



Protocollo di Isolamento del DNA del Sangue Umano Fresco Bionano Prep SP v2

Numero documento: 30397

Revisione documento: A

Sommario

Avviso legale	3
Cronologia delle revisioni.....	4
Panoramica del flusso di lavoro	5
Kit di isolamento del DNA Bionano Prep SP e materiali forniti dall'utente	6
Contenuto del kit di isolamento del DNA delle cellule e del sangue Bionano Prep SP v2 (N. codice 80042, 10 preparazioni)	6
Materiali forniti dall'utente.....	6
Introduzione e note importanti.....	7
Introduzione	7
Panoramica.....	7
Note importanti.....	8
Protocollo di Isolamento del DNA del Sangue Umano Fresco Bionano Prep SP v2.....	10
Preparazione per l'isolamento del gDNA.....	10
Isolamento gDNA (3 ore).....	10
Omogeneizzazione della soluzione di gDNA (70 minuti)	15
Quantificazione del gDNA (45 minuti).....	16
Risoluzione dei problemi.....	18
Il gDNA non viene legato dal Nanobind Disk.	18
Il gDNA non è omogeneo prima dell'etichettatura.....	18
Il gDNA non è viscoso.	18
Appendice.....	19
Conteggi emocui < 4.500 e > 2.800 GB/ μ l.....	19
Assistenza tecnica	21

Avviso legale

Solo per uso di ricerca. Non per l'uso in procedure diagnostiche.

Questo materiale è protetto dalla legge sul copyright e dai trattati internazionali degli Stati Uniti. L'uso non autorizzato di questo materiale è vietato. Nessuna parte della pubblicazione può essere copiata, riprodotta, distribuita, tradotta, decodificata o trasmessa in qualsiasi forma o con qualsiasi mezzo o con qualsiasi mezzo, ora noto o sconosciuto, senza l'espressa autorizzazione scritta di Bionano Genomics. La copia, secondo la legge, include la traduzione in un'altra lingua o formato. I dati tecnici qui contenuti sono destinati alle destinazioni finali consentite dalla legge statunitense. Divieto di diversione contraria alla legge degli Stati Uniti. Questa pubblicazione rappresenta le ultime informazioni disponibili al momento del rilascio. A causa dei continui sforzi per migliorare il prodotto, potrebbero verificarsi modifiche tecniche che non sono riportate in questo documento. Bionano Genomics si riserva il diritto di apportare modifiche alle specifiche e ad altre informazioni contenute in questa pubblicazione in qualsiasi momento e senza preavviso. Si prega di contattare il supporto clienti di Bionano Genomics per le ultime informazioni.

BIONANO GENOMICS DECLINA OGNI GARANZIA RELATIVA AL PRESENTE DOCUMENTO, ESPRESSA O IMPLICITA, COMPRESE MA NON LIMITATE A QUELLE DI COMMERCIALIZZABILITÀ O IDONEITÀ PER UN PARTICOLARE SCOPO. NELLA MISURA MASSIMA CONSENTITA DALLA LEGGE, IN NESSUN CASO BIONANO GENOMICS SARÀ RESPONSABILE, SIA PER CONTRATTO, ILLECITO, GARANZIA O PER STATUTO O SU QUALSIASI ALTRA BASE PER DANNI SPECIALI, ACCIDENTALI, INDIRETTI, PUNITIVI, MULTIPLI O CONSEGUENZIALI IN RELAZIONE CON O DERIVANTI DAL PRESENTE DOCUMENTO, COMPRESO MA NON LIMITATO ALL'USO DELLO STESSO, SIA O NON PREVEDIBILE E SE BIONANO GENOMICS SIA AVVISATA O NO DELLA POSSIBILITÀ DI TALI DANNI.

Brevetti

I prodotti Bionano Genomics® possono essere coperti da uno o più brevetti statunitensi o esteri.

Marchi di Fabbrica

Il logo Bionano Genomics e i nomi dei prodotti o servizi Bionano Genomics sono marchi registrati o marchi di proprietà di Bionano Genomics negli Stati Uniti e in alcuni altri paesi.

Bionano Genomics®, Irys®, IrysView®, IrysChip®, IrysPrep®, IrysSolve®, Saphyr®, Saphyr Chip®, Bionano Access, e Bionano EnFocus™ sono marchi di Bionano Genomics, Inc. Tutti gli altri marchi sono di proprietà esclusiva dei rispettivi proprietari.

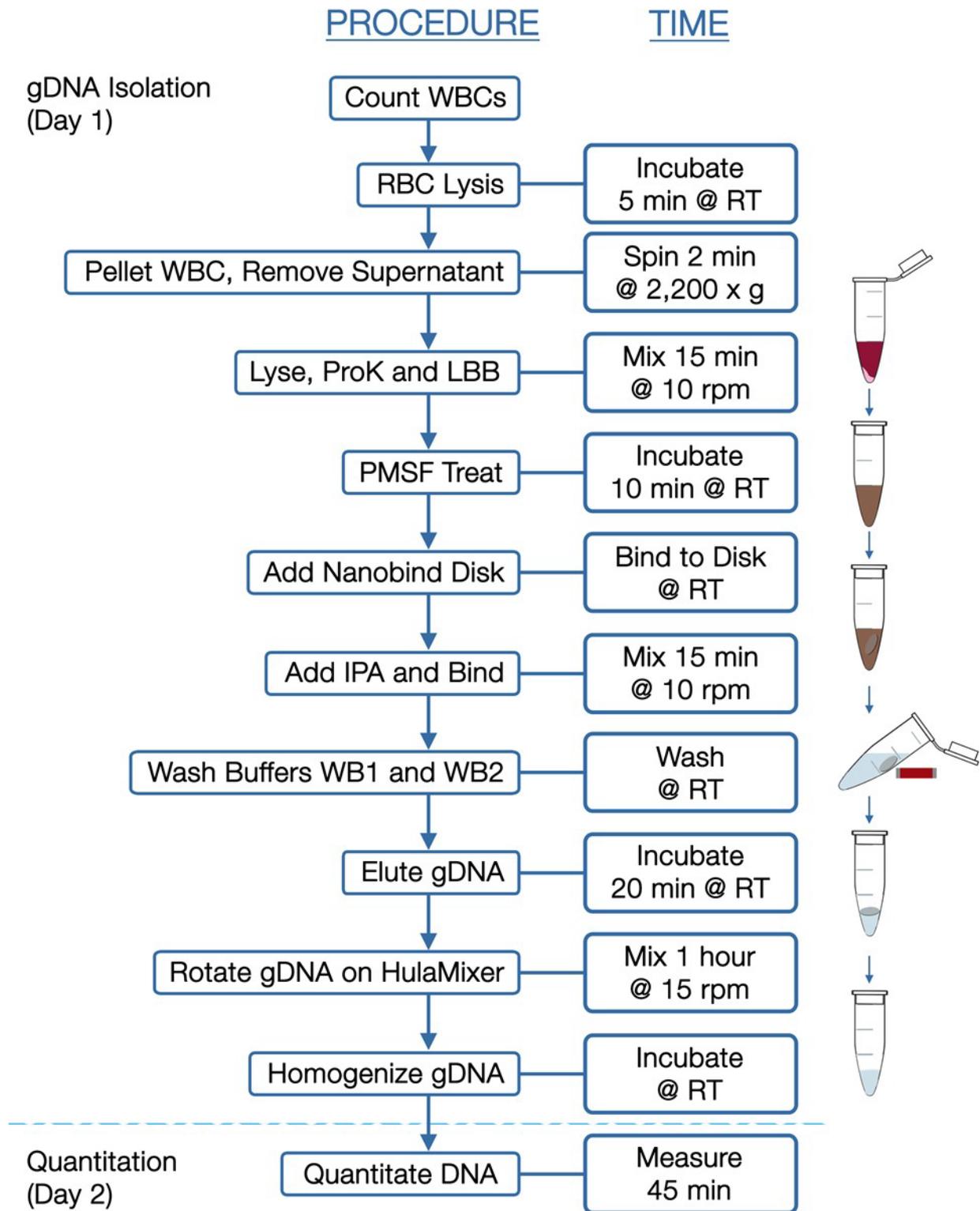
Nessuna licenza per l'uso di marchi di Bionano Genomics è data o implicita. Gli utenti non sono autorizzati a utilizzare questi marchi senza il previo consenso scritto di Bionano Genomics. L'uso di questi marchi o di qualsiasi altro materiale, ad eccezione di quanto consentito nel presente documento, è espressamente vietato e potrebbe violare le leggi federali o altre leggi applicabili.

© Copyright 2022 Bionano Genomics, Inc. Tutti i diritti riservati.

Cronologia delle revisioni

Revisione	Data di rilascio	Note
A	04.15.2022	Versione iniziale. Tradotto in italiano

Panoramica del flusso di lavoro



Kit di isolamento del DNA Bionano Prep SP e materiali forniti dall'utente

Contenuto del kit di isolamento del DNA delle cellule e del sangue Bionano Prep SP v2 (N. codice 80042, 10 preparazioni)

Articolo	Quantità	Numero di parte	Stoccaggio
Nanobind Disk da 4 mm	10 dischi	20402	Temperatura ambiente (18-25°C)
Provette per microcentrifuga Protein LoBind, 1,5 ml	10 tubi	20422	Temperatura ambiente (18-25°C)
Provette per microcentrifuga Protein LoBind, 0,5 ml	10 tubi	20421	Temperatura ambiente (18-25°C)
Enzima RNasi A**	200 microlitri	20373	Refrigerare (4°C)
Stabilizzatore del DNA**	350 µl	20423	Temperatura ambiente (18-25°C)
Provette per microcentrifuga standard, 2,0 ml	10 tubi	20396	Temperatura ambiente (18-25°C)
Buffer cellulare	50 ml	20374	Temperatura ambiente (18-25°C)
Enzima della proteinasi K	0,5 ml	20372	Temperatura ambiente (18-25°C)
Lisi e tampone di legame (LBB)*	2,5 ml	20375	Temperatura ambiente (18-25°C)
Tampone di lavaggio 1 concentrato (2,5X) (WB1)*	3,25 ml	20376	Temperatura ambiente (18-25°C)
Tampone di lavaggio 2 concentrato (2,5X) (WB2)	5 ml	20377	Temperatura ambiente (18-25°C)
Tampone di eluizione (EB)	1,1 ml	20378	Temperatura ambiente (18-25°C)
Guaina in plastica per il recupero del disco magnetico	10	20381	Temperatura ambiente (18-25°C)

*Vedere la sezione Note importanti per informazioni sui rifiuti pericolosi.

**Non utilizzato in questo protocollo.

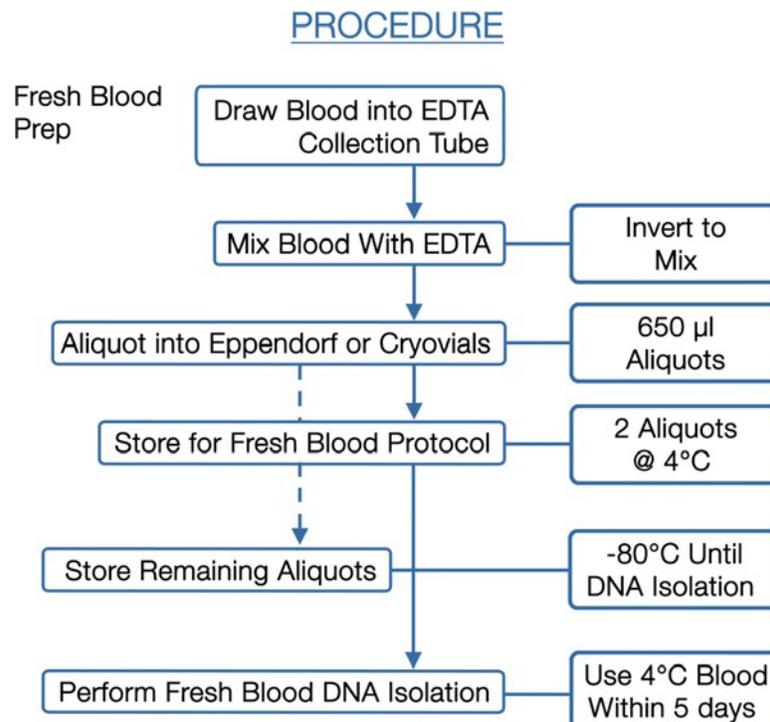
Materiali forniti dall'utente

Articolo	Fornitore	Catalogo num.
Giorno 1 – Pellettatura, isolamento del gDNA e omogeneizzazione		
Bionano Prep SP Magnetic Retriever (confezione da 2)	Bionano Genomics	80031
Analizzatore di globuli bianchi HemoCue	Distributore Fisher Scientific (per gli Stati Uniti) (al di fuori degli Stati Uniti)	22-601-017
Microcuvette HemoCue	Fisher Scientific	22-601-018
Bilanciere per provette Vari-Mix	Thermo Fisher o equivalente	M48725Q
Portaprovette magnetico DynaMag-2	Thermo Fisher	12321D
HulaMixer Sample Mixer	Thermo Fisher	15920D
Provette per microcentrifuga, 1,5 ml, prive di nucleasi	VWR	87003-294
Soluzione per la lisi dei globuli rossi	Qiagen	158902
Soluzione di fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), 100 mM	Sigma-Aldrich	93482
Etanolo, 200 prove, grado di biologia molecolare	Sigma-Aldrich	E7023
Isopropanolo (IPA), ≥ 99,5%, grado di biologia molecolare	Fisher Scientific	A461-212
Concentrato disinfettante, TexQ TX651	Texwipe	TX651
Candeggina per lo smaltimento del sangue	Fornitore di laboratorio generale	
Provette coniche per centrifuga, 50 ml, PP	Thermo Fisher o equivalente	14-432-22
Centrifuga con rotore per provette da 1,5 ml (2.200 xg spin)	Fornitore di laboratorio generale	
Secchiello per il ghiaccio e ghiaccio	Fornitore di laboratorio generale	
Pipette monouso sterili da 5 e 10 ml (TD+)	Fornitore di laboratorio generale	
Mini microcentrifuga da banco (2.200 spin xg)	Labnet	C1301B
Pinze a punta	Scienze della microscopia elettronica o equivalenti	78141-01
Puntali per pipette a foro largo, filtrati, aerosol, 200 µl	Equivalente VWR o Rainin	46620-642
Puntali extra lunghi da 1.000 µl, sterili	Equivalente VWR o Rainin	16466-008
Pipette (10, 20, 200 e 1.000 µl) e Puntali per pipette filtrati e privi di nucleasi	Fornitore di laboratorio generale	
Parafilm	Fornitore di laboratorio generale	
Giorno 2 - Quantificazione		
Vortex da banco	Fornitore di laboratorio generale	
Sonicatore da bagno (consigliato)	Branson o equivalente	CPX 952-119R
Tubo Conico da 15 ml	Fisher Scientific	05-539-12
Fluorometro, Qubit	Thermo Fisher o equivalente	Q33216
Kit di analisi del dsDNA Qubit® BR (ampia gamma)	Thermo Fisher o equivalente	Q32853
Tubi per test Qubit	Thermo Fisher	Q32856
Pipetta a spostamento positivo MR-10 (opzionale)	Rainin o equivalente	17008575
Puntali per pipette, 10 µl, C-10 per pos. Displ. Pipetta (opzionale)	Rainin o equivalente	17008604

Introduzione e note importanti

Introduzione

Questo Protocollo di Isolamento del DNA del Sangue Umano Fresco Bionano Prep SP v2 può fornire gDNA ad altissimo peso molecolare (UHMW) in meno di 4 ore. Utilizza una procedura di lisi, legame, lavaggio ed eluizione comune per le tecnologie di estrazione del gDNA a base di silice in combinazione con un nuovo disco paramagnetico. A differenza delle sfere magnetiche e delle colonne spin di silice, che tagliano il gDNA di grandi dimensioni, il Nanobind Disk si lega e rilascia il gDNA con una frammentazione significativamente inferiore, con conseguente gDNA UHMW. L'elevata capacità di legame del gDNA è il risultato di una nuova silice nanostrutturata all'esterno del disco paramagnetico termoplastico. Questo protocollo è stato testato utilizzando sangue umano prelevato in provette EDTA conservate a 4°C e processate entro 4 giorni dalla data di prelievo. Per ottenere i migliori risultati, si consiglia di conservare il sangue a 4°C per non più di 5 giorni dopo la raccolta prima dell'elaborazione. In alternativa, i campioni di sangue sono stabili se mantenuti a temperatura ambiente (22-25°C) fino a 66 ore, di cui fino a 6 ore a temperatura elevata (30-40°C). La conservazione dei campioni di sangue a temperatura ambiente oltre le 66 ore o l'esposizione prolungata (> 6 ore) a temperature elevate può portare a una riduzione della lunghezza della molecola di gDNA e alla compromissione dei risultati del test. Il gDNA preparato utilizzando questo protocollo è stato convalidato solo con l'etichettatura DLS. Vedere [Video di formazione](#) per passaggi tecnicamente critici e risoluzione dei problemi; i passaggi menzionati nel video corrispondono al protocollo Frozen Blood, ma sono gli stessi processi di qui.



Panoramica

La lisi cellulare e la digestione della proteinasi K avvengono in un tampone caotropico e il gDNA rilasciato si lega al Nanobind Disk dopo l'aggiunta di isopropanolo. Dopo tre fasi di lavaggio, il disco viene trasferito in una nuova provetta e il gDNA viene eluito dal disco. Il gDNA UHMW recuperato viene sottoposto a taglio limitato per rendere il gDNA UHMW più omogeneo. Il gDNA viene quindi miscelato ed equilibrato durante la notte a

temperatura ambiente per facilitare l'omogeneità del DNA e viene determinata la concentrazione. Il tipico intervallo di dimensioni del gDNA va da 50 Kbp a ≥ 1 Mbp.

Note importanti

Omogeneità del DNA

Il gDNA recuperato viene sottoposto a miscelazione tramite pipetta con un puntale standard da 200 μ l per aumentare l'omogeneità, garantendo un campionamento coerente del DNA per l'etichettatura.

Quantificazione del gDNA

La quantificazione del gDNA viene utilizzata per misurare la concentrazione e funge da indicatore dell'omogeneità del gDNA UHMW. La quantificazione Qubit è preferita rispetto ad altri metodi di quantificazione poiché può essere utilizzata anche per misurare la concentrazione di gDNA della reazione di etichettatura. Il saggio dsDNA Qubit Broad Range (BR) misura la concentrazione di gDNA dopo l'isolamento, mentre il saggio dsDNA ad alta sensibilità (HS) misura la concentrazione di gDNA dopo l'etichettatura.

Per misurare l'omogeneità del gDNA, è essenziale misurare la concentrazione di gDNA in più posizioni nella soluzione. Poiché il gDNA viscoso è difficile da pipettare, seguire le linee guida nelle Note importanti per un pipettaggio accurato. I saggi standard per la quantificazione della concentrazione di gDNA non forniranno misurazioni accurate del gDNA lungo a causa della sua natura viscosa.

- Per una quantificazione accurata è necessaria un'efficace frammentazione del gDNA campionato tramite sonicazione o vortex su vasta scala.
- Il coefficiente di variazione (CV) da tre campionamenti univoci deve essere inferiore o uguale a 0,30.
- La concentrazione tipica di gDNA è 45-90 ng/ μ l.

Pipettaggio di DNA genomico viscoso (gDNA)

Per prelevare gDNA viscoso, tenere il tubo di scorta per una visualizzazione ravvicinata, premere lo stantuffo della pipetta fino al primo arresto, immergere la punta della pipetta e rilasciare lentamente e con cautela lo stantuffo per iniziare a prelevare il gDNA viscoso nella punta monitorando attentamente l'assorbimento. Tenere la punta sommersa anche dopo che la soluzione viscosa smette di muoversi verso l'alto e si livella. Aspettare. Il gDNA viscoso può richiedere alcuni secondi per riempire fino a 2 μ l. Rilasciare lo stantuffo troppo velocemente può produrre una bolla nella punta che porta a un sottocampionamento (se ciò si verifica ricominciare da capo). Dopo che la soluzione nella punta si è livellata e mentre la punta è ancora immersa nella soluzione di gDNA, raschiare la punta contro il fondo del tubo 3-5 volte con un movimento circolare. Rimuovere la punta dalla soluzione di gDNA e ispezionare visivamente per confermare che sia riempita a 2 μ l. Rimuovere la punta della pipetta dalla soluzione di gDNA troppo presto o raschiare in modo inefficace la punta per rompere i filamenti di gDNA dalla punta, può produrre una bolla sulla punta della punta della pipetta che indica il sottocampionamento (ricominciare se ciò accade).

Gestione del gDNA

- La miscelazione del gDNA recuperato viene sempre eseguita con una punta di pipetta a foro largo per evitare il taglio.
- Il gDNA recuperato non deve mai essere congelato o vortexato.
- Il pipettaggio del gDNA recuperato per un campionamento accurato viene sempre eseguito con un puntale standard o una pipetta a spostamento positivo.

Caratteristiche del gDNA di alta qualità per la mappatura di Bionano

- Una soluzione di gDNA chiara è l'ideale, ma una soluzione poco chiara non è sempre correlata a una scarsa qualità del campione.
- Il gDNA recuperato in soluzione è viscoso.
- La presenza di gDNA di dimensioni megabase viene misurata mediante elettroforesi su gel in campo pulsato (PFGE).
- Il gDNA recuperato è omogeneo come misurato con il test di quantificazione del gDNA Qubit con $CV \leq 0,30$.

Utilizzo del Bionano Prep SP Magnetic Retriever

- a. Tenere una guaina di plastica sui lati vicino alla parte superiore e inserire il Bionano Prep SP Magnetic Retriever nella guaina, posizionandolo in modo che si trovi nella parte inferiore della protezione.
- b. Inserire il retriever inguainato nella provetta per microcentrifuga Protein LoBind per attirare il Nanobind Disk verso il retriever nella protezione.
- c. Sollevare con cautela il retriever inguainato con il disco legato fuori dal tubo e inserire il retriever inguainato in una nuova provetta per microcentrifuga Protein LoBind.
- d. Tenendo la guaina sul lato vicino alla parte superiore, con una mano tirare il retriever fino a quando il Nanobind Disk si dissocia dalla guaina e cade nel nuovo tubo.
- e. Cambio guaina per ogni nuovo campione.

Dimensione del lotto

Si consiglia di elaborare fino a 6 campioni alla volta.

Smaltimento dei rifiuti pericolosi

I tamponi LBB e WB1 contengono guanidina cloridrato (GuHCl). GuHCl è nocivo se ingerito o inalato e provoca irritazione della pelle e degli occhi. NON mescolare con candeggina o reagenti acidi. I rifiuti liquidi contenenti GuHCl devono essere decontaminati in sicurezza con un disinfettante a base di ammonio quaternario prima dello smaltimento in un flusso di rifiuti pericolosi. Consigliamo la candeggina per la decontaminazione del surnatante del pellet e TexQ per la decontaminazione di tutte le soluzioni miscelate con GuHCl. Questo è conforme ai requisiti di smaltimento nello stato della California, Stati Uniti, ma potrebbe essere diverso per la tua posizione. Consultare i requisiti locali per la decontaminazione e lo smaltimento.

Protocollo di Isolamento del DNA del Sangue Umano Fresco Bionano Prep SP v2

Preparazione per l'isolamento del gDNA

Prima del primo utilizzo

- Verificare che la velocità di centrifuga della mini microcentrifuga da banco sia di 2.200 x g.
- Il PMSF si decompone rapidamente in soluzioni acquose. Creare aliquote di 120 microlitri in provette con tappo a vite da 1,5 ml e conservare le scorte e le aliquote a 4°C. Ogni aliquota sarà sufficiente per dieci isolamenti di gDNA.
- Aggiungere il 100% di etanolo ai tamponi di lavaggio (WB1 e WB2) e mescolare accuratamente:
 - Aggiungere 5 ml di etanolo al 100% al tampone di lavaggio 1 (WB1) per un volume finale di 8,25 ml.
 - Aggiungere 7,5 ml di etanolo al 100% al tampone di lavaggio 2 (WB2) per un volume finale di 12,5 ml.

Impostazione

- Raccogliere i materiali (vedere la sezione "Materiale fornito dall'utente" sopra).
- Per lo smaltimento dei rifiuti, preparare:
 - Una conica da 50 ml con 5 ml di candeggina + 20 ml di acqua; capovolgere più volte per mescolare.
 - Un cono da 50 ml con 100 µl di decontaminante TexQ per campione (smaltito come rifiuto pericoloso).
- Per ogni campione, etichettare una provetta per proteine LoBind da 0,5 ml (Bionano), una provetta per proteine LoBind da 1,5 ml (Bionano) e una provetta per microcentrifuga da 2,0 ml (Bionano).
- Capovolgere le provette di PMSF e Proteinasi K (Bionano) tre volte per miscelare, girare brevemente a impulsi. Metti PMSF sul ghiaccio.
- Preparare una striscia di Parafilm (~2 cm) per HemoCue, micro cuvette pronte e [sistema HemoCue](#).

Isolamento gDNA (3 ore)

Mescolare sangue, lisare globuli rossi, globuli bianchi in pellet e rimuovere il surnatante

Nota: vedere il video [Demo contatore globuli bianchi HemoCue](#) per istruzioni sul corretto funzionamento di HemoCue.

1. Per ogni campione, rimuovere la provetta di sangue da 4°C e miscelare accuratamente su Vari-Mix Test Tube Rocker per 15 minuti a temperatura ambiente per garantire una buona uniformità.
2. Elaborazione di un campione alla volta:
 - a. Rimuovere la provetta di sangue dal bilanciario e dispensare immediatamente 20 µl su Parafilm e utilizzare la cuvetta HemoCue per misurare i globuli bianchi.
 - b. Registrare la lettura di HemoCue nella tabella nella pagina successiva.
 Se il conteggio di HemoCue è inferiore a 4.500 cellule/µl non sarà possibile eseguire la lisi dei globuli rossi in una singola provetta da 1,5 ml. Vedere l'Appendice per le istruzioni in questo scenario.
 - c. Eseguire i seguenti calcoli per compilare la tabella nella pagina successiva per ogni campione:
 - Volume da trasferire (µl) = 1.500 ÷ Lettura con HemoCue
 - Soluzione di lisi RBC (µl) = Volume di trasferimento x 3
 - Volume di rimozione (µl) = (Volume da trasferire – 40 µl) ÷ 2

- d. Riposizionare la provetta del sangue sull'attuatore e continuare a miscelare mentre si completano i conteggi aggiuntivi o prima di continuare con il passaggio 3 di seguito.

Nota: l'HemoCue fornisce letture in cellule/L, ma il calcolo si basa su cellule/ μ l per aliquota $1,5 \times 10^6$ globuli bianchi.

Calcolo: μ l di sangue per 1,5 milioni di cellule = $1,5 \times 10^6$ (cellule)/conta leucocitaria (cellule/ μ l).

- Utilizzando una pipetta impostata su [Volume di trasferimento], trasferire il volume di sangue nella provetta Protein LoBind da 1,5 ml precedentemente etichettata.
- Per ogni campione di sangue, aggiungere 3 volumi di RBC Lysis Solution alla provetta Protein LoBind contenente il sangue. Tappare e capovolgere la provetta 10 volte per mescolare. Incubare la provetta a temperatura ambiente per 5 minuti. Dopo l'incubazione, capovolgere la provetta 10 volte per mescolare nuovamente.
- Spin aliquota di sangue bilanciata per 2 minuti a 2.200 xg a temperatura ambiente. Ispezionare il fondo della provetta per il pellet WBC.

Nota: è utile allineare la cerniera del tubo al bordo esterno della centrifuga, in modo che il pellet sia sempre localizzato sullo stesso lato.

- Impostare una pipetta da 1.000 μ l con un puntale extra lungo da 1.000 μ l per rimuovere il volume originale di soluzione di lisi RBC da ciascuna provetta (aspirare dalla parte superiore del liquido). Ora dovresti avere un volume uguale al volume di trasferimento rimasto nel tubo.
- Impostare una pipetta da 200 microlitri su Volume di rimozione per rimuovere il surnatante rimanente con una punta standard da 200 microlitri in due passaggi (cambiare i puntali ogni volta e non disturbare il pellet). Dispensare il surnatante del sangue nel cono di candeggina. Dopo entrambe le rimozioni, dovrebbero esserci circa 40 μ l di soluzione con il pellet WBC.

Nota: angolare il tubo e aspirare molto lentamente dalla parte superiore del menisco liquido, sul lato opposto al pellet. Se il volume dell'aliquota iniziale è ≤ 240 μ l, eseguire la rimozione del surnatante in un passaggio con una punta da 200 μ l. Se il volume dell'aliquota iniziale è ≥ 440 μ l, eseguire la rimozione del surnatante in tre passaggi con una punta da 200 μ l. Una volta rimosso il surnatante da tutti i campioni, è possibile riempire il cono contenente candeggina fino a 50 ml con acqua, tappare conico, invertire conico per miscelare e smaltire il contenuto nel lavandino.

ID campione	Letture HemoCue	Volume di trasferimento	Soluzione per la lisi dei globuli rossi	Volume di rimozione
	cellule/L	μ l	μ l	μ l
	cellule/L	μ l	μ l	μ l
	cellule/L	μ l	μ l	μ l
	cellule/L	μ l	μ l	μ l
	cellule/L	μ l	μ l	μ l
	cellule/L	μ l	μ l	μ l

Lisi e digestione dei globuli bianchi

8. Aggiungere 50 ml di tampone cellulare (Bionano) direttamente sul pellet WBC.
9. Aggiungere 50 ml di proteinasi K (Bionano) direttamente sul pellet WBC.
10. Pipettare miscelare il campione 5 volte con un puntale standard da 200 µl impostato su 120 µl per risospendere il pellet.

Nota: estrarre l'intero volume del campione nella punta e ispezionare visivamente la provetta durante la miscelazione per assicurarsi che il pellet venga risospeso completamente durante la miscelazione, in modo tale che alla fine della miscelazione non rimanga alcun pellet visibile sul lato del tubo.

11. Incubare a temperatura ambiente per 3 minuti.
12. Aggiungere 225 µl di tampone LBB ai campioni utilizzando una punta da 1.000 µl. Tappare e capovolgere la provetta 15 volte per miscelare.
Nota: LBB è una soluzione viscosa e schiumosa che aderisce alla punta della pipetta. Erogare lentamente e cambiare i puntali tra un'erogazione e l'altra per garantire l'accuratezza del volume di erogazione.
13. Ruotare il campione su HulaMixer per 15 minuti a temperatura ambiente a 10 rpm. Nessun scuotimento/vibrazione.
14. Spingere la provetta a impulsi per 2 secondi per raccogliere il liquido sul fondo della provetta.
15. Aggiungere 10 ml di PMSF 100 mM nella parte liquida del tubo. Tappare e capovolgere la provetta 5 volte per mescolare, ruotare a impulsi il tubo per 2 secondi per raccogliere il liquido sul fondo del tubo.
16. Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti.

Legare, lavare ed eluire gDNA

17. Utilizzando una pinza, trasferire con attenzione un singolo Nanobind Disk al lisato.

Nota: i dischi a volte possono restare uniti.

18. Aggiungere 340 µl di isopropanolo al 100% a tutte le provette. Tappare e capovolgere le provette 5 volte per miscelare.
19. Ruotare il campione su HulaMixer per 15 minuti a temperatura ambiente a 10 rpm. Nessun scuotimento/vibrazione.

Nota: assicurarsi che il Nanobind Disk non rimanga nel coperchio del tubo durante le rotazioni iniziali. In tal caso, spegnere il rotatore e capovolgere la provetta per microcentrifuga finché il Nanobind Disk non torna nella soluzione. Riposizionare il tubo sull'HulaMixer e riprendere la miscelazione.

20. Esaminare l'associazione del gDNA con Nanobind Disk e invertire per aumentare il legame (vedere [Video di formazione](#), 0:25):
 - a. Collocare le provette del campione in un rack per provette Dynamag trasparente e ispezionare visivamente tutte le provette nel rack per assicurarsi che il gDNA sia collegato al Nanobind Disk.
 - b. Se i filamenti di gDNA sono visibilmente pendenti in basso, invertire rapidamente di 180° per portare il gDNA in un'associazione più stretta con il Nanobind Disk.
 - c. Le inversioni di 180° possono essere eseguite molte volte fino a quando l'associazione del gDNA con il Nanobind Disk non appare invariata.

21. Combina il rack trasparente con la base magnetica come indicato di seguito, assicurandoti che il Nanobind Disk sia fissato dal magnete vicino alla parte superiore del livello del liquido. In caso contrario, eseguire nuovamente il rack (vedere [Video di formazione](#), 0:50).

a. Capovolgere il rack per provette Dynamag trasparente e posizionarlo capovolto con i coperchi dei campioni che toccano la superficie di lavoro. I tubi saranno sulla stessa fila del rack e nella fila più lontana da te.



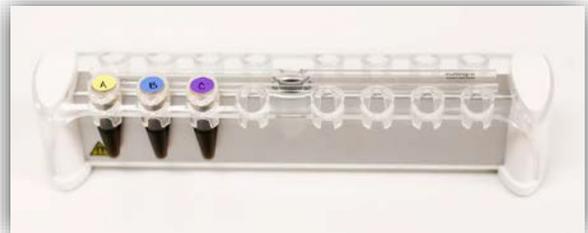
b. Capovolgere la base magnetica Dynamag e abbassarla sul rack trasparente.



c. Inclinare lentamente l'apparecchio combinato di 90° verso di sé mentre continua a poggiare sulla superficie. I tubi saranno ora orizzontali e visibili a te.



d. Inclinare lentamente l'apparecchio combinato di 90° verso di sé mentre continua ad appoggiarsi sulla superficie, in modo che sia completamente in posizione verticale e i tubi siano rivolti verso di sé.



e. Assicurati che il Nanobind Disk sia fissato al magnete vicino alla parte superiore del livello del liquido.



22. Impostare una pipetta da 1.000 µl su 1.000 µl e una seconda su 700 µl.
23. Rimuovere il surnatante come descritto di seguito, facendo attenzione a non aspirare il gDNA (vedere [Video di formazione](#), 1:15):
 - a. Inclinare l'intero rack a un angolo di 45° tenendolo con una mano (afferrando l'intero apparato dal basso con i tubi visibili a te e le palpebre verso l'altra mano).
 - b. Attendere 2 secondi affinché gDNA si posi sul Nanobind Disk.
 - c. Rimuovere lentamente tutto il liquido con una punta extra lunga da 1.000 µl angolata lontano dal Nanobind Disk e/o dal gDNA per evitare interruzioni.
 - d. Dispensare il surnatante in un cono contenente TexQ.

 Assicurarsi che il gDNA non venga rimosso ispezionando visivamente la punta contenente il tampone prima di scartare. Se il gDNA viene aspirato accidentalmente o si stacca dal disco, fare riferimento alla sezione Risoluzione dei problemi di seguito.

24. Eseguire il lavaggio WB1 (vedere [Video di formazione](#), 2:21):
 - a. Dispensare 700 µl di Buffer WB1 direttamente sui dischi nelle provette e tappare le provette.
 - b. Sollevare il portaprovette trasparente per separarlo dalla base magnetica.
 - c. Capovolgere la griglia trasparente con i tubi 180° 4 volte per lavare.
 - d. Riposizionare il rack per provette trasparenti e le provette con base magnetica come descritto al passaggio 21.
 - e. Rimuovere il surnatante come descritto al punto 23.

 Assicurarsi che il gDNA non venga rimosso ispezionando visivamente la punta contenente il tampone prima di scartare. Se il gDNA viene aspirato accidentalmente o si stacca dal disco, fare riferimento alla sezione Risoluzione dei problemi di seguito.

25. Impostare la seconda pipetta a 500 µl (precedentemente a 700 µl).
26. Eseguire il lavaggio WB2 (vedere [Video di formazione](#), 4:10):

- a. Dispensare 500 µl di Buffer WB2 direttamente sui dischi nelle provette e tappare.
- b. Sollevare la cremagliera trasparente per separare dalla base magnetica.
- c. Capovolgere la griglia trasparente di 180° 10 volte per lavare.
- d. Riposizionare il rack per provette trasparenti e le provette con base magnetica come descritto al passaggio 21.
- e. Rimuovere il surnatante come descritto al punto 23.

 Assicurarsi che il gDNA non venga rimosso ispezionando visivamente la punta contenente il tampone prima di scartare. Se il gDNA viene aspirato accidentalmente o si stacca dal disco, fare riferimento alla sezione Risoluzione dei problemi di seguito.

27. Ripetere il lavaggio WB2, passaggio 26 (vedere [Video di formazione](#), 5:50).

Nota: rimuovere il tampone da 2 o 3 provette alla volta ed elaborare attraverso la fase di incubazione del tampone EB in piccoli lotti per evitare che il disco/gDNA si secchi.

28. Aprire completamente il coperchio delle provette (parallelo al banco da laboratorio) e sollevare ciascuna provetta dalla base.
29. In prossimità di una provetta Protein LoBind da 0,5 ml, trasferire Nanobind Disk nella provetta Protein LoBind da 0,5 ml utilizzando Bionano Prep SP Magnetic Retriever (vedere la sezione Note importanti per un uso corretto). Tappare il tubo per evitare che il disco si secchi (vedere [Video di formazione](#), 7:30).
30. Girare la provetta Protein LoBind nella microcentrifuga da banco per 5 secondi.
31. Rimuovere tutto il liquido residuo sul fondo della provetta utilizzando un puntale standard da 10 µl.
Nota: è necessario spostare il Nanobind Disk utilizzando la punta per raggiungere il liquido sul fondo del tubo. Muovere la punta con piccoli movimenti circolari per rimuovere tutto il liquido residuo.
32. Aggiungere 65 µl di Buffer EB alla provetta Protein LoBind.
33. Girare la provetta sulla microcentrifuga da banco per 5 secondi.
34. Utilizzando un puntale standard da 10 µl, spingere delicatamente il Nanobind Disk verso il fondo della provetta, assicurandosi che sia completamente immerso nel liquido. Il disco dovrebbe rimanere parallelo alla superficie del banco (vedere [Video di formazione](#), 8:20).
35. Incubare il Nanobind Disk sommerso nel tampone EB a temperatura ambiente per 20 minuti.
36. Raccogliere il gDNA estratto trasferendo l'eluato in una nuova provetta per microcentrifuga standard da 2,0 ml con 200 µl punta standard da 200 µl.
37. Girare la provetta con il Nanobind Disk su microcentrifuga da banco per 5 secondi e trasferire tutto l'eluato rimanente contenente gDNA viscoso nella stessa provetta per microcentrifuga standard da 2,0 ml come nel passaggio precedente con una punta standard da 200 µl. È possibile rimuovere il disco prima di aspirare il tampone di eluizione rimanente.
Nota: quasi tutto il gDNA viscoso esce dal Nanobind Disk durante il secondo giro.

Omogeneizzazione della soluzione di gDNA (70 minuti)

Omogeneizzazione della soluzione di gDNA

38. Pipettare lentamente l'intero volume di gDNA in una punta standard da 200 µl, quindi dispensare lentamente il gDNA. Evitare la formazione di bolle.
 - Ripetere questo processo 8 volte per un totale di 9 colpi (1 colpo = 1 aspirazione e 1 erogazione).
Nota: se l'assorbimento del gDNA si blocca a causa dell'elevata viscosità, potrebbe essere necessario agitare delicatamente mentre si rilascia lentamente lo stantuffo per prelevare il gDNA.
39. Posizionare la provetta per microcentrifuga standard da 2.0 ml contenente gDNA nel rack di Hula Mixer Sample Mixer e ruotare a temperatura ambiente per 1 ora a 15 rpm.
Nota: durante le rotazioni iniziali, assicurarsi che il gDNA venga prelevato dal fondo della provetta per microcentrifuga per risiedere nel coperchio della provetta durante le rotazioni. Se la soluzione di DNA rimane sul fondo della provetta durante le rotazioni iniziali, spegnere Hula Mixer e posizionare il rack in modo che la provetta per microcentrifuga sia capovolta. Colpire delicatamente il fondo della provetta per microcentrifuga fino a quando il gDNA viene attirato nel coperchio e riprendere la miscelazione.

40. Rimuovere la provetta per microcentrifuga dal rack di Hula Mixer e far girare la provetta sulla microcentrifuga da banco per 2 secondi per portare il gDNA sul fondo della provetta. Consentire al gDNA di equilibrarsi durante la notte a temperatura ambiente (25°C) per omogeneizzare.

Nota: la maggior parte dei campioni diventerà omogenea entro il terzo giorno (dall'inizio del protocollo), ma i campioni possono essere etichettati non appena diventano omogenei.

Quantificazione del gDNA (45 minuti)

Quantificazione Qubit - BR dsDNA Assay

Fare riferimento al manuale utente del kit Qubit dsDNA BR Assay per i dettagli del kit e seguire i metodi descritti nella sezione "Pipettaggio del DNA genomico viscoso", per garantire un pipettaggio accurato del gDNA viscoso.

1. Equilibrare gli standard del kit di analisi Qubit BR a temperatura ambiente.

Nota: se il gDNA è stato conservato a 4°C, equilibrarlo a temperatura ambiente prima di passare alla fase successiva.

2. Aggiungere il tampone Qubit BR alle provette per test Qubit da 0,5 ml:
 - a. Per ogni campione, aggiungere 18 µl di Qubit BR Buffer a tre provette Qubit Assay separate.
 - b. Per gli standard Qubit, aggiungere 10 µl di Qubit BR Buffer a due provette Qubit Assay separate.
3. Utilizzando una pipetta da 200 µl con una punta a foro largo, mescolare delicatamente l'intero volume del campione di gDNA pipettando su e giù 5 volte, facendo attenzione a non generare bolle.
4. Utilizzando un nuovo puntale per pipetta standard o un puntale per pipetta a spostamento positivo per ogni prelievo:

Rimuovere 2 µl di aliquote dal lato sinistro, medio e destro di ciascun campione e dispensare nel tampone BR della corrispondente provetta Qubit Assay, risciacquando la punta durante l'erogazione. Collocare le provette in un rack galleggiante e sonicare per 10 minuti. Eseguire i passaggi 5 e 6 durante la sonicazione.

Nota: se non è disponibile un sonicatore da bagno, vortexare per almeno 30 secondi alla massima velocità, quindi ruotare brevemente verso il basso per 2 secondi.

5. Preparare la soluzione di lavoro diluendo il Dye Assay Reagent nel tampone di diluizione BR (1:200):
 - a. 200 µl di soluzione di lavoro per ciascuno dei due standard (400 µl totali).
 - b. 200 µl di soluzione di lavoro per ogni aliquota di campione (600 µl per ogni campione).
6. Per gli standard Qubit DNA, aggiungere 10 µl di standard 1 e 2 alle provette contenenti il tampone BR dal passaggio 2b.
7. Una volta completata la sonicazione, recuperare le provette del dosaggio e far girare brevemente l'impulso. Vortexare i tubi per 5 secondi alla massima velocità, quindi girare di nuovo a impulsi.

8. Aggiungere 180 µl di soluzione di lavoro a ciascuna aliquota di DNA sonicato e aliquota Qubit DNA Standard. Vortexare per 5 secondi e far girare le provette a impulsi.
9. Incubare i campioni per almeno 2 minuti, quindi leggere sul fluorometro Qubit.
10. Il coefficiente di variazione (CV = deviazione standard/media) da tre letture deve essere < 0,30.

Nota: se CV > 0,30, pipettare delicatamente l'intero volume di gDNA con cinque corse (1 corsa = 1 corsa verso l'alto + 1 corsa in discesa) utilizzando una punta a foro largo. Lasciare riposare il gDNA almeno una notte a temperatura ambiente prima di ripetere la quantificazione.

Nota: le concentrazioni tipiche di DNA variano da 45 a 90 ng/ul.

ID campione	Sinistra (ng/µl)	Mezzo (ng/µl)	Destra (ng/µl)	CV (dev.st/media)

Etichettatura

Il DNA è pronto per l'etichettatura Direct Label and Stain (DLS). Vedere la sezione "Kit e materiali di consumo" su <https://bionanogenomics.com/support/> per kit e protocolli applicabili.

Risoluzione dei problemi

Vedere [Video di formazione](#) a partire da 8:40 per le spiegazioni video sulla risoluzione dei problemi.

Il gDNA non viene legato dal Nanobind Disk.

Prova: il gDNA viene aspirato o si stacca dal disco durante il legame o durante i lavaggi.

Passaggi da seguire se il campione viene aspirato:

1. Lasciando la provetta del campione posizionata sul magnete, dispensare il liquido contenente gDNA nella provetta contenente il disco.
2. Rimuovere il tubo rack dal magnete e capovolgere il rack più volte a mano per ristabilire il legame.

In alternativa:

1. Lasciando la provetta del campione posizionata sul magnete, dispensare il liquido contenente gDNA nella provetta contenente il disco.
2. Aspirare il liquido dalla provetta in modo tale che un volume minimo (~50 µl) rimanga al di sopra del gDNA non legato e scartare il surnatante lasciando il DNA in un volume minimo sul fondo della provetta.
3. Aspirare con cautela il gDNA non legato contenente il liquido minimo nella punta della pipetta e pipettare direttamente sul disco in rack sul magnete per ristabilire il legame.

Il gDNA non è omogeneo prima dell'etichettatura.

Prova: il CV di quantificazione del gDNA di tre misurazioni (superiore, centrale e inferiore) è > 0,30.

Passi da seguire:

1. Aspirare e dispensare il campione utilizzando una punta a foro largo per un totale di 5 volte.
2. Incubare il gDNA a temperatura ambiente per 1-3 giorni.
3. Dopo l'incubazione, aspirare nuovamente e dispensare il campione per 5 volte utilizzando una punta a foro largo.
4. Quantificare con Qubit BR Assay.

Il gDNA non è viscoso.

Prova: La consistenza del campione è molto sottile e facilmente pipettabile, ma la concentrazione è > 35 ng/µL.

È probabile che il campione non abbia gDNA ad alto peso molecolare.

Controllare il campione utilizzando l'elettroforesi su gel a campo di impulsi prima dell'etichettatura per confermare la presenza di gDNA ad alto peso molecolare.

Valutare il metodo di preparazione del campione e la qualità/età del materiale in ingresso e ripetere l'isolamento del DNA dal campione biologico.

Appendice

Conteggi emocui < 4.500 e > 2.800 GB/ μ l

Mescolare il sangue, lisare i globuli bianchi

- Per letture HemoCue basse (< 4.500 cellule/ μ l), calcolare la quantità di sangue da trasferire per 1,5 milioni di globuli bianchi:
 - $1.500 \div$ Lettura con HemoCue = Volume da trasferire in μ l (μ l per $1,5 \times 10^6$ cellule) $\div 2$ = volume da trasferire in μ l
Nota: l'HemoCue fornisce letture in cellule/L, sebbene il calcolo sia basato su cellule/ μ l. μ l di sangue per 1,5 milioni di cellule = $1,5 \times 10^6$ / conteggio HemoCue (cellule/ μ l).
 - Determinare la quantità di RBC Lysis Solution necessaria:
 - (Volume di trasferimento in μ l dal passaggio 1a) $\times 3$ = volume della soluzione di lisi dei globuli rossi in μ l
 - Riposizionare la provetta di sangue sul bilanciere e continuare a miscelare mentre si completano i conteggi aggiuntivi o prima di continuare con il passaggio 2 di seguito.

ID campione	Letture HemoCue	Volume di trasferimento (Fase 1a)	Soluzione di lisi RBC da aggiungere (Fase 1b)	Volume di rimozione (passaggio 5)
	cellule/L	μ l	μ l	μ l
	cellule/L	μ l	μ l	μ l
	cellule/L	μ l	μ l	μ l
	cellule/L	μ l	μ l	μ l
	cellule/L	μ l	μ l	μ l
	cellule/L	μ l	μ l	μ l

- Elaborando un campione alla volta, trasferire uguali volumi di sangue (che insieme equivalgono a 1,5 milioni di cellule) come calcolato nel passaggio 1a sopra in ciascuna delle due provette per microcentrifuga da 1,5 ml.
- Aggiungere 3 volumi di RBC Lysis Solution (come calcolato nel passaggio 1b sopra) a ciascuna delle due provette per microcentrifuga da 1,5 ml contenenti uguali volumi di sangue. Tappare e capovolgere le provette 10 volte per miscelare. Incubare le provette a temperatura ambiente per 5 minuti. Capovolgere le provette per 10 volte per mescolare.
- Rotare i tubi per 2 minuti a 2.200 xg a temperatura ambiente. Ispezionare il fondo delle provette per il pellet WBC.
Nota: è utile allineare la cerniera del tubo al bordo esterno della centrifuga, in modo che il pellet sia sempre localizzato sullo stesso lato.
- Impostare una pipetta da 1.000 μ l con un puntale extra lungo da 1.000 μ l per rimuovere il volume della soluzione di lisi dei globuli rossi (calcolato al punto 1b sopra) da ciascuna provetta.
- Impostare una pipetta da 200 microlitri per rimuovere il surnatante rimanente con una punta standard da 200 microlitri in due passaggi (cambiare i puntali ogni volta e non disturbare il pellet). Dispensare il surnatante del sangue nella candeggina conica:
 - Impostazione della pipetta = (Volume da trasferire in μ l dal passaggio 1a – 40 μ l) $\div \div 2$**Nota:** angolare il tubo e aspirare molto lentamente dalla parte superiore del menisco liquido, sul lato opposto al pellet.

Lisi e digestione dei globuli bianchi

7. Aggiungere 25 ml di tampone cellulare direttamente su ogni pellet WBC. Risospendere il pellet in una provetta miscelando 5 volte con un puntale standard da 200 µl con pipetta impostata a 35 µl. Quindi trasferire l'intero volume di pellet risospeso da questa provetta in una provetta Protein LoBind. Risospendere il secondo pellet per il campione nello stesso modo e quindi trasferire l'intero volume nella stessa provetta Protein LoBind del primo pellet risospeso. Aggiungere 50 µl di Proteinasi K (Bionano) alla provetta Protein LoBind contenente leucociti risospesi riuniti per il campione.
8. Pipettare il campione di miscelazione 10 volte con un puntale a foro largo da 200 µl impostato su 120 µl per miscelare i globuli bianchi risospesi con la proteinasi K.
9. Procedere al passaggio 11 a pagina 12 e continuare con il resto del protocollo.

Assistenza tecnica

Per assistenza tecnica, contattare il supporto tecnico di Bionano Genomics.

È possibile recuperare la documentazione sui prodotti Bionano, SDS, certificati di analisi, domande frequenti e altri documenti correlati dal sito Web dell'Assistenza o su richiesta tramite e-mail e telefono.

Tipo	Contatto
E-mail	support@bionanogenomics.com
Telefono	Orario Lavorativo: Dal lunedì al venerdì, dalle 9:00 alle 17:00, PST USA: +1 (858) 888-7663
Sito web	www.bionanogenomics.com/support