

MARQUAGE AMBION

PRECAUTIONS GENERALES :

- **Toutes les manipulations** se font avec **des gants** de façon à limiter le risque de dépôt de RNAses présentes en grande quantité sur notre peau.
- Tout le **matériel** utilisé (pointes, tubes...) doit être **exempt de RNase**, de même que l'**eau** utilisée dans le protocole (dilutions, éluions, qsp...).
- Après chaque addition ou préparation de **mélanges** dans les tubes, les **homogénéiser** puis les **centrifuger** quelques instants.
- Les **enzymes** utilisés tout au long du processus sont stockés dans un **bac à enzyme** au congélateur, ce bac permet de les maintenir à température pendant les manipulations.
- **Eviter** de laisser les **ARN à température ambiante** trop longtemps pour limiter leur dégradation. Les stocker dès que possible dans un bac à glace (sauf si indications contraires précisées dans le protocole).
- Les **ARNs** utilisés pour être **hybridés** doivent d'abord subir une étape de **Contrôle Qualité** selon l'instruction « Gestion des échantillons à hybrider ».

MATERIELS ET REACTIFS UTILISES :

- Kit d'amplification Amino Allyl AMBION
40 réactions d'amplification
- Colonnes de purification PCR Qiagen
- Colonnes de purification RNeasy Qiagen
- Marqueurs Cyanine Amersham
- Tampon de fragmentation 25X Agilent
- Tampon d'hybridation 2X Agilent hi-rpm

Attention l'eau utilisée dans ce protocole est de **l'eau exempte de Rnase**, fournie dans le kit **Ambion** (réf. de l'eau seule #9914G) ou **Qiagen** (seulement disponible dans le kit).

Modification du Kit:

- Les volumes recommandés sont divisés par 2 :
1 kit ⇒ **40 réactions d'amplification** ⇒ minimum **80 couplages** aux marqueurs Cy
- Colonnes de purification Qiagen à utiliser à la place de celles du kit Ambion pour la purification des ADN double brin et des ARN couplés.



 Plate-Forme Transcriptome	Marquage des puces pan-genomiques	REF-PROD-02
---	--	-------------

7.1 Synthèse du premier brin d'ADN

Kit utilisé : AMBION amino Allyl Message Amp.

Utiliser de 250 ng à 2000 ng d'ARN total et utiliser des tubes PCR.

- 250 ng à 2000 ng **ARN total**
- 0.5 µl **T7-Oligo(dT) primer**
- qsp 6.0 µl **H2O**

→ 6 µl final

Incuber **10 min à 70°C**
PCR machine, heated lid ON
 + Centrifugation rapide

Préparer le mélange RT-MIX pendant l'incubation :

- 2.0 µl dNTP MIX
- 1.0 µl 10X First strand buffer
- 0.5 µl RNase inhibitor
- 0.5 µl Reverse Transcriptase

Ajouter le RT-MIX dans chaque tube à réaction (4µl) → 10 µl final

Incuber **2 heures à 42°C**
PCR machine, lid OFF
Centrifugation rapide + GLACE

7.2 Synthèse du second brin d'ADN

Kit utilisé : AMBION amino Allyl Message Amp.

Préparer le mélange 2nd Strand-MIX :

- 5.0 µl 10X Second strand buffer
- 2.0 µl dNTP MIX
- 0.5 µl Rnase H
- 1.0 µl DNA polymerase
- 31.5 µl RNase free H₂O (qsp 40 µl)

Ajouter 40 µl de ce mélange dans chaque tube à réaction → 50 µl final

Incuber **2 heures à 16°C**
PCR machine, heated lid OFF

A cette étape, il est possible de conserver les tubes au congélateur (-20°C)

7.3 Purification des ADN double brins

Kit utilisé : Qiagen PCR purification

- Ajouter 300 µl **Tampon PB. Bien mélanger.**
 Charger la colonne.
 Centrifuger à 14 000 rpm 1 min.
 Transférer la colonne dans un tube vide de 2 mL.

Fixation ADN

- Ajouter 750 µl **Tampon PE**
 Centrifuger à 14 000 rpm 1 min.
 Transférer la colonne dans un tube vide de 2 mL.
 Centrifuger à 14 000 rpm 1 min pour sécher la colonne.

Lavage

Transférer la colonne dans un tube de 1.5 ml.

- Ajouter 50 µl **H₂O chaude (42°C)**
 Laisser 1 min à Température Ambiante.
 Centrifuger à 14 000 rpm 1 min.

Elution

- Ajouter 50 µl **H₂O chaude (42°C)**
 Laisser 1 min à Température Ambiante.
 Centrifuger à 14 000 rpm 1 min.

→ 100 µl final

A cette étape, il est possible de conserver les tubes au congélateur (-20°C)

7.4 Concentration des ADN double brins

- Dessécher les échantillons au Speed Vac,
- Reprendre le culot avec 7µl H₂O.

7.5 Transcription In Vitro (IVT)

- 7 µl **ADN double brins**

Préparer le mélange IVT-MIX :

- 2.0 µl T7 10X reaction buffer
- 6.0 µl ATP, CTP, GTP Mix
- 1.5 µl UTP
- 1.5 µl aaUTP
- 2.0 µl T7 enzyme mix

Ajouter 13 µl du mélange IVT-MIX par tube

→ 20 µl final

Incuber **over night à 37°C**

7.6 Purification des ARNa

Kit utilisé : Qiagen RNeasy purification

- Ajouter:
 - 80 µl **H2O**
 - 350 µl **Tampon RLT. Bien mélanger.**
 - 250 µl **Ethanol (96-100%)**
 Mélanger et charger la colonne.
 Centrifuger à 13000 rpm 30 sec.
 Transférer la colonne dans un tube de 2 ml vide.
 } **Fixation ARN**

- Ajouter 500 µl **Tampon RPE**
 Centrifuger à 13000 rpm 30 sec.
 Transférer la colonne dans un tube de 2 ml vide.
 } **Lavages**

- Ajouter 500 µl **Tampon RPE**
 Centrifuger à 13000 rpm 1 min.
 Transférer la colonne dans un tube de 2 ml vide.
 Centrifuger à 13000 rpm 1 min pour sécher la colonne.
 } **Lavages**

- Transférer la colonne dans un tube de 1.5 ml.

- Ajouter 30 µl **H2O chaude (42°C)**
 Laisser 1 min à température ambiante.
 Centrifuger à 13000 rpm 30 sec.
 } **Elutions**

- Ajouter 30 µl **H2O chaude (42°C)**
 Laisser 1 min à température ambiante.
 Centrifuger à 13000 rpm 30 sec.
 } **Elutions**

- 60 µl final**

7.7 Mesure de la concentration en ARNa

Prendre la DO à 260 nm (1DO = 40µg RNA/ml).

Le **Nanodrop RNA** (programme « Nucleic Acids ») est fortement recommandé pour cette mesure.

Il est possible de s'arrêter à cette étape en stockant à -80°C

7.8 Post-processing des lames

- Immerger les lames dans une solution de blocage (50mM d'éthanolamine dans 50 mM de tampon borate pH 9.0) pendant 1 heure à température ambiante.
- Rincer à l'eau distillée.
- Sécher par centrifugation à 900 rpm (700 g) pendant 2 min.

7.9 Couplage aux marqueurs Cy3 et 5

Kit utilisé : AMBION amino Allyl Message Amp.

- Resuspendre chacun des 2 tubes de marqueurs Cy3 et Cy5 dans 18 µl de DMSO (Ambion). Bien mélanger.
- Utiliser 3 - 5 µg d'ARNa, desséchés par SpeedVac, par couplage.

Réaction

- 5 µg aRNA
- 8.0 µl Coupling buffer (kit Ambion)
- 2.0 µl DMSO CyDye Cy3 or Cy5

→ 10 µl final

A partir de cette étape, il faut prendre soin de protéger les échantillons de la lumière au maximum.

Incuber **30 min à température ambiante**
A L'ABRI DE LA LUMIERE

Dye quenching

- 4.0 µl 4M Hydroxylamine (kit Ambion)

→ 14 µl final

Incuber **15 min (exactement) à température ambiante**
A l'abri de la lumière

Procéder immédiatement à l'étape de purification des ARN.

7.10 Purification des ARN marqués

Kit utilisé : Qiagen RNeasy purification

- Ajouter :

- 86 µl **H2O**
- 350 µl **Tampon RLT. Bien Mélanger**
- 250 µl **Ethanol (96-100%)**

Mélanger et charger la colonne.
 Centrifuger à 13000 rpm 30 sec.
 Transférer la colonne dans un tube vide de 2 mL.

Fixation ARN

- Ajouter 500 µl **Tampon RPE**
 Centrifuger à 13000 rpm 30 sec.
 Transférer la colonne dans un tube vide de 2 mL.

Lavages

- Ajouter 500 µl **Tampon RPE**
 Centrifuger à 13000 rpm 1 min.
 Transférer la colonne dans un tube vide de 2 mL.
 Centrifuger à 13000 rpm 1 min pour sécher la colonne.

Transférer la colonne dans un tube de 1.5 ml.

- Ajouter 30 µl **H2O chaude (42°C)**
 Laisser 1 min à température ambiante.
 Centrifuger à 13000 rpm 30 sec.

- Ajouter 30 µl **H2O chaude (42°C)**
 Laisser 1 min à température ambiante.
 Centrifuger à 13000 rpm 30 sec.

} **Elutions**

→ 60 µl final

7.11 Mesure du rendement de couplage des ARN marqués

- Mesurer les DO à 260nm, 550nm (Cy3) and 650 nm (Cy5).

Le **Nanodrop RNA** (programme « Microarray ») est fortement recommandé pour cette mesure.

NB : Il est conseillé de travailler avec un **rendement** de couplage >5%.

7.12 Fragmentation des ARN et hybridation

Utiliser le Tampon de Fragmentation Agilent 25X.

Réaction :

- 750 ng aARN couplé Cy3
- 750 ng aARN couplé Cy5
- qsp 240 µl H₂O RNase free
- 10 µl Tampon de fragmentation Agilent 25X

→ 250 µl final

Incuber **30 min à 60°C**
A l'abri de la lumière

- 250 µl Tampon d'hybridation Agilent 2X

→ 500 µl final

Remarque : stockage des échantillons d'ARN couplés supplémentaires.

- Mélanger dans un tube de 1.5 ml :
 - 750 ng aARN couplé Cy3
 - 750 ng aARN couplé Cy5
- Sécher au SpeedVac
- Stocker à - 80°C

Pour utiliser ces échantillons reprendre le protocole à partir du point 7.12.

Pour l'hybridation en chambres Agilent et les lavages post hybridation voir le « **protocole d'hybridation des puces à ADN** ».