



# **Bionano Prep SP Frisches Humanblut DNA-Isolationsprotokoll v2**

Dokumentnummer: 30397

Dokumentrevision: A

## Inhaltsverzeichnis

Impressum.....	3
Revisionshistorie.....	4
Workflow-Übersicht.....	5
Bionano Prep SP DNA-Isolierungskit und vom Benutzer bereitgestellte Materialien .....	6
Bionano Prep SP Blut- und Zell-DNA-Isolationskit v2 Inhalt (Teile-Nr. 80042, 10 Präparate) .....	6
Vom Benutzer bereitgestellte Materialien .....	6
Einführung und wichtige Hinweise .....	7
Einführung.....	7
Überblick .....	7
Wichtige Notizen .....	8
Bionano Prep SP Frisches Humanblut DNA-Isolationsprotokoll v2 .....	10
Vorbereitung für die gDNA-Isolierung.....	10
gDNA-Isolierung (3 Stunden) .....	10
Homogenisierung der gDNA-Lösung (70 Minuten) .....	15
gDNA-Quantifizierung (45 Minuten).....	16
Fehlerbehebung.....	18
Die gDNA kommt ungebunden von der Nanobind Disk. ....	18
Die gDNA ist vor der Markierung nicht homogen. ....	18
Die gDNA ist nicht viskos. ....	18
Anhang .....	19
Hemocue-Zahl < 4.500 und > 2.800 WBC/µl .....	19
Technische Unterstützung .....	21

## Impressum

---

### **Nur für Forschungszwecke. Nicht zur Verwendung in diagnostischen Verfahren.**

Dieses Material ist durch das US-amerikanische Urheberrecht und internationale Verträge geschützt. Die unbefugte Verwendung dieses Materials ist untersagt. Kein Teil der Veröffentlichung darf ohne die ausdrückliche vorherige schriftliche Genehmigung von Bionano Genomics in irgendeiner Form oder durch ein beliebiges Medium oder auf irgendeine Weise, bekannt oder unbekannt, kopiert, reproduziert, verteilt, übersetzt, rückentwickelt oder übertragen werden. Das Kopieren umfasst laut Gesetz die Übersetzung in eine andere Sprache oder ein anderes Format. Die hierin enthaltenen technischen Daten sind für nach US-Gesetz zugelassene Endziele bestimmt. In Umlauf bringen entgegen US-Recht verboten. Diese Veröffentlichung stellt die neuesten Informationen dar, die zum Zeitpunkt der Veröffentlichung verfügbar waren. Aufgrund ständiger Bemühungen zur Verbesserung des Produkts können sich technische Änderungen ergeben, die in diesem Dokument nicht berücksichtigt sind. Bionano Genomics behält sich das Recht vor, jederzeit und ohne vorherige Ankündigung Änderungen der Spezifikationen und anderer Informationen in dieser Veröffentlichung vorzunehmen. Bitte wenden Sie sich an den Bionano Genomics-Kundensupport, um die neuesten Informationen zu erhalten.

BIONANO GENOMICS LEHNT JEDLICHE AUSDRÜCKLICHE ODER STILLSCHWEIGENDE GEWÄHRLEISTUNG IN BEZUG AUF DIESES DOKUMENT AB, EINSCHLIESSLICH, ABER NICHT BESCHRÄNKT AUF DIE MARKTGÄNGIGKEIT ODER EIGNUNG FÜR EINEN BESTIMMTEN ZWECK. SOWEIT GESETZLICH ZULÄSSIG, ÜBERNIMMT BIONANO GENOMICS IN KEINEM FALL HAFTUNG FÜR BESONDERE, ZUFÄLLIGE, INDIREKTE, STRAF-, MEHRFACH- ODER FOLGESCHÄDEN IN VERBINDUNG MIT DIESEM DOKUMENT ODER DIE AUS DIESEM DOKUMENT ENTSTEHEN, EINSCHLIESSLICH, ABER NICHT BESCHRÄNKT AUF DESSEN VERWENDUNG, UNGEACHTET, OB VORHERSEHBAR ODER NICHT UND OB BIONANO GENOMICS AUF DIE MÖGLICHKEIT SOLCHER SCHÄDEN HINGEWIESEN WURDE.

### **Patente**

Produkte von Bionano Genomics® können durch ein oder mehrere US- oder ausländische Patente geschützt sein.

### **Warenzeichen**

Das Bionano Genomics-Logo und die Namen der Produkte oder Dienstleistungen von Bionano Genomics sind eingetragene Marken oder Marken von Bionano Genomics in den USA und bestimmten anderen Ländern.

Bionano Genomics®, Irys®, IrysView®, IrysChip®, IrysPrep®, IrysSolve®, Saphyr®, Saphyr Chip®, Bionano Access und Bionano EnFocus™ sind Marken von Bionano Genomics, Inc. Alle anderen Marken sind das alleinige Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber.

Es wird keine Lizenz zur Verwendung von Marken von Bionano Genomics erteilt oder impliziert. Benutzern ist es nicht gestattet, diese Marken ohne die vorherige schriftliche Zustimmung von Bionano Genomics zu verwenden. Die Verwendung dieser Marken oder anderer Materialien, außer wie hierin erlaubt, ist ausdrücklich verboten und kann gegen Bundesgesetze oder andere geltende Gesetze verstoßen.

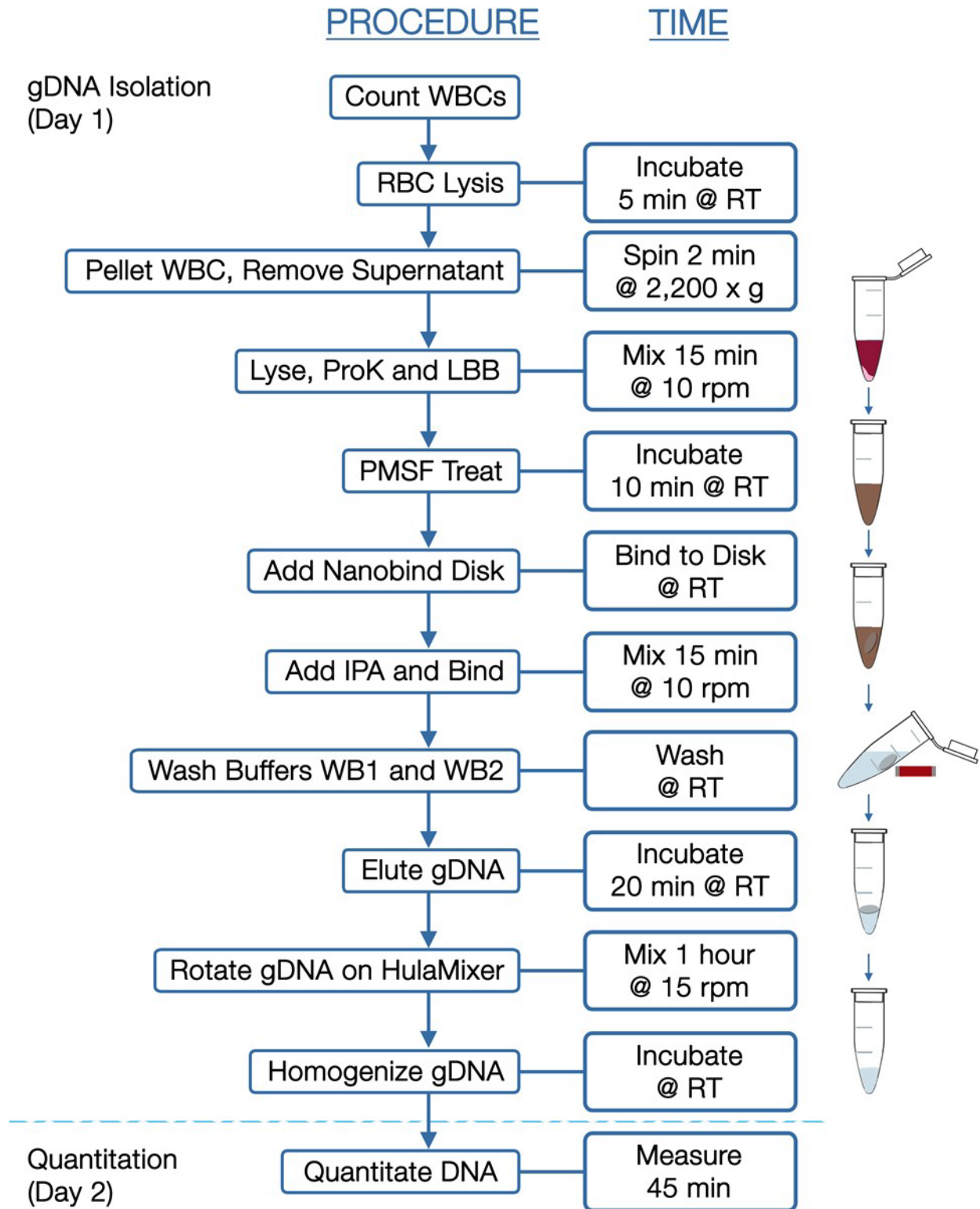
© Copyright 2022 Bionano Genomics, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

## Revisionshistorie

---

Revision	Veröffentlichungsdatum	Anmerkungen
A	04.15.2022	Erstveröffentlichung. Übersetzung in die Sprache Deutsch.

## Workflow-Übersicht



## Bionano Prep SP DNA-Isolierungskit und vom Benutzer bereitgestellte Materialien

### Bionano Prep SP Blut- und Zell-DNA-Isolationskit v2 Inhalt (Teile-Nr. 80042, 10 Präparate)

Artikel	Anzahl	Artikelnummer	Lagerung
4-mm-Nanobind-Disks	10 Disks	20402	Raumtemperatur (18-25 °C)
Protein-LoBind-Mikrozentrifugenröhrchen, 1,5 ml	10 Röhrchen	20422	Raumtemperatur (18-25 °C)
Protein-LoBind-Mikrozentrifugenröhrchen, 0,5 ml	10 Röhrchen	20421	Raumtemperatur (18-25 °C)
RNase-A-Enzym**	200 µl	20373	Kühlen (4°C)
DNA-Stabilisator**	350 µl	20423	Raumtemperatur (18-25 °C)
Standard-Mikrozentrifugenröhrchen, 2,0 ml	10 Röhrchen	20396	Raumtemperatur (18-25 °C)
Zellpuffer	50 ml	20374	Raumtemperatur (18-25 °C)
Proteinase K Enzym	0,5 ml	20372	Raumtemperatur (18-25 °C)
Lyse- und Bindungspuffer (LBB)*	2,5 ml	20375	Raumtemperatur (18-25 °C)
Waschpuffer 1 Konzentrat (2.5X) (WB1)*	3,25 ml	20376	Raumtemperatur (18-25 °C)
Waschpuffer 2 Konzentrat (2.5X) (WB2)	5 ml	20377	Raumtemperatur (18-25 °C)
Elutionspuffer (EB)	1,1 ml	20378	Raumtemperatur (18-25 °C)
Magnetic Disk Retriever Kunststoffscheide	10	20381	Raumtemperatur (18-25 °C)

\* Informationen zu gefährlichen Abfällen finden Sie im Abschnitt Wichtige Hinweise.

\*\* In diesem Protokoll nicht verwendet.

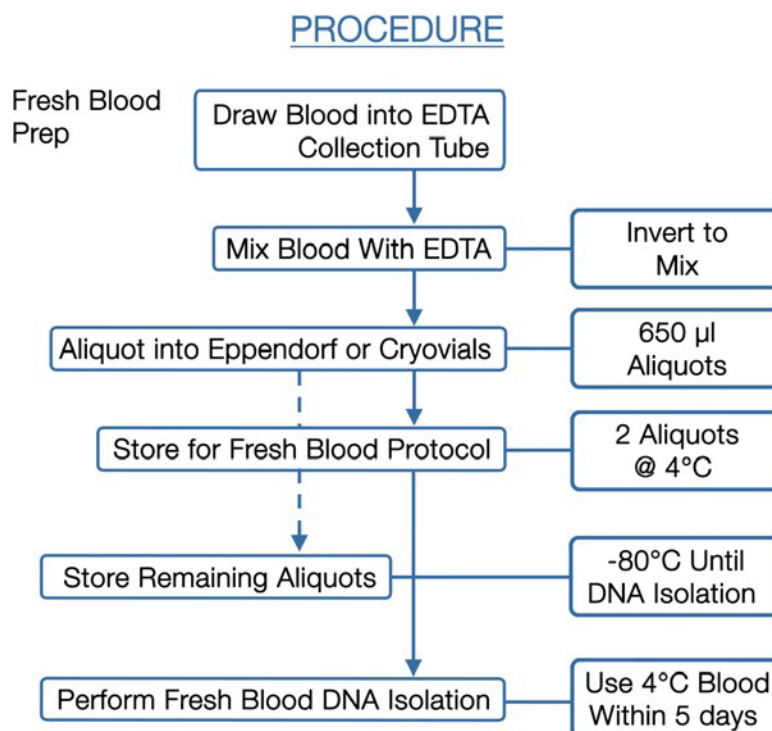
### Vom Benutzer bereitgestellte Materialien

Artikel	Anbieter	Katalog-Nr.
<b>Tag 1 – Pelletierung, gDNA-Isolierung und Homogenisierung</b>		
Bionano Prep SP Magnetischer Retriever (2er Pack)	Bionano Genomics	80031
HemoCue WBC-Analysator	Fisher Scientific (USA-Vertriebspartner) (außerhalb der USA)	22-601-017
HemoCue Mikroküvetten	Fisher Scientific	22-601-018
Vari-Mix Reagenzglaswippe	Thermo Fisher oder gleichwertig	M48725Q
DynaMag-2 Magnetröhrchenständer	Thermo Fisher	12321D
HulaMixer Probenmischer	Thermo Fisher	15920D
Mikrozentrifugenröhrchen, 1,5 ml, Nukleasefrei	VWR	87003-294
RBC-Lyselösung	Qiagen	158902
Phenylmethylsulfonylfluoridlösung (PMSF), 100 mM	Sigma-Aldrich	93482
Ethanol, 200 Proof, Molekularbiologie-Qualität	Sigma-Aldrich	E7023
Isopropanol (IPA), ≥ 99,5 %, molekularbiologischer Grad	Fisher Scientific	A461-212
Desinfektionsmittelkonzentrat, TexQ TX651	Texwipe	TX651
Bleichmittel zur Blutentsorgung	Allgemeiner Laborlieferant	
Konische Zentrifugenröhrchen, 50 ml, PP	Thermo Fisher oder gleichwertig	14-432-22
Zentrifuge mit 1,5 ml Röhrchenrotor (Drehzahl 2.200 x g)	Allgemeiner Laborlieferant	
Eiskübel und Eis	Allgemeiner Laborlieferant	
Sterile 5 und 10 ml Einwegpipetten (TD+)	Allgemeiner Laborlieferant	
Mini-Tischmikrozentrifuge (Drehzahl 2.200 x g)	Labnet	C1301B
Spitzzange	Elektronenmikroskopische Wissenschaften oder gleichwertig	78141-01
Pipettenspitzen mit weiter Öffnung, gefiltert, Aerosol, 200 µl	VWR- oder Rainin-Äquivalent	46620-642
Extra lange 1.000-µl-Spitzen, steril	VWR- oder Rainin-Äquivalent	16466-008
Pipetten (10, 20, 200 und 1.000 µl) und Nukleasefreie, gefilterte Pipettenspitzen	Allgemeiner Laborlieferant	
Parafilm	Allgemeiner Laborlieferant	
<b>Tag 2 - Quantifizierung</b>		
Tischvortexer	Allgemeiner Laborlieferant	
Ultraschallbad (empfohlen)	Branson oder gleichwertig	CPX 952-119R
15 ml konisches Röhrchen	Fisher Scientific	05-539-12
Fluorometer, Qubit	Thermo Fisher oder gleichwertig	Q33216
Qubit® BR (Broad Range) dsDNA-Assay-Kit	Thermo Fisher oder gleichwertig	Q32853
Qubit Assay-Röhrchen	Thermo Fisher	Q32856
Direktverdrängerpipette MR-10 (optional)	Rainin oder Äquivalent	17008575
Pipettenspitzen, 10 µl, C-10 für Direktverdräng. Pipette (optional)	Rainin oder Äquivalent	17008604

## Einführung und wichtige Hinweise

### Einführung

Dieses Bionano Prep® SP Frisches Humanblut DNA-Isolationsprotokoll v2 kann gDNA mit ultrahohem Molekulargewicht (UHMW) in weniger als 4 Stunden bereitstellen. Es verwendet ein Lyse-, Binde-, Wasch- und Eluierungsverfahren, das für Kieselsäure-basierte gDNA-Extraktionstechnologien üblich ist, in Kombination mit einer neuartigen paramagnetischen Scheibe. Im Gegensatz zu magnetischen Beads und Silica-Spin-Säulen, die große gDNA schneidet, bindet und gibt die Nanobind Disk gDNA mit deutlich weniger Fragmentierung ab, was zu UHMW-gDNA führt. Die hohe gDNA-Bindungs Kapazität ist das Ergebnis einer neuartigen nanostrukturierten Kieselsäure auf der Außenseite der thermoplastischen paramagnetischen Scheibe. Dieses Protokoll wurde unter Verwendung von Humanblut getestet, das in bei 4 °C gelagerte EDTA-Röhrchen abgezogen und innerhalb von 4 Tagen nach dem Entnahmedatum verarbeitet wurde. Für beste Ergebnisse wird empfohlen, das Blut vor der Verarbeitung nicht länger als 5 Tage nach der Entnahme bei 4 °C aufzubewahren. Blutproben sind auch stabil, wenn sie bis zu 66 Stunden bei Raumtemperatur (22-25 °C) aufbewahrt werden, bis zu 6 Stunden hiervon auch bei erhöhter Temperatur (30-40 °C). beträgt. Die Lagerung von Blutproben bei Raumtemperatur über 66 Stunden oder eine längere Exposition (> 6 Stunden) bei erhöhter Temperatur kann zu einer verringerten gDNA-Moleküllänge und beeinträchtigten Testergebnissen führen. Die nach diesem Protokoll hergestellte gDNA wurde nur mit DLS-Markierung validiert. Siehe [Schulungsvideo](#) für technisch kritische Schritte und Fehlerbehebung; die im Video erwähnten Schritte entsprechen dem Gefrorenes Blut Protokoll, jedoch sind es dieselben Prozesse wie hier bereits beschrieben.



### Überblick

Die Zellyse und der Proteinase K-Verdau erfolgen in einem chaotropen Puffer und die freigesetzte gDNA bindet nach Zugabe von Isopropanol an die Nanobind Disk. Nach drei Waschschrinen wird die Disk in ein frisches Röhrchen überführt und die gDNA wird von der Scheibe eluiert. Die gewonnene UHMW-gDNA wird einer



begrenzten Scherung unterzogen, um die UHMW-gDNA homogener zu machen. Die gDNA wird dann gemischt und über Nacht bei Raumtemperatur äquilibriert, um die DNA-Homogenität zu erleichtern, und die Konzentration wird bestimmt. Der typische gDNA-Größenbereich reicht von 50 Kbp bis 1 Mbp.

## Wichtige Notizen

### DNA-Homogenität

Die wiedergewonnene gDNA wird einer Pipettenmischung mit einer 200- $\mu$ l-Standardpipettenspitze unterzogen, um die Homogenität zu erhöhen und eine konsistente DNA-Probenahme für die Markierung zu gewährleisten.

### gDNA-Quantifizierung

Die gDNA-Quantifizierung wird verwendet, um die Konzentration zu messen und dient als Maß für die UHMW-gDNA-Homogenität. Die Qubit-Quantifizierung wird gegenüber anderen Quantifizierungsverfahren bevorzugt, da sie auch zum Messen der gDNA-Konzentration der Markierungsreaktion verwendet werden kann. Der Qubit Broad Range (BR) dsDNA Assay misst die gDNA-Konzentration nach der Isolierung, während der High Sensitivity (HS) dsDNA Assay die gDNA-Konzentration nach der Markierung misst.

Um die gDNA-Homogenität zu messen, ist es wichtig, die Konzentration von gDNA an mehreren Positionen in der Lösung zu messen. Da viskose gDNA schwer zu pipettieren ist, befolgen Sie die Richtlinien in den wichtigen Hinweisen für genaues Pipettieren. Standardassays zur Quantifizierung der gDNA-Konzentration liefern aufgrund ihrer viskosen Natur keine genauen Messungen von langer gDNA.

- Für eine genaue Quantifizierung ist eine effektive Fragmentierung der gDNA-Probe durch Ultrabeschallung oder ausgiebiges Vortexen erforderlich.
- Der Variationskoeffizient (CV) aus drei einzelnen Stichproben sollte kleiner oder gleich 0,30 sein.
- Die typische gDNA-Konzentration beträgt 45-90 ng/ $\mu$ l.

### Pipettieren von viskoser genomischer DNA (gDNA)

Um viskose gDNA zu zeichnen, halten Sie das Vorratsröhrchen für die Nahansicht, drücken Sie den Pipettenkolben bis zum ersten Anschlag, tauchen Sie die Pipettenspitze ein und lassen Sie den Kolben vorsichtig und langsam los, um mit dem Aufziehen der viskosen gDNA in die Spitze zu beginnen, während Sie die Aufnahme sorgfältig überwachen. Halten Sie die Spitze auch dann untergetaucht, wenn die viskose Lösung aufhört, sich nach oben zu bewegen und sich abzuflachen. Seien Sie geduldig. Es kann einige Sekunden dauern, bis viskose gDNA auf bis zu 2  $\mu$ l gefüllt ist. Ein zu schnelles Loslassen des Kolbens kann zu einer Blase in der Spitze führen, die zu Undersampling führt (in diesem Fall von vorne beginnen). Nachdem sich die Lösung in der Spitze eingependelt hat und die Spitze noch in die gDNA-Lösung eingetaucht ist, kratzen Sie die Spitze 3-5-mal mit kreisenden Bewegungen gegen den Boden des Röhrchens. Entfernen Sie die Spitze aus der gDNA-Lösung und überprüfen Sie visuell, ob sie auf 2  $\mu$ l gefüllt ist. Wenn Sie die Pipettenspitze zu früh aus der gDNA-Lösung entfernen oder die Spitze ineffektiv abkratzen, um gDNA-Stränge von der Spitze abzubrechen, kann an der Spitze der Pipettenspitze eine Blase entstehen, die auf eine unzureichende Probenahme hinweist (beginnen Sie in diesem Fall von vorne).

### gDNA-Handhabung

- Das Mischen der wiedergewonnenen gDNA wird immer mit einer Pipettenspitze mit weiter Öffnung durchgeführt, um ein Scheren zu vermeiden.
- Wiedergewonnene gDNA sollte niemals eingefroren oder gevortext werden.



- Das Pipettieren der wiedergewonnenen gDNA für eine genaue Probennahme erfolgt immer mit einer Spitze mit Standardöffnung oder einer Direktverdrängerpipette.

### **Eigenschaften hochwertiger gDNA für die Bionano-Kartierung**

- Eine klare gDNA-Lösung ist ideal, aber eine unklare Lösung korreliert nicht immer mit einer schlechten Probenqualität.
- Wiedergewonnene gDNA in Lösung ist viskos.
- Die Anwesenheit von gDNA mit Megabasengröße wird durch Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) gemessen.
- Die wiedergewonnene gDNA ist homogen, gemessen mit dem Qubit-gDNA-Quantifizierungsassay mit CV 0,30.

### **Verwendung des Bionano Prep SP Magnetic Retrievers**

- a. Halten Sie eine Kunststoffhülle an den Seiten nahe der Oberseite und führen Sie den Bionano Prep SP Magnetic Retriever in die Hülle ein. Positionieren Sie ihn so, dass er unten in der Hülle sitzt.
- b. Führen Sie den umhüllten Retriever in das Protein LoBind Mikrozentrifugenröhrchen ein, um die Nanobind Disk an den Retriever in der Ummantelung zu ziehen.
- c. Heben Sie den umhüllten Retriever mit der gebundenen Scheibe vorsichtig aus dem Röhrchen und führen Sie den umhüllten Retriever in ein neues Protein-LoBind-Mikrozentrifugenröhrchen ein.
- d. Halten Sie die Hülle an der Seite in der Nähe des oberen Randes und ziehen Sie den Retriever mit einer Hand nach oben, bis sich die Nanobind Disk von der Hülle löst und in das neue Röhrchen fällt.
- e. Wechseln Sie die Hülle für jede neue Probe.

### **Chargengröße**

Wir empfehlen, bis zu 6 Proben gleichzeitig zu verarbeiten.

### **Sondermüllbeseitigung**

Die Puffer LBB und WB1 enthalten Guanidinhydrochlorid (GuHCl). GuHCl ist gesundheitsschädlich beim Verschlucken oder Einatmen und verursacht Haut- und Augenreizungen. NICHT mit Bleichmittel oder sauren Reagenzien mischen. Flüssige Abfälle, die GuHCl enthalten, sollten vor der Entsorgung in einen gefährlichen Abfallstrom sicher mit einem quartären Ammonium-Desinfektionsmittel dekontaminiert werden. Wir empfehlen Bleichmittel zur Dekontamination des Pelletüberstands und TexQ zur Dekontamination aller mit GuHCl gemischten Lösungen. Dies entspricht den Entsorgungsvorschriften im US-Bundesstaat Kalifornien, kann sich jedoch an Ihrem Standort unterscheiden. Bitte beachten Sie die örtlichen Vorschriften zur Dekontamination und Entsorgung.

## Bionano Prep SP Frisches Humanblut DNA-Isolationsprotokoll v2

### Vorbereitung für die gDNA-Isolierung

#### Vor dem ersten Gebrauch

- Stellen Sie sicher, dass die Schleuderdrehzahl der Mini-Tisch-Mikrozentrifuge 2.200 x g beträgt.
- PMSF zersetzt sich in wässrigen Lösungen schnell. Erstellen Sie Aliquots von 120 µl in 1,5-ml-Schraubdeckelröhrchen und lagern Sie Vorrat und Aliquots bei 4 °C. Jedes Aliquot reicht für zehn gDNA-Isolierungen.
- Fügen Sie 100 % Ethanol zu den Waschpuffern (WB1 und WB2) hinzu und mischen Sie gründlich:
  - 5 ml 100 % Ethanol zu Waschpuffer 1 (WB1) für ein Endvolumen von 8,25 ml hinzufügen.
  - Fügen Sie 7,5 ml 100 % Ethanol zu Waschpuffer 2 (WB2) hinzu, um ein Endvolumen von 12,5 ml zu erhalten.


#### Einrichten

- Sammeln Sie Materialien (siehe Abschnitt „Vom Benutzer bereitgestelltes Material“ oben).
- Bereiten Sie für die Abfallentsorgung vor:
  - Ein konischer 50 ml mit 5 ml Bleichmittel + 20 ml Wasser; zum Mischen mehrmals umdrehen.
  - Ein 50 ml konisches Mittel mit 100 µl TexQ Dekontaminationsmittel pro Probe (als Sondermüll entsorgt).
- Markieren Sie für jede Probe ein 0,5-ml-Protein-LoBind-Röhrchen (Bionano), ein 1,5-ml-Protein-LoBind-Röhrchen (Bionano) und ein 2,0-ml Mikrozentrifugenröhrchen (Bionano).
- Röhrchen mit PMSF und Proteinase K (Bionano) 3-mal zum Mischen umdrehen, kurz pulszentrifugieren. Legen Sie PMSF auf Eis.
- Bereiten Sie einen Streifen Parafilm (~ 2 cm) für HemoCue, fertige Mikroküvetten und [HemoCue-System](#) vor.

### gDNA-Isolierung (3 Stunden)

#### Blut mischen, Erythrozyten lysieren, Leukozyten pelletieren und Überstand entfernen

**Hinweis:** Siehe Video [HemoCue WBC-Zähler-Demo](#) für Anweisungen zum ordnungsgemäßen Betrieb von HemoCue.

1. Entfernen Sie für jede Probe das Blutröhrchen von 4 °C und mischen Sie es 15 Minuten lang bei Raumtemperatur sorgfältig auf der Vari-Mix Teströhrchen Vorrichtung, um eine gute Homogenität zu gewährleisten.
2. Verarbeitung einer Probe nach der anderen:
  - a. Entfernen Sie das Blutröhrchen aus der Vorrichtung und pipettieren Sie sofort 20 µl auf Parafilm und verwenden Sie HemoCue Küvette zur Messung von WBC.
  - b. Notieren Sie den HemoCue-Messwert in der Tabelle auf der nächsten Seite.  
 Wenn die HemoCue-Zahl weniger als 4.500 Zellen/µl beträgt, können Sie die RBC-Lyse nicht in einem einzelnen 1,5-ml-Röhrchen durchführen. Anweisungen zu diesem Szenario finden Sie im Anhang.
  - c. Führen Sie die folgenden Berechnungen durch, um die Tabelle auf der nächsten Seite für jede Probe auszufüllen:
    - Transfervolumen (µl) = 1.500 ÷ HemoCue-Messwert
    - RBC-Lyselösung (µl) = Transfervolumen x 3
    - Entfernungsvolumen (µl) = (Transfervolumen – 40 µl) ÷ 2

- d. Legen Sie das Blutröhrchen wieder auf die Laborwippe und mischen Sie weiter, während Sie weitere Zählungen durchführen oder bevor Sie mit Schritt 3 unten fortfahren.

**Hinweis:** Der HemoCue gibt Messwerte in Zellen/l an, die Berechnung basiert jedoch auf Zellen/ $\mu$ l, um  $1,5 \times 10^6$  Leukozyten zu aliquotieren.

**Berechnung:**  $\mu$ l Blut für 1,5 Millionen Zellen =  $1,5 \times 10^6$  (Zellen)/Leukozytenzahl (Zellen/ $\mu$ l).

- Übertragen Sie das Blutvolumen mit einer auf [Transfer Volume] eingestellten Pipette in das zuvor markierte 1,5 ml Protein LoBind-Röhrchen.
- Geben Sie für jede Blutprobe 3 Volumina RBC-Lyselösung in das Protein-LoBind-Röhrchen, das Blut enthält. Das Röhrchen zum Mischen 10-mal verschließen und umdrehen. Röhrchen 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Nach der Inkubation Röhrchen 10-mal umdrehen, um erneut zu mischen.
- Ausgewogenes Blut-Aliquot für 2 Minuten bei 2.200 xg bei Raumtemperatur zentrifugieren. Untersuchen Sie den Boden des Röhrchens auf WBC-Pellet.

**Hinweis:** Es ist hilfreich, das Röhrchenscharnier an der Außenkante der Zentrifuge auszurichten, damit sich das Pellet immer auf der gleichen Seite befindet.

- Setzen Sie eine 1.000- $\mu$ l-Pipette mit einer extralangen 1.000- $\mu$ l-Spitze ein, um das ursprüngliche Volumen der RBC-Lyselösung aus jedem Röhrchen zu entfernen (vom oberen Ende der Flüssigkeit ansaugen). Sie sollten jetzt ein Volumen haben, das dem Transfervolumen im Röhrchen entspricht.
- Stellen Sie eine 200- $\mu$ l-Pipette auf Entfernungsvolumen ein, um den verbleibenden Überstand mit einer 200- $\mu$ l-Standardspitze in zwei Durchgängen zu entfernen (jedes Mal die Spitzen wechseln und das Pellet nicht stören). Blutüberstand in konisches Bleichmittel pipettieren. Nach beiden Entnahmen sollten sich ca. 40  $\mu$ l Lösung mit dem WBC-Pellet befinden.

**Hinweis:** Das Röhrchen anwinkeln und von der Oberseite des Flüssigkeitsmeniskus auf der dem Pellet gegenüberliegenden Seite sehr langsam ziehen. Wenn das anfängliche Aliquotvolumen  $\leq 240$   $\mu$ l beträgt, entfernen Sie den Überstand in einem Durchgang mit einer 200- $\mu$ l-Spitze. Wenn das anfängliche Aliquotvolumen  $\geq 440$   $\mu$ l beträgt, entfernen Sie den Überstand in drei Durchgängen mit einer 200- $\mu$ l-Spitze. Sobald der Überstand von allen Proben entfernt wurde, können Sie das Bleichmittel enthaltende konische Konus mit Wasser auf 50 ml auffüllen, konisch verschließen, konisch zum Mischen umdrehen und den Inhalt in die Spüle entsorgen.

Proben-ID	HemoCue-Lesung	Transfervolumen	RBC-Lyselösung	Entfernungsvolumen
	Zellen/L	$\mu$ l	$\mu$ l	$\mu$ l
	Zellen/L	$\mu$ l	$\mu$ l	$\mu$ l
	Zellen/L	$\mu$ l	$\mu$ l	$\mu$ l
	Zellen/L	$\mu$ l	$\mu$ l	$\mu$ l
	Zellen/L	$\mu$ l	$\mu$ l	$\mu$ l
	Zellen/L	$\mu$ l	$\mu$ l	$\mu$ l

### **Leukozyten lysieren und verdauen**

8. Geben Sie 50 µl Zellpuffer (Bionano) direkt auf das WBC-Pellet.
9. Fügen Sie 50 µl Proteinase K (Bionano) direkt auf das WBC-Pellet hinzu.
10. Probe 5-mal pipettieren mit 200 µl Standardspitze auf 120 µl eingestellt, um das Pellet zu resuspendieren.

**Hinweis:** Ziehen Sie das gesamte Probenvolumen in die Spitze und überprüfen Sie das Röhrchen während des Mischens visuell, um sicherzustellen, dass das Pellet während des Mischens vollständig resuspendiert wird, sodass am Ende des Mischens kein sichtbares Pellet an der Seite des Röhrchens verbleibt.

11. 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
12. Fügen Sie 225 µl Puffer LBB zu den Proben mit einer 1.000-µl-Spitze hinzu. Das Röhrchen zum Mischen 15-mal verschließen und umdrehen.

**Hinweis:** LBB ist eine viskose und schaumige Lösung, die an der Pipettenspitze haftet. Pipettieren Sie langsam und wechseln Sie die Spitzen zwischen den Vorgängen, um die Genauigkeit des Pipettier Volumens zu gewährleisten.

13. Rotieren Sie die Probe auf dem HulaMixer für 15 Minuten bei Raumtemperatur bei 10 U/min. Kein Schütteln/Vibriieren.
14. Pulszentrifugieren Sie das Röhrchen 2 Sekunden lang, um die Flüssigkeit am Boden des Röhrchens zu sammeln.
15. Geben Sie 10 µl 100 mM PMSF in den flüssigen Teil im Röhrchen. Röhrchen verschließen und zum Mischen 5-mal schwenken, puls-zentrifugieren 2 Sekunden lang das Röhrchen, um die Flüssigkeit am Boden des Röhrchens zu sammeln.
16. 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

### **gDNA binden, waschen und eluieren**

17. Mit einer Pinzette vorsichtig eine einzelne Nanobind Disk auf das Lysat übertragen.

**Hinweis:** Disks können gegebenenfalls zusammenkleben.

18. 340 µl 100 % Isopropanol in alle Röhrchen geben. Die Röhrchen zum Mischen 5-mal verschließen und umdrehen.
19. Rotieren Sie die Probe auf dem HulaMixer für 15 Minuten bei Raumtemperatur bei 10 U/min. Kein Schütteln/Vibriieren.

**Hinweis:** Stellen Sie sicher, dass die Nanobind Disk während der ersten Rotationen nicht im Deckel des Röhrchens verbleibt. Wenn dies der Fall ist, schalten Sie den Rotator aus und drehen Sie das Mikrozentrifugenröhrchen um, bis die Nanobind Disk wieder in die Lösung gelangt. Setzen Sie das Röhrchen auf den HulaMixer und setzen Sie das Mischen fort.

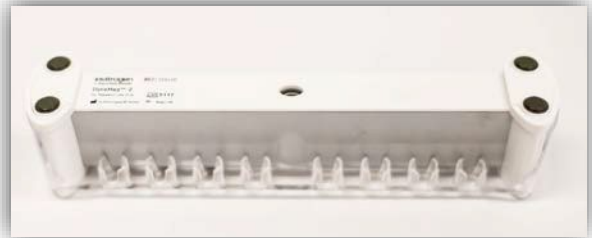
20. Untersuchen Sie die gDNA-Assoziation mit der Nanobind-Disk und drehen Sie sie um, um die Bindung zu erhöhen (siehe [Schulungsvideo](#), 0:25):
  - a. Stellen Sie die Probenröhrchen in ein durchsichtiges Dynamag-Röhrchengestell und überprüfen Sie alle Röhrchen im Gestell visuell, um sicherzustellen, dass die gDNA an die Nanobind Disk gebunden ist.
  - b. Wenn gDNA-Stränge sichtbar tief hängen, kehren Sie schnell um 180 ° um, um die gDNA näher mit der Nanobind Disk zu verbinden.
  - c. 180°-Drehungen können viele Male durchgeführt werden, bis die gDNA-Assoziation mit der Nanobind Disk unverändert erscheint.

21. Kombinieren Sie das transparente Gitter mit der Magnetbasis wie unten beschrieben und stellen Sie sicher, dass die Nanobind-Disk durch den Magneten nahe der Oberkante des Flüssigkeitsspiegels gesichert ist. Falls nicht, dann wiederholen Sie den Vorgang (Siehe [Schulungsvideo](#), 0:50).

a. Drehen Sie das durchsichtige Dynamag-Röhrchengestell um und stellen Sie es auf den Kopf, sodass die Probendeckel die Arbeitsfläche berühren. Die Röhrchen befinden sich in derselben Reihe des Racks und in der Reihe, die am weitesten von Ihnen entfernt ist.



b. Drehen Sie die Dynamag-Magnetbasis um, und senken Sie sie auf das durchsichtige Rack ab.



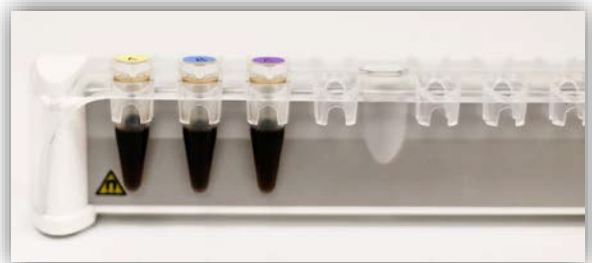
c. Kippen Sie das kombinierte Gerät langsam um 90° zu sich hin, während es weiterhin auf der Oberfläche ruht. Die Röhren sind jetzt horizontal und für Sie sichtbar.




d. Kippen Sie das kombinierte Gerät langsam um 90° zu sich hin, während es weiterhin auf der Oberfläche ruht, sodass es vollständig aufrecht steht und die Rohre zu Ihnen zeigen.




e. Stellen Sie sicher, dass die Nanobind Disk an den Magneten nahe der Oberkante des Flüssigkeitsspiegels gehalten wird.




22. Stellen Sie eine 1.000- $\mu$ l-Pipette auf 1.000  $\mu$ l und eine zweite auf 700  $\mu$ l ein.
23. Entfernen Sie den Überstand wie unten beschrieben, achten Sie darauf, die gDNA nicht anzusaugen (siehe [Schulungsvideo](#), 1:15):
- Winkeln Sie das gesamte Rack in einem 45°-Winkel an, indem Sie es in einer Hand halten (das gesamte Gerät von unten mit den Röhrchen für Sie sichtbar und den Deckeln zur anderen Hand fassen).
  - Warten Sie 2 Sekunden, bis gDNA auf der Nanobind Disk liegt.
  - Entfernen Sie langsam die gesamte Flüssigkeit mit einer 1.000  $\mu$ l extralangen Spitze, die von der Nanobind Disk und/oder der gDNA abgewinkelt ist, um Störungen zu vermeiden.
  - Überstand in konische Form mit TexQ pipettieren.

 Stellen Sie sicher, dass die gDNA nicht entfernt wird, indem Sie die Pufferspitze vor dem Entsorgen visuell überprüfen. Wenn gDNA versehentlich angesaugt wird oder sich von der Disk löst, lesen Sie den Abschnitt zur Fehlerbehebung weiter unten.

24. Führen Sie die WB1-Wäsche durch (siehe [Schulungsvideo](#), 2:21):
- Pipettieren Sie 700  $\mu$ l Puffer WB1 direkt auf die Scheiben in den Röhrchen und Kappenröhrchen.
  - Heben Sie das durchsichtige Röhrchengestell an, um es von der Magnetbasis zu trennen.
  - Drehen Sie das durchsichtige Gestell mit den Röhrchen 4-mal um 180°, um es zu waschen.
  - Stellen Sie das durchsichtige Röhrchengestell und die Röhrchen mit Magnetboden wie in Schritt 21 beschrieben neu ein.
  - Entfernen Sie den Überstand wie in Schritt 23 beschrieben.

 Stellen Sie sicher, dass die gDNA nicht entfernt wird, indem Sie die Pufferspitze vor dem Entsorgen visuell überprüfen. Wenn gDNA versehentlich aspiriert wurde oder sich von der Disk löst, lesen Sie den Abschnitt zur Fehlerbehebung weiter unten.

25. Stellen Sie die zweite Pipette auf 500  $\mu$ l (vorher auf 700  $\mu$ l).
26. Führen Sie die WB2-Wäsche durch (siehe [Schulungsvideo](#), 4:10):
- Pipettieren Sie 500  $\mu$ l Puffer WB2 direkt auf die Scheiben in den Röhrchen und verschließen Sie sie.
  - Heben Sie das durchsichtige Rack an, um es von der Magnetbasis zu trennen.
  - Drehen Sie das durchsichtige Gestell 10-mal um 180°, um es zu waschen.
  - Stellen Sie das durchsichtige Röhrchengestell und die Röhrchen mit Magnetboden wie in Schritt 21 beschrieben neu ein.
  - Entfernen Sie den Überstand wie in Schritt 23 beschrieben.

 Stellen Sie sicher, dass die gDNA nicht entfernt wird, indem Sie die Pufferspitze vor dem Entsorgen visuell überprüfen. Wenn gDNA versehentlich aspiriert wurde oder sich von der Disk löst, lesen Sie den Abschnitt zur Fehlerbehebung weiter unten.

27. Wäsche von WB2 wiederholen, Schritt 26 (Siehe [Schulungsvideo](#), 5:50).

**Hinweis:** Entfernen Sie den Puffer gleichzeitig aus 2 oder 3 Röhrchen und verarbeiten Sie den Puffer-EB-Inkubationsschritt in kleinen Chargen, um ein Austrocknen der Disk/gDNA zu verhindern.



28. Öffnen Sie den Röhrchendeckel vollständig (parallel zum Labortisch) und heben Sie jedes Röhrchen vom Boden ab.
29. In unmittelbarer Nähe eines 0,5-ml-Protein-LoBind-Röhrchens die Nanobind Disk mit dem Bionano Prep SP Magnetic Retriever auf das 0,5-ml-Protein-LoBind-Röhrchen übertragen (siehe Abschnitt „Wichtige Hinweise“ für die richtige Verwendung). Röhrchen verschließen, um das Austrocknen der Disk zu verhindern (siehe [Schulungsvideo](#), 7:30).
30. Drehen Sie das Protein LoBind-Röhrchen in einer Tischmikrozentrifuge für 5 Sekunden.
31. Entfernen Sie alle Flüssigkeitsreste am Boden des Röhrchens mit einer 10 µl-Standardspitze.  
**Hinweis:** Um die Flüssigkeit am Boden des Röhrchens zu erreichen, muss die Nanobind Disk mit der Spitze verschoben werden. Bewegen Sie die Spitze mit kleinen kreisenden Bewegungen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.
32. 65 µl Puffer EB in das Protein LoBind-Röhrchen geben.
33. Drehen Sie das Röhrchen 5 Sekunden lang auf einer Tischmikrozentrifuge.
34. Bewegen Sie die Nanobind Disk mit einer 10 µl Standardspitze vorsichtig zum Boden des Röhrchens und stellen Sie sicher, dass es vollständig in die Flüssigkeit eingetaucht ist. Die Disk sollte parallel zur Bankoberfläche bleiben (siehe [Schulungsvideo](#), 8:20).
35. Inkubieren Sie die eingetauchte Nanobind Disk in Puffer EB bei Raumtemperatur für 20 Minuten.
36. Sammeln Sie extrahierte gDNA, indem Sie das Eluat in ein neues Standard-2,0-ml-Mikrozentrifugenröhrchen mit einem 200 µl übertragen Standardtipp.
37. Drehen Sie das Röhrchen mit der Nanobind Disk auf einer Tischmikrozentrifuge für 5 Sekunden und übertragen Sie das gesamte verbleibende Eluat, das viskose gDNA enthält, in das gleiche Standard-2,0-ml-Mikrozentrifugenröhrchen wie im vorherigen Schritt mit einer Standard-200-µl-Spitze. Sie können die Disk entfernen, bevor Sie den restlichen Elutionspuffer absaugen.  
**Hinweis:** Fast die gesamte viskose gDNA löst sich während des zweiten Pulszentrifugierens von der Nanobind Disk.

## Homogenisierung der gDNA-Lösung (70 Minuten)

### Homogenisierung der gDNA-Lösung

38. Pipettieren Sie das gesamte gDNA-Volumen langsam in eine 200-µl-Standardspitze und geben Sie dann langsam die gDNA ab. Vermeiden Blasen erzeugen.
  - Wiederholen Sie diesen Vorgang 8-mal für insgesamt 9 Hübe (1 Hub = 1 Aufnahme und 1 Abgabe).  
**Hinweis:** Wenn die gDNA-Aufnahme aufgrund der hohen Viskosität zum Stillstand kommt, kann es erforderlich sein, vorsichtig zu rühren, während der Kolben langsam losgelassen wird, um die gDNA zu entnehmen.
39. Platzieren Sie ein Standard 2,0 ml Mikrozentrifugenröhrchen mit gDNA in einem Rack des Hula Mixer Sample Mixer und rotieren Sie bei Raumtemperatur für 1 Stunde bei 15 U/min.  
**Hinweis:** Stellen Sie während der anfänglichen Rotationen sicher, dass die gDNA vom Boden des Mikrozentrifugenröhrchens abgezogen wird, um während der Rotationen im Deckel des Röhrchens zu bleiben. Bleibt die DNA-Lösung auf dem Boden während ersten Rotationen, schalten Sie den Hula-Mixer aus und positionieren Sie das Gittergestell so, dass das Mikrozentrifugenröhrchen auf dem Kopf steht.



Bewegen Sie den Boden des Mikrozentrifugenröhrchens vorsichtig, bis die gDNA in den Deckel gezogen wird, und setzen Sie das Mischen fort.

40. Entfernen Sie das Mikrozentrifugenröhrchen aus dem Rack des Hula-Mixers und drehen Sie das Röhrchen 2 Sekunden lang auf einer Tischmikrozentrifuge, um die gDNA auf den Boden des Röhrchens zu bringen. Lassen Sie die gDNA über Nacht bei Raumtemperatur (25°C) äquilibrieren, um zu homogenisieren.

**Hinweis:** Die meisten Proben werden am dritten Tag (ab Beginn des Protokolls) homogen, aber Proben können markiert werden, sobald sie homogen sind.

## gDNA-Quantifizierung (45 Minuten)

### Qubit-Quantifizierung – BR dsDNA-Assay

Einzelheiten zum Qubit dsDNA BR Assay Kit finden Sie im Benutzerhandbuch des Qubit dsDNA BR Assay Kit; befolgen Sie die im Abschnitt „Pipettieren von viskoser genomischer DNA“ beschriebenen Methoden, um ein genaues Pipettieren von viskoser gDNA zu gewährleisten.

1. Äquilibrieren Sie die Qubit BR Assay Kit Standards auf Raumtemperatur.

**Hinweis:** Wenn die gDNA bei 4 °C gelagert wurde, äquilibrieren Sie bei Raumtemperatur, bevor Sie mit dem nächsten Schritt fortfahren.

2. Qubit BR Puffer zu 0,5 ml Qubit Assay Tubes hinzufügen:

- a. Für jede Probe 18 µl Qubit BR Buffer in drei separate Qubit Assay Tubes geben.
- b. Für die Qubit-Standards 10 µl Qubit BR-Puffer in zwei separate Qubit-Teströhrchen geben.

3. Mischen Sie das gesamte gDNA-Probenvolumen mit einer 200-µl-Pipette mit einer Spitze mit weiter Öffnung vorsichtig durch 5-maliges Auf- und Abpipettieren, wobei darauf zu achten ist, dass keine Blasen entstehen.
4. Verwenden einer frischen Standard-Pipettenspitze oder einer Direktverdränger-Pipettenspitze für jede Entnahme:

2 µl-Aliquots von der linken, mittleren und rechten Seite jeder Probe entfernen und in den BR-Puffer des entsprechenden Qubit-Assay-Röhrchens dispensieren, wobei die Spitze beim Pipettieren gespült wird. Stellen Sie die Teströhrchen in ein schwimmendes Rack und unterziehen Sie es 10 Minuten lang einem Ultraschallbad. Führen Sie die Schritte 5 und 6 während des Ultraschallbads durch.

**Hinweis:** Wenn kein Ultraschallbad verfügbar ist, mindestens 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit vortexen und dann 2 Sekunden lang kurz herunterdrehen.

5. Bereiten Sie die Arbeitslösung vor, indem Sie das Dye Assay Reagent in BR Dilution Buffer (1:200) verdünnen:
  - a. 200 µl Arbeitslösung für jeden der beiden Standards (insgesamt 400 µl).
  - b. 200 µl Arbeitslösung für jedes Probenaliquot (600 µl für jede Probe).
6. Für die Qubit-DNA-Standards 10 µl der Standards 1 und 2 in die Assay-Röhrchen mit BR-Puffer aus Schritt 2b geben.
7. Sobald das Ultraschallbad abgeschlossen ist, entnehmen Sie die Teströhrchen und pulscentrifugieren Sie sie kurz. Röhrchen 5 Sekunden lang bei maximaler Geschwindigkeit vortexen, dann erneut pulscentrifugieren.

8. 180 µl Arbeitslösung zu jedem beschallten DNA-Aliquot und Qubit-DNA-Standard-Aliquot hinzufügen. 5 Sekunden vortexen und Röhrchen pulscentrifugieren.
9. Proben mindestens 2 Minuten inkubieren, dann auf dem Qubit Fluorometer ablesen.
10. Der Variationskoeffizient (CV = Standardabweichung/Mittelwert) von drei Messwerten sollte < 0,30 betragen.

**Hinweis:** Wenn CV > 0,30, pipettieren Sie das gesamte gDNA-Volumen vorsichtig mit fünf Hüben (1 Hub = 1 Aufwärtshub) + 1 Abwärtshub) mit einer Spitze mit weiter Öffnung. Lassen Sie die gDNA mindestens über Nacht bei Raumtemperatur ruhen, bevor Sie die Quantifizierung wiederholen.

**Hinweis:** Typische DNA-Konzentrationen reichen von 45-90 ng/ul.

Proben-ID	Links (ng/µl)	Mitte (ng/µl)	Rechts (ng/µl)	CV (stdev/mean)

### **Markierung**

DNA ist bereit für Direct Label and Stain (DLS)-Markierung. Siehe Abschnitt „Kits und Verbrauchsmaterialien“ unter <https://bionanogenomics.com/support/> für anwendbare Kits und Protokolle.

## Fehlerbehebung

---

Siehe [Schulungsvideo](#) ab 8:40 Videoerklärungen zur Fehlerbehebung.

### Die gDNA kommt ungebunden von der Nanobind Disk.

**Beweis:** gDNA wird während der Bindung oder während des Waschens aspiriert oder von der Scheibe abgelöst.

Schritte, die zu befolgen sind, wenn eine Probe angesaugt wird:

1. Lassen Sie das Probenröhrchen auf dem Magneten und pipettieren Sie gDNA-haltige Flüssigkeit zurück in das Röhrchen mit der Scheibe.
2. Entfernen Sie das Rack-Röhrchen vom Magneten und drehen Sie das Rack mehrmals von Hand um, um die Bindung wiederherzustellen. Alternativ:
  1. Lassen Sie das Probenröhrchen auf dem Magneten und pipettieren Sie gDNA-haltige Flüssigkeit zurück in das Röhrchen mit der Scheibe.
  2. Flüssigkeit aus dem Röhrchen so absaugen, dass ein minimales Volumen (~50 µl) über ungebundener gDNA verbleibt und den Überstand verwerfen, wobei die DNA in einem minimalen Volumen am Boden des Röhrchens verbleibt.
  3. Aspirieren Sie vorsichtig ungebundene gDNA, die die minimale Flüssigkeit enthält, in die Pipettenspitze und pipettieren Sie sie direkt auf eine Magnetscheibe, um die Bindung wiederherzustellen.

### Die gDNA ist vor der Markierung nicht homogen.

**Beweis:** Der gDNA-Quantifizierungs-VK von drei Messungen (oben, Mitte und unten) ist > 0,30.

Zu befolgende Schritte:

1. Probe mit einer Spitze mit weiter Öffnung insgesamt 5-mal ansaugen und pipettieren.
2. Inkubieren Sie die gDNA bei Raumtemperatur für 1 bis 3 Tage.
3. Nach der Inkubation die Probe erneut ansaugen und 5-mal mit einer Spitze mit weiter Öffnung pipettieren.
4. Quantifizieren Sie mit dem Qubit BR Assay.

### Die gDNA ist nicht viskos.

**Nachweis:** Die Probenkonsistenz ist sehr dünn und lässt sich leicht pipettieren, aber die Konzentration beträgt > 35 ng/µL.

Die Probe weist wahrscheinlich keine gDNA mit hohem Molekulargewicht auf.

Überprüfen Sie die Probe vor dem Markieren mit Pulsfeld-Gelelektrophorese, um das Vorhandensein von gDNA mit hohem Molekulargewicht zu bestätigen.

Bewerten Sie die Probenvorbereitungsmethode und die Qualität/das Alter des Eingangsmaterials und wiederholen Sie die DNA-Isolierung aus der biologischen Probe.

## Anhang

### Hemocue-Zahl < 4.500 und > 2.800 WBC/ $\mu$ l

#### Blut mischen, Leukozyten lysieren

1. Berechnen Sie für niedrige HemoCue-Messwerte (< 4.500 Zellen/ $\mu$ l) die zu übertragende Blutmenge für 1,5 Millionen WBC:
  - a.  $1.500 \div \text{HemoCue-Anzeige} = \text{Transfervolumen in } \mu\text{l} (\mu\text{l für } 1,5 \times 10^6 \text{ Zellen}) \div 2 = \text{Transfervolumen in } \mu\text{l}$   
**Hinweis:** Der HemoCue gibt Messwerte in Zellen/l an, obwohl die Berechnung auf Zellen/ $\mu$ l basiert.  $\mu\text{l Blut für } 1,5 \text{ Millionen Zellen} = 1,5 \times 10^6 / \text{HemoCue (Zellen}/\mu\text{l})$ .
  - b. Bestimmen Sie die benötigte Menge der RBC-Lyselösung:
    - (Transfervolumen in  $\mu$ l aus Schritt 1a)  $\times 3 =$  Volumen der RBC-Lyselösung in  $\mu$ l
  - c. Legen Sie das Blutröhrchen wieder auf die Laborwippe und mischen Sie weiter, während Sie weitere Zählungen durchführen oder bevor Sie mit Schritt 2 unten fortfahren.

Proben-ID	HemoCue-Lesung	Transfervolumen (Schritt 1a)	RBC-Lyselösung Hinzufügen (Schritt 1b)	Entfernungsvolumen (Schritt 5)
	Zellen/L	$\mu$ l	$\mu$ l	$\mu$ l
	Zellen/L	$\mu$ l	$\mu$ l	$\mu$ l
	Zellen/L	$\mu$ l	$\mu$ l	$\mu$ l
	Zellen/L	$\mu$ l	$\mu$ l	$\mu$ l
	Zellen/L	$\mu$ l	$\mu$ l	$\mu$ l
	Zellen/L	$\mu$ l	$\mu$ l	$\mu$ l

2. Verarbeiten Sie jeweils eine Probe und übertragen Sie die gleichen Blutvolumina (die zusammen 1,5 Millionen Zellen entsprechen), wie in Schritt 1a oben berechnet, in jedes der zwei 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen.
3. Geben Sie 3 Volumina RBC-Lyselösung (wie in Schritt 1b oben berechnet) in jedes der beiden 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen mit denselben Blutvolumina. Die Röhrchen zum Mischen 10-mal verschließen und umdrehen. Röhrchen 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Röhrchen zum Mischen 10-mal umdrehen.
4. Röhrchen 2 Minuten lang bei 2.200 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren. Untersuchen Sie den Boden der Röhrchen auf WBC-Pellets. **Hinweis:** Es ist hilfreich, das Röhrchenscharnier an der Außenkante der Zentrifuge auszurichten, damit sich das Pellet immer auf der gleichen Seite befindet.
5. Setzen Sie eine 1.000- $\mu$ l-Pipette mit einer extralangen 1.000- $\mu$ l-Spitze ein, um das Volumen der RBC-Lyselösung (berechnet in Schritt 1b oben) aus jedem Röhrchen zu entfernen.
6. Stellen Sie eine 200- $\mu$ l-Pipette ein, um den verbleibenden Überstand mit einer 200- $\mu$ l-Standardspitze in zwei Durchgängen zu entfernen (jedes Mal die Spitzen wechseln und das Pellet nicht stören).  
Blutüberstand in konisches Bleichmittel pipettieren:
  - Pipetteneinstellung = (Transfervolumen in  $\mu$ l aus Schritt 1a – 40  $\mu$ l)  $\div 2$

**Hinweis:** Das Röhrchen anwinkeln und von der Oberseite des Flüssigkeitsmeniskus auf der dem Pellet gegenüberliegenden Seite sehr langsam ziehen.

### **Leukozyten lysieren und verdauen**

7. Geben Sie 25  $\mu$ l Zellpuffer direkt auf jedes WBC-Pellet. Pellet in einem Röhrchen durch 5-maliges Mischen mit einer 200- $\mu$ l-Standardspitze mit einer Pipette von 35  $\mu$ l resuspendieren. Übertragen Sie dann das gesamte resuspendierte Pelletvolumen aus diesem Röhrchen in ein Protein-LoBind-Röhrchen. Resuspendieren Sie das zweite Pellet für die Probe auf dieselbe Weise und übertragen Sie dann das gesamte Volumen in dasselbe Protein-LoBind-Röhrchen wie das erste resuspendierte Pellet. Geben Sie 50  $\mu$ l Proteinase K (Bionano) in das Protein-LoBind-Röhrchen, das gepoolte resuspendierte WBC für die Probe enthält.
8. Mischen Sie die Probe 10-mal mit einer 200- $\mu$ l-Spitze mit weiter Öffnung, die auf 120  $\mu$ l eingestellt ist, um resuspendierte WBC mit Proteinase K zu mischen.
9. Fahren Sie mit Schritt 11 auf Seite 12 fort und fahren Sie mit dem Rest des Protokolls fort.

## Technische Unterstützung

---

Für technische Unterstützung wenden Sie sich an den technischen Support von Bionano Genomics.

Sie können die Dokumentation zu Bionano-Produkten, Sicherheitsdatenblätter, Analysenzertifikate, häufig gestellte Fragen und andere zugehörige Dokumente von der Support-Website oder auf Anfrage per E-Mail und Telefon abrufen.

Typ	Kontakt
E-Mail	<a href="mailto:support@bionanogenomics.com">support@bionanogenomics.com</a>
Telefon	Öffnungszeiten:  Montag bis Freitag, 9:00 bis 17:00 Uhr, PST USA: +1  (858) 888-7663
Webseite	<a href="http://www.bionanogenomics.com/support">www.bionanogenomics.com/support</a>