



# **Protocolo de aislamiento de ADN de sangre humana congelada Bionano Prep SP-G2**

NÚMERO DE DOCUMENTO:

CG-00006-3

REVISIÓN DEL DOCUMENTO:

B

Fecha de entrada en vigor: 01/08/2023

## Índice

<b>Aviso legal.....</b>	<b>3</b>
Patentes .....	3
Marcas comerciales.....	3
<b>Historial de revisiones .....</b>	<b>4</b>
<b>Resumen del flujo de trabajo.....</b>	<b>5</b>
<b>Kit de aislamiento de ADN en sangre y cultivo celular Bionano Prep SP-G2 de Bionano y materiales suministrados por el usuario.....</b>	<b>6</b>
Contenido del Kit de aislamiento de ADN en sangre y cultivo celular Bionano Prep SP-G2 (Ref. 80060, 12 reacciones) .....	6
Equipo y materiales suministrados por el usuario .....	7
<b>Introducción y notas importantes .....</b>	<b>8</b>
Introducción .....	8
Visión general.....	8
Notas importantes .....	8
<b>Protocolo de aislamiento de ADN en sangre humana congelada Bionano Prep SP-G2. 12</b>	
Preparación para el aislamiento de ADNg (30 minutos).....	12
Aislamiento de ADNg (2 horas 35 minutos).....	13
Homogeneización de la solución de ADNg (70 minutos).....	20
Cuantificación del ADNg (45 minutos).....	20
<b>Asistencia técnica .....</b>	<b>23</b>

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

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

### **Patentes**

Los productos de Bionano Genomics® pueden estar cubiertos por una o varias patentes estadounidenses o extranjeras.

### **Marcas comerciales**

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

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

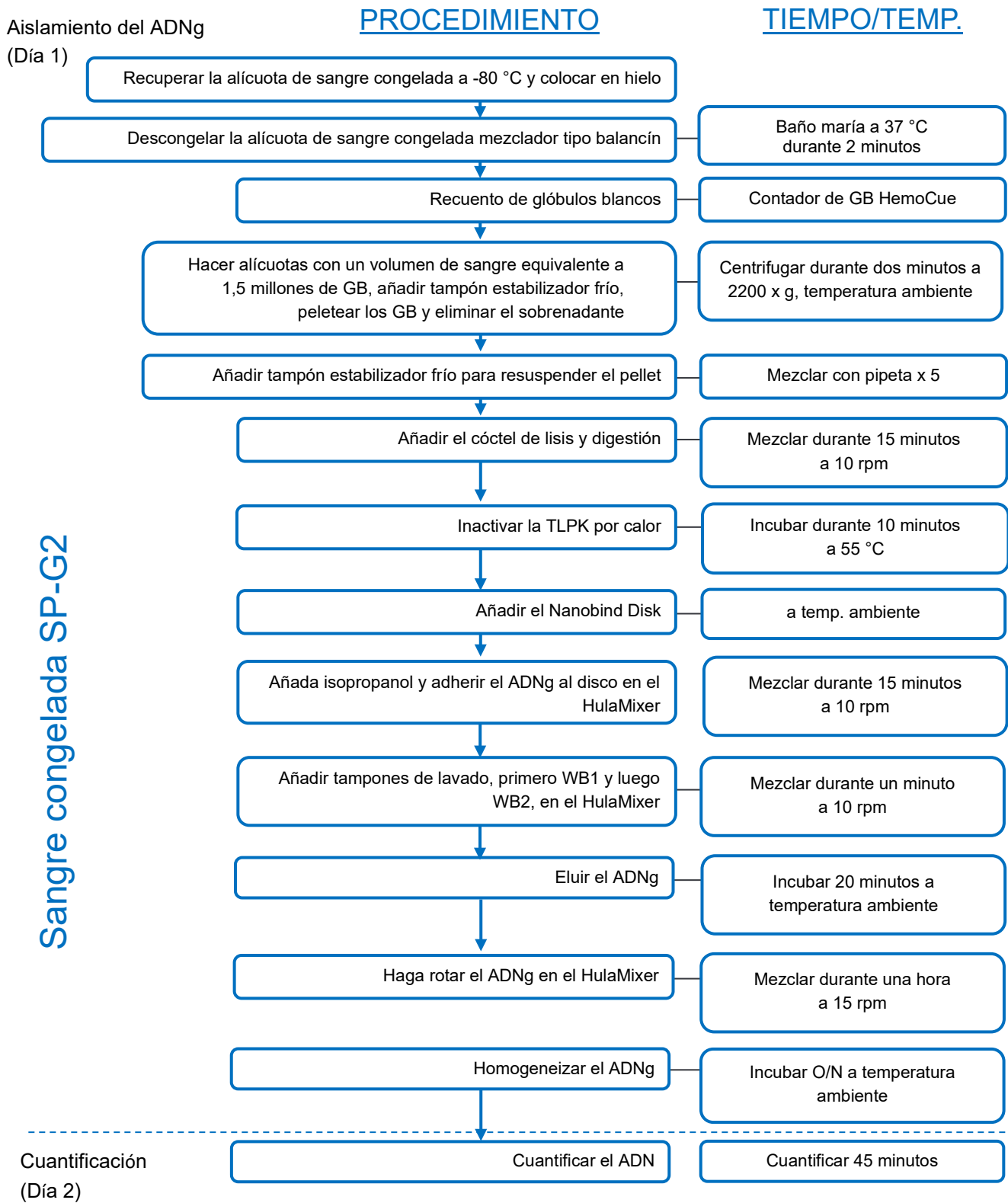
No se otorga ni está implícita ninguna licencia para utilizar ninguna marca comercial de Bionano Genomics. Los usuarios no están autorizados a utilizar estas marcas sin el consentimiento previo por escrito de Bionano Genomics. El uso de estas marcas registradas o de cualquier otro material, excepto en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

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

## Historial de revisiones

REVISIÓN	NOTAS
A	Lanzamiento comercial.
B	Cambios generales de formato para la publicación.

## Resumen del flujo de trabajo



## Kit de aislamiento de ADN en sangre y cultivo celular Bionano Prep SP-G2 de Bionano y materiales suministrados por el usuario

Contenido del Kit de aislamiento de ADN en sangre y cultivo celular Bionano Prep SP-G2 (Ref. 80060, 12 reacciones)

Artículo	Cantidad	Número de referencia	Almacenamiento
Solución de lisis de GR*	18 ml	20442	Temperatura ambiente (15-30 °C)
Tampón celular	50 ml	20374	Temperatura ambiente (15-30 °C)
Potenciador de digestión	4,0 ml	20443	Temperatura ambiente (15-30 °C)
Tampón de lisis y unión (LBB)**	1,2 ml	20444	Temperatura ambiente (15-30 °C)
Tampón de lavado 1 (WB1)**	4,5 ml	20445	Temperatura ambiente (15-30 °C)
Tampón de lavado 2 (WB2)	6,0 ml	20446	Temperatura ambiente (15-30 °C)
Tampón de elución (EB)	1,1 ml	20378	Temperatura ambiente (15-30 °C)
Detergente DE	55 µl	20447	Temperatura ambiente (15-30 °C)
Nanobind Disks de 4 mm	12 unidades	20448	Temperatura ambiente (15-30 °C)
Tubos Protein LoBind de 1,5 ml	2 x 12 unidades	20449	Temperatura ambiente (15-30 °C)
Tubos Protein LoBind de 0,5 ml	12 unidades	20450	Temperatura ambiente (15-30 °C)
Recuperador magnético con funda de plástico (Magnetic Retriever Plastic Sheath)	12 unidades	20451	Temperatura ambiente (15-30 °C)
Tubos de 2 ml	12 unidades	20452	Temperatura ambiente (15-30 °C)
Estabilizador de ADN	350 µl	20423	Temperatura ambiente (15-30 °C)
RNasa A*	150 µl	20455	Refrigerar (2-8 °C)
Agua ultrapura	2 x 900 µl	20355	Refrigerar (2-8 °C)
Proteinasa K termolábil (TLPK)	150 µl	20441	Congelar (-15 °C a -25 °C)

\*No se utiliza en este protocolo.

\*\*Véase la sección «Notas importantes» con información sobre residuos peligrosos.

## Equipo y materiales suministrados por el usuario

Artículo	Proveedor	N.º de catálogo
<b>Día 1- Peleting, aislamiento y homogeneización del ADNg</b>		
Recuperador magnético Bionano Prep SP (paquete de 2)	Bionano Genomics (Kit de formación)	80031
Analizador de GB HemoCue	Fisher Scientific (para EE. UU.) Distribuidor ( <a href="#">fuera de EE. UU.</a> )	22-601-017
Microcubetas HemoCue	Fisher Scientific	22-601-018
Gradilla de tubos magnética DynaMag-2	Thermo Fisher	12321D
Mezclador de muestras HulaMixer	Thermo Fisher	15920D
Tubos de 2,0 ml, sin nucleasas	Fisher Scientific o equivalente	05-408-138
Tubos de 5,0 ml, sin nucleasas	Thomas Scientific o equivalente	1201T80
Etanol ultrapuro, grado de biología molecular	Sigma-Aldrich	E7023
Isopropanol (IPA), ≥ 99,5 %, grado de biología molecular	Fisher Scientific	A461-212
Lejía para eliminación de sangre	Proveedor general de suministros del laboratorio	
Tubos de centrifuga cónicos, 50 ml, PP	Thermo Fisher o equivalente	14-432-22
Centrífuga con rotor para tubos de 1,5 ml (2200 x g)	Cole-Parmer o equivalente	EW-17701-11
Baño de agua a 37 °C	Proveedor general de suministros del laboratorio	
Cubo de hielo y hielo	Proveedor general de suministros del laboratorio	
Termomezclador o Thermomixer, 55 °C	Eppendorf o equivalente	5382000023
Parafilm	Proveedor general de suministros del laboratorio	
Pinzas puntiagudas	Electron Microscopy Sciences o equivalente	78141-01
Puntas de pipeta de diámetro ancho, filtradas, aerosol, 200 µl	VWR o equivalente a Rainin	46620-642
Puntas extralargas con filtro de 1000 µl, estériles	VWR o equivalente	76322-154
Pipetas (10, 20, 200 y 1.000 µl) y puntas de pipeta con filtro, sin nucleasas	Proveedor general de suministros del laboratorio	
Bloque refrigerador de aluminio para 1,5 ml y 2,0 ml (opcional)	Sigma Aldrich o equivalente	Z743497
<b>Día 2: Cuantificación</b>		
Agitador vórtex	VWR o equivalente	10153-838
Baño ultrasónico	Proveedor general de suministros del laboratorio	
Tubo cónico de 15 ml	Fisher Scientific	05-539-12
Fluorímetro, Qubit	Thermo Fisher o equivalente	Q33216
Kit de ensayo Qubit dsDNA BR	Thermo Fisher o equivalente	Q32853
Tubos Qubit	Thermo Fisher	Q32856
Pipeta de desplazamiento positivo MR-10 (opcional)	Rainin o equivalente	17008575
Puntas de pipeta, 10 µl, C-10 para pipeta para despl. pos. (opcional)	Rainin o equivalente	17008604

# Introducción y notas importantes

## Introducción

Este Protocolo de aislamiento de ADN de sangre humana congelada Bionano Prep® SP-G2 puede proporcionar ADN genómico (ADNg) de ultra alto peso molecular (UHMW) en menos de cuatro horas a partir de 1,5 millones de glóbulos blancos de sangre humana congelada. Utiliza un procedimiento mejorado de lisado, unión, lavado y elución, habitual en las tecnologías de extracción de ADNg basadas en sílice, en combinación con un novedoso disco paramagnético. A diferencia de las perlas magnéticas y las columnas de sílice, que cortan el ADNg de gran tamaño, el Nanobind Disk se une y libera el ADNg con una fragmentación significativamente menor, lo que da como resultado un ADNg de UHMW. La alta capacidad de unión del ADNg es el resultado de una nueva sílice nanoestructurada en el exterior del disco paramagnético termoplástico. Este protocolo se evaluó utilizando sangre humana extraída en tubos EDTA, alícuotada y congelada a -80 °C en los cuatro días siguientes a la fecha de extracción y procesada sin ciclos adicionales de congelación/descongelación. Para obtener los mejores resultados, se recomienda conservar la sangre a 4 °C durante cinco días como máximo tras la extracción antes de congelarla. Alternativamente, pueden mantenerse las muestras de sangre a temperatura ambiente (22-25 °C) durante 66 horas como máximo, de ellas hasta seis horas a alta temperatura (30-40 °C) antes de la congelación. El almacenamiento de las muestras de sangre a temperatura ambiente durante más de 66 horas o la exposición prolongada (>6 horas) a alta temperatura puede reducir la longitud de las moléculas de ADNg y poner en riesgo los resultados del ensayo. El ADNg preparado mediante este protocolo se ha validado únicamente con marcaje directo y tinción (DLS). Consulte el [vídeo de formación](#) para conocer los pasos técnicos críticos y la resolución de problemas.

## Visión general

La lisis celular y la digestión con proteinasa K termolábil se producen en un tampón caotrópico, y el ADNg liberado se une al Nanobind Disk al añadir isopropanol. Después de tres pasos de lavado, el disco se transfiere a un tubo nuevo y el ADNg se eluye del disco. El ADNg de UHMW recuperado se somete a una fragmentación controlada para hacer el ADNg de UHMW más homogéneo. A continuación, el ADNg se mezcla y se atempera durante la noche a temperatura ambiente para facilitar la homogeneidad del ADN y finalmente se determina la concentración. El intervalo característico de tamaño del ADNg es de 50 Kbp a  $\geq 1$  Mbp.

## Notas importantes

### HOMOGENEIDAD DEL ADN

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

### CUANTIFICACIÓN DEL ADNg

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

Para medir la homogeneidad del ADNg, es esencial medir la concentración de ADNg en múltiples posiciones en la solución. Dado que el ADNg viscoso es difícil de pipetear, siga las directrices de la sección **Notas importantes** para efectuar un pipeteo preciso. Los análisis estándar para la cuantificación de la concentración de ADNg no proporcionarán mediciones precisas de ADNg largo debido a su naturaleza viscosa.



- Para una cuantificación precisa, se necesita sonicar el ADNg a cuantificar.
- La concentración normal de ADNg es de 45 a 90 ng/μl.

## PIPETEO DE ADNg VISCOSO

Para extraer el ADNg viscoso, sujete el tubo de la solución madre o stock para visualizarlo de cerca, presione el émbolo de la pipeta hasta el primer tope, sumerja la punta de la pipeta y suelte suave y lentamente el émbolo para comenzar a aspirar el ADNg viscoso con la punta mientras controla cuidadosamente la absorción. Mantenga la punta sumergida incluso después de que la solución viscosa deje de moverse hacia arriba y se nivele. Sea paciente. El ADNg viscoso puede tardar varios segundos en llenar un volumen de 2 μl. Si suelta el émbolo demasiado rápido se podría formar una burbuja en la punta, lo cual derivaría en una muestra insuficiente (comience de nuevo si esto ocurre). Una vez que la solución presente en la punta se haya nivelado y mientras la punta todavía se encuentre sumergida en la solución de ADNg, raspe la punta contra el fondo del tubo de tres a cinco veces realizando un movimiento circular. Extraiga la punta de la solución de ADNg e inspecciónela visualmente para confirmar que esté llena hasta 2 μl. Si se retira la punta de la pipeta de la solución de ADNg demasiado rápido, o se raspa ineficazmente la punta para romper las hebras de ADNg, también puede formarse una burbuja en la parte superior de la punta de la pipeta que indique un muestreo insuficiente (vuelva a empezar el proceso si eso ocurre).

## MANIPULACIÓN DEL ADNg

- La mezcla del ADNg recuperado (después de los pasos de homogeneización) se realiza siempre con una punta de pipeta de diámetro ancho para evitar la fragmentación.
- El ADNg recuperado nunca debe congelarse ni agitarse en vórtex.
- Durante un almacenamiento prolongado, el ADNg puede perder la homogeneidad.
- El pipeteo del ADNg recuperado para un muestreo preciso se realiza siempre con una punta de calibre estándar o una pipeta de desplazamiento positivo.

## CARACTERÍSTICAS DEL ADNg DE ALTA CALIDAD PARA EL MAPEO DE BIONANO

- Una solución transparente de ADNg es ideal, pero una solución poco transparente no siempre se correlaciona con una mala calidad de la muestra.
- El ADNg recuperado en la solución es viscoso.
- La presencia de ADNg de tamaño megabase se mide mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).
- El ADNg recuperado es homogéneo según lo medido con el ensayo de cuantificación de ADNg Qubit con un coeficiente de variación (CV)  $\leq 0,30$  (recomendado).

## USO DEL RECUPERADOR MAGNÉTICO BIONANO PREP SP

1. Sostenga una funda de plástico por los lados cerca de la parte superior e inserte el recuperador magnético Bionano Prep SP en la funda colocándolo de manera que quede asentado en la parte inferior de la funda.
2. Inserte el recuperador enfundado en un tubo Protein LoBind de 1,5 ml para atraer el Nanobind Disk al recuperador en la funda.
3. Levante con cuidado el recuperador enfundado con el disco fijado fuera del tubo e introduzca el recuperador enfundado en un tubo Protein LoBind de 0,5 ml hasta que el disco encaje suavemente en el fondo del tubo.
4. Sosteniendo la funda por el lado cercano a la parte superior, tire del recuperador hacia arriba con una mano hasta que el Nanobind Disk se disocie de la funda y quede en el tubo Protein LoBind de 0,5 ml.
5. Cambie la funda para cada muestra nueva.

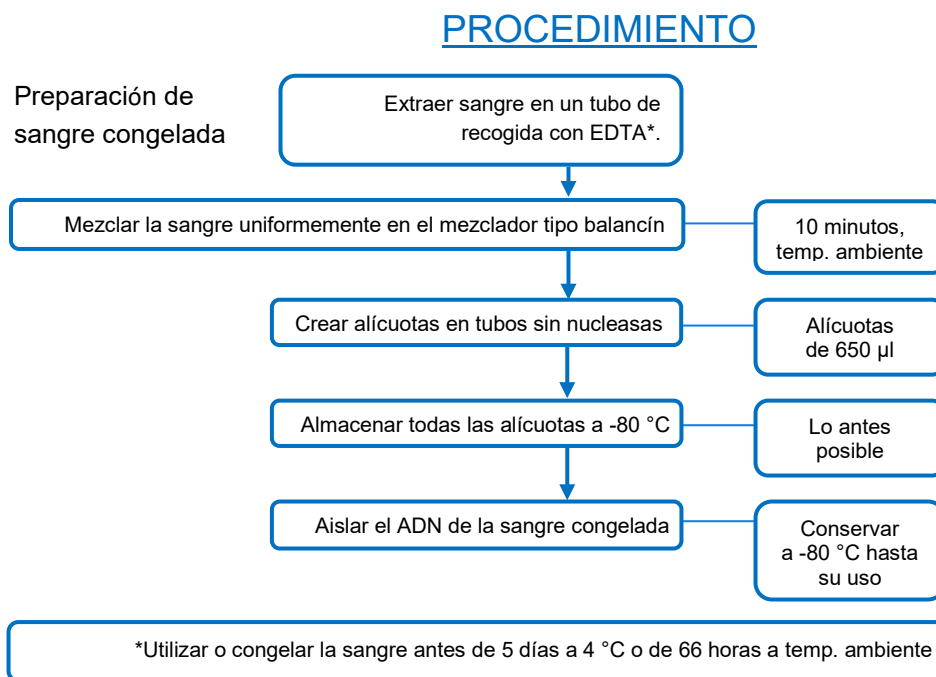
### TAMAÑO DE TANDA Y RECuento DE GLÓBULOS BLANCOS

Se recomienda procesar un máximo de seis muestras a la vez y hasta dos tandas por día laborable. Se requiere un mínimo de 2,5E+9 células/L.

### ELIMINACIÓN DE RESIDUOS PELIGROSOS

Los tampones Digestion Enhancer, LBB y WB1 contienen clorhidrato de guanidina (GuHCl). El GuHCl es dañino si se ingiere o inhala y causa irritación de la piel y los ojos. NO lo mezcle con lejía o reactivos ácidos. Los residuos líquidos que contienen GuHCl deben descontaminarse de manera segura con un desinfectante de amonio cuaternario antes de eliminarlos en el flujo de residuos peligrosos. Recomendamos utilizar lejía para la descontaminación del sobrenadante de los pellets y seguir la normativa local en materia de medio ambiente, salud y seguridad para la descontaminación y eliminación de todas las soluciones mezcladas con GuHCl.

### CONGELACIÓN DE LA SANGRE PARA SU ALMACENAMIENTO



El contenido de ADNg se obtiene a partir de los glóbulos blancos. Normalmente, 200-600 µl de sangre humana normal extraída del paciente en un tubo EDTA serán suficientes para este proceso. Las dos alícuotas de sangre (650 µl/alícuota) deben congelarse (-80 °C) en tubos separados y almacenarse sin descongelar hasta el aislamiento del ADNg. Para obtener los mejores resultados, se recomienda conservar la sangre a 4 °C durante cinco días como máximo tras la extracción antes de congelarla. Alternativamente, pueden mantenerse las muestras de sangre a temperatura ambiente (22-25 °C) durante 66 horas como máximo, de ellas hasta seis horas a alta temperatura (30-40 °C) antes de la congelación. El almacenamiento de las muestras de sangre a temperatura ambiente durante más de 66 horas o la exposición prolongada (> 6 horas) a alta temperatura puede reducir la longitud de las moléculas de ADNg y poner en riesgo los resultados del ensayo. Por lo general, solo se requerirá una alícuota para este protocolo, y la segunda servirá como reserva en caso de cualquier problema.

- Mezcle bien la sangre humana fresca a temperatura ambiente para garantizar una buena uniformidad (10 minutos en el mezclador tipo balancín a temperatura ambiente).
- Transfiera dos alícuotas de 650 µl a tubos de microcentrífuga de 1,5 ml sin nucleasas (material suministrado por el usuario).
- Tape los tubos y ponga inmediatamente las alícuotas a -80 °C para un almacenamiento a largo plazo.
- No descongele la alícuota de -80 °C hasta que proceda al aislamiento del ADNg.

# Protocolo de aislamiento de ADN en sangre humana congelada

## Bionano Prep SP-G2

### Preparación para el aislamiento de ADNg (30 minutos)

#### ANTES DEL PRIMER USO

1. Añada etanol al 100 % a los tampones de lavado (WB1 y WB2) y mezcle bien:
  - a. Añada 6,75 ml de etanol al 100 % al tampón de lavado 1 (WB1) para obtener un volumen final de 11,25 ml.
  - b. Añada 9,00 ml de etanol al 100 % al tampón de lavado 2 (WB2) para obtener un volumen final de 15,00 ml.

#### PREPARACIÓN

1. Reúna los materiales y verifique el equipo (consulte la sección anterior «Material suministrado por el usuario»):
  - a. Prepare el baño maría a 37 °C. Compruebe la temperatura con un termómetro.
  - b. Pipetas y puntas
  - c. Prepare tiras de Parafilm (~ 2 cm) para HemoCue, prepare las microcubetas y el [sistema HemoCue](#).
  - d. Cubo para hielo y hielo
  - e. Compruebe que la velocidad de centrifugado de la microcentrífuga sea de 2200 x g, dos minutos, temperatura ambiente.
  - f. Para la eliminación de residuos, prepare:
    - Un tubo cónico de 50 ml con 5 ml de lejía + 20 ml de agua; invierta varias veces para mezclar.
    - Un tubo cónico de 50 ml designado para los residuos líquidos de GuHCl (eliminados como residuos peligrosos según la normativa local en materia de medio ambiente, salud y seguridad)
  - g. Mezclador de muestras HulaMixer
  - h. Isopropanol 100 %
  - i. Gradilla de tubos magnética DynaMag-2
  - j. Recuperador magnético Bionano Prep SP (Bionano Prep SP Magnetic Retriever)
  - k. Configure un Thermomixer a 55 °C, 10 minutos, sin agitación.
  - l. Pinzas puntiagudas
  - m. Etiquete un tubo de 2,0 ml para un tamaño de tanda de tres o menos muestras o un tubo de 5,0 ml para un tamaño de tanda de cuatro a seis muestras para la Cocktail Master Mix de lisis y digestión.
2. Reúna los siguientes reactivos y materiales del kit SP-G2: tampón celular, estabilizador de ADN, potenciador de digestión, detergente DE, agua ultrapura, Nanobind Disk, tubos de microcentrífuga, funda, LBB, WB1, WB2 y EB.
  - a. Para cada muestra, prepare 1200 µl de tampón estabilizador (SB) mezclando 1176 µl de tampón celular con 24 µl de estabilizador de ADN. Multiplique por el número de reacciones si el número de muestras es superior a uno. Agite en vórtex para mezclar y coloque en hielo.
  - b. Para cada muestra, etiquete un tubo Protein LoBind Tube (Bionano) de 0,5 ml y un tubo Protein LoBind Tube (Bionano) de 1,5 ml. Coloque los tubos Protein LoBind de 1,5 ml en hielo.

- c. Por cada muestra, etiquete un tubo de 2,0 ml (Bionano) para el paso de homogeneización del ADNg. Colóquelo en una gradilla a temperatura ambiente.
3. Prepare la Cocktail Master Mix de lisis y digestión en un tubo de 2,0 ml para tandas de tres o menos muestras o en un tubo de 5,0 ml para tandas de cuatro a seis muestras. Prepare la Master Mix siguiendo el orden de adición de componentes indicado en la **Tabla 1**. Tape el tubo, invierta la mezcla 15 veces y coloque el tubo en una gradilla a temperatura ambiente.

**Nota:** No utilice vórtex. No añada todavía la TLPK a la Cocktail Master Mix.

**Tabla 1. Hoja de trabajo para preparar la Cocktail Master Mix de lisis y digestión**

Componente de la Master Mix	Volumen de componentes de la Master Mix (µl)	N.º de muestras	Excedente de la Master Mix	Volumen total de los componentes de la Master Mix = Volumen de componentes de la Master Mix x Número de muestras x Exceso de Master Mix	Orden de adición
<b>Potenciador de digestión</b>	270		1,2		1
<b>Agua sin nucleasas</b>	66,25		1,2		2
<b>LBB*</b>	80		1,2		3
<b>Detergente DE*</b>	3,75		1,2		4
<b>TLPK**</b>	10		1,2		5
<b>Total</b>	<b>430</b>				

\*Pipetee LBB y el Detergente DE lentamente debido a su alta viscosidad y al riesgo de que se formen burbujas.

\*\*Añádalo justo antes de su uso en el Paso 11, en Aislamiento de ADNg.

### Aislamiento de ADNg (2 horas 35 minutos)

**DESCONGELE, CUENTE, HAGA ALÍCUOTAS DE LA SANGRE, DILUYA LA SANGRE CON TAMPÓN ESTABILIZADOR FRÍO, PELETEE LOS GLÓBULOS BLANCOS Y ELIMINE EL SOBRENADANTE**

- Por cada muestra, tome una alícuota de 650 µl de sangre congelada del congelador a -80 °C y colóquela en hielo. Descongele hasta seis alícuotas en un baño maría a 37 °C durante dos minutos con una gradilla para tubos flotante. Transcurridos dos minutos, retire la(s) alícuota(s) del baño maría y colóquelas en hielo.
- Procesando una muestra de sangre cada vez, para un tamaño de tanda no superior a seis muestras:
  - Tome una alícuota de sangre del hielo e inviértala 10 veces para mezclar. Luego, dé un golpe de centrifuga de un segundo para recoger cualquier material restante en la tapa del tubo. Dispense inmediatamente 20 µl sobre un trozo de Parafilm y utilice la cubeta HemoCue para medir los GB. Coloque la muestra en hielo.
  - Registre el ID de la muestra y la lectura HemoCue (en E+03 células/µl) en la **Tabla 2**.  
**Nota:** Si la concentración de GB de la muestra de sangre es demasiado alta (> 30E+09 células/L) y queda fuera del rango de detección, la pantalla del instrumento HemoCue mostrará «HHH». Normalmente, las muestras de sangre que arrojan una concentración HemoCue de «HHH» pueden diluirse en tampón celular y luego recontarse para determinar con precisión la concentración de GB (véase más abajo).

- i. Invierta la muestra de sangre 10 veces para mezclarla. Dé un golpe de centrifuga de un segundo para recoger el material de la tapa del tubo. Colóquelos en hielo.
- ii. Transfiera de inmediato 25 µl de las muestras de sangre a un tubo de 1,5 ml que contenga 75 µl de tampón celular (para hacer una dilución 1:4 de la muestra de sangre).
- iii. Mezcle suavemente con una pipeta todo el volumen 10 veces usando una punta de calibre estándar de 200 µl. Dé un golpe de centrifuga de dos segundos.
- iv. Dispense inmediatamente 20 µl sobre Parafilm y utilice la cubeta HemoCue para medir los GB.
- v. Efectúe los siguientes cálculos y registre los valores en la **Tabla 2**.
  - Lectura de HemoCue = Recuento de GB (tras dilución con tampón celular) x DF (=4)
- c. Para cada muestra, realice los siguientes cálculos y registre los valores en la **Tabla 2**.
  - Volumen de transferencia (µl) =  $1,5E+06 \text{ células} \div \text{Lectura HemoCue en E+03 células/}\mu\text{l}$
  - Volumen de dilución del tampón estabilizador frío (µl) =  $1200 \mu\text{l} - \text{Volumen de transferencia } (\mu\text{l})$
  - Volumen de extracción (µl) = 1160 µl

**Nota:** El HemoCue da lecturas en E+09 células/L, pero el cálculo se basa en E+03 células/µl para crear alícuotas de 1,5E+06 GB en un tubo Protein LoBind de 1,5 ml previamente enfriado.

**Ejemplo de cálculos de muestra, es decir, lectura HemoCue: 5,0E+09 células/L = 5,0E+03 células/µl**

- Volumen de transferencia (µl) =  $1,5E+06 \text{ células} \div 5,0E+03 \text{ células/}\mu\text{l} = 300 \mu\text{l}$
- Volumen de dilución del tampón estabilizador frío (µl) =  $1200 \mu\text{l} - 300 \mu\text{l} = 900 \mu\text{l}$
- Volumen de extracción (µl) = 1160 µl

**Tabla 2. Hoja de trabajo para muestras de sangre congelada**

ID de la muestra	Lectura HemoCue* (E+03 células/µl)	Volumen de transferencia (1,5 E+06 células ÷ Lectura HemoCue)	Volumen de dilución de tampón estabilizador frío (1200 µl - Volumen de transferencia)	Volumen de extracción
		µl	µl	1160 µl
		µl	µl	1160 µl
		µl	µl	1160 µl
		µl	µl	1160 µl
		µl	µl	1160 µl
		µl	µl	1160 µl

\*Multiplique por DF (=4) si utiliza tampón celular para diluir la muestra de sangre debido a un recuento elevado de GB (HemoCue muestra HHH, aislamiento de ADNg, paso 2.b.).

3. Procese una muestra cada vez:
  - a. Invierta 10 veces para mezclar y dé un golpe de centrifuga.
  - b. Transfiera el [Volumen de transferencia] calculado al tubo Protein LoBind de 1,5 ml previamente etiquetado y enfriado. Tape el tubo y colóquelo en hielo. Cambie las puntas entre una muestra y otra.
 

**Nota:** El volumen de transferencia normal para una persona sana normal oscilará entre 200 y 600 µl.
4. Añada a cada muestra el [Volumen de dilución del tampón estabilizador frío], calculado en la **Tabla 2**. Tape el tubo y colóquelo en hielo.

**Nota:** Añadir tampón estabilizador frío diluye la sangre para ayudar a visualizar los GB después del paso de centrifugación y eliminar contaminantes y restos celulares.

5. Invierta la muestra 10 veces para mezclarla y, a continuación, póngala en hielo. Centrifugue la muestra equilibrada durante dos minutos a 2200 x g a temperatura ambiente.  
**Nota:** Es útil alinear la bisagra del tubo con el borde exterior de la centrífuga, para que el sedimento se localice siempre en el mismo lado.
6. Durante la centrifugación para peletear los glóbulos blancos, tome la TLPK almacenada a -20 °C y colóquela en hielo. Deseche cualquier resto de sangre no utilizada en el contenedor de residuos con lejía y coloque el tubo de alícuota vacío en la bolsa de residuos biológicos peligrosos.
7. Retire la muestra de la centrífuga después de la centrifugación. Inspeccione el fondo del tubo para visualizar el pellet de GB y anote su ubicación. Coloque la muestra en hielo.
8. Tras la centrifugación, extraiga 1160 µl de sobrenadante de cada tubo de muestra en dos pasadas:
  - a. Con una punta extralarga con filtro de 1000 µl, extraiga y deseche 1000 µl de sobrenadante en el tubo cónico con lejía. Cambie las puntas entre una muestra y otra.
  - b. Con una P200, extraiga 160 µl de sobrenadante y deséchelo en el cono de lejía. Aspire desde el menisco sin alterar el pellet. Tape el tubo y colóquelo en hielo. Tras la eliminación del sobrenadante, debe haber aproximadamente 40 µl de sobrenadante con el pellet de GB. Cambie las puntas entre una muestra y otra.

#### RESUSP RESUSPENDA, LISE/DIGIERA LOS GLÓBULOS BLANCOS E INACTIVE LA PROTEINASA K TERMOLÁBIL

9. Para cada muestra, añada 20 µl de tampón estabilizador frío sobre los ~40 µl que contienen el sobrenadante y el pellet de GB.
10. Procesando las muestras una a una, utilice una punta de pipeta de calibre estándar de 200 µl para rascar suavemente el pellet siguiendo un patrón circular de 3 a 5 veces para liberarlo a la solución. A continuación, con la misma punta, mezcle pipeteando lentamente la muestra cinco veces para resuspender el pellet. Coloque la muestra en hielo. Cambie las puntas entre una muestra y otra.  
**Nota:** Aspire todo el volumen de la muestra en la punta e inspeccione visualmente el tubo mientras lo mezcla para comprobar que el pellet se resuspende por completo, de forma que al terminar de mezclar no quede ningún pellet visible en el lateral del tubo. Evite generar burbujas.
11. Dé un golpecito al tubo de TLPK tres veces con los dedos y dé un golpe de centrifuga de dos segundos. Añada el volumen de TLPK calculado para el tamaño de la tanda en la **Tabla 1** a la Cocktail Master Mix de lisis y digestión para obtener la Cocktail Master Mix de lisis y digestión completa. Tape e invierta la Master Mix 15 veces para mezclarla y colóquela de nuevo en la gradilla a temperatura ambiente. Coloque la TLPK en hielo.  
**Nota:** No utilice vórtex. A partir de este paso, las muestras se manipularán a temperatura ambiente.
12. Añada 430 µl de Cocktail Master Mix de lisis y digestión completa a cada muestra. Tape el tubo. Cambie las puntas entre una muestra y otra.
13. Invierta de cada muestra 15 veces para mezclar.
14. Coloque la muestra en el HulaMixer durante 15 minutos a temperatura ambiente a 10 rpm, sin agitación ni vibración.

15. Durante la rotación, guarde de nuevo la TLPK a -20 °C. Deseche cualquier resto de Cocktail Master Mix de lisis y digestión (con TLPK) no utilizado en el tubo cónico de 50 ml para residuos líquidos de GuHCl. Llene el tubo cónico con lejía hasta 50 ml con agua, tape el tubo, invierta para mezclar y deseche el contenido por el desagüe.
16. Retire la muestra del HulaMixer y dé un golpe de centrifuga de dos segundos.
17. Incube la muestra en un Thermomixer preconfigurado a 55 °C durante 10 minutos, sin agitación.
18. Retire la muestra del Thermomixer y apáguelo.

#### **ADHESIÓN, LAVADO Y ELUCIÓN DEL ADN<sub>g</sub>**

19. Con unas pinzas puntiagudas, añada con cuidado un único Nanobind Disk de 4 mm al lisado.  
**Nota:** A veces, los discos pueden adherirse entre sí.
20. Añada 480 µl de IPA al 100% a cada muestra. Tape el tubo.
21. Invierta cada muestra cinco veces para mezclarla.
22. Colocar la muestra en el HulaMixer durante 15 minutos a temperatura ambiente a 10 rpm, sin agitación ni vibración.  
**Nota:** Asegúrese de que el Nanobind Disk no permanezca en la tapa del tubo durante las rotaciones iniciales. De lo contrario, apague el rotador e invierta el tubo hasta que el Nanobind Disk regrese a la solución. Vuelva a colocar el tubo en el HulaMixer y reanude la mezcla.
23. Retire la muestra del HulaMixer.
24. Combine la gradilla transparente con la base magnética como se describe a continuación y compruebe que el disco Nanobind esté fijado por el imán cerca de la parte superior del nivel de líquido. De lo contrario, vuelva a montarlo (ver [vídeo de formación](#), 0:50).



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



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



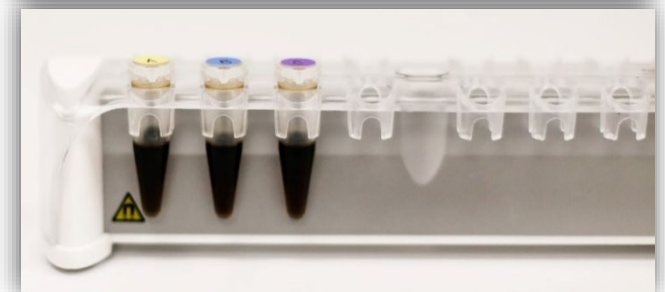
- c. Incline lentamente el aparato combinado 90° en sentido horario mientras lo mantiene apoyado sobre la superficie. Los tubos estarán ahora horizontales y serán visibles para el usuario.



- d. Incline lentamente el aparato combinado 90° en sentido horario mientras lo mantiene apoyado en la superficie, de modo que quede totalmente vertical y los tubos se orienten hacia el usuario.



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



25. Prepare una pipeta P1000 en 1000 µl y una segunda en 700 µl.
26. Elimine el sobrenadante como se indica a continuación, con cuidado de no aspirar el ADNg y cambiando las puntas entre una muestra y otra (ver [vídeo de formación](#), 1:15):
- Incline toda la gradilla en un ángulo de 45° sujetándola con una mano (agarre todo el aparato desde abajo con los tubos visibles y las tapas hacia la otra mano del usuario).
  - Espere dos segundos a que el ADNg se deposite en el Nanobind Disk.
  - Imine suavemente todo el líquido con una punta extralarga de 1000 µl colocada en ángulo alejado del Nanobind Disk o del ADNg para evitar perturbarlo.
  - Dispense el sobrenadante en el tubo cónico de 50 ml para residuos líquidos de GuHCl.



Inspeccione visualmente la punta que contiene el tampón antes de desecharla para comprobar que no se ha eliminado el ADNg. Si el ADNg se aspira accidentalmente o se desprende del disco, consulte la Guía de resolución de problemas (P/N 30608).

27. Realice el lavado con WB1:
- Dispense 700 µl de tampón WB1 en el tubo y tápelo.
  - Separe la gradilla transparente de la gradilla Dynamag y transfiera las muestras al HulaMixer.
  - Haga girar las muestras en el HulaMixer durante un minuto a temperatura ambiente a 10 rpm, sin agitación ni vibración.
- Nota:** El Nanobind Disk puede quedar atascado en el lateral, la tapa o el fondo del tubo. Si el Nanobind Disk se atasca en algún punto del tubo, no detenga la rotación del HulaMixer ni intervenga, ya que es algo normal.
- Retire las muestras del HulaMixer.
  - Coloque las muestras en la gradilla transparente Dynamag. Invierta y agite suavemente la gradilla transparente Dynamag hasta que el Nanobind Disk de cada muestra no esté adherido a ninguna parte del tubo.
  - Combine la gradilla de tubos transparente que contiene las muestras con la base magnética, como se describe en los pasos 24a a 24e.
  - Extraiga el sobrenadante como se describe en el Paso 26.



Inspeccione visualmente la punta que contiene el tampón antes de desecharla para comprobar que no se ha eliminado el ADNg. Si el ADNg se aspira accidentalmente o se desprende del disco, consulte la Guía de resolución de problemas (P/N 30608).

28. Prepare la segunda pipeta en 500 µl (anteriormente en 700 µl).
29. Realice el lavado con WB2:
- Dispense 500 µl de tampón WB2 en el tubo y tápelo.
  - Separe la gradilla transparente de la gradilla Dynamag y transfiera las muestras al HulaMixer.
  - Haga girar las muestras en el HulaMixer durante un minuto a temperatura ambiente a 10 rpm, sin agitación ni vibración.

**Nota:** El Nanobind Disk puede quedar atascado en el lateral, la tapa o el fondo del tubo. Si el Nanobind Disk se atasca en algún punto del tubo, no detenga la rotación del HulaMixer ni intervenga ya que es algo normal.

- d. Retire las muestras del HulaMixer.
- e. Coloque el tubo en la gradilla transparente Dynamag. Invierta y agite suavemente la gradilla transparente Dynamag hasta que el Nanobind Disk de cada muestra no esté adherido a ninguna parte del tubo.
- f. Combine la gradilla de tubos transparente que contiene las muestras con la base magnética, como se describe en los pasos 24a a 24e.
- g. Extraiga el sobrenadante como se describe en el Paso 26.



Inspeccione visualmente la punta que contiene el tampón antes de desecharla para comprobar que no se ha eliminado el ADNg. Si el ADNg se aspira accidentalmente o se desprende del disco, consulte la Guía de solución de problemas (P/N 30608).

30. Repita el lavado WB2, paso 29.
31. Después de eliminar el segundo sobrenadante WB2, transfiera las muestras con las tapas abiertas a la gradilla que contiene los tubos Protein LoBind de 0,5 ml previamente etiquetados.
32. Introduzca por completo el recuperador magnético Bionano Prep SP en una funda de plástico de recuperador magnético limpia hasta que el recuperador entre en contacto total con el fondo de la funda. Cambie las fundas entre una muestra y otra.
33. Introduzca el recuperador magnético Bionano Prep SP enfundado en el tubo Protein LoBind de 1,5 ml y coloque el recuperador enfundado contra el Nanobind Disk hasta que recoja el disco. Sostenga el recuperador magnético Bionano Prep SP enfundado de forma que permanezca en contacto total con la parte inferior de la funda y el Nanobind Disk quede retenido magnéticamente.
34. Levante con cuidado el recuperador enfundado con el disco fijado fuera del tubo e introdúzcalo en un tubo Protein LoBind de 0,5 ml hasta que el disco encaje suavemente en el fondo del tubo.

**Nota:** Cambie las fundas entre una muestra y otra.

#### ELUCIÓN DEL ADNg

35. Añada 65 µl de EB al tubo Protein LoBind de 0,5 ml que contiene el Nanobind Disk y tape el tubo.
36. Centrifugue el tubo en la microcentrifugadora durante cinco segundos.
37. Con una punta estándar de 10 µl, empuje suavemente el Nanobind Disk hacia el fondo del tubo y compruebe que esté totalmente sumergido en líquido. El disco debe permanecer paralelo a la superficie de la pipeta (ver vídeo de formación).
38. Incube el Nanobind Disk sumergido en EB a temperatura ambiente durante 20 minutos.
39. Para recoger el ADNg extraído, transfiera el eluido al tubo de 2,0 ml etiquetado con una punta estándar de 200 µl.
40. Centrifugue el tubo con el Nanobind Disk en la microcentrifuga durante cinco segundos para separar el eluido residual del Nanobind Disk.
41. Transfiera el eluido restante que contiene ADNg viscoso al mismo tubo de 2,0 ml etiquetado con una punta estándar de 200 µl.

**Nota:** Casi todo el ADNg viscoso se desprende del Nanobind Disk durante este centrifugado. Dé uno o dos golpes de centrifuga más si el ADNg viscoso se atasca entre el disco y el fondo del tubo Protein LoBind de 0,5 ml.

42. Dé un golpe de centrifuga de dos segundos a las muestras.

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

### HOMOGENEIZACIÓN DEL ADNg

43. Pipetee lentamente todo el volumen de ADNg con una punta estándar de 200 µl, luego dispense lentamente el ADNg. Evite la formación de burbujas.

Repita este proceso tres veces para efectuar un total de cuatro ciclos (1 ciclo = 1 aspiración y 1 dispensación).

**Nota:** Si la absorción de ADNg se estanca debido a alta viscosidad, para extraer el ADNg puede ser necesario remover suavemente mientras se suelta el émbolo poco a poco.

44. Coloque el tubo estándar de 2,0 ml que contiene el ADNg en la gradilla del mezclador de muestras del HulaMixer y hágalo girar a temperatura ambiente durante una hora a 15 rpm.

**Nota:** Durante las rotaciones iniciales, asegúrese de que se extraiga el ADNg del fondo del tubo para que quede en la tapa del tubo al girar. Si la solución de ADN permanece en el fondo del tubo durante las primeras rotaciones, apague el HulaMixer y coloque la gradilla de modo que el tubo quede orientado boca abajo. Dé un golpecito suavemente con los dedos al fondo del tubo hasta que el ADNg llegue a la tapa y reanude la mezcla.

45. Retire el tubo del HulaMixer y centrifúguelo en la microcentrifuga durante dos segundos para arrastrar el ADNg hasta el fondo del tubo.

46. Deje que el ADNg se atempere durante la noche a temperatura ambiente para homogeneizarlo.

**Nota:** La mayoría de las muestras pueden marcarse al día siguiente o en las 48 horas posteriores al aislamiento del ADNg utilizando el Protocolo DLS-G2 (PN 30553).

## Cuantificación del ADNg (45 minutos)

### CUANTIFICACIÓN QUBIT - ENSAYO dsDNA BR

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

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

**Nota:** Si el ADNg se ha almacenado a 4 °C, atempere a temperatura ambiente y dé un golpe de centrifuga antes de pasar al siguiente paso.

2. Agregue tampón Qubit BR a los tubos de ensayo Qubit de 0,5 ml:

- a. Por cada muestra, agregue 18 µl de tampón Qubit BR a tres tubos de ensayo Qubit separados.
- b. En cuanto a los patrones Qubit, agregue 10 µl de tampón Qubit BR a dos tubos de ensayo Qubit separados.
3. Con una pipeta de 200 µl con punta de diámetro ancho, mezcle suavemente todo el volumen de muestra de ADNg pipeteando arriba y abajo cinco veces, prestando atención a no generar burbujas.
4. Usando una nueva punta estándar o una punta de una pipeta de desplazamiento positivo para cada extracción:  

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

**Nota:** Si no se dispone de un baño ultrasónico, agite en el vórtex durante al menos 30 segundos a la velocidad máxima y, a continuación, reduzca la velocidad de centrifugado brevemente durante dos segundos.
5. Prepare la solución de trabajo diluyendo el colorante en el tampón de dilución BR (1:200):
  - a. 200 µl de solución de trabajo para cada uno de los dos patrones (400 µl en total).
  - b. 200 µl de solución de trabajo por cada alícuota de muestra (600 µl por cada muestra).
6. En cuanto a los patrones de ADN Qubit, agregue 10 µl de los patrones 1 y 2 a los tubos Qubit que contienen el tampón BR del Paso 2b.
7. Una vez que se complete la sonicación, tome los tubos Qubit y dé un golpe de centrifuga breve. Agite los tubos en el vórtex durante cinco segundos a velocidad máxima, a continuación, dé un nuevo golpe de centrifuga.
8. Agregue 180 µl de la solución de trabajo a cada alícuota de ADN sonicada y cada alícuota del patrón de ADN Qubit. Agite en el vórtex durante cinco segundos y dé un golpe de centrifuga a los tubos.
9. Incube las muestras durante al menos dos minutos, a continuación, léelas en el fluorímetro Qubit. Registre los valores en la **Tabla 3**.
10. Calcule el CV = desviación típica/media de cada muestra y anótelos en la **Tabla 3**.  

**Nota:** Si el CV >0,30, mezcle suavemente pipeteando todo el volumen de ADNg cinco veces (1 vez = 1 aspiración + 1 dispensación) **utilizando una punta de diámetro ancho**. Deje reposar el ADNg durante toda la noche a temperatura ambiente para luego repetir la cuantificación y efectuar el marcado DLS al día siguiente. Las concentraciones normales de ADN oscilan entre 45 y 90 ng/µl.

**Tabla 3. Hoja de trabajo para cuantificación del ADNg (BR dsDNA)**

ID de la muestra	Izquierda (ng/μl)	Centro (ng/μl)	Derecha (ng/μl)	CV (desviación típica/media)

**MARCAJE**

Las muestras de ADNg están listas para el marcaje directo y la tinción (DLS) en las 48 horas siguientes al aislamiento. Consulte las secciones «Kits de preparación de muestras» e «Instrumentos y consumibles» en <https://bionano.com/support/> para conocer los kits y protocolos aplicables.

## Asistencia técnica

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

Para consultar documentación sobre los productos de 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 o teléfono.

TIPO	CONTACTO
Correo electrónico	<a href="mailto:support@bionano.com">support@bionano.com</a>
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	<a href="http://www.bionano.com/support">www.bionano.com/support</a>
Dirección	Bionano Genomics, Inc. 9540 Towne Centre Drive, Suite 100 San Diego, CA 92121