



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

NUMERO DOCUMENTO:

CG-00004-4

REVISIONE DOCUMENTO:

C

Decorrenza: 07/30/2024

Sommario

Cronologia delle revisioni.....	3
Panoramica del flusso di lavoro.....	4
Kit di isolamento del DNA da sangue e colture cellulari Bionano Prep SP-G2 e materiali forniti dall'utilizzatore.....	5
Contenuto del kit di isolamento del DNA da sangue e colture cellulari Bionano Prep SP-G2 (codice 80060, 12 preparazioni)	5
Materiali e apparecchiature forniti dall'utilizzatore	6
Introduzione e note importanti	8
Introduzione.....	8
Panoramica	8
Note importanti	8
Preparazione di pellet cellulari congelati per la conservazione	11
Protocollo di isolamento del DNA del pellet cellulare congelato Bionano Prep SP-G2 ..	14
Preparazione per l'isolamento del gDNA (30 minuti)	14
Isolamento del gDNA (2 ore)	16
Omogeneizzazione della soluzione di gDNA (70 minuti)	21
Quantificazione del gDNA (45 minuti).....	22
Assistenza tecnica.....	24
Avviso legale.....	25
Brevetti	25
Marchi commerciali.....	25

Cronologia delle revisioni

REVISIONE	NOTE
A	Distribuzione commerciale.
B	Modifiche generali alla formattazione per la distribuzione.
C	Aggiornamenti di formattazione.

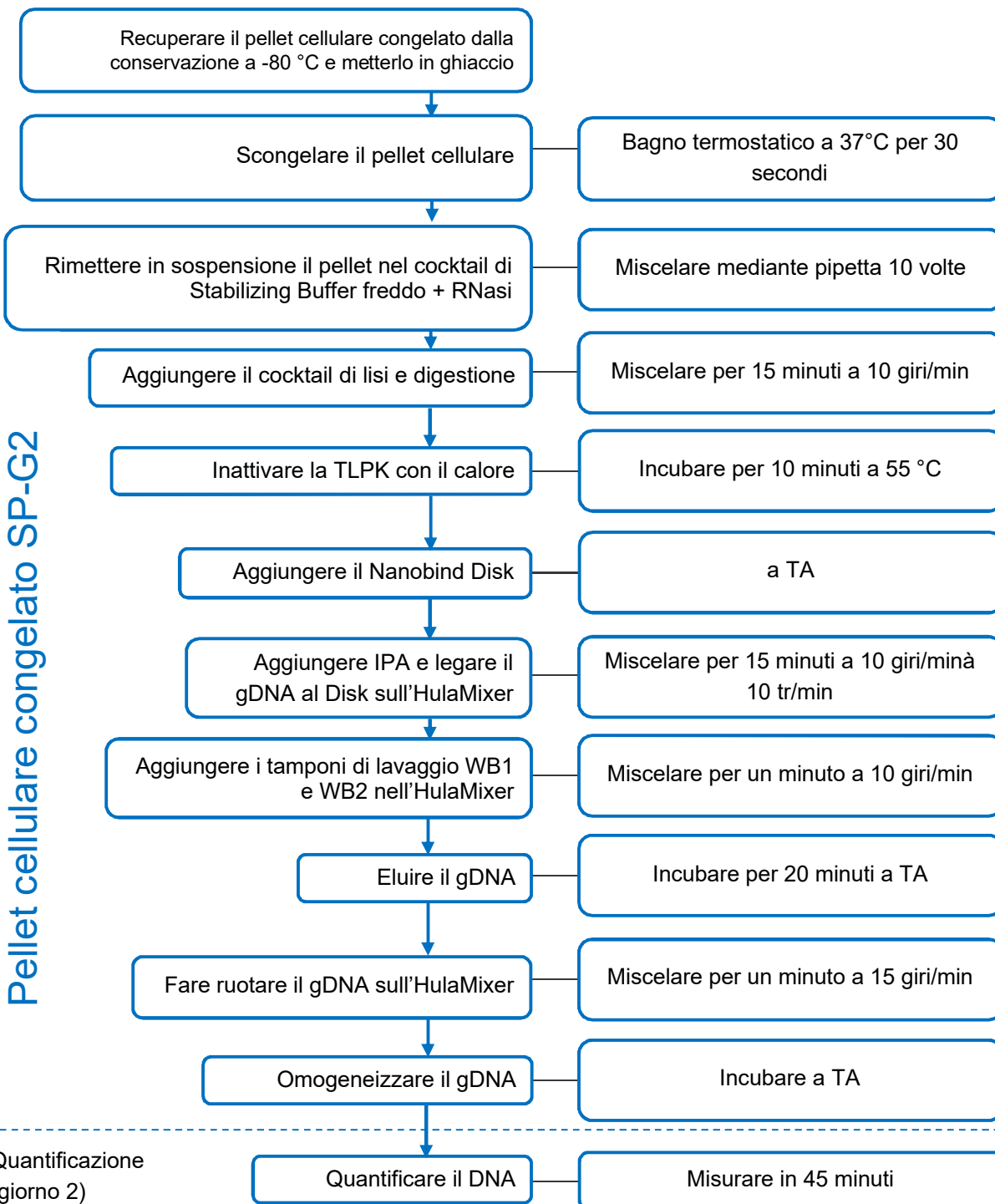
Panoramica del flusso di lavoro

Isolamento del gDNA
(giorno 1)

PROCEDURA

TEMPO/TEMP.

Pellet cellulare congelato SP-G2



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 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
Giorno 1 – Pellettatura, isolamento del gDNA e omogeneizzazione		
Bionano Prep SP recuperatore magnetico (confezione da 2)	Bionano Genomics (Kit di formazione)	80031
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 del sangue	Fornitore di attrezzature da laboratorio	
Provette coniche per centrifuga, 50 ml, PP	Thermo Fisher o equivalente	14-432-22
Provetta conica da 15 ml	Fisher Scientific	05-539-12
Centrifuga 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	
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 equivalenti	78141-01
Puntali per pipette a foro largo, filtrati, 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
Box di crioconservazione (per provette per microcentrifuga da 1,5 ml)	Fornitore di attrezzature da laboratorio	
Giorno 2 - Quantificazione		
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

Articolo	Fornitore	N. catalogo
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 a spost. pos. (opzionale)	Rainin o equivalente	17008604

Introduzione e note importanti

Introduzione

Questo Protocollo di isolamento del DNA del pellet cellulare congelato Bionano Prep® SP-G2 può fornire DNA genomico (gDNA) ad altissimo peso molecolare (UHMW) in circa 3 ore e mezza da 1,5 milioni di cellule congelate. 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 mostrati.

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 ≥ 1 Mbp.

Note importanti

OMOGENEITÀ DEL DNA

Il gDNA recuperato viene sottoposto a miscelazione mediante pipetta con un puntale standard da 200 μ 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. Il metodo di quantificazione Qubit è preferito rispetto ad altri metodi di quantificazione poiché può essere utilizzato 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 richiedere 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. Rimuovere il puntale dalla soluzione di gDNA troppo presto o raschiare in modo inefficace il puntale per rompere i filamenti di gDNA può produrre una bolla all'estremità del puntale della pipetta che indica il sottocampionamento (ricominciare se ciò accade).

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.

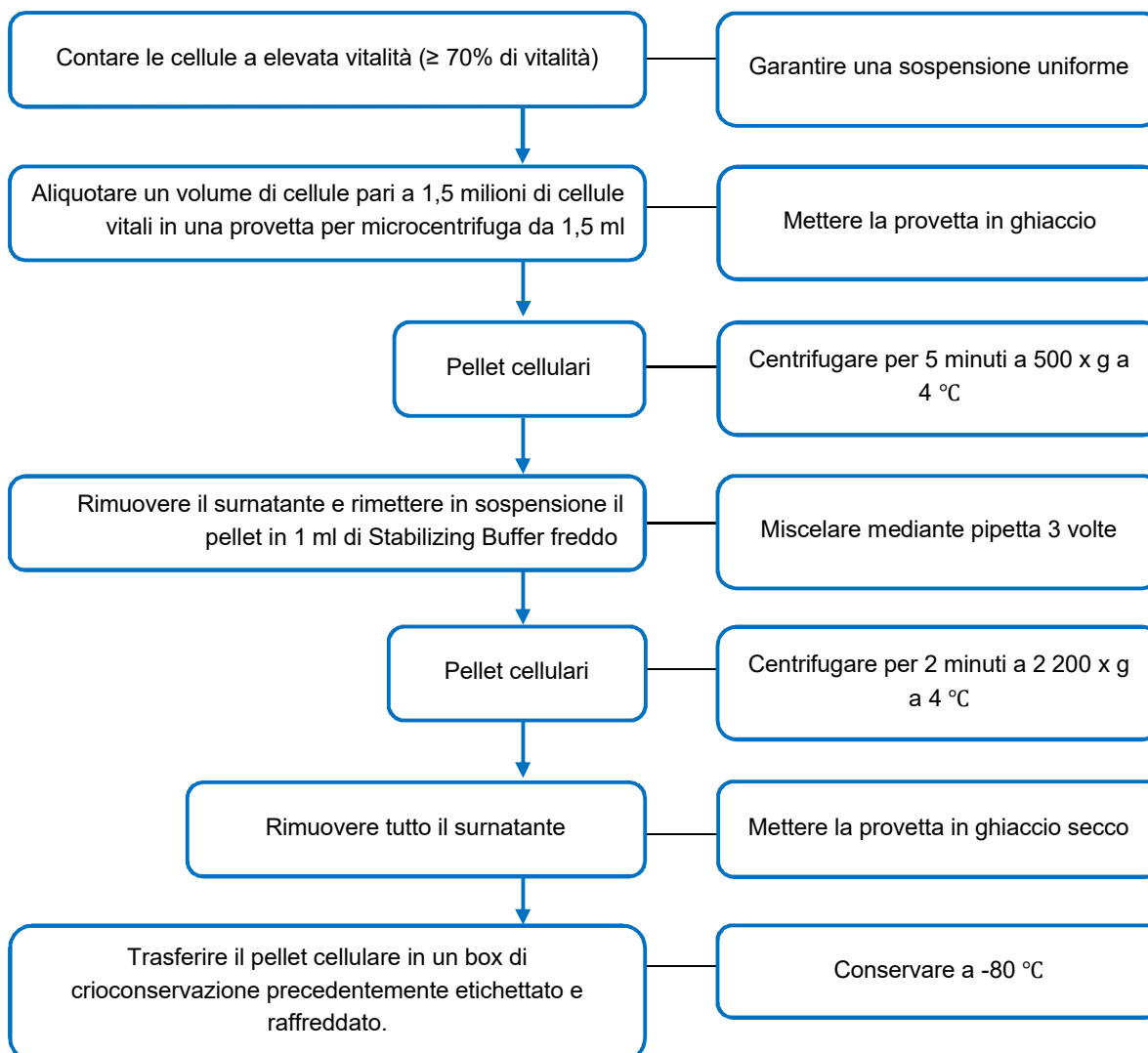
SMALTIMENTO DEI RIFIUTI PERICOLOSI

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.

Preparazione di pellet cellulari congelati per la conservazione

Input consigliato: 1,5E+06 di cellule di mammifero vitali con vitalità ≥ 70%.

PROCEDURA DI PRODUZIONE DEI PELLET CELLULARI CONGELATI



ALLESTIMENTO

1. Preparare i materiali e verificare le apparecchiature necessarie.
 - 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 per 5 minuti, 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. Preparare pipette e puntali
 - g. Aggiungere ghiaccio in un secchiello per il ghiaccio.
 - h. Aggiungere ghiaccio secco in un secondo secchiello del ghiaccio.
 - i. Per lo smaltimento dei rifiuti, preparare 2 provette coniche da 50 ml ciascuna con 5 ml di candeggina e 20 ml di acqua. Capovolgere più volte per miscelare.
 - j. Etichettare il numero desiderato di provette per microcentrifuga Protein LoBind da 1,5 ml per i pellet cellulari.
 - k. 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, moltiplicare per il numero di preparazioni. Vortexare per miscelare. Mettere in ghiaccio.
 - l. Etichettare un box di crioconservazione per la conservazione dei pellet cellulari e preraffreddarlo a -80 °C.

PROCEDURA DI PREPARAZIONE DEI PELLET CELLULARI CONGELATI

1. Contare le cellule nello stock di coltura cellulare
 - a. Risospendere 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 logaritmica 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 dodici pellet 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 pellet le cellule.
 - c. Rimuovere il surnatante 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 x g a 4 °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 µl.
 - c. Centrifugare le cellule a 2 200 x g a 4 °C per 2 minuti in una microcentrifuga con rotore ad angolo fisso.
 - d. Dopo la centrifugazione, porre i campioni in ghiaccio.
 - e. 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.
 - f. Conservare i campioni sul ghiaccio fino alla rimozione di tutti i surnatanti.
6. Congelare i pellet cellulari in ghiaccio
 - a. Mettere i pellet cellulari in ghiaccio secco e incubare per 5 minuti per ottenere un congelamento rapido.
 - b. Trasferire i pellet cellulari congelati rapidamente in un box di crioconservazione precedentemente etichettato e raffreddato (-80 °C).

NOTA: i pellet cellulari congelati possono essere utilizzati per l'isolamento del gDNA il giorno successivo.

Protocollo di isolamento del DNA del pellet cellulare congelato 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. Pipette e puntali
 - c. Secchiello per il ghiaccio e ghiaccio
 - d. Per lo smaltimento dei rifiuti, predisporre:
 - 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).
 - e. Miscelatore di campioni HulaMixer
 - f. Portaprovette magnetico DynaMag-2
 - g. IPA al 100%
 - h. Bionano Prep SP recuperatore magnetico
 - i. Impostare un Thermomixer a 55 °C, 10 minuti, senza agitare.
 - j. Pinzette a punta
 - k. 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 50 µl di Stabilizing Buffer miscelando 49 µl di Cell Buffer con 1 µl di Stabilizzatore di DNA. Se la dimensione del lotto è maggiore di 1 campione, moltiplicare per il numero di preparazioni. Vortexare per miscelare. Centrifugare per 2 secondi 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 un campione, moltiplicare per il numero di preparazioni. Vortexare brevemente per miscelare. Centrifugare brevemente e mettere in ghiaccio.
 - d. Recuperare la TLPK dalla conservazione a -20 °C e metterla in ghiaccio.
 - e. Per ogni campione, marcare una provetta Protein LoBind da 0,5 ml.
 - f. Per ogni campione, marcare e conservare sul ghiaccio una provetta Protein LoBind da 1,5 ml (se il campione di pellet cellulare congelato non è stato precedentemente preparato e conservato a -80 °C in una provetta Protein LoBind da 1,5 ml).
 - g. Per ogni campione, marcare una provetta per microcentrifuga da 2,0 ml 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 da 2,0 ml per un lotto di 3 o meno campioni, oppure in una provetta 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 = 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
Totale	430				

*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 nel passaggio 4 dell'isolamento del gDNA.

Isolamento del gDNA (2 ore)

SCONGELARE I PELLET CELLULARI CONGELATI, AGGIUNGERE SB/RNASI E RIMETTERE IN SOSPENSIONE LE CELLULE

Input consigliato: 1,5E+06 cellule vitali

1. Per ogni campione, rimuovere un pellet cellulare congelato dal congelatore a -80 °C e metterlo in ghiaccio. Scongelare fino a 6 pellet cellulari contenenti 1,5E+06 cellule ciascuno in un bagno termostatico a 37 °C per 30 secondi utilizzando un portaprovette galleggiante. Dopo 30 secondi, togliere il pellet cellulare o i pellet cellulari dal bagno d'acqua e metterli in ghiaccio.
2. Aggiungere 40 µl di Stabilizing Buffer/RNasi freddo sulla parte superiore di ogni pellet. Mettere in ghiaccio.
3. Maneggiando un campione alla volta, utilizzare un puntale per pipetta standard da 200 µl 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 risospendere 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 risospeso completamente durante la miscelazione, in modo tale che alla fine della miscelazione non rimanga alcun pellet visibile sul lato della provetta. Evitare la formazione di bolle.

LISARE, DIGERIRE E INATTIVARE LA PROTEINASI K TERMOLABILE

4. Picchiettare la provetta di TLPK 3 volte e centrifugare a impulsi 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. Chiudere la provetta e capovolgere la Master Mix 15 volte per miscelarla, quindi riporla 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.
5. 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.
6. Capovolgere ogni campione 15 volte per miscelarlo.
7. Fare ruotare il campione sull'HulaMixer per 15 minuti a temperatura ambiente a 10 giri/minuto, senza scuotimenti o vibrazioni.
8. 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.
9. Rimuovere il campione dall'HulaMixer e centrifugarlo per 2 secondi.
10. Incubare il campione in un Thermomixer preimpostato a 55 °C per 10 minuti, senza agitare.
11. Rimuovere il campione dal Thermomixer e spegnere il Thermomixer.

LEGARE, LAVARE ED ELUIRE IL gDNA

12. 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.

13. Aggiungere 480 µl di IPA al 100% a ciascun campione. Tappare la provetta.

14. Capovolgere ogni campione 5 volte per miscelarlo.

15. 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.

16. Rimuovere il campione dall'HulaMixer.

17. 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](#)).

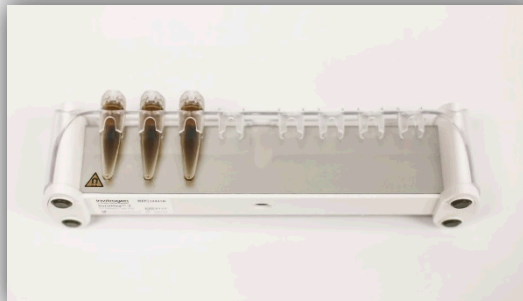
- a. Capovolgere il portaprovette trasparente Dynamag e posizionarlo capovolto con i coperchi dei campioni che toccano la superficie di lavoro. Le provette si trovano sulla stessa fila del portaprovette e nella fila più lontana dalla parte anteriore.



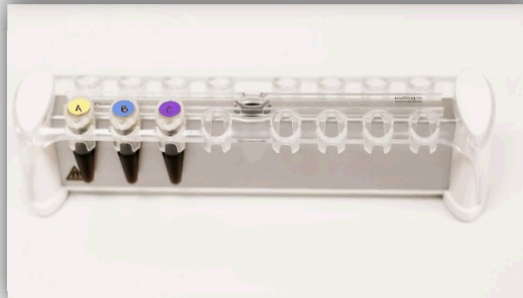
- b. Capovolgere la base magnetica Dynamag e inserirla nel portaprovette trasparente.



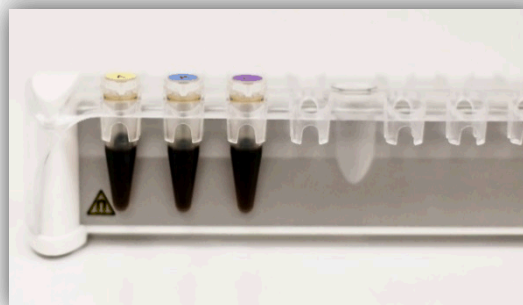
- c. Inclinare lentamente l'apparecchio montato di 90° in senso orario mentre continua a poggiare sulla superficie. Le provette saranno ora orizzontali e visibili all'utilizzatore.



- 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.



18. Impostare una pipetta per P1000 su 1 000 µl e una seconda su 700 µl.
19. 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):
 - a. Inclinare l'intero portaprovette a un angolo di 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).
 - b. Attendere 2 secondi affinché il gDNA si depositi sul Nanobind Disk.
 - c. 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.
 - d. Dispensare 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 *Bionano Prep SP-G2 and DLS-G2 Kit Troubleshooting Guide* (CG-30608).

20. Eseguire il lavaggio con WB1:
 - a. Erogare 700 µl di Buffer WB1 nella provetta e chiuderla.
 - b. Separare il portaprovette trasparente dal portaprovette Dynamag e trasferire i campioni nell'HulaMixer.
 - c. 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 passaggi da 17a a 17e.
- g. Rimuovere il surnatante come descritto al passaggio 19.



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 *Bionano Prep SP-G2 and DLS-G2 Kit Troubleshooting Guide* (CG-30608).

21. Impostare la seconda pipetta a 500 µl (precedentemente a 700 µl).

22. Eseguire il lavaggio con WB2:

- a. Erogare 500 µl di Buffer WB2 nella provetta e tapparla.
- b. Separare il portaprovette trasparente dal portaprovette Dynamag e trasferire i campioni nell'HulaMixer.
- c. 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 Dynamag trasparente 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 passaggi da 17a a 17e.
- g. Rimuovere il surnatante come descritto al passaggio 19.

 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 *Bionano Prep SP-G2 and DLS-G2 Kit Troubleshooting Guide* (CG-30608).

23. Ripetere il lavaggio con WB2, passaggio 22.
24. 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.
25. 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.
26. Inserire il Bionano Prep SP recuperatore magnetico rivestito 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.
27. Sollevare con cautela il Bionano Prep SP recuperatore magnetico 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 incastra delicatamente sul fondo della provetta.

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

ELUIZIONE DEL gDNA

28. Aggiungere 65 µl di EB alla provetta Protein LoBind da 0,5 ml contenente il Nanobind Disk e chiudere la provetta.

29. Centrifugare la provetta sulla microcentrifuga da banco per 5 secondi.
 30. 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](#), 8:20).
 31. Incubare il Nanobind Disk immerso nell'EB a temperatura ambiente per 20 minuti.
 32. Raccogliere il gDNA estratto trasferendo l'eluato nella provetta per microcentrifuga da 2,0 ml marcata con un puntale standard da 200 µl.
 33. Centrifugare la provetta con il Nanobind Disk sulla microcentrifuga da banco per 5 secondi per separare l'eluato residuo dal Nanobind Disk.
 34. Trasferire l'eluato residuo contenente il 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 si stacca dal Nanobind Disk durante la centrifuga. 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 a impulsi.
35. Centrifugare a impulsi i campioni per 2 secondi.

Omogeneizzazione della soluzione di gDNA (70 minuti)

OMOGENEIZZAZIONE DEL gDNA

36. 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.
37. 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. Picchiettare il fondo della provetta per microcentrifuga fino a quando il gDNA viene attirato nel coperchio e riprendere la miscelazione.
38. 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.

39. 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 Bionano Prep DLS-G2* (CG-30553-4).

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 "Pipettaggio di gDNA viscoso" 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 il trasferimento. 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 soluzione di lavoro per ognuno dei 2 standard (400 µl totali).
- b. 200 µl di soluzione di lavoro 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 soluzione di lavoro 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 fluorometro 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 (ng/µl)	Centro (ng/µl)	Destra (ng/µl)	CV (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.

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
Sito web	www.bionano.com/support
Indirizzo	Bionano, Inc. 9540 Towne Centre Drive, Suite 100 San Diego, CA 92121, Stati Uniti

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, COMPRESE, 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 CONSEGUENZIALI 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™, Bionano Genomics®, 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.