



DNA 起始量低和捕获文库较小的 Agilent SureSelect^{XT} 甲基化测序应用

应用简报

作者

**Alicia Alonso、Mame Penda Fall 与
Thadeous James Kacmarczyk**

医学系
血液学/肿瘤学部
表观基因组学核心实验室
威尔康奈尔医学院
纽约州纽约市

**Josh Zhiyong Wang
Carlos Pabon
Mary Napier**

安捷伦科技有限公司
加利福尼亚州圣克拉拉

摘要

Agilent SureSelect^{XT} 人甲基化测序试剂盒可以用来以低至 250 ng 的 DNA 起始量生成甲基化测序文库。虽然重复读出率较高，但测序数据的读出深度覆盖率与采用 1 µg DNA 所获得的文库相当。可以通过略微增加用来扩增重亚硫酸盐处理文库的 PCR 循环次数（10-11 次对标准方案中的 8 次），利用较低的起始量。

文中还评估了一种使用低 DNA 起始量的替代方法，该方法将 Agilent SureSelect^{XT} 捕获与 Illumina TruSeq 甲基化方案结合，不过相比于单独使用 SureSelect^{XT} 人甲基化工作流程，初步结果生成可用性较低的测序数据。此外，文中还提供了使用目标区域较小 (< 3 Mb) 的定制 SureSelect^{XT} 甲基化测序捕获文库的指南。

前言

众所周知，DNA 甲基化跨物种的基因调控通用机制，同时已经在人类多种疾病如癌症和情感障碍中观察到 DNA 异常甲基化，这凸显甲基化位点作为诊断标记物和/或药物靶的实用性。一般通过测序（包括下一代测序 (NGS)）实现以单核苷酸分辨率检测 DNA 甲基化。



Agilent Technologies

虽然全基因组重亚硫酸盐测序 (WGBS) 是一种切实可行方案, 但靶向方法如 Agilent SureSelect^{XT} 甲基化测序更为经济有效。Agilent SureSelect^{XT} 甲基化测序可实现专门设计用于甲基化组区域的靶向序列捕获以及后续重亚硫酸盐处理, 以在单碱基对分辨率检出有意义的甲基化事件。这种靶向方法还有助于数据存储和分析。

本应用简报描述了对使用 250 至 500 ng DNA 起始量附带调整改进的 Agilent SureSelect^{XT} 人甲基化测序工作流程的评估, 这种 DNA 起始量远低于标准方案中需要的 1 µg DNA 起始量。简报还提供了采用靶向更小区域 (< 3 Mb) 的定制甲基化测序捕获文库工作的指南。另外, 还就低 DNA 起始量 (250-500 ng) 时在单核苷酸水平检测 DNA 甲基化状态的适用性, 评估了联合使用 Agilent SureSelect^{XT} 人甲基化测序捕获文库与 Illumina TruSeq 甲基化试剂盒的方法。这种联合方法并未改善这些低 DNA 起始量时在单核苷酸水平检测 DNA 甲基化状态的能力。

材料与amp;方法

样品和试剂

用于甲基化测序方案的样品为用作参比标准品的人血液样品 (C177 和 C196) 或人肺成纤维细胞系样品 (IMR90)。Agilent SureSelect^{XT} 甲基化测序试剂盒和

SureSelect^{XT} 人甲基化测序试剂盒分别用于 NGS 文库制备和杂交捕获推定的基因组甲基化区域。Illumina TruSeq DNA 甲基化试剂盒是 NGS 文库制备用杂交方案的组成部分, 这个杂交方案也使用 SureSelect^{XT} 人甲基化测序试剂盒进行捕获。使用 Beckman Coulter Agencourt AMPure XP 清除剪切的 DNA。来自 Zymo Research 的 EZ-DNA 甲基化-金试剂盒提供所捕获文库的重亚硫酸盐转化。

仪器

采用 Covaris S220 聚焦超声发生器实现 DNA 剪切, 并且在剪切和文库连接后, 采用 Agilent 2100 生物分析仪评估 DNA 片段大小。捕获后文库最终产率用 Qubit 3.0 荧光计 (赛默飞世尔科技公司) 测量。合并最终文库, 以 10 pM 在双端读取流通池中聚集, 并在 Illumina HiSeq 2500 系统上按每份样品约 100 M 读出序列的深度测序 2 x 100 个循环。采用 Illumina CASAVA 1.8.2 软件执行碱基识别和解复用。

数据分析

使用 Flexbar 2.4 软件 (<https://github.com/seqan/flexbar>) 从测序用读出序列去除接头序列。使用 Bismark v0.14.4 (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/bismark/Bismark_User_Guide_v0.14.4.pdf) 和 Bowtie2 v2.2.5 ([http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.](http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml)

[shtml](#)) 软件, 根据以下命令行, 执行测序用读出序列至参考基因组的定位 (这里使用样品 IMR90_1) :

```
flexbar -r IMR90_1_R1_PF.fastq -p
IMR90_1_R2_PF.fastq -t IMR90_1 -a
Truseq_adapters.fa -f i1.8 -n 10 -ao
6 -m 21 -at 2 -ae RIGHT -u 2 -j -am
3 -ai -3 -ag -20

/Bismark-0.14.4/bismark -q
-un --ambiguous -L 32 -X 500 /
genomes/indices/Homo_sapiens/
Bismark_bt2_hg19 -1 IMR90_1_
R1.fastq -2 IMR90_1_R2.fastq
```

采用集成了 bedtools 工具 (<http://bedtools.readthedocs.io/en/latest/>) 的流程, 进行在靶测序用读出序列百分比和读取深度的数据分析。

结果与amp;讨论

评估 DNA 起始量低于 1-3 µg 的 SureSelect^{XT} 甲基化测序

安捷伦科技公司的目录 SureSelect^{XT} 人甲基化测序试剂盒提供了 84 Mb 人类基因组的靶向覆盖率。该方案推荐使用 3 µg 或 1 µg 的 DNA 起始量连同组成如下的工作流程: 构建基因组 DNA 文库, 接着进行捕获杂交、捕获后重亚硫酸盐处理和随后 PCR。但是, 相比基于阵列的甲基化分析, 1-3 µg 基因组 DNA 的要求高, 前者通常需要 250-500 ng DNA。

为了确定 SureSelect^{XT} 甲基化测序试剂盒是否可能成功用于低于 1 μg 的 DNA 起始量，使用目录试剂盒，按用于总计 4 个数据点的 500 ng 和 250 ng 起始量处理了两份人血 DNA 样品 (C77 和 C196)。作为初次尝试，对于 500 ng 和 250 ng 起始量，捕获后 PCR 循环次数分别提高至 10 和 12。

使用 Qubit 荧光测量定量法，测定捕获后文库最终产率并且在表 1 中显示。对于重亚硫酸盐处理的文库扩增步骤采用 500 ng DNA 起始量和 10 次 PCR 循环时，我们对 C77 和 C196 样品分别获得 7.18 ng/μL 和 9.68 ng/μL 浓度。这些浓度分别等同于 35.9 nM 和 48.4 nM。由于文库最终浓度的目标是 >10-20 nM，因此结果表明，以 500 ng DNA 起始量及 9-10 次 PCR 循环开始是可行的。类似地，对于 250 ng DNA 起始量，10-11 次而非 12 次 PCR 循环可能适用于重亚硫酸盐处理的文库扩增步骤。

所有这些文库均用 Illumina HiSeq 2500 仪进行双端 2x100 bp 测序，原始测序结果为 15-25 Gb，同时对采用 3 μg IMR90 DNA 起始量产生的对照捕获文库测序。为了生成参比，使用人 hg19 基因组构建作为 Bismark 软件的输入，该软件是一个定位重亚硫酸盐转化的测序用读出序列并确定胞嘧啶甲基化状态的工具¹。合格的

读出序列利用 Flexbar 2.4 版软件去除接头序列，并随后使用数据分析部分中提供的命令行，利用 Bismark v0.14.4 和 Bowtie2 v2.2.5 软件定位至参比基因组。

实现约 75% 定位效率，并且表 2 显示了 bam 文件针对约 100 M 读出序列归一化后的 SureSelect^{XT} 甲基化测序靶向序列捕获性能。在 250 ng 至 3 μg 的起始量时，目标区域内读出序列的百分比保持极高水平 (81.9%-87.6%)。在目标区域 +/- 200 bp 内读出序列的百分比同样如此，范围为 94.2%-96.3%。这些结果证实，250-500 ng 的较低 DNA 起始量并不影响根据这项 QC 标准的性能。

另一方面，如预期，重复读出序列百分比从 3 μg DNA 起始量的 8.3% 大幅增加至 500 ng DNA 起始量的 40%-50% 以及 250 ng DNA 起始量时的 50%-65% (表 2)。因此，平均读取深度从 3 μg DNA 起始量时的 84x 降低至 500 ng DNA 起始量的 47x-55x 以及 250 ng DNA 起始量时的 32x-45x。综合而言，这些结果表明，250-500 ng 的较低 DNA 起始量并不影响在靶读出序列的百分比，但的确导致重复率较高。

有趣的是，在查看读取覆盖率为至少 10x 的碱基百分比时，即使采用 250 ng DNA 起始量，81%-87% 的靶向 84 M 碱基已经实现这个标准，从而提示该结果的高度实用水平 (表 2)。事实上，读取覆盖率为至少 10x 的碱基百分比可能随额外的测序结果进一步提高。例如，在测序结果为 100 M 读出序列的情况下，样品 C77 在 10x 读取覆盖率时提供 81.4% 的碱基 (表 2)。然而，使用以 250 ng 起始 DNA 制得的相同文库，167 M 读出测序结果在 10x 读取覆盖率时产生 91.6% 的碱基 (数据未示出)。类似地，测序结果为 100 M 读出序列的情况下，样品 C196 在 10x 读取覆盖率时产生 87.7% 的碱基 (表 2)，相比而言，测序结果为 195 M 读出序列的情况下，该样品在 10x 读取覆盖率时产生 95.0% 的碱基 (数据未示出)。

总之，以 250 ng 和 500 ng 起始材料获得的结果证实，使用低 DNA 起始量时，必须进行适当的方案改进以实现最佳的可能结果。

样品	DNA 起始量 (ng)	浓度 (ng/μL)	浓度 (nM)
C77	500	7.18	35.9
C196	500	9.68	48.4
C77	250	10.6	53
C196	250	24.8	124

表 1. 以 250 ng 和 500 ng DNA 起始量使用 SureSelect^{XT} 人甲基化测序的文库产率比较

SureSelect^{XT} 甲基化测序文库制备 + SureSelect^{XT} 捕获与 TruSeq DNA 甲基化试剂盒 + SureSelect^{XT} 捕获的工作流程和测序数据比较

为了探索利用低 DNA 起始量进行甲基化测序的应用，本文还描述了一种使用 DNA 起始量低至 10 ng 和 100 ng 的替代方法，称作 PBAT（重亚硫酸盐处理后接头标记法）²。这种方法首先剪切基因组 DNA 供捕获杂交，然后进行重亚硫酸盐处理和接头标记/随机引物步骤等，旨在重亚硫酸盐处理后构建文库。但是，该方法要求从多名供应商处订购大量组分缓冲液和试剂配制，并且缺乏试剂 QC 或相关支持。

在 PBAT 的接头标记步骤和一种商业试剂盒（EpiGnome/TruSeq DNA 甲基化试剂盒，Illumina）的工作流程步骤之间存在惊人的相似之处，这种试剂盒常用于全基因组重亚硫酸盐测序。通过联系 Illumina 可获得 TruSeq DNA 甲基化试剂盒的介绍。因此，在使用 SureSelect^{XT} 甲基化测序试剂盒工作时，为了研究目标区域内的甲基化信息，TruSeq 试剂盒与人 SureSelect^{XT} 捕获文库组合可以提供比 PBAT 更方便的替代方案。表 3 显示了这两种策略之间的工作流程比较，两种工作流程均采用相同的捕获杂交/洗涤/重亚硫酸盐处理步骤并耗时约两天半，但区别在于 DNA 剪切大小、捕获前 DNA 处理和重亚硫酸盐处理后的 DNA 处理。

SureSelect^{XT} 捕获/TruSeq 甲基化联合方案用于一式两份处理起始量为 500 ng 和 250 ng 的 IMR90 DNA。将 DNA 用 Covaris 仪器剪切成约 600 bp 峰，使用 Agencourt AMPure 纯化，并与 SureSelect^{XT} 人甲基化测序捕获文库杂交。将捕获的产物随后在 20 μL 洗脱缓冲液中洗脱，在室温下温育 20 分钟，并使用 EZ-DNA 甲基化-金试剂盒（Zymo Research 公司）在 64 °C 下接受重亚硫酸盐处理 2.5 小时，最终洗脱于 9 μL 洗脱缓冲液中。洗脱的 DNA 随后充当 TruSeq DNA 甲基化试剂盒工作流程的起始材料，并且在完成双链 DNA 合成后，进行 qPCR 以确定适当的 PCR 循环次数。

	IMR90	C77	C196	C77	C196
DNA 量 (ng)	3000	500	500	250	250
HQ 唯一定位的总读出序列:	96.5M	93.4M	94.4M	92.4M	93.4M
重复读出序列百分比:	8.3%	50%	40.5%	65.5%	50.1%
去除重复后的总 HQ 读出序列:	88.5M	46.7M	56.1M	31.8M	46.6M
目标区域的读出序列数:	72.5M	40.7M	47.6M	27.9M	38.9M
目标区域的读出序列百分比:	81.92%	87.24%	84.83%	87.65%	83.54%
区域 +/- 100bp 内的读出序列百分比:	93.04%	95.55%	95.29%	95.65%	95.04%
区域 +/- 200bp 内的读出序列百分比:	94.23%	96.13%	96.43%	96.19%	96.34%
平均读取深度:	84x	47x	55x	32x	45x
由以下读出序列覆盖的靶向碱基百分比					
至少 1 个读出序列:	98.89%	98.16%	98.56%	97.67%	98.36%
至少 5 个读出序列:	97.14%	94.04%	95.30%	91.42%	94.33%
至少 10 个读出序列:	94.48%	87.65%	89.97%	81.44%	87.70%
至少 20 个读出序列:	87.92%	72.98%	77.14%	60.14%	72.13%
至少 30 个读出序列:	80.33%	58.58%	63.99%	42.18%	56.99%

表 2. 使用不同 DNA 起始量的 SureSelect^{XT} 人甲基化测序靶向序列捕获 NGS 测序性能

在评估的 DNA 样品中，确定 12-17 次 PCR 循环适宜，并且表 4 中显示文库最终产率。500 ng 的两次重复均提供良好的文库产率（约 4 ng/μL），然而，与另一份样品相比，一份 250 ng 样品的产率 (0.3 ng/μL) 低 10 倍。由于难以确定 250 ng 起始量时结果不一致的原因，因此决定仅对采用 500 ng 起始量制得的重复文库测序。

另请注意，当采用 TruSeq 甲基化 + SureSelect^{XT} 捕获工作流程的最终文库（表 3）和采用标准 SureSelect^{XT} 甲基化测序工作流程时的最终文库（表 1）的生物分析仪峰图叠加时，各峰在 250-300 bp 相似（数据未示出）。

这些文库在 HiSeq 2500 仪上用双端 2x100 bp 化学法测序，原始测序结果为 15-25 Gb。表 5 显示了 bam 文件针对约 100 M 读出序列归一化后，SureSelect^{XT} 捕获/TruSeq 甲基化（方法 2）和单一 SureSelect^{XT} 甲基化测序（方法 1）之间的靶向序列捕获性能比较结果。

采用相同的 500 ng DNA 起始量，SureSelect^{XT}/TruSeq 联合方法时目标区域内读出序列的百分比可观地为 66.6%-67.2%，但低于采用单一 SureSelect^{XT} 甲基化测序方法所实现的 84.8%-87.2%（表 5）。更为惊讶地观察到，SureSelect^{XT}/TruSeq 联合方法的重复读出序列的百分比极高为 80.6%-86.7%，相比之下采用单一

SureSelect^{XT} 甲基化测序方法实现了 40%-50% 的百分比。因此，对于 SureSelect^{XT}/TruSeq 联合方法而言，平均读取深度低，处于 8x-12x，相比之下，对于单一 SureSelect^{XT} 甲基化测序方法，则为 47x-55x。

总之，采用 500 ng 的 DNA 起始量，SureSelect^{XT}/TruSeq 联合方法生成的测序数据并非与使用单一 SureSelect^{XT} 甲基化测序方法所生成的测序数据同样有用，尽管工作流程似乎相似。这个结果表明，SureSelect^{XT}/TruSeq 联合方法文库复杂度可能比单一 SureSelect^{XT} 甲基化测序方法受损更多。在考虑 SureSelect^{XT}/TruSeq 联合方法用于靶向甲基化测序应用时，还可能需额外的方案优化。

时间	步骤	SureSelect ^{XT} 甲基化测序	TruSeq 甲基化 + SureSelect ^{XT} 捕获
第 1 天	捕获前	DNA 剪切成约 150 bp 峰 末端修复、dA 加尾、接头连接以获得 DNA 文库 SureSelect ^{XT} 杂交过夜	DNA 剪切成约 600 bp 峰
	捕获杂交	SureSelect ^{XT} 杂交过夜	SureSelect ^{XT} 杂交过夜
第 2 天	捕获后	SureSelect ^{XT} 捕获/洗涤，重亚硫酸盐处理	SureSelect ^{XT} 捕获/洗涤，重亚硫酸盐处理
	重亚硫酸盐处理后	PCR 扩增重亚硫酸盐处理的文库（8-14 个循环）	引物复性、DNA 合成和 DNA 标记、索引 重亚硫酸盐处理文库的 PCR（12-17 个循环）过夜
第 3 天	重亚硫酸盐处理后	通过 PCR 索引修饰后的文库，最终 QC	最终 QC
用于该步骤的试剂盒成分			
第 1 天	NGS 文库制备	SureSelect ^{XT}	N/A
	捕获文库	SureSelect ^{XT}	SureSelect ^{XT}
第 2/3 天	结合/洗涤缓冲液	SureSelect ^{XT}	SureSelect ^{XT}
	EZ-DNA 甲基化金试剂盒	SureSelect ^{XT}	SureSelect ^{XT}
第 2/3 天	NGS 文库制备	N/A	TruSeq

N/A — 不适用

表 3. 标准 SureSelect^{XT} 人甲基化测序工作流程与 SureSelect^{XT} 捕获和 TruSeq 甲基化结合工作流程之间的比较

使用目标区域较小 (< 3 Mb) 的定制甲基化测序捕获文库的指南

SureSelect^{XT} 靶向序列捕获是一个十分常用的平台，该平台令富集从 < 100 kb 至超过 100 Mb 的特定基因组区域成为可能，但现有 SureSelect^{XT} 甲基化测序方案仅支持 84 Mb 的目录人甲基化测序设计。对于有兴趣分析小于 3 Mb 的基因组区域内甲基化信息的研究人员，则应当考虑下列改进。

1. 对于杂交中使用的捕获文库体积：SureSelect^{XT} 甲基化测序方案 C.0 版建议每次杂交使用 5 μ L。然而，对于定制文库，该体积将根据捕获文库的大小调节。对于小于 3 Mb 的文库，应当每次杂交使用 2 μ L，如表 6 中对捕获杂交混合物配制所示。

试剂	1 次反应的体积 (μ L)
杂交缓冲液混合物	13
10% 核糖核酸酶封闭液*	5
捕获文库 (< 3 Mb)	2
合计	20

* 按 1:9 稀释度从核糖核酸酶封闭液配制

表 6. 定制捕获文库 (< 3 Mb) 杂交混合物的配制

样品	DNA 起始量 (ng)	浓度 (ng/ μ L)	浓度 (nM)
IMR90	500	4.9	24.5
IMR90	500	3.4	17.1
IMR90	250	3.0	15.1
IMR90	250	0.3	1.5

表 4. 使用 SureSelect^{XT} 捕获与 TruSeq 甲基化试剂盒联合时的文库最终产率

样品	单一 SureSelect ^{XT} 甲基化		SureSelect ^{XT} /TruSeq 联合	
	C77	C196	IMR90-1	IMR90-2
HQ 唯一定位的总读出序列:	93.4 M	94.4 M	86.1 M	85.9 M
重复读出序列百分比:	50%	40.5%	80.6%	86.7%
去除重复后的总 HQ 读出序列:	46.7 M	56.1 M	16.7 M	11.4 M
目标区域的读出序列数:	40.7 M	47.6 M	11.1 M	7.6 M
目标区域的读出序列百分比:	87.24%	84.83%	66.64%	67.27%
区域 +/- 100bp 内的读出序列百分比:	95.55%	95.29%	83.65%	84.36%
区域 +/- 200bp 内的读出序列百分比:	96.13%	96.43%	90.10%	90.74%
平均读取深度:	47x	55x	12x	8x
由以下读出序列覆盖的靶向碱基百分比				
至少 1 个读出序列:	98.16%	98.56%	90.08%	85.94%
至少 5 个读出序列:	94.04%	95.30%	68.29%	57.92%
至少 10 个读出序列:	87.65%	89.97%	47.45%	34.12%
至少 20 个读出序列:	72.98%	77.14%	21.54%	10.82%
至少 30 个读出序列:	58.58%	63.99%	9.32%	3.28%

表 5. 500 ng DNA 起始量时 SureSelect^{XT}/TruSeq 联合方法与单一 SureSelect^{XT} 甲基化测序方法的靶向序列捕获性能比较

起始 DNA (ng)	捕获大小	SureSelect ^{XT} 甲基化测序	TruSeq 甲基化 + SureSelect ^{XT} 捕获
1000-3000	1 kb-0.5 Mb	13-14	
1000-3000	0.5-1.49 Mb	11-12	
1000-3000	> 1.5 Mb	10	
1000-3000	84 Mb 目录产品	8*	
500	84 Mb 目录产品	9-10	12-17, 取决于 qPCR
250	84 Mb 目录产品	10-11	12-17, 取决于 qPCR

* SureSelect^{XT} 甲基化测序方案中指定的循环次数

表 7. 扩增重亚硫酸盐处理文库的建议 PCR 循环次数

2. 捕获后 PCR 循环次数：

SureSelect^{XT} 甲基化测序方案建议，第一 PCR 循环 8 次以扩增重亚硫酸盐处理的文库，然后索引 PCR 循环 6 次，但对于定制文库，应当调节第一 PCR 中的循环次数。表 7 提供了 SureSelect^{XT} 甲基化测序方案或 TruSeq 甲基化试剂盒联合 SureSelect^{XT} 捕获工作流程的建议循环次数。对于用来扩增重亚硫酸盐处理文库的第一 PCR，仅改变循环次数，而对于第二次索引 PCR，6 次循环保持不变。此外，还应提供 DNA 起始量为 250 ng 至 3 µg 的起始 PCR 循环次数。

结论

Agilent SureSelect^{XT} 甲基化测序靶向序列捕获平台为甲基化基因组区域研究提供了具有单碱基分辨率的高度可靠且高效的方法。现有产品包括目录人甲基化测序捕获设计以及小鼠和大鼠甲基化测序设计。

可以用定制化甲基化测序设计附带某些工作流程改进，轻易实现靶向任何目的区域的灵活性（从 < 100 kb 至 > 100 Mb）。这项研究表明，SureSelect^{XT} 甲基化测序工作流程在 DNA 起始量为 500 ng

和 250 ng 时均能够产生在读取深度覆盖率方面与 1-3 µg 推荐 DNA 起始量相当的结果。

还提供了使用定制甲基化测序文库时的方案改进细节（表 7）。此外，还评估了 TruSeq 甲基化试剂盒联合 SureSelect^{XT} 捕获文库对低 DNA 起始量的实用性，但这种联合实现的结果并未与采用单一 SureSelect^{XT} 甲基化测序方法生成的那些结果相当，这可能归因于文库复杂度降低或方案优化不充分。

参考文献

1. “Agilent SureSelect^{XT} Human Methyl-Seq for the Quantitative Analysis of DNA Methylation with Single-Base Resolution” (Agilent SureSelect^{XT} 人甲基化测序对 DNA 甲基化的单碱基分辨率定量分析), 安捷伦出版号 5991-0166EN
2. Miura F and Ito T. “Highly sensitive targeted methylome sequencing by post-bisulfite adaptor tagging.” *DNA Res* **22**, 13-18 (2014)

可靠结果，完整方案。

PR7000-0620

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017

2017 年 1 月 27 日，中国出版

5991-7838CHCN

如需了解更多信息，请访问：

www.agilent.com/genomics

查找当地的安捷伦客户服务中心：

www.agilent.com/genomics/contactus

免费专线：

800-820-3278

400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

仅限研究使用。不可用于诊断目的。



Agilent Technologies