

Obrada uzoraka

- 1 Preuzmite sledeće korake za svaki alikvot:
 - a Centrifugirajte pri brzini od 1600 × g u trajanju od 10 minuta na temperaturi od 4 °C.
 - b Započnite izolaciju plazme u roku od 15 minuta.
- 2 Pregledajte da biste potvrdili da svaka epruveta sadrži najmanje 1,5 ml plazme iznad puferske obloge.
- 3 Skinite poklopce sa epruveta i stavite epruvete u nosače epruveta.

Izolovanje plazme

- 1 Unesite ID serije i korisničko ime.
- 2 Stavite list uzorka ili kliknite na **No Sample Sheet** (Bez lista uzorka).
- 3 Izaberite veličinu serije.
- 4 Izaberite broj kontrola bez predloška (NTC).
- 5 Postavite uzorke, vrhove i pločice na nosač (tako da bar-kod bude okrenut udesno).
- 6 Pratite automatske korake.
- 7 Kada završite, kliknite na **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili držač.
- 8 Uklonite pločicu dubokog otvora za srednju plazmu.
 - a Pregledajte da li su na pločici zapremine ujednačene
 - b Zabeležite sve nedoslednosti.
 - c Zatvorite pločicu, postavite balans i centrifugirajte brzinom od 5600 × g u trajanju od 10 minuta.
- 9 Kliknite na **Yes** (Da).
- 10 Skinite poklopac pločice i ponovo postavite pločicu na nosač.
- 11 Pratite automatske korake.
- 12 Kada završite, kliknite na **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili držač.
- 13 Kada vas na to uputi Workflow Manager (Upravljač radnim tokom), ispraznite nosače i držač.
- 14 Uklonite pločicu dubokog otvora za krajnju plazmu.
- 15 Pregledajte da li na pločici postoje ujednačene zapremine, vidljiv ćelijski pelet i prekomerna hemoliza.
- 16 Uzorke sa vidljivim ćelijskim peletom ili prekomernom hemolizom označite kao nevažeće.

- 17 Unesite komentare u vezi sa aktivnim otvorima.

BEZBEDNA TAČKA ZAUSTAVLJANJA

Ako zaustavljate proces, zatvorite pločicu sa krajnjom plazmom i čuvajte je na temperaturi od 2 °C do 8 °C najduže 7 dana.

Ekstrahovanje cfDNA

- 1 Postavite vrhove.
- 2 Unesite lokaciju prvog i poslednjeg vrha za svaki držač vrhova.
- 3 Skenirajte bar-kodove kutije za ekstrahovanje.
- 4 Upišite korisničko ime ili inicijale lica koje priprema reagens.
- 5 Skenirajte bar-kodove kutije sa dodatnim priborom.
- 6 Upišite korisničko ime ili inicijale lica koje priprema reagens.
- 7 Otvorite pločicu iz dubokog otvora sa krajnjom plazmom i postavite pločice u nosač (tako da bar-kod bude okrenut udesno).
- 8 Kod parcijalnih serija pločica, postavite isečeni poklopac za pločice preko neiskorišćenih otvora (kolone 4–12 za 24 serije uzoraka i kolone 7–12 za 48 serija uzoraka).
- 9 Postavite pločicu za DNK vezivanje na vakuumski razdelnik.
- 10 Izaberite polje za označavanje **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Da li su kolone sa pločicama za DNK vezivanje zatvorene?), pa kliknite na **OK** (U redu).
- 11 Sipajte reagense u posude i napunite.
- 12 Prenesite reagense u rezervoare dubokih otvora i napunite.
- 13 Sačekajte da se završi provera zapremine reagensa.
- 14 Potvrdite da je vakuumski otpad najviše dopola pun (preporučuje se da bude prazan).
- 15 Pratite automatske korake.
- 16 Centrifugirajte pločicu za DNK vezivanje brzinom od 5600 × g u trajanju od 10 minuta.
- 17 Tokom centrifugiranja, očistite vakuum 70%-tnim EtOH.

- 18 Nakon centrifugiranja otvorite otvore sa uzorcima na pločici za DNK vezivanje i stavite je na pločicu cfDNA Elution.
- 19 Pratite automatske korake.
- 20 Nakon inkubacije izaberite polje za označavanje **Plates are assembled as indicated** (Pločice su sklopljene po uputstvu).
- 21 Centrifugirajte pločicu za DNK vezivanje brzinom od 5600 × g u trajanju od 2 minuta.
- 22 Pregledajte da li su na pločici cfDNA Elution zapremine ujednačene
- 23 Zatvorite i zadržite pločicu cfDNA Elution za pripremu biblioteke.
- 24 Kada završite, kliknite na **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili držač.
- 25 Ispraznite sve nosače i očistite ML STAR držač.
- 26 Unesite komentare u vezi sa aktivnim otvorima.
- 27 Preduzmite jedan od sledećih koraka:
 - ▶ Da biste nastavili sa pripremom biblioteka, kliknite na **Yes** (Da).
 - ▶ Da biste zaustavili proces, kliknite na **Exit** (Napusti).

BEZBEDNA TAČKA ZAUSTAVLJANJA

Ako zaustavljate proces, zatvorite cfDNA Evolution pločicu i skladištite na temperaturi od -25 °C do -15 °C u periodu od 7 dana.

Priprema biblioteka

- 1 Skenirajte bar-kodove kutije za pripremu biblioteke.
- 2 Upišite korisničko ime ili inicijale lica koje priprema reagens.
- 3 Skenirajte bar-kodove kutije sa dodatnim priborom.
- 4 Upišite korisničko ime ili inicijale lica koje priprema reagens.
- 5 Postavite vrhove.
- 6 Unesite lokaciju prvog vrha za svaki držač vrhova.
- 7 Postavite pločice.
- 8 Sipajte reagense u rezervoare dubokih otvora i postavite.
- 9 Sipajte reagense u posude i napunite.
- 10 Sačekajte da se završi provera zapremine reagensa.
- 11 Pratite automatske korake.
- 12 Kada završite, kliknite na **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili držač.
- 13 Pogledajte da li na pločici biblioteka postoje ujednačene zapremine.
- 14 Ukoliko ih skladištite, zatvorite i zadržite pločicu biblioteka.
- 15 Ispraznite nosače i očistite držač.
- 16 Unesite komentare u vezi sa aktivnim otvorima.
- 17 Preduzmite jedan od sledećih koraka:
 - ▶ Da biste nastavili sa pripremom biblioteka, kliknite na **Yes** (Da).
 - ▶ Da biste zaustavili proces, kliknite na **Exit** (Napusti).
- 18 Ukoliko ne zaustavljate proces, odmah pređite na kvantifikaciju.

BEZBEDNA TAČKA ZAUSTAVLJANJA

Ako zaustavljate proces, zatvorite pločicu biblioteka pre skladištenja. Pločica biblioteka je stabilna do 7 dana od datuma pripreme pri temperaturi od -25 °C do -15 °C.

Kvantifikacija biblioteka

- 1 Skenirajte bar-kodove kutije sa dodatnim priborom.
- 2 Upišite korisničko ime ili inicijale lica koje priprema reagens.
- 3 Postavite vrhove na nosač vrhova.
- 4 Otvorite pločicu biblioteka i potom postavite pločice.
- 5 Postavite epruvete sa reagensima bez poklopaca.
- 6 Sipajte reagense u epruvete i postavite ih.
- 7 Sačekajte da se završi provera zapremine reagensa.
- 8 Pratite automatske korake.
- 9 Kada završite, kliknite na **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili nosač.
- 10 Skinite pločicu biblioteka, proverite da li su zapremine ujednačene, zatvorite i čuvajte na sobnoj temperaturi.
- 11 Skinite pločice sa 96 otvora i proverite da li su zapremine ujednačene
- 12 Skinite ploču sa 384 otvora i proverite da li postoji tečnost u odgovarajućim otvorima.
- 13 Zatvorite ploču folijom.
- 14 Centrifugirajte brzinom od 1000 × g u trajanju od 20 sekundi.
- 15 Inkubirajte na sobnoj temperaturi 10 minuta, zaštićeno od svetlosti.
- 16 Ispraznite sve nosače i očistite ML STAR držač.
- 17 Nakon inkubacije, skinite foliju i stavite ploču sa 384 otvora na čitač mikroploče.
- 18 Dvaput kliknite na šablon VeriSeq NIPT da biste ga otvorili u SoftMax Pro.
- 19 Izaberite **New Experiment** (Novi eksperiment) na kartici Home (Početak).

- 20 Izaberite **Read** (Očitavanje).
- 21 Izvezite podatke u XML format na sledeći način.
 - a Kliknite desnim tasterom miša na **Plate** (Pločica), pa izaberite **Rename** (Promeni naziv).
 - b Skenirajte bar-kod pločice za kvantifikaciju, pa kliknite na **OK** (U redu).
 - c U gornjem levom uglu ekrana, kliknite na ikonu pločice, pa izaberite stavku **Export** (Izvoz) u meniju.
 - d Izaberite polje za označavanje **Expt name** (Naziv izvoza), podesite opciju datuma pločice na neobrađeno, podesite izlazni format na XML, pa kliknite na **OK** (U redu).
 - e Podesite putanju i naziv izlazne datoteke, pa kliknite na **Save** (Sačuvaj).
- 22 Na sistemu ML STAR upišite ID fluorometra i komentare za ciklus, pa otpremite XML datoteku.
- 23 Pregledajte rezultate analize.
- 24 Unesite komentare u vezi sa aktivnim otvorima.
- 25 Procenite rezultate.
 - ▶ Ukoliko rezultati prođu specifikaciju, pređite na pulovanje biblioteka. Da biste saznali specifikacije, pogledajte QC metriku i tabelu sa graničnim vrednostima u vodiču za softver VeriSeq NIPT Solution v2 (br. dokumenta 100000067940).
 - ▶ Ukoliko rezultati ne prođu specifikaciju, sistem će prekinuti metod. Ponovite postupke kvantifikacije počevši sa **Obrada uzoraka na stranici 1**.
- 26 Preduzmite jedan od sledećih koraka:
 - ▶ Da biste nastavili sa pulovanjem biblioteka, kliknite na **Yes** (Da).

- ▶ Da biste zaustavili proces, kliknite na **Exit** (Napusti).

BEZBEDNA TAČKA ZAUSTAVLJANJA

Ako zaustavljate proces, zatvorite pločicu i čuvajte je na temperaturi od -25 °C do -15 °C najduže 7 dana.

Pulovanje biblioteka

- 1 Postavite pločicu biblioteke na termički cikler i pokrenite program denaturacije.
- 2 Centrifugirajte pločicu biblioteka brzinom od 1000 × g u trajanju od 20 sekundi.
- 3 Izaberite koncentraciju pula.
- 4 Postavite list uzorka ili upotrebite podrazumevani.
- 5 Izaberite **Start** (Počni).
- 6 Postavite vrhove.
- 7 Postavite pločicu denaturisane biblioteke.
- 8 Postavite epruvete za pulovanje.
- 9 Sipajte reagense u epruvete i postavite ih.
- 10 Postavite vrhove.
- 11 Unesite lokaciju prvog i poslednjeg vrha za svaki držač vrhova.
- 12 Pratite automatske korake.
- 13 Unesite komentare u vezi sa aktivnim otvorima.
- 14 Kada završite, kliknite na **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili držač.
- 15 Skinite nosač epruveta.
- 16 Poklopite svaku epruvetu za pulovanje, vorteksujte i kratko centrifugirajte.
- 17 Kliknite na **OK** (U redu).
- 18 Sekvencirajte biblioteke što pre nakon pulovanja. Ukoliko je potrebno, zatvorite pločicu biblioteka i skladištite je na temperaturi od -25 °C do -15 °C najduže 7 dana kumulativnim čuvanjem da bi se omogućilo ponovno pulovanje.

BEZBEDNA TAČKA ZAUSTAVLJANJA

Ako zaustavljate proces, zatvorite epruvete za pulovanje i čuvajte ih na temperaturi od -25 °C do -15 °C najduže 7 dana.

Priprema pulovanih biblioteka za sekvenciranje

- 1 Dodajte sledeći potrošni materijal u kertridž za reagense, pa pipetirajte da biste izmešali.
 - ▶ 900 µl pufera za hibridizaciju
 - ▶ 450 µl pula A
- 2 Pređite na sekvenciranje na sistemu za sekvenciranje sledeće generacije.
- 3 Ukoliko je potrebno, ponovite postupak za Pul B.
 - ▶ Da biste dostigli ciljni opseg gustine klastera, pločicu biblioteke možete ponovo da pulujete pomoću druge koncentracije pulovanja na sistemu Hamilton. Ponovno pulovanje čini prvobitni pul nevažecim.
 - ▶ Druga mogućnost je modifikovanje odnosa pula prema HT1 (450+900ul) radi postizanja ciljnog opsega gustine klastera.