

SureSelect^{XT} HS Target Enrichment utilizzando il sistema Magnis NGS Prep System

Protocollo

Solo per l'uso con finalità di ricerca. Non utilizzare per procedure diagnostiche.

Versione D0, ottobre 2021



Avviso

© Agilent Technologies, Inc. 2019, 2021

Nessuna parte di questo manuale può essere riprodotta in qualsiasi forma o con qualsiasi mezzo (compresa la memorizzazione elettronica e il recupero o la traduzione in una lingua straniera) senza previo accordo e consenso scritto da parte di Agilent Technologies, Inc., come disciplinato dalle leggi degli Stati Uniti e internazionali sul copyright.

Codice parte manuale

G9731-90012

Edizione

Versione D0, ottobre 2021

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

Assistenza tecnica

Per Stati Uniti e Canada

Chiamare il numero 800-227-9770
(opzione 3, 4, 4)

In alternativa, inviare un'e-mail all'indirizzo
ngs.support@agilent.com

Per tutte le altre regioni

I dettagli di contatto dei centri di vendita e assistenza Agilent di tutto il mondo sono disponibili all'indirizzo

www.agilent.com/genomics alla voce **Contatti**.

Garanzia

Il materiale contenuto nel presente documento viene fornito così "com'è" ed è soggetto a modifiche senza preavviso nelle edizioni future. Inoltre, nella misura massima consentita dalle leggi in vigore, Agilent esclude qualunque garanzia, espressa o implicita, in relazione al presente manuale e alle informazioni contenute, incluse, a titolo di esempio, le garanzie implicite di commerciabilità e idoneità a uno scopo specifico. Agilent non deve essere ritenuta responsabile per gli errori o i danni incidentali o consequenziali connessi alla fornitura, all'uso o alle prestazioni di questo documento o di qualsiasi informazione ivi contenuta. Qualora Agilent e l'utente abbiano sottoscritto un accordo separato, con termini di garanzia che coprono il materiale di questo documento e sono in conflitto con le presenti condizioni, hanno la precedenza i termini di garanzia contenuti nell'accordo separato.

Licenze tecnologiche

L'hardware e/o software descritto in questo documento sono forniti sotto licenza e possono essere utilizzati o copiati solo in conformità con i termini di tale licenza.

Legenda dei diritti limitati

Diritti limitati dal Governo degli Stati Uniti. I diritti sul software e sui dati tecnici concessi al governo federale includono solo i diritti abitualmente forniti ai clienti finali. Agilent fornisce questa licenza commerciale abituale per il software e i dati tecnici ai sensi di FAR 12.211 (Dati tecnici) e 12.212 (Software per computer) e, per il Dipartimento della Difesa, DFARS 252.227-7015 (Dati tecnici articoli commerciali) e DFARS 227.7202-3 (Diritti nel software commerciale o nella documentazione del software per computer).

Avviso per l'acquirente

Questo prodotto viene fornito nell'ambito di un accordo tra Bio-Rad Laboratories e Agilent Technologies Inc. e la produzione, l'uso, la vendita o l'importazione di questo prodotto è coperta dal brevetto statunitense n. 6,627,424 e dal brevetto europeo n. 1 283 875 81, detenuto da Bio-Rad Laboratories, Inc. L'acquisto di questo prodotto conferisce all'acquirente il diritto non trasferibile di utilizzare la quantità acquistata del prodotto e dei componenti del prodotto per effettuare PCR (ma non include PCR in tempo reale) nel campo della ricerca (compresi tutti i campi di ricerca applicata, inclusi (ma non solo) gli ambiti della medicina legale, della sperimentazione animale e dei test alimentari) e per effettuare PCR in tempo reale nei campi diagnostici e prognostici. Non sono concessi diritti per l'uso di questo prodotto per la PCR in tempo reale nel campo della ricerca, compresi tutti i campi di ricerca applicata (inclusi, ma non solo, gli ambiti della medicina legale, della sperimentazione sugli animali e dei test sugli alimenti).

Avvisi di sicurezza

ATTENZIONE

Un avviso di **ATTENZIONE** indica un pericolo. Richiama l'attenzione su una procedura operativa, pratica o simili che, se non correttamente eseguita o rispettata, potrebbe causare danni al prodotto o la perdita di dati importanti. Non procedere oltre un avviso di **ATTENZIONE** fino a quando le condizioni indicate non sono state pienamente comprese e soddisfatte.

AVVERTENZA

Un avviso di **AVVERTENZA** indica un pericolo. Richiama l'attenzione su una procedura operativa, pratica o simili che, se non correttamente eseguita o rispettata, potrebbe causare lesioni personali o morte. Non procedere oltre l'avviso di **AVVERTENZA** fino a quando le condizioni indicate non sono state pienamente comprese e soddisfatte.

In questo manuale...

Questo manuale fornisce le istruzioni per la preparazione automatica delle librerie SureSelect^{XT HS} con arricchimento dei target per il sequenziamento paired-end multiplex (in parallelo) Illumina effettuata utilizzando il sistema Magnis NGS Prep System.

Il sistema SureSelect^{XT HS} viene utilizzato per preparare campioni di librerie indicizzati con codici a barre molecolari prima dell'arricchimento dei target per consentire il sequenziamento ad alta sensibilità sulla piattaforma Illumina.

- 1 Premessa
- 2 Preparazione di librerie di sequenziamento con Magnis NGS Prep System
- 3 Appendice 1: linee guida per la preparazione dei campioni di DNA
- 4 Appendice 2: uso di strip di sonde preparate al momento della corsa
- 5 Appendice 3: linee guida per l'elaborazione di campioni di DNA dopo la corsa per l'NGS
- 6 Riferimenti

Novità della versione D0

- Supporto per i protocolli Magnis SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM e LT-SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM, impostati utilizzando un Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit (PN G9730D), fornito con strip di ingresso sonda vuote (EPIS). Vedere [“Appendice 2: uso di strip di sonde preparate al momento della corsa”](#) da [pagina 54](#) a [pagina 57](#) per istruzioni dettagliate sulla configurazione delle strip di ingresso sonda per questo protocollo. Per informazioni sul Reagent Kit PN G9730D, vedere [Tabella 1](#) a pagina 11 e [Tabella 16](#) a pagina 73. Per informazioni sulla compatibilità del protocollo Magnis e del formato del kit reagenti, vedere [Tabella 7](#) a pagina 27 e informazioni sulla risoluzione dei problemi a [pagina 86](#).
- Supporto per i Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit PN G9736C e G9736D, forniti con piastre per sonda personalizzate da 24-50 Mb, e aggiornamenti al codice parte aggiuntivo e alle informazioni sulla denominazione delle piastre per sonda fornite con i Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit. Vedere [Tabella 1](#) a pagina 11, [Tabella 16](#) e [Tabella 17](#) a pagina 74, [Tabella 18](#) a pagina 74, e vedere [passaggio 5](#) a [pagina 24](#).
- Aggiornamenti alle descrizioni della piastra per sonde per il Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit (formato originale). Vedere la sezione [Tabella 25](#) a pagina 77.
- Aggiornamenti alle immagini dell'interfaccia del touch screen a [pagina 28](#), [pagina 39](#), [pagina 40](#), [pagina 41](#) e [pagina 42](#).
- Aggiornamenti delle linee guida dei kit di sequenziamento Illumina nella [Tabella 15](#) a pagina 64.
- Aggiornamenti delle informazioni sulla risoluzione dei problemi sul display Time Remaining del touch screen Magnis (vedere [pagina 86](#)).

Novità della versione C0

- Supporto per l'uso del protocollo LT-SSEL XTHS-RevB-ILM con i Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit. Per informazioni su come selezionare il protocollo compatibile con il formato del kit reagenti in uso e con gli altri parametri del flusso di lavoro durante la configurazione della corsa, vedere [pagina 27](#). Vedere anche *Risoluzione dei problemi* a [pagina 86](#).
- Il Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit fornito con le strip di ingresso sonda vuote, c.p. G9730D, non è al momento disponibile; vedere gli aggiornamenti degli elenchi dei Magnis Reagent Kit supportati nella [Tabella 1](#) a pagina 11 e nella [Tabella 16](#) a pagina 73. Le informazioni sull'uso del protocollo SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM per l'elaborazione delle corse impostate con il Reagent Kit G9730D sono state rimosse dalla [Tabella 7](#) a pagina 27 e dall'[“Appendice 2: uso di strip di sonde preparate al momento della corsa”](#) da [pagina 54](#) a [pagina 57](#). Visitare il sito [Agilent.com](#) per aggiornamenti sul Magnis Reagent Kit e sulla disponibilità dei protocolli.

Novità della versione B0

- Supporto per Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit, trattati con il protocollo SSEL XTHS-RevB-ILM. I kit reagenti Rev B includono componenti riformattati (Magnis SureSelect XT HS Reagent Plates Rev B ILM e un Magnis SureSelect XT HS Probe Plate, Pre-filled Single Well Format) che devono essere trattati con un protocollo RevB. Per informazioni sui componenti del Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit, vedere da [pagina 74](#) a [pagina 76](#). Le istruzioni contenute in questo documento includono anche il trattamento dei campioni utilizzando il formato del kit reagenti originale. Per informazioni sui componenti del Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit (formato originale), vedere da [pagina 77](#) a [pagina 79](#). Vedere la [Tabella 1](#) a pagina 11 per un elenco riassuntivo di tutti i kit

reagenti supportati. Per le attuali istruzioni di configurazione della piastra di reagenti e della piastra per sonde, vedere da [pagina 23](#) a [pagina 24](#). Per informazioni su come selezionare il protocollo compatibile con il formato del kit reagenti in uso durante la configurazione dell'esecuzione, vedere [pagina 27](#).

- Supporto per sonde personalizzate prodotte con processi di progettazione e produzione aggiornati a partire da agosto 2020. Le sonde per tutti i nuovi progetti personalizzati vengono prodotte con il processo aggiornato. Le sonde per i progetti personalizzati esistenti, creati prima di agosto 2020, vengono prodotte utilizzando il processo di produzione precedente. Vedere la [Tabella 18](#) a pagina 74 per informazioni sulle sonde fornite con i Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit. Vedere la [Tabella 25](#) a pagina 77 per informazioni sulle sonde fornite con Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits nel formato originale.
- Supporto per Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits con Human All Exon V8 Probe ([Tabella 1](#) a pagina 11, [Tabella 16](#) a pagina 73 e [Tabella 18](#) a pagina 74).
- Aggiornamenti alle istruzioni per la manipolazione dei componenti del kit da [pagina 22](#) a [pagina 23](#), incluse le istruzioni per lo scongelamento della Reagent Plate e i dettagli per la manipolazione delle coperture del sigillo e degli astucci delle piastre.
- Aggiornamenti minori delle istruzioni di caricamento del modulo del refrigeratore da [pagina 33](#) a [pagina 34](#).
- Aggiunta di un igrometro all'elenco delle **Strumenti richiesti** nella [Tabella 2](#) a pagina 12 e aggiunta della fase di misurazione dell'umidità alle istruzioni di configurazione dello strumento a [pagina 20](#).
- Aggiornamenti alle informazioni di ordinazione per la centrifuga a cestelli oscillanti ([Tabella 2](#) a pagina 12) e per 1X Low TE Buffer e il fluorimetro Qubit ([Tabella 3](#) a pagina 13).
- Supporto per il controllo qualità della libreria che utilizza Agilent 5200 Fragment Analyzer (vedere nota a piè di pagina nella [Tabella 3](#) a pagina 13 e *Nota* a [pagina 59](#)).
- Aggiornamenti all'**"Appendice 2: uso di strip di sonde preparate al momento della corsa"** da [pagina 54](#) a [pagina 57](#). Gli aggiornamenti includono il supporto per il protocollo *SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM*, impostato utilizzando un Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit fornito con strip di ingresso della sonda vuote (EPIS).
- Aggiornamenti alla *Risoluzione dei problemi* a [pagina 85](#), incluse le informazioni sull'accesso al protocollo, sull'inserimento della strip nella provetta e sugli indicatori *Verify Labware* per la mancata corrispondenza tra il protocollo e il materiale di laboratorio.
- Aggiornamento a [pagina 9](#) per includere la descrizione delle piattaforme di sequenziamento compatibili e aggiornamenti alle linee guida sui kit di sequenziamento Illumina nella [Tabella 15](#) a pagina 64.
- Eliminazione delle informazioni per l'ordinazione di glicole etilenico dalla [Tabella 6](#) a pagina 14. Vedere [pagina 47](#) e [pagina 51](#) per gli aggiornamenti relativi alle istruzioni di impostazione della frammentazione del DNA.
- Aggiunta di informazioni per l'ordinazione dell'analisi D1000 ScreenTape nella [Tabella 6](#) a pagina 14.
- Aggiornamento delle informazioni di contatto dell'assistenza tecnica (vedere [pagina 2](#)).

Sommario

1 Premessa 8

Panoramica del flusso di lavoro 9

Avvertenze di sicurezza 10

Materiali necessari 11

Materiali necessari per le corse SureSelect XT HS sul sistema Magnis Prep System 11

Materiali necessari per la preparazione e l'analisi dei campioni di DNA 13

Materiali opzionali 14

2 Preparazione di librerie di sequenziamento con Magnis NGS Prep System 15

Informazioni critiche sul tracciamento dei campioni 16

Orientamento dei campioni nei pozzetti delle Magnis Sample Input Strip 16

Assegnazione dei campioni alle posizioni dei pozzetti nel software di Magnis 17

Preparazione dei campioni di DNA per la corsa 19

Preparazione dello strumento Magnis e dei reagenti per la corsa 20

Passaggio 1. Preparazione dello strumento per l'esecuzione di un protocollo 20

Passaggio 2. Preparazione dei reagenti e dei contenitori in plastica di
SureSelect^{XT HS} 22

Esecuzione del protocollo di preparazione delle librerie 26

Passaggio 1. Avvio del protocollo e immissione dati corsa 27

Passaggio 2. Preparazione del deck 29

Passaggio 3. Verifica contenitori 36

Passaggio 4. Immissione dati campioni 38

Passaggio 5. Conferma delle impostazioni e avvio della corsa 39

Passaggio 6. Raccolta dei campioni finali delle librerie dallo strumento 41

Passaggio 7. Pulizia dello strumento dopo la corsa 44

3 Appendice 1: linee guida per la preparazione dei campioni di DNA 45

I. Preparazione di campioni di DNA di alta qualità per le corse su Magnis 46

Passaggio 1. Preparazione, quantificazione e qualificazione di campioni di
DNA genomico 46

Passaggio 2. Frammentazione del DNA 46

II. Preparazione di campioni di DNA derivati da campioni FFPE per le corse su
Magnis 49

Passaggio 1. Preparazione del DNA genomico estratto da campioni FFPE 49

Passaggio 2. Qualificazione e quantificazione di campioni di DNA estratti da
campioni FFPE 49

Passaggio 3. Frammentazione dei campioni di DNA ottenuti da campioni FFPE 51

4 Appendice 2: uso di strip di sonde preparate al momento della corsa 54

Preparazione di strip di sonde al momento della corsa **55**

Inserimento dei dati della sonda nel software di Magnis durante la configurazione della corsa **57**

5 Appendice 3: linee guida per l'elaborazione di campioni di DNA dopo la corsa per l'NGS 58

Passaggio 1. Analisi di quantità e qualità dei campioni di DNA delle librerie **59**

Passaggio 2. Raggruppamento dei campioni per il sequenziamento in parallelo (opzionale) **62**

Passaggio 3. Preparazione dei campioni per il sequenziamento **63**

Passaggio 4. Esecuzione della corsa di sequenziamento e analisi dei dati **65**

Linee guida per l'impostazione di corse di sequenziamento sugli strumenti HiSeq/NextSeq/NovaSeq **65**

Linee guida per l'impostazione di corse di sequenziamento sullo strumento MiSeq **68**

Risorse per l'analisi delle sequenze **71**

6 Riferimenti 72

Contenuto del kit reagenti **73**

Contenuto del Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit **74**

Contenuto del Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit (formato originale) **77**

Informazioni di riferimento per gli indici (index) SureSelect XT HS **80**

Informazioni sulle posizioni delle piastre **80**

Sequenze nucleotidiche degli indici **82**

Tracciamento dell'identità degli indici dopo la corsa **83**

Guida per la risoluzione dei problemi **84**

1

Premessa

Panoramica del flusso di lavoro 9

Avvertenze di sicurezza 10

Materiali necessari 11

Materiali necessari per le corse SureSelect XT HS sul sistema Magnis Prep System 11

Materiali necessari per la preparazione e l'analisi dei campioni di DNA 13

Materiali opzionali 14

Questo capitolo contiene informazioni da leggere e comprendere prima di iniziare.

Panoramica del flusso di lavoro

Il flusso di lavoro per l'arricchimento dei target con SureSelect^{XT HS} utilizzando il sistema Magnis NGS Prep System è riassunto nella [Figura 1](#). Una volta caricati i campioni di DNA genomico frammentato, i reagenti predistribuiti sulle piastre e i contenitori da laboratorio, il sistema di preparazione Magnis NGS Prep System esegue tutte le fasi di preparazione delle librerie di SureSelect^{XT HS} e di gestione e incubazione dei liquidi per l'arricchimento dei target. Una volta completata la corsa sul sistema Magnis NGS Prep System, le librerie sottoposte ad arricchimento dei target sono pronte per essere raggruppate per la preparazione del campione per NGS multiplex e analisi delle sequenze, utilizzando i sequenziatori Illumina HiSeq, MiSeq, NextSeq 500 o NovaSeq 6000.

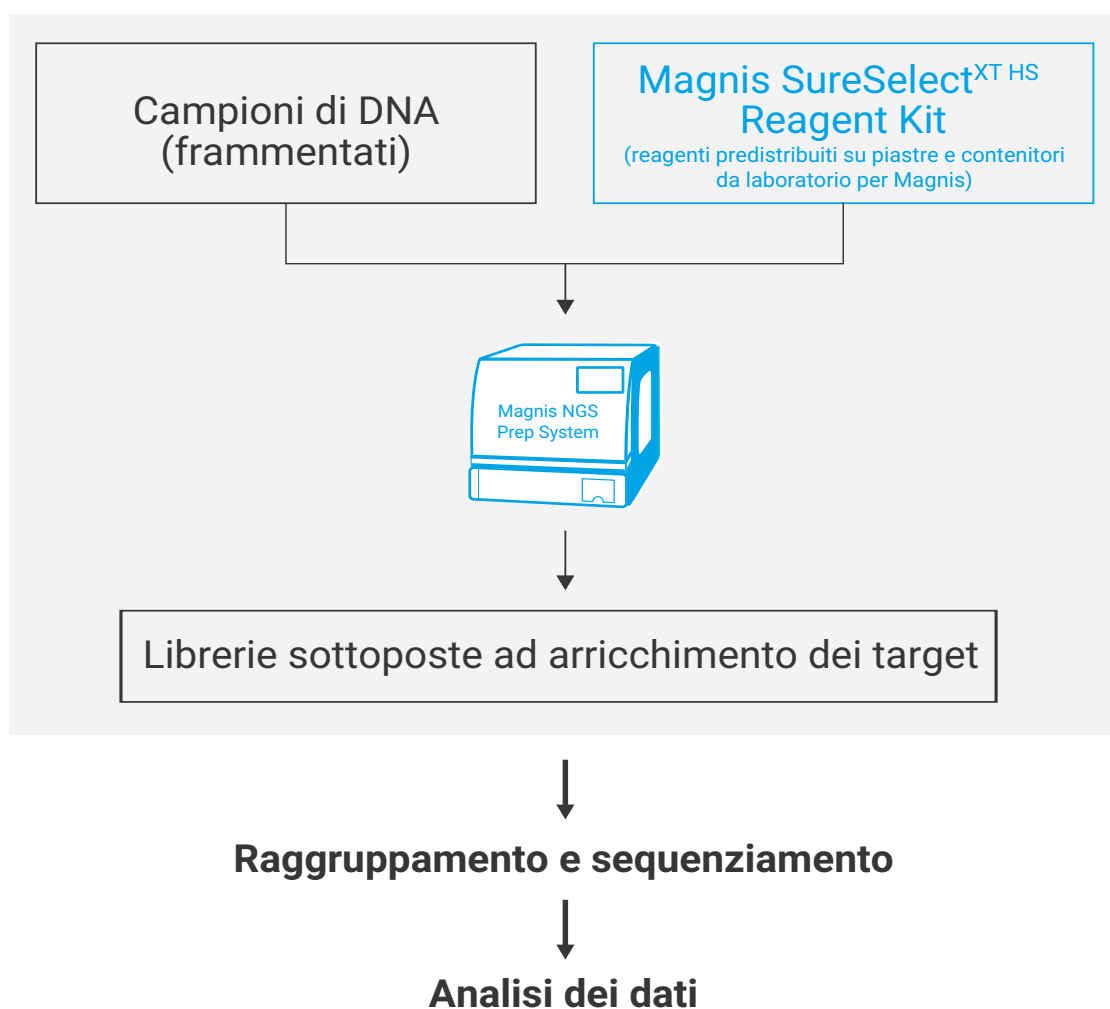


Figura 1 Flusso di lavoro complessivo di preparazione dei campioni per NGS con Magnis NGS Prep System.

Avvertenze di sicurezza

ATTENZIONE

Lavorando in laboratorio, indossare appropriati dispositivi di protezione individuale (PPE o DPI).

Pericolo di esposizione a luce ultravioletta (UV)

Lo sportello e i pannelli laterali dello strumento Magnis non sono trasparenti alla luce UV, quindi il rischio di esposizione è ridotto al minimo. Tuttavia, è comunque necessario prendere le precauzioni indicate di seguito.

- Durante la decontaminazione con luce UV del deck dello strumento, non guardare direttamente o indirettamente la fonte di luce UV.
- Eseguire sempre la decontaminazione con lo sportello dello strumento chiuso e bloccato. Lo sportello dello strumento è programmato per rimanere bloccato quando la luce UV è accesa.
- I tubi UV di ricambio devono essere forniti da Agilent e devono essere installati da un tecnico Agilent o da un fornitore di servizi autorizzato da Agilent.

Pericolo di ustioni

- Durante l'esecuzione del protocollo, il blocco termico e gli altri componenti del modulo termociclatore raggiungono rapidamente temperature superiori a 50 °C. Per garantire un utilizzo sicuro, lo sportello dello strumento deve rimanere chiuso durante le corse. Lo strumento è programmato per mantenere lo sportello bloccato mentre il protocollo viene eseguito.
- Utilizzare solo materiali (piastre, sigilli adesivi, pellicole di alluminio, tappetini) Agilent destinati a essere utilizzati su Magnis NGS Prep System. Questi materiali sono sufficientemente stabili al variare della temperatura (fino a 120 °C).

Materiali necessari

Materiali necessari per le corse SureSelect XT HS sul sistema Magnis Prep System

Tabella 1 Kit reagenti supportati (selezionarne uno)

Descrizione	96 reazioni [*]	32 reazioni [†]
Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit:	Agilent	Agilent
con Tier 1 Probe (1-499 kb)	c.p. G9731D	c.p. G9731C
con Tier 2 Probe (0,5-2,9 Mb)	c.p. G9732D	c.p. G9732C
con Tier 3 Probe (3-5,9 Mb)	c.p. G9733D	c.p. G9733C
con Tier 4 Probe (6-11,9 Mb)	c.p. G9734D	c.p. G9734C
con Tier 5 Probe (12-24 Mb)	c.p. G9735D	c.p. G9735C
con Probe 24-50 Mb	c.p. G9736D	c.p. G9736C
con Human All Exon V7 Probe	c.p. G9771D	c.p. G9771C
con Human All Exon V8 Probe	c.p. G9772D	c.p. G9772C
con Magnis Probe Input Strips vuote [‡]	c.p. G9730D	Non fornito
Per un elenco dei contenuti del kit, vedere da pagina 74 a pagina 76 .		
OPPURE		
Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit (formato originale):	Agilent	Agilent
con Probe 1-499 kb	c.p. G9731B	c.p. G9731A
con Probe 0,5-2,9 Mb	c.p. G9732B	c.p. G9732A
con Probe 3-5,9 Mb	c.p. G9733B	c.p. G9733A
con Probe 6-11,9 Mb	c.p. G9734B	c.p. G9734A
con Probe 12-24 Mb	c.p. G9735B	c.p. G9735A
con Human All Exon V7 Probe	c.p. G9771B	c.p. G9771A
con Magnis Probe Input Strips vuote [‡]	c.p. G9730B	Non fornito
Per un elenco dei contenuti del kit, vedere da pagina 77 a pagina 79 .		

* I kit da 96 reazioni sono predisposti per 12 corse da 8 campioni ciascuna.

† I kit da 32 reazioni sono predisposti per 4 corse da 8 campioni ciascuna.

‡ La sonda deve essere acquistata separatamente. Per informazioni sul riempimento della strip Magnis Probe Input Strip per la corsa, vedere [pagina 55](#).

Tabella 2 Strumenti richiesti

Descrizione	Fornitore e codice parte
Magnis NGS Prep System*	Agilent c.p. G9710AA
Puntali per pipettaggio robotico (sterili, con filtro, da 250 µl)	Agilent c.p. G9477G
Igrometro	Registratore di dati di temperatura/umidità tracciabile, Cole-Parmer c.p. 18004-13 o equivalente
Miscelatore vortex	Vortex Genie-2, VWR c.p. 58815-234 o equivalente
Microcentrifuga	Microcentrifuga Eppendorf, modello 5417C o equivalente [†]
Centrifuga a cestelli oscillanti	Centrifuga Eppendorf modello 5804 con rotore A-2-DWP o equivalente [‡]
Pipette (con capacità di 2, 10, 20 e 200 µl)	Pipette Rainin Pipet-Lite Pipette o equivalenti
Puntali sterili per pipette, con barriera di contenimento degli aerosol, privi di nucleasi	Generici fornitori di attrezzature da laboratorio
Congelatori (2) impostati su -20 °C e -80 °C	Generici fornitori di attrezzature da laboratorio
Frigorifero, impostato a +4 °C	Generici fornitori di attrezzature da laboratorio
Contenitore con ghiaccio	Generici fornitori di attrezzature da laboratorio
Guanti privi di polvere	Generici fornitori di attrezzature da laboratorio

* I kit di reagenti Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit e i protocolli descritti in questa pubblicazione sono compatibili anche con il sistema Magnis Dx NGS Prep System (c.p. K1007AA).

† Il rotore della centrifuga deve poter ospitare le strip di provette fornite con i Magnis SureSelectXT HS Reagent Kit.

‡ Il rotore della centrifuga deve poter ospitare le piastre con pozzetti profondi fornite con i Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit. Non è necessario disporre di un sistema di refrigerazione.

Materiali necessari per la preparazione e l'analisi dei campioni di DNA

Tabella 3 Materiali necessari per la preparazione e l'analisi dei campioni di DNA (tutti i tipi di campioni)

Descrizione	Fornitore e codice parte
1X Low TE Buffer (10 mM di Tris-HCl, pH 7,5-8,0, 0,1 mM di EDTA)	Thermo Fisher Scientific c.p. 12090-015, o equivalente
Qubit BR dsDNA Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
100 analisi	c.p. Q32850
500 analisi	c.p. Q32853
Fluorimetro Qubit	Thermo Fisher Scientific c.p. Q33238
Provette per analisi Qubit	Thermo Fisher Scientific c.p. Q32856
Sistema di preparazione dei campioni Covaris	Covaris modello E220
Portacampioni Covaris microTUBE	Covaris c.p. 520045
Sistema di analisi del DNA e materiali di consumo:*	
Agilent 4150 TapeStation	Agilent c.p. G2992AA
OPPURE	
Agilent 4200 TapeStation	Agilent c.p. G2991AA
E	
Strip di provette da 8 pozzetti compatibili con TapeStation	Agilent c.p. 401428
Strip di tappi per provette da 8 pozzetti	Agilent c.p. 401425
High Sensitivity D1000 ScreenTape	Agilent c.p. 5067-5584
High Sensitivity D1000 Reagents	Agilent c.p. 5067-5585

* Agilent 2100 Bioanalyzer (c.p. G2939BA) e High Sensitivity DNA Kit (c.p. 5067-2646) o Agilent 5200 Fragment Analyzer (c.p. M5310AAA) e HS NGS Fragment Kit (c.p. DNF-474-0500) possono essere utilizzati anche per l'analisi del DNA di librerie.

Tabella 4 Materiali richiesti; solo campioni di DNA di alta qualità

Descrizione	Fornitore e codice parte
Sistema di purificazione del gDNA di alta qualità, ad esempio:	
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
50 campioni	c.p. 51304
250 campioni	c.p. 51306

Tabella 5 Materiali richiesti; solo campioni di DNA fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE)

Descrizione	Fornitore e codice parte
Sistema di purificazione per gDNA FFPE, ad esempio:	Qiagen
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, 50 campioni	c.p. 56404
Deparaffinization Solution	c.p. 19093
Sistema di valutazione dell'integrità del DNA FFPE:	
Agilent NGS FFPE QC Kit (metodo raccomandato)	Agilent
16 reazioni	c.p. G9700A
96 reazioni	c.p. G9700B
OPPURE	
Sistema di analisi TapeStation Genomic DNA:*	Agilent
Genomic DNA ScreenTape	c.p. 5067-5365
Genomic DNA Reagents	c.p. 5067-5366

* Sono necessari anche il sistema 4150 TapeStation o 4200 TapeStation di Agilent e contenitori in plastica compatibili. Vedere la [Tabella 3](#) sopra per i dati per gli ordini.

Materiali opzionali

Tabella 6 Informazioni sui fornitori dei materiali opzionali indicati nei protocolli

Descrizione	Finalità	Fornitore e codice parte
Salviette con candeggina diluita (10%)	Pulizia della superficie del deck dello strumento (vedere pagina 20)*	Hype-Wipe Bleach Towelettes (VWR c.p. 16200-218) o equivalenti
Salviette con alcol (70%)	Pulizia della superficie del deck dello strumento (vedere pagina 20)*	VWR Pre-Moistened Clean Wipes (VWR c.p. 21910-110) o equivalenti
Salviette asciutte, antigraffio e che non lasciano residui	Pulizia della superficie della finestra del lettore di codici a barre	Salviette Kimwipes (VWR c.p. 21905-026) o equivalenti
D1000 ScreenTape e D1000 Reagents	Analisi di campioni per QC opzionali delle librerie di pre-acquisizione utilizzando il sistema Agilent TapeStation 4200/4150 (vedere pagina 43)	Agilent c.p. 5067-5582 e c.p. 5067-5583
Tween 20	Spazio di stoccaggio delle librerie di sequenziamento (vedere pagina 62)	Sigma-Aldrich c.p. P9416-50ML

* Per la decontaminazione di routine dello strumento, Agilent consiglia di utilizzare i programmi di decontaminazione mediante luce UV dello strumento Magnis. Se è necessaria una pulizia con solventi, consultare le istruzioni complete sulla pulizia delle superfici contenute nel manuale utente dello strumento. Prima di utilizzarli, applicare i solventi consentiti su un supporto solido, come un panno. Non spruzzare acqua, candeggina, alcool o altri liquidi all'interno dello strumento. Prima di utilizzarli, rimuovere l'eventuale liquido in eccesso dai panni o dalle salviette per non rischiare di introdurre liquidi nei componenti dello strumento.

2

Preparazione di librerie di sequenziamento con Magnis NGS Prep System

Informazioni critiche sul tracciamento dei campioni	16
Orientamento dei campioni nei pozzetti delle Magnis Sample Input Strip	16
Assegnazione dei campioni alle posizioni dei pozzetti nel software di Magnis	17
Preparazione dei campioni di DNA per la corsa	19
Preparazione dello strumento Magnis e dei reagenti per la corsa	20
Passaggio 1. Preparazione dello strumento per l'esecuzione di un protocollo	20
Passaggio 2. Preparazione dei reagenti e dei contenitori in plastica di SureSelect ^{XT HS}	22
Esecuzione del protocollo di preparazione delle librerie	26
Passaggio 1. Avvio del protocollo e immissione dati corsa	27
Passaggio 2. Preparazione del deck	29
Passaggio 3. Verifica contenitori	36
Passaggio 4. Immissione dati campioni	38
Passaggio 5. Conferma delle impostazioni e avvio della corsa	39
Passaggio 6. Raccolta dei campioni finali delle librerie dallo strumento	41
Passaggio 7. Pulizia dello strumento dopo la corsa	44

Questo capitolo contiene le istruzioni per la preparazione di librerie di sequenziamento di DNA con arricchimento dei target SureSelect^{XT HS} utilizzando il sistema Magnis NGS Prep System. Per una panoramica del flusso di lavoro, vedere la **Figura 1** a pagina 9.

Di seguito vengono fornite istruzioni dettagliate per la configurazione dello strumento Magnis NGS Prep System e dei componenti dell'analisi per una corsa, quindi per l'esecuzione del protocollo dello strumento Magnis per la preparazione automatica di campioni di librerie per NGS.

Per ogni campione da sequenziare, si prepara una singola libreria indicizzata e con codice a barre molecolare. Le librerie preparate con i protocolli qui descritti sono pronte per il sequenziamento con letture paired-end mediante il sistema Illumina.

Informazioni critiche sul tracciamento dei campioni

Un accurato tracciamento dei campioni è fondamentale per l'interpretazione dei risultati del sequenziamento. Prima di iniziare una corsa, assicurarsi di aver letto e compreso le informazioni sul tracciamento dei campioni contenute in questa sezione, incluse quelle relative a 1) orientamento dei numeri dei campioni nei pozzetti delle strip Magnis Sample Input Strip e 2) inserimento delle identità dei campioni nel software di Magnis durante la configurazione della corsa.

Orientamento dei campioni nei pozzetti delle Magnis Sample Input Strip

Per le corse eseguite su Magnis NGS Prep System occorre che i campioni siano orientati come mostrato nella [Figura 2](#) di seguito, con il campione 1 caricato nel pozzetto più lontano dal codice a barre presente sulla strip Magnis Sample Input Strip fornita insieme al prodotto. Caricare i campioni nei pozzetti della Magnis Sample Input Strip secondo l'orientamento indicato durante la fase di configurazione della corsa descritta a [pagina 23](#).

Prima di configurare la corsa, assegnare ciascun campione a uno specifico numero di campione da 1 a 8 e registrare i numeri associati ai campioni. I metodi per inserire le assegnazioni dei campioni ai numeri e relative a una corsa nel software di Magnis sono descritti da [pagina 17](#) a [pagina 18](#).

ATTENZIONE

Non aggiungere scritte o etichette che rischiano di oscurare il codice a barre presente sulla Magnis Sample Input Strip.

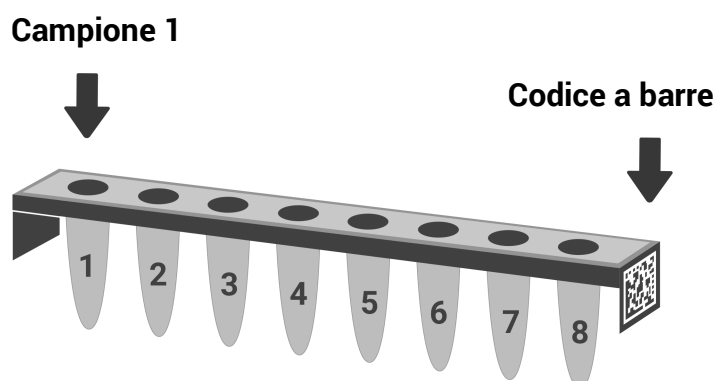


Figura 2 Orientamento richiesto per i numeri dei campioni da 1 a 8 nella Magnis Sample Input Strip.

Assegnazione dei campioni alle posizioni dei pozzetti nel software di Magnis

L'identità di ciascun campione della corsa deve essere specificata nel software dello strumento Magnis utilizzando uno dei due metodi descritti di seguito. Gli specifici ID dei campioni da includere in una corsa vengono inseriti nel sistema Magnis durante la configurazione della corsa, come descritto nella sezione **"Passaggio 4. Immissione dati campioni"** a pagina 38. Accertarsi di aver compreso le informazioni sul posizionamento e il tracciamento dei campioni riportate di seguito prima di iniziare la configurazione della corsa.

Ogni ID campione deve essere costituito da 1-30 caratteri e deve essere univoco nell'ambito della corsa. Gli ID dei campioni possono essere riutilizzati in corse diverse.

Metodo 1 per l'assegnazione dei campioni: importazione di assegnazioni di campioni mediante un file .csv

- 1 Creare un file .csv (a valori separati da virgole) contenente i nomi dei campioni ordinati. I dati relativi ai nomi dei campioni possono essere inseriti sotto forma di tabella utilizzando un'applicazione per i fogli di calcolo, come il software Microsoft Excel, e quindi salvati in formato .csv.
 - a Inserire il testo di intestazione **sample_id** nella cella A1, come mostrato nella [Figura 3](#).
 - b Inserire il nome di ciascun campione nelle caselle da A2 ad A9 (vedere la [Figura 3](#), pannello di sinistra). Il file di input relativo ai campioni deve contenere 8 ID dei campioni univoci. Se alcuni pozzetti dei campioni vengono lasciati vuoti per la corsa, è necessario inserire un testo segnaposto nelle posizioni corrispondenti (vedere la [Figura 3](#), pannello di destra).

8 campioni presenti nella corsa

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

6 campioni presenti nella corsa e 2 ID campioni segnaposto

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

Figura 3 Esempio di contenuto del file .csv (mostrato in formato foglio di calcolo) per il caricamento delle assegnazioni dei campioni

- 2 Salvare il file in formato .csv.
- 3 Scaricare il file .csv su un'unità USB non criptata.
- 4 Quando si configura la corsa, premere il pulsante di caricamento dei campioni mostrato di seguito nella schermata *Enter Sample Info*, quindi seguire le istruzioni della procedura guidata di configurazione del protocollo per trasferire gli ID campione dall'unità USB.



Metodo 2 per l'assegnazione dei campioni: assegnazione manuale dei campioni mediante il touch screen dello strumento Magnis

- 1 Prima di distribuire i campioni nei pozzetti della Magnis Sample Input Strip, registrare l'identità di ciascun numero di campione incluso nella corsa utilizzando procedure di registrazione su supporto cartaceo o elettronico adeguate.
- 2 Quando si configura la corsa, seguire le istruzioni visualizzate sul touch screen di Magnis per immettere il Sample ID relativo a ogni posizione dei pozzetti dei campioni utilizzando la schermata *Enter Sample Info* mostrata di seguito. Il sistema Magnis assegna automaticamente un ID campione predefinito a ogni posizione dei campioni. Per modificare il Sample ID, selezionare prima una posizione specifica dei campioni sul touch screen, quindi utilizzare lo strumento **Edit Sample ID** a destra per inserire il testo desiderato in Sample ID. Premere **Change** per salvare il testo immesso come Sample ID per il campione.

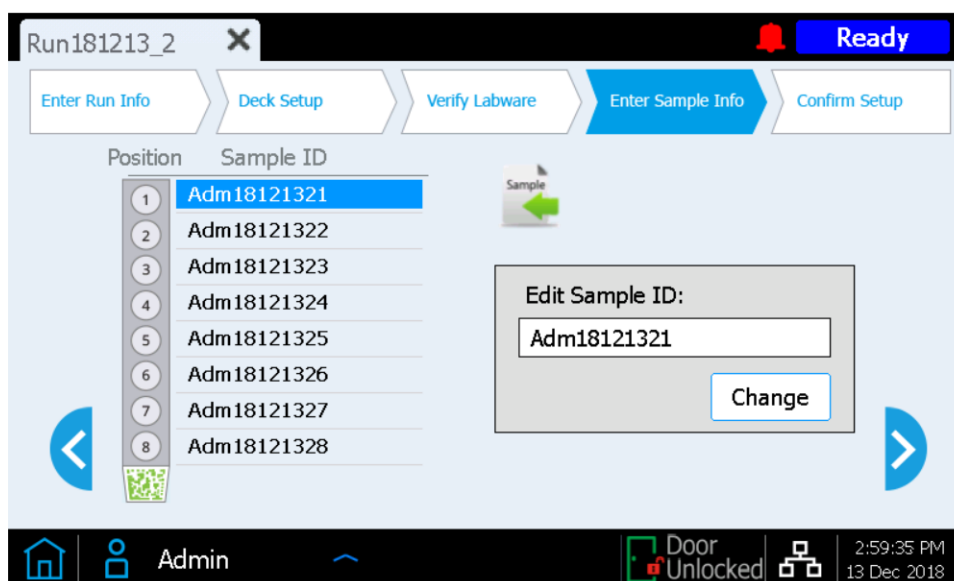


Figura 4 Interfaccia del touch screen di Magnis per l'assegnazione manuale dei campioni durante una corsa.

Preparazione dei campioni di DNA per la corsa

Il protocollo di preparazione delle librerie è compatibile sia con gDNA di alta qualità preparato da campioni freschi o congelati freschi, sia con DNA di qualità inferiore preparato da campioni FFPE. Le corse per l'elaborazione del DNA di alta qualità o derivato da campioni FFPE possono essere eseguite con 10 ng, 50 ng, 100 ng o 200 ng di DNA in ingresso. Per ottenere risultati di sequenziamento ottimali, utilizzare la quantità massima di DNA in ingresso disponibile entro questo intervallo. Tutti i campioni inclusi nella stessa corsa devono essere di pari quantità.

Prima di poter configurare la corsa su Magnis, occorre preparare i campioni di DNA, quantificarli, qualificarli e frammentarli secondo le linee guida e i protocolli indicati nell'["Appendice 1: linee guida per la preparazione dei campioni di DNA"](#) a pagina 45. Può essere necessario completare alcune fasi del protocollo di preparazione dei campioni di DNA, in particolare la fase di qualificazione del DNA derivato da campioni FFPE, fino a un giorno prima di iniziare i passaggi della corsa su Magnis. È comunque necessario frammentare e distribuire i campioni di DNA nella strip di provette per campioni di DNA in ingresso immediatamente prima di utilizzarla nella corsa.

Prima di iniziare a eseguire le fasi per la configurazione del sistema Magnis NGS Prep System alla pagina seguente, riesaminare i passaggi per la preparazione dei campioni di DNA elencati a partire da [pagina 45](#) per essere certi che i campioni di gDNA e lo strumento Covaris E220 siano pronti per la frammentazione del DNA al momento della configurazione della corsa.

NOTA

La preparazione dello strumento Covaris E220 per la frammentazione del DNA richiede circa 30-60 minuti per il raffreddamento e la degassazione del bagnomaria. Svolgere questi passaggi di condizionamento (vedere il [passaggio 1 a pagina 47](#)) prima di iniziare qualsiasi passaggio di configurazione dei reagenti e del sistema Magnis NGS Prep System riportato nelle prossime pagine.

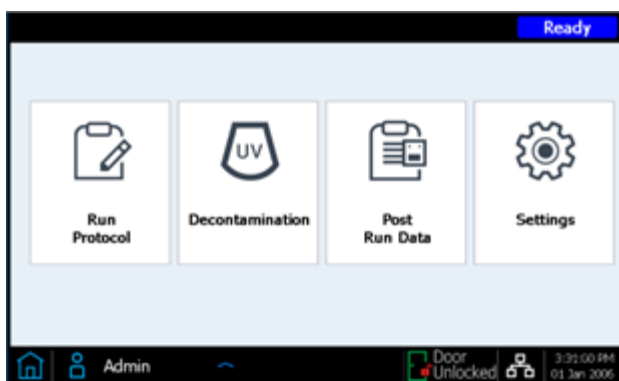
Preparazione dello strumento Magnis e dei reagenti per la corsa

Passaggio 1. Preparazione dello strumento per l'esecuzione di un protocollo

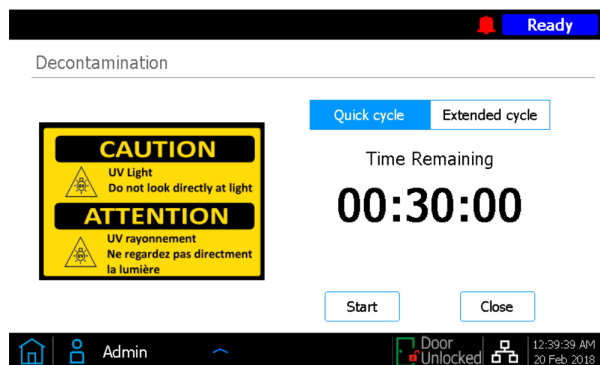
NOTA

Le istruzioni che seguono comprendono una procedura di decontaminazione eseguita per mezzo dello strumento che utilizza luce ultravioletta (UV) per decontaminare il deck dello strumento. In aggiunta o in alternativa alla procedura automatica di decontaminazione con luce UV, è possibile utilizzare altre procedure di decontaminazione (ad esempio, con una soluzione di candeggina al 10%). Per leggere le istruzioni complete sulla decontaminazione e la pulizia delle superfici, consultare il manuale utente del sistema Magnis.

- 1 Prima di iniziare, utilizzare un igrometro per misurare l'umidità ambientale in prossimità dello strumento Magnis. Verificare che l'umidità senza condensa sia nell'intervallo accettabile dal 30% al 70%.
- 2 Verificare che il deck dello strumento non sia occupato dai contenitori da laboratorio utilizzati nelle corse precedenti o da qualsiasi altro oggetto. Qualsiasi oggetto presente sul deck dello strumento durante la configurazione della corsa può interferire con i processi di configurazione della corsa e avvio dello strumento.
- 3 Accendere lo strumento premendo il pulsante di accensione situato sulla parte anteriore del dispositivo. Chiudere lo sportello dello strumento.
Lo strumento si accende, le spie LED all'interno dello strumento si illuminano e il software si avvia sul touch screen.
Attendere che il sistema esegua una serie di attività di avvio, che può richiedere diversi minuti.
- 4 Agilent consiglia di eseguire la procedura di decontaminazione con luce UV *Quick cycle* (della durata di 30 minuti) prima di ogni corsa, seguendo i passaggi indicati di seguito.
 - a Nella schermata Home, premere **Decontamination**.



- b Nella schermata Decontamination, premere **Quick cycle**, quindi premere **Start**. La durata della procedura di decontaminazione *Quick cycle* è di 30 minuti. Durante la procedura di decontaminazione UV, le spie LED sono spente e durante questo intervallo di tempo il tubo UV dello strumento emette luce UV.



AVVERTENZA

Non guardare direttamente la luce UV mentre è in corso la decontaminazione.

NOTA

Durante il processo di decontaminazione della durata di 30 minuti, iniziare a eseguire i passaggi per la preparazione dei reagenti descritti nel dettaglio a [pagina 22](#).

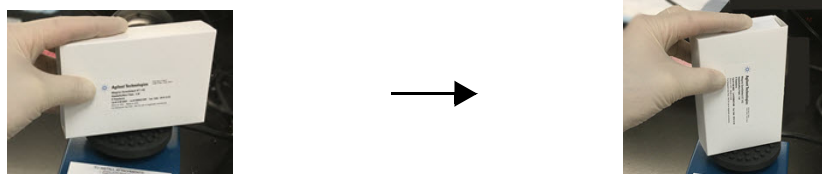
- 5 Una volta completato il ciclo di decontaminazione, le spie LED dello strumento si accendono e diventano blu. Tornare alla schermata Home utilizzando il touch screen per eseguire i passaggi di configurazione della corsa.

Passaggio 2. Preparazione dei reagenti e dei contenitori in plastica di SureSelect^{XT} HS

Istruzioni per l'utilizzo delle piastre e delle strip di provette

Prima di iniziare a configurare la corsa, leggere le importanti istruzioni per la gestione dei contenitori da laboratorio riportate di seguito.

- Le Magnis Sample Input Strips (strip rosse fornite in un supporto a piastra, c.p. 5190-9882 o 5191-5676), così come tutti i reagenti per la preparazione e la diluizione dei campioni di DNA in ingresso, devono essere conservate e utilizzate solo nelle aree del laboratorio dedicate alle fasi precedenti la PCR. Anche le Magnis Probe Input Strips vuote (c.p. 5190-9883, fornite solo insieme ai kit G9730D e G9730B) devono essere conservate e riempite in un'area dedicata alle fasi precedenti la PCR.
- I sigilli e le pellicole adesive che ricoprono le piastre del kit e le strip delle provette devono essere lasciati in posizione durante la configurazione della corsa e l'esecuzione. Non toccare o danneggiare le pellicole e le coperture adesive durante la configurazione della corsa. Se la copertura del sigillo della strip di campioni in ingresso viene forata durante la configurazione della corsa, occorre sigillare nuovamente i pozzetti con una nuova strip di sigilli presente nel kit. Fare attenzione a non contaminare o danneggiare in altro modo i sigilli sostitutivi.
- Le piastre dei reagenti piene (sia le piastre Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plates, sia le piastre Magnis SureSelect XT HS Reagent Plates), sono fornite in astucci di cartone bianco. Lasciare le piastre piene nei relativi astucci durante tutti i passaggi di preparazione descritti di seguito. Per ispezionare visivamente i pozzetti della piastra, far scorrere con attenzione la piastra dei reagenti **solo parzialmente** al di fuori dell'astuccio per evitare di piegare o danneggiare la pellicola o la copertura adesiva. Il reinserimento non corretto della piastra nell'astuccio potrebbe compromettere l'integrità della piastra.
- Miscelare con un agitatore vortex le piastre dei reagenti piene utilizzando la seguente procedura, illustrata nelle immagini sottostanti. Durante la miscelazione con agitatore vortex, tenere la piastra inserita nell'astuccio in posizione verticale (su un lato) anziché orizzontale. Premere dapprima uno dei lati lunghi della piastra sulla testa dell'agitatore vortex e mescolare per 10 secondi; ruotare quindi la piastra di 90° e premerne uno dei lati corti sulla testa dell'agitatore vortex per altri 10 secondi. Continuare la sequenza di rotazione/10 secondi di miscelazione finché non si sono utilizzati tutti e quattro i lati della piastra.



- Se un componente del kit appare danneggiato durante il disimballaggio o la configurazione della corsa (ad esempio, se la pellicola o la copertura adesiva è forata oppure se i contenitori in plastica sono rotti), non utilizzare il componente e contattare l'assistenza tecnica Agilent.

Fasi di configurazione dei campioni e dei reagenti

- 1 Preparare la piastra **Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate** per la corsa eseguendo i passaggi seguenti:
 - a Portare una piastra Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate dai +4 °C della zona di conservazione a temperatura ambiente, mantenendo la piastra nell'astuccio di cartone bianco. Prima di utilizzarla nella corsa, lasciare che la piastra inserita nell'astuccio raggiunga la temperatura ambiente per almeno 30 minuti.
 - b Miscelare la piastra inserita nell'astuccio con un agitatore vortex, tenendo la piastra in posizione verticale come descritto nella sezione precedente contenente le istruzioni per la gestione.
 - c Centrifugare la piastra ancora inserita nell'astuccio in una centrifuga impostata su 250 × g per 3 secondi per raccogliere il liquido senza che le sfere si depositino formando pellet (iniziare a cronometrare quando la centrifuga raggiunge la velocità massima). Non superare la velocità e il tempo di centrifugazione consigliati per evitare che le sfere si depositino formando pellet.
 - d Conservare la piastra inserita nell'astuccio a temperatura ambiente per utilizzarla in una corsa da eseguire il giorno stesso.
- 2 Preparare **Magnis SureSelect XT HS Reagent Plate Rev B ILM** o **Magnis SureSelect XT HS Reagent Plate ILM** attenendosi alle seguenti fasi:
 - a Portare una piastra di reagenti da -20 °C della zona di conservazione a temperatura ambiente, mantenendo la piastra nell'astuccio di cartone bianco. Lasciare scongelare i reagenti a temperatura ambiente per 15-30 minuti. Far scorrere la piastra parzialmente al di fuori dell'astuccio e verificare con un'ispezione visiva che i reagenti siano completamente scongelati.
 - b Una volta scongelato il contenuto dei pozzetti, agitare la piastra inserita nell'astuccio con un agitatore vortex, posizionandola verticalmente come descritto nella sezione delle istruzioni per la gestione riportate sopra.
 - c Centrifugare la piastra inserita nell'astuccio in una centrifuga impostata su 250 × g per 1 minuto (iniziare a cronometrare quando la centrifuga raggiunge la velocità massima). Controllare il fondo dei pozzetti della piastra per verificare che non siano presenti eventuali bolle e se sono presenti bolle ripetere la fase di centrifugazione fino a quando tutte le bolle non sono state rilasciate.
 - d Tenere la piastra inserita nell'astuccio nel ghiaccio per utilizzarla in una corsa entro la fine della giornata.
- 3 Preparare la strip **Magnis Sample Input Strip** per i campioni di DNA seguendo la procedura seguente.
 - a Verificare che lo strumento Covaris E220 sia pronto per essere utilizzato nella fase di frammentazione del DNA, con il bagnomaria raffreddato a 5 °C e degassato come descritto in dettaglio a [pagina 47](#) o [pagina 51](#).
 - b Portare il kit Magnis Sample Input Strip dalla temperatura di conservazione a temperatura ambiente. Rimuovere una Sample Input Strip rossa vuota (con la "S" incisa all'estremità della strip) dal supporto della piastra, lasciando intatta la copertura del sigillo. Preparare una nuova strip di sigilli in alluminio con il rivestimento sul retro per sigillare nuovamente la strip nella [passaggio d](#).
 - c Utilizzando le istruzioni corrispondenti al tipo di campione di DNA utilizzato, preparare la Magnis Sample Input Strip per la corsa. Per i campioni di DNA di alta qualità, seguire le istruzioni riportate da [pagina 46](#) a [pagina 48](#). Per il DNA estratto da campioni FFPE, seguire le istruzioni riportate da [pagina 49](#) a [pagina 53](#).

Al termine della procedura, le strip di ingresso dei campioni devono contenere 50 µl di DNA frammentato (10 ng, 50 ng, 100 ng o 200 ng) in ogni pozzetto per campioni e tutti i pozzetti della strip devono contenere la stessa quantità di DNA.

- d Una volta che tutti i campioni sono stati inseriti nei pozzetti della Magnis Sample Input Strip, sigillare nuovamente la strip di provette utilizzando la strip di sigilli intatta preparata durante la [passaggio b](#) e avendo cura di non oscurare il codice a barre della strip di provette con il sigillo in alluminio. Assicurarsi che il sigillo sia applicato in modo saldo e uniforme, senza eccessive sporgenze o pieghe che potrebbero ostruire l'inserimento della strip della provetta durante il caricamento nello strumento.
 - e Controllare visivamente i pozzetti dei campioni sigillati per verificare che non siano presenti bolle. Rimuovere eventuali bolle d'aria centrifugando la strip di campioni preparata in una centrifuga impostata su $250 \times g$ per 5 secondi o finché non sono state rilasciate tutte le bolle presenti nella soluzione con DNA.
 - f Tenere la strip di provette con i campioni nel ghiaccio fino al momento di utilizzarla come indicato a [pagina 34](#).
- 4 Preparare la **strip di provette con gli indici (index)** eseguendo i passaggi seguenti:
- a Determinare il set di indici appropriato da utilizzare per la corsa. Sull'estremità opposta a quella con il codice a barre delle strip di provette con gli indici in dotazione sono incisi i codici A1, A2, A3 o A4, che indicano l'insieme specifico di indici contenuto nei pozzetti (vedere a [pagina 80](#) per informazioni complete sugli indici). Se si utilizzano i campioni provenienti da diverse corse di preparazione delle librerie per NGS effettuate con Magnis per l'NGS multiplex (in parallelo), occorre utilizzare un diverso set di indici per ogni corsa al fine di garantire che tutti i campioni analizzati in parallelo siano marcati con una sequenza di indici univoca.
 - b Prelevare la piastra Magnis SureSelect XT HS Index Plate conservata a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rimuovere la strip nera di indici corretta (contrassegnata con A1, A2, A3 o A4) dal supporto della piastra, lasciando intatta la copertura del sigillo. Collocare la strip rimossa nel ghiaccio per lasciarla scongelare lentamente e ricollocare la piastra con le rimanenti strip di indici nella zona di conservazione a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - c Una volta scongelato il contenuto dei pozzetti della strip di indici, agitare la strip con un agitatore vortex ad alta velocità per 5 secondi.
 - d Centrifugare la strip di indici in una centrifuga impostata su $250 \times g$ per 5 secondi. Controllare i pozzetti della strip per verificare che il liquido si sia raccolto sul fondo dei pozzetti e che non siano presenti bolle. Rimuovere eventuali bolle ripetendo la fase di centrifugazione finché non sono state rilasciate tutte le bolle.
 - e Conservare nel ghiaccio la strip di provette con gli indici fino al momento dell'utilizzo come indicato a [pagina 34](#).
- 5 Preparare la **strip di provette con le sonde** attenendosi alle fasi seguenti per i kit forniti con uno dei formati di piastra per sonde preimpostate:
- *Magnis SureSelect Probe Plate, Pre-filled Single Well Format* o *Magnis SureSelect XT HS Probe Plate, Pre-filled Single Well Format* con il volume pieno di soluzione della sonda per una corsa da 8 campioni forniti nel pozzetto A (i pozzetti da B ad H sono vuoti)
 - *Magnis SureSelect XT HS Probe Plate*, con volume di soluzione della sonda per una corsa da 8 campioni suddivisi tra tutti gli 8 pozzetti

Se il kit utilizzato non contiene strip con le sonde preriempite (kit con c.p. G9730D o G9730B) e comprende invece strip per sonde vuote per la preparazione delle sonde al momento della corsa, saltare le istruzioni riportate di seguito e preparare la strip con le sonde seguendo le istruzioni a [pagina 55](#).

- a Prelevare la piastra per sonde conservata a -80 °C. Rimuovere una strip con sonde bianca (contrassegnata da una "P" incisa all'estremità della strip) dal supporto della piastra, lasciando intatta la copertura del sigillo. Collocare la strip rimossa nel ghiaccio per lasciarla scongelare lentamente e ricollocare la piastra con le rimanenti strip di sonde nella zona di conservazione a -80 °C.

ATTENZIONE

Le strip con le sonde non sono dotate di etichette leggibili dagli esseri umani che indichino l'identità specifica del design della sonda. Prestare attenzione a tracciare e preservare l'identità della strip di sonde dopo averla rimossa dalla confezione della piastra. Non aprire diverse scatole e rimuovere contemporaneamente le strip di sonde con design di diverso tipo.

- b Una volta scongelato il contenuto dei pozzetti della strip di sonde, agitare la strip con un agitatore vortex ad alta velocità per 5 secondi.
- c Centrifugare la strip di sonde in una centrifuga impostata su $250 \times g$ per 5 secondi. Ispezionare visivamente i pozzetti della strip per verificare che il liquido si sia raccolto sul fondo dei pozzetti e che non siano presenti bolle. Rimuovere eventuali bolle ripetendo la fase di centrifugazione finché non sono state rilasciate tutte le bolle.

NOTA

L'intero volume della soluzione della sonda per la corsa è presente in un unico pozzetto per le strisce di sonde fornite con i kit reagenti Rev B ed è ripartito in tutti gli 8 pozzetti per le strip di sonde fornite con i kit reagenti nel formato originale.

- d Conservare nel ghiaccio la strip di sonde fino al momento dell'utilizzo come indicato a [pagina 34](#).
- 6 Prelevare una scatola di Magnis Empty Consumables conservata a temperatura ambiente per utilizzarla durante la preparazione del deck.

Passare alla fase di ["Esecuzione del protocollo di preparazione delle librerie"](#) a pagina 26.

Esecuzione del protocollo di preparazione delle librerie

Quando lo strumento Magnis e tutti i reagenti sono stati preparati per l'esecuzione di SureSelect XT HS, seguire le istruzioni fornite sul touch screen dello strumento per caricare i contenitori da laboratorio sullo strumento ed eseguire il protocollo di preparazione delle librerie. I passaggi da eseguire sono riassunti nella [Figura 5](#).

Il touch screen dello strumento Magnis fornisce istruzioni per l'inserimento delle informazioni sulla corsa, il caricamento della piattaforma, la verifica della presenza di tutti i contenitori da laboratorio necessari e delle condizioni richieste, l'inserimento delle informazioni sui campioni e la conferma dell'impostazione del protocollo. Durante queste fasi di impostazione, le spie LED sul deck dello strumento sono illuminate in bianco. Ulteriori informazioni su ciascuno di questi passaggi richiesti dal sistema sono riportate per i nuovi utenti da [pagina 27](#) a [pagina 39](#).

Durante l'esecuzione del protocollo, il sistema effettua la preparazione delle librerie e l'arricchimento dei target sui campioni di DNA frammentato per generare librerie di DNA con target arricchiti pronte per il sequenziamento. Durante la corsa, le spie LED si illuminano in verde.

Al termine della corsa, indicato dalle spie LED che diventano blu, il touch screen del sistema richiede di rimuovere dallo strumento i campioni delle librerie di sequenziamento finali e i campioni per il controllo qualità (QC, se presenti). Le linee guida per l'elaborazione delle librerie con target arricchiti finali per il sequenziamento del DNA sono riportate nell'["Appendice 3: linee guida per l'elaborazione di campioni di DNA dopo la corsa per l'NGS"](#) a pagina 58.

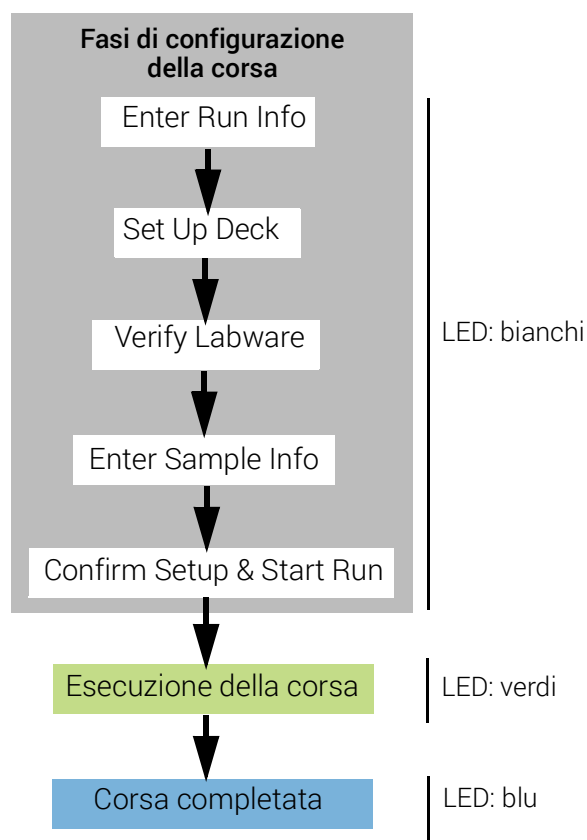
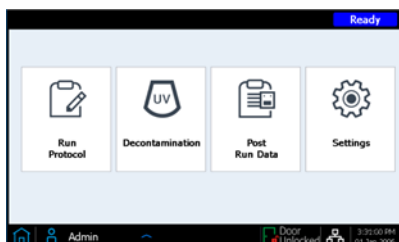


Figura 5 Panoramica dei passaggi per la configurazione e il completamento di una corsa sul sistema Magnis NGS Prep System. Il colore della luce emessa dalle spie LED dello strumento durante queste fasi è indicato a destra.

Passaggio 1. Avvio del protocollo e immissione dati corsa

- 1 Nella schermata Home sul touch screen, premere **Run Protocol**.

Il sistema blocca lo sportello dello strumento ed esegue un controllo dello stato dello strumento (IHC), che può richiedere diversi minuti. Se sul display viene segnalato un problema relativo all'IHC, vedere la guida [“Guida per la risoluzione dei problemi”](#) a pagina 84 per istruzioni su come procedere.



- 2 Seguire le istruzioni fornite nella schermata *Enter Run Info* (Immissione dati corsa) come illustrato di seguito. Nella prima schermata, specificare il nome del protocollo e le impostazioni di raccolta per il controllo qualità per la corsa.
 - a Espandere il menu **Protocollo** e selezionare il protocollo appropriato per il formato del kit reagenti in uso, come descritto nella [Tabella 7](#). I protocolli visibili sul touchscreen e disponibili per l'uso sullo strumento potrebbero variare rispetto ai protocolli elencati nella [Tabella 7](#) (vedere la [“Guida per la risoluzione dei problemi”](#) a pagina 84 per maggiori informazioni).

Tabella 7 Informazioni sull'uso del protocollo

Nome del protocollo	Kit di reagenti compatibili	Dettagli sull'uso
SSEL XTHS-RevB-ILM	Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit forniti con strip di ingresso sonda preriempite (formato monopozzetto preriempito)	Questo protocollo offre condizioni di ibridazione ottimali per le sonde SureSelect Human All Exon V7 e V8 e per la maggior parte dei modelli di sonde SureSelect XT HS personalizzate con i SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit.
LT-SSEL XTHS-RevB-ILM	Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit forniti con strip di ingresso sonda preriempite (formato monopozzetto preriempito)	Questo protocollo offre condizioni di ibridazione equivalenti al protocollo <i>SureSelectXT HS-Illumina</i> . L'uso è consigliato per il trattamento di campioni con i Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit, mantenendo le prestazioni dei flussi di lavoro ottenute con il protocollo <i>SureSelectXT HS-Illumina</i> o quando si utilizzano sonde personalizzate originariamente progettate per l'uso con il sistema SureSelect XT.
SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM	Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit fornito con strip di ingresso sonda vuote (PN G9730D)	Utilizzare per elaborare i Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit forniti con strip di ingresso sonda vuote (EPIS) utilizzando condizioni di ibridazione equivalenti al protocollo <i>SSEL XTHS-RevB-ILM</i> . La strip di ingresso sonda deve essere riempita prima della corsa, come descritto dettagliatamente a pagina 55 .
LT-SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM	Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit fornito con strip di ingresso sonda vuote (PN G9730D)	Utilizzare per elaborare i Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit forniti con strip di ingresso sonda vuote (EPIS) utilizzando condizioni di ibridazione equivalenti al protocollo <i>LT-SSEL XTHS-RevB-ILM</i> . La strip di ingresso sonda deve essere riempita prima della corsa, come descritto dettagliatamente a pagina 55 .

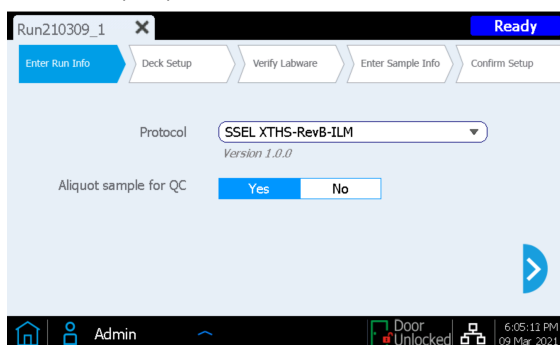
Tabella 7 Informazioni sull'uso del protocollo

Nome del protocollo	Kit di reagenti compatibili	Dettagli sull'uso
SureSelectXT HS-Illumina	Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit in formato originale forniti con strip di ingresso sonda preriempite o vuote	I Magnis Reagent Kit forniti nel formato originale devono essere trattati utilizzando questo protocollo. Laddove applicabile, la strip di ingresso sonda vuota deve essere riempita prima della corsa, come descritto dettagliatamente a pagina 55 .

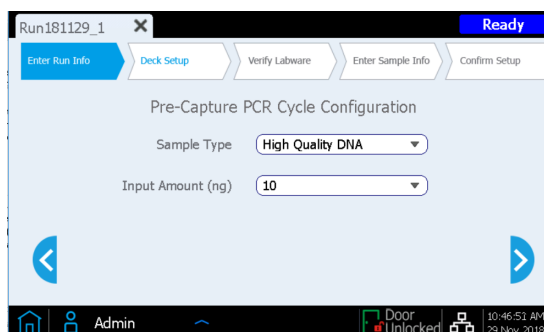
- b Fare clic su **Yes** accanto a **Aliquot sample for QC** se si desidera che lo strumento prelevi un'aliquota (3 µl) di ogni campione di libreria per effettuare l'analisi facoltativa di controllo qualità dopo il termine della corsa. (I campioni QC pre-acquisizione sono disponibili per l'analisi solo al termine dell'intera corsa.) Se si sta effettuando questa selezione, assicurarsi di caricare la strip per QC blu durante la configurazione della piastra descritta a [pagina 34](#).

In alternativa, deselezionare la casella di controllo per saltare il passaggio opzionale di raccolta delle aliquote per il QC.

- c Premere la freccia in avanti per passare alla schermata successiva.



- 3 Nella seconda schermata, selezionare il **Sample Type** appropriato (*High Quality DNA* per i campioni di alta qualità o *FFPE DNA* per il DNA da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina) e la quantità di DNA **Input Amount** in ingresso (*10 ng*, *50 ng*, *100 ng* o *200 ng*) dei campioni da elaborare durante la corsa. Queste impostazioni vengono utilizzate per determinare le corrette condizioni dei cicli di PCR della corsa. Il numero di cicli di PCR effettuati e le altre condizioni da utilizzare durante la corsa sono visualizzati durante i passaggi di conferma della configurazione *Confirm Setup* (vedere a [pagina 39](#)).



Passaggio 2. Preparazione del deck

L'interfaccia del touch screen di Magnis guida l'utente attraverso i passaggi per la preparazione del deck. Ulteriori informazioni per i nuovi utenti sono riportate da [pagina 30](#) a [pagina 35](#).

L'immagine seguente mostra il deck completamente preparato per illustrare le posizioni del deck di Magnis riservate ai contenitori da laboratorio.

Mentre si completano i passaggi di preparazione del deck specificati sul touch screen, prestare particolare attenzione ai dettagli di importanza critica riportati di seguito per garantire una corsa priva di errori:

- Accertarsi che le scatole di puntali siano completamente piene e che siano posizionate orizzontalmente sulle piattaforme. Verificare che ogni scatola di puntali sia posizionata all'interno del telaio con linguette rialzate corrispondente alla sua posizione sulla piattaforma e che le scatole non si sgancino durante la rimozione del coperchio.
- Assicurarsi che tutti i contenitori da laboratorio siano posizionati con il codice a barre rivolto verso l'operatore (ovvero verso la parte anteriore dello strumento).

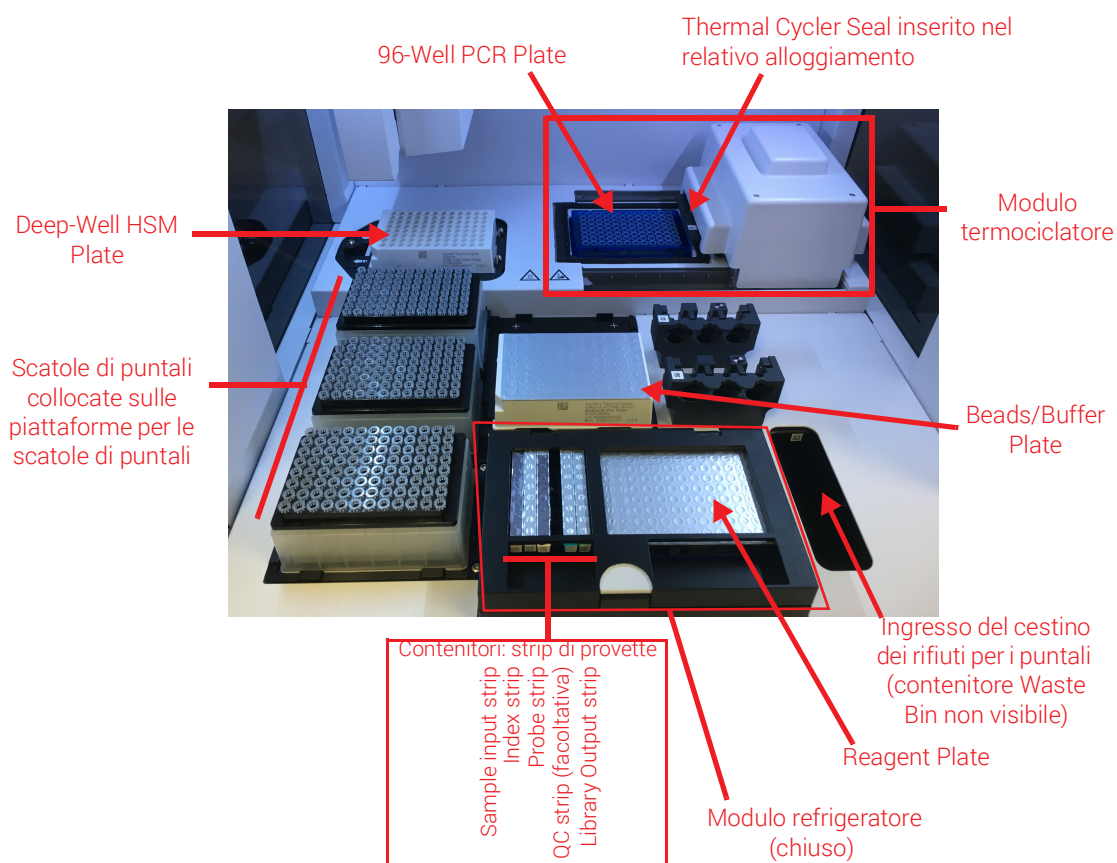
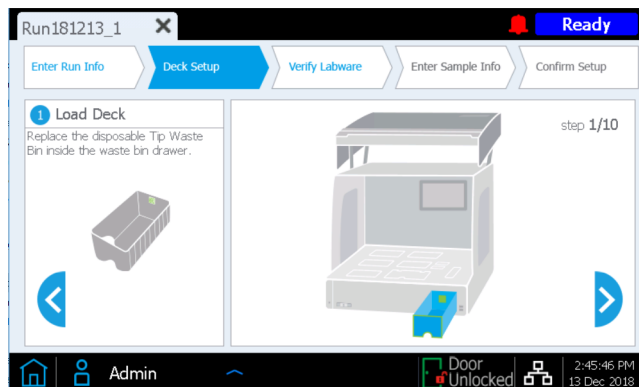


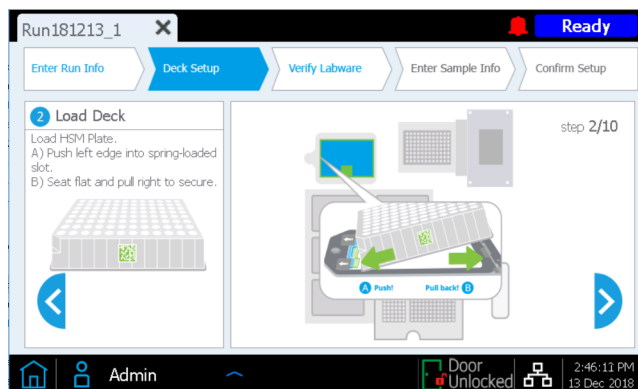
Figura 6 Deck dello strumento caricato per una corsa

Di seguito sono descritte in dettaglio le fasi di *Deck Setup* (Preparazione del deck) richieste dall'interfaccia del touch screen di Magnis. Per ogni passaggio del caricamento del deck, la posizione del deck da caricare viene evidenziata in blu sul touch screen. Una volta completato ogni passaggio, premere la freccia in avanti per passare alla schermata successiva.

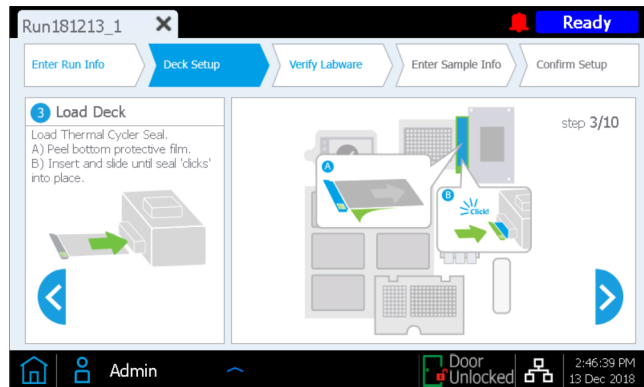
- 1 Rimuovere il Magnis Tip Waste Bin monouso dalla confezione dei Magnis Empty Consumables. Collocare il cestino monouso nell'apposito cassetto, con il codice a barre rivolto verso l'operatore, come indicato sul touch screen. Chiudere il cassetto dei rifiuti.



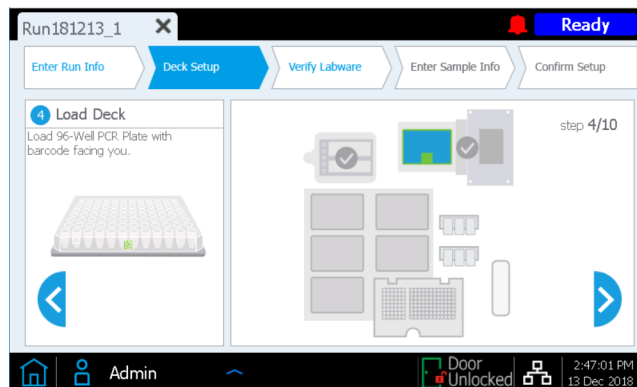
- 2 Rimuovere la piastra Magnis Deep-Well HSM Plate dalla confezione dei Magnis Empty Consumables. Installare la piastra nella posizione del deck indicata sul touch screen, con il codice a barre rivolto verso l'operatore. Per caricare la piastra, inserire prima il bordo sinistro della piastra nella fessura a molla, quindi abbassare il bordo destro della piastra fino a quando la piastra non è in posizione orizzontale sulla piattaforma. Quando è in posizione orizzontale, spostare la piastra leggermente a destra (con l'aiuto del meccanismo a molla) e assicurarsi che sia completamente inserita e fissata all'interno del supporto sulla piattaforma.



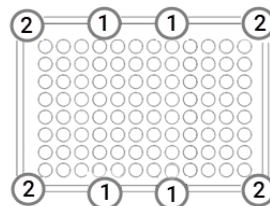
- 3 Rimuovere il Magnis Thermal Cyclers Seal dalla confezione dei Magnis Empty Consumables. Staccare la pellicola protettiva dal cuscinetto in schiuma al di sotto della piastra metallica, iniziando con la linguetta gialla. Dopo aver rimosso l'intera pellicola, inserire il Thermal Cyclers Seal nella fessura nella posizione indicata sul touch screen, con il codice a barre rivolto verso l'alto. Continuare a far scorrere il Thermal Cyclers Seal nella fessura finché non scatta in posizione.



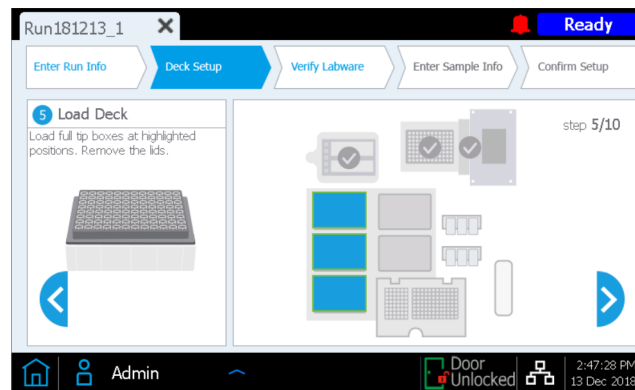
- 4 Rimuovere la piastra Magnis 96-Well PCR Plate dalla confezione dei Magnis Empty Consumables. Caricare la piastra nella posizione del deck indicata sul touch screen inserendo i pozzetti della piastra nei pozzetti del blocco del termociclatore, con il codice a barre della piastra rivolto verso l'operatore.



Per assicurarsi che la piastra sia completamente inserita nel blocco, posizionare prima il centro della piastra nei pozzetti del blocco premendo uniformemente nelle posizioni della piastra contrassegnate con **1** nella figura sottostante. Quindi premere uniformemente su tutti e quattro gli angoli della piastra (posizioni contrassegnate con **2** nella figura sottostante).



- 5 Caricare una nuova scatola di puntali piena in ciascuna delle posizioni del deck indicate sul touch screen. **Rimuovere i coperchi** dalle scatole. Dopo aver rimosso i coperchi, verificare che ogni scatola di puntali sia appoggiata in posizione orizzontale e si trovi all'interno del telaio con linguette rialzate corrispondente alla sua posizione sulla piattaforma.

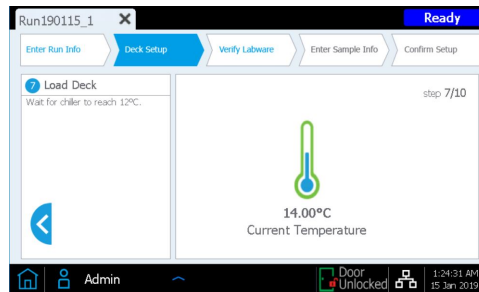


- 6 Prendere la Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate preparata come indicato a [pagina 23](#). Togliere l'astuccio di cartone bianco, quindi caricare la piastra nella posizione del deck indicata sul touch screen, con il codice a barre rivolto verso l'operatore. Per caricare la piastra, inserire prima il bordo sinistro della piastra nella fessura a molla, quindi abbassare il bordo destro della piastra fino a quando la piastra non è in posizione orizzontale sulla piattaforma. Quando è in posizione orizzontale, spostare la piastra leggermente a destra (con l'aiuto del meccanismo a molla) e assicurarsi che sia completamente inserita e fissata all'interno del supporto sulla piattaforma.

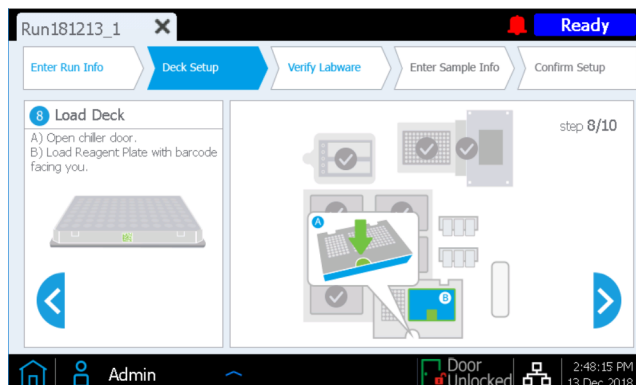


- 7 Prima di poter essere caricato per la corsa come indicato nel [passaggio 8](#) di seguito, il modulo refrigeratore dello strumento deve raggiungere la temperatura corretta (tipicamente 12 °C). Finché il refrigeratore non raggiunge la temperatura di caricamento, il touch screen ha l'aspetto mostrato sotto e consente di controllare lo stato del refrigeratore.

Questa schermata potrebbe non apparire durante la corsa se il refrigeratore ha già raggiunto la temperatura richiesta.



- 8 Caricare il modulo refrigeratore come descritto di seguito.
- Aprire lo sportello del refrigeratore premendo il pulsante semicircolare indicato sul touch screen da una freccia verde.
 - Prendere la piastra reagenti preparata come descritto a [pagina 23](#). Rimuovere l'astuccio in cartone bianco e controllare il fondo dei pozzetti per verificare la presenza di eventuali bolle. Se sono presenti bolle, rimuoverle centrifugando la piastra, come indicato a [pagina 23](#). Caricare la piastra nel modulo del refrigeratore nella posizione del deck indicata sul touchscreen, con il codice a barre rivolto verso l'operatore. Premere con forza verso il basso, esercitando una pressione uniforme sulla piastra. Accertarsi che la piastra dei reagenti sia saldamente inserita nel supporto per piastra del refrigeratore.



- 9 Caricare le strip di provette della corsa nelle posizioni indicate del refrigeratore come indicato di seguito, nell'ordine elencato. Prima di caricare ogni strip, controllare i fondi dei pozzetti per verificare la presenza di eventuali bolle. Se sono presenti bolle, rimuoverle centrifugando la strip, come indicato a [pagina 24](#). Assicurarsi che ogni strip sia posizionata correttamente premendo con decisione e in modo uniforme sui bordi della strip di provette durante il caricamento. Non toccare o danneggiare le coperture dei sigilli. **Accertarsi di orientare ogni strip di provette con il codice a barre rivolto verso l'operatore.**

- Caricare la **strip di provette rossa contenente i campioni di DNA in ingresso** (preparati come descritto a [pagina 23](#) e conservati nel ghiaccio) nella posizione del supporto per strip di provette contrassegnata con una **S**.
- Caricare la **strip di provette nera contenente i primer indicizzati** (preparati come descritto a [pagina 24](#) e conservati nel ghiaccio) nella posizione del supporto per strip di provette contrassegnata con la dicitura **IDX**.
- Caricare la **strip di provette bianca contenente la soluzione della sonda** (preparata come descritto a [pagina 24](#) e conservata nel ghiaccio) nella posizione del supporto per strip di provette contrassegnato con una **P**.
- Prendere la Magnis Library Output Strip, la QC Strip e il pacchetto di Foil Seals dalla confezione dei Magnis Empty Consumables. Caricare la **strip di uscita delle librerie verde vuota** (con una "L" incisa sull'estremità della strip) nella posizione del supporto per strip di provette contrassegnato con una **L**. Lasciare intatta la copertura del sigillo.

Se la corsa comprende la raccolta di aliquote dei campioni delle librerie prima dell'acquisizione per il controllo qualità (vedere [pagina 27](#)), caricare la **QC strip blu vuota** (con una "Q" incisa sull'estremità della strip) nella posizione del supporto per strip di provette contrassegnata con una **Q**. Lasciare intatta la copertura del sigillo.

Conservare i Foil Seals nuovi forniti nella confezione pronti per essere utilizzati al termine della corsa.

- Dopo aver caricato le strip di provette nelle posizioni **S, IDX, P, L e Q** (se presenti), chiudere lo sportello del refrigeratore. (Assicurarsi che lo sportello sia completamente chiuso: la chiusura è segnalata da uno scatto udibile).



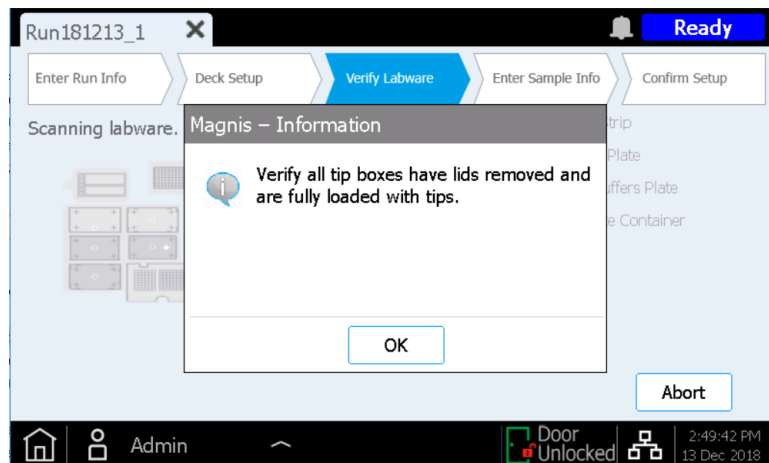
10 Chiudere lo sportello dello strumento.



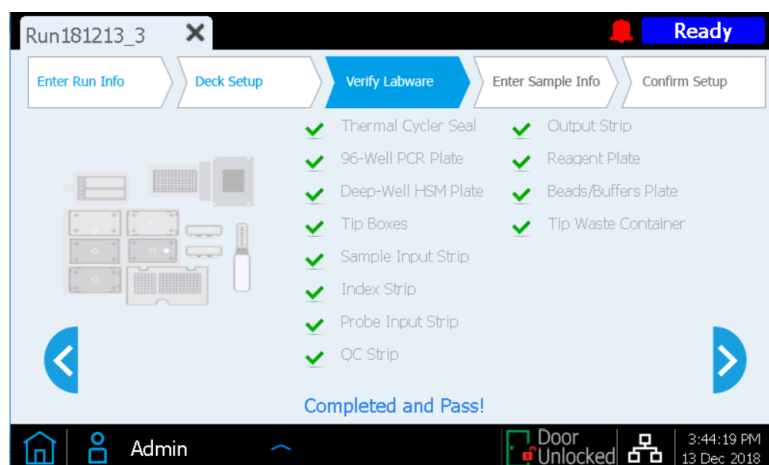
Passaggio 3. Verifica contenitori

Una volta completati tutti i passaggi di *Deck Setup*, lo strumento esegue la fase della corsa *Verify Labware* (Verifica dei contenitori), in cui lo strumento legge il codice a barre presente su ciascuno dei contenitori da laboratorio presenti sul deck.

Prima di avviare la verifica automatica dei contenitori da laboratorio, è necessario verificare che i coperchi siano stati rimossi da tutte le scatole di puntali e che tutte le scatole siano piene, come richiesto nella finestra pop-up raffigurata sotto. Una volta verificato lo stato delle scatole di puntali, premere **OK** per avviare la procedura di verifica automatica dei contenitori da laboratorio da parte dello strumento.



Durante la lettura dei codici a barre, lo strumento verifica che tutti i componenti necessari per il tipo di corsa scelto siano presenti, si trovino nella posizione corretta siano orientati come previsto e non siano scaduti. I risultati della verifica vengono visualizzati sul touch screen di Magnis. Premere la freccia in avanti per proseguire.



Se la schermata *Verify Labware* segnala un problema relativo a uno o più componenti da utilizzare nella corsa, consultare la [“Guida per la risoluzione dei problemi”](#) a pagina 84 per istruzioni su come procedere.

La schermata *Verify Labware* finale consente di riesaminare i dati della Probe Input Strip.

Per le corse che comprendono sonde predistribuite, l'identità della soluzione della sonda viene automaticamente trasmessa al software di Magnis tramite il codice a barre della strip e le proprietà della sonda vengono visualizzate per consentirne la verifica, come mostrato di seguito. Premere la freccia in avanti per proseguire.

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

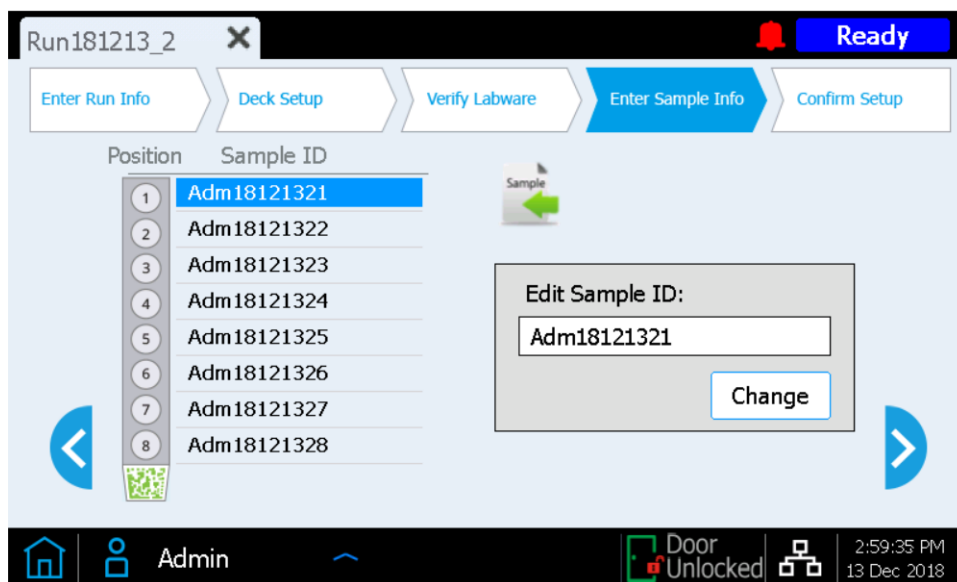
Capture Size Small Large

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

Per le corse che comprendono strip di sonde riempite al momento della corsa (corse effettuate con il kit c.p. G9730D o G9730B, che include strip di sonde vuote), è necessario immettere manualmente in questa schermata le proprietà relative alla sonda. Vedere le istruzioni a [pagina 57](#). Una volta che tutti i campi sono stati compilati, premere la freccia in avanti per proseguire.

Passaggio 4. Immissione dati campioni

Utilizzare questa schermata per assegnare ogni posizione del pozzetto a uno specifico campione nel software di Magnis. Il software di Magnis assegna automaticamente un Sample ID predefinito a ogni posizione dei campioni. I Sample ID predefiniti possono essere sostituiti con il nome del campione/Sample ID desiderato utilizzando uno dei due metodi seguenti.



Metodo 1: importazione di assegnazioni di campioni mediante un file .csv

- 1 Creare un file .csv (a valori separati da virgola) contenente i Sample ID che si vogliono includere nella corsa elencati nell'ordine corretto e scaricare il file csv su un'unità USB non criptata, come descritto nel dettaglio a [pagina 17](#).
- 2 Nella schermata *Enter Sample Info* (Immissione dati campioni) raffigurata sopra, premere il pulsante di caricamento del campione, quindi seguire le istruzioni della procedura guidata di impostazione del protocollo per trasferire i Sample ID dall'unità USB.



Metodo 2: assegnazione manuale dei campioni al momento della corsa

- 1 Selezionare una posizione specifica dei campioni sul touch screen.
- 2 Utilizzare lo strumento **Edit Sample ID** a destra per inserire il testo desiderato come Sample ID. Premere **Change** per salvare il testo inserito come Sample ID associato alla posizione selezionata in precedenza.

Passaggio 5. Conferma delle impostazioni e avvio della corsa

Utilizzare questa serie di schermate per confermare i dettagli delle impostazioni della corsa prima di avviarne l'esecuzione.

- 1 Nella prima schermata, verificare le caratteristiche generali della corsa. Dopo aver verificato che le voci siano corrette, premere la freccia in avanti per passare alla schermata di configurazione finale.



- 2 Nella seconda schermata sono visualizzati i dettagli della corsa relativi alle caratteristiche del campione di DNA e della sonda utilizzati nella corsa. Vengono visualizzati i numeri dei pre-capture e post-capture PCR cycle che verranno utilizzati nella corsa (in base alle condizioni ottimali per il DNA in ingresso e per la sonda utilizzati nella corsa).



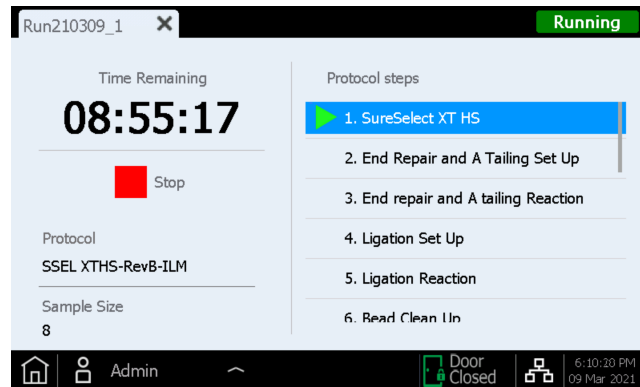
Quando un utente con livello di accesso *Advanced* è connesso, è possibile modificare i valori dei numeri di cicli premendo il pulsante che raffigura una matita. Gli utenti con livello di accesso *Standard* non sono in grado di modificare questi parametri di esecuzione e non possono visualizzare il pulsante con la matita nella schermata mostrata sopra.

- 3 Dopo aver verificato i dettagli delle impostazioni della corsa, premere il pulsante Start per avviare la corsa.

Dopo l'avvio della corsa, le spie LED sono verdi e il touch screen visualizza lo stato della corsa con una stima del tempo rimanente prima del completamento della stessa.

Le corse richiedono in genere dalle 8,5 alle 9 ore e possono essere effettuate durante la notte per comodità. Una volta completato il protocollo, le librerie preparate vengono conservate automaticamente a 12 °C. Raccogliere le librerie dallo strumento entro 72 ore.

Se necessario, premere il pulsante rosso quadrato **Stop** per interrompere la corsa. Si apre un messaggio di avvertenza che chiede di confermare che si desidera interrompere la corsa. Una volta interrotta una corsa, non è possibile riprenderla e i contenitori da laboratorio utilizzati in quella corsa non possono essere caricati nuovamente per una corsa futura.

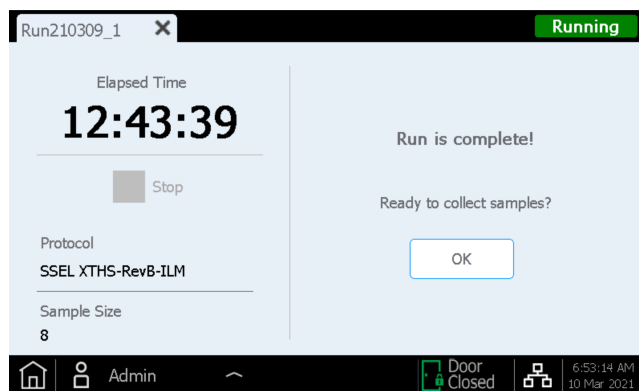


NOTA

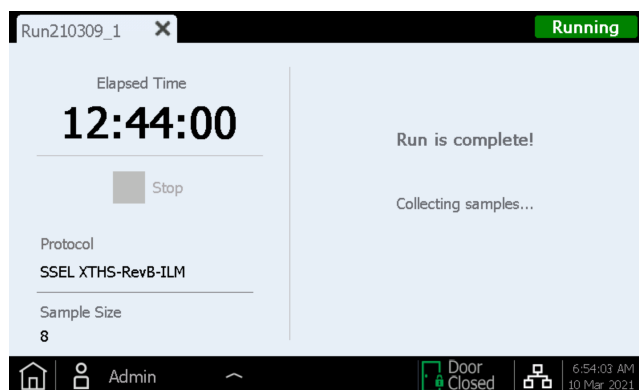
La schermata *Running* deve rimanere aperta per tutta la durata della corsa e mentre la corsa è in esecuzione il pulsante per chiudere della schermata (✕) e gli altri pulsanti di navigazione sono inattivi. Non è possibile utilizzare il touch screen per eseguire altre funzioni durante una corsa.

Passaggio 6. Raccolta dei campioni finali delle librerie dallo strumento

Quando la sessione è completa, il touch screen visualizza le istruzioni mostrate nell'immagine sottostante. Premere **OK** quando si è pronti a prelevare i campioni delle librerie dallo strumento.

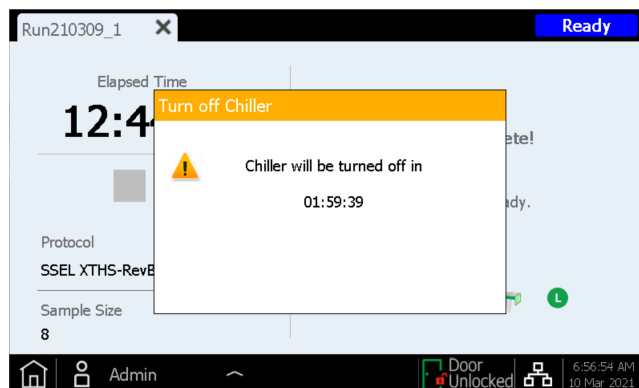


Lo strumento trasferisce quindi le soluzioni delle librerie preparate dalla piastra per PCR nel termociclatore alla Library Output Strip verde nel refrigeratore.



Prima di aprire lo sportello dello strumento, attendere che le spie LED diventino blu, a indicare che tutte le fasi di elaborazione dei campioni effettuate dallo strumento sono state completate.

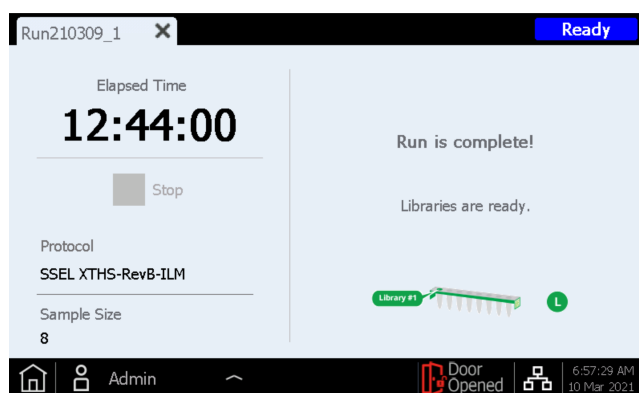
Una volta che i campioni sono posizionati nella Library Output Strip verde collocata nel refrigeratore, il touch screen appare come segue. Il refrigeratore, che contiene i campioni delle librerie, viene mantenuto a 12 °C per un massimo di 2 ore, e il periodo di conservazione rimanente viene indicato sul touch screen come mostrato di seguito. Il refrigeratore si spegne quando si apre lo sportello dello strumento.



Aprire completamente lo sportello dello strumento (fino a quando le spie LED non diventano bianche) e raccogliere i campioni finali delle librerie nella Library Output Strip verde presente nella posizione L del modulo refrigeratore. Sigillare nuovamente i pozzetti utilizzando una nuova strip di sigilli in alluminio (inclusa nella confezione con le strip di provette Library Output e QC), quindi collocare le librerie in un luogo con condizioni di conservazione adeguate per l'utilizzo previsto dal disegno della ricerca.

Le linee guida per l'elaborazione delle librerie con target arricchiti finali per il sequenziamento del DNA sono riportate nell'[Appendice 3: linee guida per l'elaborazione di campioni di DNA dopo la corsa per l'NGS](#) a pagina 58.

Una volta aperto lo sportello per la raccolta dei campioni delle librerie, il touch screen appare come mostrato di seguito.



Chiudere la schermata della corsa premendo la X presente sulla scheda per tornare alla schermata Home.

NOTA

La chiusura della schermata può richiedere alcuni secondi. Non premere ripetutamente il tasto X.

Elaborazione dei campioni per QC opzionale delle librerie pre-acquisizione

Se si sono raccolti i campioni per QC opzionali delle librerie pre-acquisizione durante la corsa, rimuovere la QC strip blu dal modulo refrigeratore. Far essiccare il DNA nei pozzetti lasciando la QC strip non sigillata a temperatura ambiente fino a quando i campioni sono essiccati. I campioni per QC possono essere conservati essiccati finché non si analizzano le librerie di sequenziamento.

NOTA

I campioni per QC possono sembrare essiccati o parzialmente essiccati alla fine della corsa, poiché le QC strip non vengono sigillate dopo la raccolta delle aliquote da 3 µl effettuata durante la corsa. Per garantire l'accuratezza dei risultati del controllo qualità, i campioni devono essere completamente essiccati prima di essere archiviati o ricostituiti.

Se è necessario analizzare campioni per il controllo qualità, sospendere nuovamente i campioni essiccati in 6 µl di acqua priva di nucleasi per ottenere una concentrazione adatta all'analisi con il sistema TapeStation di Agilent e un test D1000 ScreenTape o con uno strumento analitico simile. Dopo aver aggiunto 6 µl di acqua a ciascun pozzetto, incubare a temperatura ambiente per 5-10 minuti, quindi miscelare bene con un agitatore vortex per garantire una risospensione completa.

Risultati attesi: generalmente le librerie pre-acquisizione hanno un picco delle dimensioni dei frammenti di DNA tra 300 e 400 bp per il DNA in ingresso di alta qualità oppure tra 200 e 400 bp per il DNA in ingresso derivato da campioni FFPE.

I campioni per QC che sono stati essiccati e risospesi in 6 µl dovrebbero avere una concentrazione di circa 30-100 ng/µl a seconda della qualità del DNA in ingresso e del numero dei cicli di PCR pre-acquisizione. È possibile calcolare il rendimento complessivo delle librerie pre-acquisizione può essere calcolato moltiplicando la quantità di DNA presente in 1 µl del campione per QC ricostituito per 36 (tenendo conto sia della diluizione che gli aggiustamenti relativi al campionamento).

Passaggio 7. Pulizia dello strumento dopo la corsa

Rimuovere e smaltire tutti i materiali di consumo usati rimasti sul deck dello strumento:

- Rimuovere il cestino dei rifiuti per i puntali dal cassetto dei rifiuti, quindi richiudere il cassetto
- Rimuovere la Deep-Well HSM Plate usata dal modulo HSM
- Rimuovere la 96-Well PCR Plate usata e il thermal cycler seal dal modulo per PCR
- Rimuovere tutte le scatole di puntali, comprese quelle parzialmente piene
- Rimuovere la Beads/Buffers Plate usata dal supporto per piastra al centro del deck
- Aprire il modulo refrigeratore e rimuovere la Reagent Plate usata e le strip di provette rossa, nera e bianca usate. Accertarsi che le strip di provette Library Output (L) verdi e le QC sample (Q) strip blu siano state rimosse dal refrigeratore e conservate per un'ulteriore elaborazione.

NOTA

È fondamentale rimuovere tutti i componenti dei contenitori da laboratorio e qualsiasi altro oggetto dal deck dello strumento prima di iniziare una nuova corsa. La presenza di qualsiasi oggetto sul deck al momento dell'avvio di una nuova corsa può pregiudicare il successo dell'Instrument Health Check (IHC) effettuato in vista della corsa successiva.

Se sul deck si riscontra la presenza di sostanze dovuta a fuoriuscite o perdite, Agilent consiglia di eseguire la procedura di decontaminazione UV Extended Cycle (vedere a [pagina 20](#) per ulteriori informazioni sulla decontaminazione UV). Pulire eventuali fuoriuscite come indicato nelle istruzioni fornite nel manuale utente dello strumento.

3

Appendice 1: linee guida per la preparazione dei campioni di DNA

- I. Preparazione di campioni di DNA di alta qualità per le corse su Magnis **46**
 - Passaggio 1. Preparazione, quantificazione e qualificazione di campioni di DNA genomico **46**
 - Passaggio 2. Frammentazione del DNA **46**
- II. Preparazione di campioni di DNA derivati da campioni FFPE per le corse su Magnis **49**
 - Passaggio 1. Preparazione del DNA genomico estratto da campioni FFPE **49**
 - Passaggio 2. Qualificazione e quantificazione di campioni di DNA estratti da campioni FFPE **49**
 - Passaggio 3. Frammentazione dei campioni di DNA ottenuti da campioni FFPE **51**

Prima di configurare la corsa per la preparazione delle librerie di sequenziamento del DNA con Magnis SureSelect^{XT HS}, occorre preparare, quantificare, qualificare e frammentare i campioni di DNA seguendo le linee guida e i protocolli indicati in questa sezione.

Le Magnis Sample Input Strip (strip di provette rosse fornite in un supporto a piastra, c.p. 5190-9882 o 5191-5676), così come tutti i reagenti per la preparazione e la diluizione dei campioni di DNA in ingresso, devono essere conservate e utilizzate solo nelle aree del laboratorio dedicate alle fasi precedenti la PCR.

Il protocollo di preparazione delle librerie è compatibile sia con gDNA di alta qualità preparato da campioni freschi o congelati freschi, sia con DNA di qualità inferiore preparato da campioni FFPE. Per campioni di gDNA di alta qualità, vedere a **pagina 46**. Per DNA derivato da campioni FFPE, vedere a **pagina 49**.

Le corse eseguite su Magnis possono gestire 10 ng, 50 ng, 100 ng o 200 ng di DNA in ingresso. Per ottenere risultati di sequenziamento ottimali, utilizzare la quantità massima di DNA in ingresso disponibile entro questo intervallo.

I. Preparazione di campioni di DNA di alta qualità per le corse su Magnis

Le corse con Magnis SureSelect XT HS richiedono 10 ng, 50 ng, 100 ng o 200 ng di DNA in ingresso in un volume di 50 µl di 1X Low TE Buffer. Tutti i campioni inclusi nella stessa corsa devono essere di pari quantità.

NOTA

Non diluire i campioni da frammentare con acqua. La frammentazione dei campioni in acqua riduce la complessità e il rendimento complessivo della preparazione delle librerie.

Passaggio 1. Preparazione, quantificazione e qualificazione di campioni di DNA genomico

- 1 Preparare il gDNA di alta qualità da campioni biologici freschi o congelati utilizzando un sistema di purificazione adeguato, come il QIAamp DNA Mini Kit di Qiagen, seguendo il protocollo del produttore.

NOTA

Assicurarsi che i campioni di DNA genomico siano di alta qualità con un rapporto di assorbimento 260/280 che va da 1,8 a 2,0.

- 2 Utilizzare il kit di analisi Qubit BR dsDNA Assay Kit per determinare la concentrazione di ciascun campione di gDNA. Seguire le istruzioni del produttore dello strumento e del kit di analisi.
- 3 Preparare ciascun campione di DNA per il protocollo di preparazione delle librerie diluendo la quantità appropriata (10 ng, 50 ng, 100 ng o 200 ng) di ciascun campione di gDNA con 1X Low TE Buffer in modo da ottenere un volume finale di 50 µl. Miscelare bene con agitatore vortex, quindi centrifugare brevemente per raccogliere il liquido. Conservare i campioni nel ghiaccio.

Passaggio 2. Frammentazione del DNA

In questo passaggio, i campioni di gDNA da 50 µl vengono frammentati in condizioni ottimali per il DNA di alta qualità. La dimensione del frammento target di DNA è compresa tra 150 e 200 bp.

NOTA

Questo protocollo è stato ottimizzato utilizzando uno strumento Covaris modello E220 e Covaris microTUBE da 130 µl. Consultare le raccomandazioni del produttore relative all'utilizzo di altri strumenti o portacampioni Covaris per ottenere frammenti target di DNA delle stesse dimensioni.

- 1 Impostare lo strumento Covaris E220. Per ulteriori informazioni, fare riferimento al manuale utente dello strumento.
 - a Verificare che il serbatoio di Covaris sia stato riempito con acqua deionizzata pulita fino al livello appropriato indicato dalla linea di riempimento secondo le raccomandazioni del produttore relative allo specifico modello di strumento e alla provetta o alla piastra utilizzata.
 - b Controllare che l'acqua copra la parte in vetro visibile della provetta.
 - c Sul pannello di controllo dello strumento, premere il pulsante Degas. Degassare secondo le raccomandazioni del produttore, in genere 30-60 minuti.
 - d Impostare la temperatura del refrigeratore a un valore compreso tra 2 °C e 5 °C per garantire che la lettura della temperatura nel bagnomaria sia 5 °C. Consultare le raccomandazioni del produttore per l'aggiunta di liquidi refrigeranti per evitare il congelamento.
- 2 Completare le fasi per la frammentazione del DNA indicate di seguito per ciascuno dei campioni di gDNA.
 - a Trasferire ogni campione di DNA da 50 µl in un microTUBE Covaris, utilizzando un puntale per pipetta conico per trasferire lentamente il campione attraverso il setto preforato del tappo.
 - b Centrifugare il microTUBE per 30 secondi per raccogliere il liquido e rimuovere eventuali bolle dal fondo della provetta.
 - c Fissare il microTUBE nel supporto per provette e frammentare il DNA utilizzando le impostazioni indicate nella **Tabella 8**.

Tabella 8 Impostazioni di frammentazione per lo strumento della serie E di Covaris (software SonoLab v7 o successivo)

Impostazione	Valore
Tasso di pulsazione	10%
Potenza incidente di picco (PIP)	175
Cicli per burst	200
Temperatura del bagno	Da 2 °C a 8 °C
Tempo di trattamento	2 × 120 secondi (frammentazione in due fasi, utilizzando i passaggi descritti di seguito) <ul style="list-style-type: none"> • Frammentare per 120 secondi • Centrifugare il microTUBE per 10 secondi • Miscelare con agitatore vortex il microTUBE ad alta velocità per 5 secondi • Centrifugare il microTUBE per 10 secondi • Frammentare per altri 120 secondi • Centrifugare il microTUBE per 10 secondi • Miscelare con agitatore vortex il microTUBE ad alta velocità per 5 secondi • Centrifugare il microTUBE per 10 secondi

- d Passare direttamente alla fase successiva, non lasciare il DNA frammentato nel microTUBE Covaris più a lungo del necessario.

- 3 Rimettere il microTUBE Covaris contenente DNA frammentato nella stazione di carico e scarico. Lasciando in posizione il tappo a incastro del microTUBE, inserire il puntale di una pipetta attraverso il setto preforato, quindi rimuovere lentamente il DNA frammentato.
- 4 Trasferire il campione di DNA frammentato da 50 µl dal microTUBE di Covaris al pozzetto designato della Magnis Sample Input Strip rossa, perforando il sigillo in alluminio con il puntale della pipetta appena prima di erogare il liquido. Conservare i campioni nel ghiaccio.

Assicurarsi di caricare i campioni nei pozzetti per campioni corrispondenti alle posizioni corrette, con il campione 1 nel pozzetto più lontano dal codice a barre (barcode), come mostrato nella Figura 7 di seguito.

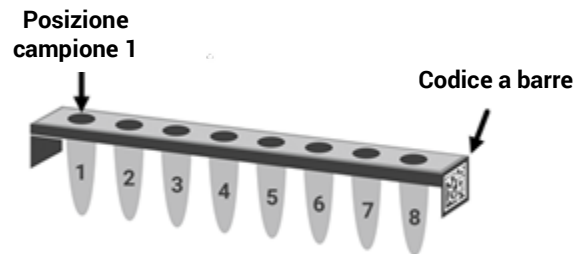


Figura 7 Orientamento richiesto per i numeri dei campioni da 1 a 8 nella Magnis Sample Input Strip.

- 5 Dopo aver trasferito il campione di DNA, centrifugare brevemente il microTUBE per raccogliere eventuale campione residuo. Trasferire eventuale ulteriore liquido raccolto nello stesso pozzetto della Magnis Sample Input Strip.

NOTA

È importante evitare la perdita di DNA in ingresso in questa fase, specialmente per i campioni di DNA scarsi. Ispezionare visivamente il microTUBE per assicurarsi che tutto il campione sia stato trasferito. Se nel microTUBE rimangono alcune goccioline, ripetere il [passaggio 5](#).

- 6 Una volta che tutti i campioni sono stati caricati, continuare a impostare la strip di campioni in ingresso come descritto in dettaglio a [pagina 24](#) (vedere la fase d del [passaggio 3](#)).

II. Preparazione di campioni di DNA derivati da campioni FFPE per le corse su Magnis

Le corse con Magnis SureSelect XT HS richiedono 10 ng, 50 ng, 100 ng o 200 ng di DNA in ingresso in un volume di 50 µl di 1X Low TE Buffer. Tutti i campioni inclusi nella stessa corsa devono essere di pari quantità.

NOTA

Non diluire i campioni da frammentare con acqua. La frammentazione dei campioni in acqua riduce la complessità e il rendimento complessivo della preparazione delle librerie.

Passaggio 1. Preparazione del DNA genomico estratto da campioni FFPE

Preparazione e qualificazione di gDNA proveniente da campioni FFPE

- 1 Preparare il gDNA estratto da sezioni di tessuto FFPE utilizzando il QIAamp DNA FFPE Tissue Kit di Qiagen la Deparaffinization Solution di Qiagen, seguendo il protocollo del produttore. Eluire i campioni finali di gDNA nella colonna MinElute in due fasi, utilizzando 30 µl di Buffer ATE in ogni fase, per un volume di eluizione finale di circa 60 µl.

NOTA

Se la lisi tissutale appare incompleta dopo un'ora di digestione con Proteinase K, aggiungere altri 10 µl di Proteinase K e continuare a incubare a 56 °C, miscelando periodicamente, per un massimo di tre ore.

Conservare i campioni di gDNA nel ghiaccio per utilizzarli nella preparazione delle librerie il giorno stesso, oppure a -20 °C per elaborarli successivamente.

- 2 Valutare la qualità (integrità del DNA) di ciascun campione di DNA estratto da campioni FFPE utilizzando uno dei metodi seguenti.

Passaggio 2. Qualificazione e quantificazione di campioni di DNA estratti da campioni FFPE

Valutare la qualità (integrità del DNA) di ciascun campione di DNA derivato da campioni FFPE utilizzando uno dei due metodi seguenti. L'integrità del DNA misurata in questa fase serve a determinare i mezzi appropriati necessari per la quantificazione dei campioni di gDNA da 10 ng, 50 ng, 100 ng o 200 ng amplificabili da utilizzare nella corsa.

Metodo 1: qualificazione con l'Agilent NGS FFPE QC Kit (metodo raccomandato)

L'Agilent NGS FFPE QC Kit fornisce un test basato su qPCR per la determinazione dell'integrità di campioni di DNA. I risultati comprendono un punteggio di integrità del DNA $\Delta\Delta Cq$ e l'esatta quantità di DNA amplificabile presente nel campione, consentono quindi la normalizzazione diretta del DNA in ingresso per ogni campione. Le raccomandazioni relative al DNA in ingresso in funzione dei punteggi $\Delta\Delta Cq$ dei singoli campioni sono riassunte nella [Tabella 9](#).

- a Utilizzare il kit di analisi Qubit BR dsDNA Assay Kit per determinare la concentrazione di ciascun campione di gDNA. Seguire le istruzioni del produttore dello strumento e del kit di analisi.
- b Prelevare un'aliquota di 1 µl del campione di gDNA estratto da campioni FFPE da analizzare utilizzando l'Agilent NGS FFPE QC Kit per determinare il punteggio di integrità del DNA $\Delta\Delta Cq$. Per ulteriori informazioni, consultare il manuale utente del kit all'indirizzo www.agilent.com.
- c Per tutti i campioni con punteggio di integrità del DNA $\Delta\Delta Cq \leq 1$, utilizzare la concentrazione di gDNA basata su Qubit determinata nel **passaggio a** qui sopra, per determinare il volume di DNA in ingresso necessario per il protocollo.
- d Per tutti i campioni con punteggio di integrità del DNA $\Delta\Delta Cq > 1$, utilizzare la concentrazione di gDNA amplificabile calcolata in base alla qPCR, riportata dai risultati dell'Agilent NGS FFPE QC Kit, per determinare le quantità di DNA in ingresso per il protocollo.

Tabella 9 Modifiche del DNA in ingresso per SureSelect XT HS in base al punteggio di integrità del DNA $\Delta\Delta Cq$

Parametro del protocollo	DNA non estratto da campioni FFPE	DNA estratto da campioni FFPE	
		$\Delta\Delta Cq \leq 1^*$	$\Delta\Delta Cq > 1$
DNA in ingresso per la preparazione delle librerie	10 ng, 50 ng, 100 ng o 200 ng di DNA, sulla base dell'analisi Qubit	10 ng, 50 ng, 100 ng o 200 ng di DNA, sulla base dell'analisi Qubit	10 ng, 50 ng, 100 ng o 200 ng di DNA amplificabile, sulla base della quantificazione mediante qPCR

* I campioni con DNA estratto da campioni FFPE con punteggi $\Delta\Delta Cq \leq 1$ dovrebbero essere trattati come campioni non estratti da campioni FFPE ai fini della determinazione della quantità di DNA in ingresso. Per campioni di questo tipo, assicurarsi di utilizzare la concentrazione di DNA determinata dall'analisi Qubit, invece della concentrazione determinata in base alla qPCR, per calcolare il volume richiesto per 10-200 ng di DNA.

- 3 Preparare ciascun campione di DNA estratto da campioni FFPE per il protocollo di preparazione delle librerie diluendo la quantità appropriata (10 ng, 50 ng, 100 ng o 200 ng) di ciascun campione di gDNA con 1X Low TE Buffer in modo da ottenere un volume finale di 50 µl. Miscelare bene con agitatore vortex, quindi centrifugare brevemente per raccogliere il liquido. Conservare i campioni nel ghiaccio.

Metodo 2: qualificazione mediante il punteggio DIN dell'analisi con Agilent's Genomic DNA ScreenTape

L'analisi Agilent's Genomic DNA ScreenTape, utilizzata in combinazione con l'Agilent's 4200 TapeStation, fornisce un test elettroforetico quantitativo per la determinazione dell'integrità del campione di DNA. Questo test riporta un punteggio DIN (DNA Integrity Number, punteggio di integrità del DNA) per ogni campione che viene utilizzato per stimare la normalizzazione adeguata del DNA in ingresso richiesto per i campioni di DNA a bassa integrità.

- a Utilizzare il kit di analisi Qubit BR dsDNA Assay Kit per determinare la concentrazione di ciascun campione di gDNA. Seguire le istruzioni del produttore dello strumento e del kit di analisi.
- b Rimuovere un'aliquota di 1 µl del campione di gDNA estratto da campioni FFPE e analizzarla con l'analisi Genomic DNA ScreenTape. Per ulteriori informazioni, consultare il [manuale per l'utente all'indirizzo www.agilent.com](http://www.agilent.com).

- c Utilizzando il punteggio DIN riportato per ciascun campione nell'analisi Genomic DNA ScreenTape, consultare la [Tabella 10](#) e determinare la quantità raccomandata di DNA in ingresso per il campione.

Tabella 10 Modifiche del DNA in ingresso per SureSelect XT HS in base al punteggio DIN del DNA

Parametro del protocollo	DNA non estratto da campioni FFPE	DNA estratto da campioni FFPE		
		DIN > 8*	DIN 3-8	DIN < 3
DNA in ingresso per la preparazione delle librerie	10 ng, 50 ng, 100 ng o 200 ng di DNA, quantificato con l'analisi Qubit	10 ng, 50 ng, 100 ng o 200 ng di DNA, quantificato con l'analisi Qubit	Utilizzare 50 ng, 100 ng o 200 ng di DNA (utilizzare la quantità massima di DNA disponibile, fino a 200 ng). Quantificare mediante analisi Qubit per determinare il volume richiesto per 50 ng, 100 ng o 200 ng di DNA in ingresso.	Utilizzare 100 ng o 200 ng di DNA (utilizzare la quantità massima di DNA disponibile, fino a 200 ng). Quantificare mediante analisi Qubit per determinare il volume richiesto per 100 ng o 200 ng di DNA in ingresso.

* I campioni derivati da campioni FFPE con DIN > 8 devono essere trattati come campioni non derivati da campioni FFPE ai fini della determinazione della quantità di DNA in ingresso.

- 4 Preparare ciascun campione di DNA estratto da campioni FFPE per il protocollo di preparazione delle librerie diluendo la quantità appropriata (10 ng, 50 ng, 100 ng o 200 ng) di ciascun campione di gDNA con 1X Low TE Buffer in modo da ottenere un volume finale di 50 µl. Miscelare bene con agitatore vortex ciascun campione diluito, quindi centrifugare brevemente per raccogliere il liquido. Conservare i campioni nel ghiaccio.

Passaggio 3. Frammentazione dei campioni di DNA ottenuti da campioni FFPE

In questo passaggio, i campioni di gDNA da 50 µl vengono frammentati in condizioni ottimali per il DNA derivato da campioni FFPE. La dimensione del frammento target di DNA è compresa tra 150 e 200 bp.

NOTA

Questo protocollo è stato ottimizzato utilizzando uno strumento Covaris modello E220 e Covaris microTUBE da 130 µl. Consultare le raccomandazioni del produttore relative all'utilizzo di altri strumenti o portacampioni Covaris per ottenere frammenti target di DNA delle stesse dimensioni.

- 1 Impostare lo strumento Covaris E220. Per ulteriori informazioni, fare riferimento al manuale utente dello strumento.
 - a Verificare che il serbatoio di Covaris sia stato riempito con acqua deionizzata pulita fino al livello appropriato indicato dalla linea di riempimento secondo le raccomandazioni del produttore relative allo specifico modello di strumento e alla provetta o alla piastra utilizzata.
 - b Controllare che l'acqua copra la parte in vetro visibile della provetta.
 - c Sul pannello di controllo dello strumento, premere il pulsante Degas. Degassare secondo le raccomandazioni del produttore, in genere 30-60 minuti.

- d Impostare la temperatura del refrigeratore a un valore compreso tra 2 °C e 5 °C per garantire che la lettura della temperatura nel bagnomaria sia 5 °C. Consultare le raccomandazioni del produttore per l'aggiunta di liquidi refrigeranti per evitare il congelamento.
- 2 Completare i passaggi di frammentazione del DNA seguenti per ciascuno dei campioni di gDNA da 50 µl (contenenti 10 ng, 50 ng, 100 ng o 200 ng di gDNA in 50 µl di 1X Low TE Buffer).
 - a Trasferire ogni campione di DNA da 50 µl in un microTUBE Covaris, utilizzando un puntale per pipetta conico per trasferire lentamente il campione attraverso il setto preforato del tappo.
 - b Centrifugare il microTUBE per 30 secondi per raccogliere il liquido e rimuovere eventuali bolle dal fondo della provetta.
 - c Fissare il microTUBE nel supporto per provette e frammentare il DNA utilizzando le impostazioni indicate nella [Tabella 11](#).

Tabella 11 Impostazioni di frammentazione per lo strumento della serie E di Covaris (software SonoLab v7 o successivo)

Impostazione	Valore
Tasso di pulsazione	10%
Potenza incidente di picco (PIP)	175
Cicli per burst	200
Temperatura del bagno	Da 2 °C a 8 °C
Tempo di trattamento	240 secondi

- d Passare direttamente alla fase successiva, non lasciare il DNA frammentato nel microTUBE Covaris più a lungo del necessario.
- 3 Rimettere il microTUBE Covaris contenente DNA frammentato nella stazione di carico e scarico. Lasciando in posizione il tappo a incastro del microTUBE, inserire il puntale di una pipetta attraverso il setto preforato, quindi rimuovere lentamente il DNA frammentato.
- 4 Trasferire il campione di DNA frammentato da 50 µl dal microTUBE di Covaris al pozzetto designato della Magnis Sample Input Strip rossa, perforando il sigillo in alluminio con il puntale della pipetta appena prima di erogare il liquido. Conservare i campioni nel ghiaccio.

Assicurarsi di caricare i campioni nei pozzetti per campioni corrispondenti alle posizioni corrette, con il campione 1 nel pozzetto più lontano dal codice a barre (barcode), come mostrato nella [Figura 8](#) di seguito.

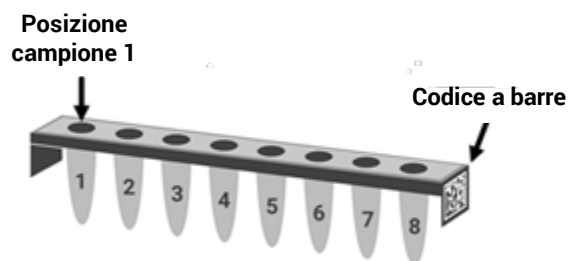


Figura 8 Orientamento richiesto per i numeri dei campioni da 1 a 8 nella Magnis Sample Input Strip.

- 5 Dopo aver trasferito il campione di DNA, centrifugare brevemente il microTUBE per raccogliere eventuale campione residuo. Trasferire eventuale ulteriore liquido raccolto nello stesso pozzetto della Magnis Sample Input Strip.

NOTA

È importante evitare la perdita di DNA in ingresso in questa fase, specialmente per i campioni di DNA scarsi. Ispezionare visivamente il microTUBE per assicurarsi che tutto il campione sia stato trasferito. Se nel microTUBE rimangono alcune goccioline, ripetere il [passaggio 5](#).

- 6 Una volta che tutti i campioni sono stati caricati, continuare a impostare la strip di campioni in ingresso come descritto in dettaglio a [pagina 24](#) (vedere la fase d del [passaggio 3](#)).

4

Appendice 2: uso di strip di sonde preparate al momento della corsa

Preparazione di strip di sonde al momento della corsa [55](#)

Inserimento dei dati della sonda nel software di Magnis durante la configurazione della corsa [57](#)

Le istruzioni contenute in questa sezione sono specifiche per l'uso con il kit reagenti con codice parte G9730D o G9730B, fornito con Probe Input Strips (EPIS) vuote. Le corse eseguite con questi kit richiedono la preparazione di strip di sonde al momento della corsa e le fasi aggiuntive di immissione dati descritte in questa sezione.

I codici parte dei kit reagenti G9730B e G9730D sono elaborati utilizzando diversi protocolli di esecuzione Magnis. Le fasi di configurazione della strip di sonde sono simili per entrambi i protocolli, differendo solo per il volume di sonda richiesto per pozzetto dei campioni, come riassunto nella [Tabella 12](#) a pagina 55.

Le istruzioni presenti in questa sezione non si applicano ai kit che contengono strip per sonde preriempite; per informazioni sull'utilizzo delle strip per sonde preriempite, vedere [pagina 24](#).

Preparazione di strip di sonde al momento della corsa

Le Magnis Probe Input Strips vuote (c.p. 5190-9883, strip bianche fornite in un supporto a piastra) devono essere conservate e riempite in un'area del laboratorio dedicata alle azioni da eseguire prima della PCR. Preparare la strip di ingresso sonda appena prima dell'uso nella corsa; non preriempire e scongelare le strip di ingresso sonda usate in questi protocolli.

Consultare la [Tabella 12](#) di seguito per determinare il volume di SureSelect Probe necessario per pozzetto a seconda del tipo di kit reagenti e di Capture Size della sonda.

Gli 8 pozzetti della Magnis Probe Input Strip vuota possono essere riempiti con la stessa o con diverse soluzioni sonda. Tutte le sonde utilizzate nella stessa corsa devono, tuttavia, avere una dimensione di progetto simile per consentire l'uso delle stesse condizioni di corsa da parte di Magnis (vedere [Tabella 13](#) a pagina 57 per gli intervalli di dimensioni di progetto della sonda compatibili).

Tabella 12 Requisiti di riempimento della Magnis Probe Input Strip vuota

Nome del kit reagenti (codice parte)	Protocollo selezionato sulla schermata <i>Enter Run Info</i>	Capture Size sonda	Volume da pipettare in ogni pozzetto	Volume richiesto per l'esecuzione di una corsa da 8 campioni
Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit (G9730D)	SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM O LT-SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM	≥ 3 Mb (Large Capture Size)*	5 µl	40 µl
		< 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

* L'attributo **Large** o **Small Capture Size** per la sonda o le sonde utilizzate nella corsa si immette nel software di Magnis come descritto a [pagina 57](#). Tutte le sonde utilizzate in una corsa devono avere lo stesso attributo **Capture Size** e devono utilizzare le stesse condizioni di ciclo di PCR post-acquisizione (vedere [Tabella 13](#) a pagina 57).

- 1 Prendere una Magnis Probe Input Strip bianca vuota e una strip di sigilli in alluminio nuova (con lo strato protettivo sul retro) dal kit con c.p. 5190-9883, conservati a temperatura ambiente.
- 2 Scongelare e miscelare i flaconi di SureSelect Probe per utilizzarli come sonda per la corsa e conservarli nel ghiaccio.
- 3 Riempire i pozzetti della Magnis Probe Input Strip vuota con la quantità di soluzione SureSelect Probe necessaria per il tipo di kit reagenti e le dimensioni di progetto della sonda, seguendo la procedura qui sotto:
 - a Usare un puntale per pipetta vuoto da 200 µl per preperforare il sigillo in alluminio di ogni pozzetto della strip di ingresso sonda da riempire per la corsa.
 - b Usando una micropipetta idonea per distribuire accuratamente il volume della sonda elencato nella [Tabella 12](#), distribuire la quantità indicata di soluzione SureSelect Probe in ogni pozzetto.

Usare una micropipetta con capacità di 2 µl e un puntale per pipetta quando si distribuiscono 2 µl di sonda.

Usare una micropipetta con capacità di 10 µl e un puntale per pipetta quando si distribuiscono 5 µl, 6 µl, o 8 di sonda.

NOTA

È importante riempire i pozzetti della strip di ingresso sonda utilizzando esattamente i volumi indicati nella [Tabella 12](#). Utilizzare una pipetta calibrata qualificata per distribuire il volume indicato con accuratezza e precisione elevate.

- 4 Dopo aver distribuito la soluzione sonda in tutti i pozzetti, sigillarli nuovamente con il sigillo nuovo incluso nel kit, avendo cura di non coprire il codice a barre della strip di sonde con il sigillo in alluminio. Assicurarsi che il sigillo sia applicato in modo saldo e uniforme, senza eccessive sporgenze o pieghe che potrebbero ostruire l'inserimento della strip della provetta durante il caricamento nello strumento.
- 5 Controllare visivamente i pozzetti della strip di sonde per verificare che non siano presenti bolle. Rimuovere eventuali bolle d'aria centrifugando la strip di sonde preparata in una centrifuga impostata su 250 x g per 5 secondi o finché non sono state rilasciate tutte le bolle presenti nella soluzione sonda.
- 6 Conservare nel ghiaccio la strip di sonde fino al momento dell'utilizzo durante la preparazione del deck descritta a [pagina 34](#).

Quando si carica la strip di sonde durante la preparazione del deck, assicurarsi di verificare che la strip sia correttamente posizionata nel modulo del refrigeratore.

Inserimento dei dati della sonda nel software di Magnis durante la configurazione della corsa

Per le corse che comprendono strip di ingresso sonda riempite al momento della corsa (corse con il kit codice parte G9730D o G9730B), è necessario immettere le proprietà relative alla sonda nei campi mostrati di seguito durante la fase di configurazione della corsa *Verify Labware* (vedere [pagina 37](#)).

Inserire le informazioni nei campi *Part Number*, *Lot Number* e *Design ID* conformemente ai requisiti di registrazione della struttura. Il Design ID e il Lot Number delle sonde per l’acquisizione delle librerie SureSelect o ClearSeq fornite da Agilent sono riportate sul flacone del prodotto e sul Certificato di analisi.

Immettere il numero dei cicli di PCR da utilizzare nella corsa nel campo *Post-Capture PCR Cycles*, in base alle dimensioni del disegno della sonda, quindi premere l’attributo appropriato di *Capture Size* per descrivere la sonda o le sonde utilizzate nella corsa. Vedere le linee guida nella [Tabella 13](#) di seguito. Il numero di cicli di PCR suggerito è tipicamente quello ottimale per le dimensioni dei design delle sonde elencate, ma il numero di cicli di PCR può essere regolato per soddisfare le esigenze del proprio progetto sperimentale. Mentre gli 8 pozzetti della Magnis Probe Input Strip possono contenere soluzioni sonda diverse, tutte le sonde utilizzate nella stessa corsa devono utilizzare le stesse impostazioni per *Post-Capture PCR Cycles* e *Capture Size*.

Tabella 13 Impostazioni consigliate per le sonde distribuite al momento della corsa

Dimensione di progetto SureSelect Probe	Post-Capture PCR Cycles	Capture Size
< 200 kb	14	Small
200-749 kb	13	Small
750-2.999 kb	12	Small
3-5 Mb	10	Large
> 5 Mb	9	Large

Dopo aver compilato tutti i campi, premere la freccia in avanti per passare alla schermata *Enter Sample Info* ed eseguire i passaggi di configurazione della corsa rimanenti a partire da [pagina 38](#).

5

Appendice 3: linee guida per l'elaborazione di campioni di DNA dopo la corsa per l'NGS

Passaggio 1. Analisi di quantità e qualità dei campioni di DNA delle librerie	59
Passaggio 2. Raggruppamento dei campioni per il sequenziamento in parallelo (opzionale)	62
Passaggio 3. Preparazione dei campioni per il sequenziamento	63
Passaggio 4. Esecuzione della corsa di sequenziamento e analisi dei dati	65
Linee guida per l'impostazione di corse di sequenziamento sugli strumenti HiSeq/NextSeq/NovaSeq	65
Linee guida per l'impostazione di corse di sequenziamento sullo strumento MiSeq	68
Risorse per l'analisi delle sequenze	71

Dopo aver completato la corsa di preparazione delle librerie con Magnis SureSelect^{XT HS}, i campioni di DNA vengono quantificati e qualificati, quindi analizzati mediante NGS. In questa sezione sono riportate le linee guida generali per l'elaborazione dei campioni dopo la corsa per l'NGS; il flusso di lavoro di analisi ed elaborazione successive alla corsa per l'NGS può variare nel caso specifico.

Passaggio 1. Analisi di quantità e qualità dei campioni di DNA delle librerie

Prima del raggruppamento dei campioni per il sequenziamento in parallelo, analizzare la quantità e la qualità del DNA presente nei singoli campioni delle librerie preparate con Agilent 4200 TapeStation o 4150 TapeStation e con High Sensitivity D1000 ScreenTape e il relativo kit di reagenti. Vedere la [Tabella 3](#) a pagina 13 per i dati sugli ordini. Per istruzioni dettagliate, consultare la [Agilent High Sensitivity D1000 Assay Quick Guide](#).

NOTA

In alternativa, i campioni di DNA della libreria possono essere analizzati utilizzando Agilent 2100 Bioanalyzer e [Bioanalyzer High Sensitivity DNA Assay](#) o utilizzando Agilent 5200 Fragment Analyzer e [HS NGS Fragment Kit](#). Per istruzioni complete, consultare le guide per l'utente delle analisi collegate.

- 1 Preparare i campioni per l'analisi con TapeStation in una nuova strip di provette come indicato nella [Guida rapida all'analisi](#). Utilizzare 2 µl di ciascun campione di DNA delle librerie diluito con 2 µl di buffer per campioni High Sensitivity D1000 per l'analisi.

ATTENZIONE

Per una quantificazione accurata, assicurarsi di miscelare accuratamente il DNA combinato e il buffer per campioni con un vortex IKA, come indicato nella [Guida rapida all'analisi](#).

- 2 Caricare le strip di provette per l'analisi con High Sensitivity D1000 del [passaggio 1](#), l'High Sensitivity D1000 ScreenTape e caricare i puntali nella TapeStation come indicato nella [Guida rapida all'analisi](#). Avviare la corsa.
- 3 Verificare che l'elettroferogramma presenti un picco di dimensione dei frammenti di DNA posizionato tra 200 e 400 bp. Gli elettroferogrammi dei campioni sono mostrati nella [Figura 9](#) (libreria preparata da DNA di alta qualità), nella [Figura 10](#) (libreria preparata da DNA di media qualità derivato da campioni FFPE) e nella [Figura 11](#) (libreria preparata da DNA di bassa qualità derivato da campioni FFPE).
- 4 Determinare la concentrazione di ogni libreria integrando sotto l'intero picco.

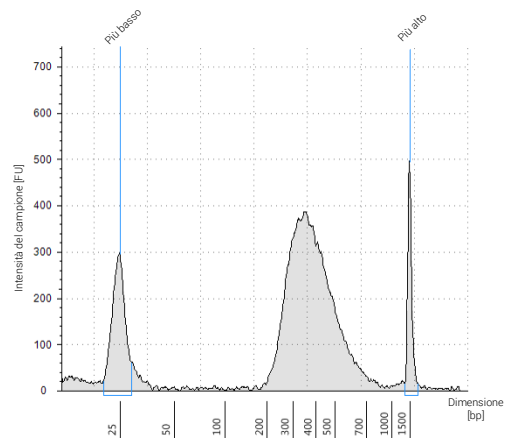


Figura 9 Libreria post-acquisizione preparata a partire da un campione di gDNA di alta qualità analizzato utilizzando il saggio High Sensitivity D1000 ScreenTape.

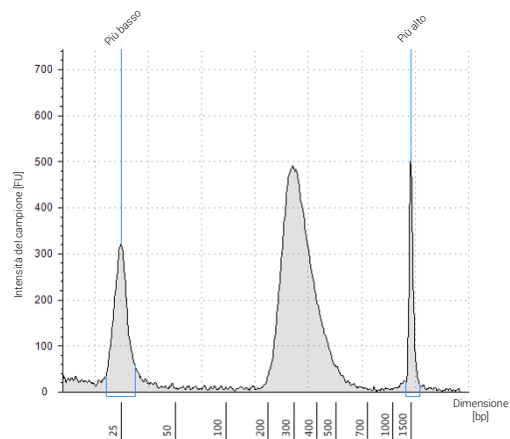


Figura 10 Libreria post-acquisizione preparata a partire da un tipico campione di gDNA derivato da campioni FFPE e analizzato utilizzando il saggio High Sensitivity D1000 ScreenTape.

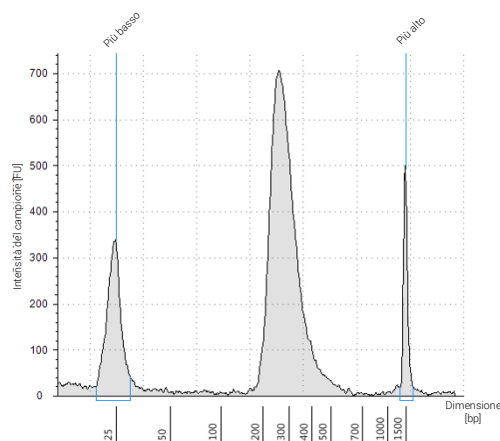


Figura 11 Libreria post-acquisizione preparata a partire da un campione di gDNA di bassa qualità derivato da campioni FFPE e analizzato utilizzando il saggio High Sensitivity D1000 ScreenTape.

Punto di arresto Se non si passa immediatamente al passaggio successivo, conservare i campioni a 4 °C per una notte o a -20 °C per una conservazione prolungata.

Passaggio 2. Raggruppamento dei campioni per il sequenziamento in parallelo (opzionale)

Il numero di librerie indicizzate che possono essere analizzate in parallelo in una singola corsia di sequenziamento è determinato dalle specifiche di uscita del sequenziatore utilizzato e dalla quantità di dati di sequenziamento necessari per il progetto di ricerca. Calcolare il numero di indici che possono essere combinati per ogni corsia, in base alla capacità del sequenziatore e alla quantità di dati di sequenziamento richiesti per ogni campione.

Combinare le librerie in modo tale che ogni libreria contrassegnata da un indice sia presente in quantità equimolare nel raggruppamento utilizzando uno dei metodi indicati di seguito. Utilizzare il diluente specificato dal proprio fornitore di materiale per il sequenziamento, come Low TE, per le fasi di diluizione.

Metodo 1: diluire ogni campione delle librerie da raggruppare in modo da ottenere la stessa concentrazione finale (tipicamente 4-15 nM, o la concentrazione del campione più diluito) quindi combinare volumi uguali di tutti i campioni per creare il raggruppamento finale.

Metodo 2: partendo da campioni di librerie a diverse concentrazioni, aggiungere un volume appropriato di ogni campione per ottenere una concentrazione equimolare nel raggruppamento, quindi modificare il volume finale del raggruppamento per ottenere quello desiderato utilizzando Low TE. Per determinare la quantità di ciascun campione indicizzato da aggiungere al raggruppamento, utilizzare la formula seguente.

$$\text{Volume dell'indice} = \frac{V(f) \times C(f)}{N \times C(i)}$$

in cui $V(f)$ è il volume finale desiderato del raggruppamento,

$C(f)$ è la concentrazione finale desiderata di tutto il DNA presente nel raggruppamento (tipicamente 4-15 nM o la concentrazione del campione più diluito)

N è il numero di indici e

$C(i)$ è la concentrazione iniziale di ciascun campione indicizzato

La **Tabella 14** mostra un esempio delle quantità di 4 campioni indicizzati (di diversa concentrazione) e di Low TE (buffer a bassa forza ionica a base di Tris-EDTA) necessarie per ottenere un volume finale di 20 µl a con concentrazione di DNA di 10 nM.

Tabella 14 Esempio di calcolo del volume per un volume totale di 20 µl con una concentrazione di 10 nM

Componente	V(f)	C(i)	C(f)	N	Volume da utilizzare (µl)
Campione 1	20 µl	20 nM	10 nM	4	2,5
Campione 2	20 µl	10 nM	10 nM	4	5
Campione 3	20 µl	17 nM	10 nM	4	2,9
Campione 4	20 µl	25 nM	10 nM	4	2
Low TE					7,6

Se si conserva la libreria prima del sequenziamento, aggiungere Tween 20 allo 0,1% v/v e conservare a -20 °C per brevi periodi oppure conservare nelle condizioni specificate dal proprio fornitore di materiali per il sequenziamento.

Passaggio 3. Preparazione dei campioni per il sequenziamento

Il raggruppamento finale delle librerie SureSelect^{XT HS} è pronto per il sequenziamento diretto utilizzando primer paired-end e prodotti chimici standard di Illumina. Ogni frammento della libreria preparata contiene un inserto target circondato da motivi di sequenza necessari per il sequenziamento in parallelo con i sequenziatori Illumina, come mostrato nella [Figura 12](#).

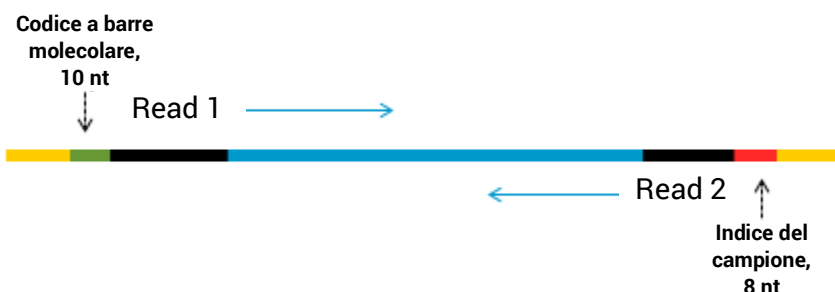


Figura 12 Contenuto della libreria di sequenziamento SureSelect XT HS. Ogni frammento contiene un inserto target (blu) circondato dagli elementi di sequenziamento paired-end Illumina (neri), dall'indice del campione (rosso), dal codice a barre molecolare (verde) e dai primer per la bridge PCR delle librerie (giallo).

Le librerie possono essere sequenziate sui sequenziatori Illumina HiSeq, MiSeq, NextSeq o NovaSeq usando il tipo di corsa e le combinazioni chimiche mostrate nella [Tabella 15](#).

ATTENZIONE

Non utilizzare lo strumento HiSeq 2500 per corse in modalità a uscita elevata (chimica versione 4) se la pipeline di analisi comprende codici a barre molecolari (i5). Sequenziando le librerie SureSelect^{XT HS} sullo strumento HiSeq 2500 in questa modalità è stata riscontrata una scarsa qualità dei dati della sequenza di codici a barre molecolari (punteggi Q più bassi, con impatti sulla copertura e sulla sensibilità delle chiamate delle varianti). Vedere la [Tabella 15](#) per modalità di esecuzione alternative/opzioni chimiche per lo strumento HiSeq 2500. Le prestazioni di sequenziamento per Read 1, Read 2 e letture dell'indice del livello del campione (i7) non risultano influenzate e questa combinazione di strumento/modalità di funzionamento/chimica può essere utilizzata per applicazioni che omettono l'analisi del codice a barre molecolare.

Passare all'amplificazione dei cluster utilizzando il kit Illumina per la generazione di cluster paired-end adeguato. Vedere la [Tabella 15](#) per le configurazioni del kit compatibili con la lunghezza delle letture consigliata.

La concentrazione di seed ottimale per le librerie SureSelect^{XT HS} con target arricchiti varia a seconda dello strumento utilizzato per il sequenziamento, del tipo di corsa e della versione del kit Illumina. Vedere le linee guida contenute nella [Tabella 15](#). Anche la concentrazione di seed e la densità di cluster possono aver bisogno di essere ottimizzate in base all'intervallo di dimensioni dei frammenti di DNA della libreria e all'output e alla qualità dei dati desiderati. Iniziare l'ottimizzazione utilizzando una concentrazione di seed al centro della gamma indicata.

Seguire la raccomandazione di Illumina riguardo all'inserimento di un eventuale controllo PhiX in caso di bassa concentrazione per migliorare il controllo di qualità del sequenziamento.

Tabella 15 Linee guida per la scelta della configurazione del kit Illumina

Strumento	Tipo di corsa	Lunghezza letture	Configurazione del kit SBS	Chimica	Concentrazione di seed
HiSeq 2500	Rapid Run	2 × 100 bp	Kit 200 cicli	v2	9-10 pM
HiSeq 2500	High Output*	2 × 100 bp	Kit 250 cicli	v4	12-14 pM
MiSeq	Tutte le corse	2 × 100 bp	Kit 300 cicli	v2	9-10 pM
MiSeq	Tutte le corse	2 × 75 bp	Kit 150 cicli	v3	12-16 pM
NextSeq 500/550	Tutte le corse	2 × 100 bp	Kit 300 cicli	v2.5	1,2-1,5 pM
HiSeq 3000/4000	Tutte le corse	2 × 100 bp	Kit 300 cicli	v1	300-400 pM
NovaSeq 6000	Corse con flusso di lavoro standard	2 × 100 bp	Kit 300 cicli	v1.0 o v1.5	300-600 pM
NovaSeq 6000	Corse con flusso di lavoro Xp	2 × 100 bp	Kit 300 cicli	v1.0 o v1.5	200-400 pM

* Non utilizzare HiSeq 2500 High Output (chimica v4) se la pipeline di analisi comprende letture di codici a barre molecolari (i5). Ridotta qualità della sequenza dei codici a barre molecolari e punteggi Q inferiori sono stati osservati in sequenze ottenute da corse su HiSeq 2500 in queste condizioni. Le prestazioni del sequenziamento per Read 1, Read 2 e indice del livello del campione (i7) non risultano influenzate.

Passaggio 4. Esecuzione della corsa di sequenziamento e analisi dei dati

Utilizzare le seguenti linee guida per la configurazione e l'analisi della corsa di sequenziamento delle librerie SureSelect^{XT HS}.

- L'indice a livello del campione (i7) richiede una lettura dell'indice da 8 bp. Per informazioni complete sulla sequenza di indici i7, vedere la [Tabella 34](#) a pagina 82.
- Il codice a barre molecolare degenerato (i5) richiede la lettura di un indice da 10 bp.
- Per le corse sugli strumenti HiSeq, NextSeq e NovaSeq, impostare la corsa utilizzando l'interfaccia utente dello strumento e seguendo le linee guida a [pagina 65](#).
- Per le corse sullo strumento MiSeq, impostare la corsa utilizzando Illumina Experiment Manager (IEM) ed eseguendo i passaggi descritti nel dettaglio da [pagina 68](#) a [pagina 71](#) per generare un foglio campioni personalizzato.
- Il recupero dei file di indici I2 contenenti le letture degli indici dei codici a barre molecolari (i5) richiede la conversione off-line dei file .bcl in file fastq. Per informazioni su come eseguire questo passaggio, vedere a [pagina 66](#) per le corse su HiSeq, NextSeq e NovaSeq e vedere a [pagina 71](#) per le corse su MiSeq.
- Prima di allineare le letture al genoma di riferimento, tagliare le letture dalle sequenze degli adattatori Illumina. Per informazioni sul software di analisi dei dati SureCall di Agilent, che può essere utilizzato a questo scopo, vedere a [pagina 71](#).

Linee guida per l'impostazione di corse di sequenziamento sugli strumenti HiSeq/NextSeq/NovaSeq

Impostare le corse di sequenziamento tramite l'interfaccia software di controllo dello strumento. Di seguito viene mostrato un esempio di configurazione di una corsa sullo strumento HiSeq con sequenziamento paired-end di 100 + 100 bp.

The screenshot shows the 'PRE-RUN SETUP' tab in the sequencing software. The 'Flow Cell Setup' section is active, displaying 'Index Type' and 'Flow Cell Format' options. The 'Index Type' section shows 'No Index', 'Single Index', 'Dual Index', and 'Custom' (selected). The 'Flow Cell Format' section shows 'Single Read' and 'Paired End' (selected). Below these, the 'Read 1', 'Index 1 (i7)', 'Index 2 (i5)', and 'Read 2' sections are visible, with 'Cycles' set to 100 for Read 1 and Read 2, and 8 for Index 1 (i7) and 10 for Index 2 (i5).

Se si utilizza lo strumento NextSeq o NovaSeq, individuare gli stessi parametri nella schermata *Run Setup* e compilare i campi **Read Length** usando le impostazioni di **Cycles** mostrate nell'esempio qui sopra relativo allo strumento HiSeq. Nella sezione **Custom Primers** della schermata *Run Setup* dello strumento NextSeq o NovaSeq, deselezionare (**non** selezionare) le caselle di controllo relative a tutti i primer (*Read 1*, *Read 2*, *Index 1* e *Index 2*).

BaseSpace attualmente non supporta il sequenziamento di codici a barre molecolari come letture di indici. Impostare le corse su NextSeq utilizzando la modalità indipendente.

Recuperare i file fastq I2 contenenti codici a barre molecolari

Il recupero dei file di indice I2 contenenti le letture degli indici dei codici a barre molecolari (i5) richiede la conversione off-line dei file .bcl in file fastq mediante uno dei due metodi seguenti.

Opzione 1: utilizzo del software bcl2fastq con mascheratura di basi

Per generare i file fastq Index 2 contenenti i codici a barre molecolari P5 utilizzando il software bcl2fastq, seguire le istruzioni per l'uso del software Illumina con le seguenti modifiche:

- 1 È obbligatorio, e non facoltativo, utilizzare un foglio campioni. Modificare il foglio campioni così che comprenda solo l'indice del campione e non l'indice del codice a barre molecolare cancellando il contenuto delle colonne **I5_Index_ID** e **index2**.
- 2 Impostare il valore 0 per **mask-short-adaptor-reads**.
- 3 Utilizzare la seguente maschera di base: Y*, I8, Y10, Y* (dove * va sostituito con la lunghezza effettiva della lettura, e il valore inserito corrisponde al valore della lunghezza della lettura nel file RunInfo.xml).

ATTENZIONE

Quando si generano file fastq utilizzando il software bcl2fastq di Illumina, assicurarsi di cancellare il contenuto della colonna **index2** nel foglio campioni come descritto sopra. **Non inserire una sequenza N₁₀ per rappresentare il codice a barre molecolare degenerato**; lasciare semplicemente vuote le celle della colonna.

Il software bcl2fastq non tratta il carattere "N" come un carattere jolly quando si trova nelle sequenze di indici dei fogli campioni: l'uso di "N" in questo contesto causerebbe una mancata corrispondenza per qualsiasi carattere di sequenza diverso da "N".

Opzione 2: utilizzo degli strumenti Picard del Broad Institute

Per generare file fastq Index 2 contenenti i codici a barre molecolari P5 utilizzando gli strumenti Picard del Broad Institute, eseguire i seguenti passaggi:

- 1 Utilizzare lo strumento **ExtractIlluminaBarcodes** per trovare i codici a barre. Di seguito viene mostrato un esempio di comandi (i comandi utilizzati dalla struttura possono variare).

```
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 Utilizzare lo strumento **IlluminaBaseCallsToFastq** per generare i file fastq a partire dall'output del passaggio 1. Di seguito viene mostrato un esempio di comandi (i comandi utilizzati dalla struttura possono variare).

```
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>
```

Linee guida per l'impostazione di corse di sequenziamento sullo strumento MiSeq

Utilizzare il software Illumina Experiment Manager (IEM) per generare un foglio campioni personalizzato secondo le linee guida riportate di seguito. Una volta generato un foglio campioni, le sequenze di indici devono essere modificate manualmente inserendo gli indici di SureSelect XT HS utilizzati per ogni campione. Vedere la [Tabella 34](#) a pagina 82 per le sequenze di nucleotidi degli indici del sistema SureSelect XT HS.

Impostare un foglio campioni personalizzato:

- 1 Nel software IEM, creare un foglio campioni per lo strumento MiSeq utilizzando le selezioni per il flusso di lavoro indicate di seguito.
 - In *Category*, selezionare **Other**.
 - In *Application*, selezionare **FASTQ Only**.
- 2 Nella schermata *Workflow Parameters*, immettere i dati della corsa, prestando attenzione a specificare i parametri fondamentali evidenziati di seguito. Nel campo *Library Prep Workflow*, selezionare **TruSeq Nano DNA**. Nel campo *Index Adapters*, selezionare **TruSeq DNA CD Indexes (96 Indexes)**. Se la pipeline utilizza SureCall per il taglio degli adattatori, accertarsi di deselezionare entrambe le caselle di controllo per il taglio degli adattatori in *FASTQ Only Workflow-Specific Settings* (cerchiate sotto), poiché queste sono selezionate per impostazione predefinita.

Se **TruSeq Nano DNA** non è disponibile nel campo *Sample Prep Kit*, selezionare invece **TruSeq HT**.

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

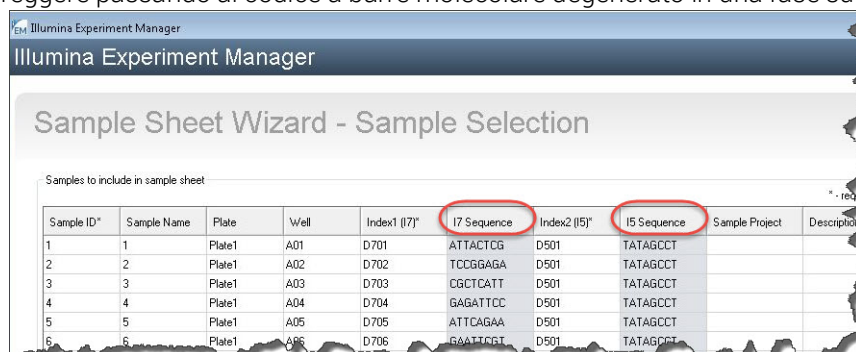
☐ Reverse Complement

☐ Use Adapter Trimming

☐ Use Adapter Trimming Read 2

- Utilizzando il **Sample Sheet Wizard**, impostare una **New Plate**, inserendo le informazioni richieste per ogni campione da sequenziare. Nella colonna **I7 Sequence**, assegnare ciascun campione a uno qualsiasi degli indici Illumina i7. L'indice sarà corretto in un secondo tempo sostituendolo con un indice SureSelect XT HS.

Allo stesso modo, nella colonna **I5 Sequence**, assegnare uno qualsiasi degli indici Illumina i5, da correggere passando al codice a barre molecolare degenerato in una fase successiva.



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		

- Terminare le attività di impostazione del foglio campioni e salvare il file.

Modificare il foglio campioni per inserire gli indici di SureSelect XT HS e i codici a barre molecolari

- 1 Aprire il file del foglio campioni in un editor di testo e modificare le informazioni sugli indici i7 e i5 per ogni campione nelle colonne 5-8 (evidenziate nella [Figura 13](#)).
 - Nella colonna 5, alla voce **I7_Index_ID**, inserire il nome dell'indice SureSelect XT HS assegnato al campione. Nella colonna 6, sotto **index**, inserire la corrispondente sequenza degli indici di SureSelect XT HS. Vedere la [Tabella 34](#) a pagina 82 per conoscere le sequenze nucleotidiche degli indici di SureSelect XT HS.
 - Nella colonna 7, sotto **I5_Index_ID**, inserire *MBC* per tutti i campioni. Nella colonna 8, sotto **index2**, inserire il testo *NNNNNNNNNN* per tutti i campioni per rappresentare il codice a barre molecolare degenerato a 10 nucleotidi che contrassegna ogni frammento.

NOTA

Inserire il testo N_{10} nella colonna **index2** solo quando i fogli campione vengono elaborati utilizzando il software MiSeq Reporter impostato per recuperare i file I2 fastq contenenti codici a barre molecolari, come descritto nel dettaglio a [pagina 71](#). I fogli campioni elaborati off-line utilizzando il software bcl2fastq di Illumina non devono contenere sequenze di indici jolly N_{10} . Per ulteriori informazioni, vedere le *Informazioni precauzionali* a [pagina 66](#).

[Header]									
IEMFileVersion	5								
Experiment	XTHS								
Date	1/22/2018								
Workflow	GenerateFASTQ								
Application	FASTQ Only								
Instrument	MiSeq								
Assay	TruSeq Nano DNA								
Index Adapter	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	Sample
XTHS-S1	XTHS-S1	1	A01	A01	A01	GTCTGTCA	MBC	NNNNNNNNNN	XTHS-S1
XTHS-S2	XTHS-S2	1	B01	B01	B01	TGAAGAGA	MBC	NNNNNNNNNN	XTHS-S2

Figura 13 Foglio campioni da utilizzare con lo strumento MiSeq dopo la riconfigurazione di MiSeq Reporter

- 2 Salvare il foglio campioni modificato in un percorso appropriato per utilizzarlo nella corsa su MiSeq.

Riconfigurare il software MiSeq Reporter per il recupero dei file FASTQ I2

Per impostazione predefinita, il software MiSeq Reporter non genera file fastq I2 per le letture degli indici. Per generare file fastq I2 degli indici che contengano le letture dei codici a barre molecolari utilizzando MiSeq Reporter, regolare le impostazioni del software come descritto di seguito prima del primo utilizzo dello strumento MiSeq per il sequenziamento delle librerie SureSelect XT HS. Una volta modificata, questa impostazione viene mantenuta per le corse future.

Per modificare l'impostazione, aprire il file **MiSeq Reporter.exe.config**. Sotto il tag **<appSettings>**, aggiungere **<add key="CreateFastqForIndexReads" value="1"/>**. Per rendere effettiva questa la modifica dell'impostazione, è necessario riavviare lo strumento.

NOTA

Se si utilizza lo stesso strumento per analisi diverse dal sequenziamento delle librerie SureSelect XT HS, prima di eseguire un'altra analisi occorre modificare il file di configurazione in **<add key="CreateFastqForIndexReads" value="0"/>** e riavviare lo strumento.

Se si utilizza il sistema MiSeqDx, far funzionare lo strumento in modalità ricerca per modificare le impostazioni di MiSeq Reporter. Se la modalità ricerca non è disponibile sullo strumento, può essere necessario aggiornare il sistema per rendere disponibile la configurazione dual boot che consente di modificare le impostazioni nella modalità ricerca.

I metodi alternativi per il recupero dei file fastq I2 descritti a [pagina 66](#) per le corse su HiSeq NextSeq e NovaSeq possono essere utilizzati anche per le corse su MiSeq.

Risorse per l'analisi delle sequenze

Il software di analisi dati per l'NGS Agilent SureCall è progettato per eseguire il taglio degli adattatori, l'allineamento delle letture e la chiamata delle varianti dei dati di sequenziamento generati dalle librerie SureSelect^{XT HS}. Per scaricare SureCall gratuitamente e per ulteriori informazioni, compresi i tutorial del software SureCall, visitare la [pagina SureCall all'indirizzo **www.agilent.com**](#).

Se si utilizza un'altra pipeline per l'allineamento e l'analisi a valle, Agilent fornisce l'Agilent Genomics NextGen Toolkit (AGeNT), con alcune delle capacità di Agilent SureCall e un'interfaccia flessibile a riga di comando, da integrare nella propria pipeline bioinformatica. AGeNT è un modulo software basato su Java progettato per fornire adattatori e basi di bassa qualità per il taglio e la rimozione dei duplicati delle letture in dati altamente sensibili (HS) e non. Questo strumento è stato progettato espressamente per gli utenti che possono contare sul supporto di esperti di bioinformatica interni alla propria struttura in grado di costruire, integrare, mantenere le pipeline di analisi interne e risolverne i problemi. Inoltre, il modulo è progettato specificamente per utenti con un'infrastruttura e un'assistenza informatica e sufficienti a risolvere tutti i problemi non legati all'esecuzione degli algoritmi AGeNT. Poiché Agilent fornisce un'assistenza tecnica limitata per quanto riguarda AGeNT, gli utenti con competenze di bioinformatica limitate devono utilizzare il software Agilent SureCall. Agilent non offre garanzie sull'usabilità di eventuali strumenti di terze parti (open source o meno) utilizzati insieme ad AGeNT per l'analisi dei dati a monte o a valle. Per ulteriori informazioni su questo strumento, visitare la [pagina AGeNT all'indirizzo **www.agilent.com**](#).

6 Riferimenti

Contenuto del kit reagenti	73
Contenuto del Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit	74
Contenuto del Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit (formato originale)	77
Informazioni di riferimento per gli indici (index) SureSelect XT HS	80
Informazioni sulle posizioni delle piastre	80
Sequenze nucleotidiche degli indici	82
Tracciamento dell'identità degli indici dopo la corsa	83
Guida per la risoluzione dei problemi	84

Questo capitolo contiene informazioni di riferimento, compresi il contenuto dei kit reagenti, le sequenze di indici e le informazioni per la risoluzione dei problemi relativi alle corse di preparazione delle librerie con SureSelect^{XT HS}.

Contenuto del kit reagenti

I codici parte Agilent per Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits, compresi i kit Rev B riformattati e i kit in formato originale, sono riassunti nella **Tabella 16**. Assicurarsi di aver verificato il tipo di formato del kit in possesso prima di iniziare a configurare la corsa; i kit riformattati Rev B devono essere elaborati utilizzando l'appropriato protocollo *RevB* (selezionato sulla schermata *Enter Run Info* durante la configurazione della corsa).

I dettagli del contenuto per Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits sono forniti [pagina 74](#) a [pagina 76](#), mentre Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits in formato originale sono [pagina 77](#) a [pagina 79](#).

Tabella 16 Codici parte e formati dei kit reagenti

SureSelect Probe inclusa	Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit		Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit (formato originale)	
	96 reazioni	32 reazioni	96 reazioni	32 reazioni
Personalizzata da 1-499 kb	G9731D	G9731C	G9731B	G9731A
Personalizzata da 0,5-2,9 Mb	G9732D	G9732C	G9732B	G9732A
Personalizzata da 3-5,9 Mb	G9733D	G9733C	G9733B	G9733A
Personalizzata da 6-11,9 Mb	G9734D	G9734C	G9734B	G9734A
Personalizzata da 12-24 Mb	G9735D	G9735C	G9735B	G9735A
Personalizzata da 24-50 Mb	G9736D	G9736C	Non fornito	Non fornito
Human All Exon V7	G9771D	G9771C	G9771B	G9771A
Human All Exon V8	G9772D	G9772C	Non fornito	Non fornito
Nessuna (il kit include Probe Input Strip vuote per configurare le sonde al momento della corsa)	G9730D	Non fornito	G9730B	Non fornito

Contenuto del Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit

I Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit includono i kit di componenti elencati nella [Tabella 17](#), con il contenuto di ogni kit di componenti dettagliato dalla [Tabella 18](#) alla [Tabella 23](#).

Tabella 17 Componenti compresi nei Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit

Nome del componente del kit	Condizioni di conservazione	C.p. del componente del kit	
		96 reazioni	32 reazioni
Magnis SureSelect Probe Plate, Pre-filled Single Well Format ^{*†}	-80 °C	Diversi c.p., vedere la Tabella 18	Diversi c.p., vedere la Tabella 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	Temperatura ambiente	5190-9712	5191-5675
Magnis Sample Input Strip	Temperatura ambiente	5190-9882	5191-5676

* Può anche essere contrassegnato come *Magnis SureSelect XT HS Probe Plate, Pre-filled Single Well Format*.

† Il kit con codice parte G9730D non comprende una Magnis Probe Plate. Al suo posto, il kit G9730D, predisposto per la configurazione delle sonde al momento della corsa, comprende invece Magnis Probe Input Strips vuote sufficienti per 12 corse (c.p. 5190-9883), da conservare a temperatura ambiente.

Tabella 18 Codici parte di Magnis SureSelect Probe Plate, Pre-filled Single Well Format

C.p. kit reagenti	Design della sonda incluso	C.p. Probe Plate	Quantità per kit
G9731D (96 reazioni)	Personalizzata da 1-499 kb (tier 1)	5191-6817 o 5191-6816*	1 piastra (12 strip)
G9731C (32 reazioni)	Personalizzata da 1-499 kb (tier 1)	5191-6807 o 5191-6806*	1 piastra (4 strip)
G9732D (96 reazioni)	Personalizzata da 0,5-2,9 Mb (tier 2)	5191-6819 o 5191-6818*	1 piastra (12 strip)
G9732C (32 reazioni)	Personalizzata da 0,5-2,9 Mb (tier 2)	5191-6809 o 5191-6808*	1 piastra (4 strip)
G9733D (96 reazioni)	Personalizzata da 3-5,9 Mb (tier 3)	5191-6821 o 5191-6820*	1 piastra (12 strip)
G9733C (32 reazioni)	Personalizzata da 3-5,9 Mb (tier 3)	5191-6811 o 5191-6810*	1 piastra (4 strip)
G9734D (96 reazioni)	Personalizzata da 6-11,9 Mb (tier 4)	5191-6823 o 5191-6822*	1 piastra (12 strip)
G9734C (32 reazioni)	Personalizzata da 6-11,9 Mb (tier 4)	5191-6813 o 5191-6812*	1 piastra (4 strip)
G9735D (96 reazioni)	Personalizzata da 12-24 Mb (tier 5)	5191-6825 o 5191-6824*	1 piastra (12 strip)
G9735C (32 reazioni)	Personalizzata da 12-24 Mb (tier 5)	5191-6815 o 5191-6814*	1 piastra (4 strip)

Tabella 18 Codici parte di Magnis SureSelect Probe Plate, Pre-filled Single Well Format

C.p. kit reagenti	Design della sonda incluso	C.p. Probe Plate	Quantità per kit
G9736D (96 reazioni)	Personalizzata da 24-50 Mb	5191-6846	1 piastra (12 strip)
G9736C (32 reazioni)	Personalizzata da 24-50 Mb	5191-6845	1 piastra (4 strip)
G9771D (96 reazioni)	Human All Exon V7	5191-6827	1 piastra (12 strip)
G9771C (32 reazioni)	Human All Exon V7	5191-6826	1 piastra (4 strip)
G9772D (96 reazioni)	Human All Exon V8	5191-6974	1 piastra (12 strip)
G9772C (32 reazioni)	Human All Exon V8	5191-6973	1 piastra (4 strip)

* Il C.p. Probe Plate appropriato per il proprio progetto della sonda personalizzato viene determinato da Agilent quando si effettua un ordine per un Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit. Entrambi i codici parte elencati per ogni kit reagenti sono pienamente compatibili con i protocolli Magnis supportati in questa pubblicazione.

Tabella 19 Componenti del kit Magnis SureSelect XT HS Reagent Plates Rev B ILM

Codice parte (dimensioni del kit)	Componente fornito	Quantità e formato
5191-6805 (96 reazioni)	Magnis SureSelect XT HS Reagent Plate Rev B ILM	12 piastre (utilizzare 1 piastra per ogni corsa)
5191-6804 (32 reazioni)		4 piastre (utilizzare 1 piastra per ogni corsa)

Tabella 20 Componenti del kit Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM

Codice parte (dimensioni del kit)	Componente fornito	Quantità e formato
5190-9880 (96 reazioni)	Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM	1 piastra da 12 strip (usare 1 strip per ogni corsa)
5191-5673 (32 reazioni)		1 piastra da 4 strip (usare 1 strip per ogni corsa)

Tabella 21 Componenti del kit Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate, ILM

Codice parte (dimensioni del kit)	Componente fornito	Quantità e formato
5190-9692 (96 reazioni)	Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate, ILM	12 piastre (utilizzare 1 piastra per ogni corsa)
5191-5674 (32 reazioni)		4 piastre (utilizzare 1 piastra per ogni corsa)

Tabella 22 Componenti del kit Magnis Empty Consumables

Componenti forniti	Quantità e formato*
Magnis Deep-Well HSM Plate	1 piastra
Magnis 96-Well PCR Plate	1 piastra
Magnis Library Output Strip	1 strip di provette verde
Magnis QC Strip	1 strip di provette blu

Tabella 22 Componenti del kit Magnis Empty Consumables

Componenti forniti	Quantità e formato*
Magnis Foil Seals	1 foglio (6 strip di sigilli in alluminio per singole strip di provette)
Magnis Thermal Cyclers Seal	1 piastra sigillante metallica monouso
Magnis Tip Waste Bin	1 rivestimento per cestino monouso

* I prodotti elencati sono da intendersi per ogni scatola di prodotti di consumo da una corsa. Ogni kit da 96 reazioni comprende 12 singole scatole (c.p. 5190-9712) di materiali di consumo per una singola corsa, e ogni kit da 32 reazioni è comprende 4 singole scatole (c.p. 5191-5675) di materiali di consumo per una singola corsa.

Tabella 23 Componenti del kit Magnis Sample Input Strip

Codice parte (dimensioni del kit)	Componenti forniti	Quantità e formato
5190-9882 (96 reazioni)	Magnis Sample Input Strip	12 strip rosse vuote, con sigilli in alluminio
	Magnis Foil Seals	2 fogli (6 strip di sigilli in alluminio per singole strip di provette in ogni foglio)
5191-5676 (32 reazioni)	Magnis Sample Input Strip	4 strip rosse vuote, con sigilli in alluminio
	Magnis Foil Seals	1 foglio (6 strip di sigilli in alluminio per singole strip di provette in ogni foglio)

Contenuto del Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit (formato originale)

I Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit (formato originale) includono i kit di componenti elencati nella [Tabella 24](#), con il contenuto di ogni kit di componenti dettagliato dalla [Tabella 25](#) alla [Tabella 31](#).

Tabella 24 Componenti compresi nei Magnis SureSelect^{XT HS} Reagent Kit

Nome del componente del kit	Condizioni di conservazione	C.p. del componente del kit	
		96 reazioni	32 reazioni
Magnis SureSelect XT HS Probe Plate*	-80 °C*	Diversi c.p., vedere la Tabella 25	Diversi c.p., vedere la Tabella 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	Temperatura ambiente	5190-9712	5191-5675
Magnis Sample Input Strip	Temperatura ambiente	5190-9882	5191-5676

* Il kit con codice parte G9730B non comprende una Magnis SureSelect XT HS Probe Plate. Al suo posto, il kit G9730B, predisposto per la configurazione delle sonde al momento della corsa, comprende invece Magnis Probe Input Strips vuote sufficienti per 12 corse (c.p. 5190-9883), da conservare a temperatura ambiente.

Tabella 25 Codici parte della piastra della sonda

C.p. kit reagenti	Design della sonda incluso	C.p. Probe Plate	Quantità per kit
G9731B (96 reazioni)	Personalizzata da 1-499 kb	5190-9690 or 5190-9691*	1 piastra (12 strip)
G9731A (32 reazioni)	Personalizzata da 1-499 kb	5191-5677 o 5191-5678*	1 piastra (4 strip)
G9732B (96 reazioni)	Personalizzata da 0,5-2,9 Mb	5190-9884 o 5190-9955*	1 piastra (12 strip)
G9732A (32 reazioni)	Personalizzata da 0,5-2,9 Mb	5191-5679 o 5191-5680*	1 piastra (4 strip)
G9733B (96 reazioni)	Personalizzata da 3-5,9 Mb	5190-9886 o 5190-9956*	1 piastra (12 strip)
G9733A (32 reazioni)	Personalizzata da 3-5,9 Mb	5191-5681 o 5191-5682*	1 piastra (4 strip)
G9734B (96 reazioni)	Personalizzata da 6-11,9 Mb	5190-9888 o 5190-9957*	1 piastra (12 strip)
G9734A (32 reazioni)	Personalizzata da 6-11,9 Mb	5191-5683 o 5191-5684*	1 piastra (4 strip)
G9735B (96 reazioni)	Personalizzata da 12-24 Mb	5190-9890 o 5190-9958*	1 piastra (12 strip)
G9735A (32 reazioni)	Personalizzata da 12-24 Mb	5191-5685 o 5191-5686*	1 piastra (4 strip)
G9771B (96 reazioni)	Human All Exon V7	5191-5721	1 piastra (12 strip)

Tabella 25 Codici parte della piastra della sonda

C.p. kit reagenti	Design della sonda incluso	C.p. Probe Plate	Quantità per kit
G9771A (32 reazioni)	Human All Exon V7	5191-5720	1 piastra (4 strip)
G9730B (96 reazioni)	Nessuna (Magnis Probe Input Strips vuote in dotazione)	5190-9883 (Probe Input Strip vuote)	12 strip

* Il c.p. Probe Plate appropriato per il proprio progetto della sonda personalizzato viene determinato da Agilent quando si effettua un ordine per un Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit. Entrambi i codici parte elencati per ogni kit reagenti sono pienamente compatibili con i protocolli Magnis supportati in questa pubblicazione.

Tabella 26 Componenti del kit Magnis SureSelect XT HS Reagent Plates, ILM

Codice parte (dimensioni del kit)	Componente fornito	Quantità e formato
5190-9688 (96 reazioni)	Magnis SureSelect XT HS Reagent Plate, ILM	12 piastre (utilizzare 1 piastra per ogni corsa)
5191-5672 (32 reazioni)		4 piastre (utilizzare 1 piastra per ogni corsa)

Tabella 27 Componenti del kit Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM

Codice parte (dimensioni del kit)	Componente fornito	Quantità e formato
5190-9880 (96 reazioni)	Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM	1 piastra da 12 strip (usare 1 strip per ogni corsa)
5191-5673 (32 reazioni)		1 piastra da 4 strip (usare 1 strip per ogni corsa)

Tabella 28 Componenti del kit Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate, ILM

Codice parte (dimensioni del kit)	Componente fornito	Quantità e formato
5190-9692 (96 reazioni)	Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate, ILM	12 piastre (utilizzare 1 piastra per ogni corsa)
5191-5674 (32 reazioni)		4 piastre (utilizzare 1 piastra per ogni corsa)

Tabella 29 Componenti del kit Magnis Empty Consumables

Componenti forniti	Quantità e formato*
Magnis Deep-Well HSM Plate	1 piastra
Magnis 96-Well PCR Plate	1 piastra
Magnis Library Output Strip	1 strip di provette verde
Magnis QC Strip	1 strip di provette blu
Magnis Foil Seals	1 foglio (6 strip di sigilli in alluminio per singole strip di provette)
Magnis Thermal Cycler Seal	1 piastra sigillante metallica monouso
Magnis Tip Waste Bin	1 rivestimento per cestino monouso

* I prodotti elencati sono da intendersi per ogni scatola di prodotti di consumo da una corsa. Ogni kit da 96 reazioni comprende 12 singole scatole (c.p. 5190-9712) di materiali di consumo per una singola corsa, e ogni kit da 32 reazioni è comprende 4 singole scatole (c.p. 5191-5675) di materiali di consumo per una singola corsa.

Tabella 30 Componenti del kit Magnis Sample Input Strip

Codice parte (dimensioni del kit)	Componenti forniti	Quantità e formato
5190-9882 (96 reazioni)	Magnis Sample Input Strip	12 strip rosse vuote, con sigilli in alluminio
	Magnis Foil Seals	2 fogli (6 strip di sigilli in alluminio per singole strip di provette in ogni foglio)
5191-5676 (32 reazioni)	Magnis Sample Input Strip	4 strip rosse vuote, con sigilli in alluminio
	Magnis Foil Seals	1 foglio (6 strip di sigilli in alluminio per singole strip di provette in ogni foglio)

Tabella 31 Componenti del kit Magnis Probe Input Strip

Codice parte (dimensioni del kit)	Componenti forniti	Quantità e formato
5190-9883 (96 reazioni)	Magnis Probe Input Strip	12 strip bianche vuote, con sigilli in alluminio
	Magnis Foil Seals	2 fogli (6 strip di sigilli in alluminio per singole strip di provette in ogni foglio)

Informazioni di riferimento per gli indici (index) SureSelect XT HS

Informazioni sulle posizioni delle piastre

I primer utilizzati per indicizzare le librerie di sequenziamento sono forniti nella Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM. Le piastre contengono gli indici HS SureSelect XT HS A01-H04 in aliquote monouso nei singoli pozzetti delle strip di provette collocate nel supporto a piastra. La piastra fornita nei kit da 32 reazioni (c.p. 5191-5673) contiene un set di quattro (4) strip etichettate con A1, A2, A3 o A4, con ciascuno dei 32 indici unici A01-H04 forniti in un singolo pozzetto. Nella [Tabella 32](#) è riportata una mappa della piastra.

Tabella 32 Mappa degli indici della piastra Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM fornita con i kit da 32 reazioni

Colonna della piastra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Etichetta della strip di provette	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 piastra fornita nei kit da 96 reazioni (c.p. 5190-9880) contiene 12 strip, corrispondenti a tre set costituiti dalle quattro (4) strip etichettate con A1, A2, A3 o A4, con ciascuno dei 32 indici unici A01-H04 forniti in tre pozzetti. Nella [Tabella 33](#) è riportata una mappa della piastra. Non utilizzare strip di indici con lo stesso codice per effettuare diverse corse di preparazione di librerie che saranno utilizzate in parallelo per l'NGS.

Tabella 33 Mappa degli indici della piastra Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM fornita con i kit da 96 reazioni

Colonna della piastra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Etichetta della strip di provette	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

Sequenze nucleotidiche degli indici

La sequenza nucleotidica di ogni indice SureSelect XT HS è indicata nella [Tabella 34](#). Ogni indice ha una lunghezza di 8 nt, e le corse di sequenziamento devono essere eseguite con letture degli indici da 8 bp (vedere a [pagina 65](#)).

Tabella 34 Indici SureSelect XT HS da A01 a H04

Strip A1		Strip A2		Strip A3		Strip A4	
Indice	Sequenza	Indice	Sequenza	Indice	Sequenza	Indice	Sequenza
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

ATTENZIONE

Le sequenze del sistema SureSelect XT HS da A01 a H04 sono diverse dalle sequenze del sistema di Agilent SureSelect XT contrassegnate dagli stessi codici (da A01 a H04).

Tracciamento dell'identità degli indici dopo la corsa

La specifica strip di indici utilizzata per una corsa su Magnis Prep System è riportata nella schermata **Post-Run Data**, accessibile mediante il touch screen dalla schermata Home. Nella schermata **Post-Run Data**, aprire la scheda **Labware Info**, quindi individuare, sotto **Labware**, la riga *Index Strip* per visualizzare le diverse caratteristiche della strip di indici utilizzata per la corsa. Il numero della strip di indici, riportato sotto forma di valore compreso tra 1 e 12, può essere visualizzato scorrendo sullo schermo per visualizzare la colonna *Index Strip* all'estrema destra. Il numero della strip di indici corrispondente (da 1 a 12) si trova anche nel file di log della corsa.

Gli specifici indici SureSelect XT HS associati a ciascuna strip di indici contrassegnata da un numero tra 1 e 12 sono indicati nella [Tabella 35](#).

Tabella 35 Utilizzo dei numeri delle strip di indici inclusi nei Post-Run Data per il tracciamento degli indici

Numeri delle <i>Index Strip</i> nella schermata Post-Run Data o nel log	Etichetta della strip di provette degli indici (incisione)	Indice per numero di campione della corsa							
		Cam- pione 1	Cam- pione 2	Cam- pione 3	Cam- pione 4	Cam- pione 5	Cam- pione 6	Cam- pione 7	Cam- pione 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

Guida per la risoluzione dei problemi

Di seguito sono riportate le linee guida per la risoluzione dei problemi relativi all'esecuzione dei protocolli di preparazione delle librerie SureSelect XT HS NGS sul sistema Magnis NGS Prep System e alle fasi di preparazione dei campioni a monte e di analisi delle librerie a valle. Per la risoluzione di problemi generici dello strumento Magnis, consultare il manuale utente dello strumento, pubblicazione K1007-90000.

Se l'uso del touch screen per la configurazione della corsa comporta problemi di usabilità o se il touch screen non risponde

- ✓ In alternativa ai comandi mediante touch screen, è possibile utilizzare un mouse collegato via USB per effettuare le selezioni e inserire i dati nel software di Magnis. Collegare il mouse utilizzando una delle due porte USB situate sulla parte anteriore dello strumento. Una volta collegato il mouse, utilizzarne le funzioni di puntamento e clic per effettuare selezioni sull'interfaccia visualizzata sul touch screen.
- ✓ Riavviare il sistema per ripristinare la funzionalità del touch screen.

Se le spie LED dello strumento diventano rosse e sul touch screen viene visualizzato il messaggio di errore *"Teach points are shifted. Please perform auto teaching from the Settings screen."*

- ✓ Questo messaggio di errore appare quando la verifica dell'Instrument Health Check (IHC) non supera la verifica dei punti di apprendimento; indica quindi che i marcatori dei punti di apprendimento presenti sul ponte dello strumento possono essere coperti o che lo strumento deve eseguire una procedura di Auto Teaching dei punti di apprendimento prima che si possa configurare una corsa. Eseguire i passaggi indicati di seguito per preparare lo strumento all'esecuzione di una corsa:
 - Verificare che tutte le posizioni del deck di Magnis siano libere da materiali di consumo dei kit e altri detriti. La presenza di qualsiasi oggetto sul deck dello strumento può impedire il corretto rilevamento dei contrassegni dei punti di apprendimento.
 - Pulire la finestra del lettore di codici a barre utilizzando le istruzioni per la pulizia contenute nel manuale utente dello strumento. Eventuali detriti o impronte digitali presenti sul lettore possono coprire i punti di apprendimento, pregiudicando la riuscita della verifica.
 - Riavviare il sistema. Dopo aver effettuato l'accesso, lo strumento eseguirà un altro IHC. Se la verifica dello stato dello strumento ha esito positivo, è possibile riprendere il processo di configurazione senza eseguire l'Auto Teaching. Se l'IHC non ha esito positivo, occorre effettuare l'Auto Teaching eseguendo i passaggi seguenti.
 - Nella schermata Home, aprire la schermata **Settings** e premere **Auto Teaching**. Seguire le istruzioni visualizzate sul touch screen. Il processo di Auto Teaching richiede circa 30 minuti ed è necessario che sia presente un operatore per posizionare i contenitori da laboratorio sullo strumento.
 - Al termine dell'Auto Teaching, è possibile iniziare a configurare la corsa premendo **Run Protocol** nella schermata Home.

Se le spie LED dello strumento diventano rosse e sul touch screen viene visualizzato un messaggio di errore relativo all'Instrument Health Check (IHC)

- ✓ Dopo un IHC non riuscito, Agilent consiglia di riavviare lo strumento attenendosi alla procedura seguente:
 - Nella finestra di dialogo dell'errore, premere **Cancel** per rifiutare l'avvio del test diagnostico.
 - Premere l'icona di errore nella parte inferiore dello schermo e annotare il codice di errore da utilizzare per risolvere il problema con l'assistenza tecnica Agilent.

- Spegnerlo lo strumento premendo il pulsante di accensione sulla parte anteriore dello strumento.
- Verificare che tutte le posizioni del deck di Magnis siano libere da materiali di consumo dei kit e altri detriti. La presenza di qualsiasi oggetto sul deck dello strumento può interferire con l'IHC eseguito al riavvio.
- Accendere lo strumento premendo il pulsante di accensione sulla parte anteriore dello strumento.
- Dopo aver effettuato l'accesso, lo strumento eseguirà un altro IHC. Se il controllo dello stato dello strumento ha esito positivo, è possibile iniziare o iniziare nuovamente a configurare una corsa premendo **Run Protocol** nella schermata **Home**.

Se l'IHC ha nuovamente esito negativo dopo il riavvio dello strumento, contattare l'Assistenza tecnica Agilent in tutto il mondo per ottenere assistenza.

Se manca un protocollo dal menu Protocol nella schermata *Enter Run Info*

- ✓ I protocolli di esecuzione Magnis visibili sulla schermata *Enter Run Info* del touchscreen e disponibili per l'esecuzione sullo strumento in uso potrebbero variare, a seconda della data di acquisto dello strumento, della data di disponibilità del protocollo e se sono stati effettuati aggiornamenti post-acquisto sullo strumento. Se è necessario un protocollo non attualmente disponibile sullo strumento, visitare la [pagina di download del protocollo Magnis su Agilent.com](#) per maggiori informazioni.

Se l'inserimento delle strip di provette nel modulo del refrigeratore è difficile

- ✓ Per facilitare la corretta collocazione delle strip di provette nel modulo del refrigeratore, caricare la strip campione riempita, la strip di indici e la strip di sonde in ordine da sinistra a destra.
- ✓ Sigilli in alluminio non posizionati correttamente possono ostruire il posizionamento e l'inserimento della strip di provette durante il caricamento del refrigeratore. Quando si richiude la strip di campioni in ingresso o una strip di sonde auto-riempita con un sigillo in alluminio, prestare attenzione ad applicare il sigillo in modo saldo e uniforme, senza eccessive sporgenze o pieghe.

Se la schermata *Verify Labware* segnala un problema relativo a uno o più componenti di contenitori da laboratorio dopo la scansione dei codici a barre di questi ultimi

- ✓ Se non è riuscita la verifica di tutti i contenitori da laboratorio o della maggior parte di essi, può essere necessario pulire la finestra del lettore di codici a barre. Per istruzioni sulla pulizia, consultare il manuale utente dello strumento. Una volta completata la pulizia, ripetere il passaggio *Verify Labware*.
- ✓ Se solo uno o pochi componenti dei contenitori da laboratorio non hanno superato la verifica, premere l'icona di errore nella parte inferiore dello schermo ed espandere le informazioni relative alla posizione in cui la verifica non è riuscita per visualizzare il motivo.
 - **Se il lettore di codici a barre non è riuscito a leggere un particolare componente dei contenitori da laboratorio**
 Verificare che il componente sia collocato nella posizione del deck richiesta e che sia orientato correttamente, con il codice a barre rivolto verso la parte anteriore dello strumento. Riesaminare le pagine da [pagina 30](#) a [pagina 34](#) per completare i passaggi di caricamento del deck. Correggere eventuali assenze o errori di posizionamento, quindi ripetere il passaggio *Verify Labware*. Se i componenti dei contenitori da laboratorio che non hanno superato la verifica sono presenti e posizionati correttamente, ispezionare visivamente il codice a barre per verificarne l'integrità. Per poter essere letti correttamente, i codici a barre devono essere privi di graffi, macchie, condensa e non essere coperti da sigilli, scritte o altri segni sulla plastica. Se si sospetta che il codice a barre sia danneggiato o coperto, aggiustare o sostituire il componente del contenitore da laboratorio e ripetere il passaggio *Verify Labware*.
 - **Se il contenitore da laboratorio letto è scaduto**
 Sostituire i componenti scaduti con componenti non scaduti, quindi ripetere il passaggio *Verify Labware*. La data di scadenza è riportata sul Certificato di analisi fornito con ogni kit di componenti contenente reagenti precaricati. I componenti forniti come contenitori in plastica vuoti non hanno una data di scadenza.

- **Se la piastra dei reagenti scansionata e la strip di ingresso della sonda sono identificate come *wrong labware***

Quando la piastra dei reagenti e la strip di ingresso della sonda, nello specifico, vengono identificate come *wrong labware*, è importante verificare che sia stato selezionato il protocollo corretto per il formato del kit reagenti caricato sullo strumento. Controllare il formato del kit reagenti caricato per la corsa, quindi utilizzare la tabella seguente per verificare che sia stato selezionato il protocollo corretto durante l'impostazione della corsa. Se è stato selezionato il protocollo errato, tornare alla schermata *Enter Run Info* premendo la freccia indietro sul touchscreen e selezionare il protocollo corretto dal menu, espandendo il menu del protocollo, se necessario. Dopo aver selezionato il protocollo corretto, utilizzare i tasti freccia in avanti per tornare alla schermata *Verify Labware*, quindi ripetere la fase *Verify Labware*.

Reagent Kit	Protocollo di elaborazione corretto
Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit forniti con strip di ingresso sonda preriempite	SSEL XT _{HS} -RevB-ILM O LT-SSEL XT _{HS} -RevB-ILM
Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit fornito con strip di ingresso sonda vuote (riempite al momento della corsa)	SSEL XT _{HS} -EPIS-RevB-ILM O LT-SSEL XT _{HS} -EPIS-RevB-ILM
Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit in formato originale forniti con strip di ingresso sonda preriempite	SureSelectXT HS-Illumina
Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit in formato originale forniti con strip di ingresso sonda vuote (riempite al momento della corsa)	SureSelectXT HS-Illumina

- **Se il laboratorio è stato identificato come *wrong labware*, con il protocollo corretto selezionato**

Sostituire il contenitore da laboratorio fuori posto con quello corretto e ripetere la fase *Verify Labware*.

Se il puntale di un micropipettatore non collegato è appoggiato sul deck dello strumento durante la corsa

- ✓ Occasionalmente, quando lo strumento espelle i puntali usati nel contenitore dei rifiuti, può capitare che un puntale rimbalzi e atterri sul deck dello strumento. Indossando i guanti, spostare il puntale nel contenitore dei rifiuti o smaltirlo come si fa quando si svuota il contenitore dei rifiuti.

Se la finestra di dialogo *Turn off Chiller* copre la schermata della corsa dopo l'apertura dello sportello dello strumento e la raccolta delle librerie al termine della corsa

- ✓ Se lo sportello dello strumento viene aperto alla fine della corsa prima che le spie LED diventino blu (per indicare il completamento di tutte le fasi della corsa sullo strumento) o se lo sportello dello strumento viene aperto solo parzialmente alla fine della corsa, la finestra di dialogo *Turn off Chiller* può essere rimanere sulla schermata della corsa, coprendone il contenuto. In futuro, prima di aprire lo sportello dello strumento attendere che le spie LED diventino blu per indicare che lo strumento ha raggiunto lo stato di inattività successivo al termine della corsa. Prima di raccogliere i campioni, aprire completamente lo sportello (finché le spie LED non diventano bianche).

Se il display *Time Remaining* del touch screen non indica 0:00 subito prima di passare alle schermate di corsa completata/raccolta dei campioni

- ✓ Il valore di *Time Remaining* visualizzato sul touch screen è solo una stima del tempo rimanente per il completamento della corsa. Il contatore può regolare la stima del tempo rimanente durante la corsa e può visualizzare un tempo maggiore di 0:00 quando il sistema è pronto per iniziare la raccolta dei campioni. Questa situazione non indica la presenza di un problema relativo alla corsa o allo strumento.

Se la dimensione dei frammenti delle librerie è maggiore di quanto previsto negli elettroferogrammi

- ✓ È possibile che la frammentazione non sia ottimale. Per campioni di DNA intatti e di alta qualità, assicurarsi che la frammentazione sia stata completata utilizzando il protocollo di frammentazione in due fasi in dotazione, comprese tutte le fasi di centrifugazione e miscelazione con agitatore vortex.
- ✓ Eventuali bolle presenti sul filamento di microTUBE possono impedire il completamento della frammentazione. Centrifugare il microTUBE per 30 secondi prima della prima fase di frammentazione per assicurarsi che eventuali bolle vengano rilasciate.

Se il rendimento delle librerie post-acquisizione è basso

- ✓ Può essere necessario ottimizzare il numero di cicli di PCR. Ripetere la preparazione delle librerie e l'arricchimento dei target per il campione, aumentando il numero dei post-capture PCR cycle da 1 a 2. Solo gli utenti con livello di accesso *Advanced* possono modificare il numero dei post-capture PCR cycle. Vedere a [pagina 39](#) per ulteriori informazioni.
- ✓ Verificare che il campione di DNA in ingresso soddisfi le linee guida per la qualità e l'intervallo di concentrazione specificati nell'["Appendice 1: linee guida per la preparazione dei campioni di DNA"](#).
- ✓ Verificare che la corsa sia stata configurata per la concentrazione e la qualità del DNA in ingresso corrette. È possibile controllare le impostazioni nella scheda **Run Setup** della schermata **Post Run Data** relativa alla corsa.
- ✓ Verificare che la frammentazione del DNA sia stata eseguita in buffer Low TE e non in acqua. La frammentazione dei campioni di DNA in acqua riduce la complessità e il rendimento complessivo delle librerie.
- ✓ Assicurarsi che le corse vengano completate in condizioni di umidità compresa tra il 30% e il 70% (senza condensa). L'utilizzo del sistema con livelli di umidità al di fuori di questo intervallo può influire sulle prestazioni e comportare un rendimento delle librerie inferiore o nullo.
- ✓ Un rendimento molto basso o nullo per uno o più campioni nella corsa può indicare un problema relativo ai puntali delle pipette utilizzati nella corsa. Durante la fase di caricamento dei puntali sullo strumento, verificare che tutte le scatole di puntali siano completamente piene e che siano tutte posizionate in piano e all'interno dei telai con linguette rialzate delle piattaforme. Accertarsi che le scatole di puntali non si spostino e si sgancino quando vengono rimossi i relativi coperchi.

Se le letture di sequenziamento non coprono le regioni del genoma previste

- ✓ È possibile che sia stata utilizzata una sonda con il disegno sbagliato nell'esecuzione del protocollo di arricchimento dei target. Controllare il tracciamento del campione e della sonda registrato durante la corsa. Se necessario, ripetere l'esecuzione del protocollo con la sonda di disegno corretto.

In questo manuale

Questo manuale fornisce le istruzioni per la preparazione automatica delle librerie SureSelect^{XT} HS con arricchimento dei target per il sequenziamento paired-end multiplex (in parallelo) Illumina effettuata utilizzando il sistema Magnis NGS Prep System.

