



使用 Magnis NGS Prep System 的 SureSelect XT HS2 DNA Target Enrichment

方案

仅限用于研究。不适用于诊断过程。

版本 C0, 2025 年 8 月



声明

© Agilent Technologies, Inc. 2022 年、2023 年、
2025 年

根据美国和国际版权法，未经 Agilent Technologies, Inc. 事先同意和书面许可，不得以任何形式或任何方式（包括以电子方式存储和检索或翻译成外文）复制本手册的任何部分。

手册货号

G9751-90015

版本

版本 C0，2025 年 8 月

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

技术支持

美国和加拿大

拨打 800-227-9770（选择 3、4、4）
或发送电子邮件至
ngs.support@agilent.com

所有其他地区

可在 www.agilent.com/genomics 网站的
“**Contact Us**”下方获得您所在当地 Agilent's
全球销售和支持中心的详细联系信息。

担保说明

本手册内容按“原样”提供，在将来的版本中如有更改，恕不另行通知。此外，在适用法律允许的最大范围内，Agilent 对本手册以及本手册中包含的任何信息不作任何明示或暗示担保，包括但不限于适销性和针对某一特殊用途的适用性的暗示担保。对于因提供、使用或执行本手册或本手册中包含的任何信息而产生的错误，或造成的附带或后果性损害赔偿，Agilent 概不负责。如果 Agilent 与用户签订了单独的书面协议，其中涉及本手册内容的担保条款与这些条款冲突，则以单独协议中的担保条款为准。

安全提示

小心

“**小心**”提示表示存在危险。它提醒用户注意某个操作程序、方法或类似步骤；如果执行不当或不予以遵守，可能会导致产品损坏或重要数据丢失。只有完全理解并符合指定的条件时，才可以越过**小心**提示继续进行操作。

警告

“**警告**”提示表示存在危险。它提醒用户注意某个操作程序、方法或类似步骤；如果执行不当或不予以遵守，可能会导致人身伤亡。只有完全理解并符合指定的条件时，才可以越过“**警告**”提示继续进行操作。

本指南中的内容

本指南提供了使用 Magnis NGS Prep System 自动制备 SureSelect XT HS2 DNA 靶标富集 Illumina 双端多重测序文库的说明。

SureSelect XT HS2 系统用于在靶标富集之前制备带有分子条形码的双标签文库样本，以允许在 Illumina 平台上进行高灵敏测序。

- 1 前言
- 2 使用 Magnis NGS Prep System 进行测序文库制备
- 3 附录 1：DNA 样本制备指南
- 4 附录 2：使用运行时准备的 Probe Strip
- 5 附录 3：运行后 DNA 样本的 NGS 处理指南
- 6 参考信息

版本 C0 中的新特性

- 支持 Magnis SureSelect XT HS2 Clinical Research Exome V4 试剂盒（参见第 10 页的[表 1](#) 和第 60 页的[表 23](#)）
- 更新第 11 页的[表 3](#)，以显示 Agilent 自动化电泳平台的当前可用性。
- 支持使用各种 Magnis 固件版本的运行设置。对于运行固件 v1.4 或更早版本的仪器，请参见[第 25 页](#)。对于运行固件 v1.5 或更高版本的仪器，请参见[第 27 页](#)。固件 v1.5 在 *Enter Run Info* 屏幕上添加了新的 *Application* 菜单
- 在[第 29 页](#)中添加了实验器皿定位注意事项
- 在[第 41 页](#)中添加了最终文库样本量，并在[第 73 页](#)中添加了故障排除信息
- 更新[第 55 页至第 58 页](#)和[第 63 页](#)中的下游测序支持性信息。从第 12 页的[表 6](#)中删除了 Tween 20。
- 已将 SureSelect XT HS2 标签序列资源电子表格的链接添加到[第 57 页](#)、[第 63 页](#)和[第 66 页](#)中
- 删除了[第 2 页](#)中不适用的通知

版本 B0 中的新特性

- 支持 Magnis protocol SSEL-DNA-XTHS2-EPIS-ILM，使用随附有 empty probe input strips (EPIS) 的 Magnis SureSelect XT HS2 Reagent Kit (部件号 G9750B) 运行。有关本方案的详细 probe input strip 填充和运行设置说明，请参见[第 49 页至第 51 页](#)。相关的运行设置更新，请参见[第 22 页](#)、[第 26 页](#)和[第 36 页](#)，相关的故障排除信息，请参见[第 72 页](#)。有关试剂盒 (部件号 G9750B) 的信息，请参见[第 10 页](#)和[第 60 页](#)。
- 支持 Magnis SureSelect Cancer CGP 试剂盒（请参见[第 10 页](#)和[第 60 页](#)）
- 更新第 10 页的[表 2](#)上的 Magnis NGS Prep System 订购信息
- 更新了[第 20 页至第 23 页](#)的试剂盒试剂和塑料器皿准备说明
- 针对使用粘合密封剂涂抹器提出建议（参见[第 12 页](#)和[第 22 页](#)上的注意）
- 在[第 22 页](#)上新增多重测序标签对分配考虑事项方面的注意
- 更新[第 24 页](#)上有关仪器 LED 灯彩色指示器的信息
- 更新[第 29 页](#)上的台面设置概要，包括新的冷却器排管彩图
- 小幅更新[第 34 页](#)上的冷却器排管装载须知，明确要求为运行所装载的所有排管的铝箔盖完好无损
- 小幅更新[第 41 页](#)，包括增加最终文库溶剂组成
- 在[第 42 页](#)上新增处置部分
- 小幅更新 DNA 样本稀释说明，阐明在所有工作流程中使用 1x Low TE Buffer 溶剂（请参见[第 44 页](#)和[第 47 页](#)）
- 更新[第 45 页](#)和[第 48 页](#)上的 Covaris 仪器设置说明
- 更新下游测序支持性信息（参见[第 56 页至第 58 页](#)）
- 支持使用 Agilent Alissa Reporter 软件进行 SureSelect XT HS2 DNA 文库序列预处理和人类生殖系 DNA 变异分析
- 更新了[第 63 页至第 69 页](#)的 P5 标签序列方向的使用方法
- 更新[第 71 页](#)上有关触摸屏响应问题的故障排除信息
- 删除[第 2 页](#)上的买方须知

目录

1 前言 7
工作流程概述 8
安全注意事项 9
所需材料 10
SureSelect XT HS2 DNA Magnis 运行所需的材料 10
DNA 样本制备和分析所需的材料 11
可选材料 12
2 使用 Magnis NGS Prep System 进行测序文库制备 13
关键样本跟踪信息 14
Magnis Sample Input Strip 孔中的样本顺序方向 14
在 Magnis 软件中将样本分配到各个孔位 15
准备用于运行的 DNA 样本 17
准备用于运行的 Magnis 仪器和试剂 18
步骤 1：仪器运行方案准备 18
步骤 2：准备 SureSelect XT HS2 DNA 试剂和塑料器皿 20
运行文库制备方案 24
步骤 1：启动方案并 Enter Run Info 25
步骤 2：设置台面 29
步骤 3：Verify Labware 35
步骤 4：输入样本信息 37
步骤 5：Confirm Setup 并开始运行 38
步骤 6：从仪器中采集最终文库样本 40
步骤 7：运行后清理仪器 42
3 附录 1：DNA 样本制备指南 43
I. 制备用于 Magnis 运行的高质量 DNA 样本 44
步骤 1：制备、定量和定性基因组 DNA 样本 44
步骤 2：稀释用于运行的 DNA 样本 44
步骤 3：剪切 DNA (仅在没有 enzymatic fragmentation 的情况下运行) 45
II. 制备用于 Magnis 运行的 FFPE 来源 DNA 样本 46
步骤 1：从 FFPE 样本制备基因组 DNA 46
步骤 2：定性和定量 FFPE DNA 样本 46
步骤 3：稀释用于运行的合格 FFPE DNA 样本 47
步骤 4：剪切 FFPE DNA (仅在没有 enzymatic fragmentation 的情况下运行) 48

4 附录 2：使用运行时准备的 Probe Strip 49

运行时准备 Empty Probe Input Strip (EPIS) 50

在运行设置期间输入 Probe 信息 51

5 附录 3：运行后 DNA 样本的 NGS 处理指南 52

步骤 1：定量和定性 DNA 文库 53

步骤 2：合并样本以进行多样本混合测序（可选） 55

步骤 3：制备测序样本 56

步骤 4：对文库进行测序 57

步骤 5：处理读段 58

AGeNT 软件读段处理指南 58

6 参考信息 59

试剂盒内容物 60

SureSelect XT HS2 Indexes 的参考信息 63

板位置信息 64

Index 核苷酸序列 66

运行后跟踪标签标识 70

故障排除指南 71

1 前言

工作流程概述 8

安全注意事项 9

所需材料 10

 SureSelect XT HS2 DNA Magnis 运行所需的材料 10

 DNA 样本制备和分析所需的材料 11

 可选材料 12

本章包含您需要在开始之前阅读并理解的信息。

工作流程概述

图 1 对使用 Magnis NGS Prep System 的 SureSelect XT HS2 DNA 靶标富集工作流程进行了总结。DNA 样本、预铺板试剂和实验器皿已在仪器上装载。一经装载，Magnis NGS Prep System 就可执行所有 SureSelect XT HS2 DNA 文库制备以及靶标富集液体处理和孵育步骤。Magnis NGS Prep System 运行完成后，就可随时合并靶标富集文库，以用于多重 NGS 样本制备并使用 Illumina 测序仪进行序列分析。

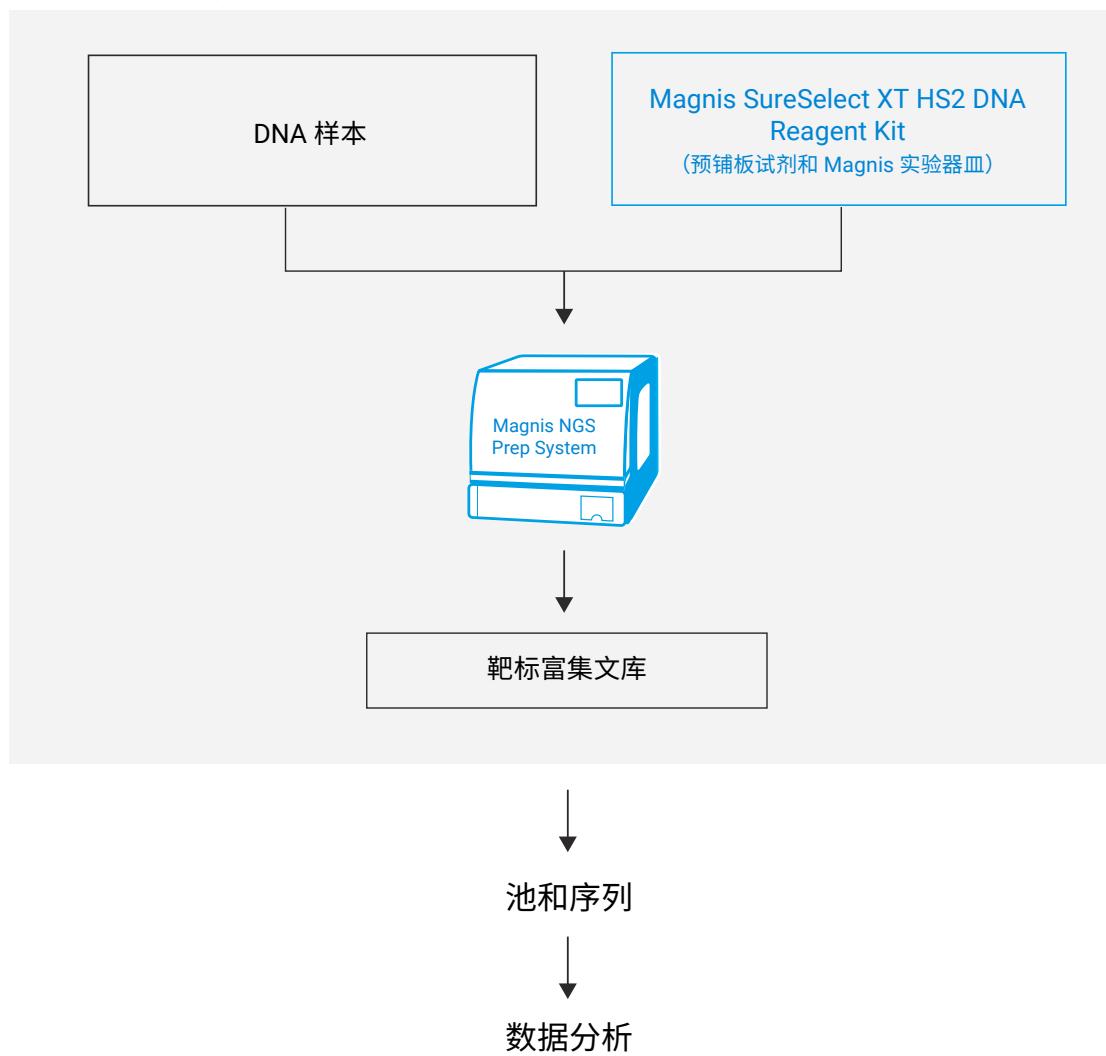


图 1 总体 Magnis NGS Prep System NGS 样本制备工作流程。

安全注意事项

小心

在实验室中工作时, 请穿戴合适的个人防护装备 (PPE)。

紫外线 (UV) 灯暴露危险

紫外线无法透过 Magnis 仪器门和侧面板, 因此暴露于紫外线灯的可能性很小。但是, 仍需要采取以下预防措施。

- 在使用紫外线灯对仪器台面进行去污染处理时, 切勿直视或间接地看向紫外线光源。
- 务必在仪器门关闭并上锁的情况下进行去污染处理。仪器门设定为在紫外线灯打开时保持锁定状态。
- 替换用紫外线灯管必须由 Agilent 提供, 并且必须由 Agilent 工程师或 Agilent 授权服务提供商安装。

灼伤危险

- 在方案运行期间, 热循环仪模块的加热模块和其他组件的温度会迅速达到 50°C 以上。为确保安全操作, 在运行期间仪器门必须保持关闭状态。仪器设定为在方案运行时门保持锁定状态。
- 请仅使用适合在 Magnis NGS Prep System 上使用的 Agilent 材料 (板、粘合密封剂、箔、垫)。这些材料具有足够的温度稳定性 (最高 120°C)。

所需材料

SureSelect XT HS2 DNA Magnis 运行所需的材料

表 1 支持的试剂盒（选择一项）

描述	96 次反应*	32 次反应†
Magnis SureSelect XT HS2 DNA Reagent Kit:	Agilent	Agilent
含 Tier 1 (1–499 kb) Probe	货号 G9751B	货号 G9751A
含 Tier 2 (0.5–2.9 Mb) Probe	货号 G9752B	货号 G9752A
含 Tier 3 (3–5.9 Mb) Probe	货号 G9753B	货号 G9753A
含 Tier 4 (6–11.9 Mb) Probe	货号 G9754B	货号 G9754A
含 Tier 5 (12–24 Mb) Probe	货号 G9755B	货号 G9755A
含 24–50 Mb Probe	货号 G9756B	货号 G9756A
含 Human All Exon V7 Probe	货号 G9773B	货号 G9773A
含 Human All Exon V8 Probe	货号 G9774B	货号 G9774A
含 SureSelect Clinical Research Exome V4 (CRE V4) Probe	部件号 G9775B	部件号 G9775A
含 SureSelect Cancer CGP DNA Probe	部件号 G9777B	部件号 G9777A
含空 Magnis Probe Input Strips‡	货号 G9750B	未提供

有关试剂盒内容物的列表，请参见第 60 页到第 62 页。

* 96 次反应试剂盒设定为 12 次运行，每次运行包含 8 个样本。

† 32 次反应试剂盒设定为 4 次运行，每次运行包含 8 个样本。

‡ Probe 必须单独购买。有关填充空 Magnis Probe Input Strip 以进行运行的信息，请参见第 50 页。

表 2 所需设备

描述	供应商和部件号
Magnis NGS Prep System*	Agilent 部件号 G9710A
机器人移液吸头（无菌，过滤式，250 μL）	Agilent 货号 G9477G
湿度计	Traceable 温度 / 湿度数据记录仪，Cole-Parmer 部件号 18004-13 或同类产品
涡旋混合器	Vortex Genie-2, VWR（部件号 58815-234）或同类产品
微量离心机	Eppendorf 微型离心机（型号 5417C）或同类产品†
吊桶式离心机	Eppendorf 离心机（型号 5804，带 A-2-DWP 转子）或同类产品‡
移液器（容量为 10 μL、20 μL 和 200 μL）	Rainin Pipet-Lite 移液器或同类产品
无菌、无核酸酶的气溶胶阻隔移液吸头	一般实验室用品供应商
设为 -20°C 和 -80°C 的冷冻箱 (2)	一般实验室用品供应商
设为 +4°C 的冰箱	一般实验室用品供应商
冰桶	一般实验室用品供应商
无粉手套	一般实验室用品供应商

* 本手册中详述的 Magnis SureSelect XT HS2 Reagent Kit 及方案也与 MagnisDx NGS Prep System（部件号 K1007A）兼容。

† 离心机转子必须可容纳 Magnis SureSelect XT HS2 Reagent Kit 随附的排管。

‡ 离心机转子必须可容纳 Magnis SureSelect XT HS2 Reagent Kit 随附的深孔板。不需要制冷系统。

DNA 样本制备和分析所需的材料

表 3 DNA 样本制备和分析所需的材料 – 所有样本类型

描述	供应商和部件号
1x Low TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5–8.0, 0.1 mM EDTA)	Thermo Fisher Scientific 部件号 12090-015 或同类产品
Qubit BR dsDNA Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
100 次检测	货号 Q32850
500 次检测	货号 Q32853
Qubit Fluorometer	Thermo Fisher Scientific 部件号 Q33238
Qubit Assay Tubes	Thermo Fisher Scientific 部件号 Q32856
DNA 分析系统和耗材: *	
Agilent 4150/4200 TapeStation	Agilent 部件号 G2992AA/Agilent 部件号 G2991AA
TapeStation 兼容 8 孔排管	Agilent 部件号 401428
8 孔排管盖	Agilent 货号 401425
High Sensitivity D1000 ScreenTape	Agilent 货号 5067-5584
高灵敏度 D1000 试剂	Agilent 货号 5067-5585
或	
Agilent 5200/5300/5400 Fragment Analyzer 仪器	Agilent 部件号 M5310AA/M5311AA/M5312AA
HS NGS 片段试剂盒	部件号 DNF-474-0500

* 如果您的实验室有 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 High Sensitivity DNA Kit (部件号 5067-2646)，也可用于文库 DNA 分析。

表 4 所需材料 – 仅限高质量 DNA 样本

描述	供应商和部件号
高质量的 gDNA 纯化系统, 例如:	
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
50 个样本	货号 51304
250 个样本	货号 51306

表 5 所需材料 – 仅限 FFPE DNA 样本

描述	供应商和部件号
FFPE gDNA 纯化系统, 例如:	Qiagen
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, 50 个样本	货号 56404
Deparaffinization Solution	货号 19093
FFPE DNA 完整性评估系统:	
Agilent NGS FFPE QC Kit (推荐方法)	Agilent
16 次反应	部件号 G9700A
96 次反应	部件号 G9700B
或	
TapeStation Genomic DNA 分析检测: *	Agilent
Genomic DNA ScreenTape	货号 5067-5365
Genomic DNA Reagents	货号 5067-5366

* 还需要 Agilent 4150 TapeStation 或 4200 TapeStation 以及兼容的塑料器皿。有关订购信息, 请参见上面的表 3。

可选材料

表 6 方案中可选材料的供应商信息

描述	用途	供应商和部件号
Covaris 样本制备系统	机械式 DNA 剪切 (非自动化 enzymatic fragmentation 替代方法)	Covaris 型号 E220
Covaris microTUBE 样本架	机械式 DNA 剪切 (非自动化 enzymatic fragmentation 替代方法)	Covaris 部件号 520045
稀释漂白剂 (10%) 擦巾	仪器台面的表面清洁 (参见第 18 页) *	Hype-Wipe Bleach Towelettes (VWR 部件号 16200-218) 或同类产品
酒精 (70%) 擦巾	仪器台面的表面清洁 (参见第 18 页) *	VWR Pre-Moistened Clean Wipes (VWR 部件号 21910-110) 或同类产品
干燥、不起毛、无刮擦的擦拭纸	条形码扫描仪视窗的表面清洁	Kimwipes 擦拭纸 (VWR 部件号 21905-026) 或同类产品
粘合密封剂涂抹器	已填充的 Magnis Sample Input Strips 应用 Foil Seals 能降低污染风险 (请参见第 22 页)	Thermo Fisher Scientific 部件号 AB1391, 或同类产品
D1000 ScreenTape 和 D1000 Reagents	使用 Agilent 4200/4150 TapeStation 系统对可选 pre-capture library QC 样本进行分析 (参见第 41 页)	Agilent 部件号 5067-5582 和部件号 5067-5583

* Agilent 建议使用 Magnis 仪器紫外线介导的去污染程序进行常规仪器去污染处理。如需使用溶剂进行清洁，则请参见[仪器用户指南](#)以了解完整的表面清洁说明。使用前，必须将允许使用的溶剂涂在固体布载体上。请勿在仪器内喷洒水、漂白剂、酒精或其他液体。使用前从擦巾或湿巾上除去多余的液体，以防止液体进入仪器组件。

2

使用 Magnis NGS Prep System 进行测序文库制备

关键样本跟踪信息 14

 Magnis Sample Input Strip 孔中的样本顺序方向 14

 在 Magnis 软件中将样本分配到各个孔位 15

准备用于运行的 DNA 样本 17

准备用于运行的 Magnis 仪器和试剂 18

 步骤 1: 仪器运行方案准备 18

 步骤 2: 准备 SureSelect XT HS2 DNA 试剂和塑料器皿 20

运行文库制备方案 24

 步骤 1: 启动方案并 Enter Run Info 25

 步骤 2: 设置台面 29

 步骤 3: Verify Labware 35

 步骤 4: 输入样本信息 37

 步骤 5: Confirm Setup 并开始运行 38

 步骤 6: 从仪器中采集最终文库样本 40

 步骤 7: 运行后清理仪器 42

本章包含使用 Magnis NGS Prep System 进行 SureSelect XT HS2 靶标富集 DNA 测序文库制备的说明。有关工作流程的概述，请参见第 8 页的图 1。

本章提供了针对运行设置 Magnis NGS Prep System 仪器和检测组件、然后运行 Magnis 仪器程序以进行自动化 NGS 文库样本制备的详细说明。

对于每个待测序的样本，都会连接单独的双标签和分子条形码文库。使用此处所述方案制备文库后，即可使用 Illumina 双端测序读段系统对其进行测序。

关键样本跟踪信息

准确的样本追踪对于测序结果的解读至关重要。在开始运行之前，确保阅读并理解本节中的样本追踪信息，包括 1) Magnis Sample Input Strip 孔中的样本编号方向，以及 2) 如何在运行设置期间在 Magnis 软件中输入样本标识信息。

Magnis Sample Input Strip 孔中的样本顺序方向

Magnis NGS Prep System 运行使用以下图 2 所示的样本方向，其中样本 1 装载于提供的 Magnis Sample Input Strips 中距条形码最远的孔中。在第 21 页所述的运行设置期间，样本必须按此方向装入 Magnis Sample Input Strip 孔中。

在设置运行之前，为每个样本分配特定的样本编号 1 到 8，并记录样本编号分配信息。第 15 页至第 16 页介绍了将用于运行的样本分配信息输入 Magnis 软件的方法。

小心

请勿添加任何可能遮盖 Magnis Sample Input Strip 上条形码的文字或标签。

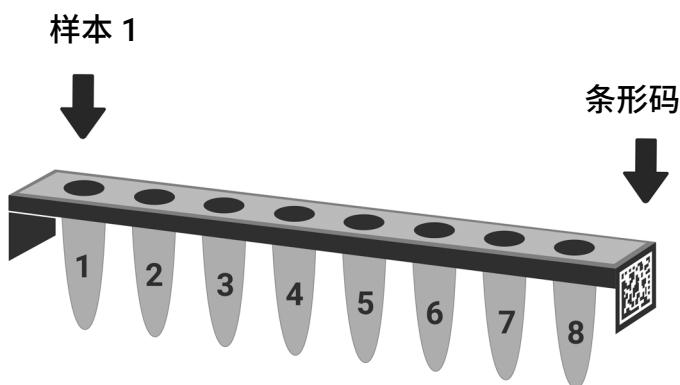


图 2 Magnis Sample Input Strip 中样本编号 1 到 8 的所需方向。

在 Magnis 软件中将样本分配到各个孔位

必须使用下述两种方法之一在 Magnis 仪器软件中指定运行中每个样本的标识。在运行设置期间，将在 Magnis 系统中输入要包含在运行中的特定 Sample ID，如第 37 页的“[步骤 4：输入样本信息](#)”部分中所述。在开始运行设置之前，请确保您了解下面的样本定位和追踪信息。

每个 Sample ID 必须包含 1–30 个字符，并且在运行中必须是唯一的。Sample ID 可以在不同的运行中重复使用。

样本分配方法 1：使用 .csv 文件导入样本分配信息

- 1 创建包含有序样本名称的 .csv (逗号分隔值) 文件。可以使用电子表格应用程序 (例如 Microsoft Excel 软件) 以表格格式输入样本名称数据，然后以 .csv 格式保存。
 - a 在单元格 A1 中输入标题文本 **sample_id**，如图 3 所示。
 - b 在单元格 A2 到 A9 中输入每个样本的名称 (参见图 3，左图)。样本输入文件必须包含 8 个唯一的 Sample ID。如果要在运行时将任何样本孔留空，则必须在相应位置输入占位符文本 (参见图 3，右图)。

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

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

图 3 用于上传样本分配信息的 .csv 文件内容示例 (以电子表格格式显示)

- 2 以 .csv 格式保存文件。
- 3 将 .csv 文件下载到未加密的 USB 闪存盘。
- 4 设置运行时，在 *Enter Sample Info* 屏幕上，按下面显示的样本上传按钮，然后按照方案设置向导提示从 USB 闪存盘传输 Sample ID。



样本分配方法 2：使用 Magnis 仪器触摸屏手动分配样本

- 1 在将样本分配到 Magnis Sample Input Strip 孔中之前，根据适当的硬拷贝或软拷贝记录保存程序，记录用于运行的每个样本的识别编号。
- 2 设置运行时，按照 Magnis 触摸屏提示，使用下面所示的 *Enter Sample Info* 屏幕为每个样本孔位输入 Sample ID。Magnis 系统会自动为每个样本位置分配默认的 Sample ID。要更改 Sample ID，首先在触摸屏上选择特定的样本位置，然后使用右侧的 **Edit Sample ID** 工具输入所需的 Sample ID 文本。按 **Change** 以保存为样本输入的 Sample ID 文本。

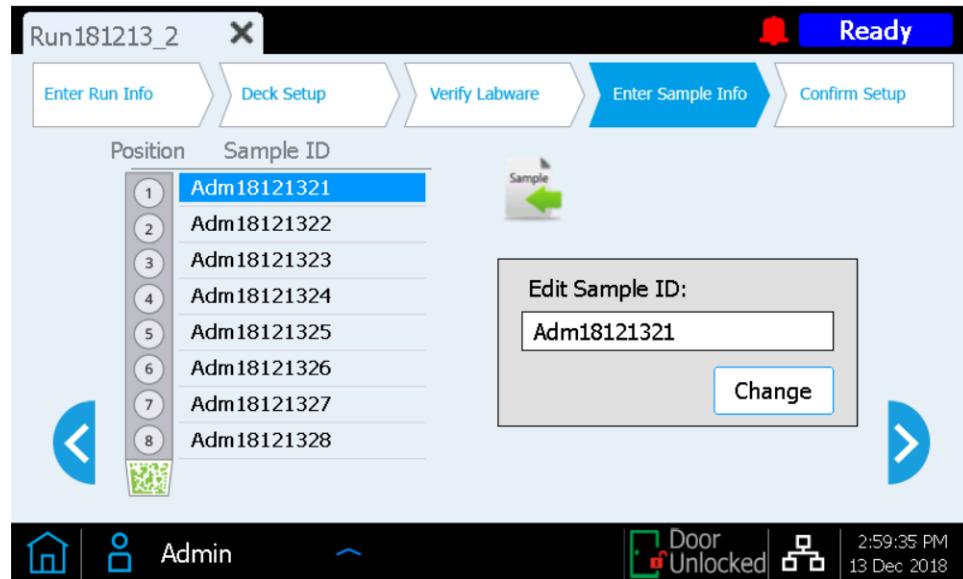


图 4 用于在运行期间手动分配样本的 Magnis 触摸屏界面。

准备用于运行的 DNA 样本

该文库制备方案同时适用于从新鲜或新鲜冷冻样本制备的高质量 gDNA 和从 FFPE 样本制备的低质量 DNA。处理高质量或 FFPE 来源 DNA 的运行起始量可包括 10 ng、50 ng、100 ng 或 200 ng DNA。要获得最佳测序结果，请使用此范围内可用的最大输入 DNA 量。对于同一次运行中的所有样本，DNA 的起始量（输入量）必须相同。

在设置 Magnis 运行之前，必须根据第 43 页的“[附录 1：DNA 样本制备指南](#)”所述制备、定量和定性 DNA 样本。某些 DNA 样本制备步骤，特别是 FFPE 来源样本的定性，可能需要在开始 Magnis 运行步骤前一天内完成。

在制备 NGS 文库之前，所有的 DNA 样本必须通过 enzymatic fragmentation 或机械剪切的方式进行片段化。当运行设置中包含酶切 DNA 片段化步骤时，该步骤使用 Magnis 自动化完成（参见 [第 25 页](#)）。另外，在运行期间，可以于临用前使用“[附录 1：DNA 样本制备指南](#)”中提供的非自动化方案，对 DNA 样本进行机械剪切。

注意

准备 Covaris E220 仪器以进行 DNA 片段化时，需要大约 30–60 分钟来使水浴冷却和排气（参见 [第 45 页](#) 或 [第 48 页](#)）。对于包含经 Covaris 剪切 DNA 的运行，在开始以下页面中的任何 Magnis NGS Prep System 和试剂设置步骤之前，请先开始这些调节步骤。

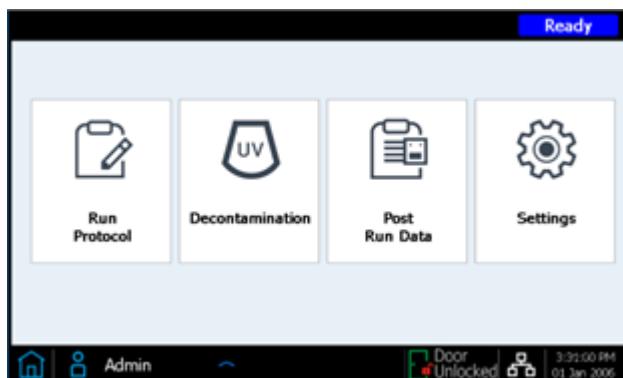
准备用于运行的 Magnis 仪器和试剂

步骤 1：仪器运行方案准备

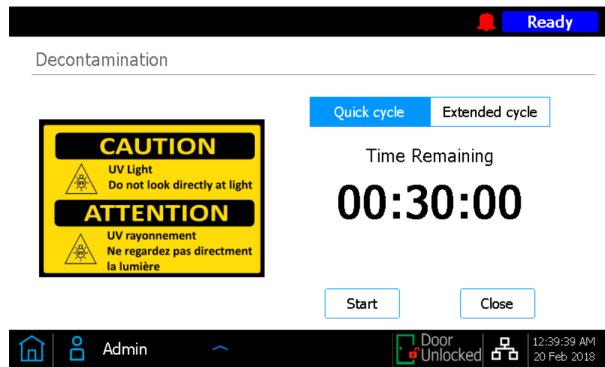
注意

以下说明包括仪器介导的去污染程序，该程序使用紫外线 (UV) 灯对仪器台面进行去污染处理。可以采用其他去污染程序（例如，使用 10% 漂白剂溶液）来补充或替代自动 UV 去污染程序。有关完整的表面去污染和清洁说明，请参见 [Magnis 仪器用户指南](#)。

- 1 在开始之前，使用湿度计测量 Magnis 仪器附近的环境湿度。确认湿度范围在 30%–70%，该范围为无冷凝湿度所接受的范围。
- 2 确认已从仪器台面上清除了先前运行使用的所有实验器皿，以及任何其他杂散材料。运行设置期间仪器台面上存在任何材料都可能会干扰仪器的启动和运行设置程序。
- 3 按下仪器正面的电源按钮，打开仪器。关闭仪器门。
仪器随即打开，仪器内部的 LED 指示灯亮起，软件在触摸屏上启动。
在旁边观察系统执行一系列启动活动，这可能需要几分钟。
- 4 Agilent 建议每次运行前使用以下步骤运行 UV 去污染 Quick cycle 程序（需要 30 分钟）。
 - a 在 Home 屏幕上，按 Decontamination。



- b** 在 Decontamination 屏幕上，按 **Quick cycle**，然后按 **Start**。Quick cycle 去污染程序的持续时间为 30 分钟。在 UV 去污染过程中，LED 指示灯会熄灭，仪器的 UV 灯管会在此间隔期间发出 UV。



警告

在去污染过程中，切勿直视 UV。

注意

在 30 分钟的去污染过程中，开始试剂制备步骤，详见[第 20 页](#)。

- 5** 一旦完成去污染循环，仪器的 LED 指示灯即会发出蓝光。使用触摸显示屏返回 Home 屏幕，以访问运行设置步骤。

步骤 2：准备 SureSelect XT HS2 DNA 试剂和塑料器皿

表 7 列出了每次 Magnis SureSelect XT HS2 DNA 运行中使用的试剂和塑料器皿组件。在开始执行表中所列的制备步骤之前，请查看以下“[板和排管处理说明](#)”部分。

表 7 Magnis SureSelect XT HS2 DNA 运行耗材 (RT= 室温)

数量	组分	储存条件	制备步骤
1	Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate ILM [*]	+4°C	请参见 第 21 页上的步骤 1 。 运行前在室温下保存 30 分钟。
1	Magnis SureSelect XT HS2 Reagent Plate ILM	-20°C	请参见 第 21 页上的步骤 2 。 在进一步处理之前，在室温下解冻 15–30 分钟。
1	空 Magnis Sample Input Strip (红色) 和同一包装的替换铝箔密封带	RT	准备填充。 请参见 第 21 页上的步骤 3 ，了解填充说明。
1	Magnis SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs ILM 板的 Index strip (黑色)	-20°C	请参见 第 22 页上的步骤 4 。 在进一步处理之前，在冰上短暂解冻。
1	Magnis SureSelect Probe Plate, Pre-filled Single Well Format 的 Probe strip (白色) [†]	-80°C	请参见 第 22 页上的步骤 5 。 在进一步处理之前，在冰上短暂解冻。
1	Magnis Empty Consumables 盒，内含：Magnis Tip Waste Bin、Magnis Deep-Well HSM Plate、Magnis Thermal Cycler Seal、Magnis 96-Well PCR Plate、Magnis Library Output Strip (绿色)、Magnis QC Strip (蓝色)、Magnis Foil Seals	RT	随时可用。
3	盒装机器人移液吸头 (与 Magnis Reagent Kit 分别购买)	RT	随时可用。

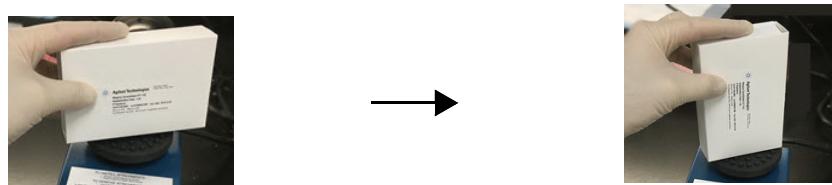
* 提供的 Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plates ILM 既用于 Magnis SureSelect XT HS2，也用于 Magnis SureSelect XT HS 运行。

† 若使用 SSEL-DNA-XTHS2-EPIS-ILM 方案进行运行，则需要一 (1) 个在室温下储存的空 Magnis Probe Input Strip (白色)。在运行中使用前，必须按照[第 50 页](#)上提供的说明填充空 probe strip。

板和排管处理说明

在开始执行[第 21 页至第 22 页](#)上的组件准备步骤之前，请熟悉下面的重要实验器皿处理说明。

- Magnis Sample Input Strip (以板形式提供的红色排管，部件号 5190-9882 或 5191-5676) 以及所有输入 DNA 样本制备和稀释试剂仅应在实验室的 PCR 前区域储存和使用。
- 在运行设置和执行期间，必须将覆盖试剂盒板和排管的粘合密封剂和铝箔留在原位。在运行设置期间，避免接触或损坏铝箔和粘合盖。运行设置期间刺穿 sample input strip 铝箔盖，之后必须使用同一包装中提供的新铝箔密封带重新密封孔。小心避免对更换的 Foil Seals 造成污染或其他损坏。
- 已填充的试剂板 (Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate 和 Magnis SureSelect XT HS2 Reagent Plate) 以白色硬纸套包裹的形式提供。在下面所述的所有制备步骤中，将已填充的板留在纸套中。要目视检查板孔，请小心地将试剂板仅部分滑出纸套，以避免弯曲或损坏铝箔或粘合盖。将板不正确地重新插入纸套可能会损害板的完整性。
- 在解冻后，使用以下步骤涡旋已填充的试剂板，如下图所示。使用配备有橡胶涂层宽平台的涡旋 (如图所示)，并在整个过程中使用高速设置。在涡旋时，将带纸套的板保持在竖直位置 (侧放) 而不是水平位置。首先将板的长边按到涡旋头上并混合 10 秒钟。然后将板旋转 90° 并将板的短边按到涡旋头上再混合 10 秒钟。继续旋转 /10 秒混合序列，直到对板的所有四个侧边完成此操作。



- 如果在拆封或运行设置过程中试剂盒组件出现损坏（例如，铝箔或粘合盖被刺穿或塑料器具损坏），请勿使用该组件；联系 Agilent [技术支持](#)以获取帮助。

样本和试剂设置步骤

- 使用以下步骤准备用于运行的 **Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate**：
 - 将一块储存在 +4°C 下的 Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate 转移至室温下，将板留在白色硬纸套中。在运行中使用之前，使带纸套的板平衡至室温至少 30 分钟。
 - 涡旋带纸套的板，将板竖直放置，如上面的处理说明部分所述。
 - 在设为 $250 \times g$ 的离心机中对带纸套的板离心 3 秒钟以收集液体而不使磁珠沉淀（离心机达到全速后开始计时）。请勿超过建议的旋转速度和持续时间，以防止磁珠沉淀。
 - 将带纸套的板保存于室温下，以用于当天的运行。
- 使用以下步骤准备 **Magnis SureSelect XT HS2 Reagent Plate**：
 - 将一块储存在 -20°C 下的 Reagent Plate 转移至室温下，将板留在白色硬纸套中。将试剂在室温下解冻 15 至 30 分钟。将板部分滑出纸套，并目视确认试剂已完全解冻。
 - 孔内试剂解冻后，涡旋带纸套的板，使板竖直放置，详见上面的处理说明部分。
 - 在设为 $250 \times g$ 的离心机中对带纸套的板离心 1 分钟（离心机达到全速后开始计时）。检查板孔底部是否有任何气泡，如果存在气泡，则重复离心步骤，直到释放所有气泡。
 - 将带纸套的板保存于冰上，以用于当天的运行。
- 使用以下步骤准备 **Magnis Sample Input Strip**。确保对于样本类型和片段化方法而言，用于运行的所有 DNA 样本的制备方法均适当，详见[第 43 页至第 48 页](#)。

小心

确保在此步骤中为您的应用加载正确体积的样本。

- 对于输入 DNA 的 Magnis 自动化 enzymatic fragmentation，**装载 14 μ L 未剪切的 DNA**。
- 对于经 Covaris 预剪切的输入 DNA，**装载 50 μ L 已剪切的 DNA**。

- 取出储存于室温下的 Magnis Sample Input Strips 试剂盒。从板支撑物中取出一个空的红色 Sample Input Strip（排管的端部刻有“S”），使铝箔盖留在原位。将一新的铝箔密封带和配套的背衬放在一边，用于在**步骤 c** 中重新密封。
- 在每个样本孔中放入 14 μ L 未片段化的 DNA 或 50 μ L 片段化的 DNA，在分配液体前用移液器吸头刺破铝箔密封带。排管所有孔都必须含有相同量的 DNA（10 ng、50 ng、100 ng 或 200 ng）。

确保将样本装入正确的样本孔位置，其中样本 1 位于离条形码最远的孔中，如下图所示。

样本 1 的位置



- c 将所有样本放入 Magnis Sample Input Strip 孔中后，用准备的新铝箔密封带重新密封排管，小心不要使铝箔密封带挡住排管条形码。确保铝箔密封带均匀牢固的密封覆盖好，避免铝箔密封带过多延伸或者褶皱，这可能会妨碍排管在仪器中放置平稳。

注意

在使用铝箔密封带时，请注意避免核酸酶和外来核酸的污染。考虑在此步骤中使用（每次使用前已清洁的）密封涂抹器。涂抹器介绍，请参见第 12 页的表 6。

- d 目视检查密封的样本孔，确认无气泡存在。通过在设为 $250 \times g$ 的离心机中对准备的样本排管离心 5 秒钟或直到 DNA 溶液中的所有气泡均已释放，去除所有气泡。

- e 直到按照第 34 页上的说明使用之前，将密封的样本排管保存于冰上。

4 使用以下步骤准备 index strip tube：

- a 确定要用于运行的适当标签组。所提供的 index strips 在与条形码相对的排管端刻有 D1 至 D24，用于指示孔中包含的双 index pairs 特定组（有关标签分布图，请参见第 64 页）。

注意

确保使用唯一 index pair 为待多样品混合的每个样本编写索引。

- 如果对来自不同 Magnis NGS 文库制备运行的样本进行多样品混合以供 NGS，则每次运行都必须使用不同编号的 index strip。
- Agilent SureSelect XT HS2 index pairs 在所有格式中都使用统一的编号系统。例如，Magnis XT HS2 index strips D1 至 D12（黑色排管）中提供的 index pairs 1-96 等同于手动处理专用格式的 SureSelect XT HS2 Reagent Kits 的橙色板中提供的 index pairs 1-96。请勿将用来自不同试剂盒格式但编号相同的 index pair 来索引的样本合并以供多重测序。

- b 取出在 -20°C 下储存的 Magnis SureSelect XT HS2 Index Plate。从板支架中取出相应的黑色 index strip（标记为 D1 至 D24），将铝箔盖留在原位。将取下的排管置于冰上解冻，并将包含剩余 index strips 的板放回 -20°C 下储存。

- c Index strip 孔内试剂解冻后，以高速涡旋排管 5 秒钟。

- d 在设为 $250 \times g$ 的离心机中对 index strip 离心 5 秒钟。检查排管孔，确认液体被收集于孔底部并且无气泡存在。重复离心步骤直到释放所有气泡，去除所有气泡。

- e 将 index strip tube 保存于冰上，直到按照第 34 页上的说明使用时。

5 对于随附有预填充 probe plate (Magnis SureSelect Probe Plate, Pre-filled Single Well Format) 的试剂盒，使用以下步骤准备 probe strip tube。 请注意，孔 A 中提供了全部体积的 probe 溶液，孔 B 至孔 H 是空的。

如果您的试剂盒包含用于运行时 probe 填充的空 probe strips (试剂盒部件号 G9750B) , 请跳过下面的说明，并按照[第 50 页](#)上的说明准备 probe strip。

- a** 取出储存在 -80°C 下的 Probe Plate。从板支撑物中取出一个白色的 probe strip (排管端部刻有 "P")，将铝箔盖留在原位。将 probe strip 置于冰上解冻，并将包含剩余 probe strip 的板放回 -80°C 下储存。

小心

Probe strip 不包括显示特定 probe 设计标识的人类可读标签。从板包装中取出 probe strip 后，适当注意跟踪和维护 probe strip 标识。请勿同时打开多个盒子的 probe strip tube，以免不同的 probe 混乱。

- b** 排管孔内的 probe 解冻后，以高速涡旋排管 5 秒钟。
- c** 在设为 $250 \times g$ 的离心机中对 probe strip 离心 5 秒钟。目视检查孔 A，确认液体被收集于孔底部并且无气泡存在。重复离心步骤直到释放所有气泡，去除所有气泡。
- d** 将 probe strip 保存于冰上，直到按照[第 34 页](#)上的说明使用时。

- 6** 取出一个在室温下储存的 **Magnis Empty Consumables** 盒，以便在台面设置期间使用。

继续执行第 24 页的“[运行文库制备方案](#)”。

运行文库制备方案

为 SureSelect XT HS2 DNA 运行准备好 Magnis 仪器和所有试剂后，按照仪器触摸屏上提供的提示将实验器皿装载到仪器上并运行文库制备方案。相关步骤在 [图 5](#) 中总结。

Magnis 仪器触摸屏会提供以下方面的提示：输入运行信息、装载台面、验证所有实验器皿都存在并具备要求的属性、输入样本信息以及确认方案设置。在这些设置步骤中，仪器台面上的 LED 指示灯会发出白光。[第 25 页至第 38 页](#) 为新用户提供了有关这些提示步骤的额外信息。

在方案运行期间，系统对 DNA 样本执行文库制备和靶标富集，以生成可用于测序的靶标富集 DNA 文库。在运行期间，LED 指示灯发出绿光。

运行完成后，系统触摸屏将指导您逐步完成从仪器中取出最终测序文库样本和 QC 样本（如果包括）。LED 指示灯发出蓝光后，可打开仪器门并取出样本以供进一步处理。用于 DNA 测序的最终靶标富集文库的处理指南见第 52 页的 [“附录 3：运行后 DNA 样本的 NGS 处理指南”](#)。

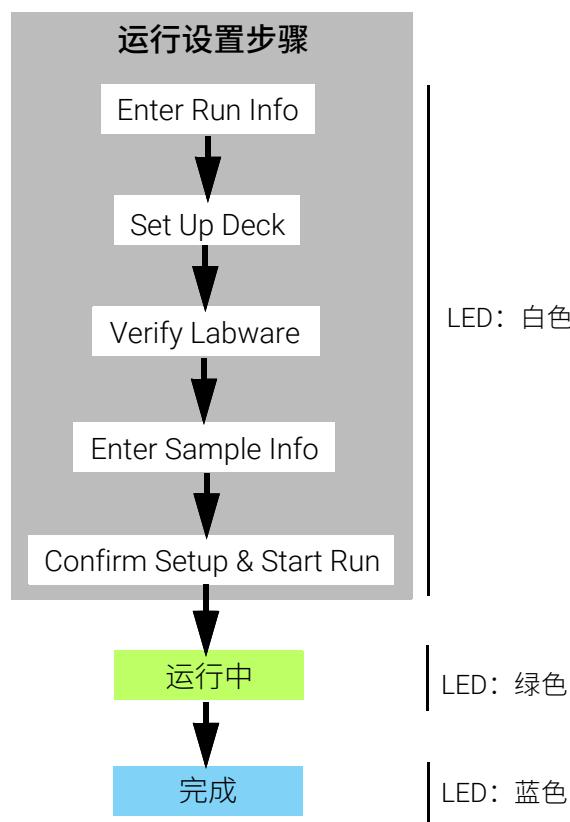


图 5 Magnis NGS Prep System 运行设置和完成步骤概览。在这些步骤期间，仪器 LED 指示灯发出的光的颜色显示在右侧。

步骤 1：启动方案并 Enter Run Info

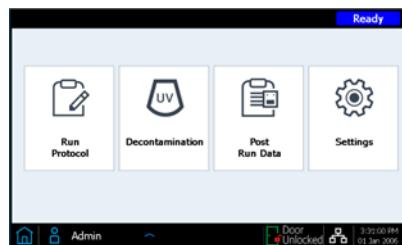
本节中的运行设置步骤包括选择要运行的特定 Magnis 方案。表 8 描述了本出版物支持的 Magnis 方案。您的仪器上可能有一组不同的方案可供使用，并且可以在触摸屏上看到。有关 Magnis 方案可用性的更多信息，请参见第 71 页。

表 8 本出版物中支持的 Magnis 方案的使用信息

方案名称	支持的试剂盒格式
SSEL-DNA-XTHS2-ILM	用于处理随附有 预填充 probe input strips (随附有标记为 <i>Magnis SureSelect Probe Plate</i> 、 <i>Pre-filled Single Well Format</i> 的 probe 板试剂盒) 的 Magnis SureSelect XT HS2 DNA Reagent Kits
SSEL-DNA-XTHS2-EPIS-ILM	用于处理随附有 empty probe input strips (EPIS) 的 Magnis SureSelect XT HS2 DNA Reagent Kits。必须在运行之前按照第 50 页上的详细说明填充空 probe input strip。

1 在触摸屏 Home 屏幕中，按 **Run Protocol**。

系统随即锁定仪器门并执行 Instrument Health Check (IHC)，这可能需要几分钟。如果显示屏报告 IHC 问题，请参见第 71 页和第 71 页了解修复指南。

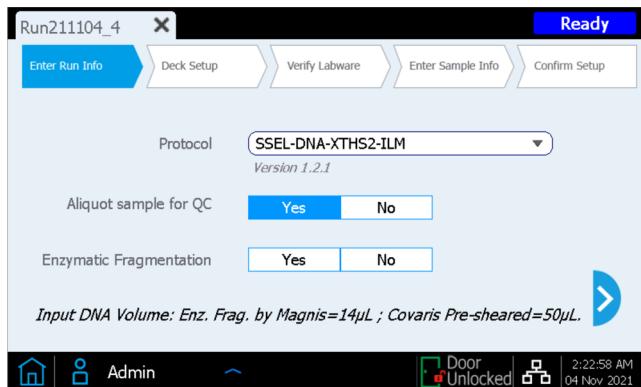


2 按照 *Enter Run Info* 屏幕上的提示操作。

如果您需要有关使用 *Enter Run Info* 屏幕的更多信息，请参见下面有关仪器上运行的 Magnis 固件版本的相应部分。对于运行固件版本 1.5 或更高版本的仪器，请转至第 27 页。

输入 Magnis 固件 v1.4 及更早版本的 *Enter Run Info* 说明：

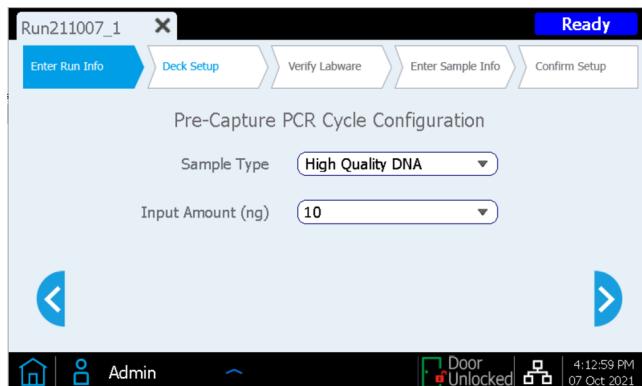
1 在第一个屏幕上，指定方案名称以及是否将可选的 QC 样本收集和 enzymatic fragmentation 步骤包括在运行中。



a 按下下拉箭头，展开 **Protocol** 菜单，然后滚动选择适合您的试剂盒格式的方案（请参见第 25 页的表 8）。

- b** 如果希望仪器从每个预捕获文库样本中取一份 (3 μ L) 等分试样以用于备选运行后 QC 分析, 请按 **Aliquot sample for QC** 旁的 **Yes**。 (预捕获 QC 样本仅可在全部运行完成后用于分析。) 如果要进行此选择, 请确保在第 34 页所述的台面设置期间装载蓝色 QC Strip。或者, 按 **No** 以跳过可选的 QC 等分试样采集步骤。
- c** 使用 **Enzymatic Fragmentation** 设置按钮, 在运行中包括或排除自动化酶切 DNA 片段化。如果样本是未剪切的 DNA (体积为 14 μ L), 请按 **Yes**, 以将 Magnis 系统的自动化 enzymatic fragmentation 功能包括在运行中。如果样本是已 Covaris 剪切的 DNA (体积为 50 μ L), 请按 **No** 跳过 enzymatic fragmentation 步骤。在进入下一屏幕之前, 您必须通过选择 **Yes** 或 **No** 来表明是否在自动化方案中包括 enzymatic fragmentation。
- d** 按向前箭头进入下一个 *Enter Run Info* 屏幕。

- 2** 在第二个屏幕上, 为运行中处理的样本选择适当的 **Sample Type** (*High Quality DNA* 或 *FFPE DNA*) 和 **DNA Input Amount** (10 ng、50 ng、100 ng 或 200 ng)。这些设置用于确定运行的正确 PCR 循环条件。要在运行期间使用的 PCR 循环数和其他条件在 *Confirm Setup* 步骤期间报告 (参见第 38 页)。

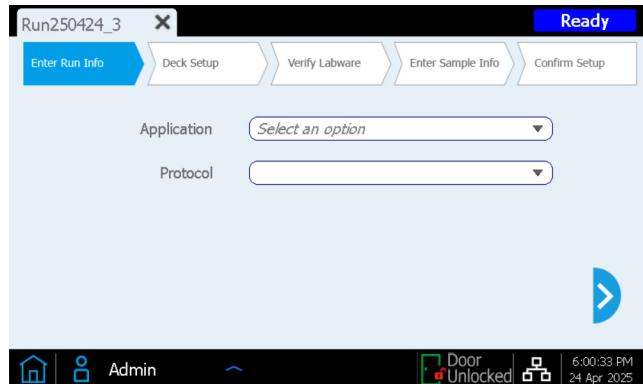


- 3** 按向前箭头前进至 *Deck Setup* 屏幕, 然后进入第 29 页了解台面设置说明。

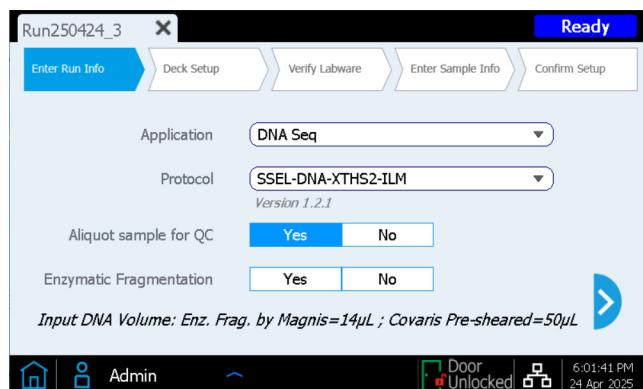
输入 Magnis 固件 v1.5 及更高版本的 *Enter Run Info* 说明：

1 在第一个屏幕上，按下拉箭头展开 **Application** 菜单，然后选择 *DNA Seq*。

展开 **Protocol** 菜单，然后滚动选择适合您的试剂盒格式的方案（请参见第 25 页的表 8）。按向前箭头进入下一个 *Enter Run Info* 屏幕。

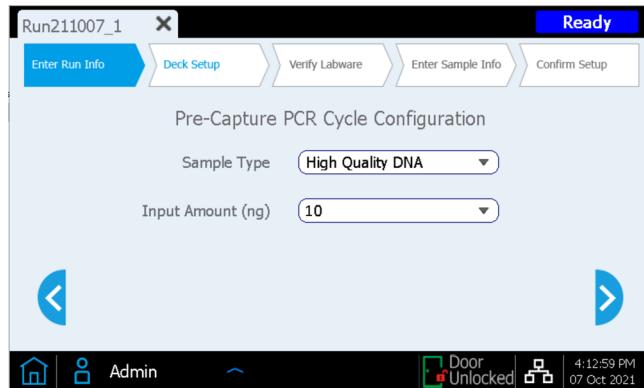


2 使用如下所示的 e **Yes/No** 按钮指定运行中是否包括可选的 QC 样品收集和 enzymatic fragmentation 步骤。



- a 如果希望仪器从每个预捕获文库样本中取一份 (3 μ L) 等分试样以用于备选运行后 QC 分析，请按 **Aliquot sample for QC** 旁的 **Yes**。（预捕获 QC 样本仅可在全部运行完成后用于分析。）如果要进行此选择，请确保在第 34 页所述的台面设置期间装载蓝色 QC Strip。
或者，按 **No** 以跳过可选的 QC 等分试样采集步骤。
- b 使用 **Enzymatic Fragmentation** 设置按钮，在运行中包括或排除自动化酶切 DNA 片段化。
如果样本是未剪切的 DNA（体积为 14 μ L），请按 **Yes**，以将 Magnis 系统的自动化 enzymatic fragmentation 功能包括在运行中。
如果样本是已 Covaris 剪切的 DNA（体积为 50 μ L），请按 **No** 跳过 enzymatic fragmentation 步骤。
在进入下一屏幕之前，您必须通过选择 **Yes** 或 **No** 来表明是否在自动化方案中包括 enzymatic fragmentation。
- c 按向前箭头进入下一个 *Enter Run Info* 屏幕。

- 3 为运行中处理的样本选择适当的 **Sample Type** (*High Quality DNA* 或 *FFPE DNA*) 和 DNA **Input Amount** (10 ng、50 ng、100 ng 或 200 ng)。这些设置用于确定运行的正确 PCR 循环条件。要在运行期间使用的 PCR 循环数和其他条件在 *Confirm Setup* 步骤期间报告 (参见第 38 页)。



- 4 按向前箭头前进至 *Deck Setup* 屏幕，然后进入第 29 页了解台面设置说明。

步骤 2：设置台面

Magnis 触摸屏界面将引导您完成台面设置步骤。第 30 页至第 34 页为新用户提供了额外信息。下图是一个经过完全设置的台面，显示了 Magnis 台面位置和运行用实验器皿的方向。

在完成触摸显示屏上指定的台面设置步骤时，请特别注意下面的关键细节，以确保运行无错误：

- 确保所有实验器皿都平放在指定的台面平台上，或完全放入相应的实验器皿架中。请参见第 30 页至第 34 页，了解为每个实验室器皿组件提供的详细实验室器皿装载说明和放置注意事项。实验器皿放置不当会导致部分或全部样本的最终文库得率较低或没有最终文库得率。
- 确保吸头盒已完全装满并平稳放在平台上。确认每个吸头盒均放置在其平台位置的凸起框架内，并且在移除盖子时盒子不会脱离。
- 按从左到右的顺序将排管装入冷却器模块，以便利排管正确就位。
- 确保所有实验器皿的条形码 (barcode) 都朝向您（仪器正面）。

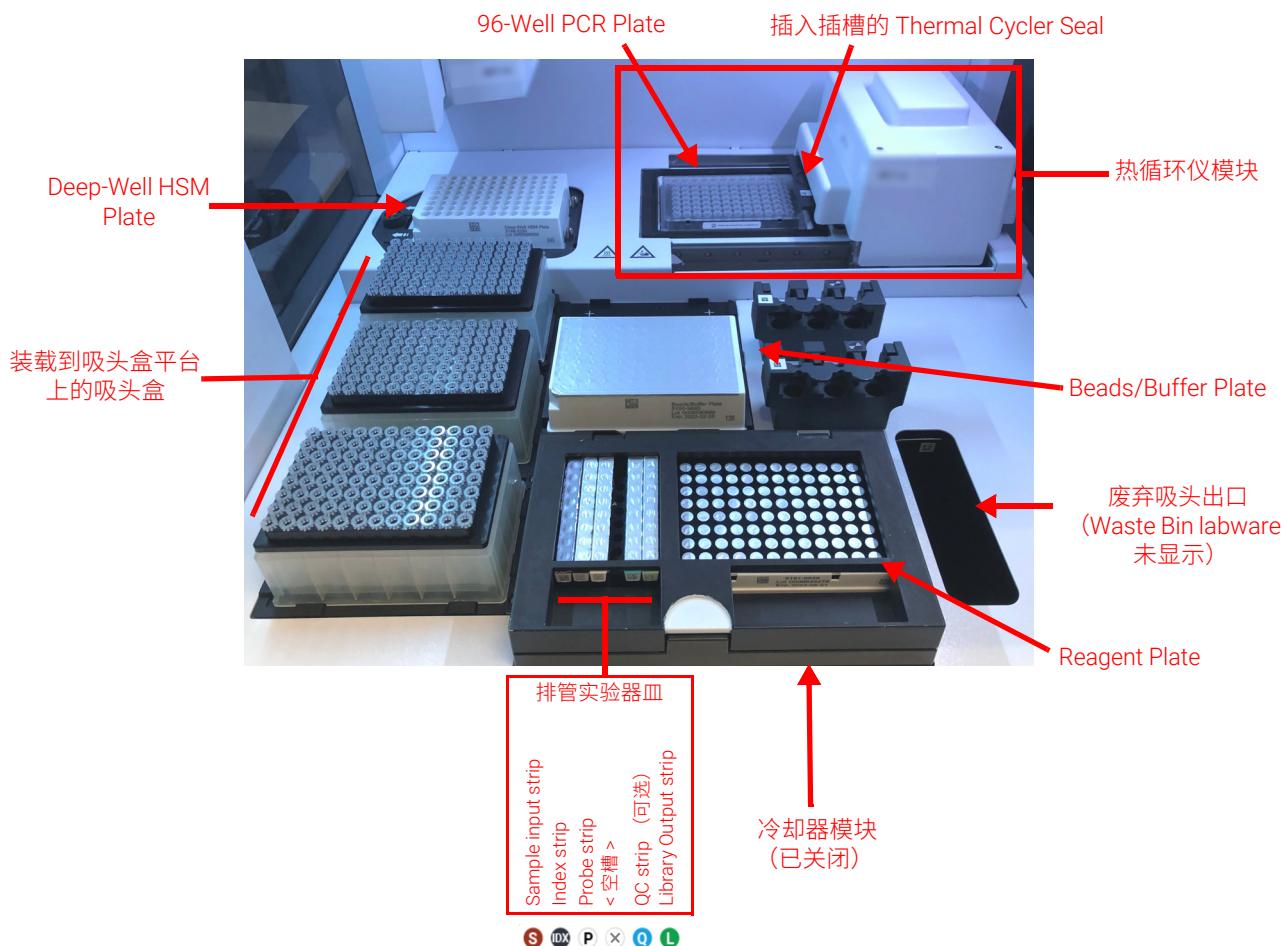
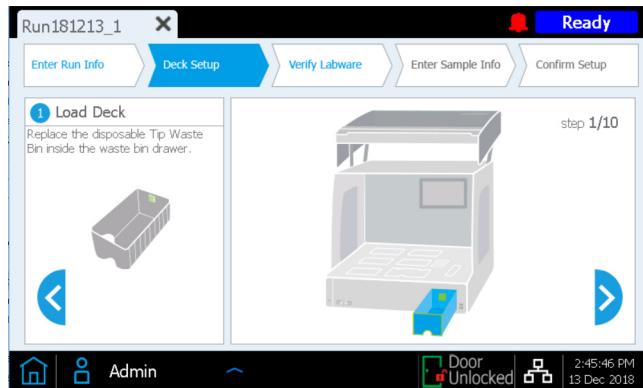


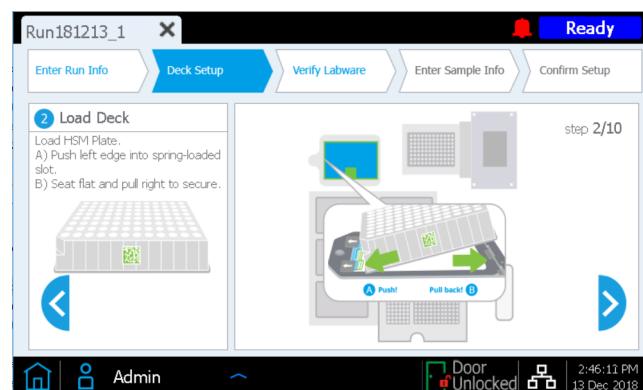
图 6 为运行而装载的仪器台面排管实验室器具的颜色显示在排管图例下方的圆圈中。

Magnis 触摸屏界面提示的 Deck Setup 步骤详述如下。对于每个台面装载步骤，要装载的台面位置在触摸屏上以蓝色阴影显示。完成每个步骤后，按向前箭头进入下一个屏幕。

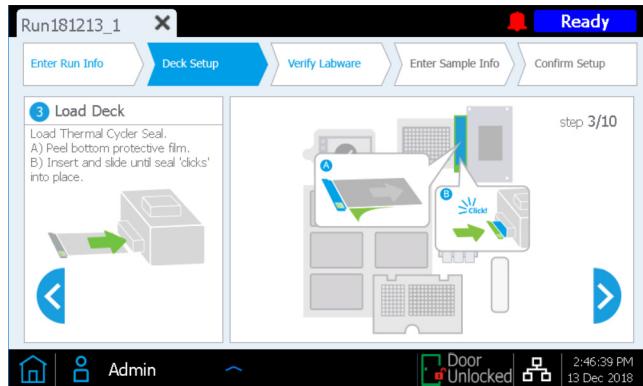
- 1 从 Magnis Empty Consumables 包中取出一次性 Magnis Tip Waste Bin。将一次性垃圾箱放入 Waste Bin 抽屉，使条形码朝向您，如触摸屏上所示。关闭垃圾箱抽屉。



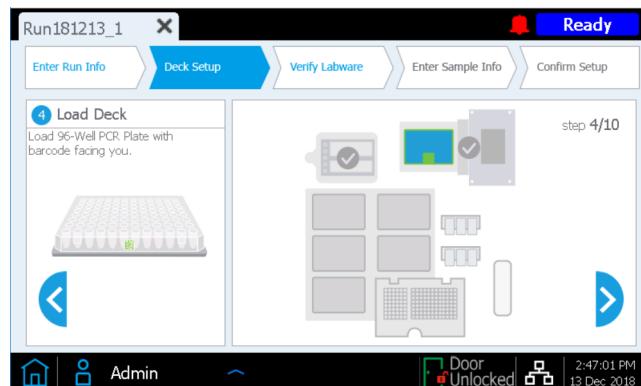
- 2 从 Magnis Empty Consumables 包中取出 Magnis Deep-Well HSM Plate。将板安装在触摸屏上显示的台面位置，使条形码朝向您。要装载板，首先将板的左边缘插入弹簧式插槽中，然后放下板的右边缘，直到板平放在平台上。放平后，将板稍微向右移动（在弹簧机构的辅助下），并确保板完全就位并固定在平台上的支座内。



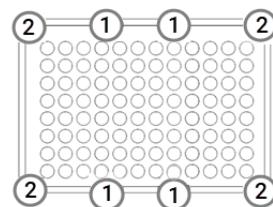
- 3 从 Magnis Empty Consumables 包中取出 Magnis Thermal Cycler Seal。从黄色的拉片处开始，从金属板下方的泡沫垫上剥下保护膜。取下整张保护膜后，将 Thermal Cycler Seal 插入触摸屏上显示位置的插槽中，使条形码朝上。继续将 Thermal Cycler Seal 滑入插槽，直至其卡入到位。



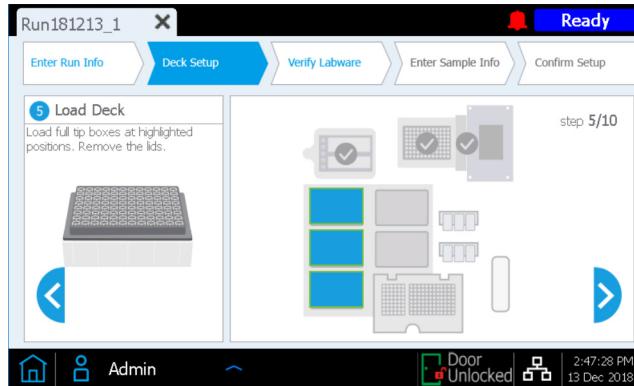
- 4 从 Magnis Empty Consumables 包中取出 Magnis 96-Well PCR Plate。通过将板孔插入热循环仪模块的孔中，将板装载到触摸屏上所示的台面位置，使板条形码朝向您。



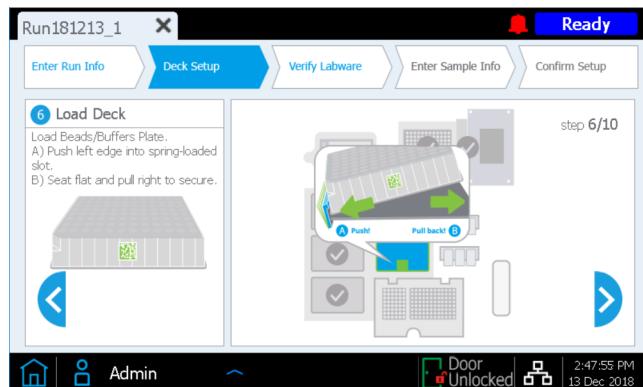
为了确保板在模块中完全就位，首先通过均匀地按压下图中标记为 **1** 的板位置，将板的中间部分固定在模块孔中。然后均匀地按压板的所有四个角（下图中标记为 **2** 的位置）。



- 5 在触摸屏上所示的每个台面位置装载一个新的、装满的吸头盒。从盒子上移除盖子。移除盖子后，确认每个吸头盒仍平放在其平台位置的凸起框架内。

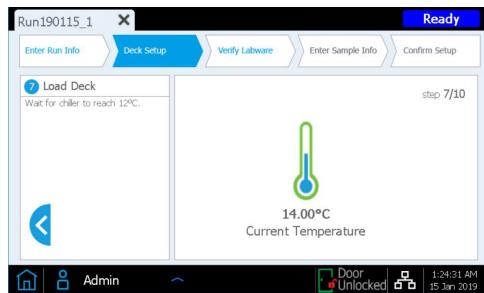


- 6 取出按照第 21 页所述步骤准备的 Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate。取下白色硬纸套，然后将板装载到触摸屏上显示的台面位置，使条形码朝向您。要装载板，首先将板的左边缘插入弹簧式插槽中，然后放下板的右边缘，直到板平放在平台上。放平后，将板稍微向右移动（在弹簧机构的辅助下），并确保板完全就位并固定在平台上的支座内。



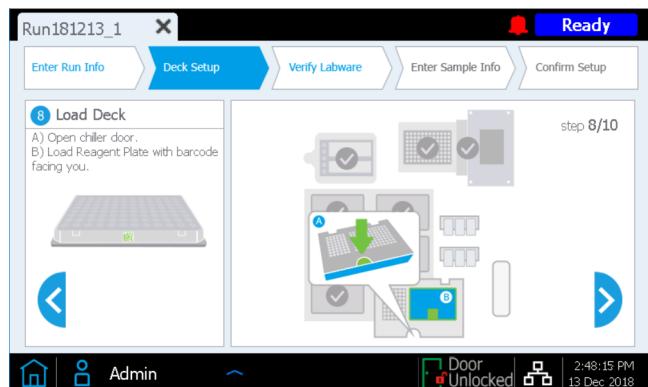
7 仪器的冷却器模块必须达到正确的温度（通常为 12°C），才可以在下面的**步骤 8**中装载以用于运行。在冷却器达到装载温度之前，触摸显示屏显示如下，允许您检查冷却器的状态。

如果冷却器已达到所需温度，则在运行期间可能不会出现此屏幕。



8 如下所述装载冷却器模块。

- a 按下触摸屏上以绿色箭头指示的半圆按钮，打开冷却器门。
- b 取出按照**第 21 页**所述步骤准备的 Reagent Plate。取下白色硬纸套，并检查孔底部是否有气泡。如果存在气泡，请按照**第 21 页**上的指示旋转板，以消除气泡。将板装载到触摸屏上所示位置的冷却器模块中，使条形码朝向您。在板上均匀用力，向下按压。确保试剂板牢牢位于冷却板支座中。



9 如下所述，以所列顺序将用于运行的排管装载到冷却器的指示位置中。在装载每个排管之前，检查孔底部是否有气泡。如果存在气泡，请按照第 22 页上的指示离心排管，以消除气泡。在装载过程中，通过用力均匀按压排管边缘，确保正确放置每个排管。避免接触或损坏铝箔盖。确保每个排管上的条形码都朝向您。

- a 将含有输入 DNA 样本的红色样本排管（按照第 21 页所述步骤制备并保存于冰上）装载到标有 **S** 的排管架位置。保持铝箔盖完好无损。
- b 将含有标签引物的黑色排管（按照第 22 页所述步骤制备并保存于冰上）装载到标有 **IDX** 的排管架位置。保持铝箔盖完好无损。
- c 将含有 **probe** 溶液的白色排管（按照第 22 页或第 50 页所述步骤制备并保存于冰上）装载到标有 **P** 的排管架位置。保持铝箔盖完好无损。
- d 从 Magnis Empty Consumables 包中取出 Magnis Library Output Strip、QC Strip 和 Foil Seals 包。将空的绿色 **library output strip**（排管端部刻有“L”）装载到标有 **L** 的排管架位置。保持铝箔盖完好无损。
如果运行将包括采集等分试样用于 QC 的预捕获文库样本（参见），则将空的蓝色 QC strip（排管端部刻有“Q”）装载到标有 **Q** 的排管架位置。保持铝箔盖完好无损。
保留包装中提供的新 Foil Seals，以准备好在运行结束时使用。
- e 将排管装载到 **S**、**IDX**、**P**、**L** 和 **Q**（如果包括）位置后，关闭冷却器门。（确保门完全关闭，听到咔哒声则表示门已关闭）。



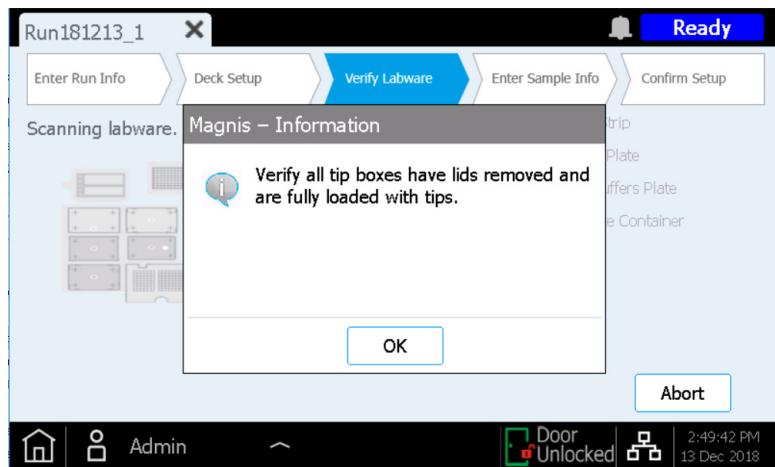
10 关闭仪器门。



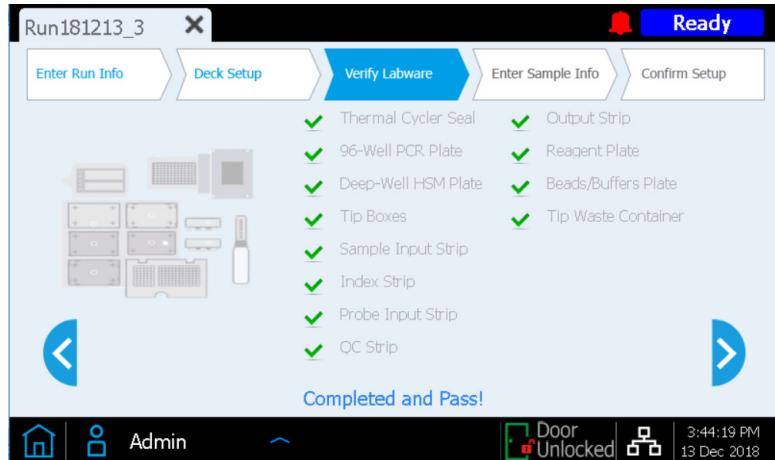
步骤 3: Verify Labware

完成所有 *Deck Setup* 步骤后，仪器将执行运行的 *Verify Labware* 阶段，在此阶段中，仪器将扫描台面上存在的每个实验器皿组件上的条形码。

在开始自动实验器皿验证之前，您需要确认已移除所有吸头盒的盖子，并且所有吸头盒已满，如下面的提示所示。验证了吸头盒的状态后，按 **OK** 开始仪器的自动实验器皿验证程序。



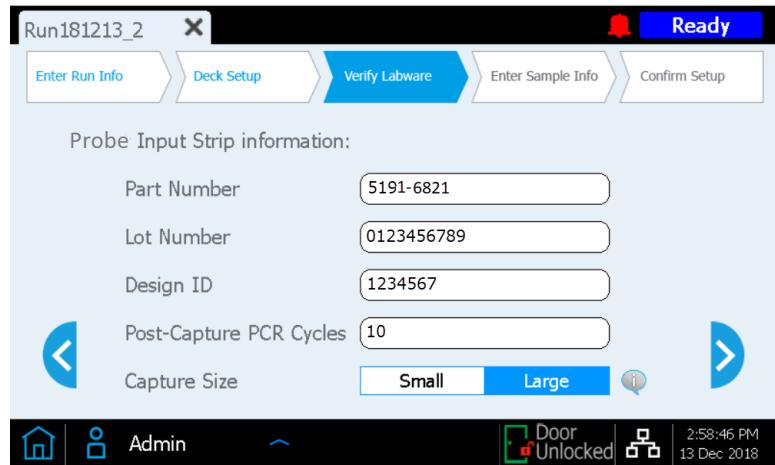
在条形码扫描期间，仪器会验证运行类型所需的所有组件是否都存在、位置和方向是否正确以及是否未过期。验证结果会显示在 Magnis 触摸屏上。按向前箭头继续操作。



如果 *Verify Labware* 屏幕报告一个或多个运行组件存在问题，请参见第 72 页中的故障排除信息以获取修复指南。

最后一个 Verify Labware 屏幕允许您查看 Probe Input Strip 的详细信息。

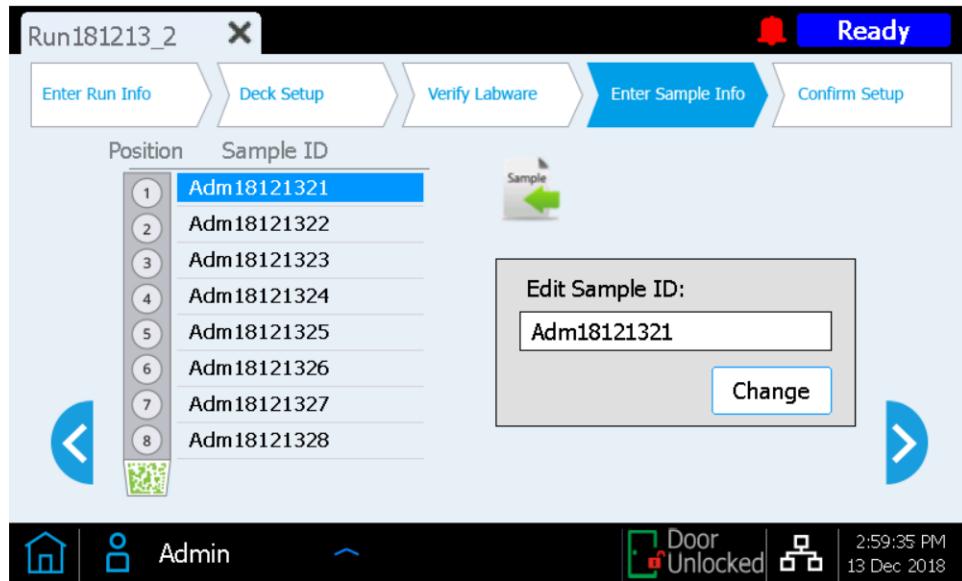
对于包括预分配 Probe 的运行， Probe 溶液的标识信息会通过排管条形码自动传送到 Magnis 软件，并报告 Probe 属性供您查看，如下所示。按向前箭头继续操作。



对于使用运行时填充 probe strip 的 SSEL-DNA-XTHS2-EPIS-ILM 的运行，必须手动在此屏幕上输入 probe 相关属性。请参见第 51 页上的说明。填充所有字段后，按向前箭头继续。

步骤 4：输入样本信息

在 Magnis 软件中，使用此屏幕将每个孔位分配给特定样本。Magnis 软件会自动为每个样本位置分配默认的 Sample ID。可以使用以下两种方法之一，用所选样本名称 /Sample ID 替换默认 Sample ID。



方法 1：使用 .csv 文件导入样本分配信息

- 1 以正确的顺序为运行创建包含所需 Sample ID 的 .csv（逗号分隔值）文件，并将 .csv 文件下载到未加密的 USB 闪存盘，如[第 15 页](#)所述。
- 2 在上面显示的 *Enter Sample Info* 屏幕上，按样本上传按钮，然后按照方案设置向导提示从 USB 闪存盘传输 Sample ID。



方法 2：手动运行时样本分配

- 1 在触摸屏上选择特定的样本位置。
- 2 使用右侧的 **Edit Sample ID** 工具输入所需的 Sample ID 文本。按 **Change** 以保存为样本位置输入的 Sample ID 文本。

步骤 5: Confirm Setup 并开始运行

在开始运行之前，使用此组屏幕确认运行设置详细信息。某些运行参数可以通过按下参数值旁边的铅笔按钮来更改。 

注意

有些参数仅以 *Advanced* 访问级别的用户身份登录后才能更改，当以 *Standard* 访问级别的用户身份登录后，铅笔图标可能不会出现，如下屏幕所示。

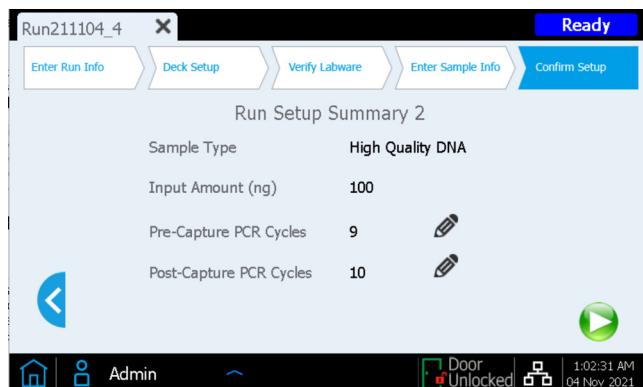
- 1 确认第一个 *Run Setup Summary* 屏幕上显示的运行设置。如果运行包括 Enzymatic Fragmentation，确认片段化时长设置是否适合于 DNA 样本类型和读长，概述如下表所示。

NGS 读长	高质量 DNA 样本	FFPE DNA 样本
2 × 100 读段	25 分钟	25 分钟
2 × 150 读段	15 分钟	25 分钟

确认或更正条目后，按向前箭头进入最终设置屏幕。



- 2 第二个屏幕显示与用于运行的 DNA 样本和 probe 特征相关的运行细节。将显示将在运行中使用的 pre-capture 和 post-capture PCR cycle 数（基于运行中所用输入 DNA 和 probe 的典型最佳条件）。

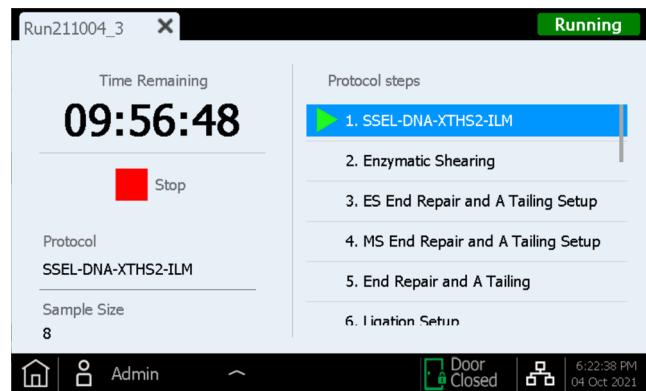


- 3 确认运行设置详细信息后，按开始按钮开始运行。 

运行开始后，LED 指示灯会变为绿色，并且触摸屏会显示运行状态，包括估计的运行完成前剩余时间。包括 Magnis 上 enzymatic fragmentation 的运行需要大约 10 小时，而使用预片段化 DNA 的运行需要大约 9 小时。

为方便起见，可在夜间运行。方案完成后，制备好的文库会自动保存于 12°C。请在 72 小时内从仪器中采集文库。

如果需要，可按红色正方形 **Stop** 按钮中止运行。随即打开一条警告消息，要求您确认是否要中止运行。运行停止后无法再恢复，并且无法为将来的运行重新加载该运行中使用的实验器皿。

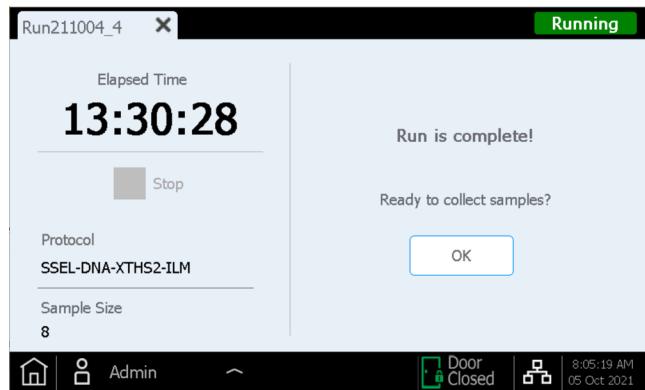


注意

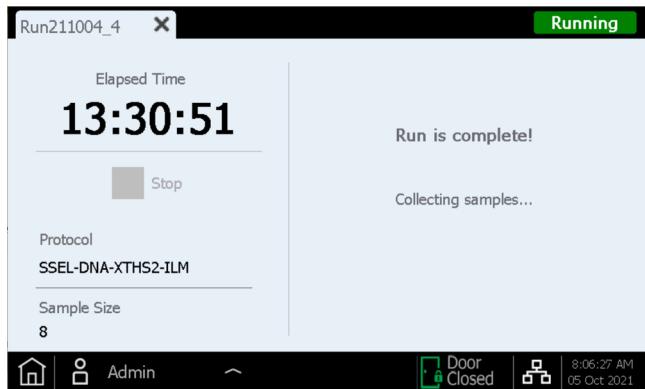
Running 屏幕必须在整个运行期间保持打开状态，在运行过程中屏幕关闭 (x) 按钮和其他导航按钮均处于非激活状态。在运行期间，您无法使用触摸屏执行其他功能。

步骤 6：从仪器中采集最终文库样本

运行完成后，触摸屏会显示以下提示。当准备好从仪器中采集文库样本时，按 **OK**。

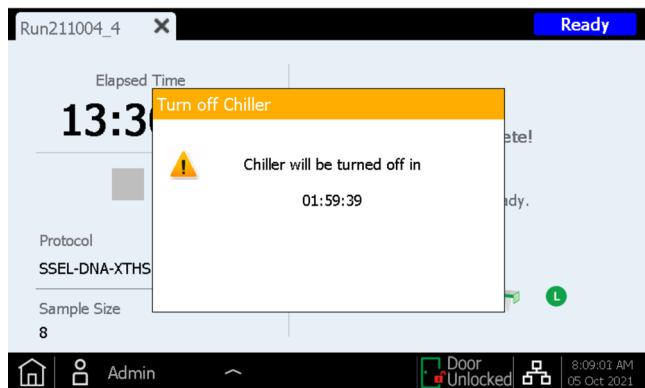


此时，仪器会将制备好的文库溶液从热循环仪中的 PCR 板转移到冷却器中的绿色 Library Output Strip。



等待 LED 指示灯变为蓝色，表示所有仪器介导的样本处理步骤都已完成，再打开仪器门。

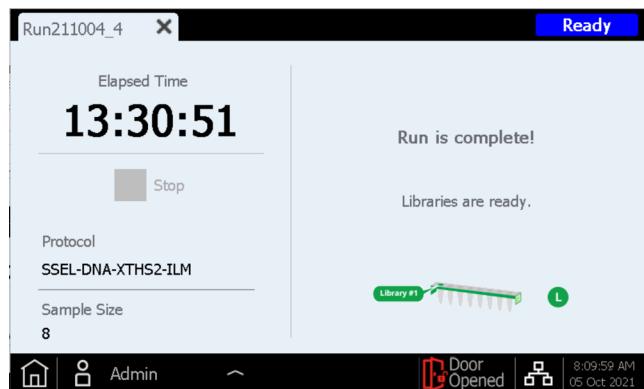
样本被放入冷却器中的绿色 Library Output Strip 后，触摸显示屏显示如下。包含文库样本的冷却器被保持在 12°C 下最多 2 小时，触摸屏对话框中会指示剩余的冷藏时间，如下所示。仪器门打开后，冷却器即会关闭。



完全打开仪器门（直到 LED 指示灯变为白色）并从冷却器模块的 L 位置采集绿色 Library Output Strip 中的最终文库样本。使用新的铝箔密封带（在 Library Output 和 QC strip 排管包中提供）重新密封孔。最终靶标富集文库位于约 20–23 μL Low TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5–8.0, 0.1 mM EDTA) 中。根据您的研究设计，将文库置于合适的储存条件下（储存建议参见第 54 页）。

用于 DNA 测序的文库处理指南参见第 52 页的“附录 3：运行后 DNA 样本的 NGS 处理指南”。

打开门进行文库样本采集后，触摸屏将显示如下。



按选项卡上的 X 关闭运行屏幕，以返回 Home 屏幕。

注意

关闭屏幕可能需要几秒钟。请勿反复按 X 按钮。

可选 Pre-Capture Library QC 样本的处理

如果采集了可选 pre-capture library QC 样本用于运行，则从冷却器模块中取出蓝色 QC Strip。通过将未密封的 QC Strip 留在室温下直到样本干燥，以此来干燥孔中的 DNA。QC 样本可储存于干燥条件下，直到对测序文库进行分析。

注意

由于在运行期间采集 3 μL 等分试样后 QC Strip 保持未密封状态，因此 QC 样本在运行结束时可能会显得干燥或部分干燥。样本应在储存或复溶前完全干燥，以确保获得准确的 QC 结果。

如需分析 QC 样本，则使用 Agilent's TapeStation 系统和 D1000 ScreenTape 检测或类似分析工具将干燥样本重悬于 6 μL 无核酸酶水中，以达到适合分析的浓度。向每个孔中加入 6 μL 水后，在室温下孵育 5–10 分钟，然后通过涡旋充分混合以确保完全重悬。

预期结果：对于高质量输入 DNA，典型预捕获文库的 DNA 片段大小峰值介于 300 和 400 bp 之间，FFPE 来源的输入 DNA 介于 200 和 400 bp 之间。

根据输入 DNA 质量和 pre-capture PCR cycle 数，已干燥并在 6 μL 水中重悬的 QC 样本应具备约 30–100 ng/ μL 的浓度。预捕获文库总得率的计算方法为：1 μL 复溶 QC 样本中的 DNA 量 \times 36（包括稀释和取样调整）。

步骤 7：运行后清理仪器

移除并处置仪器台面上剩余的所有已使用耗材：

- 从 Waste Bin 抽屉中取出已装满的吸头 Waste Bin，然后关闭抽屉
- 从 HSM 模块中取出用过的 Deep-Well HSM plate
- 从 PCR 模块中取出用过的 96-Well PCR Plate 和 Thermal cycler seal
- 移除所有吸头盒，包括任何未完全装满的吸头盒
- 从台面中央板座上取下用过的深孔 Beads/Buffers Plate
- 打开冷却器模块，取下用过的 Reagent Plate 和用过的红色、黑色和白色排管。确保从冷却器中取出所有绿色 Library Output (L) strip 管和蓝色 QC sample (Q) strip 管，并保留用于进一步处理。

注意

在开始新的运行之前，务必从仪器台面移除所有实验器皿和所有其他杂散材料。启动新运行时，台面上存在任何材料都可能导致新运行的 Instrument Health Check 失败。

如果发现仪器台面上有任何溢出或泄漏的材料，Agilent 建议运行 UV 去污染 Extended Cycle 程序（有关 UV 污染的更多信息，请参见[第 18 页](#)）。使用酒精或稀释漂白剂擦拭布清洁溢出物（请参见第 12 页的[表 6](#)；完整清洁说明，请参见[仪器用户指南](#)）。

处置

按照国家、联邦、州和地方法规，处置未使用的试剂、废物和标本。

3

附录 1：DNA 样本制备指南

I. 制备用于 Magnis 运行的高质量 DNA 样本	44
步骤 1：制备、定量和定性基因组 DNA 样本	44
步骤 2：稀释用于运行的 DNA 样本	44
步骤 3：剪切 DNA（仅在没有 enzymatic fragmentation 的情况下运行）	45
II. 制备用于 Magnis 运行的 FFPE 来源 DNA 样本	46
步骤 1：从 FFPE 样本制备基因组 DNA	46
步骤 2：定性和定量 FFPE DNA 样本	46
步骤 3：稀释用于运行的合格 FFPE DNA 样本	47
步骤 4：剪切 FFPE DNA（仅在没有 enzymatic fragmentation 的情况下运行）	48

在设置 Magnis SureSelect XT HS2 DNA 测序文库制备运行之前，必须根据本附录中的指南制备、定量、定性 DNA 样本。

Magnis 文库制备方案同时适用于从新鲜或新鲜冷冻样本制备的高质量 gDNA 和从 FFPE 样本制备的低质量 DNA。对于高质量 gDNA 样本，请参见[第 44 页](#)。对于 FFPE 来源 DNA 样本，请参见[第 46 页](#)。

Magnis 运行可包括 10 ng、50 ng、100 ng 或 200 ng 的输入 DNA。要获得最佳测序结果，请使用此范围内可用的最大输入 DNA 量。对于同一次运行中的所有样本，DNA 的起始量（输入量）必须相同。Magnis Sample Input Strip（以板形式提供的红色排管，部件号 5190-9882 或 5191-5676）以及所有输入 DNA 样本制备和稀释试剂仅应在实验室的 PCR 前区域储存和使用。

在制备 NGS 文库之前，所有的 DNA 样本必须通过 Magnis 自动化 enzymatic fragmentation 或非自动化机械剪切的方式进行片段化。本附录中提供了对高质量和 FFPE 来源的 DNA 样本进行非自动化 Covaris 剪切的方案。

当使用 Magnis 自动化 enzymatic fragmentation 时，对大多数工作流程而言，自动化方案中使用的默认时长（25 分钟）最佳。对于使用高质量 DNA 样本和较长 NGS 读长的工作流程，建议缩短 enzymatic fragmentation 的时长（ ≥ 150 bp 读段），以增加 DNA 片段的大小分布。指南总结请参见[表 9](#)。在运行设置过程中，可以对自动化 enzymatic fragmentation 的时长进行调整，如[第 38 页](#)所述。

表 9 Magnis 自动化 enzymatic fragmentation 时长指南

NGS 读长	推荐的自动化 enzymatic fragmentation 时长	
	高质量 DNA 样本	FFPE DNA 样本
2 × 100 读段	25 分钟	25 分钟
2 × 150 读段	15 分钟	25 分钟

I. 制备用于 Magnis 运行的高质量 DNA 样本

步骤 1：制备、定量和定性基因组 DNA 样本

- 1 使用合适的纯化系统（如 Qiagen QIAamp DNA Mini Kit），按照制造商的方案，从新鲜或冷冻的生物样本制备高质量 gDNA。

注意

确保基因组 DNA 样本具有高质量，OD 260/280 比值范围为 1.8 至 2.0。

- 2 使用 Qubit BR dsDNA Assay Kit 测定每个 gDNA 样本的浓度。按照制造商提供的仪器和检测试剂盒说明进行操作。

步骤 2：稀释用于运行的 DNA 样本

- 1 使用所选择的片段化方法，按照表 10 中所示的量稀释 1X Low TE Buffer 中适当量（10 ng、50 ng、100 ng 或 200 ng）的各 gDNA 样本，制备文库制备所需的各 DNA 样本。将样本保存于冰上。

表 10 DNA 样本稀释参数

片段化方法	溶剂	最终样本体积
Enzymatic fragmentation (Magnis 自动化)	1X Low TE Buffer	14 μ L
使用 Covaris 进行机械剪切 (非自动化)	1X Low TE Buffer	50 μ L

注意

请勿稀释要用水进行剪切的样本。在水中片段化样本会降低整体文库制备收率和复杂性。

- 2 对于包含 Magnis 自动化 DNA 片段化的运行，请查看第 21 页，并按照说明将未剪切的 DNA 样本填充至 sample input strips。

对于使用非自动化 Covaris 剪切的运行，请查看下面的 DNA 剪切说明。

步骤 3：剪切 DNA（仅在没有 enzymatic fragmentation 的情况下运行）

在此步骤中，使用针对高质量 DNA 优化的条件剪切 50 μ L gDNA 样本，总结见表 11。

表 11 高质量的 DNA 片段化指南

计划的 NGS 读长	靶片段大小	最佳片段化时长
2 \times 100 读段	150 至 200 bp	2 \times 120 秒
2 \times 150 读段	180 至 250 bp	2 \times 60 秒

注意

该方案已使用 Covaris E220 型仪器和 130 μ L Covaris microTUBE 进行了优化。若要使用其他 Covaris 仪器或样本架，请参见制造商的相关建议，以获得相同的靶 DNA 片段大小。

- 1 根据制造商的说明，设置 Covaris 仪器。在启动剪切方案之前，为仪器排气和水浴冷却留出足够的时间（通常为 30–60 分钟）。
- 2 对于每个 gDNA 样本，完成下面的 DNA 片段化步骤。
 - a 使用锥形移液吸头通过盖子的预开口垫缓慢转移样本，将 50 μ L DNA 样本转移到 Covaris microTUBE 中。
 - b 离心 microTUBE 30 秒，以收集液体并除去管底部的所有气泡。
 - c 将 microTUBE 固定在管架中，并使用表 12 中的设置剪切 DNA。剪切后，直接进入下一步，请勿将已剪切 DNA 留在 Covaris microTUBE 中超过要求的时间。

表 12 Covaris E 系列仪器（SonoLab 软件 v7 或更高版本）的高质量 DNA 剪切设置

设置	数值	方法详情
工作系数	10%	—
峰值入射功率 (PIP)	175	—
循环破碎系数	200	—
水浴温度	2 至 8°C	—
处理时间	2 \times 100 bp NGS 为 2 \times 120 秒 或 2 \times 150 bp NGS 为 2 \times 60 秒	<ul style="list-style-type: none">片段化 120 秒 或 60 秒将 microTUBE 离心 10 秒，然后高速涡旋 5 秒，再离心 10 秒，收集液体再次重复整个过程，在整个过程中保持样本在 microTUBE 中

- 3 将含有已剪切 DNA 的 Covaris microTUBE 放回装载和卸载站。保持 microTUBE 弹扣盖打开，将移液吸头插入预开口垫，然后慢慢移除已剪切 DNA。
- 4 查看第 21 页，并按照说明将每个已剪切 DNA 样本填充至 sample input strip。

注意

为避免低丰度 DNA 样本在此步骤中的损失，在将 DNA 转移到 Magnis Sample Input Strip 后，短暂离心 microTUBE，并将所有残留液体转移到同一孔中。目视检查 microTUBE，确保已转移所有样本。如果 microTUBE 中留有液滴，请重复离心和转移步骤。

II. 制备用于 Magnis 运行的 FFPE 来源 DNA 样本

步骤 1：从 FFPE 样本制备基因组 DNA

使用 Qiagen QIAamp DNA FFPE Tissue Kit 和 Qiagen Deparaffinization Solution，按照制造商的方案从 FFPE 组织切片制备 gDNA。分两轮从 MinElute 柱洗脱最终 gDNA 样本，每轮使用 30 μ L Buffer ATE，最终洗脱体积约为 60 μ L。

注意

如果用 Proteinase K 消化 1 小时后组织裂解不完全，则再加入 10 μ L Proteinase K，继续在 56°C 下孵育并定时混合，持续最多 3 小时。

在冰上保存 gDNA 样本以供当天文库制备，或在 -20°C 下储存以备后续处理。

步骤 2：定性和定量 FFPE DNA 样本

使用以下两种方法之一，评估每个 FFPE 来源 DNA 样本的质量（DNA 完整性）。在该步骤中测定的 DNA 完整性决定了在运行中包括 10 ng、50 ng、100 ng 或 200 ng 可扩增 gDNA 样本所需的适当样本定量方法。

方法选项 1：使用 Agilent NGS FFPE QC Kit 进行定性（推荐方法）

Agilent NGS FFPE QC Kit 提供基于 qPCR 的检测试剂，用于测定 DNA 样本的完整性。结果包括 $\Delta\Delta Cq$ DNA 完整性评分和样本中可扩增 DNA 的精确数量，允许直接归一化每个样本的 DNA 输入。[表 13](#) 汇总了基于各个样本 $\Delta\Delta Cq$ 评分的 DNA 起始量建议。

- 1 使用 Qubit BR dsDNA Assay Kit 测定每个 gDNA 样本的浓度。按照制造商提供的仪器和检测试剂盒说明进行操作。
- 2 取 1 μ L 等分试样的 FFPE gDNA 样本，使用 Agilent NGS FFPE QC Kit 进行分析，以确定 $\Delta\Delta Cq$ DNA 完整性评分。有关更多信息，请参见 www.agilent.com 上的试剂盒用户手册。
- 3 对于 $\Delta\Delta Cq$ DNA 完整性评分 ≤ 1 的所有样本，使用上面 [步骤 1](#) 中测定的基于 Qubit 的 gDNA 浓度，来确定方案所需的输入 DNA 体积。
- 4 对于 $\Delta\Delta Cq$ DNA 完整性评分 > 1 的所有样本，使用根据 Agilent NGS FFPE QC Kit 结果报告的基于 qPCR 的可扩增 gDNA 浓度，来确定方案的输入 DNA 量。

表 13 基于 $\Delta\Delta Cq$ DNA 完整性评分的 SureSelect XT HS2 DNA 输入量修改

方案参数	$\Delta\Delta Cq \leq 1^*$	$\Delta\Delta Cq > 1$
用于文库制备的 DNA 输入	10 ng、50 ng、100 ng 或 200 ng DNA，基于 Qubit Assay	10 ng、50 ng、100 ng 或 200 ng 可扩增 DNA，基于 qPCR 定量

* 对于 $\Delta\Delta Cq$ 评分 ≤ 1 的 FFPE 样本，应当像非 FFPE 样本一样进行 DNA 输入量测定。对于此类样本，确保使用通过 Qubit Assay 测定的 DNA 浓度（而不是通过 qPCR 测定的浓度），来计算 10–200 ng DNA 所需的样本体积。

方法选项 2：使用 Agilent Genomic DNA ScreenTape 检测 DIN 评分进行定性

结合使用 Agilent Genomic DNA ScreenTape 检测与 Agilent 4200 TapeStation 可提供定量电泳检测，以进行 DNA 样本完整性测定。该检测将报告每个样本的 DNA 完整值 (DIN) 评分，用于估算低完整性 DNA 样本所需的适当归一化 DNA 样本起始量。

- 1 使用 Qubit BR dsDNA Assay Kit 测定每个 gDNA 样本的浓度。按照制造商提供的仪器和检测试剂盒说明进行操作。
- 2 取 1 μ L 等分试样的 FFPE gDNA 样本，并使用 Genomic DNA ScreenTape 检测进行分析。有关更多信息，请参见 www.agilent.com 上的用户手册。
- 3 使用 Genomic DNA ScreenTape 检测中报告的每个样本的 DIN 评分，参考表 14 确定该样本的建议起始 DNA 量。

表 14 基于 DNA Integrity Number (DIN) 评分的 SureSelect XT HS2 DNA 输入量修改

方案参数	非 FFPE 样本	FFPE 样本	DIN > 8*	DIN 3-8	DIN < 3
用于文库制备的 DNA 输入	10 ng、50 ng、100 ng 或 200 ng DNA，通过 Qubit Assay 定量	10 ng、50 ng、100 ng 或 200 ng DNA，通过 Qubit Assay 定量	使用 50 ng、100 ng 或 200 ng DNA (使用最大可用 DNA 量，最多 200 ng)。通过 Qubit Assay 进行定量，以确定 50 ng、100 ng 或 200 ng 输入量所需的体积。	使用 50 ng、100 ng 或 200 ng DNA (使用最大可用 DNA 量，最多 200 ng)。通过 Qubit Assay 进行定量，以确定 50 ng、100 ng 或 200 ng 输入量所需的体积。	使用 100 ng 或 200 ng DNA (使用最大可用 DNA 量，最多 200 ng)。通过 Qubit Assay 进行定量，以确定 100 ng 或 200 ng 输入量所需的体积。

* 对于 DIN>8 的 FFPE 样本，应当像非 FFPE 样本一样进行 DNA 输入量测定。

步骤 3：稀释用于运行的合格 FFPE DNA 样本

- 1 使用所选择的片段化方法，按照表 15 中所示的量稀释 1X Low TE Buffer 中适当量 (10 ng、50 ng、100 ng 或 200 ng) 的各 gDNA 样本，制备文库制备所需的各 DNA 样本。将样本保存于冰上。

表 15 DNA 样本稀释参数

片段化方法	溶剂	最终样本体积
Enzymatic fragmentation (Magnis 自动化)	1X Low TE Buffer	14 μ L
使用 Covaris 进行机械剪切 (非自动化)	1X Low TE Buffer	50 μ L

注意

请勿稀释要用水进行剪切的样本。在水中片段化样本会降低整体文库制备收率和复杂性。

- 2 对于包含 Magnis 自动化 DNA 片段化的运行，请查看第 21 页，并按照说明将未剪切的 DNA 样本填充至 sample input strips。

对于使用非自动化 Covaris 剪切的运行，请查看下面的 DNA 剪切说明。

步骤 4：剪切 FFPE DNA（仅在没有 enzymatic fragmentation 的情况下运行）

在此步骤中，使用针对 FFPE 来源 DNA 优化的条件片段化 50 μ L gDNA 样本，总结见表 16。

表 16 FFPE 来源 DNA 的片段化指南

计划的 NGS 读长	靶片段大小*	最佳片段化时长†
2 \times 100 读段	150 至 200 bp	240 秒
2 \times 150 读段	180 至 250 bp	240 秒

* 该表显示了每种读长的理想目标片段大小。FFPE 来源样本的初始 DNA 片段大小可能影响剪切后的片段大小分布，导致片段大小短于本表所列的目标范围。应使用适合最终文库片段大小分布的 NGS 读长，对使用 FFPE 样本制备的文库进行分析。

† 所有 FFPE 样本均经 240 秒的片段化，以生成适合用于建库的片段末端。

注意

该方案已使用 Covaris E220 型仪器和 130 μ L Covaris microTUBE 进行了优化。若要使用其他 Covaris 仪器或样本架，请参见制造商的相关建议，以获得相似的靶片段大小。

- 1 根据制造商的说明，设置 Covaris 仪器。在启动剪切方案之前，为仪器排气和水浴冷却留出足够的时间（通常为 30–60 分钟）。
- 2 对于每个 gDNA 样本，完成下面的 DNA 片段化步骤。
 - a 使用锥形移液吸头通过盖子的预开口垫缓慢转移样本，将 50 μ L DNA 样本转移到 Covaris microTUBE 中。
 - b 离心 microTUBE 30 秒，以收集液体并除去管底部的所有气泡。
 - c 将 microTUBE 固定在管架中，并使用表 17 中的设置剪切 DNA。剪切后，直接进入下一步，请勿将已剪切 DNA 留在 Covaris microTUBE 中超过要求的时间。

表 17 Covaris E 系列仪器（SonoLab 软件 v7 或更高版本）的 FFPE DNA 剪切设置

设置	数值
工作系数	10%
峰值入射功率 (PIP)	175
循环破碎系数	200
水浴温度	2 至 8°C
处理时间	240 秒

- 3 将含有已剪切 DNA 的 Covaris microTUBE 放回装载和卸载站。保持 microTUBE 弹扣盖打开，将移液吸头插入预开口垫，然后慢慢移除已剪切 DNA。
- 4 查看第 21 页，并按照说明将每个已剪切 FFPE DNA 样本填充至 sample input strip。

注意

为避免低丰度 DNA 样本在此步骤中的损失，在将 DNA 转移到 Magnis Sample Input Strip 后，短暂离心 microTUBE，并将所有残留液体转移到同一孔中。目视检查 microTUBE，确保已转移所有样本。如果 microTUBE 中留有液滴，请重复离心和转移步骤。

4

附录 2：使用运行时准备的 Probe Strip

运行时准备 Empty Probe Input Strip (EPIS) [50](#)

在运行设置期间输入 Probe 信息 [51](#)

本节中的说明特别适用于在 *SSEL-DNA-XTHS2-EPIS-ILM* Magnis 方案运行中自填充 probe strips 的制备和使用，以及使用部件号 G9750B 的试剂盒（随附有空 Probe Input Strips 的 Magnis SureSelect XT HS2 DNA Reagent Kit）进行的设置。*SSEL-DNA-XTHS2-EPIS-ILM* Magnis 方案需要在运行时填充所提供的空 probe strips，还需要进行额外的 probe 数据输入步骤，如本节所述。

本节中的说明不适用于包含预填充 probe strips 的试剂盒；有关预填充 probe strip 设置的信息，请参见[第 22 页](#)。

运行时准备 Empty Probe Input Strip (EPIS)

空 Magnis Probe Input Strips (部件号 5190-9883, 以板形式提供的白色排管) 应在实验室的 PCR 前区域储存和加填充。在 SSEL-DNA-XTHS2-EPIS-ILM 运行中使用前准备好 probe input strips；请勿预先填充和冻融本方案中使用的 probe input strips。

空 Magnis Probe Input Strip 的 8 个孔可以填充相同或不同的 probe 溶液。但是，相同运行中使用的所有 probes 必须具有相似的设计尺寸，以允许 Magnis 使用相同的运行条件 (有关兼容的 probe 设计尺寸范围，请参见第 51 页的 [表 19](#))。

- 1 从部件号为 5190-9883 的套件中取一个空的白色 Magnis Probe Input Strip 和一个新的铝箔密封带 (带背衬)，储存在室温下。
- 2 解冻并混合要用于运行的 SureSelect Probe 小瓶，保存于冰上。
- 3 请参考下面的 [表 18](#) 确定您的 probe 设计尺寸所需的 SureSelect Probe 溶液量。

表 18 Probe 量要求

Probe Capture Size	每个孔的移液量	运行 8 个样本所需的量	Enter Run Info 屏幕上的选定 Protocol
≥3 Mb (Large Capture Size)*	5 μ L	40 μ L	SSEL-DNA-XTHS2-EPIS-ILM
<3 Mb (Small Capture Size)*	2 μ L	16 μ L	

* 运行中使用的 probe 的 Large 与 Small Capture Size 输入上详述的 Magnis 软件 [第 51 页](#)。一次运行中使用的所有 probe 必须具有相同的 Capture Size，并且必须使用相同的捕获后 PCR 循环条件 (参见 [第 51 页](#) 上的 [表 19](#))。

- 4 按照以下步骤，在空 Magnis Probe Input Strip 的孔中填充适当量的 SureSelect Probe 溶液：
 - a 用一个空的 200 μ L 的移液器吸头预先穿透 probe input strip 的每个孔的铝箔密封带，以备运行时填充。
 - b 使用合格的微量移液器精确分配 [表 18](#) 中列出的 probe 量，将指定数量的 SureSelect Probe 溶液分配到每个孔中。

在分配 2 μ L 的 probe 时，请使用容量为 2 μ L 的微量移液器和移液器吸头。

在分配 5 μ L 的 probe 时，请使用容量为 10 μ L 的微量移液器和移液器吸头。

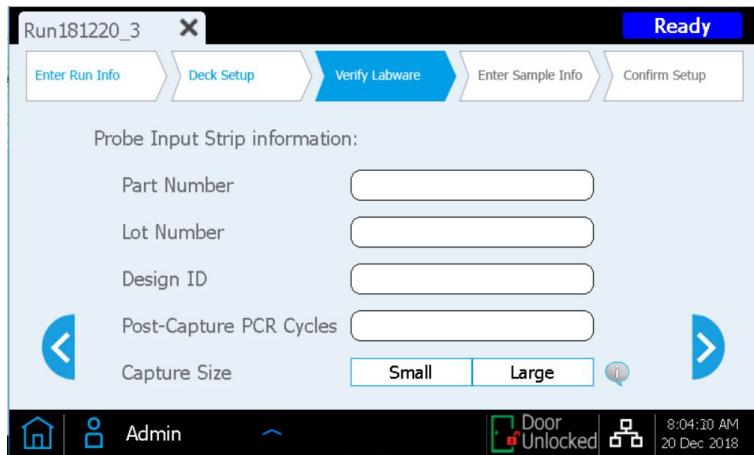
注意

重要的是，要精确使用 [表 18](#) 中所示的量填充 probe input strip。使用合格的校准后移液器，以高准确性和精确度分配指定的量。

- 5 将 probe 溶液分配到所有孔中后，用套件中提供的新铝箔密封带重新密封孔，小心不要使铝箔密封带挡住 probe strip 条形码。确保铝箔密封带均匀牢固的密封覆盖好，避免铝箔密封带过多延伸或者褶皱，这可能会妨碍排管在仪器中放置平稳。
- 6 目视检查 probe strip 孔，确认不存在气泡。通过在设为 $250 \times g$ 的离心机中离心准备的 probe strip 5 秒钟或直到 probe 溶液中的所有气泡均已释放，去除所有气泡。
- 7 在 SSEL-DNA-XTHS2-EPIS-ILM 运行中使用之前，将 probe strip 保存于冰上。在 [第 34 页](#) 上描述的台面设置步骤中，装载填充好的 probe strip。在装载 probe strip 时，务必确认排管已正确放置在冷却器模块中。

在运行设置期间输入 Probe 信息

对于 **SSEL-DNA-XTHS2-EPIS-ILM** 的运行，必须在运行设置的 *Verify Labware* 阶段中在如下字段中输入 probe 相关属性（参见第 36 页）。



根据您所在机构的记录保存要求，在 *Part Number*、*Lot Number* 和 *Design ID* 字段中输入信息。对于 Agilent 提供的 SureSelect 或 ClearSeq probes，*Design ID* 和 *Lot Number* 在产品小瓶和分析证书上提供。

根据 Probe 设计的大小，在 *Post-Capture PCR Cycles* 字段中输入运行中要使用的 PCR 循环数，并针对运行中使用的 Probe 点按相应的 *Capture Size* 类型。相关指南请参见下面的表 19。建议的 PCR 循环数对于列出的 Probe 设计大小通常是最佳的，但可以调整 PCR 循环数以满足您的实验设计需要。虽然 Magnis Probe Input Strip 的 8 个孔中可能含有不同的 probe 溶液，但在同一次运行中使用的所有 probes 必须使用相同的 *Post-Capture PCR Cycles* 和 *Capture Size* 设置。

表 19 运行时分配的 probe 的建议设置

SureSelect XT HS Probe Size	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

填充所有字段后，按向前箭头进入 *Enter Sample Info* 屏幕，然后执行从第 37 页开始的其余运行设置步骤。

5

附录 3：运行后 DNA 样本的 NGS 处理指南

步骤 1：定量和定性 DNA 文库 53

步骤 2：合并样本以进行多样本混合测序（可选） 55

步骤 3：制备测序样本 56

步骤 4：对文库进行测序 57

步骤 5：处理读段 58

在完成 Magnis SureSelect XT HS2 DNA 文库制备运行后，需要对 DNA 样本进行定量和定性，然后通过 NGS 进行分析。本节提供了典型的运行后样本 NGS 处理指南；您的运行后 NGS 处理和分析工作流程可能会有所不同。

步骤 1：定量和定性 DNA 文库

在进行多重测序的样本合并之前，使用 Agilent TapeStation 仪器以及 High Sensitivity D1000 ScreenTape 和相关试剂盒进行分析，以定量和定性各个制备的 DNA 文库。有关订购信息，请参见第 11 页的 [表 3](#)。有关详细说明，请参见 [Agilent High Sensitivity D1000 Assay Quick Guide](#)。

注意

或者，可以使用 Agilent 5200 Fragment Analyzer 和 [HS NGS Fragment Kit](#) 或使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 [Bioanalyzer High Sensitivity DNA Assay](#) 对文库 DNA 样本进行分析。有关完整说明，请参见链接的检测用户指南。

- 1 按照[分析快速指南](#)中的说明，在新的排管中制备 TapeStation 检测样本。将 2 μ L 的每个 DNA 文库用 2 μ L High Sensitivity D1000 Sample Buffer 稀释以供分析。

小心

确保按照[分析快速指南](#)中的说明，在 IKA 涡旋混合器上彻底混合已合并的 DNA 和样本缓冲液，以进行准确定量。

- 2 按照[分析快速指南](#)中的说明，将[步骤 1](#)中准备的 High Sensitivity D1000 检测排管、High Sensitivity D1000 ScreenTape 和装载吸头装载到 TapeStation 中。开始运行。
- 3 确认电泳图显示的 DNA 片段大小峰值介于 200 与 400 bp 之间。样本电泳图显示在[图 7](#)（由高质量 DNA 制备的文库）、[图 8](#)（由中等质量 FFPE DNA 制备的文库）和[图 9](#)（由低质量 FFPE DNA 制备的文库）中。
- 4 通过对整个峰求积分，确定每个文库的浓度。

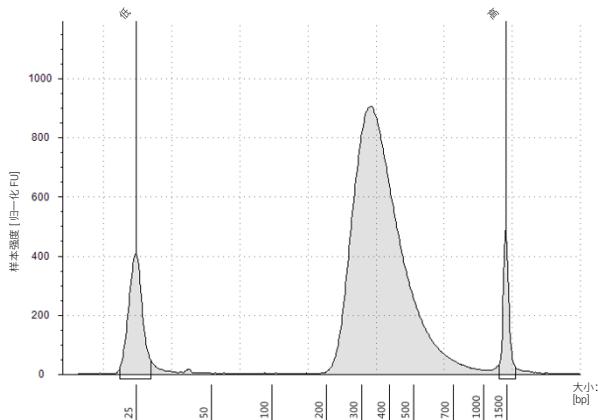


图 7 使用 High Sensitivity D1000 ScreenTape 检测试剂分析由高质量 gDNA 样本制备的捕获后文库。

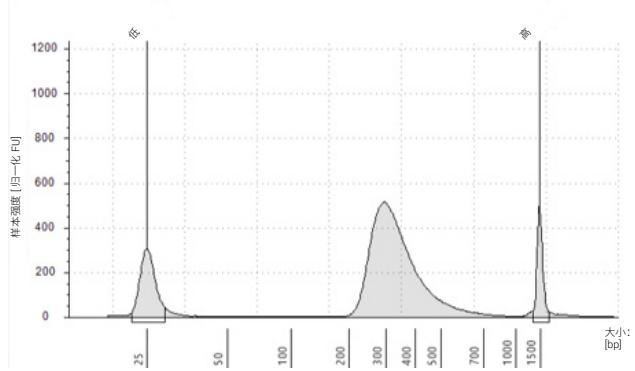


图 8 使用 High Sensitivity D1000 ScreenTape 检测分析的由典型 FFPE gDNA 样本制备的捕获后文库。

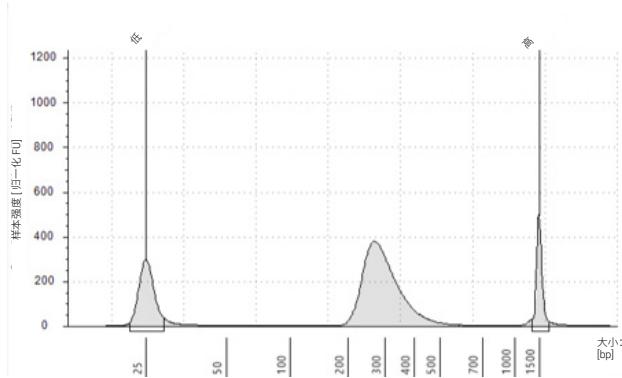


图 9 使用 High Sensitivity D1000 ScreenTape 检测分析的由低质量 FFPE gDNA 样本制备的捕获后文库。

停止时间点 如果不继续下一步，将样本在 4°C 下储存过夜或在 -20°C 下长期储存。

步骤 2：合并样本以进行多样本混合测序（可选）

在一个测序通道中可以同时混合多少标签样本进行测序，取决于测序仪的容量以及研究所需的测序数据量来共同确定。根据测序仪的通量和每个样本所需的测序数据量，计算每个测序通道可以组合的标签数量。

使用以下其中一种方法合并这些文库，使每个标签标记的文库在混合文库中以等摩尔量存在。使用测序供应商指定的稀释剂（如 Low TE）进行稀释步骤。

方法 1：将每个待合并的文库样本稀释至相同的最终浓度（通常为 4–15 nM，或最稀样本的浓度），然后将等体积的所有样本合并以创建最终的混合文库。

方法 2：以不同浓度的文库样本开始，加入适当的体积使每个文库样本在混个文库中达到等摩尔浓度，然后使用 Low TE 将混合文库调节至所需的最终体积。下面的公式用于确定要添加到池中的每个标签样本的量。

$$\text{标签体积} = \frac{V(f) \times C(f)}{\# \times C(i)}$$

其中 $V(f)$ 是所需的最终混合文库体积，

$C(f)$ 是混合文库中所有 DNA 所需的最终浓度（通常为 4 nM–15 nM 或最稀样本的浓度）

是标签的数量，以及

$C(i)$ 是每个标签样本的初始浓度

表 20 显示了制备浓度为 10 nM DNA、最终体积为 20 μ L 的样本所需的 4 个（不同浓度）标签标记样本和 Low TE 的量。

表 20 制备浓度为 10 nM、总体积为 20 μ L 的样本的体积计算示例

组分	V(f)	C(i)	C(f)	#	所用体积 (μ L)
样本 1	20 μ L	20 nM	10 nM	4	2.5
样本 2	20 μ L	10 nM	10 nM	4	5
样本 3	20 μ L	17 nM	10 nM	4	2.9
样本 4	20 μ L	25 nM	10 nM	4	2
Low TE					7.6

将文库池储存在测序提供商指定的条件下。通常，文库应短期储存在 -20°C 下。

步骤 3：制备测序样本

最终 SureSelect XT HS2 混合文库已准备好，可使用标准 Illumina 双端引物和化学反应进行直接测序。制备的文库中的每个片段均含有一个靶向插入片段，其被使用 Illumina 测序仪进行多样本混合测序所需的序列基序包围，如图 10 所示。

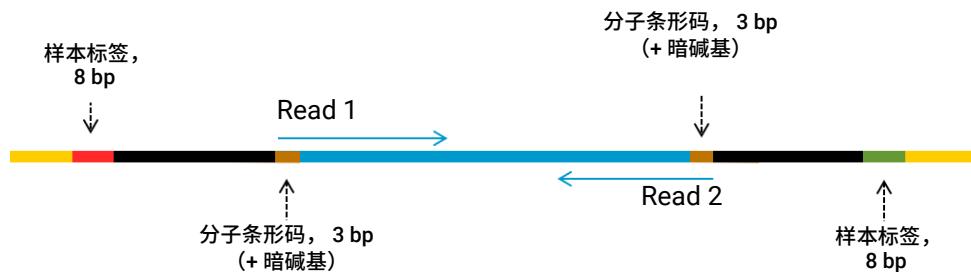


图 10 SureSelect XT HS2 测序文库的序列。每一个片段包含，一个目的插入片段（蓝色）、插入片段周围是 Illumina 双端测序元件（黑色）、唯一双样本标签（红色和绿色）、分子条形码（MBC；棕色）以及文库 PCR 引物（黄色）。

使用适当的 Illumina Paired-End Cluster Generation Kit 进行簇扩增。表 21 针对适合此应用的多种仪器和化学反应组合提供使用指南。对于其他 Illumina NGS 平台，请查阅 Illumina 的文件，了解试剂盒配置和接种浓度指南。

表 21 Illumina 试剂盒配置选择指南

仪器	运行类型	读段长度	SBS 试剂盒配置	化学反应	接种浓度
MiSeq	所有运行	2 × 100 bp 或	300 次循环试剂盒	v2	9–10 pM
		2 × 150 bp	600 次循环试剂盒	v3	12–16 pM
iSeq 100	所有运行	2 × 100 bp 或 2 × 150 bp	300 次循环试剂盒	v2	50–150 pM
NextSeq 500/550	所有运行	2 × 100 bp 或 2 × 150 bp	300 次循环试剂盒	v2.5	1.2–1.5 pM
NextSeq 1000/2000	所有运行	2 × 100 bp 或 2 × 150 bp	200 或 300 次循环试剂盒	标准 SBS	650–1000 pM
				XLEAP-SBS	650–1000 pM
NovaSeq 6000	标准工作流程运行	2 × 100 bp 或 2 × 150 bp	200 或 300 次循环试剂盒	v1.5	300–600 pM
NovaSeq 6000	Xp 工作流程运行	2 × 100 bp 或 2 × 150 bp	200 或 300 次循环试剂盒	v1.5	200–400 pM
NovaSeq X	所有运行	2 × 100 bp 或 2 × 150 bp	200 或 300 次循环试剂盒	v1	90–180 pM

此外，可能还需要根据文库的 DNA 片段大小范围以及所需的通量和数据质量来优化接种浓度和簇密度。使用表 21 中所列的或 Illumina 提供的范围中间的接种浓度开始优化。遵循 Illumina 提供的有关将 PhiX 对照品用作低浓度加标对照品的建议，以改善测序质量控制。

步骤 4：对文库进行测序

设置测序运行，为使用仪器的单机模式软件或使用 Local Run Manager (LRM)、 Illumina Experiment Manager (IEM) 或 BaseSpace 等 Illumina 运行管理工具的各个样本生成 Read 1 和 Read 2 FASTQ 文件。为您的文库读长以及使用 8-bp dual index 读段输入相应的 **Cycles** 或 **Read Length** 值。有关 2 x 150 bp 测序的示例设置，请参见表 22。

表 22 2 x 150 bp 测序的运行设置

运行段	Cycles/Read Length
Read 1	151*
Index 1 (i7)	8
Index 2 (i5)	8
Read 2	151*

* 按照 Illumina 的建议，为所需读长额外增加一 (1) 个周期。

遵循 Illumina 针对各个平台和设置软件选项提供的说明，并结合下面的附加设置指南：

- 各样本级标签 (i7 和 i5) 均需 8-bp 标签读段。有关完整的标签序列信息，请参见第 63 页。
- SureSelect XT HS2 文库测序未使用自定义引物。在运行设置期间，清除或取消选择 *Read 1*、*Read 2*、*Index 1* 和 *Index 2* 的 *Custom Primers* 选项。
- 关闭 Illumina 的运行设置和读段处理软件应用中所含的任何接头修剪工具。在后续处理步骤中使用 Agilent 软件工具对接头进行修剪，以确保正确处理接头，包括接头序列中的简并分子条形码 (MBC)。
- 对于使用 Illumina LRM、IEM 或 BaseSpace 应用程序进行的运行设置，请参考 Illumina 针对使用选定软件中的自定义文库制备试剂盒和标签试剂盒设置运行提供的说明和支持资源。如需用于这些应用程序，SureSelect XT HS2 标签序列可通过从 Agilent.com 下载 **SureSelect XT HS2 Index Sequence Resource** Excel 电子表格获取。提供的序列应转换为 .tsv/.csv 文件格式，或复制到 Sample Sheet，并遵循 Illumina 针对每个应用程序的规范。如果您在所选应用中需要 SureSelect XT HS2 运行设置方面的帮助，请联系 SureSelect 支持团队（参见第 2 页）或您当地的代表。

步骤 5：处理读段

以下是适合 SureSelect XT HS2 DNA 文库的典型 NGS 读段处理和分析流程步骤的指南。您的 NGS 流程可能有所不同。

- 使用 Illumina 的 bcl2fastq、BCL Convert 或 DRAGEN 软件来拆分，根据双标签生成双端读段，并去除 P5 和 P7 标签错配的序列。关闭 Illumina 拆分软件中的 MBC/UMI 修剪选项，以便下游软件工具能够进行正确的接头和 MBC 处理。
- 经拆分的 FASTQ 数据需要预处理，以修剪测序接头，提取并使用 MBC 序列进行去重。Agilent Genomics NextGen Toolkit (AGeNT) 软件模块（如下所述）可用于这些预处理步骤。

注意

也可以使用经过性能验证的合适的开源软件工具（如 fgbio）完成这些读段预处理步骤。如果使用的不是 Agilent 工具，而是其他工具，应对其性能进行验证，以确定其是否能够对两条链上的接头和 MBC 序列进行适当处理。有些非 Agilent 接头修剪器可能无法准确去除对侧接头中的 MBC 序列，从而可能会影响比对质量。

- 如果您的序列分析流程不包含 MBC，在拆分步骤中，您可以使用以下指南，通过修剪或屏蔽每个读段的前五个碱基来去除 MBC。

如果使用 bcl2fastq 来拆分，则可通过包括碱基屏蔽 **N5Y***、**I8**、**I8**、**N5Y*** 来屏蔽 MBC（其中 * 替换为减去 5 个屏蔽碱基后的剩余读长，例如，使用 **N5Y146**、**I8**、**I8**、**N5Y146** 表示 2x150 NGS 设置，如第 57 页的表 22 所示）。N 和 Y 后面的数值之和必须与 RunInfo.xml 文件中的读长值一致。

如果使用 BCL Convert 来拆分，则可以通过在 sample sheet 头中包含以下字符串来修剪 MBC：**OverrideCycles**、**N5Y***；**I8**；**I8**；**N5Y***（其中用修剪后的读长替代 *，例如，使用 **N5Y146**；**I8**；**I8**；**N5Y146** 表示 2x150 NGS 设置，如第 57 页的表 22 所示）。N 和 Y 后面的数值之和必须与 RunInfo.xml 文件中的读长值一致。

AGeNT 软件读段处理指南

Agilent AGeNT 是一个基于 Java 的工具包，用于文库读段处理步骤，专为具有生物信息学专业知识的用户设计，可用于构建内部分析流程。若要下载该工具包，请访问 www.agilent.com 的 AGeNT 页面。AGeNT 读段处理工具的使用简要概述如下。请参见 AGeNT Best Practices 文档了解更多信息。

- 在发现变异之前，对经拆分的 SureSelect XT HS2 文库 FASTQ 数据进行预处理，以去除测序接头，并使用 AGeNT Trimmer 模块提取 MBC 序列。
- 应比对经修剪的读段，并使用 BWA-MEM 等合适工具将 MBC 标签添加至经比对的 BAM 文件。
- 一旦完成比对和标记，就使用 AGeNT CReaK（共有读段工具包）工具来生成共有读段并标记或删除重复读段。生成的 BAM 文件可用于下游分析，包括变异发现。

6 参考信息

试剂盒内容物 [60](#)

SureSelect XT HS2 Indexes 的参考信息 [63](#)

板位置信息 [64](#)

Index 核苷酸序列 [66](#)

运行后跟踪标签标识 [70](#)

故障排除指南 [71](#)

本章包含参考信息，包括试剂盒内容物、标签序列和 SureSelect XT HS2 DNA 文库制备运行的故障排除信息。

试剂盒内容物

Magnis SureSelect XT HS2 DNA Reagent Kit 的 Agilent 部件号汇总于表 23。

表 23 试剂盒部件号

包括 Probe	Magnis SureSelect XT HS2 DNA Reagent Kit	
	96 次反应	32 次反应
定制 1 - 499 kb	G9751B	G9751A
定制 0.5 - 2.9 Mb	G9752B	G9752A
定制 3 - 5.9 Mb	G9753B	G9753A
定制 6 - 11.9 Mb	G9754B	G9754A
定制 12 - 24 Mb	G9755B	G9755A
定制 24 - 50 Mb	G9756B	G9756A
Human All Exon V7	G9773B	G9773A
Human All Exon V8	G9774B	G9774A
SureSelect Clinical Research Exome V4 (CRE V4)	G9775B	G9775A
SureSelect Cancer CGP DNA	G9777B	G9777A
无 (试剂盒包括用于运行时 probe 设置的空 Probe Input Strips)	G9750B	未提供

Magnis SureSelect XT HS2 DNA Reagent Kit 包括在表 24 中列出的组件套件，每个组件套件的内容物在表 25 至表 30 中详述。

表 24 Magnis SureSelect XT HS2 DNA Reagent Kit 随附的组件套件

组件套件名称	储存条件	组件套件货号	
		96 次反应	32 次反应
Magnis SureSelect Probe Plate, Pre-filled Single Well Format	-80°C	货号各异；参见表 25 [*]	部件号各异；参见表 25
Magnis SureSelect XT HS2 Reagent Plates ILM	-20°C	5191-6831	5191-6830
Magnis SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs ILM	-20°C	5191-6833 (Index Pairs 1-96) 或 5191-6835 (Index Pairs 97-192)	5191-6837 (Index Pairs 1-32)
Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plates ILM [†]	+4°C	5190-9692	5191-5674
Magnis Empty Consumables	室温	5190-9712	5191-5675
Magnis Sample Input Strips	室温	5190-9882	5191-5676

^{*} 部件号为 G9750B 的试剂盒不包括 Magnis Probe Plate。相反，G9750B 试剂盒是为运行时 probe 设置而配置的，包括用于 12 次运行的空 Magnis Probe Input Strips (部件号 5190-9883)，在室温下储存。

[†] 提供的 Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plates ILM 与 Magnis SureSelect XT HS2 Reagent Kits 和 Magnis SureSelect XT HS Reagent Kits 兼容。

表 25 Probe Plate 部件号

试剂盒部件号	包括 Probe design	Probe Plate 部件号	每个试剂盒的数量
G9751B (96 次反应)	定制 1–499 kb (Tier 1)	5191-6817	1 板 (12 条)
G9751A (32 次反应)	定制 1–499 kb (Tier 1)	5191-6807	1 板 (4 条)
G9752B (96 次反应)	定制 0.5–2.9 Mb (Tier 2)	5191-6819	1 板 (12 条)
G9752A (32 次反应)	定制 0.5–2.9 Mb (Tier 2)	5191-6809	1 板 (4 条)
G9753B (96 次反应)	定制 3–5.9 Mb (Tier 3)	5191-6821	1 板 (12 条)
G9753A (32 次反应)	定制 3–5.9 Mb (Tier 3)	5191-6811	1 板 (4 条)
G9754B (96 次反应)	定制 6–11.9 Mb (Tier 4)	5191-6823	1 板 (12 条)
G9754A (32 次反应)	定制 6–11.9 Mb (Tier 4)	5191-6813	1 板 (4 条)
G9755B (96 次反应)	定制 12–24 Mb (Tier 5)	5191-6825	1 板 (12 条)
G9755A (32 次反应)	定制 12–24 Mb (Tier 5)	5191-6815	1 板 (4 条)
G9756B (96 次反应)	定制 24–50 Mb	5191-6846	1 板 (12 条)
G9756A (32 次反应)	定制 24–50 Mb	5191-6845	1 板 (4 条)
G9773B (96 次反应)	Human All Exon V7	5191-6827	1 板 (12 条)
G9773A (32 次反应)	Human All Exon V7	5191-6826	1 板 (4 条)
G9774B (96 次反应)	Human All Exon V8	5191-6974	1 板 (12 条)
G9774A (32 次反应)	Human All Exon V8	5191-6973	1 板 (4 条)
G9775B (96 次反应)	SureSelect CRE V4	5282-0042	1 板 (12 条)
G9775A (32 次反应)	SureSelect CRE V4	5282-0041	1 板 (4 条)
G9777B (96 次反应)	SureSelect Cancer CGP DNA	5282-0037	1 板 (12 条)
G9777A (32 次反应)	SureSelect Cancer CGP DNA	5282-0036	1 板 (4 条)

表 26 Magnis SureSelect XT HS2 Reagent Plates ILM 套件的组件

提供的组件	货号 (套件规格)	数量和形式
Magnis SureSelect XT HS2 Reagent Plate ILM	5191-6831 (96 次反应) 5191-6830 (32 次反应)	12 板 (每次运行使用 1 板) 4 板 (每次运行使用 1 板)

表 27 Magnis SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs ILM 套件的组件

提供的组件	货号 (套件规格)	数量和形式
Magnis SureSelect HS2 Index Primer Pairs ILM	5191-6833 (Index Pairs 1-96) 或 5191-6835 (Index Pairs 97-192)	1 板 12 条 (每次运行使用 1 条)
	5191-6837 (32 次反应)	1 板 4 条 (每次运行使用 1 条)

表 28 Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate, ILM 套件的组件

提供的组件	货号 (套件规格)	数量和形式
Magnis SureSelect XT HS Beads/Buffers Plate, ILM	5190-9692 (96 次反应) 5191-5674 (32 次反应)	12 板 (每次运行使用 1 板) 4 板 (每次运行使用 1 板)

表 29 Magnis Empty Consumables 套件的组件

提供的组件	数量和形式*
Magnis Deep-Well HSM Plate	1 板
Magnis 96-Well PCR Plate	1 板
Magnis Library Output Strip	1 个绿色排管
Magnis QC Strip	1 个蓝色排管
Magnis Foil Seals	1 张 (6 条单排管铝箔密封带)
Magnis Thermal Cycler Seal	1 块一次性金属密封板
Magnis Tip Waste Bin	1 个一次性垃圾袋

* 所列为每个单次运行耗材盒的部件。每个 96 次反应试剂盒随附 12 个单独的单次运行耗材盒 (货号 5190-9712) , 每个 32 次反应试剂盒随附 4 个单独的单次运行耗材盒 (货号 5191-5675) 。

表 30 Magnis Sample Input Strip 套件的组件

部件号 (套件规格)	提供的组件	数量和形式
5190-9882 (96 次反应)	Magnis Sample Input Strips Magnis Foil Seals	12 条空的红色铝箔密封排管 2 张 (每张含 6 条单排管铝箔密封带)
5191-5676 (32 次反应)	Magnis Sample Input Strips Magnis Foil Seals	4 条空的红色铝箔密封排管 1 张 (每张含 6 条单排管铝箔密封带)

SureSelect XT HS2 Indexes 的参考信息

Magnis SureSelect XT HS2 Reagent Kits 包括相应的 SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs 组，单次使用等分试样分装在 index strip 管的各个孔中，管置于板平台上。以预合并的形式提供引物对。引物对的每个构件都包含一个独特的 8 bp P7 或 P5 标签，从而产生双标签 NGS 文库。

标签序列可参见 [第 66 页至第 69 页](#)。标签序列也可以通过访问 Agilent.com 下载 [SureSelect XT HS2 Index Sequence Resource](#) Excel 电子表格获取。

注意

单击 Agilent.com 网站上的 Excel 电子表格链接可自动将标签电子表格下载到网络浏览器用于保存下载文件的默认文件夹中。找到文件夹中的文件，用 Microsoft Excel 或其他兼容的电子表格程序打开。电子表格的第一个选项卡为电子表格内容的使用说明。

在第 66 页的 [表 35](#) 至第 69 页的 [表 38](#) 以及可下载的 Excel 电子表格中，P7 标签以正向显示，适用于任何 Illumina 平台。P5 标签以两个方向（正向和反向补码）显示，用于不同的平台和测序运行设置以及管理工具，例如，Local Run Manager 和 Instrument Run Setup。Illumina 测序平台及其 P5 测序方向如 [表 31](#) 所示。在 sample sheet 中或在测序运行设置期间，正确表示 P5 标签方向对于成功拆分至关重要。请参见 Illumina 支持文档和资源，为您的应用确定正确的 P5 标签方向。

表 31 通过 Illumina 平台进行 P5 标签测序定向

P5 标签方向	平台
正向	MiSeq
反向补码*	NovaSeq 6000，配有 v1.5 化学技术 NextSeq 500/550/1000/2000 iSeq 100 MiniSeq

* 与这些平台一起使用的某些运行设置和管理工具会自动创建为运行而输入的 P5 标签序列的反向补码序列。对于流程中所使用的平台和工具组合，请务必查阅 Illumina 的支持文档，以确定在运行设置期间要输入的正确索引方向。

板位置信息

32 次反应试剂盒（部件号 5191-6837）随附的板包含一组四 (4) 条标记为 D1、D2、D3 或 D4 的 index strips，32 个唯一双标签引物对 1-32 中的每一个在单个孔中提供。板分布图请参见表 32。

表 32 32 次反应试剂盒随附的 Magnis SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs 1-32, ILM 的标签分布图

板列	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
排管标签	D1	D2	D3	D4	(板第 5-12 列中没有提供 index strips)							
Index Pair 编号	1	9	17	25	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	10	18	26	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	11	19	27	—	—	—	—	—	—	—	—
	4	12	20	28	—	—	—	—	—	—	—	—
	5	13	21	29	—	—	—	—	—	—	—	—
	6	14	22	30	—	—	—	—	—	—	—	—
	7	15	23	31	—	—	—	—	—	—	—	—
	8	16	24	32	—	—	—	—	—	—	—	—

96 次反应试剂盒随附的板包含一组 12 条 index strips，内含 96 个唯一双标签引物对，每一个在单个孔中提供。试剂盒随附部件号 5191-6833，含引物对 1-96，置于标记为 D1 至 D12 的 index strips，或随附部件号 5191-6835，含引物对 97-192，置于标记为 D13 至 D24 的 index strips。板分布图请参见表 33 和表 34。

表 33 96 次反应试剂盒随附的 Magnis SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs 1-96, ILM 的标签分布图

板列	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
排管标签	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
Index Pair 编号	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96

表 34 96 次反应试剂盒随附的 Magnis SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs 97-192, ILM 的标签分布图

板列	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
排管标签	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24
Index Pair 编号	97	105	113	121	129	137	145	153	161	169	177	185
	98	106	114	122	130	138	146	154	162	170	178	186
	99	107	115	123	131	139	147	155	163	171	179	187
	100	108	116	124	132	140	148	156	164	172	180	188
	101	109	117	125	133	141	149	157	165	173	181	189
	102	110	118	126	134	142	150	158	166	174	182	190
	103	111	119	127	135	143	151	159	167	175	183	191
	104	112	120	128	136	144	152	160	168	176	184	192

Index 核苷酸序列

每个 SureSelect XT HS2 index 的核苷酸序列如表 35 至表 38 所示。每个标签的长度为 8 nt, 测序运行应使用 8 bp index reads 完成 (参见第 57 页。) 序列也可以通过访问 Agilent.com 下载 [SureSelect XT HS2 Index Sequence Resource Excel](#) 电子表格获取。

表 35 SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs 1-48

Primer Pair #	Index Strip	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Index Strip	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
1	D1	CAAGGTGA	ATGGTTAG	CTAACCAT	25	D4	AGATGGAT	TGGCACCA	TGGTGCCA
2	D1	TAGACCAA	CAAGGTGA	TCACCTTG	26	D4	GAATTGTG	AGATGGAT	ATCCATCT
3	D1	AGTCGCGA	TAGACCAA	TTGGTCTA	27	D4	GAGCACTG	GAATTGTG	CACAATTG
4	D1	CGGTAGAG	AGTCGCGA	TCGCGACT	28	D4	GTTGCGGA	GAGCACTG	CAGTGCTC
5	D1	TCAGCATC	AAGGAGCG	CGCTCCTT	29	D4	AATGGAAC	GTTGCGGA	TCCGCAAC
6	D1	AGAAGCAA	TCAGCATC	GATGCTGA	30	D4	TCAGAGGT	AATGGAAC	GTTCCATT
7	D1	GCAGGTTC	AGAAGCAA	TTGCTTCT	31	D4	GCAACAAT	TCAGAGGT	ACCTCTGA
8	D1	AAGTGTCT	GCAGGTTC	GAACCTGC	32	D4	GTCGATCG	GCAACAAT	ATTGTTGC
9	D2	CTACCGAA	AAGTGTCT	AGACACTT	33	D5	ATGGTAGC	GTCGATCG	CGATCGAC
10	D2	TAGAGCTC	CTACCGAA	TTCGGTAG	34	D5	CGCCAATT	ATGGTAGC	GCTACCAT
11	D2	ATGTCAAG	TAGAGCTC	GAGCTCTA	35	D5	GACAATTG	CGCCAATT	AATTGGCG
12	D2	GCATCATA	ATGTCAAG	CTTGACAT	36	D5	ATATTCCG	GACAATTG	CAATTGTC
13	D2	GACTTGAC	GCATCATA	TATGATGC	37	D5	TCTACCTC	ATATTCCG	CGGAATAT
14	D2	CTACAATG	GACTTGAC	GTCAAGTC	38	D5	TCGTCGTG	TCTACCTC	GAGGTAGA
15	D2	TCTCAGCA	CTACAATG	CATTGTAG	39	D5	ATGAGAAC	TCGTCGTG	CACGACGA
16	D2	AGACACAC	TCTCAGCA	TGCTGAGA	40	D5	GTCCTATA	ATGAGAAC	GTTCTCAT
17	D3	CAGGTCTG	AGACACAC	GTGTGTCT	41	D6	AATGACCA	GTCCTATA	TATAGGAC
18	D3	AATACGCG	CAGGTCTG	CAGACCTG	42	D6	CAGACGCT	AATGACCA	TGGTCATT
19	D3	GCACACAT	AATACGCG	CGCGTATT	43	D6	TCGAACTG	CAGACGCT	AGCGTCTG
20	D3	CTTGCATA	GCACACAT	ATGTGTGC	44	D6	CGCTTCCA	TCGAACTG	CAGTTCGA
21	D3	ATCCTCTT	CTTGCATA	TATGCAAG	45	D6	TATTCCGT	CGCTTCCA	TGGAAGCG
22	D3	GCACCTAA	ATCCTCTT	AAGAGGAT	46	D6	CAAGTTAC	TATTCCGT	CAGGAATA
23	D3	TGCTGCTC	GCACCTAA	TTAGGTGC	47	D6	CAGAGCAG	CAAGTTAC	GTAACCTG
24	D3	TGGCACCA	TGCTGCTC	GAGCAGCA	48	D6	CGCGCAAT	CAGAGCAG	CTGCTCTG

表 36 SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs 49-96

Primer Pair #	Index Strip	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Index Strip	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
49	D7	TGAGGAGT	CGCGCAAT	ATTGCGCG	73	D10	AACGCATT	ATAGTGAC	GTCACTAT
50	D7	ATGACGAA	TGAGGAGT	ACTCCTCA	74	D10	CAGTTGCG	AACGCATT	AATGCGTT
51	D7	TACGGCGA	ATGACGAA	TTCGTCAT	75	D10	TGCCTCGA	CAGTTGCG	CGCAACTG
52	D7	AGCGAGTT	TACGGCGA	TCGCCGTA	76	D10	AAGGCTTA	TGCCTCGA	TCGAGGCA
53	D7	TGTATCAC	AGCGAGTT	AACTCGCT	77	D10	GCAATGAA	AAGGCTTA	TAAGCCTT
54	D7	GATCGCCT	TGTATCAC	GTGATACA	78	D10	AAGAACCT	GCAATGAA	TTCATTGC
55	D7	GACTCAAT	GATCGCCT	AGGCGATC	79	D10	CTGTGCCT	AAGAACCT	AGGTTCTT
56	D7	CAGCTTGC	GACTCAAT	ATTGAGTC	80	D10	TACGTAGC	CTGTGCCT	AGGCACAG
57	D8	AGCTGAAG	CAGCTTGC	GCAAGCTG	81	D11	AAGTGGAC	TACGTAGC	GCTACGTA
58	D8	ATTCCGTG	AGCTGAAG	CTTCAGCT	82	D11	CAACCGTG	AAGTGGAC	GTCCACTT
59	D8	TATGCCGC	ATTCCGTG	CACGGAAT	83	D11	CTGTTGTT	CAACCGTG	CACGGTTG
60	D8	TCAGCTCA	TATGCCGC	GCAGCATA	84	D11	GCACGATG	CTGTTGTT	AACAACAG
61	D8	AACTGCAA	TCAGCTCA	TGAGCTGA	85	D11	GTACGGAC	GCACGATG	CATCGTGC
62	D8	ATTAGGAG	AACTGCAA	TTGCAGTT	86	D11	CTCCAAGC	GTACGGAC	GTCCGTAC
63	D8	CAGCAATA	ATTAGGAG	CTCCTAAT	87	D11	TAGTCTGA	CTCCAAGC	GCTTGGAG
64	D8	GCCAAGCT	CAGCAATA	TATTGCTG	88	D11	TTCGCCGT	TAGTCTGA	TCAGACTA
65	D9	TCCGTTAA	GCCAAGCT	AGCTTGGC	89	D12	GAACTAAG	ATACGAAG	CTTCGTAT
66	D9	GTGCAACG	TCCGTTAA	TTAACCGA	90	D12	AAGCCATC	GAGATTCA	TGAATCTC
67	D9	AGTAACGC	GTGCAACG	CGTTGCAC	91	D12	AACTCTTG	AAGCCATC	GATGGCTT
68	D9	CATAGCCA	AGTAACGC	GCGTTACT	92	D12	GTAGTCAT	AACTCTTG	CAAGAGTT
69	D9	CACTAGTA	CATAGCCA	TGGCTATG	93	D12	CTCGCTAG	GTAGTCAT	ATGACTAC
70	D9	TTAGTGC	CACTAGTA	TACTAGTG	94	D12	AGTCTTCA	CAGTATCA	TGATACTG
71	D9	TCGATACA	TTAGTGC	CGCACTAA	95	D12	TCAAGCTA	CTTCGTAC	GTACGAAG
72	D9	ATAGTGAC	TCGATACA	TGTATCGA	96	D12	CTTATCCT	TCAAGCTA	TAGCTTGA

表 37 SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs 97-144

Primer Pair #	Index Strip	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Index Strip	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
97	D13	TCATCCTT	CTTATCCT	AGGATAAG	121	D16	CAGGCAGA	AGACGCCT	AGGCGTCT
98	D13	AACACTCT	TCATCCTT	AAGGATGA	122	D16	TCCGCGAT	CAGGCAGA	TCTGCCTG
99	D13	CACCTAGA	AACACTCT	AGAGTGTT	123	D16	CTCGTACG	TCCGCGAT	ATCGCGGA
100	D13	AGTTCATG	CACCTAGA	TCTAGGTG	124	D16	CACACATA	CTCGTACG	CGTACGAG
101	D13	GTTGGTGT	AGTTCATG	CATGAACT	125	D16	CGTCAAGA	CACACATA	TATGTGTG
102	D13	GCTACGCA	GTTGGTGT	ACACCAAC	126	D16	TTCGCGCA	CGTCAAGA	TCTTGACG
103	D13	TCAACTGC	GCTACGCA	TGCGTAGC	127	D16	CGACTACG	TTCGCGCA	TGCGCGAA
104	D13	AAGCGAAT	TCAACTGC	GCAGTTGA	128	D16	GAAGGTAT	CGACTACG	CGTAGTCG
105	D14	GTGTTACA	AAGCGAAT	ATTCGCTT	129	D17	TTGGCATG	GAAGGTAT	ATACCTTC
106	D14	CAAGCCAT	GTGTTACA	TGTAACAC	130	D17	CGAATTCA	TTGGCATG	CATGCCAA
107	D14	CTCTCGTG	CAAGCCAT	ATGGCTTG	131	D17	TTAGTTGC	CGAATTCA	TGAATTTC
108	D14	TCGACAAAC	CTCTCGTG	CACGAGAG	132	D17	GATGCCAA	TTAGTTGC	GCAACTAA
109	D14	TCGATGTT	TCGACAAAC	GTTGTCGA	133	D17	AGTTGCCG	GATGCCAA	TTGGCATC
110	D14	CAAGGAAG	TCGATGTT	AACATCGA	134	D17	GTCCACCT	AGTTGCCG	CGGCAACT
111	D14	ATTGATGC	AGAGAATC	GATTCTCT	135	D17	ATCAAGGT	GTCCACCT	AGGTGGAC
112	D14	TCGCAGAT	TTGATGGC	GCCATCAA	136	D17	GAACCAGA	ATCAAGGT	ACCTTGAT
113	D15	GCAGAGAC	TCGCAGAT	ATCTGCGA	137	D18	CATGTTCT	GAACCAGA	TCTGGTTC
114	D15	CTGCGAGA	GCAGAGAC	GTCCTCTG	138	D18	TCACTGTG	CATGTTCT	AGAACATG
115	D15	CAACCAAC	CTGCGAGA	TCTCGCAG	139	D18	ATTGAGCT	TCACTGTG	CACAGTGA
116	D15	ATCATGCG	CAACCAAC	GTTGGTTG	140	D18	GATAGAGA	ATTGAGCT	AGCTCAAT
117	D15	TCTGAGTC	ATCATGCG	CGCATGAT	141	D18	TCTAGAGC	GATAGAGA	TCTCTATC
118	D15	TCGCCTGT	TCTGAGTC	GACTCAGA	142	D18	GAATCGCA	TCTAGAGC	GCTCTAGA
119	D15	GCGCAATT	TCGCCTGT	ACAGGCGA	143	D18	CTTCACGT	GAATCGCA	TGCGATT
120	D15	AGACGCCT	GCGCAATT	AATTGCGC	144	D18	CTCCGGTT	CTTCACGT	ACGTGAAG

表 38 SureSelect XT HS2 Index Primer Pairs 145-192

Primer Pair #	Index Strip	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement	Primer Pair #	Index Strip	P7 Index Forward	P5 Index Forward	P5 Index Reverse Complement
145	D19	TGTGACTA	CTCCGGTT	AACCGGAG	169	D22	CGCTCAGA	CTAACAAAG	CTTGTAG
146	D19	GCTTCCAG	TGTGACTA	TAGTCACA	170	D22	TAACGACA	CGCTCAGA	TCTGAGCG
147	D19	CATCCTGT	GCTTCCAG	CTGGAAGC	171	D22	CATACTTG	TAACGACA	TGTCGTTA
148	D19	GTAATACG	CATCCTGT	ACAGGATG	172	D22	AGATACGA	CATACTTG	CAAGTATG
149	D19	GCCAACAA	GTAATACG	CGTATTAC	173	D22	AATCCGAC	AGATACGA	TCGTATCT
150	D19	CATGACAC	GCCAACAA	TTGTTGGC	174	D22	TGAAGTAC	AATCCGAC	GTCGGATT
151	D19	TGCAATGC	CATGACAC	GTGTCATG	175	D22	CGAATCAT	TGAAGTAC	GTACTTCA
152	D19	CACATTG	TGCAATGC	GCATTGCA	176	D22	TGATTGGC	CGAATCAT	ATGATTG
153	D20	CAATCCGA	CACATTG	CGAATGTG	177	D23	TCGAAGGA	TGATTGGC	GCCAATCA
154	D20	CATCGACG	CAATCCGA	TCGGATTG	178	D23	CAGTCATT	TCGAAGGA	TCCTTCGA
155	D20	GTGCGCTT	CATCGACG	CGTCGATG	179	D23	CGCGAAC	CAGTCATT	AATGACTG
156	D20	ATAGCGTT	GTGCGCTT	AAGCGCAC	180	D23	TACGGTTG	CGCGAAC	TGTTCGCG
157	D20	GAGTAAGA	ATAGCGTT	AACGCTAT	181	D23	AGAACCGT	TACGGTTG	CAACCGTA
158	D20	CTGACACA	GAGTAAGA	TCTTACTC	182	D23	AGGTGCTT	AGAACCGT	ACGGTTCT
159	D20	ATACGTGT	CTGACACA	TGTGTCAG	183	D23	ATCGAAC	AGGTGCTT	AAGCACCT
160	D20	GACCGAGT	ATACGTGT	ACACGTAT	184	D23	GCCTCTCA	ATCGAAC	GTTGCGAT
161	D21	GCAGTTAG	GACCGAGT	ACTCGGTC	185	D24	TCGCGTCA	GCCTCTCA	TGAGAGGC
162	D21	CGTTCGTC	GCAGTTAG	CTAACTGC	186	D24	GAGTGCCT	TCGCGTCA	TGACGCGA
163	D21	CGTTAACG	CGTTCGTC	GACGAACG	187	D24	CGAACACT	GCATAAGT	ACTTATGC
164	D21	TCGAGCAT	CGTTAACG	CGTTAACG	188	D24	TAAGAGTG	AGAAGACG	CGTCTTCT
165	D21	GCCGTAAC	TCGAGCAT	ATGCTCGA	189	D24	TGGATTGA	TAAGAGTG	CACTCTTA
166	D21	GAGCTGTA	GCCGTAAC	GTTACGGC	190	D24	AGGACATA	TGGATTGA	TCAATCCA
167	D21	AGGAAGAT	GAGCTGTA	TACAGCTC	191	D24	GACATCCT	AGGACATA	TATGTCCT
168	D21	CTAACAAAG	AGGAAGAT	ATCTTCCT	192	D24	GAAGCCTC	GACATCCT	AGGATGTC

运行后跟踪标签标识

用于 Magnis Prep System 运行的特定 Index Strip 在 **Post-Run Data** 中报告，可从触摸屏 Home 屏幕访问。从 **Post-Run Data** 屏幕打开 **Labware Info** 选项卡，在 *Labware* 下找到 *Index Strip* 行，查看用于运行的 index strip 的各种属性。Index Strip 编号报告为 1-24 的值，可以通过滚动至屏幕的最右侧部分并找到 *Index Strip* 列来查看。同样的 Index Strip 编号 1-24 也可在运行日志文件中找到。

与每个 Index Strip 编号 1-24 关联的特定 SureSelect XT HS2 双标签引物对如表 39 所示。

表 39 使用 Post-Run Data 屏幕中的 Index Strip 编号进行标签跟踪

Post-Run Data 屏幕或日志中的 <i>Index Strip</i> 编号	Index Strip 管标签 (刻印)	双 Index 引物对 (按运行中的样本编号列示)							
		样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5	样本 6	样本 7	样本 8
1	D1	1	2	3	4	5	6	7	8
2	D2	9	10	11	12	13	14	15	16
3	D3	17	18	19	20	21	22	23	24
4	D4	25	26	27	28	29	30	31	32
5	D5	33	34	35	36	37	38	39	40
6	D6	41	42	43	44	45	46	47	48
7	D7	49	50	51	52	53	54	55	56
8	D8	57	58	59	60	61	62	63	64
9	D9	65	66	67	68	69	70	71	72
10	D10	73	74	75	76	77	78	79	80
11	D11	81	82	83	84	85	86	87	88
12	D12	89	90	91	92	93	94	95	96
13	D13	97	98	99	100	101	102	103	104
14	D14	105	106	107	108	109	110	111	112
15	D15	113	114	115	116	117	118	119	120
16	D16	121	122	123	124	125	126	127	128
17	D17	129	130	131	132	133	134	135	136
18	D18	137	138	139	140	141	142	143	144
19	D19	145	146	147	148	149	150	151	152
20	D20	153	154	155	156	157	158	159	160
21	D21	161	162	163	164	165	166	167	168
22	D22	169	170	171	172	173	174	175	176
23	D23	177	178	179	180	181	182	183	184
24	D24	185	186	187	188	189	190	191	192

故障排除指南

下文提供了在 Magnis NGS Prep System 上运行自动化 SureSelect XT HS2 DNA NGS Library Preparation 方案以及上游样本制备和下游文库分析步骤的故障排除指南。有关 Magnis 仪器的一般故障排除，请参见仪器用户指南，出版号 [K1007-90000](#)。

如果触摸屏无响应

- ✓ 重新启动系统以重置触摸屏功能。

如果仪器 LED 指示灯变为红色并且触摸屏显示错误消息 “*Teach points are shifted. Please perform auto teaching from the Settings screen.*”

- ✓ 当 Instrument Health Check (IHC) 未通过教学点验证时，会显示此错误消息，指示仪器台面上的教学点标记可能被遮挡，或者仪器需要先执行教学点 Auto Teaching 程序然后才能设置运行。完成以下步骤以做好仪器运行准备工作：

- 确认已从所有 Magnis 台面位置清除了试剂盒耗材和其他碎屑。仪表台面上存在任何材料均可能会妨碍成功检测教学点标记。
- 使用仪器用户指南中的清洁说明清洁条形码扫描仪视窗。扫描仪上的碎屑或指纹可能会遮挡教学点，从而导致验证失败。
- 重新启动系统。登录后，仪器将执行另一次 IHC。如果此运行状况检查成功，则可以在不执行 Auto Teaching 的情况下重新开始设置过程。如果 IHC 不成功，请使用以下步骤完成 Auto Teaching。
- 在 Home 屏幕中，打开 **Settings** 屏幕并按 **Auto Teaching**。按照触摸显示屏上的说明操作。Auto Teaching 过程大约需要 30 分钟，并且需要操作员在场以将实验器皿放置在仪器上。
- Auto Teaching 完成后，即可通过在 Home 屏幕上按 **Run Protocol** 开始运行设置。

如果仪器 LED 指示灯变为红色且触摸屏显示 Instrument Health Check (IHC) 失败消息

- ✓ Agilent 建议在 IHC 失败后使用以下步骤重新启动仪器：
 - 在错误对话框中，按 **Cancel** 以拒绝启动诊断测试。
 - 按屏幕底部的错误图标，并记录错误代码，以备 Agilent 支持进行故障排除时使用。
 - 按仪器正面的电源按钮，关闭仪器。
 - 确认已从所有 Magnis 台面位置清除了试剂盒耗材和其他碎屑。仪器台面上存在任何材料都可能影响重新启动后的 IHC。
 - 按仪器正面的电源按钮，打开仪器。
 - 登录后，仪器将执行另一次 IHC。如果此运行状况检查成功，即可通过在 Home 屏幕上按 **Run Protocol** 开始或重启运行设置。

如果重新启动仪器后 IHC 再次失败，请联系 Agilent 全球技术支持以获取帮助。

如果 *Enter Run Info* 屏幕上的 **Protocol** 菜单中缺少某方案

- ✓ 在触摸屏 *Enter Run Info* 上可见以及可在您的仪器上运行的 Magnis 运行方案可能不同，具体取决于仪器购买日期、方案可用日期以及仪器在购买后是否进行了更新。如果您需要的方案当前在仪器上不可用，请访问 [Agilent.com 的 Magnis 方案下载页面](#) 获取更多信息。

如果排管在冷却器模块中难以就位

- ✓ 为便于排管在冷却器模块中正确就位, 请按从左到右的顺序装载排管 (已填充的 sample strip、index strip、probe strip、空 QC strip 和空 library strip)。
- ✓ 装载冷却器时, Foil Seals 如放置不当, 可能会阻碍排管的定位和就位。当采用铝箔密封带来重新密封 sample input strip 或自填充 probe strip 时, 请小心谨慎, 用力均匀地覆好密封, 避免过多外伸量或皱褶。

如果扫描实验器皿条形码后, *Verify Labware* 屏幕报告一个或多个实验器皿组件存在问题

- ✓ 如果所有或大部分实验器皿验证失败, 则条形码扫描仪视窗可能需要清洁。有关清洁说明, 请参见 [仪器用户指南](#)。清洁完成后, 重复执行 *Verify Labware* 步骤。
- ✓ 如果只有一个或少数几个实验器皿组件验证失败, 请按屏幕底部的错误图标并展开失败位置的信息, 以查看失败原因。

- **如果条形码扫描仪无法扫描特定的实验器皿组件**

确认实验器皿位于所需的台面位置并且方向正确, 条形码朝向仪器正面。查看[第 30 页至第 34 页](#), 了解完整的台面装载步骤。纠正遗漏或定位错误, 然后重复执行 *Verify Labware* 步骤。如果存在验证失败的实验器皿组件且其定位正确, 则目视检查条形码以验证完整性。要成功扫描, 条形码上必须没有划痕、污迹、冷凝水珠, 且不会被 Foil Seals 以及塑料器具上的字迹或其他标记阻挡。如果怀疑条形码损坏或被阻挡, 请调整或更换实验器皿组件并重复执行 *Verify Labware* 步骤。

- **如果扫描的实验器皿已过期**

用未过期组件替换所有过期组件, 然后重复执行 *Verify Labware* 步骤。失效日期可在每个含有预填充试剂的组件套件随附的分析证书上找到。作为空塑料件提供的组件没有失效日期。

- **如果扫描的实验器皿组件被识别为 *wrong labware***

具体而言, 当扫描的实验器皿 (例如, Beads/Buffers Plate 或 Probe Input Strip) 被识别为 *wrong labware* 时, 务必确认是否为仪器上装载的试剂盒的格式选择了正确的方案。检查运行装载的试剂盒的格式, 然后使用下表确认在运行设置期间选择了正确的方案。如已选择错误的方案, 请通过按下触摸屏上的回退箭头返回 *Enter Run Info* 屏幕, 并从菜单中选择正确的方案, 视需要展开方案菜单。选择正确的方案后, 使用向前箭头退回到 *Verify Labware* 屏幕, 然后重复执行 *Verify Labware* 步骤。

试剂盒	正确的处理 Protocol
随附有预填充 probe input strips 的 Magnis SureSelect XT HS2 DNA Reagent Kits	SSEL-DNA-XTHS2-ILM
随附有空 probe input strips (在运行时填充) 的 Magnis SureSelect HS2 DNA Reagent Kits	SSEL-DNA-XTHS2-EPIS-ILM
随附有 Magnis SureSelect RNA Beads/Buffers Plates ILM 和预填充或空 probe input strips 的 Magnis SureSelect HS2 RNA Reagent Kits	SSEL-RNA-XTHS2-ILM 或 SSEL-RNA-XTHS2-EPIS-ILM

- **如果实验器皿被识别为 *wrong labware*, 并选择了正确的方案**

用正确的实验器皿替换放错位置的实验器皿, 并重复执行 *Verify Labware* 步骤。

如果运行期间仪器台面上有一个散落的微量移液器吸头

- ✓ 有时, 当仪器将用过的吸头弹射到废物容器中时, 吸头可能反弹并落到仪器台面上。戴上手套, 将吸头移至废物容器或像清空废物容器一样将其弃置。

如果在运行结束时打开仪器门并采集文库后，触摸屏的 *Turn off Chiller* 对话框遮挡了运行屏幕

- ✓ 如果在运行结束时 LED 指示灯变为蓝色（表示所有仪器运行步骤完成）之前打开仪器门或者在运行结束时仅部分打开仪器门，则 *Turn off Chiller* 对话框可能会留在运行屏幕上，遮挡屏幕内容。在之后的运行中，等待 LED 指示灯变为蓝色，表示仪器已进入运行后空闲状态，然后再打开仪器门。在采集样本之前，完全打开门（直到 LED 指示灯变为白色）。

在即将进入已完成的运行 / 样本采集屏幕前，如果触摸屏 *Time Remaining* 未显示 0:00 读数

- ✓ 触摸屏上显示的 *Time Remaining* 值只是对运行剩余时间的预估。计时器可在运行过程中调整剩余时间预估值，且当系统就绪开始样本采集时可能会显示大于 0:00 的时间。这并不表示运行或仪器存在问题。

如果最终文库样本量低于预期

- ✓ 运行结束时，将最终文库样本 (20–23 μ L) 转移至绿色 Library Output Strip 的孔中，并在 12°C 的冷却器中保存，直至从仪器中取出。运行后冷却器保存的时间和相对湿度条件会影响从 Library Output Strip 中回收的样本量。

如果捕获后文库得率较低

- ✓ 对于使用自动化 enzymatic fragmentation 进行的运行，请确认 DNA 样本的制备浓度为 14 μ L，包含 10 ng、50 ng、100 ng 或 200 ng DNA。上样量较大且浓度较低的样本无效；Magnis 仪器从 sample input strip 中取出 14 μ L 样品进行进一步处理。
- ✓ 确认酶切或机械 DNA 剪切是在 Low TE Buffer 而非水中执行的。在水中片段化 DNA 样本会降低整体文库收率和复杂性。
- ✓ 确认输入 DNA 样本符合 “[附录 1：DNA 样本制备指南](#)” 中指定的质量和浓度范围指南
- ✓ 确认已按照适当的输入 DNA 浓度和质量设置运行。可以在相关运行的 Post Run Data 屏幕的 Run Setup 选项卡上检查设置。
- ✓ 确保在 30% 至 70%（无冷凝）的湿度条件下完成运行。在该范围之外的湿度水平下操作系统可能会影响性能并导致低或零文库得率。
- ✓ 运行中一个或多个样本的得率非常低或为零可能表明运行中使用的移液吸头存在问题。将吸头装载到仪器上时，确认所有吸头盒已完全装满，并且所有吸头盒均平放在平台的凸起框架内。在移除吸头盒盖时，确保吸头盒不会受到干扰和脱离。
- ✓ 用于运行的塑料器皿定位或就位的问题也可能导致运行中一个或多个样本得率非常低或为零。查看并遵守 [第 30 页 到 第 34 页](#) 中所提供的塑料器皿定位明细。尤其是确保所有排管都已在冷却器模块中正确就位；可通过按从左到右的顺序（已填充的 sample input strip、index strip、probe strip、空 QC strip 和空 library output strip）装载排管来促进此目标。
- ✓ PCR 周期数可能需要优化。重复进行样本的文库制备和靶标富集，将 post-capture PCR cycle 数增加 1 至 2 个循环。只有具有 Advanced 访问级别的用户才能更改 post-capture PCR cycle 次数。更多信息请参见 [第 38 页](#)。

如需进行 pre-capture PCR 优化

- ✓ 必要时，可在 *Confirm Setup* 屏幕上调整运行所用的 pre-capture PCR cycle 次数。更多信息请参见 [第 38 页](#)。只有具有 *Advanced* 访问级别的用户才能更改 pre-capture PCR cycle 次数。使用下列指南作为循环数自我优化的起始点。

输入 DNA 数量	推荐 Pre-Capture PCR Cycles	
	高质量输入 DNA	FFPE - 来源输入 DNA
10 ng	11	14
50 ng	10	13
100 ng	9	12
200 ng	8	11

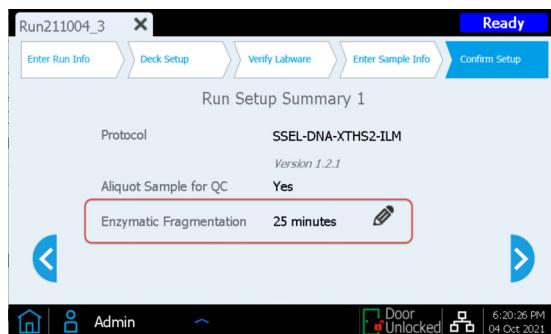
如需进行 post-capture PCR 优化

- ✓ 必要时，可在 *Confirm Setup* 屏幕上调整运行所用的 post-capture PCR cycle 次数。更多信息请参见 [第 38 页](#)。只有具有 *Advanced* 访问级别的用户才能更改 post-capture PCR cycle 次数。使用下列指南作为循环数自我优化的起始点。

SureSelect XT HS Probe 设计尺寸	推荐 Post-Capture PCR Cycles
<200 kb	14
200–749 kb	13
750–2999 kb	12
3–5 Mb	10
>5 Mb	9

如果电泳图中经酶切片段化的文库片段大小大于预期

- ✓ 片段化的时长可能需要优化。要增加平均库片段大小，缩短片段化时长，或者减少平均库片段大小，延长片段化时长。可以在 *Confirm Setup* 屏幕上调整运行的片段化时长的设置（有关更多信息，请参见 [第 38 页](#)）。



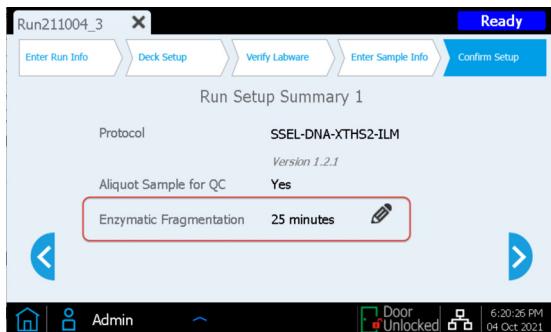
在此总结了推荐设计。对于使用 FFPE DNA 样本的工作流程和使用 100 bp 读长 NGS 的高质量 DNA 样本的工作流程，默认值 25 分钟通常最佳。对于包含高质量 DNA 样本和较长 NGS 读长（≥150 bp 读段）的工作流程，建议缩短片段化时长，以增加 DNA 片段尺寸分布。

NGS 读长	推荐的自动化 Enzymatic Fragmentation 时长	
	高质量 DNA 样本	FFPE DNA 样本
2 × 100 读段	25 分钟	25 分钟
2 × 150 读段	15 分钟	25 分钟

- ✓ FFPE 来源样本的初始 DNA 片段大小可能会影响库片段大小的最终分布。在由更多降解 FFPE 样本制备的文库中，较小文库片段的比例可能更大，一些 FFPE 来源样本的最终片段大小可能不会因片段化时长缩短而增加。

如您需要更多关于自动化 enzymatic fragmentation 时长设置的信息

- ✓ 在 *Confirm Setup* 屏幕上可见的 **Enzymatic Fragmentation** 设置控制了 Magnis 将样本与片段化试剂一起保持在 37°C 以使 DNA 裂解的时间。在确认过程中，可以通过按下设置值旁边的铅笔按钮来调整这一设置。
- ✓ 已专门针对 Magnis 仪器上自动片段化所用反应量和其他参数对此时长的设置进行优化，时长值可能与非自动化处理工作流程中的值不同。推荐设置总结见第 74 页。



如在运行前输入 DNA 已手动酶切片段化

- ✓ Magnis SureSelect XT HS2 DNA 文库制备方案包括可选的 Magnis 自动化 enzymatic fragmentation，和尚未使用运行前已酶切片段化的输入 DNA 进行验证的系统。如果您想使用由 Agilent's SureSelect Enzymatic Fragmentation Kit 生成的预片段化输入 DNA 对工作流程进行自我验证，请遵循下列指南：
 - 从含有 10 ng、50 ng、100 ng 或 200 ng DNA 的 DNA 样本开始，按照[试剂盒用户手册](#)中的方案进行片段化。
 - Enzymatic fragmentation 完成后，用无核酸酶水将片段化 DNA 样本稀释至体积为 50 μL。
 - 使用 Magnis SureSelect XT HS2 DNA 文库制备方案（不含 Enzymatic Fragmentation）处理样本，方案如已 Covaris 剪切 DNA 所述（参见第 21 页和第 25 页）。

如果电泳图中经 Covaris 片段化的文库片段大小大于预期

- ✓ 片段化可能不是很好。要获得完整、高质量的 DNA 样本，确保使用提供的两轮片段化方案完成片段化，包括所有离心和涡旋步骤。
- ✓ microTUBE 细丝上存在的任何气泡都可能干扰完整剪切。在第一轮剪切之前对 microTUBE 离心 30 秒以确保释放所有气泡。

如果测序读段不覆盖预期的基因组区

- ✓ 靶标富集的方案运行中可能使用了错误的 probe 设计。查看运行期间的样本和 probe 跟踪记录。如有必要，使用正确的 probe 设计重复进行方案运行。

本手册内容

本指南提供了使用 Magnis NGS Prep System
自动制备 SureSelect XT HS2 DNA 靶标富集
Illumina 双端多重测序文库的说明。

© Agilent Technologies, Inc. 2022 年、2023 年、2025 年

版本 C0, 2025 年 8 月



G9751-90015

