



Bionano Prep Direct Label and Stain (DLS)-Protokoll

Dokumentnummer: 30206

Dokumentrevision: A

Inhaltsverzeichnis

Impressum	3
Revisionshistorie	4
Bionano Prep DLS Übersicht (750 ng).....	5
Bionano Prep DLS Kit und vom Benutzer bereitgestellte Materialien.....	6
Einführung und wichtige Hinweise	7
Einführung	7
Wichtige Hinweise.....	7
Bionano DLS-Markierungsprotokoll	10
Fehlerbehebung	18
Häufig gestellte Fragen	21
Technische Unterstützung.....	22

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 kopiert, reproduziert, verteilt, übersetzt, rückentwickelt oder in irgendeiner Form oder durch ein beliebiges Medium oder auf irgendeine Weise, bekannt oder unbekannt, 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 JEGLICHE 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, INDIRECTE, 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-Genomik®, Saphyr®, Saphyr-Chip®, und Bionano-Zugang® sind Marken von Bionano Genomics, Inc. Alle anderen Marken sind alleiniges 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.

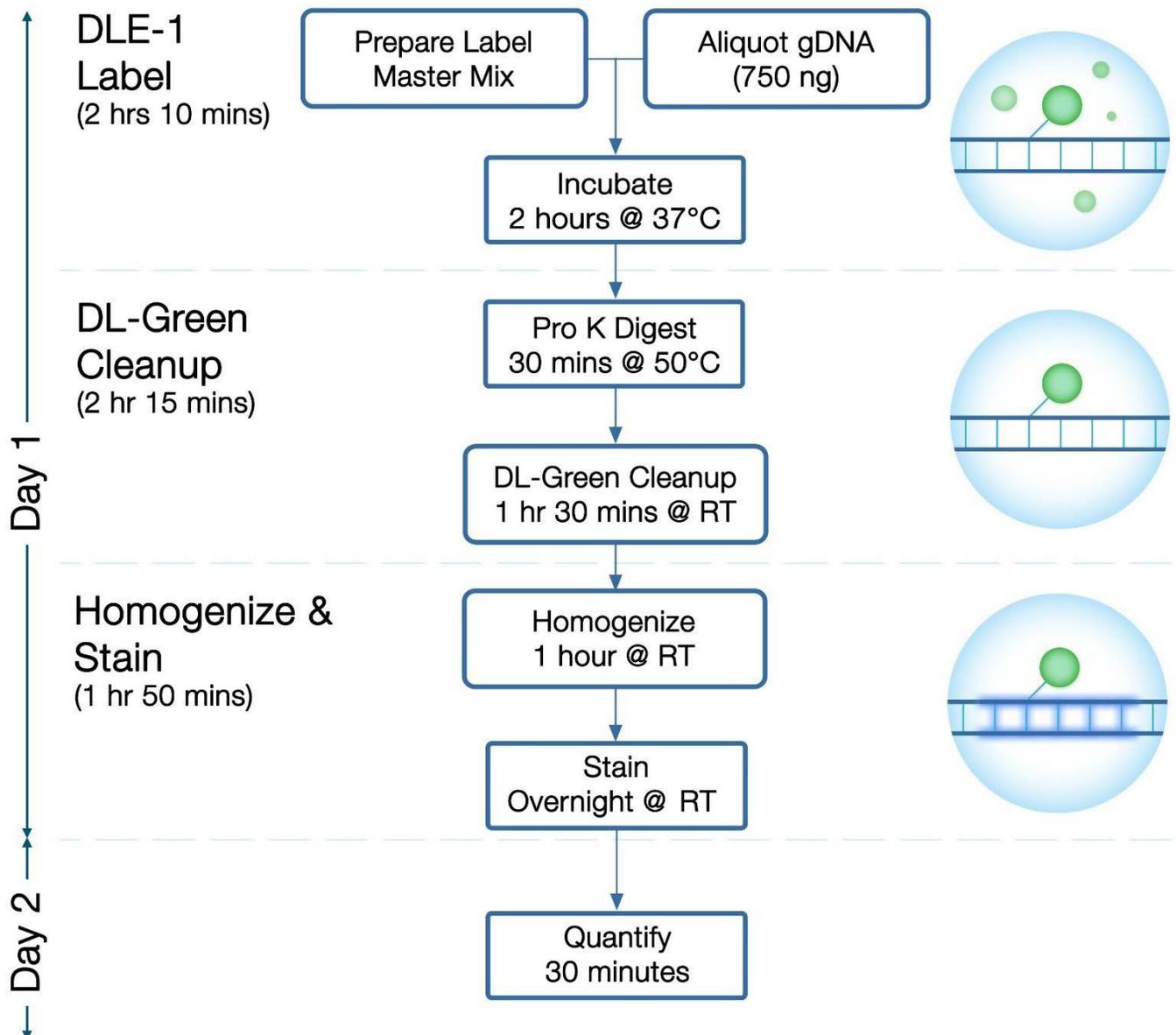
Revisionshistorie

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

Bionano Prep DLS Übersicht (750 ng)

DLS ist eine sequenzspezifische Markierung von genomischer DNA (gDNA) mit ultrahohem Molekulargewicht (UHMW) für die optische Bionano-Genomkartierung (OGM) unter Verwendung eines Direct Label-Enzyms (z. B. DLE-1), gefolgt von einer Färbung des DNA-Rückgrats.

Workflow-Übersicht – Markieren und Färben an Tag 1; an Tag 2 quantifizieren, nach der Quantifizierung auf den Chip laden



Hinweis: Gestrichelte Linien () kennzeichnen mögliche Pausen-/Stoppunkte.

Bionano Prep DLS Kit und vom Benutzer bereitgestellte Materialien

Tabelle 1: Inhalt des Bionano Prep DLS-Kits (Art.-Nr. 80005)

Komponente	Teile-Nr.	Anzahl	Lagerung	Hinweise zur Handhabung
20x DLE-1	20351	18 µl	-20 °C	Das Röhrchen zum Mischen dreimal schwenken und kurz zentrifugieren. Bis zur Verwendung in einem Enzymkühler bei -20 °C aufbewahren.
20x DL-Grün	20352	18 µl	-20 °C	Bei Raumtemperatur (RT) auftauen. Vortexen und kurz zentrifugieren. Bis zur Verwendung auf vorgekühltem Aluminiumblock aufbewahren.
5x DLE-1 Puffer	20350	200 µl	-20 °C	Bei Raumtemperatur auftauen. Vortexen und kurz zentrifugieren. Bis zur Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahren.
4x Flusspuffer	20353	190 µl	4 °C	Vortexen und kurz zentrifugieren. Bis zur Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahren.
DNA-Färbung	20356	65 µl	-20 °C	Bei Raumtemperatur auftauen. Vortexen und kurz zentrifugieren. Bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur aufbewahren; DMSO in DNA-Färbung kristallisiert auf Eis.
1 Mio. DVB-T	20354	75 µl	-20 °C	
Ultrareines Wasser	20355	900 µl	4 °C	Kann bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.
DLS 24-Well-Platte	20357	1 Teller	RT	Abgedeckt aufbewahren, um Staub zu vermeiden.
DLS-Membranen (13 mm)	20358	25	RT	Vermeiden Sie übermäßige Feuchtigkeit.
DLS-Plattendichtungsstreifen	20361	10	RT	
Bernsteinfarbene DLS-Röhren, runder Boden	20362	12	RT	

Hinweis: RT = 18 - 25 °C

Tabelle 2: Vom Benutzer bereitgestellte Materialien

Artikel	Beschreibung	Katalog-Nr.
HulaMixer Probenmischer	Thermo Fisher	15920D
Thermocycler mit beheiztem Deckel	Allgemeiner Laborlieferant	
Puregene Proteinase K	Qiagen	158918 oder 158920
PCR-Gefäße, 0,2 ml, dünnwandig, flache Kappe, nukleasefrei	Thermo Fisher oder gleichwertig	AM12225
Mikrozentrifugenröhrchen, 0,5 ml, Bernstein gelb, nukleasefrei	USA Scientific oder gleichwertig	1605-0007
Pipettenspitzen, unfiltriert, 200 µl	USA Scientific oder gleichwertig	1111-1810
Pipettenspitzen mit weiter Öffnung, gefiltert, 200 µl	VWR oder Rainin-Äquivalent	46620-642
Pipettenspitzen, Standard, gefiltert, 2, 10, 20 und 200 µl	Allgemeiner Laborlieferant	
-20 °C Tisch-Enzymkühler	VWR oder gleichwertig	414004-286
4-°C-Aluminium-Kühlrohrblock	Sigma Aldrich oder gleichwertig	Z740270
Pinzette, spitz und gebogen	Electron Microscopy Sciences oder	78141-01
Pipetten (2, 10, 20 und 200 µl)	Allgemeiner Laborlieferant	
Eiskübel und Eis	Allgemeiner Laborlieferant	
Vortexer	Allgemeiner Laborlieferant	
Mikrozentrifuge für 0,2-, 0,5- und 1,5-ml-Röhrchen	Allgemeiner Laborlieferant	
Qubit-Fluorometer	Thermo Fisher	Q33238
Qubit® Assay-Röhrchen	Thermo Fisher	Q32856
Qubit® HS (High Sensitivity) dsDNA Assay Kit	Thermo Fisher	Q32851
Ultraschallbad (empfohlen)	Branson oder gleichwertig	CPX 952-119R
Direktverdrängerpipette MR-10 (optional)	Rainin oder gleichwertig	17008575
Pipettenspitzen, 10 µL, C-10 für Direktverdrängung (optional)	Rainin oder gleichwertig	17008604

Einführung und wichtige Hinweise

Einführung

Dieses Protokoll beschreibt einen enzymatischen Markierungsansatz für die direkte Fluoreszenzmarkierung von UHMW-gDNA durch das Direct Label Enzyme (DLE-1). Das DLE-1-Enzym bindet den DL-Green-Fluorophor über kovalente Modifikation an ein spezifisches Sequenzmotiv. Dieser Markierungsprozess schädigt die gDNA nicht, ermöglicht die Erstellung von dicht beieinanderliegenden Genomkarten und bietet eine hohe Empfindlichkeit für den Nachweis struktureller Varianten. Nach der sequenzspezifischen Markierung mit DLE-1 wird die markierte DNA zur Sichtbarmachung des Rückgrats gefärbt. Bei der Abbildung auf dem Saphyr werden die markierten Proben als grüne Punkte auf blauen Linien visualisiert. Das Kit Bionano Prep Direct Label and Stain (DLS) (Katalog-Nr. 80005) enthält die erforderlichen Reagenzien für dieses Protokoll.

DLE-1 Reaktionsgröße (750 ng)

Dieses Protokoll ergibt 60 µl markierte DNA. Diese Menge reicht aus, um eine einzelne Durchflusszelle eines Saphyr-Chips zu bestücken und im Falle eines geringen Durchsatzes oder eines anderen Fehlers bleibt genügend Probenmaterial für eine weitere Durchflusszelle übrig. Das Ausgangsmaterial sollte eine Länge von mindestens Hunderten von Kilobasen haben; bei Bedarf kann dies mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) bestimmt werden. Markierungsmetriken werden auf dem Bionano Saphyr bestimmt, gemessen in Markierungen/100 Kilobasenpaaren (kbp). Zusätzliche Markierungsmetriken können bestimmt werden, indem eine Referenz- und Überwachungsabbildungsrate, falsch-positive Markierungen (PLV) und falsch-negative Markierungen (NLV) bereitgestellt werden. Weitere Einzelheiten finden Sie im Abschnitt „Wichtige Hinweise“ weiter unten.

Einzelheiten zu den erwarteten Metriken finden Sie in [Dokument 30223, Richtlinien für den Qualitätsbericht von Saphyr-Molekülen](#).

Wichtige Hinweise

Allgemeine Überlegungen

- Wir empfehlen die Verwendung eines auf Eis vorgekühlten Kühlblocks aus Aluminiumrohr, um aufgetaute Reaktionskomponenten zu halten und Markierungsreaktionen aufzubauen.
- Enzyme und Puffer sollten genau herauspipettiert werden, ohne dass Tröpfchen an der Außenseite der Pipettenspitze hängen. Das Enzym sollte vollständig in das Reaktionsgefäß abgegeben werden und Blasenbildung sollte sorgfältig vermieden werden, um reproduzierbare Reaktionen zu gewährleisten. Dies wird am besten erreicht, indem die Reagenzröhrchen beim Ansaugen oder Pipettieren auf Augenhöhe gehalten werden, um den Prozess zu visualisieren.
- Langsames und gründliches Pipettieren des DLE-1-Master-Mixes mit gDNA ist ein kritischer Schritt und fördert die DNA-Homogenität und Enzymzugänglichkeit für eine effiziente Markierung hochviskoser DNA.
- Dieses Protokoll beinhaltet die Handhabung von lichtempfindlichen fluoreszierenden Molekülen. Es ist wichtig, die Lichtexposition sowohl der Reaktionen als auch der lichtempfindlichen Reagenzien während der Arbeit zu minimieren. Zusätzlich sind die lichtempfindlichen Reagenzien während der Lagerung vor Licht zu schützen.

- Die Konzentration der markierten DNA wird an Tag 2 nach der Markierung, Reinigung, Homogenisierung und Färbung gemessen. Die DNA-Homogenität wird durch doppelte Quantifizierung (Variationskoeffizient, CV < 0,30) bestimmt. Homogen markierte DNA ermöglicht eine genaue Schätzung der Konzentration und eine gleichmäßigere DNA-Beladung auf den Chip. Die markierte DNA-Konzentration sollte zwischen 4 und 12 ng/µl liegen.

Chargengröße

- Bis zu 12 Proben können gleichzeitig verarbeitet werden.
 - Jedes Kit Bionano Prep DLS enthält genügend Reagenzien für 10 Proben.

Voraussetzungen für den DNA-Start

- Die Probe sollte gDNA mit Megabasenlänge enthalten, die typischerweise durch hohe Viskosität und/oder PFGE der Probe bestimmt wird.
- Die gDNA-Konzentration sollte zwischen 36 und 150 ng/µl liegen.
 - gDNA-Proben > 150 ng/µl sollten mit TE (pH 8,0) auf 50 - 150 ng/µl verdünnt und 5-mal mit einer Spitze mit weiter Öffnung gemischt werden und dann über Nacht bei Raumtemperatur ruhen. Überprüfen Sie die endgültige DNA-Konzentration und Homogenität vor der Markierung.
 - Für gDNA-Proben < 36 ng/µl wenden Sie sich an den technischen Support unter Support@bionanogenomics.com.

Bestimmung des Enzyms

- Bevor Sie das DLS-Protokoll für nicht-humane Proben starten, importieren Sie die Sequenzdaten für Ihre Probe entweder in die Silico-Digestion-Funktion von Bionano Access oder in die [Label Density Calculator](#)-Software, um sicherzustellen, dass die DLS-Markierung die richtige Wahl für Ihre Probe ist. Ihre tatsächliche Markierungsdichte sollte innerhalb von ± 2 Markierungen der Vorhersage liegen. Kontaktieren Sie den technischen Support unter Support@bionanogenomics.com, um Ihnen Anleitung zu geben, wenn Sie unsicher sind.
- Bei nicht-humanen Proben sind aktuelle Downstream-Analysetools am erfolgreichsten mit Genomen, die DLS-Markierungsdichten zwischen 9 und 25 Markierungen pro 100kbp aufweisen.

Umgang mit genomischer DNA

Allgemein:

- Dieses Protokoll beinhaltet die Handhabung von viskoser genomischer gDNA, die sich nur schwer genau zu pipettieren lässt. Es ist wichtig, alle Schritte in diesem Protokoll sorgfältig zu befolgen, um eine genaue DNA-Probenentnahme zu gewährleisten, um ein geeignetes Enzym-zu-DNA- und DNA-zu-Färbungsverhältnis zu erreichen, eine unnötige Handhabung der gDNA zu minimieren, was zu nicht ausreichend langen Molekülen für die Analyse führen kann.

Hinzufügen von gDNA zur Markierungsreaktion:

- Um eine genaue Probenahme aus dem viskosen gDNA-Stamm zu gewährleisten, maximieren Sie zunächst die Homogenität der Stamm-DNA, indem Sie die bei Raumtemperatur äquilibrierte DNA-Lösung mit einer Spitze mit weiter Öffnung 5-mal vorsichtig durchpipettieren; befolgen Sie außerdem die nachstehenden Richtlinien für das korrekte Pipettieren in und aus einer Standardspitze oder einer Direktverdrängerspizze, um eine vollständige Abgabe sicherzustellen.
- Bevor Sie viskose gDNA in eine Standardspitze aufziehen, pipettieren Sie eine identische Wassermenge und markieren Sie den Lösungsstand auf der Spitze mit einem feinen Marker, um beim Pipettieren von gDNA eine Orientierungshilfe zu haben. Bewahren Sie die markierte Spitze als Orientierungshilfe auf und verwenden Sie eine neue für die DNA-Wiederherstellung. Alternativ kann die Verwendung einer Direktverdrängungspipette die Konsistenz beim Pipettieren viskoser gDNA verbessern.
- Um viskose gDNA in eine Standardspitze zu ziehen, halten Sie das DNA-Stammröhrchen für eine genaue Betrachtung in der Hand, drücken Sie den Pipettenkolben bis zum ersten Anschlag, tauchen Sie die Pipettenspitze in die Mitte der viskosen Lösung ein und lösen Sie den Kolben vorsichtig und so **langsam** wie möglich. Bewegen Sie die Spitze dabei kreisförmig, um die viskose DNA in die Spitze zu ziehen und achten Sie dabei sorgfältig auf die DNA-Aufnahme. Halten Sie die Spitze auch dann untergetaucht, wenn sich die viskose DNA-Lösung nicht mehr nach oben bewegt und abflacht (verwenden Sie die markierte Spitze als grobe Richtlinie, um zu überprüfen, ob sich die viskose Lösung auf dem richtigen Niveau abgeglichen hat). Es kann bis zu 30 Sekunden dauern, bis die Spitze der viskosen DNA bis zum richtigen Füllstand gefüllt ist. Wenn Sie den Kolben zu schnell loslassen, kann sich eine Blase in der Spitze bilden, die zu einem Undersampling führt (in diesem Fall von vorne beginnen). Nachdem sich die Lösung in der Pipettenspitze eingependelt hat und die Spitze noch in die DNA-Lösung eingetaucht ist, schaben Sie die Spitze 5-mal mit kreisenden Bewegungen gegen den Boden des Röhrchens. Nehmen Sie die Spitze aus der DNA-Lösung und überprüfen Sie visuell, ob sie bis zum richtigen Füllstand gefüllt ist, indem Sie sie mit der markierten Spitze vergleichen. Wenn Sie die Pipettenspitze zu früh aus der gDNA-Lösung nehmen oder die Spitze nicht richtig am Boden des Röhrchens abkratzen, kann am Ende der Pipettenspitze eine Blase entstehen, die auf ein Undersampling hinweist (in diesem Fall von vorne beginnen). **Mit Übung und Geduld ist ein genaues Pipettieren von viskoser gDNA möglich.**
- Um das gesamte Volumen der viskosen gDNA in ein Röhrchen oder einen Mastermix zu geben, halten Sie das Reaktionsröhrchen für eine Nahsichtkontrolle in der Hand und geben Sie die DNA ab, indem Sie die Pipettenspitze in die Lösung einführen und den Kolben vorsichtig bis zum ersten und dann bis zum zweiten Anschlag drücken, und überwachen Sie dabei die DNA-Freisetzung, bis die gesamte DNA aus der Spitze ist. Entfernen Sie die Spitze sofort, sobald die gesamte DNA die Pipettenspitze verlassen hat, und halten Sie dabei einen konstanten Druck aufrecht, um die Aufnahme von Flüssigkeit oder das Eindringen von Luftblasen zu vermeiden. Nehmen Sie nach dem Entfernen aus der Lösung eine Sichtprüfung der Spitze vor, um sicherzustellen, dass sie leer ist.

Bionano DLS-Markierungsprotokoll

Protokollstart, Tag 1

Siehe Abschnitt *Wichtige Hinweise* zur korrekten Handhabung von gDNA; die gDNA-Konzentration sollte zwischen 36 ng/μl und 150 ng/μl liegen.

Informationen zur richtigen Handhabung und Lagerung der Reagenzien finden Sie in den Abschnitten *Kit-Inhalt* und *Vom Benutzer bereitgestellte Materialien*.

Setup

- 20x DL-Grün auftauen. Gut vortexen und pulscentrifugieren. In einem 4-°C-Aluminiumblock auf Eis halten.
- 5x DLE-1 Puffer auftauen. Gut vortexen und pulscentrifugieren. Bis zur Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahren.
- 20 DLE-1 Enzyme dreimal mit der Hand schwenken und pulscentrifugieren. Auf der Bank in einem -20-°C-Enzymblock halten.
- Entfernen Sie das Röhrchen ultrareines Wasser von 4 °C (falls erforderlich) und bewahren Sie es bei Raumtemperatur auf.

DLE-1-Markierung (30 μl Reaktion, 2 Stunden 10 Minuten)

gDNA verdünnen und mit Markierungs-Mix kombinieren (10 Minuten)

- Wenn unmittelbar vor der Markierung bereits eine gDNA-Quantifizierung durchgeführt wurde, fahren Sie mit Schritt 6 fort. Wenn nicht, pulscentrifugieren Sie und wiederholen Sie dann die Quantifizierung, bevor Sie mit Schritt 6 fortfahren.
- Fügen Sie in einem dünnwandigen PCR-Röhrchen 750 ng gDNA (a) zu ultrareinem Wasser (b) bis zu einem Gesamtvolumen von 21 μl hinzu.
 - $750 \text{ ng} / [\text{gDNA-Konzentration}] = \mu\text{l gDNA}$
 - $21 \mu\text{l} - (\mu\text{l gDNA}) = \mu\text{l ultrareines Wasser}$.

gDNA-Proben-ID	gDNA-Konzentration (ng/μl)	Volumen von ultrareinem Wasser (μl)	Volumen der gDNA (μl)

7. Wenn Sie mehr als eine Probe verarbeiten, bereiten Sie einen Markierungs-Master-Mix in einem bernsteinfarbenen 0,5-ml-Röhrchen vor. Fügen Sie die Komponenten in der nachstehenden Tabelle in der angegebenen Reihenfolge hinzu. Das gesamte Volumen des Markierungs-Master-Mix mit einer Standard-Pipettenspitze fünfmal auf- und abpipettieren; dabei darauf achten, dass keine Blasen entstehen. Pulszentrifugieren und bis zum Gebrauch in einem Aluminiumblock auf Eis halten. Innerhalb von 30 Minuten nach dem Mischen der Komponenten verwenden.

Hinweis: Lassen Sie nach dem Master-Mix 5x DLE-1-Puffer bei Raumtemperatur stehen, um sie in Schritt 12 zu verwenden.

Berechnungstabelle für den Markierungs-Master-Mix

Markierungsreaktion	1 Probe	Anzahl der Proben	Master-Mix-Überschuss	Master-Mix-Gesamtmenge
gDNA (750 ng) + Ultrareines Wasser	21 µl			
5x DLE-1 Puffer	6,0 µl		× 1,2	µl
20x DL-Grün	1,5 µl		× 1,2	µl
20x DLE-1	1,5 µl		× 1,2	µl
Endgültiges Reaktionsvolumen	30 µl			µl

8. Geben Sie mit einer Standard-Pipettenspitze 9 µl Master Mix auf die 21 µl gDNA + ultrareines Wasser, ohne zu mischen. Mit einer Standardpipettenspitze mit einer neuen, auf 28 µl eingestellten Pipette die Probe 5-mal langsam zum Mischen auf- und abbewegen (1 x hoch + 1 x herunter = 1-mal). Röhre für 2 Sekunden pulszentrifugieren. Vor Licht schützen. 

Siehe das Video mit dem Titel [DLS-Master-Mix-Mixing](#) unter dem Abschnitt [DLS-Markierungskit](#) der Support-Website.

Hinweis: Eine sorgfältig und gründlich gemischte Probe ist erforderlich, um alle Moleküle effizient zu markieren. Nehmen Sie die Probe von unten und pipettieren Sie sie im oberen Bereich (ohne mit der Pipettenspitze das Röhrchen zu berühren), um die Durchmischung zu maximieren.

Markieren (2 Stunden)

9. In einem Thermocycler unter Verwendung eines auf 47 °C eingestellten beheizten Deckels inkubieren (oder „Ein“, wenn keine Temperaturwahl verfügbar ist):
- 2 Stunden bei 37 °C
 - Bis zum nächsten Schritt bei 4 °C halten. Fahren Sie nach dem Entfernen der Probe aus dem Thermocycler schnell mit dem nächsten Schritt fort. Kurz pulszentrifugieren.

Proteinase K Verdauung und DL-Green-Reinigung (2 Stunden 15 Minuten)

Proteinase K-Verdauung (35 Minuten)

10. Pipettieren Sie 5 µl Puregene Proteinase K (Qiagen) direkt in den zentralen Teil der Probe im PCR-Röhrchen. Nicht mischen, um ein versehentliches Entfernen von DNA zu vermeiden, die an der Spitze haften könnte.
11. In einem Thermocycler unter Verwendung eines auf 60°C eingestellten beheizten Deckels inkubieren (oder „Ein“, wenn keine Temperaturwahl verfügbar ist):

- a. 30 Minuten bei 50 °C
- b. Bis zum nächsten Schritt bei 4 °C halten. Fahren Sie nach dem Entfernen der Probe aus dem Thermocycler schnell mit dem nächsten Schritt fort. Kurz puls zentrifugieren.

Membranadsorption (1 Stunde, 40 Minuten)

Die Schritte 12-18 finden Sie im Video mit dem Titel [DLS-Membran-Demo](#) unter dem Abschnitt [DLS-Beschriftungskit](#) der Support-Website.

12. Benetzen Sie für jede Probe die Unterseite von 1 DLS-Membran mit 1x DLE-1-Puffer in der DLS-24-Well-Platte:

- a. Bereiten Sie für jede Probe 60 µl 1x DLE-1-Puffer (12 µl 5x DLE-1-Puffer + 48 µl ultra reines Wasser) vor. Vortexen, um zu mischen und puls zentrifugieren.
- b. 25 µl 1x DLE-1-Puffer in die Mitte eines Wells der DLS-24-Well-Platte pipettieren.
- c. Verwenden Sie eine Pinzette, um eine DLS-Membran auf den Puffer zu legen.
- d. Versiegeln Sie die Wells sofort mit einem DLS-Plattendichtungsstreifen, um eine Verdunstung zu verhindern. Halten Sie die Platte fest und üben Sie dabei Druck aus, um den DLS-Plattendichtungsstreifen am oberen Rand der Wells zu befestigen.
- e. Lassen Sie die Membran 10 Minuten lang vollständig benetzen.

Hinweis: Die Membran sollte nach vollständiger Benetzung eine bläuliche Farbe annehmen. Sehen Sie die 0:55-Marke des Videos [DLS Membran-Demo](#). Wenn die Membran nach 10 Minuten nicht vollständig benetzt ist, verwenden Sie eine neue Membran. Gegebenenfalls muss ein zusätzlicher 1x DLE-1-Puffer für die neue Membran vorbereitet werden.

13. Führen Sie die DL-Green-Aufreinigung durch, indem Sie die markierte DNA-Probe auf die Mitte der benetzten Membran verteilen:

- a. Halten Sie die Platte fest und entfernen Sie vorsichtig den DLS-Plattendichtungsstreifen. Saugen Sie mit einer Standardpipettenspitze und einer auf 38 µl eingestellten Pipette das gesamte Volumen (~35 µl) der markierten DNA an.
- b. Die markierte DNA vorsichtig auf die Mitte der benetzten DLS-Membran pipettieren.
- c. Versiegeln Sie die Wells sofort mit einem DLS-Plattendichtungsstreifen, um eine Verdunstung zu verhindern. Halten Sie die Platte fest und üben Sie dabei Druck aus, um den DLS-Plattendichtungsstreifen am oberen Rand der Wells zu befestigen.
- d. Die DLS 24-Well-Platte vor Licht schützen (abdecken) und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren. Achten Sie darauf, dass die Platte während der Inkubation nicht versehentlich bewegt wird. ⚠
- e. Befeuchten Sie bis zu 10 Minuten vor Abschluss der Inkubation eine zweite Membran der unbenutzten DLS 24-Well-Platte, indem Sie die Schritte 12b - 12e oben befolgen.
- f. Halten Sie die Platte nach 1 Stunde sorgfältig fest und entfernen Sie vorsichtig den DLS-Plattendichtungsstreifen.
- g. Mit einer ungefilterten Standardpipettenspitze mit einer Pipetteneinstellung von 38 µl die gesamte markierte Probe langsam ansaugen, dabei senkrecht mit der Membran in Kontakt treten und die Spitze während des Ansaugens über den DNA-Bereich bewegen, um die DNA zu sammeln.

14. Wiederholen Sie die Schritte 13b - 13d, aber pipettieren Sie auf die zweite (unbenutzte) Membran, die in Schritt 13e vorbereitet wurde, und inkubieren Sie diese für 30 Minuten bei Raumtemperatur.

15. Bringen Sie während der 30-minütigen Inkubationszeit 1 M DTT, 4x Flusspuffer und DNA-Färbung auf Raumtemperatur. Nach dem Auftauen alle Röhrcchen gut vortexen und kurz puls zentrifugieren, um den Inhalt zu sammeln. Bewahren Sie alle Röhrcchen bis zur Verwendung bei Raumtemperatur auf.

16. Halten Sie die Platte nach 30 Minuten sorgfältig fest und entfernen Sie vorsichtig den DLS-Plattendichtungstreifen.
17. Mit einer ungefilterten Standardpipettenspitze mit einer Pipetteneinstellung von 35 µl die gesamte markierte Probe langsam ansaugen, dabei senkrecht mit der Membran in Kontakt treten und die Spitze während des Ansaugens über den DNA-Bereich bewegen, um die DNA zu sammeln. In ein neues PCR-Röhrchen oder ein bernsteinfarbenes 0,5-ml-Röhrchen überführen. Für 2 Sekunden pulszentrifugieren. Röhren vor Licht schützen. ⚠
18. Mit einer 200-µl-Standardpipettenspitze 20 µl der markierten Probe aus dem PCR-Röhrchen oder dem bernsteinfarbenen 0,5-ml-Röhrchen ansaugen und auf den Boden des bernsteinfarbenen DLS-Rundbodenröhrchens (2 ml) geben. Fahren Sie mit dem nächsten Schritt fort (**DNA-Färbung und Homogenisierung**).
 - a. Wenn das gewonnene Probenvolumen < 20 µl beträgt, bringen Sie das Volumen mit 1x DLE-1-Puffer auf insgesamt 20 µl.

DNA-Färbung und Homogenisierung (1 Stunde 10 Minuten)

Färbung und Homogenisierung (1 Stunde, 10 Minuten)

19. Bereiten Sie in einem neuen bernsteinfarbenen 0,5-ml-Röhrchen den Färbe-Master-Mix gemäß der nachstehenden Tabelle vor. Zum Mischen vortexen, dann pulszentrifugieren, um den Inhalt zu sammeln.

Berechnungstabelle für Färbe-Master-Mix

Färbereaktion	1 Probe	Anzahl der Proben	Master-Mix-Überschuss	Master-Mix-Gesamtmenge
Markierte Probe (Schritt 19)	20 µl			
4x Flusspuffer	15 µl		× 1,25	µl
1 Mio. DVB-T	6 µl		× 1,25	µl
DNA-Färbung	3,5 µl		× 1,25	µl
Ultrareines Wasser	15,5 µl		× 1,25	µl
Gesamt	60 µl			µl

Hinweis: Der Flusspuffer ist viskos, pipettieren Sie Lösungen, die ihn enthalten, deshalb langsam, um die Genauigkeit zu erhöhen.

20. Geben Sie für jede markierte DNA 40 µl Färbe-Master-Mix auf die markierte Probe (20 µl), die im DLS Rundboden-Bernsteinröhrchen (2 ml) enthalten ist. Nicht mischen.

Hinweis: Der Master-Mix wird über der die markierte Probe pipettiert, um ein versehentliches Herausziehen von DNA zu vermeiden, die an der Pipettenspitze haften könnte.

21. Platzieren Sie die bernsteinfarbenen DLS-Rundbodenröhrchen mit Proben in den HulaMixer (Thermo Fisher) mit einer Geschwindigkeit von 5 U/min. Die Oberfläche des Röhrchenhalters sollte flach und parallel zur Arbeitsfläche sein. 1 Stunde bei Raumtemperatur mischen, wobei alle Optionen außer der Rotation ausgeschaltet sind.

22. Nehmen Sie nach 1 Stunde die Proben aus dem HulaMixer. Pulszentrifugieren, um den Inhalt zu sammeln.

Hinweis: Die Rotation darf nicht länger als 1 Stunde erfolgen, da dies zu einer Verringerung des Moleküls N50 führen kann.

23. Über Nacht bei Raumtemperatur lagern, vor Licht schützen.

Protokollstart, Tag 2

Sehen Sie sich die Liste der vom Benutzer bereitgestellten Verbrauchsmaterialien und Geräte an, um sicherzustellen, dass alle verfügbar sind.

Quantifizierung von markierter und gefärbter DNA (30 Minuten)

DNA-Quantifizierung (30 Minuten)

Bestimmen Sie die Endkonzentration der markierten und gefärbten DNA. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn die DNA-Konzentration (Mittelwert zweier Messungen) zwischen 4 und 12 ng/µl liegt. Die Variation der Endkonzentration ist auf die Schwierigkeiten bei der genauen Probennahme der viskosen Ausgangs-gDNA und die Variation in der gDNA-Gewinnung aus dem DL-Green-Entfernungsschritt zurückzuführen. Wenn Ihre Probenkonzentration nicht in diesen Bereich fällt, finden Sie Empfehlungen im Abschnitt Fehlerbehebung.

Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit & Qubit Fluorometer:

Hinweis: Das Standardprotokoll des Qubit dsDNA HS Assay liefert aufgrund der extrem langen Längen der markierten DNA keine genauen Konzentrationsmessungen. Wir haben das Qubit-Protokoll modifiziert, um einen Beschallungsschritt einzuschließen, um ein Aliquot der markierten DNA zu fragmentieren, um genaue Konzentrationsmessungen zu gewährleisten. Weitere Informationen zum Kit finden Sie im Benutzerhandbuch zum Qubit dsDNA HS Assay Kit.

1. Mischen Sie die markierte und gefärbte DNA fünfmal mit einer Spitze mit weiter Öffnung an einer 200-µl-Pipette, die auf 50 µl eingestellt ist. Pulszentrifugieren Sie diese.
2. Lassen Sie Qubit HS Standards und markierte DNA auf Raumtemperatur kommen (mindestens 30 Minuten).
3. Bereiten Sie 0,5 ml Qubit Assay-Röhrchen vor:
 - a. 2 separate Teströhrchen für die HS-Standardmessung mit jeweils 10 µl Qubit HS-Puffer.
 - b. 2 separate Assay-Röhrchen pro markierte Probe, die jeweils 18 µl Qubit HS-Puffer enthalten.
4. Mit einer Standardpipettenspitze oder einer Direktverdrängerpipette zwei separate 2-µl-Aliquots aus jeder Probe entnehmen und in 18 µl HS-Qubit-Puffer im Qubit-Assay-Röhrchen pipettieren, Spitze spülen. Stellen Sie Qubit-Röhrchen in ein schwimmendes Gestell und beschallen Sie sie 10 Minuten lang in einem Ultraschallbad. Bereiten Sie während der Beschallung die Arbeitslösung wie unten beschrieben vor.

Hinweis: Wenn beim Entfernen der Spitze aus dem Röhrchen ein langer DNA-Strang an der Spitze haftet, geben Sie die Probe zurück in das Röhrchen und wiederholen Sie die Aliquotentnahme mit einer neuen Spitze.

- a. Wenn kein Ultraschallbad verfügbar ist, mindestens 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit vortexen und dann 2 Sekunden lang kurz herunterschleudern.
5. Bereiten Sie die Arbeitslösung vor, indem Sie das Farbstofftestreagenz in HS-Verdünnungspuffer (1:200) verdünnen:
 - a. Bereiten Sie für jeden der beiden Standards 200 µl Arbeitslösung vor (insgesamt 400 µl).
 - b. Bereiten Sie 200 µl Arbeitslösung für jedes Probenaliquot vor (400 µl für jede Probe).
 6. Geben Sie für die Qubit-DNA-Standards 10 µl der Standards 1 und 2 zu getrennten markierten Qubit-Assayröhrchen hinzu, die 10 µl Qubit HS-Puffer aus Schritt 3a enthalten.

7. Nach Abschluss des Ultraschallbads die Teströhrchen entnehmen und kurz zentrifugieren, um die Lösung am Boden der Röhrchen zu sammeln. Röhrchen 5 Sekunden lang bei maximaler Geschwindigkeit vortexen, dann Röhrchen für 2 Sekunden drehen.
8. Fügen Sie jedem Röhrchen mit beschallter markierter DNA und Qubit DNA Standard plus HS-Puffer 180 µl Arbeitslösung (hergestellt in Schritt 5) hinzu. 5 Sekunden vortexen und kurz zentrifugieren, um die Lösung am Boden der Röhrchen zu sammeln.
9. Inkubieren Sie die Proben 2 Minuten lang im Dunkeln, bevor Sie sie auf dem Qubit-Fluorometer quantifizieren.

Hinweis: Die Konzentration der markierten DNA sollte idealerweise zwischen 4 - 12 ng/µl mit einem CV (Standardabweichung ÷ Mittelwert) zwischen den Probenentnahmen < 0,30 liegen. Wenn beide Probenentnahmen außerhalb von 4 - 12 ng/µl liegen, siehe nachstehenden Abschnitt zur **Fehlerbehebung**. Wenn eine Probenentnahme zwischen 4 - 12 ng/µl und die andere außerhalb dieses Bereichs liegt, befolgen Sie diese Richtlinien:

- Wenn eine Probenentnahme zwischen 4 - 12 ng/µl und die andere über 12 ng/µl liegt, fahren Sie mit dem Laden des Chips fort.
- Wenn eine Probenentnahme zwischen 4 - 12 ng/µl und die andere unter 4 ng/µl liegt, wiederholen Sie das Mischen mit dem HulaMixer für 30 Minuten und wiederholen Sie die Quantifizierung.

10. Notieren Sie die Qubit-Messungen in der Tabelle auf der nächsten Seite.
11. Wenn Sie die Proben nicht am selben Tag durchführen, lagern Sie sie bis zur Verwendung bei 4 °C im Dunkeln.

Hinweis: Beschriftete Proben zeigen keine Leistungsminderung, wenn sie innerhalb eines Monats verwendet werden.

gDNA-Qubit-Messungen

Proben-ID	Messung 1 (ng/μl)	Messung 2 (ng/μl)	Durchschnitt (ng/μl)	Lebenslauf (Standardabw./ Mittelwert)

Laden des Bionano-Chips (40 Minuten; 30 Minuten, um den Chip auf Raumtemperatur zu bringen, und 10 Minuten zum Laden)

Siehe **Saphyr System User Guide** (für Saphyr P/N [60325](#) oder [60239](#)) für vollständige Anweisungen zum Laden von Chips und zum Betrieb des Instruments.

Hinweis: Beim Aspirieren einer DLS-markierten Probe zur Chipbeladung nehmen Sie diese aus der Mitte des Röhrchens.

Fehlerbehebung

Die markierte Probe sollte bei 4 °C in einer lichtgeschützten Box gelagert werden, wenn sie nicht verwendet wird. Markierte Proben sollten vor der Quantifizierung und/oder der Chipbeladung auf Raumtemperatur gebracht werden.

Erwartete Metriken basierend auf internen Erfahrungen bei Bionano Genomics mit humanen Proben:

N50 (> 150 kbp)	Markierungen/ 100 kbp	Kartenpreis	Falsch-positive Markierungen	Falsch-negative Markierungen
> 230 kbp	14 - 17	> 70 %	< 10 %	< 15 %

A. Die gDNA ist vor der Markierung nicht homogen

Beweis: CV der Quantifizierungsmessungen erfüllt nicht die Anforderungen des DNA-Isolierungsprotokolls (z. B. CV > 0,30 zwischen linken, mittleren und rechten Messungen in den SP-Protokollen).

Zu befolgende Schritte:

1. Saugen Sie die Probe langsam an und pipettieren Sie sie 5-mal mit einer Spitze mit weiter Öffnung.
2. Inkubieren Sie die gDNA bei Raumtemperatur für 1 bis 3 Tage.
3. Saugen Sie die Probe langsam an und pipettieren Sie sie 5-mal mit einer Spitze mit weiter Öffnung.
4. Mit dem Qubit Broad Range Assay quantifizieren.

B. Die gDNA ist nicht viskos

Nachweis: Die Probenkonsistenz ist sehr dünn (nicht viskos) und leicht zu pipettieren, aber die Konzentration ist > 35 ng/μL.

Die Probe enthält wahrscheinlich keine hochmolekulare gDNA.

Bewerten Sie die Größe der Start-gDNA durch Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE) vor der Markierung.

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

C. Die gDNA-Konzentration beträgt < 36 ng/μL

Nachweis: Die am Ende des DNA-Isolierungsprotokolls gemessene gDNA-Konzentration beträgt weniger als 36 ng/μl. Kontaktieren Sie den Bionano Genomics Support unter Support@bionanogenomics.com.

D. Die markierte Probe ist zu viskos

Nachweis: Die Probe braucht ungewöhnlich lange (mehr als 30 Sekunden), um die Finger des Chips zu füllen.

Kontaktieren Sie den Bionano Genomics Support unter Support@bionanogenomics.com.

E. Die Markierungsdichte ist niedriger als erwartet

Nachweis: Die durchschnittliche erkannte Markierungsdichte ist immer niedriger als die durchschnittliche Standortdichte. Dies ist auf eine Kombination aus Standort-Clustering, DNA-Stretch und optischer Auflösung zurückzuführen. Zum Beispiel beträgt die durchschnittliche Standortdichte für DLE-1 beim Menschen 20,7 Markierungen pro 100 kbp, aber die nachgewiesene Markierungsdichte kann von knapp über 14 bis knapp unter 17 Markierungen pro 100 kbp variieren.

Eine niedrige Markierungsdichte kann das Ergebnis einer suboptimalen enzymatischen Markierung, des Photobleichens von Fluorophoren oder Detektionsproblemen sein.

Mögliche Ursachen für eine geringe Markierungsdichte während des Protokolls:

- Hemmstoffe in der DNA-Präp.
- Unzureichendes Mischen von viskoser gDNA und Master-Mix.
- Falsche Handhabung von DLE-1 (Exposition erhöhter Temperatur, Vortexen usw.).
- Belichtung der Markierungsreaktion durch Licht und Photobleichen von DL-Green.
- Längere Inkubationszeit von DL-Green gegenüber dem pH-Wert des Master-Mix (> 30 min).
- Hardwareproblem.

F. Markierte DNA ist < 4 ng/µl für beide Messungen

Nachweis: Beide Messungen liegen außerhalb des Konzentrationsbereichs von 4 - 12 ng/µl mit dem Qubit High Sensitivity Assay Kit.

Zu befolgende Schritte:

1. Wiederholen Sie die Quantifizierung des DNA-Ausgangsmaterials.
2. Wenn die Probe 3 - 4 ng/µl beträgt, fahren Sie mit dem Laden auf eigenes Risiko fort, aber der erwartete Durchsatz wird wahrscheinlich nicht erreicht.
3. Wenn die Probe < 3 ng/µl ist, laden Sie nicht. Überprüfen Sie die DNA-Anfangskonzentration und wiederholen Sie den Markierungsassay.

G. Markierte DNA ist > 12 ng/µl für beide Messungen

Nachweis: Beide Messungen liegen außerhalb des Konzentrationsbereichs von 4 - 12 ng/µl mit dem Qubit High Sensitivity Assay Kit.

Zu befolgende Schritte:

1. Wenn die Probe > 12 ng/µl ist, wenden Sie sich an den Bionano-Kundendienst (Support@bionanogenomics.com), um Hilfe zu erhalten.
2. Sie können mit dem Laden auf eigenes Risiko fortfahren, aber die markierte Probe kann den Chip verstopfen und reduziertes N50-Molekül aufweisen.

H. Der N50 (≥ 150 kbp) ist kleiner als 230 kbp, oder der N50 (≥ 20 kbp) ist kleiner als 150 kbp

Nachweis: Die N50-Metriken des Dashboards und die Ergebnisse des Bionano Access Molecule Quality Report (MQR) reichen für die oben aufgeführten Spezifikationen nicht aus. Zu befolgende Schritte:

1. Bewerten Sie die Größe der Start-gDNA durch Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE).
2. Bewerten Sie die Probenvorbereitungsmethode, wenn keine gDNA mit hohem Molekulargewicht (Megabase) vorhanden ist.
3. Wenn die Anfangs-gDNA-Größe groß ist, markieren Sie die gDNA neu und stellen Sie sicher, dass übermäßiges Pipettieren oder Pipettieren mit hoher Geschwindigkeit vermieden wird.
4. Kontaktieren Sie den Bionano Kundendienst (Support@bionanogenomics.com), um zu erfahren, ob Sie die Probe auf einem anderen Chip wiederholen sollten.

I. Kartenrate ist niedrig (humane Stichproben)

Nachweis: Die MQR-Kartenrate von Bionano Access beträgt < 70 % Zu befolgende Schritte:

1. Ist die Markierungsdichte niedrig (< 14 Markierungen pro 100 kbp)?
 - a. Wenn dies der Fall ist, wiederholen Sie die Quantifizierung des gDNA-Ausgangsmaterials und wiederholen Sie die Markierung, nachdem die in Abschnitt D aufgeführten möglichen Ursachen berücksichtigt wurden.
2. Wenn die Markierungsdichte bei allen Scans zwischen 14 und 17 Markierungen pro 100 kbp liegt, wenden Sie sich an den Kundendienst.
3. Überprüfen Sie den N50-Wert (≥ 20 kbp) im MQR. Wenn dieser Wert niedrig ist (z. B. weniger als 100 kbp), kann dies zu Problemen mit der Abbildungsrate führen

J. Der effektive Durchsatz beträgt weniger als 10 Gbp pro Scan

Nachweis: Der Durchsatz nach Scan 7 beträgt immer noch weniger als 10 Gbp pro Scan im ICS-Dashboard.

Zu befolgende Schritte:

1. Wiederholen Sie die Quantifizierung der markierten Probe.
2. Stellen Sie sicher, dass die Durchflusszelle mit nukleasefreiem Wasser richtig hydratisiert ist.

Mögliche Ursachen:

- Niedriges N50 (≥ 20 kbp) und/oder niedriges N50 (≥ 150 kbp).
- Verdunstung verursacht eine Zunahme des Salzes und verändert entsprechend die DNA-Migration.
 - a. Wurden die Einlass- und Auslass-Wells mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt (rehydriert), bevor Chip-Plugs/Clips platziert wurden?
- Inhomogene DNA.
- DNA außerhalb des Bereichs von 4-12 ng/ μ l.

Häufig gestellte Fragen

1. Wie weit im Voraus können die Membranen auf der Platte benetzt werden?

Wir empfehlen 10 Minuten vor der Zugabe der Probe zur Membran zu warten. Es ist möglich, beide Membrane gleichzeitig zu benetzen (10 Minuten vor der ersten Membrannutzung), dies hängt jedoch ganz davon ab, ob der Benutzer mit dem Dichtungsstreifen eine dichte Verbindung herstellen kann, um eine Verdunstung zu verhindern. Lassen Sie den Dichtungsstreifen befestigt – es sei denn, Sie tragen eine Probe auf.

2. Wie lange kann die Markierungsreaktion bei 4 °C gehalten werden?

Über Nacht, solange es vor Licht geschützt ist.

3. Wie lange kann die Probe nach Pro K bei 4 °C ruhen?

Über Nacht, solange es vor Licht geschützt ist.

4. Welche Auswirkungen hat eine DNA-Probenkonzentration außerhalb des zulässigen Bereichs?

Wir hatten keine Probleme beim Laden von Proben mit einer DNA-Konzentration von bis zu 12 ng/ul, obwohl Proben über 12 ng/ul den Chip verstopfen können, wenn die Homogenität schlecht ist, oder möglicherweise nicht richtig gefärbt werden. Im Gegensatz dazu haben wir festgestellt, dass Proben mit einer DNA-Konzentration < 4 ng/ul gegebenenfalls nicht genügend Daten für einen effektiven Durchsatz sammeln.

5. Wie lange ist die Probe gut?

Obwohl wir festgestellt haben, dass gefärbte DNA-Proben bei 4 °C bis zu einem Monat vor Licht geschützt aufbewahrt werden können, ohne die Probenmetrik zu beeinträchtigen, empfehlen wir, die Proben innerhalb einer Woche zu untersuchen, um die Wahrscheinlichkeit von Probenqualitätsproblemen zu reduzieren, die sich mit der Zeit entwickeln können.

6. Der grüne Hintergrund in DLS-markierten Proben ist höher als in NLRS-markierten Proben. Ist das ein Problem?

Das übrig gebliebene DL-Green zeigt in den mit dem Saphyr aufgenommenen Bildern oft einen höheren Hintergrund als das, was in NLRS-markierten Proben zu sehen ist. Dies ist normal, und die Membranreinigungsschritte entfernen genug DL-Green, um die Datenmetriken nicht zu beeinträchtigen. Abweichungen bei falsch-positiven Markierungen (PLV) von zusätzlichen Fluorophoren treten zufällig auf und sind kein Problem, wenn sie innerhalb der erwarteten Metriken liegen.

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	support@bionanogenomics.com
Telefon	Öffnungszeiten: Montag bis Freitag, 9:00 bis 17:00 Uhr, Pazifische Zeit USA: +1 (858) 888-7663
Webseite	www.bionanogenomics.com/support