



Protocollo di Isolamento del DNA dell'aspirato di midollo osseo (BMA) Bionano Prep SP BMA v2

Numero documento: 30399

Revisione documento: A

Sommario

Avviso legale	3
Cronologia delle revisioni.....	4
Panoramica del flusso di lavoro	5
Kit di isolamento del DNA dell'aspirato del midollo osseo (BMA) Bionano Prep SP e materiali forniti dall'utente	6
Contenuto del kit di isolamento del DNA dell'aspirato di midollo osseo (BMA) Bionano Prep SP v2 (Parte num. 90057, 10 preparazioni)	6
Materiali forniti dall'utente.....	6
Introduzione e note importanti.....	8
Introduzione:	8
Note importanti:.....	8
Protocollo di Isolamento del DNA dell'aspirato di midollo osseo (BMA) Bionano Prep SP BMA v2	12
Preparazione per l'isolamento del gDNA	12
Isolamento gDNA (~3 ore).....	12
Omogeneizzazione della soluzione di gDNA (70 minuti)	19
Quantificazione del gDNA (45 minuti).....	19
Appendice A: aggiunta di stabilizzatore di DNA all'aspirato di midollo osseo umano scongelato in eparina	22
Risoluzione dei problemi.....	24
Il gDNA associato al Nanobind ha ancora colore nel secondo lavaggio WB2.....	24
Il gDNA non è omogeneo prima dell'etichettatura.....	24
Il gDNA non è viscoso	25
Assistenza tecnica	26

Avviso legale

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

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

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

Brevetti

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

Marchi di Fabbrica

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

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

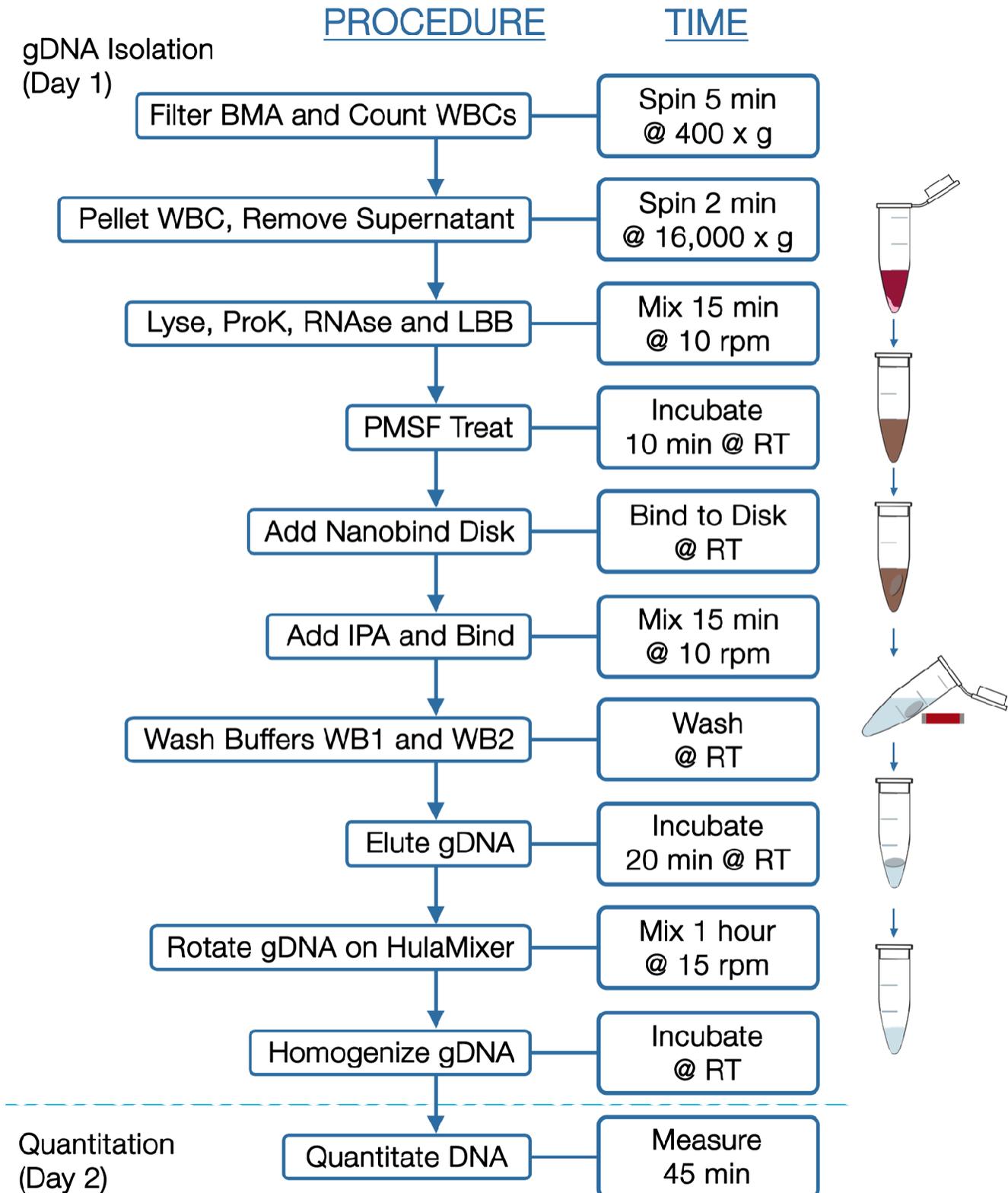
Nessuna licenza per l'uso di marchi di Bionano Genomics è data o implicita. Gli utenti non sono autorizzati a utilizzare questi marchi senza il previo consenso scritto di Bionano Genomics. L'uso di questi marchi o di qualsiasi altro materiale, ad eccezione di quanto consentito nel presente documento,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

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

Cronologia delle revisioni

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

Panoramica del flusso di lavoro



Kit di isolamento del DNA dell'aspirato del midollo osseo (BMA) Bionano Prep SP e materiali forniti dall'utente

Contenuto del kit di isolamento del DNA dell'aspirato di midollo osseo (BMA) Bionano Prep SP v2 (Parte num. 90057, 10 preparazioni)

Contenuto del kit di isolamento del DNA di cellule e sangue Bionano Prep SP v2 (N. codice 80042, 10 reazioni)

Articolo	Quantità	Numero di parte	Stoccaggio
Nanobind Disk da 4 mm	10 dischi	20402	Temperatura ambiente (18-25°C)
Provette per microcentrifuga Protein LoBind, 1,5 ml	10 tubi	20422	Temperatura ambiente (18-25°C)
Provette per microcentrifuga Protein LoBind, 0,5 ml	10 tubi	20421	Temperatura ambiente (18-25°C)
Enzima RNasi A	200 microlitri	20373	Refrigerare (4°C)
Stabilizzatore del DNA	350 µl	20423	Temperatura ambiente (18-25°C)
Provette per microcentrifuga standard, 2,0 ml	10 tubi	20396	Temperatura ambiente (18-25°C)
Buffer cellulare	50 ml	20374	Temperatura ambiente (18-25°C)
Enzima della proteinasi K	0,5 ml	20372	Temperatura ambiente (18-25°C)
Lisi e tampone di legame (LBB)*	2,5 ml	20375	Temperatura ambiente (18-25°C)
Tampone di lavaggio 1 concentrato (2,5X) (WB1)*	3,25 ml	20376	Temperatura ambiente (18-25°C)
Tampone di lavaggio 2 concentrato (2,5X) (WB2)	5 ml	20377	Temperatura ambiente (18-25°C)
Tampone di eluizione (EB)	1,1 ml	20378	Temperatura ambiente (18-25°C)
Guaina in plastica per il recupero del disco magnetico	10	20381	Temperatura ambiente (18-25°C)

*Vedere la sezione Note importanti per informazioni sui rifiuti pericolosi

Bionano Prep SP BMA Add-On (Parte # 80037, 10 reazioni)

Articolo	Quantità	Numero di parte	Stoccaggio
Stabilizzatore del DNA	4 ml	20398	Temperatura ambiente (18-25°C)
Provette per microcentrifuga standard, 2,0 ml	tubi 2 x 10	20396	Temperatura ambiente (18-25°C)
Filtri BMA, 100 µm	20 filtri	20401	Temperatura ambiente (18-25°C)

Materiali forniti dall'utente

Articolo	Fornitore	Catalogo num.
Giorno 1 – Pellettatura, isolamento del gDNA e omogeneizzazione		
Bionano Prep SP Magnetic Retriever (confezione da 2)	Bionano Genomics	80031
Analizzatore di globuli bianchi HemoCue	Distributore Fisher Scientific (per gli Stati Uniti) (al di fuori degli Stati Uniti)	22-601-017
Microcuvette HemoCue	Fisher Scientific	22-601-018
Bilanciere per provette Vari-Mix	Thermo Fisher o equivalente	M48725Q
Portaprovette magnetico DynaMag-2	Thermo Fisher	12321D
HulaMixer Sample Mixer	Thermo Fisher	15920D
Provette per microcentrifuga, 1,5 ml, prive di nucleasi	VWR	87003-294
Soluzione di fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), 100 mM	Sigma-Aldrich	93482
Etanolo, 200 prove, grado di biologia molecolare	Sigma-Aldrich	E7023
Isopropanolo (IPA), ≥ 99,5%, grado di biologia molecolare	Fisher Scientific	A461-212
Concentrato disinfettante, TexQ TX651	Texwipe	TX651
Candeggina per lo smaltimento del sangue	Fornitore di laboratorio generale	
Provette coniche per centrifuga, 50 ml, PP	Thermo Fisher o equivalente	14-432-22
Microcentrifuga a velocità variabile (400-16.000 x g spin)	Fornitore di laboratorio generale	
Bagnomaria, 37°C	Fornitore di laboratorio generale	
Secchiello per il ghiaccio e ghiaccio	Fornitore di laboratorio generale	
Pipette monouso sterili da 5 e 10 ml (TD+)	Fornitore di laboratorio generale	
Mini microcentrifuga da banco (2.200 spin xg)	Labnet	C1301B
Pinze a punta	Scienze della microscopia elettronica o equivalenti	78141-01
Puntali per pipette a foro largo, filtrati, aerosol, 200 µl	Equivalente VWR o Rainin	46620-642
Puntali extra lunghi da 1000 µl, sterili	Equivalente VWR o Rainin	16466-008
Pipette (10, 20, 200 e 1.000 µl) e prive di nucleasi, puntali per pipette filtrati	Fornitore di laboratorio generale	
Parafilm	Fornitore di laboratorio generale	

Giorno 2 - Quantificazione		
Vortex da banco	Fornitore di laboratorio generale	
Sonicator da bagno (opzionale)	Branson o equivalente	CPX 952-119R
Tubo Conico da 15 ml	Fisher Scientific	05-539-12
Fluorometro, Qubit	Thermo Fisher o equivalente	Q33216
Kit di analisi del dsDNA Qubit® BR (ampia gamma)	Thermo Fisher o equivalente	Q32853
Tubi per test Qubit	Thermo Fisher	Q32856
Pipetta a spostamento positivo MR-10 (opzionale)	Rainin o equivalente	17008575
Puntali per pipette, 10 ul, C-10 per pos. Displ. Pipetta (opzionale)	Rainin o equivalente	17008604

Introduzione e note importanti

Introduzione:

Questo Protocollo di Isolamento del DNA v2 dell'aspirato midollare (BMA) Bionano Prep® SP BMA può fornire gDNA ad altissimo peso molecolare (UHMW) in meno di quattro ore. Utilizza una procedura di lisi, legame, lavaggio ed eluizione comune per le tecnologie di estrazione del gDNA a base di silice in combinazione con un nuovo disco paramagnetico. A differenza delle sfere magnetiche e delle colonne spin di silice, che tagliano il gDNA di grandi dimensioni, il Nanobind Disk si lega e rilascia il gDNA con una frammentazione significativamente inferiore, con conseguente gDNA UHMW. L'elevata capacità di legame del gDNA è il risultato di una nuova silice nanostrutturata all'esterno del disco paramagnetico termoplastico. Questo protocollo è stato testato elaborando diversi aspirati di midollo osseo, con gli aspirati di midollo osseo del donatore elaborati fino a due alla volta. DNA Stabilizer è stato aggiunto a un volume di 1 ml di aspirato di midollo osseo umano fresco prelevato in una provetta di eparina che è stata congelata e quindi trattata senza ulteriori cicli di congelamento/scongelo. Il gDNA preparato utilizzando questo protocollo è stato testato solo con l'etichettatura DLS. Vedere [Video di formazione](#) per passaggi tecnicamente critici e risoluzione dei problemi. L'attuale flusso di lavoro è impostato in modo tale che quattro BMA possano essere comodamente elaborati in una tipica giornata lavorativa, con due BMA al mattino e due al pomeriggio.

Panoramica

La lisi cellulare, la digestione della proteinasi K e dell'RNasi avviene in un tampone caotropico e il gDNA rilasciato si lega al Nanobind Disk dopo l'aggiunta di isopropanolo. Dopo tre fasi di lavaggio, il disco viene trasferito in una nuova provetta e il gDNA viene eluito dal disco. Il gDNA UHMW recuperato viene sottoposto a taglio limitato per rendere il gDNA UHMW più omogeneo. Il gDNA viene quindi miscelato ed equilibrato durante la notte a temperatura ambiente per facilitare l'omogeneità del DNA e viene determinata la concentrazione. Il tipico intervallo di dimensioni del gDNA va da 50 Kbp a ≥ 1 Mbp.

Note importanti:

Omogeneità del DNA

Il gDNA recuperato viene sottoposto a miscelazione mediante pipetta con un puntale standard da 200 μ l per aumentare l'omogeneità, garantendo un campionamento coerente del DNA per l'etichettatura.

Quantificazione del gDNA

La quantificazione del gDNA viene utilizzata per misurare la concentrazione e funge da indicatore dell'omogeneità del gDNA UHMW. La quantificazione Qubit è preferita rispetto ad altri metodi di quantificazione poiché può essere utilizzata anche per misurare la concentrazione di gDNA della reazione di etichettatura. Il saggio dsDNA Qubit Broad Range (BR) misura la concentrazione di gDNA dopo l'isolamento, mentre il saggio dsDNA ad alta sensibilità (HS) misura la concentrazione di gDNA dopo l'etichettatura.

Per misurare l'omogeneità del gDNA, è essenziale misurare la concentrazione di gDNA in più posizioni nella soluzione. Poiché il gDNA viscoso è difficile da pipettare, seguire le linee guida nelle Note importanti per un pipettaggio accurato.

I saggi standard per la quantificazione della concentrazione di gDNA non forniranno misurazioni accurate del gDNA lungo a causa della sua natura viscosa.

- Per una quantificazione accurata è necessaria un'efficace frammentazione del gDNA campionato tramite sonicazione o vortex su vasta scala.
- Il coefficiente di variazione (CV) di tre campioni unici deve essere inferiore o uguale a 0,30. CV = deviazione standard/media.
- La concentrazione tipica di gDNA è 45-90 ng/μl.

Pipettaggio di DNA genomico viscoso (gDNA)

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

Gestione del gDNA

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

Caratteristiche del gDNA di alta qualità per la mappatura di Bionano

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

Dimensione del lotto

Si consiglia di elaborare fino a quattro campioni alla volta, con un massimo di otto campioni al giorno di cui quattro al mattino e quattro al pomeriggio.

Utilizzo del Bionano Prep SP Magnetic Retriever

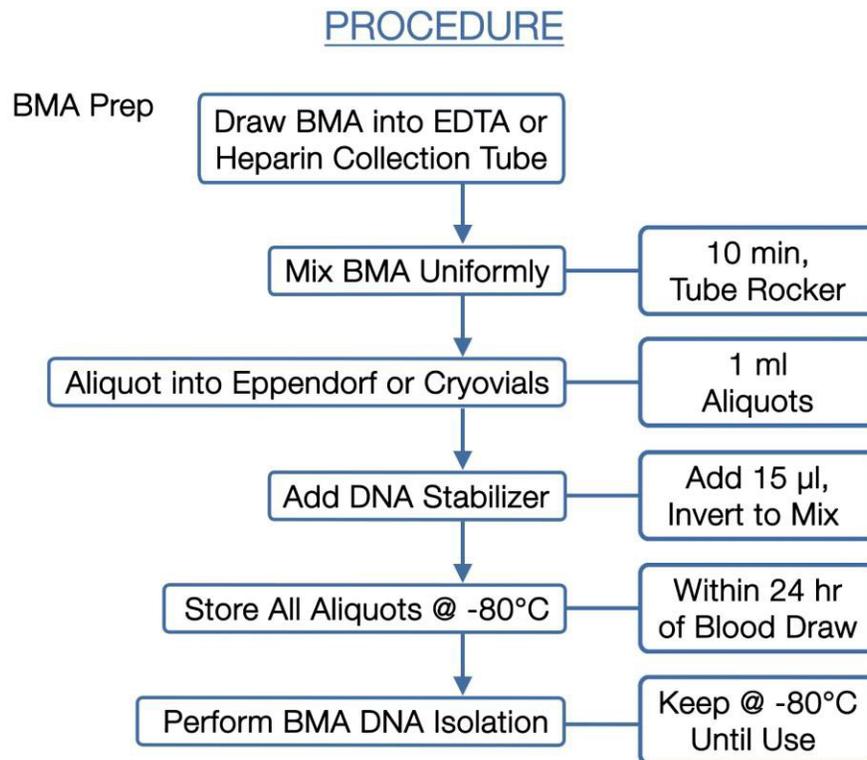
- a. Tenere una guaina di plastica sui lati vicino alla parte superiore e inserire il Bionano Magnetic SP Disk Retriever nella guaina, posizionandolo in modo che si trovi nella parte inferiore della guaina.
- b. Inserire il retriever inguainato nella provetta per microcentrifuga Protein LoBind per attirare il Nanobind Disk verso il retriever nella guaina.
- c. Sollevare con cautela il retriever inguainato con il disco legato fuori dal tubo e inserire il retriever inguainato in una nuova provetta per microcentrifuga Protein LoBind.
- d. Tenendo la guaina sul lato vicino alla parte superiore, con una mano tirare il retriever fino a quando il Nanobind Disk si dissocia dalla guaina e cade nel nuovo tubo.
- e. Cambio guaina per ogni nuovo campione.

Smaltimento dei rifiuti pericolosi

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

Congelamento di aspirati midollari umani eparinizzati freschi per la conservazione con stabilizzatore del DNA

Il contenuto di gDNA è ottenuto dai globuli bianchi (WBC). Per ogni campione di BMA, due aliquote di BMA eparinizzate (~1 ml ciascuna) devono essere congelate (-80°C) in provette separate e conservate senza scongelamento fino all'isolamento del gDNA. In genere, per questo protocollo sarà richiesta solo un' aliquota, mentre la seconda fungerà da backup. I campioni devono essere congelati entro 24 ore dall'aspirazione, conservare a 4°C fino al congelamento a -80°C.



- a. Mescolare accuratamente il BMA umano eparinizzato fresco a temperatura ambiente per garantire una buona uniformità (15 minuti su un bilanciante a temperatura ambiente).
- b. Elaborando un campione di BMA alla volta, trasferire due aliquote da 1 ml in provette da 1,5 ml prive di DNAsi/RNAsi.
- c. Aggiungere 15 µl di DNA Stabilizer a ciascuna provetta contenente il volume di 1 ml di aspirato di midollo osseo umana fresco.
- d. Tappare le provette, capovolgerle 10 volte per miscelare, quindi far girare le provette a impulsi **per un secondo** per raccogliere qualsiasi materiale dal coperchio della provetta per microcentrifuga e spostare immediatamente le aliquote a -80°C per la conservazione a lungo termine.
- e. Non scongelare un'aliquote da -80°C fino a quando non si procede con l'isolamento del gDNA.

Protocollo di Isolamento del DNA dell'aspirato di midollo osseo (BMA)

Bionano Prep SP BMA v2

Preparazione per l'isolamento del gDNA

Prima del primo utilizzo

- Verificare l'accesso a una microcentrifuga a velocità variabile (400 - 16.000 xg).
- Il PMSF si decompone rapidamente in soluzioni acquose. Creare aliquote di 120 microlitri in provette con tappo a vite da 1,5 ml e conservare il brodo e le aliquote a 4°C. Ogni aliquota sarà sufficiente per dieci isolamenti di gDNA.
- Aggiungere il 100% di etanolo ai tamponi di lavaggio (WB1 e WB2), mescolare accuratamente e selezionare le caselle "Etanolo aggiunto":
 - Aggiungere 5 ml di etanolo al 100% al tampone di lavaggio 1 (WB1) per un volume finale di 8,25 ml.
 - Aggiungere 7,5 ml di etanolo al 100% al tampone di lavaggio 2 (WB2) per un volume finale di 12,5 ml.

Impostazione

- Raccogliere i materiali (vedere la sezione "Materiale fornito dall'utente" sopra).
- Per lo smaltimento dei rifiuti, preparare:
 - Una conica da 50 ml con 5 ml di candeggina + 20 ml di acqua; capovolgere più volte per mescolare.
 - Un cono da 50 ml con 100 µl di decontaminante TexQ per campione (smaltito come rifiuto pericoloso).
- Per ogni campione, etichettare una provetta per proteine LoBind da 0,5 ml (Bionano), una provetta per proteine LoBind da 1,5 ml (Bionano) e tre provette per microcentrifuga da 2,0 ml (Bionano).
 - Porre un filtro BMA (Bionano) in due delle provette per microcentrifuga da 2,0 ml etichettate.
- Capovolgere le provette di PMSF, proteinasi K (Bionano) e RNAsi (Bionano) tre volte per miscelare, girare brevemente. Mettere PMSF e RNase sul ghiaccio.
- Preparare una striscia di Parafilm (~2 cm) per HemoCue, micro cuvette pronte e [sistema HemoCue](#).
- Impostare il bagnomaria a 37°C. Verificare la temperatura con il termometro.

Isolamento gDNA (~3 ore)

Scongelare fino a quattro aliquote di aspirato midollare contenenti stabilizzatore di DNA, globuli bianchi in pellet e rimuovere il surnatante.

Nota: vedere il video [Demo contatore globuli bianchi HemoCue](#) sul corretto funzionamento di HemoCue.

1. Per ogni campione, rimuovere una singola aliquota da 1 ml di BMA eparinizzato congelato contenente DNA Stabilizer dal congelatore a -80°C e scongelare in un bagnomaria a 37°C per 2 minuti utilizzando un portaprovette galleggiante. Rimuovere le aliquote dal bagnomaria e conservare a temperatura ambiente.

Nota importante: se non si è sicuri se il DNA Stabilizer sia stato aggiunto all'aliquota da 1 ml di BMA eparinizzato prima del congelamento, aggiungere 15 µl di DNA Stabilizer alla provetta dopo lo scongelamento e procedere al passaggio 2. Se la BMA eparinizzata congelata non si trova in un'aliquota da 1 ml con stabilizzatore del DNA aggiunto, fare riferimento all'Appendice A.

2. Elaborazione simultanea delle aliquote da un massimo di quattro campioni:

- a. Capovolgere le provette di aliquota BMA 10 volte per miscelare, quindi far girare le provette **a impulsi per un secondo** per raccogliere qualsiasi materiale dal coperchio della provetta per microcentrifuga.
- b. Per ogni campione BMA scongelato, trasferire 500 µl in due filtri BMA separati inseriti in provette per microcentrifuga da 2,0 ml etichettate.
- c. Posizionare con cautela le provette con i filtri inseriti nella microcentrifuga da banco e centrifugare per 5 minuti a 400 xg a temperatura ambiente.

Nota: orientare le provette per microcentrifuga con inserti filtranti in modo che i cappucci siano rivolti verso il centro del rotore.

- d. Rimuovere con cautela le provette dalla centrifuga e gettare i filtri in un contenitore per rifiuti Biohazard.
- e. Pipettare delicatamente miscelare l'intero volume del BMA filtrato 10 volte con un puntale da 1.000 µl.
- f. Dopo aver miscelato la pipetta, unire i due volumi di campione filtrati in una delle provette da 2 ml.
- g. Chiudere e capovolgere la provetta contenente il midollo osseo raccolto e filtrato, aspirare 10 volte per miscelare, quindi far girare a impulsi la provetta **per un secondo** per raccogliere il materiale dal coperchio.

3. Determinare la conta leucocitaria un campione alla volta:

- a. Pipettare delicatamente l'intero volume del BMA filtrato 10 volte per miscelare, quindi far girare il tubo a impulsi per un secondo per raccogliere qualsiasi materiale dal coperchio.
- b. Dispensare immediatamente 20 µl su Parafilm e utilizzare la cuvetta HemoCue per misurare i globuli bianchi.
- c. Registrare la lettura di HemoCue nella tabella nella pagina successiva.
- d. Eseguire i seguenti calcoli per compilare la tabella in questa sezione per ogni campione:
 - Volume da trasferire (µl) = $1.500 \div \text{Lettura con HemoCue}$
 - Volume di rimozione (µl) = (Volume di trasferimento – 40 µl)

Nota: l'HemoCue fornisce letture in cellule/L, ma il calcolo si basa su cellule/µl per aliquota $1,5 \times 10^6$ globuli bianchi.

Calcolo: µl di sangue per 1,5 milioni di cellule = $1,5 \times 10^6$ (cellule)/conta leucocitaria (cellule/µl).

Nota: se la concentrazione di globuli bianchi nel BMA contenente lo stabilizzatore del DNA è elevata e non rientra nell'intervallo di rilevamento, il display dello strumento HemoCue visualizzerà "HHH". Tipicamente, i BMA che danno una lettura HemoCue di 'HHH' possono essere diluiti in Cell Buffer e poi ricontati per determinare con precisione la concentrazione di globuli bianchi nell'aspirato midollare (vedere sotto).

Per un aspirato midollare concentrato che visualizza "HHH" solo per la lettura iniziale con HemoCue:

Determinare la conta leucocitaria un campione alla volta:

- e. Capovolgere la provetta per le aliquote del midollo osseo 10 volte per miscelare, quindi far girare la provetta a impulsi per un secondo per raccogliere il materiale dal coperchio.

- f. Trasferire immediatamente 25 µl di aspirato midollare in una provetta da 1,5 ml contenente 75 µl di tampone cellulare (per ottenere una diluizione 1:4 del midollo osseo).
- g. Pipettare miscelare delicatamente l'intero volume 10 volte con un puntale standard da 200 µl.
- h. Dispensare immediatamente 20 µl su Parafilm e utilizzare la cuvetta HemoCue per misurare i globuli bianchi.
- i. Eseguire il seguente calcolo per determinare la concentrazione di globuli bianchi del campione e registrare la lettura HemoCue nella tabella nella pagina successiva:
 - $\text{Letture HemoCue} \times 4 = \text{Letture HemoCue non diluito}$
- j. Eseguire i seguenti calcoli per compilare la tabella in questa sezione per ogni campione:
 - $\text{Volume da trasferire } (\mu\text{l}) = 1.500 \div \text{lettura con HemoCue non diluito}$
 - $\text{Volume di rimozione } (\mu\text{l}) = (\text{Volume di trasferimento} - 40 \mu\text{l})$

Nota: se il volume di trasferimento è 40 µl, non è necessario alcun volume di rimozione per il campione. Se il volume di trasferimento è < 40 µl, determinare la quantità di tampone cellulare da aggiungere al campione al punto 4.

- $\text{Volume di aggiunta tampone cellulare } (\mu\text{l}) = (40 \mu\text{l} - \text{Volume di trasferimento})$

Nota: l'HemoCue fornisce letture in cellule/L, ma il calcolo si basa su cellule/µl per aliquota $1,5 \times 10^6$ globuli bianchi.

Calcolo: µl di sangue per 1,5 milioni di cellule = $1,5 \times 10^6$ (cellule)/conta leucocitaria (cellule/µl).

4. Dopo aver contato i globuli bianchi, invertire ogni BMA filtrata 10 volte per miscelare, girare a impulsi per un secondo per raccogliere il materiale dal coperchio della provetta per microcentrifuga. Utilizzando una pipetta impostata su [Volume di trasferimento], trasferire il volume di BMA nella provetta Protein LoBind da 1,5 ml precedentemente etichettata.
 - a. **Se il [Volume di trasferimento] determinato al passaggio 3 = 40 µl**, non completare i passaggi 5 e 6 e passare al passaggio 7.
 - b. **Se il [Volume di trasferimento] determinato nel passaggio 3 è < 40 µl**, aggiungere Cell Buffer all'aspirato di midollo osseo trasferito a 40 µl, non completare i passaggi 5 e 6 e procedere direttamente al passaggio 7.
 - c. **Se il [Volume di trasferimento] determinato al punto 3 è > 40 µl**, passare al punto 5.
5. Centrifugare le aliquote di BMA bilanciate a 16.000 xg per 2 minuti a temperatura ambiente.

Nota: è utile allineare la cerniera del tubo al bordo esterno della centrifuga, in modo che il pellet sia sempre localizzato sullo stesso lato.

6. Impostare una pipetta appropriata su [Removal Volume] per rimuovere il surnatante con un puntale standard. Dispensare il surnatante nella candeggina conica. Dopo la rimozione, dovrebbero esserci circa 40 µl di soluzione con il pellet WBC.

Nota: angolare il tubo e aspirare molto lentamente dalla parte superiore del menisco liquido, sul lato opposto al pellet. Se il volume dell'aliquota iniziale è $\leq 240 \mu\text{l}$, eseguire la rimozione del surnatante in un unico passaggio. Se il volume dell'aliquota iniziale è $\geq 240 \mu\text{l}$, eseguire la rimozione del surnatante in più passaggi con una punta da 200 µl, cambiando la punta ad ogni passaggio. Una volta che

il surnatante è stato rimosso da tutti i campioni, è possibile riempire la provetta conica contenente candeggina fino a 50 ml con acqua, tappare conica, invertire conica per mescolare e smaltire il contenuto nel lavandino.

ID campione	Non diluito Lettura HemoCue	Volume di trasferimento	Volume di rimozione	Volume tampone cellulare
	cellule/L	µl	µl	µl
	cellule/L	µl	µl	µl
	cellule/L	µl	µl	µl
	cellule/L	µl	µl	µl
	cellule/L	µl	µl	µl
	cellule/L	µl	µl	µl
	cellule/L	µl	µl	µl
	cellule/L	µl	µl	µl

Lisi e digestione dei globuli bianchi

7. Aggiungere 50 ml di proteinasi K (Bionano) direttamente su ogni pellet WBC. Non pipettare la miscela.
8. Aggiungere 20 µl di RNase A (Bionano) a ciascuna provetta. Non pipettare la miscela.
9. Pipettare miscelare il campione 5 volte con un puntale standard da 200 µl impostato su 110 µl per risospesare il pellet.

Nota: tirare su l'intero volume del campione nella punta e ispezionare visivamente la provetta durante la miscelazione per assicurarsi che il pellet venga risospeso completamente durante la miscelazione, in modo tale che alla fine della miscelazione non rimanga alcun pellet visibile sul fondo o sul lato del tubo.

10. Incubare a temperatura ambiente per 3 minuti.
11. Aggiungere 225 µl di tampone LBB ai campioni utilizzando una punta da 1.000 µl. Tappare e capovolgere la provetta 15 volte per miscelare.

Nota: LBB è una soluzione viscosa e schiumosa che aderisce alla punta della pipetta. Erogare lentamente e cambiare i puntali tra un'erogazione e l'altra per garantire l'accuratezza del volume di erogazione.

12. Ruotare i campioni su HulaMixer per 15 minuti a temperatura ambiente a 10 giri/min. Nessun scuotimento/vibrazione.
13. Spingere la provetta a impulsi per 2 secondi per raccogliere il liquido sul fondo della provetta.
14. Aggiungere 10 ml di PMSF 100 mM nella parte liquida del tubo. Tappare e capovolgere la provetta 5 volte per miscelare, far girare a impulsi la provetta per 2 secondi per raccogliere il liquido sul fondo della provetta.
15. Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti.

Legare, lavare ed eluire gDNA

16. Utilizzando una pinza, trasferire con attenzione un singolo Nanobind Disk al lisato.

Nota: i dischi a volte possono restare uniti, assicurarsi che solo un disco venga trasferito nel tubo.

17. Aggiungere 340 µl di isopropanolo al 100% a tutte le provette. Tappare e capovolgere le provette 5 volte per miscelare.
18. Ruotare il campione su HulaMixer per 15 minuti a temperatura ambiente a 10 rpm. Nessun scuotimento/vibrazione.

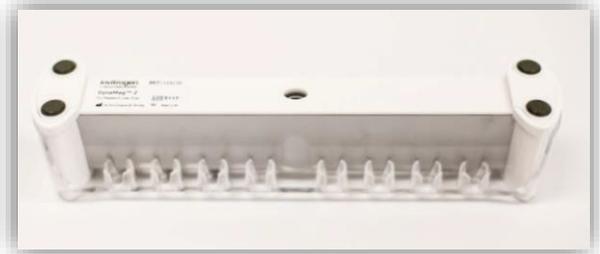
Nota: assicurarsi che il Nanobind Disk non rimanga nel coperchio del tubo durante le rotazioni iniziali. In tal caso, spegnere il rotatore e capovolgere la provetta per microcentrifuga finché il Nanobind Disk non torna nella soluzione. Riposizionare il tubo sull'HulaMixer e riprendere la miscelazione.

19. Esaminare l'associazione del gDNA con Nanobind Disk e invertire per aumentare il legame (vedere [Video di formazione](#), 0:25):
 - a. Collocare le provette del campione in un rack per provette Dynamag trasparente e ispezionare visivamente tutte le provette nel rack per assicurarsi che il gDNA sia collegato al Nanobind Disk.
 - b. Se i filamenti di gDNA sono visibilmente sospesi vicino al fondo del tubo, invertire rapidamente di 180° per portare il gDNA in associazione più stretta con il Nanobind Disk.
 - c. Le inversioni di 180° possono essere eseguite molte volte fino a quando l'associazione del gDNA con il Nanobind Disk non appare invariata.
20. Combina il rack trasparente con la base magnetica come indicato di seguito, assicurandoti che il Nanobind Disk sia fissato dal magnete vicino alla parte superiore del livello del liquido. In caso contrario, ri-rack (vedere [Video di formazione](#), 0:50).

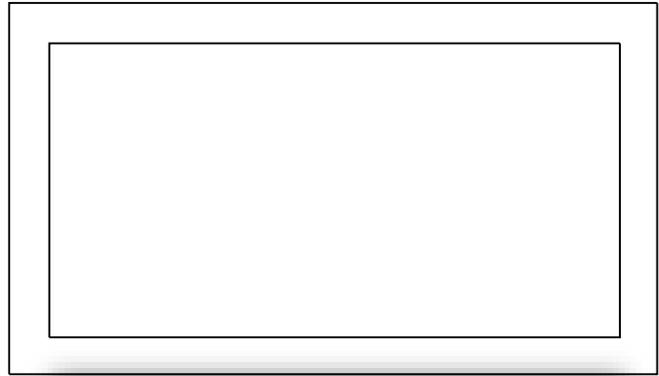
- a. Capovolgere il rack per provette Dynamag trasparente e posizionarlo capovolto con i coperchi dei campioni che toccano la superficie di lavoro. I tubi saranno sulla stessa fila del rack e nella fila più lontana da te.



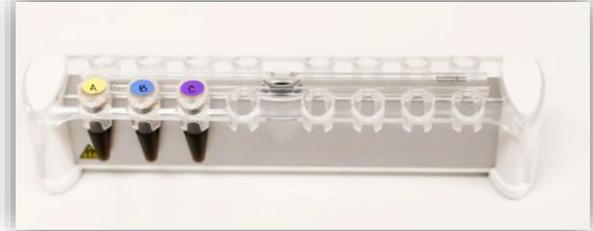
- b. Capovolgere la base magnetica Dynamag e abbassarla sul rack trasparente.



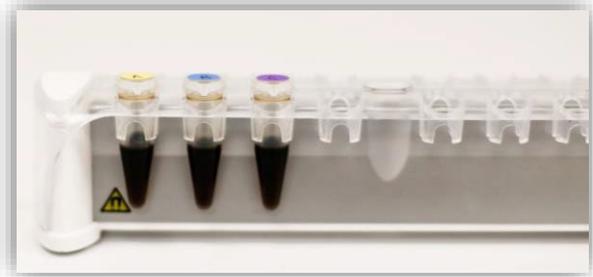
- c. Inclinare lentamente l'apparecchio combinato di 90° verso di sé mentre continua a poggiare sulla superficie. Le provette saranno ora orizzontali e visibili.



- d. Inclinare lentamente l'apparecchio combinato di 90° verso di sé mentre continua ad appoggiarsi sulla superficie, in modo che sia completamente in posizione verticale e i tubi siano rivolti verso di sé.



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



21. Impostare una pipetta da 1.000 µl su 1.000 µl e una seconda su 700 µl.
22. Rimuovere il surnatante come indicato di seguito, facendo attenzione a non aspirare il gDNA (vedere [Video di formazione](#), 1:15):
- Inclinare l'intero rack a un angolo di 45° tenendolo con una mano (afferrando l'intero apparato dal basso con i tubi visibili a te e le palpebre verso l'altra mano).
 - Attendere 2 secondi affinché gDNA si posi sul Nanobind Disk.
 - Rimuovere lentamente tutto il liquido con una punta extra lunga da 1.000 µl angolata lontano dal Nanobind Disk e/o dal gDNA per evitare interruzioni.
 - Dispensare il surnatante in un cono contenente TexQ.
- ⚠ Assicurarsi che il gDNA non venga rimosso ispezionando visivamente la punta contenente il tampone prima di scartare. Se il gDNA viene aspirato accidentalmente o si stacca dal disco, fare riferimento alla sezione Risoluzione dei problemi di seguito.
23. Eseguire il lavaggio WB1 (vedere [Video di formazione](#), 2:21): dispensare 700 µl di tampone WB1 direttamente sui dischi nelle provette e provette con tappo.
- Sollevarle il portaprovette trasparente per separarlo dalla base magnetica.

- b. Capovolgere il cestello trasparente con i tubi a 180° per 10 volte per il lavaggio.
- c. Riposizionare il rack per provette trasparenti e le provette con base magnetica come descritto al passaggio 20.
- d. Rimuovere il surnatante come descritto al punto 22.

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

24. Impostare la seconda pipetta a 500 µl (precedentemente a 700 µl).

25. Eseguire il lavaggio WB2:

- a. Dispensare 500 µl di Buffer WB2 direttamente sui dischi nelle provette e tappare.
- b. Sollevare la cremagliera trasparente per separare dalla base magnetica.
- c. Capovolgere la griglia trasparente di 180° 20 volte per lavare.
- d. Riposizionare il rack per provette trasparenti e le provette con base magnetica come descritto al passaggio 20.
- e. Rimuovere il surnatante come descritto al punto 22.

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

26. Ripetere il lavaggio WB2, passaggio 25.

 Se il gDNA associato al Nanobind ha ancora colore dopo 20 inversioni, vedere Risoluzione dei problemi

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

28. In prossimità di una provetta Protein LoBind da 0,5 ml, trasferire Nanobind Disk nella provetta Protein LoBind da 0,5 ml utilizzando Bionano Prep SP Magnetic Retriever (vedere la sezione Note importanti per un uso corretto). Tappare il tubo per evitare che il disco si secchi (vedere [Video di formazione](#), 7:30).

 Assicurarsi che il gDNA rimanga aderente al disco durante il trasferimento.

29. Girare la provetta Protein LoBind nella microcentrifuga da banco per 5 secondi.

30. Rimuovere tutto il liquido residuo sul fondo della provetta utilizzando un puntale standard da 10 µl.

Nota: è necessario spostare il Nanobind Disk utilizzando la punta per raggiungere il liquido sul fondo del tubo. Muovere la punta con piccoli movimenti circolari per rimuovere tutto il liquido residuo dal fondo del tubo.

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

32. Girare la provetta sulla microcentrifuga da banco per 5 secondi.

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

34. Incubare il Nanobind Disk sommerso nel tampone EB a temperatura ambiente per 20 minuti.
35. Raccogliere il gDNA trasferendo l'eluato nella provetta per microcentrifuga da 2,0 ml etichettata con una punta standard da 200 µl.
36. Girare la provetta con il Nanobind Disk sulla microcentrifuga da banco per 5 secondi e trasferire tutto l'eluato rimanente contenente gDNA viscoso nella stessa provetta per microcentrifuga da 2,0 ml etichettata come nel passaggio precedente con una punta standard da 200 µl. È possibile rimuovere il disco prima di aspirare il tampone di eluizione rimanente.

Nota: quasi tutto il gDNA viscoso fuoriesce dal Nanobind Disk durante la rotazione.

Omogeneizzazione della soluzione di gDNA (70 minuti)

Omogeneizzazione del gDNA

37. Aspirare lentamente l'intero volume di gDNA in una punta standard da 200 µl, quindi dispensare lentamente il gDNA. Evita di creare bolle.

- Ripetere questo processo 5 volte per un totale di 6 colpi (1 colpo = 1 aspirazione e 1 erogazione).

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

38. Posizionare la provetta per microcentrifuga standard da 2.0 ml contenente gDNA nel rack di Hula Mixer Sample Mixer e ruotare a temperatura ambiente per 1 ora a 15 rpm.

Nota: durante le rotazioni iniziali, assicurarsi che il gDNA venga prelevato dal fondo della provetta per microcentrifuga per risiedere nel coperchio della provetta durante le rotazioni. Se la soluzione di DNA rimane sul fondo della provetta durante le rotazioni iniziali, spegnere Hula Mixer e posizionare il rack in modo che la provetta per microcentrifuga sia capovolta. Colpire delicatamente il fondo della provetta per microcentrifuga fino a quando il gDNA viene attirato nel coperchio e riprendere la miscelazione.

Nota: per ridurre al minimo il tempo della procedura, le provette per microcentrifuga possono essere lasciate sull'Hula Mixer durante la notte se il mixer è configurato per l'arresto dopo 1 ora. Il giorno seguente, girare le provette sulla microcentrifuga da banco per 2 secondi per portare il gDNA sul fondo della provetta prima della quantificazione.

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

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

Quantificazione del gDNA (45 minuti)

Quantificazione Qubit - BR dsDNA Assay

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

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

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

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

Rimuovere 2 µl di aliquote dal lato sinistro, medio e destro di ciascun campione e dispensare nel tampone BR della corrispondente provetta Qubit Assay, risciacquando la punta durante l'erogazione. Collocare le provette in un rack galleggiante e sonicare per 10 minuti. Eseguire i passaggi 5 e 6 durante la sonicazione.

Nota: se non è disponibile un sonicatore da bagno, vortexare per almeno 30 secondi alla massima velocità, quindi ruotare brevemente verso il basso per 2 secondi.

5. Preparare la soluzione di lavoro diluendo il Dye Assay Reagent nel tampone di diluizione BR (1:200):
 - a. 200 µl di soluzione di lavoro per ciascuno dei due standard (400 µl totali).
 - b. 200 µl di soluzione di lavoro per ogni aliquota di campione (600 µl per ogni campione).
6. Per gli standard Qubit DNA, aggiungere 10 µl di standard 1 e 2 alle provette contenenti il tampone BR dal passaggio 2b.
7. Una volta completata la sonicazione, recuperare le provette del dosaggio e far girare brevemente l'impulso. Vortexare i tubi per 5 secondi alla massima velocità, quindi girare di nuovo a impulsi.
8. Aggiungere 180 µl di soluzione di lavoro a ciascuna aliquota di DNA sonicato e aliquota Qubit DNA Standard. Vortexare per 5 secondi e far girare le provette a impulsi.
9. Incubare i campioni per almeno 2 minuti, quindi leggere sul fluorometro Qubit. Registrare i valori di seguito.
10. Il coefficiente di variazione (CV = deviazione standard/media) da tre letture dovrebbe essere $\leq 0,30$. Registra sotto.

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

Nota: le concentrazioni tipiche di DNA variano da 45 a 90 ng/ul.

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

Etichettatura

Il DNA è pronto per [Etichettatura e colorazione diretta \(DLS\) \(30206\)](#) etichettatura. Vedere la sezione "Kit e materiali di consumo" su <https://bionanogenomics.com/support/> per kit e protocolli applicabili.

Appendice A: aggiunta di stabilizzatore di DNA all'aspirato di midollo osseo umano scongelato in eparina

Impostazione

- Verificare l'accesso a una microcentrifuga a velocità variabile (400-16.000 xg).
- Per tenere conto della variazione significativa nella concentrazione di globuli bianchi nelle BMA eparinizzate da campioni umani, è necessario filtrare e raggruppare due aliquote da 500 µl di ciascuna BMA eparinizzata scongelata. Per ogni volume di 500 µl di campione BMA scongelato, etichettare una provetta per microcentrifuga da 2,0 ml e posizionare un filtro BMA sulla provetta.
- Impostare il bagnomaria a 37°C. Verificare la temperatura con il termometro.

Scongellare l'aspirato midollare con eparina, filtrare e aggiungere lo stabilizzatore del DNA

1. Elaborazione di un campione alla volta:
 - a. Rimuovere la BMA eparinizzata congelata dal congelatore a -80°C e scongelare a bagnomaria a 37°C per 2 minuti (assumendo ~2 ml nella provetta) utilizzando un portaprovette galleggianti. Togliere dal bagnomaria e conservare a temperatura ambiente.

Nota: il tempo necessario per lo scongelamento varia a seconda della quantità di aspirato midollare congelato da scongelare. Per volumi ≤ 1 ml dovrebbero essere sufficienti 2 minuti di scongelamento a 37°C. Per volumi maggiori, come ≥ 4,8 ml, possono essere necessari fino a 8 minuti di scongelamento.
 - b. Capovolgere la provetta BMA scongelata 10 volte per miscelare, girare a impulsi **per un secondo** per raccogliere il materiale dal coperchio della provetta per microcentrifuga.
 - c. Trasferire 500 µl di campione di BMA scongelato su ciascuno dei due filtri BMA posizionati su provette per microcentrifuga da 2,0 ml etichettate.

Nota: se il materiale di partenza è inferiore a 1 ml, aggiungere lo stesso volume di campione a ciascun filtro.
 - d. Posizionare con cautela le provette con i filtri inseriti nella microcentrifuga da banco e centrifugare per 5 minuti a 400 xg a temperatura ambiente.

Nota: orientare le provette per microcentrifuga con l'inserito del filtro in modo tale che i cappucci siano rivolti verso il centro del rotore.
 - e. Rimuovere con cautela le provette con i filtri inseriti dalla centrifuga e gettare i filtri in un contenitore per rifiuti Biohazard.
 - f. Pipettare delicatamente miscelare l'intero volume dell'aspirato midollare 10 volte per miscelare, quindi centrifugare a impulsi il tubo **per un secondo** per raccogliere materiale dal coperchio della provetta per microcentrifuga.
 - g. Dopo aver miscelato la pipetta, unire i due volumi di campione filtrati in una delle provette da 2 ml.
 - h. Tappare e capovolgere la provetta contenente il pool di aspirato midollare filtrato 10 volte, quindi far girare la provetta **a impulsi per un secondo** per raccogliere il materiale dal coperchio della provetta per microcentrifuga.
 - i. Trasferire il **volume massimo misurato** in una provetta per microcentrifuga da 1,5 ml etichettata.

- j. Aggiungere la quantità appropriata di DNA Stabilizer al BMA in pool filtrato utilizzando la seguente equazione: $\mu\text{l di DNA Stabilizer da aggiungere} = 15 \times [\mu\text{l di BMA filtrato}]/1000$.
- k. Tappare e capovolgere la provetta 10 volte per miscelare, quindi far girare la provetta **a impulsi per un secondo** per raccogliere qualsiasi materiale dal coperchio della provetta per microcentrifuga. Procedere al passaggio 3b del 'Bionano Prep SP BMA DNA Isolation Protocol'.

Risoluzione dei problemi

Vedere [Video di formazione](#) a partire da 8:40 per le spiegazioni video sulla risoluzione dei problemi.

Il gDNA non viene legato dal Nanobind Disk.

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

Passaggi da seguire se il campione viene aspirato:

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

In alternativa:

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

Il gDNA associato al Nanobind ha ancora colore nel secondo lavaggio WB2

Prova: dopo 20 inversioni nel secondo lavaggio WB2 il gDNA associato al Nanobind ha ancora il colore.

Passaggi da seguire:

1. Sollevare la cremagliera trasparente per separare dalla base magnetica.
2. Capovolgere il rack trasparente in modo che i Nanobind Disk poggino nei tappi delle provette e **agitare energicamente il rack per provette continuamente per 10 secondi**, assicurandosi che i Nanobind Disk attraversino l'intero arco delle microprovette dall'alto verso il basso durante l'agitazione.
3. Riposizionare il rack per provette trasparenti e le provette con base magnetica come descritto nel passaggio 20 a pagina 15.
4. Rimuovere il surnatante come descritto nel passaggio 22 a pagina 16.

Il gDNA non è omogeneo prima dell'etichettatura

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

Passi da seguire:

1. Aspirare e dispensare il campione utilizzando una punta a foro largo per un totale di 5 volte.
2. Incubare il gDNA a temperatura ambiente per 1-3 giorni.

3. Dopo l'incubazione, aspirare nuovamente e dispensare il campione per 5 volte utilizzando una punta a foro largo.
4. Quantificare con Qubit BR Assay.

Il gDNA non è viscoso

Prova: La consistenza del campione è molto sottile e facilmente pipettabile, ma la concentrazione è $> 35 \text{ ng}/\mu\text{L}$.

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

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

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

Assistenza tecnica

Per assistenza tecnica, contattare il supporto tecnico di Bionano Genomics.

È possibile recuperare la documentazione sui prodotti Bionano, SDS, certificati di analisi, domande frequenti e altri documenti correlati dal sito Web dell'Assistenza o su richiesta tramite e-mail e telefono.

Tipo	Contatto
E-mail	support@bionanogenomics.com
Telefono	Orario Lavorativo: Dal lunedì al venerdì, dalle 9:00 alle 17:00, PST USA: +1 (858) 888-7663
Sito web	www.bionanogenomics.com/support