

Numuneleri İşleme

- 1 Her bir alikot için aşağıdaki adımları tamamlayın:
 - a 4°C'de 10 dakika süreyle 1600 × g düzeyinde santrifüjleyin.
 - b 15 dakika içinde plazma izolasyonunu başlatın.
- 2 Her bir tüpün beyaz kan hücresi tabakasının üzerinde en az 1,5 ml plazma içerdiğini onaylamak üzere inceleyin.
- 3 Tüplerin kapaklarını açın ve tüpleri, tüp taşıyıcılara yerleştirin.

Plazma İzolasyonu

- 1 Seri numarasını ve kullanıcı adını girin.
- 2 Bir numune sayfası yükleyin veya **No Sample Sheet** (Numune Sayfası Yok) seçeneğine tıklayın.
- 3 Seri boyutunu seçin.
- 4 Şablonsuz kontrol (NTC) sayısını seçin.
- 5 Numuneleri, uçları ve plakaları (barkod sağa dönük olacak şekilde) taşıyıcıya yükleyin.
- 6 Otomatik adımları gözlemleyin.
- 7 İşlem tamamlandığında, tablayı boşaltmak üzere **Unload** (Boşalt) seçeneğine tıklayın.
- 8 Ara Plazma derin kuyulu plakasını çıkarın.
 - a Hacimlerin tutarlı olup olmadığı açısından plakayı inceleyin.
 - b Tüm tutarsızlıkları not edin.
 - c Plakayı kapatın, dengeli bir şekilde yükleyin ve 10 dakika süreyle 5600 × g'de santrifüjleyin.
- 9 **Yes** (Evet) ögesine tıklayın.
- 10 Plaka kapağını açın ve plakayı tekrar taşıyıcıya yükleyin.
- 11 Otomatik adımları gözlemleyin.
- 12 İşlem tamamlandığında, tablayı boşaltmak üzere **Unload** (Boşalt) seçeneğine tıklayın.
- 13 İş Akışı Yöneticisi tarafından uyarıldığında, taşıyıcıları ve tablayı boşaltın.
- 14 Nihai Plazma derin kuyulu plakasını çıkarın.
- 15 Hacimlerin tutarlı olup olmadığı, görünür hücre taneciği olup olmadığı ve aşırı düzeyde hemoliz olup olmadığı açısından plakayı inceleyin.
- 16 Görünür hücre taneciği veya aşırı hemoliz olan numuneleri geçersiz kılın.
- 17 Etkilenen kuyular hakkında yorumlar girin.

GÜVENLİ DURMA NOKTASI

Durduruyorsanız Nihai Plazma plakasını kapatın ve 2 °C'ile 8 °C'de en fazla 7 gün süreyle depolayın.

cfDNA Ekstraksiyonu

- 1 Uçları yükleyin.
- 2 Her bir uç rakı için ilk ve son ucun konumunu girin.
- 3 Ekstraksiyon Kutusu barkodlarını tarayın.
- 4 Kullanıcı adını veya reaktifi hazırlayanın adının ve soyadının baş harflerini girin.
- 5 Aksesuar Kutusu barkodlarını tarayın.
- 6 Kullanıcı adını veya reaktifi hazırlayanın adının ve soyadının baş harflerini girin.
- 7 Nihai Plazma derin kuyu plakasını açın ve plakaları (barkod sağa dönük olacak şekilde) taşıyıcıya yükleyin.
- 8 Kısmi plaka serileri için kullanılmayan numunelerin üzerine kesilmiş bir plaka kapağı takın (24 numuneli seriler için 4–12 sütunları ve 48 numuneli seriler için 7–12 sütunları).
- 9 DNA Bağlama plakasını vakum manifoldunun üstüne yükleyin.
- 10 **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (DNA Bağlama Plakası Sütunları Kapalı mı?) onay kutusunu seçin ve ardından **OK** (Tamam) ögesine tıklayın.
- 11 Reaktifleri tüplere dökün ve yükleyin.
- 12 Reaktifleri derin kuyu haznelere aktarın ve yükleyin.
- 13 Reaktif hacmi kontrolünün tamamlanmasını bekleyin.
- 14 Vakum atığının yarısından fazlasının dolu olmadığını onaylayın (tamamen boş olması tavsiye edilir).
- 15 Otomatik adımları gözlemleyin.
- 16 DNA Bağlama plakasını 10 dakika süreyle 5600 x g'de santrifüjleyin.
- 17 Santrifüj sırasında vakumu %70 EtOH ile temizleyin.

- 18 Santrifüj işleminden sonra DNA Bağlama plakasındaki numune içeren kuyuları açın ve cfDNA Elüsyon plakasının üst kısmına yerleştirin.
- 19 Otomatik adımları gözlemleyin.
- 20 İnkübasyondan sonra **Plates are assembled as indicated** (Plakalar belirtildiği şekilde takıldı) onay kutusunu işaretleyin.
- 21 DNA Bağlama plakasını 2 dakika süreyle 5600 x g'de santrifüjleyin.
- 22 Hacimlerin tutarlı olup olmadığı açısından cfDNA Elüsyon plakasını inceleyin
- 23 Kapatın ve kitaplık hazırlığı için cfDNA Elüsyon plakasını tutun.
- 24 İşlem tamamlandığında, tablayı boşaltmak üzere **Unload** (Boşalt) seçeneğine tıklayın.
- 25 Tüm taşıyıcıları boşaltın ve ML STAR tablasını temizleyin.
- 26 Etkilenen kuyular hakkında yorumlar girin.
- 27 Aşağıdaki adımlardan birini gerçekleştirin:
 - ▶ Kitaplıkları Hazırlamaya devam etmek için **Yes** (Evet) ögesine tıklayın.
 - ▶ Durmak için **Exit** (Çık) ögesine tıklayın.

GÜVENLİ DURMA NOKTASI

Durduruyorsanız cfDNA Elüsyon plakasını kapatın ve -25 °C'ye -15 °C'de en fazla 7 gün süreyle depolayın.

Kitaplıkları Hazırlama

- 1 Kitaplık Hazırlama Kutusu barkodlarını tarayın.
- 2 Kullanıcı adını veya reaktifi hazırlayanın adının ve soyadının baş harflerini girin.
- 3 Aksesuar Kutusu barkodlarını tarayın.
- 4 Kullanıcı adını veya reaktifi hazırlayanın adının ve soyadının baş harflerini girin.
- 5 Uçları yükleyin.
- 6 Her bir uç rakı için ilk ucun konumunu girin.
- 7 Plakaları yükleyin.
- 8 Reaktifleri derin kuyu haznelere dökün ve yükleyin.
- 9 Reaktifleri tüplere dökün ve yükleyin.
- 10 Reaktif hacmi kontrolünün tamamlanmasını bekleyin.
- 11 Otomatik adımları gözlemleyin.
- 12 İşlem tamamlandığında, tablayı boşaltmak üzere **Unload** (Boşalt) seçeneğine tıklayın.
- 13 Hacimlerin tutarlı olup olmadığı açısından Kitaplıklar plakasını inceleyin.
- 14 Depolanıyorsa Kitaplıklar plakasını kapatın ve saklayın.
- 15 Taşıyıcıları boşaltın ve tablayı temizleyin.
- 16 Etkilenen kuyular hakkında yorumlar girin.
- 17 Aşağıdaki adımlardan birini gerçekleştirin:
 - ▶ Kitaplık Miktar Tayini prosedürüne devam etmek için **Yes** (Evet) ögesine tıklayın.
 - ▶ Durmak için **Exit** (Çık) ögesine tıklayın.
- 18 Durdurmuyorsanız derhal miktar tayini adımına geçin.

GÜVENLİ DURMA NOKTASI

Durduruyorsanız Kitaplıklar plakasını depolamadan önce kapatın. Kitaplıklar plakası -25 °C'ye -15 °C'de hazırlama tarihinden itibaren en fazla 7 gün süreyle stabildir.

Kitaplık Miktar Tayini

- 1 Aksesuar Kutusu barkodlarını tarayın.
- 2 Kullanıcı adını veya reaktifi hazırlayanın adının ve soyadının baş harflerini girin.
- 3 Uçları, uç taşıyıcıya yükleyin.
- 4 Kitaplıklar plakasını açın ve ardından plakaları yükleyin.
- 5 Kapakları olmadan reaktif tüplerini yükleyin.
- 6 Reaktifleri reaktif tüplerine dökün ve yükleyin.
- 7 Reaktif hacmi kontrolünün tamamlanmasını bekleyin.
- 8 Otomatik adımları gözlemleyin.
- 9 İşlem tamamlandığında, tablayı boşaltmak üzere **Unload** (Boşalt) seçeneğine tıklayın.
- 10 Kitaplıklar plakasını boşaltın, hacimlerin tutarlı olup olmadığını kontrol edin, kapatın ve oda sıcaklığında depolayın.
- 11 96 kuyulu plakaları boşaltın ve hacimlerin tutarlı olup olmadığını kontrol edin
- 12 384 kuyulu plakayı boşaltın ve uygun kuyulardaki sıvıları kontrol edin.
- 13 Plakayı folyoyla kapatın.
- 14 1000 x g' de 20 saniye boyunca santrifüjleyin.
- 15 Oda sıcaklığında, ışıktan korunmuş olarak 10 dakika boyunca inkübe edin.
- 16 Tüm taşıyıcıları boşaltın ve ML STAR tablasını temizleyin.
- 17 İnkübasyon sonrasında, folyo kapamayı açın ve 384 kuyulu plakayı mikroplaka okuyucuya yükleyin.
- 18 SoftMax Pro ile açmak için VeriSeq NIPT şablonuna çift tıklayın.
- 19 Ana sekmede **New Experiment** (Yeni Deney) seçeneğini belirleyin.
- 20 **Read** (Oku) seçeneğini belirleyin.
- 21 Verileri XML olarak aşağıdaki gibi dışa aktarın.

- a **Plate** (Plaka) ögesine sağ tıklayın ve ardından **Rename** (Yeniden Adlandır) seçeneğini belirleyin.
- b Miktar Tayini plakasının barkodunu tarayın ve ardından **OK** (Tamam) ögesine tıklayın.
- c Ekranın sol üst köşesindeki plaka simgesine tıklayın ve ardından menüden **Export** (Dışa Aktar) ögesini seçin.
- d **Expt name** (Dışa Aktarma Adı) onay kutusunu seçin, plaka tarihi seçeneğini işlenmemiş olarak ayarlayın, çıktı formatını XML olarak ayarlayın ve **OK** (Tamam) ögesine tıklayın.
- e Çıktı dosyası yolunu ve adını belirleyin ve ardından **Save** (Kaydet) ögesine tıklayın.
- 22 ML STAR sisteminde florometre kimliğini girin, çalıştırmaya ilişkin yorumları girin ve XML dosyasını yükleyin.
- 23 Analiz sonuçlarını inceleyin.
- 24 Etkilenen kuyular hakkında yorumlar girin.
- 25 Sonuçları değerlendirin.
 - ▶ Sonuçlar spesifikasyonu geçerse Havuz Kitaplıklarına ilerleyin. Spesifikasyonlar için, VeriSeq NIPT Çözümü v2 Yazılımı Kılavuzu (belge no 1000000067940) belgesindeki miktar tayini KK metrikleri ve sınırlar tablosuna bakın.
 - ▶ Sonuçlar spesifikasyonu karşılamazsa sistem yöntemi iptal eder. *Kitaplıkları Hazırlama, sayfa 2* ile başlayarak miktar tayini prosedürlerini tekrarlayın.
- 26 Aşağıdaki adımlardan birini gerçekleştirin:
 - ▶ Havuz Kitaplıkları prosedürüne devam etmek için **Yes** (Evet) ögesine tıklayın.
 - ▶ Durmak için **Exit** (Çık) ögesine tıklayın.

GÜVENLİ DURMA NOKTASI

Durduruyorsanız plakayı kapatın ve -25 °C ila -15 °C'de en fazla 7 gün süreyle depolayın.

Havuz Kitaplıkları

- 1 Kitaplıklar plakasını termal döngüleyiciye yerleştirin ve denşirme programını çalıştırın.
- 2 Kitaplıklar plakasını 20 saniye süreyle 1000 x g'de santrifüjleyin.
- 3 Havuz konsantrasyonunu seçin.
- 4 Bir numune sayfası yükleyin veya varsayılanı kullanın.
- 5 **Start** (Başlat) seçeneğini belirleyin.
- 6 Uçları yükleyin.
- 7 Denşirilen Kitaplık plakasını yükleyin.
- 8 Havuzlama tüplerini yükleyin.
- 9 Reaktifleri reaktif tüplerine dökün ve yükleyin.
- 10 Uçları yükleyin.
- 11 Her bir uç rakı için ilk ve son ucun konumunu girin.
- 12 Otomatik adımları gözlemleyin.
- 13 Etkilenen kuyular hakkında yorumlar girin.
- 14 İşlem tamamlandığında, tablayı boşaltmak üzere **Unload** (Boşalt) ögesini seçin.
- 15 Tüp taşıyıcıyı boşaltın.
- 16 Her bir havuzlama tüpünü kapatın, vorteksleyin ve ardından kısaca santrifüjleyin.
- 17 **OK** (Tamam) ögesine tıklayın.
- 18 Havuzlamadan sonra kitaplıkları en kısa sürede sekanslayın. Gerekirse yeniden havuzlamaya olanak sağlamak için Kitaplıklar plakasını kapatın ve -25°C ila -15°C' de en fazla 7 gün süreyle kümülatif depolamada depolayın.

GÜVENLİ DURMA NOKTASI

Durduruyorsanız havuzlama tüplerini kapatın ve -25 °C ila -15 °C' de en fazla 7 gün süreyle depolayın.

Sekanslama için Havuzlanan Kitaplıkları Hazırlama

- 1 Aşağıdaki sarf malzemelerini reaktif kartuşuna ekleyin ve ardından karıştırmak üzere pipetleyin.
 - ▶ 900 µl Hibridizasyon Tamponu
 - ▶ 450 µl Havuz A
- 2 Yeni nesil sekanslama sisteminde sekanslama adımına ilerleyin.
- 3 Gerekirse Havuz B için bu prosedürü tekrarlayın.
 - ▶ Hedef küme yoğunluğu aralığına ulaşmak için, kitaplık plakası Hamilton üzerinde farklı bir havuzlama konsantrasyonu kullanılarak yeniden havuzlanabilir. Yeniden havuzlama işlemi orijinal havuzu geçersiz kılar.
 - ▶ Alternatif olarak HT1 (450+900 ul) havuz oranı, hedef küme yoğunluğu aralığına ulaşmak üzere değiştirilebilir.