



Bionano Prep SP Protokoll zur Isolierung von Gewebe- und Tumor-DNA

Dokumentnummer: 30339

Dokumentrevision: A

Inhaltsverzeichnis

Impressum	3
Revisionshistorie	4
Workflow-Übersicht	5
SP Gewebe- und Tumor-DNA-Isolierungskit und vom Benutzer bereitgestellte Materialien	6
Einführung und wichtige Hinweise	7
Einführung	7
Wichtige Hinweise	7
Bionano SP Prep Gewebe- und Tumor-DNA-Isolationsprotokoll	10
Vorbereitung für die gDNA-Isolierung aus frischem oder frisch gefrorenem Gewebe und Tumor	10
gDNA-Isolierung (4,5 Stunden)	11
Homogenisierung der gDNA-Lösung (70 Minuten)	16
gDNA-Quantifizierung (45 Minuten)	17
Fehlerbehebung	19
Die gDNA kommt ungebunden von der Nanobind Disk.	19
Die gDNA ist vor der Markierung nicht homogen	19
Die gDNA ist nicht viskos	19
Häufig gestellte Fragen	20
Welche Gewebetypen sind mit diesem Protokoll kompatibel?	20
Welche Faktoren beeinflussen die Qualität der gDNA?	20
Welche Faktoren beeinflussen die gDNA-Ausbeute?	20
Wie viele Proben können verarbeitet werden?	20
Welche Gewebekonservierungsmittel sind mit diesem Protokoll kompatibel?	20
Anhang: Vorbereiten von frischem Gewebe oder Tumor für die Lagerung	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 in irgendeiner Form oder durch ein beliebiges Medium oder auf irgendeine Weise, bekannt oder unbekannt, kopiert, reproduziert, verteilt, übersetzt, rückentwickelt oder übertragen werden. Das Kopieren umfasst laut Gesetz die Übersetzung in eine andere Sprache oder ein anderes Format. Die hierin enthaltenen technischen Daten sind für nach US-Gesetz zugelassene Endziele bestimmt. In Umlauf bringen entgegen US-Recht verboten. Diese Veröffentlichung stellt die neuesten Informationen dar, die zum Zeitpunkt der Veröffentlichung verfügbar waren. Aufgrund ständiger Bemühungen zur Verbesserung des Produkts können sich technische Änderungen ergeben, die in diesem Dokument nicht berücksichtigt sind. Bionano Genomics behält sich das Recht vor, jederzeit und ohne vorherige Ankündigung Änderungen der Spezifikationen und anderer Informationen in dieser Veröffentlichung vorzunehmen. Bitte wenden Sie sich an den Bionano Genomics-Kundensupport, um die neuesten Informationen zu erhalten.

BIONANO GENOMICS LEHNT JEDLICHE AUSDRÜCKLICHE ODER STILLSCHWEIGENDE GEWÄHRLEISTUNG IN BEZUG AUF DIESES DOKUMENT AB, EINSCHLIESSLICH, ABER NICHT BESCHRÄNKT AUF DIE MARKTGÄNGIGKEIT ODER EIGNUNG FÜR EINEN BESTIMMTEN ZWECK. SOWEIT GESETZLICH ZULÄSSIG, ÜBERNIMMT BIONANO GENOMICS IN KEINEM FALL 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[®], Irys[®], IrysView[®], IrysChip[®], IrysPrep[®], IrysSolve[®], Saphyr[®], Saphyr-Chip[®], Bionano-Zugang[®] und Bionano EnFocus[™] sind Marken von Bionano Genomics, Inc. Alle anderen Marken sind alleiniges Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber.

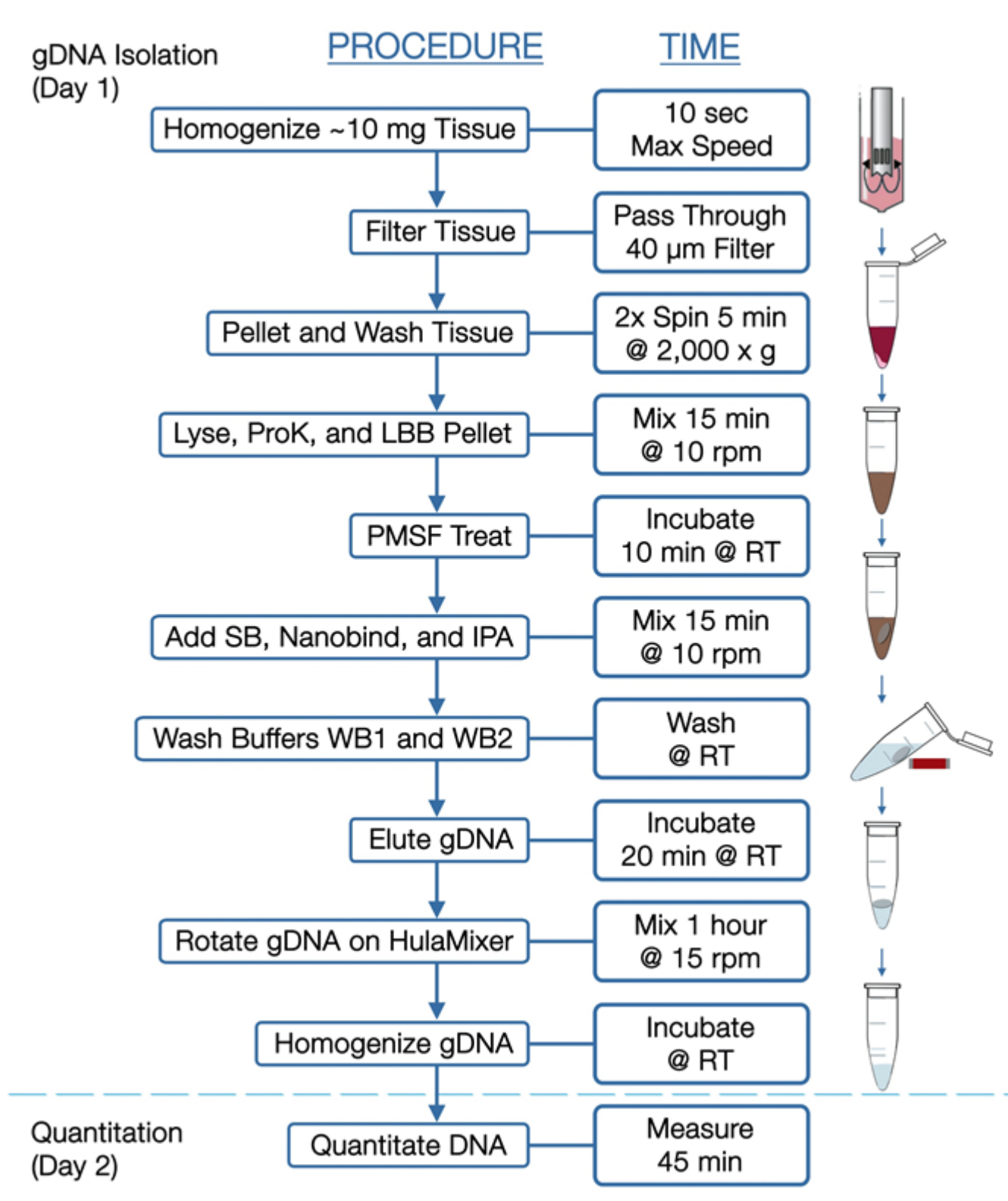
Es wird keine Lizenz zur Verwendung von Marken von Bionano Genomics erteilt oder impliziert. Benutzern ist es nicht gestattet, diese Marken ohne die vorherige schriftliche Zustimmung von Bionano Genomics zu verwenden. Die Verwendung dieser Marken oder anderer Materialien, außer wie hierin erlaubt, ist 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.

Workflow-Übersicht



SP Gewebe- und Tumor-DNA-Isolierungskit und vom Benutzer bereitgestellte Materialien

Tabelle 1: Inhalt des Bionano Prep SP Gewebe- und Tumor-DNA-Isolierungskits (Art.-Nr. 80038, 10 Präparate)

Artikel	Anzahl	Artikelnummer	Lagerung
4-mm-Nanobind-Disks	10 Disks	20402	Raumtemperatur (18-25 °C)
Protein-LoBind-Mikrozentrifugenröhrchen, 1,5 ml	10 Röhrchen	20380	Raumtemperatur (18-25 °C)
Mikrozentrifugenröhrchen, 2 ml	10 Röhrchen	20396	Raumtemperatur (18-25 °C)
40 µm Zellsieb	je 10	20403	Raumtemperatur (18-25 °C)
Waschmittel	150 µl	20405	Raumtemperatur (18-25 °C)
Salzpuffer	1,1 ml	20404	Raumtemperatur (18-25 °C)
Homogenisierungspuffer	96 ml	20406	Raumtemperatur (18-25 °C)
Waschpuffer A	12 ml	20407	Raumtemperatur (18-25 °C)
Proteinase K	0,5 ml	20372	Raumtemperatur (18-25 °C)
Lyse- und Bindungspuffer (LBB)*	2,5 ml	20375	Raumtemperatur (18-25 °C)
Waschpuffer 1 Konzentrat (2.5X) (WB1)*	2 x 3,25 ml	20376	Raumtemperatur (18-25 °C)
Waschpuffer 2 Konzentrat (2.5X) (WB2)	5 ml	20377	Raumtemperatur (18-25 °C)
Elutionspuffer (EB)	1,1 ml	20378	Raumtemperatur (18-25 °C)
SP-Hüllen	je 10	20381	Raumtemperatur (18-25 °C)

* Informationen zu gefährlichen Abfällen finden Sie im Abschnitt „Wichtige Hinweise“

Tabelle 2: Vom Benutzer bereitgestellte Materialien

Artikel	Anbieter	Katalog-Nr.
Tag 1 – Gewebeaufschluss, Pelletierung, gDNA-Isolierung und Homogenisierung		
Bionano Prep SP Magnetischer Retriever (2er Pack)	Bionano-Genomik	80031
Rotor-Stator: TissueRuptor (Version I oder II)	QIAGEN oder gleichwertig	9002755
Steckdosenleiste (empfohlen)	Allgemeiner Laborlieferant	
Einwegsonden für TissueRuptor	QIAGEN oder gleichwertig	990890
Ringständer & Dreistiftklemme (z. B. VWR 76293-368)	Allgemeiner Laborlieferant	
DynaMag-2 Magnetröhrchenständer	Thermo Fisher	12321D
HulaMixer Probenmischer	Thermo Fisher	15920D
Waagschalen	Allgemeiner Laborlieferant	
Präzisionswaage	Allgemeiner Laborlieferant	
Mikrozentrifugenröhrchen, 1,5 ml, Nukleasefrei	VWR	87003-294
Schraubdeckelröhrchen mit O-Ring, 1,5 ml	Allgemeiner Laborlieferant	
Rasierklinge	Allgemeiner Laborlieferant	
Biosicherheitskabine (optional)	Allgemeiner Laborlieferant	
Trockeneis (optional)	Allgemeiner Laborlieferant	
Aluminiumblock	Allgemeiner Laborlieferant	
Metallspatel	VWR	82027-530
Phenylmethylsulfonylfluoridlösung (PMSF), 100 mM	Sigma-Aldrich	93482
Ethanol, 200 Proof, Molekularbiologie-Qualität	Sigma-Aldrich	E7023
Isopropanol (IPA), ≥ 99,5 %, molekularbiologischer Grad	Fisher Scientific	A461-212
Desinfektionsmittelkonzentrat, TexQ TX651	Texwipe	TX651
Konische Zentrifugenröhrchen, 50 ml, PP	Thermo Fisher oder gleichwertig	14-432-22
Konische Zentrifugenröhrchen, 15 ml, PP	Thermo Fisher oder gleichwertig	05-539-12
Gekühlte Zentrifuge mit 1,5/2,0 ml Röhrchenrotor (Drehzahl 2.000 x g)	Allgemeiner Laborlieferant	
Gekühlte Zentrifuge, Ausschwingrotor für konische 15-ml-Röhrchen	Allgemeiner Laborlieferant	
Eiskübel und Eis	Allgemeiner Laborlieferant	
Sterile 5 und 10 ml Einwegpipetten (TD+)	Allgemeiner Laborlieferant	
Mini-Tischmikrozentrifuge (Drehzahl 2.000 x g)	Labnet	C1301B
Spitzzange	Electron Microscopy Sciences oder gleichwertig	78141-01
Pipettenspitzen mit weiter Öffnung, gefiltert, Aerosol, 200 µl	VWR- oder Rainin-Äquivalent	46620-642
Extra lange 1000-µl-Spitzen, steril	VWR- oder Rainin-Äquivalent	16466-008

Pipetten (10, 20, 200 und 1.000 µl) und nukleasefreie, gefilterte Pipettenspitzen	Allgemeiner Laborlieferant	
Tag 2 - Quantifizierung		
Tisch-Vortexer	Allgemeiner Laborlieferant	
Ultraschallbad (optional)	Branson oder gleichwertig	CPX 952-119R
Fluorometer, Qubit	Thermo Fisher oder gleichwertig	Q33216
Qubit® BR (Broad Range) dsDNA-Assay-Kit	Thermo Fisher oder gleichwertig	Q32853
Qubit Assay-Röhrchen	Thermo Fisher	Q32856
Direktverdrängerpipette MR-10 (optional)	Rainin oder Äquivalent	17008575
Pipettenspitzen, 10 µl, C-10 für Direktverdräng. Pipette (optional)	Rainin oder Äquivalent	17008604

Einführung und wichtige Hinweise

Einführung

Dieses Bionano SP Prep Gewebe- und Tumor-DNA-Isolationsprotokoll kann ultrahochmolekulare (UHMW) gDNA in weniger als 6 Stunden aus einer Charge von bis zu 8 Proben (bis zu 4 empfohlen für Erstanwender) mit etwa 10 mg frischem oder frisch gefrorenem Gewebe oder Tumor liefern. Es verwendet ein Homogenisierungs-, Lyse-, Binde-, Wasch- und Eluierungsverfahren, das für Kieselsäure-basierte gDNA-Extraktionstechnologien in Kombination mit einer neuartigen paramagnetischen Scheibe üblich ist. Im Gegensatz zu magnetischen Beads und Silica-Spin-Säulen, die große gDNA schneidet, bindet und gibt die Nanobind Disk gDNA mit deutlich weniger Fragmentierung ab, was zu UHMW-gDNA führt. Die hohe gDNA-Bindungskapazität ist das Ergebnis einer neuartigen nanostrukturierten Kieselsäure auf der Außenseite der thermoplastischen paramagnetischen Scheibe. Dieses Protokoll wurde verwendet, um Leber-, Lungen-, Nieren-, Dickdarm-, Eierstock-, Prostata-, Hoden- und Gebärmuttergewebe von Brown-Norway-Ratten und humanen Blasen-, Lungen-, Leber-, Nieren-, Dickdarm-, Brust-, Prostata-, Gehirn-, Schilddrüsen- und Eierstocktumoren zu verarbeiten. Dieses Protokoll wurde von mehreren Benutzern vollständig validiert, indem humane Tumoren aus Leber, Lunge und Brust sowie normale Rattennieren getestet wurden. Die nach diesem Protokoll hergestellte gDNA wurde mit DLS-Markierung getestet. Siehe [Schulungsvideo für Gewebe-Homogenisierung und Filtration](#) und [SP-gDNA-Isolierung für kritische Schritte und Fehlerbehebung](#); die im Video erwähnten Schritte entsprechen dem Bionano Prep SP Frozen Human Blood DNA Isolation Protocol (30246), aber es handelt sich um die gleichen Prozesse wie hier.

Übersicht

Nach Homogenisierung in einem ethanolhaltigen Puffer erfolgt die Gewebelyse und Proteinase K-Verdauung in einem chaotropen Puffer und die freigesetzte gDNA bindet nach Zugabe von Salzpuffer und Isopropanol an die Nanobind Disk.

Nach vier Waschschritten wird die Scheibe in ein frisches Röhrchen überführt und die gDNA von der Scheibe eluiert. Die gewonnene UHMW-gDNA wird einer begrenzten Scherung unterzogen, um die UHMW-gDNA homogener zu machen. Die gDNA wird dann gemischt und über Nacht bei Raumtemperatur äquilibriert, um die DNA-Homogenität zu erleichtern, und die Konzentration wird bestimmt. Der typische gDNA-Größenbereich reicht von 50 Kbp bis 1 Mbp.

Wichtige Hinweise

DNA-Homogenität

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

gDNA-Quantifizierung

Die gDNA-Quantifizierung wird verwendet, um die Konzentration zu messen und dient als Maß für die UHMW-gDNA-Homogenität. Die Invitrogen™ Qubit™-Quantifizierung wird anstelle anderer Quantifizierungsmethoden verwendet, da sie auch zur Messung der gDNA-Konzentration der Markierungsreaktion verwendet werden kann und genauer ist als die Spektrophotometer-Messwerte für unsere Proben. Der Qubit Broad Range (BR) dsDNA Assay misst die gDNA-Konzentration nach der Isolierung, während der High Sensitivity (HS) dsDNA Assay die gDNA-Konzentration nach der Markierung misst.

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

- Für eine genaue Quantifizierung ist eine effektive Fragmentierung der gDNA-Probe durch Ultrabeschallung oder ausgiebiges Vortexen erforderlich.
- Der Variationskoeffizient (CV) aus drei einzelnen Stichproben sollte weniger als 0,30 betragen.
- Die typische gDNA-Konzentration beträgt 50-300 ng/µl.

Pipettieren von viskoser genomischer DNA (gDNA)

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

gDNA-Handhabung

- Das Mischen der wiedergewonnenen gDNA wird immer mit einer Pipettenspitze mit weiter Öffnung durchgeführt, um ein Scheren zu vermeiden.
- Wiedergewonnene gDNA sollte niemals eingefroren oder gevortext werden.
- Das Pipettieren der wiedergewonnenen gDNA für eine genaue Probenahme erfolgt immer mit einer Standardspitze oder einer Direktverdrängerpipette.

Eigenschaften hochwertiger gDNA für die Bionano-Kartierung

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

- Die wiedergewonnene gDNA ist homogen, wie mit dem Qubit-gDNA-Quantifizierungsassay mit CV < 0,30 gemessen.

Verwendung des Bionano Prep SP Magnetic Retrievers

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

Empfohlener Input (mg Gewebe) und Gewebequalität

- Wir empfehlen, mit 10 mg zu beginnen, wobei je nach Zellkerngehalt des Gewebes im Verhältnis zur Gewebemasse bereits 5 mg und 20 mg oder mehr verwendet werden können.
- Wenn möglich, empfehlen wir ausdrücklich, ~ 10 mg Gewebestücke vorzubereiten, bevor das Gewebe eingefroren wird. Wiegen Sie das frische Gewebe idealerweise vor, bevor Sie es schockgefrieren und bei -80 °C lagern.
- Wir empfehlen, frisches oder schockgefrorenes Gewebe zu verwenden, das frei von Knochenresten, Blutgerinnseln und ausgedehnter Nekrose ist.
- Chirurgische Proben sollten so schnell wie möglich auf nassem Eis oder in eiskaltem PBS gelagert werden, um den DNA-Abbau vor dem Schneiden und/oder Schockgefrieren zu minimieren.
- Beschädigtes Gewebe (nicht ordnungsgemäß gehandhabt oder gelagert) oder Gewebe, das Gefrier-Auftau-Zyklen durchlaufen hat, sollte für die UHMW-DNA-Isolierung vermieden werden.
- Die interne Erfolgsrate von UHMW-DNA, die aus Tumorproben mit hoher RIN (RNA Integrity Number) isoliert wurde $\geq 9,0$ war > 90 %, während die Erfolgsrate von UHMW-DNA, die aus einer begrenzten Anzahl von Tumorproben mit signifikant niedrigerem RIN (5-6) isoliert wurde, niedriger war (< 50 %).

Chargengröße

- Wir empfehlen, bis zu 8 Proben gleichzeitig zu verarbeiten (bis zu 4 gleichzeitig für Erstanwender).

Sondermüllbeseitigung

Alle biogefährlichen Abfälle, einschließlich Kunststoffartikel, sind gemäß den lokalen Vorschriften zu entsorgen.

Die Puffer LBB und WB1 enthalten Guanidinhydrochlorid (GuHCl). GuHCl ist gesundheitsschädlich beim Verschlucken oder Einatmen und verursacht Haut- und Augenreizungen. NICHT mit Bleichmittel oder sauren Reagenzien mischen. Flüssige Abfälle, die GuHCl enthalten, müssen mit einem quaternären Ammonium-Desinfektionsmittel sicher dekontaminiert werden, bevor sie in den Abfallstrom für gefährliche Abfälle entsorgt werden. Wir empfehlen Bleichmittel zur Dekontamination des Pellet-Überstands und TexQ zur Dekontamination aller Lösungen, die mit GuHCl gemischt sind. Dies entspricht den Entsorgungsvorschriften im US-Bundesstaat Kalifornien, kann sich jedoch an Ihrem Standort unterscheiden. Bitte beachten Sie die lokalen Vorschriften zur Dekontamination und Entsorgung.

Bionano SP Prep Gewebe- und Tumor-DNA-Isolationsprotokoll

Vorbereitung für die gDNA-Isolierung aus frischem oder frisch gefrorenem Gewebe und Tumor

Hinweis: Um beste Ergebnisse zu erzielen, empfehlen wir, das Gewebe wie im Anhang beschrieben vorzubereiten.

Vor dem ersten Gebrauch

- Überprüfen Sie den Zugang zu einer gekühlten Zentrifuge mit Ausschwingrotor, die konische 15-ml-Polypropylenröhrchen aufnehmen kann, um das Homogenisat zu pelletieren.
- Stellen Sie sicher, dass die Schleuderdrehzahl der Mini-Tischzentrifuge mit gekühlter Mikrozentrifuge 2.000 x g beträgt.
- PMSF zersetzt sich in wässrigen Lösungen schnell. Erstellen Sie Aliquots von 120 µl in 1,5 ml Schraubverschlussröhrchen und lagern Sie Vorrat und Aliquots lichtgeschützt bei 4 °C. Jedes Aliquot reicht für zehn gDNA-Isolierungen.
- 125 µl Bionano Prep Detergent zum Lysis and Binding Buffer (LBB)-Röhrchen geben und zum Mischen 10 Mal umdrehen. Mark LBB Rohr, das Reinigungsmittel zugesetzt wurde.
- Fügen Sie 100 % Ethanol zum Homogenisierungspuffer und den Waschpuffern (WB1 und WB2) hinzu, invertieren Sie zum Mischen 10 Mal und aktivieren Sie die Kästchen „Ethanol hinzugefügt“:
 - 96 ml 100 % Ethanol zum Homogenisierungspuffer auf ein Endvolumen von 192 ml geben.
 - 5 ml 100 % Ethanol zu Waschpuffer 1 (WB1) für ein Endvolumen von 8,25 ml hinzufügen.
 - Fügen Sie 7,5 ml 100 % Ethanol zu Waschpuffer 2 (WB2) hinzu, um ein Endvolumen von 12,5 ml zu erhalten.

Erstellen

- Gekühlte Ausschwingzentrifuge und gekühlte Mikrozentrifuge auf 4 °C einstellen.
- Immobilisieren der TissueRuptor (Qiagen) auf einem vertikalen Ständer. Verbinden Sie TissueRuptor mit einem Steckdosenleistschalter.
- Sammeln Sie Materialien (siehe Abschnitt „Vom Benutzer bereitgestelltes Material“ oben). Homogenisierungspuffer, Waschpuffer A und TissueRuptor-Sonde(n) vorkühlen.
- Zur Abfallentsorgung konische 50-ml-Röhrchen (1 Röhrchen pro 2 Proben) mit 100 µl TexQ-Dekontaminationsmittel pro Probe vorbereiten (als Sondermüll zu entsorgen).
- Für jede Probe zwei konische 15-ml-Röhrchen und ein konisches 50-ml-Röhrchen markieren und auf Eis legen. Setzen Sie ein 40-µm-Zellsieb (Bionano) in das konische 50-ml-Röhrchen.
- Markieren Sie für jede Probe zwei 1,5-ml-Protein-LoBind-Röhrchen (Bionano) und ein 2,0-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (Bionano). Legen Sie eines der markierten 1,5-ml-Protein-LoBind-Röhrchen auf Eis.
- Röhrchen mit PMSF und Proteinase K (Bionano) dreimal zum Mischen umdrehen, kurz pulszentrifugieren. Legen Sie PMSF auf Eis.
 - Der Einfachheit halber können alle Puffer, die in diesem Protokoll bei 4 °C verwendet werden, langfristig bei 4 °C gelagert werden.

gDNA-Isolierung (4,5 Stunden)

Hinweis: Wichtige Anweisungen zur Vorbereitung von gefrorenem Gewebe finden Sie im Anhang.

1. Für jede Gewebeprobe 2 ml gekühlten Bionano Prep SP Gewebe- und Tumorphomogenisierungspuffer in ein konisches 15-ml-Röhrchen geben und auf Eis aufbewahren.
2. Gewebe entnehmen und Portionen von ~10 mg (siehe Abschnitt „Empfohlene Eingabe“ oben) vorbereiten:

Hinweis: Beim Schneiden von ~10-mg-Portionen sollte das Gewebe möglichst wenig Raumtemperatur ausgesetzt werden. Wenn eine Portion außerhalb des Gewichtsbereichs von 9 - 13 mg liegt, wird empfohlen, diese zu verwerfen und ein neues Stück abzuschneiden (falls mehr Gewebe verfügbar ist).

- a. Für **frisches** Gewebe – verwenden Sie einen sterilisierten, eisgekühlten Aluminiumblock als Schneidefläche, schneiden Sie das Gewebe mit einer sterilisierten Rasierklinge und einer Pinzette und wiegen Sie ~10 mg in einem Wägeschiffchen auf einer Präzisionswaage (wenn das Gewicht nicht bereits bekannt ist).
- b. Für **gefrorenes** Gewebe:
 - 1) Wenn das Gewebestück nicht größer als 2 x 2 x 4 mm ist, in einem Wägeschiffchen mit einer sterilisierten Rasierklinge und einer Pinzette auf einem eisgekühlten Aluminiumblock schneiden. Wiegen Sie ~10 mg in einem anderen Wägeschiffchen und werfen Sie entweder den Rest oder frieren Sie es erneut ein und lagern Sie es bei -80 °C, um DNA zu isolieren, die nicht UHMW sein muss.
 - 2) Wenn das Gewebestück größer ist und Sie keinen bestimmten Bereich des Gewebes entnehmen müssen, legen Sie das gefrorene Gewebe in einen Plastikbeutel, der auf einem mit Trockeneis gekühlten Aluminiumblock gekühlt wurde, verschließen Sie den Beutel und zerteilen Sie das Gewebe mit Hilfe eines großen Stößels oder Hammers in kleinere Stücke. Entfernen Sie ein kleines Stück und verarbeiten Sie es wie oben beschrieben (Schritt 2.b.1). Die verbleibenden Fragmente können erneut bei -80 °C gelagert werden.
 - 3) Wenn das Gewebestück größer ist und Sie eine bestimmte Geweberegion entnehmen müssen, legen Sie das gefrorene Gewebe in ein Wägeschiffchen auf einen vorgekühlten Aluminiumblock (-20 °C) und schneiden Sie ein kleines Stück mit einem Skalpell oder einer Rasierklinge und Pinzette ab. Wiegen Sie ~10 mg in einem anderen Wägeschiffchen und lagern Sie das verbleibende große Gewebestück erneut bei -80 °C.

Hinweis: Bei faserigen Geweben wird empfohlen, das Gewebe im Wägeschiffchen in kleine Stücke zu schneiden (1 - 2 mm)

3. Das geschnittene Gewebe mit einem sterilisierten, vorgekühlten Metallspatel sofort in das markierte konische 15-ml-Röhrchen mit Homogenisierungspuffer überführen. Stellen Sie sicher, dass die Gewebestücke in den Homogenisierungspuffer eingetaucht sind und das konische Röhrchen auf Eis gestellt ist. Übertragen Sie die vorgekühlte Sonde in ein konisches Röhrchen.
4. Wiederholen Sie die Schritte 2-3, um jede weitere Probe vorzubereiten, bis zu insgesamt 8 Proben.

Hinweis: Bevor Sie mit dem nächsten Schritt fortfahren, stellen Sie sicher, dass jede Gewebe- oder Tumorseite in einen konischen 15-ml-Homogenisierungspuffer und eine TissueRuptor-Sonde auf Eis gelegt wird. Siehe Gewebe- und Tumor- Homogenisierungs- und Filtrations-Video zu den Schritten 5-11.

5. Nehmen Sie jeweils ein konisches Röhrchen aus dem Eis und befestigen Sie die Sonde fest am TissueRuptor-Gerät, während Sie das konische Röhrchen halten. Halten Sie das Röhrchen so, dass die Spitze der TissueRuptor-Sonde in den Puffer eintaucht und sich sehr nahe am Boden des Röhrchens befindet.
6. Schalten Sie den TissueRuptor mit dem Schalter an der Steckdosenleiste ein und aus. Überprüfen Sie, ob das Gewebepellet zerbrochen ist. Bei besonders dichtem Gewebe zusätzlich 2-3-mal schalten, um es zu zerbrechen und eine gründliche Homogenisierung zu erreichen.

Hinweis: Stellen Sie sicher, dass das Gewebe nicht an der Röhrchenwand oder der Sondenspitze klebt. Das Gewebe bei Bedarf mit einem Spatel in den Homogenisierungspuffer eintauchen. Bei Fasergewebe empfehlen wir, das Gewebe vor der Homogenisierung mit dem TissueRuptor in kleine Stücke zu schneiden.

7. Mischen Sie kontinuierlich 10 Sekunden lang mit maximaler Geschwindigkeit, wobei die Sondenspitze stets eingetaucht sein muss. Bewegen Sie das Röhrchen während des Mischens in einer Kreisbewegung von oben nach unten, um die Effizienz der Homogenisierung zu erhöhen. Schalten Sie am Ende des Mischens den am TissueRuptor angeschlossenen Steckerleistenschalter aus, entfernen Sie die Sonde aus dem TissueRuptor und stellen Sie das Röhrchen (mit der Sonde im Röhrchen) wieder auf Eis.
Hinweis: Das konische Röhrchen sollte unmittelbar nach der Homogenisierung wieder eingesetzt werden, um die höchste DNA-Qualität zu gewährleisten.

8. Wiederholen Sie die Schritte 5-7 für alle anderen Proben. Bis zu 8 Proben insgesamt.
9. Spülen Sie jede Sondenspitze mit 6 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer mit einer Pipette und sammeln Sie sie in demselben konischen Röhrchen. Entsorgen Sie die Sonde ordnungsgemäß (potenzielle Biogefahr).
10. Dekantieren Sie das Homogenat durch ein 40- μ m-Zellsieb auf das markierte konische 50-ml-Röhrchen, das auf Eis gestellt wird. Bewahren Sie das konische Röhrchen für den nächsten Schritt auf.
11. Fügen Sie weitere 6 ml eiskalten Homogenisierungspuffer dem konischen 15-ml-Röhrchen hinzu und schwenken Sie es, um Ablagerungen von den Seiten des Röhrchens abzuspülen, und gießen Sie ihn dann über das Zellsieb und sammeln Sie ihn in demselben konischen 50-ml-Röhrchen. Entsorgen Sie das Zellsieb ordnungsgemäß (potenzielle Biogefahr).

Hinweis: Wenn das Homogenisat nicht durch das Zellsieb fließt, heben und senken Sie das Sieb kurz, um den Durchfluss zu unterstützen.

12. Pipettieren Sie das gesamte Volumen zweimal, bevor Sie das Homogenisat in ein neues konisches 15-ml-Röhrchen mit Deckel überführen.
13. Zentrifugieren Sie bei 2.000 x g für 5 Minuten bei 4 °C unter Verwendung eines Ausschwingrotors (stellen Sie Beschleunigung und Verzögerung auf 9 ein).
14. Dekantieren Sie den Überstand unmittelbar nach dem Stoppen der Zentrifuge in TexQ-Abfall (potenzielle Biogefahr), stellen Sie das konische Röhrchen 30 Sekunden lang auf Eis und verwenden Sie eine 1.000- μ l-Pipette, um so viel Restflüssigkeit wie möglich zu entfernen, ohne das Pellet zu beeinträchtigen (wobei < 200 μ l Volumen übrigbleiben).
15. Fügen Sie 300 μ l Waschpuffer A hinzu, resuspendieren Sie das Pellet mit einer 1.000 μ l Spitze (auf 300 μ l eingestellt) durch langsames Auf- und Abpipettieren. Übertragen Sie das gesamte Volumen der Suspension mit einer 1.000- μ l-Spitze in ein zuvor markiertes, vorgekühltes 1,5-ml-Protein-LoBind-Röhrchen. Bewahren Sie das konische Röhrchen für den nächsten Schritt auf.

16. Fügen Sie dem konischen 15-ml-Röhrchen weitere 700 µl Waschpuffer A hinzu, pipettieren Sie zum Mischen zweimal vorsichtig und überführen Sie das gesamte Volumen mit einer 1.000-µl-Spitze in das gleiche markierte vorgekühlte 1,5 ml Protein LoBind-Röhrchen.
17. Zentrifugieren Sie bei 2.000 x g für 5 Minuten bei 4 °C.
18. Ohne das Pellet zu beeinträchtigen den Überstand absaugen, um ein Volumen von ungefähr 40 µl zu hinterlassen. Überstand im TexQ-Abfall entsorgen (potenzielle Biogefahr). Legen Sie das Röhrchen 30 Sekunden lang auf Eis.
19. Pellet im Restvolumen 10-mal mit einer 200-µl-Standardspitze resuspendieren. Restvolumina können abweichen.

Lyse- und Verdauungszellen

20. 50 µl Proteinase K in das Protein LoBind-Röhrchen geben und das Röhrchen verschließen. **MISCHUNG NICHT PIPETTIEREN.**
21. 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
22. 225 µl Puffer LBB, enthaltend Detergens, mit einer 1.000 µl Spitze zur Probe geben. Das Röhrchen zum Mischen 15 Mal verschließen und umdrehen.

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

23. Rotieren Sie die Probe auf dem HulaMixer für 15 Minuten bei Raumtemperatur bei 10 U/min. Kein Schütteln/Vibriieren.
24. Pulszentrifugieren Sie das Röhrchen 2 Sekunden lang, um die Flüssigkeit am Boden des Röhrchens zu sammeln.
25. Geben Sie 10 µl 100 mM PMSF in den flüssigen Teil im Röhrchen. Röhrchen verschließen und zum Mischen 5-mal schwenken. Röhrchen 2 Sekunden lang pulszentrifugieren, um die Flüssigkeit am Boden des Röhrchens zu sammeln.
26. 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

gDNA binden, waschen und eluieren

27. 85 µl Bionano Prep Salting Buffer in das Röhrchen geben, verschließen und 10-mal umdrehen und das Röhrchen 2 Sekunden lang pulszentrifugieren.
28. Mit einer Pinzette vorsichtig eine einzelne 4 mm Nanobind Disk auf das Lysat übertragen.

Hinweis: Disks können manchmal zusammenkleben.

29. 400 µl 100 % Isopropanol in das Röhrchen geben. Das Röhrchen verschließen und zum Mischen 5-mal umdrehen.
30. Rotieren Sie die Probe auf dem HulaMixer für 15 Minuten bei Raumtemperatur bei 10 U/min. Kein Schütteln/Vibriieren.

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

31. Untersuchen Sie die gDNA-Assoziation mit der Nanobind Disk und drehen Sie sie um, um die Bindung zu erhöhen (Siehe Training Video, 0:25):
 - a. Stellen Sie die Probenröhrchen in ein durchsichtiges Dynamag-Röhrchengestell und überprüfen Sie alle Röhrchen im Gestell visuell, um sicherzustellen, dass die gDNA an die Nanobind Disk gebunden ist.

- b. Wenn gDNA-Stränge sichtbar tief hängen, schnell um 180° drehen, um die gDNA näher mit der Nanobind Disk zu verbinden.
- c. 180°-Drehungen können beliebig oft durchgeführt werden, bis die gDNA-Verbindung mit der Nanobind Disk stabil erscheint.

32. Verbinden Sie das transparente Rack mit der Magnetbasis wie unten beschrieben und stellen Sie sicher, dass die Nanobind Disk durch den Magneten nahe der Oberkante des Flüssigkeitsspiegels gesichert ist. Wenn nicht, Rack erneut positionieren (siehe [Schulungsvideo](#), 0:50).

Hinweis: Die Farbe der Flüssigkeit in den folgenden Bildern wurde zu Veranschaulichungszwecken geändert.

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



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



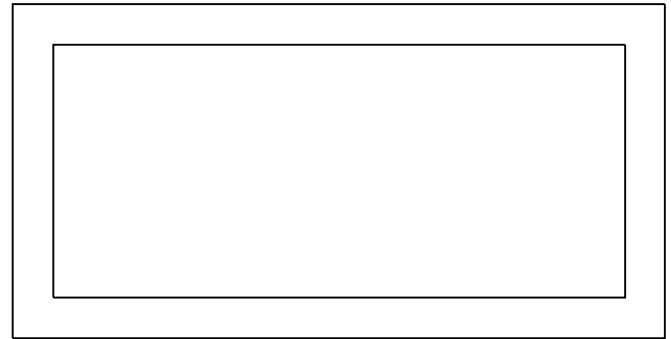
- c. Kippen Sie das kombinierte Gerät langsam um 90° zu sich hin, während es weiterhin auf der Oberfläche ruht. Die Röhrchen liegen nun horizontal und sind für Sie sichtbar.



- d. Kippen Sie das kombinierte Gerät langsam um 90° in Ihre Richtung, während es weiterhin auf der Oberfläche ruht, sodass es vollständig aufrecht steht und die Röhrchen in Ihre Richtung zeigen.



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



33. Stellen Sie eine 1.000- μ l-Pipette auf 1.000 μ l und eine zweite auf 700 μ l ein.
34. Entfernen Sie den Überstand wie unten beschrieben, achten Sie darauf, die gDNA nicht anzusaugen (siehe [Schulungsvideo](#), 1:15):
- a. Neigen Sie das gesamte Rack in einem 45°-Winkel an, indem Sie es in einer Hand halten (greifen Sie das gesamte Gerät von unten, sodass die Röhren für Sie sichtbar sind und die Deckel zu Ihrer anderen Hand zeigen).
 - b. Warten Sie 2 Sekunden, bis die gDNA auf der Nanobind Disk aufliegt.
 - c. Entfernen Sie langsam die gesamte Flüssigkeit mit einer 1.000 μ l extralangen Spitze, die von der Nanobind Disk und/oder der gDNA abgewinkelt ist, um Störungen zu vermeiden.
 - d. Pipettieren Sie den Überstand in ein konisches Röhren mit TexQ ab.

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

35. Führen Sie die WB1-Wäsche durch (siehe [Schulungsvideo](#), 2:21):
- a. Pipettieren Sie 700 μ l Puffer WB1 direkt auf die Disks in den Röhren und Kappenröhren.
 - b. Heben Sie das durchsichtige Röhrengestell an, um es von der Magnetbasis zu trennen.
 - c. Drehen Sie das durchsichtige Gestell mit den Röhren 4-mal um 180°, um es zu waschen.
 - d. Stellen Sie das durchsichtige Röhrengestell und die Röhren mit Magnetboden wie in Schritt 32 beschrieben neu auf.
 - e. Entfernen Sie den Überstand wie in Schritt 34 beschrieben.

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

36. WB1-Wäsche, Schritt 35 wiederholen.

37. Stellen Sie die zweite Pipette auf 500 μ l (vorher auf 700 μ l).

38. Führen Sie die WB2-Wäsche durch (siehe [Schulungsvideo](#), 4:10):

- a. Pipettieren Sie 500 μ l Puffer WB2 direkt auf die Disks in den Röhren und verschließen Sie sie.
- b. Heben Sie das durchsichtige Gestell an, um es von der Magnetbasis zu trennen.
- c. Drehen Sie das durchsichtige Gestell 10-mal um 180°, um es zu waschen.
- d. Stellen Sie das durchsichtige Röhrengestell und die Röhren mit Magnetboden wie in Schritt 32 beschrieben neu auf.

e. Entfernen Sie den Überstand wie in Schritt 34 beschrieben.

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

39. WB2-Wäsche, Schritt 38 wiederholen (siehe [Schulungsvideo](#), 5:50).

Hinweis: Entnehmen Sie den Puffer aus jeweils 2 oder 3 Röhrchen und führen Sie den Puffer-EB-Inkubationsschritt in kleinen Chargen durch, um ein Austrocknen der Disk/DNA zu verhindern.

40. Öffnen Sie den Röhrchendeckel vollständig (parallel zum Labortisch) und heben Sie jedes Röhrchen vom Boden ab.

41. Übertragen Sie die Nanobind Disk in unmittelbarer Nähe eines neuen Protein LoBind-Röhrchens mit dem Bionano Prep SP Magnetic Retriever auf ein neues Protein LoBind-Röhrchen (siehe Abschnitt „Wichtige Hinweise“ für die richtige Verwendung). Röhrchen verschließen, um ein Austrocknen der Disk zu verhindern (siehe [Schulungsvideo](#), 7:30).

42. 65 µl Puffer EB in das Protein LoBind-Röhrchen geben.

43. Pulszentrifugieren Sie des Röhrchens auf einer Tischmikrozentrifuge für 5 Sekunden.

44. Bewegen Sie die Nanobind Disk mit einer 10 µl Standardspitze vorsichtig zum Boden des Röhrchens und stellen Sie sicher, dass es vollständig in die Flüssigkeit eingetaucht ist. Die Disk muss parallel zur Tischoberfläche bleiben (siehe [Schulungsvideo](#), 8:20).

45. Inkubieren Sie die eingetauchte Nanobind Disk in Puffer EB bei Raumtemperatur für 20 Minuten.

46. Sammeln Sie die extrahierte gDNA, indem Sie das Eluat mit einer 200-µl-Standardspitze in ein zuvor markiertes 2,0-ml-Mikrozentrifugenröhrchen überführen.

47. Das Röhrchen mit der Nanobind Disk auf einer Tischmikrozentrifuge 5 Sekunden lang pulszentrifugieren und das gesamte verbleibende Eluat, das viskose gDNA enthält, in das gleiche Standard-2,0-ml-Mikrozentrifugenröhrchen wie im vorherigen Schritt mit einer Standard-200-µl-Spitze überführen. Sie können die Disk entfernen, bevor Sie den restlichen Elutionspuffer absaugen.

Hinweis: Fast die gesamte viskose gDNA löst sich während des Pulszentrifugierens von der Nanobind Disk.

Homogenisierung der gDNA-Lösung (70 Minuten)

Homogenisierung der gDNA-Lösung

48. Geben Sie langsam das gesamte gDNA-Volumen in eine 200-µl-Spitze mit Standardöffnung und pipettieren Sie dann langsam die gDNA.

Vermeiden Sie Blasenbildung.

- Wiederholen Sie diesen Vorgang 3-mal für insgesamt 4 Hübe: (1 Hub = 1 Aufnahme und 1 Abgabe).

Hinweis: Wenn die gDNA-Aufnahme aufgrund der hohen Viskosität zum Stillstand kommt, kann es erforderlich sein, vorsichtig zu rühren, während der Kolben langsam losgelassen wird, um die gDNA zu entnehmen.

49. Platzieren Sie ein Standard 2,0 ml Mikrozentrifugenröhrchen mit gDNA in einem HulaMixer-Rack und drehen Sie es 1 Stunde lang bei 15 U/min bei Raumtemperatur.

Hinweis: Stellen Sie während der anfänglichen Rotationen sicher, dass sich die gDNA vom Boden des Mikrozentrifugenröhrchens löst, um während der Rotationen im Deckel des Röhrchens zu bleiben. Wenn die DNA-Lösung während der anfänglichen Rotationen am Boden des Röhrchens verbleibt, schalten Sie den HulaMixer aus und positionieren Sie das Gestell so, dass das Mikrozentrifugenröhrchen auf dem Kopf steht. Bewegen Sie den Boden des Mikrozentrifugenröhrchens vorsichtig, bis die gDNA in den Deckel gezogen ist, und fahren Sie mit dem Mischen fort.

50. Entfernen Sie das Mikrozentrifugenröhrchen aus dem Gestell des HulaMixer und pulscentrifugieren Sie das Röhrchen auf einer Tischmikrozentrifuge für 2 Sekunden, um die gDNA auf den Boden des Röhrchens zu bringen. Lassen Sie die gDNA über Nacht bei Raumtemperatur (25°C) äquilibrieren, um zu homogenisieren.

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

gDNA-Quantifizierung (45 Minuten)

Qubit-Quantifizierung - BR dsDNA-Assay

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

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

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

2. Qubit BR Puffer zu 0,5 ml Qubit Assay Tubes hinzufügen:
 - a. Für jede Probe 18 µl Qubit BR Buffer in drei separate Qubit Assay Tubes geben.
 - b. Für die Qubit-Standards 10 µl Qubit BR-Puffer in zwei separate Qubit-Teströhrchen geben.
3. Mischen Sie das gesamte gDNA-Probenvolumen mit einer 200-µl-Pipette mit einer Spitze mit weiter Öffnung vorsichtig durch 5-maliges Auf- und Abpipettieren, wobei darauf zu achten ist, dass keine Blasen entstehen.
4. Verwenden einer frischen Pipettenspitze mit Standardöffnung oder einer Direktverdränger-Pipettenspitze für jede Entnahme:

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

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

5. Bereiten Sie die Arbeitslösung vor, indem Sie das Dye Assay Reagent in BR Dilution Buffer (1:200) verdünnen:
 - a. 200 µl Arbeitslösung für jeden der beiden Standards (insgesamt 400 µl).
 - b. 200 µl Arbeitslösung für jedes Probenaliquot (600 µl für jede Probe).

6. Für die Qubit-DNA-Standards 10 µl der Standards 1 und 2 in die Assay-Röhrchen mit BR-Puffer aus Schritt 2b geben.
7. Sobald das Ultraschallbad abgeschlossen ist, entnehmen Sie die Teströhrchen und pulscentrifugieren Sie sie kurz. Röhrchen 5 Sekunden lang bei maximaler Geschwindigkeit vortexen, dann erneut pulscentrifugieren.
8. 180 µl Arbeitslösung zu jedem beschallten DNA-Aliquot und Qubit-DNA-Standard-Aliquot hinzufügen. 5 Sekunden vortexen und Röhrchen pulscentrifugieren.
9. Proben mindestens 2 Minuten inkubieren, dann auf dem Qubit Fluorometer ablesen.
10. Der Variationskoeffizient ($CV = \text{Standardabweichung}/\text{Mittelwert}$) von drei Messwerten sollte $< 0,30$ betragen.

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

Hinweis: Typische DNA-Konzentrationen reichen von 50-300 ng/µl. Wenn die Konzentration > 150 ng/µl beträgt, siehe Wichtige Hinweise des Bionano Prep Direct Label and Stain (DLS) Protocol ([30206](#)).

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

Markierung

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

Fehlerbehebung

Die gDNA kommt ungebunden von der Nanobind Disk.

Nachweis: gDNA wird während der Bindung oder während des Waschens aspiriert oder von der Disk abgelöst.

Schritte, die zu befolgen sind, wenn gDNA aspiriert wird:

1. Lassen Sie das Probenröhrchen auf dem Magneten und pipettieren Sie gDNA-haltige Flüssigkeit zurück in das Röhrchen mit der Disk.
2. Entfernen Sie das Rack-Röhrchen vom Magneten und drehen Sie das Gestell mehrmals von Hand um, um die Bindung wiederherzustellen.

Alternativ:

1. Lassen Sie das Probenröhrchen auf dem Magneten und pipettieren Sie gDNA-haltige Flüssigkeit zurück in das Röhrchen mit der Disk.
2. Flüssigkeit aus dem Röhrchen absaugen, sodass ein minimales Volumen (~50 µl) über ungebundener gDNA verbleibt und den Überstand verwerfen, wobei die DNA in einem minimalen Volumen am Boden des Röhrchens verbleibt.
3. Aspirieren Sie vorsichtig ungebundene gDNA, die die minimale Flüssigkeit enthält, in die Pipettenspitze und pipettieren Sie sie direkt auf eine Magnet-Disk, um die Bindung wiederherzustellen.

Schritte, die zu befolgen sind, wenn gDNA visuell von der Nanobind Disk abgelöst und nicht aspiriert wird:

1. Nehmen Sie das Röhrchen aus dem Gestell und halten Sie es waagrecht.
2. Rollen Sie das Röhrchen zwischen den Fingern, bis die Bindung wieder hergestellt ist.

Die gDNA ist vor der Markierung nicht homogen

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

Zu befolgende Schritte:

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

Die gDNA ist nicht viskos

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

Die Probe weist wahrscheinlich keine gDNA mit hohem Molekulargewicht auf.

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

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

Häufig gestellte Fragen

Welche Gewebetypen sind mit diesem Protokoll kompatibel?

- Mit diesem Protokoll wurden die folgenden Gewebetypen erfolgreich verarbeitet:
 - Von der braunen Wanderratte: Leber, Lunge, Niere, Dickdarm, Eierstock, Prostata, Hoden und Gebärmutter.
 - Vom Menschen: Blase, Lunge, Leber, Niere, Dickdarm, Brust, Prostata, Gehirn, Schilddrüse und Eierstock.
 - Von Maus: Milz (2-3 mg Zufuhr empfohlen)
- Haut-, Muskel- und Nicht-Wirbeltier-Gewebe werden noch nicht vollständig unterstützt.
- Normalgewebe und Tumorbiopsien werden empfohlen. Dieses Protokoll wurde nicht mit Feinnadelaspiraten getestet.

Welche Faktoren beeinflussen die Qualität der gDNA?

- Die Lagerung und Handhabung von Geweben beeinflusst die Qualität der gDNA. Folgendes kann die gDNA-Qualität negativ beeinflussen:
 - Gewebe, die nach anfänglicher Lagerung bei -80 °C einen Gefrier-Tau-Zyklus durchlaufen haben.
 - Gefrorenes Gewebe, das während des Schneidens längere Zeit Raumtemperatur ausgesetzt war.
 - Nekrotisches Gewebe innerhalb der Gewebeprobe.
 - Gewebe mit RIN (RNA-Integritätszahl) < 9,0.
- Zu viel Ausgangsmaterial führt zu einer geringeren gDNA-Qualität.

Welche Faktoren beeinflussen die gDNA-Ausbeute?

- Der Kerngehalt relativ zur Gewebemasse beeinflusst die gDNA-Ausbeute. Gewebe, die aufgrund eines geringen Kerngehalts ein hohes Gewebezugabegewicht erfordern, können schlecht markieren und haben einen geringen Durchsatz.
 - Hinweis:** Tumorproben weisen im Vergleich zu normalem Gewebe normalerweise eine höhere gDNA-Ausbeute pro mg Gewebe auf.
- Gewebe mit hohem Fettgehalt können eine niedrige gDNA-Ausbeute aufweisen.

Wie viele Proben können verarbeitet werden?

- Dieses Protokoll kann für Chargengrößen bis 8 verwendet werden.
 - Die Verarbeitung einer Charge dieser Größe dauert bis zu 6 Stunden.
- Basierend auf dem typischen Durchsatz des Saphyr-Instruments können Daten von mindestens 9 Proben pro Woche gesammelt werden

Welche Gewebekonservierungsmittel sind mit diesem Protokoll kompatibel?

- Obwohl wir Konservierungsstoffe derzeit noch nicht auf Kompatibilität mit diesem Produkt getestet haben, ist dies ein Bereich der laufenden Forschung und wir werden diesen Abschnitt mit neuen Erkenntnissen aktualisieren, sobald sie verfügbar sind.

Anhang: Vorbereiten von frischem Gewebe oder Tumor für die Lagerung

Empfohlene Zufuhr: 10 mg Frischgewebe oder Tumor aus Lunge, Leber, Niere, Gebärmutter, Eierstock, Dickdarm, Prostata, Schilddrüse, Hoden, Brust und Blase. Dieses Protokoll unterstützt Muskelgewebe noch nicht vollständig.

Hinweis: Gewebe mit niedrigem Zellkerngehalt im Verhältnis zur Gewebemasse produziert möglicherweise nicht genügend gDNA, und zu viel Gewebe kann gDNA produzieren, die weniger rein und schwieriger zu homogenisieren ist.

1. Gewebe in eiskaltem PBS abspülen und auf einem sterilisierten eiskalten Metallblock in kleinere Stücke (~10 mg pro Stück) schneiden.
 - a. Es wird empfohlen, von jedem Gewebe mehrere Portionen vorzubereiten.
2. Gewebe in ein 1,5-ml-Röhrchen mit Schraubverschluss überführen und 3 Minuten in flüssigem Stickstoff schockfrostet, bevor es zur Langzeitlagerung in einen -80 °C Gefrierschrank überführt wird.
3. Das gefrorene Gewebe wird am besten innerhalb von 6 Monaten bei -80 °C gelagert.
4. Wenn Sie gefrorenes Gewebe versenden, befolgen Sie bitte die Richtlinien in den Anweisungen zum Versand von Gewebe und Tumoren ([30186](#)).

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, PST USA: +1 (858) 888-7663
Webseite	www.bionanogenomics.com/support