VeriSeq NIPT Solution v2 Sample Prep Checklist (Контрольный список для подготовки образцов VeriSeq NIPT Solution v2 Sample Prep)

Обработка образцов

- ☐ 1 Выполните следующие шаги для каждой аликвоты:
  - ☐ a Центрифугируйте со при 1600 × g в течение 10 минут при 4 °C.
  - ☐ b Начните выделение плазмы в течение 15 минут.
- ☐ 2 Осмотрите каждую пробирку, чтобы убедиться, что она содержит не менее 1,5 мл плазмы над лейкоцитарной пленкой.
- ☐ 3 Снимите крышку с пробирок и загрузите их в держатели пробирок.

Выделение плазмы

- ☐ 1 Введите Batch ID (Идентификатор серии) и имя пользователя.
- ☐ 2 Загрузите протокол анализа или щелкните **No Sample Sheet** (Нет протокола анализа).
- ☐ 3 Выберите размер серии.
- ☐ 4 Выберите количество контролей без матрицы (NTC) .
- ☐ 5 Загрузите образцы, наконечники и планшет (штрихкод обращен вправо) в держатель.
- ☐ 6 автоматических шагов.
- ☐ 7 По завершении нажмите **Unload** (Выгрузить), чтобы выгрузить платформу.
- ☐ 8 Извлеките планшет с глубокими лунками для промежуточной плазмы.
  - ☐ a Осмотрите планшет на предмет одинаковых объемов.
  - ☐ b Отметьте любые несоответствия.
  - ☐ c Герметизируйте планшет, сбалансируйте нагрузку и центрифугируйте при 5600 × g в течение 10 минут.
- ☐ 9 Нажмите **Yes (Да)**.
- ☐ 10 Снимите герметизацию планшета и установите планшет на держатель.
- ☐ 11 автоматических шагов.
- ☐ 12 По завершении нажмите **Unload** (Выгрузить), чтобы выгрузить платформу.
- ☐ 13 По запросу менеджера рабочего процесса опорожните держатели и платформу.
- ☐ 14 Извлеките планшет с глубокими лунками для конечной плазмы.
- ☐ 15 Осмотрите планшет одинаковых объемов, видимого клеточного осадка и чрезмерного гемолиза.
- ☐ 16 Недействительные образцы с видимым клеточным осадком или чрезмерным гемолизом.
- ☐ 17 Введите комментарии о затронутых лунках .

ТОЧКА БЕЗОПАСНОЙ ОСТАНОВКИ

Если вы останавливаетесь, герметизируйте планшет с конечной плазмой и храните при температуре от 2 °C до 8 °C в течение не более 7 дней.

СОБСТВЕННОСТЬ КОМПАНИИ ILLUMINA

VeriSeq NIPT Solution v2 Sample Prep Checklist (Контрольный список для подготовки образцов VeriSeq NIPT Solution v2 Sample Prep)

Экстрагируйте cfDNA

- ☐ 1 Загрузите наконечники.
- ☐ 2 Введите местоположение первого и последнего наконечников для каждого штатива наконечников.
- ☐ 3 Отсканируйте штрихкоды блока для извлечения.
- ☐ 4 Введите имя пользователя или инициалы лица, готовившего реагенты.
- ☐ 5 Сканируйте штрихкоды комплекта принадлежностей.
- ☐ 6 Введите имя пользователя или инициалы лица, готовившего реагенты.
- ☐ 7 При разгерметизируйте планшет с глубокими лунками для конечной плазмы и загрузите планшеты (штрихкод обращен вправо) .
- ☐ 8 Для партий частичного планшета наносят обрезанную герметизирующую пленку планшета на неиспользованные лунки (столбцы 4-12 для партий из 24 образцов и колонки 7-12 для партий из 48 образцов).
- ☐ 9 Загрузите планшет для связывания ДНК в вакуумный коллектор .
- ☐ 10 Установите флажок **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Загерметизированы ли столбцы планшетов для связывания ДНК?) и нажмите **OK**.
- ☐ 11 Налейте реагенты в пробирки и загрузите их.
- ☐ 12 Перенесите реагенты в глубоколуночные резервуары и загрузите их.
- ☐ 13 Дождитесь завершения проверки объема реагента.
- ☐ 14 Убедитесь в том, что отсек для вакуумных отходов заполнен не более чем наполовину (рекомендуется опустошить), .
- ☐ 15 Наблюдайте автоматических шагов.
- ☐ 16 Центрифугируйте планшет для связывания ДНК при 5600 × g в течение 10 минут.
- ☐ 17 Во время центрифугирования очищают вакуумную систему 70 % раствором EtOH.
- ☐ 18 После центрифугирования разгерметизируйте лунки, содержащие образцы, на планшете для связывания ДНК и поместите его поверх планшета для элюирования cfDNA.
- ☐ 19 Наблюдайте автоматических шагов.
- ☐ 20 После инкубации установите соответствующий флажок в поле **Plates are assembled as indicated** (Планшеты собраны как указано),
- ☐ 21 Центрифугируйте планшет для связывания ДНК при 5600 × g в течение 2 минут.
- ☐ 22 Осмотрите планшет на предмет одинаковых объемов.
- ☐ 23 Герметизируйте и сохраните планшет для элюирования cfDNA для приготовления библиотеки.
- ☐ 24 По завершении нажмите **Unload** (Выгрузить), чтобы выгрузить платформу.
- ☐ 25 Выгрузите все держатели и очистите платформу ML STAR .
- ☐ 26 Введите комментарии о затронутых лунках .
- ☐ 27 Выполните один из следующих шагов:
  - Чтобы продолжить подготовку библиотек, нажмите **Yes (Да)**.
  - Чтобы остановиться, нажмите **Exit** (Выход).

ТОЧКА БЕЗОПАСНОЙ ОСТАНОВКИ

При остановке герметизируйте планшет для элюирования cfDNA и храните при температуре от -25 °C до -15 °C в течение не более 7 дней.

VeriSeq NIPT Solution v2 Sample Prep Checklist (Контрольный список для подготовки образцов VeriSeq NIPT Solution v2 Sample Prep)

Подготовка библиотек

- ☐ 1 Отсканируйте штрихкоды комплекта подготовки библиотеки.
- ☐ 2 Введите имя пользователя или инициалы лица, готовившего реагенты.
- ☐ 3 Сканируйте штрихкоды комплекта принадлежностей.
- ☐ 4 Введите имя пользователя или инициалы лица, готовившего реагенты.
- ☐ 5 Загрузите наконечники.
- ☐ 6 Введите расположение первого наконечника для каждого штатива для наконечников .
- ☐ 7 Загрузите планшеты.
- ☐ 8 Залейте реагенты в резервуары глубоких скважин и загрузите их.
- ☐ 9 Налейте реагенты в пробирки и загрузите их.
- ☐ 10 Дождитесь завершения проверки объема реагента.
- ☐ 11 Наблюдайте за шагов.
- ☐ 12 По завершении нажмите **Unload** (Выгрузить), чтобы выгрузить платформу.
- ☐ 13 Осмотрите планшет с библиотеками на предмет одинаковых объемов.
- ☐ 14 При хранении герметизируйте и сохраните планшет библиотеки.
- ☐ 15 Выгрузите держатели очистите платформу.
- ☐ 16 Введите комментарии о затронутых лунках .
- ☐ 17 Выполните один из следующих шагов:
  - ▶ Чтобы перейти к количественному определению библиотек, нажмите **Yes** (Да).
  - ▶ Чтобы остановиться, нажмите **Exit** (Выход).
- ☐ 18 Если вы не остановились, немедленно выполните количественное определение.

ТОЧКА БЕЗОПАСНОЙ ОСТАНОВКИ

При остановке герметизируйте планшет библиотек перед хранением. Планшет библиотек стабилен в течение до 7 дней с даты приготовления при температуре от -25 °C до -15 °C.

Количественное определение библиотеки

- ☐ 1 Сканируйте штрихкоды комплекта принадлежностей.
- ☐ 2 Введите имя пользователя или инициалы лица, готовившего реагенты.
- ☐ 3 Загрузите наконечники в держатель наконечника.
- ☐ 4 Разгерметизируйте планшет библиотек, а затем загрузите планшеты.
- ☐ 5 Загрузите пробирки с реагентами без крышек.
- ☐ 6 Налейте реагенты в пробирки для реагентов и загрузите их.
- ☐ 7 Дождитесь завершения проверки объема реагента.
- ☐ 8 Наблюдайте автоматических шагов.
- ☐ 9 По завершении нажмите **Unload** (Выгрузить), чтобы выгрузить платформу.
- ☐ 10 Выгрузите планшет библиотек, проверьте наличие одинаковых объемов, герметизируйте и храните при комнатной температуре.
- ☐ 11 96-луночные планшеты и проверьте наличие одинаковых объемов
- ☐ 12 Выгрузите 384-луночный планшет и проверьте наличие жидкости в соответствующих лунках.
- ☐ 13 Герметизируйте планшет фольгой.
- ☐ 14 Центрифугируйте 20 секунд при 1000 × g.
- ☐ 15 Инкубируйте при комнатной температуре в течение 10 минут в защищенном от света месте.

СОБСТВЕННОСТЬ КОМПАНИИ ILLUMINA

VeriSeq NIPT Solution v2 Sample Prep Checklist (Контрольный список для подготовки образцов VeriSeq NIPT Solution v2 Sample Prep)

- ☐ 16 Выгрузите все держатели и очистите платформу ML STAR .
- ☐ 17 После инкубации снимите фольгу и загрузите 384-луночный планшет в считывающее устройство для микропланшетов.
- ☐ 18 Дважды щелкните шаблон VeriSeq NIPT, чтобы открыть его в SoftMax Pro.
- ☐ 19 Выберите **New Experiment** (Новый эксперимент) на вкладке Home (Главная страница).
- ☐ 20 Выберите **Read** (Прочтение).
- ☐ 21 Экспортируйте данные в формате XML следующим образом.
  - ☐ a Щелкните правой кнопкой мыши **Plate** (Планшет) и выберите **Rename** (Переименовать).
  - ☐ b Отсканируйте штрих-код планшета для количественного определения и нажмите **OK**.
  - ☐ c В верхнем левом углу экрана щелкните значок планшета и выберите **Export** (Экспорт) в меню.
  - ☐ d Установите флажок **Expt name** (Экспортировать имя), установите параметр даты планшета в необработанное значение, установите формат вывода в XML и нажмите **OK**.
  - ☐ e Задайте путь к выходному файлу и имя, а затем нажмите **Save** (Сохранить).
- ☐ 22 На ML STAR введите идентификатор флуорометра, введите комментарии к запуску и загрузите файл XML.
- ☐ 23 Просмотрите концентрации образца.
- ☐ 24 Введите комментарии о затронутых лунках .
- ☐ 25 Оцените результаты.
  - Если результаты соответствуют спецификации, перейдите к библиотекам пулов. Спецификации см. в таблице показателей контроля качества и границ количественного определения в VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (Руководство по программному обеспечению VeriSeq NIPT Solution v2) (документ № 1000000067940).
  - Если результаты не соответствуют спецификации, система прерывает метод. Повторите процедуры количественного определения, начиная с .
- ☐ 26 Выполните один из следующих шагов:
  - Чтобы перейти к объединенным библиотекам, нажмите **Yes** (Да).
  - Чтобы остановиться, нажмите **Exit** (Выход).

ТОЧКА БЕЗОПАСНОЙ ОСТАНОВКИ

Если вы останавливаетесь, герметизируйте планшет и храните при температуре от -25 °C до -15 °C до 7 дней.

Объединение библиотек

- ☐ 1 Поместите планшет библиотек на термоциклер и запустите программу денатурации.
- ☐ 2 Кратковременно центрифугируйте планшет библиотек при 1000 × g в течение 20 секунд.
- ☐ 3 Выберите концентрацию пула.
- ☐ 4 Загрузите протокол анализа или используйте его по умолчанию.
- ☐ 5 Выберите **Start**.
- ☐ 6 Загрузите наконечники.
- ☐ 7 Загрузите планшет денатурированной библиотеки.
- ☐ 8 Загрузите пробирки для объединения.
- ☐ 9 Налейте реагенты в пробирки для реагентов и загрузите их.
- ☐ 10 Загрузите наконечники.
- ☐ 11 Введите расположение первого и последнего наконечников для каждого штатива наконечников.
- ☐ 12 Наблюдайте автоматических шагов.
- ☐ 13 Введите комментарии о затронутых лунках .
- ☐ 14 По завершении выберите **Unload** (Выгрузить), чтобы выгрузить платформу.
- ☐ 15 Выгрузите держатель пробирки.
- ☐ 16 Закройте каждую пробирку для объединения, перемешайте на вихревой мешалке, а затем ненадолго центрифугируйте.
- ☐ 17 Нажмите **OK**.
- ☐ 18 Секвенируйте библиотеки как можно скорее после объединения. При необходимости герметизируйте планшет

СОБСТВЕННОСТЬ КОМПАНИИ ILLUMINA

библиотек и храните при температуре от -25 °C до -15 °C в течение до 7 дней общего времени хранения, чтобы обеспечить повторное объединение.

ТОЧКА БЕЗОПАСНОЙ ОСТАНОВКИ

Если вы останавливаетесь, закройте пробирки для сбора образцов крышками и храните при температуре от -25 °C до -15 °C в течение не более 7 дней.

Подготовка объединенных библиотек к секвенированию

- ☐ 1 Добавьте следующие расходные материалы в картридж с реагентом, а затем перемешайте пипеткой.
  - Гибридизационный буфер, 900 мкл
  - 450 мкл пула A
- ☐ 2 Выполните секвенирование в следующего поколения.
- ☐ 3 При необходимости повторите эту процедуру для пула B.
  - Для достижения целевого диапазона плотности кластера планшет библиотеки можно повторно объединить с использованием другой концентрации для объединения на Hamilton. Повторное объединение аннулирует исходный пул.
  - В качестве альтернативы, отношение пула к HT1 (450+900 мкл) может быть изменено для достижения целевого диапазона плотности кластера.

СОБСТВЕННОСТЬ КОМПАНИИ ILLUMINA