

MGISEQ-200RS

高通量（快速）测序试剂套装使用说明书

试剂套装货号及名称：

1000019840	MGISEQ-200RS	高通量测序试剂套装（FCL SE50）
1000019841	MGISEQ-200RS	高通量测序试剂套装（FCL SE100）
1000019842	MGISEQ-200RS	高通量测序试剂套装（FCL PE50）
1000019844	MGISEQ-200RS	高通量测序试剂套装（FCL PE100）
1000019843	MGISEQ-200RS	高通量测序试剂套装（FCL PE150）
1000019845	MGISEQ-200RS	高通量快速测序试剂套装（FCS SE100）
1000019846	MGISEQ-200RS	高通量快速测序试剂套装（FCS PE100）
1000019847	MGISEQ-200RS	高通量快速测序试剂套装（FCS PE150）

试剂套装版本号：V3.1

说明书版本号：7.0

版本历史

版本	修订日期	修订内容摘要
7.0	2021 年 7 月	- 载片运输及储存温度由 0°C~30°C 变更为 2°C~8°C - 增加试剂盒有效期及运输温度
A5	2020 年 12 月	- 更新 logo, 网址和邮箱, 更新说明书模板 - 增加配置 2
A4	2020 年 6 月	- 更新 CPAS 条形码引物 3 的货号 and 装量 - 载片储存温度由 RT 改为 0°C~30°C - 更新清洗试剂的用量
A3	2020 年 3 月	- 更新测序仪界面配图, 并将配图转换为线图 - 更新产品名称、货号及版本号 - 更新 dNTPs 混合液 III、dNTPs 混合液 II 和 DNA 聚合酶混合液的加入量 - 新增高通量快速测序试剂套装 (FCS) 系列产品 - 新增 FCL PE150 读长 - 新增双末端测序的双 Barcode 测序 - 在“4.5 DNB 加载及处理”章节新增 DNB 加载缓冲液 II 中出现结晶的解决办法 - 在“5 准备试剂槽”章节新增 18 号孔位中试剂可能会出现墨绿色结晶的说明。 - 更新图示中试剂槽开孔位置
A2	2019 年 12 月	- 新增“注意事项”一节 - 更新文库投入量的计算公式 - 新增“版本历史”一节
A1	2019 年 3 月	- 试剂盒储存温度更新为 -25°C~-15°C - 新增 SE100 测序读长
A0	2018 年 11 月	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	4
2.1 测序试剂套装组分清单	4
2.2 自备耗材	13
第三章 测序工作流程	14
第四章 DNB 制备	15
4.1 文库插入片段大小要求	15
4.2 文库浓度及所需量的要求	15
4.3 DNB 制备	15
4.3.1 准备 DNB 制备试剂	15
4.3.2 ssDNA 文库所需量的计算	15
4.3.3 制备 DNB	16
4.4 DNB 浓度测定	17
4.5 DNB 加载及处理	18
第五章 准备测序试剂槽	18
第六章 准备载片	22
第七章 开始测序	23
7.1 进入程序	23
7.2 放置样品	24
7.3 测序参数配置	25

7.4 放置试剂盒	28
7.5 放置载片	29
7.6 复核信息	32
7.7 开始测序	32
第八章 清洗维护	33
8.1 清洗的术语和定义	33
8.2 清洗规则	33
8.3 清洗试剂准备	34
8.4 清洗试剂槽	35
8.5 清洗流程	36
8.5.1 常规清洗	36
8.5.2 深度清洗	37
8.5.3 全套清洗流程	39
第九章 异常处理	39
9.1 DNB 浓度低	39
9.2 负压异常	39
9.3 产生气泡	40
9.4 载片上出现杂质	40
9.5 泵液失败	40
9.6 试剂盒暂存	40

第一章 介绍

本说明书是使用MGISEQ-200RS高通量测序试剂套装及MGISEQ-200RS高通量快速测序试剂套装进行测序操作的作业指导书，内容包括初始样品的制备及载片的准备，测序试剂盒组分、存储环境和使用方法，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-200RS)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，PE50 测序是按照双端各 50 循环 (2×50) 共计 100 循环执行，最后被分析的是 100 循环。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

测序读长	一键读长	二键读长	标签读长	总读长	最大支持循环数
SE35	35	—	10	35+10	70
SE50	50	—	10	50+10	70
SE100	100	—	10	100+10	120
PE50	50	50	10	100+10	120
PE100	100	100	10	200+10	220
PE150	150	150	10	300+10	320

注：如需进行 SE35 读长的测序，请使用 MGISEQ-200RS 高通量测序试剂套装 (FCL SE50)。

1.5 测序时长

表 1-2: 配置 1 各读长理论时长 (h)

时长 (小时)	SE35	SE50	SE100	PE50	PE100	PE150
FCL	7.7	9.7	16.0	22.7	45.0	63.5
FCS	/	/	9.5	/	30.7	42.0
数据处理 (FCL)	0.5	0.6	1.0	1.0	2.0	2.8
数据处理 (FCS)	/	/	0.3	/	0.5	0.7

表 1-3: 配置 2 各读长理论时长 (h)

时长 (小时)	SE35	SE50	SE100	PE50	PE100	PE150
FCL	5.8	7.7	12.7	14.5	25.0	38.7
FCS	/	/	8.9	/	18.9	26.7
数据处理 (FCL)	0.2	0.3	0.3	0.5	0.9	1.3
数据处理 (FCS)	/	/	0.1	/	0.1	0.3

注:

- ① 上表中的测序时长包括从 DNB loading 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-200RS 高通量测序试剂套装 (FCL SE50) 货号 1000019840

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	运输及储存温度	有效期
MGISEQ-200RS 测序载片 货号: 1000020206	测序载片	1 张	2°C~8°C运输 2°C~8°C储存	8 个月
MGISEQ-200RS 高通量测序试剂盒 (FCL SE50/FCS SE100) 货号: 1000019834	TE 缓冲液	100 μ L×1 支	-15°C以下运输 -25°C~-15°C储存	10 个月
	DNB 制备缓冲液	50 μ L×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 I	100 μ L×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 II (LC)	13 μ L×1 支		
	DNB 终止缓冲液	50 μ L×1 支		
	DNB 加载缓冲液 I	300 μ L×1 支		
	DNB 加载缓冲液 II	120 μ L×1 支		
	0.5mL 冻存管	1 支		
	dNTPs 混合液 III	0.32 mL×1 支		
	dNTPs 混合液 II	0.56 mL×1 支		
	DNA 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		

注: 如需进行 SE35 读长的测序, 请使用 MGISEQ-200RS 高通量测序试剂套装 (FCL SE50)。

表 2-2: MGISEQ-200RS 高通量测序试剂套装 (FCL SE100) 货号 1000019841

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	运输及储存温度	有效期
MGISEQ-200RS 测序载片 货号: 1000020206	测序载片	1 张	2°C~8°C运输 2°C~8°C储存	8 个月
MGISEQ-200RS 高通量测序试剂盒 (FCL SE100) 货号: 1000019835	TE 缓冲液	100 μ L×1 支	-15°C以下运输 -25°C~-15°C储存	10 个月
	DNB 制备缓冲液	50 μ L×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 I	100 μ L×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 II (LC)	13 μ L×1 支		
	DNB 终止缓冲液	50 μ L×1 支		
	DNB 加载缓冲液 I	300 μ L×1 支		
	DNB 加载缓冲液 II	120 μ L×1 支		
	0.5mL 冻存管	1 支		
	dNTPs 混合液 III	0.44 mL×1 支		
	dNTPs 混合液 II	0.76 mL×1 支		
	DNA 聚合酶混合液	0.82 mL×1 支		
	测序试剂槽	1 个		
	透明封口膜	2 张		

表 2-3: MGISEQ-200RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE50) 货号: 1000019842

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	运输及储存温度	有效期
MGISEQ-200RS 测序载片 货号: 1000020206	测序载片	1 张	2°C~8°C运输 2°C~8°C储存	8 个月
MGISEQ-200RS 高通量测序试剂盒 (FCL PE50/FCS PE100) 货号: 1000019836	TE 缓冲液	100 μ L×1 支	-15°C以下运输 -25°C~-15°C储存	10 个月
	DNB 制备缓冲液	50 μ L×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 I	100 μ L×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 II (LC)	13 μ L×1 支		
	DNB 终止缓冲液	50 μ L×1 支		
	DNB 加载缓冲液 I	300 μ L×1 支		
	DNB 加载缓冲液 II	120 μ L×1 支		
	0.5mL 冻存管	1 支		
	dNTPs 混合液 III	0.56 mL×1 支		
	dNTPs 混合液 II	0.92 mL×1 支		
	DNA 聚合酶混合液	1.02 mL×1 支		
	MDA 试剂	1.40 mL×1 支		
	MDA 聚合酶混合液	0.30 mL×1 支		
	测序试剂槽	1 个		
	透明封口膜	2 张		

表 2-4: MGISEQ-200RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE100) 货号: 1000019844

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	运输及储存温度	有效期
MGISEQ-200RS 测序载片 货号: 1000020206	测序载片	1 张	2°C~8°C运输 2°C~8°C储存	8 个月
MGISEQ-200RS 高通量测序试剂盒 (FCL PE100/FCS PE150) 货号: 1000019838	TE 缓冲液	100 μ L×1 支	-15°C以下运输 -25°C~-15°C储存	10 个月
	DNB 制备缓冲液	50 μ L×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 I	100 μ L×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 II (LC)	13 μ L×1 支		
	DNB 终止缓冲液	50 μ L×1 支		
	DNB 加载缓冲液 I	300 μ L×1 支		
	DNB 加载缓冲液 II	120 μ L×1 支		
	0.5mL 冻存管	1 支		
	dNTPs 混合液 III	0.74 mL×1 支		
	dNTPs 混合液 II	1.48 mL×1 支		
	DNA 聚合酶混合液	1.48 mL×1 支		
	MDA 试剂	1.40 mL×1 支		
	MDA 聚合酶混合液	0.30 mL×1 支		
	测序试剂槽	1 个		
	透明封口膜	2 张		

表 2-5: MGISEQ-200RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE150) 货号: 1000019843

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	运输及储存温度	有效期
MGISEQ-200RS 测序载片 货号: 1000020206	测序载片	1 张	2°C~8°C运输 2°C~8°C储存	8 个月
MGISEQ-200RS 高通量测序试剂盒 (FCL PE150) 货号: 1000019837	TE 缓冲液	100 μ L×1 支	-15°C以下运输 -25°C~-15°C储存	10 个月
	DNB 制备缓冲液	50 μ L×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 I	100 μ L×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 II (LC)	13 μ L×1 支		
	DNB 终止缓冲液	50 μ L×1 支		
	DNB 加载缓冲液 I	300 μ L×1 支		
	DNB 加载缓冲液 II	120 μ L×1 支		
	0.5mL 冻存管	1 支		
	dNTPs 混合液 III	0.96 mL×1 支		
	dNTPs 混合液 II	1.02 mL×2 支		
	DNA 聚合酶混合液	0.99 mL×2 支		
	MDA 试剂	1.40 mL×1 支		
	MDA 聚合酶混合液	0.30 mL×1 支		
	测序试剂槽	1 个		
	透明封口膜	2 张		

表 2-6: MGISEQ-200RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS SE100) 货号 1000019845

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	运输及储存温度	有效期
MGISEQ-200RS 快速测序载片 货号: 1000020207	测序载片	1 张	2°C~8°C运输 2°C~8°C储存	8 个月
MGISEQ-200RS 高通量测序试剂盒 (FCL SE50/FCS SE100) 货号: 1000019834	TE 缓冲液	100 μ L×1 支	-15°C以下运输 -25°C~-15°C储存	10 个月
	DNB 制备缓冲液	50 μ L×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 I	100 μ L×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 II (LC)	13 μ L×1 支		
	DNB 终止缓冲液	50 μ L×1 支		
	DNB 加载缓冲液 I	300 μ L×1 支		
	DNB 加载缓冲液 II	120 μ L×1 支		
	0.5mL 冻存管	1 支		
	dNTPs 混合液 III	0.32 mL×1 支		
	dNTPs 混合液 II	0.56 mL×1 支		
	DNA 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 2-7: MGISEQ-200RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS PE100) 货号: 1000019846

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	运输及储存温度	有效期
MGISEQ-200RS 快速测序载片 货号: 1000020207	测序载片	1 张	2°C~8°C运输 2°C~8°C储存	8 个月
MGISEQ-200RS 高通量测序试剂盒 (FCL PE50/FCS PE100) 货号: 1000019836	TE 缓冲液	100 μ L×1 支	-15°C以下运输 -25°C~-15°C储存	10 个月
	DNB 制备缓冲液	50 μ L×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 I	100 μ L×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 II (LC)	13 μ L×1 支		
	DNB 终止缓冲液	50 μ L×1 支		
	DNB 加载缓冲液 I	300 μ L×1 支		
	DNB 加载缓冲液 II	120 μ L×1 支		
	0.5mL 冻存管	1 支		
	dNTPs 混合液 III	0.56 mL×1 支		
	dNTPs 混合液 II	0.92 mL×1 支		
	DNA 聚合酶混合液	1.02 mL×1 支		
	MDA 试剂	1.40 mL×1 支		
	MDA 聚合酶混合液	0.30 mL×1 支		
	测序试剂槽	1 个		
	透明封口膜	2 张		

表 2-8: MGISEQ-200RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS PE150) 货号: 1000019847

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	运输及储存温度	有效期
MGISEQ-200RS 快速测序载片 货号: 1000020207	测序载片	1 张	2°C~8°C运输 2°C~8°C储存	8 个月
MGISEQ-200RS 高通量测序试剂盒 (FCL PE100/FCS PE150) 货号: 1000019838	TE 缓冲液	100 μ L×1 支	-15°C以下运输 -25°C~-15°C储存	10 个月
	DNB 制备缓冲液	50 μ L×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 I	100 μ L×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 II (LC)	13 μ L×1 支		
	DNB 终止缓冲液	50 μ L×1 支		
	DNB 加载缓冲液 I	300 μ L×1 支		
	DNB 加载缓冲液 II	120 μ L×1 支		
	0.5mL 冻存管	1 支		
	dNTPs 混合液 III	0.74 mL×1 支		
	dNTPs 混合液 II	1.48 mL×1 支		
	DNA 聚合酶混合液	1.48 mL×1 支		
	MDA 试剂	1.40 mL×1 支		
	MDA 聚合酶混合液	0.30 mL×1 支		
	测序试剂槽	1 个		
	透明封口膜	2 张		

表 2-9: 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	运输及储存温度	有效期
用于双端测序方案的双 Barcode 测序引物	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	3.5 mL×1 支	-15°C以下运输 -25°C~-15°C储存	12 个月

2.2 自备耗材

表 2-10：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℃冰箱	无	无
-25℃~-15℃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
0.2 mL PCR 八连管	AXYGEN	无
1.5 mL 离心管	AXYGEN	MCT-150-C
冰盒	AXYGEN	无

第三章 测序工作流程



DNB 制备：使用 DNB 制备试剂进行制备



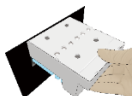
准备新的试剂槽：检查完整性、融化、试剂添加和混匀



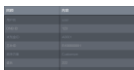
准备新的载片：打开包装检查完整性



载片放置：把载片转移到测序仪上



放入试剂槽



按照测序指引填写测序信息并开始测序



从控制软件界面可查看测序情况和进程



当测序完成后进行仪器的维护

第四章 DNB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科技有限公司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 50-500 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。

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/μL，每个 DNB 制备体系所需文库量为 40 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/μL)。然后根据下列公式换算成 (fmol/μL)：

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

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/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。

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 TE 缓冲液、DNB 制备缓冲液、DNB 聚合酶混合液 I 和 DNB 终止缓冲液，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，短暂离心置于冰盒上备用。

① 注意：

不同批次试剂盒严禁混用。

4.3.2 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 ($\text{fmol}/\mu\text{L}$)，每个 DNB 制备体系所需的文库投入量为：
ssDNA 文库量 (μL) = $40 \text{ fmol} / C$ ($\text{fmol}/\mu\text{L}$)。

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。

计算每个 DNB 制备体系所需 ssDNA 文库投入量，填入表 4-1 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。

4.3.3 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 4-1： 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 4-2： 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℃ 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 4-3： DNB 制备反应组分 2

组分	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 4-4： DNB 制备滚环扩增条件

温度	时间
热盖 (35℃)	On
30℃	25 min
4℃	Hold

- 当 PCR 仪温度达到 4℃ 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℃ 保存备用 (48 小时内使用)。

注：

- ① 部分品牌 PCR 仪的热盖升降温度慢，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℃，或尽可能设置成接近 35℃ 的最低温度。

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，浓度不合格的需重新制备。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 I 稀释至 20 ng/μL 后使用。DNB 可置于 4℃ 保存备用（48 小时内使用）。

4.5 DNB 加载及处理

取出 DNB 加载缓冲液 I 和 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。

- 取出 0.5 mL 冻存管，按表 4-5 所示加入试剂：

注：

以下 DNB 加载体系要现配现用。建议在完成“5 准备测序试剂槽”之后再行 DNB 加载体系的配制。

表 4-5：DNB 加载体系

组分	加入量
DNB 加载缓冲液 I	50 μL
DNB 加载缓冲液 II	50 μL
DNB 聚合酶混合液 II (LC)	1 μL
DNB	100 μL

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

第五章 准备测序试剂槽

- 取出测序试剂槽常温水浴解冻后，置于 2-8℃ 冰箱备用（或者提前一天将其置于 2-8℃ 冰箱解冻备用），使用前颠倒混匀 3 次。混匀时需注意试剂中无肉眼可见的分层，尤其是 17 号试剂和 18 号试剂。

注：

如 18 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。

- 打开试剂槽盖板（如图 5-1），使用无尘纸擦净冷凝水；试剂槽的孔位示意图如图 5-2。

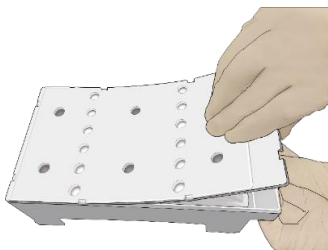


图 5-1: 开盖和清洁

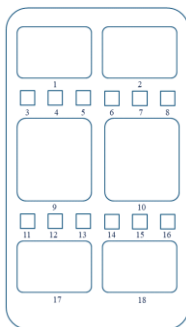


图 5-2: 试剂槽孔位信息

- 提前 1 h 取出 dNTPs 混合液 III 和 dNTPs 混合液 II，室温融化后置于 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 4℃ 备用，加样前需颠倒混匀 4-6 次。
- 使用洁净的 1 mL 枪头在 1 号和 2 号孔边缘位置 (如图 5-3)，轻轻戳出一个直径小于 1 cm 的加样孔位：



图 5-3: 试剂槽加样开孔

- 取 1 mL 移液器，按照下表量取试剂加入到 1 号孔：

表 5-1: dNTPs 混合液 III 加样表

产品型号	试剂名称	加样体积 mL
FCL SE50/FCS SE100	dNTPs 混合液 III	0.320
FCL SE100	dNTPs 混合液 III	0.440
FCL PE50/FCS PE100	dNTPs 混合液 III	0.560
FCL PE100/FCS PE150	dNTPs 混合液 III	0.740
FCL PE150	dNTPs 混合液 III	0.960

- 取 1 mL 移液器，按照下表量取试剂加入到 2 号孔：

表 5-2: dNTPs 混合液 II 加样表

产品型号	试剂名称	加样体积 mL
FCL SE50/FCS SE100	dNTPs 混合液 II	0.560
FCL SE100	dNTPs 混合液 II	0.760
FCL PE50/FCS PE100	dNTPs 混合液 II	0.920
FCL PE100/FCS PE150	dNTPs 混合液 II	1.480
FCL PE150	dNTPs 混合液 II	2.040

- 取 1 mL 移液器，按照下表量取试剂分别加入到 1 和 2 号孔：

表 5-3：DNA 聚合酶混合液加样表

产品型号	试剂名称	1 号孔加样体积 mL	2 号孔加样体积 mL
FCL SE50/FCS SE100	DNA 聚合酶混合液	0.320	0.280
FCL SE100	DNA 聚合酶混合液	0.440	0.380
FCL PE50/FCS PE100	DNA 聚合酶混合液	0.560	0.460
FCL PE100/FCS PE150	DNA 聚合酶混合液	0.740	0.740
FCL PE150	DNA 聚合酶混合液	0.960	1.020

- 使用配套的透明封口膜将加样孔封住，切勿盖住孔位中心位置，避免影响试剂针下降：



图 5-4：开孔的封膜

- 测序试剂槽水平放置在桌面上，双手握住两侧，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，且 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 5-5：加样后混匀

- 15 号孔位 (如图 5-2)：以下操作只适用于 PE 试剂槽
用 200 μ L 移液器移取 200 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。
- ① **注意：**
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！
- 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：
 - ① 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；
 - ② 使用枪头戳破封口膜；把混匀后的 CPAS AD153 条形码引物 3 工作液，取 1.30mL 加入到 12 号孔位中，确保孔位底部无气泡。

第六章 准备载片

- 取出测序载片；
- 撕开载片外包装；



图 6-1: 撕开载片外包装

- 打开包装盒，取出载片，检查载片是否完整；

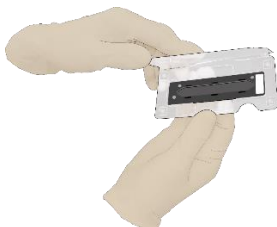


图 6-2: 检查载片完整性

第七章 开始测序

7.1 进入程序

- 输入用户名“user”密码“123”，点击“登录”进入主界面：



图 7-1: 登录界面

➤ 界面如下:



图 7-2: 主界面

7.2 放置样品

➤ 点击界面上的“测序”选项，进入如下界面：



图 7-3：样品输入界面

- 将光标移至“DNB ID”后面的文本框，输入文库名称或编号；
- 打开试剂舱门，放入要加载的 DNB 冻存管；

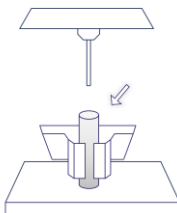


图 7-4：放置加载样品

- 关闭试剂舱门。

7.3 测序参数配置

- 在“测序方案”下拉菜单中选择需要的程序，有一键测序方案（PE100_FCL、PE100_FCS 等）和用户自定义

义 (Customize);

注:

- ① 测序方案中带有“FCL”的为 MGISEQ-200RS 高通量测序试剂套装 (FCL) 的测序方案, 带有“FCS”的为 MGISEQ-200RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS) 的测序方案。
- ② 如果需要进行 SE35 读长的测序, 请使用 MGISEQ-200RS 高通量测序试剂套装 (FCL SE50), 并选择“SE35_FCL”或“Customize”测序方案进行测序。
- ③ 如果需要进行双 Barcode 测序, 需选择程序“Customize”。

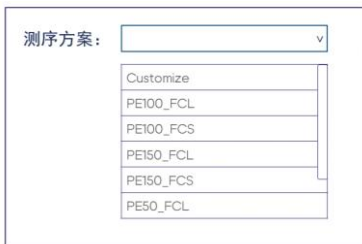


图 7-5: 测序方案的选择

- 如选择一键测序, 下一步操作可直接进入 7.4; 如选择 Customize 则继续以下步骤:
- 在开始阶段, 请选择测序开始的位置:



图 7-6: 程序选择

- 选择读长, 如 PE100, 则一键读长输入 100, 二键读长输入 100;

一链读长:

100

✓

二链读长:

100

✓

图 7-7: 读长选择

- 选择标签长度，如果是双标签测序，则需将标签二的长度填写在 Dual barcode 右侧的文本框中，否则不需填写：

Barcode:

10

▼

Dual barcode:

10

✓

☒ Dual barcode 测序

图 7-8: 标签读长选择

- 选择是否需要拆分 Barcode，需要拆分的进行勾选，并选择对应的 Barcode 序列；

拆分 Barcode:

☒ Lane1

Barcode 类型:

1-128

▼

图 7-9: Barcode 拆分选择

- 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:	2	☒	--	5	☒	读长
二链暗反应:	3	☒	--	8	☒	读长

图 7-10: 暗反应的选择

7.4 放置试剂盒

- 将光标放置在“试剂槽 ID”文本框，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 7-11: 试剂槽信息录入界面

- 打开试剂舱门，一只手拉动清洗试剂槽 1 的把手使其部分移出冰箱，同时另一只手托住清洗试剂槽 1 的底部，缓慢取出；

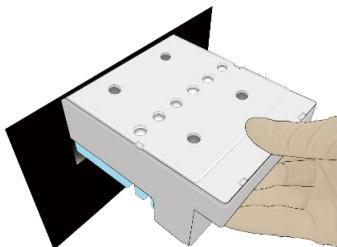


图 7-12: 取出清洗试剂槽

- 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 7-13：维护冰箱

- 一只手握住试剂槽的把手，另一只手托住试剂槽底部，按照试剂槽盖板指示方向，把准备好的试剂槽轻轻推进试剂舱，直到推到底部并确认测序试剂槽完全放入；关闭试剂舱门；

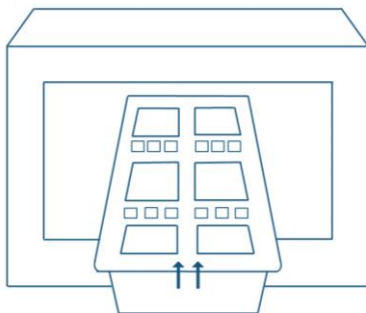


图 7-14：测序试剂槽放入示意图

7.5 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；

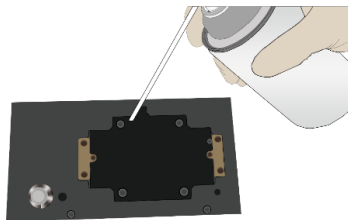


图 7-15: 清洁载片平台

- 按下载片吸附按钮。
- 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；

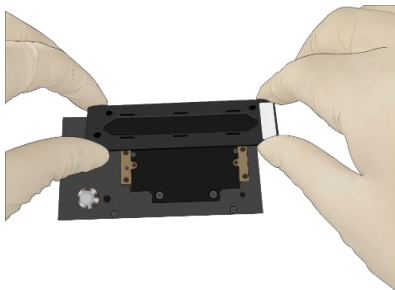


图 7-16: 载片放置

- 载片孔位对应定位柱放置，保持载片空位内壁与定位柱贴合，将载片边框左右两边同时按下，使载片吸附在平台上；

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；

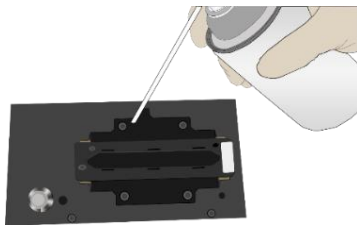


图 7-17：载片清洁

- 点击“下一步”，把光标移至“载片 ID”后面的文本框，扫描二维码录入载片信息。如不能正常自动录入，则把光标移至“载片 ID”后面的代写区域，进行手动输入：

① **注意：**

手动输入载片 ID 时需严格按照载片标签上的载片号进行输入。输入不同的载片 ID 将调用不同的测序脚本，S2 开头的载片 ID 为 FCL，K2 开头的载片 ID 为 FCS。

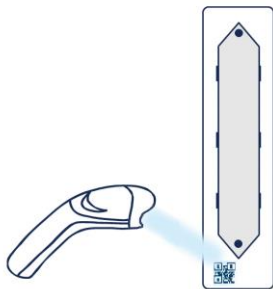


图 7-18: 载片信息录入

7.6 复核信息

对填写的各项信息进行复核，确保准确无误。

回顾	内容
用户名	user
DNB ID	123 1-128
试剂槽ID	A0001
载片ID	S200000001
测序方案	PE150_FCL
读长	312

图 7-19: 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 PE150 测序方案，一链读长为 150，二链读长为 150，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 312。

7.7 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 7-20: 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；

第八章 清洗维护

8.1 清洗的术语和定义

表 8-1: 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 75 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 15 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 30 min

8.2 清洗规则

- 当出现以下界面时，可进行清洗：



图 8-1: 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。

8.3 清洗试剂准备

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

表 8-2：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℃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 8-3：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℃存放, 有效期 28 天)

表 8-4：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

8.4 清洗试剂槽

- 全套清洗维护使用的空试剂槽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, 清洗试剂重新灌装, 持续使用 20 次后或每半年请更换新的清洗试剂槽;
- 清洗载片是下机的废旧载片, 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 0.5 mL 冻存管 (用于清洗 DNB 加载管道), 所有孔位和冻存管都灌装 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 0.5 mL 冻存管, 所有孔位和冻存管都灌装 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 0.5 mL 冻存管, 所有孔位和冻存管都灌装 80% (不超过 90%) 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 0.5 mL 冻存管, 15 号孔位和冻存管都灌装 80% (不超过 90%) 1M NaCl + 0.05% Tween-20 溶液, 其余孔位都灌装 80% (不超过 90%) 0.05% Tween-20 溶液, 标记为清洗试剂槽 4。

8.5 清洗流程

8.5.1 常规清洗

- 使用清洗试剂槽 1, 一只手握住试剂盒的把手, 另一只手托住试剂槽底部, 按照试剂槽盖板指示方向, 轻轻推进冰箱, 直到推到底部并确认试剂盒全完放入, 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 30 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 8-2: 清洗软件的选择

- 当显示界面如下时，常规清洗结束；



清洗已完成
点击“返回”，移除清洗试剂槽

图 8-3：常规清洗结束界面

8.5.2 深度清洗

- 使用清洗试剂槽 4，一只手握住试剂槽的把手，另一只手托住试剂槽底部，按照试剂槽盖板指示方向，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；
- 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 15 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 8-4 时，点击“是”进行抬针操作，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；
- 使用清洗试剂槽 3，继续进行深度清洗；耗时约 15 min；



图 8-4：第一次深度清洗结束界面

- 当界面显示图 8-5 时，点击“是”进行抬针操作，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 8-5：第二次深度清洗结束界面

- 使用清洗试剂槽 2，继续进行深度清洗；耗时约 15 min；
- 当界面显示图 8-6 时，点击“否”结束深度清洗。



图 8-6: 深度清洗结束界面

8.5.3 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 75 min。

第九章 异常处理

9.1 DNB浓度低

当 DNB 浓度低于 8 ng/μL 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；
- 重新制备后仍不符合要求，请联系工程师。

9.2 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。

9.3 产生气泡

- 更换一张废旧载片，检查泵液情况；
- 如仍有较多气泡，请联系工程师。

9.4 载片上出现杂质

- 请对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。

9.5 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：

- MGISEQ-200RS：取下载片，检查密封垫是否有杂质，用空气罐吹净，并按照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。

9.6 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“5 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，若不能及时使用，可放在 4℃ 内暂存，并于 24 h 内使用，用前需要按照“5 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，务必使用锡箔纸密封，放在 4℃ 内暂存，并于 24 h 内使用，使用前轻轻试剂槽，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。

生产企业名称：武汉华大智造科技有限公司

生产地址：

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