



Protocollo Bionano Prep Direct Label and Stain (DLS)

Numero documento: 30206

Revisione documento: A

Sommario

Avviso legale.....	3
Cronologia delle revisioni.....	4
Panoramica Bionano Prep DLS (750 ng).....	5
Panoramica del flusso di lavoro: Label and Stain il giorno 1, Quant and Load il giorno 2.....	5
Kit Bionano Prep DLS e materiali forniti dall'utente.....	6
Introduzione e note importanti	7
Introduzione	7
Note importanti	7
Protocollo di etichettatura DLS Bionano	10
Inizio protocollo, giorno 1	10
Inizio protocollo, giorno 2.....	15
Risoluzione dei problemi.....	18
Domande frequenti	21
Assistenza tecnica	22

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, 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 Genomica®, Saphyra®, Saphyr Chip® e Bionano Access® 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.

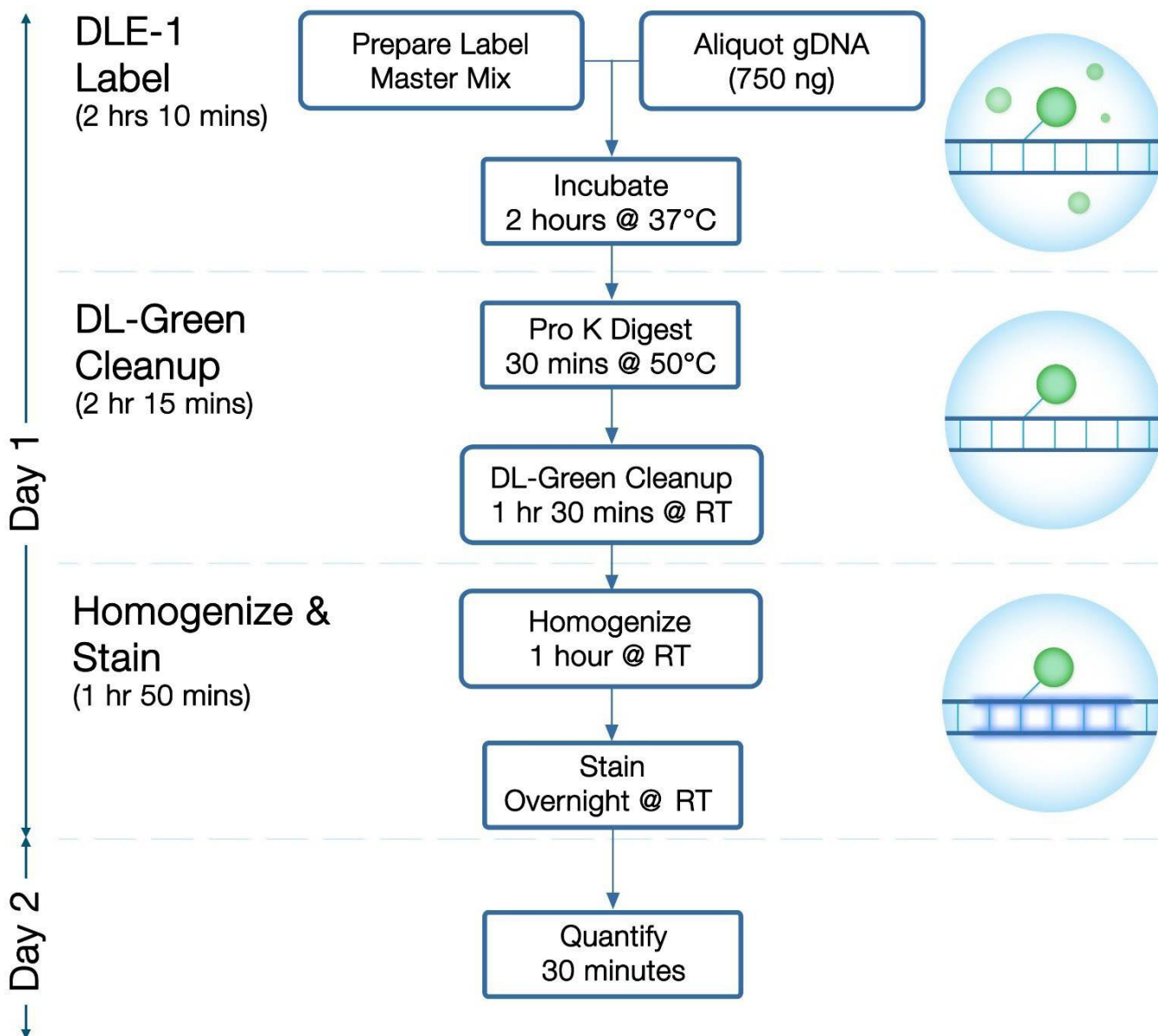
Cronologia delle revisioni

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

Panoramica Bionano Prep DLS (750 ng)

Il DLS è un'etichettatura specifica della sequenza del DNA genomico (gDNA) ad altissimo peso molecolare (UHMW) per la mappatura del genoma ottico di Bionano (OGM) utilizzando un enzima Direct Label (ad esempio, DLE-1), seguito dalla colorazione della spina dorsale del DNA.

Panoramica del flusso di lavoro: Label and Stain il giorno 1; Quantificazione il giorno 2, Caricamento chip dopo la quantificazione



Nota: le linee tratteggiate (----) denotano potenziali punti di pausa/arresto.

Kit Bionano Prep DLS e materiali forniti dall'utente

Tabella 1: Contenuto del kit Bionano Prep DLS (codice n. 80005)

Componente	Parte num.	Quantità	Stoccaggio	Considerazioni sulla gestione
20x DLE-1 (Enzima DLE-1 20x)	20351	18 µl	-20°C	Agitare la provetta 3 volte per mescolare e centrifugare brevemente. Conservare in frigorifero enzimatico a -20°C fino al momento dell'uso.
20x DL-Green	20352	18 µl	-20°C	Scongelare a temperatura ambiente (TA). Vortexare e centrifugare brevemente. Conservare sul blocco di alluminio preraffreddato fino all'uso.
5x DLE-1 Buffer (Tampone DLE-1 5x)	20350	200 µl	-20°C	Scongelare a temperatura ambiente. Vortexare e centrifugare brevemente. Conservare a temperatura ambiente fino all'uso.
4x Flow Buffer (Tampone di Flusso 4x)	20353	190 µl	4°C	Vortexare e centrifugare brevemente. Conservare a temperatura ambiente fino all'uso.
DNA Stain	20356	65 µl	-20°C	Scongelare a temperatura ambiente. Vortexare e centrifugare brevemente. Conservare a temperatura ambiente fino al momento dell'uso; il DMSO contenuto nel DNA Stain cristallizza se messo sul ghiaccio.
1M DTT	20354	75 µl	-20°C	
Ultra Pure Water (Acqua ultra-pura)	20355	900 µl	4°C	Si può conservare a temperatura ambiente.
Piastra a 24 pozzetti DLS	20357	1 piatto	TA	Tenere coperto per evitare la polvere.
Membrane DLS (13 mm)	20358	25	TA	Evitare l'umidità in eccesso.
Nastro adesivo per piastre DLS	20361	10	TA	
Tubi DLS ambra, fondo tondo	20362	12	TA	

Nota: TA = 18 - 25°C

Tabella 2: Materiali forniti dall'utente

Articolo	Descrizione	Catalogo num.
HulaMixer Sample Mixer	Thermo Fisher	15920D
Termociclature con coperchio riscaldato	Fornitura di laboratorio generale	
Puregene Proteinasi K	Qiagen	158918 o 158920
Provette per PCR, 0,2 ml, a parete sottile, tappo piatto, prive di nucleasi	Thermo Fisher o equivalente	AM12225
Provette per micro centrifuga, 0,5 ml, ambrate, prive di nucleasi	USA Scientific o equivalente	1605-0007
Puntali per pipette, non filtrati, 200 µl	USA Scientific o equivalente	1111-1810
Puntali per pipette a foro largo, filtrati, 200 µl	VWR o equivalente Rainin	46620-642
Puntali per pipette, standard, filtrati; 2, 10, 20 e 200 µl	Fornitura di laboratorio generale	
Raffreddatore enzimatico da banco a -20°C	VWR o equivalente	414004-286
Blocco tubo di raffreddamento in alluminio a 4°C	Sigma Aldrich o equivalente	Z740270
Forcipe, appuntito e curvo	Electron Microscopy Sciences o	78141-01
Pipette (2, 10, 20 e 200 µl)	Fornitura di laboratorio generale	
Secchiello per il ghiaccio e ghiaccio	Fornitura di laboratorio generale	
Vortexer	Fornitura di laboratorio generale	
Microcentrifuga per provette da 0,2, 0,5 e 1,5 ml	Fornitura di laboratorio generale	
Fluorometro Qubit	Thermo Fisher	Q33238
Provette per test Qubit®	Thermo Fisher	Q32856
Kit Qubit® HS (Alta Sensibilità) dsDNA Assay	Thermo Fisher	Q32851
Sonicatore da bagno (consigliato)	Branson o equivalente	CPX 952-119R
Pipetta a spostamento positivo MR-10 (opzionale)	Rainin o equivalente	17008575
Puntali per pipette, 10 µl, C-10 per pos. spostamento (opzionale)	Rainin o equivalente	17008604

Introduzione e note importanti

Introduzione

Questo protocollo descrive un approccio di etichettatura enzimatica per l'etichettatura fluorescente diretta del gDNA UHMW da parte dell'enzima Direct Label (DLE-1). L'enzima DLE-1 attacca il fluoroforo DL-Green tramite modifica covalente a un motivo di sequenza specifica. Questo processo di etichettatura non danneggia il gDNA, consentendo la generazione di mappe genomiche altamente contigue e fornendo un'elevata sensibilità al rilevamento di varianti strutturali. Dopo l'etichettatura specifica per la sequenza con DLE-1, il DNA marcato viene colorato per la visualizzazione della spina dorsale. Quando vengono visualizzati sul Saphyr, i campioni etichettati vengono visualizzati come punti verdi su linee blu. Il kit Bionano Prep Direct Label and Stain (DLS) (Catalogo n. 80005) fornisce i reagenti necessari per questo protocollo.

Dimensione della reazione DLE-1 (750 ng)

Questo protocollo produce 60 µl di DNA marcato. Questo è sufficiente per caricare su una singola cella a flusso di un Saphyr Chip, con sufficiente campione rimanente per una cella a flusso aggiuntiva in caso di bassa produttività o altri guasti. Il materiale iniziale dovrebbe essere lungo almeno centinaia di kilobase; se necessario, questo può essere determinato tramite gel elettroforesi a campo pulsato (PFGE). Le metriche di etichettatura sono determinate sul Bionano Saphyr, misurato in etichette/100 coppie di kilobase (kbp). Ulteriori metriche di etichettatura possono essere determinate fornendo un riferimento e monitorando la frequenza di mappa, la positive label variance (PLV) e la varianza dell'etichetta negativa (NLV). Per ulteriori dettagli, vedere la sezione "Note importanti" di seguito.

I dettagli sulle metriche previste sono disponibili nel [Documento 30223, Linee guida per il rapporto sulla qualità della molecola di Saphyr](#).

Note importanti

Considerazioni Generali

- Si consiglia di utilizzare un blocco di raffreddamento del tubo di alluminio preraffreddato su ghiaccio per contenere i componenti della reazione scongelati e per assemblare le reazioni di etichettatura.
- Gli enzimi e i tamponi devono essere pipettati accuratamente, senza goccioline che pendono dall'esterno della punta della pipetta. L'enzima deve essere completamente erogato nella provetta di reazione e la formazione di bolle deve essere accuratamente evitata per garantire reazioni riproducibili. Ciò si ottiene tenendo le provette dei reagenti all'altezza degli occhi durante l'aspirazione o l'erogazione, per visualizzare il processo.
- La miscelazione lenta e accurata del master mix DLE-1 con gDNA è un passaggio fondamentale e promuove l'omogeneità del DNA e l'accessibilità degli enzimi per un'etichettatura efficiente del DNA altamente viscoso.
- Questo protocollo prevede la manipolazione di molecole fluorescenti sensibili alla luce. È importante ridurre al minimo l'esposizione alla luce sia delle reazioni che dei reagenti fotosensibili durante il lavoro. Inoltre, proteggere dalla luce i reagenti fotosensibili durante la conservazione.

- La concentrazione del DNA marcato viene misurata il giorno 2, dopo la marcatura, il cleanup, l'omogenizzazione e la colorazione. L'omogeneità del DNA viene valutata quantificando in duplicato (Coefficiente di variazione (CV) < 0,30). Il DNA etichettato omogeneo consente una stima accurata della concentrazione e un caricamento del DNA sul chip più uniforme. La concentrazione di DNA etichettato deve essere compresa tra 4 e 12 ng/μl.

Dimensione del lotto

- Possono essere processati fino a 12 campioni alla volta.
 - Ogni kit Bionano Prep DLS contiene reagenti sufficienti per 10 campioni.

Requisiti per Avviare il DNA

- Il campione deve contenere gDNA di lunghezza megabase, tipicamente determinato dall'elevata viscosità e/o dal PFGE del campione.
- La concentrazione di gDNA deve essere compresa tra 36 e 150 ng/μl.
 - I campioni di gDNA > 150 ng/μl devono essere diluiti con TE (pH 8,0) a 50 - 150 ng/μl, mescolati 5 volte con un puntale a orifizio largo e lasciati riposare per una notte a temperatura ambiente. Verificare la concentrazione finale del DNA e l'omogeneità prima dell'etichettatura.
 - Per campioni di gDNA < 36 ng/μl, contattare l'assistenza tecnica all'indirizzo Support@bionanogenomics.com.

Determinazione dell'Enzima

- Per campioni non umani, prima di avviare il protocollo DLS, importare i dati della sequenza per il campione nella funzionalità Silico Digestion di Bionano Access o nel software indipendente [Label Density Calculator](#) per assicurarsi che l'etichettatura DLS sia la scelta appropriata per il campione. La densità effettiva dell'etichetta dovrebbe essere entro ± 2 etichette del previsto. Contatta il supporto tecnico a Support@bionanogenomics.com per le istruzioni in caso di dubbio.
- Per i campioni non umani, gli attuali strumenti di analisi a valle hanno più successo con i genomi che hanno densità di etichette DLS comprese tra 9 e 25 etichette per 100 kbp.

Gestione del DNA genomico

Generale:

- Questo protocollo prevede la gestione del gDNA genomico viscoso, che è difficile da pipettare con precisione. È fondamentale seguire attentamente tutti i passaggi di questo protocollo per garantire un campionamento accurato del DNA al fine di ottenere il corretto rapporto enzima-DNA e DNA-macchia, e ridurre al minimo la manipolazione non necessaria del gDNA, che può portare a molecole insufficientemente lunghe per l'analisi.

Aggiunta di gDNA alla Reazione di Etichettatura:

- Per garantire un campionamento accurato dallo stock di gDNA viscoso, massimizzare prima l'omogeneità del DNA dello stock pipettando delicatamente la soluzione di DNA equilibrata a temperatura ambiente con un puntale a orificio largo 5 volte e seguire le linee guida di seguito per un corretto pipettaggio dentro e fuori un puntale standard, o puntale a spostamento positivo, per l'erogazione completa.
- Prima di prelevare gDNA viscoso in un puntale standard, pipettare un volume d'acqua identico e contrassegnare il livello della soluzione sul puntale con un pennarello a punta fine che serva da guida durante il pipettaggio del gDNA. Salva la punta contrassegnata come guida e usare una nuova per il recupero del DNA. In alternativa, l'uso di una pipetta a spostamento positivo può migliorare la consistenza durante il pipettaggio di gDNA viscoso.
- Per aspirare il gDNA viscoso in una punta standard, tenere la provetta del DNA di serie per una visualizzazione ravvicinata, premere lo stantuffo della pipetta fino al primo arresto, immergere la punta della pipetta verso il centro della soluzione viscosa e rilasciare con cautela lo stantuffo, il più **lentamente** possibile muovendo la punta con un movimento circolare, per attirare il DNA viscoso nella punta monitorando attentamente l'assorbimento del DNA. Tenere la punta sommersa anche dopo che la soluzione di DNA viscoso smette di muoversi verso l'alto e si livella (usare la punta contrassegnata come guida approssimativa per vedere se la soluzione viscosa si livella al livello appropriato). Il DNA viscoso può impiegare fino a 30 secondi per riempire la punta al livello appropriato. Rilasciare lo stantuffo troppo rapidamente può produrre una bolla nella punta, con conseguente sottocampionamento (se si verifica ricominciare da capo). Dopo che la soluzione nella punta della pipetta si è livellata e mentre la punta è ancora immersa nella soluzione di DNA, raschiare la punta contro il fondo della provetta 5 volte con un movimento circolare. Rimuovere la punta dalla soluzione di DNA e ispezionarla visivamente per confermare che sia riempita al livello appropriato, confrontandola con la punta contrassegnata. Rimuovere troppo presto la punta della pipetta dalla soluzione di gDNA o raschiare in modo improprio la punta sul fondo della provetta può produrre una bolla all'estremità della punta della pipetta, indicando un sottocampionamento (ricominciare se ciò accade). **Il pipettaggio accurato del gDNA viscoso è possibile con pratica e pazienza.**
- Per depositare l'intero volume di gDNA viscoso in una provetta o master mix, tenere la provetta di reazione per una visualizzazione ravvicinata e rilasciare il DNA inserendo la punta della pipetta nella soluzione e premendo delicatamente lo stantuffo fino al primo arresto, quindi al secondo fermarsi, monitorando il rilascio del DNA, fino a quando l'ultimo pezzetto di DNA non ha lasciato la punta. Rimuovere immediatamente la punta non appena l'ultimo pezzetto di DNA ha lasciato la punta della pipetta mantenendo una pressione costante per evitare l'assorbimento di fluido o l'introduzione di bolle d'aria. Ispezionare visivamente il puntale dopo averlo rimosso dalla soluzione per confermare che sia vuoto.

Protocollo di etichettatura DLS Bionano

Inizio protocollo, giorno 1

Per la corretta manipolazione del gDNA, vedere la sezione *Note importanti*. La concentrazione di gDNA deve essere compresa tra 36 ng/ μ l e 150 ng/ μ l.

Per una corretta manipolazione e conservazione dei reagenti, vedere le sezioni *Contenuto del kit* e *Materiali forniti dall'utente*.

Impostazione

1. Scongela 20x DL-Green. Vortexare bene e ruotare a impulsi. Trattenere il ghiaccio in un blocco di alluminio a 4°C.
2. Scongela il 5x DLE-1 Buffer. Vortexare bene e ruotare a impulsi. Tenere a temperatura ambiente fino al momento dell'uso.
3. Fai scorrere 20x DLE-1 Enzyme tre volte e ruota a impulsi. Tenere su banco in blocco enzimatico -20°C.
4. Rimuovere il tubo dell'acqua ultra-pura da 4°C (se necessario) e mantenerlo a temperatura ambiente.

Etichettatura DLE-1 (30 μ l di reazione, 2 ore e 10 minuti)

Diluire il gDNA e combinare con la miscela di etichettatura (10 minuti)

5. Se la quantificazione del gDNA è già stata eseguita immediatamente prima dell'etichettatura, procedere al passaggio 6. In caso contrario, girare a impulsi e quindi ripetere la quantificazione prima di procedere al passaggio 6.
6. In una provetta per PCR a parete sottile, aggiungere 750 ng di gDNA (a) ad acqua ultra pura (b) per un volume totale di 21 μ l.
 - a. $750 \text{ ng} / [\text{concentrazione di gDNA}] = \mu\text{l di gDNA}$
 - b. $21 \mu\text{l} - (\mu\text{l di gDNA}) = \mu\text{l di acqua ultra-pura}$.


ID campione gDNA	Concentrazione di gDNA (ng/ μ l)	Volume di acqua ultra-pura Acqua (μ l)	Volume di gDNA (ml)

7. Se si elabora più di un campione, preparare una Master Mix di etichettatura in una provetta ambrata da 0,5 ml. Aggiungere i componenti nell'ordine indicato nella tabella seguente. Con un puntale standard, pipettare tutto il volume della Master Mix di marcatura, aspirando e rilasciando per cinque volte, facendo attenzione a non generare bolle. Ruota a impulsi e conserva in un blocco di alluminio sul ghiaccio fino al momento dell'uso. Utilizzare entro 30 minuti dalla miscelazione dei componenti.

Nota: dopo aver creato la master mix, lasciare il 5x DLE-1 Buffer a temperatura ambiente perché andrà usato nel passaggio 12.

Tabella di Calcolo della Master Mix di Etichettatura

Reazione di Etichettatura	1 Campione	Num. di campioni	Eccesso di Master Mix	Master mix totale
gDNA (750 ng) + Acqua ultra-pura	21 µl			
5x DLE-1 Buffer (Tampone DLE-1 5x)	6,0 µl		× 1,2	µl
20x DL-Green	1,5 µl		× 1,2	µl
20x DLE-1 (Enzima DLE-1 20x)	1,5 µl		× 1,2	µl
Volume di Reazione Finale	30 µl			µl

8. Utilizzando un puntale standard, aggiungere 9 µl di master mix al disopra dei 21 µl di gDNA + acqua ultra-pura, senza miscelare. Poi, utilizzando un puntale standard nuovo con pipetta impostata su 28 µl, miscelare lentamente il campione su e giù per 5 volte (1 su + 1 giù = 1 volta). Ruota ad impulsi la provetta per 2 secondi. Proteggi dalla luce. 

Guardare il video intitolato [DLS Master Mix Mixing](#) nella sezione [DLS Labeling Kit](#) della pagina Support del sito Web.

Nota: un campione accuratamente miscelato è necessario per etichettare in modo efficiente tutte le molecole. Aspirare il campione dal basso e dispensare vicino alla parte superiore (senza toccare la punta della pipetta sulla provetta) per massimizzare la miscelazione.

Etichettatura (2 ore)

9. Incubare in un termociclatore utilizzando un coperchio riscaldato impostato a 47°C (o "On" se non è disponibile alcuna scelta di temperatura):
- 2 ore a 37°C
 - Tenere a 4°C fino al passaggio successivo. Dopo aver tolto il termociclatore, procedere rapidamente al passaggio successivo. Ruotare a impulsi brevemente.

Digestione della proteinasi K e pulizia DL-Green (2 ore e 15 minuti)

Digestione della Proteinasi K (35 minuti)

10. Dispensare 5 μ l di Puregene Proteinase K (Qiagen) direttamente nella massa centrale del campione contenuto nella provetta per PCR. Per evitare di rimuovere inavvertitamente il DNA che potrebbe aderire alla punta, non mescolare.
11. Incubare in un termociclatore utilizzando un coperchio riscaldato impostato a 60°C (o "On" se non è disponibile alcuna scelta di temperatura):
 - a. 30 minuti a 50°C
 - b. Tenere a 4°C fino al passaggio successivo. Dopo aver tolto il termociclatore, procedere rapidamente al passaggio successivo. Ruotare a impulsi brevemente.

Adsorbimento a membrana (1 ora e 40 minuti)

Per i passaggi 12-18, guardare il video intitolato [DLS Membrane Demo](#) nella sezione [DLS Labeling Kit](#) della pagina Support del sito Web.

12. Per ogni campione, inibire il lato inferiore di una membrana DLS con l'1x DLE-1 Buffer all'interno della piastra a 24 pozzetti per DLS:
 - a. Per ogni campione, preparare 60 μ l di 1x DLE-1 Buffer (12 μ l di 5x DLE-1 Buffer + 48 μ l di acqua ultra-pura). Vortexare per mescolare e ruotare a impulsi.
 - b. Dispensare 25 μ l di 1x DLE-1 Buffer al centro di un pozzetto della piastra a 24 pozzetti per DLS.
 - c. Utilizzare una pinza per posizionare una membrana DLS sopra il buffer.
 - d. Sigillare immediatamente i pozzetti con un Nastro adesivo per piastre DLS per evitare l'evaporazione. Tenendo ferma la piastra, applicare pressione per fissare il Nastro adesivo per piastre DLS al bordo superiore dei pozzetti.
 - e. Lasciare che la membrana si inumidisca completamente per 10 minuti.

Nota: la membrana dovrebbe assumere un colore bluastro una volta completamente bagnata. Guardare all'incirca a 0:55 del video [DLS Membrane Demo](#). Se la membrana non si bagna completamente dopo 10 minuti, utilizzare una nuova membrana. Potrebbe essere necessario preparare altro 1x DLE-1 Buffer per inibire la nuova membrana.

13. Eseguire la pulizia DL-Green dispensando il campione di DNA etichettato al centro della membrana bagnata:
 - a. Tenere saldamente la piastra e rimuovere con attenzione il Nastro adesivo per piastre DLS. Utilizzando un puntale standard con la pipetta impostata su 38 μ l, aspirare l'intero volume (~ 35 μ l) di DNA etichettato.
 - b. Dispensare con cautela il DNA etichettato al centro della membrana DLS bagnata.

- c. Sigillare immediatamente i pozzetti con un Nastro adesivo per piastre DLS per evitare l'evaporazione. Tenendo ferma la piastra, applicare pressione per fissare il Nastro adesivo per piastre DLS al bordo superiore dei pozzetti.
 - d. Proteggere la piastra a 24 pozzetti DLS dalla luce (coperchio) e incubare a temperatura ambiente per 1 ora. Assicurarsi che la piastra rimanga indisturbata, senza movimenti involontari della piastra durante l'incubazione. ⚠
 - e. Fino a 10 minuti prima del completamento dell'incubazione, bagnare una seconda membrana in un pozzetto inutilizzato della piastra a 24 pozzetti DLS, seguendo i passaggi 12b - 12e sopra.
 - f. Dopo 1 ora, tenere saldamente la piastra e rimuovere con attenzione il Nastro adesivo per piastre DLS.
 - g. Utilizzando una punta di pipetta standard non filtrata, con la pipetta impostata su 38 µl, aspirare lentamente l'intero campione etichettato tenendo il contatto perpendicolarmente con la membrana e spostare la punta attraverso l'area del DNA mentre si aspira per raccogliere il DNA.
14. Ripetere i passaggi 13b - 13d, ma dispensare sulla seconda membrana (non utilizzata) preparata nel passaggio 13e e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
15. Durante i 30 minuti di incubazione, portare a temperatura ambiente il DTT 1M , il 4x Flow Buffer e il DNA Stain. Una volta scongelate, agitare bene tutte le provette e ruotare a impulsi brevemente per raccogliere il contenuto. Tenere tutte le provette a temperatura ambiente fino al momento dell'uso.
16. Dopo 30 minuti, tenere saldamente la piastra e rimuovere con attenzione il Nastro adesivo per piastre DLS.
17. Utilizzando una punta di pipetta standard non filtrata, con la pipetta impostata su 35 µl, aspirare lentamente l'intero campione etichettato mentre si fa contatto perpendicolarmente con la membrana e spostare la punta attraverso l'area del DNA mentre si aspira per raccogliere il DNA. Trasferire in una nuova provetta per PCR o in una provetta ambrata da 0,5 ml. Ruotare a impulsi per 2 secondi. Proteggere i tubi dalla luce. ⚠
18. Utilizzando un puntale standard da 200 µl, aspirare 20 µl del campione etichettato dalla provetta PCR o dalla provetta ambrata da 0,5 ml e dispensare sul fondo della provetta ambrata a fondo tondo DLS (2 ml). Procedere al passaggio successivo (**colorazione e omogenizzazione del DNA**).
- a. Se il volume del campione recuperato è <20 µl, portare il volume a un totale di 20 µl utilizzando l'1x DLE-1 Buffer.

Colorazione e omogenizzazione del DNA (1 ora e 10 minuti)

Colorazione e Omogeneizzazione (1 ora, 10 minuti)

19. In una nuova provetta ambrata da 0,5 ml, preparare la Staining Master Mix (master mix di colorazione) secondo la tabella seguente. Vortexare per mescolare, quindi ruotare a impulsi per raccogliere i contenuti.

Tabella per il calcolo della Staining Master Mix

Reazione alla colorazione	1 Campione	Num. di campioni	Eccesso di Master Mix	Master mix totale
Campione etichettato (passaggio 19)	20 µl			
4x Flow Buffer (Tampone di Flusso 4x)	15 µl		× 1,25	µl
1M DTT	6 µl		× 1,25	µl
DNA Stain	3,5 µl		× 1,25	µl
Ultra Pure Water (Acqua ultra-pura)	15,5 µl		× 1,25	µl
Totale	60 µl			µl

Nota: il Flow Buffer è viscoso, quindi pipettare lentamente le soluzioni che lo contengono per una maggiore precisione.

20. Per ogni DNA etichettato, aggiungere 40 µl di Staining Master Mix sopra il campione etichettato (20 µl) contenuto nella DLS Round Bottom Amber Tube (2 ml). Non mescolare.

Nota: la master mix viene dispensata sopra il campione etichettato per evitare di estrarre inavvertitamente il DNA che potrebbe attaccarsi alla punta della pipetta.

21. Collocare le provette DLS ambrate a fondo tondo contenenti i campioni in HulaMixer (Thermo Fisher) con velocità impostata su 5 giri/min. La superficie del supporto del tubo deve essere piana e parallela alla superficie di lavoro. Mescolare per 1 ora a temperatura ambiente con tutte le opzioni diverse dalla rotazione disattivate.

22. Dopo 1 ora, rimuovere i campioni dall'HulaMixer. Ruotare a impulsi per raccogliere i contenuti.

Nota: non lasciare che la rotazione prosegua per più di 1 ora, poiché ciò potrebbe diminuire la molecola N50.

23. Conservare per una notte a temperatura ambiente, al riparo dalla luce.

Inizio protocollo, giorno 2

Consultare l'elenco dei materiali di consumo e delle apparecchiature forniti dall'utente per assicurarsi che siano tutti disponibili.

Quantificazione del DNA marcato e colorato (30 minuti)

Quantificazione del DNA (30 minuti)

Determinare la concentrazione finale del DNA marcato e colorato. Risultati migliori si otterranno se la concentrazione di DNA (media di due misurazioni) è compresa tra 4 e 12 ng/μl. La variazione nella concentrazione finale è dovuta alle difficoltà nel campionare accuratamente il gDNA viscoso iniziale e alla variazione nel recupero del gDNA dalla fase di rimozione del DL-Green. Se la concentrazione del campione non rientra in questo intervallo, consultare la sezione Risoluzione dei problemi per i consigli.

Kit di analisi Qubit dsDNA HS (alta sensibilità) e fluometro Qubit:

Nota: il protocollo Qubit dsDNA HS Assay standard non fornirà misurazioni accurate della concentrazione a causa delle lunghezze estremamente lunghe del DNA etichettato. Abbiamo modificato il protocollo Qubit per includere una fase di sonicazione per frammentare un'aliquota del DNA etichettato per garantire misurazioni accurate della concentrazione. Fare riferimento al manuale utente del kit di analisi Qubit dsDNA HS per i dettagli del kit.

1. Utilizzando un puntale a orifizio largo su una pipetta da 200 μl impostata a 50 μl, mescolare 5 volte il DNA etichettato e colorato. Ruotare a impulsi.
2. Lascia che i Qubit HS Standards e il DNA etichettato raggiungano la temperatura ambiente (almeno 30 minuti).
3. Preparare provette Qubit da 0,5 ml:
 - a. 2 provette da dosaggio separate per la misurazione degli Standard di Qubit HS, ciascuna contenente 10 μl di Qubit HS Buffer.
 - b. 2 provette di analisi separate per campione etichettato, ciascuna contenente 18 μl di Qubit HS Buffer.
4. Utilizzando un puntale standard o un puntale per pipetta a spostamento positivo, prelevare due aliquote separate da 2 μl da ciascun campione e dispensarle in 18 μl di tampone HS Qubit nella provetta da dosaggio Qubit, risciacquando il puntale. Posizionare le provette Qubit in un portaprovette galleggiante e sonicare in un sonicatore da bagno per 10 minuti. Durante la sonicazione, preparare la soluzione di lavoro come descritto di seguito.

Nota: se una lunga stringa di DNA è attaccata alla punta quando si rimuove la punta dalla provetta, dispensare nuovamente il campione nella provetta e ripetere la rimozione dell'aliquota con una nuova punta.

 - a. Se non è disponibile un sonicatore da bagno, vortexare per almeno 30 secondi alla massima velocità, quindi ruotare brevemente per 2 secondi.
5. Preparare la Soluzione di lavoro diluendo il reagente colorante (Dye Assay Reagent) in HS Dilution Buffer (Tampone di diluizione HS) (1:200):
 - a. Preparare 200 μl di Working Solution per ciascuno dei due standard (400 μl in totale).
 - b. Preparare 200 μl di Working Solution per ogni aliquota di campione (400 μl per ogni campione).

6. Per i DNA standard di Qubit , aggiungere 10 µl degli Standard 1 e 2 a provette da dosaggio diverse etichettate contenenti 10 µl di Qubit HS Buffer dal passaggio 3a.
7. Una volta completata la sonicazione, recuperare le provette e centrifugare brevemente per raccogliere la soluzione sul fondo delle provette. Vortexare le provette per 5 secondi alla massima velocità, quindi ruotare le provette per 2 secondi.
8. Aggiungere 180 µl di Working Solution (preparata al passaggio 5) a ogni provetta contenente il DNA marcato sonicato e il DNA Standard di Qubit più l'HS Buffer. Vortexare per 5 secondi e centrifugare brevemente per raccogliere la soluzione sul fondo delle provette.
9. Incubare i campioni al buio per 2 minuti prima della quantificazione sul fluometro Qubit.

Nota: la concentrazione di DNA etichettato dovrebbe idealmente rientrare tra 4-12 ng/µl con un CV (deviazione standard ÷ media) tra il campionamento < 0,30. Se entrambi i campionamenti sono al di fuori di 4 - 12 ng/µl, vedere la sezione **Risoluzione dei problemi** di seguito. Se un campionamento è compreso tra 4 e 12 ng/µl e l'altro è al di fuori di questo intervallo, attenersi alle seguenti linee guida:

- Se un campionamento è compreso tra 4 - 12 ng/µl e l'altro è superiore a 12 ng/µl, procedere al caricamento del chip.
- Se un campionamento è compreso tra 4 - 12 ng/µl e l'altro è inferiore a 4 ng/µl, ripetere la miscelazione di HulaMixer per 30 minuti e ripetere la quantificazione.

10. Registra le misurazioni Qubit nella tabella nella pagina successiva.
11. Se non si eseguiranno i campioni lo stesso giorno, conservare al buio a 4°C fino all'uso.

Nota: i campioni etichettati non mostrano alcuna riduzione delle prestazioni se utilizzati entro un mese.

Misurazioni Qubit gDNA

ID campione	Misura 1 (ng/μl)	Misura 2 (ng/μl)	Media (ng/μl)	CV (dev.st/media)

Caricamento del chip Bionano (40 minuti; 30 minuti per portare il chip a temperatura ambiente e 10 minuti per caricare)

Fare riferimento alla **Guida per l'utente del sistema Saphyr** (per Saphyr P/N [60325](#) o [60239](#)) per istruzioni complete sul caricamento del chip e sul funzionamento dello strumento.

Nota: quando si aspira il campione con etichetta DLS per il caricamento del chip, aspirare dal centro della provetta.

Risoluzione dei problemi

Il campione etichettato deve essere conservato a 4°C in una scatola protetta dalla luce quando non è in uso. Il campione etichettato deve essere portato a temperatura ambiente prima della quantificazione e/o del caricamento su chip.

Metriche previste basate sull'esperienza interna di Bionano Genomics con campioni umani:

N50 (> 150 kbp)	Etichette/ 100 kbp	Ratio della Mappa	Positive label variance	Varianza etichetta negativa
> 230 kbp	14 - 17	> 70%	< 10%	< 15%

A. Il gDNA non è omogeneo prima dell'etichettatura

Evidenza: il CV delle misurazioni di quantificazione non soddisfa i requisiti del protocollo di isolamento del DNA (p. es., CV > 0,30 tra le misurazioni sinistra, centrale e destra nei protocolli SP).

Passi da seguire:

1. Aspirare e dispensare il campione lentamente utilizzando un puntale a orifizio largo 5 volte.
2. Incubare il gDNA a temperatura ambiente per 1-3 giorni.
3. Aspirare e dispensare il campione lentamente utilizzando un puntale a orifizio largo 5 volte.
4. Quantificazione con Qubit Broad Range Assay.

B. Il gDNA non è viscoso

Evidenza: la consistenza del campione è molto sottile (non viscosa) e facilmente pipettabile, ma la concentrazione è > 35 ng/μl.

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

Valutare la dimensione del gDNA iniziale mediante elettroforesi su gel a campo pulsato (PFGE) prima dell'etichettatura.

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

C. La concentrazione di gDNA è < 36 ng/μl

Prova: la concentrazione di gDNA misurata alla fine del protocollo di isolamento del DNA è inferiore a 36 ng/μl.

Contatta il supporto di Bionano Genomics a Support@bionanogenomics.com

D. Il campione etichettato è troppo viscoso

Prova: il campione impiega un tempo anormalmente lungo (superiore a 30 secondi) per riempire le dita del chip.

Contattare il supporto di Bionano Genomics a Support@bionanogenomics.com

E. La densità dell'etichetta è inferiore al previsto

Evidenza: la densità media dell'etichetta rilevata sarà sempre inferiore alla densità media del sito. Ciò è dovuto a una combinazione di clustering del sito, allungamento del DNA e risoluzione ottica. Ad esempio, la densità media del sito per DLE-1 nell'uomo è 20,7 etichette per 100 kbp, ma la densità dell'etichetta rilevata può variare da appena sopra 14 a appena sotto 17 etichette per 100 kbp.

La bassa densità dell'etichetta può essere il risultato di un'etichettatura enzimatica non ottimale, del fotosbiancamento dei fluorofori o di problemi di rilevamento.

Potenziati cause di bassa densità di etichette durante il protocollo:

- Sostanze inibitorie nella preparazione del DNA.
- Miscelazione inadeguata di gDNA viscoso e master mix.
- Cattiva gestione di DLE-1 (esposizione a temperature elevate, vortex, ecc.).
- Esposizione della reazione di etichettatura alla luce e al fotosbiancamento DL-Green.
- Esposizione prolungata di DL-Green al pH della master mix (> 30 min).
- Problema hardware.

F. Il DNA marcato è < 4 ng/μl per entrambe le misurazioni

Evidenza: entrambe le misurazioni sono al di fuori dell'intervallo di concentrazione di 4 -12 ng/μl utilizzando il kit Qubit High Sensitivity Assay.

Passi da seguire:

1. Ripetere la quantificazione dello stock di DNA iniziale.
2. Se il campione è di 3 - 4 ng/μl, procedere al caricamento a proprio rischio, ma probabilmente non verrà raggiunta la produttività prevista.
3. Se il campione è < 3 ng/μl non caricare. Controllare la concentrazione iniziale del DNA e ripetere il test di etichettatura.

G. Il DNA marcato è > 12 ng/μl per entrambe le misurazioni

Evidenza: entrambe le misurazioni sono al di fuori dell'intervallo di concentrazione di 4 -12 ng/μl utilizzando il kit Qubit High Sensitivity Assay.

Passi da seguire:

1. Se il campione è > 12 ng/μl, contattare l'Assistenza Clienti Bionano (Support@bionanogenomics.com) per assistenza.
2. Si può procedere al caricamento a proprio rischio, ma il campione etichettato potrebbe ostruire il chip e avere una molecola N50 ridotta.

H. L'N50 (≥ 150 kbp) è inferiore a 230 kbp o l'N50 (≥ 20 kbp) è inferiore a 150 kbp

Evidenza: le metriche del dashboard N50 e i risultati del Bionano Access Molecule Quality Report (MQR) non raggiungono le specifiche sopra elencate.

Passi da seguire:

1. Valutare la dimensione del gDNA iniziale mediante elettroforesi su gel a campo pulsato (PFGE).
2. Valutare il metodo di preparazione del campione se non è presente gDNA ad alto peso molecolare (megabase).
3. Se la dimensione iniziale del gDNA è grande, rietichettare il gDNA assicurandosi di evitare un pipettaggio eccessivo o ad alta velocità.
4. Contattare l'Assistenza Clienti Bionano (Support@bionanogenomics.com) per assistenza se è necessario eseguire nuovamente il campione su un chip diverso.

I. La frequenza della mappa è bassa (campioni umani)

Prova: il tasso di mappa MQR di Bionano Access è < 70% Passaggi da seguire:

1. La densità dell'etichetta è bassa (< 14 etichette per 100 kbp)?
 - a. In tal caso, ripetere la quantificazione dello stock di gDNA iniziale e ripetere l'etichettatura dopo aver considerato le potenziali cause elencate nella Sezione D.
2. Se la densità dell'etichetta è compresa tra 14-17 etichette per 100 kbp in tutte le scansioni, contattare l'assistenza.
3. Controllare il valore N50 (≥ 20 kbp) nell'MQR. Se questo valore è basso (ad esempio, inferiore a 100 kbp), può causare problemi con la frequenza di mappa

J. Il throughput effettivo è inferiore a 10 Gbp per scansione

Evidenza: il throughput dopo la scansione 7 è ancora inferiore a 10 Gbp per scansione in ICS Dashboard.

Passi da seguire:

1. Ripetere la quantificazione del campione etichettato.
2. Assicurarsi che la cella a flusso sia adeguatamente idratata con acqua priva di nucleasi. Potenziali cause:
 - N50 basso (≥ 20 kbp) e/o N50 basso (≥ 150 kbp).
 - L'evaporazione causa un aumento della concentrazione di sale e modifica la migrazione del DNA.
 - a. I pozzetti di ingresso e uscita sono stati rabboccati (reidratati) con acqua priva di nucleasi prima della sigillatura con tappi/clip?
 - DNA non omogeneo.
 - DNA al di fuori dell'intervallo 4-12 ng/ μ l.

Domande frequenti

1. Con quanto anticipo si possono bagnare le membrane sulla piastra?

Si consiglia 10 minuti prima di aggiungere il campione alla membrana. È possibile bagnare entrambe le membrane contemporaneamente (10 minuti prima del primo uso della membrana), ma ciò dipende interamente dalla capacità dell'utente di creare una tenuta ermetica con il nastro adesivo per evitare l'evaporazione. Mantenere il nastro adesivo a meno che non si applichi il campione.

2. Per quanto tempo può resistere la reazione di etichettatura a 4°C?

Durante la notte, purché al riparo dalla luce.

3. Per quanto tempo il campione può rimanere a 4°C dopo Pro K?

Durante la notte, purché al riparo dalla luce.

4. Qual è l'impatto di una concentrazione del campione di DNA fuori range?

Non abbiamo avuto problemi a caricare campioni con una concentrazione di DNA fino a 12 ng/ul, sebbene i campioni superiori a 12 ng/ul possano ostruire il chip se l'omogeneità è scarsa o possano non essere colorati correttamente. Al contrario, abbiamo scoperto che i campioni con concentrazione di DNA < 4 ng/ul potrebbero non raccogliere dati sufficienti per un rendimento efficace.

5. Per quanto tempo è valido il campione?

Sebbene abbiamo scoperto che i campioni di DNA colorati alle condizioni ottimali possono rimanere a 4°C protetti dalla luce fino a un mese senza degradazione delle metriche del campione, suggeriamo di eseguire i campioni entro una settimana per ridurre la probabilità di problemi di qualità dei campioni che potrebbero insorgere nel corso del tempo.

6. Lo sfondo verde nei campioni con etichetta DLS è più alto rispetto ai campioni con etichetta NLRS. È un problema?

Il DL-Green rimanente spesso mostrerà uno sfondo più alto nelle immagini scattate sul Saphyr rispetto a quello che si vede nei campioni etichettati con NLRS. Questo è normale e i passaggi di pulizia della membrana rimuovono una quantità sufficiente di DL-Green per non influire sulle metriche dei dati. La Positive label variance (PLV) da fluorofori extra si verifica in modo casuale e non è un problema se entro le metriche previste.

Assistenza tecnica

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

La documentazione riguardante i prodotti Bionano, le SDS, i certificati di analisi, le domande frequenti e gli altri documenti correlati è reperibile dalla pagina Support del sito Web 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, tempo Pacifico USA: +1 (858) 888-7663
Sito web	www.bionanogenomics.com/support