管均为试剂盒原管，无需单独准备。

具体位置如下图所示（图中数字对应上表序号，可单独使用附件 A 中的大图进行核对）：



2.2.4 试剂放置结束后，在程序界面右下角勾选 **Emulate** 后点击 **Run** 进行预跑，预跑成功后，取消勾选并进行正式流程；

提示： 点击 **Run** 仪器开始自检，会有弹窗提示，需要人工核验机械臂是否装载移液器，默认为未装载移液器，若仪器装有移液器请先进行移液器卸载操作，卸载后，弹窗全部点击“否”。

2.2.5 流程结束后，取出 **Pos6:A1-H2** 位置的 8 联排 PCR 管，扣盖振荡混匀并离心，然后放入热循环仪（PCR 仪）中准备进行反应；

2.2.6 按照如下步骤清理台面：

- (1) 将 **Pos3:A1-H2** 上的 8 联排 PCR 管直接丢弃；
- (2) 将 **Pos5:A1-H1** 的纯化磁珠 IGT™ Pure Beads 和 **Pos5:A2-H2** 的 YF Buffer B 回收，并按照管标签上的温度储存。

- (3) 将 **Pos6:A7** 上的 **IGT™ EM808 Polymerase Mixture**、**Pos6:C7** 上的 **Enhancer Buffer M**、**Pos6:A8** 上的 **Nuclease Free Water** 扣盖按照管标签上的温度储存；
- (4) 将 **Pos9:A1-H4** 的 8 联排 PCR 管扣盖于 4 °C 暂存；
- (5) 将 **Pos6:A3-H3** 的 8 联排 PCR 管以及 **Pos6:D7** 上的 1.5 mL 离心管直接丢弃；
- (6) 取下 **Pos6** 上的多功能适配器 AdapterMF；
- (7) 其它耗材与适配器保持不动。

2.3 设置热循环仪（PCR 仪）程序如下，将 2.2.5 步骤的第二轮 PCR 反应液置于热循环仪（PCR 仪）上，运行程序；

热盖温度 105 °C			
步骤	循环数	温度	时间
1	1	95 °C	3 min 30 s
2	9	98 °C	20 s
		58 °C	1 min
		72 °C	30 s
3	1	72 °C	5 min
4	1	4 °C	Hold

注意：

请按照上述表格中的反应体系和反应条件进行 PCR 反应，更改反应参数可能会导致文库的质量下降或文库构建失败。

2.4 PCR 程序结束后立即进行 STEP 3。

STEP 3 第二轮 PCR 产物磁珠纯化

需要用到的试剂：

- 纯化磁珠 IGT™ Pure Beads

需要用到的设备：

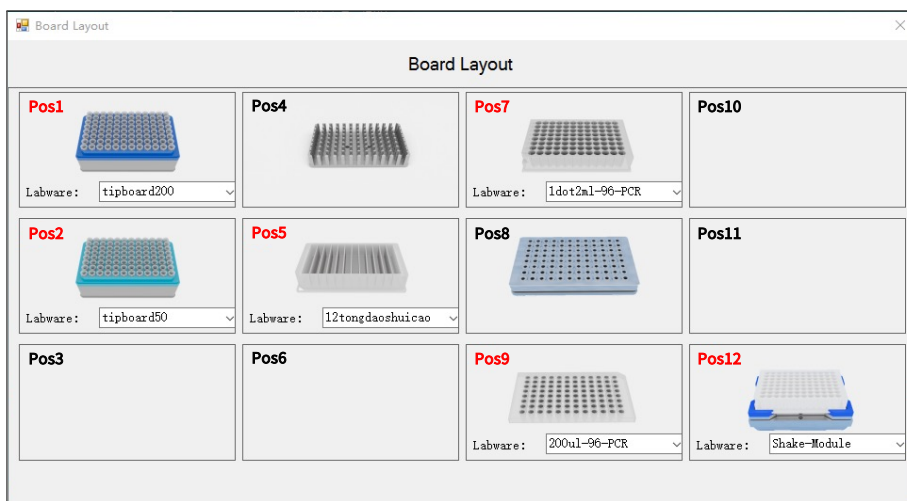
- IGT-AS12 自动化液体工作站（配置 2）

3.1 在程序界面菜单栏点击 **Libraries**，选择 **MultipSeq 建库流程-RD01-MultipSeq 建库流程（2 管引物-多 Panel 读取表格）**，选择 **RD01-02 多重 PCR 建库流程（2 管引物-多 Panel）-16 样本**，选择 **Step03 多重第二轮扩增产物纯化-16 样本程序**；

3.2 进入程序后，按照下表与布置图在 IGT-AS12 台面放置相应的适配器与耗材；

适配器/耗材	标识	放置位置
200 μL 盒装透明移液吸头	TipRack200	Pos1
50 μL 盒装透明移液吸头	TipRack50	Pos2
12 道储液槽	Reservior12	Pos5
1.2 mL 深孔板	DWP1200	Pos7
磁分离模块	MagneticStand	Pos8
96 孔 PCR 板适配器	Adapter96	Pos9
1.2 mL 深孔板	DWP1200	Pos12

具体位置如下图所示：

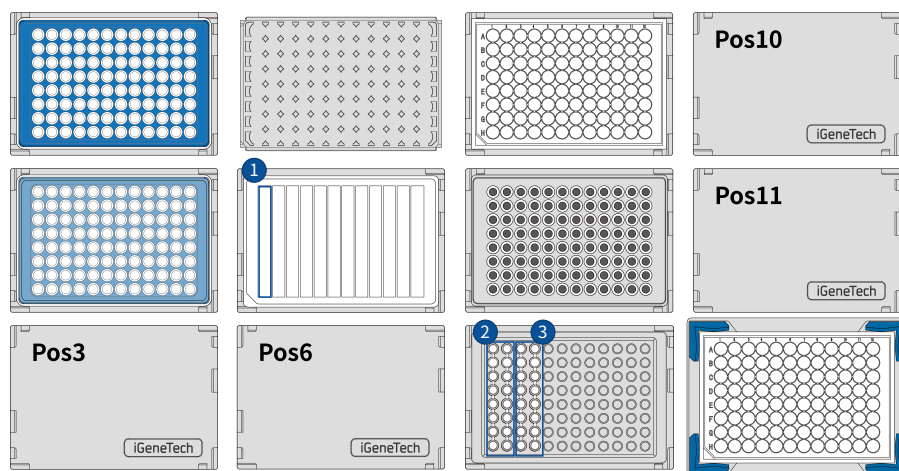


3.3 按照下图所示放置相关试剂组分和耗材，放置完成后根据提示打勾，点击 **Next** 进入程序界面；

序号	组分名称	分装体积	使用耗材	放置位置
1	纯化磁珠 IGT™ Pure Beads*	2.5 mL	12 道储液槽	Pos5:A1-H1
2	2.4 步骤扩增产物	30 μL	8 联排 PCR 管	Pos9:A1-H2
3	产物收集管	-	8 联排 PCR 管	Pos9:A3-H4

* 使用磁珠为 IGT™ Pure Beads，若选用其它品牌纯化磁珠，需咨询对应供应商，并通过预实验自行摸索合适的磁珠用量。

具体位置如下图所示（图中数字对应上表序号，可单独使用附件 A 中的大图进行核对）：



3.4 试剂放置结束后，在程序界面右下角勾选 **Emulate** 后点击 **Run** 进行预跑，预跑成功后，取消勾选并进行正式流程；

提示： 点击 **Run** 仪器开始自检，会有弹窗提示，需要人工核验机械臂是否装载移液器，默认为未装载移液器，若仪器装有移液器请先进行移液器卸载操作，卸载后，弹窗全部点击“否”。

3.5 流程结束后，取出 **Pos9:A3-H4** 位置的 8 联排 PCR 管，即为纯化后产物；

- 3.6 取1 μ L文库使用 **Qubit dsDNA HS Assay Kit** 试剂在 Qubit 4.0 Fluorometer 上进行文库浓度测定，记录文库浓度；
- 3.7 取1 μ L文库使用片段分析仪进行片段质检；
- 3.8 按照如下步骤清理台面：
 - (1) 将 **Pos5:A1-H1** 纯化磁珠 **IGT™ Pure Beads** 回收，按照管标签上的温度储存；
 - (2) 剩余耗材直接丢弃；
 - (3) 清理台面其余适配器。

实验结束，可以安排上机测序。

附录 A

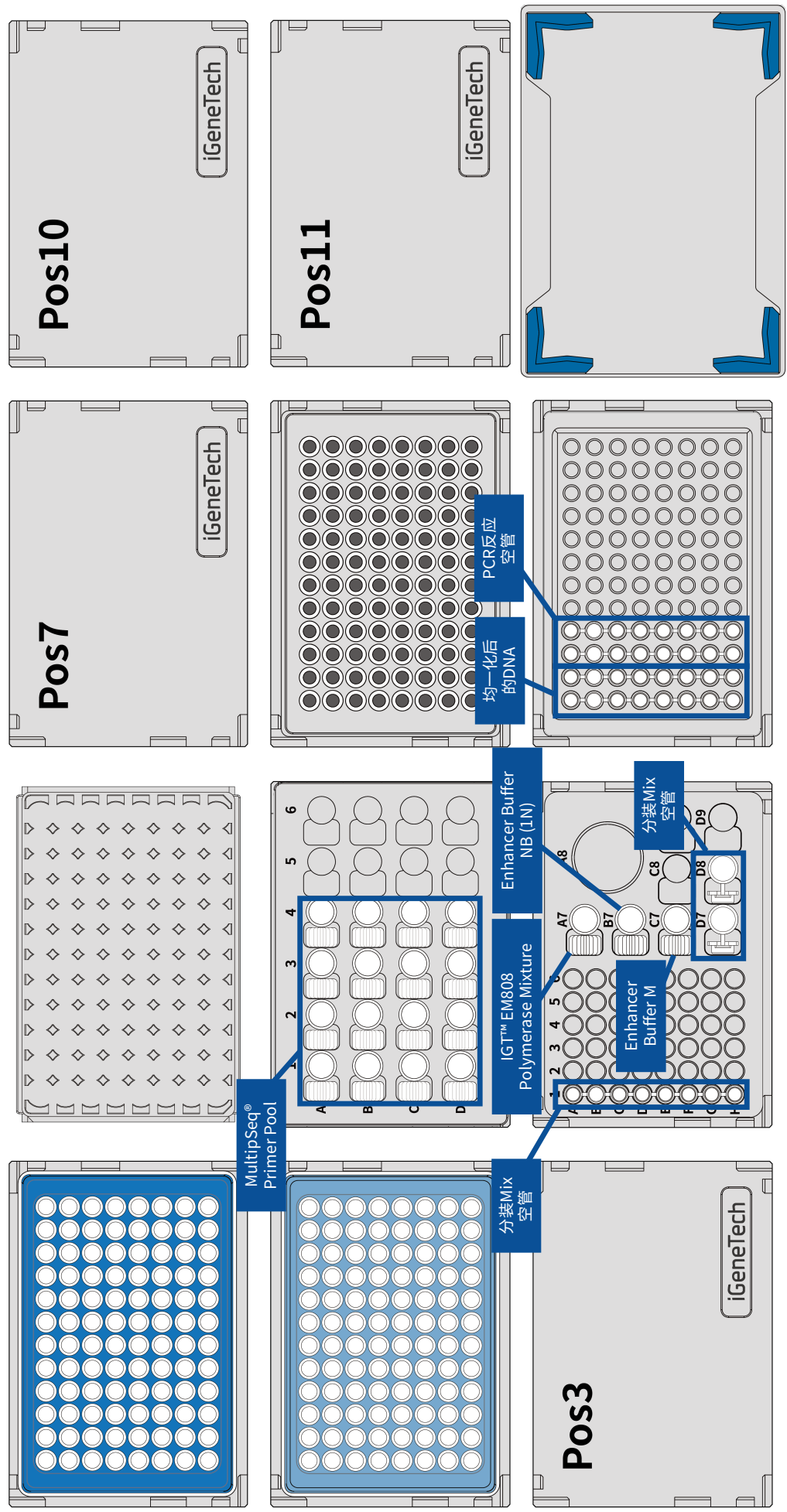
板位布置大图

以下为本操作流程所使用的供实验核对使用的三个板位布置图大图：

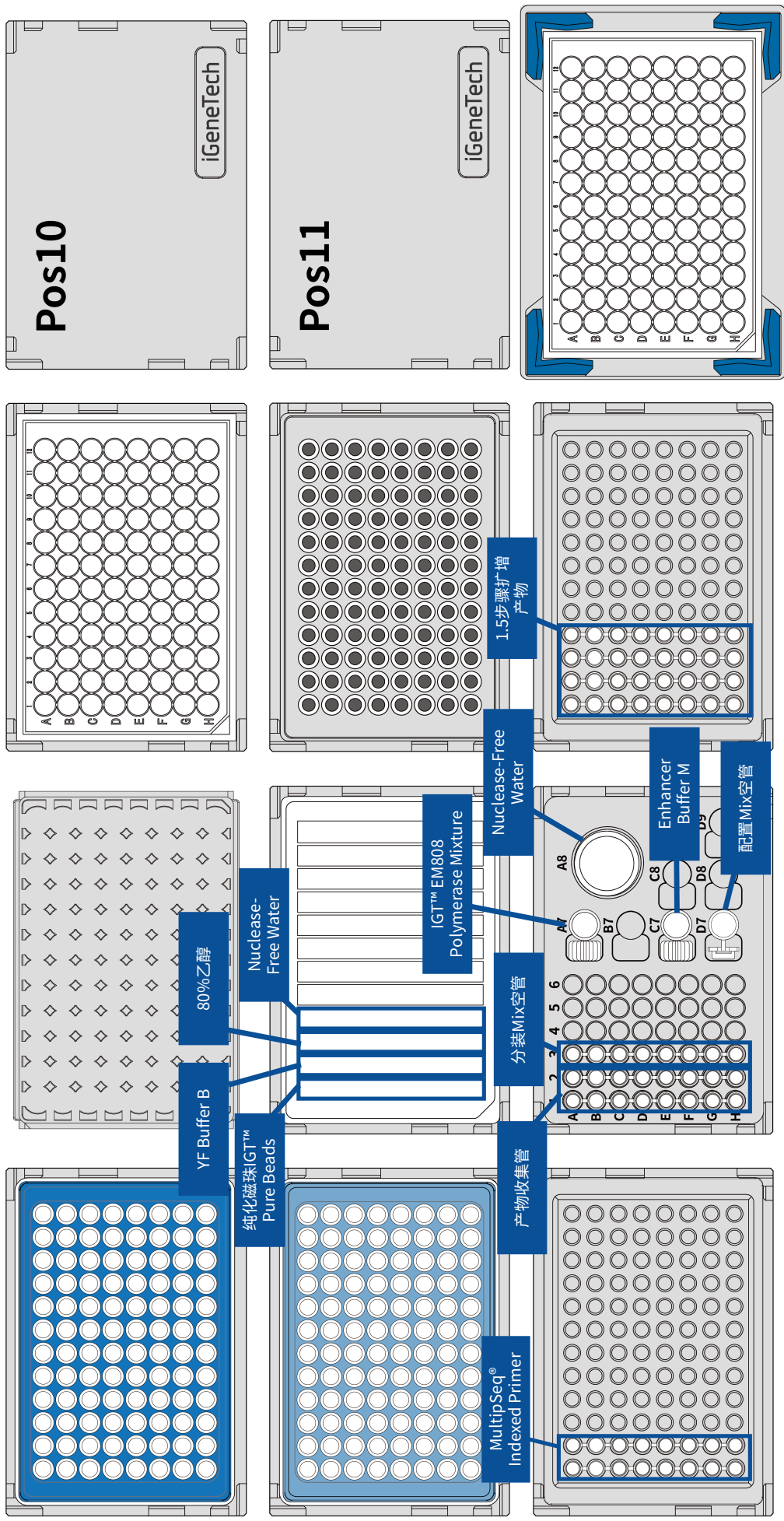
1. 第一轮 PCR 反应体系配制板位布置图
2. 第一轮 PCR 产物磁珠纯化 & 第二轮 PCR 反应体系配制板位布置图
3. 第二轮 PCR 产物纯化板位布置图

大图请见后页。

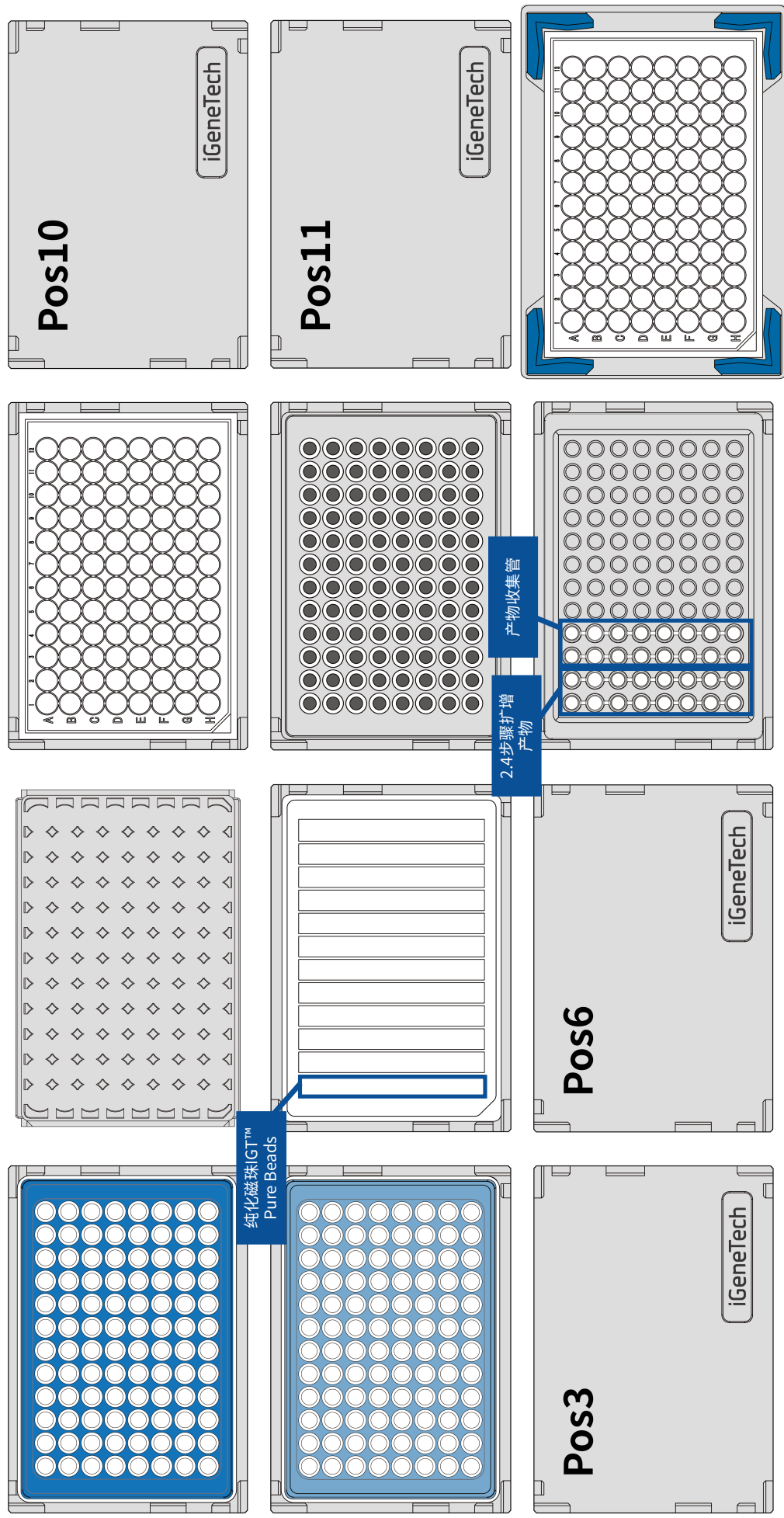
MultipSeq® 多重扩增子建库自动化流程 (PROTXXXXXX, Rev.A.0) 第一轮 PCR 反应体系配制板位布置图



MultipSeq® 多重扩增子建库自动化流程 (PROTXXXXXX, Rev A.0) 第一轮 PCR 产物磁珠纯化 & 第二轮 PCR 反应体系配制板位布置图



MultipSeq® 多重扩增子建库自动化流程 (PROTXXXXXX, Rev.A.0) 第二轮 PCR 产物纯化





网址：www.igenetech.com/support

邮箱：support@igenetech.com

总部地址：北京市昌平区中关村生命科学园 8 号院一区 9 号楼 A 座 3 层

嘉兴子公司：浙江省嘉兴市嘉善县大云镇宏业路 371 号 2 号楼

官方微信



仅供科研使用，不可用于临床诊断。

版权声明：本手册版权属于艾吉泰康生物科技（北京）有限公司及其子公司所有，未经本公司书面许可，任何其他个人或组织不得以任何形式将本手册中的各项内容进行复制、拷贝、编辑或翻译成其他语言。本手册所有商标或标识均属于艾吉泰康生物科技（北京）有限公司、其子公司及其所有者所有。

版本号：A.0（2023 年 2 月）

PROT230202