



Protocole Bionano Prep SP-G2 pour l'extraction d'ADN à partir de sang humain frais

NUMÉRO DU DOCUMENT :

CG-00005-5

RÉVISION DU DOCUMENT :

C

Date d'entrée en vigueur : 01/08/2023

Table des matières

Mention légal	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 sang humain frais .	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)	20
Quantification de l'ADNg (45 minutes).....	20
Assistance technique	23

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.

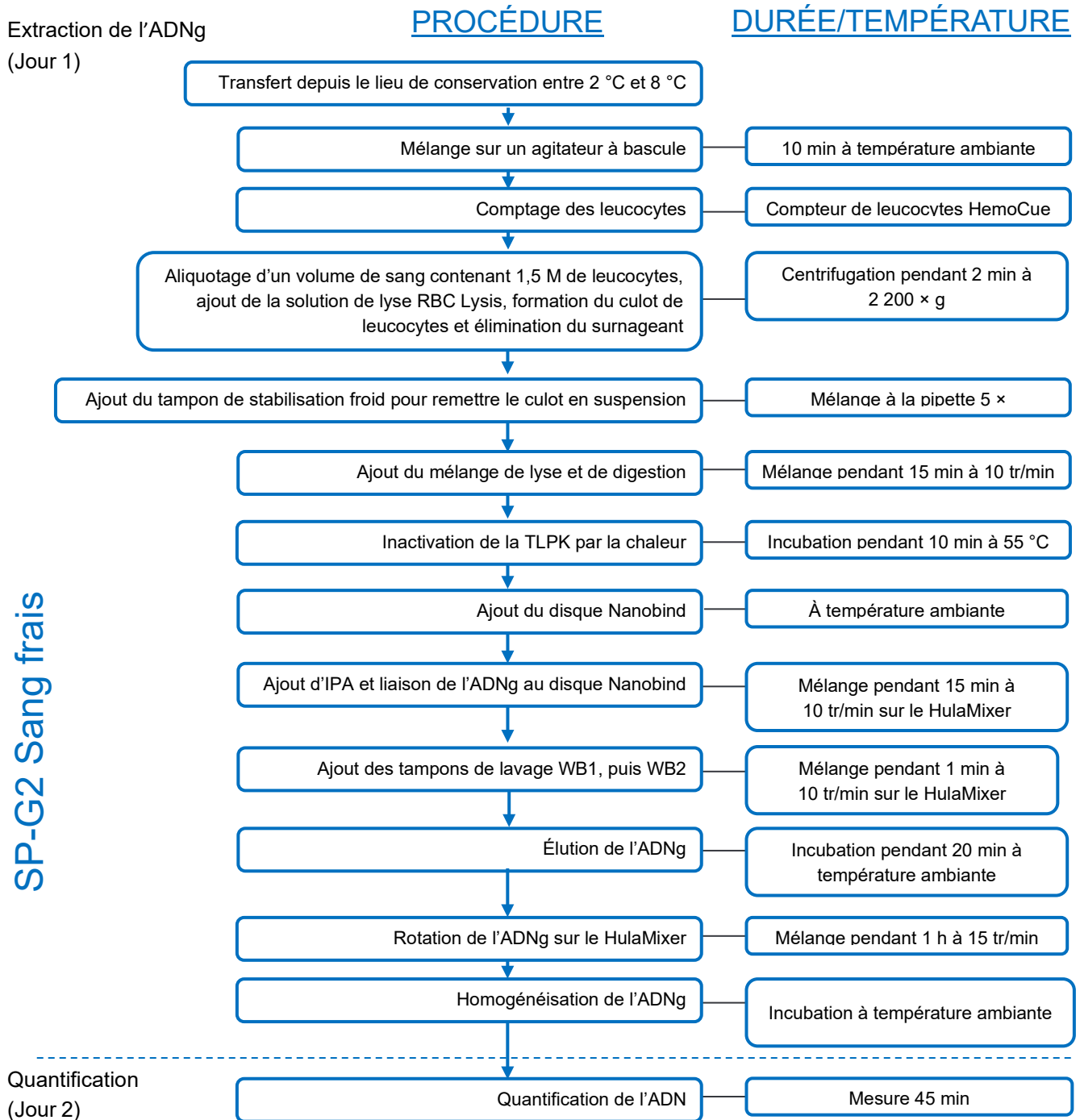
Aucune licence d'utilisation d'aucune marque de commerce de Bionano Genomics n'est accordée de manière expresse ou implicite. Les utilisateurs ne sont pas autorisés à utiliser ces marques de commerce sans le consentement écrit préalable de Bionano Genomics. L'utilisation de ces marques de commerce ou 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.
C	Mise à jour du résumé du protocole.

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 Solution (Solution de 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'éluion)	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)
Gaines en plastique pour le récupérateur magnétique	12	20451	Température ambiante (15 °C à 30 °C)
Tubes de microcentrifugation, 2 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)

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

** Non utilisé dans ce protocole.

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
Compteur de leucocytes HemoCue	Fisher Scientific (aux États-Unis) Distributeur (hors États-Unis)	22-601-017
Microcuvettes HemoCue	Fisher Scientific	22-601-018
Agitateur à bascule pour tubes	VWR ou équivalent	10159-754
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 du sang	Fournisseur de matériel de laboratoire général	
Tubes de centrifugation coniques, 50 ml, polypropylène (PP)	Thermo Fisher ou équivalent	14-432-22
Centrifugeuse équipée d'un rotor pour tubes de 1,5 ml (centrifugation à 2 200 g)	Cole-Parmer ou équivalent	EW-17701-11
Seau à glace et glace	Fournisseur de matériel de laboratoire général	
Mélangeur thermique de type ThermoMixer, 55 °C	Eppendorf ou équivalent	538200023
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 exempts 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 paillasse	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 sang humain frais, 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 leucocytes provenant de sang humain frais. 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 du sang humain qui a été prélevé dans des tubes recouverts d'acide éthylènediamine-tétraacétique (EDTA), conservé à 4 °C et traité dans les quatre jours qui ont suivi le prélèvement. Pour de meilleurs résultats, il est recommandé de conserver le sang à 4 °C pendant une durée ne dépassant pas cinq jours après le prélèvement avant de le congeler. Les échantillons de sang peuvent également rester à température ambiante (entre 22 °C et 25 °C) avant la congélation, pendant une durée maximale de 66 heures et sans dépasser 6 heures à une température élevée (entre 30 °C et 40 °C). La conservation des échantillons de sang à température ambiante au-delà de 66 heures ou une exposition prolongée (> 6 heures) à une température élevée peut entraîner une réduction de la longueur des molécules d'ADNg et compromettre les résultats de dosage. 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](#).

L'ADNg est obtenu à partir des leucocytes. Généralement, pour ce protocole, il suffit de recueillir 200 µl à 600 µl de sang total humain normal d'un patient dans un tube EDTA.

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 µl 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 visqueux est 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/µl et 120 ng/µl.

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 ET NOMBRE DE LEUCOCYTES

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. Il est nécessaire de disposer d'un minimum de 2,5E+9 cellules/l.

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 sang humain frais

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 (voir la section « Matériel à fournir par l'utilisateur » ci-dessus).
 - a. Pipettes et embouts.
 - b. Préparez des bandes de Parafilm (d'environ 2 cm) pour l'HemoCue, des microcuvettes prêtes à l'emploi et le [système HemoCue](#).
 - c. Seau à glace et glace.
 - d. Vérifiez que la microcentrifugeuse est réglée sur 2 200 × g, pendant deux minutes, à température ambiante.
 - e. 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).
 - f. Mélangeur d'échantillons HulaMixer.
 - g. IPA 100 %.
 - h. Aimant DynaMag-2 et son portoir à tubes.
 - i. Récupérateur magnétique Bionano Prep SP.
 - j. Réglez un ThermoMixer sur 55 °C, pendant 10 minutes, sans agitation.
 - k. Pince à bouts pointus.
 - l. Pour le mélange réactionnel de lyse et de digestion, nommez un tube de microcentrifugation de 2,0 ml si vous préparez trois échantillons ou moins, ou un tube de microcentrifugation de 5,0 ml pour quatre à six échantillons.
2. Rassemblez les réactifs et matériels suivants du kit SP-G2 : RBC Lysis Solution, Cell Buffer, DNA Stabilizer, Digestion Enhancer, DE Detergent, eau ultra-pure, disques Nanobind, tubes de microcentrifugation, gaines, LBB, WB1, WB2 et EB.
 - a. Pour chaque échantillon, préparez 50 µl de tampon de stabilisation en mélangeant 49 µl de tampon Cell Buffer avec 1 µl de DNA Stabilizer. Multipliez par le nombre d'échantillons à préparer s'il y en a plus d'un. Vortexez pour mélanger et mettez le tube sur de la glace.
 - b. 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.

- c. 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 14 dans Extraction de l'ADNg.

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

MELANGE/NUMERATION/ALIQUOTAGE DU SANG, AJOUT DE LA RBC LYSIS SOLUTION, FORMATION DU CULOT DE LEUCOCYTES ET ELIMINATION DU SURNAGEANT

Quantité de départ recommandée : 1,5E+06 leucocytes

- Pour chaque échantillon, sortez un tube de sang du lieu de conservation à 4 °C (jusqu'à six tubes de sang par lot) et mélangez sur l'agitateur à bascule pendant 10 minutes à température ambiante pour assurer une bonne uniformité.
- Éteignez l'agitateur à bascule au bout de 10 minutes.
- En traitant un seul échantillon de sang à la fois, pour un lot ne dépassant pas six échantillons :
 - Retirez le tube de prélèvement de l'agitateur à bascule. Retournez manuellement le tube deux fois pour le mélanger, déposez immédiatement 20 µl sur un morceau de Parafilm et utilisez une cuvette HemoCue pour mesurer les leucocytes. Fermez délicatement le bouchon du tube de prélèvement et mettez ce dernier sur un portoir à tubes.
 - Consignez l'ID de l'échantillon et le résultat de l'HemoCue (en E+03 cellules/µl) dans le **Tableau 2**.

Remarque : Si la concentration de leucocytes dans l'échantillon de sang est trop élevée (> 30E+09 cellules/l) et se situe en dehors de la plage de détection, l'écran de l'HemoCue affiche « HHH ». En général, les échantillons de sang

qui donnent une concentration HemoCue « HHH » peuvent être dilués dans du tampon Cell Buffer, puis soumis à un nouveau comptage pour déterminer précisément la concentration des leucocytes (voir ci-dessous).

- i. Retournez dix fois l'échantillon de sang pour le mélanger. Passez l'échantillon à la centrifugeuse pendant 1 seconde pour faire descendre le sang présent dans le couvercle du tube. Mettez l'échantillon sur de la glace.
 - ii. Transférez immédiatement 25 µl de l'échantillon de sang dans un tube de 1,5 ml contenant 75 µl de tampon Cell Buffer pour obtenir une dilution de l'échantillon de sang au 1/4.
 - iii. Mélangez délicatement à la pipette dix fois tout le volume à l'aide d'un embout à orifice standard de 200 µl. Passez à la centrifugeuse pendant 2 secondes.
 - iv. Déposez immédiatement 20 µl sur du Parafilm et utilisez une cuvette HemoCue pour mesurer les leucocytes.
 - v. Effectuez le calcul suivant et consignez la valeur dans le **Tableau 2**.
 - Résultat HemoCue = numération leucocytaire (après dilution dans le Cell Buffer) × facteur de dilution (= 4)
- c. Pour chaque échantillon, effectuez les calculs suivants et consignez les valeurs dans le **Tableau 2**.
- Volume de transfert (µl) = $1,5E+06 \text{ cellules} \div \text{résultat HemoCue en } E+03 \text{ cellules}/\mu\text{l}$
 - Volume de RBC Lysis Solution (µl) = Volume de transfert × 3 (µl)
 - Volume de prélèvement 1 (µl) = Volume de RBC Lysis Solution (µl)
 - Volume de prélèvement 2 (µl) = Volume de transfert - 40 µl ; ou
 - Si le sang a été réparti dans deux tubes de 1,5 ml pour les étapes de lyse des érythrocytes en raison d'un résultat HemoCue faible ($\leq 2,0E+09 \text{ cellules/l}$) : Volume de prélèvement 2 (µl) = Volume de transfert - 10 µl

Remarque : L'HemoCue donne des résultats en E+09 cellules/l, mais le calcul est basé sur des E+03 cellules/µl pour transférer 1,5E+06 leucocytes dans un tube Protein LoBind de 1,5 ml préalablement réfrigéré.

Exemples de calculs :

- i. **Utilisez un seul tube Protein LoBind de 1,5 ml lorsque le résultat HemoCue est $\geq 5,0E+09 \text{ cellules/l}$ ($5,0E+03 \text{ cellules}/\mu\text{l}$). Par exemple, résultat HemoCue = $7,5E+09 \text{ cellules/l}$ ($7,5E+03 \text{ cellules}/\mu\text{l}$)**
 - Volume de transfert (µl) = $1,5E+06 \text{ cellules} \div 7,5E+03 \text{ cellules}/\mu\text{l} = 200 \mu\text{l}$
 - Volume de RBC Lysis Solution (µl) = $200 \mu\text{l} \times 3 = 600 \mu\text{l}$
 - Volume de prélèvement 1 (µl) = Volume de RBC Lysis Solution = 600 µl
 - Volume de prélèvement 2 (µl) = Volume de transfert - 40 µl = 160 µl
- ii. **Utilisez deux tubes Protein LoBind de 1,5 ml lorsque $2,0E+09 \text{ cellules/l} \leq \text{résultat HemoCue} < 5,0E+09 \text{ cellules/l}$. Par exemple, résultat HemoCue = $2,0E+09 \text{ cellules/l}$ ($2,0E+03 \text{ cellules}/\mu\text{l}$).**
 - Volume de transfert (µl) = $1,5E+06 \text{ cellules} \div 2,0E+03 \text{ cellules}/\mu\text{l} = 750 \mu\text{l}$
 - Transférez 375 µl dans chaque tube Protein LoBind de 1,5 ml.
 - Volume de RBC Lysis Solution (µl) pour chaque tube = $375 \mu\text{l} \times 3 = 1\,125 \mu\text{l}$
 - Volume de prélèvement 1 (µl) = Volume de RBC Lysis Solution = 1 125 µl
 - Volume de prélèvement 2 (µl) = Volume de transfert - 10 µl = 365 µl

Tableau 2. Feuille de calcul pour des échantillons de sang frais

ID de l'échantillon	Résultat HemoCue* (E+03 cellules/ μ l)	Volume de transfert (1,5E+06 cellules ÷ résultat HemoCue)	Volume de RBC Lysis Solution	Si le résultat HemoCue est $\geq 5,0E+09$ cellules/l (Un tube de 1,5 ml pour la lyse des érythrocytes)		Si $2,0E+09$ cellules/l \leq résultat HemoCue $< 5,0E+09$ cellules/l (Deux tubes de 1,5 ml pour la lyse des érythrocytes)	
				Volume de prélèvement 1 = Volume de RBC Lysis Solution	Volume de prélèvement 2 = Volume de transfert - 40 μ l	Volume de prélèvement 1 = Volume de RBC Lysis Solution	Volume de prélèvement 2 = Volume de transfert - 10 μ l
		μ l	μ l	μ l	μ l	μ l	μ l
		μ l	μ l	μ l	μ l	μ l	μ l
		μ l	μ l	μ l	μ l	μ l	μ l
		μ l	μ l	μ l	μ l	μ l	μ l
		μ l	μ l	μ l	μ l	μ l	μ l
		μ l	μ l	μ l	μ l	μ l	μ l

* Multipliez par le facteur de dilution (= 4) si l'échantillon de sang est dilué avec du tampon Cell Buffer parce que la numération leucocytaire est élevée (l'HemoCue affiche « HHH » à l'étape 3.b. de l'Extraction de l'ADNg).

4. En traitant un seul échantillon à la fois :
 - a. Retirez le tube de sang de l'agitateur à bascule. Assurez-vous que le bouchon du tube de prélèvement est bien fermé. Retournez cinq fois pour mélanger.
 - b. Transférez le [Volume de transfert] qui a été calculé dans le tube Protein LoBind de 1,5 ml que vous avez étiqueté et réfrigéré au préalable. Refermez le tube et mettez-le sur de la glace. Changez d'embout entre chaque échantillon.
Remarque : En général, le volume de transfert pour l'échantillon d'une personne normale en bonne santé est compris entre 200 μ l et 600 μ l. Si le volume de transfert est > 750 μ l, répartissez-le dans deux tubes Protein LoBind de 1,5 ml.
5. Ajoutez à chaque échantillon le [Volume de RBC Lysis Solution] qui a été calculé dans le **Tableau 2**. Refermez les tubes et mettez-les à température ambiante.
6. Retournez dix fois les échantillons pour les mélanger. Laissez incuber les échantillons à température ambiante pendant 5 minutes.
7. Après l'incubation, retournez dix fois les échantillons pour les mélanger.
8. Passez les échantillons à la centrifugeuse pendant 2 minutes à $2\ 200 \times g$ à température ambiante.
Remarque : Il peut s'avérer utile d'aligner la charnière des tubes sur le bord extérieur de la centrifugeuse de sorte que les culots soient toujours situés du même côté.
9. Pendant la centrifugation visant à obtenir des culots de leucocytes, sortez l'enzyme TLPK de son lieu de conservation à -20 °C et mettez-la sur de la glace. Jetez tout le sang restant non utilisé dans le tube conique de 50 ml contenant de l'eau de Javel et mettez le tube vide de l'aliquote dans le sachet pour déchets présentant un risque biologique.
10. Sortez les échantillons de la centrifugeuse après la centrifugation. Inspectez le fond des tubes pour visualiser les culots de leucocytes et repérez leur emplacement. Mettez les échantillons sur de la glace.
11. Après la centrifugation, retirez le surnageant de chaque tube d'échantillon comme décrit ci-après.
 - a. À l'aide d'un embout de pipette extra-long avec filtre de 1 000 μ l, prélevez un volume de surnageant égal au volume de prélèvement 1 [volume de RBC Lysis Solution] dans chaque tube (aspirez depuis la surface du liquide). Jetez le

surnageant dans le tube conique contenant de l'eau de Javel. Refermez le tube et mettez-le sur de la glace. Le volume restant de surnageant doit correspondre au [Volume de transfert].

Remarque : Si le volume de prélèvement 1 est > 1 000 µl, changez d'embout entre les passages.

- b. À l'aide d'une pipette P200, prélevez un volume de surnageant égal au [Volume de prélèvement 2] dans chaque tube. Aspirez depuis le ménisque mais ne touchez pas le culot. Jetez le surnageant dans le tube conique contenant de l'eau de Javel. Refermez le tube et mettez-le sur de la glace. Après avoir retiré la majeure partie du surnageant, il doit en rester environ 40 µl (ou 10 µl pour deux tubes de 1,5 ml) avec le culot de leucocytes.

Remarque : Si le volume de prélèvement 2 est > 200 µl, changez d'embout entre les passages.

REMISE EN SUSPENSION, LYSE/DIGESTION DES LEUCOCYTES ET INACTIVATION DE LA PROTEINASE K THERMOLABILE

12. Ajoutez à chaque échantillon 20 µl de tampon de stabilisation froid au-dessus des 40 µl (ou 10 µl pour deux tubes de 1,5 ml) contenant le surnageant et le culot de leucocytes.
13. 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 cinq fois pour remettre le culot en suspension. Mettez l'échantillon sur de la glace. Si deux tubes Protein LoBind de 1,5 ml ont été utilisés pour lyser les érythrocytes, combinez les deux suspensions. Mettez la suspension combinée 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.

14. 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.

15. Ajoutez 430 µl de mélange réactionnel de lyse et de digestion complet à chaque échantillon. Fermez les tubes. Changez d'embout entre chaque échantillon.
16. Retournez quinze fois chaque échantillon pour le mélanger.
17. Faites tourner les échantillons sur le HulaMixer pendant 15 minutes à température ambiante à 10 tr/min, sans agitation ni vibration.
18. 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.
19. Retirez les échantillons du HulaMixer et passez-les à la centrifugeuse pendant 2 secondes.
20. Mettez les échantillons à incuber dans le ThermoMixer pré-réglé à 55 °C pendant 10 minutes, sans agitation.
21. Sortez les échantillons et éteignez le ThermoMixer.

LIAISON, LAVAGE ET ELUTION DE L'ADNg

22. 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.

23. Ajoutez 480 µl d'IPA 100 % à chaque échantillon. Fermez les tubes.

24. Retournez cinq fois chaque échantillon pour le mélanger.

25. 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.

26. Sortez les échantillons du HulaMixer.

27. 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](#), à 0:50).

- 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.



28. Réglez une pipette P1000 sur 1 000 µl et une autre sur 700 µl.
29. 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 le Guide d'aide au dépannage (référence 30608).

30. 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 27a à 27e ;
 - retirez les surnageants comme décrit à l'étape 29.



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 le Guide d'aide au dépannage (référence 30608).

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

32. 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.

- d. sortez les échantillons du HulaMixer ;
- e. 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 27a à 27e ;
- g. retirez les surnageants comme décrit à l'étape 29.



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 le Guide d'aide au dépannage (référence 30608).

- 33. Répétez le lavage au WB2, étape 32.
- 34. 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 étiquetés.
- 35. 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.
- 36. 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.
- 37. 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

- 38. Ajoutez 65 µl de tampon EB dans chaque tube Protein LoBind de 0,5 ml contenant un disque Nanobind et refermez les tubes.
- 39. Passez les tubes à la microcentrifugeuse de paillasse pendant 5 secondes.
- 40. 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. Changez d'embout entre les échantillons (voir la [Vidéo de formation](#)).
- 41. Laissez les disques Nanobind immergés dans le tampon d'éluat EB incubé à température ambiante pendant 20 minutes.
- 42. 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 énuméré.
- 43. Passez les tubes avec les disques Nanobind à la microcentrifugeuse de paillasse pendant 5 secondes pour séparer l'éluat résiduel de chaque disque Nanobind.
- 44. 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.

45. Passez les échantillons à la centrifugeuse pendant 2 secondes.

Homogénéisation de la solution d'ADNg (70 minutes)

HOMOGENEISATION DE L'ADNg

46. 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.

47. 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 manière à retourner les tubes de microcentrifugation. Tapotez délicatement le fond des tubes de microcentrifugation jusqu'à ce que l'ADNg soit entraîné dans les couvercles et reprenez le mélange.

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

49. 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 :

- a. pour chaque échantillon, distribuez 18 µl de tampon Qubit BR Buffer dans trois tubes de dosage Qubit différents ;
 - b. 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 3** 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 3** ci-dessous.

Remarque : Si le CV est $> 0,30$, mélangez délicatement à la pipette tout le volume d'ADNg en procédant à 5 allers-retours (1 aller-retour = 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 3. 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