Protocollo Bionano Prep DLS-G2

NUMERO DEL DOCUMENTO:
CG-30553-4

REVISIONE DEL DOCUMENTO:
D

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

bionano

Sommario

Cronologia delle revisioni **3**

Panoramica di Bionano Prep DLS-G2 **4**

FLUSSO DI LAVORO 4

Kit di marcatura Bionano Prep DLS-G2 e materiali forniti dall'utente **5**

Introduzione e note importanti **7**

INTRODUZIONE 7

NOTE IMPORTANTI 7

MANIPOLAZIONE DEL DNA GENOMICO 9

Protocollo Bionano Prep DLS-G2 **11**

ALLESTIMENTO 11

MARCATURA CON DLE-1 11

CLEAN-UP DEL DL-GREEN 13

COLORAZIONE E OMOGENEIZZAZIONE DEL DNA 14

QUANTIFICAZIONE DEL DNA MARCATO E COLORATO 15

CARICAMENTO DEL SAPHYR CHIP 18

Assistenza tecnica **19**

Avviso legale **20**

BREVETTI 20

MARCHI COMMERCIALI 20

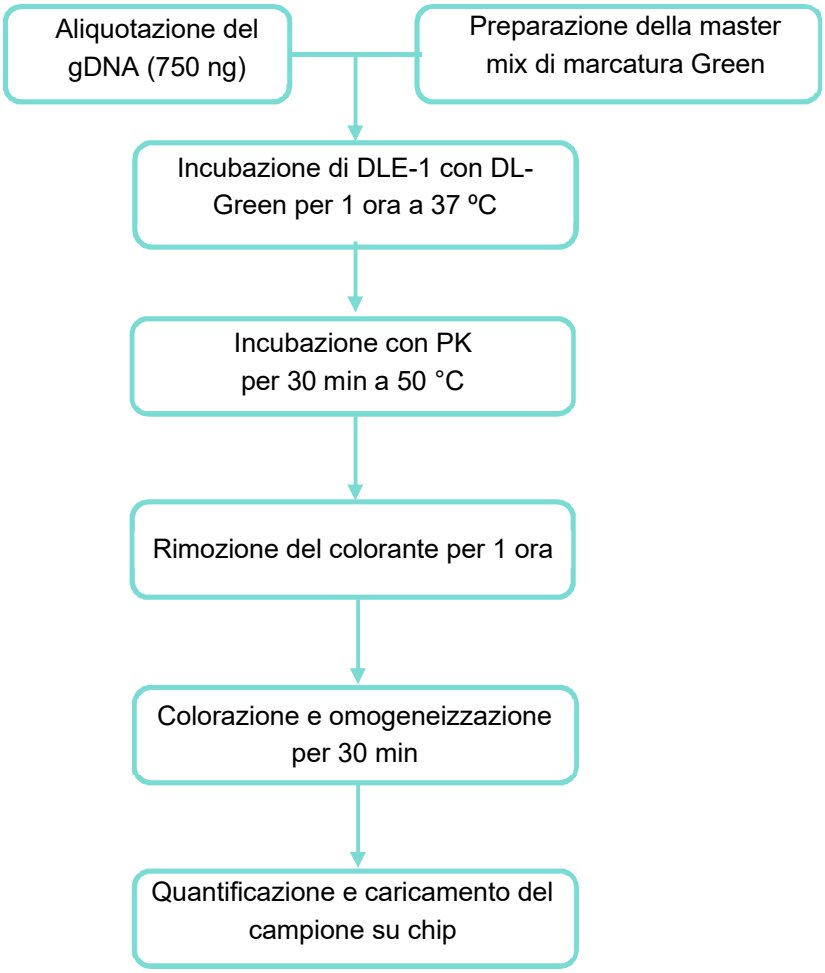
Cronologia delle revisioni

REVISIONE	NOTE
A	Versione iniziale
B	Aggiornato testo ai punti 9 e 10 a scopo di chiarimento.
C	Rimosse le sezioni Guida alla risoluzione dei problemi/Domande frequenti. Queste sezioni sono ora incluse in un documento separato, ossia CG-30608. Rimosse le stime sui tempi nei passaggi del protocollo.
D	Tempo di digestione Prot.K aggiornato da 5 minuti a 30 minuti in tutto il documento. Nei materiali forniti dall'utente, puntali per pipette standard senza filtro rimossi e sostituiti con puntali per pipette standard con filtro.

Panoramica di Bionano Prep DLS-G2

Il Kit e protocollo di marcatura Bionano Prep DLS-G2 (Direct Label and Stain-G2, marcatura diretta e colorazione-G2) è un kit e un protocollo per la marcatura sequenza-specifica del DNA genomico (gDNA) ad altissimo peso molecolare (UHMW, Ultra-High Molecular Weight) destinato all'uso con la piattaforma di mappatura ottica del genoma (OGM, Optical Genome Mapping) di Bionano tramite un enzima per marcatura diretta (ad esempio, DLE-1).

FLUSSO DI LAVORO



Kit di marcatura Bionano Prep DLS-G2 e materiali forniti dall'utente

Tabella 1. Contenuto del Kit di marcatura Bionano Prep DLS-G2 (codice articolo 80046)

Componente	Codice articolo	Quantità	Conservazione	Considerazioni sulla manipolazione
10x DLE-1 (Enzima DLE-1 10x)	20430	44 µl	Tra -25 °C e -15 °C	Picchiettare la provetta tre volte per mescolare, quindi centrifugare brevemente. Conservare a -20 °C in un congelatore per enzimi fino al momento dell'uso.
20x DL-Green (Fluoroforo 20x DL-Green)	20429	22 µl	Tra -25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente (TA). Vortexare e centrifugare brevemente. Conservare su un termoblocco di alluminio preraffreddato fino al momento dell'uso.
5x DLE-1 Buffer (Tampone DLE-1 5x)	20428	175 µl	Tra -25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente. Vortexare e centrifugare brevemente. Conservare a temperatura ambiente fino al momento dell'uso.
DNA Stain (Colorante)	20356	65 µl	Tra -25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente. Vortexare e centrifugare brevemente. Conservare a temperatura ambiente fino al momento dell'uso; il DMSO contenuto nel DNA Stain cristallizza se conservato su ghiaccio.
10x DTT	20432	90 µl	Tra -25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente. Vortexare e centrifugare brevemente. Conservare a temperatura ambiente fino al momento dell'uso.
Proteinasi K	20434	60 µl	Tra 2 °C e 8 °C	
4x Flow Buffer (Tampone di Flusso 4x)	20431	225 µl	Tra 2 °C e 8 °C	Vortexare e centrifugare brevemente. Conservare a temperatura ambiente fino al momento dell'uso.
Acqua ultra-pura	20355	900 µl	Tra 2 °C e 30 °C	Conservabile a temperatura ambiente.
Piastra a 24 pozzetti per DLS	20357	Una piastra	Tra 15 °C e 30 °C	Mantenere coperta per evitare l'ingresso di polvere.
Membrane DLS	20358	25	Tra 15 °C e 30 °C	Evitare l'umidità in eccesso.
Fogli sigillanti per DLS	20433	12	Tra 15 °C e 30 °C	
Provette per DLS color ambra	20437	14	Tra 15 °C e 30 °C	

Tabella 2. Materiali forniti dall'utente

Articolo	Fornitori	N. catalogo
Miscelatore di campioni HulaMixer*	Thermo Fisher	15920D
Termociclatore con coperchio riscaldato+	Fornitore di attrezzature da laboratorio	
Provette per PCR, 0,2 ml, a parete sottile, tappo piatto, prive di nucleasi	Thermo Fisher o equivalente	AM12225
Provette per microcentrifuga, 0,5 ml, color ambra, prive di nucleasi	USA Scientific o equivalente	1605-0007
Puntali per pipetta, a orifizio largo, con filtro, 200 µl	VWR o equivalente Rainin	46620-642
Puntali per pipetta, standard, con filtro; 2, 10, 20 e 200 µl	Fornitore di attrezzature da laboratorio	
Congelatore da banco per enzimi a -20 °C	VWR o equivalente	414004-286
Termoblocco di alluminio per provette a 4 °C	Sigma Aldrich o equivalente	Z740270
Pinzette a punta e a punta smussata	Electron Microscopy Sciences o equivalente	78141-01
Pipette (2, 10, 20 e 200 µl)	Fornitore di attrezzature da laboratorio	
Secchiello per ghiaccio e ghiaccio	Fornitore di attrezzature da laboratorio	
Vortex	VWR o equivalente	10153-838
Microcentrifuga per provette da 0,2 ml, 0,5 ml e 1,5 ml	Fornitore di attrezzature da laboratorio	
Fluorometro Qubit*	Thermo Fisher	Q33238
Provette da dosaggio Qubit®*		Thermo Fisher
Kit di analisi Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity, alta sensibilità) *	Thermo Fisher	Q32851
Bagno sonicatore (raccomandato)	Branson o equivalente	CPX 952-119R
Pipetta a spostamento positivo MR-10 (opzionale) **	Rainin o equivalente	17008575
Puntali per pipetta, 10 µl, C-10 per spostamento positivo (opzionale) **	Rainin o equivalente	17008604

*(Articolo in blu) Consigliamo vivamente di non sostituire questa attrezzatura e di ottenere l'esatto articolo consigliato, poiché il loro utilizzo darà il risultato migliore dal flusso di lavoro.
+Per il nostro flusso di lavoro sono accettabili termociclatori con regolazione della temperatura del coperchio o con l'opzione di attivare/disattivare il riscaldamento del coperchio.
**Una pipetta a spostamento positivo è una pipetta speciale con uno stantuffo che aziona un pistone incorporato in puntali speciali forniti con la pipetta. Tali pipette e puntali sono estremamente efficaci nel pipettare e dispensare con precisione piccoli volumi di liquidi viscosi e pertanto se ne consiglia vivamente l'uso durante l'aliquotazione del gDNA ad altissimo peso molecolare isolato utilizzando i protocolli Bionano.

Introduzione e note importanti

INTRODUZIONE

Questo protocollo descrive un approccio di marcatura enzimatica per la marcatura con fluorescenza diretta del gDNA UHMW (con lunghezza da centinaia di chilobasi a megabasi) mediante l'enzima per marcatura diretta (DLE-1) a livello di un motivo sequenza-specifico. Questa marcatura diretta non causa rotture a singolo filamento (nick) nel DNA e consente agli utenti di generare mappe genomiche costituite da sequenze contigue molto lunghe, con N50 di 20-100 Mbp a seconda del genoma e della qualità del campione.

Il kit Bionano Prep DLS-G2 fornisce i reagenti necessari per la marcatura sequenza-specifica del gDNA UHMW con la piattaforma di marcatura ottica del genoma (OGM) di Bionano sul sistema Saphyr®. Dopo la marcatura sequenza-specifica con DLE-1, il DNA marcato viene colorato per visualizzarne il backbone. Quando acquisiti come immagini sullo strumento Saphyr®, i fluorofori DL-Green vengono visualizzati come marcatori verdi su una molecola blu.

Dimensioni per la reazione con DLE-1

Questo protocollo produce 60 µl di DNA marcato. Tale quantità è sufficiente per caricare una singola cella di flusso di un Saphyr Chip®, con sufficiente campione rimanente per una cella aggiuntiva in caso di bassa resa o problemi di altro tipo. La lunghezza del materiale di partenza deve essere almeno nell'ordine delle centinaia di chilobasi; se necessario, questa può essere determinata tramite elettroforesi a campo pulsato (PFGE, Pulsed Field Gel Electrophoresis). I valori dei parametri di marcatura sono determinati sullo strumento Saphyr, come ad es. il numero di marcatori, che è espresso in marcatori/100 coppie di chilobasi (kbp). Ulteriori valori per i parametri di marcatura possono essere determinati fornendo un riferimento e monitorando la percentuale di mappa, la varianza di marcatura positiva (PLV, Positive Label Variance) e la varianza di marcatura negativa (NLV, Negative Label Variance). Per ulteriori dettagli, vedere la sezione "Note importanti" di seguito.

I dettagli sulle misure attese sono reperibili nel documento Saphyr Molecule Quality Report Guidelines (codice articolo 30223).

NOTE IMPORTANTI

Considerazioni generali

- Si raccomanda l'uso di un termoblocco di alluminio per provette, preraffreddato su ghiaccio, per conservare i componenti della reazione scongelati e per allestire le reazioni di marcatura.
- Gli enzimi e i tamponi devono essere pipettati accuratamente, evitando che rimangano goccioline adese alla parete esterna del puntale per pipetta. Perché le reazioni siano riproducibili, l'enzima deve essere erogato completamente nella provetta di reazione e si deve prestare attenzione a evitare la formazione di bolle. A tal fine, per meglio visionare la procedura, durante l'aspirazione o l'erogazione mantenere le provette dei reagenti all'altezza degli occhi.

- La miscelazione lenta e accurata della master mix di marcatura con il gDNA mediante pipetta è un passaggio fondamentale e promuove l'omogeneità del DNA e l'accessibilità dell'enzima per una marcatura efficiente del DNA altamente viscoso.

- Questo protocollo prevede la manipolazione di molecole fluorescenti sensibili alla luce. Mentre si lavora, è importante ridurre al minimo l'esposizione alla luce. Durante la conservazione, proteggere dalla luce sia le reazioni che i reagenti fotosensibili.

- La concentrazione di DNA marcato viene misurata il giorno 1 o 2, dopo marcatura, clean-up, omogeneizzazione e colorazione, e prima del caricamento. L'omogeneità del DNA viene valutata mediante quantificazione in duplicato (coefficiente di variazione [CV] < 0,30). Il DNA marcato omogeneo consente una stima accurata della concentrazione e un caricamento più uniforme del DNA sul chip. La concentrazione di DNA marcato deve essere compresa tra 4 e 16 ng/µl.

Dimensioni del lotto

- Possono essere processati fino a dodici campioni alla volta.
    - Ogni kit Bionano Prep DLS-G2 contiene reagenti sufficienti per dodici campioni.

Requisiti del DNA di partenza

- Il campione deve contenere gDNA di lunghezza nell'ordine delle megabasi, stabilita tipicamente in base all'alta viscosità e/o tramite PFGE del campione.

- La concentrazione del gDNA deve essere compresa tra 39 e 150 ng/µl.
    - I campioni di gDNA > 150 ng/µl vanno diluiti con TE (pH 8,0) portandoli a una concentrazione di 50-150 ng/µl, mescolati cinque volte con un puntale a orifizio largo e lasciati riposare per una notte a temperatura ambiente. Prima della marcatura, verificare la concentrazione finale e l'omogeneità del DNA.
    - Per campioni di gDNA < 39 ng/µl, contattare il Supporto tecnico all'indirizzo Support@bionano.com.

Determinazione dell'enzima

- In caso di campioni non umani, prima di iniziare il protocollo DLS-G2, importare i dati di sequenza del campione desiderato nella funzione In Silico Digestion del software Bionano Access® o nel software indipendente Label Density Calculator per assicurarsi che la marcatura mediante DLS-G2 sia la scelta appropriata per il campione. La densità di marcatura effettiva deve essere compresa entro ± 2 marcatori rispetto a quella prevista. Per indicazioni in caso di dubbi, rivolgersi al Supporto tecnico all'indirizzo Support@bionano.com.

- In caso di campioni non umani, gli attuali strumenti di analisi downstream hanno più successo con genomi aventi densità di marcatura mediante DLS-G2 compresa tra 9 e 25 marcatori ogni 100 kbp.

MANIPOLAZIONE DEL DNA GENOMICO

Informazioni generali

- Questo protocollo prevede la manipolazione di gDNA viscoso, difficile da pipettare con precisione. È fondamentale seguire attentamente tutti i passaggi di questo protocollo a garanzia dell'accuratezza del prelievo dei campioni di DNA per ottenere un corretto rapporto enzima-DNA e DNA-colorazione e per ridurre al minimo manipolazioni superflue del gDNA che potrebbero causare la formazione di molecole di lunghezza insufficiente per l'analisi.

Aggiunta del gDNA alla reazione di marcatura

- Perché il prelievo dei campioni dallo stock di gDNA viscoso sia accurato, dapprima è necessario ottimizzare l'omogeneità dello stock di DNA mescolando delicatamente per cinque volte la soluzione di DNA equilibrata a temperatura ambiente usando una pipetta con puntale a orifizio largo, quindi seguire le indicazioni riportate di seguito per pipettare correttamente all'interno e all'esterno di un puntale per pipetta standard, o di una pipetta a spostamento positivo, al fine di rilasciare tutto il DNA.
- Prima di prelevare il gDNA viscoso in un puntale standard, pipettare un identico volume d'acqua e, con un pennarello a punta fine, contrassegnare il livello della soluzione sul puntale utilizzato, che fungerà da guida quando si pipetterà il gDNA. Conservare il puntale contrassegnato per usarlo come guida e usarne uno nuovo per prelevare il DNA. In alternativa, l'uso di una pipetta a spostamento positivo può migliorare la riproducibilità quando si pipetta gDNA viscoso.
- Per aspirare il gDNA viscoso in un puntale standard, tenere la provetta dello stock di DNA in modo da osservarla a distanza ravvicinata, premere lo stantuffo della pipetta fino al primo arresto, immergere il puntale verso il centro della soluzione viscosa e rilasciare con cautela lo stantuffo, il più **lentamente** possibile, muovendo il puntale con moto circolare, per aspirare il DNA viscoso nel puntale monitorando al tempo stesso l'aspirazione del DNA. Lasciare il puntale immerso anche dopo che la soluzione di DNA viscoso smette di risalire e si stabilizza al livello desiderato (usare il puntale contrassegnato come guida approssimativa per controllare se la soluzione viscosa si stabilizza al livello appropriato). Possono essere necessari fino a 30 secondi perché il DNA viscoso riempia il puntale fino al livello appropriato. Se lo stantuffo viene rilasciato troppo rapidamente può formarsi una bolla nel puntale, con conseguente sottocampionamento (**NOTA**: se ciò accade, l'utente deve ricominciare da capo). Quando la soluzione nel puntale per pipetta si è stabilizzata al livello desiderato e mentre il puntale è ancora immerso nella soluzione di DNA, raschiare il puntale contro il fondo della provetta per cinque volte con un movimento circolare. Rimuovere il puntale dalla soluzione di DNA e ispezionarlo visivamente per confermare che sia riempito fino al livello appropriato, confrontandolo con il puntale contrassegnato. Se il puntale per pipetta viene rimosso troppo presto dalla soluzione di gDNA o se il fondo della provetta viene raschiato in modo improprio con il puntale, può formarsi una bolla all'estremità del puntale per pipetta, che indica un sottocampionamento (**NOTA**: se ciò accade, l'utente deve ricominciare da capo). **Con la pratica e con pazienza è possibile pipettare il gDNA viscoso con precisione.**
- Per depositare tutto il volume di gDNA viscoso in una provetta, tenere la provetta di reazione in modo da osservarla a distanza ravvicinata, quindi depositare il DNA inserendo il puntale per pipetta nella soluzione e premendo delicatamente lo stantuffo fino al primo arresto, poi fino al secondo arresto, controllando al contempo la deposizione del DNA, finché l'ultimo frammento di DNA non è uscito dal puntale. Non appena l'ultimo frammento di DNA è uscito dal puntale, estrarre immediatamente il puntale per pipetta continuando

a tenere premuto lo stantuffo per evitare di aspirare del liquido o di introdurre bolle d'aria. Ispezionare visivamente il puntale dopo averlo estratto dalla soluzione per confermare che sia vuoto.

Protocollo Bionano Prep DLS-G2

ALLESTIMENTO

1. Scongelare il 20x DL-Green. Vortexare accuratamente, centrifugare a impulsi e tenere su ghiaccio in un termoblocco di alluminio a 4 °C.

2. Scongelare il 5x DLE-1 Buffer**.** Vortexare accuratamente e centrifugare a impulsi. Tenere a temperatura ambiente fino al momento dell'uso.

3. Picchiettare per tre volte l'enzima 10x DLE-1 e centrifugare a impulsi. Tenere sul banco in un congelatore per enzimi a -20 °C.

4. Rimuovere la provetta con acqua ultra-pura dall'unità di refrigerazione a 4 °C (se necessario) e lasciarla a temperatura ambiente.

MARCATURA CON DLE-1

Diluire il gDNA e unirlo alla miscela di marcatura

5. Se la quantificazione del gDNA è già stata eseguita secondo le istruzioni del protocollo Bionano Prep SP subito prima della marcatura, procedere al passaggio 6. In caso contrario, centrifugare a impulsi per due secondi e ripetere la quantificazione prima di procedere al passaggio 6.

6. In una provetta per reazione a catena della polimerasi (PCR, Polymerase Chain Reaction) a parete sottile, aggiungere 750 ng di gDNA (a) ad acqua ultra-pura (b) per un volume totale di 19,5 µl. Utilizzare la **Tabella 3** per registrare i volumi di gDNA e di acqua per ciascun campione.

    a. 750 ng/[concentrazione di gDNA (ng/µl)] = **µl di gDNA**

    b. 19,5 µl – (**µl di gDNA**) = µl di acqua ultra-pura.

Tabella 3. Calcolo della quantità di gDNA

ID del campione di gDNA	Concentrazione di gDNA (ng/µl)	Volume di acqua ultra-pura (µl)	Volume di gDNA (µl)

7. Preparare una master mix di marcatura in una provetta color ambra da 0,5 ml. Aggiungere i componenti nell'ordine indicato nella **Tabella 4**. Mescolare pipettando tutto il volume con un puntale per pipetta standard, aspirando e rilasciando per cinque volte, facendo attenzione a non generare bolle. Centrifugare a impulsi per due secondi e posizionare la provetta in un termoblocco di alluminio su ghiaccio fino al momento dell'uso. Utilizzare non appena possibile dopo aver mescolato i componenti.

Tabella 4. Tabella per il calcolo della master mix di marcatura

Reazione di marcatura	Volume per un campione	N. di campioni	Eccesso per master mix	Totale master mix
5x DLE-1 Buffer (Tampone DLE-1 5x)	6,0 µl		× 1,2	µl
20x DL-Green (Fluoroforo 20x DL-Green)	1,5 µl		× 1,2	µl
10x DLE-1	3,0 µl		× 1,2	µl
Volume totale della master mix	**10,5 µl**			**µl**

8. Utilizzando un puntale per pipetta standard, aggiungere 10,5 µl di master mix al di sopra dei 19,5 µl di gDNA + acqua ultra-pura. Regolare la pipetta su 28 µl e mescolare lentamente il campione aspirando e rilasciando per cinque volte (1 aspirazione + 1 rilascio = 1 volta). Centrifugare a impulsi la provetta per due secondi.
   AVVERTIMENTO: proteggere i campioni dalla luce. ⚠️

   NOTA: il video DLS Master Mix mixing disponibile all'indirizzo https://bionanogenomics.com/support-page/dna-labeling-kit-dls/ può essere di valido aiuto.

NOTA: per marcare in modo efficiente tutte le molecole è indispensabile che il campione sia stato accuratamente e completamente mescolato. Aspirare il campione dal fondo ed erogarlo in prossimità della parte superiore (evitando che il puntale della pipetta tocchi la provetta) per mescolare in modo ottimale.

Reazione di marcatura

9. Incubare in un termociclatore con il coperchio riscaldato impostato a 47 °C, oppure su "On" se la temperatura del coperchio riscaldato non è regolabile:
    a. 1 ora a 37 °C (temperatura del termociclatore)
    b. Tenere a 4 °C fino al passaggio successivo. **AVVERTIMENTO: proteggere i campioni dalla luce.** ⚠️

NOTA: dopo aver posizionato i campioni nel termociclatore, preparare la micropiastra per il clean-up del DL-Green (passaggio 12) durante l'incubazione della reazione di marcatura.

DIGESTIONE CON PROTEINASI K

10. Erogare 5 µl di proteinasi K direttamente nella parte centrale del campione contenuto nella provetta per PCR. Per evitare di rimuovere inavvertitamente il DNA che potrebbe aderire al puntale, non mescolare.
11. Incubare in un termociclatore con il coperchio riscaldato impostato a 60 °C oppure su "On" se la temperatura del coperchio riscaldato non è regolabile:
    a. 30 minuti a 50 °C (temperatura del termociclatore)
    b. Tenere a 4 °C fino al passaggio successivo. Dopo aver estratto la provetta dal termociclatore, procedere rapidamente al passaggio successivo. Centrifugare brevemente a impulsi. **AVVERTIMENTO: proteggere i campioni dalla luce.** ⚠️

CLEAN-UP DEL DL-GREEN

PREPARARE LA PIASTRA DLS DA 24 POZZETTI PER IL CLEAN-UP DEL DL-GREENNOTA: le membrane possono essere imbibite subito dopo aver allestito la reazione di marcatura. Assicurarsi di chiudere la piastra con un foglio sigillante fino al momento dell'uso.

NOTA: per i passaggi 12-13, guardare il video DLS Membrane Demo sulla pagina DLS Labeling Kit del sito di supporto.

12. Per ogni campione, imbibire il lato inferiore di 1 membrana DLS con 1x DLE-1 Buffer all'interno della micropiastra fornita da Bionano:
    a. Per ogni campione, preparare 30 µl di 1x DLE-1 Buffer (6 µl di 5x DLE-1 Buffer + 24 µl di acqua ultra-pura). Vortexare per mescolare. Centrifugare a impulsi per due secondi.
    b. Erogare 25 µl di 1x DLE-1 Buffer al centro di un pozzetto della micropiastra per DLS.

c. Utilizzare una pinzetta a punta smussata per posizionare una membrana DLS al di sopra del tampone.

d. Chiudere immediatamente i pozzetti con un foglio sigillante per DLS per evitare l'evaporazione fino al momento di procedere.

NOTA: accertarsi che le membrane siano completamente imbibite dopo tre minuti. Le membrane imbibite assumono un colore blu uniforme e traslucido. Se la membrana non è imbibita dopo tre minuti, gettarla e imbibirne una nuova prelevata dalla confezione. In caso di dubbi o domande, contattare support@bionano.com.

13. Eseguire il clean-up del DL-Green erogando il campione di DNA marcato al centro della membrana imbibita:

    a. Utilizzando un puntale per pipetta standard da 200 µl con la pipetta impostata su 37 µl, erogare tutto il volume (~35 µl) di DNA marcato al centro della membrana DLS.

    b. Chiudere immediatamente i pozzetti con le membrane utilizzando un foglio sigillante per DLS. Tenendo ferma la micropiastra, esercitare pressione per fissare il tappetino sigillante al bordo superiore dei pozzetti per evitare l'evaporazione.

    c. **AVVERTIMENTO: proteggere la micropiastra dalla luce (coprire)** ⚠️ e incubare a temperatura ambiente per un'ora. Assicurarsi che la piastra rimanga integra e che non subisca movimenti accidentali durante l'incubazione.

14. Durante l'ora di incubazione, portare a temperatura ambiente il 10x DTT, il 4x Flow Buffer e il DNA Stain. Una volta scongelate, vortexare bene tutte le provette e centrifugare brevemente a impulsi per raccogliere il contenuto. Tenere tutte le provette a temperatura ambiente fino al momento dell'uso.

15. Dopo un'ora, afferrare saldamente la piastra e rimuovere con cautela il foglio sigillante per DLS.

16. Utilizzando un puntale per pipetta standard da 200 µl, con la pipetta impostata su 35 µl, aspirare lentamente tutto il campione marcato mantenendo perpendicolarmente il contatto con la membrana e spostando il puntale lungo l'area del DNA mentre si aspira per raccogliere il DNA. Trasferire in una nuova provetta per PCR o in una provetta microfuga da 0,5 ml color ambra. Centrifugare a impulsi per due secondi. **AVVERTIMENTO: proteggere le provette dalla luce (coprire).** ⚠️

17. Utilizzando una pipetta da 200 µl, erogare 20 µl di campione marcato dalla provetta per PCR o dalla provetta da 0,5 ml color ambra nella provetta per DLS color ambra a fondo rotondo (2 ml), quindi procedere con il passaggio successivo (colorazione e omogeneizzazione del DNA).

    a. Se il volume del campione recuperato è < 20 µl, portarlo a un volume totale di 20 µl utilizzando l'1x DLE-1 Buffer.

COLORAZIONE E OMOGENEIZZAZIONE DEL DNA

18. Preparare la master mix con colorante secondo la **Tabella 5**.

Tabella 5. Tabella per il calcolo della master mix con colorante

Reazione di colorazione	1 campione	N. di campioni	Eccesso per master mix	Totale master mix
4x Flow Buffer	15 µl		× 1,25	µl
10x DTT	6 µl		× 1,25	µl
DNA Stain (Colorante)	3,5 µl		× 1,25	µl
Acqua ultra-pura	15,5 µl		× 1,25	µl
Volume totale della miscela di reazione di colorazione	40 µl			µl

NOTA: il Flow Buffer è viscoso, quindi pipettare lentamente le soluzioni che lo contengono per una maggiore precisione.

19. Per ogni DNA marcato, aggiungere 40 µl di master mix con colorante al di sopra del campione marcato (20 µl) contenuto nella provetta per DLS color ambra a fondo rotondo (2 ml). Non mescolare.

    NOTA: la master mix va erogata al di sopra della soluzione per evitare di estrarre inavvertitamente il DNA che potrebbe attaccarsi al puntale per pipetta.

20. Inserire le provette per DLS color ambra a fondo rotondo contenenti i campioni nel miscelatore HulaMixer (Thermo Fisher) impostando la velocità su 5 rotazioni al minuto (rpm). La superficie del portaprovette deve essere piana e parallela al piano di lavoro. Mescolare per trenta minuti a temperatura ambiente disattivando tutte le opzioni diverse dalla rotazione.

21. Dopo trenta minuti, rimuovere i campioni dal miscelatore HulaMixer. Centrifugare a impulsi per due secondi.

    NOTA: non lasciare proseguire la rotazione per più di trenta minuti, poiché ciò potrebbe diminuire il valore dell'N50 delle molecole.

22. Se si desidera raccogliere i dati lo stesso giorno, procedere immediatamente con la quantificazione prima di caricare i campioni sul Saphyr Chip. Altrimenti, tenere i campioni a 4 C **proteggendoli dalla luce.** ⚠️

QUANTIFICAZIONE DEL DNA MARCATO E COLORATO

NOTA: consultare l'elenco dei materiali di consumo e delle apparecchiature fornite dall'utente (**Tabella 2**) per verificarne la completa disponibilità.

Prima di caricare il DNA marcato e colorato sul Saphyr Chip, determinarne la concentrazione finale. I migliori risultati si ottengono quando la concentrazione di DNA (media di due misure) è compresa tra 4 e 16 ng/µl. Le variazioni della concentrazione finale sono dovute alle difficoltà nel prelevare con precisione il campione di gDNA viscoso di partenza e alla variabilità del recupero del gDNA durante il passaggio di rimozione del DL-Green. Se la

concentrazione del campione non rientra in questo intervallo, consultare la Guida alla risoluzione dei problemi (CG-30608) per indicazioni.

Kit di analisi Qubit dsDNA HS (High Sensitivity, alta sensibilità) e fluorometro Qubit:

NOTA: il protocollo standard del Kit di analisi Qubit dsDNA HS non fornisce misure accurate della concentrazione a causa delle lunghezze estremamente elevate del DNA marcato. Il protocollo Qubit è stato modificato includendo un passaggio di sonicazione per frammentare un'aliquota del DNA marcato al fine di garantire misure precise della concentrazione. Fare riferimento al manuale utente del Kit di analisi Qubit dsDNA HS per i dettagli sul kit.

1. Utilizzando un puntale a orifizio largo su una pipetta da 200 µl impostata su 50 µl, mescolare cinque volte il DNA marcato e colorato. Centrifugare a impulsi.

2. Portare a temperatura ambiente gli standard Qubit HS e il DNA marcato attendendo almeno trenta minuti.

3. Preparare le provette da dosaggio Qubit da 0,5 ml:

    a. Due provette da dosaggio separate per la misurazione degli standard HS, ciascuna contenente 10 µl di tampone Qubit HS.

    b. Due provette da dosaggio separate per campione marcato, ciascuna contenente 18 µl di tampone Qubit HS.

4. Utilizzando un puntale per pipetta standard o una pipetta a spostamento positivo, prelevare due aliquote separate da 2 µl da ciascun campione ed erogarle in 18 µl di tampone Qubit HS nella provetta da dosaggio Qubit, immergendo il puntale. Posizionare le provette Qubit in un portaprovette galleggiante e sonicare in un bagno sonicatore per dieci minuti. Durante la sonicazione, preparare la soluzione di lavoro come descritto nel passaggio 5.

    NOTA: se durante l'estrazione del puntale dalla provetta rimane attaccato un lungo filo di DNA al puntale, erogare nuovamente il campione nella provetta e ripetere il prelievo dell'aliquota con un nuovo puntale.

    a. Se non si dispone di un bagno sonicatore, vortexare per almeno trenta secondi a velocità massima, quindi centrifugare a velocità ridotta per due secondi.

5. Preparare la soluzione di lavoro diluendo il reagente Qubit dsDNA HS nel tampone di diluizione HS (1:200):

    a. Preparare 200 µl di soluzione di lavoro per ciascuno dei due standard (400 µl in totale).

    b. Preparare 200 µl di soluzione di lavoro per ogni aliquota di campione (400 µl per ogni campione).

6. Per gli standard di DNA Qubit, aggiungere 10 µl degli standard 1 e 2 a provette da dosaggio Qubit diverse opportunamente etichettate, contenenti 10 µl di tampone Qubit HS, preparate secondo quanto descritto al passaggio 3a.

7. Al termine della sonicazione, prelevare le provette da dosaggio e centrifugare brevemente per raccogliere la soluzione sul fondo delle stesse. Vortexare le provette per cinque secondi a velocità massima, quindi centrifugarle a velocità ridotta per due secondi.

8. Aggiungere 180 µl di soluzione di lavoro (preparata nel passaggio 5) a ogni provetta contenente il DNA marcato sonicato e lo standard di DNA Qubit più il tampone HS. Vortexare per cinque secondi e centrifugare brevemente per raccogliere la soluzione sul fondo delle provette.

9. Incubare i campioni al buio per due minuti prima della quantificazione sul fluorometro Qubit.

10. Annotare le misure di Qubit nella **Tabella 6**.

NOTA: idealmente la concentrazione di DNA marcato dovrebbe rientrare nell'intervallo 4-16 ng/µl, con un CV (deviazione standard ÷ media) < 0,30 tra le misure. Se entrambe le misure non rientrano nell'intervallo 4-16 ng/µl, vedere la Guida alla risoluzione dei problemi (CG-30608). Se una misura è compresa nell'intervallo 4-16 ng/µl e quella dell'altro campione non rientra in questo intervallo:

- Se una misura è compresa nell'intervallo 4-16 ng/µl e quella dell'altro campione è superiore a 16 ng/µl, procedere al caricamento del chip.
- Se una misura è compresa nell'intervallo 4-16 ng/µl e quella dell'altro campione è inferiore a 4 ng/µl, ripetere la miscelazione con HulaMixer del DNA marcato e colorato per trenta minuti, quindi ripetere la quantificazione.

11. Se i campioni non devono essere analizzati immediatamente, conservarli al buio a 4 °C fino al momento dell'uso.

Tabella 6. Misure del gDNA con Qubit

ID del campione	Misura 1 (ng/µl)	Misura 2 (ng/µl)	Media (ng/µl)	CV (DS/media)

CARICAMENTO DEL SAPHYR CHIP

Fare riferimento alla *Saphyr System User Guide* (CG-30247) per istruzioni complete sul caricamento su chip e sul funzionamento dello strumento.

NOTA: quando si aspira il campione marcato con metodo DLS per caricarlo sul chip, prelevarlo dal centro della provetta.

Assistenza tecnica

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

La documentazione riguardante i prodotti Bionano, le schede di sicurezza (SDS), i certificati di analisi, le domande frequenti e altri documenti correlati sono reperibili alla pagina Support del sito web o su richiesta tramite e-mail e telefono.

CANALE	CONTATTO
E-mail	support@bionano.com
Telefono	Orario lavorativo: dal lunedì al venerdì, dalle 9:00 alle 17:00, fuso orario del Pacifico (PST) Stati Uniti: +1 (858) 888-7663
Sitio web	www.bionano.com/support
Indirizzo	Bionano Genomics, Inc. 9540 Towne Centre Drive, Suite 100 San Diego, CA 92121

Avviso legale

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

Questo materiale è protetto dalla legge sul copyright degli Stati Uniti e da trattati internazionali. L'uso non autorizzato di questo materiale è vietato. Nessuna parte di questa pubblicazione può essere copiata, riprodotta, distribuita, tradotta, sottoposta a *reverse engineering* o trasmessa in alcuna forma o con qualsiasi mezzo, attualmente esistente o disponibile in futuro, senza l'espressa previa autorizzazione scritta da parte di Bionano Genomics. La copia, secondo la legge, include la traduzione in un'altra lingua o in un altro formato. I dati tecnici qui contenuti sono rivolti ai destinatari finali autorizzati dalla legge statunitense. È proibita qualsiasi difformità dalla legge statunitense. Questa pubblicazione presenta le informazioni più aggiornate disponibili al momento del rilascio. A seguito del continuo impegno volto a migliorare il prodotto, potrebbero essere apportate modifiche tecniche non riportate in questo documento. Bionano Genomics si riserva il diritto di apportare modifiche alle specifiche e ad altre informazioni contenute in questa pubblicazione in qualsiasi momento e senza preavviso. Per informazioni aggiornate, contattare il Supporto clienti di Bionano Genomics.

BIONANO GENOMICS NON RICONOSCE ALCUNA GARANZIA, NÉ ESPRESSA NÉ IMPLICITA, RISPETTO AL PRESENTE DOCUMENTO, INCLUSE A TITOLO ESEMPLIFICATIVO MA NON ESAUSTIVO LE GARANZIE DI COMMERCIABILITÀ O IDONEITÀ A UNO SCOPO PARTICOLARE. NELLA MISURA MASSIMA CONSENTITA DALLA LEGGE, IN NESSUN CASO BIONANO GENOMICS SARÀ RESPONSABILE, SIA PER CONTRATTO, ILLECITO, GARANZIA O AI SENSI DI QUALSIASI LEGGE O SU QUALSIASI ALTRA BASE, PER DANNI SPECIALI, ACCIDENTALI, INDIRETTI, PUNITIVI, MULTIPLI O CONSEQUENZIALI CONNESSI O DERIVANTI DAL PRESENTE DOCUMENTO, INCLUSO A TITOLO ESEMPLIFICATIVO MA NON ESAUSTIVO L'USO DELLO STESSO, SIA CHE SIANO PREVEDIBILI O MENO E INDIPENDENTEMENTE DAL FATTO CHE BIONANO GENOMICS SIA STATA INFORMATA O MENO DELL'EVENTUALITÀ DI TALI DANNI.

BREVETTI

I prodotti Bionano Genomics® possono essere coperti da uno o più brevetti statunitensi o di altri paesi.

MARCHI COMMERCIALI

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

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

Non viene concessa né sarà implicita alcuna licenza per l'uso dei marchi commerciali di Bionano Genomics. Agli utenti non è consentito alcun utilizzo di questi marchi commerciali senza il previo consenso scritto di Bionano Genomics. L'uso di questi marchi commerciali o di qualsiasi altro materiale, ad eccezione di quanto consentito nel presente documento, è espressamente vietato e potrebbe violare le leggi federali o altre leggi applicabili.

© Copyright 2023 Bionano Genomics, Inc. Tutti i diritti riservati.