

Etape 3 : Protocole de conversion de l'ADN par le bisulfite de sodium

Protocole

La procédure de conversion au bisulfite de l'ADN est réalisée avec le kit EZ DNA Modification Kit (Zymo Research). Le kit peut être conservé à température ambiante (15-25°C) jusqu'à 12 mois.

Equipement et réactifs à fournir par l'utilisateur :

- EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research), catalog Nos. D5001 (50 ms.) & D5002 (200 ms.)
- Tube C (capuchon rouge) de l'Urodiag® Multiplex PCR Kit = ADN de contrôle humain méthylé
- Ethanol absolu (96-100%)
- Microtubes de 1,5 ml et tubes PCR de 0,2 ml (barrette de 8 tubes) avec capuchons (barrette de 8)
- Micropipettes et pointes stériles avec filtre
- Microcentrifugeuse (avec rotor pour microtubes de 1.5 ml)
- Vortex
- Bain-marie ou bloc chauffant (37°C et 50°C) ou thermocycler (50°C)

Préparation des solutions:

Préparation de la solution de conversion (Tube CT-Conversion) - Le tube **CT Conversion** est un mélange solide. La solution de conversion doit être préparée comme suit :

1. Introduire 750 μ l d'eau stérile et 210 μ l de la solution **M-Dilution Buffer** dans le tube **CT-Conversion**.
2. Vortexer le tube 5-10 minutes à température du laboratoire (15-25°C).

***Note:** Il est normal de voir des traces de réactif non dissous. La solution de CT-Conversion est conçue pour 10 réactions et peut être utilisée immédiatement après sa préparation (recommandé) ou conservée une semaine à 4°C et un mois à -20°C).*

Préparation de la solution de lavage (flacon M-Wash Buffer) – Additionner 24 ml d'éthanol au 6 ml de **M-Wash Buffer** (D5001) ou 96 ml d'éthanol au 24 ml de **M-Wash Buffer** (D5002).

1. Additionner 5 μ l de **M-Dilution Buffer** à l'échantillon d'ADN (microtube de 1,5 ml) et ajuster le volume final à 50 μ l avec de l'eau stérile (Tableau ci-dessous).

	Tube C	Patient	
	Conc. 1.25 ng/ μ l	Conc. 1.25 ng/ μ l	Conc. 0.625-1.25 ng/ μ l
Echantillon d'ADN	24 μ l	24 μ l (30 ng)	X μ l (15 à 30 ng)
M-Dilution Buffer	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Eau stérile	21 μ l	21 μ l	X μ l (ajuster le volume à 50 μ l)
Homogénéiser l'échantillon par pipetage-refoulement.			

Note: La quantité d'ADN optimale requise est de 30 ng (24 µl d'échantillon d'ADN à 1,25 ng / µl). Une quantité d'ADN de 15 à 30 ng (0,625 à 1,25 ng / pl) peut également être utilisée.

2. Incuber l'échantillon d'ADN pendant 15 minutes à 37°C (bain-marie ou bloc chauffant).
3. Centrifuger brièvement l'échantillon d'ADN pendant 2 secondes pour retirer les gouttes du couvercle ou des côtés du tube.
4. Additionner 100 µl de la solution de conversion à l'échantillon d'ADN (50 µl) et homogénéiser par « pipetage-refoulement » 10 fois.
5. Incuber l'échantillon, à l'abri de la lumière, pendant 15h30 à 50°C dans un bain-marie ou dans un bloc chauffant.
6. Centrifuger le tube pendant 2 secondes pour s'assurer qu'il n'y a pas de gouttelettes dans le capuchon ou sur les côtés du tube.
7. Incuber le tube à 4°C pendant 10 minutes minimum.

Note: Condition d'incubation alternative. Pour les étapes 5 & 6, transférer l'échantillon d'ADN (150 µl) contenu dans le microtube de 1,5 ml dans un tube PCR de 0,2 ml (par exemple, barrette de 8 MicroAmp tubes et barrette de 8 capuchons, applied biosystems).

Incuber l'échantillon dans un thermocycleur à 50°C pendant 15 h30, puis « maintenir » à 4°C.

8. Introduire 400 µl de la solution **M-Binding Buffer** dans la colonne **Zymo-Spin IC Column** munie d'un **tube collecteur**.
9. Additionner l'échantillon (~150 µl) dans la colonne Zymo-Spin IC contenant le tampon M-Binding Buffer. Fermer la colonne et homogénéiser le mélange par retournement de la colonne au moins 5 fois.
10. Centrifuger la colonne à vitesse maximale (14,000 rpm, 16,800 rcf) pendant 30 secondes. Jeter le filtrat.
11. Introduire 100 µl de la solution **M-Wash Buffer** dans la colonne. Fermer la colonne et centrifuger à vitesse maximale pendant 30 secondes.
12. Introduire 200 µl de la solution **M-Desulphonation Buffer** dans la colonne et laisser en contact 20 minutes à 15-25°C. Centrifuger la colonne à vitesse maximale pendant 30 secondes.
13. Introduire 200 µl de la solution **M-Wash Buffer** dans la colonne. Fermer la colonne et centrifuger à la vitesse maximale pendant 30 secondes. Répéter l'étape de lavage une nouvelle fois.
14. Placer la colonne dans un microtube de 1,5 ml et centrifuger à la vitesse maximale pendant 30 secondes pour retirer par pipetage les traces éventuelles de M-Wash Buffer.
15. Introduire 10 µl de la solution **M-Elution Buffer** au centre de la colonne (contact avec la matrice), et laisser en contact 5 minutes à 15-25°C. Centrifuger le microtube à la vitesse maximale pendant 30 secondes pour éluer la solution d'ADN bisulfite.

La solution d'ADN convertie au bisulfite est prête immédiatement pour l'analyse de méthylation ou peut être conservée à -20°C pour une utilisation ultérieure.