



Bionano Prep DLS-G2-Protokoll

DOKUMENT-NUMMER:

CG-30553-2

DOKUMENTEN-REVISION:

C

Inhaltsverzeichnis

Rechtsvermerk	3
PATENTE	3
MARKEN	3
Revisionsverlauf	5
Überblick über Bionano Prep DLS-G2	6
VERFAHREN	6
Inhalt des Bionano Prep DLS-G2-Markierungskits und vom Anwender bereitzustellende Materialien	7
Einführung und wichtige Hinweise	8
EINFÜHRUNG	8
WICHTIGE HINWEISE	9
HANDHABUNG VON GENOMISCHER DNA	10
Bionano Prep DLS-G2-Protokoll	12
EINRICHTUNG	12
DLE-1-MARKIERUNG	12
DL-GRÜN-REINIGUNG	14
DNA-FÄRBUNG UND -HOMOGENISIERUNG	15
BELADUNG DES SAPHYR-CHIPS	19
Technische Unterstützung	20

Rechtsvermerk

Nur zu Forschungszwecken. Nicht zur Verwendung in Diagnoseverfahren.

Dieses Dokument ist durch das US-amerikanische Urheberrecht und internationale Verträge geschützt. Die unbefugte Verwendung dieses Dokuments ist untersagt. Kein Teil dieser Publikation darf ohne die ausdrückliche vorherige schriftliche Genehmigung von Bionano Genomics kopiert, vervielfältigt, verteilt, übersetzt, zurückentwickelt oder in irgendeiner Form oder durch irgendein Medium oder mit irgendwelchen Mitteln übertragen werden, unabhängig davon, ob sie derzeit bereits bekannt sind oder nicht. Zum Kopieren gehört nach dem Gesetz auch das Übersetzen in eine andere Sprache oder in ein anderes Format. Die in diesem Dokument enthaltenen technischen Daten sind für den nach US-Gesetz zulässigen Endverbleib vorgesehen. Das Inumlaufbringen unter Verletzung der US-amerikanischen Gesetze ist untersagt. Diese Publikation enthält die neuesten, zum Zeitpunkt der Veröffentlichung verfügbaren Informationen. Aufgrund ständiger Bemühungen zur Verbesserung des Produkts können technische Änderungen auftreten, die in diesem Dokument nicht berücksichtigt wurden. Bionano Genomics behält sich das Recht vor, jederzeit und ohne vorherige Ankündigung Änderungen an den technischen Daten und anderen Informationen in dieser Publikation vorzunehmen. Bitte wenden Sie sich an den Kundendienst von Bionano Genomics, um die neuesten Informationen zu erhalten.

BIONANO GENOMICS LEHNT JEDWEDE AUSDRÜCKLICHE ODER STILLSCHWEIGENDE GEWÄHRLEISTUNG IM ZUSAMMENHANG MIT DIESEM DOKUMENT AB, EINSCHLISSLICH, ABER NICHT BESCHRÄNKT AUF DIE GEWÄHRLEISTUNG DER MARKTGÄNGIGKEIT ODER EIGNUNG FÜR EINEN BESTIMMTEN ZWECK. SOWEIT GESETZLICH ZULÄSSIG, HAFTET BIONANO GENOMICS IN KEINEM FALL, WEDER VERTRAGLICH, NOCH AUFGRUND UNERLAUBTER HANDLUNGEN, EINER GEWÄHRLEISTUNG, AUF GESETZLICHER ODER ANDERER GRUNDLAGE FÜR BESONDERE, BEILÄUFIGE ODER INDIRECTE SCHÄDEN, STRAFSCHADENERSATZ, MEHRFACHE ODER FOLGESCHÄDEN IN VERBINDUNG MIT ODER AUFGRUND DIESES DOKUMENTS, INSBESONDERE DURCH DESSEN VERWENDUNG, UNABHÄNGIG DAVON, OB DIESE VORHERSEHBAR WAREN ODER NICHT UND UNABHÄNGIG DAVON, OB BIONANO GENOMICS DIE MÖGLICHKEIT SOLCHER SCHÄDEN BEKANNT WAR ODER NICHT.

PATENTE

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

MARKEN

Das Logo von Bionano Genomics und die Namen von Produkten oder Dienstleistungen von Bionano Genomics sind eingetragene Handelsmarken oder Marken im Besitz von Bionano Genomics in den Vereinigten Staaten und in bestimmten anderen Ländern.

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

Bionano Genomics erteilt weder stillschweigend noch ausdrücklich eine Lizenz zur Nutzung von Marken. Nutzer dürfen diese Marken nicht ohne die vorherige schriftliche Zustimmung von Bionano Genomics nutzen. Die Nutzung dieser Marken oder anderer Materialien, außer wie hierin gestattet, ist ausdrücklich untersagt und kann einen Verstoß gegen Bundesgesetze oder andere geltende Gesetze darstellen.

© Copyright 2023 Bionano Genomics, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

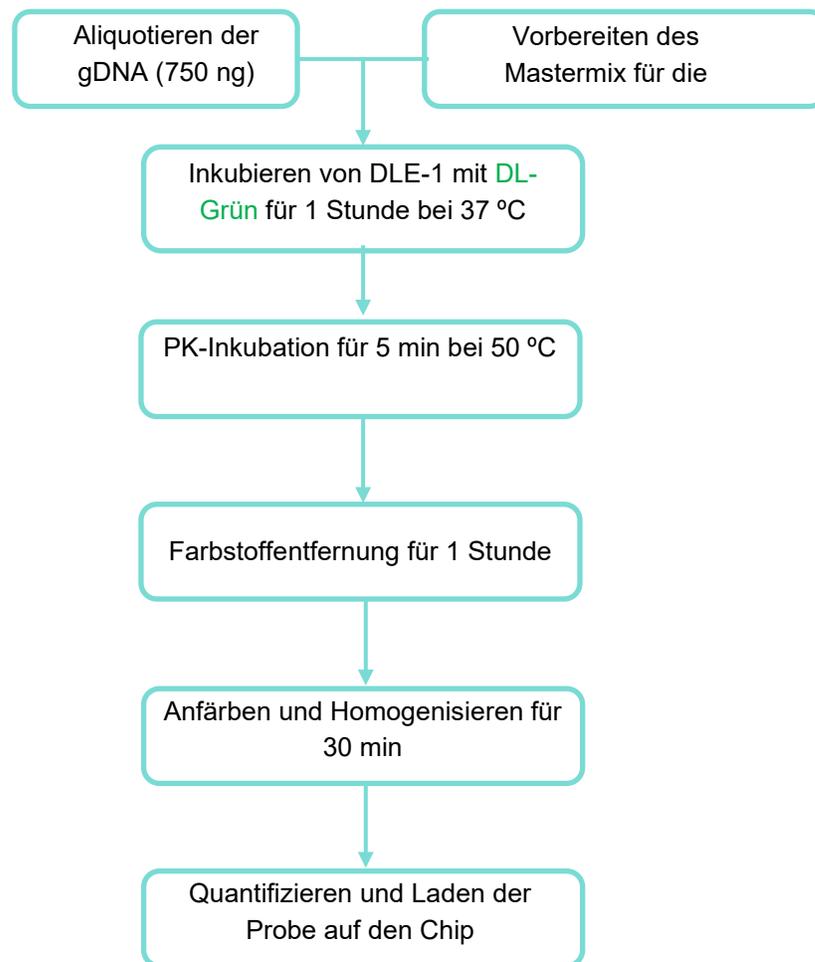
Revisionsverlauf

REVISION	ANMERKUNGEN
A	Erstveröffentlichung
B	Formulierungen in Schritt 9 und 10 zur Klarstellung aktualisiert
C	Abschnitte Leitfaden zur Fehlerbehebung/Häufig gestellte Fragen entfernt. Jetzt in einem eigenständigen Dokument enthalten: CG-30608. Zeiteinschätzungen in den Protokollschritten entfernt

Überblick über Bionano Prep DLS-G2

Das Bionano Prep DLS-G2 (Direct Label und Stain-G2)-Markierungskit und -Protokoll ist ein sequenzspezifisches Markierungskit und Protokoll für die Markierung von ultrahochmolekularer (UHMW) genomischer DNA (gDNA) zur Verwendung auf der Bionano Optical Genome Mapping (OGM)-Plattform, das mit einem Direktmarkierungsenzym (z. B. DLE-1) arbeitet.

VERFAHREN



Inhalt des Bionano Prep DLS-G2-Markierungskits und vom Anwender bereitzustellende Materialien

Tabelle 1: Inhalt des Bionano Prep DLS-G2-Markierungskits (Produkt-Nr. 80046)

Komponente	Artikel-Nr.	Menge	Aufbewahrung	Hinweise zur Handhabung
10x DLE-1	20430	44 µl	-25 °C bis -15 °C	Das Röhrchen dreimal hin- und herschwenken, um den Inhalt zu mischen, und kurz zentrifugieren. Bis zur Verwendung in einem Enzymkühler bei -20 °C aufbewahren.
20x DL-Grün	20429	22 µl	-25 °C bis -15 °C	Bei Raumtemperatur (RT) auftauen lassen. Durch Vortexen vermischen und kurz zentrifugieren. Bis zur Verwendung auf einem vorgekühlten Aluminiumblock aufbewahren.
5x DLE-1-Puffer	20428	175 µl	-25 °C bis -15 °C	Bei Raumtemperatur auftauen lassen. Durch Vortexen vermischen und kurz zentrifugieren. Bis zur Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahren.
DNA-Farbstoff	20356	65 µl	-25 °C bis -15 °C	Bei Raumtemperatur auftauen lassen. Durch Vortexen vermischen und kurz zentrifugieren. Bis zur Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahren. Das DMSO im DNA-Farbstoff kristallisiert auf Eis.
10x DTT	20432	90 µl	-25 °C bis -15 °C	Bei Raumtemperatur auftauen lassen. Durch Vortexen vermischen und kurz zentrifugieren. Bis zur Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahren.
Proteinase K	20434	60 µl	2 °C bis 8 °C	
4x Flusspuffer	20431	225 µl	2 °C bis 8 °C	Durch Vortexen vermischen und kurz zentrifugieren. Bis zur Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahren.
Ultrapures Wasser	20355	900 µl	2 °C bis 30 °C	Bei Zimmertemperatur haltbar.
DLS-24-Well-Platte	20357	1 Platte	15 °C bis 30 °C	Stets abdecken, um eine Staubansammlung zu vermeiden.
DLS-Membranen	20358	je 25	15 °C bis 30 °C	Übermäßige Feuchtigkeit vermeiden.
DLS-Klebefolien	20433	je 12	15 °C bis 30 °C	
DLS-Röhrchen, gelb	20437	je 14	15 °C bis 30 °C	

Tabelle 2: Vom Benutzer bereitzustellende Materialien

Artikel	Lieferant	Katalog-Nr.
HulaMixer-Probenmischer	Thermo Fisher	15920D
Thermocycler mit beheiztem Deckel	Allgemeiner Lieferant für Laborbedarf	
PCR-Röhrchen, 0,2 ml, dünnwandig, flache Kappe, nukleasefrei	Thermo Fisher oder gleichwertiger Lieferant	AM12225
Mikrozentrifugenröhrchen, 0,5 ml, gelb, nukleasefrei	USA Scientific oder gleichwertiger Lieferant	1605-0007
Pipettenspitzen, ohne Filter, 200 µl	USA Scientific oder gleichwertiger Lieferant	1111-1810
Pipettenspitzen, weite Öffnung, mit Filter, 200 µl	VWR oder Rainin oder gleichwertiger Lieferant	46620-642
Pipettenspitzen, Standard, mit Filter, 2, 10, 20 und 200 µl	Allgemeiner Lieferant für Laborbedarf	

Artikel	Lieferant	Katalog-Nr.
Tisch-Enzymkühler, -20 °C	VWR oder gleichwertiger Lieferant	414004-286
Aluminium-Kühlblock für Röhren, 4 °C	Sigma Aldrich oder gleichwertiger Lieferant	Z740270
Pinzette, spitz und gebogen	Electron Microscopy Sciences oder gleichwertiger Lieferant	78141-01
Pipette (2, 10, 20 und 200 µl)	Allgemeiner Lieferant für Laborbedarf	
Eiskübel und Eis	Allgemeiner Lieferant für Laborbedarf	
Vortexer	VWR oder gleichwertiger Lieferant	10153-838
Mikrozentrifuge für Röhren mit 0,2 ml, 0,5 ml und 1,5 ml	Allgemeiner Lieferant für Laborbedarf	
Qubit-Fluorometer	Thermo Fisher	Q33238
Qubit® Assayröhren	Thermo Fisher	Q32856
Qubit® HS (High Sensitivity) dsDNA-Testkit	Thermo Fisher	Q32851
Ultraschallbad (empfohlen)	Branson oder gleichwertiger Lieferant	CPX 952-119R
Direktverdrängungspipette MR-10 (optional)	Rainin oder gleichwertiger Lieferant	17008575
Pipettenspitzen, 10 µl, C-10 für Direktverdrängung (optional)	Rainin oder gleichwertiger Lieferant	17008604

Einführung und wichtige Hinweise

EINFÜHRUNG

Dieses Protokoll beschreibt ein enzymatisches Markierungsverfahren für die direkte Fluoreszenzmarkierung von ultrahochmolekularer (UHMW) gDNA (mit einer Länge von hunderten Kilobasenpaare bis Megabasenpaaren) an einem bestimmten Sequenzmotiv durch das direkte Markierungsenzym (DLE-1). Diese direkte Markierung verursacht keine Nicks in der DNA und ermöglicht die Erstellung von hochgradig zusammenhängenden Genomkarten mit N50-Längen zwischen 20 und 100 Mbp, je nach Genom und Probenqualität.

Das Bionano Prep DLS-G2-Kit enthält Reagenzien für die sequenzspezifische Markierung von UHMW-gDNA für die optische Genomkartierung (Bionano Optical Genome Mapping, OGM) auf dem Saphyr®-System. Nach der sequenzspezifischen Markierung mit DLE-1 wird die markierte DNA zur Visualisierung des Backbones eingefärbt. Bei Visualisierung auf dem Saphyr®-System sind die DL-Grün-Fluoreszenzfarbstoffe als grüne Markierungen auf einem blauen Molekül zu erkennen.

DLE-1-REAKTIONSGRÖßE

Dieses Protokoll ergibt 60 µl markierte DNA. Diese Menge reicht für die Beladung einer einzelnen Durchflusszelle eines Saphyr®-Einweg-Chips aus, wobei im Falle eines geringen Durchsatzes oder eines anderen Fehlers genügend Probenmaterial für eine weitere Durchflusszelle übrigbleibt. Das Ausgangsmaterial sollte mindestens eine Länge von mehreren hundert Kilobasen haben. Falls erforderlich, kann die Größe mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE, pulsed field gel electrophoresis) bestimmt werden. Die Markierungsmesswerte werden

mit dem Saphyr-System bestimmt und in Markierungen/100 Kilobasenpaare (kbp) gemessen. Zusätzliche Markierungsmesswerte können durch Angabe einer Referenz- und Überwachungskartierungsrate, der positiven Markierungsvarianz (positive label variance, PLV) und der negativen Markierungsvarianz (negative label variance, NLV) bestimmt werden. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Wichtige Hinweise“ weiter unten.

Einzelheiten zu den erwarteten Messwerten finden Sie im Dokument Saphyr Molecule Quality Report Guidelines (Artikel-Nr. 30223).

WICHTIGE HINWEISE

Allgemeine Hinweise

- Zur Beladung mit den aufgetauten Reaktionskomponenten und zur Zusammenstellung der Markierungsreaktionen wird die Verwendung eines auf Eis vorgekühlten Aluminium-Kühlblocks empfohlen.
- Enzyme und Puffer sollten präzise herauspipettiert werden, wobei darauf zu achten ist, dass es an der Außenseite der Pipettenspitze nicht zu einer Tröpfchenbildung kommt. Um reproduzierbare Reaktionen zu gewährleisten, sollte das Enzym vollständig in das Reaktionsgefäß abgegeben und eine Blasenbildung sorgfältig vermieden werden. Dies wird am besten erreicht, wenn die Reagenzröhrchen beim Ansaugen oder Abgeben auf Augenhöhe gehalten werden, um den Prozess optisch zu verfolgen.
- Das langsame und gründliche Mischen vom DLE-1-Markierungs-Mastermix mit gDNA durch Pipettieren ist ein entscheidender Schritt, der die Homogenität und Enzympermeabilität der DNA fördert und eine effiziente Markierung der hochviskosen DNA gewährleistet.
- Dieses Protokoll beinhaltet die Handhabung von lichtempfindlichen fluoreszierenden Molekülen. Es ist wichtig, die Lichteinwirkung während der Arbeit zu minimieren. Sowohl die Reaktionen als auch lichtempfindliche Reagenzien sind vor Licht geschützt aufzubewahren.
- Die Konzentration der markierten DNA wird an Tag 1 oder 2 nach der Markierung, Reinigung, Homogenisierung und Färbung und vor dem Beladen gemessen. Die DNA-Homogenität wird durch doppelte Quantifizierung (Variationskoeffizient (CV) < 0,30) bestimmt. Je homogener die markierte DNA ist, desto genauer kann die Konzentration geschätzt und desto gleichmäßiger kann die DNA auf den Chip geladen werden. Die Konzentration der markierten DNA sollte zwischen 4 und 16 ng/µl liegen.

CHARGENGRÖßE

- Es können bis zu 12 Proben gleichzeitig verarbeitet werden.
 - Jedes Bionano Prep DLS-G2-Kit enthält genügend Reagenzien für 12 Proben.

ANFORDERUNGEN AN DIE AUSGANGS-DNA

- Die Probe sollte gDNA in Megabasenlänge enthalten, was in der Regel anhand der Viskosität (hoch) und/oder mittels PFGE der Probe bestimmt wird.
- Die gDNA-Konzentration sollte zwischen 39 und 150 ng/µl liegen.

- gDNA-Proben > 150 ng/µl mit TE-Puffer (pH 8,0) auf 50–150 ng/µl verdünnen und 5-mal mit einer Spitze mit breiter Öffnung mischen. Danach die Probe über Nacht bei Raumtemperatur ruhen lassen. Die endgültige DNA-Konzentration und -Homogenität vor der Markierung überprüfen.
- Bei gDNA-Proben < 39 ng/µl den technischen Kundendienst unter Support@bionanogenomics.com kontaktieren.

BESTIMMUNG DES ENZYMS

- Bei nicht-humanen Proben vor dem Start des DLS-G2-Protokolls die Sequenzdaten für die gewünschte Probe entweder in die Silico-Digestion-Funktion der Bionano Access®-Software oder in die eigenständige Label Density Calculator-Software importieren, um zu prüfen, ob die DLS-G2-Markierung für die Probe angemessen ist. Die tatsächliche Markierungsdichte sollte nicht mehr als ± 2 Markierungen von der vorhergesagten Markierungsdichte abweichen. Im Zweifelsfall steht der technische Kundendienst unter Support@bionanogenomics.com für weitere Hilfestellung zur Verfügung.
- Bei nicht-humanen Proben sind aktuelle Downstream-Analysetools am erfolgreichsten bei Genomen mit DLS-G2-Markierungsdichten zwischen 9 und 25 Markierungen pro 100 kbp.

HANDHABUNG VON GENOMISCHER DNA

ALLGEMEINES

- Dieses Protokoll beinhaltet die Handhabung von viskoser gDNA, die sich nur schwer präzise pipettieren lässt. Es ist wichtig, alle Protokollschritte zu befolgen, um eine genaue DNA-Probenahme sicherzustellen, damit das richtige Enzym-zu-DNA- und DNA-zu-Farbstoff-Verhältnis erreicht wird und eine unnötige Handhabung der gDNA minimiert wird, die dazu führen kann, dass die Molekülgröße nicht für die Analyse ausreicht.

HINZUFÜGEN VON GDNA ZUR MARKIERUNGSRREAKTION

- Um eine genaue Probenahme aus dem viskosen gDNA-Ausgangsmaterial zu gewährleisten, zunächst die Homogenität des DNA-Ausgangsmaterials maximieren, indem die auf Raumtemperatur gebrachte DNA-Lösung vorsichtig mit einer Pipette mit weiter Öffnung durch Pipettieren gemischt wird (5-mal). Für die vollständige Dispersion die nachfolgenden Hinweise zum korrekten Pipettieren in und aus einer Standard-Pipettenspitze oder einer Direktverdrängungspipette beachten.
- Vor dem Aufziehen der viskosen gDNA in eine Pipette mit einer Standardspitze eine identische Wassermenge pipettieren und den Füllstand der Lösung mit einem feinen Marker an der Spitze markieren. Diese Markierung dient später als Orientierungshilfe beim Pipettieren der gDNA. Die markierte Spitze als Orientierungshilfe aufbewahren und für die DNA-Gewinnung eine neue Spitze verwenden. Alternativ kann die Verwendung einer Direktverdrängungspipette die Genauigkeit beim Pipettieren von viskoser gDNA verbessern.
- Um viskose gDNA in eine Standardspitze aufzuziehen, das Röhrchen mit dem DNA-Ausgangsmaterial gut sichtbar in die Hand nehmen, den Pipettenkolben bis zum ersten Anschlag hinunterdrücken, die Pipettenspitze bis in die Mitte der viskosen Lösung eintauchen und den Kolben vorsichtig und so langsam wie möglich zurückziehen. Dabei die Spitze kreisförmig bewegen, um die viskose DNA in die Spitze aufzuziehen.

Währenddessen die Aufnahme der DNA sorgfältig überwachen. Die Spitze noch untergetaucht lassen, auch wenn keine Aufwärtsbewegung der viskosen DNA-Lösung mehr stattfindet und sich die Füllhöhe neu einpendelt (die markierte Spitze als grobe Orientierungshilfe verwenden, um zu überprüfen, ob sich die viskose Lösung auf dem richtigen Niveau eingependelt hat). Es kann bis zu 30 Sekunden dauern, bis die viskose DNA den richtigen Füllstand in der Spitze erreicht hat. Ein zu schnelles Loslassen des Kolbens kann zur Bildung einer Blase in der Spitze und zum Aufziehen eines zu geringen Probenvolumens führen (**HINWEIS:** Der Benutzer muss in diesem Fall von vorn beginnen). Nachdem sich die Lösung in der Pipettenspitze eingependelt hat und während die Spitze noch in die DNA-Lösung eingetaucht ist, mit der Spitze 5-mal mit kreisenden Bewegungen gegen den Boden des Röhrchens kratzen. Die Spitze aus der DNA-Lösung herausziehen und mittels Sichtprüfung bestätigen, dass der richtige Füllstand erreicht ist (mittels Vergleich mit der markierten Spitze). Wenn die Pipettenspitze zu früh aus der gDNA-Lösung herausgezogen wird oder die Spitze nicht richtig am Boden des Röhrchens abgekratzt wird, kann sich am Ende der Pipettenspitze eine Blase bilden, was darauf hindeutet, dass ein zu geringes Probenvolumen aufgezogen wurde (**HINWEIS:** Der Benutzer muss in diesem Fall von vorn beginnen). **Mit Übung und Geduld ist ein genaues Pipettieren von viskoser gDNA möglich.**

- Um das gesamte Volumen der viskosen gDNA in ein Röhrchen oder Mastermix zu geben, das Reaktionsröhrchen so halten, dass es gut zu erkennen ist, und die DNA durch Eintauchen der Pipettenspitze in die Lösung und vorsichtiges Drücken des Kolbens bis zum ersten Anschlag in das Röhrchen abgeben. Dann den Kolben bis zum zweiten Anschlag herunterdrücken und die Abgabe der DNA so lange überwachen, bis sich keine DNA mehr in der Spitze befindet. Sobald die gesamte DNA die Pipettenspitze verlassen hat, die Spitze sofort herausziehen und dabei einen konstanten Druck aufrechterhalten, um das Aufziehen von Flüssigkeit oder das Eindringen von Luftblasen zu vermeiden. Die Spitze nach dem Entfernen aus der Lösung einer Sichtprüfung unterziehen, um sicherzustellen, dass sie leer ist.

Bionano Prep DLS-G2-Protokoll

EINRICHTUNG

1. 20x DL-Grün auftauen. Gut durch Vortexen vermischen und pulscentrifugieren und in einem Aluminiumblock bei 4°C auf Eis legen.
2. 5x DLE-1-Puffer auftauen. Gut durch Vortexen vermischen und pulscentrifugieren. Zur späteren Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahren.
3. 10x DLE-1-Enzyme dreimal schwenken und pulscentrifugieren. Auf dem Labortisch in einem Enzymblock bei -20 °C aufbewahren.
4. Das Röhrchen mit ultrareinem Wasser von der Aufbewahrung bei 4 °C (falls erforderlich) auf Raumtemperatur überführen.

DLE-1-MARKIERUNG

GDNA VERDÜNNEN UND ZUM MARKIERUNGSMIX GEBEN

5. Wenn die gDNA-Quantifizierung gemäß den Anweisungen des Bionano Prep SP-Protokolls unmittelbar vor der Markierung durchgeführt wurde, mit Schritt 6 fortfahren. Wenn nicht, 2 Sekunden pulscentrifugieren und die Quantifizierung wiederholen. Dann mit Schritt 6 fortfahren.
6. In einem dünnwandigen PCR-Röhrchen 750 ng gDNA (a) mit ultrareinem Wasser (b) auf ein Gesamtvolumen von 19,5 µl auffüllen. Das Volumen an gDNA und Wasser für jede Probe in Tabelle 3 aufzeichnen.
 - a. $750 \text{ ng}/[\text{gDNA-Konzentration}] \text{ (ng}/\mu\text{l}) = \mu\text{l gDNA}$
 - b. $19,5 \mu\text{l} - (\mu\text{l gDNA}) = \mu\text{l ultrareines Wasser}$

Tabelle 3: Berechnung des gDNA-Volumens

gDNA-Proben-ID	gDNA-Konzentration (ng/µl)	Volumen ultrareines Wasser (µl)	gDNA-Proben-ID (µl)

gDNA-Proben-ID	gDNA-Konzentration (ng/μl)	Volumen ultrareines Wasser (μl)	gDNA-Proben-ID (μl)

7. Einen Markierungs-Mastermix in einem gelben 0,5-ml-Röhrchen vorbereiten. Die Komponenten in der in **Tabelle 4** angegebenen Reihenfolge hinzufügen. Mischen durch Auf- und Abpipettieren des gesamten Volumens mit einer Standard-Pipettenspitze (5-mal); darauf achten, dass keine Blasen entstehen. 2 Sekunden lang pulscentrifugieren und bis zum Gebrauch in einem Aluminiumblock auf Eis aufbewahren. Die Komponenten nach dem Mischen schnellstmöglich verwenden.

Tabelle 4: Berechnungstabelle für den Markierungs-Mastermix

Markierungsreaktion	Volumen für eine Probe	Anzahl Proben	Zusatzvolumen für Mastermix	Mastermix Gesamtmenge
5x DLE-1-Puffer	6,0 μl		× 1,2	μl
20x DL-Grün	1,5 μl		× 1,2	μl
10x DLE-1	3,0 μl		× 1,2	μl
Gesamtvolumen Mastermix	10,5 μl			μl

8. Mit einer Standard-Pipettenspitze 10,5 μl Mastermix oben auf die 19,5 μl (gDNA + ultrareines Wasser) pipettieren. Die Pipette auf 28 μl einstellen, die Probe langsam durch Auf- und Abwärtsbewegungen vermischen (5 x) (eine Aufwärts- und eine Abwärtsbewegung ergeben zusammen einen Mischvorgang). Das Röhrchen 2 Sekunden lang pulscentrifugieren. **WARNUNG: Die Proben lichtgeschützt aufbewahren.** ⚠

HINWEIS: Weitere Hinweise sind dem [Video](https://bionanogenomics.com/support-page/dna-labeling-kit-dls/) DLS Master Mix Mixing unter <https://bionanogenomics.com/support-page/dna-labeling-kit-dls/> zu entnehmen.

HINWEIS: Um alle Moleküle effizient zu markieren muss die Probe sorgfältig und gründlich gemischt werden. Die Probe vom Boden aufziehen und in den oberen Bereich abgeben (ohne mit der Pipettenspitze das Röhrchen zu berühren), um eine gute Mischung zu erzielen.

Markierungsreaktion

9. In einem auf 47 °C eingestellten Thermocycler mit beheiztem Deckel inkubieren, oder das Gerät auf „On“ stellen, wenn keine Temperaturwahl möglich ist:

- a. 1 Stunde bei 37 °C (Thermocyclertemperatur)
- b. Die Temperatur bis zum nächsten Schritt auf 4 °C halten. **WARNUNG: Die Proben lichtgeschützt aufbewahren.** ⚠

HINWEIS: Nachdem die Proben in den Thermocycler gegeben wurden, während der Inkubation der Markierungsreaktion die Mikroplatte für die DL-Grün-Reinigung (Schritt 12) vorbereiten.

PROTEINASE K-VERDAUUNG

10. 5 µl Proteinase K direkt in den Mittelteil der Probe im Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Röhrchen pipettieren. Nicht mischen, um zu vermeiden, dass an der Spitze haftende DNA versehentlich entfernt werden könnte.
11. In einem auf 60 °C eingestellten Thermocycler mit beheiztem Deckel inkubieren, oder das Gerät auf „On“ stellen, wenn keine Temperaturwahl möglich ist:
 - a. 5 Minuten bei 50 °C (Thermocyclertemperatur)
 - b. Die Temperatur bis zum nächsten Schritt auf 4 °C halten. Nach Entnahme aus dem Thermocycler schnell mit dem nächsten Schritt fortfahren. Kurz pulszentrifugieren. **WARNUNG: Die Proben lichtgeschützt aufbewahren.** ⚠

DL-GRÜN-REINIGUNG

MEMBRANADSORPTION IN DER MIKROTITERPLATTE

HINWEIS: Die Membranen können unmittelbar nach dem Einrichten der Markierungsreaktion benetzt werden. Die Platte bis zum Gebrauch mit Klebefolie verschließen.

HINWEIS: Weitere Informationen zu Schritt 12–13 sind dem Video [DLS Membrane Demo](#) auf der Kundendienst-Website für das [DLS-Markierungskit](#) zu entnehmen.

12. Bei jeder Probe die Unterseite von 1 DLS-Membran mit 1x DLE-1-Puffer in der von Bionano bereitgestellten Mikrotiterplatte benetzen:
 - a. Für jede Probe 30 µl 1x DLE-1-Puffer (6 µl 5x DLE-1-Puffer + 24 µl ultrareines Wasser) vorbereiten. Durch Vortexen vermischen. Für 2 Sekunden pulszentrifugieren.
 - b. 25 µl 1x DLE-1-Puffer in die Mitte einer Vertiefung der DLS-Mikroplatte pipettieren.
 - c. Eine Pinzette mit stumpfem Ende verwenden, um eine DLS-Membran auf den Puffer zu legen.
 - d. Die Vertiefungen sofort mit DLS-Klebefolie verschließen, um ein Verdunsten bis zu den nächsten Verfahrensschritten zu verhindern.

HINWEIS: **Nach 3 Minuten prüfen, ob die Membranen nach vollständig benetzt sind.** Benetzte Membranen haben über die gesamte Fläche ein gleichmäßiges, durchscheinend blaues Aussehen. Wenn eine Membran nach

3 Minuten nicht benetzt ist, die Membran entsorgen und eine neue Membran aus der Packung benetzen. Bei Fragen wenden Sie sich an support@bionanogenomics.com.

13. Die DL-Grün-Reinigung durchführen. Dazu die markierte DNA-Probe auf die Mitte der benetzten Membran geben:

- a. Mit einer auf 37 µl eingestellten 200-µl-Standardpipettenspitze das gesamte Volumen (ca. 35 µl) der markierten DNA auf die Mitte der DLS-Membran pipettieren.
- b. Die Membranvertiefungen mit DLS-Klebefolie verschließen. Um ein Verdunsten zu verhindern, die Mikrotiterplatte festhalten und Druck auf den Dichtungsstreifen ausüben, um diesen am oberen Rand der Vertiefungen zu befestigen.
- c. **WARNUNG: Die Mikrotiterplatte vor Licht schützen (abdecken)** ⚠ und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren. Sicherstellen, dass die Platte ruhig steht und während der Inkubation nicht versehentlich bewegt wird.

14. Während der einstündigen Inkubationszeit 10x DTT, 4x Flusspuffer und DNA-Färbemittel Raumtemperatur annehmen lassen. Nach dem Auftauen alle Röhren gut durch Vortexen vermischen und kurz pulszentrifugieren, um den Inhalt zu sammeln. Alle Röhren bis zur Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahren.

15. Nach einer Stunde die Platte festhalten und die DLS-Klebefolie vorsichtig abziehen.

16. Mit einer auf 35 µl eingestellten 200-µl-Standardpipettenspitze die gesamte markierte Probe langsam ansaugen. Dabei die Membran senkrecht berühren und die Spitze beim Ansaugen über den DNA-Bereich bewegen, um die DNA zu sammeln. In ein neues PCR-Röhrchen oder ein gelbes 0,5-ml-Mikrofugeröhrchen überführen. Für 2 Sekunden pulszentrifugieren. **WARNUNG: Die Röhrchen vor Licht schützen (abdecken)**.



17. Mit einer 200-µl-Pipette 20 µl der markierten Probe aus dem PCR-Röhrchen bzw. dem gelben 0,5-ml-Röhrchen in das gelbe DLS-Rundboden-Röhrchen (2 ml) überführen und mit dem nächsten Schritt (DNA-Färbung und Homogenisierung) fortfahren.

- a. Wenn < 20 µl Probenvolumen angesaugt wurde, das Volumen mit 1x DLE-1-Puffer auf insgesamt 20 µl auffüllen.

DNA-FÄRBUNG UND -HOMOGENISIERUNG

18. Den Staining-Mastermix gemäß **Tabelle 5** vorbereiten.

Tabelle 1: Berechnungstabelle für Staining-Mastermix

Färbereaktion	1 Probe	Anzahl Proben	Zusatzvolumen für Mastermix	Mastermix Gesamtmenge
4x Flusspuffer	15 µl		× 1.25	µl
10x DTT	6 µl		× 1.25	µl
DNA-Farbstoff	3.5 µl		× 1.25	µl
Ultrapures Wasser	15.5 µl		× 1.25	µl
Gesamtvolumen der Färbereaktionsmischung	40 µl			µl

HINWEIS: Lösungen, die Flusspuffer enthalten, aufgrund der Viskosität des Flusspuffers langsam pipettieren, um die Genauigkeit zu erhöhen.

19. Für jede markierte DNA 40 µl Staining-Mastermix oben auf die markierte Probe (20 µl) im gelben DLS-Rundboden-Röhrchen (2 ml) geben. Nicht mischen.

HINWEIS: Der Mastermix wird oben auf die Lösung pipettiert, um zu vermeiden, dass versehentlich DNA angesaugt wird, die an der Pipettenspitze hängen geblieben sein könnte.

20. Die gelben DLS-Rundboden-Röhrchen mit den Proben in einen HulaMixer (Thermo Fisher) geben, der auf eine Geschwindigkeit von 5 Umdrehungen pro Minute (rpm) eingestellt ist. Die Oberfläche des Röhrchenhalters sollte flach und parallel zur Arbeitsfläche ausgerichtet sein. Dreißig Minuten bei Raumtemperatur mischen. Dabei alle anderen Optionen außer der Rotation ausschalten.

21. Die Proben nach 30 Minuten vom HulaMixer nehmen. Für 2 Sekunden pulscentrifugieren.

HINWEIS: Die Rotation darf nicht länger als dreißig Minuten dauern, da sonst der N50-Wert des Moleküls abnehmen kann.

22. Wenn die Datenerfassung noch an demselben Tag erfolgen soll, die Quantifizierung unmittelbar vor dem Laden der Proben auf den Saphyr-Chip durchführen. Andernfalls die Proben **lichtgeschützt** bei 4 °C aufbewahren.



(Das Protokoll wird unten fortgesetzt; potenzielles Ende von Tag 1, bei Bedarf.)

HINWEIS: Anhand der Liste der vom Anwender bereitzustellenden Verbrauchsmaterialien und Geräte prüfen, ob alle benötigten Utensilien verfügbar sind.

QUANTIFIZIERUNG DER MARKIERTEN UND GEFÄRBTEN DNA

Vor dem Beladen des Saphyr-Chips die Endkonzentration der markierten und gefärbten DNA bestimmen. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn die DNA-Konzentration (Durchschnitt von zwei Messungen) zwischen 4

und 16 ng/µl liegt. Die Schwankungen in der Endkonzentration sind auf die Schwierigkeiten bei der genauen Entnahme der viskosen Ausgangs-gDNA und Schwankungen bei der Wiedergewinnung der gDNA im Rahmen des DL-Grün-Entfernungsschritts zurückzuführen. Wenn die Probenkonzentration nicht in diesen Bereich liegt, sind im Leitfaden zur Fehlerbehebung (CG-30608) Empfehlungen zu Abhilfemaßnahmen zu finden.

Qubit dsDNA HS (High Sensitivity)-Testkit und Qubit-Fluorometer:

HINWEIS: Das Standard-Qubit dsDNA HS-Testprotokoll liefert aufgrund der extremen Länge der markierten DNA keine genauen Konzentrationsmessungen. Das Qubit-Protokoll wurde dahingehend geändert, dass es einen Ultraschallschritt zur Fragmentierung eines Aliquots der markierten DNA enthält, um genaue Konzentrationsmessungen zu gewährleisten. Weitere Informationen sind dem Benutzerhandbuch des Qubit dsDNA HS Testkits zu entnehmen.

1. Die markierte und gefärbte DNA mit einer auf 50 µl eingestellten 200-µl-Pipette mit weiter Öffnung fünf Mal mischen. Pulszentrifugieren.
2. Die Qubit HS-Standards und die markierte DNA mindestens dreißig Minuten lang Raumtemperatur annehmen lassen.
3. 0,5-ml-Qubit Assayröhrchen vorbereiten:
 - a. 2 separate Assayröhrchen für die HS-Standardmessung mit jeweils 10 µl Qubit HS-Puffer
 - b. Zwei separate Assayröhrchen pro markierte Probe mit jeweils 18 µl Qubit HS-Puffer
4. Mit einer Standardpipettenspitze oder einer Direktverdrängungspipette zwei getrennte 2-µl-Aliquots von jeder Probe entnehmen und in 18 µl HS-Qubit-Puffer in einem Qubit-Assayröhrchen geben. Dabei die Spitze in die Lösung tauchen und spülen. Die Qubit-Röhrchen in ein schwimmendes Gestell stellen und zehn Minuten lang in einem Ultraschallbad beschallen. Während der Ultraschallanwendung die Arbeitslösung gemäß Anweisungen in Schritt 5 vorbereiten.

HINWEIS: Wenn beim Entfernen der Spitze aus dem Röhrchen ein langer DNA-Strang an der Spitze anhaftet, die Probe zurück in das Röhrchen geben und die Aliquotentnahme mit einer neuen Spitze wiederholen.

- a. Wenn kein Ultraschallbad zur Verfügung steht, mindestens 30 Sekunden lang mit maximaler Geschwindigkeit vortexen und dann 2 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
5. Die Arbeitslösung vorbereiten. Dazu das Farbstoff-Testreagenz in HS-Verdünnungspuffer (1:200) verdünnen:
 - a. 200 µl Arbeitslösung für jeden der beiden Standards vorbereiten (insgesamt 400 µl).
 - b. 200 µl Arbeitslösung für jedes Proben-Aliquot vorbereiten (400 µl für jede Probe).
6. Für die Qubit DNA-Standards 10 µl von Standard 1 und 2 in separate, beschriftete Qubit-Assayröhrchen geben,

BELADUNG DES SAPHYR-CHIPS

Eine vollständige Anleitung zum Beladen des Chips und Betrieb des Instruments ist dem **Saphyr System User Guide** (für Saphyr-Produktnummer [60325](#) oder [60239](#)) zu entnehmen.

HINWEIS: Die DLS-markierten Proben für die Beladung des Chips aus der Mitte des Röhrchens ansaugen.

Technische Unterstützung

Für technische Unterstützung wenden Sie sich bitte an den technischen Kundendienst von Bionano Genomics.

Materialien zu Bionano-Produkten, Sicherheitsdatenblätter, Analysezertifikate, häufig gestellte Fragen und andere Unterlagen können Sie auf der Kundendienst-Website einsehen oder auf Anfrage per E-Mail und Telefon anfordern.

ART	KONTAKT
E-Mail	support@bionanogenomics.com
Telefon	Öffnungszeiten: Montag bis Freitag, 9:00 bis 17:00 Uhr, PST USA: +1 (858) 888-7663
Website	www.bionanogenomics.com/support
Adresse	Bionano Genomics, Inc. 9540 Towne Centre Drive, Suite 100 San Diego, CA 92121