

SureSelect^{XT} HS Target Enrichment mit dem Magnis NGS Prep System

Protokoll

Nur zur Anwendung für Forschungszwecke. Nicht zur Anwendung in diagnostischen Verfahren.

Version D0, Oktober 2021



Anzeigen und Mitteilungen

© Agilent Technologies, Inc. 2019, 2021

Kein Teil dieses Handbuchs darf ohne die vorherige schriftliche Zustimmung von Agilent Technologies, Inc. in irgendeiner Form oder mit irgendwelchen Mitteln (einschließlich elektronische Speicherung und Abruf oder Übersetzung in eine andere Sprache) entsprechend den Urheberrechtsgesetzen der Vereinigten Staaten und internationalem Urheberrecht reproduziert werden.

Handbuch-Artikel-Nr.

G9731-90013

Auflage

Version D0, Oktober 2021

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

Technischer Kundendienst

Für USA und Kanada

Wählen Sie 800-227-9770 (Option 3, 4, 4)
Oder senden Sie eine E-Mail an
ngs.support@agilent.com

Für alle anderen Regionen

Die Telefonnummern der weltweiten Vertriebs- und Supportzentren von Agilent finden Sie auf www.agilent.com/genomics unter **Contact Us**.

Garantie

Die in diesem Dokument enthaltenen Materialien werden in der vorliegenden Form zur Verfügung gestellt und können bei zukünftigen Ausgaben ohne vorherige Ankündigung geändert werden. Außerdem lehnt Agilent, soweit dies die anwendbaren Gesetze zulassen, jedwede Garantien, ausdrückliche oder stillschweigende, im Zusammenhang mit diesem Handbuch und allen hierin enthaltenen Informationen ab, einschließlich, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, implizierte Garantien bezüglich der Mängelgewährleistung und der Eignung für einen bestimmten Zweck. Agilent haftet nicht für etwaige Fehler oder für Neben- oder Folgeschäden in Zusammenhang mit der Ausstattung, Verwendung oder Ausführung dieses Dokuments oder in diesem Dokument enthaltenen Informationen. Sollten der Benutzer und Agilent einen gesonderten schriftlichen Vertrag mit Garantiebestimmungen im Zusammenhang mit dem Material in diesem Dokument vereinbart haben, die den hier aufgeführten Bedingungen widersprechen, sind die Garantiebestimmungen des separaten Vertrags maßgebend.

Technologielizenzen

Die in diesem Dokument beschriebene Hard- und/oder Software wird unter einer Lizenz bereitgestellt und darf nur in Übereinstimmung mit den Bedingungen dieser Lizenz verwendet oder kopiert werden.

Erläuterung zu eingeschränkten Rechten

Eingeschränkte Rechte der US-Regierung. Die der Bundesregierung eingeräumten Software- und technischen Datenrechte umfassen nur die Rechte, die Endkunden üblicherweise gewährt werden. Agilent stellt diese handelsübliche Lizenz für Software und technische Daten gemäß FAR 12.211 (Technische Daten) und 12.212 (Computersoftware) sowie für das Verteidigungsministerium gemäß DFARS 252.227-7015 (Technische Daten – Handelswaren) und DFARS 227.7202-3 (Rechte an kommerzieller Computersoftware oder Computersoftware-Dokumentation) zur Verfügung.

Hinweis für den Käufer

Dieses Produkt wird im Rahmen einer Vereinbarung zwischen Bio-Rad Laboratories und Agilent Technologies Inc. bereitgestellt, und die Herstellung, Verwendung, der Verkauf oder die Einfuhr dieses Produkts unterliegt US-Pat. Nr. 6.627.424 und EP-Pat. Nr. 1 283 875 81, im Besitz von Bio-Rad Laboratories, Inc. Der Kauf dieses Produkts gewährt dem Käufer das nicht übertragbare Recht, die gekaufte Menge des Produkts und der Komponenten des Produkts in der PCR (jedoch nicht in der Echtzeit-PCR) im Forschungsbereich (einschließlich aller Forschungsbereiche, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Forensik, Tierversuche und Lebensmitteltests) und in der Echtzeit-PCR in den Bereichen Diagnose und Prognostik zu verwenden. Es werden keine Rechte für die Verwendung dieses Produkts für die Echtzeit-PCR im Forschungsbereich, einschließlich aller Forschungsbereiche (einschließlich, aber nicht beschränkt auf Forensik, Tierversuche und Lebensmitteltests), gewährt.

Sicherheitshinweise

VORSICHTSHINWEIS

Ein **VORSICHTSHINWEIS** zeigt eine Gefahr an. Er weist auf ein Betriebsverfahren, eine Praxis oder dergleichen hin, wobei es bei unsachgemäßer Ausführung oder Nichteinhaltung zu einer Beschädigung des Produkts oder zum Verlust wichtiger Daten kommen kann. Bei einem **VORSICHTSHINWEIS** nicht fortfahren, bis die angegebenen Bedingungen vollständig verstanden und erfüllt wurden.

WARNHINWEIS

Ein **WARNHINWEIS** zeigt eine Gefahr an. Er weist auf ein Betriebsverfahren, eine Praxis oder dergleichen hin, wobei es bei unsachgemäßer Ausführung oder Nichteinhaltung zu Verletzungen oder zum Tod kommen kann. Bei einem **WARNHINWEIS** nicht fortfahren, bis die angegebenen Bedingungen vollständig verstanden und erfüllt wurden.

In diesem Handbuch...

Dieser Leitfaden enthält Anweisungen für die automatisierte Vorbereitung der mit SureSelect^{XT HS} zielangereicherten multiplexierten Illumina-Sequenzierungsbibliotheken mit gepaarten Enden mit dem Magnis NGS Prep System.

Das SureSelect^{XT HS}-System wird verwendet, um indizierte Bibliotheksproben mit molekularen Barcodes vor der Zielanreicherung herzustellen, um eine hochempfindliche Sequenzierung auf der Illumina-Plattform zu ermöglichen.

- 1 Vor dem Start
- 2 Bibliotheksvorbereitung mit dem Magnis NGS Prep System sequenzieren
- 3 Anhang 1: Richtlinien zur Vorbereitung von DNA-Proben
- 4 Anhang 2: Laufzeitvorbereitete Sondenstreifen verwenden
- 5 Anhang 3: Richtlinien für die Verarbeitung von DNA-Proben nach dem Durchlauf für NGS
- 6 Literaturhinweise

Was ist neu in der Version D0

- Unterstützung der Magnis-Protokolle *SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM* und *LT-SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM*, die mit einem Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit (Artikel-Nr. G9730D) mit leeren Probe Input Strips (EPIS) konfiguriert wurden. Siehe „[Anhang 2: Laufzeitvorbereitete Sondenstreifen verwenden](#)“ auf [Seite 55](#) bis [Seite 58](#) für detaillierte Anweisungen zur Einrichtung der Probe Input Strips für dieses Protokoll. Informationen zum Reagent Kit, Artikel-Nr. G9730D, finden Sie in [Tabelle 1](#) auf Seite 11 und [Tabelle 16](#) auf Seite 74. Informationen zur Kompatibilität von Magnis-Protokollen und Reagent Kits finden Sie in [Tabelle 7](#) auf Seite 28. Informationen zur Fehlerbehebung finden Sie auf [Seite 87](#).
- Unterstützung für Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits, Artikel-Nr. G9736C und G9736D, die mit kundenspezifischen 24–50 Mb Probe Plates geliefert werden, und Aktualisierungen der zusätzlichen Artikel-Nr. und Bezeichnungen für die mit den Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits gelieferten Probe Plates. Siehe [Tabelle 1](#) auf Seite 11, [Tabelle 16](#) und [Tabelle 17](#) auf Seite 75, [Tabelle 18](#) auf Seite 75, und siehe [Schritt 5](#) auf [Seite 24](#).
- Aktualisierungen der Beschreibungen der Probe Plate für die Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits (Originalformat). Siehe [Tabelle 25](#) auf Seite 78.
- Aktualisierungen der Bilder der Touchscreen-Oberfläche auf [Seite 29](#), [Seite 40](#), [Seite 41](#), [Seite 42](#) und [Seite 43](#).
- Aktualisierungen der Richtlinien für Illumina-Sequenzierkits in [Tabelle 15](#) auf Seite 65.
- Aktualisierungen der Informationen zur Fehlerbehebung der Anzeige „Time Remaining“ auf dem Magnis-Touchscreen (siehe [Seite 88](#)).

Was ist neu in der Version C0

- Unterstützung zur Verwendung des Protokolls *LT-SSEL XTHS-RevB-ILM* mit Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits. Informationen über die Auswahl des Protokolls, das mit Ihrem Reagent Kit-Format kompatibel ist, und andere Workflow-Parameter im Rahmen der Lauf-Einrichtung finden Sie auf [Seite 28](#). Siehe auch *Fehlerbehebung* auf [Seite 87](#).
- Das Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit, das mit leeren Probe Input Strips, Teilnr. G9730D, geliefert wird, ist derzeit nicht verfügbar. Siehe aktualisierte Listen der unterstützten Magnis Reagent Kits in [Tabelle 1](#) auf Seite 11 und [Tabelle 16](#) auf Seite 74. Informationen zur Verwendung des Protokolls *SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM* für die Verarbeitung von Läufen, die mit dem G9730D Reagent Kit eingerichtet wurden, wurden aus [Tabelle 7](#) auf Seite 28 und aus „[Anhang 2: Laufzeitvorbereitete Sondenstreifen verwenden](#)“ auf [Seite 55](#) bis [Seite 58](#) entfernt. Besuchen Sie Agilent.com für Aktualisierungen zum Magnis Reagent Kit und zur Verfügbarkeit von Protokollen.

Was ist neu in der Version B0

- Unterstützung für Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits, die mit dem Protokoll *SSEL XTHS-RevB-ILM* verarbeitet wurden. Die *Rev B* Reagent Kits enthalten neu formatierte Komponenten (*Magnis SureSelect XT HS Reagent Plates Rev B ILM* und eine *Magnis SureSelect XT HS Probe Plate, Pre-filled Single Well Format*), die unter Verwendung eines *RevB*-Protokolls verarbeitet werden müssen. Siehe [Seite 75](#) bis [Seite 77](#) für Informationen über die Komponenten des Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit. Die Anleitungen in diesem Dokument bieten auch Unterstützung für die Probenverarbeitung unter Verwendung des ursprünglichen Reagent Kit-Formats. Siehe [Seite 78](#) bis [Seite 80](#) für Informationen über die Komponenten des Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit (Originalformat). Eine

zusammenfassende Liste aller unterstützten Reagent Kits finden Sie in [Tabelle 1](#) auf Seite 11. Aktuelle Anweisungen zur Einrichtung der Reagent Plate und der Probe Plate finden Sie auf [Seite 23](#) bis [Seite 24](#). Informationen über die Auswahl des Protokolls, das mit Ihrem Reagent Kit-Format während der Durchlauf-Einrichtung kompatibel ist, finden Sie auf [Seite 28](#).

- Unterstützung für kundenspezifische Sonden, die mit aktualisierten Design- und Herstellungsverfahren ab August 2020 produziert werden. Sonden für alle neuen kundenspezifischen Designs werden mit dem aktualisierten Verfahren hergestellt. Sonden für bestehende kundenspezifische Designs, die vor August 2020 erstellt wurden, werden mit dem alten Herstellungsverfahren produziert. Siehe [Tabelle 18](#) auf Seite 75 für Informationen über Sonden, die mit den Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits geliefert werden. Siehe [Tabelle 25](#) auf Seite 78 für Informationen über Sonden, die mit den Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits im Originalformat geliefert werden.
- Unterstützung für Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits mit Human All Exon V8 Probe ([Tabelle 1](#) auf Seite 11, [Tabelle 16](#) auf Seite 74 und [Tabelle 18](#) auf Seite 75).
- Aktualisierungen der Handhabungshinweise für Kitkomponenten auf [Seite 22](#) bis [Seite 23](#) einschließlich Anweisungen zum Auftauen von Reagent Plates und Details zur Handhabung von Folienabdeckungen und Plattenhüllen.
- Kleinere Aktualisierungen der Ladeanweisungen für Kühlermodule auf [Seite 34](#) bis [Seite 35](#).
- Ergänzung des Hygrometergeräts in der Liste **Erforderliche Ausrüstung** in der [Tabelle 2](#) auf Seite 12 und Ergänzung des Feuchtigkeitsmessschritts in der Anleitung zur Einrichtung des Instruments auf [Seite 20](#).
- Aktualisierungen der Bestellinformationen für die Zentrifuge mit Ausschwingrotor ([Tabelle 2](#) auf Seite 12) und für 1X Low TE Buffer und Qubit Fluorometer ([Tabelle 3](#) auf Seite 13).
- Unterstützung für QC-Bibliothekspalten mit dem Agilent 5200 Fragment Analyzer (siehe Fußnote zu [Tabelle 3](#) auf Seite 13 und *Anmerkung* auf [Seite 60](#)).
- Aktualisierungen von „[Anhang 2: Laufzeitvorbereitete Sondenstreifen verwenden](#)“ auf [Seite 55](#) bis [Seite 58](#). Die Aktualisierungen beinhalten Unterstützung für das *SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM Protokoll*, das mit einem Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit mit Empty Probe Input Strips (EPIS) konfiguriert wurde.
- Aktualisierungen der *Fehlerbehebung* auf [Seite 86](#), einschließlich Informationen zum Protokollzugriff, zum Sitz der Streifenröhrchen und zu *Verify Labware*-Anzeigen für nicht übereinstimmende Protokolle und Laborgeräte.
- Aktualisierung von [Seite 9](#) mit Beschreibung kompatibler Sequenzierplattformen und Aktualisierung der Richtlinien für Illumina-Sequenzierkits in [Tabelle 15](#) auf Seite 65.
- Entfernung der Ethylenglykol-Bestellinformationen aus [Tabelle 6](#) auf Seite 14. Siehe [Seite 47](#) und [Seite 52](#) für entsprechende Aktualisierungen der Anweisungen zur Einrichtung des DNA-Scherens.
- Hinzufügen der Bestellinformationen für D1000 ScreenTape Assay zu [Tabelle 6](#) auf Seite 14.
- Aktualisierung der Kontaktinformationen des Technischen Supports (siehe [Seite 2](#)).

Inhalt

1 Vor dem Start 8

Überblick über den Ablauf 9

Sicherheitshinweise 10

Benötigtes Material 11

Benötigte Materialien für Durchläufe von SureSelect XT HS Magnis Prep System 11

Benötigte Materialien für die DNA-Probenvorbereitung und -analyse 13

Optionale Materialien 14

2 Bibliotheksvorbereitung mit dem Magnis NGS Prep System sequenzieren 15

Informationen zur Nachverfolgung kritischer Proben 16

Probenorientierung in den Magnis Sample Input Strip Wells 16

Zuordnung von Proben zu Well-Positionen in der Magnis-Software 17

Vorbereitung Ihrer DNA-Proben für den Durchlauf 19

Vorbereiten des Magnis-Geräts und der Reagenzien für den Durchlauf 20

Schritt 1. Gerät für die Ausführung eines Protokolls vorbereiten 20

Schritt 2. SureSelect^{XT} HS-Reagenzien und Kunststoffe vorbereiten 22

Bibliotheksvorbereitungsprotokoll ausführen 26

Schritt 1. Protokoll initiieren und Durchlaufinformationen eingeben 28

Schritt 2. Deck einrichten 30

Schritt 3. Verifizieren von Laborartikeln 37

Schritt 4. Eingeben von Probeninformationen 39

Schritt 5. Einrichtung bestätigen und Durchlauf starten 40

Schritt 6. Endgültige Bibliotheksproben vom Instrument sammeln 42

Schritt 7. Reinigen des Geräts nach dem Durchlauf 45

3 Anhang 1: Richtlinien zur Vorbereitung von DNA-Proben 46

I. Vorbereitung hochwertiger DNA-Proben für Magnis-Durchläufe 47

Schritt 1. Vorbereiten, Quantifizieren und Qualifizieren der genomischen DNA-Proben 47

Schritt 2. Scheren der DNA 47

II. Vorbereitung von FFPE-basierten DNA-Proben für Magnis-Durchläufe 50

Schritt 1. Vorbereiten genomischer DNA aus FFPE-Proben 50

Schritt 2. Qualifizieren und Quantifizieren der FFPE DNA-Proben 50

Schritt 3. Scheren der FFPE DNA-Proben 52

4	Anhang 2: Laufzeitvorbereitete Sondenstreifen verwenden	55
	Laufzeitvorbereitung des Sondenstreifens	56
	Sondeninformationen in die Magnis-Software während der Durchlauf-Einrichtung eingeben	58
5	Anhang 3: Richtlinien für die Verarbeitung von DNA-Proben nach dem Durchlauf für NGS	59
	Schritt 1. Analysieren von Quantität und Qualität der DNA-Proben der Bibliothek	60
	Schritt 2. Poolproben für die multiplexierte Sequenzierung (optional)	63
	Schritt 3. Vorbereitung der Sequenzierungsproben	64
	Schritt 4. Ausführen des Sequenzierungsdurchlaufs und Analysieren der Daten	66
	Richtlinien für die Einrichtung der HiSeq/NextSeq/NovaSeq-Gerätesequenzierung	66
	Richtlinien für die Einrichtung der MiSeq-Gerätesequenzierung	69
	Ressourcen für die Sequenzanalyse	72
6	Literaturhinweise	73
	Reagent Kit-Inhalte	74
	Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit-Inhalte	75
	Magnis SureSelect XT HS (Originalformat) Reagent Kit-Inhalte	78
	Referenzinformationen für SureSelect XT HS-Indizes	81
	Informationen zur Plattenposition	81
	Index Nukleotidsequenzen	83
	Nachverfolgen der Index-Identität nach dem Durchlauf	84
	Leitfaden zur Fehlerbehebung	85

1

Vor dem Start

Überblick über den Ablauf 9

Sicherheitshinweise 10

Benötigtes Material 11

Benötigte Materialien für Durchläufe von SureSelect XT HS Magnis Prep System 11

Benötigte Materialien für die DNA-Probenvorbereitung und -analyse 13

Optionale Materialien 14

Dieses Kapitel enthält Informationen, die Sie vor Beginn lesen und verstehen sollten.

Überblick über den Ablauf

Der Workflow für die SureSelect^{XT HS} Target Enrichment mit dem Magnis NGS Prep System wird in **Abbildung 1** zusammengefasst. Sobald die gescherten genomischen DNA-Proben und die vorplattierten Reagenzien und Laborgeräte geladen sind, führt das Magnis NGS Prep System alle Schritte der SureSelect^{XT HS}-Bibliotheksvorbereitung und Ziellanreicherung im Liquid Handling und Inkubation durch. Nach Abschluss des Durchlaufs des Magnis NGS Prep System stehen die zielangereicherten Bibliotheken zur Verfügung, um sie unter Verwendung von Illumina HiSeq, MiSeq, NextSeq 500 oder NovaSeq 6000-Sequenzern für die multiplexierte NGS-Probenvorbereitung und Sequenzanalyse zu bündeln.

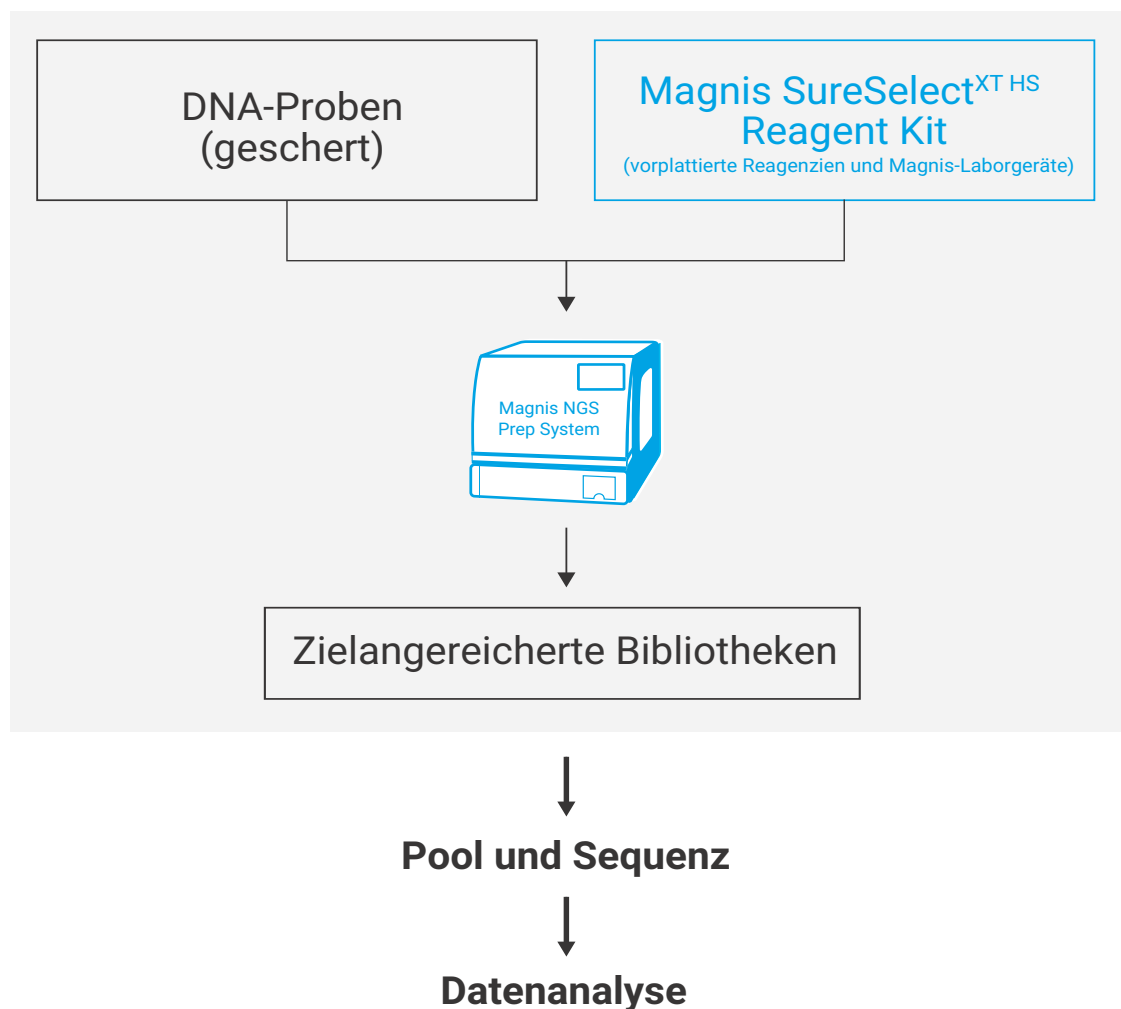


Abbildung 1 Gesamtablauf der NGS-Probenvorbereitung mit dem Magnis NGS Prep System

Sicherheitshinweise

VORSICHTSHINWEIS

Tragen Sie geeignete persönliche Schutzausrüstung (PSA), wenn Sie im Labor arbeiten.

Gefahr der Einwirkung von ultravioletter (UV-)Licht

Die Tür und die Seitenwände des Magnis-Geräts sind nicht UV-durchlässig, daher ist die Belastung durch UV-Licht minimal. Die folgenden Vorsichtsmaßnahmen sind jedoch erforderlich.

- Bei der Dekontamination der Geräteplatten mit UV-Licht dürfen Sie weder direkt noch indirekt in die UV-Lichtquelle blicken.
- Führen Sie die Dekontamination immer bei geschlossener und verriegelter Gerätetür durch. Die Gerätetür ist so programmiert, dass sie bei eingeschaltetem UV-Licht verriegelt bleibt.
- UV-Ersatzröhren müssen von Agilent zur Verfügung gestellt und von einem Agilent Techniker oder einem von Agilent autorisierten Dienstleister installiert werden.

Verbrennungsgefahr

- Während der Protokolldurchläufe erreichen der Thermoblock und andere Komponenten des Thermocyclermoduls schnell Temperaturen von mehr als 50 °C. Um einen sicheren Betrieb zu gewährleisten, muss die Gerätetür während des Durchlaufs geschlossen bleiben. Das Gerät ist so programmiert, dass die Tür während des Protokolldurchlaufs verriegelt bleibt.
- Verwenden Sie nur Agilent Material (Platten, Klebestreifen, Folien, Matten), das für die Verwendung mit dem Magnis NGS Prep System vorgesehen ist. Diese Materialien sind ausreichend temperaturbeständig (bis 120 °C).

Benötigtes Material

Benötigte Materialien für Durchläufe von SureSelect XT HS Magnis Prep System

Tabelle 1 Unterstützte Reagent Kits (wählen Sie eins aus)

Beschreibung	96 Reaktionen [*]	32 Reaktionen [†]
Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit:	Agilent	Agilent
mit Tier 1 (1–499 kb) Sonde	Artikel-Nr. G9731D	Artikel-Nr. G9731C
mit Tier 2 (0,5–2,9 Mb) Sonde	Artikel-Nr. G9732D	Artikel-Nr. G9732C
mit Tier 3 (3–5,9 Mb) Sonde	Artikel-Nr. G9733D	Artikel-Nr. G9733C
mit Tier 4 (6–11,9 Mb) Sonde	Artikel-Nr. G9734D	Artikel-Nr. G9734C
mit Tier 5 (12–24 Mb) Sonde	Artikel-Nr. G9735D	Artikel-Nr. G9735C
mit 24–50 Mb Sonde	Artikel-Nr. G9736D	Artikel-Nr. G9736C
mit Human All Exon V7 Probe	Artikel-Nr. G9771D	Artikel-Nr. G9771C
mit Human All Exon V8 Probe	Artikel-Nr. G9772D	Artikel-Nr. G9772C
mit leeren Magnis Probe Input Strips [‡]	Artikel-Nr. G9730D	Nicht angeboten
Eine Liste der Kit-Inhalte finden Sie auf Seite 75 bis Seite 77 .		
ODER		
Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit (Originalformat):	Agilent	Agilent
mit 1–499 kb Sonde	Artikel-Nr. G9731B	Artikel-Nr. G9731A
mit 0,5–2,9 Mb Sonde	Artikel-Nr. G9732B	Artikel-Nr. G9732A
mit 3–5,9 Mb Sonde	Artikel-Nr. G9733B	Artikel-Nr. G9733A
mit 6–11,9 Mb Sonde	Artikel-Nr. G9734B	Artikel-Nr. G9734A
mit 12–24 Mb Sonde	Artikel-Nr. G9735B	Artikel-Nr. G9735A
mit Human All Exon V7 Probe	Artikel-Nr. G9771B	Artikel-Nr. G9771A
mit leeren Magnis Probe Input Strips [‡]	Artikel-Nr. G9730B	Nicht angeboten
Eine Liste der Kit-Inhalte finden Sie auf Seite 78 bis Seite 80 .		

* 96 Reaktions-Kits sind für 12 Durchläufe mit 8 Proben pro Durchlauf formatiert.

† 32 Reaktions-Kits sind für 4 Durchläufe mit 8 Proben pro Durchlauf formatiert.

‡ Die Sonde muss separat erworben werden. Auf [Seite 56](#) finden Sie Informationen zum Befüllen des leeren Magnis Probe Input Strip für den Durchlauf.

Tabelle 2 Erforderliche Ausrüstung

Beschreibung	Lieferant und Artikel-Nr.
Magnis NGS Prep System*	Agilent Teilnr. G9710AA
Roboter-Pipettierspitzen (steril, gefiltert, 250 µl)	Agilent Teilnr. G9477G
Hygrometer	Rückverfolgbarer Temperatur-/Feuchtigkeits-Datenlogger, Cole-Parmer Teilnr. 18004-13 oder gleichwertig
Vortex-Mischer	Vortex Genie-2, VWR Teilnr. 58815-234 oder gleichwertig
Mikrozentrifuge	Eppendorf-Mikrozentrifuge Modell 5417C oder gleichwertig [†]
Schwenkbecherzentrifuge	Eppendorf-Zentrifuge Modell 5804 mit Rotor A-2-DWP oder gleichwertig [‡]
Pipetten (2-, 10-, 20- und 200-µl-Kapazität)	Rainin Pipet-Lite-Pipetten oder gleichwertig
Sterile, nucleasefreie Aerosol-Barriere-Pipettenspitzen	Lieferant für allgemeinen Laborbedarf
Kühlschrank (2) auf –20 °C und –80 °C eingestellt	Lieferant für allgemeinen Laborbedarf
Kühlschrank, eingestellt auf +4 °C	Lieferant für allgemeinen Laborbedarf
Eiskübel	Lieferant für allgemeinen Laborbedarf
Puderfreie Handschuhe	Lieferant für allgemeinen Laborbedarf

* Die Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits und die in dieser Publikation beschriebenen Protokolle sind auch mit dem Magnis Dx NGS Prep System (Teilnr. K1007AA) kompatibel.

† Der Zentrifugenrotor muss die mit den Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits gelieferten Streifenröhrchen aufnehmen.

‡ Der Zentrifugenrotor muss die mit den Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits gelieferten tiefen Well-Platten aufnehmen. Ein Kühlsystem ist nicht erforderlich.

Benötigte Materialien für die DNA-Probenvorbereitung und -analyse

Tabelle 3 Benötigte Materialien für die DNA-Probenvorbereitung und -analyse – Alle Probenotypen

Beschreibung	Lieferant und Artikel-Nr.
1X Low TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5–8,0, 0,1 mM EDTA)	Thermo Fisher Scientific Teilnr. 12090-015 oder gleichwertig
Qubit BR dsDNA Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
100 Assays	Teilnr. Q32850
500 Assays	Teilnr. Q32853
Qubit-Fluorometer	Thermo Fisher Scientific Teilnr. Q33238
Qubit-Assay-Röhrchen	Thermo Fisher Scientific Teilnr. Q32856
Covaris Probenvorbereitungssystem	Covaris Modell E220
Covaris microTUBE-Probenhalterungen	Covaris Teilnr. 520045
DNA-Analysesystem und Verbrauchsmaterial:*	
Agilent 4150 TapeStation	Agilent Teilnr. G2992AA
ODER	
Agilent 4200 TapeStation	Agilent Teilnr. G2991AA
UND	
TapeStation-kompatible 8-Well-Röhrchenstreifen	Agilent Teilnr. 401428
8-Well Röhrchenstreifenkappen	Agilent Teilnr. 401425
High Sensitivity D1000 ScreenTape	Agilent Teilnr. 5067-5584
High Sensitivity D1000 Reagents	Agilent Teilnr. 5067-5585

* Der Agilent 2100 Bioanalyzer (Teilnr. G2939BA) und das High Sensitivity DNA Kit (Teilnr. 5067-2646) oder der Agilent 5200 Fragment Analyzer (Teilnr. M5310AA) und das HS NGS Fragment Kit (Teilnr. DNF-474-0500) können auch für die DNA-Analyse in der Bibliothek verwendet werden.

Tabelle 4 Erforderliche Materialien – Nur hochwertige DNA-Proben

Beschreibung	Lieferant und Artikel-Nr.
Hochwertiges gDNA-Aufarbeitungssystem, z. B.:	
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
50 Proben	Teilnr. 51304
250 Proben	Teilnr. 51306

Tabelle 5 Erforderliche Materialien – Nur FFPE DNA-Proben

Beschreibung	Lieferant und Artikel-Nr.
FFPE gDNA-Aufarbeitungssystem, z. B.:	Qiagen
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, 50 Proben	Teilnr. 56404
Deparaffinization Solution	Teilnr. 19093
FFPE DNA-Integritätsbewertungssystem:	
Agilent NGS FFPE QC Kit (empfohlene Methode)	Agilent
16 Reaktionen	Teilnr. G9700A
96 Reaktionen	Teilnr. G9700B
ODER	
TapeStation Genomic DNA-Analyseassay:*	Agilent
Genomic DNA ScreenTape	Teilnr. 5067-5365
Genomic DNA Reagents	Teilnr. 5067-5366

* Die 4150 TapeStation oder 4200 TapeStation von Agilent und kompatible Kunststoffteile werden ebenfalls benötigt. In der oben angeführten [Tabelle 3](#) finden Sie Bestellinformationen.

Optionale Materialien

Tabelle 6 Lieferanteninformationen für optionale Materialien in Protokollen

Beschreibung	Funktion	Lieferant und Artikel-Nr.
Tücher mit verdünnten Bleichmitteln (10 %)	Oberflächenreinigung des Gerätedecks (siehe Seite 20)*	Hype-Wipe Wischtücher mit Bleichmittel (VWR Teilnr. 16200-218) oder gleichwertig
Alkoholtupfer (70 %)	Oberflächenreinigung des Gerätedecks (siehe Seite 20)*	Vorgefeuchtete VWR-Reinigungstücher (VWR Teilnr. 21910-110) oder gleichwertig
Trockene, fusselfreie, kratzfreie Wischtücher	Oberflächenreinigung des Barcodescannerfensters	Kimwipes-Wischtücher (VWR Teilnr. 21905-026) oder gleichwertig
D1000 ScreenTape und D1000 Reagents	Analyse von optionalen QC-Bibliothekspalten vor der Erfassung mit dem Agilent 4200/4150 TapeStation-System (siehe Seite 44)	Agilent Teilnr. 5067-5582 und Teilnr. 5067-5583
Tween 20	Speicher der Sequenzierungsbibliothek (siehe Seite 63)	Sigma-Aldrich Teilnr. P9416-50ML

* Agilent empfiehlt die Verwendung der UV-vermittelten Dekontaminationsprogramme des Magnis-Geräts für die routinemäßige Instrumentendekontamination. Wenn eine lösungsmittelbasierte Reinigung erforderlich ist, finden Sie im Benutzerhandbuch des Geräts vollständige Anweisungen zur Oberflächenreinigung. Zulässige Lösungsmittel müssen vor der Verwendung auf einen festen Stoffträger aufgetragen werden. Sprühen Sie kein Wasser, Bleichmittel, Alkohol oder andere Flüssigkeiten in das Gerät. Entfernen Sie vor Gebrauch überschüssige Flüssigkeit aus Tüchern oder Feuchttüchern, um das Eindringen von Flüssigkeiten in die Gerätekomponenten zu verhindern.

2 Bibliotheksvorbereitung mit dem Magnis NGS Prep System sequenzieren

Informationen zur Nachverfolgung kritischer Proben	16
Probenorientierung in den Magnis Sample Input Strip Wells	16
Zuordnung von Proben zu Well-Positionen in der Magnis-Software	17
Vorbereitung Ihrer DNA-Proben für den Durchlauf	19
Vorbereiten des Magnis-Geräts und der Reagenzien für den Durchlauf	20
Schritt 1. Gerät für die Ausführung eines Protokolls vorbereiten	20
Schritt 2. SureSelect ^{XT HS} -Reagenzien und Kunststoffe vorbereiten	22
Bibliotheksvorbereitungsprotokoll ausführen	26
Schritt 1. Protokoll initiieren und Durchlaufinformationen eingeben	28
Schritt 2. Deck einrichten	30
Schritt 3. Verifizieren von Laborartikeln	37
Schritt 4. Eingeben von Probeninformationen	39
Schritt 5. Einrichtung bestätigen und Durchlauf starten	40
Schritt 6. Endgültige Bibliotheksproben vom Instrument sammeln	42
Schritt 7. Reinigen des Geräts nach dem Durchlauf	45

Dieses Kapitel enthält Anweisungen zur Vorbereitung der SureSelect^{XT HS} zielangereicherten DNA-Sequenzierungsbibliothek mit dem Magnis NGS Prep System. Einen Überblick über den Workflow finden Sie auf [Abbildung 1](#) auf Seite 9.

Hier finden Sie detaillierte Anweisungen zur Einrichtung des Magnis NGS Prep System-Geräts und der Assaykomponenten für einen Durchlauf und die anschließende Ausführung eines Magnis Instrument Protokolls für die automatisierte Probenvorbereitung der NGS-Bibliothek.

Für jede zu sequenzierende Probe wird eine individuelle indizierte und molekularbarcodierte Bibliothek erstellt. Bibliotheken, die mit den hier beschriebenen Protokollen erstellt wurden, sind bereit für die Sequenzierung mit dem Illumina-System zur gepaarten Ablesung.

Informationen zur Nachverfolgung kritischer Proben

Eine genaue Probenverfolgung ist entscheidend für die Interpretation Ihrer Sequenzierungsergebnisse. Bevor Sie mit einem Durchlauf beginnen, vergewissern Sie sich, dass Sie die Informationen zur Probenverfolgung in diesem Abschnitt gelesen und verstanden haben, einschließlich 1) der Orientierung der Probennummer in den Magnis Sample Input Strip Wells und 2) der Eingabe von Probenidentitäten in die Magnis-Software während der Durchlauf-Einrichtung.

Probenorientierung in den Magnis Sample Input Strip Wells

Magnis NGS Prep System-Durchläufe verwenden die nachfolgend in [Abbildung 2](#) dargestellte Probenausrichtung, wobei die Probe 1 am weitesten vom Barcode in den mitgelieferten Magnis Sample Input Strips entfernt geladen ist. Proben müssen in den Magnis Sample Input Strip Wells in dieser Ausrichtung während der Durchlauf-Einrichtung auf [Seite 23](#) geladen werden.

Ordnen Sie vor der Einrichtung des Durchlaufs jede Probe einer bestimmten Probennummer 1 bis 8 zu und zeichnen Sie die Probennummernzuordnungen auf. Methoden zur Eingabe von Probenzuordnungen für einen Lauf in die Magnis-Software werden auf [Seite 17](#) bis [Seite 18](#) beschrieben.

VORSICHTSHINWEIS

Fügen Sie keine Schriftzüge oder Etiketten hinzu, die den Barcode auf dem Magnis Sample Input Strip verdecken könnten.

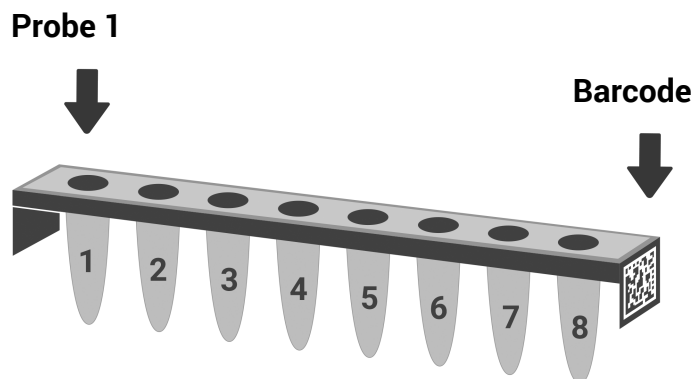


Abbildung 2 Erforderliche Ausrichtung der Probennummern 1 bis 8 im Magnis Sample Input Strip.

Zuordnung von Proben zu Well-Positionen in der Magnis-Software

Die Identität jeder Probe im Durchlauf muss in der Magnis-Gerätesoftware mit einer der beiden nachfolgend beschriebenen Methoden angegeben werden. Die spezifischen Proben-IDs, die in einen Lauf einbezogen werden sollen, werden bei der Durchlauf-Einrichtung in das Magnis-System eingegeben, wie im Abschnitt „**Schritt 4. Eingeben von Probeninformationen**“ auf Seite 39 beschrieben. Stellen Sie sicher, dass Sie die folgenden Informationen zur Probenpositionierung und -verfolgung verstehen, bevor Sie mit der Durchlauf-Einrichtung beginnen.

Jede Proben-ID muss 1–30 Zeichen enthalten und innerhalb des Durchlaufs eindeutig sein. Proben-IDs können in verschiedenen Durchläufen wiederverwendet werden.

Probenzuordnung Methode 1: Import von Probenzuordnungen über eine .csv-Datei

- 1 Erstellen Sie eine .csv-Datei (comma separated value) mit den geordneten Probenamen. Die Daten des Probennamens können mit Hilfe einer Tabellenkalkulationsanwendung, wie beispielsweise Microsoft Excel, im Tabellenformat eingegeben und dann im .csv-Format gespeichert werden.
- a Geben Sie den Kopftext **sample_id** in Zelle A1 ein, wie in **Abbildung 3** gezeigt.
- b Geben Sie den Namen jeder Probe in die Zellen A2 bis A9 ein (siehe **Abbildung 3**, linke Leiste). Die Probeneingabedatei muss 8 eindeutige Proben-IDs enthalten. Wenn für den Durchlauf Proben-Wells leer bleiben, müssen Sie an den entsprechenden Stellen Platzhaltertexte eingeben (siehe **Abbildung 3**, rechte Leiste).

8 Proben im Durchlauf

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

6 Proben im Durchlauf mit 2 Platzhalter-Proben-IDs

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

Abbildung 3 .csv-Beispieldateiinhalte (im Tabellenkalkulationsformat dargestellt) für das Hochladen von Probenzuordnungen

- 2 Speichern Sie die Datei im .csv-Format.
- 3 Laden Sie die .csv-Datei auf einen unverschlüsselten USB-Stick herunter.
- 4 Wenn Sie den Durchlauf einrichten, drücken Sie auf dem Bildschirm *Enter Sample Info* die unten abgebildete Schaltfläche zum Hochladen von Proben und folgen Sie dann den Anweisungen des Protokoll-Setup-Assistenten, um die Proben-IDs von der USB-Disk zu übertragen.



Probenzuordnung Methode 2: Manuelle Probenzuordnung über den Touchscreen des Magnis-Geräts

- 1 Notieren Sie die Identität jeder Probennummer für den Lauf mit geeigneten Hardcopy- oder Softcopy-Protokollierungsverfahren, bevor Sie Proben in die Magnis Sample Input Strip Wells geben.
- 2 Wenn Sie den Durchlauf einrichten, folgen Sie den Aufforderungen des Magnis-Touchscreens, um die Sample ID für jede Proben-Well-Position über den unten gezeigten Bildschirm *Enter Sample Info* einzugeben. Das Magnis-System weist jeder Probenposition automatisch eine Standard-Sample ID zu. Um die Sample ID zu ändern, wählen Sie zunächst eine bestimmte Proben-Position auf dem Touchscreen aus und geben Sie dann mit dem Werkzeug **Edit Sample ID** auf der rechten Seite den gewünschten Sample ID-Text ein. Drücken Sie auf **Change**, um den eingegebenen Text zur Sample ID für die Probe zu speichern.

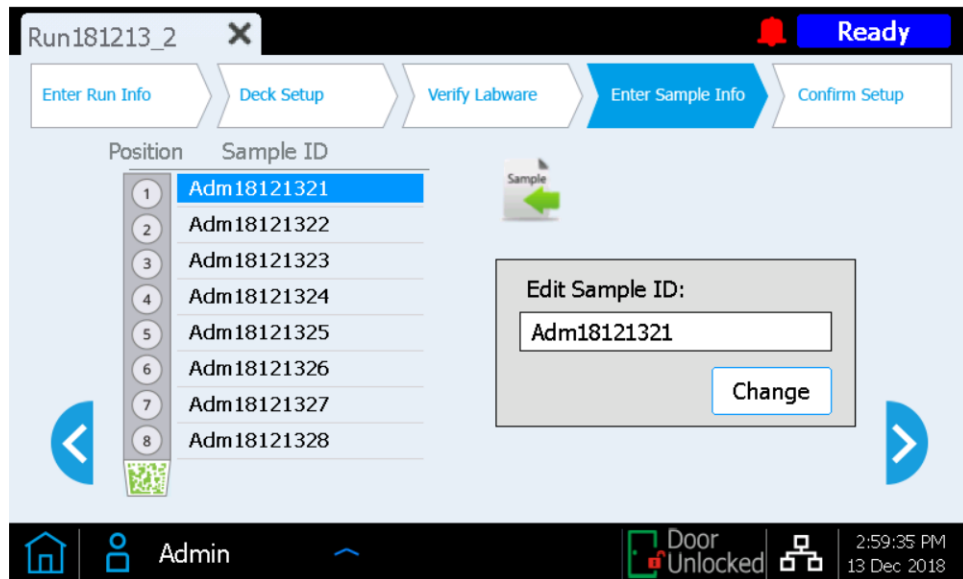


Abbildung 4 Magnis Touchscreen-Schnittstelle für die manuelle Probenzuordnung während eines Durchlaufs.

Vorbereitung Ihrer DNA-Proben für den Durchlauf

Das Vorbereitungsprotokoll der Bibliothek ist sowohl mit hochwertiger gDNA aus frischen oder frisch gefrorenen Proben als auch mit minderwertiger DNA aus FFPE-Proben kompatibel. Durchläufe zur Verarbeitung von hochwertiger oder FFPE-basierter DNA können 10 ng, 50 ng, 100 ng oder 200 ng eingegebene DNA beinhalten. Für optimale Sequenzierungsergebnisse verwenden Sie die maximale Menge an eingegebener DNA, die in diesem Bereich verfügbar ist. Alle Proben desselben Durchlaufs müssen in der gleichen Menge bereitgestellt werden.

Vor der Einrichtung des Magnis-Durchlaufs müssen DNA-Proben unter Verwendung der Richtlinien und Protokolle in „[Anhang 1: Richtlinien zur Vorbereitung von DNA-Proben](#)“ auf Seite 46 vorbereitet, quantifiziert, qualifiziert und geschert werden. Einige Teile des DNA-Probenvorbereitungsprotokolls, insbesondere die Qualifizierung von FFPE-basierten Proben, müssen möglicherweise bis zu einem Tag vor Beginn der Magnis-Durchlaufschritte abgeschlossen werden. DNA-Proben müssen jedoch unmittelbar vor dem Einsatz im Durchlauf geschert und in das eingegebene DNA-Probenstreifenröhrchen abgegeben werden.

Bevor Sie mit den Einrichtungsschritten des Magnis NGS Prep System auf der folgenden Seite beginnen, überprüfen Sie die Schritte zur Vorbereitung der DNA-Proben ab [Seite 46](#), um sicherzustellen, dass die gDNA-Proben und das Covaris E220-Gerät zur Durchlauf-Einrichtungszeit für das DNA-Scheren bereit sind.

HINWEIS

Die Vorbereitung des Covaris E220-Geräts für die DNA-Scherung benötigt ca. 30–60 Minuten zum Kühlen und Entgasen des Wasserbades. Führen Sie diese Konditionierungsschritte durch (siehe [Schritt 1](#) auf [Seite 47](#)), bevor Sie einen der Schritte zur Einrichtung des Magnis NGS Prep System und der Reagenzien auf den folgenden Seiten durchführen.

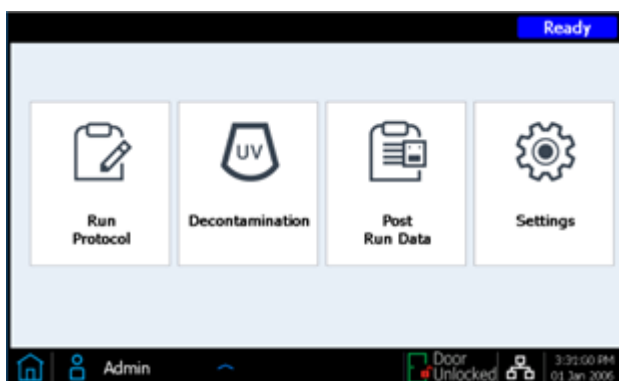
Vorbereiten des Magnis-Geräts und der Reagenzien für den Durchlauf

Schritt 1. Gerät für die Ausführung eines Protokolls vorbereiten

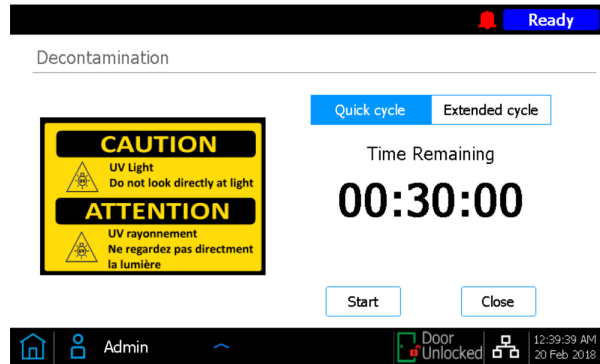
HINWEIS

Die folgenden Anweisungen beinhalten ein gerätevermitteltes Dekontaminationsverfahren, bei dem ultraviolettes (UV-)Licht zur Dekontamination des Instrumentendecks verwendet wird. Andere Dekontaminationsverfahren (z. B. mit einer 10%igen Bleichlösung) können zusätzlich oder alternativ zum automatisierten UV-Dekontaminationsverfahren eingesetzt werden. Siehe die Bedienungsanleitung des Magnis-Systems für vollständige Anweisungen zur Oberflächendekontamination und Reinigung.

- 1 Bevor Sie beginnen, verwenden Sie ein Hygrometer, um die Umgebungsfeuchtigkeit in der Nähe des Magnis-Geräts zu messen. Überprüfen Sie, ob die nicht kondensierende Luftfeuchtigkeit im akzeptablen Bereich von 30 % bis 70 % liegt.
- 2 Vergewissern Sie sich, dass das Gerätedeck von allen Laborartikeln aus früheren Durchläufen und von allen anderen verstreuten Materialien gereinigt ist. Alle Materialien, die sich während des Einrichtens auf dem Gerätedeck befinden, können die Inbetriebnahme des Geräts und die Durchlauf-Einrichtung stören.
- 3 Schalten Sie das Gerät ein, indem Sie den Ein-/Aus-Schalter an der Vorderseite des Geräts drücken. Schließen Sie die Gerätetür.
Das Gerät schaltet sich ein, die LED-Anzeige leuchtet im Inneren des Geräts auf und die Software wird auf dem Touchscreen gestartet.
Halten Sie sich bereit, wenn das System eine Reihe von Inbetriebnahmeaktivitäten durchführt, die mehrere Minuten in Anspruch nehmen können.
- 4 Agilent empfiehlt die Durchführung des *Quick cycle* für die UV-Dekontamination (erfordert 30 Minuten) vor jedem Durchlauf, wobei die folgenden Schritte ausgeführt werden.
 - a Drücken Sie auf dem Bildschirm Home auf **Decontamination**.



- b Drücken Sie auf dem Bildschirm „Decontamination“ auf **Quick cycle** und dann auf **Start**. Die Dauer des Dekontaminationsvorgangs *Quick cycle* beträgt 30 Minuten. Die LED-Anzeigeleuchten sind während des UV-Dekontaminationsvorgangs ausgeschaltet, wobei die UV-Lichtröhre des Geräts in diesem Zeitraum UV-Licht emittiert.



WARNHINWEIS

Blicken Sie nicht direkt in das UV-Licht, während die Dekontamination läuft.

HINWEIS

Beginnen Sie während des 30-minütigen Dekontaminationsprozesses mit den Schritten zur Reagenzienvorbereitung, die auf [Seite 22](#) beschrieben werden.

- 5 Nach Abschluss des Dekontaminationszyklus leuchten die LED-Anzeigeleuchten des Geräts blau. Kehren Sie über die Touchscreen-Bildschirm zum Bildschirm „Home“ zurück, um auf die Einrichtungsschritte zuzugreifen.

Schritt 2. SureSelect^{XT HS}-Reagenzien und Kunststoffe vorbereiten

Handhabungshinweise für Platten und Streifenröhrchen

Machen Sie sich mit den wichtigen Anweisungen zur Handhabung von Laborgeräten vertraut, bevor Sie mit der Einrichtung des Durchlaufs beginnen.

- Magnis Sample Input Strips (rote Streifen im Plattenformat, Teilnr. 5190-9882 oder 5191-5676), zusammen mit allen Reagenzien zur Vorbereitung und Verdünnung von DNA-Proben, sollten nur in den Prä-PCR-Bereichen des Labors gelagert und verwendet werden. Die leeren Magnis Probe Input Strips (Artikel-Nr. 5190-9883, nur mit Kits Artikel-Nr. G9730D und G9730B) sollten auch in einem Prä-PCR-Bereich gelagert und gefüllt werden.
- Die Klebestreifen und Folien, die die Kitplatten und Streifenröhrchen bedecken, dürfen während der Einrichtung und Ausführung des Laufs nicht entfernt werden. Vermeiden Sie es, die Folien- und Klebestreifenabdeckungen während der Durchlauf-Einrichtung zu berühren oder zu beschädigen. Die Folienabdeckung des Probeneingangsstreifens wird während des Durchlaufs durchbohrt und die Wells müssen wieder mit einem frischen Folienversiegelungsstreifen versiegelt werden, das im Kit enthalten ist. Achten Sie darauf, dass die Ersatzfolienversiegelungen nicht verunreinigt oder anderweitig beschädigt werden.
- Gefüllte Reagenzplatten (sowohl Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffer Plates als auch Magnis SureSelect XT HS Reagent Plates) werden in weißen Kartonhüllen geliefert. Lassen Sie die gefüllten Platten während aller nachfolgend beschriebenen Vorbereitungsschritte in den Hüllen. Zur visuellen Inspektion der Platten-Wells die Reagent Plate vorsichtig **nur teilweise** aus der Hülle herauschieben, um ein Verbiegen oder Beschädigen der Folien- oder Klebestreifenabdeckung zu vermeiden. Das unsachgemäße Wiedereinsetzen der Platte in die Hülle kann die Integrität der Platte beeinträchtigen.
- Mischen Sie mit einem Vortexer die gefüllten Reagenzplatten mit dem folgenden Verfahren, wie in den folgenden Abbildungen dargestellt. Halten Sie die eingehüllte Platte während des Mischens mit einem Vortexer in einer vertikalen Position (auf ihrer Seite) statt horizontal. Beginnen Sie, indem Sie eine lange Seite der Platte auf den Vortexerkopf drücken und 10 Sekunden lang mischen, dann die Platte um 90° drehen und die kurze Seite der Platte auf den Vortexerkopf für weitere 10 Sekunden drücken. Setzen Sie die Rotation/Mischsequenz von 10 Sekunden fort, bis sie auf allen vier Seiten der Platte abgeschlossen ist.



- Wenn eine Kitkomponente beim Auspacken oder Durchlauf-Einrichten beschädigt scheint (z. B. wird die Folien- oder Klebestreifenabdeckung durchbohrt oder sind Kunststoffteile zerbrochen), verwenden Sie die Komponente nicht; wenden Sie sich an den Agilent Support, um Unterstützung zu erhalten.

Schritte zur Einrichtung von Proben und Reagenzien

- 1 Bereiten Sie die **Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate** mit den folgenden Schritten für den Durchlauf vor:
 - a Transferieren Sie eine Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate aus der Lagerung bei +4 °C zu RT und bewahren Sie die Platte in der weißen Papphülle auf. Lassen Sie die mit Hüllen versehene Platte mindestens 30 Minuten lang bei RT abgleichen, bevor Sie sie während des Durchlaufs verwenden.
 - b Mischen Sie die gepolsterte Platte mit einem Vortexer, wobei die Platte vertikal positioniert ist, wie im Abschnitt über die Handhabungshinweise oben beschrieben.
 - c Drehen Sie die mit Hüllen versehene Platte in einer Zentrifuge, die auf 250 × *g* eingestellt ist, 3 Sekunden lang, um die Flüssigkeit aufzufangen, ohne die Kügelchen zu pelletieren (Beginn der Zeitmessung, sobald die Zentrifuge die volle Geschwindigkeit erreicht hat). Überschreiten Sie nicht die empfohlene Schleuderdrehzahl und -dauer, um ein Pelletieren der Kügelchen zu verhindern.
 - d Halten Sie die mit Hüllen versehene Platte bei RT für den Einsatz im Durchlauf am selben Tag.
- 2 Bereiten Sie die **Magnis SureSelect XT HS Reagent Plate Rev B ILM** oder die **Magnis SureSelect XT HS Reagent Plate ILM** gemäß den folgenden Schritten vor:
 - a Transferieren Sie eine Reagent Plate aus der Lagerung bei –20 °C zu RT und bewahren Sie die Platte in der weißen Papphülle auf. Lassen Sie die Reagenzien 15 bis 30 Minuten bei RT auftauen. Die Platte teilweise aus der Hülse schieben und visuell überprüfen, ob die Reagenzien vollständig aufgetaut sind.
 - b Sobald der Wellinhalt aufgetaut ist, mischen Sie die gepolsterte Platte mit einem Vortexer, wobei die Platte vertikal positioniert ist, wie im Abschnitt über die Handhabungshinweise oben beschrieben.
 - c Drehen Sie die mit Hüllen versehene Platte in einer Zentrifuge, die auf 250 × *g* eingestellt ist, 1 Minute (Beginn der Zeitmessung, sobald die Zentrifuge die volle Geschwindigkeit erreicht hat). Überprüfen Sie die Unterseite der Platten-Wellen auf Blasen, und wenn Blasen vorhanden sind, wiederholen Sie den Drehschritt, bis alle Blasen gelöst sind.
 - d Bewahren Sie die gepolsterte Platte auf Eis für den Einsatz im Durchlauf am selben Tag auf.
- 3 Bereiten Sie den **Magnis Sample Input Strip** mit den folgenden Schritten auf die Aufnahme der DNA-Proben vor.
 - a Vergewissern Sie sich, dass das Covaris E220-Gerät für den Einsatz im DNA-Scherschritt bereit ist, wobei das Wasserbad auf 5 °C gekühlt und wie auf [Seite 47](#) oder [Seite 52](#) beschrieben entgast wird.
 - b Nehmen Sie das Magnis Sample Input Strips Kit aus dem Lager bei RT. Entfernen Sie einen leeren roten Probeneingangsstreifen (mit der Aufschrift „S“ am Bandende) von der Plattenhalterung und lassen Sie die Folienabdeckung an ihrem Platz. Legen Sie einen frischen Folienversiegelungstreifen und eine angebrachte Rückseite zum erneuten Versiegeln in [Schritt d](#) beiseite.
 - c Bereiten Sie den Magnis Sample Input Strip mit den für Ihren DNA-Probentyp geeigneten Anweisungen für den Durchlauf vor. Für hochwertige DNA-Proben folgen Sie den Anweisungen auf [Seite 47](#) bis [Seite 49](#). Für FFPE-DNA-Proben folgen Sie den Anweisungen auf [Seite 50](#) bis [Seite 54](#).

Die endgültigen Probeneingangsstreifen müssen 50 µl gescherte DNA (10 ng, 50 ng, 100 ng oder 200 ng) in jedem Proben-Well enthalten, wobei alle Wells des Streifens die gleiche Menge an DNA enthalten.

- d Nachdem alle Proben in die Magnis Sample Input Strip Wells gelegt wurden, verschließen Sie das Streifenröhrchen wieder mit der frischen Folienversiegelung von **Schritt b** und achten Sie darauf, dass der Barcode des Streifenröhrchens nicht durch den Folienversiegelung verdeckt wird. Stellen Sie sicher, dass die Versiegelung fest und gleichmäßig angebracht wird, ohne übermäßige Überstände oder Falten, die den Sitz des Streifenröhrchens beim Einlegen in das Instrument behindern könnten.
 - e Überprüfen Sie die versiegelten Proben-Wells visuell, um sicherzustellen, dass keine Blasen vorhanden sind. Entfernen Sie alle Blasen, indem Sie den vorbereiteten Probenstreifen in einer Zentrifuge, die auf 250 × g eingestellt ist, 5 Sekunden lang drehen oder bis alle Blasen aus der DNA-Lösung gelöst sind.
 - f Halten Sie das Probenstreifenröhrchen auf Eis, bis Sie es auf **Seite 35** verwenden.
- 4 Bereiten Sie das **Index-Streifenröhrchen** mit den folgenden Schritten vor:
- a Bestimmen Sie den geeigneten Satz von Indizes, die für den Durchlauf verwendet werden sollen. Die mitgelieferten Indexstreifenröhrchen sind auf dem dem Barcode gegenüberliegenden Ende des Streifenröhrchens mit A1, A2, A3 oder A4 beschriftet, um den in den Wells enthaltenen spezifischen Indexsatz anzugeben (siehe **Seite 81** für vollständige Indexinformationen). Wenn Proben aus verschiedenen Magnis NGS-Bibliotheksvorbereitungsdurchläufen für NGS gemultiplext werden, muss jeder Durchlauf einen anderen Satz von Indizes verwenden, um sicherzustellen, dass alle gemultiplexten Proben mit einer eindeutigen Indexsequenz versehen sind.
 - b Nehmen Sie die Magnis SureSelect XT HS Index Plate aus der Lagerung bei –20 °C. Entfernen Sie den entsprechenden schwarzen Indexstreifen (mit der Bezeichnung A1, A2, A3 oder A4) von der Plattenhalterung und lassen Sie die Folienabdeckung an ihrem Platz. Legen Sie den entfernten Streifen zum Auftauen auf Eis und geben Sie die Platte mit den restlichen Indexstreifen bei –20 °C zur Lagerung zurück.
 - c Sobald der Inhalt des Indexstreifen-Wells aufgetaut ist, mischen Sie den Streifen mit einem Vortexer 5 Sekunden lang mit hoher Geschwindigkeit.
 - d Drehen Sie den Indexstreifen in einer Zentrifuge, die auf 250 × g eingestellt ist, 5 Sekunden lang. Überprüfen Sie die Streifen-Wells, um sicherzustellen, dass die Flüssigkeit im Boden der Wells gesammelt wird und keine Blasen vorhanden sind. Entfernen Sie alle Blasen, indem Sie den Drehschritt wiederholen, bis alle Blasen gelöst sind.
 - e Halten Sie das Indexstreifenröhrchen auf Eis, bis Sie es auf **Seite 35** verwenden.
- 5 Bereiten Sie das **Streifenröhrchen der Sonde (Probe)** mit den folgenden Schritten für Kits vor, die mit einem der unten aufgeführten vorgefüllten Probe Plate Formaten geliefert werden:
- *Magnis SureSelect Probe Plate, Pre-filled Single Well Format* oder *Magnis SureSelect XT HS Probe Plate, Pre-filled Single Well Format*, mit vollem Volumen der Sondenlösung für 8 Probendurchläufe in Well A (Well B bis H sind leer).
 - Magnis SureSelect XT HS Probe Plate, mit Volumen der Sondenlösung für 8 Probendurchläufe, aufgeteilt auf alle 8 Wells.

Wenn Ihr Kit keine vorgefüllten Sondenstreifen (Kit Teilnr. G9730D G9730B) enthält und stattdessen leere Sondenstreifen für die Vorbereitung der Laufzeit-Sonde enthält, überspringen Sie die folgenden Anweisungen und bereiten Sie den Sondenstreifen stattdessen anhand der Anweisungen auf **Seite 56** vor.

- a Nehmen Sie die Probe Plate aus der Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Entfernen Sie einen weißen Sondenstreifen (mit der Aufschrift „P“ am Streifenende) von der Plattenhalterung und lassen Sie die Folienabdeckung an ihrem Platz. Legen Sie den entfernten Streifen zum Auftauen auf Eis und geben Sie die Platte mit den restlichen Sondenstreifen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ zur Lagerung zurück.

VORSICHTSHINWEIS

Die Sondenstreifen enthalten keine vom Menschen lesbaren Etiketten, die die spezifische Identität des Sondendesigns zeigen. Seien Sie vorsichtig, um die Identität des Sondenstreifens zu verfolgen und zu erhalten, sobald ein Sondenstreifen aus der Plate-Verpackung entfernt wird. Öffnen Sie nicht mehrere Verpackungen und entfernen Sondenstreifenröhrchen für verschiedene Sondendesigns gleichzeitig.

- b Sobald der Inhalt des Sondenstreifen-Wells aufgetaut ist, mischen Sie den Streifen mit einem Vortexer 5 Sekunden lang mit hoher Geschwindigkeit.
- c Drehen Sie den Sondenstreifen in einer Zentrifuge, die auf $250 \times g$ eingestellt ist, 5 Sekunden lang. Überprüfen Sie die Streifen-Wells visuell, um sicherzustellen, dass die Flüssigkeit im Boden des/der Wells gesammelt wird und keine Blasen vorhanden sind. Entfernen Sie alle Blasen, indem Sie den Drehschritt wiederholen, bis alle Blasen gelöst sind.

HINWEIS

Das volle Volumen der Sondenlösung für den Lauf ist bei den mit den Rev B Reagent Kits gelieferten Sondenstreifen in einem einzigen Well vorhanden und wird bei den mit den Reagent Kits im Originalformat gelieferten Sondenstreifen auf alle 8 Wells verteilt.

- d Halten Sie den Sondenstreifen auf Eis, bis Sie es auf [Seite 35](#) verwenden.
- 6 Nehmen Sie sich eine Magnis Empty Consumables-Verpackung aus der Lagerung bei Raumtemperatur (RT) für die Verwendung während der Deckseinrichtung.

Fahren Sie fort mit „[Bibliotheksvorbereitungsprotokoll ausführen](#)“ auf Seite 26.

Bibliotheksvorbereitungsprotokoll ausführen

Wenn das Magnis-Gerät und alle Reagenzien für den SureSelect XT HS-Durchlauf vorbereitet wurden, folgen Sie den Anweisungen auf dem Touchscreen des Geräts, um die Laborgeräte auf das Gerät zu laden und das Protokoll zur Bibliotheksvorbereitung auszuführen. Die Schritte sind in [Abbildung 5](#) zusammengefasst.

Der Touchscreen des Magnis-Geräts bietet Aufforderungen zur Eingabe der Durchlaufinformationen, zum Laden des Decks, zur Überprüfung, ob alle Laborgeräte vorhanden sind und die erforderlichen Eigenschaften aufweisen, zur Eingabe von Probeninformationen und zur Bestätigung der Protokolleinrichtung. Während dieser Einrichtungsschritte geben die LED-Anzeigeleuchten des Geräts auf dem Deck ein weißes Licht ab. Zusätzliche Informationen zu jedem dieser angezeigten Schritte werden für neue Benutzer auf [Seite 28](#) bis [Seite 40](#) geboten.

Während des Protokolldurchlaufs führt das System die Bibliotheksvorbereitung und Zielanreicherung Ihrer gescherten DNA-Proben durch, um zielangereicherte DNA-Bibliotheken zu erzeugen, die für die Sequenzierung bereit sind. Während des Durchlaufs leuchtet die LED-Anzeige grün.

Wenn der Durchlauf abgeschlossen ist, wie durch die Abgabe von blauem Licht von der LED-Anzeige angezeigt, fordert Sie der Touchscreen des Systems auf, die endgültigen Sequenzierungsbibliothekspalten und QC-Proben (falls vorhanden) aus dem Gerät zu entfernen. Richtlinien für die Verarbeitung der endgültigen zielgruppenangereicherten Bibliotheken für die DNA-Sequenzierung finden Sie in „[Anhang 3: Richtlinien für die Verarbeitung von DNA-Proben nach dem Durchlauf für NGS](#)“ auf Seite 59.

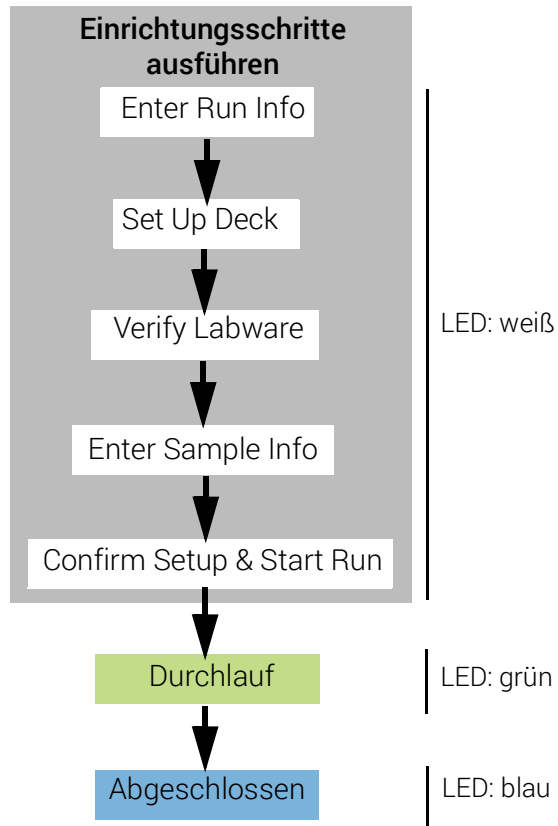
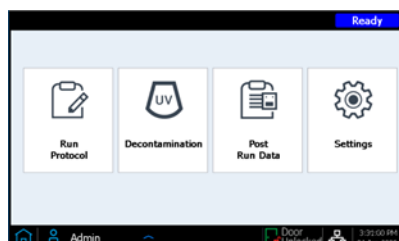


Abbildung 5 Übersicht über die Schritte zur Einrichtung und Fertigstellung des Magnis NGS Prep System. Die Farbe des Lichts, das von den LED-Anzeigeleuchten des Geräts während dieser Schritte abgegeben wird, ist rechts dargestellt.

Schritt 1. Protokoll initiieren und Durchlaufinformationen eingeben

- 1 Drücken Sie auf dem Bildschirm „Home“ des Touchscreens auf **Run Protocol**.

Das System verriegelt die Gerätetür und führt einen Instrument Health Check (IHC) durch, der mehrere Minuten dauern kann. Wenn der Bildschirm ein IHC-Problem meldet, finden Sie die Richtlinien für die Behebung im „[Leitfaden zur Fehlerbehebung](#)“ auf Seite 85.



- 2 Folgen Sie den Anweisungen auf dem Bildschirm *Enter Run Info* (Durchlaufinformationen eingeben), wie im Folgenden beschrieben. Geben Sie auf dem ersten Bildschirm den Protokollnamen und die Einstellungen für die QC-Sammlung für den Durchlauf an.
 - a Erweitern Sie das Menü **Protokoll**, und wählen Sie das für Ihr Reagent Kit Format geeignete Protokoll aus, wie unter [Tabelle 7](#) beschrieben. Protokolle, die auf Ihrem Touchscreen sichtbar sind und für die Verwendung auf Ihrem Instrument zur Verfügung stehen, können von den in [Tabelle 7](#) aufgeführten Protokollen abweichen (siehe „[Leitfaden zur Fehlerbehebung](#)“ auf Seite 85 für weitere Informationen).

Tabelle 7 Informationen zur Protokoll-Verwendung

Protokollname	Kompatible(s) Reagent Kit(s)	Verwendungsdetails
SSEL XTHS-RevB-ILM	Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits, die mit vorgefüllten Probe Input Strips geliefert werden (Pre-filled Single Well Format)	Dieses Protokoll bietet optimale Hybridisierungsbedingungen für SureSelect Human All Exon V7 und V8 Probes und für die meisten benutzerdefinierten SureSelect XT HS Sondendesigns mit den SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits.
LT-SSEL XTHS-RevB-ILM	Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits, die mit vorgefüllten Probe Input Strips geliefert werden (Pre-filled Single Well Format)	Dieses Protokoll bietet Hybridisierungsbedingungen, die dem Protokoll <i>SureSelectXT HS-Illumina</i> entsprechen. Die Verwendung wird für die Bearbeitung von Proben mit Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits empfohlen, wobei die Leistung von Workflows, die mit dem Protokoll <i>SureSelectXT HS-Illumina</i> eingerichtet wurden, oder bei der Verwendung von benutzerdefinierten Sonden, die ursprünglich für die Verwendung mit dem SureSelect XT System entwickelt wurden, erhalten bleibt.
SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM	Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit, das mit leeren Probe Input Strips geliefert wird (Artikel-Nr. G9730D)	Zum Verarbeiten von Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits, die mit leeren Probe Input Strips (EPIS) geliefert werden, unter Hybridisierungsbedingungen, die dem Protokoll <i>SSEL XTHS-RevB-ILM</i> entsprechen. Der Probe Input Strip vor dem Durchlauf befüllt werden, wie auf Seite 56 beschrieben.
LT-SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM	Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit, das mit leeren Probe Input Strips geliefert wird (Artikel-Nr. G9730D)	Zum Verarbeiten von Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits, die mit leeren Probe Input Strips (EPIS) geliefert werden, unter Hybridisierungsbedingungen, die dem Protokoll <i>LT-SSEL XTHS-RevB-ILM</i> entsprechen. Der Probe Input Strip vor dem Durchlauf befüllt werden, wie auf Seite 56 beschrieben.

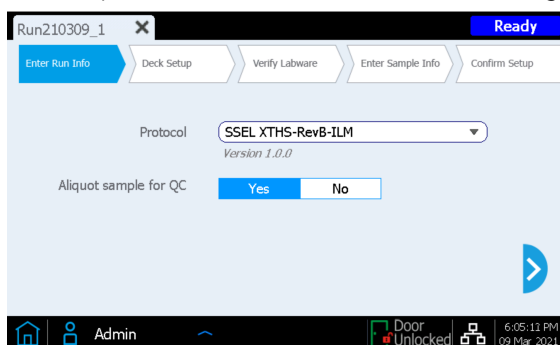
Tabelle 7 Informationen zur Protokoll-Verwendung

Protokollname	Kompatible(s) Reagent Kit(s)	Verwendungsdetails
SureSelectXT HS-Illumina	Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits im Originalformat , die mit vorgefüllten oder leeren Probe Input Strips geliefert werden	Magnis Reagent Kits, die im Originalformat geliefert werden, müssen mit diesem Protokoll verarbeitet werden. Falls zutreffend, muss der leere Probe Input Strip vor dem Durchlauf befüllt werden, wie auf Seite 56 beschrieben.

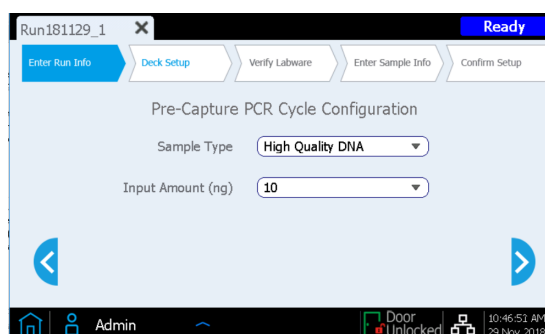
- b Wenn Sie möchten, dass das Gerät von jeder Pre-Capture Library-Probe ein Aliquot (3 µl) für die optionale QC-Analyse nach dem Durchlauf entnimmt, drücken Sie **Yes** neben **Aliquot sample for QC**. (Die QC-Proben vor der Aufnahme stehen nur dann für die Analyse zur Verfügung, wenn der gesamte Durchlauf abgeschlossen ist.) Wenn Sie diese Auswahl treffen, stellen Sie sicher, dass Sie den blauen QC-Streifen während der Deckseinrichtung auf [Seite 35](#) einlegen.

Oder deaktivieren Sie das Kontrollkästchen, um den optionalen Schritt zur Sammlung von QC-Aliquots zu überspringen.

- c Drücken Sie den Vorwärtspfeil, um zum nächsten Bildschirm zu gelangen.



- 3 Wählen Sie auf dem zweiten Bildschirm den geeigneten **Sample Type** (entweder *High Quality DNA* oder *FFPE DNA*) und die **Input Amount** (10 ng, 50 ng, 100 ng oder 200 ng) für die im Lauf verarbeiteten Proben aus. Diese Einstellungen werden verwendet, um die richtigen PCR-Zyklusbedingungen für den Durchlauf zu bestimmen. Die Nummer der PCR-Zyklen und andere Bedingungen, die während des Durchlaufs verwendet werden sollen, werden während der Schritte *Confirm Setup* gemeldet (siehe [Seite 40](#)).



Schritt 2. Deck einrichten

Die Magnis-Touchscreen-Oberfläche führt Sie durch die Schritte zur Deckseinrichtung. Für neue Benutzer werden auf [Seite 31](#) bis [Seite 36](#) zusätzliche Informationen bereitgestellt. Die folgende Abbildung zeigt ein komplett eingerichtetes Deck zur Orientierung an den Magnis-Deckpositionen und den Durchlauf-Laborgeräten.

Wenn Sie die auf dem Touchscreen-Bildschirm angegebenen Schritte zur Deckseinrichtung durchführen, achten Sie besonders auf die folgenden kritischen Details, um einen fehlerfreien Betrieb zu gewährleisten:

- Vergewissern Sie sich, dass die Spitzenverpackungen vollständig gefüllt sind und flach auf den Plattformen sitzen. Vergewissern Sie sich, dass jede Spitzenverpackung innerhalb des Rahmens der erhöhten Lasche ihrer Plattformposition platziert ist und dass sich die Verpackungen beim Entfernen des Deckels nicht lösen.
- Vergewissern Sie sich, dass alle Laborgeräte mit dem Barcode zu Ihnen hin ausgerichtet sind (Vorderseite des Geräts).

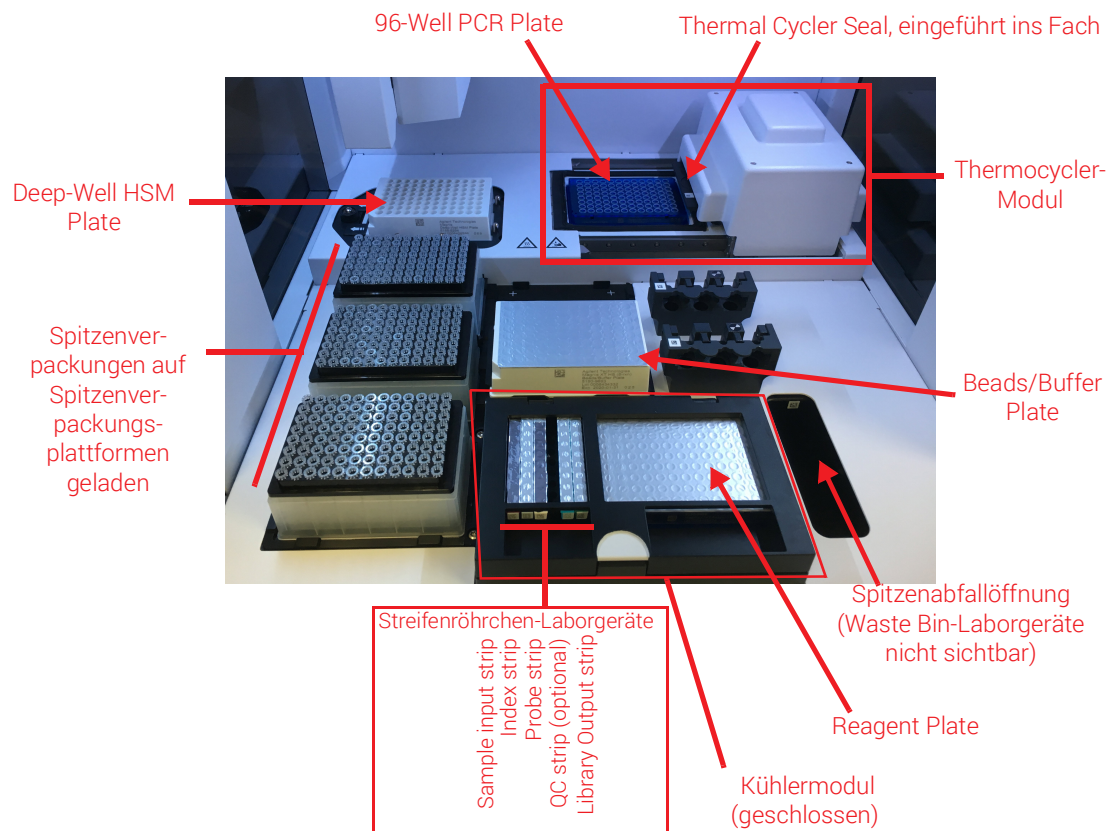
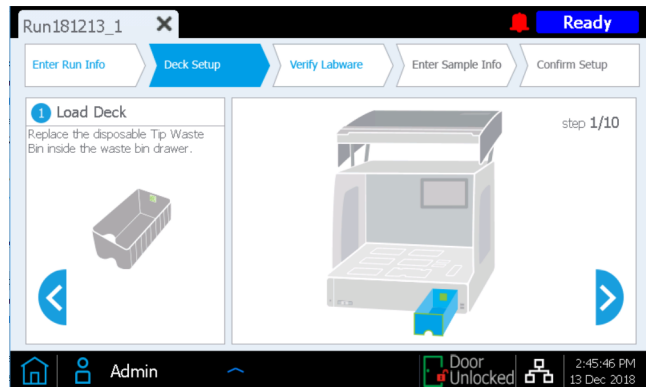


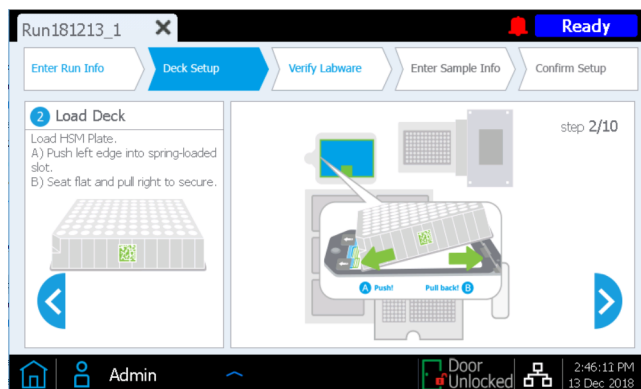
Abbildung 6 Instrumentendeck für die Durchführung geladen

Die Schritte zur *Deck Setup* (Deckseinrichtung), die auf der Magnis-Touchscreen-Oberfläche angezeigt werden, sind im Folgenden beschrieben. Für jeden Decksladeschritt wird die zu ladende Deckposition auf dem Touchscreen-Bildschirm blau hinterlegt. Sobald jeder Schritt abgeschlossen ist, drücken Sie den Vorwärtspfeil, um zum nächsten Bildschirm zu gelangen.

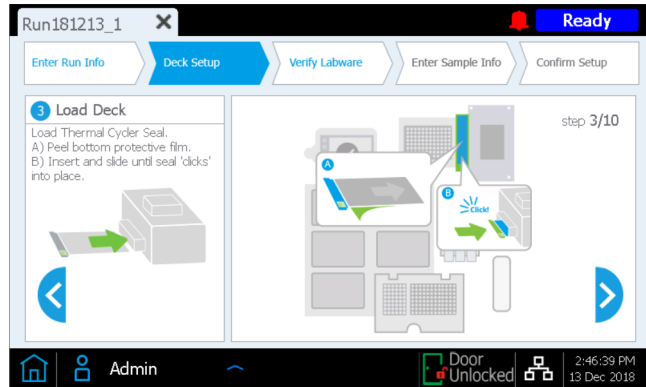
- 1 Entfernen Sie den Einweg-Magnis Tip Waste Bin aus der Magnis Empty Consumables Packung. Legen Sie den Einwegbehälter mit dem Barcode nach vorne in die Schublade des Abfallschubfachs, wie auf dem Touchscreen dargestellt. Schließen Sie das Abfallschubfach.



- 2 Entfernen Sie die Magnis Deep-Well HSM Plate aus der Magnis Empty Consumables Packung. Installieren Sie die Platte in der auf dem Touchscreen angezeigten Deckposition, wobei der Barcode zu Ihnen zeigt. Um die Platte zu laden, stecken Sie zuerst die linke Kante der Platte in den Schlitz mit Federbelastung und senken Sie dann die rechte Kante der Platte nach unten, bis die Platte flach auf der Plattform liegt. Sobald die Platte flach ist, verschieben Sie sie leicht nach rechts (mit Hilfe des Federmechanismus) und stellen Sie sicher, dass die Platte fest sitzt und im Inneren der Halterung auf der Plattform befestigt ist.



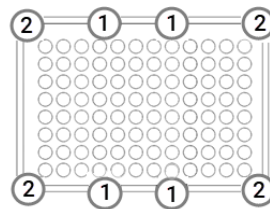
- Entfernen Sie die Magnis Thermal Cycler Seal aus der Magnis Empty Consumables Packung. Ziehen Sie die Schutzfolie vom Schaumstoffpolster unterhalb der Metallplatte ab, beginnend mit der gelben Lasche. Nachdem die gesamte Folie entfernt wurde, stecken Sie die Thermal Cycler Seal mit dem Barcode nach oben in den Schlitz an der auf dem Touchscreen angezeigten Position. Schieben Sie die Thermal Cycler Seal weiter in den Schlitz, bis sie einrastet.



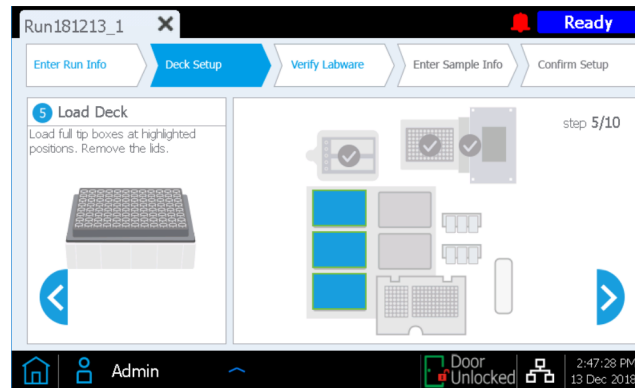
- Entfernen Sie die Magnis 96-Well PCR Plate aus der Magnis Empty Consumables Packung. Laden Sie die Platte in die auf dem Touchscreen angezeigte Deckposition, indem Sie die Platten-Well in die Block-Wellen des Thermocyclers einsetzen, wobei der Plattenbarcode zu Ihnen zeigt.



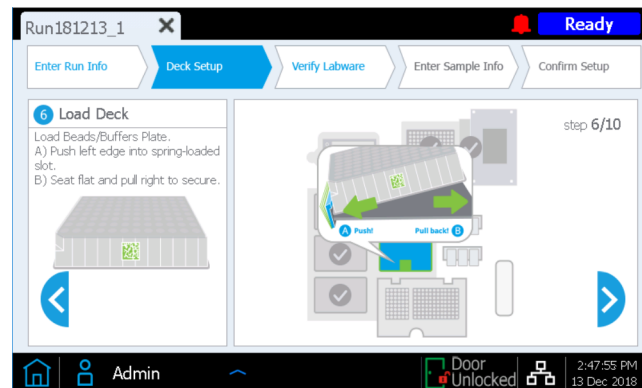
Um sicherzustellen, dass die Platte fest im Block sitzt, setzen Sie zuerst die Mitte der Platte in die Block-Wellen, indem Sie gleichmäßig auf die Plattenpositionen drücken, die in der Abbildung unten mit **1** markiert sind. Drücken Sie dann gleichmäßig auf alle vier Ecken der Platte (Positionen, die in der Abbildung unten mit **2** markiert sind).



- 5 Laden Sie eine frische, volle Spitzenverpackung an jeder der auf dem Touchscreen angezeigten Deckpositionen. **Entfernen Sie die Deckel** von den Verpackungen. Vergewissern Sie sich nach dem Entfernen des Deckels, dass jede Spitzenverpackung flach und innerhalb des Rahmens der angehobenen Lasche ihrer Plattformposition liegt.

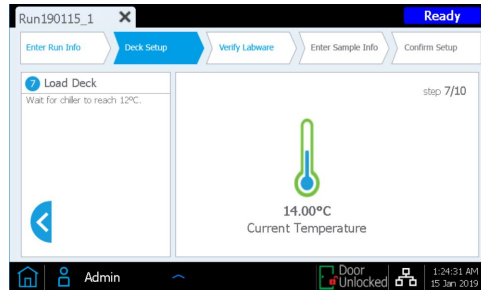


- 6 Nehmen Sie sich die Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate, die auf [Seite 23](#) vorbereitet wurde. Entfernen Sie die weiße Papphülle und legen Sie die Platte in die auf dem Touchscreen angezeigte Deckposition, wobei der Barcode zu Ihnen zeigt. Um die Platte zu laden, stecken Sie zuerst die linke Kante der Platte in den Schlitz mit Federbelastung und senken Sie dann die rechte Kante der Platte nach unten, bis die Platte flach auf der Plattform liegt. Sobald die Platte flach ist, verschieben Sie sie leicht nach rechts (mit Hilfe des Federmechanismus) und stellen Sie sicher, dass die Platte festsitzt und im Inneren der Halterung auf der Plattform befestigt ist.

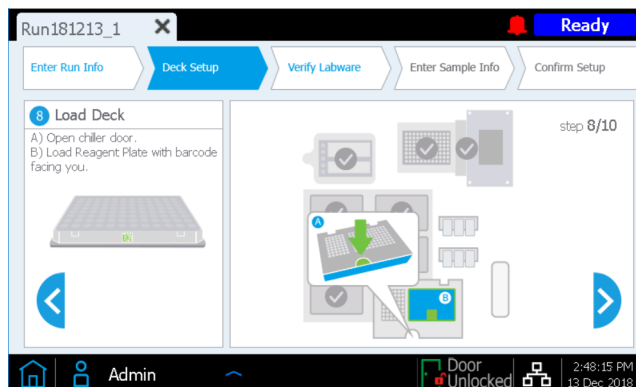


- 7 Das Kühlermodul des Geräts muss die richtige Temperatur (typischerweise 12 °C) erreichen, bevor es für den Durchlauf im nachfolgenden **Schritt 8** geladen werden kann. Bis die Kältemaschine die Ladetemperatur erreicht hat, erscheint der Touchscreen-Bildschirm wie folgt, so dass Sie den Status der Kältemaschine überprüfen können.

Dieser Bildschirm erscheint möglicherweise nicht während des Durchlaufs, wenn die Kältemaschine bereits die erforderliche Temperatur erreicht hat.



- 8 Laden Sie das Kältemodul wie unten beschrieben.
- Öffnen Sie die Kühltür, indem Sie auf die Halbkreis-Taste drücken, die mit einem grünen Pfeil auf dem Touchscreen gekennzeichnet ist.
 - Nehmen Sie die Reagent Plate, die auf **Seite 23** vorbereitet wurde. Entfernen Sie die weiße Papphülle und überprüfen Sie die Böden der Wells auf eventuelle Blasen. Falls Blasen vorhanden sind, entfernen Sie diese durch Drehen der Platte wie auf **Seite 23** angegeben. Laden Sie die Platte in das auf dem Touchscreen angezeigte Kühlermodul, wobei der Barcode zu Ihnen zeigt. Drücken Sie sie fest nach unten und üben Sie den Druck gleichmäßig auf die Platte aus. Vergewissern Sie sich, dass die Reagenzplatte fest im gekühlten Plattenhalter sitzt.



- 9 Laden Sie die Streifenröhrchen für den Durchlauf in den angegebenen Positionen der Kältemaschine wie unten beschrieben und in der aufgeführten Reihenfolge. Vor dem Einlegen jedes Streifens den Boden des Wells auf Blasenbildung prüfen. Falls Blasen vorhanden sind, entfernen Sie diese durch Drehen des Streifens wie auf [Seite 24](#) angegeben. Vergewissern Sie sich, dass jeder Streifen richtig sitzt, indem Sie beim Laden fest und gleichmäßig auf die Kanten der Streifenröhrchen drücken. Vermeiden Sie es, die Folienabdeckungen zu berühren oder zu beschädigen. **Achten Sie darauf, dass Sie jedes Streifenröhrchen mit dem Barcode nach vorne ausrichten.**
 - a Laden Sie das **rote Probenstreifenröhrchen mit den eingegebenen DNA-Proben** (auf [Seite 23](#) vorbereitet und auf Eis gehalten) in die mit **S** gekennzeichnete Position des Streifenröhrchenhalters.
 - b Laden Sie das **schwarze Streifenröhrchen mit indexierten Primern** (auf [Seite 24](#) vorbereitet und auf Eis gehalten) in die mit **IDX** gekennzeichnete Position des Streifenröhrchenhalters.
 - c Laden Sie das **weiße Streifenröhrchen mit der Sondenlösung** (auf [Seite 24](#) vorbereitet und auf Eis gehalten) in die mit **P** gekennzeichnete Position des Streifenröhrchenhalters.
 - d Nehmen Sie das Paket Magnis Library Output Strip, QC Strip und Foil Seals aus der Magnis Empty Consumables Packung. Laden Sie den **leeren grünen Bibliotheksausgabestreifen** (mit der Aufschrift „L“ am Streifenende) in die mit **L** gekennzeichnete Position des Streifenröhrchenaufnahmehalters. Lassen Sie die Folienabdeckung intakt.

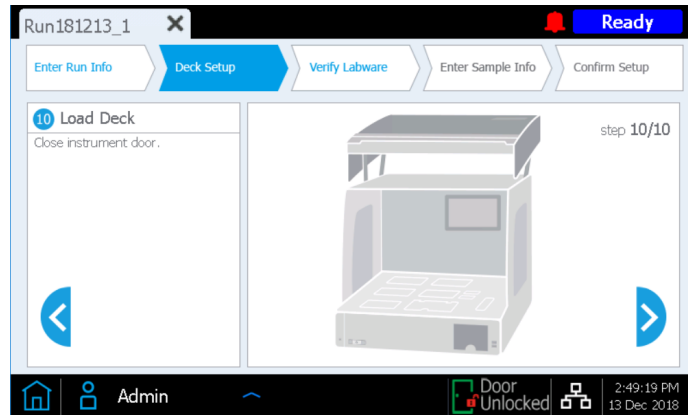
Wenn der Durchlauf das Sammeln von Aliquots der Bibliotheksproben für QC vor der Erfassung beinhaltet (siehe [Seite 28](#)), laden Sie den **leeren blauen QC-Streifen** (mit der Aufschrift „Q“ am Ende des Streifens) in die mit **Q** beschriftete Position des Streifenröhrchenhalters ein. Lassen Sie die Folienabdeckung intakt.

Halten Sie die in der Packung mitgelieferten frischen Folienversiegelungen am Ende des Durchlaufs gebrauchsfertig.

- e Sobald die Streifenröhrchen an den Positionen **S, IDX, P, L** und **Q** (falls vorhanden) geladen sind, schließen Sie die Kühltür. (Vergewissern Sie sich, dass die Tür vollständig geschlossen ist, wie durch ein hörbares Klickgeräusch angezeigt).



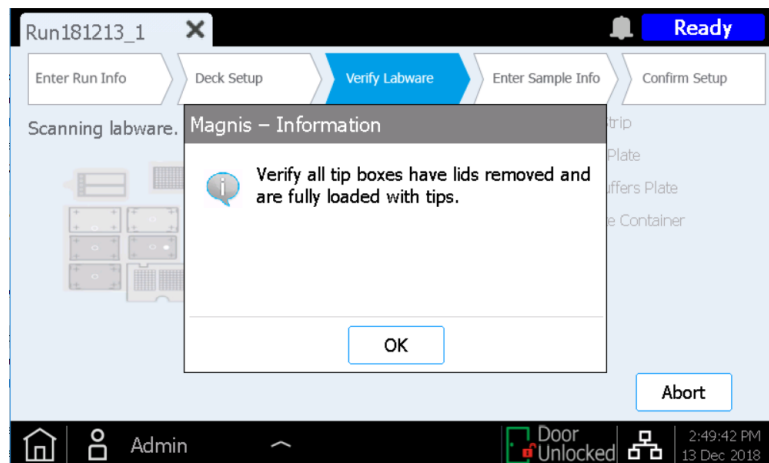
10 Schließen Sie die Gerätetür.



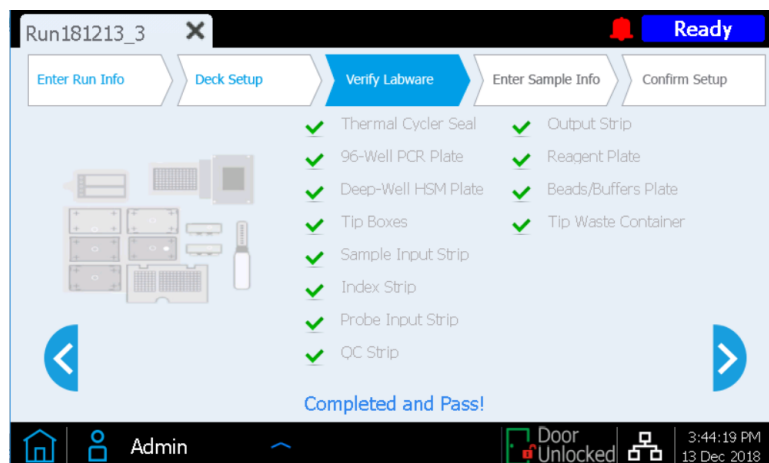
Schritt 3. Verifizieren von Laborartikeln

Sobald alle *Deck Setup*-Schritte abgeschlossen sind, führt das Gerät die Phase *Verify Labware* (Laborgeräte überprüfen) des Durchlaufs durch, in der das Gerät den Barcode auf jeder der auf dem Deck vorhandenen Laborgerätekomponenten scannt.

Bevor Sie mit der automatisierten Laborgeräteverifizierung beginnen, müssen Sie sicherstellen, dass die Deckel von allen Spitzenverpackungen entfernt wurden und dass alle Spitzenverpackungen voll sind, wie in der folgenden Aufforderung angegeben. Sobald der Status der Spitzenverpackung überprüft wurde, drücken Sie auf **OK**, um die automatisierte Laborverifikation des Geräts zu starten.



Während des Barcodescans überprüft das Gerät, ob alle für den Durchlauftyp erforderlichen Komponenten vorhanden, in der richtigen Position und Ausrichtung sind und nicht abgelaufen sind. Die Ergebnisse der Überprüfung werden auf dem Magnis-Touchscreen angezeigt. Drücken Sie zum Fortfahren auf den Vorwärtspfeil.



Wenn der Bildschirm *Verify Labware* ein Problem mit einer oder mehreren Durchlaufkomponenten meldet, lesen Sie die Richtlinien für die Behebung im „[Leitfaden zur Fehlerbehebung](#)“ auf Seite 85.

Der letzte Bildschirm *Verify Labware* ermöglicht es Ihnen, Details für den Probe Input Strip zu überprüfen.

Bei Durchläufen, die vordosierte Sonden beinhalten, wird die Identität der Sondenlösung automatisch durch den Streifenbarcode an die Magnis-Software übermittelt, und die Sondereigenschaften werden wie unten gezeigt zur Überprüfung gemeldet. Drücken Sie zum Fortfahren auf den Vorwärtspfeil.

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

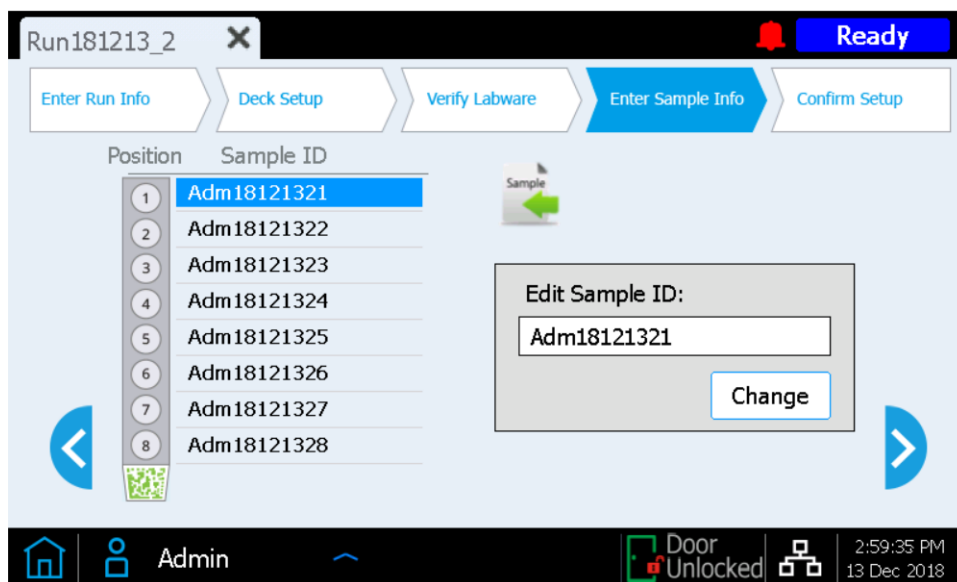
Capture Size Small Large

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

Für Durchläufe, die mit gefüllten Laufzeit-Sondenstreifen durchgeführt werden (Durchläufe mit dem Kit Artikel-Nr. G9730D oder G9730B, das leere Probe Input Strips enthält), müssen Sie die sondenbezogenen Eigenschaften auf diesem Bildschirm manuell eingeben. Siehe die Anweisungen auf [Seite 58](#). Sobald alle Felder ausgefüllt sind, drücken Sie den Vorwärtspfeil, um fortzufahren.

Schritt 4. Eingeben von Probeninformationen

Verwenden Sie diesen Bildschirm, um jede Well-Position einer bestimmten Probe in der Magnis-Software zuzuordnen. Die Magnis-Software weist jeder Probenposition automatisch eine standardmäßige Sample ID zu. Die standardmäßigen Sample IDs können mit einer der beiden folgenden Methoden durch eine/n ausgewählte/n Probennamen / Sample ID ersetzt werden.



Verfahren 1: Import von Probenzuordnungen über eine .csv-Datei

- 1 Erstellen Sie eine .csv-Datei (comma separated value) mit den gewünschten Sample IDs für den Durchlauf in der richtigen Reihenfolge und laden Sie die .csv-Datei auf einen unverschlüsselten USB-Datenträger herunter, wie auf [Seite 17](#) beschrieben.
- 2 Drücken Sie auf dem oben gezeigten Bildschirm *Enter Sample Info* (Probeninformationen eingeben) die Schaltfläche zum Proben-Upload und folgen Sie dann den Anweisungen des Protokoll-Setup-Assistenten, um die Sample IDs von der USB-Disk zu übertragen.



Verfahren 2: Manuelle Laufzeitprobenzuordnung

- 1 Wählen Sie eine bestimmte Probenposition auf dem Touchscreen aus.
- 2 Verwenden Sie das Werkzeug **Edit Sample ID** auf der rechten Seite, um den gewünschten Sample ID-Text einzugeben. Drücken Sie auf **Change**, um den eingegebenen Sample ID-Text für die Probenposition zu speichern.

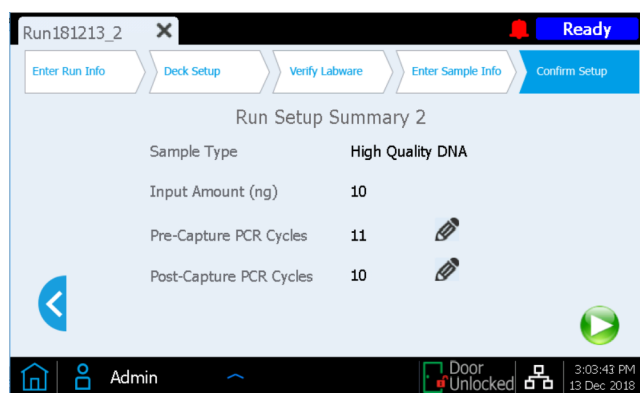
Schritt 5. Einrichtung bestätigen und Durchlauf starten

Verwenden Sie diesen Bildschirmsatz, um die Details der Durchlaufeinrichtung zu bestätigen, bevor Sie einen Durchlauf starten.

- 1 Überprüfen Sie auf dem ersten Bildschirm die allgemeinen Merkmale des Durchlaufs. Sobald die Eingaben als korrekt bestätigt wurden, drücken Sie den Vorwärtspfeil, um zum letzten Einrichtungsbildschirm zu gelangen.



- 2 Der zweite Bildschirm zeigt Durchlaufdetails in Bezug auf die Eigenschaften der DNA-Probe und der für den Durchlauf verwendeten Sonde an. Die Nummern der Pre-Capture und Post-Capture PCW Cycles, die im Lauf verwendet werden (basierend auf typischen optimalen Bedingungen für die eingegebene DNA und die im Durchlauf verwendete Sonde), werden angezeigt.



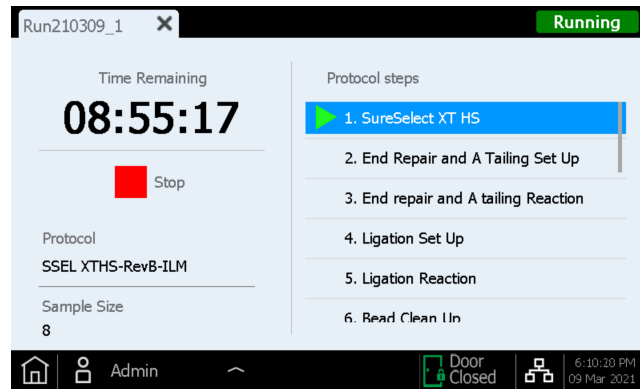
Wenn ein Benutzer der *Advanced* Zugriffsebene angemeldet ist, kann jeder Wert der Zyklusnummer durch Drücken der Stifttaste geändert werden. Benutzer der *Standard*-Berechtigungsebene können diese Durchlauf-Parameter nicht ändern und die Stifttaste ist auf dem oben gezeigten Bildschirm nicht sichtbar.

- 3 Nachdem Sie die Details der Durchlaufeinrichtung bestätigt haben, drücken Sie die Schaltfläche Start, um den Durchlauf zu starten.

Sobald der Durchlauf beginnt, leuchtet die LED-Anzeige grün, und der Touchscreen zeigt den Status des Durchlaufs an, einschließlich einer Schätzung der verbleibenden Zeit bis zur Beendigung des Durchlaufs.

Der Lauf dauert in der Regel 8,5 bis 9 Stunden und kann aus praktischen Gründen auch über Nacht durchgeführt werden. Nach Abschluss des Protokolls werden die vorbereiteten Bibliotheken automatisch bei 12 °C gehalten. Sammeln Sie die Bibliotheken innerhalb von 72 Stunden vom Gerät.

Drücken Sie bei Bedarf die rote **Stop**-Taste, um den Durchlauf abubrechen. Es erscheint eine Warnmeldung, in der Sie aufgefordert werden, zu bestätigen, dass Sie den Durchlauf abbrechen möchten. Sobald Sie einen Durchlauf gestoppt haben, kann er nicht mehr fortgesetzt werden, und die in diesem Durchlauf verwendeten Laborgeräte können nicht mehr für einen späteren Durchlauf neu geladen werden.

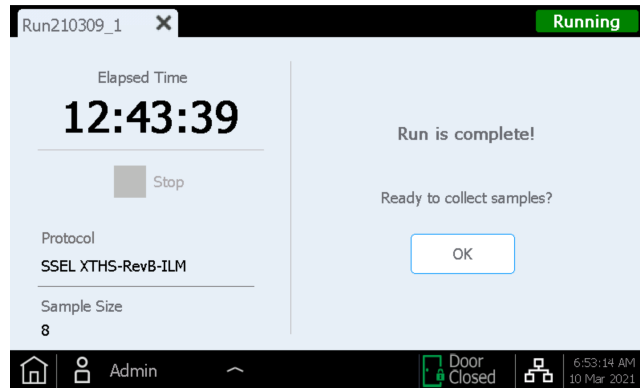


HINWEIS

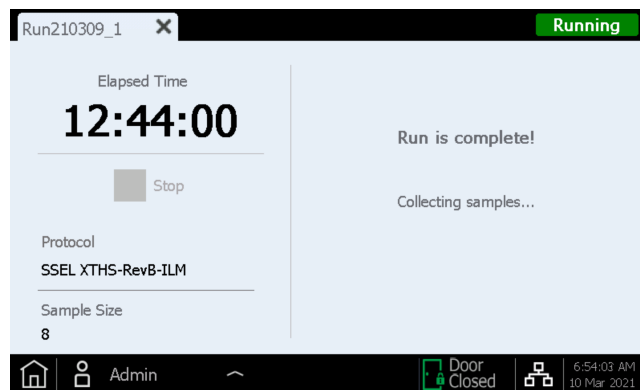
Der Bildschirm *Running* muss während der Dauer des Durchlaufs geöffnet bleiben, und die Schaltfläche zum Schließen des Bildschirms (✕) und andere Navigationstasten sind während des Durchlaufs inaktiv. Sie können den Touchscreen nicht verwenden, um während eines Durchlaufs andere Funktionen auszuführen.

Schritt 6. Endgültige Bibliotheksproben vom Instrument sammeln

Wenn der Durchlauf abgeschlossen ist, zeigt der Touchscreen die folgende Eingabeaufforderung an. Drücken Sie auf **OK**, wenn Sie die Bibliotheksproben vom Gerät entnehmen möchten.

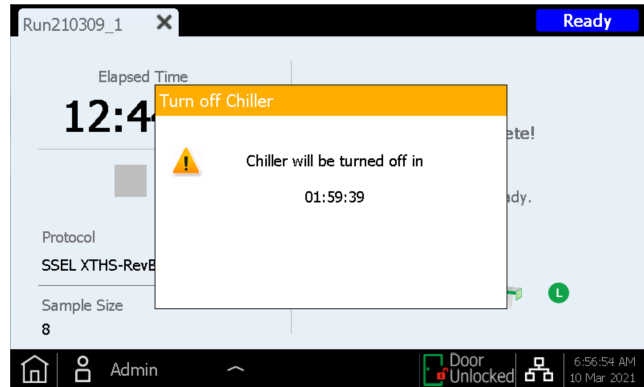


Das Gerät überträgt die vorbereiteten Bibliothekslösungen von der PCR-Platte im Thermocycler auf den grünen Library Output Strip in der Kältemaschine.



Warten Sie, bis die LED-Anzeigeleuchten blau leuchten und damit anzeigen, dass alle vom Gerät ausgelösten Probenverarbeitungsschritte abgeschlossen sind, bevor Sie die Gerätetür öffnen.

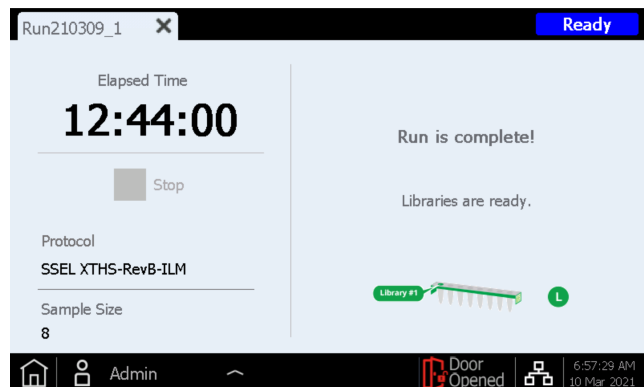
Sobald die Proben in den grünen Library Output Strip in der Kältemaschine gelegt wurden, erscheint der Touchscreen-Bildschirm wie folgt. Die Kältemaschine, die die Bibliotheksproben enthält, wird bis zu 2 Stunden lang bei 12 °C gehalten, wobei die verbleibende Kühlzeit auf dem Touchscreen-Dialog wie folgt angezeigt wird. Die Kältemaschine wird ausgeschaltet, sobald die Gerätetür geöffnet wird.



Öffnen Sie die Gerätetür vollständig (bis die LED-Anzeige weiß leuchtet) und entnehmen Sie die endgültigen Bibliotheksproben im grünen Library Output Strip von der L-Position des Kühlmoduls. Versiegeln Sie die Wells erneut mit einem frischen Folienversiegelungsstreifen (im Lieferumfang der Library Output and QC-Streifenröhrchen-Packung enthalten) und platzieren Sie die Bibliotheken dann unter geeigneten Lagerbedingungen, entsprechend Ihrem Forschungsdesign.

Richtlinien für die Verarbeitung der endgültigen zielgruppenangereicherten Bibliotheken für die DNA-Sequenzierung finden Sie in „[Anhang 3: Richtlinien für die Verarbeitung von DNA-Proben nach dem Durchlauf für NGS](#)“ auf Seite 59.

Sobald die Tür für die Bibliotheksprobenahme geöffnet ist, erscheint der Touchscreen wie unten gezeigt.



Schließen Sie den Durchlaufbildschirm, indem Sie auf der Registerkarte auf das X drücken, um zum Home-Bildschirm zurückzukehren.

HINWEIS

Das Schließen des Bildschirms kann einige Sekunden dauern. Drücken Sie die Taste X nicht erneut.

Verarbeitung der optionalen QC-Bibliothekspalten vor der Aufnahme

Wenn die optionalen QC-Bibliothekspalten vor der Aufnahme gesammelt wurden, entfernen Sie den blauen QC Strip aus dem Kältemodul. Trocknen Sie die DNA in den Wells, indem Sie den unverschlossenen QC Strip bei RT belassen, bis die Proben getrocknet sind. QC-Proben können im getrockneten Zustand gelagert werden, bis die Sequenzierungsbibliotheken analysiert sind.

HINWEIS

QC-Proben können am Ende des Durchlaufs getrocknet oder teilweise getrocknet erscheinen, da die QC Strips unversiegelt bleiben, nachdem die 3- μ l-Aliquots während des Durchlaufs gesammelt wurden. Die Proben sollten vor der Lagerung oder Rekonstitution vollständig getrocknet sein, um genaue QC-Ergebnisse zu gewährleisten.

Wenn eine Analyse der QC-Proben erforderlich ist, resuspendieren Sie die getrockneten Proben in 6 μ l nukleasefreiem Wasser, um eine Konzentration zu erreichen, die für die Analyse mit dem Agilent's TapeStation-System und einem D1000 ScreenTape-Assay oder einem ähnlichen Analysegerät geeignet ist. Nach Zugabe von 6 μ l Wasser zu jedem Well inkubieren Sie es bei RT für 5–10 Minuten und mischen Sie es dann gut mit einem Vortexer, um eine vollständige Resuspension zu gewährleisten.

Erwartete Ergebnisse: Typische Bibliotheken vor der Aufnahme haben einen Höchstwert der DNA-Fragment-Größe zwischen 300 und 400 bp für hochwertige eingegebene DNA oder zwischen 200 und 400 bp für eingegebene FFPE-basierte DNA.

QC-Proben, die in 6 μ l getrocknet und resuspendiert wurden, sollten eine Konzentration von ca. 30–100 ng/ μ l aufweisen, abhängig von der Qualität der eingegebenen DNA und der Nummer des PCR-Zyklus vor der Aufnahme. Die Gesamtausbeute der Bibliothek vor der Aufnahme kann als DNA-Menge in 1 μ l der rekonstituierten QC-Probe x 36 berechnet werden (beinhaltet sowohl Verdünnungs- als auch Probenanpassungen).

Schritt 7. Reinigen des Geräts nach dem Durchlauf

Entfernen und entsorgen Sie alle verwendeten Verbrauchsmaterialien, die sich auf dem Gerätedeck befinden:

- Entfernen Sie den gefüllten Spitzenabfallbehälter aus der Schubfach des Abfallbehälters und stellen Sie das Schubfach wieder in die geschlossene Position
- Entfernen Sie die verwendete Deep-Well HSM Plate vom HSM-Modul
- Entfernen Sie die verwendete 96-Well PCR Plate und das Thermal Cycler Seal vom PCR-Modul
- Entfernen Sie alle Spitzenverpackungen, einschließlich der teilweise gefüllten Verpackungen
- Entfernen Sie die gebrauchte Beads/Buffers Plate aus dem zentralen Deckplattenhalter
- Öffnen Sie das Kältemodul und entfernen Sie die verwendete Reagent Plate und die verwendeten roten, schwarzen und weißen Streifenröhrchen. Stellen Sie sicher, dass alle grünen Library Output (L) Strip-Röhrchen und blauen QC Sample (Q) Strip-Röhrchen aus der Kältemaschine entfernt und für die weitere Verarbeitung aufbewahrt wurden.

HINWEIS

Es ist wichtig, alle Laborgerätekomponten und alle anderen verstreuten Materialien vom Gerätedeck zu entfernen, bevor ein neuer Durchlauf gestartet wird. Das Vorhandensein von Materialien auf dem Deck, wenn ein neuer Durchlauf eingeleitet wird, kann dazu führen, dass der Instrument Health Check für den neuen Durchlauf fehlschlägt.

Wenn verschüttete oder ausgelaufene Materialien auf dem Gerätedeck beobachtet werden, empfiehlt Agilent die Durchführung des Extended Cycle-Verfahrens zur UV-Dekontamination (weitere Informationen zur UV-Dekontamination finden Sie auf [Seite 20](#)). Entfernen Sie das verschüttete Produkt gemäß den Anweisungen in der Bedienungsanleitung des Geräts.

3

Anhang 1: Richtlinien zur Vorbereitung von DNA-Proben

- I. Vorbereitung hochwertiger DNA-Proben für Magnis-Durchläufe [47](#)
 - Schritt 1. Vorbereiten, Quantifizieren und Qualifizieren der genomischen DNA-Proben [47](#)
 - Schritt 2. Scheren der DNA [47](#)
- II. Vorbereitung von FFPE-basierten DNA-Proben für Magnis-Durchläufe [50](#)
 - Schritt 1. Vorbereiten genomischer DNA aus FFPE-Proben [50](#)
 - Schritt 2. Qualifizieren und Quantifizieren der FFPE DNA-Proben [50](#)
 - Schritt 3. Scheren der FFPE DNA-Proben [52](#)

Vor der Einrichtung des Vorbereitungsdurchlaufs der Magnis SureSelect^{XT HS} DNA-Sequenzierungsbibliothek müssen DNA-Proben unter Verwendung der Richtlinien und Protokolle in diesem Abschnitt vorbereitet, quantifiziert, qualifiziert und geschert werden.

Magnis Sample Input Strips (rote Streifenröhrchen im Plattenformat, Teilnr. 5190-9882 oder 5191-5676), zusammen mit allen Reagenzien zur Vorbereitung und Verdünnung von DNA-Proben, sollten nur in den Prä-PCR-Bereichen des Labors gelagert und verwendet werden.

Das Vorbereitungsprotokoll der Bibliothek ist sowohl mit hochwertiger gDNA aus frischen oder frisch gefrorenen Proben als auch mit minderwertiger DNA aus FFPE-Proben kompatibel. Informationen zu hochwertigen gDNA-Proben finden Sie auf [Seite 47](#). Informationen zu FFPE-basierten DNA-Proben finden Sie auf [Seite 50](#).

Magnis-Durchläufe können 10 ng, 50 ng, 100 ng oder 200 ng eingegebene DNA beinhalten. Für optimale Sequenzierungsergebnisse verwenden Sie die maximale Menge an eingegebener DNA, die in diesem Bereich verfügbar ist.

I. Vorbereitung hochwertiger DNA-Proben für Magnis-Durchläufe

Magnis SureSelect XT HS-Durchläufe erfordern 10 ng, 50 ng, 100 ng oder 200 ng eingegebener DNA in einem Volumen von 50 µl 1X Low TE Buffer. Alle Proben desselben Durchlaufs müssen in der gleichen Menge bereitgestellt werden.

HINWEIS

Verdünnen Sie die zu scherenden Proben nicht mit Wasser. Das Scheren von Proben in Wasser reduziert die Gesamtausbeute und Komplexität der Bibliotheksvorbereitung.

Schritt 1. Vorbereiten, Quantifizieren und Qualifizieren der genomischen DNA-Proben

- 1 Bereiten Sie hochwertige gDNA aus frischen oder gefrorenen biologischen Proben mit einem geeigneten Reinigungssystem, wie beispielsweise dem Qiagen's QIAamp DNA Mini Kit, nach dem Protokoll des Herstellers vor.

HINWEIS

Stellen Sie sicher, dass genomische DNA-Proben von hoher Qualität sind und ein OD 260/280-Verhältnis von 1,8 bis 2,0 aufweisen.

- 2 Verwenden Sie das Qubit BR dsDNA Assay Kit, um die Konzentration jeder gDNA-Probe zu bestimmen. Befolgen Sie die Anweisungen des Herstellers für das Gerät und das Assaykit.
- 3 Bereiten Sie jede DNA-Probe für das Bibliotheksaufbereitungsprotokoll vor, indem Sie die entsprechende Menge (10 ng, 50 ng, 100 ng oder 200 ng) jeder gDNA-Probe mit 1X Low TE Buffer auf ein Endvolumen von 50 µl verdünnen. Mischen Sie sie gut mit einem Vortexer, drehen Sie sie dann kurz, um die Flüssigkeit zu sammeln. Halten Sie die Proben auf Eis.

Schritt 2. Scheren der DNA

In diesem Schritt werden die 50-µl gDNA-Proben unter Bedingungen geschert, die für hochwertige DNA optimiert sind. Die Größe des Ziel-DNA-Fragments beträgt 150 bis 200 bp.

HINWEIS

Dieses Protokoll wurde mit einem Covaris Modell E220-Gerät und dem 130-µl Covaris microTUBE optimiert. Beachten Sie die Empfehlungen des Herstellers für die Verwendung anderer Covaris-Geräte oder Probenhalter, um die gleiche Ziel-DNA-Fragmentgröße zu erreichen.

- 1 Richten Sie das Covaris E220-Gerät ein. Weitere Informationen finden Sie in der Bedienungsanleitung des Geräts.
 - a Überprüfen Sie, ob das Wasser im Covaris-Tank mit frischem deionisiertem Wasser bis zum entsprechenden Füllstand gefüllt ist, gemäß den Empfehlungen des Herstellers für das jeweilige Gerätemodell und das verwendete Probengefäß oder die verwendete Platte.
 - b Überprüfen Sie, ob das Wasser den sichtbaren Glasteil des Röhrchens bedeckt.
 - c Drücken Sie auf der Systemsteuerung des Instruments die Taste Degas. Entgasen Sie gemäß den Empfehlungen des Herstellers, typischerweise 30–60 Minuten.

- d Stellen Sie die Temperatur der Kältemaschine auf 2 °C bis 5 °C ein, um sicherzustellen, dass die Temperaturanzeige im Wasserbad 5 °C anzeigt. Beachten Sie die Herstellerangaben zur Zugabe von Kühlflüssigkeit, um ein Einfrieren zu verhindern.
- 2 Führen Sie die folgenden DNA-Scherschritte für jede der gDNA-Proben durch.
 - a Transferieren Sie die 50-µl DNA-Probe in ein Covaris microTUBE, indem Sie eine konische Pipettenspitze verwenden, um die Probe langsam durch das vorgespaltene Septum der Kappe zu transferieren.
 - b Drehen Sie den microTUBE 30 Sekunden lang, um die Flüssigkeit aufzufangen und Blasen vom Boden des Röhrchens zu entfernen.
 - c Befestigen Sie den microTUBE im Röhrchenhalter und scheren Sie die DNA mit den Einstellungen in [Tabelle 8](#).

Tabelle 8 Schereinstellungen für Geräte der Covaris E-Serie (SonoLab Software Version 7 oder höher)

Einstellung	Wert
Betriebsfaktor	10 %
Spitzeneinfalleistung (PIP)	175
Zyklen pro Burst	200
Badtemperatur	2 bis 8 °C
Behandlungszeit	2 × 120 Sekunden (Zwei-Runden-Scheren mit den unten beschriebenen Schritten) <ul style="list-style-type: none"> • Scheren Sie für 120 Sekunden • Drehen Sie den microTUBE für 10 Sekunden • Mischen Sie den microTUBE mit einem Vortexer mit hoher Geschwindigkeit für 5 Sekunden • Drehen Sie den microTUBE für 10 Sekunden • Scheren sie weitere 120 Sekunden • Drehen Sie den microTUBE für 10 Sekunden • Mischen Sie den microTUBE mit einem Vortexer mit hoher Geschwindigkeit für 5 Sekunden • Drehen Sie den microTUBE für 10 Sekunden

- d Gehen Sie direkt zum nächsten Schritt über, lassen Sie die gescherte DNA nicht länger als nötig im Covaris microTUBE.
- 3 Legen Sie den Covaris microTUBE mit der gescherten DNA wieder in die Be- und Entladestation zurück. Halten Sie die microTUBE-Schnappkappe auf, führen Sie eine Pipettenspitze durch das vorgespaltene Septum und entfernen Sie dann langsam die gescherte DNA.
 - 4 Transferieren Sie die 50-µl gescherte DNA-Probe aus dem Covaris microTUBE in das dafür vorgesehene Well des roten Magnis Sample Input Strip und durchbohren Sie die Foliensiegel mit der Pipettenspitze kurz vor der Abgabe der Flüssigkeit. Halten Sie die Proben auf Eis.

Achten Sie darauf, dass Sie die Proben an der richtigen Proben-Well-Position einlegen, wobei die Probe 1 am weitesten vom Barcode entfernt ist, wie nachfolgend in [Abbildung 7](#) gezeigt.

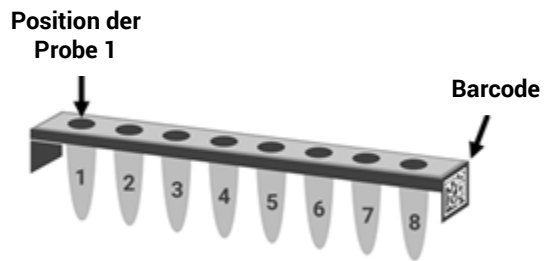


Abbildung 7 Erforderliche Ausrichtung der Probennummern 1 bis 8 im Magnis Sample Input Strip.

- 5 Nach dem Transfer der DNA-Probe drehen Sie den microTUBE kurz, um das verbleibende Probenvolumen zu sammeln. Transferieren Sie alle zusätzlich gesammelten Flüssigkeiten in das gleiche Well des Magnis Sample Input Strip.

HINWEIS

Es ist wichtig, den Verlust von eingegebener DNA in diesem Schritt zu vermeiden, insbesondere bei DNA-Proben mit geringem Überfluss. Überprüfen Sie den microTUBE, um sicherzustellen, dass die gesamte Probe transferiert wurde. Wenn Tröpfchen im microTUBE verbleiben, wiederholen Sie [Schritt 5](#).

- 6 Sobald alle Proben geladen sind, fahren Sie mit der Einrichtung des Probeneingangsstreifens fort, wie auf [Seite 24](#) erläutert (siehe Teil d von [Schritt 3](#)).

II. Vorbereitung von FFPE-basierten DNA-Proben für Magnis-Durchläufe

Magnis SureSelect XT HS-Durchläufe erfordern 10 ng, 50 ng, 100 ng oder 200 ng eingegebener DNA in einem Volumen von 50 µl 1X Low TE Buffer. Alle Proben desselben Durchlaufs müssen in der gleichen Menge bereitgestellt werden.

HINWEIS

Verdünnen Sie die zu scherenden Proben nicht mit Wasser. Das Scheren von Proben in Wasser reduziert die Gesamtausbeute und Komplexität der Bibliotheksvorbereitung.

Schritt 1. Vorbereiten genomischer DNA aus FFPE-Proben

Vorbereiten und Qualifizieren von gDNA aus FFPE-Proben

- 1 Bereiten Sie gDNA aus FFPE-Gewebeschnitten mit Qiagen's QIAamp DNA FFPE Tissue Kit und Qiagen's Deparaffinization Solution nach dem Protokoll des Herstellers vor. Eluieren Sie die endgültigen gDNA-Proben aus der MinElute-Säule in zwei Runden mit jeweils 30 µl Buffer ATE für ein endgültiges Elutionsvolumen von ca. 60 µl.

HINWEIS

Wenn die Gewebelyse nach einer Stunde Verdauung mit Proteinase K unvollständig erscheint, geben Sie zusätzliche 10 µl Proteinase K zu und inkubieren Sie sie bei 56 °C unter periodischem Mischen bis zu drei Stunden lang.

Lagern Sie die gDNA-Proben auf Eis für die Vorbereitung der Bibliothek am selben Tag oder bei –20 °C für die spätere Verarbeitung.

- 2 Bewerten Sie die Qualität (DNA-Integrität) für jede FFPE DNA-Probe mit einer der folgenden Methoden.

Schritt 2. Qualifizieren und Quantifizieren der FFPE DNA-Proben

Bewerten Sie die Qualität (DNA-Integrität) für jede FFPE-basierte DNA-Probe mit einer der beiden folgenden Methoden. Die in diesem Schritt gemessene DNA-Integrität bestimmt die geeigneten Mittel zur Probenquantifizierung, die erforderlich sind, um 10 ng, 50 ng, 100 ng oder 200 ng amplifizierbare gDNA-Proben in den Durchlauf aufzunehmen.

Verfahrensoption 1: Qualifizierung mit dem Agilent NGS FFPE QC Kit (empfohlene Methode)

Das Agilent NGS FFPE QC Kit bietet einen qPCR-basierten Assay zur Bestimmung der DNA-Probenintegrität. Die Ergebnisse beinhalten einen $\Delta\Delta Cq$ DNA-Integritätswert und die genaue Menge an amplifizierbarer DNA in der Probe, was eine direkte Normalisierung der DNA-Eingabe für jede Probe ermöglicht. DNA-Eingabeempfehlungen basierend auf $\Delta\Delta Cq$ -Werten für einzelne Proben werden in [Tabelle 9](#) zusammengefasst.

- a Verwenden Sie das Qubit BR dsDNA Assay Kit, um die Konzentration jeder gDNA-Probe zu bestimmen. Befolgen Sie die Anweisungen des Herstellers für das Gerät und das Assaykit.
- b Entfernen Sie einen 1 µl Aliquot der FFPE gDNA-Probe zur Analyse mit dem Agilent NGS FFPE QC Kit zur Bestimmung des $\Delta\Delta Cq$ DNA Integritätswerts. Weitere Informationen finden Sie im Benutzerhandbuch des Kits unter www.agilent.com.

- c Für alle Proben mit dem $\Delta\Delta Cq$ DNA Integritätswert ≤ 1 verwenden Sie die Qubit-basierte gDNA-Konzentration, die oben in **Schritt a** bestimmt wurde, um das Volumen der für das Protokoll benötigten eingegebenen DNA zu bestimmen.
- d Für alle Proben mit dem $\Delta\Delta Cq$ DNA Integritätswert > 1 verwenden Sie die qPCR-basierte Konzentration von amplifizierbarer gDNA, die von den Ergebnissen des Agilent NGS FFPE QC Kit berichtet wird, um Mengen an eingegebener DNA für das Protokoll zu bestimmen.

Tabelle 9 SureSelect XT HS DNA-Eingabemodifikationen basierend auf dem $\Delta\Delta Cq$ DNA Integritätswert

Protokollparameter	nicht-FFPE Proben	FFPE Proben	
		$\Delta\Delta Cq \leq 1^*$	$\Delta\Delta Cq > 1$
DNA-Eingabe für die Bibliotheksvorbereitung	10 ng, 50 ng, 100 ng oder 200 ng DNA, basierend auf dem Qubit-Assay	10 ng, 50 ng, 100 ng oder 200 ng DNA, basierend auf dem Qubit-Assay	10 ng, 50 ng, 100 ng oder 200 ng amplifizierbare DNA, basierend auf der qPCR-Quantifizierung

* FFPE-Proben mit den $\Delta\Delta Cq$ -Werten ≤ 1 sollten wie nicht-FFPE Proben für DNA-Eingabemengenbestimmungen behandelt werden. Für solche Proben ist darauf zu achten, dass die mit dem Qubit-Assay bestimmte DNA-Konzentration anstelle der mit qPCR bestimmten Konzentration verwendet wird, um das für 10–200 ng DNA erforderliche Volumen zu berechnen.

- 3 Bereiten Sie jede FFPE DNA-Probe für das Bibliotheksaufbereitungsprotokoll vor, indem Sie die entsprechende Menge (10 ng, 50 ng, 100 ng oder 200 ng) jeder gDNA-Probe mit 1X Low TE Buffer auf ein Endvolumen von 50 μ l verdünnen. Mischen Sie sie gut mit einem Vortexer, drehen Sie sie dann kurz, um die Flüssigkeit zu sammeln. Halten Sie die Proben auf Eis.

Verfahrensoption 2: Qualifizierung mit dem DIN-Wert des Agilent's Genomic DNA ScreenTape-Assays

Der Agilent's Genomic DNA ScreenTape-Assay, der in Verbindung mit der Agilent's 4200 TapeStation verwendet wird, bietet einen quantitativen elektrophoretischen Assay zur Bestimmung der Integrität von DNA-Proben. Dieser Assay liefert für jede Probe einen Wert der DNA Integrity Number (DIN), mit dem die geeignete Normalisierung der DNA-Eingabe für DNA-Proben mit niedriger Integrität geschätzt wird.

- a Verwenden Sie das Qubit BR dsDNA Assay Kit, um die Konzentration jeder gDNA-Probe zu bestimmen. Befolgen Sie die Anweisungen des Herstellers für das Gerät und das Assaykit.
- b Entfernen Sie einen 1- μ l-Aliquot der FFPE gDNA-Probe und analysieren Sie ihn mit dem Genomic DNA ScreenTape-Assay. Weitere Informationen finden Sie im **Benutzerhandbuch** unter www.genomics.agilent.com.

- c Anhand des DIN-Wertes, der für jede Probe im Genomic DNA ScreenTape-Assay angegeben wurde, beachten Sie [Tabelle 10](#), um die empfohlene Menge an Eingabe-DNA für die Probe zu bestimmen.

Tabelle 10 SureSelect XT HS DNA Eingabemodifikationen basierend auf dem Wert der DNA Integrity Number (DIN)

Protokoll- parameter	nicht-FFPE Proben	FFPE Proben		
		DIN >8*	DIN 3–8	DIN <3
DNA-Eingabe für die Bibliotheksvorbereitung	10 ng, 50 ng, 100 ng oder 200 ng DNA, quantifiziert durch den Qubit-Assay	10 ng, 50 ng, 100 ng oder 200 ng DNA, quantifiziert durch den Qubit-Assay	Verwenden Sie 50 ng, 100 ng oder 200 ng DNA (verwenden Sie die maximal verfügbare Menge an DNA, bis zu 200 ng). Quantifizierung durch den Qubit-Assay zur Bestimmung des Volumens für eine Eingabe von 50 ng, 100 ng oder 200 ng.	Verwenden Sie 100 ng oder 200 ng DNA (verwenden Sie die maximal verfügbare Menge an DNA, bis zu 200 ng). Quantifizierung durch Qubit Assay zur Bestimmung des Volumens für eine Eingabe von 100 ng oder 200 ng.

* FFPE-Proben mit DIN >8 sollten wie nicht-FFPE Proben für DNA-Eingabemengenbestimmungen behandelt werden.

- 4 Bereiten Sie jede FFPE DNA-Probe für das Bibliotheksaufbereitungsprotokoll vor, indem Sie die entsprechende Menge (10 ng, 50 ng, 100 ng oder 200 ng) jeder gDNA-Probe mit 1X Low TE Buffer auf ein Endvolumen von 50 µl verdünnen. Mischen Sie jede Probenverdünnung mit einem Vortexer, drehen Sie sie dann kurz, um die Flüssigkeit zu sammeln. Lagern Sie die Proben auf Eis.

Schritt 3. Scheren der FFPE DNA-Proben

In diesem Schritt werden die 50-µl gDNA-Proben unter Bedingungen geschert, die für FFPE-basierte DNA optimiert sind. Die Größe des Ziel-DNA-Fragments beträgt 150 bis 200 bp.

HINWEIS

Dieses Protokoll wurde mit einem Covaris Modell E220-Gerät und dem 130-µl Covaris microTUBE optimiert. Beachten Sie die Empfehlungen des Herstellers für die Verwendung anderer Covaris-Geräte oder Probenhalter, um die gleiche Ziel-DNA-Fragmentgröße zu erreichen.

- 1 Richten Sie das Covaris E220-Gerät ein. Weitere Informationen finden Sie in der Bedienungsanleitung des Geräts.
 - a Überprüfen Sie, ob das Wasser im Covaris-Tank mit frischem deionisiertem Wasser bis zum entsprechenden Füllstand gefüllt ist, gemäß den Empfehlungen des Herstellers für das jeweilige Gerätemodell und das verwendete Probengefäß oder die verwendete Platte.
 - b Überprüfen Sie, ob das Wasser den sichtbaren Glasteil des Röhrchens bedeckt.
 - c Drücken Sie auf der Systemsteuerung des Instruments die Taste Degas. Entgasen Sie gemäß den Empfehlungen des Herstellers, typischerweise 30–60 Minuten.
 - d Stellen Sie die Temperatur der Kältemaschine auf 2 °C bis 5 °C ein, um sicherzustellen, dass die Temperaturanzeige im Wasserbad 5 °C anzeigt. Beachten Sie die Herstellerangaben zur Zugabe von Kühlflüssigkeit, um ein Einfrieren zu verhindern.

- 2 Führen Sie die folgenden DNA-Scherschritte für jede der 50-µl gDNA-Proben durch (die 10 ng, 50 ng, 100 ng oder 200 ng gDNA in 50 µl 1X Low TE Buffer enthalten).
 - a Transferieren Sie die 50-µl DNA-Probe in ein Covaris microTUBE, indem Sie eine konische Pipettenspitze verwenden, um die Probe langsam durch das vorgespaltene Septum der Kappe zu transferieren.
 - b Drehen Sie den microTUBE 30 Sekunden lang, um die Flüssigkeit aufzufangen und Blasen vom Boden des Röhrchens zu entfernen.
 - c Befestigen Sie den microTUBE im Röhrchenhalter und scheren Sie die DNA mit den Einstellungen in [Tabelle 11](#).

Tabelle 11 Schereinstellungen für Geräte der Covaris E-Serie (SonoLab Software Version 7 oder höher)

Einstellung	Wert
Betriebsfaktor	10 %
Spitzeneinfallleistung (PIP)	175
Zyklen pro Burst	200
Badtemperatur	2 bis 8 °C
Behandlungszeit	240 Sekunden

- d Gehen Sie direkt zum nächsten Schritt über, lassen Sie die gescherte DNA nicht länger als nötig im Covaris microTUBE.
- 3 Legen Sie den Covaris microTUBE mit der gescherten DNA wieder in die Be- und Entladestation zurück. Halten Sie die microTUBE-Schnappkappe auf, führen Sie eine Pipettenspitze durch das vorgespaltene Septum und entfernen Sie dann langsam die gescherte DNA.
- 4 Transferieren Sie die 50-µl gescherte DNA-Probe aus dem Covaris microTUBE in das dafür vorgesehene Well des roten Magnis Sample Input Strip und durchbohren Sie die Foliensiegel mit der Pipettenspitze kurz vor der Abgabe der Flüssigkeit. Halten Sie die Proben auf Eis.

Achten Sie darauf, dass Sie die Proben an der richtigen Proben-Well-Position einlegen, wobei die Probe 1 am weitesten vom Barcode entfernt ist, wie nachfolgend in [Abbildung 8](#) gezeigt.

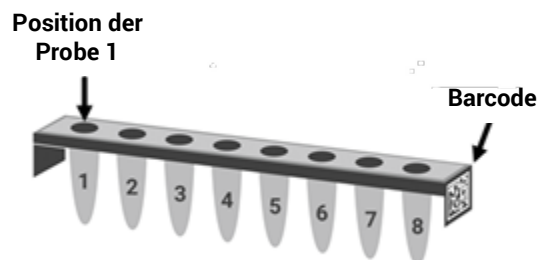


Abbildung 8 Erforderliche Ausrichtung der Probennummern 1 bis 8 im Magnis Sample Input Strip.

- 5 Nach dem Transfer der DNA-Probe drehen Sie den microTUBE kurz, um das verbleibende Probenvolumen zu sammeln. Transferieren Sie alle zusätzlich gesammelten Flüssigkeiten in das gleiche Well des Magnis Sample Input Strip.

HINWEIS

Es ist wichtig, den Verlust von eingegebener DNA in diesem Schritt zu vermeiden, insbesondere bei DNA-Proben mit geringem Überfluss. Überprüfen Sie den microTUBE, um sicherzustellen, dass die gesamte Probe transferiert wurde. Wenn Tröpfchen im microTUBE verbleiben, wiederholen Sie [Schritt 5](#).

- 6 Sobald alle Proben geladen sind, fahren Sie mit der Einrichtung des Probeneingangsstreifens fort, wie auf [Seite 24](#) erläutert (siehe Teil d von [Schritt 3](#)).

4

Anhang 2: Laufzeitvorbereitete Sondenstreifen verwenden

Laufzeitvorbereitung des Sondenstreifens [56](#)

Sondeninformationen in die Magnis-Software während der Durchlauf-Einrichtung eingeben [58](#)

Die Anweisungen in diesem Abschnitt sind speziell für die Verwendung mit dem Reagent Kit mit der Artikel-Nr. G9730D oder G9730B bestimmt, der mit leeren Probe Input Strips (EPIS) geliefert wird. Durchläufe, die mit diesen Kits durchgeführt werden, erfordern die Laufzeitvorbereitung von Sondenstreifen und erfordern die in diesem Abschnitt beschriebenen zusätzlichen Schritte zur Dateneingabe.

Die Reagent Kits mit den Artikel-Nr. G9730D und G9730B werden mit unterschiedlichen Magnis-Laufprotokollen verarbeitet. Die Schritte zur Einrichtung der Sondenstreifen sind für beide Protokolle ähnlich und unterscheiden sich nur im Volumen der pro Probenwell benötigten Sonde, zusammengefasst in [Tabelle 12](#) auf Seite 56.

Die Anweisungen in diesem Abschnitt gelten nicht für Kits, die vorgefüllte Sondenstreifen enthalten; Informationen zur Einrichtung der vorgefüllten Sondenstreifen finden Sie auf [Seite 24](#).

Laufzeitvorbereitung des Sondenstreifens

Die leeren Magnis Probe Input Strips (Teilenr. 5190-9883, weiße Streifen im Plattenformat) sollten in einem Prä-PCR-Bereich des Labors gelagert und gefüllt werden. Bereiten Sie den Probe Input Strip erst unmittelbar vor dem Durchlauf vor; füllen Sie die in diesen Protokollen verwendeten Probe Input Strips nicht vorab und vermeiden Sie Einfrier-/Auftau-Vorgänge.

Siehe [Tabelle 12](#) unten, um das Volumen der SureSelect Probe zu bestimmen, das pro Well für den Typ des Reagent Kits und die Probe Capture Size erforderlich ist.

Die 8 Wells des leeren Magnis Probe Input Strip können mit den gleichen oder unterschiedlichen Sondenlösungen gefüllt werden. Alle Sonden, die im gleichen Durchgang verwendet werden, müssen jedoch eine ähnliche Designgröße aufweisen, um die Verwendung der gleichen Betriebsbedingungen durch die Magnis zu ermöglichen (siehe [Tabelle 13](#) auf Seite 58 für kompatible Größenbereiche des Sondendesigns).

Tabelle 12 Anforderungen für die Befüllung des leeren Magnis Probe Input Strip

Reagent Kit Name (Artikel-Nr.)	Auf dem Bildschirm <i>Enter Run Info</i> (Durchlaufinformationen eingeben) ausgewähltes Protokoll	Probe Capture Size	Pipettier- volumen pro Well	Benötigtes Volumen für 8-Proben- Durchlauf
Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit (G9730D)	<i>SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM</i> ODER <i>LT-SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM</i>	≥ 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)	<i>SureSelectXT HS-Illumina</i>	≥ 3 Mb (Large Capture Size)*	8 µl	64 µl
		< 3 Mb (Small Capture Size)*	6 µl	48 µl

* Die Bezeichnung Large gegenüber Small Capture Size für die im Durchlauf verwendete(n) Sonde(n) wird so in die Magnis-Software eingegeben, wie auf [Seite 58](#) beschrieben. Alle in einem Durchlauf verwendeten Sonden müssen die gleiche Bezeichnung für Capture Size und die gleichen PCR-Zyklusbedingungen nach der Erfassung verwenden (siehe [Tabelle 13](#) auf Seite 58).

- Nehmen Sie einen leeren weißen Magnis Probe Input Strip und einen frischen Foliensiegelstreifen (mit Rückseite) aus dem Kit mit der Teilernr. 5190-9883, gelagert bei RT.
- Tauen Sie die Fläschchen der SureSelect Probe auf und mischen Sie sie, um sie als Sonde für den Durchlauf zu verwenden, und lagern Sie sie auf Eis.
- Füllen Sie die Wells des leeren Magnis Prob Input Strips mit der Menge an SureSelect Probe-Lösung, die für den Typ des Reagent Kits und die Sondendesigngröße erforderlich ist, und gehen Sie dabei wie folgt vor:
 - Verwenden Sie eine leere 200-µl-Pipettenspitze, um die Folierversiegelung jedes Wells des Probe Input Strips, der für den Durchlauf gefüllt werden soll, vorher zu durchbohren.
 - Geben Sie mit einer Mikropipette, die für die genaue Dosierung des in [Tabelle 12](#) aufgeführten Sondenvolumens geeignet ist, die angegebene Menge der SureSelect Probe-Lösung in jedes Well.

Verwenden Sie eine Mikropipette mit einem Fassungsvermögen von 2 µl und eine entsprechende Pipettenspitze für die Abgabe von 2 µl der Sonde.

Verwenden Sie eine Mikropipette mit 10 µl Fassungsvermögen und eine entsprechende Pipettenspitze für die Abgabe von 5 µl, 6 µl oder 8 µl der Sonde.

HINWEIS

Es ist wichtig, die Wells des Probe Input Strips genau mit den in [Tabelle 12](#) angegebenen Volumina zu füllen. Verwenden Sie eine kalibrierte Pipette, die geeignet ist, das angegebene Volumen mit hoher Genauigkeit und Präzision abzugeben.

- 4 Nachdem Sie die Sondenlösung in alle Wells gegeben haben, verschließen Sie die Wells wieder mit der im Kit mitgelieferten frischen Folienversiegelung und achten Sie darauf, dass der Barcode des Sondenstreifens nicht mit der Folienversiegelung verdeckt wird. Stellen Sie sicher, dass die Versiegelung fest und gleichmäßig angebracht wird, ohne übermäßige Überstände oder Falten, die den Sitz des Streifenröhrchens beim Einlegen in das Instrument behindern könnten.
- 5 Überprüfen Sie die Sondenstreifen-Wells, um sicherzustellen, dass keine Blasen vorhanden sind. Entfernen Sie alle Blasen, indem Sie den vorbereiteten Sondenstreifen in einer Zentrifuge, die auf $250 \times g$ eingestellt ist, 5 Sekunden lang drehen oder bis alle Blasen aus der Sondenlösung gelöst sind.
- 6 Lagern Sie den Sondenstreifen auf Eis, bis Sie ihn während der Abdeckeinrichtung auf [Seite 35](#) verwenden.

Wenn Sie den Sondenstreifen beim Einrichten des Decks einlegen, stellen Sie sicher, dass der Streifen richtig im Kühlmodul sitzt.

Sondeninformationen in die Magnis-Software während der Durchlauf-Einrichtung eingeben

Für Durchläufe, die mit zur Laufzeit gefüllten Sonden durchgeführt werden (Durchläufe mit dem Kit Artikel-Nr. G9730D oder G9730B), müssen Sie die sondenbezogenen Eigenschaften in die unten stehenden Felder während der Phase *Verify Labware* der Durchlauf-Einrichtung eingeben (siehe [Seite 38](#)).

Geben Sie Informationen in die Felder *Part Number*, *Lot Number* und *Design ID* anhand der Anforderungen Ihrer Einrichtung an die Datensätze ein. Die Design ID und Lot Number für die von Agilent gelieferten SureSelect- oder ClearSeq-Sonden finden Sie auf dem Produktfläschchen und auf dem Analysezertifikat.

Geben Sie im Feld *Post-Capture PCR Cycles* die Nummer des PCR-Zyklus ein, der im Durchlauf verwendet werden soll, je nach Größe Ihrer Sondenkonstruktion(en), und drücken Sie die entsprechende Beschreibung der *Capture Size* für die im Durchlauf verwendeten Sonden. Informationen zu den Anleitungen finden Sie unten in der [Tabelle 13](#). Die vorgeschlagene PCR-Zyklusnummer ist in der Regel optimal für die angegebene Sondengröße, aber die PCR-Zyklusnummer kann an die Bedürfnisse Ihres Versuchsplans angepasst werden. Während die 8 Wells des Magnis Probe Input Strip unterschiedliche Sondenlösungen enthalten können, müssen alle Sonden, die im gleichen Durchlauf verwendet werden, die gleichen Einstellungen für *Post-Capture PCR Cycles* und *Capture Size* verwenden.

Tabelle 13 Empfohlene Einstellungen für laufzeitdispensierte Sonden

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

Sobald alle Felder ausgefüllt sind, drücken Sie den Vorwärtspfeil, um zum Bildschirm *Enter Sample Info* zu gelangen, und folgen Sie den weiteren Schritten zur Durchlauf-Einrichtung ab [Seite 39](#).

5

Anhang 3: Richtlinien für die Verarbeitung von DNA-Proben nach dem Durchlauf für NGS

Schritt 1. Analysieren von Quantität und Qualität der DNA-Proben der Bibliothek	60
Schritt 2. Poolproben für die multiplexierte Sequenzierung (optional)	63
Schritt 3. Vorbereitung der Sequenzierungsproben	64
Schritt 4. Ausführen des Sequenzierungsdurchlaufs und Analysieren der Daten	66
Richtlinien für die Einrichtung der HiSeq/NextSeq/NovaSeq-Gerätesequenzierung	66
Richtlinien für die Einrichtung der MiSeq-Gerätesequenzierung	69
Ressourcen für die Sequenzanalyse	72

Nach Abschluss des Magnis SureSelect^{XT HS}-Bibliotheksvorbereitungslaufs werden die DNA-Proben quantifiziert und qualifiziert und anschließend von NGS analysiert. In diesem Abschnitt finden Sie Richtlinien für die typische Probenverarbeitung nach dem Durchlauf für NGS; Ihr NGS-Verarbeitungs- und Analyseablauf nach dem Durchlauf kann variieren.

Schritt 1. Analysieren von Quantität und Qualität der DNA-Proben der Bibliothek

Analysieren Sie vor dem Probenpooling für die multiplexierte Sequenzierung die Quantität und Qualität der DNA in den einzelnen vorbereiteten Bibliotheksproben mit einer Agilent 4200 TapeStation oder 4150 TapeStation und dem High Sensitivity D1000 ScreenTape und dem zugehörigen Reagenz-Kit. Bestellinformationen finden Sie in [Tabelle 3](#) auf Seite 13. Detaillierte Anweisungen finden Sie im [Agilent High Sensitivity D1000 Assay Quick Guide](#).

HINWEIS

Alternativ können DNA-Proben der Bibliothek mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer und dem [Bioanalyzer High Sensitivity DNA-Assay](#) oder mit dem Agilent 5200 Fragment Analyzer und dem [HS NGS Fragment Kit](#) analysiert werden. Eine vollständige Anleitung finden Sie in den verlinkten Assay-Benutzerhandbüchern.

- 1 Bereiten Sie die Proben des TapeStation-Assays in einem frischen Röhrenstreifen vor, wie im [Assay Quick Guide](#) beschrieben. Verwenden Sie 2 µl jeder DNA-Probe der Bibliothek, verdünnt mit 2 µl der High Sensitivity D1000-Probenpuffer für die Analyse.

VORSICHTSHINWEIS

Stellen Sie sicher, dass Sie die kombinierte DNA und den Probenpuffer mit dem IKA-Vortexer gründlich mischen, wie im [Assay Quick Guide](#) angegeben, um eine genaue Quantifizierung zu gewährleisten.

- 2 Laden Sie die High Sensitivity D1000-Assay-Röhrenstreifen aus [Schritt 1](#), das High Sensitivity D1000 ScreenTape und die Ladespitzen in die TapeStation, wie im [Assay Quick Guide](#) beschrieben. Starten Sie den Durchlauf.
- 3 Vergewissern Sie sich, dass das Elektropherogramm den Höchstwert der DNA-Fragmentgröße zwischen 200 und 400 bp zeigt. Proben-Elektropherogramme sind in [Abbildung 9](#) (Bibliothek aus hochwertiger DNA), [Abbildung 10](#) (Bibliothek aus mittlerer FFPE-DNA) und [Abbildung 11](#) (Bibliothek aus minderwertiger FFPE-DNA) dargestellt.
- 4 Bestimmen Sie die Konzentration jeder Bibliothek, indem Sie unter den gesamten Höchstwert integrieren.

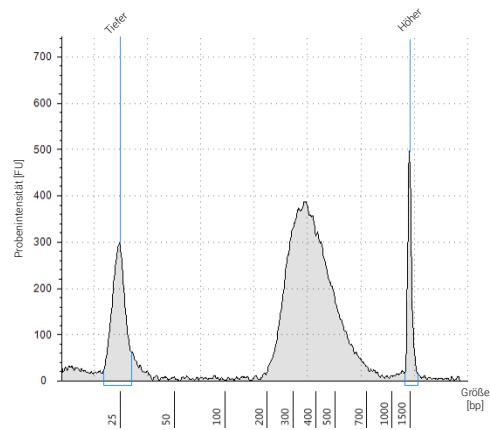


Abbildung 9 Bibliothek nach der Erfassung, hergestellt aus einer hochwertigen gDNA-Probe, die mit einem High Sensitivity D1000 ScreenTape-Assay analysiert wurde.

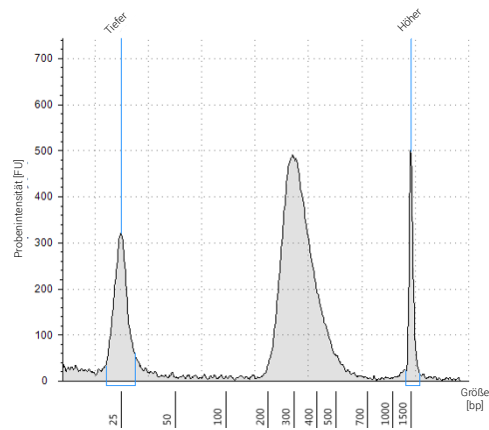


Abbildung 10 Bibliothek nach der Erfassung, hergestellt aus einer typischen FFPE gDNA-Probe, die mit einem High Sensitivity D1000 ScreenTape-Assay analysiert wurde.

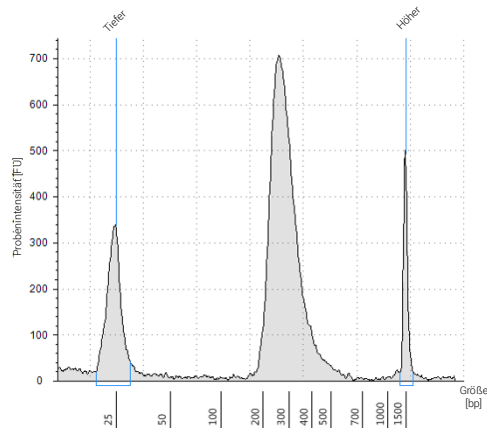


Abbildung 11 Bibliothek nach der Erfassung, hergestellt aus einer minderwertigen FFPE gDNA-Probe, die mit einem High Sensitivity D1000 ScreenTape-Assay analysiert wurde.

Haltepunkt Wenn Sie nicht mit dem nächsten Schritt fortfahren, lagern Sie die Proben über Nacht bei 4 °C oder bei –20 °C für eine längere Lagerung.

Schritt 2. Poolproben für die multiplexierte Sequenzierung (optional)

Die Anzahl der indizierten Bibliotheken, die in einer einzigen Sequenzierungsspur gemultiplext werden können, wird durch die Ausgabespezifikationen des verwendeten Sequenzierers sowie die Menge der für Ihr Forschungsdesign erforderlichen Sequenzierungsdaten bestimmt. Berechnen Sie die Anzahl der Indizes, die pro Spur kombiniert werden können, entsprechend der Kapazität des Sequenzierers und der Menge der pro Probe benötigten Sequenzierungsdaten.

Kombinieren Sie die Bibliotheken so, dass jede mit einem Index getagte Bibliothek in äquimolaren Mengen im Pool vorhanden ist, wobei Sie eines der folgenden Verfahren verwenden. Verwenden Sie für die Verdünnungsschritte das von Ihrem Sequenzierdienstleister angegebene Verdünnungsmittel, z. B. Low TE.

Verfahren 1: Verdünnen Sie jede zu poolende Bibliotheksprobe auf die gleiche Endkonzentration (typischerweise 4–15 nM oder die Konzentration der am stärksten verdünnten Probe) und kombinieren Sie dann das gleiche Volumen aller Proben, um den endgültigen Pool zu bilden.

Verfahren 2: Beginnen Sie mit Bibliotheksproben in verschiedenen Konzentrationen, fügen Sie das entsprechende Volumen jeder Probe hinzu, um die äquimolare Konzentration im Pool zu erreichen, und stellen Sie den Pool dann mit Low TE auf das gewünschte Endvolumen ein. Die folgende Formel dient zur Bestimmung der Menge jeder indizierten Probe, die in dem Pool hinzugefügt wird.

$$\text{Volumen des Index} = \frac{V(f) \times C(f)}{\# \times C(i)}$$

wobei $V(f)$ das endgültige gewünschte Volumen des Pools ist,

$C(f)$ die gewünschte Endkonzentration der gesamten DNA im Pool ist (typischerweise 4 nM–15 nM oder die Konzentration der am stärksten verdünnten Probe)

$\#$ die Anzahl der Indizes ist, und

$C(i)$ die Anfangskonzentration jeder indexierten Probe ist.

Tabelle 14 zeigt ein Beispiel für die Menge von 4 mit einem Index markierten Proben (mit unterschiedlichen Konzentrationen) und Low TE, die für ein Endvolumen von 20 µl bei 10 nM DNA benötigt werden.

Tabelle 14 Beispiel einer Volumenberechnung für ein Gesamtvolumen von 20 µl bei 10 nM Konzentration

Komponente	V(f)	C(i)	C(f)	#	Zu verwendendes Volumen (µl)
Probe 1	20 µl	20 nM	10 nM	4	2,5
Probe 2	20 µl	10 nM	10 nM	4	5
Probe 3	20 µl	17 nM	10 nM	4	2,9
Probe 4	20 µl	25 nM	10 nM	4	2
Low TE					7,6

Wenn Sie die Bibliothek vor der Sequenzierung speichern, fügen Sie Tween 20 bis 0,1 % v/v hinzu und lagern Sie sie kurzfristig bei –20 °C oder lagern Sie sie unter den von Ihrem Sequenzierdienstleister angegebenen Bedingungen.

Schritt 3. Vorbereitung der Sequenzierungsproben

Der endgültige SureSelect^{XT HS}-Bibliothekspool ist bereit für die direkte Sequenzierung mit Illumina Standard-Endprimern mit gepaarten Enden und Chemie. Jedes Fragment in der vorbereiteten Bibliothek enthält einen Zieleinsatz, der von Sequenzmotiven umgeben ist, die für die multiplexierte Sequenzierung mit Illumina-Sequenzern erforderlich sind, wie in [Abbildung 12](#) gezeigt.

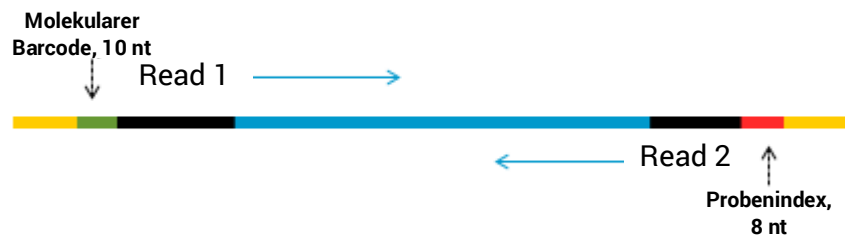


Abbildung 12 Inhalt der SureSelect XT HS Sequenzierungsbibliothek. Jedes Fragment enthält einen Zieleinsatz (blau), der von den Illumina-Sequenzierungselementen mit gepaarten Enden (schwarz), dem Probenindex (rot), dem molekularen Barcode (grün) und den Bibliotheksbrücken-PCR-Primern (gelb) umgeben ist.

Bibliotheken können auf Illumina HiSeq-, MiSeq-, NextSeq- oder NovaSeq-Sequenzierern mit dem in [Tabelle 15](#) gezeigten Durchlauftyp und Chemiekombination sequenziert werden.

VORSICHTSHINWEIS

Verwenden Sie das HiSeq 2500-Gerät nicht im Durchlaufmodus mit hoher Ausgabe (v4-Chemie), wenn Ihre Analysepipeline molekulare Barcode-Ablesungen (i5) enthält. Schlechte molekulare Barcode-Sequenzdatenqualität (niedrigere Q-Werte, mit Auswirkungen auf die Abdeckung und Empfindlichkeit von Variantenereignissen) wurde beobachtet, wenn SureSelect^{XT HS}-Bibliotheken in diesem Modus auf dem HiSeq 2500-Gerät sequenziert werden. Informationen zu alternativen Betriebsmodus-/Chemieoptionen für das HiSeq 2500-Gerät finden Sie in [Tabelle 15](#). Die Sequenzierungsleistung für Read-1-, Read-2- und Proben-Level-Index-Ablesungen (i7) ist nicht betroffen, und diese(s/r) Gerät/Laufmodus/Chemie kann für Anwendungen verwendet werden, bei denen die molekulare Barcode-Analyse entfällt.

Fahren Sie mit der Cluster-Amplifikation mit dem entsprechenden Illumina-Kit für Cluster-Generation mit gepaarten Enden fort. Weitere Informationen zu Kit-Konfigurationen, die mit der empfohlenen Ablesungslänge kompatibel sind, finden Sie in [Tabelle 15](#).

Die optimale Seeding-Konzentration für die mit SureSelect^{XT HS} zielangereicherten Bibliotheken variiert je nach Sequenziergerät, Lauftyp und Illumina-Kit-Version. Anleitungen finden Sie in [Tabelle 15](#). Die Seeding-Konzentration und die Clusterdichte müssen möglicherweise auch

basierend auf dem Größenbereich der DNA-Fragmente für die Bibliothek und der gewünschten Ausgabe- und Datenqualität optimiert werden. Beginnen Sie mit der Optimierung mit einer Seeding-Konzentration in der Mitte des aufgeführten Bereichs.

Befolgen Sie die Empfehlung von Illumina für eine PhiX-Steuerung in einem niedrig konzentrierten Spike-In für eine verbesserte Qualitätskontrolle der Sequenzierung.

Tabelle 15 Auswahlrichtlinien für die Konfiguration des Illumina-Kits

Gerät	Durchlaufart	Ablesungslänge	SBS-Kitkonfiguration	Chemie	Seeding-Konzentration
HiSeq 2500	Rapid Run	2 × 100 bp	200 Zyklus-Kit	v2	9–10 pM
HiSeq 2500	High Output*	2 × 100 bp	250 Zyklus-Kit	v4	12–14 pM
MiSeq	Alle Durchläufe	2 × 100 bp	300 Zyklus-Kit	v2	9–10 pM
MiSeq	Alle Durchläufe	2 × 75 bp	150 Zyklus-Kit	v3	12–16 pM
NextSeq 500/550	Alle Durchläufe	2 × 100 bp	300 Zyklus-Kit	v2.5	1,2–1,5 pM
HiSeq 3000/4000	Alle Durchläufe	2 × 100 bp	300 Zyklus-Kit	v1	300–400 pM
NovaSeq 6000	Standard-Arbeitsdurchläufe	2 × 100 bp	300 Zyklus-Kit	v1.0 oder v1.5	300–600 pM
NovaSeq 6000	Xp-Arbeitsdurchläufe	2 × 100 bp	300 Zyklus-Kit	v1.0 oder v1.5	200–400 pM

* Verwenden Sie keine Durchläufe mit HiSeq 2500 High Output (v4 Chemie), wenn Ihre Analysepipeline molekulare Barcode-Ablesungen (i5) enthält. Reduzierte molekulare Barcode-Sequenzqualität und reduzierte Q-Werte wurden in Sequenzen beobachtet, die aus HiSeq 2500-Durchläufen unter diesen Bedingungen erhalten wurden. Die Sequenzierungsleistung für Read 1, Read 2 und Proben-Level-Index-Ablesungen (i7) ist nicht beeinträchtigt.

Schritt 4. Ausführen des Sequenzierungsdurchlaufs und Analysieren der Daten

Verwenden Sie die folgenden Richtlinien für die Einrichtung und Analyse des Durchlaufs der SureSelect^{XT HS}-Bibliotheksequenzierung.

- Der Proben-Level-Index (i7) erfordert ein Ablesen des 8-bp-Index. Vollständige Informationen zur i7-Indexsequenz finden Sie in [Tabelle 34](#) auf Seite 83.
- Der degenerierte molekulare Barcode (i5) erfordert ein Ablesen des 10-bp-Index.
- Für HiSeq-, NextSeq- und NovaSeq-Gerätedurchläufe richten Sie den Betrieb über die Benutzeroberfläche des Geräts ein und befolgen Sie die Richtlinien auf [Seite 66](#).
- Richten Sie für die MiSeq-Instrumentendurchläufe den Durchlauf mit Illumina Experiment Manager (IEM) ein, indem Sie die auf [Seite 69](#) bis [Seite 72](#) aufgeführten Schritte durchführen, um ein benutzerdefiniertes Probenblatt zu erstellen.
- Das Abrufen von I2-Indexdateien, die die molekularen Barcode-Indexablesungen (i5) enthalten, erfordert die Offline-Konvertierung von .bcl- in fastq-Dateien. Informationen zur Durchführung dieses Schrittes finden Sie auf [Seite 67](#) für HiSeq, NextSeq und NovaSeq und auf [Seite 72](#) für MiSeq.
- Bevor Sie die Ablesungen auf das Referenzgenom ausrichten, trimmen Sie die Ablesungen von Illumina-Adaptersequenzen. Siehe [Seite 72](#) für Informationen zur Datenanalysesoftware Agilent's SureCall, die für diese Aufgabe verwendet werden kann.

Richtlinien für die Einrichtung der HiSeq/NextSeq/NovaSeq-Gerätesequenzierung

Richten Sie Sequenzierdurchläufe über die Schnittstelle der Instrumentenbediensoftware ein. Eine Probendurchlaufeinrichtung für das HiSeq-Gerät mit 100 + 100 bp Sequenzierung mit gepaarten Enden ist unten dargestellt.

The screenshot shows the 'PRE-RUN SETUP' tab in the Illumina sequencing software. The 'Flow Cell Setup' section is active, displaying 'Index Type' with 'Custom' selected, and 'Flow Cell Format' with 'Paired End' selected. Below, the 'Read 1' and 'Read 2' sections show 'Cycles' set to 100 and 'Index 1 (i7)' set to 8, and 'Index 2 (i5)' set to 10, respectively. The 'Read 2' section also shows 'Cycles' set to 100. Red circles highlight the 'Custom' index type, the 'Paired End' flow cell format, and the 'Read 1' and 'Read 2' cycle settings.

Wenn Sie das NextSeq- oder NovaSeq-Gerät verwenden, suchen Sie die gleichen Parameter auf dem Bildschirm *Run Setup* und füllen Sie die Felder **Read Length** mit den **Cycles**-Einstellungen aus, die im obigen Beispiel des HiSeq-Geräts gezeigt werden. Deaktivieren Sie (markieren Sie **nicht**) im Abschnitt **Custom Primers** auf dem *Run Setup*-Bildschirm des NextSeq- oder NovaSeq-Geräts die Kontrollkästchen für alle Primer (*Read 1*, *Read 2*, *Index 1* und *Index 2*).

BaseSpace unterstützt derzeit nicht die Sequenzierung von molekularen Barcodes als Indexablesungen. Richten Sie NextSeq-Durchläufe im Standalone-Modus ein.

Abrufen von I2 FASTQ-Dateien mit molekularen Barcodes

Das Abrufen von I2-Indexdateien, die die molekularen Barcode-Indexablesungen (i5) enthalten, erfordert die Offline-Konvertierung von .bcl- in fastq-Dateien mit einer der beiden folgenden Methoden.

Option 1: Verwendung der bcl2fastq-Software mit Basis-Maskierung

Um Index 2 fastq-Dateien mit den molekularen P5-Barcodes mit der bcl2fastq-Software zu erzeugen, folgen Sie den Anweisungen von Illumina zur Verwendung der Software mit den folgenden Änderungen:

- 1 Die Verwendung eines Probenblattes ist obligatorisch und nicht optional. Ändern Sie das Probenblatt so, dass es nur den Probenindex und nicht den molekularen Barcode-Index enthält, indem Sie den Inhalt der Spalten **I5_Index_ID** und **index2** löschen.
- 2 Setzen Sie **mask-short-adapter-reads** auf den Wert 0.
- 3 Verwenden Sie die folgende Basismaske: Y*, I8, Y10, Y* (wobei * durch die tatsächliche Ablesungslänge ersetzt werden sollte, während der eingegebene Wert dem Wert der Ablesungslänge in der Datei RunInfo.xml entspricht).

VORSICHTSHINWEIS

Wenn Sie fastq-Dateien mit der bcl2fastq-Software von Illumina erstellen, stellen Sie sicher, dass Sie den Inhalt der **index2**-Spalte im Probenblatt wie oben beschrieben löschen. **Geben Sie keine N₁₀-Sequenz ein, um den degenerierten molekularen Barcode darzustellen**, sondern lassen Sie die Spaltenzellen einfach leer.

Die bcl2fastq-Software behandelt das „N“-Zeichen nicht als Platzhalter, wenn es in Probenblattindexsequenzen gefunden wird, und die Verwendung in diesem Zusammenhang führt zu einer Abweichung für ein anderes Sequenzzeichen als „N“.

Option 2: Verwendung von Broad Institute Picard-Tools

Um Index 2 fastq-Dateien mit den molekularen P5-Barcodes mit den Broad Institute Picard-Tools zu erzeugen, führen Sie die folgenden Schritte aus:

- 1 Verwenden Sie das Tool **ExtractIlluminaBarcodes**, um die Barcodes zu suchen. Nachfolgend sehen Sie einen Probensatz von Befehlen (die von Ihrer Einrichtung verwendeten Befehle können variieren).

```
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 Verwenden Sie das Tool **IlluminaBaseCallsToFastq**, um die fastq-Dateien basierend auf der Ausgabe von Schritt 1 zu generieren. Nachfolgend sehen Sie einen Probensatz von Befehlen (die von Ihrer Einrichtung verwendeten Befehle können variieren).

```
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>
```

Richtlinien für die Einrichtung der MiSeq-Gerätesequenzierung

Verwenden Sie die Illumina Experiment Manager (IEM)-Software, um ein benutzerdefiniertes Probenblatt gemäß den folgenden Richtlinien zu erstellen. Sobald ein Probenblatt generiert wurde, müssen die Indexsequenzen manuell auf die für jede Probe verwendeten SureSelect XT HS-Indizes umgestellt werden. Siehe [Tabelle 34](#) auf Seite 83 für Nukleotidsequenzen der SureSelect XT HS Systemindizes.

Einrichten eines benutzerdefinierten Probenblattes:

- 1 Erstellen Sie in der IEM-Software ein Probenblatt für das MiSeq-Gerät mit den folgenden Workflow-Auswahlen.
 - Wählen Sie unter *Category* die Option **Other**.
 - Wählen Sie unter *Application* die Option **FASTQ Only**.
- 2 Geben Sie auf dem Bildschirm *Workflow Parameters* die Durchlaufinformationen ein und geben Sie die unten hervorgehobenen Schlüsselparameter an. Wählen Sie im Feld *Library Prep Workflow* die Option **TruSeq Nano DNA**. Wählen Sie im Feld *Index Adapters* die Option **TruSeq DNA CD Indexes (96 Indexes)**. Wenn Ihre Pipeline SureCall für das Trimmen von Adaptern verwendet, deaktivieren Sie beide Kontrollkästchen unter *FASTQ Only Workflow-Specific Settings* (unten eingekreist), da diese standardmäßig ausgewählt sind.

Wenn **TruSeq Nano DNA** nicht im Feld *Sample Prep Kit* verfügbar ist, wählen Sie stattdessen **TruSeq HT**.

The screenshot displays two panels from the Illumina Experiment Manager software. The left panel, titled "FASTQ Only Run Settings", contains the following fields and options:

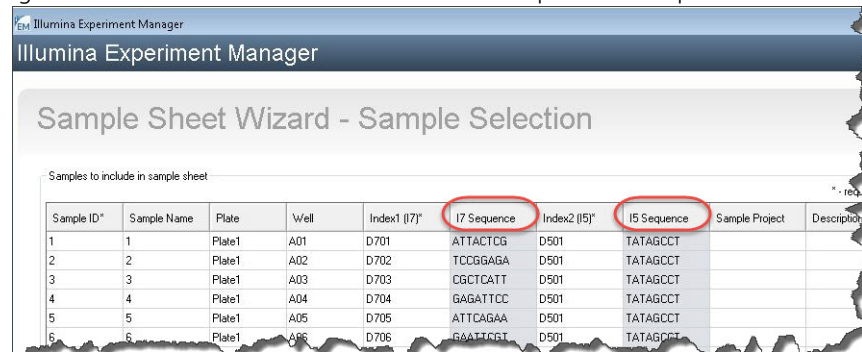
- Reagent Cartridge Barcode*: MS5871368-300V2
- Library Prep Workflow: TruSeq Nano DNA (highlighted with a red box)
- Index Adapters: TruSeq DNA CD Indexes (96 Indexes) (highlighted with a red box)
- Index Reads: ☐ 0 (None) ☐ 1 (Single) ☒ 2 (Dual) (highlighted with a red box)
- Experiment Name: [empty text box]
- Investigator Name: [empty text box]
- Description: [empty text box]
- Date: 1/22/2018
- Read Type: ☒ Paired End ☐ Single Read (highlighted with a red box)
- Cycles Read 1: 100 (highlighted with a red box)
- Cycles Read 2: 100 (highlighted with a red box)

The right panel, titled "FASTQ Only Workflow-Specific Settings", contains the following checkboxes:

- ☐ Custom Primer for Read 1
- ☐ Custom Primer for Index
- ☐ Custom Primer for Read 2
- ☐ Reverse Complement
- ☐ Use Adapter Trimming (highlighted with a red box)
- ☐ Use Adapter Trimming Read 2 (highlighted with a red box)

- 3 Richten Sie mit dem **Sample Sheet Wizard** eine **New Plate** ein, indem Sie die erforderlichen Informationen für jede zu sequenzierende Probe eingeben. Ordnen Sie in der Spalte **I7 Sequence** jede Probe einem der Illumina i7-Indizes zu. Der Index wird zu einem späteren Zeitpunkt auf einen SureSelect XT HS Index korrigiert.

Ebenso weisen Sie in der Spalte **I5 Sequence** einen der zu korrigierenden Illumina i5-Indizes dem degenerierten molekularen Barcode zu einem späteren Zeitpunkt zu.



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

- 4 Beenden Sie die Einrichtungsaufgaben für das Probenblatt und speichern Sie die Probenblatt-Datei.

Bearbeiten des Probenblattes, um SureSelect XT HS-Indizes und molekulare Barcodes aufzunehmen

- Öffnen Sie die Probenblatt-Datei in einem Texteditor und bearbeiten Sie die i7- und i5-Indexinformationen für jede Probe in den Säulen 5–8 (markiert in [Abbildung 13](#)).
 - Geben Sie in Säule 5 unter **I7_Index_ID** den Namen des SureSelect XT HS Index ein, der der Probe zugeordnet ist. Geben Sie in Spalte 6 unter **index** die entsprechende SureSelect XT HS Indexsequenz ein. Siehe [Tabelle 34](#) auf Seite 83 für Nukleotidsequenzen der SureSelect XT HS Indizes.
 - Geben Sie in Säule 7 unter **I5_Index_ID** für alle Proben *MBC* ein. Geben Sie in Säule 8 unter **index2** den Text *NNNNNNNNNN* für alle Proben ein, um den degenerierten molekularen 10-Nukleotid-Barcode darzustellen, der jedes Fragment markiert.

HINWEIS

Geben Sie N₁₀-Text nur dann in die Säule **index2** ein, wenn Probenblätter mit der MiSeq Reporter-Software verarbeitet werden, die so angepasst ist, dass sie I2 fastq-Dateien mit molekularen Barcodes abrufen, wie auf [Seite 72](#) beschrieben. Probenblätter, die offline mit der Illumina's bcl2fastq-Software verarbeitet wurden, dürfen keine N₁₀-Platzhalter-Indexsequenzen enthalten. Weitere Informationen finden Sie auf [Seite 67](#) unter *Warnhinweis*.

[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

Abbildung 13 Probenblatt zur Verwendung mit dem MiSeq-Gerät nach der Rekonfiguration des MiSeq Reporter

- Speichern Sie das bearbeitete Probenblatt an einem geeigneten Speicherort für die Verwendung im MiSeq-Durchlauf.

Rekonfigurieren der MiSeq Reporter-Software, um I2 FASTQ-Dateien abzurufen

Standardmäßig erzeugt die MiSeq Reporter-Software keine fastq-Dateien für Indexablesungen. Um fastq I2-Indexdateien zu erzeugen, die die molekularen Barcode-Ablesungen mit dem MiSeq Reporter enthalten, passen Sie die Softwareeinstellungen wie unten beschrieben an, bevor Sie das MiSeq-Gerät zum ersten Mal für die Sequenzierung der SureSelect XT HS-Bibliothek verwenden. Nach der Änderung bleibt diese Einstellung für zukünftige Durchläufe erhalten.

Um diese Einstellung zu ändern, öffnen Sie die Datei **MiSeq Reporter.exe.config**. Fügen Sie unter dem Tag **<appSettings>** **<add key="CreateFastqForIndexReads" value="1"/>** hinzu. Sie müssen das Gerät neu starten, damit diese Änderung der Einstellung wirksam wird.

HINWEIS

Wenn Sie das gleiche Gerät für andere Assays als die Sequenzierung der SureSelect XT HS-Bibliothek verwenden, sollte die Konfigurationsdatei in **<add key="CreateFastqForIndexReads" value="0"/>** geändert werden und das Gerät sollte neu gestartet werden, bevor der andere Assay ausgeführt wird.

Wenn Sie das MiSeqDx-System verwenden, führen Sie das Gerät im Forschungsmodus aus, um Änderungen an den Einstellungen des MiSeq Reporter vorzunehmen. Wenn der Forschungsmodus auf Ihrem Gerät nicht verfügbar ist, müssen Sie das System möglicherweise aktualisieren, um die Dual-Boot-Konfiguration einzubinden, damit Einstellungen im Forschungsmodus geändert werden können.

Die alternativen Methoden zum Abrufen von I2 fastq-Dateien, die auf [Seite 67](#) für HiSeq, NextSeq und NovaSeq-Durchläufe beschrieben werden, können auch auf MiSeq-Durchläufe angewendet werden.

Ressourcen für die Sequenzanalyse

Die Agilent SureCall NGS-Datenanalyse-Software wurde entwickelt, um Adaptertrimmen, Ablesungsausrichtung und Variantenaufbau von Sequenzierungsdaten aus SureSelect^{XT} HS-Bibliotheken durchzuführen. Auf der [SureCall Seite unter **www.agilent.com**](#) können Sie kostenlos SureCall herunterladen und weitere Informationen, einschließlich der SureCall-Software-Tutorials, finden.

Wenn Sie eine andere Pipeline für die Ausrichtung und die nachgelagerte Analyse verwenden, stellt Agilent das Agilent Genomics NextGen Toolkit (AGeNT) mit einigen der Agilent SureCall-Funktionen in einer flexiblen Befehlszeilenschnittstelle zur Integration in Ihre Bioinformatik-Pipeline zur Verfügung. AGeNT ist ein Java-basiertes Softwaremodul, das entwickelt wurde, um Adapter und minderwertiges Basentrimmen und Entfernen von Duplikaten für hochempfindliche (HS) und Nicht-HS-Daten bereitzustellen. Dieses Tool wurde speziell für Anwender mit etablierten internen Bioinformatik-Experten entwickelt, die in der Lage sind, interne Analysepipelines aufzubauen, zu integrieren, zu warten und Fehler zu beheben. Darüber hinaus ist das Modul speziell für Benutzer mit ausreichender Recheninfrastruktur und IT-Support konzipiert, um alle Probleme zu beheben, die nicht mit der Ausführung der AGeNT-Algorithmen zusammenhängen. Da Agilent nur begrenzten Support für AGeNT bietet, sollten Anwender mit begrenztem bioinformatischem Fachwissen stattdessen die Agilent SureCall-Software verwenden. Agilent garantiert nicht die Verwendbarkeit von Drittanbieterwerkzeugen (Open- oder Closed-Source) bei der vor- und nachgelagerten Analyse von Daten in Verbindung mit AGeNT. Weitere Informationen zu diesem Werkzeug finden Sie auf der [AGeNT-Seite unter **www.agilent.com**](#).

6 Literaturhinweise

Reagent Kit-Inhalte	74
Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit-Inhalte	75
Magnis SureSelect XT HS (Originalformat) Reagent Kit-Inhalte	78
Referenzinformationen für SureSelect XT HS-Indizes	81
Informationen zur Plattenposition	81
Index Nukleotidsequenzen	83
Nachverfolgen der Index-Identität nach dem Durchlauf	84
Leitfaden zur Fehlerbehebung	85

Dieses Kapitel enthält Referenzinformationen, einschließlich Inhalt des Reagent Kit, Indexsequenzen und Fehlerbehebungsinformationen für die Vorbereitungsdurchläufe der SureSelect^{XT HS}-Bibliothek.

Reagent Kit-Inhalte

Die Agilent Bestellnummern für die Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits, einschließlich neu formatierter Rev B Kits und Kits im Originalformat, sind zusammengefasst in [Tabelle 16](#). Vergewissern Sie sich, dass Sie den Formattyp Ihres Kits überprüft haben, bevor Sie mit der Einrichtung des Laufs beginnen; neu formatierte Rev B Kits müssen mit dem entsprechenden *RevB* Protokoll verarbeitet werden (auf dem Bildschirm *Enter Run Info* während der Einrichtung des Durchlaufs).

Inhaltliche Einzelheiten zu den Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagenziensätzen finden Sie auf [Seite 75](#) bis [Seite 77](#) und zu den Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits im Originalformat auf [Seite 78](#) bis [Seite 80](#).

Tabelle 16 Reagent Kit Formate und Artikel-Nummern

Inklusive SureSelect Probe	Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits		Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits (Originalformat)	
	96 Reaktionen	32 Reaktionen	96 Reaktionen	32 Reaktionen
Kundenspezifisch 1–499 kb	G9731D	G9731C	G9731B	G9731A
Kundenspezifisch 0,5–2,9 Mb	G9732D	G9732C	G9732B	G9732A
Kundenspezifisch 3–5,9 Mb	G9733D	G9733C	G9733B	G9733A
Kundenspezifisch 6–11,9 Mb	G9734D	G9734C	G9734B	G9734A
Kundenspezifisch 12–24 Mb	G9735D	G9735C	G9735B	G9735A
Kundenspezifisch 24–50 Mb	G9736D	G9736C	Nicht angeboten	Nicht angeboten
Human All Exon V7	G9771D	G9771C	G9771B	G9771A
Human All Exon V8	G9772D	G9772C	Nicht angeboten	Nicht angeboten
Keine (Kit umfasst leere Probe Input Strips für die Einrichtung der Laufzeitsonden)	G9730D	Nicht angeboten	G9730B	Nicht angeboten

Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit-Inhalte

Die Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits enthalten die unter [Tabelle 17](#) aufgeführten Komponenten-Kits, wobei der Inhalt jedes Komponenten-Kits im Detail in [Tabelle 18](#) bis [Tabelle 23](#) aufgeführt ist.

Tabelle 17 Komponenten-Kits, die mit Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits geliefert werden

Name des Komponentenkits	Lagerbedingungen	Teilenr. des Komponentenkits	
		96 Reaktionen	32 Reaktionen
Magnis SureSelect Probe Plate, Pre-filled Single Well Format ^{††}	–80 °C	Teilenr. variiert; siehe Tabelle 18	Teilenr. variiert; siehe Tabelle 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	Raumtemperatur	5190-9712	5191-5675
Magnis Sample Input Strips	Raumtemperatur	5190-9882	5191-5676

* Möglicherweise auch bezeichnet als *Magnis SureSelect XT HS Probe Plate, Pre-filled Single Well Format*.

† Das Kit Artikel-Nr. G9730D enthält keine Magnis Probe Plate. Stattdessen enthält das für die Einrichtung der Laufzeitsonde konfigurierte Kit G9730D leere Magnis Probe Input Strips für 12 Durchläufe (Artikel-Nr. 5190-9883), die bei Raumtemperatur gelagert werden.

Tabelle 18 Magnis SureSelect Probe Plate, Pre-filled Single Well Format-Artikel-Nr.

Teilenr. des Reagenz-Kits	Enthaltenes Sondendesign	Teilenr. der Probe Plate	Menge pro Kit
G9731D (96 Reaktionen)	Kundenspezifisch 1–499 kb (Tier 1)	5191-6817 oder 5191-6816*	1 Platte (12 Streifen)
G9731C (32 Reaktionen)	Kundenspezifisch 1–499 kb (Tier 1)	5191-6807 oder 5191-6806*	1 Platte (4 Streifen)
G9732D (96 Reaktionen)	Kundenspezifisch 0,5–2,9 Mb (Tier 2)	5191-6819 oder 5191-6818*	1 Platte (12 Streifen)
G9732C (32 Reaktionen)	Kundenspezifisch 0,5–2,9 Mb (Tier 2)	5191-6809 oder 5191-6808*	1 Platte (4 Streifen)
G9733D (96 Reaktionen)	Kundenspezifisch 3–5,9 Mb (Tier 3)	5191-6821 oder 5191-6820*	1 Platte (12 Streifen)
G9733C (32 Reaktionen)	Kundenspezifisch 3–5,9 Mb (Tier 3)	5191-6811 oder 5191-6810*	1 Platte (4 Streifen)
G9734D (96 Reaktionen)	Kundenspezifisch 6–11,9 Mb (Tier 4)	5191-6823 oder 5191-6822*	1 Platte (12 Streifen)
G9734C (32 Reaktionen)	Kundenspezifisch 6–11,9 Mb (Tier 4)	5191-6813 oder 5191-6812*	1 Platte (4 Streifen)
G9735D (96 Reaktionen)	Kundenspezifisch 12–24 Mb (Tier 5)	5191-6825 oder 5191-6824*	1 Platte (12 Streifen)
G9735C (32 Reaktionen)	Kundenspezifisch 12–24 Mb (Tier 5)	5191-6815 oder 5191-6814*	1 Platte (4 Streifen)

Tabelle 18 Magnis SureSelect Probe Plate, Pre-filled Single Well Format-Artikel-Nr.

Teilenr. des Reagenz-Kits	Enthaltenes Sondendesign	Teilenr. der Probe Plate	Menge pro Kit
G9736D (96 Reaktionen)	Kundenspezifisch 24–50 Mb	5191-6846	1 Platte (12 Streifen)
G9736C (32 Reaktionen)	Kundenspezifisch 24–50 Mb	5191-6845	1 Platte (4 Streifen)
G9771D (96 Reaktionen)	Human All Exon V7	5191-6827	1 Platte (12 Streifen)
G9771C (32 Reaktionen)	Human All Exon V7	5191-6826	1 Platte (4 Streifen)
G9772D (96 Reaktionen)	Human All Exon V8	5191-6974	1 Platte (12 Streifen)
G9772C (32 Reaktionen)	Human All Exon V8	5191-6973	1 Platte (4 Streifen)

* Die Artikel-Nr. der Probe Plate, die für Ihr kundenspezifisches Sondendesign geeignet ist, wird von Agilent bestimmt, wenn Sie ein Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit bestellen. Beide für die einzelnen Reagent Kits aufgeführten Artikel-Nr. sind mit den in dieser Publikation unterstützten Magnis-Protokollen vollständig kompatibel.

Tabelle 19 Komponenten der Magnis SureSelect XT HS Reagent Plates Rev B ILM Kits

Artikel-Nr. (Kitgröße)	Beigestellte Komponente	Menge und Format
5191-6805 (96 Reaktionen)	Magnis SureSelect XT HS Reagent Plate Rev B ILM	12 Platten (1 Platte pro Durchgang verwenden)
5191-6804 (32 Reaktionen)		4 Platten (1 Platte pro Durchgang verwenden)

Tabelle 20 Komponenten des Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM-Kits

Artikel-Nr. (Kitgröße)	Beigestellte Komponente	Menge und Format
5190-9880 (96 Reaktionen)	Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM	1 Platte mit 12 Streifen (1 Streifen pro Durchgang verwenden)
5191-5673 (32 Reaktionen)		1 Platte mit 4 Streifen (1 Streifen pro Durchgang verwenden)

Tabelle 21 Komponenten des Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plates, ILM-Kits

Artikel-Nr. (Kitgröße)	Beigestellte Komponente	Menge und Format
5190-9692 (96 Reaktionen)	Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate, ILM	12 Platten (1 Platte pro Durchgang verwenden)
5191-5674 (32 Reaktionen)		4 Platten (1 Platte pro Durchgang verwenden)

Tabelle 22 Komponenten des Magnis Empty Consumables-Kits

Beigestellte Komponenten	Menge und Format*
Magnis Deep-Well HSM Plate	1 Platte
Magnis 96-Well PCR Plate	1 Platte
Magnis Library Output Strip	1 grüner Röhrchen-Streifen
Magnis QC Strip	1 blauer Röhrchen-Streifen
Magnis Foil Seals	1 Blatt (6 Foliensiegelstreifen für Einzelröhrchen-Streifen)

Tabelle 22 Komponenten des Magnis Empty Consumables-Kits

Beigestellte Komponenten	Menge und Format*
Magnis Thermal Cyclor Seal	1 Einweg-Metall-Abdichtungsplatte
Magnis Tip Waste Bin	1 Einweg-Fachauskleidung

* Die aufgeführten Teile sind pro Verpackung mit Verbrauchsmaterial für einen einzigen Durchlauf. Jedes 96 Reaktions-Kit wird mit 12 Einzelverpackungen (Teilenr. 5190-9712) mit Verbrauchsmaterial für einen einzigen Durchlauf geliefert, und jedes 32 Reaktions-Kit wird mit 4 Einzelverpackungen (Teilenr. 5191-5675) mit Verbrauchsmaterial für einen einzigen Durchlauf geliefert.

Tabelle 23 Komponenten des Magnis Sample Input Strips-Kits

Artikel-Nr. (Kitgröße)	Beigestellte Komponenten	Menge und Format
5190-9882 (96 Reaktionen)	Magnis Sample Input Strips	12 leere rote, folienversiegelte Streifen
	Magnis Foil Seals	2 Blätter (6 Foliensiegelstreifen für Einzelröhrchen-Streifen pro Blatt)
5191-5676 (32 Reaktionen)	Magnis Sample Input Strips	4 leere rote, folienversiegelte Streifen
	Magnis Foil Seals	1 Blatt (6 Foliensiegelstreifen für Einzelröhrchen-Streifen pro Blatt)

Magnis SureSelect XT HS (Originalformat) Reagent Kit-Inhalte

Die Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits (Originalformat) enthalten die unter [Tabelle 24](#), aufgeführten Komponenten-Kits, wobei der Inhalt jedes Komponenten-Kits im Detail in [Tabelle 25](#) bis [Tabelle 31](#) aufgeführt ist.

Tabelle 24 Komponenten-Kits, die mit Magnis SureSelect^{XT HS} Reagent Kits geliefert werden

Name des Komponentenkits	Lagerbedingungen	Teilenr. des Komponentenkits	
		96 Reaktionen	32 Reaktionen
Magnis SureSelect XT HS Probe Plate*	−80 °C*	Teilenr. variiert; siehe Tabelle 25	Teilenr. variiert; siehe Tabelle 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	Raumtemperatur	5190-9712	5191-5675
Magnis Sample Input Strips	Raumtemperatur	5190-9882	5191-5676

* Die Artikel-Nr. des Kits G9730B enthält keine Magnis SureSelect XT HS Probe Plate. Stattdessen enthält das für die Einrichtung der Laufzeitsonde konfigurierte Kit G9730B leere Magnis Probe Input Strips für 12 Durchläufe (Artikel-Nr. 5190-9883), die bei Raumtemperatur gelagert werden.

Tabelle 25 Teilenummern Probe Plate

Teilenr. des Reagenz-Kits	Enthaltenes Sondendesign	Teilenr. der Probe Plate	Menge pro Kit
G9731B (96 Reaktionen)	Kundenspezifisch 1–499 kb	5190-9690 oder 5190-9691*	1 Platte (12 Streifen)
G9731A (32 Reaktionen)	Kundenspezifisch 1–499 kb	5191-5677 oder 5191-5678*	1 Platte (4 Streifen)
G9732B (96 Reaktionen)	Kundenspezifisch 0,5–2,9 Mb	5190-9884 oder 5190-9955*	1 Platte (12 Streifen)
G9732A (32 Reaktionen)	Kundenspezifisch 0,5–2,9 Mb	5191-5679 oder 5191-5680*	1 Platte (4 Streifen)
G9733B (96 Reaktionen)	Kundenspezifisch 3–5,9 Mb	5190-9886 oder 5190-9956*	1 Platte (12 Streifen)
G9733A (32 Reaktionen)	Kundenspezifisch 3–5,9 Mb	5191-5681 oder 5191-5682*	1 Platte (4 Streifen)
G9734B (96 Reaktionen)	Kundenspezifisch 6–11,9 Mb	5190-9888 oder 5190-9957*	1 Platte (12 Streifen)
G9734A (32 Reaktionen)	Kundenspezifisch 6–11,9 Mb	5191-5683 oder 5191-5684*	1 Platte (4 Streifen)
G9735B (96 Reaktionen)	Kundenspezifisch 12–24 Mb	5190-9890 oder 5190-9958*	1 Platte (12 Streifen)

Tabelle 25 Teilenummern Probe Plate

Teilennr. des Reagenz-Kits	Enthaltenes Sondendesign	Teilennr. der Probe Plate	Menge pro Kit
G9735A (32 Reaktionen)	Kundenspezifisch 12–24 Mb	5191-5685 oder 5191-5686*	1 Platte (4 Streifen)
G9771B (96 Reaktionen)	Human All Exon V7	5191-5721	1 Platte (12 Streifen)
G9771A (32 Reaktionen)	Human All Exon V7	5191-5720	1 Platte (4 Streifen)
G9730B (96 Reaktionen)	Keine (geliefert mit leeren Magnis Probe Input Strips)	5190-9883 (leere Probe Input Strips)	12 Streifen

* Die Artikel-Nr. der Probe Plate, die für Ihr kundenspezifisches Sondendesign geeignet ist, wird von Agilent bestimmt, wenn Sie ein Magnis SureSelect XT HS Reagent Kit bestellen. Beide für die einzelnen Reagent Kits aufgeführten Artikel-Nr. sind mit den in dieser Publikation unterstützten Magnis-Protokollen vollständig kompatibel.

Tabelle 26 Komponenten des Magnis SureSelect XT HS Reagent Plates, ILM-Kits

Artikel-Nr. (Kitgröße)	Beigestellte Komponente	Menge und Format
5190-9688 (96 Reaktionen)	Magnis SureSelect XT HS Reagent Plate, ILM	12 Platten (1 Platte pro Durchgang verwenden)
5191-5672 (32 Reaktionen)		4 Platten (1 Platte pro Durchgang verwenden)

Tabelle 27 Komponenten des Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM-Kits

Artikel-Nr. (Kitgröße)	Beigestellte Komponente	Menge und Format
5190-9880 (96 Reaktionen)	Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM	1 Platte mit 12 Streifen (1 Streifen pro Durchgang verwenden)
5191-5673 (32 Reaktionen)		1 Platte mit 4 Streifen (1 Streifen pro Durchgang verwenden)

Tabelle 28 Komponenten des Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plates, ILM-Kits

Artikel-Nr. (Kitgröße)	Beigestellte Komponente	Menge und Format
5190-9692 (96 Reaktionen)	Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate, ILM	12 Platten (1 Platte pro Durchgang verwenden)
5191-5674 (32 Reaktionen)		4 Platten (1 Platte pro Durchgang verwenden)

Tabelle 29 Komponenten des Magnis Empty Consumables-Kits

Beigestellte Komponenten	Menge und Format*
Magnis Deep-Well HSM Plate	1 Platte
Magnis 96-Well PCR Plate	1 Platte
Magnis Library Output Strip	1 grüner Röhrchen-Streifen
Magnis QC Strip	1 blauer Röhrchen-Streifen
Magnis Foil Seals	1 Blatt (6 Foliensiegelstreifen für Einzelröhrchen-Streifen)
Magnis Thermal Cycler Seal	1 Einweg-Metall-Abdichtungsplatte
Magnis Tip Waste Bin	1 Einweg-Fachauskleidung

* Die aufgeführten Teile sind pro Verpackung mit Verbrauchsmaterial für einen einzigen Durchlauf. Jedes 96 Reaktions-Kit wird mit 12 Einzelverpackungen (Teilennr. 5190-9712) mit Verbrauchsmaterial für einen einzigen Durchlauf geliefert, und jedes 32 Reaktions-Kit wird mit 4 Einzelverpackungen (Teilennr. 5191-5675) mit Verbrauchsmaterial für einen einzigen Durchlauf geliefert.

Tabelle 30 Komponenten des Magnis Sample Input Strips-Kits

Artikel-Nr. (Kitgröße)	Beigestellte Komponenten	Menge und Format
5190-9882 (96 Reaktionen)	Magnis Sample Input Strips	12 leere rote, folienversiegelte Streifen
	Magnis Foil Seals	2 Blätter (6 Foliensiegelstreifen für Einzelröhrchen-Streifen pro Blatt)
5191-5676 (32 Reaktionen)	Magnis Sample Input Strips	4 leere rote, folienversiegelte Streifen
	Magnis Foil Seals	1 Blatt (6 Foliensiegelstreifen für Einzelröhrchen-Streifen pro Blatt)

Tabelle 31 Komponenten des Magnis Probe Input Strip-Kits

Artikel-Nr. (Kitgröße)	Beigestellte Komponenten	Menge und Format
5190-9883 (96 Reaktionen)	Magnis Probe Input Strip	12 leere weiße, folienversiegelte Streifen
	Magnis Foil Seals	2 Blätter (6 Foliensiegelstreifen für Einzelröhrchen-Streifen pro Blatt)

Referenzinformationen für SureSelect XT HS-Indizes

Informationen zur Plattenposition

Primer zur Indexierung der Sequenzierungsbibliotheken sind in der Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM enthalten. Die Platten enthalten die SureSelect XT HS-Indizes A01–H04 in Einmal-Aliquots in den einzelnen Wells von Streifenröhrchen, die in einem Plattenträger enthalten sind. Die mit 32 Reaktions-Kits (Teilenr. 5191-5673) versehene Platte enthält einen Satz von vier (4) Streifen mit der Bezeichnung A1, A2, A3 oder A4, wobei jeder der 32 eindeutigen Indizes A01–H04 in einem einzigen Well bereitgestellt wird. In der [Tabelle 32](#) finden Sie eine Plattenkarte.

Tabelle 32 Indexkarte für Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM mit **32 Reaktions-Kits** ausgestattet

Plattensäule	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Streifenröhrchen-Etikett	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	—	—	—	—	—	—	—	—

Die mit 96 Reaktions-Kits (Teilenr. 5190-9880) versehene Platte enthält 12 Streifen, die aus drei Sätzen von vier (4) Streifen mit der Bezeichnung A1, A2, A3 oder A4 bestehen, wobei jeder der 32 eindeutigen Indizes A01–H04 in drei Wells vorgesehen ist. In der [Tabelle 33](#) finden Sie eine Plattenkarte. Verwenden Sie nicht die gleiche Indexstreifen-Nummer für mehrere Durchläufe, die zur Vorbereitung von Bibliotheken verwendet werden, die für NGS gemultiplext werden.

Tabelle 33 Indexkarte für Magnis SureSelect XT HS Index Plate, ILM mit **96 Reaktions-Kits** ausgestattet

Plattensäule	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Streifenröhrchen- Etikett	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

Index Nukleotidsequenzen

Die Nukleotidsequenz der einzelnen SureSelect XT HS-Indizes wird in [Tabelle 34](#) gezeigt. Jeder Index ist 8 nt lang, und Sequenzierungsdurchläufe sollten mit 8-bp Indexlesungen abgeschlossen werden (siehe [Seite 66](#)).

Tabelle 34 SureSelect XT HS-Indizes A01 bis H04

Streifen A1		Streifen A2		Streifen A3		Streifen A4	
Index	Sequenz	Index	Sequenz	Index	Sequenz	Index	Sequenz
A01	GTCTGTCA	A02	GCGAGTAA	A03	AGCAGGAA	A04	CCGTGAGA
B01	TGAAGAGA	B02	GTCGTAGA	B03	AGCCATGC	B04	GACTAGTA
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

VORSICHTSHINWEIS

Die Sequenzen des SureSelect XT HS-Systemindex A01 bis H04 unterscheiden sich von den Sequenzen des Agilent's SureSelect XT-Systems A01 bis H04.

Nachverfolgen der Index-Identität nach dem Durchlauf

Der spezifische Indexstreifen, der für einen Magnis Prep System-Durchlauf verwendet wird, wird in den **Post-Run Data** dargestellt, die über den Bildschirm „Home“ des Touchscreens zugänglich sind. Öffnen Sie auf dem Bildschirm **Post-Run Data** die Registerkarte **Labware Info** und suchen Sie unter *Labware* die Zeile *Index Strip*, um verschiedene Eigenschaften des für den Lauf verwendeten Indexstreifens anzuzeigen. Die Index Streifennummer, die als Wert von 1–12 angegeben wird, kann angezeigt werden, indem Sie zum rechten Rand des Bildschirms scrollen und in der Säule *Index Strip* suchen. Die entsprechende Index-Streifennummer von 1–12 finden Sie auch in der Durchlaufprotokolldatei.

Die spezifischen SureSelect XT HS-Indizes, die jedem Indexstreifen Nummer 1–12 zugeordnet sind, werden in **Tabelle 35** gezeigt.

Tabelle 35 Verwendung von Index-Streifennummern aus Post-Run Data zur Indexverfolgung

Index Strip Nummer von Post-Run Data-Bildschirm oder -Protokoll	Index- Streifenröhrchen- Etikett (Beschriftung)	Index nach Probennummer im Durchlauf							
		Probe1	Probe2	Probe3	Probe4	Probe5	Probe6	Probe7	Probe8
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

Leitfaden zur Fehlerbehebung

Nachfolgend finden Sie Anleitungen zur Fehlerbehebung für den Betrieb der SureSelect XT HS NGS Library Preparation auf dem Magnis NGS Prep System sowie für die Schritte zur Probenvorbereitung und Bibliotheksanalyse. Informationen zur allgemeinen Fehlerbehebung bei Magnis-Geräten finden Sie im Benutzerhandbuch des Geräts, Publikation K1007-90000.

Wenn die Verwendung des Touchscreens zur Durchlauf-Einrichtung zu Problemen bei der Benutzerfreundlichkeit führt oder wenn der Touchscreen nicht reagiert

- ✓ Alternativ zu den Touchscreen-Bedienelementen können Sie mit einer über den USB-Anschluss angeschlossenen Maus Auswahlen treffen und Daten in die Magnis-Software eingeben. Schließen Sie die Maus über einen der beiden USB-Anschlüsse an der Vorderseite des Geräts an. Verwenden Sie nach der Verbindung die Point-and-Click-Funktion der Maus, um eine Auswahl auf der auf dem Touchscreen angezeigten Benutzeroberfläche vorzunehmen.
- ✓ Starten Sie das System neu, um die Touchscreen-Funktionalität zurückzusetzen.

Wenn die LED-Anzeige des Geräts rot leuchtet und der Touchscreen die Fehlermeldung „*Teach points are shifted. Please perform auto teaching from the Settings screen.*“ anzeigt

- ✓ Diese Fehlermeldung erscheint, wenn der Instrument Health Check (IHC) die Teachpoint-Verifizierung nicht besteht und anzeigt, dass die Teachpoint-Marker auf dem Gerätedeck verdeckt sein können oder dass das Gerät vor der Durchlauf-Einrichtung die Teachpoint-Funktion Auto Teaching durchführen muss. Führen Sie die folgenden Schritte aus, um das Gerät für einen Durchlauf vorzubereiten:
 - Vergewissern Sie sich, dass alle Magnis-Deckpositionen frei von Kit-Verbrauchsmaterial und anderen Ablagerungen sind. Das Vorhandensein von Materialien auf dem Gerätedeck kann die erfolgreiche Erkennung der Teachpoint-Marker verhindern.
 - Reinigen Sie das Fenster des Barcodescanners gemäß den Reinigungshinweisen im Benutzerhandbuch des Geräts. Ablagerungen oder Fingerabdrücke auf dem Scanner können die Teachpoints verdecken und zu einem Verifizierungsfehler führen.
 - Starten Sie das System neu. Nach der Anmeldung führt das Gerät einen weiteren IHC durch. Wenn dieser Zustandscheck erfolgreich war, können Sie den Einrichtungsvorgang fortsetzen, ohne das Auto Teaching durchzuführen. Wenn der IHC erfolglos ist, führen Sie das Auto Teaching mit den folgenden Schritten durch.
 - Öffnen Sie auf dem Bildschirm „Home“ den Bildschirm **Settings** und drücken Sie **Auto Teaching**. Befolgen Sie die Anweisungen auf dem Touchscreen-Bildschirm. Der Auto Teaching-Prozess dauert ca. 30 Minuten und erfordert, dass ein Bediener anwesend ist, um die Laborgeräte auf dem Gerät zu platzieren.
 - Sobald das Auto Teaching abgeschlossen ist, können Sie mit der Einrichtung beginnen, indem Sie die Taste **Run Protocol** auf dem Bildschirm „Home“ drücken.

Wenn die LED-Anzeige des Geräts rot leuchtet und der Touchscreen eine Fehlermeldung des Instrument Health Check (IHC) anzeigt

- ✓ Agilent empfiehlt, das Gerät nach einem IHC-Fehler mit den folgenden Schritten neu zu starten:
 - Drücken Sie im Fehlerdialog auf **Cancel**, um die Einleitung des Diagnosetests abzulehnen.
 - Drücken Sie das Fehlersymbol am unteren Bildschirmrand und notieren Sie den Fehlercode für die mögliche Verwendung bei der Fehlersuche mit Agilent Support.
 - Schalten Sie das Gerät aus, indem Sie den Ein-/Aus-Schalter an der Vorderseite des Geräts drücken.

- Vergewissern Sie sich, dass alle Magnis-Deckpositionen frei von Kit-Verbrauchsmaterial und anderen Ablagerungen sind. Das Vorhandensein von Materialien auf dem Gerätedeck kann den IHC beim Neustart stören.
- Schalten Sie das Gerät ein, indem Sie den Ein-/Aus-Schalter an der Vorderseite des Geräts drücken.
- Nach der Anmeldung führt das Gerät einen weiteren IHC durch. Wenn dieser Zustandscheck erfolgreich war, können Sie die Durchlauf-Einrichtung starten oder neu starten, indem Sie die Taste **Run Protocol** auf dem Bildschirm „Home“ drücken.

Wenn der IHC nach dem Neustart des Geräts erneut fehlschlägt, wenden Sie sich an den technischen Kundendienst von Agilent Worldwide.

Wenn ein Protokoll im Protokollmenü auf dem Bildschirm *Enter Run Info* (Durchlaufinformationen eingeben) fehlt

- ✓ Die Magnis-Durchlaufprotokolle, die auf dem Touchscreen-Bildschirm *Enter Run Info* (Durchlaufinformationen eingeben) sichtbar sind und auf Ihrem Gerät ausgeführt werden können, können je nach Kaufdatum des Geräts, Verfügbarkeitsdatum des Protokolls und ob Aktualisierungen nach dem Kauf auf Ihrem Gerät vorgenommen wurden, variieren. Wenn Sie ein Protokoll benötigen, das derzeit nicht auf Ihrem Gerät verfügbar ist, besuchen Sie die [Downloadseite für Protokolle auf Agilent.com](#) für weitere Informationen.

Schwierigkeiten bei der Platzierung der Streifenröhrchen im Kühlermodul

- ✓ Um die korrekte Platzierung der Streifenröhrchen im Kühlermodul zu erleichtern, laden Sie das gefüllte Probenstreifenröhrchen, den Indexstreifen und den Sondenstreifen in der Reihenfolge von links nach rechts ein.
- ✓ Falsch platzierte Folienversiegelungen können die Positionierung und den Sitz des Streifenröhrchens beim Beladen des Kühlers behindern. Achten Sie beim Wiederverschließen des Probeneingangsstreifens oder eines selbstgefüllten Sondenstreifens mit einer Folienversiegelung darauf, dass die Versiegelung fest und gleichmäßig, ohne übermäßige Überstände oder Falten, aufgebracht wird.

Wenn der Bildschirm *Verify Labware* ein Problem mit einer oder mehreren Laborgerätekomponenten meldet, nachdem die Barcodes der Laborgeräte gescannt wurden

- ✓ Wenn die Verifizierung der gesamten oder der meisten Laborgeräte fehlgeschlagen ist, muss das Barcodescannerfenster möglicherweise gereinigt werden. Weitere Informationen zu Reinigungsanleitungen finden Sie im Benutzerhandbuch. Wiederholen Sie nach Abschluss der Reinigung den Schritt *Verify Labware*.
- ✓ Wenn nur eine oder wenige Laborgerätekomponenten die Überprüfung nicht bestanden haben, drücken Sie das Fehlersymbol am unteren Bildschirmrand und erweitern Sie die Informationen für die fehlerhafte Position, um den Grund für den Fehler anzuzeigen.
 - **Wenn der Barcodescanner eine bestimmte Laborgerätekomponente nicht gescannt hat**
Vergewissern Sie sich, dass das Laborgerät an der erforderlichen Deckposition vorhanden und richtig ausgerichtet ist, wobei der Barcode zur Vorderseite des Geräts zeigt. Lesen Sie die Seiten [Seite 31](#) bis [Seite 35](#) für komplette Deckladeschritte. Korrigieren Sie die Auslassung oder den/die Positionierungsfehler und wiederholen Sie dann den Schritt *Verify Labware*. Wenn die fehlgeschlagenen Laborgerätekomponenten vorhanden und korrekt positioniert sind, überprüfen Sie den Barcode, um die Integrität zu überprüfen. Für ein erfolgreiches Scannen müssen die Barcodes frei von Kratzern, Flecken, Kondenswasser, Verstopfungen durch Foliensiegel, Schriftzüge oder andere Markierungen auf den Kunststoffen sein. Wenn der Verdacht besteht, dass der Barcode beschädigt oder verstopft ist, passen Sie die Laborgerätekomponente an oder ersetzen Sie sie und wiederholen Sie den Schritt *Verify Labware*.

- **Wenn das gescannte Laborgerät sein Ablaufdatum überschritten hat**

Ersetzen Sie alle abgelaufenen Komponenten durch nicht abgelaufene Komponenten und wiederholen Sie dann den Schritt *Verify Labware*. Das Ablaufdatum ist dem Analysezertifikat zu entnehmen, das jedem Komponenten-Kit mit vorgefüllten Reagenzien beigelegt ist. Komponenten, die als leere Kunststoffteile bereitgestellt werden, haben kein Ablaufdatum.

- **Wenn die gescannte Reagent Plate und der Probe Input Strip als *falsche Laborgeräte* identifiziert werden**

Wenn die Reagent Plate und der Probe Input Strip als *falsche Laborgeräte* identifiziert werden, muss überprüft werden, ob das richtige Protokoll für das Format des auf das Gerät geladenen Reagent Kit ausgewählt wurde. Überprüfen Sie das Format des für den Durchlauf geladenen Reagent Kits und vergewissern Sie sich dann anhand der unten stehenden Tabelle, dass beim Einrichten des Durchlaufs das richtige Protokoll ausgewählt wurde. Wenn das falsche Protokoll ausgewählt wurde, kehren Sie zum Bildschirm *Enter Run Info* (Durchlaufinformationen eingeben) zurück, indem Sie den Rückwärtspfeil auf dem Touchscreen drücken, und wählen Sie das richtige Protokoll aus dem Menü aus und erweitern Sie das Protokollmenü, falls erforderlich. Nachdem Sie das richtige Protokoll ausgewählt haben, verwenden Sie die Vorwärtspfeiltasten, um zum Bildschirm *Verify Labware* zurückzukehren, und wiederholen dann den Schritt *Verify Labware*.

Reagent Kit	Protokoll zur korrekten Verarbeitung
Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kits, die mit vorgefüllten Probe Input Strips geliefert werden	<i>SSEL XTHS-RevB-ILM ODER</i> <i>LT-SSEL XTHS-RevB-ILM</i>
Magnis SureSelect XT HS Rev B Reagent Kit, das mit leeren Probe Input Strips (zur Laufzeit gefüllt) geliefert wird	<i>SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM</i> ODER <i>LT-SSEL XTHS-EPIS-RevB-ILM</i>
Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits im Originalformat , die mit vorgefüllten Probe Input Strips geliefert werden	<i>SureSelectXT HS-Illumina</i>
Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits im Originalformat , die mit leeren Probe Input Strips (zur Laufzeit gefüllt) geliefert werden	<i>SureSelectXT HS-Illumina</i>

- **Wenn Laborgeräte als falsche Laborgeräte mit dem richtigen Protokoll ausgewählt wurden**

Ersetzen Sie die verlegten Laborgeräte durch die richtige Laborgerätekomponente und wiederholen Sie den Schritt *Verify Labware*.

Wenn während des Durchlaufs eine lose Mikropipettenspitze auf dem Gerätedeck liegt

- ✓ Gelegentlich, wenn das Gerät gebrauchte Spitzen in den Abfallbehälter wirft, kann eine Spitze herausspringen und auf dem Gerätedeck landen. Legen Sie die Spitze mit einem Handschuh in den Abfallbehälter oder entsorgen Sie sie wie beim Entleeren des Abfallbehälters.

Wenn der Dialog *Turn off Chiller* des Touchscreens den Durchlaufbildschirm verdeckt, nachdem die Gerätetür geöffnet wurde und Bibliotheken am Ende des Durchlaufs gesammelt wurden

- ✓ Wenn die Gerätetür am Ende des Durchlaufs geöffnet wird, bevor die LED-Anzeigen blau leuchten (was den Abschluss aller Schritte des Instrumentendurchlaufs anzeigt), oder wenn die Gerätetür am Ende des Durchlaufs nur teilweise geöffnet wird, kann der Dialog *Turn off Chiller* auf dem Durchlaufbildschirm beibehalten werden, was den Bildschirminhalt verdeckt. Warten Sie zukünftig, bis die LED-Anzeigen blau leuchten, um anzuzeigen, dass das Gerät einen Ruhezustand nach dem Start erreicht hat, bevor Sie die Gerätetür öffnen. Öffnen Sie die Tür vollständig (bis die LED-Anzeige weiß leuchtet), bevor Sie Ihre Proben entnehmen.

Wenn die Anzeige *Time Remaining* auf dem Touchscreen nicht 0:00 anzeigt, unmittelbar bevor Sie mit den Bildschirmen für den Abschluss des Durchlaufs/der Probenahme fortfahren

- ✓ Der auf dem Touchscreen angezeigte Wert *Time Remaining* ist nur ein Schätzwert für die verbleibende Zeit des Durchlaufs. Der Zähler kann die geschätzte verbleibende Zeit während des Durchlaufs anpassen und eine Zeit größer als 0:00 anzeigen, wenn das System bereit ist, mit der Probenahme zu beginnen. Dies ist kein Hinweis auf ein Problem des Durchlaufs oder des Instruments.

Wenn die Größe der Bibliotheksfragmente größer ist als in Elektropherogrammen erwartet

- ✓ Die Scherung ist möglicherweise nicht optimal. Für intakte, hochwertige DNA-Proben ist darauf zu achten, dass die Scherung mit dem mitgelieferten Zwei-Runden-Scherungsprotokoll einschließlich aller Dreh- und Vortexer-Schritte durchgeführt wird.
- ✓ Alle auf dem microTUBE-Filament vorhandenen Blasen können die vollständige Scherung stören. Drehen Sie das microTUBE vor der ersten Scherungsrunde 30 Sekunden lang, um sicherzustellen, dass Blasen freigesetzt werden.

Wenn die Ausbeute der Bibliotheken nach der Erfassung gering ist

- ✓ Die Nummer des PCR-Zyklus kann eine Optimierung erfordern. Wiederholen Sie die Bibliotheksvorbereitung und Zielanreicherung für die Probe und erhöhen Sie die Anzahl der PCR-Zyklen nach der Erfassung um 1 bis 2 Zyklen. Nur Benutzer mit dem Zugriffsrecht *Advanced* können die Anzahl der PCR-Zyklen nach der Erfassung ändern. Weitere Informationen finden Sie auf [Seite 40](#).
- ✓ Überprüfen Sie, ob die eingegebene DNA-Probe den unter „[Anhang 1: Richtlinien zur Vorbereitung von DNA-Proben](#)“ angegebenen Richtlinien für Qualität und Konzentrationsbereich entspricht.
- ✓ Überprüfen Sie, ob der Durchlauf für die entsprechende eingegebene DNA-Konzentration und -Qualität eingerichtet wurde. Die Einstellungen können auf der Registerkarte **Run Setup** des Bildschirms **Post Run Data** für den Durchlauf überprüft werden.
- ✓ Stellen Sie sicher, dass die DNA-Scherung im Puffer mit geringem TE und nicht in Wasser durchgeführt wurde. Das Scheren von DNA-Proben in Wasser reduziert die Gesamtausbeute und Komplexität der Bibliothek.
- ✓ Stellen Sie sicher, dass die Durchläufe bei einer Luftfeuchtigkeit von 30 % bis 70 % (nicht kondensierend) durchgeführt werden. Der Betrieb des Systems bei Luftfeuchtigkeiten außerhalb dieses Bereichs kann die Leistung beeinträchtigen und zu einer niedrigeren oder gar keiner Bibliotheksausbeute führen.
- ✓ Eine sehr geringe oder gar keine Ausbeute für eine oder mehrere Proben im Durchlauf kann auf ein Problem mit den im Durchlauf verwendeten Pipettenspitzen hinweisen. Vergewissern Sie sich beim Laden von Spitzen auf das Gerät, dass alle Spitzenverpackungen vollständig gefüllt sind und dass alle Spitzenverpackungen flach und innerhalb der Rahmen mit erhöhter Lasche der Plattformen sitzen. Achten Sie darauf, dass die Spitzenverpackungen beim Entfernen der Deckel der Spitzenverpackungen nicht gestört und unbesetzt sind.

Wenn Sequenzierungslesungen die erwarteten genomischen Bereiche nicht abdecken

- ✓ Möglicherweise wurde im Protokolldurchlauf zur Zielanreicherung das falsche Sondendesign verwendet. Überprüfen Sie die Probe und die Sondenverfolgung, die während des Durchlaufs aufgezeichnet wurden. Wiederholen Sie bei Bedarf den Protokolldurchlauf mit dem richtigen Sondendesign.

In diesem Buch

Dieser Leitfaden enthält Anweisungen für die automatisierte Vorbereitung der mit SureSelect^{XT HS} zielangereicherten multiplexierten Illumina-Sequenzierungsbibliotheken mit gepaarten Enden mit dem Magnis NGS Prep System.

