



概述

本快速操作指南用于指导快速使用 DNBSEQ-T7RS 仪器及试剂盒。

适用的试剂套装信息如下：

货号	名称	产品型号	版本
940-000270-00	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装	FCL SE35	V2.0
940-000271-00	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装	FCL SE50	V2.0
940-000272-00	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装	FCL SE100	V2.0
940-000269-00	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装	FCL PE100	V3.0
940-000268-00	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装	FCL PE150	V3.0
1000020834	CPAS 条形码引物 3 试剂盒	/	V2.0
1000014048	CPAS 条形码引物 4 试剂盒	/	V1.0

准备工作

准备测序载片 (1)

从测序载片试剂盒中取出测序载片，在室温环境下放置 30 min~24 h。

准备测序试剂槽 (1)

参考下表，根据型号选择适合的解冻方法。

测序读长	解冻方法		
	常温水浴 (h)	提前24 h于2 °C~8 °C 冰箱解冻，再常温水浴 (h)	2 °C~8 °C冰箱 (h)
SE35	1.0	0.5	8.0
SE50	1.0	0.5	10.0
SE100	2.0	0.5	12.0
PE100	2.5	1.5	24.0
PE150	3.0	2.0	24.0

准备样本加载试剂板 (1)

- 从 DNB 加载试剂盒中取出样本加载试剂板。
- 选择合适的方式解冻：

	常温解冻	2 °C~8 °C冰箱解冻
时长	2 h	24 h

- 完全解冻后，置于 2 °C ~8 °C 冰箱备用。

解冻 DNB 加载试剂

- 从 DNB 加载试剂盒中取出 DNB 加载缓冲液 II 或 DNB 加载缓冲液 IV。
- 置于室温解冻 30 min。
- 待融化后，使用漩涡振荡器振荡混匀 5 s，短暂离心后置于冰盒上备用。



提示

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

准备 0.1 M NaOH 试剂

0.1 M NaOH 的配制方法见第 12 页“准备清洗”。

每个样本加载试剂板需要至少 4 mL 的 0.1 M NaOH 试剂。



制备 DNB



警告

制备 DNB 过程中, 切勿使用带滤芯的吸头。

文库要求



- 如建库试剂盒有特殊要求, 以建库试剂盒为准。
- 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。

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)	适用文库类型	比对 reads 数 (M)	数据量 (Gb)
FCL SE35	50-230	NIPT	5800	192
FCL SE50	50-230	NIPT, PMSEQ	5800	275
FCL SE100	200-400	PMSEQ	5800	550
FCL PE100	200-400	WGS, WES, RNAseq, 单细胞	5800	1160
FCL PE150	300-500	WGS, WES, RNAseq	5800	1740

典型文库的要求如下:

文库类型	初始文库 ssDNA 浓度要求
常规	≥3 fmol/μL
PCR free	≥3.75 fmol/μL



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/μL)。然后根据下列公式换算成 (fmol/μL):

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

- 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。

确定 Pooling 样本数

根据具体应用所需的数据量, 测序读长及测序 Barcode 等信息决定可 pooling 在一起上机的样本量。建议样本在 DNB 制备完后, 先定量 DNB, 再 pooling DNB。由于每个 Barcode 产出的数据量会有偏差, 建议所需的总数据量不超过理论数据产量的 90%。

若样本的 pooling 的差别在 10% 之内, 按照以下公式计算:

$$\text{样本最大pooling数目} = \frac{\text{一张载片总数据量} \times (1 - \text{pooling间的误差})}{\text{应用需要数据量}}$$



提示

对于有特殊测序深度要求的, 可以适当增加或减少 pooling 的样本数量。

样本 pooling 数计算举例				
	测序读长	每个样本需求	Pooling 数量	每个样本的理论产出范围
例一	PE100	100 Gb	10 个样本	104 Gb ~ 127 Gb
例二	PE100	50 Gb	20 个样本	52 Gb ~ 63 Gb
例三	PE150	100 Gb	4 个 WGS 样本	102 Gb ~ 122 Gb
例四	PE150	50 Gb	23 个 RNAseq 样本	51 Gb ~ 62 Gb



检查 Barcode 的平衡性

检查待 pooling 样本的 Barcode, 建议每个 cycle 的 A, C, G, T 四个碱基的相对含量均不低于 12.5%。若某个碱基的相对含量在 5% ~ 12.5% 间, 可以风险上机。若低于 5%, 则不建议上机, 需重新规划 pooling 方案。每个 cycle, 只有碱基含量相对较平衡时, 才能达到最佳测序质量。

检查待 pooling 在一起上机的样本的 Barcode 是否唯一。

制备 DNB

1. 根据下表计算所需 ssDNA 文库体积:

文库类型	100 μ L DNB 反应体系		50 μ L DNB 反应体系		90 μ L DNB 反应体系	
	加入量 (fmol)	所需 ssDNA 文库体积 V (μ L)	加入量 (fmol)	所需 ssDNA 文库体积 V (μ L)	加入量 (fmol)	所需 ssDNA 文库体积 V (μ L)
常规	60	60/C	30	30/C	60	60/C
PCR free	75	75/C	37.5	37.5/C	75	75/C

提示

C 表示文库浓度 (fmol/ μ L)。

2. 按照下表处理文库和试剂。

提示

不同批次试剂盒严禁混用。

名称	管盖颜色	步骤1)	步骤2)	步骤3)
文库	/	/	/	
DNB聚合酶混合液I (FCL SE35/SE50/SE100/PE100) DNB快速聚合酶混合液II (FCL PE150)	●	置于冰盒上 解冻30 min		
TE缓冲液	●		涡旋振荡 混匀5 s, 短暂离心	置于冰盒 上备用
DNB制备缓冲液	●	置于室温解 冻30 min		
DNB终止缓冲液	●			

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

顺序	组分	管盖颜色	FCL SE35/SE50/SE100/PE100 读长 DNB		PE150 读长 DNB
			加入量 (μ L) /100 μ L 体系	加入量 (μ L) /50 μ L 体系	加入量 (μ L)
1	文库 ssDNA	/	V	V	V
2	DNB 制备缓冲液	●	20	10	20
3	TE 缓冲液	●	20-V	10-V	20-V
总体积			40	20	40

4. 将反应体系混匀并离心 5 s, 置于冰盒上备用。

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

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, 确保在进行 DNB 反应时热盖处于工作温度。

温度	105 $^{\circ}$ C (热盖)	95 $^{\circ}$ C	65 $^{\circ}$ C	40 $^{\circ}$ C	4 $^{\circ}$ 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，置于冰盒上备用。
- PCR 仪达到 4 °C 后，取出 PCR 管，短暂离心 5 s 后，置于冰盒上。
- 向 PCR 管加入试剂，配置反应体系 2。

组分	管盖颜色	制备 FCL PE100 读长 DNB		制备 FCL PE150 读长 DNB
		试剂体积 /100 μL 体系	试剂体积 /50 μL 体系	试剂体积 /90 μL 体系
DNB 聚合酶混合液 I		40 μL	20 μL	/
DNB 快速聚合酶混合液 II		/	/	40 μL
DNB 聚合酶混合液 II (LC)		4 μL	2 μL	1.6 μL

- 将反应体系混匀并短暂离心，置于冰盒上备用。
- 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 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。

	温度	35 °C (热盖)	30 °C	4 °C
FCL SE35/SE50/SE100/PE100	时间	On	25 min	Hold
FCL PE150	时间	On	10 min	Hold

- PCR 仪达到 4 °C 后，立即取出 PCR 管置于冰盒上。向 PCR 管加入 DNB 终止缓冲液，并用阔口不带滤芯吸头缓慢吸打混匀 8 次。

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。

组分	管盖颜色	制备 FCL SE35/SE50/SE100/PE100 读长 DNB		制备 FCL PE150 等读长 DNB
		试剂体积 /100 μL 体系	试剂体积 /50 μL 体系	试剂体积 /90 μL 体系
DNB 终止缓冲液		20 μL	10 μL	10 μL
总体积		104	52	91.6

- 将制备好的 DNB 置于 2 °C ~ 8 °C 保存备用，并在 48 h 内使用。

制备好的 FCL PE150 读长的 DNB 须立即使用。

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阔口吸头吹打混匀 8 次。

测定 DNB 浓度

提示

- 若 DNB 浓度不合格，需重新制备。
- 如样本数量较多，建议分批定量，避免荧光猝灭导致 DNB 浓度定量不准。
- 若浓度超过 40 ng/μL，需要稀释至 20 ng/μL 后使用。

DNB 浓度合格标准		
型号	常规文库合格浓度	其他文库合格浓度
FCL SE35/SE50/SE100/PE100	≥ 15 ng/μL	≥ 8 ng/μL
FCL PE150	≥ 8 ng/μL	≥ 5 ng/μL

准备工作 **制备 DNB** 加载 DNB 测序前准备 进行测序 自动清洗 数据处理

DNB 稀释方案				
型号	稀释所需试剂	管盖颜色	保存条件	保存时间
FCL SE35/FCL SE50/FCL SE100/FCL PE100	DNB 加载缓冲液 I		2 °C ~ 8 °C	≤ 48 h
FCL PE150	TE 缓冲液		2 °C ~ 8 °C	≤ 8 h

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备用。

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。

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 3.0 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。



- 点击【Oligo】>【ssDNA】>【读取标准值】，开始检测。
- 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。
- 放入标准品 2 检测管，盖上盖子，点击【读取标准值】。
- 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。
- 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。
- 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。

- 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。
- 重复步骤 7，检测剩余样本。

DNB pooling

提示

使用普通吸头吸取所需体积 DNB，再使用阔口吸头混匀。

- 计算每个样本理论相对量 V_n 。

$$V_n = \frac{\text{该样本所需数据量}}{\text{该样本 DNB 浓度}}$$

n 为样本 ID。

- 计算总相对量 V_2 。

$$V_2 = V_A + V_B + \dots + V_H$$

- 计算每个样本 pooling 体积。

$$V_{\text{DNB}} (\mu\text{L}) = \frac{300 \times V_n (\mu\text{L})}{V_2 (\mu\text{L})}$$

- 根据计算结果吸取并混合 DNB。

准备工作

制备 DNB

加载 DNB

测序前准备

进行测序

自动清洗

数据处理

加载 DNB



警告

加载 DNB 过程中, 切勿使用带滤芯的吸头。

准备样本加载试剂板 (2)

1. 取出样本加载试剂板。
2. 使用前轻轻颠倒混匀 5 次, 离心 1 min。

配制 DNB 加载体系

1. 取新的 0.5 mL 冻存管, 根据读长准备 DNB 加载体系:

名称	管盖颜色	FCL PE150	FCL SE35/SE50/SE100/PE100
		加入量 (μL)	加入量 (μL)
DNB*	/	300	270
DNB 加载缓冲液 II		/	90
DNB 加载缓冲液 IV		150	/
DNB 聚合酶混合液 II (LC)		/	1



提示

* 表中的 DNB 为 pooling 后的 DNB。

2. 完成后, 用阔口不带滤芯吸头缓慢吹打混匀 8 次。



提示

- 该 DNB 加载体系需现配现用, 并需要全程在冰盒上进行配制和放置, 并于 30 min 内进行加载。
- 切勿离心、振荡及剧烈吹打。

准备测序载片 (2)

使用前, 撕开载片真空包装袋, 确认载片完整后, 使用压缩空气罐将载片背面吹净, 再开始 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 h 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 h 内使用, 如超过 24 h, 不建议使用。

加载 DNB

1. 确认装载仓仓门关闭后, 启动 MGIDL-T7RS。
2. 进入 MGIDL-T7RS 程序, 输入用户名 *user* 和密码 *Password123*, 登录进入主界面。
3. 任选空闲状态下的 A/B 边进行操作。点击【装载】, 进入信息填写界面。
4. 打开装载仓仓门。

5. 在文本框中输入 DNB 信息后, 将装有 DNB 加载体系的 0.5 mL 冻存管放置在 MGIDL-T7RS 的 DNB 试剂管孔中, 界面显示 DNB 管已放置。



提示

输入的 DNB 信息仅限于数字或字母或数字与字母组合。

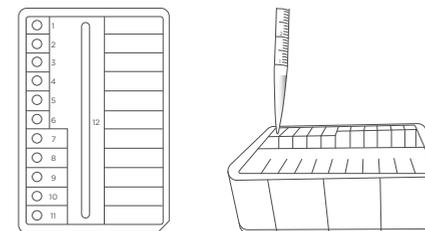
6. 将样本加载试剂板对准 RFID 扫描区, ID 信息显示在样本加载试剂板 ID 后的文本框中。



提示

如果未显示, 可按提示手动输入。

7. 撕去样本加载试剂板封膜, 在 11 号孔位中加入 4 mL 0.1 M NaOH, 样本加载试剂板孔位如下图所示:



8. 将准备好的样本加载试剂板, 放置在 MGIDL-T7RS 的试剂板托架上, 界面显示试剂板已放置。

准备工作

制备 DNB

加载 DNB

测序前准备

进行测序

自动清洗

数据处理



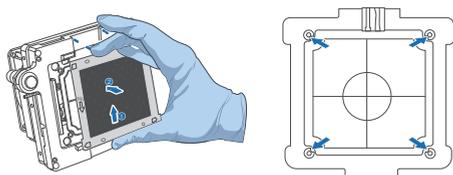
9. 将测序载片对准 RFID 扫描区, ID 信息显示在载片 ID 后的文本框中。

提示

如果未显示, 可按提示手动输入。

10. 装载载片。

- ① 确认载片平台的四个密封垫无缺失。
- ② 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。
- ③ 将载片框抵靠在载片平台下框处, 放置载片。



- ④ 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色, 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。

11. 关闭装载仓仓门。

12. 点击【开始】, 选择【是】。DNB 加载开始。等待 DNB 加载完成, 耗时约 2 h。

13. 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。

提示

- 装载完成的载片建议用自封袋保存, 以防边缘风干。
- 如暂不使用, 请将载片平放在 2 °C ~ 8 °C 冰箱内保存, 并于 48 h 内使用。

14. 进行后清洗:

- ① 取下装载完成的测序载片后, 放入清洗载片, 按下载片平台上的载片吸附按钮, 关闭装载仓仓门。点击【确定】。
- ② 点击【后清洗】, 在弹出的对话框中选择【是】, 开始 MGIDL-T7RS 清洗。耗时约 20 min。
- ③ 取出清洗载片并室温保存。
- ④ 将样本加载试剂板中的废液倒入实验室指定的容器中。

⑤ 处理废液和样本管。

⑥ 使用纯水清洗试剂板 3~5 次, 风干后常温保存, 后续可用于清洗。

建议反复使用 1 个月或 10 次后, 按照医疗废弃物处理标准, 处理试剂板。



测序前准备

准备测序试剂槽 (2)

1. 确保试剂槽中的试剂完全融化。
2. 将试剂槽颠倒混匀 3 次。将试剂槽置于正前方，前后左右剧烈晃动 20 次，使试剂槽内各试剂混合均匀。

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。

3. 准备 9 号孔和 10 号孔:

① 根据下表准备试剂:

组分	管盖颜色	操作步骤
dNTPs 混合液 IV		室温融化后 (约 1 h)，上下颠倒缓慢混匀 6 次，轻轻敲击台面将试剂聚于管底，置于冰盒上备用。
dNTPs 混合液 V		
dNTPs 混合液 II		
DNA 聚合酶混合液	/	上下颠倒缓慢混匀 6 次，置于冰盒上备用。

② 根据测序类型，取出相应试剂，将其置于室温完全融化后，涡旋振荡 5 s 使其充分混匀:

测序类型	试剂盒名称	试剂
SE双Barcode测序	cPAS条形码引物4试剂盒	cPAS AD153条形码引物4工作液
PE双Barcode测序	cPAS 条形码引物3试剂盒	cPAS AD153条形码引物3工作液

- ③ 打开试剂槽盖板，使用无尘纸擦净冷凝水，喷洒 75% 酒精于试剂槽封膜表面并用无尘纸擦净，使用洁净的 1 mL 吸头，在 9 号孔和 10 号孔中间位置轻轻戳出一个直径约 2 cm 的加样孔位。
- ④ 取对应量程的移液器，根据型号和孔位，分别将下表中的试剂加入相应的孔中:

产品型号	9 号孔			10 号孔	
	dNTPs 混合液 IV (mL)	dNTPs 混合液 V (mL)	DNA 聚合酶混合液 (mL)	dNTPs 混合液 II (mL)	DNA 聚合酶混合液 (mL)
FCL SE35	1.7	/	1.7	4.5	1.5
FCL SE50	2.0	/	2.0	5.4	1.8
FCL SE100	3.0	/	3.0	8.1	2.7
FCL PE100	/	2.76	2.76	8.28	2.76
FCL PE150	/	3.74	3.74	11.22	3.74

- ⑤ 用配套的透明封口膜将 9 号和 10 号加样孔封住。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。
- ⑥ 试剂槽水平放置在桌面上，双手握住两侧，顺时针摇晃 20 次，再逆时针摇晃 20 次，直至 9 号试剂上下层颜色均匀一致，以保证试剂的充分混匀。
- ⑦ 撕掉 9 号和 10 号孔位的封口膜弃用。

提示

- 封口膜严禁重复使用。
- 注意 9 号和 10 号孔的试剂不要交叉污染。

4. 轻轻敲打测序试剂槽，以减少试剂中的气泡。

提示

此时 FCL SE35/SE50/SE100 测序试剂槽的上机前准备工作完成。

5. 根据不同测序类型，进行额外加样，确保孔位底部无气泡后，盖上测序试剂槽盖板。



提示

使用 MDA 聚合酶混合液时, 请勿触摸试剂所在管壁, 以免影响酶的活性。

测序类型	步骤
SE双Barcode测序	<ol style="list-style-type: none"> 使用吸头戳破3号孔封膜。 取3.50 mL CPAS AD153 条形码引物 4工作液沿管壁加入到3号孔中。
PE单Barcode测序	<ol style="list-style-type: none"> 使用吸头戳破8号孔的封膜。 用1 mL移液器移取600 μL MDA 聚合酶混合液加入到MDA试剂的试剂管中, 并反复吹打3次以上。 上下颠倒混匀4~6次, 将混合液沿管壁加入8号孔中。 <p>在PE单Barcode测序操作的基础上还需进行以下操作:</p>
PE双Barcode测序	<ol style="list-style-type: none"> 使用吸头戳破3号孔封膜。 取3.5 mL CPAS AD153 条形码引物 3工作液沿管壁加入到3号孔中。

准备清洗试剂槽

- 顺时针摇晃清洗试剂槽 10 次, 再逆时针摇晃 10 次, 以保证试剂的充分混匀。
- 喷洒 75% 酒精于清洗试剂槽封膜表面并用无尘纸擦净, 选择任意一个 2 号孔位, 使用洁净的 1 mL 吸头将膜戳破。
- 用电动移液器移取 45 mL 0.1 M NaOH 从戳孔的位置加入到 2 号孔位中。

准备纯净水桶

提示

- 检查纯净水桶水量是否充足。如纯水不足, 会导致测序失败。及时补充纯水, 并注意打开纯净水桶气孔。
- 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% 酒精喷洒于纯净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净水桶三次, 此操作需在测序仪空闲状态下进行。
- 纯水更新完成后, 确保纯水管穿过桶盖和桶壁上的孔, 直至纯净水桶底部。
- 纯净水桶的安装方法详见相关说明书。

测序试剂盒	纯水用量表 (L)			
	1 张载片	2 张载片	3 张载片	4 张载片
FCL SE35	1.0	2.0	3.0	4.0
FCL SE50	1.0	2.0	3.0	4.0
FCL SE100	1.5	3.0	4.5	6.0
FCL PE100	3.0	6.0	9.0	12.0
FCL PE150	4.5	9.0	13.5	18.0

准备工作

制备 DNB

加载 DNB

测序前准备

进行测序

自动清洗

数据处理

进行测序

1. 放置试剂槽

- ① 将试剂仓门打开，用被纯水润湿的无尘纸或无尘布擦拭测序试剂仓内底部及侧面，保持清洁干燥。

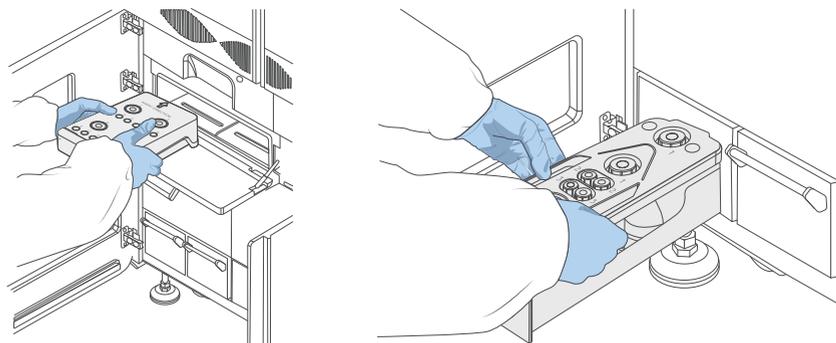


提示
清洁测序试剂仓内壁时，小心操作防止被上方试剂针划伤。

- ② 将测序试剂槽放入上层测序试剂仓，将清洗试剂槽放入下层清洗试剂仓。



提示
单载片测序时试剂槽装载位置必须与载片放置位置一致。



- ③ 关闭测序试剂仓仓门和清洗试剂仓仓门，最后关闭试剂仓仓门。

2. 在主界面点击 ，输入由本公司提供的用户名 *user* 和密码 *Password123*，登录控制软件。

3. 放置测序载片

- ① 任选空闲状态下的 A/B/C/D 进行测序，点击界面中的【测序】，选择【新建测序】。

- ② 将加载完成的测序载片用压缩空气罐吹净，确保载片表面和背面无可见灰尘后，将载片放入芯驱，按压芯驱按钮，使芯驱收回。

4. 配置测序参数

- ① RFID 自动识别测序试剂槽、清洗试剂槽及载片 ID 后，ID 信息将显示在相应的文本框中。



提示
如无法自动识别，可按提示手动输入。

- ② 点击测序方案后的 ▼，在下拉菜单里选择相应的测序方案，如需自定义测序方案，则在下拉菜单里选择【自定义测序方案】。详见附录。

- ③ 测序方案后的第二个 ▼，选择相应的标签序列。如需自定义标签序列，则选择【导入】，导入自定义标签序列文件即可。可选择 Barcode 和 DualBarcode 是否拆分。

- ④ 点击【高级选项】后的展开符号，选择是否为自定义引物，下机是否自动清洗。

5. 点击【下一步】。

6. 进行信息回顾。确认信息无误后，点击【开始】，选择【是】，仪器开始测序。

测序过程中，点击界面中的 ，可以回顾测序信息，并修改是否下机自动清洗。



- 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，DualBarcode 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。

准备工作

制备 DNB

加载 DNB

测序前准备

进行测序

自动清洗

数据处理

自动清洗

系统默认启用【自动清洗】，每次测序完成后，仪器都会自动进行清洗。

清洗完成后，进行如下操作：

1. 点击【完成】，回到主界面。
2. 打开测序仪右侧载片回收仓门，取出载片。将清洗载片置于常温保存。
建议反复使用 1 个月或 10 次后，按照医疗废弃物处理标准，处理清洗载片。
3. 打开试剂仓门，取出测序试剂槽与清洗试剂槽。
4. 将试剂槽中的残留液体倒入实验室指定废液桶中，按照实验室要求及当地法律法规要求处理废液。
5. 使用纯水清洗测序试剂槽和清洗试剂槽三次，风干后常温保存，后续可用于清洗。
建议反复使用 1 个月或 10 次后，按照医疗废弃物处理标准，处理试剂槽。

数据处理



如实验室已配置 MGI-ZTRON-LITE 服务器，ZLIMS 会实时检测测序仪状态。

测序完成后，数据会自动上传至 MGI-ZTRON-LITE，ZLIMS 自动启动生信分析。

MGI-ZTRON-LITE 的具体操作，参见相关产品说明书。

仪器清洗与维护

提示

- 各边载片平台需独立进行自动清洗或手动清洗。
- 清洗维护所使用的空试剂槽和载片随仪器配送。
- 下机后的测序载片可用作清洗载片。
- 使用过的测序试剂槽可用作清洗试剂槽。
- 使用过的加载试剂板可用作清洗试剂板。
- 用于清洗的试剂板及试剂槽每次使用前必须进行清洁，清洗试剂重新灌装。
- 清洗载片、清洗试剂槽、清洗试剂板常温保存即可。建议反复使用 1 个月或 10 次后更换。

准备清洗

1. 根据具体情况，选择清洗方案。

清洗方案	试剂槽类型	时长	描述
MGIDL-T7RS 自动清洗	样本加载试剂板	15 min	正常加载完成下机后，更换清洗载片，点击【后清洗】，MGIDL-T7RS 自动进行清洗，不需要更换样本加载试剂板。
DNBSEQ-T7RS 自动清洗	清洗试剂板	40 min	正常下机后，测序仪自动进行清洗，不需要实验人员进行操作。
MGIDL-T7RS 手动清洗	测序试剂槽、清洗试剂槽	20 min	以下情况选择手动清洗： <ul style="list-style-type: none"> MGIDL-T7RS 首次进行工作时 间隔一周以上未进行工作时 技术支持检修后及出现杂质时
DNBSEQ-T7RS 手动清洗	测序试剂槽（空）、清洗试剂槽（空）	40 min	以下情况选择手动清洗： <ul style="list-style-type: none"> DNBSEQ-T7RS 首次进行工作时 间隔一周以上未进行工作时 上机时选择不进行自动清洗 技术支持检修后及出现杂质时

2. 准备清洗试剂。

提示

下清洗试剂均需在 4 °C 存放，有效期为 28 天。

- 按照如下体积配制 1 M NaCl+0.05% Tween-20:

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:

试剂	用量
2 M NaOH 溶液	50 mL
实验室级用水	950 mL

3. 根据需要，准备相应清洗套装。

- MGIDL-T7RS 清洗试剂板

取干净的空的样本加载试剂板，根据下表加入各试剂：

孔位	试剂组分	加入量 (mL)
11	0.1 M NaOH	4
10	1 M NaCl+0.05% Tween-20	4
9	纯水	4
12	纯水	20

- DNBSEQ-T7RS 清洗维护试剂槽：

类型	孔位	试剂组分	加入量 (mL)
测序试剂槽（空）	所有	NA	NA
清洗试剂槽（空）	2	0.1 M NaOH	45
	3	1 M NaCl+0.05% Tween-20	45

4. 准备清洗载片。

手动清洗 MGIDL-T7RS

1. 输入用户名 *user* 和密码 *Password123*, 登录主界面。
2. 选择将要进行清洗的一侧。
3. 打开装载仓仓门。
4. 使用灌装好清洗试剂的 **MGIDL-T7RS** 清洗试剂板, 放入需要进行清洗的一侧, 关闭仓门。
5. 按压载片吸附按钮, 等待负压释放后, 取下载片平台上的载片。



提示

MGIDL-T7RS 上没有载片时, 忽略此步骤。

6. 取出清洗所用载片, 将载片放置于载片平台上, 按下载片吸附按钮, 轻轻按压载片, 待载片吸附按钮出现绿灯, 表明载片已完全吸附。
7. 点击【清洗】, 在弹出的对话框中选择【是】, 开始清洗。耗时约 20 min。
8. 清洗完成后, 按照界面提示取出所有耗材。
9. 点击【完成】返回主界面。
10. 将清洗载片置于常温下保存。
建议使用一个月后, 按照医疗废弃物处理标准, 处理清洗载片。
11. 将样本加载试剂板中的废液倒入实验室指定的容器中, 并按照实验室要求及当地法律法规要求处理废液。
12. 使用纯水清洗试剂板 3~5 次, 风干后常温保存, 后续可用于清洗。
建议反复使用 1 个月或 10 次后, 按照医疗废弃物处理标准, 处理试剂板。

手动清洗 DNBSEQ-T7RS

1. 确认纯水桶水量不少于 4.5 L。
2. 输入用户名 *user* 和密码 *Password123*, 登录主界面。
3. 选择需要进行清洗的一侧, 点击界面中的【清洗】。
4. 在弹出的芯驱上放入清洗载片, 点击芯驱按钮, 加载载片至仪器。
5. 使用干净的空的 **DNBSEQ-T7RS** 测序试剂槽, 放入需要进行清洗一侧的测序试剂仓, 关闭测序试剂仓仓门。
6. 使用已准备好 **DNBSEQ-T7RS** 清洗试剂槽, 放入需要进行清洗一侧的清洗试剂仓, 关闭清洗试剂仓仓门, 再关闭试剂仓门。
7. 点击【开始】, 在弹出的对话框中选择【是】, 开始清洗。耗时约 40 min。
8. 清洗完成后, 点击【完成】, 回到主界面。
9. 分别取出清洗载片、测序试剂槽和清洗试剂槽。
10. 将清洗载片置于常温保存。
建议反复使用一个月后, 按照医疗废弃物处理标准, 处理清洗载片。
11. 将试剂槽中的残留液体倒入实验室指定废液桶中, 按照实验室要求及当地法律法规要求处理废液。
12. 使用纯水清洗测序试剂槽和清洗试剂槽 3 次, 风干后常温保存, 后续可用于清洗。
建议反复使用 1 个月或 10 次后, 按照医疗废弃物处理标准, 处理试剂槽。

关闭与开启 DNBSEQ-T7RS

关闭 DNBSEQ-T7RS

关机顺序 (FPGA 配置)

• 方法一 (推荐):



- ① 返回测序仪计算机 (以下简称 **SBC**) 系统桌面。具体操作, 请联系技术支持。
- ② 关闭 **Basecall** 服务器 (以下简称 **BCS**)。
 - a. 通过系统的远程桌面连接功能, 进入 **BCS** 系统桌面。
 - b. 打开 **BCS** 任务管理器的【服务】页签, 找到并关闭 **LiteCall** 与 **BIS** 服务后, 关闭任务管理器窗口。
 - c. 点击 **BCS** 桌面底部任务栏  >  > 。
- ③ 关闭远程连接窗口, 返回 **SBC** 系统桌面。
- ④ 关闭控制软件与 **SBC**:
 - a. 从 **SBC** 桌面任务栏中, 恢复显示控制软件界面。
 - b. 点击 , 选择【关机】>【关机】, 关闭控制软件与 **SBC**。
- ⑤ 等待 3 min 后, 将仪器侧面底部的电源开关拨至 **OFF** 位置, 关闭仪器电源。

• 方法二



- ① 返回 **SBC** 系统桌面。具体操作, 请联系技术支持。
- ② 关闭控制软件: 打开 **SBC** 任务管理器的【服务】页签, 找到并关闭控制软件的服务 **ISW.ZebraT7Seq.Service** 后, 关闭任务管理器窗口。
- ③ 关闭 **BCS**。具体操作, 参见方法一第 2 步。

- ④ 关闭远程连接窗口, 返回 **SBC** 系统桌面。
- ⑤ 关闭 **SBC**。可选择如下任意一种方式:
 - 点击 **SBC** 桌面任务栏  >  > 。
 - 按下键盘托架上方的电源按钮。
- ⑥ 等待 3 min 后, 将仪器侧面底部的电源开关拨至 **OFF** 位置, 关闭仪器电源。

关机顺序 (GPU 配置)

• 方法一 (推荐):



- ① 返回 **SBC** 系统桌面。具体操作, 请联系技术支持。
- ② 关闭 **BCS**:
 - a. 双击打开 **VNC Viewer**。
 - b. 在 **VNC Viewer** 中, 双击打开 **zebracall**。
 - c. 按下 **Enter** 键, 输入密码 **zebra**, 登录 **BCS**。
 - d. 点击右上角 , 弹出关机窗口。
 - e. 点击【**Power off**】。
- ③ 关闭 **VNC Viewer**, 返回 **SBC** 系统桌面。
- ④ 关闭控制软件与 **SBC**:
 - a. 从 **SBC** 桌面任务栏中, 恢复显示控制软件界面。
 - b. 点击 , 选择【关机】>【关机】, 关闭控制软件与 **SBC**。
- ⑤ 等待 3 min 后, 将仪器侧面底部的电源开关拨至 **OFF** 位置, 关闭仪器电源。

• 方法二



- ① 返回 **SBC** 系统桌面。具体操作，请联系技术支持。
- ② 关闭控制软件：在 **SBC** 任务管理器的【服务】页签中，找到并关闭控制软件的服务 (*ISW.ZebraT7Seq.Service*) 后，关闭任务管理器窗口。
- ③ 关闭 **BCS**。具体操作，参见方法一第 2 步。
- ④ 关闭 **VNC Viewer**，返回 **SBC** 系统桌面。。
- ⑤ 关闭 **SBC**。可选择如下任意一种方式：
 - 点击 **SBC** 桌面任务栏  >  > 。
 - 按下键盘托架上方的电源按钮。
- ⑥ 等待 3 min 后，将仪器侧面底部的电源开关拨至 **OFF** 位置，关闭仪器电源。

开启 DNBSEQ-T7RS

1. 距离上次关闭电源至少 5 min 后，将仪器侧面底部的电源开关拨至 **ON** 位置，开启仪器电源。系统自动启动 **BCS**。
2. 登录系统后，系统自动启动控制软件。

常见故障

测序仪异常

将电源开关拨至 ON 位置后设备无法开机

当主电源处于异常状态、仪器未连接到主电源 / 不间断电源 (UPS) 或 UPS 电量耗尽时, 就会出现供电问题。

若要解决此问题, 请执行以下步骤:

1. 检查主电源和 UPS 是否正常运行。
2. 确保仪器已连接到主电源或 UPS。

控制软件运行过程中出现错误提示

当参数设置不当或软硬件通讯发生错误时, 可能会出现错误提示。

若要解决此问题, 请执行以下步骤:

1. 在维护界面启动系统自检。查看自检失败的相关硬件信息。
2. 查看错误日志, 根据界面提示处理故障。
3. 重启仪器。

负压异常

当负压数值显示为红色时, 负压异常。

操作步骤如下:

1. 使用除尘气罐吹净载片背面, 确保无可见灰尘。



警告

使用除尘气罐清除载片背面的灰尘时, 避免将空气吹入进液孔。

2. 如问题仍然存在, 请联系技术支持。

测序界面出现温度异常警告

测序仪长时间关闭后, 试剂仓将处于室温, 重新开机后传感器会检测到试剂仓超出预设温度。当温控板出现错误时, 也可能出现此问题。

若要解决此问题, 请执行以下步骤:

1. 等待试剂仓冷却。当试剂仓处于工作温度时, 错误提示会自动消失。
2. 重新启动测序仪。

测序界面中出现与 LT 板 (激光器温控板) 相关的温度错误消息和警告

当LT板的温度超过预设限值和/或温度传感器错误出现错误时, 可能会出现错误消息。建议记录测序运行的警告和相关日志, 并联系技术支持。

废液液位传感器报警

如果废液液位水平超出预设限值、液位传感器安装不正确或液位传感器损坏, 废液液位传感器可能会报警。建议记录测序运行的警告和相关日志, 并联系技术支持。

DNB 加载仪异常

界面提示载片仓仓门已打开

当载片仓仓门打开时出现此提示。请确保仓门已关闭。

负压异常

当负压数值显示为红色时，负压异常。

操作步骤如下：

1. 使用 75% 酒精润湿的无尘纸或无尘布轻轻擦拭平台表面，并用除尘气罐吹净，确保载片平台清洁无尘。
2. 使用除尘气罐吹净载片背面，确保无可见灰尘。
 **警告**
 使用除尘气罐清除载片背面的灰尘时，避免将空气吹入进液孔。
3. 如问题仍然存在，请联系技术支持。

试剂针在操作过程中撞到加载板后变形

如果位置设置不正确，试剂针可能会与加载板接触。如果发生这种情况，请联系技术支持。

进入载片的流体管路中存在气泡

吸入试剂时，载片的流体管路中可能存在气泡。

若要解决此问题，请执行以下步骤：

1. 加载完成后，按下载片负压按钮释放载片。
2. 检查密封圈安装是否平整到位。否则，请重新安装密封圈。

载片没有固定到载片平台上

如果载片未吸附到加载仪上的载片平台，可能是由于未按下吸附按钮，或载片平台 /

或载片背面可能存在灰尘、碎屑或损坏。

若要解决此问题，请执行以下步骤：

1. 检查是否按下了载片吸附按钮。
2. 检查载片平台是否有灰尘、碎屑或损坏。如有，清洁载片平台。具体操作，参考说明书相关章节。

液体不通过载片的流体管路

当密封圈上存在异物或损坏时，液体可能无法通过流体管路。如果液体无法通过流体管路，载片背部或流体管路中可能存在异物。

若要解决此问题，请执行以下步骤：

1. 检查载片平台上的密封圈是否完好无损，或者是否有任何异物堵塞密封圈。
2. 检查载片背部或载片平台表面是否有异物。如存在异物，清洁载片或载片平台。具体操作，参考说明书相关章节。

载片平台发生泄漏

如果出现以下情况，载片加载阶段可能会发生泄漏：

- 未安装密封圈。
- 密封圈未正确安装。
- 载片背面有异物。
- 流体管路被阻塞。

若要解决此问题，请执行以下步骤：

1. 检查密封圈是否安装。
2. 检查载片平台上的密封圈是否完好，或者是否有异物堵塞密封圈。
3. 检查载片背面或载片平台表面是否有异物。如存在异物，清洁载片或载片平台。具体操作，参考说明书相关章节。

远程服务器异常

测序仪提示 ZLIMS 断开连接

当测序仪与 MGI-ZTRON-LITE 断开连接或在 MGI-ZTRON-LITE 上无法打开 ZLIMS 页面时, 会出现错误提示。

操作步骤如下:

1. 检查测序仪与 MGI-ZTRON-LITE 网口连接的网线是否松动。
2. 如问题仍然存在, 请联系技术支持。

测序仪提示“磁盘空间不足”

当测序仪上的远程服务器磁盘空间不足时, 会出现错误提示。

提示

PE150 单载片平台测序约需 5 TB, PE100 单载片平台测序约需 3.5 TB。

• FPGA 配置

- ① 返回测序仪计算机 (以下简称 SBC) 系统桌面。具体操作, 请联系技术支持。
- ② 通过系统的远程桌面连接功能, 进入 BIS 系统桌面, 打开【我的电脑】。
- ③ 查看远程服务器挂载目录的剩余空间是否满足测序需求。如空间不足, 拷贝挂载目录中的数据至存储服务器或移动硬盘, 然后删除已拷贝的数据以释放挂载磁盘空间。

• GPU 配置

- ① 返回测序仪计算机 (以下简称 SBC) 系统桌面。具体操作, 请联系技术支持。
- ② 使用 VNC Viewer 远程连接 BCS:
 - a. 双击打开 VNC Viewer。
 - b. 在 VNC Viewer 中, 双击打开 zebraCall。
- ③ 查看远程服务器挂载目录的剩余空间是否满足测序需求。如空间不足, 备份数据并释放磁盘空间。如有疑问, 请联系技术支持。

试剂异常

DNB 浓度低

当 DNB 浓度不符合要求时, 进行如下操作:

- 检查所用 DNB 制备试剂套装是否过期。
- 检查文库是否符合要求。
- 重新制备 DNB。如问题仍然存在, 请联系技术支持。

进行 PE 测序时, 忘记在 8 号孔中添加试剂

MDA 酶 II 是制备 PE 测序二链模板所必需的。准备测序试剂槽时, 必须向 8 号孔中加入适量的 MDA 酶混合液 II 和 MDA 试剂。如果在开始测序运行之前未将 MDA 混合液添加到 8 号孔中, 且测序流程处于 Read1 测序阶段, 可通过执行以下步骤来解决此问题:

1. 暂停测序流程: 在测序界面点击 , 在弹出的确认框中选择【是】。
2. 抬起试剂针: 点击 , 在弹出的确认框中选择【是】, 再点击【完成】。
3. 在测序试剂槽的 8 号孔中添加试剂:
 - ① 打开试剂仓门, 取出测序试剂槽。
 - ② 根据要求在 MDA 试剂管中加入 MDA 酶混合液 II, 制备 MDA 混合液。
 - ③ 充分混匀并将所有混合液转移到 8 号孔中。
 - ④ 将准备好的测序试剂槽重新放入测序仪。
4. 恢复测序:
 - ① 在主界面上点击【测序】>【恢复测序】。
 - ② 使用除尘气罐清洁载片, 确保载片表面和背面不存在可见的灰尘。将载片插入芯区, 点击芯区按钮, 将载片加载至测序仪。



警告
 使用除尘气罐清除载片背面的灰尘时, 避免将空气吹入进液孔。
 - ③ 点击【下一步】查看参数, 确保所有参数无误。
 - ④ 点击【开始】>【继续】。

断点续测

测序过程中，流程可能会因为意外情况中断，包括测序因机械臂故障、载片转移失败、流体故障或拍照失败等。解决故障后可进行断点续测。

操作步骤如下：

1. 在测序界面，点击【完成】。
2. 解决故障后，在主界面点击【测序】>【恢复测序】。



处理过程中如取出了测序试剂槽或清洗试剂槽，恢复测序前务必重新将试剂槽放置到位。

3. 重新加载载片。

- ① 用除尘气罐吹净载片，确保载片表面和背面无可见灰尘。



使用除尘气罐清除载片背面的灰尘时，避免将空气吹入进液孔。

- ② 将载片放入芯驱，点击芯驱按钮。
4. 点击【下一步】，检查测序参数是否正确。
5. 点击【开始】>【继续】，恢复测序流程。

试剂盒暂存

- 如试剂盒已经融化（包括 dNTPs），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，可放于 2 °C ~ 8 °C 暂存，使用前充分混匀试剂槽：
 - 24 h 内可正常使用。
 - 7 天内可用于测序，但可能影响测序质量。
 - 超过 7 天不建议使用。
- 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，放于 2 °C ~ 8 °C 暂存，并于 24 h 内使用。使用前轻轻混匀试剂槽。混匀时注意避免试剂溅出造成交叉污染。

产生气泡

- **MGIDL-T7RS:**

- ① 检查密封圈是否安装到位。
- ② 检查加样板各孔中的试剂是否足够。
- ③ 更换一张废旧载片，检查泵液情况。
- ④ 如仍有较多气泡，请联系技术支持。

- **DNBSEQ-T7RS:**

- ① 检查纯净水桶中的纯水是否充足。
- ② 检查纯净水桶中的水管是否穿过把手。
- ③ 检查试剂针是否正常下针。如试剂针无法正常下针，重新启动控制软件。
- ④ 如重启后问题仍然存在，请联系技术支持。

加载 DNB 或测序时，泵液失败

- **MGIDL-T7RS:**

- ① 检查纯净水桶中的纯水是否充足。
- ② 移除载片，检查密封圈上是否有可见灰尘。如有，使用除尘气罐吹净。
- ③ 重新放置载片，再次加载。
- ④ 如问题仍然存在，请联系技术支持。

- **DNBSEQ-T7RS:**

- ① 检查纯净水桶中的纯水是否充足。
- ② 检查试剂针是否正常下针。如试剂针无法正常下针，重新启动控制软件。
- ③ 如问题仍然存在，请联系技术支持。

出现杂质

1. 对 MGIDL-T7RS 和 DNBSEQ-T7RS 均进行手动清洗。
2. 若手动清洗维护后仍无改善，重新配制清洗试剂，并再次进行手动清洗。
3. 如问题仍然存在，请联系技术支持。

自定义测序方案

自定义测序方案填写规则如下：

- 测序方案名称支持字母、数字、“+”、“_”和“-”。
- 测序方案名称会进行重复性校验，即新的测序方案名称不能与已有测序方案名称重复。
- 一链读长、二链读长、Barcode 读长与 DualBarcode 读长仅支持数字。
- 一链暗反应读长与二链暗反应读长支持用户设置多段暗反应读长，多段之间以英文“,” 分割，无空格，每段支持“数字”和“数字 - 数字”。



提示

暗反应是指只进行生化反应，不做采图处理的 cycle。

例：目前有一个测序需求如下：

- 一链读长为 100 循环，二链读长为 100 循环。
- Barcode 读长为 10 循环，DualBarcode 读长为 10 循环。
- 在一链读长的 100 个循环中，第 20~30、第 50~60 个循环需要做暗反应；二链读长的 100 个循环中，第 20~30 个循环需要做暗反应。
- 将该测序方案命名为“PE100+10+10+Dark”。

自定义测序方案填写如下图所示：

自定义测序方案				
测序方案名称	PE100+10+10+Dark			
	一链	二链	Barcode	DualBarcode
读长	100	100	10	10
	一链	二链		
暗反应	20-30,50-60		20-30	