

编号: H-940-002625-00



甲基化高通量 测序试剂套装

DNBSEQ-T7RS

说明书

版本: 1.0

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: 4000-688-114
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 DNBSEQ-T7RS 甲基化测序试剂套装和 DNBSEQ-T7RS 甲基化 DNB 制备和加载试剂套装，说明书版本 1.0，试剂盒版本 V1.0。

本产品说明书及其包含的信息为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盒的一部分，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。

NextSeq™ 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。文中涉及的其它名称及商标属于各自所有者资产。

©2023-2024 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
1.0	2024 年 12 月	首次发布

试剂套装货号及名称

货号	产品名称	产品型号	版本
940-002625-00	DNBSEQ-T7RS 甲基化高通量测序试剂套装	T7 Methylation FCL PE150	V1.0
940-002628-00	DNBSEQ-T7RS 甲基化 DNB 制备和加载试剂套装	T7 Methylation FCL PE150	V1.0
1000005033	标准文库试剂	V3.0	/
1000020834	CPAS 条形码引物 3 试剂盒	/	V2.0
1000020832	高通量双末端测序引物试剂盒 (App-A)	/	V2.0
1000014047	高通量条形码引物 3 试剂盒 (App-A)	/	V1.0
1000028550	高通量双末端测序引物试剂盒 (App-D)	/	V2.0

目录

第 1 章 介绍	1
1.1 预期用途	1
1.2 检验原理	1
1.3 样本需求	1
1.4 数据分析	1
1.5 测序读长	2
1.6 测序时长	2
1.7 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	7
第 3 章 测序工作流程	8
第 4 章 测序前准备	8
4.1 化冻测序试剂槽	8
4.2 准备清洗试剂	9
4.3 准备纯水试剂桶	10
4.4 测序前检查	10
第 5 章 准备文库	11
5.1 文库插入片段大小要求	11
第 6 章 制备 DNB	11
6.1 估算 ssDNA 文库所需量	11
6.2 准备 DNB 制备试剂	12
6.3 制备 DNB	12
6.3.1 甲基化文库和标准文库试剂（V3.0）DNB 制备	12
6.3.2 非甲基化文库 DNB 制备	14
6.3.3 测定 DNB 浓度	17

6.3.4 DNB pooling	17
6.3.4.1 甲基化文库纯测 pooling	17
6.3.4.2 甲基化文库混测 pooling	18
6.3.4.3 甲基化文库纯测 pooling 标准文库试剂 (V3.0)	19
第 7 章 加载 DNB	20
7.1 准备样本加载试剂板和缓冲液	20
7.1.1 准备甲基化样本加载试剂板和缓冲液	20
7.1.1.1 解冻样本加载试剂板	20
7.1.1.2 解冻 DNB 加载试剂	20
7.1.1.3 准备 0.1 M NaOH 试剂	20
7.2 准备测序载片	21
7.3 加载 DNB	21
第 8 章 准备测序试剂槽和清洗试剂槽	29
第 9 章 测序	29
附录 1 样本 DNB 定量作业指导	30
附录 2 制造商信息	31

第 1 章 介绍

本说明书是使用 DNBSEQ-T7RS 甲基化高通量测序试剂套装和 DNBSEQ-T7RS 甲基化 DNB 制备和加载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等。

1.1 预期用途

本产品是用于测定纯甲基化文库或甲基化文库与其他非甲基化文库（如：WGS、RNAseq 等文库）混合测序的专用试剂盒，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 检验原理

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 样本需求

本试剂套装搭配引物试剂盒可测 MGI 文库或 App 接头的文库。MGI 文库是 MGI 文库制备试剂盒所构建的文库。App 文库是通过 MGIEasy 通用文库转换试剂盒（App-A）或 MGI 提供的其它转换试剂盒将第三方文库（包括 TruSeq 和 Nextera 接头）转换成可用于 MGI 平台测序的文库。

1.4 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。

1.5 测序读长

PE150 测序，按照双端各 150 cycles（2×150）共计 300 cycles 执行，最后得到 300 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	双标签读长	总读长	最大支持 cycle 数
FCL PE150	150	150	10	10	302+10+10	322

1.6 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 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）
FCL PE150	21.0 ~ 23.0	23.0 ~ 28.0	1	2

1.7 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 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
- App DNB 制备缓冲液可用于制备 MGI 文库和 App 文库的 DNB。
 - 不同批次之间试剂组分严禁混用。

表 3 DNBSEQ-T7RS 甲基化高通量测序试剂套装（T7 Methylation FCL PE150）V1.0
货号：940-002625-00

试剂盒信息	组分信息	管盖颜色	规格及数量	储存温度	运输温度	有效期
DNBSEQ-T7RS 甲基化测序载片 货号： 940-002697-00	测序载片（T7-2 FCL）	/	1 张	2 °C ~ 8 °C	2 °C ~ 8 °C	10 个月
DNBSEQ-T7RS 甲基化 DNB 制备试剂盒 V1.0 货号： 940-002444-00	TE 缓冲液		960 μL / 支 ×1 支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	10 个月
	甲基化 DNB 制备缓冲液		240 μL / 支 ×1 支			
	App DNB 制备缓冲液		400 μL / 支 ×1 支			
	甲基化 DNB 聚合酶混合液 I		480 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			
	DNB 加载缓冲液 V		360 μL / 支 ×1 支			

试剂盒信息	组分信息	管盖颜色	规格及数量	储存温度	运输温度	有效期
DNBSEQ-T7RS 甲基化DNB加载试剂盒V1.0 货号： 940-002696-00	0.5 mL 冻存管		1支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12 个月
	甲基化样本加载试剂板 (T7 FCL) V1.0	/	1个			
DNBSEQ-T7RS 甲基化高通量测序试剂盒 (T7 Methylation FCL PE150) V1.0 货号： 940-002698-00	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			
	甲基化测序试剂槽	/	1个			
	透明封口膜	/	2 张			
DNBSEQ-T7RS 甲基化清洗试剂盒 (T7 Methylation FCL PE150) V1.0 货号：940-002693-00	甲基化清洗试剂槽	/	1个	0 °C ~ 30 °C	40 °C以下	12 个月

表 4 DNBSEQ-T7RS 甲基化 DNB 制备和加载试剂套装（T7 Methylation FCL PE150）V1.0
货号：940-002628-00

试剂盒信息	组分信息	管盖颜色	规格及数量	储存温度	运输温度	有效期
DNBSEQ-T7RS 甲基化 DNB 制备试剂盒 V1.0 货号： 940-002444-00	TE 缓冲液		960 μL / 支 ×1 支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	10 个月
	甲基化 DNB 制备缓冲液		240 μL / 支 ×1 支			
	App DNB 制备缓冲液		400 μL / 支 ×1 支			
	甲基化 DNB 聚合酶混合液 I		480 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			
	DNB 加载缓冲液 V		360 μL / 支 ×1 支			
DNBSEQ-T7RS 甲基化 DNB 加载试剂盒 V1.0 货号： 940-002696-00	0.5 mL 冻存管		1 支	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	12 个月
	甲基化样本加载试剂板 (T7 FCL) V1.0	/	1 个			

表 5 CPAS 条形码引物 3 试剂盒 货号：1000020834

产品类型	管盖颜色	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 6 高通量双末端测序引物试剂盒 (App-A) 货号：1000020832

产品类型	管盖颜色	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单/双Barcode测序		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 7 高通量条形码引物 3 试剂盒 (App-A) 货号：1000014047

产品类型	管盖颜色	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		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 8 高通量双末端测序引物试剂盒 (App-D) 货号：1000028550

产品类型	管盖颜色	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单/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 DNB 制备缓冲液	400 μL / 支 ×1 支			

2.2 自备设备、试剂与耗材



- 提示
- 若要混合 DNB，需要使用不带滤芯的阔口吸头。
 - 其他耗材建议使用推荐品牌货号。

表 9 自备设备、试剂与耗材

物料名称	推荐品牌	供应商货号
Qubit 4 荧光定量仪	Thermo Fisher	Q33226
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
ssDNA Assay Kit	翌圣生物	12645ES60 / 12645ES76
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	MGI	091-000355-00
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 八联管	AXYGEN	无
5 mL 灭菌管	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

 提示 若纯测甲基化文库的 3' 端起始碱基是固定序列（如：IDT、Vazyme 等公司的单链建库法甲基化文库），在上机之前需要联系 MGI 工程师对测序软件进行特殊设置。

1. 测序前准备：检查试剂槽完整性，化冻测序试剂槽（4 ~ 24 小时），准备清洗试剂及纯净水桶，检查废液桶余量、存储空间。
2. 准备 DNB：使用 DNB 制备试剂进行制备。
3. 加载样本：在 MGIDL - T7RS 上，使用 DNB 加载试剂将 DNB 加载到载片上。
4. 准备测序试剂槽：将测序试剂盒内的单管试剂加入到试剂槽并混匀。
5. 点击开始测序，设备自检。
6. 测序。
7. 数据分析。

第 4 章 测序前准备

4.1 化冻测序试剂槽

操作步骤如下：

1. 从甲基化高通量测序试剂盒中取出甲基化测序试剂槽。
2. 将甲基化测序试剂槽常温水浴解冻，或者提前一天将其置于 2 °C ~ 8 °C 冰箱解冻，解冻后置于 2 °C ~ 8 °C 冰箱备用。试剂槽解冻时间见下表：

表 10 试剂槽水浴解冻时间

产品型号	解冻方法		
	常温水浴 (小时)	2 °C~8 °C冰箱过夜后 常温水浴解冻 (小时)	2 °C~8 °C冰箱 (小时)
T7 Methylation FCL PE150	3.0	2.0	24.0

4.2 准备清洗试剂



提示 以下清洗试剂均需在 2 °C to 8 °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 11 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 12 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

4.3 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。
 - 在测序前准备纯水，如需要在测序过程中加水，请沿水桶壁轻柔加入，以免剧烈倾倒的气泡进入泵水管路内影响测序质量。
 - 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 13 纯水用量表 (L)

产品型号	1 张载片	2 张载片	3 张载片	4 张载片
T7 Methylation FCL PE150	4.5	9.0	13.5	18.0

4.4 测序前检查

每次测序前，执行如下检查：

检查磁盘空间大小，对于 1 张载片（PE150），若包含 FASTQ 文件，则需满足剩余空间不低于 4.7 TB。若磁盘剩余空间不足，需清除历史数据。

检查废液桶，对于 1 张载片（PE150），废液量可用容量需 ≥7L，若容量不足请在测序前及时清空废液。

若出现上述以外的任何故障，请重启控制软件。

第 5 章 准备文库

5.1 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 250 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。
 - 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。通常情况下，文库插入片段主峰越小，文库主带分布越集中，总数据量越高。

表 14 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)	测序方案	适用文库类型	数据量 (M)	数据量 (Gb)
T7 Methylation FCL PE150	250 ~ 500	主测甲基化文库 (0~30%平衡文库，平衡文库数据不可用)	甲基化文库，MGI V3标准文库等平衡文库	≥ 4500	≥ 1350
		甲基化文库混测 (推荐非甲基化文库占比 $\geq 80\%$)	甲基化文库，WGS，RNAseq等非甲基化文库	≥ 5800	≥ 1740

第 6 章 制备 DNB

-  提示
- 不同批次试剂盒严禁混用。
 - 若要混合 DNB，需要使用不带滤芯的阔口吸头。

6.1 估算 ssDNA 文库所需量

- 对于 T7 Methylation FCL PE150 测序读长，一张测序载片需要加载的 DNB 体积为 270 μL ，根据每个样本测序所需要的数据量及文库 pooling 方式，决定 DNB 的制备体系为 100uL 或 50uL。通常采用 DNB pooling 方式的 barcode 拆分均一性比其他方式 (PCR pooling 或 ssCir pooling) 更好。
- 下表为 1 个 DNB 制备体系所需 ssDNA 文库体积：

 提示 C 表示文库浓度（fmol/μL）。

表 15 甲基化 FCL PE150 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
甲基化文库	V=160 fmol / C	V=80 fmol / C
非甲基化文库	V=60 fmol / C	V=30 fmol / C
非甲基化 PCR free 文库	V=75 fmol / C	V=37.5 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： $V=a/b\times 270\text{ }\mu\text{L}$ 。
样本 A 的 DNB 制备个数为 $V/90$ ，取整数 +1。

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. 从甲基化 DNB 制备试剂盒中取出 TE 缓冲液、甲基化 DNB 制备缓冲液和 DNB 终止缓冲液置于室温解冻，约 0.5 小时。
 - 非甲基化文库测序：取出 App DNB 制备缓冲液，置于室温解冻。
3. 取出甲基化 DNB 聚合酶混合液 I 置于冰上解冻，约 0.5 小时。
 - 非甲基化文库测序：取出 DNB 聚合酶混合液 I 置于冰上解冻，约 0.5 小时。

 提示 此时不要取出 DNB 聚合酶混合液 II（LC）。

6.3 制备 DNB

此部分内容包含不同文库类型的 DNB 制备方案。

- 进行甲基化文库纯测pooling或甲基化文库纯测pooling标准文库试剂（V3.0），详见第 12 页“甲基化文库和标准文库试剂（V3.0）DNB 制备”。
- 进行甲基化文库混测pooling，除进行上述甲基化DNB制备外，还需进行 第 14 页“非甲基化文库 DNB 制备”。

6.3.1 甲基化文库和标准文库试剂（V3.0）DNB 制备

操作步骤如下：

1. 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：

- 提示
- 下表所示为 1 个 DNB 制备体系。
 - 根据第 11 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体系个数。
 - 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 16 甲基化文库和标准文库试剂（V3.0）DNB 制备反应体系 1（FCL PE150）

组分	管盖颜色	100 μL 体系 加入量（μL）	50 μL 体系 加入量（μL）
TE 缓冲液		20 - V	10 - V
甲基化 DNB 制备缓冲液		20	10
文库 ssDNA	/	V	V
总体积		40	20

2. 将上述 DNB 制备反应体系 1 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 17 甲基化文库和标准文库试剂（V3.0）DNB 制备引物杂交反应条件 1(FCL PE150)

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

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，置于冰上。
5. 根据下表配制甲基化文库和标准文库试剂（V3.0）DNB 制备反应体系 2：

表 18 甲基化文库和标准文库试剂 (V3.0) DNB 制备反应体系 2 (FCL PE150)

组分	管盖颜色	试剂体积 (μL)/100 μL 体系	试剂体积 (μL) /50 μL 体系
甲基化 DNB 聚合酶混合液 I		40	20
DNB 聚合酶混合液 II (LC)		1.6	0.8

6. 反应混合液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
- 部分品牌 PCR 仪的热盖升降温速度慢。对于这种类型的 PCR 仪，需提前进行热盖预热或冷却，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 19 甲基化文库和标准文库试剂 (V3.0) DNB 制备滚环扩增条件 (FCL PE150)

温度	时间
35 °C 热盖	On
30 °C	40 分钟
4 °C	Hold

7. 当 PCR 仪温度达到 4 °C 后，按照下表立即加入 DNB 终止缓冲液，用阔口吸头缓慢地吹打混匀 5~8 次。

表 20 甲基化文库和标准文库试剂 (V3.0) 终止缓冲液加入体积 (FCL PE150)

组分	管盖颜色	试剂体积 (μL) /100 μL 体系	试剂体积 (μL) /50 μL 体系
终止缓冲液		15	7.5

- 提示
- DNB 必须使用无滤芯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 2 °C ~ 8 °C 保存并于 8 小时内使用。

6.3.2 非甲基化文库 DNB 制备

操作步骤如下：

1. 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：

表 21 非甲基化文库 DNB 制备反应体系 1 (FCL PE150)

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

- 将上述 DNB 制备反应体系 1 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 22 DNB 制备引物杂交反应条件 1(FCL PE150)

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 秒后，置于冰上。
- 根据下表配制非甲基化文库 DNB 制备反应体系 2：

表 23 非甲基化文库 DNB 制备反应体系 2 (FCL PE150)

组分	管盖颜色	试剂体积 (μL)/100 μL 体系	试剂体积 (μL)/50 μL 体系
DNB 聚合酶混合液 I		40	20
DNB 聚合酶混合液 II (LC)		4	2

- 反应混合液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
- 部分品牌 PCR 仪的热盖升降温速度慢。对于这种类型的 PCR 仪，需提前进行热盖预热或冷却，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 24 非甲基化文库 DNB 制备滚环扩增条件 (FCL PE150)

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，按照下表立即加入 DNB 终止缓冲液，用阔口吸头缓慢地吹打混匀 5~8 次。

表 25 非甲基化文库终止缓冲液加入体积 (FCL PE150)

组分	管盖颜色	试剂体积 (μL) /100 μL 体系	试剂体积 (μL) /50 μL 体系
终止缓冲液		20	10

- 提示
- DNB 必须使用无滤芯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 2 °C ~ 8 °C 保存并于 8 小时内使用。

6.3.3 测定 DNB 浓度

DNB 制备完成后，取用 2 μL DNB，使用 Qubit ssDNA Assay Kit 和 Qubit 4.0 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，在排除 DNB 定量不准的情况后，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。

表 26 DNB 浓度合格标准

产品型号	DNB 合格浓度
甲基化文库和标准文库试剂（V3.0）FCL PE150	$\geq 5 \text{ ng}/\mu\text{L}$
非甲基化文库 FCL PE150	$\geq 8 \text{ ng}/\mu\text{L}$

-  提示
- 若浓度超过 40 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ，需要用 TE 缓冲液稀释至 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 后使用。
 - 若需稀释 DNB，请确保使用前再稀释，稀释后的 DNB 需立即使用。

6.3.4 DNB pooling

6.3.4.1 甲基化文库纯测 pooling

-  提示
- 甲基化文库采用 DNB pooling。根据 Qubit 荧光定量仪定量出的 DNB 的浓度（ $\text{ng}/\mu\text{L}$ ）依据下列公式换算成（ $\text{fmol}/\mu\text{L}$ ）：
$$\text{Concentration (fmol}/\mu\text{L}) = 3030 \times \text{Concentration (ng}/\mu\text{L}) / N$$

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）。
 - 用尖口吸头缓慢的进行 DNB 取样，所有样本 DNB 取样完成后，再用无滤芯阔口吸头进行混匀。

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。

6.3.4.1.1 计算每个文库理论相对量

A 文库的理论相对量为： $A1 = A \text{ 文库所需数据量} / A \text{ 文库 DNB 浓度}$

B 文库的理论相对量为： $B1 = B \text{ 文库所需数据量} / B \text{ 文库 DNB 浓度}$

.....

H 文库的理论相对量为： $H1 = H \text{ 文库所需数据量} / H \text{ 文库 DNB 浓度}$

6.3.4.1.2 计算总相对量

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

6.3.4.1.3 计算每个文库 pooling 体积

- 每张载片所需 DNB 总体积为 270 μL ，每个文库的 pooling 体积为：

甲基化 A 文库的 pooling 体积为： $A2 = 270 * A1 / V$

甲基化 B 文库的 pooling 体积为： $B2 = 270 * B1 / V$

.....

甲基化文库 H 的 pooling 体积为： $H2 = 270 * H1 / V$

6.3.4.2 甲基化文库混测 pooling

-  提示 • 甲基化文库与非甲基化文库混测采用 DNB pooling。当有多个甲基化样本时，甲基化样本间需 DNB pooling；当 pooling 非甲基化样本为同类应用时，该同类应用样本间可样本 pooling；不同类应用样本间需 DNB pooling。在混测中，甲基化文库所需数据量占比不超过总数据量的 20%，混测理论总数据量 1740 Gb，即甲基化文库数据量 ≤ 348 Gb。根据 Qubit 荧光定量仪定量出的 DNB 的浓度（ $\text{ng}/\mu\text{L}$ ）依据下列公式换算成（ $\text{fmol}/\mu\text{L}$ ）：

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

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）。

- 用尖口吸头缓慢的进行 DNB 取样，所有样本 DNB 取样完成后，再用无滤芯阔口吸头进行混匀。

当 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。

6.3.4.2.1 计算每个文库理论相对量

甲基化文库 A 的理论相对量为： $A1 = A \text{ 文库所需数据量} / A \text{ 文库 DNB 浓度 (fmol}/\mu\text{L})$

甲基化文库 B 的理论相对量为： $B1 = B \text{ 文库所需数据量} / B \text{ 文库 DNB 浓度 (fmol}/\mu\text{L})$

.....

非甲基化文库 AA（例 WGS）的理论相对量为： $AA1 = AA \text{ 文库所需数据量} / AA \text{ 文库 DNB 浓度 (fmol}/\mu\text{L})$

非甲基化文库 AB（例 RNA）的理论相对量为： $AB1 = AB \text{ 文库所需数据量} / AB \text{ 文库 DNB 浓度 (fmol}/\mu\text{L})$

.....

6.3.4.2.2 计算总相对量

$$V = A1 + B1 + \dots + AA1 + AB1 + \dots$$

6.3.4.2.3 计算每个文库 pooling 体积

每张载片所需 DNB 总体积为 270 μL ，每个文库的 pooling 体积为：

甲基化文库 A 的 pooling 体积为： $A2 = 270 * A1 / V$

甲基化文库 B 的 pooling 体积为 : $B2=270*B1/V$

非甲基化文库 AA (例 WGS) 的 pooling 体积为 : $AA2=270*AA1/V$

非甲基化文库 AB (例 RNA) 的 pooling 体积为 : $AB2=270*AB1/V$

.....

6.3.4.3 甲基化文库纯测 pooling 标准文库试剂 (V3.0)



提示 甲基化文库与标准文库试剂 (V3.0) 测序采用 DNB pooling。当有多个甲基化样本时, 甲基化样本间需 DNB pooling。可根据甲基化文库片段大小进行标准文库试剂 (V3.0) pooling 比例的摸索。纯测理论总数据量 1350 Gb, 例如标准文库试剂 (V3.0) 样本数据量占比 $\leq 20\%$, 则标准文库试剂 (V3.0) 样本数据量 ≤ 270 Gb。根据 Qubit 荧光定量仪定量出的 DNB 的浓度 (ng/ μL) 依据下列公式换算成 (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)。

- 用尖口吸头缓慢的进行 DNB 取样, 所有样本 DNB 取样完成后, 再用无滤芯阔口吸头进行混匀。

6.3.4.3.1 计算每个文库理论相对量

甲基化文库 A 的理论相对量为 : $A1=A$ 文库所需数据量 /A 文库 DNB 浓度 (fmol/ μL)

甲基化文库 B 的理论相对量为 : $B1=B$ 文库所需数据量 /B 文库 DNB 浓度 (fmol/ μL)

.....

标准文库试剂 (V3.0) 的理论相对量为 : $AA1=AA$ 文库所需数据量 /AA 文库 DNB 浓度 (fmol/ μL)

6.3.4.3.2 计算总相对量

$$V=A1+B1+\cdots+AA1$$

6.3.4.3.3 计算每个文库 pooling 体积

每张载片所需 DNB 总体积为 270 μL , 每个文库的 pooling 体积为 :

甲基化文库 A 的 pooling 体积为 : $A2=270*A1/V$

甲基化文库 B 的 pooling 体积为 : $B2=270*B1/V$

.....

标准文库试剂 (V3.0) 的 pooling 体积为 : $AA2=270*AA1/V$

第 7 章 加载 DNB



- 提示
- 不同批次试剂盒严禁混用。
 - 若要混合 DNB，需要使用不带滤芯的阔口吸头。

7.1 准备样本加载试剂板和缓冲液

7.1.1 准备甲基化样本加载试剂板和缓冲液

7.1.1.1 解冻样本加载试剂板

操作步骤如下：

1. 准备试剂，从 DNBSEQ-T7RS 甲基化 DNB 加载试剂盒中取出甲基化样本加载试剂板。
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. 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。

7.1.1.2 解冻 DNB 加载试剂

操作步骤如下：

1. 从 DNBSEQ-T7RS 甲基化 DNB 加载试剂盒中取出 DNB 加载缓冲液 V。
2. 根据以下不同文库进行相应操作：
 - App-A 文库测序：从甲基化 DNB 试剂盒中取出 DNB 加载缓冲液 V。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：从甲基化 DNB 试剂盒中取出 DNB 加载缓冲液 V。从高通量双 / 单末端测序引物试剂盒（App-D）中取出 App-D 测序引物工作液 1。
3. 置于室温解冻 0.5 小时。
4. 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。

7.1.1.3 准备 0.1 M NaOH 试剂

0.1 M NaOH 的配制方法见第 9 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。

7.2 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. 使用压缩空气罐吹净载片背面的灰尘和杂质。

7.3 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 “research” 和密码 “Admin123”, 或用户名 “user” 和密码 “Password123”, 登录进入主界面。

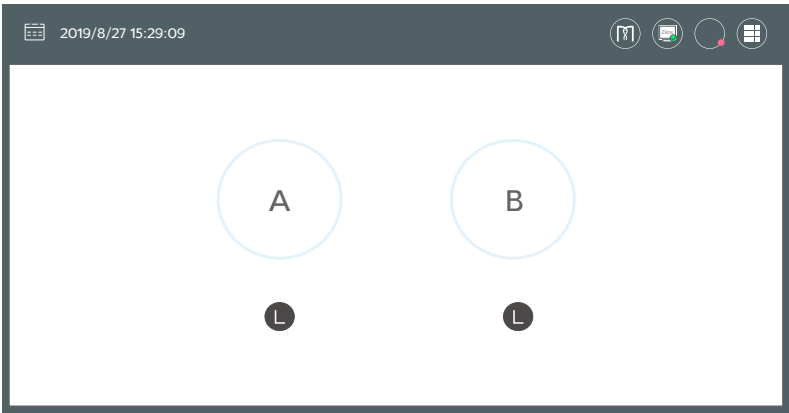


图 1 MGIDL - T7RS 主界面任选空闲状态下的A / B进行操作。

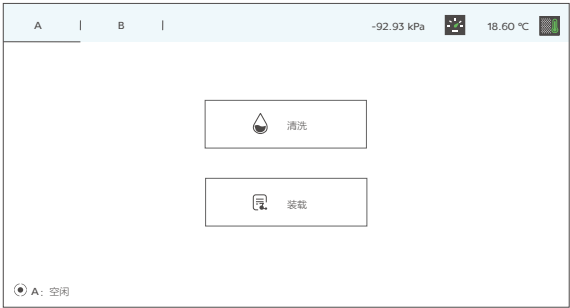


图 2 MGIDL - T7RS操作选择界面

3. 点击【装载】，进入下图界面：



图 3 MGIDL - T7RS信息输入界面

4. 打开装载仓仓门。
5. 取出解冻后的甲基化样本加载试剂板, 将加载试剂板对准 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。

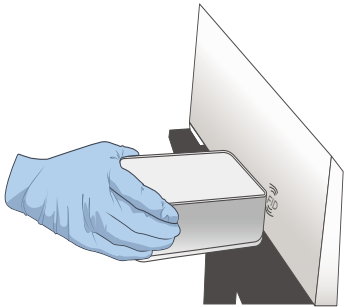


图 4 样本加载试剂板信息录入将加载试剂板轻轻颠倒混匀5次，离心1分钟或轻拍加载板封膜并静置2~3分钟，再撕开封膜，在11号孔位中加入4 mL 0.1 M NaOH，加载试剂板孔位如下图所示：

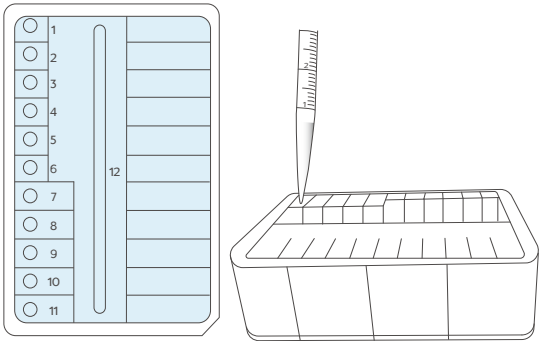


图 5 样本加载试剂板孔位信息及加液操作

6. 若使用 App-A 或 App-D 文库进行测序时，根据使用的试剂盒类型分别进行相应操作：
- App-A 文库测序：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：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。
7. 将准备好的加载试剂板，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

8. 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。



图 7 测序载片信息确认握住载片两侧，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。

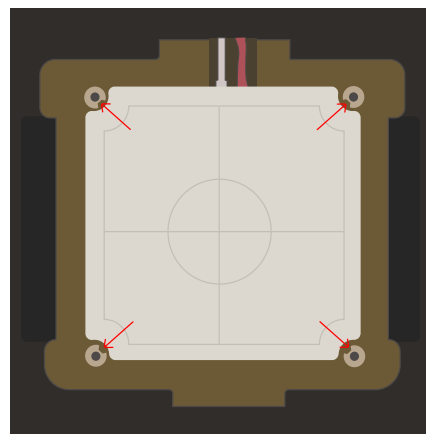
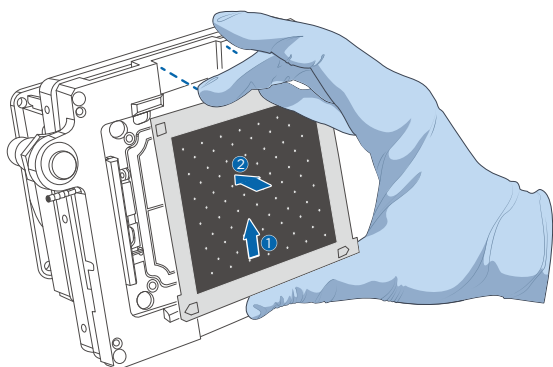


图 8 载片放置和密封垫示意图

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

- 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。

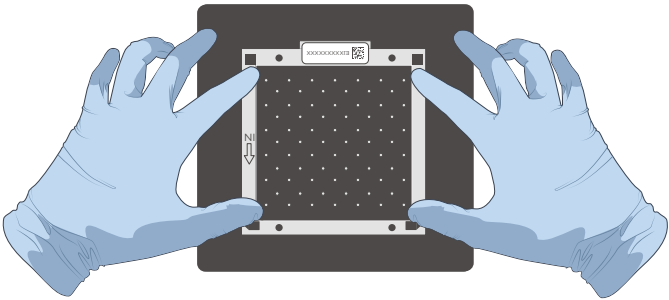


图 9 按压测序载片

10. 取出 0.5 mL 冻存管，按下表所示配制 DNB 加载体系，用无滤芯阔口吸头缓慢混匀 5~8 次。

表 27 DNB 加载体系

加样顺序	组分	管盖颜色	加入量 (μL)
1	DNB	/	270
2	DNB 加载缓冲液 V		90
	总体积		360

- 提示
- 以上表格中的 DNB 指的是第 17 页 “DNB pooling” 中已 pooling 好的 DNB 样本。
 - 切勿离心、振荡及剧烈吹打加载体系。
 - 在加载仪运行前即刻准备新鲜的加载体系，全程在冰上进行，现配现用。
 - 配制好的加载体系需在 30 分钟内使用。

12. 录入 DNB 信息。

 提示 输入的 DNB 信息仅限于数字或字母或数字与字母组合。

将装有 DNB 加载体系的 0.5 mL 冻存管，按照所示放置在 MGIDL - T7RS 的 DNB 试剂管孔中，界面显示 DNB 管已放置。

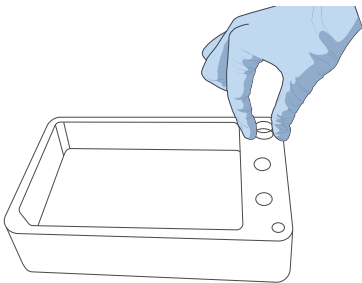


图 10 放置DNB管

- 13. 关闭装载仓仓门。
- 14. 点击【开始】，选择【是】。

 提示 此处显示 “Methylation FCL 样本加载试剂板”。

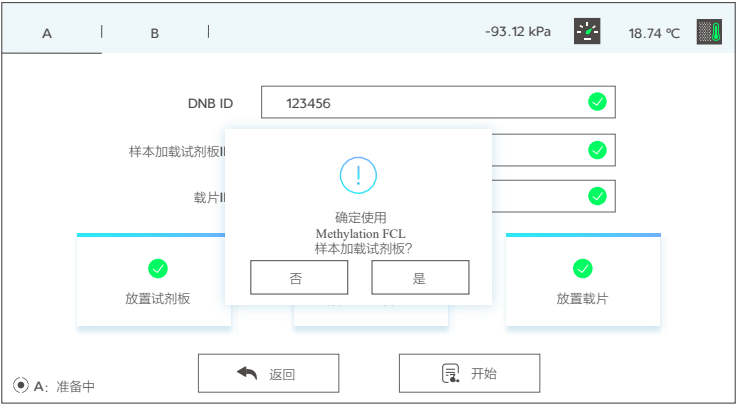


图 11 MGIDL - T7RS确认装载界面

15. 载片装载开始。

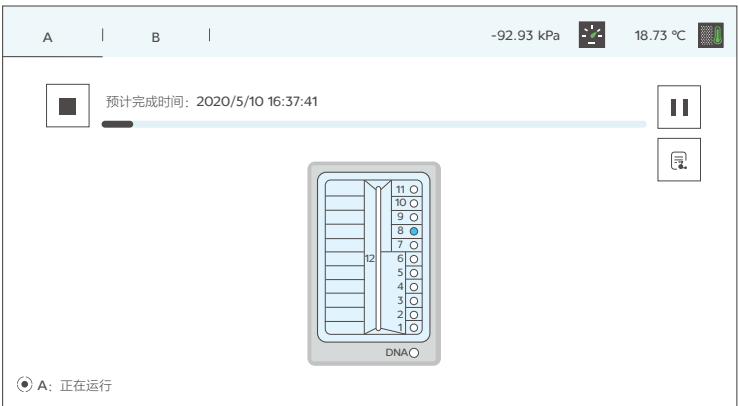


图 12 MGIDL - T7RS装载载片界面

16. 当界面如下图时，表示载片已装载完成，耗时约 2 小时。

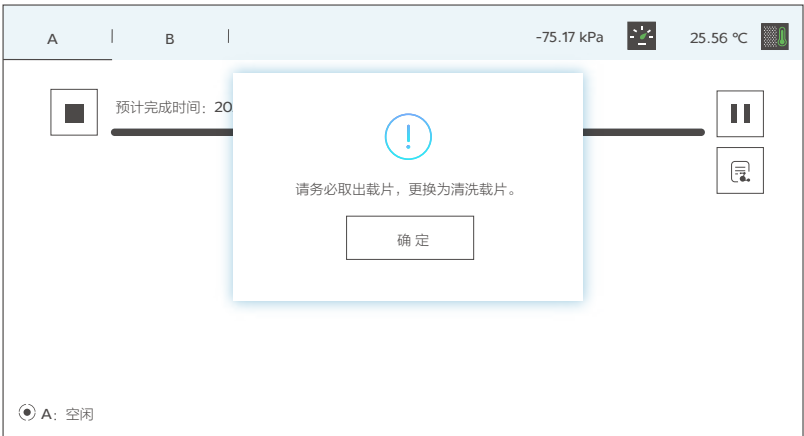


图 13 MGIDL - T7RS载片装载完成界面

17. 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 2 °C ~ 8 °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。

18. 点击【确定】，在载片平台放置清洗载片，按下载片平台上的载片吸附按钮，。

19. 点击【后清洗】。



图 14 MGIDL - T7RS后清洗界面在弹出的对话框中选择【是】，开始MGIDL - T7RS清洗，耗时约20分钟。



图 15 MGIDL - T7RS后清洗确认界面

20. MGIDL - T7RS 清洗开始。

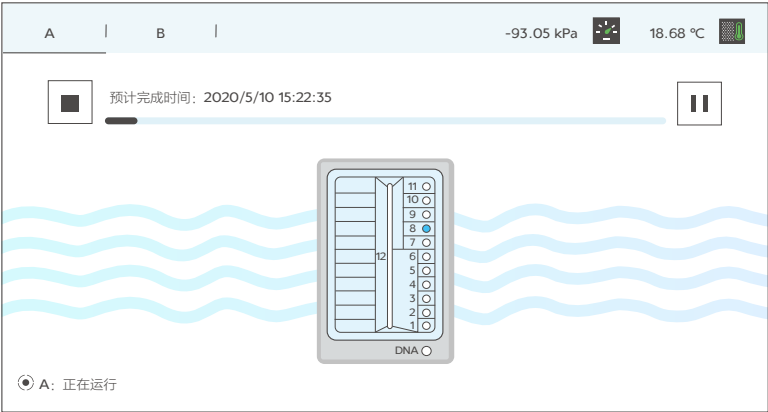


图 16 MGIDL - T7RS清洗界面

21. 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。

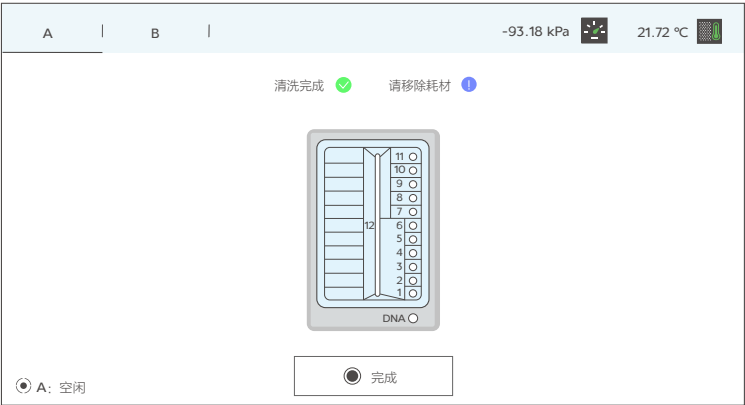


图 17 MGIDL - T7RS清洗完成界面

第 8 章 准备测序试剂槽和清洗试剂槽

请参考 *DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装使用说明书* “第 7 章 准备测序试剂槽和清洗试剂槽” 或 *DNBSEQ-T7RS 系统操作指南* 进行测序步骤。

第 9 章 测序

请参考 *DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装使用说明书* “第 8 章 测序” 或 *DNBSEQ-T7RS 系统操作指南* 进行测序步骤。

附录 1 样本 DNB 定量作业指导

- 提示
- Working solution 配制后需在半小时内使用。
 - 建议每批定量样品数量不超过 8 个，避免因荧光猝灭导致 DNB 定量不准确。
 - 禁止碰触检测管的锥形管壁。
 - 避免在检测管中引入气泡。

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	190	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，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	武汉华大智造科技有限公司
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
技术支持厂家	武汉华大智造科技有限公司
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

--- 此页有意留白 ---