

Spracovanie vzoriek

- 1 Vykonajte nasledujúce kroky pre každú alikvotnú časť:
 - a Odstredujte v centrifúge 10 minút pri 1 600 x g a teplote 4 °C.
 - b Do 15 minút začnite s izoláciou plazmy.
- 2 Skontrolujte, či každá skúmavka obsahuje minimálne 1,5 ml plazmy nad leukocytovo-trombocytovou vrstvou.
- 3 Odstráňte uzávery zo skúmaviek a skúmavky vložte do držiakov.

Izolácia plazmy

- 1 Zadať ID dávky a meno používateľa.
- 2 Načítajte hárok so vzorkou alebo kliknite na položku **No Sample Sheet** (Žiadny hárok so vzorkou).
- 3 Vyberte veľkosť dávky.
- 4 Vyberte počet kontrol bez šablóny (NTC).
- 5 Do nosiča vložte vzorky, špičky a doštičky (s čiarovým kódom smerujúcim nahor).
- 6 Sledujte automatizované kroky.
- 7 Po dokončení kliknite na položku **Unload** (Vyložiť) na vyloženie plošiny.
- 8 Vyberte doštičku s hlbokými jamkami na dočasnú plazmu.
 - a Skontrolujte konzistentnosť objemov na doštičke.
 - b Zaznamenajte si všetky nekonzistencie.
 - c Utesnite doštičku, vložte ju tak, aby bola vyvážená, a odstredujte rýchlosťou 5600 g 10 minút.
- 9 Kliknite na položku **Yes** (Áno).
- 10 Odstráňte utesnenie doštičky a vložte doštičku na nosič.
- 11 Sledujte automatizované kroky.
- 12 Po dokončení kliknite na položku **Unload** (Vyložiť) na vyloženie plošiny.
- 13 Po zobrazení výzvy aplikácie Workflow Manager vyprázdňte nosiče a plošinu.
- 14 Vyberte doštičku s hlbokými jamkami na záverečnú plazmu.
- 15 Skontrolujte doštičku z hľadiska konzistencie objemov, viditeľných bunkových peliet a nadmernej hemolýzy.
- 16 Zrušte platnosť vzoriek s viditeľnými bunkovými peletami alebo nadmernou hemolýzou.
- 17 Zadať komentár k príslušným jamkám.

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak postup prerušujete, doštičku s konečnou plazmou zaplombujte a skladujte pri teplote 2 °C až 8 °C maximálne 7 dní.

Extrakcia cfDNA

- 1 Vložte špičky.
- 2 Zadajte umiestnenie prvej a poslednej špičky z každého zásobníka špičiek.
- 3 Naskenujte čiarové kódy škatule na extrakciu.
- 4 Zadajte meno používateľa alebo iniciály osoby, ktorá pripravila reagensiu.
- 5 Naskenujte čiarové kódy škatule s príslušenstvom.
- 6 Zadajte meno používateľa alebo iniciály osoby, ktorá pripravila reagensiu.
- 7 Odstráňte tesnenie doštičky s hlbokými jamkami a finálnou plazmou a vložte doštičky (s čiarovým kódom smerujúcim doprava) do nosiča.
- 8 V prípade čiastkových dávok na doštičke aplikujte upravené tesnenie na nepoužívané jamky (stĺpce 4 – 12 v prípade dávok s 24 vzorkami a stĺpce 7 – 12 v prípade dávok so 48 vzorkami).
- 9 Vložte doštičku viažucu DNA do vákuového potrubia.
- 10 Začiarknite políčko **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Sú stĺpce doštičky viažucej DNA utesnené?) a potom kliknite na položku **OK**.
- 11 Nalejte reagensie do skúmaviek a vložte ich.
- 12 Preneste reagensie do zásobníkov s hlbokými jamkami a vložte ich.
- 13 Počkajte na dokončenie kontroly objemu reagensie.
- 14 Overte, či vákuová odpadová fľaša nie je naplnená nad polovicu jej objemu (odporúčame použiť prázdnu).
- 15 Sledujte automatizované kroky.
- 16 Odstreďujte doštičku viažucu DNA rýchlosťou 5600 g 10 minút.

- 17 Počas odstredovania vyčistite vákuový systém 70 % roztokom EtOH.
- 18 Po dokončení odstredovania otvorte na doštičke viažucej DNA jamky obsahujúce vzorky a umiestnite ju na doštičku na elúciu cfDNA.
- 19 Sledujte automatizované kroky.
- 20 Po dokončení inkubácie začiarknite políčko **Plates are assembled as indicated** (Doštičky sú zostavené podľa indikácie).
- 21 Odstreďujte doštičku viažucu DNA rýchlosťou 5600 g 2 minúty.
- 22 Skontrolujte konzistentnosť objemov na doštičke na elúciu cfDNA
- 23 Utesnite a odložte doštičku na elúciu cfDNA na účely prípravy knižnice.
- 24 Po dokončení kliknite na položku **Unload** (Vyložiť) na vyloženie plošiny.
- 25 Vyložte všetky nosiče a vyčistite plošinu prístroja ML STAR.
- 26 Zadajte komentár k príslušným jamkám.
- 27 Vykonajte niektorý z nasledujúcich krokov:
 - ▶ Ak chcete pokračovať prípravou knižníc, kliknite na položku **Yes** (Áno).
 - ▶ Ak chcete postup prerušiť, kliknite na **Exit** (Skončiť).

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak postup prerušujete, doštičku na elúciu cfDNA zaplombujte a skladujte ju pri teplote -25 °C až -15 °C maximálne 7 dní.

Príprava knižníc

- 1 Naskenujte čiarové kódy balenia na prípravu knižnice.
- 2 Zadajte meno používateľa alebo iniciály osoby, ktorá pripravuje reagensie.
- 3 Naskenujte čiarové kódy na balení s príslušenstvom.
- 4 Zadajte meno používateľa alebo iniciály osoby, ktorá pripravuje reagensie.
- 5 Vložte špičky.
- 6 Zadajte umiestnenie prvej a poslednej špičky z každého zásobníka špičiek.
- 7 Vložte doštičky.
- 8 Nalejte reagensie do zásobníkov s hlbokými jamkami a vložte ich.
- 9 Nalejte reagensie do skúmaviek a vložte ich.
- 10 Počkajte, kým sa dokončí kontrola objemu reagensí.
- 11 Sledujte automatizované kroky.
- 12 Po dokončení kliknite na položku **Unload** (Vyložiť) na vyloženie položky.
- 13 Skontrolujte, či sú v doštičke s knižnicami rovnaké objemy.
- 14 Pri skladovaní doštičku s knižnicami zaplombujte a zaistite.
- 15 Vyložte držiaky a vyčistite plošinu.
- 16 Zadajte komentár k príslušným jamkám.
- 17 Vykonajte jeden z nasledujúcich krokov:
 - ▶ Ak chcete pokračovať v kvantifikácii knižníc, kliknite na **Yes** (Áno).
 - ▶ Ak chcete postup prerušiť, kliknite na **Exit** (Skončiť).
- 18 Ak nechcete postup prerušiť, prejdite hneď ku kvantifikácii.

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak postup prerušujete, doštičku s knižnicami pred uschovaním zaplombujte. Doštička s knižnicami je stabilná až 7 dní od dátumu prípravy pri teplote -25 °C až -15 °C.

Kvantifikácia knižníc

- 1 Naskenujte čiarové kódy na balení s príslušenstvom.
- 2 Zadajte meno používateľa alebo iniciály osoby, ktorá pripravuje reagencie.
- 3 Vložte špičky do držiaka špičiek.
- 4 Odplombujte doštičku s knižnicami a potom vložte doštičky.
- 5 Vložte skúmavky na reagencie bez uzáverov.
- 6 Nalejte reagencie do skúmaviek na reagencie a vložte ich.
- 7 Počkajte, kým sa dokončí kontrola objemu reagencií.
- 8 Sledujte automatizované kroky.
- 9 Po dokončení kliknite na položku **Unload** (Vyložiť) na vyloženie plošiny.
- 10 Vyložte doštičku s knižnicami, skontrolujte, či sú objemy rovnaké, zaplombujte ju a uskladnite ju pri izbovej teplote.
- 11 Vyložte doštičky s 96 jamkami a skontrolujte, či sú objemy rovnaké.
- 12 Vyložte doštičku s 384 jamkami a skontrolujte, či sa v správnych jamkách nachádza kvapalina.
- 13 Zaplombujte doštičku tesniacou fóliou.
- 14 Odstredujte v centrifúge 20 sekúnd pri 1 000 × g.
- 15 Inkubujte 10 minút pri izbovej teplote a chráňte pred svetlom.
- 16 Vyložte všetky držiaky a vyčistite plošinu systému ML STAR.
- 17 Po inkubácii odstráňte fóliovú plombu a doštičku s 384 jamkami vložte na čítačku mikrodoštičiek.
- 18 Dvojklikom na šablónu VeriSeq NIPT ju otvorte v softvéri SoftMax Pro.
- 19 Zvoľte možnosť **New Experiment** (Nový pokus) na karte Home (Domov).
- 20 Zvoľte možnosť **Read** (Čítať).
- 21 Exportujte údaje vo formáte XML ďalej uvedeným spôsobom.
 - a Pravým tlačidlom myši vyberte možnosť **Plate** (Doštička) a potom vyberte možnosť **Rename** (Premenovať).
 - b Naskenujte čiarový kód doštičky na kvantifikáciu a potom kliknite na možnosť **OK**.
 - c V ľavom hornom rohu obrazovky kliknite na ikonu doštičky a z ponuky vyberte možnosť **Export** (Exportovať).
 - d Začiarknite políčko **Expt name** (Názov exportu), nastavte dátum doštičky na „nespracované“ (raw), nastavte výstupný formát na XML a potom kliknite na **OK**.
 - e Zadajte cestu a názov výstupného súboru a potom kliknite na **Save** (Uložiť).
- 22 V systéme ML STAR zadajte ID fluorometra, vložte komentáre k chodu a nahrajte súbor XML.
- 23 Skontrolujte výsledky analýzy.
- 24 Zadajte komentár k príslušným jamkám.
- 25 Vyhodnoťte výsledky.
 - ▶ Ak sú výsledky v súlade so špecifikáciou, pokračujte na združovanie knižníc. Špecifikácie nájdete v tabuľke Metriky a hranice kontroly kvality kvantitatívneho vyjadrenia v Príručke k softvéru VeriSeq NIPT Solution v2 (dokument č. 1000000067940).
 - ▶ Ak výsledky nie sú v súlade so špecifikáciou, systém metódu preruší. Zopakujte postupy kvantifikácie od časti *Kvantifikácia knižníc na strane 3*.

- 26 Vykonaňte jeden z nasledujúcich krokov:
- ▶ Ak chcete prejsť na združovanie knižníc, kliknite na **Yes** (Áno).
 - ▶ Ak chcete postup prerušiť, kliknite na **Exit** (Skončiť).

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak postup prerušujete, doštičku zaplombujte a skladujte pri teplote -25 °C až -15 °C maximálne 7 dní.

Združovanie knižníc

- 1 Doštičku s knižnicami umiestnite do termálneho cykléra a spustíte program denaturácie.
- 2 Odstred'ujte doštičku s knižnicami v centrifúge 20 sekúnd pri 1000 × g.
- 3 Vyberte koncentráciu združovania.
- 4 Vložte hárok údajov na analýzu alebo použite predvolené nastavenie.
- 5 Vyberte možnosť **Start** (Spustiť).
- 6 Vložte špičky.
- 7 Vložte doštičku s denaturovanou knižnicou.
- 8 Vložte skúmavky na združovanie.
- 9 Nalejte reagencie do skúmaviek na reagencie a vložte ich.
- 10 Vložte špičky.
- 11 Zadaťte umiestnenie prvej a poslednej špičky z každého zásobníka špičiek.
- 12 Sledujte automatizované kroky.
- 13 Zadaťte komentár k príslušným jamkám.
- 14 Po skončení vyberte možnosť **Unload** (Vyložiť) na vyloženie plošiny.
- 15 Vyložte nosič skúmaviek.
- 16 Každú skúmavku na združovanie uzavrite, vortexujte a potom krátko odstred'te v centrifúge.
- 17 Kliknite na **OK**.
- 18 Knižnice sekvenujte čo najskôr po združení. Ak je to potrebné, zaplombujte doštičku s knižnicami a skladujte ju pri teplote od -25 °C do -15 °C maximálne 7 dní kumulatívneho skladovania, aby sa umožnilo opätovné združovanie.

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak postup prerušujete, skúmavky na združovanie (pooling) uzavrite a skladujte pri teplote -25 °C až -15 °C maximálne 7 dní.

Príprava združených knižníc na sekvenovanie

- 1 Pridajte nasledujúci spotrebný materiál do kazety s reagensiami a pipetujte, aby sa obsah premiešal.
 - ▶ 900 µl hybridizačného pufra
 - ▶ 450 µl skupiny A
- 2 Pokračujte sekvenovaním v systéme sekvenovania novej generácie.
- 3 V prípade potreby tento postup zopakujte pre skupinu B.
 - ▶ Ak chcete dosiahnuť cieľový rozsah hustoty klastra, doštičku s knižnicou môžete opätovne združiť použitím inej koncentrácie združovania v systéme Hamilton. Opätovné združenie zneplatní pôvodnú skupinu.
 - ▶ Prípadne je možné pomer skupiny k HT1 (450 µl + 900 µl) upraviť tak, aby sa dosiahol cieľový rozsah hustoty klastra.