



# Protocolo Bionano Prep Direct Label and Stain (DLS)

Número de documento: 30206

Revisión del documento: A

## Índice

---

Aviso legal .....	3
Historial de revisiones .....	4
Descripción general de Bionano Prep DLS (750 ng) .....	5
Descripción general del flujo de trabajo: marcado y tinción durante el día 1; cuantificación durante el día 2, carga en el chip tras la cuantificación.....	5
Kit Bionano Prep DLS y materiales proporcionados por el usuario .....	6
Introducción y notas importantes .....	7
Introducción .....	7
Notas importantes.....	7
Protocolo de marcaje DLS de Bionano .....	10
Inicio del protocolo: Día 1 .....	10
Inicio del protocolo: Día 2 .....	15
Solución de problemas .....	18
Preguntas frecuentes.....	21
Asistencia técnica .....	22

## Aviso legal

---

### **Para uso exclusivo en investigación. No debe utilizarse en procedimientos de diagnóstico.**

Este material está protegido por las leyes de derechos de autor de Estados Unidos y tratados internacionales. Se prohíbe el uso no autorizado de este material. Ninguna parte de la publicación puede copiarse, reproducirse, distribuirse, traducirse, someterse a ingeniería inversa ni transmitirse de ninguna forma ni por ningún medio o método, ya sea conocido o desconocido, sin el permiso previo, expreso y por escrito de Bionano Genomics. Copiar, según la ley, incluye traducir a otro idioma o formato. Se pretende que la información técnica que se incluye en este documento se utilice para los destinos finales permitidos por la ley de EE. UU. Se prohíbe cualquier desviación contraria a la ley de EE. UU. Este documento representa la información más reciente disponible en el momento de su publicación. Debido a los esfuerzos continuos para mejorar el producto, pueden producirse cambios técnicos que no estén recogidos en este documento. Bionano Genomics se reserva el derecho de realizar cambios en las especificaciones y en el resto de la información contenida en esta publicación en cualquier momento y sin previo aviso. Póngase en contacto con el Servicio de soporte al cliente de Bionano Genomics para obtener la información más reciente.

BIONANO GENOMICS RENUNCIA A TODAS LAS GARANTÍAS CON RESPECTO A ESTE DOCUMENTO, EXPRESAS O IMPLÍCITAS, INCLUIDAS, ENTRE OTRAS, LAS DE COMERCIALIZACIÓN O IDONEIDAD PARA UN PROPÓSITO EN PARTICULAR. EN LA MAYOR MEDIDA PERMITIDA POR LA LEY, BAJO NINGUNA CIRCUNSTANCIA BIONANO GENOMICS SERÁ RESPONSABLE, YA SEA POR CONTRATO, AGRAVIO, GARANTÍA, O CONFORME A CUALQUIER ESTATUTO O CUALQUIER OTRO FUNDAMENTO DE DAÑOS ESPECIALES, INCIDENTALES, INDIRECTOS, PUNITIVOS, MÚLTIPLES O EMERGENTES QUE SE RELACIONEN CON ESTE DOCUMENTO O QUE SURJAN DE ESTE DOCUMENTO, INCLUIDO, ENTRE OTROS, SU USO, SEAN PREVISIBLES O NO E INDEPENDIENTEMENTE DE QUE BIONANO GENOMICS ESTÉ INFORMADO DE LA POSIBILIDAD DE TALES DAÑOS.

### **Patentes**

Es posible que los productos de Bionano Genomics® estén protegidos por una o más patentes estadounidenses o extranjeras.

### **Marcas comerciales**

El logotipo de Bionano Genomics y los nombres de los productos o servicios de Bionano Genomics son marcas comerciales registradas o marcas comerciales propiedad de Bionano Genomics en Estados Unidos y en otros países.

Bionano Genomics®, Saphyr®, Saphyr Chip® y Bionano Access® son marcas comerciales de Bionano Genomics, Inc. Las demás marcas comerciales son propiedad exclusiva de sus respectivos dueños.

No se otorga ni se da a entender ninguna licencia para utilizar ninguna marca comercial de Bionano Genomics. Los usuarios no pueden utilizar estas marcas comerciales sin previo consentimiento por escrito de Bionano Genomics. El uso de estas marcas registradas o de cualquier otro material, excepto en la medida en que lo permita este documento, está expresamente prohibido y puede infringir las leyes federales u otras leyes aplicables.

© Copyright 2022 Bionano Genomics, Inc. Todos los derechos reservados.

## Historial de revisiones

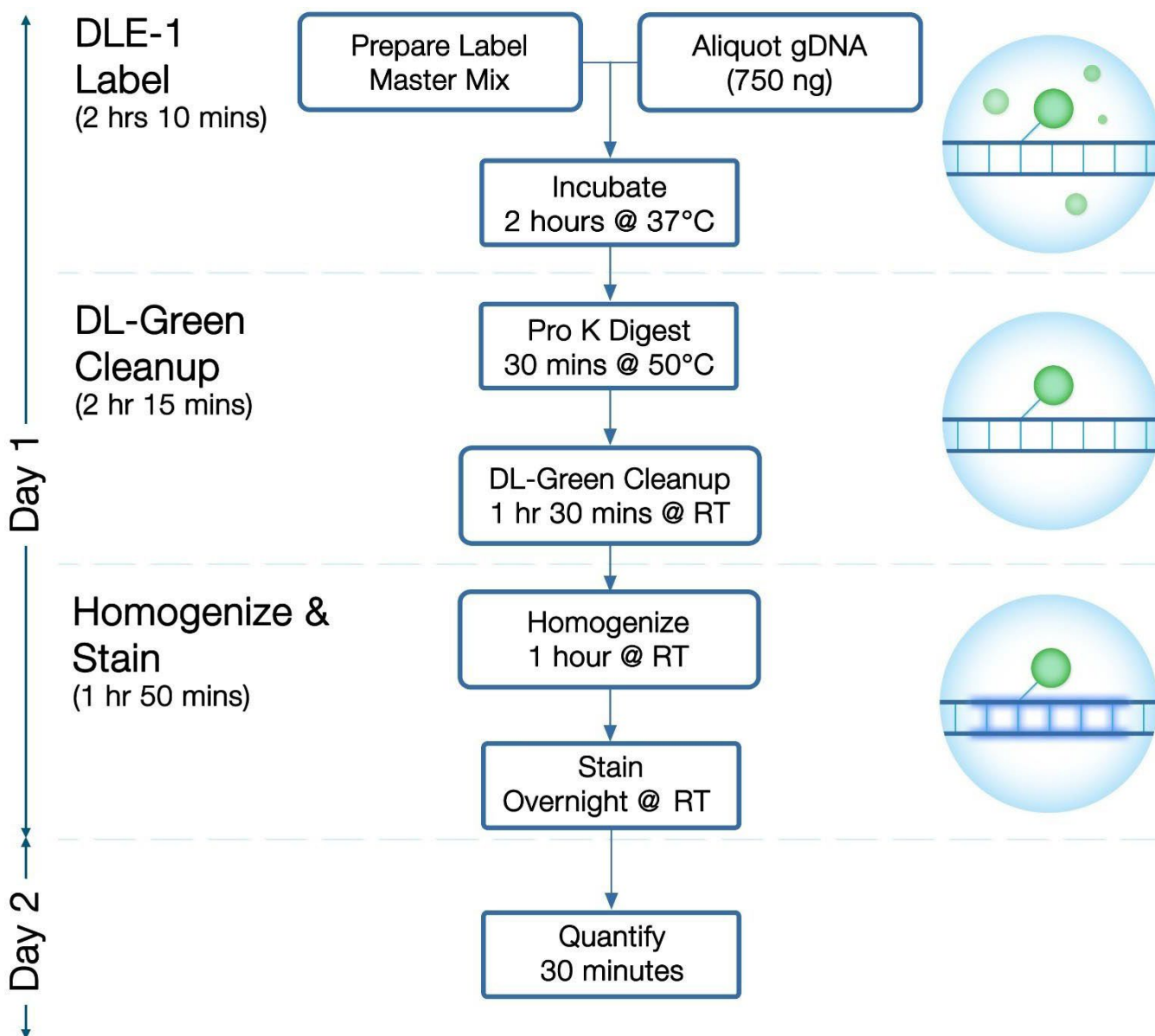
---

Revisión	Fecha de lanzamiento	Notas
A	04.15.2022	Publicación inicial. Traducido al español

## Descripción general de Bionano Prep DLS (750 ng)

El procedimiento DLS es un marcaje específico de secuencia de ADN genómico (gDNA) de peso molecular ultraalto (UHMW, en inglés) para la cartografía óptica del genoma (OGM, en inglés) de Bionano utilizando una enzima de marcaje directo (p. ej., DLE-1) seguido de la tinción de la cadena principal del ADN.

### Descripción general del flujo de trabajo: marcado y tinción durante el día 1; cuantificación durante el día 2, carga en el chip tras la cuantificación



**Nota:** las líneas discontinuas ( ) indican posibles puntos de pausa/parada.

## Kit Bionano Prep DLS y materiales proporcionados por el usuario

**Tabla 1:** Contenido del kit Bionano Prep DLS (N.º de referencia 80005)

Componente	N.º de referencia	Cantidad	Almacenamiento	Consideraciones de manipulación
20x DLE-1	20351	18 µl	-20 °C	Mueva el tubo 3 veces para mezclar y centrifugue brevemente. Conserve en una nevera de enzimas a -20 °C hasta su utilización.
20x DL-Green	20352	18 µl	-20 °C	Descongele a temperatura ambiente (RT, en inglés). Agite en el vórtex y centrifugue brevemente. Conserve en un bloque de aluminio preenfriado hasta su utilización.
5x DLE-1 buffer	20350	200 µl	-20 °C	Descongele a temperatura ambiente. Agite en el vórtex y centrifugue brevemente. Conserve a temperatura ambiente hasta su utilización.
4x Flow buffer	20353	190 µl	4 °C	Agite en el vórtex y centrifugue brevemente. Conserve a temperatura ambiente hasta su utilización.
Tinción de ADN	20356	65 µl	-20 °C	Descongele a temperatura ambiente. Agite en el vórtex y centrifugue brevemente. Conserve a temperatura ambiente hasta su utilización; el DMSO en la tinción de ADN se cristalizará en hielo.
1M DTT	20354	75 µl	-20 °C	
Agua ultrapura	20355	900 µl	4 °C	Puede conservarse a temperatura ambiente.
Placa DLS de 24 pocillos	20357	1 placa	RT	Manténgala cubierta para evitar el polvo.
Membranas DLS (13 mm)	20358	25	RT	Evite el exceso de humedad.
Tiras de sellado de placa DLS	20361	10	RT	
Tubos DLS ámbar, fondo redondo	20362	12	RT	

**Nota:** RT = 18-25 °C

**Tabla 2:** Materiales proporcionados por el usuario

Artículo	Descripción	N.º de catálogo
Mezclador de muestras HulaMixer	Thermo Fisher	15920D
Termociclador con tapa térmica	Proveedor general de suministros de laboratorio	
Proteinasa K Puregene	Qiagen	158918 o 158920
Tubos para PCR de 0,2 ml, de paredes delgadas, tapón plano y sin nucleasas	Thermo Fisher o equivalente	AM12225
Tubos de microcentrifuga de 0,5 ml, ámbar y sin nucleasas	USA Scientific o equivalente	1605-0007
Puntas de pipeta, sin filtro, 200 µl	USA Scientific o equivalente	1111-1810
Puntas de pipeta de calibre ancho con filtro, 200 µl	VWR o equivalente a Rainin	46620-642
Puntas de pipeta estándar con filtro, 2, 10, 20 y 200 µl	Proveedor general de suministros de laboratorio	
Enfriador de enzimas de sobremesa a -20 °C	VWR o equivalente	414004-286
Bloque de aluminio para enfriamiento de tubos a 4 °C	Sigma Aldrich o equivalente	Z740270
Pinzas puntiagudas y curvas	Electron Microscopy Sciences o	78141-01
Pipetas (2, 10, 20 y 200 µl)	Proveedor general de suministros de laboratorio	
Cubo de hielo y hielo	Proveedor general de suministros de laboratorio	
Agitador vórtex	Proveedor general de suministros de laboratorio	
Microcentrifuga para tubos de 0,2, 0,5 y 1,5 ml	Proveedor general de suministros de laboratorio	
Fluorímetro de Qubit	Thermo Fisher	Q33238
Tubos Qubit®	Thermo Fisher	Q32856
Kit de análisis de HS (alta sensibilidad) de dsDNA Qubit® (Qubit® HS dsDNA Assay Kit)	Thermo Fisher	Q32851
Baño ultrasónico (recomendado)	Branson o equivalente	CPX 952-119R
Pipeta de desplazamiento positivo MR-10 (opcional)	Rainin o equivalente	17008575
Puntas de pipeta de 10 µl, C-10 para desplazamiento positivo (opcional)	Rainin o equivalente	17008604

## Introducción y notas importantes

---

### Introducción

Este protocolo describe un método de marcaje enzimático para el marcaje fluorescente directo de gDNA de UHMW con una enzima de marcaje directo (DLE-1). La enzima DLE-1 se conecta al fluoróforo DL-Green a través de una modificación covalente en un motivo secuencial específico. Este proceso de marcaje no daña al gDNA, lo que permite generar mapas del genoma altamente contiguos y proporciona una alta sensibilidad para la detección de variantes estructurales. Tras el marcaje específico de la secuencia con DLE-1, el ADN marcado se tiñe para visualizar la cadena principal. Cuando se visualizan en el Saphyr, las muestras marcadas se muestran como puntos verdes sobre líneas azules. El kit Bionano Prep Direct Label and Stain (DLS) (n.º de catálogo 80005) proporciona los reactivos necesarios para este protocolo.

### Tamaño de reacción de la DLE-1 (750 ng)

Este protocolo produce 60 µl de ADN marcado. Este volumen es suficiente para cargarlo en una única cubeta de lectura de un chip Saphyr, con suficiente muestra restante para una cubeta de lectura adicional en casos de bajo rendimiento u otro problema. El material de partida debe tener al menos cientos de kilopares de base de longitud; si fuera necesario, esto se puede determinar mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, en inglés). Las mediciones de marcaje se determinan con el Bionano Saphyr y se miden en marcas/100 kilopares de bases (kbp). Se pueden determinar mediciones de marcaje adicionales si se aporta una tasa de referencia y control para el mapa, la variación positiva de la marca (PLV) y la variación negativa de la marca (NLV). Consulte la sección «Notas importantes» a continuación para obtener más información.

La información sobre las mediciones esperadas se puede encontrar en el [documento 30223, «Directrices para el informe de calidad de la molécula Saphyr»](#).

### Notas importantes

#### Consideraciones generales

- Recomendamos utilizar un bloque de aluminio de enfriamiento de tubos previamente enfriado en hielo para contener los componentes de reacción descongelados y ensamblar las reacciones de marcaje.
- Las enzimas y los búferes deben pipetarse con precisión, sin que queden gotas en el exterior de la punta de la pipeta. La enzima debe introducirse por completo en el tubo de reacción y debe evitarse que se formen burbujas para garantizar reacciones reproducibles. Para ello, los tubos de reactivos se deben sostener a la altura de los ojos al aspirar o dispensar, para visualizar el proceso.
- La mezcla lenta y completa con pipeta de la mezcla maestra de DLE-1 con gDNA es un paso crítico y promueve la homogeneidad del ADN y la accesibilidad de las enzimas para un marcaje eficiente de ADN altamente viscoso.
- Este protocolo implica la manipulación de moléculas fluorescentes sensibles a la luz. Es importante minimizar la exposición a la luz, tanto de las reacciones como de los reactivos fotosensibles, mientras se trabaja. Además, proteja de la luz los reactivos fotosensibles durante el almacenamiento.

- La concentración de ADN marcado se mide el día 2, después del marcaje, la limpieza, la homogenización y la tinción. La homogeneidad del ADN se evalúa cuantificándola por duplicado (coeficiente de variación [CV] < 0,30). El ADN marcado homogéneo permite una estimación precisa de la concentración y una carga de ADN más uniforme en el chip. La concentración de ADN marcado debe estar entre 4 y 12 ng/μl.

### Tamaño de la tanda

- Se pueden procesar hasta 12 muestras a la vez.
  - Cada kit Bionano Prep DLS contiene suficientes reactivos para 10 muestras.

### Requisitos para el ADN de partida

- La muestra debe contener gDNA de longitud de megabases, determinado normalmente por la alta viscosidad o la PFGE de la muestra.
- La concentración de gDNA debe ser entre 36 y 150 ng/μl.
  - Las muestras de gDNA > 150 ng/μl deben diluirse con TE (pH 8,0) a entre 50 y 150 ng/μl, mezclarse 5 veces con una punta de calibre ancho y dejarse reposar durante la noche a temperatura ambiente. Verifique la concentración y homogeneidad final del ADN antes de marcarlo.
  - Para muestras de gDNA < 36 ng/μl, póngase en contacto con Soporte técnico en [Support@bionanogenomics.com](mailto:Support@bionanogenomics.com).

### Determinación de la enzima

- En el caso de las muestras no humanas, antes de iniciar el protocolo DLS, importe los datos de secuencia de su muestra a la función In Silico Digestion de Bionano Access o al software independiente [Label Density Calculator](#) para asegurarse de que el marcaje DLS sea la opción adecuada para su muestra. La densidad real de su marca debe estar dentro de ±2 marcas del valor previsto. Póngase en contacto con Soporte técnico en [Support@bionanogenomics.com](mailto:Support@bionanogenomics.com) para recibir orientación si tiene dudas.
- En el caso de muestras no humanas, las herramientas actuales de análisis distales son más eficaces con genomas que tengan densidades de marcas DLS de entre 9 y 25 marcas por 100 kbp.

### Manipulación de ADN genómico

#### Generalidades:

Este protocolo implica la manipulación de gDNA genómico viscoso, que es difícil de pipetear con precisión. Es fundamental seguir todos los pasos de este protocolo para garantizar un muestreo preciso de ADN a fin de lograr una proporción adecuada de enzima y ADN, y de ADN y tinción, así como para minimizar la manipulación innecesaria del gDNA, que puede dar como resultado moléculas sin la longitud suficiente para el análisis.



### Adición de gDNA a la reacción de marcaje:

- Para asegurar un muestreo preciso del stock de gDNA viscoso, primero maximice la homogeneidad del stock de ADN mezclando suavemente con la pipeta la solución de ADN equilibrada a temperatura ambiente con una punta de calibre ancho 5 veces y siga las pautas que aparecen a continuación para pipetear correctamente dentro y fuera de una punta de pipeta estándar, o pipeta de desplazamiento positivo, para un suministro completo.
- Antes de extraer gDNA viscoso con una punta estándar, pipetee un volumen idéntico de agua y marque el nivel de la solución en la punta con un marcador de punta fina para que sirva de guía al pipetear el gDNA. Guarde la punta marcada como guía y use una nueva para la extracción de ADN. Como alternativa, el uso de una pipeta de desplazamiento positivo puede mejorar la consistencia al pipetear gDNA viscoso.
- Para extraer gDNA viscoso con una punta estándar, sostenga el tubo de ADN original para una visualización de cerca, presione el émbolo de la pipeta hasta el primer tope, sumerja la punta de la pipeta hacia el centro de la solución viscosa y suelte el émbolo con cuidado, tan **lentamente** como sea posible mientras mueve la punta en un movimiento circular para extraer el ADN viscoso con la punta mientras controla cuidadosamente la absorción de ADN. Mantenga la punta sumergida incluso después de que la solución viscosa de ADN deje de moverse hacia arriba y se nivele (use la punta marcada como guía aproximada para determinar si la solución viscosa se nivela a la altura apropiada). El ADN viscoso puede tardar hasta 30 segundos en llenar la punta hasta el nivel apropiado. Soltar el émbolo demasiado rápido puede producir una burbuja en la punta, lo cual derivaría en una Muestra insuficiente (comience de nuevo si ocurre esto). Después de que la solución de la punta de la pipeta se haya nivelado y mientras la punta todavía esté sumergida en la solución de ADN, raspe la punta contra el fondo del tubo 5 veces con un movimiento circular. Retire la punta de la solución de ADN e inspecciónela visualmente para confirmar que está llena al nivel apropiado, en comparación con la punta marcada. Quitar la punta de la pipeta de la solución de gDNA demasiado pronto o rasparla de manera incorrecta contra la parte inferior del tubo puede producir una burbuja en el extremo de la punta de la pipeta, lo que indica un submuestreo (comience de nuevo si sucede esto). **Se puede lograr un pipeteado preciso de gDNA viscoso con práctica y paciencia.**
- Para depositar todo el volumen de gDNA viscoso en un tubo o mezcla maestra, sostenga el tubo de reacción para una visualización de cerca e introduzca el ADN insertando la punta de la pipeta en la solución y presionando suavemente el émbolo hasta el primer tope y, luego, hasta el segundo, mientras controla la liberación de ADN, hasta que el último fragmento de ADN haya salido de la punta. Retire inmediatamente la punta tan pronto como el último fragmento de ADN haya salido de la punta de la pipeta mientras mantiene una presión constante para evitar la absorción de líquido o la introducción de burbujas de aire. Inspeccione visualmente la punta después de retirarla de la solución para confirmar que esté vacía.

## Protocolo de marcaje DLS de Bionano

### Inicio del protocolo: Día 1

Consulte la sección *Notas importantes* para obtener información sobre la manipulación adecuada del gDNA.

La concentración de gDNA debe estar entre 36 y 150 ng/μl.

Consulte las secciones *Contenido del kit* y *Materiales proporcionados por el usuario* para obtener información sobre la manipulación y el almacenamiento adecuados de los reactivos.

### Preparación

1. Descongele 20 DL-Green. Agite bien en el vórtex y dé un golpe de centrifuga. Mantenga en hielo en un bloque de aluminio a 4 °C.
2. Descongele 5 búferes de DLE-1. Agite bien en el vórtex y dé un golpe de centrifuga. Conserve a temperatura ambiente hasta su utilización.
3. Golpee suavemente 20 unidades de la enzima DLE-1 tres veces y dé un golpe de centrifuga. Déjelas en la mesa de trabajo en un bloque enzimático a -20 °C.
4. Retire el tubo de agua ultrapura de 4 °C (si fuera necesario) y conserve a temperatura ambiente.

### Marcaje de DLE-1 (reacción de 30 μl, 2 horas y 10 minutos)

#### Diluya el gDNA y combínelo con la mezcla de marcaje (10 minutos)

5. Si la cuantificación de gDNA ya se realizó justo antes del marcaje, continúe con el paso 6. De lo contrario, dé un golpe de centrifuga y repita la cuantificación antes de continuar con el paso 6.
6. En un tubo de PCR de pared delgada, agregue 750 ng de gDNA (a) al agua ultrapura (b) hasta alcanzar un volumen total de 21 μl.
  - a.  $750 \text{ ng}/[\text{concentración de gDNA}] = \mu\text{l de gDNA}$
  - b.  $21 \mu\text{l} - (\mu\text{l de gDNA}) = \mu\text{l de agua ultrapura}$ .

ID de muestra de gDNA	Concentración de gDNA (ng/μl)	Volumen de agua ultrapura (μl)	Volumen de gDNA (μl)

7. Si procesa más de una muestra, prepare una mezcla maestra de marcaje en un tubo ámbar de 0,5 ml. Agregue los componentes en el orden indicado en la siguiente tabla. Pipetee todo el volumen de la mezcla maestra de marcaje hacia arriba y hacia abajo con una punta de pipeta estándar, cinco veces, con cuidado de no generar burbujas. Dé un golpe de centrifuga y mantenga en un bloque de aluminio sobre hielo hasta su utilización. Utilícelo en los 30 minutos de mezcla de los componentes.

**Nota:** después de hacer la mezcla maestra, deje 5 búferes de DLE-1 a temperatura ambiente para usar en el Paso 12.

#### **Tabla de cálculo de mezcla maestra de marcaje**

Reacción de marcaje	1 muestra	N.º de muestras	Exceso de mezcla maestra	Total de mezcla maestra
gDNA (750 ng) + agua ultrapura	21 µl			
5x búfer de DLE-1	6,0 µl		× 1,2	µl
20x DL-Green	1,5 µl		× 1,2	µl
20x DLE-1	1,5 µl		× 1,2	µl
Volumen de reacción final	30 µl			µl

8. Con una punta de pipeta estándar, agregue 9 µl de mezcla maestra sobre los 21 µl de gDNA + agua ultrapura, sin mezclar. A continuación, con una nueva punta de pipeta estándar y una pipeta ajustada a 28 µl, mezcle la muestra lentamente hacia arriba y hacia abajo 5 veces (1 hacia arriba + 1 hacia abajo = 1 vez). Dé un golpe de centrifuga al tubo durante 2 segundos. Protéjalo de la luz. ⚠

Vea el vídeo titulado [DLS Master Mix Mixing \(Mezcla maestra DLS\)](#) en la sección [Kit de marcaje DLS](#) del sitio web de soporte.

**Nota:** se necesita una muestra cuidadosa y completamente mezclada para marcar de manera eficiente todas las moléculas. Extraiga la muestra de la parte inferior y dispense cerca de la parte superior (sin tocar el tubo con la punta de la pipeta) para maximizar la mezcla.

#### **Marcaje (2 horas)**

9. Incube en un termociclador con una tapa térmica configurada a 47 °C (o en «Encendido» si no hay opción de temperatura disponible):
- 2 horas a 37 °C
  - Conserve a 4 °C hasta el siguiente paso. Después de sacarlo del termociclador, continúe rápidamente con el siguiente paso. Dé un golpe de centrifuga.

## Digestión de proteinasa K y limpieza con DL-Green (2 horas y 15 minutos)

### **Digestión con proteinasa K (35 minutos)**

10. Dispense 5 µl de proteinasa K Puregene (Qiagen) directamente en la parte central de la muestra contenida en el tubo de PCR. Para evitar la eliminación inadvertida del ADN que pueda adherirse a la punta, no mezcle.
11. Incube en un termociclador con una tapa térmica configurada a 60 °C (o en «Encendido» si no hay opción de temperatura disponible):
  - a. 30 minutos a 50 °C
  - b. Conserve a 4 °C hasta el siguiente paso. Después de sacarlo del termociclador, continúe rápidamente con el siguiente paso. Dé un golpe de centrifuga.



### **Adsorción de membrana (1 hora y 40 minutos)**

Para los pasos 12-18, vea el vídeo titulado [DLS Membrane Demo \(Demostración sobre la membrana DLS\)](#) en la sección [Kit de marcaje DLS](#) del sitio web de soporte.

12. Por cada muestra, humedezca la parte inferior de una membrana DLS con 1 buffer de DLE-1 en la placa DLS de 24 pocillos:
  - a. Por cada muestra, prepare 60 µl de 1 buffer de DLE-1 (12 µl de 5 buffers de DLE-1 + 48 µl de agua ultrapura). Agite en el vórtex para mezclar y dé un golpe de centrifuga.
  - b. Dispense 25 µl de 1 buffer de DLE-1 en el centro de un pocillo de la placa DLS de 24 pocillos.
  - c. Utilice pinzas para colocar una membrana DLS encima del buffer.
  - d. Selle los pocillos inmediatamente con una tira de sellado para placas DLS para evitar la evaporación. Mientras sostiene la placa, aplique presión para fijar la tira de sellado para placas DLS al borde superior de los pocillos.
  - e. Deje que la membrana se humedezca por completo durante 10 minutos.

**Nota:** la membrana debe cambiar a un color azulado una vez que esté completamente húmeda. Véase aproximadamente en el minuto 0:55 del vídeo [DLS Membrane Demo](#). Si la membrana no se humedece completamente a los 10 minutos, utilice una membrana nueva. Es posible que sea necesario preparar un buffer DLE-1 adicional para la nueva membrana.

13. Realice la limpieza de DL-Green dispensando una muestra de ADN marcada en el centro de la membrana humedecida:
  - a. Sostenga la placa de forma segura y retire con cuidado la tira de sellado para placas DLS. Utilice una punta de pipeta estándar con la pipeta ajustada a 38 µl para aspirar todo el volumen (~35 µl) de ADN marcado.
  - b. Dispense con cuidado el ADN marcado en el centro de la membrana DLS humedecida.
  - c. Selle los pocillos inmediatamente con una tira de sellado para placas DLS para evitar la evaporación. Mientras sostiene la placa, aplique presión para fijar la tira de sellado para placas DLS al borde superior de los pocillos.

- d. Proteja la placa DLS de 24 pocillos de la luz (cúbrala) e incube a temperatura ambiente durante 1 hora. Asegúrese de que la placa permanezca intacta, sin movimientos involuntarios durante la incubación .
  - e. 10 minutos antes de que se complete la incubación, humedezca una segunda membrana en un pocillo que no esté utilizado de la placa DLS de 24 pocillos siguiendo del paso 12b al 12e mencionados anteriormente.
  - f. Tras 1 hora, sostenga la placa de forma segura y retire con cuidado la tira de sellado para placas DLS.
  - g. Con la punta de una pipeta estándar sin filtro y con la pipeta ajustada a 38  $\mu$ l, aspire lentamente toda la muestra marcada mientras hace contacto perpendicularmente con la membrana y mueva la punta a través del área del ADN mientras aspira para recoger el ADN.
14. Repita del paso 13b al 13d, pero dispense en la segunda membrana (sin usar) preparada en el paso 13e e incube durante 30 minutos a temperatura ambiente.
15. Durante el periodo de incubación de 30 minutos, lleve 1M DTT, 4 buffers de flujo y tinte de ADN a temperatura ambiente. Una vez descongelados, agite bien todos los tubos en el vórtex y dé un golpe de centrifuga brevemente para recoger el contenido. Mantenga todos los tubos a temperatura ambiente hasta que los vaya a utilizar.
16. Tras 30 minutos, sostenga la placa de forma segura y retire con cuidado la tira de sellado para placas DSL.
17. Con la punta de una pipeta estándar sin filtro y con la pipeta ajustada a 35  $\mu$ l, aspire lentamente toda la muestra marcada mientras hace contacto perpendicularmente con la membrana y mueva la punta a través del área del ADN mientras aspira para recoger el ADN. Transfiera a un nuevo tubo de PCR o tubo ámbar de 0,5 ml. Dé un golpe de centrifuga durante 2 segundos. Proteja los tubos de la luz. .
18. Con una punta de pipeta estándar de 200  $\mu$ l, aspire 20  $\mu$ l de la muestra marcada del tubo de PCR o del tubo ámbar de 0,5 ml y dispense en la parte inferior del tubo ámbar de fondo redondo DLS (2 ml). Continúe con el siguiente paso (**tinción y homogeneización del ADN**).
- a. Si el volumen de muestra recuperado es <20  $\mu$ l, aumente el volumen hasta un total de 20  $\mu$ l utilizando 1 buffer de DLE-1.

## Tinción y homogeneización de ADN (1 hora y 10 minutos)

### Tinción y homogeneización (1 hora, 10 minutos)

19. En un nuevo tubo ámbar de 0,5 ml, prepare la mezcla Staining Master Mix de acuerdo con la siguiente tabla. Agite en el vórtex para mezclar y luego dé un golpe de centrifuga para recoger el contenido.

#### Tabla de cálculo de la mezcla Staining Master Mix

Reacción de tinción	1 muestra	N.º de muestras	Exceso de mezcla maestra	Total de mezcla maestra
Muestra marcada (Paso 19)	20 µl			
4x búferes de flujo	15 µl		×1,25	µl
1M DTT	6 µl		×1,25	µl
Tinción de ADN	3,5 µl		×1,25	µl
Agua ultrapura	15,5 µl		×1,25	µl
<b>Total</b>	<b>60 µl</b>			<b>µl</b>

**Nota:** el buffer de flujo es viscoso, por lo que pipetee las soluciones que lo contengan lentamente para aumentar la precisión.

20. En cada ADN marcado, agregue 40 µl de mezcla Staining Master Mix encima de la muestra marcada (20 µl) contenida en el tubo ámbar de fondo redondo DLS (2 ml). No mezcle.

**Nota:** la mezcla maestra se dispensa sobre la muestra marcada para evitar extraer inadvertidamente el ADN que pueda adherirse a la punta de la pipeta.

21. Coloque los tubos ámbar DLS de fondo redondo que contengan las muestras en HulaMixer (Thermo Fisher) con la velocidad establecida en 5 rpm. La superficie del soporte del tubo debe ser plana y paralela a la superficie de trabajo. Mezcle durante 1 hora a temperatura ambiente con todas las opciones desactivadas, excepto la rotación.

22. Tras 1 hora, retire las muestras del HulaMixer. Dé un golpe de centrifuga para recoger el contenido.

**Nota:** no permita que la rotación continúe durante más de 1 hora, ya que podría reducir el valor N50 de la molécula.

23. Almacene durante la noche a temperatura ambiente y protegido de la luz.

## Inicio del protocolo: Día 2

Consulte la lista de equipos y consumibles suministrados por el usuario para asegurarse de que estén todos disponibles.

### Cuantificación de ADN marcado y teñido (30 minutos)

#### **Cuantificación de ADN (30 minutos)**

Determine la concentración final del ADN marcado y teñido. Se obtendrán mejores resultados si la concentración de ADN (media de dos mediciones) es de entre 4 y 12 ng/μl. La variación en la concentración final se debe a las dificultades para muestrear con precisión el gDNA de partida viscoso y a la variación en la recuperación del gDNA de la etapa de eliminación de DL-Green. Si la concentración de su muestra no se encuentra dentro de este intervalo, consulte la sección Solución de problemas para obtener recomendaciones.

#### **Kit de análisis de HS (alta sensibilidad) de dsDNA y fluorímetro de Qubit:**

**Nota:** el protocolo estándar del análisis de HS de dsDNA de Qubit no proporcionará mediciones precisas de concentración debido a las longitudes extremadamente largas del ADN marcado. Hemos modificado el protocolo de Qubit para incluir un paso de sonicación que nos permita fragmentar una alícuota del ADN marcado y así garantizar mediciones de concentración precisas. Consulte el manual del usuario del kit de análisis de HS de dsDNA de Qubit para obtener detalles sobre el kit.

1. Use una punta de calibre ancho en una pipeta de 200 μl ajustada a 50 μl para mezclar 5 veces el ADN marcado y teñido. Dé un golpe de centrifuga.
2. Deje que los estándares de HS de Qubit y el ADN marcado alcancen la temperatura ambiente (al menos 30 minutos).
3. Prepare tubos de ensayo Qubit de 0,5 ml:
  - a. 2 tubos de ensayo separados para la medición de la HS estándar, cada uno con 10 μl de buffer de HS de Qubit.
  - b. 2 tubos de ensayo separados por cada muestra marcada, cada uno con 18 μl de buffer de HS de Qubit.
4. Con la punta de una pipeta estándar o una pipeta de desplazamiento positivo, extraiga dos alícuotas individuales de 2 μl de cada muestra y dispénelas en 18 μl de buffer de HS de Qubit en un tubo de ensayo Qubit, sumergiendo la punta. Coloque los tubos Qubit en una gradilla flotante y sométalos a sonicación en un baño ultrasónico durante 10 minutos. Durante la sonicación, prepare la solución de trabajo como se describe a continuación.

**Nota:** si se une una cadena larga de ADN a la punta al retirar la punta del tubo, vuelva a dispensar la muestra en el tubo y repita la extracción de la alícuota con una punta nueva.

- a. Si no se dispone de un baño ultrasónico, agite en el vórtex durante al menos 30 segundos a la velocidad máxima y luego y luego reduzca la velocidad brevemente durante de 2 segundos.
5. Prepare la solución de trabajo diluyendo el reactivo de análisis de tinte en el buffer de dilución de HS (1:200):
    - a. Prepare 200 μl de solución de trabajo para cada uno de los dos estándares (400 μl en total).
    - b. Prepare 200 μl de solución de trabajo para cada alícuota de muestra (400 μl para cada muestra).

6. Para los estándares de ADN Qubit, agregue 10 µl de los estándares 1 y 2 para separar los tubos de ensayo Qubit marcados que contengan 10 µl del buffer de HS de Qubit del Paso 3a.
7. Una vez que se complete la sonicación, recupere los tubos de ensayo y centrifugue brevemente para recoger la solución en el fondo de los tubos. Agite los tubos en el vórtex durante 5 segundos a velocidad máxima, luego dé un golpe de centrifuga durante 2 segundos.
8. Añada 180 µl de solución de trabajo (preparada en el paso 5) a cada tubo de ADN marcado sonificado y estándar de ADN Qubit más buffer de HS. Agite en el vórtex durante 5 segundos y centrifugue brevemente para recoger la solución en el fondo de los tubos.
9. Incube las muestras en la oscuridad durante 2 minutos antes de la cuantificación en el fluorímetro Qubit.

**Nota:** la concentración de ADN marcado idealmente debería ser de entre 4 y 12 ng/µl con un CV (desviación estándar ÷ media) entre el muestreo <0,30. Si ambos muestreos están fuera de los valores de entre 4 y 12 ng/µl, consulte la sección **Solución de problemas**. Si una muestra se encuentra entre los 4 y 12 ng/µl y la otra está fuera de este intervalo, siga estas directrices:

- Si una muestra se encuentra entre los 4 y 12 ng/µl y la otra es superior a 12 ng/µl, proceda a cargar el chip.
- Si una muestra se encuentra entre los 4 y 12 ng/µl y la otra por debajo de 4 ng/µl, repita la mezcla con HulaMixer durante 30 minutos y repita la cuantificación.

10. Registre las medidas de Qubit en la tabla de la página siguiente.
11. Si no va a analizar las muestras ese mismo día, almacénelas en la oscuridad a 4 °C hasta su utilización.

**Nota:** las muestras marcadas no muestran ninguna reducción en el rendimiento si se utilizan dentro de un mes.



### **Mediciones de gDNA de Qubit**

ID de la muestra	Medición 1 (ng/μl)	Medición 2 (ng/μl)	Media (ng/μl)	CV (desv. estándar/media)

### **Carga del chip Bionano (40 minutos; 30 minutos para poner el chip a temperatura ambiente y 10 minutos para cargarlo)**

Consulte la **Guía del usuario del sistema Saphyr** (para Saphyr P/N [60325](#) o [60239](#)) para obtener instrucciones completas sobre la carga del chip y el funcionamiento del instrumento.

**Nota:** cuando aspire una muestra marcada DLS para cargar el chip, extraiga desde el centro del tubo.

## Solución de problemas

La muestra marcada debe almacenarse a 4 °C en una caja protegida de la luz cuando no esté en uso. La muestra marcada debe estar a temperatura ambiente antes de proceder a la cuantificación o la carga del chip.

Mediciones esperadas basadas en la experiencia interna de Bionano Genomics con muestras humanas:

N50 (>150 kpb)	Marcas/ 100 kpb	Tasa de cartografía o map rate	Positive Label Variance	Negative Label Variance
>230 kpb	14-17	>70 %	<10 %	<15 %

### A. El gDNA no es homogéneo antes del marcaje

**Evidencia:** el CV de las mediciones de cuantificación no cumple con los requisitos del protocolo de aislamiento de ADN (p. ej., CV >0,30 entre las mediciones izquierda, media y derecha en los protocolos SP).

Pasos que debe seguir:

1. Aspire y dispense la muestra lentamente con una punta de calibre ancho 5 veces.
2. Incube el gDNA a temperatura ambiente durante 1 a 3 días.
3. Aspire y dispense la muestra lentamente con una punta de calibre ancho 5 veces.
4. Cuantifique con el análisis Qubit Broad Range Assay.

### B. El gDNA no es viscoso

**Evidencia:** la consistencia de la muestra es muy fina (no es viscosa) y fácil de pipetear, pero la concentración es >35 ng/μl.

Es probable que la muestra no contenga gDNA de alto peso molecular.

Evalúe el tamaño del gDNA de partida mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) antes del marcaje.

Evalúe el método de preparación de la muestra, así como la calidad y la edad del material de entrada, y repita el aislamiento del ADN de la muestra biológica.

### C. La concentración de gDNA es <36 ng/μl

**Evidencia:** la concentración de gDNA medida al final del protocolo de aislamiento de ADN es inferior a 36 ng/μl. Póngase en contacto con el Servicio de soporte de Bionano Genomics en [Support@bionanogenomics.com](mailto:Support@bionanogenomics.com)

### D. La muestra marcada es demasiado viscosa

**Evidencia:** la muestra tarda un tiempo anormalmente largo (más de 30 segundos) en llenar los dedos del chip. Póngase en contacto con el Servicio de soporte de Bionano Genomics en [Support@bionanogenomics.com](mailto:Support@bionanogenomics.com).

## E. La densidad de la marca es menor de lo esperado

**Evidencia:** la densidad media detectada de la marca siempre será inferior a la densidad media del sitio esperada. Esto se debe a una combinación de agrupación de sitios, estiramiento del ADN y resolución óptica. Por ejemplo, la densidad de sitio media para la DLE-1 en humanos es de 20,7 marcas por 100 kbp, pero la densidad de marca detectada puede variar desde un poco más de 14 hasta un poco menos de 17 marcas por 100 kbp.

La baja densidad de la marca puede deberse a un marcaje enzimático subóptimo, el fotoblanqueo de fluoróforos o problemas de detección.

Posibles causas de baja densidad de marcas durante el protocolo:

- Sustancias inhibitoras en la preparación de ADN.
- Mezcla inadecuada de gDNA viscoso y mezcla maestra.
- Mala manipulación de la DLE-1 (exposición a temperaturas elevadas, agitación en el vórtex, etc.).
- Exposición de la reacción de marcaje a la luz y al fotoblanqueo de DL-Green.
- Exposición prolongada de DL-Green al pH de la mezcla maestra (>30 min).
- Problema de hardware.

## F. El ADN marcado es <4 ng/μl para ambas mediciones

**Evidencia:** ambas mediciones están fuera del intervalo de concentración de entre 4 y 12 ng/μl con el kit de análisis de alta sensibilidad de Qubit.

Pasos que debe seguir:

1. Repita la cuantificación del ADN de partida original.
2. Si la muestra se encuentra entre 3 y 4 ng/μl, proceda a cargarla bajo su responsabilidad, pero es probable que no se alcance el rendimiento esperado.
3. Si la muestra es <3 ng/μl, no la cargue. Compruebe la concentración de ADN de partida y repita el análisis de marcaje.

## G. El ADN marcado es >12 ng/μl en ambas mediciones

**Evidencia:** ambas mediciones están fuera del intervalo de concentración de entre 4 y 12 ng/μl con el kit de análisis de alta sensibilidad de Qubit.

Pasos que debe seguir:

1. Si la muestra es >12 ng/μl, póngase en contacto con el Servicio de soporte al cliente de Bionano ([Support@bionanogenomics.com](mailto:Support@bionanogenomics.com)) para recibir orientación.
2. Puede proceder a cargarla bajo su responsabilidad, pero la muestra marcada puede obstruir el chip y reducir el valor N50 de la molécula.

## H. El valor N50 de la molécula (≥150 kbp) es inferior a 230 kbp o el valor N50 (≥20 kbp) es inferior a 150 kbp

**Evidencia:** las mediciones del valor N50 del panel y los resultados del informe de calidad molecular (MQR) de Bionano Access no alcanzan las especificaciones enumeradas antes.

Pasos que debe seguir:

1. Evalúe el tamaño del gDNA de partida mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).
2. Evalúe el método de preparación de muestras si no hay gDNA de alto peso molecular (megabases).
3. Si el tamaño del gDNA de partida es grande, vuelva a marcar el gDNA asegurándose de evitar el pipeteo en exceso o el pipeteo a alta velocidad.
4. Póngase en contacto con el Servicio de soporte al cliente de Bionano ([Support@bionanogenomics.com](mailto:Support@bionanogenomics.com)) para recibir información sobre si debe volver a ejecutar la muestra en un chip diferente.

## I. La frecuencia del mapa es baja (muestras humanas)

**Evidencia:** la tasa del mapa de Bionano Access MQR es <70 %.

Pasos que debe seguir:

1. ¿La densidad de la marca es baja (<14 marcas cada 100 kbp)?
  - a. Si es así, repita la cuantificación de gDNA de partida original y repita el marcaje después de considerar las posibles causas enumeradas en la Sección D.
2. Si la densidad de la marca está dentro de 14 a 17 marcas por 100 kbp en todos los escaneos, póngase en contacto con Soporte.
3. Compruebe el valor de N50 ( $\geq 20$  kbp) en el MQR. Si este valor es bajo (p. ej., inferior a 100 kbp), puede causar problemas con la velocidad del mapa

## J. El rendimiento efectivo es inferior a 10 Gbp por escaneo

**Evidencia:** el rendimiento tras el Escaneo 7 sigue siendo inferior a 10 Gbp por escaneo en el Panel de ICS o de Access. Pasos que debe seguir:

1. Repita la cuantificación de la muestra marcada.
2. Asegúrese de que la celda de flujo esté correctamente hidratada con agua sin nucleasas.

Posibles causas:

- N50 bajo ( $\geq 20$  kbp) o N50 bajo ( $\geq 150$  kbp).
- La evaporación provoca un aumento de la concentración de sal y cambia la migración del ADN.
  - a. ¿Se llenaron (rehidrataron) los pocillos de entrada y salida con agua sin nucleasas antes de colocar los taponos/clips del chip?
- ADN no homogéneo.
- ADN fuera del intervalo entre 4 y 12 ng/ $\mu$ l.

## Preguntas frecuentes

---

### 1. ¿Con cuánta anticipación se pueden humedecer las membranas en la placa?

Recomendamos humedecerlas 10 minutos antes de agregar la muestra a la membrana. Es posible humedecer ambas membranas al mismo tiempo (10 minutos antes del primer uso de la membrana), pero esto depende completamente de la capacidad del usuario para crear un sello hermético con la tira de sellado para evitar la evaporación. Mantenga la tira de sellado puesta a menos que aplique la muestra.

### 2. ¿Cuánto tiempo puede mantenerse la reacción de marcaje a 4 °C?

Toda la noche, siempre que esté protegida de la luz.

### 3. ¿Cuánto tiempo puede permanecer la muestra a 4 °C después de Pro K?

Toda la noche, siempre que esté protegida de la luz.

### 4. ¿Cuál es el impacto de que la concentración de una muestra de ADN esté fuera del intervalo?

No hemos tenido problemas para cargar muestras con una concentración de ADN tan alta como 12 ng/ul, aunque las muestras superiores a 12 ng/ul pueden obstruir el chip si la homogeneidad es deficiente o no se tiñen correctamente. Por el contrario, hemos detectado que las muestras con una concentración de AND <4 ng/ul pueden no recopilar suficientes datos para un rendimiento efectivo.

### 5. ¿Cuánto tiempo dura la muestra?

Si bien hemos detectado que las muestras de ADN teñidas en las mejores condiciones pueden permanecer a 4 °C protegidas de la luz durante un mes, como máximo, sin que se degraden las mediciones de la muestra, sugerimos analizar las muestras en un plazo de una semana para reducir la probabilidad de que se produzcan problemas de calidad de la muestra con el paso del tiempo.

### 6. El fondo verde de las muestras marcadas DLS es más alto que en las muestras marcadas NLRs. ¿Es eso un problema?

El DL-Green sobrante suele mostrar un fondo más intenso en las imágenes tomadas en el Saphyr que lo que se ve en las muestras marcadas NLRs. Es normal y los pasos de limpieza de la membrana eliminan suficiente DL-Green para que las mediciones de datos no se vean afectadas. La variación positiva de la marca de fluoróforos adicionales se produce de forma aleatoria y no supone un problema si se encuentra dentro de las mediciones esperadas.

## Asistencia técnica

---

Para obtener asistencia técnica, póngase en contacto con el Soporte técnico de Bionano Genomics.

Para recuperar la documentación sobre productos Bionano, hojas de datos de seguridad, certificados de análisis, preguntas frecuentes y otros documentos relacionados, visite el sitio web de Soporte o envíe una solicitud por correo electrónico o teléfono.

Tipo	Contacto
<b>Correo electrónico</b>	support@bionanogenomics.com
<b>Teléfono</b>	Horario de atención:  De lunes a viernes, de 9:00 a. m. a 5:00 p. m., hora del Pacífico de EE. UU.: +1 (858) 888-7663
<b>Sitio web</b>	<a href="http://www.bionanogenomics.com/support">www.bionanogenomics.com/support</a>