

Traitement des échantillons

- 1 Effectuez les étapes suivantes pour chaque aliquote :
 - a Centrifugez à 1 600 × g pendant 10 minutes, à une température de 4 °C.
 - b Commencez l'isolation du plasma dans les 15 minutes.
- 2 Inspectez chaque tube pour vous assurer qu'il contient au moins 1,5 ml de plasma au-dessus de la couche leuco-plaquettaire.
- 3 Débouchez les éprouvettes et chargez-les dans les porteurs d'éprouvettes.

Isolation du plasma

- 1 Entrez l'identification du lot et le nom d'utilisateur.
- 2 Chargez une feuille d'échantillons ou cliquez sur **No Sample Sheet** (Aucune feuille d'échantillons).
- 3 Sélectionnez la taille du lot.
- 4 Sélectionnez le nombre de contrôles négatifs (NTC).
- 5 Chargez les échantillons, les embouts et les plaques (code à barres orienté vers la droite) sur le porteur.
- 6 Observez les étapes automatisées.
- 7 Lorsque vous avez terminé, cliquez sur **Unload** (Décharger) pour décharger la plateforme.
- 8 Retirez la plaque à puits profonds Intermediate Plasma.
 - a Inspectez la plaque pour vérifier l'uniformité des volumes.
 - b Notez toute incohérence.
 - c Scellez la plaque, chargez-la avec le reste et centrifugez à 5 600 × g pendant 10 minutes.
- 9 Cliquez sur **Yes** (oui).
- 10 Retirez le scellé de la plaque et rechargez la plaque sur le porteur.
- 11 Observez les étapes automatisées.
- 12 Lorsque vous avez terminé, cliquez sur **Unload** (Décharger) pour décharger la plateforme.
- 13 Lorsque le gestionnaire de flux de travail vous l'indiquera, videz les porteurs et la plateforme.
- 14 Retirez la plaque à puits profonds Final Plasma.
- 15 Inspectez la plaque pour vérifier l'uniformité des volumes, la présence de culots de cellules visibles et s'il y a une hémodialyse excessive.

- 16 Invalidez les échantillons comportant un culot de cellules visibles ou une hémodialyse excessive.
- 17 Entrez les commentaires sur les puits touchés.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous arrêtez, scellez la plaque Final Plasma et entreposez-la pendant un maximum de 7 jours à une température maintenue entre 2 et 8 °C.

Extraction de l'ADN acellulaire

- 1 Chargez les embouts.
- 2 Entrez l'emplacement du premier et du dernier embouts pour chacun des supports d'embouts.
- 3 Balayez les codes à barres des boîtes d'extraction.
- 4 Entrez le nom de l'utilisateur ou les initiales de la personne ayant préparé les réactifs.
- 5 Balayez les codes à barres de la boîte d'accessoires.
- 6 Entrez le nom de l'utilisateur ou les initiales de la personne ayant préparé les réactifs.
- 7 Descellez la plaque à puits profonds Final Plasma et chargez les plaques (code à barres orienté vers la droite) sur le porteur.
- 8 Pour les lots de plaques partiels, recouvrez les puits inutilisés d'un joint de plaque découpé (les colonnes 4 à 12 pour les lots de 24 échantillons et les colonnes 7 à 12 pour les lots de 48 échantillons).
- 9 Chargez la plaque de fixation de l'ADN sur le collecteur pour le vide.
- 10 Cochez la case **Are DNA Binding Plate Columns Sealed? (La plaque de fixation de l'ADN est-elle scellée?)**, puis cliquez sur **OK**.
- 11 Versez les réactifs dans les réservoirs et chargez-les.
- 12 Transférez les réactifs dans les réservoirs à puits profonds et chargez-les.
- 13 Attendez que la vérification du volume de réactifs soit terminée.
- 14 Confirmez que la vidange du vide est tout au plus à moitié pleine (il est recommandé qu'elle soit vide).
- 15 Observez les étapes automatisées.

- 16 Centrifugez la plaque de fixation de l'ADN à 5 600 × g pendant 10 minutes.
- 17 Pendant la centrifugation, nettoyez le système de vide avec de l'alcool éthylique à 70 %.
- 18 Après la centrifugation, descellez les puits remplis d'échantillons sur la plaque de fixation de l'ADN et placez la plaque de fixation sur le dessus de la plaque d'élution de l'ADN acellulaire.
- 19 Observez les étapes automatisées.
- 20 Après l'incubation, cochez la case **Plates are assembled as indicated** (Les plaques sont assemblées comme indiqué).
- 21 Centrifugez la plaque de fixation de l'ADN à 5 600 × g pendant 2 minutes.
- 22 Inspectez la plaque d'élution de l'ADN acellulaire pour vérifier l'uniformité des volumes.
- 23 Scellez et conservez la plaque d'élution de l'ADN acellulaire pour la préparation de la librairie.
- 24 Lorsque vous avez terminé, cliquez sur **Unload** (Décharger) pour décharger la plateforme.
- 25 Déchargez tous les porteurs et nettoyez la plateforme du système ML STAR.
- 26 Entrez les commentaires sur les puits touchés.
- 27 Effectuez l'une des étapes suivantes :
 - ▶ Pour poursuivre la préparation des librairies, cliquez sur **Yes** (Oui).
 - ▶ Pour arrêter, cliquez sur **Exit** (Sortie).

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous arrêtez, scellez la plaque d'élution de l'ADN acellulaire et entreposez-la pendant un maximum de 7 jours à une température maintenue entre -25 et -15 °C.

Préparation des librairies

- 1 Balayez les codes à barres de la boîte de préparation de librairies.
- 2 Entrez le nom de l'utilisateur ou les initiales de la personne ayant préparé les réactifs.
- 3 Balayez les codes à barres de la boîte d'accessoires.
- 4 Entrez le nom de l'utilisateur ou les initiales de la personne ayant préparé les réactifs.
- 5 Chargez les embouts.
- 6 Entrez l'emplacement du premier embout pour chacun des supports d'embouts.
- 7 Chargez les plaques.
- 8 Versez les réactifs dans les réservoirs des puits profonds et chargez-les.
- 9 Versez les réactifs dans les réservoirs et chargez-les.
- 10 Attendez que la vérification du volume de réactifs soit terminée.
- 11 Observez les étapes automatisées.
- 12 Lorsque vous avez terminé, cliquez sur **Unload** (Décharger) pour décharger la plateforme.
- 13 Inspectez la plaque de librairies pour vérifier l'uniformité des volumes.
- 14 Si elle doit être entreposée, scellez et conservez la plaque de librairies.
- 15 Déchargez les porteurs et nettoyez la plateforme.
- 16 Entrez les commentaires sur les puits touchés.
- 17 Effectuez l'une des étapes suivantes :
 - ▶ Pour poursuivre la quantification des librairies, cliquez sur **Yes** (Oui).
 - ▶ Pour arrêter, cliquez sur **Exit** (Sortie).
- 18 Sauf si vous arrêtez, effectuez immédiatement la quantification.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous arrêtez, scellez la plaque de librairies avant de l'entreposer. La plaque de librairies demeure stable pendant un maximum de 7 jours à compter de la date de préparation, à une température maintenue entre -25 et -15 °C.

Quantification des librairies

- 1 Balayez les codes à barres de la boîte d'accessoires.
- 2 Entrez le nom de l'utilisateur ou les initiales de la personne ayant préparé les réactifs.
- 3 Chargez les embouts sur le porteur d'embouts.
- 4 Descellez la plaque de librairies et chargez ensuite les plaques.
- 5 Chargez les tubes de réactifs sans leur bouchon.
- 6 Versez les réactifs dans les réservoirs de réactifs et chargez-les.
- 7 Attendez que la vérification du volume de réactifs soit terminée.
- 8 Observez les étapes automatisées.
- 9 Lorsque vous avez terminé, cliquez sur **Unload** (Décharger) pour décharger la plateforme.
- 10 Déchargez le plateau de librairies, vérifiez l'uniformité des volumes, scellez-le et entreposez-le à température ambiante.
- 11 Déchargez les plaques de 96 puits et vérifiez l'uniformité des volumes.
- 12 Déchargez la plaque de 384 puits et vérifiez si le liquide se trouve dans les puits appropriés.
- 13 Scellez la plaque avec un opercule en aluminium.
- 14 Centrifugez à 1 000 g pendant 20 secondes.
- 15 Incubez à température ambiante pendant 10 minutes, à l'abri de la lumière.
- 16 Déchargez tous les porteurs et nettoyez la plateforme du système ML STAR.
- 17 Après l'incubation, retirez l'opercule en aluminium et chargez la plaque de 384 puits sur le lecteur de microplaques.
- 18 Faites un double-clic sur le modèle DPNI VeriSeq pour l'ouvrir dans SoftMax Pro.
- 19 Sélectionnez **New Experiment** (Nouvelle expérimentation) à l'onglet Home (Accueil).
- 20 Sélectionnez **Read** (Lecture).
- 21 Exportez les données dans un fichier XML, comme suit :
 - a Faites un clic droit sur **Plate** (Plaque), puis sélectionnez **Rename** (Renommer).
 - b Balayez le code à barres de la plaque de quantification, puis cliquez sur **OK**.
 - c Dans le coin supérieur gauche de l'écran, cliquez sur l'icône de la plaque, puis sélectionnez **Export** (Exporter) dans le menu.
 - d Sélectionnez la case **Expt name** (Nom de l'expérimentation), choisissez « raw » (brut) à l'option relative aux données de la plaque, choisissez le format de fichier XML, puis cliquez sur **OK**.
 - e Définissez le chemin et le nom du fichier de sortie, puis cliquez sur **Save** (Enregistrer).
- 22 Sur le système ML STAR, entrez l'identification du fluoromètre et les commentaires concernant l'analyse, et téléversez le fichier XML.
- 23 Examinez les résultats de l'analyse.
- 24 Entrez les commentaires sur les puits touchés.

- 25 Évaluez les résultats.
- ▶ Si les résultats réussissent la spécification, procédez au regroupement des librairies. Pour obtenir des renseignements sur les spécifications, consultez le tableau sur les indicateurs de CQ et les limites de l'analyse quantitative du Guide du logiciel de la solution DPNI VeriSeq v2 (document n° 1000000067940).
 - ▶ Si les résultats échouent la spécification, le système met fin à la méthode. Répétez les procédures de quantification en commençant par la *Préparation des librairies*, page 2.
- 26 Effectuez l'une des étapes suivantes :
- ▶ Pour poursuivre le regroupement des librairies, cliquez sur **Yes** (Oui).
 - ▶ Pour arrêter, cliquez sur **Exit** (Sortie).

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous arrêtez, scellez la plaque et entreposez-la pendant un maximum de 7 jours à une température maintenue entre -25 et -15 °C.

Regroupement des librairies

- 1 Placez la plaque de librairies sur le thermocycleur et lancez le programme de dénaturation.
- 2 Centrifugez la plaque de librairies à 1 000 × g pendant 20 secondes.
- 3 Sélectionnez la concentration du regroupement.
- 4 Chargez une feuille d'échantillons ou utilisez celle par défaut.
- 5 Sélectionnez **Start** (Démarrer).
- 6 Chargez les embouts.
- 7 Chargez la plaque de librairies dénaturées.
- 8 Chargez les éprouvettes de regroupement.
- 9 Versez les réactifs dans les réservoirs de réactifs et chargez-les.
- 10 Chargez les embouts.
- 11 Entrez l'emplacement du premier et du dernier embouts pour chacun des supports d'embouts.
- 12 Observez les étapes automatisées.
- 13 Entrez les commentaires sur les puits touchés.
- 14 Lorsque vous avez terminé, sélectionnez **Unload** (Décharger) pour décharger la plateforme.
- 15 Déchargez le porteur de tubes.
- 16 Bouchez chacun des tubes de regroupement, agitez et centrifugez ensuite brièvement.
- 17 Cliquez sur **OK**.
- 18 Séquencez les librairies dès que possible après le regroupement. Si nécessaire, scellez la plaque de librairies et entreposez-la à une température maintenue entre -25 et -15 °C pendant un maximum de sept jours cumulatifs pour permettre de nouveau le regroupement.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous arrêtez, bouchez les éprouvettes de regroupement et entreposez-les pendant un maximum de 7 jours à une température maintenue entre -25 et -15 °C.

Préparation des bibliothèques regroupées pour le séquençage

- 1 Ajoutez les consommables suivants à la cartouche de réactifs et pipettez pour mélanger :
 - ▶ Tampon d'hybridation, 900 µl
 - ▶ Regroupement A, 450 µl
- 2 Procédez au séquençage sur un séquenceur nouvelle génération.
- 3 Si nécessaire, répétez cette procédure pour le regroupement B.
 - ▶ Pour atteindre l'intervalle de densités des amplifiats visé, la plaque de bibliothèques peut être regroupée de nouveau sur le système d'Hamilton en utilisant une concentration différente. Le fait de regrouper de nouveau invalide le regroupement initial.
 - ▶ Le rapport de regroupement de HT1 (450 + 900 µl) peut aussi être modifié pour atteindre l'intervalle de densités des amplifiats visé.