



适用范围

试剂套装 / 试剂盒名称	货号
MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (SE50)	1000012551
MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (SE100)	1000012552
MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (PE100)	1000012554
MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (PE150)	1000012555
MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (SE400)	1000013857
MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (PE200)	940-000040-00
MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装(SE50) (Small RNA)	1000006138
MGISEQ-2000RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS SE100)	1000011719
MGISEQ-2000RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS PE100)	1000013155
MGISEQ-2000RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS PE150)	1000011718
MGISEQ-2000RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS PE300)	940-000039-00
cPAS 条形码引物 3 试剂盒	1000020834
cPAS 条形码引物 4 试剂盒	1000014048

制备DNB

准备文库

1. 确认文库插入片段范围在 20 bp~800 bp，同时主带集中在 ± 100 bp 以内。如建库试剂盒有特殊要求，以建库试剂盒为准。
2. 文库需用 Qubit[®] ssDNA Assay Kit 和 Qubit[®] Fluorometer 定量。

- 对于一般文库，要求初始 ssDNA 浓度不小于 2 fmol/ μ L。
- 对于 PCR-Free 文库，要求初始文库 ssDNA 浓度不小于 3.75 fmol/ μ L。
- 对于 Small RNA 文库，要求初始文库 ssDNA 浓度不小于 3 fmol/ μ L。

制备DNB

提示

不同批次试剂盒严禁混用。

1. 取出 TE 缓冲液、文库、DNB 制备缓冲液、DNB 聚合酶混合液 I 和 DNB 终止缓冲液，置于冰盒上约 0.5 h。待融化后，使用漩涡振荡器振荡混匀 5 s 后，短暂离心置于冰盒上备用。
- 提示
如需制备 FCS PE300 读长 DNB，将 DNB 聚合酶混合液替换为 DNB 快速聚合酶混合液 II。
2. 根据样本种类，选择不同的仪器进行加载。

加载仪类型		测序仪	MGIDL-200RS	MGIDL-200H
可加载样本种类		1	1-4	1-4
DNB 加载体积 (μ L/Lane)	制备 FCS PE300 读长 DNB	45	45	22.5
	制备其他读长 DNB	50	50	25
DNB 制备体系 (μ L)	制备 FCS PE300 读长 DNB	90	90	45
	制备其他读长 DNB	100	100	100
反应体系数量 /FCL 载片		2	2-4	1-4
反应体系数量 /FCS 载片		1-2	1-2	1-2

3. 取 0.2 mL 八连管或 PCR 管，按下表在冰上配制反应体系。

适用范围 **制备DNB** 测定DNB浓度 准备载片与测序试剂槽 加载DNB 装载测序试剂槽与载片 开始测序 清洗维护

组分	FCS PE300 读长 DNB		其他读长 DNB
	加入量 (μL) /90 μL 体系	加入量 (μL) /45 μL 体系	加入量 (μL)
TE 缓冲液	20-V	10-V	20-V
DNB 制备缓冲液	20	10	20
文库 ssDNA	V	V	V
总体积	40	20	40

4. 将反应体系混匀并瞬时离心，置于 PCR 仪中反应，反应条件如下表。

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

5. 取出 DNB 聚合酶混合液 II (LC)，短暂离心 5 s 后，置于冰盒上备用。

提示

- 勿将 DNB 聚合酶混合液 II (LC) 置于室温。
- 勿长时间用手触碰管壁。

6. PCR 仪达到 4 °C 后取出 PCR 管，短暂离心 5 s 后，置于冰上。

7. 根据以下不同情况，向 PCR 管加入试剂：

组分	制备 FCS PE300 读长 DNB		制备其他读长 DNB
	试剂体积 /90 μL 体系	试剂体积 /45 μL 体系	试剂体积 /100 μL 体系
DNB 快速聚合酶混合液 II	40 μL	20 μL	/
DNB 聚合酶混合液 II (LC)	1.6 μL	0.8 μL	4 μL
DNB 聚合酶混合液 I	/	/	40 μL

8. 用漩涡振荡器振荡混匀反应混合液，用迷你离心机离心 5 s，置于 PCR 仪中反应，反应条件如下表。

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

提示

- 对于热盖升降速度慢的 PCR 仪，需提前进行热盖预热，确保进行 DNB 反应时热盖处于工作温度。
- 热盖温度建议设置为 35 °C，或尽可能设置成接近 35 °C 的最低温度。

9. PCR 仪到达 4 °C 后，立即取出 PCR 管置于冰上。

10. 根据以下不同情况，向 PCR 管加入试剂，并用阔口吸头缓慢吸打混匀 5~8 次。

组分	制备 FCS PE300 读长 DNB		制备其他读长 DNB
	试剂体积 /90 μL 体系	试剂体积 /45 μL 体系	试剂体积 /100 μL 体系
DNB 终止缓冲液	20 μL	5 μL	20 μL

提示

- 操作过程中，DNB 需置于冰上，防止 DNB 进行二次扩增。
- 用阔口吸头缓慢吸打混匀 DNB，切勿离心、振荡及剧烈吸打。
- 制备好的 DNB 可置于 4 °C 保存备用，须 48 小时内使用，但制备好的 FCS PE300 读长 DNB 须 4 小时内使用。

适用范围

制备DNB

测定DNB浓度

准备载片与测序试剂槽

加载DNB

装载测序试剂槽与载片

开始测序

清洗维护

测定DNB浓度

配制Qubit检测工作液

1. 从 Qubit ssDNA Assay Kit 试剂盒中取出 Qubit® ssDNA Reagent、Qubit® ssDNA Standard #1和 Qubit® ssDNA Standard #2,用漩涡振荡器振荡混匀 5 s, 短暂离心后置于室温备用。

提示

Qubit® ssDNA Reagent 需避光融化后混匀。

2. 按照下表配制 Qubit 检测工作液。

组分	加入量 (μL)
Qubit® ssDNA Buffer	199 × (N+1)
Qubit® ssDNA Reagent	1 × (N+1)

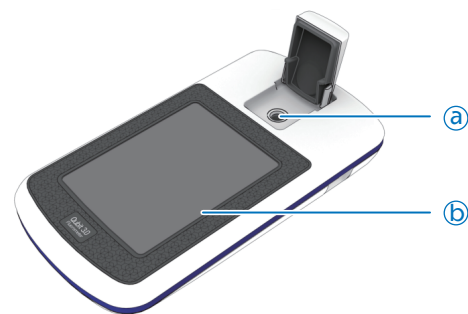
3. 用漩涡振荡器振荡混匀 5 s,短暂离心后,在 2 个标准品检测管中加入 190 μL 工作液, 在 DNB 检测管中加入 198 μL 工作液。
4. 在 2 个标准品检测管中分别加入 10 μL 的 Qubit ssDNA Standard #1 和 Qubit ssDNA Standard #2, 在 DNB 检测管中加入 2 μL 制备好的 DNB。
5. 用漩涡振荡器振荡混匀 5 s, 短暂离心后在室温下避光孵育 2 min。完成后, 进行浓度测定。

提示

操作过程中, 避免检测管的管壁外侧与其它物体直接接触, 以防管壁温度过高影响测定浓度的数值。

测定DNB浓度

下文以 Qubit 3 Fluorometer 为例。a 为检测室, 用于放置检测管; b 为触摸屏, 用于仪器操作和结果显示。



1. 点击【Oligo】>【ssDNA】>【读取标准值】, 开始检测。
2. 放入标准品 #1 检测管, 盖上盖子, 点击【读取标准值】, 完成后取出。
3. 放入标准品 #2 检测管, 盖上盖子, 点击【读取标准值】。
4. 检测完成后, 点击【运行样品】, 将体积设为 10 μL, 浓度单位设为 ng/μL。
5. 点击【读取试管】。浓度要求为 19.9 ng/μL~20 ng/μL, 否则, 重复步骤 2~5。
6. 取出标准品 #2 检测管。重新设置体积为 2 μL, 浓度单位为 ng/μL。
7. 放入样本检测管, 盖上盖子, 点击【读取试管】。此时, 屏幕上会显示检测浓度。
8. 重复步骤 7, 检测剩余样本。

提示

- 如 DNB 数量较多, 建议分批定量, 避免荧光猝灭导致 DNB 浓度定量不准。
- 对于浓度合格标准, FCS PE300 读长 DNB 为 10 ng/uL, 其他读长 DNB 为 8 ng/μL, 浓度不合格需重新制备。
- 如浓度超过 40 ng/μL, FCS PE300 读长 DNB 需用 TE 缓冲液稀释至 20 ng/μL 后使用, 其他读长 DNB 需用 DNB 加载缓冲液 I 稀释至 20 ng/μL 后使用。

适用范围

制备DNB

测定DNB浓度

准备载片与测序试剂槽

加载DNB

装载测序试剂槽与载片

开始测序

清洗维护

准备载片与测序试剂槽

1. 从 $-25^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出载片，将载片从包装彩盒中取出，此时不要拆开真空包装袋，将载片在室温环境下放置至少 60 min（不超过 24 h），使用前再打开载片真空包装袋，确认载片完整后，开始 DNB 加载。

提示

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

2. 取出测序试剂槽，待融化后，颠倒混匀 3 次。接着，将试剂槽置于正前方，前后左右剧烈晃动 10~20 次，直至试剂中无肉眼可见的分层，尤其是 9 号和 10 号试剂。

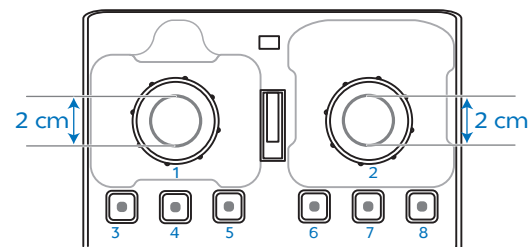
提示

- 如进行 PE200 测序，需取出补充装试剂。
- 如 10 号孔中发现墨绿色结晶，表示该孔位试剂原料析出，属于正常现象。待试剂融化，混匀溶解结晶后即可正常使用，不会影响测序质量。详细内容，参考 *MGISEQ-2000RS 高通量（快速）测序试剂套装使用说明书*。

3. 打开试剂槽盖板，用无尘纸擦干冷凝水。

4. 取出 dNTPs 混合液和 dNTPs 混合液 II，室温融化后置于冰盒上备用，加样前需使用漩涡振荡器振荡混匀 5 s，短暂离心后再使用。使用前取出 DNA 聚合酶混合液置于冰盒上备用，加样前需颠倒混匀 4~6 次。

5. 用 1 mL 吸头在 1 号和 2 号孔边缘分别戳出一个直径约 2 cm 的孔。



6. 根据不同试剂槽，将如下试剂加入新的 5 mL 或 10 mL 的灭菌管内混匀，再分别加入 1 和 2 号孔：

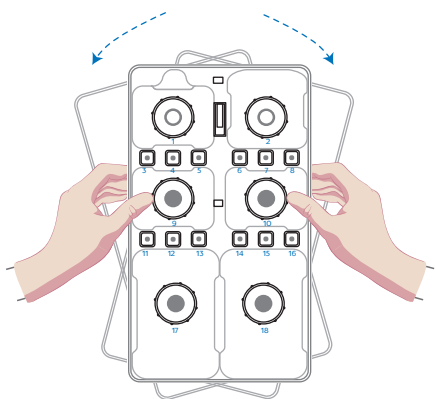
测序试剂盒读长	1 号孔		2 号孔	
	dNTPs 混合液	dNTPs 聚合酶混合液	dNTPs 混合液 II	DNA 聚合酶混合液
FCL SE50	0.700 mL	0.700 mL	0.600 mL	0.600 mL
FCL SE100	1.100 mL	1.100 mL	0.900 mL	0.900 mL
FCL PE100	1.800 mL	1.800 mL	1.500 mL	1.500 mL
FCL PE150	2.400 mL	2.400 mL	2.100 mL	2.100 mL
FCL SE400	4.000 mL	4.000 mL	12.000 mL	4.000 mL
FCL PE200	3.800 mL	3.800 mL	5.700 mL	3.800 mL
FCL SE50 (small RNA)	0.700 mL	0.700 mL	0.600 mL	0.600 mL
FCS SE100	0.800 mL	0.800 mL	1.600 mL	0.800 mL
FCS PE100	1.400 mL	1.400 mL	2.800 mL	1.400 mL
FCS PE150	1.900 mL	1.900 mL	3.800 mL	1.900 mL
FCS PE300	3.800 mL	3.800 mL	5.700 mL	3.800 mL

测序试剂盒读长	加样孔位	补充试剂全称
FCL PE200	17	CPAS 洗脱试剂 1 V2.0
	18	CPAS 洗脱试剂 2
	9	CPAS 再生试剂

适用范围 制备DNB 测定DNB浓度 准备载片与测序试剂槽 **加载DNB** 装载测序试剂槽与载片 开始测序 清洗维护

提示

- 需严格按照表格顺序加样补充试剂，且每添加一种补充试剂后，需及时更换新的手套，再添加下一种。
 - 测序洗脱试剂中包含高浓度甲酰胺，是一种可能具有生殖毒性，致癌性及特异性靶器官系统毒性的化学品。使用时注意避免吸入蒸汽，并戴防护手套、穿防护服、戴防护眼罩或防护面具。使用后的试剂需按照当地和国家法规进行废弃处理。
7. 用配套的透明封口膜将加样孔封住，切勿盖住孔位中心位置，避免影响试剂针下降。
8. 试剂槽水平放置，双手握住两侧。顺时针摇晃 10~20 次，再逆时针摇晃 10~20 次，确保肉眼可见旋涡，直至 1 号试剂上下层试剂中颜色均匀一致，保证试剂充分混匀。



9. 根据不同测序方案，进行额外加样：

- 对于 PE 测序，取出 MDA 聚合酶混合液和 MDA 试剂，将 500 μ L MDA 聚合酶混合液加入到 MDA 试剂的试剂管中。颠倒混匀 4~6 次至充分混匀后，全部转移至 15 号孔中，避免引入气泡。
- 对于 Small RNA 测序，取 4.50 mL Small RNA 测序洗脱试剂，混匀后加入 7 号孔，并选择测序方案 SE50_sR。

- 对于 FCL SE400 测序，取出测序洗脱试剂充分混匀后，用枪头戳破 7 号孔添加 2.70 mL 到 7 号孔位中，确保孔位底部无气泡。
- 对于 PE 双 Barcode 测序，取 2.90 mL 的 CPAS AD153 条形码引物 3 工作液，混匀后加入到 4 号孔位中，避免引入气泡。
- 对于 SE 双 Barcode 测序，取出 cPAS 条形码引物 4 试剂盒中的 cPAS AD153 条形码引物 4 工作液，室温融化，充分混匀后，用枪头戳破 4 号孔添加 2.90 mL cPAS AD153 条形码引物 4 工作液至 4 号孔位中，确保孔位底部无气泡。

加载DNB

以下内容是使用MGISEQ-2000RS加载DNB。

1. 按照下表选择合适的仪器。

仪器	选择条件	
	每条 lane 同一样本	每条 lane 不同样本
测序仪	√	×
MGIDL-200RS	√	√
MGIDL-200H	√	√

提示

- 关于使用 MGISEQ-200RS 加载 DNB，参考 *MGIDL-200RS 全自动样本加载系统产品说明书*。
- 关于使用 MGIDL-200H 便携式加样器加载 DNB，参考 *MGIDL-200H 便携式加样器快速操作指南*。

2. 根据读长不同，取 0.5 mL 冻存管，准备 DNB 加载体系：

适用范围

制备DNB

测定DNB浓度

准备载片与测序试剂槽

加载DNB

装载测序试剂槽与载片

开始测序

清洗维护

	制备 FCS PE300 读长 DNB		制备其他读长 DNB	
	FCS PE300 加入量	FCL 加入量	FCS 加入量	
DNB 加载缓冲液 IV	45 μ L	/	/	
DNB	90 μ L	200 μ L	100 μ L	
DNB 加载缓冲液 II	/	64 μ L	32 μ L	
DNB 聚合酶混合液 II (LC)	/	2 μ L	1 μ L	
总体积	135 μ L	266 μ L	133 μ L	

提示

如发现 DNB 加载缓冲液 II 中有结晶，使用漩涡振荡器持续剧烈振荡约 1~2 分钟至沉淀重新溶解，短暂离心后方可使用。

3. DNB 加载体系配制完成后，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。
- 该 DNB 加载体系要现配现用。

4. 输入用户名【user】，密码【123】，点击【登录】进入主界面。

5. 点击【测序】，进入样本信息输入界面。

6. 输入或扫码录入【DNB ID】，并在【DNB ID】右侧选择相应的 barcode。如有多种 DNB，则点击 barcode 右侧的 ⊕ 展开每条 lane 的信息，并分别填写。

7. 打开试剂仓门，将装有待加载 DNB 的 0.5 mL 冻存管放入样本管架，并缓慢放下取样针，确保针头在冻存管底部。完成后，关闭仓门。

8. 勾选【DNB 加载】复选框。

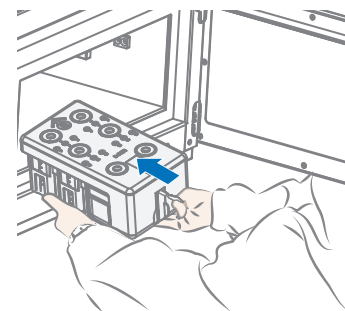
9. 在测序方案下拉菜单中选择所需测序方案。

10. 点击【下一步】。

装载测序试剂槽与载片

装载测序试剂槽

- 将光标放置在【试剂槽 ID】待写区，用条码扫描枪扫描试剂槽条码录入试剂槽信息。若扫码无效，可手动输入。
- 取出清洗试剂槽。用无尘纸擦拭试剂仓底部及侧面的冷凝水，保持干燥和干净。
- 按照测序试剂槽盖板指示方向，把准备好的测序试剂槽轻轻推进试剂仓，直到推到底部并确认完全放入。



提示

试剂仓左侧为试剂槽 A，右侧为试剂槽 B。单载片测序时试剂槽装载位置必须与载片放置位置一致。

4. 关闭试剂仓门，点击【下一步】。

装载载片

- 打开载片仓门，一手压住清洗载片两侧，一手按下载片吸附按钮，待真空释放后，从平台上取出清洗载片。

适用范围 制备DNB 测定DNB浓度 准备载片与测序试剂槽 加载DNB 装载测序试剂槽与载片 开始测序 清洗维护

- 用空气罐吹净载片平台和载片背面的灰尘。如平台表面有可见结晶，用 75% 酒精润湿的无尘纸轻轻擦拭，并检查密封垫是否完好。
- 取出新的载片，两孔位置在左侧，一孔位置在右侧，标签位置靠右，双手握住载片两端。
- 载片孔位对应定位柱放置，同时向左上角 45° 轻轻推动，保持载片空位内壁与定位柱贴合，按下载片吸附按钮，将载片边框左右两边同时按下，使载片吸附在平台上。

提示

载片硅片脆弱，轻触定位柱即可。按下载片时如与定位柱过度摩擦，则可能使硅片碎裂。

- 检查确认负压在正常范围内（-80~-99 kPa）。
如负压出现异常，参考 *MGISEQ-2000RS 高通量（快速）测序试剂套装使用说明书* 中 10.2 负压异常进行处理。
- 用空气罐吹净载片表面的灰尘后，关闭载片仓门。
- 点击【下一步】，仪器会自动录入载片 ID。
若无法自动录入，则手动输入。

开始测序

- 复核各项信息，确保准确无误。
- 点击【开始】，弹窗中点击【是】，仪器开始测序。
- 开始测序后，立即打开载片仓门，确保样本或试剂进入载片后，关闭载片仓门。

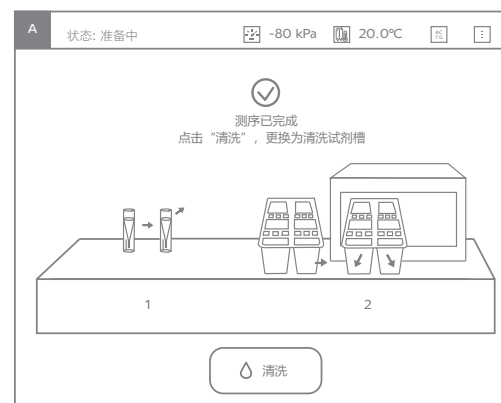
提示

为保证测序质量，在完成一链和二链的测序后，测序仪会自动多测一个循环用于校正。例如，对于 PE100 的双 barcode 测序方案，一链读长为 100，二链读长为 100，barcode 读长为 10，dual barcode 读长为 10，一链校正循环为 1，二链校正循环为 1，barcode 部分无需做校正，因此总测序读长为 222。

清洗维护

准备清洗

- 测序完成后，出现以下界面时，可进行清洗。需在 24 小时内进行清洗维护。



- 根据具体情况，选择清洗方案。

清洗方案	描述
全套清洗维护 1/ 全套清洗维护 2	<ul style="list-style-type: none"> 使用测序仪加载样本或进行 PE 测序后。 更换管路、试剂针等与试剂进行接触的配件，使用测序仪前。 开机状态下，仪器超过 7 天以上未进行使用，使用测序仪前。 需进行 7 天以上的断电处理，在断电前后均需执行。 载片出现明显杂质，并排除其他因素后。
常规清洗	<ul style="list-style-type: none"> 全套清洗维护完成后，超过 12 小时未进行上机，则需在上机前再次进行。 工程师检修后。 除全套清洗维护与深度清洗执行情况外的其他情况。



提示

- 全套清洗维护 1 的作用包含全套清洗维护 2。
- 全套清洗维护 2 需搭配脚本 StandardMPS_V1.6.1.04 版本及以上使用。

3. 根据不同清洗方案，确定清洗步骤。

清洗方案	描述	时间
常规清洗	清洗试剂槽 1	约 48 分钟
全套清洗维护 1	执行以下步骤： ① 清洗试剂槽 3 ② 清洗试剂槽 2 ③ 清洗试剂槽 1	约 76 分钟
全套清洗维护 2	执行以下步骤： ① 清洗试剂槽 4 ② 清洗试剂槽 1	约 42 分钟

提示

- 常规清洗目的是清洗管道中残留的试剂，降低试剂污染的风险，同时对试剂管路进行排空。
- 全套清洗维护 1 或全套清洗维护 2 的目的是清洗管道中残留试剂和蛋白等，降低管道阻塞。

4. 根据清洗步骤，确定所需清洗试剂槽。

名称	2.0 mL 冻存管	大孔位	15 号小孔位	其余小孔位
清洗试剂槽 1	95% 以上体积的实验室级用水			
清洗试剂槽 2	1800 μL 清洗试剂 3	50 mL 清洗试剂 3	6 mL 清洗试剂 3	6 mL 清洗试剂 3
清洗试剂槽 3	1800 μL 清洗试剂 2	50 mL 清洗试剂 1	6 mL 清洗试剂 2	6 mL 清洗试剂 1
清洗试剂槽 4	1800 μL 清洗试剂 4	50 mL 清洗试剂 4	6 mL 清洗试剂 4	6 mL 清洗试剂 4

提示

- 大孔位: 第 1、2、9、10、17、18 号孔。
- 小孔位: 第 3、4、5、6、7、8、11、12、13、14、15、16 号孔。

5. 根据清洗试剂槽所需试剂，配制清洗试剂。

清洗试剂类型	试剂组分	加入量 (mL)
清洗试剂 1 (0.05% Tween-20)	100% Tween-20	0.5
	实验室级用水	999.5
清洗试剂 2 (1 M NaCl+0.05% Tween-20)	5 M NaCl 溶液	200
	100% Tween-20	0.5
	纯水	799.5
清洗试剂 3 (0.1 M NaOH)	2 M NaOH 溶液	50
	实验室级用水	950
清洗试剂 4 (0.05% Tween-20+0.03% ProClin300)	100 % Tween-20	0.5
	100 % ProClin300	0.3
	实验室级用水	999.2

提示

- 粉末配制的试剂，需经 0.22 μm 过滤膜过滤后使用。
- 可将清洗试剂装入挤瓶中储存，使用前再加入清洗试剂槽中。如清洗试剂置于 4 °C 保存，有效期为 28 天。

6. 配制完成后，根据步骤 4 的清洗试剂槽信息表，添加试剂至冻存管及相应孔位。

进行清洗

1. 根据所选清洗类型，取出准备好的清洗试剂槽与清洗载片。
2. 在载片平台上放置清洗载片。
3. 在试剂仓中放入清洗试剂槽。
4. 选择清洗程序，点击【清洗】。