



MGISEQ-2000RS

高通量（快速）测序试剂套装使用说明书

试剂套装货号、名称及版本号：

- 1000012551, MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (SE50), V3.1
- 1000012552, MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (SE100), V3.1
- 1000012554, MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (PE100), V3.1
- 1000012555, MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (PE150), V3.1
- 1000013857, MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (SE400), V3.1
- 1000013858, MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (PE200), V3.1
- 1000006138, MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (SE50) (Small RNA), V3.1
- 1000011719, MGISEQ-2000RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS SE100), V1.0
- 1000013155, MGISEQ-2000RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS PE100), V1.0
- 1000011718, MGISEQ-2000RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS PE150), V1.0

引物试剂盒货号，名称及版本号：

- 1000020834, CPAS 条形码引物 3 试剂盒, V2.0

说明书版本号：A7

版本历史

| 版本 | 修订日期 | 修订内容摘要 |
|----|-------------|---|
| A7 | 2020 年 12 月 | <ul style="list-style-type: none"> • 变更测序试剂槽材质及结构 • 取消 FCL SE400 补充装 • 增加试剂套装运输温度 • 变更公司网址 |
| A6 | 2020 年 7 月 | <ul style="list-style-type: none"> • 更新生产企业名称 |
| A5 | 2020 年 5 月 | <ul style="list-style-type: none"> • 增加高通量快速测序试剂套装 (FCS) 系列产品相关信息 • 载片的储存温度更改为 -25°C -- -15°C, 并更新载片使用前的准备工作 and 注意事项 • 更新测序时长 • 更新 CPAS 条形码引物 3 试剂盒的货号, 装量和版本号 |
| A4 | 2019 年 12 月 | <ul style="list-style-type: none"> • 增加使用 MGIDL-200H 加载 DNB 的详细描述 • 更新文库投入量的计算公式 • 更新“准备测序试剂槽”章节中加入与混匀 dNTPs 和酶的操作 • 增加 DNB 加载缓冲液 II 中出现结晶的解决方法 • “异常处理”章节中新增“测序试剂槽 10 号孔中出现墨绿色结晶”和“文库量不足 40 fmol”两个部分。 • 将“测序试剂套装及自备耗材”的内容移到“测序工作流程”之前 • 新增“注意事项”章节 • 新增“版本历史” |
| A3 | 2019 年 4 月 | <ul style="list-style-type: none"> • 新增 SE400 和 PE200 的读长 • 新增使用 MGIDL-200H 加载 DNB 的操作 • 在自备耗材中增加电动移液器和一次性移液管 • 将测序仪界面的配图转换为线图 |
| A2 | 2019 年 1 月 | <ul style="list-style-type: none"> • 新增 SE100 读长 • 新增 PE 双 barcode 和 small RNA 测序的操作说明 • 将清洗试剂配方中使用的 NaCl 粉末更改为 5M NaCl 溶液, 将 NaOH 粉末更改为 2M NaOH 溶液 • “异常处理”章节中新增“Post loading 失败处理” • 修订产品规格 PE150、PE100、SE100、SE50 的高通量测序试剂套装及高通量测序试剂盒货号 |
| A1 | 2018 年 9 月 | <ul style="list-style-type: none"> • 更新 SE50、PE100 和 PE150 读长的 dNTPs 混合液、dNTPs 混合液 II 和 DNA 聚合酶混合液的装量及加样体积。 |

| | | |
|----|------------|---|
| | | <ul style="list-style-type: none">• 测序载片货号由 940-100109-00 变更为 1000016985。• 将图 6-3、6-4 和 6-20 中的“文库 ID”更改为“DNB ID”。• 更新 6-6, 6-7, 6-21, 7-1, 7-3 图例。 |
| A0 | 2018 年 4 月 | <ul style="list-style-type: none">• 首次发布 |

目录

| | |
|--|----|
| 第一章 介绍..... | 1 |
| 1.1 预期用途 | 1 |
| 1.2 测序原理..... | 1 |
| 1.3 数据分析..... | 1 |
| 1.4 测序读长..... | 1 |
| 1.5 测序时长 | 2 |
| 1.6 注意事项..... | 2 |
| 第二章 测序试剂套装及自备耗材..... | 3 |
| 2.1 测序试剂套装组分清单..... | 3 |
| 2.2 自备耗材..... | 14 |
| 第三章 测序工作流程..... | 15 |
| 第四章 DNB 的制备..... | 16 |
| 4.1 文库插入片段大小要求 | 16 |
| 4.2 文库浓度及所需量的要求 | 17 |
| 4.3 DNB 制备 | 17 |
| 4.3.1 准备 DNB 制备试剂 | 17 |
| 4.3.2 DNB 加载仪的选择..... | 17 |
| 4.3.3 ssDNA 文库所需量的计算: | 18 |
| 4.3.4 制备 DNB | 18 |
| 4.4 DNB 浓度测定..... | 20 |
| 第五章 载片准备 | 20 |
| 第六章 DNB 加载..... | 21 |
| 6.1 测序仪加载 DNB..... | 21 |
| 6.2 MGIDL-200RS 加载 DNB | 22 |
| 6.3 MGIDL-200H 加载 DNB | 23 |
| 第七章 准备测序试剂槽..... | 24 |
| 7.1 FCL SE50/FCL SE100/FCS SE100 测序试剂槽的准备..... | 25 |

| | |
|--|-----------|
| 7.2 FCL PE100/FCL PE150/FCS PE100/FCS PE150 测序试剂槽的准备 | 28 |
| 7.3 FCL PE200 测序试剂槽的准备 | 30 |
| 7.4 FCL SE50 (Small RNA) /FCL SE400 测序试剂槽的准备 | 33 |
| 7.5 双 barcode 测序 | 36 |
| 第八章 开始测序 | 36 |
| 8.1 进入程序 | 36 |
| 8.2 放置样品 | 37 |
| 8.3 测序参数配置 | 39 |
| 8.4 放置试剂槽 | 41 |
| 8.5 放置载片 | 42 |
| 8.6 复核信息 | 45 |
| 8.7 开始测序 | 45 |
| 第九章 清洗维护 | 46 |
| 9.1 清洗的术语和定义 | 46 |
| 9.2 清洗规则 | 46 |
| 9.3 清洗试剂准备 | 47 |
| 9.4 清洗试剂盒 | 48 |
| 9.5 清洗流程 | 49 |
| 9.5.1 常规清洗 | 49 |
| 9.5.2 深度清洗 | 50 |
| 9.5.3 全套清洗流程 | 52 |
| 第十章 异常处理 | 52 |
| 10.1 DNB 浓度低 | 52 |
| 10.2 负压异常 | 52 |
| 10.3 产生气泡 | 52 |
| 10.4 载片上出现杂质 | 53 |
| 10.5 泵液失败 | 53 |
| 10.6 试剂盒暂存 | 53 |
| 10.7 Post loading 失败处理 | 54 |
| 10.8 测序试剂槽 10 号孔中出现墨绿色结晶 | 54 |
| 10.9 文库量不足 40 fmol | 55 |

第一章 介绍

本说明书是使用MGISEQ-2000RS高通量测序试剂套装及MGISEQ-2000RS高通量快速测序试剂套装进行测序操作的作业指导书，内容包括DNA纳米球（DNB）的制备及载片的准备，测序试剂盒组分、存储环境及使用方法，测序上机操作以及测序完成后的仪器维护等。

1.1 预期用途

本产品是用于测定DNA或RNA文库序列的通用试剂盒，与基因测序仪(MGISEQ-2000RS)配合使用，完成高通量测序并获取样本序列信息。本试剂套装仅供科研使用，不能用于临床诊断。

1.2 测序原理

本试剂套装使用联合探针锚定聚合技术（cPAS），通过将DNA分子锚和荧光探针在DNA纳米球（DNB）上进行聚合，并利用高分辨率成像系统对光信号进行采集，光信号经过数字化处理后获得高质量高准确度的样本序列信息。

1.3 数据分析

当测序正在进行时，控制软件自动调用base call软件分析，并输出测序数据到指定位置用于二次分析。

1.4 测序读长

在测序过程中，测序循环数是按照所选择的测序读长执行的。例如，PE150测序是按照双端各150循环（ 2×150 ）共计300循环执行，最后得到300循环的序列数据。标签序列的10循环数需要额外进行计算。

表 1-1: 测序循环数示例

| 测序试剂盒 | 一链读长 | 二链读长 | 标签读长 | 总读长 | 最大支持循环数 |
|-------|------|------|------|--------|---------|
| SE50 | 50 | -- | 10 | 50+10 | 70 |
| SE100 | 100 | -- | 10 | 100+10 | 120 |
| SE400 | 400 | -- | 10 | 400+10 | 420 |
| PE100 | 100 | 100 | 10 | 200+10 | 220 |
| PE150 | 150 | 150 | 10 | 300+10 | 320 |
| PE200 | 200 | 200 | 10 | 400+10 | 420 |

1.5 测序时长

表 1-2: FCL 各读长理论测序时长 (小时)

| 时长 (小时) | SE50 | SE100 | SE400 | PE100 | PE150 | PE200 |
|-----------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 单载片 | 12.0 | 22.0 | 104.0 | 42.5 | 61.5 | 100.0 |
| 双载片 | 13.0 | 23.0 | 104.0 | 43.5 | 62.5 | 102.0 |
| 数据处理 (单边) | 0.5 | 0.8 | 2.5 | 1.3 | 1.8 | 2.5 |
| 数据处理 (双边) | 1.0 | 1.5 | 5.0 | 2.5 | 3.5 | 5.0 |

表 1-3: FCS 各读长理论测序时长 (小时)

| 时长 (小时) | SE100 | PE100 | PE150 |
|-----------|-------|-------|-------|
| 单载片 | 12.5 | 24.9 | 35.4 |
| 双载片 | 12.7 | 25.0 | 35.6 |
| 数据处理 (单边) | 0.4 | 0.5 | 0.6 |
| 数据处理 (双边) | 0.7 | 1.0 | 1.2 |

注:

- ① 上表中的测序时长 (单载片/双载片) 包括从 Post loading prime 开始, 到测序完成的时间; 数据处理的时间包括测序完成后测序仪自动进行 barcode 拆分 (如有选择拆分 barcode) 和 FASTQ 文件输出的时间。
- ② 上表数值仅为理论测序时长, 不同测序仪的实际运行时间可能会有所不同。

1.6 注意事项

- 1) 本产品仅用于科学研究, 使用前请仔细阅读产品说明书;
- 2) 试验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项;
- 3) 所有样本及试剂应避免直接接触皮肤和眼睛, 切勿吞咽, 一旦发生这种情况应立即用大量清水冲洗并及时到医院就诊;
- 4) 所有样本和各种废弃物均应按相关法规规定进行污染物处理。
- 5) 本产品为一次性使用产品, 不可重复使用。
- 6) 超过有效期的产品严禁使用。

第二章 测序试剂套装及自备耗材

2.1 测序试剂套装组分清单

表 2-1: MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (SE50) 货号: 1000012551

| 试剂盒信息 | 组分信息 | 规格及数量 | 储存温度 | 运输温度 |
|---|--------------------|-------------|-------------|---------|
| MGISEQ-2000RS 测序载片 货号: 1000008403 | 测序载片 | 1 张 | -25°C~-15°C | -15°C以下 |
| MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂盒 (SE50) 货号: 1000012533 | TE 缓冲液 | 300 μL×1 支 | -25°C~-15°C | -15°C以下 |
| | DNB 制备缓冲液 | 100 μL×1 支 | | |
| | DNB 聚合酶混合液 I | 200 μL×1 支 | | |
| | DNB 聚合酶混合液 II (LC) | 25 μL×1 支 | | |
| | DNB 终止缓冲液 | 100 μL×1 支 | | |
| | DNB 加载缓冲液 I | 200 μL×1 支 | | |
| | DNB 加载缓冲液 II | 200 μL×1 支 | | |
| | 0.5mL 冻存管 | 1 支 | | |
| | dNTPs 混合液 | 0.80 mL×1 支 | | |
| | dNTPs 混合液 II | 0.70 mL×1 支 | | |
| | DNA 聚合酶混合液 | 1.60 mL×1 支 | | |
| | 测序试剂槽 | 1 个 | | |
| 透明封口膜 | 2 张 | | | |



表 2-2: MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (SE100) 货号: 1000012552

| 试剂盒信息 | 组分信息 | 规格及数量 | 储存温度 | 运输温度 |
|--|--------------------|-----------------|---------------|----------|
| MGISEQ-2000RS 测序载片 货号: 1000008403 | 测序载片 | 1 张 | -25°C ~ -15°C | -15°C 以下 |
| MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂盒 (SE100) 货号: 1000012534 | TE 缓冲液 | 300 μ L×1 支 | -25°C ~ -15°C | -15°C 以下 |
| | DNB 制备缓冲液 | 100 μ L×1 支 | | |
| | DNB 聚合酶混合液 I | 200 μ L×1 支 | | |
| | DNB 聚合酶混合液 II (LC) | 25 μ L×1 支 | | |
| | DNB 终止缓冲液 | 100 μ L×1 支 | | |
| | DNB 加载缓冲液 I | 200 μ L×1 支 | | |
| | DNB 加载缓冲液 II | 200 μ L×1 支 | | |
| | 0.5mL 冻存管 | 1 支 | | |
| | dNTPs 混合液 | 1.20 mL×1 支 | | |
| | dNTPs 混合液 II | 1.00 mL×1 支 | | |
| | DNA 聚合酶混合液 | 2.30 mL×1 支 | | |
| | 测序试剂槽 | 1 个 | | |
| | 透明封口膜 | 2 张 | | |

表 2-3: MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (SE400) 货号: 1000013857

| 试剂盒信息 | 组分信息 | 规格及数量 | 储存温度 | 运输温度 |
|--|--------------------|--------------|-------------|---------|
| MGISEQ-2000RS 测序载片 货号: 1000008403 | 测序载片 | 1张 | -25°C--15°C | -15°C以下 |
| MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂盒 (SE400) 货号: 1000013853 | TE 缓冲液 | 300 μL×1 支 | -25°C--15°C | -15°C以下 |
| | DNB 制备缓冲液 | 100 μL×1 支 | | |
| | DNB 聚合酶混合液 I | 200 μL×1 支 | | |
| | DNB 聚合酶混合液 II (LC) | 25 μL×1 支 | | |
| | DNB 终止缓冲液 | 100 μL×1 支 | | |
| | DNB 加载缓冲液 I | 200 μL×1 支 | | |
| | DNB 加载缓冲液 II | 200 μL×1 支 | | |
| | 0.5mL 冻存管 | 1 支 | | |
| | dNTPs 混合液 | 4.10 mL×1 支 | | |
| | dNTPs 混合液 II | 12.20 mL×1 支 | | |
| | DNA 聚合酶混合液 | 8.30 mL×1 支 | | |
| | 测序洗脱试剂 | 2.90 mL×1 支 | | |
| | 测序试剂槽 | 1 个 | | |
| 透明封口膜 | 2 张 | | | |



表 2-4: MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (PE100) 货号: 1000012554

| 试剂盒信息 | 组分信息 | 规格及数量 | 储存温度 | 运输温度 |
|--|--------------------|--------------------------|----------------|----------|
| MGISEQ-2000RS 测序载片 货号: 1000008403 | 测序载片 | 1 张 | -25°C -- -15°C | -15°C 以下 |
| MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂盒 (PE100) 货号: 1000012536 | TE 缓冲液 | 300 μ L \times 1 支 | -25°C -- -15°C | -15°C 以下 |
| | DNB 制备缓冲液 | 100 μ L \times 1 支 | | |
| | DNB 聚合酶混合液 I | 200 μ L \times 1 支 | | |
| | DNB 聚合酶混合液 II (LC) | 25 μ L \times 1 支 | | |
| | DNB 终止缓冲液 | 100 μ L \times 1 支 | | |
| | DNB 加载缓冲液 I | 200 μ L \times 1 支 | | |
| | DNB 加载缓冲液 II | 200 μ L \times 1 支 | | |
| | 0.5mL 冻存管 | 1 支 | | |
| | dNTPs 混合液 | 1.90 mL \times 1 支 | | |
| | dNTPs 混合液 II | 1.60 mL \times 1 支 | | |
| | DNA 聚合酶混合液 | 3.60 mL \times 1 支 | | |
| | MDA 试剂 | 3.50 mL \times 1 支 | | |
| | MDA 聚合酶混合液 | 0.60 mL \times 1 支 | | |
| | 测序试剂槽 | 1 个 | | |
| 透明封口膜 | 2 张 | | | |

表 2-5: MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (PE150) 货号: 1000012555

| 试剂盒信息 | 组分信息 | 规格及数量 | 储存温度 | 运输温度 |
|--|--------------------|-------------|---------------|----------|
| MGISEQ-2000RS 测序载片 货号: 1000008403 | 测序载片 | 1 张 | -25°C ~ -15°C | -15°C 以下 |
| MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂盒 (PE150) 货号: 1000012537 | TE 缓冲液 | 300 μL×1 支 | -25°C ~ -15°C | -15°C 以下 |
| | DNB 制备缓冲液 | 100 μL×1 支 | | |
| | DNB 聚合酶混合液 I | 200 μL×1 支 | | |
| | DNB 聚合酶混合液 II (LC) | 25 μL×1 支 | | |
| | DNB 终止缓冲液 | 100 μL×1 支 | | |
| | DNB 加载缓冲液 I | 200 μL×1 支 | | |
| | DNB 加载缓冲液 II | 200 μL×1 支 | | |
| | 0.5mL 冻存管 | 1 支 | | |
| | dNTPs 混合液 | 1.30 mL×2 支 | | |
| | dNTPs 混合液 II | 1.15 mL×2 支 | | |
| | DNA 聚合酶混合液 | 4.80 mL×1 支 | | |
| | MDA 试剂 | 3.50 mL×1 支 | | |
| | MDA 聚合酶混合液 | 0.60 mL×1 支 | | |
| | 测序试剂槽 | 1 个 | | |
| 透明封口膜 | 2 张 | | | |



表 2-6: MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (PE200) 货号: 1000013858

| 试剂盒信息 | 组分信息 | 规格及数量 | 储存运输温度 | 运输温度 |
|---|--------------------|--------------|-------------|---------|
| MGISEQ-2000RS 测序载片 货号: 1000008403 | 测序载片 | 1张 | -25°C--15°C | -15°C以下 |
| MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂盒 (PE200) 货号: 1000013854 | TE 缓冲液 | 300 μL×1 支 | -25°C--15°C | -15°C以下 |
| | DNB 制备缓冲液 | 100 μL×1 支 | | |
| | DNB 聚合酶混合液 I | 200 μL×1 支 | | |
| | DNB 聚合酶混合液 II (LC) | 25 μL×1 支 | | |
| | DNB 终止缓冲液 | 100 μL×1 支 | | |
| | DNB 加载缓冲液 I | 200 μL×1 支 | | |
| | DNB 加载缓冲液 II | 200 μL×1 支 | | |
| | 0.5mL 冻存管 | 1 支 | | |
| | dNTPs 混合液 | 3.20 mL×1 支 | | |
| | dNTPs 混合液 II | 8.30 mL×1 支 | | |
| | DNA 聚合酶混合液 | 6.10 mL×1 支 | | |
| | MDA 试剂 | 3.50 mL×1 支 | | |
| | MDA 聚合酶混合液 | 0.60 mL×1 支 | | |
| | 测序试剂槽 | 1 个 | | |
| 透明封口膜 | 5 张 | | | |
| MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂盒补充装 (PE200) 货号: 1000013856 | CPAS 再生试剂 | 200.0 mL×1 瓶 | -25°C--15°C | -15°C以下 |
| | CPAS 洗脱试剂 1V2.0 | 200.0 mL×1 瓶 | | |
| | CPAS 洗脱试剂 2 | 200.0 mL×1 瓶 | | |

表 2-7: MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (SE50) (Small RNA) 货号:100006138

| 试剂盒信息 | 组分信息 | 规格及数量 | 储存运输温度 | 运输温度 |
|--|--------------------|-------------|-------------|---------|
| MGISEQ-2000RS 测 序载片 货号: 1000008403 | 测序载片 | 1张 | -25°C--15°C | -15°C以下 |
| MGISEQ-2000RS 高 通量测序试剂盒 (SE50) 货号: 1000012533 | TE 缓冲液 | 300 μL×1 支 | -25°C--15°C | -15°C以下 |
| | DNB 制备缓冲液 | 100 μL×1 支 | | |
| | DNB 聚合酶混合液 I | 200 μL×1 支 | | |
| | DNB 聚合酶混合液 II (LC) | 25 μL×1 支 | | |
| | DNB 终止缓冲液 | 100 μL×1 支 | | |
| | DNB 加载缓冲液 I | 200 μL×1 支 | | |
| | DNB 加载缓冲液 II | 200 μL×1 支 | | |
| | 0.5mL 冻存管 | 1 支 | | |
| | dNTPs 混合液 | 0.80 mL×1 支 | | |
| | dNTPs 混合液 II | 0.70 mL×1 支 | | |
| | DNA 聚合酶混合液 | 1.60 mL×1 支 | | |
| | 测序试剂槽 | 1 个 | | |
| 透明封口膜 | 2 张 | | | |
| MGIEasy Small RNA 测序洗脱试剂 货号:1000006387 | Small RNA 测序洗脱试剂 | 1.60 mL×3 支 | 2°C-8°C | 2°C-8°C |

表 2-8: MGISEQ-2000RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS SE100) 货号: 1000011719

| 试剂盒信息 | 组分信息 | 规格及数量 | 储存温度 | 运输温度 |
|---|--------------------|-----------------|----------------|---------|
| MGISEQ-2000RS 快速测序载片 货号: 1000011720 | 测序载片 | 1 张 | -25°C -- -15°C | -15°C以下 |
| MGISEQ-2000RS 高通 量快速测序试剂盒 (FCS SE100) 货号: 1000013149 | TE 缓冲液 | 300 μ L×1 支 | -25°C -- -15°C | -15°C以下 |
| | DNB 制备缓冲液 | 100 μ L×1 支 | | |
| | DNB 聚合酶混合液 I | 200 μ L×1 支 | | |
| | DNB 聚合酶混合液 II (LC) | 25 μ L×1 支 | | |
| | DNB 终止缓冲液 | 100 μ L×1 支 | | |
| | DNB 加载缓冲液 I | 200 μ L×1 支 | | |
| | DNB 加载缓冲液 II | 200 μ L×1 支 | | |
| | 0.5mL 冻存管 | 1 支 | | |
| | dNTPs 混合液 | 0.90 mL×1 支 | | |
| | dNTPs 混合液 II | 1.70 mL×1 支 | | |
| | DNA 聚合酶混合液 | 1.90 mL×1 支 | | |
| | 测序试剂槽 | 1 个 | | |
| 透明封口膜 | 2 张 | | | |



表 2-9: MGISEQ-2000RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS PE100) 货号: 1000013155

| 试剂盒信息 | 组分信息 | 规格及数量 | 储存温度 | 运输温度 |
|---|--------------------|-------------|-------------|---------|
| MGISEQ-2000RS 快速测序载片 货号: 1000011720 | 测序载片 | 1 张 | -25°C--15°C | -15°C以下 |
| MGISEQ-2000RS 高通量快速测序试剂盒 (FCS PE100) 货号: 1000013151 | TE 缓冲液 | 300 μL×1 支 | -25°C--15°C | -15°C以下 |
| | DNB 制备缓冲液 | 100 μL×1 支 | | |
| | DNB 聚合酶混合液 I | 200 μL×1 支 | | |
| | DNB 聚合酶混合液 II (LC) | 25 μL×1 支 | | |
| | DNB 终止缓冲液 | 100 μL×1 支 | | |
| | DNB 加载缓冲液 I | 200 μL×1 支 | | |
| | DNB 加载缓冲液 II | 200 μL×1 支 | | |
| | 0.5mL 冻存管 | 1 支 | | |
| | dNTPs 混合液 | 1.50 mL×1 支 | | |
| | dNTPs 混合液 II | 1.50 mL×2 支 | | |
| | DNA 聚合酶混合液 | 3.10 mL×1 支 | | |
| | MDA 试剂 | 3.50 mL×1 支 | | |
| | MDA 聚合酶混合液 | 0.60 mL×1 支 | | |
| | 测序试剂槽 | 1 个 | | |
| 透明封口膜 | 2 张 | | | |

表 2-10: MGISEQ-2000RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS PE150) 货号: 1000011718

| 试剂盒信息 | 组分信息 | 规格及数量 | 储存温度 | 运输温度 |
|---|--------------------|-------------|-------------|---------|
| MGISEQ-2000RS 快速测序载片 货号: 1000011720 | 测序载片 | 1 张 | -25°C--15°C | -15°C以下 |
| MGISEQ-2000RS 高通量快速测序试剂盒 (FCS PE150) 货号: 1000013152 | TE 缓冲液 | 300 μL×1 支 | -25°C--15°C | -15°C以下 |
| | DNB 制备缓冲液 | 100 μL×1 支 | | |
| | DNB 聚合酶混合液 I | 200 μL×1 支 | | |
| | DNB 聚合酶混合液 II (LC) | 25 μL×1 支 | | |
| | DNB 终止缓冲液 | 100 μL×1 支 | | |
| | DNB 加载缓冲液 I | 200 μL×1 支 | | |
| | DNB 加载缓冲液 II | 200 μL×1 支 | | |
| | 0.5mL 冻存管 | 1 支 | | |
| | dNTPs 混合液 | 2.00 mL×1 支 | | |
| | dNTPs 混合液 II | 2.00 mL×2 支 | | |
| | DNA 聚合酶混合液 | 4.80 mL×1 支 | | |
| | MDA 试剂 | 3.50 mL×1 支 | | |
| | MDA 聚合酶混合液 | 0.60 mL×1 支 | | |
| | 测序试剂槽 | 1 个 | | |
| 透明封口膜 | 2 张 | | | |

表 2-11: CPAS 条形码引物 3 试剂盒 货号: 1000020834

| 产品类型 | 试剂盒信息 | 组分信息 | 规格及数量 | 储存运输温度 |
|-------------------------|------------------------------------|--|-------------|--|
| 仅提供用于双端测序方案的双barcode 测序 | CPAS 条形码引物 3 试剂盒 货号: 1000020834 | CPAS AD153 条形码引物 3 工作液 货号: 1000020833 | 3.50 mL×1 支 | 储存温度: -25°C~-15°C 运输温度: -15°C以下 |

2.2 自备耗材

表 2-12: 自备设备和耗材

| 物料名称 | 推荐品牌 | 供应商货号 |
|--------------------------|---------------|--------------|
| Qubit® 3.0 荧光定量仪 | Thermofisher | Q33216 |
| 迷你离心机 | 无 | 无 |
| 漩涡振荡器 | 无 | 无 |
| PCR 仪 | Bio-Rad | 无 |
| 移液器 | Eppendorf | 无 |
| 2-8°C冰箱 | 无 | 无 |
| -25°C~-15°C冰箱 | 无 | 无 |
| Qubit® ssDNA Assay Kit | Thermo Fisher | Q10212 |
| Power Dust remover (空气罐) | MATIN | M-6318 |
| 盒装灭菌吸头 | AXYGEN | 无 |
| 200μL 阔口吸头 | AXYGEN | T-205-WB-C |
| Qubit Assay Tubes | Thermo Fisher | Q32856 |
| 100% Tween-20 | BBI | A600560-0500 |
| 5M NaCl | SIGMA | S5150-4L |
| 2M NaOH | 阿拉丁 | S128511-1L |
| 0.2mL PCR 八连管 | AXYGEN | 无 |
| 1.5mL 离心管 | AXYGEN | MCT-150-C |
| 2.0 mL 冻存管 | SARSTEDT | 72.609.003 |
| 冰盒 | AXYGEN | 无 |
| 电动移液器 | Labnet | FASTPETTEV-2 |
| 一次性移液管 | CORNING | 无 |
| 5 mL 灭菌管 | SARSTEDT | 60.558.001 |
| 10 mL 灭菌管 | SARSTEDT | 60.551.001 |
| 15 mL 灭菌管 | SARSTEDT | 60.732.001 |
| 25 mL 灭菌管 | SARSTEDT | 60.9922.243 |

第三章 测序工作流程



DNB 制备：使用 DNB 制备试剂进行制备



准备新的载片：打开包装检查完整性



DNB 加载：将 DNB 加载到测序载片上



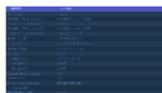
测序试剂槽准备：检查完整性、融化、试剂添加和混匀



载片放置：把载片转移到测序仪上



试剂槽放置：放入试剂槽



开始测序：按照测序指引填写测序信息并开始测序



测序：从控制软件界面可查看测序情况和进程



数据处理：测序完成后测序仪会自动进行 barcode 拆分（如有选择拆分 barcode）和 FASTQ 文件输出



仪器维护：当测序完成后进行仪器的维护

第四章 DNB的制备

4.1 文库插入片段大小要求

本试剂盒适用于华大智造提供的建库试剂盒所构建的文库或标准文库。文库片段长度要求：文库插入片段范围在 20-800 bp，同时主带集中在 ± 100 bp 以内，如建库试剂盒说明书有特殊要求，则以建库试剂盒说明书的片段要求为准。

表 4-1: 推荐插入片段长度

| 测序试剂盒* | 理想文库插入片段大小 (bp) | 产出数据量 (Gb/lane) ** |
|--------------------|-----------------|--------------------|
| FCL SE50 | 50-230 | 18.7-22.5 |
| FCL SE100 | 200-400 | 37.5-45.0 |
| FCL SE400 | 400-600 | 150.0-180.0 |
| FCL PE100 | 200-400 | 75.0-90.0 |
| FCL PE150 | 300-500 | 112.5-135.0 |
| FCL PE200 | 400-600 | 150-180.0 |
| FCL Small RNA SE50 | 20-60 | / |
| FCS SE100 | 200-400 | ~27.5 |
| FCS PE100 | 200-400 | ~55.0 |
| FCS PE150 | 300-500 | ~82.5 |

*: 具体试剂盒的选择需要考虑片段大小和所需数据量。

**：平均产出数据量仅为参考，不同文库和不同应用产出数据量都会有变化。

4.2 文库浓度及所需量的要求

参照其相应的文库制备说明书，以文库说明书的要求为准。对于一般文库，要求初始文库 ssDNA 浓度 ≥ 2 fmol/ μ L，每个 DNB 制备体系所需文库量为 40 fmol。对于 Small RNA 文库，要求初始文库 ssDNA 浓度 ≥ 3 fmol/ μ L，每个 DNB 制备体系所需文库量为 60 fmol。

如文库浓度未知，建议使用 Qubit® ssDNA Assay Kit 和 Qubit® Fluorometer 定量出文库实际浓度 (ng/ μ L)。然后根据下列公式换算成 (fmol/ μ L)：

$$C \text{ (fmol}/\mu\text{L)} = 3030 * C(\text{ng}/\mu\text{L}) / N$$

N 表示核苷酸平均数目（文库总片段长度，包括 adaptor 序列长度），C 表示文库浓度 ng/ μ L。

如建库试剂盒说明书有特殊要求，则以建库试剂盒说明书的文库要求为准。

4.3 DNB制备

4.3.1 准备DNB制备试剂

取出文库置于冰盒上备用。从测序试剂盒中取出 DNB 制备缓冲液、DNB 聚合酶混合液 I、TE 缓冲液和 DNB 终止缓冲液，置于冰盒上约 0.5 h，待融化后，使用涡涡振荡器震荡混匀 5s 后，短暂离心置于冰盒上备用。

① 注意：

不同批次试剂盒严禁混用。

4.3.2 DNB加载仪的选择

每张 MGISEQ-2000RS 测序载片含有 4 条 lane，每张 MGISEQ-2000RS 快速测序载片含有 2 条 lane。将 DNB 加载到测序载片上有三种选择：第一种为直接使用测序仪；第二种为采用 MGIDL-200RS 全自动样本加载系统；第三种为采用 MGIDL-200H 便携式加样器。

- 当使用测序仪加载 DNB 时，一张载片上的每条 lane 都必须是同一份 DNB，每条 lane 需要 50 μ L 的 DNB。
- 当使用 MGIDL-200RS 加载 DNB 时，一张载片上的每条 lane 都可以分别加载上不同的 DNB，每条 lane 需要 50 μ L 的 DNB。
- 当使用 MGIDL-200H 加载样品时，一张载片上的每条 lane 都可以分别加载上不同的 DNB，每条 lane 需要 25 μ L 的 DNB。

表 4-2: 每张 MGISEQ-2000RS 测序载片所需制备 DNB 反应体系数量

| 载片类型 | 加载仪器 | DNB 加载体积 ($\mu\text{L}/\text{Lane}$) | DNB 制备体 系 (μL) | 反应体系数 量/载片 |
|------|-------------|---|--------------------------------|---------------|
| FCL | 测序仪 | 50 | 100 | 2 |
| | MGIDL-200RS | 50 | 100 | 2-4 |
| | MGIDL-200H | 25 | 100 | 1-4 |
| FCS | 测序仪 | 50 | 100 | |
| | MGIDL-200RS | 50 | 100 | 1-2 |
| | MGIDL-200H | 25 | 100 | |

4.3.3 ssDNA文库所需量的计算:

根据 4.2 所测得的 ssDNA 文库的浓度及所需的文库 fmol 量, 计算每个 DNB 制备体系所需投入的 ssDNA 文库体积。

使用 100 μL 的 DNB 反应体系, ssDNA 的浓度为 C (fmol/ μL), 每个 DNB 制备体系所需的文库投入量为:

$$\text{ssDNA 文库量 } (\mu\text{L}) = 40 \text{ fmol} / C \text{ (fmol}/\mu\text{L})$$

注:

对于 Small RNA 文库, ssDNA 文库量 (μL) = 60 fmol / C (fmol/ μL)

如建库试剂盒说明书有特殊要求, 则以建库试剂盒说明书的文库要求为准。

计算每个 DNB 制备体系所需 ssDNA 文库投入量, 填入表 4-3 的 V 中。

① 注意:

所有样本均视为有潜在感染性的物品, 操作时需按国家相关标准执行。

4.3.4 制备DNB

- 取用 0.2 mL 八连管或 PCR 管, 在冰上按如下体系配制反应混合液

表 4-3: DNB 制备反应体系 1

| 组分 | 加入量 (μL) |
|-----------|----------|
| 文库 ssDNA | V |
| TE 缓冲液 | 20-V |
| DNB 制备缓冲液 | 20 |
| 总体积 | 40 |

- 将反应混合液用漩涡振荡器震荡混匀，迷你离心机离心 5 s，置于 PCR 仪中进行引物杂交，反应条件见下表：

表 4-4: DNB 制备反应引物杂交条件

| 温度 | 时间 |
|------------|-------|
| 热盖 (105°C) | On |
| 95°C | 1 min |
| 65°C | 1 min |
| 40°C | 1 min |
| 4°C | Hold |

- 取出 DNB 聚合酶混合液 II (LC) 置于冰盒上，短暂离心 5 s，置于冰盒上备用。
- ① **注意：**
请勿将 DNB 聚合酶混合液 II (LC) 置于室温，请勿长时间触碰管壁。
- 当 PCR 仪达到 4°C 后取出 PCR 管，迷你离心机离心 5 s 后，在冰上加入如下组分：

表 4-5: DNB 制备反应组分 2

| 组分 | 100 μL 体系加入量 (μL) |
|--------------------|-------------------|
| DNB 聚合酶混合液 I | 40 |
| DNB 聚合酶混合液 II (LC) | 4 |

- 反应混合液用漩涡振荡器震荡混匀，迷你离心机离心 5s，即刻置于 PCR 仪中，反应条件如

下:

表 4-6: DNB 制备滚环扩增条件

| 温度 | 时间 |
|-----------|--------|
| 热盖 (35°C) | On |
| 30°C | 25 min |
| 4°C | Hold |

注:

- ① 部分品牌 PCR 仪的热盖升降速度慢, 在热盖升降过程中, 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。
 - ② 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
- 当 PCR 仪温度达到 4°C 后立即加入 20 μL DNB 终止缓冲液。用阔口吸头缓慢地吹打混匀 5-8 次, 切勿震荡及剧烈吹打。
- ① **注意:**
DNB 一定要用阔口吸头缓慢吹打混匀, 切勿离心、震荡及剧烈吹打。DNB 可置于 4°C 保存备用 (48 小时内使用)。

4.4 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, 浓度 8 ng/ μL 以上为合格 DNB 浓度合格方可上机。浓度不合格可参考“10.1 DNB 浓度低”。如样品数量多时, 建议分批定量, 避免荧光猝灭导致 DNB 浓度定量不准确。如浓度超过 40 ng/ μL , 需要用 DNB 加载缓冲液 1 稀释至 20 ng/ μL 后使用。 DNB 可置于 4°C 保存备用 (48 小时内使用)。

第五章 载片准备

- 从 -25°C ~ -15°C 冰箱中取出载片, 将载片从包装彩盒中取出, **此时不要拆开真空包装袋**, 将载片在室温环境下放置至少 60 min (不超过 24 h)。
- 使用前再打开载片真空包装袋, 开始 DNB 加载。

注:

- ① 如载片从冰箱取出并已于室温放置后不能在 24h 之内使用, 且真空包装袋完好无损时, 可以继续放回 -25°C ~ -15°C 保存, 但 -25°C ~ -15°C 与室温的环境切换不得超过 3 次。

- ② 真空包装袋打开后不能即刻使用，可于室温保存，并在 24h 之内使用，如超过 24 小时，不建议使用。



图 5-1: 撕开载片真空包装袋

- 取出载片，检查载片是否完整；



图 5-2: 检查载片完整性

第六章 DNB加载

取出 DNB 加载缓冲液 II，置于冰盒上约 0.5 h 待融化后，使用漩涡振荡器震荡混匀 5s 后，短暂离心后置于冰盒上备用。如发现 DNB 加载缓冲液 II 中有结晶，使用漩涡振荡器持续剧烈振荡约 1-2 分钟至沉淀重新溶解，短暂离心后方可使用。

6.1 测序仪加载DNB

- 取出 0.5 mL 冻存管，按下表所示配制 DNB 加载体系：

表 6-1: DNB 加载体系 1 (使用测序仪加载)

| 组分 | FCL 加入量 (μL) | FCS 加入量 (μL) |
|--------------------|--------------|--------------|
| DNB 加载缓冲液 II | 64 | 32 |
| DNB 聚合酶混合液 II (LC) | 2 | 1 |
| DNB | 200 | 100 |
| 总体积 | 266 | 133 |

- DNB 加载体系用阔口吸头缓慢混匀 5-8 次。切勿离心、震荡及剧烈吹打。混匀后放置 4°C 备用。

注:

- ① 每张测序载片 (FCL) 需要 266 μL DNB 加载体系, 每张快速测序载片 (FCS) 需要 133 μL DNB 加载体系。
- ② 该 DNB 加载体系要现配现用

6.2 MGIDL-200RS 加载 DNB

- 取出新的八连管, 按下表所示配制 DNB 加载体系:

表 6-2: DNB 加载体系 2 (使用 MGIDL-200RS 加载)

| 组分 | FCL 加入量 (μL) | FCS 加入量 (μL) |
|--------------------|--------------|--------------|
| DNB 加载缓冲液 II | 16 | 16 |
| DNB 聚合酶混合液 II (LC) | 0.5 | 0.5 |
| DNB | 50 | 50 |
| 总体积 | 66.5 | 66.5 |

- DNB 加载体系用阔口吸头缓慢混匀 5-8 次。切勿离心、震荡及剧烈吹打。
- 详细操作请参考《MGIDL-200RS 全自动样本加载系统产品说明书》。

注:

- ① 每条 lane 需要至少 66.5 μL DNB 加载体系;
- ② 加载前需按照全自动样本加载系统 MGIDL-200RS 产品说明书进行清洗操作;
- ③ 把混匀后的 DNB 样品放置在 MGIDL-200RS 指定位置 (见图 6-1);
- ④ 按下载片吸附按钮, 握住测序载片两侧, 将载片上的定位孔对准平台上的定位柱, 将载片边

框左右两边同时按下，使载片吸附在平台上；

- ⑤ 在下拉列表中选择所需的装载方案，开始加载 DNB；
- ⑥ 载片加载完成后，取下载片，放置在 PE 手套或塑料密封袋中，室温放置 30 min，即刻转移到测序仪上使用。



图 6-1: 加载样品的放置

6.3 MGIDL-200H加载DNB

- 取出新的八连管，按下表所示配制 DNB 加载体系：

表 6-3: DNB 加载体系 3 (使用 MGIDL-200H 加载)

| 组分 | FCL 加入量 (μL) | FCS 加入量 (μL) |
|--------------------|--------------|--------------|
| DNB 加载缓冲液 II | 8 | 8 |
| DNB 聚合酶混合液 II (LC) | 0.25 | 0.25 |
| DNB | 25.00 | 25.00 |
| 总体积 | 33.25 | 33.25 |

- DNB 加载体系用阔口吸头缓慢混匀 5-8 次。切勿离心、震荡及剧烈吹打。
- 详细 DNB 加载操作请参考《MGIDL-200H 便携式加样器快速操作指南》。

注：

- ① 每条 lane 需要 30 μL DNB 加载体系；
- ② 加载前需按照《MGIDL-200H 便携式加样器快速操作指南》进行清洁操作；
- ③ 将密封垫放置在密封垫槽中，将载片放置在加样器中。用移液器吸取 30 μL 混匀后 DNB 样品，将扩口吸头插入流路入口中，不要按下移液器的控制按钮。按下移液器上的吸头脱卸按

钮，样本会自动流入芯片中；

- ④ 确保样本加载完成后，逆时针旋转拔出吸头。将加样器正面朝上，水平放置 30 分钟，即刻转移到测序仪上使用。

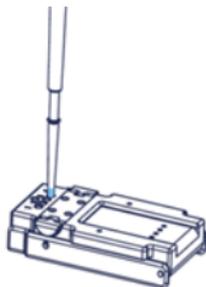


图 6-2：使用 MGIDL-200H 加载样品

① 注意：

在 DNB 加载过程中请勿移动载片，室温放置处理后的载片要即刻使用。

第七章 准备测序试剂槽

- 取出测序试剂槽（若是进行 PE200 的测序，则还需取出补充装试剂）于常温水浴解冻 3-4 h 后（或者提前一天将其置于 2-8°C 冰箱解冻备用），置于 2-8°C 冰箱备用，此时可以同步将载片从 -25--15°C 冰箱取出放置于常温备用。使用前颠倒混匀试剂槽 3 次，然后将试剂槽置于正前方，前后左右剧烈晃动 10-20 次，直至试剂中无肉眼可见的分层，尤其是 9 号试剂和 10 号试剂。

注：

- ① 如 10 号孔中发现墨绿色结晶，是该孔位试剂原料析出现象，属于正常现象。待试剂融化，混匀溶解结晶后即可正常使用，不会影响测序质量。详细内容见本说明书“10.8 测序试剂槽 10 号孔中出现墨绿色结晶”。
 - ② 载片从 -25--15°C 取出后需要在室温放置至少 60 min（不超过 24 h）才可进行 DNB 加载。
- 使用无尘纸擦净盖板及孔位处的冷凝水；试剂槽的孔位示意图如图 7-1 所示：

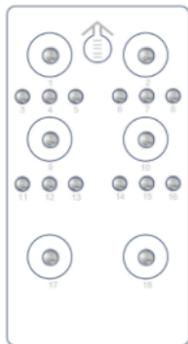


图 7-1: 试剂槽孔位示意图

- 提前 1h 取出 dNTPs 混合液 和 dNTPs 混合液 II，室温融化后置于冰上或 4℃ 备用；加样前需使用漩涡振荡器震荡混匀 5s，短暂离心后再使用。
- 使用前取出 DNA 聚合酶混合液，置于冰上或 4℃ 备用；加样前需颠倒混匀 4-6 次。

7.1 FCL SE50/FCL SE100/FCS SE100 测序试剂槽的准备

- 使用洁净的 1 mL 枪头在 1 号和 2 号（如图 7-1）孔中间位置轻轻戳出一个直径约 2 cm 的加样孔位（如图 7-2）：

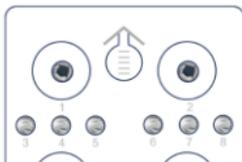


图 7-2: FCL SE50/FCL SE100/FCS SE100 试剂槽加样孔开孔

- 取对应量程的移液器，按照下表体积，先将 dNTPs 混合液加入新的 5 mL 灭菌管内，后将 DNA 聚合酶混合液加入管内的 dNTPs 混合液中，轻轻颠倒混匀 4-6 次，再将混合液全部加到 1 号孔中：

注意：转移混合液时，小心操作，防止混合液从试剂管中溢出。

表 7-1: FCL SE50/FCL SE100/FCS SE100 测序试剂槽 1 号孔试剂加样表

| 测序试剂盒读长 | dNTPs 混合液加样体积 mL | DNA 聚合酶混合液加样体积 mL |
|-----------|------------------|-------------------|
| FCL SE50 | 0.700 | 0.700 |
| FCL SE100 | 1.100 | 1.100 |
| FCS SE100 | 0.800 | 0.800 |

- 取对应量程的移液器，按照下表体积，先将 dNTPs 混合液 II 加入新的 5 mL 灭菌管内，后将 DNA 聚合酶混合液加入管内的 dNTPs 混合液 II 中，轻轻颠倒混匀 4-6 次，再将混合液全部加到 2 号孔中：

注意：转移混合液时，小心操作，防止混合液从试剂管中溢出。

表 7-2: FCL SE50/FCL SE100 /FCS SE100 测序试剂槽 2 号孔试剂加样表

| 测序试剂盒读长 | dNTPs 混合液 II 加样体积 mL | DNA 聚合酶混合液加样体积 mL |
|-----------|----------------------|-------------------|
| FCL SE50 | 0.600 | 0.600 |
| FCL SE100 | 0.900 | 0.900 |
| FCS SE100 | 1.600 | 0.800 |

- 使用配套的透明封口膜将 1 号和 2 号加样孔封住（如图 7-3），贴封口膜时使用大拇指旋转按压圆盖子处的封口膜，确保贴牢固无气泡（如图 7-4），保证试剂槽内的试剂不会从加样孔溢出：



图 7-3: FCL SE50/FCL SE100/FCS SE100 试剂槽加样孔封膜

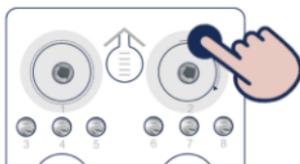


图 7-4: FCL SE50/FCL SE100/FCS SE100 贴紧封口膜

- 试剂槽水平放置在桌面上，双手握住两侧（如图 7-5），顺时针摇晃 10-20 次，再逆时针摇晃 10-20 次，期间要确保肉眼可见旋涡，直至 1 号试剂上下层试剂中颜色均匀一致，以保证试剂的充分混匀。

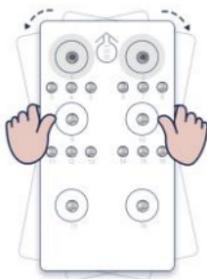


图 7-5: 试剂槽加样后混匀

- 试剂槽混匀后，撕掉 1 号和 2 号孔位的封口膜弃用（如图 7-6），撕下的封口膜严禁重复使用。注意 1 号和 2 号孔的试剂不要交叉污染。此时 FCL SE50 或 FCL SE100 或 FCS SE100 测序试剂槽的上机前的准备工作完成。



图 7-6: FCL SE50/FCL SE100 /FCS SE100 试剂槽混匀撕掉封口膜

7.2 FCL PE100/FCL PE150/FCS PE100/FCS PE150测序试剂槽的准备

- 使用洁净的 1 mL 枪头在 1 号和 2 号 (如图 7-1) 孔中间位置轻轻戳出一个直径约 2 cm 的加样孔位 (如图 7-7):

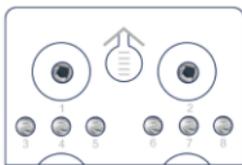


图 7-7: FCL PE100/FCL PE150/FCS PE100/FCS PE150 试剂槽加样孔开孔

- 取对应量程的移液器, 按照下表体积, 先将 dNTPs 混合液加入新的 5 mL 灭菌管内, 后将 DNA 聚合酶混合液加入管内的 dNTPs 混合液中, 轻轻颠倒混匀 4-6 次, 将混合液全部加到 1 号孔中:

注意: 转移混合液时, 小心操作, 防止混合液从试剂管中溢出。

表 7-3: FCL PE100/FCL PE150/FCS PE100/FCS PE150 测序试剂槽 1 号试剂加样表

| 测序试剂盒读长 | dNTPs 混合液加样体积 mL | DNA 聚合酶混合液加样体积 mL |
|-----------|------------------|-------------------|
| FCL PE100 | 1.800 | 1.800 |
| FCL PE150 | 2.400 | 2.400 |
| FCS PE100 | 1.400 | 1.400 |
| FCS PE150 | 1.900 | 1.900 |

- 取对应量程的移液器, 按照下表体积, 先将 dNTPs 混合液 II 加入新的 15 mL 灭菌管内, 后将 DNA 聚合酶混合液加入管内的 dNTPs 混合液 II 中, 轻轻颠倒混匀 4-6 次, 将混合液全部加到 2 号孔中:

注意: 转移混合液时, 小心操作, 防止混合液从试剂管中溢出。

表 7-4: FCL PE100/FCL PE150/FCS PE100/FCS PE150 测序试剂槽 2 号孔试剂加样表

| 测序试剂盒读长 | dNTPs 混合液 II 加样体积 mL | DNA 聚合酶混合液加样体积 mL |
|-----------|----------------------|-------------------|
| FCL PE100 | 1.500 | 1.500 |
| FCL PE150 | 2.100 | 2.100 |
| FCS PE100 | 2.800 | 1.400 |
| FCS PE150 | 3.800 | 1.900 |

- 使用配套的透明封口膜将 1 号和 2 号加样孔封住 (如图 7-8), 贴封口膜时使用大拇指旋转按压圆盖子处的封口膜, 确保贴牢固无气泡 (如图 7-9), 保证试剂槽内的试剂不会从加样孔溢出:



图 7-8: FCL P100/FCL PE150/FCS PE100/FCS PE150 试剂槽加样孔封膜

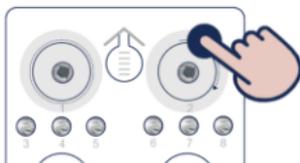


图 7-9: FCL P100/FCL PE150/FCS PE100/FCS PE150 贴紧封口膜

- 试剂槽水平放置在桌面上, 双手握住两侧 (如图 7-5), 顺时针摇晃 10-20 次, 再逆时针摇晃 10-20 次, 期间要确保肉眼可见旋涡, 直至 1 号试剂上下层试剂中颜色均匀一致, 以保证试剂的充分混匀。
- 使用枪头戳破 15 号孔的封口膜。用 1 mL 移液器移取 500 μ L MDA 聚合酶混合液加入到 MDA 试剂的试剂管中。颠倒混匀 4-6 次, 使其充分混匀, 再将混匀液加入 15 号孔中, 加入时确保

管底部无气泡。

➤ **注意：**

- ① 使用 MDA 聚合酶混合液时，请勿触摸试剂所在管壁，以免影响酶活。
- ② 转移混匀液时，小心操作，防止混匀液从试剂管中溢出。

- 撕掉 1 号和 2 号孔位的封口膜弃用（如图 7-10），撕下的封口膜严禁重复使用。注意 1 号和 2 号孔的试剂不要交叉污染。此时 FCL PE100 或 FCL PE150 或 FCS PE100 或 FCS PE150 测序试剂槽的上机前的准备工作完成。



图 7-10：试剂槽混匀撕掉封口膜

7.3 FCL PE200 测序试剂槽的准备

- 使用洁净的 1 mL 枪头在 1 号和 2 号，9 号，17 号和 18 号（如图 7-11）中间位置轻轻戳出一个直径约 2 cm 的加样孔位（如图 7-11）：

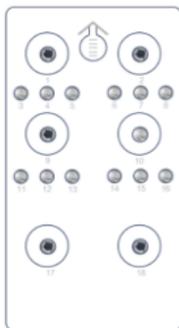


图 7-11：FCL PE200 试剂槽加样孔开孔

- 取对应量程的移液器，按照下表体积，先将 dNTPs 混合液加入新的 10 mL 灭菌管内，后将 DNA 聚合酶混合液加入管内的 dNTPs 混合液中，轻轻颠倒混匀 4-6 次，将混合液全部加到 1 号孔中：

注意：转移混合液时，小心操作，防止混合液从试剂管中溢出。

表 7-5: FCL PE200 测序试剂槽 1 号孔试剂加样表

| 测序试剂盒读长 | dNTPs 混合液加样体积 mL | DNA 聚合酶混合液加样体积 mL |
|-----------|------------------|-------------------|
| FCL PE200 | 3.100 | 3.100 |

- 取对应量程的移液器，按照下表体积，先将 dNTPs 混合液 II 加入新的 15 mL 灭菌管内，后将 DNA 聚合酶混合液加入管内的 dNTPs 混合液 II 中，轻轻颠倒混匀 4-6 次，将混合液全部加到 2 号孔中：

注意：转移混合液时，小心操作，防止混合液从试剂管中溢出。

表 7-6: FCL PE200 测序试剂槽 2 号孔试剂加样表

| 测序试剂盒读长 | dNTPs 混合液 II 加样体积 mL | DNA 聚合酶混合液加样体积 mL |
|-----------|----------------------|-------------------|
| FCL PE200 | 8.100 | 2.700 |

- 上下颠倒混匀补充装试剂，取对应量程的移液器，按照下表量取试剂加入对应孔位中：

表 7-7: FCL PE200 补充装试剂加样表

| 测序试剂盒读长 | 加样孔位 | 补充试剂全称 | 加样体积 mL |
|-----------|------|------------------|---------|
| FCL PE200 | 17 | CPAS 洗脱试剂 1 V2.0 | 200.0 |
| | 18 | CPAS 洗脱试剂 2 | 200.0 |
| | 9 | CPAS 再生试剂 | 200.0 |

① **注意：**

- ① **补充试剂加样顺序请严格按照表格顺序进行；**

② 每添加一种补充试剂后，请及时更换新的手套，再添加下一种。

- 使用配套的透明封口膜将1号，2号，9号，17号和18号加样孔封住（如图7-12），贴封口膜时使用大拇指旋转按压圆盖子处的封口膜，确保贴牢固无气泡（如图7-13），保证试剂槽内的试剂不会从加样孔溢出：

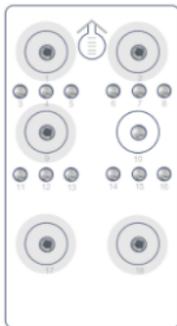


图 7-12: FCL PE200 试剂槽加样孔贴膜

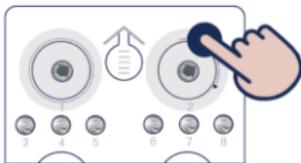


图 7-13: FCL P200 贴紧封口膜

- 试剂槽水平放置在桌面上，双手握住两侧（如图7-5），顺时针摇晃10-20次，再逆时针摇晃10-20次，期间要确保肉眼可见旋涡，直至1号试剂上下层试剂中颜色均匀一致，以保证试剂的充分混匀。
- 使用枪头戳破15号孔的封口膜。用1mL移液器移取500μL MDA聚合酶混合液加入到MDA试剂的试剂管中。颠倒混匀4-6次，使其充分混匀，再将混匀液加入15号孔中，加入时确保管底部无气泡。

① 注意：

② 使用 MDA 聚合酶混合液时，请勿触摸试剂所在管壁，以免影响酶活。

② 转移混匀液时，小心操作，防止混匀液从试剂管中溢出。

- 试剂槽混匀后，撕掉1号、2号、9号、17号和18号孔位的封口膜弃用（如图 7-14），撕下的封口膜严禁重复使用。注意1号、2号、9号、17号和18号孔的试剂不要交叉污染。此时 FCL PE200 测序试剂槽的上机前的准备工作完成。



图 7-14：试剂槽混匀撕掉封口膜

7.4 FCL SE50 (Small RNA) /FCL SE400测序试剂槽的准备

- 取出 Small RNA 测序洗脱试剂或测序洗脱试剂，室温融化后置于冰上或 4℃ 备用。
- 使用洁净的 1 mL 枪头在 1 号和 2 号孔中间位置轻轻戳出一个直径约 2 cm 的加样孔位（如图 7-15）：



图 7-15：FCL SE50/FCL SE400 试剂槽加样孔开孔

- 取对应量程的移液器，按照下表体积，先将 dNTPs 混合液加入新的 5 mL 或 15mL 灭菌管内，后将 DNA 聚合酶混合液加入管内的 dNTPs 混合液中，轻轻颠倒混匀 4-6 次，将混合液全部加到 1 号孔中：

注意：转移混合液时，小心操作，防止混合液从试剂管中溢出。

表 7-8: FCL SE50/FCL SE400 测序试剂槽 1 号孔试剂加样表

| 测序试剂盒读长 | dNTPs 混合液加样体积 mL | DNA 聚合酶混合液加样体积 mL |
|-----------|------------------|-------------------|
| FCL SE50 | 0.700 | 0.700 |
| FCL SE400 | 4.000 | 4.000 |

- 取对应量程的移液器，按照下表体积，先将 dNTPs 混合液 II 加入新的 5 mL 或 50mL 灭菌管内，后将 DNA 聚合酶混合液加入管内的 dNTPs 混合液 II 中，轻轻颠倒混匀 4-6 次，将混合液全部加到 2 号孔中：

注意：转移混合液时，小心操作，防止混合液从试剂管中溢出。

表 7-9: FCL SE50/FCL SE400 测序试剂槽 2 号孔试剂加样表

| 测序试剂盒读长 | dNTPs 混合液 II 加样体积 mL | DNA 聚合酶混合液加样体积 mL |
|-----------|----------------------|-------------------|
| FCL SE50 | 0.600 | 0.600 |
| FCL SE400 | 12.00 | 4.000 |

- 使用配套的透明封口膜将 1 号和 2 号加样孔封住 (如图 7-16)，贴封口膜时使用大拇指旋转按压圆盖子处的封口膜，确保贴牢固无气泡 (如图 7-17)，保证试剂槽内的试剂不会从加样孔溢出：



图 7-16: FCL SE50/FCL SE400 试剂槽加样孔封膜



图 7-17: FCL SE50/FCL SE400 贴紧封口膜

- 试剂槽水平放置在桌面上，双手握住两侧（如图 7-5），顺时针摇晃 10-20 次，再逆时针摇晃 10-20 次，期间要确保肉眼可见旋涡，直至 1 号试剂上下层试剂中颜色均匀一致，以保证试剂的充分混匀。
- 如是 FCL SE50（Small RNA）：取出 Small RNA 测序洗脱试剂（Wash Buffer For Small RNA Sequencing）并旋涡震荡 5 s，使其充分混匀。使用枪头戳破 7 号孔，把混匀后的 Small RNA 测序洗脱试剂（Wash Buffer For Small RNA Sequencing）4.5 mL 加入到 7 号孔位中，确保孔位底部无气泡，
如是 FCL SE400：取出测序洗脱试剂（Wash Buffer for Sequencing）并旋涡震荡 5 s，使其充分混匀。使用枪头戳破 7 号孔，把混匀后的测序洗脱试剂（Wash Buffer for Sequencing）2.70 mL 加入到 7 号孔位中，确保孔位底部无气泡，
- 撕掉 1 号和 2 号孔位的封口膜弃用（如图 7-18），撕下的封口膜严禁重复使用。注意 1 号和 2 号孔的试剂不要交叉污染。此时测序试剂槽的上机前的准备工作完成。



图 7-18 试剂槽混匀撕掉封口膜

注意：

Small RNA 测序洗脱试剂和测序洗脱试剂中包含高浓度甲酰胺，是一种可能具有生殖毒性、致癌性及特异性靶器官系统毒性的化学品。使用时注意避免吸入蒸汽，并戴防护手套/穿防护

服/戴防护眼罩/戴防护面具。使用后的试剂请按照当地和国家法规进行废弃处理。

7.5 双barcode测序

如进行双 barcode 测序，完成 PE 测序试剂槽的准备后还需执行以下操作：

- 取出 CPAS 条形码引物 3 试剂盒中的 CPAS AD153 条形码引物 3 工作液（仅提供用于双端测序方案的双 barcode 测序）室温融化并旋涡震荡 5 s，使其充分混匀；
- 使用枪头戳破 4 号孔封口膜；把混匀后的 CPAS AD153 条形码引物 3 工作液，取 2.90mL 加入到 4 号孔位中，确保孔位底部无气泡；

第八章 开始测序

8.1 进入程序

- 输入用户名“user”密码“123”，点击“登录”进入主界面：



图 8-1：登录界面

- 界面如下：



图 8-2: 主界面

8.2 放置样品

- 点击界面上的“测序”选项，进入如下界面：

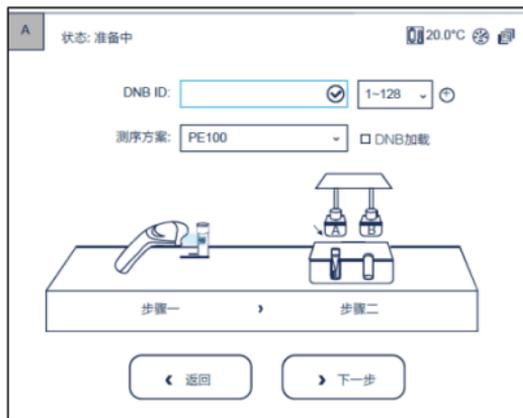


图 8-3: 样品输入界面

- 点击“DNB ID”后面的⊕将 4 条 lane 或 2 条 lane 信息显示出来；
注：FCL 需要选择 4 条 lane，FCS 需要选择 2 条 lane。

| | | | |
|---------|---|------------------------------|----------------------------------|
| DNB ID: | WGS <input checked="" type="checkbox"/> | 1~128 <input type="text"/> | <input type="button" value="⊕"/> |
| | RNA <input checked="" type="checkbox"/> | 501~596 <input type="text"/> | <input type="button" value="⊖"/> |
| | WGS <input checked="" type="checkbox"/> | 1~128 <input type="text"/> | <input type="button" value="⊖"/> |
| | RNA <input checked="" type="checkbox"/> | 501~596 <input type="text"/> | <input type="button" value="⊖"/> |

图 8-4: 样品及信息选择界面

- 将光标移至“DNB ID”后面的待写区，输入文库名称或编号；
 - 拉动⊕前面的下拉菜单，选择不同 lane 的 barcode 序列；
 - 如需使用测序仪加载样品，打开冰箱舱门，一只手轻轻抬起试剂针，另一只手取出清洗试剂管，然后放入要加载的样品，并缓慢放下试剂针；
- 注：如使用测序仪加载 DNB，则进行此步骤，如否，忽略此步骤。

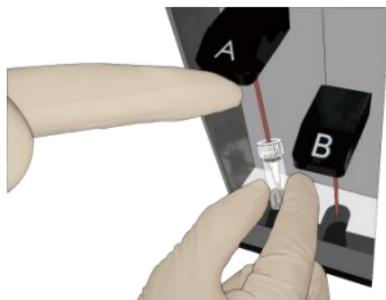


图 8-5: 放置加载样品

- 关闭冰箱舱门。

8.3 测序参数配置

- 在“测序方案”下拉菜单中选择需要的程序，有一键测序程序（PE150、SE50 等），和用户自定义（Customize）

注：

测序程序“SE50_sR”为 Small RNA 测序程序。

如进行双 barcode 测序，需选择程序“Customize”。

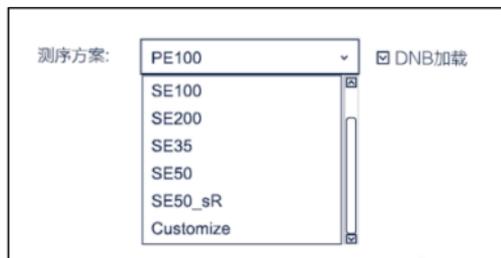


图 8-6： 测序方案的选择

- 当用户选择一键测序时，如果在测序仪上加载 DNB，则勾选“DNB 加载”（如图 8-6），否则不勾选，然后下一步操作可直接进入 8.4；如果选择 Customize 则继续进行以下步骤：
- 在开始阶段，请选择测序开始的位置：



图 8-7： 选择测序开始位置

- 选择读长，如 PE100，则一链读长输入 100，二链读长输入 100；

| | | |
|-------|-----|-------------------------------------|
| 一链读长: | 100 | <input checked="" type="checkbox"/> |
| 二链读长: | 100 | <input checked="" type="checkbox"/> |

图 8-8: 读长选择

- 选择标签长度, 如果是单 barcode 测序, 仅需要填写下图中的 Barcode 长度, 如果是双 barcode 测序, Barcode 及 Dual barcode 长度均要填写;

| | | |
|---------------|----|-------------------------------------|
| Barcode: | 10 | ▼ |
| Dual barcode: | 10 | <input checked="" type="checkbox"/> |

图 8-9: 标签读长选择

- 选择是否需要拆分 barcode, 需要拆分的进行勾选;

| | | | | |
|------------|---|---|---|---|
| 拆分Barcode: | <input checked="" type="checkbox"/> Lane1 | <input checked="" type="checkbox"/> Lane2 | <input checked="" type="checkbox"/> Lane3 | <input checked="" type="checkbox"/> Lane4 |
|------------|---|---|---|---|

图 8-10: 不同 lane 选择拆分

- 选择暗反应, 可分别在一链和二链的任意位置设置, 如无需进行暗反应, 则不要填写下表。
暗反应: 只进行化学反应, 不进行光学信息采集的过程

| | | | | | | |
|--------|--------------------------------|-------------------------------------|---|--------------------------------|-------------------------------------|----|
| 一链暗反应: | <input type="text" value="2"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | - | <input type="text" value="5"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | 读长 |
| 二链暗反应: | <input type="text" value="3"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | - | <input type="text" value="8"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | 读长 |

图 8-11: 暗反应的选择

- 点击“确认”

8.4 放置试剂槽

- 将光标放置在“试剂槽 ID”待写区，使用条码扫描枪扫描试剂槽条码录入试剂槽信息；也可进行手动输入；

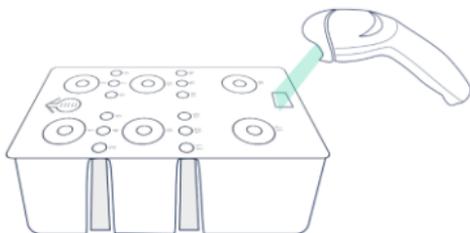


图 8-12: 试剂槽信息录入界面

- 打开冰箱舱门，一只手拉动清洗试剂 1 的拉环使其部分移出冰箱，同时另一只手托住清洗试剂盒 1 的底部，缓慢取出；

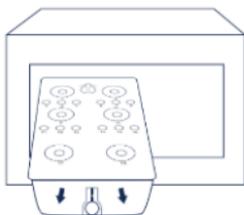


图 8-13: 取出清洗试剂盒

- 用实验室级用水润湿无尘纸或无尘布，并用其擦拭冰箱底部及侧面，保持清洁干燥；



图 8-14: 维护冰箱

- 一只手扶住试剂槽侧面，另一只手托住试剂盒底部，按照试剂盒盖板指示方向，把准备好的试剂槽轻轻推进冰箱，直到推到底部并确认试剂槽完全放入；关闭冰箱舱门；

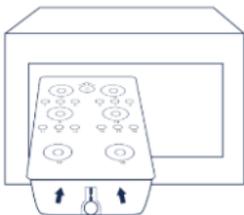


图 8-15: 试剂槽放入示意图

8.5 放置载片

- 打开载片舱门，一手压住水洗载片两侧，另一手按下载片吸附按钮，待真空释放后，将水洗

载片从平台上取出；

- 用空气罐吹净载片平台和载片背面的灰尘，如平台表面有可见结晶，需要用润湿的无尘纸轻轻擦拭，确保载片可以牢固吸附；

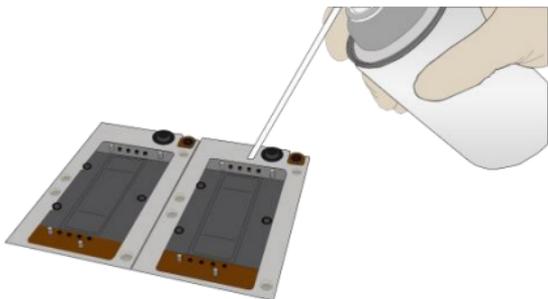


图 8-16: 清洁载片平台

- 取出新的载片，两孔位置在左侧，一孔位置在右侧，标签位置靠右，双手握住载片两端；

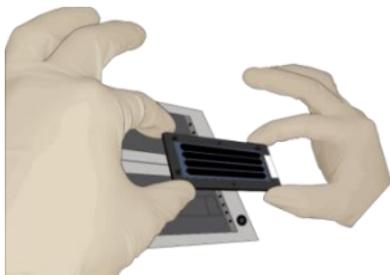


图 8-17: 载片放置

- 载片孔位对应定位柱放置，同时向左上角 45° (在 MGIDL-200RS 上安装载片时，向右上角 45°) 轻轻推动，保持载片空位内壁与定位柱贴合，按下载片吸附按钮，将载片边框左右两边同时按下，使载片吸附在平台上。检查负压在正常范围内 (-80 - -99 kPa) 方可继续，如负

压出现异常，请参考本说明书“10.2 负压异常”进行处理。

① **注意：**

载片易碎，操作过程请控制力度。

- 用空气罐吹净载片表面的灰尘，关闭载片舱门；

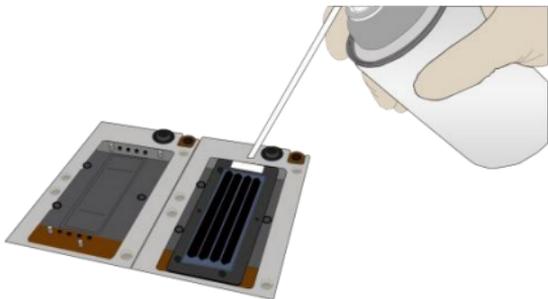


图 8-18：载片清洁

- 点击“下一步”，仪器会自动录入载片 ID；如果不能正常自动录入，则把光标移至“载片 ID”后面的待写区域，进行手动输入：

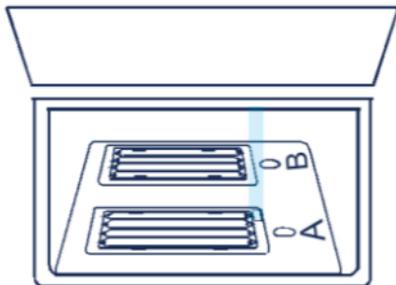


图 8-19：载片信息录入

- 点击“下一步”。

8.6 复核信息

对填写的各项信息进行复核，确保准确无误。

| 项目 | 内容 |
|--------------|---------------|
| 登录用户 | user |
| DNB ID Lane1 | WGS 1-128 |
| DNB ID Lane2 | RNA 501-596 |
| DNB ID Lane3 | WGS 1-128 |
| DNB ID Lane4 | RNA 501-596 |
| 试剂槽ID | AA000012 |
| 载片ID | V300001234 |
| 测序方案 | Customize |
| 开始阶段 | DNB加载 |
| 读长 | 222 |
| 一链读长 | 100 |
| 二链读长 | 100 |
| Dual Barcode | 10 |
| Barcode | 10 |
| 拆分barcode | 是 是 是 是 |
| 一链暗反应 | 2 - 5 |
| 二链暗反应 | 3 - 8 |

图 8-20: 信息核对

注:

为保证测序质量，在完成一链和二链的测序后，测序仪都会自动多测一个循环用于校正。例如，对于 PE100 的双 barcode 测序方案，一链读长为 100，二链读长为 100，barcode 读长为 10，dual barcode 读长为 10，一链校正循环为 1，二链校正循环为 1，barcode 部分不需要做校正，所以总测序读长为 222。

8.7 开始测序

- 各项信息确认无误后，点击“开始”

- 系统再次确认“是否要测序”，点击“是”开始测序



图 8-21: 确认测序界面

- 开始测序后，立即打开载片舱门，确保样品（或试剂）顺利进入载片后，关闭载片舱门；

第九章 清洗维护

9.1 清洗的术语和定义

表 9-1: 清洗方案

| 清洗方案 | 描述 | 所需时间 |
|--------|--|-----------|
| 全套清洗维护 | 首先进行一次深度清洗，其次进行一次常规清洗 | 约 125 min |
| 深度清洗 | 目的是清洗管道中残留试剂和蛋白等，降低管道阻塞的风险，依次使用清洗试剂槽 4→清洗试剂槽 3→清洗试剂槽 2 | 约 75 min |
| 常规清洗 | 目的是清洗管道中残留的试剂，降低试剂污染的风险，使用清洗试剂槽 1，同时对试剂管路进行排空 | 约 50 min |

9.2 清洗规则

- 当出现以下界面时，可进行清洗：



图 9-1: 清洗开始标志界面

- 测序完成后，需要在 24 小时内进行清洗维护；
- 当使用测序仪加载样品，或进行 PE 测序后，需要进行全套清洗维护；其他情况执行常规清洗；
- 全套清洗维护完成后，超过 12 小时未进行上机，则需在上机前再次进行常规清洗；
- 经过工程师检修后，需要进行常规清洗；
- 如更换管路、试剂针等与试剂进行接触的配件，使用前需进行全套清洗维护；
- 如需进行 7 天以上的断电处理，在断电前后均需进行深度清洗；
- 开机状态下，仪器超过 7 天以上未进行使用，在使用前需进行全套清洗维护；
- 一旦发现载片出现明显杂质，并排除其他因素后，需进行全套清洗维护。

9.3 清洗试剂准备

- 按照如下体积配制 0.05% Tween-20 (4°C 存放，有效期 28 天)

表 9-2: 清洗试剂准备 (1)

| 试剂 | 用量 |
|---------------|----------|
| 100% Tween-20 | 0.5 mL |
| 实验室级用水 | 999.5 mL |

- 按照如下体积配制 1M NaCl + 0.05% Tween-20 (4°C存放, 有效期 28 天)

注:

粉末配制的试剂, 需使用 0.22μm 过滤膜过滤后使用

表 9-3: 清洗试剂准备 (2)

| 试剂 | 用量 |
|---------------|----------|
| 5M NaCl 溶液 | 200 mL |
| 100% Tween-20 | 0.5 mL |
| 实验室级用水 | 799.5 mL |

- 按照如下体积配制 0.1M NaOH (4°C存放, 有效期 28 天)

表 9-4: 清洗试剂准备 (3)

| 试剂 | 用量 |
|------------|--------|
| 2M NaOH 溶液 | 50 mL |
| 实验室级用水 | 950 mL |

9.4 清洗试剂盒

- 全套清洗维护使用的空试剂盒和清洗载片随仪器配套;
- 用于清洗的试剂槽每次使用前必须进行清洁, 并重新灌装清洗试剂, 持续使用 20 次后或每半年请更换新的清洗试剂槽;
- 清洗载片可使用下机的废旧载片, 每张可循环使用 20 次全套清洗维护;
- 清洗试剂槽 1: 取干净的试剂槽及 2.0 mL 冻存管 (用于清洗 DNB 加载管道), 所有孔位灌装 90%以上体积的实验室级用水, 标记为清洗试剂槽 1;
- 清洗试剂槽 2: 取干净的试剂槽及 2.0 mL 冻存管, 所有孔位灌装 90%以上体积的实验室级用水, 标记为清洗试剂槽 2;
- 清洗试剂槽 3: 取干净的试剂槽及 2.0 mL 冻存管, 大孔位灌装 50 mL 0.1M NaOH, 小孔位灌

装 6 mL 0.1M NaOH, 2.0 mL 冻存管灌装 1800 μ L 0.1M NaOH, 标记为清洗试剂槽 3;

- 清洗试剂槽 4: 取干净的试剂槽及 2.0 mL 冻存管, 大孔位灌装 50 mL 0.05% Tween-20 溶液, 15 号孔位灌装 6 mL 1M NaCl + 0.05% Tween-20 溶液, 2.0mL 冻存管灌装 1800 μ L 1M NaCl + 0.05% Tween-20 溶液, 其余孔位灌装 6 mL 0.05% Tween-20 溶液, 标记为清洗试剂槽 4。

注:

大孔位是: 第 1、2、9、10、17、18 号孔位。

小孔位是: 第 3、4、5、6、7、8、11、12、13、14、15、16 号孔位。

9.5 清洗流程

9.5.1 常规清洗

- 使用清洗试剂盒 1, 一只手握住试剂盒的把手, 另一只手托住试剂盒底部, 按照试剂盒盖板指示方向, 轻轻推进冰箱, 直到推到底部并确认试剂盒完全放入; 关闭冰箱舱门;
- 在界面点击清洗按钮;
- 放置水洗载片;
- 在下拉菜单中选择常规清洗, 开始常规清洗; 耗时约 50 min;
- 若是单独进行常规清洗, 需在此步骤观察清洗载片, 有明显过液气泡可继续进行清洗; 如未看到, 停止清洗, 重新安放载片并开始清洗; 若是在深度清洗后进行常规清洗, 可忽略此操作;

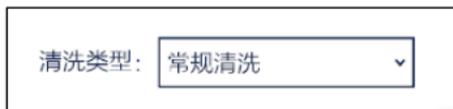


图 9-2: 清洗软件的选择

- 当显示界面如下时, 常规清洗结束;



图 9-3: 常规清洗结束界面

9.5.2 深度清洗

- 使用清洗试剂盒 4，一只手握住试剂盒的把手，另一只手托住试剂盒底部，按照试剂盒盖板指示方向，轻轻推进冰箱，直到推到底部并确认试剂盒完全放入；关闭冰箱舱门；
- 在界面点击清洗按钮；
- 放置水洗载片；
- 在下拉菜单中选择深度清洗，开始深度清洗；耗时约 25 min；
- 在此步骤观察清洗载片，有明显过液气泡可继续进行清洗；如未看到，停止清洗，重新安放载片并开始清洗；
- 当界面显示图 9-4 时，点击“是”，测序仪将自动进行抬针操作，待抬针完成方可打开试剂舱门更换清洗试剂盒；
- 使用清洗试剂盒 3，继续进行深度清洗；耗时约 25 min；



图 9-4：第一次深度清洗结束界面

- 当界面显示图 9-5 时，点击“是”，测序仪将自动进行抬针操作，待抬针完成方可打开试剂舱门更换清洗试剂盒；



图 9-5：第二次深度清洗结束界面

- 使用清洗试剂盒 2，继续进行深度清洗；耗时约 25 min；
- 当界面显示图 9-6 时，点击“否”结束深度清洗。



图 9-6: 结束深度清洗页面

9.5.3 全套清洗流程

进行一次深度清洗后，再进行一次常规清洗。耗时约 125 min。

第十章 异常处理

10.1 DNB浓度低

当 DNB 浓度低于 8 ng/ μ L 时，请进行如下操作排查问题：

- 检查所用试剂盒是否过期；
- 检查文库是否符合要求；
- 重新制备 DNB。可订购 DNBSEQ DNB 制备试剂盒（货号：1000016115）重新制备 DNB。如重新制备后仍不符合要求，请联系工程师。

10.2 负压异常

当负压数值显示为红色时，负压异常，请进行如下操作

- 使用润湿的无尘纸或无尘布轻轻擦拭平台表面，并用空气罐吹净平台，确保无可见尘埃；
- 使用空气罐吹净载片背面，确保无可见尘埃；
- 如以上方法仍无法解决异常负压，请联系工程师。

10.3 产生气泡

- 更换一张废旧水洗载片，检查泵液情况；

- 如仍有较多气泡，请联系工程师。

10.4 载片上出现杂质

- 请参考《MGIDL-200RS 全自动样本加载系统产品说明书》和本说明书中“9.5 清洗流程”对 MGIDL-200RS 和测序仪均进行全套清洗维护；
- 经过全套清洗维护后仍无改善，请联系工程师。

10.5 泵液失败

如果出现载片不过液，或是载片中出现大气泡的现象，请进行如下操作：

- MGIDL-200RS 和测序仪：取下载片，检查密封垫是否有杂质，用空气罐吹净，并按照本说明书“8.5 放置载片”的正确指导方式安装载片，重试；
- 检查试剂针是否正常下针；
- 如试剂针无法正常下针，重新启动测序软件；
- 重启后仍无法正常进行，请联系工程师。

10.6 试剂盒暂存

- 如试剂盒已经融化（包括 dNTPs），且不能按时使用，最多可再冻融一次；
- 如试剂盒已经融化（包括 dNTPs），且不能按时使用，可放在 4℃ 内暂存，并于 24 h 内使用，使用前需要按照“7 准备测序试剂槽”中的操作重新混匀试剂；
- 如 dNTPs 和酶已经加入试剂槽中，即试剂槽已经准备完毕，若不能及时使用，可放在 4℃ 内暂存，并于 24 h 内使用，使用前需要按照“7 准备测序试剂槽”中的操作重新混匀试剂槽；
- 如 dNTPs 和酶已经加入试剂槽中，即试剂槽已经准备完毕，且已经在仪器上下针，若不能及时使用，务必使用锡箔纸或保鲜膜密封，可放在 4℃ 内暂存，并于 24 h 内使用，使用前轻轻混匀试剂槽，混匀时务必小心试剂不可从下针孔位中溢出，以免各孔位试剂之间污染影响测序质量。

10.7 Post loading失败处理

- 如果 Post loading 失败，但已经执行了预载，需要重新从 Post loading 开始，则执行以下步骤；
- 按照本操作规程的“8.开始测序”部分，把载片重新进行安装；
- 执行“8.3 测序参数配置”时，需选择程序“Customize”；
- 点击图 10-1 中“Post loading”后面的“...”，展开操作项



图 10-1: 程序选择 1

- 如需从 Post loading 预载开始，则勾选“预载”，如已完成 prime 则不勾选；
- 其他步骤按照本操作规程的第 8 章节开始测序部分执行。

10.8 测序试剂槽10号孔中出现墨绿色结晶

- 10 号孔中出现墨绿色结晶（见图 10-2）是该孔位试剂原料析出现象，属于正常现象；
- 混匀溶解结晶后即可正常使用，不会影响测序质量。



图 10-2: 10 号孔墨绿色结晶

10.9 文库量不足40 fmol

当文库量不足 40 fmol 时（但不少于 24 fmol 时），可以尝试使用 60 μL 的 DNB 制备体系。需注意，使用 60 μL 的 DNB 制备体系可能会造成数据产量和质量不足预期的情况，当文库量足够时仍需使用 100 μL 的 DNB 制备体系。

➤ ssDNA 文库所需量的计算：

根据 4.2 所测得的 ssDNA 文库的浓度及所需的文库 fmol 量，计算每个 DNB 制备体系所需投入的 ssDNA 文库体积。

使用 60 μL 的 DNB 反应体系，ssDNA 的浓度为 C (fmol/ μL)，每个 DNB 制备体系所需的文库投入量为：

$$\text{ssDNA 文库量 } (\mu\text{L}) = 24 \text{ fmol} / C \text{ (fmol}/\mu\text{L})$$

计算每个 DNB 制备体系所需 ssDNA 文库投入量，填入表 10-1 的 V 中。

➤ 制备 DNB

取用 0.2 mL 八连管或 PCR 管，在冰上按如下体系配制反应混合液

表 10-1: DNB 制备反应体系 1

| 组分 | 60 μL 体系加入量 (μL) |
|-----------|--|
| 文库 ssDNA | V |
| TE 缓冲液 | 12-V |
| DNB 制备缓冲液 | 12 |
| 总体积 | 24 |

将反应混合液用漩涡振荡器震荡混匀，迷你离心机离心 5 s，置于 PCR 仪中反应，置于 PCR 仪中进行引物杂交，反应条件见下表：

表 10-2: DNB 制备反应引物杂交条件

| 温度 | 时间 |
|------------|-------|
| 热盖 (105°C) | On |
| 95°C | 1 min |
| 65°C | 1 min |
| 40°C | 1 min |
| 4°C | Hold |

取出 DNB 聚合酶混合液 II (LC) 置于冰盒上, 短暂离心 5 s, 置于冰盒上备用。

① **注意:**

请勿将 DNB 聚合酶混合液 II (LC) 置于室温, 请勿长时间触碰管壁。

当 PCR 仪达到 4°C 后取出 PCR 管, 迷你离心机离心 5 s 后, 在冰上加入如下组分:

表 10-3: DNB 制备反应体系 2

| 组分 | 60 μ L 体系加入体系 (μ L) |
|--------------------|------------------------------|
| DNB 聚合酶混合液 I | 24 |
| DNB 聚合酶混合液 II (LC) | 2.4 |

反应混合液用漩涡振荡器震荡混匀, 迷你离心机离心 5s, 即刻置于 PCR 仪中, 反应条件如下:

表 10-4: DNB 制备滚环扩增条件

| 温度 | 时间 |
|-----------|--------|
| 热盖 (35°C) | On |
| 30°C | 25 min |
| 4°C | Hold |

当 PCR 仪温度达到 4°C 后立即加入 12 μ L DNB 终止缓冲液。用阔口吸头缓慢地吹打混匀 5-8 次, 切勿震荡及剧烈吹打。

① **注意：**

DNB 一定要用阔口吸头缓慢吹打混匀，切勿离心、震荡及剧烈吹打。

- DNB 可置于 4°C 保存备用 (48 小时内使用)。从 4.4 DNB 浓度测定继续操作。



生产企业名称：深圳华大智造科技股份有限公司/武汉华大智造科技有限
公司

生产地址：

深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区 11 栋

武汉市东湖新技术开发区高新二路 388 号武汉光谷国际生物医药企业加
速器 3.1 期 24 栋

武汉市东湖新技术开发区高新大道 818 号 B13 栋

客服电话：4000-966-988

技术支持：MGI-service@mgi-tech.com

网 址：www.mgi-tech.com



官方微信