

Обробка зразків

- ☐ 1 Для кожної аліквоти завершіть зазначені далі етапи.
 - ☐ a Центрифугуйте зразки крові на 1600 g протягом 10 хвилин за температури 4 °C.
 - ☐ b У проміжку часу 15 хвилин розпочніть виділення плазми.
- ☐ 2 Перевірте кожну з пробірок. Переконайтеся, що в кожній пробірці міститься принаймні 1,5 мл плазми над лейкоцитарною плівкою.
- ☐ 3 Зніміть кришки з пробірок і завантажте їх у тримачі пробірок.

Виділення плазми

- ☐ 1 Введіть ідентифікатор партії та ім'я користувача.
- ☐ 2 Завантажте протокол аналізу або натисніть **No Sample Sheet** (Без протоколу аналізу).
- ☐ 3 Виберіть розмір партії.
- ☐ 4 Виберіть кількість контролів без матриць (NTC).
- ☐ 5 Завантажте наконечники та планшети на тримач (штрихкод має бути праворуч).
- ☐ 6 Спостерігайте за під час проходженням автоматизованих етапів.
- ☐ 7 Після завершення натисніть **Unload** (Вивантажити), щоб вивантажити платформу.
- ☐ 8 Приберіть планшет для проміжної плазми з глибокими лунками.
 - ☐ a Перевірте планшет на відповідність об'ємів.
 - ☐ b Відзначте всі суперечності.
 - ☐ c Герметично закрийте планшет, завантажте противагу та центрифугуйте на 5600 g протягом 10 хвилин.
- ☐ 9 Виберіть **Yes** (Так).
- ☐ 10 Зніміть кришку планшета й завантажте планшет на тримач.
- ☐ 11 Спостерігайте за проходженням автоматизованих етапів.
- ☐ 12 Після завершення натисніть **Unload** (Вивантажити), щоб вивантажити платформу.
- ☐ 13 Після запиту від диспетчера робочого процесу Workflow Manager звільніть тримачі та платформу.

- ☐ 14 Приберіть планшет для готової плазми з глибокими лунками.
- ☐ 15 Перевірте планшет на відповідність об'ємів, видимі осади з клітин і надлишковий гемоліз.
- ☐ 16 Анулюйте зразки з видимим осадом із клітин або надлишковим гемолізом.
- ☐ 17 Введіть примітки щодо проблемних лунок.

ТОЧКА БЕЗПЕЧНОГО ЗУПИНЕННЯ

Якщо ви зупиняєте процес, герметично закрийте планшет для готової плазми та зберігайте його за температури від 2 °C до 8 °C до 7 діб.

Екстракція пкДНК

- 1 Завантажте наконечники.
- 2 Укажіть розташування першого й останнього наконечників для кожної стійки для наконечників.
- 3 Відскануйте штрихкоди коробки з матеріалами для екстракції.
- 4 Введіть ім'я користувача або ініціали особи, що готує реактиви.
- 5 Відскануйте штрихкоди коробки з приладдям.
- 6 Введіть ім'я користувача або ініціали особи, що готує реактиви.
- 7 Відкрийте планшет для готової плазми з глибокими лунками та завантажте на тримач (штрихкод має бути розташовано з правого боку).
- 8 Для партій із частковим заповнення планшета застосовуйте обмежувальну герметизацію планшета над лунками, що не використовуються (стовпці 4-12 для партій з 24 зразків і стовпці 7-12 для партій із 48 зразків).
- 9 Завантажте планшет для зв'язування ДНК на вакуумний колектор.
- 10 Установіть прапорець **Are DNABinding Plate Columns Sealed?** (Стовпці на планшеті для зв'язування ДНК герметично закриті?), а потім натисніть **OK (OK)**.
- 11 Налийте реактиви в пробірки й завантажте їх.
- 12 Перенесіть реактиви до резервуарів для глибоких лунок і завантажте їх.
- 13 Зачекайте завершення процедури перевірки об'єму.
- 14 Переконайтеся, що вакуумна ємність для залишків заповнена не більше ніж наполовину (рекомендовано порожній стан).
- 15 Спостерігайте за проходженням автоматизованих етапів.
- 16 Відцентрифугуйте планшет для зв'язування ДНК на 5600 × g протягом 10 хвилин.
- 17 Під час центрифугування очистьте вакуумну лінію 70 % EtOH.
- 18 Після центрифугування відкрийте лунки, які містять зразки, на планшеті для зв'язування ДНК та розмістіть його зверху планшета для елювання пкДНК.
- 19 Спостерігайте за проходженням автоматизованих етапів.
- 20 Після інкубації встановіть прапорець **Plates are assembled as indicated** (Планшети складено в указаний спосіб).
- 21 Відцентрифугуйте планшет для зв'язування ДНК за 5600 × g протягом 2 хвилин.
- 22 Перевірте планшет для елювання пкДНК на відповідність об'ємів.
- 23 Герметично закрийте планшет для елювання пкДНК, щоб підготувати бібліотеку.
- 24 Після завершення натисніть **Unload** (Вивантажити), щоб вивантажити платформу.
- 25 Вивантажте всі тримачі й очистьте платформу ML STAR.
- 26 Введіть примітки щодо проблемних лунок.
- 27 Виконайте один із зазначених етапів.
 - ▶ Щоб продовжити приготування бібліотек, натисніть **Yes** (Так).

- ▶ Щоб зупинити процедуру, натисніть **Exit** (Вийти).

ТОЧКА БЕЗПЕЧНОГО ЗУПИНЕННЯ

Якщо виконуєте зупинення, герметично закрийте планшет для елювання пкДНК і зберігайте його за температури від -25 °C до -15 °C до 7 діб.

Підготування бібліотек

- ☐ 1 Відскануйте штрихкоди коробки з матеріалами для підготування бібліотек.
- ☐ 2 Введіть ім'я користувача або ініціали особи, що готує реагенти.
- ☐ 3 Відскануйте штрихкоди коробки з приладдям.
- ☐ 4 Введіть ім'я користувача або ініціали особи, що готує реагенти.
- ☐ 5 Завантажте наконечники.
- ☐ 6 Укажіть розташування першого наконечника для кожної стійки для наконечників.
- ☐ 7 Завантажте планшети.
- ☐ 8 Налийте реагенти в резервуари з глибокими лунками та завантажте їх у прилад.
- ☐ 9 Налийте реагенти в пробірки й завантажте їх.
- ☐ 10 Зачекайте завершення процедури перевірки об'єму.
- ☐ 11 Спостерігайте за проходженням автоматизованих етапів.
- ☐ 12 Після завершення натисніть **Unload** (Вивантажити), щоб вивантажити платформу.
- ☐ 13 Перевірте планшет для бібліотек на відповідність об'ємів.
- ☐ 14 Для зберігання герметично закрийте та зафіксуйте планшет для бібліотек.
- ☐ 15 Вивантажте всі тримачі очистьте платформу.
- ☐ 16 Введіть примітки щодо проблемних лунок.
- ☐ 17 Виконайте один із зазначених етапів.

- ▶ Щоб продовжити кількісний аналіз бібліотек, натисніть **Yes** (Так).
- ▶ Щоб зупинити процедуру, натисніть **Exit** (Вийти).
- ☐ 18 Якщо не припиняєте процедуру, якомога швидше переходьте до кількісного аналізу.

ТОЧКА БЕЗПЕЧНОГО ЗУПИНЕННЯ

Якщо виконуєте зупинення, перед зберіганням герметично закрийте планшет. Планшет для бібліотек стабільний до 7 діб з дати приготування за температури від -25 °C до -15 °C.

Кількісний аналіз бібліотек

- ☐ 1 Відскануйте штрихкоди коробки з приладдям.
- ☐ 2 Введіть ім'я користувача або ініціали особи, що готує реагенти.
- ☐ 3 Завантажте наконечники в тримач для наконечників.
- ☐ 4 Розгерметизуйте планшет із бібліотеками, а потім завантажте планшети.
- ☐ 5 Завантажте пробірки з реагентами без кришок.
- ☐ 6 Налийте реагенти в пробірки для реагентів і завантажте їх.
- ☐ 7 Зачекайте завершення процедури перевірки об'єму.
- ☐ 8 Спостерігайте за проходженням автоматизованих етапів.
- ☐ 9 Після завершення натисніть **Unload** (Вивантажити), щоб вивантажити платформу.
- ☐ 10 Вивантажте планшет Libraries (для бібліотек), перевірте на відповідність об'ємів, герметично закрийте та зберігайте за кімнатної температури.
- ☐ 11 Вивантажте 96-лунковий планшет і перевірте на відповідність об'ємів
- ☐ 12 Вивантажте 384-лунковий планшет і перевірте на наявність рідини у відповідних лунках.
- ☐ 13 Закрийте планшет фольговим ущільнювачем.
- ☐ 14 Відцентрифугуйте на 1000 g протягом 20 секунд.
- ☐ 15 Інкубуйте за кімнатної температури протягом 10 хвилин, захищаючи від світла.

- 16 Вивантажте всі тримачі й очистіть платформу ML STAR.
- 17 Після інкубації видаліть фольгове ущільнення й завантажте 384-лунковий планшет на зчитувач мікропланшетів.
- 18 Двічі натисніть шаблон VeriSeq NIPT, щоб відкрити його в програмі SoftMax Pro.
- 19 Виберіть **New Experiment** (Нове дослідження) на вкладці Home (Головний екран).
- 20 Виберіть **Read** (Зчитати).
- 21 Експортуйте дані як XML, як описано далі.
 - a Клацніть правою кнопкою миші позначку **Plate** (Планшет), а потім виберіть **Rename** (Перейменувати).
 - b Відскануйте штрихкод на планшеті для кількісного аналізу, а потім натисніть **OK**.
 - c У верхньому лівому куті екрана натисніть значок планшета, а потім виберіть **Export** (Експортувати) у меню.
 - d Установіть прапорець **Expt name** (Експортувати назву), зазначте варіант дати для планшета raw, задайте формат вихідних даних XML, а потім натисніть **OK**.
 - e Зазначте шлях до файлу та його ім'я, а потім натисніть **Save** (Зберегти).
- 22 На вкладці ML STAR введіть ідентифікатор флуориметра, введіть примітки щодо прогону та завантажте файл XML.
- 23 Перегляньте результати аналізу концентрації зразка.

- 24 Введіть примітки щодо проблемних лунок.
- 25 Оцініть результати.
 - Якщо результати відповідають вимогам, переходьте до отримання пулу бібліотек. Технічні характеристики див. у таблиці кількісних показників контролю якості та меж у документі Посібник із програмного забезпечення системи VeriSeq NIPT Solution версії 2 (документ № 1000000067940).
 - Якщо результати не відповідають вимогам, система скасує метод. Повторіть процедури кількісного визначення, починаючи з етапу *Приготування на стор. 1*.
- 26 Виконайте один із зазначених етапів.
 - Щоб продовжити отримання пулу бібліотек, натисніть **Yes** (Так).
 - Щоб зупинити процедуру, натисніть **Exit** (Вийти).

ТОЧКА БЕЗПЕЧНОГО ЗУПИНЕННЯ

Якщо виконуєте зупинення, герметично закрийте планшет і зберігайте його за температури від -25 °C до -15 °C до 7 діб.

Отримання пулу бібліотек

- 1 Помістіть планшет для бібліотек на термоциклер і запустіть програму денатурації.
- 2 Відцентрифугуйте планшет для бібліотек на 1000 g протягом 20 секунд.
- 3 Виберіть концентрацію пулу.
- 4 Завантажте протокол аналізу або використовуйте прилад за замовчуванням.
- 5 Виберіть **Start**.
- 6 Завантажте наконечники.
- 7 Завантажте планшет із денатурованою бібліотекою.
- 8 Завантажте пробірки для об'єднання в пул.
- 9 Налийте реагенти в пробірки для реагентів і завантажте їх.
- 10 Завантажте наконечники.
- 11 Укажіть розташування першого й останнього наконечників для кожної стійки для наконечників.
- 12 Спостерігайте за проходженням автоматизованих етапів.
- 13 Введіть примітки щодо проблемних лунок.
- 14 Після завершення виберіть **Unload** (Вивантажити), щоб вивантажити платформу.
- 15 Вивантажте тримач пробірок.
- 16 Закрийте кришкою кожну пробірку для отримання пулу, перемішайте на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
- 17 Натисніть **OK**.

- 18 Після отримання пулу якомога скоріше секвенуйте бібліотеки. За потреби герметично закрийте планшет з бібліотеками і зберігайте його за температури від -25 °C до -15 °C до 7 діб сумарного часу зберігання, щоб забезпечити можливість повторного отримання пулу.

ТОЧКА БЕЗПЕЧНОГО ЗУПИНЕННЯ

Якщо виконуєте зупинення, закрийте кришками пробірки для отримання пулу та зберігайте їх за температури від -25 °C до -15 °C до 7 діб.

Підготовка об'єднаних у пул бібліотек до секвенування

- 1 Додайте до картриджа для реагентів указані витратні розчини, а потім перемішайте піпеткою.
 - 900 мкл буфера для гібридизації.
 - 450 мкл пулу А.
- 2 Перейдіть до секвенування за допомогою секвенаторів системи секвенування наступного покоління NextSeq 550 або NextSeq 500 System.
- 3 За потреби повторіть цю процедуру для пулу В.
 - Щоб досягти цільового діапазону щільності кластерів, на планшеті бібліотек можна повторно отримати пул, використовуючи іншу концентрацію пулу, встановлену на Hamilton. Повторне отримання пулу анулює початковий пул.
 - Також можна змінювати співвідношення пулу до НТ1 (450 + 900 мкл), щоб досягти цільового діапазону щільності кластерів.