

Elaborazione dei campioni

- 1 Completare le fasi seguenti per ciascuna aliquota:
 - a Centrifugare a $1.600 \times g$ per 10 minuti a 4°C .
 - b Iniziare l'isolamento del plasma entro 15 minuti.
- 2 Ispezionare per confermare che ciascuna provetta contenga almeno 1,5 ml di plasma sopra lo strato leucocitario-piastrinico.
- 3 Stappare le provette e caricarle nel portaprovette.

Isolamento del plasma

- 1 Immettere Batch ID (ID batch) e il nome utente.
- 2 Caricare il foglio campioni o fare clic su **No Sample Sheet** (Nessun foglio campioni).
- 3 Selezionare la dimensione del batch.
- 4 Selezionare il numero di controlli non templati (NTC).
- 5 Caricare i campioni, le punte e le piastre (codice a barre rivolto verso destra) sul dispositivo di trasporto.
- 6 Attenersi alle fasi automatizzate.
- 7 Una volta terminato, fare clic su **Unload** (Scarica) per scaricare il piano.
- 8 Rimuovere la piastra con pozzetti profondi Intermediate Plasma (Plasma intermedio).
 - a Ispezionare la piastra per eventuali volumi incoerenti.
 - b Annotare qualsiasi incoerenza.
 - c Sigillare la piastra, caricarla, bilanciarla e centrifugare a $5.600 \times g$ per 10 minuti.
- 9 Fare clic su **Yes** (Sì).
- 10 Rimuovere il sigillo della piastra e ricaricare la piastra sul dispositivo di trasporto.
- 11 Attenersi alle fasi automatizzate.
- 12 Una volta terminato, fare clic su **Unload** (Scarica) per scaricare il piano.
- 13 Quando suggerito da Workflow Manager, svuotare il dispositivo di trasporto e il piano.
- 14 Rimuovere la piastra con pozzetti profondi Final Plasma (Plasma finale).
- 15 Ispezionare la piastra per eventuali volumi incoerenti, pellet cellulari visibili ed eccessiva emolisi.
- 16 Invalidare i campioni con un pellet cellulare visibile o eccessiva emolisi.
- 17 Immettere i commenti sui pozzetti rilevanti.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Nel caso si esegua un arresto, sigillare la piastra Final Plasma (Plasma finale) e conservare a una temperatura compresa tra 2°C e 8°C per un massimo di sette giorni.

Estrazione di cfDNA

- 1 Caricare le punte.
- 2 Immettere la posizione della prima e dell'ultima punta per ciascun rack delle punte.
- 3 Eseguire la scansione dei codici a barre di Extraction Box (Scatola estrazione).
- 4 Immettere il nome utente o le iniziali di colui che ha preparato i reagenti.
- 5 Eseguire la scansione dei codici a barre di Accessory Box (Scatola accessori).
- 6 Immettere il nome utente o le iniziali di colui che ha preparato i reagenti.
- 7 Utilizzare la piastra a pozzetti profondi Final Plasma (Plasma finale) e caricare le piastre (codice a barre rivolto verso destra) sul dispositivo di trasporto.
- 8 Per batch della piastra parziali, applicare un sigillo sui pozzetti non utilizzati (le colonne 4-12 per i batch da 24 campioni e le colonne 7-12 per i batch da 48 campioni).
- 9 Caricare la piastra DNA Binding (Legame del DNA) sul collettore del vuoto.
- 10 Selezionare la casella di controllo **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Le colonne della piastra di legame del DNA sono sigillate?), quindi fare clic su **OK** (Ok).
- 11 Trasferire i reagenti nelle provette e caricarli.
- 12 Trasferire i reagenti nei serbatoi con pozzetti profondi e caricarli.
- 13 Attendere il completamento della verifica del volume dei reagenti.
- 14 Confermare che lo scarico del vuoto sia vuoto per più della metà (è raccomandato vuoto).
- 15 Attenersi alle fasi automatizzate.
- 16 Centrifugare la piastra DNA Binding (Legame del DNA) a 5.600 × g per 10 minuti.
- 17 Durante la centrifugazione, pulire il dispositivo

del vuoto con EtOH al 70%.

- 18 Al termine della centrifugazione, togliere i sigilli dai pozzetti contenenti i campioni sulla piastra DNA Binding (Legame del DNA) e posizionarla sopra la piastra cfDNA Elution (Eluizione di cfDNA).
- 19 Attenersi alle fasi automatizzate.
- 20 Al termine dell'incubazione, selezionare la casella di controllo **Plates are assembled as indicated** (Le piastre sono assemblate come indicato).
- 21 Centrifugare la piastra DNA Binding (Legame del DNA) a 5.600 × g per due minuti.
- 22 Ispezionare la piastra cfDNA Elution (Eluizione di cfDNA) per eventuali volumi incoerenti.
- 23 Sigillare e tenere la piastra cfDNA Elution (Eluizione di cfDNA) per la preparazione delle librerie.
- 24 Una volta terminato, fare clic su **Unload** (Scarica) per scaricare il piano.
- 25 Scaricare tutti i dispositivi di trasporto e pulire il piano di ML STAR.
- 26 Immettere i commenti sui pozzetti rilevanti.
- 27 Eseguire una delle fasi seguenti:
 - ▶ Per passare a Prepare Libraries (Preparazione delle librerie), fare clic su **Yes** (Sì).
 - ▶ Per fermarsi, fare clic su **Exit** (Esci).

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Nel caso si esegua un arresto, sigillare la piastra cfDNA Elution (Eluizione di cfDNA) e conservare a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di sette giorni.

Preparazione delle librerie

- 1 Eseguire la scansione dei codici a barre di Library Prep Box (Scatola preparazione delle librerie).
- 2 Immettere il nome utente o le iniziali di colui che ha preparato i reagenti.
- 3 Eseguire la scansione dei codici a barre di Accessory Box (Scatola accessori).
- 4 Immettere il nome utente o le iniziali di colui che ha preparato i reagenti.
- 5 Caricare le punte.
- 6 Immettere la posizione della prima punta per ciascun rack delle punte.
- 7 Caricare le piastre.
- 8 Trasferire i reagenti nei serbatoi con pozzetti profondi e caricarli.
- 9 Trasferire i reagenti nelle provette e caricarli.
- 10 Attendere il completamento della verifica del volume dei reagenti.
- 11 Attenersi alle fasi automatizzate.
- 12 Una volta terminato, fare clic su **Unload** (Scarica) per scaricare il piano.
- 13 Ispezionare la piastra Libraries (Librerie) per eventuali volumi incoerenti.
- 14 Se conservata, la piastra Libraries (Librerie) deve essere sigillata e conservata.
- 15 Scaricare tutti i dispositivi di trasporto e pulire il piano.
- 16 Immettere i commenti sui pozzetti rilevanti.
- 17 Eseguire una delle fasi seguenti:
 - ▶ Per passare a Quantify Libraries (Quantificazione delle librerie), fare clic su **Yes** (Sì).
 - ▶ Per fermarsi, fare clic su **Exit** (Esci).
- 18 A meno che si decida di fermarsi, passare immediatamente alla quantificazione.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Nel caso si esegua un arresto, sigillare la piastra Libraries (Librerie) prima della conservazione. La piastra Libraries (Librerie) è stabile per un massimo di sette giorni dalla data di preparazione a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C.

Quantificazione delle librerie

- 1 Eseguire la scansione dei codici a barre di Accessory Box (Scatola accessori).
- 2 Immettere il nome utente o le iniziali di colui che ha preparato i reagenti.
- 3 Caricare le punte sul portapunte.
- 4 Togliere il sigillo alla piastra Libraries (Librerie), quindi caricare le piastre.
- 5 Caricare le provette di reagente senza i tappi.
- 6 Trasferire i reagenti nelle provette dei reagenti e caricarli.
- 7 Attendere il completamento della verifica del volume dei reagenti.
- 8 Attenersi alle fasi automatizzate.
- 9 Una volta terminato, fare clic su **Unload** (Scarica) per scaricare il piano.
- 10 Scaricare la piastra Libraries (Librerie), controllare che i volumi siano coerenti, sigillarla e conservarla a temperatura ambiente.
- 11 Scaricare le piastre a 96 pozzetti e verificare che i volumi siano coerenti.
- 12 Caricare la piastra a 384 pozzetti e verificare la presenza di liquido nei pozzetti appropriati.
- 13 Sigillare la piastra con un sigillo.
- 14 Centrifugare a 1.000 × g per 20 secondi.
- 15 Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti, al riparo dalla luce.
- 16 Scaricare tutti i dispositivi di trasporto e pulire il piano di ML STAR.
- 17 Dopo l'incubazione, rimuovere il sigillo e caricare la piastra a 384 pozzetti sul lettore per micropiastre.
- 18 Fare doppio clic sul modello VeriSeq NIPT per aprirlo in SoftMax Pro.
- 19 Selezionare **New Experiment** (Nuovo esperimento) nella scheda Home (Inizio).
- 20 Selezionare **Read** (Leggi).
- 21 Esportare i dati in formato XML nel modo seguente.
 - a Fare clic con il pulsante destro del mouse su **Plate** (Piastra), quindi selezionare **Rename** (Rinomina).
 - b Eseguire la scansione del codice a barre della piastra Quantification (Quantificazione), quindi fare clic su **OK** (Ok).
 - c Nell'angolo superiore sinistro della schermata, fare clic sull'icona della piastra, quindi selezionare **Export** (Esporta) dal menu.
 - d Selezionare la casella di controllo **Expt name** (Nome esperimento), impostare l'opzione dei dati della piastra su dati non elaborati, impostare il formato di output in XML, quindi fare clic su **OK** (Ok).
 - e Impostare il percorso degli output e il nome del file, quindi fare clic su **Save** (Salva).
- 22 Su ML STAR, immettere l'ID del fluorimetro, immettere i commenti per la corsa e caricare il file XML.
- 23 Rivedere i risultati dell'analisi.
- 24 Immettere i commenti sui pozzetti rilevanti.

- 25 Valutare i risultati.
- ▶ Se i risultati superano la specifica, passare a Pool Libraries (Raggruppamento in pool delle librerie). Per le specifiche, vedere le metriche di quantizzazione del controllo qualità e le tabelle dei limiti nella Guida del software VeriSeq NIPT Solution v2 (documento n. 1000000067940).
 - ▶ Se i risultati non superano la specifica, il sistema interrompe il metodo. Ripetere le procedure di qualificazione iniziando con *Preparazione delle librerie a pagina 2*.
- 26 Eseguire una delle fasi seguenti:
- ▶ Per passare a Pool Libraries (Raggruppamento in pool delle librerie), fare clic su **Yes** (Sì).
 - ▶ Per fermarsi, fare clic su **Exit** (Esci).

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Nel caso si esegua un arresto, sigillare la piastra cfDNA Elution (Eluizione di cfDNA)(Eluizione di cfDNA) e conservare a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di sette giorni.

Raggruppamento in pool delle librerie

- 1 Posizionare la piastra Libraries (Librerie) sul ciclatore termico ed eseguire il programma di denaturazione.
- 2 Centrifugare la piastra Libraries (Librerie) a 1.000 × g per 20 secondi.
- 3 Selezionare la concentrazione del raggruppamento in pool.
- 4 Caricare il foglio campioni o utilizzare l'impostazione predefinita.
- 5 Selezionare **Start** (Avvia).
- 6 Caricare le punte.
- 7 Caricare la piastra Denatured Library (Libreria denaturata).
- 8 Caricare le provette con i raggruppamenti in pool.
- 9 Trasferire i reagenti nelle provette dei reagenti e caricarli.
- 10 Caricare le punte.
- 11 Immettere la posizione della prima e dell'ultima punta per ciascun rack delle punte.
- 12 Attenersi alle fasi automatizzate.
- 13 Immettere i commenti sui pozzetti rilevanti.
- 14 Una volta terminato, selezionare **Unload** (Scarica) per scaricare il piano.
- 15 Scaricare il portaprovette.
- 16 Tappare ciascuna provetta di raggruppamento in pool, utilizzare un vortex, quindi centrifugare brevemente.
- 17 Fare clic su **OK** (Ok).

- 18 Sequenziare le librerie il prima possibile dopo il raggruppamento in pool. Se necessario, sigillare la piastra Libraries (Librerie) e conservarla a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di sette giorni di conservazione cumulativa per consentire un nuovo raggruppamento in pool.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Nel caso si esegua un arresto, tappare le provette di raggruppamento e conservare a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di sette giorni.

Preparazione delle librerie raggruppate in pool per il sequenziamento

- 1 Dispensare i seguenti materiali di consumo nella cartuccia di reagenti, quindi pipettare per miscelare.
 - ▶ 900 µl di Hybridization Buffer (Tampone di ibridazione)
 - ▶ 450 µl di Pool A (Raggruppamento in pool A)
- 2 Procedere con il sequenziamento su un sistema di sequenziamento di nuova generazione.
- 3 Se necessario, ripetere questa procedura per Pool B (Raggruppamento in pool B).
 - ▶ Per ottenere l'intervallo di densità dei cluster richiesto, la piastra delle librerie può essere nuovamente raggruppata in pool utilizzando una diversa concentrazione di raggruppamento in pool su Hamilton. Il nuovo raggruppamento in pool, invalida il raggruppamento in pool iniziale.
 - ▶ Oppure, il rapporto del raggruppamento in pool a HT1 (450+900 ul) può essere modificato per ottenere l'intervallo di densità dei cluster richiesto.