



概述

本快速操作指南用于指导快速使用 MGISEQ-2000RS 测序试剂及仪器。

可选试剂套装信息如下表：

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

提示

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



制备DNB

文库插入片段大小要求

文库类型	片段范围	主带
环状 ssDNA	20 bp~800 bp	±100 bp 以内

文库浓度及所需量的要求

文库类型	初始文库ssDNA 浓度要求 (fmol/ μ L)
一般文库 (WGS, WES, RNASeq...)	≥2
Small RNA	≥3
PCR free 文库	≥3.75

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/ μ L)。然后根据下列公式换算成 (fmol/ μ 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)。
- 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。

计算DNB反应体系数量

加载仪器	可加载样本种类	DNB 体积 (μ L/lane)		DNB 制备体积 (μ L/lane)		反应体系数量	
		FCS PE300	其他读长	FCS PE300	其他读长	FCL 载片	FCS 载片
MGISEQ-2000RS	1	45	50	90	100	2	1
MGIDL-200H	1-4	22.5	25	45	100	1-4	1-2

计算ssDNA文库所需量

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

文库类型	文库体积/90 μ L 体系	文库体积/45 μ L 体系	文库体积/100 μ L 体系
常规	V=40 fmol/C	V=20 fmol/C	V=40 fmol/C
Small RNA	V=60 fmol/C	V=30 fmol/C	V=60 fmol/C
PCR free 文库	V=75 fmol/C	V=37.5 fmol/C	V=75 fmol/C

提示

所有样本均视为有潜在感染性的物品, 操作时需按国家相关标准执行。

制备DNB

提示

可在此步骤开始前取出载片和测序试剂槽进行解冻。具体解冻时间, 参考第 7 页“准备测序试剂槽”。

- 按照下表处理文库和试剂。

名称	步骤1)	步骤2)	步骤3)
文库	/	/	
DNB聚合酶混合液I	置于冰上解冻30 min		
TE缓冲液		涡涡振荡	置于冰盒上待用
DNB制备缓冲液	置于室温解冻30 min	混匀5 s,	短暂离心
DNB终止缓冲液			

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。

- 取 0.2 mL 八联管或 PCR 管, 按下表在冰上配制反应体系 1。

提示

请按下表所列顺序进行加样。

组分	FCS PE300 读长 DNB		其他读长 DNB
	加入量 (μ L) /90 μ L 体系	加入量 (μ L) /45 μ L 体系	加入量 (μ L) /100 μ L 体系
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



- 将反应体系混匀并短暂离心，置于冰盒上待用。
- 按照下表设置 PCR 仪反应条件，将反应体系 1 置于 PCR 仪中进行引物杂交反应。

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。

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

- 取出 DNB 聚合酶混合液 II (LC)，短暂离心 5 s 后，置于冰盒上待用。
- PCR 仪达到 4 °C 后，取出 PCR 管，短暂离心 5 s 后，置于冰盒上。
- 根据以下不同情况，向 PCR 管加入试剂，配制反应体系 2。

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

- 将反应体系混匀并短暂离心，置于冰盒上待用。
- 按照下表设置 PCR 仪反应条件，将反应体系 2 置于 PCR 仪中进行滚环扩增反应。

提示

如使用步骤 4 中的 PCR 仪，需提前将热盖进行降温。建议使用另外一台 PCR 仪。

FCS PE300 DNB 制备滚环扩增条件			
温度	35 °C (热盖)	30 °C	4 °C
时间	On	15 min	Hold

其他读长 DNB 制备滚环扩增条件			
温度	35 °C (热盖)	30 °C	4 °C
时间	On	25 min	Hold

- PCR 仪到达 4 °C 后，立即取出 PCR 管置于冰盒上。
- 根据以下不同情况，向 PCR 管加入试剂，并用阔口、不带滤芯的吸头缓慢吸打混匀 5-8 次。

提示

混匀时，注意缓慢吸取 DNB 后悬在液面上方，缓慢地一滴一滴地滴下即可，注意避免出现气泡。

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	10 μL	5 μL	20 μL

- 制备好的 FCS PE300 读长的 DNB 可置于 2 °C ~ 8 °C 保存备用，并在 4 小时内使用。
制备好的其他读长的 DNB 可置于 2 °C ~ 8 °C 保存备用，并在 48 小时内使用。

提示

请勿将 DNB 放在其他温度下保存。DNB 放置后再次使用前需要使用阔口吸头吹打混匀 5-8 次。

测定 DNB 浓度

配制 Qubit 检测工作液

- 从 Qubit ssDNA Assay Kit 试剂盒中取出 Qubit ssDNA Reagent、Qubit ssDNA Standard #1 和 Qubit ssDNA Standard #2，漩涡振荡混匀 5 s，短暂离心后置于室温待用。

提示

Qubit ssDNA Reagent 需避光融化后混匀。

- 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)

- 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。
- 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。
- 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。

制备DNB

加载DNB

准备测序试剂槽

测序前准备

进行测序

进行后期清洗

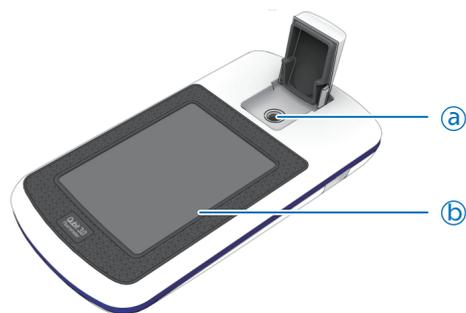
查看结果

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, 以防管壁温度过高或过低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 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。
5. 点击【读取试管】。浓度要求为 19.9 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ~20 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 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 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。
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 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 其他读长 DNB 为 8 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 浓度不合格需重新制备。

9. (可选) 如浓度超过 40 $\text{ng}/\mu\text{L}$, FCS PE300 读长 DNB 需用 TE 缓冲液稀释至 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 后使用, 其他读长 DNB 需用 DNB 加载缓冲液 I 稀释至 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 后使用。

型号	组分	存储条件	存储时间
FCS PE300	TE缓冲液	4 °C	≤4 h
其他	DNB加载缓冲液I	4 °C	≤48 h

制备DNB **加载DNB** 准备测序试剂槽 测序前准备 进行测序 进行后期清洗 查看结果

加载DNB

按照下表选择合适的仪器。

仪器	条件	
	每条 lane 同一样本	每条 lane 不同样本
MGISEQ-2000RS	√	×
MGIDL-200H	√	√

准备载片

从 -25 °C ~ -15 °C 冰箱中取出载片包装盒，再取出载片，在室温环境下放置 1 h~24 h。使用前，撕开载片真空包装袋，确认载片完整后，再开始 DNB 加载。

提示

- 如载片置于室温未超过 24 小时，且真空包装袋完好无损，暂不使用时，可放回 -25°C ~ -15°C 保存，但 -25°C ~ -15°C 与室温的环境切换不得超过 3 次。
- 如真空包装袋已撕开但暂不使用，可置于室温保存，并在 24 小时之内使用。如超过 24 小时，不建议使用。

使用测序仪加载DNB

1. 按照下表处理试剂。

型号	名称	步骤1)	步骤2)	步骤3)
FCS PE300	DNB加载缓冲液 IV	置于冰上解冻 30 min	漩涡振荡混匀 5 s, 短暂离心	置于冰盒上待用
FCS PE300 之外的读长	DNB加载缓冲液 II	置于冰上解冻 30 min	漩涡振荡混匀 5 s, 短暂离心	置于冰盒上待用

提示

在测序仪上加载 FCS PE300 读长的 DNB 时，确保控制软件版本在 1.6.2.1653 及其以上，BaseCall 软件版本在 1.4.0.257 及其以上。

2. 取新的 0.5 mL 冻存管，根据型号准备 DNB 加载体系：

提示

表中的总体积为一张载片的用量。

名称	DNB 加载体系 (FCS PE300)		
	FCS 加入量 (μL)	FCL 加入量 (μL)	FCS 加入量 (μL)
DNB 加载缓冲液 IV	45	/	/
DNB	90	200	100
DNB 加载缓冲液 II	/	64	32
DNB 聚合酶混合液 II (LC)	/	2	1
总体积	135	266	133

3. 完成后，用阔口、不带滤芯的吸头缓慢吹打混匀 5~8 次。

提示

该 DNB 加载体系要现配现用。

使用MGIDL-200H加载DNB

提示

具体操作，参考 MGIDL-200H 便携式加样器快速操作指南。

1. 按照下表处理试剂。

型号	名称	步骤1)	步骤2)	步骤3)
FCS PE300	DNB 加载缓冲液 IV	置于冰上解冻 30 min	漩涡振荡混匀 5 s, 短暂离心	置于冰盒上待用
其他型号	DNB加载缓冲液 II			

2. 取新的八联管，根据型号准备 DNB 加载体系：

提示

表中的总体积为一张载片的用量。

名称	DNB 加载体系 (FCS PE300)			DNB 加载体系 (其他读长)
	FCS PE300 加入量 (μL)	FCL 加入量 (μL)	FCS 加入量 (μL)	FCS 加入量 (μL)
DNB 加载缓冲液 IV	22.5	/	/	/
DNB	45	100	50	
DNB 加载缓冲液 II	/	32	16	
DNB 聚合酶混合液 II (LC)	/	1	0.5	
总体积	67.5	133	66.5	

3. 完成后，用阔口、不带滤芯的吸头缓慢吹打混匀 5~8 次。

提示

该 DNB 加载体系要现配现用。

制备DNB

加载DNB

准备测序试剂槽

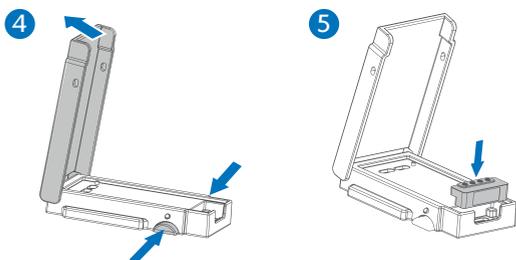
测序前准备

进行测序

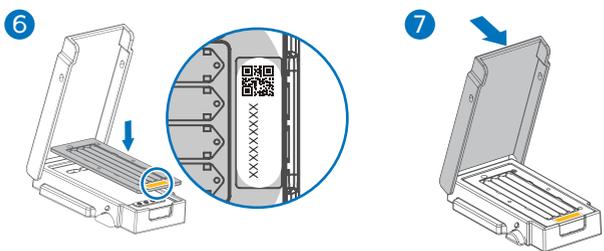
进行后期清洗

查看结果

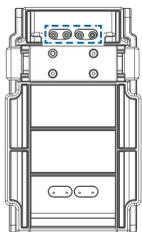
- 按住两侧卡扣打开加样器盖板。
- 将密封垫放置在密封垫槽中，确保密封垫平整。



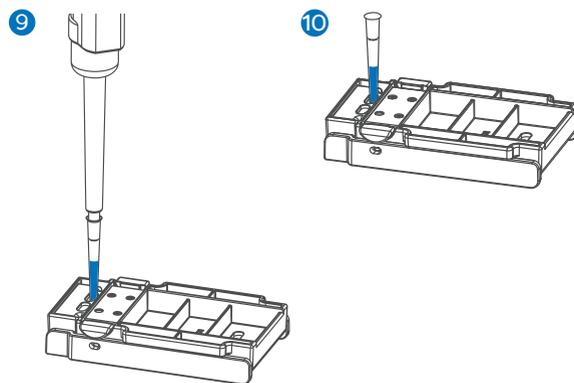
- 将测序载片上的定位孔对准定位柱，并放置在加样器中。
- 盖上盖板，确认盖板已盖紧。



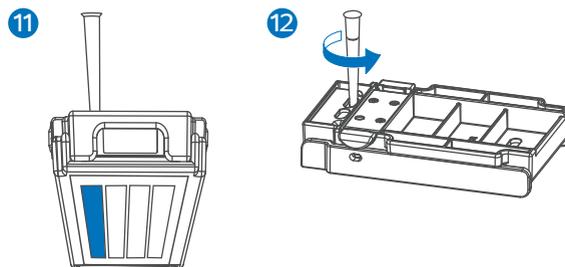
- 使加样器背面朝上，检查流路入口与密封垫中的孔是否对齐，确保无异物堵塞。



- 使用扩口吸头，用移液枪吸取 30 μL DNB 样本，将移液枪吸头插入流路入口中。
- 按下移液枪上相应按钮卸载吸头，样本自动流入载片中。

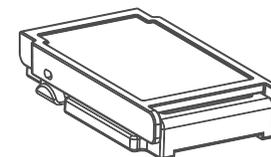


- 将加样器水平举高（与实验桌平行），查看载片中是否充满样本。
- 确保样本加载完成后，逆时针旋转拔出吸头。

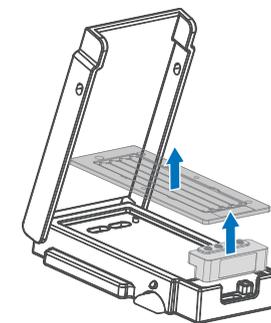


- 重复步骤 9~12 将样本加载到载片上其他流路。

- 将加样器正面朝上，按照不同读长处理加载后的 DNB：
 - FCS PE300 读长的 DNB 加载后，建议将载片保留在加样器中，在 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下放置 60-90 min，立即转移到测序仪上使用。
 - FCS PE300 之外的读长的 DNB 加载后，水平放置 30 min 待用。



- 打开盖板，取出载片和密封垫。



制备DNB

加载DNB

准备测序试剂槽

测序前准备

进行测序

进行后期清洗

查看结果

准备测序试剂槽

- 取出测序试剂槽。
- 参考下表，根据型号选择适合的解冻方法。确保试剂槽中的试剂完全融化。

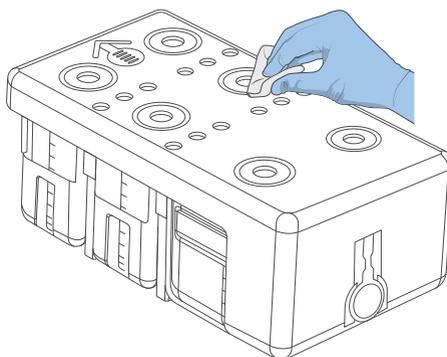
型号	解冻方法		
	常温水浴 (h)	提前一晚2 °C~8 °C冰箱解冻, 再常温水浴 (h)	2 °C~8 °C 冰箱 (h)
FCL SE50	2.0	0.5	24.0
FCL SE100	2.0	0.5	24.0
FCL SE400	8.0	3.0	48.0
FCL PE100	3.0	1.5	36.0
FCL PE150	5.0	2.0	48.0
FCL PE200	6.0	3.5	48.0
FCS SE100	1.0	0.5	24.0
FCS PE100	2.0	0.5	36.0
FCS PE150	3.0	1.5	36.0
FCS PE300	6.0	3.5	48.0

- 使用前颠倒混匀试剂槽 3 次，再将试剂槽置于正前方，前后左右剧烈摇晃 10~20 次，确保试剂充分混匀，尤其是 9 号和 10 号试剂。

提示

- 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。
- 由于 PE300 试剂槽装量较满，使用前请确保充分混匀。

- 使用无尘纸擦净盖板及孔位处的冷凝水。

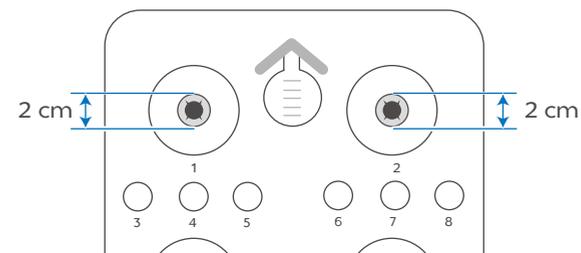


- 提前 1 小时取出 dNTPs 混合液和 dNTPs 混合液 II，室温融化后置于冰上或 2 °C ~8 °C 备用。
- 使用前取出 DNA 聚合酶混合液，置于冰上或 2 °C ~8 °C 备用。
- (可选) 根据不同型号进行相应操作：
 - PE 测序
取出 MDA 试剂置于冰上或 2 °C ~8 °C 备用。
 - FCL SE50 (Small RNA) 或 FCL SE400 测序
取出 Small RNA 测序洗脱试剂或测序洗脱试剂，室温融化后置于冰上或 2 °C ~8 °C 备用。
 - SE 双 Barcode 测序
取出 cPAS 条形码引物 4 试剂盒中的 cPAS AD153 条形码引物 4 工作液，室温融化后置于冰上或 2 °C ~8 °C 备用。
 - PE 双 Barcode 测序

取出 cPAS 条形码引物 3 试剂盒中的 cPAS AD153 条形码引物 3 工作液，室温融化后置于冰上或 2 °C ~8 °C 备用。

- 配制 1 号孔试剂。

- 使用洁净的 1 mL 吸头，在 1 号和 2 号孔中间分别戳出一个直径约 2 cm 的孔。



- 确保 dNTPs 混合液已完全融化。
- dNTPs 混合液漩涡振荡 5 秒，并短暂离心。
- 按照下表中的体积，将 dNTPs 混合液加入新的 5 mL 或 15 mL 灭菌管内。

型号	1 号孔	
	dNTPs 混合液 (mL)	DNA 聚合酶混合液 (mL)
FCL SE50	0.700	0.700
FCL SE50 (small RNA)	0.700	0.700
FCL SE100	1.100	1.100
FCL SE400	4.000	4.000
FCS SE100	0.800	0.800
FCL PE100	1.800	1.800
FCL PE150	2.400	2.400
FCL PE200	3.800	3.800

制备DNB

加载DNB

准备测序试剂槽

测序前准备

进行测序

进行后期清洗

查看结果

型号	1号孔	
	dNTPs 混合液 (mL)	DNA 聚合酶混合液 (mL)
FCS PE100	1.400	1.400
FCS PE150	1.900	1.900
FCS PE300	3.800	3.800

- ⑤ DNA 聚合酶混合液颠倒混匀 4-6 次。
- ⑥ 按照上表中的体积，将 DNA 聚合酶混合液加入管内的 dNTPs 混合液中。
- ⑦ 将混合液轻轻颠倒混匀 4-6 次。
- ⑧ 将混合液全部加到 1 号孔中。

提示

转移混合液时，小心操作，防止混合液从灭菌管中溢出。

9. 配制 2 号孔试剂。

- ① 确保 dNTPs 混合液 II 已完全融化。
- ② dNTPs 混合液 II 漩涡振荡 5 秒，并短暂离心。
- ③ 按照下表中的体积，将 dNTPs 混合液 II 加入新的 5 mL、15 mL 或 25 mL 灭菌管内。

型号	2号孔	
	dNTPs 混合液 II (mL)	DNA 聚合酶混合液 (mL)
FCL SE50	0.600	0.600
FCL SE50 (small RNA)	0.600	0.600
FCL SE100	0.900	0.900
FCL SE400	12.000	4.000
FCS SE100	1.600	0.800
FCL PE100	1.500	1.500
FCL PE150	2.100	2.100

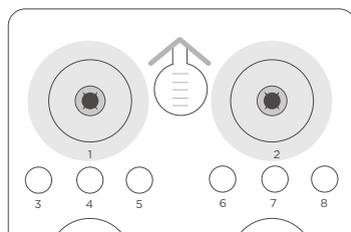
型号	2号孔	
	dNTPs 混合液 II (mL)	DNA 聚合酶混合液 (mL)
FCL PE200	5.700	3.800
FCS PE100	2.800	1.400
FCS PE150	3.800	1.900
FCS PE300	5.700	3.800

- ④ DNA 聚合酶混合液颠倒混匀 4-6 次。
- ⑤ 按照上表中的体积，将 DNA 聚合酶混合液加入管内的 dNTPs 混合液 II 中。
- ⑥ 将混合液轻轻颠倒混匀 4-6 次。
- ⑦ 将混合液全部加到 2 号孔中。

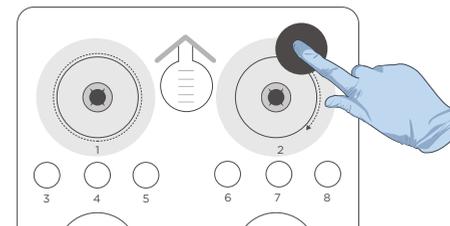
提示

转移混合液时，小心操作，防止混合液从灭菌管中溢出。

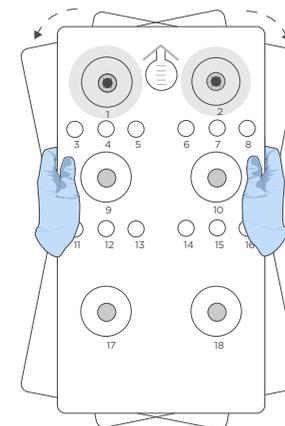
10. 使用配套的透明封口膜将 1 和 2 号孔封住。



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



12. 试剂槽水平放置在桌面上，双手握住两侧，顺时针摇晃 10-20 次，再逆时针摇晃 10-20 次，确保试剂的充分混匀。



13. 撕掉 1 号和 2 号孔位的封口膜弃用。

提示

- 撕下的封口膜严禁重复使用。
- 注意 1 号和 2 号孔的试剂不要交叉污染。

制备DNB

加载DNB

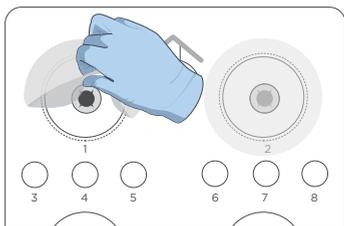
准备测序试剂槽

测序前准备

进行测序

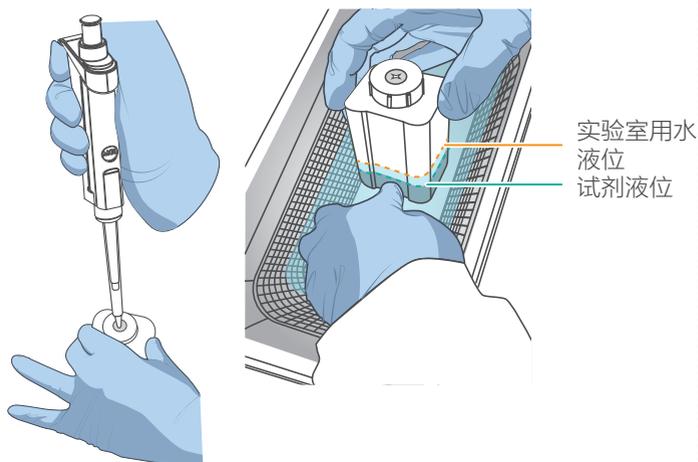
进行后期清洗

查看结果



14. 推荐按照以下步骤处理 10 号孔试剂:

- ① 打开试剂槽盖板, 取出 10 号孔中的试剂瓶。
- ② 在超声波清洗仪中放入实验室用水。
超声波清洗仪推荐功率 300 W-600 W, 容量: 10 L-30 L。
- ③ 用吸头戳破封膜。将试剂瓶放入超声波清洗仪, 确保水面没过瓶内试剂液位, 并避免水进入试剂瓶。



- ④ 开启超声波清洗仪, 振动 3-5 分钟。
- ⑤ 完成后, 取出试剂瓶, 避免再摇晃试剂瓶。
- ⑥ 用无尘纸擦去试剂瓶表面的水分。
- ⑦ 将试剂瓶放回试剂槽中, 盖好盖板。

15. 轻轻敲打测序试剂槽, 以减少试剂中的气泡。

提示

此时 FCL SE50/FCL SE100/FCS SE100 单 Barcode 测序试剂槽准备完毕, 可直接进入下一步操作。

16. (可选) 根据不同测序方案, 进行额外加样, 确保孔位底部无气泡。

危险

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。

■ Small RNA 测序

- a. 取出 Small RNA 测序洗脱试剂。
- b. 漩涡振荡 5 秒。
- c. 用吸头戳破 7 号孔。
- d. 吸取 4.50 mL 加到 7 号孔。

■ FCL SE400 测序

- a. 取出测序洗脱试剂。
- b. 漩涡振荡 5 秒。

- c. 用吸头戳破 7 号孔。
- d. 吸取 2.70 mL 加到 7 号孔。

■ PE 测序

提示

使用 MDA 酶混合液或者 MDA 酶混合液 II (具体以试剂管标签上的名称为准) 时, 请勿触摸试剂所在管壁, 以免影响酶的活性。

- a. 用吸头戳破 15 号孔。
- b. 吸取 500 μ L MDA 聚合酶混合液到 MDA 试剂的试剂管中。
- c. 颠倒混匀 MDA 试剂管 4-6 次。
- d. 将混匀液加入 15 号孔中。

■ SE 双 Barcode 测序

- a. 取出 cPAS AD153 条形码引物 4 工作液。
- b. 漩涡振荡 5 秒。
- c. 用吸头戳破 4 号孔。
- d. 吸取 2.90 mL 加到 4 号孔中。

■ PE 双 Barcode 测序

- a. 取出 cPAS AD153 条形码引物 3 工作液。
- b. 漩涡振荡 5 秒。
- c. 用吸头戳破 4 号孔。
- d. 吸取 2.90 mL 加到 4 号孔中。

制备DNB

加载DNB

准备测序试剂槽

测序前准备

进行测序

进行后期清洗

查看结果

测序前准备

登录控制软件

1. 打开仪器电源。
2. 输入计算机开机密码 (123)，登录计算机。
3. 点击主界面的登录图标 。
4. 按照下表确定软件版本,输入对应的用户名和密码,登录控制软件。

项目	用户名	密码
ECR7.0 之前版本	user	123
ECR7.0 之后版本	user	Password123

检查磁盘空间

确保剩余磁盘空间大于 4.6 TB。如空间不足,点击【设备维护】>【清除历史数据】。

检查废液桶

当出现以下一种情况时,及时清空废液桶:

- 废液达到废液桶容量的三分之二
- 废液桶图标变成 

1. 佩戴个人防护装备,包括实验室防护衣,防护眼镜、口罩和手套等,以免吸入废液或废液接触皮肤、粘膜、眼睛,造成伤害。
2. 拧开废液桶的无连接管一端的盖子。
3. 将废液倒入实验室指定的容器中,并按照实验室要求、当地法律法规要求处理废液。
4. 往桶中倒入实验室用水,如有必要,盖上桶盖。轻轻摇晃桶身,直至废液桶所有内表面都已进行冲洗。
5. 将实验室用水倒入指定容器中。
如有必要,重复步骤 4~5。
6. 用棉球蘸 75% 酒精擦拭废液桶表面和桶口,确保无残留废液。
7. 拧紧废液桶的无连接管一端的盖子。

进行预清洗

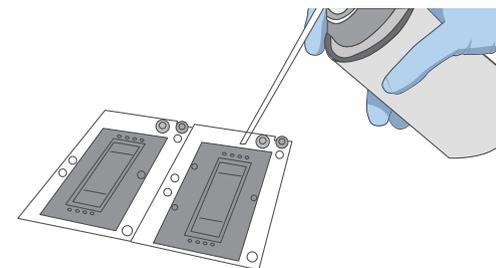
根据具体情况,选择清洗方案。具体清洗方案及步骤,参考第 13 页“测序仪清洗”。

清洁载片平台

所需工具包括:清洗载片、移液枪、无尘布、75% 酒精和压缩空气罐。

1. 打开载片仓门,一只手压住清洗载片两侧,另一只手按下载片吸附按钮,待真空释放后,将清洗载片从载片平台上取下。

2. 用压缩空气罐向载片平台的载台进行吹气,直至其表面无可见的灰尘或杂质。
如载台表面有可见结晶,用无尘布蘸少量无水酒精进行擦拭,并等待自然风干。
擦拭时,避开擦拭载片平台上的真空吸附孔和真空吸附槽,以免 75% 酒精进入孔内,导致仪器损坏。



制备DNB

加载DNB

准备测序试剂槽

测序前准备

进行测序

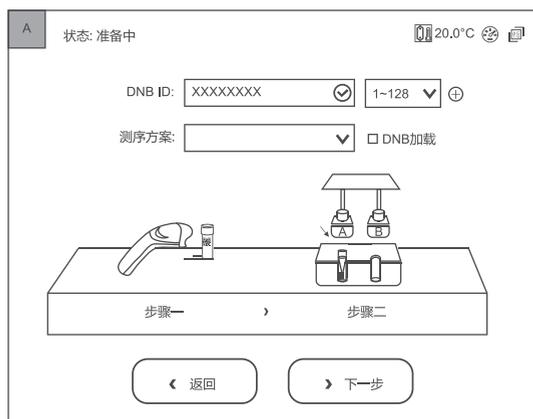
进行后期清洗

查看结果

进行测序

设置测序方案

1. 点击【测序】，进入样本信息输入界面。

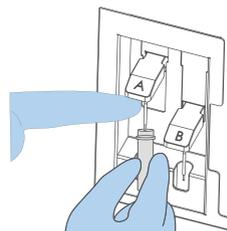


2. 点击【DNB ID】右侧文本框，手动输入 DNB ID，并在【DNB ID】右侧选择相应的 barcode。

如有多种 DNB，则点击右侧的 ⊕ 展开每条 lane 的信息，并分别填写。

3. 如使用测序仪加载 DNB，执行以下操作：

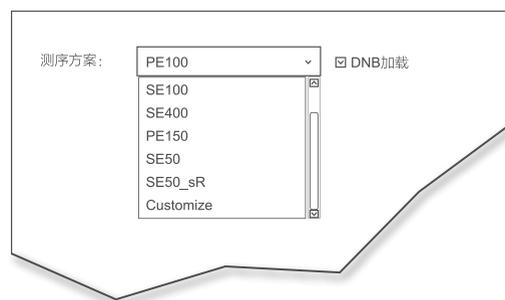
- ① 打开试剂仓门，移除待加载 DNB 的 0.5 mL 冻存管的管盖。
- ② 将冻存管放入样本管座中，按下接头座，确保取样针针头接触到管底部。



③ 勾选【DNB 加载】复选框。

4. 在测序方案下拉菜单中选择所需测序方案。

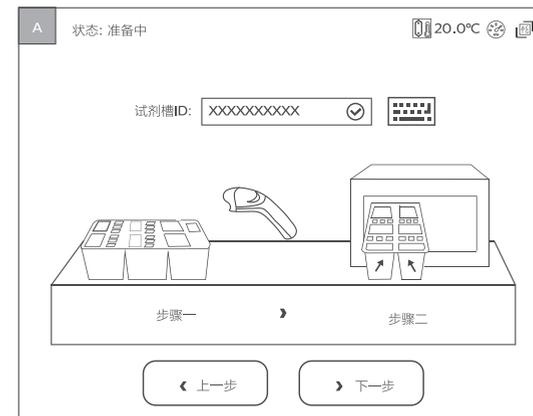
如需自定义测序方案，选择【Customize】，并在自定义参数界面设置相关参数。具体设置方法，参考 *MGISEQ-2000 & MGISEQ-2000RS 基因测序仪软件操作指南*。



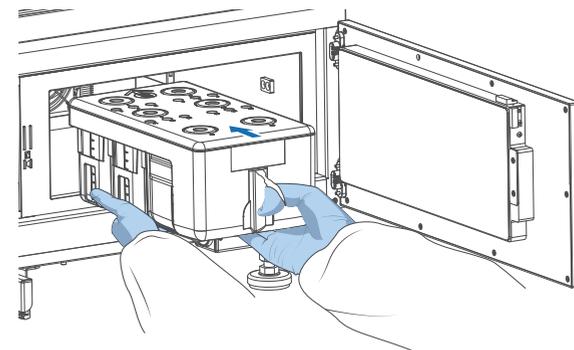
5. 点击【下一步】。

装载测序试剂槽

1. 点击【试剂槽 ID】右侧文本框，手动输入或扫码录入测序试剂槽标签右下角的条形码。



2. 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。
3. 按照测序试剂槽盖板指示方向，把准备好的测序试剂槽放入试剂仓，并推入到底。



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】。

制备DNB

加载DNB

准备测序试剂槽

测序前准备

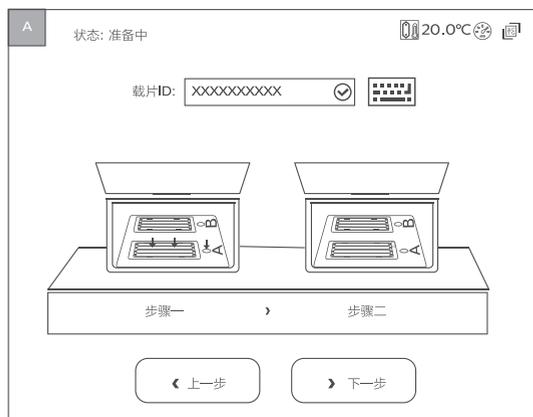
进行测序

进行后期清洗

查看结果

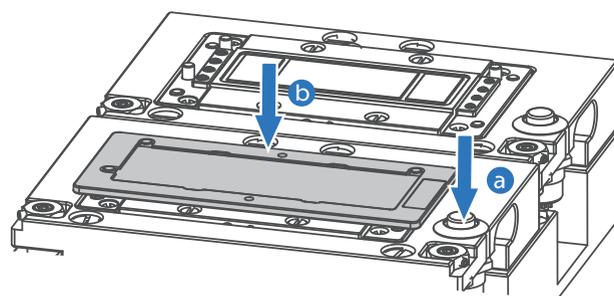
装载载片

- 按下以打开载片仓门，一手按压清洗载片两侧，一手按下载片吸附按钮，待真空释放后，从平台上取下清洗载片。
- 按加载 DNB 的方式选择载片：
 - 如使用测序仪加载 DNB，取出新的载片，撕开载片真空包装袋，确认载片完整。
 - 如使用 MGIDL-200H 加载 DNB，取出已完成加载的载片。
- 点击【载片 ID】右侧文本框，手动输入或扫码录入载片信息。



- 双手握住载片两端，确保两孔位置在左侧，一孔位置在右侧，标签位置靠右。
- 将载片上的定位孔对准载片平台上的定位柱并放下，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，双手同时向下按压载片两边，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。
- 载片安装过程中，避免触碰载片表面。如表面有灰尘，可用压缩空气罐吹干净。

- 检查确认负压在正常范围内（-80 kPa~-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。
- 关闭载片仓门，点击【下一步】。

开始测序

- 复核各项信息，确保准确无误。



- 点击【开始】，在弹窗中点击【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

- 测序过程中请勿撞击仪器，或在仪器周围放置产生震动的设备。否则，可能导致结果不准。
- 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。

制备DNB

加载DNB

准备测序试剂槽

测序前准备

进行测序

进行后期清洗

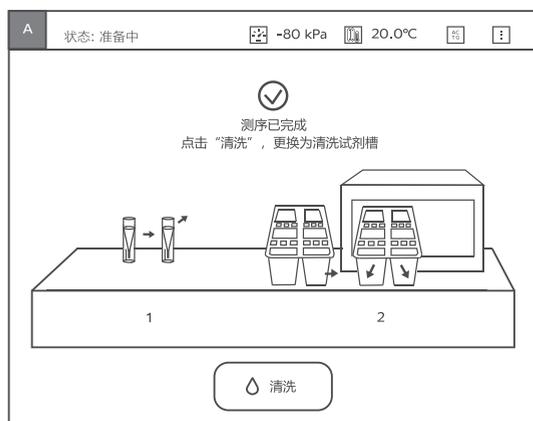
查看结果

进行后期清洗

测序仪清洗

准备清洗

1. 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。



2. 根据具体情况，选择清洗方案。

清洗方案	描述	时间
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。 技术支持更换管路、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。 	<ul style="list-style-type: none"> 全套清洗维护 1: 约 76 分钟 全套清洗维护 2: 约 42 分钟
常规清洗	<ul style="list-style-type: none"> 进行 SE 测序后。 全套清洗维护完成后，超过 24 小时但不到 7 天未进行上机，则需在上机前再次进行。 技术支持更换不与试剂进行接触的配件。 除全套清洗维护与深度清洗执行情况外的其他情况。 	约 48 分钟

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。脚本版本可在 summary report 中查看。
3. 根据清洗方案，确定清洗步骤，并配制清洗试剂槽。

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。
- 每次使用前或每周一次，清空清洗试剂槽中的废弃清洗试剂，再用超纯水冲洗 3 次，自然风干后，重新灌装清洗试剂。
- 持续使用 20 次后或每半年更换新的清洗试剂槽。
- 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。配制好的清洗试剂在未分装的情况下，在 2 °C ~ 8 °C 可保存 28 天。

清洗方案	描述	清洗试剂
常规清洗	清洗试剂槽 1	1000 mL 实验室用水
全套清洗维护 1	① 清洗试剂槽 3	1. 清洗试剂 1 (0.05% Tween-20) : 0.5 mL 100% Tween-20 + 999.5 mL 实验室用水
	② 清洗试剂槽 2	2. 清洗试剂 2 (1 M NaCl+0.05% Tween-20) : 200 mL 5 M NaCl 溶液 +0.5 mL 100% Tween-20+799.5 mL 纯水
	③ 清洗试剂槽 1	清洗试剂 3 (0.1 M NaOH) : 50 mL 2 M NaOH 溶液 +950 mL 实验室级用水
	③ 清洗试剂槽 1	1000 mL 实验室用水

制备DNB

加载DNB

准备测序试剂槽

测序前准备

进行测序

进行后期清洗

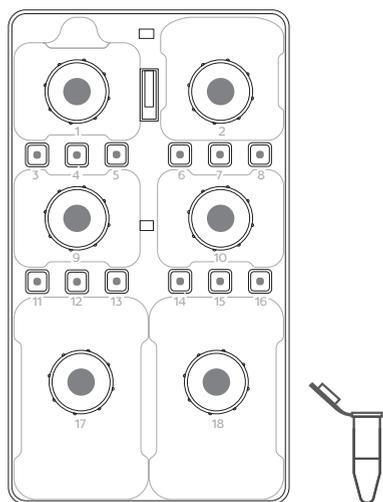
查看结果

清洗方案	描述	清洗试剂
全套清洗 维护 2	① 清洗试剂槽 4	清洗试剂 4 (0.05% Tween-20+0.03% ProClin300) : 0.5 mL 100% Tween-20+0.3 mL 100% ProClin300+999.2 mL 实验室用水
	② 清洗试剂槽 1	1000 mL 实验室用水

清洗试剂槽 1

按下表准备冻存管和清洗试剂槽 1。

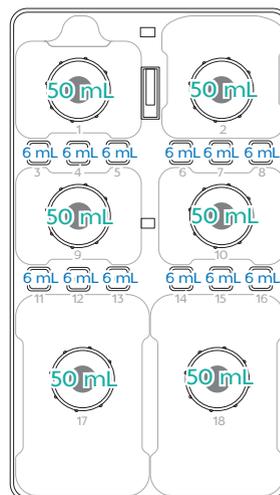
清洗试剂槽 1
(各孔95%以上体积实验室级用水)



清洗试剂槽 2

按下表和图准备清洗试剂、清洗试剂槽 2 和冻存管。

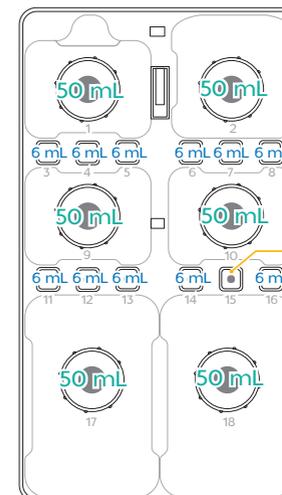
清洗试剂槽 2
(0.1 M NaOH)



清洗试剂槽 3

按下表和图准备清洗试剂、清洗试剂槽 3 和冻存管。

清洗试剂槽 3
(0.05% Tween-20)



6 mL
1 M NaCl+0.05% Tween-20

1.8 mL
1 M NaCl+0.05% Tween-20

制备DNB

加载DNB

准备测序试剂槽

测序前准备

进行测序

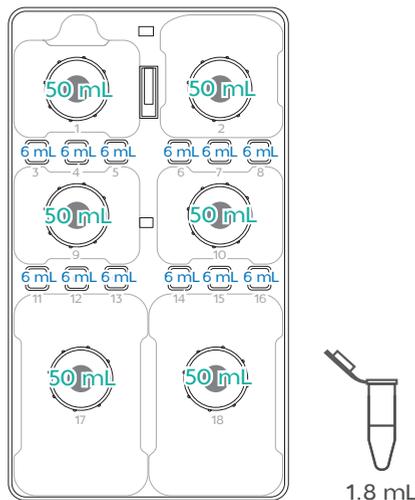
进行后期清洗

查看结果

清洗试剂槽 4

按下表和图准备清洗试剂、清洗试剂槽 4 和冻存管。

清洗试剂槽4
(0.05% Tween-20+0.03% ProClin300)



4. 准备清洗载片。

提示

清洗载片可使用下机后的废旧载片，持续使用 20 次后请进行更换。

进行清洗

1. 根据所选清洗方案，取出准备好的清洗试剂槽与清洗载片。
2. 将载片安装到载片平台上。
3. 将所需的清洗试剂槽放入试剂仓中，关闭所有仓门。

4. 在测序完成界面点击【清洗】。

5. 按照清洗方案在【清洗类型】下拉框中选择对应的清洗类型，点击【清洗】。
6. 根据第 13 页“准备清洗”步骤 3 表中的步骤描述完成清洗。

便携式加样器及密封垫清洁

警告

- 请勿将加样器浸泡清洗，否则可能导致加样器损坏。
- 请勿使用其他消毒液（如二氯乙烷、三氯乙烯、氯仿、甲苯等溶剂）清洗加样器，否则可能导致加样器损坏。
- 建议使用 1 年后，更换便携式加样器（货号：900-000217-00）。
- 若对消毒液的兼容性有疑问，请联系技术支持。

每次加载完成后，按照以下步骤进行清洁：

1. 用无尘布蘸取 75% 酒精擦拭加样器内外表面，再用超纯水擦拭一遍。
2. 用无尘布擦干水分，并等待自然风干。
3. 将使用过的密封垫放入 200 mL 烧杯中，在烧杯中倒入超纯水并进行清洗。
4. 完成后清空烧杯。重复步骤 3-4 两次。
5. 在超声波清洗槽中倒入超纯水，将密封垫放入清洗槽中并清洗约 15 分钟。

6. 重复步骤 3-4，将洗净的密封垫放在干净的容器中，等待自然风干。

7. （可选）出现以下任意一种情况时，请更换新的密封垫（推荐品牌：MGI，货号：510-000718-00）：

- 密封垫清洗 20 次后。
- 密封垫使用满 3 个月。
- 移液枪吸头加载样本时松动。

制备DNB

加载DNB

准备测序试剂槽

测序前准备

进行测序

进行后期清洗

查看结果

查看结果

提示

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

开始测序后,控制软件将在 D 盘中生成测序结果。

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

常见故障

DNB浓度低

当 DNB 浓度低于 8 ng/μL 时,请进行如下操作排查问题:

1. 检查所用试剂盒是否过期。
2. 检查文库是否符合要求。
3. 可订购 DNBSEQ DNB 制备试剂盒(货号: 1000016115)重新制备 DNB。DNB 重新制备后仍不符合要求,请联系技术支持。

负压异常

当负压数值显示为红色时,负压异常,请进行如下操作:

1. 使用 75% 酒精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,确保吸附平台清洁无尘。
2. 使用 75% 酒精润湿的无尘纸或无尘布轻轻擦拭清洗载片吸附面,并用压缩空气罐吹净,确保清洗载片吸附面清洁无尘。
3. 如以上方法仍无法解决负压异常,请联系技术支持。

清洗时产生气泡

1. 检查确认密封垫有无破损、表面是否干净。
2. 在仪器清洗或待机状态,检查进出液块的弹性,确定能上下顺畅移动。
3. 更换一张清洗正常的载片,检查泵液情况。
4. 如仍有较多气泡,请联系技术支持。

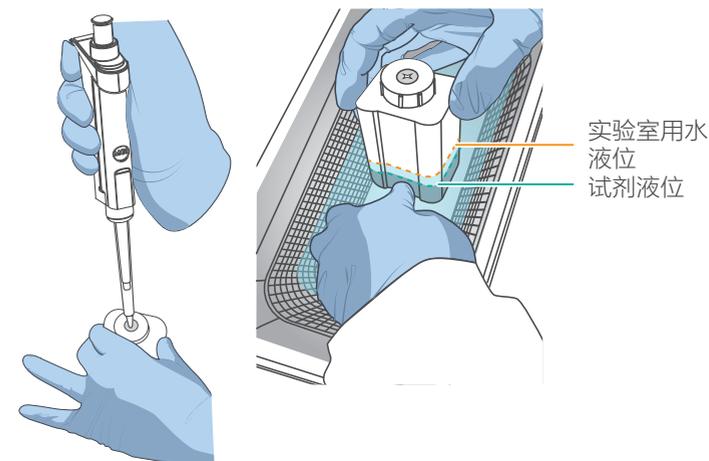
出现杂质

1. 检查确认清洗液原液的质量。
2. 检查确认清洗液的有效日期。
3. 检查确认清洗试剂槽的清洁度及维护情况。
4. 参考相关产品说明书对测序仪进行全套清洗维护。
5. 经过全套清洗维护后仍无改善,请联系技术支持。

测序时出现连续气泡

可能是 10 号孔的 IR 扫描试剂在抽液过程中析出大量气泡,脱气腔无法完全去除。可进行如下操作:

1. 打开试剂槽盖板,取出 10 号孔中的试剂瓶。
2. 在超声波清洗仪中放入实验室用水。
超声波清洗仪推荐功率 300 W-600 W,容量: 10 L-30 L。
3. 用吸头戳破封膜。将试剂瓶放入超声波清洗仪,确保水面没过瓶内试剂液位,并避免水进入试剂瓶。



4. 开启超声波清洗仪,振动 3-5 分钟。
5. 完成后,取出试剂瓶,避免再摇晃试剂瓶。
6. 用无尘纸擦去试剂瓶表面的水分。

制备DNB

加载DNB

准备测序试剂槽

测序前准备

进行测序

进行后期清洗

查看结果

泵液失败

如果载片不过液，进行如下操作：

1. 在保证清洗维护正常的情况下，从测序仪上取下载片，检查密封垫及载片进出液口附近是否有杂质。
2. 如有，用压缩空气罐吹净，并按照本指南第 12 页“装载载片”的正确指导方式安装载片后再重试。
3. 如重试后仍无法正常进行，请联系技术支持。

如测序刚开始出现不过液的情况，进行如下操作：

1. 点击【暂停】，观察载片背面和密封垫附近是否出现毛絮或结晶。
2. 将观察到的信息反馈给技术支持。

试剂盒暂存

- 如试剂盒已经融化（包括dNTPs），dNTPs和MDA 酶混合液或者 MDA 酶混合液 II 等试剂未加入试剂槽中，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 2 °C ~8 °C 下避光保存，并于 24 小时内使用，使用前需要按照第 11 页“装载测序试剂槽”中的操作重新混匀试剂。
- 如 dNTPs 和 DNA 聚合酶混合液已经加入试剂盒中，即试剂盒已经准备完毕，若不能及时使用，可放在

2 °C ~8 °C 内暂存，并于 24 小时内使用，使用前需要按照第 11 页“装载测序试剂槽”中的操作重新混匀试剂。

- 如 dNTPs 和 DNA 聚合酶混合液已经加入试剂槽中，即试剂槽已经准备完毕，且已经在仪器上下针，若不能及时使用，务必使用锡箔纸或保鲜膜密封，可放在 2 °C ~8 °C 内暂存，并于 24 小时内使用，使用前轻轻混匀试剂槽，混匀时务必小心试剂不可从下针孔位中溢出，以免各孔位试剂之间污染影响测序质量。

--- 此页有意留白 ---