

Verwerking van monsters

- 1 Voer voor elk aliquot de volgende stappen uit:
 - a Centrifugeer gedurende 10 minuten bij $1600 \times g$ op 4°C .
 - b Start binnen 15 minuten met plasma-isolatie.
- 2 Controleer elk buisje om te zien of er ten minste 1,5 ml plasma boven de buffycoat zit.
- 3 Haal de doppen van de buisjes en plaats ze in de buisdragers.

Plasma isoleren

- 1 Voer de batch-ID en de gebruikersnaam in.
- 2 Laad een monsterblad of klik op **No Sample Sheet** (Geen monsterblad).
- 3 Selecteer de batchgrootte.
- 4 Selecteer het aantal amplificatiereagenscontroles (NTC's, no template controls).
- 5 Laad de monsters, tips en platen (met de barcode naar rechts) op de drager.
- 6 Observeer de automatische stappen.
- 7 Als u klaar bent, klikt u op **Unload** (Uitladen) om het dek uit te laden.
- 8 Verwijder de plaat met diepe monsterputjes voor tussenstap-plasma.
 - a Controleer of de plaat overal een gelijk volume heeft.
 - b Noteer alle afwijkingen.
 - c Sluit de plaat af, laad deze met balans en centrifugeer bij $5600 \times g$ gedurende 10 minuten.
- 9 Klik op **Yes** (Ja).
- 10 Verwijder de afdekfolie van de plaat en laad de plaat opnieuw op de drager.
- 11 Observeer de automatische stappen.
- 12 Als u klaar bent, klikt u op **Unload** (Uitladen) om het dek uit te laden.
- 13 Wanneer de Workflowmanager dit vraagt, moeten de dragers en het dek worden geleegd.
- 14 Verwijder de plaat met diepe monsterputjes voor definitief plasma.
- 15 Controleer de plaat op consistente volumes, zichtbare celpellets en overmatige hemolyse.
- 16 Verklaar monsters met een zichtbare celpellet of overmatige hemolyse ongeldig.

- 17 Voer opmerkingen in over aangetaste monsterputjes.

VEILIG STOPPUNT

Als u stopt, moet de Definitief plasma-plaat met afdekfolie worden afgesloten en maximaal 7 dagen worden opgeslagen bij 2°C tot 8°C .

Extraheren cfDNA

- 1 Laad de tips.
- 2 Voer de locatie van de eerste en laatste tip voor elk tiprek in.
- 3 Scan de streepjescodes op de extractiedoos.
- 4 Voer de gebruikersnaam of de initialen in van degene die het reagens heeft bereid.
- 5 Scan de streepjescodes op de accessoiredoos.
- 6 Voer de gebruikersnaam of de initialen in van degene die het reagens heeft bereid.
- 7 Verwijder de afdekfolie van de plaat met diepe monsterputjes voor definitief plasma en laad de platen (met de barcode naar rechts) op de drager.
- 8 Voor batches waarbij de plaat gedeeltelijk wordt gebruikt, de ongebruikte putjes afsluiten met een bijgesneden plaatafdekfolie (kolommen 4-12 voor 24 monsterbatches en kolommen 7-12 voor 48 monsterbatches).
- 9 Laad de DNA-bindingsplaat op het vacuümspruitstuk.
- 10 Selecteer het selectievakje **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Zijn de DNA-bindingsplaatkolommen afgesloten?) en klik vervolgens op **OK**.
- 11 Giet de reagentia in buisjes en laad deze.
- 12 Verplaats de reagentia naar reservoirs met diepe monsterputjes en laad deze.
- 13 Wacht tot de reagensvolumecontrole is uitgevoerd.
- 14 Controleer of het vacuümafvalbakje niet meer dan halfvol is (leeg wordt aanbevolen).
- 15 Observeer de automatische stappen.
- 16 Centrifugeer de DNA-bindingsplaat op 5600 × g gedurende 10 minuten.

- 17 Reinig het vacuüm met 70% EtOH tijdens het centrifugeren.
- 18 Verwijder na het centrifugeren de afdekfolie van de monsterputjes met monster op de DNA-bindingsplaat en plaats deze bovenop de cfDNA-elutieplaat.
- 19 Observeer de automatische stappen.
- 20 Selecteer na de incubatie het selectievakje **Plates are assembled as indicated** (Platen zijn geplaatst als aangegeven).
- 21 Centrifugeer de DNA-bindingsplaat bij 5600 × g gedurende 2 minuten.
- 22 Controleer of er in elk monsterputje van de cfDNA-elutieplaat een even groot volume zit
- 23 Sluit de cfDNA-elutieplaat af met afdekfolie en bewaar deze voor de bibliotheekvoorbereiding.
- 24 Als u klaar bent, klikt u op **Unload** (Uitladen) om het dek uit te laden.
- 25 Laad alle dragers uit en reinig het ML STAR-dek.
- 26 Voer opmerkingen in over aangetaste monsterputjes.
- 27 Voer een van de volgende stappen uit:
 - ▶ Klik op **Yes** (Ja) om verder te gaan met het voorbereiden van bibliotheken.
 - ▶ Klik op **Exit** (Afsluiten) om te stoppen.

VEILIG STOPPUNT

Als u stopt, moet de cfDNA-elutieplaat met afdekfolie worden afgesloten en maximaal 7 dagen worden opgeslagen bij -25 °C tot -15 °C.

Bibliotheken voorbereiden

- 1 Scan de streepjescodes van de bibliotheekvoorbereidingsdoos.
- 2 Voer de gebruikersnaam of de initialen in van degene die het reagens heeft bereid.
- 3 Scan de streepjescodes op de accessoiredoos.
- 4 Voer de gebruikersnaam of de initialen in van degene die het reagens heeft bereid.
- 5 Laad de tips.
- 6 Voer de locatie van de eerste tip voor elk tiprek in.
- 7 Laad de platen.
- 8 Giet reagentia in de reservoirs met diepe monsterputjes en laad deze.
- 9 Giet reagentia in buisjes en laad deze.
- 10 Wacht tot de reagensvolumecontrole is uitgevoerd.
- 11 Observeer de automatische stappen.
- 12 Als u klaar bent, klikt u op **Unload** (Uitladen) om het dek uit te laden.
- 13 Controleer of de bibliothekenplaat overal een gelijk volume heeft.
- 14 Bij opslaan de bibliothekenplaat afsluiten met afdekfolie en deze bewaren.
- 15 Laad de dragers uit en reinig het dek.
- 16 Voer opmerkingen in over aangetaste monsterputjes.
- 17 Voer een van de volgende stappen uit:
 - ▶ Klik op **Yes** (Ja) om verder te gaan met het kwantificeren van bibliotheken.
 - ▶ Klik op **Exit** (Afsluiten) om te stoppen.
- 18 Tenzij u stopt, onmiddellijk verdergaan met kwantificering.

VEILIG STOPPUNT

Als u stopt, moet de bibliotheekplaat vóór opslag met afsluitfolie worden afgedekt. De bibliotheekplaat is tot 7 dagen na de datum van bereiding stabiel bij -25 °C tot -15 °C.

Bibliotheken kwantificeren

- 1 Scan de streepjescodes op de accessoiredoos.
- 2 Voer de gebruikersnaam of de initialen in van degene die het reagens heeft bereid.
- 3 Laad de tips op de tipdrager.
- 4 Haal de afdekfolie van de bibliotheekplaat en laad vervolgens de platen.
- 5 Laad reagensbuisjes zonder de dop.
- 6 Giet de reagentia in reagensbuisjes en laad deze.
- 7 Wacht tot de reagentievolumecontrolle is uitgevoerd.
- 8 Observeer de automatische stappen.
- 9 Als u klaar bent, klikt u op **Unload** (Uitladen) om het dek uit te laden.
- 10 Laad de bibliotheekplaat uit, controleer of deze overal een gelijk volume heeft, dek de plaat af met afdekfolie en bewaar de plaat op kamertemperatuur.
- 11 Laad de platen met 96 monsterputjes uit en controleer of deze overal een gelijk volume hebben.
- 12 Laad de plaat met 384 monsterputjes uit en controleer deze of er in de betreffende monsterputjes vloeistof zit.
- 13 Dek de plaat af met een afsluitfolie.
- 14 Centrifugeer bij 1000 × g gedurende 20 seconden.
- 15 Incubeer bij kamertemperatuur gedurende 10 minuten, buiten het bereik van licht.
- 16 Laad alle dragers uit en reinig het ML STAR-dek.
- 17 Verwijder na de incubatie de afsluitfolie en laad de plaat met 384 monsterputjes op de microplaatlezer.
- 18 Dubbelklik op de VeriSeq NIPT-template om deze te openen in SoftMax Pro.
- 19 Selecteer **New Experiment** (nieuw experiment) in het tabblad Home (start).
- 20 Selecteer **Read** (lezen).
- 21 Exporteer de gegevens als XML op de volgende wijze.
 - a Klik met de rechtermuisknop op **Plate** (plaat) en selecteer dan **Rename** (een andere naam geven).
 - b Scan de barcode van de kwantificeringsplaat en klik vervolgens op **OK**.
 - c Selecteer linksboven in het scherm het plaat-pictogram en selecteer dan **Export** (Exporteren) in het menu.
 - d Selecteer het selectievakje **Expt name** (Naam export), stel de optie voor plaatgegevens in op onbewerkt, stel de uitvoerindeling in op XML en klik vervolgens op **OK**.
 - e Stel het pad van het uitvoerbestand en de naam in en klik op **Save** (Opslaan).
- 22 Voer de fluorometer-id in op de ML STAR, voer opmerkingen in voor de run en upload het XML-bestand.
- 23 Bekijk de analyseresultaten.
- 24 Voer opmerkingen in over aangetaste monsterputjes.

- 25 Beoordeel de resultaten.
- ▶ Als de resultaten voldoen aan de specificatie, ga verder naar Poolbibliotheken. Zie voor specificaties de tabel met kwantificerings-QC-metrieken en -grenswaarden in de Softwarehandleiding VeriSeq NIPT Solution v2 (documentnr. 1000000067940).
 - ▶ Als de resultaten niet voldoen aan de specificatie, zal het systeem de methode afbreken. Herhaal de kwantificeringsprocedures die beginnen met *Verwerking van monsters op pagina 1*.
- 26 Voer een van de volgende stappen uit:
- ▶ Klik op **Yes** (Ja) om verder te gaan naar poolbibliotheken.
 - ▶ Klik op **Exit** (Afsluiten) om te stoppen.

VEILIG STOPPUNT

Als u stopt, moet de plaat met afdekfolie worden afgesloten en kan deze maximaal 7 dagen worden opgeslagen bij -25 °C tot -15 °C.

Poolbibliotheken

- 1 Plaats de bibliothekenplaat op de thermocycler en voer het denatureringsprogramma uit.
- 2 Centrifugeer de bibliothekenplaat bij 1000 × g gedurende 20 seconden.
- 3 Selecteer de poolconcentratie.
- 4 Laad een monsterblad of gebruik het standaardblad.
- 5 Selecteer **Start**.
- 6 Laad de tips.
- 7 Laad de gedensatureerde bibliotheekplaat.
- 8 Laad de poolingbuisjes.
- 9 Giet de reagentia in reagensbuisjes en laad deze.
- 10 Laad de tips.
- 11 Voer de locatie van de eerste en laatste tip voor elk tiprek in.
- 12 Observeer de automatische stappen.
- 13 Voer opmerkingen in over aangetaste monsterputjes.
- 14 Als u klaar bent, selecteert u **Unload** (Uitladen) om het dek uit te laden.
- 15 Laad de buisdrager uit.
- 16 Plaats een dop op elke poolingbuis, vortex en centrifugeer kort.
- 17 Klik op **OK**.
- 18 Sequence de bibliotheken zo snel als mogelijk na pooling. Sluit de bibliothekenplaat zo nodig af met afdekfolie en bewaar deze maximaal 7 dagen achter elkaar bij -25 °C tot -15 °C om opnieuw te kunnen poolen.

VEILIG STOPPUNT

Als u stopt, moeten de doppen op de poolingbuisjes worden gedaan en maximaal 7 dagen worden opgeslagen bij -25 °C tot -15 °C.

Gepoolde bibliotheken voorbereiden voor sequencing

- 1 Voeg de volgende verbruiksartikelen toe aan de reagenscartridge en pipetteer om te mengen.
 - ▶ 900 µl hybridisatiebuffer
 - ▶ 450 µl Pool A
- 2 Ga verder met sequencing met een next-generation sequencing-systeem.
- 3 Herhaal deze procedure zo nodig voor Pool B.
 - ▶ Om de beoogde clusterdichtheid te bereiken, kan de bibliotheekplaat met de Hamilton opnieuw worden gepoold met een andere poolconcentratie. Door opnieuw te poolen wordt de oorspronkelijke pool ongeldig.
 - ▶ Om de beoogde clusterdichtheid te bereiken, kan ook de verhouding van pool tot HT1 (450+900ul) worden gewijzigd.