

Processar amostras

- 1 Execute os seguintes passos para cada alíquota:
 - a Centrifugue a 1600 × g durante 10 minutos a 4 °C.
 - b Inicie o isolamento do plasma no prazo de 15 minutos.
- 2 Inspeccione para confirmar se cada tubo contém pelo menos 1,5 ml de plasma acima da camada leucocitária.
- 3 Destape os tubos e volte a colocá-los nos suportes dos tubos.

Isolar plasma

- 1 Introduza o ID do lote e o nome de utilizador.
- 2 Carregue uma folha de amostras ou clique em **No Sample Sheet** (Sem folha de amostras).
- 3 Selecione o tamanho do lote.
- 4 Selecione o número de NTCs (controles sem modelo).
- 5 Carregue as amostras, pontas e placas (com o código de barras voltado para a direita) no suporte.
- 6 Observe os passos automáticos.
- 7 Quando terminar, clique em **Unload** (Descarregar) para descarregar a plataforma.
- 8 Remova a placa de poços profundos de Plasma intermédio.
 - a Inspeccione a placa para verificar se os volumes são consistentes.
 - b Anote quaisquer inconsistências.
 - c Sele a placa, carregue de forma equilibrada e centrifugue a 5600 × g durante 10 minutos.
- 9 Clique em **Yes** (Sim).
- 10 Remova o selo da placa e volte a colocar no suporte.
- 11 Observe os passos automáticos.
- 12 Quando terminar, clique em **Unload** (Descarregar) para descarregar a plataforma.
- 13 Quando solicitado pelo Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho), esvazie os suportes e a plataforma.
- 14 Remova a placa de poços profundos de Plasma final.
- 15 Inspeccione a placa para verificar se os volumes são consistentes, se existem sedimentos celulares visíveis e hemólise excessiva.

- 16 Invalide as amostras com sedimentos celulares visíveis ou hemólise excessiva.
- 17 Introduza comentários sobre os poços afetados.

PONTO DE PARAGEM DE SEGURANÇA

Se parar, coloque o selo na placa de plasma final e armazene a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C até um máximo de 7 dias.

Extração de cfDNA

- 1 Pontas de carregamento.
- 2 Introduza a localização da primeira e da última ponta de cada rack de pontas.
- 3 Leia os códigos de barras da caixa de extração.
- 4 Introduza o nome de utilizador ou as iniciais do preparador do reagente.
- 5 Leia os códigos de barras da caixa de acessórios.
- 6 Introduza o nome de utilizador ou as iniciais do preparador do reagente.
- 7 Retire o selo da placa de poços profundos de Plasma e carregue as placas (com o código de barras voltado para a direita) no suporte.
- 8 Em lotes de placas parciais, coloque um selo recortado nos poços não utilizados (colunas 4–12 para lotes de 24 amostras e colunas 7–12 para lotes de 48 amostras).
- 9 Carregue a placa de ligação de ADN no tubo de vácuo.
- 10 Selecione a caixa de verificação **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (As colunas da placa de ligação de ADN estão seladas?) e, em seguida, clique em **OK**.
- 11 Coloque os reagentes em recipientes e carregue.
- 12 Transfira os reagentes para o reservatório de poços profundos e carregue.
- 13 Aguarde pela conclusão da verificação do volume de reagente.
- 14 Confirme se o recipiente de resíduos de vácuo não está a mais de metade da sua capacidade (recomenda-se que esteja vazio).
- 15 Observe os passos automáticos.
- 16 Centrifugue a placa de ligação de ADN a 5600 × g durante 10 minutos.

- 17 Durante a centrifugação, limpe o vácuo com EtOH a 70%.
- 18 Após a centrifugação, retire os selos dos poços que contêm as amostras da placa de ligação de ADN e coloque-a por cima da placa de eluição de cfDNA.
- 19 Observe os passos automáticos.
- 20 Após a incubação, selecione a caixa de verificação **Plates are assembled as indicated** (As placas estão montadas conforme indicado).
- 21 Centrifugue a placa de ligação de ADN a 5600 x g durante 2 minutos.
- 22 Inspeccione a placa de eluição de cfDNA para verificar se os volumes são consistentes
- 23 Coloque o selo e preserve a placa de eluição de cfDNA para a preparação da biblioteca.
- 24 Quando terminar, clique em **Unload** (Descarregar) para descarregar a plataforma.
- 25 Retire todos os suportes e limpe a plataforma do ML STAR.
- 26 Introduza comentários sobre os poços afetados.
- 27 Execute um dos seguintes passos:
 - ▶ Para continuar a Preparar bibliotecas, clique em **Yes** (Sim).
 - ▶ Para parar, clique em **Exit** (Sair).

PONTO DE PARAGEM DE SEGURANÇA

Se parar, coloque o selo na placa de eluição de cfDNA e armazene entre -25 °C e -15 °C até um máximo de 7 dias.

Preparar bibliotecas

- 1 Proceda à leitura dos códigos de barras das caixas de preparação da biblioteca.
- 2 Introduza o nome de utilizador ou as iniciais do preparador do reagente.
- 3 Leia os códigos de barras da caixa de acessórios.
- 4 Introduza o nome de utilizador ou as iniciais do preparador do reagente.
- 5 Pontas de carregamento.
- 6 Introduza a localização da primeira ponta de cada rack de pontas.
- 7 Carregue as placas.
- 8 Coloque os reagentes nos reservatórios de poços profundos e carregue.
- 9 Coloque os reagentes em recipientes e carregue.
- 10 Aguarde pela conclusão da verificação do volume de reagente.
- 11 Observe os passos automáticos.
- 12 Quando terminar, clique em **Unload** (Descarregar) para descarregar a plataforma.
- 13 Inspeccione a placa de bibliotecas para verificar se os volumes são consistentes.
- 14 Se armazenar, sele e guarde a placa de bibliotecas.
- 15 Retire os suportes e limpe a plataforma.
- 16 Introduza comentários sobre os poços afetados.
- 17 Execute um dos seguintes passos:
 - ▶ Para continuar para a Quantificar bibliotecas, clique em **Yes** (Sim).
 - ▶ Para parar, clique em **Exit** (Sair).
- 18 A menos que esteja a parar, proceda de imediato à quantificação.

PONTO DE PARAGEM DE SEGURANÇA

Se parar, coloque o selo na placa de bibliotecas antes de armazenar. A placa de bibliotecas mantém-se estável até um máximo de 7 dias a contar da data de preparação a uma temperatura entre -25 °C e -15 °C.

Quantificar bibliotecas

- 1 Leia os códigos de barras da caixa de acessórios.
- 2 Introduza o nome de utilizador ou as iniciais do preparador do reagente.
- 3 Carregue as pontas no suporte de pontas.
- 4 Retire o selo da placa de bibliotecas e, em seguida, carregue as placas.
- 5 Carregue os tubos de reagente sem tampas.
- 6 Coloque os reagentes nos recipientes de reagente e carregue.
- 7 Aguarde pela conclusão da verificação do volume de reagente.
- 8 Observe os passos automáticos.
- 9 Quando terminar, clique em **Unload** (Descarregar) para descarregar a plataforma.
- 10 Descarregue a placa de bibliotecas, verifique se os volumes são consistentes, sele e armazene à temperatura ambiente.
- 11 Descarregue as placas de 96 poços e verifique se os volumes são consistentes.
- 12 Retire a placa de 384 poços e verifique se existe líquido nos poços apropriados.
- 13 Coloque um selo de alumínio na placa.
- 14 Centrifugue a 1000 × g durante 20 segundos.
- 15 Incube à temperatura ambiente durante 10 minutos, ao abrigo da luz.
- 16 Retire todos os suportes e limpe a plataforma do ML STAR.
- 17 Após a incubação, remova o selo de alumínio e coloque a placa de 384 poços no leitor de microplacas.
- 18 Faça duplo clique no modelo VeriSeq NIPT para abrir o modelo no SoftMax Pro.
- 19 Selecione **New Experiment** (Novo ensaio) no separador Home (Início).
- 20 Selecione **Read** (Leitura).
- 21 Exporte os dados como XML, da seguinte forma.
 - a Clique com o botão direito em **Plate** (Placa) e, em seguida, selecione **Rename** (Mudar o nome).
 - b Leia o código de barras da placa de quantificação e, em seguida, clique em **OK**.
 - c No canto superior esquerdo do ecrã, clique no ícone da placa e, em seguida, selecione **Export** (Exportar) no menu.
 - d Selecione a caixa de verificação **Expt name** (Nome de expt), defina a data da placa como não processada, defina o formato de saída como XML e, em seguida, clique em **OK**.
 - e Defina o nome e o caminho do ficheiro de saída e, em seguida, clique em **Save** (Guardar).
- 22 No ML STAR, introduza o ID do fluorómetro, introduza comentários para o ensaio e carregue o ficheiro XML.
- 23 Reveja os resultados da análise.
- 24 Introduza comentários sobre os poços afetados.
- 25 Avalie os resultados.
 - ▶ Se os resultados forem aprovados na especificação, avance para as bibliotecas de pool. Para obter especificações, consulte a tabela de métricas e limites de CQ no Manual do Software VeriSeq NIPT Solution v2 (documento n.º 1000000067940).
 - ▶ Se os resultados falharem a especificação, o sistema interrompe o método. Repita os procedimentos de quantificação, começando pela *Preparação na página 1*.

- 26 Execute um dos seguintes passos:
- ▶ Para continuar o pooling de bibliotecas, clique em **Yes** (Sim).
 - ▶ Para parar, clique em **Exit** (Sair).

PONTO DE PARAGEM DE SEGURANÇA

Se parar, coloque o selo na placa e armazene a uma temperatura entre -25 °C e -15 °C até um máximo de 7 dias.

Bibliotecas de pool

- 1 Coloque a placa de bibliotecas no termociclador e execute o programa de desnaturação.
- 2 Centrifugue a placa de bibliotecas a 1000 × g durante 20 segundos.
- 3 Selecione a concentração do pool.
- 4 Carregue uma folha de amostras ou utilize a predefinição.
- 5 Selecione **Start** (Iniciar).
- 6 Pontas de carregamento.
- 7 Carregue a placa de bibliotecas de desnaturação.
- 8 Carregue tubos de pool.
- 9 Coloque os reagentes nos recipientes de reagente e carregue.
- 10 Pontas de carregamento.
- 11 Introduza a localização da primeira e da última ponta de cada rack de pontas.
- 12 Observe os passos automáticos.
- 13 Introduza comentários sobre os poços afetados.
- 14 Quando terminar, selecione **Unload** (Descarregar) para descarregar a plataforma.
- 15 Retire o suporte de tubos.
- 16 Tape cada tubo de pooling, agite em vórtice e centrifugue brevemente.
- 17 Clique em **OK**.
- 18 Proceda à sequenciação das bibliotecas assim que possível após o pooling. Se necessário, sele a placa de bibliotecas e armazene entre os -25 °C e os -15 °C durante até 7 dias de armazenamento cumulativo para poder voltar a fazer o pool.

PONTO DE PARAGEM DE SEGURANÇA

Se parar, coloque as tampas nos tubos de pooling e armazene a uma temperatura entre -25 °C e -15 °C até um máximo de 7 dias.

Preparar pools de bibliotecas para sequenciação

- 1 Adicione os seguintes consumíveis ao cartucho de reagentes e proceda à pipetagem para misturar.
 - ▶ Tampão de hibridização de 900 µl
 - ▶ Pool A de 450 µl
- 2 Avance com a sequenciação num sistema de sequenciação de nova geração.
- 3 Se necessário, repita este procedimento para o Pool B.
 - ▶ Para alcançar um intervalo de densidade do cluster-alvo, pode ser feito um novo pool da placa de bibliotecas utilizando uma concentração de pool diferente no Hamilton. Ao realizar novamente o pool invalida o pool original.
 - ▶ Em alternativa, a razão do pool para HT1 (450+900ul) pode ser modificada para alcançar um intervalo de densidade do cluster-alvo.