

Przetwarzanie próbek

- 1 Dla każdej podwielokrotności wykonać następujące czynności:
 - a Wirować z prędkością 1600 × g przez 10 minut w temperaturze 4°C.
 - b Rozpocząć izolowanie osocza w ciągu 15 minut.
- 2 Upewnić się, że każda próbówka zawiera co najmniej 1,5 ml osocza powyżej kożuszka leukocyarno-platekowego.
- 3 Zdjąć zatyczki z próbek, a następnie załadować próbki do nośników.

Wyizolowanie osocza

- 1 Wprowadzić identyfikator partii i nazwę użytkownika.
- 2 Załadować arkusz próbek lub kliknąć opcję **No Sample Sheet** (Brak arkusza próbek).
- 3 Wybrać wielkość partii.
- 4 Wybrać liczbę kontroli bez szablonu (NTC).
- 5 Załadować próbki, końcówki i płytki (z kodem kreskowym skierowanym w prawo) na nośnik.
- 6 Monitorować wykonywanie kroków automatycznych.
- 7 Po zakończeniu kliknąć opcję **Unload** (Rozładuj), aby rozładować platformę.
- 8 Wyjąć płytkę z głębokimi dołkami z osoczem pośrednim.
 - a Sprawdzić sekcje płytki pod kątem jednakowej objętości.
 - b Zwrócić uwagę na wszelkie niezgodności.
 - c Uszczelnić płytkę, załadować przeciwwagę i wirować z prędkością 5600 × g przez 10 minut.
- 9 Kliknąć przycisk **Yes** (Tak).
- 10 Zdjąć uszczelnienie płytki i załadować płytkę na nośnik.
- 11 Monitorować wykonywanie kroków automatycznych.
- 12 Po zakończeniu kliknąć opcję **Unload** (Rozładuj), aby rozładować platformę.
- 13 Po wyświetleniu komunikatu przez oprogramowanie Workflow Manager opróżnić nośniki i platformę.
- 14 Wyjąć płytkę z głębokimi dołkami z osoczem końcowym.
- 15 Sprawdzić sekcje płytki pod kątem jednakowej objętości, widocznego osadu komórkowego i nadmiernej hemolizy.

- 16 Unieważnić próbki z widocznym osadem komórkowym lub nadmierną hemolizą.
- 17 Wprowadzić komentarz dotyczący konkretnych dołków.

BEZPIECZNE PRZERWANIE OZNACZEŃ

Na czas przerwy w wykonywaniu testów należy szczelnie zabezpieczyć płytkę na osocze końcowe i przechowywać ją w temperaturze od 2°C do 8°C nie dłużej niż 7 dni.

Solution v2

Ekstrakcja cfDNA

- 1 Załadować końcówki.
- 2 Wprowadzić lokalizację pierwszej i ostatniej końcówki dla każdego stojaka na końcówki.
- 3 Zeskanować kody kreskowe z zestawu do ekstrakcji.
- 4 Wprowadzić nazwę użytkownika lub inicjały osoby przygotowującej odczynnik.
- 5 Zeskanować kody kreskowe z zestawu akcesoriów.
- 6 Wprowadzić nazwę użytkownika lub inicjały osoby przygotowującej odczynnik.
- 7 Rozpieczętować płytkę z głębokimi dołkami na osocze końcowe i umieścić płytki (z kodem kreskowym skierowanym w prawo) na nośniku płytek.
- 8 W przypadku partii z niepełnymi płytkami na niewypełnione dołki nałożyć przycięte uszczelnienie płytki (kolumny 4–12 w przypadku partii złożonej z 24 próbek i kolumny 7–12 w przypadku partii złożonej z 48 próbek).
- 9 Umieścić płytkę do izolacji DNA na kolektorze próżniowym.
- 10 Zaznaczyć pole wyboru **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Czy kolumny płytki do izolacji DNA są uszczelnione?), a następnie kliknąć przycisk **OK**.
- 11 Włączyć odczynniki do rynienek i załadować.
- 12 Przenieść odczynniki do zbiorników z głębokimi dołkami i załadować.
- 13 Odczekać na zakończenie sprawdzania objętości odczynników.
- 14 Upewnić się, że odpady w systemie próżniowym nie wypełniają więcej niż połowy systemu (zalecane opróżnienie).

- 15 Monitorować wykonywanie kroków automatycznych.
- 16 Wirować płytkę do izolacji DNA z prędkością 5600 × g przez 10 minut.
- 17 Podczas wirowania należy wyczyścić system próżniowy z użyciem 70% EtOH.
- 18 Po odwirowaniu należy rozpieczętować dołki zawierające próbki na płytce do izolacji DNA i umieścić ją na płytce do elucji cfDNA.
- 19 Monitorować wykonywanie kroków automatycznych.
- 20 Po zakończeniu inkubacji zaznaczyć pole wyboru **Plates are assembled as indicated** (Płytki załadowano zgodnie ze wskazówkami).
- 21 Wirować płytkę do izolacji DNA z prędkością 5600 × g przez 2 minuty.
- 22 Sprawdzić sekcje płytki do elucji cfDNA pod kątem jednakowej objętości.
- 23 Szczelnie zabezpieczyć i zachować płytkę do elucji cfDNA do przygotowania biblioteki.
- 24 Po zakończeniu kliknąć opcję **Unload** (Rozładuj), aby rozładować platformę.
- 25 Rozładować wszystkie nośniki i wyczyścić platformę ML STAR.
- 26 Wprowadzić komentarz dotyczący konkretnych dołków.
- 27 Wykonać jeden z następujących kroków:
 - ▶ Aby kontynuować przygotowywanie bibliotek, kliknąć przycisk **Yes** (Tak).
 - ▶ Aby zatrzymać, kliknąć przycisk **Exit** (Wyjdź).

BEZPIECZNE PRZERWANIE OZNACZEŃ

W przypadku przerwania procedury płytkę do elucji cfDNA należy szczelnie zamknąć i przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C nie dłużej niż przez 7 dni.

Przygotowywanie bibliotek

- 1 Zeskanować kody kreskowe zestawu do przygotowania biblioteki.
- 2 Wprowadzić nazwę użytkownika lub inicjały osoby przygotowującej odczynnik.
- 3 Zeskanować kody kreskowe z zestawu akcesoriów.
- 4 Wprowadzić nazwę użytkownika lub inicjały osoby przygotowującej odczynnik.
- 5 Załadować końcówki.
- 6 Wprowadzić lokalizację pierwszej końcówki dla każdego stojaka na końcówki.
- 7 Załadować płytki.
- 8 Włączyć odczynniki do zbiorników z głębokimi dołkami, a następnie załadować.
- 9 Włączyć odczynniki do rynienek i załadować.
- 10 Odczekać na zakończenie sprawdzania objętości odczynników.
- 11 Monitorować wykonywanie kroków automatycznych.
- 12 Po zakończeniu kliknąć opcję **Unload** (Rozładuj), aby rozładować platformę.
- 13 Sprawdzić sekcje płytki bibliotek pod kątem jednakowej objętości.
- 14 W przypadku przechowywania płytkę bibliotek należy szczelnie zamknąć i zachować.
- 15 Rozładować nośniki i wyczyścić platformę.
- 16 Wprowadzić komentarz dotyczący konkretnych dołków.
- 17 Wykonać jeden z następujących kroków:
 - ▶ Aby kontynuować kwantyfikację bibliotek, kliknąć przycisk **Yes** (Tak).
 - ▶ Aby zatrzymać, kliknąć przycisk **Exit** (Wyjdź).

- 18 Jeśli użytkownik nie przerywa procedury, należy natychmiast przejść do kwantyfikacji.

BEZPIECZNE PRZERWANIE OZNACZEŃ

W przypadku przerywania procedury płytkę bibliotek należy szczelnie zamknąć przed przechowywaniem. Płytkę bibliotek zachowuje stabilność do 7 dni od daty przygotowania w temperaturze od -25°C do -15°C.

Kwantyfikacja bibliotek

- 1 Zeskanować kody kreskowe z zestawu akcesoriów.
- 2 Wprowadzić nazwę użytkownika lub inicjały osoby przygotowującej odczynnik.
- 3 Załadować końcówki do nośnika końcówek.
- 4 Rozpieczętować płytkę bibliotek, a następnie załadować płytki.
- 5 Załadować próbówki z odczynnikiem bez zatyczek.
- 6 Włączyć odczynniki do rynienek na odczynniki i załadować.
- 7 Oczekać na zakończenie sprawdzania objętości odczynników.
- 8 Monitorować wykonywanie kroków automatycznych.
- 9 Po zakończeniu kliknąć opcję **Unload** (Rozładuj), aby rozładować platformę.
- 10 Rozładować płytkę bibliotek, sprawdzić pod kątem jednakowych objętości, szczelnie zamknąć, a następnie przechowywać w temperaturze pokojowej.
- 11 Rozładować płytki 96-dołkowe i sprawdzić, czy sekcje zawierają jednakową objętość.
- 12 Rozładować płytkę 384-dołkową i sprawdzić płyn w odpowiednich dołkach.
- 13 Zapieczętować płytkę folią.
- 14 Wirować z prędkością 1000 × g przez 20 sekund.
- 15 Inkubować w temperaturze pokojowej przez 10 minut, chroniąc przed światłem.
- 16 Rozładować wszystkie nośniki i wyczyścić platformę ML STAR.
- 17 Po inkubacji zdjąć foliowe uszczelnienie i załadować płytkę 384-dołkową do czytnika mikroplątek.

- 18 Kliknąć dwukrotnie szablon VeriSeq NIPT, aby otworzyć go w oprogramowaniu SoftMax Pro.
- 19 Na karcie głównej wybrać **New Experiment** (Nowy eksperyment).
- 20 Wybrać **Read** (Odczyt).
- 21 Wyeksportować dane w formacie XML w opisany poniżej sposób.
 - a Dwukrotnie kliknąć **Plate** (Płytki), a następnie wybrać **Rename** (Zmień nazwę).
 - b Zeskanować kod kreskowy płytki do kwantyfikacji, a następnie kliknąć przycisk **OK**.
 - c W lewym górnym rogu ekranu kliknąć ikonę płytki, a następnie wybrać z menu opcję **Export** (Eksport).
 - d Zaznaczyć pole wyboru **Expt name** (Nazwa eksportu), ustawić opcję daty płytki na nieprzetworzoną, ustawić format wyjściowy na XML, a następnie kliknąć przycisk **OK**.
 - e Ustawić ścieżkę i nazwę pliku wyjściowego, a następnie kliknąć opcję **Save** (Zapisz).
- 22 Na platformie ML STAR wprowadzić identyfikator fluorometru, wprowadzić komentarze dotyczące przebiegu, a następnie załadować plik XML.
- 23 Przejrzeć wyniki analizy.
- 24 Wprowadzić komentarz dotyczący konkretnych dołków.

- 25 Ocenić wyniki.
- ▶ Jeśli wyniki będą zgodne ze specyfikacją, należy przejść do pulowania bibliotek. Specyfikacje znajdują się w tabeli zawierającej parametry i granice kontroli jakości oznaczenia ilościowego w Przewodniku użytkownika oprogramowania VeriSeq NIPT Solution v2 (nr dokumentu: 1000000067940).
 - ▶ Jeśli wyniki będą niezgodne ze specyfikacją, system przerwie metodę. Powtórzyć procedury kwantyfikacji, począwszy od *Przetwarzanie próbek na stronie 1*.
- 26 Wykonać jeden z następujących kroków:
- ▶ Aby kontynuować pulowanie bibliotek, kliknąć przycisk **Yes** (Tak).
 - ▶ Aby zatrzymać, kliknąć przycisk **Exit** (Wyjdź).

BEZPIECZNE PRZERWANIE OZNACZEŃ

W przypadku przerwania procedury płytkę należy szczelnie zamknąć i przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C nie dłużej niż przez 7 dni.

Pulowanie bibliotek

- 1 Umieścić płytkę bibliotek w termocyklerze i uruchomić program denaturacji.
- 2 Odwirowywać płytkę bibliotek z prędkością 1000 × g przez 20 sekund.
- 3 Wybrać stężenie puli.
- 4 Załadować arkusz próbek lub użyć domyślnego.
- 5 Wybrać **Start** (Uruchom).
- 6 Załadować końcówki.
- 7 Załadować płytkę bibliotek poddanych denaturacji.
- 8 Załadować probówki puli.
- 9 Włać odczynniki do rynienek na odczynniki i załadować.
- 10 Załadować końcówki.
- 11 Wprowadzić lokalizację pierwszej i ostatniej końcówki dla każdego stojaka na końcówki.
- 12 Monitorować wykonywanie kroków automatycznych.
- 13 Wprowadzić komentarz dotyczący konkretnych dołków.
- 14 Po zakończeniu wybrać opcję **Unload** (Rozładuj), aby rozładować platformę.
- 15 Rozładować nośnik probówek.
- 16 Każdą probówkę puli należy zamknąć, wymieszać przez worteksowanie, a następnie szybko odwirować.
- 17 Kliknąć przycisk **OK**.
- 18 Sekwencjonowanie bibliotek należy wykonać jak najszybciej po pulowaniu. W razie konieczności zamknąć szczelnie płytkę bibliotek i przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C nie dłużej niż przez 7 dni łącznego przechowywania, aby umożliwić ponowne pulowanie.

BEZPIECZNE PRZERWANIE OZNACZEŃ

W przypadku przerwania procedury probówki puli należy zamknąć i przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C nie dłużej niż przez 7 dni.

Przygotowanie puli bibliotek do sekwencjonowania

- 1 Dodać następujące materiały eksploatacyjne do kasety z odczynnikami, a następnie wykonać pipetowanie w celu wymieszania.
 - ▶ Bufor do hybrydyzacji, 900 µl
 - ▶ Pula A, 450 µl
- 2 Przystąpić do sekwencjonowania z użyciem systemu sekwencjonowania nowej generacji.
- 3 W razie konieczności należy powtórzyć tę procedurę dla puli B.
 - ▶ Aby osiągnąć docelowy zakres gęstości klastra, można przeprowadzić ponowne pulowanie płytki biblioteki za pomocą innego stężenia puli na platformie Hamilton. Ponowne pulowanie unieważnia oryginalną pulę.
 - ▶ Alternatywnie można zmodyfikować stosunek puli do HT1 (450 + 900 ul), aby osiągnąć docelowy zakres gęstości klastra.