

编号:H-020-000927-00

| 货号            | 产品型号            |
|---------------|-----------------|
| 940-001895-00 | T7 STO FCL PE75 |

STOmics MGI

# 时空可视化试剂套装

## DNBSEQ-T7RS

说明书

版本:4.0

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  
电 话：4000-688-114  
邮 箱：MGI-service@mgi-tech.com  
网 址：www.mgi-tech.com

仅供科研使用

武汉华大智造科技有限公司

---

## 关于说明书

本说明书适用于 DNBSEQ-T7RS 时空可视化试剂套装，说明书版本 4.0。

本产品使用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使用说明书进行重印、复制、修改、传播或公布给他人。本产品使用说明书的读者为终端用户。产品使用说明书作为试剂套装的一部分，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使用说明书。

华大智造对本产品使用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，确保本产品使用说明书的准确性。但是，华大智造对遗漏不承担责任，并保留任何对本产品使用说明书和试剂套装进行改进以提高其可靠性、功能或设计的权利。

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。

©2024-2025 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                                          |
|-----|-------------|-------------------------------------------------|
| 4.0 | 2025 年 06 月 | 适配 CITE V1.1-cDNA 和 CITE V1.1-ADT 文库 pooling 测序 |
| 3.0 | 2025 年 01 月 | 适配 FF V1.3 文库测序                                 |
| 2.0 | 2024 年 06 月 | 更新产品名称                                          |
| 1.0 | 2024 年 04 月 | 首次发布                                            |

## 试剂盒基本信息

| 货号            | 名称                    | 型号              | 版本   |
|---------------|-----------------------|-----------------|------|
| 940-001895-00 | DNBSEQ-T7RS 时空可视化试剂套装 | T7 STO FCL PE75 | V1.0 |

目录

|                           |    |
|---------------------------|----|
| 第 1 章 介绍                  | 1  |
| 1.1 预期用途                  | 1  |
| 1.2 测序原理                  | 1  |
| 1.3 样本需求                  | 1  |
| 1.4 数据分析                  | 1  |
| 1.5 测序读长                  | 1  |
| 1.6 测序时长                  | 3  |
| 1.7 注意事项                  | 3  |
| 第 2 章 可视化试剂套装组分清单及自备设备和耗材 | 4  |
| 2.1 可视化试剂套装组分清单           | 4  |
| 2.2 自备设备、试剂与耗材            | 6  |
| 第 3 章 测序工作流程              | 8  |
| 第 4 章 准备 DNB              | 9  |
| 4.1 文库插入片段大小要求            | 9  |
| 4.2 文库浓度                  | 9  |
| 4.3 pooling 方案            | 10 |
| 4.3.1 确定 pooling 样本数      | 10 |
| 4.3.2 检查碱基的平衡性            | 10 |
| 4.4 制备 DNB                | 10 |
| 4.4.1 DNB 制备              | 10 |
| 4.4.1.1 估算 dsDNA 文库所需量    | 10 |
| 4.4.1.2 准备 DNB 制备试剂       | 11 |
| 4.4.1.3 制备 DNB            | 12 |
| 4.5 测定 DNB 浓度及 pooling    | 13 |
| 4.5.1 测定 DNB 浓度           | 13 |
| 4.5.2 DNB pooling         | 14 |

|                                                     |           |
|-----------------------------------------------------|-----------|
| 4.5.2.1 计算每个样本理论相对量                                 | 14        |
| 4.5.2.2 计算总相对量                                      | 14        |
| 4.5.2.3 计算每个样本 pooling 体积                           | 14        |
| 4.5.3 CITE V1.1-cDNA 与 CITE V1.1-ADT 文库 DNB pooling | 14        |
| 4.5.3.1 计算每个样本理论相对量                                 | 14        |
| 4.5.3.2 计算总相对量                                      | 15        |
| 4.5.3.3 计算每个样本 pooling 体积                           | 15        |
| <b>第 5 章 加载 DNB</b>                                 | <b>15</b> |
| 5.1 准备样本加载试剂板和缓冲液                                   | 15        |
| 5.1.1 解冻样本加载试剂板                                     | 15        |
| 5.1.2 解冻 DNB 加载试剂                                   | 15        |
| 5.1.3 准备 0.1 M NaOH 试剂                              | 16        |
| 5.2 准备测序载片                                          | 16        |
| 5.3 配制 DNB 加载体系                                     | 16        |
| 5.4 加载 DNB                                          | 17        |
| <b>第 6 章 测序前准备</b>                                  | <b>24</b> |
| 6.1 准备测序试剂槽                                         | 24        |
| 6.2 准备清洗试剂槽                                         | 27        |
| 6.3 准备纯水试剂桶                                         | 29        |
| <b>第 7 章 测序</b>                                     | <b>30</b> |
| 7.1 放置试剂槽                                           | 30        |
| 7.2 进入主界面                                           | 30        |
| 7.3 放置测序载片                                          | 31        |
| 7.4 测序参数配置                                          | 32        |
| 7.5 复核信息                                            | 35        |
| 7.6 开始测序                                            | 36        |
| 7.7 数据获取                                            | 37        |

---

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| <b>第 8 章 清洗维护</b>                   | <b>38</b> |
| 8.1 清洗规则                            | 38        |
| 8.2 清洗准备                            | 38        |
| 8.2.1 准备清洗试剂                        | 38        |
| 8.2.2 准备加载仪清洗板                      | 39        |
| 8.2.3 准备测序仪清洗槽                      | 40        |
| 8.2.4 准备清洗载片                        | 40        |
| 8.3 手动清洗流程                          | 41        |
| 8.3.1 手动清洗 MGIDL - T7RS ( ~20 分钟 )  | 41        |
| 8.3.2 手动清洗 DNBSEQ - T7RS ( ~40 分钟 ) | 41        |
| 8.3.3 清洗载片、样本加载板和清洗槽子的反复使用          | 42        |
| 8.3.3.1 清洗载片                        | 42        |
| 8.3.3.2 空 样本加载板                     | 42        |
| 8.3.3.3 空 清洗槽子                      | 42        |

---

|                          |           |
|--------------------------|-----------|
| <b>第 9 章 异常处理</b>        | <b>42</b> |
| 9.1 DNB 浓度低              | 42        |
| 9.2 8 号孔漏加试剂             | 42        |
| 9.3 试剂盒暂存                | 43        |
| 9.4 负压异常                 | 43        |
| 9.5 产生气泡                 | 44        |
| 9.5.1 MGIDL - T7RS 产生气泡  | 44        |
| 9.5.2 DNBSEQ - T7RS 产生气泡 | 44        |
| 9.6 DNB 加载或测序过程中泵液失败     | 44        |
| 9.7 出现杂质                 | 44        |

---

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| <b>附录 1 DNB 定量操作指导</b> | <b>45</b> |
|------------------------|-----------|

---

|                   |           |
|-------------------|-----------|
| <b>附录 2 制造商信息</b> | <b>46</b> |
|-------------------|-----------|

---

--- 此页有意留白 ---

---

# 第 1 章 介绍

本说明书是使用 DNBSEQ-T7RS 可视化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，可视化试剂盒组分、存储环境及使用方法，测序上机操作以及测序完成后的仪器维护等。

---

## 1.1 预期用途

本产品是用于测定时空文库序列的通用试剂盒，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。本试剂套装仅供科研使用，不能用于临床诊断。

---

## 1.2 测序原理

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

本试剂套装适用于 Stereo-seq 16 Barcode 建库试剂盒（货号：101KL160）构建的时空转录组 FF V1.3 文库、时空转录组 FFPE 文库、时空蛋白转录组 Stereo-CITE V1.1 的转录组文库（CITE V1.1-cDNA）和抗体衍生标签（ADT）文库（CITE V1.1-ADT）。

---

## 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

在测序过程中，测序总循环数是按照所选择的测序读长执行的。如 PE25+62 测序，按照一链 25 循环，二链 62 循环（7-9 循环暗反应），共计 84 循环执行，最后得到 84 循环的序列数据。标签序列的 10 循环需要额外进行计算。

 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 测序循环数示例

| 文库类型                             | 测序读长     | 一链读长             | 二链读长           | 标签读长 | 总读长       | 最大支持循环数 |
|----------------------------------|----------|------------------|----------------|------|-----------|---------|
| FFPE                             | PE25+62  | 25               | 62 (7-9 循环暗反应) | 10   | 26+63+10  | 192     |
| FF V1.3                          | PE50+100 | 50 (26-40 循环暗反应) | 100            | 10   | 51+101+10 | 192     |
| CITE V1.1-cDNA+<br>CITE V1.1-ADT | PE50+100 | 50 (26-40 循环暗反应) | 100            | 10   | 51+101+10 | 192     |

## 1.6 测序时长

表 2 测序理论时长

| 文库类型                             | 测序读长     | 单边 (小时)     | 四边 (小时)     | DNB 制备 (小时) | DNB 加载 (小时) |
|----------------------------------|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| FFPE                             | PE25+62  | 11.5 ~ 12.5 | 12.5 ~ 13.5 | 1           | 2.5         |
| FF V1.3                          | PE50+100 | 17.5 ~ 18.5 | 18.5 ~ 19.5 | 1           | 2.5         |
| CITE V1.1-cDNA+<br>CITE V1.1-ADT | PE50+100 | 17.5 ~ 18.5 | 18.5 ~ 19.5 | 1           | 2.5         |

-  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 2.5 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。

---

## 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 可视化试剂套装组分清单及自备设备和耗材

2.1 可视化试剂套装组分清单

- 提示
- 不同批次之间试剂组分严禁混用。
  - 组分和包装盒的批次是分开的。
  - 请保持组分存放在包装盒中，直至使用完毕。

表 3 DNBSEQ-T7RS 时空可视化试剂套装（T7 STO FCL PE75）货号：940-001895-00

| 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 测序载片（T7 STO FCL PE75）<br>货号：940-001901-00     |                                                                                     |                 |                 |                 |       |
| 测序载片（T7-2 FCL）                                            | /                                                                                   | 1张              | 2 °C ~ 8 °C     | 2 °C ~ 8 °C     | 10 个月 |
| DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V4.0（T7 STO）<br>货号：940-001890-00     |                                                                                     |                 |                 |                 |       |
| TE 缓冲液                                                    |  | 480 μL / 支 ×1 支 | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C | 12 个月 |
| 时空组学 DNB 制备缓冲液                                            |  | 200 μL / 支 ×1 支 |                 |                 |       |
| DNB 聚合酶混合液 I（OS-V4.0）                                     |  | 400 μL / 支 ×1 支 |                 |                 |       |
| DNB 聚合酶混合液 II（OS-V4.0）                                    |  | 20 μL / 支 ×1 支  |                 |                 |       |
| DNB 终止缓冲液                                                 |  | 200 μL / 支 ×1 支 |                 |                 |       |
| DNBSEQ-T7RS DNB加载试剂盒（T7 STO FCL PE75）<br>货号：940-001888-00 |                                                                                     |                 |                 |                 |       |
| DNB 加载缓冲液 I                                               |  | 300 μL / 支 ×1 支 | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C | 12 个月 |
| DNB 加载缓冲液 6                                               |  | 150 μL / 支 ×1 支 |                 |                 |       |
| 0.5 mL 冻存管                                                |  | 1支              |                 |                 |       |
| 样本加载试剂板                                                   | /                                                                                   | 1个              |                 |                 |       |
| DNBSEQ-T7RS 时空可视化试剂盒（T7 STO FCL PE75）<br>货号：940-001892-00 |                                                                                     |                 |                 |                 |       |

| 组分信息                                | 管盖颜色                                                                              | 规格及数量           | 储存温度            | 运输温度            | 有效期   |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|
| dNTPs 混合液 II                        |  | 2.73 mL/ 支 ×1 支 | -25 °C ~ -15 °C | -80 °C ~ -15 °C | 12 个月 |
| dNTPs 混合液                           |  | 2.29 mL/ 支 ×1 支 |                 |                 |       |
| DNA 聚合酶混合液 II                       |  | 3.43 mL/ 支 ×1 支 |                 |                 |       |
| MDA 试剂                              |  | 4.20 mL/ 支 ×1 支 |                 |                 |       |
| MDA 聚合酶混合液 II                       |  | 0.60 mL/ 支 ×1 支 |                 |                 |       |
| 测序试剂槽                               | /                                                                                 | 1 个             |                 |                 |       |
| 透明封口膜                               | /                                                                                 | 2 张             |                 |                 |       |
| DNBSEQ-T7RS清洗试剂盒（ T7 STO FCL PE75 ） |                                                                                   |                 |                 |                 |       |
| 货号： 940-001904-00                   |                                                                                   |                 |                 |                 |       |
| 清洗试剂槽                               | /                                                                                 | 1 个             | 0 °C ~ 30 °C    | 40 °C以下         | 12 个月 |

2.2 自备设备、试剂与耗材

- 提示
- DNB制备和加载禁止使用带滤芯的吸头，必须使用推荐的品牌货号。
  - 其他耗材建议使用推荐品牌货号。

表 4 自备设备和耗材

| 种类 | 物料名称                     | 推荐品牌          | 供应商货号         |
|----|--------------------------|---------------|---------------|
| 设备 | Qubit 4.0 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             |
|    | 制冰机                      | 无             | 无             |
|    | 2 °C ~ 8 °C冰箱            | 无             | 无             |
|    | -25 °C ~ -15 °C冰箱        | 无             | 无             |
|    | 全自动样本加载仪                 | MGI           | 900-000132-00 |
| 试剂 | Qubit ssDNA Assay Kit    | Thermo Fisher | Q10212        |
|    | Qubit dsDNA HS Assay Kit | Thermo Fisher | Q32851/Q32854 |
|    | 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   |

| 种类 | 物料名称                       | 推荐品牌          | 供应商货号               |
|----|----------------------------|---------------|---------------------|
| 耗材 | 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           | BI-200K-H           |
|    | 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 |
| 耗材 | 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                |
|    | 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 运输管                   | AXYGEN        | 无                   |
|    | 冰盒                         | AXYGEN        | 无                   |
|    | 制冰机                        | 无             | 无                   |
|    | 无尘纸                        | 无             | 无                   |
|    | 自封袋                        | 拓泰诺           | 无                   |
|    | 空 T7测序试剂槽                  | MGI           | 940-001611-00       |
|    | 空 T7清洗试剂槽                  | MGI           | 940-001612-00       |
|    | 空 样本加载板                    | MGI           | 940-001610-00       |

## 第 3 章 测序工作流程

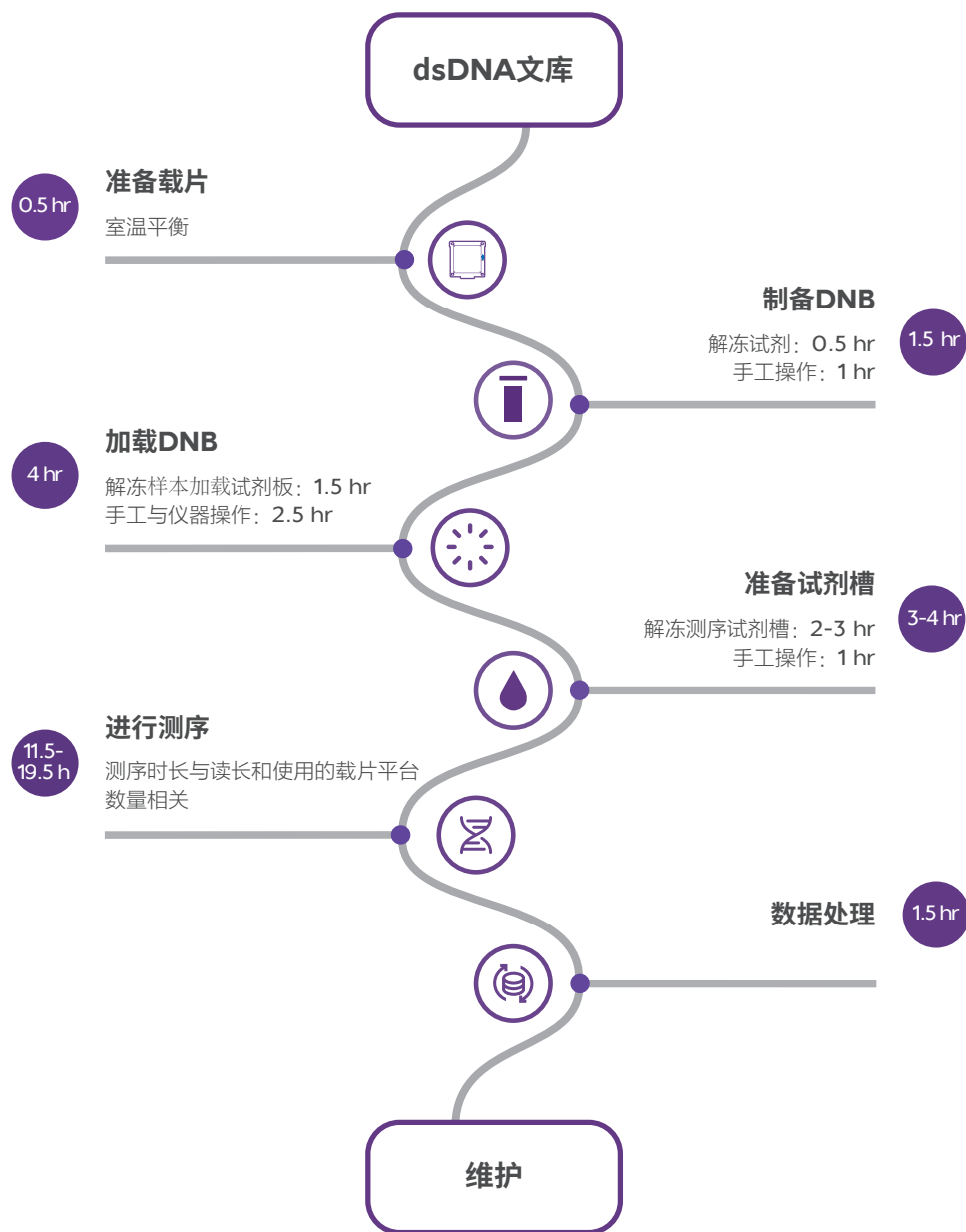


图 1 操作流程

 提示 以上提到的手动操作时间仅供参考，实际的时间需要根据操作的熟练程度决定。

## 第 4 章 准备 DNB

### 4.1 文库插入片段大小要求

本试剂盒适用于时空转录组 FF V1.3 文库、时空转录组 FFPE 文库测序、时空蛋白转录组 CITE V1.1-cDNA 文库和抗体衍生标签 CITE V1.1-ADT 文库，文库为双链 DNA。FFPE 文库插入片段范围在 150 bp~1000 bp，同时主带集中在 ±100 bp 以内。FF V1.3 文库插入片段范围在 200 bp~600 bp，同时主带集中在 ±100 bp 以内。CITE V1.1-cDNA 文库插入片段范围在 200 bp~600 bp，同时主带集中在 ±100 bp 以内。CITE V1.1-ADT 文库插入片段范围在 200 bp~260 bp。

 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。

表 5 推荐插入片段长度和单张载片数据产出

| 产品型号            | 文库类型           | 理想文库插入片段大小 (bp) | 数据量 (M) |
|-----------------|----------------|-----------------|---------|
| T7 STO FCL PE75 | FFPE           | 150 ~ 1000      | 4000    |
|                 | FF V1.3        | 200 ~ 600       | 3500    |
|                 | CITE V1.1-cDNA | 200 ~ 600       | 3500    |
|                 | CITE V1.1-ADT  | 200 ~ 260       |         |

### 4.2 文库浓度

表 6 文库浓度要求

| 文库类型           | 初始文库 dsDNA 浓度要求 |
|----------------|-----------------|
| FFPE dsDNA     | ≥ 3 ng/μL       |
| FF V1.3 dsDNA  | ≥ 20 fmol/μL    |
| CITE V1.1-cDNA | ≥ 20 fmol/μL    |
| CITE V1.1-ADT  | ≥ 10 fmol/μL    |

 提示

- 若文库浓度未知，建议使用Qubit dsDNA HS Assay Kit和 Qubit 4.0 荧光定量仪定量出实际浓度（ng/μL）。
- fmol与ng换算公式如下：

$$C(\text{fmol}/\mu\text{L}) = \frac{3030 \times C(\text{ng}/\mu\text{L})}{N \times 2}$$

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），C表示文库浓度。

- 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。

---

## 4.3 pooling 方案

### 4.3.1 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%。

$$\text{样本最大pooling数目} = \frac{\text{一张载片总数据量} \times 90\%}{\text{应用需要数据量}}$$

 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。

例如：若总数量为 3500 M，每个样本需要 380 M 的数据量，建议每张载片最多同时测序 8 个样本。

### 4.3.2 检查碱基的平衡性

每一个 cycle 中，平衡的碱基组成对于好的测序质量来说非常重要，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%。

- 检查已经 pooling 样本的 Barcode，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 样本的 Barcode，确定没有多个样本含有相同的 Barcode，否则可能导致测序质量较差。

---

## 4.4 制备 DNB

### 4.4.1 DNB 制备

#### 4.4.1.1 估算 dsDNA 文库所需量

- 一张测序载片需要加载的 DNB 体积为 270  $\mu\text{L}$ ，DNB 制备体系的体积为 100  $\mu\text{L}$ 。
- 下表为 100  $\mu\text{L}$  DNB 制备体系所需 dsDNA 文库体积：

表 7 所需 dsDNA 文库体积

| 文库类型                 | 所需 dsDNA 文库体积 V (μL) |
|----------------------|----------------------|
| FFPE dsDNA           | V=60 ng/C1           |
| FF V1.3 dsDNA        | V=400 fmol/C2        |
| CITE V1.1-cDNA dsDNA | V=400 fmol/C3        |
| CITE V1.1-ADT dsDNA  | V=200 fmol/C4        |

-  提示
- C1 表示第 9 页“文库浓度”中得到的 FFPE 文库浓度 (ng/μL)，C2 表示第 9 页“文库浓度”中得到的 FF V1.3 文库浓度 (fmol/μL)。C3 表示第 9 页“文库浓度”中得到的 CITE V1.1-cDNA 文库浓度 (fmol/μL)。C4 表示第 9 页“文库浓度”中得到的 CITE V1.1-ADT 文库浓度 (fmol/μL)。
  - 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。

例：

样本 A，所需数据量为 a，pooling 文库的总数据量需求为 b。

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  $V/100$ ，取整数 +1。

4.4.1.2 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 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V4.0 中取出以下试剂并置于室温解冻，约 0.5 小时。

表 8 试剂准备 1

| 组分             | 管盖颜色                                                                                  |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| TE 缓冲液         |  |
| 时空组学 DNB 制备缓冲液 |  |
| DNB 终止缓冲液      |  |

3. 从 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒中取出 DNB 聚合酶混合液 I (OS-V4.0) 置于冰上解冻，约 0.5 小时。

表 9 试剂准备 2

| 组分                     | 管盖颜色                                                                                  |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| DNB 聚合酶混合液 I (OS-V4.0) |  |

4. 待试剂融化后，使用漩涡振荡器振荡混匀 5 秒，短暂离心置于冰上备用。

4.4.1.3 制备 DNB

操作步骤如下：

1. 取用 0.2 mL 八联管或 PCR 管，在冰上按下表配制 DNB 制备反应体系 1：

 提示 根据第 10 页“估算 dsDNA 文库所需量”来确认文库体积及制备份数。

表 10 DNB 制备反应体系 1

| 组分             | 管盖颜色                                                                              | 体积 (μL) |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------|---------|
| TE 缓冲液         |  | 20 - V  |
| 时空组学 DNB 制备缓冲液 |  | 20      |
| 文库 dsDNA       | /                                                                                 | V       |
| 总体积            |                                                                                   | 40      |

2. 将反应混合液用漩涡振荡器振荡混匀，迷你离心机离心 5 秒，置于 PCR 仪中反应，反应条件如下：

 提示 程序反应完成后立即将样本至于冰上，缓慢降温可能会导致 DNA 复性，影响测序结果。

表 11 DNB 制备反应条件 1

| 温度                       | 时间   |
|--------------------------|------|
| 105 °C 热盖                | On   |
| 95 °C                    | 3 分钟 |
| 程序反应完成后立即将样本至于冰上，放置 2 分钟 |      |

3. 取出 DNB 聚合酶混合液 II ( OS-V4.0 )，短暂离心 5 秒，置于冰盒上备用。

 提示 请勿将 DNB 聚合酶混合液 II ( OS-V4.0 ) 置于室温，请勿长时间触碰管壁。

4. 样本管冷却后使用迷你离心机离心 5 秒后，在冰上加入如下组分：

表 12 DNB 制备反应体系 2

| 组分                        | 管盖颜色                                                                                | 体积 (μL) |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| DNB 聚合酶混合液 I ( OS-V4.0 )  |  | 40      |
| DNB 聚合酶混合液 II ( OS-V4.0 ) |  | 2       |
| 总体积                       |                                                                                     | 42      |

5. 下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
- FF V1.3 文库和 FFPE 文库反应程序不同，根据实际需求选择相应的程序。
  - 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。
  - 热盖温度建议设置为 35 °C，或尽可能设置为接近 35 °C 的最低温度。

■ FF V1.3 文库、CITE V1.1-cDNA 和 CITE V1.1-ADT 文库 DNB 制备反应条件：

表 13 DNB 制备反应条件 2

| 温度       | 时间    |
|----------|-------|
| 35 °C 热盖 | On    |
| 30 °C    | 25 分钟 |
| 4 °C     | Hold  |

■ FFPE 文库 DNB 制备反应条件：

表 14 DNB 制备反应条件 2

| 温度       | 时间    |
|----------|-------|
| 35 °C 热盖 | On    |
| 30 °C    | 30 分钟 |
| 4 °C     | Hold  |

6. 当 PCR 仪温度达到 4 °C 后，立即加入 20  $\mu$ L DNB 终止缓冲液，用阔口吸头（不带滤芯）缓慢地吹打混匀 5 ~ 8 次。

- 提示
- DNB 必须使用阔口吸头（不带滤芯）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 4 °C 保存备用，并于 48 小时内使用。

## 4.5 测定 DNB 浓度及 pooling

### 4.5.1 测定 DNB 浓度

DNB 制备完成后，取用 2  $\mu$ L DNB，使用 Qubit ssDNA Assay Kit 和 Qubit 4.0 荧光定量仪进行浓度检测，浓度  $\geq 8$  ng/ $\mu$ L 即为合格。

- 提示
- 若 DNB 浓度不合格，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。定量具体操作见第 45 页“DNB 定量操作指导”。

## 4.5.2 DNB pooling

 提示 用尖口吸头缓慢的进行 DNB 取样，所有样本 DNB 取样完成后，再用阔口吸头（不带滤芯）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。

### 4.5.2.1 计算每个样本理论相对量

A 样本的理论相对量为： $A1 = A \text{ 样本所需数据量} / A \text{ 样本 DNB 浓度}$

B 样本的理论相对量为： $B1 = B \text{ 样本所需数据量} / B \text{ 样本 DNB 浓度}$

.....

H 样本的理论相对量为： $H1 = H \text{ 样本所需数据量} / H \text{ 样本 DNB 浓度}$

### 4.5.2.2 计算总相对量

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

### 4.5.2.3 计算每个样本 pooling 体积

每张载片所需 DNB 总体积为 270  $\mu\text{L}$ ，每个样本的 pooling 体积为：

A 样本的 pooling 体积为： $A2 = 270 * A1 / V$

B 样本的 pooling 体积为： $B2 = 270 * B1 / V$

.....

H 样本的 pooling 体积为： $H2 = 270 * H1 / V$

## 4.5.3 CITE V1.1-cDNA 与 CITE V1.1-ADT 文库 DNB pooling

 提示 为了保证测序碱基平衡，建议将 CITE V1.1-cDNA 和 CITE V1.1-ADT 文库质量比不低于 1:1 进行 DNB pooling，即 CITE V1.1-cDNA 文库投入质量高于 CITE V1.1-ADT 文库。

### 4.5.3.1 计算每个样本理论相对量

CITE V1.1-cDNA 样本 1 的理论相对量为： $A1 = \text{CITE V1.1-cDNA 样本 1 所需数据量} / \text{CITE V1.1-cDNA 样本 1 DNB 浓度}$

CITE V1.1-cDNA 样本 2 的理论相对量为： $B1 = \text{CITE V1.1-cDNA 样本 2 所需数据量} / \text{CITE V1.1-cDNA 样本 2 DNB 浓度}$

.....

CITE V1.1-ADT 样本 1 的理论相对量为： $H1 = \text{CITE V1.1-ADT 样本 1 所需数据量} / \text{CITE V1.1-ADT 样本 1 DNB 浓度}$

### 4.5.3.2 计算总相对量

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

### 4.5.3.3 计算每个样本 pooling 体积

每张载片所需 DNB 总体积为 270  $\mu$ L，每个样本的 pooling 体积为：

CITE V1.1-cDNA 样本 1 的 pooling 体积为： $A2 = 270 * A1 / V$

CITE V1.1-cDNA 样本 2 的 pooling 体积为： $B2 = 270 * B1 / V$

.....

CITE V1.1-ADT 样本 1 的 pooling 体积为： $H2 = 270 * H1 / V$

## 第 5 章 加载 DNB

### 5.1 准备样本加载试剂板和缓冲液

#### 5.1.1 解冻样本加载试剂板

操作步骤如下：

1. 从 DNBSEQ-T7RS DNB 加载试剂盒取出样本加载试剂板。
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 1.5 小时。
  - 2  $^{\circ}$ C ~ 8  $^{\circ}$ C 冰箱解冻：提前一天将其置于 2  $^{\circ}$ C ~ 8  $^{\circ}$ C 冰箱解冻备用。
3. 完全解冻后，置于 2  $^{\circ}$ C ~ 8  $^{\circ}$ C 冰箱备用。
4. 使用前轻轻颠倒混匀 5 次，离心 1 分钟。

#### 5.1.2 解冻 DNB 加载试剂

操作步骤如下：

1. 从 DNBSEQ-T7RS DNB 加载试剂盒中取出 DNB 加载缓冲液 6。
2. 置于室温解冻 0.5 小时。
3. 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。



提示 如发现 DNB 加载缓冲液 6 中出现结晶，使用漩涡振荡器持续剧烈振荡 1~2 分钟至沉淀重新溶解，短暂离心后方可使用。

5.1.3 准备 0.1 M NaOH 试剂

0.1 M NaOH 的配制方法见第 38 页“清洗准备”。每个样本加载试剂板需要至少 4 mL 的 0.1 M NaOH 试剂。

5.2 准备测序载片

操作步骤如下：

1. 从 DNBSEQ-T7RS 测序载片盒中取出测序载片。

 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℃~8℃保存，但 2℃~8℃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. 使用压缩空气罐将载片背面吹净。

5.3 配制 DNB 加载体系

 提示 DNB 加载体系要现配现用。

操作步骤如下：

1. 从 DNBSEQ-T7RS DNB 加载试剂盒中取出 0.5 mL 冻存管，按下表所示配制 DNB 加载体系：

 提示 该表格中的 DNB 指第 14 页“DNB pooling”中已 pooling 好的 DNB 样本。

表 15 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 6            |  | 90      |
| 3    | DNB 聚合酶混合液 II（OS-V4.0） |  | 1       |

2. DNB 加载体系用润口吸头缓慢混匀 5~8 次。

 提示 切勿离心、振荡及剧烈吹打。

## 5.4 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。
- 3. 任选空闲状态下的 A/B 进行操作。

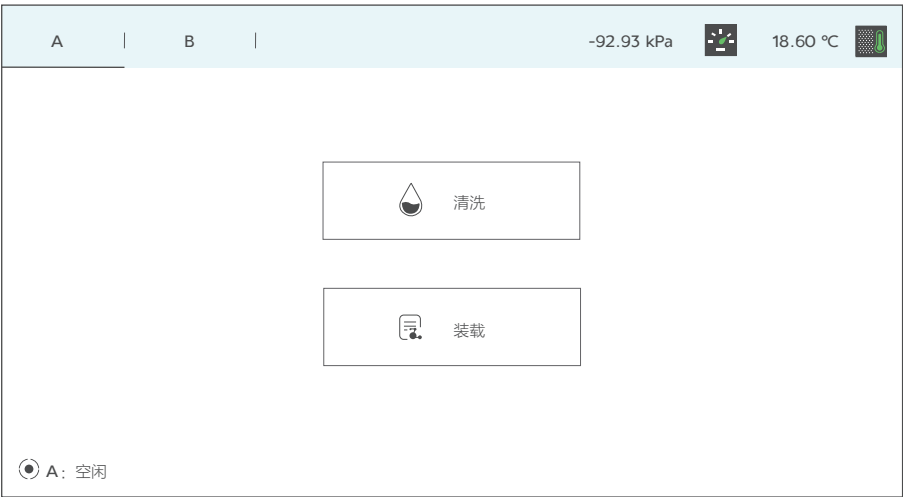


图 2 MGIDL - T7RS操作选择界面

- 4. 点击【装载】，进入下图界面：



图 3 MGIDL - T7RS信息输入界面

- 5. 打开装载仓仓门。

6. 如上图，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，按下图所示放置在 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。

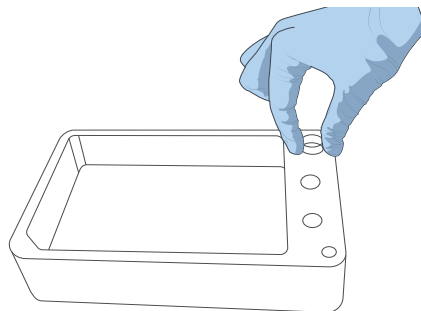


图 4 DNB管放置示意图

7. 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。

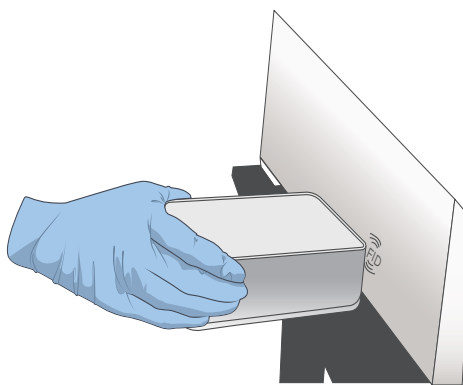


图 5 样本加载试剂板信息录入

8. 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：

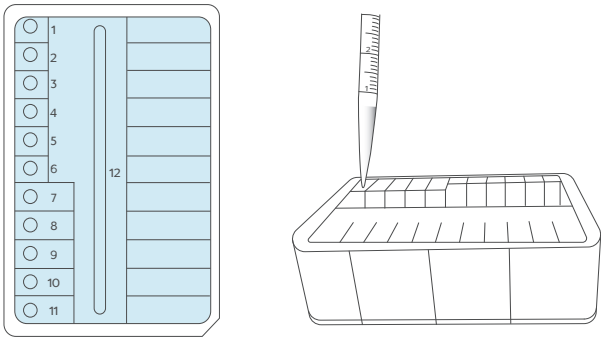


图 6 样本加载试剂板孔位信息及加液操作

9. 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。



图 7 样本加载试剂板放置示意图

10. 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。



图 8 测序载片信息确认

11. 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。

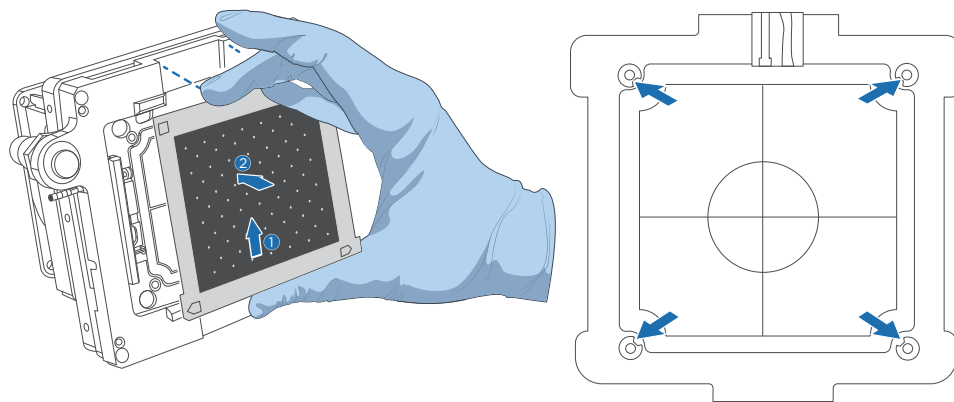


图 9 载片放置和密封垫示意图

12. 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。

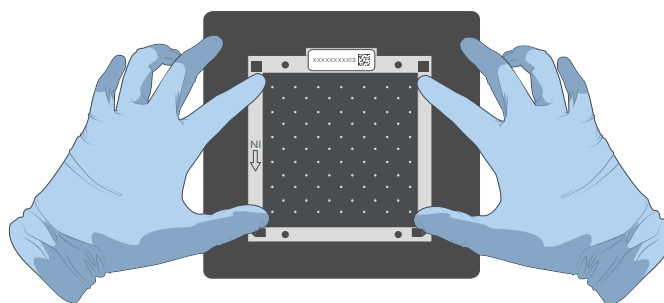


图 10 按压测序载片

13. 关闭装载仓仓门。
14. 点击【开始】，选择【是】。

15. 载片装载开始。

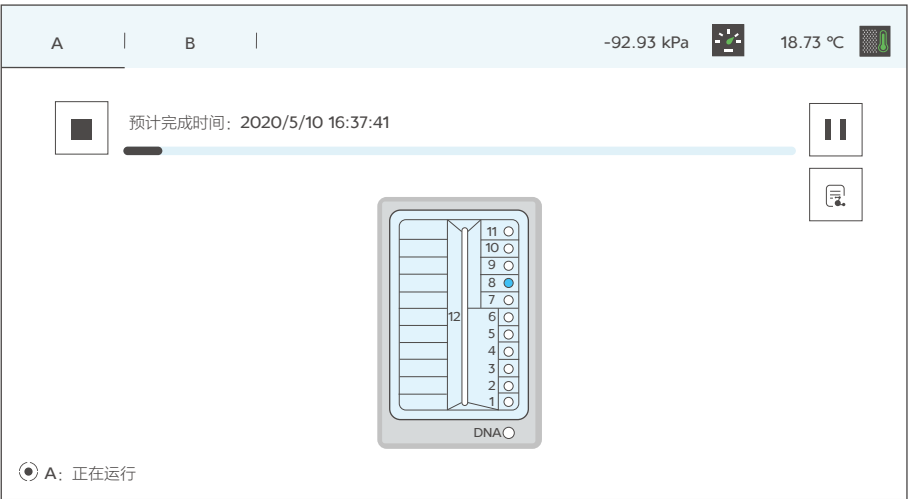


图 11 MGIDL - T7RS装载载片界面

16. 当界面如下图时，表示载片已装载完成，耗时约 2.5 小时。

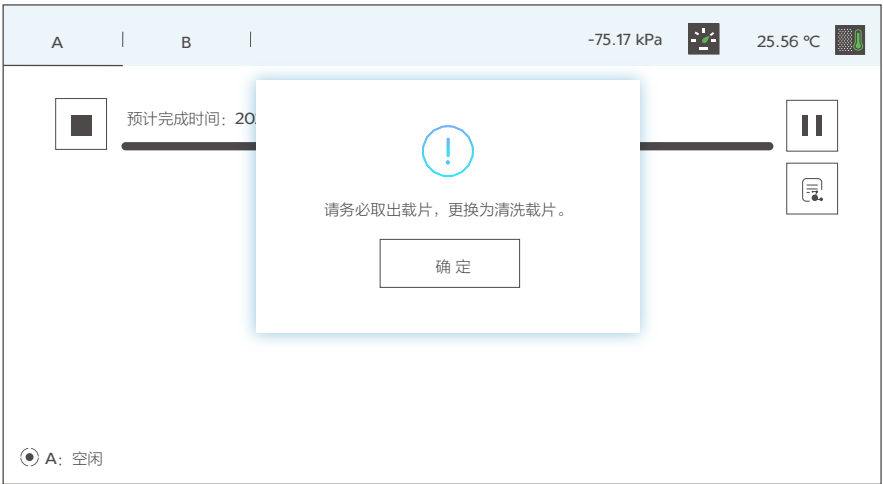


图 12 MGIDL - T7RS载片装载完成界面

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 4 °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. 取下装载完成的载片后，放入清洗载片，按下载片平台上的载片吸附按钮，点击【确定】。

19. 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 分钟。



图 13 MGIDL - T7RS后清洗界面

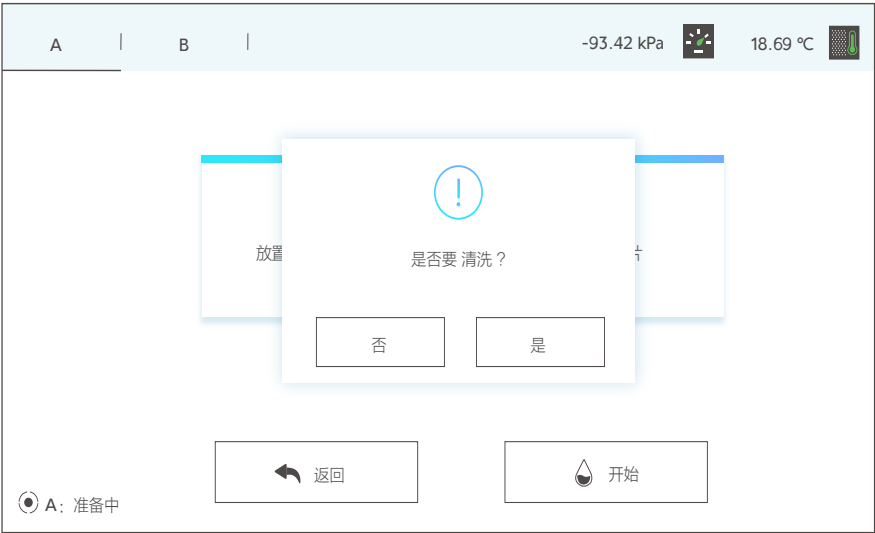


图 14 MGIDL - T7RS后清洗确认界面

20. MGIDL - T7RS 清洗开始。

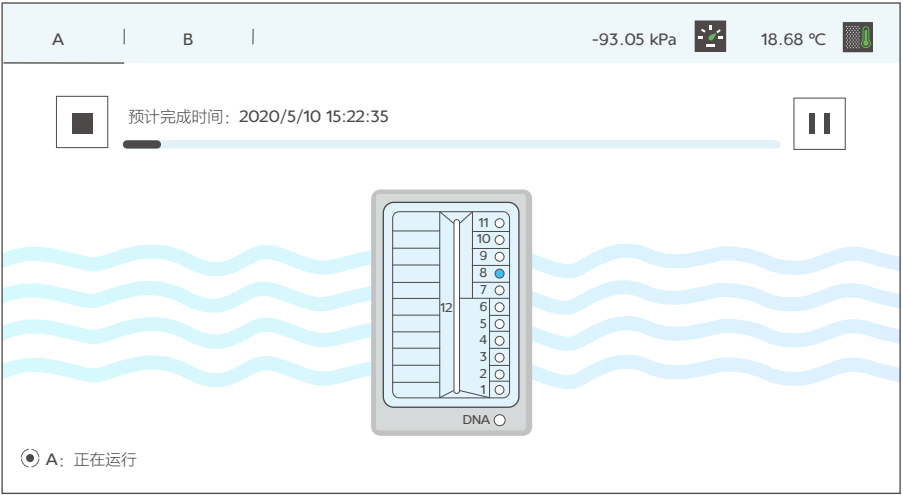


图 15 MGIDL - T7RS清洗界面

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。

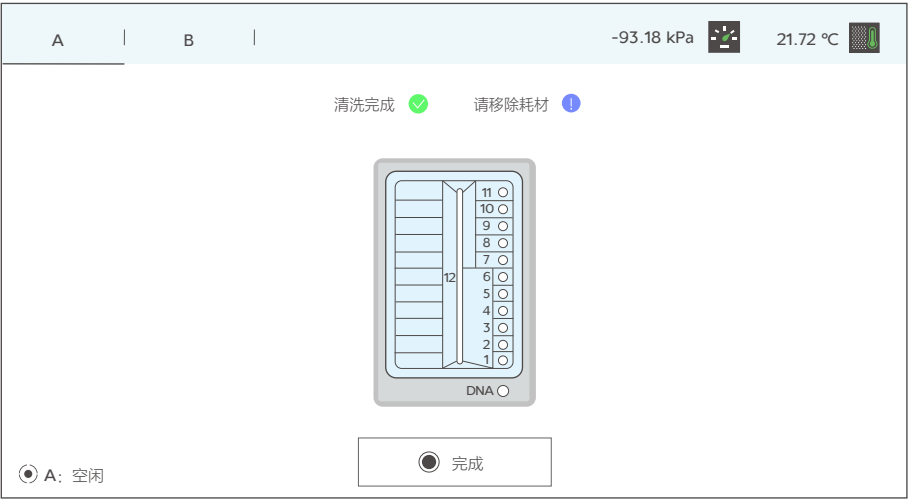


图 16 MGIDL - T7RS清洗完成界面

## 第 6 章 测序前准备

### 6.1 准备测序试剂槽

DNA 聚合酶混合液 II，dNTPs 混合液和 dNTPs 混合液 II 装在不同的管中，并与测序试剂槽一起包装。开始测序前，需在测序试剂槽的 9 号和 10 号孔位加入适量的 DNA 聚合酶混合液 II，dNTPs 混合液或 dNTPs 混合液 II。此外，8 号孔需要加入 MDA 聚合酶混合液 II 与 MDA 试剂的混合液。如试剂槽已经准备完毕但不能立刻上机测序，参考第 43 页“试剂盒暂存”。

操作步骤如下：

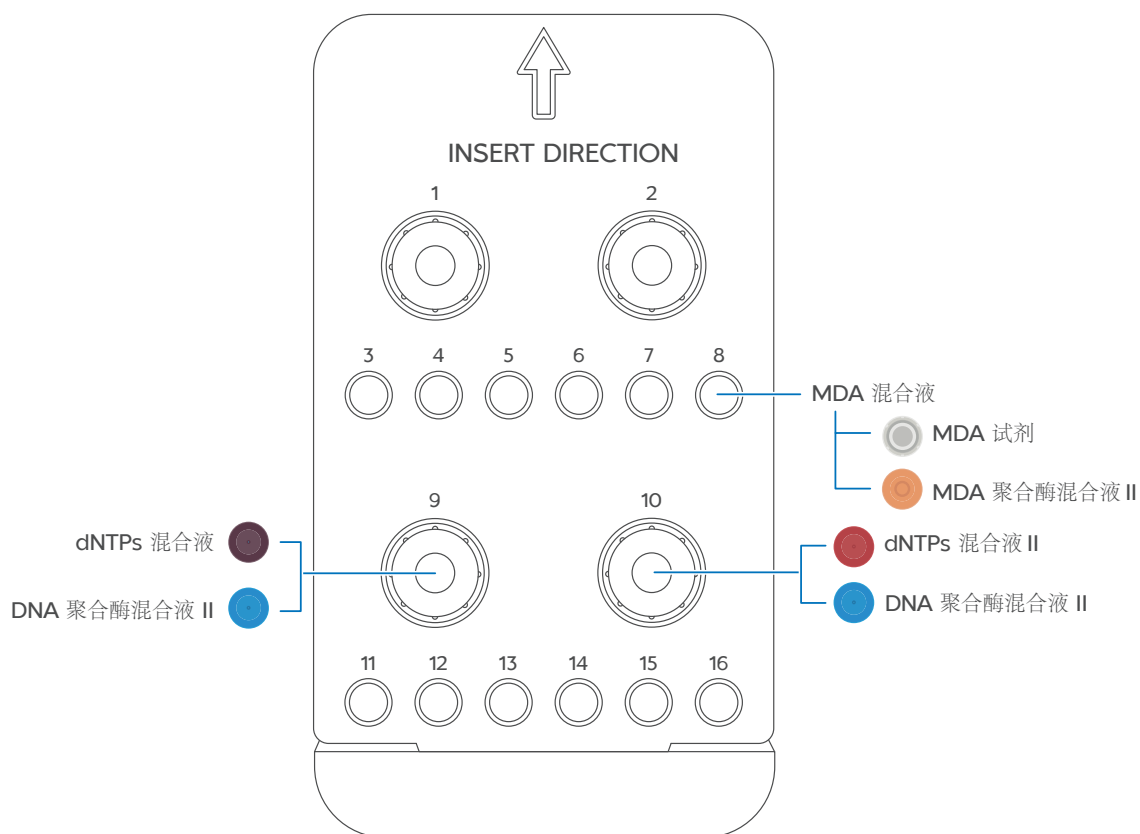


图 17 试剂槽孔位信息示意图

- 1. 从 DNBSEQ-T7RS 可视化试剂盒中取出测序试剂槽。
- 2. 将测序试剂槽常温水浴解冻，或者提前一天将其置于 2℃~8℃冰箱解冻后再水浴解冻，解冻时间见下表：

💡 提示

  - 水浴温度为 19℃~30℃。
  - “过夜”时长为 16 小时。

表 16 试剂槽水浴解冻时间

| 型号              | 解冻方式      |                   |
|-----------------|-----------|-------------------|
|                 | 室温水浴解冻（h） | 2℃~8℃冰箱过夜后室温水浴（h） |
| T7 STO FCL PE75 | 3         | 1.5               |

- 3. 完全解冻后，置于 2℃~8℃冰箱备用。
- 4. 使用无尘纸擦净试剂槽盖板以及孔周围的冷凝水。

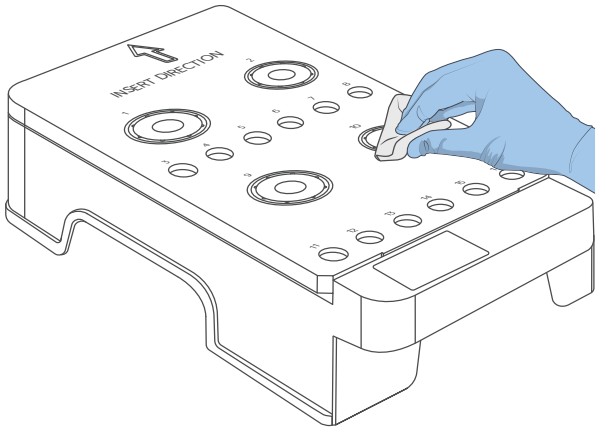


图 18 擦拭试剂槽盖板

- 5. 将试剂槽置于正前方，前后左右剧烈晃动 20~30 次，使试剂槽内各试剂混合均匀。

💡 提示

试剂槽 2 号孔位的试剂容易析出结晶，试剂槽化冻后需充分混匀，以免影响测序结果。
- 6. 从 DNBSEQ-T7RS 时空可视化试剂盒中取出 dNTPs 混合液，dNTPs 混合液 II，室温融化后（约 1 小时），置于冰上备用。

表 17 试剂准备 3

| 组分           | 管盖颜色 |
|--------------|------|
| dNTPs 混合液    | ●    |
| dNTPs 混合液 II | ●    |

- 7. 试剂化冻后，上下颠倒混匀 6 次，将其轻轻在桌面上敲打，将管盖内液体带至管底部。

8. 从 DNBSEQ-T7RS 时空可视化试剂盒中取出 DNA 聚合酶混合液 II，上下颠倒混匀 6 次，将其轻轻在桌面上敲打，将管盖内液体带至管底部，置于冰上备用。
9. 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。
10. 取对应量程的移液器，将 dNTPs 混合液和 DNA 聚合酶混合液 II 加入到 9 号孔中，加入体积如下表：

表 18 测序试剂槽 9 号孔试剂加样表

| 型号              | 体积（mL）                                                                                        |                                                                                                   |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                 | dNTPs 混合液  | DNA 聚合酶混合液 II  |
| T7 STO FCL PE75 | 2.290                                                                                         | 2.290                                                                                             |

11. 取对应量程的移液器，按照下表体积，将 dNTPs 混合液 II 和 DNA 聚合酶混合液 II 加入到 10 号孔中。

表 19 测序试剂槽 10 号孔试剂加样表

| 型号              | 体积（mL）                                                                                             |                                                                                                     |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                 | dNTPs 混合液 II  | DNA 聚合酶混合液 II  |
| T7 STO FCL PE75 | 2.730                                                                                              | 1.140                                                                                               |

12. 用配套的透明封口膜将 9 号和 10 号加样孔封住。
13. 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。
14. 试剂槽水平放置在桌面上，双手握住两侧，顺时针用力摇晃 10~20 次，再逆时针用力摇晃 10~20 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。

 提示 摇晃试剂槽时要用力但不要过于剧烈，请勿上下摇晃或倾斜拿放试剂槽，以防槽中试剂溢出。
15. 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。
16. 轻轻敲打测序试剂槽，以减少试剂中的气泡。
17. 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 II 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 6 次，使其充分混匀，如下图。再将混合液沿管壁加入 8 号孔中。

 提示 使用 MDA 聚合酶混合液时，请勿触摸试剂所在管壁，以免影响酶活。

表 20 测序试剂槽 8 号孔试剂加样表

| 组分            | 管盖颜色                                                                                |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| MDA 聚合酶混合液 II |  |
| MDA 试剂        |  |

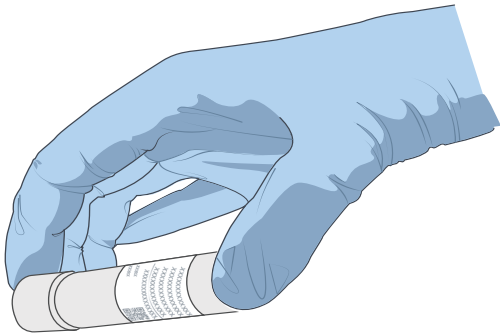


图 19 MDA试剂加酶后混匀

## 6.2 准备清洗试剂槽

操作步骤如下：

1. 顺时针摇晃清洗试剂槽 5~10 次，再逆时针摇晃 5~10 次，以保证试剂的充分混匀。

2. 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，试剂孔位示意图如下。

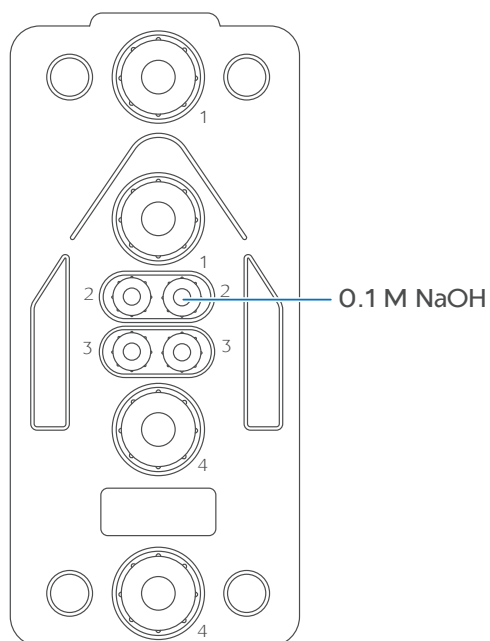


图 20 清洗试剂槽孔位信息

3. 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。0.1 M NaOH 配制方法见第 38 页“清洗准备”。

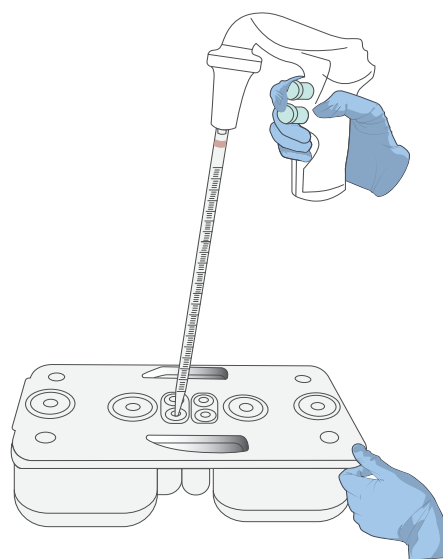


图 21 清洗试剂槽加液操作

### 6.3 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。
  - 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 21 纯水用量表（L）

| 型号              | 1 张载片 | 2 张载片 | 3 张载片 | 4 张载片 |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|
| T7 STO FCL PE75 | 2.5   | 4.5   | 7.0   | 9.0   |

## 第 7 章 测序

### 7.1 放置试剂槽

操作步骤如下：

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

 提示 清洁低温仓内壁时, 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低温仓, 将清洗试剂槽放入下层常温仓。

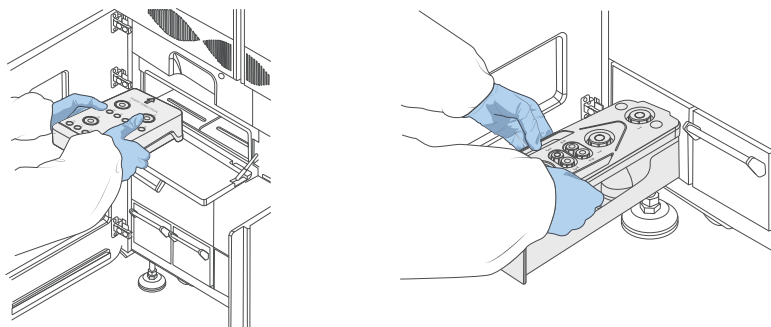


图 22 测序试剂槽和清洗试剂槽放置

3. 关闭低温仓仓门和常温仓仓门, 最后关闭试剂仓仓门。

### 7.2 进入主界面

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。

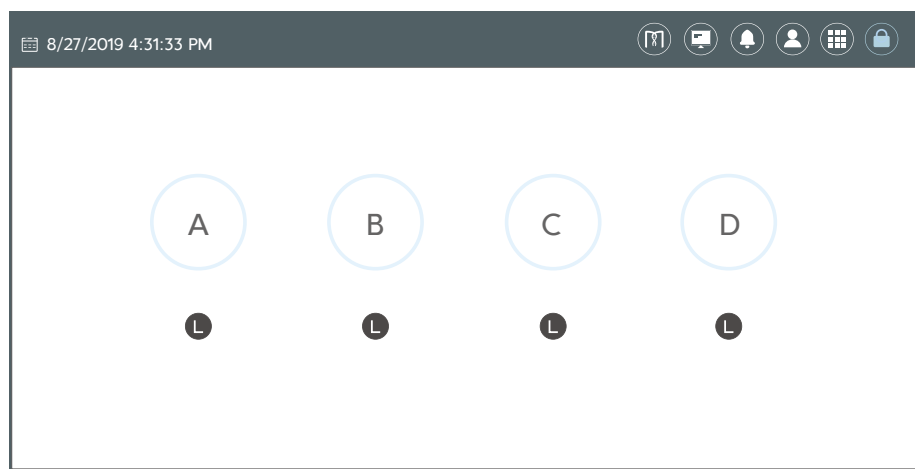


图 23 DNBSEQ-T7RS主界面

### 7.3 放置测序载片

操作步骤如下：

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



图 24 DNBSEQ-T7RS操作选择界面

- 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。

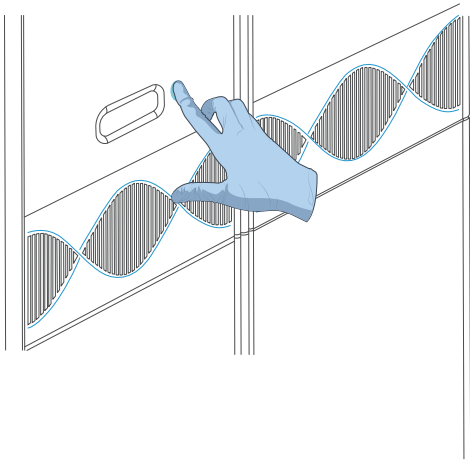


图 25 按压芯驱按钮

# 7.4 测序参数配置

操作步骤如下：

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。
  - 请确保手动输入的 ID 格式正确，否则将提示 ID 错误，并且不能继续进行操作。
  - 试剂槽 ID 包含货号 (REF) 和序列号 (SN)。手动输入 ID 时，不要漏货号中的特殊字符。

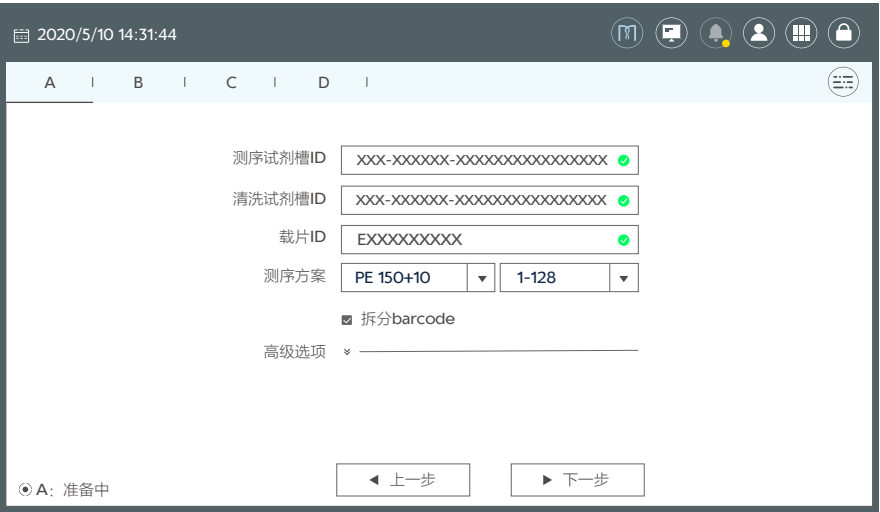


图 26 DNBSEQ-T7RS测序参数输入及选择界面

2. 点击测序方案后的【▼】，在下拉菜单里选择自定义测序方案，根据下图信息编辑方案：

- 提示
- 仅首次进行该读长测序时需要自定义测序方案，若再次测序时采用相同的测序方案，可在测序方案中直接选择首次设置的方案名称，无需再次编辑自定义测序方案。
  - FFPE 文库自定义测序方案：一链读长为 25，二链读长为 62，barcode 读长为 10，二链 7-9 循环暗反应。
  - FF V1.3 文库或 CITE V1.1-cDNA 与 CITE V1.1-ADT pooling 文库自定义测序方案：一链读长 50，二链读长 100，barcode 读长 10，一链 26-40 循环暗反应。

2020/4/24 16:30:30



测序方案

×

自定义测序方案

测序方案名称

25 + 62 + 10

一链

二链

Barcode

DualBarcode

读长

25

62

10

一链

二链

暗反应

7-9

保存

图 27 FFPE文库自定义测序方案

2020/4/24 16:30:30



测序方案

×

自定义测序方案

测序方案名称

50 + 100 + 10

一链

二链

Barcode

DualBarcode

读长

50

100

10

一链

二链

暗反应

26-40

保存

图 28 FF V1.3文库或CITE V1.1-cDNA与CITE V1.1-ADT pooling文库自定义测序方案

3. 如下图，点击红框内的【▼】，选择相应的标签序列。

The screenshot shows the 'Label Sequence' dropdown menu open, with '1-128' selected. The interface includes fields for 'Sequencing Reagent ID', 'Cleaning Reagent ID', 'Chip ID', and 'Sequencing Scheme'. The 'Sequencing Scheme' is set to '25+62+10'. The 'Label Sequence' dropdown is highlighted with a red box. The 'Advanced Options' section is collapsed.

2020/5/10 14:31:44

A | B | C | D |

测序试剂槽ID XXX-XXXXX-XXXXXXXXXXXXXXXXX ✓

清洗试剂槽ID XXX-XXXXX-XXXXXXXXXXXXXXXXX ✓

载片ID EXXXXXXXXX ✓

测序方案 25+62+10 ▼ 1-128 ▼

☒ 拆分barcode

高级选项 ▾

◀ 上一步 ▶ 下一步

● A: 准备中

图 29 DNBSEQ-T7RS标签序列设置

4. 点击高级选项后的展开符号，出现下图所示界面，支持选择下机是否自动清洗。

The screenshot shows the 'Advanced Options' section expanded, revealing 'Custom Primer' and 'Auto Cleaning' settings. The 'Sequencing Scheme' is set to '25+62+10' and the 'Label Sequence' is '1-128'. The 'Auto Cleaning' option is set to 'Yes'.

2020/5/10 14:34:51

A | B | C | D |

测序试剂槽ID XXX-XXXXX-XXXXXXXXXXXXXXXXX ✓

清洗试剂槽ID XXX-XXXXX-XXXXXXXXXXXXXXXXX ✓

载片ID EXXXXXXXXX ✓

测序方案 25+62+10 ▼ 1-128 ▼

☒ 拆分barcode

高级选项 ⌵

自定义引物 ○ 是 ● 否

自动清洗 ● 是 ○ 否

◀ 上一步 ▶ 下一步

● A: 准备中

图 30 DNBSEQ-T7RS高级选项设置

7.5 复核信息

点击【下一步】，进行信息回顾。



图 31 FFPE文库测序信息回顾界面



图 32 FF V1.3文库或CITE V1.1-cDNA与CITE V1.1-ADT pooling文库测序信息回顾界面

## 7.6 开始测序

操作步骤如下：

- 1. 确认信息无误后，点击【开始】，选择【是】。

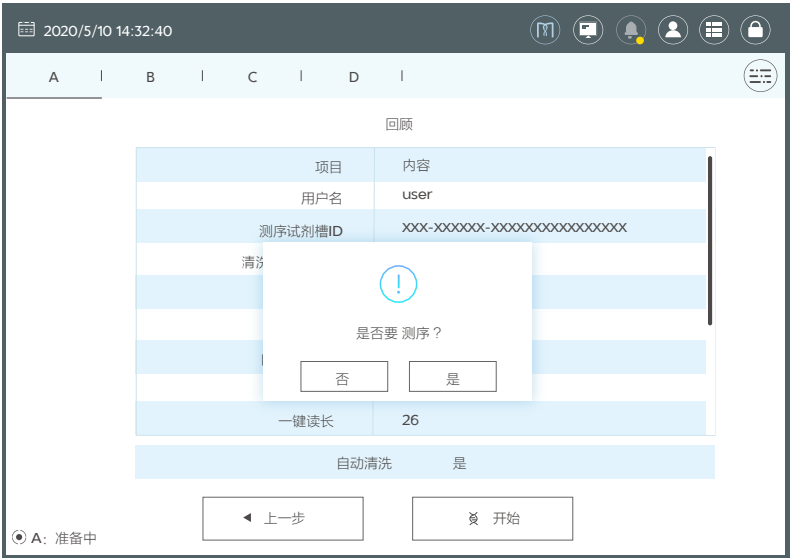


图 33 DNBSEQ-T7RS测序确认界面

- 2. 当界面如下，测序开始，此时上机操作完毕。

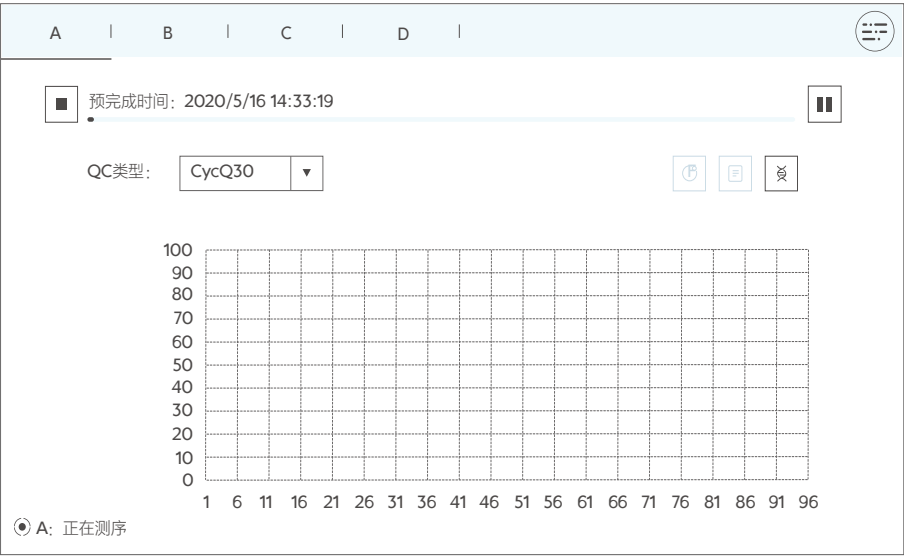


图 34 DNBSEQ-T7RS测序开始界面

3. 当测序以及清洗流程结束时，出现下图所示界面。

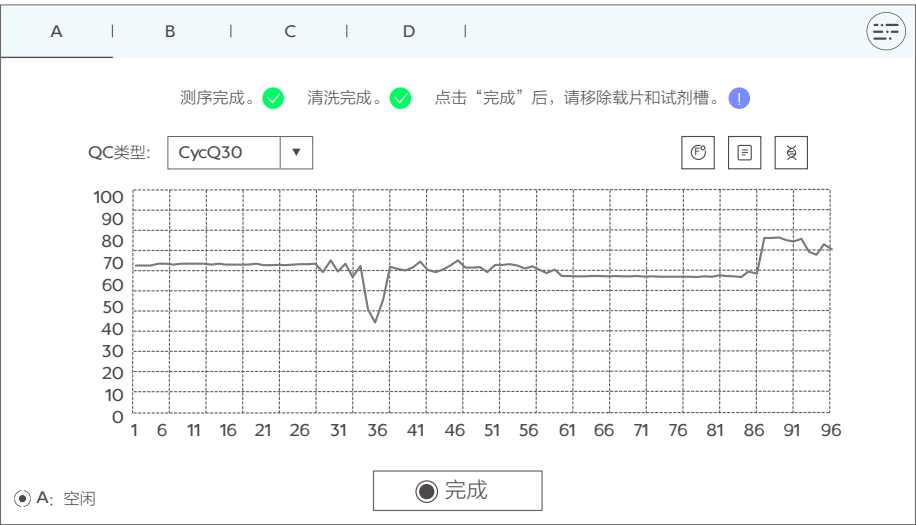


图 35 DNBSEQ-T7RS测序开始界面

## 7.7 数据获取

 提示 详情请参考 *DNBSEQ-T7* 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。

1. 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）。
2. 以载片 ID 命名的结果文件夹，主要包含 FASTQ 文件，summary report 文件及 bioinfo 文件等。

# 第 8 章 清洗维护

## 8.1 清洗规则

表 22 清洗方案

| 仪器          | 清洗方案 | 清洗容器                    | 清洗时长（分钟） | 描述                                                                                                                                                      |
|-------------|------|-------------------------|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MGIDL-T7RS  | 自动清洗 | 样本加载试剂板                 | 15       | 当 DNB 加载完成时，不需要更换样本加载版，加载仪会自动进行清洗。                                                                                                                      |
|             | 手动清洗 | 空 样本加载板*                | 20       | <ul style="list-style-type: none"><li>• 加载仪首次进行工作时</li><li>• 间隔一周以上未使用时</li><li>• 技术支持检修后及出现杂质时</li></ul>                                               |
| DNBSEQ-T7RS | 自动清洗 | 测序试剂槽和清洗试剂槽             | 40       | 若设置了自动清洗，仪器会在每个测序流程结束后自动进行清洗。                                                                                                                           |
|             | 手动清洗 | 空 T7 测序试剂槽和空 T7 清洗试剂槽 * | 40       | 以下情况选择手动清洗： <ul style="list-style-type: none"><li>• DNBSEQ-T7RS 首次进行工作时</li><li>• 间隔一周以上未进行工作时</li><li>• 上机时选择不进行自动清洗</li><li>• 技术支持检修后及出现杂质时</li></ul> |

 提示 空 样本加载板、空 T7测序试剂槽和空 T7清洗试剂槽需要单独购买，购买详情见 第 2 页 “试剂盒基本信息”。

## 8.2 清洗准备

### 8.2.1 准备清洗试剂

根据下表准备清洗试剂：

表 23 清洗试剂 2：0.05% Tween-20 +1 M NaCl

| 试剂            | 用量（mL） | 终浓度   |
|---------------|--------|-------|
| 100% Tween-20 | 0.5    | 0.05% |
| 5 M NaCl 溶液   | 200    | 1 M   |

| 试剂     | 用量 (mL)       | 终浓度 |
|--------|---------------|-----|
| 实验室级用水 | 799.5         | /   |
| 总体积    | 1000          |     |
| 有效期    | 4 °C 可保存 1 个月 |     |

- 按照如下体积配制 0.1 M NaOH:

表 24 清洗试剂 3: 0.1 M NaOH

| 试剂          | 用量 (mL)       | 终浓度   |
|-------------|---------------|-------|
| 2 M NaOH 溶液 | 50            | 0.1 M |
| 实验室级用水      | 950           | /     |
| 总体积         | 1000          |       |
| 有效期         | 4 °C 可保存 1 个月 |       |

8.2.2 准备加载仪清洗板

加载仪清洗板的俯视图如下:

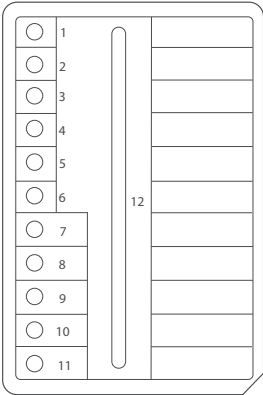


图 36 空 样本加载板

根据下表准备用于清洗 MGIDL-T7RS 的加载仪清洗板:

表 25 加载仪清洗板准备

| 孔位 | 清洗试剂                             | 体积 (mL) |
|----|----------------------------------|---------|
| 9  | 实验室级用水                           | 4       |
| 12 |                                  | 20      |
| 10 | 清洗试剂 2: 0.05% Tween-20+1 M NaCl+ | 4       |

| 孔位 | 清洗试剂              | 体积（mL） |
|----|-------------------|--------|
| 11 | 清洗试剂 3：0.1 M NaOH | 4      |

8.2.3 准备测序仪清洗槽

测序仪清洗槽的俯视图如下：

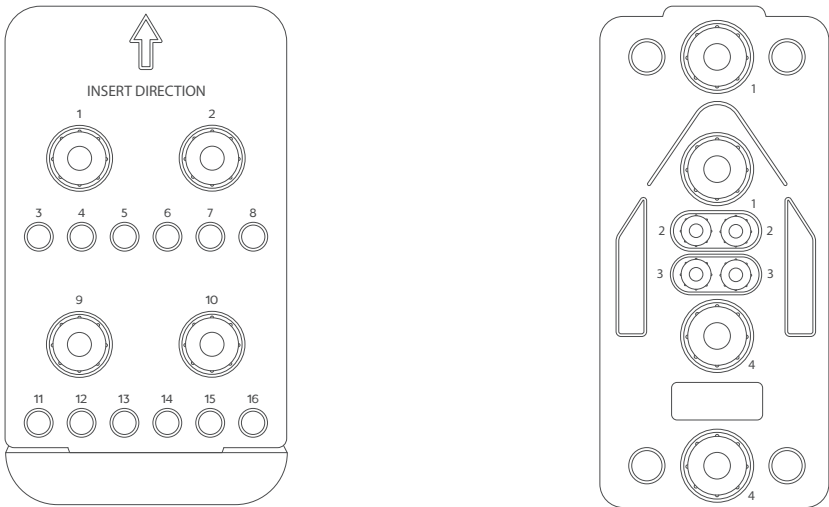


图 37 空 T7测序试剂槽和空 T7清洗试剂槽

根据下表准备用于清洗 DNBSEQ-T7RS 的测序仪的清洗槽：

表 26 测序仪清洗槽

| 槽子类别       | 孔位 | 清洗试剂                           | 体积（mL） |
|------------|----|--------------------------------|--------|
| 空 T7 测序试剂槽 | 所有 | 无                              | 无      |
| 空 T7 清洗试剂槽 | 2  | 清洗试剂 3：0.1 M NaOH              | 45     |
|            | 3  | 清洗试剂 2：0.05% Tween-20+1 M NaCl | 45     |

8.2.4 准备清洗载片

用过的下机载片可以用作清洗载片，每张清洗载片每隔一个月进行更换或每使用 10 次后更换。

## 8.3 手动清洗流程

每次下机后，需要对仪器进行自动清洗或手动清洗。

### 8.3.1 手动清洗 MGIDL-T7RS (~20 分钟)

操作步骤如下：

1. 进入程序。
2. 输入用户名“research”和密码“Admin123”，或用户名“user”和密码“Password123”，登录主界面。
3. 选择将要进行清洗的一侧。
4. 打开装载仓仓门。
5. 使用灌装好清洗试剂的加载仪清洗板，放入需要进行清洗的一侧，关闭仓门。
6. 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。

7. 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。
8. 回到主界面，点击界面中的【清洗】，在弹出的对话框中选择【是】，开始 MGIDL-T7RS 清洗，耗时约 20 分钟。

### 8.3.2 手动清洗 DNBSEQ-T7RS (~40 分钟)

清洗操作可以将流体管路以及载片平台上的剩余试剂移除，以防止交叉污染。

当自动清洗选择【是】时，下机后 DNBSEQ-T7RS 会自动执行清洗操作。当自动清洗选择【否】或仪器间隔一周以上未进行工作时，需要对仪器进行手动清洗。

操作步骤如下：

1. 确认纯净水桶里的水达到 4.5 L。
2. 进入程序，输入用户名“research”和密码“Admin123”，或用户名“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. 在弹出芯驱上放入下机的旧载片，按压芯驱按钮，使芯驱收回。
5. 将空 T7 测序试剂槽放入需要进行清洗一侧的低温仓，关闭低温仓仓门。
6. 使用灌装好清洗试剂的 T7 清洗试剂槽，放入需要进行清洗一侧的常温仓，关闭常温仓仓门，并关闭试剂仓门。
7. 点击界面中的【开始】，在弹出的对话框中选择【是】，开始 DNBSEQ-T7RS 手动清洗，耗时约 40 分钟。
8. 清洗结束后，选择【完成】退回主界面，取出空 T7 测序试剂槽和空 T7 清洗试剂槽。

### 8.3.3 清洗载片、样本加载板和清洗槽子的反复使用

#### 8.3.3.1 清洗载片

- 清洗载片可在室温下储存。
- 清洗载片每隔一个月进行更换或每使用 10 次后更换。
- 下机的测序载片可用作清洗载片。

#### 8.3.3.2 空 样本加载板

- 空 样本加载板可在室温下储存。
- 空 样本加载板每隔一个月进行更换或每使用 10 次后更换。
- 若空 样本加载板已经使用过，在补充清洗试剂前务必用实验室级用水清洗 3~5 次。
- 实验室级用水清洗过 3~5 次的空 样本加载板，只能用于加载仪清洗。

#### 8.3.3.3 空 清洗槽子

- 空 清洗槽子可在室温下储存。
- 空 清洗槽子每隔一个月进行更换或每使用 10 次后更换。
- 下机的试剂槽可用作清洗槽子。

---

## 第 9 章 异常处理

---

### 9.1 DNB 浓度低

当 DNB 浓度低于 8 ng/μL 时，操作步骤如下：

1. 检查所用试剂盒是否过期。
2. 检查文库是否符合要求。
3. 重新制备后仍不符合要求，请联系技术支持。

---

### 9.2 8 号孔漏加试剂

对于 PE 测序，二链合成需要用到 MDA 聚合酶混合液 II。准备测序试剂槽时，适量的 MDA 聚合酶混合液 II 会与 MDA 试剂进行混合，并加到 8 号孔中。若 8 号孔漏加试剂且还在一链测序阶段，可通过以下操作解决此问题。

1. 暂停测序：在测序界面按下暂定键  后，选择【是】。
2. 抬升试剂针。

- 1) 在测序界面按下结束键  后，根据提示框选择【是】。
- 2) 最后选择【完成】。
3. 补充测序试剂槽 8 号孔试剂。
  - 1) 打开低温仓仓门，取出测序试剂槽。
  - 2) 根据第 24 页“准备测序试剂槽”准备 MDA 混合液，并将其加到测序试剂槽 8 号孔中。
  - 3) 打开低温仓仓门，重新放入测序试剂槽。
4. 恢复测序。
  - 1) 在测序界面选择【测序】后，选择【恢复测序】。
  - 2) 将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。
  - 3) 点击【下一步】，复核测序信息，确保所有参数都正确。
  - 4) 点击【开始】，再点击【继续】。

---

## 9.3 试剂盒暂存

- 如试剂盒已经融化（包括 dNTPs），且不能 24 小时内使用，最多可再冻融一次。
- 如试剂盒已经融化（包括 dNTPs），且不能及时使用，可放在 4 °C 内暂存，并于 24 小时内使用，7 天内可风险上机。
- 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 4 °C 内暂存，并于 24 小时内使用，7 天内可风险上机。
- 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，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 4 °C 内暂存，并于 24 小时内使用。使用前轻轻混匀试剂槽内试剂，注意不要使试剂从针孔处溢出造成试剂污染。

---

## 9.4 负压异常

负压异常时，负压值会显示为红色，操作步骤如下：

- 使用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平台，确保无可见尘埃。
- 使用压缩空气罐吹净载片背面，确保无可见尘埃。
- 如以上方法仍无法解决异常负压，请联系技术支持。

---

## 9.5 产生气泡

### 9.5.1 MGIDL-T7RS 产生气泡

- 检查密封圈是否缺失。
- 检查加样板中的试剂是否足够。
- 更换一张废旧载片，检查泵液情况。
- 如仍有较多气泡，请联系技术支持。

### 9.5.2 DNBSEQ-T7RS 产生气泡

- 检查纯净水桶中的水是否足够。
- 检查纯净水桶中的水管是否插到底。
- 检查试剂针是否正常下针，如试剂针无法正常下针，重新启动测序软件。
- 重启后仍无法正常进行，请联系技术支持。

---

## 9.6 DNB 加载或测序过程中泵液失败

- 检查纯净水桶中的水是否足够。
- 当泵液失败发生在 DL-T7RS 和 DNBSEQ-T7RS 时：
  - 移开测序载片，检查密封圈是否有灰尘，使用压缩空气罐吹净灰尘。
  - 将载片重新放上载片平台，重新泵液。
- 检查试剂针是否正常移动，若不是，重启测序仪的控制软件。
- 如以上方法仍无法解决泵液异常，请联系技术支持。

---

## 9.7 出现杂质

当原图中出现杂质时，操作步骤如下：

1. 请对 MGIDL-T7RS 和 DNBSEQ-T7RS 均进行手动清洗维护。
2. 手动清洗维护后仍无改善，按照第 38 页“清洗准备”重新配制清洗试剂，并再次对 MGIDL-T7RS 和 DNBSEQ-T7RS 进行手动清洗维护。
3. 仍无改善时，请联系技术支持。

# 附录 1 DNB 定量操作指导

- 提示
- Qubit Working solution 配制后需在 0.5 小时内使用。
  - 禁止碰触检测管的锥形管壁。
  - 检测管中不能产生气泡。

操作步骤如下：

1. 配制 Qubit Working solution。用 Qubit ssDNA Buffer 将 Qubit ssDNA Reagent 稀释 200 倍。每次配制 Qubit Working solution 时，需使用干净的 Qubit 检测管，请勿使用玻璃容器进行操作。

- 提示
- 每个 Qubit 检测管的终体积为 200  $\mu\text{L}$ 。检测每个标准品需要 190  $\mu\text{L}$  Qubit Working solution，检测每份 DNB 需要 180 ~ 199  $\mu\text{L}$  Qubit Working solution。

准备足够的 Qubit Working solution 来建立标准曲线与检测样本 DNB 浓度。例如，检测样本数量为 8 时，还需要额外准备 2 份 Qubit Working solution 来建立标准曲线。一共 10 份，每份 200  $\mu\text{L}$ ，共准备 2 mL（10  $\mu\text{L}$  Qubit ssDNA Reagent 混合 1990  $\mu\text{L}$  Qubit ssDNA Buffer）。

2. 向 2 个标准品检测管中加入 190  $\mu\text{L}$  Qubit ssDNA Buffer。
3. 再向 2 个标准品检测管中分别加入 10  $\mu\text{L}$  Qubit ssDNA standard #1 与 10  $\mu\text{L}$  Qubit ssDNA standard #2。漩涡振荡混匀后用迷你离心机短暂离心 3 ~ 5 秒，注意不要产生气泡。
4. 计算需要准备的 0.5 mL Qubit 检测管的数量。

- 提示
- 仅使用薄壁、干净的 0.5 mL PCR 管。推荐使用 Qubit 检测管（货号：Q32856）。
  - Qubit 检测管的数量需要额外准备两个用于建立标准曲线。例如，要检测 3 份 DNB 时，需准备 5 个 0.5 mL PCR 管。

5. 在管盖上进行标记，切勿标记在管壁上。
6. 按照下表准备标准管及待测样本管的试剂：

| Component                  | S1 ( $\mu\text{L}$ ) | S2 ( $\mu\text{L}$ ) | D1 ( $\mu\text{L}$ ) | D2 ( $\mu\text{L}$ ) | D3 ( $\mu\text{L}$ ) |
|----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Working solution           | 190                  | 190                  | 198                  | 198                  | 198                  |
| S1 (0 ng/ $\mu\text{L}$ )  | 10                   | /                    | /                    | /                    | /                    |
| S2 (20 ng/ $\mu\text{L}$ ) | /                    | 10                   | /                    | /                    | /                    |
| 待测样本 DNB                   | /                    | /                    | 2                    | 2                    | 2                    |
| 总体积                        | 200                  | 200                  | 200                  | 200                  | 200                  |

7. 将准备好的样本管及标准液管漩涡振荡混匀，迷你离心机短暂离心 5 秒，避光孵育 2 分钟。
8. 参考 Qubit 的说明书进行操作，建立标准曲线与检测待测 DNB 浓度。

## 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                     |
| 客服电话   | 4000-688-114                                      |
| 技术支持   | MGI-service@mgi-tech.com                          |
| 网址     | www.mgi-tech.com                                  |