

编号: SOP-013-B01-079



高通量 测序试剂套装

DNBSEQ-T7RS

说明书

版本: 8.0

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

本使用说明书适用于 DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装，说明书版本 8.0。

本产品使用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使用说明书进行重印、复制、修改、传播或公布给他人。本产品使用说明书的读者为终端用户。产品使用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使用说明书。

华大智造对本产品使用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，确保本产品使用说明书的准确性。但是，华大智造对遗漏不承担责任，并保留任何对本产品使用说明书和试剂套装进行改进以提高其可靠性、功能或设计的权利。

Nextera™ 和 TruSeq™ 是因美纳公司或其子公司的商标。Qubit™ 是赛默飞世尔科技公司或其子公司的商标。文中涉及的其他名称及商标属于各自所有者资产。

©2019 - 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
8.0	2022 年 10 月	<ul style="list-style-type: none">• 升级 PE100 和 PE150 货号，修订“准备测序试剂盒槽”部分的加样量• 升级 SE 货号变更 SE 读长的加载试剂盒• 常规文库投入量由 40 fmol 变更为 60 fmol
7.0	2022 年 02 月	<ul style="list-style-type: none">• 更新企业 logo• 更新有效期• 修订运输温度• 删去 App-D 适用 small RNA 接头的描述
6.0	2021 年 07 月	增加试剂有效期
5.0	2021 年 07 月	<ul style="list-style-type: none">• 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	更新华大智造 logo，公司网址和邮件信息
A2	2020 年 09 月	勘误
A1	2020 年 09 月	<ul style="list-style-type: none">• 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

试剂套装货号及名称

货号	名称	产品型号	版本
940-000270-00	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装	FCL SE35	V2.0
940-000271-00	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装	FCL SE50	V2.0
940-000272-00	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装	FCL SE100	V2.0
940-000269-00	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装	FCL PE100	V3.0
940-000268-00	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装	FCL PE150	V3.0
1000019251	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装	stLFR FCL PE100	V1.0
940-000298-00	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装	App-A FCL PE100	V3.0
940-000300-00	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装	App-A FCL PE150	V3.0
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
1000014047	高通量条形码引物 3 试剂盒 (App-A)	/	V1.0
1000028550	高通量测序引物试剂盒 (App-D)	/	V1.0

--- 此页有意留白 ---

目录

第 1 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 2 章 测序试剂套装组份清单及自备设备和耗材	3
2.1 测序试剂套装组分清单	3
2.2 自备设备和耗材	13

第 3 章 测序工作流程	14
---------------------	-----------

第 4 章 准备 DNB	15
4.1 文库插入片段大小要求	15
4.2 文库浓度	16
4.3 pooling 方案	16
4.3.1 确定 pooling 样本数	16
4.3.2 检查 Barcode 的平衡性	17
4.4 制备 DNB	17
4.4.1 FCL SE35、FCL SE50、FCL SE100 及 FCL PE100 DNB 制备	18
4.4.1.1 估算 ssDNA 文库所需量	18
4.4.1.2 准备 DNB 制备试剂	18
4.4.1.3 制备 DNB	19
4.4.2 FCL PE150 DNB 制备	20
4.4.2.1 估算 ssDNA 文库所需量	20
4.4.2.2 准备 DNB 制备试剂	20

4.4.2.3 制备 DNB	21
4.4.3 App-A FCL PE100 DNB 制备	22
4.4.3.1 估算 ssDNA 文库所需量	22
4.4.3.2 准备 DNB 制备试剂	23
4.4.3.3 制备 DNB	23
4.4.4 App-A FCL PE150 DNB 制备	25
4.4.4.1 估算 ssDNA 文库所需量	25
4.4.4.2 准备 DNB 制备试剂	25
4.4.4.3 制备 DNB	25
4.4.5 App-D FCL PE150 DNB 制备	27
4.4.5.1 估算 ssDNA 文库所需量	27
4.4.5.2 准备 DNB 制备试剂	27
4.4.5.3 制备 DNB	28
4.4.6 stLFR FCL PE100 DNB 制备	29
4.4.6.1 估算 dsDNA 文库所需量	29
4.4.6.2 准备 DNB 制备试剂	30
4.4.6.3 制备 DNB	30
4.5 测定 DNB 浓度及 pooling	31
4.5.1 测定 DNB 浓度	31
4.5.2 DNB pooling	32
4.5.2.1 计算每个样本理论相对量	32
4.5.2.2 计算总相对量	32
4.5.2.3 计算每个样本 pooling 体积	33

第 5 章 加载 DNB

33

5.1 准备样本加载试剂板和缓冲液	33
5.1.1 准备 FCL SE35、FCL SE50、FCL SE100、FCL PE100、App-A FCL PE100 及 stLFR FCL PE100 样本加载试剂板和缓冲液	34
5.1.1.1 解冻样本加载试剂板	34

5.1.1.2	解冻 DNB 加载试剂	34
5.1.1.3	准备 0.1 M NaOH 试剂	34
5.1.1.4	配制 DNB 加载体系	34
.....		
5.1.2	准备 FCL PE150、App-A FCL PE150 及 App-D FCL PE150 快速样本加载试剂板和缓冲液	35
5.1.2.1	解冻样本加载试剂板	35
5.1.2.2	解冻 DNB 加载试剂	35
5.1.2.3	准备 0.1 M NaOH 试剂	36
5.1.2.4	配制 DNB 加载体系	36
5.2	准备测序载片	36
5.3	加载 DNB	37
第 6 章 测序前准备		45
6.1	准备测序试剂槽	45
6.2	准备清洗试剂槽	49
6.3	准备纯水试剂桶	50
第 7 章 测序		51
7.1	放置试剂槽	51
7.2	进入主界面	52
7.3	放置测序载片	52
7.4	测序参数配置	53
7.5	复核信息	56
7.6	开始测序	57
第 8 章 清洗维护		59
8.1	清洗的术语和定义	59
8.2	准备清洗试剂	59
8.3	清洗套装	60
8.4	手动清洗流程	60
.....		
8.4.1	手动清洗 MGIDL - T7RS	60
.....		
8.4.2	手动清洗 DNBSEQ - T7RS	61

第 9 章 异常处理	61
9.1 DNB 浓度低	61
9.2 负压异常	61
9.3 产生气泡	62
9.3.1 MGIDL - T7RS 产生气泡	62
9.3.2 DNBSEQ - T7RS 产生气泡	62
9.4 出现杂质	62
9.5 试剂盒暂存	62
附录 1 样本 DNB 定量作业指导	63
附录 2 制造商信息	64

第 1 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，内容包括制备 DNA 纳米球 (DNB)，准备载片，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。

 提示 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 basecall 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。

 提示 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。校正循环不需要设置，系统会根据测序读长自动生成。

表 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	56
SE50	50	/	10	50+10	71
SE100	100	/	10	100+10	121
PE100	100	100	10	200+10	222
PE150	150	150	10	300+10	322
App-A PE100	100	100	10	200+10	222
App-A PE150	150	150	10	300+10	322
App-D PE150	150	150	10	300+10	322
stLFR PE100	100	100	42+10	200+52	254

1.5 测序时长

-  提示
- 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。
 - DNB 加载时，每个 MGIDL-T7RS 可同时加载 2 张载片，每次时长约为 2 小时。
 - 表中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。
 - 表中的测序时长，除 stLFR PE100 外，均只表示单 Barcode 测序时长。

表 2 测序理论时长

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	15.0 ~ 16.0	16.0 ~ 20.0	1	2
PE150	21.0 ~ 23.0	23.0 ~ 28.0	1	2
App-A PE100	15.0 ~ 16.0	16.0 ~ 20.0	1	2
App-A PE150	21.0 ~ 23.0	23.0 ~ 28.0	1	2
App-D PE150	21.0 ~ 23.0	23.0 ~ 28.0	1	2
stLFR PE100	21.0	24.5	1	2

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，一旦发生此类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 测序试剂套装组份清单及自备设备和耗材

2.1 测序试剂套装组分清单

-  提示 • 在进行FCL SE35, FCL SE50或FCL SE100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 4 试剂盒（货号：1000014048）。
- 在进行FCL PE100或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 3 DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装 (FCL SE35) V2.0 货号: 940-000270-00

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	储存温度	运输温度	有效期
DNBSEQ-T7RS 测序载片 (T7-2 FCL) 货号: 930-000054-00	测序载片 (T7-2 FCL)	1 张	2 °C ~ 8 °C	2 °C ~ 8 °C	10 个月
DNBSEQ DNB 制备 试剂盒 货号: 1000016115	TE 缓冲液	960 μL / 支 × 1 支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12 个月
	DNB 制备缓冲液	400 μL / 支 × 1 支			
	DNB 聚合酶混合液 I	800 μL / 支 × 1 支			
	DNB 聚合酶混合液 II (LC)	80 μL / 支 × 1 支			
	DNB 终止缓冲液	400 μL / 支 × 1 支			
DNBSEQ-T7RS DNB加载试剂盒 V2.0 货号: 1000028452	DNB 加载缓冲液 I	300 μL / 支 × 1 支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12 个月
	DNB 加载缓冲液 II	150 μL / 支 × 1 支			
	0.5 mL 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 SE35) 货号: 1000019813	dNTPs 混合液 II	4.50 mL / 支 × 1 支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12 个月
	dNTPs 混合液 IV	1.70 mL / 支 × 1 支			
	DNA 聚合酶混合液	3.20 mL / 支 × 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	0 °C ~ 30 °C	40 °C 以下	12 个月

表 4 DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装 (FCL SE50) V2.0 货号: 940-000271-00

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	储存温度	运输温度	有效期
DNBSEQ-T7RS 测序载片 (T7-2 FCL) 货号: 930-000054-00	测序载片 (T7-2 FCL)	1 张	2 °C ~ 8 °C	2 °C ~ 8 °C	10 个月
DNBSEQ DNB 制备试剂盒 货号: 1000016115	TE 缓冲液	960 μL / 支 × 1 支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12 个月
	DNB 制备缓冲液	400 μL / 支 × 1 支			
	DNB 聚合酶混合液 I	800 μL / 支 × 1 支			
	DNB 聚合酶混合液 II (LC)	80 μL / 支 × 1 支			
	DNB 终止缓冲液	400 μL / 支 × 1 支			
DNBSEQ-T7RS DNB 加载试剂盒 V2.0 货号: 1000028452	DNB 加载缓冲液 I	300 μL / 支 × 1 支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12 个月
	DNB 加载缓冲液 II	150 μL / 支 × 1 支			
	0.5 mL 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 SE50) 货号: 1000016108	dNTPs 混合液 II	2.70 mL / 支 × 2 支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12 个月
	dNTPs 混合液 IV	2.00 mL / 支 × 1 支			
	DNA 聚合酶混合液	3.80 mL / 支 × 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	0 °C ~ 30 °C	40 °C 以下	12 个月

表 5 DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装 (FCL SE100) V2.0 货号: 940-000272-00

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	储存温度	运输温度	有效期
DNBSEQ-T7RS 测序载片 (T7-2 FCL) 货号: 930-000054-00	测序载片 (T7-2 FCL)	1张	2 °C ~ 8 °C	2 °C ~ 8 °C	10 个月
DNBSEQ DNB 制备试剂盒 货号: 1000016115	TE 缓冲液	960 μL/ 支 ×1 支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12 个月
	DNB 制备缓冲液	400 μL/ 支 ×1 支			
	DNB 聚合酶混合液 I	800 μL/ 支 ×1 支			
	DNB 聚合酶混合液 II (LC)	80 μL/ 支 ×1 支			
	DNB 终止缓冲液	400 μL/ 支 ×1 支			
DNBSEQ-T7RS DNB 加载试剂盒V2.0 货号: 1000028452	DNB 加载缓冲液 I	300 μL/ 支 ×1 支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12 个月
	DNB 加载缓冲液 II	150 μL/ 支 ×1 支			
	0.5 mL 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 SE100) 货号: 1000016109	dNTPs 混合液 II	4.05 mL/ 支 ×2 支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12 个月
	dNTPs 混合液 IV	3.00 mL/ 支 ×1 支			
	DNA 聚合酶混合液	2.85 mL/ 支 ×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	0 °C ~ 30 °C	40 °C 以下	12 个月

表 6 DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE100) V3.0 货号: 940-000269-00

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	储存温度	运输温度	有效期
DNBSEQ-T7RS 测序载片 (T7-2 FCL) 货号: 930-000054-00	测序载片 (T7-2 FCL)	1 张	2 °C ~ 8 °C	2 °C ~ 8 °C	10 个月
DNBSEQ DNB 制备试剂盒 货号: 1000016115	TE 缓冲液	960 μL / 支 × 1 支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12 个月
	DNB 制备缓冲液	400 μL / 支 × 1 支			
	DNB 聚合酶混合液 I	800 μL / 支 × 1 支			
	DNB 聚合酶混合液 II (LC)	80 μL / 支 × 1 支			
	DNB 终止缓冲液	400 μL / 支 × 1 支			
DNBSEQ-T7RS DNB 加载试剂盒 V2.0 货号: 1000028452	DNB 加载缓冲液 I	300 μL / 支 × 1 支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12 个月
	DNB 加载缓冲液 II	150 μL / 支 × 1 支			
	0.5 mL 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) V3.0 货号: 940-000267-00	dNTPs 混合液 II	8.28 mL / 支 × 1 支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12 个月
	dNTPs 混合液 V	2.76 mL / 支 × 1 支			
	DNA 聚合酶混合液	5.52 mL / 支 × 1 支			
	MDA 试剂	4.20 mL / 支 × 1 支			
	MDA 聚合酶混合液	0.60 mL / 支 × 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) V3.0 货号: 940-000299-00	清洗试剂槽	1 个	0 °C ~ 30 °C	40 °C 以下	12 个月

表 7 DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE150) V3.0 货号: 940-000268-00

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	储存温度	运输温度	有效期
DNBSEQ-T7RS 测序载片 (T7-2 FCL) 货号: 930-000054-00	测序载片 (T7-2 FCL)	1张	2 °C ~ 8 °C	2 °C ~ 8 °C	10 个月
DNBSEQ DNB 快速制备试剂盒 V2.0 货号: 1000028453	TE 缓冲液	960 μL / 支 ×1 支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12 个月
	DNB 制备缓冲液	400 μL / 支 ×1 支			
	DNB 快速聚合酶混合液 II	800 μL / 支 ×1 支			
	DNB 聚合酶混合液 II (LC)	80 μL / 支 ×1 支			
	DNB 终止缓冲液	400 μL / 支 ×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 / 支 ×1 支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12 个月
	0.5 mL 冻存管	1 支			
	快速样本加载试剂板 (T7 FCL) V2.0	1 个			
DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂盒 (FCL PE150) V3.0 货号: 940-000266-00	dNTPs 混合液 II	5.61 mL / 支 ×2 支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12 个月
	dNTPs 混合液 V	3.74 mL / 支 ×1 支			
	DNA 聚合酶混合液	7.48 mL / 支 ×1 支			
	MDA 试剂	4.20 mL / 支 ×1 支			
	MDA 聚合酶混合液	0.60 mL / 支 ×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) V3.0 货号: 940-000297-00	清洗试剂槽	1 个	0 °C ~ 30 °C	40 °C 以下	12 个月

表 8 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	有效期
用于双端测序方案的双 Barcode 测序引物	CPAS AD153 条形码引物 3 工作液	3.50 mL / 支 ×1 支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12 个月

表 9 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	有效期
用于单端测序方案的双 Barcode 测序引物	CPAS AD153 条形码引物 4 工作液	3.50 mL/ 支 ×1 支	-25 °C~ -15 °C	-80 °C~ -15 °C	12 个月

表 10 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	储存温度	运输温度	有效期
DNBSEQ-T7RS 测序载片 货号: 1000016269	测序载片 (T7 FCL)	1 张	0 °C ~ 30 °C	0 °C ~ 30 °C	10 个月
DNBSEQ DNB制备试剂盒 (stLFR) 货号: 1000019257	TE 缓冲液	480 μL/ 支 ×1 支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12 个月
	stLFR DNB 制备缓冲液	160 μL/ 支 ×1 支			
	DNB 聚合酶混合液 III	320 μL/ 支 ×1 支			
	DNB 聚合酶混合液 IV	42 μL/ 支 ×1 支			
	DNB 终止缓冲液	200 μL/ 支 ×1 支			
DNBSEQ-T7RS DNB加载试剂盒 (stLFR) 货号: 1000019256	DNB 加载缓冲液 I	500 μL/ 支 ×1 支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12 个月
	DNB 加载缓冲液 II	500 μL/ 支 ×1 支			
	0.5 mL 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/ 支 ×3 支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12 个月
	dNTPs 混合液 IV	5.40 mL/ 支 ×1 支			
	DNA 聚合酶混合液	5.15 mL/ 支 ×2 支			
	MDA 试剂	4.20 mL/ 支 ×1 支			
	MDA 聚合酶混合液	0.60 mL/ 支 ×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	0 °C ~ 30 °C	40 °C 以下	12 个月

表 11 DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装 (App-A FCL PE100) V3.0
货号: 940-000298-00

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	储存温度	运输温度	有效期
DNBSEQ-T7RS 测序载片 (T7-2 FCL) 货号: 930-000054-00	测序载片 (T7-2 FCL)	1张	2 °C ~ 8 °C	2 °C ~ 8 °C	10个月
DNBSEQ DNB制备试剂盒 货号: 1000016115	TE 缓冲液	960 μL / 支 ×1支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12个月
	DNB 制备缓冲液	400 μL / 支 ×1支			
	DNB 聚合酶混合液 I	800 μL / 支 ×1支			
	DNB 聚合酶混合液 II (LC)	80 μL / 支 ×1支			
	DNB 终止缓冲液	400 μL / 支 ×1支			
DNBSEQ-T7RS DNB加载试剂盒 V2.0 货号: 1000028452	DNB 加载缓冲液 I	300 μL / 支 ×1支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12个月
	DNB 加载缓冲液 II	150 μL / 支 ×1支			
	0.5 mL 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) V3.0 货号: 940-000267-00	dNTPs 混合液 II	8.28 mL / 支 ×1支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12个月
	dNTPs 混合液 V	2.76 mL / 支 ×1支			
	DNA 聚合酶混合液	5.52 mL / 支 ×1支			
	MDA 试剂	4.20 mL / 支 ×1支			
	MDA 聚合酶混合液	0.60 mL / 支 ×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) V3.0 货号: 940-000299-00	清洗试剂槽	1个	0 °C ~ 30 °C	40 °C 以下	12个月

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	储存温度	运输温度	有效期
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 μ L / 支 \times 1 支	-25 $^{\circ}$ C ~ -15 $^{\circ}$ C	-80 $^{\circ}$ C ~ -15 $^{\circ}$ C	12 个月
	App-A 测序引物工作液 1	2.20 mL / 支 \times 1 支			
	App-A 测序引物工作液 2	4.20 mL / 支 \times 1 支			
	App-A MDA 引物工作液	4.20 mL / 支 \times 1 支			
	App-A 条形码引物工作液 2	3.50 mL / 支 \times 1 支			

表 12 DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装 (App-A FCL PE150) V3.0
货号: 940-000300-00

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	储存温度	运输温度	有效期
DNBSEQ-T7RS 测序载片 (T7-2 FCL) 货号: 930-000054-00	测序载片 (T7-2 FCL)	1 张	2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C	2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C	10 个月
DNBSEQ DNB快速制备试剂盒V2.0 货号: 1000028453	TE缓冲液	960 μ L / 支 \times 1 支	-25 $^{\circ}$ C ~ -15 $^{\circ}$ C	-80 $^{\circ}$ C ~ -15 $^{\circ}$ C	12 个月
	DNB 制备缓冲液	400 μ L / 支 \times 1 支			
	DNB 快速聚合酶混合液 II	800 μ L / 支 \times 1 支			
	DNB 聚合酶混合液 II (LC)	80 μ L / 支 \times 1 支			
	DNB 终止缓冲液	400 μ L / 支 \times 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 μ L / 支 \times 1 支	-25 $^{\circ}$ C ~ -15 $^{\circ}$ C	-80 $^{\circ}$ C ~ -15 $^{\circ}$ C	12 个月
	0.5 mL 冻存管	1 支			
	快速样本加载试剂板 (T7 FCL) V2.0	1 个			
DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂盒 (FCL PE150) V3.0 货号: 940-000266-00	dNTPs 混合液 II	5.61 mL / 支 \times 2 支	-25 $^{\circ}$ C ~ -15 $^{\circ}$ C	-80 $^{\circ}$ C ~ -15 $^{\circ}$ C	12 个月
	dNTPs 混合液 V	3.74 mL / 支 \times 1 支			
	DNA 聚合酶混合液	7.48 mL / 支 \times 1 支			
	MDA 试剂	4.20 mL / 支 \times 1 支			
	MDA 聚合酶混合液	0.60mL / 支 \times 1 支			
	测序试剂槽	1 个			
	透明封口膜	2 张			

试剂盒信息	组分信息	规格及数量	储存温度	运输温度	有效期
DNBSEQ-T7RS 清洗试剂盒 (FCL PE150) V3.0 货号: 940-000297-00	清洗试剂槽	1个	0 °C ~ 30 °C	40 °C以下	12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 / 支 ×1支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12个月
	App-A 测序引物工作液 1	2.20 mL / 支 ×1支			
	App-A 测序引物工作液 2	4.20 mL / 支 ×1支			
	App-A MDA 引物工作液	4.20 mL / 支 ×1支			
	App-A 条形码引物工作液 2	3.50 mL / 支 ×1支			

表 13 高通量条形码引物 3 试剂盒 (App-A) 货号: 1000014047

产品类型	组分信息	规格及数量	储存温度	运输温度	有效期
仅提供用于双端测序方案的双Barcode测序	App-A 条形码引物工作液 3	3.50 mL / 支 ×1支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12个月

表 14 高通量测序引物试剂盒 (App-D) 货号: 1000028550

产品类型	组分信息	规格及数量	储存温度	运输温度	有效期
提供用于双端测序方案的双Barcode测序	App-D 测序引物工作液 1	2.20 mL / 支 ×1支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12个月
	App-D MDA 引物工作液	4.20 mL / 支 ×1支			
	App-D 测序引物工作液 2	4.20 mL / 支 ×1支			
	App-D 条形码引物工作液 2	3.50 mL / 支 ×1支			
	App-D 条形码引物工作液 3	3.50 mL / 支 ×1支			
	App-D DNB 制备缓冲液	400 μL / 支 ×1支			

 提示 高通量测序引物试剂盒 (App-D) 支持TruSeq、Nextera和AD153接头文库测序, 需搭配DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE150) 使用。

2.2 自备设备和耗材

-  提示
- DNB制备和加载禁止使用带滤芯的吸头，必须使用推荐的品牌货号。
 - 其他耗材建议使用推荐品牌货号。

表 15 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
PCR 仪	Bio-Rad	无
MPC2000 96 孔板离心机 (甩板机)	北京鼎昊源	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 °C ~ 8 °C 冰箱	无	无
-25 °C ~ -15 °C 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	S5150-4 L
2 M NaOH	阿拉丁	S128511-1 L
Qubit Assay Tubes	Thermo Fisher	Q32856
200 μL 阔口不带滤芯吸头	AXYGEN	T-205-WB-C
200 μL 阔口不带滤芯吸头	范德	BI-200K-H
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	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

物料名称	推荐品牌	供应商货号
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 3 章 测序工作流程

测序工作流程如下：

1. 准备 DNB：使用 DNB 制备试剂进行制备。
2. 加载样本：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（4~24 小时）、添加和混匀，检查纯水桶和废液桶余量。
4. 点击开始测序，设备自检。
5. 测序。
6. 数据分析。

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 bp ~ 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。

-  提示
- 对于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。文库插入片段范围在200 bp ~ 1500 bp。
 - 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。

表 16 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	数据量 (M)	数据量 (Gb)
FCL SE35	50 ~ 230	NIPT	5800	192
FCL SE50	50 ~ 230	NIPT, PMSEQ	5800	275
FCL SE100	200 ~ 400	PMSEQ	5800	550
FCL PE100	200 ~ 400	WGS, WES, RNAseq, 单细胞	5800	1160
FCL PE150	300 ~ 500	WGS, WES, RNAseq	5800	1740
App-A FCL PE100	200 ~ 400	WGS, WES, RNAseq	5800	1160
App-A FCL PE150	300 ~ 500	WGS, WES, RNAseq	5800	1740
App-D FCL PE150	300 ~ 500	WGS, WES, RNAseq	4000	1200
stLFR FCL PE100	200 ~ 1500	stLFR	4000	800

4.2 文库浓度

-  **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）：
- $$\text{Concentration (fmol/}\mu\text{L)} = 3030 \times \text{Concentration (ng/}\mu\text{L)} / N$$
- 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。

表 17 文库浓度要求

文库类型	初始文库 ssDNA 浓度要求
常规	≥ 3 fmol/μL
PCR free	≥ 3.75 fmol/μL
stLFR	≥ 1.9 ng/μL

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%。

- 例 1: 人类全基因组测序 WGS: 如果采用 PE100 测序，每个样本需要 100 Gb 的数据量，建议每张载片最多同时测序 10 个样本。
- 例 2: 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。
- 例 3: 某一应用: 如果采用 PE100 测序，每个样本需要 50 Gb 的数据量，建议每张载片最多同时测序 20 个样本。
- 例 4: 某一混合样本: 如果采用 PE150 测序，有 4 个 WGS 样本，每个需要 100 Gb 的数据量，同时还需进行 RNASeq 样本测序，每个需要 50 Gb 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 23 个 RNAseq 样本。

-  **提示** • 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。
- 若样本的 pooling 的差别在 ±10% 之内，按照以下公式计算：

$$\text{样本最大 pooling 数目} = \frac{\text{一张载片总数据量} \times (1 - \text{pooling 间的误差})}{\text{应用需要数据量}}。$$

表 18 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
例一	PE100	100 Gb	10 个样本	104 Gb ~ 127 Gb
例二	stLFR PE100	120 Gb	6 个样本	120 Gb ~ 146 Gb
例三	PE100	50 Gb	20 个样本	52 Gb ~ 63 Gb
例四	PE150	100 Gb	4 个 WGS 样本	102 Gb ~ 122 Gb
		50 Gb	23 个 RNAseq 样本	51 Gb ~ 62 Gb

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 制备 DNB

 提示 • 不同批次试剂盒严禁混用。

- DNB 制备和加载禁止使用带滤芯的吸头，必须使用推荐的品牌货号。

此部分内容包含 6 种 DNB 制备方案，可按需查阅：

- FCL SE35、FCL SE50、FCL SE100及FCL PE100 DNB制备，见 第 18 页 “FCL SE35、FCL SE50、FCL SE100 及 FCL PE100 DNB 制备”
- FCL PE150 DNB制备，见第 20 页 “FCL PE150 DNB 制备”
- App-A FCL PE100 DNB 制备，见第 22 页 “App-A FCL PE100 DNB 制备”
- App-A FCL PE150 DNB 制备，见第 25 页 “App-A FCL PE150 DNB 制备”
- App-D FCL PE150 DNB 制备，见第 27 页 “App-D FCL PE150 DNB 制备”
- stLFR FCL PE100 DNB 制备，见第 29 页 “stLFR FCL PE100 DNB 制备”

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

4.4.1.1 估算 ssDNA 文库所需量

- 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，每个样本测序所需的数据量，决定 DNB 制备体系的体积为 100 μL 或 50 μL 。

- 下表为单份 DNB 制备体系所需 ssDNA 文库体积：

 提示 C 表示文库浓度 (fmol/ μL)。

表 19 FCL SE35/SE50/SE100/PE100 所需 ssDNA 文库体积计算

文库类型	所需 ssDNA 文库体积 V (μL)	
	100 μL 体系	50 μL 体系
常规	$V=60 \text{ fmol}/C$	$V=30 \text{ fmol}/C$
PCR free	$V=75 \text{ fmol}/C$	$V=37.5 \text{ fmol}/C$

- 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： $V=a/b \times 270 \mu\text{L}$

- 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。

4.4.1.2 准备 DNB 制备试剂

操作步骤如下：

- 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，约 0.5 小时。
- 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，使用漩涡振荡器振荡混匀 5 秒，短暂离心置于冰上备用。

4.4.1.3 制备 DNB

操作步骤如下：

1. 取用 0.2 mL 八连管或 PCR 管，在冰上按下表配制反应体系，以下体系为单份 DNB 制备体系，根据第 18 页“估算 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 20 FCL SE35 / SE50 / SE100 / PE100 DNB 制备反应组分 1

组分	100 μ L 体系加入量 (μ L)	50 μ L 体系加入量 (μ L)
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

2. 将上述 DNB 制备反应体系用漩涡振荡器振荡混匀，迷你离心机离心 5 秒，置于 PCR 仪中进行引物杂交，反应条件见下表：

 提示 部分品牌 PCR 仪的热盖升降速度慢，在热盖升降过程中，加热模块处于室温状态，且程序未运行。对于这种类型的 PCR 仪，需提前进行热盖预热，确保进行 DNB 反应时热盖处于工作温度。

表 21 FCL SE35 / SE50 / SE100 / PE100 DNB 制备反应引物杂交条件

温度	时间
热盖 (105 $^{\circ}$ C)	On
95 $^{\circ}$ C	1 min
65 $^{\circ}$ C	1 min
40 $^{\circ}$ C	1 min
4 $^{\circ}$ 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，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。

4. 当 PCR 仪达到 4 $^{\circ}$ C 后取出 PCR 管，迷你离心机离心 5 秒后，在冰上向上述 PCR 管中加入如下 DNB 制备反应组分 2：

表 22 FCL SE35 / SE50 / SE100 / PE100 DNB 制备反应组分 2

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

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

 提示 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 23 FCL SE35 / SE50 / SE100 / PE100 DNB 制备滚环扩增条件

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

6. 当 PCR 仪温度达到 4 °C 后, 立即在 100 μL 体系加入 20 μL DNB 终止缓冲液, 在 50 μL 体系加入 10 μL DNB 终止缓冲液, 用阔口吸头缓慢地吹打混匀 5~8 次。

 提示

- DNB 必须使用阔口吸头缓慢吹打混匀, 切勿离心、振荡及剧烈吹打。
- 制备完成的 DNB 可置于 4 °C 保存并于 48 小时内使用。

4.4.2 FCL PE150 DNB 制备

4.4.2.1 估算 ssDNA 文库所需量

- 对于 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 。
- 下表为单份 DNB 制备体系所需 ssDNA 文库体积:

 提示 C 表示文库浓度 (fmol/ μL)。

表 24 FCL PE150 所需 ssDNA 文库体积计算

文库类型	所需 ssDNA 文库体积 V (μL)
常规	$V=60 \text{ fmol}/C$
PCR free	$V=75 \text{ fmol}/C$

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: $V=a/b \times 300 \mu\text{L}$ 。

样本 A 的 DNB 制备个数为 $V/90$, 取整数 +1。

4.4.2.2 准备 DNB 制备试剂

操作步骤如下:

1. 取出文库置于冰上备用。
2. 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, 约 0.5 小时。

3. 取出 DNB 快速聚合酶混合液 II 置于冰上解冻，约 0.5 小时。
4. 待试剂融化后，使用漩涡振荡器振荡混匀 5 秒，短暂离心置于冰上备用。

4.4.2.3 制备 DNB

操作步骤如下：

1. 取用 0.2 mL 八连管或 PCR 管，在冰上按下表配制反应体系，以下体系为单份 DNB 制备体系，根据第 20 页“估算 ssDNA 文库所需量”来确认文库体积及制备份数：

 提示 在此处使用完的 TE 缓冲液后需保留，此试剂还需用于 DNB 加载过程。

表 25 FCL PE150 DNB 制备反应组分 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

2. 将上述 DNB 制备反应体系用漩涡振荡器振荡混匀，迷你离心机离心 5 秒，置于 PCR 仪中进行引物杂交，反应条件见下表：

 提示 部分品牌 PCR 仪的热盖升降速度慢，在热盖升降过程中，加热模块处于室温状态，且程序未运行。对于这种类型的 PCR 仪，需提前进行热盖预热，确保进行 DNB 反应时热盖处于工作温度。

表 26 FCL PE150 DNB 制备反应引物杂交条件

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

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，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。

4. 当 PCR 仪达到 4 °C 后取出 PCR 管，迷你离心机离心 5 秒后，在冰上向 PCR 管中加入如下 DNB 制备反应组分 2:

表 27 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

5. 反应体系用漩涡振荡器振荡混匀，迷你离心机离心 5 秒，即刻置于 PCR 仪中，反应条件如下：
 提示 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 28 FCL PE150 DNB 制备滚环扩增条件

温度	时间
热盖 (35 °C)	On
30 °C	10 min
4 °C	Hold

6. 当 PCR 仪温度达到 4 °C 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。
 提示 • DNB 必须使用阔口吸头缓慢吹打混匀，切勿离心、振荡及剧烈吹打。
 • 制备完成的 DNB 可置于 4 °C 并于 8 小时内使用。

4.4.3 App - A FCL PE100 DNB 制备

4.4.3.1 估算 ssDNA 文库所需量

- 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。
- 下表为单份 DNB 制备体系所需 ssDNA 文库体积：

 提示 C 表示文库浓度 (fmol/μL)。

表 29 App - A FCL PE100 所需 ssDNA 文库体积计算

文库类型	所需 ssDNA 文库体积 V (μL)	
	100 μL 体系	50 μL 体系
常规文库	$V=60 \text{ fmol}/C$	$V=30 \text{ fmol}/C$
PCR free	$V=75 \text{ fmol}/C$	$V=37.5 \text{ fmol}/C$

- 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： $V = a/b \times 270 \mu\text{L}$
 - 当 pooling 样本个数小于 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 样本个数大于等于 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。

4.4.3.2 准备 DNB 制备试剂

操作步骤如下：

1. 取出文库置于冰上备用。
2. 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，约 0.5 小时。
3. 取出 DNB 聚合酶混合液 I 置于冰上解冻，约 0.5 小时。
4. 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。
5. 待试剂融化后，使用漩涡振荡器振荡混匀 5 秒，短暂离心置于冰上备用。

4.4.3.3 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 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，根据第 22 页“估算 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 30 App - A FCL PE100 DNB 制备反应组分 1

组分	100 μL 体系加入量 (μL)	50 μL 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

2. 将上述 DNB 制备反应体系用漩涡振荡器振荡混匀，迷你离心机离心 5 秒，置于 PCR 仪中进行引物杂交，反应条件见下表：

 **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。

表 31 App-A FCL PE100 DNB 制备反应引物杂交条件

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

- 取出 DNB 聚合酶混合液 II (LC) 置于冰上, 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 °C 后取出 PCR 管, 迷你离心机离心 5 秒后, 在冰上向 PCR 管中加入如下 DNB 制备反应组分 2:

表 32 App-A FCL PE100 DNB 制备反应组分 2

组分	100 μ L 体系加入量 (μ L)	50 μ L 体系加入量 (μ L)
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振荡混匀, 迷你离心机离心 5 秒, 即刻置于 PCR 仪中, 反应条件如下:

 提示 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 33 App-A FCL PE100 DNB 制备滚环扩增条件

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

- 当 PCR 仪温度达到 4 °C 后, 100 μ L 体系立即加入 20 μ L DNB 终止缓冲液, 50 μ L 体系即加入 10 μ 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 必须使用阔口吸头缓慢吹打混匀, 切勿离心、振荡及剧烈吹打。
- 制备完成的 DNB 可置于 4 °C 保存并于 48 小时内使用。

4.4.4 App - A FCL PE150 DNB 制备

4.4.4.1 估算 ssDNA 文库所需量

- 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 。
- 下表为单份 DNB 制备体系所需 ssDNA 文库体积：

 提示 C 表示文库浓度 (fmol/ μL)。

表 34 App - A FCL PE150 所需 ssDNA 文库体积计算

文库类型	所需 ssDNA 文库体积 V (μL)
常规	$V = 60 \text{ fmol} / C$
PCR free	$V = 75 \text{ fmol} / C$

- 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： $V = a / b \times 300 \mu\text{L}$
 - 样本 A 的 DNB 制备个数为 $V / 90$ ，取整数 +1。

4.4.4.2 准备 DNB 制备试剂

操作步骤如下：

1. 取出文库置于冰上备用。
2. 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，约 0.5 小时。
3. 取出 DNB 快速聚合酶混合液 II 置于冰上解冻，约 0.5 小时。
4. 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。
5. 待试剂融化后，使用漩涡振荡器振荡混匀 5 秒，短暂离心置于冰上备用。

4.4.4.3 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 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，根据第 25 页“估算 ssDNA 文库所需量”来确认文库体积及制备份数：

 提示 在此处使用完的 TE 缓冲液后需保留，此试剂还需用于 DNB 加载过程。

表 35 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

2. 将上述 DNB 制备反应体系用漩涡振荡器振荡混匀，迷你离心机离心 5 秒，置于 PCR 仪中进行引物杂交，反应条件见下表：

 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。

表 36 App-A FCL PE150 DNB 制备反应引物杂交条件

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

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，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。

4. 当 PCR 仪达到 4 °C 后取出 PCR 管，迷你离心机离心 5 秒后，在冰上向 PCR 管中加入如下 DNB 制备反应组分 2：

表 37 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

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

 提示 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 38 App-A FCL PE150 DNB 制备滚环扩增条件

温度	时间
热盖 (35 °C)	On
30 °C	10 min
4 °C	Hold

6. 当 PCR 仪温度达到 4 °C 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。

 提示

- DNB 必须使用阔口吸头缓慢吹打混匀, 切勿离心、振荡及剧烈吹打。
- 制备完成的 DNB 可置于 4 °C 保存并于 8 小时内使用。

4.4.5 App-D FCL PE150 DNB 制备

4.4.5.1 估算 ssDNA 文库所需量

- 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 300 μL, 单份 DNB 制备体系的体积为 90 μL。
- 下表为单份 DNB 制备体系所需 ssDNA 文库体积:

 提示 C 表示文库浓度 (fmol/μL)。

表 39 App-D FCL PE150 所需 ssDNA 文库体积计算

文库类型	所需 ssDNA 文库体积 V (μL)
常规	$V = 60 \text{ fmol} / C$
PCR free	$V = 75 \text{ fmol} / C$

- 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: $V = a / b \times 300 \mu\text{L}$
 - 样本 A 的 DNB 制备个数为 $V / 90$, 取整数 +1。

4.4.5.2 准备 DNB 制备试剂

操作步骤如下:

1. 取出文库置于冰上备用。
2. 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, 约 0.5 小时。
3. 取出 DNB 快速聚合酶混合液 II 置于冰上解冻, 约 0.5 小时。

4. 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。
5. 待试剂融化后, 使用漩涡振荡器振荡混匀 5 秒, 短暂离心置于冰上备用。

4.4.5.3 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 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, 根据第 27 页“估算 ssDNA 文库所需量”来确认文库体积及制备份数:

 提示 在此处使用完的 TE 缓冲液后需保留, 此试剂还需用于 DNB 加载过程。

表 40 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

2. 将上述 DNB 制备反应体系用漩涡振荡器振荡混匀, 迷你离心机离心 5 秒, 置于 PCR 仪中进行引物杂交, 反应条件见下表:

 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。

表 41 App-D FCL PE150 DNB 制备反应引物杂交条件

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

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, 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。

4. 当 PCR 仪达到 4 °C 后取出 PCR 管，迷你离心机离心 5 秒后，在冰上向 PCR 管中加入如下 DNB 制备反应组分 2:

表 42 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

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

 提示 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 43 App-D FCL PE150 DNB 制备滚环扩增条件

温度	时间
热盖 (35 °C)	On
30 °C	10 min
4 °C	Hold

6. 当 PCR 仪温度达到 4 °C 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。

 提示

- DNB 必须使用阔口吸头缓慢吹打混匀，切勿离心、振荡及剧烈吹打。
- 制备完成的 DNB 可置于 4 °C 保存并于 8 小时内使用。

4.4.6 stLFR FCL PE100 DNB 制备

4.4.6.1 估算 dsDNA 文库所需量

- 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 μL DNB 制备体系所需的文库量分别为 30 ng。单份 DNB 制备体系所需文库体积为：

$V = 30 \text{ ng} / C$ ，C 表示文库浓度 (ng/μL)。

- 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：

$V = a / b \times 270 \text{ μL}$

- 样本 A 的 DNB 制备个数为 $V / 80$ ，取整数 +1。

4.4.6.2 准备 DNB 制备试剂

操作步骤如下：

1. 取出文库置于冰上备用；
2. 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，约 0.5 小时。
3. 取出 DNB 聚合酶混合液 III 置于冰上解冻，约 0.5 小时。
4. 待试剂融化后，使用漩涡振荡器振荡混匀 5 秒，短暂离心置于冰上备用。

4.4.6.3 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 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，根据第 29 页“估算 dsDNA 文库所需量”来确认文库体积及制备份数：

表 44 stLFR FCL PE100 DNB 制备反应组分 1

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

2. 将上述 DNB 制备反应体系用漩涡振荡器振荡混匀，迷你离心机离心 5 秒，置于 PCR 仪中进行引物杂交，反应条件见下表：



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。

表 45 stLFR FCL PE100 DNB 制备反应引物杂交条件

温度	时间
热盖 (105 $^{\circ}$ C)	On
95 $^{\circ}$ C	3 min
40 $^{\circ}$ C	3 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

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



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

表 46 stLFR FCL PE100 DNB 制备反应组分 2

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

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

 提示 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 47 stLFR FCL PE100 DNB 制备滚环扩增条件

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

6. 当 PCR 仪温度达到 4 °C 后立即加入 16 μ 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 必须使用阔口吸头缓慢吹打混匀，切勿离心、振荡及剧烈吹打。
- 制备完成的 DNB 可置于 4 °C 保存并于 48 小时内使用。

4.5 测定 DNB 浓度及 pooling

4.5.1 测定 DNB 浓度

- DNB 制备完成后，取用 2 μ L DNB，使用 Qubit ssDNA Assay Kit 和 Qubit 3.0 荧光定量仪进行浓度检测，合格标准件见下表:

 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 63 页“样本 DNB 定量作业指导”。

表 48 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
PE100 及以下	≥ 15 ng/ μ L	≥ 8 ng/ μ L
PE150	≥ 8 ng/ μ L	≥ 5 ng/ μ L

- 若浓度超过 40 ng/μL，需要按照下表稀释至 20 ng/μL 后使用：

 提示 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 保存时间不大于 8 小时。

表 49 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 °C	≤48 小时
FCL SE50	DNB 加载缓冲液 I	4 °C	≤48 小时
FCL SE100	DNB 加载缓冲液 I	4 °C	≤48 小时
FCL PE100	DNB 加载缓冲液 I	4 °C	≤48 小时
App-A FCL PE100	DNB 加载缓冲液 I	4 °C	≤48 小时
stLFR FCL PE100	DNB 加载缓冲液 I	4 °C	≤48 小时
FCL PE150	TE 缓冲液	4 °C	≤8 小时
App-A FCL PE150	TE 缓冲液	4 °C	≤8 小时
App-D FCL PE150	TE 缓冲液	4 °C	≤8 小时

4.5.2 DNB pooling

 提示 用尖口吸头进行 DNB 取样，所有样本 DNB 取样完成后，再用阔口吸头进行混匀。

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。

4.5.2.1 计算每个样本理论相对量

A 样本的理论相对量为： $A1 = A \text{ 样本所需数据量} / A \text{ 样本 DNB 浓度}$

B 样本的理论相对量为： $B1 = B \text{ 样本所需数据量} / B \text{ 样本 DNB 浓度}$

.....

H 样本的理论相对量为： $H1 = H \text{ 样本所需数据量} / H \text{ 样本 DNB 浓度}$

4.5.2.2 计算总相对量

$V = A1 + B1 + \dots + H1$

4.5.2.3 计算每个样本 pooling 体积

- FCL SE35、FCL SE50、FCL SE100、FCL PE100、App-A FCL PE100 及 stLFR FCL PE100 每张载片所需 DNB 总体积为 270 μ L，每个样本的 pooling 体积为：

A 样本的 pooling 体积为： $A_2 = 270 * A_1 / V$

B 样本的 pooling 体积为： $B_2 = 270 * B_1 / V$

.....

H 样本的 pooling 体积为： $H_2 = 270 * H_1 / V$

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

A 样本的 pooling 体积为： $A_2 = 300 * A_1 / V$

B 样本的 pooling 体积为： $B_2 = 300 * B_1 / V$

.....

H 样本的 pooling 体积为： $H_2 = 300 * H_1 / V$

第 5 章 加载 DNB

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、FCL PE100、App-A FCL PE100 及 stLFR FCL PE100 样本加载试剂板和缓冲液准备，见第 34 页“准备 FCL SE35、FCL SE50、FCL SE100、FCL PE100、App-A FCL PE100 及 stLFR FCL PE100 样本加载试剂板和缓冲液”。
- FCL PE150、App-A FCL PE150 及 App-D FCL PE150 样本加载试剂板和缓冲液准备，见第 35 页“准备 FCL PE150、App-A FCL PE150 及 App-D FCL PE150 快速样本加载试剂板和缓冲液”。

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

5.1.1.1 解冻样本加载试剂板

操作步骤如下：

1. 准备试剂，根据以下不同进行相应操作：
 - 其他文库的测序：从 DNB 加载试剂盒中取出样本加载试剂板
 - stLFR 文库的测序：从 DNB 加载试剂盒（stLFR）中取出样本加载试剂板（stLFR）。
2. 解冻，根据以下不同进行相应操作：
 - 常温解冻：置于常温水浴解冻 2 小时。
 - 2 °C ~ 8 °C 冰箱解冻：提前一天将其置于 2 °C ~ 8 °C 冰箱解冻备用。
3. 完全解冻后，置于 2 °C ~ 8 °C 冰箱备用。
4. 使用前轻轻颠倒混匀 5 次，离心 1 分钟。

5.1.1.2 解冻 DNB 加载试剂

操作步骤如下：

1. 准备试剂，根据以下不同进行相应操作：
 - 其他文库的测序：从 DNB 加载试剂盒中取出 DNB 加载缓冲液 II。
 - App-A 文库测序：从 DNB 加载试剂盒中取出 DNB 加载缓冲液 II。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。
2. 置于室温解冻 0.5 小时。
3. 待融化后，使用漩涡振荡器振荡混匀 5 秒，短暂离心后置于冰上备用。

 提示 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 1~2 分钟至沉淀重新溶解，短暂离心后方可使用。

5.1.1.3 准备 0.1 M NaOH 试剂

0.1 M NaOH 的配制方法见第 59 页“准备清洗试剂”。每个样本加载试剂板需要至少 4 mL 的 0.1 M NaOH 试剂。

5.1.1.4 配制 DNB 加载体系

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：

 提示 该表格中的 DNB 指第 32 页“DNB pooling”中已 pooling 好的 DNB 样本。

表 50 FCL SE35 / SE50 / SE100 / PE100 / App - A FCL PE100 / 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

2. DNB 加载体系用阔口吸头缓慢混匀 5~8 次。

 提示 切勿离心、振荡及剧烈吹打。

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

5.1.2.1 解冻样本加载试剂板

操作步骤如下：

1. 从 DNB 快速加载试剂盒中取出快速样本加载试剂板。
2. 解冻，根据以下不同进行相应操作：
 - 常温解冻：置于常温水浴解冻 2 小时。
 - 2 °C ~ 8 °C 冰箱解冻：提前一天将其置于 2 °C ~ 8 °C 冰箱解冻备用。
3. 使用前轻轻颠倒混匀 5 次，离心 1 分钟。

5.1.2.2 解冻 DNB 加载试剂

操作步骤如下：

1. 准备试剂，根据以下不同进行相应操作：
 - 其他文库测序：从 DNB 快速加载试剂盒中取出 DNB 加载缓冲液 IV。
 - App - A 文库测序：从 DNB 快速加载试剂盒中取出 DNB 加载缓冲液 IV。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。
 - App - D 文库测序：从 DNB 快速加载试剂盒中取出 DNB 加载缓冲液 IV。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。
2. 置于冰上解冻 0.5 小时。
3. 待融化后，使用漩涡振荡器振荡混匀 5 秒，短暂离心后置于冰上备用。

5.1.2.3 准备 0.1 M NaOH 试剂

0.1 M NaOH 的配制方法见第 59 页“准备清洗试剂”。每个样本加载试剂板需要至少 4 mL 的 0.1 M NaOH 试剂。

5.1.2.4 配制 DNB 加载体系

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：

 提示 该表格中的 DNB 指的是第 32 页“DNB pooling”中已 pooling 好的 DNB 样本。

表 51 FCL PE150 / App-A FCL PE150 / 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

2. DNB 加载体系用阔口吸头缓慢混匀 5~8 次。

 提示

- 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，并于 30 分钟内进行加载。
- 切勿离心、振荡及剧烈吹打。

5.2 准备测序载片

操作步骤如下：

1. 从测序载片试剂盒中取出测序载片。

 提示 此时不要拆开真空包装袋。

2. 将载片载室温环境下放置 30 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 小时内使用，且真空包装袋完好无损时，可继续放回 2 °C ~ 8 °C 保存，但 2 °C ~ 8 °C 与室温的环境切换不可超过 3 次。
- 真空包装袋打开后不能立即使用时，可于室温保存，并于 24 小时内使用，如超过 24 小时，不建议使用。

4. 取出载片，检查载片完整性。
5. 使用压缩空气罐将载片背面吹净。

5.3 加载 DNB

操作步骤如下：

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

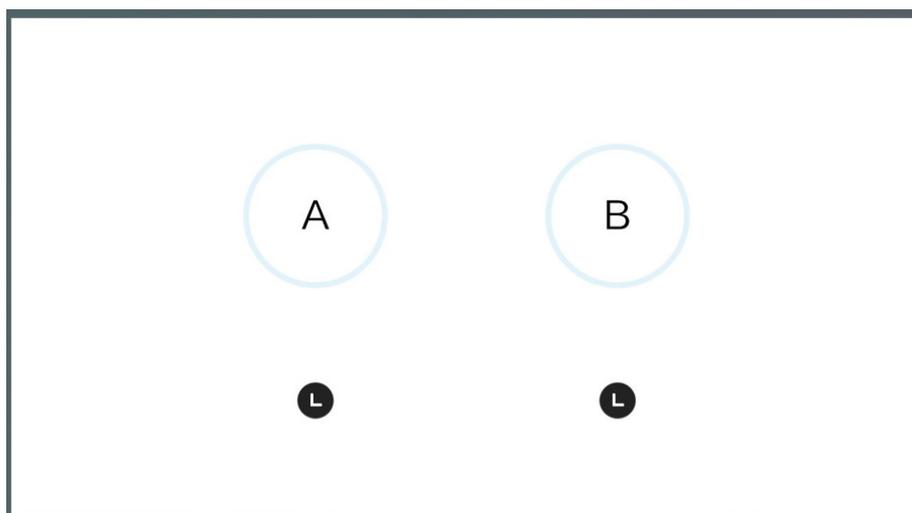


图 1 MGIDL - T7RS 主界面

3. 任选空闲状态下的 A/B 进行操作。



图 2 MGIDL - T7RS操作选择界面

4. 点击【装载】，进入下图界面：



图 3 MGIDL-T7RS信息输入界面

5. 打开装载仓仓门。
6. 如上图，在文本框中输入 DNB 信息后，将装有 DNB 加载体系的 0.5 mL 冻存管，按照第 39 页“图 6”所示放置在 MGIDL-T7RS 的 DNB 试剂管孔中，界面显示 DNB 管已放置。

 提示 输入的 DNB 信息仅限于数字或字母或数字与字母组合。

7. 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。

 提示 如果未显示，可按提示手动输入。

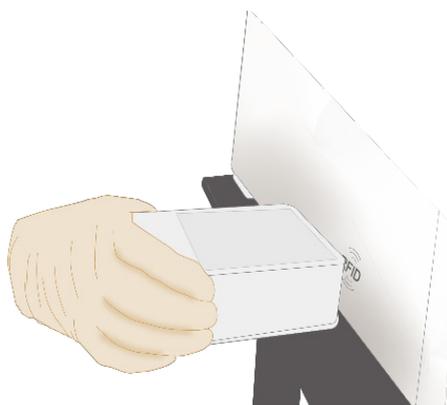


图 4 样本加载试剂板信息录入

8. 撕去样本加载试剂板封膜，在 11 号孔位中加入 4 mL 0.1 M NaOH，样本加载试剂板孔位如下图所示：

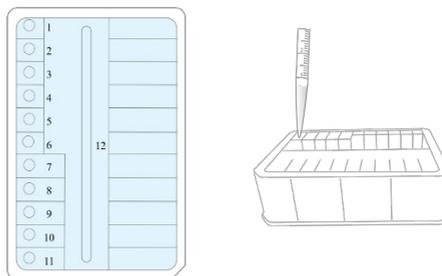


图 5 样本加载试剂板孔位信息及加液操作

9. 根据以下不同进行相应操作：
- 其他文库测序：跳过此操作步骤，直接进行下一步。
 - 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。
 - 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。
10. 将准备好的样本加载试剂板，放置在 MGIDL-T7RS 的试剂板托架上，界面显示试剂板已放置。

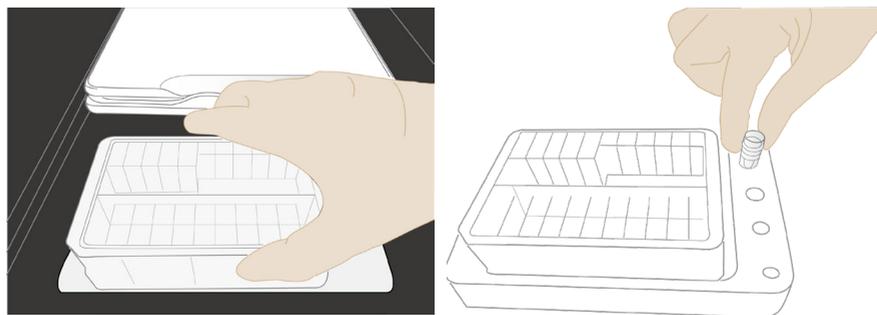


图 6 样本加载试剂板放置示意图

11. 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。

 提示 如果未显示，可按提示手动输入。

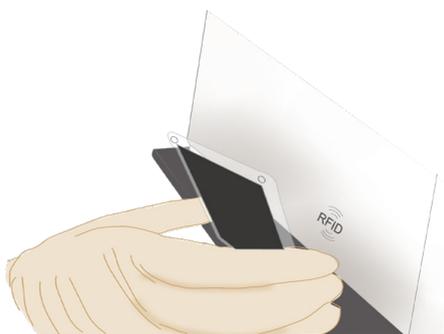


图 7 测序载片信息确认

12. 握住载片两侧，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。

 提示 放置载片前，需确认载片平台的四个密封垫无缺失。

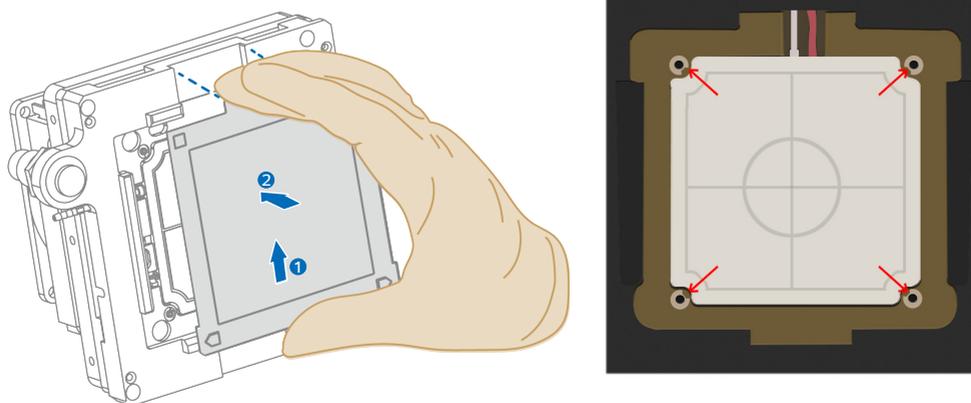


图 8 载片放置和密封垫示意图

- 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。

- 提示**
 - 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。
 - 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。
 - 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。
 - 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。

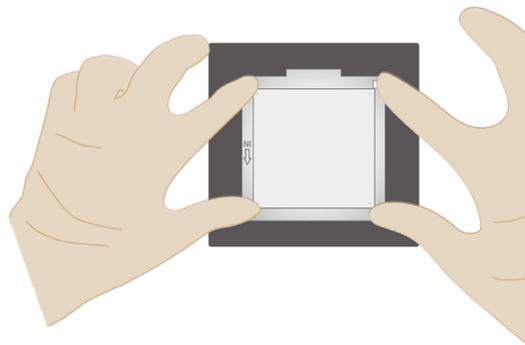


图 9 按压测序载片

- 关闭装载仓仓门。
- 点击【开始】，选择【是】。

- 提示** 如是 PE150 测序类型，此处显示“快速样本加载试剂板”。



图 10 MGIDL - T7RS确认装载界面

16. 载片装载开始。



图 11 MGIDL - T7RS 装载载片界面

17. 当界面如下图时，表示载片已装载完成，耗时约 2 小时。

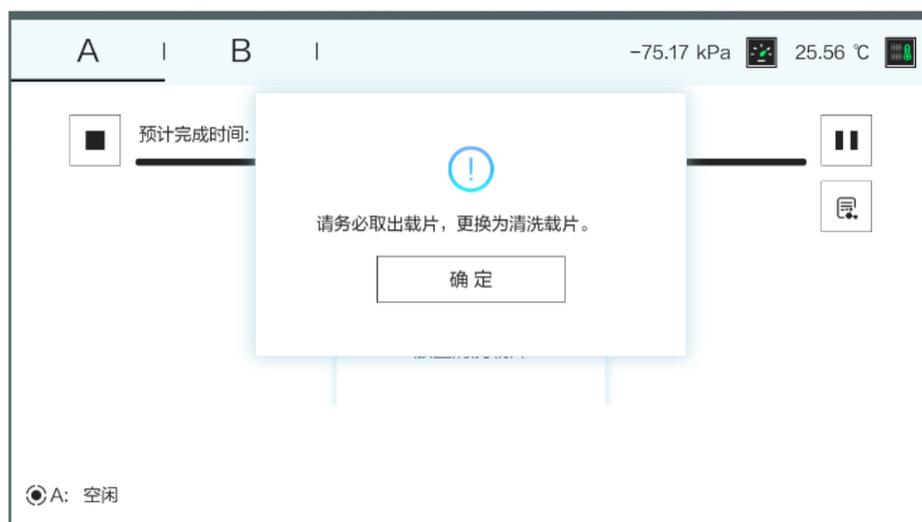


图 12 MGIDL - T7RS 载片装载完成界面

18. 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 °C 冰箱内保存，并于 48 小时内使用。

 提示 装载完成的载片建议用自封袋保存，以防边缘风干。

19. 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【确定】。

20. 点击【后清洗】，在弹出的对话框中选择【是】，开始 MGIDL - T7RS 清洗，耗时约 20 分钟。



图 13 MGIDL - T7RS后清洗界面



图 14 MGIDL - T7RS后清洗确认界面

21. MGIDL - T7RS 清洗开始。

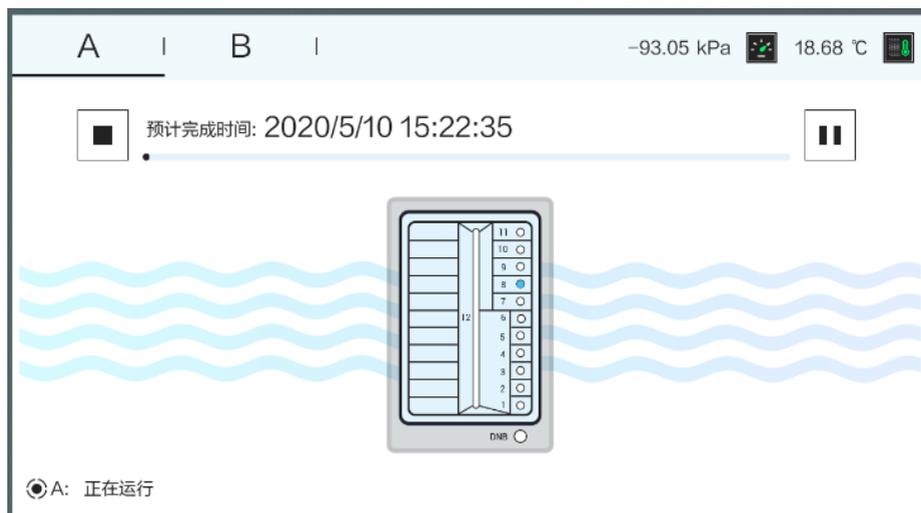


图 15 MGIDL - T7RS清洗界面

22. 当界面如下图时，表示清洗已完成，点击【完成】后可再次进行载片的装载。



图 16 MGIDL - T7RS清洗完成界面

第 6 章 测序前准备

6.1 准备测序试剂槽

操作步骤如下：

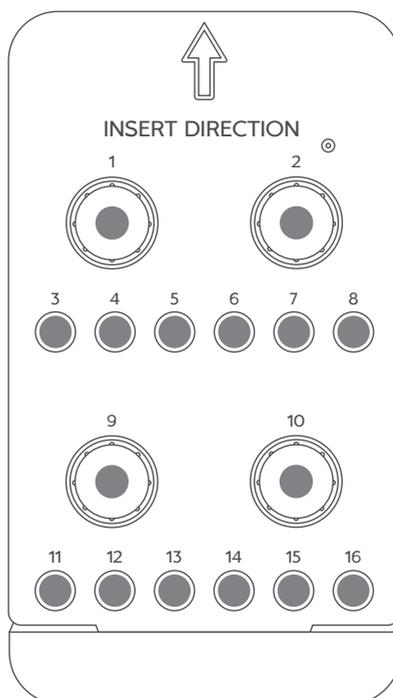


图 17 试剂槽孔位信息示意图

1. 从高通量测序试剂盒中取出测序试剂槽。
2. 解冻，根据以下不同进行相应操作：
 - 常温解冻：常温水浴解冻 4~5 小时。
 - 2 °C ~ 8 °C 冰箱解冻：提前 24 小时将其置于 2 °C ~ 8 °C 冰箱解冻备用。
3. 完全解冻后，置于 2 °C ~ 8 °C 冰箱备用。
4. 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。
 - 💡 提示 如 1 号孔中发现墨绿色结晶，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。
5. 取出 dNTPs 混合液 IV 或 dNTPs 混合液 V 和 dNTPs 混合液 II，室温融化后（约 1 小时），置于冰上备用。

6. 根据以下不同进行相应操作：

- SE 双 Barcode 测序：从 cPAS 条形码引物 4 试剂盒中取出 cPAS AD153 条形码引物 4 工作液，将其置于室温完全融化后，旋涡振荡 5 秒使其充分混匀。
- PE 双 Barcode 测序：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，旋涡振荡 5 秒使其充分混匀。
- App-A 双末端引物测序：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，室温融化并旋涡振荡 5 秒，使其充分混匀。



提示 仅 App-A 双末端的双 Barcode 测序时需要 App-A 条形码引物工作液 3。

- App-D 双末端引物测序：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，室温融化并旋涡振荡 5 秒，使其充分混匀。



提示 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。

7. 打开试剂槽盖板，使用无尘纸擦净冷凝水，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 吸头，在 9 号孔和 10 号孔中间位置轻轻戳出一个直径约 2 cm 的加样孔位。

8. 取出 DNA 聚合酶混合液，上下颠倒缓慢混匀，置于冰上备用。

9. 取对应量程的移液器，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，加入体积如下表：



提示 使用前需振荡混匀 dNTPs 混合液 IV 或 dNTPs 混合液 V 和 dNTPs 混合液 II。

表 52 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	/	2.76	2.76
FCL PE150	/	3.74	3.74
App-D FCL PE150	/	3.74	3.74
App-A FCL PE100	/	2.76	2.76
App-A FCL PE150	/	3.74	3.74
stLFR FCL PE100	5.4	/	5.4

10. 取对应量程的移液器，按照下表体积，将 dNTPs 混合液 II 和 DNA 聚合酶混合液加入到 10 号孔中。

表 53 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	8.28	2.76
FCL PE150	11.22	3.74
App - D FCL PE150	11.22	3.74
App - A FCL PE100	8.28	2.76
App - A FCL PE150	11.22	3.74
stLFR FCL PE100	14.7	4.9

11. 用配套的透明封口膜将 9 号和 10 号加样孔封住。
12. 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。
13. 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。
14. 撕掉 9 号和 10 号孔位的封口膜弃用。
-  提示
- 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。
15. 轻轻敲打测序试剂槽，以减少试剂中的气泡。
-  提示 此时 SE 测序试剂槽的上机前准备工作完成。

16. 根据以下不同进行相应操作：

- SE 双 Barcode 测序：使用吸头戳破 3 号孔封膜，取 3.50 mL CPAS AD153 条形码引物 4 工作液沿管壁加入到 3 号孔中。

 提示 此时 SE 双 Barcode 测序试剂槽的上机前准备工作完成。

- PE 测序：使用吸头戳破 8 号孔的封膜。用 1 mL 移液器移取 600 μ L 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，如下图。再将混合液沿管壁加入 8 号孔中。

 提示

- 此时 PE 测序试剂槽的上机前准备工作完成。
- 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。

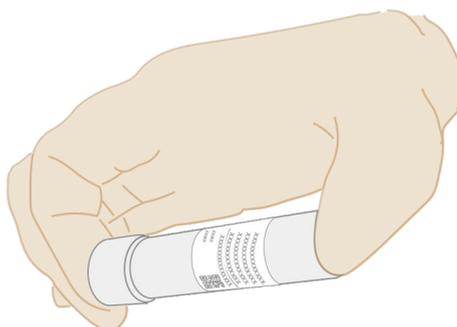


图 18 MDA试剂加酶后混匀

- PE 双 Barcode 测序：使用吸头戳破 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。

 提示 此时 PE 双 Barcode 测序试剂槽的上机前准备工作完成。

- 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，使用吸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。

 提示

- 此时 App-A PE 测序试剂槽的上机前准备工作完成。
- 仅 App-A 双末端的双 Barcode 测序时需要 App-A 条形码引物工作液 3。

表 54 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

- 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，使用吸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。



提示 • 此时 App-D PE 测序试剂槽的上机前准备工作完成。

- 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。

表 55 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

17. 盖上测序试剂槽盖板。

6.2 准备清洗试剂槽

操作步骤如下：

1. 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。
2. 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 吸头将膜戳破，试剂孔位示意图如下。

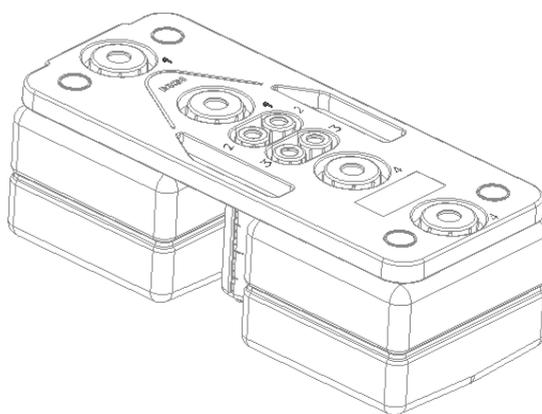


图 19 清洗试剂槽孔位信息

3. 用电动移液器移取 45 mL 0.1 M NaOH 从戳孔的位置加入到 2 号孔位中。0.1 M NaOH 配制方法见第 59 页“准备清洗试剂”。

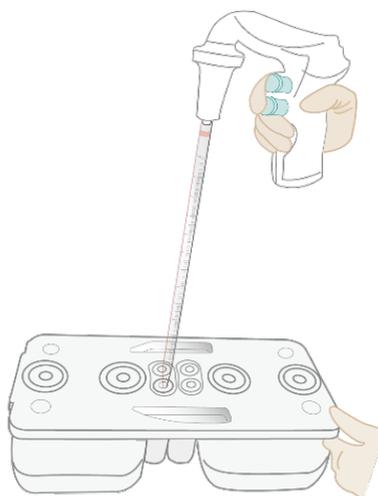


图 20 清洗试剂槽加液操作

6.3 准备纯水试剂桶

-  提示
- 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。
 - 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”。

表 56 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

第 7 章 测序

7.1 放置试剂槽

操作步骤如下：

1. 将试剂仓门打开,用被纯水润湿的无尘纸或无尘布擦拭低温仓内底部及侧面,保持清洁干燥。
💡 提示 清洁低温仓内壁时,小心操作防止被上方试剂针划伤。
2. 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。

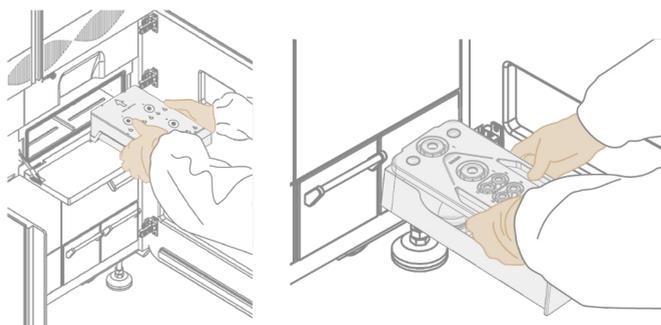


图 21 测序试剂槽和清洗试剂槽放置

3. 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”和密码“123”，登录进入主界面。

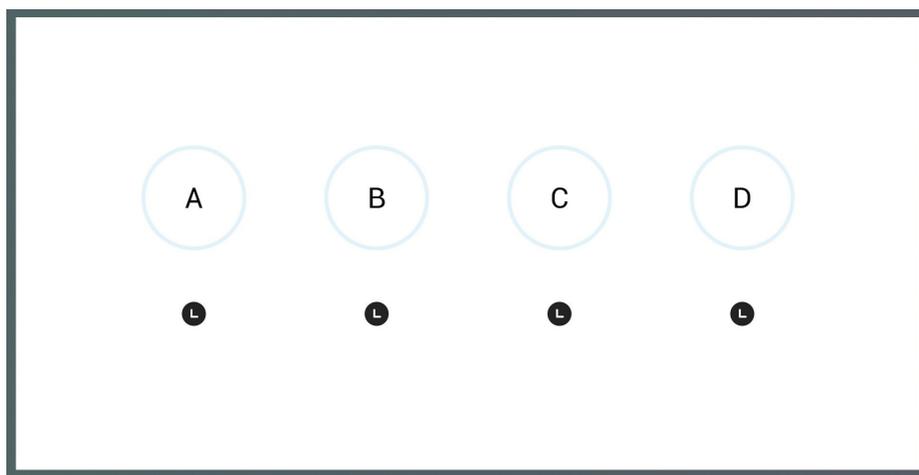


图 22 DNBSEQ-T7RS主界面

7.3 放置测序载片

操作步骤如下：

1. 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】。



图 23 DNBSEQ-T7RS操作选择界面

2. 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。

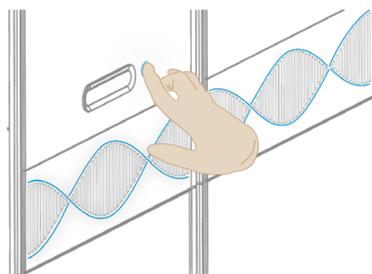


图 24 按压芯驱按钮

7.4 测序参数配置

操作步骤如下：

1. 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。

 提示 如无法自动识别，可按提示手动输入。

A screenshot of a software interface for configuring sequencing parameters. At the top, there are tabs labeled A, B, C, and D. Below the tabs, there are four input fields with green checkmarks to their right, indicating successful identification: '测序试剂槽ID' (1000016354), '清洗试剂槽ID' (1000016321), and '载片ID' (E100002731). Below these is a dropdown menu for '测序方案' (PE150+10) and another dropdown for '1-128'. There is a checked checkbox for '拆分barcode' and a collapsed '高级选项' (Advanced Options) section. At the bottom, there are two buttons: '上一步' (Previous Step) and '下一步' (Next Step). In the bottom left corner, it says 'A: 准备中' (A: Preparing).

图 25 DNBSEQ-T7RS测序参数输入及选择界面

2. 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】，出现下图所示界面：

图 26 DNBSEQ-T7RS自定义测序方案设置

- 自定义测序方案填写规则如下：
 - 测序方案名称，支持字母、数字、“+”、“_”和“-”。
 - 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。
 - 一链读长、二链读长、Barcode 读长、DualBarcode 读长，仅支持数字。
 - 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，无空格，每段支持“数字”和“数字 - 数字”。
 - 💡 提示 暗反应是指只进行生化反应，不做采图处理的 cycle。
- 例：目前有一个测序需求如下。
 - 一链读长为 100 cycles，二链读长为 100 cycles。
 - Barcode 读长为 10 cycles，DualBarcode 读长为 10 cycles。
 - 在一链读长的 100 个 cycles 中，第 20 到第 30、第 50 到第 60 个 cycles 需要做暗反应；二链读长的 100 个 cycles 中，第 20 到第 30 个 cycles 需要做暗反应。
 - 将该脚本命名为 PE100+10+10+Dark。
 - 自定义测序方案填写如下图所示：

 提示 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。



图 27 示例

3. 如下图，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。

 提示 stLFR FCL PE100 只选择 DualBarcode 进行拆分。



图 28 DNBSEQ-T7RS 标签序列设置

4. 点击高级选项后的展开符号，出现下图所示界面。支持选择是否为自定义引物，支持选择下机是否自动清洗。

Tips 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 29 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，以 FCL PE150 为例：



图 30 DNBSEQ-T7RS测序信息回顾界面

7.6 开始测序

操作步骤如下：

1. 确认信息无误后，点击【开始】，选择【是】。



图 31 DNBSEQ-T7RS测序确认界面

2. 当界面如下，测序开始，此时上机操作完毕。



图 32 DNBSEQ-T7RS测序开始界面

3. 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：



图 33 DNBSEQ-T7RS修改是否自动清洗界面

4. 当界面如下图时，测序及清洗完成，此次上机完毕。

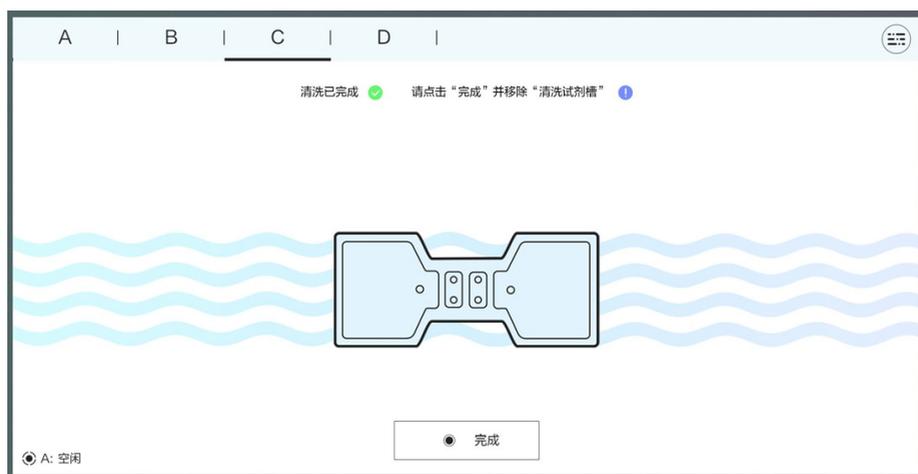


图 34 DNBSEQ-T7RS测序完成界面

第 8 章 清洗维护

8.1 清洗的术语和定义

表 57 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	以下情况选择手动清洗： <ul style="list-style-type: none"> • MGIDL-T7RS 首次进行工作时 • 间隔一周以上未进行工作时 • 技术支持检修后及出现杂质时
DNBSEQ-T7RS 手动清洗	以下情况选择手动清洗： <ul style="list-style-type: none"> • DNBSEQ-T7RS 首次进行工作时 • 间隔一周以上未进行工作时 • 上机时选择不进行自动清洗 • 技术支持检修后及出现杂质时

8.2 准备清洗试剂

 提示 以下清洗试剂均需在 4 °C 存放，有效期为 28 天。

- 按照如下体积配制 1 M NaCl + 0.05% Tween-20:

表 58 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:

表 59 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：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 手动清洗 MGIDL - T7RS

操作步骤如下：

1. 进入程序。
2. 输入密码“123”，登录主界面。
3. 选择将要进行清洗的一侧。
4. 打开装载仓仓门。
5. 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。
6. 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。

 提示 MGIDL-T7RS 上没有载片时，忽略此步骤。

7. 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。

8. 点击界面中的【清洗】，在弹出的对话框中选择【是】，开始 MGIDL-T7RS 清洗，耗时约 20 分钟。

8.4.2 手动清洗 DNBSEQ-T7RS

操作步骤如下：

1. 确认纯净水桶里的水达到 4.5 L。
2. 进入程序，输入用户名“user”和密码“123”，登录主界面。
3. 选择需要进行清洗的一侧，点击界面中的【清洗】。
4. 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。
5. 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。
6. 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。
7. 点击界面中的【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 分钟。

第 9 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，请联系技术支持。

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，请联系技术支持。

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，请联系技术支持。

9.3.2 DNBSEQ-T7RS 产生气泡

- 检查纯净水桶中的水是否足够。
- 检查纯净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，请联系技术支持。

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，按照第 59 页“准备清洗试剂”重新配制清洗试剂，并再次对 MGIDL-T7RS 和 DNBSEQ-T7RS 进行手动清洗维护。
- 仍无改善，请联系技术支持。

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 °C 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 °C 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 °C 内暂存，并于 24 小时内使用，7 天内可风险上机。

附录 1 样本 DNB 定量作业指导

-  提示
- Working solution 配制后需在 0.5 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) 漩涡振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 定量需要配制 200 μL Qubit Working solution。
 - 建立标准曲线另需 2 个 200 μL Qubit Working solution。

2. 准备 2+N 个 Qubit 检测管，分别标注 S1 (Qubit ssDNA standard#1 0 ng/ μL)、S2 (Qubit ssDNA standard#2 20 ng/ μL)、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 (μL)	S2 (μL)	D1 (μL)	D2 (μL)	D3 (μL)
Working solution	190	10	198	198	198
S1 (0 ng/ μL)	10	/	/	/	/
S2 (20 ng/ μL)	/	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振荡混匀，迷你离心机短暂离心 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 当成样品测定 1 次。此时，样本投入量选择 10 μL ，单位 ng/ μL 。
-  提示
- 当测定值在 19.9 ~ 20 ng/ μL 时，则认为此次的标准曲线为合格，可以用来检测样品。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，样品投入量选择 2 μL ，单位 ng/ μL ，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