

Behandle prøver

- 1 Fullfør følgende trinn for hver alikvot:
 - a Sentrifuger på 1600 × g i 10 minutter ved 4 °C.
 - b Start plasmaisolering innen 15 minutter.
- 2 Undersøk for å bekrefte at hvert rør inneholder minst 1,5 ml plasma over buffy coat.
- 3 Ta hettene av rørene, og last dem inn i rørbærerne.

Isolere plasma

- 1 Skriv inn parti-ID og brukernavn.
- 2 Last inne et prøveark, eller klikk på **No Sample Sheet** (Uten prøveark).
- 3 Velg partistørrelsen.
- 4 Velg antall kontroller uten mal (NTC-er).
- 5 Last prøvene, spissene og platene (med strekkoden mot høyre) på bæreren.
- 6 Observer de automatiserte trinnene.
- 7 Når du er ferdig, klikker du på **Unload** (Last av) for å tømme plattformen.
- 8 Fjern platen med dype brønner for intermedært plasma.
 - a Undersøk platen med tanke på konsekvente volumer.
 - b Legg merke til eventuelle uoverensstemmelser.
 - c Forsegl platen, last med balanse og sentrifuger på 5600 × g i 10 minutter.
- 9 Klikk på **Yes** (Ja).
- 10 Fjern plateforseglingen, og last platen på bæreren på nytt.
- 11 Observer de automatiserte trinnene.
- 12 Når du er ferdig, klikker du på **Unload** (Last av) for å tømme plattformen.
- 13 Når arbeidsprosessbehandlingen ber deg om det, tømmer du bærerne og plattformen.
- 14 Fjern platen med dype brønner for sluttplasma.
- 15 Undersøk platen med tanke på konsekvente volumer, synlige cellepelleter og overdreven hemolyse.
- 16 Ugyldiggjør prøver med en synlig cellepellet eller overdreven hemolyse.
- 17 Skriv inn kommentarer om berørte brønner.

SIKKERT STOPPUNKT

Hvis du skal stoppe, forsegler du platen for sluttplasma og oppbevarer den ved 2 °C til 8 °C i opptil 7 dager.

Ekstrahere cfDNA

- 1 Last inn spisser.
- 2 Angi plasseringen til den første og siste spissen for hvert spisstativ.
- 3 Skann ekstraksjonsboksens strekkoder.
- 4 Angi brukernavnet eller initialene til personen som klargjør reagensene.
- 5 Skann tilbehørsboksens strekkoder.
- 6 Angi brukernavnet eller initialene til personen som klargjør reagensene.
- 7 Åpne platen med dype brønner for sluttplasma, og last platene (med strekkoden mot høyre) på bæreren.
- 8 For delvise platepartier påføres en tilpasset plateforsegling over de ubrukte brønnene (kolonne 4–12 for 24 prøvepartier og kolonne 7–12 for 48 prøvepartier).
- 9 Last DNA-bindingsplaten på vakuummanifolden.
- 10 Velg avmerkingsboksen **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Er DNA-bindingsplatekolonner forseglet?), og klikk deretter på **OK**.
- 11 Tøm reagensene i rør, og last dem inn.
- 12 Overfør reagenser til beholdere med dype brønner, og last dem inn.
- 13 Vent til reagensvolumkontrollen er fullført.
- 14 Bekreft at vakuumavfallet ikke er mer enn halvfullt (tomt anbefales).
- 15 Observer de automatiserte trinnene.
- 16 Sentrifuger DNA-bindingsplaten på 5600 × g i 10 minutter.
- 17 Under sentrifugering rengjør du vakuuet med 70 % EtOH.

- 18 Etter sentrifugering fjerner du forseglingen på brønnene som inneholder prøver på DNA-bindingsplaten, og plasserer den oppå cfDNA-elueringsplaten.
- 19 Observer de automatiserte trinnene.
- 20 Etter inkubasjon velger du avmerkingsboksen **Plates are assembled as indicated** (Plater settes sammen som angitt).
- 21 Sentrifuger DNA-bindingsplaten på 5600 × g i 2 minutter.
- 22 Undersøk cfDNA-elueringsplaten med tanke på konsekvente volumer.
- 23 Forsegl og ta vare på cfDNA-elueringsplaten med tanke på bibliotekklargjøring.
- 24 Når du er ferdig, klikker du på **Unload** (Last av) for å tømme plattformen.
- 25 Last ut alle bærere, og rengjør ML STAR-plattformen.
- 26 Skriv inn kommentarer om berørte brønner.
- 27 Utfør ett av følgende trinn:
 - ▶ Hvis du vil fortsette til bibliotekklargjøring, klikker du på **Yes** (Ja).
 - ▶ Hvis du vil stoppe, klikker du på **Exit** (Avslutt).

SIKKERT STOPPUNKT

Hvis du skal stoppe, forsegler du cfDNA-elueringsplaten og oppbevarer den ved –25 °C til –15 °C i opptil 7 dager.

Klargjøre biblioteker

- 1 Skann bibliotekklargjøringsboksens strekkoder.
- 2 Angi brukernavnet eller initialene til personen som klargjør reagensene.
- 3 Skann tilbehørsboksens strekkoder.
- 4 Angi brukernavnet eller initialene til personen som klargjør reagensene.
- 5 Last inn spisser.
- 6 Angi plasseringen til den første for hvert spisstativ.
- 7 Last inn plater.
- 8 Tøm reagenser i beholderne med dype brønner, og last dem inn.
- 9 Tøm reagenser i rør, og last dem inn.
- 10 Vent til reagensvolumkontrollen er fullført.
- 11 Observer de automatiserte trinnene.
- 12 Når du er ferdig, klikker du på **Unload** (Last av) for å tømme plattformen.
- 13 Undersøk bibliotekplaten med tanke på konsekvente volumer.
- 14 Forsegl og behold bibliotekplaten hvis den skal oppbevares.
- 15 Last ut bærere, og rengjør plattformen.
- 16 Skriv inn kommentarer om berørte brønner.
- 17 Utfør ett av følgende trinn:
 - ▶ Hvis du vil fortsette til bibliotekkvantifisering, klikker du på **Yes** (Ja).
 - ▶ Hvis du vil stoppe, klikker du på **Exit** (Avslutt).
- 18 Med mindre du skal stoppe, fortsetter du straks med kvantifisering.

SIKKERT STOPPUNKT

Hvis du skal stoppe, forsegler du bibliotekplaten før oppbevaring. Bibliotekplaten er stabil i opptil 7 dager fra klargjøringsdatoen ved -25°C til -15°C .

Kvantifisere biblioteker

- 1 Skann tilbehørsboksens strekkoder.
- 2 Angi brukernavnet eller initialene til personen som klargjør reagensene.
- 3 Last spisser på spissbæreren.
- 4 Åpne bibliotekplaten, og last deretter inn platene.
- 5 Last inn reagensrør uten hetter.
- 6 Tøm reagensene i reagensrør, og last dem inn.
- 7 Vent til reagensvolumkontrollen er fullført.
- 8 Observer de automatiserte trinnene.
- 9 Når du er ferdig, klikker du på **Unload** (Last av) for å tømme plattformen.
- 10 Last ut bibliotekplaten, kontroller med tanke på konsekvente volumer, forsegl den og oppbevar den ved romtemperatur.
- 11 Last ut 96-brønnersplater, og kontroller dem med tanke på konsekvente volumer.
- 12 Last ut 384-brønnersplaten, og kontroller om det er væske i de riktige brønnene.
- 13 Forsegl platen med en folieforsegling.
- 14 Sentrifuger på $1000 \times g$ i 20 sekunder.
- 15 Inkuber ved romtemperatur i 10 minutter beskyttet mot lys.
- 16 Last ut alle bærere, og rengjør ML STAR-plattformen.
- 17 Etter inkubasjon fjerner du folieforseglingen og laster 384-brønnersplaten på mikroplateleseren.
- 18 Dobbeltklikk på VeriSeq NIPT-malen for å åpne den i SoftMax Pro.
- 19 Velg **New Experiment** (Nytt eksperiment) i fanen Home (Hjem).
- 20 Velg **Read** (Les).
- 21 Eksporter dataene som XML på følgende måte.
 - a Høyreklikk på **Plate**, og velg deretter **Rename** (Gi nytt navn).
 - b Skann strekkoden på kvantifiseringsplaten, og klikk deretter på **OK**.
 - c Klikk på plateikonet øverst i venstre hjørne av skjermbildet, og velg deretter **Export** (Eksporter) i menyen.
 - d Velg avmerkingsboksen **Expt name** (Exsp.navn), angi platedatoalternativet som rå, konfigurert utdataformatet som XML og klikk deretter på **OK**.
 - e Konfigurer utdatafilbanen og -navnet, og klikk deretter på **Save** (Lagre).
- 22 På ML STAR angir du fluorometer-ID, skriver inn kommentarer om kjøringen og laster opp XML-filen.
- 23 Gå gjennom analyseresultatene.
- 24 Skriv inn kommentarer om berørte brønner.
- 25 Vurder resultatene.
 - ▶ Hvis resultatene oppfylder spesifikasjonene, fortsetter du til sammenslåing av biblioteker. Du finner spesifikasjoner i tabellen Kvalitetskontrollmetrikk og -grenser i Programvareveiledning for VeriSeq NIPT Solution v2 (dokumentnr. 1000000067940).
 - ▶ Hvis resultatene ikke oppfylder spesifikasjonene, avbryter systemet metoden. Gjenta kvantifiseringsprosedyrene fra og med *Klargjøre biblioteker på side 2*.
- 26 Utfør ett av følgende trinn:
 - ▶ Hvis du vil fortsette til sammenslåing av biblioteker, klikker du på **Yes** (Ja).
 - ▶ Hvis du vil stoppe, klikker du på **Exit** (Avslutt).

SIKKERT STOPPUNKT

Hvis du skal stoppe, forsegler du platen og oppbevarer den ved -25°C til -15°C i opptil 7 dager.

Slå sammen biblioteker

- 1 Plasser bibliotekplaten på den termiske sykleren, og kjør denatureringsprogrammet.
- 2 Sentrifuger bibliotekplaten på $1000 \times \text{g}$ i 20 sekunder.
- 3 Velg blandingskonsentrasjonen.
- 4 Last inn et prøveark, eller bruk standardarket.
- 5 Velg **Start**.
- 6 Last inn spisser.
- 7 Last inn den denaturerte bibliotekplaten.
- 8 Last inn sammenslåingsrør.
- 9 Tøm reagensene i reagensrør, og last dem inn.
- 10 Last inn spisser.
- 11 Angi plasseringen til den første og siste spissen for hvert spisstativ.
- 12 Observer de automatiserte trinnene.
- 13 Skriv inn kommentarer om berørte brønner.
- 14 Når du er ferdig, velger du **Unload** (Last av) for å tømme plattformen.
- 15 Tøm rørbæreren.
- 16 Sett lokk på hvert sammenslåingsrør, roter og sentrifuger deretter et lite øyeblikk.
- 17 Klikk på **OK**.
- 18 Sekvenser biblioteker så snart som mulig etter sammenslåing. Forsegl om nødvendig bibliotekplaten og oppbevar den ved -25°C til -15°C i opptil 7 dager samlet lagring for en eventuell ny sammenslåing.

SIKKERT STOPPUNKT

Hvis du skal stoppe, setter du hette på sammenslåingsrørene og oppbevarer dem ved -25°C til -15°C i opptil 7 dager.

Klargjøre sammenslåtte biblioteker for sekvensering

- 1 Tilsett følgende forbruksmaterieell i reagenskassetene, og deretter blander du ved å pipettere.
 - ▶ 900 μl Hybridization Buffer
 - ▶ 450 μl blanding A
- 2 Fortsett med sekvensering i et neste generasjons sekvenseringssystem.
- 3 Gjenta denne prosedyren for blanding B ved behov.
 - ▶ For å oppnå området for målklyngetetthet kan bibliotekplaten slås sammen på nytt med en annen blandingskonsentrasjon på Hamilton. En ny sammenslåing vil ugyldiggjøre den opprinnelige blandingen.
 - ▶ Alternativt kan blandingsforholdet til HT1 (450+900 μl) endres for å oppnå området for målklyngetetthet.