

## Procesarea probelor

- 1 Finalizați următoarele etape pentru fiecare parte alicotă:
  - a Centrifugați la 1600 × g timp de 10 minute la 4°C.
  - b Începeți izolarea plasmei în termen de 15 minute.
- 2 Inspectați pentru a confirma că fiecare eprubetă conține cel puțin 1,5 ml de plasmă deasupra peliculei leucocitare.
- 3 Scoateți capacele eprubetelor și încărcați eprubetele în suporturile pentru eprubete.

## Izolarea plasmei

- 1 Introduceți ID-ul de lot și numele utilizatorului.
- 2 Încărcați o foaie de probe sau faceți clic pe **No Sample Sheet** (Nicio foaie de probe).
- 3 Selectați dimensiunea lotului.
- 4 Selectați numărul de controale fără șablon (NTC-uri).
- 5 Încărcați probele, vârfurile și plăcile (cu codul de bare orientat spre dreapta) pe suport.
- 6 Respectați etapele automatizate.
- 7 Când terminați, faceți clic pe **Unload** (Descărcare) pentru a descărca platforma.
- 8 Îndepărtați placa cu godeuri adânci pentru plasma intermediară.
  - a Inspectați placa pentru a detecta dacă volumele sunt uniforme.
  - b Notați orice neuniformități.
  - c Sigilați placa, încărcați la echilibru și centrifugați la 5600 × g timp de 10 minute.
- 9 Faceți clic pe **Yes** (Da).
- 10 Îndepărtați sigiliul plăcii și încărcați din nou placa pe suport.
- 11 Respectați etapele automatizate.
- 12 Când terminați, faceți clic pe **Unload** (Descărcare) pentru a descărca platforma.
- 13 Când vi se solicită de către Managerul fluxului de lucru, goliți suporturile și platforma.
- 14 Îndepărtați placa cu godeuri adânci pentru plasma finală.
- 15 Inspectați placa pentru a detecta dacă volumele sunt uniforme și dacă există pelete celulare vizibile și hemoliză excesivă.
- 16 Invalidați probele cu peletă celulară vizibilă sau cu hemoliză excesivă.
- 17 Introduceți comentarii despre godeurile afectate.

## PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, sigilați placa pentru plasma finală și depozitați-o la o temperatură între 2°C și 8°C timp de până la 7 zile.

## Extragerea ADN-ului liber circulant

- 1 Încărcați vârfurile.
- 2 Introduceți poziția primului și ultimului vârf pentru fiecare stativ de vârfuri.
- 3 Scanați codurile de bare ale Cutiei de extragere.
- 4 Introduceți numele utilizatorului sau inițialele preparatorului reactivilor.
- 5 Scanați codurile de bare ale Cutiei de accesorii.
- 6 Introduceți numele utilizatorului sau inițialele preparatorului reactivilor.
- 7 Desigilați placa cu godeuri adânci pentru plasma finală și încărcați plăcile (cu codul de bare orientat spre dreapta) pe suport.
- 8 Pentru loturile cu plăci parțiale, aplicați o folie de sigilare pentru placă, tăiată la dimensiuni, peste godeurile nefolosite (coloanele 4-12 pentru loturile de 24 de probe și coloanele 7-12 pentru loturile de 48 de probe).
- 9 Încărcați placa de fixare a ADN-ului în colectorul de vid.
- 10 Bifați caseta de selectare **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Sunt sigilate coloanele plăcii de fixare a ADN-ului?), apoi faceți clic pe **OK**.
- 11 Turnați reactivii în băi și încărcați.
- 12 Transferați reactivii în rezervoarele pentru godeuri adânci și încărcați.
- 13 Așteptați să se finalizeze verificarea volumului de reactivi.
- 14 Confirmați că deșeurile din vid nu depășesc jumătate (se recomandă să nu fie deloc).
- 15 Respectați etapele automatizate.
- 16 Centrifugați placa de fixare a ADN-ului la 5600 × g timp de 10 minute.

- 17 În timpul centrifugării, curățați vidul cu EtOH 70%.
- 18 După centrifugare, desigilați godeurile care conțin probe de pe placa de fixare a ADN-ului și plasați-o pe partea superioară a plăcii de eluțiune pentru ADN liber circulant.
- 19 Respectați etapele automatizate.
- 20 După incubare, bifați caseta de selectare **Plates are assembled as indicated** (Plăcile sunt asamblate după indicații).
- 21 Centrifugați placa de fixare a ADN-ului la 5600 × g timp de 2 minute.
- 22 Inspectați placa de eluțiune pentru ADN liber circulant pentru a detecta dacă volumele sunt uniforme.
- 23 Sigilați și păstrați placa de eluțiune pentru ADN liber circulant pentru pregătirea bibliotecii.
- 24 Când terminați, faceți clic pe **Unload** (Descărcare) pentru a descărca platforma.
- 25 Descărcați toate suporturile și curățați platforma instrumentului ML STAR.
- 26 Introduceți comentarii despre godeurile afectate.
- 27 Efectuați unul dintre următorii pași:
  - ▶ Pentru a continua cu Prepare Libraries (Pregătirea bibliotecilor), faceți clic pe **Yes (Da)**.
  - ▶ Pentru a vă opri, faceți clic pe **Exit** (Ieșire).

## PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, sigilați placa de eluțiune pentru ADN liber circulant și depozitați-o la o temperatură între -25°C și -15°C timp de până la 7 zile.

## Pregătirea bibliotecilor

- 1 Scanați codurile de bare ale Cutiei de pregătire a bibliotecii.
- 2 Introduceți numele utilizatorului sau inițialele preparatorului reactivilor.
- 3 Scanați codurile de bare ale Cutiei de accesorii.
- 4 Introduceți numele utilizatorului sau inițialele preparatorului reactivilor.
- 5 Încărcați vârfurile.
- 6 Introduceți poziția primului vârf pentru fiecare stativ de vârfuri.
- 7 Încărcați plăcile.
- 8 Turnați reactivii în rezervoarele pentru godeuri adânci și încărcați.
- 9 Turnați reactivii în băi și încărcați.
- 10 Așteptați să se finalizeze verificarea volumului de reactivi.
- 11 Respectați etapele automatizate.
- 12 Când terminați, faceți clic pe **Unload** (Descărcare) pentru a descărca platforma.
- 13 Inspectați placa Bibliotecii pentru a detecta dacă volumele sunt uniforme.
- 14 Dacă o depozitați, sigilați și păstrați placa Bibliotecii.
- 15 Descărcați suporturile și curățați platforma.
- 16 Introduceți comentarii despre godeurile afectate.
- 17 Efectuați unul dintre următorii pași:
  - ▶ Pentru a continua cu Quantify Libraries (Cuantificarea bibliotecilor), faceți clic pe **Yes (Da)**.
  - ▶ Pentru a vă opri, faceți clic pe **Exit** (Ieșire).
- 18 Dacă nu vă opriți, treceți imediat la cuantificare.

**PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ**

Dacă vă opriți, sigilați placa Bibliotecii înainte de depozitare. Placa Bibliotecii este stabilă timp de până la 7 zile de la data pregătirii, la o temperatură între -25°C și -15°C.

**Cuantificarea bibliotecilor**

- 1 Scanați codurile de bare ale Cutiei de accesorii.
- 2 Introduceți numele utilizatorului sau inițialele preparatorului reactivilor.
- 3 Încărcați vârfurile în suportul pentru vârfuri.
- 4 Desigilați placa Bibliotecii, apoi încărcați plăcile.
- 5 Încărcați eprubetele de reactivi fără capace.
- 6 Turnați reactivii în băile de reactivi și încărcați.
- 7 Așteptați să se finalizeze verificarea volumului de reactivi.
- 8 Respectați etapele automatizate.
- 9 Când terminați, faceți clic pe **Unload** (Descărcare) pentru a descărca platforma.
- 10 Descărcați placa Bibliotecii, verificați dacă volumele sunt uniforme, sigilați și depozitați la temperatura camerei.
- 11 Descărcați plăcile cu 96 de godeuri și verificați dacă volumele sunt uniforme.
- 12 Descărcați placa cu 384 de godeuri și verificați dacă există lichid în godeurile corespunzătoare.
- 13 Sigilați placa cu o folie de sigilare.
- 14 Centrifugați la 1000 × g timp de 20 de secunde.
- 15 Incubați la temperatura camerei timp de 10 minute, la adăpost de lumină.
- 16 Descărcați toate suporturile și curățați platforma instrumentului ML STAR.
- 17 După incubație, îndepărtați folia de sigilare și încărcați placa cu 384 de godeuri în cititorul de microplăci.
- 18 Faceți dublu clic pe șablonul VeriSeq NIPT pentru a-l deschide în SoftMax Pro.
- 19 Selectați **New Experiment** (Experiment nou) în fila Home (Pagină principală).
- 20 Selectați **Read** (Citire).
- 21 Exportați datele ca XML după cum urmează.
  - a Faceți clic dreapta pe **Plate** (Placă), apoi selectați **Rename** (Redenumire).
  - b Scanați codul de bare al plăcii Quantificare, apoi faceți clic pe **OK**.
  - c În colțul din stânga sus al ecranului, faceți clic pe pictograma plăcii, apoi selectați **Export** din meniu.
  - d Bifați caseta de selectare **Expt name** (Nume export), setați opțiunea de dată a plăcii la raw (brută), setați formatul de ieșire la XML, apoi faceți clic pe **OK**.
  - e Setați calea și numele fișierului de ieșire, apoi faceți clic pe **Save** (Salvare).
- 22 Pe ML STAR, introduceți ID-ul de fluorometru, introduceți comentariile pentru rulare și încărcați fișierul XML.
- 23 Examinați rezultatele analizei.
- 24 Introduceți comentarii despre godeurile afectate.
- 25 Evaluați rezultatele.
  - ▶ Dacă rezultatele corespund specificațiilor, treceți la Cumularea bibliotecilor. Pentru specificații, consultați tabelul de cuantificare a metricilor și limitelor de control al calității din Ghidul software pentru Soluția VeriSeq NIPT v2 (nr. document 1000000067940).
  - ▶ Dacă rezultatele nu corespund specificațiilor, sistemul abandonează metoda. Repetați procedurile de cuantificare, începând cu *Pregătirea bibliotecilor la pagina 2*.

- 26 Efectuați unul dintre următorii pași:
- ▶ Pentru a continua cu Pool Libraries (Cumularea bibliotecilor), faceți clic pe **Yes** (Da).
  - ▶ Pentru a vă opri, faceți clic pe **Exit** (Ieșire).

#### PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, sigilați placa și depozitați-o la o temperatură între -25°C și -15°C timp de până la 7 zile.

#### Cumularea bibliotecilor

- 1 Plasați placa Bibliotecii pe ciclul termic și rulați programul de denaturare.
- 2 Centrifugați placa Bibliotecii la 1000 × g timp de 20 de secunde.
- 3 Selectați concentrația de cumulare.
- 4 Încărcați o foaie de probe sau folosiți-o pe cea implicită.
- 5 Selectați **Start**.
- 6 Încărcați vârful.
- 7 Încărcați placa Bibliotecii denaturată.
- 8 Încărcați eprubetele de cumulare.
- 9 Turnați reactivii în băile de reactivi și încărcați.
- 10 Încărcați vârful.
- 11 Introduceți poziția primului și ultimului vârf pentru fiecare stativ de vârfuri.
- 12 Respectați etapele automatizate.
- 13 Introduceți comentarii despre godeurile afectate.
- 14 Când terminați, selectați **Unload** (Descărcare) pentru a descărca platforma.
- 15 Descărcați suportul pentru eprubete.
- 16 Puneți capacul fiecărei eprubete de cumulare, agitați, apoi centrifugați pentru scurt timp.
- 17 Faceți clic pe **OK**.
- 18 Secvențiați bibliotecile cât mai curând posibil după cumulare. Dacă este necesar, sigilați placa Bibliotecii și depozitați-o între -25°C și -15°C timp de cel mult 7 zile prin depozitare cumulativă, pentru a permite o nouă cumulare.

#### PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, puneți capacul eprubetelor de cumulare și depozitați-le la o temperatură între -25°C și -15°C timp de până la 7 zile.

#### Pregătirea bibliotecilor cumulate pentru secvențiere

- 1 Adăugați următoarele consumabile în cartușul cu reactivi, apoi pipetați pentru a amesteca.
  - ▶ Soluție tampon de hibridizare 900 μl
  - ▶ 450 μl Cumul A
- 2 Continuați cu secvențierea pe un sistem de secvențiere de nouă generație.
- 3 Dacă este necesar, repetați această procedură pentru Cumulul B.
  - ▶ Pentru a atinge intervalul de densitate țintă a grupului de celule, placa Bibliotecii se poate cumula din nou folosind o altă concentrație de cumulare pe Hamilton. Noua cumulare anulează validarea cumulării originale.
  - ▶ Alternativ, raportul cumulării la HT1 (450+900ul) se poate modifica pentru a se obține intervalul de densitate țintă a grupului de celule.