

Bisulfitation d'ADN : EZ DNA Methylation Gold™-Kit Zymo Research

<u>Matériels nécessaires :</u>	Plaque PCR 96 puits Thermocycleur
<u>Réactifs nécessaires :</u>	EZ DNA methylation Gold™-Kit Zymo (D5006-Proteigene) Ethanol 100% Eau distillée

Procédure :

**A )Préparation du mix de conversion.**

1. Prendre un tube Conversion Reagent (un tube pour 10 échantillons d'ADN).
2. Ajouter 900µl d'H<sub>2</sub>O.
3. Ajouter 300µl de Dilution Buffer.
4. Ajouter 50µl de Dissolving Buffer.
5. Vortexer.
6. Agiter 10min à température ambiante sur la roue.

**B) Préparation de la plaque PCR**

1. Mettre par puits 300ng ADN T congelé 600 ng ADN paraffine
2. Ajouter H<sub>2</sub>O qsp 20µl par puits
3. Ajouter 130µl de Mix de Conversion par puits
4. Sceller la plaque
5. Vortexer
6. Centrifuger 10sec jusqu'à 2000 rpm

Programme PCR

98°C	10min
64°C	2h30
4°C	∞

**C) Purification de la bisulfite**

1. Mettre une colonne de purification dans un tube receveur. Annoter les colonnes.
2. Annoter les tubes de 1.5 ml pour l'élution finale (mettre le N° de laboratoire sur le bouchon et écrire le numéro de laboratoire et la date sur le tube).
3. Déposer 600µl de Binding Buffer sur la colonne. Ajouter le produit de PCR (150µl).
4. Centrifuger 15sec à 13000 rpm, vider l'éluat du tube receveur.
5. Ajouter 100µl de Wash Buffer sur la colonne. Centrifuger 15sec à 13000 rpm.

6. Ajouter 200µl de Desulphonation Buffer sur la colonne.
7. Incuber 15min a température ambiante.
8. Centrifuger 15sec à 13000 rpm.
9. Ajouter 200µl de Wash Buffer sur la colonne. Centrifuger 15 sec à 13000 rpm.
10. Ajouter 200µl de Wash Buffer sur la colonne. Centrifuger 15 sec à 13000 rpm.
11. Vider l'éluat du tube receveur. Centrifuger a vide 30sec à 13000 rpm.
12. Placer les colonnes dans un tube de 1.5mL
13. Ajouter 10µl d'Elution Buffer au centre de la colonne.
14. Incuber 5min a température ambiante.
15. Centrifuger 30sec à 13000 rpm.
16. Conserver à -20°C.