



# **Protocollo di isolamento del DNA del pellet cellulare fresco Bionano Prep SP-G2**

NUMERO DOCUMENTO:

CG-00003-4

REVISIONE DOCUMENTO:

B

Decorrenza: 01/08/2023

## Sommario

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Avviso legale</b> .....   | <b>3</b>  |
| Brevetti .....   | 3         |
| Marchi commerciali.....  | 3         |
| <b>Cronologia delle revisioni</b> .....  | <b>4</b>  |
| <b>Panoramica del flusso di lavoro</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>Kit di isolamento del DNA da sangue e colture cellulari Bionano Prep SP-G2 e materiali forniti dall'utilizzatore</b> .....  | <b>6</b>  |
| Contenuto del kit di isolamento del DNA da sangue e colture cellulari Bionano Prep SP-G2 (codice 80060, 12 preparazioni) ..... | 6         |
| Materiali e apparecchiature forniti dall'utilizzatore .....  | 7         |
| <b>Introduzione e note importanti</b> .....  | <b>8</b>  |
| Introduzione.....  | 8         |
| Panoramica .....   | 8         |
| Note importanti .....  | 8         |
| <b>Protocollo di isolamento del DNA del pellet cellulare fresco Bionano Prep SP-G2</b> .....                                   | <b>11</b> |
| Preparazione per l'isolamento del gDNA (30 minuti) .....   | 11        |
| Isolamento del gDNA (fino a 3 ore) .....   | 13        |
| Omogeneizzazione della soluzione di gDNA (70 minuti) .....   | 19        |
| Quantificazione del gDNA (45 minuti).....  | 20        |
| <b>Assistenza tecnica</b> .....  | <b>22</b> |

## Avviso legale

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

Questo materiale è protetto dalla legge sul copyright e dai trattati internazionali degli Stati Uniti. L'uso non autorizzato di questo materiale è vietato. Nessuna parte della pubblicazione può essere copiata, riprodotta, distribuita, tradotta, decodificata o trasmessa in qualsiasi forma, con qualsiasi mezzo o strumento, noto o sconosciuto, senza l'espressa autorizzazione scritta di Bionano Genomics. La copia, secondo la legge, include la traduzione in un'altra lingua o formato. I dati tecnici qui contenuti sono rivolti ai destinatari finali autorizzati dalla legge statunitense. Sono proibite diversioni contrarie alle leggi degli Stati Uniti. Questa pubblicazione rappresenta le ultime informazioni disponibili al momento della distribuzione. 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 DECLINA OGNI GARANZIA RELATIVA AL PRESENTE DOCUMENTO, ESPRESSA O IMPLICITA, COMPRESA, TRA LE ALTRE, QUELLE DI COMMERCIALIZZABILITÀ O IDONEITÀ PER UN PARTICOLARE SCOPO. NELLA MISURA MASSIMA CONSENTITA DALLA LEGGE, IN NESSUN CASO BIONANO GENOMICS SARÀ RESPONSABILE, PER CONTRATTO, ILLECITO, GARANZIA O PER LEGGE O IN ALTRO MODO PER DANNI SPECIALI, ACCIDENTALI, INDIRETTI, PUNITIVI, MULTIPLI O CONSEQUENZIALI CORRELATI A O DERIVANTI DAL PRESENTE DOCUMENTO, COMPRESO IL SUO UTILIZZO, PREVEDIBILE O MENO E INDIPENDENTEMENTE DAL FATTO CHE BIONANO GENOMICS SIA AVVISATA O MENO DELLA POSSIBILITÀ DI TALI DANNI.

### **Brevetti**

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

### **Marchi commerciali**

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

Bionano Genomics®, Irys®, IrysView®, IrysChip®, IrysPrep®, IrysSolve®, 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 si concede alcuna licenza per l'uso dei marchi commerciali di Bionano Genomics né essa è considerata implicita. Gli utilizzatori non sono autorizzati a usare 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.

## Cronologia delle revisioni

| REVISIONE | NOTE  |
|-----------|---|
| A         | Distribuzione commerciale.                                  |
| B         | Modifiche generali alla formattazione per la distribuzione. |

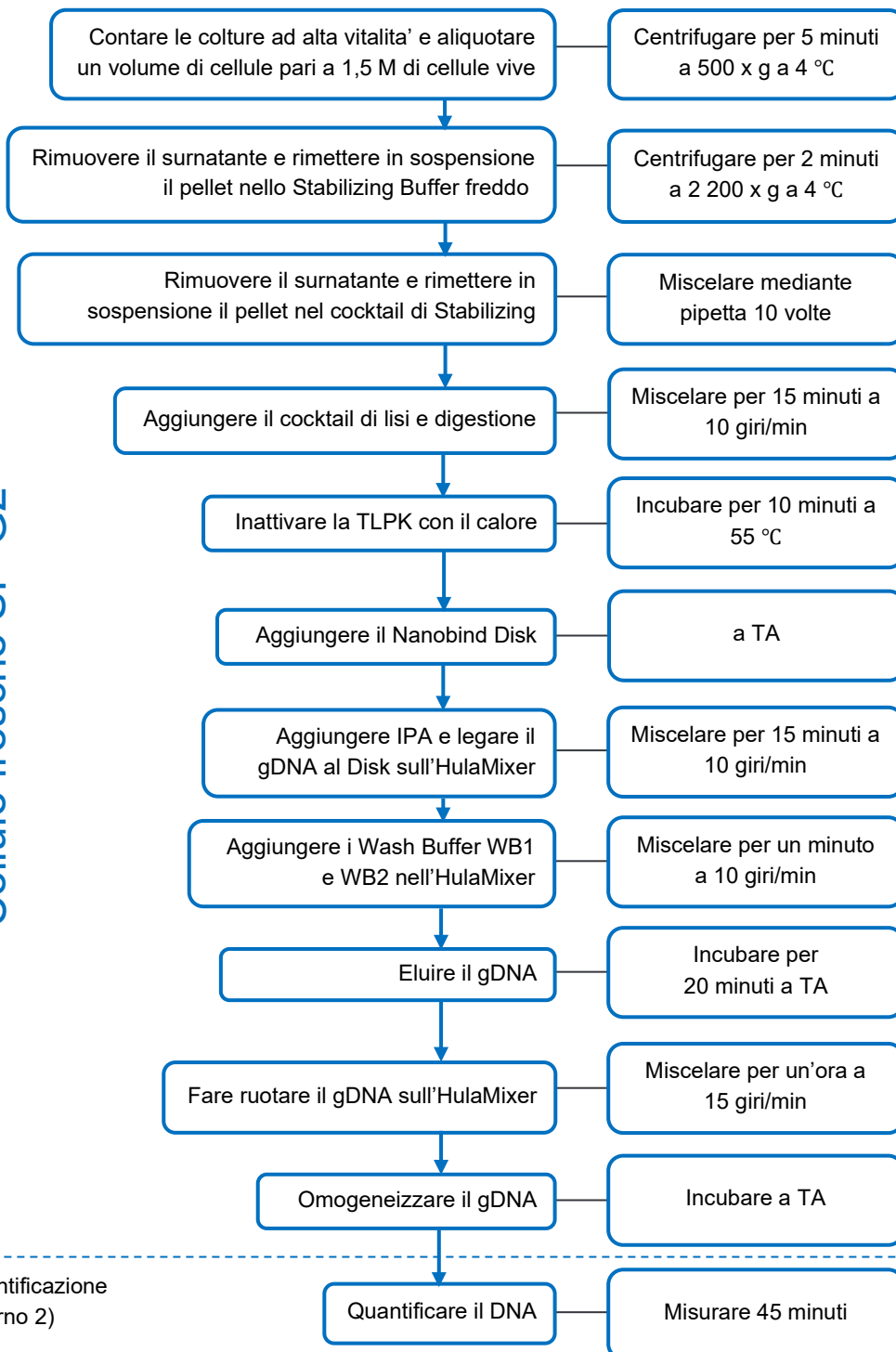
## Panoramica del flusso di lavoro

Isolamento del gDNA  
(Giorno 1)

Cellule fresche SP-G2

### PROCEDURA

### TEMPO/TEMP.



## Kit di isolamento del DNA da sangue e colture cellulari Bionano Prep SP-G2 e materiali forniti dall'utilizzatore

Contenuto del kit di isolamento del DNA da sangue e colture cellulari Bionano Prep SP-G2 (codice 80060, 12 preparazioni)

| Articolo  | Quantità           | Codice | Conservazione                   |
|---|--------------------|--------|---------------------------------|
| Lisi RBC*   | 18 ml              | 20442  | Temperatura ambiente (15-30 °C) |
| Tampone cellulare                                   | 50 ml              | 20374  | Temperatura ambiente (15-30 °C) |
| Digestion Enhancer                                  | 4,0 ml             | 20443  | Temperatura ambiente (15-30 °C) |
| Lisi e tampone di legame (LBB)**                    | 1,2 ml             | 20444  | Temperatura ambiente (15-30 °C) |
| Tampone di lavaggio 1 (WB1)**                       | 4,5 ml             | 20445  | Temperatura ambiente (15-30 °C) |
| Tampone di lavaggio 2 (WB2)                         | 6,0 ml             | 20446  | Temperatura ambiente (15-30 °C) |
| Tampone di eluizione (EB)                           | 1,1 ml             | 20378  | Temperatura ambiente (15-30 °C) |
| Detergente DE                                       | 55 µl              | 20447  | Temperatura ambiente (15-30 °C) |
| Nanobind Disk 4 mm                                  | 12 ciascuno        | 20448  | Temperatura ambiente (15-30 °C) |
| Provette per microcentrifuga Protein LoBind, 1,5 ml | 2 x 12<br>ciascuno | 20449  | Temperatura ambiente (15-30 °C) |
| Provette per microcentrifuga Protein LoBind, 0,5 ml | 12 ciascuno        | 20450  | Temperatura ambiente (15-30 °C) |
| Guaina in plastica per recuperatore magnetico       | 12 ciascuno        | 20451  | Temperatura ambiente (15-30 °C) |
| Provette per microcentrifuga, 2,0 ml                | 12 ciascuno        | 20452  | Temperatura ambiente (15-30 °C) |
| Stabilizzatore di DNA                               | 350 µl             | 20423  | Temperatura ambiente (15-30 °C) |
| RNasi A   | 150 µl             | 20455  | Refrigerare (2-8 °C)            |
| Acqua ultrapura                                     | 2 x 900 µl         | 20355  | Refrigerare (2-8 °C)            |
| Proteinasi K termolabile (TLPK)                     | 150 µl             | 20441  | Congelare (tra -15 °C e -25 °C) |

\*Non utilizzato in questo protocollo.

\*\*Vedere la sezione Note importanti per informazioni sui rifiuti pericolosi.

## Materiali e apparecchiature forniti dall'utilizzatore

| Articolo   | Fornitore                                 | N. catalogo |
|--|---|-------------|
| <b>Giorno 1 – Pellettatura, isolamento del gDNA e omogeneizzazione</b>   |   |             |
| Bionano Prep SP recuperatore magnetico (confezione da 2)   | Bionano Genomics (Kit di formazione)      | 80031       |
| Emocitometro e microscopio a contrasto di fase o contatore di cellule automatizzato  | Fornitore di attrezzature da laboratorio  |             |
| Pipette sierologiche, sterili  | Fornitore di attrezzature da laboratorio  |             |
| Pipettatore  | Fornitore di attrezzature da laboratorio  |             |
| Portaprovette magnetico DynaMag-2  | Thermo Fisher                             | 12321D      |
| Miscelatore di campioni HulaMixer  | Thermo Fisher                             | 15920D      |
| Provette per microcentrifuga, 2,0 ml, prive di nucleasi  | Fisher Scientific o equivalente           | 05-408-138  |
| Provetta per microcentrifuga, 5,0 ml, priva di nucleasi  | Thomas Scientific o equivalente           | 1201T80     |
| Etanolo, 200 prove, per biologia molecolare  | Sigma-Aldrich                             | E7023       |
| Isopropanolo (IPA), ≥ 99,5%, per biologia molecolare   | Fisher Scientific                         | A461-212    |
| Candeggina per lo smaltimento dei rifiuti liquidi a rischio biologico  | Fornitore di attrezzature da laboratorio  |             |
| Provette coniche per centrifuga, 50 ml, polipropilene  | Thermo Fisher o equivalente               | 14-432-22   |
| Provette coniche per centrifuga, 15 ml, polipropilene  | Thermo Fisher o equivalente               | 05-539-12   |
| Centrifuga con rotore a cestello oscillante per provette coniche da 15 ml, per concentrare le cellule dai mezzi di coltura | Fornitore di attrezzature da laboratorio  |             |
| Centrifuga refrigerata con rotore per provette da 1,5 ml (spin 2 200 x g)  | Cole-Parmer o equivalente                 | EW-17701-11 |
| Bagno d'acqua, 37 °C   | Fornitore di attrezzature da laboratorio  |             |
| Terreni di coltura cellulare   | Fornitore di attrezzature da laboratorio  |             |
| Secchiello per il ghiaccio e ghiaccio  | Fornitore di attrezzature da laboratorio  |             |
| Thermomixer, 55 °C   | Eppendorf o equivalente                   | 5382000023  |
| Parafilm   | Fornitore di attrezzature da laboratorio  |             |
| Pinzette a punta   | Electron Microscopy Sciences o equivalent | 78141-01    |
| Puntali per pipette a foro largo, con filtro, aerosol, 200 µl  | VWR o equivalente Rainin                  | 46620-642   |
| Puntali con filtro extra lunghi da 1 000 µl, sterili   | VWR o equivalente                         | 76322-154   |
| Pipette (10, 20, 200 e 1 000 µl) e puntali per pipette con filtro e nucleasi-free  | Fornitore di attrezzature da laboratorio  |             |
| Termoblocco di alluminio per 1,5 ml e 2,0 ml (opzionale)   | Sigma-Aldrich o equivalente               | Z743497     |
| <b>Giorno 2 - Quantificazione</b>  |   |             |
| Vortex da banco  | VWR o equivalente                         | 10153-838   |
| Bagno sonicatore   | Fornitore di attrezzature da laboratorio  |             |
| Provetta conica da 15 ml   | Fisher Scientific                         | 05-539-12   |
| Fluorometro, Qubit   | Thermo Fisher o equivalente               | Q33216      |
| Kit di analisi del dsDNA BR Qubit  | Thermo Fisher o equivalente               | Q32853      |
| Provette da dosaggio Qubit   | Thermo Fisher                             | Q32856      |
| Pipetta positive displacement MR-10 (opzionale)  | Rainin o equivalente                      | 17008575    |
| Puntali per pipette, 10 µl, C-10 per pipetta positive displacement. (opzionale)  | Rainin o equivalente                      | 17008604    |

## Introduzione e note importanti

### Introduzione

Questo Protocollo di isolamento del DNA del pellet cellulare fresco Bionano Prep® SP-G2 può fornire DNA genomico (gDNA) ad altissimo peso molecolare (UHMW) in meno di 4 ore da 1,5 milioni di cellule in coltura fresca. Utilizza una procedura migliorata di lisi, legame, lavaggio ed eluizione comune per le tecnologie di estrazione del gDNA a base di silice in combinazione con un nuovo disco paramagnetico. A differenza delle sfere magnetiche e delle colonne in silice, che tagliano il gDNA di grandi dimensioni, il Nanobind Disk si lega e rilascia il gDNA con una frammentazione significativamente inferiore, permettendo di ottenere gDNA UHMW. L'elevata capacità di legame del gDNA è dovuta all'uso di una nuova silice nanostrutturata all'esterno del disco paramagnetico termoplastico. Questo protocollo è stato valutato utilizzando una linea cellulare linfoblastoide umana immortalizzata da virus di Epstein-Barr (EBV) (GM12878) che cresce in coltura in sospensione. Il gDNA preparato utilizzando questo protocollo è stato testato solo con la marcatura Direct Label and Stain (DLS). Guardare il [Video di formazione](#) per passaggi tecnicamente critici e risoluzione dei problemi; i passaggi menzionati nel video corrispondono al Protocollo per sangue umano congelato SP-G2, ma si tratta degli stessi processi qui descritti.

### Panoramica

La lisi cellulare e la digestione della proteinasi K termolabile avvengono in un tampone caotropico e il gDNA rilasciato si lega al Nanobind Disk dopo l'aggiunta di isopropanolo. Dopo 3 passaggi di lavaggio, il disco viene trasferito in una nuova provetta e il gDNA viene eluito dal disco. Il gDNA ad altissimo peso molecolare (UHMW) recuperato viene sottoposto a frammentazione limitata affinché risulti più omogeneo. Il gDNA viene quindi miscelato ed equilibrato per una notte a temperatura ambiente per rendere il DNA più omogeneo, e ne viene determinata la concentrazione. Il range tipico di dimensioni del gDNA è compreso tra 50 kbp e  $\geq 1$  Mbp.

### Note importanti

#### OMOGENEITÀ DEL DNA

Il gDNA recuperato viene sottoposto a miscelazione mediante pipetta con un puntale standard da 200  $\mu$ l per aumentare l'omogeneità, garantendo un campionamento coerente del DNA per la marcatura.

#### QUANTIFICAZIONE DEL gDNA

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

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



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

- Per una quantificazione accurata occorre sonicare il campione di gDNA raccolto.
- La concentrazione tipica di gDNA è di 45-120 ng/μl.

#### **PIPETTAGGIO DI gDNA VISCOSO**

Per prelevare gDNA viscoso, tenere la provetta di campione originale per una visualizzazione ravvicinata, premere lo stantuffo della pipetta fino al primo arresto, immergere il puntale della pipetta e rilasciare delicatamente e lentamente lo stantuffo per iniziare a prelevare il gDNA viscoso nel puntale monitorando attentamente l'assorbimento. Tenere il puntale immerso anche dopo che la soluzione viscosa smette di spostarsi verso l'alto e si livella. Attendere. Il gDNA viscoso può impiegare alcuni secondi per riempire un volume di 2 μl. Se lo stantuffo viene rilasciato troppo rapidamente può formarsi una bolla nel puntale, con conseguente sottocampionamento (se ciò accade, ricominciare da capo). Dopo che la soluzione nel puntale si è livellata e mentre il puntale è ancora immerso nella soluzione di gDNA, raschiare il puntale contro il fondo della provetta da 3 a 5 volte con un movimento circolare. Rimuovere il puntale dalla soluzione di gDNA e ispezionare visivamente per confermare che la provetta sia stata riempita fino a 2 μl. Rimuovendo il puntale dalla soluzione di gDNA troppo presto o raschiando in modo inefficace il puntale per rompere i filamenti di gDNA si può inoltre produrre una bolla all'estremità del puntale della pipetta: tale bolla è un indizio del sottocampionamento (se ciò accade, ricominciare da capo).

#### **MANIPOLAZIONE DEL gDNA**

- La miscelazione del gDNA recuperato (dopo i passaggi di omogeneizzazione) viene sempre eseguita con un puntale per pipetta a foro largo, per evitare la frammentazione.
- Il gDNA recuperato non deve mai essere congelato o vortexato.
- Il gDNA può diventare non omogeneo in caso di conservazione prolungata.
- Per assicurare un campionamento accurato, il pipettaggio del gDNA recuperato viene sempre eseguito con un puntale a foro standard o con una pipetta positive displacement.

#### **CARATTERISTICHE DEL gDNA DI ALTA QUALITÀ PER L'ALLINEAMENTO BIONANO**

- Una soluzione di gDNA trasparente è l'ideale, ma una soluzione poco limpida non è sempre indicativa di scarsa qualità del campione.
- Il gDNA recuperato in soluzione è viscoso.
- Per determinare la presenza di gDNA di dimensioni dell'ordine delle megabasi si utilizza l'elettroforesi a campo pulsato (PFGE).
- Il gDNA recuperato è omogeneo se, a seguito di una misurazione eseguita con il test di quantificazione del gDNA Qubit, il coefficiente di variazione (CV)  $\leq 0,30$  (raccomandato).

## UTILIZZO DI BIONANO PREP SP RECUPERATORE MAGNETICO

1. Tenere una Guaina in plastica dai lati, vicino alla parte superiore, e inserirvi il Bionano Prep SP recuperatore magnetico posizionandolo in modo tale che poggi sulla parte inferiore della guaina.
2. Inserire il recuperatore protetto in una provetta per microcentrifuga Protein LoBind da 1,5 ml per attirare il Nanobind Disk verso il recuperatore contenuto nella guaina.
3. Sollevare con cautela il recuperatore protetto con il disco legato fuori dalla provetta e inserirlo in una provetta per microcentrifuga Protein LoBind da 0,5 ml finché il disco non si incunea delicatamente sul fondo della provetta.
4. Tenendo la guaina sul lato vicino alla parte superiore, con una mano tirare il recuperatore verso l'alto fino a quando il Nanobind Disk non si stacca dalla guaina rimanendo nella provetta Protein LoBind da 0,5 ml.
5. Cambiare la guaina per ogni nuovo campione.

## DIMENSIONI DEL LOTTO

Si raccomanda di processare non più di 6 campioni alla volta e fino a 2 lotti per giorno lavorativo.

## SMALTIMENTO DEI RIFIUTI PERICOLOSI

I tamponi Digestion Enhancer, LBB e WB1 contengono guanidina cloridrato (GuHCl). Il GuHCl è nocivo se ingerito o inalato e provoca irritazione della pelle e degli occhi. NON miscelare con candeggina o reagenti acidi. I rifiuti liquidi contenenti GuHCl devono essere decontaminati in sicurezza con un disinfettante a base di sali di ammonio quaternario prima dello smaltimento nei rifiuti pericolosi. Per la decontaminazione del surnatante del pellet si raccomanda di utilizzare la candeggina, mentre per la decontaminazione e lo smaltimento di tutte le soluzioni miscelate con GuHCl si raccomanda di seguire le normative locali in materia di ambiente, salute e sicurezza.

# Protocollo di isolamento del DNA del pellet cellulare fresco Bionano Prep SP-G2

## Preparazione per l'isolamento del gDNA (30 minuti)

### PRIMA DEL PRIMO UTILIZZO

1. Aggiungere etanolo al 100% ai tamponi di lavaggio (WB1 e WB2) e miscelare accuratamente:
  - a. Aggiungere 6,75 ml di etanolo al 100% al tampone di lavaggio 1 (WB1) per ottenere un volume finale di 11,25 ml.
  - b. Aggiungere 9,00 ml di etanolo al 100% al tampone di lavaggio 2 (WB2) per ottenere un volume finale di 15,00 ml.

### ALLESTIMENTO

1. Preparare i materiali e verificare le apparecchiature (vedere la sezione “Materiali e apparecchiature forniti dall'utilizzatore”).
  - a. Impostare il bagno termostatico a 37 °C. Verificare la temperatura con un termometro.
  - b. Preriscaldare i terreni di coltura cellulare in un bagno termostatico a 37 °C.
  - c. Preparare l'emocitometro e il microscopio a contrasto di fase o il contatore di cellule automatizzato.
  - d. Verificare l'accesso a una centrifuga con rotore a cestello oscillante in grado di ospitare provette coniche da 15 ml. Impostare la centrifuga a 500 x g, temperatura ambiente.
  - e. Raffreddare la microcentrifuga per provette da 1,5 ml a 4 °C e impostarla a 500 x g per 5 minuti.
  - f. Recuperare pipette e puntali
  - g. Preparare secchiello per il ghiaccio e ghiaccio
  - h. Per lo smaltimento dei rifiuti, predisporre:
    - Provetta conica da 50 ml con 5 ml di candeggina + 20 ml di acqua; capovolgere più volte per miscelare.
    - Una provetta conica da 50 ml destinata ai rifiuti liquidi contenenti GuHCl (smaltiti come rifiuti pericolosi secondo le normative locali in materia di ambiente, salute e sicurezza).
  - i. Etichettare il numero desiderato di provette per microcentrifuga Protein LoBind da 1,5 ml per i pellet cellulari (fino a sei). Mettere in ghiaccio.
  - j. Miscelatore di campioni HulaMixer
  - k. IPA al 100%
  - l. Portaprovette magnetico DynaMag-2
  - m. Bionano Prep SP recuperatore magnetico
  - n. Impostare un Thermomixer a 55 °C, 10 minuti, senza agitare.
  - o. Pinzette a punta

- p. Per la Master Mix del cocktail di lisi e digestione, marcare una provetta da 2,0 ml (per un lotto di 3 o meno campioni) oppure una provetta da 5,0 ml (per un lotto da 4 a 6 campioni).
2. Prendere i seguenti reagenti e materiali dal kit SP-G2: Cell Buffer, Stabilizzatore di DNA, RNasi A, Digestion Enhancer, DE Detergent, acqua ultrapura, Nanobind Disk, provette per microcentrifuga, guaina, LBB, WB1, WB2 ed EB.
  - a. Per ogni campione, preparare 1 200 µl di Stabilizing Buffer (SB) miscelando 1 176 µl di Cell Buffer con 24 µl di Stabilizzatore di DNA. Se la dimensione del lotto è maggiore di 1 campione, moltiplicare per il numero di preparazioni. Vortexare per miscelare e mettere in ghiaccio.
  - b. Agitare la RNasi A 3 volte per miscelare. Centrifugare brevemente e mettere in ghiaccio.
  - c. Per ogni campione, preparare 48 µl di Master Mix del cocktail di Stabilizing Buffer/RNasi A miscelando 36 µl di Stabilizing Buffer con 12 µl di RNasi A. Se la dimensione del lotto è maggiore di 1 campione, moltiplicare per il numero di preparazioni. Vortexare brevemente per miscelare. Centrifugare brevemente e mettere in ghiaccio.
  - d. Per ogni campione, marcare una provetta Protein LoBind da 0,5 ml (Bionano) e una provetta Protein LoBind da 1,5 ml (Bionano). Mettere la/e provetta/e Protein LoBind da 1,5 ml in ghiaccio.
  - e. Per ogni campione, marcare una provetta per microcentrifuga da 2,0 ml (Bionano) per il passaggio di omogeneizzazione del gDNA. Mettere in un portaprovette a temperatura ambiente.
3. Preparare la Master Mix del cocktail di lisi e digestione in una provetta per microcentrifuga da 2,0 ml per un lotto di 3 o meno campioni, oppure in una provetta per microcentrifuga da 5,0 ml per un lotto da 4 a 6 campioni. Preparare la Master Mix seguendo l'ordine di aggiunta dei componenti indicato nella **Tabella 1**. Tappare la provetta, miscelare capovolgendola 15 volte e posizionarla su un portaprovette a temperatura ambiente.

**Nota:** non vortexare. Non aggiungere ancora la TLPK alla Master Mix del cocktail.

**Tabella 1. Foglio di lavoro per la preparazione della Master Mix del cocktail di lisi e digestione**

| Componente della Master Mix | Volume del componente della Master Mix (µl) | N. di campioni | Eccesso per Master Mix | Volume totale dei componenti della Master Mix =<br>Volume dei componenti della Master Mix x n. di campioni x eccesso per Master Mix | Ordine di aggiunta |
|-----------------------------|---|----------------|------------------------|---|--------------------|
| Digestion Enhancer          | 270   |                | 1,2                    |   | 1                  |
| Acqua priva di nucleasi     | 66,25                                       |                | 1,2                    |   | 2                  |
| LBB*                        | 80  |                | 1,2                    |   | 3                  |
| DE Detergent*               | 3,75  |                | 1,2                    |   | 4                  |
| TLPK**                      | 10  |                | 1,2                    |   | 5                  |
| <b>Totale</b>               | <b>430</b>                                  |                |                        |   |                    |

\*Pipettare lentamente l'LBB e il DE Detergent a causa dell'elevata viscosità e del rischio di formazione di bolle.

\*\*Aggiungere subito prima dell'uso nella fase 8 dell'isolamento del gDNA.

### Isolamento del gDNA (fino a 3 ore)

#### PREPARARE I PELLETTI CELLULARI FRESCHI, AGGIUNGERE SB/RNASI E RIMETTERE IN SOSPENSIONE LE CELLULE

##### Input consigliato: 1,5E+06 cellule vitali

1. Contare le cellule nello stock di coltura cellulare:
  - a. Rimettere in sospensione lo stock di coltura cellulare per creare una sospensione uniforme delle cellule per il conteggio.
  - b. Contare il numero di cellule vitali con un dispositivo per la conta cellulare.  
**Nota:** le cellule devono essere in fase log con un'alta percentuale di vitalità cellulare ( $\geq 70\%$ ), per massimizzare la qualità e le dimensioni del gDNA isolato. Registrare il numero/la percentuale di cellule vitali.
  - c. Calcolare il volume dello stock di coltura cellulare originale necessario per un massimo di 6 pellettini cellulari, ciascuno contenente 1,5E+06 cellule vitali. Se la densità di cellule vitali è  $< 1,25E+06$  cellule vitali/ml, procedere al passaggio 2. Se la densità delle cellule vitali è  $\geq 1,25E+06$  cellule vitali/ml, procedere al passaggio 3.
2. Concentrare le cellule (se la concentrazione cellulare è bassa)
  - a. Trasferire un volume adeguato di stock di coltura cellulare in una provetta conica da 15 ml.
  - b. Centrifugare una provetta conica da 15 ml a 500 x g a temperatura ambiente per 5 minuti in un rotore a cestello oscillante per raccogliere in pellettini le cellule.
  - c. Rimuovere il surnatante, scartarlo nella provetta conica da 50 ml contenente candeggina e rimettere in sospensione le cellule con un volume minore di terreno di coltura per ottenere una concentrazione di cellule vive di almeno 1,25E+06 cellule vive/ml.

- d. Contare il numero di cellule vitali con un dispositivo per la conta cellulare.
  - e. Calcolare il volume di stock di coltura cellulare concentrato per produrre  $1,5E+06$  cellule vitali per pellet.
3. Aliquotare le cellule
- a. Miscelare mediante pipetta la sospensione dello stock di coltura cellulare per garantire l'omogeneità della sospensione cellulare.
  - b. Aliquotare il volume di cellule target della sospensione dello stock di coltura cellulare in ciascuna provetta Protein LoBind da 1,5 ml precedentemente marcata e raffreddata. Mettere in ghiaccio.
4. Pellet cellulari
- a. Centrifugare le cellule a  $500 \times g$  a  $4^\circ C$  per 5 minuti in una microcentrifuga con rotore ad angolo fisso.
  - b. Rimuovere tutto il surnatante senza disturbare il pellet. Scartare il surnatante nella provetta conica da 50 ml contenente candeggina. Porre il campione in ghiaccio.
5. Lavare le cellule con lo Stabilizing Buffer freddo
- a. Aggiungere 1 ml di Stabilizing Buffer freddo a ciascun pellet.
  - b. Rimettere in sospensione il pellet pipettando su e giù 3 volte con una pipetta P1000 impostata su 1 000  $\mu l$ .
  - c. Centrifugare le cellule a  $2\ 200 \times g$  a  $4^\circ C$  per 2 minuti in una microcentrifuga con rotore ad angolo fisso.
  - d. Durante la centrifugazione, recuperare la TLPK dalla conservazione a  $-20^\circ C$  e metterla in ghiaccio.
  - e. Dopo la centrifugazione, porre i campioni in ghiaccio.
  - f. Aspirare tutto il surnatante e scartarlo nella provetta conica da 50 ml contenente candeggina. Utilizzando una pipetta P200, rimuovere il liquido residuo dal pellet cellulare.
  - g. Conservare i campioni sul ghiaccio fino alla rimozione di tutti i surnatanti.
6. Aggiungere 40  $\mu l$  di Stabilizing Buffer/RNasi freddo sulla parte superiore di ogni pellet. Mettere in ghiaccio.
7. Processando un campione alla volta, utilizzare un puntale per pipetta standard da 200  $\mu l$  per grattare delicatamente il pellet in modo circolare da 3 a 5 volte per smuoverlo nella soluzione. Quindi, utilizzando lo stesso puntale, miscelare lentamente il campione per 10 volte per rimettere in sospensione il pellet. Porre il campione in ghiaccio. Cambiare i puntali tra un campione e l'altro.
- Nota:** aspirare l'intero volume del campione nel puntale e ispezionare visivamente la provetta durante la miscelazione per assicurarsi che il pellet venga rimesso in sospensione completamente durante la miscelazione, in modo tale che alla fine della miscelazione non rimanga pellet visibile sul lato della provetta. Evitare la formazione di bolle.

#### LISARE, DIGERIRE E INATTIVARE LA PROTEINASI K TERMOLABILE

8. Picchiettare la provetta di TLPK 3 volte e centrifugare per 2 secondi. Aggiungere il volume di TLPK calcolato per la dimensione del lotto della **Tabella 1** alla Master Mix del cocktail di lisi e digestione per ottenere la Master Mix completa del cocktail. Tappare la provetta e capovolgere la Master Mix 15 volte per miscelarla, quindi riparla nel portaprovette a temperatura ambiente. Posizionare la TLPK in ghiaccio.

**Nota:** non vortexare. Da questa fase in poi, il campione sarà manipolato a temperatura ambiente.

9. Aggiungere 430 µl di Master Mix completa del cocktail di lisi e digestione a ogni campione. Tappare la provetta. Cambiare i puntali tra un campione e l'altro.
10. Capovolgere ogni campione 15 volte per miscelarlo.
11. Ruotare il campione sull'HulaMixer per 15 minuti a temperatura ambiente a 10 giri/minuto, senza scuotimenti o vibrazioni.
12. Durante la rotazione, riportare la TLPK a -20 °C. Gettare la Master Mix del cocktail di lisi e digestione (con TLPK) rimasta inutilizzata nella provetta conica da 50 ml destinata ai rifiuti liquidi contenenti GuHCl. Riempire la provetta conica di candeggina fino a 50 ml con acqua, chiuderla, miscelare capovolgendola e smaltire il contenuto nel lavandino.
13. Rimuovere il campione dall'HulaMixer e centrifugarlo per 2 secondi.
14. Incubare il campione in un Thermomixer preimpostato a 55 °C per 10 minuti, senza agitare.
15. Rimuovere il campione e spegnere il Thermomixer.

#### **LEGARE, LAVARE ED ELUIRE IL gDNA**

16. Utilizzando una pinzetta a punta, aggiungere con attenzione un singolo Nanobind Disk da 4 mm al lisato.

**Nota:** i dischi a volte possono restare appiccicati tra loro.

17. Aggiungere 480 µl di IPA al 100% a ciascun campione.
18. Capovolgere ogni campione 5 volte per miscelarlo.
19. Fare ruotare il campione sull'HulaMixer per 15 minuti a temperatura ambiente a 10 giri/minuto, senza scuotimenti o vibrazioni.

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

20. Rimuovere il campione dall'HulaMixer.
21. Inserire la base magnetica nel portaprovette trasparente Dynamag come mostrato sotto, assicurandosi che il Nanobind Disk sia catturato dal magnete in prossimità della parte superiore del livello del liquido. In caso contrario, reinstallare il portaprovette (guardare il [Video di formazione](#)).

- a. Capovolgere il portaprovette trasparente Dynamag e posizionarlo capovolto con i coperchi dei campioni che toccano la superficie di lavoro. Le provette si trovano sulla stessa fila del portaprovette e nella fila più lontana dalla parte anteriore.



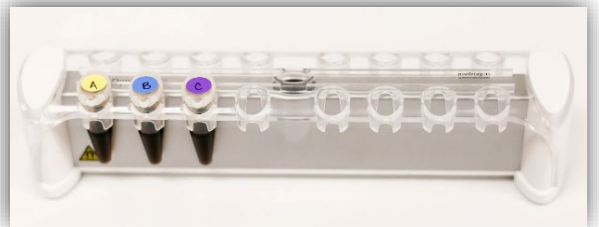
- b. Capovolgere la base magnetica Dynamag e inserirla nel portaprovette trasparente.



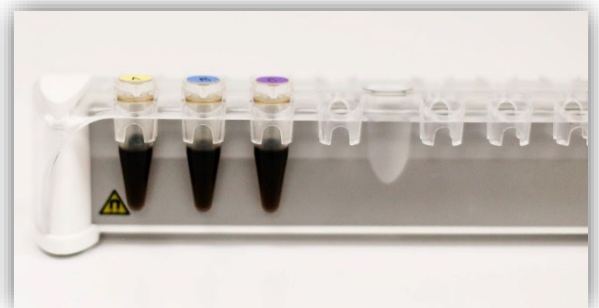
- c. Inclinare lentamente l'apparecchio montato di 90° in senso orario mentre continua a poggiare sulla superficie. Le provette saranno ora orizzontali e visibili all'utilizzatore.





- d. Inclinare lentamente l'apparecchio combinato di 90° in senso orario mentre continua a poggiare sulla superficie, in modo che sia completamente in posizione verticale e le provette siano rivolte verso l'utilizzatore.



- e. Assicurarsi che il Nanobind Disk sia bloccato dal magnete vicino alla parte superiore del livello del liquido.





22. Impostare una pipetta per P1000 su 1 000 µl e una seconda su 700 µl.
23. Rimuovere il surnatante come indicato di seguito, facendo attenzione a non aspirare il gDNA e cambiando i puntali tra un campione e l'altro (guardare il [Video di formazione](#), 1:15):
- Inclinare l'intero portaprovette a 45° tenendolo con una mano (afferrando l'intero apparecchio dal basso con le provette visibili all'utilizzatore e i coperchi rivolti verso l'altra mano dell'utilizzatore).
  - Attendere 2 secondi affinché il gDNA si depositi sul Nanobind Disk.
  - Rimuovere delicatamente tutto il liquido con un puntale extra lungo da 1 000 µl angolato lontano dal Nanobind Disk e/o dal gDNA per evitarne la degradazione.
  - Trasferire il surnatante nella provetta conica da 50 ml destinata ai rifiuti liquidi contenenti GuHCl.  
 Assicurarsi che il gDNA non sia stato rimosso ispezionando visivamente il puntale contenente il tampone prima di scartare. Se il gDNA viene aspirato accidentalmente o si stacca dal disco, fare riferimento alla sezione Troubleshooting guide.
24. Eseguire il lavaggio con WB1:
- Trasferire 700 µl di Buffer WB1 nella provetta e chiuderla.
  - Separare il portaprovette trasparente dal portaprovette Dynamag e trasferire i campioni nell'HulaMixer.
  - Fare ruotare i campioni sull'HulaMixer per un minuto a temperatura ambiente a 10 giri/minuto, senza scuotimenti o vibrazioni.  
**Nota:** il Nanobind Disk può rimanere incastrato sul lato, sul coperchio o sul fondo della provetta. Non interrompere la rotazione dell'HulaMixer né intervenire se il Nanobind Disk rimane incastrato in un punto qualsiasi della provetta, poiché questo è normale.
  - Rimuovere i campioni dall'HulaMixer.
  - Posizionare i campioni nel portaprovette Dynamag trasparente. Capovolgere e agitare delicatamente il portaprovette trasparente Dynamag fino a quando il Nanobind Disk in ogni campione si stacca da qualsiasi punto della provetta.
  - Inserire la base magnetica nel portaprovette trasparente, come descritto nei punti da 21a a 21e.
  - Rimuovere il surnatante come descritto al punto 23.  
 Assicurarsi che il gDNA non sia stato rimosso ispezionando visivamente il puntale contenente il tampone prima di scartare. Se il gDNA viene aspirato accidentalmente o si stacca dal disco, fare riferimento alla sezione Troubleshooting guide.
25. Impostare la seconda pipetta a 500 µl (precedentemente a 700 µl).
26. Eseguire il lavaggio con WB2:
- Trasferire 500 µl di Buffer WB2 nella provetta e chiuderla.
  - Separare il portaprovette trasparente dal portaprovette Dynamag e trasferire i campioni nell'HulaMixer.
  - Fare ruotare i campioni sull'HulaMixer per un minuto a temperatura ambiente a 10 giri/minuto, senza scuotimenti o vibrazioni.

**Nota:** il Nanobind Disk può rimanere incastrato sul lato, sul coperchio o sul fondo della provetta. Non interrompere la rotazione dell'HulaMixer né intervenire se il Nanobind Disk rimane incastrato in un punto qualsiasi della provetta, poiché questo è normale.

- d. Rimuovere i campioni dall'HulaMixer.
- e. Posizionare i campioni nel portaprovette Dynamag trasparente. Capovolgere e agitare delicatamente il portaprovette trasparente Dynamag fino a quando il Nanobind Disk in ogni campione si stacca da qualsiasi punto della provetta.
- f. Inserire la base magnetica nel portaprovette trasparente, come descritto nei punti da 21a a 21e.
- g. Rimuovere il surnatante come descritto al punto 23.



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

27. Ripetere il lavaggio con WB2, punto 26.
28. Dopo aver rimosso il secondo surnatante di WB2, trasferire i campioni con i tappi aperti nel portaprovette che contiene le provette Protein LoBind da 0,5 ml marcate in precedenza.
29. Inserire completamente il Bionano Prep SP recuperatore magnetico in una guaina in plastica per il recuperatore magnetico pulita finché il recuperatore non si trova completamente a contatto con la parte inferiore della guaina. Cambiare le protezioni tra un campione e l'altro.
30. Inserire il Bionano Prep SP recuperatore magnetico protetto nella provetta Protein LoBind da 1,5 ml e appoggiare il recuperatore protetto contro il Nanobind Disk finché non cattura il disco. Mantenere il Bionano Prep SP recuperatore magnetico protetto in modo che rimanga completamente a contatto con la parte inferiore della guaina e finché il Nanobind Disk non viene catturato dal magnete.
31. Sollevare con cautela il Bionano Prep SP recuperatore magnetico rivestito con il disco legato fuori dalla provetta e inserirlo in una provetta per microcentrifuga Protein LoBind da 0,5 ml finché il disco non si incastra delicatamente sul fondo della provetta.

**Nota:** cambiare la guaina tra un campione e l'altro.

#### ELUIZIONE DEL gDNA

32. Aggiungere 65 µl di EB alla provetta Protein LoBind da 0,5 ml contenente il Nanobind Disk e chiudere la provetta.
33. Centrifugare la provetta sulla microcentrifuga da banco per 5 secondi.
34. Utilizzando un puntale standard da 10 µl, spingere delicatamente il Nanobind Disk verso il fondo della provetta, assicurandosi che sia completamente immerso nel liquido. Il disco deve rimanere parallelo alla superficie del banco (guardare il [Video di formazione](#)).
35. Incubare il Nanobind Disk immerso nell'EB a temperatura ambiente per 20 minuti.

36. Raccogliere il gDNA estratto trasferendo l'eluato nella provetta per microcentrifuga da 2,0 ml marcata con un puntale standard da 200 µl.
37. Centrifugare la provetta con il Nanobind Disk su una microcentrifuga da banco per 5 secondi per separare l'eluato residuo dal Nanobind Disk.
38. Trasferire l'eluato residuo contenente gDNA viscoso nella stessa provetta per microcentrifuga da 2,0 ml marcata con un puntale standard da 200 µl.  
**Nota:** quasi tutto il gDNA viscoso fuoriesce dal Nanobind Disk durante la rotazione. Se il gDNA viscoso rimane bloccato tra il disco e il fondo della provetta Protein LoBind da 0,5 ml, eseguire 1 o 2 spin in più con la centrifuga.
39. Centrifugare a impulsi i campioni per 2 secondi.

### **Omogeneizzazione della soluzione di gDNA (70 minuti)**

#### **OMOGENEIZZAZIONE DEL gDNA**

40. Pipettare lentamente l'intero volume di gDNA in un puntale standard da 200 µl, quindi erogare lentamente il gDNA. Evitare la formazione di bolle.  
Ripetere questo processo 3 volte per un totale di 4 passaggi  
(1 passaggio = 1 aspirazione + 1 dispensazione).  
**Nota:** se l'assorbimento del gDNA si bloccasse a causa dell'elevata viscosità, potrebbe essere necessario agitare delicatamente mentre si rilascia lentamente lo stantuffo per prelevare il gDNA.
41. Posizionare la provetta per microcentrifuga standard da 2,0 ml contenente gDNA nel portaprovette dell'HulaMixer e fare ruotare a temperatura ambiente per un'ora a 15 giri/min.  
**Nota:** durante le rotazioni iniziali, assicurarsi che il gDNA risalga dal fondo della provetta per microcentrifuga per portarsi nel coperchio della provetta durante le rotazioni. Se la soluzione di DNA rimane sul fondo della provetta durante le rotazioni iniziali, spegnere l'HulaMixer e posizionare il portaprovette in modo che la provetta per microcentrifuga sia capovolta. Picchiare il fondo della provetta per microcentrifuga fino a quando il gDNA viene attirato nel coperchio e riprendere la miscelazione.
42. Rimuovere la provetta per microcentrifuga dal portaprovette dell'HulaMixer e centrifugarla sulla microcentrifuga da banco per 2 secondi per portare il gDNA sul fondo della provetta.
43. Lasciare il gDNA per una notte a temperatura ambiente (25 °C) affinché si equilibri e si omogeneizzi.  
**Nota:** la maggior parte dei campioni può essere marcata il giorno successivo o entro quarantotto ore dall'isolamento del gDNA utilizzando il protocollo DLS-G2 (codice 30553).

## Quantificazione del gDNA (45 minuti)

### QUANTIFICAZIONE QUBIT - SAGGIO BR dsDNA

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

1. Equilibrare gli standard del kit di analisi Qubit BR a temperatura ambiente.  
**Nota:** se il gDNA è stato conservato a 4 °C, equilibrarlo a temperatura ambiente e centrifugarlo a impulsi prima di passare alla fase successiva.
2. Aggiungere il Qubit BR Buffer alle provette da dosaggio Qubit da 0,5 ml:
  - a. Per ogni campione, aggiungere 18 µl di Qubit BR Buffer a 3 provette da dosaggio Qubit separate.
  - b. Per gli standard Qubit, aggiungere 10 µl di Qubit BR Buffer a 2 provette da dosaggio Qubit separate.
3. Utilizzando una pipetta da 200 µl con un puntale a foro largo, miscelare delicatamente l'intero volume del campione di gDNA pipettando su e giù 5 volte, facendo attenzione a non generare bolle.
4. Utilizzando un nuovo puntale per pipetta standard o un puntale per pipetta positive displacement per ogni prelievo:  
Prelevare un'aliquota da 2 µl dal lato sinistro, una dal centro e una dal lato destro di ciascun campione e trasferirle nel Qubit BR Buffer della corrispondente provetta da dosaggio Qubit, risciacquando il puntale durante l'erogazione. Collocare le provette da dosaggio in un portaprovette galleggiante e sonicare per 10 minuti. Eseguire i passaggi 5 e 6 durante la sonicazione.  
**Nota:** se non si dispone di un bagno sonicatore, vortexare per almeno 30 secondi a velocità massima, quindi centrifugare brevemente a velocità ridotta per 2 secondi.
5. Preparare la soluzione di lavoro diluendo il Dye Assay Reagent nel BR Dilution Buffer (1:200):
  - a. 200 µl di Working Solution per ognuno dei 2 standard (400 µl totali).
  - b. 200 µl di Working Solution per ogni aliquota di campione (600 µl per ogni campione).
6. Per gli standard di DNA Qubit, aggiungere 10 µl di standard 1 e 2 alle provette da dosaggio contenenti il BR Buffer dal passaggio 2b.
7. Una volta completata la sonicazione, recuperare le provette da dosaggio e centrifugare brevemente a impulsi. Vortexare le provette per 5 secondi a velocità massima, quindi centrifugarle nuovamente a impulsi.
8. Aggiungere 180 µl di Working Solution a ciascuna aliquota di DNA sonicato e aliquota di standard di DNA Qubit. Vortexare per 5 secondi e centrifugare le provette a impulsi.
9. Incubare i campioni per almeno 2 minuti, quindi caricarli e leggerli sul fuorimetro Qubit. Registrare i valori nella Tabella 2 seguente.

10. Calcolare il CV = deviazione standard/valore medio per ogni campione e registrarlo nella Tabella 2 seguente.

**Nota:** se il CV è > 0,30, pipettare delicatamente l'intero volume di gDNA con 5 colpi (1 colpo = 1 corsa verso l'alto + 1 corsa verso il basso) usando un puntale a foro largo. Lasciare riposare il gDNA per una notte a temperatura ambiente prima di ripetere la quantificazione ed eseguire la marcatura DLS il giorno successivo. Le concentrazioni tipiche di DNA variano da 45 a 90 ng/μl.

**Tabella 2. Foglio di lavoro per la quantificazione del gDNA (BR dsDNA)**

| ID campione | Sinistra<br>(ng/μl) | Centro<br>(ng/μl) | Destra<br>(ng/μl) | CV<br>(dev. st./media) |
|-------------|---------------------|-------------------|-------------------|------------------------|
|             |                     |                   |                   |                        |
|             |                     |                   |                   |                        |
|             |                     |                   |                   |                        |
|             |                     |                   |                   |                        |
|             |                     |                   |                   |                        |

**MARCATURA**

I campioni di gDNA sono pronti per la marcatura con il metodo Direct Label and Stain (DLS) entro 48 ore dall'isolamento. Per i kit e i protocolli applicabili, consultare le sezioni "Kit di preparazione dei campioni" e "Strumenti e materiali di consumo" all'indirizzo <https://bionano.com/support/>.

## 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    | <a href="mailto:support@bionano.com">support@bionano.com</a>   |
| Telefono  | Orario lavorativo:<br>dal lunedì al venerdì, dalle 9:00 alle 17:00, fuso orario del Pacifico (PST)<br>Stati Uniti: +1 (858) 888-7663 |
| Sito web  | <a href="http://www.bionano.com/support">www.bionano.com/support</a>   |
| Indirizzo | Bionano Genomics, Inc.<br>9540 Towne Centre Drive, Suite 100<br>San Diego, CA 92121, Stati Uniti                                     |