

## Zpracování vzorků

- 1 Následující kroky proveďte u každého alikvotního podílu:
  - a Odstředějte při 1 600 g po dobu 10 minut při teplotě 4 °C.
  - b Izolaci plazmy zahajte do 15 minut.
- 2 Zkontrolujte, zda každá zkumavka obsahuje minimálně 1,5 ml plazmy nad povlakem z vysrážených leukocytů (tzv. buffy coat).
- 3 Ze zkumavek sejměte uzávěry a zkumavky vložte do držáků zkumavek.

## Izolace plazmy

- 1 Zadejte ID dávky a uživatelské jméno.
- 2 Načtete seznam vzorků nebo klikněte na **No Sample Sheet** (Bez seznamu vzorků).
- 3 Vyberte velikost dávky.
- 4 Vyberte počet kontrol bez šablony (NTC).
- 5 Vložte vzorky, špičky a desky (s čárovým kódem směřujícím vpravo) do držáku.
- 6 Sledujte automatické kroky.
- 7 Po skončení klikněte na příkaz **Unload** (Vyložit), jímž se vyloží plošina.
- 8 Vyjměte desku s hlubokými jamkami s přechodnou plazmou.
  - a Zkontrolujte shodnost objemů na desce.
  - b Veškeré nesrovnalosti zaznamenejte.
  - c Desku zapečete, vložte ji v rovnovážné poloze a odstředějte při 5 600 g po dobu 10 minut.
- 9 Klikněte na **Yes** (Ano).
- 10 Sejměte těsnicí fólii desky a znovu vložte desku do držáku.
- 11 Sledujte automatické kroky.
- 12 Po skončení klikněte na příkaz **Unload** (Vyložit), jímž se vyloží plošina.
- 13 Když vás k tomu vyzve software Workflow Manager, vyprázdněte držáky a plošinu.
- 14 Vyjměte desku s hlubokými jamkami obsahující konečnou plazmu.
- 15 Zkontrolujte, zda jsou objemy na desce shodné a zda se zde nevyskytují viditelné buněčné shluky či nedošlo k nadměrné hemolýze.
- 16 Vzorky s viditelnými buněčnými shluky nebo nadměrnou hemolýzou zneplatněte.
- 17 Zadejte komentář k dotyčným jamkám.

## BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud musíte přerušit protokol, zapečete desku s konečnou plazmou a uskladněte ji při teplotě 2 až 8 °C (až 7 dní).

## Extrakce cfDNA

- 1 Vložte špičky.
- 2 Zadejte umístění první a poslední špičky z každého zásobníku špiček.
- 3 Naskenujte čárové kódy sady pro extrakci.
- 4 Zadejte uživatelské jméno nebo iniciály pracovníka, který připravoval reagentie.
- 5 Naskenujte čárové kódy na sadě s příslušenstvím.
- 6 Zadejte uživatelské jméno nebo iniciály pracovníka, který připravoval reagentie.
- 7 Odpečete desku s hlubokými jamkami s konečnou plazmou a desky vložte do držáku (s čárovým kódem směřujícím vpravo).
- 8 U dávek s částečně využitými deskami zapečete nepoužité jamky zastrženou těsnicí fólií (kolony 4–12 u dávek s 24 vzorky a kolony 7–12 u dávek se 48 vzorky).
- 9 Desku pro vazbu DNA vložte do vakuového sběrného potrubí.
- 10 Zvolte zaškrtačací pole **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Jsou kolony desky pro vazbu DNA zapečetěny?) a poté klikněte na tlačítko **OK**.
- 11 Do zkumavek nalijte reagentie a vložte je.
- 12 Do zásobníku s hlubokými jamkami přeneste reagentie a vložte jej.
- 13 Počkejte na dokončení kontroly objemu reagentií.
- 14 Potvrďte, že odpad z vakuování nepřesahuje polovinu objemu nádoby (doporučuje se vyprázdnění).
- 15 Sledujte automatické kroky.
- 16 Desku pro vazbu DNA odstředíte při 5 600 g po dobu 10 minut.

- 17 Při odstředování vyčistěte vakuovací soustavu pomocí 70% EtOH.
- 18 Po odstředění odpečete jamky obsahující vzorky na desce pro vazbu DNA a umístěte ji nahoru na desku pro eluci cfDNA.
- 19 Sledujte automatické kroky.
- 20 Po inkubaci vyberte zaškrtačací pole **Plates are assembled as indicated** (Desky jsou sestaveny podle pokynů).
- 21 Desku pro vazbu DNA odstředíte při 5 600 g po dobu 2 minut.
- 22 Zkontrolujte shodnost objemů na desce pro eluci cfDNA.
- 23 Zapečete a uschovejte desku pro eluci cfDNA pro účely přípravy knihovny.
- 24 Po skončení klikněte na příkaz **Unload** (Vyložit), jímž se vyloží plošina.
- 25 Vyložte všechny držáky a vyčistěte plošinu ML STAR.
- 26 Zadejte komentář k dotyčným jamkám.
- 27 Proveďte jeden z následujících kroků:
  - ▶ Chcete-li pokračovat v přípravě knihoven, klikněte na **Yes** (Ano).
  - ▶ Chcete-li skončit, klikněte na příkaz **Exit** (Konec).

## BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud musíte přerušit protokol, zapečete desku pro eluci cfDNA a uskladněte ji při teplotě –25 až –15 °C (až 7 dní).

## Příprava knihoven

- 1 Naskenujte čárové kódy sady pro přípravu knihovny.
- 2 Zadejte uživatelské jméno nebo iniciály pracovníka, který připravoval reagentie.
- 3 Naskenujte čárové kódy na sadě s příslušenstvím.
- 4 Zadejte uživatelské jméno nebo iniciály pracovníka, který připravoval reagentie.
- 5 Vložte špičky.
- 6 Zadejte umístění první špičky z každého zásobníku špiček.
- 7 Vložte desky.
- 8 Do zásobníku s hlubokými jamkami nalijte reagentie a vložte jej.
- 9 Do zkumavek nalijte reagentie a vložte je.
- 10 Počkejte na dokončení kontroly objemu reagentií.
- 11 Sledujte automatické kroky.
- 12 Po skončení klikněte na příkaz **Unload** (Vyložit), jímž se vyloží plošina.
- 13 Zkontrolujte shodnost objemů na desce s knihovnami.
- 14 Zapečete a uschovejte desku s knihovnami pro případné uskladnění.
- 15 Vyložte držáky a vyčistěte plošinu.
- 16 Zadejte komentář k dotyčným jamkám.
- 17 Proveďte jeden z následujících kroků:
  - ▶ Chcete-li pokračovat v kvantifikaci knihoven, klikněte na **Yes** (Ano).
  - ▶ Chcete-li skončit, klikněte na příkaz **Exit** (Konec).
- 18 Pokud nekončíte, pokračujte ihned v kvantifikaci.

## BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud musíte přerušit protokol, desku s knihovnamy před uskladněním zapečetejte. Deska s knihovnamy je stabilní po dobu maximálně 7 dní od data přípravy při teplotě  $-25$  až  $-15$  °C.

## Kvantifikace knihoven

- 1 Naskenujte čárové kódy na sadě s příslušenstvím.
- 2 Zadejte uživatelské jméno nebo iniciály pracovníka, který připravoval reagentie.
- 3 Vložte špičky do držáku špiček.
- 4 Odpečetejte desku s knihovnamy a poté vložte desky.
- 5 Vložte zkumavky na reagentie bez uzávěrů.
- 6 Do zkumavek na reagentie nalijte reagentie a vložte je.
- 7 Počkejte na dokončení kontroly objemu reagentií.
- 8 Sledujte automatické kroky.
- 9 Po skončení klikněte na příkaz **Unload** (Vyložit), jímž se vyloží plošina.
- 10 Vyložte desku s knihovnamy, zkontrolujte shodnost objemů, zapečetejte a uložte při pokojové teplotě.
- 11 Vyložte desky s 96 jamkami a zkontrolujte shodnost objemů
- 12 Vyložte desku s 384 jamkami a zkontrolujte, zda se v příslušných jamkách nachází kapalina.
- 13 Zapečetejte desku těsnicí fólií.
- 14 Odstřed'ujte s nastavením 1 000 g po dobu 20 sekund.
- 15 Inkubujte 10 minut při pokojové teplotě, chraňte před světlem.
- 16 Vyložte všechny držáky a vyčistěte plošinu ML STAR.
- 17 Po inkubaci sejměte těsnicí fólii a vložte desku s 384 jamkami na čtečku mikrodesky.
- 18 Dvakrát klikněte na šablonu VeriSeq NIPT, aby se otevřela v SoftMax Pro.

- 19 V záložce Domů vyberte **New Experiment** (Nový experiment).
- 20 Vyberte **Read** (Načíst).
- 21 Následujícím způsobem exportujte data ve formátu XML.
  - a Pravým tlačítkem klikněte na **Plate** (Deska) a poté vyberte **Rename** (Přejmenovat).
  - b Naskenujte čárový kód desky pro kvantifikaci a klikněte na tlačítko **OK**.
  - c V levém horním rohu displeje klikněte na ikonu desky a v nabídce vyberte možnost **Export**.
  - d Zvolte zaškrtnuté pole **Expt name** (Název exportu), volbu data desky nastavte na prvotní, výstupní formát nastavte na XML a poté klikněte na **OK**.
  - e Zadejte cestu k výstupnímu souboru a jeho název a klikněte na příkaz **Save** (Uložit).
- 22 Do systému ML STAR zadejte ID fluorometru, komentáře k běhu a nahrajte soubor XML.
- 23 Zkontrolujte výsledky analýzy.
- 24 Zadejte komentář k dotyčným jamkám.
- 25 Vyhodnoťte výsledky.
  - ▶ Pokud výsledky vyhovují specifikaci, pokračujte k části Fondy knihoven. Specifikace jsou uvedeny v tabulce parametrů a hraničních hodnot kontroly kvality kvantifikace v příručce k softwaru VeriSeq NIPT Solution v2 (dokument č. 1000000067940).
  - ▶ Pokud výsledky nevyhovují specifikaci, systém přeruší metodu. Zopakujte postupy kvantifikace počínaje částí *Příprava knihoven na straně 2*.

- 26 Proveďte jeden z následujících kroků:
- ▶ Chcete-li pokračovat k fondům knihoven, klikněte na **Yes** (Ano).
  - ▶ Chcete-li skončit, klikněte na příkaz **Exit** (Konec).

### BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud musíte přerušit protokol, zapečeteťte desku a uskladněte ji při teplotě –25 až –15 °C (max. 7 dní).

### Fondy knihoven

- 1 Vložte desku s knihovnamy na termocyklér a spusťte program denaturace.
- 2 Odstřed'ujte desku s knihovnamy při 1 000 g po dobu 20 sekund.
- 3 Vyberte koncentraci fondu.
- 4 Načteteťte seznam vzorků nebo použijte implicitní nastavení.
- 5 Vyberte **Start**.
- 6 Vložte špičky.
- 7 Vložte desku s denaturovanou knihovnou.
- 8 Vložte zkumavky pro slučování.
- 9 Do zkumavek na reagentie nalijte reagentie a vložte je.
- 10 Vložte špičky.
- 11 Zadejte umístění první a poslední špičky z každého zásobníku špiček.
- 12 Sledujte automatické kroky.
- 13 Zadejte komentář k dotyčným jamkám.
- 14 Po skončení zvolte **Unload** (Vyložit), jímž se vyloží plošina.
- 15 Vyložte držák zkumavek.
- 16 Nasad'te uzávěry na všechny zkumavky pro slučování, promíchejte vortexovou třepačkou a poté krátce odstřed'ete.
- 17 Klikněte na tlačítko **OK**.
- 18 Knihovny sekvencujte co nejdříve po sloučení do fondu. V případě potřeby zapečeteťte desku s knihovnou a skladujte ji při teplotě –25 až –15 °C po dobu maximálně 7 dní kumulativního skladování, aby bylo možno znovu provést slučování.

### BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud musíte přerušit protokol, zavřete zkumavky pro slučování a uskladněte je při teplotě –25 až –15 °C (až 7 dní).

## Příprava fondů knihoven na sekvenování

- 1 Následující spotřební materiál přidejte do zásobníku s reagensiemi a poté pipetujte do směsi.
  - ▶ Hybridizační pufr 900 µl
  - ▶ Fond A 450 µl
- 2 Dále sekvenujte v sekvenačním systému nové generace.
- 3 V případě potřeby tento postup opakujte pro fond B.
  - ▶ Aby bylo dosaženo rozmezí cílové hustoty klastru, lze desku s knihovnou znovu sloučit do fondu pomocí odlišné koncentrace slučování na přístroji Hamilton. Opakovaným slučováním se zneplatní původní fond.
  - ▶ Alternativně lze upravit poměr fondu vůči HT1 (450+900µl) tak, aby bylo dosaženo rozmezí cílové hustoty klastru.