

## MARQUAGE « MAISON »

### PRECAUTIONS GENERALES :

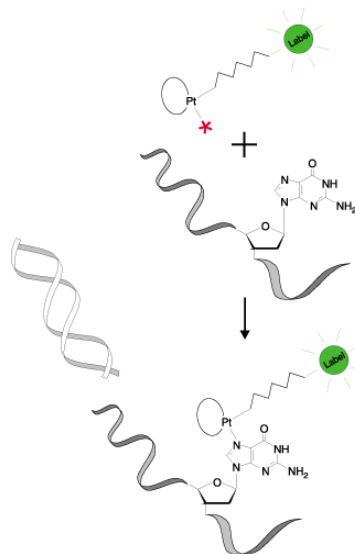
- **Toutes les manipulations** se font avec **des gants** de façon à limiter le risque de dépôt de RNAses présentes en grande quantité sur notre peau.
- Tout le **matériel** utilisé (pointes, tubes...) doit être **exempt de RNase**, de même que l'**eau** utilisée dans le protocole (dilutions, éluions, qsp...).
- **Eviter** de laisser les **miARN 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 Ulysis (Invitrogen) alexa fluor 532(U21651) et 647 (U21660)
- Kit RNeasy mini kit (Qiagen)
- Colonnes de purification Roche Quick spin oligo (11814397001)
- Tampon d'hybridation 2X Hi-RPM Agilent

**Attention** l'eau utilisée dans ce protocole est de **l'eau exempt de RNase**, fournie dans le kit **Ulysis**

### PRINCIPE :



 Plate-Forme Transcriptome	<b>Marquage miRNA : méthode ULYSIS</b>	REF-PROD-02
---	--	-------------

## 1- Purification et extraction des miRNAs

**Kit utilisé :** Rneasy mini kit (Qiagen)

Utiliser 40.0 µg d'ARN total ou moins et des tubes de 1.5 ml

- 40.0 µg **ARN total**
- H<sub>2</sub>O **qsp 50.0 µl**
- 175.0 µl **RLT buffer**+ vortexer
- 225.0 µl **EtOH 70%**+ vortexer

Transférer sur colonne RNeasy

**Centrifuger 15-30 sec à 10000g**

- 450.0 µl **d'éluat**
- 300.0 µl **EtOH 100%**+ vortexer

Transférer sur colonne RNeasy minElute

**Centrifuger 15-30 sec à 10000g**

- Conserver la colonne
- Ajouter sur la colonne 500.0 µl **RPE buffer**

**Centrifuger 30 sec à 10000g**

- Conserver la colonne
- Ajouter sur la colonne 500.0 µl **EtOH 80%**

**Centrifuger 5 min à 10000g, bouchon ouvert**

- **Mettre la colonne dans un tube de 1.5 ml**
- Ajouter sur la colonne 40.0 µl **H<sub>2</sub>O RNase free**

**Centrifuger 30 sec à 10000g**

Mesurer les DO à 230 nm, 260 nm et 280 nm en sélectionnant Nucleic Acid.

Le **Nanodrop RNA** est fortement recommandé pour cette mesure.

## 2- Marquage

**Kit utilisé :** Ulysis Invitrogen

Séparer les ARNs en 2 lots équivalents et utiliser des tubes PCR.

- 18.0 µl small RNA
- 2.0 µl 10X buffer
- 2.0 µl dye Alexa fluor 532
- 5.0 µl dye Alexa fluor 647



Volume à diviser par 2 si  
utilisation d'une chambre double

incuber 30 min à 85°C

**PCR machine, heated lid ON**+centrifugation rapide

### 3- Purification des miRNAs marqués

**Colonne utilisée :** Roche

- Laisser régénérer la colonne à t° ambiante (environ 30 minutes)
- Faire descendre le gel dans la colonne si nécessaire
- Disposer la colonne dans un tube de 2.0 ml
- Casser le bouchon du bas de la colonne
- Centrifuger la colonne: 1 minute à **1000g**
- Vider le contenu des tubes
- Décapsuler et ajouter 300.0 µl **H2O**
- Centrifuger 2 minutes à **1000 g**
- Déposer au centre de la colonne les 47.0 µl d'ARNs marqués à comparer (22.0 µl de miRNA/Alexa fluor 532 et 25.0 µl de miRNA/alexa fluor 647)
- Centrifuger 4 minutes à **1000 g**

### 4- Mesure du rendement de couplage des miRNAs marqués

- Mesurer les DO à 260nm, en sélectionnant alexa 532 et 647.

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

### 5- 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 milliQ 3 à 4 fois.
- Sécher par centrifugation à 900 rpm (700 g) pendant 2 min.

### 6- Hybridation

Utiliser le Tampon d'hybridation Agilent 2X hi-rpm.


**Réaction :**

- 50.0 µl miARN couplés aux alexas 532 et 647
- 50.0 µl Random 25 mers 100 µM
- 100.0 µl H<sub>2</sub>O RNase free
- 200.0 µl Tampon d'hybridation Agilent 2X

Volume à diviser par 2 si  
utilisation d'une chambre double

**→ 400.0 µl final**

Hybrider dans les chambres Agilent selon le protocole d'hybridation des puces à ADN à 48°C over night.

 Plate-Forme Transcriptome	<b>Marquage miRNA : méthode ULYSIS</b>	REF-PROD-02
---	--	-------------

## 7- Lavages post hybridation

**Wash 1 : 6XSSC ; 0.005% triton X101 ou tampon Oligo WASH 1 Agilent**

**Wash 2: 0.1 wash 1 ou WASH 2 Agilent**

- Démontez l'ensemble lame + lamelle en tampon wash 1
- Laver 5 minutes en wash 1 sous agitation
- Laver 30 secondes en wash 2 à 37 °C sous agitation
- Sécher par minicentrifugation.

