	Checklist génotypage Infinium XT Illumina	Version 1.1
GDB_FORM_33	Génotypage	12/05/2023
Rédaction : M. MERBAH	Vérification : M. BOUTTE, L. LIETAR, S. MARTEL, S. MERLIN	Approbation : L. LIETAR

Amplification de l'ADN

=> Sortir le RA1

- ☐ 1 Ajouter 20 µL MA1 dans chaque puits de la plaque MSA7.
- ☐ 2 Transférer 4 µL d'ADN de chaque puits de la plaque SAMAAMMNN vers la plaque MSA7.
- ☐ 3 Ajouter 4 µL de 0.1N NaOH dans chaque puits.
- ☐ 4 Vortexer la plaque MSA7 à 1600 rpm pendant 1 minute.
- ☐ 5 Centrifuger à 280 × g à température ambiante pendant 1 minute.
- ☐ 6 Incuber à température ambiante pendant 10 minutes.
- ☐ 7 Ajouter 35 µL de MA2 par puits.
- ☐ 8 Ajouter 35 µL RAM par puits.
- ☐ 9 Vortexer à 1600 rpm pendant 1 minute.
- ☐ 10 Centrifuger à 280 × g à température ambiante pendant 1 minute.

Incubation de l'ADN

- ☐ 1 Incuber les plaques MSA7 durant 3–24 heures à 37°C.

=> Sortir le FMS

- => Allumer les blocs à 37°C
- => Allumer le four à 48°C


Fragmentation de l'ADN

- ☐ 1 Centrifuger les plaques de MSA7 à 280 × g à température ambiante pendant 1 minute.
- ☐ 2 Ajouter 25 µL de FMS par puits.
- ☐ 3 Vortexer à 1600 rpm pendant 1 minute.
- ☐ 4 Centrifuger à 280 × g à température ambiante pendant 1 minute.
- ☐ 5 Incuber à 37°C pendant 30 minutes.

POINT STOP

Si vous devez vous arrêter, sceller la plaque et la conserver entre -25°C et -15°C.

- => Refroidir la centrifugeuse
- => Sortir le PM1

	Checklist génotypage Infinium XT Illumina	Version 1.1
GDB_FORM_33	Génotypage	12/05/2023
Rédaction : M. MERBAH	Vérification : M. BOUTTE, L. LIETAR, S. MARTEL, S. MERLIN	Approbation : L. LIETAR

Précipitation de l'ADN

- ☐ 1 Ajouter 50 µL de PM1 par puits.
- ☐ 2 Ajouter 155 µL de 2-propanol 100% par puits.
- ☐ 3 Appliquer de nouveaux tapis de caps.
- ☐ 4 Effectuer 10 retournements des plaques pour les mélanger.
- ☐ 5 Centrifuger à 3000 × g à 4°C pendant 20 minutes.
- ☐ 6 Enlever les plaques de la centrifugeuse et retirer les tapis de caps.
- ☐ 7 Retourner rapidement la plaque pour évacuer le surnageant.
- ☐ 8 Taper la plaque fermement sur un papier absorbant.
- ☐ 9 Laisser sécher à l'air libre durant 15 minutes.

=> Allumer la thermoscelleuse

Resuspension de l'ADN

- ☐ 1 Ajouter 23 µL de RA1 par puits.
 - ☐ 2 Thermosceller les plaques.
 - ☐ 3 Incuber durant 15 minutes à 48°C.
- => Régler les blocs à 95°C
- ☐ 4 Vortexer à 1800 rpm pendant 1 minute.
 - ☐ 5 Centrifuger à 280 × g à température ambiante pendant 1 minute.


POINT STOP

Si vous devez vous arrêter, conserver les plaques entre 2°C et 8°C pendant 24h, au-delà les conserver entre -25°C et -15°C.

Conserver le RA1 entre -25°C et -15°C, en cas d'utilisation le jour suivant conservez-le à 4°C.

Hybridation sur les lames Illumina

- ☐ 1 Incuber les plaques MSA7 à 95°C 20 minutes.
- ☐ 2 Refroidir à température ambiante 30 minutes.
- ☐ 3 Centrifuger à 280 × g à température ambiante 1 minute.
- ☐ 4 Placer le gasket dans la chambre d'hybridation XT.
- ☐ 5 Dispenser 800 µL de PB2 dans chaque réservoir.
- ☐ 6 Fermer la chambre d'hybridation XT.
- ☐ 7 Retirer chaque lame Illumina de son emballage.
- ☐ 8 Placer 2 lames Illumina sur chaque insert métallique.
- ☐ 9 Placer le XT tip guide 1 au-dessus de l'insert.
- ☐ 10 Dispenser 15 µL de chaque échantillon d'ADN dans la section appropriée sur la lame Illumina.
- ☐ 11 Retirer le XT tip guide 1 et mettre le XT tip guide 2. Dispenser 15 µL de chaque échantillon d'ADN dans la section appropriée.
- ☐ 12 Retirer le XT tip guide 2 et mettre le XT tip guide 3. Dispenser 15 µL de chaque échantillon d'ADN dans la section appropriée.
- ☐ 13 Retirer le XT tip guide 3 et inspecter les

	Checklist génotypage Infinium XT Illumina	Version 1.1
GDB_FORM_33	Génotypage	12/05/2023
Rédaction : M. MERBAH	Vérification : M. BOUTTE, L. LIETAR, S. MARTEL, S. MERLIN	Approbation : L. LIETAR

lames.


- ☐ 14 Charger l'insert dans la chambre d'hybridation.
- ☐ 15 Incuber à 48°C durant 16 à 24 heures.

Préparation du jour suivant

- ☐ 1 Ajouter 330 ml de EtOH 100% au flacon XC4 et secouer.
- ☐ 2 Laisser le flacon sur la paillasse toute la nuit.
- ☐ 3 Faire tremper les XT tip guides dans une solution d'Alconox à 1%.
- ☐ 4 Rincer et faire sécher les XT tip guides.

Lavage des lames Illumina

- ☐ 1 Remplir les 2 cuves de lavage en verre de PB1.
- ☐ 2 Retirer les inserts métalliques.
- ☐ 3 Retirer les lames Illumina.
- ☐ 4 Retirer les cover seals des lames.
- ☐ 5 Insérer les lames dans le portoir de lavage et le plonger dans la première cuve de lavage en verre.
- ☐ 6 Faire des mouvements d'agitation de haut en bas durant 1 minute.
- ☐ 7 Disposer le portoir de lavage dans la seconde cuve de lavage.
- ☐ 8 Faire des mouvements d'agitation de haut en bas durant 1 minute.
- ☐ 9 Remplir le portoir de montage des lames avec du PB1.
- ☐ 10 Placer les lames Illumina sur les supports de lames immergés dans le portoir de montage.
- ☐ 11 Disposer les lames de verre XT sur les lames Illumina.
- ☐ 12 Bloquer l'ensemble à l'aide des clips.

	Checklist génotypage Infinium XT Illumina	Version 1.1
GDB_FORM_33	Génotypage	12/05/2023
Rédaction : M. MERBAH	Vérification : M. BOUTTE, L. LIETAR, S. MARTEL, S. MERLIN	Approbation : L. LIETAR

XStain

- ☐ 1 Remplir le réservoir d'eau du bain circulant et l'allumer.
- ☐ 2 Ajuster la température du Te-flow.
- ☐ 3 Lorsque la température atteint 44°C, placer les assemblages de lames au niveau des racks du Te-flow.
- ☐ 4 Dans le réservoir de chaque assemblage dispenser :
 - ☐ a 150 µL de RA1. Incuber 30 secondes. Répéter 5 fois.
☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6
 - ☐ b 225 µL de LX1. Répéter 1 fois. Incuber 10 minutes.
☐ 1 ☐ 2
 - ☐ c 225 µL de LX2. Répéter 1 fois. Incuber 10 minutes.
☐ 1 ☐ 2
 - ☐ d 300 µL de EML. Incuber 15 minutes.
 - ☐ e 250 µL de formamide 95%/EDTA 1mM. Incuber 1 minute. Répéter deux fois.
☐ 1 ☐ 2 ☐ 3
 - ☐ f Incuber 5 minutes.
 - ☐ g Baisser la température à celle indiquée sur le tube de SML.
 - ☐ h 250 µL de XC3. Incuber 1 minute. Répéter

deux fois.

- ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3
- ☐ 5 Attendre que la température de consigne soit atteinte.
- ☐ 6 Allumer l'Iscan si vous souhaitez lire les lames directement après le staining.
- ☐ 7 Dans le réservoir de chaque assemblage dispenser :
 - ☐ a 250 µL de SML. Incuber 10 minutes.
 - ☐ b 250 µL de XC3. Incuber 1 minute. Répéter 2 fois. Attendre 5 minutes.
☐ 1 ☐ 2 ☐ 3
 - ☐ c 250 µL de ATM. Incuber 10 minutes.
 - ☐ d 250 µL de XC3. Incuber 1 minute. Répéter 2 fois. Attendre 5 minutes.
☐ 1 ☐ 2 ☐ 3
 - ☐ e 250 µL de SML. Incuber 10 minutes.
 - ☐ f 250 µL de XC3. Incuber 1 minute. Répéter 2 fois. Attendre 5 minutes.
☐ 1 ☐ 2 ☐ 3
 - ☐ g 250 µL de ATM. Incuber 10 minutes.
 - ☐ h 250 µL de XC3. Incuber 1 minute. Répéter 2 fois. Attendre 5 minutes.
☐ 1 ☐ 2 ☐ 3
 - ☐ i 250 µL de SML. Incuber 10 minutes.
 - ☐ j 250 µL de XC3. Incuber 1 minute. Répéter 2 fois. Attendre 5 minutes.

☐ 1 ☐ 2 ☐ 3

- ☐ 8 Retirer les assemblages de lames des racks du Te-flow.
- ☐ 9 Préparer les bacs plastiques de lavage du PB1 et de XC4.
- ☐ 10 Verser 310 ml de PB1 dans le bac correspondant.
- ☐ 11 Désassembler l'ensemble support de lame/lame Illumina/lame de verre.
- ☐ 12 Placer les lames Illumina dans le portoir du bac PB1.
- ☐ 13 Effectuer des mouvements d'agitation vers le haut et le bas 10 fois.
- ☐ 14 Laisser tremper 5 minutes.
- ☐ 15 Plonger les lames de verre XT dans la solution d'Alconox.
- ☐ 16 Verser 310 ml XC4 dans le bac correspondant.
- ☐ 17 Placer le portoir de lame dans le bac XC4.
- ☐ 18 Effectuer des mouvements d'agitation vers le haut et le bas 10 fois.
- ☐ 19 Laisser tremper 5 minutes.
- ☐ 20 Retirer le portoir de lames.
- ☐ 21 Sécher les lames Illumina dans le dessiccateur à vide.
- ☐ 22 Scanner les lames directement ou les stocker à l'abri de la lumière.