

## Обработка на проби

- 1 Изпълнете следните стъпки за всяка аликвота:
  - a Центрофугирайте на 1600 × g за 10 минути при 4°C.
  - b Започнете изолирането на плазмата в рамките на 15 минути.
- 2 Прегледайте, за да се уверите, че всяка епруветка съдържа поне 1,5 ml плазма над буферното покритие.
- 3 Отстранете капачките на епруветките и ги поставете в контейнерите за епруветки.

## Изолиране на плазма

- 1 Въведете идентификатора на партидата и потребителското име.
- 2 Заредете бланка за проби или щракнете върху **No Sample Sheet** (Няма бланка за проби).
- 3 Изберете размера на партидата.
- 4 Изберете броя на контролите без шаблон (NTC).
- 5 Заредете пробите, крайниците и плаките (баркодът да сочи надясно) в носача.
- 6 Следвайте автоматизираните стъпки.
- 7 Когато приключите, щракнете върху **Unload** (Изваждане) за изваждане на набора.
- 8 Отстранете плаката с дълбоки кладенчета за междинна плазма.
  - a Прегледайте плаката за консистентност на обемите.
  - b Отбележете всякакви несъответствия.
  - c Запечатайте плаката, заредете с баланс и центрофугирайте при 5600 × g за 10 минути.
- 9 Щракнете върху **Yes** (Да).
- 10 Отстранете пломбата на плаката и поставете отново плаката върху носача.
- 11 Наблюдавайте автоматизираните стъпки.
- 12 Когато приключите, щракнете върху **Unload** (Изваждане) за изваждане на набора.
- 13 Когато Workflow Manager (Мениджър на работния поток) ви подкани, изпразнете носачите и набора.
- 14 Извадете плаката с дълбоки кладенчета за крайна плазма.

- 15 Прегледайте плаката за съответстващи обеми, видими клетъчни гранули и прекомерна хемолиза.
- 16 Инвалидирайте проби с видими клетъчни гранули или прекомерна хемолиза.
- 17 Въведете коментари за засегнатите кладенчета.

## БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, запечатайте плаката с финална плазма и я съхранявайте при температура от 2°C до 8°C за период до 7 дни.

## Екстракция на cfDNA

- 1 Заредете крайниците.
- 2 Въведете местоположението на първия и последния крайник за всяка стойка за крайници.
- 3 Сканирайте баркодовете на кутиите за извличане.
- 4 Въведете потребителското име или инициалите на лицето, приготвило реагента.
- 5 Сканирайте баркодовете на кутиите за принадлежности.
- 6 Въведете потребителското име или инициалите на лицето, приготвило реагента.
- 7 Отпечатайте плаката за крайна плазма с дълбоки кладенчета и заредете плаки (баркод, обърнат надясно) върху носача.
- 8 За частични партиди от плаки запечатайте неизползваните кладенчета (колони 4 – 12 за партиди с 24 проби и колони 7 – 12 за партиди с 48 проби).
- 9 Заредете плаката за свързване на ДНК върху вакуумния колектор.
- 10 Изберете полето за отметка **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Запечатани ли са колоните на плака за свързване на ДНК?) и след това щракнете върху **OK**.
- 11 Налейте реагентите във ваничките и заредете.
- 12 Прехвърлете реагентите в резервоарите с дълбоки кладенчета и заредете.
- 13 Изчакайте проверката на обема на реагента да завърши.
- 14 Уверете се, че вакуумните отпадъци не са повече от наполовина (препоръчително е празно).
- 15 Наблюдавайте автоматизираните стъпки.
- 16 Центрофугирайте плаката за свързване на ДНК на 5600 × g за 10 минути.
- 17 По време на центрофугиране почистете вакуумния елемент със 70% EtOH.
- 18 След центрофугиране отпечатайте кладенчетата, съдържащи проби, върху плаката за свързване на ДНК и я поставете върху плаката за елуиране на cfDNA.
- 19 Следвайте автоматизираните стъпки.
- 20 След инкубиране изберете полето за отметка **Plates are assembled as indicated** (Плаките се сглобяват, както е посочено).
- 21 Центрофугирайте плаката за сдвояване на ДНК на 5600 × g за 2 минути.
- 22 Инспектирайте плаката за елуиране на cfDNA за консистентност на обемите
- 23 Запечатайте и запазете плаката за елуиране на cfDNA за подготовка на библиотеката.
- 24 Когато приключите, щракнете върху **Unload** (Изваждане) за изваждане на набора.
- 25 Извадете всички носачи и почистете набора ML STAR.
- 26 Въведете коментари за засегнатите кладенчета.
- 27 Изпълнете една от следните стъпки:
  - ▶ За да продължите да подготвяте библиотеки, щракнете върху **Yes** (Да).
  - ▶ За да спрете, щракнете върху **Exit** (Изход).

## БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, запечатайте плаката за елуиране на cfDNA и я съхранявайте при -25°C до -15°C за период до 7 дни.

## Приготвяне на библиотеки

- 1 Сканирайте баркодовете на кутията за подготовка на библиотеки.
- 2 Въведете потребителското име или инициалите на лицето, приготвило реагента.
- 3 Сканирайте баркодовете на кутиите за принадлежности.
- 4 Въведете потребителското име или инициалите на лицето, приготвило реагента.
- 5 Заредете крайниците.
- 6 Въведете местоположението на първия крайник за всяка стойка за крайници.
- 7 Заредете плаките.
- 8 Налейте реагентите в резервоарите с дълбоки кладенчета и заредете.
- 9 Налейте реагентите във ваничките и заредете.
- 10 Изчакайте проверката на обема на реагента да завърши.
- 11 Наблюдавайте автоматизираните стъпки.
- 12 Когато приключите, щракнете върху **Unload** (Изваждане) за изваждане на набора.
- 13 Прегледайте плаката за библиотеки за консистентност на обемите.
- 14 Ако съхранявате, запечатайте и запазете плаката за библиотеки.
- 15 Извадете всички носачи и почистете набора.
- 16 Въведете коментари за засегнатите кладенчета.
- 17 Изпълнете една от следните стъпки:

- ▶ За да продължите към Quantify Libraries (Количествено определяне на библиотеки), щракнете върху **Yes** (Да).
- ▶ За да спрете, щракнете върху **Exit** (Изход).
- 18 Освен ако не сте спрели, незабавно пристъпете към количествено определяне.

### БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, запечатайте плаката за библиотеки преди съхранение. Плаката с библиотеки е стабилна до 7 дни от датата на приготвяне при -25°C до -15°C.

## Количествено определяне на библиотеки

- 1 Сканирайте баркодовете на кутиите за принадлежности.
- 2 Въведете потребителското име или инициалите на лицето, приготвило реагента.
- 3 Заредете крайници в носач за крайници.
- 4 Разпечатете плаката с библиотеки и заредете плаките.
- 5 Заредете епруветките с реагенти без капачки.
- 6 Налейте реагентите във ваничките за реагенти и заредете.
- 7 Изчакайте проверката на обема на реагента да завърши.
- 8 Спазвайте автоматизираните стъпки.
- 9 Когато приключите, щракнете върху **Unload** (Изваждане) за изваждане на набора.
- 10 Извадете плаката с библиотеки, проверете за консистентност на обемите, запечатването и съхранявайте на стайна температура.
- 11 Извадете плаки с 96 кладенчета и проверете за консистентност на обемите

- 12 Извадете плаката с 384 кладенчета проверете дали има течност в съответните кладенчета.
- 13 Запечатайте плаката със запечатващо фолио.
- 14 Центрофугирайте при 1000 × g за 20 секунди.
- 15 Инкубирайте при стайна температура за 10 минути при защитени от светлина условия.
- 16 Извадете всички носачи и почистете набора ML STAR.
- 17 След инкубацията отстранете запечатващото фолио и заредете плаката с 384 кладенчета в четеца на микроплаки.
- 18 Щракнете двукратно върху шаблона VeriSeq NIPT, за да го отворите в SoftMax Pro.
- 19 Изберете **New Experiment** (Нов експеримент) в раздела Home (Начало).
- 20 Изберете **Read** (Четене).
- 21 Експортирайте данните като XML, както следва.
  - a Щракнете с десния бутон на мишката върху **Plate** (Плака), след което изберете **Rename** (Преименуване).
  - b Сканирайте баркода на плаката за количествено определяне и щракнете върху **OK**.
  - c В горния ляв ъгъл на екрана щракнете върху иконата на плаката, след което изберете **Export** (Експортиране) от менюто.
  - d Поставете отметка в квадратчето **Expt name** (Име на експ.), задайте опцията за дата на плаката като gaw (необработена), задайте изходния формат на XML и след това щракнете върху **OK**.
  - e Задайте пътя и името на изходния файл, след което щракнете върху **Save** (Записване).
- 22 На ML STAR въведете ИД на флуорометъра, въведете коментари за изпълняването и качете XML файл.
- 23 Прегледайте резултатите от анализа.
- 24 Въведете коментари за засегнатите кладенчета.
- 25 Оценете резултатите.
  - ▶ Ако резултатите отговарят на спецификацията, преминете към Pool Libraries (Библиотеки с пулове). За спецификациите вижте таблицата с количествени метрики за качествен контрол и граници в ръководството за софтуер VeriSeq NIPT Solution v2 (документ №1000000067940).
  - ▶ Ако резултатите не отговарят на спецификацията, системата прекъсва метода. Повторете процедурите за количествено определяне, като започнете от *Обработка на проби на страница 1*.
- 26 Изпълнете една от следните стъпки:
  - ▶ За да продължите да пулирате библиотеки, щракнете върху **Yes** (Да).
  - ▶ За да спрете, щракнете върху **Exit** (Изход).

### БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, запечатайте плаката и я съхранявайте при -25°C до -15°C за период до 7 дни.

### Библиотеки с пулове

- 1 Поставете плаката за библиотеки върху термоциклер и стартирайте програмата за денатуриране.
- 2 Центрофугирайте плаката за библиотеки при 1000 × g за 20 секунди.
- 3 Изберете концентрацията на пула.
- 4 Заредете бланка за проби или използвайте по подразбиране.
- 5 Изберете **Start** (Начало).
- 6 Заредете крайниците.
- 7 Заредете плаката с денатурирана библиотека.
- 8 Заредете епруветките за пулиране.
- 9 Налейте реагентите във ваничките за реагенти и заредете.
- 10 Заредете крайниците.
- 11 Въведете местоположението на първия и последния крайник за всяка стойка за крайници.
- 12 Наблюдавайте автоматизираните стъпки.
- 13 Въведете коментари за засегнатите кладенчета.
- 14 Когато приключите, изберете **Unload** (Изваждане) за изваждане на набора.
- 15 Извадете носача на епруветки.
- 16 Затворете всяка епруветка за пулиране, разбъркайте и след това центрофугирайте за кратко.
- 17 Щракнете върху **OK**.
- 18 Секвенирайте библиотеките възможно най-скоро след пулиране. Ако е необходимо, запечатайте плаката за библиотеки и я съхранявайте при температура от -25°C до -15°C в

продължение на до 7 дни кумулативно съхранение, за да се даде възможност за повторно пулиране.

#### БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, затворете епруветките за пулиране с капачки и ги съхранявайте при -25°C до -15°C за период до 7 дни.

### Приготвяне на пулирани библиотеки за секвениране

- 1 Добавете следните консумативи към касетата с реагент и след това разбъркайте с пипета.
  - ▶ 900 µl буфер за хибридизация
  - ▶ 450 µl пул А
- 2 Пристъпете към секвениране със система за секвениране от следващо поколение.
- 3 Ако е необходимо, повторете тази процедура за пул В.
  - ▶ За да се постигне целевият диапазон на плътност на клъстерите, плаката за библиотека може да се пулира повторно, като се използва различна концентрация за пулиране на Hamilton. Повторното пулиране инвалидира първоначалния пул.
  - ▶ Алтернативно, съотношението на пула към HT1 (450 + 900 µl) може да се промени, за да се постигне целевият диапазон на плътност на клъстерите.