



Bionano Prep SP BMA DNA- Isolationsprotokoll v2

Dokumentnummer: 30399

Dokumentrevision: A

Inhaltsverzeichnis

Impressum	3
Revisionshistorie	4
Workflow-Übersicht	5
Bionano Prep SP BMA DNA-Isolierungskit und vom Benutzer bereitgestellte Materialien	6
Bionano Prep SP Knochenmarkaspirat (BMA) DNA Isolierungskit v2 Inhalt (Art.-Nr. 90057, 10 Vorbereitungen)	6
Vom Benutzer bereitgestellte Materialien	6
Einführung und wichtige Hinweise	8
Einführung:	8
Überblick	8
Wichtige Hinweise:	8
Bionano Prep SP BMA DNA-Isolationsprotokoll v2	12
Vorbereitung für die gDNA-Isolierung	12
gDNA-Isolierung (~3 Stunden)	12
Homogenisierung der gDNA-Lösung (70 Minuten)	19
gDNA-Quantifizierung (45 Minuten)	19
Anhang A: Zugabe von DNA-Stabilisator zu aufgetautem humanem Heparin-Knochenmarkaspirat	22
Fehlerbehebung	24
Die gDNA kommt ungebunden von der Nanobind Disk.	24
Die mit dem Nanobind assoziierte gDNA hat auch in der zweiten WB2 Wäsche noch Farbe	24
Die gDNA ist vor der Markierung nicht homogen	24
Die gDNA ist nicht viskos	25
Technische Unterstützung	26

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 Genomics®, Irys®, IrysView®, IrysChip®, IrysPrep®, IrysSolve®, Saphyr®, Saphyr Chip®, Bionano Access® und Bionano EnFocus™ sind Marken von Bionano Genomics, Inc. Alle anderen Marken sind das alleinige Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber.

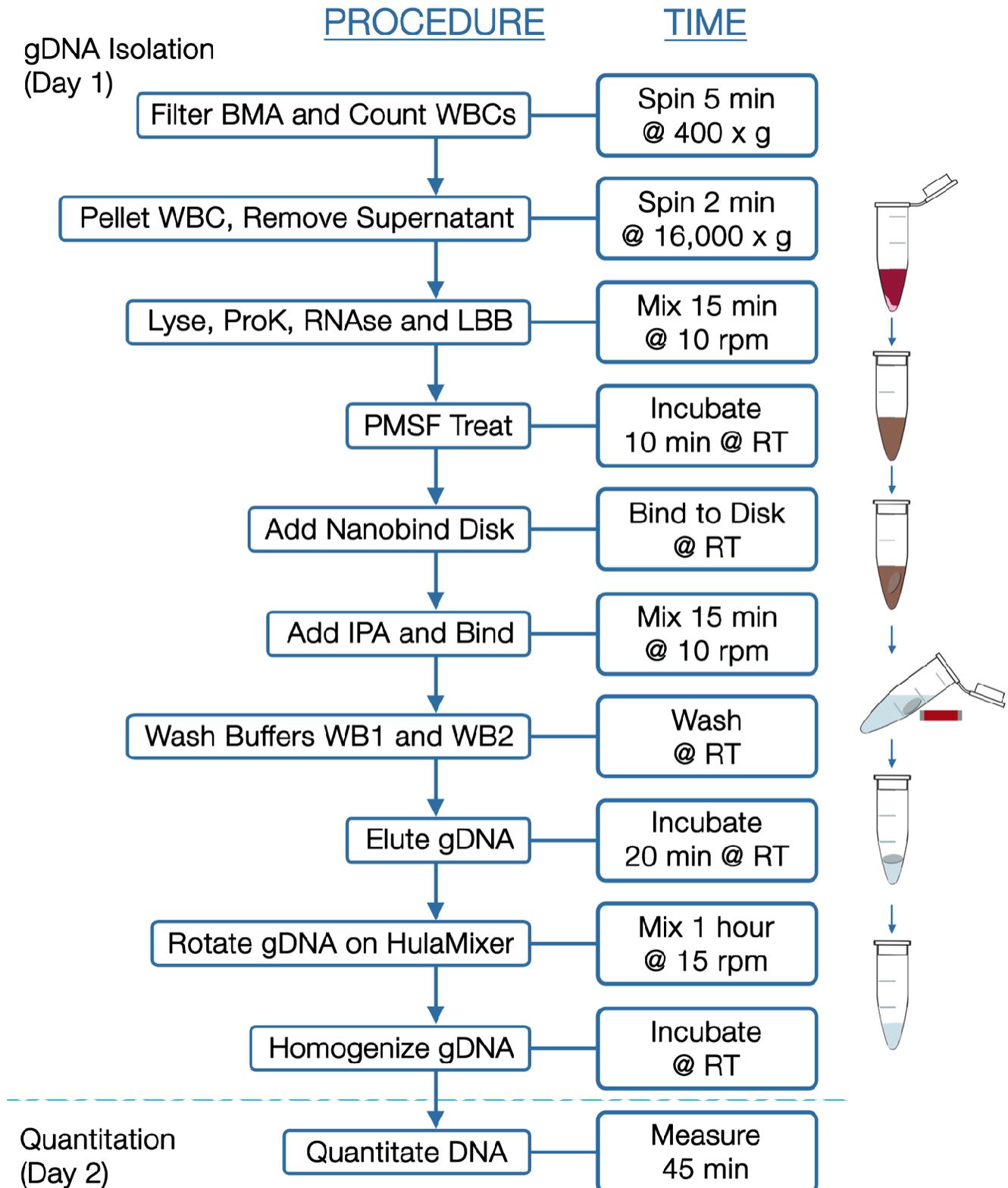
Es wird keine Lizenz zur Verwendung von Marken von Bionano Genomics erteilt oder impliziert. Benutzern ist es nicht gestattet, diese Marken ohne die vorherige schriftliche Zustimmung von Bionano Genomics zu verwenden. Die Verwendung dieser Marken oder anderer Materialien, außer wie hierin erlaubt, ist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

Bionano Prep SP Knochenmarkspirat (BMA) DNA Isolierungskit v2 Inhalt (Art.-Nr. 90057, 10 Vorbereitungen)

Bionano Prep SP Blut- und Zell-DNA-Isolationskit v2 Inhalt (Art.-Nr. 80042, 10 Reaktionen)

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“

Bionano Prep SP BMA Add-On (Art.-Nr. 80037, 10 Reaktionen)

Artikel	Anzahl	Artikelnummer	Lagerung
DNA-Stabilisator	4 ml	20398	Raumtemperatur (18-25 °C)
Standard-Mikrozentrifugenröhrchen, 2,0 ml	2 x 10 Röhrchen	20396	Raumtemperatur (18-25 °C)
BMA-Filter, 100 µm	20 Filter	20401	Raumtemperatur (18-25 °C)

Vom Benutzer bereitgestellte Materialien

Artikel	Anbieter	Katalog-Nr.
Tag 1 – Pelletierung, gDNA-Isolierung und Homogenisierung		
Bionano Prep SP Magnetischer Retriever (2er Pack)	Bionano Genomics	80031
HemoCue WBC-Analysator	Fisher Scientific (USA-Vertriebspartner) (außerhalb der USA)	22-601-017
HemoCue Mikroküvetten	Fisher Scientific	22-601-018
Vari-Mix Reagenzglaswippe	Thermo Fisher oder gleichwertig	M48725Q
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 Blutentsorgung	Allgemeiner Laborlieferant	
Konische Zentrifugenröhrchen, 50 ml, PP	Thermo Fisher oder gleichwertig	14-432-22
Mikrozentrifuge mit variabler Geschwindigkeit (Drehzahl 400-16.000 x g)	Allgemeiner Laborlieferant	
Wasserbad, 37 °C	Allgemeiner Laborlieferant	
Eiskübel und Eis	Allgemeiner Laborlieferant	
Sterile 5 und 10 ml Einweg-Pipetten (TD+)	Allgemeiner Laborlieferant	
Mini-Tischmikrozentrifuge (Drehzahl 2.200 x g)	Labnet	C1301B
Spitzzange	Elektronenmikroskopische Wissenschaften 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	
Parafilm	Allgemeiner Laborlieferant	

Tag 2 - Quantifizierung		
Tischvortexer	Allgemeiner Laborlieferant	
Ultraschallbad (optional)	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 ul, C-10 für Pos.-Nr. Displ. Pipette (optional)	Rainin oder Äquivalent	17008604

Einführung und wichtige Hinweise

Einführung:

Dieses Bionano Prep® SP KMA Protokoll v2 zur DNA-Isolation kann in weniger als vier Stunden gDNA mit ultrahohem Molekulargewicht (UHMW) 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 getestet, indem mehrere Knochenmarkaspirate verarbeitet wurden, wobei bis zu zwei Knochenmarkaspirate des Spenders gleichzeitig verarbeitet wurden. Ein DNA-Stabilisator wurde einem frischen humanen Knochenmarkaspirat von einem 1-ml-Volumen hinzugefügt, das in ein Heparinröhrchen gezogen und eingefroren wurde und dann ohne zusätzliche Einfrier-/Auftau-Zyklen verarbeitet wurde. Die nach diesem Protokoll hergestellte gDNA wurde nur mit DLS-Markierung getestet. Siehe [Schulungsvideo](#) für technisch kritische Schritte und zur Fehlerbehebung. Der aktuelle Workflow ist so ausgelegt, dass an einem typischen Arbeitstag bequem vier BMAs bearbeitet werden können, mit zwei BMAs vormittags und zwei nachmittags.

Überblick

Zellyse, Proteinase K- und RNase-Verdauung erfolgen in einem chaotropen Puffer und die freigesetzte gDNA bindet sich bei Zugabe von Isopropanol an die Nanobind-Disk. Nach drei Waschschrritten 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 unter Verwendung 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 wichtigen Hinweisen für genaues Pipettieren.

Standardassays zur Quantifizierung der gDNA-Konzentration liefern aufgrund ihrer viskosen Natur keine genauen Messungen von langer gDNA.

- Für eine genaue Quantifizierung ist eine effektive Fragmentierung der gDNA-Probe durch Ultrabeschallung oder ausgiebiges Vortexen erforderlich.
- Der Variationskoeffizient (CV) von drei einzelnen Stichproben sollte kleiner oder gleich 0,30 sein.
CV = Standardabweichung/Mittelwert.
- Die typische gDNA-Konzentration beträgt 45-90 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 abzubrechen, 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 Spitze mit Standardöffnung oder einer Direktverdrängerpipette.

Eigenschaften hochwertiger gDNA für die Bionano-Kartierung

- Eine klare gDNA-Lösung ist ideal, aber eine trübe 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, gemessen mit dem Qubit-gDNA-Quantifizierungsassay mit CV 0,30.

Chargengröße

Wir empfehlen, bis zu vier Proben gleichzeitig zu verarbeiten, mit maximal acht Proben pro Tag, wobei vier am Vormittag und vier am Nachmittag verarbeitet werden.

Verwendung des Bionano Prep SP Magnetic Retrievers

- a. Halten Sie eine Kunststoffhülle an den Seiten nahe der Oberseite und führen Sie den Bionano Magnetic SP Disk 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.

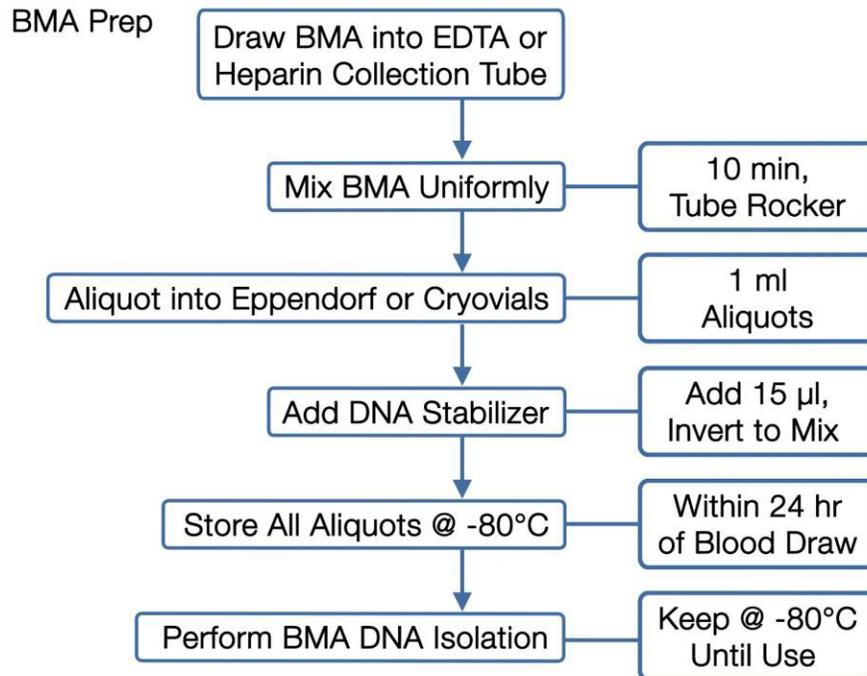
Sondermüllbeseitigung

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 örtlichen Vorschriften zur Dekontamination und Entsorgung.

Einfrieren frischer heparinierter humaner Knochenmarkaspirate zur Lagerung mit einem DNA-Stabilisator

Der gDNA-Gehalt wird aus den weißen Blutkörperchen (WBC) gewonnen. Für jede BMA-Probe sollten zwei heparinisierte BMA- Aliquots (jeweils ~1 ml) in separaten Röhrchen eingefroren (-80°C) und bis zur gDNA-Isolierung ohne Auftauen aufbewahrt werden. Normalerweise wird für dieses Protokoll nur ein Aliquot benötigt, wobei das zweite als Sicherheitskopie dient. Die Proben sollten innerhalb von 24 Stunden nach dem Absaugen eingefroren und bei 4°C aufbewahrt werden, bis sie bei -80°C eingefroren sind.

PROCEDURE



- Mischen Sie frisches heparinisiertes humanes BMA gründlich bei Raumtemperatur, um eine gute Gleichmäßigkeit zu gewährleisten (15 Minuten auf einer Laborwippe bei Raumtemperatur).
- Verarbeiten Sie jeweils eine BMA-Probe, überführen Sie zwei 1-ml-Aliquots in DNase/RNase-freie 1,5 ml-Röhrchen.
- Geben Sie 15 µl DNA Stabilisator in jedes Röhrchen, das 1 ml frisches humanes BMA enthält.
- Die Röhrchen verschließen, zum Mischen 10 Mal umdrehen, dann die Röhrchen **eine Sekunde lang** pulscentrifugieren, um jegliches Material vom Mikrozentrifugenröhrchendeckel zu sammeln, und die Aliquots sofort auf -80°C zur Langzeitlagerung bringen.
- Das Aliquot nicht bei -80 °C auftauen, bis mit der gDNA-Isolierung fortgefahren wird.

Bionano Prep SP BMA DNA-Isolationsprotokoll v2

Vorbereitung für die gDNA-Isolierung

Vor dem ersten Gebrauch

- Überprüfen Sie den Zugang zu einer Mikrozentrifuge mit variabler Geschwindigkeit (400 - 16.000 x g).
- PMSF zersetzt sich in wässrigen Lösungen schnell. Erstellen Sie Aliquots von 120 µl in 1,5-ml-Schraubdeckelröhrchen und lagern Sie den Vorrat und Aliquots bei 4°C. Jedes Aliquot reicht für zehn gDNA-Isolierungen.
- Fügen Sie 100 % Ethanol zu den Waschpuffern (WB1 und WB2) hinzu, mischen Sie gründlich und markieren Sie die Kästchen „Ethanol Hinzugefügt“:
 - 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 entsorgt).
- Markieren Sie für jede Probe ein 0,5-ml-Protein-LoBind-Röhrchen (Bionano), ein 1,5-ml-Protein-LoBind-Röhrchen (Bionano) und drei 2,0-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (Bionano).
 - Setzen Sie einen BMA-Filter (Bionano) in zwei der markierten 2,0-ml-Mikrozentrifugenröhrchen.
- Röhrchen mit PMSF, Proteinase K (Bionano) und RNase (Bionano) dreimal zum Mischen umdrehen, kurz pulscentrifugieren. Legen Sie PMSF und RNase auf Eis.
- Bereiten Sie einen Streifen Parafilm (~ 2 cm) für HemoCue, fertige Mikroküvetten und [HemoCue-System](#) vor.
- Wasserbad auf 37 °C einstellen. Überprüfen Sie die Temperatur mit einem Thermometer.

gDNA-Isolierung (~3 Stunden)

Auftauen von bis zu vier Aliquots von KMA mit DNA-Stabilisator, Pellet-Leukozyten und entfernen des Überstands

Hinweis: Siehe Video [HemoCue WBC Counter Demo](#) für Anweisungen zum ordnungsgemäßen Betrieb von HemoCue.

1. Entnehmen Sie für jede Probe ein einzelnes 1-ml-Aliquot von gefrorenem heparinisiertem BMA, das einen DNA-Stabilisator enthält, aus dem -80 °C-Gefrierschrank und tauen Sie es 2 Minuten lang in einem 37 °C-Wasserbad unter Verwendung eines schwimmenden Röhrchengestells auf. Aliquots aus dem Wasserbad nehmen und bei Raumtemperatur aufbewahren.

Wichtiger Hinweis: Wenn Sie sich nicht sicher sind, ob dem 1-ml-Aliquot des heparinisierten BMA vor dem Einfrieren DNA-Stabilisator zugesetzt wurde, geben Sie beim Auftauen 15 µl DNA-Stabilisator in das Röhrchen und fahren Sie mit Schritt 2 fort. Wenn sich das gefrorene heparinisierte BMA nicht in einem 1-ml-Aliquot mit zugesetztem DNA-Stabilisator befindet, siehe Anhang A.

2. Verarbeitung von bis zu vier Aliquot-Proben gleichzeitig:

- a. BMA-Aliquotröhrchen zum Mischen 10 Mal umdrehen, dann die Röhrchen **eine Sekunde lang** pulscentrifugieren, um jegliches Material vom Deckel des Mikrozentrifugenröhrchen zu sammeln.
- b. Überführen Sie für jede aufgetaute BMA-Probe 500 µl in zwei separate BMA-Filter, die in beschrifteten 2,0-ml-Mikrozentrifugenröhrchen sitzen.
- c. Stellen Sie die Röhrchen mit den eingesetzten Filtern vorsichtig in die Tischmikrozentrifuge und zentrifugieren Sie sie 5 Minuten lang bei 400 x g bei Raumtemperatur.

Hinweis: Richten Sie die Mikrozentrifugenröhrchen mit Filtereinsätzen so aus, dass die Kappen zur Rotormitte zeigen.

- d. Entfernen Sie die Röhrchen vorsichtig aus der Zentrifuge und entsorgen Sie die Filter in einem Bioabfallbehälter.
- e. Mischen Sie das gesamte Volumen des gefilterten BMA 10 Mal vorsichtig mit einer 1.000-µl-Pipettenspitze.
- f. Nach dem Pipettenmischen poolen Sie die beiden gefilterten Probenvolumina in einem der 2-ml-Röhrchen.
- g. Das Röhrchen mit gepooltem und gefiltertem Knochenmark verschließen und umdrehen, zum Mischen 10 Mal absaugen, dann das Röhrchen **eine Sekunde lang** pulscentrifugieren, um Material vom Deckel zu sammeln.

3. Bestimmen Sie die WBC-Zählung eine Probe nach der anderen:

- a. Das gesamte Volumen des gefilterten BMA zum Mischen vorsichtig mit einer Pipette mischen, dann das Röhrchen eine Sekunde lang pulscentrifugieren, um jegliches Material vom Deckel zu sammeln.
- b. Pipettieren Sie sofort 20 µl auf Parafilm und verwenden Sie die HemoCue-Küvette, um die Leukozyten zu messen.
- c. Notieren Sie den HemoCue-Messwert in der Tabelle auf der nächsten Seite.
- d. Führen Sie die folgenden Berechnungen durch, um die Tabelle in diesem Abschnitt für jede Probe auszufüllen:
 - Transfervolumen (µl) = 1.500 ÷ HemoCue-Messwert
 - Entfernungsvolumen (µl) = (Transfervolumen – 40 µl)

Hinweis: Der HemoCue gibt Messwerte in Zellen/l an, die Berechnung basiert jedoch auf Zellen/µl, um $1,5 \times 10^6$ Leukozyten zu aliquotieren.

Berechnung: µl Blut für 1,5 Millionen Zellen = $1,5 \times 10^6$ (Zellen)/Leukozytenzahl (Zellen/µl).

Hinweis: Wenn die Konzentration von WBC (Leukozyten) im BMA, das den DNA-Stabilisator enthält, hoch ist und außerhalb des Nachweisbereichs liegt, zeigt das Display des HemoCue-Instruments „HHH“ an.

Typischerweise können BMAs, die einen HemoCue-Wert von „HHH“ ergeben, in Zellpuffer verdünnt und dann erneut gezählt werden, um die WBC-Konzentration im Knochenmarkspirat genau zu bestimmen (siehe unten).

Für ein konzentriertes Knochenmarkspirat, das „HHH“ nur bei dem anfänglichen HemoCue-Messwert anzeigt:

Bestimmen Sie die WBC-Zählung, eine Probe nach der anderen:

- e. Das Knochenmark-Aliquotröhrchen zum Mischen 10 Mal umdrehen, dann das Röhrchen eine Sekunde lang pulscentrifugieren, um jegliches Material vom Deckel zu sammeln.

- f. Überführen Sie sofort 25 µl Knochenmarkaspirat in ein 1,5 ml-Röhrchen mit 75 µl Zellpuffer (um eine 1:4-Verdünnung des Knochenmarks herzustellen).
- g. Mischen Sie das gesamte Volumen 10 Mal vorsichtig mit einer 200-µl-Standard-Pipettenspitze.
- h. Pipettieren Sie sofort 20 µl auf Parafilm und verwenden Sie die HemoCue-Küvette, um die WBC zu messen.
- i. Führen Sie die folgende Berechnung durch, um die WBC-Konzentration in der Probe zu bestimmen und notieren Sie den HemoCue-Messwert in der Tabelle auf der nächsten Seite:
 - HemoCue-Messwert x 4 = **unverdünnter** HemoCue-Messwert
- j. Führen Sie die folgenden Berechnungen durch, um die Tabelle in diesem Abschnitt für jede Probe auszufüllen:
 - Transfervolumen (µl) = 1.500 ÷ **unverdünnter** HemoCue-Messwert
 - Entfernungsvolumen (µl) = (Transfervolumen – 40 µl)

Hinweis: Wenn das Transfervolumen 40 µl beträgt, ist kein Entnahmevermögen für die Probe erforderlich. Wenn das Transfervolumen < 40 µl beträgt, bestimmen Sie in Schritt 4 die Menge an Zellpuffer, die der Probe hinzugefügt werden soll.

- Zellpuffer-Zugabevolumen (µl) = (40 µl – Transfervolumen)

Hinweis: Der HemoCue gibt Messwerte in Zellen/l an, die Berechnung basiert jedoch auf Zellen/µl, um $1,5 \times 10^6$ Leukozyten zu aliquotieren.

Berechnung: µl Blut für 1,5 Millionen Zellen = $1,5 \times 10^6$ (Zellen)/Leukozytenzahl (Zellen/µl).

4. Nach dem Zählen der WBC jedes gefilterte BMA zum Mischen 10 Mal umdrehen, eine Sekunde lang pulscentrifugieren, um Material vom Deckel des Mikrozentrifugenröhrchens zu sammeln. Überführen Sie das BMA-Volumen mit einer auf [Transfervolumen] eingestellten Pipette in das zuvor markierte 1,5-ml-Protein-LoBind-Röhrchen.
 - a. **Wenn das in Schritt 3 ermittelte [Transfervolumen] = 40 µl beträgt**, führen Sie die Schritte 5 und 6 nicht aus und fahren mit Schritt 7 fort.
 - b. **Wenn das in Schritt 3 ermittelte [Transfervolumen] < 40 µl beträgt**, fügen Sie dem überführten Knochenmarkaspirat Zellpuffer bis zu 40 µl hinzu, führen Sie die Schritte 5 und 6 nicht aus und fahren Sie direkt mit Schritt 7 fort.
 - c. **Wenn das in Schritt 3 ermittelte [Transfervolumen] > 40 µl beträgt**, fahren Sie mit Schritt 5 fort.
5. Ausgewogene BMA-Aliquots bei 16.000 x g 2 Minuten lang bei Raumtemperatur zentrifugieren.

Hinweis: Es ist hilfreich, das Röhrchenscharnier an der Außenkante der Zentrifuge auszurichten, damit sich das Pellet immer auf der gleichen Seite befindet.
6. Stellen Sie eine geeignete Pipette auf [Entnahmevermögen] ein, um den Überstand mit einer Standardspitze zu entfernen. Überstand in konisches Bleichmittel pipettieren. Nach der Entnahme sollten sich ca. 40 µl Lösung zusammen mit dem WBC-Pellet befinden.

Hinweis: Das Röhrchen anwinkeln und von der Oberseite des Flüssigkeitsmeniskus auf der dem Pellet gegenüberliegenden Seite sehr langsam ziehen. Wenn das anfängliche Aliquotvolumen ≤ 240 µl beträgt, entfernen Sie den Überstand in einem Durchgang. Wenn das anfängliche Aliquotvolumen ≥ 240 µl beträgt, entfernen Sie den Überstand in mehreren Durchgängen mit einer 200-µl-Spitze und wechseln Sie die Spitze bei jedem Durchgang. Sobald der Überstand aller Proben entfernt wurde, können Sie

das Bleichmittel enthaltende konische Röhrchen mit Wasser auf 50 ml auffüllen, konisch verschließen, zum Mischen konisch umdrehen und den Inhalt in die Spüle entsorgen.

Proben-ID	Unverdünnt HemoCue-Lesung	Transfervolumen	Entfernungsvolumen	Zellpuffervolumen
	Zellen/L	µl	µl	µl
	Zellen/L	µl	µl	µl
	Zellen/L	µl	µl	µl
	Zellen/L	µl	µl	µl
	Zellen/L	µl	µl	µl
	Zellen/L	µl	µl	µl
	Zellen/L	µl	µl	µl
	Zellen/L	µl	µl	µl

Leukozyten lysieren und verdauen

7. Geben Sie 50 µl Proteinase K (Bionano) direkt auf jedes WBC-Pellet. Mischung nicht pipettieren.
8. Fügen Sie jedem Röhrchen 20 µl RNase A (Bionano) hinzu. Mischung nicht pipettieren.
9. Probe 5 Mal mischen und mit einer 200-µl-Standardspitze pipettieren, eingestellt auf 110 µl, um das Pellet zu resuspendieren.

Hinweis: Ziehen Sie das gesamte Probevolumen in die Spitze und überprüfen Sie das Röhrchen während des Mischens visuell, um sicherzustellen, dass das Pellet während des Mischens vollständig resuspendiert wird, so dass am Ende des Mischens kein sichtbares Pellet am Boden oder an der Seite des Röhrchens zurückbleibt.

10. 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
11. Fügen Sie 225 µl Puffer LBB zu den Proben mit einer 1.000-µl-Spitze hinzu. Das Röhrchen zum Mischen 15 Mal verschließen und umdrehen.

Hinweis: 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.

12. Rotieren Sie Proben auf HulaMixer für 15 Minuten bei Raumtemperatur bei 10 U/min. Kein Schütteln/Vibriieren.
13. Pulszentrifugieren Sie das Röhrchen 2 Sekunden lang, um die Flüssigkeit am Boden des Röhrchens zu sammeln.
14. 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.
15. 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

gDNA binden, waschen und eluieren

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

Hinweis: Disks können manchmal zusammenkleben, stellen Sie sicher, dass nur eine Disk in das Röhrchen übertragen wird.

17. 340 μ l 100 % Isopropanol in alle Röhrchen geben. Die Röhrchen zum Mischen fünfmal verschließen und umdrehen.
18. Rotieren Sie die Probe auf dem HulaMixer für 15 Minuten bei Raumtemperatur bei 10 U/min. Kein Schütteln/Vibrieren.

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.

19. 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 im unteren Bereich des Röhrchens hängen, schnell um 180° drehen, 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.
20. 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).

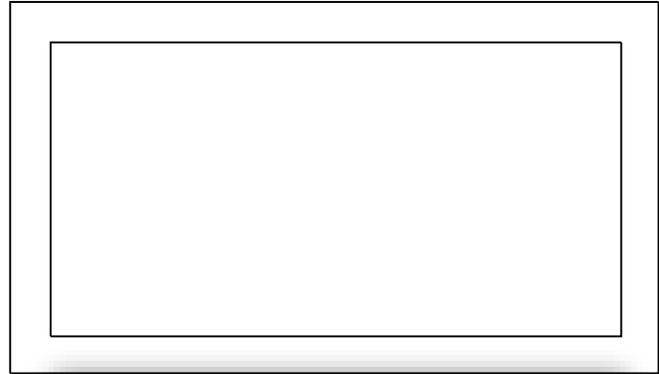
- a. Drehen Sie das durchsichtige Dynamag-Röhrchengestell um und stellen Sie es auf den Kopf, so dass der Probedeckel die Arbeitsfläche berührt. Die Röhrchen befinden sich in derselben Reihe des Gestells und in der Reihe, die am weitesten von Ihnen entfernt ist.



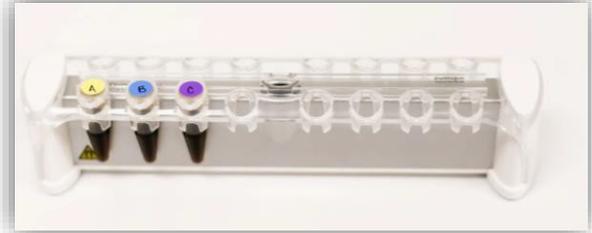
- b. Drehen Sie die Dynamag-Magnetbasis um, und senken Sie sie auf das durchsichtige Rack ab.



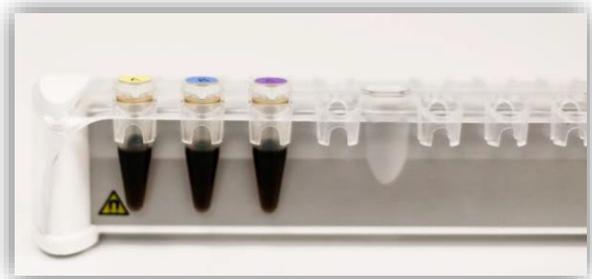
- c. Kippen Sie das kombinierte Gerät langsam um 90° zu sich hin, während es weiterhin auf der Oberfläche ruht. Die Röhren sind jetzt horizontal und für Sie sichtbar.



- 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 Röhren zu Ihnen zeigen.



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



21. Stellen Sie eine 1.000- μ l-Pipette auf 1.000 μ l und eine zweite auf 700 μ l ein.
22. Entfernen Sie den Überstand wie unten beschrieben und achten Sie darauf, die gDNA nicht abzusaugen (Siehe [Schulungsvideo](#), 1:15):
- Winkeln Sie das gesamte Rack in einem 45°-Winkel an, indem Sie es in einer Hand halten (das gesamte Gerät von unten mit den Röhren für Sie sichtbar und den Deckeln zur anderen Hand fassen).
 - Warten Sie 2 Sekunden, bis gDNA auf der Nanobind Disk liegt.
 - Entfernen Sie langsam die gesamte Flüssigkeit mit einer 1.000 μ l extralangen Spitze, die abgewinkelt von der Nanobind Disk und/oder der gDNA ist, um Störungen zu vermeiden.
 - 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.
23. Führen Sie die WB1 Wäsche durch (siehe [Schulungsvideo](#), 2:21): Pipettieren Sie 700 μ l WB1-Puffer direkt auf die Disk in den Röhren und Kappenröhren.
- Heben Sie das durchsichtige Röhrengestell an, um es von der Magnetbasis zu trennen.

- b. Drehen Sie das durchsichtige Gestell mit den Röhrchen 10 Mal um 180° um, um es zu waschen.
- c. Stellen Sie das durchsichtige Röhrchengestell und die Röhrchen mit Magnetboden, wie in Schritt 20 beschrieben, erneut auf.
- d. Entfernen Sie den Überstand, wie in Schritt 22 beschrieben.

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

24. Stellen Sie die zweite Pipette auf 500 µl (vorher auf 700 µl).

25. WB2 Wäsche durchführen:

- a. Pipettieren Sie 500 µl 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 20-mal um 180° um, um es zu waschen.
- d. Stellen Sie das durchsichtige Röhrchengestell und die Röhrchen mit Magnetboden, wie in Schritt 20 beschrieben, erneut auf.
- e. Entfernen Sie den Überstand, wie in Schritt 22 beschrieben.

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

26. Wiederholen Sie die WB2 Wäsche, Schritt 25.

 Wenn die mit dem Nanobind verbundene gDNA nach 20 Inversionen immer noch Farbe hat, siehe Fehlerbehebung

- 27. Öffnen Sie den Röhrchendeckel vollständig (parallel zum Labortisch) und heben Sie jedes Röhrchen vom Boden ab.
- 28. In unmittelbarer Nähe eines 0,5-ml-Protein-LoBind-Röhrchens die Nanobind Disk mit dem Bionano Prep SP Magnetic Retriever auf das 0,5-ml-Protein-LoBind-Röhrchen übertragen (siehe Abschnitt „Wichtige Hinweise“ für die richtige Verwendung). Röhrchen verschließen, um das Austrocknen der Disk zu verhindern (siehe [Schulungsvideo](#), 7:30).

 Stellen Sie sicher, dass die gDNA während der Überführung an der Disk haften bleibt.

29. Drehen Sie das Protein LoBind-Röhrchen in einer Tischmikrozentrifuge für 5 Sekunden.

30. Entfernen Sie alle Flüssigkeitsreste am Boden des Röhrchens mit einer 10 µl-Standardspitze.

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

31. 65 µl Puffer EB in das Protein LoBind-Röhrchen geben.

32. Drehen Sie das Röhrchen 5 Sekunden lang auf einer Tischmikrozentrifuge.

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

34. Inkubieren Sie die eingetauchte Nanobind Disk in Puffer EB bei Raumtemperatur für 20 Minuten.
35. Sammeln Sie gDNA, indem Sie das Eluat in das markierte 2,0-ml-Mikrozentrifugenröhrchen mit einer Standard-200- μ l-Spitze überführen.
36. Drehen Sie das Röhrchen mit der Nanobind Disk auf einer Tischmikrozentrifuge für 5 Sekunden und übertragen Sie das gesamte verbleibende Eluat, das viskose gDNA enthält, in das gleiche markierte 2,0-ml-Mikrozentrifugenröhrchen wie im vorherigen Schritt mit einer Standard-200- μ l-Spitze. Sie können die Disk entfernen, bevor Sie den restlichen Elutionspuffer absaugen.

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

Homogenisierung der gDNA-Lösung (70 Minuten)

gDNA-Homogenisierung

37. Das gesamte gDNA-Volumen langsam in eine 200- μ l-Standardspitze ansaugen und dann die gDNA langsam pipettieren. Vermeiden Sie Blasenbildung.
 - Wiederholen Sie diesen Vorgang 5-mal für insgesamt 6 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.

38. 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.

Hinweis: Um die Verfahrenszeit zu minimieren, können die Mikrozentrifugenröhrchen über Nacht auf dem Hula-Mixer belassen werden, wenn der Mixer so konfiguriert ist, dass er nach 1 Stunde stoppt. Am nächsten Tag die Röhrchen auf einer Tischmikrozentrifuge 2 Sekunden lang zentrifugieren, um die gDNA vor der Quantifizierung auf den Boden des Röhrchens zu bringen.

39. 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

Weitere Informationen zum Qubit dsDNA BR Assay Kit finden Sie im Benutzerhandbuch des Qubit dsDNA BR Assay Kits und befolgen Sie die im Abschnitt Wichtige Hinweise „Pipettieren von viskoser genomischer DNA (gDNA)“ beschriebenen Methoden, um ein genaues Pipettieren von viskoser gDNA zu gewährleisten.

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

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

2. Qubit BR Puffer zu 0,5 ml Qubit Assay Tubes hinzufügen:

- a. Für jede Probe 18 µl Qubit BR Buffer in drei separate Qubit Assay Tubes geben.
- b. Für die Qubit-Standards 10 µl Qubit BR-Puffer in zwei separate Qubit-Teströhrchen geben.

3. Mischen Sie das gesamte gDNA-Probenvolumen mit einer 200-µl-Pipette mit einer Spitze mit weiter Öffnung vorsichtig durch 5-maliges Auf- und Abpipettieren, wobei darauf zu achten ist, dass keine Blasen entstehen.

4. Verwenden einer frischen 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. Notieren Sie die Werte unten.

10. Der Variationskoeffizient ($CV = \text{Standardabweichung}/\text{Mittelwert}$) von drei Messwerten sollte $\leq 0,30$ betragen. Aufnahme unten.

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 45-90 ng/ul.

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

Markierung

DNA ist bereit für die Markierung gemäß [Direct Label and Stain \(DLS\) \(30206\)](#). Siehe Abschnitt „Kits und Verbrauchsmaterialien“ unter <https://bionanogenomics.com/support/> für anwendbare Kits und Protokolle.

Anhang A: Zugabe von DNA-Stabilisator zu aufgetautem humanem Heparin-Knochenmarkspirat

Einrichten

- Überprüfen Sie den Zugang zu einer Mikrozentrifuge mit variabler Geschwindigkeit (400-16.000 x g).
- Um signifikante Schwankungen der WBC-Konzentration in heparinisierter BMA aus Humanproben zu berücksichtigen, sollten zwei 500- μ l-Aliquots von jedem aufgetauten heparinisierten BMA gefiltert und gepoolt werden. Markieren Sie für jedes 500- μ l-Volumen der aufgetauten BMA-Probe ein 2,0-ml-Mikrozentrifugenröhrchen und setzen Sie einen BMA-Filter auf das Röhrchen.
- Wasserbad auf 37 °C einstellen. Überprüfen Sie die Temperatur mit einem Thermometer.

Heparin-Knochenmarkspirat auftauen, ansaugen, filtern und DNA-Stabilisator hinzufügen

1. Verarbeitung einer Probe nach der anderen:

- a. Gefrorenes heparinisierendes BMA aus dem -80°C Gefrierschrank nehmen und 2 Minuten lang in einem 37°C warmen Wasserbad auftauen (unter der Annahme von ~ 2 ml im Röhrchen) unter Verwendung eines schwimmenden Röhrchengestells. Aus dem Wasserbad nehmen und bei Raumtemperatur aufbewahren.

Hinweis: Die zum Auftauen benötigte Zeit hängt davon ab, wie viel Volumen des gefrorenen Knochenmarkspirats zum Auftauen vorhanden ist. Bei Volumen ≤ 1 ml sollten 2 Minuten Auftauen bei 37°C ausreichend sein. Bei größerem Volumen, z. B. $\geq 4,8$ ml, können bis zu 8 Minuten Auftauen erforderlich sein.

- b. Das aufgetaute BMA-Röhrchen zum Mischen 10-mal umdrehen und **eine Sekunde lang** pulscentrifugieren, um Material vom Deckel des Mikrozentrifugenröhrchens zu sammeln.
- c. Überführen Sie 500 μ l aufgetaute BMA-Probe auf jeden der zwei BMA-Filter, die auf markierten 2,0-ml-Mikrozentrifugenröhrchen sitzen.

Hinweis: Wenn das Ausgangsmaterial weniger als 1 ml beträgt, dann fügen Sie jedem Filter dasselbe Probevolumen hinzu.

- d. Stellen Sie die Röhrchen mit den eingesetzten Filtern vorsichtig in die Tischmikrozentrifuge und zentrifugieren Sie sie 5 Minuten lang bei 400 x g bei Raumtemperatur.

Hinweis: Richten Sie die Mikrozentrifugenröhrchen mit Filtereinsatz so aus, dass die Kappen zur Rotormitte zeigen.

- e. Entfernen Sie die Röhrchen mit eingesetzten Filtern vorsichtig aus der Zentrifuge und entsorgen Sie die Filter in einem Bioabfallbehälter.
- f. Mischen Sie das gesamte Volumen des Knochenmarkspirats vorsichtig mit einer Pipette **eine Sekunde lang**, um Material vom Deckel des Mikrozentrifugenröhrchens zu sammeln.
- g. Nach dem Pipettieren die beiden gefilterten Probevolumen in einem der 2-ml-Röhrchen poolen.
- h. Das Röhrchen mit dem gefilterten Knochenmarkspiratpool verschließen und 10-mal umdrehen, dann **eine Sekunde lang** pulscentrifugieren, um Material vom Deckel des Mikrozentrifugenröhrchens zu sammeln.
- i. Überführen Sie das maximal **gemessene** Volumen in ein markiertes 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen.

- j. Fügen Sie dem gefilterten gepoolten BMA die entsprechende Menge an DNA-Stabilisator nach folgender Gleichung hinzu: $\mu\text{l zuzugebender DNA-Stabilisator} = 15 \times [\mu\text{l des gefilterten BMA}]/1000$.
- k. Das Röhrchen zum Mischen verschließen und 10-mal umdrehen, dann das Röhrchen **eine Sekunde lang** pulszentrifugieren, um jegliches Material vom Deckel des Mikrozentrifugenröhrchens zu sammeln. Fahren Sie mit Schritt 3b des „Bionano Prep SP BMA DNA-Isolationsprotokoll“ fort.

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 Scheibe 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. Entfernen Sie das Rack-Röhrchen vom Magneten und drehen Sie das Rack 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 mit dem Nanobind assoziierte gDNA hat auch in der zweiten WB2 Wäsche noch Farbe

Beweis: Nach 20 Inversionen in der zweiten WB2 Wäsche hat die mit dem Nanobind assoziierte gDNA immer

noch Farbe Zu befolgende Schritte:

1. Heben Sie das durchsichtige Rack an, um es von der Magnetbasis zu trennen.
2. Stellen Sie das durchsichtige Gestell auf den Kopf, so dass die NanoBind-Disks in den Röhrchenkappen ruhen und **schütteln Sie das Röhrchengestell kontinuierlich 10 Sekunden lang**, wobei Sie darauf achten, dass die Nanobind-Disks beim Schütteln die gesamte Spannweite der Mikrozentrifugenröhrchen von oben nach unten durchlaufen.
3. Arrangieren Sie das durchsichtige Röhrchengestell und die Röhrchen mit Magnetfuß erneut, wie in Schritt 20 auf Seite 15 beschrieben.
4. Entfernen Sie den Überstand wie in Schritt 22 auf Seite 16 beschrieben.

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 ng/μL.

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.

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