

Muestras de proceso

- 1 Siga estos pasos para cada alícuota:
 - a Centrifugue a 1600 × g durante 10 minutos a 4 °C.
 - b Inicie el aislamiento de plasma antes de 15 minutos.
- 2 Haga una inspección para confirmar que todos los tubos contienen al menos 1,5 ml de plasma por encima de la capa leucocitaria.
- 3 Destape los tubos y cárguelos en los portatubos.

Aislamiento de plasma

- 1 Introduzca el ID de lote y el nombre de usuario.
- 2 Cargue una hoja de muestras o haga clic en **No Sample Sheet** (Sin hoja de muestras).
- 3 Seleccione el tamaño del lote.
- 4 Seleccione el número de controles sin cadena molde (NTC).
- 5 Cargue las muestras, las puntas y las placas (con el código de barras orientado hacia la derecha) en el portador.
- 6 Siga los pasos automatizados.
- 7 Cuando haya finalizado, haga clic en **Unload** (Descargar) para descargar la plataforma.
- 8 Retire la placa de pocillos profundos de plasma intermedio.
 - a Inspeccione la placa para comprobar que los volúmenes son invariables.
 - b Anote cualquier variación.
 - c Selle la placa, realice la carga de manera equilibrada y centrifugue a 5600 × g durante 10 minutos.
- 9 Haga clic en **Yes** (Sí).
- 10 Retire la junta de la placa y cárguela de nuevo en el portador.
- 11 Siga los pasos automatizados.
- 12 Cuando haya finalizado, haga clic en **Unload** (Descargar) para descargar la plataforma.
- 13 Cuando Workflow Manager se lo indique, vacíe los portadores y la plataforma.
- 14 Retire la placa de pocillos profundos de plasma final.
- 15 Inspeccione la placa para comprobar que los volúmenes son invariables, si los pellets de células son visibles y si la hemólisis es excesiva.

- 16 Invalide las muestras con un pellet de célula visible o una hemólisis excesiva.
- 17 Introduzca comentarios sobre los pocillos afectados.

PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO

Si va a detener el proceso, selle la placa de plasma final y almacénela a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C durante un periodo de 7 días como máximo.

Extracción de ADN sin células

- 1 Cargue las puntas.
- 2 Introduzca la ubicación de la primera y la última punta de cada gradilla de puntas.
- 3 Escanee los códigos de barras de la caja de extracción.
- 4 Introduzca el nombre de usuario o las iniciales del preparador del reactivo.
- 5 Escanee los códigos de barras de la caja de accesorios.
- 6 Introduzca el nombre de usuario o las iniciales del preparador del reactivo.
- 7 Quite la junta de la placa de pocillos profundos de plasma final y cargue las placas (con el código de barras orientado hacia la derecha) en el portaplacas.
- 8 En el caso de los lotes de placas parciales, aplique una junta de placa recortada sobre los pocillos que no se hayan utilizado (columnas 4-12 para lotes de 24 muestras y columnas 7-12 para lotes de 48 muestras).
- 9 Cargue la placa de unión de ADN en el distribuidor de vacío.
- 10 Marque la casilla de verificación **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (¿Están selladas las columnas de la placa de unión de ADN?) y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).
- 11 Vierta los reactivos en los tubos y cárguelos.
- 12 Transfiera los reactivos a depósitos de pocillos profundos y cárguelos.
- 13 Espere a que finalice la comprobación de volúmenes de reactivos.
- 14 Confirme que el depósito de residuos de vacío no se encuentra por encima de la mitad de su capacidad (se recomienda que esté vacío).
- 15 Siga los pasos automatizados.

- 16 Centrifugue la placa de unión de ADN a 5600 × g durante 10 minutos.
- 17 Durante el centrifugado, limpie el depósito de vacío con EtOH al 70 %.
- 18 Tras el centrifugado, quite la junta de los pocillos que contienen muestras de la placa de unión de ADN y colóquela en la parte superior de la placa de elución de ADN sin células.
- 19 Siga los pasos automatizados.
- 20 Tras la incubación, seleccione la casilla de verificación **Plates are assembled as indicated** (Las placas están colocadas conforme se indica).
- 21 Centrifugue la placa de unión de ADN a 5600 × g durante 2 minutos.
- 22 Inspeccione la placa de elución de ADN sin células para comprobar que los volúmenes son invariables.
- 23 Selle y conserve la placa de elución de ADN sin células para la preparación de bibliotecas.
- 24 Cuando haya finalizado, haga clic en **Unload** (Descargar) para descargar la plataforma.
- 25 Descargue todos los portadores y limpie la plataforma de ML STAR.
- 26 Introduzca comentarios sobre los pocillos afectados.
- 27 Realice una de las siguientes acciones:
 - ▶ Para ir a la preparación de bibliotecas, haga clic en **Yes** (Sí).
 - ▶ Para parar, haga clic en **Exit** (Salir).

PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO

Si va a detener el proceso, selle la placa de elución de ADN sin células y almacénela a una temperatura comprendida entre -25 °C y -15 °C durante un periodo de 7 días como máximo.

Preparación de bibliotecas

- 1 Escanee los códigos de barras de la caja de preparación de bibliotecas.
- 2 Introduzca el nombre de usuario o las iniciales del preparador del reactivo.
- 3 Escanee los códigos de barras de la caja de accesorios.
- 4 Introduzca el nombre de usuario o las iniciales del preparador del reactivo.
- 5 Cargue las puntas.
- 6 Introduzca la ubicación de la primera punta de cada gradilla de puntas.
- 7 Cargue las placas.
- 8 Vierta los reactivos en los depósitos de pocillos profundos y cárguelos.
- 9 Vierta los reactivos en tubos y cárguelos.
- 10 Espere a que finalice la comprobación de volúmenes de reactivos.
- 11 Siga los pasos automatizados.
- 12 Cuando haya finalizado, haga clic en **Unload** (Descargar) para descargar la plataforma.
- 13 Inspeccione la placa de bibliotecas para comprobar que los volúmenes son invariables.
- 14 Si la va a guardar, selle y conserve la placa de bibliotecas.
- 15 Descargue los portadores y limpie la plataforma.
- 16 Introduzca comentarios sobre los pocillos afectados.
- 17 Realice una de las siguientes acciones:
 - ▶ Para ir a la cuantificación de bibliotecas, haga clic en **Yes** (Sí).
 - ▶ Para parar, haga clic en **Exit** (Salir).
- 18 A menos que haya decidido parar, continúe de inmediato con la cuantificación.

PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO

Si va a detener el proceso, selle la placa de bibliotecas antes de su almacenamiento. La placa de bibliotecas permanece estable hasta siete días a partir de la fecha de preparación a temperaturas de entre -25°C y -15°C .

Cuantificación de bibliotecas

- 1 Escanee los códigos de barras de la caja de accesorios.
- 2 Introduzca el nombre de usuario o las iniciales del preparador del reactivo.
- 3 Cargue las puntas en el portador de puntas.
- 4 Quite la junta de la placa de bibliotecas y, a continuación, cargue las placas.
- 5 Cargue los tubos de reactivos sin tapones.
- 6 Vierta los reactivos en los tubos de reactivos y cárguelos.
- 7 Espere a que finalice la comprobación de volúmenes de reactivos.
- 8 Siga los pasos automatizados.
- 9 Cuando haya finalizado, haga clic en **Unload** (Descargar) para descargar la plataforma.
- 10 Descargue la placa de bibliotecas, compruebe que los volúmenes son invariables, sellela y guárdela a temperatura ambiente.
- 11 Descargue las placas de 96 pocillos y compruebe que los volúmenes son invariables.
- 12 Descargue la placa de 384 pocillos y compruebe el líquido en los pocillos correspondientes.
- 13 Selle la placa con un cierre metálico.
- 14 Centrifugue a $1000 \times g$ durante 20 segundos.
- 15 Incube a temperatura ambiente y protegiendo de la luz durante 10 minutos.
- 16 Descargue todos los portadores y limpie la plataforma de ML STAR.
- 17 Tras la incubación, quite el cierre metálico y cargue la placa de 384 pocillos en el lector de microplacas.
- 18 Haga doble clic en la plantilla de VeriSeq NIPT para abrirla en SoftMax Pro.
- 19 Seleccione **New Experiment** (Experimento nuevo) en la ficha Home (Inicio).
- 20 Seleccione **Read** (leer).
- 21 Exporte los datos en formato XML como se explica a continuación.
 - a Haga clic con el botón derecho en **Plate** (Placa) y, a continuación, seleccione **Rename** (Cambiar nombre).
 - b Escanee el código de barras de la placa de cuantificación y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).
 - c Haga clic en el icono de placa que aparece en la esquina superior izquierda de la pantalla y, después, seleccione **Export** (Exportar) en el menú.
 - d Seleccione la casilla de verificación **Expt name** (Nombre de exportación), establezca la opción de fecha de la placa en datos en bruto, establezca el formato de salida en XML y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).
 - e Defina la ruta y el nombre del archivo de salida y, a continuación, haga clic en **Save** (Guardar).
- 22 En ML STAR, introduzca el ID del fluorímetro y los comentarios del experimento; a continuación, cargue el archivo XML.
- 23 Revise los resultados del análisis.
- 24 Introduzca comentarios sobre los pocillos afectados.

- 25 Evalúe los resultados.
- ▶ Si los resultados superan la especificación, vaya a Pool Libraries (Agrupación de bibliotecas). Si desea ver las especificaciones, consulte la tabla de límites y criterios de medición de CC en la guía del software de VeriSeq NIPT Solution v2 (n.º de documento 1000000067940).
 - ▶ Si los resultados no superan la especificación, el sistema cancela el método. Repita los procedimientos de cuantificación empezando por *Preparación de bibliotecas en la página 2*.
- 26 Realice una de las siguientes acciones:
- ▶ Para ir a la agrupación de bibliotecas, haga clic en **Yes** (Sí).
 - ▶ Para parar, haga clic en **Exit** (Salir).

PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO

Si va a detener el proceso, selle la placa y almacénela a una temperatura comprendida entre -25 °C y -15 °C durante un periodo de siete días como máximo.

Agrupación de bibliotecas

- 1 Coloque la placa de bibliotecas en el ciclador térmico y ejecute el programa de desnaturalización.
- 2 Centrifugue la placa de bibliotecas a 1000 × g durante 20 segundos.
- 3 Seleccione la concentración del grupo.
- 4 Cargue la hoja de muestras o use la predeterminada.
- 5 Seleccione **Start** (Iniciar).
- 6 Cargue las puntas.
- 7 Cargue la placa de bibliotecas desnaturalizadas.
- 8 Cargue los tubos de agrupación.
- 9 Vierta los reactivos en los tubos de reactivos y cárguelos.
- 10 Cargue las puntas.
- 11 Introduzca la ubicación de la primera y la última punta de cada gradilla de puntas.
- 12 Siga los pasos automatizados.
- 13 Introduzca comentarios sobre los pocillos afectados.
- 14 Cuando haya finalizado, seleccione **Unload** (Descargar) para descargar la plataforma.
- 15 Descargue el portatubos.
- 16 Tape todos los tubos de agrupación, agite en vórtice y, a continuación, centrifugue brevemente.
- 17 Haga clic en **OK** (Aceptar).
- 18 Secuencie las bibliotecas lo antes posible tras la agrupación. En caso de que sea necesario, selle la placa de bibliotecas y guárdela a temperaturas de entre -25 °C y -15 °C un máximo de siete días para permitir la reagrupación.

PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO

Si va a detener el proceso, tape los tubos de agrupación y almacénelos a una temperatura comprendida entre -25 °C y -15 °C durante un periodo de 7 días como máximo.

Preparación de bibliotecas agrupadas para la secuenciación

- 1 Añada los siguientes consumibles al cartucho de reactivo y, a continuación, pipetee para mezclar.
 - ▶ Tampón de hibridación de 900 µl
 - ▶ Grupo A de 450 µl
- 2 Proceda con la secuenciación en un sistema de secuenciación de próxima generación.
- 3 En caso de que sea necesario, repita este procedimiento el grupo B.
 - ▶ Para alcanzar el rango de densidad de grupos objetivo, la placa de bibliotecas se puede volver a agrupar con una concentración del grupo distinta en el Hamilton. Si se vuelve a agrupar, se invalida el grupo original.
 - ▶ Por otra parte, la relación entre el grupo y el HT1 (450 + 900 µl) se puede modificar para alcanzar el rango de densidad de grupos objetivo.