

Behandling af prøver

- 1 Gennemfør følgende trin for hver portion:
 - a Centrifuger ved 1600 × g i 10 minutter ved 4 °C.
 - b Påbegynd plasmaisolering inden for 15 minutter.
- 2 Kontrollér, at hvert rør indeholder mindst 1,5 ml plasma over buffy coat-laget.
- 3 Tag hætte af rørene, og sæt dem i rørholderne.

Plasmaisolering

- 1 Indtast batch-ID'et og brugernavnet.
- 2 Overfør et prøveark, eller klik på **No Sample Sheet** (Ingen prøveark).
- 3 Vælg batchstørrelsen.
- 4 Vælg antallet af NTC'er (No Template Controls).
- 5 Overfør prøverne, spidserne og pladerne (med strekkoden mod højre) til holderen.
- 6 Overvåg de automatiserede trin.
- 7 Når de er gennemført, skal du klikke på **Unload** (Ryd) for at rydde dækket.
- 8 Fjern dybbrøndspladen Intermediær Plasma
 - a Kontrollér pladen for konsistente voluminer.
 - b Notér eventuelle uoverensstemmelser.
 - c Forsegl pladen, overfør den med balance, og centrifuger den ved 5600 × g i 10 minutter.
- 9 Klik på **Yes** (Ja).
- 10 Fjern pladeforseglingen, og overfør pladen til holderen igen.
- 11 Overvåg de automatiserede trin.
- 12 Når de er gennemført, skal du klikke på **Unload** (Ryd) for at rydde dækket.
- 13 Når du får besked derom via Workflow Manager, skal du tømme holderne og dækket.
- 14 Fjern dybbrøndspladen Final Plasma.
- 15 Kontrollér pladen for konsistente voluminer, synlige cellepellets og markant hæmolyse.
- 16 Ugyldiggør prøver med en synlig cellepellet eller markant hæmolyse.
- 17 Indtast kommentarer om de berørte brønde.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper, skal du forsegle pladen Final Plasma og opbevare den ved 2 °C til 8 °C i op til 7 dage.

cfDNA-ekstraktion

- 1 Overfør spidser.
- 2 Indtast placeringen af den første og sidste spids på hvert spidsstativ.
- 3 Scan strekkoderne på Extraction Box.
- 4 Indtast brugernavn eller initialer på den person, der har klargjort reagenser.
- 5 Scan strekkoderne på Accessory Box.
- 6 Indtast brugernavn eller initialer på den person, der har klargjort reagenser.
- 7 Tag forseglingen af dybbrøndspladen Final Plasma, og overfør pladerne (med strekkoden mod højre) til holderen.
- 8 Hvis der ikke er batches i alle brønde på pladen, dækkes de ubrugte brønde (kolonne 4-12 ved 24 prøvebatches og kolonne 7-12 ved 48 prøvebatches) med en tilklippet pladeforsegling.
- 9 Overfør pladen DNA-binding til vakuummanifolden.
- 10 Markér afkrydsningsfeltet **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Er DNA-bindingspladepolonnerne forseglede?), og klik så på **OK**.
- 11 Hæld reagenserne i kar, og overfør dem.
- 12 Flyt reagenser til dybbrøndsreservoirerne, og overfør dem.
- 13 Vent, til reagensvolumenkontrollen er gennemført.
- 14 Kontrollér, at vakuumaffaldsbeholderen ikke er mere end halvt fyldt (tømning anbefales).
- 15 Overvåg de automatiserede trin.
- 16 Centrifuger pladen DNA-binding ved 5600 × g i 10 minutter.
- 17 Rengør vakuumsystemet med 70 % EtOH, imens centrifugeringen kører.

- 18 Efter centrifugering: Fjern forseglingen fra de brønde, der indeholder prøver, på pladen DNA-binding, og placer den oven på pladen cfDNA-eluering.
- 19 Overvåg de automatiserede trin.
- 20 Efter inkubation: Markér afkrydsningsfeltet **Plates are assembled as indicated** (Plader er samlet som anvist).
- 21 Centrifuger pladen DNA-binding ved 5600 × g i 2 minutter.
- 22 Kontrollér pladen cfDNA-eluering for konsistente voluminer.
- 23 Forsegl og gem pladen cfDNA-eluering med henblik på biblioteksklargøring.
- 24 Når du er færdig, skal du klikke på **Unload** (Ryd) for at rydde dækket.
- 25 Tag alle holderne ud, og rengør ML STAR-dækket.
- 26 Indtast kommentarer om de berørte brønde.
- 27 Gennemfør ét af følgende trin:
 - ▶ Hvis du vil fortsætte til klargøring af biblioteker, skal du klikke på **Yes** (Ja).
 - ▶ Hvis du vil stoppe, skal du klikke på **Exit** (Afslut).

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper, skal du forsegle pladen cfDNA-eluering og opbevare den ved -25 °C til -15 °C i op til 7 dage.

Klargøring af biblioteker

- 1 Scan strekkoderne på Library Prep Box.
- 2 Indtast brugernavn eller initialer på den person, der har klargjort reagenser.
- 3 Scan strekkoderne på Accessory Box.
- 4 Indtast brugernavn eller initialer på den person, der har klargjort reagenser.
- 5 Overfør spidser.
- 6 Indtast placeringen af den første spids på hvert spidsstativ.
- 7 Overfør plader.
- 8 Hæld reagenser i de dybbrøndsreservoirerne, og overfør dem.
- 9 Hæld reagenserne i karrene, og overfør dem.
- 10 Vent, til reagensvolumenkontrollen er gennemført.
- 11 Overvåg de automatiserede trin.
- 12 Når de er gennemført, skal du klikke på **Unload** (Ryd) for at rydde dækket.
- 13 Kontrollér pladen Biblioteker for konsistente voluminer.
- 14 Hvis pladen Biblioteker skal sættes til opbevaring, skal du forsegle den først.
- 15 Tag holderne ud, og rengør dækket.
- 16 Indtast kommentarer om de berørte brønde.
- 17 Gennemfør ét af følgende trin:
 - ▶ Hvis du vil fortsætte til kvantificering af biblioteker, skal du klikke på **Yes** (Ja).
 - ▶ Hvis du vil stoppe, skal du klikke på **Exit** (Afslut).
- 18 Medmindre du stopper, skal du fortsætte til kvantificering med det samme.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper, skal du forsegle pladen Biblioteker inden opbevaring. Bibliotekspladen er stabil i op til 7 dage efter klargøringsdatoen ved -25 °C til -15 °C.

Kvantificering af biblioteker

- 1 Scan strekkoderne på Accessory Box.
- 2 Indtast brugernavn eller initialer på den person, der har klargjort reagenser.
- 3 Overfør spidserne til spidsholderen.
- 4 Tag forseglingen af pladen Biblioteker, og overfør så pladerne.
- 5 Overfør reagensrørene uden hætter.
- 6 Hæld reagenserne i reagenskarrene, og overfør dem.
- 7 Vent, til reagensvolumenkontrollen er gennemført.
- 8 Overvåg de automatiserede trin.
- 9 Når de er fuldført, skal du klikke på **Unload** (Ryd) for at rydde dækket.
- 10 Tag pladen Biblioteker ud, og kontrollér den for konsistente voluminer, forsegl den, og opbevar den ved rumtemperatur.
- 11 Tag pladerne med 96 brønde ud, og kontrollér dem for konsistente voluminer.
- 12 Tag pladen med 384 brønde ud, og kontrollér, at der er væske i de relevante brønde.
- 13 Forsegl pladen med en folieforsegling.
- 14 Centrifuger ved 1000 × g i 20 sekunder.
- 15 Inkuber ved rumtemperatur i 10 minutter, beskyttet mod lys.
- 16 Tag alle holderne ud, og rengør ML STAR-dækket.
- 17 Efter inkubation skal du fjerne folieforseglingen og overføre pladen med 384 brønde til mikropladelæseren.
- 18 Dobbeltklik på VeriSeq NIPT-skabelonen for at åbne den i SoftMax Pro.
- 19 Vælg **New Experiment** (Nyt eksperiment) under fanen Home (Startside).
- 20 Vælg **Read** (Læsning).
- 21 Eksportér dataene som XML, som følger.
 - a Højreklik på **Plate** (Plade), og vælg så **Rename** (Omdøb).
 - b Scan strekkoden på pladen Kvantificering, og klik så på **OK**.
 - c Klik på plade-ikonet i øverste venstre hjørne af skærmen, og vælg så **Export** (Eksportér) i menuen.
 - d Markér afkrydsningsfeltet **Expt name** (Eksportnavn), angiv pladedatoindstilling raw (rå), angiv outputformat XML, og klik på **OK**.
 - e Angiv stien til output-filen og filnavnet, og klik så på **Save** (Gem).
- 22 Indtast fluorometer-ID'et og kommentarer til kørslen på ML STAR, og overfør XML-filen.
- 23 Gennemgå analyseresultaterne.
- 24 Indtast kommentarer om de berørte brønde.
- 25 Vurder resultaterne.
 - ▶ Hvis resultaterne lever op til specifikationen, skal du fortsætte til Oprettelse af puljebiblioteker. Du finder specifikationer i tabellen over QC-målinger og -grænser for kvantificering i VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (Softwarevejledning til VeriSeq NIPT Solution v2) (dokumentnr. 1000000067940).
 - ▶ Hvis resultaterne ikke lever op til specifikationen, afbryder systemet metoden. Gentag kvantificeringsprocedurerne. Start med *Klargøring af biblioteker på side 2*.
- 26 Gennemfør ét af følgende trin:
 - ▶ Hvis du vil fortsætte til oprettelse af bibliotekspuljer, skal du klikke på **Yes** (Ja).
 - ▶ Hvis du vil stoppe, skal du klikke på **Exit** (Afslut).

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper, skal du forsegle pladen og opbevare den ved -25 °C til -15 °C i op til 7 dage.

Oprettelse af bibliotekspuljer

- 1 Anbring pladen Biblioteker på termocykleren, og kør denatureringsprogrammet.
- 2 Centrifuger pladen Biblioteker ved 1000 x g i 20 sekunder.
- 3 Vælg puljekoncentrationen.
- 4 Overfør et prøveark, eller brug standardindstillingen.
- 5 Vælg **Start**.
- 6 Overfør spidsér.
- 7 Overfør pladen Denatureret Bibliotek.
- 8 Overfør puljerørerne.
- 9 Hæld reagenserne i reagenskarrene, og overfør dem.
- 10 Overfør spidsér.
- 11 Indtast placeringen af den første og sidste spids på hvert spidsstativ.
- 12 Overvåg de automatiserede trin.
- 13 Indtast kommentarer om de berørte brønde.
- 14 Når de er gennemført, skal du vælge **Unload** (Ryd) for at rydde dækket.
- 15 Tag rørholderen ud.
- 16 Sæt hætter på alle puljerør, bland på vortexblander, og centrifuger så kortvarigt.
- 17 Klik på **OK**.
- 18 Sekventer bibliotekerne så hurtigt som muligt efter puljeoprettelsen. Om nødvendigt kan pladen Biblioteker forsegles og opbevares ved -25 °C til -15 °C i op til 7 dage med henblik på akkumuleret opbevaring til oprettelse af nye puljer.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper, skal du sætte hætter på puljerørerne og opbevare dem ved -25 °C til -15 °C i op til 7 dage.

Klargøring af puljebiblioteker til sekventering

- 1 Overfør følgende materialer til reagenskassetten, og bland ved pipettering.
 - ▶ 900 µl Hybridization Buffer
 - ▶ 450 µl Pulje A
- 2 Fortsæt til sekventering på et next-generation-sekventeringssystem.
- 3 Gentag om nødvendigt samme fremgangsmåde for Pulje B
 - ▶ For at opnå en clusterdensitet inden for det tilstræbte område kan bibliotekspladepuljen genoprettes med brug en anden puljekoncentration på Hamilton. Genoprettelse af puljen ugyldiggør den oprindelige pulje.
 - ▶ Alternativt kan forholdet mellem puljen og HT1 (450 + 900 µl) ændres for at opnå en clusterdensitet inden for det tilstræbte område.