

Näytteiden käsitteleminen

- 1 Tee seuraavat toimet kaikille alikvooteille:
 - a Sentrifugoi voimalla $1\ 600 \times g$ 10 minuutin ajan lämpötilassa $4\ ^\circ\text{C}$.
 - b Aloita plasman eristys 15 minuutin sisällä.
- 2 Tarkista, että kukin putki sisältää vähintään 1,5 ml plasmaa valkosolukerroksen päällä.
- 3 Poista putkista korkit ja aseta putket putkitelineisiin.

Plasman eristäminen

- 1 Anna erätunniste ja käyttäjätunnus.
- 2 Lataa näytetiedosto tai valitse **No Sample Sheet** (Ei näytetiedostoa).
- 3 Valitse erän koko.
- 4 Valitse mallittomien kontrollien (NTC) määrä.
- 5 Lataa näytteet, kärjet ja levyt (viivakoodi oikealle suunnattuna) telineeseen.
- 6 Tarkkaile automaattisia toimia.
- 7 Kun olet valmis, poista alusta valitsemalla **Unload** (Poista).
- 8 Poista keskiplasman syväkuoppalevy.
 - a Tarkista, että levyn kussakin kuopassa on sama määrä.
 - b Huomioi epäyhdenmukaisuudet.
 - c Peitä levy, aseta tasapaino ja sentrifugoi voimalla $5\ 600 \times g$ 10 minuutin ajan.
- 9 Valitse **Yes** (Kyllä).
- 10 Poista levypeitin ja aseta levy uudelleen telineeseen.
- 11 Tarkkaile automaattisia toimia.
- 12 Kun olet valmis, poista alusta valitsemalla **Unload** (Poista).
- 13 Kun Workflow Manager niin kehottaa, tyhjennä telineet ja alusta.
- 14 Poista lopullisen plasman syväkuoppalevy.
- 15 Tarkista, että levyn kussakin kuopassa on sama määrä. Tarkista lisäksi, havaitsetko näkyviä solupellettejä tai liiallista hemolyysiä.
- 16 Hylkää näytteet, joissa havaitset näkyviä solupellettejä tai liiallista hemolyysiä.
- 17 Kirjoita kohdekuoppia koskevat huomautukset.

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, peitä lopullisen plasman levy ja aseta se säilytykseen $2-8\ ^\circ\text{C}$:seen enintään 7 vuorokaudeksi.

cfDNA:n eristäminen

- 1 Lataa kärjet.
- 2 Anna kunkin kärkitelineen ensimmäisen ja viimeisen kärjen paikka.
- 3 Skannaa eristämiserasian viivakoodit.
- 4 Anna käyttäjätunnus tai reagenssien valmistelijan nimikirjaimet.
- 5 Skannaa lisävarusterasian viivakoodit.
- 6 Anna käyttäjätunnus tai reagenssien valmistelijan nimikirjaimet.
- 7 Poista peitin lopullisen plasman syväkuoppalevystä ja aseta levyt (viivakoodi oikealle suunnattuna) levytelineeseen.
- 8 Osittaisissa levyerissä aseta leikattu levypeitin käyttämättömien kuoppien päälle (sarakkeet 4–12 käytettäessä 24 näytteen erää ja sarakkeet 7–12 käytettäessä 48 näytteen erää).
- 9 Aseta DNA:n sidontalevy imuputkiston päälle.
- 10 Valitse **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Onko DNA:n sidontalevyn sarakkeet peitetty?) -valintaruutu ja valitse sitten **OK**.
- 11 Annostele reagenssit putkiin ja lataa.
- 12 Siirrä reagenssit syväkuoppasäiliöihin ja lataa.
- 13 Odota, että reagenssimäärän tarkistus päättyy.
- 14 Tarkista, että imujäte ei ole yli puoliksi täynnä (tyhjää suositellaan).
- 15 Tarkkaile automaattisia toimia.
- 16 Sentrifugoi DNA:n sidontalevyä voimalla 5 600 × g 10 minuutin ajan.
- 17 Puhdista imuputkisto sentrifugoinnin aikana 70-prosenttisella EtOH:lla.
- 18 Sentrifugoinnin jälkeen peitä kuopat, joissa on näytteitä DNA:n sidontalevyssä, ja aseta levy cfDNA:n eluutiolevyn päälle.

- 19 Tarkkaile automaattisia toimia.
- 20 Valitse inkuboinnin jälkeen **Plates are assembled as indicated** (Levyt on koottu ohjeiden mukaan) -valintaruutu.
- 21 Sentrifugoi DNA:n sidontalevyä voimalla 5 600 × g 2 minuutin ajan.
- 22 Tarkista, että cfDNA:n eluutiolevyn kussakin kuopassa on sama määrä.
- 23 Peitä ja säilytä cfDNA-eluutiolevy kirjaston valmistelua varten.
- 24 Kun olet valmis, poista alusta valitsemalla **Unload** (Poista).
- 25 Poista kaikki telineet ja puhdista ML STAR -laitteen alusta.
- 26 Kirjoita kohdekuoppia koskevat huomautukset.
- 27 Tee jokin seuraavista:
 - ▶ Jatka kirjastojen valmistelua valitsemalla **Yes** (Kyllä).
 - ▶ Lopeta valitsemalla **Exit** (Lopeta).

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, peitä cfDNA-eluutiolevy ja aseta se säilytykseen –25...–15 °C:seen enintään 7 vuorokaudeksi.

Kirjastojen valmistelu

- 1 Skannaa kirjastonvalmistelurasian viivakoodit.
- 2 Anna käyttäjätunnus tai reagenssien valmistelijan nimikirjaimet.
- 3 Skannaa lisävarusterasian viivakoodit.
- 4 Anna käyttäjätunnus tai reagenssien valmistelijan nimikirjaimet.
- 5 Lataa kärjet.
- 6 Anna kunkin kärkitelineen ensimmäisen kärjen paikka.
- 7 Lataa levyt.
- 8 Annostele reagenssit syväkuoppasäiliöihin ja lataa.
- 9 Annostele reagenssit putkiin ja lataa.
- 10 Odota, että reagenssimäärän tarkistus päättyy.
- 11 Tarkkaile automaattisia toimia.
- 12 Kun olet valmis, poista alusta valitsemalla **Unload** (Poista).
- 13 Tarkista, että kirjastolevyn kussakin kuopassa on sama määrä.
- 14 Jos kirjastolevy on tarkoitus säilyttää, peitä ja säästä se.
- 15 Poista telineet ja puhdista alusta.
- 16 Kirjoita kohdekuoppia koskevat huomautukset.
- 17 Tee jokin seuraavista:
 - ▶ Jatka kirjastojen kvantifioimista valitsemalla **Yes** (Kyllä).
 - ▶ Lopeta valitsemalla **Exit** (Lopeta).
- 18 Ellet lopeta, jatka kvantifointia välittömästi.

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, peitä kirjastolevy ennen sen asettamista säilytykseen. Kirjastolevy on stabiili enintään 7 vuorokautta valmistelupäivästä, kun sitä säilytetään lämpötilassa –25...–15 °C.

Kirjastojen kvantifioiminen

- 1 Skannaa lisävarusterasian viivakoodit.
- 2 Anna käyttäjätunnus tai reagenssien valmistelijan nimikirjaimet.
- 3 Lisää kärjet kärkitelineeseen.
- 4 Poista kirjastolevyn peitin ja lataa sitten levyt.
- 5 Lataa reagenssiputket ilman korkkeja.
- 6 Annostelee reagenssit reagenssiputkiin ja lataa.
- 7 Odota, että reagenssimäärän tarkistus päättyy.
- 8 Tarkkaile automaattisia toimia.
- 9 Kun olet valmis, poista alusta valitsemalla **Unload** (Poista).
- 10 Poista kirjastolevy, tarkista määrien yhdenmukaisuus, peitä ja säilytä huoneenlämmössä.
- 11 Poista 96 kuopan levyt ja tarkista, että määrä on sama kussakin kuopassa.
- 12 Poista 384 kuopan levy ja tarkista, että tarvittavissa kuopissa on nestettä.
- 13 Peitä levy foliopeittimellä.
- 14 Sentrifugoi voimalla 1000 × g 20 sekunnin ajan.
- 15 Inkuboi huoneenlämmössä 10 minuuttia suojattuna valolta.
- 16 Poista kaikki telineet ja puhdistaa ML STAR -laitteen alusta.
- 17 Poista foliopeitin inkuboinnin jälkeen ja aseta 384 kuopan levy mikrolevylukijaan.
- 18 Avaa VeriSeq NIPT -malli SoftMax Pro -ohjelmistossa kaksoisnapsauttamalla.
- 19 Valitse Home (Aloitus) -välilehdestä **New Experiment** (Uusi testi).
- 20 Valitse **Read** (Lue).
- 21 Vie tiedot XML-muotoon seuraavasti.
 - a Napsauta **Plate** (Levy) -kohtaa hiiren kakkospainikkeella ja valitse sitten **Rename** (Nimeä uudelleen).
 - b Skannaa kvantifiointilevyn viivakoodi ja valitse sitten **OK**.
 - c Valitse näytön vasemmasta yläkulmasta levykuvake ja valitse sitten valikosta **Export** (Vie).
 - d Valitse **Expt name** (Vie nimi) -valintaruutu, aseta levyn päivämäärävalinnaksi raw (raaka), aseta tuotosmuoto XML:ksi ja valitse sitten **OK**.
 - e Määritä tuotettavan tiedoston polku ja nimi ja valitse **Save** (Tallenna).
- 22 Anna ML STAR -järjestelmässä fluorometrin tunniste, kirjoita ajoa koskevat huomautukset ja lataa XML-tiedosto.
- 23 Tarkastele analyysin tuloksia.
- 24 Kirjoita kohdekuoppia koskevat huomautukset.
- 25 Arvioi tulokset.
 - ▶ Jos tulokset läpäisevät määrityksen, jatka kirjastojen poolaukseen. Katso määritykset kvantitoinnin laadunvalvontametriikoiden ja -raja-arvojen taulukosta VeriSeq NIPT Solution v2 -ohjelmiston ohjeesta (asiakirjanro 1000000067940).
 - ▶ Jos tulokset eivät läpäise määrityksiä, järjestelmä keskeyttää menetelmän. Toista kvantifiointitoimenpiteet alkaen kohdasta *Näytteiden käsitleminen sivulla 1*.
- 26 Tee jokin seuraavista:
 - ▶ Jatka poolikirjastoihin valitsemalla **Yes** (Kyllä).
 - ▶ Lopeta valitsemalla **Exit** (Lopeta).

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, peitä levy ja aseta se säilytykseen -25...-15 °C:seen enintään 7 vuorokaudeksi.

Poolikirjastot

- 1 Aseta kirjastolevy lämpöblokin päälle ja aja denaturointiohjelma.
- 2 Sentrifugoi kirjastolevyä voimalla 1 000 × g 20 sekunnin ajan.
- 3 Valitse poolin pitoisuus.
- 4 Lataa näytetiedosto tai käytä oletusarvoa.
- 5 Valitse **Start** (Aloita).
- 6 Lataa kärjet.
- 7 Lataa denaturoitu kirjastolevy.
- 8 Lataa poolausputket.
- 9 Annostelee reagenssit reagenssiputkiin ja lataa.
- 10 Lataa kärjet.
- 11 Anna kunkin kärkitelineen ensimmäisen ja viimeisen kärjen paikka.
- 12 Tarkkaile automaattisia toimia.
- 13 Kirjoita kohdekuoppia koskevat huomautukset.
- 14 Kun olet valmis, poista alusta valitsemalla **Unload** (Poista).
- 15 Poista putkiteline.
- 16 Aseta korkki kuhunkin poolausputkeen, vorteksoi ja sentrifugoi lyhyesti.
- 17 Valitse **OK**.
- 18 Sekvensoi kirjastot mahdollisimman pian poolauksen jälkeen. Peitä kirjastolevy tarvittaessa ja säilytä sitä lämpötilassa -25...-15 °C enintään 7 vuorokautta, jotta uudelleenpoolaus on mahdollinen.

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, aseta poolausputkiin korkit ja aseta putket säilytykseen -25...-15 °C:seen enintään 7 vuorokaudeksi.

Poolattujen kirjastojen valmistelu sekvensointia varten

- 1 Lisää seuraavat tarvikkeet reagenssikasettiin ja sekoita pipetoimalla.
 - ▶ 900 µl hybridisaatiopuskuria
 - ▶ 450 µl poolia A
- 2 Jatka sekvensointia uuden sukupolven sekvensointijärjestelmällä.
- 3 Toista tämä toimenpide tarvittaessa poolille B.
 - ▶ Kohdeklusterin tiheysalueen saavuttamiseksi kirjastolevy voidaan poolata uudelleen käyttämällä eri poolauspitoisuutta Hamiltonissa. Uudelleenpoolaus mitätöi alkuperäisen poolin.
 - ▶ Vaihtoehtoisesti poolauksen suhdetta HT1:een (450 + 900 ul) voi muokata, jotta saavutetaan kohdeklusterin tiheysalue.