





PyroMark Q24 测序仪标准操作规程

一、 实验前准备工作：

1. 认真阅读 PyroMark Q24 使用说明书后安装系统。
2. 将稀释 Control Oligo 的 10×的 Dilution buffer 稀释成 1×， 稀释的方法是：取 200 μL 的 10×Dilution buffer 加到 1800 μL 的超纯水中， 摇匀后保存。（实际中可以按比例少配制些， 到用时再配）。
3. 将 PyroMark Q24 Plate Holder 放在 80C°的金属浴中预热。
4. 在测序前将测序过程中所要用到的所有试剂都保证其在室温状态下。

二、 操作步骤：（以 Control Oligo 为例）：

1. 用 PyroMark Q24 MDx software 进行序列编辑（可以是 AQ、CpG 或者 SQA）。
2. 以建立基因 SNP 分型为例，在软件上点击工具栏  按钮，然后选择“New AQ Assay”。
3. 在“Sequence to Analyze”格式栏下输入将要检测分析的序列，TAYGGTTTGCA。
4. 点击“Dispensation Order”获得仪器碱基加样的顺序和预期的峰型图。
5. 保存待分析的序列信息（）。
6. 点击工具栏的  按钮，建立序列的运行信息，具体操作见软件操作规程。
7. 点击工具栏上的保存按钮（），将运行信息保存到 USB 存储器里。
8. 点击软件上的 tools 工作栏下拉菜单中的 Pre run information，得到酶，底物及 dNTPs 的加样量的信息，打印结果（很重要）。
9. 将 Streptavidin Sepharose High Performance（Beads）轻轻振荡，保证其充分

混匀。

10. 按下表准备混合液（考虑到损耗，实际用量比理论用量多 10%左右）：

表一：结合液的配制

11. 将 PyroMark Q24 Control Oligo 按下表稀释到 0.04uM。

表二：Control Oligo 的稀释

表二：Control Oligo 的稀释

组分	体积	浓度
Control Oligo	10 μ L	20 uM
Dilution buffer 1 \times	90 μ L	-
第一次稀释后	100 μ L	2 uM
Control Oligo	30 μ L	2 uM
Dilution buffer 1 \times	1470 μ L	-
最终稀释后	1500 μ L	0.04 uM

12. 取表一中的混合液 60 μ L 加到含有 20 μ L 的 PCR 产物当中（PCR 扩增引物中一条用生物素标记），对照组用 0.04 uM 的 Control Oligo，PCR 产物用容易揭盖的 PCR 管（如 8 联管）盛放。

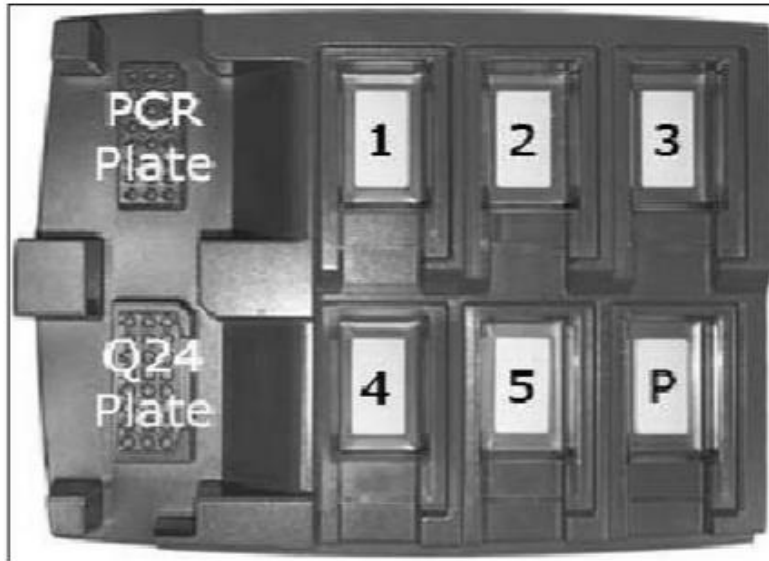
13. 将盖子盖上。

14. 将 PCR 产物（20 μ L）与表一的混合液混合后在室温下 1400 rpm 振荡 5 – 10 分钟，使 Beads 和生物素充分结合(此步为关键步骤)。

15. 添加 24 μ L 的 Annealing Buffer 和 1.2 μ L 的对应的测序引物加入到 PyroMark Q24 板上（Control Oligo 为自带测序引物，所以不用加，Annealing buffer 加 25 μ L）。

16. 把 PCR 反应板（OR 8 联管）放在真空工作区的 PCR Plate 上，

如下图：



图一：Q24 工作区

- ① 所盛放的试剂为 70%酒精
- ② 所盛放的试剂为变性液 (Denaturation Solution)
- ③ 所盛放的试剂为洗脱液 (Wash Buffer)
- ④ 所盛放的试剂为超纯水
- ⑤ 所盛放的试剂为超纯水 P 区为探针存放区

17. 打开真空泵的开关和吸附器(如图二)的开关, 在⑤所盛放的超纯水区吸 30s。



图二：真空吸附器

18. 将振荡后的 PCR 板 (or8 联管) 放在上图所示的 PCR Plate 区, 把探针放在

PCR 板 (or 8 联管里) 吸取 15 s, 把探针拿起时应该非常小心, 避免碰落探针上吸附的 Beads (此步相当重要, 应当要 1 分钟以内完成)。

19. 把探针放在上图所示①区所盛放的 70%酒精里 5 s。

20. 把探针放在上图所示②区所盛放的变性液里 5 s。

21. 把探针放在上图所示③区所盛放的洗脱液里 10 s。

22. 把真空泵的吸附器如下图所示竖直 5 s, 使管子中不再有液体流出。

23. 把吸附器水平放在图一所示工作区的 Q24 Plate 上方 (板中加有 Annealing buffer 和测序引物), 不要接触液面, 关闭吸附器的开关。

24. 将吸附器上的探针放到含有 Annealing buffer 和测序引物混合液的液面以下, 轻轻摇动吸附器以确保探针上吸附的 Beads 完全释放到混合液中 (此步骤相当重要, 持续时间大约 1 分钟)。

25. 将吸附器转到图一所示④所盛放的超纯水里, 洗涤探针上没有完全洗脱的 Beads, 持续 10 s – 30 s。

26. 将吸附器转到图一所示⑤所盛放的超纯水里, 开启吸附器开关, 持续 30 s。

27. 将吸附器如图二所示, 竖直大概 5 s, 使吸附器中的液体流尽。

28. 关闭吸附器的开关并将其放入图一所示的 P 区存放。

29. 关闭真空泵的开关。

30. 将经过步骤 24 后的 Q24 板 (上有 Annealing buffer 和测序引物的混合液) 放在预热的 PyroMark Q24 Plate Holder 上在 80C°下加热 2 分钟 (关键)。

31. 将 Q24 板从 PyroMark Q24 Plate Holder 上移下后室温下(15-25C°)至少放置 5 分钟 (关键)。

32. 在试剂仓中加入第 8 步所得到的酶、底物及 dNTPs 的量 (试剂仓的标签面朝

向自己)。

33. 打开测序仪机箱上的盖子，把试剂仓放进去，使试剂仓上的标签朝向自己。

34. 确定试剂仓的标签朝向自己后，固定试剂仓前的卡夹。

35. 打开固定 Q24 板的固定框把 Q24 板（上有室温放置 5 分钟后的待测序液）放在加热板上。

36. 关闭固定框和测序仪机箱的盖。

37. 将存有运行信息的 USB 插入到测序仪上。

38. 选择“RUN”按钮后点击“OK”。

39. 选择 USB 里存储的运行信息。

40. 当选择好存储的运行信息后点击“Select”选择运行仪器。

41. 当测序完成以后，仪器会自动将结果保存到 USB 存储器里（即运行信息），点击“Close”。

42. 移除 USB 存储器。

43. 打开测序仪的机箱盖。

44. 打开试剂仓前的固定装置打开，移出试剂仓。

45. 将试剂仓前的固定装置回位。

46. 打开 Q24 的固定框，把 Q24 板从加热器上移出。

47. 关闭 Q24 固定框和仪器的机箱盖。

48. 扔掉反应后的 Q24 板并按照试剂仓清洗说明洗涤试剂仓。

49. 打开 PyroMark Q24 MDx Software 查看测序结果。