

测序反应通用试剂盒  
( 联合探针锚定聚合测序法 )  
产品说明书

---

适用机型：MGISEQ-200    说明书版本号：A4

---

武汉华大智造科技有限公司

知识产权，属华大智造所有。

# 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	产品型号	包装规格
基因测序仪 (MGISEQ-200)	1000019925	FCL SE50	SE50 循环/测试, 1 测试/盒
	1000019926	FCL SE100	SE100 循环/测试, 1 测试/盒
	1000019927	FCL PE50	PE50 循环/测试, 1 测试/盒
	1000019928	FCL PE100	PE100 循环/测试, 1 测试/盒
	1000019929	FCL PE150	PE150 循环/测试, 1 测试/盒
	1000019930	FCS SE100	SE100 循环/测试, 1 测试/盒
	1000019931	FCS PE100	PE100 循环/测试, 1 测试/盒
	1000019932	FCS PE150	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。

### 【主要组成成份】

表1 SE测序通用试剂盒主要组成成份

包装盒	试剂	主要成份	FCL SE50/ FCS SE100 装量	FCL SE100 装量
包装盒 1	测序载片 (MGISEQ-200)	硅片	1张	1张
包装盒 2	环化反应缓冲液	醋酸镁、醋酸钾、二硫苏糖醇、三羟甲基氨基甲烷、寡聚核苷酸	110 $\mu$ L/支 $\times$ 1支	110 $\mu$ L/支 $\times$ 1支

包装盒	试剂	主要成份	FCL SE50/ FCS SE100 装量	FCL SE100 装量
	连接酶	DNA 连接酶	5 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	5 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	TE 缓冲液	三羟甲基氨基甲烷、盐酸、乙二胺四乙酸	100 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	100 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	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	50 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	50 $\mu$ L/支 $\times$ 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	100 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	100 $\mu$ L/支 $\times$ 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	13 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	13 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	DNB 终止缓冲液	乙二胺四乙酸、分子级水	50 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	50 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	DNB 加载缓冲液 I	磷酸氢二钠、分子级水	300 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	300 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	DNB 加载缓冲液 II	柠檬酸钾、柠檬酸	120 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	120 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	dNTPs 混合液 III	三羟甲基氨基甲烷、盐酸、乙二胺四乙酸、经过化学修饰的 dNTPs	0.32 mL/支 $\times$ 1 支	0.44 mL/支 $\times$ 1 支

包装盒	试剂	主要成份	FCL SE50/ FCS SE100 装量	FCL SE100 装量
	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	0.56 mL/支 ×1 支	0.76 mL/支 ×1 支
	DNA 聚合酶混合液	DNA 聚合酶、甘油	0.60 mL/支 ×1 支	0.82 mL/支 ×1 支
	测序试剂槽 (MGISEQ-200)	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	FCL SE50/ FCS SE100 ×1 个	FCL SE100 ×1 个
	0.5m 冻存管	PP 塑料	1 支	1 支
	透明封口膜	PP 塑料	2 张	2 张

注：如需进行 SE35 读长的测序，请使用型号为 FCL SE50 的试剂盒。

表 2 PE 测序通用试剂盒主要组成成份

包装盒	试剂	主要成份	FCL PE50/ FCS PE100 装量	FCL PE100/ FCS PE150 装量	FCL PE150 装量
包装盒 1	测序载片 (MGISEQ-200)	硅片	1张	1张	1张
包装盒 2	环化反应缓冲液	醋酸镁、醋酸钾、 二硫苏糖醇、三羟 甲基氨基甲烷、寡 聚核苷酸	110 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	110 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	110 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	连接酶	DNA 连接酶	5 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	5 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	5 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	TE 缓冲液	三羟甲基氨基甲 烷、盐酸、乙二胺 四乙酸	100 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	100 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	100 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	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	50 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	50 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	50 $\mu$ L/支 $\times$ 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	100 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	100 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	100 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支

包装盒	试剂	主要成份	FCL PE50/ FCS PE100 装量	FCL PE100/ FCS PE150 装量	FCL PE150 装量
	DNB 聚合酶混合液 II (LC)	三羟甲基氨基甲烷、氯化钾、乙二醇四乙酸、DNB 聚合酶、甘油	13 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	13 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	13 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	DNB 终止缓冲液	乙二醇四乙酸、分子级水	50 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	50 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	50 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	DNB 加载缓冲液 I	磷酸氢二钠、分子级水	300 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	300 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	300 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	DNB 加载缓冲液 II	柠檬酸钾、柠檬酸	120 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	120 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	120 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	dNTPs 混合液 III	三羟甲基氨基甲烷、盐酸、乙二醇四乙酸、经过化学修饰的 dNTPs	0.56 mL/支 $\times$ 1 支	0.74 mL/支 $\times$ 1 支	0.96 mL/支 $\times$ 1 支
	dNTPs 混合液 II	三羟甲基氨基甲烷、盐酸、乙二醇四乙酸、经过化学修饰的 dNTPs	0.92 mL/支 $\times$ 1 支	1.48 mL/支 $\times$ 1 支	1.02 mL/支 $\times$ 2 支
	DNA 聚合酶混合液	DNA 聚合酶、甘油	1.02 mL/支 $\times$ 1 支	1.48 mL/支 $\times$ 1 支	0.99 mL/支 $\times$ 2 支
	MDA 聚合酶混合液	MDA 聚合酶、甘油	0.30 mL/支 $\times$ 1 支	0.30 mL/支 $\times$ 1 支	0.30 mL/支 $\times$ 1 支

包装盒	试剂	主要成份	FCL PE50/ FCS PE100 装量	FCL PE100/ FCS PE150 装量	FCL PE150 装量
	MDA 试剂	脱氧核糖核苷三磷酸、二硫苏糖醇、二甲亚砜、蔗糖、甘油	1.40 mL/支 ×1 支	1.40 mL/支 ×1 支	1.40 mL/支 ×1 支
	测序试剂槽 (MGISEQ-200)	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	FCL PE50/ FCS PE100 ×1 个	FCL PE100/ FCS PE150 ×1 个	FCL PE150 ×1 个
	0.5mL 冻存管	PP 塑料	1 支	1 支	1 支
	透明封口膜	PP 塑料	2 张	2 张	2 张

注：不同批次之间试剂组分严禁混用，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。

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

### 【储存条件及有效期】

本试剂盒包装盒1置于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-200)。

### 【样本要求】

1. 样本要求: 文库总量要求 $\geq 1$  pmol, 文库体积 $\leq 48$   $\mu\text{L}$ 。
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. 环化反应

##### 1.1 环化反应试剂准备

取出环化反应缓冲液和连接酶, 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: 不要将连接酶室温解冻, 不要用手长时间触碰管壁。

- 1.2 根据 DNA 文库定量结果, 于新的 0.2mL PCR 管中将待测文库根据标签接头编号等量混合, 取总量为约 1pmol(实际取用量可根据检测试剂盒推荐使用量取用, pmol(摩尔数)与 ng(质量)间的换算见公式 1) 的 DNA 混合文库按照如下体系加到 0.2mL

的管子中。

注：若混合文库体积大于 48 $\mu$ L，请重新制备文库。

公式 1 PCR 产物 pmol 与 ng 间的换算

$$1 \text{ pmol PCR 产物对应的质量 (ng)} = \frac{\text{DNA 主带片段 (bp)}}{1000 \text{ bp}} \times 660 \text{ ng}$$

表3 环化反应体系1

组份	加入量 ( $\mu$ L )
DNA混合文库	V
TE缓冲液	48-V

- 1.3 将反应 Mix 用漩涡振荡混匀，迷你离心机离心 5s，置于 PCR 仪上 95 $^{\circ}$ C 孵育 5min，孵育完毕即刻取出 PCR 管放置于冰上冷却 2min。
- 1.4 向上述反应体系中加入如下组份，充分混匀，短暂离心，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。反应过后的产物可进入下一步反应或放置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱冻存。

表4 环化反应体系2

组份	加入量 ( $\mu$ L )
环化反应缓冲液	11.6
连接酶	0.5

## 2. DNB 制备

### 2.1 DNB 制备试剂准备

知识产权，属华大智造所有。

第-9-页，共 17 页

取出 TE 缓冲液、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5 DNB制备体系1

组份	加入量 ( $\mu\text{L}$ )
DNA文库	20
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 6：

表6 DNB反应条件1

温度	时间
热盖 ( 105 $^{\circ}\text{C}$ )	On
95 $^{\circ}\text{C}$	1 min
65 $^{\circ}\text{C}$	1 min
40 $^{\circ}\text{C}$	1 min
4 $^{\circ}\text{C}$	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7 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8 DNB反应条件2

温度	时间
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 2.25 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 的知识产权，属华大智造所有。

DNB 需重新制备,对浓度高于 40 ng/ $\mu$ L 的 DNB 需用 DNB 加载缓冲液 I 稀释到 20 ng/ $\mu$ L。DNB 放置在 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

### 3. 测序

#### 3.1 DNB 加载的准备

将100  $\mu$ L检测合格的DNB、50  $\mu$ L DNB加载缓冲液I和50  $\mu$ L DNB加载缓冲液II转移到一个新的0.5 mL冻存管,再加入1  $\mu$ L 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 III 和 dNTPs 混合液 II 室温解冻后,立刻置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

3.2.2 使用前取出 DNA 聚合酶混合液,置于 4 $^{\circ}$ C 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 1 cm 的加样孔位。

3.2.4 按照下表量取试剂加入到 1 号孔:

表9 dNTPs混合液III加样表

产品型号	试剂名称	加样体积 (mL)
FCL SE50/FCS SE100	dNTPs 混合液 III	0.320
FCL SE100	dNTPs 混合液 III	0.440
FCL PE50/FCS PE100	dNTPs 混合液 III	0.560
FCL PE100/FCS PE150	dNTPs 混合液 III	0.740
FCL PE150	dNTPs 混合液 III	0.960

3.2.5 按照下表量取试剂加入到 2 号孔：

表10 dNTPs混合液II加样表

产品型号	试剂名称	加样体积 (mL)
FCL SE50/FCS SE100	dNTPs 混合液 II	0.560
FCL SE100	dNTPs 混合液 II	0.760
FCL PE50/FCS PE100	dNTPs 混合液 II	0.920
FCL PE100/FCS PE150	dNTPs 混合液 II	1.480
FCL PE150	dNTPs 混合液 II	2.040

3.2.6 按照下表量取试剂分别加入到 1 和 2 号孔：

表11 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
FCL SE50/FCS SE100	DNA 聚合酶混合液	0.320	0.280
FCL SE100	DNA 聚合酶混合液	0.440	0.380
FCL PE50/FCS PE100	DNA 聚合酶混合液	0.560	0.460
FCL PE100/FCS PE150	DNA 聚合酶混合液	0.740	0.740
FCL PE150	DNA 聚合酶混合液	0.960	1.020

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，期间要确保肉眼可见旋涡，以保证试剂知识产权，属华大智造所有。

的充分混匀。

### 3.2.9 15号孔位:

△ 注意: 以下操作仅适用于PE试剂槽!

用1 mL移液器移取200  $\mu$ L 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-200) 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。

### 【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 $\geq 99\%$ 。

#### 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 amplificatio

n using multiplex displacement amplification. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 99, 5261–5266 (2002).

[2] Peters, B.A., et al., Accurate whole-genome sequencing and haplotyping from 10 to 20 human cells. Nature 487, 190–195 (2012).

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

[4] Lander, E. S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409, 860–921 (2001).

[5] 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](http://www.mgitech.cn)

生产备案凭证编号：鄂汉食药监械生产备20180037号

【医疗器械备案凭证编号/产品技术要求编号】

鄂汉械备20190039号

【说明书核准日期及修改日期】

核准日期：2020年02月25日