

Verarbeiten von Proben

- 1 Führen Sie für jedes Aliquot folgende Schritte durch:
 - a Zentrifugieren Sie 10 Minuten lang bei 1.600 x g und einer Temperatur von 4 °C.
 - b Beginnen Sie innerhalb von 15 Minuten mit der Plasmaisolation.
- 2 Stellen Sie sicher, dass jedes Röhrchen mindestens 1,5 ml Plasma über dem Buffy-Coat enthält.
- 3 Entfernen Sie die Kappe der Röhrchen und laden Sie diese in die Röhrchenträger.

Isolieren von Plasma

- 1 Geben Sie Batch-ID und Benutzernamen ein.
- 2 Laden Sie ein Probenblatt oder klicken Sie auf **No Sample Sheet** (Kein Probenblatt).
- 3 Legen Sie die Batchgröße fest.
- 4 Legen Sie die Anzahl der Negativkontrollen (NTCs) fest.
- 5 Laden Sie die Proben, Spitzen und Platten (mit dem Barcode nach rechts) auf den Träger.
- 6 Überwachen Sie die automatisierten Schritte.
- 7 Klicken Sie nach Abschluss des Vorgangs auf **Unload** (Entladen), um das Deck zu entladen.
- 8 Entfernen Sie die Deep-Well-Platte „Vorläufiges Plasma“ vom Träger.
 - a Überprüfen Sie die Platte auf konsistente Volumen.
 - b Protokollieren Sie eventuelle Abweichungen.
 - c Versiegeln Sie die Platte, laden Sie diese mit Ausgleichsmaterial und zentrifugieren Sie sie 10 Minuten lang bei 5.600 x g.
- 9 Klicken Sie auf **Yes** (Ja).
- 10 Entfernen Sie die Plattenversiegelung und laden Sie die Platte erneut auf den Träger.
- 11 Überwachen Sie die automatisierten Schritte.
- 12 Klicken Sie nach Abschluss des Vorgangs auf **Unload** (Entladen), um das Deck zu entladen.
- 13 Leeren Sie die Träger und das Deck, wenn Sie vom Workflow Manager dazu aufgefordert werden.
- 14 Entfernen Sie die Deep-Well-Platte „Endgültiges Plasma“.
- 15 Überprüfen Sie die Platte auf konsistente Volumen, sichtbare Zellpellets und übermäßige Hämolyse.

- 16 Machen Sie Proben mit sichtbaren Zellpellets oder übermäßiger Hämolyse ungültig.
- 17 Geben Sie Kommentare zu betroffenen Wells ein.

SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie den Vorgang stoppen, versiegeln Sie die Platte „Endgültiges Plasma“ und lagern Sie sie bis zu 7 Tage lang bei 2 °C bis 8 °C.

Extraktion der cfDNA

- 1 Laden Sie die Spitzen.
- 2 Geben Sie die Position der ersten und letzten Spitze für jedes Spitzen-Rack ein.
- 3 Scannen Sie die Barcodes der Extraktionsbox.
- 4 Geben Sie den Benutzernamen oder die Initialen des Mitarbeiters, der die Reagenzien vorbereitet hat, ein.
- 5 Scannen Sie die Barcodes der Zubehörbox.
- 6 Geben Sie den Benutzernamen oder die Initialen des Mitarbeiters, der die Reagenzien vorbereitet hat, ein.
- 7 Entsiegeln Sie die Deep-Well-Platte „Endgültiges Plasma“ und laden Sie die Platten (mit dem Barcode nach rechts) auf den Träger.
- 8 Bringen Sie bei partiellen Plattenbatches eine zurechtgeschnittene Plattenversiegelung über den nicht verwendeten Wells (Spalten 4 bis 12 für Batches mit 24 Proben und Spalten 7 bis 12 für Batches mit 48 Proben) an.
- 9 Laden Sie die DNA-Binding-Platte auf das Vakuummanifold.
- 10 Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Sind die Spalten der DNA-Binding-Platte versiegelt?) und klicken Sie auf **OK**.
- 11 Füllen Sie die Reagenzien in die Röhren und laden Sie diese.
- 12 Geben Sie die Reagenzien in die Deep-Well-Behälter und laden Sie diese.
- 13 Warten Sie, bis die Prüfung des Reagenzienvolumens abgeschlossen ist.
- 14 Stellen Sie sicher, dass der Abfallbehälter des Vakuumsystems nicht mehr als zur Hälfte gefüllt ist (leer empfohlen).

- 15 Überwachen Sie die automatisierten Schritte.
- 16 Zentrifugieren Sie die DNA-Binding-Platte 10 Minuten lang bei 5.600 × g.
- 17 Reinigen Sie während der Zentrifugierung das Vakuumsystem mit 70%igem Alkohol.
- 18 Entsiegeln Sie nach der Zentrifugierung die Wells mit Proben auf der DNA-Binding-Platte und positionieren Sie die Platte über der cfDNA-Elution-Platte.
- 19 Überwachen Sie die automatisierten Schritte.
- 20 Aktivieren Sie nach der Inkubation das Kontrollkästchen **Plates are assembled as indicated** (Platten sind wie angegeben zusammengesetzt).
- 21 Zentrifugieren Sie die DNA-Binding-Platte 2 Minuten lang bei 5.600 × g.
- 22 Überprüfen Sie die cfDNA-Elution-Platte auf konsistente Volumen.
- 23 Versiegeln Sie die cfDNA-Elution-Platte und legen Sie sie für die Bibliotheksvorbereitung beiseite.
- 24 Klicken Sie nach Abschluss des Vorgangs auf **Unload** (Entladen), um das Deck zu entladen.
- 25 Entladen Sie alle Träger und reinigen Sie das Deck des ML STAR-Geräts.
- 26 Geben Sie Kommentare zu betroffenen Wells ein.
- 27 Führen Sie einen der folgenden Schritte durch:
 - ▶ Klicken Sie auf **Yes** (Ja), um mit der Bibliotheksvorbereitung fortzufahren.
 - ▶ Um den Vorgang zu beenden, klicken Sie auf **Exit** (Beenden).

SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie den Vorgang stoppen, versiegeln Sie die cfDNA-Elution-Platte und lagern Sie sie bis zu 7 Tage lang bei -25 °C bis -15 °C.

Vorbereiten der Bibliotheken

- 1 Scannen Sie die Barcodes der Bibliotheksvorbereitungsbox.
- 2 Geben Sie den Benutzernamen oder die Initialen des Mitarbeiters, der die Reagenzien vorbereitet hat, ein.
- 3 Scannen Sie die Barcodes der Zubehörbox.
- 4 Geben Sie den Benutzernamen oder die Initialen des Mitarbeiters, der die Reagenzien vorbereitet hat, ein.
- 5 Laden Sie die Spitzen.
- 6 Geben Sie die Position der ersten Spitze für jedes Spitzen-Rack ein.
- 7 Laden Sie die Platten.
- 8 Geben Sie die Reagenzien in die Deep-Well-Behälter und laden Sie diese.
- 9 Füllen Sie die Reagenzien in die Röhren und laden Sie diese.
- 10 Warten Sie, bis die Prüfung des Reagenzienvolumens abgeschlossen ist.
- 11 Überwachen Sie die automatisierten Schritte.
- 12 Klicken Sie nach Abschluss des Vorgangs auf **Unload** (Entladen), um das Deck zu entladen.
- 13 Überprüfen Sie die Platte „Bibliotheken“ auf konsistente Volumen.
- 14 Wenn die Platte „Bibliotheken“ gelagert werden soll, versiegeln Sie diese und legen Sie sie beiseite.
- 15 Entladen Sie alle Träger und reinigen Sie das Deck.
- 16 Geben Sie Kommentare zu betroffenen Wells ein.
- 17 Führen Sie einen der folgenden Schritte durch:
 - ▶ Klicken Sie auf **Yes** (Ja), um mit dem Quantifizieren der Bibliotheken fortzufahren.

- ▶ Um den Vorgang zu beenden, klicken Sie auf **Exit** (Beenden).
- 18 Sofern Sie den Vorgang nicht beenden, müssen Sie unmittelbar mit der Quantifizierung fortfahren.

SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie den Vorgang stoppen, versiegeln Sie die Platte „Bibliotheken“, bevor Sie sie lagern. Die Platte „Bibliotheken“ ist ab dem Zeitpunkt der Vorbereitung sieben Tage lang stabil, wenn sie bei -25 °C bis -15 °C gelagert wird.

Quantifizieren der Bibliotheken

- 1 Scannen Sie die Barcodes der Zubehörbox.
- 2 Geben Sie den Benutzernamen oder die Initialen des Mitarbeiters, der die Reagenzien vorbereitet hat, ein.
- 3 Laden Sie die Spitzen auf den Spitzenträger.
- 4 Entsiegeln Sie die Platte „Bibliotheken“ und laden Sie anschließend die Platten.
- 5 Laden Sie die Reagenzröhrchen ohne Kappen.
- 6 Füllen Sie die Reagenzien in die Reagenzröhrchen und laden Sie diese.
- 7 Warten Sie, bis die Prüfung des Reagenzienvolumens abgeschlossen ist.
- 8 Überwachen Sie die automatisierten Schritte.
- 9 Klicken Sie nach Abschluss des Vorgangs auf **Unload** (Entladen), um das Deck zu entladen.
- 10 Entladen Sie die Platte „Bibliotheken“, überprüfen Sie sie auf konsistente Volumen und intakte Versiegelung und lagern Sie sie bei Raumtemperatur.
- 11 Entladen Sie die 96-Well-Platte und überprüfen Sie sie auf konsistente Volumen.
- 12 Entladen Sie die 384-Well-Platte und prüfen Sie sie auf Flüssigkeit in den entsprechenden Wells.
- 13 Versiegeln Sie die Platte mit einer Folienversiegelung.
- 14 Zentrifugieren Sie bei 1.000 × g für 20 Sekunden.
- 15 Führen Sie die Inkubation 10 Minuten lang bei Raumtemperatur und geschützt vor Licht durch.
- 16 Entladen Sie alle Träger und reinigen Sie das Deck des ML STAR-Geräts.
- 17 Entfernen Sie nach der Inkubation die Verschlussfolie und laden Sie die 384-Well-Platte auf den Mikroplatten-Reader.
- 18 Doppelklicken Sie auf die Vorlage „VeriSeq NIPT“. Die Vorlage wird in SoftMax Pro geöffnet.
- 19 Wählen Sie auf der Registerkarte „Home“ (Startseite) die Option **New Experiment** (Neuer Versuch).
- 20 Wählen Sie **Read**.
- 21 Exportieren Sie die Daten wie folgt im XML-Format.
 - a Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf **Plate** (Platte) und wählen Sie dann **Rename** (Umbenennen).
 - b Scannen Sie den Barcode der Quantifizierungsplatte und klicken Sie anschließend auf **OK**.
 - c Klicken Sie im Bildschirm oben links auf das Plattensymbol und wählen Sie im Menü **Export** (Exportieren).
 - d Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Expt name** (Name des Exports) und legen Sie für die Platte die Rohdatenoption und als Ausgabeformat XML fest. Klicken Sie dann auf **OK**.
 - e Legen Sie den Pfad und den Namen für die Datei fest und klicken Sie anschließend auf **Save** (Speichern).
- 22 Geben Sie am ML STAR-Gerät die Fluorometer-ID und Kommentare für den Lauf ein. Laden Sie die XML-Datei hoch.
- 23 Prüfen Sie die Analyseergebnisse.
- 24 Geben Sie Kommentare zu betroffenen Wells ein.

- 25 Prüfen Sie die Ergebnisse.
- ▶ Wenn die Ergebnisse den Spezifikationen entsprechen, fahren Sie mit „Pool Libraries“ (Bibliotheken in einem Pool zusammenfassen) fort. Spezifikationen finden Sie in der Tabelle mit den Metriken und Grenzwerten der Qualitätssicherung im Handbuch zur VeriSeq NIPT Solution v2 Software (Dokument-Nr. 1000000067940).
 - ▶ Wenn die Ergebnisse nicht den Spezifikationen entsprechen, bricht das System die Methode ab. Wiederholen Sie das Quantifizierungsverfahren, beginnend mit *Vorbereiten der Bibliotheken auf Seite 2*.
- 26 Führen Sie einen der folgenden Schritte durch:
- ▶ Klicken Sie auf **Yes** (Ja), um mit dem Zusammenfassen der Bibliotheken in einem Pool fortzufahren.
 - ▶ Um den Vorgang zu beenden, klicken Sie auf **Exit** (Beenden).

SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie den Vorgang stoppen, versiegeln Sie die Platte. Bei -25 °C bis -15 °C können Sie sie bis zu sieben Tage lang aufbewahren.

Zusammenfassen der Bibliotheken in einem Pool

- 1 Platzieren Sie die Platte „Bibliotheken“ auf dem Thermocycler und starten Sie das Denaturierungsprogramm.
- 2 Zentrifugieren Sie die Platte „Bibliotheken“ 20 Sekunden lang bei 1.000 × g.
- 3 Legen Sie die Pool-Konzentration fest.
- 4 Laden Sie ein Probenblatt oder verwenden Sie das Standard-Probenblatt.
- 5 Wählen Sie **Start**.
- 6 Laden Sie die Spitzen.
- 7 Laden Sie die Platte „Denaturierte Bibliothek“.
- 8 Laden Sie die Pooling-Röhrchen.
- 9 Füllen Sie die Reagenzien in die Reagenzröhrchen und laden Sie diese.
- 10 Laden Sie die Spitzen.
- 11 Geben Sie die Position der ersten und letzten Spitze für jedes Spitzen-Rack ein.
- 12 Überwachen Sie die automatisierten Schritte.
- 13 Geben Sie Kommentare zu betroffenen Wells ein.
- 14 Wählen Sie nach Abschluss des Vorgangs **Unload** (Entladen), um das Deck zu entladen.
- 15 Entladen Sie den Röhrchenträger.
- 16 Verschließen Sie jedes Pooling-Röhrchen. Mischen Sie die Röhrchen mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie sie danach kurz.
- 17 Klicken Sie auf **OK**.
- 18 Sequenzieren Sie Bibliotheken so bald wie möglich nach dem Pooling. Versiegeln Sie ggf. die Platte „Bibliotheken“ und lagern Sie diese kumuliert bis zu sieben Tage lang bei -25 °C bis -15 °C für ein eventuelles Repooling.

SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie den Vorgang stoppen, verschließen Sie die Pooling-Röhrchen und lagern Sie sie bis zu 7 Tage lang bei -25 °C bis -15 °C.

Vorbereiten von gepoolten Bibliotheken für die Sequenzierung

- 1 Fügen Sie folgende Verbrauchsmaterialien zur Reagenzienkartusche hinzu und mischen Sie den Inhalt mit der Pipette.
 - ▶ 900 µl Hybridization Buffer
 - ▶ 450 µl Pool A
- 2 Fahren Sie mit der Sequenzierung in einem Sequenzierer der nächsten Generation fort.
- 3 Wiederholen Sie ggf. dieses Verfahren für Pool B.
 - ▶ Zum Erreichen des Zielbereichs für die Clusterdichte kann die Bibliotheksplatte mithilfe des Hamilton und einer anderen Pool-Konzentration erneut in einem Pool zusammengefasst werden. Durch Repooling wird der ursprüngliche Pool ungültig gemacht.
 - ▶ Sie können auch das Pool-Verhältnis für HT1 (450 + 900 µl) ändern, um den Zielbereich für die Clusterdichte zu erzielen.