



Protocole Bionano Prep DLS-G2

NUMÉRO DE DOCUMENT :

CG-30553-5

RÉVISION DU DOCUMENT :

C

Table des matières

Avertissement légal	3
BREVETS	3
MARQUES DE COMMERCE	3
Historique des révisions	5
Vue d'ensemble du protocole Bionano Prep DLS-G2	6
ÉTAPES DU PROTOCOLE	6
Matériel fourni dans le kit de marquage Bionano Prep DLS-G2 et matériel à fournir par l'utilisateur	7
Introduction et remarques importantes	8
INTRODUCTION	8
REMARQUES IMPORTANTES	9
MANIPULATION DE L'ADN GENOMIQUE	11
Protocole Bionano Prep DLS-G2	13
PRÉPARATION	13
MARQUAGE PAR L'ENZYME DLE-1	13
NETTOYAGE DU DL-GREEN	15
COLORATION ET HOMOGENÉISATION DE L'ADN	17
CHARGEMENT DE LA PUCE SAPHYR CHIP	20
Assistance technique	21

Avertissement légal

Réservé à la recherche. Ne pas utiliser dans les procédures de diagnostic.

Le présent document est protégé par la législation des États-Unis sur le droit d'auteur et par les traités internationaux. L'utilisation non autorisée de ce document est interdite. Aucune partie de la publication ne peut être copiée, reproduite, distribuée, traduite, transmise ou faire l'objet d'ingénierie inverse sous quelque forme, par quelque support ou quelque moyen que ce soit, connu ou inconnu à l'heure actuelle, sans l'autorisation expresse écrite et préalable de Bionano Genomics. La copie, en vertu de la loi, comprend la traduction dans une autre langue et dans un autre format. Les données techniques contenues dans les présentes sont réservées aux destinations ultimes autorisées par la législation des États-Unis. Tout détournement à la loi américaine est interdit. La présente publication contient les dernières informations disponibles au moment de la parution. En raison des efforts continus d'amélioration du produit, des modifications techniques peuvent être apportées sans être reflétées dans le présent document. Bionano Genomics se réserve le droit d'apporter des modifications aux caractéristiques techniques et aux autres informations contenues dans la présente publication à tout moment et sans préavis. Veuillez contacter le service client de Bionano Genomics pour obtenir les dernières informations en date.

BIONANO GENOMICS DÉCLINE TOUTE GARANTIE, EXPLICITE OU IMPLICITE, RELATIVE AU PRÉSENT DOCUMENT, NOTAMMENT ENTRE AUTRES QUANT À LA QUALITÉ MARCHANDE OU À L'ADÉQUATION POUR UN OBJECTIF PARTICULIER. DANS TOUTE LA MESURE AUTORISÉE PAR LA LOI, BIONANO GENOMICS NE POURRA EN AUCUN CAS ÊTRE TENU RESPONSABLE, QUE CE SOIT EN VERTU D'UN CONTRAT, D'UN TORT, D'UNE GARANTIE, DE TOUTE LOI OU DE TOUTE AUTRE BASE, DES DOMMAGES PARTICULIERS, ACCESSOIRES, INDIRECTS, PUNITIFS, MULTIPLES OU CONSÉCUTIFS EN RAPPORT AVEC OU DÉCOULANT DE CE DOCUMENT, NOTAMMENT ENTRE AUTRES, QUANT À L'UTILISATION DE CELUI-CI, QUE CES DOMMAGES SOIENT OU NON PRÉVISIBLES ET QUE BIONANO GENOMICS AIT OU NON ÉTÉ AVERTI DE LA POSSIBILITÉ DESDITS DOMMAGES.

BREVETS

Les produits de Bionano Genomics® peuvent être couverts par un ou plusieurs brevets aux États-Unis ou à l'étranger.

MARQUES DE COMMERCE

Le logo Bionano Genomics et les noms des produits ou services de Bionano Genomics sont des marques déposées ou des marques de commerce détenues par 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 d'aucune marque de commerce de Bionano Genomics n'est accordée de manière expresse ou implicite. Les utilisateurs ne sont pas autorisés à utiliser ces marques de commerce sans le consentement écrit préalable de Bionano Genomics. L'utilisation de ces marques de commerce ou de tout autre document, à l'exception de ce qui est autorisé dans les présentes, est expressément interdite et peut constituer une violation des lois fédérales ou des autres lois en vigueur.

© Copyright 2023 Bionano Genomics, Inc. Tous droits réservés.

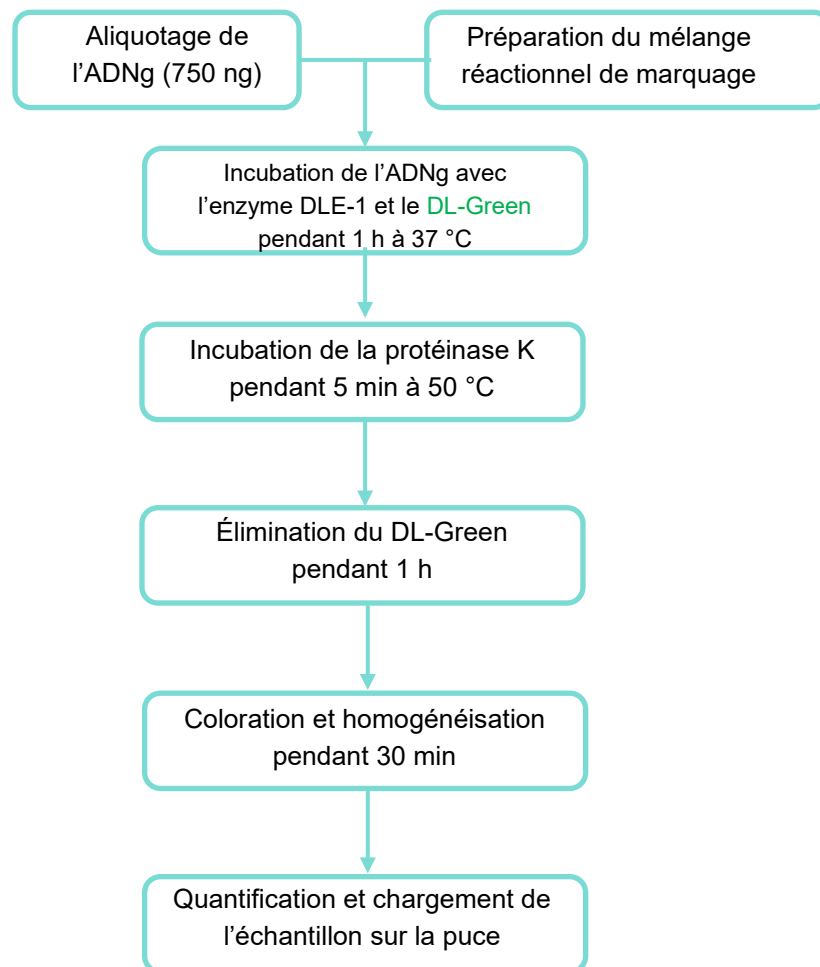
Historique des révisions

RÉVISION	REMARQUES
A	Publication initiale
B	Mise à jour du texte relatif aux étapes 9 et 11 à des fins de clarification.
C	Suppression des sections « Aide au dépannage » et « Foire aux questions ». Celles-ci sont désormais intégrées dans un document indépendant : CG-30608. Suppression des estimations de durée dans les étapes du protocole.

Vue d'ensemble du protocole Bionano Prep DLS-G2

Le kit Bionano Prep DLS-G2 (Direct Label and Stain-G2), avec son protocole, est un kit de marquage spécifique de séquence pour le marquage de l'ADNg génomique (ADNg) de très haut poids moléculaire, au moyen de l'enzyme de marquage direct DLE-1 (Direct Labeling Enzyme), en vue d'une utilisation sur la plateforme Bionano de cartographie optique du génome.

ÉTAPES DU PROTOCOLE



Matériel fourni dans le kit de marquage Bionano Prep DLS-G2 et matériel à fournir par l'utilisateur

Tableau 1. Contenu du kit de marquage Bionano Prep DLS-G2 (n° de réf. 80046)

Composant	N° de	Quantité	Conservation	Considérations de manipulation
10X DLE-1 (enzyme DLE-1 10X)	20430	44 µl	-25 °C à -15 °C	Le tube doit être tapoté trois fois pour en mélanger le contenu, puis centrifugé brièvement. À conserver sur un portoir réfrigérant de manière à maintenir la température de l'enzyme à -20 °C
20X DL-Green	20429	22 µl	-25 °C à -15 °C	À laisser décongeler à température ambiante. Puis à vortexer et à centrifuger brièvement. À conserver sur un portoir en aluminium, qui a été réfrigéré au préalable, jusqu'à utilisation.
5X DLE-1 Buffer (tampon DLE-1 5X)	20428	175 µl	-25 °C à -15 °C	À laisser décongeler à température ambiante. Puis à vortexer et à centrifuger brièvement. À conserver à température ambiante jusqu'à utilisation.
DNA Stain (colorant pour ADN)	20356	65 µl	-25 °C à -15 °C	À laisser décongeler à température ambiante. Puis à vortexer et à centrifuger brièvement. À conserver à température ambiante jusqu'à utilisation ; le DMSO contenu dans le colorant pour ADN cristallise lorsqu'il est placé sur de la glace.
10X DTT	20432	90 µl	-25 °C à -15 °C	À laisser décongeler à température ambiante. Puis à vortexer et à centrifuger brièvement. À conserver à température ambiante jusqu'à utilisation.
Protéinase K	20434	60 µl	2 °C à 8 °C	
4X Flow Buffer (tampon de flux 4X)	20431	225 µl	2 °C à 8 °C	À vortexer et à centrifuger brièvement. À conserver à température ambiante jusqu'à utilisation.
Ultra Pure Water (eau ultra pure)	20355	900 µl	2 °C à 30 °C	Peut être conservée à température ambiante.
Plaque 24 puits DLS	20357	Une plaque	15 °C à 30 °C	À conserver recouverte, pour éviter les dépôts de poussière.
Membranes DLS	20358	25	15 °C à 30 °C	À conserver à l'abri de de l'humidité.
DLS Tape Sheets (bandes de protection DLS)	20433	12	15 °C à 30 °C	
Tubes ambrés DLS	20437	14	15 °C à 30 °C	

Tableau 2. Matériel à fournir par l'utilisateur

Article	Fournisseur	N° de référence
Mélangeur d'échantillons HulaMixer	Thermo Fisher	15920D
Thermocycleur avec couvercle chauffant	Fournisseur de matériel de laboratoire général	
Tubes pour PCR, 0,2 ml, à paroi mince, avec capuchon plat, exempts de nucléases	Thermo Fisher ou équivalent	AM12225
Microtubes, 0,5 ml, ambrés, exempts de nucléases	USA Scientific ou équivalent	1605-0007
Embouts de pipette, sans filtre, 200 µl	USA Scientific ou équivalent	1111-1810
Embouts de pipette à large orifice, avec filtre, 200 µl	VWR, Rainin ou équivalent	46620-642

Article	Fournisseur	N° de référence
Embouts de pipette standard, avec filtre ; 2, 10, 20 et 200 µl	Fournisseur de matériel de laboratoire général	
Portoir réfrigérant de paillasse pour enzymes conçu pour maintenir la température à -20 °C	VWR ou équivalent	414004-286
Portoir en aluminium pour tubes, utilisé à 4 °C	Sigma Aldrich ou équivalent	Z740270
Pince courbe à bouts pointus	Electron Microscopy Sciences ou équivalent	78141-01
Pipettes (2, 10, 20 et 200 µl)	Fournisseur de matériel de laboratoire général	
Seau à glace et glace	Fournisseur de matériel de laboratoire général	
Agitateur vortex	VWR ou équivalent	10153-838
Microcentrifugeuse pour tubes de 0,2 ml, 0,5 ml et 1,5 ml	Fournisseur de matériel de laboratoire général	
Fluoromètre Qubit	Thermo Fisher	Q33238
Tubes de dosage Qubit®	Thermo Fisher	Q32856
Kit de dosage de l'ADN double brin Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity)	Thermo Fisher	Q32851
Bain à ultrasons (recommandé)	Branson ou équivalent	CPX 952-119R
Pipette à déplacement positif MR-10 (facultatif)	Rainin ou équivalent	17008575
Embouts de pipette C-10 pour pipette à déplacement positif, 10 µl (facultatif)	Rainin ou équivalent	17008604

Introduction et remarques importantes

INTRODUCTION

Ce protocole décrit une approche enzymatique pour le marquage fluorescent direct de l'ADN génomique (ADNg) de très haut poids moléculaire (longueur allant de quelques centaines de kilopaires de bases à quelques mégapaires de bases) par l'enzyme de marquage direct DLE-1 au niveau d'un motif de séquence spécifique. Ce marquage direct n'introduit pas de coupures dans l'ADN et permet aux utilisateurs de générer des cartes génomiques composées de très longues séquences contiguës, avec des N50 de 20 à 100 Mpb selon le génome et la qualité de l'échantillon.

Le kit Bionano Prep DLS-G2 contient les réactifs nécessaires pour marquer l'ADNg de très haut poids moléculaire au niveau d'une séquence spécifique en vue de réaliser une cartographie optique du génome sur le système Saphyr® de Bionano. Après le marquage spécifique de la séquence reconnue par l'enzyme DLE-1, l'ADN

marqué est coloré pour pouvoir visualiser le squelette de l'ADN. Ainsi, les fluorophores DL-Green apparaissent sous forme de marqueurs verts sur une molécule bleue lorsqu'ils sont affichés sur l'instrument Saphyr®.

La réaction DLE-1 en chiffres

Ce protocole permet d'obtenir 60 µl d'ADN marqué. Ce volume est suffisant pour être chargé sur une cellule Flowcell d'une puce Saphyr Chip® et il reste suffisamment d'échantillon pour une analyse supplémentaire en cas de rendement faible ou autre problème. La longueur du matériel de départ doit être au moins de l'ordre de plusieurs centaines de kilobases. Si nécessaire, la taille peut être déterminée par électrophorèse en champs pulsés (ou PFGE pour pulsed field gel electrophoresis en anglais). La densité du marquage est mesurée sur l'instrument Saphyr et exprimée en marqueurs pour 100 kilopaires de bases (kpb). D'autres paramètres liés au marquage peuvent être mesurés, notamment le taux de cartographie de la molécule analysée par rapport au génome de référence (map rate), le pourcentage de marqueurs présents en plus par rapport au génome de référence (positive label variance, PLV) et le pourcentage de marqueurs absents de la molécule par rapport au génome de référence (negative label variance, NLV). Consultez la section « Remarques importantes » ci-dessous pour plus d'informations.

Vous trouverez des informations détaillées sur les paramètres mesurés et les valeurs attendues dans le document Saphyr Molecule Quality Report Guidelines (n° de réf. 30223).

REMARQUES IMPORTANTES

POINTS GENERAUX

- Il est recommandé d'utiliser un portoir en aluminium réfrigéré au préalable sur de la glace pour conserver les réactifs décongelés et préparer les réactions de marquage.
- Les enzymes et les tampons doivent être prélevés avec précision, sans gouttelettes sur la partie extérieure de l'embout de la pipette. L'enzyme doit être transférée en totalité dans le tube, en évitant soigneusement la formation de bulles pour garantir la reproductibilité des réactions. Les meilleurs résultats sont obtenus en plaçant les tubes de réactif au niveau de l'œil au moment du prélèvement ou de la distribution afin de bien voir ce que l'on fait.
- Il est essentiel que le mélange réactionnel de marquage soit mélangé lentement et minutieusement à la pipette avec l'ADNg : cette étape favorise l'homogénéité de l'ADN qui est extrêmement visqueux et l'accessibilité de l'enzyme pour un marquage efficace.
- Ce protocole nécessite de manipuler des molécules fluorescentes sensibles à la lumière. Il est important de limiter le plus possible l'exposition à la lumière pendant les manipulations. Protégez de la lumière les réactions et les réactifs sensibles à la lumière pendant leur conservation.
- La concentration en ADN marqué est mesurée le Jour 1 ou 2, après le marquage, le nettoyage, l'homogénéisation et la coloration, et avant le chargement. L'homogénéité de l'ADN est évaluée en procédant à

deux quantifications (coefficient de variation [CV] < 0,30). Si l'ADN marqué est homogène, l'estimation de la concentration sera précise et le chargement de l'ADN sur la puce sera plus uniforme. La concentration de l'ADN marqué doit être comprise entre 4 et 16 ng/μl.

Capacité de traitement

- Il est possible de traiter jusqu'à 12 échantillons en même temps.
 - Chaque kit Bionano Prep DLS-G2 contient des réactifs en quantité suffisante pour traiter 12 échantillons.

Exigences relatives à l'ADN de départ

- L'échantillon doit contenir de l'ADNg d'une longueur de l'ordre de la mégabase, ce qui est généralement indiqué par une viscosité élevée et/ou vérifié par PFGE.
- La concentration de l'ADNg doit être comprise entre 39 et 150 ng/μl.
 - Les échantillons d'ADNg dont la concentration est > 150 ng/μl doivent être dilués avec du tampon TE (pH 8,0) pour obtenir une concentration comprise entre 50 et 150 ng/μl, mélangés à cinq reprises à l'aide d'une pipette avec un embout à large orifice et laissés à température ambiante pendant la nuit. Vérifiez la concentration finale de l'ADN et l'homogénéité de la solution avant le marquage.
 - Pour les échantillons d'ADNg dont la concentration est < 39 ng/μl, contactez l'assistance technique à l'adresse Support@bionanogenomics.com.

CONFIRMATION DE L'ENZYME A UTILISER POUR LE MARQUAGE

- Pour les échantillons non humains, il convient d'importer les données de séquence relatives à l'échantillon à analyser soit dans la fonction In Silico Digestion du logiciel Bionano Access®, soit dans le logiciel autonome [Label Density Calculator](#) pour s'assurer, avant de démarrer le protocole, que le marquage DLS-G2 est un choix approprié pour l'échantillon. La densité réelle du marquage doit se situer à ± 2 marqueurs de la densité du marquage attendue. Contactez l'assistance technique à l'adresse Support@bionanogenomics.com pour obtenir des conseils en cas de doute.
- Pour les échantillons non humains, les outils actuels d'analyse en aval sont les plus efficaces sur les génomes dont les densités du marquage DLS-G2 sont comprises entre 9 et 25 marqueurs pour 100 kpb.

MANIPULATION DE L'ADN GENOMIQUE

Généralités

- Ce protocole implique de manipuler de l'ADNg visqueux qui est difficile à pipeter avec exactitude. Il est essentiel de suivre toutes les étapes du protocole pour garantir un prélèvement précis de l'ADN, afin d'obtenir des rapports enzyme/ADN et ADN/colorant appropriés, et de limiter le plus possible les manipulations inutiles de l'ADNg, lesquelles sont susceptibles de conduire à des molécules de taille insuffisante pour l'analyse.

Ajout de l'ADNg à la réaction de marquage

- Pour garantir un prélèvement précis à partir de la solution initiale d'ADNg visqueux, il est nécessaire que la solution initiale d'ADN soit homogénéisée : une fois amenée à température ambiante, elle doit être mélangée délicatement à cinq reprises à l'aide d'une pipette avec un embout à large orifice. Il convient de suivre les directives ci-dessous pour assurer un pipetage correct par aspiration et refoulement avec une pipette standard, ou avec une pipette à déplacement positif, et une distribution complète.
- Avant de prélever l'ADNg visqueux dans un embout standard, pipetez un volume identique d'eau et indiquez le niveau de la solution sur l'embout avec un stylo à pointe fine pour servir de guide lors du piquetage de l'ADNg. Conservez l'embout avec le repère comme guide et utilisez-en un autre pour aspirer l'ADN. Il est également possible d'utiliser une pipette à déplacement positif pour que le pipetage de l'ADNg visqueux soit plus uniforme.
- Pour prélever l'ADNg visqueux dans un embout standard, tenez le tube contenant la solution initiale d'ADN de manière à le voir de près, poussez sur le piston de la pipette jusqu'à la première butée, immergez l'embout de la pipette jusqu'au milieu de la solution visqueuse et relâchez délicatement le piston, aussi **lentement** que possible, tout en déplaçant l'embout en un mouvement circulaire et en surveillant attentivement l'aspiration de l'ADN durant le procédé. Maintenez l'embout immergé même après que la solution d'ADN visqueux a cessé de monter et s'est stabilisée (utilisez l'embout avec le repère comme guide approximatif pour déterminer si la solution visqueuse atteint le niveau approprié). Cela peut prendre jusqu'à 30 secondes pour que l'ADN visqueux atteigne le niveau approprié. Un relâchement trop rapide du piston peut conduire à la formation d'une bulle dans l'embout et entraîner un prélèvement insuffisant (**REMARQUE** : l'utilisateur doit recommencer la procédure si cela se produit). Une fois que la solution dans l'embout de la pipette a atteint un niveau stable et avec l'embout encore immergé dans la solution d'ADN, frottez l'embout à cinq reprises contre le fond du tube en décrivant un mouvement circulaire. Retirez l'embout de la solution d'ADN et inspectez-le visuellement pour vérifier qu'il est rempli jusqu'au niveau approprié, en le comparant à l'embout avec le repère. Le retrait trop précoce de l'embout de la pipette hors de la solution d'ADNg ou un frottement inapproprié de l'embout sur le fond du tube peut entraîner la formation d'une bulle à l'extrémité de l'embout de la pipette, ce qui indique un prélèvement insuffisant (**REMARQUE** : l'utilisateur doit recommencer la procédure si cela se produit). **Il est possible de réaliser un pipetage précis de l'ADNg visqueux avec de la pratique et de la patience.**

- Pour déposer tout le volume d'ADNg visqueux dans un tube, tenez le tube à la main de manière à le voir de près et distribuez l'ADN en immergeant l'embout de la pipette dans la solution : tout en surveillant la sortie de l'ADN, appuyez délicatement sur le piston jusqu'à la première butée, puis jusqu'à la deuxième butée, jusqu'à ce que tout l'ADN soit sorti de l'embout. Dès qu'il n'y a plus d'ADN dans l'embout de la pipette, retirez immédiatement l'embout de la solution, tout en maintenant une pression constante pour éviter d'aspirer du liquide ou de faire entrer des bulles d'air. Inspectez visuellement l'embout après l'avoir sorti de la solution pour vérifier qu'il est vide.

Protocole Bionano Prep DLS-G2

PRÉPARATION

1. Laissez décongeler le DL-Green 20X. Vortexez-le bien, passez-le à la centrifugeuse et conservez-le sur de la glace dans un portoir en aluminium à 4 °C.
2. Laissez décongeler le tampon 5X DLE-1 Buffer. Vortexez-le bien et passez-le à la centrifugeuse. Conservez-le à température ambiante pour une utilisation ultérieure.
3. Tapotez à trois reprises le tube d'enzyme 10X DLE-1 puis passez-le à la centrifugeuse. Conservez-le sur la paillasse dans un portoir pour enzyme à -20 °C.
4. Sortez le tube d'eau ultra pure de son lieu de conservation à 4 °C (le cas échéant) et gardez-le à température ambiante.

MARQUAGE PAR L'ENZYME DLE-1

Dilution de l'ADNg et ajout du mélange réactionnel de marquage

5. Si l'ADNg a été quantifié selon les instructions du protocole Bionano Prep SP juste avant le marquage, passez à l'étape 6. Dans le cas contraire, passez l'ADNg à la centrifugeuse pendant 2 secondes et procédez à une nouvelle quantification avant de passer à l'étape 6.
6. Dans un tube pour PCR à paroi mince, ajoutez 750 ng d'ADNg (a) à de l'eau ultra pure (b) de manière à obtenir un volume total de 19,5 µl. Utilisez le **Tableau 3** pour consigner les volumes d'ADNg et d'eau pour chaque échantillon.
 - a. $750 \text{ ng} / (\text{concentration de l'ADNg } [\text{ng}/\mu\text{l}]) = \mu\text{l d'ADNg}$
 - b. $19,5 \mu\text{l} - (\mu\text{l d'ADNg}) = \mu\text{l d'eau ultra pure.}$

Tableau 2. Calcul de la quantité d'ADNg

ID de l'échantillon d'ADNg	Concentration de l'ADNg (ng/µl)	Volume d'eau ultra pure (µl)	Volume d'ADNg (µl)

ID de l'échantillon d'ADNg	Concentration de l'ADNg (ng/µl)	Volume d'eau ultra pure (µl)	Volume d'ADNg (µl)

7. Préparez un mélange réactionnel de marquage dans un tube ambré de 0,5 ml. Ajoutez les composants dans l'ordre indiqué dans le **Tableau 4**. Mélangez à cinq reprises par aspiration et refoulement de la totalité du volume à l'aide d'une pipette munie d'un embout standard, en prenant soin de ne pas faire de bulles. Passez le tube à la centrifugeuse pendant 2 secondes et conservez-le dans un portoir en aluminium sur de la glace jusqu'à utilisation. Utilisez le mélange réactionnel aussi vite que possible après en avoir mélangé les composants.

Tableau 4. Tableau de calcul pour la préparation du mélange réactionnel de marquage

Réaction de marquage	Volume pour un échantillon	Nb d'échantillons	Surplus de mélange réactionnel	Total mélange réactionnel
5X DLE-1 Buffer (tampon DLE-1 5X)	6,0 µl		× 1,2	µl
20X DL-Green	1,5 µl		× 1,2	µl
10X DLE-1	3,0 µl		× 1,2	µl
Volume total du mélange réactionnel	10,5 µl			µl

8. À l'aide d'un embout de pipette standard, ajoutez 10,5 µl de mélange réactionnel au-dessus des 19,5 µl (ADNg + eau ultra pure). Réglez la pipette sur 28 µl, mélangez lentement l'échantillon par aspiration et refoulement à cinq reprises (une aspiration + un refoulement = un mélange). Passez le tube à la centrifugeuse pendant 2 secondes. **ATTENTION : Protégez les échantillons de la lumière.** ⚠

REMARQUE : À toutes fins utiles, vous pouvez regarder la [vidéo](https://bionanogenomics.com/support-page/dna-labeling-kit-dls/) DLS Master Mix mixing à l'adresse <https://bionanogenomics.com/support-page/dna-labeling-kit-dls/>.

REMARQUE : Il est nécessaire de mélanger soigneusement et complètement l'échantillon pour que toutes les molécules soient correctement marquées. Aspirez l'échantillon depuis le fond du tube et déposez-le à proximité du haut (sans que l'embout de la pipette ne touche le tube) pour optimiser le mélange.

Réaction de marquage

9. Mettez les tubes à incuber dans un thermocycleur dont le couvercle chauffant est réglé sur 47 °C – ou sur « On » si aucun choix de température n'est disponible – :
 - a. Pendant 1 heure à 37 °C (température du thermocycleur)
 - b. Conservez à 4 °C jusqu'à l'étape suivante. **ATTENTION : Protégez les échantillons de la lumière.** ⚠

REMARQUE : Pendant l'incubation de la réaction de marquage dans le thermocycleur, préparez la microplaque pour le nettoyage du DL-Green (étape 12).

DIGESTION À LA PROTÉINASE K

10. Distribuez 5 µl de protéinase K directement au milieu de l'échantillon contenu dans le tube pour PCR. Pour éviter de retirer par inadvertance de l'ADN qui pourrait adhérer à l'embout, ne mélangez pas.
11. Mettez à incuber dans un thermocycleur dont le couvercle chauffant est réglé sur 60 °C – ou sur « On » si aucun choix de température n'est disponible – :
 - a. Pendant 5 minutes à 50 °C (température du thermocycleur)
 - b. Conservez à 4 °C jusqu'à l'étape suivante. Après avoir retiré le tube du thermocycleur, passez rapidement à l'étape suivante. Centrifugez brièvement. **ATTENTION : Protégez les échantillons de la lumière.** ⚠

NETTOYAGE DU DL-GREEN

Adsorption sur membrane dans la microplaque

REMARQUE : Les membranes peuvent être humidifiées dès que la réaction de marquage est mise en route. Assurez-vous de fermer la plaque avec une bande de protection DLS de manière à assurer son étanchéité jusqu'à son utilisation.

REMARQUE : Pour les étapes 12 et 13, veuillez regarder la vidéo intitulée [DLS Membrane Demo](#) dans la partie Support du site internet de Bionano Genomics pour le [kit de marquage DLS](#).

12. Pour chaque échantillon, humidifiez la face inférieure d'une membrane DLS avec du tampon DLE-1 1X dans la microplaque fournie par Bionano :
 - a. Pour chaque échantillon, préparez 30 µl de tampon DLE-1 1X (6 µl de 5X DLE-1 Buffer + 24 µl d'eau ultra pure). Vortexez pour mélanger. Passez à la centrifugeuse pendant 2 secondes.
 - b. Déposez 25 µl de tampon DLE-1 1X au centre d'un puits de la microplaque DLS.
 - c. Utilisez une pince à bout rond pour placer une membrane DLS sur le tampon.

- d. Apposez immédiatement une bande de protection DLS sur les puits pour éviter toute évaporation jusqu'à ce que vous soyez prêt à poursuivre.

REMARQUE : Assurez-vous que les membranes sont entièrement humidifiées au bout de trois minutes. Les membranes humidifiées ont un aspect bleu translucide uniforme sur toute leur surface. Si une membrane n'est pas humidifiée au bout de trois minutes, veuillez jeter la membrane et en humidifier une nouvelle. Contactez support@bionanogenomics.com pour toute question.

13. Nettoyez le DL-Green en déposant l'échantillon d'ADN marqué au centre de la membrane humidifiée :
 - a. À l'aide de la pipette munie d'un embout standard de 200 µl et réglée sur 37 µl, déposez la totalité du volume (environ 35 µl) d'ADN marqué au milieu de la membrane DLS.
 - b. Apposez une bande de protection DLS sur les puits contenant une membrane : tout en tenant la microplaque, appliquez une pression pour fixer la bande scellante sur le bord supérieur des puits afin d'éviter toute évaporation.
 - c. **ATTENTION : Protégez la microplaque de la lumière (couvercle)** ⚠ et laissez incuber à température ambiante pendant 1 heure. Assurez-vous que la plaque reste intacte et qu'elle n'est pas déplacée de manière accidentelle pendant l'incubation.
14. Pendant la période d'incubation de 1 heure, faites revenir les tubes de 10X DTT, 4X Flow Buffer et DNA Stain à température ambiante. Une fois décongelés, vortexez bien tous les tubes et centrifugez brièvement pour faire descendre le contenu au fond des tubes. Maintenez tous les tubes à température ambiante jusqu'à ce que vous soyez prêt à les utiliser.
15. Au bout d'1 heure, tenez fermement la plaque et retirez délicatement la bande de protection DLS.
16. À l'aide de la pipette munie d'un embout standard de 200 µl et réglée sur 35 µl, aspirez lentement la totalité de l'échantillon marqué en restant perpendiculaire à la membrane lorsque vous la touchez. Déplacez l'embout sur toute la zone contenant l'ADN lorsque vous aspirez pour récupérer l'ADN. Transférez l'ADN dans un nouveau tube pour PCR ou dans un microtube de 0,5 ml. Passez-le à la centrifugeuse pendant 2 secondes. **ATTENTION : Protégez les tubes de la lumière (couvercle)**. ⚠
17. À l'aide d'une pipette de 200 µl, transférez 20 µl de l'échantillon marqué du tube pour PCR ou du tube ambré de 0,5 ml dans un tube ambré à fond rond DLS (2 ml) et passez à l'étape suivante (coloration et homogénéisation de l'ADN).
 - a. Si le volume d'échantillon récupéré est < 20 µl, portez le volume à un total de 20 µl en ajoutant du tampon DLE-1 1X.

COLORATION ET HOMOGENÉISATION DE L'ADN

18. Préparez le mélange réactionnel de coloration selon le **Tableau 5**.

Tableau 3. Tableau de calcul pour la préparation du mélange réactionnel de coloration

Réaction de coloration	1 échantillon	Nb d'échantillons	Surplus de mélange réactionnel	Total mélange réactionnel
4X Flow Buffer	15 µl		× 1,25	µl
10X DTT	6 µl		× 1,25	µl
DNA Stain	3,5 µl		× 1,25	µl
Eau ultra pure	15,5 µl		× 1,25	µl
Volume total du mélange réactionnel de coloration	40 µl			µl

REMARQUE : Le tampon Flow Buffer est visqueux, par conséquent pipetez lentement les solutions qui en contiennent pour davantage de précision.

19. Pour chaque ADN marqué, ajoutez 40 µl de mélange réactionnel de coloration sur le dessus de l'échantillon marqué (20 µl) contenu dans le tube ambré à fond rond DLS (2 ml). Ne mélangez pas.

REMARQUE : Le mélange réactionnel est distribué au-dessus de la solution afin d'éviter de prélever par inadvertance de l'ADN qui pourrait adhérer à l'embout de la pipette.

20. Placez les tubes ambrés à fond rond DLS contenant les échantillons dans un mélangeur HulaMixer (Thermo Fisher) avec une vitesse réglée sur 5 tours par minute (tr/min). La surface du portoir de tubes doit être horizontale et parallèle à la surface de travail. Mélangez pendant 30 minutes à température ambiante en désactivant toutes les options hormis la rotation.

21. Au bout de 30 minutes, sortez les échantillons du HulaMixer. Passez-les à la centrifugeuse pendant 2 secondes.

REMARQUE : Ne laissez pas la rotation se poursuivre pendant plus de 30 minutes car cela pourrait diminuer la N50 de la molécule.

22. Si vous souhaitez procéder à l'acquisition des données le même jour, passez immédiatement à l'étape de quantification avant de charger les échantillons sur la puce Saphyr Chip. Sinon, conservez les échantillons à 4 °C, à l'abri de la lumière. ⚠

(Le protocole se poursuit ci-dessous ; fin potentielle du Jour 1, si souhaité.)

REMARQUE : Consultez la liste des consommables et équipements à fournir par l'utilisateur pour vous assurer que vous disposez de tout le nécessaire.

QUANTIFICATION DE L'ADN MARQUÉ ET COLORÉ

Déterminez la concentration finale de l'ADN marqué et coloré avant de le charger sur la puce Saphyr Chip. Une concentration en ADN (moyenne de deux mesures) comprise entre 4 et 16 ng/µl permet d'obtenir les meilleurs résultats. Les variations au niveau de la concentration finale sont dues aux difficultés rencontrées pour prélever avec précision l'ADN visqueux de départ et à la variabilité de la récupération de l'ADN à l'étape de l'élimination du DL-Green. Si la concentration de l'échantillon ne se situe pas dans l'intervalle recommandé, consultez le Guide d'aide au dépannage (CG-30608) pour obtenir des recommandations.

Kit de dosage de l'ADN double brin Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity) et fluoromètre Qubit :

REMARQUE : Le protocole standard du dosage Qubit dsDNA HS ne donnera pas des mesures exactes de la concentration de l'ADN marqué en raison de sa longueur extrêmement importante. Le protocole Qubit a donc été modifié pour inclure une étape de sonication qui va fragmenter une aliquote de l'ADN marqué et permettre d'obtenir des mesures exactes de la concentration. Reportez-vous au manuel d'utilisation du kit de dosage Qubit dsDNA HS pour obtenir des informations détaillées sur le kit.

1. À l'aide d'une pipette de 200 µl munie d'un embout à large orifice et réglée sur 50 µl, mélangez l'ADN marqué et coloré à cinq reprises. Passez-le à la centrifugeuse.
2. Laissez les étalons Qubit HS Standards et l'ADN marqué revenir à température ambiante pendant au moins 30 minutes.
3. Préparez des tubes de dosage Qubit de 0,5 ml :
 - a. deux tubes de dosage distincts pour la mesure des étalons, contenant chacun 10 µl de tampon Qubit HS Buffer ;
 - b. deux tubes de dosage distincts par échantillon marqué, chacun contenant 18 µl de tampon Qubit HS Buffer.
4. À l'aide d'une pipette standard ou d'une pipette à déplacement positif, prélevez deux aliquotes distinctes de 2 µl à partir de chaque échantillon et transférez chacune dans un tube de dosage Qubit contenant 18 µl de tampon HS Qubit Buffer, en plongeant l'embout dans le tampon. Placez les tubes Qubit dans un portoir flottant et soniquez dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes. Pendant la sonication, préparez la solution de travail comme décrit à l'étape 5.

REMARQUE : Si vous remarquez un long filament d'ADN fixé à l'embout lorsque vous sortez l'embout du tube, remettez l'échantillon dans le tube et répétez le prélèvement de l'aliquote avec un nouvel embout.

- a. En l'absence de bain à ultrasons, vortexez pendant au moins 30 secondes à vitesse maximale, puis passez brièvement à la centrifugeuse pendant 2 secondes.
 5. Préparez la solution de travail en diluant le réactif Qubit dsDNA HS Reagent dans le tampon de dilution HS Dilution Buffer (1:200) :
 - a. préparez 200 µl de solution de travail pour chacun des deux étalons (400 µl au total) ;
 - b. préparez 200 µl de solution de travail pour chaque aliquote d'échantillon (400 µl pour chaque échantillon).
 6. Pour les étalons d'ADN Qubit, ajoutez 10 µl des étalons Standards 1 et 2 dans les tubes de dosage Qubit soigneusement étiquetés qui ont été préparés à l'étape 3a avec 10 µl de tampon Qubit HS.
 7. Une fois la sonication terminée, sortez les tubes de dosage et centrifugez-les brièvement pour faire descendre la solution au fond des tubes. Vortexez les tubes pendant 5 secondes à vitesse maximale, puis passez-les à la centrifugeuse pendant 2 secondes.
 8. Ajoutez 180 µl de solution de travail (préparée à l'étape 5) dans chaque tube d'ADN marqué et soniqué, et dans chaque tube contenant un mélange étalon d'ADN Qubit plus tampon HS Buffer. Vortexez pendant 5 secondes et centrifugez brièvement pour faire descendre la solution au fond des tubes.
 9. Laissez incuber les échantillons dans l'obscurité pendant 2 minutes avant de procéder à la quantification sur le fluoromètre Qubit.
- REMARQUE** : La concentration de l'ADN marqué doit dans l'idéal se situer entre 4 et 16 ng/µl avec un CV (écart-type ÷ moyenne) entre les mesures < 0,30. Si les deux mesures se situent en dehors de l'intervalle allant de 4 à 16 ng/µl, consultez le Guide d'aide au dépannage (CG-30608). Si une mesure se situe entre 4 et 16 ng/µl et que l'autre est en dehors de cet intervalle, procédez comme suit :
- ❖ Si une mesure se situe entre 4 et 16 ng/µl et que l'autre est supérieure à 16 ng/µl, passez au chargement de la puce.
 - ❖ Si une mesure se situe entre 4 et 16 ng/µl et que l'autre est inférieure à 4 ng/µl, mélangez à nouveau avec le HulaMixer pendant 30 minutes (en repartant de l'étape 20 dans la section « Coloration et homogénéisation de l'ADN ») et recommencez la quantification.
10. Consignez les mesures Qubit dans le **Tableau 6**.
 11. Si les échantillons ne sont pas analysés immédiatement, conservez-les dans l'obscurité à 4 °C jusqu'à utilisation.

Tableau 6. Mesures Qubit de l'ADNg

ID de l'échantillon	Mesure 1 (ng/µl)	Mesure 2 (ng/µl)	Moyenne (ng/µl)	CV (ÉT/moyenne)
---------------------	---------------------	---------------------	--------------------	--------------------

CHARGEMENT DE LA PUCE SAPHYR CHIP

Reportez-vous au **Saphyr System User Guide** correspondant à votre système Saphyr (n° de réf. [60325](#) ou [60239](#)) pour des instructions complètes sur le chargement de la puce et le fonctionnement de l'instrument.

REMARQUE : Pour procéder au chargement de la puce, prélevez l'échantillon marqué DLS en aspirant dans le milieu du tube.

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 fichiers de foire aux questions et d'autres documents associés dans la partie Support du site internet de Bionano Genomics, ou sur demande par e-mail et par téléphone.

TYPE	CONTACT
E-mail	support@bionanogenomics.com
Phone	Heures d'ouverture : du lundi au vendredi, de 9 h 00 à 17 h 00, Heure normale du Pacifique États-Unis : +1 (858) 888-7663
Site internet	www.bionanogenomics.com/support
Adresse	Bionano Genomics, Inc. 9540 Towne Centre Drive, Suite 100 San Diego, CA 92121