DNBSEQ-T7RS

高通量测序试剂套装使用说明书

试剂套装货号及名称：

1000020243，DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装（FCL SE35）

1000016102，DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装（FCL SE50）

1000016103，DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装（FCL SE100）

1000028455，DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装（FCL PE100）V2.0

1000028454，DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装（FCL PE150）V2.0

1000019251，DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装（stLFR FCL PE100）

940-000005-00，DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装（App-A FCL PE100）V2.0

940-000003-00，DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装（App-A FCL PE150）V2.0

试剂套装版本号：V2.0

说明书版本号：6.0

深圳华大智造科技股份有限公司 版权所有

版本历史

版本	修订日期	修订内容摘要
6.0	2021 年 7 月	◆ 增加试剂有效期
5.0	2021 年 7 月	◆ 新增 App-D 类型的测序 ◆ 修订 PE150 DNB 制备及加载操作 ◆ 修订测序试剂槽准备过程中试剂加入体积
A3	2020 年 12 月	◆ 修改华大智造 logo，公司网址和邮件信息
A2	2020 年 9 月	◆ 勘误
A1	2020 年 9 月	◆ 新增 SE35、SE50、SE100、PE150 读长 ◆ 新增双末端的双 Barcode 测序 ◆ 新增 stLFR 文库的测序 ◆ 新增 App-A 文库的测序 ◆ 更新部分测序界面图示 ◆ 修订 DNB pooling 方案 ◆ 增加 DNB 定量附件
A0	2019 年 12 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 3
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 15
第三章 测序工作流程 16
第四章 DNB 准备 16
4.1 文库插入片段大小要求 16
4.2 文库浓度 17
4.3 pooling 方案 17
4.3.1 确定 pooling 样本数 17
4.3.2 检查 Barcode 的平衡性 18
4.4 DNB 制备 18
4.4.1 FCL SE35、FCL SE50、FCL SE100 及 FCL PE100 DNB 制备 18
4.4.2 FCL PE150 DNB 制备 21
4.4.3 App-A FCL PE100 DNB 制备 23
4.4.4 App-A FCL PE150 DNB 制备 25
4.4.5 App-D FCL PE150 DNB 制备 28
4.4.6 stLFR FCL PE100 DNB 制备 30
4.5 DNB 浓度测定及 pooling 32
4.5.1 DNB 浓度测定 32
4.5.2 DNB pooling 33
第五章 DNB 加载 34
5.1 准备样本加载试剂板和缓冲液 34
5.1.1 FCL SE35、FCL SE50、FCL SE100、FCLPE100、App-A FCL PE100 及 stLFR FCL PE100 样本加载试剂板和缓冲液准备 34
5.1.2FCL PE150、App-A FCL PE150 及 App-D FCL PE150 快速样本加载试剂板和缓冲液

准备 35
5.2 准备测序载片 36
5.3 DNB 加载 36
第六章 测序前准备 44
6.1 测序试剂槽准备 44
6.2 准备清洗试剂槽 48
6.3 纯水试剂桶准备 49
第七章 测序 50
7.1 放置试剂槽 50
7.2 进入主界面 50
7.3 放置测序载片 51
7.4 测序参数配置 51
7.5 复核信息 54
7.6 开始测序 55
第八章 清洗维护 57
8.1 清洗的术语和定义 57
8.2 清洗试剂准备 57
8.3 清洗套装 58
8.4 手动清洗流程 58
8.4.1 MGIDL-T7RS 手动清洗 58
8.4.2 DNBSEQ-T7RS 手动清洗 59
第九章 异常处理 59
9.1 DNB 浓度低 59
9.2 负压异常 59
9.3 产生气泡 59
9.3.1 MGIDL-T7RS 产生气泡 60
9.3.2 DNBSEQ-T7RS 产生气泡 60
9.4 出现杂质 60
9.5 试剂盒暂存 60
第十章 附件 60

第一章 介绍

本说明书是使用DNBSEQ-T7RS高通量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，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（DNBSEQ-T7RS）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，测序总cycle数是按照所选择的测序读长执行的。如PE100测序，按照双端各100 cycles（2 × 100）共计200 cycles执行，最后得到200 cycles的序列数据。标签序列的10 cycles需要额外进行计算。

表1-1 测序cycle数示例

测序读长	一链读长	二链读长	标签读长	总读长	最大支持cycle 数
SE35	35	/	10	35+10	55
SE50	50	/	10	50+10	70
SE100	100	/	10	100+10	120
PE100	100	100	10	200+10	220
PE150	150	150	10	300+10	320
App-A PE100	100	100	10	200+10	220
App-A PE150	150	150	10	300+10	320
App-D PE150	150	150	10	300+10	320
stLFR PE100	100	100	42+10	200+52	252

1.5 测序时长

表1-2 DNBSEQ-T7RS 测序理论时长（小时）

测序读长	单边（小时）	四边（小时）	DNB 制备（小时）	DNB 加载（小时）
SE35	4.5	5.0	1	2
SE50	5.5	6.0	1	2
SE100	9.0	10.5	1	2
PE100	17.5	20.5	1	2
PE150	24.5	29.0	1	2
App-A PE100	17.5	20.5	1	2
App-A PE150	24.5	29.0	1	2
App-D PE150	24.5	29.0	1	2
stLFR PE100	21.0	24.5	1	2

注：

① 上表中的测序时长（单边/四边）包括从测序开始到测序完成的时间。DNB 制备、加载和 FASTQ 文件

生成的时长不占用测序仪时间，故不计入测序时长。（单张载片 FASTQ 文件生成时长约 1.5 小时）。

② DNB 加载时，每个 MGIDL-T7RS 可同时进行 2 张载片的加载，每次时长约为 2 小时。

③ 上表数值仅为标准模式下理论测序时长，不同仪器的实际运行时间可能会有所不同。

④ 上表中的测序时长，除 stLFR PE100 外，均只表示单 Barcode 测序时长。

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，一旦发生此类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

在进行FCL PE100和FCL PE150双Barcode测序时，除相应高通量测序试剂套装外，还需使用CPAS 条形码引物 3 试剂盒（货号：1000020834）。在进行 App-A FCL PE100和App-A FCL PE150 双Barcode测序时，除相应高通量测序试剂套装外，还需使用高通量条形码引物 3 试剂盒（App-A）（货号：1000014047）。在进行App-D FCL PE150测序时，除高通量测序试剂套装（FCL PE150）外，还需使用高通量测序引物试剂盒（App-D）（货号：1000028550）。

表2-1 DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装（FCL SE35） 货号：1000020243

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	运输及储存温度	有效期
DNBSEQ-T7RS 测序载片 货号：1000016269	测序载片（T7 FCL）	1 张	0℃~30℃运输 0℃~30℃储存	10 个月
DNBSEQ DNB 制备试剂盒 货号：1000016115	TE 缓冲液	960 μL×1 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	DNB 制备缓冲液	400 μL×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 I	800 μL×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 II （LC）	80 μL×1 支		
	DNB 终止缓冲液	400 μL×1 支		
DNBSEQ-T7RS DNB 加载试剂盒 货号：1000016114	DNB 加载缓冲液 I	300 μL×1 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	DNB 加载缓冲液 II	150 μL×1 支		
	0.5mL 冻存管	1 支		
	样本加载试剂板	1 个		
DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂盒（FCL SE35） 货号：1000019813	dNTPs 混合液 II	4.50 mL×1 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	dNTPs 混合液 IV	1.70 mL×1 支		
	DNA 聚合酶混合液	3.20 mL×1 支		
	测序试剂槽	1 个		
	透明封口膜	2 张		
DNBSEQ-T7RS 清洗试剂盒 （FCL SE35） 货号：1000019812	清洗试剂槽	1 个	40℃以下运输 0℃~30℃储存	10 个月

表2-2 DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装（FCL SE50） 货号：1000016102

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	运输及储存温度	有效期
DNBSEQ-T7RS 测序载片 货号：1000016269	测序载片（T7 FCL）	1 张	0℃~30℃运输 0℃~30℃储存	10 个月
DNBSEQ DNB 制备试剂盒 货号：1000016115	TE 缓冲液	960 μL×1 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	DNB 制备缓冲液	400 μL×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 I	800 μL×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 II（LC）	80 μL×1 支		
	DNB 终止缓冲液	400 μL×1 支		
DNBSEQ-T7RS DNB 加载试剂盒 货号：1000016114	DNB 加载缓冲液 I	300 μL×1 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	DNB 加载缓冲液 II	150 μL×1 支		
	0.5mL 冻存管	1 支		
	样本加载试剂板	1 个		
DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂盒 （FCL SE50） 货号：1000016108	dNTPs 混合液 II	2.70 mL×2 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	dNTPs 混合液 IV	2.00 mL×1 支		
	DNA 聚合酶混合液	3.80 mL×1 支		
	测序试剂槽	1 个		
	透明封口膜	2 张		
DNBSEQ-T7RS 清洗试剂盒 （FCL SE50） 货号：1000016117	清洗试剂槽	1 个	40℃以下运输 0℃~30℃储存	10 个月

表2-3 DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装（FCL SE100） 货号：1000016103

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	运输及储存温度	有效期
DNBSEQ-T7RS 测序载片 货号：1000016269	测序载片（T7 FCL）	1 张	0℃~30℃运输 0℃~30℃储存	10 个月
DNBSEQ DNB 制备试剂盒 货号：1000016115	TE 缓冲液	960 μL×1 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	DNB 制备缓冲液	400 μL×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 I	800 μL×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 II （LC）	80 μL×1 支		
	DNB 终止缓冲液	400 μL×1 支		
DNBSEQ-T7RS DNB 加载试剂盒 货号：1000016114	DNB 加载缓冲液 I	300 μL×1 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	DNB 加载缓冲液 II	150 μL×1 支		
	0.5mL 冻存管	1 支		
	样本加载试剂板	1 个		
DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂盒 （FCL SE100） 货号：1000016109	dNTPs 混合液 II	4.05 mL×2 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	dNTPs 混合液 IV	3.00 mL×1 支		
	DNA 聚合酶混合液	2.85 mL×2 支		
	测序试剂槽	1 个		
	透明封口膜	2 张		
DNBSEQ-T7RS 清洗试剂盒 （FCL SE100） 货号：1000016118	清洗试剂槽	1 个	40℃以下运输 0℃~30℃储存	10 个月

表2-4 DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装（FCL PE100）V2.0 货号：1000028455

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	运输及储存温度	有效期
DNBSEQ-T7RS 测序载片 货号：1000016269	测序载片（T7 FCL）	1 张	0℃~30℃运输 0℃~30℃储存	10 个月
DNBSEQ DNB 制备试剂盒 货号：1000016115	TE 缓冲液	960 μL×1 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	DNB 制备缓冲液	400 μL×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 I	800 μL×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 II (LC)	80 μL×1 支		
	DNB 终止缓冲液	400 μL×1 支		
DNBSEQ-T7RS DNB 加载试剂盒 V2.0 货号：1000028452	DNB 加载缓冲液 I	300 μL×1 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	DNB 加载缓冲液 II	150 μL×1 支		
	0.5mL 冻存管	1 支		
	样本加载试剂板（T7 FCL）V2.0	1 个		
DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂盒（FCL PE100）V2.0 货号：1000028450	dNTPs 混合液 II	3.40 mL×3 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	dNTPs 混合液 V	3.90 mL×1 支		
	DNA 聚合酶混合液	3.65mL×2 支		
	MDA 试剂	4.20 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		
DNBSEQ-T7RS 清洗试剂盒 （FCL PE100）V2.0 货号：940-000004-00	清洗试剂槽	1 个	40℃以下运输 0℃~30℃储存	10 个月

表2-5 DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装（FCL PE150）V2.0 货号：1000028454

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	运输及储存温度	有效期
DNBSEQ-T7RS 测序载片 货号：1000016269	测序载片（T7 FCL）	1 张	0℃~30℃运输 0℃~30℃储存	10 个月
DNBSEQ DNB 快速制备试剂盒 V2.0 货号：1000028453	TE 缓冲液	960 μL×1 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	DNB 制备缓冲液	400 μL×1 支		
	DNB 快速聚合酶混合液 II	800 μL×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 II (LC)	80 μL×1 支		
	DNB 终止缓冲液	400 μL×1 支		
DNBSEQ-T7RS DNB 快速加载试剂盒 V2.0 货号：1000028451	DNB 加载缓冲液 IV	200 μL×1 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	0.5mL 冻存管	1 支		
	快速样本加载试剂板（T7 FCL PE150）V2.0	1 个		
DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂盒（FCL PE150）V2.0 货号：1000028449	dNTPs 混合液 II	6.90 mL×2 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	dNTPs 混合液 V	5.30 mL×1 支		
	DNA 聚合酶混合液	4.95 mL×2 支		
	MDA 试剂	4.20 mL×1 支		
	MDA 聚合酶混合液	0.60mL×1 支		
	测序试剂槽	1 个		
	透明封口膜	2 张		
DNBSEQ-T7RS 清洗试剂盒（FCL PE150）V2.0 货号：940-000006-00	清洗试剂槽	1 个	40℃以下运输 0℃~30℃储存	10 个月

表2-6 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	3.50 mL×1 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月

表2-7 DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装（stLFR FCL PE100） 货号：1000019251

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	运输及储存温度	有效期
DNBSEQ-T7RS 测序载片 货号：1000016269	测序载片（T7 FCL）	1 张	0℃~30℃运输 0℃~30℃储存	10 个月
DNBSEQ DNB 制备试剂盒（stLFR） 货号：1000019257	TE 缓冲液	480 μL×1 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	stLFR DNB 制备缓冲液	160 μL×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 III	320 μL×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 IV	42 μL×1 支		
	DNB 终止缓冲液	200 μL×1 支		
DNBSEQ-T7RS DNB 加载试剂盒（stLFR） 货号：1000019256	DNB 加载缓冲液 I	500 μL×1 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	DNB 加载缓冲液 II	500 μL×1 支		
	0.5mL 冻存管	1 支		
	样本加载试剂板（stLFR）	1 个		
DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂盒（stLFR FCL PE100） 货号：1000019252	dNTPs 混合液 II	4.90 mL×3 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	dNTPs 混合液 IV	5.40 mL×1 支		
	DNA 聚合酶混合液	5.15 mL×2 支		
	MDA 试剂	4.20 mL×1 支		
	MDA 聚合酶混合液	0.60mL×1 支		
	测序试剂槽	1 个		
	透明封口膜	2 张		
DNBSEQ-T7RS 清洗试剂盒 （stLFR FCL PE100） 货号：1000019254	清洗试剂槽	1 个	40℃以下运输 0℃~30℃储存	10 个月

表2-8 DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装（App-A FCL PE100）V2.0 货号：940-000005-00

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	运输及储存温度	有效期
DNBSEQ-T7RS 测序载片 货号：1000016269	测序载片（T7 FCL）	1 张	0℃~30℃运输 0℃~30℃储存	10 个月
DNBSEQ DNB 制备试剂盒 货号：1000016115	TE 缓冲液	960 μL×1 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	DNB 制备缓冲液	400 μL×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 I	800 μL×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 II（LC）	80 μL×1 支		
	DNB 终止缓冲液	400 μL×1 支		
DNBSEQ-T7RS DNB 加载试剂盒 V2.0 货号：1000028452	DNB 加载缓冲液 I	300 μL×1 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	DNB 加载缓冲液 II	150 μL×1 支		
	0.5mL 冻存管	1 支		
	样本加载试剂板（T7 FCL）V2.0	1 个		
DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂盒 （FCL PE100）V2.0 货号：1000028450	dNTPs 混合液 II	3.40 mL×3 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	dNTPs 混合液 V	3.90 mL×1 支		
	DNA 聚合酶混合液	3.65mL×2 支		
	MDA 试剂	4.20 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		
DNBSEQ-T7RS 清洗试剂盒 （FCL PE100）V2.0 货号：940-000004-00	清洗试剂槽	1 个	40℃以下运输 0℃~30℃储存	10 个月
高通量双末端测序引物试剂盒（App-A） 货号：1000020832	App-A DNB 制备缓冲液	400 μL×1 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	App-A 测序引物工作液 1	2.20 mL×1 支		
	App-A 测序引物工作液 2	4.20 mL×1 支		
	App-A MDA 引物工作液	4.20 mL×1 支		
	App-A 条形码引物工作液 2	3.50 mL×1 支		

表2-9 DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装（App-A FCL PE150）V2.0 货号：940-000003-00

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	运输及储存温度	有效期
DNBSEQ-T7RS 测序载片 货号：1000016269	测序载片（T7 FCL）	1 张	0℃~30℃运输 0℃~30℃储存	10 个月
DNBSEQ DNB 快速制备试剂盒 V2.0 货号：1000028453	TE 缓冲液	960 μL×1 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	DNB 制备缓冲液	400 μL×1 支		
	DNB 快速聚合酶混合液 II	800 μL×1 支		
	DNB 聚合酶混合液 II (LC)	80 μL×1 支		
	DNB 终止缓冲液	400 μL×1 支		
DNBSEQ-T7RS DNB 快速加载试剂盒 V2.0 货号：1000028451	DNB 加载缓冲液 IV	200 μL×1 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	0.5mL 冻存管	1 支		
	快速样本加载试剂板（T7 FCL PE150）V2.0	1 个		
DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂盒 （FCL PE150）V2.0 货号：1000028449	dNTPs 混合液 II	6.90 mL×2 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	dNTPs 混合液 V	5.30 mL×1 支		
	DNA 聚合酶混合液	4.95 mL×2 支		
	MDA 试剂	4.20 mL×1 支		
	MDA 聚合酶混合液	0.60mL×1 支		
	测序试剂槽	1 个		
	透明封口膜	2 张		
DNBSEQ-T7RS 清洗试剂盒 （FCL PE150）V2.0 货号：940-000006-00	清洗试剂槽	1 个	40℃以下运输 0℃~30℃储存	10 个月
高通量双末端测序引物试剂盒（App-A） 货号：1000020832	App-A DNB 制备缓冲液	400 μL×1 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
	App-A 测序引物工作液 1	2.20 mL×1 支		
	App-A 测序引物工作液 2	4.20 mL×1 支		
	App-A MDA 引物工作液	4.20 mL×1 支		
	App-A 条形码引物工作液 2	3.50 mL×1 支		

表2-10　高通量条形码引物 3 试剂盒（App-A）货号：1000014047

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
仅提供用于双端测序方案的双 Barcode 测序	高通量条形码引物 3 试剂盒（App-A） 货号：1000014047	App-A 条形码引物工作液 3 货号：1000012595	3.50 mL×1 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月

表2-11 高通量测序引物试剂盒（App-D） 货号：1000028550

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
提供用于双端测序方案的双Barcode测序	高通量测序引物试剂盒（App-D） 货号：1000028550	App-D 测序引物工作液 1 货号：1000028601	2.20 mL×1 支	-15℃以下运输 -25℃~-15℃储存	10 个月
		App-D MDA 引物工作液 货号：1000028600	4.20 mL×1 支		
		App-D 测序引物工作液 2 货号：1000028602	4.20 mL×1 支		
		App-D 条形码引物工作液 2 货号：1000028599	3.50 mL×1 支		
		App-D 条形码引物工作液 3 货号：1000028603	3.50 mL×1 支		
		App-D DNB 制备缓冲液 货号：1000028604	400 μL×1 支		

注：高通量测序引物试剂盒（App-D）可适配 FCL PE150 读长的测序试剂套装使用。

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
PCR 仪	Bio-Rad	无
MPC2000 96 孔板离心机（甩板机）	北京鼎昊源科技有限公司	无
移液器	Eppendorf	无
电动移液器	Labnet	FASTPETTEV-2
迷你离心机	无	无
漩涡振荡器	无	无
2~8℃冰箱	无	无
-25~-15℃冰箱	无	无
Qubit™ ssDNA Assay Kit	Thermo Fisher	Q10212
75%酒精	无	无
100%Tween-20	BBI	A600560-0500
5 M NaCl	SIGMA	S5150-4L
2 M NaOH	阿拉丁	S128511-1L
Qubit Assay Tubes	Thermo Fisher	Q32856
200 μL 阔口吸头	AXYGEN	T-205-WB-C
Power Dust remover（压缩空气罐）	MATIN	M-6318
1.5 mL 离心管	AXYGEN	MCT-150-C
无尘布	深圳达斯特福瑞科技有限公司	LJ618180B1#超细纤维无尘布
15 mL 灭菌管	SARSTEDT	60.732.001
100 mL 一次性移液管	CORNING	4491
25 mL 一次性移液管	CORNING	4489
10 mL 一次性移液管	CORNING	4488
盒装灭菌吸头	AXYGEN	无
5 mL 盒装灭菌吸头	AXYGEN	无
0.2 mL PCR 八连管	AXYGEN	无
5 mL 运输管	AXYGEN	无
冰盒	AXYGEN	无
制冰机	无	无
无尘纸	无	无
自封袋	拓泰诺	无

第三章 测序工作流程

测序工作流程如下表所示

1	DNB 准备：使用 DNB 制备试剂进行制备
2	样本加载：在 MGIDL-T7RS 上，使用 DNB 加载试剂将 DNB 加载到载片上
3	测序前准备：检查试剂槽完整性，进行试剂融化、添加和混匀，检查纯水桶和废液桶余量
4	测序
5	数据分析

第四章 DNB准备

4.1 文库插入片段大小要求

本试剂盒适用于深圳华大智造科技股份有限公司提供的建库试剂盒所构建的文库。对于常规文库，文库为DNA单链环。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。

注：如果是深圳华大智造科技股份有限公司提供的stLFR建库试剂盒所构建的stLFR文库，文库为DNA双链环。文库片段长度要求：文库插入片段范围在200-1500 bp。

表4-1 推荐插入片段长度和单张载片数据产出

产品型号	理想文库插入片段大小 （bp）	适用文库类型	比对 reads 数（M）	数据量（Gb）
FCL SE35	50-230	NIPT	5000	175
FCL SE50	50-230	NIPT，PMSEQ	5000	250
FCL SE100	200-400	PMSEQ	5000	500
FCL PE100	200-400	WGS，WES，RNAseq，单细胞	5000	1000
FCL PE150	300-500	WGS，WES，RNAseq	5000	1500
App-A FCL PE100	200-400	WGS，WES，RNAseq	5000	1000
App-A FCL PE150	300-500	WGS，WES，RNAseq	5000	1500
App-D FCL PE150	300-500	WGS，WES，RNAseq	4000	1200
stLFR FCL PE100	200-1500	stLFR	4000	800

注：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会有变化。

4.2 文库浓度

对于常规文库，要求初始文库ssDNA浓度≥2 fmol/μL。

对于PCR free文库，要求初始文库ssDNA浓度≥3.75 fmol/μL。

注：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）：

Concentration（fmol/μL）= 3030 * Concentration （ng/μL）/ N

N表示核苷酸平均数目（文库总片段长度，包括接头序列长度）

对于stLFR文库，要求初始文库dsDNA浓度≥1.9 ng/μL，文库需用Qubit dsDNA HS Assay Kit和Qubit Fluorometer定量。

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 pooling方案

4.3.1 确定 pooling 样本数

根据具体应用所需的数据量，测序读长及测序Barcode等信息决定可pooling在一起上机的样本量。建议样本在DNB制备完后，先定量DNB，再pooling DNB。由于每个Barcode产出的数据量会有偏差，建议所需的总数据量不超过理论数据产量的90%。

举例一：人全基因组测序WGS：如果采用PE100测序，每个样本需要100Gb的数据量，建议每张载片最多同时测序9个样本。

举例二： 某一stLFR文库：如果采用PE100测序，每个样本测序深度为40X，建议每张载片最多同时测序6个样本。

举例三：某一应用：如果采用PE100测序，每个样本需要50Gb的数据量，建议每张载片最多同时测序18个样本。

举例四：某一混合样本：如果采用PE150测序，有4个WGS样本，每个需要100Gb的数据量，同时还需进行RNASeq样本测序，每个需要50Gb的数据量，建议每张载片在测序4个WGS样本的同时最多测序18个RNAseq样本。

对于有特殊测序深度要求的，可以适当增加或减少pooling的样本数量。

表4-2 样本pooling数计算举例

序号	测序读长	每个样本需求	Pooling 数量*	每个样本的理论产出范围
举例一	PE100	100Gb	9 个样本	100Gb-122Gb
举例二	stLFR PE100	120Gb	6 个样本	120Gb-146Gb
举例三	PE100	50Gb	18 个样本	50Gb-61Gb
举例四	PE150	100Gb	4 个 WGS 样本	102Gb-122Gb
		50Gb	18 个 RNAseq 样本	52Gb-64Gb

*假如样本的pooling的差别在±10%之内：

样本最大pooling数目= 一张载片总数据量×（1-pooling间的误差）/应用需要数据量

4.3.2 检查 Barcode 的平衡性

检查待pooling样本的Barcode，建议每个cycle的A，C，G，T四个碱基的相对含量均不低于12.5%。若某个碱基的相对含量在5-12.5%间，可以风险上机。若低于5%，则不建议上机，需重新规划pooling方案。每个cycle，只有碱基含量相对较平衡时，才能达到最佳测序质量。

检查待pooling在一起上机的样本的Barcode，确定没有多个样本含有相同的Barcode。

4.4 DNB制备

此部分内容包含7种DNB制备方案，可按需查阅：

方案一，FCL SE35、FCL SE50、FCL SE100及FCL PE100 DNB制备，见4.4.1

方案二，FCL PE150 DNB制备，见4.4.2

方案三，App-A FCL PE100 DNB制备，见4.4.3

方案四，App-A FCL PE150 DNB制备，见4.4.4

方案五，App-D FCL PE150 DNB制备，见4.4.5

方案六，stLFR FCL PE100 DNB制备，见4.4.6

4.4.1 FCL SE35、FCL SE50、FCL SE100 及 FCL PE100 DNB 制备

4.4.1.1 ssDNA 文库所需量的估算

对于FCL SE35、FCL SE50、FCL SE100及FCL PE100测序试剂盒，一张测序载片需要加载的DNB体积为

270 μL。根据样本的种类，每个样本的测序所需的数据量，决定DNB制备体系的体积为100 μL或50 μL。对于常规文库，对应每个100 μL及50 μL DNB制备体系所需的文库量分别为40 fmol及20 fmol；对于PCR free文库， 对应每个100 μL及50 μL DNB制备体系所需的文库量分别为75 fmol及37.5 fmol。下表为单份DNB制备体系所需ssDNA文库体积：

表4-3 FCL SE35/SE50/SE100/PE100所需ssDNA文库体积计算

样本	所需 ssDNA 文库体积 V（μL）	
	100 μL 体系	50 μL 体系
常规文库	40 fmol/C	20 fmol/C
PCR free	75 fmol/C	37.5 fmol/C

注：上表中C表示文库浓度（fmol/μL）

举例：样本A，所需数据量为a，pooling文库的总数据量需求为b，进行PE100测序。样本A所需的理论体积为： V=a/b*270 μL

当pooling样本个数＜6时，建议DNB制备体系的体积为100 μL，样本A的DNB制备个数为V/100，取整数+1。

当pooling样本个数≥6时，建议DNB制备体系的体积为50 μL，样本A的DNB制备个数为V/50，取整数+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。**

4.4.1.2 DNB 制备试剂准备

取出文库置于冰上备用，从DNB制备试剂盒中取出TE缓冲液、DNB制备缓冲液和DNB终止缓冲液置于室温解冻，取出DNB聚合酶混合液 I 置于冰上解冻，约0.5小时。待试剂融化后，使用旋涡振荡器震荡混匀5s，短暂离心置于冰上备用。

⚠ **注意：不同批次试剂盒严禁混用。**

4.4.1.3 制备 DNB

- 取用 0.2 mL 八连管或 PCR 管，在冰上按如下 DNB 制备反应组分 1 配制反应体系，以下体系为单份 DNB 制备体系，根据 4.4.1.1 ssDNA 文库所需量来选择制备反应体系、确认文库体积和制备份数:

表4-4 FCL SE35/SE50/SE100/PE100 DNB制备反应组分1

组分	100μL 体系加入量（μL）	50μL 体系加入量（μL）
文库 ssDNA	V	V
TE 缓冲液	20-V	10-V
DNB 制备缓冲液	20	10
总体积	40	20

- 将上述 DNB 制备反应体系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4-5 FCL SE35/SE50/SE100/PE100 DNB制备反应引物杂交条件

温度	时间
热盖（105℃）	On
95℃	1 min
65℃	1 min
40℃	1 min
4℃	Hold

- 取出 DNB 聚合酶混合液 II （LC） 置于冰上，短暂离心 5 s，置于冰上备用，使用前吹打混匀 6-8 次。

⚠ **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，在冰上向上述 PCR 管中加入如下 DNB 制备反应组分 2：

表4-6 FCL SE35/SE50/SE100/PE100 DNB制备反应组分2

组分	100μL 体系加入量（μL）	50μL 体系加入量（μL）
DNB 聚合酶混合液 I	40	20
DNB 聚合酶混合液 II （LC）	4	2

- 反应体系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4-7 FCL SE35/SE50/SE100/PE100 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，100μL 体系立即加入 20 μL DNB 终止缓冲液，50μL 体系即加入 10 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。

⚠ **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。制备好的 DNB 可置于 4℃保存备用（48 小时内使用）。**

注：

① 部分品牌 PCR 仪的热盖升降温速度慢，在热盖升降温过程中，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。

4.4.2 FCL PE150 DNB 制备

4.4.2.1 ssDNA 文库所需量的估算：

对于FCL PE150测序试剂盒，一张测序载片需要加载的DNB体积为300μL，单份DNB制备体系的体积为90 μL。对于常规文库，对应每个90 μL DNB制备体系所需的文库量为40 fmol；对于PCR free文库， 对应每个90 μL DNB制备体系所需的文库量为75 fmol。下表为单份DNB制备体系所需ssDNA文库体积：

表4-8 FCL PE150所需ssDNA文库体积计算

样本	所需 ssDNA 文库体积 V（μL）
常规文库	40 fmol/C
PCR free	75 fmol/C

注：上表中C表示文库浓度（fmol/μL）

举例：样本A，所需数据量为a，pooling文库的总数据量需求为b，进行PE150测序。样本A所需的理论体积为： V=a/b*300 μL

样本A的DNB制备个数为V/90，取整数+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。**

4.4.2.2 DNB 制备试剂准备

取出文库置于冰上备用，从DNB快速制备试剂盒中取出TE缓冲液、DNB制备缓冲液和DNB终止缓冲液置于室温解冻，取出DNB快速聚合酶混合液 II置于冰上解冻，约0.5 小时。待试剂融化后，使用漩涡振荡器震荡混匀5s，短暂离心置于冰上备用。

⚠ **注意：不同批次试剂盒严禁混用。**

4.4.2.3 制备 DNB

- 取用 0.2 mL 八连管或 PCR 管，在冰上按如下 DNB 制备反应组分 1 配制反应体系，以下体系为单份 DNB 制备体系，根据 4.4.2.1 ssDNA 文库所需量来确认文库体积及制备份数:

表4-9 FCL PE150 DNB制备反应组分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

*：TE缓冲液在此处使用完成后，需保留，此试剂还需用于DNB加载过程

- 将上述 DNB 制备反应体系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4-10 FCL PE150 DNB制备反应引物杂交条件

温度	时间
热盖（105℃）	On
95℃	1 min
65℃	1 min
40℃	1 min
4℃	Hold

- 取出 DNB 聚合酶混合液 II （LC） 置于冰上，短暂离心 5 s，置于冰上备用，使用前吹打混匀 6-8 次。

⚠ **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，在冰上向 PCR 管中加入如下 DNB 制备反应组分 2:

表4-11 FCL PE150 DNB制备反应组分2

组分	加入量（μL）
DNB 快速聚合酶混合液 II	40
DNB 聚合酶混合液 II （LC）	1.6

- 反应体系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4-12　FCL PE150 DNB制备滚环扩增条件

温度	时间
热盖（35℃）	On
30℃	10 min
4℃	Hold

- 当 PCR 仪温度达到 4℃后立即加入 10 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。

⚠ **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。制备好的 DNB 可置于 4℃保存备用（8 小时内使用）。**

注：

① 部分品牌 PCR 仪的热盖升降温速度慢，在热盖升降温过程中，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。

4.4.3　App-A FCL PE100 DNB 制备

4.4.3.1 ssDNA 文库所需量的估算：

对于App-A FCL PE100测序试剂盒，一张测序载片需要加载的DNB体积为270 μL。根据样本的种类，每个样本的测序所需的数据量，决定DNB的制备体系体积为100 μL或50 μL。对于常规文库， 对应每个100 μL及50 μL DNB制备体系所需的文库量分别为60 fmol及30 fmol；对于PCR free文库， 对应每个100 μL及50 μL DNB制备体系所需的文库量分别为75 fmol及37.5 fmol。下表为单份DNB制备体系所需ssDNA文库体积:

表4-13　App-A FCL PE100所需ssDNA文库体积计算

样本	ssDNA 文库体积 V（μL）	
	100 μL 体系	50 μL 体系
常规文库	60 fmol/C	30 fmol/C
PCR free	75 fmol/C	37.5 fmol/C

注：上表中C表示文库浓度（fmol/μL）

举例：样本A，所需数据量为a，pooling文库的总数据量需求为b，进行PE100测序。样本A所需的理论体积为： V=a/b*270 μL

当pooling样本个数＜6时，建议DNB制备体系的体积为100 μL，样本A的DNB制备个数为V/100，取整数

+1。

当pooling样本个数≥6时，建议DNB制备体系的体积为50 μL，样本A的DNB制备个数为V/50，取整数+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。**

4.4.3.2 DNB 制备试剂准备

取出文库置于冰上备用，从DNB制备试剂盒中取出TE缓冲液和DNB终止缓冲液置于室温解冻，取出DNB聚合酶混合液 I置于冰上解冻，从高通量双末端测序引物试剂盒（App-A）取出App-A DNB制备缓冲液置于室温解冻，约0.5 小时。待试剂融化后，使用漩涡振荡器震荡混匀5s，短暂离心置于冰上备用。

⚠ **注意：不同批次试剂盒严禁混用。**

4.4.3.3 制备 DNB

取用0.2 mL八连管或PCR管，在冰上按如下DNB制备反应组分1配制反应体系，以下体系为单份DNB制备体系，根据4.4.3.1 ssDNA文库所需量来选择制备反应体系、确认文库体积和制备份数:

表4-14 App-A FCL PE100 DNB制备反应组分1

组分	100μL 体系加入量（μL）	50μL 体系加入量（μL）
文库 ssDNA	V	V
TE 缓冲液	20-V	10-V
App-A DNB 制备缓冲液	20	10
总体积	40	20

- 将上述 DNB 制备反应体系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4-15 App-A FCL PE100 DNB制备反应引物杂交条件

温度	时间
热盖（105℃）	On
95℃	1 min
65℃	1 min
40℃	1 min
4℃	Hold

- 取出 DNB 聚合酶混合液 II （LC） 置于冰上，短暂离心 5 s，置于冰上备用，使用前吹打混匀 6-8 次。

⚠ **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，在冰上向 PCR 管中加入如下 DNB 制备反应组分 2：

表4-16 App-A FCL PE100 DNB制备反应组分2

组分	100μL 体系加入量（μL）	50μL 体系加入量（μL）
DNB 聚合酶混合液 Ⅰ	40	20
DNB 聚合酶混合液 Ⅱ （LC）	4	2

- 反应体系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4-17 App-A FCL PE100 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，100μL 体系立即加入 20 μL DNB 终止缓冲液，50μL 体系即加入 10 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。

⚠ **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。制备好的 DNB 可置于 4℃保存备用（48 小时内使用）。**

注：

① 部分品牌 PCR 仪的热盖升降温速度慢，在热盖升降温过程中，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。

4.4.4 App-A FCL PE150 DNB 制备

4.4.4.1 ssDNA 文库所需量的估算：

对于App-A FCL PE150测序试剂盒，一张测序载片需要加载的DNB体积为300 μL，单份DNB制备体系的体积为90 μL。对于常规文库， 对应每个90 μL DNB制备体系所需的文库量为60 fmol；对于PCR free文库， 对应每个90 μL DNB制备体系所需的文库量为75 fmol。下表为单份DNB制备体系所需ssDNA文库体积：

表4-18　App-A FCL PE150所需ssDNA文库体积计算

样本	所需 ssDNA 文库体积 V（μL）
常规文库	60 fmol/C
PCR free	75 fmol/C

注：上表中C表示文库浓度（fmol/μL）

举例：样本A，所需数据量为a，pooling文库的总数据量需求为b，进行PE150测序。样本A所需的理论体积为： V=a/b*300 μL

样本A的DNB制备个数为V/90，取整数+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。**

4.4.4.2 DNB 制备试剂准备

取出文库置于冰上备用，从DNB快速制备试剂盒中取出TE缓冲液和DNB终止缓冲液置于室温解冻，取出DNB快速聚合酶混合液 II置于冰上解冻，从高通量双末端测序引物试剂盒（App-A）取出App-A DNB制备缓冲液置于室温解冻，约0.5 小时。待试剂融化后，使用旋涡振荡器震荡混匀5s，短暂离心置于冰上备用。

⚠ **注意：不同批次试剂盒严禁混用。**

4.4.4.3 制备 DNB

- 取用 0.2 mL 八连管或 PCR 管，在冰上按如下 DNB 制备反应组分 1 配制反应体系，以下体系为单份 DNB 制备体系，根据 4.4.4.1 ssDNA 文库所需量来确认文库体积及制备份数:

表4-19　App-A FCL PE150 DNB制备反应组分1

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

*：TE缓冲液在此处使用完成后，需保留，此试剂还需用于DNB加载过程

- 将上述 DNB 制备反应体系用旋涡振荡器震荡混匀，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4-20　App-A FCL PE150 DNB制备反应引物杂交条件

温度	时间
热盖（105℃）	On
95℃	1 min
65℃	1 min
40℃	1 min
4℃	Hold

- 取出 DNB 聚合酶混合液 II （LC） 置于冰上，短暂离心 5 s，置于冰上备用，使用前吹打混匀 6-8 次。

⚠ **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，在冰上向上述 PCR 管中加入如下 DNB 制备组分 2：

表4-21　App-A FCL PE150 DNB制备反应组分2

组分	加入量（μL）
DNB 快速聚合酶混合液 II	40
DNB 聚合酶混合液 II （LC）	1.6

- 反应体系用旋涡振荡器震荡混匀，迷你离心机离心 5s，即刻置于 PCR 仪中，反应条件如下：

表4-22　App-A FCL PE150 DNB制备滚环扩增条件

温度	时间
热盖（35℃）	On
30℃	10 min
4℃	Hold

- 当 PCR 仪温度达到 4℃后立即加入 10 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。

⚠ **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。制备好的 DNB 可置于 4℃保存备用（8 小时内使用）。**

注：

① 部分品牌 PCR 仪的热盖升降温速度慢，在热盖升降温过程中，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。、

4.4.5 App-D FCL PE150 DNB 制备

4.4.5.1 ssDNA 文库所需量的估算：

对于App-D FCL PE150测序读长，一张测序载片需要加载的DNB体积为300μL，单份DNB制备体系的体积为90 μL。对于常规文库，对应每个90 μL DNB制备体系所需的文库量为60 fmol；对于PCR free文库，对应每个90 μL DNB制备体系所需的文库量为75 fmol。下表为单份DNB制备体系所需ssDNA文库体积：

表4-23 App-D FCL PE150所需ssDNA文库体积计算

样本	所需 ssDNA 文库体积 V（μL）
常规文库	60 fmol/C
PCR free	75 fmol/C

注：上表中C表示文库浓度（fmol/μL）

举例：样本A，所需数据量为a，pooling文库的总数据量需求为b，进行PE150测序。样本A所需的理论体积为： V=a/b*300 μL

样本A的DNB制备个数为V/90，取整数+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。**

4.4.5.2 DNB 制备试剂准备

取出文库置于冰上备用，从DNB快速制备试剂盒中取出TE缓冲液和DNB终止缓冲液置于室温解冻，取出DNB快速聚合酶混合液II置于冰上解冻，从高通量测序引物试剂盒（App-D）取出App-D DNB制备缓冲液置于室温解冻，约0.5 小时。待试剂融化后，使用漩涡振荡器震荡混匀5s，短暂离心置于冰上备用。

⚠ **注意：不同批次试剂盒严禁混用。**

4.4.5.3 制备 DNB

- 取用 0.2 mL 八连管或 PCR 管，在冰上按如下 DNB 制备反应组分 1 配制反应体系，以下体系为单份 DNB 制备体系，根据 4.4.5.1 ssDNA 文库所需量来确认文库体积及制备份数:

表4-24 App-D FCL PE150 DNB制备反应组分1

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

*：TE缓冲液在此处使用完成后，需保留，此试剂还需用于DNB加载过程

- 将上述 DNB 制备反应体系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4-25 App-D FCL PE150 DNB制备反应引物杂交条件

温度	时间
热盖（105℃）	On
95℃	1 min
65℃	1 min
40℃	1 min
4℃	Hold

- 取出 DNB 聚合酶混合液 II （LC） 置于冰上，短暂离心 5 s，置于冰上备用，使用前吹打混匀 6-8 次。

⚠ **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，在冰上向上述 PCR 管中加入如下 DNB 制备组分 2：

表4-26 App-D FCL PE150 DNB制备反应组分2

组分	加入量（μL）
DNB 快速聚合酶混合液 II	40
DNB 聚合酶混合液 II （LC）	1.6

- 反应体系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4-27　App-D FCL PE150 DNB制备滚环扩增条件

温度	时间
热盖（35℃）	On
30℃	10 min
4℃	Hold

- 当 PCR 仪温度达到 4℃后立即加入 10 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。

⚠ **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。制备好的 DNB 可置于 4℃保存备用（8 小时内使用）。**

注：

③ 部分品牌 PCR 仪的热盖升降温速度慢，在热盖升降温过程中，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，确保进行 DNB 反应时热盖处于工作温度。

④ 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。

4.4.6　stLFR FCL PE100 DNB 制备

4.4.6.1 dsDNA 文库所需量的估算：

对于stLFR FCL PE100测序试剂盒，一张测序载片需要加载的DNB体积为270 μL，单份DNB制备体系的体积为80 μL。对应每个80 μLDNB制备体系所需的文库量分别为30ng。单份DNB制备体系所需文库体积为：V=30 ng/C，C表示文库浓度（ng/μL）

举例：样本A，所需数据量为a，pooling文库的总数据量需求为b，进行PE100测序。样本A所需的理论体积为： V=a/b*270 μL

样本A的DNB制备个数为V/80，取整数+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。**

4.4.6.2 DNB 制备试剂准备

取出文库置于冰上备用，从DNB加载试剂盒 （stLFR） 中取出TE缓冲液、stLFR DNB制备缓冲液和DNB终止缓冲液置于室温解冻，取出DNB聚合酶混合液 III置于冰上解冻，约0.5 小时。 待试剂融化后，使用漩涡振荡器震荡混匀5s，短暂离心置于冰上备用。

⚠ **注意：不同批次试剂盒严禁混用。**

4.4.6.3 制备 DNB

- 取用 0.2 mL 八连管或 PCR 管，在冰上按如下 DNB 制备反应组分 1 配制反应体系，以下体系为单份 DNB 制备体系，根据 4.4.6.1 dsDNA 文库所需量来确认文库体积及制备份数:

表4-28 stLFR FCL PE100 DNB制备反应组分1

组分	80μL 体系加入量（μL）
文库 dsDNA	V
TE 缓冲液	16-V
stLFR DNB 制备缓冲液	16
总体积	32

- 将上述 DNB 制备反应体系用旋涡振荡器震荡混匀，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4-29 stLFR FCL PE100 DNB制备反应引物杂交条件

温度	时间
热盖（105℃）	On
95℃	3 min
40℃	3 min
4℃	Hold

- 取出 DNB 聚合酶混合液 IV 置于冰上，短暂离心 5 s，置于冰上备用，使用前缓慢吹打混匀 6-8 次。

⚠ **注意：请勿将 DNB 聚合酶混合液 IV 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，在冰上向上述 PCR 管中加入如下 DNB 制备反应组分 2:

表4-30 stLFR FCL PE100 DNB制备反应组分2

组分	80μL 体系加入量（μL）
DNB 聚合酶混合液 III	32
DNB 聚合酶混合液 IV	3.2

- 反应体系用旋涡振荡器震荡混匀，迷你离心机离心 5s，即刻置于 PCR 仪中，反应条件如下:

表4-31　stLFR FCL PE100 DNB制备滚环扩增条件

温度	时间
热盖（35℃）	On
30℃	30 min
4℃	Hold

- 当 PCR 仪温度达到 4℃后立即加入 16 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。

⚠ **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。制备好的 DNB 可置于 4℃保存备用（48 小时内使用）。**

注：

① 部分品牌 PCR 仪的热盖升降温速度慢，在热盖升降温过程中，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。

4.5 DNB浓度测定及pooling

4.5.1　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。PE100及以下读长，浓度 8ng/μL（标准文库15ng/μL） 以上为合格，PE150，浓度 5ng/μL（标准文库10ng/μL）以上为合格，浓度不合格的需重新制备。如样本数量多时，建议分批定量，避免荧光猝灭导致DNB浓度定量不准确。定量具体操作见附件一。如浓度超过40 ng/μL，需要按照下表稀释至20ng/μL后使用：

注：为保证FCL PE150，App-A FCL PE150 和App-D FCL PE150 DNB的持续滚环扩增能力，需用TE缓冲液进行DNB稀释，DNB保存时间≤8小时。

表4-32　DNB稀释方案

测序类型	稀释 DNB 所需试剂	保存条件	保存时间
FCL SE35	DNB 加载缓冲液 I	4℃	≤48 小时
FCL SE50	DNB 加载缓冲液 I	4℃	≤48 小时
FCL SE100	DNB 加载缓冲液 I	4℃	≤48 小时
FCL PE100	DNB 加载缓冲液 I	4℃	≤48 小时
App-A FCL PE100	DNB 加载缓冲液 I	4℃	≤48 小时
stLFR FCL PE100	DNB 加载缓冲液 I	4℃	≤48 小时
FCL PE150	TE 缓冲液	4℃	≤8 小时
App-A FCL PE150	TE 缓冲液	4℃	≤8 小时
App-D FCL PE150	TE 缓冲液	4℃	≤8 小时

4.5.2　DNB pooling

当被pooling样本为同类应用或具有类似的插入片段时，根据样本所需的数据量和DNB浓度计算各样本的DNB pooling体积，计算过程如下：

- 计算每个样本理论相对量：

A样本的理论相对量为：A1= A样本所需数据量/A样本DNB浓度

B样本的理论相对量为：B1=B样本所需数据量/B样本DNB浓度

……

H样本的理论相对量为：H1=H样本所需数据量/H样本DNB浓度

- 计算总相对量：

V=A1+B1+……+H1

- 计算每个样本 pooling 体积：

FCL SE35、FCL SE50、FCL SE100、FCLPE100、App-A FCL PE100及stLFR FCL PE100每张载片所

需DNB总体积为270μL，每个样本的pooling体积为：

A样本的pooling体积为：A2=270*A1/V

B样本的pooling体积为：B2=270*B1/V

……

H样本的pooling体积为：H2=270*H1/V

FCL PE150、App-A FCLPE150和App-D FCL PE150读长每张载片所需DNB总体积为300μL，每个样本的pooling体积为：

A样本的pooling体积为：A2=300*A1/V

B样本的pooling体积为：B2=300*B1/V

……

H样本的pooling体积为：H2=300*H1/V

⚠ **注：用尖口枪头进行 DNB 取样，所有样本 DNB 取样完成后，再用阔口枪头进行混匀。**

第五章 DNB加载

5.1 准备样本加载试剂板和缓冲液

此部分内容包含2种样本加载试剂板和缓冲液准备，可按需查阅：

FCL SE35、FCL SE50、FCL SE100、FCLPE100、App-A FCL PE100及stLFR FCL PE100样本加载试剂板和缓冲液准备，见5.1.1。

FCLPE150、App-A FCL PE150及App-D FCL PE150样本加载试剂板和缓冲液准备，见5.1.2。

5.1.1 FCL SE35、FCL SE50、FCL SE100、FCLPE100、App-A FCL PE100 及 stLFR FCL PE100 样本加载试剂板和缓冲液准备

5.1.1.1 解冻样本加载试剂板：

从DNB加载试剂盒中取出样本加载试剂板（如进行stLFR文库的测序，则从DNB加载试剂盒（stLFR）中取出样本加载试剂板（stLFR）），置于常温水浴解冻2小时，完全解冻后，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）。使用前轻轻颠倒混匀5次，离心1min。

5.1.1.2 解冻 DNB 加载试剂：

取出DNB加载缓冲液 II（如进行App-A文库测序，还需从高通量双末端测序引物试剂盒（App-A）中取出App-A 测序引物工作液1，置于室温解冻0.5小时，待融化后，使用漩涡振荡器震荡混匀5s，短暂离心后置于冰上备用，如发现DNB加载缓冲液 II中出现结晶，使用漩涡振荡器持续剧烈振荡1-2min至沉淀重新溶解，短暂离心后方可使用。

5.1.1.3 准备 0.1M NaOH 试剂

0.1M NaOH的配制方法见8.2清洗试剂准备。每个样本加载试剂板需要至少4 mL的0.1M NaOH试剂。

5.1.1.4 配制 DNB 加载体系

- 取出 0.5 mL 冻存管，按表 5-1 所示配制 DNB 加载体系：

表5-1 FCL SE35/SE50/SE100/PE100、App-A FCL PE100及stLFR FCL PE100 DNB加载体系

加样顺序	组分	加入量（μL）
1	DNB*	270
2	DNB 加载缓冲液 II	90
3	DNB 聚合酶混合液 II （LC）	1

*：该表格中的DNB指的是4.5.2中已pooling好的DNB样本

- 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。

5.1.2 FCL PE150、App-A FCL PE150 及 App-D FCL PE150 快速样本加载试剂板和缓冲液准备

5.1.2.1 解冻快速样本加载试剂板

从DNB快速加载试剂盒中取出快速样本加载试剂板，置于常温水浴解冻2小时，完全解冻后，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）。使用前轻轻颠倒混匀5次，离心1min。

5.1.2.2 解冻 DNB 加载试剂

从DNB快速加载试剂盒中取出DNB加载缓冲液 IV（如进行App-A文库测序，还需从高通量双末端测序引物试剂盒（App-A）中取出App-A 测序引物工作液1；如进行App-D类型文库测序，还需从高通量测序引物试剂盒（App-D）中取出App-D 测序引物工作液1），置于冰上解冻0.5小时，待融化后，使用漩涡振荡器震荡混匀5s，短暂离心后置于冰上备用。

5.1.2.3 准备 0.1M NaOH 试剂

0.1M NaOH的配制方法见8.2清洗试剂准备。每个样本加载试剂板需要至少4 mL的0.1M NaOH试剂。

5.1.2.4 配制 DNB 加载体系

- 取出 0.5 mL 冻存管，按表 5-2 所示配制 DNB 加载体系：

表5-2　FCL PE150、App-A FCL PE150及App-D FCL PE150 DNB加载体系

加样顺序	组分	加入量（μL）
1	DNB*	300
2	DNB 加载缓冲液 IV	150

*：该表格中的DNB指的是4.5.2中已pooling好的DNB样本

- 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。

⚠ **注：该 DNB 加载体系要现配现用，并需要全程在冰上进行配制和放置（30min 内进行加载）。**

5.2 准备测序载片

- 从测序载片试剂盒中取出测序载片。
- 撕开外包装。
- 打开包装盒，取出载片，检查载片是否完整。
- 使用压缩空气罐将载片背面吹净。

5.3 DNB加载

- 初次启动 MGIDL-T7RS，需先关闭装载仓仓门。
- 进入 MGIDL-T7RS 程序，输入用户名“user”密码“123”，登录进入主界面，如图 5-1：

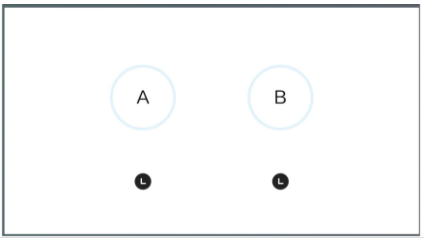

图 5-1　MGIDL-T7RS 主界面

- 任选空闲状态下的 A/B 进行操作，界面如图 5-2：

图 5-2　MGIDL-T7RS 操作选择界面

- 点击【装载】，进入如图 5-3 界面：

图 5-3　MGIDL-T7RS 信息输入界面

- 打开装载仓仓门。
- 如图 5-3，点击“DNB ID”后的文本框，在文本框中输入 DNB 信息（注：仅限于数字或字母或数字与字母组合）后，将装有 DNB 加载体系的 0.5 mL 冻存管，按照如图 5-6 所示放置在 MGIDL-T7RS 的 DNB 试剂管孔中，界面显示 DNB 管已放置。
- 如图 5-4，将样本加载试剂板对准 RFID 扫描区，ID 信息显示在样本加载试剂板 ID 后的文本框中（如果未显示，可按提示手动输入）。

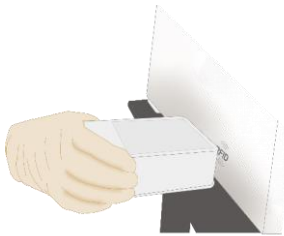

图 5-4　样本加载试剂板信息录入

- 撕去样本加载试剂板封膜，在 11 号孔位中加入 4 mL 0.1M NaOH，样本加载试剂板孔位如图 5-5 所示：

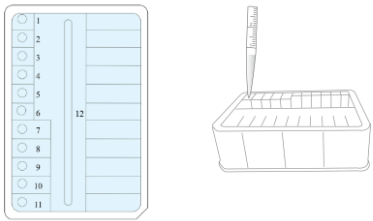

图 5-5　样本加载试剂板孔位信息及加液操作

- 如进行 App-A 文库测序，需将 1 号孔内试剂吸尽弃用，再加入 2 mL App-A 测序引物工作液 1。
- 如进行 App-D 文库测序，需将 1 号孔内试剂吸尽弃用，再加入 2 mL App-D 测序引物工作液 1。
- 将准备好的样本加载试剂板，按照如图 5-6 所示放置在 MGIDL-T7RS 的试剂板托架上，界面显示试剂板已放置。

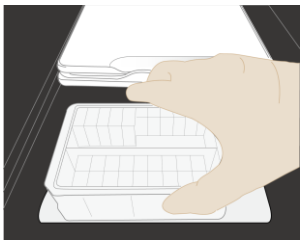

图 5-6　样本加载试剂板放置示意图

- 如图 5-7，将测序载片对准 RFID 扫描区，ID 信息显示在载片 ID 后的文本框中（如果未显示，可按提示手动输入）；握住载片两侧，如图 5-8 所示将载片上的定位凸起向上对准载片平台上的定位凹槽，并将载片框抵靠在载片平台下框处，放置载片。

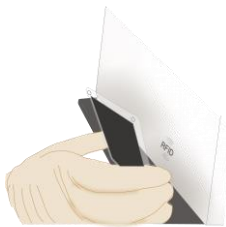

图 5-7　测序载片信息确认

注：放置载片前，需确认载片平台的四个密封垫无缺失。

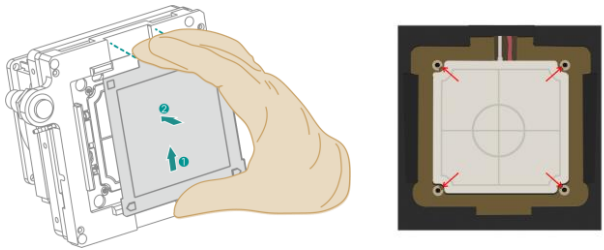

图 5-8　载片放置和密封垫示意图

- 如图 5-9，按下载片平台上的载片吸附按钮，轻轻向下按压载片边缘，使其与载片平台完全贴合，载片吸附按钮显示绿灯，界面显示载片已放置：

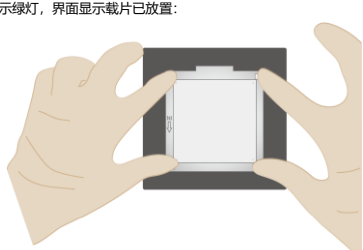

图 5-9　按压测序载片

注：

① 放置载片前需用压缩空气罐吹净载片背面和载片平台表面的灰尘。

② 请勿按压载片玻璃，以免损坏载片或将指纹及杂质残留在玻璃表面。

③ 放置好载片后，请勿移动载片，否则可能造成载片流道孔和密封垫之间错位。

④ 如未成功吸附，请用无尘布蘸取 75%酒精擦拭载片平台和载片背面，并用压缩空气罐吹净。

- 关闭装载仓仓门。
- 点击【开始】，选择【是】，界面如图 5-10：

图 5-10　MGIDL-T7RS 确认装载界面

- 载片装载开始，如图 5-11：

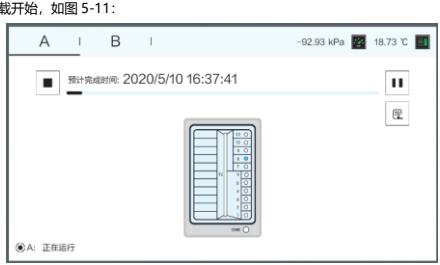

图 5-11　MGIDL-T7RS 装载载片界面

- 当界面如图 5-12 时，表示载片已装载完成，耗时约 2 小时：

图 5-12　MGIDL-T7RS 载片装载完成界面

- 按下载片平台上的载片吸附按钮，取下装载完成的载片，可进行测序。 如暂不使用，请将载片平放在 4 ℃ 冰箱内保存，并于 48 小时内使用。

  注：装载完成的载片建议用自封袋保存，以防边缘风干。

- 取下装载完成的载片后，放入清洗载片，按下载片平台上的载片吸附按钮，点击图 5-12 中的【确定】。

- 如图 5-13，点击【后清洗】， 如图 5-14，在弹出的对话框中选择【是】，开始 MGIDL-T7RS 清洗，耗时约 20min。

图 5-13　MGIDL-T7RS 后清洗界面

图 5-14　MGIDL-T7RS 后清洗确认界面

- MGIDL-T7RS 清洗开始，如图 5-15：

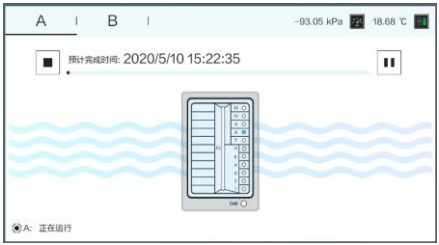

图 5-15　MGIDL-T7RS 清洗界面

- 当界面如图 5-16 时，表示清洗已完成，点击【完成】后可再次进行载片的装载。

图 5-16　MGIDL-T7RS 清洗完成界面

第六章 测序前准备

6.1 测序试剂槽准备

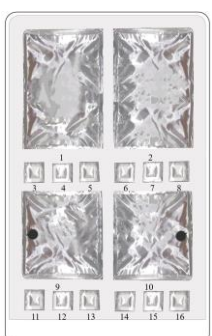

图 6-1　试剂槽孔位信息及 9 号和 10 号孔开孔示意

- 从高通量测序试剂盒中取出测序试剂槽于常温水浴解冻 4-5 小时，完全解冻后，置于 2-8℃冰箱备用（或者提前 24 小时将其置于 2-8℃冰箱解冻备用），然后将试剂槽置于正前方，前后左右剧烈晃动

10-20 次，使试剂槽内各试剂混合均匀。

注：如1号孔中发现墨绿色结晶，是该孔位试剂原料析出，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。

- **（仅进行 PE 双 Barcode 测序时需要）**从 CPAS 条形码引物 3 试剂盒中取出 CPAS AD153 条形码引物 3 工作液，将其置于室温完全融化后，旋涡震荡 5s 使其充分混匀。
- **（仅进行 App-A 双末端引物测序需要）**从高通量双末端测序引物试剂盒（App-A）中取出 App-A 条形码引物工作液 2，App-A MDA 引物工作液，App-A 测序引物工作液 2，从高通量条形码引物 3 试剂盒（App-A）中取出 App-A 条形码引物工作液 3（仅 App-A 双末端的双 Barcode 测序时需要），室温融化并旋涡震荡 5 s，使其充分混匀。
- **（仅进行 App-D 双末端引物测序需要）**从高通量测序引物试剂盒（App-D）中取出 App-D 条形码引物工作液 2，App-D MDA 引物工作液，App-D 测序引物工作液 2，App-D 条形码引物工作液 3（仅 App-D 双末端的双 Barcode 测序时需要 App-D 条形码引物工作液 3），室温融化并旋涡震荡 5 s，使其充分混匀。
- 使用前必须在 9 号孔位加入相应量的 dNTPs 混合液 IV 或 dNTPs 混合液 V 和 DNA 聚合酶混合液，在 10 号孔位加入相应量的 dNTPs 混合液 II 和 DNA 聚合酶混合液。如果是 PE 测序，还需在 8 号孔中加入 MDA 聚合酶混合液和 MDA 试剂的混合液才能使用。试剂孔位及 9 号和 10 号孔开孔示意如图 6-1 所示。
- 提前 1 小时取出 dNTPs 混合液 IV 或 dNTPs 混合液 V 和 dNTPs 混合液 II，室温融化后，震荡混匀 dNTPs 混合液 IV 或 dNTPs 混合液 V 和 dNTPs 混合液 II，置于冰上备用。
- 打开试剂槽盖板，先使用无尘纸擦净冷凝水，再喷洒 75%酒精于试剂槽封膜表面并用无尘纸擦净，使用洁净的 1 mL 枪头，在 9 号孔左侧和 10 号孔右侧边缘位置轻轻戳出一个直径约 2 cm 的加样孔位，如图 6-1 所示。
- 取出 DNA 聚合酶混合液，上下颠倒缓慢混匀，置于冰上备用。
- 取对应量程的移液器，按照表 6-1 体积，将 dNTPs 混合液 IV 或 dNTPs 混合液 V 和 DNA 聚合酶混合液加入到 9 号孔中：

表6-1 测序试剂槽9号孔试剂加样表

产品型号	dNTPs 混合液 IV (mL)	dNTPs 混合液 V (mL)	DNA 聚合酶混合液 (mL)
FCL SE35	1.7	/	1.7
FCL SE50	2.0	/	2.0
FCL SE100	3.0	/	3.0
FCL PE100	/	3.9	3.9
FCL PE150	/	5.3	5.3
App-D FCL PE150	/	5.3	5.3
App-A FCL PE100	/	3.9	3.9
App-A FCL PE150	/	5.3	5.3
stLFR FCL PE100	5.4	/	5.4

- 取对应量程的移液器，按照表 6-2 体积，将 dNTPs 混合液 II 和 DNA 聚合酶混合液加入到 10 号孔中：

表6-2 测序试剂槽10号孔试剂加样表

产品型号	dNTPs 混合液 II（mL）	DNA 聚合酶混合液（mL）
FCL SE35	4.5	1.5
FCL SE50	5.4	1.8
FCL SE100	8.1	2.7
FCL PE100	10.2	3.4
FCL PE150	13.8	4.6
App-D FCL PE150	13.8	4.6
App-A FCL PE100	10.2	3.4
App-A FCL PE150	13.8	4.6
stLFR FCL PE100	14.7	4.9

- 使用配套的透明封口膜将 9 号和 10 号加样孔封住，切勿盖住孔位中心位置，避免影响试剂针下降。
- 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，直至 9 号试剂上下层颜色均匀一致，以保证试剂的充分混匀。此时 SE 测序试剂槽的上机前准备工作完成。

如进行 PE 测序，还需进行以下操作：

- 使用枪头戳破 8 号孔的封膜。用 1 mL 移液器移取 600 μL MDA 聚合酶混合液加入到 MDA 试剂的试剂管中，并反复吹打 3 次以上。上下颠倒混匀 4-6 次，使其充分混匀，如图 6-2，再将混合液沿管壁加入 8 号孔中。此时 PE 测序试剂槽的上机前准备工作完成。

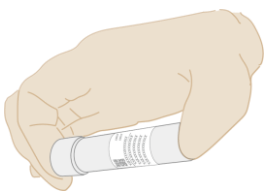

图 6-2　MDA 试剂加酶后混匀

⚠ **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！**

如进行PE双Barcode测序，还需进行以下操作：

- 使用枪头戳破 3 号孔封膜，取 3.5 mL CPAS AD153 条形码引物 3 工作液沿管壁加入到 3 号孔中。

如进行 App-A PE 测序，在普通 PE 单 barcode 测序操作的基础上还需进行以下操作：

- 取对应量程的移液器，按照下表，使用枪头将相应孔的封膜戳破，再将引物工作液加入对应的孔中，加入时确保管底部无气泡：

表6-3　App-A双末端引物测序引物工作液加样表

引物工作液	孔位	体积 mL
App-A 条形码引物工作液 2	4 号	3.5
App-A MDA 引物工作液	6 号	4.2
App-A 测序引物工作液 2	13 号	4.2
App-A 条形码引物工作液 3*	3 号	3.5

*：仅App-A双末端的双Barcode测序时需要

如进行 App-D PE 测序，在普通 PE 单 barcode 测序操作的基础上还需进行以下操作：

- 取对应量程的移液器，按照下表，使用枪头将相应孔的封膜戳破，再将引物工作液加入对应的孔中，

加入时确保管底部无气泡：

表6-4　App-D双末端引物测序引物工作液加样表

引物工作液	孔位	体积 mL
App-D 条形码引物工作液 2	4 号	3.5
App-D MDA 引物工作液	6 号	4.2
App-D 测序引物工作液 2	13 号	4.2
App-D 条形码引物工作液 3*	3 号	3.5

*：仅App-D双末端的双Barcode测序时需要

- 盖上测序试剂槽盖板。

6.2 准备清洗试剂槽

- 使用前顺时针摇晃清洗试剂槽 5-10 次，再逆时针摇晃 5-10 次，以保证试剂的充分混匀。
- 喷洒 75%酒精于清洗试剂槽封膜表面并用无尘纸擦净，选择任意一个 2 号孔位，使用洁净的 1 mL 枪头将膜戳破，试剂孔位示意图如图 6-3 所示。

图 6-3　清洗试剂槽孔位信息

- 如图 6-4，用电动移液器移取 45 mL 0.1M NaOH 从戳孔的位置加入到 2 号孔位中。0.1M NaOH 配制方法见 8.2 清洗试剂准备。

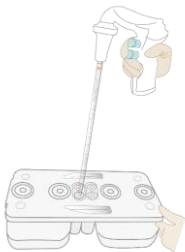

图 6-4　清洗试剂槽加液操作

6.3 纯水试剂桶准备

检查纯水桶水量是否充足，如纯水不足，会导致测序失败。及时补充纯水，并注意打开纯水桶气孔：

表6-5　纯水用量表（L）

测序试剂盒	1 张载片	2 张载片	3 张载片	4 张载片
FCL SE35	1.0	2.0	3.0	4.0
FCL SE50	1.0	2.0	3.0	4.0
FCL SE100	1.5	3.0	4.5	6.0
FCL PE100	3.0	6.0	9.0	12.0
FCL PE150	4.5	9.0	13.5	18.0
App-D FCL PE150	4.5	9.0	13.5	18.0
App-A FCL PE100	3.0	6.0	9.0	12.0
App-A FCL PE150	4.5	9.0	13.5	18.0
stLFR FCL PE100	3.5	7.0	10.5	14.0

注意：该纯水参与测序，故必须保证洁净，需一周彻底更新一次桶内纯水。灌装新的纯水前，用 75%酒精喷洒于纯水桶盖内部及纯水管表面，再用干净的无尘布擦拭干净，并用干净的纯水清洗纯水桶三次，此操作需在测序仪空闲状态下进行。纯水更新完成后，将纯水管穿过桶盖和桶壁上的孔，直至纯水桶底部，拧紧桶盖。纯水桶的灌装和安装方法详见《H-020-000155-00 DNBSEQ-T7RS 基因测序仪产品说明书》的“准备工作：准备纯水桶”。

第七章 测序

7.1 放置试剂槽

- 将试剂仓门打开，用纯水润湿无尘纸或无尘布，并用其擦拭低温仓内底部及侧面，保持清洁干燥。

⚠ **注意：清洁低温仓内壁时注意不要被上方的试剂针划伤。**

- 将测序试剂槽放入上层低温仓，将清洗试剂槽放入下层常温仓。

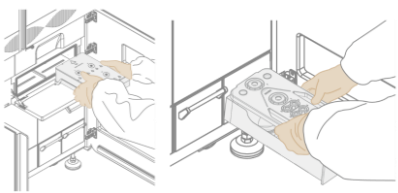

图 7-1 测序试剂槽和清洗试剂槽放置

- 关闭低温仓仓门和常温仓仓门，最后关闭试剂仓仓门。

7.2 进入主界面

- 输入用户名“user”密码“123”，登录进入主界面，如图 7-2：

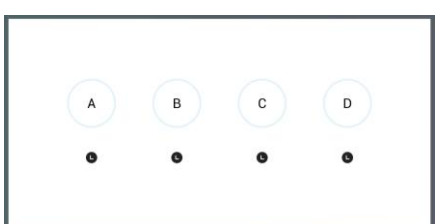

图 7-2 DNBSEQ-T7RS 主界面

7.3 放置测序载片

- 任选空闲状态下的 A/B/C/D 进行测序，点击界面上的【测序】，选择【新建测序】，如图 7-3：

图 7-3　DNBSEQ-T7RS 操作选择界面

- 将加载完成的测序载片用压缩空气罐吹净，确保载片表面和背面无可见灰尘后，将载片放入芯驱，按压芯驱按钮，使芯驱收回，如图 7-4：

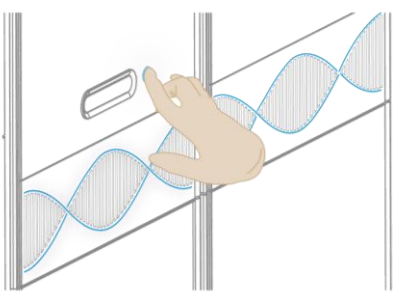

图 7-4　按压芯驱按钮

7.4 测序参数配置

- RFID 自动识别测序试剂槽、清洗试剂槽及载片 ID 后，ID 信息将显示在相应的文本框中，如图 7-5（如无法自动识别，可按提示手动输入）：

图 7-5　DNBSEQ-T7RS 测序参数输入及选择界面

- 如图 7-5，点击测序方案后的【▼】，在下拉菜单里选择相应的测序方案，如需自定义测序方案，则在下拉菜单里选择【自定义测序方案】，出现如图 7-6 所示界面：

图 7-6　DNBSEQ-T7RS 自定义测序方案设置

自定义测序方案填写规则如下：

① 测序方案名称，支持字母、数字、“+”、“_”和“-”。

② 测序方案名称会进行重复性校验，即新的测序方案名称不能与已有测序方案名称重复。

③ 一链读长、二链读长、Barcode 读长、DualBarcode 读长，仅支持数字。

④ 一链暗反应读长、二链暗反应读长，支持用户设置多段暗反应读长，多段之间以英文“,”分割，不要加空格，每段支持“数字”和“数字-数字”。

注：暗反应是指只进行生化反应，不做采图处理的cycle。

举例：目前有一个测序需求如下，

① 一链读长为 100 cycles，二链读长为 100 cycles。

② Barcode 读长为 10 cycles，DualBarcode 读长为 10 cycles。

③ 在一链读长的 100 个 cycles 中，第 20 到第 30、第 50 到第 60 个 cycle 需要做暗反应；二链读长的 100 个 cycles 中，第 20 到第 30 个 cycle 需要做暗反应。

④ 将该脚本命名为 PE100+10+10+Dark。

自定义测序方案填写如图 7-6 示例 所示:

图 7-6 示例

注：stLFR FCL PE100测序方案的填写为一链读长100 cycles，二链读长100 cycles，Barcode读长42 cycles，DualBarcode读长10 cycles。

- 如图 7-7，点击红框内的【▼】，选择相应的标签序列。如需自定义标签序列，则选择【导入】，导入自定义标签序列文件即可。可选择 Barcode 和 DualBarcode 是否拆分（stLFR FCL PE100 只选择 DualBarcode 进行拆分）：

图 7-7　DNBSEQ-T7RS 标签序列设置

- 点击高级选项后的展开符号，出现如图 7-8 所示界面。支持选择是否为自定义引物，支持选择下机是否自动清洗：

注：自定义引物是指需要进行引物替换测序方式，如App-A文库/App-D文库测序属于自定义引物，而stLFR文库测序不属于自定义引物。

图 7-8　DNBSEQ-T7RS 高级选项设置

7.5 复核信息

- 点击【下一步】，进行信息回顾，如图 7-9（以 FCL PE150 为例）：

图 7-9　DNBSEQ-T7RS 测序信息回顾界面

7.6 开始测序

- 确认信息无误后，点击【开始】，选择【是】，如图 7-10：

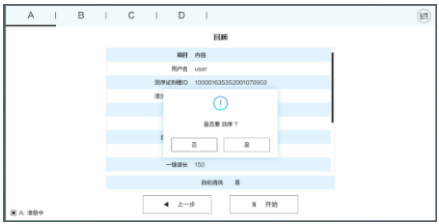

图 7-10　DNBSEQ-T7RS 测序确认界面

- 当界面如图 7-11，测序开始，此时上机操作完毕：

图 7-11　DNBSEQ-T7RS 测序开始界面

- 测序过程中，点击界面上的，可以回顾测序信息，并修改是否下机自动清洗，如图 7-12：

图 7-12　DNBSEQ-T7RS 修改是否自动清洗界面

- 当界面如图 7-13 时，测序及清洗完成，此次上机完毕：

图 7-13　DNBSEQ-T7RS 测序完成界面

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
MGIDL-T7RS 自动清洗	正常加载完成下机后，更换废弃载片，点击“后清洗”，MGIDL-T7RS 自动进行清洗，不需要更换样本加载试剂板。
DNBSEQ-T7RS 自动清洗	正常下机后，测序仪自动进行清洗，不需要实验人员进行操作。
MGIDL-T7RS 手动清洗	MGIDL-T7RS 首次进行工作，间隔一周以上未进行工作，工程师检修后及出现杂质的情况下，进行手动清洗 。
DNBSEQ-T7RS 手动清洗	DNBSEQ-T7RS 首次进行工作，间隔一周以上未进行工作，上机时选择不进行自动清洗，工程师检修后及出现杂质的情况下，进行手动清洗。

8.2 清洗试剂准备

- 按照如下体积配制 1 M NaCl + 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
5 M NaCl 溶液	200 mL
100% Tween-20	0.5 mL
纯水	799.5 mL

- 按照如下体积配制 0.1 M NaOH（4℃存放，有效期 28 天）：

表8-3：清洗试剂准备（2）

试剂	用量
2 M NaOH 溶液	50 mL
实验室级用水	950 mL

8.3 清洗套装

- 清洗维护所使用的空试剂槽和载片随仪器配送。
- 用于清洗的试剂板及试剂槽每次使用前必须进行清洁，清洗试剂重新灌装，持续使用三个月后请更换。
- 清洗所用的载片是下机的废旧载片，每张可循环使用 3 次。
- MGIDL-T7RS 清洗试剂板试剂灌装：取干净的空的样本加载试剂板，在 11 号孔位灌装 4 mL 的 0.1 M NaOH，在 10 号孔位灌装 4 mL 的 1 M NaCl + 0.05% Tween-20，在 9 号孔位灌装 4 mL 的纯水，在 12 号孔位灌装 20 mL 的纯水。
- DNBSEQ-T7RS 清洗维护试剂槽 1 准备：即干净的空的测序试剂槽：
- DNBSEQ-T7RS 清洗维护试剂槽 2 准备：取干净的清洗试剂槽，在任意一个 2 号孔位灌装 45 mL 的 0.1 M NaOH，在任意一个 3 号孔位灌装 45 mL 的 1 M NaCl + 0.05% Tween-20。

8.4 手动清洗流程

8.4.1 MGIDL-T7RS 手动清洗

- 进入程序。
- 输入密码“123”，登录主界面。
- 选择将要进行清洗的一侧。
- 打开装载仓仓门。
- 使用灌装好清洗试剂的 MGIDL-T7RS 清洗试剂板，放入需要进行清洗的一侧，关闭仓门。
- 按压载片吸附按钮，等待负压释放后，取下载片平台上的载片（MGIDL-T7RS 上没有载片时，忽略此

步骤）。

- 取出清洗所用载片，将载片放置于载片平台上，按下载片吸附按钮，轻轻按压载片，待载片吸附按钮出现绿灯，表明载片已完全吸附。
- 点击界面上的【清洗】，在弹出的对话框中选择【是】，开始 MGIDL-T7RS 清洗，耗时约 20 min。

8.4.2 DNBSEQ-T7RS 手动清洗

- 进行清洗操作之前，请确认纯水桶里的水达到 4.5 L。
- 进入程序，输入用户名“user”密码“123”，登录主界面。
- 选择需要进行清洗的一侧，点击界面上的“清洗”。
- 在弹出芯驱上放入下机的旧载片，按压芯驱按钮，使芯驱收回。
- 使用干净的空的 DNBSEQ-T7RS 清洗维护试剂槽 1，放入需要进行清洗一侧的低温仓，关闭低温仓仓门。
- 使用已准备好 DNBSEQ-T7RS 清洗维护试剂槽 2，放入需要进行清洗一侧的常温仓，关闭常温仓仓门，并关闭试剂仓门。
- 点击界面上的【开始】，在弹出的对话框中选择【是】，开始 DNBSEQ-T7RS 手动清洗，耗时约 40 min。

第九章 异常处理

9.1 DNB浓度低

- 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

- 使用润湿的无尘纸或无尘布轻轻擦拭平台表面，并用压缩空气罐吹净平台，确保无可见尘埃。
- 使用压缩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

9.3.1 MGIDL-T7RS 产生气泡

- 检查密封圈是否缺失。
- 检查加样板中的试剂是否足够。
- 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。

9.3.2 DNBSEQ-T7RS 产生气泡

- 检查纯水桶中的水是否足够。
- 检查纯水桶中的水管是否插到底。
- 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。

9.4 出现杂质

- 请对 MGIDL-T7RS 和 DNBSEQ-T7RS 均进行手动清洗维护。
- 手动清洗维护后仍无改善，按照 8.2 重新配置清洗试剂，并再次对 MGIDL-T7RS 和 DNBSEQ-T7RS 进行手动清洗维护。
- 仍无改善，请联系工程师。

9.5 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 小时内使用，7 天内可风险上机。
- 如 dNTPs 和 DNA 聚合酶混合液已经加入试剂盒中，即试剂盒已经准备完毕，若不能及时使用，可放在 4℃内暂存，并于 24 小时内使用，7 天内可风险上机。
- 如 dNTPs 和 DNA 聚合酶混合液已经加入试剂盒中，即试剂盒已经准备完毕，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 小时内使用，7 天内可风险上机。

第十章 附件

附件一 样本DNB定量作业指导

操作

- 配制 Qubit Working solution：混匀 Qubit ssDNA Buffer 与 Qubit ssDNA Reagent，在避光管里以 199：1 的比例混合，旋涡震荡混匀后使用迷你离心机短暂离心 5s，放置待用；每个样本 DNB 定量需要配置 200μL Qubit Working solution，建立标准曲线另需 2 个 200μL Qubit Working solution。
- 准备 2+N 个 Qubit 检测管，分别标注 S1（Qubit ssDNA standard#1 0ng/μL）、S2（Qubit ssDNA standard#2 20ng/μL）、D1（待测样本 DNB）、D2（待测样本 DNB）、D3（待测样本 DNB）等。按照下表进行标准管及待测样本管的准备，将准备好的样本管及标准液管旋涡震荡混匀，瞬时离心 5s，避光孵育 2min，孵育结束后，可进行下一步。

	S1 (μL)	S2 (μL)	D1 (μL)	D2 (μL)	D3 (μL)
Working solution	190	190	198	198	198
S1（0ng/μL）	10	/	/	/	/
S2（20ng/μL）	/	10	/	/	/
待测样本 DNB	/	/	2	2	2
总体积	200	200	200	200	200

- 按照 Qubit 使用说明书，选择 ssDNA 检测通道，分别放入标准液 S1 和标准液 S2 建立标准曲线，曲线生成后把 S2 当成样品测定 1 次（此时的样本投入量选择 10μL，单位 ng/μL），当测定值在 19.9-20ng/μL 时，则认为此次的标准曲线为合格可以用来检测样品；如果不在这个范围，请再次混匀后重新建立标准曲线，S2 在合格范围内才可使用该标准曲线；否则重新配制标准品。
- 放入待测样本管，样品投入量选择 2μL，单位 ng/μL，测量。记录测量出的数值。

注意事项

- Working solution 配制后需在半小时内使用。
- 禁止碰触检测管的锥形管壁。
- 检测管中不能有气泡。

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