

(可选) 关闭测序仪



准备测序试剂槽(1)

● 提示

- 解冻时无须打开密封袋。
- 水浴解冻时,水位与试剂槽上表面齐平即可。
- 1. 检查测序试剂槽是否漏液。如漏液,该试剂槽不能 用于测序。
- 2. 取出测序试剂槽干常温水浴解冻,或者提前一天将 其置干2 ℃-8 ℃冰箱解冻,解冻后置干2 ℃-8 ℃冰箱备用,不同型号试剂槽水浴解冻时间见下 表:

		解冻方式		
型号	室温下水浴 解冻(h)	2 ℃ ~ 8 ℃冰箱过 夜后室温水浴(h)	2 ℃ ~ 8 ℃ 冰箱(h)	
G99 SM FCL SE100/PE50	2.0	0.5	8.0	
G99 SM FCL PE150	3.0	0.5	14.0	
G99 SM FCL SE400	4.0	0.5	16.0	
G99 SM FCL PE300	4.5	0.5	21.0	
G99 SM App-C FCL SE100	2.0	0.5	8.0	
G99 SM App-C FCL PE150	3.0	0.5	14.0	

准备载片(1)

1. 从 -25 ℃ ~-15 ℃冰箱中取出试剂套装,将载片从 试剂套装中取出。

☑ 提示

- 此时请勿拆开真空包装袋。
- 2. 将载片在室温环境下放置 0.5 h~24 h。

制备 DNB

文库要求

- 具体试剂套装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。
- 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。

推荐插入片段长度和单张载片数据产出					
型号	推荐文库插入片 段大小 (bp)	理论产出数据 量 (G b/载片)			
G99 SM FCL SE100/PE50	200 ~ 400	8.0			
G99 SM FCL PE150	300 ~ 500	24.0			
G99 SM FCL SE400	400 ~ 600	32.0			
G99 SM FCL PE300	400 ~ 700	48.0			
G99 SM App-C FCL SE100	200 ~ 400	8.0			
G99 SM App-C FCL PE150	300 ~ 500	24.0			

文库浓度及所需量的要求如下:

仪器清洗与维护

■ 如果文库浓度未知,建议使用 Oubit[®] ssDNA Assav Kit 和 Oubit 荧光定量仪定量出文库实 际浓度(na/uL)。 fmol 和 ng 换算公式:

$C(fmol/\mu L) = \frac{3030 \times C(ng/\mu L)}{N}$

- 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)
- 如果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。

文库类型	初始文库 ssDNA 浓 度要求	每个 DNB 制备 体系所需文库量
PCR	≥2 fmol/µL	20 fmol
PCR free	≥3.75 fmol/µL	37.5 fmol
PE300 测序使用的文库	≥3 fmol/µL	30 fmol
第三方 PCR	≥3 fmol/µL	30 fmol
第三方 PCR free	≥3.75 fmol/µL	37.5 fmol



制备 DNB

```
测序前准备
```

制备 DNB

1. 根据下表计算所需 ssDNA 文库体积:

文库类型	FCL SE100/ PE50/PE150	FCL PE300	FCL SE400	App-C FCL SE100/PE150
PCR	20 fmol/ <i>C2</i>	30 fmol/C2	/	30 fmol/ <i>C2</i>
PCR free	37.5 fmol/ <i>C2</i>	37.5 fmol/ C2	/	37.5 fmol/C2
非 STR 扩 增子文库	/	/	60 fmol/ <i>C2</i>	/
STR 扩增 子文库	/	/	n/ <i>C1</i>	/

♀ 提示

- C1 表示文库质量浓度(ng/µL), C2 表示文 库摩尔浓度(fmol/µL)。n 表示文库的投入 质量(ng)。
- STR 扩增子文库的投入量建议保持在 5 ng~10 ng。不同样本类型所需投入量不同,具体请参 考相关建库试剂说明书。
- 2. 按照下表处理文库和试剂。



不同批次试剂盒严禁混用。



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

组分	体积(µL)
TE 缓冲液	10-V
DNB 制备缓冲液	
或	10
App-C DNB 制备缓冲液	
文库 ssDNA	V
总体积	20

😧 提示

- TE 缓冲液使用完后请勿丢弃,后续可能会用于稀释 DNB。
- 4. 将反应体系混匀并短暂离心,置于冰盒上待用。

仪器清洗与维护

5. 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

当热盖温度到达100 ℃以上时再盖上热盖进行 PCR反应,避免热盖在升温过程中提前接触样本 管造成样本提前升温导致的实验结果不准确。

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

● 停止点

此步骤完成后可暂停实验。产物可以放在 -20 ℃ 暂存。

6. 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。

😧 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。

- 7. PCR 仪达到 4 ℃后, 取出 PCR 管, 短暂离心 5 s 后, 置于冰盒上。
- 8. 向 PCR 管加入试剂,配制反应体系 2。





		G99 SM FCL	G99 SM F 读长 DNI	CL SE400 B(µL)	G99 SM	G99
组分	管盖颜色	SE100/ PE50/ PE150 读 长 DNB (µL)	ATOPlex 双标签平 衡文库试 剂 V2.0	包含 STR (短串联 重复)位 点的扩增 子文库	App-C FCL SE100/ PE150 读 长(µL)	PE300 读长 DNB (µL)
DNB 聚合 酶混合液 I		20	/	/	20	/
DNB 聚合 酶混合液 II (LC)	0	2	2	2	2	0.8
DNB 聚合 酶混合液 V		/	15	30	/	/
DNB 高效 聚合酶混合 液 V		/	/	/	/	20

- 9. 将反应体系 2 用涡旋振荡器混匀并短暂离心,即刻 置于 PCR 仪中。
- 10. 按照下表设置 PCR 仪反应条件,进行滚环扩增反应。 2. 提示

如使用步骤 5 中的 PCR 仪, 需提前将热盖进行降温。 建议使用另外一台 PCR 仪。

型号	温度	35 ℃ (热盖)	30 °C	4 °C
G99 SM FCL SE100/ PE50/PE150 读长 DNB	时间	On	20 min	Hold
G99 SM FCL SE400 读长 DNB	时间	On	25 min	Hold
G99 SM FCL PE300 读长 DNB	时间	On	30 min	Hold

型号	温度	35 ℃ (热盖)	30 °C	4 °C
G99 SM App-C FCL SE100/PE150 读长 DNB	时间	On	20 min	Hold

PCR 仪到达 4 ℃后,立即取出 PCR 管置于冰盒上。
 向 PCR 管加入 10 µL DNB 终止缓冲液,并用无滤
 芯阔口吸头缓慢吸打混匀 5~8 次。

1 注意

仅可使用无滤芯阔口吸头混匀,否则,可能影响测 序质量。

😧 提示

- 混匀时,注意缓慢吸取 DNB 后悬在液面上方, 缓慢滴下,注意避免出现气泡。
- 切勿离心、振荡及剧烈吹打。
- **12.** 将制备好的 DNB 置于 4 ℃保存备用,并在 48 h 内使用。

😧 提示

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

测定 DNB 浓度

DNB 浓度合格标准				
型号	应用文库合格浓度			
G99 SM FCL SE100/PE50				
G99 SM FCL PE150	≥8 ng/µL			
G99 SM FCL SE400				
G99 SM FCL PE300	≥12 ng/µL			
G99 SM App-C FCL SE100	≥8 ng/µL			
G99 SM App-C FCL PE150	≥8 ng/µL			

型号 DNB 浓度 ^{稀释所} 保存 例 需试剂 条件

G99 SM FCL SE100/PE50

G99 SM FCL PE150	≥20 ng/µL	TE 缓	4 ℃	≤48 h
G99 SM App-C FCL SE100/PE150	0.1	冲液		

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。



仪器清洗与维护

(可选)关闭测序仪

2. 按照下表配制 Oubit 检测工作液。

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

准备载片(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 uL 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 Oubit 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/过低影响测定浓度的 数值。

测定 DNB 浓度

下文以 Oubit 3.0 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】。 屏幕上会显示检测浓度。
- 8. 重复步骤7, 检测剩余样本。

测序前准备

准备测序仪

- 1. 将电源开关拨至 位置,启动电源。
- 2. 根据第9页"附录:管路清洗"要求,对测序 仪进行深度清洗。

准备测序试剂槽(2)

混匀

1. 颠倒混匀试剂槽 5 次。

- 2. 撕掉包装袋, 使用无尘纸擦净盖板及孔位处的冷凝 7ko
- 3. 将配套的按压器对准柱塞,用手掌将四个柱塞按压 到位。



4. 双手握住试剂槽 A、B 两侧,上下、左右摇晃混匀 20次,保证试剂充分混匀。

混匀不充分可能影响测序质量。

5. 用洁净的1 mL 吸头戳破试剂槽的 MDA 孔。此时 G99 FCL SE100/G99 SM App-C FCL SE100 测序上机前的准备工作已完成。

注意

未戳破 MDA 孔会导致清洗失败。

添加 MDA (仅适用于 PE 测序)

操作步骤如下:

- 1. 从测序试剂套装中取出 MDA 试剂和 MDA 聚合酶 混合液,用 200 uL 移液枪吸取 125 uL MDA 聚 合酶混合液加入到 MDA 试剂的试管中。
- 2. 将试管颠倒混匀 6 次,使其充分混匀。

[▲] 注意



制备 DNB

准备试剂槽(1)

仪器清洗与维护

测序

(可选)关闭测序仪

3. 用移液枪吸取全部 MDA 混合液,倾斜吸头,将吸 头紧贴 MDA 孔壁,缓缓加入孔中,避免产生气泡。



测序

登录控制软件

- 1. 点击 🏝 进入登录界面。
- 2. 输入用户名【user】和密码【123】,点击【登录】 进入主界面。

测序前自检

- 1. 选择载片平台 A/B 或者 A&B。
- 2. 点击【测序】,执行如下操作之一:
 - 如果废液仓门自动打开,执行步骤 **3**。
 - 如果废液仓门没有打开,跳过步骤 3,系统自动 进入测序前自检。

- **3.** 根据界面提示放置空的废液桶至废液仓,轻按以关闭废液仓门。系统自动进入测序前自检。
- **4**. 自检通过后,点击【下一步】,进入测序信息录入 界面。

填写测序信息

1 注意

- Barcode 列表仅可通过控制软件导入。
- 确保试剂槽类型与测序方案一致。

♀ 提示

- 【测序 & 信息传输】和【BBS】测序类型只能 在 DNBSEQ-G99ARS 测序仪上进行。
- 确保测序参数填写正确。

根据需求选择以下任一测序类型:

- 只测序:
 - 自检完成后点击【下一步】,选择【只测序】, BBS 默认选择【否】,将光标放置在【DNB ID】待写区,输入 DNB 信息。
 - 2 在【测序方案】下拉菜单中选择预设的测序方 案或自定义测序方案。

😧 提示

对于不在测序列表中(如 SE35、SE50 和 PE100等)的测序,选择【自定义】自定义测 序方案。

- ③ 点击测序方案右侧的下拉菜单按钮,选择标签 序列,也可以选择【其他】自定义标签序列,自 定义标签序列的设置可参考 DNBSEQ-G99 系 列基因测序仪软件操作指南。
- ④ 在【高级设置】中可选择测序完成后是否拆分 Barcode 和自动清洗,默认选择【是】。
- ⑤ 点击【下一步】,升降屏自动上升。
- 测序 & 信息传输:
 - ① 在 ZLIMS 配置好相应的样本信息。
 - ② 选择【测序 & 信息传输】, BBS 选择【否】。
 - ③ 将光标放置在【DNB ID】待写区,输入 DNB 信息。确保与 ZLIMS 填写的 DNB ID 一致。
 - ④ 在【测序方案】下拉菜单中选择相应的测序方案。
 - ⑤ 点击【下一步】,升降屏自动上升。
- BBS (Bioanalysis By Sequencing):
 - ① 在 ZLIMS 配置好相应的样本信息。
 - ② 选择【测序&信息传输】,BBS选择【是】, 并填写数据上传分析的节点。
 - ③ 填写 DNB ID。确保与 ZLIMS 中填写的 DNB ID 一致。
 - ④ 在【测序方案】下拉菜单中选择相应的测序方案。
 - ⑤ 点击【下一步】,升降屏自动上升。









制备 DNB





仪器清洗与维护

(可选) 关闭测序仪

4. 轻轻扎取 200 µL 不带滤芯尖口吸头, 吸取 10 µL 混匀后的 DNB 加载体系, 垂直插入载片讲液口 A。 ▲ 注意

准备载片(1)

切勿倾斜或旋转吸头。

准备试剂槽(1)



- 5. 用一只手固定住吸头,另一只手按下移液枪上的吸 头脱卸按钮卸载吸头,观察吸头中液面下降情况:
 - 若液面自动下降, DNB 加载体系自动流入载片 中, 跳讨下一步。
 - 若液面没有下降,执行下一步。



- ▲ 注意
 - 请勿按下移液枪的控制按钮。
 - 在加载过程中请勿转动吸头或者移动载片。
- 6. (可选) 若液面没有下降,执行以下步骤:
 - ① 保持进液口 A 的吸头不动。
 - ② 将移液枪移液体积调至 2 µL。
 - ③ 扎取新的 200 µL 无滤芯尖口吸头。

- ④ 按压住移液枪控制按钮,并将空吸头轻轻插入 载片出液口 B。
- ⑤ 轻轻松开控制按钮,观察并确认液面下降后, 拔出位置 B 的吸头。



- 7. 确保 DNB 加载体系加载完成后, 拔出位置 A 的吸头。
- 8. 将加样器反转正面朝上,即刻将载片转移到测序仪 上使用。

▲ 注意

建议 10 min 之内完成操作,否则可能影响测序质 - 帯、

放置载片

1. 将载片带有标签的一面朝上,按该面箭头指示方向, 插入载片平台。系统会自动扫描载片ID并录入。 如扫描失败,可手动输入 ID。

√ 提示

此时请留意界面压力图标,若显示橙红色 🛃 ,代 表载片吸附异常,需重新放置载片。确保载片正常 吸附后,再执行下一步骤。

2. 点击【下一步】, 升降屏自动关闭。

测序

请及时留意状态指示灯带、界面图标或弹出的对话 框。如发现异常,请根据提示检查问题部件,排除 故障。如仍有异常,请联系技术支持。

回顾测序信息

在测序信息回顾界面,确认各项信息无误后,可开始测序。

开始测序

- 1. 点击【测序】,在弹出的对话框中选择【是】,开 始测序。
- 2. 测序完成后,点击【完成】,结束测序流程。系统 自动打开升降屏和废液仓门。

(可选) 查看生信分析报告

仅当选择【测序 & 信息传输】流程类型,且在测序 和生信分析任务完成后,可执行此步骤。

- 1. 在主界面点击 (💵) 进入 ZLIMS 登录页面。
- 2. 输入用户名 lite 与密码 lite123456, 进入 ZLIMS 主界面。
- 3. 在右侧【任务状态】区域点击【已完成】或其对应 的数字, 弹出任务列表。

仟务列表中默认显示最近一月完成的所有仟务。

4. 点击待查看任务选项卡的任意位置,进入分析信息 界面。







DNBSEQ-G99RS & DNBSEQ-G99ARS 基因测序仪快速操作指南

附录:管路清洗	使用测序试剂槽进行手动清洗	16 . 按照实验室要求与当地法律法规要求处理废液。
注意	如测序时未勾选【自动清洗】,测序完成后,该测序试剂 槽可用于一次手动清洗。	17. 按照医疗废弃物处理标准,处理载片与测序试剂槽。
 需关机超过7天时,确保关机前已完成自动清洗 与深度清洗。 未在要求时间内完成清洗可能影响仪器性能,请 尽快进行清洗。如有问题,请联系技术支持。 	 1. 点击【完成】,结束流程。系统自动打开升降屏和 废液仓门。 2. 取出载片、测序试剂槽与废液桶。 2. 最二 	使用清洗试剂槽进行深度清洗 1. 准备清洗试剂。 提前配置 0.1 M NaOH。具体方法,参考相关试 剂套装说明书。
类型 试剂槽类型 大约时长 (min) 适用场景 自动 (方) 测序试剂槽 26 每次测序完成后系统进行	 移除载片时,需先下压或整体往上抬再拔出。 3. 清洁试剂仓。 用实验室级用水润湿无尘纸或无尘布,并用其擦拭试剂仓底部及侧面,保持清洁干燥。 2. 准备清洗试剂槽。 ① 使用枪头戳破清洗试剂槽上的 NaOH 和 MDA 孔位。 ② 在 NaOH 孔位加入 7.5 mL 0.1 M NaOH。 3. 检查废液桶。 如已放置空的废液桶,进入下一步。 如主放置座液杨或座液杨去语穴。座液合门白式 	
清洗 水/// 2001/li Lo 自动清洗。 测序试剂槽 未勾选【自动清洗】或未 手动 (未执行自 正常下机时,测序结束后 清洗 动清洗的下 12 h 内需进行手动清洗。		
深度 清洗 清洗 清洗试剂槽 30 • 需闲置(包含关机和开机不工作)超过7天时, 闲置前后均需进行深度 清洗。 • 仪器正常使用情况下, 需每月进行一次深度清洗。 • 仪器正常使用情况下, 需每月进行一次深度清洗。 正常使用指每边的 测序间隔均不超过7 天,且正常下机并进 行自动清洗。	 4. 清洗废液桶。 具体操作,参见第8页"仪器清洗与维护"步骤4。 5. 将废液桶放回废液仓,关闭仓门。 6. 界面显示所有操作完成后,点击【返回主页】。 7. 点击主界面的【清洗】,系统自动打开升降屏和废液仓门。 8. 放置测序试剂槽,确认试剂槽类型,关闭废液仓门。 9. 点击【清洗】。 10. 在弹出的确认框中点击【是】开始清洗。 11. 清洗结束后,点击【完成】。 	 如米瓜直废液桶或废液桶米清空,废液包门自动 打开。需清空并清洗废液桶后将其放置到位,关 闭仓门。界面显示操作完成后,点击【返回主页】。 4. 点击主界面的【清洗】,系统自动打开升降屏和废 液仓门。 5. 放置清洗试剂槽,确认试剂槽类型,关闭废液仓门。 6. 点击【清洗】。 7. 在弹出的确认框中点击【确定】开始清洗。 8. 清洗结束后,点击【完成】。 9. 取出清洗试剂槽与废液桶。 10. 清洗废液桶。 具体操作,参见<i>第8页"仪器清洗与维护"步骤4。</i> 11. 将废液桶放回废液仓,关闭仓门。 12. (可选)点击【返回主页】可回到主界面。 13. 按照实验室要求与当地法律法规要求处理废液。 14. 按照医疗废弃物处理标准,处理清洗试剂槽。
	 12. 取出测序试剂槽与废液桶。 13. 清洗废液桶。 具体操作,参见第8页"仪器清洗与维护"步骤4。 14. 将废液桶放回废液仓,关闭仓门。 15. (可选)点击【返回主页】可回到主界面。 	

--- 此页有意留白 ---