



Protocollo di Isolamento del DNA di Tessuti e Tumori Bionano SP Prep

Numero del documento: 30339

Revisione del documento: A

Sommario

Avviso legale	3
Cronologia delle revisioni.....	4
Panoramica del flusso di lavoro	5
Kit di isolamento del DNA di tessuto e tumore SP e materiali forniti dall'utente.....	6
Introduzione e note importanti.....	8
Introduzione	8
Note importanti.....	8
Protocollo di isolamento del tessuto e del DNA tumorale Bionano Prep SP	11
Preparazione per l'isolamento del gDNA da tessuto e tumore freschi o congelati	11
Isolamento gDNA (4,5 ore).....	12
Omogeneizzazione della soluzione di gDNA (70 minuti)	17
Quantificazione del gDNA (45 minuti).....	18
Risoluzione dei problemi.....	20
Il gDNA non viene legato dal Nanobind Disk.	20
Il gDNA non è omogeneo prima dell'etichettatura.....	20
Il gDNA non è viscoso	20
Domande frequenti	21
Quali tipi di tessuto sono compatibili con questo protocollo?	21
Quali fattori influenzeranno la qualità del gDNA?	21
Quali fattori influenzeranno la resa di gDNA?	21
Quanti campioni possono essere processati?	21
Quali conservanti dei tessuti sono compatibili con questo protocollo?	21
Appendice: preparazione di tessuto fresco o tumore per la conservazione.....	22
Assistenza tecnica	23

Avviso legale

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

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

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

Brevetti

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

Marchi di Fabbrica

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

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

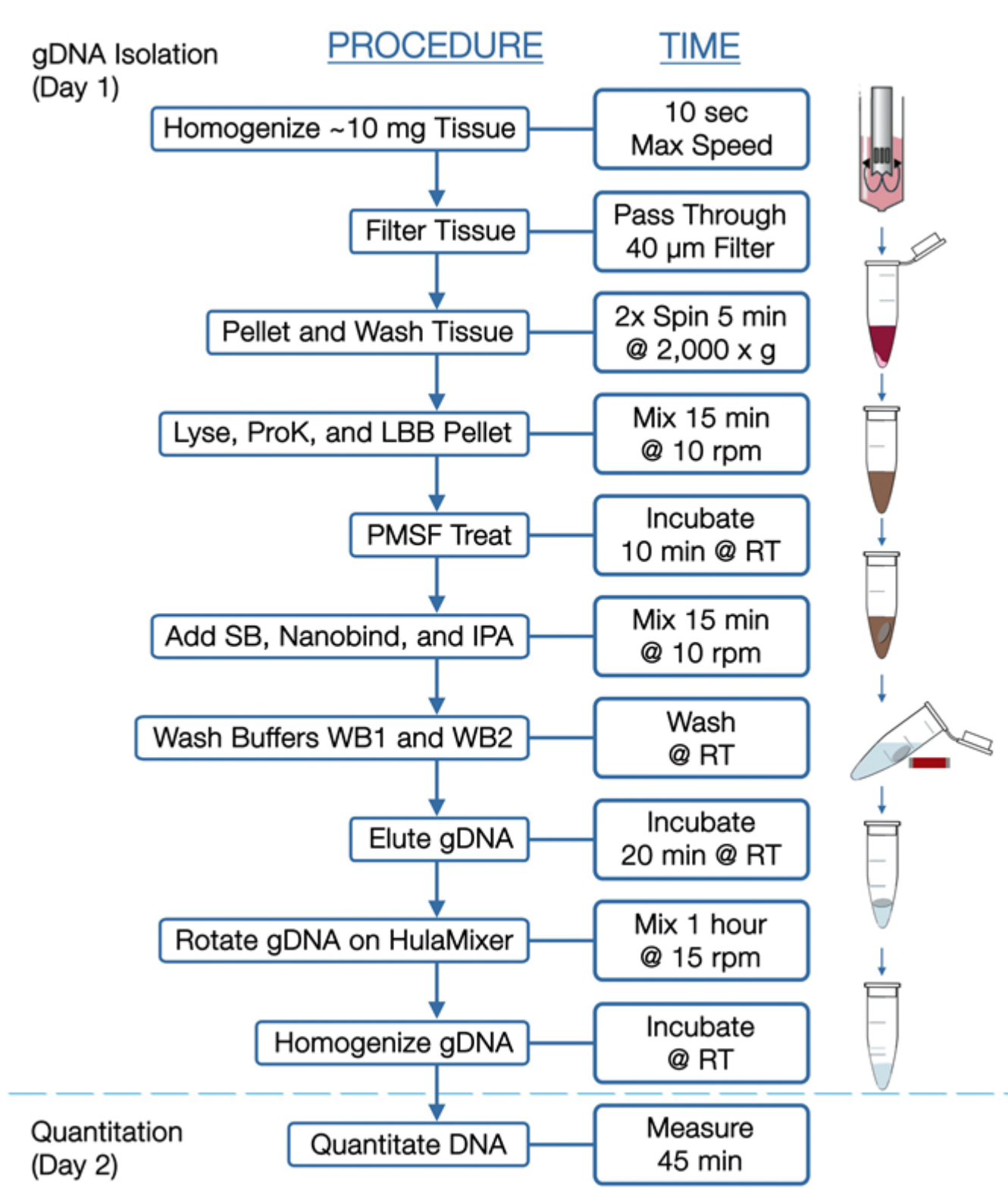
Nessuna licenza per l'uso di marchi di Bionano Genomics è data o implicita. Gli utenti non sono autorizzati a utilizzare questi marchi senza il previo consenso scritto di Bionano Genomics. L'uso di questi marchi o di qualsiasi altro materiale, ad eccezione di quanto consentito nel presente documento,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

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

Cronologia delle revisioni

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

Panoramica del flusso di lavoro



Kit di isolamento del DNA di tessuto e tumore SP e materiali forniti dall'utente

Tabella 1: Contenuto del kit di isolamento dei tessuti e del DNA tumorale Bionano Prep SP (N. codice 80038, 10 preparazioni)

Articolo	Quantità	Numero di parte	Stoccaggio
Nanobind Disk da 4 mm	10 dischi	20402	Temperatura ambiente (18-25°C)
Provette per microcentrifuga Protein LoBind, 1,5 ml	10 tubi	20380	Temperatura ambiente (18-25°C)
Provette per microcentrifuga, 2 ml	10 tubi	20396	Temperatura ambiente (18-25°C)
Setaccio cellulare da 40 µm	10 ciascuno	20403	Temperatura ambiente (18-25°C)
Detergent (Detergente)	150 microlitri	20405	Temperatura ambiente (18-25°C)
Salting Buffer (Tampone salino)	1,1 ml	20404	Temperatura ambiente (18-25°C)
Homogenization Buffer (Tampone di omogenizzazione)	96 ml	20406	Temperatura ambiente (18-25°C)
Wash Buffer (Tampone di lavaggio A)	12 ml	20407	Temperatura ambiente (18-25°C)
Proteinasi K	0,5 ml	20372	Temperatura ambiente (18-25°C)
Lysis and Binding Buffer (LBB)* (Tampone di lisi e di legame)	2,5 ml	20375	Temperatura ambiente (18-25°C)
Wash Buffer 1 Concentrate (2.5X) (WB1)* (Tampone di lavaggio 1)	2 x 3,25 ml	20376	Temperatura ambiente (18-25°C)
Wash Buffer 2 Concentrate (2.5X) (WB2) (Tampone di lavaggio 2)	5 ml	20377	Temperatura ambiente (18-25°C)
Elution Buffer (EB) (Tampone di eluizione)	1,1 ml	20378	Temperatura ambiente (18-25°C)
Guaine SP	10 ciascuno	20381	Temperatura ambiente (18-25°C)

*Vedere la sezione Note importanti per informazioni sui rifiuti pericolosi

Tabella 2: Materiali forniti dall'utente

Articolo	Fornitore	Catalogo num.
Giorno 1 – Interruzione dei tessuti, pellettizzazione, isolamento del gDNA e omogeneizzazione		
Bionano Prep SP Magnetic Retriever (recuperatore magnetico) (confezione da 2)	Bionano Genomics	80031
Rotore-statore: TissueRuptor (versione I o II)	QIAGEN o equivalente	9002755
Multipresa (consigliata)	Fornitore di laboratorio generale	
Sonde monouso per TissueRuptor	QIAGEN o equivalente	990890
Supporto ad anello e morsetto a tre poli (ad es. VWR 76293-368)	Fornitore di laboratorio generale	
Portaprovette magnetico DynaMag-2	Thermo Fisher	12321D
HulaMixer Sample Mixer	Thermo Fisher	15920D
Pesa barche	Fornitore di laboratorio generale	
Bilancia di precisione	Fornitore di laboratorio generale	
Provette per microcentrifuga, 1,5 ml, prive di nucleasi	VWR	87003-294
Provette con tappo a vite con O-ring, 1,5 ml	Fornitore di laboratorio generale	
Lama del rasoio	Fornitore di laboratorio generale	
Armadio di biosicurezza (opzionale)	Fornitore di laboratorio generale	
Ghiaccio Secco (opzionale)	Fornitore di laboratorio generale	
Blocco di alluminio	Fornitore di laboratorio generale	
Spatola di metallo	VWR	82027-530
Soluzione di fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), 100 mM	Sigma-Aldrich	93482

Etanolo, 200 prove, grado di biologia molecolare	Sigma-Aldrich	E7023
Isopropanolo (IPA), ≥ 99,5%, grado di biologia molecolare	Fisher Scientific	A461-212
Concentrato disinfettante, TexQ TX651	Texwipe	TX651
Provette coniche per centrifuga, 50 ml, PP	Thermo Fisher o equivalente	14-432-22
Provette coniche per centrifuga, 15 ml, PP	Thermo Fisher o equivalente	05-539-12
Centrifuga refrigerata con rotore per provette da 1,5/2,0 ml (spin 2.000 xg)	Fornitore di laboratorio generale	
Centrifuga refrigerata, rotore oscillante per provette coniche da 15 ml	Fornitore di laboratorio generale	
Secchiello per il ghiaccio e ghiaccio	Fornitore di laboratorio generale	
Pipette monouso sterili da 5 e 10 ml (TD+)	Fornitore di laboratorio generale	
Mini microcentrifuga da banco (spin 2.000 xg)	Labnet	C1301B
Pinze a punta	Electron Microscopy Sciences o equivalenti	78141-01
Puntali per pipette a foro largo, filtrati, aerosol, 200 µl	Equivalente VWR o Rainin	46620-642
Puntali extra lunghi da 1000 µl, sterili	Equivalente VWR o Rainin	16466-008
Pipette (10, 20, 200 e 1.000 µl) e prive di nucleasi, filtrate Puntali per le pipette	Fornitore di laboratorio generale	
Giorno 2 - Quantificazione		
Vortex da banco	Fornitore di laboratorio generale	
Sonicator da bagno (opzionale)	Branson o equivalente	CPX 952-119R
Fluorometro, Qubit	Thermo Fisher o equivalente	Q33216
Kit di analisi del dsDNA Qubit® BR (ampia gamma)	Thermo Fisher o equivalente	Q32853
Tubi per test Qubit	Thermo Fisher	Q32856
Pipetta a spostamento positivo MR-10 (opzionale)	Rainin o equivalente	17008575
Puntali per pipette, 10 µl, C-10 per pos. Displ. Pipetta (opzionale)	Rainin o equivalente	17008604

Introduzione e note importanti

Introduzione

Questo protocollo di isolamento dei tessuti e del DNA tumorale Bionano Prep SP può fornire gDNA ad altissimo peso molecolare (UHMW) in meno di 6 ore da un lotto di un massimo di 8 campioni (fino a 4 consigliati per utenti inesperti) con circa 10 mg freschi o freschi tessuto congelato o tumore. Utilizza una procedura di omogeneizzazione, lisi, legame, lavaggio ed eluizione comune per le tecnologie di estrazione del gDNA a base di silice in combinazione con un nuovo disco paramagnetico. A differenza delle sfere magnetiche e delle colonne spin di silice, che tagliano il gDNA di grandi dimensioni, il Nanobind Disk si lega e rilascia il gDNA con una frammentazione significativamente inferiore, con conseguente gDNA UHMW. L'elevata capacità di legame del gDNA è il risultato di una nuova silice nanostrutturata all'esterno del disco paramagnetico termoplastico. Questo protocollo è stato utilizzato per elaborare i tessuti di fegato, polmone, rene, colon, ovaio, prostata, testicoli e utero di ratti grigi e tumori umani della vescica, del polmone, del fegato, dei reni, del colon, della mammella, della prostata, del cervello, della tiroide e dell'ovaio. Questo protocollo è stato completamente convalidato in replica da più utenti testando tumori umani da fegato, polmone e seno e rene di ratto normale. Il gDNA preparato utilizzando questo protocollo è stato testato con l'etichettatura DLS. Guardare il video [Homogenization and Filtration](#) per i tessuti e il [Training Video](#) sull'isolamento di gDNA con Bionano Prep SP per i passaggi cruciali e la risoluzione dei problemi; i passaggi menzionati nel video corrispondono a quelli del Protocollo Bionano Prep SP per l'isolamento del DNA da sangue umano congelato ([30246](#)), ma la procedura mostrata è identica a quella descritta qui.

Panoramica

Dopo l'omogeneizzazione in un tampone contenente etanolo, la lisi del tessuto e la digestione con Proteinasi K avvengono in un tampone caotropico e il gDNA rilasciato si lega al Nanobind Disk dopo l'aggiunta di Salting Buffer e di isopropanolo.

Dopo quattro fasi di lavaggio, il disco viene trasferito in una nuova provetta e il gDNA viene eluito dal disco. Il gDNA UHMW recuperato viene sottoposto a taglio limitato per rendere il gDNA UHMW più omogeneo. Il gDNA viene quindi miscelato ed equilibrato durante la notte a temperatura ambiente per facilitare l'omogeneità del DNA e viene determinata la concentrazione. Il tipico intervallo di dimensioni del gDNA va da 50 Kbp a ≥ 1 Mbp.

Note importanti

Omogeneità del DNA

Il gDNA recuperato viene sottoposto a miscelazione tramite pipetta con un puntale standard da 200 μ l per aumentare l'omogeneità, garantendo così la riproducibilità di prelievo dei campioni di DNA da marcare.

Quantificazione del gDNA

La quantificazione del gDNA viene utilizzata per misurare la concentrazione e funge da indicatore dell'omogeneità del gDNA UHMW. La quantificazione Invitrogen™ Qubit™ viene utilizzata al posto di altri metodi di quantificazione poiché può essere utilizzata anche per misurare la concentrazione di gDNA della reazione di etichettatura ed è più accurata delle letture dello spettrofotometro per i nostri campioni. Il saggio dsDNA Qubit Broad Range (BR) misura la concentrazione di gDNA dopo l'isolamento, mentre il saggio dsDNA ad alta sensibilità (HS) misura la concentrazione di gDNA dopo l'etichettatura.

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

- Per una quantificazione accurata è necessaria un'efficace frammentazione del gDNA campionato tramite sonicazione o vortex su vasta scala.
- Il coefficiente di variazione (CV) di tre campioni unici deve essere inferiore a 0,30.
- La concentrazione tipica di gDNA è 50-300 ng/μl.

Pipettaggio di DNA genomico viscoso (gDNA)

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

Gestione del gDNA

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

Caratteristiche del gDNA di alta qualità per la mappatura di Bionano

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

Utilizzo del Bionano Prep SP Magnetic Retriever

- a. Prendere un manicotto di plastica tenendolo subito sotto l'imboccatura e inserirvi il Bionano Prep SP Magnetic Retriever, posizionandolo in modo che arrivi al fondo della protezione.
- b. Inserire Magnetic Retriever rivestito dalla protezione nella provetta microfuga Protein LoBind per attrarre il Nanobind Disksul Retriever nel protezione.
- c. Sollevare con cautela dalla provetta il Magnetic Retriever rivestito dalla protezione insieme con il disco legato e inserirli in una nuova provetta microfuga Protein LoBind.
- d. Tenendo la protezione subito sotto l'imboccatura, con una mano estrarre il Magnetic Retriever fino a quando il Nanobind Disk non si stacca dalla protezione e cade nella nuova provetta.
- e. Cambio guaina per ogni nuovo campione.

Input consigliato (mg di tessuto) e qualità del tessuto

- Si consiglia di iniziare con 10 mg, dove possono essere utilizzati fino a 5 mg e 20 mg o più a seconda del contenuto di nuclei del tessuto rispetto alla massa del tessuto.
- Se possibile, si consiglia vivamente di preparare pezzi di tessuto da ~10 mg prima che il tessuto venga congelato. Idealmente, prepesare il tessuto fresco prima del congelamento rapido e della conservazione a -80°C.
- Si consiglia di utilizzare tessuti freschi o congelati a scatto, privi di detriti ossei, coaguli di sangue e necrosi estesa.
- I campioni chirurgici devono essere conservati su ghiaccio umido o in PBS ghiacciato il prima possibile per ridurre al minimo la degradazione del DNA prima del taglio e/o del congelamento rapido.
- I tessuti compromessi (non maneggiati o conservati correttamente) o i tessuti che hanno subito cicli di congelamento-scongelo dovrebbero essere evitati per l'isolamento del DNA UHMW.
- Il tasso di successo interno del DNA UHMW isolato da campioni tumorali con alto RIN (RNA Integrity Number) $\geq 9,0$ era $> 90\%$, mentre il tasso di successo del DNA UHMW isolato da un numero limitato di campioni tumorali con RIN significativamente più basso (5-6) era inferiore ($< 50\%$).

Dimensione del lotto

- Si consiglia di elaborare fino a 8 campioni alla volta (fino a 4 alla volta per gli utenti inesperti).

Smaltimento dei rifiuti pericolosi

Tutti i rifiuti a rischio biologico, compresi gli articoli in plastica, devono essere smaltiti in conformità con le normative locali.

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

Protocollo di isolamento del tessuto e del DNA tumorale Bionano Prep SP

Preparazione per l'isolamento del gDNA da tessuto e tumore freschi o congelati

Nota: per ottenere i migliori risultati, consigliamo di preparare il tessuto come descritto nell'Appendice.

Prima del primo utilizzo

- Verificare l'accesso alla centrifuga refrigerata con rotore a secchio oscillante che può ospitare provette coniche in polipropilene da 15 ml per agglomerare l'omogenato.
- Verificare che la velocità di centrifuga della mini microcentrifuga refrigerata da banco sia di 2.000 x g.
- Il PMSF si decompone rapidamente in soluzione acquosa. Creare aliquote di 120 microlitri in provette con tappo a vite da 1,5 ml e conservare le scorte e le aliquote al riparo dalla luce a 4°C. Ogni aliquota sarà sufficiente per dieci isolamenti di gDNA.
- Aggiungere 125 µl di Bionano Prep Detergent alla provetta con Lysis and Binding Buffer (LBB) e capovolgere 10 volte per miscelare. Contrassegnare la provetta LBB per segnalare che è stato aggiunto il Detergent.
- Aggiungere di etanolo al 100% all'Homogenization Buffer e ai Wash Buffer (WB1 e WB2), capovolgere 10 volte per miscelare e apporre un segno di spunta alle caselle "Etanolo aggiunto":
 - Aggiungere 96 ml di etanolo al 100% all'Homogenization Buffer per un volume finale di 192 ml.
 - Aggiungere 5 ml di etanolo al 100% al Wash Buffer 1 (WB1) per un volume finale di 8,25 ml.
 - Aggiungere 7,5 ml di etanolo al 100% al Wash Buffer 2 (WB2) per un volume finale di 12,5 ml.

Impostazione

- Impostare la centrifuga refrigerata a secchio oscillante e la microcentrifuga refrigerata a 4°C.
- Immobilizzare il TissueRuptor (Qiagen) su un supporto verticale. Collega TissueRuptor a una presa multipla.
- Raccogliere i materiali (vedere la sezione "Materiale fornito dall'utente" sopra). Raffreddare preventivamente l'Homogenization Buffer, il Wash Buffer A e la(e) sonda(e) del TissueRuptor.
- Per lo smaltimento dei rifiuti, preparare provette coniche da 50 ml (1 provetta ogni 2 campioni) con 100 µl di decontaminante TexQ per campione (da smaltire come rifiuto pericoloso).
- Per ogni campione, etichettare due provette coniche da 15 ml e una provetta conica da 50 ml e porre su ghiaccio. Impostare un setaccio cellulare da 40 micron (Bionano) nella provetta conica da 50 ml.
- Per ogni campione, etichettare due provette Protein LoBind da 1,5 ml (Bionano) e una provetta per microcentrifuga da 2,0 ml (Bionano). Collocare una delle provette Protein LoBind da 1,5 ml etichettate sul ghiaccio.
- Capovolgere le provette di PMSF e Proteinasi K (Bionano) tre volte per miscelare, girare brevemente a impulsi. Metti PMSF sul ghiaccio.
- Per comodità, tutti i tamponi utilizzati a 4°C in questo protocollo possono essere conservati a lungo termine a 4°C.

Isolamento gDNA (4,5 ore)

Nota: per importanti istruzioni sulla preparazione del tessuto congelato, fare riferimento all'Appendice.

1. Per ogni campione di tessuto, aggiungere 2 ml di Bionano Prep SP Homogenization Buffer per tessuti e tumori raffreddato a una provetta conica da 15 ml e conservare su ghiaccio.
2. Recuperare il tessuto e preparare porzioni da ~10 mg (fare riferimento alla sezione Input suggerito sopra):

Nota: ridurre al minimo l'esposizione del tessuto a temperatura ambiente durante il taglio di porzioni da ~10 mg. Se una porzione viene pesata al di fuori dell'intervallo di 9 - 13 mg, si consiglia di scartare quella porzione e tagliare un nuovo pezzo (se è disponibile più tessuto).

- a. Per il **tessuto fresco**: utilizzando un blocco di alluminio sterilizzato e ghiacciato come superficie di taglio, tagliare il tessuto con una lama di rasoio sterilizzata e una pinza e pesare ~10 mg in una navicella di pesatura su una bilancia di precisione (se il peso non è già noto).
- b. Per il tessuto **congelato**:
 - 1) Se il pezzo di tessuto non è più di 2 x 2 x 4 mm, tagliare in una barca di pesatura con una lama di rasoio sterilizzata e pinze su un blocco di alluminio ghiacciato. Pesare ~10 mg in una barca di pesatura diversa e scartare il resto o ricongelare e conservare a -80°C per isolare il DNA che non deve essere UHMW.
 - 2) Se il pezzo di tessuto è più grande e non è necessario campionare una regione specifica del tessuto, posizionare il tessuto congelato in un sacchetto di plastica che è stato raffreddato su un blocco di alluminio refrigerato con ghiaccio secco, sigillare il sacchetto e rompere il tessuto in frammenti più piccoli con l'ausilio di un grosso pestello o martello. Rimuovere un piccolo pezzo e trattare come sopra (Fase 2.b.1). I frammenti rimanenti possono essere rimessi a -80°C per la conservazione.
 - 3) Se il pezzo di tessuto è più grande ed è necessario campionare una regione specifica del tessuto, posizionare il tessuto congelato in una navicella di pesatura su un blocco di alluminio preraffreddato (-20°C) e tagliare un piccolo pezzo con un bisturi o lama di rasoio e pinze. Pesare ~10 mg in una barca di pesatura diversa e riporre il pezzo di tessuto di grandi dimensioni rimanente a -80°C per la conservazione.

Nota: per i tessuti fibrosi, si consiglia di tagliare il tessuto in piccoli pezzi nella navicella di pesatura (1 - 2 mm)

3. Utilizzando una spatola metallica sterilizzata pre-raffreddata, trasferire immediatamente il tessuto tagliato nella provetta conica da 15 ml etichettata contenente l'Homogenization Buffer. Assicurarsi che i pezzetti di tessuto siano immersi nell' Homogenization Buffer e che la provetta conica sia posta su ghiaccio. Trasferire la sonda preraffreddata nel tubo conico.
4. Ripetere i passaggi 2-3 per preparare ogni campione aggiuntivo, fino a 8 campioni in totale.

Nota: prima di continuare con il passaggio successivo, assicurarsi che tutti i campioni di tessuto o di tumore siano stati trasferiti in una provetta conica da 15 ml contenente Homogenization Buffer e una sonda TissueRuptor e che siano conservati su ghiaccio. Guardare il video [Homogenization and Filtration](#) per tessuti e tumori per i passaggi 5-11.

5. Rimuovere una provetta conica dal ghiaccio alla volta e collegare saldamente la sonda al dispositivo TissueRuptor tenendo la conica. Tenere la provetta in modo tale che la punta della sonda TissueRuptor sia immersa nel tampone e molto vicina al fondo della provetta.
6. Impulso il TissueRuptor utilizzando l'interruttore della ciabatta accendendolo e spegnendolo. Controllare per vedere se il pellet di tessuto è stato rotto. Se il tessuto è particolarmente denso, pulsare altre 2-3 volte per romperlo e ottenere una completa omogeneizzazione.

Nota: assicurarsi che il tessuto non si attacchi alla parete del tubo o alla punta della sonda. Se necessario, immergere il tessuto nell'Homogenization Buffer utilizzando la spatola. Per il tessuto fibroso, si consiglia di tagliare il tessuto in piccoli pezzi prima dell'omogeneizzazione di TissueRuptor.

7. Frullare continuamente per 10 secondi alla massima velocità con la punta della sonda sempre immersa. Muovere il tubo con un movimento su-giù e circolare durante la miscelazione per aumentare l'efficienza dell'omogeneizzazione. Al termine della miscelazione, spegnere la presa multipla collegata al TissueRuptor, rimuovere la sonda dal TissueRuptor e riportare il tubo (con la sonda nel tubo) nel ghiaccio.
Nota: la provetta conica deve essere riposizionata immediatamente dopo l'omogeneizzazione per garantire la massima qualità del DNA.
8. Ripetere i passaggi 5-7 per tutti gli altri campioni. Fino a 8 campioni in totale.
9. Sciacquare ciascuna punta della sonda con 6 ml di Homogenization Buffer ghiacciato utilizzando una pipetta raccogliendo il tampone nella stessa provetta conica. Smaltire correttamente la sonda (potenziale rischio biologico).
10. Decantare l'omogeneizzato attraverso un setaccio cellulare da 40 µm sulla parte superiore del tubo conico da 50 ml etichettato che è impostato sul ghiaccio. Conservare il tubo conico per il passaggio successivo.
11. Aggiungere ulteriori 6 ml di Homogenization Buffer ghiacciato alla provetta conica da 15 ml e agitare per sciacquare i detriti dai lati della provetta, quindi versare sul setaccio cellulare, raccogliendo nella stessa provetta conica da 50 ml. Eliminare correttamente il setaccio cellulare (potenziale rischio biologico).
Nota: se l'omogenato non passa attraverso il setaccio cellulare, sollevare e abbassare brevemente il setaccio per favorire il flusso.
12. Pipettare l'intero volume 2 volte prima di trasferire l'omogeneizzato in una nuova provetta conica da 15 ml e tappare.
13. Centrifugare a 2.000 xg per 5 minuti a 4°C utilizzando un rotore a tazze oscillanti (impostare l'accelerazione e la decelerazione su 9).
14. Decantare il surnatante nei rifiuti TexQ (potenziale rischio biologico) subito dopo l'arresto della centrifuga, posizionare la provetta conica sul ghiaccio per 30 secondi e utilizzare una pipetta da 1.000 µl per rimuovere quanto più liquido residuo possibile senza disturbare il pellet (lasciando < 200 µl di volume).
15. Aggiungere 300 µl di Wash Buffer A, risospendere il pellet con un puntale da 1.000 µl (impostato a 300 µl) pipettando lentamente su e giù per 5 volte. Trasferire l'intero volume della sospensione in una provetta da 1,5 ml di Protein LoBind pre-raffreddata precedentemente etichettata utilizzando un puntale da 1.000 µl. Conservare il tubo conico per il passaggio successivo.

16. Aggiungere ulteriori 700 µl di Wash Buffer A alla provetta conica da 15 ml, pipettare delicatamente 2 volte per miscelare e trasferire 'intero'intero'intero'intero'intero'intero tutto il volume nella stessa provetta Protein LoBind da 1,5 ml di precedentemente etichettata preraffreddata utilizzando un puntale da 1.000 µl.
17. Centrifugare a 2.000 xg per 5 minuti a 4°C.
18. Pur non disturbando il pellet, aspirare il surnatante per lasciare un volume di circa 40 µl. Smaltire il surnatante nei rifiuti TexQ (potenziale rischio biologico). Metti la provetta sul ghiaccio per 30 secondi.
19. Risospendere il pellet nel volume residuo 10 volte utilizzando una punta standard da 200 µl. I volumi residui possono differire.

Lyse e digerire le cellule

20. Aggiungere 50 µl di Proteinasi K alla provetta Protein LoBind, tappare la provetta. **NON MISCELARE CON LA PIPETTA.**
21. Incubare a temperatura ambiente per 3 minuti.
22. Con un puntale da 1.000 µl aggiungere 225 µl di Buffer LBB, contenente il Detergent, al campione. . Tappare e capovolgere la provetta 15 volte per miscelare.
Nota: il Buffer LBB con detergente è una soluzione viscosa e schiumosa che aderirà al puntale della pipetta. Erogare lentamente e cambiare i puntali tra un'erogazione e l'altra per garantire l'accuratezza del volume di erogazione.
23. Ruotare il campione su HulaMixer per 15 minuti a temperatura ambiente a 10 rpm. Nessun scuotimento/vibrazione.
24. Spingere la provetta a impulsi per 2 secondi per raccogliere il liquido sul fondo della provetta.
25. Aggiungere 10 ml di PMSF 100 mM nella parte liquida del tubo. Tappare e capovolgere la provetta 5 volte per mescolare, ruotare a impulsi il tubo per 2 secondi per raccogliere il liquido sul fondo del tubo.
26. Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti.

Legare, lavare ed eluire gDNA

27. Aggiungere 85 µl di Bionano Prep Salting Buffer alla provetta, chiudere con il tappo e capovolgere 10 volte, e centrifugare a impulsi la provetta per 2 secondi.
28. Utilizzando una pinza, trasferire con attenzione un singolo Nanobind Disk da 4 mm al lisato.
Nota: i dischi a volte possono restare uniti.
29. Aggiungere 400 µl di isopropanolo al 100% nella provetta. Tappare e capovolgere la provetta 5 volte per mescolare.
30. Ruotare il campione su HulaMixer per 15 minuti a temperatura ambiente a 10 rpm. Nessun scuotimento/vibrazione.

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

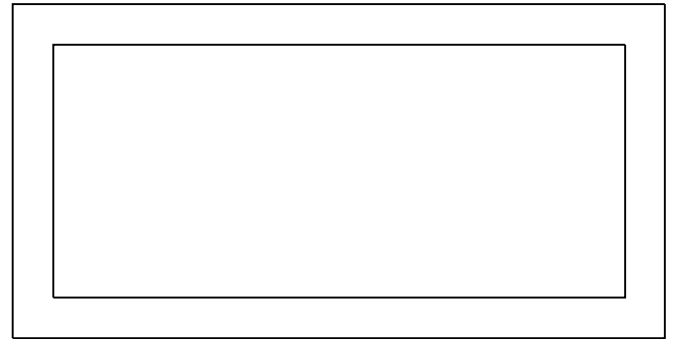
31. Esaminare l'associazione del gDNA con Nanobind Disk e capovolgere per ottimizzare il legame (guardare il [Training Video](#), 0:25):
- Collocare le provette del campione in un rack per provette Dynamag trasparente e ispezionare visivamente tutte le provette nel rack per assicurarsi che il gDNA sia collegato al Nanobind Disk.
 - Se i filamenti di gDNA sono visibilmente pendenti in basso, invertire rapidamente di 180° per portare il gDNA in un'associazione più stretta con il Nanobind Disk.
 - Le inversioni di 180° possono essere eseguite molte volte fino a quando l'associazione del gDNA con il Nanobind Disk non appare invariata.
32. Inserire la base magnetica nel portaprovette trasparente come mostrato sotto, assicurandosi che il Nanobind Disk sia catturato dal magnete in prossimità della parte superiore del livello del liquido. In caso contrario, reinstallare il rack (guardare il [Training Video](#), 0:50).

Nota: il colore del liquido nelle immagini sottostanti è stato modificato a scopo illustrativo.

- Capovolgere il rack per provette Dynamag trasparente e posizionarlo capovolto con i coperchi dei campioni che toccano la superficie di lavoro. I tubi saranno sulla stessa fila del rack e nella fila più lontana da te.
- Capovolgere la base magnetica Dynamag e abbassarla sul rack trasparente.
- Inclinare lentamente l'apparecchio combinato di 90° verso di sé mentre continua a poggiare sulla superficie. I tubi saranno ora orizzontali e visibili a te.
- Inclinare lentamente l'apparecchio combinato di 90° verso di sé mentre continua ad appoggiarsi sulla superficie, in modo che sia completamente in posizione verticale e i tubi siano rivolti verso di sé.



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



33. Impostare una pipetta da 1.000 µl su 1.000 µl e una seconda su 700 µl.
34. Rimuovere il surnatante come descritto di seguito, facendo attenzione a non aspirare il gDNA (guardare il [Training Video](#), 1:15):
- Inclinare l'intero rack a un angolo di 45° tenendolo con una mano (afferrando l'intero apparato dal basso con i tubi visibili a te e le palpebre verso l'altra mano).
 - Attendere 2 secondi affinché gDNA si posi sul Nanobind Disk.
 - Rimuovere lentamente tutto il liquido con una punta extra lunga da 1.000 µl angolata lontano dal Nanobind Disk e/o dal gDNA per evitare interruzioni.
 - Dispensare il surnatante in una provetta conica contenente TexQ.
- ⚠ Assicurarsi che il gDNA non venga rimosso ispezionando visivamente la punta contenente il tampone prima di scartare. Se il gDNA viene aspirato accidentalmente o si stacca dal disco, fare riferimento alla sezione Risoluzione dei problemi di seguito.
35. Eseguire il lavaggio con il Buffer WB1 (guardare il [Training Video](#), 2:21):
- Dispensare 700 µl di Buffer WB1 direttamente sui dischi nelle provette e chiudere le provette con il tappo.
 - Sollevare il portaprovette trasparente per separarlo dalla base magnetica.
 - Capovolgere la griglia trasparente con i tubi 180° 4 volte per lavare.
 - Reinstallare il rack per provette trasparenti e le provette con base magnetica come descritto al punto 32.
 - Rimuovere il surnatante come descritto al punto 34.
- ⚠ Assicurarsi che il gDNA non venga rimosso ispezionando visivamente la punta contenente il tampone prima di scartare. Se il gDNA viene aspirato accidentalmente o si stacca dal disco, fare riferimento alla sezione Risoluzione dei problemi di seguito.
36. Ripetere il lavaggio con il Buffer WB1, passaggio 35.
37. Impostare la seconda pipetta a 500 µl (precedentemente a 700 µl).
38. Eseguire il lavaggio con il Buffer WB2 (guardare il [Training Video](#), 4:10):
- Dispensare 500 µl di Buffer WB2 direttamente sui dischi nelle provette e chiudere le provette con il tappo.
 - Sollevare la cremagliera trasparente per separare dalla base magnetica.
 - Capovolgere la griglia trasparente di 180° 10 volte per lavare.
 - Reinstallare il rack per provette trasparenti e le provette con base magnetica come descritto al punto 32.
 - Rimuovere il surnatante come descritto al punto 34.

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

39. Ripetere il lavaggio con il Buffer WB2, passaggio 38 (guardare il [Training Video](#), 5:50).

Nota: per evitare che il disco/gDNA si secchi, rimuovere il tampone da 2 o 3 provette alla volta e procedere fino al passaggio dell'incubazione con il Buffer EB lavorando con piccoli lotti.

40. Aprire completamente il coperchio delle provette (parallelo al banco da laboratorio) e sollevare ciascuna provetta dalla base.

41. Tenendo a distanza ravvicinata una nuova provetta Protein LoBind, trasferirvi il Nanobind Disk utilizzando il Magnetic Retriever Retriever Bionano Prep SP (vedere la sezione Note importanti per l'uso corretto). Chiudere la provetta con il tappo per evitare che il disco si secchi (guardare il [Training Video](#), 7:30).

42. Aggiungere 65 µl di Buffer EB alla provetta Protein LoBind.

43. Ruotare a impulsi la provetta sulla microcentrifuga da banco per 5 secondi.

44. Utilizzando un puntale standard da 10 µl, spingere delicatamente il Nanobind Disk verso il fondo della provetta, assicurandosi che sia completamente immerso nel liquido. Il disco dovrebbe rimanere parallelo alla superficie del banco (guardare il [Training Video](#), 8:20).

45. Incubare il Nanobind Disk sommerso nel Buffer EB a temperatura ambiente per 20 minuti.

46. Raccogliere il gDNA estratto trasferendo l'eluato in una provetta per microcentrifuga da 2,0 ml precedentemente etichettata con una punta standard da 200 µl.

47. Girare a impulsi la provetta con il Nanobind Disk sulla microcentrifuga da banco per 5 secondi e trasferire tutto l'eluato rimanente contenente gDNA viscoso nella stessa provetta per microcentrifuga standard da 2,0 ml come nel passaggio precedente con una punta standard da 200 µl. È possibile rimuovere il disco prima di aspirare il tampone di eluizione residuo.

Nota: quasi tutto il gDNA viscoso esce dal Nanobind Disk durante la rotazione dell'impulso.

Omogeneizzazione della soluzione di gDNA (70 minuti)

Omogeneizzazione della soluzione di gDNA

48. Pipettare lentamente l'intero volume di gDNA in un puntale standard da 200 µl, quindi dispensare lentamente il gDNA.

Evitare la formazione di bolle.

- Ripetere questo processo 3 volte per un totale di 4 passaggi: (1 colpo = 1 aspirazione + 1 erogazione).

Nota: se l'assorbimento del gDNA si blocca a causa dell'elevata viscosità, potrebbe essere necessario agitare delicatamente mentre si rilascia lentamente lo stantuffo per prelevare il gDNA.

49. Posizionare la provetta per microcentrifuga standard da 2,0 ml contenente gDNA nel rack di HulaMixer e ruotare a temperatura ambiente per 1 ora a 15 giri/min.

Nota: durante le rotazioni iniziali, assicurarsi che il gDNA risalga dal fondo della provetta per portarsi nel coperchio, della provetta durante le rotazioni. Se la soluzione di DNA rimane sul fondo della provetta durante le rotazioni iniziali, spegnere HulaMixer e posizionare il rack in modo che la provetta per microcentrifuga sia capovolta. Picchiettare delicatamente il fondo della provetta microfuga finché il gDNA non risale nel suo coperchio e riprendere la miscelazione.

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

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

Quantificazione del gDNA (45 minuti)

Quantificazione Qubit - Saggio BR dsDNA

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

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

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

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

Prelevare un'aliquota da 2 µl dal lato sinistro, una dal centro e una dal lato destro di ciascun campione e aggiungerle al Qbit BR Buffer della corrispondente provetta da dosaggio Qubit, risciacquando il puntale durante l'erogazione. Collocare le provette in un rack galleggiante e sonicare per 10 minuti. Eseguire i passaggi 5 e 6 durante la sonicazione.

Nota: se non è disponibile un sonicatore da bagno, vortexare per almeno 30 secondi alla massima velocità, quindi ridurre brevemente l'impulso per 2 secondi.

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

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

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

Nota: le concentrazioni tipiche di DNA vanno da 50 a 300 ng/µl. Se la concentrazione è > 150 ng/µl, fare riferimento a Important Notes of Bionano Prep Direct Label and Stain (DLS) Protocol ([30206](#)).

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

Etichettatura

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

Risoluzione dei problemi

Il gDNA non viene legato dal Nanobind Disk.

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

Passaggi da seguire se viene aspirato gDNA:

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

In alternativa:

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

Passaggi da seguire se il gDNA è visivamente staccato dal Nanobind Disk e non aspirato:

1. Rimuovere il tubo dal rack e tenerlo in posizione orizzontale.
2. Arrotolare il tubo tra le dita fino a ristabilire il legame.

Il gDNA non è omogeneo prima dell'etichettatura

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

Passi da seguire:

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

Il gDNA non è viscoso

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

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

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

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

Domande frequenti

Quali tipi di tessuto sono compatibili con questo protocollo?

- Questo protocollo è stato utilizzato per elaborare con successo i seguenti tipi di tessuto:
 - Da Ratto Grigio: fegato, polmone, rene, colon, ovaio, prostata, testicoli e utero.
 - Da Umano: vescica, polmone, fegato, rene, colon, seno, prostata, cervello, tiroide e ovaio.
 - Da Topo: milza (consigliato input 2-3 mg)
- Pelle, muscoli e tessuti non vertebrati non sono ancora completamente supportati.
- Si raccomandano biopsie di tessuti e tumori normali. Questo protocollo non è stato testato con aspirati con ago sottile.

Quali fattori influenzeranno la qualità del gDNA?

- La conservazione e la manipolazione dei tessuti influenzeranno la qualità del gDNA. Quanto segue può influenzare negativamente la qualità del gDNA:
 - Tessuti che hanno subito un ciclo di congelamento-scongelo dopo la conservazione iniziale a -80°C.
 - Tessuti congelati esposti a temperatura ambiente per lunghi periodi di tempo durante il taglio.
 - Tessuto necrotico all'interno del campione di tessuto.
 - Tessuti con RIN (RNA Integrity Number) < 9,0.
- Troppo materiale di partenza porterà a una qualità inferiore del gDNA.

Quali fattori influenzeranno la resa di gDNA?

- Il contenuto di nuclei rispetto alla massa tissutale influenzerà la resa di gDNA. I tessuti che richiedono un grande peso di input tissutale a causa del basso contenuto di nuclei possono etichettare male e avere un basso rendimento.

Nota: i campioni tumorali di solito hanno una resa di gDNA maggiore per mg di tessuto rispetto al tessuto normale.
- I tessuti con un alto contenuto di grassi possono avere una bassa resa di gDNA.

Quanti campioni possono essere processati?

- Questo protocollo può essere utilizzato per lotti fino a 8.
 - Ci vorranno fino a 6 ore per elaborare un batch di queste dimensioni.
- In base alla produttività tipica dello strumento Saphyr, è possibile raccogliere dati da almeno 9 campioni a settimana

Quali conservanti dei tessuti sono compatibili con questo protocollo?

- Sebbene al momento non abbiamo testato la compatibilità dei conservanti con questo prodotto, è un'area di ricerca in corso e aggiorneremo questa sezione con nuove scoperte non appena saranno disponibili.

Appendice: preparazione di tessuto fresco o tumore per la conservazione

Input consigliato: 10 mg di tessuto fresco o tumore da polmone, fegato, rene, utero, ovaio, colon, prostata, tiroide, testicoli, seno e vescica. Questo protocollo non supporta ancora completamente i tessuti muscolari.

Nota: il tessuto con un basso contenuto di nuclei rispetto alla massa tissutale potrebbe non produrre gDNA sufficiente e una quantità eccessiva di tessuto potrebbe produrre gDNA meno puro e più difficile da diventare omogeneo.

1. Sciacquare il tessuto in PBS ghiacciato e tagliarlo in pezzi più piccoli (~10 mg per pezzo) su un blocco di metallo ghiacciato sterilizzato.
 - a. Si consiglia di preparare più porzioni di ogni tessuto.
2. Trasferire il tessuto in una provetta da 1,5 ml con tappo a vite e congelare a scatto in azoto liquido per 3 minuti prima di trasferirlo in un congelatore a -80°C per la conservazione a lungo termine.
3. Il tessuto congelato viene utilizzato al meglio entro 6 mesi di conservazione a -80°C.
4. Se si spedisce tessuto congelato, seguire le linee guida fornite nelle Istruzioni per la spedizione di tessuti e tumori ([30186](#)).

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