

Obrada uzoraka

- 1 Izvedite sljedeće korake za svaki alikvot:
 - a Centrifugirajte na 1600 × g tijekom 10 minuta na temperaturi od 4 °C.
 - b Započnite izolaciju plazme u roku od 15 minuta.
- 2 Provjerite sadrži li svaka epruveta najmanje 1,5 ml plazme iznad sloja leukocita i trombocita.
- 3 Skinite čep s epruveta te ih postavite na nosače epruveta.

Izoliranje plazme

- 1 Unesite ID serije i korisničko ime.
- 2 Postavite list s uzorcima ili kliknite **No Sample Sheet** (Bez lista s uzorcima).
- 3 Odaberite veličinu serije.
- 4 Odaberite broj kontrola bez predloška (NTC-ova).
- 5 Postavite uzorke, vrhove i pločice (s barkodom okrenutim udesno) na nosač.
- 6 Nadzirite automatizirane korake.
- 7 Po završetku kliknite **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili platformu
- 8 Uklonite ploču dubokih jažica s međuplazmom.
 - a Provjerite ujednačenost volumena na ploči.
 - b Uočite eventualne neujednačenosti.
 - c Zatvorite ploču, postavite uz ravnotežu i centrifugirajte na 5600 × g tijekom 10 minuta.
- 9 Kliknite **Yes** (Da).
- 10 Uklonite poklopac s ploče i ponovno je postavite na nosač.
- 11 Nadzirite automatizirane korake.
- 12 Po završetku kliknite **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili platformu.
- 13 Kada Workflow Manager to zatraži, ispraznite nosače i platformu.
- 14 Uklonite ploču dubokih jažica s konačnom plazmom.
- 15 Provjerite ujednačenost volumena, vidljivost staničnih peleta i prekomjernost hemolize za ploču.
- 16 Poništite uzorke s vidljivim staničnim peletom ili prekomjernom hemolizom.
- 17 Unesite komentare o zahvaćenim jažicama.

TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

U slučaju prekidanja zatvorite pločicu za konačnu plazmu i uskladištite na temperaturi od 2 °C do 8 °C najviše 7 dana.

Kontrolni popis za pripremu uzoraka za VeriSeq NIPT Solution v2

Izdvajanje cfDNA

- 1 Postavite vrhove.
- 2 Unesite mjesto prvog i posljednjeg vrha za svaki stalak s vrhovima.
- 3 Skenirajte crtične kodove na kutiji za izdvajanje.
- 4 Unesite korisničko ime ili inicijale osobe koja je pripremila reagens.
- 5 Skenirajte crtične kodove na kutiji za dodatnu opremu.
- 6 Unesite korisničko ime ili inicijale osobe koja je pripremila reagens.
- 7 Skinite poklopac s ploče dubokih jažica za konačnu plazmu i postavite ploče (s crtičnim kodom okrenutim udesno) na nosač.
- 8 Za nepotpune serije ploča postavite skraćeni poklopac na neiskorištene jažice (stupci 4 – 12 za serije s 24 uzoraka i stupci 7 – 12 za serija s 48 uzoraka).
- 9 Postavite pločicu za vezivanje DNA na vakuumski razdjelnik.
- 10 Potvrdite okvir **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Jesu li pločice za vezivanje DNA zatvorene?) pa kliknite **OK** (U redu).
- 11 Ulijte reagense u posude i umetnite ih.
- 12 Prenesite reagense u duboke jažice i umetnite ih.
- 13 Pričekajte na završetak provjere volumena reagensa.
- 14 Provjerite je li vakuumski otpad pun najviše od polovice (preporučuje se da bude prazan)
- 15 Nadzirite automatizirane korake.
- 16 Centrifugirajte pločicu za povezivanje DNA pri 5600 × g tijekom 10 minuta.
- 17 Tijekom centrifugiranja očistite vakuum s 70 % etanolom.

- 18 Nakon centrifuge odbrtvite jažice koje sadrže uzorke na pločici za povezivanje DNA i stavite je na pločicu za ispiranje cfDNA.
- 19 Nadzirite automatizirane korake.
- 20 Nakon inkubacije označite okvir **Plates are assembled as indicated** (Pločice se sastavljaju na naznačen način).
- 21 Centrifugirajte pločicu za vezivanje DNA-a na 5600 × g tijekom 2 minute.
- 22 Provjerite ujednačenost volumena za pločicu za eluiranje cfDNA.
- 23 Zatvorite i pričvrstite pločicu za eluiranje cfDNA radi pripreme biblioteke.
- 24 Po završetku kliknite **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili platformu.
- 25 Ispraznite sve nosače i očistite platformu sustava ML STAR.
- 26 Unesite komentare o zahvaćenim jažicama.
- 27 Izvedite neki od sljedećih koraka:
 - ▶ Da biste nastavili s pripremom biblioteka, kliknite **Yes** (Da).
 - ▶ Da biste prekinuli, kliknite **Exit** (Izađi).

TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

U slučaju prekidanja zatvorite pločicu za eluiranje cfDNA i uskladištite na temperaturi od –25 °C do –15 °C na najviše 7 dana.

Priprema biblioteka

- 1 Skenirajte crtične kodove na kutiji za pripremu biblioteke.
- 2 Unesite korisničko ime ili inicijale osobe koja je pripremila reagens.
- 3 Skenirajte crtične kodove na kutiji za dodatnu opremu.
- 4 Unesite korisničko ime ili inicijale osobe koja je pripremila reagens.
- 5 Postavite vrhove.
- 6 Unesite mjesto prvog vrha za svaki stalak s vrhovima.
- 7 Postavite pločice.
- 8 Ulijte reagense u duboke jažice i umetnite ih.
- 9 Ulijte reagense u epruvete i umetnite ih.
- 10 Pričekajte na završetak provjere volumena reagensa.
- 11 Nadzirite automatizirane korake.
- 12 Po završetku kliknite **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili platformu.
- 13 Provjerite ujednačenost volumena za pločicu za biblioteke.
- 14 Ako ćete je pohranjivati, zabrtvite i zadržite pločicu s bibliotekama.
- 15 Ispraznite nosače i očistite platformu.
- 16 Unesite komentare o zahvaćenim jažicama.
- 17 Izvedite neki od sljedećih koraka:
 - ▶ Da biste nastavili s kvantificiranjem biblioteka, kliknite **Yes** (Da).
 - ▶ Da biste prekinuli, kliknite **Exit** (Izađi).
- 18 Ako ne prekidate, odmah prijedite na kvantifikaciju.

TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

U slučaju prekidanja zatvorite pločicu za biblioteke prije skladištenja. Pločica za biblioteke stabilna je najviše 7 dana od dana pripreme na temperaturi od -25 °C do -15 °C.

Kvantifikacija biblioteka

- 1 Skenirajte crtične kodove na kutiji za dodatnu opremu.
- 2 Unesite korisničko ime ili inicijale osobe koja je pripremila reagens.
- 3 Postavite vrhove na nosač vrhova.
- 4 Skinite poklopac s pločice za biblioteke, a zatim postavite pločice.
- 5 Postavite epruvete s reagensom bez čepova.
- 6 Ulijte reagens u posude za reagens i umetnite ih.
- 7 Pričekajte na završetak provjere volumena reagensa.
- 8 Nadzirite automatizirane korake.
- 9 Po završetku kliknite **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili platformu.
- 10 Ispraznite pločicu s bibliotekama, provjerite ujednačenost volumena, zatvorite i uskladištite na sobnoj temperaturi.
- 11 Ispraznite pločice s 96 jažica i provjerite ujednačenost volumena.
- 12 Ispraznite pločicu s 384 jažica i provjerite ima li tekućine u odgovarajućim jažicama.
- 13 Zatvorite pločicu folijom.
- 14 Centrifugirajte na 1000 × g tijekom 20 sekundi.
- 15 Inkubirajte na sobnoj temperaturi 10 minuta zaštićeno od svjetlosti.
- 16 Ispraznite sve nosače i očistite platformu sustava ML STAR.
- 17 Nakon inkubacije skinite foliju i postavite pločicu s 384 jažica na čitač mikropločica.
- 18 Dvaput kliknite predložak VeriSeq NIPT da biste ga otvorili u programu SoftMax Pro.
- 19 Na kartici Home (Početno) odaberite **New Experiment** (Novi eksperiment).
- 20 Odaberite **Read** (Očitaj).
- 21 Izvezite podatke u XML obliku na način opisan u nastavku.
 - a Desnom tipkom miša kliknite **Plate** (Pločica), a zatim odaberite **Rename** (Preimenuj).
 - b Skenirajte crtični kôd pločice za kvantifikaciju, a zatim kliknite **OK** (U redu).
 - c U gornjem lijevom kutu zaslona kliknite ikonu pločice, a zatim na izborniku odaberite **Export** (Izvezi).
 - d Potvrdite okvir **Expt name** (Naziv izvezene datoteke), mogućnost datuma pločice postavite na neobrađeno, izlazni oblik postavite na XML, a zatim kliknite **OK** (U redu).
 - e Postavite put i naziv izlazne datoteke, a zatim kliknite **Save** (Spremi).
- 22 U sustavu ML STAR unesite ID fluorometra, unesite komentare za analizu te prenesite XML datoteku.
- 23 Pregledajte rezultate analize.
- 24 Unesite komentare o zahvaćenim jažicama.
- 25 Procijenite rezultate.
 - ▶ Ako rezultati zadovoljavaju specifikacije, prijedite na stvaranje skupova biblioteka. Specifikacije potražite u tablici metričkih podataka i granica za kvantifikacijsku kontrolu kvalitete u priručniku za softver VeriSeq NIPT Solution v2 (dokument br. 1000000067940).
 - ▶ Ako rezultati ne zadovoljavaju specifikacije, sustav će prekinuti metodu. Ponovite postupke kvantifikacije počevši od odjeljka *Priprema biblioteka na stranici 2*.
- 26 Izvedite neki od sljedećih koraka:
 - ▶ Da biste nastavili sa stvaranjem skupova biblioteka, kliknite **Yes** (Da).
 - ▶ Da biste prekinuli, kliknite **Exit** (Izađi).

TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

U slučaju prekidanja zatvorite pločicu i uskladištite je na temperaturi od $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ na najviše 7 dana.

Stvaranje skupova biblioteka

- 1 Postavite pločicu za biblioteke na instrument za amplifikaciju i pokrenite program denaturizacije.
- 2 Centrifugirajte pločicu s bibliotekama na $1000 \times g$ tijekom 20 sekundi.
- 3 Odaberite koncentraciju stvaranja skupova.
- 4 Postavite list s uzorcima ili upotrebjavajte zadani.
- 5 Odaberite **Start** (Pokreni).
- 6 Postavite vrhove.
- 7 Postavite pločicu za denaturiranu biblioteku.
- 8 Postavite epruvete za stvaranje skupova.
- 9 Ulijte reagense u posude za reagens i umetnite ih.
- 10 Postavite vrhove.
- 11 Unesite mjesto prvog i posljednjeg vrha za svaki stalak s vrhovima.
- 12 Nadzirite automatizirane korake.
- 13 Unesite komentare o zahvaćenim jažicama.
- 14 Po završetku odaberite **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili platformu.
- 15 Ispraznite nosač epruveta.
- 16 Zatvorite svaku epruvetu za stvaranje skupova, promiješajte u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
- 17 Kliknite **OK** (U redu).
- 18 Sekvencirajte biblioteke što prije nakon stvaranja skupova. Ako je potrebno, zabrtvite pločicu s bibliotekama i pohranite na temperaturi od $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ do 7 dana ukupne pohrane da bi se ponovno stvorili skupovi.

TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

U slučaju prekidanja stavite čep na epruvete za stvaranje skupova i uskladištite na temperaturi od $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ na najviše 7 dana.

Priprema skupova biblioteka za
sekvenciranje

- 1 Dodajte sljedeći potrošni materijal u spremnik reagensa, a zatim pipetirajte u smjesu.
 - ▶ 900 µl pufera za hibridizaciju
 - ▶ 450 µl skupa A
- 2 Nastavite sa sekvenciranjem na sustavu za sekvenciranje nove generacije.
- 3 Prema potrebi ponovite postupak za skup B.
 - ▶ Da biste postigli raspon gustoće ciljnog klastera, za pločicu s bibliotekom može se ponovno stvoriti skup pomoću druge koncentracije za stvaranje skupa na uređaju Hamilton. Ponovno stvaranje skupa čini izvorni skup nevažećim.
 - ▶ Umjesto toga se omjer skupa prema HT1 (450 + 900 µl) može izmijeniti tako da se postigne raspon gustoće ciljnog klastera.