

Kit de Marquage CGH pour Oligo Arrays

Pour la préparation d'ADN marqué avec Cyanine 3 et Cyanine 5 pour puce d'hybridation génomique comparative

Manuel d'instructions

ENZ-42671-K010

20 réactions pour marquage avec cyanine 3-dUTP et cyanine 5-dUTP

ENZ-42671-K100

200 réactions pour marquage avec cyanine 3-dUTP et cyanine 5-dUTP

Note :

- Le kit de 20 réactions contient les réactifs suffisant pour effectuer 20 réactions (10 réactions de marquage Cyanine 3-dUTP et 10 réactions de marquage Cyanine 5-dUTP)
- Le kit de 200 réactions contient les réactifs suffisant pour effectuer 200 réactions (100 réactions de marquage Cyanine 3-dUTP et 100 réactions de marquage Cyanine 5-dUTP)

UTILISATION A OBJECTIF DE RECHERCHE UNIQUEMENT

Ce produit est fabriqué et vendu par Enzo Life Sciences, Inc uniquement pour la recherche et n'est pas destiné à des fins diagnostiques ou une utilisation thérapeutique. L'achat n'inclut pas un droit ou une licence d'utilisation, de développer ou exploiter ce produit commercialement. Toute utilisation commerciale, développement ou exploitation de ce produit sans autorisation écrite préalable de la part d'Enzo Life Sciences, Inc. est strictement interdite.

GARANTIE LIMITEE

Ces produits sont proposés sous une garantie limitée. Les produits sont garantis à répondre aux spécifications correspondantes décrites dans la notice au moment de l'expédition. La seule obligation d'Enzo Life Sciences est de remplacer les produits à la mesure du prix d'achat. Toutes réclamations doivent être faites à Enzo Life Sciences, Inc. dans les cinq jours suivant la réception de la commande.

MARQUES ET BREVETS

Plusieurs des produits d'Enzo et les applications de ces produits sont couverts par des brevets aux États-Unis et à l'étranger et des brevets en instance. Enzo et BIOSCORE[®] sont des marques d'Enzo Life Sciences, Inc.

NOTE COMPLEMENTAIRE

Le kit de marquage CGH pour Oligo Arrays contient de la cyanine 3-dUTP et de la cyanine 5-dUTP spécialement développées par Enzo. Ces nucléotides sont préparés en utilisant un nouveau groupe allylique réactif contenant un bras de liaison semi-rigide pour la fixation directe du fluorochrome au nucléotide.

POUR UTILISATION EN RECHERCHE UNIQUEMENT.

L'utilisateur est responsable de l'obtention des autorisations nécessaires auprès des autorités compétentes avant toute utilisation en diagnostic.

TABLE DES MATIERES

Introduction	2
Réactifs Fournis et Stockage	2
Avertissements et Précautions de Sécurité	3
Autres Matériels Nécessaires	3
Méthodes et Procédures	4
Quantité d'ADN requis.....	4
Isolation d'ADN génomique.....	5
Digestion et purification de l'ADN génomique (facultatif)	5
Marquage de l'ADN	7
Purification et caractérisation de l'ADN marqué.....	8
Problématiques potentielles.....	10
Annexe.....	11
A – Préparation de l'ADN marqué pour l'hybridation sur des Oligo Arrays d'Agilent.....	11
B – Protocole de précipitation acétate de sodium/éthanol pour l'ADN Cot-1	12
C – Purification de l'ADN d'échantillons FFPE	13
Informations de Contact.....	18

INTRODUCTION

Le **kit de marquage CGH pour Oligo Arrays** d'Enzo Life Sciences a été optimisé pour marquer l'ADN destiné à des essais d'hybridation génomique comparative sur Oligo Arrays d'Agilent. Tous les réactifs nécessaires sont fournis, y compris un mélange optimisé de nucléotides contenant soit cyanine 3-dUTP, soit cyanine 5-dUTP.

REACTIFS FOURNIS ET STOCKAGE

Le **kit de marquage CGH pour Oligo Arrays** est expédié en carboglace. Dès sa réception, stockez tous les réactifs à -20°C dans un congélateur sans dégivrage.

Évitez la congélation et la décongélation répétée des réactifs du kit. Nous recommandons d'aliquoter les réactifs de ce kit dans des volumes pratiques pour votre travail lors de la première utilisation. Les mélanges désoxynucléotidiques cyanine 3 et cyanine 5 sont sensibles à la lumière. Protégez contre les effets de la lumière à tout moment. Le produit est stable pendant un an à partir de la date de réception si les recommandations de stockage sont correctement suivies.

Réactif	Identité du tube	Volume minimum fourni	
		ENZ-42671-K010	ENZ-42671-K100
Tampon amorces/réaction	1	400µl	4ml
Mélange nucléotide Cyanine 3-dUTP	2	2 x 50µl	1ml
Mélange nucléotide Cyanine 5-dUTP	3	2 x 50µl	1ml
ADN Polymérase Klenow	4	20µl	200µl
Tampon Stop	5	100µl	1ml
Eau (sans nucléase)	W	1ml	10ml

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS DE SECURITE

- Ce produit est strictement réservé à la recherche. Il n'est pas destiné au diagnostic de maladies chez l'humain ou l'animal.
- Pour éviter le photo-blanchiment des nucléotides marqués à la cyanine, effectuez toutes les manipulations dans des tubes ambrés ou protégés de la lumière par d'autres moyens.
- L'ADN polymérase Klenow Exo contient du dithiothréitol (DTT). DTT provoque une irritation de la peau, des yeux et des voies respiratoires. Il est nocif en cas d'ingestion ou d'inhalation. Si la solution venait en contact avec la peau ou les yeux, lavez immédiatement avec de l'eau.

AUTRES MATERIELS NECESSAIRES

1. ADN de référence
 - a. Pour une analyse CGH + SNP, utilisez l'ADN génotypé HapMap (Coriell Institute).
 - b. Pour une analyse CGH sans SNP, nous recommandons l'ADN génomique humain mâle (Réf. Cat. Enzo ENZ-GEN106) et femelle (Réf. Cat. Enzo ENZ-GEN107).
 2. Bain-marie, bloc de chauffage ou un incubateur fixé à 37°C et 99°C ou une PCR à couvercle chauffant
 3. Bain de glace ou bloc froid (0-4°C)
 4. Colonnes de purification d'ADN (PCR & Gel Clean-up Columns, Réf. Cat. Enzo ENZ-GEN100)
- Facultatif : les enzymes de restriction *AluI/RsaI* et le tampon approprié (Réf. Cat. Enzo ENZ-GEN108 et ENZ-GEN109)
 - Facultatif : tampon TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0)
 - Facultatif : bain-marie supplémentaire, bloc de chauffage, incubateur réglé à 65°C ou une PCR à couvercle chauffant

METHODES ET PROCEDURES

Quantité d'ADN requis

- Le **kit de marquage CGH pour Oligo Arrays** est optimisé pour une utilisation avec une quantité d'ADN génomique de 0.25 à 2.5µg comme matière première pour les Oligo Arrays d'Agilent.
- En général, 0.5µg d'ADN génomique sont suffisants pour le marquage et l'hybridation à tous les formats d'Oligo Arrays d'Agilent. Des quantités plus élevées d'ADN d'entrée (1 à 2.5µg) peuvent conduire à de meilleurs résultats avec les plus grands formats d'hybridation d'Oligo Arrays.
- Nous recommandons l'utilisation de plus grandes quantités d'ADN (1 à 2.5µg) lors de l'analyse CGH d'ADN génomique isolé de tissus fixés au formol et paraffinés (FFPE). Dans des conditions où l'ADN génomique de génomique est limité (< 200ng) et/ou isolé à partir de tissus FFPE, nous recommandons l'utilisation du kit **BIOSCORE® Screening and Amplification** d'Enzo (Réf. Cat. ENZ-42440). Le kit **BIOSCORE® Screening and Amplification** est une méthode d'amplification génomique isotherme utilisée pour évaluer la qualité des échantillons d'ADN. Les échantillons d'ADN FFPE appropriés pour l'analyse CGH sont identifiés par des rendements élevés lors de la réaction d'amplification.

Les échantillons d'ADN (1 à 2.5µg) amplifiés par le kit **BIOSCORE® Screening and Amplification** peuvent être marqués pour analyse CGH à faible densité sans digestion de restriction. Les ADN génomiques de référence et d'échantillon doivent être soumis à une amplification avant leur marquage. Chaque amplification de l'ADN diminue la qualité de l'analyse CGH. Si l'ADN est de bonne qualité, nous recommandons d'utiliser l'ADN non amplifié. 200ng suffisent pour la réaction de marquage.

Isolation d'ADN génomique

- Isolez l'ADN génomique en utilisant un protocole établi ou un kit disponible sur le marché. Une méthode suggérée pour la purification d'ADN génomique à partir d'échantillons FFPE se trouve à l'annexe C.
- Déterminez la concentration et la pureté de l'ADN génomique par mesure de l'absorbance à 260nm et 280nm. Nous recommandons l'utilisation du spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 UV-VIS ou équivalent. Le ratio A260/A280 doit être environ d'1.8 et le ratio A260/A230 doit être supérieur ou égal 2.0. Un écart significatif de ces ratios suggère la présence de contaminants et indique que l'échantillon devrait être purifié à nouveau.
- L'ADN génomique de haute qualité et de haut poids moléculaire peut être utilisé directement pour le marquage à la cyanine et l'hybridation sans digestion de restriction.

Digestion et purification de l'ADN génomique (facultatif)

- Agilent recommande que l'ADN génomique de référence et de l'échantillon soit soumis à une digestion de restriction afin de réduire la taille avant le marquage. La digestion de restriction n'est pas nécessaire lors de l'utilisation du kit de marquage CGH pour Oligo Arrays. Toutefois, elle est requise lors d'hybridations avec des arrays CGH + SNP.
- L'ADN génomique isolé à partir de tissus FFPE et l'ADN de référence ne doivent pas être digérés.
- Lorsque la digestion est effectuée, à la fois les ADN de référence et de l'échantillon doivent être digérés par la combinaison d'*AluI* (Réf. Cat. Enzo ENZ-GEN108) et *RsaI* (Réf. Cat. Enzo ENZ-GEN109). La taille moyenne des ADN digérés doit être ≤ 5 kb en longueur (déterminée par électrophorèse sur gel d'agarose).
- Le produit de la digestion avec les enzymes de restriction peut être utilisé directement pour le marquage si le volume total est inférieur à 19 μ l. Nous recommandons de digérer l'ADN comme suit :
 - ADN (jusqu'à 16.34 μ l)
 - 1.9 μ l de tampon de restriction 10X
 - 0.34 μ l d'*AluI*
 - 0.34 μ l de *RsaI*

- Complétez jusqu'à 19µl avec de l'eau exempte de nucléase.
- Incubez à 37°C pendant 2 heures puis arrêtez la réaction en chauffant à 65°C pendant 15 minutes.
- Pour la purification de l'ADN digéré par *AluI* et *RsaI*, nous recommandons l'utilisation des colonnes de purification PCR & Gel clean-up (Réf. Cat. Enzo ENZ-GEN100). Ne chargez pas les colonnes avec plus de 25µg d'ADN par colonne.
- Déterminez la concentration et la pureté de l'ADN digéré en mesurant l'absorbance à 260nm et 280nm. Nous recommander l'utilisation du spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 UV-VIS ou équivalent.

Marquage de l'ADN

L'ADN marqué est préparé par l'incorporation de nucléotides conjugués à de la cyanine selon le mode opératoire décrit ci-dessous et résumé dans le tableau 1 à la page 7. Pour chaque paire d'ADN génomique à comparer, marquer un échantillon à la cyanine 3 et l'autre à la cyanine 5. Si une validation supplémentaire est souhaitée, les marquages peuvent être échangés lors d'une expérience en parallèle ou ultérieure.

Tableau 1. Aperçu du protocole de réaction standard		
Etape	Composant/Condition	Quantité
1. Ajoutez	ADN (0.25-2.5µg)	jusqu'à 19µl
2. Ajoutez	Tampon Amorces/Réaction (tube 1)	20µl
3. Ajoutez	Eau (tube W)	Jusqu'à 39µl
4. Incubez	99°C, 10 minutes	
5. Incubez	Glace, 5 minutes	
6. Ajoutez	Mélange de Nucléotides (tube 2 ou 3)	10µl
7. Ajoutez	ADN polymérase Klenow (tube 4)	1µl
8. Incubez	37°C, 4 heures	
9. Ajoutez	Tampon Stop (tube 5)	5µl

Dénaturez l'ADN et associez les amorces aléatoires

1. Combinez 0.25 à 2.5µg d'ADN génomique (jusqu'à 19µl) avec 20µl de tampon Amorces/ Réaction (tube 1), et ajoutez suffisamment d'eau (tube W) pour amener le mélange réactionnel à 39µl.

2. Chauffez à 99°C pendant 10 minutes et placez sur glace pendant 5 minutes. Centrifugez brièvement, et placez de nouveau sur glace.

Allongez les amorces avec l'ADN polymérase Klenow Exo

1. Laissez les tubes sur glace et ajoutez 10µl du mélange approprié de nucléotides marqués à la cyanine (tube 2 ou 3) et 1µl d'ADN polymérase Klenow Exo (tube 4) à l'échantillon d'ADN associé aux amorces aléatoires. Mélangez délicatement le contenu du tube en le fliquant. Centrifugez brièvement.

2. Incubez la réaction à 37°C pendant 4 heures.

Remarque : Avec un ADN de bonne qualité, le temps d'incubation peut être raccourci à 2 heures sans baisser significativement la quantité d'ADN généré. Toutefois, une diminution de l'activité spécifique peut être observée.

3. Ajoutez 5µl du tampon stop (tube 5), mélangez et centrifugez brièvement. Chauffez le tube pendant 10 minutes à 65°C pour désactiver l'enzyme puis centrifugez brièvement.

Purification et caractérisation de l'ADN marqué

Purifiez l'ADN marqué

1. Purifiez chaque réaction de marquage séparément.
2. Les colonnes de purification PCR & Gel Clean-up d'Enzo (Réf. Cat. Enzo ENZ-GEN100) sont recommandées pour cette étape (le protocole suivant est inclus dans le manuel des colonnes de purification).

3. Binding Buffer avec indicateur de pH

Le pH optimal permettant la liaison de petits fragments d'ADN à la membrane de silice est autour de 5-6. Le Binding Buffer est tamponné pour maintenir ce pH. Toutefois, un indicateur de pH a été ajouté afin de s'assurer que ce pH est correct. Cet indicateur de pH n'interfère pas avec la liaison de l'ADN et est complètement éliminé lors de la purification. La couleur jaune est également bénéfique pour l'extraction à partir de gel afin d'identifier facilement les morceaux d'agarose non dissous. Pour restaurer des conditions de pH correctes, ajoutez plus de Binding Buffer, acétate de sodium pH 5.0 ou de petits volumes d'acide chlorhydrique jusqu'à ce que la couleur redevienne jaune.

Jaune – conditions correctes

Vert – pH légèrement trop élevé, ajustement recommandé

Bleu – pH trop élevé, ajustement nécessaire

4. Préparation des solutions

- a. Le Wash Buffer contient des sels chaotropiques. Portez des gants et des lunettes de protection.
- b. Le Wash Buffer 1X doit être préparé avant de commencer le protocole de purification de votre ADN. Ajoutez de l'éthanol 96-100% au Wash Buffer 5X. Par exemple, pour 20 préparations, ajoutez 32ml d'éthanol 96-100% à 8ml de Wash Buffer 5X pour un volume total de 40ml de Wash Buffer 1X.

5. Ajustez les conditions de liaison de l'ADN

- a. Mélangez l'échantillon marqué avec 110µl (deux volumes) de Binding Buffer.

6. Liez l'ADN

- a. Placez la colonne de purification dans un tube de récupération de 2ml et ajoutez votre échantillon.
- b. Centrifugez pendant 30 secondes à 11.000 x g. Éliminez l'écoulement et placez la colonne de purification à nouveau dans le tube de récupération.

7. Lavez la membrane de silice

- a. Ajoutez 700µl de Wash Buffer. Centrifugez pendant 30 secondes à 11.000 x g. Éliminez l'écoulement et placez la colonne de purification à nouveau dans le tube de récupération.
- b. Facultatif : nous recommandons d'ajouter à nouveau 700µl de Wash Buffer et de répéter l'étape de lavage pour éliminer tous les sels.

8. Séchez la membrane de silice

- a. Centrifugez pendant 2 minutes à 11.000 x g pour éliminer tout le Wash Buffer. Le bout de la colonne ne doit pas entrer en contact avec l'écoulement lorsque vous la retirez de la centrifuge et du tube de récupération.
- b. L'éthanol résiduel du Wash Buffer peut inhiber les réactions suivantes et doit être éliminé lors de cette étape. L'élimination complète de l'éthanol peut être obtenue en incubant les colonnes de purification pendant 2 à 5 minutes à 70°C avant élution.

9. Eluez l'ADN

- a. Placez la colonne de purification dans un tube d'1.5ml pour micro-centrifuge (non-fourni). Ajoutez 25µl d'Elution Buffer et incubez pendant 1 minute à température ambiante pour augmenter le rendement. Centrifugez pendant 1 minute à 11.000 x g.
- b. Répétez à nouveau cette dernière étape avec 25µl d'Elution Buffer pour un volume final de 50µl.

Remarque : Sur la base des exigences de votre plate-forme d'hybridation, la réduction du volume peut être nécessaire.

Déterminez le rendement et l'incorporation

Nous recommandons d'utiliser un spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 UV-VIS dans le mode de mesure de Puces à ADN pour déterminer le rendement et l'incorporation de la cyanine. Utilisez 1.5µl de chaque échantillon à mesurer.

Pour une réaction de marquage classique, avec une quantité de départ de 850ng d'ADN génomique de haute qualité, le rendement attendu doit être au moins de 4µg. Cet ADN devrait contenir au moins 200pmol de Cyanine-3 ou au moins 130pmol de Cyanine 5.

PROBLEMATIQUES POTENTIELLES

- 1. Faible rendement et incorporation.** Un faible marquage reflète souvent au départ la faible qualité de l'ADN. Cela peut être dû à la présence de contaminants provenant de la purification de l'ADN génomique et/ou la présence d'ADN dégradé et/ou d'ADN réticulé isolé à partir de tissus FFPE.
- 2. Mauvais ratio signal/bruit malgré une bonne incorporation.** Un faible signal peut être causé par des conditions d'hybridation inappropriées (tampon trop stricte ou température excessive) ou lorsque la durée d'hybridation est trop courte. Un bruit de fond trop important peut être causé par un blocage insuffisant et/ou des conditions de lavage inappropriées. Des quantités excessives d'ADN marqué peuvent également se traduire par un bruit de fond élevé.
- 3. D'excellents DLRs dans le rapport de contrôle qualité de l'analyse CGH, mais certains oligos montrent un plissage ou un écart significatif du ratio \log_2 attendu.** Assurez-vous que l'ADN Cot-1 soit ajouté en quantité suffisante. Digérez l'ADN génomique avec *AluI* et *RsaI* avant marquage peut également aider avec ces déviations mineures.
- 4. Un Oligo Array jaune vif avec une amplitude réduite des variations prévues.** Ceci peut être dû à un manque d'ADN Cot-1, à des agents de blocage ou des conditions d'hybridation et de lavage qui ne sont pas assez strictes.
- 5. Des scores DLRs élevés.** Les scores élevés de DLR peuvent être causés par le marquage d'ADN amplifié. Si l'ADN est de mauvaise qualité, l'ADN amplifié peut être utilisé, mais les résultats ne seront pas de haute qualité. Le marquage d'ADN de pauvre qualité conduit souvent à de meilleurs résultats qu'un marquage d'ADN amplifié. 200ng d'ADN génomique de bonne qualité suffisent pour le marquage.

ANNEXE

A. Préparation de l'ADN marqué pour l'hybridation sur des Oligo Arrays d'Agilent

1. Mélangez les éluats d'ADN marqué à la cyanine-3 et cyanine-5.
2. Amenez le volume final des éluats une fois combinés au volume spécifié par Agilent pour l'Oligo Array choisi avec de l'eau exempte de nucléase.

Remarque : Si le volume des éluats combinés plus l'ADN Cot-1 dépasse le volume spécifié par Agilent pour l'Oligo Array choisi, le volume peut être réduit par lyophilisation partielle dans un concentrateur centrifuge sous vide ou par précipitation à l'aide d'acétate de sodium / éthanol et reconstitution dans l'eau. Voir Annexe B.

3. Ajoutez l'ADN Cot-1, les agents de blocage et le tampon d'hybridation 2X comme indiqué par Agilent pour l'Oligo Array choisi.
4. Effectuez la pré-hybridation, l'hybridation, le lavage de l'Oligo Array et la numérisation de celui-ci comme indiqué par Agilent pour l'Oligo Array choisi.

Remarque : Utilisez la quantité d'ADN Cot-1 recommandée par Agilent.

B. Protocole de précipitation acétate de sodium / éthanol pour l'ADN Cot-1

1. Combinez les ADN marqués et l'ADN Cot-1 dans un tube séparé d'1,5ml.
2. Ajoutez 1/10ème du volume soit 25µl d'acétate de sodium 3M pH 5.2, et 2.5 volumes soit 625µl d'éthanol à 100% glacé. Bien mélangez et stockez la nuit à -20°C ou 1 heure à -70°C.
3. Centrifugez pendant 10 minutes à 16.000 x g dans une microcentrifugeuse à 4°C.
4. Retirez délicatement le surnageant, ajoutez 500µl d'éthanol à 70% glacé et centrifugez pendant 5 minutes à 16.000 x g à température ambiante.
5. Retirez délicatement le surnageant, centrifugez pendant 1 minute et éliminez le liquide résiduel.
6. Séchez à l'air libre pendant 10 minutes ou dans un concentrateur centrifuge sous vide pendant 2 minutes.
7. Reprenez le culot dans 20µl d'eau exempte de nucléase et déterminez la concentration avec un spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 UV-VIS dans le mode Acides Nucléiques.

C. Purification de l'ADN d'échantillons FFPE

La procédure qui suit est basée sur le protocole décrit par Essen et Ylstra dans *Methods in Molecular Biology*, Vol. 938 Ed. Feuk, Lars 2012, XII, 386, chapitre 16.

1. Placez l'échantillon FFPE dans un tube de micro-centrifugeuse de 1.5ml exempt de nucléase. Si le tissu contient de l'eau, centrifugez pendant 5 minutes à vitesse maximale et décantez le surnageant.
2. Si nécessaire, retirez la paraffine résiduelle comme suit:
 - a. Ajoutez 1ml de xylène ou un substitut de xylène et incubez pendant 10 minutes à 55°C. Centrifugez à pleine vitesse pendant 2 minutes à température ambiante et décantez le surnageant. Répétez cette étape deux fois de plus.
 - b. Ajoutez 1ml de méthanol et incubez pendant 5 minutes à température ambiante. Centrifugez à vitesse maximale et décanter le surnageant. Répétez cette procédure une fois de plus.
 - c. Ajoutez 1ml d'éthanol 96-100%, vortexez, centrifugez pendant 5 minutes, et décanter le surnageant. Répétez cette procédure une fois de plus. Puis séchez à l'air le culot.
3. Ajoutez 500µl d'une solution de NaSCN (1M), ou 1ml si la taille du tissu dépasse 1cm². Assurez-vous que le tissu est dans le liquide, à tout moment. Mélangez par inversion (ne pas vortexer) et incubez à 38-40°C jusqu'au lendemain.
4. Centrifugez à vitesse maximale pendant une heure ou plus si le culot ne s'est pas formé. Pipetez avec précaution le surnageant. Pour supprimer le NaSCN résiduel, centrifugez à vitesse maximale pendant une minute, puis décantez.
5. Ajoutez 160µl de tampon ATL (du kit QIAamp) et 40µl de protéinase K (20mg/ml du kit QIAamp), vortexez pendant 15 secondes, et incubez pendant une nuit à 55°C. Vortexez environ toutes les heures pendant la journée.

Si la procédure a été lancée dans la matinée, ajoutez un montant supplémentaire de 20µl de protéinase K à la fin de la journée. Dans le cas contraire, ajoutez 20µl supplémentaire de protéinase K le lendemain matin. Puis continuez l'incubation à 55°C toute l'après-midi.

6. Vortexez le lysat pendant 15 secondes. Vérifiez que tout le tissu a été digéré. Le lysat doit être clair. Si le tissu n'est

- pas digéré, ajoutez 20µl supplémentaires de protéinase K. Centrifugez à vitesse maximale pendant 1 minute.
7. Incubez à 98°C pendant 10 minutes pour réduire l'activité de la protéinase K. Puis centrifugez à vitesse maximale pendant 1 minute.
 8. Ajoutez 200µl de tampon AL (du kit QIAamp) et vortexez pendant 15 secondes. Puis ajoutez 200µl d'éthanol 96-100% et vortexez pendant 15 secondes. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes, puis centrifugez à pleine vitesse pendant 1 minute.
 9. Placez une colonne QIAamp dans un tube QIAamp. Appliquez le volume total de l'échantillon sur la colonne par palier de 600µl à chaque fois.
 10. Centrifugez pendant une minute à 6.000 x g et décantez le filtrat. Si la colonne n'est pas exempte de gouttelettes, centrifugez de nouveau après le retrait du filtrat.
 11. Transférez la colonne dans un nouveau tube QIAamp puis ajoutez 500µl de tampon AW1 (du kit QIAamp, et préparée selon le protocole du fabricant) à la colonne. Centrifugez pendant 1 minute à 6000 x g. Si la colonne n'est pas libre de gouttelettes, centrifugez une seconde fois après le retrait du filtrat.
 12. Transférez la colonne dans un nouveau tube QIAamp puis ajoutez 500µl de tampon AW2 (du kit QIAamp, et préparée selon le protocole du fabricant) à la colonne. Centrifugez à vitesse maximale pendant 1 minute. Décantez le filtrat. Centrifugez à vitesse maximale pendant 3 minutes pour faire sécher complètement la membrane.
 13. Placez la colonne dans un nouveau tube de microcentrifugeuse de 1.5ml exempt de nucléase puis éluez l'ADN en ajoutant 20 à 30µl de tampon AE à la colonne. Incubez pendant un minimum de 5 minutes à température ambiante. Centrifugez à vitesse maximale pendant 3 minutes.
 14. Jetez la colonne et procédez à la quantification de l'ADN et son marquage.

REMARQUES

REMARQUES

GLOBAL HEADQUARTERS

Enzo Life Sciences Inc.
10 Executive Boulevard
Farmingdale, NY 11735
Toll-Free: 1.800.942.0430
Phone: 631.694.7070
Fax: 631.694.7501
info-usa@enzolifesciences.com

EUROPE/ASIA

Enzo Life Sciences (ELS) AG
Industriestrasse 17
CH-4415 Lausen
Switzerland
Phone: +41/0 61 926 89 89
Fax: +41/0 61 926 89 79
info-ch@enzolifesciences.com

For local distributors and detailed product information visit us online:

www.enzolifesciences.com