测序反应通用试剂盒

（联合探针锚定聚合测序法）

说明书

适用机型：MGISEQ-2000　　说明书版本号：A0

产品规格：App-A

武汉华大智造科技有限公司

测序反应通用试剂盒

（联合探针锚定聚合测序法）

【产品名称】

测序反应通用试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）

【包装规格】

适用机型	货号	适用机型	包装规格
基因测序仪 (MGISEQ-2000)	1000018229	MGISEQ-2000 SE50	App-A SE50 循环/测试，1 测试/盒
	1000018228	MGISEQ-2000 PE100	App-A PE100 循环/测试，1 测试/盒
	1000018227	MGISEQ-2000 PE150	App-A PE150 循环/测试，1 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒是检测人类基因组 DNA 文库的一组常用试剂，与基因测序仪配合使用，完成高通量测序过程并获取样本序列信息，是该测序反应系统的通用试剂。本产品不用于全基因组测序。

【检验原理】

本试剂盒使用联合探针锚定聚合技术（Combinatorial Probe-Anchor Synthesis，以下简称 cPAS），测定装载在载片上的 DNA 纳米球（DNA Nanoball，以下简称 DNB）携带的碱基序列。实验流程主要分为三个部分，分别为 DNB 的制备、DNB 的装载及测序。具体地说，利用本试剂盒提供的试剂对 DNA 文库进行环化处理，然后通过滚环复制反应制备 DNB，并将 DNB 装载到测序载片上。在测序过程中，末端特殊修饰的碱基分别被标记为不同的荧光探针，DNA 分子锚和荧光探针在纳米球上进行聚合，随后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即可获得待测序列。

【主要组成成分】

见下表。

表 1 SE 测序通用试剂盒主要组成成分

包装盒	组份名称	主要成分	SE50 装量
包装盒 1	测序载片 (MGISEQ-2000)	硅载片	1 张
	TE 缓冲液	三羟甲基氨基甲烷、盐酸、乙二胺四乙酸	300μL/支×1 支
	App-A DNB 制备缓冲液	硫酸铵、二硫苏糖醇、氯化镁、三羟甲基氨基甲烷、寡聚核苷酸	80μL/支×1 支
	DNB 聚合酶混合液 I	dNTP（脱氧核糖核苷三磷酸）、硫酸铵、二硫苏糖醇、氯化镁、三羟甲基氨基甲烷、甘油、单链结合蛋白	200μL/支×1 支
	DNB 聚合酶混合液 II（LC）	三羟甲基氨基甲烷、氯化钾、乙二胺四乙酸、DNB 聚合酶、甘油	25μL/支×1 支
	DNB 终止缓冲液	乙二胺四乙酸、分子级水	100μL/支×1 支
	DNB 加载缓冲液 I	磷酸氢二钠、分子级水	200μL/支×1 支
	DNB 加载缓冲液 II	柠檬酸钾、柠檬酸	200μL/支×1 支

知识产权，属华大智造所有。

包装盒	组份名称	主要成分	SE50 装量
	dNTPs 混合液	三羟甲基氨基甲烷、盐酸、乙二胺四乙酸、经过化学修饰的 dNTPs	0.80mL/支×1 支
	dNTPs 混合液 II	三羟甲基氨基甲烷、盐酸、乙二胺四乙酸、经过化学修饰的 dNTPs	0.70mL/支×1 支
	DNA 聚合酶混合液	DNA 聚合酶、甘油	1.60mL/支×1 支
	测序试剂槽（MGISEQ-2000）	三羟甲基氨基甲烷、氯化钠、乙二胺四乙酸、硫酸镁、吐温 20、盐酸、双脱氧核苷三磷酸、柠檬酸钠、寡聚核苷酸、DNA 聚合酶、	SE50×1 个
	0.5mL 冻存管	PP 塑料	1 支

知识产权，属华大智造所有。

表 2 PE 测序通用试剂盒主要组成成分

包装盒	组份名称	主要成分	PE100 装量	PE150 装量
包装盒 1	测序载片 (MGISEQ-2000)	硅载片	1 张	1 张
	TE 缓冲液	三羟甲基氨基甲烷、盐酸、乙二胺四乙酸	300μL/支×1 支	300μL/支×1 支
	App-A DNB 制备缓冲液	硫酸铵、二硫苏糖醇、氯化镁、三羟甲基氨基甲烷、寡聚核苷酸	80μL/支×1 支	80μL/支×1 支
	DNB 聚合酶混合液 I	dNTP（脱氧核糖核苷三磷酸）、硫酸铵、二硫苏糖醇、氯化镁、三羟甲基氨基甲烷、甘油、单链结合蛋白	200μL/支×1 支	200μL/支×1 支
	DNB 聚合酶混合液 II（LC）	三羟甲基氨基甲烷、氯化钾、乙二胺四乙酸、DNB 聚合酶、甘油	25μL/支×1 支	25μL/支×1 支
	DNB 终止缓冲液	乙二胺四乙酸、分子级水	100μL/支×1 支	100μL/支×1 支
	DNB 加载缓冲液 I	磷酸氢二钠、分子级水	200μL/支×1 支	200μL/支×1 支

知识产权，属华大智造所有。

包装盒	组份名称	主要成分	PE100 装量	PE150 装量
	DNB 加载缓冲液 II	柠檬酸钾、柠檬酸	200μL/支×1 支	200μL/支×1 支
	dNTPs 混合液	三羟甲基氨基甲烷、盐酸、乙二胺四乙酸、经过化学修饰的 dNTPs	1.90mL/支×1 支	1.30mL/支×2 支
	dNTPs 混合液 II	三羟甲基氨基甲烷、盐酸、乙二胺四乙酸、经过化学修饰的 dNTPs	1.60mL/支×1 支	1.15mL/支×2 支
	DNA 聚合酶混合液	DNA 聚合酶、甘油	3.60mL/支×1 支	4.80mL/支×1 支
	MDA 聚合酶混合液	MDA 聚合酶、甘油	0.60mL/支×1 支	0.60mL/支×1 支
	MDA 试剂	脱氧核糖核苷三磷酸、二硫苏糖醇、二甲基亚砜、蔗糖、甘油	3.50mL/支×1 支	3.50mL/支×1 支

知识产权，属华大智造所有。

包装盒	组份名称	主要成分	PE100 装量	PE150 装量
	测序试剂槽 (MGISEQ-2000)	三羟甲基氨基甲烷、氯化钠、乙二胺四乙酸、硫酸镁、吐温 20、盐酸、双脱氧核苷三磷酸、柠檬酸钠、寡聚核苷酸、DNA 聚合酶、甘油、氯化钾	PE100×1 个	PE150×1 个
	0.5mL 冻存管	PP 塑料	1 支	1 支

注：不同批次之间试剂组份严禁混用，每套试剂盒仅限一次使用。

检测所需但未提供的主要设备和材料：

设备：Qubit® 荧光计、迷你离心机、漩涡振荡器、PCR 仪、各规格移液器、透明封口膜。

材料：Qubit® ssDNA Assay Kit、带滤芯吸头、100μL 阔口吸头、0.2mLPCR 管、0.5mL 冻存管、1.5/2.0mL 离心管、冰盒。

【储存条件及有效期】

本试剂盒包装盒 1 置于常温(0-30℃)保存，包装盒 2 置于-25℃~-15℃保存，有效期均为 8 个月；生产日期、失效日期：见标签。

【适用仪器】

基因测序仪（MGISEQ-2000）。

【样本要求】

1. 样本要求：文库总量要求≥1.5ng/μL。

知识产权，属华大智造所有。

2. 样本安全性：所有样本均视为有潜在感染性的物品，操作时按国家相关标准执行。

【检验方法】

1. 文库定量

初始文库 DNA 浓度≥1.5ng/μL，文库需用 Qubit® ssDNA HS Assay Kit 和 Qubit® Fluorometer 定量，根据定量的结果计算投入量。

注：投入体积 V（μL）=N*330 g/mol*60 fmol/(1000*1000*C)

N 表示核苷酸数目（文库总片段长度），C 表文库浓度 ng/μL

2. DNB 制备

2.1 DNB 制备试剂准备

取出 TE 缓冲液、App-A DNB 制备缓冲液、DNB 聚合酶混合液 I、DNB 聚合酶混合液 II（LC）和 DNB 终止缓冲液，置于冰盒上，待融化后用漩涡振荡器震荡混匀 5 秒后，短暂离心置于冰盒上备用。

注意：不要将 DNB 聚合酶混合液 II（LC）室温解冻，不要用手长时间触碰管壁！

2.2 DNB 制备

2.2.1 取新的 0.2mL PCR 管加入如下组份：

表3 DNB制备体系1

组份	加入量（μL）
DNA文库	V
TE 缓冲液	20-V
App-A DNB制备缓冲液	20

2.2.2 将反应 Mix 用漩涡振荡器震荡混匀，迷你离心机离心 5 秒置于 PCR 仪中反应。反应条件见表 4：

表4 DNB反应条件1

温度	时间
热盖（105℃）	On

知识产权，属华大智造所有。

95℃	1 min
65℃	1 min
40℃	1 min
4℃	Hold

2.2.3 当温度达到4℃时取出PCR管，迷你离心机离心5秒后加入在冰上加入如下组份：

表5 DNB制备体系2

组份	加入量（μL）
DNB聚合酶混合液I	40
DNB聚合酶混合液II（LC）	4

2.2.4 反应Mix用漩涡振荡器震荡混匀，迷你离心机离心5秒后即刻置于PCR仪中开始反应，反应条件如下：

表6 DNB反应条件2

温度	加入量（μL）
热盖（35℃）	On
30℃	25 min
4℃	Hold

2.2.5 当温度达到4℃后立即取出PCR管，置于冰盒上，即刻加入20μL DNB终止缓冲液，用移液器和阔口吸头缓慢地吹打混匀，切勿震荡及剧烈吹打，置于4℃保存备用。

⚠注意：混匀DNB时一定要用阔口吸头缓慢吹打。

2.2.6 DNB浓度测定：取2μL步骤2.2.5产物，用Qubit® ssDNA Assay Kit和 Qubit® 荧光计，参照厂家说明书进行浓度测定。以DNB浓度≥8 ng/μL为合格标准，对浓度低于8 ng/μL的DNB需重新制备，对浓度高于40 ng/μL的DNB需用DNB加载缓冲液I稀释到20 ng/μL。DNB放置在4℃保存备用。

3. 测序

3.1 DNB加载的准备

知识产权，属华大智造所有。

将100μL检测合格的DNB、32μL DNB加载缓冲液II转移到一个新的0.5mL冻存管，再加入1μL DNB聚合酶混合液II（LC），用阔口吸头温和混匀5-8次（切勿离心、震荡或剧烈吹打）。混匀后立即使用。

3.2 测序试剂准备

3.2.1 取出测序试剂槽、dNTPs 混合液和 dNTPs 混合液 II 室温解冻后，立刻置于 4℃冰箱备用。

3.2.2 使用前取出 DNA 聚合酶混合液，置于 4℃备用；

3.2.3 使用洁净的 1 mL 枪头在 1 号和 2 号孔边缘位置，轻轻戳出一个直径小于 1cm 的加样孔位。

3.2.4 按照下表量取试剂加入到 1 号孔：

表7 dNTPs混合液加样表

产品型号	试剂名称	加样体积（mL）
MGISEQ-2000 App-A SE50	dNTPs 混合液	0.700
MGISEQ-2000 App-A PE100	dNTPs 混合液	1.800
MGISEQ-2000 App-A PE150	dNTPs 混合液	2.400

3.2.5 按照下表量取试剂加入到 2 号孔：

表8 dNTPs混合液II加样表

产品型号	试剂名称	加样体积（mL）
MGISEQ-2000 App-A SE50	dNTPs 混合液 II	0.600
MGISEQ-2000 App-A PE100	dNTPs 混合液 II	1.500
MGISEQ-2000 App-A PE150	dNTPs 混合液 II	2.100

3.2.6 按照下表量取试剂分别加入到 1 和 2 号孔：

表9 DNA聚合酶混合液加样表

产品型号	试剂名称	1 号孔加样体积（mL）	2 号孔加样体积（mL）
MGISEQ-2000 App-A SE50	DNA 聚合酶混合液	0.700	0.600
MGISEQ-2000 App-A PE100	DNA 聚合酶混合液	1.800	1.500
MGISEQ-2000 App-A PE150	DNA 聚合酶混合液	2.400	2.100

知识产权，属华大智造所有。

3.2.7 使用配套的透明封口膜将加样孔封住，切勿盖住孔位中心位置，避免影响试剂针下降。

3.2.8 试剂盒水平放置在桌面上，双手握住两侧，顺时针摇晃 10-20 次，再逆时针摇晃 10-20 次，期间要确保肉眼可见旋涡，以保证试剂的充分混匀。

3.2.9 15 号孔位：

注意：以下操作仅适用于PE试剂盒！

用1 mL移液器移取500μL MDA聚合酶混合液加入到MDA试剂的试剂管中。旋涡震荡5 s，使其充分混匀，再将混匀液加入15号孔中，加入时确保管底部无气泡。

3.3 上机测序

参照基因测序仪（MGISEQ-2000）使用说明书启动基因测序仪，完成DNB管、测序载片和测序试剂槽装载，并启动测序程序。

4. 数据分析

测序完成后，程序将产生标准序列文件。

【检验结果的解释】

1. 本试剂盒具有高灵敏度特点，以下情况可能会影响检测结果，应排除影响后才能检测。

a) 样本放置过久；

b) 样本被其它核酸污染；

c) 样品片段大小不均一。

2. 另外一些操作错误可能导致试验结果的不合格，比如：试剂盒在有效期外使用、加样器不准确、室内温度过高、未按说明书检测程序进行试验等。

3. 质量合格的测序数据应综合临床特征和其它检测指标共同判定，进而得出检验结果。

【检验方法的局限性】

本试剂盒是一个定性体外诊断试剂盒，不具备定量功能。

知识产权，属华大智造所有。

【产品性能指标】

1. 准确度

检测企业参考品 Q，测序所得序列信息与已知参考序列信息的符合率应≥99%。

2. 重复性

重复检测企业参考品 Q 5 次，测序所得序列信息与已知参考序列信息的符合率的 CV 值不大于 5%（n=5）。

3. 批间差

使用三个不同批次的试剂盒，分别检测企业参考品 Q 5 次，测序所得序列信息与已知序列信息符合率的 CV 值不大于 5%（n=15）。

【注意事项】

1. 本产品仅用于体外诊断；

2. 使用前请仔细阅读产品说明书，掌握操作方法，熟悉注意事项；

3. 所有样本及试剂切勿吞咽，并避免直接接触皮肤和眼睛,若发生此类情况请立即用大量清水冲洗并及时到医院就诊；

4. 样本及废弃物具有其潜在感染性，应按当地相关法规规定进行处理。

【参考文献】

1. Dean, F. B. et al. Comprehensive human genome amplification using multipledisplacement amplification. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 99, 5261–5266 (2002).

2. Peters, B.A., et al.,Accurate whole genome sequencing and haplotyping from-

3. 10 to 20 human cells. Nature 487,190-195(2012).

4. Drmanac, R. Nucleic acid analysis by random mixtures of non-overlapping fragments. US patent 7,901 891 (2006).

5. Lander, E. S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409, 860–921 (2001).
知识产权，属华大智造所有。

6. Drmanac, R. et al. Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays. Science 327, 78–81 (2010).

【基本信息】

备案人/生产企业名称：武汉华大智造科技有限公司

住所：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

联系方式：4000-966-988

售后服务单位名称：武汉华大智造科技有限公司

联系方式：4000-966-988

生产地址：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

邮编：430075

网址：www.mgitech.cn

生产备案凭证编号：

【医疗器械备案凭证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准日期及修改日期】

核准日期：2019年10月26日

知识产权，属华大智造所有。