

Bearbeta prov

- 1 Utför följande steg för varje delmängd.
 - a Centrifugera vid 1 600 g i 10 minuter vid 4 °C.
 - b Påbörja isolering av plasma inom 15 minuter.
- 2 Kontrollera att varje rör innehåller minst 1,5 ml plasma över buffy-coat.
- 3 Ta bort rörens lock och ställ dem i rörhållarna.

Isolera plasma

- 1 Ange batch-ID och användarnamn.
- 2 Läs in ett provark eller klicka på **No Sample Sheet** (Inget provark).
- 3 Välj batchstorleken.
- 4 Välj antal NTC:er.
- 5 Ladda proven, spetsarna och plattorna (med streckkoden vänd mot höger) på hållaren.
- 6 Observera de automatiserade stegen.
- 7 Klicka på **Unload** (Lasta av) för att lasta av plattformen när du är klar.
- 8 Ta bort deepwell-plattan med intermediär plasma.
 - a Kontrollera plattan för att säkerställa att volymerna är konsekventa.
 - b Notera eventuella skillnader.
 - c Försegla plattan, ladda den försiktigt och centrifugera vid 5 600 g i 10 minuter.
- 9 Klicka på **Yes** (Ja).
- 10 Ta bort plattans försegling och ställ tillbaka den på hållaren.
- 11 Observera de automatiserade stegen.
- 12 Klicka på **Unload** (Lasta av) för att lasta av plattformen när du är klar.
- 13 Töm hållarna och plattformen när du uppmanas att göra det av Workflow Manager.
- 14 Ta bort deepwell-plattan med slutgiltig plasma.
- 15 Kontrollera om det förekommer skillnader i volym, synliga cellpellets och mycket uttalad hemolys på plattan.
- 16 Ogiltigförklara prover med en synlig cellpellet eller mycket uttalad hemolys.
- 17 Fyll i kommentarer om påverkade brunnar.

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter ska du försegla plattan med den slutgiltiga plasman och förvara den vid 2 °C till 8 °C i upp till sju dagar.

Extrahera cfDNA

- 1 Ladda spetsarna.
- 2 Ange positionen för den första och sista spetsen för varje spetshållare.
- 3 Skanna extraheringssatsens streckkoder.
- 4 Ange användarnamnet eller initialerna för personen som förberedde reagensen.
- 5 Skanna tillbehörlådans streckkoder.
- 6 Ange användarnamnet eller initialerna för personen som förberedde reagensen.
- 7 Bryt förseglingen på deepwell-plattan för slutgiltig plasma och ställ plattorna (med streckkoden vänd mot höger) på hållaren.
- 8 Om bara en del av plattan används ska du placera en tillklippt försegling över de oanvända brunnarna (kolumn 4–12 för batcher med 24 prover och kolumn 7–12 för batcher med 48 prover).
- 9 Ställ DNA-bindningsplattan på vakuumgrenröret.
- 10 Markera kryssrutan **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Är DNA-bindningsplattans kolumner förseglade?) och klicka sedan på **OK**.
- 11 Häll reagenserna i behållare och ladda dem.
- 12 Överför reagenserna till deepwell-behållare och ladda dem.
- 13 Vänta tills reagensvolymkontrollen har slutförts.
- 14 Kontrollera att behållaren för vakuumavfallet inte är mer än halvfull (den ska helst vara tom).
- 15 Observera de automatiserade stegen.
- 16 Centrifugera DNA-bindningsplattan vid 5 600 g i 10 minuter.

- 17 Rengör vakuumsystemet med 70-procentig etanol under centrifugeringen.
- 18 Efter centrifugeringen ska du bryta förseglingen på brunnarna som innehåller prov på DNA-bindningsplattan och ställa den på cfDNA-euleringsplattan.
- 19 Observera de automatiserade stegen.
- 20 Markera kryssrutan **Plates are assembled as indicated** (Plattor är monterade enligt anvisningarna) efter inkubationen.
- 21 Centrifugera DNA-bindningsplattan vid 5 600 g i 2 minuter.
- 22 Kontrollera cfDNA-euleringsplattan för att säkerställa att volymen är konsekvent.
- 23 Försegla och behåll cfDNA-euleringsplattan för bibliotekspreparering.
- 24 Klicka på **Unload** (Lasta av) för att lasta av plattformen när du är klar.
- 25 Lasta av alla hållare och rengör plattformen på ML STAR.
- 26 Fyll i kommentarer om påverkade brunnar.
- 27 Utför ett av följande steg:
 - ▶ Klicka på **Yes** (Ja) för att fortsätta till bibliotekspreparering.
 - ▶ Klicka på **Exit** (Avsluta) för att avsluta.

SÅKER STOPPUNKT

Om du avbryter ska du försegla euleringsplattan med cfDNA och förvara den vid -25 °C till -15 °C i upp till sju dagar.

Förbered bibliotek

- 1 Skanna biblioteksprepareringssatsens streckkoder.
- 2 Ange användarnamnet eller initialerna för personen som förberedde reagensen.
- 3 Skanna tillbehörlådans streckkoder.
- 4 Ange användarnamnet eller initialerna för personen som förberedde reagensen.
- 5 Ladda spetsarna.
- 6 Ange positionen för den första spetsen för varje spetshållare.
- 7 Ladda plattorna.
- 8 Häll reagenserna i deepwell-behållarna och ladda dem.
- 9 Häll reagenserna i behållare och ladda dem.
- 10 Vänta tills reagensvolymkontrollen har slutförts.
- 11 Observera de automatiserade stegen.
- 12 Klicka på **Unload** (Lasta av) för att lasta av plattformen när du är klar.
- 13 Kontrollera biblioteksplattan för att säkerställa att volymerna är konsekventa.
- 14 Försegla och ställ undan biblioteksplattan om du vill behålla den.
- 15 Lasta av hållarna och rengör plattformen.
- 16 Fyll i kommentarer om påverkade brunnar.
- 17 Utför ett av följande steg:
 - ▶ Klicka på **Yes** (Ja) för att fortsätta till bibliotekskvantifiering.
 - ▶ Klicka på **Exit** (Avsluta) för att avsluta.

- 18 Fortsätt omedelbart med kvantifieringen om du inte avbryter förfarandet här.

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter ska du försegla biblioteksplattan innan den förvaras. Biblioteksplattan är stabil i upp till 7 dagar från förberedelsedagen om den förvaras vid -25 °C till -15 °C.

Kvantifiera bibliotek

- 1 Skanna tillbehörslådans streckkoder.
- 2 Ange användarnamnet eller initialerna för personen som förberedde reagensen.
- 3 Ladda spetsarna på spetshållarna.
- 4 Bryt förseglingen på biblioteksplattan och ladda sedan plattorna.
- 5 Ladda uppsättningsrören utan lock.
- 6 Håll reagenserna i reagensbehållare och ladda dem.
- 7 Vänta tills reagensvolymkontrollen har slutförts.
- 8 Observera de automatiserade stegen.
- 9 Klicka på **Unload** (Lasta av) för att lasta av plattformen när du är klar.
- 10 Lasta av biblioteksplattan och kontrollera att volymerna är konsekventa. Försegla den sedan och förvara den i rumstemperatur.
- 11 Lasta av plattorna med 96 brunnar och kontrollera att volymerna är konsekventa.
- 12 Lasta av plattan med 384 brunnar och kontrollera att det finns vätska i lämpliga brunnar.
- 13 Försegla plattan med en folieförsegling.
- 14 Centrifugera vid 1 000 g i 20 sekunder.
- 15 Inkubera vid rumstemperatur i 10 minuter och skydda från ljus.
- 16 Lasta av alla hållare och rengör plattformen på ML STAR.
- 17 Efter inkubationen tar du bort folieförseglingen och ställer plattan med 384 brunnar på mikroplattans läsare.
- 18 Dubbelklicka på VeriSeq NIPT-mallen för att öppna den i SoftMax Pro.

- 19 Välj **New Experiment** (Nytt försök) på fliken Home (Start).
- 20 Välj **Read** (Läs av).
- 21 Exportera data som XML enligt följande.
 - a Högerklicka på **Plate** (Platta) och välj sedan **Rename** (Byt namn).
 - b Skanna kvantifieringsplattans streckkod och klicka sedan på **OK**.
 - c Klicka på ikonen för plattor i det övre vänstra hörnet på skärmen och välj sedan **Export** (Exportera) i menyn.
 - d Markera kryssrutan **Expt name** (Exportera namn), ange plattans datumalternativ som raw, ange utdataformatet till XML och klicka sedan på **OK**.
 - e Ange utdatafilens sökväg och namn. Klicka sedan på **Save** (Spara).
- 22 Ange fluorimeter-ID, ange kommentarer för körningen och ladda upp XML-filen på ML STAR.
- 23 Granska analysresultaten.
- 24 Fyll i kommentarer om påverkade brunnar.
- 25 Utvärdera resultaten.
 - ▶ Gå vidare till Uppsättningsbibliotek om resultaten möter specifikationerna. Specifikationer finns i QC-måtten för kvantifiering och tabellen med gränsvärden i Programhandbok för VeriSeq NIPT Solution v2 (dokumentnr 1000000067940).
 - ▶ Systemet avbryter förfarandet om resultaten inte möter specifikationerna. Upprepa kvantifieringsförfarandena som börjar med *Förbered bibliotek på sidan 2*.

- 26 Utför ett av följande steg:
- ▶ Klicka på **Yes** (Ja) för att fortsätta till uppsättningsbibliotek.
 - ▶ Klicka på **Exit** (Avsluta) för att avsluta.

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter förfarandet kan du förvara plattan vid $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i upp till sju dagar om du förseglar den.

Uppsättningsbibliotek

- 1 Ställ biblioteksplattan på termocyklern och kör denatureringsprogrammet.
- 2 Centrifugera biblioteksplattan vid 1 000 g i 20 sekunder.
- 3 Välj uppsättningskoncentration.
- 4 Läs in ett provark eller använd standardalternativet.
- 5 Välj **Start** (Starta).
- 6 Ladda spetsarna.
- 7 Ladda den denaturerade biblioteksplattan.
- 8 Ladda uppsättningsrören.
- 9 Håll reagenserna i reagensbehållare och ladda dem.
- 10 Ladda spetsarna.
- 11 Ange positionen för den första och sista spetsen för varje spetshållare.
- 12 Observera de automatiserade stegen.
- 13 Fyll i kommentarer om påverkade brunnar.
- 14 Välj **Unload** (Lasta av) för att lasta av plattformen när förfarandet har slutförts.
- 15 Lasta av rörhållaren.
- 16 Sätt lock på alla uppsättningsrör, vortexblanda dem och centrifugera dem sedan kort.
- 17 Klicka på **OK**.
- 18 Sekvensera biblioteken så snart som möjligt efter uppsättningsprocessen. Om du eventuellt vill att uppsättningen körs om ska du försegla biblioteksplattan och förvara den vid $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i upp till sju dagar i följd.

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter ska du fästa lock på uppsättningsrören och förvara dem vid $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i upp till sju dagar.

Förbereda uppsättningsbibliotek för sekvensering

- 1 Tillsätt följande förbrukningsmaterial i patronen med reagenser och pipettera sedan blandningen.
 - ▶ 900 μl hybridiseringsbuffert
 - ▶ 450 μl uppsättning A
- 2 Fortsätt med sekvensering på ett NGS-system.
- 3 Upprepa det här förfarandet för Uppsättning B om det behövs.
 - ▶ Biblioteksplattan kan körs om med en annan uppsättningskoncentration på Hamilton för att uppnå rätt målklustertäthetsintervall. Om uppsättningen körs om ogiltigförklaras den ursprungliga uppsättningen.
 - ▶ Det går även att anpassa förhållandet mellan uppsättningen och HT1 (450 + 900 μl) för att uppnå målklustertäthetsintervallet.