

编号: SOP-013-B01-054



# 高通量(快速) 测序试剂套装

## MGISEQ-2000RS

说明书

版本: 11.0

创新智造  
引领生命科技

生产地址: 中国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  
中国武汉市东湖新技术开发区高新大道818号B13栋  
中国深圳市盐田区北山路146号北山工业区11栋

电 话: 4000-966-988  
邮 箱: MGI-service@mgi-tech.com  
网 址: www.mgi-tech.com

仅供科研使用

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

---

## 关于说明书

本产品说明书适用于 **MGISEQ-2000RS** 高通量（快速）测序试剂套装，说明书版本 **11.0**。

本产品说明书及其包含的信息为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（以下简称华大智造）的专有保密信息，未经华大智造的书面许可，任何个人或组织不得全部或部分地对本产品说明书进行重印、复制、修改、传播或公布给他人。本产品说明书的读者为终端用户。产品说明书作为试剂套装的一部分，由华大智造授权终端用户予以使用。严禁未授权的个人使用本产品说明书。

华大智造对本产品说明书不做任何种类的保证，包括（但不限于）用于特定目的的商业性和合理性的隐含保证。华大智造已经采取措施，确保本产品说明书的准确性。但是，华大智造对遗漏不承担责任，并保留任何对本产品说明书和仪器进行改进以提高其可靠性、功能或设计的权利。

**Qubit™** 是赛默飞世尔科技公司或其子公司的商标。文中涉及的其它名称及商标属于各自所有者资产。

©2018-2022 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版权所有。

## 版本记录

| 版本   | 发布日期        | 修订内容摘要   |
|------|-------------|--|
| 11.0 | 2022 年 08 月 | 变更 FCL PE150/FCL PE200/FCL SE400 测序载片货号  |
| 10.0 | 2022 年 02 月 | <ul style="list-style-type: none"><li>• 更换说明书 Logo</li><li>• 将运输温度从“-15 °C以下”改成“-80 °C ~ -15 °C”</li><li>• 更新清洗流程</li></ul>  |
| 9.0  | 2021 年 09 月 | <ul style="list-style-type: none"><li>• 增加 FCS PE300 读长</li><li>• 新增 FCS PE300 的 DNB 制备操作</li><li>• 新增 FCS PE300 的 DNB 加载操作</li><li>• 更改 FCL PE200 的试剂槽配制的操作说明</li></ul>   |
| A7   | 2020 年 12 月 | <ul style="list-style-type: none"><li>• 变更测序试剂槽材质及结构</li><li>• 取消 FCL SE400 补充装</li><li>• 增加试剂套装运输温度</li><li>• 变更公司网址</li></ul>  |
| A6   | 2020 年 07 月 | 更新生产企业名称   |
| A5   | 2020 年 05 月 | <ul style="list-style-type: none"><li>• 增加高通量快速测序试剂套装 (FCS) 系列产品相关信息</li><li>• 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和注意事项</li><li>• 更新测序时长</li><li>• 更新 CPAS 条形码引物 3 试剂盒的货号, 装量和版本号</li></ul>  |
| A4   | 2019 年 12 月 | <ul style="list-style-type: none"><li>• 增加使用 MGIDL-200H 加载 DNB 的详细描述</li><li>• 更新文库投入量的计算公式</li><li>• 更新“准备测序试剂槽”章节中加入与混匀 dNTPs 和酶的操作</li><li>• 增加 DNB 加载缓冲液 II 中出现结晶的解决方法</li><li>• “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。</li><li>• 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</li><li>• 新增“注意事项”章节</li><li>• 新增“版本历史”</li></ul> |
| A3   | 2019 年 04 月 | <ul style="list-style-type: none"><li>• 新增 SE400 和 PE200 的读长</li><li>• 新增使用 MGIDL-200H 加载 DNB 的操作</li><li>• 在自备耗材中增加电动移液器和一次性移液管</li><li>• 将测序仪界面的配图转换为线图</li></ul>  |

| 版本 | 发布日期        | 修订内容摘要   |
|----|-------------|--|
| A2 | 2019 年 01 月 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 新增 SE100 读长</li> <li>• 新增 PE 双 barcode 和 small RNA 测序的操作说明</li> <li>• 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</li> <li>• “异常处理”章节中新增“Post loading 失败处理”</li> <li>• 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</li> </ul> |
| A1 | 2018 年 09 月 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 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。</li> <li>• 测序载片货号由940-100109-00变更为1000016985。</li> <li>• 将图6-3、6-4和6-20中的“文库ID”更改为“DNB ID”。</li> <li>• 更新6-6, 6-7, 6-21, 7-1, 7-3图例。</li> </ul>  |
| A0 | 2018 年 04 月 | 首次发布   |

## 产品信息

| 试剂套装货号        | 试剂套装名称                                     | 版本   |
|---------------|--|------|
| 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 |
| 940-000040-00 | MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (PE200)            | V3.2 |
| 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 |
| 940-000039-00 | MGISEQ-2000RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS PE300)      | V1.0 |
| 1000020834    | cPAS 条形码引物 3 试剂盒                           | V2.0 |
| 1000014048    | cPAS 条形码引物 4 试剂盒                           | V1.0 |

-  提示
- MGISEQ-2000RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS PE300) 要求测序仪控制软件版本在 1.6.2.1653 及其以上配合使用, BaseCall 软件版本在 1.4.0.257 及其以上版本配合使用。
  - MGISEQ-2000RS 高通量快速测序试剂套装 (FCL SE400) 要求更新脚本版本至 V1.7.1.03 及其以上配合使用。

# 目录

---

|                 |          |
|-----------------|----------|
| <b>第 1 章 介绍</b> | <b>1</b> |
| 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        |

---

|                          |          |
|--------------------------|----------|
| <b>第 2 章 测序试剂套装及自备耗材</b> | <b>3</b> |
| 2.1 测序试剂套装组分清单           | 3        |
| 2.2 自备耗材                 | 14       |

---

|                     |           |
|---------------------|-----------|
| <b>第 3 章 测序工作流程</b> | <b>15</b> |
|---------------------|-----------|

---

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| <b>第 4 章 准备 DNB</b>       | <b>16</b> |
| 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 制备 DNB                | 17        |
| 4.3.1 制备 FCS PE300 读长 DNB | 17        |
| 4.3.1.1 准备 DNB 制备试剂       | 17        |
| 4.3.1.2 计算 DNB 反应体系数量     | 18        |
| 4.3.1.3 计算 ssDNA 文库所需量    | 18        |
| 4.3.1.4 制备 DNB            | 18        |
| 4.3.2 制备其他读长 DNB          | 20        |
| 4.3.2.1 准备 DNB 制备试剂       | 20        |
| 4.3.2.2 计算 DNB 反应体系数量     | 20        |
| 4.3.2.3 计算 ssDNA 文库所需量    | 21        |
| 4.3.2.4 制备 DNB            | 22        |
| 4.4 DNB 浓度测定              | 23        |

---

|                          |           |
|--------------------------|-----------|
| <b>第 5 章 载片准备</b>        | <b>24</b> |
| <b>第 6 章 加载 DNB</b>      | <b>25</b> |
| 6.1 加载 FCS PE300 DNB     | 25        |
| 6.1.1 测序仪加载 DNB          | 25        |
| 6.1.2 MGIDL-200RS 加载 DNB | 26        |
| 6.1.3 MGIDL-200H 加载 DNB  | 27        |
| 6.2 加载其他读长 DNB           | 28        |
| 6.2.1 测序仪加载 DNB          | 28        |
| 6.2.2 MGIDL-200RS 加载 DNB | 28        |
| 6.2.3 MGIDL-200H 加载 DNB  | 29        |
| <b>第 7 章 准备测序试剂槽</b>     | <b>30</b> |
| <b>第 8 章 开始测序</b>        | <b>36</b> |
| 8.1 进入程序                 | 36        |
| 8.2 放置样品                 | 37        |
| 8.3 测序参数配置               | 38        |
| 8.4 放置试剂槽                | 40        |
| 8.5 放置载片                 | 41        |
| 8.6 复核信息                 | 43        |
| 8.7 开始测序                 | 43        |
| 8.8 数据获取                 | 44        |
| <b>第 9 章 清洗维护</b>        | <b>44</b> |
| 9.1 清洗规则                 | 44        |
| 9.2 清洗的术语和定义             | 46        |
| 9.3 准备清洗试剂               | 47        |
| 9.4 清洗试剂槽                | 48        |
| 9.5 清洗流程                 | 48        |
| 9.5.1 常规清洗               | 48        |
| 9.5.2 全套清洗维护 1           | 49        |

---

---

|                |    |
|----------------|----|
| 9.5.3 全套清洗维护 2 | 51 |
|----------------|----|

---

|                          |           |
|--------------------------|-----------|
| <b>第 10 章 异常处理</b>       | <b>52</b> |
| 10.1 DNB 浓度低             | 52        |
| 10.2 负压异常                | 52        |
| 10.3 产生气泡                | 53        |
| 10.4 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   | 53        |
| 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        |

---

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| <b>附录 1 样本 DNB 定量操作指导</b> | <b>57</b> |
|---------------------------|-----------|

---

|                   |           |
|-------------------|-----------|
| <b>附录 2 制造商信息</b> | <b>58</b> |
|-------------------|-----------|

--- 此页有意留白 ---

## 第 1 章 介绍

本产品说明书是使用 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 支持平台及读长

| 测序读长  | 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     |

| 测序读长  | 一链读长 | 二链读长 | 标签读长 | 总读长    | 最大支持循环数 |
|-------|------|------|------|--------|---------|
| PE200 | 200  | 200  | 10   | 400+10 | 420     |
| PE300 | 300  | 300  | 10   | 600+10 | 620     |

## 1.5 测序时长

表 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 3 FCS 各读长理论测序时长 (小时)

| 时长 (小时)   | SE100 | PE100 | PE150 | PE300 |
|-----------|-------|-------|-------|-------|
| 单载片       | 12.5  | 24.9  | 35.4  | 95.5  |
| 双载片       | 12.7  | 25.0  | 35.6  | 96.3  |
| 数据处理 (单边) | 0.4   | 0.5   | 0.6   | 2     |
| 数据处理 (双边) | 0.7   | 1.0   | 1.2   | 4     |

-  提示
- 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。
  - 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

- 本产品仅用于科学研究, 使用前请仔细阅读产品说明书。
- 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。
- 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。
- 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。
- 本产品为一次性使用产品, 不可重复使用。

- 组分与试剂盒的批次是独立的，请勿取出组分，将其保存在包装盒中直至使用完毕。不同批次之间试剂组分严禁混用。
- 严禁使用超过有效期的产品。

## 第 2 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 4 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<br>测序载片<br>货号: 1000008403               | 测序载片             | 1张         | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C |
| MGISEQ-2000RS<br>高通量测序试剂盒<br>(SE50)<br>货号: 1000012533 | TE 缓冲液           | 300 μL×1支  | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C |
|   | 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  |                 |                 |
|   | 0.5 mL 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 5 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<br>测序载片<br>货号: 1000008403                | 测序载片             | 1 张         | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C |
| MGISEQ-2000RS<br>高通量测序试剂盒<br>(SE100)<br>货号: 1000012534 | TE 缓冲液           | 300 μL×1 支  | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C |
|  | 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  |                 |                 |
|  | 0.5 mL 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 6 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<br>测序载片<br>货号: 940-000626-00             | 测序载片            | 1 张          | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C |
| MGISEQ-2000RS<br>高通量测序试剂盒<br>(SE400)<br>货号: 1000013853 | TE 缓冲液          | 300 μL×1 支   | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C |
|  | 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   |                 |                 |
|  | 0.5 mL 冻存管      | 1 支          |                 |                 |
| MGISEQ-2000RS<br>高通量测序试剂盒<br>(SE400)<br>货号: 1000013853 | dNTPs 混合液       | 4.10 mL×1 支  | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C |
|  | 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 7 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<br>测序载片<br>货号: 1000008403                | 测序载片            | 1 张         | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C |
| MGISEQ-2000RS<br>高通量测序试剂盒<br>(PE100)<br>货号: 1000012536 | TE 缓冲液          | 300 μL×1 支  | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C |
|  | 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  |                 |                 |
|  | 0.5 mL 冻存管      | 1 支         |                 |                 |
|  | dNTPs 混合液       | 1.90 mL×1 支 |                 |                 |
|  | dNTPs 混合液 II    | 1.60 mL×1 支 |                 |                 |
|  | DNA 聚合酶混合液      | 3.60 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 8 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<br>测序载片<br>货号: 940-<br>000626-00         | 测序载片             | 1 张         | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C |
| MGISEQ-2000RS<br>高通量测序试剂盒<br>(PE150)<br>货号: 1000012537 | TE 缓冲液           | 300 μL×1 支  | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C |
|  | 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  |                 |                 |
|  | 0.5 mL 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 9 MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (PE200) 货号: 940-000040-00

| 试剂盒信息   | 组分信息             | 规格及数量       | 储存温度            | 运输温度            |
|---|------------------|-------------|-----------------|-----------------|
| MGISEQ-2000RS<br>测序载片<br>货号: 940-000626-00                | 测序载片             | 1 张         | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C |
| MGISEQ-2000RS<br>高通量测序试剂盒 (PE200)<br>货号:<br>940-000149-00 | TE 缓冲液           | 300 μL×1 支  | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C |
|   | 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  |                 |                 |
|   | 0.5 mL 冻存管       | 1 支         |                 |                 |
|   | dNTPs 混合液        | 3.80 mL×1 支 |                 |                 |
|   | dNTPs 混合液 II     | 2.85 mL×2 支 |                 |                 |
|   | DNA 聚合酶混合液       | 7.60 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 10 MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (SE50) (Small RNA)  
货号: 1000006138

| 试剂盒信息   | 组分信息             | 规格及数量       | 储存温度            | 运输温度            |
|---|------------------|-------------|-----------------|-----------------|
| MGISEQ-2000RS<br>测序载片<br>货号: 1000008403               | 测序载片             | 1 张         | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C |
| MGISEQ-2000RS<br>高通量测序试剂盒<br>(SE50)<br>货号: 1000012533 | TE 缓冲液           | 300 μL×1 支  | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C |
|   | 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  |                 |                 |
|   | 0.5 mL 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<br>测序洗脱试剂<br>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 11 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<br>快速测序载片<br>货号: 1000011720                     | 测序载片            | 1 张         | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C |
| MGISEQ-2000RS<br>高通量快速测序试剂<br>盒 (FCS SE100)<br>货号: 1000013149 | TE 缓冲液          | 300 μL×1 支  | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C |
|   | 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  |                 |                 |
|   | 0.5 mL 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 12 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<br>快速测序载片<br>货号: 1000011720                     | 测序载片             | 1张         | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C |
| MGISEQ-2000RS<br>高通量快速测序试剂<br>盒 (FCS PE100)<br>货号: 1000013151 | TE 缓冲液           | 300 μL×1支  | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C |
|   | 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  |                 |                 |
|   | 0.5 mL 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 13 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<br>快速测序载片<br>货号: 1000011720                     | 测序载片             | 1 张         | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C |
| MGISEQ-2000RS<br>高通量快速测序试剂<br>盒 (FCS PE150)<br>货号: 1000013152 | TE 缓冲液           | 300 μL×1 支  | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C |
|   | 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  |                 |                 |
|   | 0.5 mL 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 14 cPAS 条形码引物 3 试剂盒 货号: 1000020834

| 产品类型                     | 组分信息                   | 规格及数量       | 储存温度            | 运输温度            |
|--------------------------|------------------------|-------------|-----------------|-----------------|
| 仅提供用于双端测序方案的双 Barcode 测序 | cPAS AD153 条形码引物 3 工作液 | 3.50 mL×1 支 | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C |

表 15 MGISEQ-2000RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS PE300) 货号: 940-000039-00

| 试剂盒信息   | 组分信息            | 规格及数量       | 储存温度            | 运输温度            |
|---|-----------------|-------------|-----------------|-----------------|
| MGISEQ-2000RS<br>快速测序载片<br>货号: 1000011720                       | 测序载片            | 1 张         | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C |
| MGISEQ-2000RS高通<br>量快速测序试剂盒 (FCS<br>PE300)<br>货号: 940-000150-00 | TE 缓冲液          | 300 μL×1 支  | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C |
|   | DNB 制备缓冲液       | 100 μL×1 支  |                 |                 |
|   | DNB 聚合酶混合液 I    | 200 μL×1 支  |                 |                 |
|   | DNB 快速聚合酶混合液 II | 160 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 IV    | 200 μL×1 支  |                 |                 |
|   | 0.5 mL 冻存管      | 1 支         |                 |                 |
|   | dNTPs 混合液       | 3.80 mL×1 支 |                 |                 |
|   | dNTPs 混合液 II    | 2.85 mL×2 支 |                 |                 |
|   | DNA 聚合酶混合液      | 7.60 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 16 cPAS 条形码引物 4 试剂盒 货号 1000014048

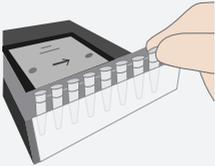
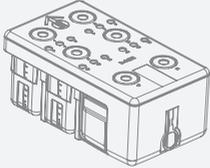
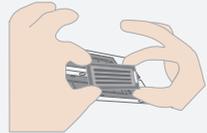
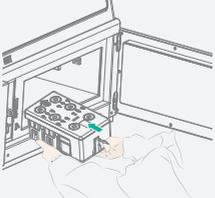
| 产品类型                       | 组分信息                       | 规格及数量      | 储存温度            | 运输温度            |
|----------------------------|----------------------------|------------|-----------------|-----------------|
| 用于单端测序方案的双<br>Barcode 测序引物 | cPAS AD153 条形码引<br>物 4 工作液 | 3.5 mL×1 支 | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C |

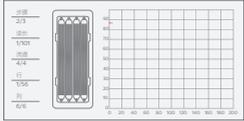
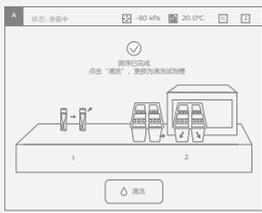
## 2.2 自备耗材

表 17 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          | Thermo Fisher | 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 °C ~ 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            |
| 200 μL 阔口吸头              | AXYGEN        | T-205-WB-C   |
| Qubit Assay Tubes        | Thermo Fisher | Q32856       |
| 100% Tween-20            | BBI           | A600560-0500 |
| 5 M NaCl                 | SIGMA         | S5150-4L     |
| 2 M NaOH                 | 阿拉丁           | S128511-1L   |
| ProClin 300              | SIGMA         | 48912-U      |
| 0.2 mL PCR 八连管           | AXYGEN        | 无            |
| 1.5 mL 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 3 章 测序工作流程

|   |                                 |
|---|---------------------------------|
|    | <p>制备 DNB：使用 DNB 制备试剂进行制备</p>   |
|    | <p>准备新的载片：打开包装检查完整性</p>         |
|   | <p>加载 DNB：将 DNB 加载到测序载片上</p>    |
|  | <p>准备测序试剂槽：检查完整性、融化、试剂添加和混匀</p> |
|  | <p>放置载片：把载片转移到测序仪上</p>          |
|  | <p>放置试剂槽：放入试剂槽</p>              |
|  | <p>开始测序：按照测序指引填写测序信息并开始测序</p>   |

|   |  |
|---|--|
|  | <p>测序：从控制软件界面可查看测序情况和进程</p>                                      |
|  | <p>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</p> |
|  | <p>维护仪器：当测序完成后进行仪器的维护</p>  |

## 第 4 章 准备 DNB

### 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  $\pm 100$  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。

 提示 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 18 推荐插入片段长度和单张载片数据产出

| 测序列试剂盒             | 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          |

| 测序试剂盒     | 理想文库插入片段大小 (bp) | 产出数据量 (Gb/lane) |
|-----------|-----------------|-----------------|
| FCS PE100 | 200 - 400       | ~ 55.0          |
| FCS PE150 | 300 - 500       | ~ 82.5          |
| FCS PE300 | 400 - 700       | ~ 90            |

-  提示
- 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 文库浓度及所需量的要求

表 19 文库浓度要求

| 文库类型      | 初始文库 ssDNA 浓度要求 |
|-----------|-----------------|
| 常规        | ≥ 2 fmol/μL     |
| PCR free  | ≥ 3.75 fmol/μL  |
| Small RNA | ≥ 3 fmol/μL     |

-  提示
- 若文库浓度未知，建议使用Qubit ssDNA Assay Kit和Qubit 3.0荧光定量仪定量出文库实际浓度 (ng/μL)。然后根据下列公式换算成 (fmol/μL)：
- $$\text{Concentration (fmol/μL)} = 3030 \times \text{Concentration (ng/μL)} / N$$
- 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)。
- 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 制备 DNB

此部分内容包括 2 种 DNB 制备方案，可按需查阅：

方案一：制备 FCS PE300 读长 DNB，见第 17 页“制备 FCS PE300 读长 DNB”

方案二：制备其他读长 DNB，见第 20 页“制备其他读长 DNB”

### 4.3.1 制备 FCS PE300 读长 DNB

#### 4.3.1.1 准备 DNB 制备试剂

操作步骤如下：

1. 取出文库置于冰盒上备用。
2. 从测序试剂盒中取出 DNB 制备缓冲液、TE 缓冲液、DNB 快速聚合酶混合液 II 和 DNB 终止缓冲液，置于冰盒上约 0.5 小时。

3. 待融化后，使用漩涡振荡器震荡混匀 5 秒后，短暂离心置于冰盒上备用。

 提示 FCS PE300 的 DNB 用的是 DNB 快速聚合酶混合液 II，切勿用错。

#### 4.3.1.2 计算 DNB 反应体系数量

每张 MGISEQ-2000RS 快速测序载片含有 2 条 lane，可根据情况从以下方案中选择合适的加载方式，不同的加载方式所需的 DNB 反应体系数量不同：

- 测序仪  
一张载片上的 2 条 lane 必须是同一份 DNB，每条 lane 需要 45  $\mu\text{L}$  的 DNB。
- MGIDL-200RS 全自动样本加载系统  
一张载片上的 2 条 lane 可以加载不同份的 DNB，每条 lane 需要 45  $\mu\text{L}$  的 DNB。
- MGIDL-200H 便携式加样器  
一张载片上的 2 条 lane 可以加载不同份的 DNB，每条 lane 需要 22.5  $\mu\text{L}$  的 DNB。

表 20 每张 MGISEQ-2000RS 快速测序载片所需制备 DNB 反应体系数量

| 载片类型 | 加载仪器        | DNB 体积<br>( $\mu\text{L}/\text{Lane}$ ) | DNB 制备体系 ( $\mu\text{L}$ ) | 反应体系数量/载片 |
|------|-------------|---|----------------------------|-----------|
| FCS  | 测序仪         | 45                                      | 90                         | 1         |
|      | MGIDL-200RS | 45                                      | 90                         | 1         |
|      | MGIDL-200H  | 22.5                                    | 45                         | 1         |

#### 4.3.1.3 计算 ssDNA 文库所需量

根据第 17 页“文库浓度及所需量的要求”，计算每个 DNB 制备体系所需投入的 ssDNA 文库体积：

表 21 ssDNA 文库所需量

| 文库类型     | 文库体积 / 90 $\mu\text{L}$ 体系 | 文库体积 / 45 $\mu\text{L}$ 体系 |
|----------|----------------------------|----------------------------|
| 常规       | $V = 40 \text{ fmol}/C$    | $V = 20 \text{ fmol}/C$    |
| PCR free | $V = 75 \text{ fmol}/C$    | $V = 37.5 \text{ fmol}/C$  |

-  提示
- 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。
  - 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。

#### 4.3.1.4 制备 DNB

操作步骤如下：

1. 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 22 DNB 制备反应体系 1

| 组分        | 试剂体积 / 90 $\mu\text{L}$ 体系 | 试剂体积 / 45 $\mu\text{L}$ 体系 |
|-----------|----------------------------|----------------------------|
| TE 缓冲液    | 20-V                       | 10-V                       |
| DNB 制备缓冲液 | 20                         | 10                         |
| 文库 ssDNA  | V                          | V                          |
| 总体积       | 40                         | 20                         |

 提示 V 表示第 18 页“计算 ssDNA 文库所需量”中每个 DNB 制备体系所需投入的 ssDNA 文库体积。

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

表 23 DNB 制备反应条件 1

| 温度                        | 时间   |
|---------------------------|------|
| 105 $^{\circ}\text{C}$ 热盖 | On   |
| 95 $^{\circ}\text{C}$     | 1 分钟 |
| 65 $^{\circ}\text{C}$     | 1 分钟 |
| 40 $^{\circ}\text{C}$     | 1 分钟 |
| 4 $^{\circ}\text{C}$      | Hold |

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

 提示 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  $^{\circ}\text{C}$ 后取出 PCR 管, 迷你离心机离心 5 秒, 置于冰上。
- 向上述 PCR 管中加入如下 DNB 制备反应组分 2:

表 24 DNB 制备反应组分 2

| 组分                 | 试剂体积 / 90 $\mu\text{L}$ 体系 | 试剂体积 / 45 $\mu\text{L}$ 体系 |
|--------------------|----------------------------|----------------------------|
| DNB 快速聚合酶混合液 II    | 40                         | 20                         |
| DNB 聚合酶混合液 II (LC) | 1.6                        | 0.8                        |

6. 反应体系用漩涡振荡器震荡混匀, 迷你离心机离心 5 秒, 即刻置于 PCR 仪中, 反应条件如下:

-  **提示**
- 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, 确保在进行 DNB 反应时热盖处于工作温度。
  - 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。

表 25 DNB 制备滚环扩增条件

| 温度      | 时间    |
|---------|-------|
| 35 °C热盖 | On    |
| 30 °C   | 15 分钟 |
| 4 °C    | Hold  |

7. PCR 仪温度达到 4 °C, 立即取出 PCR 管置于冰上。  
8. 按照下表加入试剂, 并用阔口吸头缓慢地吹打混匀 5-8 次:

表 26 DNB 制备滚环终止条件

| 组分        | 试剂体积 / 90 μL 体系 | 试剂体积 / 45 μL 体系 |
|-----------|-----------------|-----------------|
| DNB 终止缓冲液 | 10              | 5               |

-  **提示**
- 操作时 DNB 全程都要置于冰上, 防止 DNB 进行二次扩增。
  - DNB 必须使用阔口吸头混匀, 切勿离心、震荡及剧烈吹打。
  - 制备完成的 DNB 可置于 4 °C 保存备用, 并于 4 小时内使用。

## 4.3.2 制备其他读长 DNB

### 4.3.2.1 准备 DNB 制备试剂

操作步骤如下:

- 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、TE 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 小时。
- 待融化后, 使用漩涡振荡器震荡混匀 5 秒后, 短暂离心置于冰盒上备用。

### 4.3.2.2 计算 DNB 反应体系数量

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。可根据情况从以下方案中选择合适的加载方式, 不同的加载方式所需的 DNB 反应体系数量不同:

- 测序仪  
一张载片上的每条 lane 必须是同一份 DNB，每条 lane 需要 50  $\mu\text{L}$  的 DNB。
- MGIDL-200RS 全自动样本加载系统  
一张载片上的每条 lane 可以加载不同份的 DNB，每条 lane 需要 50  $\mu\text{L}$  的 DNB。
- MGIDL-200H 便携式加样器  
一张载片上的每条 lane 可以加载不同份的 DNB，每条 lane 需要 25  $\mu\text{L}$  的 DNB。

表 27 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体积<br>( $\mu\text{L}/\text{Lane}$ ) | DNB制备体系 ( $\mu\text{L}$ ) | 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                       | 1         |
|      | MGIDL-200RS | 50                                     | 100                       | 1-2       |
|      | MGIDL-200H  | 25                                     | 100                       |           |

#### 4.3.2.3 计算 ssDNA 文库所需量

根据第 17 页“文库浓度及所需量的要求”，计算每个 DNB 制备体系所需投入的 ssDNA 文库体积：

表 28 ssDNA 文库所需量

| 文库类型      | 文库体积 / 100 $\mu\text{L}$ 体系 |
|-----------|-----------------------------|
| 常规        | $V = 40 \text{ fmol/C}$     |
| Small RNA | $V = 60 \text{ fmol/C}$     |

-  提示
- 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。
  - 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。

### 4.3.2.4 制备 DNB

操作步骤如下：

1. 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 29 DNB 制备反应体系 1

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

 提示 V 表示第 21 页“计算 ssDNA 文库所需量”中每个 DNB 制备体系所需投入的 ssDNA 文库体积。

2. 将反应混合液用漩涡振荡器震荡混匀，迷你离心机离心 5 秒。
3. 置于 PCR 仪中进行如下反应，反应条件见下表：

表 30 DNB 制备反应条件 1

| 温度       | 时间   |
|----------|------|
| 105 °C热盖 | On   |
| 95 °C    | 1 分钟 |
| 65 °C    | 1 分钟 |
| 40 °C    | 1 分钟 |
| 4 °C     | Hold |

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

 提示 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。

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

表 31 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                 |

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

-  提示
- 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
  - 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。

表 32 DNB 制备滚环扩增条件

| 温度      | 时间    |
|---------|-------|
| 35 °C热盖 | On    |
| 30 °C   | 25 分钟 |
| 4 °C    | Hold  |

7. 当 PCR 仪温度达到 4 °C 后立即加入 20  $\mu$ L DNB 终止缓冲液, 用阔口吸头缓慢地吹打混匀 5-8 次。

-  提示
- DNB 必须使用阔口吸头混匀, 切勿离心、震荡及剧烈吹打。
  - 制备完成的 DNB 可置于 4 °C 保存备用, 并于 48 小时内使用。

## 4.4 DNB 浓度测定

操作步骤如下:

1. DNB 制备完成后, 取用 2  $\mu$ L DNB, 使用 Qubit ssDNA Assay Kit 和 Qubit 3.0 荧光定量仪进行浓度检测, 合格标准见下表:

-  提示
- 若 DNB 浓度不合格, 需重新制备。
  - 若样本数量多时, 建议分批定量, 避免荧光猝灭导致 DNB 浓度定量不准确。定量具体操作见第 57 页“样本 DNB 定量操作指导”。

表 33 DNB 浓度合格标准

| 读长        | 标准文库合格浓度              | 应用文库合格浓度             |
|-----------|-----------------------|----------------------|
| FCS PE300 | $\geq 10$ ng/ $\mu$ L | $\geq 8$ ng/ $\mu$ L |
| 其他读长      | $\geq 8$ ng/ $\mu$ L  | $\geq 8$ ng/ $\mu$ L |

2. 若浓度超过 40 ng/ $\mu$ L, 需要按照下表稀释至 20 ng/ $\mu$ L 后使用:

表 34 DNB 稀释方案

| 读长        | 稀释 DNB 所需试剂 | 保存条件 | 保存时间         |
|-----------|-------------|------|--------------|
| FCS PE300 | TE 缓冲液      | 4 °C | $\leq 4$ 小时  |
| 其他读长      | DNB 加载缓冲液 I | 4 °C | $\leq 48$ 小时 |

## 第 5 章 载片准备

操作步骤如下：

1. 从  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  ~  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中取出测序载片彩盒，将载片从彩盒中取出。

 提示 此时不要拆开真空包装袋。

2. 将载片在室温环境下放置 60 分钟到 24 小时。
3. 使用前再打开载片真空包装袋，开始 DNB 加载。

 提示

- 如载片从冰箱取出并已于室温放置后不能在 24 小时之内使用，且真空包装袋完好无损时，可以继续放回  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  ~  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存，但  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  ~  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  与室温的环境切换不得超过 3 次。
- 真空包装袋打开后不能立即使用，可于室温保存，并在 24 小时之内使用，如超过 24 小时，不建议使用。

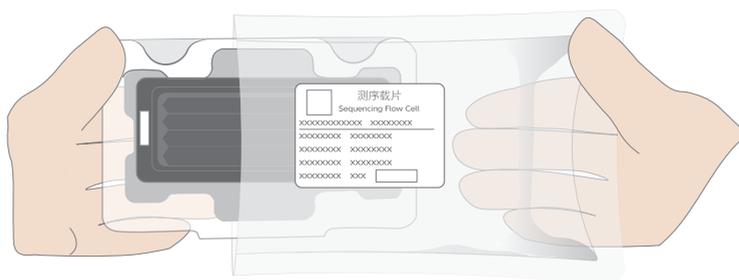


图 1 撕开载片真空包装袋

4. 取出载片，检查载片是否完整。

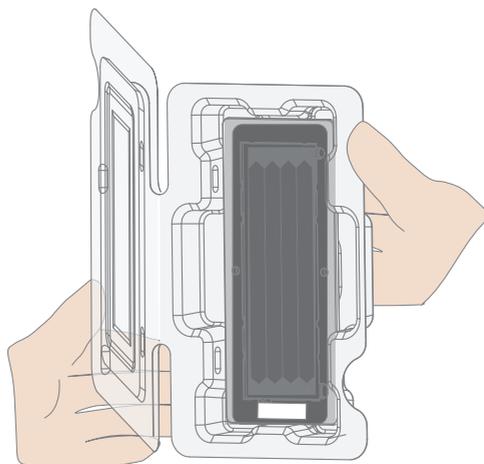


图 2 检查载片完整性

## 第 6 章 加载 DNB

操作步骤如下：

1. 准备 DNB 加载体系，根据以下不同进行相应操作：
  - FCS PE300：取出 DNB 加载缓冲液 IV，置于冰盒上约 0.5 小时，待融化后，使用漩涡振荡器震荡混匀 5 秒，短暂离心后置于冰盒上备用。
  - 其他读长：取出 DNB 加载缓冲液 II，置于冰盒上约 0.5 小时，待融化后，使用漩涡振荡器震荡混匀 5 秒，短暂离心后置于冰盒上备用。

 提示 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。
2. 加载 DNB，根据以下不同选择相应操作：
  - FCS PE300：第 25 页“加载 FCS PE300 DNB”
  - 其他读长：第 28 页“加载其他读长 DNB”

### 6.1 加载 FCS PE300 DNB

#### 6.1.1 测序仪加载 DNB

操作步骤如下：

1. 取出 0.5 mL 冻存管，按下表所示配制 DNB 加载体系

表 35 DNB 加载体系 1

| 组分           | 加入量 (μL) |
|--------------|----------|
| DNB 加载缓冲液 IV | 45       |
| DNB          | 90       |
| 总体积          | 135      |

-  提示 该 DNB 加载体系要现配现用。
2. DNB 加载体系用阔口吸头缓慢混匀 5-8 次。
 

 提示

    - 切勿离心、震荡及剧烈吹打。
    - 每张快速测序载片 (FCS) 需要 135 μL DNB 加载体系。

## 6.1.2 MGIDL-200RS 加载 DNB

 提示 详细操作请参考 *MGIDL-200RS* 全自动样本加载系统产品说明书，加载前应按该说明书进行清洗操作。

操作步骤如下：

1. 取出新的八连管，按下表所示配制 DNB 加载体系：

表 36 DNB 加载体系 2

| 组分           | 加入量 (μL) |
|--------------|----------|
| DNB 加载缓冲液 IV | 22.5     |
| DNB          | 45       |
| 总体积          | 67.5     |

2. DNB 加载体系用阔口吸头缓慢混匀 5-8 次。

 提示

- 切勿离心、震荡及剧烈吹打。
- 每条 lane 需要至少 67.5 μL DNB 加载体系。

3. 把混匀后的 DNB 样品放置在 MGIDL-200RS 指定位置。

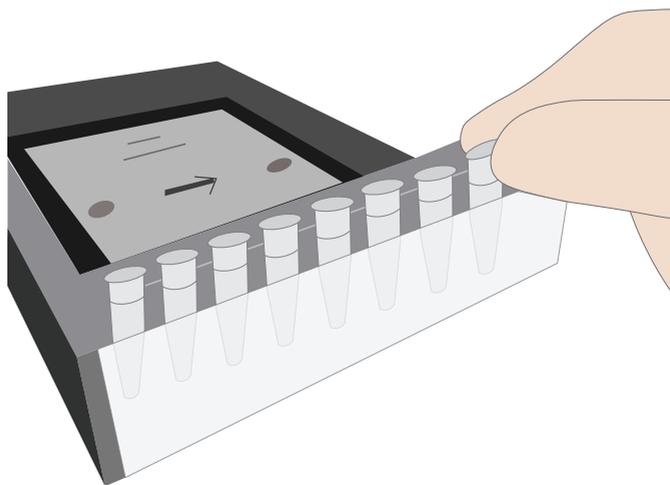


图 3 加载样品的放置

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，同时按下载片边框左右两边，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 手套或密封袋中，25 °C ± 2 °C 放置 60-90 分钟，立刻转移到测序仪上使用。

### 6.1.3 MGIDL-200H 加载 DNB

 提示 详细 DNB 加载操作请参考 *MGIDL-200H 便携式加样器快速操作指南*，加载前需按照该说明书进行清洁操作。

操作步骤如下：

1. 取出新的八连管，按下表所示配制 DNB 加载体系：

表 37 DNB 加载体系 3

| 组分           | 加入量 (μL) |
|--------------|----------|
| DNB 加载缓冲液 IV | 11.5     |
| DNB          | 22.5     |
| 总体积          | 34       |

2. DNB 加载体系用阔口吸头缓慢混匀 5-8 次。
  -  提示
    - 切勿离心、震荡及剧烈吹打。
    - 每条 lane 需要至少 30 μL DNB 加载体系。
3. 将密封垫放置在密封垫槽中。
4. 将载片放置在加样器中。
5. 用移液器吸取 30 μL 混匀后 DNB 加载体系，将阔口吸头插入流路入口中。
  -  提示
    - 请勿按下移液器的控制按钮。
    - DNB 加载过程中请勿移动载片。

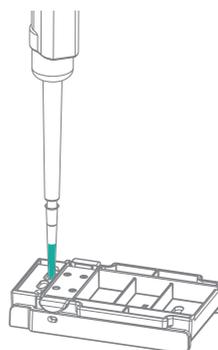


图 4 使用 MGIDL-200H 加载样品

6. 按下移液器上的吸头脱卸按钮，样本会自动流入载片中。
7. 确保样本加载完成后，逆时针旋转拔出吸头。
8. 将加样器正面朝上放置。
  -  提示 FCS PE300 的载片加载完成后，建议保持在 MGIDL-200H 便携式加样器上，25 °C ± 2 °C 放置 60-90 分钟，立即转移到测序仪上使用，切勿超过 90 分钟。

## 6.2 加载其他读长 DNB

### 6.2.1 测序仪加载 DNB

操作步骤如下：

1. 取出 0.5 mL 冻存管，按下表所示配制 DNB 加载体系：

表 38 DNB 加载体系 1

| 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          |

 提示 该 DNB 加载体系要现配现用。

2. DNB 加载体系用阔口吸头缓慢混匀 5-8 次，放置 4 °C 备用。

 提示

- 切勿离心、震荡及剧烈吹打。
- 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。

### 6.2.2 MGIDL-200RS 加载 DNB

 提示 详细操作请参考 *MGIDL-200RS 全自动样本加载系统产品说明书*，加载前需按照该说明书进行清洁操作。

操作步骤如下：

1. 取出新的八连管，按下表所示配制 DNB 加载体系：

表 39 DNB 加载体系 2

| 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         |

2. DNB 加载体系用阔口吸头缓慢混匀 5-8 次。

- 提示
    - 切勿离心、震荡及剧烈吹打。
    - 每条 lane 需要至少 66.5  $\mu\text{L}$  DNB 加载体系。
3. 混匀后的 DNB 加载体系放置在 MGIDL-200RS 指定位置。

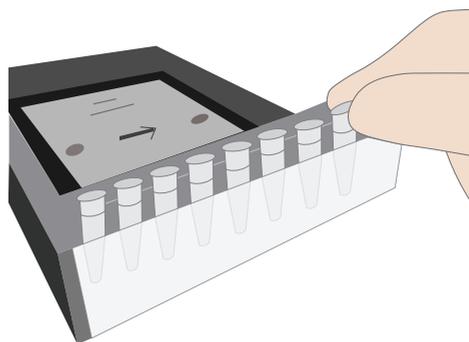


图 5 加载样品的放置

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，同时按下载片边框左右两边，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 手套或密封袋中，室温放置 30 分钟，立即转移到测序仪上使用。

提示 室温放置时间切勿超过 30 分钟。

### 6.2.3 MGIDL-200H 加载 DNB

提示 详细 DNB 加载操作请参考 *MGIDL-200H 便携式加样器快速操作指南*，加载前需按照该说明书进行清洁操作。

操作步骤如下：

1. 取出新的八连管，按下表所示配制 DNB 加载体系：

表 40 DNB 加载体系 3

| 组分                 | FCL 加入量 ( $\mu\text{L}$ ) | FCS 加入量 ( $\mu\text{L}$ ) |
|--------------------|---------------------------|---------------------------|
| DNB 加载缓冲液 II       | 8                         | 8                         |
| DNB 聚合酶混合液 II (LC) | 0.25                      | 0.25                      |
| DNB                | 25                        | 25                        |
| 总体积                | 33.25                     | 33.25                     |

2. DNB 加载体系用阔口吸头缓慢混匀 5-8 次。

提示
 

- 切勿离心、震荡及剧烈吹打。
- 每条 lane 需要 30  $\mu\text{L}$  DNB 加载体系。

3. 将密封垫放置在密封垫槽中。
4. 将载片放置在加样器中。
5. 用移液器吸取 30  $\mu\text{L}$  混匀后 DNB 加载体系，将阔口吸头插入流路入口中。

-  提示
- 请勿按下移液器的控制按钮。
  - DNB 加载过程中请勿移动载片。

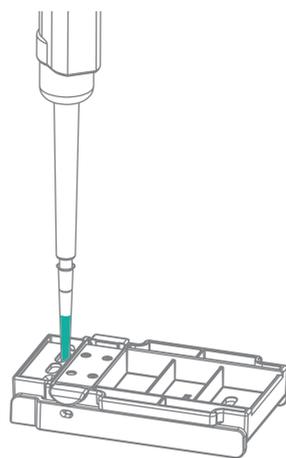


图 6 使用MGIDL-200H加载样品

6. 按下移液器上的吸头脱卸按钮，样本会自动流入载片中。
7. 确保样本加载完成后，逆时针旋转拔出吸头。
8. 将加样器正面朝上，水平放置 30 分钟，立即转移到测序仪上使用。

## 第 7 章 准备测序试剂槽

操作步骤如下：

1. 取出测序试剂槽，于常温水浴解冻 3-4 小时后，或提前一天将其置于 2  $^{\circ}\text{C}$  ~ 8  $^{\circ}\text{C}$  冰箱解冻，置于 2  $^{\circ}\text{C}$  ~ 8  $^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。
2. 使用前颠倒混匀试剂槽 3 次，然后将试剂槽置于正前方，前后左右剧烈摇晃 10-20 次，确保试剂充分混匀，尤其是 9 号试剂和 10 号试剂。

-  提示
- 如 10 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。详细内容见本说明书第 54 页“测序试剂槽 10 号孔中出现墨绿色结晶”。
  - 由于 PE300 试剂槽装量较满，使用前请确保充分混匀。

3. 使用无尘纸擦净盖板及孔位处的冷凝水。

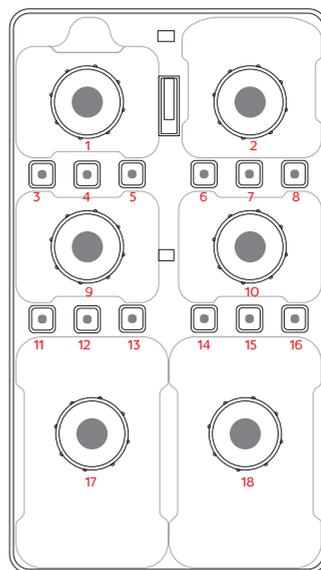


图 7 试剂槽孔位示意图

4. 提前 1 小时取出 dNTPs 混合液和 dNTPs 混合液 II，室温融化后置于冰上或 4 °C 备用。
5. 使用前取出 DNA 聚合酶混合液，置于冰上或 4 °C 备用。
6. 根据以下不同进行相应操作：
- 如需进行 PE 测序，取出 MDA 试剂置于冰上或 4 °C 备用。
  - 如进行 FCL SE50(Small RNA)或FCL SE400测序，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 °C 备用。
  - 如需进行 SE 双 Barcode 测序，取出 cPAS 条形码引物 4 试剂盒中的 cPAS AD153 条形码引物 4 工作液，室温融化后置于冰上或 4 °C 备用。
  - 如需进行 PE 双 Barcode 测序，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，室温融化后置于冰上或 4 °C 备用。
7. 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。

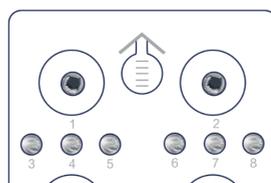


图 8 试剂槽加样孔开孔

8. 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/15 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。

-  提示
- dNTPs 混合液加样前需使用漩涡振荡器震荡混匀 5 秒,短暂离心后再使用。
  - DNA 聚合酶混合液加样前需颠倒混匀 4-6 次。
  - 转移混合液时,小心操作,防止混合液从试剂管中溢出。

表 41 测序试剂槽 1 号孔试剂加样表

| 测序读长               | 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 Small RNA SE50 | 0.700              | 0.700               |
| FCL SE100          | 1.100              | 1.100               |
| FCL SE400          | 4.000              | 4.000               |
| FCS SE100          | 0.800              | 0.800               |
| FCL PE100          | 1.800              | 1.800               |
| FCL PE150          | 2.400              | 2.400               |
| FCL PE200          | 3.800              | 3.800               |
| FCS PE100          | 1.400              | 1.400               |
| FCS PE150          | 1.900              | 1.900               |
| FCS PE300          | 3.800              | 3.800               |

9. 取对应量程的移液器,按照下表体积,将 dNTPs 混合液 II 加入新的 5 mL/15 mL/25 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。

-  提示
- dNTPs 混合液 II 加样前需使用漩涡振荡器震荡混匀 5 秒,短暂离心后再使用。
  - DNA 聚合酶混合液加样前需颠倒混匀 4-6 次。
  - 转移混合液时,小心操作,防止混合液从试剂管中溢出。

表 42 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 Small RNA SE50 | 0.600                  | 0.600               |
| FCL SE100          | 0.900                  | 0.900               |
| FCL SE400          | 12.00                  | 4.000               |

| 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) |
|-----------|------------------------|---------------------|
| FCS SE100 | 1.600                  | 0.800               |
| FCL PE100 | 1.500                  | 1.500               |
| FCL PE150 | 2.100                  | 2.100               |
| FCL PE200 | 5.700                  | 3.800               |
| FCS PE100 | 2.800                  | 1.400               |
| FCS PE150 | 3.800                  | 1.900               |
| FCS PE300 | 5.700                  | 3.800               |

10. 使用配套的透明封口膜将 1 号和 2 号加样孔封住。

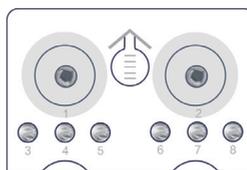


图 9 试剂槽加样孔封膜

11. 贴封口膜时使用手指旋转按压圆盖子处的封口膜，确保贴牢固无气泡，试剂槽内的试剂不会从加样孔溢出。

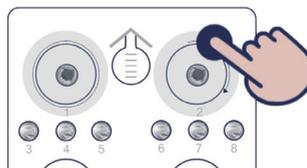


图 10 贴紧封口膜

12. 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，确保试剂的充分混匀。

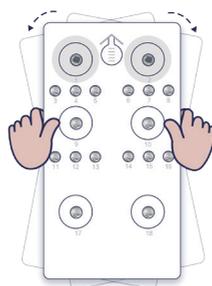


图 11 试剂槽加样后混匀

13. 撕掉 1 号和 2 号孔位的封口膜弃用。

-  提示
- 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。

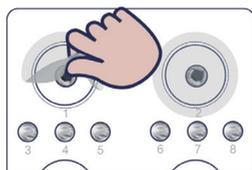


图 12 试剂槽混匀撕掉封口膜

14. 轻轻敲打测序试剂槽，以减少试剂中的气泡。

-  提示 此时 FCL SE50/FCL SE100/FCS SE100 单 Barcode 测序试剂槽准备完毕，下一步操作可直接进入第 36 页“开始测序”。

15. 根据以下不同进行相应操作：

-  提示 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。

■ 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 秒，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 ) 4.50 mL 加入到 7 号孔位中，确保孔位底部无气泡。

-  提示 此时 FCL SE50 ( Small RNA ) 单 Barcode 测序试剂槽准备完毕，下一步操作可直接进入第 36 页“开始测序”。

- FCL SE400

- 取出测序洗脱试剂 (Wash Buffer for Sequencing) 并旋涡震荡 5 秒, 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。

 提示 此时 FCL SE400 单 Barcode 测序试剂槽准备完毕, 下一步操作可直接进入第 36 页“开始测序”。

- PE 测序

- 使用枪头戳破 15 号孔的封口膜。
- 用 1 mL 移液器移取 500  $\mu$ 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。
- 将混匀液加入 15 号孔中, 加入时确保管底部无气泡。

 提示

- 转移混匀液时, 小心操作, 防止混匀液从试剂管中溢出。
- 此时 FCL PE100/ FCL PE150/ FCL PE200/ FCS PE100/ FCS PE150/ FCS PE300 单 Barcode 测序试剂槽准备完毕, 下一步操作可直接进入第 36 页“开始测序”。

16. 根据以下不同进行相应操作:

- SE 双 Barcode 测序, 完成 SE 单 Barcode 测序试剂槽的准备后还需执行以下操作:

- 取出 cPAS AD153 条形码引物 4 工作液并旋涡震荡 5 秒, 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 4 工作液, 取 2.90 mL 加入到 4 号孔位中, 确保孔位底部无气泡。

 提示 此时 FCL SE50/ FCL SE100/ FCL SE400/ FCL SE50 (Small RNA) / FCS SE100 双 Barcode 测序试剂槽准备完毕, 下一步操作可直接进入第 36 页“开始测序”。

- PE 双 Barcode 测序, 完成 PE 单 Barcode 测序试剂槽的准备后还需执行以下操作:

- 取出 cPAS AD153 条形码引物 3 工作液并旋涡震荡 5 秒, 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 2.90 mL 加入到 4 号孔位中, 确保孔位底部无气泡。

 提示 此时 FCL PE100/ FCL PE150/ FCL PE200/ FCS PE100/ FCS PE150/ FCS PE300 双 Barcode 测序试剂槽准备完毕。

## 第 8 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，主界面如第 36 页“图 14”所示。

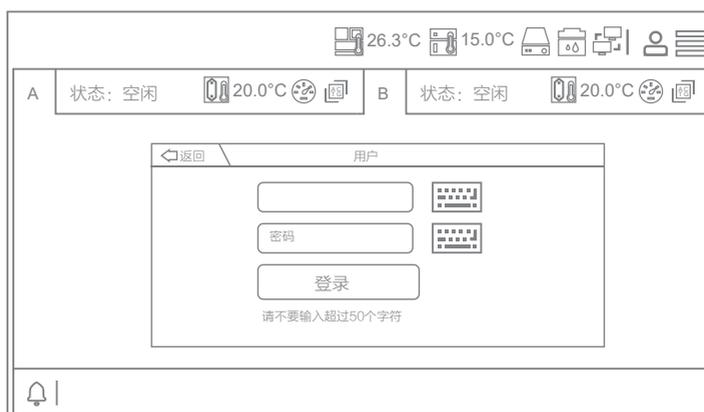


图 13 登录界面

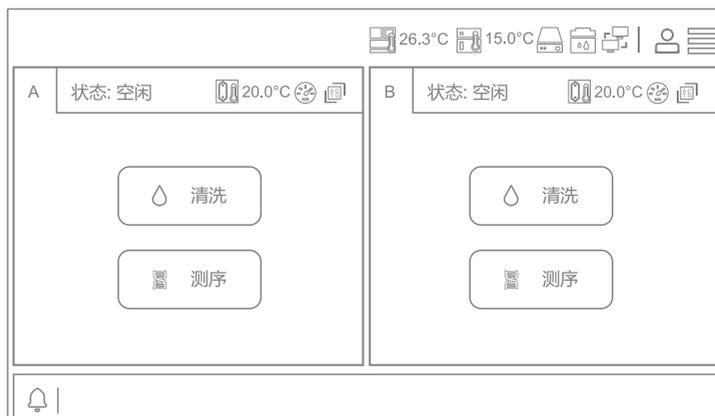


图 14 主界面

## 8.2 放置样品

操作步骤如下：

1. 点击主界面面上的【测序】选项，进入如下界面：

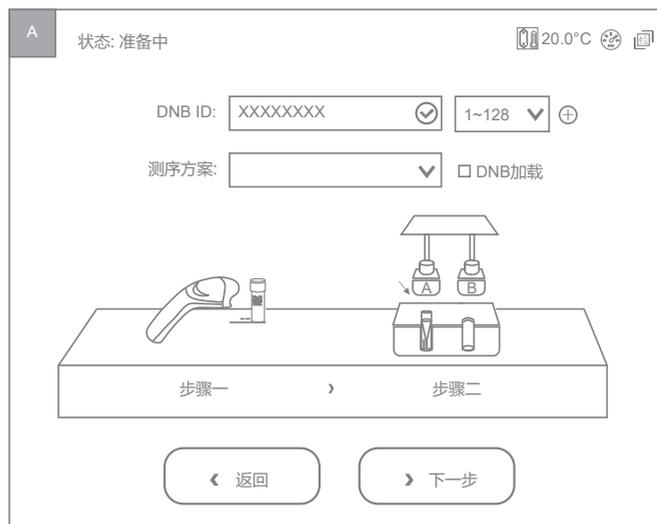


图 15 样品输入界面

2. 点击【DNB ID】后面的⊕显示4条lane或2条lane的信息。

 提示 FCL 需要选择4条lane，FCS需要选择2条lane。

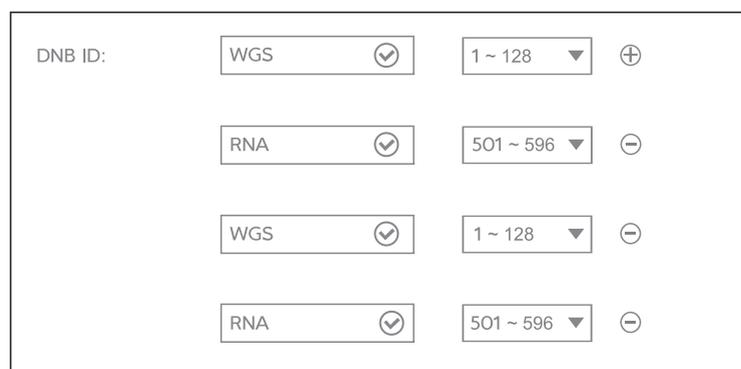


图 16 样品及信息选择界面

3. 将光标移至【DNB ID】后面的待写区，输入文库名称或编号。
4. 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，打开试剂仓门，一只手轻轻抬起试剂针，另一只手取出清洗试剂管，然后放入需要加载的 DNB 加载体系，并缓慢放下试剂针。

 提示 如使用测序仪加载 DNB，则进行此步骤。如不使用，跳过此步骤。

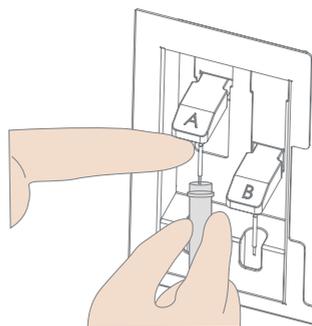


图 17 放置加载样品

- 关闭试剂仓门。

## 8.3 测序参数配置

操作步骤如下：

- 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）：

-  提示
- 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 18 测序方案的选择

- 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】，否则不勾选，然后下一步操作可直接进入第 40 页“放置试剂槽”；如果选择【Customize】则继续进行以下步骤。

3. 在开始阶段，请选择测序开始的位置：

|   |                              |  |
|---|------------------------------|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> 开始阶段: | <input type="radio"/> DNB 加载 | <input type="radio"/> Post loading ... |
|   | <input type="radio"/> 测序预处理  | <input type="radio"/> 测序               |

图 19 选择测序开始位置

4. 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 20 读长选择

5. 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 | <input type="checkbox"/>            |
| Dual barcode: | 10 | <input checked="" type="checkbox"/> |

图 21 标签读长选择

6. 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 22 不同lane选择拆分

7. 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。

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

图 23 暗反应的选择

8. 点击【确认】。

## 8.4 放置试剂槽

操作步骤如下：

1. 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标签右下角的条形码录入试剂槽信息。也可进行手动输入。

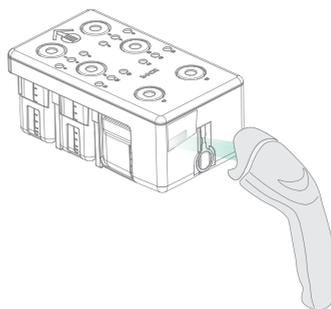


图 24 试剂槽信息录入界面

2. 打开试剂仓门，一只手拉动清洗试剂盒 1 的拉环使其部分移出试剂仓，同时另一只手托住清洗试剂盒 1 的底部，缓慢取出。

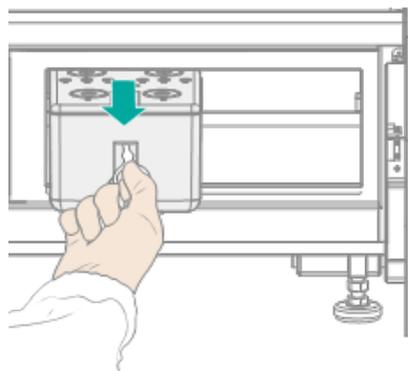


图 25 取出清洗试剂盒

3. 用实验室级用水润湿无尘纸或无尘布，并用其擦拭试剂仓底部及侧面，保持清洁干燥。

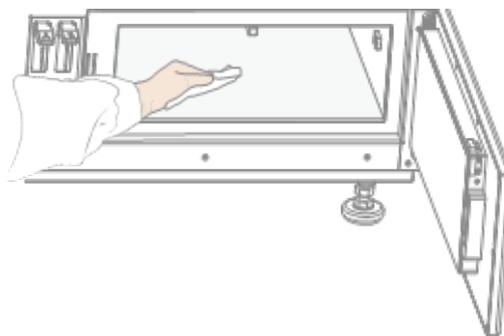


图 26 维护试剂仓

4. 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试剂仓，直到推到底部并确认试剂槽完全放入；关闭试剂仓门。

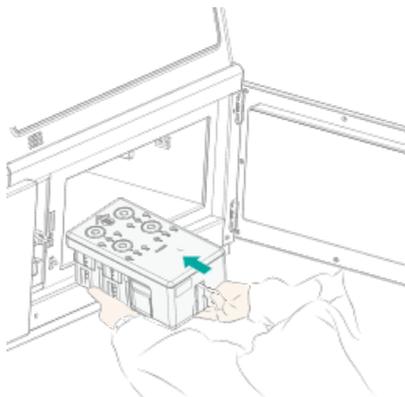


图 27 试剂槽放入示意图

## 8.5 放置载片

操作步骤如下：

1. 打开载片仓门，一只手压住水洗载片两侧，另一只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。
2. 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。

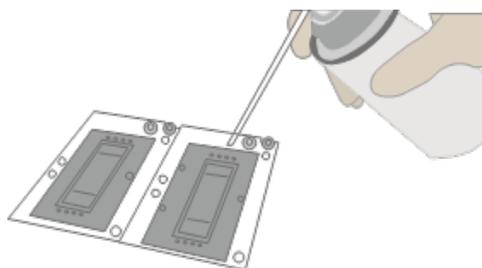


图 28 清洁载片平台

- 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。

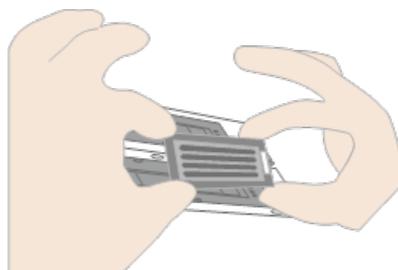


图 29 载片放置

- 载片孔位对应定位柱放置，同时向左上角  $45^\circ$  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。



提示 • 载片易碎，操作过程请控制力度。

- 在 MGIDL-200RS 上安装载片时，向右上角  $45^\circ$ 。

- 检查负压在正常范围内  $-80 \sim -99$  kPa 方可继续，如负压出现异常，请参考本说明书第 52 页“负压异常”进行处理。
- 用空气罐吹净载片表面的灰尘，关闭载片仓门。

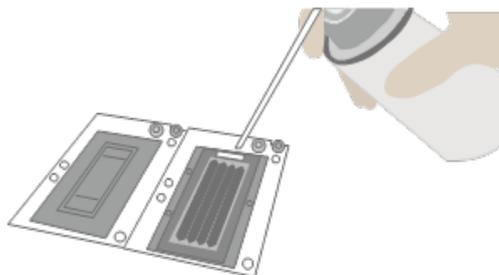


图 30 载片清洁

- 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：

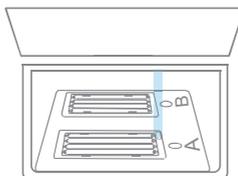


图 31 载片信息录入

- 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：

 **提示** 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。

| 项目            | 内容              |
|---------------|-----------------|
| 登录用户          | user            |
| DNB ID Lane 1 | WGS   1 ~ 128   |
| DNB ID Lane 2 | RNA   501 ~ 596 |
| DNB ID Lane 3 | WGS   1 ~ 128   |
| DNB ID Lane 4 | 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 32 信息核对

## 8.7 开始测序

操作步骤如下：

1. 各项信息确认无误后，点击【开始】。

2. 系统再次确认“是否要测序”，点击【是】开始测序



图 33 确认测序界面

3. 开始测序后，立即打开载片仓门，确保样品或试剂顺利进入载片后，关闭载片仓门。

## 8.8 数据获取

 提示 详细请参考 *MGISEQ-2000 & MGISEQ-2000RS* 基因测序仪软件操作指南。

开始测序后，控制软件将在 D 盘中生成测序结果。

- 以载片 ID 命名的数据文件夹，主要包含图片数据，以及仪器运行过程中的数据（如 metrics 文件）。
- 以载片 ID 命名的结果文件夹，主要包含 FASTQ 文件及报告文件，Bioinfo 文件及以 summaryReport 等文件。

# 第 9 章 清洗维护

## 9.1 清洗规则

测序完成后，出现以下界面时，可进行清洗。需在 24 小时内进行清洗维护。



图 34 清洗开始标志界面

表 43 清洗规则

| 清洗方案                  | 描述  |
|-----------------------|---|
| 全套清洗维护 1/<br>全套清洗维护 2 | <ul style="list-style-type: none"> <li>使用测序仪加载样品或进行 PE 测序后。</li> <li>更换管路、试剂针等与试剂进行接触的配件，使用测序仪前。</li> <li>开机状态下，仪器超过 7 天以上未进行使用，使用测序仪前。</li> <li>需进行 7 天以上的断电处理，在断电前后均需执行。</li> <li>载片出现明显杂质，并排除其他因素后。</li> </ul> |
| 常规清洗                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>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。</li> <li>工程师检修后。</li> <li>除全套清洗维护与深度清洗执行情况外的其他情况。</li> </ul>   |

• 具体可参考以下清洗流程图：

-  提示 • 全套清洗维护 1 的作用包含全套清洗维护 2。
- 全套清洗维护 2 需搭配脚本 StandardMPS\_V1.6.1.04 版本及以上使用。

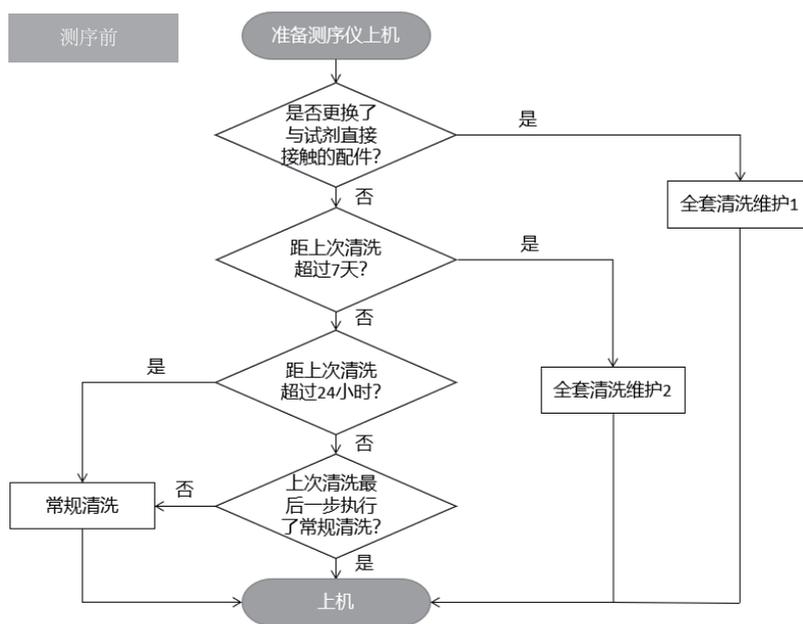


图 35 测序前清洗规则

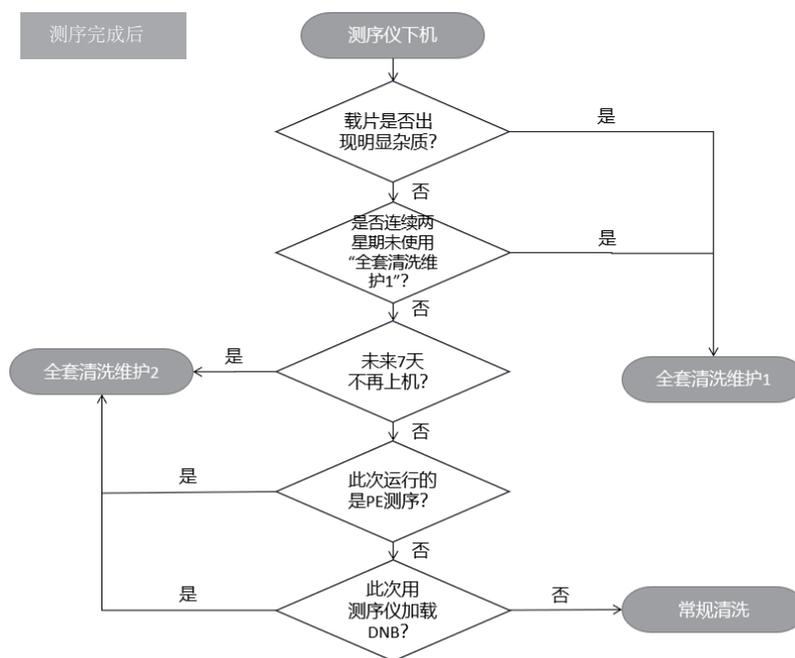


图 36 测序后清洗规则

## 9.2 清洗的术语和定义

表 44 清洗方案

| 清洗方案     | 描述                             | 所需时间    |
|----------|--------------------------------|---------|
| 常规清洗     | 步骤：清洗试剂槽 1                     | 约 48 分钟 |
| 全套清洗维护 1 | 步骤：清洗试剂槽 3 > 清洗试剂槽 2 > 清洗试剂槽 1 | 约 76 分钟 |
| 全套清洗维护 2 | 步骤：清洗试剂槽 4 > 清洗试剂槽 1           | 约 62 分钟 |

- 提示**
- 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，同时对试剂管路进行排空。
  - 全套清洗维护 1 或全套清洗维护 2 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。

## 9.3 准备清洗试剂

 提示 清洗试剂 4 °C 存放，有效期 28 天。

- 按照如下体积配制 0.05% Tween-20:

表 45 准备清洗试剂 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 1 M NaCl + 0.05% Tween-20:

 提示 粉末配制的试剂，需使用 0.22 μm 过滤膜过滤后使用。

表 46 准备清洗试剂 2

| 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:

表 47 准备清洗试剂 3

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

- 按照如下体积配制 0.05 % Tween-20 + 0.03 % ProClin300:

表 48 准备清洗试剂 4

| 试剂               | 用量       |
|------------------|----------|
| 100 % Tween-20   | 0.5 mL   |
| 100 % ProClin300 | 0.3 mL   |
| 实验室级用水           | 999.2 mL |

## 9.4 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，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。
- 可按如下表格准备对应的清洗试剂槽：

表 49 清洗试剂槽准备

| 清洗试剂槽名称 | 2.0 mL冻存管              | 大孔位             | 15号小孔位         | 其余小孔位          |
|---------|------------------------|-----------------|----------------|----------------|
| 清洗试剂槽 1 | 95% 以上体积的实验室级用水        |                 |                |                |
| 清洗试剂槽 2 | 1800 $\mu$ L<br>清洗试剂 3 | 50 mL<br>清洗试剂 3 | 6 mL<br>清洗试剂 3 | 6 mL<br>清洗试剂 3 |
| 清洗试剂槽 3 | 1800 $\mu$ L<br>清洗试剂 2 | 50 mL<br>清洗试剂 1 | 6 mL<br>清洗试剂 2 | 6 mL<br>清洗试剂 1 |
| 清洗试剂槽 4 | 1800 $\mu$ L<br>清洗试剂 4 | 50 mL<br>清洗试剂 4 | 6 mL<br>清洗试剂 4 | 6 mL<br>清洗试剂 4 |



- 提示
- 大孔位：第 1、2、9、10、17、18 号孔位。
  - 小孔位：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

操作步骤如下：

1. 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，轻轻推进试剂仓，直到推到底部并确认试剂盒完全放入；关闭试剂仓门。
2. 在界面点击清洗按钮。
3. 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 48 分钟。



图 37 清洗软件的选择

- 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。
- 当显示界面如下时，常规清洗结束。



图 38 常规清洗结束界面

## 9.5.2 全套清洗维护 1

操作步骤如下：

- 使用清洗试剂盒 3，一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，轻轻推进试剂仓，直到推到底部并确认试剂盒完全放入。
- 关闭试剂仓门。
- 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 14 分钟。
- 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。

- 当界面显示如下图时，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仓门更换清洗试剂盒。



图 39 第一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 14 分钟。
- 当界面显示如下图时，点击【否】结束深度清洗。



图 40 结束深度清洗页面

- 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，轻轻推进试剂仓，直到推到底部并确认试剂盒全完放入；关闭试剂仓门。
- 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 48 分钟。



图 41 清洗软件的选择

14. 当显示界面如下时，全套清洗维护 1 结束。



图 42 全套清洗维护1结束界面

### 9.5.3 全套清洗维护 2

操作步骤如下：

1. 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，轻轻推进试剂仓，直到推到底部并确认试剂盒完全放入。
2. 关闭试剂仓门。
3. 在界面点击【清洗】按钮。
4. 放置水洗载片。
5. 在下拉菜单中选择深度清洗，开始深度清洗，耗时约 14 分钟。
6. 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。
7. 当界面显示如下图时，点击【否】结束深度清洗。



图 43 结束深度清洗页面

8. 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，轻轻推进试剂仓，直到推到底部并确认试剂盒全完放入；关闭试剂仓门。
9. 在界面点击清洗按钮。
10. 放置水洗载片。

11. 在下拉菜单中选择常规清洗，开始常规清洗，耗时约 48 分钟。



图 44 清洗软件的选择

12. 当显示界面如下时，全套清洗维护 2 结束。



图 45 全套清洗维护2结束界面

## 第 10 章 异常处理

### 10.1 DNB 浓度低

当 DNB 浓度低于 8 ng/ $\mu$ 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。
- 可订购 DNBSEQ DNB 制备试剂盒（货号：1000016115）重新制备 DNB。DNB 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。

---

## 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 出现杂质

- 请参考 *MGIDL-200RS 全自动样本加载系统产品说明书* 和本说明书中第 48 页“清洗流程”对 *MGIDL-200RS* 和测序仪进行全套清洗维护。
- 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，并按照本说明书第 41 页“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 °C 内暂存，并于 24 小时内使用，使用前需要按照第 30 页“准备测序试剂槽”中的操作重新混匀试剂。
- 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 °C 内暂存，并于 24 小时内使用，使用前需要按照第 30 页“准备测序试剂槽”中的操作重新混匀试剂。
- 如 dNTPs 和 DNA 聚合酶混合液已经加入试剂槽中，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 °C 内暂存，并于 24 小时内使用，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：

1. 按照第 36 页“开始测序”部分，重新安装载片。

2. 执行第 38 页“测序参数配置”时，需选择程序【Customize】。
3. 点击下图中【Post loading】后面的【…】，展开操作项。

|   |                              |   |
|---|------------------------------|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> 开始阶段: | <input type="radio"/> DNB 加载 | <input checked="" type="radio"/> Post loading ... |
|   | <input type="radio"/> 测序预处理  | <input type="radio"/> 测序                          |

图 46 程序选择1

4. 如需从 Post loading 预处理开始，则勾选【预处理】，如已完成预处理则不勾选。

|   |                              |   |
|---|------------------------------|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> 开始阶段: | <input type="radio"/> DNB 加载 | <input checked="" type="radio"/> Post loading ... |
|   | <input type="radio"/> 测序预处理  | <input checked="" type="checkbox"/> 预处理           |
|   |                              | <input type="radio"/> 测序                          |

图 47 程序选择2

5. 其他步骤按照第 36 页“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，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 48 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  $\mu\text{L}$  的 DNB 制备体系。需注意, 使用 60  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  的 DNB 制备体系。

- ssDNA 文库所需量的计算:

根据第 17 页“文库浓度及所需量的要求”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  $\mu\text{L}$  的 DNB 反应体系, ssDNA 的浓度为 C (fmol/ $\mu\text{L}$ ), 每个 DNB 制备体系所需的文库投入量为:

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

计算每个 DNB 制备体系所需 ssDNA 文库投入量, 填入第 55 页“DNB 制备反应体系 1”的 V 中。

- 制备 DNB:

1) 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 50 DNB 制备反应体系 1

| 组分        | 加入量 ( $\mu\text{L}$ ) |
|-----------|-----------------------|
| 文库 ssDNA  | V                     |
| TE 缓冲液    | 12 - V                |
| DNB 制备缓冲液 | 12                    |
| 总体积       | 24                    |

2) 将反应混合液用漩涡振荡器震荡混匀, 迷你离心机离心 5 秒, 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 51 DNB 制备反应引物杂交条件

| 温度                        | 时间   |
|---------------------------|------|
| 105 $^{\circ}\text{C}$ 热盖 | On   |
| 95 $^{\circ}\text{C}$     | 1 分钟 |
| 65 $^{\circ}\text{C}$     | 1 分钟 |
| 40 $^{\circ}\text{C}$     | 1 分钟 |
| 4 $^{\circ}\text{C}$      | Hold |

3) 取出 DNB 聚合酶混合液 II (LC) 置于冰上, 短暂离心 5 秒, 置于冰上备用。

 提示 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。

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

表 52 DNB 制备反应组分 2

| 组分                 | 100 $\mu\text{L}$ 体系加入量 ( $\mu\text{L}$ ) |
|--------------------|---|
| DNB 聚合酶混合液 I       | 24  |
| DNB 聚合酶混合液 II (LC) | 2.4                                       |

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

表 53 DNB 制备滚环扩增条件

| 温度       | 时间    |
|----------|-------|
| 35 °C 热盖 | On    |
| 30 °C    | 25 分钟 |
| 4 °C     | Hold  |

- 6) 当 PCR 仪温度达到 4 °C 后立即加入 12  $\mu\text{L}$  DNB 终止缓冲液，用阔口吸头缓慢地吹打混匀 5-8 次。

 提示 必须使用阔口吸头缓慢吹打混匀 DNB，切勿离心、震荡及剧烈吹打。

- 7) DNB 可置于 4 °C 保存并于 48 小时内使用。  
8) 转到第 23 页 “DNB 浓度测定” 继续操作。

## 附录 1 样本 DNB 定量操作指导

-  提示
- 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。

操作步骤如下:

1. 配制 Qubit working solution:

- 1) 混匀 Qubit ssDNA Buffer 与 Qubit ssDNA Reagent, 在避光管里以 199:1 的比例混合。
- 2) 漩涡震荡混匀后用迷你离心机短暂离心 5 秒, 放置待用。

-  提示
- 每个样本 DNB 定量需要配置 200  $\mu\text{L}$  Qubit Working solution。
  - 建立标准曲线另需 2 个 200  $\mu\text{L}$  Qubit Working solution。

2. 准备 2 + N 个 Qubit 检测管, 分别标注 S1 ( Qubit ssDNA standard#1 0 ng/ $\mu\text{L}$  )、S2 ( Qubit ssDNA standard#2 20 ng/ $\mu\text{L}$  )、D1 ( 待测样本 DNB )、D2 ( 待测样本 DNB )、D3 ( 待测样本 DNB ) 等。

3. 按照下表准备标准管及待测样本管:

|                            | S1 ( $\mu\text{L}$ ) | S2 ( $\mu\text{L}$ ) | D1 ( $\mu\text{L}$ ) | D2 ( $\mu\text{L}$ ) | D3 ( $\mu\text{L}$ ) |
|----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Working solution           | 190                  | 190                  | 198                  | 198                  | 198                  |
| S1 (0 ng/ $\mu\text{L}$ )  | 10                   | /                    | /                    | /                    | /                    |
| S2 (20 ng/ $\mu\text{L}$ ) | /                    | 10                   | /                    | /                    | /                    |
| 待测样本 DNB                   | /                    | /                    | 2                    | 2                    | 2                    |
| 总体积                        | 200                  | 200                  | 200                  | 200                  | 200                  |

4. 将准备好的样本管及标准液管漩涡震荡混匀, 瞬时离心 5 秒, 避光孵育 2 分钟, 孵育结束后, 可进行下一步。
5. 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 当成样本测定 1 次。此时, 样本投入量选择 10  $\mu\text{L}$ , 单位 ng/ $\mu\text{L}$ 。

-  提示
- 当测定值在 19.9 ~ 20 ng/ $\mu\text{L}$  时, 则认为此次的标准曲线为合格, 可以用来检测样本。若不在这个范围, 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。

6. 放入待测样本管, 样本投入量选择 2  $\mu\text{L}$ , 单位 ng/ $\mu\text{L}$ , 测量并记录测量出的数值。

## 附录 2 制造商信息

|        |   |
|--------|---|
| 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   | 中国深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区 11 栋                       |
|        | 中国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 |
|        | 中国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                                  |