

编号:H-020-000617-00



高通量 测序试剂套装

DNBSEQ-E25RS

使用说明书

版本:5.0

创新智造
引领生命科技

生产地址：中国(山东)自由贸易试验区青岛片区横云山路2号4号楼
电 话：4000-688-114
邮 箱：MGI-service@mgi-tech.com
网 址：www.mgi-tech.com

仅供科研使用

青岛华大智造科技有限责任公司

关于说明书

本说明书适用于 **DNBSEQ-E25RS** 高通量测序试剂套装。说明书版本 **5.0**，试剂套装版本 **1.0**，主机软件版本 **V1**。

本说明书及其包含的信息为青岛华大智造科技有限责任公司（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说明书进行重印、复制、修改、传播或公布给他人。本说明书的读者为终端用户。说明书作为产品的一部分，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说明书。

华大智造对本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，并保留任何对本说明书和产品进行改进以提高其可靠性、功能或设计的权利。

本说明书中的所有图片均为示意图，图片内容可能与实物有细微差异，请以购买的产品为准。

DNBSEQ™ 是华大智造或其子公司在中国和 / 或其他国家（地区）的商标或注册商标。**Qubit™** 是赛默飞世尔科技公司或其子公司的商标。文中涉及的其它名称及商标属于各自所有者资产。

©2023-2024 青岛华大智造科技有限责任公司 版权所有。

版本记录

版本	发布日期	修订内容摘要
5.0	2024 年 8 月 15 日	更新载片货号
4.0	2024 年 5 月 23 日	- 修改载片、FCL SE100 和 App-C FCL SE100 试剂盒的效期 - 更新转换酶的解冻方式
3.0	2024 年 1 月 25 日	- 修改组分 - 修改制备 DNB 步骤
2.0	2023 年 9 月 25 日	- 增加 App-C 测序的试剂盒信息和操作步骤 - 增加漏斗的使用 - 更新表达
1.0	2023 年 3 月 22 日	首次发布

试剂盒基本信息

货号	名称	型号	版本
940-000573-00	DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂套装	FCL SE100	1.0
940-000567-00	DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂套装	FCL PE150	1.0
940-000569-00	DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂套装	App-C FCL SE100	1.0
940-000574-00	DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂套装	App-C FCL PE150	1.0

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 测序循环数与时长	1
1.5 注意事项	2
第 2 章 组分清单及自备设备、试剂与耗材	3
2.1 测序试剂套装组分清单	3
2.2 自备设备、试剂与耗材	6
第 3 章 测序工作流程	7
第 4 章 DNB 制备	7
4.1 文库插入片段大小要求	7
4.2 文库浓度及所需量的要求	7
4.3 制备 DNB	8
4.4 测定 DNB 浓度	11
第 5 章 准备测序试剂槽	11
第 6 章 准备测序载片	15
第 7 章 开始测序	15
7.1 登录系统	15
7.2 选择测序方案	16
7.3 装载载片、试剂槽与废液盒	18
7.4 装载样本	21
7.5 回顾参数	23
7.6 开始测序	23
7.7 移除测序载片、试剂槽与废液盒	27

第 8 章 清洁维护	28
第 9 章 异常处理	29
9.1 DNB 浓度不合格	29
9.2 试剂盒暂存	29
9.3 试剂槽底部胶塞歪斜或脱落	29
附录 1 制造商信息	30

第 1 章 介绍

本说明书是使用 DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂套装进行测序操作的作业指导书，内容包括 DNA 纳米球（DNB）的制备、载片准备、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 DNBSEQ-E25RS 系列基因测序仪配合使用，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

基因测序仪采用先进的 DNA 纳米球（DNA Nanoball，DNB）以及联合探针锚定聚合（combinatorial probe-anchor synthesis，cPAS）测序核心技术，使用一种经过特殊表面修饰的规则阵列载片。每个修饰位点仅固定一个 DNA 纳米球，阵列载片修饰位点的间距均一，可保证不同纳米球的光信号不会互相干扰，从而大幅提高信号处理的准确性。

测序过程中，流体模块将 DNB 及测序试剂泵入测序载片，载片上加载的 DNB 可依次结合带标记的游离碱基，被标记的碱基会在试剂的作用下发出自发光信号。不同的标记物所发出的信号被传感器接收，经过处理后转换成数字信号，传输到计算模块进行处理，可以获取待测样本的碱基序列信息。

1.3 数据分析

测序正在进行时，控制软件自动调用 basecall 软件分析，并输出测序数据至指定位置用于二次分析。

1.4 测序循环数与时长

在测序过程中，测序循环数由所选择或输入的测序读长决定。例如，SE100 测序是按照单端 100 循环执行，最后得到 100 bp 的碱基序列数据。标签测序的循环数（如 MGI 双分子标签为 20 循环）需额外计算。

表 1 测序循环数及时长

型号	一链最大读长	二链最大读长	总读长	测序时长 (h)	支持最大循环数
FCL SE100	100	/	100+20	6.0	121
			100+10	5.5	
			100	5.0	
FCL PE150	150	150	300+20	20.5	322
			300+10	20	
			300	19.5	
App-C FCL SE100	100	/	100+16	6.0	117
			100+8	5.5	
			100	5.0	
App-C FCL PE150	150	150	300+16	20.5	318
			300+8	20	
			300	19.5	

1.5 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不同的，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 组分清单及自备设备、试剂与耗材

2.1 测序试剂套装组分清单

- 提示
- 不同批次之间的试剂组分严禁混用。
 - 组分和包装盒的批次是不同的。
 - 请将组分存放在包装盒中，直至使用完毕。

表 2 DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂套装（FCL SE100）货号：940-000573-00

试剂盒信息	组分	规格及数量	储存温度	效期	运输温度
DNBSEQ-E25RS集成测序载片 货号：930-000045-00	测序载片	1 张	10 °C ~ 25 °C	10 个月	10 °C ~ 25 °C
DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂盒 （ FCL SE100 ） 货号：940-000570-00	TE 缓冲液	300 μL/ 支 ×1	-25 °C ~ -15 °C	9 个月	-80 °C ~ -15 °C
	DNB制备缓冲液（ OS-V2.0-DB ）	80 μL/ 支 ×1			
	DNB制备缓冲液（ OS-V2.0-SB ）	80 μL/ 支 ×1			
	DNB 聚合酶混合液 I（OS）	160 μL/ 支 ×1			
	DNB 聚合酶混合液 II（OS）	16 μL/ 支 ×1			
	DNB 终止缓冲液	100 μL/ 支 ×1			
	DNB 加载缓冲液 II	120 μL/ 支 ×1			
	测序试剂槽	1 个			
	信号因子 1	15 μL/ 支 ×1			
	信号因子 2	10 μL/ 支 ×1			
	信号因子缓冲液	10 mL/ 支 ×1			
	废液盒	1 个			
	漏斗	1 个			

表 3 DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE150) 货号: 940-000567-00

试剂盒信息	组分	规格及数量	储存温度	效期	运输温度
DNBSEQ-E25RS集成测序载片 货号: 930-000045-00	测序载片	1 张	10 °C ~ 25 °C	10 个月	10 °C ~ 25 °C
DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂盒 (FCL PE150) 货号: 940-000571-00	TE 缓冲液	300 µL/ 支 ×1	-25 °C ~ -15 °C	6 个月	-80 °C ~ -15 °C
	DNB制备缓冲液 (OS-V2.0-DB)	80 µL/ 支 ×1			
	DNB制备缓冲液 (OS-V2.0-SB)	80 µL/ 支 ×1			
	DNB 聚合酶混合液 I (OS)	160 µL/ 支 ×1			
	DNB 聚合酶混合液 II (OS)	16 µL/ 支 ×1			
	DNB 终止缓冲液	100 µL/ 支 ×1			
	DNB 加载缓冲液 II	120 µL/ 支 ×1			
	测序试剂槽	1 个			
	信号因子 1	31.5 µL/ 支 ×1			
	信号因子 2	21 µL/ 支 ×1			
	信号因子缓冲液	21 mL/ 支 ×1			
	MDA T- 试剂	0.35 mL/ 支 ×1			
	MDA 测序酶混合液	0.05 mL/ 支 ×1			
	废液盒	1 个			
	漏斗	1 个			

表 4 DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂套装 (App-C FCL SE100) 货号: 940-000569-00

试剂盒信息	组分	规格及数量	储存温度	效期	运输温度
DNBSEQ-E25RS集成测序载片 货号: 930-000045-00	测序载片	1 张	10 °C ~ 25 °C	10 个月	10 °C ~ 25 °C
DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂盒 (App-C FCL SE100) 货号: 940-000572-00	TE 缓冲液	300 µL/ 支 ×1	-25 °C ~ -15 °C	9 个月	-80 °C ~ -15 °C

试剂盒信息	组分	规格及数量	储存温度	效期	运输温度
DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂盒 (App-C FCL SE100) 货号：940-000572-00	DNB 制备缓冲液 (OS-App-V4.0)	80 μL/ 支 ×1	-25 °C ~ -15 °C	9 个月	-80 °C ~ -15 °C
	转换酶	5 μL/ 支 ×1			
	DNB 聚合酶混合液 I (OS)	160 μL/ 支 ×1			
	DNB 聚合酶混合液 II (OS)	16 μL/ 支 ×1			
	DNB 终止缓冲液	100 μL/ 支 ×1			
	DNB 加载缓冲液 II	120 μL/ 支 ×1			
	测序试剂槽	1 个			
	信号因子 1	15 μL/ 支 ×1			
	信号因子 2	10 μL/ 支 ×1			
	信号因子缓冲液	10 mL/ 支 ×1			
	废液盒	1 个			
	漏斗	1 个			

表 5 DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂套装（App-C FCL PE150）货号：940-000574-00

试剂盒信息	组分	规格及数量	储存温度	效期	运输温度
DNBSEQ-E25RS集成测 序载片 货号：930-000045-00	测序载片	1 张	10 °C ~ 25 °C	10 个月	10 °C ~ 25 °C
DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂盒 (App-C FCL PE150) 货号：940-000568-00	TE 缓冲液	300 μL/ 支 ×1	-25 °C ~ -15 °C	6 个月	-80 °C ~ -15 °C
	DNB 制备缓冲液 (OS-App-V4.0)	80 μL/ 支 ×1			
	转换酶	5 μL/ 支 ×1			
	DNB 聚合酶混合液 I (OS)	160 μL/ 支 ×1			
	DNB 聚合酶混合液 II (OS)	16 μL/ 支 ×1			
	DNB 终止缓冲液	100 μL/ 支 ×1			
	DNB 加载缓冲液 II	120 μL/ 支 ×1			
	测序试剂槽	1 个			
	信号因子 1	31.5 μL/ 支 ×1			
	信号因子 2	21 μL/ 支 ×1			

试剂盒信息	组分	规格及数量	储存温度	效期	运输温度
DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂盒 (App-C FCL PE150) 货号: 940-000568-00	信号因子缓冲液	21 mL/ 支 × 1	-25 °C ~ -15 °C	6 个月	-80 °C ~ -15 °C
	MDA T- 试剂	0.35 mL/ 支 × 1			
	MDA 测序酶混合液	0.05 mL/ 支 × 1			
	废液盒	1 个			
	漏斗	1 个			

2.2 自备设备、试剂与耗材

表 6 自备设备、试剂与耗材

类型	名称	推荐品牌	供应商货号
设备	Qubit 4 荧光定量仪	Thermo Fisher	Q33226
	迷你离心机	无	无
	涡旋振荡器	无	无
	PCR 仪	Bio-Rad	无
	移液器	Eppendorf	无
	尖头镊子	无	无
	2 °C ~ 8 °C 冰箱	无	无
	-25 °C ~ -15 °C 冰箱	无	无
试剂	75% 酒精	无	无
	Qubit ssDNA Assay Kit	Thermo Fisher	Q10212
	Qubit dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher	Q32854
耗材	无尘纸	无	无
	盒装灭菌吸头	AXYGEN	无
	200 µL 阔口吸头 (不带滤芯)	MGI	091-000355-00
	Qubit Assay Tubes	Thermo Fisher	Q32856
	0.2 mL 八联管 /PCR 管	AXYGEN	PCR-02-C
	1.5 mL 离心管	AXYGEN	MCT-150-C
	冰盒	AXYGEN	无

第 3 章 测序工作流程



第 4 章 DNB 制备

4.1 文库插入片段大小要求

本试剂盒适用于 MGI 接头文库和 App 文库（包括 TruSeq 和 Nextera 接头）。文库片段长度为 200 bp~500 bp，同时主带集中在 ± 100 bp 以内。

-  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。
 - 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 7 推荐插入片段大小

型号	推荐插入片段大小 (bp)	产出数据量 (Gb/ 载片)
FCL SE100	200 ~ 400	≈2.5
FCL PE150	300 ~ 500	≈7.5
App-C FCL SE100	200 ~ 400	≈2
App-C FCL PE150	300 ~ 500	≈6

4.2 文库浓度及所需量的要求

- 文库浓度要求
 - 对于 MGI 接头文库，要求初始 dsDNA 文库浓度不小于 2 fmol/ μ L。
 - 对于 App 文库，要求初始 dsDNA 文库浓度不小于 5 fmol/ μ L。
 - 如文库浓度未知，建议使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 和 Qubit Fluorometer 定量测得文库实际浓度（ng/ μ L）。

ng 与 fmol 换算公式如下：

$$c(\text{fmol}/\mu\text{L}) = \frac{\frac{10^6}{330 \times 2} \times c(\text{ng}/\mu\text{L})}{N}$$

330 为碱基平均分子量 (330 g/mol)。N 表示文库总片段长度 (包括接头序列长度)。
c 表示浓度。

- 文库量要求

- 对于一般测序，每个 DNB 制备体系所需文库量为 40 fmol。
- 对于 App-C 测序，每个 DNB 制备体系所需文库量为 100 fmol。



提示 如 DNB 制备说明书有特殊要求，则以 DNB 制备说明书的文库量要求为准。
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量要求为准。

4.3 制备 DNB



- 提示
- 不同批次试剂禁止混用。
 - 切勿使用带滤芯吸头制备 DNB。建议使用推荐品牌和货号的移液器和吸头。
 - 每个试剂盒可制备 4 份 DNB。

4.3.1 准备 DNB 制备混合液

操作步骤如下：

- 取出文库置于冰盒上备用。
- 根据不同的测序方案，取出相应试剂盒。

测序方案	试剂盒名称
SE100 测序	DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂盒 (FCL SE100)
PE150 测序	DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂盒 (FCL PE150)
App-C SE100 测序	DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂盒 (App-C FCL SE100)
App-C PE150 测序	DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂盒 (App-C FCL PE150)

- 取出 TE 缓冲液、DNB 制备缓冲液 (OS-V2.0-SB) 或 DNB 制备缓冲液 (OS-V2.0-DB) 或 DNB 制备缓冲液 (OS-App-V4.0)、DNB 聚合酶混合液 I (OS) 和 DNB 终止缓冲液，置于冰盒上约 30 分钟。



- 提示
- DNB 制备缓冲液 (OS-V2.0-SB) 适用于单 barcode 文库。
 - DNB 制备缓冲液 (OS-V2.0-DB) 适用于双 barcode 文库。
 - DNB 制备缓冲液 (OS-App-V4.0) 仅适用于 App-C 测序。

- 融化后，用涡旋振荡器振荡混匀 5 秒，短暂离心后置于冰上备用。

4.3.2 计算 dsDNA 文库所需量

- 如投入量为 40 fmol，根据以下公式进行计算：

文库投入量V(μL)= $\frac{N(bp) \times 330 \times 2 \times 40 \text{ fmol}}{c(ng/\mu L) \times 10^6}$

- 如投入量为 100 fmol，根据以下公式进行计算：

文库投入量V(μL)= $\frac{N(bp) \times 330 \times 2 \times 100 \text{ fmol}}{c(ng/\mu L) \times 10^6}$

其中，N 为文库片段总长度（包括接头序列长度），c 为文库浓度，330 为碱基平均分子量（330 g/mol）。

4.3.3 制备 DNB

 提示 切勿使用带滤芯吸头制备 DNB。

操作步骤如下：

- （可选）如是 App-C 测序，取出转换酶。
- 取用 0.2 mL 八联管或 PCR 管，在冰上按如下体系配制反应混合液 1：

表 8 DNB 制备反应混合液 1（MGI 接头文库）

组分	体积（μL）
TE 缓冲液	20-V
DNB 制备缓冲液	20
dsDNA 文库	V
总体积	40

-  提示
- DNB 制备缓冲液为第 8 页“准备 DNB 制备混合液”的步骤 3 取出的缓冲液。
 - V 表示第 9 页“计算 dsDNA 文库所需量”所计算的值。

表 9 DNB 制备反应混合液 1（App 文库）

组分	体积（μL）
TE 缓冲液	20-V
DNB 制备缓冲液	20
dsDNA 文库	V
转换酶	0.5
总体积	40.5

- 提示
- DNB 制备缓冲液为第 8 页“准备 DNB 制备混合液”的步骤 3 取出的缓冲液。
 - V 表示第 9 页“计算 dsDNA 文库所需量”所计算的值。

3. 用涡旋振荡器振荡混匀反应混合液 1, 用迷你离心机离心 5 秒, 置于 PCR 仪中进行引物杂交, 反应条件如下:

表 10 DNB 制备反应引物杂交条件 (MGI 接头文库)

温度	时间
105 °C (热盖)	On
95 °C	3 分钟
57 °C	3 分钟
4 °C	Hold

表 11 DNB 制备反应引物杂交条件 (App 文库)

温度	时间
105 °C (热盖)	On
37 °C	5 分钟
95 °C	3 分钟
40 °C	3 分钟
4 °C	Hold

4. 取出 DNB 聚合酶混合液 II (OS) 置于冰上后, 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 (OS) 置于室温。
 - 请勿长时间触碰管壁, 避免高温导致酶失活。

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

表 12 DNB 制备反应混合液 2

组分	体积 (μL)
DNB 聚合酶混合液 I (OS)	40
DNB 聚合酶混合液 II (OS)	4

6. 用涡旋振荡器振荡混匀 PCR 管内试剂, 用迷你离心机离心 5 秒, 立刻置于 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 13 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. PCR 仪温度达到 4 °C 后，立即加入 20 μL DNB 终止缓冲液，用阔口吸头（不带滤芯）缓慢地吹打混匀 5~8 次。

- 提示
- 一定要用阔口吸头（不带滤芯）缓慢吹打混匀 DNB，切勿离心、振荡及剧烈吹打。
 - 制备好的 DNB 可置于 4 °C 保存备用，并在 48 小时内使用。

4.4 测定 DNB 浓度

DNB 制备完成后，取用 2 μL DNB，使用 Qubit ssDNA Assay Kit 和 Qubit Fluorometer 仪器进行浓度检测。

- 提示
- 样品数量多时，建议分批定量，避免荧光淬灭导致 DNB 浓度定量不准确。
- 对于 MGI 接头文库，浓度的合格标准为 4 ng/μL~40 ng/μL。否则，参考第 29 页“DNB 浓度不合格”。
 - 对于 App 文库，浓度的合格标准为不小于 6 ng/μL。否则，参考第 29 页“DNB 浓度不合格”。

第 5 章 准备测序试剂槽

- 提示
- 对于单端测序，执行步骤 1~10 和步骤 12。
 - 对于双端测序，执行步骤 1~12。
 - 信号因子 1、信号因子 2 和信号因子缓冲液分别装在不同的管子里，与测序试剂槽打包装在同一个试剂盒里。测序开始前，将适量的信号因子 1、信号因子 2 和信号因子缓冲液混合并将混合液加入至试剂槽的 MSP 孔。
 - 如需进行双端测序，将适量的 MDA T- 试剂和 MDA 测序酶混合液混合并将混合液加入至试剂槽的 MDA 孔。

操作步骤如下：

1. 取出试剂槽，标签朝上，竖直向上放置在桌面上。

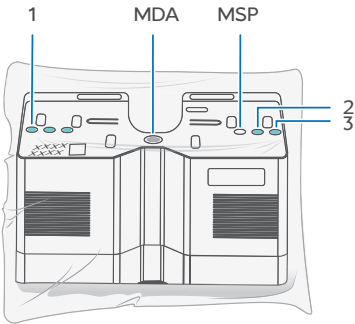


图 1 竖直放置试剂槽

2. 根据下表，提前将带包装的测序试剂槽和信号因子缓冲液解冻备用。

型号	解冻方式	
	2 °C ~ 8 °C 冰箱 (h)	15 °C ~ 25 °C 室温 (h)
FCL SE100	6	3.5 ~ 4.5
FCL PE150	10	4.5 ~ 5
App-C FCL SE100	6	3.5 ~ 4.5
App-C FCL PE150	10	4.5 ~ 5

-  提示
- 摇晃试剂槽时如无碎冰，表示试剂槽已完全融化。
 - 如是过夜解冻，试剂盒内的其他组分需继续置于 -25 °C ~ -15 °C 条件下。
 - 禁止水浴解冻试剂槽。
3. 将信号因子 1 和信号因子 2 置于冰上 10 分钟解冻备用。将 DNB 加载缓冲液 II 置于冰上解冻备用。
4. 试剂槽解冻完成后，摇晃试剂槽，检查是否已无冰块。若有，需置于室温直至冰块完全融化，并用无尘纸擦干试剂槽表面的冷凝水。
-  提示
- 出现包装袋鼓起、试剂槽上端包装破损或试剂泄漏（非冷凝水情况）时，切勿使用该试剂槽，并迅速转移至指定垃圾桶。
 - 如是试剂泄漏，液体明显呈现颜色，液体从试剂槽底部，尤其是从底部盖板流出，或流出的液体会浸湿整个试剂槽底部。
 - 如是冷凝水，液体一般出现在试剂槽的侧面和四个底角周围。此时，可用无尘纸擦干。

5. 完毕后，双手握住试剂槽两侧，上下颠倒 20 次并拍击桌面 10 次，再上下颠倒 10 次并拍击桌面 10 次。

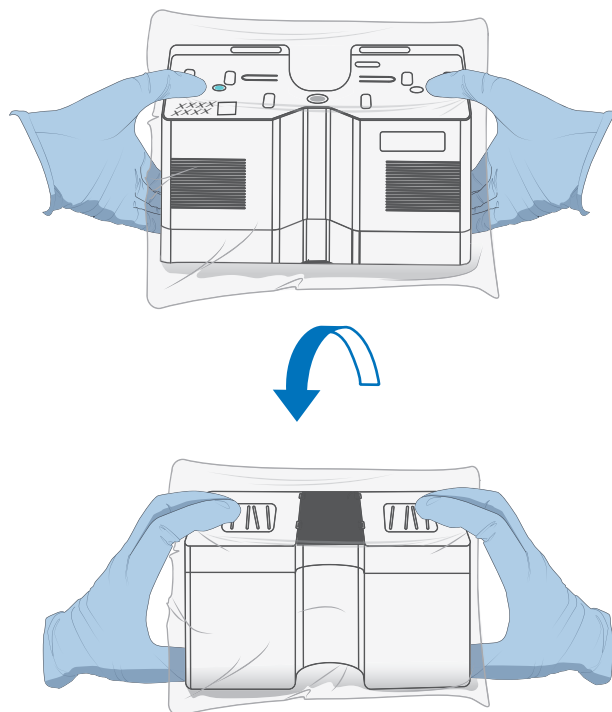


图 2 颠倒试剂槽

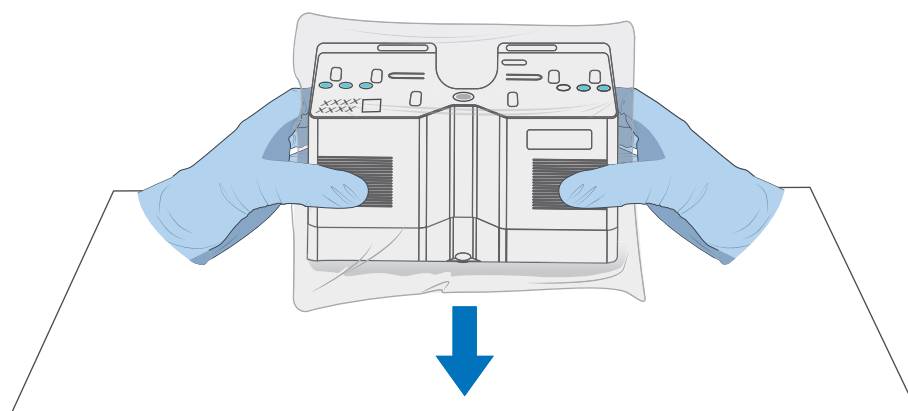


图 3 拍击桌面

6. 握住试剂槽底部中间用力甩 10 次。剪开试剂槽外包装袋。
7. 用涡旋振荡器振荡混匀融化后的信号因子 1 和信号因子 2 约 5 秒。短暂离心 4~5 秒后备用。
8. 根据下表，将相应体积的信号因子 1 和信号因子 2 加入到信号因子缓冲液中，制备成信号因子混合液。

	FCL SE100	FCL PE150	App-C FCL SE100	App-C FCL PE150
信号因子 1	15 μL	31.5 μL	15 μL	31.5 μL
信号因子 2	10 μL	21 μL	10 μL	21 μL
信号因子缓冲液	10 mL	21 mL	10 mL	21 mL

9. 盖上信号因子混合液瓶的盖子，上下颠倒 10~15 次，混匀试剂。过程中勿剧烈振荡，避免气泡产生。
10. 按照下图放置试剂槽，将漏斗放在 MSP 孔上，将混好的信号因子混合液全部加入孔中。

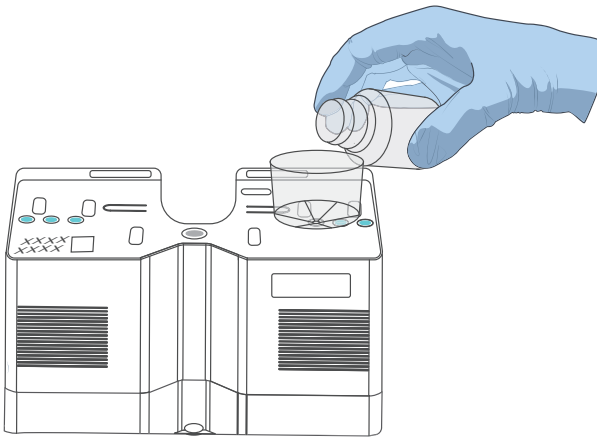


图 4 加入信号因子混合液

11. （可选）进行 PE 测序时，还需执行以下步骤：
- 1) 取出 MDA T- 试剂和 MDA 测序酶混合液。
 - 2) 上下颠倒混匀 MDA 测序酶混合液，瞬时离心。
 - 3) 用移液枪取 50 μL MDA 测序酶混合液，加至 MDA T- 试剂中，用枪头吹吸 10~15 次，混匀试剂。过程中勿剧烈振荡，避免气泡产生。
 - 4) 用干净的吸头戳破 MDA 孔，将混匀后的 MDA 混合液全部加入 MDA 孔中。加入时确保不引入气泡。

 提示 MDA 混合液加入试剂槽后，需尽快上机，否则可能影响测序质量。

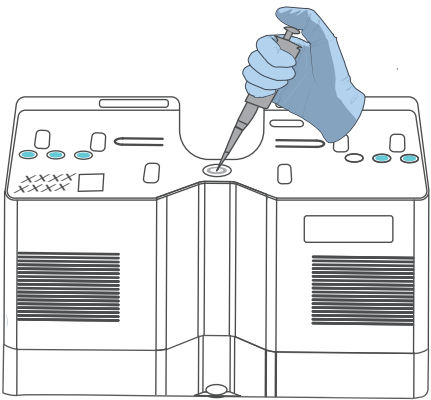


图 5 添加MDA混合液至MDA孔

12. 用尖头镊子夹取 1 号、2 号和 3 号孔上的胶塞。

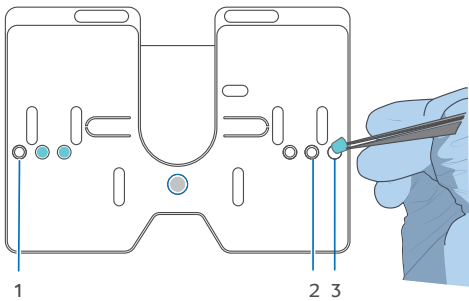


图 6 夹取1号、2号和3号孔上的胶塞

第 6 章 准备测序载片

操作步骤如下：

1. 取出载片盒，然后从盒中取出载片。

 提示 此时请勿打开塑料外包装。

2. 使用前，打开载片外塑料包装，并于 24 小时内使用载片。

第 7 章 开始测序

7.1 登录系统

操作步骤如下：

1. 确保测序仪主机和计算模块均已接通电源，测序仪主机与计算模块之间网线连接正常。

 提示 计算模块应保持常开状态。

- 2. 打开测序仪主机电源，系统进入登录界面。
- 3. 输入用户名和密码后，点击【登录】。

 提示 本控制软件支持两种账号类型：管理员和普通用户。

账号类型	默认用户名	默认密码
管理员账号	admin	123456
普通用户账号	user	123

7.2 选择测序方案

操作步骤如下：

- 1. 点击  ，进入定制测序方案界面。

此时，试剂仓进行初始化，即仓门自动打开，托架自动弹出。

 提示 在测序开始前，切勿手动关上仓门。

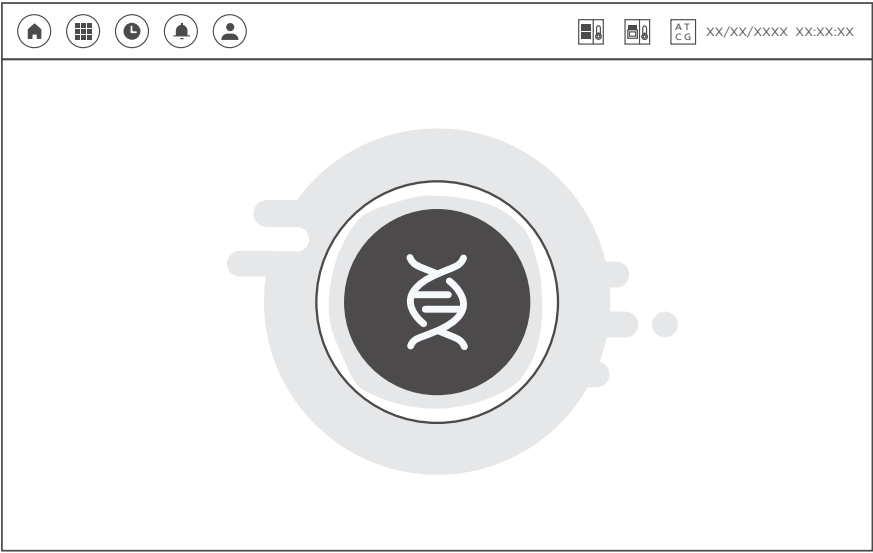


图 7 主界面

2. 点击【测序方案】下拉列表，选择测序方案。



图 8 定制测序方案

3. 点击【读长 1】文本框，在弹出的软键盘上手动输入一链读长。

提示 对于任何一个选定的测序方案，手动输入的读长不可大于其支持的最大读长。

4. 点击【读长 2】文本框，在弹出的软键盘上手动输入二链读长。

- 提示
- 对于单端测序方案，如 SE100，读长 2 默认不可编辑。
 - 对于双端测序方案，如 PE150，系统默认读长 2 为 150。如需减小，可手动编辑。

5. 点击【Barcode】下拉列表，选择所需 Barcode 测序方案。

四种默认可选 Barcode 方案说明如下：

项目	说明
【 MGI UDBA 】	适用于双 Barcode 测序，适配 MGI 双端独立标签 UDB 接头试剂盒 A。
【 MGI PFA 】	适用于双 Barcode 测序，适配 MGI 双端独立标签 PF 接头试剂盒 A。
【 MGI Single 】	适用于单 Barcode 测序，适配 MGI 单 Barcode 接头试剂盒。
【 / 】	不进行 Barcode 测序。

如需自定义 Barcode 方案，参考 *DNBSEQ-E25RS&DNBSEQ-E25ARS 基因测序仪产品说明书*。

6. 确认方案无误后，点击 进入下一步。

如点击 ，界面提示【请确认退出测序？已装载的耗材不可复用。】

- 如需取消测序，点击【确定】。软件返回至测序主界面，仪器进行卸载。
- 如需继续测序，点击【取消】。

7.3 装载载片、试剂槽与废液盒

操作步骤如下：

1. 用扫码枪扫描测序载片塑料包装上的二维码，【载片序列号】、【通量】、和【有效期至】信息自动显示。如扫码失败，可点击文本框，在弹出的软键盘上手动输入外包装标签上的信息。

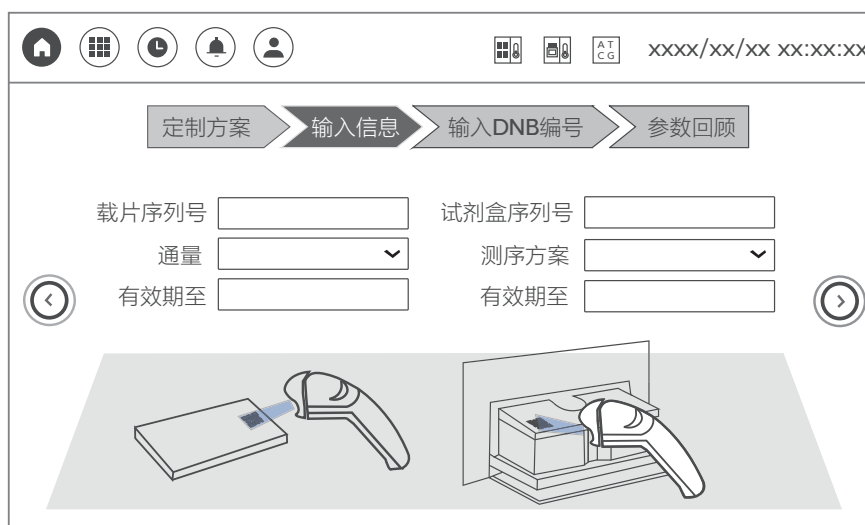


图 9 扫描载片二维码

2. 撕开载片包装，检查载片完整性并确认载片二维码信息与标签上的序列号一致。

 提示 握住载片时，避免触碰载片上的小孔，以免造成污染。

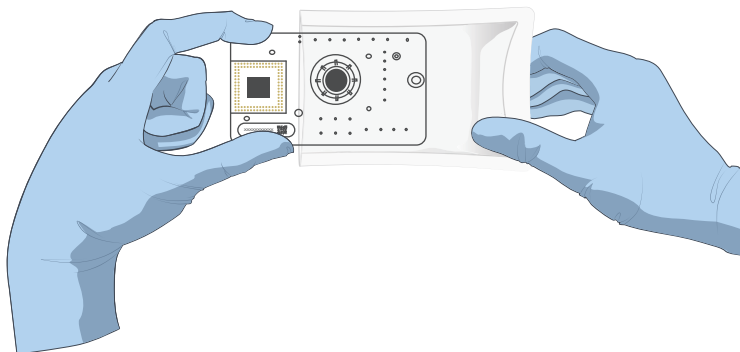


图 10 检查载片

3. 托架卸载完成后,手捏旋转阀,将测序载片上的定位孔对准载片装载架上的定位柱进行安装。

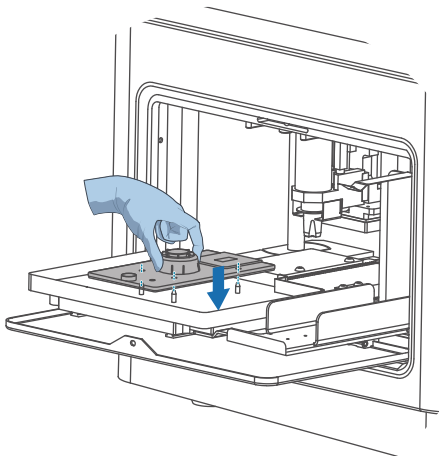


图 11 安装载片

4. 取出准备好的测序试剂槽,用扫码枪扫描试剂槽上的二维码。【试剂盒序列号】、【测序方案】和【有效期至】信息自动显示。

如扫码失败,可点击文本框,在弹出的软键盘上手动输入试剂槽上的信息。

提示 选择测序方案时,如是双端测序,选择【PE150】。如是单端测序,选择【SE100】。

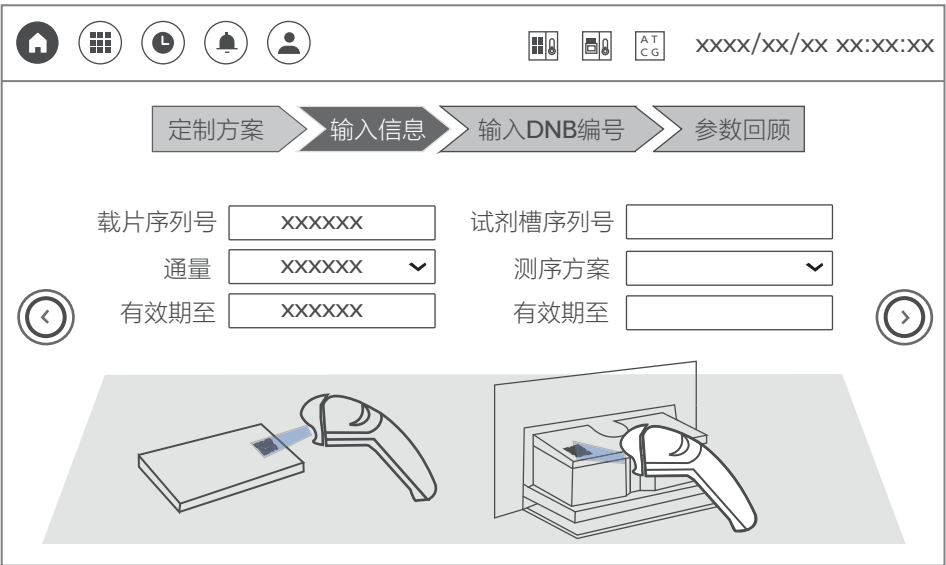


图 12 扫描试剂槽二维码

5. 卸下试剂槽底部保护盖,检查确认试剂槽底的 21 个橡胶塞未脱落。

-  提示 如试剂槽底的胶塞脱离试剂槽或掉进底盖，需将胶塞对准孔位，拧紧胶塞后使用。具体操作可参考第 29 页“试剂槽底部胶塞歪斜或脱落”。

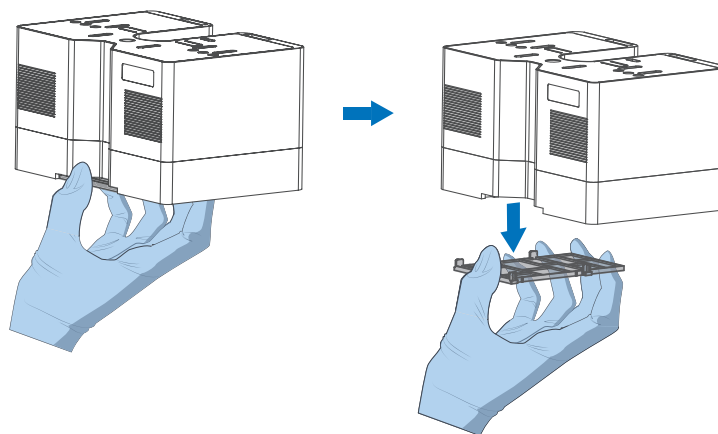


图 13 卸下试剂槽底部保护盖

6. 将试剂槽对准定位柱，放在测序载片上。过程中切勿摇晃或翻转试剂槽。

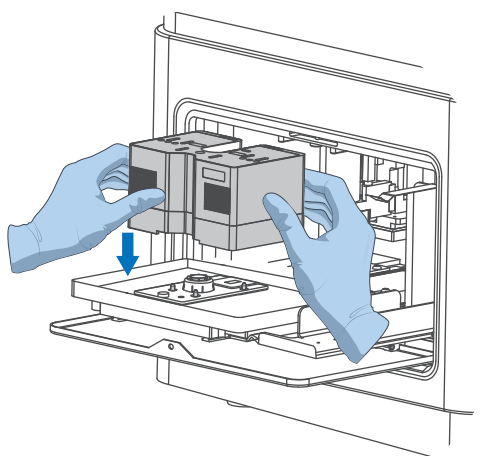


图 14 安装试剂槽

-  提示 如需二次安装试剂槽，需确保试剂槽底部中间的胶塞无脱落。

7. 确保废液盒胶塞处于打开状态，按照下图方向将废液盒放在托架上，并卡入限位装置。

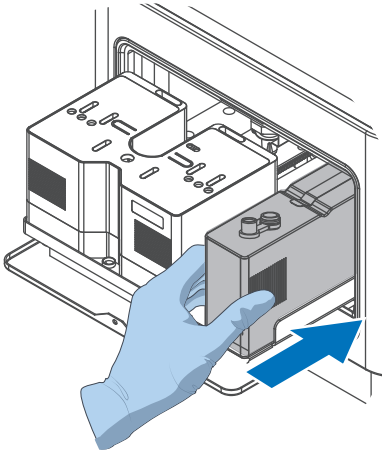


图 15 安装废液盒

 提示 定位夹刚好对准废液盒凹槽时，废液盒放置正确。

8. 安装完成后，点击  >【确定】，仪器将自动进行装载和压紧动作。点击 ，进入下一步。

 警告 此时请勿手动关闭仓门。

7.4 装载样本

操作步骤如下：

1. 用扫码枪扫描样本管上的二维码。如扫码失败，可点击【DNB 编号】文本框，在弹出的软键盘上手动输入样本信息。

 警告 此时返回定制测序方案界面，点击  取消测序会导致已装载的试剂槽和载片报废。



图 16 录入DNB ID

2. 准备 DNB 加载混合液。

1) DNB 加载缓冲液 II 融化后，用涡旋振荡器振荡混匀 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 中有结晶，用涡旋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) 用移液器添加 34 μL DNB 加载缓冲液 II 至装有 DNB 的 PCR 管中，配制 DNB 加载混合液。

 提示 该 DNB 加载混合液需现配现用。

表 14 DNB 加载混合液

组分	体积 (μL)
DNB 加载缓冲液 II	34
DNB	102
总体积	136

3) 用阔口吸头（不带滤芯）缓慢吹打 DNB 加载混合液 8 次。

 提示 切勿离心、振荡及剧烈吹打。

3. 用阔口吸头将制备好的 DNB 加载混合液加入到测序载片的 DNB 加载口。确认加载口无气泡后，进入下一步。

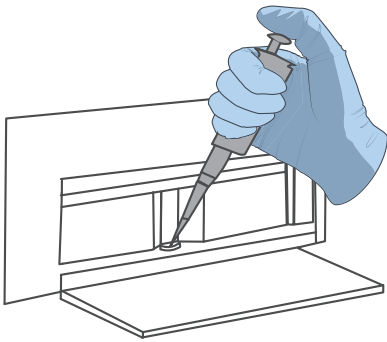


图 17 加样DNB加载混合液

 提示 为避免产生气泡，用阔口吸头尖抵住 DNB 加载口，用移液枪将 DNB 样本缓慢注入。

4. 手动关闭仓门。

5. 点击  进入下一步。

7.5 回顾参数

请仔细核对每一项信息。



图 18 回顾参数

- 如有误，点击  返回至相应界面进行修改。
-  **警告** 如返回至定制测序方案界面后，点击  取消测序会导致已装载的试剂槽和载片报废。
- 如无误，确认计算模块已连接，点击  >【确定】进行测序。

7.6 开始测序

-  **警告**
 - 测序前请确保仓门处于关闭状态。如未关闭，确认仓门处无障碍物后关闭仓门。
 - 测序过程中请勿操作仪器的仓门，以免影响测序结果。
 - 测序过程中请勿撞击、移动仪器，或在仪器周围放置产生振动的设备。否则，可能导致测序结果不准，甚至设备损坏。
 - 及时留意界面图标、状态指示灯或弹出的对话框。如发现异常，请根据提示排查。如仍有异常，请联系技术支持。

开始测序后，进入测序进行中界面。



图 19 DNB加载中界面

项目	说明
	点击可提前终止测序。  警告 终止后无法恢复，需谨慎操作。
【 DNB加载中 】	显示当前测序阶段，如【 DNB 加载中 】、【 进度（当前测序循环 / 总循环数） 】。
【 进度 】	显示测试进度百分比。
【 剩余时间 】	表示测序剩余时间。点击可切换为【 结束时间 】。
【 结束时间 】	显示测序结束时间点。点击可切换为【 剩余时间 】。
【 指标 】	显示测序质量信息。在【 指标 】页签，点击【 测序指标 】下拉框，选择需查看的类型，界面显示曲线图。

第一循环测序运行结束后，等待系统输出第一循环报告。



图 20 第一循环报告

 提示 点击确认后，无法再次查看第一循环报告。

运行完全结束后，等待报告生成。

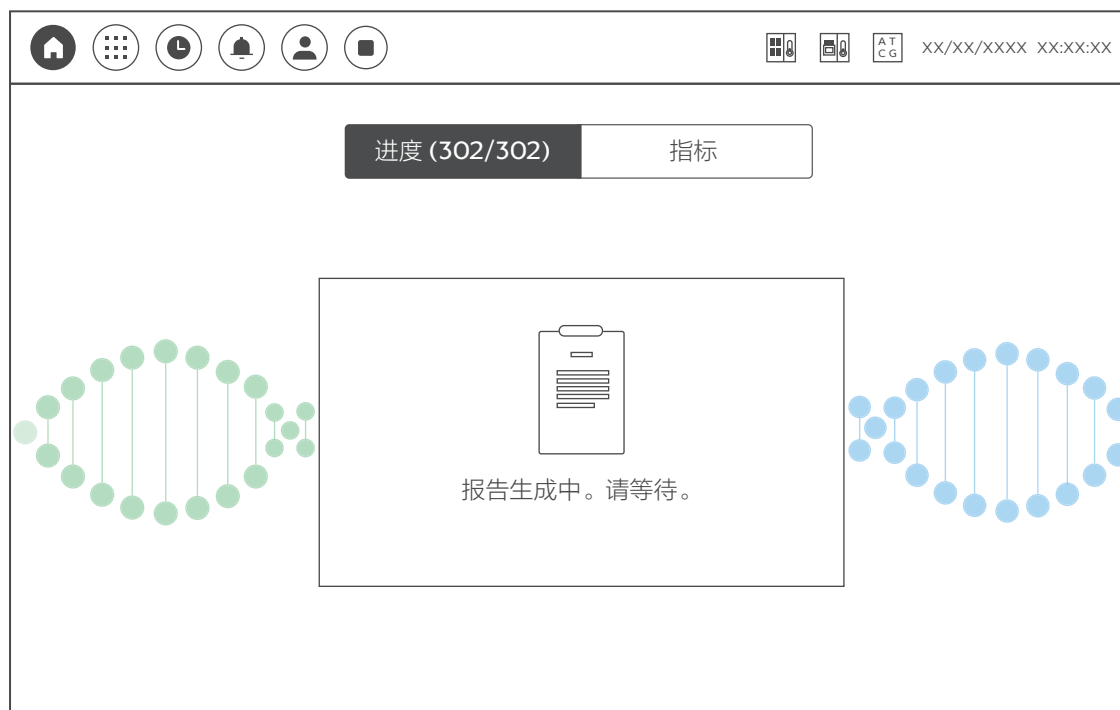


图 21 报告生成界面

- 若报告生成，报告会自动显示。关闭报告并点击 ，进入测序完成界面。
- 若报告未生成， 和【任务异常】会自动显示。点击 ，进入测序完成界面。检查故障原因。
 - 若因设备自身问题，则联系技术支持维修。
 - 若因用户操作不当，比如未连接计算模块，则规范操作后，重新测序。

测序完成后，界面如下时，可移除测序载片、试剂槽与废液盒。



图 22 测序完成界面

7.7 移除测序载片、试剂槽与废液盒

- 警告**
- 测序完成后，移除载片和试剂槽时，应保持试剂槽与载片处于扣合状态，并确保试剂槽始终处于水平状态，以免废液溢出，造成生物污染。
 - 测序完成后及关机前，需确保试剂槽与废液盒已取出，以免遗留在仪器内部，造成部件损坏。

操作步骤如下：

1. 移除载片和试剂槽。此时试剂槽与载片需保持扣合状态，试剂槽保持水平状态。将载片和试剂槽转移至指定垃圾桶。

提示 移除载片和试剂槽后，尽快转移至指定垃圾桶，否则试剂可能会泄漏。

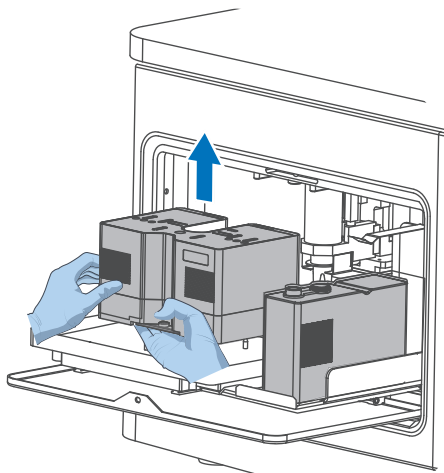


图 23 移除试剂槽与载片

2. 塞住废液盒胶塞，向上微微抬起废液盒，再向外拖出废液盒，取下废液盒至指定垃圾桶。

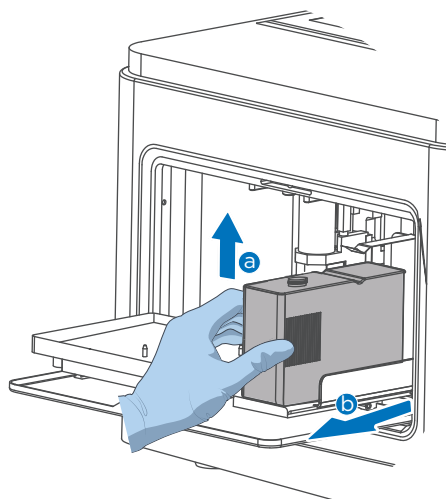


图 24 移除废液盒

3. 手动推回托架，关闭仓门。
4. 点击  回到主界面。
5. 按照实验室要求及法规，处理样本管、载片和试剂槽。

第 8 章 清洁维护

每次测序完成后，仪器自动清洗。

清洗的目的时清理管路内的剩余试剂，避免结晶遗留在管路内。

第 9 章 异常处理

9.1 DNB 浓度不合格

DNB 浓度不符合第 11 页“测定 DNB 浓度”的要求时，执行如下操作：

1. 检查所用试剂盒是否过期。
2. 检查文库是否符合要求。
3. 重新制备 DNB。

如重新制备后仍不符合要求，请联系技术支持。

9.2 试剂盒暂存

- 如试剂盒已经融化，但不能按时使用，最多可再冻融一次。
- 如试剂槽已经融化，但不能按时使用，可放在 2 °C ~8 °C 冰箱内暂存，并于 24 小时内使用。使用前需要按照第 11 页“准备测序试剂槽”中的操作重新混匀试剂槽。
- 如试剂槽已经融化，且按照第 11 页“准备测序试剂槽”的操作将信号因子混合液加至 MSP 孔，但不能按时使用，可将试剂槽置于室温暂存，并于 2 小时内使用。
- 如试剂槽已经融化，且已将 MDA 混合液加至 MDA 孔，但不能按时使用，可将试剂槽置于室温暂存，并于 2 小时内使用。

9.3 试剂槽底部胶塞歪斜或脱落

试剂槽底部胶塞歪斜或脱落时，执行如下操作：

1. 将试剂槽保持在水平状态。
2. 确认胶塞歪斜或脱落的孔位。
3. 用尖头镊子夹住胶塞，对准相应孔位，拧紧胶塞。
4. 拧紧其它胶塞。

附录 1 制造商信息

生产企业名称	青岛华大智造科技有限责任公司
生产地址	中国（山东）自由贸易试验区青岛片区横云山路 2 号 4 号楼
技术支持电话	4000-688-114
技术支持邮箱	MGI-service@mgi-tech.com
网址	www.mgi-tech.com