



# **Bionano Prep SP Protocole d'extraction de l'ADN des tissus et des tumeurs**

Numéro de document : 30339

Révision du document : A

## Table des matières

---

Mention légale .....	3
Historique des révisions.....	4
Présentation du flux de travail.....	5
SP Kit d'extraction d'ADN des tissus et des tumeurs et matériel fourni par l'utilisateur.....	6
Introduction et remarques importantes.....	7
Introduction .....	7
Présentation .....	7
Remarques importantes .....	7
Bionano Prep SP Protocole d'extraction de l'ADN des tissus et des tumeurs .....	11
Extraction d'ADNg (4,5 heures).....	12
Homogénéisation de la solution d'ADNg (70 minutes).....	17
Quantification de l'ADNg (45 minutes).....	18
Résolution des problèmes .....	20
L'ADNg n'est pas lié au disque Nanobind.....	20
L'ADNg n'est pas homogène avant le marquage.....	20
L'ADNg n'est pas visqueux.....	20
Foire aux questions .....	21
Quels types de tissus sont compatibles avec ce protocole ? .....	21
Quels facteurs influent sur la qualité de l'ADNg ? .....	21
Quels facteurs influent sur le rendement en ADNg ?.....	21
Combien d'échantillons peuvent être traités ? .....	21
Quels conservateurs tissulaires sont compatibles avec ce protocole ?.....	21
Annexe : Préparation de tissus frais ou de tumeurs pour la conservation .....	22
Assistance technique .....	23

## Mention légale

---

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

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

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

### **Brevets**

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

### **Marques**

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

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

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

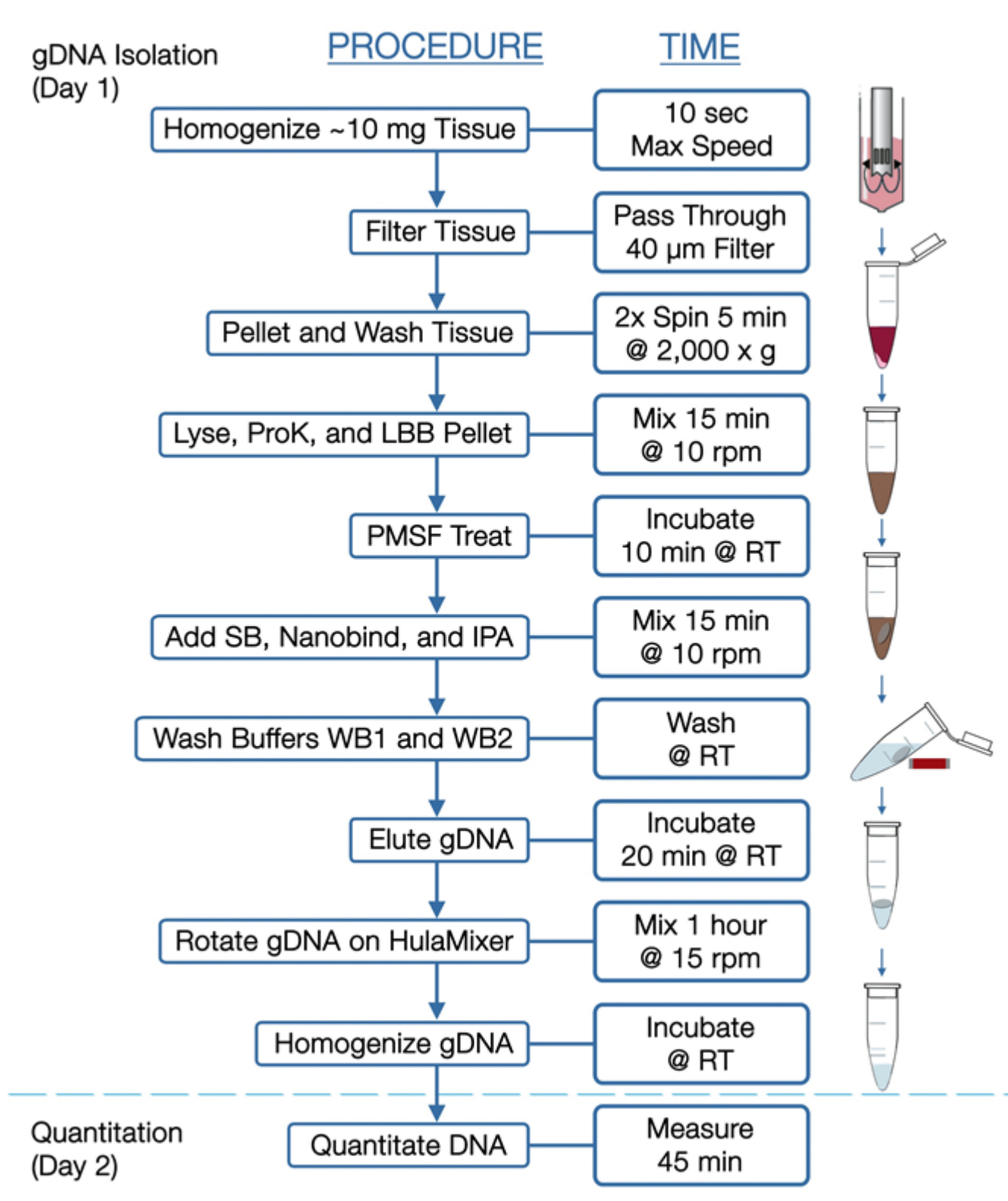
© Copyright 2022 Bionano Genomics, Inc. Tous droits réservés.

## Historique des révisions

---

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

## Présentation du flux de travail



## SP Kit d'extraction d'ADN des tissus et des tumeurs et matériel fourni par l'utilisateur

Tableau 1 : Bionano Prep SP Contenu du kit d'extraction de l'ADN des tissus et des tumeurs (Réf. n° 80038, 10 préparations)

Article	Quantité	Référence	Conser- vation
Disques Nanobind 4 mm	10 disques	20402	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Tubes de centrifugeuse Protein LoBind, 1,5 ml	10 tubes	20380	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Tubes de centrifugeuse, 2 ml	10 tubes	20396	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Tamis cellulaire 40 µm	10 de chaque	20403	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Détergent	150 µl	20405	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Solution tampon saline	1,1 ml	20404	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Tampon d'homogénéisation	96 ml	20406	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Tampon de lavage A	12 ml	20407	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Protéinase K	0,5 ml	20372	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Tampon de lyse et de liaison (LBB)*	2,5 ml	20375	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Tampon de lavage 1 concentré (2,5X) (WB1)*	2 x 3,25 ml	20376	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Tampon de lavage 2 concentré (2,5X) (WB2)	5 ml	20377	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Tampon d'élution (EB)	1,1 ml	20378	Température ambiante (18 °C-25 °C)
Gaines SP	10 de chaque	20381	Température ambiante (18 °C-25 °C)

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

Tableau 2 : Matériel fourni par l'utilisateur

Article	Fournisseur	Réf. catalogue
<b>Jour 1 – Rupture tissulaire, sédimentation, extraction et homogénéisation de l'ADNg</b>		
Récupérateur magnétique Bionano Prep SP (paquet de 2)	Bionano Genomics	80031
Rotor-stator : TissueRuptor (version I ou II)	QIAGEN ou équivalent	9002755
Multiprise (recommandé)	Fournisseur de matériel de laboratoire général	
Sondes jetables pour TissueRuptor	QIAGEN ou équivalent	990890
Portoir à anneau et pince à trois broches (par exemple VWR 76293-368)	Fournisseur général de matériel de laboratoires	
Portoir de tubes magnétique DynaMag-2	Thermo Fisher	12321D
Mélangeur d'échantillons HulaMixer	Thermo Fisher	15920D
Plateaux de pesée	Fournisseur général de matériel de laboratoires	
Échelle de précision	Fournisseur général de matériel de laboratoires	
Tubes de centrifugeuse, 1,5 ml, sans nucléase	VWR	87003-294
Tubes à bouchon à vis avec joint torique, 1,5 ml	Fournisseur général de matériel de laboratoires	
Lame de rasoir	Fournisseur général de matériel de laboratoires	
Poste de sécurité microbiologique (facultatif)	Fournisseur général de matériel de laboratoires	
Glace carbonique (facultatif)	Fournisseur général de matériel de laboratoires	

Bloc en aluminium	Fournisseur général de matériel de laboratoires	
Spatule en métal	VWR	82027-530
Solution de fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF), 100 mM	Sigma-Aldrich	93482
Éthanol 200 Proof, de qualité biologie moléculaire	Sigma-Aldrich	E7023
Isopropanol (IPA), ≥ 99,5 %, de qualité biologie moléculaire	Fisher Scientific	A461-212
Concentré désinfectant, TexQ TX651	Texwipe	TX651
Tubes à centrifuger coniques, 50 ml, PP	Thermo Fisher ou équivalent	14-432-22
Tubes à centrifuger coniques, 15 ml, PP	Thermo Fisher ou équivalent	05-539-12
Centrifugeuse réfrigérée avec rotor de tubes de 1,5/2,0 ml (vitesse de rotation 2 000 x g)	Fournisseur général de matériel de laboratoires	
Centrifugeuse réfrigérée, rotor pour tubes coniques de 15 ml	Fournisseur général de matériel de laboratoires	
Seau à glace et glace	Fournisseur général de matériel de laboratoires	
Pipettes stériles jetables de 5 ml et 10 ml (TD+)	Fournisseur général de matériel de laboratoires	
Mini centrifugeuse de paillasse (vitesse de rotation 2 000 x g)	Labnet	C1301B
Pince à bouts pointus	Electron Microscopy Sciences, ou équivalent	78141-01
Embouts de pipette à grand diamètre, filtrés, aérosol, 200 µl	VWR ou équivalent Rainin	46620-642
Embouts extra-longs de 1 000 µl, stériles	VWR ou équivalent Rainin	16466-008

Pipettes (10, 20, 200 et 1 000 µl) et embouts de pipette filtrés sans nucléase	Fournisseur général de matériel de laboratoires	
<b>Jour 2 – Quantification</b>		
Vortexeur de paillasse	Fournisseur général de matériel de laboratoires	
Bain à ultrasons (facultatif)	Branson ou équivalent	CPX 952-119R
Fluoromètre, Qubit	Thermo Fisher ou équivalent	Q33216
Kit de dosage Qubit® dsDNA BR (large plage)	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, 10 µl, C-10 pour pipette à déplacement pos. (facultatif)	Rainin ou équivalent	17008604

## Introduction et remarques importantes

### Introduction

Ce protocole d'extraction de l'ADN des tissus et des tumeurs Bionano Prep SP peut fournir de l'ADNg de masse moléculaire très élevée (UHMW) en moins de 6 heures à partir d'un lot de 8 échantillons maximum (jusqu'à 4 recommandés pour les utilisateurs novices) avec environ 10 mg de tissu ou de tumeur frais ou congelé. Il utilise une procédure d'homogénéisation, de lyse, de liaison, de lavage et d'éluion qui est courante pour les technologies d'extraction de l'ADNg à base de silice en combinaison avec un nouveau disque paramagnétique. Contrairement aux billes magnétiques et aux colonnes de spin en silice, qui cisailent les segments d'ADNg de grande taille, le disque Nanobind se lie et se délie avec l'ADNg avec beaucoup moins de fragmentation, ce qui donne un ADNg de très haut poids moléculaire. La capacité élevée de liaison de l'ADNg est le résultat d'une nouvelle nanostructure en silice à l'extérieur du disque paramagnétique thermoplastique. Ce protocole a été utilisé pour traiter les tissus du foie, des poumons, des reins, du côlon, des ovaires, de la prostate, des testicules et de l'utérus chez le rat brun, et des tumeurs humaines de la vessie, des poumons, du foie, des reins, du côlon, du sein, de la prostate, du cerveau, de la thyroïde et des ovaires chez l'humain. Ce protocole a été entièrement validé et répliqué par plusieurs utilisateurs en testant des tumeurs humaines du foie, des poumons et du sein, et des reins de rat normaux. L'ADNg préparé à l'aide de ce protocole a été testé avec le marquage DLS. Vous pouvez regarder les vidéos concernant l'[homogénéisation et la filtration](#) des tissus et la [vidéo de formation](#) à l'extraction de l'ADNg SP pour connaître les étapes critiques et la résolution des problèmes. Les étapes mentionnées dans la vidéo correspondent au protocole d'extraction de l'ADN du sang humain congelé Bionano Prep SP ([30246](#)), mais ce sont les mêmes processus qu'ici.

### Présentation

Après homogénéisation dans un tampon contenant de l'éthanol, la lyse des tissus et la digestion par la protéinase K se produisent dans des agents chaotropiques inclus dans un tampon de lyse et l'ADNg libéré se lie au disque Nanobind lors de l'ajout de la solution tampon saline et d'isopropanol.

Après quatre étapes de lavage, le disque est transféré dans un nouveau tube et l'ADNg est élué du disque. 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 équilibré pendant une nuit à température ambiante pour faciliter l'homogénéité de l'ADN, et la concentration est déterminée. La plage de tailles d'ADNg va de 50 Kpb à plus de 1 Mpb.



## Remarques importantes

### Homogénéité de l'ADN

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

### Quantification de l'ADNg

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

Pour évaluer l'homogénéité de l'ADNg, il est essentiel de mesurer la concentration d'ADNg à plusieurs endroits dans la solution. Étant donné que l'ADNg visqueux est difficile à pipeter, suivez les directives fournies dans les sections Remarques importantes et Quantification de l'ADNg ci-dessous pour garantir un pipetage précis. Les dosages standard pour la quantification de la concentration d'ADNg ne fourniront pas des mesures précises d'ADNg long en raison de sa nature visqueuse.

- Une fragmentation efficace de l'ADNg échantillonné via sonication ou mélange au vortex extensif est nécessaire pour obtenir une quantification précise.
- Le coefficient de variation (CV) de trois prélèvements uniques doit être inférieur à 0,30.
- La concentration typique d'ADNg est comprise entre 50 ng/μl et 300 ng/μl.

### Pipetage d'ADNg visqueux

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

### Manipulation de l'ADNg

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

- Une solution limpide d'ADNg est idéale, mais une solution peu limpide ne correspond pas toujours à une mauvaise qualité d'échantillon.
- L'ADNg récupéré en solution est visqueux.
- La présence d'ADNg de taille mégabase est mesurée par électrophorèse sur gel en champ pulsé (ECP).

- L'ADNg récupéré est homogène tel que mesuré avec le test de quantification de l'ADNg Qubit avec un CV < 0,30.

#### Utilisation du récupérateur magnétique Bionano Prep SP

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

#### Apport suggéré (mg de tissu) et qualité des tissus

- Nous recommandons de commencer par 10 mg, mais 5 mg peuvent suffire et jusqu'à 20 mg ou plus peuvent être utilisés en fonction de la teneur en noyaux des tissus par rapport à la masse tissulaire.
- Si possible, nous vous recommandons fortement de préparer des morceaux de tissu d'environ 10 mg avant congélation du tissu. Idéalement, pesez au préalable le tissu frais avant de le congeler et de le conserver à -80 °C.
- Nous vous recommandons d'utiliser des tissus frais ou congelés exempts de débris osseux, de caillots sanguins et de nécrose étendue.
- Les échantillons chirurgicaux doivent être conservés sur de la glace humide ou dans du PBS glacé dès que possible afin de minimiser la dégradation de l'ADN avant de les découper et/ou de les congeler.
- Les tissus compromis (incorrectement manipulés ou conservés) ou les tissus qui ont subi des cycles de congélation-décongélation doivent être évités pour l'extraction de l'ADN UHMW.
- Le taux de réussite interne de l'ADN UHMW extrait à partir d'échantillons tumoraux avec un facteur d'intégrité RIN élevé (Numéro d'intégrité de l'ARN)  $\geq 9,0$  était > 90 %, tandis que le taux de réussite de l'ADN UHMW extrait à partir d'un nombre limité d'échantillons tumoraux avec un facteur d'intégrité RIN significativement inférieur (5-6) était plus faible (< 50 %).

#### Taille du lot

- Nous vous recommandons de traiter jusqu'à 8 échantillons à la fois (jusqu'à 4 à la fois pour les utilisateurs novices).

#### Élimination des déchets dangereux

Tous les déchets présentant un risque biologique, y compris les articles en plastique, doivent être éliminés conformément aux réglementations locales.

Les tampons LBB et WB1 contiennent du chlorhydrate de guanidine (GuHCl). Le GuHCl est nocif en cas

Pour la recherche uniquement.  
Ne pas utiliser dans les procédures

d'ingestion ou d'inhalation et provoque une irritation de la peau et des yeux. NE PAS mélanger avec de l'eau de Javel ou des réactifs acides. Les déchets liquides contenant du  $\text{GuHCl}$  doivent être décontaminés en toute sécurité avec un désinfectant à base d'ammonium quaternaire avant leur élimination dans un flux de déchets dangereux. Nous recommandons l'utilisation d'eau de Javel pour la décontamination du surnageant du culot cellulaire et de TexQ pour la décontamination de toutes les solutions

Pour la recherche uniquement.  
Ne pas utiliser dans les procédures

mélangées avec du GuHCl. Cette procédure est conforme aux exigences d'élimination de l'État de Californie, aux États-Unis, mais il peut en être autrement dans votre région. Veuillez consulter les exigences locales pour la décontamination et l'élimination.

## Bionano Prep SP Protocole d'extraction de l'ADN des tissus et des tumeurs

### Préparation pour l'extraction d'ADNg à partir de tissus et de tumeurs frais ou congelés

**Remarque :** Pour de meilleurs résultats, nous encourageons la préparation des tissus comme décrit dans l'Annexe.

#### Avant la première utilisation

- Vérifiez l'accès à la centrifugeuse réfrigérée avec un rotor pouvant accueillir des tubes coniques en polypropylène de 15 ml pour agglomérer l'homogénat.
- Vérifiez que la vitesse de rotation de la centrifugeuse réfrigérée de paillasse est de 2 000 x g.
- Le PMSF se décompose rapidement dans les solutions aqueuses. Créez des aliquotes de 120 µl dans des tubes à bouchon à vis de 1,5 ml et stockez la solution mère et les aliquotes à l'abri de la lumière à 4 °C. Chaque aliquote sera suffisante pour dix extractions d'ADNg.
- Ajoutez 125 µl de détergent Bionano Prep au tube de solution tampon de lyse et de liaison (LBB) et retournez-le 10 fois pour mélanger. Étiquetez le tube LBB dans lequel le détergent a été ajouté.
- Ajoutez de l'éthanol pur au tampon d'homogénéisation et aux tampons de lavage (WB1 et WB2), retournez 10 fois le tube pour mélanger et cochez les cases « Éthanol ajouté » :
  - Ajoutez 96 ml d'éthanol pur au tampon d'homogénéisation pour un volume final de 192 ml.
  - Ajoutez 5 ml d'éthanol pur au tampon de lavage 1 (WB1) pour un volume final de 8,25 ml.
  - Ajoutez 7,5 ml d'éthanol pur au tampon de lavage 2 (WB2) pour un volume final de 12,5 ml.

#### Mise en place

- Réglez la centrifugeuse à rotor pour tubes coniques réfrigérés et la centrifugeuse réfrigérée à 4 °C.
- Immobilisez le TissueRuptor (Qiagen) sur un portoir vertical. Connectez le TissueRuptor à un interrupteur multiprise.
- Rassemblez le matériel (voir la section « Matériel fourni par l'utilisateur » ci-dessus). Refroidissez au préalable le tampon d'homogénéisation, le tampon de lavage A et la/les sonde(s) TissueRuptor.
- Pour l'élimination des déchets, préparez des tubes coniques de 50 ml (1 tube pour 2 échantillons) avec 100 µl de décontaminant TexQ par échantillon (à éliminer comme déchets dangereux).
- Pour chaque échantillon, étiquetez deux tubes coniques de 15 ml et un tube conique de 50 ml et placez-les sur de la glace. Placez un tamis cellulaire de 40 µm (Bionano) dans le tube conique de 50 ml.
- Pour chaque échantillon, étiquetez deux tubes Protein LoBind de 1,5 ml (Bionano) et un tube de centrifugeuse de 2,0 ml (Bionano). Placez l'un des tubes Protein LoBind étiquetés de 1,5 ml sur la glace.
- Retournez les tubes de PMSF et de protéinase K (Bionano) trois fois pour mélanger, puis passez-les à la centrifugeuse brièvement. Placez le PMSF sur de la glace.
  - Pour plus de commodité, tous les tampons utilisés à 4 °C dans ce protocole peuvent être stockés à long

Pour la recherche uniquement.  
Ne pas utiliser dans les procédures

**terme à 4 °C.**



## Extraction de l'ADNg (4,5 heures)

**Remarque :** Pour obtenir des instructions importantes sur la préparation des tissus congelés, veuillez-vous reporter à l'Annexe.

1. Pour chaque échantillon de tissu, ajoutez 2 ml de tampon d'homogénéisation des tissus et des tumeurs Bionano Prep SP réfrigéré dans un tube conique de 15 ml et conservez-le sur de la glace.
2. Récupérez les tissus et préparer des portions d'environ 10 mg (reportez-vous à la section Suggestion ci-dessus) :

**Remarque :** Minimisez l'exposition des tissus à la température ambiante lors de la découpe des portions d'environ 10 mg. Si une portion est pesée en dehors de la plage de 9 à 13 mg, il est recommandé de jeter cette portion et de couper un nouveau morceau (si du tissu supplémentaire est disponible).

- a. Pour les tissus **frais** : en utilisant un bloc d'aluminium stérilisé et glacé comme surface de coupe, coupez le tissu avec une lame de rasoir stérilisée et une pince et pesez environ 10 mg dans un plateau de pesée sur une balance de précision (si le poids n'est pas déjà connu).
- b. Pour les tissus **congelés** :
  - 1) Si le morceau de tissu ne mesure pas plus de 2 x 2 x 4 mm, coupez-le dans un plateau de pesée avec une lame de rasoir stérilisée et une pince sur un bloc d'aluminium glacé. Pesez environ 10 mg dans un plateau de pesée différent et jetez le reste ou recongelez-le et conservez-le à -80 °C pour extraire l'ADN qui n'a pas besoin d'être de très haut poids moléculaire.
  - 2) Si le morceau de tissu est plus gros et si n'avez pas besoin d'échantillonner une région spécifique du tissu, placez le tissu congelé dans un sac en plastique qui a été refroidi sur un bloc d'aluminium refroidi à la neige carbonique, scellez le sac et cassez le tissu en fragments plus petits à l'aide d'un gros pilon ou d'un marteau. Retirez un petit morceau et traitez-le comme indiqué ci-dessus (étape 2.b.1). Les fragments restants peuvent être remis et conservés à -80 °C.
  - 3) Si le morceau de tissu est plus gros et si vous devez prélever un échantillon d'une région spécifique du tissu, placez le tissu congelé dans un plateau de pesée sur un bloc d'aluminium pré-réfrigéré (-20 °C) et coupez un petit morceau avec un scalpel ou lame de rasoir et une pince. Pesez environ 10 mg dans un plateau de pesée différent et remplacez le gros morceau de tissu restant à -80 °C pour le conserver.

**Remarque :** Pour les tissus fibreux, il est recommandé de couper les tissus en petits morceaux dans le plateau de pesée (1 à 2 mm).

3. À l'aide d'une spatule métallique stérilisée pré-réfrigérée, transférez immédiatement le tissu découpé dans le tube conique étiqueté de 15 ml contenant le tampon d'homogénéisation. Assurez-vous que les morceaux de tissu sont immergés dans le tampon d'homogénéisation et que le tube conique est placé sur de la glace. Transférez la sonde pré-réfrigérée dans le tube conique.
4. Répétez les étapes 2 et 3 pour préparer chaque échantillon supplémentaire, jusqu'à 8 échantillons maximum.

**Remarque :** Avant de passer à l'étape suivante, placez bien chaque échantillon tissulaire ou tumoral dans un tube conique de 15 ml contenant le tampon d'homogénéisation et une sonde TissueRuptor sur de la glace. Voir la vidéo [Homogénéisation et filtration](#) des tissus et tumeurs pour connaître les étapes 5 à 11.

5. Retirez un tube conique de la glace à la fois et fixez fermement la sonde au dispositif TissueRuptor tout en tenant le tube conique. Tenez le tube de manière à ce que la pointe de la sonde TissueRuptor soit immergée dans le tampon et très proche du fond du tube.
6. Centrifugez au TissueRuptor à l'aide de l'interrupteur en l'allumant et en l'éteignant successivement. Vérifiez la bonne dissolution du culot cellulaire de tissu. Si le tissu est particulièrement dense, vous pouvez broyer 2 à 3 fois supplémentaires afin de le décomposer et d'obtenir une homogénéisation complète.

**Remarque :** Assurez-vous que le tissu n'adhère pas à la paroi du tube ou à l'embout de la sonde. Immergez le tissu dans le tampon d'homogénéisation à l'aide d'une spatule si nécessaire. Pour les tissus fibreux, nous recommandons de couper le tissu en petits morceaux avant l'homogénéisation au TissueRuptor.

7. Mélangez en continu pendant 10 secondes à vitesse maximale en gardant l'embout de la sonde immergé en permanence. Faites décrire au tube un mouvement de haut en bas et circulaire pendant le mélange pour augmenter l'efficacité de l'homogénéisation. À la fin du mélange, mettez l'interrupteur connecté au TissueRuptor en position éteinte, retirez la sonde du TissueRuptor et remettez le tube (avec la sonde à l'intérieur) dans la glace.

**Remarque :** Le tube conique doit être remis en place immédiatement après l'homogénéisation pour garantir la plus haute qualité d'ADN.

8. Répéter les étapes 5 à 7 pour tous les autres échantillons. Jusqu'à 8 échantillons maximum.
9. Rincez chaque embout de pipette avec 6 ml de tampon d'homogénéisation glacé à l'aide d'une pipette, en recueillant le tampon dans le même tube conique. Jetez la sonde comme il se doit (risque biologique potentiel).
10. Décantez l'homogénat à travers un tamis cellulaire de 40 µm au-dessus du tube conique étiqueté de 50 ml placé sur de la glace. Conservez le tube conique pour l'étape suivante.
11. Ajoutez 6 ml de tampon d'homogénéisation glacé supplémentaire au tube conique de 15 ml et agitez pour récupérer les débris sur les bords du tube, puis verser sur le tamis cellulaire, en recueillant le liquide dans le même tube conique de 50 ml. Jetez le tamis cellulaire comme il se doit (risque biologique potentiel).

**Remarque :** Si l'homogénat ne passe pas par le tamis cellulaire, soulevez et abaissez brièvement le tamis pour faciliter l'écoulement.

12. Pipetez le volume entier 2 fois avant de transférer l'homogénat dans un nouveau tube conique de 15 ml, et fermez le tube.
13. Centrifugez à 2 000 x g pendant 5 minutes à 4 °C à l'aide d'un rotor pour tubes coniques (réglez l'accélération et la décélération sur 9).
14. Décantez le surnageant dans les déchets TexQ (risque biologique potentiel) immédiatement après l'arrêt de la centrifugeuse, placez le tube conique sur de la glace pendant 30 secondes et utilisez une pipette de 1 000 µl pour éliminer autant de liquide résiduel que possible sans agiter le culot cellulaire (en laissant un volume < 200 µl).

15. Ajoutez 300 µl de tampon de lavage A, remettez le culot cellulaire en suspension avec un embout de 1 000 µl (réglé à 300 µl) en pipetant lentement de haut en bas 5 fois. Transférez la totalité du volume de la suspension dans un tube Protein LoBind de 1,5 ml pré-réfrigéré préalablement étiqueté à l'aide d'un embout de 1 000 µl. Conservez le tube conique pour l'étape suivante.

16. Ajoutez 700 µl de tampon de lavage A supplémentaire au tube conique de 15 ml, pipetez doucement 2 fois pour mélanger et transférez le volume entier dans le même tube Protein LoBind de 1,5 ml pré-réfrigéré étiqueté à l'aide d'un embout de 1 000 µl.
17. Centrifugez à 2 000 x g pendant 5 minutes à 4 °C.
18. Sans agiter le culot cellulaire, aspirez le surnageant pour laisser un volume d'environ 40 µl. Éliminez le surnageant avec les déchets TexQ (risque biologique potentiel). Placez le tube sur de la glace pendant 30 secondes.
19. Remettez en suspension le culot cellulaire dans le volume résiduel 10 fois à l'aide d'un embout standard de 200 µl. Les volumes résiduels peuvent varier.

#### Lyse et digestion des cellules

20. Ajoutez 50 µl de protéinase K au tube Protein LoBind, et bouchez le tube. **NE PAS MÉLANGER À LA PIPETTE.**
21. Incubez à température ambiante pendant 3 minutes.
22. Ajoutez 225 µl de tampon LBB, contenant du détergent, à l'échantillon avec un embout de 1 000 µl. Bouchez et retournez le tube 15 fois pour mélanger.  
  
**Remarque** : Le tampon LBB avec détergent est une solution visqueuse et mousseuse qui adhère à l'embout de la pipette. Distribuez-le lentement et changez les embouts entre les distributions pour assurer la précision du volume de distribution.
23. Faites tourner l'échantillon au HulaMixer pendant 15 minutes à température ambiante à 10 tr/min. Ne pas secouer/faire vibrer.
24. Passez le tube à la centrifugeuse pendant 2 secondes pour recueillir le liquide au fond du tube.
25. Ajoutez 10 µl de PMSF 100 mM dans la partie liquide du tube. Bouchez et retournez le tube 5 fois pour mélanger, puis passer le tube à la centrifugeuse pendant 2 secondes pour recueillir le liquide au fond du tube.
26. Incubez à température ambiante pendant 10 minutes.

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

27. Ajouter 85 µl de solution tampon saline Bionano Prep au tube, bouchez et retournez 10 fois, et passez le tube à la centrifugeuse pendant 2 secondes.
28. À l'aide d'une pince, transférez soigneusement un seul disque Nanobind de 4 mm dans le lysat.  
  
**Remarque** : Les disques peuvent parfois se coller les uns aux autres.
29. Ajoutez 400 µl d'isopropanol à 100 % dans le tube. Bouchez et retournez le tube 5 fois pour mélanger.
30. Faites tourner l'échantillon au HulaMixer pendant 15 minutes à température ambiante à 10 tr/min. Ne pas secouer/faire vibrer.

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

le disque Nanobind revienne dans la solution. Replacez le tube sur le HulaMixer et reprenez le mélange.

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

- b. Si des brins d'ADNg flottent vers le fond du tube, retournez celui-ci rapidement pour associer plus étroitement l'ADNg au disque Nanobind.
- c. Vous pouvez retourner le tube plusieurs fois, jusqu'à ce que l'association de l'ADNg avec le disque Nanobind apparaisse inchangée.

32. Combinez le portoir transparent avec la base magnétique comme indiqué ci-dessous, en vous assurant que le disque Nanobind est fixé par l'aimant près du haut du niveau de liquide. Si ce n'est pas le cas, placez-le sur le portoir magnétique (voir la [vidéo de formation](#), 0:50).

**Remarque** : La couleur du liquide dans les images ci-dessous a été modifiée à des fins d'illustration.

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



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



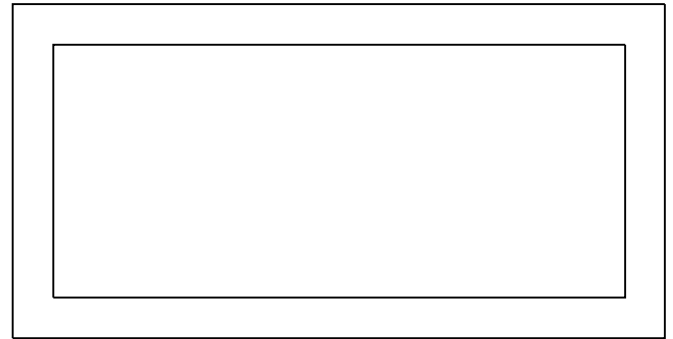
- c. Inclinez lentement l'appareil de 90 ° vers vous tout en le laissant en contact avec la surface de travail. Les tubes sont maintenant horizontaux et visibles pour vous.



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



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



33. Réglez une pipette de 1 000 µl sur 1 000 µl et une seconde sur 700 µl.
34. Retirez le surnageant comme indiqué ci-dessous, en faisant attention de ne pas aspirer l'ADNg (voir la [vidéo de formation](#), 1:15) :
- Inclinez l'ensemble du portoir à 45 ° en le tenant d'une main (en saisissant l'ensemble de l'appareil par le bas avec les tubes visibles pour vous et les bouchons vers votre autre main).
  - Attendez 2 secondes pour que l'ADNg se pose sur le disque Nanobind.
  - Retirez lentement tout le liquide avec un embout extra-long de 1 000 µl incliné à distance du disque Nanobind et/ou de l'ADNg pour éviter de l'altérer.
  - Distribuez le surnageant dans un tube conique contenant du TexQ.

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

35. Effectuez le lavage au WB1 (voir la [vidéo de formation](#), 2:21) :
- Distribuez 700 µl de tampon WB1 directement sur les disques dans les tubes et fermez les tubes.
  - Soulevez le portoir de tubes transparent pour le séparer de la base magnétique.
  - Retournez le portoir transparent avec les tubes à 180 ° 4 fois pour procéder au lavage.
  - Placez le portoir transparent et les tubes sur la base magnétique comme décrit à l'étape 32.
  - Retirez le surnageant comme décrit à l'étape 34.

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

36. Répétez le lavage au WB1, étape 35.
37. Réglez la deuxième pipette sur 500 µl (auparavant à 700 µl).
38. Effectuez le lavage au WB2 (voir la [vidéo de formation](#), 4:10) :

- Distribuez 500 µl de tampon WB2 directement sur les disques dans les tubes, et fermez les tubes.
- Soulevez le portoir transparent pour le séparer de la base magnétique.



- c. Retournez le portoir transparent à 180 ° 10 fois pour procéder au lavage.
- d. Placez le portoir transparent et les tubes sur la base magnétique comme décrit à l'étape 32.

e. Retirez le surnageant comme décrit à l'étape 34.

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

39. Répétez le lavage au WB2, étape 38 (voir la [vidéo de formation](#), 5:50).

**Remarque** : Retirez le tampon de 2 ou 3 tubes à la fois et procédez à l'étape d'incubation du tampon EB par petits lots pour empêcher le disque/l'ADNg de se dessécher.

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

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

42. Ajoutez 65 µl de tampon EB au tube Protein LoBind.

43. Passez le tube à la centrifugeuse de paillasse pendant 5 secondes.

44. À l'aide d'un embout standard de 10 µl, poussez doucement le disque Nanobind vers le fond du tube, en vous assurant qu'il est complètement immergé dans le liquide. Le disque doit rester parallèle à la surface de la paillasse (voir la [vidéo de formation](#), 8:20).

45. Incubez le disque Nanobind immergé dans le tampon d'éluion à température ambiante pendant 20 minutes.

46. Recueillez l'ADNg extrait en transférant l'éluat dans un tube de centrifugeuse de 2,0 ml préalablement étiqueté avec un embout standard de 200 µl.

47. Passez le tube contenant le disque Nanobind à la centrifugeuse de paillasse pendant 5 secondes et transférez tout l'éluat restant contenant l'ADNg visqueux dans le même tube de centrifugeuse standard de 2,0 ml qu'à l'étape précédente avec un embout standard de 200 µl. Vous pouvez retirer le disque avant d'aspirer le tampon d'éluion restant.

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

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

### Homogénéisation de la solution d'ADNg

48. Pipetez lentement tout le volume d'ADNg dans un embout standard de 200 µl, puis distribuez lentement l'ADNg.

Évitez de créer des bulles.

- Répétez ce processus 3 fois supplémentaires (4 au total) : (1 fois = 1 aspiration et 1 distribution).

**Remarque** : Si l'absorption d'ADNg se bloque en raison d'une viscosité élevée, il peut être nécessaire de  
30339 Bionano Prep SP, Protocole d'extraction de l'ADN des tissus et des tumeurs Rév. A Page 26 sur 34

remuer doucement tout en relâchant lentement le piston pour retirer l'ADNg.

49. Placez le tube de centrifugeuse standard de 2,0 ml contenant l'ADNg dans le portoir du HulaMixer et faites-le tourner à température ambiante pendant 1 heure à 15 tr/min.

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

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

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

## Quantification de l'ADNg (45 minutes)

### Quantification Qubit - Dosage BR dsDNA

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

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

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

2. Ajoutez le tampon Qubit BR aux tubes de dosage Qubit de 0,5 ml :
  - a. Pour chaque échantillon, ajoutez 18 µl de tampon Qubit BR à trois tubes Qubit distincts.
  - b. Pour les solutions mères Qubit, ajoutez 10 µl de tampon Qubit BR à deux tubes Qubit distincts.
3. À l'aide d'une pipette de 200 µl à embout large, mélangez doucement tout le volume de l'échantillon d'ADNg en pipetant de haut en bas 5 fois, en veillant à ne pas générer de bulles.
4. En utilisant un embout de pipette standard neuf ou un embout de pipette à déplacement positif pour chaque aspiration :

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

**Remarque** : Si un bain à ultrasons n'est pas disponible, vortexez pendant au moins 30 secondes à vitesse maximale, puis passez brièvement à la centrifugeuse pendant 2 secondes pour faire descendre le liquide vers le fond du tube.

5. Préparez la solution étalon en diluant le réactif de dosage de colorant dans le tampon de dilution BR (1:200) :
  - a. 200 µl de solution étalon pour chacune des deux solutions mères (400 µl au total).
  - b. 200 µl de solution étalon pour chaque aliquote d'échantillon (600 µl pour chaque échantillon).

6. Pour les solutions mères d'ADN Qubit, ajoutez 10  $\mu$ l des solutions mères 1 et 2 aux tubes contenant le tampon BR de l'étape 2b.
  
7. Une fois la sonication terminée, récupérez les tubes et passez-les brièvement à la centrifugeuse. Vortexez les tubes pendant 5 secondes à vitesse maximale, puis passez-les à nouveau à la centrifugeuse.

- Ajoutez 180 µl de solution étalon à chaque aliquote d'ADN soniqué et aliquote de solution mère d'ADN Qubit. Vortexez pendant 5 secondes, puis passez les tubes à la centrifugeuse.
- Incubez les échantillons pendant au moins 2 minutes, puis lisez la valeur sur le fluoromètre Qubit.
- Le coefficient de variation (CV = écart type/moyenne) de trois résultats doit être < 0,30.

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

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

Remarque : Les concentrations d'ADN typiques sont comprises entre 50 ng/µl et 300 ng/µl. Si la concentration est > 150 ng/µl, se reporter aux Remarques importantes du protocole Direct Label and Stain (DLS) Bionano Prep ([30206](#)).

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

### Marquage

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

## Résolution des problèmes

---

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

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

Étapes à suivre si l'ADNg est aspiré :

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

Étapes à suivre si l'ADNg est visuellement détaché du disque Nanobind et non aspiré :

1. Retirez le tube du portoir et maintenez-le à l'horizontale.
2. Faites rouler le tube entre les doigts jusqu'à ce que la liaison soit rétablie.

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

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

Étapes à suivre :

1. Aspirez et distribuez l'échantillon à l'aide d'une pipette à embout large un total de 5 fois.
2. Incubez l'ADNg à température ambiante pendant 1 à 3 jours.
3. Après incubation, aspirez à nouveau et distribuez l'échantillon à l'aide d'une pipette à embout large 5 fois.
4. Quantifiez par dosage Qubit BR.

### L'ADNg n'est pas visqueux

Preuve : La consistance de l'échantillon est très fluide et facile à pipeter, mais la concentration

est > 35 ng/µl. L'échantillon ne contient probablement pas d'ADNg de haut poids

moléculaire.

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

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

## Foire aux questions

---

### Quels types de tissus sont compatibles avec ce protocole ?

- Ce protocole a été utilisé pour traiter avec succès les types de tissus suivants :
  - Rat surmulot brun : foie, poumon, rein, côlon, ovaire, prostate, testicule et utérus.
  - Humain : vessie, poumon, foie, rein, côlon, sein, prostate, cerveau, thyroïde et ovaire.
  - Souris : rate (apport de 2 à 3 mg recommandé)
- Les tissus cutanés, musculaires et non vertébrés ne sont pas encore entièrement pris en charge.
- Des biopsies de tissus normaux et de tumeurs sont recommandées. Ce protocole n'a pas été testé avec des aspirations à l'aiguille fine.

### Quels facteurs influent sur la qualité de l'ADNg ?

- La conservation et la manipulation des tissus influent sur la qualité de l'ADNg. Les éléments suivants peuvent affecter négativement la qualité de l'ADNg :
  - Tissus ayant subi un cycle de congélation-décongélation après une conservation initiale à -80 °C.
  - Tissus congelés exposés à la température ambiante pendant de longues périodes pendant la coupe.
  - Présence de tissu nécrotique dans l'échantillon de tissu.
  - Tissus avec un facteur d'intégrité RIN (Numéro d'intégrité de l'ARN) < 9,0.
- Un échantillon de départ de trop grande taille entraînera une baisse de la qualité de l'ADNg.

### Quels facteurs influent sur le rendement en ADNg ?

- La teneur en noyaux par rapport à la masse tissulaire influe sur le rendement en ADNg. Les tissus qui nécessitent un tissu de poids important en raison de la faible teneur en noyaux peuvent être mal marqués et avoir un faible rendement.

**Remarque :** Les échantillons de tumeurs ont généralement un rendement en ADNg par mg de tissu plus élevé que le tissu normal.
- Les tissus à haute teneur en graisses peuvent avoir un faible rendement en ADNg.

### Combien d'échantillons peuvent être traités ?

- Ce protocole peut être utilisé pour des tailles de lots contenant jusqu'à 8 échantillons.
  - Il faudra jusqu'à 6 heures pour traiter un lot de cette taille.
- Sur la base du débit typique de l'instrument Saphyr, les données peuvent être collectées à partir d'au moins 9 échantillons par semaine.

### Quels conservateurs tissulaires sont compatibles avec ce protocole ?

- Bien que nous n'ayons pas encore testé la compatibilité des conservateurs avec ce produit, il s'agit d'un domaine de recherche en cours et nous mettrons à jour cette section avec les nouvelles conclusions dès qu'elles seront disponibles.



## Annexe : Préparation de tissus frais ou de tumeurs pour la conservation

**Apport recommandé** : 10 mg de tissu ou de tumeur frais provenant des poumons, du foie, des reins, de l'utérus, des ovaires, du côlon, de la prostate, de la thyroïde, des testicules, du sein ou de la vessie. Ce protocole ne prend pas encore complètement en charge les tissus musculaires.

**Remarque** : Les tissus avec une faible teneur en noyaux par rapport à la masse tissulaire peuvent ne pas produire suffisamment d'ADNg, et une trop grande quantité de tissu peut produire un ADNg moins pur et plus difficile à homogénéiser.

1. Rincez le tissu dans du PBS glacé et coupez-le en petits morceaux (environ 10 mg par morceau) sur un bloc de métal glacé stérilisé.
  - a. Il est recommandé de préparer plusieurs portions de chaque tissu.
2. Transférez le tissu dans un tube de 1,5 ml avec bouchon à vis et congelez-le dans de l'azote liquide pendant 3 minutes avant de le transférer dans un congélateur à -80 °C pour la conservation à long terme.
3. Il est préférable d'utiliser le tissu congelé et conservé à -80 °C dans les 6 mois.
4. Si vous expédiez des tissus congelés, veuillez suivre les directives fournies dans les Instructions d'expédition des tissus et des tumeurs ([30186](#)).

## Assistance technique

---

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

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

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