

Minták feldolgozása

- 1. Minden egyes rész minta esetén végezze el a következő lépéseket:
 - a Centrifugálja 1600 × g sebességgel 10 percig 4 °C-os hőmérsékleten.
 - b 15 percen belül kezdje meg a plazma izolálását.
- 2. Ellenőrizze, hogy az egyes kémcsövek legalább 1,5 ml plazmát tartalmaznak-e a határérték felett.
- 3. Távolítsa el a kupakot a csövekről, majd helyezze a csöveket a csőtartókba.

Plazma izolálása

- 1. Adja meg a sarzsazonosítót és a felhasználónevet.
- 2. Töltsön be egy mintalapot, vagy kattintson a **No Sample Sheet** (Nincs mintalap) lehetőségre.
- 3. Válassza ki a sarzs méretét.
- 4. Válassza ki a sablon nélküli kontrollok számát (NTC-k).
- 5. Helyezze be a mintákat, a hegyeket és a lemezeket (vonalkód jobbra néz) a tartóba.
- 6. Figyelje meg az automatizált lépéseket.
- 7. Ha a művelet befejeződött, az **Eltávolítás** gombra kattintva távolítsa el a fedélzetet.
- 8. Távolítsa el a „Köztes plazma” mélyüregű lemezt.
 - a Ellenőrizze a lemezt, hogy a mennyiségek konzisztensek-e.
 - b Jegyezzen fel minden inkonzisztenciát.
 - c Zárja le a lemezt, egyensúlyozza ki, majd centrifugálja 5600 × g sebességgel 10 percig.
- 9. Kattintson a **Yes** (Igen) lehetőségre.
- 10. Távolítsa el a lemez szigetelését, majd helyezze vissza a lemezt a tartóba.
- 11. Figyelje meg az automatizált lépéseket.
- 12. Ha a művelet befejeződött, az **Eltávolítás** gombra kattintva távolítsa el a fedélzetet.
- 13. Ha a Workflow Manager erre kéri, ürítse ki a tartókat és a fedélzetet.
- 14. Távolítsa el a „Végső plazma” mélyüregű lemezt.
- 15. Ellenőrizze a lemezt, hogy a mennyiségek konzisztensek-e, illetve láthatók-e sejt pelletek vagy túlzott mértékű hemolízisre utaló jelek.

- 16. Érvénytelenítse azokat a mintákat, ahol sejt pellet vagy túlzott mértékű hemolízis látható.
- 17. Írjon megjegyzést az érintett üregekhez.

BIZTONSÁGOS LEÁLLÍTÁSI PONT

Ha félbehagyja a műveletet, zárja le a „Végső plazma” lemezt, majd -2 °C és -8 °C közötti hőmérsékleten legfeljebb 7 napig tárolja.

cfDNS extrakciója

- 1. Helyezze be a hegyeket.
- 2. Adja meg az első és az utolsó hegy pozícióját minden egyes hegytartóhoz.
- 3. Olvassa be a kivonási doboz vonalkódjait.
- 4. Adja meg a felhasználónevet vagy a reagenst előkészítő személy monogramját.
- 5. Olvassa be a kiegészítőket tartalmazó doboz vonalkódjait.
- 6. Adja meg a felhasználónevet vagy a reagenst előkészítő személy monogramját.
- 7. Nyissa fel a „Végső plazma” mélyüregű lemezt, majd helyezze be a lemezeket (a vonalkódot jobbra nézve) a tartóba.
- 8. Részleges lemezsarzsok esetén vigyen fel egy levágott lemezszigetelést a nem használt üregekre (24 mintás sarzsok esetén a 4–12. oszlop, 48 mintás sarzsok esetén a 7–12. oszlop).
- 9. Helyezze be a DNS-kötési lemezt a vákuum elosztócsővére.
- 10. Válassza ki az **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (A DNS-kötő lemez oszlopai szigetelve vannak?) jelölőnégyzetet, majd kattintson az **OK** gombra.
- 11. Helyezze be a reagenseket az edényekbe, majd helyezze be őket.
- 12. Vigye át a reagenseket a mély üregekbe, majd helyezze be a lemezt.
- 13. Várja meg a reagensmennyiség ellenőrzésének befejezését.
- 14. Győződjön meg róla, hogy a vákuum-hulladéktároló legfeljebb félig legyen (üres javasolt).
- 15. Figyelje meg az automatizált lépéseket.
- 16. Centrifugálja a DNS-kötési lemezt 5600 × g sebességgel 10 percig.

- 17. A centrifugálás közben tisztítsa meg a vákuumegységet 70%-os etanollal.
- 18. A centrifugálást követően szüntesse meg a DNS-kötési lemez mintákat tartalmazó üregek szigetelését, majd helyezze a cfDNS-tisztító lemez tetejére.
- 19. Figyelje meg az automatizált lépéseket.
- 20. Az inkubálást követően válassza ki a **Plates are assembled as indicated** (A lemezek a képen látható módon vannak összeszerelve) jelölőnégyzetet.
- 21. Centrifugálja a DNS-kötési lemezt 5600 x g sebességgel 2 percig.
- 22. Ellenőrizze a cfDNS-tisztító lemezt, hogy a mennyiségek konzisztensek-e.
- 23. Zárja le, majd tárolja el a cfDNS-tisztító lemezt a könyvtár előkészítéséhez.
- 24. Ha a művelet befejeződött, az **Eltávolítás** gombra kattintva távolítsa el a fedélzetet.
- 25. Távolítsa el a tartókat, majd tisztítsa meg az ML STAR fedélzetét.
- 26. Írjon megjegyzést az érintett üregekhez.
- 27. Végezze el a következő lépések valamelyikét:
 - ▶ A könyvtárak elkészítése lépéssel való folytatáshoz kattintson a **Yes** (Igen) lehetőségre.
 - ▶ A befejezéshez kattintson az **Exit** (Kilépés) lehetőségre.

BIZTONSÁGOS LEÁLLÍTÁSI PONT

Ha félbehagyja a műveletet, zárja le a cfDNS-tisztító lemezt, majd -25 °C és -15 °C közötti hőmérsékleten legfeljebb 7 napig tárolja.

Könyvtárak készítése

- 1. Olvassa be a Könyvtár-előkészítési doboz vonalkódjait.
- 2. Adja meg a felhasználónevet vagy a reagenst előkészítő személy monogramját.
- 3. Olvassa be a kiegészítőket tartalmazó doboz vonalkódjait.
- 4. Adja meg a felhasználónevet vagy a reagenst előkészítő személy monogramját.
- 5. Helyezze be a hegyeket.
- 6. Adja meg az első hely pozícióját minden egyes hegytartóhoz.
- 7. Helyezze be a lemezeket.
- 8. Töltsön reagenseket a mély üregekbe, majd helyezze be a lemezt.
- 9. Töltsön reagenseket az edényekbe, majd helyezze be őket.
- 10. Várja meg a reagensmennyiség ellenőrzésének befejezését.
- 11. Figyelje meg az automatizált lépéseket.
- 12. Ha a művelet befejeződött, az **Eltávolítás** gombra kattintva távolítsa el a fedélzetet.
- 13. Ellenőrizze a „Könyvtárak” lemezt, hogy a mennyiségek konzisztensek-e.
- 14. Tárolás esetén zárja le és tárolja el a „Könyvtárak” lemezt.
- 15. Távolítsa el a tartókat, majd tisztítsa meg a fedélzetet.
- 16. Írjon megjegyzést az érintett üregekhez.
- 17. Végezze el a következő lépések valamelyikét:
 - ▶ A könyvtárak mennyiségi meghatározásához kattintson a **Yes** (Igen) lehetőségre.
 - ▶ A befejezéshez kattintson az **Exit** (Kilépés) lehetőségre.

18. Azonnal kezdje meg a kvantifikálást (kivéve a művelet félbe hagyása esetén).

BIZTONSÁGOS LEÁLLÍTÁSI PONT

Ha félbehagyja a műveletet, a tárolás előtt zárja le a „Könyvtárak” lemezt. A „Könyvtárak” lemez az előkészítést követően legfeljebb 7 napig, -25 °C és -15 °C közötti hőmérsékleten tárolható.

Könyvtárak mennyiségi meghatározása

- 1. Olvassa be a kiegészítőket tartalmazó doboz vonalkódjait.
- 2. Adja meg a felhasználónevet vagy a reagenst előkészítő személy monogramját.
- 3. Helyezze be a hegyeket a hegytartóba.
- 4. Szüntesse meg a „Könyvtárak” lemez lezárását, majd helyezze be a lemezeket.
- 5. Távolítsa el a kupakokat a reagenscsövekről, majd helyezze be őket.
- 6. Töltse be a reagenseket a reagensedényekbe, majd helyezze be őket.
- 7. Várja meg a reagensmennyiség ellenőrzésének befejezését.
- 8. Figyelje meg az automatizált lépéseket.
- 9. Ha a művelet befejeződött, az **Eltávolítás** gombra kattintva távolítsa el a fedélzetet.
- 10. Távolítsa el a „Könyvtárak” lemezt, ellenőrizze, hogy a mennyiségek konzisztensek-e, szigetelje le a lemezt, majd szobahőmérsékleten tárolja el.
- 11. Távolítsa el a 96 üregű lemezeket, majd ellenőrizze, hogy a mennyiségek konzisztensek-e
- 12. Távolítsa el a 384 üregű lemezt, majd ellenőrizze a megfelelő üregekben lévő folyadékot.
- 13. Szigetelje le a lemezt védőfólia segítségével.
- 14. 1000 × g sebességgel 20 másodpercig centrifugázza.
- 15. 10 percig szobahőmérsékleten inkubálja fénytől védett módon.
- 16. Távolítsa el a tartókat, majd tisztítsa meg az ML STAR fedélzetét.

- 17. Az inkubálást követően távolítsa el a védőfóliát, majd helyezze be a 384 üregű lemezt a mikrolemez-olvasóba.
- 18. A VeriSeq NIPT-sablon SoftMax Pro szoftverben történő megnyitásához
- 19. Válassza a **New Experiment** (Új kísérlet) lehetőséget a Kezdőlapen.
- 20. Válassza a **Read** (Beolvasás) lehetőséget.
- 21. A következő lépéseket követve exportálja az adatokat XML-formátumban.
 - a A jobb egérgombbal kattintson a **Plate** (Lemez) lehetőségre, majd válassza a **Rename** (Átnevezés) lehetőséget.
 - b Olvassa be a kvantifikációs lemez vonalkódját, majd kattintson az **OK** gombra.
 - c A képernyő bal felső sarkában kattintson a lemez ikonra, majd válassza ki a menü **Export** (Exportálás) elemét.
 - d Jelölje be az **Expt name** (Export neve) jelölőnégyzetet, állítsa a lemez dátumára vonatkozó opciót a nyers lehetőségre, állítsa a kimeneti fájlformátumot az XML lehetőségre, majd nyomja meg az **OK** gombot.
 - e Adja meg a kimeneti fájl útvonalát és nevét, majd kattintson a **Save** (Mentés) lehetőségre.
- 22. Az ML STAR készüléken adja meg a fluorométer azonosítóját, írjon megjegyzéseket a futtatáshoz, majd tölts fel az XML-fájlt.
- 23. Tekintse át az analízis eredményeit.
- 24. Írjon megjegyzést az érintett üregekhez.

25. Értékelje ki az eredményeket.
- ▶ Ha az eredmények megfelelnek a specifikációknak, folytassa a keverékkönyvtárakkal. A specifikációkkal kapcsolatos információkért tekintse meg a QC mérőszámokat és a határértékeket tartalmazó táblázatot a VeriSeq NIPT Solution v2 szoftverútmutatóban (1000000067940 sz. dokumentum).
 - ▶ Ha az eredmények a specifikációkon kívül vannak, a rendszer megszakítja a módszert. Ismétlje meg a kvantifikációs eljárásokat az 1. oldalon található *Könyvtárak készítése*, 2. oldal.
26. Végezze el a következő lépések valamelyikét:
- ▶ A keverékkönyvtárakkal való folytatáshoz kattintson a **Yes** (Igen) lehetőségre.
 - ▶ A befejezéshez kattintson az **Exit** (Kilépés) lehetőségre.

BIZTONSÁGOS LEÁLLÍTÁSI PONT

Ha félbehagyja a műveletet, zárja le a lemezt, majd -25 °C és -15 °C közötti hőmérsékleten tárolja legfeljebb 7 napig.

Keverékkészítés a könyvtárakból

- 1. Helyezze a „Könyvtárak” lemezt a hőváltoztató inkubátorra, majd indítsa el a denaturálási programot.
- 2. Centrifugálja a „Könyvtárak” lemezt 1000 x g sebességgel 20 másodpercig.
- 3. Válassza ki a keverék koncentrációját.
- 4. Töltsön be egy mintalapot, vagy használja az alapértelmezettet.
- 5. Válassza a **Start** (Indítás) lehetőséget.
- 6. Helyezze be a hegyeket.
- 7. Helyezze be a „Denaturált könyvtár” lemezt.
- 8. Helyezze be a keverékkészítési csöveket.
- 9. Töltse be a reagenseket a reagensedényekbe, majd helyezze be őket.
- 10. Helyezze be a hegyeket.
- 11. Adja meg az első és az utolsó hegy pozícióját minden egyes hegytartóhoz.
- 12. Figyelje meg az automatizált lépéseket.
- 13. Írjon megjegyzést az érintett üregekhez.
- 14. Ha a művelet befejeződött, az **Eltávolítás** lehetőséget kiválasztva távolítsa el a fedézetet.
- 15. Távolítsa el a kémcsőtartót.
- 16. Helyezze fel a kupakot az egyes keverékkészítési csőbe, kémcsőkeverővel keverje össze, majd rövid ideig centrifugálja őket.
- 17. Kattintson az **OK** gombra.
- 18. A keverékkészítést követően a lehető legrövidebb időn belül végezze el a könyvtárak szekvenálását. Szükség esetén szigetelje le a „Könyvtárak” lemezt, majd -25 °C és -15 °C közötti hőmérsékleten tárolja el legfeljebb 7 napig (összevont tárolás), lehetővé téve ezáltal az ismételt keverékkészítést.

BIZTONSÁGOS LEÁLLÍTÁSI PONT

Ha félbehagyja a műveletet, helyezze fel a kupakot a keverékkészítési csövekre, majd -25 °C és -15 °C közötti hőmérsékleten tárolja őket legfeljebb 7 napig.

A keverékkönyvtárak előkészítése a szekvenáláshoz

1. Adj a következő fogyóeszközöket a reagenskazettába, majd pipettázással keverje őket össze.
 - ▶ 900 µl hibridizációs puffer
 - ▶ 450 µl „A” keverék
2. Folytassa a műveletet a következő generációs szekvenálórendszeren végzett szekvenálással.
3. Szükség esetén ismétlje meg a műveletet a „B” keverék esetén.
 - ▶ A klaszter-célsűrűség tartományának elérése érdekében a könyvtárlemez esetén eltérő keverékkészítési koncentrációt alkalmazva ismét el kell végezni a keverékkészítést a Hamilton berendezésen. Az ismételt keverékkészítés érvényteleníti az eredeti keveréket.
 - ▶ Másik megoldásként a keverék arányának HT1 (450+900ul) arányra történő módosításával is elérhető a klaszter-célsűrűség tartománya.