



# **Protocole Direct Label and Stain (DLS) Bionano Prep**

Numéro de document : 30206

Révision du document : A

## Table des matières

---

Mention légale.....	3
Historique des révisions.....	4
Vue d'ensemble du protocole Bionano Prep DLS (750 ng).....	5
Vue d'ensemble du flux de travail – Marquage et coloration le jour 1, quantification et chargement le jour 2.....	5
Kit Bionano Prep DLS et matériel fourni par l'utilisateur .....	6
Introduction et remarques importantes .....	7
Introduction.....	7
Remarques importantes .....	7
Protocole de marquage DLS Bionano.....	10
Début du protocole, Jour 1.....	10
Début du protocole, Jour 2.....	15
Résolution des problèmes .....	18
Foire aux questions.....	21
Assistance technique .....	22

## Mention légale

---

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

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

Bionano Genomics se réserve le droit d'apporter des modifications aux caractéristiques et autres informations contenues dans cette publication à tout moment et sans préavis. Veuillez contacter le service client de Bionano Genomics pour obtenir les dernières informations.

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

### **Brevets**

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

### **Marques**

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

Bionano Genomics®, Saphyr®, Saphyr Chip® et Bionano Access® sont des marques de commerce de Bionano Genomics, Inc. Toutes les autres marques de commerce sont la propriété exclusive de leurs détenteurs respectifs.

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

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

## Historique des révisions

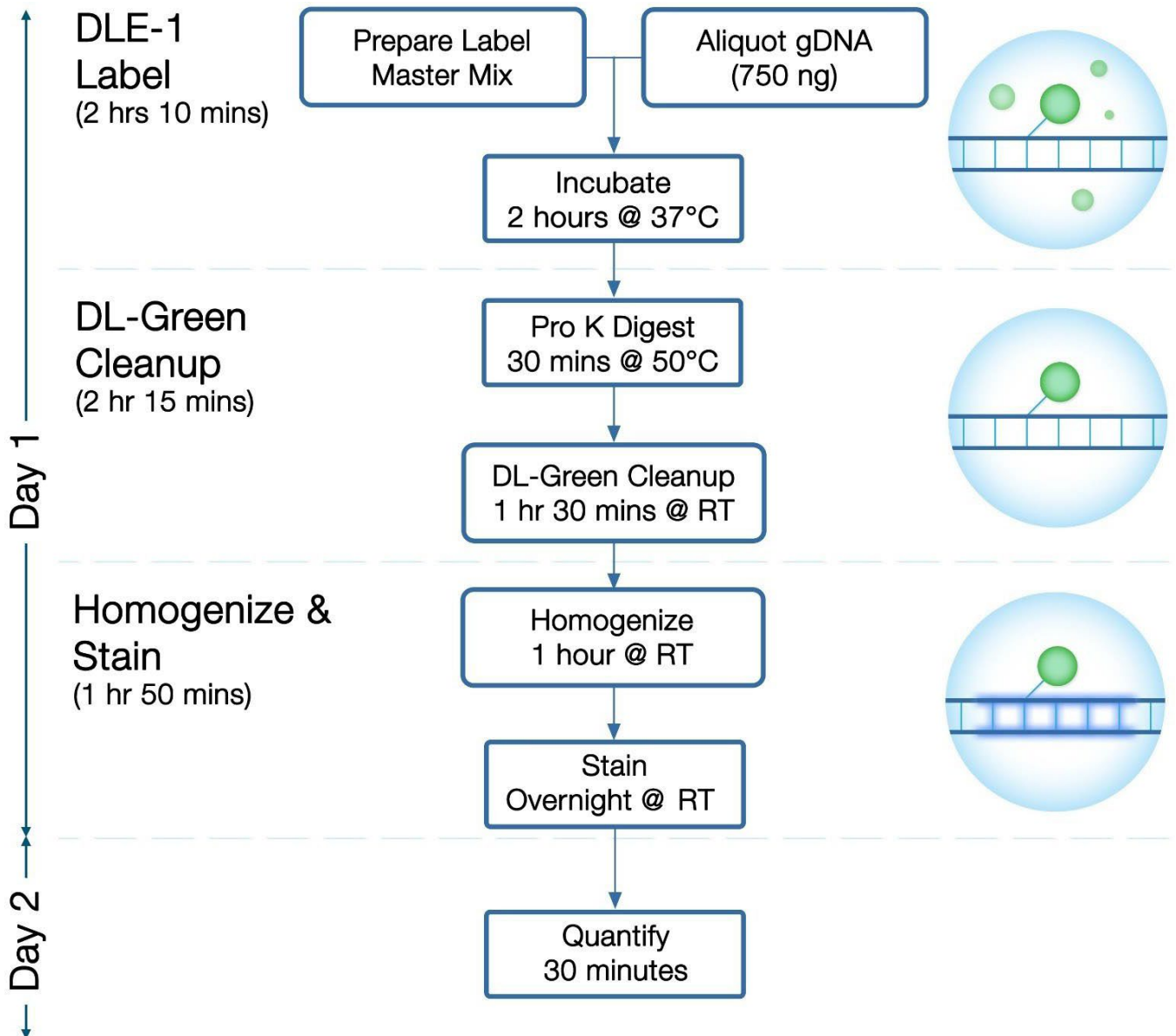
---

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

## Vue d'ensemble du protocole Bionano Prep DLS (750 ng)

Le DLS est un marquage spécifique à la séquence de l'ADNg (ADNg) de masse moléculaire ultra élevée (UHMW) pour la cartographie optique du génome de Bionano (OGM) à l'aide d'une enzyme de marquage direct (par exemple, DLE-1), suivi d'une coloration du squelette de l'ADN.

### Vue d'ensemble du flux de travail - Étiqueter et colorer le jour 1 ; Quantifier le jour 2, charger sur la puce après la quantification



**Remarque :** Les lignes en pointillés ( ) désignent des points de pause/d'arrêt potentiels.

## Kit Bionano Prep DLS et matériel fourni par l'utilisateur

**Tableau 1** : Contenu du kit Bionano Prep DLS (Réf. n° 80005)

Composant	Référence	Quantité	Stockage	Considérations relatives à la manipulation
20 DLE-1	20351	18 µl	-20 °C	Faites tourner le tube 3 fois pour mélanger et centrifuger brièvement. Conservez dans un refroidisseur d'enzymes à -20 °C jusqu'à utilisation.
20 DL-Green	20352	18 µl	-20 °C	Décongelez à température ambiante (TA). Vortexez et centrifugez brièvement. Conservez sur un bloc d'aluminium pré-refrigéré jusqu'à utilisation.
5 tampons DLE-1	20350	200 µl	-20 °C	Décongelez à température ambiante. Vortexez et centrifugez brièvement. Conservez à température ambiante jusqu'à utilisation.
4 tampons de flux	20353	190 µl	4 °C	Vortexez et centrifugez brièvement. Conservez à température ambiante jusqu'à utilisation.
Colorant pour ADN	20356	65 µl	-20 °C	Décongelez à température ambiante. Vortexez et centrifugez brièvement. Conservez à température ambiante jusqu'à utilisation ; le DMSO dans le colorant pour ADN cristallisera sur la glace.
1M DTT	20354	75 µl	-20 °C	
Eau ultra pure	20355	900 µl	4 °C	Peut se conserver à température ambiante.
Plaque DLS 24 puits	20357	1 plaque	TA	Gardez couvert pour éviter la poussière.
Membranes DLS (13 mm)	20358	25	TA	Évitez l'excès d'humidité.
Bandes scellantes pour plaques DLS	20361	10	TA	
Tubes sombres DLS, fond rond	20362	12	TA	

**Remarque** : TA = 18 - 25 °C

**Tableau 2** : Matériel fourni par l'utilisateur

Article	Description	N° de catalogue
Mélangeur d'échantillons HulaMixer	Thermo Fisher	15920D
Thermocycleur avec couvercle chauffant	Fournisseur général de laboratoires	
Protéinase K Puregene	Qiagen	158918 ou 158920
Tubes PCR, 0,2 ml, à paroi mince, bouchon plat, sans nucléase	Thermo Fisher ou équivalent	AM12225
Tubes de microcentrifugeuse, 0,5 mL, sombres, sans nucléase	USA Scientific ou équivalent	1605-0007
Embouts de pipette, non filtrés, 200 µl	USA Scientific ou équivalent	1111-1810
Embouts de pipette à grand diamètre, filtrés, 200 µl	VWR ou équivalent Rainin	46620-642
Embouts de pipette, standards, filtrés ; 2, 10, 20 et 200 µl	Fournisseur général de laboratoires	
Refroidisseur d'enzymes de paille -20 °C	VWR ou équivalent	414004-286
Bloc pour tubes de refroidissement en aluminium 4 °C	Sigma Aldrich ou équivalent	Z740270
Pince, pointue et courbe	Electron Microscopy Sciences ou	78141-01
Pipettes (2, 10, 20 et 200 µl)	Fournisseur général de laboratoires	
Seau à glace et glace	Fournisseur général de	

	laboratoires	
Vortexeur	Fournisseur général de laboratoires	
Centrifugeuse pour tubes de 0,2, 0,5 et 1,5 ml	Fournisseur général de laboratoires	
Fluoromètre Qubit	Thermo Fisher	Q33238
Tubes de dosage Qubit®	Thermo Fisher	Q32856
Kit de dosage ADNdb Qubit® HS (haute sensibilité)	Thermo Fisher	Q32851
Bain à ultrasons (recommandé)	Branson ou équivalent	CPX 952-119R
Pipette à déplacement positif MR-10 (facultatif)	Rainin ou équivalent	17008575
Embouts de pipette, 10 µL, C-10 à déplacement pos. (facultatif)	Rainin ou équivalent	17008604

## Introduction et remarques importantes

---

### Introduction

Ce protocole décrit une approche de marquage enzymatique pour le marquage fluorescent direct de l'ADNg UHMW par l'enzyme de marquage DLE-1 (Direct Label Enzyme). L'enzyme DLE-1 attache le fluorophore DL-Green via une modification covalente à un motif de séquence spécifique. Ce processus de marquage n'endommage pas l'ADNg, permet la génération de cartes génomiques hautement contiguës et offre une sensibilité élevée à la détection de variantes structurelles. Après le marquage spécifique à la séquence au DLE-1, l'ADN marqué est coloré pour la visualisation du squelette. Lorsqu'ils sont imagés sur le Saphyr, les échantillons étiquetés sont visualisés sous forme de points verts sur des lignes bleues. Le kit Bionano Prep Direct Label and Stain (DLS) (N° de catalogue 80005) fournit les réactifs nécessaires pour ce protocole.

### Taille de la réaction DLE-1 (750 ng)

Ce protocole produit 60 µl d'ADN marqué. Cela est suffisant pour charger sur une seule cellule d'écoulement d'une puce Saphyr, avec suffisamment d'échantillon restant pour une cellule d'écoulement supplémentaire en cas de faible débit ou d'autre défaillance. Le matériau de départ doit avoir une longueur minimale de centaines de kilobases ; si nécessaire, cela peut être déterminé par électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE). Les valeurs de marquage sont déterminées sur le Bionano Saphyr, mesurées en étiquettes/100 kilobases paires (kbp). Des valeurs de marquage supplémentaires peuvent être déterminées en fournissant un taux de carte de référence et de surveillance, un écart positif des marqueurs (PLV) et une variance de marquage négative (NLV). Voir la section « Remarques importantes » ci-dessous pour plus de détails.

Les détails sur les valeurs attendues se trouvent dans [Document 30223, Lignes directrices pour le rapport de qualité des molécules Saphyr](#).

### Remarques importantes

#### Considérations générales

- Nous vous recommandons d'utiliser un bloc de refroidissement des tubes en aluminium pré-refroidi sur de la glace pour contenir les composants de réaction décongelés et pour assembler les réactions de marquage.
- Les enzymes et les tampons doivent être pipetés avec précision, sans gouttelettes suspendues à l'extérieur de l'embout de la pipette. L'enzyme doit être complètement délivrée dans le tube de réaction et la formation de bulles doit être soigneusement évitée pour garantir des réactions reproductibles. Il est pour cela préférable de tenir les tubes de réactifs à hauteur d'yeux lors de l'aspiration ou de la distribution, pour visualiser le processus.



- Le mélange à la pipette lent et minutieux du master mix DLE-1 avec l'ADNg est une étape critique et favorise l'homogénéité de l'ADN et l'accessibilité des enzymes pour un marquage efficace d'un ADN très visqueux.
- Ce protocole implique la manipulation de molécules fluorescentes sensibles à la lumière. Il est important de minimiser l'exposition à la lumière des réactions et des réactifs photosensibles pendant le travail. De plus, protégez de la lumière les réactifs photosensibles pendant le stockage.
- La concentration d'ADN marqué est mesurée au jour 2, après marquage, nettoyage, homogénéisation et coloration. L'homogénéité de l'ADN est évaluée par quantification en double (coefficient de variation <0,30). L'ADN marqué homogène permet une estimation précise de la concentration et une charge d'ADN plus uniforme sur la puce. La concentration d'ADN marqué doit être comprise entre 4 ng/μl et 12 ng/μl.

### Nombre d'échantillons

- Jusqu'à 12 échantillons peuvent être traités simultanément.
  - Chaque kit Bionano Prep DLS contient suffisamment de réactifs pour 10 échantillons.

### Conditions requises pour démarrer l'ADN

- L'échantillon doit contenir de l'ADNg de longueur mégabase, généralement déterminé par une viscosité élevée et/ou par ECP de l'échantillon.
- La concentration d'ADNg doit être comprise entre 36 ng/μl et 150 ng/μl.
  - Les échantillons d'ADNg >150 ng/μl doivent être dilués avec du tampon TE (pH 8,0) à 50 ng/μl - 150 ng/μl, mélangés 5 fois avec un cône à embout large et laissés au repos pendant une nuit à température ambiante. Vérifiez la concentration et l'homogénéité finales de l'ADN avant le marquage.
  - Pour les échantillons d'ADNg <36 ng/μl, contactez l'assistance technique à l'adresse [Support@bionanogenomics.com](mailto:Support@bionanogenomics.com).

### Détermination de l'enzyme

- Pour les échantillons non humains, avant de démarrer le protocole DLS, importez les données de séquence de votre échantillon dans Bionano Access ou le logiciel autonome [Label Density Calculator](#) pour vous assurer que le marquage DLS est le choix approprié pour votre échantillon. La densité réelle de votre marqueur doit être dans  $\pm 2$  marqueurs de prédit. Contactez l'assistance technique à l'adresse [Support@bionanogenomics.com](mailto:Support@bionanogenomics.com) pour obtenir des conseils en cas d'incertitude.

- Pour les échantillons non humains, les outils d'analyse en aval actuels sont plus efficaces avec les génomes qui ont des densités de marqueurs DLS comprises entre 9 et 25 marqueurs pour 100 kpb.

## Manipulation de l'ADNg

### Généralités :

- Ce protocole implique la manipulation d'ADNg visqueux, qui est difficile à pipeter avec précision. Il est essentiel de suivre attentivement toutes les étapes de ce protocole pour assurer un échantillonnage précis de l'ADN afin d'atteindre des rapports enzyme-ADN et ADN-coloration appropriés et de réduire la manipulation inutile de l'ADNg, susceptible d'entraîner des molécules insuffisamment longues pour l'analyse.

### Ajout d'ADNg à la réaction de marquage :

- Pour assurer un prélèvement précis à partir de la solution mère d'ADNg visqueux, commencez par maximiser l'homogénéité de la solution mère d'ADN en mélangeant doucement 5 fois la solution d'ADN équilibrée à température ambiante avec un cône à embout large, et suivez les directives ci-dessous pour un pipetage correct dans et hors d'un embout de pipette standard, ou d'une pipette à déplacement positif, pour une distribution complète.
- Avant de prélever de l'ADNg visqueux avec un embout standard, pipetez un volume d'eau identique et marquez le niveau de solution sur l'embout avec un marqueur à pointe fine pour servir d'indicateur lors du pipetage de l'ADNg. Conservez l'embout marqué comme indicateur et utilisez-en un nouveau pour le prélèvement de l'ADN. Il est également possible d'utiliser une pipette à déplacement positif pour améliorer la cohérence lors du pipetage d'ADNg visqueux.
- Pour aspirer de l'ADNg visqueux avec un embout standard, maintenez le tube de solution mère d'ADN à hauteur d'yeux, appuyez sur le piston de la pipette jusqu'à la première butée, plongez l'embout de la pipette vers le milieu de la solution visqueuse et relâchez délicatement le piston, aussi **lentement** que possible, tout en faisant tourner l'embout, pour attirer l'ADN visqueux dans l'embout, tout en surveillant attentivement l'aspiration de l'ADN. Gardez la pointe immergée même après que la solution d'ADN visqueux ait cessé de monter et se soit stabilisée (utilisez l'embout marqué comme indicateur approximatif pour voir si la solution visqueuse se stabilise au niveau approprié). L'ADN visqueux peut prendre jusqu'à 30 secondes pour remplir l'embout jusqu'au niveau approprié. Relâcher le piston trop rapidement peut entraîner la formation d'une bulle dans l'embout, entraînant un sous-échantillonnage (recommencez si cela se produit). Une fois que la solution dans l'embout de la pipette s'est stabilisée et pendant que l'embout est encore immergé dans la solution d'ADN, frottez l'embout 5 fois contre le fond du tube en décrivant un mouvement circulaire. Retirez l'embout de la solution d'ADN et inspectez visuellement pour vérifier qu'il est rempli au niveau approprié, en le comparant à l'embout marqué. Le retrait prématuré de l'embout de la pipette de la solution d'ADNg ou le frottement incorrect de l'embout au fond du tube peut produire une bulle à l'extrémité de l'embout de la pipette, indiquant un sous-échantillonnage (recommencer si cela se produit). **Un pipetage précis de l'ADNg visqueux est**

**possible avec de la pratique et de la patience.**

- Pour déposer la totalité du volume d'ADNg visqueux dans un tube ou un master mix, tenez le tube de réaction pour une visualisation rapprochée et distribuez l'ADN en insérant l'embout de la pipette dans la solution et en appuyant doucement sur le piston jusqu'à la première butée, puis jusqu'à la seconde butée, tout en surveillant la libération de l'ADN, jusqu'à ce que le dernier fragment d'ADN soit sorti de l'embout. Retirez immédiatement l'embout dès que le dernier fragment d'ADN a quitté l'embout de la pipette tout en maintenant une pression constante pour éviter l'absorption de liquide ou l'introduction de bulles d'air. Inspectez visuellement l'embout après l'avoir retiré de la solution pour confirmer qu'il est vide.

## Protocole de marquage DLS Bionano

### Début du protocole, jour 1

Voir la section *Remarques importantes* pour la manipulation correcte de l'ADNg. La concentration d'ADNg doit être comprise entre 36 ng/μl et 150 ng/μl.

Voir les sections *Contenu du kit* et *Matériel fourni par l'utilisateur* pour une manipulation et un stockage appropriés des réactifs.

### Mise en place

1. Décongelez 20 DL-Green. Vortexez bien et passez à la centrifugeuse. Maintenez sur la glace dans un bloc d'aluminium à 4 °C.
2. Décongelez 5 tampons DLE-1. Vortexez bien et passez à la centrifugeuse. Maintenez à température ambiante jusqu'à utilisation.
3. Tapotez 20 enzymes DLE-1 trois fois et passez à la centrifugeuse. Conservez sur paillasse dans un bloc enzymatique à -20 °C.
4. Retirez le tube d'eau ultra pure de 4 °C (si nécessaire) et conservez à température ambiante.

### Marquage DLE-1 (réaction de 30 μl, 2 heures 10 minutes)

#### Dilution de l'ADNg et combinaison avec le mélange de marquage (10 minutes)

5. Si la quantification de l'ADNg a déjà été effectuée juste avant le marquage, passez à l'étape 6. Si ce n'est pas le cas, passez à la centrifugeuse, puis répétez la quantification avant de passer à l'étape 6.
6. Dans un tube PCR à paroi mince, ajoutez 750 ng d'ADNg (a) à de l'eau ultra pure (b) pour un volume total de 21 μl.
  - a.  $750 \text{ ng} / [\text{concentration d'ADNg}] = \mu\text{l d'ADNg}$
  - b.  $21 \mu\text{l} - (\mu\text{l d'ADNg}) = \mu\text{l d'eau ultra pure.}$

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

7. Si vous traitez plusieurs échantillons, préparez un Master Mix de marquage dans un tube sombre de 0,5 ml. Ajoutez les composants dans l'ordre indiqué dans le tableau ci-dessous. Pipetez la totalité du volume de Master Mix de marquage de haut en bas avec une pointe de pipette standard, 5 fois, en prenant soin de ne pas générer de bulles. Passez à la centrifugeuse et conservez dans un bloc en aluminium sur de la glace jusqu'à utilisation. Utilisez dans les 30 minutes suivant le mélange des composants.

**Remarque :** Après avoir préparé le Master Mix, laissez 5 tampons DLE-1 à température ambiante pour les utiliser à l'étape 12.

#### **Tableau de calcul du Master Mix de marquage**

Réaction de marquage	1 échantillon	Nb. d'échantillons	Excès de Master Mix	Master Mix total
ADNg (750 ng) + Eau ultra pure	21 µl			
5 tampons DLE-1	6,0 µl		× 1,2	µl
20 DL-Green	1,5 µl		× 1,2	µl
20 DLE-1	1,5 µl		× 1,2	µl
Volume final de la réaction	30 µl			µl

8. À l'aide d'un embout de pipette standard, ajoutez 9 µl de Master Mix sur 21 µl d'ADNg + eau ultra pure, sans mélanger. À l'aide d'un embout de pipette standard avec une pipette réglée à 28 µl, mélangez lentement l'échantillon de haut en bas 5 fois (1 fois en haut + 1 fois en bas = 1 fois). Passez à la centrifugeuse pendant 2 secondes. Protégez de la lumière. ⚠

Voir la vidéo intitulée [Mixage Master Mix DLS](#) dans la section [Kit de marquage DLS](#) du site Web d'assistance.

**Remarque :** Un échantillon soigneusement mélangé est nécessaire pour marquer efficacement toutes les molécules. Aspirez l'échantillon par le bas et distribuez-le près du haut (sans contact entre l'embout de la pipette et le tube) pour maximiser le mélange.

#### **Marquage (2 heures)**

9. Incubez dans un thermocycleur à l'aide d'un couvercle chauffant réglé à 47 °C (ou sur « Marche » si aucun choix de température n'est disponible) :
- 2 heures à 37 °C
  - Maintenez à 4 °C jusqu'à l'étape suivante. Une fois le thermocycleur retiré, passez rapidement à l'étape suivante. Centrifugez brièvement.

#### **Digestion de la protéinase K et nettoyage DL-Green (2 heures 15 minutes)**

##### **Digestion de la protéinase K (35 minutes)**

10. Distribuez 5 µl de protéinase K Puregene (Qiagen) directement dans la masse centrale de l'échantillon contenu dans le tube PCR. Pour éviter de retirer par inadvertance l'ADN qui pourrait adhérer à l'embout, ne mélangez pas.

11. Incubez dans un thermocycleur à l'aide d'un couvercle chauffant réglé à 60 °C (ou sur « Marche » si aucun choix de température n'est disponible) :
  - a. 30 minutes à 50 °C
  - b. Maintenez à 4 °C jusqu'à l'étape suivante. Une fois le thermocycleur retiré, passez rapidement à l'étape suivante. Centrifugez brièvement.

### Adsorption membranaire (1 heure 40 minutes)

Pour les étapes 12 à 18, veuillez consulter la vidéo intitulée [Démonstration de la membrane DLS](#) dans la section [Kit de marquage DLS](#) du site Web d'assistance.

12. Pour chaque échantillon, mouillez le dessous d'une membrane DLS avec 1 tampon DLE-1 dans la plaque DLS 24 puits :
  - a. Pour chaque échantillon, préparez 60 µl de tampon DLE-1 (12 µl pour 5 tampons DLE-1 + 48 µl d'eau ultra pure). Vortexez pour mélanger et centrifugez.
  - b. Distribuez 25 µl de tampon DLE-1 au centre d'un puits de la plaque DLS 24 puits.
  - c. Utilisez une pince pour placer une membrane DLS sur le tampon.
  - d. Scellez immédiatement avec une bande scellante pour plaque DLS pour empêcher l'évaporation. Tout en tenant la microplaque, appliquez une pression pour fixer la bande scellante sur le bord supérieur des puits.
  - e. Laissez la membrane se mouiller complètement pendant 10 minutes.

**Remarque :** La membrane doit prendre une couleur bleuâtre une fois complètement mouillée. Voir autour de la marque 0:55 de la vidéo [DLS Démo de membrane](#). Si la membrane n'est pas complètement mouillée après 10 minutes, utilisez une nouvelle membrane. Un tampon supplémentaire DLE-1 devra peut-être être préparé pour la nouvelle membrane.

13. Effectuez le nettoyage au DL-Green en distribuant un échantillon d'ADN marqué au centre de la membrane mouillée :
  - a. Tenez fermement et attentivement la plaque et retirez délicatement la bande scellante pour plaque DLS. À l'aide d'un embout de pipette standard avec la pipette réglée sur 38 µl, aspirez tout le volume (~ 35 µl) d'ADN marqué.
  - b. Déposez soigneusement l'ADN marqué au milieu de la membrane DLS mouillée.
  - c. Scellez immédiatement avec une bande scellante pour plaque DLS pour empêcher l'évaporation. Tout en tenant la microplaque, appliquez une pression pour fixer la bande scellante sur le bord supérieur des puits.
  - d. Protégez la plaque DLS 24 puits de la lumière (couvrez) et incubez à température ambiante pendant 1 heure. Assurez-vous que la plaque reste intacte, sans mouvement accidentel de la plaque pendant l'incubation. ⚠
  - e. Dix minutes avant la fin de l'incubation, mouillez une seconde membrane dans un puits inutilisé de la plaque DLS 24 puits, en suivant les étapes 12b à 12e ci-dessus.
  - f. Après 1 heure, tenez fermement et attentivement la plaque et retirez délicatement la bande scellante pour plaque DLS.
  - g. À l'aide d'un embout de pipette standard non filtré, avec une pipette réglée à 38 µl, aspirez lentement la totalité de l'échantillon marqué tout en établissant un contact perpendiculaire à la membrane et déplacez l'embout sur la zone d'ADN tout en aspirant pour collecter l'ADN.

14. Répétez les étapes 13b à 13d, mais distribuez sur la deuxième membrane (inutilisée) préparée à l'étape 13e et incubez pendant 30 minutes.
15. Pendant la période d'incubation de 30 minutes, amenez le DTT 1M, 4 tampons d'écoulement et le colorant d'ADN à température ambiante. Une fois décongelés, vortexez bien tous les tubes et centrifugez brièvement pour récupérer le contenu. Gardez tous les tubes à température ambiante jusqu'au moment de les utiliser.
16. Au bout de 30 minutes, tenez fermement et attentivement la plaque et retirez délicatement la bande scellante pour plaque DLS.
17. À l'aide d'un embout de pipette standard non filtré, avec une pipette réglée à 35 µl, aspirez lentement la totalité de l'échantillon marqué en établissant un contact perpendiculaire à la membrane et déplacez l'embout sur la zone d'ADN en aspirant pour collecter l'ADN. Transférez dans un nouveau tube PCR ou un tube sombre de 0,5 ml. Passez à la centrifugeuse pendant 2 secondes. Protégez les tubes de la lumière. ⚠
18. À l'aide d'un embout de pipette standard de 200 µl, aspirez 20 µl de l'échantillon marqué du tube PCR ou du tube sombre de 0,5 ml et versez dans le fond du tube sombre à fond rond DLS (2 ml). Passez à l'étape suivante (**Coloration et homogénéisation de l'ADN**).
  - a. Si le volume d'échantillon récupéré est <20 µl, portez le volume à un total de 20 µl en utilisant 1 tampon DLE-1.

### Coloration et homogénéisation de l'ADN (1 heure 10 minutes)

#### **Coloration et homogénéisation (1 heure 10 minutes)**

19. Dans un nouveau tube sombre de 0,5 ml, préparez le Master Mix de coloration selon le tableau ci-dessous. Vortexez pour mélanger puis centrifugez.

#### **Tableau de calcul du xMaster Mix de coloration**

Réaction de coloration	1 échantillon	Nb. d'échantillons	Excès de Master Mix	Master Mix total
Échantillon marqué (étape 19)	20 µl			
4 tampons de flux	15 µl		× 1,25	µl
1M DTT	6 µl		× 1,25	µl
Colorant pour ADN	3,5 µl		× 1,25	µl
Eau ultra pure	15,5 µl		× 1,25	µl
<b>Total</b>	<b>60 µl</b>			<b>µl</b>

**Remarque :** Le tampon d'écoulement est visqueux, par conséquent pipetez lentement les solutions qui le contiennent pour augmenter la précision.

20. Pour chaque ADN marqué, ajoutez 40 µl de Staining Master Mix au-dessus de l'échantillon marqué (20 µl)

contenu dans le tube sombre à fond rond DLS (2 ml). Ne mélangez pas.

**Remarque :** Le Master Mix est distribué au-dessus de l'échantillon marqué afin d'éviter de retirer par inadvertance de l'ADN qui pourrait coller à l'embout de la pipette.

21. Placez les tubes sombres à fond rond DLS contenant les échantillons dans le HulaMixer (Thermo Fisher) avec une vitesse réglée sur 5 tr/min. La surface du portoir de tubes doit être plane et parallèle à la surface de travail. Mélangez pendant 1 heure à température ambiante avec toutes les options autres que la rotation désactivées.

22. Après 1 heure, retirez l'échantillon du HulaMixer. Passez à la centrifugeuse pour recueillir le contenu.

**Remarque :** Ne laissez pas la rotation se poursuivre pendant plus d'une heure, car cela pourrait diminuer la molécule N50.

23. À conserver une nuit à température ambiante, à l'abri de la lumière.



## Début du protocole, Jour 2

Consultez la liste des consommables et équipements fournis par l'utilisateur pour vous assurer qu'ils sont tous disponibles.

### Quantification de l'ADN marqué et coloré (30 minutes)

#### Quantification de l'ADN (30 minutes)

Déterminez la concentration finale de l'ADN marqué et coloré. Les résultats obtenus seront meilleurs si la concentration en ADN (moyenne de deux mesures) est comprise entre 4 ng/µl et 12 ng/µl. La variation de la concentration finale est due aux difficultés de prélèvement précis de l'ADN visqueux de départ et à la variation de la récupération de l'ADN à partir de l'étape d'élimination du DL-Green. Si la concentration de votre échantillon ne se situe pas dans cette plage, reportez-vous à la section Résolution des problèmes pour obtenir des recommandations.

#### Kit de dosage Qubit dsDNA HS (haute sensibilité) et fluoromètre Qubit :

**Remarque :** Le protocole standard du test de dosage Qubit dsDNA HS ne fournira pas de mesures précises de la concentration en raison des longueurs extrêmement importantes de l'ADN marqué. Nous avons modifié le protocole Qubit pour inclure une étape de sonication pour fragmenter un aliquot de l'ADN marqué, afin d'assurer des mesures de concentration précises. Reportez-vous au manuel d'utilisation du kit de dosage Qubit dsDNA HS pour plus de détails sur le kit.

1. À l'aide d'un cône à embout large sur une pipette de 200 µl réglée à 50 µl, mélangez l'ADN marqué et coloré 5 fois. Centrifugation.
2. Laissez les étalons Qubit HS et l'ADN marqué revenir à température ambiante (au moins 30 minutes).
3. Préparez des tubes de dosage Qubit de 0,5 ml :
  - a. 2 tubes à essai séparés pour la mesure de l'étalon HS, chacun contenant 10 µl de tampon Qubit HS.
  - b. 2 tubes à essai séparés par échantillon marqué, chacun contenant 18 µl de tampon Qubit HS.
4. À l'aide d'un embout de pipette standard ou d'une pipette à déplacement positif, prélevez deux aliquotes distinctes de 2 µl de chaque échantillon et distribuez-les dans 18 µl de tampon HS Qubit dans un tube de dosage Qubit, avec embout de rinçage. Placez les tubes Qubit dans un portoir flottant et nettoyez-les dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes. Pendant la sonication, préparez la solution étalon comme décrit ci-dessous.

**Remarque :** Si une longue chaîne d'ADN est accrochée à l'embout lors du retrait de l'embout du tube, redistribuez l'échantillon dans le tube et répétez le retrait de l'aliquote avec un nouvel embout.

- a. Si un bain à ultrasons n'est pas disponible, vortexez pendant au moins 30 secondes à vitesse maximale, puis centrifugez brièvement pendant 2 secondes.
5. Préparez la solution étalon en diluant le réactif de dosage de colorant dans le tampon de dilution HS (1:200) :
    - a. Préparez 200 µl de solution étalon pour chacun des deux étalons (400 µl au total).
    - b. Préparez 200 µl de solution étalon pour chaque aliquote d'échantillon (400 µl pour chaque échantillon).

6. Pour les étalons d'ADN Qubit, ajoutez 10 µl des étalons 1 et 2 pour séparer les tubes à essai Qubit étiquetés contenant 10 µl de tampon Qubit HS de l'étape 3a.
7. Une fois la sonication terminée, récupérez les tubes et centrifugez brièvement pour recueillir la solution au fond des tubes. Vortexez les tubes pendant 5 secondes à vitesse maximale, puis centrifugez pendant 2 secondes.
8. Ajoutez 180 µl de solution étalon (préparée à l'étape 5) dans chaque tube d'ADN marqué soniqué et d'étalon d'ADN Qubit plus tampon HS. Vortexez pendant 5 secondes et centrifugez brièvement pour recueillir la solution au fond des tubes.
9. Incubez les échantillons dans l'obscurité pendant 2 minutes avant quantification sur le fluoromètre Qubit.

**Remarque :** La concentration d'ADN marqué devrait idéalement se situer entre 4 ng/µl et 12 ng/µl avec un CV (écart type ÷ moyenne) entre les prélèvements <0,30. Si les deux prélèvements sont en dehors de la plage 4 ng/µl-12 ng/µl, voir la section **Résolution des problèmes** ci-dessous. Si un échantillon se situe entre 4 et 12 ng/µl et que l'autre est en dehors de cette plage, suivez ces directives :

- Si un prélèvement est compris entre 4 ng/µl et 12 ng/µl et l'autre est supérieur à 12 ng/µl, procédez au chargement de la puce.
- Si un prélèvement est compris entre 4 ng/µl et 12 ng/µl et l'autre est inférieur à 4 ng/µl, répétez le mélange au HulaMixer pendant 30 minutes et recommencez la quantification.

10. Enregistrez les mesures de Qubit dans le tableau de la page suivante.
11. Si vous ne comptez pas analyser les échantillons le même jour, conservez-les dans l'obscurité à 4 °C jusqu'à leur utilisation.

**Remarque :** Les échantillons marqués ne montrent aucune réduction des performances s'ils sont utilisés dans un délai d'un mois.

### **Mesures de Qubit d'ADNg**

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

### **Chargement de la puce Bionano (40 minutes ; 30 minutes pour amener la puce à température ambiante et 10 minutes pour charger)**

Reportez-vous au **Guide de l'utilisateur du système Saphyr** (pour les références Saphyr [60325](#) ou [60239](#)) pour des instructions complètes sur le chargement de la puce et le fonctionnement de l'instrument.

**Remarque :** Lors de l'aspiration d'un échantillon marqué DLS pour le chargement de la puce, tirez à partir du milieu du tube.

## Résolution des problèmes

L'échantillon marqué doit être conservé à 4 °C dans une boîte à l'abri de la lumière lorsqu'il n'est pas utilisé. L'échantillon marqué doit être amené à température ambiante avant la quantification et/ou le chargement de la puce.

Valeurs attendues basées sur l'expérience interne de Bionano Genomics avec des échantillons humains :

N50 (> 150 kbp)	Marqueurs /100 kbp	Taux de carte	Écart positif des marqueurs	Écart négatif des marqueurs
>230 kbp	14 - 17	>70 %	<10 %	<15 %

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

**Preuve** : Le CV des mesures de quantification ne répond pas aux exigences du protocole d'extraction de l'ADN (par exemple, CV >0,30 entre les mesures gauche, médiane et droite dans les protocoles SP).

Étapes à suivre :

1. Aspirez et distribuez l'échantillon lentement à l'aide d'un cône à embout large 5 fois.
2. Incubez l'ADNg à température ambiante pendant 1 à 3 jours.
3. Aspirez et distribuez l'échantillon lentement à l'aide d'un cône à embout large 5 fois.
4. Quantifiez avec le dosage à large plage Qubit.

### B. L'ADNg n'est pas visqueux

**Preuve** : La consistance de l'échantillon est très fluide (non visqueuse) et facile à pipetter, mais la concentration est >35 ng/μl.

L'échantillon ne contient probablement pas d'ADNg de haut poids moléculaire.

Évaluez la taille de l'ADNg de départ par électrophorèse sur gel en champ pulsé (ECP) avant le marquage.

Évaluez la méthode de préparation des échantillons et la qualité et l'âge de l'apport matériel et répétez l'extraction de l'ADN à partir de l'échantillon biologique.

### C. La concentration d'ADNg est <36 ng/μl

**Preuve** : La concentration d'ADNg mesurée à la fin du protocole d'extraction d'ADN est inférieure à 36 ng/μl.

Contactez l'assistance de Bionano Genomics à l'adresse [Support@bionanogenomics.com](mailto:Support@bionanogenomics.com)

### D. L'échantillon marqué est trop visqueux

**Preuve** : L'échantillon prend un temps anormalement long (supérieur à 30 secondes) pour remplir les branches de la puce. .Contactez l'assistance de Bionano Genomics à l'adresse [Support@bionanogenomics.com](mailto:Support@bionanogenomics.com).

## E. La densité du marqueur est plus faible que prévu

**Preuve** : La densité moyenne des marqueurs détectés sera toujours inférieure à la densité moyenne prévue du site. Cela est dû à une combinaison de regroupement de sites, d'étirement de l'ADN et de résolution optique. Par exemple, la densité de site moyenne pour le DLE-1 chez l'homme est de 20,7 marqueurs pour 100 kpb, mais la densité de marqueurs détectée peut varier d'un peu plus de 14 à un peu moins de 17 marqueurs pour 100 kpb.

Une faible densité de marqueurs peut être le résultat d'un marquage enzymatique sous-optimal, d'un photoblanchiment des fluorophores ou de problèmes de détection.

Causes potentielles d'une faible densité de marqueurs pendant le protocole :

- Substances inhibitrices dans la préparation de l'ADN.
- Mélange inadéquat de l'ADNg visqueux et du master mix.
- Mauvaise manipulation du DLE-1 (exposition à température élevée, mélange au vortex, etc.).
- Exposition de la réaction de marquage à la lumière et photoblanchiment du DL-Green.
- Exposition prolongée de DL-Green au pH du master mix (>30 min).
- Problème matériel.

## F. L'ADN marqué est <4 ng/μl pour les deux mesures

**Preuve** : Les deux mesures sont en dehors de la plage de concentration de 4 ng/μl à 12 ng/μl à l'aide du kit de dosage à haute sensibilité Qubit.

Étapes à suivre :

1. Répétez la quantification de la solution mère d'ADN.
2. Si l'échantillon est de 3 à 4 ng/μl, procédez au chargement à vos risques et périls, mais le débit attendu ne sera probablement pas atteint.
3. Si l'échantillon est < 3 ng/μl, ne chargez pas. Vérifiez la concentration d'ADN de départ et répétez le test de marquage.

## G. L'ADN marqué est >12 ng/μl pour les deux mesures

**Preuve** : Les deux mesures sont en dehors de la plage de concentration de 4 ng/μl à 12 ng/μl à l'aide du kit de dosage à haute sensibilité Qubit.

Étapes à suivre :

1. Si l'échantillon est >12 ng/μl, contactez le service clients de Bionano ([Support@bionanogenomics.com](mailto:Support@bionanogenomics.com)) pour obtenir des conseils.
2. Vous pouvez procéder au chargement à vos risques et périls, mais l'échantillon marqué peut obstruer la puce et avoir une molécule N50 réduite.

## H. Le N50 (≥150 kbp) est inférieur à 230 kbp, ou le N50 (≥20 kbp) est inférieur à 150 kbp

**Preuve** : Les valeurs N50 du tableau de bord et les résultats du rapport de qualité des molécules Bionano Access 30206 Rév. A, Protocole Direct Label and Stain Bionano Prep

(MQR) n'atteignent pas les spécifications énumérées ci-dessus. Étapes à suivre :

1. Évaluez la taille de l'ADNg de départ par électrophorèse sur gel en champ pulsé (ECP).
2. Évaluez la méthode de préparation des échantillons s'il n'y a pas d'ADNg de masse moléculaire élevée (mégabase).
3. Si la taille de l'ADNg de départ est importante, procédez à un nouveau marquage de l'ADNg en veillant à éviter un pipetage excessif ou un pipetage trop rapide.
4. Contactez le service client Bionano ([Support@bionanogenomics.com](mailto:Support@bionanogenomics.com)) pour savoir si vous devez repasser l'échantillon sur une puce différente.

## I. Le taux de cartographie est faible (échantillons humains)

**Preuve** : Le taux de carte Bionano Access MQR est

inférieur à 70 %. Instructions à suivre :

1. La densité de marqueurs est-elle faible (< 14 marqueurs pour 100 kbp) ?
  - a. Si tel est le cas, répétez la quantification de la solution mère d'ADNg de départ et répétez le marquage après avoir examiné les causes potentielles énumérées dans la section D.
2. Si la densité de marqueurs est comprise entre 14 et 17 marqueurs par 100 kbp sur toutes les analyses, contactez l'assistance.
3. Vérifiez la valeur N50 ( $\geq 20$  kbp) dans le MQR. Si cette valeur est faible (par exemple, moins de 100 kbp), cela peut entraîner des problèmes avec le taux de carte

## J. Le débit effectif est inférieur à 10 Gbp par analyse

**Preuve** : Le débit après l'analyse 7 est toujours inférieur à 10 Gbp par analyse dans le tableau de bord ICS

ou Access. Étapes à suivre :

1. Répétez la quantification de l'échantillon marqué.
2. S'assurer que la cuve à circulation est correctement

hydratée avec de l'eau sans nucléase. Causes potentielles :

- Faible N50 ( $\geq 20$  kbp) et/ou faible N50 ( $\geq 150$  kbp).
- Évaporation provoquant une augmentation de concentration du sel, modifiant la migration de l'ADN.
  - a. Les puits d'entrée et de sortie ont-ils été remplis (réhydratés) avec de l'eau exempte de nucléase avant de placer les bouchons/clips à puce ?
- ADN non homogène.
- ADN en dehors de la plage de 4 ng/ $\mu$ l à 12 ng/ $\mu$ l.

## Foire aux questions

---

### **1. Combien de temps à l'avance les membranes peuvent-elles être mouillées sur la plaque ?**

Nous recommandons 10 minutes avant d'ajouter l'échantillon à la membrane. Il est possible de mouiller les deux membranes en même temps (10 minutes avant la première utilisation de la membrane), mais cela dépend entièrement de la capacité de l'utilisateur à créer un joint étanche avec la bande scellante pour empêcher l'évaporation. Gardez la bande scellante en place à moins d'appliquer l'échantillon.

### **2. Combien de temps la réaction de marquage peut-elle rester à 4°C ?**

Toute une nuit, à condition qu'elle soit à l'abri de la lumière.

### **3. Combien de temps un échantillon peut-il rester à 4 °C après l'étape Pro K ?**

Toute une nuit, à condition qu'elle soit à l'abri de la lumière.

### **4. Quel est l'impact d'une concentration d'échantillon d'ADN hors plage ?**

Nous n'avons pas eu de problèmes pour charger des échantillons avec une concentration d'ADN aussi élevée que 12 ng/ul, bien que les échantillons supérieurs à 12 ng/ul puissent obstruer la puce si l'homogénéité est médiocre ou s'ils ne sont pas correctement colorés. En revanche, nous avons constaté que les échantillons avec une concentration d'ADN <4 ng/ul peuvent ne pas collecter suffisamment de données pour un rendement efficace.

### **5. Combien de temps l'échantillon est-il bon ?**

Bien que nous ayons constaté que les échantillons d'ADN colorés dans des conditions optimales peuvent rester à 4 °C à l'abri de la lumière jusqu'à un mois sans dégradation des paramètres de l'échantillon, nous suggérons d'analyser les échantillons dans la semaine afin de réduire le risque de problèmes de qualité de l'échantillon qui peuvent se développer dans le temps.

### **6. Le fond vert dans les échantillons marqués DLS est plus élevé que dans les échantillons marqués NLRS. Est-ce un problème ?**

Le DL-Green restant affiche souvent un arrière-plan plus élevé dans les images prises sur le Saphyr que ce qui est vu dans les échantillons marqués NLRS. Ceci est normal et les étapes de nettoyage de la membrane suppriment suffisamment de DL-Green pour ne pas affecter les valeurs de données. L'écart positif des marqueurs (PLV) provenant de fluorophores supplémentaires se produit de manière aléatoire et n'est pas un problème s'il respecte les valeurs attendues.

## 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 SDS, les certificats d'analyse, les questions fréquemment posées et d'autres documents connexes à partir du site Internet de l'Assistance ou sur demande par e-mail et par téléphone.

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