



Protocolo Bionano Prep SP de aislamiento de ADN a partir de sangre humana fresca v2

Número de documento: 30397

Revisión del documento: A

Índice

Aviso legal	3
Historial de revisiones.....	4
Descripción general del flujo de trabajo	5
Kit Bionano Prep SP de aislamiento de ADN y materiales proporcionados por el usuario	6
Contenido del kit Bionano Prep SP de aislamiento de ADN a partir de sangre y células v2 (N.º de referencia 80042, 10 preparaciones).....	6
Materiales proporcionados por el usuario.....	6
Introducción y notas importantes	7
Introducción	7
Descripción general	7
Notas importantes	8
Protocolo Bionano Prep SP de aislamiento de ADN a partir de sangre humana fresca v2.....	10
Preparación para el aislamiento del gDNA	10
Aislamiento del gDNA (3 horas)	10
Homogeneización de la solución de gDNA (70 minutos).....	15
Cuantificación de gDNA (45 minutos).....	16
Solución de problemas	18
El gDNA se libera del disco Nanobind.....	18
El gDNA no es homogéneo antes del marcaje.....	18
El gDNA no es viscoso.....	18
Apéndice.....	19
Recuentos del HemoCue < 4500 y > 2800 GB/µl.....	19
Asistencia técnica.....	21

Aviso legal

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

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

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

Patentes

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

Marcas comerciales

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

Bionano Genomics®, Irys®, IrysView®, IrysChip®, IrysPrep®, IrysSolve®, Saphyr®, Saphyr Chip®, Bionano Access y Bionano EnFocus™ son marcas comerciales de Bionano Genomics, Inc. Las demás marcas comerciales son propiedad exclusiva de sus respectivos dueños.

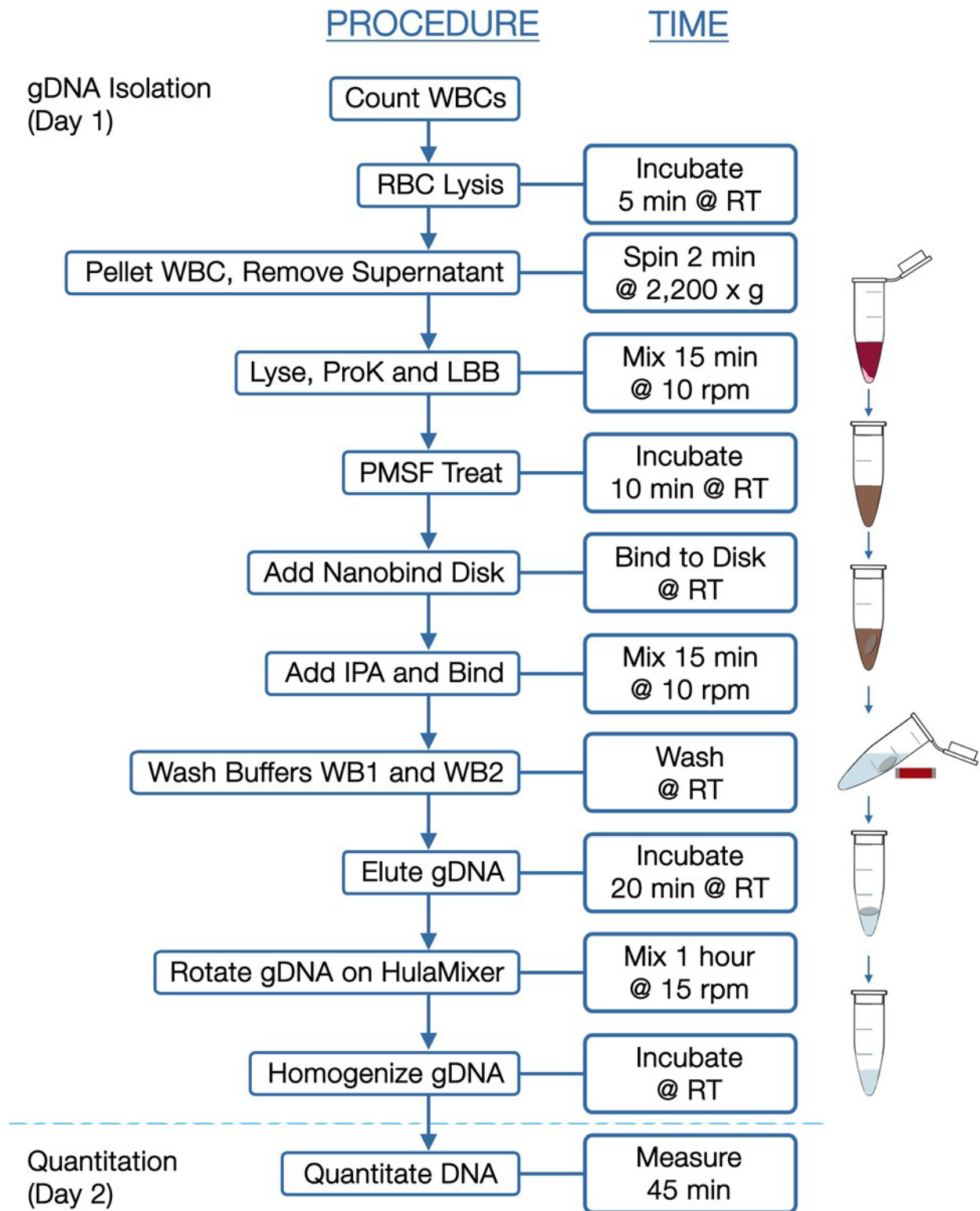
No se otorga ni se da a entender ninguna licencia para utilizar ninguna marca comercial de Bionano Genomics. Los usuarios no pueden utilizar estas marcas comerciales sin previo consentimiento por escrito de Bionano Genomics. El uso de estas marcas registradas o de cualquier otro material, excepto en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

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

Historial de revisiones

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

Descripción general del flujo de trabajo



Kit Bionano Prep SP de aislamiento de ADN y materiales proporcionados por el usuario

Contenido del kit Bionano Prep SP de aislamiento de ADN a partir de sangre y células v2 (N.º de referencia 80042, 10 preparaciones)

Artículo	Cantidad	Número de referencia	Almacenamiento
Discos Nanobind de 4 mm	10 discos	20402	Temperatura ambiente (entre 18 y 25 °C)
Tubos de microcentrifuga Protein LoBind de 1,5 ml	10 tubos	20422	Temperatura ambiente (entre 18 y 25 °C)
Tubos de microcentrifuga Protein LoBind de 0,5 ml	10 tubos	20421	Temperatura ambiente (entre 18 y 25 °C)
Enzima RNasa A **	200 µl	20373	Refrigerar (4 °C)
DNA Stabilizer**	350 µl	20423	Temperatura ambiente (entre 18 y 25 °C)
Tubos de microcentrifuga estándar de 2,0 ml	10 tubos	20396	Temperatura ambiente (entre 18 y 25 °C)
Cell buffer	50 ml	20374	Temperatura ambiente (entre 18 y 25 °C)
Proteinasa K	0,5 ml	20372	Temperatura ambiente (entre 18 y 25 °C)
Buffer de lisis y unión (LBB)*	2,5 ml	20375	Temperatura ambiente (entre 18 y 25 °C)
Buffer de lavado 1 concentrado (2,5 veces) (WB1)*	3,25 ml	20376	Temperatura ambiente (entre 18 y 25 °C)
Buffer de lavado 2 concentrado (2,5 veces) (WB2)	5 ml	20377	Temperatura ambiente (entre 18 y 25 °C)
Buffer de elución (EB)	1,1 ml	20378	Temperatura ambiente (entre 18 y 25 °C)
Funda de plástico para el recuperador del disco magnético	10	20381	Temperatura ambiente (entre 18 y 25 °C)

* Consulte la sección Notas importantes para obtener información sobre residuos peligrosos.

** No se utiliza en este protocolo.

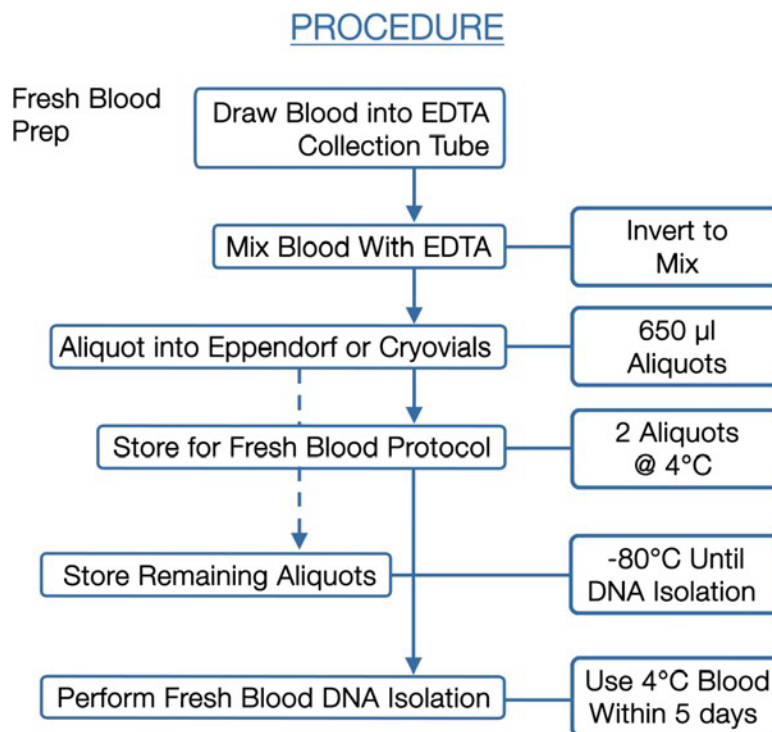
Materiales proporcionados por el usuario

Artículo	Proveedor	N.º de catálogo
Día 1: sedimentación o pelleting, aislamiento y homogeneización del gDNA		
Bionano Prep SP Magnetic Retriever (paquete de 2)	Bionano Genomics	80031
Analizador de GB HemoCue	Distribuidor de Fisher Scientific (para EE. UU.) (fuera de EE. UU.)	22-601-017
Microcubetas HemoCue	Fisher Scientific	22-601-018
Agitador de balanceo para tubos de ensayo Vari-Mix	Thermo Fisher o equivalente	M48725Q
Gradilla de tubos magnética DynaMag-2	Thermo Fisher	12321D
Mezclador de muestras HulaMixer	Thermo Fisher	15920D
Tubos de microcentrifuga de 1,5 ml, sin nucleasas	VWR	87003-294
Solución de lisis de GR	Qiagen	158902
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 100 mM	Sigma-Aldrich	93482
Etolanol, absoluto (100%), grado de biología molecular	Sigma-Aldrich	E7023
Isopropanol (IPA), ≥99,5 %, grado de biología molecular	Fisher Scientific	A461-212
Concentrado desinfectante, TexQ TX651	Texwipe	TX651
Lejía para eliminación de sangre	Proveedor general de suministros de laboratorio	
Tubos de centrifuga cónicos, 50 ml, PP	Thermo Fisher o equivalente	14-432-22
Centrifuga con rotor para tubos de 1,5 ml (2200 x g)	Proveedor general de suministros de laboratorio	
Cubo de hielo y hielo	Proveedor general de suministros de laboratorio	
Pipetas estériles desechables de 5 y 10 ml (TD +)	Proveedor general de suministros de laboratorio	
Minicentrífuga de mesa (2200 x g)	Labnet	C1301B
Pinzas puntiagudas	Electron Microscopy Sciences o equivalente	78141-01
Puntas de pipeta de calibre ancho, con filtro, aerosol, 200 µl	VWR o equivalente a Rainin	46620-642
Puntas extralargas de 1000 µl, estériles	VWR o equivalente a Rainin	16466-008
Pipetas (10, 20, 200 y 1000 µl) y Puntas de pipeta con filtro y sin nucleasas	Proveedor general de suministros de laboratorio	
Parafilm	Proveedor general de suministros de laboratorio	
Día 2: Cuantificación		
Agitador vórtex de sobremesa	Proveedor general de suministros de laboratorio	
Baño ultrasónico (recomendado)	Branson o equivalente	CPX 952-119R
Tubo cónico de 15 ml	Fisher Scientific	05-539-12
Fluorímetro, Qubit	Thermo Fisher o equivalente	Q33216
Kit de análisis Qubit® dsDNA BR (rango amplio)	Thermo Fisher o equivalente	Q32853
Tubos de ensayo Qubit	Thermo Fisher	Q32856
Pipeta de desplazamiento positivo MR-10 (opcional)	Rainin o equivalente	17008575
Puntas de pipeta, 10 µl, C-10 para desplazamiento positivo Pipeta (opcional)	Rainin o equivalente	17008604

Introducción y notas importantes

Introducción

Este protocolo de aislamiento de ADN de sangre humana fresca v2 de Bionano Prep® SP puede proporcionar gDNA de peso molecular ultraalto (UHMW) en menos de 4 horas. Utiliza un procedimiento de lisis, unión, lavado y elución que es común para las tecnologías de extracción de gDNA a base de sílice en combinación con un novedoso disco paramagnético. A diferencia de las perlas magnéticas y las columnas de rotación de sílice, que cortan el gDNA de gran tamaño, el disco Nanobind se une y libera el gDNA con una fragmentación significativamente menor, lo que da como resultado un gDNA de UHMW. La alta capacidad de unión del gDNA es el resultado de una novedosa nanoestructura de sílice en el exterior del disco paramagnético termoplástico. Este protocolo se probó utilizando sangre humana extraída en tubos con EDTA almacenados a 4 °C y procesados dentro de los 4 días posteriores a la fecha de extracción. Para obtener los mejores resultados, se recomienda almacenar la sangre a 4 °C durante no más de 5 días tras la obtención antes de procesarla. Por otra parte, las muestras de sangre son estables si se mantienen a temperatura ambiente (22-25 °C) durante un máximo de 66 horas, aunque estén a temperatura elevada (30-40 °C) durante un máximo de 6 horas de ese período. El almacenamiento de muestras de sangre a temperatura ambiente durante más de 66 horas o la exposición prolongada (>6 horas) a una temperatura elevada reduce la longitud de la molécula de gDNA y compromete los resultados del análisis. El gDNA preparado con este protocolo se validó solo con el marcaje DLS. Vea el [Vídeo de formación](#) para conocer los pasos técnicamente críticos y la solución de problemas; los pasos que se mencionan en el vídeo corresponden al protocolo de sangre congelada, pero son los mismos procesos que se detallan aquí.



Descripción general

La lisis celular y la digestión con proteinasa K tienen lugar en un buffer caotrópico y el gDNA liberado se une al disco Nanobind luego del agregado de isopropanol. Después de tres pasos de lavado, el disco se transfiere a un tubo nuevo y el gDNA

se eluye del disco. El gDNA de UHMW recuperado se somete a una fragmentación limitada para hacer que el gDNA de UHMW sea más homogéneo. A continuación, el gDNA se mezcla y se atempera durante la noche a temperatura ambiente para facilitar la homogeneidad del ADN y después se determina la concentración. El intervalo característico de tamaño de gDNA es de 50 Kbp a ≥ 1 Mbp.

Notas importantes

Homogeneidad del ADN

El gDNA recuperado se somete a una mezcla con pipeta utilizando una punta estándar de 200 μ l para aumentar la homogeneidad, lo que garantiza una muestra de ADN uniforme para el marcaje.

Cuantificación del gDNA

La cuantificación del gDNA se utiliza para medir la concentración y sirve como indicador de la homogeneidad del gDNA de UHMW. Se prefiere la cuantificación Qubit sobre otros métodos de cuantificación, ya que también se puede usar para medir la concentración de gDNA de la reacción de marcaje. El análisis de dsDNA de rango amplio (BR) Qubit mide la concentración de gDNA después del aislamiento, mientras que el análisis de dsDNA de alta sensibilidad (HS) mide la concentración de gDNA después del marcaje.

Para medir la homogeneidad del gDNA, es esencial medir la concentración de gDNA en múltiples posiciones en la solución. Dado que el gDNA viscoso es difícil de pipetear, siga las pautas descritas en las Notas importantes para un pipeteo preciso. Los análisis estándar para la cuantificación de la concentración de gDNA no proporcionarán mediciones precisas de gDNA largo debido a su naturaleza viscosa.

- Para una cuantificación precisa, es necesaria la fragmentación eficaz del gDNA muestreado mediante sonicación o agitación intensa con vórtex.
- El coeficiente de variación (CV) de tres muestreos únicos debe ser menor o igual a 0,30.
- La concentración típica de gDNA es de 45 a 90 ng/ μ l.

Pipeteo de ADN genómico viscoso (gDNA)

Para extraer gDNA viscoso, sujete el tubo de la muestra original para poder verlo de cerca, presione el émbolo de la pipeta hasta el primer tope, sumerja la punta de la pipeta y suelte el émbolo con cuidado y lentamente para comenzar a extraer el gDNA viscoso en la punta mientras se controla cuidadosamente la absorción. Mantenga la punta sumergida incluso después de que la solución viscosa deje de moverse hacia arriba y se nivele. Sea paciente. El gDNA viscoso puede tardar unos segundos en alcanzar los 2 μ l. Si suelta el émbolo demasiado rápido se podría producir una burbuja en la punta, lo cual derivaría en una muestra insuficiente (comience de nuevo si esto ocurre). Después de que la solución de la punta se haya nivelado y mientras la punta todavía está sumergida en la solución de gDNA, raspe la punta contra el fondo del tubo de 3 a 5 veces con un movimiento circular. Extraiga la punta de la solución de gDNA e inspecciónela visualmente para confirmar que esté llena hasta 2 μ l. Extraer la punta de la pipeta de la solución de gDNA demasiado pronto, o raspar de manera ineficaz para romper las hebras de gDNA de la punta, podría provocar una burbuja en la punta de la pipeta, lo cual indicaría en una muestra insuficiente (comience de nuevo si esto sucede).

Manipulación del gDNA

- La mezcla del gDNA recuperado siempre se lleva a cabo con una punta de pipeta de calibre ancho para evitar en lo posible la fragmentación.
- El gDNA recuperado nunca debe congelarse ni agitarse en vórtex.

- El pipeteado del gDNA recuperado para obtener un muestreo preciso siempre se realiza con una punta de calibre estándar o una pipeta de desplazamiento positivo.

Características del gDNA de alta calidad para la cartografía Bionano

- Una solución de gDNA transparente es ideal, pero una solución turbia no siempre se correlaciona con una mala calidad de la muestra.
- El gDNA recuperado en solución es viscoso.
- La presencia de gDNA de tamaño de megabases se mide mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).
- El gDNA recuperado es homogéneo cuando se mide con el análisis Qubit de cuantificación de gDNA, con un CV $\leq 0,30$.

Uso del Bionano Prep SP Magnetic Retriever

- a. Sostenga una funda de plástico por los lados cerca de la parte superior e inserte el Bionano Prep SP Magnetic Retriever en la funda, colocándolo de manera que quede asentado en la parte inferior de la funda.
- b. Inserte el recuperador enfundado en el tubo Protein LoBind para atraer el disco Nanobind al recuperador en la funda.
- c. Levante con cuidado el recuperador enfundado con el disco unido fuera del tubo e inserte el recuperador enfundado en un nuevo tubo Protein LoBind.
- d. Sosteniendo la funda por el lado cercano a la parte superior, con una mano tire del recuperador hacia arriba hasta que el disco Nanobind se separe de la funda y caiga en el nuevo tubo.
- e. Cambie la funda para cada muestra nueva.

Tamaño de la tanda

Recomendamos procesar un máximo de 6 muestras a la vez.

Eliminación de residuos peligrosos

Los buffers LBB y WB1 contienen clorhidrato de guanidina (GuHCl). El GuHCl es dañino si se ingiere o inhala y causa irritación de la piel y los ojos. NO lo mezcle con lejía o reactivos ácidos. Los residuos líquidos que contienen GuHCl deben descontaminarse de manera segura con un desinfectante de amonio cuaternario antes de eliminarlos en el flujo de residuos peligrosos. Recomendamos lejía para descontaminar el sobrenadante de los pellets y TexQ para descontaminar todas las soluciones mezcladas con GuHCl. Esto cumple con los requisitos de eliminación del estado de California, EE. UU., pero puede ser diferente en su ubicación. Consulte los requisitos locales para la descontaminación y eliminación.

Protocolo Bionano Prep SP de aislamiento de ADN a partir de sangre humana fresca v2

Preparación para el aislamiento del gDNA

Antes del primer uso

- Verifique que la velocidad de centrifugado de la minimicrocentrífuga de sobremesa sea de 2200 x g.
- El PMSF se descompone rápidamente en soluciones acuosas. Prepare alícuotas de 120 µl en tubos de 1,5 ml con tapón de rosca y almacene el sobrante y las alícuotas a 4 °C. Cada alícuota será suficiente para diez aislamientos de gDNA.
- Agregue etanol al 100 % a los buffers de lavado (WB1 y WB2) y mezcle bien:
 - Agregue 5 ml de etanol al 100 % al buffer de lavado 1 (WB1) para obtener un volumen final de 8,25 ml.
 - Agregue 7,5 ml de etanol al 100 % al buffer de lavado 2 (WB2) para obtener un volumen final de 12,5 ml.

Configuración

- Reúna los materiales (consulte la sección «Material suministrado por el usuario» más arriba).
- Para la eliminación de residuos, prepare:
 - Un tubo cónico de 50 ml con 5 ml de lejía + 20 ml de agua; invierta varias veces para mezclar.
 - Un tubo cónico de 50 ml con 100 µl de descontaminante TexQ por muestra (eliminado como residuo peligroso).
- Por cada muestra, etiquete un tubo Protein LoBind de 0,5 ml (Bionano), un tubo Protein LoBind de 1,5 ml (Bionano) y un tubo de 2,0 ml (Bionano).
- Invierta los tubos de PMSF y proteinasa K (Bionano) tres veces para mezclar y dé un breve golpe de centrifuga. Coloque el PMSF en hielo.
- Prepare una tira de Parafilm (~2 cm) para el HemoCue, las microcubetas y el [sistema HemoCue](#).

Aislamiento del gDNA (3 horas)

Mezclar sangre, lisar GR, sedimentar GB y extraer el sobrenadante

Nota: vea el vídeo [HemoCue WBC Counter Demo](#) para obtener instrucciones sobre el funcionamiento correcto de HemoCue.

1. Por cada muestra, extraiga el tubo de sangre a 4 °C y mezcle bien en el balancín para tubos de ensayo Vari-Mix durante 15 minutos a temperatura ambiente para asegurar una buena uniformidad.
2. Procese las muestras de una en una:
 - a. Extraiga el tubo de sangre del balancín y dispense inmediatamente 20 µl en parafilm y use la cubeta HemoCue para medir GB.
 - b. Anote la lectura del HemoCue en la tabla de la página siguiente.
 - ⚠ Si el recuento del HemoCue es inferior a 4500 células/µl, no podrá realizar la lisis de GR en un solo tubo de 1,5 ml. Consulte el Apéndice para obtener instrucciones sobre este escenario.
 - c. Realice los siguientes cálculos para completar la tabla de la página siguiente para cada muestra:
 - Volumen a transferir (µl) = $1500 \div \text{Lectura del HemoCue}$
 - Solución de lisis de GR (µl) = $\text{Volumen a transferir} \times 3$
 - Volumen de eliminación (µl) = $(\text{Volumen a transferir} - 40 \mu\text{l}) \div 2$

- d. Vuelva a colocar el tubo de sangre en el balancín y continúe mezclando mientras completa los recuentos adicionales o antes de continuar con el Paso 3 a continuación.

Nota: HemoCue proporciona lecturas en células/l, pero el cálculo se basa en células/ μ l para alicuotar $1,5 \times 10^6$ GB.

Cálculo: μ l de sangre para 1,5 millones de células = $1,5 \times 10^6$ (células)/recuento de GB (células/ μ l).

3. Con una pipeta ajustada a [Volumen de transferencia], transfiera el volumen de sangre al tubo Protein LoBind de 1,5 ml previamente etiquetado.
4. En cada muestra de sangre, agregue 3 volúmenes de solución de lisis de GR al tubo de Protein LoBind que contiene sangre. Tape e invierta el tubo 10 veces para mezclar. Incube el tubo a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de la incubación, invierta el tubo 10 veces para volver a mezclar.
5. Centrifugue la alícuota de sangre equilibrada durante 2 minutos a 2200 x g a temperatura ambiente. Inspeccione la parte inferior del tubo para ver si hay pellet de GB.

Nota: Es útil alinear la bisagra del tubo con el borde exterior de la centrifuga, de modo que el pellet siempre se ubique en el mismo lado.

6. Coloque una pipeta de 1000 μ l con una punta extralarga de 1000 μ l para extraer el volumen original de solución de lisis de GR de cada tubo (aspire de la parte superior del líquido). Ahora debería tener un volumen igual al volumen a transferir que queda en el tubo.
7. Configure una pipeta de 200 μ l en volumen de eliminación para extraer el sobrenadante restante con una punta estándar de 200 μ l en dos pasadas (cambie las puntas cada vez y no altere el pellet). Dispense el sobrenadante de sangre en el tubo cónico con lejía. Después de ambas eliminaciones, debe haber aproximadamente 40 μ l de solución con el pellet de GB.

Nota: incline el tubo y extraiga desde la parte superior del menisco del líquido, en el lado opuesto al pellet, muy lentamente. Si el volumen de la alícuota inicial es ≤ 240 μ l, extraiga el sobrenadante en una pasada con una punta de 200 μ l. Si el volumen de la alícuota inicial es ≥ 440 μ l, realice la eliminación del sobrenadante en tres pasadas con una punta de 200 μ l. Una vez que se haya eliminado el sobrenadante de todas las muestras, puede llenar la cónica que contiene lejía hasta 50 ml con agua, tapar la cónica, invertir la cónica para mezclar y desechar el contenido en el fregadero.

ID de la muestra	Lectura del HemoCue	Volumen a transferir	Solución de lisis de GR	Volumen a extraer
	células/l	μ l	μ l	μ l
	células/l	μ l	μ l	μ l
	células/l	μ l	μ l	μ l
	células/l	μ l	μ l	μ l
	células/l	μ l	μ l	μ l
	células/l	μ l	μ l	μ l

Lisar y digerir los GB

8. Añada 50 µl de buffer celular (Bionano) directamente en el pellet de GB.
9. Añada 50 µl de proteinasa K (Bionano) directamente en el pellet de GB.
10. Mezcle la muestra con una pipeta 5 veces con una punta estándar de 200 µl ajustada a 120 µl para resuspender el pellet.

Nota: aspire todo el volumen de muestra en la punta e inspeccione visualmente el tubo mientras mezcla para asegurarse de que el pellet se resuspenda completamente durante la mezcla, de modo que cuando termine de mezclar no quede ningún pellet visible en el lado del tubo.

11. Incube a temperatura ambiente durante 3 minutos.
12. Agregue 225 µl de buffer LBB a las muestras usando una punta de 1000 µl. Tape e invierta el tubo 15 veces para mezclar.

Nota: el LBB es una solución viscosa y espumosa que se adhiere a la punta de la pipeta. Dispense lentamente y cambie las puntas entre dispensación y dispensación para garantizar la precisión del volumen dispensado.

13. Centrifugue la muestra en HulaMixer durante 15 minutos a temperatura ambiente a 10 rpm. No sacuda ni produzca vibraciones.
14. Dé un breve golpe de centrifuga al tubo durante 2 segundos para recoger el líquido en el fondo del tubo.
15. Agregue 10 µl de PMSF 100 mM en la porción líquida del tubo. Tape e invierta el tubo 5 veces para mezclar y dé un golpe de centrifuga el tubo durante 2 segundos para recoger el líquido en el fondo del tubo.
16. Incube a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Unión, lavado y elución del gDNA

17. Con unas pinzas, transfiera cuidadosamente un solo disco Nanobind al lisado.

Nota: a veces los discos se pueden adherir unos a otros.

18. Agregue 340 µl de isopropanol al 100 % a todos los tubos. Tape e invierta los tubos 5 veces para mezclar.
19. Ponga la muestra en el HulaMixer durante 15 minutos a temperatura ambiente a 10 rpm. No produzca sacudidas ni vibraciones.

Nota: asegúrese de que el disco Nanobind no permanezca en la tapa del tubo durante las rotaciones iniciales. Si es así, apague el rotador e invierta el tubo hasta que el disco Nanobind vuelva a la solución. Vuelva a colocar el tubo en el HulaMixer y reanude la mezcla.

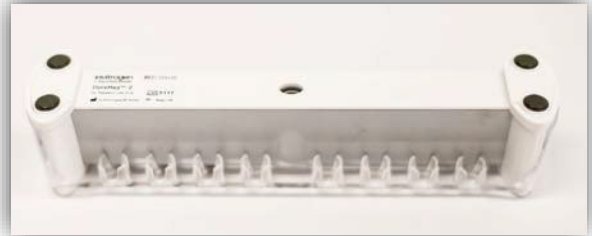
20. Examine la asociación de gDNA con el disco Nanobind e invierta para aumentar la unión (vea el [Vídeo de formación](#), 0:25):
 - a. Coloque los tubos de muestra en una gradilla de tubos Dynamag transparente e inspeccione visualmente todos los tubos de la gradilla para asegurarse de que el gDNA esté anclado al disco Nanobind.
 - b. Si las hebras de gDNA cuelgan visiblemente bajas, invierta rápidamente 180° para que el gDNA se adhiera al disco Nanobind.
 - c. Se pueden realizar inversiones de 180° muchas veces hasta que la adhesión del gDNA con el disco Nanobind parezca mantenerse sin cambios.

21. Combine la gradilla transparente con la base magnética como se describe a continuación y compruebe que el disco Nanobind esté fijado por el imán cerca de la parte superior del nivel de líquido. Si no es así, vuelva a colocar el tubo en la gradilla (vea el [Vídeo de formación](#), 0:50).

- a. Invierta la gradilla de tubos Dynamag transparente y colóquela boca abajo con las tapas de muestra tocando la superficie de trabajo. Los tubos estarán en la misma fila de la gradilla y en la fila más alejada de usted.



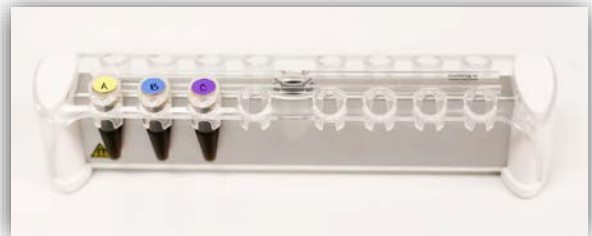
- b. Invierta la base magnética Dynamag y bájela sobre una gradilla transparente.



- c. Incline el aparato combinado lentamente 90° hacia usted mientras continúa apoyado en la superficie. Los tubos ahora estarán horizontales y visibles para usted.




- d. Incline el aparato combinado lentamente 90° hacia usted mientras continúa apoyado en la superficie, de modo que quede completamente erguido y los tubos estén frente a usted.




- e. Asegúrese de que el disco Nanobind esté sujeto al imán cerca de la parte superior del nivel de líquido.



22. Ajuste una pipeta de 1000 µl a 1000 µl y una segunda a 700 µl.
23. Extraiga el sobrenadante como se describe a continuación, con cuidado de no aspirar el gDNA (vea el [Vídeo de formación](#), 1:15):
 - a. Inclíne toda la gradilla a un ángulo de 45° sosteniéndola con una mano (agarre todo el aparato desde abajo con los tubos visibles y las tapas hacia la otra mano).
 - b. Espere 2 segundos para que el gDNA se coloque en el disco Nanobind.
 - c. Extraiga lentamente todo el líquido con una punta extralarga de 1000 µl en ángulo hacia el exterior del disco Nanobind o gDNA para evitar interrupciones.
 - d. Dispense el sobrenadante en un tubo cónico que contenga TexQ.


 Asegúrese de que el gDNA no se extraiga inspeccionando visualmente la punta que contiene el buffer antes de desecharlo. Si el gDNA es aspirado accidentalmente o se suelta del disco, consulte la sección Solución de problemas a continuación.

24. Realice el lavado con WB1 (vea el [Vídeo de formación](#), 2:21):
 - a. Dispense 700 µl de buffer WB1 directamente sobre los discos dentro de los tubos y ciérrelos.
 - b. Levante la gradilla de tubos transparente para separarla de la base magnética.
 - c. Invierta la gradilla transparente con los tubos a 180° 4 veces para lavar.
 - d. Vuelva a colocar la gradilla para tubos transparentes y los tubos con base magnética como se describe en el Paso 21.
 - e. Extraiga el sobrenadante como se describe en el Paso 23.

 Asegúrese de que el gDNA no se extraiga inspeccionando visualmente la punta que contiene el buffer antes de desecharlo. Si el gDNA se aspira accidentalmente o se suelta del disco, consulte la sección Solución de problemas a continuación.

25. Ajuste la segunda pipeta a 500 µl (anteriormente a 700 µl).

26. Realice el lavado con WB2 (vea el [Vídeo de formación](#), 4:10):
 - a. Dispense 500 µl de Buffer WB2 directamente sobre los discos en los tubos y tápelos.
 - b. Levante la gradilla transparente para separarla de la base magnética.
 - c. Invierta la gradilla transparente a 180° 10 veces para lavar.
 - d. Vuelva a colocar la gradilla para tubos transparentes y los tubos con base magnética como se describe en el Paso 21.
 - e. Extraiga el sobrenadante como se describe en el Paso 23.

 Asegúrese de que el gDNA no se extraiga inspeccionando visualmente la punta que contiene el buffer antes de desecharlo. Si el gDNA se aspira accidentalmente o se suelta del disco, consulte la sección Solución de problemas a continuación.

27. Repita el lavado de WB2, Paso 26 (consulte el [Vídeo de formación](#), 5:50).

Nota: extraiga el buffer de 2 o 3 tubos a la vez y procese hasta el paso de incubación con buffer EB en tandas pequeñas para evitar que el disco o el gDNA se sequen.

28. Abra completamente la tapa del tubo (paralela a la mesa de laboratorio) y levante y separe cada tubo de la base.
29. Muy cerca de un tubo Protein LoBind de 0,5 ml, transfiera el disco Nanobind al tubo Protein LoBind de 0,5 ml con el Bionano Prep SP Magnetic Retriever (consulte la sección Notas importantes para conocer el uso adecuado). Tape el tubo para evitar que el disco se seque (vea el [Vídeo de formación](#), 7:30).
30. Centrifugue el tubo Protein LoBind en una microcentrífuga de sobremesa durante 5 segundos.
31. Extraiga todo el líquido residual del fondo del tubo con una punta estándar de 10 µl.
Nota: es necesario desplazar el disco Nanobind con la punta para alcanzar el líquido en el fondo del tubo. Mueva la punta con un pequeño movimiento circular para extraer todo el líquido residual.
32. Agregue 65 µl del buffer EB al tubo Protein LoBind.
33. Centrifugue el tubo en una microcentrífuga de sobremesa durante 5 segundos.
34. Con una punta estándar de 10 µl, empuje suavemente el disco Nanobind hacia la parte inferior del tubo y asegúrese de que esté completamente sumergido en líquido. El disco debe permanecer paralelo a la superficie de la mesa (vea el [Vídeo de formación](#) , 8:20).
35. Incube el disco Nanobind sumergido en el buffer EB a temperatura ambiente durante 20 minutos.
36. Recoja el gDNA extraído mediante la transferencia del eluido a un nuevo tubo estándar de 2,0 ml con una punta estándar de 200 µl.
37. Centrifugue el tubo con el disco Nanobind en una microcentrífuga de sobremesa durante 5 segundos y transfiera todo el eluido restante que contiene gDNA viscoso al mismo tubo estándar de 2,0 ml como en el paso anterior con una punta estándar de 200 µl. Puede sacar el disco antes de aspirar el buffer de elución restante.

Nota: casi todo el gDNA viscoso sale del disco Nanobind durante el segundo centrifugado.

Homogeneización de la solución de gDNA (70 minutos)

Homogeneización de la solución de gDNA

38. Pipetee lentamente todo el volumen de gDNA con una punta estándar de 200 µl, luego dispense lentamente el gDNA. Evite crear burbujas.
 - Repita este proceso 8 veces para alcanzar un total de 9 veces (1 vez = 1 aspiración y 1 dispensación).**Nota:** si la absorción de gDNA se detiene debido a la alta viscosidad, puede ser necesario remover suavemente mientras suelta lentamente el émbolo para sacar el gDNA.
39. Coloque un tubo estándar de 2,0 ml que contenga el gDNA en una gradilla del mezclador de muestras Hula Mixer y gírelo a temperatura ambiente durante 1 hora a 15 rpm.
Nota: durante las rotaciones iniciales, asegúrese de que el gDNA se extraiga de la parte inferior del tubo para quedarse en la tapa del tubo durante las rotaciones. Si la solución de ADN permanece en el fondo del tubo durante las rotaciones iniciales, apague el Hula Mixer y coloque la gradilla de modo que el tubo esté orientado al revés. Golpee suavemente la parte inferior del tubo hasta que el gDNA se introduzca en la tapa y reanude la mezcla.

40. Extraiga el tubo de la gradilla del Hula Mixer y centrifugue el tubo en una microcentrífuga de sobremesa durante 2 segundos para llevar el gDNA al fondo del tubo. Deje que el gDNA repose durante la noche a temperatura ambiente (25 °C) para su homogeneización.

Nota: la mayoría de las muestras se volverán homogéneas al tercer día (desde el inicio del protocolo), pero las muestras pueden marcarse tan pronto como se vuelvan homogéneas.

Cuantificación de gDNA (45 minutos)

Cuantificación con Qubit - Análisis dsDNA BR

Consulte el manual de usuario del kit de análisis Qubit dsDNA BR para obtener detalles del kit y siga los métodos descritos en la sección «Pipeteo de ADN genómico viscoso» para garantizar un pipeteado preciso del gDNA viscoso.

1. Equilibre los patrones del kit de análisis Qubit BR a temperatura ambiente.

Nota: si el gDNA se almacenó a 4 °C, equilibre a temperatura ambiente antes de pasar al siguiente paso.

2. Agregue el buffer Qubit BR a los tubos de ensayo Qubit de 0,5 ml:
 - a. En cada muestra, agregue 18 µl de buffer Qubit BR a tres tubos de ensayo Qubit separados.
 - b. En cuanto a los patrones Qubit, agregue 10 µl de buffer Qubit BR a dos tubos de ensayo Qubit separados.
3. Usando una pipeta de 200 µl con una punta de calibre ancho, mezcle suavemente todo el volumen de muestra de gDNA pipeteando hacia arriba y hacia abajo 5 veces, con cuidado de no generar burbujas.
4. Usando una nueva punta estándar o una punta de una pipeta de desplazamiento positivo para cada extracción:

Tome alícuotas de 2 µl del lado izquierdo, del centro y del lado derecho de cada muestra y dispénelas en el buffer BR del tubo de ensayo Qubit correspondiente, enjuagando la punta al dispensar. Coloque los tubos de ensayo en una gradilla flotante y someta a ultrasonidos durante 10 minutos. Realice los pasos 5 y 6 durante la sonicación.

Nota: si no se dispone de un baño ultrasónico, agite en el vórtex durante al menos 30 segundos a la velocidad máxima y luego reduzca la velocidad brevemente durante de 2 segundos.

5. Prepare la solución de trabajo diluyendo el colorante en el buffer de dilución BR (1:200):
 - a. 200 µl de solución de trabajo por cada uno de los dos patrones (400 µl en total).
 - b. 200 µl de solución de trabajo por cada alícuota de muestra (600 µl por cada muestra).
6. En cuanto a los patrones de ADN Qubit, agregue 10 µl de los patrones 1 y 2 a los tubos de ensayo que contienen el buffer BR del Paso 2b.
7. Una vez que se complete la sonicación, tome los tubos de ensayo y dé un breve golpe de centrifuga. Agite los tubos en el vórtex durante 5 segundos a máxima velocidad y luego dé un golpe de centrifuga nuevamente.

8. Agregue 180 µl de la solución de trabajo a cada alícuota de ADN sonificado y las alícuotas de los patrones de ADN Qubit. Agite en el vórtex durante 5 segundos y dé un breve golpe de centrifuga a los tubos.
9. Incube las muestras durante al menos 2 minutos y luego lea en el fluorímetro Qubit.
10. El coeficiente de variación (CV = desviación estándar/media) de tres lecturas debe ser <0,30.

Nota: si el CV es >0,30, mezcle pipeteando suavemente todo el volumen de gDNA cinco veces (1 vez = 1 aspiración + 1 dispensación) con una punta de calibre ancho. Deje reposar el gDNA al menos durante la noche a temperatura ambiente antes de repetir la cuantificación.

Nota: las concentraciones típicas de ADN oscilan entre 45 y 90 ng/µl.

ID de la muestra	Izquierda (ng/µl)	Centro (ng/µl)	Derecha (ng/µl)	CV (desv. estándar/media)

Marcaje

El ADN está listo para el marcaje Direct Label and Stain (DLS). Consulte la sección «Kits y consumibles» en <https://bionanogenomics.com/support/> para conocer cuáles son los kits y protocolos vigentes.

Solución de problemas

Vea el [Vídeo de formación](#) a partir del minuto 8:40 para obtener las explicaciones en vídeo sobre la solución de problemas.

El gDNA se libera del disco Nanobind.

Evidencia: el gDNA se aspira o se desprende del disco durante la unión o durante los lavados.

Pasos que se deben seguir si se aspira la muestra:

1. Dejando el tubo con la muestra colocado en el imán, dispense el líquido que contiene el gDNA de nuevo en el tubo que contiene el disco.
2. Extraiga el tubo de la gradilla del imán e invierta la gradilla varias veces con la mano para restablecer la unión.

Como alternativa:

1. Dejando el tubo con la muestra colocado en el imán, dispense el líquido que contiene el gDNA de nuevo en el tubo que contiene el disco.
2. Aspire el líquido del tubo de manera que quede un volumen mínimo (~50 µl) por encima del gDNA no unido y deseche el sobrenadante dejando el ADN en un volumen mínimo en el fondo del tubo.
3. Aspire con cuidado el gDNA suelto que contenga el mínimo de líquido en la punta de la pipeta y pipetee directamente sobre el disco montado en el imán para restablecer la unión.

El gDNA no es homogéneo antes del marcaje.

Evidencia: el CV de la cuantificación de gDNA de las tres mediciones (superior, media e inferior) es >0,30.

Pasos que debe seguir:

1. Aspire y dispense la muestra con una punta de calibre ancho un total de 5 veces.
2. Incube el gDNA a temperatura ambiente durante 1 a 3 días.
3. Después de la incubación, vuelva a aspirar y dispensar la muestra con una punta de calibre ancho 5 veces.
4. Cuantifique con el análisis Qubit BR.

El gDNA no es viscoso.

Evidencia: la consistencia de la muestra es muy aguada y fácil de pipetear, pero la concentración es >35 ng/µl.

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

Compruebe la muestra mediante electroforesis en gel de campo pulsado antes de marcar para confirmar la presencia de gDNA de alto peso molecular.

Evalúe el método de preparación de la muestra y la calidad y edad del material de partida y repita el aislamiento del ADN de la muestra biológica.

Apéndice

Recuentos del HemoCue < 4500 y > 2800 GB/ μ l

Mezclar sangre, lisar GB

- Para lecturas bajas del HemoCue (< 4500 células/ μ l), calcule la cantidad de sangre que se transferirá para 1,5 millones de GB:
 - $1500 \div \text{lectura del HemoCue} = \text{volumen a transferir en } \mu\text{l}$ (μl para $1,5 \times 10^6$ células) \div 2 = volumen a transferir en μl
Nota: HemoCue proporciona lecturas en células/l, aunque el cálculo se basa en células/ μ l. μl de sangre para 1,5 millones de células = $1,5 \times 10^6 / \text{recuento de HemoCue (células}/\mu\text{l})$.
 - Determine la cantidad de solución de lisis de GR necesaria:
 - (volumen a transferir en μl del Paso 1a) \times 3 = volumen de solución de lisis de GR en μl
 - Vuelva a colocar el tubo de sangre en el balancín y continúe mezclando mientras completa los recuentos adicionales o antes de continuar con el Paso 2 a continuación.

ID de la muestra	Lectura del HemoCue	Volumen a transferir (Paso 1a)	Solución de lisis de GR que se añade (Paso 1b)	Volumen de eliminación (Paso 5)
	células/l	μl	μl	μl
	células/l	μl	μl	μl
	células/l	μl	μl	μl
	células/l	μl	μl	μl
	células/l	μl	μl	μl
	células/l	μl	μl	μl

- Procesando las muestras de una en una, transfiera volúmenes iguales de sangre (que en conjunto equivalen a 1,5 millones de células), como se calculó en el Paso 1a anterior, a cada uno de los dos tubos de microcentrífuga de 1,5 ml.
- Añada 3 volúmenes de solución de lisis de GR (como se calculó en el Paso 1b anterior) a cada uno de los dos tubos de microcentrífuga de 1,5 ml que contienen volúmenes de sangre iguales. Tape e invierta los tubos 10 veces para mezclar. Incube los tubos a temperatura ambiente durante 5 minutos. Invierta los tubos 10 veces para mezclar.
- Centrifugue los tubos durante 2 minutos a 2200 xg a temperatura ambiente. Inspeccione la parte inferior de los tubos para ver si hay pellet de GB. **Nota:** es útil alinear la bisagra del tubo con el borde exterior de la centrífuga, de modo que el pellet siempre se ubique en el mismo lado.
- Coloque una pipeta de 1000 μl con una punta extralarga de 1000 μl para extraer el volumen de solución de lisis de GR (calculado en el paso 1b anterior) de cada tubo.
- Coloque una pipeta de 200 μl para extraer el sobrenadante restante con una punta estándar de 200 μl en dos pasadas (cambie las puntas cada vez y no altere el pellet). Dispense el sobrenadante de sangre en un cono de lejía:
 - Configuración de la pipeta = (volumen a transferir en μl del Paso 1a - 40 μl) \div 2**Nota:** incline el tubo y extraiga desde la parte superior del menisco del líquido, en el lado opuesto al pellet, muy lentamente.

Lisar y digerir los GB

7. Añada 25 μ l de buffer celular directamente en cada pellet de GB. Resuspenda el pellet en un tubo mezclándolo 5 veces con una punta estándar de 200 μ l con una pipeta ajustada a 35 μ l. Luego, transfiera todo el volumen del pellet resuspendido de este tubo a un tubo Protein LoBind. Resuspenda el segundo pellet de la muestra de la misma manera y luego transfiera todo el volumen al mismo tubo de Protein LoBind que el primer pellet resuspendido. Añada 50 μ l de proteinasa K (Bionano) al tubo de Protein LoBind que contiene los GB resuspendidos agrupados para la muestra.
8. Mezcle la muestra con una pipeta 10 veces con una punta de calibre ancho de 200 μ l ajustada a 120 μ l para mezclar los GB resuspendidos con la proteinasa K.
9. Continúe con el Paso 11 en la página 12 y con el resto del protocolo.

Asistencia técnica

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

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

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