



Protocole Bionano Prep SP-G2 pour l'extraction d'ADN à partir de culots de cellules fraîches

NUMÉRO DU DOCUMENT :

CG-00003-5

RÉVISION DU DOCUMENT :

B

Date d'entrée en vigueur : 01/08/2023

Table des matières

Mention légale	3
Brevets	3
Marques de commerce	3
Historique des révisions	4
Résumé du protocole	5
Matériel fourni dans le kit Bionano Prep SP-G2 d'extraction d'ADN à partir de sang et de cultures cellulaires, et matériel à fournir par l'utilisateur	6
Contenu du kit Bionano Prep SP-G2 d'extraction d'ADN à partir de sang et de cultures cellulaires (n° de réf. 80060, 12 préparations)	6
Matériel et équipement à fournir par l'utilisateur	7
Introduction et remarques importantes	8
Introduction.....	8
Vue d'ensemble	8
Remarques importantes	8
Protocole Bionano Prep SP-G2 pour l'extraction d'ADN à partir de culots de cellules fraîches	11
Préparation pour l'extraction de l'ADNg (30 minutes).....	11
Extraction de l'ADNg (jusqu'à 3 heures).....	12
Homogénéisation de la solution d'ADNg (70 minutes)	18
Quantification de l'ADNg (45 minutes).....	18
Assistance technique	20

Mention 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 ou dans un autre format. Les données techniques contenues dans les présentes sont réservées aux destinations ultimes autorisées par la loi 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, Y COMPRIS, MAIS SANS S'Y LIMITER, CELLES DE QUALITÉ MARCHANDE OU D'ADAPTATION À UN USAGE 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 DÉLIT, 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 DU PRÉSENT DOCUMENT, NOTAMMENT ENTRE AUTRES QUANT À L'UTILISATION DE CELUI-CI, QUE CES DOMMAGES SOIENT OU NON PRÉVISIBLES ET QUE BIONANO GENOMICS AIT ÉTÉ AVERTI OU NON DE LA POSSIBILITÉ DESDITS DOMMAGES.

Brevets

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

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.

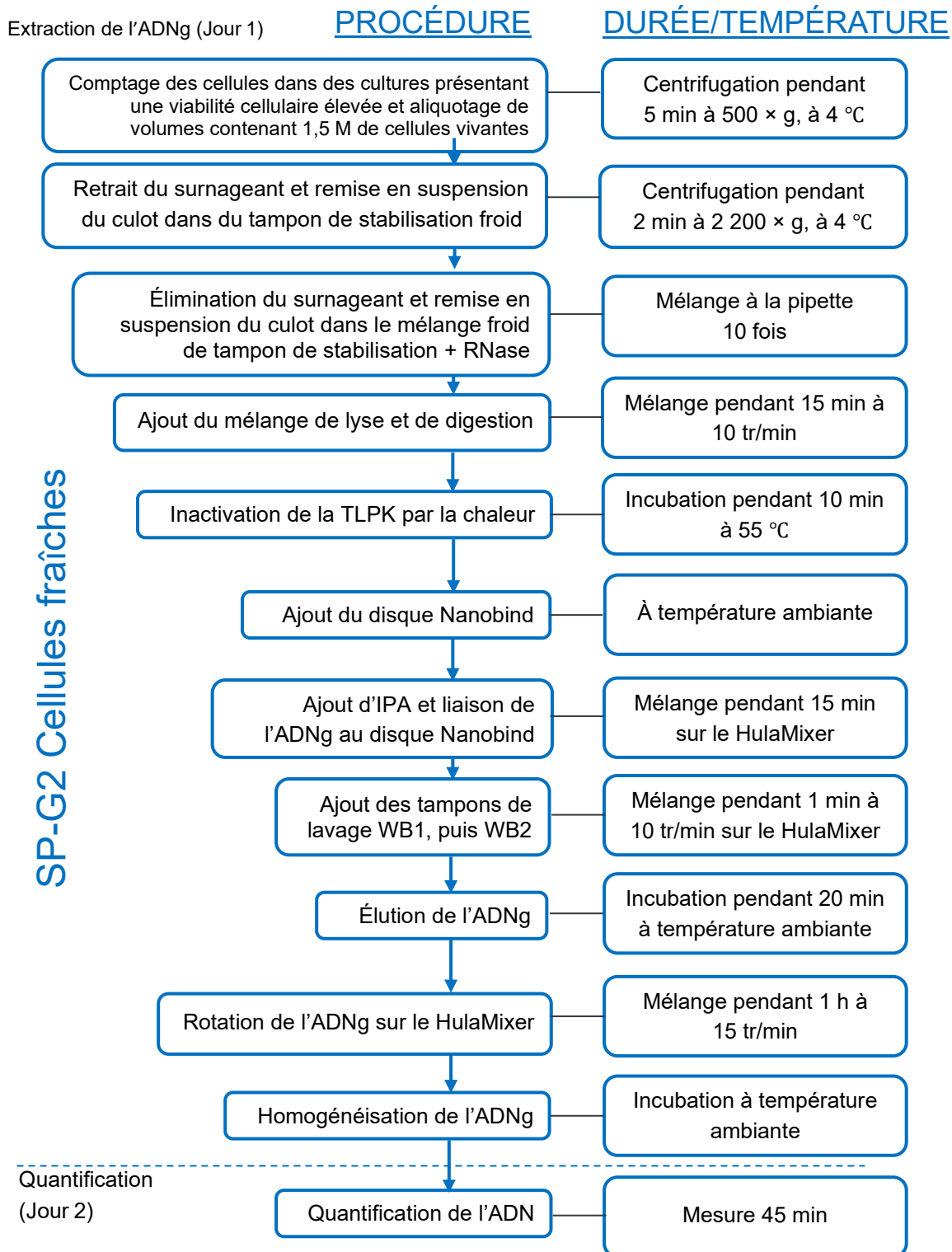
Aucune licence d'utilisation d'aucune marque de commerce de Bionano Genomics n'est accordée de manière expresse ou implicite. Les utilisateurs ne sont pas autorisés à utiliser ces marques de commerce sans le consentement écrit préalable de Bionano Genomics. L'utilisation de ces marques de commerce ou 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 autres lois en vigueur.

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

Historique des révisions

RÉVISION	REMARQUES
A	Sortie commerciale.
B	Modifications de la mise en forme générale pour diffusion.

Résumé du protocole



Matériel fourni dans le kit Bionano Prep SP-G2 d'extraction d'ADN à partir de sang et de cultures cellulaires, et matériel à fournir par l'utilisateur

Contenu du kit Bionano Prep SP-G2 d'extraction d'ADN à partir de sang et de cultures cellulaires (n° de réf. 80060, 12 préparations)

Article	Quantité	N° de référence	Conservation
RBC Lysis (Lyse des érythrocytes)*	18 ml	20442	Température ambiante (15 °C à 30 °C)
Cell Buffer (Tampon pour cellules)	50 ml	20374	Température ambiante (15 °C à 30 °C)
Digestion Enhancer (Amplificateur de digestion)	4,0 ml	20443	Température ambiante (15 °C à 30 °C)
Lysis and Binding Buffer (LBB, Tampon de lyse et de liaison)**	1,2 ml	20444	Température ambiante (15 °C à 30 °C)
Wash Buffer 1 (WB1, Tampon de lavage 1)**	4,5 ml	20445	Température ambiante (15 °C à 30 °C)
Wash Buffer 2 (WB2, Tampon de lavage 2)	6,0 ml	20446	Température ambiante (15 °C à 30 °C)
Elution Buffer (EB, Tampon d'élution)	1,1 ml	20378	Température ambiante (15 °C à 30 °C)
DE Detergent (Détergent DE)	55 µl	20447	Température ambiante (15 °C à 30 °C)
Disques Nanobind de 4 mm	12	20448	Température ambiante (15 °C à 30 °C)
Tubes de microcentrifugation Protein LoBind, 1,5 ml	2 × 12	20449	Température ambiante (15 °C à 30 °C)
Tubes de microcentrifugation Protein LoBind, 0,5 ml	12	20450	Température ambiante (15 °C à 30 °C)
Gainex en plastique pour le récupérateur magnétique	12	20451	Température ambiante (15 °C à 30 °C)
Tubes de microcentrifugation, 2,0 ml	12	20452	Température ambiante (15 °C à 30 °C)
DNA Stabilizer (Stabilisateur d'ADN)	350 µl	20423	Température ambiante (15 °C à 30 °C)
RNase A	150 µl	20455	Au réfrigérateur (2 °C à 8 °C)
Ultrapure Water (Eau ultra-pure)	2 × 900 µl	20355	Au réfrigérateur (2 °C à 8 °C)
Thermolabile Proteinase K (TLPK, Protéinase K thermolabile)	150 µl	20441	Au congélateur (-15 °C à -25 °C)

* Non utilisé dans ce protocole.

** Voir la section Remarques importantes sur l'élimination des déchets dangereux.

Matériel et équipement à fournir par l'utilisateur

Article	Fournisseur	N° de référence
Jour 1 – Formation des culots cellulaires, extraction de l'ADNg et homogénéisation		
Récupérateur magnétique Bionano Prep SP (sachet de 2)	Bionano Genomics (kit de formation)	80031
Hémocytomètre et microscope à contraste de phase ou automate de numération cellulaire	Fournisseur de matériel de laboratoire général	
Pipettes sérologiques, stériles	Fournisseur de matériel de laboratoire général	
Pipeteur	Fournisseur de matériel de laboratoire général	
Aimant DynaMag-2 et son portoir à tubes	Thermo Fisher	12321D
Mélangeur d'échantillons HulaMixer	Thermo Fisher	15920D
Tubes de microcentrifugation, 2,0 ml, exempts de nucléases	Fisher Scientific ou équivalent	05-408-138
Tubes de microcentrifugation, 5,0 ml, exempts de nucléases	Thomas Scientific ou équivalent	1201T80
Éthanol absolu (200 Proof) pour biologie moléculaire	Sigma-Aldrich	E7023
Isopropanol (IPA) ≥ 99,5 % pour biologie moléculaire	Fisher Scientific	A461-212
Eau de Javel pour l'élimination des déchets liquides présentant un risque biologique	Fournisseur de matériel de laboratoire général	
Tubes de centrifugation coniques, 50 ml, polypropylène	Thermo Fisher ou équivalent	14-432-22
Tubes de centrifugation coniques, 15 ml, polypropylène	Thermo Fisher ou équivalent	05-539-12
Centrifugeuse équipée d'un rotor à godets oscillants pour tubes coniques de 15 ml	Fournisseur de matériel de laboratoire général	
Centrifugeuse réfrigérée équipée d'un rotor pour tubes de 1,5 ml (centrifugation à 2 200 g)	Cole-Parmer ou équivalent	EW-17701-11
Bain-marie, 37 °C	Fournisseur de matériel de laboratoire général	
Milieux de culture cellulaire	Fournisseur de matériel de laboratoire général	
Seau à glace et glace	Fournisseur de matériel de laboratoire général	
Mélangeur thermique de type ThermoMixer, 55 °C	Eppendorf ou équivalent	5382000023
Parafilm	Fournisseur de matériel de laboratoire général	
Pince à bouts pointus	Electron Microscopy Sciences ou équivalent	78141-01
Embouts de pipette de 200 µl à large orifice, avec filtre	VWR ou équivalent Rainin	46620-642
Embouts extra-longs de 1 000 µl, avec filtre, stériles	VWR ou équivalent	76322-154
Pipettes (10, 20, 200 et 1 000 µl) et embouts de pipette avec filtre exempt de nucléases	Fournisseur de matériel de laboratoire général	
Bloc de refroidissement en aluminium pour tubes de 1,5 ml et 2,0 ml (facultatif)	Sigma Aldrich ou équivalent	Z743497
Jour 2 – Quantification		
Agitateur vortex de pailasse	VWR ou équivalent	10153-838
Bain à ultrasons	Fournisseur de matériel de laboratoire général	
Tube conique de 15 ml	Fisher Scientific	05-539-12
Fluoromètre, Qubit	Thermo Fisher ou équivalent	Q33216
Kit de dosage de l'ADN double brin Qubit dsDNA BR (Broad Range)	Thermo Fisher ou équivalent	Q32853
Tubes de dosage Qubit	Thermo Fisher	Q32856
Pipette à déplacement positif MR-10 (facultatif)	Rainin ou équivalent	17008575
Embouts de pipette C10 de 10 µl pour pipette à déplacement positif (facultatif)	Rainin ou équivalent	17008604

Introduction et remarques importantes

Introduction

Ce protocole, Bionano Prep® SP-G2 pour l'extraction d'ADN à partir de culots de cellules fraîches, permet d'obtenir de l'ADN génomique (ADNg) de très haut poids moléculaire en moins de quatre heures à partir de 1,5 million de cellules fraîchement mises en culture. Il utilise une procédure améliorée de lyse, de liaison, de lavage et d'élution, qui est courante dans les technologies d'extraction d'ADNg à base de silice, en l'associant à un nouveau disque paramagnétique. Contrairement aux billes magnétiques et aux colonnes de silice à centrifuger, qui cisailent l'ADNg de grande taille, le disque Nanobind lie et libère l'ADNg en entraînant nettement moins de fragmentation, ce qui permet d'obtenir de l'ADNg de très haut poids moléculaire. La partie extérieure du disque paramagnétique thermoplastique est faite d'une nouvelle nanostructure de silice qui lie particulièrement bien l'ADNg. Ce protocole a été évalué sur une lignée de cellules lymphoblastoïdes humaines immortalisées par le virus d'Epstein Barr (EBV) (GM12878) qui se multiplie en culture en suspension. L'ADNg préparé au moyen de ce protocole a été validé uniquement avec un marquage DLS (Direct Label and Stain). Pour les étapes délicates sur le plan technique et pour l'aide au dépannage, visionnez la [Vidéo de formation](#). Les étapes abordées correspondent à des étapes du protocole SP-G2 réalisé à partir de sang humain congelé, mais les procédures sont identiques à celles décrites dans le présent document.

Vue d'ensemble

La lyse cellulaire et la digestion par la protéinase K thermolabile ont lieu dans un tampon chaotropique ; 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 où 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 en faciliter l'homogénéité, puis sa concentration est déterminée. Généralement, la taille de l'ADNg est comprise entre 50 kpb et ≥ 1 Mpb.

Remarques importantes

HOMOGENEITE DE L'ADN

L'ADNg récupéré est mélangé à la pipette avec un embout standard de 200 μ l pour améliorer son homogénéité et garantir ainsi un prélèvement uniforme pour le marquage.

QUANTIFICATION DE L'ADNg

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

Pour évaluer l'homogénéité de l'ADNg, il est essentiel de mesurer la concentration de l'ADNg à plusieurs endroits dans la solution. Étant donné que l'ADNg est visqueux et donc difficile à pipeter, suivez les indications données dans la section Remarques importantes pour faire en sorte de procéder à un pipetage précis. Les mesures fournies par les dosages standard ne sont pas précises avec un ADNg de grande taille en raison de sa nature visqueuse :

- il est nécessaire de procéder à la sonication des échantillons d'ADNg pour obtenir une quantification précise ;
- en général, la concentration de l'ADNg est comprise entre 45 ng/ μ l et 120 ng/ μ l.

PIPETAGE D'ADNg VISQUEUX

Pour prélever de l'ADNg visqueux, tenez le tube contenant la solution initiale d'ADN de manière à le voir de près, appuyez sur le piston de la pipette jusqu'à la première butée, plongez l'embout de la pipette dans la solution et relâchez délicatement et lentement le piston pour commencer à aspirer l'ADNg visqueux, tout en surveillant attentivement l'aspiration dans l'embout. Maintenez l'embout immergé même après que la solution visqueuse a cessé de monter et s'est stabilisée. Soyez patient(e). Cela peut prendre quelques secondes pour prélever un volume d'ADNg visqueux de 2 µl. Un relâchement trop rapide du piston peut conduire à la formation d'une bulle dans l'embout et entraîner un prélèvement insuffisant (il faudra recommencer la procédure si cela se produit). Une fois que la solution dans l'embout de la pipette a atteint un niveau stable et pendant que l'embout est encore immergé dans la solution d'ADNg, frottez-le trois à cinq fois contre le fond du tube en décrivant un mouvement circulaire. Retirez l'embout de la solution d'ADNg et inspectez-le visuellement pour vérifier qu'il est rempli jusqu'à 2 µl. Le retrait trop précoce de l'embout de la pipette hors de la solution d'ADNg ou un frottement inefficace de l'embout pour casser les brins d'ADNg peut également entraîner la formation d'une bulle à l'extrémité de l'embout de la pipette, ce qui indique un prélèvement insuffisant (il faudra recommencer la procédure si cela se produit).

MANIPULATION DE L'ADNg

- Mélangez toujours l'ADNg récupéré (après les étapes d'homogénéisation) à l'aide d'un embout de pipette à large orifice pour éviter toute fragmentation.
- L'ADNg récupéré ne doit jamais être congelé ou vortexé.
- L'ADNg peut perdre son homogénéité s'il est conservé pendant une durée prolongée.
- Pipetez toujours l'ADNg récupéré avec un embout à orifice standard ou une pipette à déplacement positif pour un prélèvement précis.

CARACTERISTIQUES D'UN ADNg DE GRANDE QUALITE POUR LA CARTOGRAPHIE BIONANO

- Dans l'idéal, la solution d'ADNg doit être limpide mais si ce n'est pas le cas, ce n'est pas toujours un signe de mauvaise qualité de l'échantillon.
- La solution d'ADNg récupéré est visqueuse.
- La présence d'ADNg d'une taille de l'ordre de la mégabase est déterminée par électrophorèse en champs pulsés (PFGE pour pulsed field gel electrophoresis en anglais).
- L'ADNg récupéré est homogène si la quantification de l'ADNg obtenue avec le kit de dosage Qubit est associée à un coefficient de variation (CV) $\leq 0,30$ (recommandé).

UTILISATION DU RECUPERATEUR MAGNETIQUE BIONANO PREP SP

1. Tenez une gaine en plastique par les côtés, à proximité du haut, et insérez le récupérateur magnétique Bionano Prep SP dans la gaine, en le positionnant de manière à ce qu'il repose au fond.
2. Insérez le récupérateur recouvert de la gaine dans un tube de microcentrifugation Protein LoBind de 1,5 ml pour attirer le disque Nanobind vers le récupérateur recouvert de la gaine.
3. Soulevez doucement le récupérateur recouvert de la gaine avec le disque accroché pour le sortir du tube et insérez le récupérateur dans un tube de microcentrifugation Protein LoBind de 0,5 ml jusqu'à ce que le disque soit calé délicatement au fond du tube.
4. En tenant la gaine par le côté à proximité du haut, remontez le récupérateur avec une main jusqu'à ce que le disque Nanobind se détache de la gaine et reste dans le tube Protein LoBind de 0,5 ml.
5. Changez de gaine pour chaque nouvel échantillon.

CAPACITE DE TRAITEMENT RECOMMANDEE

Il est recommandé de ne pas traiter plus de six échantillons à la fois et de ne pas dépasser deux lots par journée de travail.

ÉLIMINATION DES DECHETS DANGEREUX

Les tampons Digestion Enhancer, 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. Il NE doit PAS être mélangé avec de l'eau de Javel ou des réactifs acides. Les déchets liquides contenant du GuHCl doivent être décontaminés avec un désinfectant à base d'ammonium quaternaire dans de bonnes conditions de sécurité avant d'être jetés avec les déchets dangereux. Nous recommandons de décontaminer le surnageant du culot avec de l'eau de Javel et de respecter les réglementations locales en matière d'environnement, de santé et de sécurité pour décontaminer et éliminer toutes les solutions contenant du GuHCl.

Protocole Bionano Prep SP-G2 pour l'extraction d'ADN à partir de culots de cellules fraîches

Préparation pour l'extraction de l'ADNg (30 minutes)

AVANT LA PREMIERE UTILISATION

1. Ajoutez de l'éthanol 100 % dans les tampons de lavage WB1 et WB2, et mélangez soigneusement :
 - a. ajoutez 6,75 ml d'éthanol 100 % au tampon de lavage WB1 pour obtenir un volume final de 11,25 ml ;
 - b. ajoutez 9,00 ml d'éthanol 100 % au tampon de lavage WB2 pour obtenir un volume final de 15,00 ml.

MISE EN PLACE

1. Rassemblez le matériel et vérifiez l'équipement nécessaire (voir la section « Matériel à fournir par l'utilisateur » ci-dessus).
 - a. Réglez le bain-marie sur 37 °C. Vérifiez la température avec un thermomètre.
 - b. Préchauffez les milieux de culture cellulaire au bain-marie à 37 °C.
 - c. Préparez l'hémacytomètre et le microscope à contraste de phase ou l'automate de numération cellulaire.
 - d. Vérifiez que vous avez accès à une centrifugeuse équipée d'un rotor à godets oscillants compatible avec des tubes coniques de 15 ml. Réglez les paramètres de centrifugation sur 500 × g, à température ambiante.
 - e. Mettez la microcentrifugeuse pour tubes de microcentrifugation de 1,5 ml à refroidir à 4 °C. Réglez les paramètres de centrifugation sur 500 × g, pendant 5 minutes.
 - f. Préparez des pipettes et des embouts.
 - g. Préparez un seau à glace avec de la glace.
 - h. Pour l'élimination des déchets, préparez :
 - un tube conique de 50 ml contenant 5 ml d'eau de Javel + 20 ml d'eau ; retournez-le plusieurs fois pour mélanger ;
 - un tube conique de 50 ml destiné aux déchets liquides contenant du GuHCl (que vous éliminerez en tant que déchets dangereux conformément aux réglementations locales en matière d'environnement, de santé et de sécurité).
 - i. Nommez le nombre souhaité de tubes de microcentrifugation Protein LoBind de 1,5 ml pour les culots de cellules (jusqu'à six). Mettez les tubes sur de la glace.
 - j. Mélangeur d'échantillons HulaMixer.
 - k. IPA 100 %.
 - l. Aimant DynaMag-2 et son portoir à tubes.
 - m. Récupérateur magnétique Bionano Prep SP.
 - n. Réglez un ThermoMixer sur 55 °C, pendant 10 minutes, sans agitation.
 - o. Pince à bouts pointus.
 - p. Nommez un tube de 2,0 ml (si vous préparez trois échantillons ou moins) ou un tube de 5,0 ml (pour quatre à six échantillons) pour le mélange réactionnel de lyse et de digestion.

2. Rassemblez les réactifs et matériels suivants du kit SP-G2 : Cell Buffer, DNA Stabilizer, RNase A, Digestion Enhancer, DE Detergent, eau ultra-pure, disques Nanobind, tubes de microcentrifugation, gaines, LBB, WB1, WB2 et EB.
 - a. Pour chaque échantillon, préparez 1 200 µl de tampon de stabilisation (SB) en mélangeant 1 176 µl de tampon Cell Buffer avec 24 µl de DNA Stabilizer. Multipliez par le nombre d'échantillons à préparer s'il y en a plus de un. Vortexez pour mélanger et mettez le tube sur de la glace.
 - b. Tapotez 3 fois la RNase A pour la mélanger. Passez le tube à la centrifugeuse et mettez-le sur de la glace.
 - c. Pour chaque échantillon, préparez 48 µl de mélange réactionnel de tampon de stabilisation/RNase A en mélangeant 36 µl de tampon de stabilisation avec 12 µl de RNase A. Multipliez par le nombre d'échantillons à préparer s'il y en a plus d'un. Vortexez brièvement pour mélanger. Passez le tube à la centrifugeuse et mettez-le sur de la glace.
 - d. Pour chaque échantillon, nommez un tube Protein LoBind de 0,5 ml (Bionano) et un tube Protein LoBind de 1,5 ml (Bionano). Mettez-le(s) tube(s) Protein LoBind de 1,5 ml sur de la glace.
 - e. Pour chaque échantillon, nommez un tube de microcentrifugation de 2,0 ml (Bionano) pour l'étape d'homogénéisation de l'ADNg. Mettez-le(s) sur un portoir à température ambiante.
3. Préparez le mélange réactionnel de lyse et de digestion dans un tube de microcentrifugation de 2,0 ml si vous préparez trois échantillons ou moins, ou dans un tube de microcentrifugation de 5,0 ml si vous préparez quatre à six échantillons. Préparez le mélange réactionnel en ajoutant les composants dans l'ordre indiqué dans le **Tableau 1**. Fermez le tube, retournez le mélange quinze fois et mettez le tube sur un portoir à tubes à température ambiante.

Remarque : Ne vortexez pas. N'ajoutez pas encore la protéinase K thermolabile TLPK au mélange réactionnel.

Tableau 1. Feuille de calcul pour préparer le mélange réactionnel de lyse et de digestion

Composant du mélange réactionnel	Volume du composant du mélange réactionnel (µl)	Nb d'échantillons	Surplus de mélange réactionnel	Volume total du composant du mélange réactionnel = volume du composant du mélange réactionnel × nb d'échantillons × surplus de mélange réactionnel	Ordre d'ajout
Digestion Enhancer	270		1,2		1
Eau exempte de nucléases	66,25		1,2		2
LBB*	80		1,2		3
DE Detergent*	3,75		1,2		4
TLPK**	10		1,2		5
Total	430				

* Pipetez lentement le LBB et le DE Detergent en raison de leur viscosité élevée et du risque de formation de bulles.

** À ajouter juste avant d'utiliser le mélange réactionnel, à l'étape 8 dans Extraction de l'ADNg.

Extraction de l'ADNg (jusqu'à 3 heures)

PREPARATION DES CULOTS DE CELLULES FRAICHES, AJOUT DU MELANGE SB/RNASE ET REMISE EN SUSPENSION DES CELLULES

Quantité de départ recommandée : 1,5E+06 cellules viables

1. Comptez les cellules dans la culture cellulaire initiale.
 - a. Remettez la culture cellulaire initiale en suspension afin d'obtenir une suspension cellulaire uniforme pour la numération.

- b. Comptez le nombre de cellules viables à l'aide d'un compteur de cellules.
Remarque : Les cellules doivent être en phase de croissance exponentielle et présenter un pourcentage élevé de viabilité cellulaire ($\geq 70\%$) afin de maximiser la qualité et la taille de l'ADNg isolé. Consignez le nombre/pourcentage de cellules viables.
 - c. Calculez le volume de la culture cellulaire initiale qui est nécessaire pour obtenir jusqu'à six culots de cellules contenant chacun $1,5E+06$ cellules viables. Si la densité de cellules viables est $< 1,25E+06$ cellules viables/ml, passez à l'étape 2. Si la densité des cellules viables est $\geq 1,25E+06$ cellules viables/ml, passez à l'étape 3.
2. Concentrez les cellules (si leur concentration est faible).
 - a. Transférez le volume approprié de la culture cellulaire initiale dans un tube conique de 15 ml.
 - b. Centrifugez le tube conique de 15 ml à température ambiante à $500 \times g$ pendant 5 minutes dans un rotor à godets oscillants afin de former un culot de cellules.
 - c. Retirez le surnageant, jetez-le dans le tube conique de 50 ml contenant de l'eau de Javel et remettez les cellules en suspension dans un volume plus petit de milieu de croissance pour obtenir une concentration d'au moins $1,25E+06$ cellules vivantes/ml.
 - d. Comptez le nombre de cellules viables à l'aide d'un compteur de cellules.
 - e. Calculez le volume de la culture cellulaire initiale concentrée qui est nécessaire pour obtenir $1,5E+06$ cellules viables par culot.
 3. Aliquotez les cellules.
 - a. Mélangez à la pipette la culture cellulaire initiale en suspension pour obtenir une suspension homogène.
 - b. Aliquotez le volume cible de la suspension de culture cellulaire initiale dans chaque tube Protein LoBind de 1,5 ml qui a été étiqueté et réfrigéré au préalable. Mettez les tubes sur de la glace.
 4. Préparez les culots de cellules.
 - a. Centrifugez les cellules à 4 °C à $500 \times g$ pendant 5 minutes dans une microcentrifugeuse équipée d'un rotor à angle fixe.
 - b. Retirez la totalité du surnageant sans toucher le culot. Jetez le surnageant dans le tube conique de 50 ml contenant de l'eau de Javel. Mettez les échantillons sur de la glace.
 5. Lavez les cellules avec le tampon de stabilisation froid.
 - a. Ajoutez 1 ml de tampon de stabilisation froid à chaque culot.
 - b. Avec une pipette P1000 réglée sur $1\ 000\ \mu\text{l}$, remettez le culot en suspension en mélangeant par aspiration et refoulement trois fois.
 - c. Centrifugez les cellules à 4 °C à $2\ 200 \times g$ pendant 2 minutes dans une microcentrifugeuse équipée d'un rotor à angle fixe.
 - d. Pendant la centrifugation, sortez l'enzyme TLPK de son lieu de conservation à -20 °C et mettez-la sur de la glace.
 - e. Après la centrifugation, mettez les échantillons sur de la glace.
 - f. Aspirez la totalité du surnageant et jetez-le dans le tube conique de 50 ml contenant de l'eau de Javel. Utilisez une pipette P200 pour retirer le liquide résiduel du culot de cellules.
 - g. Maintenez les échantillons sur de la glace jusqu'à ce que tous les surnageants aient été retirés.
 6. Ajoutez $40\ \mu\text{l}$ du mélange tampon de stabilisation/RNase froid au-dessus de chaque culot. Mettez les tubes sur de la glace.

7. En traitant un seul échantillon à la fois, utilisez un embout de pipette de 200 µl à orifice standard pour gratter délicatement le culot en décrivant un mouvement circulaire trois à cinq fois pour le détacher et le mettre dans la solution. Puis, à l'aide du même embout, mélangez lentement l'échantillon à la pipette dix fois pour remettre le culot en suspension. Mettez l'échantillon sur de la glace. Changez d'embout entre chaque échantillon.

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

LYSE, DIGESTION ET INACTIVATION DE LA PROTEINASE K THERMOLABILE

8. Tapotez trois fois le tube de TLPK et passez-le à la centrifugeuse pendant 2 secondes. Ajoutez dans le mélange réactionnel de lyse et de digestion le volume de TLPK qui a été calculé dans le **Tableau 1** en fonction du nombre d'échantillons à préparer pour obtenir le mélange réactionnel de lyse et de digestion complet. Fermez le tube et retournez-le quinze fois pour en mélanger le contenu, puis replacez-le sur le portoir à température ambiante. Mettez l'enzyme TLPK sur de la glace.
Remarque : Ne vortexez pas. À partir de cette étape, les échantillons seront manipulés à température ambiante.
9. Ajoutez 430 µl de mélange réactionnel de lyse et de digestion complet à chaque échantillon. Fermez les tubes. Changez d'embout entre chaque échantillon.
10. Retournez quinze fois chaque échantillon pour le mélanger.
11. Faites tourner les échantillons sur le HulaMixer pendant 15 minutes à température ambiante à 10 tr/min, sans agitation ni vibration.
12. Pendant ce temps, remettez l'enzyme TLPK à -20 °C. Jetez le mélange réactionnel de lyse et de digestion inutilisé (avec la TLPK) dans le tube conique de 50 ml prévu pour les déchets liquides contenant du GuHCl. Dans le tube conique contenant de l'eau de Javel, ajoutez de l'eau jusqu'à 50 ml, fermez le tube, retournez-le pour mélanger et jetez son contenu dans l'évier.
13. Retirez les échantillons du HulaMixer et passez-les à la centrifugeuse pendant 2 secondes.
14. Mettez les échantillons à incuber dans le ThermoMixer pré-réglé à 55 °C pendant 10 minutes, sans agitation.
15. Sortez les échantillons et éteignez le ThermoMixer.

LIAISON, LAVAGE ET ELUTION DE L'ADNg

16. À l'aide d'une pince à bouts pointus, ajoutez délicatement un seul disque Nanobind de 4 mm dans chaque lysat.
Remarque : Les disques peuvent parfois se coller les uns aux autres.
17. Ajoutez 480 µl d'IPA 100 % à chaque échantillon.
18. Retournez cinq fois chaque échantillon pour le mélanger.
19. Faites tourner les échantillons sur le HulaMixer pendant 15 minutes à température ambiante à 10 tr/min, sans agitation ni vibration.
Remarque : Veillez à ce que les disques Nanobind ne restent pas dans les couvercles des tubes pendant les premières rotations. Si c'est le cas, arrêtez le mélangeur et retournez les tubes de microcentrifugation jusqu'à ce que les disques Nanobind retournent dans la solution. Replacez les tubes sur le HulaMixer et reprenez le mélange.
20. Sortez les échantillons du HulaMixer.

21. Associez le portoir transparent avec la base magnétique Dynamag comme décrit ci-dessous, en vous assurant que l'aimant maintienne bien les disques Nanobind à proximité de la surface du liquide. Si ce n'est pas le cas, remettez le portoir en place (voir la [Vidéo de formation](#)).

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



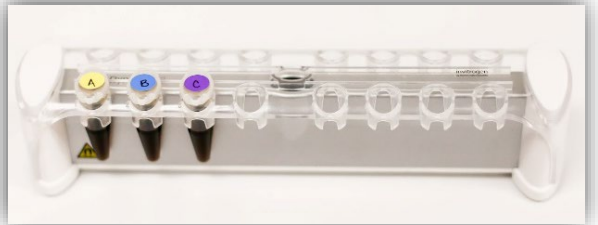
- b. Retournez la base magnétique Dynamag et placez-la sur le portoir transparent.



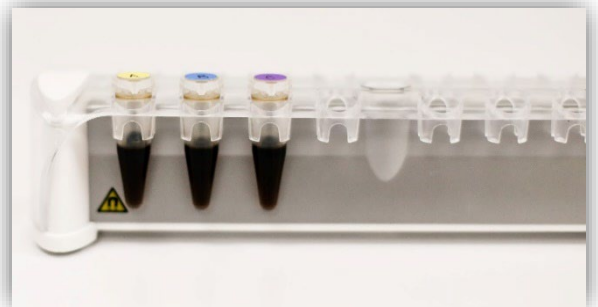
- c. Faites tourner lentement le dispositif associé de 90° dans le sens des aiguilles d'une montre tout en le maintenant en contact avec la surface. Les tubes sont désormais à l'horizontale et visibles par l'utilisateur.



- d. Faites tourner lentement le dispositif associé de 90° dans le sens des aiguilles d'une montre tout en le maintenant en contact avec la surface, de manière à ce qu'il soit entièrement à la verticale avec les tubes face à l'utilisateur.



- e. Assurez-vous que l'aimant maintienne les disques Nanobind à proximité de la surface du liquide.



22. Réglez une pipette P1000 sur 1 000 µl et une autre sur 700 µl.
23. Retirez les surnageants comme décrit ci-dessous, en veillant à ne pas aspirer l'ADNg et en changeant d'embout entre les échantillons (voir la [Vidéo de formation](#), à 1:15) :
- inclinez le portoir à un angle de 45° en le maintenant d'une main (prenez l'ensemble du dispositif par le dessous de sorte que les tubes soient visibles et les couvercles orientés vers l'autre main de l'utilisateur) ;
 - attendez 2 secondes que l'ADNg se dépose sur le disque Nanobind ;
 - retirez délicatement tout le liquide à l'aide d'un embout extra-long de 1 000 µl incliné et éloigné du disque Nanobind et/ou de l'ADNg pour éviter toute dissociation ;
 - transférez le surnageant dans le tube conique de 50 ml destiné aux déchets liquides contenant du GuHCl.



Assurez-vous que l'ADNg n'a pas été prélevé en inspectant visuellement l'embout contenant le tampon avant de le jeter. Si de l'ADNg est aspiré accidentellement ou se détache du disque, consultez la section Aide au dépannage.

24. Effectuez le lavage au WB1 :
- distribuez 700 µl de tampon WB1 dans chaque tube et refermez-les ;
 - séparez le portoir transparent de la base magnétique Dynamag et transférez les échantillons sur le HulaMixer ;
 - faites tourner les échantillons sur le HulaMixer pendant 1 minute à température ambiante à 10 tr/min, sans agitation ni vibration.
- Remarque** : Il est possible que le disque Nanobind se coince sur le côté, le couvercle ou le fond du tube. N'arrêtez pas la rotation du HulaMixer et ne faites rien si le disque Nanobind se coince quelque part dans le tube, c'est normal ;
- sortez les échantillons du HulaMixer ;
 - placez les échantillons sur le portoir transparent du Dynamag. Retournez et agitez délicatement le portoir transparent du Dynamag jusqu'à ce que, pour chaque échantillon, le disque Nanobind ne soit plus collé sur aucune partie du tube ;
 - associez le portoir transparent contenant les échantillons avec la base magnétique comme décrit aux étapes 21a à 21e ;
 - retirez les surnageants comme décrit à l'étape 23.



Assurez-vous que l'ADNg n'a pas été prélevé en inspectant visuellement l'embout contenant le tampon avant de le jeter. Si de l'ADNg est aspiré accidentellement ou se détache du disque, consultez la section Aide au dépannage.

25. Réglez la deuxième pipette sur 500 µl (au lieu de 700 µl).

26. Effectuez le lavage au WB2 :
- distribuez 500 µl de tampon WB2 dans chaque tube et refermez-les ;
 - séparez le portoir transparent de la base magnétique Dynamag et transférez les échantillons sur le HulaMixer ;
 - faites tourner les échantillons sur le HulaMixer pendant 1 minute à température ambiante à 10 tr/min, sans agitation ni vibration.
- Remarque** : Il est possible que le disque Nanobind se coince sur le côté, le couvercle ou le fond du tube. N'arrêtez pas la rotation du HulaMixer et ne faites rien si le disque Nanobind se coince quelque part sur le tube, c'est normal.
- sortez les échantillons du HulaMixer ;
 - placez les échantillons sur le portoir transparent du Dynamag. Retournez et agitez délicatement le portoir transparent du Dynamag jusqu'à ce que, pour chaque échantillon, le disque Nanobind ne soit plus collé sur aucune partie du tube ;

- f. associez le portoir transparent contenant les échantillons avec la base magnétique comme décrit aux étapes 21a à 21e ;
- g. retirez les surnageants comme décrit à l'étape 23.



Assurez-vous que l'ADNg n'a pas été prélevé en inspectant visuellement l'embout contenant le tampon avant de le jeter. Si de l'ADNg est aspiré accidentellement ou se détache du disque, consultez la section Aide au dépannage.

- 27. Répétez le lavage au WB2, étape 26.
- 28. Après avoir retiré le surnageant de WB2 pour la deuxième fois, mettez les tubes contenant les échantillons avec les bouchons ouverts sur le portoir qui contient les tubes Protein LoBind de 0,5 ml que vous avez précédemment nommés.
- 29. Insérez entièrement le récupérateur magnétique Bionano Prep SP dans une gaine en plastique propre jusqu'à ce que le récupérateur soit totalement en contact avec le fond de la gaine. Changez de gaine entre les échantillons.
- 30. Insérez le récupérateur magnétique Bionano Prep SP recouvert de la gaine dans un tube Protein LoBind de 1,5 ml et placez-le contre le disque Nanobind jusqu'à ce que le disque soit fixé. Tenez le récupérateur magnétique Bionano Prep SP recouvert de la gaine de manière à ce qu'il reste totalement en contact avec le fond de la gaine et que le disque Nanobind reste fixé magnétiquement.
- 31. Soulevez doucement le récupérateur recouvert de la gaine avec le disque accroché pour le sortir du tube et insérez le récupérateur dans un tube de microcentrifugation Protein LoBind de 0,5 ml jusqu'à ce que le disque soit calé délicatement au fond du tube.

Remarque : Changez de gaine entre les échantillons.

ÉLUTION DE L'ADNg

- 32. Ajoutez 65 µl de tampon EB dans chaque tube Protein LoBind de 0,5 ml contenant un disque Nanobind et refermez les tubes.
- 33. Passez les tubes à la microcentrifugeuse de paillasse pendant 5 secondes.
- 34. À l'aide d'un embout standard de 10 µl, poussez délicatement les disques Nanobind vers le fond des tubes pour faire en sorte qu'ils soient entièrement immergés. Les disques doivent rester parallèles à la surface de la paillasse (voir la [Vidéo de formation](#)).
- 35. Laissez les disques Nanobind immergés dans le tampon d'éluat EB incubé à température ambiante pendant 20 minutes.
- 36. Avec un embout standard de 200 µl, prélevez l'ADNg qui a été extrait en transférant chaque éluat dans un tube de microcentrifugation de 2,0 ml nommé.
- 37. Passez les tubes avec les disques Nanobind à la microcentrifugeuse de paillasse pendant 5 secondes pour séparer l'éluat résiduel de chaque disque Nanobind.
- 38. Avec un embout standard de 200 µl, transférez les éluats restants contenant l'ADNg visqueux dans les tubes de microcentrifugation de 2,0 ml nommés correspondants.
Remarque : Pratiquement tout l'ADNg visqueux se détache du disque Nanobind pendant la centrifugation. Effectuez une ou deux centrifugation(s) supplémentaire(s) si de l'ADNg visqueux est coincé entre les disques et le fond des tubes Protein LoBind de 0,5 ml.
- 39. Passez les échantillons à la centrifugeuse pendant 2 secondes.

Homogénéisation de la solution d'ADNg (70 minutes)

HOMOGENEISATION DE L'ADNg

40. Pour chaque échantillon, aspirez lentement la totalité du volume d'ADNg dans un embout standard de 200 µl, puis refoulez lentement l'ADNg. Évitez la formation de bulles.

Répétez cette procédure trois fois pour un total de 4 allers-retours (1 aller-retour= 1 aspiration et 1 refoulement).

Remarque : Si l'aspiration de l'ADNg s'interrompt en raison de sa viscosité élevée, il peut être nécessaire de remuer le tube délicatement pendant que vous relâchez lentement le piston pour aspirer l'ADNg.

41. Placez les tubes de microcentrifugation standard de 2,0 ml contenant l'ADNg sur le portoir du mélangeur d'échantillons HulaMixer et faites faire des rotations à 15 tr/min à température ambiante pendant 1 heure.

Remarque : Pendant les premières rotations, assurez-vous que l'ADNg ne reste pas au fond des tubes de microcentrifugation et va dans le couvercle des tubes. Si la solution d'ADN reste au fond des tubes pendant les premières rotations, éteignez le HulaMixer et positionnez le portoir de sorte que les tubes de microcentrifugation soient à l'envers. Tapotez délicatement le fond des tubes de microcentrifugation jusqu'à ce que l'ADNg soit entraîné dans les couvercles et reprenez le mélange.

42. Sortez les tubes de microcentrifugation du portoir du HulaMixer et passez-les à la microcentrifugeuse de paillasse pendant 2 secondes pour faire descendre l'ADNg au fond des tubes.

43. Laissez l'ADNg pendant la nuit à température ambiante (25 °C) pour qu'il s'homogénéise.

Remarque : La plupart des échantillons d'ADNg peuvent être marqués le lendemain ou dans les 48 heures qui suivent l'extraction en utilisant le protocole DLS-G2 (réf. 30553).

Quantification de l'ADNg (45 minutes)

QUANTIFICATION AVEC LE KIT DE DOSAGE QUBIT dsDNA BR

Reportez-vous au manuel d'utilisation du kit de dosage Qubit dsDNA BR pour obtenir des informations détaillées sur le kit et suivez les méthodes décrites dans la section « Pipetage d'ADNg visqueux » de la partie **Remarques importantes** pour faire en sorte de procéder à un pipetage précis de l'ADNg.

1. Laissez les étalons du kit de dosage Qubit BR revenir à température ambiante.

Remarque : Si les échantillons d'ADNg ont été conservés à 4 °C, laissez-les revenir à température ambiante et passez-les à la centrifugeuse avant de procéder à l'étape suivante.

2. Ajoutez le tampon Qubit BR Buffer dans les tubes de dosage Qubit de 0,5 ml :

- pour chaque échantillon, distribuez 18 µl de tampon Qubit BR Buffer dans trois tubes de dosage Qubit différents ;
- pour les étalons Qubit, distribuez 10 µl de tampon Qubit BR Buffer dans deux tubes de dosage Qubit.

3. Pour chaque échantillon, prenez une pipette de 200 µl avec un embout à large orifice et mélangez délicatement tout le volume d'ADNg par aspiration et refoulement à cinq reprises, en veillant à ne pas former de bulles.

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

Prélevez des aliquotes de 2 µl à gauche, au milieu et à droite de chaque tube, et distribuez-les dans les tubes de dosage Qubit correspondants contenant le tampon BR Buffer. Plongez l'embout dans le tampon pour le rincer lors de la

distribution. Placez les tubes de dosage Qubit sur un portoir flottant et soumettez-les à une sonication pendant 10 minutes. Effectuez les étapes 5 et 6 pendant la sonication.

Remarque : 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 BR Reagent dans le tampon de dilution BR Dilution Buffer (1:200) :
 - a. 200 µl de solution de travail pour chacun des deux étalons (400 µl au total) ;
 - b. 200 µl de solution de travail pour chaque aliquote d'échantillon (600 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 qui ont été préparés à l'étape 2b avec le tampon BR Buffer.
7. Une fois la sonication terminée, sortez les tubes de dosage et passez-les brièvement à la centrifugeuse. Vortexez les tubes pendant 5 secondes à vitesse maximale, puis passez-les de nouveau à la centrifugeuse.
8. Ajoutez 180 µl de solution de travail à chaque aliquote d'ADN soniqué et à chaque aliquote d'étalon d'ADN Qubit. Vortexez pendant 5 secondes et passez les tubes à la centrifugeuse.
9. Laissez incuber les échantillons pendant au moins 2 minutes, puis lisez le résultat sur le fluoromètre Qubit. Consignez les valeurs obtenues dans le Tableau 2 ci-dessous.
10. Calculez le coefficient de variation (CV) de chaque échantillon ($CV = \text{écart-type}/\text{valeur moyenne}$) et consignez-le dans le Tableau 2 ci-dessous.

Remarque : Si le CV est $> 0,30$, mélangez délicatement à la pipette tout le volume d'ADNg en procédant à 5 mouvements (1 mouvement = 1 aspiration + 1 refoulement) à l'aide d'un embout à large orifice. Laissez l'ADNg reposer pendant la nuit à température ambiante avant de procéder à une nouvelle quantification et d'effectuer le marquage DLS le lendemain. Généralement, les concentrations d'ADN sont comprises entre 45 et 90 ng/µl.

Tableau 2. Feuille de calcul pour la quantification de l'ADNg (dsDNA BR)

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

MARQUAGE

Les échantillons d'ADNg sont prêts pour être marqués selon le protocole DLS (Direct Label and Stain) dans les 48 heures qui suivent leur extraction. Voir les sections « Kits de préparation des échantillons » et « Instruments et consommables » à l'adresse <https://bionano.com/support/> pour connaître les kits et les protocoles qui peuvent être utilisés.

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 fiches de données de sécurité (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, ou sur demande par e-mail et par téléphone.

TYPE	CONTACT
E-mail	support@bionano.com
Téléphone	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.bionano.com/support
Adresse	Bionano Genomics, Inc. 9540 Towne Centre Drive, Suite 100 San Diego, CA 92121, États-Unis