Protocolo Bionano Prep DLS-G2

NÚMERO DE DOCUMENTO:
CG-30553-3

REVISIÓN DEL DOCUMENTO:
D

Uso exclusivo para fines de investigación. No debe utilizarse en procedimientos de diagnóstico..

bionano

Índice

Historial de revisiones **3**

Descripción general de Bionano Prep DLS-G2 **4**

PROCEDIMIENTO 4

Kit de marcaje Bionano Prep DLS-G2 y materiales proporcionados por el usuario **5**

Introducción y notas importantes **7**

INTRODUCCIÓN 7

NOTAS IMPORTANTES 7

MANIPULACIÓN DE ADN GENÓMICO 9

Protocolo Bionano Prep DLS-G2 **11**

PREPARACIÓN 11

MARCAJE CON DLE-1 11

CLEAN-UP DEL DL-GREEN 13

TINCIÓN Y HOMOGENEIZACIÓN DEL ADN 15

CUANTIFICACIÓN DEL ADN MARCADO Y TEÑID 16

CARGA DEL SAPHYR CHIP 18

Asistencia técnica **19**

Aviso legal **20**

PATENTES 20

MARCAS COMERCIALES 20

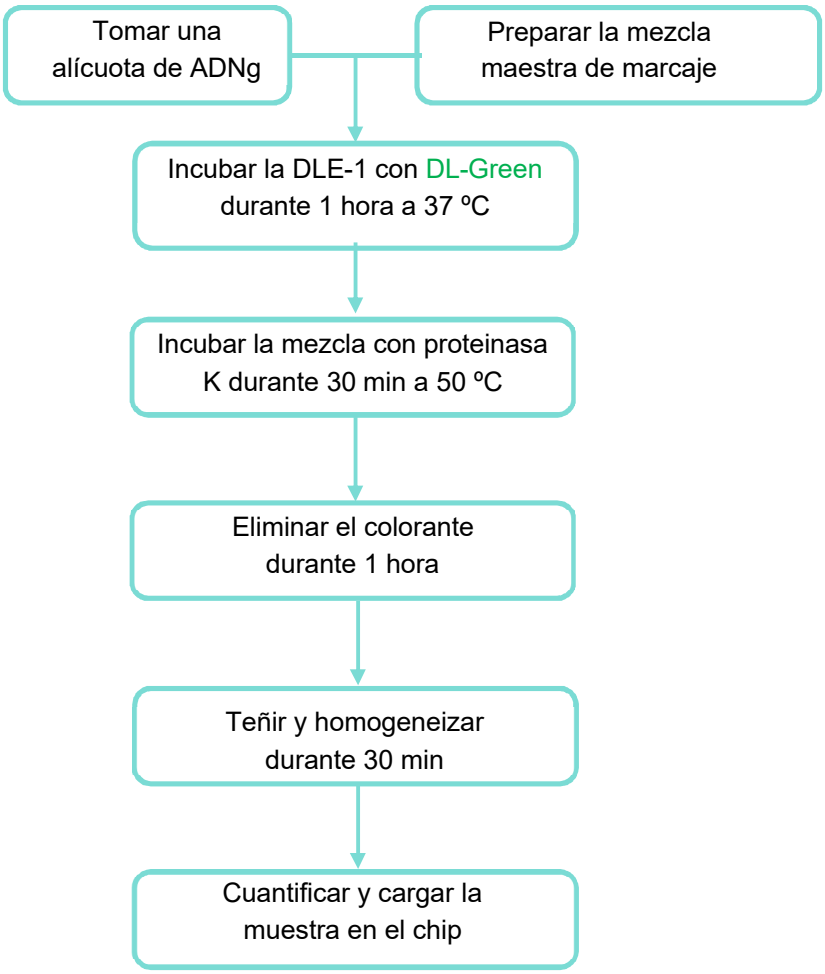
Historial de revisiones

REVISIÓN	NOTAS
A	Publicación inicial
B	Texto actualizado en los pasos 9 y 10 con fines de clarificación
C	Eliminadas las secciones Solución de problemas y Preguntas frecuentes, ahora contenidas en un documento independiente: CG-30608. Eliminadas las estimaciones de tiempo en los pasos del protocolo.
D	Tiempo de digestión de Prot.K actualizado de 5 minutos a 30 minutos en todo el documento. En los materiales suministrados por el usuario, se quitaron las puntas de pipeta estándar sin filtro y se reemplazaron por puntas de pipeta estándar con filtro.

Descripción general de Bionano Prep DLS-G2

El kit y protocolo de marcaje Bionano Prep DLS-G2 (Direct Label and Stain-G2) es un kit y protocolo de marcaje específico para secuencias de ácido desoxirribonucleico genómico (ADNg) de peso molecular ultraalto (UHMW, por su sigla en inglés) diseñado para ser utilizado en la plataforma Bionano Optical Genome Mapping (OGM) con una enzima de marcaje directo (p. ej., DLE-1).

PROCEDIMIENTO



Kit de marcaje Bionano Prep DLS-G2 y materiales proporcionados por el usuario

Tabla 1: Contenido del kit de marcaje Bionano Prep DLS-G2 (ref. 80046)

Componente	Ref.	Cantidad	Almacenamiento	Consideraciones de manipulación
10x DLE-1	20430	44 µl	De -25 °C a -15 °C	Golpee suavemente el tubo tres veces para mezclar su contenido y centrifúguelo brevemente. Almacene la muestra en un congelador para enzimas a -20 °C hasta su uso.
20x DL-Green	20429	22 µl	De -25 °C a -15 °C	Descongele la mezcla a temperatura ambiente. Agite la mezcla en un vórtex y centrifúguela brevemente. Almacene la mezcla en un bloque de aluminio enfriado previamente hasta su uso.
5x tampón para DLE-1	20428	175 µl	De -25 °C a -15 °C	Descongele la mezcla a temperatura ambiente. Agite la mezcla en un vórtex y centrifúguela brevemente. Mantenga la mezcla a temperatura ambiente hasta su uso.
Colorante de ADN	20356	65 µl	De -25 °C a -15 °C	Descongele la mezcla a temperatura ambiente. Agite la mezcla en un vórtex y centrifúguela brevemente. Mantenga la mezcla a temperatura ambiente hasta su uso; el dimetilsulfóxido (DMSO) presente en el colorante de ADN se cristaliza sobre hielo.
10x ditiotreitol (DTT)	20432	90 µl	De -25 °C a -15 °C	Descongele la mezcla a temperatura ambiente. Agite la mezcla en un vórtex y centrifúguela brevemente. Mantenga la mezcla a temperatura ambiente hasta su uso.
Proteinasa K	20434	60 µl	De 2 °C a 8 °C	
4x tampón de flujo	20431	225 µl	De 2 °C a 8 °C	Agite la mezcla en un vórtex y centrifúguela brevemente. Mantenga la mezcla a temperatura ambiente hasta su uso.
Agua ultrapura	20355	900 µl	De 2 °C a 30 °C	Puede mantenerse a temperatura ambiente.
Placa de 24 pocillos DLS	20357	Una placa	De 15 °C a 30 °C	Mantenga la placa cubierta para evitar el depósito de polvo.
Membranas DLS	20358	25 unidades	De 15 °C a 30 °C	Evite el exceso de humedad.
Láminas de cinta DLS	20433	12 unidades	De 15 °C a 30 °C	
Tubos DLS de color topacio	20437	14 unidades	De 15 °C a 30 °C	

Tabla 2: Materiales proporcionados por el usuario

Artículo	Descripción	N.º de catálogo
Mezclador de muestras HulaMixer*	Thermo Fisher	15920D
Termociclador con tapa térmica+	Proveedor de laboratorio general	
Tubos para reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por su sigla en inglés) de 0,2 ml, con paredes finas, tapón plano, sin nucleasas	Thermo Fisher o equivalente	AM12225
Tubos de microcentrifugación de 0,5 ml, color topacio, sin nucleasas	USA Scientific o equivalente	1605-0007
Puntas de pipeta de 200 µl, con orificio grande, con filtro	VWR o equivalente para Rainin	46620-642
Puntas de pipeta estándar de 2 µl, 10 µl, 20 µl y 200 µl, con filtro	Proveedor de laboratorio general	
Congelador de enzimas de sobremesa a -20 °C	VWR o equivalente	414004-286
Bloque de aluminio para enfriamiento de tubos a 4 °C	Sigma Aldrich o equivalente	Z740270
Pinzas puntiagudas y curvas	Electron Microscopy Sciences o	78141-01
Pipetas (2 µl, 10 µl, 20 µl y 200 µl)	Proveedor de laboratorio general	
Cubo para hielo y hielo	Proveedor de laboratorio general	
Agitador vórtex	VWR o equivalente	10153-838
Microcentrífuga para tubos de 0,2 ml, 0,5 ml y 1,5 ml	Proveedor de laboratorio general	
Fluorímetro para Qubit*	Thermo Fisher	Q33238
Tubos de ensayo Qubit®*		Thermo Fisher
Kit de ensayo de alta sensibilidad (HS) de ADNbc Qubit®*	Thermo Fisher	Q32851
Baño ultrasónico (recomendado)	Branson o equivalente	CPX 952-119R
Pipeta de desplazamiento positivo MR-10 (opcional) **	Rainin o equivalente	17008575
Puntas de pipeta de 10 µl, C-10 para desplazamiento positivo (opcional) **	Rainin o equivalente	17008604

*(Artículo en azul) Recomendamos encarecidamente no sustituir este equipo y obtener el artículo exacto recomendado, ya que su uso dará el resultado más exitoso del flujo de trabajo.
+Los termocicladores con regulación de temperatura de la tapa o con la opción de encender/apagar el calentamiento de la tapa son aceptables para nuestro flujo de trabajo.
**Una pipeta de desplazamiento positivo es una pipeta especial con un émbolo que acciona un pistón incorporado en puntas especiales que van con la pipeta. Dichas pipetas y puntas son muy efectivas para pipetear y dispensar con precisión pequeños volúmenes de líquidos viscosos y, por lo tanto, se recomienda encarecidamente su uso al tomar alícuotas de ADNg de peso molecular ultraalto aislado mediante los protocolos de Bionano.

Introducción y notas importantes

INTRODUCCIÓN

Este protocolo describe un método de marcaje enzimático para el marcaje fluorescente directo de ADNg UHMW (de cientos de pares de kilobases a megapares de bases de longitud) en un motivo de secuencia específico mediante la enzima de marcaje directo (DLE-1, por su sigla en inglés). Este marcaje directo no introduce mellas en el ADN y permite a los usuarios generar mapas genómicos muy contiguos, con valores N50 de 20 Mbp a 100 Mbp en función del genoma y la calidad de la muestra.

El kit Bionano Prep DLS-G2 proporciona reactivos para el marcaje específico de secuencias de ADNg UHMW para cartografiado Bionano Optical Genome Mapping (OGM) en el sistema Saphyr®. Tras realizar el marcaje específico de una secuencia con DLE-1, el ADN marcado se tiñe para visualizar la cadena principal. Cuando se evalúan en el instrumento Saphyr®, los fluoróforos DL-Green se ven como marcas verdes sobre una molécula azul.

Tamaño de reacción de DLE-1

Este protocolo genera 60 µl de ADN marcado. Esta es una cantidad suficiente para cargar una única celda de flujo de material fungible del dispositivo Saphyr Chip®, quedando un volumen de muestra restante suficiente para la carga de una celda de flujo adicional en casos de rendimiento bajo u otro fallo. El material de partida debe tener al menos cientos de kilobases de longitud. De ser necesario, su tamaño puede determinarse mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, por su sigla en inglés). Las mediciones de los marcajes se determinan con el instrumento Saphyr y se expresan en marcas/100 pares de kilobases (kbp, por su sigla en inglés). Pueden determinarse mediciones de marcaje adicionales si se aporta una tasa de referencia y control cartográfico, la desviación positiva de la marca (PLV, por su sigla en inglés) y la desviación negativa de la marca (NLV, por su sigla en inglés). Consulte la sección «Notas importantes» a continuación para obtener más información al respecto.

Pueden consultarse datos sobre las mediciones esperadas en el documento Saphyr Molecule Quality Report Guidelines (Directrices Saphyr para el informe de calidad de las moléculas, ref. 30223).

NOTAS IMPORTANTES

Consideraciones generales

- Se recomienda el uso de un bloque de aluminio de enfriamiento de tubos enfriado previamente en hielo para sostener los componentes de reacción descongelados y preparar las reacciones de marcaje.
- Las enzimas y los tampones deben pipetearse con precisión, sin que queden gotas colgando en el exterior de la punta de la pipeta. La enzima debe introducirse por completo en el tubo de reacción y debe evitarse la formación de burbujas para garantizar que se produzcan reacciones reproducibles. Para ello, los tubos de reactivos deben sostenerse a la altura de los ojos al aspirar o dispensar las mezclas, a fin de poder visualizar el proceso.

- El mezclado lento y meticuloso con la pipeta de la mezcla maestra de DLE-1 con el ADNg es un paso crítico, ya que promueve la homogeneidad del ADN y la accesibilidad de las enzimas para lograr un marcaje eficiente de ADN de gran viscosidad.

- Este protocolo entraña la manipulación de moléculas fluorescentes sensibles a la luz. Por este motivo, es importante que se minimice la exposición a la luz mientras se trabaja. Proteja de la luz tanto a las reacciones como a los reactivos sensibles a la luz durante su almacenamiento.

- La concentración de ADN marcado debe medirse el día 1 o 2, después del marcaje, el enjuagado, la homogeneización y la tinción, y antes de la carga. La homogeneidad del ADN debe evaluarse mediante una cuantificación por duplicado (coeficiente de variación [CV] <0,30). El ADN homogéneo y marcado permite efectuar una estimación precisa de la concentración y una carga más uniforme del ADN en el chip. La concentración de ADN marcado debe ser de entre 4 ng/µl y 16 ng/µl.

Tamaño del lote

- Pueden procesarse hasta doce muestras a la vez.

    - Cada kit Bionano Prep DLS-G2 contiene una cantidad de reactivos suficiente para procesar doce muestras.

Requisitos del ADN de partida

- La muestra debe contener ADNg con una longitud de megabases, que habitualmente se determina por una viscosidad elevada o mediante PFGE.

- La concentración de ADNg debe ser de entre 39 ng/µl y 150 ng/µl.

    - Las muestras de ADNg >150 ng/µl deben diluirse con tampón tris-ácido etilendiaminotetraacético (TE) (pH 8,0) hasta una concentración de entre 50 ng/µl y 150 ng/µl, mezclarse cinco veces con una punta con orificio grande y dejarse reposar durante la noche a temperatura ambiente. Verifique la concentración y homogeneidad finales del ADN antes de proceder con el marcaje.

    - Para muestras de ADNg <39 ng/µl, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica a través del correo electrónico support@bionano.com.

Enzima determinante

- En el caso de muestras de seres humanos, antes de iniciar el protocolo DLS-G2, importe los datos de secuencias de la muestra deseada en la función In Silico Digestion del programa informático Bionano Access® o en el programa informático independiente Label Density Calculator para asegurarse de que el marcaje DLS-G2 sea la opción apropiada para la muestra. La densidad de marcaje real debe estar comprendida en el intervalo de ±2 marcas con respecto a la densidad de marcaje prevista. Para obtener orientación en caso de dudas, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica a través del correo electrónico support@bionano.com.

- En el caso de muestras de seres no humanos, las herramientas actuales de análisis distal son más eficaces con genomas que tengan densidades de marcaje DLS-G2 de entre 9 y 25 marcas por 100 kbp.

MANIPULACIÓN DE ADN GENÓMICO

General

- Este protocolo implica la manipulación de ADNg viscoso, que resulta difícil de pipetear con precisión. Por ello, resulta fundamental seguir todos los pasos de este protocolo para garantizar que se obtiene una muestra precisa del ADN, a fin de lograr una proporción adecuada de enzima frente a ADN y de ADN frente al colorante, así como para minimizar la manipulación innecesaria del ADNg, ya que ello podría dar lugar a moléculas de tamaño insuficiente para el análisis.

Adición del ADNg a la reacción de marcaje

- Para asegurar una muestra precisa de la solución madre de ADNg viscoso, maximice primero la homogeneidad de la solución madre de ADN utilizando una pipeta con una punta de calibre ancho para mezclar con suavidad la solución de ADN equilibrada a temperatura ambiente un total de cinco veces y siga las pautas que aparecen a continuación para pipetear correctamente en ambos sentidos con una punta de pipeta estándar, o bien una pipeta de desplazamiento positivo, para conseguir una administración total de la muestra.

- Antes de extraer ADNg viscoso con una punta estándar, pipetee un volumen idéntico de agua y marque el nivel de la solución en la punta con un marcador de punta fina para que le sirva de guía al pipetear el ADNg. Guarde la punta marcada como una guía y utilice una nueva punta para la extracción del ADN. Como alternativa, el uso de una pipeta de desplazamiento positivo puede mejorar la coherencia a la hora de pipetear ADNg viscoso.

- Para extraer ADNg viscoso con una punta estándar, sostenga el tubo de la muestra de ADN original para visualizarlo de cerca, presione el émbolo de la pipeta hasta el primer tope, sumerja la punta de la pipeta hacia el centro de la solución viscosa y suelte el émbolo con cuidado, lo más **despacio** posible, mientras realiza movimientos circulares con la punta para atraer el ADN viscoso hacia la punta, al tiempo que supervisa con atención la captación de ADN. Mantenga la punta sumergida incluso después de que la solución viscosa de ADN deje de moverse hacia arriba y se nivele (use la punta marcada como una guía aproximada para determinar si la solución viscosa se nivela a la altura de la marca apropiada). El ADN viscoso puede tardar hasta 30 segundos en llenar la punta hasta el nivel apropiado. Si suelta el émbolo con demasiada rapidez podría formarse una burbuja en la punta y causar un muestreo insuficiente (**NOTA**: Si esto ocurre, el usuario debe reiniciar el proceso). Una vez que la solución presente en la punta de la pipeta se haya nivelado y mientras la punta todavía se encuentre sumergida en la solución de ADN, arrastre la punta contra el fondo del tubo cinco veces realizando un movimiento circular. Retire la punta de la solución de ADN e inspecciónela a simple vista para confirmar que se ha llenado hasta el nivel apropiado en comparación con la punta marcada. Retirar la punta de la pipeta de la

solución de ADNg demasiado pronto o arrastrarla de manera incorrecta contra la parte inferior del tubo puede provocar la formación de una burbuja en el extremo de la punta de la pipeta, lo que indicaría que la muestra es insuficiente (**NOTA**: Si esto ocurre, el usuario debe reiniciar el proceso). **Puede lograrse un pipeteado preciso de ADNg viscoso con práctica y paciencia.**

- Para depositar el volumen total de ADNg viscoso en un tubo o la mezcla maestra, sostenga el tubo de reacción manualmente para visualizarlo de cerca y transfiera el ADN introduciendo la punta de la pipeta en la solución y presionando suavemente el émbolo hasta el primer tope y, a continuación, hasta el segundo, mientras supervisa la liberación del ADN y hasta que se haya transferido la totalidad del ADN de la punta. Retire inmediatamente la punta tan pronto como la última porción de ADN haya salido de la punta de la pipeta mientras mantiene una presión constante para evitar la captación de líquido o la introducción de burbujas de aire. Inspeccione la punta a simple vista después de retirarla de la solución para confirmar que se encuentre vacía.

Protocolo Bionano Prep DLS-G2

PREPARACIÓN

1. Descongele 20x de DL-Green. Agite la solución en el vórtex, dele un golpe de centrífuga y almacene sobre hielo en un bloque de aluminio a 4 °C.
2. Descongele 5x tampón para DLE-1**.** Agite bien en el vórtex y dele un golpe de centrífuga. Almacene a temperatura ambiente para su uso posterior.
3. Golpee tres veces 10x de DLE-1 y dele un golpe de centrífuga. Almacene la solución en la mesa de trabajo en un bloque enzimático a -20 °C.
4. Retire el tubo de agua ultrapura almacenado a 4 °C (de ser necesario) y consérvelo a temperatura ambiente.

MARCAJE CON DLE-1

Diluya el ADNg y combínelo con la mezcla de marcaje

5. Si la cuantificación de ADNg se ha efectuado de acuerdo con las instrucciones del protocolo Bionano Prep SP e inmediatamente antes del marcaje, continúe con el paso 6. De lo contrario, dele un golpe de centrífuga durante dos segundos y repita la cuantificación antes de continuar con el paso 6.
6. En un tubo de PCR con paredes finas, añada 750 ng de ADNg (a) al agua ultrapura (b) hasta alcanzar un volumen total de 19,5 µl. Use la **Error! Reference source not found.** para registrar los volúmenes de ADNg y agua utilizados para cada muestra.
    a. 750 ng/[concentración de ADNg (ng/µl)] = **µl de ADNg**
    b. 19,5 µl – (**µl de ADNg**) = µl de agua ultrapura.

Tabla 3: Cálculo de la cantidad de ADNg

ID de la muestra de ADNg	Concentración de ADNg (ng/µl)	Volumen de agua ultrapura (µl)	Volumen de ADNg (µl)

7. Prepare una mezcla maestra de marcaje en un tubo de color topacio de 0,5 ml. Añada los componentes según el orden descrito en la **Tabla 4**. Para mezclar la solución, pipetee todo el volumen cinco veces en ambos sentidos con una punta de pipeta estándar, tomando precauciones para no generar burbujas. Dele un golpe de centrífuga durante dos segundos y mantenga la mezcla en un bloque de aluminio sobre hielo hasta su uso. Utilícela lo antes posible después de mezclar los componentes.

Tabla 4 Tabla de cálculo de la mezcla maestra de marcaje

Reacción de marcaje	Volumen para una muestra	N.º de muestras	Excedente de la mezcla maestra	Total de la mezcla maestra
5x tampón para DLE-1	6,0 µl		× 1,2	µl
20x DL-Green	1,5 µl		× 1,2	µl
10x DLE-1	3,0 µl		× 1,2	µl
Volumen total de la mezcla maestra	10,5 µl			**µl**

8. Con una punta de pipeta estándar, añada 10,5 µl de la mezcla maestra sobre los 19,5 µl (ADNg + agua ultrapura). Ajuste la pipeta a 28 µl, mezcle la muestra despacio pipeteando en ambos sentidos un total de cinco veces (una subida + una bajada = una vez). Dele un golpe de centrífuga al tubo durante dos segundos. **ADVERTENCIA: Proteja las muestras de la luz.** ⚠️

   NOTA: El vídeo titulado DLS Master Mix mixing disponible en https://bionanogenomics.com/support-page/dna-labeling-kit-dls/ le resultará de utilidad.

NOTA: Se necesita una muestra mezclada de forma meticulosa y exhaustiva para marcar todas las moléculas de manera eficiente. Extraiga la muestra de la parte inferior y dispense la solución cerca de la parte superior (sin tocar el tubo con la punta de la pipeta) para maximizar el mezclado.

Reacción de marcaje

9. Incube la solución en un termociclador con la tapa térmica configurado a 47 °C, o «Encendido» si no dispone de una opción de regulación de la temperatura:
    a. 1 hora a 37 °C (temperatura del termociclador)
    b. Conserve a 4 °C hasta el siguiente paso. **ADVERTENCIA: Proteja las muestras de la luz**.

NOTA: Después de colocar las muestras en el termociclador, prepare la microplaca para el clean-up del DL-Green (paso 12) mientras se incuba la reacción de marcaje.

DIGESTIÓN CON PROTEINASA K

10. Dispense 5 µl de proteinasa K directamente en la parte central de la muestra contenida en el tubo de PCR. Para evitar la eliminación inadvertida del ADN que pueda adherirse a la punta, no mezcle la solución.
11. Incube el tubo en un termociclador con la tapa térmica configurado a 60°C, o «Encendido» si no dispone de una opción de regulación de la temperatura:
    a. 30 minutos a 50 °C (temperatura del termociclador)
    b. Conserve a 4 °C hasta el siguiente paso. Después de extraerlo del termociclador, continúe rápidamente con el siguiente paso. Dele un golpe de centrífuga breve. **ADVERTENCIA: proteja las muestras de la luz.**

CLEAN-UP DEL DL-GREEN

PREPARAR LA PLACA DE 24 POZOS DLS PARA EL CLEAN-UP DEL DL-GREENNOTA: Las membranas pueden humedecerse inmediatamente después de configurar la reacción de marcaje. Asegúrese de sellar la placa con cinta hasta el momento de su uso.

NOTA: Para los pasos 12-13, consulte el vídeo titulado DLS Membrane Demo en el sitio web de asistencia del Kit de marcaje DLS.

12. Para cada muestra, humedezca la parte inferior de 1 membrana DLS con 1x tampón para DLE-1 en la microplaca suministrada por Bionano:
    a. Para cada muestra, prepare 30 µl de 1x tampón para DLE-1 (5x tampón para DLE-1 de 6 µl + 24 µl de agua ultrapura). Agite la solución en el vórtex para mezclarla. Dele un golpe de centrífuga durante 2 segundos.

b. Dispense 25 µl de 1x tampón para DLE-1 en el centro de un pocillo de la microplaca DLS.

c. Utilice pinzas de punta roma para colocar una membrana DLS encima del tampón.

d. Selle los pocillos inmediatamente con una lámina de cinta DLS para evitar la evaporación hasta que pueda proceder con el siguiente paso.

NOTA: Asegúrese de que las membranas estén completamente humedecidas después de tres minutos. Las membranas humedecidas tienen un aspecto azul translúcido uniforme en toda la membrana. Si una membrana no se encuentra humedecida después de tres minutos, deséchela y humedezca una membrana nueva del paquete de membranas. Póngase en contacto con support@bionano.com si tiene alguna pregunta o duda.

13. Efectúe el clean-up del DL-Green dispensando una muestra de ADN marcado en el centro de la membrana humedecida:

    a. Con una punta de pipeta estándar de 200 µl y una pipeta ajustada a 37 µl, dispense el volumen completo (~35 µl) de ADN marcado en el centro de la membrana DLS.

    b. Selle los pocillos de la membrana con láminas de cinta DLS. Mientras sostiene la microplaca, aplique presión para fijar la tira de sellado al borde superior de los pocillos a fin de evitar la evaporación.

    c. **ADVERTENCIA: Proteja la microplaca de la luz (cúbrala)** ⚠ e incúbela a temperatura ambiente durante una hora. Asegúrese de que nadie toque la placa y de que no se produzcan movimientos involuntarios durante la incubación.

14. Durante el período de incubación de una hora, lleve 10x DTT, 4x tampón de flujo y colorante de ADN a temperatura ambiente. Una vez descongelados, agite bien todos los tubos en el vórtex y deles un golpe de centrífuga breve para recoger su contenido. Mantenga todos los tubos a temperatura ambiente hasta que estén listos para usar.

15. Después de una hora, sostenga la placa de forma segura y retire con cuidado la lámina de cinta DLS.

16. Con una punta de pipeta estándar de 200 µl y la pipeta ajustada a 35 µl, aspire despacio la totalidad de la muestra marcada mientras hace contacto perpendicular con la membrana y mueva la punta a través del área del ADN mientras efectúe la aspiración para recoger el ADN. Transfiera la muestra a un nuevo tubo de PCR o a un tubo de microcentrífuga de color topacio de 0,5 ml. Dele un golpe de centrífuga durante 2 segundos. **ADVERTENCIA: Proteja los tubos de la luz (cúbralos).** ⚠

17. Con una pipeta de 200 µl, dispense 20 µl de la muestra marcada del tubo de PCR o del tubo de color topacio de 0,5 ml en el tubo de color topacio y fondo redondo DLS (2 ml) y continúe con el paso siguiente (tinción y homogeneización del ADN).

a. Si el volumen de la muestra recuperada es <20 µl, aumente este volumen hasta alcanzar un total de 20 µl con 1x tampón para DLE-1.

TINCIÓN Y HOMOGENEIZACIÓN DEL ADN

18. Prepare la mezcla de tinción maestra según la **Tabla 5**.

Tabla 5: Tabla de cálculo para la mezcla de tinción maestra

Reacción de tinción	1 muestra	N.º de muestras	Excedente de la mezcla maestra	Total de la mezcla maestra
4x tampón de flujo	15 µl		× 1,25	µl
10x ditiotreitol (DTT)	6 µl		× 1,25	µl
Colorante de ADN	3,5 µl		× 1,25	µl
Agua ultrapura	15,5 µl		× 1,25	µl
Volumen total de la mezcla de reacción de tinción	40 µl			µl

NOTA: El tampón de flujo es viscoso, por lo que debe pipetear despacio las soluciones que lo contengan para aumentar la precisión.

19. Para cada ADN marcado, añada 40 µl de la mezcla maestra de tinción encima de la muestra marcada (20 µl) contenida en el tubo de color topacio y fondo redondo DLS (2 ml). No mezcle esta solución.

    NOTA: La mezcla maestra se dispensa sobre la solución para evitar la extracción inadvertida de ADN que pueda adherirse a la punta de la pipeta.

20. Coloque los tubos de color topacio y fondo redondo DLS que contengan las muestras en un dispositivo HulaMixer (Thermo Fisher) con la velocidad configurada a 5 rotaciones por minuto (rpm). La superficie del soporte de tubos debe ser plana y paralela a la superficie de trabajo. Mezcle la solución durante treinta minutos a temperatura ambiente con todas las opciones desactivadas, excepto la rotación.

21. Pasados treinta minutos, retire las muestras del HulaMixer. Dele un golpe de centrífuga durante 2 segundos.

    NOTA: No permita que la rotación continúe durante más de treinta minutos, ya que ello podría reducir el valor N50 de las moléculas.

22. Si desea recopilar datos el mismo día, proceda con la cuantificación inmediatamente antes de cargar las muestras en el material fungible del dispositivo Saphyr Chip. De lo contrario, almacene las muestras a 4 °C, **protegidas de la luz**. ⚠️

CUANTIFICACIÓN DEL ADN MARCADO Y TEÑID

NOTA: Consulte la lista de material fungible y equipos suministrados por el usuario (**Tabla 2**) para comprobar que disponga de todos ellos.

Determine la concentración final del ADN marcado y teñido antes de cargarlo en el material fungible del dispositivo Saphyr Chip. Se obtendrán mejores resultados si la concentración de ADN (media de dos mediciones) es de entre 4 ng/µl y 16 ng/µl. Las variaciones en la concentración final se deben a la dificultad que supone muestrear con precisión el ADNg de partida viscoso y a las diferencias en la recuperación del ADNg durante la etapa de eliminación de DL-Green. Si la concentración de la muestra no se encuentra dentro de este intervalo, consulte la Guía de solución de problemas (CG-30608) para obtener recomendaciones.

Kit de ensayo Qubit dsDNA HS (High Sensitivity, alta sensibilidad) y fluorímetro Qubit:

NOTA: El protocolo estándar del ensayo de HS de ADNbc Qubit no proporcionará mediciones precisas de la concentración debido a las longitudes extremadamente largas del ADN marcado. El protocolo Qubit se ha modificado para incluir un paso de sonicación cuya intención es fragmentar una alícuota del ADN marcado a fin de garantizar que se obtienen mediciones de concentración precisas. Consulte el manual del usuario del kit de ensayo de HS de ADNbc Qubit para obtener información sobre el kit.

1. Con una punta con orificio grande en una pipeta de 200 µl ajustada a 50 µl, mezcle cinco veces el ADN marcado y teñido. Dele a la solución un golpe de centrífuga.
2. Deje que los patrones del ensayo de HS Qubit y el ADN marcado alcancen la temperatura ambiente (durante al menos treinta minutos).
3. Prepare tubos de ensayo Qubit de 0,5 ml:
    a. Dos tubos de ensayo independientes para la medición de patrones del ensayo de HS, cada uno con 10 µl de tampón para el ensayo de HS Qubit.
    b. Dos tubos de ensayo independientes por muestra marcada, cada uno con 18 µl de tampón para el ensayo de HS Qubit.
4. Con una punta de pipeta estándar o una pipeta de desplazamiento positivo, pipetee dos alícuotas individuales de 2 µl de cada muestra y dispénselas en 18 µl de tampón para el ensayo de HS Qubit en un tubo de ensayo Qubit, preenjuagando la punta cada vez. Coloque los tubos Qubit en una gradilla flotante y sométalos a sonicación en un baño ultrasónico durante diez minutos. Durante la sonicación, prepare la solución de trabajo del modo descrito en el paso 5.

    NOTA: Si se encuentra una cadena larga de ADN adherida a la punta al retirar esta del tubo, vuelva a dispensar la muestra en el tubo y repita la extracción de la alícuota con una punta nueva.

a. Si no se dispone de un baño ultrasónico, agite en el vórtex durante al menos treinta segundos a la velocidad máxima y, a continuación, reduzca la velocidad de centrifugado durante dos segundos.

5. Prepare la solución de trabajo diluyendo el reactivo del ensayo de tinción en el tampón de dilución para el ensayo de HS (1:200):

   a. Prepare 200 µl de solución de trabajo para cada uno de los dos patrones (400 µl en total).

   b. Prepare 200 µl de solución de trabajo por cada alícuota de la muestra (400 µl por cada muestra).

6. Para los patrones Qubit de ADN, añada 10 µl de los patrones 1 y 2 a tubos de ensayo Qubit independientes marcados que contengan 10 µl del tampón para el ensayo de HS Qubit del paso 3a.

7. Una vez que se complete la sonicación, extraiga los tubos de ensayo y centrifúguelos brevemente para recoger la solución en el fondo de los tubos. Agite los tubos en el vórtex durante cinco segundos a velocidad máxima y, a continuación, reduzca la velocidad de centrifugado durante 2 segundos.

8. Añada 180 µl de solución de trabajo (preparada en el paso 5) a cada tubo de ADN marcado y sonicado, además de patrón Qubit de ADN más tampón del ensayo de HS. Agite la solución en el vórtex durante cinco segundos y centrifúguelo brevemente para recoger la solución en el fondo de los tubos.

9. Incube las muestras a oscuras durante dos minutos antes de efectuar la cuantificación en el fluorímetro Qubit

10. Registre las mediciones Qubit en la **Tabla 6**.

NOTA: Idealmente, la concentración de ADN marcado debería ser de entre 4 ng/µl y 16 ng/µl, con un CV (desviación típica ÷ media) entre las mediciones <0,30. Si ambas mediciones dan valores fuera del intervalo de entre 4 ng/µl y 16 ng/µl, consulte la Guía de solución de problemas (CG-30608). Si solo una medición da un valor de entre 4 ng/µl y 16 ng/µl y la otra se encuentra fuera de este intervalo:

- Si solo una medición da un valor de entre 4 ng/µl y 16 ng/µl y la otra es superior a 16 ng/µl, proceda a cargar el chip.
- Si solo una medición da un valor de entre 4 ng/µl y 16 ng/µl y la otra es inferior a 4 ng/µl, repita la mezcla en el dispositivo HulaMixer durante treinta minutos y repita la cuantificación.

11. Si las muestras no van a analizarse de inmediato, se deberán almacenar a oscuras a 4 C hasta su uso.

Tabla 6: Mediciones Qubit de ADNg

ID de la muestra	Medición 1 (ng/µl)	Medición 2 (ng/µl)	Media (ng/µl)	CV (DE/media)

CARGA DEL SAPHYR CHIP

Consulte la guía del usuario *Saphyr System User Guide* (CG-30247) para obtener instrucciones completas sobre la carga del chip y el funcionamiento del instrumento.

NOTA: Cuando aspire una muestra marcada mediante DLS para cargar el chip, efectúe la extracción desde el centro del tubo.

.

Asistencia técnica

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

Para consultar documentación sobre los productos Bionano, hojas de datos de seguridad, certificados de análisis, preguntas frecuentes y otros documentos relacionados, visite el sitio web del equipo de asistencia o envíe una solicitud por correo electrónico y teléfono.

TIPO	CONTACTO
Correo electrónico	support@bionano.com
Teléfono	Horario de atención: De lunes a viernes, de 9:00 a 17:00, hora estándar del Pacífico EE. UU.: +1 (858) 888-7663
Sitio web	www.bionano.com/support
Dirección	Bionano Genomics, Inc. 9540 Towne Centre Drive, Suite 100 San Diego, CA 92121

Aviso legal

Uso exclusivo para fines de investigación. No debe utilizarse en procedimientos de diagnóstico.

Este material está protegido por las leyes de derechos de autor de los Estados Unidos y los tratados internacionales. Se prohíbe el uso no autorizado del presente material. No puede copiarse, reproducirse, distribuirse, traducirse, someterse a ingeniería inversa ni transmitirse ninguna parte de la presente publicación 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 la traducción a otro idioma o formato. Se pretende que la información técnica que se incluye en esta publicación se utilice para los destinos finales permitidos por la legislación estadounidense. Se prohíbe cualquier desviación que contravenga la legislación estadounidense. Esta publicación representa la información más reciente disponible en el momento de su edición. Debido a los esfuerzos continuos para mejorar el producto descrito, pueden producirse cambios técnicos que no estén recogidos en el presente documento. Bionano Genomics se reserva el derecho de realizar cambios en las especificaciones y otra información que se recoge en esta publicación en cualquier momento y sin previo aviso. Póngase en contacto con el servicio de atención al cliente de Bionano Genomics para obtener la información más actualizada.

BIONANO GENOMICS RENUNCIA A TODAS LAS GARANTÍAS ASOCIADAS A ESTE DOCUMENTO, SEAN EXPLÍCITAS O IMPLÍCITAS, INCLUIDAS, ENTRE OTRAS, LAS DE COMERCIABILIDAD O IDONEIDAD PARA UN FIN DETERMINADO. EN LA MEDIDA EN QUE LO PERMITA LA LEY, BIONANO GENOMICS NO SERÁ RESPONSABLE EN NINGÚN CASO, YA SEA POR CONTRATO, AGRAVIO, GARANTÍA O EN VIRTUD DE CUALQUIER LEY O POR CUALQUIER OTRO MOTIVO, DE LOS DAÑOS ESPECIALES, INCIDENTALES, INDIRECTOS, PUNITIVOS, MÚLTIPLES O CONSECUENTES RELACIONADOS CON ESTE DOCUMENTO O DERIVADOS DE ÉL, INCLUIDO, ENTRE OTROS, EL USO DEL MISMO, TANTO SI SON PREVISIBLES COMO SI NO Y TANTO SI SE AVISA A BIONANO GENOMICS DE LA POSIBILIDAD DE DICHOS DAÑOS COMO SI NO.

PATENTES

Los productos de Bionano Genomics® pueden estar protegidos por una o varias patentes estadounidenses o de otros países.

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, Inc. en los Estados Unidos y algunos otros países.

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

No se otorga ninguna licencia explícita o implícita para utilizar ninguna marca comercial de Bionano Genomics. No se permite a los usuarios hacer uso de estas marcas comerciales sin el consentimiento previo por escrito de Bionano Genomics. El uso de estas marcas comerciales o de cualquier otro material, excepto del modo permitido en el presente documento, está expresamente prohibido y puede constituir una violación de las leyes federales u otras leyes aplicables.

© Copyright 2023 Bionano Genomics, Inc. Todos los derechos reservados.