

SureSelect^{XT} HS Target Enrichment avec le système Magnis NGS Prep System

Protocole

À des fins de recherche uniquement. Non destiné à une utilisation lors de procédures diagnostiques.

Version D0, octobre 2021



Avis

© Agilent Technologies, Inc. 2019, 2021

Aucune partie du présent manuel ne peut être reproduite sous quelque forme ou par quelque moyen que ce soit (y compris sous forme électronique et de récupération ou de traduction dans une autre langue) sans l'autorisation écrite préalable d'Agilent Technologies, Inc., conformément aux dispositions des lois américaines et internationales sur la propriété intellectuelle.

Référence du manuel

G9731-90011

Édition

Version D0, octobre 2021

Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd.
Santa Clara, CA 95051

Assistance technique

Pour les États-Unis et le Canada

Composez le 800-227-9770 (option 3, 4, 4)
ou envoyez un courriel à
ngs.support@agilent.com

Pour toutes les autres régions

Les coordonnées des centres de vente
et d'assistance d'Agilent de votre région
peuvent être obtenues à l'adresse
www.agilent.com/genomics sous
Contactez-nous.

Garantie

Le contenu de ce document est fourni « tel quel » et est susceptible de faire l'objet de modifications, sans préavis, dans les prochaines éditions. En outre, dans toute la mesure permise par la législation applicable, Agilent décline toute garantie, expresse ou implicite, en ce qui concerne ce manuel et toutes les informations qu'il contient, y compris, sans s'y limiter, les garanties implicites en matière de qualité marchande et de compatibilité pour un usage particulier. Agilent décline toute responsabilité en cas d'erreurs ou de dommages accessoires ou indirects liés à la mise à disposition, à l'utilisation ou aux performances de ce document ou à toute information ci-incluse. Dans le cas où Agilent et l'utilisateur ont conclu un accord écrit séparé contenant des modalités de garantie relatives au contenu de ce document et incompatibles avec ces modalités, les modalités de garantie de l'accord séparé prévaudront.

Licences technologiques

Le matériel et/ou le logiciel décrit dans le présent document sont fournis sous licence et ne peuvent être utilisés ou copiés que conformément aux conditions de cette licence.

Légende des droits restreints

Droits restreints du gouvernement des États-Unis. Les droits relatifs aux logiciels et données techniques accordés au gouvernement fédéral ne comprennent que les droits habituellement accordés aux clients utilisateurs finaux. Agilent accorde cette licence commerciale habituelle pour les logiciels et les données techniques conformément à la FAR 12.211 (Données techniques) et 12.212 (Logiciels informatiques) et, pour le Département de la Défense, DFARS 252.227-7015 (Données techniques — Articles commerciaux) et DFARS 227.7202-3 (Droits sur les logiciels informatiques commerciaux ou documentation des logiciels informatiques).

Avis destiné à l'acheteur

Ce produit est fourni en vertu d'une entente entre Bio-Rad Laboratories et Agilent Technologies Inc. et la fabrication, l'utilisation, la vente ou l'importation de ce produit est assujettie au U.S. Pat. N° 6,627,424 et EP Pat. N° 1 283 875 81, propriété de Bio-Rad Laboratories, Inc. L'achat de ce produit confère à l'acheteur le droit inaliénable d'utiliser la quantité achetée du produit et des composants du produit en réaction de polymérisation en chaîne (à l'exclusion de la réaction de polymérisation en chaîne en temps réel) dans le domaine de la recherche (y compris tous les domaines de la recherche appliquée, y compris sans s'y limiter, à la médecine légale, aux expérimentations sur les animaux et aux tests alimentaires) et de la réaction de polymérisation en chaîne en temps réel dans les domaines du diagnostic et du pronostic. Aucun droit n'est accordé pour l'utilisation de ce produit pour la réaction de polymérisation en chaîne en temps réel dans le domaine de la recherche, y compris tous les domaines de la recherche appliquée (y compris sans s'y limiter, la médecine légale, les expérimentations sur les animaux et les tests alimentaires).

Consigne de sécurité

MISE EN GARDE

Une **MISE EN GARDE** indique un danger. Elle attire l'attention sur un mode opératoire, une pratique ou autre qui, si il/elle n'est pas correctement exécuté(e) ou respecté(e), peut endommager le produit ou entraîner la perte de données importantes. Ne poursuivez pas au-delà d'une **MISE EN GARDE** tant que les conditions indiquées ne sont entièrement comprises et remplies.

AVERTISSEMENT

Un **AVERTISSEMENT** indique un danger. Il attire l'attention sur un mode opératoire, une pratique ou autre qui, si il/elle n'est pas correctement exécuté(e) ou respecté(e), peut entraîner des blessures corporelles ou la mort. Ne poursuivez pas au-delà d'un **AVERTISSEMENT** tant que les conditions indiquées ne sont entièrement comprises et remplies.

Dans ce guide...

Ce guide fournit des instructions pour la préparation automatisée des banques de séquençage multiplex d'extrémités appariées Illumina enrichies en cibles SureSelect^{XT HS} avec le système Magnis NGS Prep System.

Le système SureSelect^{XT HS} est utilisé pour préparer des échantillons de banque indexés avec des codes-barres moléculaires avant l'enrichissement des cibles afin de permettre un séquençage à haute sensibilité sur la plateforme Illumina.

- 1 Avant de commencer
- 2 Préparation des banques de séquençage à l'aide du système Magnis NGS Prep System
- 3 Annexe 1 : Directives relatives à la préparation des échantillons d'ADN
- 4 Annexe 2 : Utilisation des Probe strips préparées pendant l'exécution
- 5 Annexe 3 : Directives relatives au traitement des échantillons d'ADN après cycle pour le NGS
- 6 Références

Les nouveautés de la version D0

- Prise en charge des protocoles Magnis SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM et LT-SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM, configurés à l'aide d'un Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit (Réf. G9730D), fourni avec des Probe Input Strips vides (EPIS). Voir « [Annexe 2 : Utilisation des Probe strips préparées pendant l'exécution](#) » de la [page 54](#) à la [page 57](#) pour des instructions détaillées concernant la configuration des bandes d'entrée de sonde pour ce protocole. Pour plus d'informations sur le kit de réactifs Réf. G9730D, voir le [Tableau 1](#) à la page 11 et le [Tableau 16](#) à la page 73. Pour plus d'informations sur la compatibilité du protocole Magnis et du format des kits de réactifs, voir le [Tableau 7](#) à la page 27 et les informations de dépannage à la [page 87](#).
- Prise en charge des Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits Réf. G9736C et G9736D, fournis avec des plaques de sondes personnalisées de 24 à 50 Mb, et mise à jour des informations supplémentaires sur les références et les noms des plaques de sondes fournies avec les kits de réactifs Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits. Voir [Tableau 1](#) à la page 11, [Tableau 16](#) et [Tableau 17](#) à la page 74, [Tableau 18](#) à la page 74 ainsi que l'[étape 5](#) à la [page 24](#).
- Mise à jour des descriptions des plaques de sonde pour les Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits (format original). Voir le [Tableau 25](#) à la page 77.
- Mises à jour des images de l'interface de l'écran tactile à la [page 28](#), [page 39](#), [page 40](#), [page 41](#) et [page 42](#).
- Mises à jour des directives relatives aux kits de séquençage Illumina au [Tableau 15](#) à la page 64.
- Mise à jour des informations de dépannage relatives à l'affichage du Time Remaining sur l'écran tactile Magnis (reportez-vous à la [page 87](#)).

Les nouveautés de la version C0

- Prise en charge de l'utilisation du protocole LT-SSEL XTHS-RevB-ILM avec les kits de réactifs Magnis SureSelect XT HS Rev B. Pour plus d'informations sur la façon de sélectionner le protocole compatible avec le format de votre kit de réactifs et avec les autres paramètres de processus pendant la configuration du cycle, reportez-vous à la [page 27](#). Voir également la section *Dépannage* à la [page 86](#).
- Le kit de réactifs Magnis SureSelect XT HS Rev B fourni avec les probe input strips vides, Réf. G9730D, n'est pas disponible actuellement ; voir les mises à jour des listes de kits de réactifs Magnis pris en charge dans le [Tableau 1](#) à la page 11 et le [Tableau 16](#) à la page 73. Les informations relatives à l'utilisation du protocole SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM pour le traitement des séries mises en place avec le kit de réactifs G9730D ont été supprimées du [Tableau 7](#) à la page 27 et de l'[Annexe 2 : Utilisation des Probe strips préparées pendant l'exécution](#) de la [page 54](#) à la [page 57](#). Consultez le site [Agilent.com](#) pour obtenir des mises à jour sur la disponibilité du kit de réactifs Magnis et des protocoles.

Les nouveautés de la version B0

- Prise en charge des kits de réactifs Magnis SureSelect XT HS Rev B, traités à l'aide du protocole SSEL XTHS-RevB-ILM. Les kits de réactifs Rev B contiennent des composants reformatés (*Magnis SureSelect XT HS Reagent Plates Rev B ILM* et *Magnis SureSelect XT HS Probe Plate, format pré-rempli à un seul puits*) qui doivent être traités à l'aide d'un protocole RevB. Reportez-vous de la [page 74](#) à la [page 76](#) pour plus d'informations sur les composants du Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit. Les instructions contenues dans ce

document permettent également de traiter les échantillons à l'aide du format d'origine du kit de réactifs. Reportez-vous de la [page 77](#) à la [page 79](#) pour plus d'informations sur les composants du Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit (format d'origine). Reportez-vous au [Tableau 1](#) à la page 11 pour une liste récapitulative de tous les kits de réactifs pris en charge. Pour consulter les instructions de configuration pour Reagent Plate et Probe Plate, reportez-vous de la [page 23](#) à la [page 24](#). Pour plus d'informations sur la façon de sélectionner le protocole compatible avec le format de votre kit de réactifs pendant la configuration du cycle, reportez-vous à la [page 27](#).

- Prise en charge des sondes personnalisées produites grâce à de nouveaux processus de conception et de fabrication à partir d'août 2020. Les sondes pour tous les nouveaux modèles personnalisés sont produites selon le nouveau processus. Les sondes pour les modèles personnalisés existants, créées avant août 2020, sont produites en utilisant l'ancien processus de fabrication. Reportez-vous au [Tableau 18](#) à la page 74 pour plus d'informations sur les sondes fournies avec les Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits. Reportez-vous au [Tableau 25](#) à la page 77 pour plus d'informations sur les sondes fournies avec les kits de réactifs Magnis SureSelect XT HS dans leur format d'origine.
- Prise en charge des kits de réactifs Magnis SureSelect XT HS Rev B avec la sonde Human All Exon V8 ([Tableau 1](#) à la page 11, [Tableau 16](#) à la page 73, et [Tableau 18](#) à la page 74).
- Mises à jour des instructions de manipulation des composants du kit de la [page 22](#) à la [page 23](#) et notamment des instructions de décongélation des Reagent Plates, ainsi que des informations sur la manipulation des opercules ou adhésifs et des étuis de plaques.
- Mises à jour mineures des instructions de chargement du module refroidisseur de la [page 33](#) à la [page 34](#).
- Ajout d'un hygromètre à la liste des **Équipements requis** dans le [Tableau 2](#) à la page 12 et ajout de l'étape de mesure de l'humidité dans les instructions de configuration de l'instrument à la [page 20](#).
- Mises à jour des informations de commande de la centrifugeuse à godets mobiles ([Tableau 2](#) à la page 12), du 1X Low TE Buffer et du fluoromètre Qubit ([Tableau 3](#) à la page 13).
- Prise en charge du CQ en banque à l'aide de l'Agilent 5200 Fragment Analyzer (reportez-vous à la note de bas de page du [Tableau 3](#) à la page 13 et à la *Remarque* à la [page 59](#)).
- Mises à jour de **Annexe 2 : Utilisation des Probe strips préparées pendant l'exécution** de la [page 54](#) à la [page 57](#). Les mises à jour comprennent la prise en charge du protocole *SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM*, à l'aide d'un Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit fourni avec des probe input strips vides (EPIS).
- Mises à jour de la section *Dépannage* à la [page 85](#) avec les informations sur l'accès au protocole, la mise en place de tubes à essai et des indicateurs *Verify Labware* de protocoles et de logiciels de laboratoire mésappariés.
- Mise à jour de la [page 9](#) pour inclure la description des plates-formes de séquençage compatibles et les mises à jour des lignes directrices du kit de séquençage Illumina dans le [Tableau 15](#) à la page 64.
- Suppression des informations de commande d'éthylène glycol dans le [Tableau 6](#) à la page 14. Reportez-vous à la [page 47](#) et à la [page 51](#) pour les mises à jour correspondantes des instructions de configuration de la fragmentation de l'ADN.
- Ajout des informations de commande du dosage D1000 ScreenTape dans le [Tableau 6](#) à la page 14.
- Mise à jour des coordonnées de l'assistance technique (reportez-vous à la [page 2](#)).

Table des matières

1	Avant de commencer	8
	Vue d'ensemble des étapes	9
	Consignes de sécurité	10
	Matériels requis	11
	Matériels requis pour les cycles SureSelect XT HS Magnis Prep System	11
	Matériels requis pour la préparation et l'analyse des échantillons d'ADN	13
	Matériels facultatifs	14
2	Préparation des banques de séquençage à l'aide du système Magnis NGS Prep System	15
	Informations essentielles sur le suivi des échantillons	16
	Sens des échantillons dans les puits Magnis Sample Input Strip	16
	Affectation des échantillons dans les puits via le logiciel Magnis	17
	Préparation de vos échantillons d'ADN pour le cycle	19
	Préparation de l'instrument Magnis et des réactifs pour le cycle	20
	Étape 1. Préparation de l'instrument pour exécuter un protocole	20
	Étape 2. Préparation des réactifs SureSelect ^{XT HS} et des articles en plastique	22
	Exécution du protocole de préparation des banques	26
	Étape 1. Lancement du protocole et saisie des informations sur le cycle	27
	Étape 2. Configuration de la platine	29
	Étape 3. « Vérification du matériel de laboratoire »	36
	Étape 4. « Saisie des informations sur les échantillons »	38
	Étape 5. Confirmation de la configuration et lancement du cycle	39
	Étape 6. Recueil des échantillons des banques finales dans l'instrument	41
	Étape 7. Nettoyage de l'instrument après le cycle	44
3	Annexe 1 : Directives relatives à la préparation des échantillons d'ADN	45
	I. Préparation des échantillons d'ADN de haute qualité pour les cycles Magnis	46
	Étape 1. Préparation, quantification et qualification des échantillons d'ADN génomique	46
	Étape 2. Fragmentation de l'ADN	46
	II. Préparation des échantillons d'ADN dérivé de FFPE pour les cycles Magnis	49
	Étape 1. Préparation de l'ADN génomique à partir d'échantillons FFPE	49
	Étape 2. Qualification et quantification des échantillons d'ADN FFPE	49
	Étape 3. Fragmentation des échantillons d'ADN FFPE	51

4	Annexe 2 : Utilisation des Probe strips préparées pendant l'exécution	54
	Préparation des Probe strips pendant l'exécution	55
	Saisie des informations relatives aux sondes (probe) dans le logiciel Magnis pendant la configuration du cycle	57
5	Annexe 3 : Directives relatives au traitement des échantillons d'ADN après cycle pour le NGS	58
	Étape 1. Analyse de la quantité et de la qualité des échantillons d'ADN des banques	59
	Étape 2. Pool d'échantillons pour le séquençage multiplex (optionnel)	62
	Étape 3. Préparation des échantillons de séquençage	63
	Étape 4. Exécution du cycle de séquençage et analyse des données	65
	Directives relatives à la configuration des cycles de séquençage avec les instruments HiSeq/NextSeq/NovaSeq	65
	Directives relatives à la configuration des cycles de séquençage avec l'instrument MiSeq	68
	Ressources relatives à l'analyse séquentielle	71
6	Références	72
	Contenu des kits de réactifs	73
	Contenu du Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit	74
	Contenu du Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit (format d'origine)	77
	Informations de référence relatives à SureSelect XT HS Indexes	80
	Informations relatives à la position des plaques	80
	Séquences nucléotidiques des index (index)	82
	Suivi post-cycle de l'identité des index (index)	83
	Guide de dépannage	84

1

Avant de commencer

Vue d'ensemble des étapes 9

Consignes de sécurité 10

Matériels requis 11

Matériels requis pour les cycles SureSelect XT HS Magnis Prep System 11

Matériels requis pour la préparation et l'analyse des échantillons d'ADN 13

Matériels facultatifs 14

Ce chapitre contient des informations que vous devez lire et comprendre avant de commencer.

Vue d'ensemble des étapes

Les étapes du SureSelect^{XT HS} target enrichment avec le système Magnis NGS Prep System sont résumées dans la [Figure 1](#). Une fois les échantillons d'ADN génomique fragmenté, les réactifs pré-étalés et le matériel de laboratoire chargés, le système Magnis NGS Prep System effectue toutes les étapes de préparation des banques SureSelect^{XT HS} et de manipulation et d'incubation du liquide d'enrichissement des cibles. Une fois le cycle Magnis NGS Prep System terminé, les banques enrichies en cibles sont prêtes à être poolées pour la préparation d'échantillons NGS (séquençage de nouvelle génération) multiplex et l'analyse séquentielle, à l'aide des séquenceurs Illumina HiSeq, MiSeq, NextSeq 500 ou NovaSeq 6000.

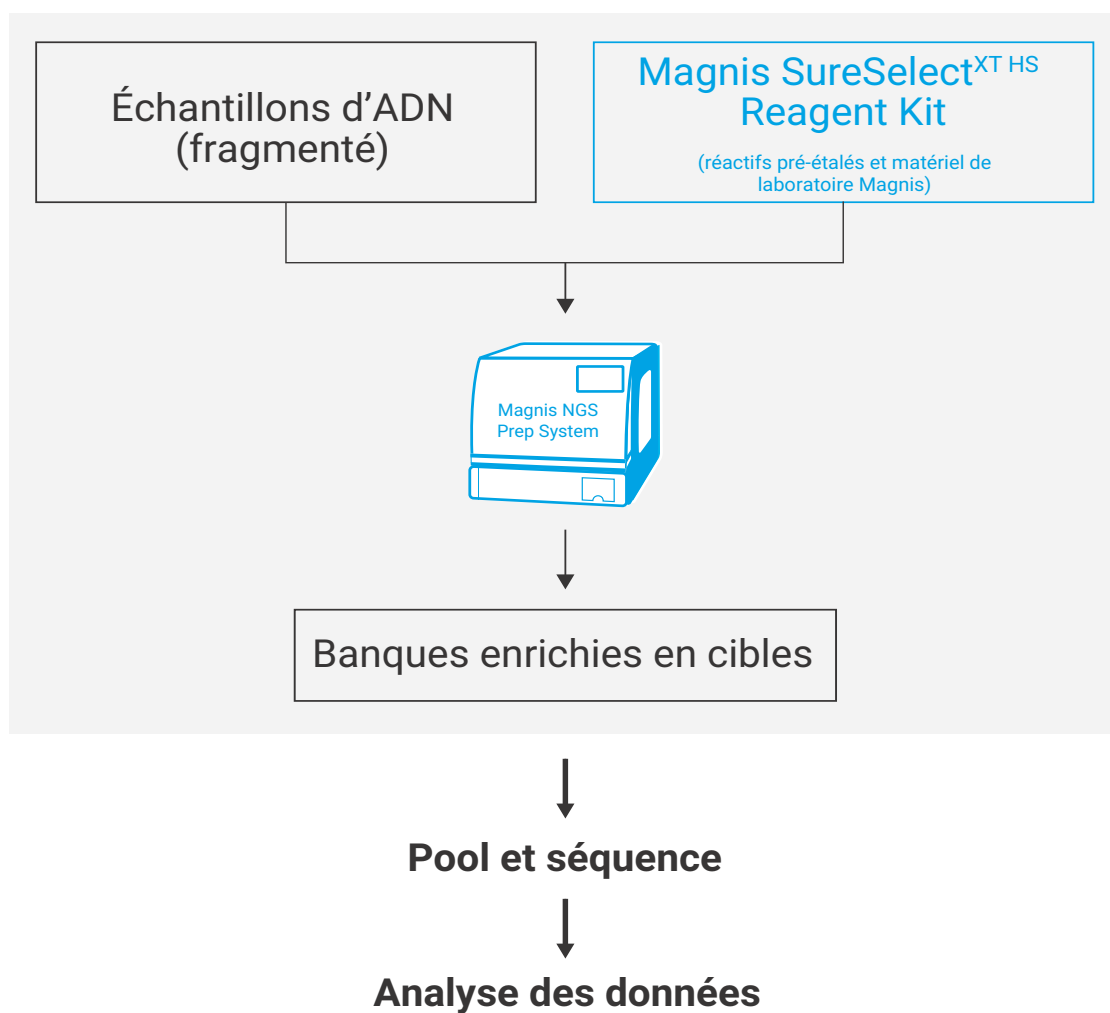


Figure 1 Étapes globales de la préparation des échantillons NGS Magnis NGS Prep System.

Consignes de sécurité

MISE EN GARDE

Portez un équipement de protection individuelle (EPI) adapté lorsque vous travaillez dans le laboratoire.

Risque d'exposition à la lumière ultraviolette (UV)

La porte et les panneaux latéraux des instruments Magnis ne sont pas transparents aux UV. Par conséquent, l'exposition à la lumière UV est minimale. Toutefois, vous devez tout de même prendre les précautions suivantes.

- Lors de la décontamination de la platine de l'instrument à la lumière UV, ne regardez pas directement ou indirectement la source de lumière UV.
- Effectuez toujours la décontamination avec la porte de l'instrument fermée et verrouillée. La porte de l'instrument est programmée pour rester verrouillée tant que la lampe UV est allumée.
- Les tubes UV de remplacement doivent être fournis par Agilent et doivent être installés par un technicien Agilent ou par un fournisseur de service agréé Agilent.

Risque de brûlures

- Pendant les cycles du protocole, le bloc thermique et les autres composants du module du thermocycleur atteignent rapidement des températures supérieures à 50 °C. Pour garantir un fonctionnement en toute sécurité, la porte de l'instrument doit rester fermée pendant les cycles. L'instrument est programmé pour maintenir la porte verrouillée pendant que les cycles du protocole sont en cours d'exécution.
- Utilisez uniquement des matériels Agilent (plaques, joints adhésifs, films, tapis) conçu pour être utilisé avec le Magnis NGS Prep System. Ces matériels sont suffisamment résistants à la température (jusqu'à 120 °C).

Matériels requis

Matériels requis pour les cycles SureSelect XT HS Magnis Prep System

Tableau 1 Kits de réactifs pris en charge (en sélectionner un)

Description	96 réactions*	32 réactions†
Magnis SureSelectXT HS Rev B Reagent Kit :	Agilent	Agilent
avec Tier 1 (1 à 499 kb) Probe	Réf. G9731D	Réf. G9731C
avec Tier 2 (0,5 à 2,9 Mb) Probe	Réf. G9732D	Réf. G9732C
avec Tier 3 (3 à 5,9 Mb) Probe	Réf. G9733D	Réf. G9733C
avec Tier 4 (6 à 11,9 Mb) Probe	Réf. G9734D	Réf. G9734C
avec Tier 5 (12 à 24 Mb) Probe	Réf. G9735D	Réf. G9735C
avec 24 à 50 Mo Probe	Réf. G9736D	Réf. G9736C
avec Human All Exon V7 Probe	Réf. G9771D	Réf. G9771C
avec Human All Exon V8 Probe	Réf. G9772D	Réf. G9772C
avec des Magnis Probe Input Strips vides‡	Réf. G9730D	Non proposée à la vente
Pour obtenir une liste du contenu du kit, consultez de la page 74 à la page 76 .		
OU		
Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit (format d'origine) :	Agilent	Agilent
Avec 1 à 499 kb Probe	Réf. G9731B	Réf. G9731A
avec 0,5 à 2,9 Mb Probe	Réf. G9732B	Réf. G9732A
avec 3 à 5,9 Mb Probe	Réf. G9733B	Réf. G9733A
avec 6 à 11,9 Mb Probe	Réf. G9734B	Réf. G9734A
avec 12 à 24 Mb Probe	Réf. G9735B	Réf. G9735A
avec Human All Exon V7 Probe	Réf. G9771B	Réf. G9771A
avec des Magnis Probe Input Strips vides‡	Réf. G9730B	Non proposé à la vente
Pour obtenir une liste du contenu du kit, consultez de la page 77 à la page 79 .		

* Les kits 96 réactions sont formatés pour 12 cycles contenant 8 échantillons chacun.

† Les kits 32 réactions sont formatés pour 4 cycles contenant 8 échantillons chacun.

‡ La sonde doit être achetée séparément. Reportez-vous à la [page 55](#) pour plus d'informations sur le remplissage des Magnis Probe Input Strips vides pour le cycle.

Tableau 2 Équipements requis

Description	Fournisseur et référence
Magnis NGS Prep System*	Agilent Réf. G9710AA
Embouts de pipetage robotisé (stériles, filtrés, 250 µl)	Agilent Réf. G9477G
Hygromètre	Enregistreur de données d'humidité/température traçables, Cole-Parmer Réf. 18004-13 ou équivalent
Agitateur à vortex	Vortex Genie-2, VWR Réf. 58815-234 ou équivalent
Microcentrifugeuse	Microcentrifugeuse Eppendorf, modèle 5417C ou équivalent†
Centrifugeuse à godets mobiles	Centrifugeuse Eppendorf, modèle 5804 avec rotor A-2-DWP ou équivalent‡
Pipettes (capacité de 2, 10, 20 et 200 µl)	Pipettes Rainin Pipet-Lite ou équivalent
Embouts de pipette stériles, exempts de nucléase, à filtre anti-aérosols	Fournisseur d'équipement de laboratoire général
Congélateurs (2) réglés à -20 °C et -80 °C	Fournisseur d'équipement de laboratoire général
Réfrigérateur réglé à +4 °C	Fournisseur d'équipement de laboratoire général
Seau à glace	Fournisseur d'équipement de laboratoire général
Gants non poudrés	Fournisseur d'équipement de laboratoire général

* Les kits Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits et les protocoles détaillés dans cette publication sont également compatibles avec le système Magnis Dx NGS Prep System (Réf. K1007AA).

† Le rotor de la centrifugeuse doit être adapté aux tubes à bandes fournis avec les Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits.

‡ Le rotor de la centrifugeuse doit être adapté aux plaques à puits profonds fournies avec les Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits. Aucun système de réfrigération n'est requis.

Matériels requis pour la préparation et l'analyse des échantillons d'ADN

Tableau 3 Matériels requis pour la préparation et l'analyse des échantillons d'ADN – Tous types d'échantillon

Description	Fournisseur et référence
1X Low TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5–8,0 ; 0,1 mM EDTA)	Thermo Fisher Scientific Réf. 12090-015 ou équivalent
Qubit BR dsDNA Assay Kit 100 dosages 500 dosages	Thermo Fisher Scientific Réf. Q32850 Réf. Q32853
Fluorimètre Qubit	Thermo Fisher Scientific Réf. Q33238
Tubes de dosage Qubit	Thermo Fisher Scientific Réf. Q32856
Système de préparation d'échantillons Covaris	Covaris modèle E220
Porte-échantillons Covaris microTUBE	Covaris Réf. 520045
Système d'analyse d'ADN et consommables :*	
Agilent 4150 TapeStation OU Agilent 4200 TapeStation ET Bandes de tubes 8 puits compatibles TapeStation Bouchons pour bandes de tubes 8 puits High Sensitivity D1000 ScreenTape High Sensitivity D1000 Reagents	Agilent Réf. G2992AA Agilent Réf. G2991AA Agilent Réf. 401428 Agilent Réf. 401425 Agilent Réf. 5067-5584 Agilent Réf. 5067-5585

* L'Agilent 2100 Bioanalyzer (Réf. G2939BA) et le High Sensitivity DNA Kit (Réf. 5067-2646) ou l'Agilent 5200 Fragment Analyzer (Réf. M5310AA) et le HS NGS Fragment Kit (Réf. DNF-474-0500) peuvent également être utilisés pour l'analyse d'ADN en banque.

Tableau 4 Matériels requis -- Échantillons d'ADN de haute qualité uniquement

Description	Fournisseur et référence
Système de purification d'ADNg de haute qualité, par exemple :	
QIAamp DNA Mini Kit 50 échantillons 250 échantillons	Qiagen Réf. 51304 Réf. 51306

Tableau 5 Matériels requis -- Échantillons d'ADN FFPE uniquement

Description	Fournisseur et référence
Système de purification d'ADNg FFPE, par exemple :	Qiagen
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, 50 échantillons	Réf. 56404
Deparaffinization Solution	Réf. 19093
Système d'évaluation de l'intégrité de l'ADN FFPE :	
Agilent NGS FFPE QC Kit (méthode recommandée)	Agilent
16 réactions	Réf. G9700A
96 réactions	Réf. G9700B
OU	
Dosage d'analyse TapeStation Genomic DNA :*	Agilent
Genomic DNA ScreenTape	Réf. 5067-5365
Genomic DNA Reagents	Réf. 5067-5366

* Agilent's 4150 TapeStation ou 4200 TapeStation, ainsi que des articles en plastique compatibles, sont également requis. Reportez-vous au [Tableau 3](#) ci-dessus pour connaître les références de commande.

Matériels facultatifs

Tableau 6 Informations des fournisseurs relatives aux matériels facultatifs dans les protocoles

Description	Fonction	Fournisseur et référence
Lingettes à l'eau de Javel diluée (10 %)	Nettoyage de surface de la platine de l'instrument (reportez-vous à la page 20)*	Hype-Wipe Bleach Towelettes (VWR Réf. 16200-218), ou équivalent
Lingettes imbibées d'alcool (70 %)	Nettoyage de surface de la platine de l'instrument (reportez-vous à la page 20)*	VWR Pre-Moistened Clean Wipes (VWR Réf. 21910-110), ou équivalent
Lingettes douces, non pelucheuses et sèches	Nettoyage de surface de la fenêtre du lecteur de codes-barres	Lingettes Kimwipes (VWR Réf. 21905-026), ou équivalent
D1000 ScreenTape et D1000 Reagents	Analyse des échantillons CQ facultatifs des banques pré-capture à l'aide du système Agilent 4200/4150 TapeStation (reportez-vous à la page 43)	Agilent Réf. 5067-5582 et Réf. 5067-5583
Tween 20	Stockage des banques de séquençage (reportez-vous à la page 62)	Sigma-Aldrich Réf. P9416-50ML

* Agilent recommande d'utiliser les programmes de décontamination par UV pour instruments Magnis pour la décontamination de routine des instruments. Si un nettoyage à base de solvant est nécessaire, reportez-vous au guide d'utilisation de l'instrument pour avoir toutes les instructions relatives au nettoyage de surface. Les solvants autorisés doivent être appliqués sur un support en tissu solide avant utilisation. Ne vaporisez pas d'eau, d'eau de Javel, d'alcool ou d'autres liquides à l'intérieur de l'instrument. Éliminez tout excès de liquide des lingettes avant utilisation afin d'éviter l'infiltration de liquides dans les composants de l'instrument.

2

Préparation des banques de séquençage à l'aide du système Magnis NGS Prep System

Informations essentielles sur le suivi des échantillons	16
Sens des échantillons dans les puits Magnis Sample Input Strip	16
Affectation des échantillons dans les puits via le logiciel Magnis	17
Préparation de vos échantillons d'ADN pour le cycle	19
Préparation de l'instrument Magnis et des réactifs pour le cycle	20
Étape 1. Préparation de l'instrument pour exécuter un protocole	20
Étape 2. Préparation des réactifs SureSelect ^{XT HS} et des articles en plastique	22
Exécution du protocole de préparation des banques	26
Étape 1. Lancement du protocole et saisie des informations sur le cycle	27
Étape 2. Configuration de la platine	29
Étape 3. « Vérification du matériel de laboratoire »	36
Étape 4. « Saisie des informations sur les échantillons »	38
Étape 5. Confirmation de la configuration et lancement du cycle	39
Étape 6. Recueil des échantillons des banques finales dans l'instrument	41
Étape 7. Nettoyage de l'instrument après le cycle	44

Ce chapitre contient des instructions pour la préparation des banques de séquençage d'ADN enrichies en cibles SureSelect^{XT HS} à l'aide du système Magnis NGS Prep System. Pour une vue d'ensemble des étapes, reportez-vous à la [Figure 1](#) à la page 9.

Des instructions détaillées sont fournies ici pour configurer l'instrument Magnis NGS Prep System et les composants de dosage pour un cycle, puis pour exécuter le protocole de l'instrument Magnis pour la préparation automatisée des échantillons de banque NGS.

Pour chaque échantillon à séquencer, une banque individuelle indexée et dotée de codes-barres moléculaires est préparée. Les banques préparées selon les protocoles décrits ici sont prêtes à être séquençées à l'aide du système de lecture de paires Illumina.

Informations essentielles sur le suivi des échantillons

Un suivi précis des échantillons est essentiel à l'interprétation de vos résultats de séquençage. Avant de commencer un cycle, assurez-vous de lire et comprendre les informations relatives au suivi des échantillons dans cette section, y compris 1) le sens des numéros d'échantillon dans les puits Magnis Sample Input Strip et 2) la façon de saisir les identités des échantillons dans le logiciel Magnis pendant la configuration du cycle.

Sens des échantillons dans les puits Magnis Sample Input Strip

Le système Magnis NGS Prep System utilise le sens des échantillons indiqué dans la [Figure 2](#) ci-dessous, l'Échantillon 1 étant chargé dans le puits le plus éloigné du code-barres dans les Magnis Sample Input Strips fournies. Les échantillons doivent être chargés dans les puits Magnis Sample Input Strip dans ce sens (illustré à la [page 23](#)) lors de la configuration du cycle.

Avant de configurer le cycle, affectez chaque échantillon à un numéro d'échantillon spécifique de 1 à 8 et consignez les assignations des numéros d'échantillon. Les méthodes de saisie des affectations des échantillons pour un cycle dans le logiciel Magnis sont décrites de la [page 17](#) à la [page 18](#).

MISE EN GARDE

N'ajoutez ni texte ni étiquette qui pourrait masquer le code-barres sur la Magnis Sample Input Strip.

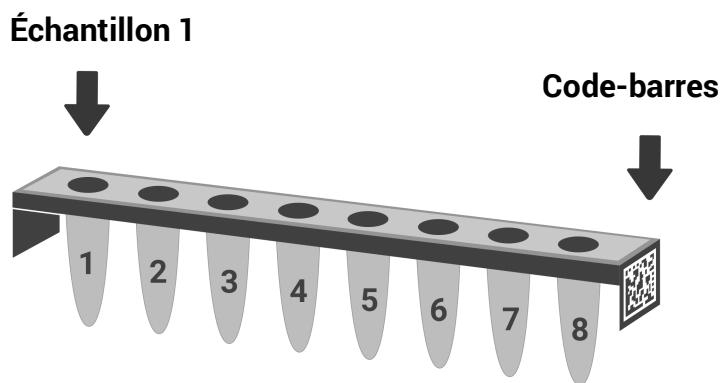


Figure 2 Sens requis des numéros d'échantillon 1 à 8 dans Magnis Sample Input Strip.

Affectation des échantillons dans les puits via le logiciel Magnis

L'identité de chaque échantillon dans le cycle doit être spécifiée dans le logiciel de l'instrument Magnis en utilisant l'une des deux méthodes décrites ci-dessous. Les ID d'échantillon spécifiques à inclure dans un cycle sont saisis dans le système Magnis pendant la configuration du cycle, comme détaillé dans la section « [Étape 4. « Saisie des informations sur les échantillons »](#) » à la page 38. Assurez-vous de bien comprendre les informations de positionnement et de suivi des échantillons ci-dessous avant de commencer la configuration du cycle.

Chaque ID d'échantillon doit contenir 1 à 30 caractères et doit être unique dans le cycle. Les ID d'échantillon peuvent être réutilisés dans d'autres cycles.

Méthode 1 d'affectation des échantillons : importation d'exemples d'affectation avec un fichier .csv

- 1 Créez un fichier .csv (valeurs séparées par des virgules) contenant les noms des échantillons commandés. Les données relatives aux noms des échantillons peuvent être saisies sous forme de tableau à l'aide d'une application tableur, telle que le logiciel Microsoft Excel, puis enregistrées au format .csv.
 - a Saisissez le texte d'en-tête **sample_id** dans la cellule A1, comme indiqué dans la [Figure 3](#).
 - b Saisissez le nom de chaque échantillon dans les cellules A2 à A9 (reportez-vous à la [Figure 3](#), panneau de gauche). Le fichier d'entrée d'échantillons doit contenir 8 ID d'échantillon uniques. Si des puits d'échantillon sont laissés vides pour le cycle, vous devez saisir un texte fictif dans les positions correspondantes (reportez-vous à la [Figure 3](#), panneau de droite).

8 échantillons dans le cycle

	A	B
1	sample_id	
2	HD18060701	
3	HD18060702	
4	HD18060703	
5	HD18060704	
6	HD18060705	
7	HD18060706	
8	HD18060707	
9	HD18060708	
10		

6 échantillons dans le cycle avec 2 ID d'échantillon fictifs

	A	B
1	sample_id	
2	HD18060701	
3	HD18060702	
4	HD18060703	
5	HD18060704	
6	HD18060705	
7	HD18060706	
8	empty1	
9	empty2	
10		

Figure 3 Exemple de contenu d'un fichier .csv (présenté sous forme de tableur) pour le téléchargement d'exemples d'affectation

- 2 Enregistrez le fichier au format .csv.
- 3 Téléchargez le fichier .csv sur un disque USB non crypté.
- 4 Lors de la configuration du cycle, sur l'écran *Enter Sample Info*, appuyez sur le bouton de téléchargement d'échantillon illustré ci-dessous, puis suivez les invites de l'assistant de configuration de protocole pour transférer les ID d'échantillon à partir du disque USB.



Méthode 2 d'affectation des échantillons : affectation manuelle des échantillons à l'aide de l'écran tactile de l'instrument Magnis

- 1 Consignez l'identité de chaque numéro d'échantillon pour le cycle en utilisant les procédures appropriées de tenue de dossiers sur papier ou en version informatique avant de distribuer les échantillons dans les puits Magnis Sample Input Strip.
- 2 Lors de la configuration du cycle, suivez les invites de l'écran tactile Magnis pour saisir le Sample ID pour chaque position de puits d'échantillon en utilisant l'écran *Enter Sample Info* illustré ci-dessous. Le système Magnis attribue automatiquement un Sample ID par défaut à chaque position d'échantillon. Pour modifier le Sample ID, sélectionnez d'abord une position d'échantillon spécifique sur l'écran tactile, puis utilisez l'outil **Edit Sample ID** à droite pour saisir le texte Sample ID souhaité. Appuyez sur **Change** pour enregistrer le texte Sample ID saisi pour l'échantillon.

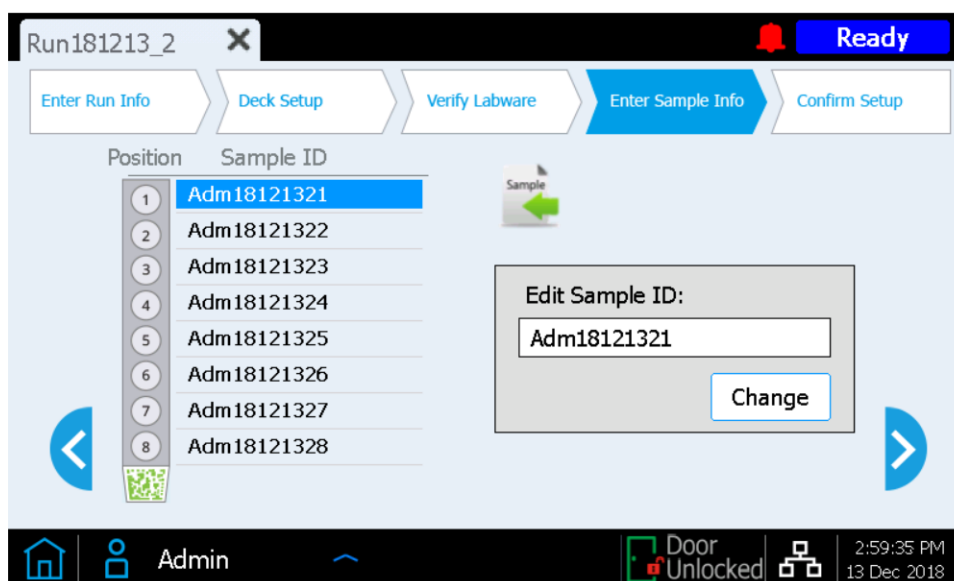


Figure 4 Interface de l'écran tactile Magnis utilisée pour l'affectation manuelle des échantillons en cours d'un cycle.

Préparation de vos échantillons d'ADN pour le cycle

Le protocole de préparation des banques est compatible à la fois avec un ADNg de haute qualité préparé à partir d'échantillons frais ou frais congelés et avec un ADN de qualité inférieure préparé à partir d'échantillons FFPE. Les cycles de traitement de l'ADN de haute qualité ou de l'ADN dérivé de FFPE peuvent comprendre 10 ng, 50 ng, 100 ng ou 200 ng d'ADN d'entrée. Pour des résultats de séquençage optimaux, utilisez la quantité maximale d'ADN d'entrée disponible dans cette plage. Tous les échantillons d'un même cycle doivent être fournis dans la même quantité.

Avant de configurer le cycle Magnis, les échantillons d'ADN doivent être préparés, quantifiés, qualifiés et fragmentés selon les directives et les protocoles figurant dans l'« [Annexe 1 : Directives relatives à la préparation des échantillons d'ADN](#) » à la page 45. Il sera peut-être nécessaire d'exécuter certaines parties du protocole de préparation des échantillons d'ADN, en particulier la qualification des échantillons dérivés de FFPE, jusqu'à un jour avant le début des étapes du cycle Magnis. Toutefois, les échantillons d'ADN doivent être fragmentés et distribués dans le tube d'échantillon d'ADN d'entrée en bande immédiatement avant d'être utilisés dans le cycle.

Avant de commencer les étapes de configuration du système Magnis NGS Prep System en page suivante, passez en revue les étapes de préparation des échantillons d'ADN à partir de la [page 45](#) pour vous assurer que les échantillons d'ADNg et l'instrument Covaris E220 seront prêts pour la fragmentation de l'ADN lors de la configuration du cycle.

REMARQUE

La préparation de l'instrument Covaris E220 pour la fragmentation de l'ADN nécessite environ 30 à 60 minutes pour refroidir et dégazer le bain-marie. Lancez ces étapes de conditionnement (reportez-vous à l'[étape 1](#) à la [page 47](#)) avant d'initier une quelconque des étapes de configuration des réactifs et du système Magnis NGS Prep System aux pages suivantes.

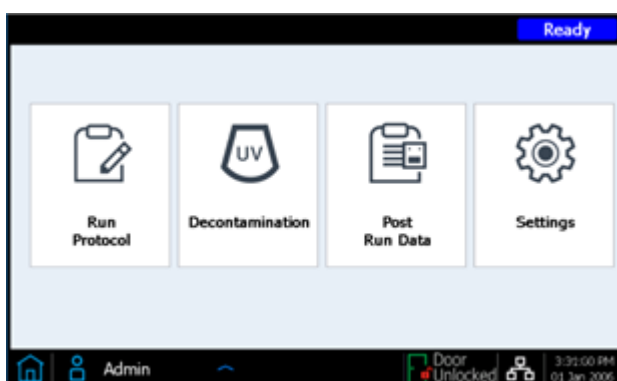
Préparation de l'instrument Magnis et des réactifs pour le cycle

Étape 1. Préparation de l'instrument pour exécuter un protocole

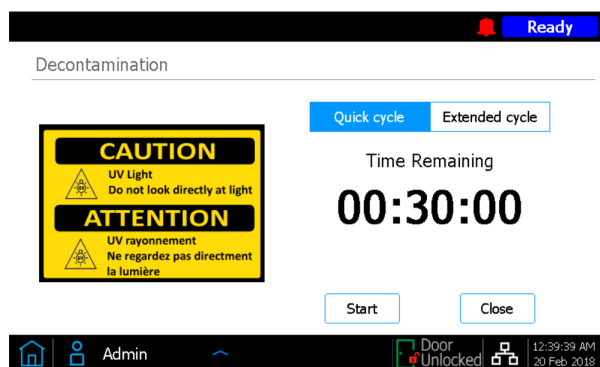
REMARQUE

Les instructions ci-dessous comprennent une procédure de décontamination par l'intermédiaire d'instruments qui utilisent la lumière ultraviolette (UV) pour décontaminer la platine des instruments. D'autres procédures de décontamination (par exemple, l'utilisation d'une solution d'eau de Javel à 10 %) peuvent être utilisées en plus ou en remplacement de la procédure de décontamination UV automatisée. Reportez-vous au Guide d'utilisation du système Magnis pour les instructions complètes de décontamination et de nettoyage de la surface.

- 1 Avant de commencer, utilisez un hygromètre pour mesurer l'humidité ambiante à proximité de l'instrument Magnis. Vérifiez que l'humidité sans condensation se situe dans la plage acceptable de 30 % à 70 %.
- 2 Vérifiez que la platine de l'instrument est débarrassée de tout le matériel de laboratoire des cycles précédents et de tout autre matériel inutile. Tous les matériels présents sur la platine de l'instrument pendant la configuration du cycle peuvent interférer avec les processus de configuration et de démarrage de l'instrument.
- 3 Mettez l'instrument sous tension en appuyant sur le bouton d'alimentation situé à l'avant de l'appareil. Fermez la porte de l'instrument.
L'instrument s'allume, les voyants DEL à l'intérieur de l'instrument s'allument et le logiciel se lance sur l'écran tactile.
Tenez-vous prêt pendant que le système effectue une série d'activités de démarrage, qui peuvent prendre plusieurs minutes.
- 4 Agilent recommande d'exécuter la procédure de décontamination par UV *Quick cycle* (requiert 30 minutes) avant chaque cycle, en suivant les étapes ci-dessous.
 - a Sur l'écran Home, appuyez sur **Decontamination**.



- b Sur l'écran Decontamination, appuyez sur **Quick cycle**, puis sur **Start**. La durée de la procédure de décontamination *Quick cycle* est de 30 minutes. Les voyants DEL s'éteignent pendant la procédure de décontamination par UV, et le tube de lumière UV de l'instrument émet de la lumière UV pendant cet intervalle.



AVERTISSEMENT

Ne regardez pas directement la lumière UV lorsque la décontamination est en cours.

REMARQUE

Au cours du processus de décontamination de 30 minutes, commencez les étapes de préparation des réactifs décrites en détail à la [page 22](#).

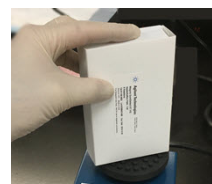
- 5 Une fois le cycle de décontamination terminé, les voyants DEL de l'instrument deviennent bleus. Revenez à l'écran Home à l'aide de l'écran tactile pour accéder aux étapes de configuration du cycle.

Étape 2. Préparation des réactifs SureSelect^{XT HS} et des articles en plastique

Instructions relatives à la manipulation des plaques et des tubes en bande

Familiarisez-vous avec les instructions importantes de manipulation du matériel de laboratoire ci-dessous avant de commencer à configurer le cycle.

- Les Magnis Sample Input Strips (bandes rouges fournies en format plaque, Réf. 5190-9882 ou 5191-5676), ainsi que tous les réactifs de préparation et de dilution des échantillons d'ADN d'entrée, ne doivent être stockés et utilisés que dans les zones pré-réaction de polymérisation en chaîne du laboratoire. Les Magnis Probe Input Strips vides (Réf. 5190-9883, fournies uniquement avec les kits G9730D et G9730B) doivent également être stockées et remplies dans une zone pré-réaction de polymérisation en chaîne.
- Les joints adhésifs et les opercules recouvrant les plaques de kit et les tubes en bande doivent être laissés en place pendant la configuration et l'exécution du cycle. Évitez de toucher ou d'endommager l'opercule et les joints adhésifs pendant la configuration du cycle. L'opercule en aluminium de la Sample Input Strip est percé au cours de la configuration du cycle et les puits doivent être refermés à l'aide d'une nouvelle bande d'opercule en aluminium fournie dans le kit. Veillez à ne pas contaminer ou endommager les opercules de remplacement.
- Les plaques de réactifs remplies (aussi bien Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plates que Magnis SureSelect XT HS Reagent Plates) sont fournies dans des étuis en carton blanc. Laissez les plaques remplies dans les étuis pendant toutes les étapes de préparation décrites ci-dessous. Afin d'inspecter visuellement les puits de la plaque, faites glisser **partiellement** la plaque de réactif hors de l'étui afin d'éviter de plier ou d'endommager l'opercule ou l'adhésif. Toute réinsertion incorrecte de la plaque dans l'étui peut compromettre l'intégrité de la plaque.
- Agitez au vortex les plaques de réactifs remplies à l'aide de la procédure suivante, illustrée ci-dessous. Tenez la plaque dans l'étui en position verticale (sur le côté) plutôt qu'à l'horizontale pendant l'agitation au vortex. Commencez par appuyer un côté long de la plaque sur la tête de l'agitateur à vortex, puis mélangez pendant 10 secondes. Ensuite, tournez la plaque de 90° et appuyez le côté court de la plaque sur la tête de l'agitateur à vortex pendant 10 secondes supplémentaires. Poursuivez la séquence de rotation/mélange de 10 secondes jusqu'à ce que le mélange soit terminé sur les quatre côtés de la plaque.



- Si un composant du kit semble endommagé lors du déballage ou de la configuration du cycle (p. ex., si l'opercule ou l'adhésif en aluminium est percé ou si des articles en plastique sont cassés), n'utilisez pas ce composant ; contactez le centre d'assistance d'Agilent pour obtenir de l'aide.

Étapes de configuration des échantillons et des réactifs

- 1 Préparez la **Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate** pour le cycle en suivant les étapes ci-dessous :
 - a Transférez une Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate du stockage à +4 °C à température ambiante, en conservant la plaque dans son étui en carton blanc. Laissez la plaque dans l'étui s'équilibrer à température ambiante pendant au moins 30 minutes avant de l'utiliser dans le cycle.
 - b Agitez au vortex la plaque dans l'étui positionnée verticalement comme indiqué dans la section des instructions de manipulation ci-dessus.
 - c Centrifugez la plaque dans l'étui dans une centrifugeuse réglée sur 250 × g pendant 3 secondes pour recueillir le liquide sans réduire les billes en fragments (lancez le chronomètre lorsque la centrifugeuse atteint sa vitesse maximale). Ne dépassez pas la vitesse et la durée de centrifugation recommandées pour éviter que les billes ne soient réduites en fragments.
 - d Conservez la plaque dans son étui à température ambiante pour un cycle le jour même.
- 2 Préparez la **Magnis SureSelect XT HS Reagent Plate Rev B ILM** ou la **Magnis SureSelect XT HS Reagent Plate ILM** en suivant les étapes ci-dessous :
 - a Transférez une Reagent Plate du stockage à -20 °C à température ambiante, en conservant la plaque dans son étui en carton blanc. Laissez les réactifs dégeler à température ambiante pendant 15 à 30 minutes. Faites partiellement glisser la plaque hors de l'étui et vérifiez que les réactifs sont complètement décongelés.
 - b Une fois le contenu des puits décongelé, agitez au vortex la plaque dans l'étui positionnée verticalement comme indiqué dans la section des instructions de manipulation ci-dessus.
 - c Centrifugez la plaque dans l'étui dans une centrifugeuse réglée sur 250 × g pendant 1 minute (lancez le chronomètre lorsque la centrifugeuse atteint sa vitesse maximale). Vérifiez l'absence de bulles au fond des puits de la plaque et, si des bulles sont présentes, répétez l'étape de centrifugation jusqu'à ce que toutes les bulles soient éliminées.
 - d Conservez la plaque dans son étui sur de la glace pour un cycle le jour même.
- 3 Préparez la **Magnis Sample Input Strip** pour accueillir les échantillons d'ADN en suivant les étapes ci-dessous.
 - a Vérifiez que l'instrument Covaris E220 est prêt à être utilisé dans l'étape de fragmentation de l'ADN, avec le bain-marie refroidi à 5 °C et dégazé comme indiqué à la [page 47](#) ou à la [page 51](#).
 - b Transférez le kit Magnis Sample Input Strips du stockage à température ambiante. Retirez une Sample Input Strip rouge vide (avec un « S » inscrit à l'extrémité de la bande) du support de plaque, en laissant l'opercule en aluminium en place. Mettez de côté une nouvelle bande à opercule d'aluminium et fixez l'endos pour la refermer à l'[étape d](#).
 - c En suivant les instructions appropriées à votre type d'échantillon d'ADN, préparez la Magnis Sample Input Strip pour le cycle. Pour les échantillons d'ADN de haute qualité, suivez les instructions de la [page 46](#) à la [page 48](#). Pour les échantillons d'ADN FFPE, suivez les instructions de la [page 49](#) à la [page 53](#).

Les Sample Input Strips finales doivent contenir 50 µl d'ADN fragmenté (10 ng, 50 ng, 100 ng ou 200 ng) dans chaque puits d'échantillon, tous les puits de la bande contenant la même quantité d'ADN.

- d Une fois tous les échantillons placés dans les puits de la Magnis Sample Input Strip, refermez le tube en bande avec le nouvel opercule en aluminium de l'**étape b**, en prenant soin de ne pas masquer le code-barres du tube en bande avec l'opercule. Vérifiez que l'opercule est uniformément appliqué, sans qu'il ne déborde ou ne soit excessivement plié, ce qui pourrait obstruer l'emplacement du tube en bande lors du chargement dans l'instrument.
 - e Vérifiez visuellement l'absence de bulles dans les puits d'échantillon scellés. Éliminez les éventuelles bulles en centrifugeant la bande d'échantillons préparée dans une centrifugeuse réglée sur $250 \times g$ pendant 5 secondes ou jusqu'à ce que toutes les bulles soient éliminées de la solution d'ADN.
 - f Conservez le tube d'échantillon en bande sur de la glace jusqu'à ce que vous l'utilisiez à la [page 34](#).
- 4** Préparez le **tube Index Strip** en suivant les étapes ci-dessous :
- a Déterminez l'ensemble d'index approprié à utiliser pour le cycle. Les tubes Index Strip fournis sont marqués avec A1, A2, A3 ou A4 sur l'extrémité du tube en bande opposée au code-barres, pour indiquer l'ensemble spécifique d'index contenus dans les puits (reportez-vous à la [page 80](#) pour des informations complètes sur les index). Si des échantillons provenant de différents cycles de préparation de banques NGS Magnis doivent être multiplexés pour NGS, chaque cycle doit utiliser un ensemble différent d'index pour s'assurer que tous les échantillons multiplexés sont marqués avec une séquence d'index unique.
 - b Retirez la Magnis SureSelect XT HS Index Plate du stockage à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Retirez l'Index Strip noire appropriée (étiquetée A1, A2, A3 ou A4) du support de plaque, en laissant l'opercule en aluminium en place. Placez la bande retirée sur de la glace pour la décongélation et remettez la plaque avec les Index Strips restantes dans le stockage à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - c Une fois le contenu des puits de l'Index Strip décongelé, agitez au vortex la bande à haute vitesse pendant 5 secondes.
 - d Centrifugez l'Index Strip dans une centrifugeuse réglée sur $250 \times g$ pendant 5 secondes. Contrôlez les puits en bande afin de vérifier que le liquide est recueilli dans le fond des puits et qu'il n'y a pas de bulles. Éliminez toutes les bulles en répétant l'étape de centrifugation jusqu'à ce que toutes les bulles soient éliminées.
 - e Conservez le tube Index Strip sur de la glace jusqu'à ce que vous l'utilisiez à la [page 34](#).
- 5** Préparez le **tube Probe strip** en suivant les étapes ci-dessous pour les kits fournis avec l'un des formats de Probe Plates préremplies répertoriés ci-dessous :
- *Magnis SureSelect Probe Plate, au format pré-rempli à un seul puits ou Magnis SureSelect XT HS Probe Plate, au format pré-rempli à un seul puits* avec le volume total de solution de sonde pour un cycle de 8 échantillons dans le puits A (les puits B à H sont vides)
 - Magnis SureSelect XT HS Probe Plate, avec le volume de solution de sonde nécessaire pour un cycle de 8 échantillons répartis entre les 8 puits

Si votre kit ne comprend pas de Probe strips préremplies (kit Réf. G9730D ou G9730B) et qu'il comprend à la place des Probe strips vides pour la préparation des sondes pendant l'exécution, ignorez les instructions ci-dessous et préparez la Probe strip en suivant les instructions à la [page 55](#).

- a** Retirez la Probe Plate du stockage à -80 °C. Retirez une Probe strip blanche (étiquetée « P » à son extrémité) du support de plaque, en laissant l'opercule en aluminium en place. Placez la bande retirée sur de la glace pour la décongélation et remettez la plaque avec les Probe strips restantes dans le stockage à -80 °C.

MISE EN GARDE

Les Probe strips ne comportent pas d'étiquettes lisibles par l'homme indiquant l'identité spécifique du type de la sonde. Veillez à suivre et maintenir l'identité de la Probe strip une fois qu'elle est retirée de la boîte. N'ouvrez pas plusieurs boîtes et ne retirez pas en même temps les tubes Probe strip pour différents types de sonde.

- b** Une fois le contenu des puits Probe strip décongelé, agitez au vortex la bande à haute vitesse pendant 5 secondes.
- c** Centrifugez la Probe strip dans une centrifugeuse réglée sur $250 \times g$ pendant 5 secondes. Inspectez visuellement les puits en bande afin de vérifier que le liquide est recueilli dans le fond du ou des puits et qu'il n'y a pas de bulles. Éliminez toutes les bulles en répétant l'étape de centrifugation jusqu'à ce que toutes les bulles soient éliminées.

REMARQUE

Le volume total de solution de sonde pour le cycle est présent dans un seul puits pour les Probe strips fournies avec les Rev B Reagent Kits, tandis qu'il est réparti dans les 8 puits pour les Probe strips fournies avec les Reagent Kits dans le format d'origine.

- d** Conservez la Probe strip sur de la glace jusqu'à ce que vous l'utilisiez à la [page 34](#).
- 6** Transférez une boîte de Magnis Empty Consumables du stockage à température ambiante (TA) pour l'utiliser pendant la configuration de la platine.

Passez à l'étape « [Exécution du protocole de préparation des banques](#) » à la page 26.

Exécution du protocole de préparation des banques

Lorsque l'instrument Magnis et tous les réactifs ont été préparés pour le cycle SureSelect XT HS, suivez les invites sur l'écran tactile de l'instrument pour charger le matériel de laboratoire sur l'instrument et exécuter le protocole de préparation des banques. Les étapes sont résumées dans la [Figure 5](#).

L'écran tactile de l'instrument Magnis fournit des invites pour saisir les informations sur le cycle, charger la platine, vérifier que tout le matériel de laboratoire est présent et possède les propriétés requises, saisir les informations sur les échantillons et confirmer la configuration du protocole. Au cours de ces étapes de configuration, les voyants DEL sur la platine de l'instrument deviennent blancs. Des informations supplémentaires sur chacune de ces étapes guidées sont fournies aux nouveaux utilisateurs de la [page 27](#) à la [page 39](#).

Pendant l'exécution du protocole, le système effectue la préparation des banques et l'enrichissement des cibles sur vos échantillons d'ADN fragmenté pour générer des banques d'ADN enrichi en cibles qui sont prêtes pour le séquençage. Pendant le cycle, le voyant DEL devient vert.

Une fois le cycle terminé, comme l'indique la lumière bleue du voyant DEL, l'écran tactile du système vous invite à retirer les échantillons des banques de séquençage finales et les échantillons CQ (s'ils sont inclus) de l'instrument. Les directives relatives au traitement des banques finales enrichies en cibles pour le séquençage de l'ADN figurent à l'« [Annexe 3 : Directives relatives au traitement des échantillons d'ADN après cycle pour le NGS](#) » à la page 58.

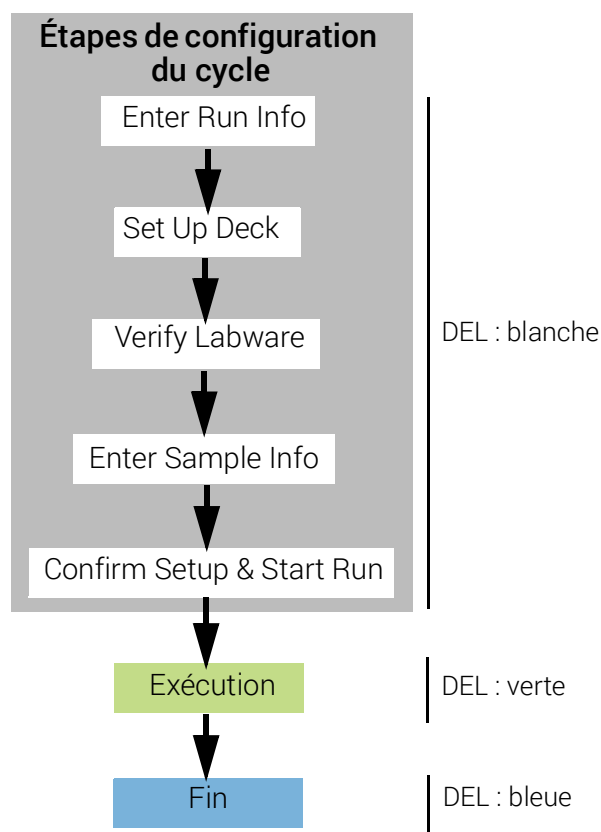
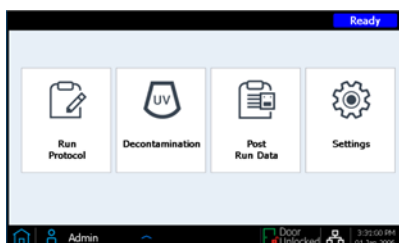


Figure 5 Vue d'ensemble des étapes de configuration et d'exécution du cycle Magnis NGS Prep System. La couleur de la lumière émise par les voyants DEL de l'instrument pendant ces étapes est indiquée à droite.

Étape 1. Lancement du protocole et saisie des informations sur le cycle

- 1 Sur l'écran Home de l'écran tactile, appuyez sur **Run Protocol**.

Le système verrouille la porte de l'instrument et effectue un Instrument Health Check (IHC), qui peut prendre plusieurs minutes. Si l'affichage signale un problème IHC, reportez-vous à la section « [Guide de dépannage](#) » à la page 84 pour les directives relatives aux mesures correctives.



- 2 Suivez les invites sur l'écran *Enter Run Info* comme indiqué ci-dessous. Sur le premier écran, spécifiez le nom du protocole et les réglages de recueil CQ pour le cycle.
 - a Ouvrez le menu **Protocol** et sélectionnez le protocole approprié au format de votre kit de réactifs, tel que décrit dans le [Tableau 7](#). Les protocoles visibles sur votre écran tactile et disponibles sur votre instrument peuvent différer des protocoles répertoriés dans le [Tableau 7](#) (reportez-vous à la section « [Guide de dépannage](#) » à la page 84 pour plus d'informations).

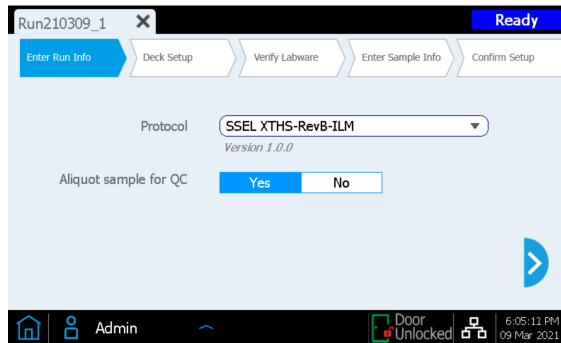
Tableau 7 Informations sur l'utilisation des protocoles

Nom du protocole	Kit(s) de réactifs compatibles	Informations d'utilisation
SSEL XTHS-RevB-ILM	Kits de réactifs Magnis SureSelect XT HS Rev B fournis avec les Probe input strips préremplies (format prérempli à un seul puits)	Ce protocole fournit des conditions d'hybridation optimales pour les sondes SureSelect Human All Exon V7 et V8 et pour la plupart des sondes personnalisées SureSelect XT HS conçues avec les kits de réactifs SureSelect XT HS Rev B.
LT-SSEL XTHS-RevB-ILM	Kits de réactifs Magnis SureSelect XT HS Rev B fournis avec les Probe input strips préremplies (format prérempli à un seul puits)	Ce protocole fournit des conditions d'hybridation équivalentes au protocole <i>SureSelectXT HS-Illumina</i> . L'utilisation est recommandée pour le traitement des échantillons avec les kits de réactifs Magnis SureSelect XT HS Rev B tout en maintenant les performances des flux de travail établis à l'aide du protocole <i>SureSelectXT HS-Illumina</i> ou lors de l'utilisation de sondes personnalisées conçues à l'origine pour être utilisées avec le système SureSelect XT.
SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM	Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit fourni avec des Probe Input Strips vides (Réf. G9730D)	À utiliser pour traiter les Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits fournis avec des Probe Input Strips vides (EPIS) en utilisant des conditions d'hybridation équivalentes au protocole SSEL XTHS-RevB-ILM . La Probe input strip doit être remplie avant le cycle, tel qu'indiqué à la page 55 .
LT-SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM	Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit fourni avec des Probe Input Strips vides (Réf. G9730D)	À utiliser pour traiter les Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits fournis avec Probe Input Strips vides (EPIS) en utilisant des conditions d'hybridation équivalentes au protocole LT-SSEL XTHS-RevB-ILM . La Probe Input Strip doit être remplie avant le cycle, tel qu'indiqué à la page 55 .
SureSelectXT HS-Illumina	Kits de réactifs Magnis SureSelect XT HS au format d'origine fournis avec les Probe input strips vides ou préremplies	Les kits de réactifs Magnis fournis au format original doivent être traités selon ce protocole. Le cas échéant, la Probe Input Strip vide doit être remplie avant le cycle, tel qu'indiqué à la page 55 .

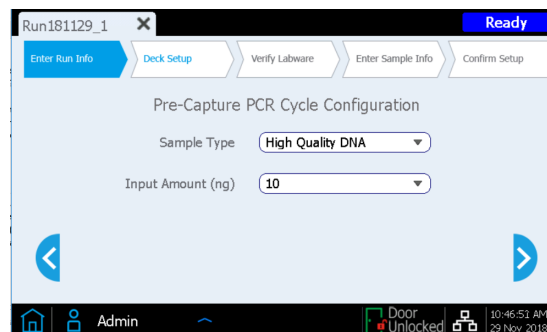
- b Si vous voulez que l'instrument prélève un aliquot (3 µl) de chaque échantillon de la Pre-capture library pour une analyse QC post-cycle facultative, appuyez sur **Yes** à côté de **Aliquot sample for QC**. (Les échantillons QC pre-capture ne sont disponibles que pour analyse lorsque le cycle complet est terminé.) Si vous cochez cette case, assurez-vous de charger la QC Strip bleue pendant le Deck Setup à la [page 34](#).

Ou bien, décochez la case pour ignorer l'étape facultative de recueil d'aliquots CQ.

- c Appuyez sur la flèche vers l'avant pour passer à l'écran suivant.



- 3 Sur le deuxième écran, sélectionnez le **Sample Type** approprié (*High Quality DNA* ou *FFPE DNA*) et la **Input Amount** d'ADN (*10 ng*, *50 ng*, *100 ng* ou *200 ng*) pour les échantillons traités pendant le cycle. Ces réglages sont utilisés pour déterminer les conditions de cyclage de réaction de polymérisation en chaîne correctes pour le cycle. Le nombre de cycles de réaction de polymérisation en chaîne et les autres conditions à utiliser pendant le cycle sont indiqués pendant les étapes de *Confirm Setup* (reportez-vous à la [page 39](#)).



Étape 2. Configuration de la platine

L'interface de l'écran tactile Magnis vous guide à travers les étapes de configuration de la platine. Des informations supplémentaires sont fournies aux nouveaux utilisateurs de la [page 30](#) à la [page 35](#). L'image ci-dessous montre une platine entièrement configurée pour le sens vers les positions de la platine Magnis et le matériel de laboratoire du cycle.

Lorsque vous exécutez les étapes de configuration de la platine spécifiées sur l'écran tactile, faites tout particulièrement attention aux détails essentiels ci-dessous afin d'avoir un cycle sans erreur :

- Assurez-vous que les boîtes d'embouts sont totalement pleines et qu'elles sont à plat sur les plateformes. Vérifiez que chaque boîte d'embouts est placée à l'intérieur du cadre surélevé par des pattes de sa position de plateforme et que les boîtes ne se déplacent pas pendant le retrait du couvercle.
- Assurez-vous que tout le matériel de laboratoire est positionné avec le code-barres face à vous (avant de l'instrument).

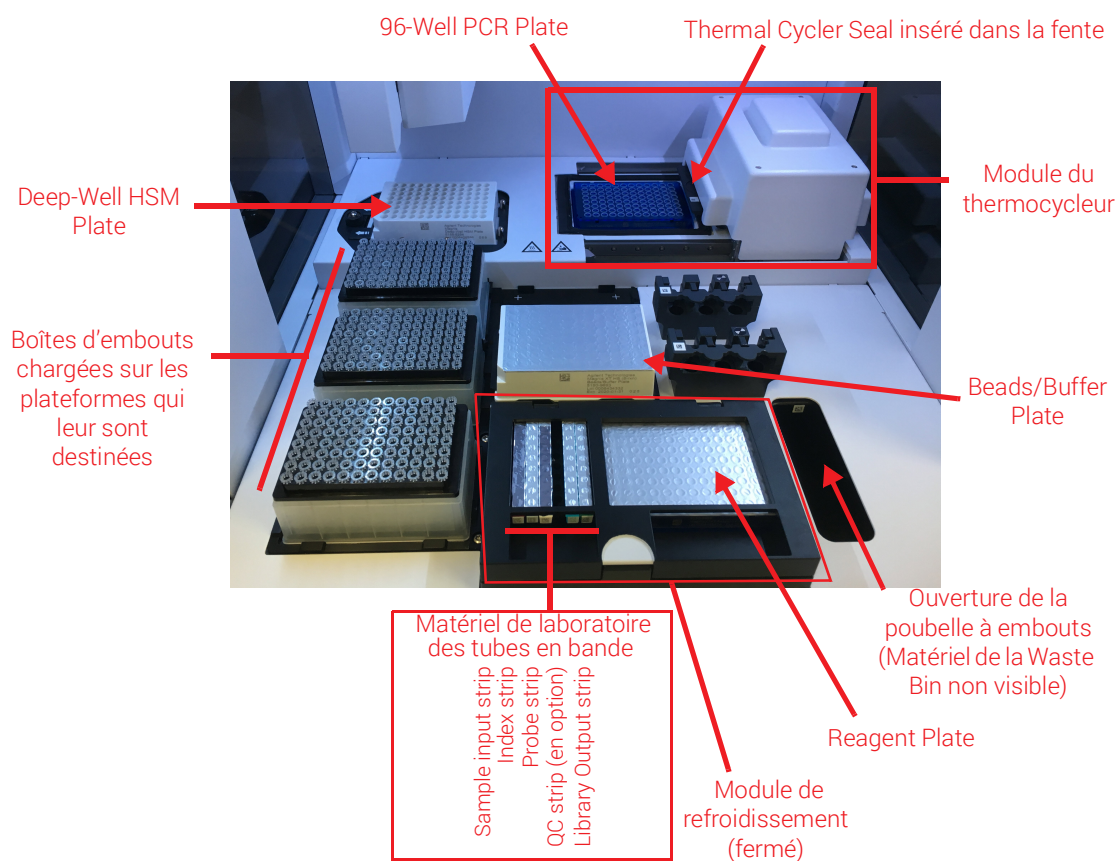
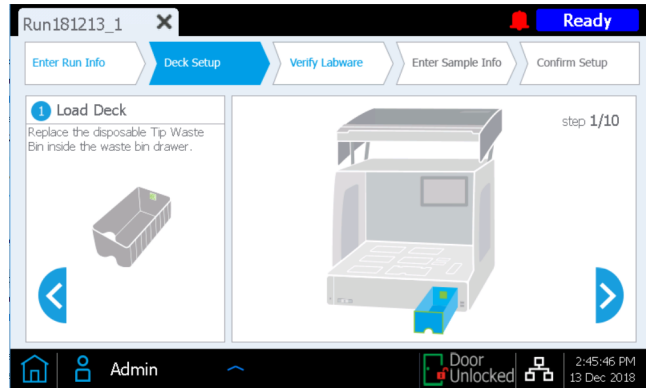


Figure 6 Platine de l'instrument chargée pour le cycle

Les étapes *Deck Setup* (Configuration de la platine) demandées par l'interface de l'écran tactile Magnis sont détaillées ci-dessous. Pour chaque étape de chargement de la platine, la position de la platine à charger est nuancée en bleu sur l'écran tactile. Une fois chaque étape terminée, appuyez sur la flèche vers l'avant pour passer à l'écran suivant.

- 1 Retirez la Magnis Tip Waste Bin jetable de l'emballage des Magnis Empty Consumables. Placez la poubelle jetable dans le tiroir de la Waste Bin, avec le code-barres face à vous, comme indiqué sur l'écran tactile. Fermez le tiroir de la poubelle.



- 2 Retirez la Magnis Deep-Well HSM Plate de l'emballage des Magnis Empty Consumables. Installez la plaque dans la position de la platine indiquée sur l'écran tactile, avec le code-barres face à vous. Pour charger la plaque, insérez d'abord le bord gauche de la plaque dans la fente à ressort, puis abaissez le bord droit de la plaque jusqu'à ce qu'elle soit à plat sur la plateforme. Une fois à plat, déplacez légèrement la plaque vers la droite (à l'aide du mécanisme à ressort) et assurez-vous qu'elle est bien en place et fixée à l'intérieur du support sur la plateforme.



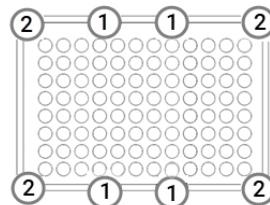
- Retirez le Magnis Thermal Cycler Seal de l'emballage des Magnis Empty Consumables. Enlevez la pellicule protectrice du tampon en mousse sous la plaque de métal, en commençant par la languette jaune. Une fois toute la pellicule retirée, insérez le Thermal Cycler Seal dans la fente à la position indiquée sur l'écran tactile, le code-barres vers le haut. Continuez de faire avancer le Thermal Cycler Seal dans la fente jusqu'à ce qu'il s'enclenche.



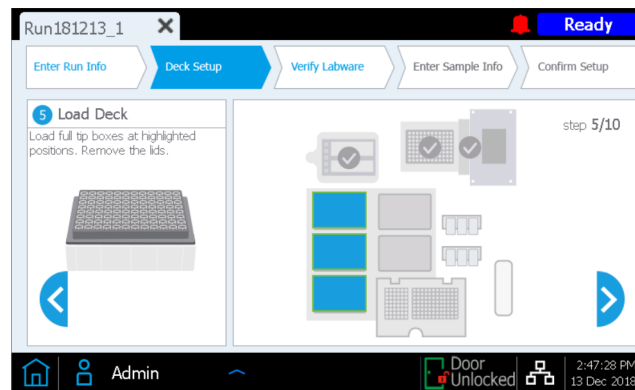
- Retirez la Magnis 96-Well PCR Plate de l'emballage des Magnis Empty Consumables. Chargez la plaque dans la position de la platine indiquée sur l'écran tactile en insérant les puits de la plaque dans les puits du bloc du thermocycleur, avec le code-barres de la plaque face à vous.



Pour s'assurer que la plaque est bien en place dans le bloc, placez d'abord le centre de la plaque dans les puits du bloc en appuyant uniformément aux positions marquées **1** sur la figure ci-dessous. Appuyez ensuite uniformément sur les quatre coins de la plaque (positions marquées **2** sur la figure ci-dessous).



- 5 Chargez une nouvelle boîte d'embouts complète à chacune des positions de la platine indiquées sur l'écran tactile. **Retirez les couvercles** des boîtes. Après avoir retiré les couvercles, vérifiez que chaque boîte d'embouts reste à plat et dans le cadre surélevé par des pattes de sa position de plateforme.

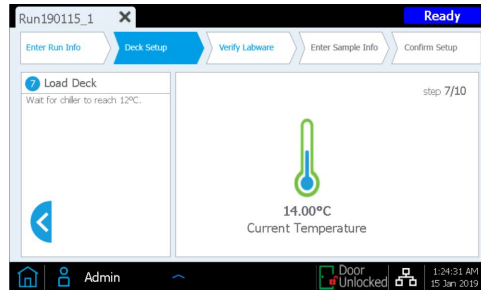


- 6 Prenez la Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate qui a été préparée à la [page 23](#). Retirez l'étui en carton blanc, puis chargez la plaque dans la position de la platine indiquée sur l'écran tactile, le code-barres face à vous. Pour charger la plaque, insérez d'abord le bord gauche de la plaque dans la fente à ressort, puis abaissez le bord droit de la plaque jusqu'à ce qu'elle soit à plat sur la plateforme. Une fois à plat, déplacez légèrement la plaque vers la droite (à l'aide du mécanisme à ressort) et assurez-vous qu'elle est bien en place et fixée à l'intérieur du support sur la plateforme.



- 7 Le module de refroidissement de l'instrument doit atteindre la température correcte (généralement 12 °C) avant de pouvoir être chargé pour le cycle à l'étape 8 ci-dessous. Jusqu'à ce que le refroidisseur atteigne la température de chargement, l'écran tactile apparaît comme illustré ci-dessous, vous permettant de vérifier le statut du refroidisseur.

Cet écran peut ne pas s'afficher pendant votre cycle, si le refroidisseur a déjà atteint la température requise.



- 8 Chargez le module de refroidissement comme décrit ci-dessous.
- Ouvrez la porte du refroidisseur en appuyant sur le bouton en demi-cercle indiqué par une flèche verte sur l'écran tactile.
 - Prenez la Reagent Plate qui a été préparée à la [page 23](#). Retirez l'étui en carton blanc et vérifiez le fond des puits à la recherche de bulles. Si des bulles sont présentes, éliminez-les en centrifugeant la plaque comme indiqué à la [page 23](#). Chargez la plaque dans le module refroidisseur dans la position de la platine indiquée sur l'écran tactile, avec le code-barres face à vous. Appuyez fermement et uniformément sur toute la surface de la plaque. Assurez-vous que la Reagent Plate est bien en place dans le support de la plaque refroidie.



- 9 Chargez les tubes en bande pour le cycle dans les positions indiquées du refroidisseur comme illustré ci-dessous et dans l'ordre indiqué. Avant de charger chaque bande, vérifiez s'il y a des bulles au fond des puits. Si des bulles sont présentes, éliminez-les en centrifugeant la bande comme indiqué à la [page 24](#). Assurez-vous que chaque bande est correctement placée en appuyant fermement et uniformément sur les bords des tubes en bande pendant le chargement. Évitez de toucher ou d'endommager les opercules. **Veillez à orienter chaque tube en bande avec le code-barres face à vous.**

- a Chargez le **tube d'échantillon en bande rouge contenant les échantillons d'ADN d'entrée** (préparés à la [page 23](#) et conservés sur de la glace) dans la position du support de tubes en bande marquée **S**.
- b Chargez le **tube en bande noir contenant les amorces indexées** (préparées à la [page 24](#) et conservées sur de la glace) dans la position du support de tubes en bande marquée **IDX**.
- c Chargez le **tube en bande blanc contenant la solution de la sonde** (préparée à la [page 24](#) et conservée sur de la glace) dans la position du support de tubes en bande marquée **P**.
- d Sortez la boîte Magnis Library Output Strip, QC Strip, and Foil Seals de l'emballage des Magnis Empty Consumables. Chargez la **Library output strip verte vide** (avec « L » inscrit à l'extrémité de la bande) dans la position du support de tubes en bande marquée **L**. Ne touchez pas à l'opercule en aluminium.

Si le cycle comprend le recueil d'aliqouts des échantillons de la banque pré-capture pour le CQ (reportez-vous à la [page 27](#)), chargez la **QC Strip bleue vide** (avec « Q » inscrit à l'extrémité de la bande) dans la position du support des tubes en bande marquée **Q**. Ne touchez pas à l'opercule en aluminium.

Conservez les opercules neufs fournis dans l'emballage à portée de main pour pouvoir les utiliser à la fin du cycle.

- e Une fois que les tubes en bande chargés aux positions **S, IDX, P, L** et **Q** (le cas échéant), fermez la porte du refroidisseur. (Assurez-vous que la porte est complètement fermée. Vous devez entendre un clic).



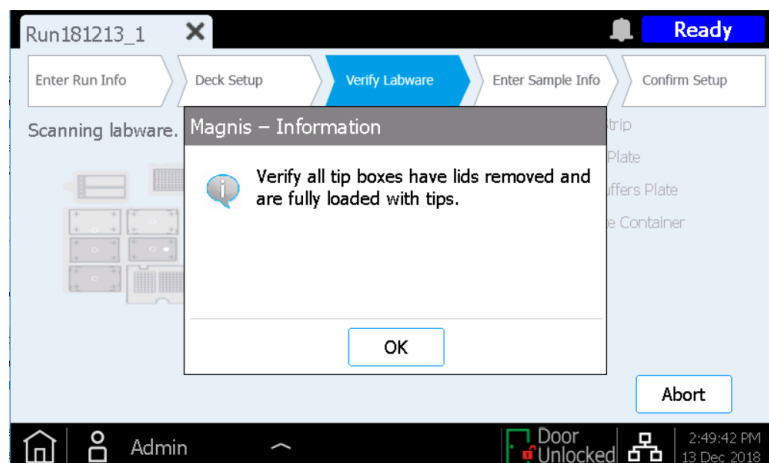
10 Fermez la porte de l'instrument.



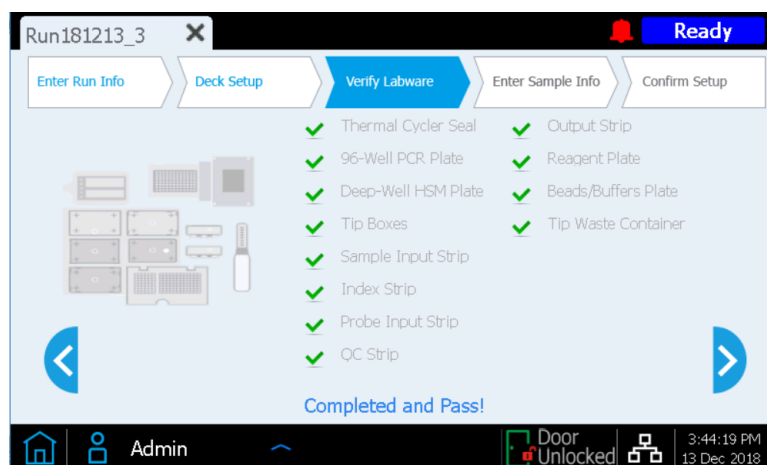
Étape 3. « Vérification du matériel de laboratoire »

Une fois toutes les étapes *Deck Setup* terminées, l'instrument exécute la phase *Verify Labware* du cycle, au cours de laquelle l'instrument scanne le code-barres de chaque composant du matériel de laboratoire présent sur la platine.

Avant de commencer la vérification automatisée du matériel de laboratoire, vous devez vérifier que les couvercles ont été retirés de toutes les boîtes d'embouts et que ces dernières sont pleines, comme indiqué dans l'invite ci-dessous. Une fois le statut des boîtes d'embouts vérifié, appuyez sur **OK** pour lancer le processus de vérification automatisée du matériel de laboratoire de l'instrument.



Lors de la lecture des codes-barres, l'instrument vérifie que tous les composants requis pour le type du cycle sont présents, dans la bonne position et le bon sens, et qu'ils ne sont pas périmés. Les résultats de la vérification sont affichés sur l'écran tactile Magnis. Appuyez sur la flèche vers l'avant pour continuer.



Si l'écran *Verify Labware* signale un problème avec un ou plusieurs composants du cycle, reportez-vous aux directives relatives aux mesures correctives à la section « [Guide de dépannage](#) » à la page 84.

L'écran final *Verify Labware* vous permet d'examiner les détails de la Probe Input Strip.

Pour les cycles comprenant des sondes prédistribuées, l'identité de la solution de la sonde est automatiquement transmise au logiciel Magnis par le code-barres de la bande, et les propriétés de la sonde s'affichent pour que vous puissiez les consulter comme indiqué ci-dessous. Appuyez sur la flèche vers l'avant pour continuer.

Run181213_2 X Ready

Enter Run Info Deck Setup Verify Labware Enter Sample Info Confirm Setup

Probe Input Strip information:

Part Number 5190-9886

Lot Number 0123456789

Design ID 1234567

Post-Capture PCR Cycles 10

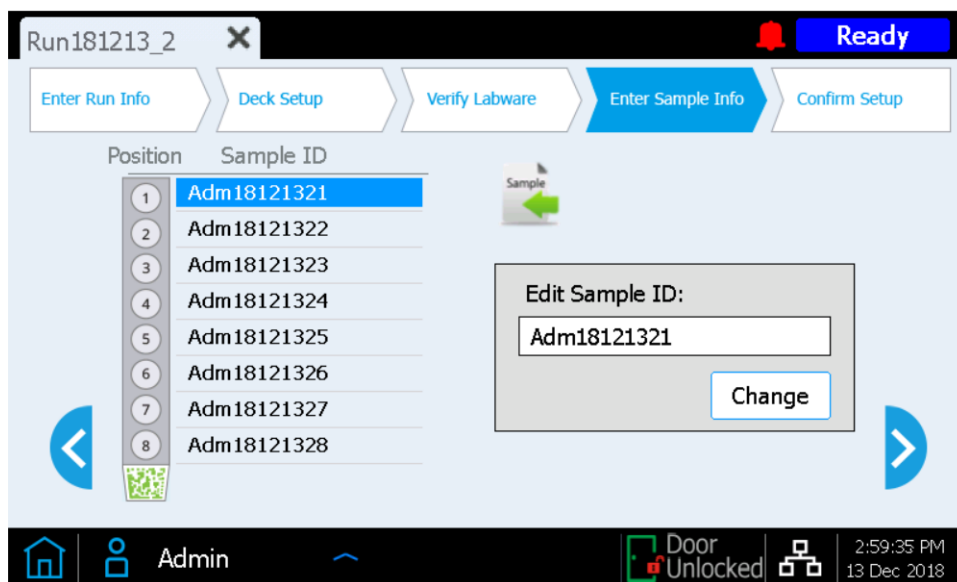
Capture Size Small Large

Admin Door Unlocked 2:58:46 PM 13 Dec 2018

Pour les cycles qui comprennent des Probe strips remplies pendant l'exécution (cycles utilisant le kit Réf. G9730D ou G9730B, qui comprend des Probe Input Strips vides), vous devez saisir manuellement les propriétés relatives aux sondes sur cet écran. Reportez-vous aux instructions à la [page 57](#). Une fois tous les champs remplis, appuyez sur la flèche vers l'avant pour continuer.

Étape 4. « Saisie des informations sur les échantillons »

Utilisez cet écran pour attribuer chaque position de puits à un échantillon spécifique dans le logiciel Magnis. Le logiciel Magnis attribue automatiquement un Sample ID par défaut à chaque position d'échantillon. Les Sample ID par défaut peuvent être remplacés par un nom d'échantillon/Sample ID choisi en utilisant l'une des deux méthodes ci-dessous.



Méthode 1 : importation d'exemples d'affectation avec un fichier .csv

- 1 Créez un fichier .csv (valeurs séparées par des virgules) contenant les Sample ID souhaités pour le cycle dans le bon ordre et téléchargez le fichier .csv sur un disque USB non crypté, comme indiqué à la [page 17](#).
- 2 Sur l'écran *Enter Sample Info* ci-dessus, appuyez sur le bouton de téléchargement d'échantillon, puis suivez les invites de l'assistant de configuration de protocole pour transférer les Sample ID à partir du disque USB.



Méthode 2 : affectation manuelle des échantillons pendant l'exécution

- 1 Sélectionnez une position d'échantillon spécifique sur l'écran tactile.
- 2 Utilisez l'outil **Edit Sample ID** à droite pour saisir le texte Sample ID souhaité. Appuyez sur **Change** pour enregistrer le texte Sample ID saisi pour la position de l'échantillon.

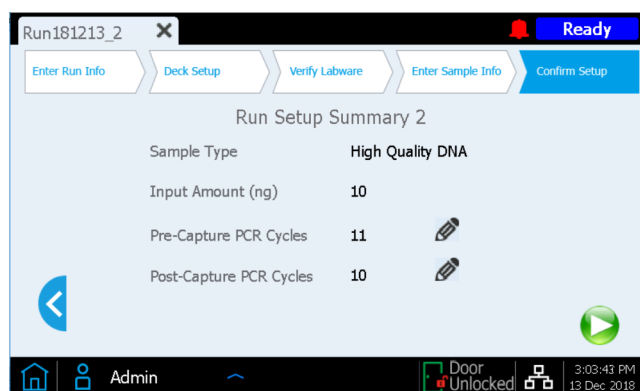
Étape 5. Confirmation de la configuration et lancement du cycle


Utilisez cet ensemble d'écrans pour confirmer les détails de configuration du cycle avant de lancer un cycle.


- 1 Sur le premier écran, vérifiez les caractéristiques générales du cycle. Après avoir confirmé que les saisies étaient correctes, appuyez sur la flèche vers l'avant pour passer au dernier écran de configuration.



- 2 Le deuxième écran affiche les détails du cycle liés aux caractéristiques de l'échantillon d'ADN et de la sonde utilisés pour le cycle. Le nombre de cycles de réaction de polymérisation en chaîne pre-capture et post-capture qui seront utilisés lors du cycle (en fonction des conditions optimales habituelles de l'ADN d'entrée et de la sonde utilisés lors du cycle) sont affichés.



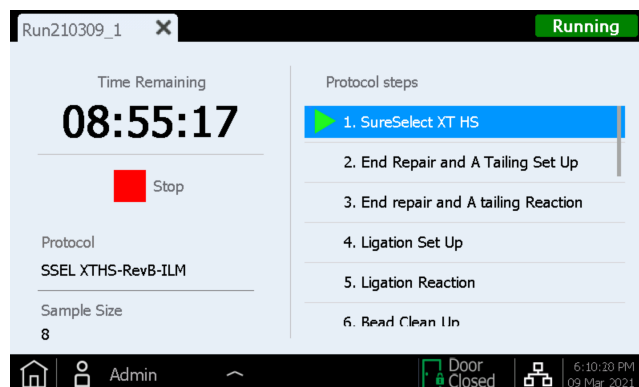
Lorsqu'un utilisateur ayant un niveau d'accès *Advanced* est connecté, l'une ou l'autre valeur du numéro de cycle peut être modifiée en appuyant sur le bouton Crayon . Les utilisateurs ayant un niveau d'accès *Standard* ne peuvent pas modifier ces paramètres du cycle et le bouton Crayon n'est pas visible sur l'écran illustré ci-dessus.

- 3 Après avoir confirmé les détails de configuration du cycle, appuyez sur le bouton Start pour lancer le cycle .

Une fois le cycle commencé, les voyants DEL sont verts et l'écran tactile affiche le statut du cycle, y compris une estimation du temps restant avant la fin du cycle.

Les cycles durent généralement de 8,5 à 9 heures et peuvent être effectués pendant la nuit pour des raisons pratiques. Une fois le protocole terminé, les banques préparées sont automatiquement maintenues à 12 °C. Récupérez les banques dans l'instrument dans les 72 heures.

Si nécessaire, appuyez sur le bouton carré rouge **Stop** pour annuler le cycle. Un message d'avertissement s'affiche pour vous demander de confirmer que vous souhaitez interrompre le cycle. Lorsqu'un cycle est arrêté, il ne peut pas être repris et le matériel de laboratoire utilisé au cours de ce cycle ne peut pas être rechargé pour un cycle ultérieur.

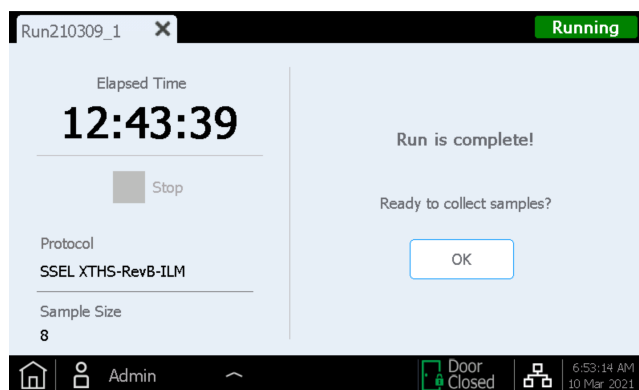


REMARQUE

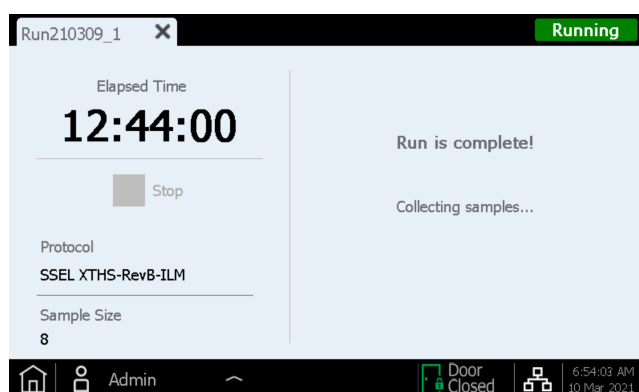
L'écran *Running* doit rester ouvert pendant toute la durée du cycle, et le bouton de fermeture d'écran (✕) et les autres boutons de navigation sont inactifs pendant l'exécution du cycle. Vous ne pouvez pas utiliser l'écran tactile pour exécuter d'autres fonctions au cours d'un cycle.

Étape 6. Recueil des échantillons des banques finales dans l'instrument

Une fois le cycle terminé, l'écran tactile affiche l'invite ci-dessous. Appuyez sur **OK** lorsque vous êtes prêt à prélever les échantillons de l'instrument.

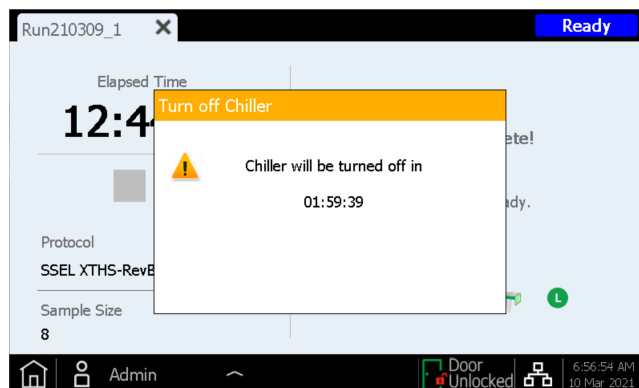


Lors de cette phase, l'instrument transfère les solutions de banque préparées de la plaque de réaction de polymérisation en chaîne dans le thermocycleur vers la Library Output Strip verte dans le refroidisseur.



Attendez que les voyants DEL deviennent bleus, indiquant que toutes les étapes de traitement des échantillons par l'instrument sont terminées, avant d'ouvrir la porte de l'instrument.

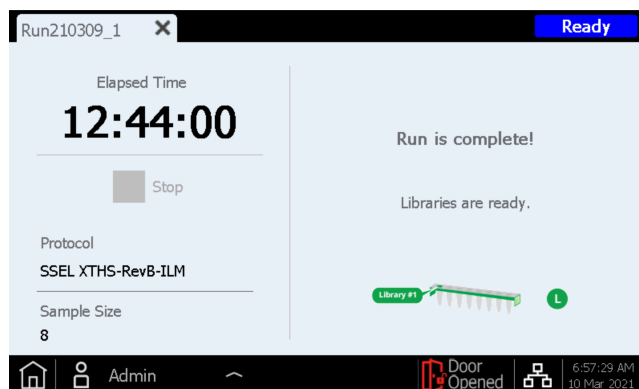
Une fois les échantillons placés dans la Library Output Strip verte dans le refroidisseur, l'écran tactile apparaît comme suit. Le refroidisseur, contenant les échantillons de la banque, est maintenu à 12 °C pendant 2 heures maximum, la durée de conservation au froid restante étant indiquée sur la boîte de dialogue de l'écran tactile comme illustré ci-dessous. Le refroidisseur est mis hors tension lorsque la porte de l'instrument est ouverte.



Ouvrez complètement la porte de l'instrument (jusqu'à ce que les voyants DEL deviennent blancs) et recueillez les échantillons des banques finales dans la Library Output Strip verte à la position L du module de refroidissement. Refermez les puits à l'aide d'un nouvel opercule en aluminium (fourni dans l'emballage des tubes QC Strip et Library Output), puis placez les banques dans des conditions de stockage appropriées, selon le type de votre recherche.

Les directives relatives au traitement des banques finales enrichies en cibles pour le séquençage de l'ADN figurent à l'« [Annexe 3 : Directives relatives au traitement des échantillons d'ADN après cycle pour le NGS](#) » à la page 58.

Une fois la porte ouverte pour recueillir les échantillons de la banque, l'écran tactile apparaît comme illustré ci-dessous.



Fermez l'écran du cycle en appuyant sur le X sur l'onglet pour revenir à l'écran Home.

REMARQUE

La fermeture de l'écran peut prendre plusieurs secondes. N'appuyez pas plusieurs fois sur le bouton X.

Traitement des échantillons CQ facultatifs des banques pré-capture

Si les échantillons CQ facultatifs des banques pré-capture ont été recueillis pour le cycle, retirez la QC Strip bleue du module de refroidissement. Faites sécher l'ADN dans les puits en laissant la QC Strip non scellée à température ambiante jusqu'à ce que les échantillons soient secs. Les échantillons CQ peuvent être conservés séchés jusqu'à l'analyse des banques de séquençage.

REMARQUE

Les échantillons CQ peuvent sembler secs ou partiellement secs à la fin du cycle, car les QC strips restent ouvertes après le recueil des aliquots de 3 µl pendant le cycle. Les échantillons doivent être complètement séchés avant le stockage ou la reconstitution afin d'obtenir des résultats CQ précis.

Si une analyse des échantillons CQ est nécessaire, remettez les échantillons séchés en suspension dans 6 µl d'eau exempte de nucléase pour obtenir une concentration adaptée à l'analyse en utilisant le système Agilent's TapeStation et un dosage D1000 ScreenTape, ou un outil analytique similaire. Après avoir ajouté 6 µl d'eau dans chaque puits, incubez à température ambiante pendant 5 à 10 minutes, puis mélangez en agitant au vortex pour assurer une remise en suspension complète.

Résultats attendus : la taille maximale des fragments d'ADN des banques pré-capture habituelles est comprise entre 300 et 400 pb pour l'ADN d'entrée de haute qualité ou entre 200 et 400 pb pour l'ADN d'entrée dérivé de FFPE.

Les échantillons CQ qui ont été séchés et remis en suspension dans 6 µl devraient avoir une concentration d'environ 30-100 ng/µl selon la qualité de l'ADN d'entrée et le nombre de cycles de réaction de polymérisation en chaîne pré-capture. Le rendement global des banques pré-capture peut être calculé par la quantité d'ADN dans 1 µl de l'échantillon CQ reconstitué x 36 (comprend les ajustements pour la dilution et l'échantillonnage).

Étape 7. Nettoyage de l'instrument après le cycle

Retirez et jetez tous les consommables usagés qui restent sur la platine de l'instrument :

- Retirez la Waste Bin à embouts remplie de son tiroir, puis remettez le tiroir en position fermée.
- Retirez la Deep-Well HSM plate usagée du module HSM.
- Retirez la 96-Well PCR Plate usagée et le Thermal Cyclers Seal du module de réaction de polymérisation en chaîne.
- Retirez toutes les boîtes d'embouts, y compris les boîtes partiellement remplies.
- Retirez les Beads/Buffers Plate à puits profonds usagés du porte-plaque de la platine centrale.
- Ouvrez le module de refroidissement et retirez la Reagent Plate usagée et les tubes en bande rouges, noirs et blancs usagés. Assurez-vous que tous les tubes Library Output (L) strip verts et les tubes QC sample (Q) strip bleus ont été retirés du refroidisseur et conservés pour un traitement ultérieur.

REMARQUE

Il est essentiel de retirer tous les composants du matériel de laboratoire et tout autre matériel inutile de la platine de l'instrument avant de lancer un nouveau cycle. La présence de tout matériel sur la platine lorsqu'un nouveau cycle est lancé peut entraîner la défaillance de l'Instrument Health Check pour le nouveau cycle.

En cas de déversement ou de fuite de produits sur la platine de l'instrument, Agilent recommande d'exécuter la procédure de décontamination par UV Extended Cycle (reportez-vous à la [page 20](#) pour plus d'informations sur la décontamination par UV). Nettoyez le déversement en suivant les instructions fournies dans le Guide d'utilisation de l'instrument.

3

Annexe 1 : Directives relatives à la préparation des échantillons d'ADN

- I. Préparation des échantillons d'ADN de haute qualité pour les cycles Magnis 46
 - Étape 1. Préparation, quantification et qualification des échantillons d'ADN génomique 46
 - Étape 2. Fragmentation de l'ADN 46
- II. Préparation des échantillons d'ADN dérivé de FFPE pour les cycles Magnis 49
 - Étape 1. Préparation de l'ADN génomique à partir d'échantillons FFPE 49
 - Étape 2. Qualification et quantification des échantillons d'ADN FFPE 49
 - Étape 3. Fragmentation des échantillons d'ADN FFPE 51

Avant de configurer le cycle de préparation des banques de séquençage d'ADN Magnis SureSelect^{XT HS}, des échantillons d'ADN doivent être préparés, quantifiés, qualifiés et fragmentés en suivant les directives et protocoles figurant dans cette section.

Les Magnis Sample Input Strips (tubes à bandes rouges fournis en format plaque, Réf. 5190-9882 ou 5191-5676), ainsi que tous les réactifs de préparation et de dilution des échantillons d'ADN d'entrée, ne doivent être stockés et utilisés que dans les zones pré-réaction de polymérisation en chaîne du laboratoire.

Le protocole de préparation des banques est compatible à la fois avec un ADN_g de haute qualité préparé à partir d'échantillons frais ou frais congelés et avec un ADN de qualité inférieure préparé à partir d'échantillons FFPE. Pour des échantillons d'ADN_g de haute qualité, reportez-vous à la [page 46](#). Pour des échantillons d'ADN dérivés de FFPE, reportez-vous à la [page 49](#).

Les cycles Magnis peuvent inclure 10 ng, 50 ng, 100 ng ou 200 ng d'ADN d'entrée. Pour des résultats de séquençage optimaux, utilisez la quantité maximale d'ADN d'entrée disponible dans cette plage.

I. Préparation des échantillons d'ADN de haute qualité pour les cycles Magnis

Les cycles Magnis SureSelect XT HS requièrent 10 ng, 50 ng, 100 ng ou 200 ng d'ADN d'entrée dans un volume de 50 µl de 1X Low TE Buffer. Tous les échantillons d'un même cycle doivent être fournis dans la même quantité.

REMARQUE

Ne diluez pas les échantillons à fragmenter avec de l'eau. Le fait de fragmenter les échantillons dans l'eau réduit la complexité et le rendement global de la préparation des banques.

Étape 1. Préparation, quantification et qualification des échantillons d'ADN génomique

- 1 Préparez un ADNg de haute qualité à partir d'échantillons biologiques frais ou congelés à l'aide d'un système de purification approprié tel que Qiagen's QIAamp DNA Mini Kit, conformément au protocole du fabricant.

REMARQUE

Assurez-vous que les échantillons d'ADN génomique sont de haute qualité avec un rapport de DO 260/280 compris entre 1,8 et 2,0.

- 2 Utilisez le kit Qubit BR dsDNA Assay Kit pour déterminer la concentration de chaque échantillon d'ADNg. Suivez les instructions du fabricant pour l'instrument et le kit de dosage.
- 3 Préparez chaque échantillon d'ADN pour le protocole de préparation des banques en diluant la quantité appropriée (10 ng, 50 ng, 100 ng ou 200 ng) de chaque échantillon d'ADNg avec 1X Low TE Buffer afin d'obtenir un volume final de 50 µl. Agitez au vortex pour mélanger, puis centrifugez brièvement pour recueillir le liquide. Conservez les échantillons sur de la glace.

Étape 2. Fragmentation de l'ADN

Au cours de cette étape, les échantillons d'ADNg de 50 µl sont fragmentés dans des conditions optimisées pour obtenir un ADN de haute qualité. La taille du fragment d'ADN cible est comprise entre 150 et 200 pb.

REMARQUE

Ce protocole a été optimisé à l'aide d'un instrument Covaris modèle E220 et le Covaris microTUBE de 130 µl. Consultez les recommandations du fabricant concernant l'utilisation d'autres instruments ou porte-échantillons Covaris pour obtenir la même taille de fragment d'ADN cible.

- 1 Installez l'instrument Covaris E220. Reportez-vous au guide d'utilisation de l'instrument pour plus de détails.
 - a Vérifiez que le réservoir Covaris est rempli d'eau désionisée fraîche jusqu'au niveau de remplissage approprié conformément aux recommandations du fabricant pour le modèle d'instrument spécifique et le tube ou la plaque d'échantillonnage utilisés.
 - b Vérifiez que l'eau recouvre la partie en verre visible du tube.
 - c Sur le tableau de bord de l'instrument, appuyez sur le bouton Degas. Dégazez conformément aux recommandations du fabricant, généralement pendant 30 à 60 minutes.
 - d Réglez la température du refroidisseur entre 2 °C et 5 °C de façon à ce que la lecture de la température dans le bain-marie affiche 5 °C. Consultez les recommandations du fabricant pour savoir comment ajouter des liquides de refroidissement afin d'éviter le gel.
- 2 Exécutez les étapes de fragmentation de l'ADN ci-dessous pour chacun des échantillons d'ADNg.
 - a Transférez l'échantillon d'ADN de 50 µl dans un Covaris microTUBE, à l'aide d'un embout de pipette conique pour transférer lentement l'échantillon à travers la paroi pré-fendue du bouchon.
 - b Centrifugez le microTUBE pendant 30 secondes pour recueillir le liquide et éliminer les bulles du fond du tube.
 - c Fixez le microTUBE dans le porte-tube et fragmentez l'ADN avec les paramètres figurant dans le [Tableau 8](#).

Tableau 8 Paramètres de fragmentation pour l'instrument Covaris de la série E (logiciel SonoLab v7 ou version ultérieure)

Paramètre	Valeur
Facteur de service	10 %
Puissance incidente maximale (PIM)	175
Cycles par salve	200
Température du bain	2 à 8 °C
Durée du traitement	2 × 120 secondes (fragmentation sur deux cycles, en suivant les étapes décrites ci-dessous) <ul style="list-style-type: none"> • Fragmentation pendant 120 secondes • Centrifugation du microTUBE pendant 10 secondes • Agitation au vortex du microTUBE à grande vitesse pendant 5 secondes • Centrifugation du microTUBE pendant 10 secondes • Fragmentation pendant 120 secondes supplémentaires • Centrifugation du microTUBE pendant 10 secondes • Agitation au vortex du microTUBE à grande vitesse pendant 5 secondes • Centrifugation du microTUBE pendant 10 secondes

- d Passez directement à l'étape suivante, ne laissez pas l'ADN fragmenté dans le Covaris microTUBE plus longtemps que nécessaire.

- 3 Remettez le Covaris microTUBE contenant l'ADN fragmenté dans la station de chargement et de déchargement. Tout en laissant le bouchon hermétique sur le microTUBE, insérez un embout de pipette à travers la paroi pré-fendue, puis retirez lentement l'ADN fragmenté.
- 4 Transférez l'échantillon d'ADN fragmenté de 50 µl du Covaris microTUBE dans le puits désigné de la Magnis Sample Input Strip rouge, en perçant l'opercule en aluminium avec l'embout de la pipette juste avant d'injecter le liquide. Conservez les échantillons sur de la glace.

Veillez à charger les échantillons dans les puits d'échantillonnage appropriés, l'échantillon 1 se trouvant dans le puits le plus éloigné du code-barres, comme illustré dans la Figure 7 ci-dessous.

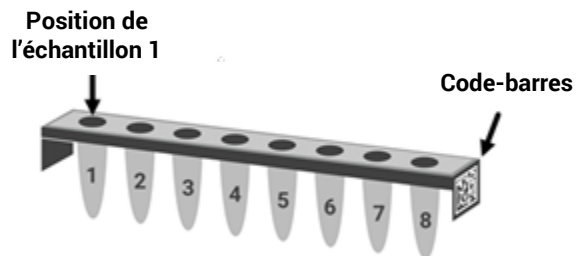


Figure 7 Sens requis des numéros d'échantillon 1 à 8 dans la Magnis Sample Input Strip.

- 5 Après avoir transféré l'échantillon d'ADN, centrifugez brièvement le microTUBE pour recueillir tout volume résiduel de l'échantillon. Transférez tout autre liquide supplémentaire recueilli dans le même puits de la Magnis Sample Input Strip.

REMARQUE

Il est important d'éviter la perte d'ADN d'entrée à cette étape, en particulier pour les échantillons d'ADN peu abondants. Inspectez visuellement le microTUBE afin de vous assurer que l'intégralité de l'échantillon a été transférée. S'il reste des gouttelettes dans le microTUBE, répétez l'[étape 5](#).

- 6 Une fois tous les échantillons chargés, poursuivez la configuration des Sample Input Strips comme indiqué en détail à la [page 24](#) (reportez-vous à la partie d de l'[étape 3](#)).

II. Préparation des échantillons d'ADN dérivé de FFPE pour les cycles Magnis

Les cycles Magnis SureSelect XT HS requièrent 10 ng, 50 ng, 100 ng ou 200 ng d'ADN d'entrée dans un volume de 50 µl de 1X Low TE Buffer. Tous les échantillons d'un même cycle doivent être fournis dans la même quantité.

REMARQUE

Ne diluez pas les échantillons à fragmenter avec de l'eau. Le fait de fragmenter les échantillons dans l'eau réduit la complexité et le rendement global de la préparation des banques.

Étape 1. Préparation de l'ADN génomique à partir d'échantillons FFPE

Préparation et qualification de l'ADNg à partir d'échantillons FFPE

- 1 Préparez l'ADNg à partir de coupes de tissus FFPE à l'aide du kit Qiagen's QIAamp DNA FFPE Tissue Kit et de la solution Qiagen's Deparaffinization Solution, conformément au protocole du fabricant. Élevez les échantillons finaux d'ADNg de la colonne MinElute en deux séries, en utilisant 30 µl de Buffer ATE à chaque série, pour un volume d'élution final d'environ 60 µl.

REMARQUE

Si la lyse tissulaire semble incomplète après une heure de digestion avec Proteinase K, ajoutez 10 µl de Proteinase K supplémentaires, puis poursuivez l'incubation à 56 °C, en mélangeant régulièrement, pendant trois heures au maximum.

Conservez les échantillons d'ADNg sur de la glace pour la préparation des banques le même jour, ou à -20 °C pour un traitement ultérieur.

- 2 Évaluez la qualité (intégrité de l'ADN) de chaque échantillon d'ADN FFPE en utilisant l'une des méthodes ci-dessous.

Étape 2. Qualification et quantification des échantillons d'ADN FFPE

Évaluez la qualité (intégrité de l'ADN) de chaque échantillon d'ADN dérivé de FFPE en utilisant l'une des deux méthodes ci-dessous. L'intégrité de l'ADN mesurée à cette étape détermine les moyens appropriés de quantification des échantillons nécessaires pour inclure 10 ng, 50 ng, 100 ng ou 200 ng d'échantillons d'ADNg amplifiables dans le cycle.

Méthode 1 : Qualification à l'aide du kit Agilent NGS FFPE QC Kit (méthode recommandée)

Le kit Agilent NGS FFPE QC Kit permet de réaliser un dosage basé sur la qPCR pour déterminer l'intégrité des échantillons d'ADN. Les résultats comprennent un score d'intégrité de l'ADN $\Delta\Delta Cq$ et la quantité précise d'ADN amplifiable dans l'échantillon, permettant une normalisation directe de l'entrée d'ADN pour chaque échantillon. Les recommandations en matière d'entrée d'ADN fondées sur les scores $\Delta\Delta Cq$ pour les échantillons individuels sont résumées dans le [Tableau 9](#).

- a Utilisez le kit Qubit BR dsDNA Assay Kit pour déterminer la concentration de chaque échantillon d'ADNg. Suivez les instructions du fabricant pour l'instrument et le kit de dosage.

- b Prélevez un aliquot de 1 µl de l'échantillon d'ADNg FFPE pour analyse à l'aide du kit Agilent NGS FFPE QC Kit afin de déterminer le score d'intégrité de l'ADN $\Delta\Delta Cq$. Pour plus d'informations, consultez le manuel d'utilisation du kit sur www.agilent.com.
- c Pour tous les échantillons avec un score d'intégrité de l'ADN $\Delta\Delta Cq \leq 1$, utilisez la concentration d'ADNg basée sur Qubit déterminée dans l'**étape a**, ci-dessus, pour déterminer le volume d'ADN d'entrée nécessaire pour le protocole.
- d Pour tous les échantillons avec un score d'intégrité de l'ADN $\Delta\Delta Cq > 1$, utilisez la concentration d'ADNg amplifiable basée sur qPCR, rapportée par les résultats du kit Agilent NGS FFPE QC Kit, pour déterminer les quantités d'ADN d'entrée pour le protocole.

Tableau 9 Modifications de l'entrée d'ADN SureSelect XT HS basées sur le score d'intégrité de l'ADN $\Delta\Delta Cq$

Paramètre du protocole	Échantillons non FFPE	Échantillons FFPE	
		$\Delta\Delta Cq \leq 1^*$	$\Delta\Delta Cq > 1$
Entrée d'ADN pour la préparation des banques	10 ng, 50 ng, 100 ng ou 200 ng d'ADN, d'après le dosage Qubit	10 ng, 50 ng, 100 ng ou 200 ng d'ADN, d'après le dosage Qubit	10 ng, 50 ng, 100 ng ou 200 ng d'ADN amplifiable, d'après la quantification par qPCR

* Les échantillons FFPE avec des scores $\Delta\Delta Cq \leq 1$ doivent être traités comme des échantillons non FFPE pour la détermination de la quantité d'entrée d'ADN. Pour les échantillons de ce type, assurez-vous d'utiliser la concentration d'ADN déterminée par le dosage Qubit, plutôt que la concentration déterminée par qPCR, afin de calculer le volume requis pour 10-200 ng d'ADN.

- 3 Préparez chaque échantillon d'ADN FFPE pour le protocole de préparation des banques en diluant la quantité appropriée (10 ng, 50 ng, 100 ng ou 200 ng) de chaque échantillon d'ADNg avec 1X Low TE Buffer afin d'obtenir un volume final de 50 µl. Agitez au vortex pour mélanger, puis centrifugez brièvement pour recueillir le liquide. Conservez les échantillons sur de la glace.

Méthode 2 : Qualification à l'aide du score DIN du dosage Agilent's Genomic DNA ScreenTape

Le dosage Agilent's Genomic DNA ScreenTape, utilisé conjointement avec Agilent's 4200 TapeStation, permet de réaliser un dosage électrophorétique quantitatif pour déterminer l'intégrité des échantillons d'ADN. Ce dosage rapporte un score DIN (DNA Integrity Number [Numéro d'intégrité de l'ADN]) pour chaque échantillon utilisé pour estimer la normalisation appropriée de l'entrée d'ADN requise pour les échantillons d'ADN de faible intégrité.

- a Utilisez le kit Qubit BR dsDNA Assay Kit pour déterminer la concentration de chaque échantillon d'ADNg. Suivez les instructions du fabricant pour l'instrument et le kit de dosage.
- b Prélevez un aliquot de 1 µl de l'échantillon d'ADNg FFPE et analysez-le à l'aide du dosage Genomic DNA ScreenTape. Pour plus d'informations, consultez le [manuel d'utilisation](http://www.agilent.com) sur www.agilent.com.

- c À l'aide du score DIN indiqué pour chaque échantillon dans le dosage Genomic DNA ScreenTape, consultez le [Tableau 10](#) pour déterminer la quantité recommandée d'ADN d'entrée pour l'échantillon.

Tableau 10 Modifications de l'entrée d'ADN SureSelect XT HS basées sur le score du numéro d'intégrité de l'ADN (DIN)

Paramètre du protocole	Échantillons non FFPE	Échantillons FFPE		
		DIN > 8*	DIN 3–8	DIN < 3
Entrée d'ADN pour la préparation des banques	10 ng, 50 ng, 100 ng ou 200 ng d'ADN, quantifiés par le dosage Qubit	10 ng, 50 ng, 100 ng ou 200 ng d'ADN, quantifiés par le dosage Qubit	Utilisez 50 ng, 100 ng ou 200 ng d'ADN (utilisez la quantité maximale d'ADN disponible, jusqu'à 200 ng). Réalisez une quantification avec le dosage Qubit afin de déterminer le volume requis pour 50 ng, 100 ng ou 200 ng d'entrée.	Utilisez 100 ng ou 200 ng d'ADN (utilisez la quantité maximale d'ADN disponible, jusqu'à 200 ng). Réalisez une quantification avec le dosage Qubit afin de déterminer le volume requis pour 100 ng ou 200 ng d'entrée.

* Les échantillons FFPE avec un score DIN > 8 doivent être traités comme des échantillons non FFPE pour la détermination de la quantité d'entrée d'ADN.

- 4 Préparez chaque échantillon d'ADN FFPE pour le protocole de préparation des banques en diluant la quantité appropriée (10 ng, 50 ng, 100 ng ou 200 ng) de chaque échantillon d'ADNg avec 1X Low TE Buffer afin d'obtenir un volume final de 50 µl. Agitez au vortex chaque dilution d'échantillon pour la mélanger, puis centrifugez brièvement pour recueillir le liquide. Conservez les échantillons sur de la glace.

Étape 3. Fragmentation des échantillons d'ADN FFPE

Au cours de cette étape, les échantillons d'ADNg de 50 µl sont fragmentés dans des conditions optimisées pour obtenir un ADN dérivé de FFPE. La taille du fragment d'ADN cible est comprise entre 150 et 200 pb.

REMARQUE

Ce protocole a été optimisé à l'aide d'un instrument Covaris modèle E220 et le Covaris microTUBE de 130 µl. Consultez les recommandations du fabricant concernant l'utilisation d'autres instruments ou porte-échantillons Covaris pour obtenir la même taille de fragment d'ADN cible.

- 1 Installez l'instrument Covaris E220. Reportez-vous au guide d'utilisation de l'instrument pour plus de détails.
 - a Vérifiez que le réservoir Covaris est rempli d'eau désionisée fraîche jusqu'au niveau de remplissage approprié conformément aux recommandations du fabricant pour le modèle d'instrument spécifique et le tube ou la plaque d'échantillonnage utilisés.
 - b Vérifiez que l'eau recouvre la partie en verre visible du tube.
 - c Sur le tableau de bord de l'instrument, appuyez sur le bouton Degas. Dégazez conformément aux recommandations du fabricant, généralement pendant 30 à 60 minutes.
 - d Réglez la température du refroidisseur entre 2 °C et 5 °C de façon à ce que la lecture de la température dans le bain-marie affiche 5 °C. Consultez les recommandations du fabricant pour savoir comment ajouter des liquides de refroidissement afin d'éviter le gel.

- 2 Exécutez les étapes de fragmentation de l'ADN ci-dessous pour chacun des échantillons d'ADNg de 50 µl (contenant 10 ng, 50 ng, 100 ng ou 200 ng d'ADNg dans 50 µl de 1X Low TE Buffer).
 - a Transférez l'échantillon d'ADN de 50 µl dans un Covaris microTUBE, à l'aide d'un embout de pipette conique pour transférer lentement l'échantillon à travers la paroi pré-fendue du bouchon.
 - b Centrifugez le microTUBE pendant 30 secondes pour recueillir le liquide et éliminer les bulles du fond du tube.
 - c Fixez le microTUBE dans le porte-tube et fragmentez l'ADN avec les paramètres figurant dans le [Tableau 11](#).

Tableau 11 Paramètres de fragmentation pour l'instrument Covaris de la série E (logiciel SonoLab v7 ou version ultérieure)

Paramètre	Valeur
Facteur de service	10 %
Puissance incidente maximale (PIM)	175
Cycles par salve	200
Température du bain	2 à 8 °C
Durée du traitement	240 secondes

- d Passez directement à l'étape suivante, ne laissez pas l'ADN fragmenté dans le Covaris microTUBE plus longtemps que nécessaire.
- 3 Remettez le Covaris microTUBE contenant l'ADN fragmenté dans la station de chargement et de déchargement. Tout en laissant le bouchon hermétique sur le microTUBE, insérez un embout de pipette à travers la paroi pré-fendue, puis retirez lentement l'ADN fragmenté.
- 4 Transférez l'échantillon d'ADN fragmenté de 50 µl du Covaris microTUBE dans le puits désigné de la Magnis Sample Input Strip rouge, en perçant l'opercule en aluminium avec l'embout de la pipette juste avant d'injecter le liquide. Conservez les échantillons sur de la glace.

Veillez à charger les échantillons dans les puits d'échantillonnage appropriés, l'échantillon 1 se trouvant dans le puits le plus éloigné du code-barres, comme illustré dans la [Figure 8](#) ci-dessous.

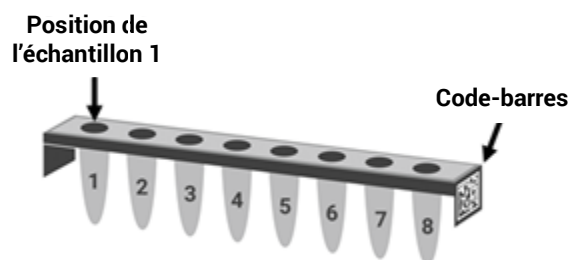


Figure 8 Sens requis des numéros d'échantillon 1 à 8 dans la Magnis Sample Input Strip.

- 5 Après avoir transféré l'échantillon d'ADN, centrifugez brièvement le microTUBE pour recueillir tout volume résiduel de l'échantillon. Transférez tout autre liquide supplémentaire recueilli dans le même puits de la Magnis Sample Input Strip.

REMARQUE

Il est important d'éviter la perte d'ADN d'entrée à cette étape, en particulier pour les échantillons d'ADN peu abondants. Inspectez visuellement le microTUBE afin de vous assurer que l'intégralité de l'échantillon a été transférée. S'il reste des gouttelettes dans le microTUBE, répétez l'[étape 5](#).

- 6 Une fois tous les échantillons chargés, poursuivez la configuration des Sample Input Strips comme indiqué en détail à la [page 24](#) (reportez-vous à la partie d de l'[étape 3](#)).

4

Annexe 2 : Utilisation des Probe strips préparées pendant l'exécution

Préparation des Probe strips pendant l'exécution [55](#)

Saisie des informations relatives aux sondes (probe) dans le logiciel Magnis pendant la configuration du cycle [57](#)

Les instructions de cette section sont spécifiquement destinées à être utilisées avec le kit de réactifs référence G9730D ou G9730B, fourni avec des Probe Input Strips vides (EPIS). Les cycles exécutés avec ces kits requièrent une préparation des Probe strips pendant l'exécution et les étapes supplémentaires de saisie de données décrites dans cette section.

Les références G9730D et G9730B du kit de réactifs sont traitées à l'aide de protocoles d'exécution Magnis différents. Les étapes de configuration des Probe strips sont similaires pour les deux protocoles, et ne diffèrent que par le volume de sonde requis par puits d'échantillon, tel que récapitulé dans le [Tableau 12](#) à la page 55.

Les instructions figurant dans cette section ne s'appliquent pas aux kits qui comprennent des Probe strips préremplies ; reportez-vous à la [page 24](#) pour les informations de configuration des Probe strips préremplies.

Préparation des Probe strips pendant l'exécution

Les Magnis Probe Input Strips vides (Réf. 5190-9883, bandes blanches fournies au format plaque) doivent être stockées et remplies dans une zone pré-réaction de polymérisation en chaîne du laboratoire. Préparer la Probe Input Strip juste avant de l'utiliser dans le cycle ; ne pas pré-remplir et congeler-décongeler les Probe Input Strips utilisées dans ces protocoles.

Reportez-vous au [Tableau 12](#) ci-dessous pour déterminer le volume de SureSelect Probe nécessaire par puits pour votre type de kit de réactifs et la Capture Size de la sonde.

Les 8 puits de la Magnis Probe Input Strip vide peuvent être remplis avec des solutions de sonde identiques ou différentes. Toutefois, toutes les sondes utilisées dans un même cycle doivent avoir une taille et une conception similaire pour permettre l'utilisation des mêmes conditions d'exécution par le Magnis (reportez-vous au [Tableau 13](#) à la page 57 pour les fourchettes de tailles de type de sonde compatibles).

Tableau 12 Exigences de remplissage de la Magnis Probe Input Strip vide

Nom des kits de réactifs (Référence)	Protocole sélectionné sur l'écran <i>Enter Run Info</i>	Probe Capture Size	Volume à pipeter par puits	Volume requis pour un cycle de 8 échantillons
Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit (G9730D)	SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM	≥3 Mb (Large Capture Size)*	5 µl	40 µl
	OU LT-SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM	<3 Mb (Small Capture Size)*	2 µl	16 µl
Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit (G9730B)	SureSelectXT HS-Illumina	≥3 Mb (Large Capture Size)*	8 µl	64 µl
		<3 Mb (Small Capture Size)*	6 µl	48 µl

* La désignation Large ou Small de la *Capture Size* de la ou des sonde(s) utilisée(s) dans l'analyse est saisie dans le logiciel Magnis comme décrit à la [page 57](#). Toutes les sondes utilisées dans une série doivent avoir la même *Capture Size* et doivent utiliser les mêmes conditions de cyclage post-capture pour la réaction de polymérisation en chaîne (voir le [Tableau 13](#) à la page 57).

- 1 Prenez une Magnis Probe Input Strip blanche vide et une bande d'opercule en aluminium neuve (avec endos) dans le kit Réf. 5190-9883, stocké à température ambiante.
- 2 Décongelez et mélangez le ou les flacon(s) de SureSelect Probe à utiliser pour le cycle et conservez sur de la glace.
- 3 Remplissez les puits de la Magnis Probe Input Strip vide avec la quantité de solution de SureSelect Probe requise pour le type de kit de réactif et la taille et le type de sonde en suivant les étapes ci-dessous :
 - a Utilisez une pointe de pipette vide de 200 µl pour prépercer le film de scellement de chaque puits de la Probe input strip à remplir pour l'analyse.
 - b À l'aide d'une micropipette adaptée pour distribuer avec précision le volume de sonde indiqué sur le [Tableau 12](#), distribuez la quantité indiquée de solution de SureSelect Probe dans chaque puits.

Utilisez une micropipette et un embout de pipette d'une capacité de 2 µl pour distribuer 2 µl de sonde.

Utilisez une micropipette et un embout de pipette d'une capacité de 10 µl lorsque vous distribuez des doses de 5 µl, 6 µl ou 8 µl de sonde.

REMARQUE

Il est important de remplir les puits de la Probe input strip en utilisant précisément les volumes indiqués sur le [Tableau 12](#). Utilisez une pipette calibrée adaptée pour distribuer le volume indiqué avec une grande exactitude et précision.

- 4 Après avoir distribué la solution de sonde dans tous les puits, refermez les puits avec l'opercule en aluminium neuf fourni dans le kit, en prenant soin de ne pas masquer le code-barres de la Probe strip avec l'opercule. Vérifiez que l'opercule est uniformément appliqué, sans qu'il ne déborde ou ne soit excessivement plié, ce qui pourrait obstruer l'emplacement du tube en bande lors du chargement dans l'instrument.
- 5 Vérifiez visuellement les puits de la Probe strip afin de contrôler qu'il n'y a pas de bulles. Éliminez les bulles éventuelles en centrifugeant la Probe strip préparée dans une centrifugeuse réglée sur $250 \times g$ pendant 5 secondes ou jusqu'à ce que toutes les bulles soient éliminées de la solution de sonde.
- 6 Conservez la Probe strip sur de la glace jusqu'à ce qu'elle soit utilisée pendant la configuration de la platine à la [page 34](#).

Lors du chargement de la Probe strip pendant le Deck Setup, assurez-vous que la bande est correctement placée dans le module refroidisseur.

Saisie des informations relatives aux sondes (probe) dans le logiciel Magnis pendant la configuration du cycle

Pour les cycles qui comprennent des **Probe Input Strips** pendant l'exécution (cycles utilisant le kit référence G9730D ou G9730B), vous devez saisir les propriétés relatives aux sondes dans les champs indiqués ci-dessous pendant la phase *Verify Labware* de la configuration du cycle (reportez-vous à la [page 37](#)).

Saisissez les informations dans les champs *Part Number*, *Lot Number* et *Design ID* selon les exigences de tenue de dossiers de votre établissement. Le Design ID et le Lot Number des sondes de banque SureSelect ou ClearSeq fournies par Agilent sont indiqués sur le flacon du produit et sur le Certificat d'analyse.

Saisissez le nombre de cycles de réaction de polymérisation en chaîne à utiliser dans le cycle dans le champ *Post-Capture PCR Cycles*, en fonction de la taille du ou des types de sonde, puis appuyez sur la description *Capture Size* appropriée pour la ou les sonde(s) utilisée(s) dans le cycle. Reportez-vous au [Tableau 13](#) ci-dessous pour les directives. Le nombre de cycles de PCR suggéré est généralement optimal pour la taille du type de sonde indiquée, mais le nombre de cycles de réaction de polymérisation en chaîne peut être ajusté pour répondre aux besoins de votre plan expérimental. Bien que les 8 puits de la Magnis Probe Input Strip puissent contenir différentes solutions de sonde, toutes les sondes utilisées au cours du même cycle doivent utiliser les mêmes réglages *Post-Capture PCR Cycles* et *Capture Size*.

Tableau 13 Réglages recommandés pour les sondes distribuées pendant l'exécution

Taille et type de SureSelect Probe	Post-Capture PCR Cycles	Capture Size
< 200 kb	14	Small
200–749 kb	13	Small
750–2999 kb	12	Small
3–5 Mb	10	Large
> 5 Mb	9	Large

Une fois tous les champs remplis, appuyez sur la flèche vers l'avant pour passer à l'écran *Enter Sample Info* et suivez les autres étapes de configuration du cycle à partir de la [page 38](#).

5

Annexe 3 : Directives relatives au traitement des échantillons d'ADN après cycle pour le NGS

- Étape 1. Analyse de la quantité et de la qualité des échantillons d'ADN des banques 59
- Étape 2. Pool d'échantillons pour le séquençage multiplex (optionnel) 62
- Étape 3. Préparation des échantillons de séquençage 63
- Étape 4. Exécution du cycle de séquençage et analyse des données 65
 - Directives relatives à la configuration des cycles de séquençage avec les instruments HiSeq/NextSeq/NovaSeq 65
 - Directives relatives à la configuration des cycles de séquençage avec l'instrument MiSeq 68
 - Ressources relatives à l'analyse séquentielle 71

Après avoir terminé le cycle de préparation des banques Magnis SureSelect^{XT HS}, les échantillons d'ADN sont quantifiés et qualifiés, puis analysés par NGS. Vous trouverez dans cette section des directives sur le traitement habituel des échantillons après analyse pour le NGS ; le traitement NGS et les étapes d'analyse après cycle peuvent varier.

Étape 1. Analyse de la quantité et de la qualité des échantillons d'ADN des banques

Avant le pooling des échantillons pour le séquençage multiplexé, analysez la quantité et la qualité de l'ADN dans chaque échantillon de la banque à l'aide d'Agilent 4200 TapeStation ou de 4150 TapeStation et de High Sensitivity D1000 ScreenTape et du kit de réactifs associé. Reportez-vous au [Tableau 3](#) à la page 13 pour connaître les références de commande. Reportez-vous à l'[Agilent High Sensitivity D1000 Assay Quick Guide](#) pour des instructions détaillées.

REMARQUE

Sinon, les échantillons d'ADN des banques peuvent être analysés à l'aide de l'Agilent 2100 Bioanalyzer et du [Bioanalyzer High Sensitivity DNA Assay](#) ou à l'aide de l'Agilent 5200 Fragment Analyzer et du [HS NGS Fragment Kit](#). Consultez les guides d'utilisation des dosages en lien pour obtenir des instructions détaillées.

- 1 Préparez les échantillons de dosage TapeStation dans une nouvelle bande de tubes comme indiqué dans l'[Assay Quick Guide](#). Pour l'analyse, utilisez 2 µl de chaque échantillon d'ADN de la banque dilués avec 2 µl de tampon d'échantillon High Sensitivity D1000.

MISE EN GARDE

Assurez-vous de bien mélanger l'ADN combiné et le tampon d'échantillon sur l'agitateur à vortex IKA, comme indiqué dans l'[Assay Quick Guide](#), pour une quantification précise.

- 2 Chargez les bandes de tubes de dosage High Sensitivity D1000 à partir de l'[étape 1](#), le High Sensitivity D1000 ScreenTape, ainsi que les embouts de chargement dans la TapeStation comme indiqué dans l'[Assay Quick Guide](#). Lancez le cycle.
- 3 Vérifiez que l'électrophérogramme montre le pic de la taille des fragments d'ADN positionnée entre 200 et 400 pb. Les électrophérogrammes des échantillons sont présentés dans la [Figure 9](#) (banque préparée à partir d'ADN de haute qualité), dans la [Figure 10](#) (banque préparée à partir d'ADN FFPE de qualité moyenne) et dans la [Figure 11](#) (banque préparée à partir d'ADN FFPE de faible qualité).
- 4 Déterminez la concentration de chaque banque en l'intégrant sous le pic entier.

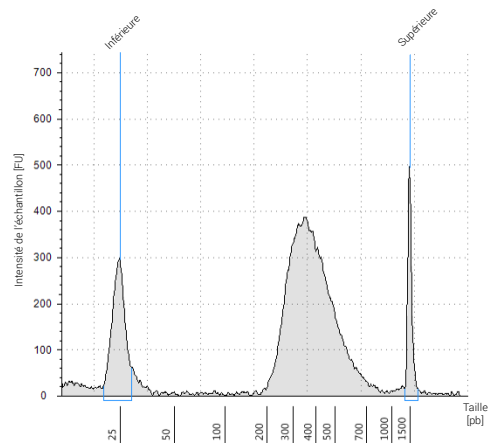


Figure 9 Banque de post-capture préparée à partir d'un échantillon d'ADNg de haute qualité analysé à l'aide d'un dosage High Sensitivity D1000 ScreenTape.

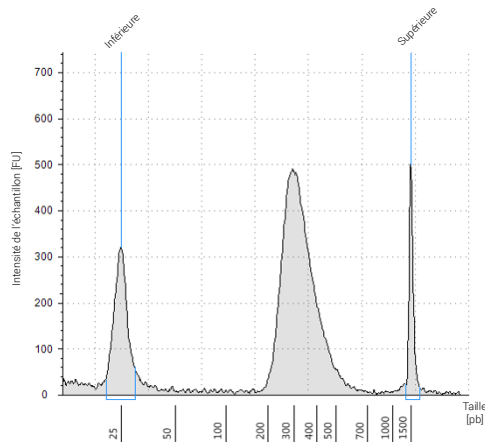


Figure 10 Banque de post-capture préparée à partir d'un échantillon d'ADNg FFPE ordinaire analysé à l'aide d'un dosage High Sensitivity D1000 ScreenTape.

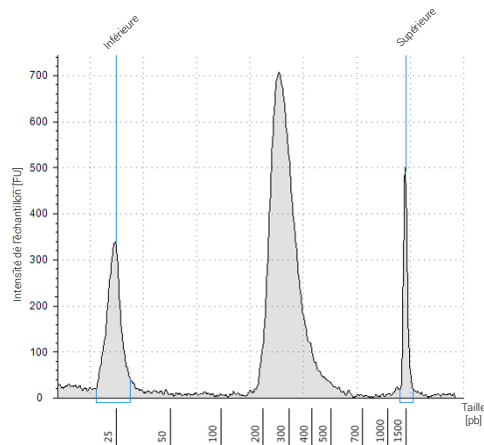


Figure 11 Banque de post-capture préparée à partir d'un échantillon d'ADNg FFPE de faible qualité analysé à l'aide d'un dosage High Sensitivity D1000 ScreenTape.

Point d'arrêt Si vous ne passez pas à l'étape suivante, conservez les échantillons à 4 °C pendant la nuit ou à -20 °C pour une conservation prolongée.

Étape 2. Pool d'échantillons pour le séquençage multiplex (optionnel)

Le nombre de banques indexées pouvant être multiplexées sur une seule piste de séquençage est déterminé par les spécifications de sortie du séquenceur utilisé, ainsi que par la quantité de données de séquençage requises pour votre plan de recherche. Calculez le nombre d'index pouvant être combinés par piste, en fonction de la capacité du séquenceur et de la quantité de données de séquençage requises par échantillon.

Combinez les banques de telle sorte que chaque banque indexée soit présente en quantités équimolaires dans le pool à l'aide de l'une des méthodes suivantes. Utilisez le diluant spécifié par votre fournisseur de séquençage, tel que Low TE, pour les étapes de dilution.

Méthode 1 : diluez chaque échantillon de la banque à pooler à la même concentration finale (généralement 4-15 nM, ou la concentration de l'échantillon le plus dilué), puis combinez des volumes égaux de tous les échantillons pour créer le pool final.

Méthode 2 : en commençant avec des échantillons de la banque à différentes concentrations, ajoutez le volume approprié de chaque échantillon pour obtenir une concentration équimolaire dans le pool, puis ajustez le pool au volume final souhaité en utilisant Low TE. La formule ci-dessous permet de déterminer la quantité de chaque échantillon indexé à ajouter au pool.

$$\text{Volume d'index} = \frac{V(f) \times C(f)}{\# \times C(i)}$$

où $V(f)$ est le volume final souhaité du pool,

$C(f)$ est la concentration finale souhaitée de tout l'ADN dans le pool (généralement 4 nM - 15 nM ou la concentration de l'échantillon le plus dilué)

$\#$ est le nombre d'index, et

$C(i)$ est la concentration initiale de chaque échantillon indexé

Le [Tableau 14](#) montre un exemple de la quantité de 4 échantillons indexés (de concentrations différentes) et de Low TE nécessaire pour un volume final de 20 µl à 10 nM d'ADN.

Tableau 14 Exemple de calcul de volume pour un volume total de 20 µl à une concentration de 10 nM

Composant	V(f)	C(i)	C(f)	#	Volume à utiliser (µl)
Échantillon 1	20 µl	20 nM	10 nM	4	2,5
Échantillon 2	20 µl	10 nM	10 nM	4	5
Échantillon 3	20 µl	17 nM	10 nM	4	2,9
Échantillon 4	20 µl	25 nM	10 nM	4	2
Low TE					7,6

Si vous stockez la banque avant le séquençage, ajoutez Tween 20 à 0,1 % v/v et stockez à -20 °C à court terme, ou stockez dans les conditions spécifiées par votre fournisseur de séquenceur.

Étape 3. Préparation des échantillons de séquençage

Le pool des banques SureSelect^{XT HS} finales est prêt pour le séquençage direct en employant la chimie et des amorces d'extrémités appariées standard d'Illumina. Chaque fragment dans la banque préparée contient un insert cible entouré de motifs de séquence requis pour le séquençage multiplex à l'aide de séquenceurs Illumina, comme illustré dans la [Figure 12](#).

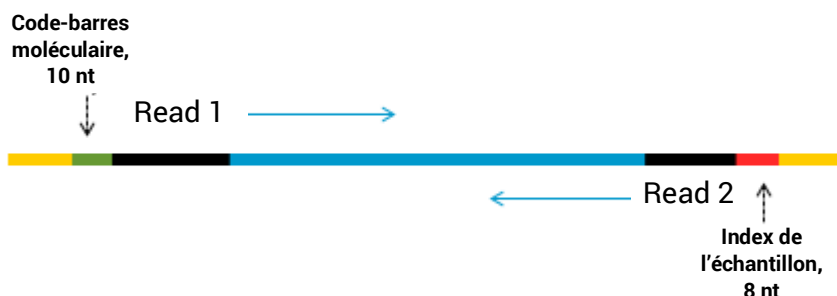


Figure 12 Contenu de la banque de séquençage SureSelect XT HS. Chaque fragment contient un insert cible (bleu) entouré par les éléments de séquençage d'extrémités appariées Illumina (noir), l'index de l'échantillon (rouge), le code-barres moléculaire (vert) et les amorces de réaction de polymérisation en chaîne en pont de la banque (jaune).

Les banques peuvent être séquencées sur les séquenceurs Illumina HiSeq, MiSeq, NextSeq ou NovaSeq en utilisant le type de cycle et les combinaisons chimiques figurant dans le [Tableau 15](#).

MISE EN GARDE

N'utilisez pas l'instrument HiSeq 2500 en mode de fonctionnement à haut rendement (chimie v4) si votre pipeline d'analyse comprend des lectures de codes-barres moléculaires (i5). Une mauvaise qualité des données des séquences de codes-barres moléculaires (scores Q plus faibles, avec des impacts sur la couverture et la sensibilité des appels de variantes) a été observée lorsque les banques SureSelect^{XT HS} sont séquencées sur l'instrument HiSeq 2500 dans ce mode. Reportez-vous au [Tableau 15](#) pour d'autres modes de fonctionnement et options chimiques pour l'instrument HiSeq 2500. Les performances de séquençage pour les lectures Read 1, Read 2 et de l'index au niveau de l'échantillon (i7) ne sont pas affectées et cet instrument/mode d'exécution/chimie peut être utilisé pour les applications qui omettent l'analyse des codes-barres moléculaires.

Procédez à l'amplification des groupes à l'aide du kit de génération de groupes d'extrémités appariées Illumina. Reportez-vous au [Tableau 15](#) pour les configurations du kit compatibles avec la longueur de lecture recommandée.

La concentration d'ensemencement optimale pour les banques enrichies en cibles SureSelect^{XT HS} varie selon l'instrument de séquençage, le type de cycle et la version du kit Illumina. Reportez-vous au [Tableau 15](#) pour connaître les directives. Il faudra également peut-être optimiser la concentration d'ensemencement et la densité des groupes en fonction de la fourchette de taille des fragments d'ADN de la banque, du rendement et de la qualité souhaitée des données. Commencez l'optimisation en utilisant une concentration d'ensemencement se situant au milieu de la fourchette indiquée.

Suivez la recommandation d'Illumina pour un contrôle PhiX dans un spike-in à faible concentration pour un meilleur contrôle de la qualité du séquençage.

Tableau 15 Directives relatives à la sélection de la configuration du kit Illumina

Instrument	Type de cycle	Longueur de lecture	Configuration du kit SBS	Chimie	Concentration d'ensemencement
HiSeq 2500	Rapid Run	2 × 100 pb	Kit de 200 cycles	v2	9–10 pM
HiSeq 2500	High Output*	2 × 100 pb	Kit de 250 cycles	v4	12–14 pM
MiSeq	Tous les cycles	2 × 100 pb	Kit de 300 cycles	v2	9–10 pM
MiSeq	Tous les cycles	2 × 75 pb	Kit de 150 cycles	v3	12–16 pM
NextSeq 500/550	Tous les cycles	2 × 100 pb	Kit de 300 cycles	v2.5	1,2–1,5 pM
HiSeq 3000/4000	Tous les cycles	2 × 100 pb	Kit de 300 cycles	v1	300–400 pM
NovaSeq 6000	Cycles avec étapes Standard	2 × 100 pb	Kit de 300 cycles	v1.0 ou v1.5	300–600 pM
NovaSeq 6000	Cycles avec étapes Xp	2 × 100 pb	Kit de 300 cycles	v1.0 ou v1.5	200–400 pM

* N'utilisez pas les cycles HiSeq 2500 High Output (chimie v4) si votre pipeline d'analyse comprend des lectures de codes-barres moléculaires (i5). Une diminution de la qualité des séquences de codes-barres moléculaires et une baisse des scores Q ont été observées dans les séquences obtenues avec des cycles HiSeq 2500 dans ces conditions. Les performances de séquençage pour les lectures Read 1, Read 2 et de l'index au niveau de l'échantillon (i7) ne sont pas affectées.

Étape 4. Exécution du cycle de séquençage et analyse des données

Suivez les directives ci-dessous pour la configuration du cycle de séquençage des banques SureSelect^{XT HS} et l'analyse.

- L'index au niveau de l'échantillon (i7) requiert une lecture d'index de 8 pb. Pour des informations complètes sur la séquence d'index i7, reportez-vous au [Tableau 34](#) à la page 82.
- Le code-barres moléculaire dégénéré (i5) requiert une lecture d'index de 10 pb.
- Pour les cycles des instruments HiSeq, NextSeq et NovaSeq, configurez le cycle à l'aide de l'interface utilisateur de l'instrument, en suivant les directives à la [page 65](#).
- Pour les cycles de l'instrument MiSeq, configurez le cycle à l'aide d'Illumina Experiment Manager (IEM) en suivant les étapes décrites de la [page 68](#) à la [page 71](#) afin de générer une feuille d'échantillon personnalisée.
- La récupération des fichiers d'index I2 contenant les lectures des index en codes-barres moléculaires (i5) requiert la conversion hors ligne des fichiers.bcl en fichiers fastq. Pour plus d'informations sur cette étape, reportez-vous à la [page 66](#) pour les cycles HiSeq, NextSeq et NovaSeq et à la [page 71](#) pour les cycles MiSeq.
- Avant d'aligner les lectures sur le génome de référence, rognez les lectures des séquences de l'adaptateur Illumina. Reportez-vous à la [page 71](#) pour plus d'informations sur le logiciel d'analyse de données SureCall d'Agilent, qui peut être utilisé pour cette tâche.

Directives relatives à la configuration des cycles de séquençage avec les instruments HiSeq/NextSeq/NovaSeq

Configurez les cycles de séquençage à l'aide de l'interface logicielle de commande de l'instrument. Une configuration de cycle d'échantillon pour l'instrument HiSeq utilisant un séquençage d'extrémités appariées de 100 + 100 pb est illustrée ci-dessous.

The screenshot displays the 'Flow Cell Setup' configuration window in the Illumina sequencing software. The window has tabs for 'RUN CONFIGURATION', 'PRE-RUN SETUP', and 'INITIATE RUN'. The 'Flow Cell Setup' tab is active, showing a progress bar with steps: Volume Check, Integration, Storage, Flow Cell Setup, Advanced, Recipe, and Sample Sheet. The 'Flow Cell Setup' step is highlighted. Below the progress bar, a message reads: 'Check remaining parameters and select NEXT to continue.' The configuration options are as follows:

- Index Type:** Radio buttons for 'No Index', 'Single Index', 'Dual Index', and 'Custom'. The 'Custom' option is selected and circled in red.
- Flow Cell Format:** Radio buttons for 'Single Read' and 'Paired End'. The 'Paired End' option is selected and circled in red.
- Cycles:** A row of input fields for 'Read 1', 'Index 1 (i7)', 'Index 2 (i5)', and 'Read 2'. The values are 100, 8, 10, and 100 respectively. Each field has a grid icon to the right. This row is circled in red.

Si vous utilisez l'instrument NextSeq ou NovaSeq, localisez les mêmes paramètres sur l'écran *Run Setup* et remplissez les champs **Read Length** à l'aide des réglages **Cycles** indiqués dans l'exemple d'instrument HiSeq ci-dessus. Dans la section **Custom Primers** de l'écran *Run Setup* de l'instrument NextSeq ou NovaSeq, décochez (ne cochez **pas**) les cases pour toutes les amorces (*Read 1, Read 2, Index 1 et Index 2*).

À l'heure actuelle, BaseSpace ne prend pas en charge le séquençage des codes-barres moléculaires au fur et à mesure que l'index est lu. Configurez les cycles NextSeq en utilisant le mode autonome.

Récupération des fichiers I2 FASTQ contenant des codes-barres moléculaires

La récupération des fichiers d'index I2 contenant les lectures des index en codes-barres moléculaire (i5) requiert la conversion hors ligne des fichiers.bcl en fichiers fastq à l'aide de l'une des deux méthodes ci-dessous.

Option 1 : utilisation du logiciel bcl2fastq avec masquage des bases

Pour générer des fichiers Index 2 fastq contenant les codes-barres moléculaires P5 à l'aide du logiciel bcl2fastq, suivez les instructions d'utilisation du logiciel d'Illumina avec les modifications suivantes :

- 1 L'utilisation d'une feuille d'échantillon est obligatoire et non facultative. Modifiez la feuille d'échantillon de façon à n'inclure que l'index de l'échantillon et non l'index du code-barres moléculaire en effaçant le contenu des colonnes **I5_Index_ID** et **index2**.
- 2 Définissez la valeur de **mask-short-adaptor-reads** sur 0.
- 3 Utilisez le masque de base suivant : Y*, I8, Y10, Y* (où * doit être remplacé par la longueur de lecture réelle, la valeur entrée correspondant à la longueur de lecture dans le fichier RunInfo.xml).

MISE EN GARDE

Lors de la génération de fichiers fastq à l'aide du logiciel bcl2fastq d'Illumina, veillez à effacer le contenu de la colonne **index2** de la feuille d'échantillon comme décrit ci-dessus. **Ne saisissez pas une séquence N₁₀ pour représenter le code-barres moléculaire dégénéré** ; à la place, laissez simplement les cellules de la colonne vides.

Le logiciel bcl2fastq ne traite pas le caractère « N » comme un caractère de remplacement lorsqu'il est présent dans des séquences d'index de feuilles d'échantillons, et son utilisation dans ce contexte entraînera un décalage pour tout caractère de séquence autre que « N ».

Option 2 : utilisation des outils Broad Institute Picard

Pour générer des fichiers Index 2 fastq contenant les codes-barres moléculaires P5 à l'aide des outils Broad Institute Picard, suivez les étapes suivantes :

- 1 Utilisez l'outil **ExtractIlluminaBarcodes** pour trouver les codes-barres. Un exemple d'ensemble de commandes figure ci-dessous (les commandes utilisées par votre installation peuvent varier).

```
nohup java -jar picard.jar ExtractIlluminaBarcodes  
BASECALLS_DIR=<sequencing_run_directory>/Data/Intensities/BaseCalls/  
OUTPUT_DIR=<barcode_output_dir_name> LANE=1 READ_STRUCTURE=<read_structure>  
BARCODE_FILE=<barcode_file> METRICS_FILE=<metric_file_name> NUM_PROCESSORS=<n>
```

- 2 Utilisez l'outil **IlluminaBaseCallsToFastq** pour générer les fichiers fastq en fonction des résultats de l'étape 1. Un exemple d'ensemble de commandes figure ci-dessous (les commandes utilisées par votre installation peuvent varier).

```
nohup java -jar picard.jar IlluminaBasecallsToFastq  
BASECALLS_DIR=<sequencing_run_directory>/Data/Intensities/BaseCalls/ LANE=1  
BARCODES_DIR=<barcode_output_dir_name> READ_STRUCTURE=<read_structure>  
FLOWCELL_BARCODE=<FCID> MACHINE_NAME=<machine_name> RUN_BARCODE=<run_number>  
ADAPTERS_TO_CHECK=PAIRED_END  
  
NUM_PROCESSORS=<n> READ_NAME_FORMAT=CASAVA_1_8 COMPRESS_OUTPUTS=true  
MULTIPLEX_PARAMS=<multiplex_params_file> IGNORE_UNEXPECTED_BARCODES=true  
TMP_DIR=<temp_directory_location>
```

Directives relatives à la configuration des cycles de séquençage avec l'instrument MiSeq

Utilisez le logiciel Illumina Experiment Manager (IEM) pour générer une feuille d'échantillon personnalisée conformément aux directives ci-dessous. Lorsqu'une feuille d'échantillon a été générée, les séquences d'index doivent être manuellement modifiées en index SureSelect XT HS utilisés pour chaque échantillon. Reportez-vous au [Tableau 34](#) à la page 82 pour les séquences nucléotidiques des index du système SureSelect XT HS.

Configuration d'une feuille d'échantillon personnalisée :

- 1 Dans le logiciel IEM, créez une feuille d'échantillon pour l'instrument MiSeq en utilisant les sélections d'étapes suivantes.
 - Sous *Category*, sélectionnez **Other**.
 - Sous *Application*, sélectionnez **FASTQ Only**.
- 2 Sur l'écran *Workflow Parameters*, saisissez les informations du cycle en veillant à spécifier les paramètres clés indiqués ci-dessous. Dans le champ *Library Prep Workflow*, sélectionnez **TruSeq Nano DNA**. Dans le champ *Index Adapters*, sélectionnez **TruSeq DNA CD Indexes (96 Indexes)**. Si votre pipeline utilise SureCall pour le rognage des adaptateurs, veillez à décocher les deux cases relatives au rognage des adaptateurs sous *FASTQ Only Workflow-Specific Settings* (entourées ci-dessous), car elles sont cochées par défaut.

Si **TruSeq Nano DNA** n'est pas disponible dans le champ *Sample Prep Kit*, sélectionnez **TruSeq HT** à la place.

FASTQ Only Run Settings

Reagent Cartridge Barcode* MS5871368-300V2

Library Prep Workflow TruSeq Nano DNA

Index Adapters TruSeq DNA CD Indexes (96 Indexes)

Index Reads ☐ 0 (None) ☐ 1 (Single) ☒ 2 (Dual)

Experiment Name

Investigator Name

Description

Date 1/22/2018

Read Type ☒ Paired End ☐ Single Read

Cycles Read 1 100

Cycles Read 2 100

FASTQ Only Workflow-Specific Settings

☐ Custom Primer for Read 1

☐ Custom Primer for Index

☐ Custom Primer for Read 2

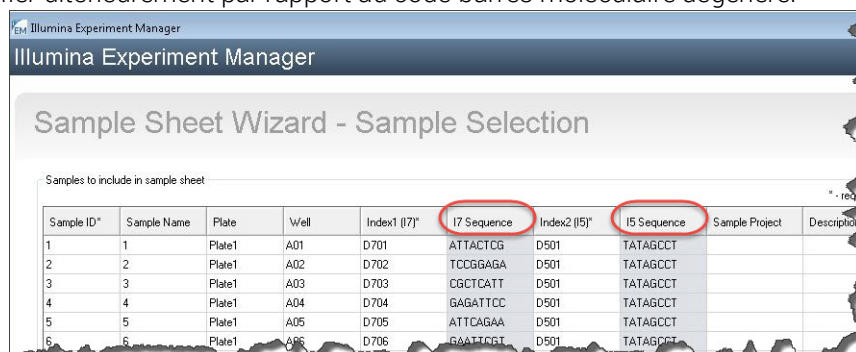
☐ Reverse Complement

☐ Use Adapter Trimming

☐ Use Adapter Trimming Read 2

- 3 À l'aide de **Sample Sheet Wizard**, configurez une **New Plate** en saisissant les informations requises pour chaque échantillon à séquencer. Dans la colonne **I7 Sequence**, affectez chaque échantillon à l'un des index Illumina i7. L'index sera rectifié en index SureSelect XT HS ultérieurement.

De même, dans la colonne **I5 Sequence**, affectez n'importe lequel des index i5 d'Illumina, à rectifier ultérieurement par rapport au code-barres moléculaire dégénéré.



Sample ID*	Sample Name	Plate	Well	Index1 (I7)*	I7 Sequence	Index2 (I5)*	I5 Sequence	Sample Project	Description
1	1	Plate1	A01	D701	ATTACTCG	D501	TATAGCCT		
2	2	Plate1	A02	D702	TCCGGAGA	D501	TATAGCCT		
3	3	Plate1	A03	D703	CGCTCATT	D501	TATAGCCT		
4	4	Plate1	A04	D704	GAGATTCC	D501	TATAGCCT		
5	5	Plate1	A05	D705	ATTCAGAA	D501	TATAGCCT		
6	6	Plate1	A06	D706	GAATTGGT	D501	TATAGCCT		

- 4 Terminez les tâches de configuration de la feuille d'échantillon et enregistrez le fichier de la feuille d'échantillon.

Modifiez la feuille d'échantillon pour inclure les index SureSelect XT HS et les codes-barres moléculaires.

- Ouvrez le fichier de la feuille d'échantillon dans un éditeur de texte et modifiez les informations des index i7 et i5 pour chaque échantillon dans les colonnes 5-8 (mises en surbrillance dans la Figure 13).
 - Dans la colonne 5, sous **I7_Index_ID**, saisissez le nom de l'index SureSelect XT HS attribué à l'échantillon. Dans la colonne 6, sous **index**, saisissez la séquence de l'index SureSelect XT HS correspondante. Reportez-vous au [Tableau 34](#) à la page 82 pour les séquences nucléotidiques des index SureSelect XT HS.
 - Dans la colonne 7, sous **I5_Index_ID**, saisissez *MBC* pour tous les échantillons. Dans la colonne 8, sous **index2**, saisissez le texte *NNNNNNNNNN* pour tous les échantillons afin de représenter le code-barres moléculaire dégénéré de 10 nucléotides marquant chaque fragment.

REMARQUE

Saisissez le texte N_{10} dans la colonne **index2** uniquement lorsque des feuilles d'échantillons sont traitées avec le logiciel MiSeq Reporter réglé de façon à récupérer les fichiers l2 fastq contenant des codes-barres moléculaires, comme indiqué à la [page 71](#). Les feuilles d'échantillons traitées hors ligne avec le logiciel bcl2fastq d'Illumina ne doivent pas contenir de séquences d'index à caractère de remplacement N_{10} . Reportez-vous à l'information *Mise en garde* à la [page 66](#) pour plus d'informations.

[Header]									
IEMFileVer	5								
Experiment	XTHS								
Date	1/22/2018								
Workflow	GenerateFASTQ								
Application	FASTQ Only								
Instrument	MiSeq								
Assay	TruSeq Nano DNA								
Index Adapters	TruSeq DNA CD Indexes (96 Indexes)								
Description									
Chemistry	Amplicon								
[Reads]									
100									
100									
[Settings]									
ReverseComplement	0								
[Data]									
Sample_ID	Sample_Name	Sample_Plate	Sample_Well	Index_Plate	Well	I7_Index_ID	index	I5_Index_ID	index2
XTHS-S1	XTHS-S1	1	A01	A01		A01	GTCTGTCA	MBC	NNNNNNNNNN
XTHS-S2	XTHS-S2	1	B01	B01		B01	TGAAGAGA	MBC	NNNNNNNNNN

Figure 13 Exemple de feuille à utiliser avec l'instrument MiSeq après la reconfiguration de MiSeq Reporter

- Enregistrez la feuille d'échantillon modifiée dans un emplacement de fichier approprié pour l'utiliser dans le cycle MiSeq.

Reconfiguration du logiciel MiSeq Reporter pour récupérer les fichiers I2 FASTQ

Par défaut, le logiciel MiSeq Reporter ne génère pas de fichiers fastq pour les lectures d'index. Pour générer des fichiers d'index fastq I2 contenant les lectures de codes-barres moléculaires à l'aide de MiSeq Reporter, réglez les paramètres du logiciel comme décrit ci-dessous avant la première utilisation de l'instrument MiSeq pour le séquençage de banques SureSelect XT HS. Une fois modifié, ce réglage est conservé pour les futurs cycles.

Pour modifier ce réglage, ouvrez le fichier **MiSeq Reporter.exe.config**. Sous l'onglet **<appSettings>**, ajoutez **<add key="CreateFastqForIndexReads" value="1"/>**. Vous devez redémarrer l'instrument pour que ce changement de réglage prenne effet.

REMARQUE

Si vous utilisez le même instrument pour des dosages autres que le séquençage de banques SureSelect XT HS, le fichier de configuration doit être modifié en **<add key="CreateFastqForIndexReads" value="0"/>** et l'instrument doit être redémarré avant d'exécuter l'autre dosage.

Si vous utilisez le système MiSeqDx, exécutez l'instrument en mode recherche pour apporter des modifications aux réglages de MiSeq Reporter. Si le mode recherche n'est pas disponible sur votre instrument, vous devrez peut-être mettre à niveau le système pour inclure la configuration à double démarrage afin d'autoriser les changements de réglage en mode recherche.

Les méthodes alternatives de récupération des fichiers I2 fastq décrites à la [page 66](#) pour les cycles HiSeq, NextSeq et NovaSeq peuvent également être appliquées aux cycles MiSeq.

Ressources relatives à l'analyse séquentielle

Le logiciel d'analyse de données NGS Agilent SureCall est conçu pour rogner les adaptateurs, aligner les lectures et appeler des variantes des données de séquençage générées par des banques SureSelect^{XT HS}. Pour télécharger gratuitement SureCall et pour plus d'informations, y compris les didacticiels du logiciel SureCall, visitez [la page SureCall sur www.agilent.com](#).

Si vous utilisez un autre pipeline pour l'alignement et l'analyse en aval, Agilent fournit l'Agilent Genomics NextGen Toolkit (AGeNT), avec certaines des capacités du SureCall d'Agilent dans une interface de ligne de commande flexible pour une intégration dans votre pipeline bioinformatique. AGeNT est un module logiciel basé sur Java qui a été conçu pour permettre l'adaptation et le rognage des bases de faible qualité et la suppression des doublons de lecture pour les données de haute sensibilité (HS) et non HS. Cet outil est explicitement conçu pour les utilisateurs ayant des experts en bioinformatique établis en interne et capables de concevoir, intégrer, maintenir et dépanner des pipelines d'analyse internes. De plus, le module est conçu spécifiquement pour les utilisateurs disposant d'une infrastructure informatique et d'un support informatique suffisants pour résoudre tous les problèmes non liés à l'exécution des algorithmes AGeNT. Comme Agilent fournit une assistance limitée pour AGeNT, les utilisateurs ayant une expertise limitée en bioinformatique devraient plutôt utiliser le logiciel du SureCall d'Agilent. Agilent ne garantit pas l'exploitabilité des outils tiers (source ouverte ou fermée) dans l'analyse des données en amont et en aval en liaison avec AGeNT. Pour plus d'informations sur cet outil, visitez la [page AGeNT sur www.agilent.com](#).

6 Références

Contenu des kits de réactifs	73
Contenu du Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit	74
Contenu du Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit (format d'origine)	77
Informations de référence relatives à SureSelect XT HS Indexes	80
Informations relatives à la position des plaques	80
Séquences nucléotidiques des index (index)	82
Suivi post-cycle de l'identité des index (index)	83
Guide de dépannage	84

Ce chapitre renferme des informations de référence, notamment le contenu des kits de réactifs, les séquences d'index et les informations relatives au dépannage pour les cycles de préparation des banques SureSelect^{XT HS}.

Contenu des kits de réactifs

Les références Agilent des Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits, notamment des kits Rev B reformatés et ceux au format d'origine, sont récapitulées dans le [Tableau 16](#). Assurez-vous d'avoir vérifié le type de format de votre kit avant de configurer le cycle ; les kits Rev B reformatés doivent être traités à l'aide du protocole *RevB* adéquat (sélectionné dans l'écran *Enter Run Info* pendant la configuration du cycle).

Le détail du contenu des Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits se trouve de la [page 74](#) à la [page 76](#), et de la [page 77](#) à la [page 79](#) pour les Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits (format d'origine).

Tableau 16 Formats et références des kits de réactifs

SureSelect Probe incluse	Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits		Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits (format d'origine)	
	96 réactions	32 réactions	96 réactions	32 réactions
Personnalisée 1–499 kb	G9731D	G9731C	G9731B	G9731A
Personnalisée 0,5–2,9 Mb	G9732D	G9732C	G9732B	G9732A
Personnalisée 3–5,9 Mb	G9733D	G9733C	G9733B	G9733A
Personnalisée 6–11,9 Mb	G9734D	G9734C	G9734B	G9734A
Personnalisée 12–24 Mb	G9735D	G9735C	G9735B	G9735A
Personnalisée 24–50 Mb	G9736D	G9736C	Non proposée à la vente	Non proposée à la vente
Human All Exon V7	G9771D	G9771C	G9771B	G9771A
Human All Exon V8	G9772D	G9772C	Non proposée à la vente	Non proposée à la vente
Aucune (le kit comprend des Probe Input Strips vides pour la configuration de la sonde pendant l'exécution)	G9730D	Non proposée à la vente	G9730B	Non proposée à la vente

Contenu du Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit

Les Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits contiennent les kits de composants répertoriés dans le [Tableau 17](#), avec le détail du contenu de chaque kit de composants du [Tableau 18](#) au [Tableau 23](#).

Tableau 17 Kits de composants fournis avec les Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits

Nom du kit de composants	Conditions de conservation	Réf. du kit de composants	
		96 réactions	32 réactions
Magnis SureSelect Probe Plate, format pré-rempli à un seul puits ^{*†}	-80 °C	La réf. varie ; reportez-vous au Tableau 18	La réf. varie ; reportez-vous au Tableau 18
Magnis SureSelect XT HS Reagent Plates Rev B ILM	-20 °C	5191-6805	5191-6804
Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM	-20 °C	5190-9880	5191-5673
Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plates, ILM	+4 °C	5190-9692	5191-5674
Magnis Empty Consumables	Température ambiante	5190-9712	5191-5675
Magnis Sample Input Strips	Température ambiante	5190-9882	5191-5676

* Peut également s'intituler *Magnis SureSelect XT HS Probe Plate, format pré-rempli à un seul puits*.

† La référence du kit G9730D ne comprend pas de Magnis Probe Plate. À la place, le kit G9730D, configuré pour la configuration de la sonde pendant l'exécution, comprend des Magnis Probe Input Strips vides pour 12 cycles (Réf. 5190-9883), stockées à température ambiante.

Tableau 18 Réf. du Magnis SureSelect Probe Plate, format pré-rempli à un seul puits

Réf. du kit de réactifs	Type de la Probe incluse	Réf. Probe Plate	Quantité par kit
G9731D (96 réactions)	Personnalisée 1–499 kb (Tier 1)	5191-6817 ou 5191-6816*	1 plaque (12 bandes)
G9731C (32 réactions)	Personnalisée 1–499 kb (Tier 1)	5191-6807 ou 5191-6806*	1 plaque (4 bandes)
G9732D (96 réactions)	Personnalisée 0,5–2,9 Mb (Tier 2)	5191-6819 ou 5191-6818*	1 plaque (12 bandes)
G9732C (32 réactions)	Personnalisée 0,5–2,9 Mb (Tier 2)	5191-6809 ou 5191-6808*	1 plaque (4 bandes)
G9733D (96 réactions)	Personnalisée 3–5,9 Mb (Tier 3)	5191-6821 ou 5191-6820*	1 plaque (12 bandes)
G9733C (32 réactions)	Personnalisée 3–5,9 Mb (Tier 3)	5191-6811 ou 5191-6810*	1 plaque (4 bandes)
G9734D (96 réactions)	Personnalisée 6–11,9 Mb (Tier 4)	5191-6823 ou 5191-6822*	1 plaque (12 bandes)
G9734C (32 réactions)	Personnalisée 6–11,9 Mb (Tier 4)	5191-6813 ou 5191-6812*	1 plaque (4 bandes)
G9735D (96 réactions)	Personnalisée 12–24 Mb (Tier 5)	5191-6825 ou 5191-6824*	1 plaque (12 bandes)
G9735C (32 réactions)	Personnalisée 12–24 Mb (Tier 5)	5191-6815 ou 5191-6814*	1 plaque (4 bandes)

Tableau 18 Réf. du Magnis SureSelect Probe Plate, format pré-rempli à un seul puits

Réf. du kit de réactifs	Type de la Probe incluse	Réf. Probe Plate	Quantité par kit
G9736D (96 réactions)	Personnalisée 24–50 Mb	5191-6846	1 plaque (12 bandes)
G9736C (32 réactions)	Personnalisée 24–50 Mb	5191-6845	1 plaque (4 bandes)
G9771D (96 réactions)	Human All Exon V7	5191-6827	1 plaque (12 bandes)
G9771C (32 réactions)	Human All Exon V7	5191-6826	1 plaque (4 bandes)
G9772D (96 réactions)	Human All Exon V8	5191-6974	1 plaque (12 bandes)
G9772C (32 réactions)	Human All Exon V8	5191-6973	1 plaque (4 bandes)

* La référence de Probe Plate correspondant à votre type de sonde personnalisé est déterminée par Agilent lorsque vous passez commande d'un Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit. Les deux références indiquées pour chaque kit de réactifs sont entièrement compatibles avec les protocoles Magnis pris en charge dans la présente publication.

Tableau 19 Composants du kit Magnis SureSelect XT HS Reagent Plates Rev B ILM

Référence (Taille du kit)	Composant fourni	Quantité et format
5191-6805 (96 réactions)	Magnis SureSelect XT HS Reagent Plate Rev B ILM	12 plaques (utilisez 1 plaque par cycle)
5191-6804 (32 réactions)		4 plaques (utilisez 1 plaque par cycle)

Tableau 20 Composants du kit Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM

Référence (Taille du kit)	Composant fourni	Quantité et format
5190-9880 (96 réactions)	Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM	1 plaque de 12 bandes (utilisez 1 bande par cycle)
5191-5673 (32 réactions)		1 plaque de 4 bandes (utilisez 1 bande par cycle)

Tableau 21 Composants du kit Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plates, ILM

Référence (Taille du kit)	Composant fourni	Quantité et format
5190-9692 (96 réactions)	Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate, ILM	12 plaques (utilisez 1 plaque par cycle)
5191-5674 (32 réactions)		4 plaques (utilisez 1 plaque par cycle)

Tableau 22 Composants du kit Magnis Empty Consumables

Composants fournis	Quantité et format*
Magnis Deep-Well HSM Plate	1 plaque
Magnis 96-Well PCR Plate	1 plaque
Magnis Library Output Strip	1 tube en bande vert
Magnis QC Strip	1 tube en bande bleu
Magnis Foil Seals	1 feuille (6 bandes d'opercule en aluminium pour tubes en une bande)
Magnis Thermal Cycler Seal	1 plaque de scellement en métal à usage unique
Magnis Tip Waste Bin	1 sac poubelle à usage unique

* Les pièces énumérées sont pour une boîte de consommables pour un seul cycle. Chaque kit de 96 réactions est fourni avec 12 boîtes individuelles (Réf. 5190-9712) de consommables pour un seul cycle, et chaque kit de 32 réactions est fourni avec 4 boîtes individuelles (Réf. 5191-5675) de consommables pour un seul cycle.

Tableau 23 Composants du kit Magnis Sample Input Strips

Référence (Taille du kit)	Composants fournis	Quantité et format
5190-9882 (96 réactions)	Magnis Sample Input Strips	12 bandes rouges vides avec opercule en aluminium
	Magnis Foil Seals	2 feuilles (6 bandes d'opercule en aluminium pour tubes en une bande par feuille)
5191-5676 (32 réactions)	Magnis Sample Input Strips	4 bandes rouges vides avec opercule en aluminium
	Magnis Foil Seals	1 feuille (6 bandes d'opercule en aluminium pour tubes en une bande par feuille)

Contenu du Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit (format d'origine)

Les Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits (format d'origine) contiennent les kits de composants répertoriés dans le [Tableau 24](#), avec le détail du contenu de chaque kit de composants du [Tableau 25](#) au [Tableau 31](#).

Tableau 24 Kits de composants fournis avec les Magnis SureSelect^{XT HS} Reagent Kits

Nom du kit de composants	Conditions de conservation	Réf. du kit de composants	
		96 réactions	32 réactions
Magnis SureSelect XT HS Probe Plate*	-80 °C*	La réf. varie ; reportez-vous au Tableau 25	La réf. varie ; reportez-vous au Tableau 25
Magnis SureSelect XT HS Reagent Plates, ILM	-20 °C	5190-9688	5191-5672
Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM	-20 °C	5190-9880	5191-5673
Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plates, ILM	+4 °C	5190-9692	5191-5674
Magnis Empty Consumables	Température ambiante	5190-9712	5191-5675
Magnis Sample Input Strips	Température ambiante	5190-9882	5191-5676

* La référence du kit G9730B ne comprend pas de Magnis SureSelect XT HS Probe Plate. À la place, le kit G9730B, configuré pour la configuration de la sonde pendant l'exécution, comprend des Magnis Probe Input Strips vides pour 12 cycles (Réf. 5190-9883), stockées à température ambiante.

Tableau 25 Références des Probe Plate

Réf. du kit de réactifs	Type de la Probe incluse	Réf. Probe Plate	Quantité par kit
G9731B (96 réactions)	Personnalisée 1–499 kb	5190-9690 ou 5190-9691*	1 plaque (12 bandes)
G9731A (32 réactions)	Personnalisée 1–499 kb	5191-5677 ou 5191-5678*	1 plaque (4 bandes)
G9732B (96 réactions)	Personnalisée 0,5–2,9 Mb	5190-9884 ou 5190-9955*	1 plaque (12 bandes)
G9732A (32 réactions)	Personnalisée 0,5–2,9 Mb	5191-5679 ou 5191-5680*	1 plaque (4 bandes)
G9733B (96 réactions)	Personnalisée 3–5,9 Mb	5190-9886 ou 5190-9956*	1 plaque (12 bandes)
G9733A (32 réactions)	Personnalisée 3–5,9 Mb	5191-5681 ou 5191-5682*	1 plaque (4 bandes)
G9734B (96 réactions)	Personnalisée 6–11,9 Mb	5190-9888 ou 5190-9957*	1 plaque (12 bandes)
G9734A (32 réactions)	Personnalisée 6–11,9 Mb	5191-5683 ou 5191-5684*	1 plaque (4 bandes)
G9735B (96 réactions)	Personnalisée 12–24 Mb	5190-9890 ou 5190-9958*	1 plaque (12 bandes)
G9735A (32 réactions)	Personnalisée 12–24 Mb	5191-5685 ou 5191-5686*	1 plaque (4 bandes)
G9771B (96 réactions)	Human All Exon V7	5191-5721	1 plaque (12 bandes)

Tableau 25 Références des Probe Plate

Réf. du kit de réactifs	Type de la Probe incluse	Réf. Probe Plate	Quantité par kit
G9771A (32 réactions)	Human All Exon V7	5191-5720	1 plaque (4 bandes)
G9730B (96 réactions)	Aucune (fournie avec des Magnis Probe Input Strips vides)	5190-9883 (Probe Input Strips vides)	12 bandes

* La référence de Probe Plate correspondant à votre type de sonde personnalisé est déterminée par Agilent lorsque vous passez commande d'un Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit. Les deux références indiquées pour chaque kit de réactifs sont entièrement compatibles avec les protocoles Magnis pris en charge dans la présente publication.

Tableau 26 Composants du kit Magnis SureSelect XT HS Reagent Plates, ILM

Référence (Taille du kit)	Composant fourni	Quantité et format
5190-9688 (96 réactions)	Magnis SureSelect XT HS Reagent Plate, ILM	12 plaques (utilisez 1 plaque par cycle)
5191-5672 (32 réactions)		4 plaques (utilisez 1 plaque par cycle)

Tableau 27 Composants du kit Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM

Référence (Taille du kit)	Composant fourni	Quantité et format
5190-9880 (96 réactions)	Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM	1 plaque de 12 bandes (utilisez 1 bande par cycle)
5191-5673 (32 réactions)		1 plaque de 4 bandes (utilisez 1 bande par cycle)

Tableau 28 Composants du kit Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plates, ILM

Référence (Taille du kit)	Composant fourni	Quantité et format
5190-9692 (96 réactions)	Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate, ILM	12 plaques (utilisez 1 plaque par cycle)
5191-5674 (32 réactions)		4 plaques (utilisez 1 plaque par cycle)

Tableau 29 Composants du kit Magnis Empty Consumables

Composants fournis	Quantité et format*
Magnis Deep-Well HSM Plate	1 plaque
Magnis 96-Well PCR Plate	1 plaque
Magnis Library Output Strip	1 tube en bande vert
Magnis QC Strip	1 tube en bande bleu
Magnis Foil Seals	1 feuille (6 bandes d'opercule en aluminium pour tubes en une bande)
Magnis Thermal Cycler Seal	1 plaque de scellement en métal à usage unique
Magnis Tip Waste Bin	1 sac poubelle à usage unique

* Les pièces énumérées sont pour une boîte de consommables pour un seul cycle. Chaque kit de 96 réactions est fourni avec 12 boîtes individuelles (Réf. 5190-9712) de consommables pour un seul cycle, et chaque kit de 32 réactions est fourni avec 4 boîtes individuelles (Réf. 5191-5675) de consommables pour un seul cycle.

Tableau 30 Composants du kit Magnis Sample Input Strips

Référence (Taille du kit)	Composants fournis	Quantité et format
5190-9882 (96 réactions)	Magnis Sample Input Strips	12 bandes rouges vides avec opercule en aluminium
	Magnis Foil Seals	2 feuilles (6 bandes d'opercule en aluminium pour tubes en une bande par feuille)
5191-5676 (32 réactions)	Magnis Sample Input Strips	4 bandes rouges vides avec opercule en aluminium
	Magnis Foil Seals	1 feuille (6 bandes d'opercule en aluminium pour tubes en une bande par feuille)

Tableau 31 Composants du kit Magnis Probe Input Strip

Référence (Taille du kit)	Composants fournis	Quantité et format
5190-9883 (96 réactions)	Magnis Probe Input Strip	12 bandes blanches vides avec opercule en aluminium
	Magnis Foil Seals	2 feuilles (6 bandes d'opercule en aluminium pour tubes en une bande par feuille)

Informations de référence relatives à SureSelect XT HS Indexes

Informations relatives à la position des plaques

Les amorces utilisées pour indexer les banques de séquençage sont fournies dans la Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM. Les plaques contiennent les index SureSelect XT HS A01-H04 dans des aliquots à usage unique dans chaque puits des tubes en bande contenus dans un support de plaque. La plaque fournie avec 32 kits de réaction (Réf. 5191-5673) contient un jeu de quatre (4) bandes marquées A1, A2, A3 ou A4, chacun des 32 index uniques A01-H04 fourni dans un seul puits. Reportez-vous au [Tableau 32](#) pour une carte des plaques.

Tableau 32 Carte des index pour Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM fournie avec des kits de 32 réactions

Colonne de la plaque	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Étiquette du tube en bande	A1	A2	A3	A4								
	A01	A02	A03	A04	—	—	—	—	—	—	—	—
	B01	B02	B03	B04	—	—	—	—	—	—	—	—
	C01	C02	C03	C04	—	—	—	—	—	—	—	—
	D01	D02	D03	D04	—	—	—	—	—	—	—	—
	E01	E02	E03	E04	—	—	—	—	—	—	—	—
	F01	F02	F03	F04	—	—	—	—	—	—	—	—
	G01	G02	G03	G04	—	—	—	—	—	—	—	—
	H01	H02	H03	H04	—	—	—	—	—	—	—	—

La plaque fournie avec des kits de 96 réactions (Réf. 5190-9880) contient 12 bandes, composées de trois jeux des quatre (4) bandes marquées A1, A2, A3 ou A4, chacun des 32 index uniques A01-H04 fourni dans trois puits. Reportez-vous au [Tableau 33](#) pour une carte des plaques. N'utilisez pas le même numéro d'Index Strip pour plusieurs cycles utilisés pour préparer les banques qui seront multiplexées pour NGS.

Tableau 33 Carte des index pour Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM fournie avec des kits de 96 réactions

Colonne de la plaque	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Étiquette du tube en bande	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A4
	A01	A02	A03	A04	A01	A02	A03	A04	A01	A02	A03	A04
	B01	B02	B03	B04	B01	B02	B03	B04	B01	B02	B03	B04
	C01	C02	C03	C04	C01	C02	C03	C04	C01	C02	C03	C04
	D01	D02	D03	D04	D01	D02	D03	D04	D01	D02	D03	D04
	E01	E02	E03	E04	E01	E02	E03	E04	E01	E02	E03	E04
	F01	F02	F03	F04	F01	F02	F03	F04	F01	F02	F03	F04
	G01	G02	G03	G04	G01	G02	G03	G04	G01	G02	G03	G04
	H01	H02	H03	H04	H01	H02	H03	H04	H01	H02	H03	H04

Séquences nucléotidiques des index (index)

La séquence nucléotidique de chaque index SureSelect XT HS est indiquée dans le [Tableau 34](#). Chaque index a une longueur de 8 nt, et les cycles de séquençage doivent être exécutés en utilisant des lectures d'index de 8 pb (reportez-vous à la [page 65](#)).

Tableau 34 Index SureSelect XT HS A01 à H04

Bande A1		Bande A2		Bande A3		Bande A4	
Index	Séquence	Index	Séquence	Index	Séquence	Index	Séquence
A01	GTCTGTCA	A02	GCGAGTAA	A03	AGCAGGAA	A04	CCGTGAGA
B01	TGAAGAGA	B02	GTCGTAGA	B03	AGCCATGC	B04	GA CTAGTA
C01	TTCACGCA	C02	GTGTTCTA	C03	TGGCTTCA	C04	GATAGACA
D01	AACGTGAT	D02	TATCAGCA	D03	CATCAAGT	D04	GCTCGGTA
E01	ACCACTGT	E02	TGGAACAA	E03	CTAAGGTC	E04	GGTGCGAA
F01	ACCTCCAA	F02	TGGTGGTA	F03	AGTGGTCA	F04	AACAACCA
G01	ATTGAGGA	G02	ACTATGCA	G03	AGATCGCA	G04	CGGATTGC
H01	ACACAGAA	H02	CCTAATCC	H03	ATCCTGTA	H04	AGTCACTA

MISE EN GARDE

Les séquences des index du système SureSelect XT HS A01 à H04 diffèrent des séquences du système Agilent's SureSelect XT A01 à H04.

Suivi post-cycle de l'identité des index (index)

L'Index Strip spécifique utilisée pour un cycle du Magnis Prep System est indiquée dans les **Post-Run Data**, accessibles depuis l'écran tactile Home. Sur l'écran **Post-Run Data**, ouvrez l'onglet **Labware Info** et, sous *Labware*, localisez la ligne *Index Strip* pour afficher diverses propriétés de l'Index Strip utilisée pour le cycle. Le numéro de l'Index Strip, indiqué par une valeur comprise entre 1 et 12, peut être visualisé en faisant défiler vers la partie la plus à droite de l'écran et en regardant dans la colonne *Index Strip*. Le numéro Index Strip équivalent de 1 à 12 est également présent dans le fichier journal du cycle.

Les index SureSelect XT HS spécifiques associés à chaque numéro d'Index Strip 1-12 figurent dans le [Tableau 35](#).

Tableau 35 Utilisation des numéros d'Index Strip à partir des Post-Run Data pour le suivi des index

Numéro <i>Index Strip</i> depuis le journal ou l'écran Post-Run Data	Étiquette du tube <i>Index Strip</i> (inscription)	Index par numéro d'échantillon dans le cycle							
		Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8
1	A1	A01	B01	C01	D01	E01	F01	G01	H01
2	A2	A02	B02	C02	D02	E02	F02	G02	H02
3	A3	A03	B03	C03	D03	E03	F03	G03	H03
4	A4	A04	B04	C04	D04	E04	F04	G04	H04
5	A1	A01	B01	C01	D01	E01	F01	G01	H01
6	A2	A02	B02	C02	D02	E02	F02	G02	H02
7	A3	A03	B03	C03	D03	E03	F03	G03	H03
8	A4	A04	B04	C04	D04	E04	F04	G04	H04
9	A1	A01	B01	C01	D01	E01	F01	G01	H01
10	A2	A02	B02	C02	D02	E02	F02	G02	H02
11	A3	A03	B03	C03	D03	E03	F03	G03	H03
12	A4	A04	B04	C04	D04	E04	F04	G04	H04

Guide de dépannage

Des directives relatives au dépannage sont incluses ci-dessous pour l'exécution des protocoles automatisés de préparation de banques SureSelect XT HS NGS sur le système Magnis NGS Prep System et pour les étapes de préparation des échantillons en amont et d'analyse des banques en aval. Pour le dépannage général de l'instrument Magnis, reportez-vous au Guide d'utilisation de l'instrument, publication K1007-90000.

Si l'utilisation de l'écran tactile pour la configuration du cycle présente des problèmes de maniabilité ou si l'écran tactile ne semble pas réactif

- ✓ Comme alternative aux commandes de l'écran tactile, vous pouvez utiliser une souris USB pour faire des sélections et saisir des données dans le logiciel Magnis. Connectez la souris à l'un des deux ports USB situés à l'avant de l'instrument. Une fois connectée, utilisez les fonctions pointer-cliquer de la souris pour effectuer des sélections sur l'interface qui s'affiche sur l'écran tactile.
- ✓ Redémarrez le système pour réinitialiser la fonctionnalité de l'écran tactile.

Si le voyant DEL de l'instrument devient rouge et que l'écran tactile affiche le message d'erreur « *Teach points are shifted. Please perform auto teaching from the Settings screen.* »

- ✓ Ce message d'erreur apparaît lorsque l'Instrument Health Check (IHC) ne réussit pas la vérification du point d'apprentissage, indiquant que les marqueurs des points d'apprentissage sur la platine de l'instrument peuvent être masqués ou que l'instrument doit effectuer un processus Auto Teaching au point d'apprentissage avant de commencer la configuration d'un cycle. Effectuez les étapes ci-dessous pour préparer l'instrument à un cycle :
 - Vérifiez que toutes les positions de la platine Magnis sont exemptes de consommables du kit et d'autres débris. La présence de tout matériel sur la platine de l'instrument peut empêcher la détection des marqueurs des points d'apprentissage.
 - Nettoyez la fenêtre du lecteur de codes-barres en suivant les instructions de nettoyage du Guide d'utilisation de l'instrument. Des débris ou des traces de doigt sur le scanner peuvent masquer les points d'apprentissage, entraînant un échec de la vérification.
 - Redémarrez le système. Après la connexion, l'instrument exécute un autre IHC. Si ce contrôle est réussi, vous pouvez reprendre le processus de configuration sans exécuter Auto Teaching. Si l'IHC échoue, exécutez Auto Teaching en suivant les étapes ci-dessous.
 - Sur l'écran Home, ouvrez l'écran **Settings** et appuyez sur **Auto Teaching**. Suivez les instructions sur l'écran tactile. Le processus Auto Teaching prend environ 30 minutes et nécessite la présence d'un opérateur pour le placement du matériel de laboratoire sur l'instrument.
 - Une fois Auto Teaching terminé, vous pouvez commencer la configuration du cycle en appuyant sur **Run Protocol** à partir de l'écran Home.

Si le voyant DEL de l'instrument devient rouge et que l'écran tactile affiche un message d'échec de l'Instrument Health Check (IHC)

- ✓ Agilent recommande de redémarrer l'instrument après une défaillance de l'IHC en suivant les étapes ci-dessous :
 - Depuis la boîte de dialogue d'erreur, appuyez sur **Cancel** pour refuser le lancement du test de diagnostic.
 - Appuyez sur l'icône d'erreur en bas de l'écran et enregistrez le code d'erreur pour une utilisation potentielle lors du dépannage avec le centre d'assistance Agilent.

- Mettez l'instrument hors tension en appuyant sur le bouton d'alimentation situé à l'avant de l'instrument.
- Vérifiez que toutes les positions de la platine Magnis sont exemptes de consommables du kit et d'autres débris. La présence de tout matériel sur la platine de l'instrument peut interférer avec l'IHC au redémarrage.
- Mettez l'instrument sous tension en appuyant sur le bouton d'alimentation situé à l'avant de l'instrument.
- Après la connexion, l'instrument exécute un autre IHC. Si ce contrôle est réussi, vous pouvez commencer ou redémarrer la configuration du cycle en appuyant sur **Run Protocol** depuis l'écran Home.

Si l'IHC échoue à nouveau après le redémarrage de l'instrument, contactez l'assistance technique internationale d'Agilent pour obtenir de l'aide.

Si un protocole est absent du menu Protocol de l'écran *Enter Run Info*

- ✓ Les protocoles de cycles Magnis visibles sur l'écran *Enter Run Info* de l'écran tactile et disponibles pour être exécutés sur votre instrument peuvent varier, selon la date d'achat de l'instrument, la date de disponibilité du protocole et de l'exécution des mises à jour sur votre instrument après l'achat. Si vous avez besoin d'un protocole qui n'est pas actuellement disponible sur votre instrument, visitez la [page de téléchargement des protocoles Magnis sur Agilent.com](#) pour plus d'informations.

Si le positionnement des tubes en bande dans le module refroidisseur est difficile

- ✓ Pour faciliter la mise en place correcte des tubes en bande dans le module refroidisseur, chargez la Sample strip remplie, l'Index strip et la Probe strip dans cet ordre de gauche à droite.
- ✓ Les opercules mal placés peuvent entraver le positionnement des tubes en bande lors du chargement du refroidisseur. Lors de la refermeture de la Sample input strip ou d'une Probe strip préremplie à l'aide d'un opercule, prenez soin d'appliquer l'opercule de manière uniforme, sans qu'il ne dépasse trop ou ne se plie.

Si l'écran *Verify Labware* signale un problème avec un ou plusieurs composants du matériel de laboratoire après avoir scanné les codes-barres du matériel de laboratoire

- ✓ Si la vérification de tout ou pratiquement tout le matériel de laboratoire a échoué, la fenêtre du lecteur de codes-barres doit peut-être être nettoyée. Reportez-vous au Guide d'utilisation de l'instrument pour les instructions de nettoyage. Une fois le nettoyage terminé, répétez l'étape *Verify Labware*.
- ✓ Si la vérification de seulement un ou quelques composants du matériel de laboratoire a échoué, appuyez sur l'icône d'erreur en bas de l'écran et développez les informations relatives à la position ayant échoué pour afficher le motif de l'échec.
 - **Si le lecteur de codes-barres n'a pas scanné un composant particulier du matériel de laboratoire**

Vérifiez que le matériel de laboratoire est présent à la position requise sur la platine et qu'il est correctement orienté, le code-barres faisant face à l'avant de l'instrument. Passez en revue les [page 30](#) à [page 34](#) pour les étapes complètes de chargement de la platine. Corrigez l'omission ou la ou les erreurs de positionnement, puis répétez l'étape *Verify Labware*. Si les composants du matériel de laboratoire ayant échoué sont présents et correctement positionnés, inspectez visuellement le code-barres pour vérifier son intégrité. Pour une numérisation réussie, les codes-barres doivent être exempts d'éraflures, de taches, de condensation, d'obstruction par les Foil Seals et d'écriture ou d'autres marques sur les articles en plastique. Si vous soupçonnez que le code-barres est endommagé ou obstrué, ajustez ou remplacez le composant du matériel de laboratoire et répétez l'étape *Verify Labware*.

- **Si le matériel de laboratoire scanné a dépassé sa date de péremption**

Remplacez tous les composants périmés par des composants non périmés, puis répétez l'étape *Verify Labware*. La date de péremption se trouve sur le Certificat d'analyse fourni avec chaque kit de composants contenant des réactifs préremplis. Les composants fournis sous forme d'articles en plastique vides n'ont pas de date de péremption.

- **Si la Reagent Plate et la Probe Input Strip lues sont identifiées comme étant du *wrong labware***

Quand la Reagent Plate et la Probe Input Strip plus particulièrement sont identifiées comme du *wrong labware*, il est important de vérifier que le bon protocole a été sélectionné pour le format du kit de réactifs chargé sur l'instrument. Vérifiez le format du kit de réactifs chargé pour le cycle, puis utilisez le tableau ci-dessous pour vérifier que le bon protocole a été sélectionné lors de la configuration du cycle. Si ce n'est pas le bon protocole qui a été sélectionné, revenez à l'écran *Enter Run Info* en appuyant sur la flèche de retour de l'écran tactile et sélectionnez le bon protocole dans le menu, en développant le menu si nécessaire. Après avoir sélectionné le bon protocole, utilisez les touches fléchées vers l'avant pour atteindre l'écran *Verify Labware*, puis répétez l'étape *Verify Labware*.

Kit de réactifs	Protocole de traitement correct
Kits de réactifs Magnis SureSelect XT HS Rev B fournis avec les Probe Input Strips préremplies	<i>SSEL XTHS-RevB-ILM</i> OU <i>LT-SSEL XTHS-RevB-ILM</i>
Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit fourni avec les Probe Input Strips vides (remplies au moment du cycle)	<i>SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM</i> OU <i>LT-SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM</i>
Kits de réactifs Magnis SureSelect XT HS dans leur format d'origine fournis avec les Probe Input Strips préremplies	<i>SureSelectXT HS-Illumina</i>
Kits de réactifs Magnis SureSelect XT HS dans leur format d'origine fournis avec les Probe Input Strips vides (remplies au moment du cycle)	<i>SureSelectXT HS-Illumina</i>

- **Si le matériel de laboratoire a été identifié comme du *wrong labware*, et que le protocole sélectionné est le bon**

Remplacez le matériel de laboratoire mal positionné par le bon composant de matériel de laboratoire et répétez l'étape *Verify Labware*.

Si un embout de micropipette non fixée se trouve sur la platine de l'instrument pendant le cycle

- ✓ Parfois, lorsque l'instrument éjecte des embouts usagés dans la poubelle, un embout peut rebondir et atterrir sur la platine de l'instrument. D'une main gantée, mettez l'embout dans la poubelle ou jetez-le comme vous le feriez lorsque vous videz la poubelle.

Si la boîte de dialogue de l'écran tactile *Turn off Chiller* masque l'écran du cycle après l'ouverture de la porte de l'instrument et le recueil des banques à la fin du cycle

- ✓ Si la porte de l'instrument est ouverte à la fin du cycle avant que les voyants DEL ne deviennent bleus (indiquant que toutes les étapes du cycle de l'instrument sont terminées) ou si la porte de l'instrument n'est que partiellement ouverte à la fin du cycle, la boîte de dialogue *Turn off Chiller* peut être conservée sur l'écran du cycle, masquant le contenu de l'écran. Pour les prochains cycles, attendez que les voyants DEL deviennent bleus, indiquant que l'instrument a atteint un état d'inactivité post-cycle, avant d'ouvrir la porte de l'instrument. Ouvrez complètement la porte (jusqu'à ce que les voyants DEL deviennent blancs) avant de recueillir vos échantillons.

Si l'affichage du *Time Remaining* sur l'écran tactile n'indique pas 0:00 juste avant de passer aux écrans de fin de cycle/de prélèvement d'échantillons

- ✓ La valeur du *Time Remaining* affichée sur l'écran tactile n'est qu'une estimation du temps restant du cycle. Le compteur peut ajuster l'estimation du temps restant pendant l'exécution et peut afficher un temps supérieur à 0:00 lorsque le système est prêt à commencer la collecte d'échantillons. Cela n'est pas indicateur de problème au niveau du cycle ou de l'instrument.

Si la taille des fragments de la banque est plus importante que prévue dans les électrophérogrammes

- ✓ La fragmentation peut ne pas être optimale. Pour des échantillons d'ADN intacts et de haute qualité, assurez-vous que la fragmentation est effectuée à l'aide du protocole de fragmentation sur deux cycles fourni, y compris toutes les étapes de centrifugation et d'agitation au vortex.
- ✓ Toute bulle présente sur le filament du microTUBE peut perturber toute la fragmentation. Centrifugez le microTUBE pendant 30 secondes avant le premier cycle de fragmentation pour vous assurer que toutes les bulles sont éliminées.

Si le rendement des banques post-capture est faible

- ✓ Il se peut que le nombre de cycles de réaction de polymérisation en chaîne doive être optimisé. Répétez la préparation des banques et l'enrichissement des cibles pour l'échantillon, ce qui augmente le nombre de cycles de réaction de polymérisation en chaîne post-capture de 1 à 2 cycles. Seuls les utilisateurs ayant un niveau d'accès *Advanced* peuvent modifier le nombre de cycles de réaction de polymérisation en chaîne post-capture. Reportez-vous à la [page 39](#) pour plus d'informations.
- ✓ Vérifiez que l'échantillon d'ADN d'entrée est conforme aux directives relatives à la qualité et à la plage de concentration précisées dans l'« [Annexe 1 : Directives relatives à la préparation des échantillons d'ADN](#) ».
- ✓ Vérifiez que le cycle a été configuré pour la qualité et la concentration appropriées de l'ADN d'entrée. Les réglages peuvent être vérifiés dans l'onglet *Run Setup* de l'écran *Post Run Data* pour le cycle.
- ✓ Vérifiez que la fragmentation de l'ADN a été exécutée dans un Low TE Buffer, et non dans de l'eau. La fragmentation des échantillons d'ADN dans l'eau réduit le rendement global et la complexité des banques.
- ✓ Assurez-vous que les cycles sont exécutés dans des conditions d'humidité comprises entre 30 et 70 % (sans condensation). L'utilisation du système à des niveaux d'humidité en dehors de cette plage peut avoir un impact sur les performances et se traduire par un rendement des banques inférieur ou nul.
- ✓ Un rendement très faible ou nul pour un ou plusieurs échantillons dans le cycle peut indiquer un problème au niveau des embouts de pipette utilisés dans le cycle. Lors du chargement des embouts sur l'instrument, vérifiez que toutes les boîtes d'embouts sont totalement remplies et qu'elles sont à plat et à l'intérieur des cadres surélevés par des pattes des plateformes. Veillez à ce que les boîtes d'embouts ne soient pas déplacées lors du retrait des couvercles des boîtes d'embouts.

Si les lectures de séquençage ne couvrent pas les régions génomiques attendues

- ✓ Le mauvais type de sonde a peut-être été utilisé dans l'exécution du protocole pour l'enrichissement des cibles. Examinez le suivi des échantillons et des sondes qui a été enregistré au cours du cycle. Si nécessaire, répétez l'exécution du protocole avec le type de sonde adapté.

Dans ce manuel

Ce guide fournit des instructions pour la préparation automatisée des banques de séquençage multiplex d'extrémités appariées Illumina enrichies en cibles SureSelect^{XT} HS avec le système Magnis NGS Prep System.

