



Bionano Prep SP Fresh Cells DNA-Isolationsprotokoll v2

Dokumentnummer: 30396

Dokumentrevision: A

Inhaltsverzeichnis

Impressum.....	3
Revisionshistorie.....	4
Workflow-Übersicht.....	5
Bionano Prep SP DNA-Isolierungskit und vom Benutzer bereitgestellte Materialien	6
Bionano Prep SP Blut- und Zell-DNA-Isolationskit v2 Inhalt (Teile-Nr. 80042, 10 Präparate)	6
Vom Benutzer bereitgestellte Materialien	6
Einführung und wichtige Hinweise	7
Einführung:.....	7
Wichtige Hinweise:	7
Bionano Prep SP Fresh Cells DNA-Isolationsprotokoll v2.....	10
Vorbereitung für die gDNA-Isolierung aus frischen Zellen	10
gDNA-Isolierung (3 Stunden)	10
Homogenisierung der gDNA-Lösung (70 Minuten)	15
gDNA-Quantifizierung (45 Minuten).....	16
Fehlerbehebung.....	18
Die gDNA kommt ungebunden von der Nanobind Disk.	18
Die gDNA ist vor der Markierung nicht homogen.....	18
Die gDNA ist nicht viskos	18
Anhang	19
Vorbereiten von tiefgefrorenen Zellpellets als Backup.....	19
Technische Unterstützung	21

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 HAFTUNG FÜR BESONDERE, ZUFÄLLIGE, INDIRECTE, STRAF-, MEHRFACH- ODER FOLGESCHÄDEN IN VERBINDUNG MIT DIESEM DOKUMENT ODER DIE AUS DIESEM DOKUMENT ENTSTEHEN, EINSCHLIESSLICH, ABER NICHT BESCHRÄNKT AUF DESSEN VERWENDUNG, UNGEACHTET, OB VORHERSEHBAR ODER NICHT UND OB BIONANO GENOMICS AUF DIE MÖGLICHKEIT SOLCHER SCHÄDEN HINGEWIESEN WURDE.

Patente

Produkte von Bionano Genomics[®] können durch ein oder mehrere US- oder ausländische Patente geschützt sein.

Warenzeichen

Das Bionano Genomics-Logo und die Namen der Produkte oder Dienstleistungen von Bionano Genomics sind eingetragene Marken oder Marken von Bionano Genomics in den USA und bestimmten anderen Ländern.

Bionano-Genomik[®], 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.

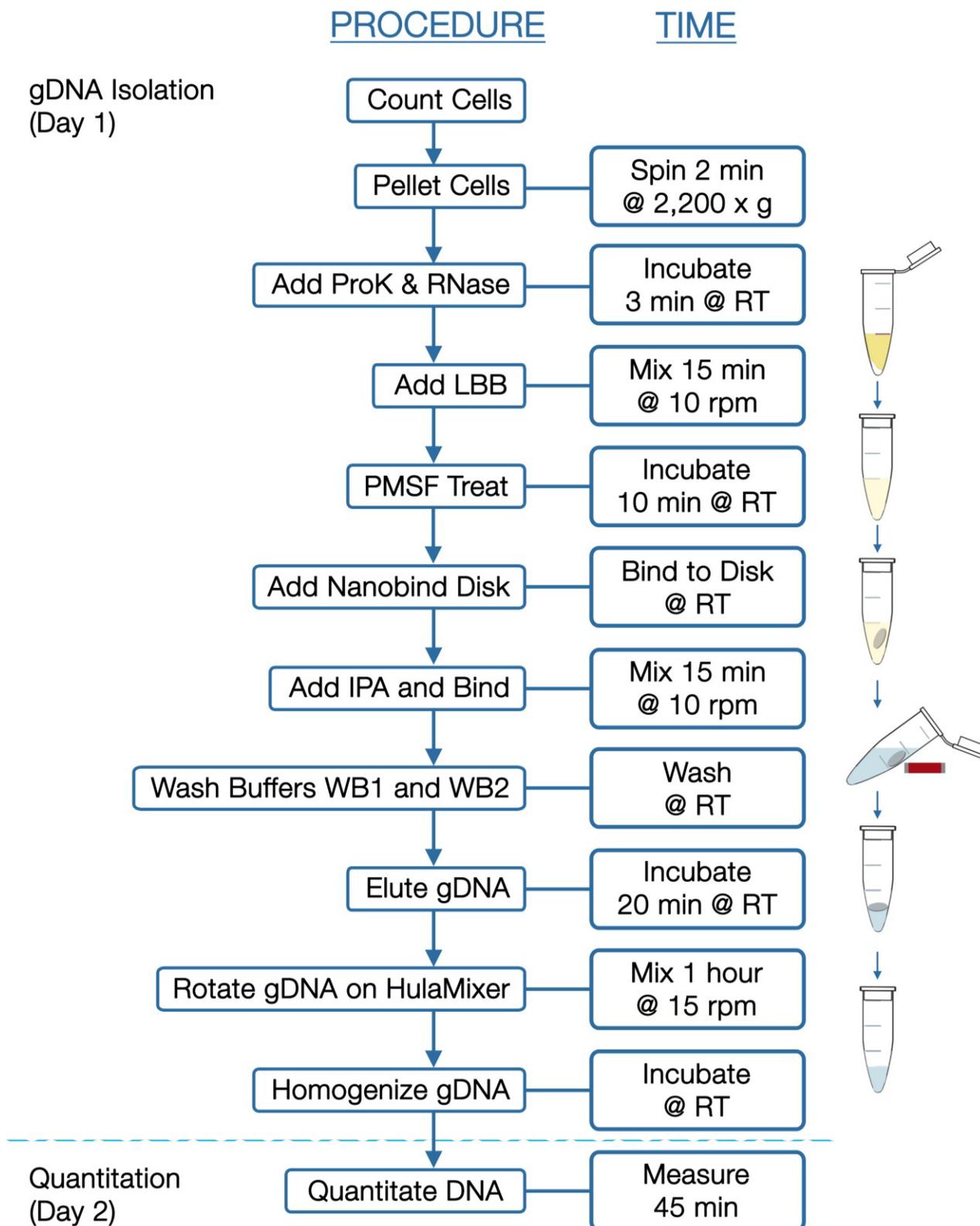
Es wird keine Lizenz zur Verwendung von Marken von Bionano Genomics erteilt oder impliziert. Benutzern ist es nicht gestattet, diese Marken ohne die vorherige schriftliche Zustimmung von Bionano Genomics zu verwenden. Die Verwendung dieser Marken oder anderer Materialien, außer wie hierin erlaubt, ist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



Bionano Prep SP DNA-Isolierungskit und vom Benutzer bereitgestellte Materialien

Bionano Prep SP Blut- und Zell-DNA-Isolationskit v2 Inhalt (Teile-Nr. 80042, 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	20422	Raumtemperatur (18-25 °C)
Protein-LoBind-Mikrozentrifugenröhrchen, 0,5 ml	10 Röhrchen	20421	Raumtemperatur (18-25 °C)
RNase A Enzym	200 µl	20373	Kühlen (4°C)
DNA-Stabilisator**	350 µl	20423	Raumtemperatur (18-25 °C)
Standard-Mikrozentrifugenröhrchen, 2,0 ml	10 Röhrchen	20396	Raumtemperatur (18-25 °C)
Zellpuffer	50 ml	20374	Raumtemperatur (18-25 °C)
Proteinase K Enzym	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)*	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)
Magnetic Disk Retriever Kunststoffscheide	10	20381	Raumtemperatur (18-25 °C)

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

** Wird verwendet, um gefrorene Zellpellets herzustellen

Vom Benutzer bereitgestellte Materialien

Artikel	Anbieter	Katalog-Nr.
Tag 1 – Zählen, Pelletieren, gDNA-Isolierung und Homogenisierung		
Bionano Prep SP Magnetischer Retriever (2er Pack)	Bionano Genomics	80031
Hämozytometer und Phasenkontrastmikroskop oder automatischer Zellzähler	Allgemeiner Laborlieferant	
DynaMag-2 Magnetröhrchenständer	Thermo Fisher	12321D
HulaMixer Probenmischer	Thermo Fisher	15920D
Mikrozentrifugenröhrchen, 1,5 ml, Nukleasefrei	VWR	87003-294
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
Bleichmittel zur Entsorgung von Zellmedien	Allgemeiner Laborlieferant	
Konische Zentrifugenröhrchen, 50 ml, PP	Thermo Fisher oder gleichwertig	14-432-22
Konische Zentrifugenröhrchen, 15 ml, PP	Fisher Scientific	05-539-12
Zentrifuge mit 1,5 ml Röhrchenrotor (Drehzahl 2.200 x g)	Allgemeiner Laborlieferant	
Zentrifuge mit Ausschwingrotor für konische 15 ml-Röhrchen zum Konzentrieren von Zellen aus Medien (Drehzahl 2.200 x g)	Allgemeiner Laborlieferant	
Eiskübel und Eis	Allgemeiner Laborlieferant	
Sterile 5 und 10 ml Einwegpipetten (TD+)	Allgemeiner Laborlieferant	
Mini Tischmikrozentrifuge (Drehzahl 2.200 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		
Tischvortexer	Allgemeiner Laborlieferant	
Ultraschallbad (empfohlen)	Branson oder gleichwertig	CPX 952-119R
15 ml konisches Röhrchen	Fisher Scientific	05-539-12
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 Pos.-Nr. Displ. Pipette (optional)	Rainin oder Äquivalent	17008604

Einführung und wichtige Hinweise

Einführung:

Dieses Bionano Prep® SP Fresh Cells DNA Isolation Protocol v2 kann gDNA mit ultrahohem Molekulargewicht (UHMW) in weniger als 4 Stunden aus 1,5 Millionen Säugerzellen bereitstellen. Es verwendet ein 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 unter Verwendung einer EBV-immortalisierten humanen lymphoblastoiden Zelllinie (GM12878) getestet, die in Suspensionskultur wächst. Die nach diesem Protokoll hergestellte gDNA wurde nur mit DLS-Markierung validiert. Siehe [Schulungsvideo](#) für technisch kritische Schritte und Fehlerbehebung; die im Video erwähnten Schritte entsprechen dem Gefrorenem Blut Protokoll, sind aber dieselben Prozesse wie hier beschrieben.

Überblick

Die Zellyse und der Proteinase K-Verdau erfolgen in einem chaotropen Puffer und die freigesetzte gDNA bindet nach Zugabe von Isopropanol an die Nanobind Disk. Nach drei 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- μ l-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 Qubit-Quantifizierung wird gegenüber anderen Quantifizierungsverfahren bevorzugt, da sie auch zum Messen der gDNA-Konzentration der Markierungsreaktion verwendet werden kann. 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 Ultraschall oder ausgiebiges Vortexen erforderlich.

- Der Variationskoeffizient (CV) aus drei einzelnen Stichproben sollte weniger als 0,30 betragen.
- Die typische gDNA-Konzentration beträgt 50-120 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. Entfernen 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 entfernen oder die Spitze ineffektiv abkratzen, um gDNA-Stränge von der Spitze abzubringen, 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.

Chargengröße

- Wir empfehlen, bis zu 6 Proben gleichzeitig zu verarbeiten.
- Es ist am bequemsten, 1,5 Millionen Zellen jeder der zu verarbeitenden Kulturproben in konischen 15-ml-Polypropylen zu verarbeiten und als Gruppe zu zentrifugieren, um die Zellen zu konzentrieren.

Sondermüllbeseitigung

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, sollten vor der Entsorgung in einen gefährlichen Abfallstrom sicher mit einem quartären Ammonium-Desinfektionsmittel dekontaminiert werden. Wir empfehlen Bleichmittel zur Dekontamination des Pelletüberstands und TexQ zur Dekontamination aller mit GuHCl gemischten Lösungen. 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.

Herstellen von tiefgefrorenen Zellpellets als Backup

- Wir empfehlen, aus jeder der aktiven Zellkulturen, aus denen Sie DNA isolieren, mindestens ein gefrorenes Backup-Zellpellet zu erstellen.
- Dies ist problemlos möglich, nachdem Sie Ihre DNA-Elution aus frischen Pellets abgeschlossen haben (siehe Anhang).

Bionano Prep SP Fresh Cells DNA-Isolationsprotokoll v2

Vorbereitung für die gDNA-Isolierung aus frischen Zellen

Vor dem ersten Gebrauch

- Überprüfen Sie den Zugang zur Tischzentrifuge mit Ausschwingrotor, der 15 ml Polypropylen-Kegel aufnehmen kann, um Zellen aus Medien zu konzentrieren.
- Stellen Sie sicher, dass die Schleuderdrehzahl der Mini-Tisch-Mikrozentrifuge 2.200 x g beträgt.
- PMSF zersetzt sich in wässrigen Lösungen schnell. Erstellen Sie Aliquots von 120 µl in 1,5-ml-Schraubdeckelröhrchen und lagern Sie Vorrat und Aliquots bei 4 °C. Jedes Aliquot reicht für zehn gDNA-Isolierungen.
- Fügen Sie 100 % Ethanol zu den Waschpuffern (WB1 und WB2) hinzu und mischen Sie gründlich:
 - 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.

Einrichten

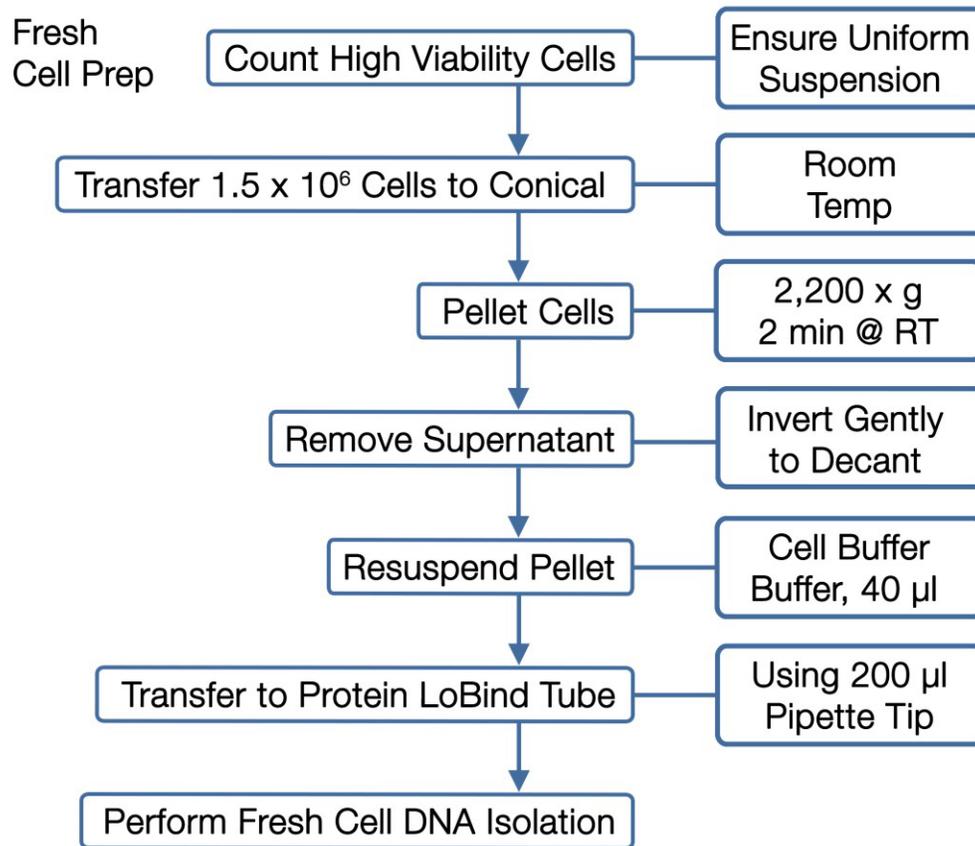
- Sammeln Sie Materialien (siehe Abschnitt „Vom Benutzer bereitgestelltes Material“ oben).
- Bereiten Sie für die Abfallentsorgung vor:
 - Ein konischer 50 ml mit 5 ml Bleichmittel + 20 ml Wasser; zum Mischen mehrmals umdrehen.
 - Ein 50 ml konisches Mittel mit 100 µl TexQ Dekontaminationsmittel pro Probe (als Sondermüll zu entsorgen).
- Markieren Sie für jede Probe ein konisches 15-ml-Polypropylen-Röhrchen, ein 0,5-ml-Protein-LoBind-Röhrchen (Bionano), ein 1,5-ml-Protein-LoBind-Röhrchen (Bionano) und ein 2,0-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (Bionano).
- Röhrchen mit PMSF, RNase A (Bionano) und Proteinase K (Bionano) dreimal zum Mischen umdrehen, kurz puls zentrifugieren. Legen Sie PMSF und RNase A auf Eis.

gDNA-Isolierung (3 Stunden)

Zellen zählen, pelletieren, Überstand entfernen, Zellen resuspendieren und in Protein-LoBind-Röhrchen überführen

Empfohlener Input: 1,5 Millionen Säugetierzellen.

PROCEDURE



1. Pipettieren Sie für jede Probe isolierte Zellen wiederholt in Wachstumsmedien, um eine gleichmäßige Suspension zu gewährleisten.

Hinweis: Stellen Sie nach Möglichkeit sicher, dass die Zellen aktiv mit hoher Lebensfähigkeit wachsen, da dies die Qualität und Größe der isolierten gDNA maximiert.

2. Entnehmen Sie schnell ein Aliquot und zählen Sie die Zellen mit oder ohne Verdünnung mit dem Zellzählgerät.
3. Berechnen Sie das Volumen des ursprünglichen Zellbestands, der für 1,5 Millionen Zellen benötigt wird.
4. Nach dem Pipettieren, um eine gleichmäßige Suspension zu gewährleisten, das Volumen für 1,5 x 10⁶ Zellen in einen markierten 15-ml-Kegel aus Polypropylen übertragen.
5. Nachdem sich alle Proben in markierten konischen Gefäßen befinden, werden die Zellen durch Zentrifugation mit einem Ausschwingrotor bei 2.200 xg für 2 Minuten bei Raumtemperatur pelletiert.
6. Entfernen Sie die Überstände, indem Sie sie mit Bleichmittel in den Abfallkonus dekantieren, und verwenden Sie ein Kimwipe®, um Restflüssigkeit aus dem umgekehrten Konus zu absorbieren.

Hinweis: Sobald die Überstände von allen Proben entfernt wurden, können Sie den Bleichmittel-haltigen Konus mit Wasser auf 50 ml auffüllen, verschließen, zum Mischen umdrehen und den Inhalt in die Spüle entsorgen.

7. Auf jedes Pellet 40 µl Zellpuffer (Bionano) geben.
8. Dispensieren Sie das Pellet mit einer 200-µl-Spitze mit weiter Öffnung und fahren Sie dann fort, das Pellet durch 10-maliges Auf- und Abpipettieren zu resuspendieren.
9. Übertragen Sie das gesamte Suspensionsvolumen (>40 µl) in ein zuvor markiertes Protein LoBind-Röhrchen mit einer Standard-200-µl-Spitze.

Zellen lysieren und verdauen

10. Fügen Sie 50 µl Proteinase K und 20 µl RNase A zu jedem der Protein-LoBind-Röhrchen mit resuspendierten Zellen hinzu. **NICHT MISCHEN.**
11. 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
12. Fügen Sie jeder Probe 225 µl Puffer LBB mit einer Standardspitze von 1.000 µl hinzu. Das Röhrchen zum Mischen 15-mal verschließen und umdrehen.

Hinweis: Puffer LBB 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.

13. Rotieren Sie die Probe auf dem HulaMixer für 15 Minuten bei Raumtemperatur bei 10 U/min. Kein Schütteln/Vibriieren.
14. Pulszentrifugieren Sie das Röhrchen 2 Sekunden lang, um die Flüssigkeit am Boden des Röhrchens zu sammeln.
15. Geben Sie 10 µl 100 mM PMSF in den flüssigen Teil im Röhrchen. Das Röhrchen verschließen und zum Mischen 5-mal umdrehen, das Röhrchen 2 Sekunden lang pulszentrifugieren, um die Flüssigkeit am Boden des Röhrchens zu sammeln.
16. 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

gDNA binden, waschen und eluieren

17. Mit einer Pinzette vorsichtig eine einzelne Nanobind Disk auf das Lysat übertragen.

Hinweis: Disks können gegebenenfalls zusammenkleben.

18. 340 µl 100 % Isopropanol in alle Röhrchen geben. Die Röhrchen zum Mischen 5-mal verschließen und umdrehen.
19. 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.

20. Untersuchen Sie die gDNA-Assoziation mit der Nanobind-Disk und drehen Sie sie um, um die Bindung zu erhöhen (siehe [Schulungsvideo](#), 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, kehren Sie schnell um 180 ° um, um die gDNA näher mit der Nanobind Disk zu verbinden.
- c. 180°-Drehungen können viele Male durchgeführt werden, bis die gDNA-Assoziation mit der Nanobind Disk unverändert erscheint.

21. Kombinieren Sie das transparente Gitter 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 zur Veranschaulichung 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.



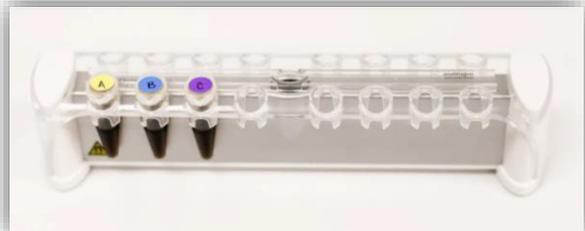
- b. Drehen Sie die Dynamag-Magnetbasis um, und senken Sie sie auf das durchsichtige Rack ab.



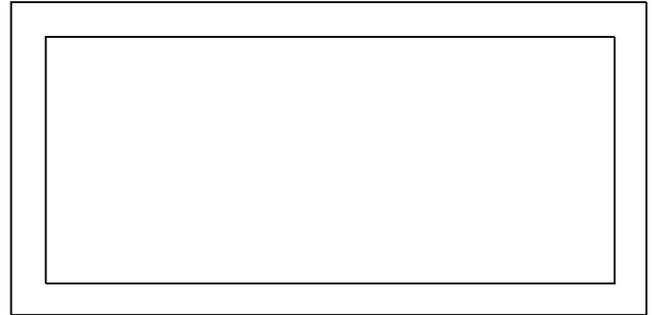
- c. Kippen Sie das kombinierte Gerät langsam um 90° zu sich hin, während es weiterhin auf der Oberfläche ruht. Die Röhren sind jetzt horizontal und für Sie sichtbar.



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



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



22. Stellen Sie eine 1.000- μ l-Pipette auf 1.000 μ l und eine zweite auf 700 μ l ein.
23. Entfernen Sie den Überstand wie unten beschrieben, achten Sie darauf, die gDNA nicht anzusaugen (siehe [Schulungsvideo](#), 1:15):
- a. Winkeln Sie das gesamte Rack in einem 45°-Winkel an, indem Sie es in einer Hand halten (das gesamte Gerät von unten mit den Röhrchen für Sie sichtbar und den Deckeln zur anderen Hand fassen).
 - b. Warten Sie 2 Sekunden, bis gDNA auf der Nanobind Disk liegt.
 - 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. Überstand in konische Form mit TexQ pipettieren.

 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.

24. Führen Sie die WB1-Wäsche durch (siehe [Schulungsvideo](#), 2:21):
- a. Pipettieren Sie 700 μ l Puffer WB1 direkt auf die Scheiben in den Röhrchen und Kappenröhrchen.
 - b. Heben Sie das durchsichtige Röhrchengestell an, um es von der Magnetbasis zu trennen.
 - c. Drehen Sie das durchsichtige Gestell mit den Röhrchen 4-mal um 180°, um es zu waschen.
 - d. Stellen Sie das durchsichtige Röhrchengestell und die Röhrchen mit Magnetboden wie in Schritt 21 beschrieben neu ein.
 - e. Entfernen Sie den Überstand wie in Schritt 23 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.

25. Stellen Sie die zweite Pipette auf 500 μ l (vorher auf 700 μ l).
26. Führen Sie die WB2-Wäsche durch (siehe [Schulungsvideo](#), 4:10):
- a. Pipettieren Sie 500 μ l Puffer WB2 direkt auf die Scheiben in den Röhrchen und verschließen Sie sie.
 - b. Heben Sie das durchsichtige Rack 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 Röhrchengestell und die Röhrchen mit Magnetboden wie in Schritt 21 beschrieben neu ein.
 - e. Entfernen Sie den Überstand wie in Schritt 23 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.

27. Waschen WB2 Schritt 26 wiederholen (Siehe [Schulungsvideo](#), 5:50).

Hinweis: Entfernen Sie den Puffer gleichzeitig aus 2 oder 3 Rörchchen und verarbeiten Sie den Puffer-EB-Inkubationsschritt in kleinen Chargen, um ein Austrocknen der Disk/gDNA zu verhindern.

28. Öffnen Sie den Rörchendeckel vollständig (parallel zum Labortisch) und heben Sie jedes Rörchchen vom Boden ab.

29. In unmittelbarer Nähe eines 0,5-ml-Protein-LoBind-Rörchchens die Nanobind Disk mit dem Bionano Prep SP Magnetic Retriever auf das 0,5-ml-Protein-LoBind-Rörchchen übertragen (siehe Abschnitt „Wichtige Hinweise“ für die richtige Verwendung). Rörchchen verschließen, um das Austrocknen der Disk zu verhindern (siehe [Schulungsvideo](#), 7:30).

30. Drehen Sie das Protein LoBind-Rörchchen in einer Tischmikrozentrifuge für 5 Sekunden.

31. Entfernen Sie alle Flüssigkeitsreste am Boden des Rörchchens mit einer 10 µl-Standardspitze.

Hinweis: Um die Flüssigkeit am Boden des Rörchchens zu erreichen, muss die Nanobind Disk mit der Spitze verschoben werden. Bewegen Sie die Spitze mit kleinen kreisenden Bewegungen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.

32. 65 µl Puffer EB in das Protein LoBind-Rörchchen geben.

33. Drehen Sie das Rörchchen 5 Sekunden lang auf einer Tischmikrozentrifuge.

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

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

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

37. Drehen Sie das Rörchchen mit der Nanobind Disk auf einer Tischmikrozentrifuge für 5 Sekunden und übertragen Sie das gesamte verbleibende Eluat, das viskose gDNA enthält, in das gleiche Standard-2,0-ml-Mikrozentrifugenrörchchen wie im vorherigen Schritt mit einer Standard-200-µl-Spitze. Sie können die Disk entfernen, bevor Sie den restlichen Elutionspuffer absaugen.

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

Homogenisierung der gDNA-Lösung (70 Minuten)

Homogenisierung der gDNA-Lösung

38. Pipettieren Sie das gesamte gDNA-Volumen langsam in eine 200-µl-Standardspitze und geben Sie dann langsam die gDNA ab. Vermeiden Sie Blasenbildung.

- Wiederholen Sie diesen Vorgang 8-mal für insgesamt 9 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.

39. Platzieren Sie ein Standard 2,0 ml Mikrozentrifugenröhrchen mit gDNA in einem Rack des Hula Mixer Sample Mixer und rotieren Sie bei Raumtemperatur für 1 Stunde bei 15 U/min.

Hinweis: Stellen Sie während der anfänglichen Rotationen sicher, dass die gDNA vom Boden des Mikrozentrifugenröhrchens abgezogen wird, 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 Hula-Mixer aus und positionieren Sie das Rack so, dass das Mikrozentrifugenröhrchen auf dem Kopf steht. Bewegen Sie den Boden des Mikrozentrifugenröhrchens vorsichtig, bis die gDNA in den Deckel gezogen wird, und setzen Sie das Mischen fort.

40. Entfernen Sie das Mikrozentrifugenröhrchen aus dem Rack des Hula-Mixers und drehen Sie das Röhrchen 2 Sekunden lang auf einer Tischmikrozentrifuge, 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 neuen Standard-Pipettenspitze 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 Rack 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 herunterdrehen.

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 50-120 ng/ul.

Proben-ID	Links (ng/µl)	Mitte (ng/µl)	Rechts (ng/µl)	CV (Standardabw./Mittelwert)

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

Siehe [Schulungsvideo](#) ab 8:40 Videoerklärungen zur Fehlerbehebung.

Die gDNA kommt ungebunden von der Nanobind Disk.

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

Schritte, die zu befolgen sind, wenn eine Probe angesaugt wird:

1. Lassen Sie das Probenröhrchen auf dem Magneten und pipettieren Sie gDNA-haltige Flüssigkeit zurück in das Röhrchen mit der Scheibe.
2. Nehmen Sie das Röhrchen im Gestell 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 Scheibe.
2. Flüssigkeit aus dem Röhrchen absaugen, so dass 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 Magnetscheibe, um die Bindung wiederherzustellen.

Die gDNA ist vor der Markierung nicht homogen

Beweis: 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 $> 35 \text{ ng}/\mu\text{L}$.

Die Probe weist wahrscheinlich keine gDNA mit hohem Molekulargewicht auf.

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

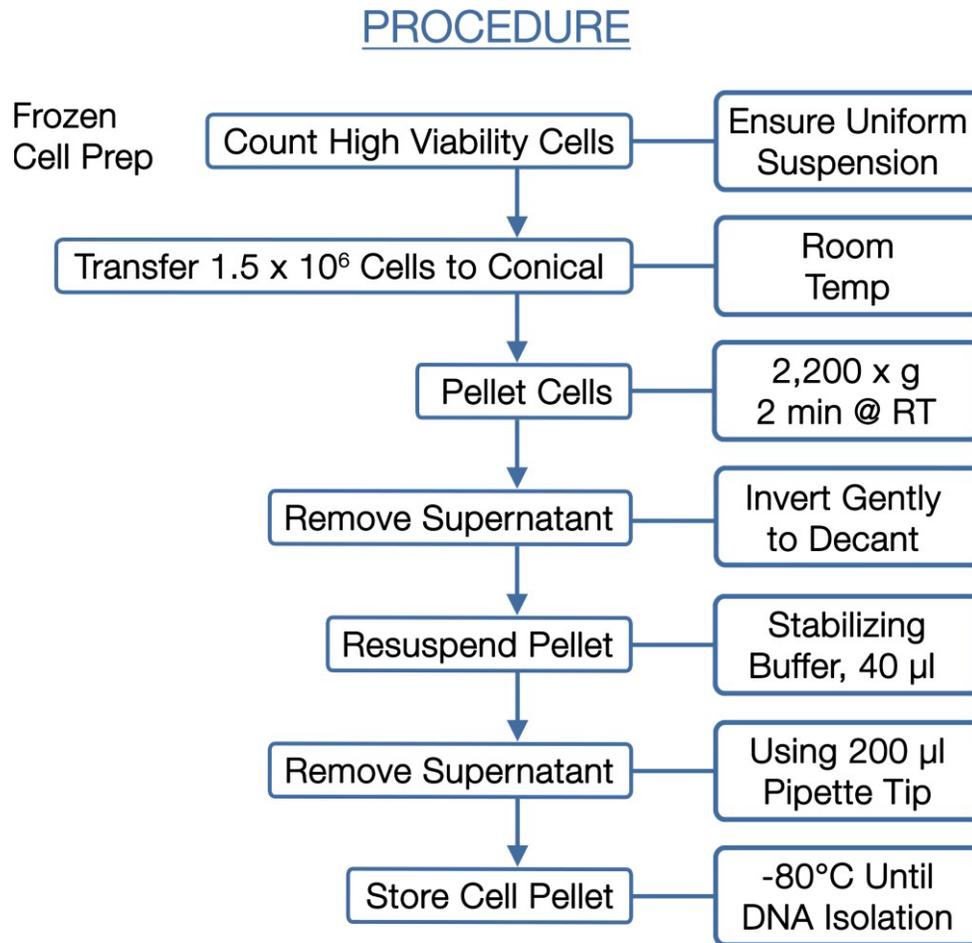
Bewerten Sie die Probenvorbereitungsmethode und die Qualität/das Alter des Eingangsmaterials und wiederholen Sie die DNA-Isolierung aus der biologischen Probe.

Anhang

Vorbereiten von tiefgefrorenen Zellpellets als Backup

1. Empfohlener Input: 1,5 Millionen Säugerzellen pro Röhrchen.

Hinweis: Stellen Sie nach Möglichkeit sicher, dass die Zellen aktiv mit hoher Lebensfähigkeit wachsen, da dies die Qualität und Größe der isolierten gDNA maximiert.



2. Bereiten Sie Stabilisatorpuffer (49 µl Zellpuffer + 1 µl DNA-Stabilisator) für jedes der Pellets vor, die Sie vorbereiten möchten.
3. Pipettieren Sie für jede Probe isolierte Zellen wiederholt in Wachstumsmedien, um eine gleichmäßige Suspension zu gewährleisten.
4. Entnehmen Sie schnell ein Aliquot und zählen Sie die Zellen mit oder ohne Verdünnung mit einem Hämozytometer oder einem anderen Zellzählgerät.
5. Ermitteln Sie die Anzahl der Zellen pro ml im unverdünnten Volumen und berechnen Sie das erforderliche Volumen für 1,5 Millionen Zellen.

6. Nach dem Pipettieren, um eine gleichmäßige Suspension zu gewährleisten, dieses Volumen in einen markierten 15-ml-Polypropylenkonus überführen.
7. Nachdem sich alle Proben in markierten Röhrchen befinden, werden die Zellen durch Zentrifugation in einem Ausschwingrotor bei 2.200 xg für 2 Minuten bei Raumtemperatur pelletiert.
8. Entfernen Sie die Überstände, indem Sie sie mit Bleichmittel in das Abfallröhrchen dekantieren und verwenden Sie ein Kimwipe®, um die restliche Flüssigkeit aus dem umgekehrten Konus zu absorbieren.

Hinweis: Nachdem die Überstände von allen Proben entfernt wurden, können Sie den Bleichmittel-enthaltenden Konus mit Wasser auf 50 ml auffüllen, den Konus verschließen, den Konus zum Mischen umdrehen und den Inhalt in die Spüle entsorgen.

9. Geben Sie 40 µl Stabilisatorpuffer auf jedes Pellet.
10. Das Pellet mit einer 200-µl-Spitze mit weiter Öffnung aufbrechen und das Pellet durch 10-maliges Auf- und Abpipettieren mit dieser Spitze resuspendieren.
11. Das gesamte Suspensionsvolumen (>40 µl) in ein markiertes 1,5-ml-Standard-Mikrozentrifugenröhrchen mit einer Standard-200-µl-Spitze überführen.
12. Pelletieren Sie die Zellen in einer Mikrozentrifuge durch Drehen bei 2.200 xg für 2 Minuten bei Raumtemperatur.
13. Mit einer 200-µl-Standardspitze vorsichtig so viel Überstand wie möglich entfernen, ohne das Pellet zu beschädigen.
14. Frieren Sie die Zellpellets ein und lagern Sie sie bei -80°C.

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