

# Plasmid-EZ入门指南

# 目录

## Plasmid-EZ简介

01

Plasmid-EZ产品介绍

Plasmid-EZ结果下载

Plasmid-EZ结果展示

## 质粒基因组注释

02

质粒注释图谱

如何打开FASTA文件

## 数据质量评估

03

读长分布与质量分数查看

## 变异检测

04

基于碱基的变异分析

多重叠群分析与注释生成

## 为什么我的样品组装失败了？

05



# 01

## PLASMID-EZ简介

# 质粒--生命科学研究和生物医药研发的必需品

## 合成生物学

基因合成、基因突变文库等

## 蛋白质工程与蛋白质药物

各种酶、抗体及胰岛素等

## 细胞与基因治疗

质粒可直接作为载体，同时也是AAV/LV等病毒载体包装瞬时转染工艺的原料

## 疫苗研发及生产

除了灭活疫苗以外的其它疫苗，如DNA疫苗、重组腺病毒载体疫苗、mRNA疫苗等都需要质粒作为生产原料

## 基因工程

微生物基因组改造、植物分子育种、动物模型等



**测序验证**是关键质控步骤，在进行下游应用前，跳过测序质控可能会导致后续的正常排查成本增加，包括时间成本和生产成本。

# 目前质粒测序质控所遇到的难点

## 结构复杂的质粒

质粒含高GC区域，串联重复，大片段重复等

## 超长质粒

质粒载入的外源基因越来越长，越来越复杂，而且序列未知

## 混合质粒

不同质粒共线生产可能会造成相互污染

## 质粒的不稳定性

重组质粒构建过程和传代都可能造成质粒结构的不稳定性

## 多聚体质粒

你确定你的质粒不是二聚体？Sanger测序不会告诉你答案

## Plasmid-EZ全质粒测序

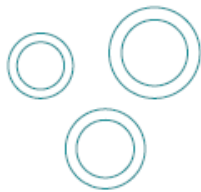
更详细、更严谨、更有效  
下游实验顺利成功的保证

# Plasmid-EZ产品介绍

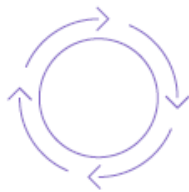
Plasmid-EZ 是一种**经济高效**，**高通量**，**快速的**从质粒到结果可交互式结构验证解决方案。

Customer

Azenta Life Sciences



Prepare and  
send samples



Full-length  
plasmid sequencing



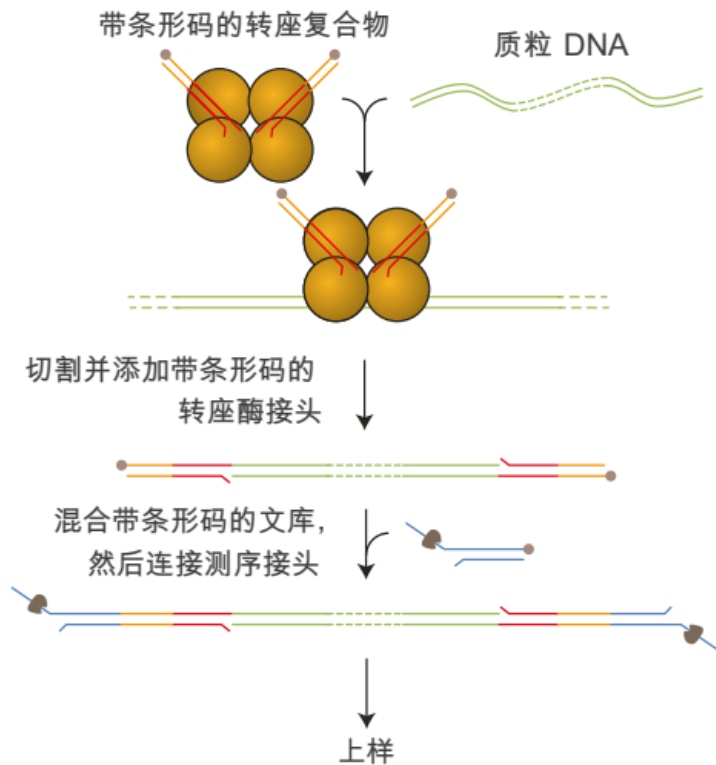
Assembly and  
annotation

- ✓ 最快1天可出结果，快速高效；
- ✓ 不需要提供已知序列信息或测序引物；
- ✓ 样本通量可灵活调整；

- ✓ 测序不受质粒大小限制；
- ✓ 测序不受结构复杂、多聚体样本的限制；
- ✓ 高准确度。

# Plasmid-EZ测序反应流程

1. 带有barcode DNA序列的转座酶与质粒结合
2. 质粒被转座酶打断，同时在打断的位置连接上barcode DNA
3. 混合连有不同barcode DNA的质粒，连接测序接头（每个样品有不同的barcode 序列）
4. 纯化后上机测序



# Plasmid-EZ与Sanger测序的比较

质粒测序验证过去一直以传统的Sanger测序技术为主导，但Plasmid-EZ流程简便快速，可以为质粒鉴定提供更全面完整的信息。

特点	Sanger测序	Plasmid-EZ
测序区域	一般仅针对目标基因，可通过Primer walking多反应测序拼接获得完整质粒	可直接测完整质粒
引物要求	是	否
PCR要求	是	否
通量	低	高
识别插入元件的方向	无法识别方向	是
解析结构复杂区域	否	是
测出多聚体质粒	否	是
测出混合质粒或杂质DNA	否	是
周期	以4个反应为例，3-4天	最快1天

# Plasmid-EZ送样要求

## 环状质粒

质粒单一，无基因组污染或降解（推荐使用Qubit定量，避免浓度虚高）

片段 $\leq 10\text{Kb}$ ：浓度  $\geq 20\text{ng}/\mu\text{l}$ ，体积 $\geq 20\mu\text{l}$ ；

片段 $10\text{Kb}-20\text{Kb}$ 之间：浓度  $\geq 30\text{ng}/\mu\text{l}$ ，体积 $\geq 20\mu\text{l}$ ；

片段 $\geq 20\text{Kb}$ ：浓度  $\geq 40\text{ng}/\mu\text{l}$ ，体积 $\geq 20\mu\text{l}$ ；

纯度要求：OD<sub>260/280</sub>为1.8-2.0，OD<sub>260/230</sub> $\geq 2.0$ 。

## 菌液/平板菌落（片段 $\leq 20\text{KB}$ ）

菌液：提供体积 $\geq 200\mu\text{l}$ 新鲜菌液（OD  $> 0.8$ ），装于1.5ml离心管中封口保存；

直抽菌液：过夜培养的新鲜大肠杆菌菌液2ml或2ml菌液沉淀；

平板菌落：单菌落，无明显卫星菌落，需将待测的菌落圈选标注并编号。

注：> 20kb的样品建议直接寄送质粒样品测序

# Plasmid-EZ结果下载

Plasmid-EZ测序结果可以直接在金唯智账户中查看/下载。点击“查看结果”，界面中会显示每个样品的组装状态，您可以点击右上角的“下载”进行结果下载。（结果保存**1个月**，建议及时下载与保存）。

订单生成日期	订单号	订单名称	项目名称	业务线	服务类型	优先级	数量	订单状态	操作
<input type="checkbox"/> 2025/1/8 14:35	<a href="#">80-1613643358</a>			Sanger测序	Plasmid-EZ全质粒测序	常规	24	等待样品	<a href="#">订单详情</a>
<input type="checkbox"/> 2024/12/17 13:15	<a href="#">80-1613337609</a>			Sanger测序	Plasmid-EZ全质粒测序	常规	1	完成	<a href="#">查看结果</a>

首页 / Sanger测序订单结果

收费数 1 [您对此份订单是否满意?](#) [是](#) [否](#) [下载](#)

已提交的样品结果

📌 订单号 80-1613337609

#	样品名称	组装状态
1	1	success

# Plasmid-EZ结果展示

结果下载后，点击80-xxxxxxx 文件夹，订单结果按照文件格式分类。

ab1	模拟峰图 (.ab1文件)
bam	测序比对 BAM 文件 (.bam文件)
genome	组装结果 (.fa 文件)
position	碱基组成 Excel 文件 (Base-composition.xls)
rawdata	原始数据 (.fq文件)
report	交互式报告 (Report.html)

点击对应格式的文件夹，可查看所有样品该类型的结果，以“genome”文件夹为例。

genome	2/11/2026 5:57 PM	File folder	
AB1_Test_ga-1694.genome.fa	2/11/2026 5:52 PM	FA File	6 KB
AB1_Test_ga-3500.genome.fa	2/11/2026 5:52 PM	FA File	6 KB
AB1_Test_ga-4459.genome.fa	2/11/2026 5:52 PM	FA File	6 KB

# Plasmid-EZ结果展示

AB1模拟峰图可在“ab1”文件夹查看，.ab1格式结果可用ABI Scanner、Chromas、SnapGene等软件打开。

ab1	2/11/2026 5:54 PM	File folder
AB1_Test_ga-1694.ab1	2/11/2026 5:52 PM	AB1 File
AB1_Test_ga-3500.ab1	2/11/2026 5:52 PM	AB1 File
AB1_Test_ga-4459.ab1	2/11/2026 5:52 PM	AB1 File

注：为保证模拟生成的 ab1 峰图质量，单个峰图的最大长度上限为 16kb。当样品序列长度超过 16kb 时，输出的序列会被拆分为多段独立文件，每段均不超过该上限。

原始.fastq格式结果可在“rawdata”文件夹查看。未经处理的测序原始数据包含在raw.fastq.gz中，如需查看，可用系统自带解压软件或7zip等软件解压获得.fastq文件，再用文本编辑器（如记事本）等软件打开。

rawdata	2/13/2026 10:43 AM	File folder	
AB1_Test_ga-1694.fq.gz	2/11/2026 5:52 PM	GZ File	4,707 KB
AB1_Test_ga-3500.fq.gz	2/11/2026 5:52 PM	GZ File	4,649 KB
AB1_Test_ga-4459.fq.gz	2/11/2026 5:52 PM	GZ File	5,077 KB





02

# 质粒基因组注释

# 质粒注释图谱

首先，打开Report.html报告。在样本报告中，您可以先点击“质粒基因组注释”查看已组装序列（又称重叠群，contig）的带注释质粒图谱。将鼠标悬停于图谱上时，会弹出对应区域的信息，该信息也会列于图谱下方的表格中。

## 一、实验流程

## 二、生物信息分析流程

## 三、生物信息分析结果

### 1 测序数据统计

### 2 质粒基因组组装

### 3 质粒基因组注释

## 四、常见问题解答

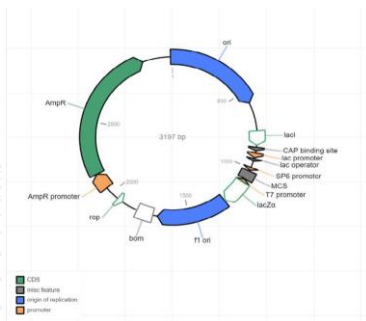
## 五、参考文献



## 生物信息分析结果

### 1 测序数据统计

第三代测序中的Oxford Nanopore纳米孔测序有着超长的读长优势，可以实现超过99%的高度精确测序，且不受DNA序列中GC和AT含量的影响。

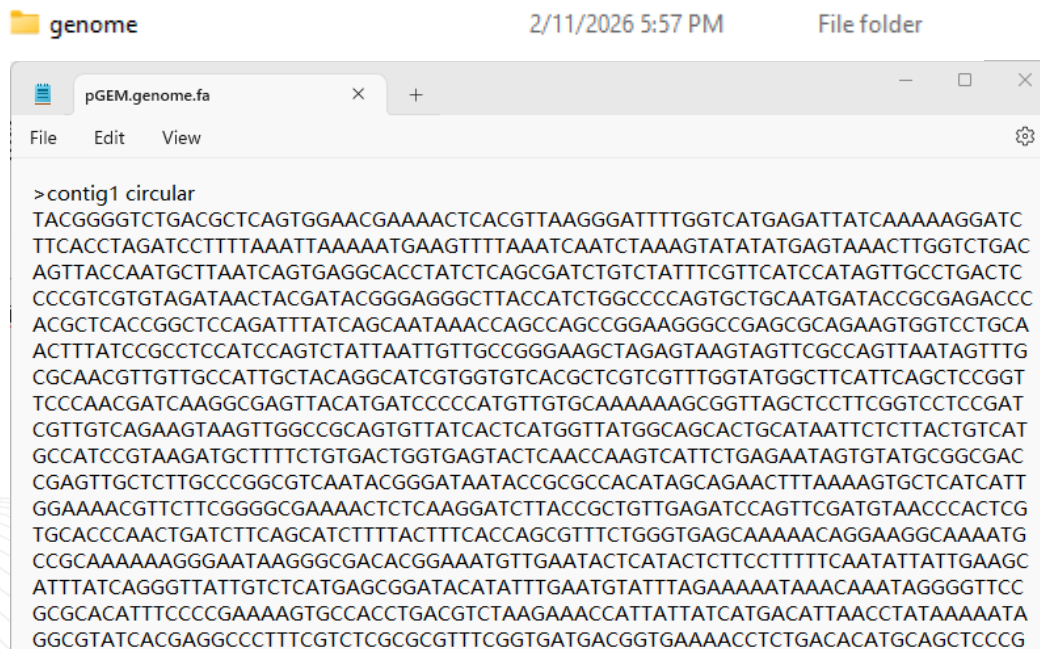


Data extracted from PGEM\_longestContig\_annot.csv

Feature	Type	percent identity	percent match length	Description
fl ori	rep_origin	100.0	100.0	fl bacteriophage origin of replication; arrow indicates direction of (+) strand synthesis
AmpR promoter	promoter	100.0	100.0	bla
AmpR	CDS	99.76	100.0	$\beta$ -lactamase; bla; confers resistance to ampicillin
ori	rep_origin	99.83	100.0	high-copy-number ColE1 pMB1 pBR322 pUC origin of replication
MCS	misc_feature	100.0	100.0	pUC18/19 multiple cloning site
lac promoter	promoter	100.0	100.0	promoter for the E. coli lac operon
CAP binding site	protein_bind	100.0	100.0	CAP binding activates transcription in the presence of cAMP. E. coli catabolite activator protein
T7 promoter	promoter	100.0	100.0	promoter for bacteriophage T7 RNA polymerase
SP6 promoter	promoter	100.0	100.0	promoter for bacteriophage SP6 RNA polymerase
lac operator	protein_bind	100.0	100.0	The lac repressor binds to the lac operator to inhibit transcription in E. coli. This inhibition can be relieved by adding lactose or isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG). lac repressor encoded by lacI
lacZa	CDS	100.0	90.80	LacZa fragment of $\beta$ -galactosidase; lacZ fragment
bom	misc_feature	100.0	70.92	basis of mobility region from pBR322
lacI	CDS	100.0	8.58	lac repressor; lacI. The lac repressor binds to the lac operator to inhibit transcription in E. coli. This inhibition can be relieved by adding lactose or isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG)
rop	CDS	100.0	18.75	Rop protein

# 如何打开FASTA文件

在样品对应文件夹和“genome”文件夹内均提供了 genome.fa 文件，其中包含该重叠群的序列。此文件可使用 SnapGene Viewer、Geneious 等软件打开，也可通过包括 Microsoft Word 在内的任意文本查看器打开。



```
>contig1 circular
TACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATC
TTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGAC
AGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTC
CCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGGTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCC
ACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTTGCA
ACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTGCCAGTTAATAGTTTG
CGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGT
TCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGAT
CGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCAT
GCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGAC
CGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTATCATT
GGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCG
TGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATG
CCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGAAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGC
ATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCC
GCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATA
GGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCG
```



03

# 数据质量评估

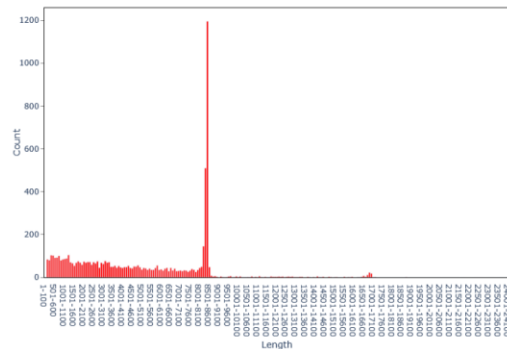
点击网页报告左侧“测序数据统计”和“质粒基因组组装”，您可以查看到测序质量指标，包括原始测序读长（又称 reads）的长度分布图（红色图表）、reads质量分布图（蓝色图表）和比对读长百分比（第3部分）等信息。

- 一、实验流程
- 二、生物信息分析流程
- 三、生物信息分析结果
  - 1 测序数据统计
  - 2 质粒基因组组装
  - 3 质粒基因组注释
- 四、常见问题解答
- 五、参考文献

## 3 生物信息分析结果

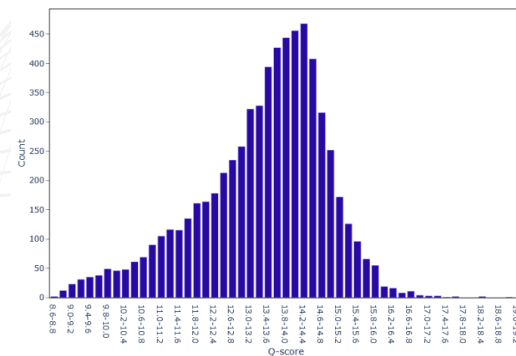
### 1 测序数据统计

第三代测序中的Oxford Nanopore纳米孔测序有着超长的读长优势，可以实现超过99%的高度精确测序，且不受DNA序列中GC和AT含量的影响。



3

Total Reads	Reads mapped to genome	Mapped Reads Ratio(%)	Coverage(%)	Mean depth
6584	6568	99.76	100.00	3901.64



1. 出现与组装长度匹配的清晰质粒峰
2. 大多数reads  $Q > 10$
3. 大多数reads能比对至组装数据，通常为90%以上






# 04

## 变异检测

# 基于碱基的变异分析

在“position”文件夹中提供了一个碱基组成 Excel 文件（Base-composition.xls），其中包含每个碱基位置处的reads数量。

position	2/11/2026 5:58 PM	File folder
 AB1_Test_ga-1694.Base-composition.xls	2/11/2026 5:52 PM	Microsoft Excel 97-2003 ...
 AB1_Test_ga-3500.Base-composition.xls	2/11/2026 5:52 PM	Microsoft Excel 97-2003 ...
 AB1_Test_ga-4459.Base-composition.xls	2/11/2026 5:52 PM	Microsoft Excel 97-2003 ...

# 基于碱基的变异分析

该文件还为您提供了在该碱基处存在插入或突变的reads数量，若为高频突变，对应的模拟ab1峰图中也会显示为套峰。由于纳米孔测序原始测序读长存在一定比例的随机突变，**此为参考值，具体变异建议以Sanger或NGS验证结果为准。**

ID	Site	Ref	Depth	A	T	C	G	Indel	Mutation	Other_Variant
contig1	2030	A	238	234	0	0	0	3	1.6807	-
contig1	2031	G	238	11	1	0	220	6	7.563	+A(3) +GA(1)
contig1	2032	A	238	235	0	0	2	1	1.2605	#NAME?
contig1	2033	G	238	3	2	2	231	0	2.9412	+T(2) +TTA(1)
contig1	2034	T	238	0	234	2	2	0	1.6807	+C(1) +G(2) +GA(1)
contig1	2035	C	238	2	9	171	48	8	28.1513	-GA(1) +G(2) +GC(1)
contig1	2036	G	238	32	2	1	202	1	15.1261	+A(1) +TT(1)+GA(1)

**ID:** 组装结果编号

**Site:** 组装结果中该位点的碱基坐标

**Ref:** 组装结果在该位置对应的参考碱基

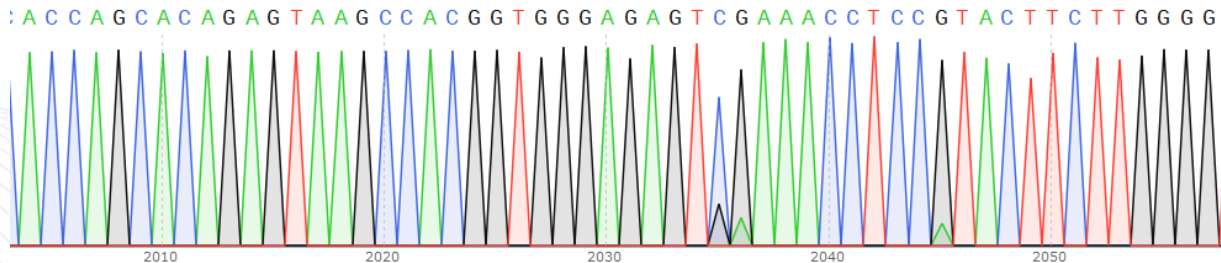
**Depth:** 该位点的有效测序深度

**A/T/C/G:** 该位点A、T、C、G的reads数

**Indel:** 该位点检测到的插入/缺失的reads总数

**Mutation\_Rate:** 测序数据中该位点的突变百分比（此为参考值）

**Other\_Variant:** 具体变异类型及频次



# 多重叠群分析与注释生成

组装结果也有可能包含多个序列，如果出现这种情况，在“genome”文件夹中的 genome.fa 文件将包含所有组装好的重叠群。

ab1	2/11/2026 5:54 PM	File folder
bam	2/11/2026 5:55 PM	File folder
genome	2/11/2026 5:57 PM	File folder
position	2/11/2026 5:58 PM	File folder
rawdata	2/11/2026 6:01 PM	File folder
report	2/11/2026 6:00 PM	File folder
AB1_Test_ga-1694.genome.fa	2/11/2026 5:52 PM	FA File
AB1_Test_ga-3500.genome.fa	2/11/2026 5:52 PM	FA File
AB1_Test_ga-4459.genome.fa	2/11/2026 5:52 PM	FA File

# 多重叠群分析与注释生成

在SnapGene Viewer中打开此文件，您将看到所有重叠群的列表，以及来自组装程序的一些详细信息。



例如，若组装得到了两个重叠群：一个是完整的环状质粒，另一个并非完整环状序列。那么，第二个重叠群很可能是组装过程中产生的组装伪像，而非真正的变异。

相反，如果看到多个环状重叠群，且用于生成重叠群的reads数量较多（e.g., > 30），则这可能代表样本中存在多个质粒变体。

如果想查看任何其他重叠群的注释，只需将序列复制粘贴到Plannotate中。这将生成带有 GenBank 文件的注释以及包含注释部分的 CSV 文件。



如果所有重叠群都只有少量reads，则可能表明样本的组装质量较低或样品本身数据量较少。



05

为什么我的样品组装  
失败了？

若样本组装失败，结果文件夹中将仅包含“rawdata”文件夹，其中包含该样品的原始数据。

 rawdata	2/11/2026 6:01 PM	File folder	
 AB1_Test_ga-1694.fq.gz	2/13/2026 10:17 AM	GZ File	13 KB

组装失败的最常见原因是样本浓度未达到所需的送样要求，或存在样品浓度虚高问题。浓度过低可能导致建库过程中片段化加剧及 / 或样本测序读长（reads）数量不足。我们强烈建议您在送样前使用 Qubit 或等效仪器检测样本浓度，以降低失败风险。

# Thank you!

