



# Protocolo Bionano Prep SP de aislamiento de ADN de aspirado de médula ósea v2

Número de documento: 30399

Revisión del documento: A

## Índice

---

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Aviso legal .....                                                                                                    | 3  |
| Historial de revisiones.....                                                                                         | 4  |
| Descripción general del flujo de trabajo .....                                                                       | 5  |
| Kit Bionano Prep SP de aislamiento de ADN de aspirado de médula ósea y materiales proporcionados por el usuario..... | 6  |
| Introducción y notas importantes .....                                                                               | 8  |
| Introducción: .....                                                                                                  | 8  |
| Descripción general .....                                                                                            | 8  |
| Notas importantes:.....                                                                                              | 8  |
| Protocolo Bionano Prep SP de aislamiento de ADN de aspirado de médula ósea v2 .....                                  | 12 |
| Preparación para el aislamiento del gDNA .....                                                                       | 12 |
| Aislamiento de gDNA (~3 horas).....                                                                                  | 12 |
| Homogeneización de la solución de gDNA (70 minutos).....                                                             | 19 |
| Cuantificación de gDNA (45 minutos).....                                                                             | 19 |
| Apéndice A: Adición de DNA Stabilizer al aspirado de médula ósea humana descongelado en heparina.....                | 22 |
| Solución de problemas .....                                                                                          | 24 |
| El gDNA asociado al Nanobind todavía tiene color en el segundo lavado con WB2.....                                   | 24 |
| El gDNA no es homogéneo antes del marcaje .....                                                                      | 24 |
| El gDNA no es viscoso.....                                                                                           | 25 |
| Asistencia técnica.....                                                                                              | 26 |

## Aviso legal

---

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

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

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

### **Patentes**

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

### **Marcas comerciales**

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

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

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

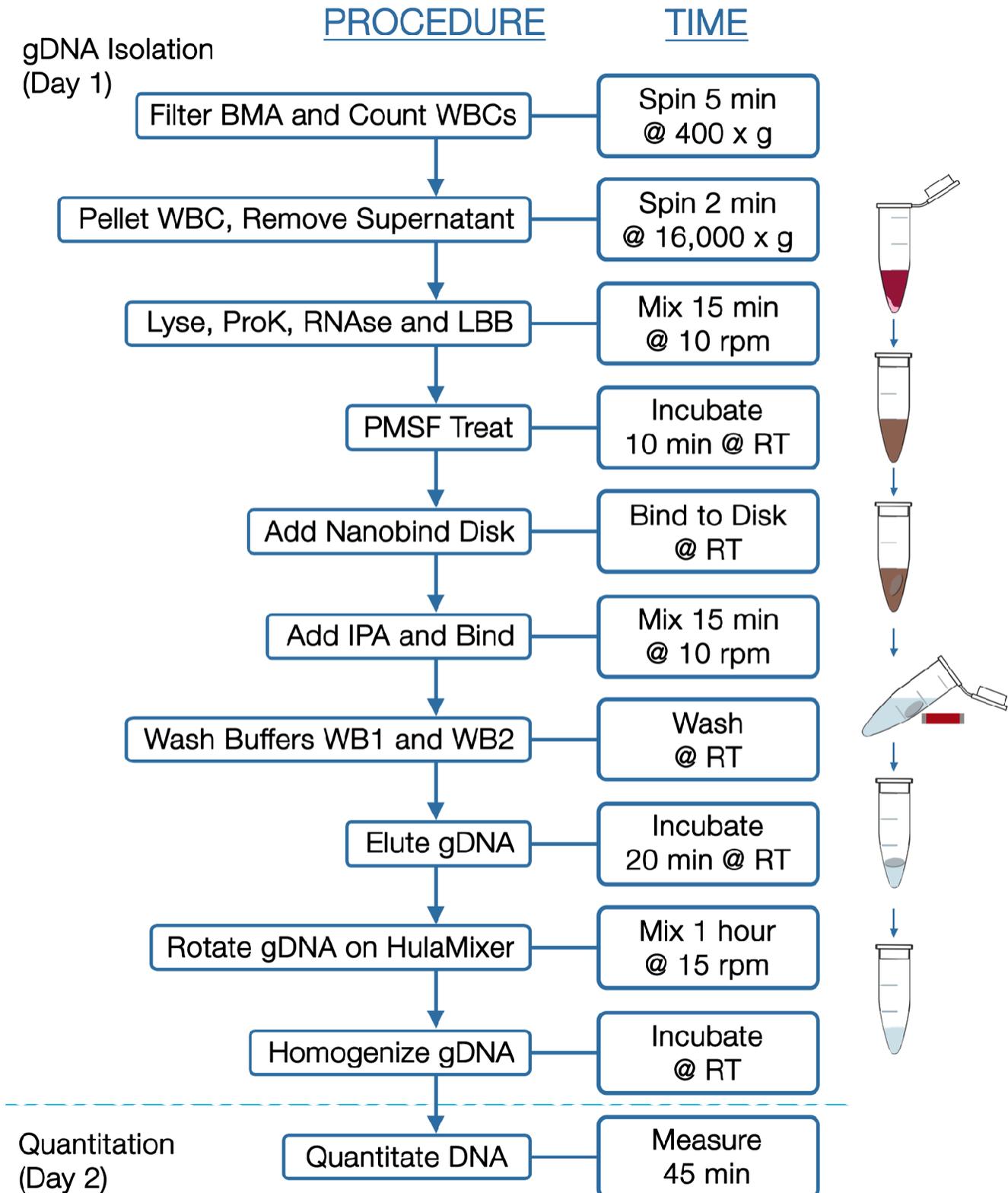
© Copyright 2022 Bionano Genomics, Inc. Todos los derechos reservados.

## Historial de revisiones

---

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

## Descripción general del flujo de trabajo



## Kit Bionano Prep SP de aislamiento de ADN de aspirado de médula ósea y materiales proporcionados por el usuario

### Contenido del kit Bionano Prep SP de aislamiento de ADN de aspirado de médula ósea (BMA) v2 (N.º de referencia 90057, 10 preparaciones)

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

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

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

### Accesorio Bionano Prep SP de aspirado de médula ósea (N.º de referencia 80037, 10 reacciones)

| Artículo                                    | Cantidad     | Número de referencia | Almacenamiento                          |
|---------------------------------------------|--------------|----------------------|-----------------------------------------|
| DNA Stabilizer                              | 4 ml         | 20398                | Temperatura ambiente (entre 18 y 25 °C) |
| Tubos de microcentrífuga estándar de 2,0 ml | 2 x 10 tubos | 20396                | Temperatura ambiente (entre 18 y 25 °C) |
| Filtros de aspirado de médula ósea, 100 µm  | 20 filtros   | 20401                | Temperatura ambiente (entre 18 y 25 °C) |

### Materiales proporcionados por el usuario

| Artículo                                                                        | Proveedor                                                              | N.º de catálogo |
|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| <b>Día 1: sedimentación o pelleting, aislamiento y homogeneización del gDNA</b> |                                                                        |                 |
| Bionano Prep SP Magnetic Retriever (paquete de 2)                               | Bionano Genomics                                                       | 80031           |
| Analizador de GB HemoCue                                                        | Distribuidor de Fisher Scientific (para EE. UU.)<br>(fuera de EE. UU.) | 22-601-017      |
| Microcubetas HemoCue                                                            | Fisher Scientific                                                      | 22-601-018      |
| Agitador de balanceo para tubos de ensayo Vari-Mix                              | Thermo Fisher o equivalente                                            | M48725Q         |
| Gradilla de tubos magnética DynaMag-2                                           | Thermo Fisher                                                          | 12321D          |
| Mezclador de muestras HulaMixer                                                 | Thermo Fisher                                                          | 15920D          |
| Tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, sin nucleasas                               | VWR                                                                    | 87003-294       |
| Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 100 mM                                  | Sigma-Aldrich                                                          | 93482           |
| Etanol, absoluto (100%), grado de biología molecular                            | Sigma-Aldrich                                                          | E7023           |
| Isopropanol (IPA), ≥99,5 %, grado de biología molecular                         | Fisher Scientific                                                      | A461-212        |
| Concentrado desinfectante, TexQ TX651                                           | Texwipe                                                                | TX651           |
| Lejía para eliminación de sangre                                                | Proveedor general de suministros de laboratorio                        |                 |
| Tubos de centrífuga cónicos, 50 ml, PP                                          | Thermo Fisher o equivalente                                            | 14-432-22       |
| Microcentrífuga de velocidad variable (400-16 000 x g)                          | Proveedor general de suministros de laboratorio                        |                 |
| Baño de agua a 37 °C                                                            | Proveedor general de suministros de laboratorio                        |                 |
| Cubo de hielo y hielo                                                           | Proveedor general de suministros de laboratorio                        |                 |
| Pipetas desechables estériles de 5 y 10 ml (TD +)                               | Proveedor general de suministros de laboratorio                        |                 |
| Minicentrífuga de mesa (2200 x g)                                               | Labnet                                                                 | C1301B          |
| Pinzas puntiagudas                                                              | Electron Microscopy Sciences o equivalente                             | 78141-01        |
| Puntas de pipeta de calibre ancho, con filtro, aerosol, 200 µl                  | VWR o equivalente a Rainin                                             | 46620-642       |
| Puntas extralargas de 1000 µl, estériles                                        | VWR o equivalente a Rainin                                             | 16466-008       |
| Pipetas (10, 20, 200 y 1000 µl) y puntas de pipeta con filtro sin nucleasas     | Proveedor general de suministros de laboratorio                        |                 |
| Parafilm                                                                        | Proveedor general de suministros de laboratorio                        |                 |

| Día 2: Cuantificación                                                           |                                                 |              |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------|
| Agitador vórtex de sobremesa                                                    | Proveedor general de suministros de laboratorio |              |
| Baño ultrasónico (opcional)                                                     | Branson o equivalente                           | CPX 952-119R |
| Tubo cónico de 15 ml                                                            | Fisher Scientific                               | 05-539-12    |
| Fluorímetro, Qubit                                                              | Thermo Fisher o equivalente                     | Q33216       |
| Kit de análisis Qubit® dsDNA BR (rango amplio)                                  | Thermo Fisher o equivalente                     | Q32853       |
| Tubos de análisis Qubit                                                         | Thermo Fisher                                   | Q32856       |
| Pipeta de desplazamiento positivo MR-10 (opcional)                              | Rainin o equivalente                            | 17008575     |
| Puntas de pipeta, 10 µl, C-10 para desplazamiento positivo<br>Pipeta (opcional) | Rainin o equivalente                            | 17008604     |

## Introducción y notas importantes

---

### Introducción:

Este protocolo de aislamiento de ADN de aspirado de médula ósea de Bionano Prep® SP v2 puede proporcionar gDNA de peso molecular ultraalto (UHMW) en menos de cuatro horas. Utiliza un procedimiento de lisis, unión, lavado y elusión que es común para las tecnologías de extracción de gDNA a base de sílice en combinación con un nuevo disco paramagnético. A diferencia de las perlas magnéticas y las columnas de rotación de sílice, que cortan el gDNA de gran tamaño, el disco Nanobind se une y libera el gDNA con una fragmentación significativamente menor, lo que da como resultado un gDNA de UHMW. La alta capacidad de unión del gDNA es el resultado de una novedosa nanoestructurada de sílice en el exterior del disco paramagnético termoplástico. Este protocolo se probó procesando varios aspirados de médula ósea, y los aspirados de médula ósea del donante se procesaron hasta dos a la vez. Se añadió DNA Stabilizer a un volumen de 1 ml de aspirado de médula ósea humano fresco extraído en un tubo de heparina que se congeló y luego se procesó sin ciclos adicionales de congelación/descongelación. El gDNA preparado con este protocolo se ha probado solo con el marcaje DLS. Vea el [Vídeo de formación](#) para conocer los pasos técnicamente críticos y la resolución de problemas. El flujo de trabajo actual está configurado de manera que se puedan procesar cómodamente cuatro aspirados de médula ósea en un día de trabajo característico, con dos aspirados por la mañana y dos por la tarde.

### Descripción general

La lisis celular y la digestión con proteinasa K y RNasa tienen lugar en un buffer caotrópico y el gDNA liberado se une al disco Nanobind tras la adición de isopropanol. Después de tres pasos de lavado, el disco se transfiere a un tubo nuevo y el gDNA se eluye del disco. El gDNA de UHMW recuperado se somete a una fragmentación limitada para hacer que el gDNA de UHMW sea más homogéneo. A continuación, el gDNA se mezcla y se atempera durante la noche a temperatura ambiente para facilitar la homogeneidad del ADN y después se determina la concentración. El rango característico de tamaño de gDNA es de 50 Kbp a  $\geq 1$  Mbp.

### Notas importantes:

#### **Homogeneidad del ADN**

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

#### **Cuantificación del gDNA**

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

Para medir la homogeneidad del gDNA, es esencial medir la concentración de gDNA en múltiples posiciones en la solución. Dado que el gDNA viscoso es difícil de pipetear, siga las pautas descritas en las Notas importantes para un pipeteo preciso.

Los análisis estándar para la cuantificación de la concentración de gDNA no proporcionarán mediciones precisas de gDNA largo debido a su naturaleza viscosa.

- Para una cuantificación precisa, es necesaria la fragmentación eficaz del gDNA muestreado mediante sonicación o agitación intensa en el vórtex.
- El coeficiente de variación (CV) de tres réplicas de la muestra debe ser menor o igual a 0,30. CV = desviación estándar/media.
- La concentración típica de gDNA es de 45 a 90 ng/μl.

### **Pipeteo de ADN genómico viscoso (gDNA)**

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

### **Manipulación del gDNA**

- La mezcla del gDNA recuperado siempre se lleva a cabo con una punta de pipeta de calibre ancho para evitar en lo posible la fragmentación.
- El gDNA recuperado nunca debe congelarse ni agitarse en vórtex.
- El pipeteado del gDNA recuperado para obtener un muestreo preciso siempre se realiza con una punta de calibre estándar o una pipeta de desplazamiento positivo.

### **Características del gDNA de alta calidad para la cartografía Bionano**

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

### **Tamaño de la tanda**

Recomendamos procesar hasta cuatro muestras a la vez, con un máximo de ocho muestras por día, cuatro procesadas por la mañana y cuatro procesadas por la tarde.

### **Uso del Bionano Prep SP Magnetic Retriever**

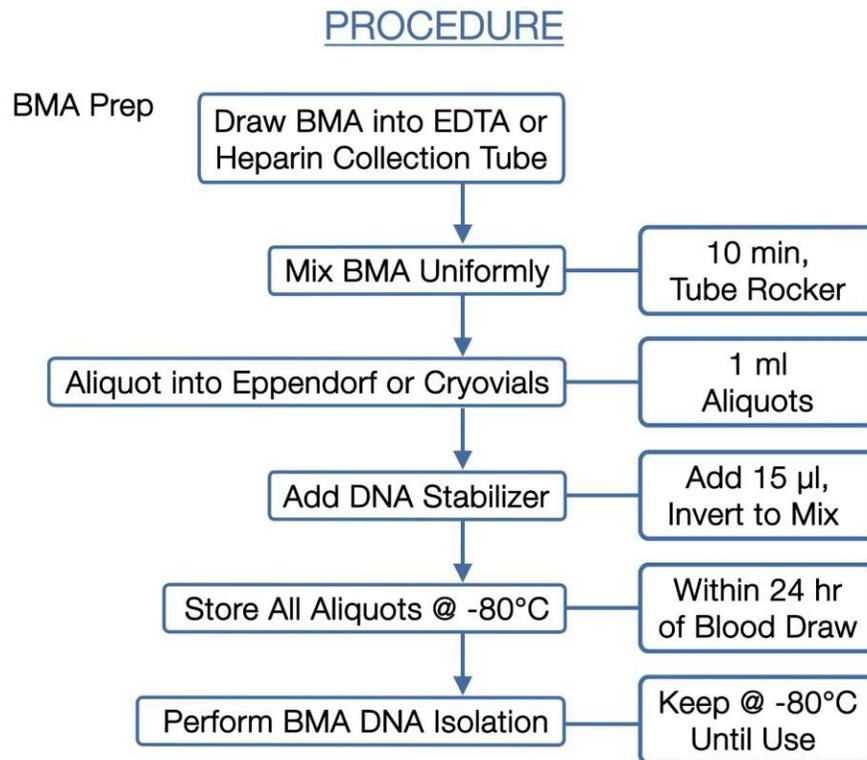
- a. Sujete una funda de plástico por los lados cerca de la parte superior e inserte el recuperador de disco magnético Bionano SP en la funda, colocándolo de manera que quede asentado en la parte inferior de la funda.
- b. Inserte el recuperador enfundado en el tubo Protein LoBind para atraer el disco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

### **Eliminación de residuos peligrosos**

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

### **Congelación de aspirados de médula ósea humana heparinizados frescos para su almacenamiento con DNA Stabilizer**

El gDNA se obtiene de los glóbulos blancos (GB). De cada muestra de aspirado de médula ósea deben congelarse (-80 °C) dos alícuotas de aspirado de médula ósea heparinizadas (~1 ml cada una) en tubos separados y almacenarse sin descongelar hasta el aislamiento del gDNA. Por lo general, solo se requerirá una alícuota para este protocolo, y la segunda servirá como respaldo. Las muestras deben congelarse dentro de las 24 horas posteriores a la aspiración y mantenerse a 4 °C hasta que se congelen a -80 °C.



- a. Mezcle bien el aspirado de médula ósea humana fresco heparinizado a temperatura ambiente para asegurar una buena uniformidad (15 minutos en un balancín a temperatura ambiente).
- b. Procese las muestras de aspirado de médula ósea de una en una y transfiera dos alícuotas de 1 ml a tubos de 1,5 ml sin DNasa/RNasa.
- c. Añada 15 µl de DNA Stabilizer a cada tubo que contenga el volumen de 1 ml de aspirado de médula ósea humana fresco.
- d. Tape los tubos, inviértalos 10 veces para mezclar, luego centrifugue los tubos **durante un segundo** para recoger cualquier material de la tapa del tubo y pase inmediatamente las alícuotas a -80 °C para un almacenamiento a largo plazo.
- e. No descongele la alícuota de -80 °C hasta proceder al aislamiento del gDNA.

## Protocolo Bionano Prep SP de aislamiento de ADN de aspirado de médula ósea v2

---

### Preparación para el aislamiento del gDNA

#### Antes del primer uso

- Verifique el acceso a una microcentrífuga de velocidad variable (400 - 16 000 x g).
- El PMSF se descompone rápidamente en soluciones acuosas. Cree alícuotas de 120 µl en tubos con tapón de rosca de 1,5 ml y almacene la muestra original y las alícuotas a 4 °C. Cada alícuota será suficiente para diez aislamientos de gDNA.
- Agregue etanol al 100 % a los buffers de lavado (WB1 y WB2), mezcle bien y marque las casillas de «Etanol agregado»:
  - Agregue 5 ml de etanol al 100 % al buffer de lavado 1 (WB1) para obtener un volumen final de 8,25 ml.
  - Agregue 7,5 ml de etanol al 100 % al buffer de lavado 2 (WB2) para obtener un volumen final de 12,5 ml.

#### Configuración

- Reúna los materiales (consulte la sección «Material suministrado por el usuario» más arriba).
- Para la eliminación de residuos, prepare:
  - Un tubo cónico de 50 ml con 5 ml de lejía + 20 ml de agua; invierta varias veces para mezclar.
  - Un tubo cónico de 50 ml con 100 µl de descontaminante TexQ por muestra (eliminado como residuo peligroso).
- Por cada muestra, etiquete un tubo Protein LoBind de 0,5 ml (Bionano), un tubo Protein LoBind de 1,5 ml (Bionano) y tres tubos de microcentrífuga de 2,0 ml (Bionano).
  - Asiente un filtro de aspirado de médula ósea (Bionano) en dos de los tubos de microcentrífuga de 2,0 ml etiquetados.
- Invierta tres veces los tubos de PMSF, proteinasa K (Bionano) y RNasa (Bionano) para mezclar, y dé un golpe de centrifugación. Coloque el PMSF y la RNasa en hielo.
- Prepare una tira de Parafilm (~2 cm) para el HemoCue, las microcubetas preparadas y el [sistema HemoCue](#).
- Ajuste el baño de agua a 37 °C. Verifique la temperatura con un termómetro.

### Aislamiento de gDNA (~3 horas)

**Descongele un máximo de cuatro alícuotas de aspirado de médula ósea que contengan DNA Stabilizer y pellet de GB, y elimine el sobrenadante.** Nota: vea el vídeo [HemoCue WBC Counter Demo](#) para obtener instrucciones sobre el funcionamiento correcto de HemoCue.

1. Por cada muestra, extraiga una alícuota de 1 ml de DNA Stabilizer heparinizado congelado que contenga aspirado de médula ósea del congelador a -80 °C y descongélelo en un baño de agua a 37 °C durante 2 minutos utilizando una gradilla de tubos flotante. Extraiga las alícuotas del baño de agua y manténgalas a temperatura ambiente.

**Nota importante:** si no está seguro de si se agregó DNA Stabilizer a la alícuota de 1 ml de aspirado de médula ósea heparinizado antes de congelar, agregue 15 µl de DNA Stabilizer al tubo después de descongelarlo y continúe con el paso 2. Si el aspirado de médula ósea heparinizado congelado no procede de una alícuota de 1 ml con el DNA Stabilizer agregado, consulte el Apéndice A.

2. Procese las alícuotas hasta un máximo de cuatro muestras simultáneamente:

- a. Invierta los tubos de alícuotas de aspirado de médula ósea 10 veces para mezclar y luego dé un golpe de centrifuga **durante un segundo** para recoger el material de la tapa del tubo.
- b. Por cada muestra de aspirado de médula ósea descongelada, transfiera 500 µl a dos filtros para aspirado de médula ósea colocados en sendos tubos de microcentrifuga de 2,0 ml etiquetados.
- c. Coloque con cuidado los tubos con filtros asentados en la microcentrifuga de sobremesa y centrifugue durante 5 minutos a 400 x g a temperatura ambiente.

**Nota:** oriente los tubos de microcentrifuga con los insertos de filtro de manera que las tapas miren hacia el centro del rotor.

- d. Extraiga con cuidado los tubos de la centrifuga y deseche los filtros en un contenedor para residuos de riesgo biológico.
  - e. Pipetee suavemente y mezcle todo el volumen del aspirado de médula ósea filtrado 10 veces con una punta de 1000 µl.
  - f. Después de mezclar con pipeta, junte los dos volúmenes de muestra filtrada en cualquiera de los tubos de 2 ml.
  - g. Tape e invierta el tubo que contiene la aspiración de médula ósea combinada y filtrada 10 veces para mezclar y luego dé un golpe de centrifuga al tubo **durante un segundo** para recoger el material de la tapa.
3. Determine el recuento de glóbulos blancos en una muestra cada vez:
- a. Mezcle suavemente con pipeta todo el volumen del aspirado de médula ósea filtrado 10 veces y luego dé un golpe de centrifuga al tubo durante un segundo para recoger el material de la tapa.
  - b. Dispense inmediatamente 20 µl en el Parafilm y use la cubeta HemoCue para medir los GB.
  - c. Anote la lectura del HemoCue en la tabla de la página siguiente.
  - d. Realice los siguientes cálculos para completar la tabla de esta sección en cada muestra:
    - Volumen a transferir (µl) =  $1500 \div \text{Lectura del HemoCue}$
    - Volumen de extracción (µl) = (Volumen de transferencia: 40 µl)

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

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

**Nota:** si la concentración de GB en el DNA Stabilizer que contiene aspirado de médula ósea es alta y está fuera del rango de detección, la pantalla del instrumento HemoCue mostrará «HHH». Por lo general, los aspirados de médula ósea que dan una lectura HemoCue de «HHH» se pueden diluir en el buffer celular y luego volver a contar para determinar con precisión la concentración de GB en el aspirado de médula ósea (ver más abajo).

**Para un aspirado concentrado de médula ósea que muestra «HHH» solo por la lectura inicial del HemoCue:**

Determine el recuento de GB en las muestras de una en una:

- e. Invierta el tubo de la alícuota de médula ósea 10 veces para mezclar y luego dé un golpe de centrifuga al tubo durante un segundo para recoger el material de la tapa.

- f. Transfiera inmediatamente 25 µl de aspirado de médula ósea a un tubo de 1,5 ml que contenga 75 µl de buffer celular (para hacer una dilución 1:4 de la médula ósea).
- g. Mezcle con pipeta todo el volumen 10 veces suavemente con una punta estándar de 200 µl.
- h. Dispense inmediatamente 20 µl sobre Parafilm y utilice la cubeta HemoCue para medir los GB.
- i. Realice el siguiente cálculo para determinar la concentración de GB de la muestra y anote la lectura del HemoCue en la tabla de la página siguiente:

- Lectura del HemoCue x 4 = Lectura de HemoCue **sin diluir**

- j. Realice los siguientes cálculos para completar la tabla en esta sección en cada muestra:

- Volumen a transferir (µl) =  $1500 \div$  lectura del HemoCue **sin diluir**

- Volumen de extracción (µl) = (Volumen de transferencia: 40 µl)

**Nota:** si el volumen de transferencia es de 40 µl, no se requiere volumen de extracción para la muestra. Si el volumen de transferencia es <40 µl, determine la cantidad de buffer celular que se agregará a la muestra en el Paso 4.

- Volumen de adición de buffer celular (µl) = (40 µl: volumen de transferencia)

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

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

4. Después de contar los GB, invierta cada aspirado de médula ósea filtrado 10 veces para mezclar y dé un golpe de centrifuga durante un segundo para recoger el material de la tapa del tubo. Con una pipeta ajustada a [Volumen de transferencia], transfiera el volumen de aspirado de médula ósea al tubo Protein LoBind de 1,5 ml previamente etiquetado.

- a. **Si el [Volumen de transferencia] determinado en el Paso 3 = 40 µl**, no complete los Pasos 5 y 6, y continúe con el Paso 7.
- b. **Si el [Volumen de transferencia] determinado en el Paso 3 es <40 µl**, agregue el buffer celular al aspirado de médula ósea transferido hasta 40 µl, no complete los Pasos 5 y 6 y continúe directamente con el Paso 7.
- c. **Si el [Volumen de transferencia] determinado en el Paso 3 es >40 µl**, continúe con el Paso 5.

5. Centrifugue las alícuotas equilibradas de aspirado de médula ósea a 16 000 x g durante 2 minutos a temperatura ambiente.

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

6. Coloque una pipeta adecuada en [Volumen de extracción] para extraer el sobrenadante con una punta estándar. Dispense el sobrenadante en un cono de lejía. Después de la extracción, debería haber aproximadamente 40 µl de solución con el pellet de GB.

**Nota:** incline el tubo y extraiga desde la parte superior del menisco del líquido, en el lado opuesto al pellet, muy lentamente. Si el volumen de la alícuota inicial es  $\leq 240$  µl, extraiga el sobrenadante en una pasada. Si el volumen de la alícuota inicial es  $\geq 240$  µl, extraiga el sobrenadante en varias pasadas con una punta de 200 µl y cambie la punta con cada pasada. Una vez que se haya extraído el sobrenadante de todas las muestras, puede llenar el tubo cónico que contiene lejía hasta los 50 ml con agua, tapar el cono, invertir el cono para mezclar y desechar el contenido en el fregadero.

| ID de la muestra | Sin diluir<br>Lectura del<br>HemoCue | Volumen a<br>transferir | Volumen a<br>extraer | Volumen de<br>buffer celular |
|------------------|--------------------------------------|-------------------------|----------------------|------------------------------|
|                  | células/l                            | µl                      | µl                   | µl                           |
|                  | células/l                            | µl                      | µl                   | µl                           |
|                  | células/l                            | µl                      | µl                   | µl                           |
|                  | células/l                            | µl                      | µl                   | µl                           |
|                  | células/l                            | µl                      | µl                   | µl                           |
|                  | células/l                            | µl                      | µl                   | µl                           |
|                  | células/l                            | µl                      | µl                   | µl                           |
|                  | células/l                            | µl                      | µl                   | µl                           |

### **Lisar y digerir los GB**

7. Agregue 50 µl de proteinasa K (Bionano) directamente sobre cada pellet de GB. No pipetee la mezcla.
8. Agregue 20 µl de RNasa A (Bionano) en cada tubo. No pipetee la mezcla.
9. Pipetee la muestra de la mezcla 5 veces con una punta estándar de 200 µl ajustada a 110 µl para resuspender el pellet.

**Nota:** extraiga todo el volumen de la muestra en la punta e inspeccione visualmente el tubo mientras mezcla para asegurarse de que el pellet se resuspende completamente durante la mezcla, de modo que al final de la mezcla no quede ningún pellet visible en la parte inferior o lateral del tubo.

10. Incube a temperatura ambiente durante 3 minutos.
11. Agregue 225 µl de buffer LBB a las muestras usando una punta de 1000 µl. Tape e invierta el tubo 15 veces para mezclar.  
**Nota:** el LBB es una solución viscosa y espumosa que se adhiere a la punta de la pipeta. Dispense lentamente y cambie las puntas entre dispensación y dispensación para garantizar la precisión del volumen dispensado.
12. Ponga las muestras en el HulaMixer a 10 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. No produzca sacudidas ni vibraciones.
13. Dé un golpe de centrifuga al tubo durante 2 segundos para recoger el líquido en el fondo del tubo.
14. Agregue 10 µl de PMSF 100 mM a la porción líquida del tubo. Tape e invierta el tubo 5 veces para mezclar, dé un golpe de centrifuga al tubo durante 2 segundos para recoger el líquido en el fondo del tubo.
15. Incube a temperatura ambiente durante 10 minutos.

### **Unión, lavado y elución del gDNA**

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

**Nota:** a veces los discos pueden pegarse unos a otros; asegúrese de que solo se transfiera un disco al tubo.

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

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

19. Examine la asociación de gDNA con el disco Nanobind e invierta para aumentar la unión (vea el [Vídeo de formación](#), 0:25):
  - a. Coloque los tubos de muestra en una gradilla de tubos Dynamag transparente e inspeccione visualmente todos los tubos de la gradilla para asegurarse de que el gDNA esté anclado al disco Nanobind.
  - b. Si las hebras de gDNA cuelgan visiblemente cerca del fondo del tubo, invierta rápidamente 180° para que el gDNA se asocie más con el disco Nanobind.
  - c. Se pueden realizar inversiones de 180° muchas veces hasta que la adhesión del gDNA con el disco Nanobind parezca mantenerse sin cambios.
20. Combine la gradilla transparente con la base magnética como se describe a continuación y compruebe que el disco Nanobind esté fijado por el imán cerca de la parte superior del nivel de líquido. Si no es así, vuelva a colocar el tubo en la gradilla (vea el [Vídeo de formación](#), 0:50).

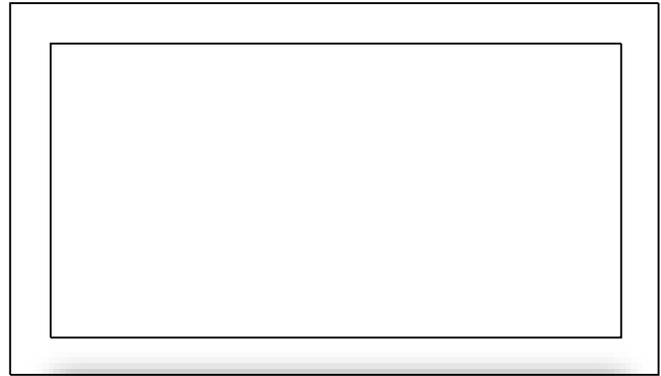
- a. Invierta la gradilla de tubos Dynamag transparente y colóquela boca abajo con las tapas de muestra tocando la superficie de trabajo. Los tubos estarán en la misma fila de la gradilla y en la fila más alejada de usted.



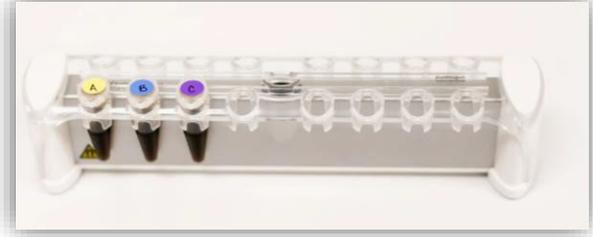
- b. Invierta la base magnética Dynamag y bájela sobre una gradilla transparente.



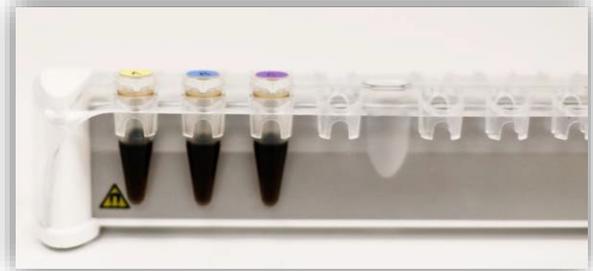
- c. Incline el aparato combinado lentamente 90° hacia usted mientras continúa apoyado en la superficie. Los tubos ahora estarán horizontales y visibles para usted.



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



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



21. Ajuste una pipeta de 1000  $\mu$ l a 1000  $\mu$ l y una segunda a 700  $\mu$ l.
22. Extraiga el sobrenadante como se describe a continuación y tenga cuidado de no aspirar el gDNA (vea el [VÍdeo de formación](#), 1:15):
- Incline toda la gradilla a un ángulo de 45° sosteniéndola con una mano (agarre todo el aparato desde abajo con los tubos visibles y las tapas hacia la otra mano).
  - Espere 2 segundos para que el gDNA se coloque en el disco Nanobind.
  - Extraiga lentamente todo el líquido con una punta extralarga de 1000  $\mu$ l posicionada en ángulo lejos del disco Nanobind o gDNA para evitar perturbaciones.
  - Dispense el sobrenadante en un tubo cónico que contenga TexQ.

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

23. Realice el lavado con WB1 (vea el [VÍdeo de formación](#), 2:21): dispense 700  $\mu$ l de buffer WB1 directamente sobre los discos de los tubos y tápelos.
- Levante la gradilla de tubos transparente para separarla de la base magnética.

- b. Invierta la gradilla transparente con los tubos 180° 10 veces para lavar.
- c. Vuelva a colocar la gradilla para tubos transparente y los tubos con base magnética como se describe en el Paso 20.
- d. Extraiga el sobrenadante como se describe en el Paso 22.

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

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

25. Realice el lavado con WB2:

- a. Dispense 500 µl de Buffer WB2 directamente sobre los discos en los tubos y tápelos.
- b. Levante la gradilla transparente para separarla de la base magnética.
- c. Invierta la gradilla transparente 180° 20 veces para lavar.
- d. Vuelva a colocar la gradilla para tubos transparente y los tubos con base magnética como se describe en el Paso 20.
- e. Extraiga el sobrenadante como se describe en el Paso 22.

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

26. Repita el lavado con WB2, Paso 25.

 Si el gDNA asociado al Nanobind todavía tiene color después de 20 inversiones, consulte la sección Resolución de problemas.

27. Abra completamente la tapa del tubo (paralela a la mesa de laboratorio) y levante y separe cada tubo de la base.

28. Muy cerca de un tubo Protein LoBind de 0,5 ml, transfiera el disco Nanobind al tubo Protein LoBind de 0,5 ml con el Bionano Prep SP Magnetic Retriever (consulte la sección Notas importantes para conocer el uso adecuado). Tape el tubo para evitar que el disco se seque (vea el [Vídeo de formación](#), 7:30).

 Asegúrese de que el gDNA permanezca adherido al disco durante la transferencia.

29. Centrifugue el tubo Protein LoBind en una microcentrífuga de sobremesa durante 5 segundos.

30. Extraiga todo el líquido residual del fondo del tubo con una punta estándar de 10 µl.

**Nota:** es necesario desplazar el disco Nanobind con la punta para alcanzar el líquido en el fondo del tubo. Mueva la punta con un pequeño movimiento circular para extraer todo el líquido residual del fondo del tubo.

31. Agregue 65 µl del buffer EB al tubo Protein LoBind.

32. Centrifugue el tubo en una microcentrífuga de sobremesa durante 5 segundos.

33. Con una punta estándar de 10 µl, empuje suavemente el disco Nanobind hacia la parte inferior del tubo y asegúrese de que esté completamente sumergido en el líquido. El disco debe permanecer paralelo a la superficie de la mesa (vea el [Vídeo de formación](#), 8:20).

34. Incube el disco Nanobind sumergido en el buffer EB a temperatura ambiente durante 20 minutos.
35. Recoja el gDNA transfiriendo el eluido al tubo de 2,0 ml etiquetado con una punta estándar de 200 µl.
36. Centrifugue el tubo con el disco Nanobind en una microcentrífuga de sobremesa durante 5 segundos y transfiera todo el eluido restante que contiene gDNA viscoso al mismo tubo de 2,0 ml etiquetado como en el paso anterior con una punta estándar de 200 µl. Puede sacar el disco antes de aspirar el buffer de elución restante.

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

## Homogeneización de la solución de gDNA (70 minutos)

### Homogeneización del gDNA

37. aspire lentamente todo el volumen de gDNA con una punta estándar de 200 µl y luego dispense lentamente el gDNA. Evite la formación de burbujas.
  - Repita este proceso 5 veces hasta un total de 6 veces (1 vez = 1 aspiración y 1 dispensación).

**Nota:** si la absorción de gDNA se detiene debido a la alta viscosidad, puede ser necesario remover suavemente mientras suelta lentamente el émbolo para sacar el gDNA.

38. Coloque un tubo estándar de 2,0 ml que contenga el gDNA en una gradilla del mezclador de muestras HulaMixer y gírelo a temperatura ambiente durante 1 hora a 15 rpm.

**Nota:** durante las rotaciones iniciales, asegúrese de que el gDNA se extraiga de la parte inferior del tubo para quedarse en la tapa del tubo durante las rotaciones. Si la solución de ADN permanece en el fondo del tubo durante las rotaciones iniciales, apague el HulaMixer y coloque la gradilla de modo que el tubo esté orientado al revés. Golpee suavemente la parte inferior del tubo hasta que el gDNA se introduzca en la tapa y reanude la mezcla.

**Nota:** para minimizar el tiempo del procedimiento, los tubos de microcentrífuga se pueden dejar en el Hula Mixer durante la noche si el mezclador está configurado para detenerse después de 1 hora. Al día siguiente, centrifugue los tubos en una microcentrífuga de sobremesa durante 2 segundos para llevar el gDNA al fondo del tubo antes de la cuantificación.

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

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

## Cuantificación de gDNA (45 minutos)

### Cuantificación con Qubit - Análisis dsDNA BR

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

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

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

2. Agregue el buffer Qubit BR a los tubos de ensayo Qubit de 0,5 ml:
  - a. Por cada muestra, agregue 18 µl de buffer Qubit BR a tres tubos de ensayo Qubit separados.
  - b. En cuanto a los patrones Qubit, agregue 10 µl de buffer Qubit BR a dos tubos de ensayo Qubit separados.

3. Usando una pipeta de 200 µl con una punta de calibre ancho, mezcle suavemente todo el volumen de muestra de gDNA pipeteando hacia arriba y hacia abajo 5 veces, con cuidado de no generar burbujas.

4. Usando una nueva punta estándar o una punta de una pipeta de desplazamiento positivo para cada extracción:

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

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

5. Prepare la solución de trabajo diluyendo el colorante en el buffer de dilución BR (1:200):
  - a. 200 µl de solución de trabajo por cada uno de los dos patrones (400 µl en total).
  - b. 200 µl de solución de trabajo por cada alícuota de muestra (600 µl por cada muestra).
6. En cuanto a los patrones de ADN del Qubit, agregue 10 µl de los patrones 1 y 2 a los tubos de ensayo que contienen el buffer BR del Paso 2b.
7. Una vez que se complete la sonicación, recupere los tubos de ensayo y dé un golpe de centrifuga brevemente. Agite los tubos en el vórtex durante 5 segundos a máxima velocidad y luego dé un golpe de centrifuga nuevamente.
8. Agregue 180 µl de la solución de trabajo a cada alícuota de ADN sonificado y las alícuotas de los patrones de ADN Qubit. Agite en el vórtex durante 5 segundos y dé un golpe de centrifuga a los tubos.
9. Incube las muestras durante al menos 2 minutos y luego lea en el fluorímetro Qubit. Anote los valores a continuación.
10. El coeficiente de variación ( $CV = \text{desviación estándar}/\text{media}$ ) de las tres lecturas debe ser  $\leq 0,30$ . Anote a continuación.

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

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

| ID de la muestra | Izquierda<br>(ng/μl) | Centro<br>(ng/μl) | Derecha<br>(ng/μl) | Media<br>(ng/μl) | CV<br>(desv. estándar/media) |
|------------------|----------------------|-------------------|--------------------|------------------|------------------------------|
|                  |                      |                   |                    |                  |                              |
|                  |                      |                   |                    |                  |                              |
|                  |                      |                   |                    |                  |                              |
|                  |                      |                   |                    |                  |                              |
|                  |                      |                   |                    |                  |                              |
|                  |                      |                   |                    |                  |                              |
|                  |                      |                   |                    |                  |                              |
|                  |                      |                   |                    |                  |                              |

### **Marcaje**

El ADN está listo para el [Direct Label and Stain \(DLS\) \(30206\)](#). Consulte la sección «Kits y consumibles» en <https://bionanogenomics.com/support/> para conocer cuáles son los kits y protocolos vigentes.

## Apéndice A: Adición de DNA Stabilizer al aspirado de médula ósea humana descongelado en heparina

---

### Configuración

- Verifique el acceso a una microcentrífuga de velocidad variable (400-16 000 x g).
- Para tener en cuenta la variación significativa en la concentración de GB en el aspirado de médula ósea heparinizado de muestras humanas, se deben filtrar y combinar dos alícuotas de 500 µl de cada aspirado de médula ósea heparinizado descongelado. Por cada volumen de 500 µl de muestra de aspirado de médula ósea descongelada, etiquete un tubo de 2,0 ml y coloque un filtro de aspirado de médula ósea en el tubo.
- Ajuste el baño de agua a 37 °C. Verifique la temperatura con un termómetro.

### Descongele el aspirado de médula ósea de heparina, filtre y agregue DNA Stabilizer

#### 1. Procesando las muestras de una en una:

- a. Extraiga el aspirado de médula ósea heparinizado congelado del congelador a -80 °C y descongele en un baño de agua a 37 °C durante 2 minutos (suponiendo que haya ~2 ml en el tubo) utilizando una gradilla flotante para tubos. Extraiga del baño de agua y mantenga a temperatura ambiente.

**Nota:** la cantidad de tiempo necesario para la descongelación varía según el volumen del aspirado de médula ósea congelado que haya que descongelar. Para volúmenes  $\leq 1$  ml, deberían ser suficientes 2 minutos de descongelación a 37 °C. Para volúmenes más grandes, como  $\geq 4,8$  ml, es posible que se requieran hasta 8 minutos de descongelación.

- b. Invierta el tubo de aspirado de médula ósea descongelado 10 veces para mezclar y dé un golpe de centrifuga **durante un segundo** para recoger el material de la tapa del tubo.
- c. Transfiera 500 µl de muestra de aspirado de médula ósea descongelada a cada uno de los dos filtros de aspirado de médula ósea asentados en tubos de microcentrífuga de 2,0 ml etiquetados.

**Nota:** si el material de partida es inferior a 1 ml, agregue el mismo volumen de muestra a cada filtro.

- d. Coloque con cuidado los tubos con filtros asentados en la microcentrífuga de sobremesa y centrifugue durante 5 minutos a 400 x g a temperatura ambiente.

**Nota:** oriente los tubos de microcentrífuga con filtro de manera que las tapas miren hacia el centro del rotor.

- e. Extraiga con cuidado los tubos con filtros asentados de la centrifuga y deseche los filtros en un contenedor de residuos de riesgo biológico.
- f. Mezcle suavemente con pipeta todo el volumen del aspirado de médula ósea 10 veces para mezclar y luego dé un golpe de centrifuga al tubo

**Durante un segundo** para recoger el material de la tapa del tubo.

- g. Después de mezclar con pipeta, combine los dos volúmenes de muestra filtrada en uno de los tubos de 2 ml.
- h. Tape e invierta el tubo que contiene la mezcla de aspirado de médula ósea filtrado 10 veces, y luego dé un golpe de centrifuga al tubo **durante un segundo** para recoger el material de la tapa del tubo.
- i. Transfiera el volumen máximo **medido** a un tubo de 1,5 ml etiquetado.

- j. Agregue la cantidad correspondiente de DNA Stabilizer al aspirado de médula ósea combinado filtrado utilizando la siguiente ecuación:  $\mu\text{l de DNA Stabilizer para agregar} = 15 \times [\mu\text{l del aspirado de médula ósea filtrado}]/1000$ .
- k. Tape e invierta el tubo 10 veces para mezclar y luego dé un golpe de centrifuga al tubo **durante un segundo** para recoger el material de la tapa del tubo. Continúe con el Paso 3b del «Protocolo de aislamiento de ADN de aspirado de médula ósea Bionano Prep SP».

## Solución de problemas

---

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

### El gDNA se libera del disco Nanobind.

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

Pasos que se deben seguir si se aspira la muestra:

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

Como alternativa:

1. Dejando el tubo con la muestra colocado en el imán, dispense el líquido que contiene el gDNA de nuevo en el tubo que contiene el disco.
2. Aspire el líquido del tubo de manera que quede un volumen mínimo (~50 µl) por encima del gDNA suelto y deseche el sobrenadante dejando el ADN en un volumen mínimo en el fondo del tubo.
3. Aspire con cuidado el gDNA suelto que contenga el mínimo de líquido en la punta de la pipeta y pipetee directamente sobre el disco montado en el imán para restablecer la unión.

### El gDNA asociado al Nanobind todavía tiene color en el segundo lavado con WB2

**Evidencia:** después de 20 inversiones en el segundo lavado con WB2, el gDNA asociado al Nanobind todavía tiene color.

Pasos que debe seguir:

1. Levante la gradilla transparente para separarla de la base magnética.
2. Invierta la gradilla transparente boca abajo de modo que los discos Nanobind descansen en las tapas de los tubos y **agite enérgicamente la gradilla para tubos de forma continua durante 10 segundos**, y asegúrese de que los discos Nanobind atraviesen todo el tramo de los microtubos desde la parte superior hasta la parte inferior mientras se realiza la agitación.
3. Vuelva a colocar la gradilla para tubos transparente y los tubos con base magnética como se describe en el Paso 20 en la página 15.
4. Extraiga el sobrenadante como se describe en el Paso 22 en la página 16.

### El gDNA no es homogéneo antes del marcaje

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

Pasos que debe seguir:

1. Aspire y dispense la muestra con una punta de calibre ancho un total de 5 veces.
2. Incube el gDNA a temperatura ambiente durante 1 a 3 días.

3. Después de la incubación, vuelva a aspirar y dispensar la muestra con una punta de calibre ancho 5 veces.
4. Cuantifique con el análisis Qubit BR.

## El gDNA no es viscoso

**Evidencia:** la consistencia de la muestra es muy aguada y fácil de pipetear, pero la concentración es  $>35$  ng/ $\mu$ l.

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

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

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

## Asistencia técnica

---

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

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

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