

## Επεξεργασία δειγμάτων

- 1 Ολοκληρώστε τα παρακάτω βήματα για κάθε τμήμα:
  - a Φυγοκεντρήστε σε ταχύτητα  $1.600 \times g$  για 10 λεπτά στους  $4^\circ\text{C}$ .
  - b Ξεκινήστε την απομόνωση πλάσματος εντός 15 λεπτών.
- 2 Επιθεωρήστε για να επιβεβαιώσετε ότι κάθε σωλήνας περιέχει τουλάχιστον 1,5 ml πλάσματος πάνω από τη λευκοκυτταρική στιβάδα (buffy coat).
- 3 Αποπωματίστε τους σωλήνες και φορτώστε τους στους φορείς σωλήνων.

## Απομόνωση πλάσματος

- 1 Εισαγάγετε το Αναγνωριστικό παρτίδας και το όνομα χρήστη.
- 2 Φορτώστε ένα φύλλο δειγμάτων ή κάντε κλικ στο **No Sample Sheet** (Κανένα φύλλο δειγμάτων).
- 3 Επιλέξτε το μέγεθος παρτίδας.
- 4 Επιλέξτε τον αριθμό αρνητικών μαρτύρων ελέγχου (no template controls — NTC).
- 5 Φορτώστε τα δείγματα, τα άκρα και τις πλάκες (με τον γραμμωτό κώδικα στραμμένο προς τα δεξιά) επάνω στον φορέα.
- 6 Επιβλέψτε την εκτέλεση των αυτοματοποιημένων βημάτων.
- 7 Μόλις ολοκληρωθούν, κάντε κλικ στο **Unload** (Εκφόρτωση) για να εκφορτώσετε τον θάλαμο.
- 8 Αφαιρέστε την πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους «Ενδιάμεσο πλάσμα».
  - a Επιθεωρήστε την πλάκα για να διαπιστώσετε αν υπάρχει συνέπεια όσον αφορά τους όγκους.
  - b Σημειώστε τυχόν ασυνέπειες.
  - c Στεγανοποιήστε την πλάκα, φορτώστε με ισορροπία και φυγοκεντρήστε σε ταχύτητα  $5.600 \times g$  για 10 λεπτά.
- 9 Κάντε κλικ στο **Yes** (Ναι).
- 10 Αφαιρέστε τη στεγανοποίηση της πλάκας και φορτώστε την ξανά επάνω στον φορέα.
- 11 Επιβλέψτε την εκτέλεση των αυτοματοποιημένων βημάτων.
- 12 Μόλις ολοκληρωθούν, κάντε κλικ στο **Unload** (Εκφόρτωση) για να εκφορτώσετε τον θάλαμο.

- 13 Όταν σας ζητηθεί από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασίας, αδειάστε τους φορείς και τον θάλαμο.
- 14 Αφαιρέστε την πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους «Τελικό πλάσμα».
- 15 Επιθεωρήστε την πλάκα για να διαπιστώσετε αν υπάρχει συνέπεια όσον αφορά τους όγκους ή για ορατά ιζήματα κυττάρων και υπερβολική αιμόλυση.
- 16 Ακυρώστε δείγματα με ορατά ιζήματα κυττάρων ή υπερβολική αιμόλυση.
- 17 Εισαγάγετε σχόλια σχετικά με επηρεαζόμενα βοηθία.

## ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν διακόψετε, στεγανοποιήστε την πλάκα «Τελικό πλάσμα» και αποθηκεύστε σε θερμοκρασία  $2^\circ\text{C}$  έως  $8^\circ\text{C}$  για έως 7 ημέρες.

## Εξαγωγή cfDNA

- 1 Φορτώστε τα άκρα.
- 2 Εισαγάγετε τη θέση του πρώτου και τελευταίου άκρου για κάθε rack άκρων.
- 3 Σαρώστε τους γραμμωτούς κώδικες του κιβωτίου εξαγωγής.
- 4 Εισαγάγετε το όνομα χρήστη ή τα αρχικά του ατόμου που προετοιμάζει το αντιδραστήριο.
- 5 Σαρώστε τους γραμμωτούς κώδικες του κιβωτίου εξαρτημάτων.
- 6 Εισαγάγετε το όνομα χρήστη ή τα αρχικά του ατόμου που προετοιμάζει το αντιδραστήριο.
- 7 Αφαιρέστε τη στεγανοποίηση της πλάκας βοθρίων μεγάλους βάθους «Τελικό πλάσμα» και φορτώστε τις πλάκες (με τον γραμμωτό κώδικα στραμμένο προς τα δεξιά) στον φορέα.
- 8 Για τις παρτίδες μερικών πλακών, εφαρμόστε μια περικομμένη στεγανοποίηση πλάκας πάνω στα μη χρησιμοποιούμενα βοθρία (στήλες 4–12 για τις παρτίδες 24 δειγμάτων και στήλες 7–12 για τις παρτίδες 48 δειγμάτων).
- 9 Φορτώστε την πλάκα «Δέσμευση DNA» πάνω στην πολλαπλή κενού.
- 10 Επιλέξτε το πλαίσιο ελέγχου **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Οι στήλες των πλακών «Δέσμευση DNA» είναι στεγανοποιημένες;) και, στη συνέχεια, κάντε κλικ στο **OK**.
- 11 Χύστε τα αντιδραστήρια μέσα στα δοχεία και φορτώστε.
- 12 Μεταφέρετε τα αντιδραστήρια σε δεξαμενές βοθρίων μεγάλου βάθους και φορτώστε.
- 13 Περιμένετε μέχρι να ολοκληρωθεί ο έλεγχος όγκου αντιδραστηρίων.
- 14 Επιβεβαιώστε ότι η φιάλη απόβλητων κενού δεν είναι γεμάτη πάνω από το ήμισυ (συνιστάται να είναι κενή).
- 15 Επιβλέψτε την εκτέλεση των αυτοματοποιημένων βημάτων.
- 16 Φυγοκεντρήστε την πλάκα «Δέσμευση DNA» σε ταχύτητα 5.600 × g για 10 λεπτά.
- 17 Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης, καθαρίστε το σύστημα κενού με 70% EtOH.
- 18 Μετά τη φυγοκέντρωση, στεγανοποιήστε τα βοθρία που περιέχουν δείγματα στην πλάκα «Δέσμευση DNA» και τοποθετήστε την πάνω στην πλάκα «Έκλυση cfDNA».
- 19 Επιβλέψτε την εκτέλεση των αυτοματοποιημένων βημάτων.
- 20 Μετά την επώαση, επιλέξτε το πλαίσιο ελέγχου **Plates are assembled as indicated** (Οι πλάκες είναι συγκεντρωμένες όπως υποδεικνύεται).
- 21 Φυγοκεντρήστε την πλάκα «Δέσμευση DNA» σε ταχύτητα 5.600 × g για 2 λεπτά.
- 22 Επιθεωρήστε την πλάκα «Έκλυση cfDNA» για να διαπιστώσετε αν υπάρχει συνέπεια όσον αφορά τους όγκους.
- 23 Στεγανοποιήστε και διατηρήστε την πλάκα «Έκλυση cfDNA» για προετοιμασία βιβλιοθηκών.
- 24 Μόλις ολοκληρωθούν, κάντε κλικ στο **Unload** (Εκφόρτωση) για να εκφορτώσετε τον θάλαμο.
- 25 Εκφορτώστε όλους τους φορείς και καθαρίστε τον θάλαμο ML STAR.
- 26 Εισαγάγετε σχόλια σχετικά με επηρεαζόμενα βοθρία.
- 27 Εκτελέστε ένα από τα παρακάτω βήματα:
  - ▶ Για να συνεχίσετε στην Προετοιμασία βιβλιοθηκών, κάντε κλικ στο **Yes** (Ναι).
  - ▶ Για να διακόψετε, κάντε κλικ στο **Exit** (Έξοδος).

**ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ**

Εάν διακόψετε, στεγανοποιήστε την πλάκα «Έκλυση cfDNA» και αποθηκεύστε σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C για έως 7 ημέρες.

## Προετοιμασία βιβλιοθηκών

- 1 Σαρώστε τους γραμμωτούς κώδικες του κιβωτίου προετοιμασίας βιβλιοθηκών.
- 2 Εισαγάγετε το όνομα χρήστη ή τα αρχικά του ατόμου που προετοιμάζει το αντιδραστήριο.
- 3 Σαρώστε τους γραμμωτούς κώδικες του κιβωτίου εξαρτημάτων.
- 4 Εισαγάγετε το όνομα χρήστη ή τα αρχικά του ατόμου που προετοιμάζει το αντιδραστήριο.
- 5 Φορτώστε τα άκρα.
- 6 Εισαγάγετε τη θέση του πρώτου άκρου για κάθε rack άκρων.
- 7 Φορτώστε πλάκες.
- 8 Ρίξτε το περιεχόμενο των αντιδραστηρίων μέσα στις δεξαμενές βοθρίων μεγάλου βάθους και φορτώστε.
- 9 Ρίξτε το περιεχόμενο των αντιδραστηρίων μέσα στα δοχεία και φορτώστε.
- 10 Περιμένετε μέχρι να ολοκληρωθεί ο έλεγχος όγκου αντιδραστηρίων.
- 11 Επιβλέψτε την εκτέλεση των αυτοματοποιημένων βημάτων.
- 12 Μόλις ολοκληρωθούν, κάντε κλικ στο **Unload** (Εκφόρτωση) για να εκφορτώσετε τον θάλαμο.
- 13 Επιθεωρήστε την πλάκα «Βιβλιοθήκες» για να διαπιστώσετε αν υπάρχει συνέπεια όσον αφορά τους όγκους.
- 14 Σε περίπτωση αποθήκευσης, στεγανοποιήστε και διατηρήστε την πλάκα «Βιβλιοθήκες».
- 15 Εκφορτώστε τους φορείς και καθαρίστε τον θάλαμο.
- 16 Εισαγάγετε σχόλια σχετικά με επηρεαζόμενα βοθρία.

- 17 Εκτελέστε ένα από τα παρακάτω βήματα:
  - ▶ Για να συνεχίσετε στον ποσοτικό προσδιορισμό βιβλιοθηκών, κάντε κλικ στο **Yes** (Ναι).
  - ▶ Για να διακόψετε, κάντε κλικ στο **Exit** (Έξοδος).
- 18 Εάν δεν διακόψετε, προχωρήστε αμέσως στον ποσοτικό προσδιορισμό.

### ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν διακόψετε, στεγανοποιήστε την πλάκα «Βιβλιοθήκες» πριν από την αποθήκευση. Η πλάκα «Βιβλιοθήκες» διατηρεί τη σταθερότητά της για έως 7 ημέρες από την ημερομηνία προετοιμασίας σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C.

## Ποσοτικός προσδιορισμός βιβλιοθηκών

- 1 Σαρώστε τους γραμμωτούς κώδικες του κιβωτίου εξαρτημάτων.
- 2 Εισαγάγετε το όνομα χρήστη ή τα αρχικά του ατόμου που προετοιμάζει το αντιδραστήριο.
- 3 Φορτώστε τα άκρα στον φορέα άκρων.
- 4 Αφαιρέστε τη στεγανοποίηση της πλάκας «Βιβλιοθήκες» και, στη συνέχεια, φορτώστε τις πλάκες.
- 5 Φορτώστε τους σωλήνες αντιδραστηρίων χωρίς πώματα.
- 6 Ρίξτε το περιεχόμενο των αντιδραστηρίων μέσα στα δοχεία αντιδραστηρίων και φορτώστε.
- 7 Περιμένετε μέχρι να ολοκληρωθεί ο έλεγχος όγκου αντιδραστηρίων.
- 8 Επιβλέψτε την εκτέλεση των αυτοματοποιημένων βημάτων.
- 9 Μόλις ολοκληρωθούν, κάντε κλικ στο **Unload** (Εκφόρτωση) για να εκφορτώσετε τον θάλαμο.
- 10 Εκφορτώστε την πλάκα «Βιβλιοθήκες», ελέγξτε αν υπάρχει συνέπεια όσον αφορά τους όγκους, στεγανοποιήστε και αποθηκεύστε σε θερμοκρασία δωματίου.
- 11 Εκφορτώστε τις πλάκες 96 βοθρίων και ελέγξτε αν υπάρχει συνέπεια όσον αφορά τους όγκους.

- 12 Εκφορτώστε την πλάκα 384 βοθρίων και ελέγξτε αν υπάρχει υγρό στα κατάλληλα βοθρία.
- 13 Στεγανοποιήστε την πλάκα με στεγανοποίηση αλουμινίου.
- 14 Φυγοκεντρήστε σε ταχύτητα 1.000 × g για 20 δευτερόλεπτα.
- 15 Επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά μακριά από το φως.
- 16 Εκφορτώστε όλους τους φορείς και καθαρίστε τον θάλαμο ML STAR.
- 17 Μετά την επώαση, αφαιρέστε τη στεγανοποίηση αλουμινίου και φορτώστε την πλάκα 384 βοθρίων στη συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών.
- 18 Κάντε διπλό κλικ στο πρότυπο VeriSeq NIPT για να το ανοίξετε σε SoftMax Pro.
- 19 Επιλέξτε **New Experiment** (Νέο πείραμα) στην καρτέλα Home (Αρχική).
- 20 Επιλέξτε **Read** (Ανάγνωση).
- 21 Εξαγάγετε τα δεδομένα ως XML ως εξής.
  - a Κάντε δεξί κλικ στο **Plate** (Πλάκα) και, στη συνέχεια, επιλέξτε **Rename** (Μετονομασία).
  - b Σαρώστε τον γραμμωτό κώδικα της πλάκας «Ποσοτικός προσδιορισμός» και, στη συνέχεια, κάντε κλικ στο **OK**.
  - c Στην επάνω αριστερή γωνία της οθόνης, επιλέξτε το εικονίδιο πλάκας και, στη συνέχεια, κάντε κλικ στο **Export** (Εξαγωγή) από το μενού.
  - d Επιλέξτε το πλαίσιο επιλογής **Expt name** (Όνομα εξαγ.), ορίστε την επιλογή ημερομηνίας πλάκας σε raw, ορίστε τη μορφή εξόδου σε XML και, στη συνέχεια, κάντε κλικ στο **OK**.
- e Ορίστε διαδρομή αρχείου εξόδου και ονομάστε το αρχείο και, στη συνέχεια, κάντε κλικ στο **Save** (Αποθήκευση).
- 22 Στον θάλαμο ML STAR, εισαγάγετε το αναγνωριστικό φθορισμομέτρου, εισαγάγετε σχόλια για την εκτέλεση και φορτώστε το αρχείο XML.
- 23 Ανασκοπήστε τα αποτελέσματα της ανάλυσης.
- 24 Εισαγάγετε σχόλια σχετικά με επηρεαζόμενα βοθρία.
- 25 Αξιολογήστε τα αποτελέσματα.
  - ▶ Εάν τα αποτελέσματα πληρούν τις προδιαγραφές, προχωρήστε στην ομαδοποίηση βιβλιοθηκών. Για τις προδιαγραφές, βλ. τον πίνακα με τις μετρήσεις και τα όρια ποιοτικού ελέγχου ποσοτικού προσδιορισμού στον Οδηγό λογισμικού VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 (αρ. εγγράφου 1000000067940).
  - ▶ Εάν τα αποτελέσματα δεν συμφωνούν με τις προδιαγραφές, το σύστημα ματαιώνει τη μέθοδο. Επαναλάβετε τις διαδικασίες ποσοτικού προσδιορισμού ξεκινώντας με την **Επεξεργασία δειγμάτων στη σελίδα 1**.
- 26 Εκτελέστε ένα από τα παρακάτω βήματα:
  - ▶ Για να συνεχίσετε στην ομαδοποίηση βιβλιοθηκών, κάντε κλικ στο **Yes** (Ναι).
  - ▶ Για να διακόψετε, κάντε κλικ στο **Exit** (Έξοδος).

## ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν διακόψετε, στεγανοποιήστε την πλάκα και αποθηκεύστε σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C για έως 7 ημέρες.

## Ομαδοποίηση βιβλιοθηκών

- 1 Τοποθετήστε την πλάκα «Βιβλιοθήκης» πάνω στον θερμικό κυκλοποιητή και εκτελέστε το πρόγραμμα αποδιάταξης.
- 2 Φυγοκεντρήστε την πλάκα «Βιβλιοθήκης» σε ταχύτητα 1.000 × g για 20 δευτερόλεπτα.
- 3 Επιλέξτε τη συγκέντρωση ομαδοποίησης.
- 4 Φορτώστε ένα φύλλο δειγμάτων ή χρησιμοποιήστε το προεπιλεγμένο.
- 5 Επιλέξτε **Start** (Έναρξη).
- 6 Φορτώστε τα άκρα.
- 7 Φορτώστε την πλάκα «Αποδιατεταγμένη βιβλιοθήκη».
- 8 Φορτώστε τους σωλήνες ομαδοποίησης.
- 9 Ρίξτε το περιεχόμενο των αντιδραστηρίων μέσα στα δοχεία αντιδραστηρίων και φορτώστε.
- 10 Φορτώστε τα άκρα.
- 11 Εισαγάγετε τη θέση του πρώτου και τελευταίου άκρου για κάθε rack άκρων.
- 12 Επιβλέψτε την εκτέλεση των αυτοματοποιημένων βημάτων.
- 13 Εισαγάγετε σχόλια σχετικά με επηρεαζόμενα βοθρία.
- 14 Μόλις ολοκληρωθούν, κάντε κλικ στο **Unload** (Εκφόρτωση) για να εκφορτώσετε τον θάλαμο.
- 15 Εκφορτώστε τον φορέα σωλήνων.
- 16 Πωματίστε κάθε σωλήνα ομαδοποίησης, αναδεύστε και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε σύντομα.
- 17 Κάντε κλικ στο **OK**.
- 18 Αλληλουχίστε τις βιβλιοθήκες το συντομότερο δυνατόν μετά την ομαδοποίηση. Εάν είναι απαραίτητο, στεγανοποιήστε την πλάκα «Βιβλιοθήκης»

και αποθηκεύστε σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C για έως 7 ημέρες σωρευτικής αποθήκευσης ώστε να καταστεί δυνατή η εκ νέου ομαδοποίηση.

#### ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν διακόψετε, πωματίστε τους σωλήνες ομαδοποίησης και αποθηκεύστε σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C για έως 7 ημέρες.

### Προετοιμασία συγκεντρωμένων βιβλιοθηκών για αλληλούχιση

- 1 Προσθέστε τα παρακάτω αναλώσιμα στην κασέτα αντιδραστηρίων και, στη συνέχεια, χρησιμοποιήστε πιπέτα για να αναμείξετε.
  - ▶ 900 μl ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού
  - ▶ Ομάδα A 450 μl
- 2 Προχωρήστε με την αλληλούχιση σε ένα σύστημα αλληλούχισης επόμενης γενιάς.
- 3 Εάν είναι απαραίτητο, επαναλάβετε αυτήν τη διαδικασία για την Ομάδα B.
  - ▶ Για να επιτύχετε το στοχευόμενο εύρος πυκνότητας συστάδας, η πλάκα «Βιβλιοθηκών» μπορεί να υποβληθεί εκ νέου σε ομαδοποίηση με τη χρήση διαφορετικής συγκέντρωσης ομαδοποίησης στο Hamilton H εκ νέου ομαδοποίηση ακυρώνει την αρχική ομάδα.
  - ▶ Εναλλακτικά, ο λόγος της ομάδας προς το HT1 (450+900 ul) μπορεί να τροποποιηθεί για την επίτευξη του στοχευόμενου εύρους πυκνότητας συστάδας.