



# **Protocole d'extraction de l'ADN à partir de prélèvements de moelle osseuse Bionano Prep SP v2**

Numéro de document : 30399

Révision du document : A

## Table des matières

---

Mention légale .....	3
Historique des révisions.....	4
Présentation du flux de travail.....	5
Kit d'extraction de l'ADN à partir de prélèvements de moelle osseuse Bionano Prep SP et matériel fourni par l'utilisateur.....	6
Contenu du kit d'extraction de l'ADN à partir de prélèvements de moelle osseuse Bionano Prep SP v2 .....	6
Matériel fourni par l'utilisateur.....	6
Introduction et remarques importantes.....	8
Introduction : .....	8
Remarques importantes : .....	8
Protocole v2 d'extraction de l'ADN à partir de prélèvements de moelle osseuse Bionano Prep SP .....	12
Préparation pour l'extraction d'ADNg.....	12
Extraction de l'ADNg (~3 heures) .....	12
Homogénéisation de la solution d'ADNg (70 minutes).....	19
Quantification de l'ADNg (45 minutes).....	19
Annexe A : Ajout de DNA Stabilizer au prélèvement de moelle osseuse humaine décongelée dans de l'héparine .....	22
Résolution des problèmes .....	24
L'ADNg associé au disque Nanobind est encore coloré dans le deuxième lavage au WB2.....	24
L'ADNg n'est pas homogène avant le marquage.....	24
L'ADNg n'est pas visqueux.....	25
Assistance technique .....	26

## Mention légale

---

### **Pour la recherche uniquement. Ne pas utiliser dans les procédures de diagnostic.**

Ce matériel est protégé par la loi américaine sur le droit d'auteur et des traités internationaux. L'utilisation non autorisée de ce matériel est interdite. Aucune partie de la publication ne peut être copiée, reproduite, distribuée, traduite, décompilée ou transmise sous une forme, un média, ou un moyen quelconque, connu ou inconnu, sans l'autorisation écrite préalable expresse de Bionano Genomics. La copie, en vertu de la loi, comprend la traduction dans une autre langue ou dans un autre format. Les données techniques contenues dans ce document sont réservées aux destinations ultimes autorisées par la loi américaine. Détournement contraire à la loi américaine interdit. Cette publication représente les dernières informations disponibles au moment de la publication. En raison des efforts continus pour améliorer le produit, des modifications techniques peuvent survenir qui ne sont pas reflétées dans ce document. Bionano Genomics se réserve le droit d'apporter des modifications aux caractéristiques et autres informations contenues dans cette publication à tout moment et sans préavis. Veuillez contacter le service client de Bionano Genomics pour obtenir les dernières informations.

BIONANO GENOMICS DÉCLINE TOUTE GARANTIE RELATIVE À CE DOCUMENT, EXPLICITE OU TACITE, Y COMPRIS, MAIS SANS S'Y LIMITER, CELLES DE QUALITÉ MARCHANDE OU D'ADAPTATION À UN USAGE PARTICULIER. DANS TOUTE LA MESURE PERMISE PAR LA LOI, BIONANO GENOMICS NE POURRA EN AUCUN CAS ÊTRE TENU RESPONSABLE, QUE CE SOIT EN CONTRAT, EN DÉLIT, EN GARANTIE OU EN VERTU D'UNE LOI OU SUR TOUTE AUTRE BASE POUR DES DOMMAGES SPÉCIAUX, ACCESSOIRES, INDIRECTS, PÉNAUX, MULTIPLES OU CONSÉCUTIFS EN RAPPORT AVEC OU DÉCOULANT DE CE DOCUMENT, Y COMPRIS MAIS SANS S'Y LIMITER À L'UTILISATION DE CELUI-CI, QU'ELLE SOIT PRÉVISIBLE OU NON ET QUE BIONANO GENOMICS SOIT OU NON AVISÉE DE LA POSSIBILITÉ DE TELS DOMMAGES.

### **Brevets**

Les produits de Bionano Genomics® peuvent être couverts par un ou plusieurs brevets américains ou étrangers.

### **Marques**

Le logo Bionano Genomics et les noms des produits ou services Bionano Genomics sont des marques déposées ou des marques commerciales appartenant à Bionano Genomics aux États-Unis et dans certains autres pays.

Bionano Genomics®, Irys®, IrysView®, IrysChip®, IrysPrep®, IrysSolve®, Saphyr®, Saphyr Chip®, Bionano Access® et Bionano EnFocus™ sont des marques de commerce de Bionano Genomics, Inc. Toutes les autres marques de commerce sont la propriété exclusive de leurs propriétaires respectifs.

Aucune licence d'utilisation des marques de commerce de Bionano Genomics n'est donnée ou implicite. Les utilisateurs ne sont pas autorisés à utiliser ces marques sans le consentement écrit préalable de Bionano Genomics. L'utilisation de ces marques de commerce ou de tout autre matériel, sauf tel qu'autorisé par les présentes, est expressément interdite et peut constituer une violation des lois fédérales ou autres lois en vigueur.

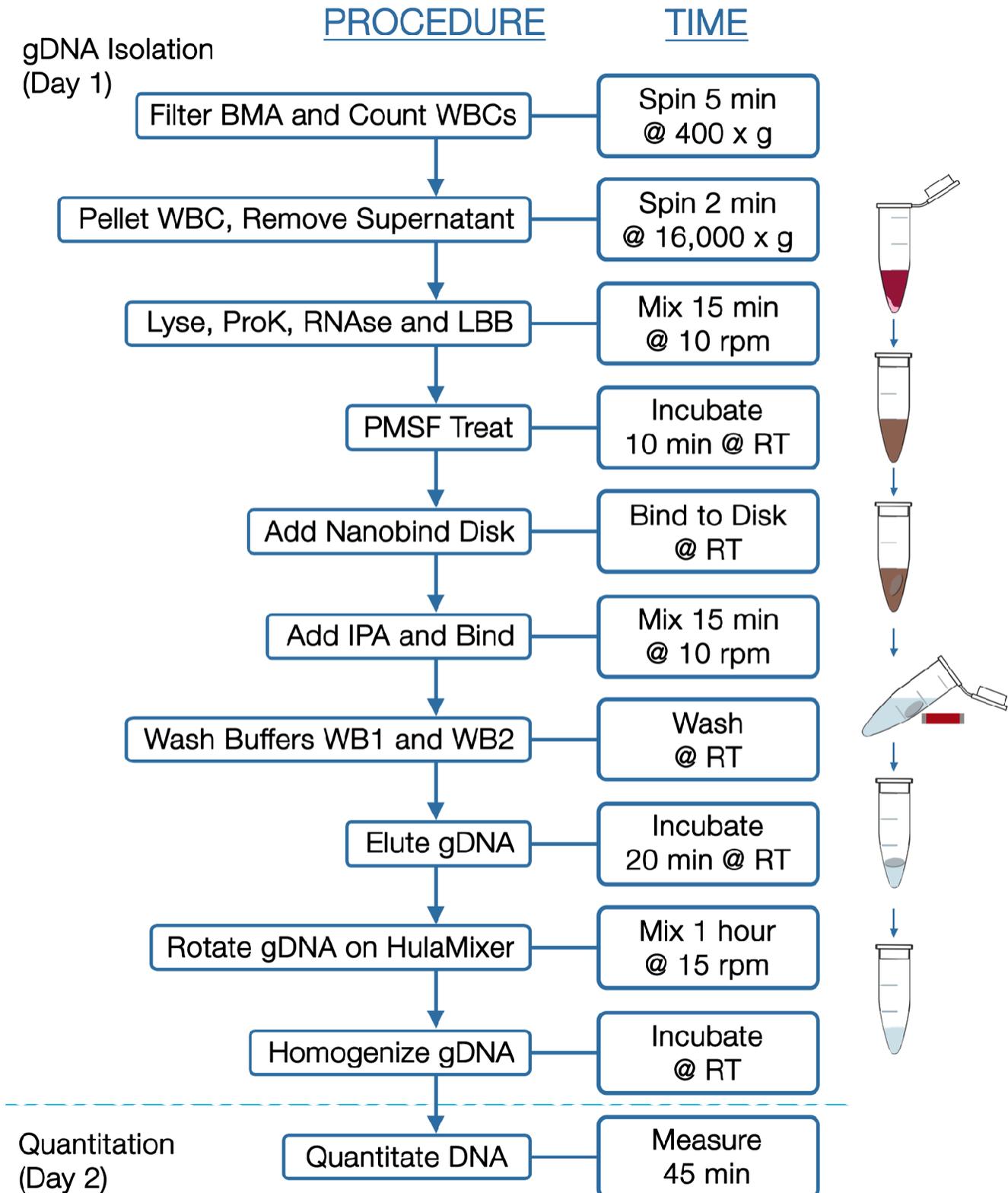
© Copyright 2022 Bionano Genomics, Inc. Tous droits réservés.

## Historique des révisions

---

Révision	Date de sortie	Remarques
A	04.15.2022	Publication initiale. Traduit en français.

## Présentation du flux de travail



## Kit d'extraction de l'ADN à partir de prélèvements de moelle osseuse Bionano Prep SP et matériel fourni par l'utilisateur

### Contenu du kit d'extraction de l'ADN à partir de prélèvements de moelle osseuse Bionano Prep SP v2 (Réf. n° 90057, 10 préparations)

Contenu du kit d'extraction de l'ADN à partir du sang et de culture cellulaire Bionano Prep SP v2 (Réf. n° 80042, 10 réactions)

Article	Quantité	Référence	Stockage
Disques Nanobind 4 mm	10 disques	20402	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Tubes de Protein LoBind, 1,5 ml	10 tubes	20422	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Tubes de Protein LoBind, 0,5 ml	10 tubes	20421	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Enzyme RNase A	200 µl	20373	Réfrigérateur (4 °C)
DNA Stabilizer	350 µl	20423	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Tubes standard, 2,0 ml	10 tubes	20396	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Tampon Cell Buffer	50 ml	20374	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Enzyme Protéinase K	0,5 ml	20372	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Tampon de lyse et de liaison (LBB)*	2,5 ml	20375	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Tampon de lavage 1 (2,5X) (WB1)*	3,25 ml	20376	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Tampon de lavage 2 (2,5X) (WB2)	5 ml	20377	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Tampon d'éluion (EB)	1,1 ml	20378	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Gaine en plastique pour récupérateur de disque magnétique	10	20381	Température ambiante (18 °C-25 °C)

\* Voir la section Remarques importantes pour consulter les informations sur les déchets dangereux

### Accessoire de prélèvement de moelle osseuse Bionano Prep SP (Réf. n° 80037, 10 réactions)

Article	Quantité	Référence	Stockage
DNA Stabilizer	4 ml	20398	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Tubes de centrifugeuse standard, 2,0 ml	2 x 10 tubes	20396	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Filtres pour prélèvements de moelle osseuse, 100 µm	20 filtres	20401	Température ambiante (18 °C-25 °C)

### Matériel fourni par l'utilisateur

Article	Fournisseur	N° de catalogue
<b>Jour 1 – Sédimentation, extraction et homogénéisation de l'ADNg</b>		
Récupérateur magnétique Bionano Prep SP (paquet de 2)	Bionano Genomics	80031
Analyseur HemoCue	Fisher Scientific (pour les États-Unis) Distributeur(en dehors des États-Unis)	22-601-017
Microcuvettes HemoCue	Fisher Scientific	22-601-018
Agitateur pour tubes Vari-Mix	Thermo Fisher ou équivalent	M48725Q
Portoir de tubes magnétique DynaMag-2	Thermo Fisher	12321D
Mélangeur d'échantillons HulaMixer	Thermo Fisher	15920D
Tubes de centrifugeuse, 1,5 ml, sans nucléase	VWR	87003-294
Solution de fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF), 100 mM	Sigma-Aldrich	93482
Éthanol 200 Proof, qualité biologie moléculaire	Sigma-Aldrich	E7023
Isopropanol (IPA), ≥ 99,5 %, qualité biologie moléculaire	Fisher Scientific	A461-212
Concentré désinfectant, TexQ TX651	Texwipe	TX651

Eau de Javel pour l'élimination du sang	Fournisseur général de matériel de laboratoires	
Tubes à centrifuger coniques, 50 ml, PP	Thermo Fisher ou équivalent	14-432-22
Centrifugeuse à vitesse variable (vitesse de rotation 400 g à 16 000 g)	Fournisseur général de matériel de laboratoires	
Bain-marie, 37 °C	Fournisseur général de matériel de laboratoires	
Seau à glace et glace	Fournisseur général de matériel de laboratoires	
Pipettes jetables stériles de 5 ml et 10 ml (TD+)	Fournisseur général de matériel de laboratoires	
Mini centrifugeuse de paillasse (vitesse de rotation 2 200 x g)	Labnet	C1301B
Pince à bouts pointus	Electron Microscopy Sciences ou équivalent	78141-01
Embouts de pipette à grand diamètre, à filtre, aérosol, 200 µl	VWR ou équivalent Rainin	46620-642
Embouts extra-longes de 1 000 µl, stériles	VWR ou équivalent Rainin	16466-008
Pipettes (10, 20, 200 et 1 000 µl) et embouts de pipette filtrés exempts de nucléase	Fournisseur général de matériel de laboratoires	
Parafilm	Fournisseur général de matériel de laboratoires	

Jour 2 – Quantification		
Vortex de paillasse	Fournisseur général de matériel de laboratoires	
Bain à ultrasons (facultatif)	Branson ou équivalent	CPX 952-119R
Tube conique de 15 ml	Fisher Scientific	05-539-12
Fluoromètre, Qubit	Thermo Fisher ou équivalent	Q33216
Kit de dosage Qubit® dsDNA BR (large plage)	Thermo Fisher ou équivalent	Q32853
Tubes à essai Qubit	Thermo Fisher	Q32856
Pipette à déplacement positif MR-10 (facultatif)	Rainin ou équivalent	17008575
Embouts de pipette, 10 µl, C-10 pour dépl. pos. à déplacement pos. (facultatif)	Rainin ou équivalent	17008604

## Introduction et remarques importantes

---

### Introduction :

Ce protocole v2 d'extraction de l'ADN à partir de prélèvements de moelle osseuse Bionano Prep® SP peut fournir un ADNg de masse moléculaire très élevée (UHMW) en moins de quatre heures. Il utilise une procédure de lyse, de liaison, de lavage et d'élution qui est courante pour les technologies d'extraction d'ADNg à base de silice en combinaison avec un nouveau disque paramagnétique. Contrairement aux billes magnétiques et aux colonnes de spin en silice, qui cisailent les segments d'ADNg de grande taille, le disque Nanobind se lie et se délie avec l'ADNg avec beaucoup moins de fragmentation, ce qui donne un ADNg de très haut poids moléculaire. La capacité élevée de liaison de l'ADNg est le résultat d'une nouvelle nanostructure en silice à l'extérieur du disque paramagnétique thermoplastique. Ce protocole a été testé en traitant plusieurs prélèvements de moelle osseuse, un maximum de deux prélèvements de moelle osseuse du donneur étant traités simultanément. Du DNA Stabilizer a été ajouté à un volume de 1 ml de moelle osseuse humaine fraîche aspirée dans un tube d'héparine qui a été congelé puis traité sans cycle de congélation/décongélation supplémentaire. L'ADNg préparé à l'aide de ce protocole a été testé uniquement avec le marquage DLS. Reportez-vous à la [vidéo de formation](#) pour connaître les étapes techniquement critiques et la résolution des problèmes. Le flux de travail actuel est configuré de telle sorte que quatre prélèvements de moelle osseuse puissent être traités confortablement au cours d'une journée de travail typique, deux prélèvements le matin et deux l'après-midi.

### Présentation

La lyse cellulaire et la digestion par la protéinase K la RNase se produisent dans des agents chaotropiques inclus dans un tampon de lyse. L'ADNg libéré se lie au disque Nanobind lors de l'ajout d'isopropanol. Après trois étapes de lavage, le disque est transféré dans un nouveau tube et l'ADNg est élué. L'ADNg de très haut poids moléculaire récupéré est soumis à une fragmentation limitée pour le rendre plus homogène. L'ADNg est ensuite mélangé et laissé pendant une nuit à température ambiante pour faciliter l'homogénéisation de l'ADN, et la concentration est déterminée. La plage de tailles d'ADNg va de 50 Kpb à plus de 1 Mpb.

### Remarques importantes :

#### **Homogénéité de l'ADN**

L'ADNg récupéré est mélangé à la pipette avec un embout de pipette standard de 200 µl pour en augmenter l'homogénéité, garantissant un prélèvement d'ADN homogène pour le marquage.

#### **Quantification de l'ADNg**

La quantification de l'ADNg est utilisée pour mesurer la concentration et sert de mesure de l'homogénéité de l'ADNg de très haut poids moléculaire. La quantification Qubit est préférée à d'autres méthodes de quantification car elle peut également être utilisée pour mesurer la concentration d'ADNg de la réaction de marquage. Le test de dosage Qubit dsDNA à large plage (BR) mesure la concentration d'ADNg après extraction, tandis que le test de dosage dsDNA haute sensibilité (HS) mesure la concentration d'ADNg après le marquage.

Pour évaluer l'homogénéité de l'ADNg, il est essentiel de mesurer la concentration d'ADNg à plusieurs endroits dans la solution. Étant donné que l'ADNg visqueux est difficile à pipeter, suivez les directives fournies dans la section Remarques importantes pour garantir un pipetage précis.

Les dosages standard pour la quantification de la concentration d'ADNg ne fourniront pas des mesures précises d'ADNg long en raison de sa nature visqueuse.

- Une fragmentation efficace de l'ADNg échantillonné via sonication ou mélange au vortex extensif est nécessaire pour obtenir une quantification précise.
- Le coefficient de variation (CV) de trois prélèvements uniques doit être inférieur ou égal à 0,30.  
CV = écart type/moyenne.
- La concentration typique d'ADNg est comprise entre 45 ng/µl et 90 ng/µl.

### **Pipetage de l'ADN génomique visqueux (ADNg)**

Pour prélever de l'ADNg visqueux, maintenez le tube contenant la solution mère à hauteur d'yeux, appuyez sur le piston de la pipette jusqu'à la première butée, plongez l'embout de la pipette et relâchez doucement et lentement le piston pour commencer à aspirer l'ADNg visqueux dans l'embout tout en surveillant attentivement l'aspiration. Gardez l'embout immergé même après que la solution visqueuse a cessé de monter et s'est stabilisée. Soyez patient(e). L'ADNg visqueux peut prendre quelques secondes pour remplir la pipette jusqu'à 2 µl. Un relâchement trop rapide du piston peut produire une bulle dans l'embout, entraînant un sous-échantillonnage (il faudra recommencer si cela se produit). Une fois que la solution dans l'embout de la pipette s'est stabilisée et pendant que l'embout est encore immergé dans la solution d'ADNg, frottez l'embout contre le fond du tube 3 à 5 fois en décrivant un mouvement circulaire. Retirez l'embout de la solution d'ADNg et inspectez visuellement pour vérifier qu'il est rempli jusqu'à 2 µl. Le retrait prématuré de l'embout de la pipette de la solution d'ADNg ou le frottement incorrect de l'embout au fond du tube pour séparer le brin d'ADNg de l'embout peut produire une bulle à l'extrémité de l'embout de la pipette, indiquant un sous-échantillonnage (il faudra recommencer si cela se produit).

### **Manipulation de l'ADNg**

- Le mélange de l'ADNg récupéré est toujours effectué avec une pipette à embout large pour éviter de casser l'ADNg.
- L'ADNg récupéré ne doit jamais être congelé ou vortexé.
- Le pipetage de l'ADNg récupéré pour un prélèvement précis est toujours effectué avec un embout large standard ou une pipette à déplacement positif.

### **Caractéristiques de l'ADNg de haute qualité pour la cartographie Bionano**

- Une solution limpide d'ADNg est idéale, mais une solution trouble ne correspond pas toujours à une mauvaise qualité d'échantillon.
- L'ADNg récupéré en solution est visqueux.
- La présence d'ADNg de taille mégabase est mesurée par électrophorèse sur gel en champ pulsé (ECP).
- L'ADNg récupéré est homogène et mesuré avec le test de quantification de l'ADNg Qubit avec un CV ≤ 0,30.

### **Taille du lot**

Nous recommandons de traiter jusqu'à quatre échantillons à la fois, avec un maximum de huit échantillons par jour, dont quatre le matin et quatre l'après-midi.

### **Utilisation du récupérateur magnétique Bionano Prep SP**

- a. Tenez une gaine en plastique et insérez le récupérateur de disque magnétique Bionano SP dans la gaine, en le positionnant de manière à ce qu'il repose au bas de la gaine.
- b. Insérez le récupérateur gainé dans le tube de centrifugeuse Protein LoBind pour attirer le disque Nanobind vers le récupérateur dans la gaine.
- c. Soulevez délicatement le récupérateur gainé avec le disque lié hors du tube et insérez le récupérateur gainé dans un nouveau tube de centrifugeuse Protein LoBind.
- d. En tenant la gaine sur le côté près du haut, avec une main, tirez le récupérateur vers le haut jusqu'à ce que le disque Nanobind se détache de la gaine et tombe dans le nouveau tube.
- e. Changez de gaine pour chaque nouvel échantillon.

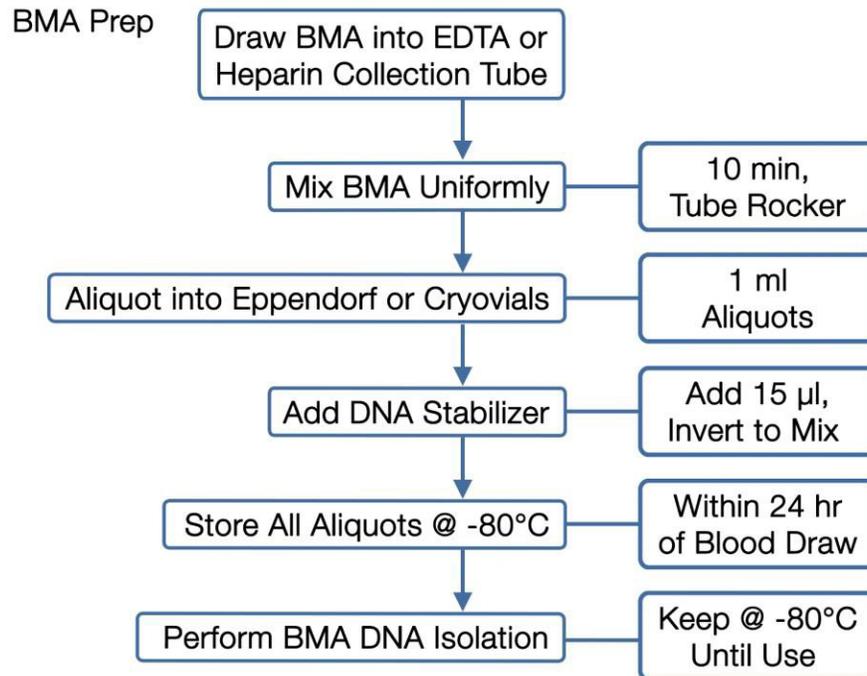
### **Élimination des déchets dangereux**

Les tampons LBB et WB1 contiennent du chlorhydrate de guanidine (GuHCl). Le GuHCl est nocif en cas d'ingestion ou d'inhalation et provoque une irritation de la peau et des yeux. NE PAS mélanger avec de l'eau de Javel ou des réactifs acides. Les déchets liquides contenant du GuHCl doivent être décontaminés en toute sécurité avec un désinfectant à base d'ammonium quaternaire avant leur élimination dans un flux de déchets dangereux. Nous recommandons l'utilisation d'eau de Javel pour la décontamination du surnageant et de TexQ pour la décontamination de toutes les solutions mélangées avec du GuHCl. Cette procédure est conforme aux exigences d'élimination de l'État de Californie, aux États-Unis, mais il peut en être autrement dans votre région. Veuillez consulter les exigences locales pour la décontamination et l'élimination.

### **Congélation de prélèvements de moelle osseuse humaine fraîche héparinés pour la conservation avec du DNA Stabilizer**

La teneur en ADNg est obtenue à partir du culot leucocytaire (globules blancs). Pour chaque échantillon de prélèvement de moelle osseuse, deux aliquotes de prélèvement de moelle osseuse hépariné (~1 ml chacun) doivent être congelées (à -80 °C) dans des tubes distincts et conservées sans décongélation jusqu'à l'extraction de l'ADNg. En règle générale, une seule aliquote sera requise pour ce protocole, la seconde servant de secours. Les échantillons doivent être congelés dans les 24 heures qui suivent le prélèvement, et conservés à 4 °C jusqu'à ce qu'ils soient congelés à -80 °C.

## PROCEDURE



- Mélangez soigneusement le prélèvement de moelle osseuse humaine hépariné à température ambiante pour assurer une bonne uniformité (15 minutes sur un agitateur à température ambiante).
- En traitant un échantillon de prélèvement de moelle osseuse à la fois, transférez deux aliquotes de 1 ml dans des tubes de 1,5 ml sans DNase/RNase.
- Ajoutez 15 µl de DNA Stabilizer à chaque tube contenant le volume de 1 ml de prélèvement de moelle osseuse humaine fraîche.
- Refermez les tubes, retournez-les 10 fois pour mélanger, puis centrifugez-les **pendant une seconde** pour recueillir tout matériel biologique qui se trouverait dans le bouchon du tube de centrifugeuse, et placez immédiatement les aliquotes à -80 °C pour conservation à long terme.
- Ne décongelez pas l'aliquote, gardez-la à -80 °C avant de procéder à l'extraction de l'ADNg.

## Protocole d'extraction de l'ADN à partir de prélèvements de moelle osseuse Bionano Prep SP v2

---

### Préparation pour l'extraction d'ADNg

#### **Avant la première utilisation**

- Vérifiez que vous disposez d'une centrifugeuse à vitesse variable (400 x g à 16 000 x g).
- Le PMSF se décompose rapidement en solutions aqueuses. Créez des aliquotes de 120 µl dans des tubes à bouchon à vis de 1,5 ml et conservez la solution mère et les aliquotes à 4 °C. Chaque aliquote sera suffisante pour dix extractions d'ADNg.
- Ajoutez de l'éthanol pur aux tampons de lavage (WB1 et WB2), mélangez bien et cochez les cases « Éthanol ajouté » :
  - Ajoutez 5 ml d'éthanol pur au tampon de lavage 1 (WB1) pour un volume final de 8,25 ml.
  - Ajoutez 7,5 ml d'éthanol pur au tampon de lavage 2 (WB2) pour un volume final de 12,5 ml.

#### **Mise en place**

- Rassemblez le matériel (voir la section « Matériel fourni par l'utilisateur » ci-dessus).
- Pour l'élimination des déchets, préparez :
  - Un tube conique de 50 ml avec 5 ml d'eau de Javel + 20 ml d'eau ; retournez plusieurs fois pour mélanger.
  - Un tube conique de 50 ml avec 100 µl de décontaminant TexQ par échantillon (éliminé comme déchets dangereux).
- Pour chaque échantillon, marquez un tube Protein LoBind de 0,5 ml (Bionano), un tube Protein LoBind de 1,5 ml (Bionano) et trois tubes de centrifugeuse de 2,0 ml (Bionano).
  - Placez un filtre pour prélèvements de moelle osseuse (Bionano) dans deux des tubes de centrifugeuse étiquetés de 2,0 ml.
- Retournez les tubes de PMSF, de protéinase K (Bionano) et de RNase (Bionano) trois fois pour mélanger, puis passez-les brièvement à la centrifugeuse. Placez le PMSF et la RNase sur de la glace.
- Préparez une bande de Parafilm (~ 2 cm) pour l'HemoCue, des microcuvettes prêtes à l'emploi et [le système HemoCue](#).
- Mettez le bain-marie à 37 °C. Vérifiez la température avec un thermomètre.

### Extraction de l'ADNg (~3 heures)

**Décongelez jusqu'à quatre aliquotes de prélèvements de moelle osseuse contenant du DNA Stabilizer, sédimentez les culots cellulaires et retirez le surnageant** Remarque : Voir la vidéo [Démonstration HemoCue WBC Counter](#) .

1. Pour chaque échantillon, prélevez une seule aliquote de 1 ml de prélèvement de moelle osseuse hépariné congelé contenant du DNA Stabilizer du congélateur à -80 °C et décongelez-la dans un bain-marie à 37 °C pendant 2 minutes à l'aide d'un portoir à tubes flottant. Retirez les aliquotes du bain-marie et laissez-les à température ambiante.

**Remarque importante** : Si vous avez des doutes quant à l'ajout de DNA Stabilizer à l'aliquote de 1 ml de prélèvement de moelle osseuse hépariné avant la congélation, ajoutez 15 µl de DNA Stabilizer dans le tube lors de la décongélation et passez à l'étape 2. Si le prélèvement de moelle osseuse hépariné ne se trouve pas dans une aliquote de 1 ml avec du DNA Stabilizer, reportez-vous à l'Annexe A.

2. Traitement des aliquotes, jusqu'à quatre échantillons simultanément :
  - a. Retournez les aliquotes de prélèvements de moelle osseuse 10 fois pour mélanger, puis centrifugez-les **pendant une seconde** pour recueillir tout matériel biologique qui se trouverait dans le bouchon du tube de centrifugeuse.
  - b. Pour chaque prélèvement de moelle osseuse décongelé, transférez 500 µl dans deux filtres pour prélèvements de moelle osseuse séparés placés dans des tubes de centrifugeuse étiquetés de 2,0 ml.
  - c. Placez soigneusement les tubes avec les filtres insérés dans la centrifugeuse de paillasse et centrifugez pendant 5 minutes à 400 g à température ambiante.

**Remarque** : Orientez les tubes de centrifugeuse avec les inserts filtrants de telle sorte que les bouchons soient orientés vers le centre du rotor.

- d. Retirez soigneusement les tubes de la centrifugeuse et jetez les filtres dans un conteneur à déchets présentant un risque biologique.
    - e. Mélangez doucement à la pipette tout le volume du prélèvement de moelle osseuse filtré 10 fois avec un embout de 1 000 µl.
    - f. Après le mélange à la pipette, regroupez les deux volumes d'échantillon filtrés dans l'un des tubes de 2 ml.
    - g. Bouchez et retournez le tube contenant le prélèvement de moelle osseuse regroupé et filtré 10 fois pour mélanger, puis centrifugez le tube **pendant une seconde** pour recueillir la substance qui se trouverait dans le bouchon.
3. Déterminez le nombre de globules blancs d'un échantillon à la fois :
  - a. Mélangez doucement à la pipette tout le volume du prélèvement de moelle osseuse filtré 10 fois, puis centrifugez pendant une seconde pour recueillir tout matériel biologique qui se trouverait dans le bouchon.
  - b. Distribuez immédiatement 20 µl sur le Parafilm et utilisez la cuvette de l'HemoCue pour mesurer les globules blancs.
  - c. Consignez la lecture sur l'HemoCue dans le tableau de la page suivante.
  - d. Effectuez les calculs suivants pour remplir le tableau de cette section pour chaque échantillon :
    - Volume de transfert (µl) = 1 500 ÷ Lecture sur l'HemoCue
    - Volume d'élimination (µl) = (Volume de transfert – 40 µl)

**Remarque** : L'HemoCue donne des résultats en cellules/L, mais le calcul est basé sur des cellules/µl pour une aliquote de 1,5 x 10<sup>6</sup> de culots leucocytaires.

**Calcul** :  $\mu\text{l}$  de sang pour 1,5 million de cellules =  $1,5 \times 10^6$  (cellules)/nombre de culots leucocytaires (cellules/ $\mu\text{l}$ ).

**Remarque** : Si la concentration de globules blancs dans le prélèvement de moelle osseuse contenant le DNA Stabilizer tombe en dehors de la plage de détection, l'écran de l'instrument HemoCue indiquera « HHH ». En règle générale, les prélèvements de moelle osseuse qui donnent une lecture sur l'HemoCue de « HHH » peuvent être dilués dans du tampon Cell Buffer, puis recomptés pour déterminer avec précision la concentration de globules blancs de l'échantillon de moelle osseuse (voir ci-dessous).

**Pour un prélèvement de moelle osseuse concentré affichant « HHH » comme lecture initiale sur l'HemoCue uniquement :**

Déterminez le nombre globules blancs d'un échantillon à la fois :

- e. Retournez le tube d'aliquote du prélèvement de moelle osseuse 10 fois pour mélanger, puis centrifugez pendant une seconde pour recueillir toute substance qui se trouverait dans le bouchon.
- f. Transférez immédiatement 25  $\mu\text{l}$  de prélèvement de moelle osseuse dans un tube de 1,5 ml contenant 75  $\mu\text{l}$  de Cell Buffer (pour faire une dilution 1:4 de la moelle osseuse).
- g. Pipetez le volume entier 10 fois doucement avec un embout standard de 200  $\mu\text{l}$ .
- h. Distribuez immédiatement 20  $\mu\text{l}$  sur le Parafilm et utilisez la cuvette de l'HemoCue pour mesurer les globules blancs.
- i. Effectuez le calcul suivant pour déterminer la concentration de globules blancs de l'échantillon et consignez la lecture sur l'HemoCue dans le tableau de la page suivante :
  - Lecture sur l'HemoCue x 4 = Lecture sur l'HemoCue **sans dilution**
- j. Effectuez les calculs suivants pour remplir le tableau de cette section pour chaque échantillon :
  - Volume de transfert ( $\mu\text{l}$ ) =  $1\ 500 \div$  lecture sur l'HemoCue **sans dilution**
  - Volume d'élimination ( $\mu\text{l}$ ) = (Volume de transfert – 40  $\mu\text{l}$ )

**Remarque** : Si le volume de transfert est de 40  $\mu\text{l}$ , il n'est pas nécessaire de réduire le volume de l'échantillon. Si le volume de transfert est < 40  $\mu\text{l}$ , déterminez la quantité de Cell Buffer à ajouter à l'échantillon à l'étape 4.

- Volume d'ajout de Cell Buffer ( $\mu\text{l}$ ) = (40  $\mu\text{l}$  – Volume de transfert)

**Remarque** : L'HemoCue donne des résultats en cellules/L, mais le calcul est basé sur des cellules/ $\mu\text{l}$  pour une aliquote de  $1,5 \times 10^6$  de culots leucocytaires.

**Calcul** :  $\mu\text{l}$  de sang pour 1,5 million de cellules =  $1,5 \times 10^6$  (cellules)/nombre de culots leucocytaires (cellules/ $\mu\text{l}$ ).

4. Après avoir compté les globules blancs, retournez chaque prélèvement de moelle osseuse filtré 10 fois pour mélanger, puis centrifugez pendant une seconde pour recueillir tout matériel biologique qui se trouverait dans le bouchon du tube de centrifugeuse. À l'aide d'une pipette réglée sur [Volume de transfert],

transférez le volume du prélèvement de moelle osseuse dans le tube Protein LoBind de 1,5 ml préalablement étiqueté.

- a. **Si le [Volume de transfert] déterminé à l'étape 3 = 40 µl**, omettez les étapes 5 et 6 et passez à l'étape 7.
  - b. **Si le [Volume de transfert] déterminé à l'étape 3 est < 40 µl**, ajoutez du tampon Cell Buffer au prélèvement de moelle osseuse transféré jusqu'à 40 µl, omettez les étapes 5 et 6 et passez directement à l'étape 7.
  - c. **Si le [Volume de transfert] déterminé à l'étape 3 est > 40 µl**, passez à l'étape 5.
5. Centrifugez les aliquotes de prélèvement de moelle osseuse équilibrés à 16 000 x g pendant 2 minutes à température ambiante.

**Remarque** : Il peut être utile d'aligner la charnière du tube sur le bord extérieur de la centrifugeuse, de sorte que le culot se trouve toujours du même côté.

6. Réglez une pipette appropriée sur [Volume de retrait] pour éliminer le surnageant avec un embout standard. Distribuez le surnageant sanguin dans le tube conique contenant l'eau de Javel. Après le retrait, il devrait rester environ 40 µl de solution avec le culot leucocytaire.

**Remarque** : Inclinez le tube et aspirez très lentement par le haut du ménisque liquide, du côté opposé au culot. Si le volume de l'aliquote initiale est  $\leq 240$  µl, procédez à l'élimination du surnageant en un seul passage. Si le volume de l'aliquote initiale est  $\geq 240$  µl, procédez à l'élimination du surnageant en plusieurs passages avec un embout de 200 µl, en changeant l'embout à chaque passage. Une fois que le surnageant de tous les échantillons a été retiré, vous pouvez remplir le tube conique contenant de l'eau de Javel jusqu'à 50 ml avec de l'eau, boucher le tube, le retourner pour mélanger et jeter le contenu dans l'évier.

ID de l'échantillon	Volume de tampon Cell Buffer Lecture sur l'HemoCue	Volume de transfert	Volume de retrait	non dilué
	cellules/L	µl	µl	µl
	cellules/L	µl	µl	µl
	cellules/L	µl	µl	µl
	cellules/L	µl	µl	µl
	cellules/L	µl	µl	µl
	cellules/L	µl	µl	µl
	cellules/L	µl	µl	µl
	cellules/L	µl	µl	µl

### **Lyse et digestion des culots leucocytaires**

7. Ajoutez 50 µl de protéinase K (Bionano) directement sur chaque culot leucocytaire. Ne mélangez pas à la pipette.
8. Ajoutez 20 µl de RNase A (Bionano) dans chaque tube. Ne mélangez pas à la pipette.
9. Mélangez l'échantillon à la pipette 5 fois avec un embout standard de 200 µl réglé sur 110 µl pour remettre en suspension le culot cellulaire.

**Remarque :** Aspirez tout le volume de l'échantillon dans l'embout et inspectez visuellement le tube pendant le mélange pour vous assurer que le culot est complètement remis en suspension pendant le mélange, de sorte qu'à la fin du mélange, il ne reste plus de culot visible sur le fond ou le côté du tube.

10. Incubez à température ambiante pendant 3 minutes.
11. Ajoutez 225 µl de tampon LBB aux échantillons en utilisant un embout de 1 000 µl. Bouchez et retournez le tube 15 fois pour mélanger.

**Remarque :** Le LBB est une solution visqueuse et mousseuse qui adhère à l'embout de la pipette. Distribuez-le lentement et changez les embouts entre les distributions pour assurer la précision du volume de distribution.

12. Faites tourner les échantillons au HulaMixer pendant 15 minutes à température ambiante à 10 tr/min. Ne pas secouer/faire vibrer.
13. Passez le tube à la centrifugeuse pendant 2 secondes pour recueillir le liquide au fond du tube.
14. Ajoutez 10 µl de PMSF 100 mM dans la partie liquide du tube. Bouchez et retournez le tube 5 fois pour mélanger, passez-le à la centrifugeuse pendant 2 secondes pour recueillir le liquide au fond du tube.
15. Incubez à température ambiante pendant 10 minutes.

### **Liaison, lavage et élution de l'ADNg**

16. À l'aide de la pince, transférez soigneusement un disque Nanobind dans le lysat.

**Remarque :** Les disques peuvent parfois se coller les uns aux autres. Assurez-vous qu'un seul disque est transféré dans le tube.

17. Ajoutez 340 µl d'isopropanol pur dans tous les tubes. Bouchez et retournez les tubes 5 fois pour mélanger.
18. Faites tourner l'échantillon au HulaMixer pendant 15 minutes à température ambiante à 10 tr/min. Ne pas secouer/faire vibrer.

**Remarque :** Assurez-vous que le disque Nanobind ne reste pas dans le bouchon du tube pendant les rotations initiales. Si c'est le cas, éteignez le rotateur et retournez le tube de centrifugeuse jusqu'à ce que le disque Nanobind revienne dans la solution. Remplacez le tube sur le HulaMixer et reprenez le mélange.

19. Examinez l'association de l'ADNg avec le disque Nanobind et retournez le tube pour augmenter la liaison (voir la [vidéo de formation](#), 0:25) :
  - a. Placez les tubes d'échantillons dans le portoir de tubes Dynamag transparent et inspectez

visuellement tous les tubes dans le portoir pour s'assurer que l'ADNg est lié au disque Nanobind.

- b. Si les brins d'ADNg flottent vers le fond du tube, retournez rapidement le tube à 180° pour rapprocher l'ADNg du disque Nanobind.
  - c. Vous pouvez retourner le tube plusieurs fois, jusqu'à ce que l'association de l'ADNg avec le disque Nanobind apparaisse inchangée.
20. Combinez le portoir transparent avec la base magnétique comme indiqué ci-dessous, en vous assurant que le disque Nanobind est fixé sur l'aimant près du haut du niveau de liquide. Si ce n'est pas le cas, remplacez-le sur le portoir magnétique (voir la [vidéo de formation](#), 0:50).

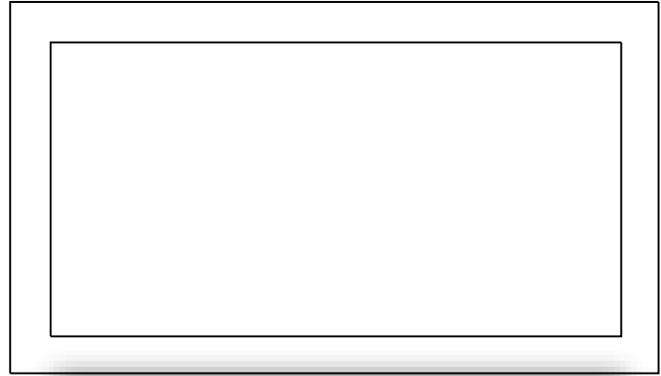
- a. Retournez le portoir de tubes Dynamag transparent et placez-le à l'envers avec les bouchons en contact avec la surface de travail. Les tubes seront sur la même rangée du portoir, et dans la rangée la plus éloignée de vous.



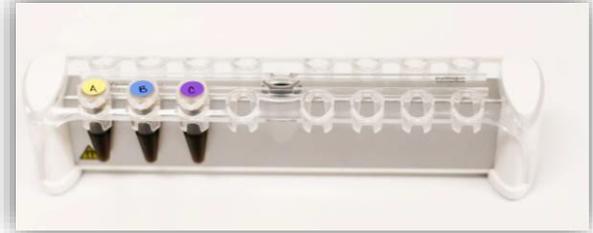
- b. Retournez la base magnétique Dynamag et abaissez-la sur le portoir transparent.



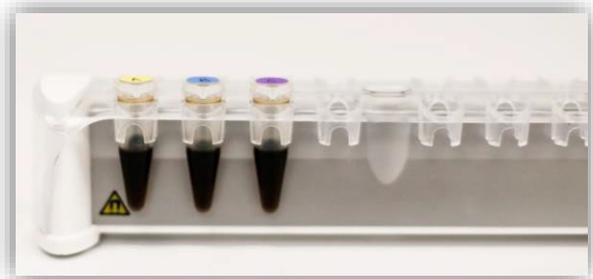
- c. Inclinez lentement l'appareil de 90° vers vous tout en le laissant en contact avec la surface de travail. Les tubes sont maintenant horizontaux et visibles.



- d. Inclinez lentement l'appareil de 90° vers vous tout en le laissant en contact avec la surface de travail, de façon à le remettre à la verticale, les tubes face à vous.



- e. Assurez-vous que le disque Nanobind est maintenu contre l'aimant près du haut du niveau de liquide.



21. Réglez une pipette de 1 000 µl sur 1 000 µl et une seconde sur 700 µl.
22. Retirez le surnageant comme indiqué ci-dessous, en faisant attention de ne pas aspirer l'ADNg (voir la [vidéo de formation](#), 1:15) :
- Inclinez l'ensemble du portoir à 45° en le tenant d'une main (en saisissant l'ensemble de l'appareil par le bas avec les tubes visibles et les bouchons vers votre autre main).
  - Attendez 2 secondes pour que l'ADNg se pose sur le disque Nanobind.
  - Retirez lentement tout le liquide avec un embout extra-long de 1 000 µl incliné à distance du disque Nanobind et/ou de l'ADNg pour éviter de l'altérer.
  - Jetez le surnageant dans un tube conique contenant du TexQ.
- ⚠** Assurez-vous de ne pas avoir retiré d'ADNg en inspectant visuellement l'embout contenant le tampon avant de le jeter. Si l'ADNg est accidentellement aspiré ou se détache du disque, voir la section Résolution des problèmes ci-dessous.
23. Effectuez le lavage au WB1 (voir la [vidéo de formation](#), 2:21) : distribuez 700 µl de tampon WB1 directement sur les disques dans les tubes et les tubes bouchés.

- a. Soulevez le portoir de tubes transparent pour le séparer de la base magnétique.
- b. Retournez le portoir transparent avec les tubes à 180° 10 fois pour procéder au lavage.
- c. Placez le portoir transparent et les tubes sur la base magnétique comme décrit à l'étape 20.
- d. Retirez le surnageant comme décrit à l'étape 22.

 Assurez-vous de ne pas avoir retiré d'ADNg en inspectant visuellement l'embout contenant le tampon avant de le jeter. Si l'ADNg est accidentellement aspiré ou se détache du disque, se reporter à la section Résolution des problèmes ci-dessous.

24. Réglez la deuxième pipette sur 500 µl (auparavant à 700 µl).

25. Effectuez le lavage au WB2 :

- a. Distribuez 500 µl de tampon WB2 directement sur les disques dans les tubes, et fermez les tubes.
- b. Soulevez le portoir transparent pour le séparer de la base magnétique.
- c. Retournez le portoir transparent à 180° 20 fois pour procéder au lavage.
- d. Replacez le portoir transparent et les tubes sur la base magnétique comme décrit à l'étape 20.
- e. Retirez le surnageant comme décrit à l'étape 22.

 Assurez-vous de ne pas avoir retiré d'ADNg en inspectant visuellement l'embout contenant le tampon avant de le jeter. Si l'ADNg est accidentellement aspiré ou se détache du disque, se reporter à la section Résolution des problèmes ci-dessous.

26. Répétez le lavage au WB2, étape 25.

 Si l'ADNg associé au disque Nanobind est encore coloré après 20 inversions, consultez la section Résolution des problèmes.

27. Ouvrez complètement le bouchon du tube (parallèle à la paillasse) et soulevez chaque tube de la base.

28. À proximité d'un tube Protein LoBind de 0,5 ml, transférez le disque Nanobind dans un nouveau tube Protein LoBind à l'aide du récupérateur magnétique Bionano Prep SP (voir la section Remarques importantes pour savoir comment utiliser le matériel). Bouchez le tube pour éviter le dessèchement du disque (voir la [vidéo de formation](#), 7:30).

 Assurez-vous que l'ADNg reste collé au disque pendant le transfert.

29. Centrifugez le tube pendant 5 secondes.

30. Retirez tout le liquide résiduel au fond du tube à l'aide d'un embout standard de 10 µl.

**Remarque :** Il est nécessaire de déplacer le disque Nanobind à l'aide de l'embout pour atteindre le liquide au fond du tube. Déplacez l'embout par petits mouvements circulaires pour éliminer tout le liquide résiduel du fond du tube.

31. Ajoutez 65 µl de tampon EB au tube Protein LoBind.
32. Centrifugez le tube pendant 5 secondes.
33. À l'aide d'un embout standard de 10 µl, poussez doucement le disque Nanobind vers le fond du tube, en vous assurant qu'il est complètement immergé dans le liquide. Le disque doit rester parallèle à la surface de la paillasse (voir la [vidéo de formation](#), 8:20).
34. Incubez le disque Nanobind immergé dans le tampon d'élution à température ambiante pendant 20 minutes.
35. Recueillez l'ADNg extrait en transférant l'éluat dans un tube de 2,0 ml préalablement étiqueté avec un embout de 200 µl
36. Passez le tube contenant le disque Nanobind à la centrifugeuse de paillasse pendant 5 secondes et transférez tout l'éluat restant contenant l'ADNg visqueux dans le même tube standard de 2,0 ml qu'à l'étape précédente avec un embout standard de 200 µl. Vous pouvez retirer le disque avant d'aspirer le tampon d'élution restant.

**Remarque** : La quasi-totalité de l'ADNg visqueux se détache du disque Nanobind pendant le passage à la centrifugeuse.

## Homogénéisation de la solution d'ADNg (70 minutes)

### Homogénéisation de l'ADNg

37. Aspirez lentement tout le volume d'ADNg dans un embout standard de 200 µl, puis distribuez lentement l'ADNg. Évitez de créer des bulles.
  - Répétez ce processus 5 fois (6 au total) : (1 fois = 1 aspiration et 1 distribution).

**Remarque** : Si l'absorption d'ADNg se bloque en raison d'une viscosité élevée, il peut être nécessaire de remuer doucement tout en relâchant lentement le piston pour retirer l'ADNg.

38. Placez le tube de centrifugeuse standard de 2,0 ml contenant l'ADNg dans le portoir du Mélangeur d'échantillons Hula Mixer et faites tourner à température ambiante pendant 1 heure à 15 tr/min.

**Remarque** : Au cours des rotations initiales, assurez-vous que l'ADNg est aspiré du fond du tube de centrifugeuse pour se placer dans le bouchon du tube pendant les rotations. Si la solution d'ADN reste au fond du tube pendant les rotations initiales, éteignez le Hula Mixer et positionnez le portoir de sorte que le tube de centrifugeuse soit tourné vers le bas. Tapotez doucement le fond du tube de centrifugeuse jusqu'à ce que l'ADNg tombe dans le bouchon et reprenez le mélange.

**Remarque** : Pour minimiser la durée de la procédure, les tubes de centrifugeuse peuvent être laissés sur le Hula Mixer pendant la nuit si l'agitateur est configuré pour s'arrêter au bout d'une heure. Le lendemain, passez les tubes à la centrifugeuse de paillasse pendant 2 secondes pour faire tomber l'ADNg au fond du tube avant la quantification.

39. Retirez le tube de centrifugeuse du portoir du Hula Mixer et passez le tube à la centrifugeuse de paillasse pendant 2 secondes pour faire tomber l'ADNg au fond du tube. Laissez l'ADNg s'équilibrer pendant la nuit à température ambiante (25 °C) pour qu'il s'homogénéise.

**Remarque :** La plupart des échantillons deviennent homogènes au troisième jour (à partir du début du protocole), mais les échantillons peuvent être marqués dès qu'ils deviennent homogènes.

## Quantification de l'ADNg (45 minutes)

### Quantification Qubit - Dosage BR dsDNA

Reportez-vous au manuel d'utilisation du kit de dosage Qubit dsDNA BR pour plus de détails sur le kit et suivez les méthodes décrites dans la section Remarques importantes « Pipetage de l'ADNg génomique (ADNg) visqueux » pour assurer un pipetage précis de l'ADNg visqueux.

1. Équilibrez les solutions mères du kit de dosage Qubit BR à température ambiante.

**Remarque :** Si l'ADNg a été conservé à 4 °C, équilibrez-le à température ambiante avant de passer à l'étape suivante.

2. Ajoutez le tampon Qubit BR aux tubes de dosage Qubit de 0,5 ml :
  - a. Pour chaque échantillon, ajoutez 18 µl de tampon Qubit BR à trois tubes Qubit distincts.
  - b. Pour les solutions mères Qubit, ajoutez 10 µl de tampon Qubit BR à deux tubes Qubit distincts.

3. À l'aide d'une pipette de 200 µl à embout large, mélangez doucement tout le volume de l'échantillon d'ADNg en pipetant de haut en bas 5 fois, en veillant à ne pas générer de bulles.

4. En utilisant un embout de pipette standard ou un embout de pipette à déplacement positif pour chaque aspiration :

Retirez des aliquotes de 2 µl du côté gauche, au milieu et du côté droit de chaque échantillon et distribuez-les dans le tampon BR du tube Qubit correspondant, en rinçant l'embout lors de la distribution. Placez les tubes dans un portoir flottant et soniquez pendant 10 minutes. Effectuez les étapes 5 et 6 pendant la sonication.

**Remarque :** Si un bain à ultrasons n'est pas disponible, vortexez pendant au moins 30 secondes à vitesse maximale, puis centrifugez brièvement pendant 2 secondes.

5. Préparez la solution étalon en diluant le réactif de dosage de colorant dans le tampon de dilution BR (1:200) :
  - a. 200 µl de solution étalon pour chacune des deux solutions mères (400 µl au total).
  - b. 200 µl de solution étalon pour chaque aliquote d'échantillon (600 µl pour chaque échantillon).
6. Pour les solutions mères d'ADN Qubit, ajoutez 10 µl des solutions mères 1 et 2 aux tubes contenant le tampon BR de l'étape 2b.
7. Une fois la sonication terminée, récupérez les tubes et passez-les brièvement à la centrifugeuse. Vortexez les tubes pendant 5 secondes à vitesse maximale, puis passez-les à nouveau à la centrifugeuse.
8. Ajoutez 180 µl de solution étalon à chaque aliquote d'ADN soniqué et aliquote de solution mère d'ADN Qubit. Vortexez pendant 5 secondes, puis passez les tubes à la centrifugeuse.

9. Incubez les échantillons pendant au moins 2 minutes, puis lisez la valeur sur le fluoromètre Qubit. Consignez les valeurs dans le tableau ci-dessous.
10. Le coefficient de variation (CV = écart type/moyenne) de trois résultats doit être inférieur à 0,30 ci-dessous.

**Remarque :** Si le CV est > 0,30, mélangez délicatement à la pipette tout le volume d'ADNg en cinq fois (1 fois = 1 mouvement vers le haut

+ 1 mouvement vers le bas) à l'aide d'une pipette à embout large. Laissez l'ADNg reposer au moins une nuit à température ambiante avant de répéter la quantification.

Remarque : Les concentrations d'ADN typiques sont comprises entre 45 ng/μl et 90 ng/μl.

ID de l'échantillon	Gauche (ng/μl)	Milieu (ng/μl)	Droite (ng/μl)	Moyenne (ng/μl)	CV (écart type/moyenne)

### **Marquage**

L'ADN est prêt pour le marquage [Direct Label and Stain \(DLS\) \(30206\)](#). Voir la section « Kits et consommables » sur <https://bionanogenomics.com/support/> pour les kits et protocoles applicables.

## Annexe A : Ajout de DNA Stabilizer au prélèvement de moelle osseuse humaine décongelée dans de l'héparine

---

### **Mise en place**

- Vérifiez que vous disposez d'une centrifugeuse à vitesse variable (400 x g à 16 000 x g).
- Afin de tenir compte de la variation significative de la concentration de globules blancs dans les prélèvements de moelle osseuse héparinés provenant d'échantillons humains, deux aliquotes de 500 µl de chaque prélèvement de moelle osseuse hépariné décongelé doivent être filtrées et regroupées. Pour chaque volume de 500 µl d'échantillon de prélèvement de moelle osseuse décongelé, étiquetez un tube de centrifugeuse de 2,0 ml et placez un filtre pour prélèvements de moelle osseuse sur le tube.
- Mettez le bain-marie à 37 °C. Vérifiez la température avec un thermomètre.

### **Décongelez le prélèvement de moelle osseuse hépariné, filtrez et ajoutez du DNA Stabilizer**

1. Traitement d'un échantillon à la fois :
  - a. Sortez le prélèvement de moelle osseuse hépariné du congélateur à -80 °C décongelez-le dans un bain-marie à 37 °C pendant 2 minutes (en supposant une quantité d'environ 2 ml dans le tube) à l'aide d'un portoir à tubes flottant. Retirez-le du bain-marie et laissez-le à température ambiante.

**Remarque :** Le temps nécessaire à la décongélation varie en fonction du volume du prélèvement de moelle osseuse congelée qu'il reste à décongeler. Pour des volumes  $\leq 1$  ml, 2 minutes de décongélation à 37 °C devraient suffire. Pour des volumes plus importants, tels que  $\geq 4,8$  ml, jusqu'à 8 minutes de décongélation peuvent être nécessaires.

- b. Retournez chaque prélèvement de moelle osseuse décongelé 10 fois pour mélanger, puis centrifugez **pendant une seconde** pour recueillir tout matériel biologique qui se trouverait dans le bouchon du tube de centrifugeuse.
- c. Transférez 500 µl d'échantillon de prélèvement de moelle osseuse décongelé sur chacun des deux filtres pour prélèvements de moelle osseuse placés sur des tubes de centrifugeuse étiquetés de 2,0 ml.

**Remarque :** Si l'échantillon de départ est inférieur à 1 ml, ajoutez un volume égal d'échantillon à chaque filtre.

- d. Placez soigneusement les tubes avec les filtres insérés dans la centrifugeuse de paillasse et centrifugez pendant 5 minutes à 400 g à température ambiante.

**Remarque :** Orientez les tubes de centrifugeuse avec les inserts filtrants de telle sorte que les bouchons soient orientés vers le centre du rotor.

- e. Retirez soigneusement les tubes avec filtres insérés de la centrifugeuse et jetez les filtres dans un conteneur pour déchets présentant un risque biologique.
- f. Mélangez doucement à la pipette tout le volume de prélèvement de moelle osseuse filtré 10 fois, puis centrifugez le tube

**pendant une seconde** pour recueillir tout matériel biologique qui se trouverait dans le bouchon du tube de centrifugeuse.

- g. Après le mélange à la pipette, regroupez les deux volumes d'échantillon filtrés dans l'un des tubes de 2 ml.
- h. Bouchez et retournez le tube contenant le prélèvement de moelle osseuse regroupé et filtré 10 fois pour mélanger, puis centrifugez le tube **pendant une seconde** pour recueillir tout matériel biologique qui se trouverait dans le bouchon du tube de centrifugeuse.
- i. Transférez le volume maximal **mesuré** dans un tube de centrifugeuse de 1,5 ml étiqueté.
- j. Ajoutez la quantité appropriée de DNA Stabilizer au prélèvement de moelle osseuse filtré regroupé en utilisant l'équation suivante :  $\mu\text{l de DNA Stabilizer à ajouter} = 15 \times [\mu\text{l de prélèvement de moelle osseuse filtré}] / 1\ 000$ .
- k. Bouchez et retournez le tube 10 fois pour mélanger, puis centrifugez-le **pendant une seconde** pour recueillir tout matériel biologique qui se trouverait dans le bouchon du tube de centrifugeuse. Passer à l'étape 3b du « Protocole d'extraction de l'ADN à partir du prélèvement de moelle osseuse Bionano Prep SP ».

## Résolution des problèmes

---

Voir la [vidéo de formation](#) à partir de 8:40 pour des explications vidéo sur la résolution des problèmes.

### L'ADNg n'est pas lié au disque Nanobind.

**Preuve** : l'ADNg est aspiré ou se détache du disque pendant la liaison ou pendant les lavages.

Étapes à suivre si l'échantillon est aspiré :

1. En laissant le tube d'échantillon sur le portoir avec l'aimant, redistribuez le liquide contenant de l'ADNg dans le tube contenant le disque.
2. Retirez le tube sur le portoir de l'aimant et retournez le portoir plusieurs fois à la main pour rétablir la liaison.

Alternative :

1. En laissant le tube d'échantillon sur le portoir avec l'aimant, redistribuez le liquide contenant de l'ADNg dans le tube contenant le disque.
2. Aspirez le liquide du tube de telle sorte qu'un volume minimal (~50 µl) reste au-dessus de l'ADNg non lié et jetez le surnageant en laissant l'ADN dans un volume minimal au fond du tube.
3. Aspirez soigneusement l'ADNg non lié contenant le minimum de liquide dans l'embout de la pipette et pipetez directement sur le disque dans le portoir sur l'aimant pour rétablir la liaison.

### L'ADNg associé au disque Nanobind est encore coloré dans le deuxième lavage au WB2

**Preuve** : Après 20 inversions, dans le second lavage au WB2, l'ADNg associé au disque Nanobind est encore coloré. Étapes à suivre :

1. Soulevez le portoir transparent pour le séparer de la base magnétique.
2. Retournez le portoir transparent de manière à ce que les disques Nanobind reposent dans les bouchons des tubes et **secouez vigoureusement le portoir de tubes de façon continue pendant 10 secondes**, en s'assurant que les disques Nanobind se déplacent de haut en bas des microtubes.
3. Placez le portoir transparent et les tubes sur la base magnétique comme décrit à l'étape 20 en page 15.
4. Retirez le surnageant comme décrit à l'étape 22 en page 16.

### L'ADNg n'est pas homogène avant le marquage

**Preuve** : Le CV de quantification de l'ADNg de trois mesures (haut, milieu et bas) est > 0,30.

Étapes à suivre :

1. Aspirez et distribuez l'échantillon à l'aide d'une pipette à embout large un total de 5 fois.
2. Incubez l'ADNg à température ambiante pendant 1 à 3 jours.

3. Après incubation, aspirez à nouveau et distribuez l'échantillon à l'aide d'un embout large 5 fois.
4. Quantifiez par dosage Qubit BR.

## L'ADNg n'est pas visqueux

**Preuve :** La consistance de l'échantillon est très fluide et facile à pipeter, mais la concentration est  $> 35 \text{ ng}/\mu\text{l}$ . L'échantillon ne contient probablement pas d'ADNg de haut poids moléculaire.

Vérifiez l'échantillon à l'aide d'une électrophorèse sur gel en champ pulsé avant le marquage pour confirmer la présence d'ADNg de haut poids moléculaire.

Évaluez la méthode de préparation des échantillons et la qualité/l'âge du matériau d'apport, puis répétez l'extraction de l'ADN à partir de l'échantillon biologique.

## Assistance technique

---

Si vous avez besoin d'aide, contactez l'assistance technique de Bionano Genomics.

Vous pouvez vous procurer la documentation sur les produits Bionano, les FDS, les certificats d'analyse, les questions fréquemment posées et d'autres documents connexes à partir du site Internet de l'Assistance ou sur demande par e-mail et par téléphone.

Type	Contact
E-mail	<a href="mailto:support@bionanogenomics.com">support@bionanogenomics.com</a>
Téléphone	Heures d'ouverture :  Du lundi au vendredi, de 9h00 à 17h00, Heure normale du Pacifique US : +1 (858) 888-7663
Site Internet	<a href="http://www.bionanogenomics.com/support">www.bionanogenomics.com/support</a>