

## Manual de uso del equipo Bioanalyzer 2100 Agilent



Diferentes chips que se pueden leer en el equipo, de ADN y ARN, los de aDN son de dos tipos, High Sensitivity (HS) que permite separar e identificar fragmentos en un rango de 50 a 7000 bp y en concentración de 5 a 500 pg/ $\mu$ L, DNA1000 para fragmentos de 25 a 1000 bp y concentración de 0.1–50 ng/ $\mu$ L y ARN en un rango de concentración de 25 a 500 ng/ $\mu$ L.



Adherirse al siguiente procedimiento para operar el equipo:

1. Conectar el regulador al tomacorriente y presionar el botón **on/mute** hasta que haga un sonido (beep).



2. Prender la computadora que controla el Bioanalyzer 2100; usuario: genómica, contraseña: genómica (sin acento genómica).



3. Iniciar el programa Agilent 2100 Expert software.

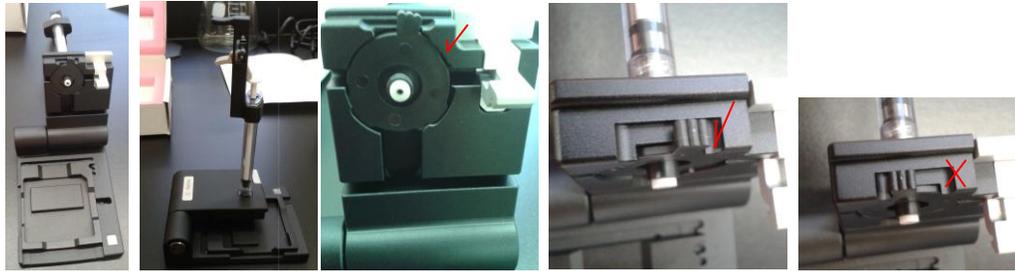


4. Insertar la jeringa en el soporte con clip hasta el fondo.



5. Girar la tapa de la plataforma negra (**chip priming station**) y colocar en su lugar la jeringa con cuidado de no trasroscarla ni forzarla, solo girar hasta que tope; ajustar al tamaño del chip y revisar que el empaque este bien colocado y el seguro ajustado a la derecha.





- Colocar el chip y subir el émbolo de la jeringa completamente.



- Sacar los tubos del refrigerador y atemperar la matriz 30 minutos a temperatura ambiente (15°C), proteger el tubo de tapa azul (dye) de la luz, envolver en aluminio, dar un vortex ligero a todos y un spin down.



- Para chips de ADN High Sensitivity transferir 15 $\mu$ L de dye (tubo de tapa azul) a un tubo de tapa roja (matriz) mezclando todo el contenido del tubo con los 15 $\mu$ L, homogeneizar con vortex suave y transferir la mezcla a la columna con filtro (incluida en el kit), centrifugar a **temperatura ambiente** 10 minutos a 6000rpm, transferir a un tubo nuevo la matriz con colorante y proteger de la luz con aluminio; para chips de ADN1000 transferir 25 $\mu$ L de dye (tubo de tapa azul) a un tubo de tapa roja (matriz) mezclando todo el contenido del tubo con los 25 $\mu$ L, homogeneizar con vortex suave y transferir la mezcla a la columna con filtro (incluida en el kit), centrifugar a **temperatura ambiente** 15 minutos a 6000rpm, para ambos chips matriz es estable solo un mes, por ello se debe hacer el cálculo para los chips que se van a leer para saber cuánta matriz se va a preparar, lo mínimo para un solo gel son 125  $\mu$ L de matriz mezclados con 3.125  $\mu$ L de colorante para ADN.



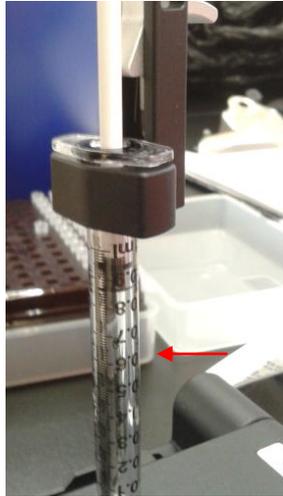
- Colocar 9  $\mu$ L de la mezcla de matriz con colorante en la posición **G** mayúscula marcada con un círculo negro introduciendo la punta de la micropipeta en posición vertical y tocar el fondo del pozo con la punta sin inclinarla pues esto puede alterar la lectura, verificar a contraluz que no hayan quedado burbujas ya que pueden impedir que el campo eléctrico sea uniforme y que los sensores (electrodos) detecten correctamente.



- Sellar hasta que la plataforma haga click y levantar el seguro del soporte, subir el émbolo hasta 1mL presionarlo hasta que pase debajo del seguro de la pieza plateada **NUNCA HASTA EL FONDO NI CON MUCHA FUERZA** ya que puede romper el chip y las muestras migrarían al siguiente pozo, contar 1 minuto.



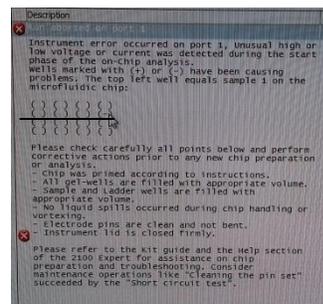
- Pasado el minuto soltar el seguro del émbolo, debe subir mínimo a 0.6mL de la jeringa para considerar que la presurización fue exitosa y la matriz se distribuyó correctamente en el gel, elevar suavemente el émbolo al máximo para evitar que haya vacíos en el gel, verificar a contraluz que n se observe burbujas ni canales debajo del chip.



12. Abrir la cubierta base del chip y transferir 9  $\mu\text{L}$  de la mezcla de matriz con colorante en las dos posiciones G restantes.



13. Transferir 5  $\mu\text{L}$  buffer de marcador (tubo verde con marcadores superior e inferior) en cada pozo 1-3, 4-6, 7-9 y 10-12 y en el del ladder y colocar 1  $\mu\text{L}$  de muestra en cada pozo excepto el del ladder, colocar 1  $\mu\text{L}$  de ladder (tubo amarillo con marcadores de diferente peso) si el número de muestras es menor al de los pozos colocar 1  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas en los restantes pues el equipo no leerá el chip si no detecta este **volumen en todos pozos**.

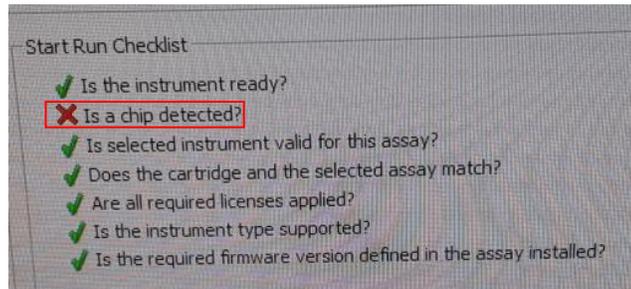




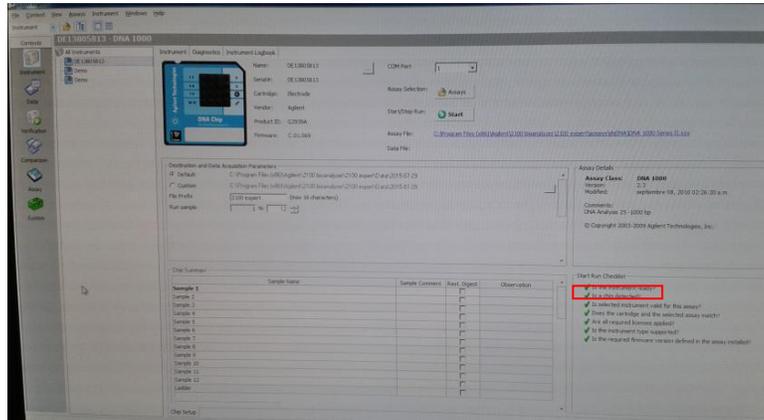
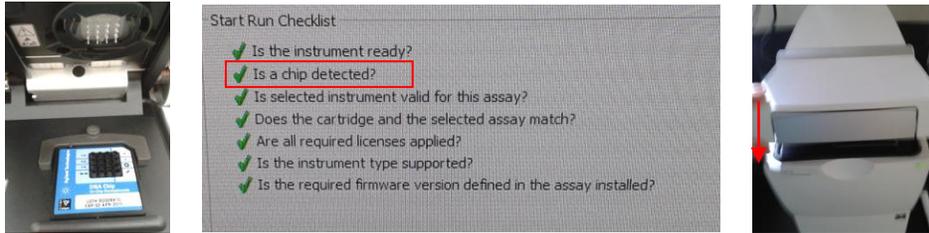
14. Colocar el chip en el agitador a 2400rpm 1 minuto o en el vortex de chips IKA MS 3 Vortexer 1 minuto a 2400 (máximo), el agitador ya está programado para solo agitar durante un minuto.



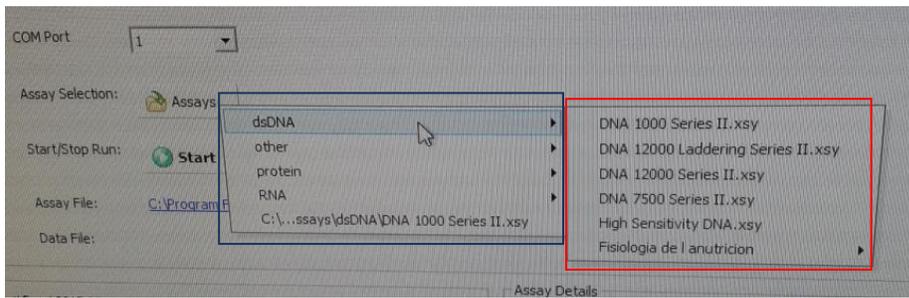
15. Desmontar la Workstation y guardarla, colocar en el chip en el equipo y correrlo antes de que hayan transcurrido 5 minutos, de lo contrario el gel ya no es viable, el equipo realiza un chequeo de rutina antes de empezar, calentar la lámpara y para verificar que todos los sistemas estén funcionando, si hay algún error lo indicará. Cuando la cubierta del equipo está abierta señala que no hay un chip detectado también cuando no hay uno colocado en el espacio, si la presurización fue exitosa y los volúmenes son correctos el equipo detecta el chip cuando se cierra la cubierta.



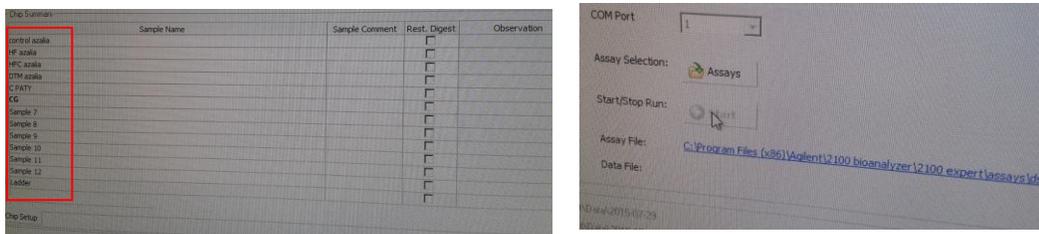
16. Colocar el chip y bajar la cubierta, en este momento el equipo detectará el chip.



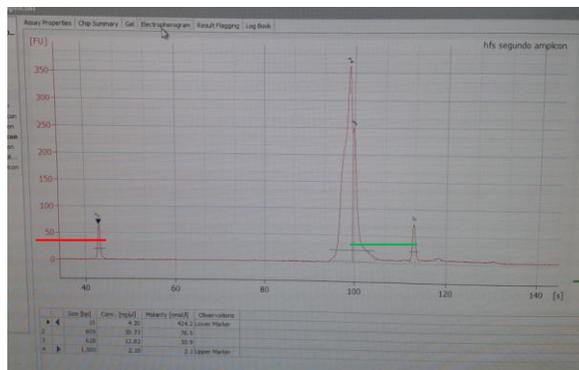
17. Selecciona el ensayo (High Sensitivity DNA, DNA1000, ARN) y el tipo de chip.



18. Etiquetar las muestras y dar click start.



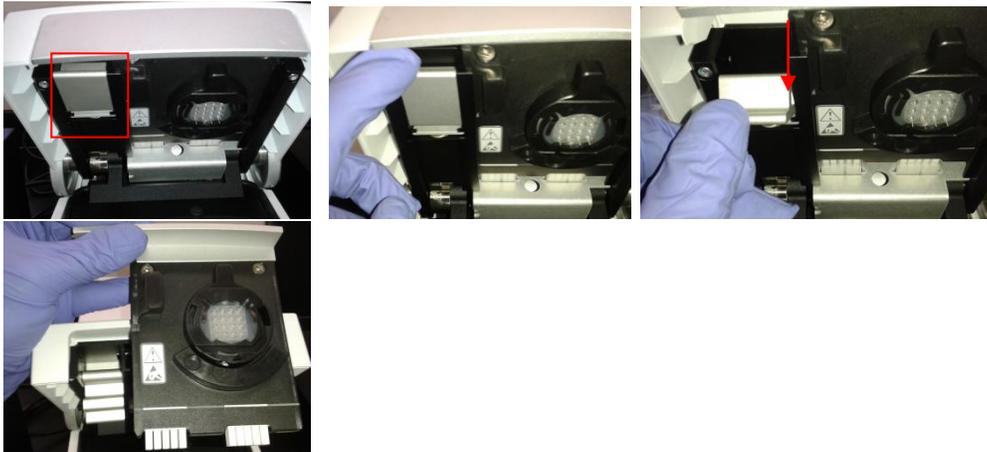
19. Monitorear la progresión del ensayo en el electroferograma y el gel que deben mostrar un patrón uniforme, los valores leídos deben estar en el rango del marcador inferior y superior, no mover el equipo durante la lectura; al terminar la lectura convertir los datos a PDF y exportarlos a algún puerto USB o disco duro.



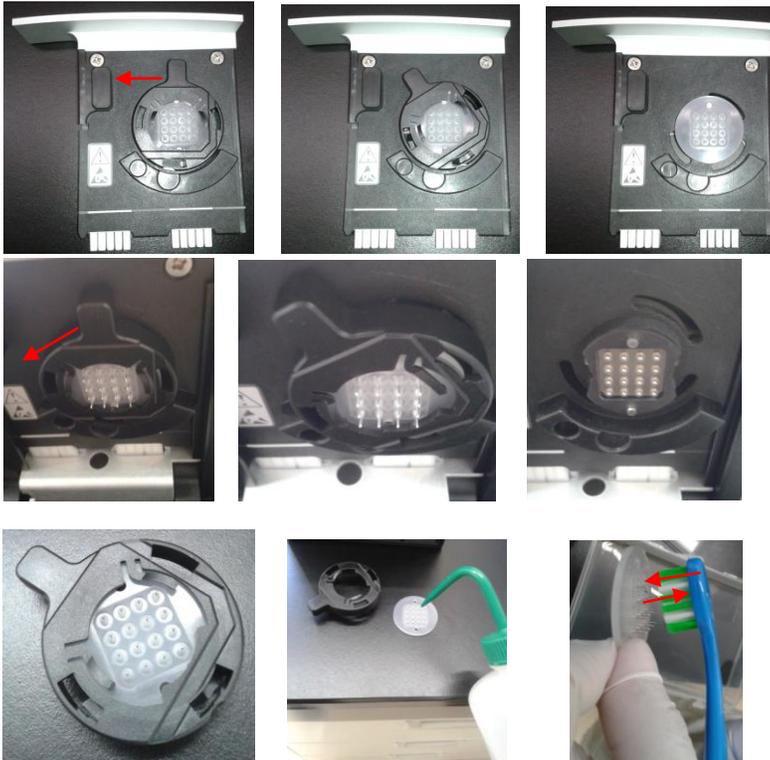
20. Después de leer varios chips colocar 350μL de solución RNAse Zap en el chip de lavado, colocarlo en el equipo, pajar la tapa y dejarlo 10 segundos, posteriormente lavar con 350μL de agua miliq con otro chip de lavado, dejar los electrodos sumergidos en agua 10 segundos, dejar secar con la cubierta arriba, no dejar el chip de lavado puesto con agua pues la humedad puede diluir las muestras o el ladder e interferir con las lecturas, lo cual se reflejará en un gel defectuoso aunque la muestra haya sido bien preparada y la presurización correcta, el agua puede oxidar los electrodos también.



21. Para lavar los electrodos desmontar la pieza moviendo el seguro que se encuentra en la parte superior izquierda de la cubierta y sacar toda la pieza.

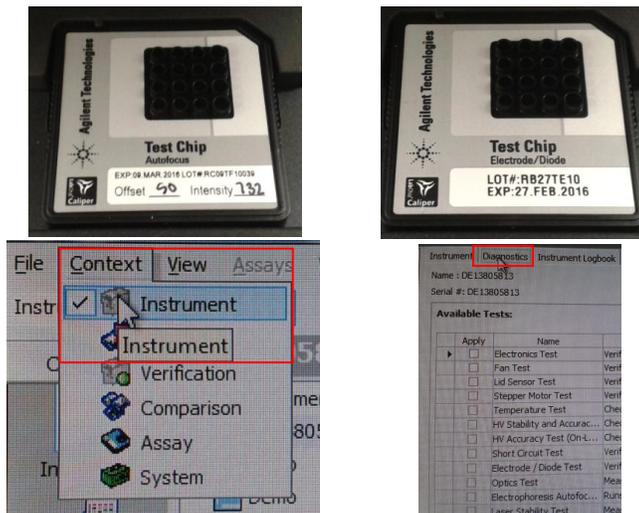


22. Girar hacia la izquierda la pieza de plástico que está arriba de los electrodos y desarmar la pieza, lavar con isopropanol y enjuagar con agua miliq, tallar con cuidado los electrodos con un cepillo pequeño de abajo hacia arriba, nunca hacia los lados porque pueden doblarse dejar secar completamente y volver a montar.

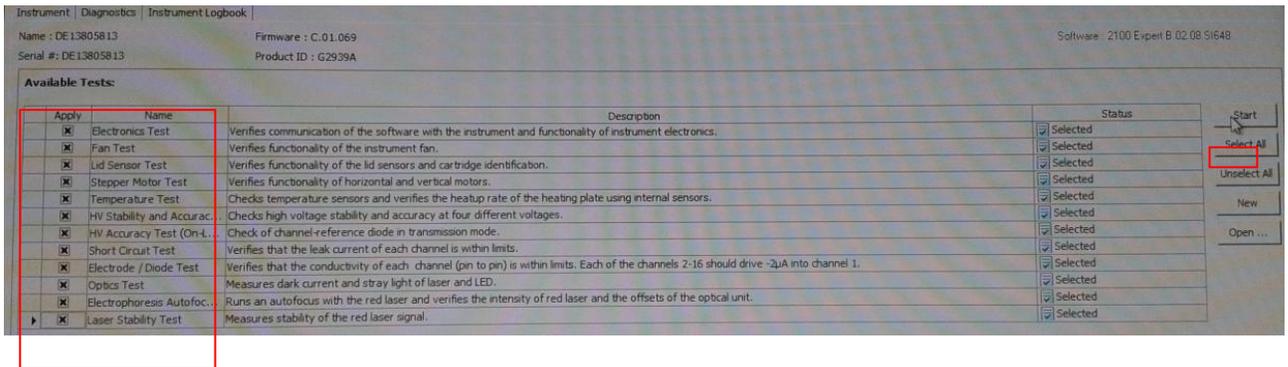


23. Se recomienda apagar el equipo y dejarlo sin actividad 30 minutos después de correr tres gels pues después de varias lecturas suele comenzar a leer desfasado el ladder y las muestras.

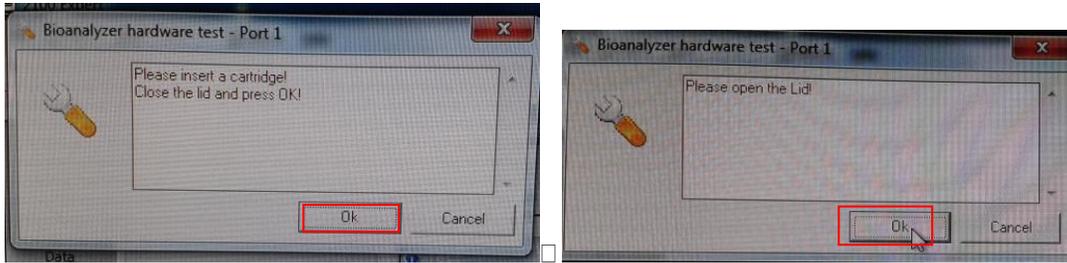
1. Si se detecta algún problema en los electrodos o en los lentes se debe hacer una prueba de diagnóstico, para ello se necesitan tres chips, uno usado que también puede ser el de lavado, el chip Autofocus para verificación del sistema óptico y el Electrode/Diode para verificar el voltaje en los electrodos. Se selecciona en la barra de menú Context a (al lado de File) la opción Instrument y en las pestañas del centro de menú seleccionar Diagnostics, esto despliega el menú de opciones de pruebas que se pueden hacer.



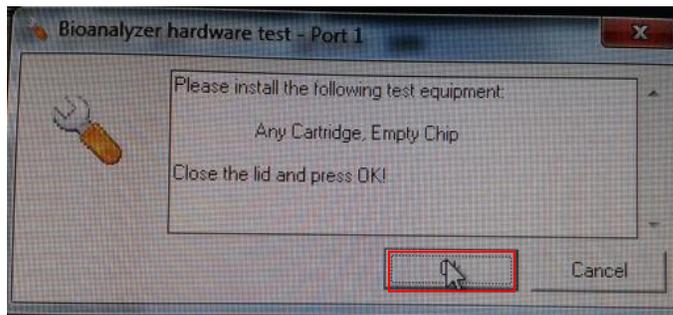
2. Si se trata de una prueba de rutina para verificar como están los diferentes sistemas seleccionar todas las opciones y dar click en Start.



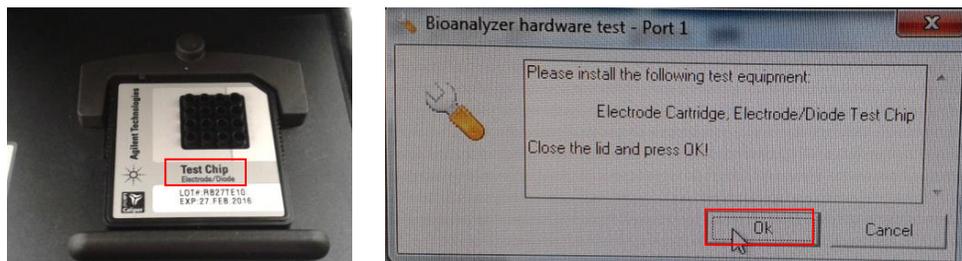
3. Después de pasar las primeras dos pruebas el equipo pedirá que se coloque un chip vacío (empty cartridge) para verificar que el equipo detecta correctamente los chips, este puede ser un cartucho usado o el de lavado y dar click en Ok, después de esta prueba el equipo pedirá que se abra la cubierta para hacer la prueba de verificación de los motores verticales y horizontales, dar click en Ok, la cubierta debe permanecer abierta mientras se realiza la prueba.



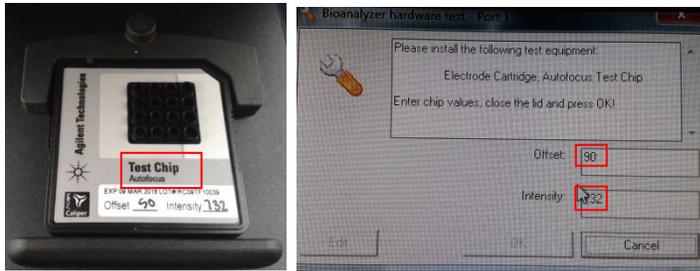
4. La siguiente prueba que es la de verificación de temperatura el equipo pedirá que se inserte un chip usado y se cierre la cubierta, q dar click en Ok, el equipo realizará varios chekings a 40°C; la siguientes prueba de voltaje de los electrodos, de referencias de transmisión de diodos y de corto circuito no requiere cambio de chip.



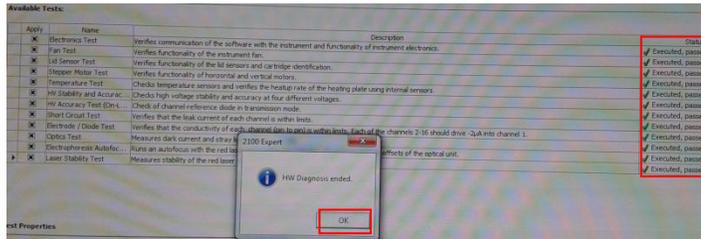
5. La siguiente prueba de conductividad de los diodos y electrodos requiere insertar el chip de prueba de electrodos y diodos, colocarlo y dar click en OK.



6. La siguiente prueba de alineamiento de los lentes requiere el chip de autoenfoco, colocarlo y dar click en Ok, el valor de intensidad de prueba debe ser 732 y debe escribirse manualmente, el de offfset debe ser 90, también hace una prueba del sistema óptico (laser LED) el máximo de corriente (dark current) del láser rojo debe ser 15 FU, y el de luz difusa 30.



- Al terminar los checkings el equipo desplegará una ventana indicando que las pruebas han concluido y si el equipo las ha pasado o requiere alguna corrección o mantenimiento, en caso de no requerirlo dar click en Ok y continuar la lectura de chips o apagar el equipo.



## Anexo A: protocolo para geles de ARN RNA Nano chip 6000

1. Sacar los reactivos del refrigerador y dejar atemperar 30 minutos a temperatura ambiente. protegidos de la luz.



2. Colocar 550  $\mu\text{L}$  (matriz para el gel) del tubo de tapa roja en una columna con filtro, colocar centrifugar la columna 10 minutos a 14000 rpm a 10°C, transferir 65  $\mu\text{L}$  de esta matriz a un tubo de 200  $\mu\text{L}$ , esta matriz es incolora y solo es estable 1 mes después de ese periodo no se debe utilizar.



3. Dar un spin rápido al de tapa tubo azul (colorante, dye) y adicionar 1  $\mu\text{L}$  de este a la matriz centrifugada (vol. final 65  $\mu\text{L}$ ), homogeneizar en vortex y centrifugar 10 minutos a 14000 rpm a 10°C, proteger siempre de la luz.

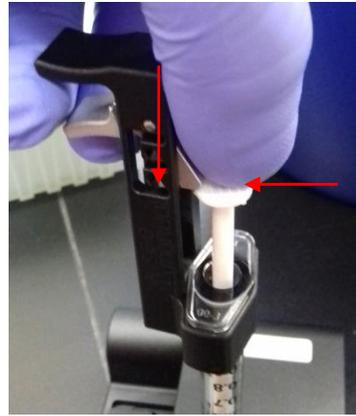


4. Abrir el seguro de la plataforma negra (**chip priming station**) y ajustar hasta la posición C, remover el tornillo plástico de la e insertar la jeringa en la plataforma con cuidado de no

trasroscarla ni forzarla girando hasta que tope, ajustar el soporte de la jeringa hasta la posición de arriba, revisar que el empaque de la plataforma este bien colocado y ajustado a la derecha.



5. Posicionar el chip en la plataforma y colocar 9  $\mu$ L de la mezcla de matriz con dye en la posición **G** (círculo negro) con la punta de la micropipeta en posición vertical tocando el fondo del pozo con la punta de la sin inclinarla, subir el émbolo de la jeringa hasta arriba (1mL) y cerrar la plataforma hasta que haga click, bajar el émbolo de la jeringa presionando solamente hasta que quede bajo el seguro de la pieza plateada y ya no suba, **NUNCA PRESIONAR HASTA EL FONDO** ya que puede romper el chip y las muestras migrarían al siguiente pozo, soltarlo permitiendo que suba hasta donde llegue y contar 30 segundos, después liberar la presión presionando la pieza plateada, si el émbolo sube hasta 0.7 mL y a contraluz no se observan burbujas indica una presurización exitosa, subir el émbolo hasta el máximo y liberar el seguro de la plataforma.



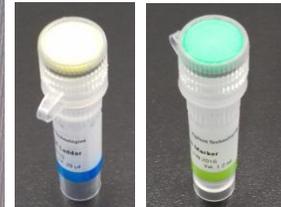
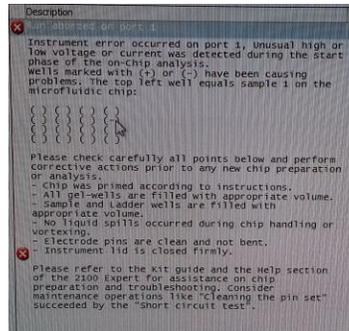
6. Colocar 9  $\mu$ L de la mezcla de matriz con dye en las otras dos posiciones marcadas con **G** mayúscula.



- El ARN suele formar dímeros, por ello es necesario desnaturalizar las muestras antes de cargarlas en el chip. Se colocan en el termociclador 2 minutos a 70°C.



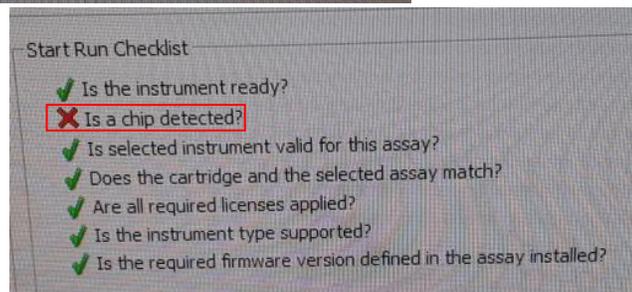
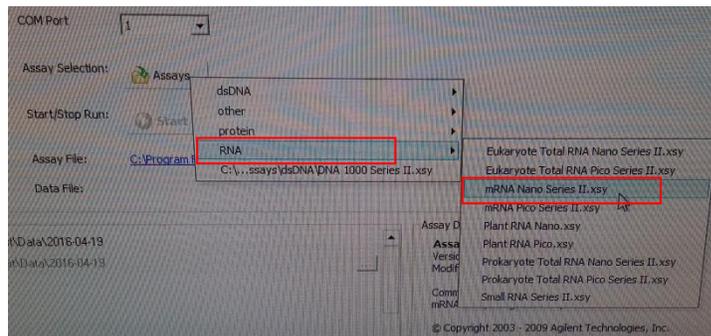
- Colocar 5 µL de RNA 6000 Nano marker (tubo verde) en el resto de las posiciones 1-3, 4-6, 7-9 y 10-12 y en el del ladder, después y 1 µL de muestra en cada pozo excepto el que está marcado como ladder (escalera), si las muestras no son suficientes para completar el todas las posiciones del chip colocar 1 µL de agua libre de nucleasas en los pozos que no se utilizarán, si el equipo no detecta el mismo volumen en todos los pozos no leerá el chip, colocar 1 µL de ladder (tubo amarillo) en la posición debajo de la G mayúscula marcada con un círculo negro, este volumen incluye el marcado superior e inferior.



- Colocar el chip en el agitador a 2400 rpm 1 minuto o en el vortex de chips IKA MS 3 Vortexer 1 minuto a 2400 (máximo).



- Colocar el chip en el equipo y correrlo antes de que hayan transcurrido 5 minutos, después de este tiempo ya no es viable; indicar el tipo de ensayo (mRNA Nano series II), el equipo realiza un chequeo de rutina antes de empezar, calentar la lámpara y para verificar que todos los sistemas estén funcionando, si hay algún error lo indicará. Cuando la cubierta del equipo está abierta señala que no hay un chip detectado también cuando no hay uno colocado en el espacio, si la presurización fue exitosa y los volúmenes son correctos el equipo detecta el chip cuando se cierra la cubierta.



- Colocar el chip y bajar la cubierta, en este momento el equipo detectará el chip.

