

Protocole complet pour RNA-seq

Pierre-Louis Stenger

10 Novembre 2016

Acétate de sodium 3 M (Acétate de soude ou Sel sodique de l'acide acétique; pH 5.2).



Alcool isopropylique (isopropanol). Inflammable et irritant. Les symptômes de l'empoisonnement à l'isopropanol se traduisent par des maux de tête, vertiges, dépression mentale, nausées, vomissements, narcolepsie et coma.



Azote liquide. À manipuler avec des gants anti-froid et des gants nitriles par-dessus.



Chloroforme (trichlorométhane) Hautement volatil. Le chloroforme a tendance à se décomposer en donnant du chlorure d'hydrogène, du chlore et de l'oxychlorure de carbone (phosgène) qui est un produit extrêmement toxique. Absorbé ou inhalé à forte concentration, il peut conduire à un coma, voire entraîner des troubles respiratoires et cardiaques qui peuvent s'avérer mortels.



Ethanol (75 pour-cent)

Ethanol (70 pour-cent)

Javel (Chlorux®)

PBS 1X (tampon phosphate salin), contient du chlorure de sodium, du phosphate disodique, du phosphate monopotassique et un peu de chlorure de potassium. Le tout traité à l'eau avec du **DEPC** (Pyrocarbonate d'éthyle, réagit spécifiquement avec les acides aminés histidine et, dans une moindre mesure, tyrosine des protéines. Il inactive certaines protéines, comme les ribonucléases). Pour enlever le DEPC, le flacon est autoclavé.

RNAssecure Reagent. Peut provoquer une légère irritation cutanée. Non dangereux. Contient du dithiothréitol (DTT) qui est un agent réducteur fort. Permet de prévenir la formation de ponts disulfures intramoléculaires et intermoléculaires. Peut aussi réduire les ponts disulfures enfouis en conditions dénaturantes.

RNASE Away®, contient de l'alkali hydroxide, irritant pour les yeux et la peau.



Trizol (Initrogen®), contient du guanidinium thiocyanate-phenol-chloroforme.



Encadré 1: Réactifs

Agilent 2100 **Bioanalyzer**[®] de Agilent Technologies[™].

Bain Marie Dry Bath FB15101 Fisher Scientific[™] ou Accublock[™] Digital Dry Bath Labnet International Inc.

Boîtes de Petri.

Broyeur Retsch[®] MM400.

Centrifugeuse 5427R eppendorf[®].

Kit **DNase** par le kit Ambion[®] RNA de Life Technologies[™] (AM1906).

kit **PureLink**[™] **RNA Mini Kit**, Ambion[®] de Life Technologies[™]

NanoDrop[®] 1000.

Pince.

Scalpels.

Tubes eppendorf[®] 1.5 mL (nombre d'échantillon x 7) et 2 mL (nombre d'échantillon x 2).

Tubes Falcon[™] 15 mL (x 1) et 50 mL (x 8).

Encadré 2: Matériels

1 Labellisation des tubes eppendorf[®]

Tubes eppendorf[®] 2 mL x 2 x nombre d'échantillon avec simplement le code de l'individu.

Tubes eppendorf[®] 1.5 mL x nombre d'échantillon avec le code de l'individu et un "S" pour "ARN stock".

Tubes eppendorf[®] 1.5 mL x nombre d'échantillon avec le code de l'individu et un "+" pour "traitement avant DNase".

Tubes eppendorf[®] 1.5 mL x nombre d'échantillon avec le code de l'individu et un "++" pour "traitement après DNase".

Tubes eppendorf[®] 1.5 mL x nombre d'échantillon avec le code de l'individu et un "Ag. Avt." pour "traitement au Bioanalyzer[®] avant DNase".

Tubes eppendorf[®] 1.5 mL x nombre d'échantillon avec le code de l'individu et un "Ag. Ap." pour "traitement au Bioanalyzer[®] après DNase".

Tubes eppendorf[®] 1.5 mL x nombre d'échantillon avec le code de l'individu et un "Ap. Pu." pour "traitement après nettoyage (purification)".

Tubes eppendorf[®] 1.5 mL x nombre d'échantillon avec le code de l'individu et un "Fin" pour "Final".
et 2 mL (nombre d'échantillon x 2).

Colonnes filtres du PureLink[™] RNA Mini Kit x nombre d'échantillon avec simplement le code de l'individu.

2 Extraction d'ARN total

2.1 Broyage

Il existe deux techniques, soit par le broyage du tissu mou avec billes, soit par cryobroyage:

Broyage; technique des billes

Préparation de la paillasse Mettre des gants et une blouse. Nettoyage de la paillasse à l'eau de javel, puis à l'éthanol. Récupération des échantillons dans le frigidaire à 4 °C. Mise en glace des échantillons. Labellisation des eppendorf® 2 mL (correspondant au nombre d'échantillon multiplié par 2). Placer 4 billes d'inox à l'aide d'une pince dans chaque tube eppendorf® 2 mL.

Travail sous hôte

Préparer 4 tubes Falcon™ dans un portoir. Dans 2 tubes, placer de l'éthanol à ras-bord. Dans les deux autres, placer la solution de PBS aussi jusqu'à ras-bord.

Prendre le Trizol® (attention, le Trizol® peut faire des trous dans les gants !) situé dans le frigidaire de droite. Le parafilm sur les bouchons sert à éviter l'évaporation des produits. Penser à prendre un stock de papier. Mettre du Trizol® dans un petit tube Falcon™ et le mettre dans la glace. Mettre 1.5 mL de Trizol® dans chaque tube eppendorf® de 2 mL (ceux avec les billes). Placer les tubes dans la glace.

Faire tourner la centrifugeuse à vide à 4 °C pour la refroidir.

Prendre une boîte de Pétri et l'ouvrir. Prendre un échantillon avec une pince nettoyée au préalable deux fois à l'éthanol (ceux des deux tubes Falcon™), puis plongée dans le PBS. Cet échantillon est lavé au PBS, à l'aide d'une pipette 1000 et du 4^{ième} tube Falcon™ contenant le PBS. Sécher l'échantillon sur du papier. Le hacher au scalpel (nettoyé selon le même procédé que la pince) l'échantillon dans la boîte de Pétri. Placer l'échantillon dans le tube eppendorf® 2 mL.

Dès qu'il y a 10 tubes eppendorf® de prêt, les placer au broyeur Retsch® MM400. Penser à équilibrer si besoin. Mettre la pieuvre (extracteur) en marche suite au Trizol®. Laisser broyer (fréquence 30 par secondes) pendant 17 minutes pour les poches perlières et 15 minutes pour les greffons/manteau.

Centrifuger ensuite à 12000 G pendant 10 minutes à 4 °C (avec les billes). Cette étape est nécessaire car les échantillons de poches et de greffons sont riches en protéines et en polysaccharides.

Récupérer la phase supérieure (pipeter tout le liquide à l'opposé du culot), puis placer la dans des tubes eppendorf® 2 mL. Bien prendre un cône par échantillon, puis le jeter dans les déchets contaminés aux phénols. Stockage à 4 °C.

Broyage; technique du cryo-broyage avec de l'azote liquide Nettoyer les broyeurs en inox[®] avec du RNASE Away[®] (ou au DEPC si il n'y en a plus). Ce protocole se base sur celui ci dessus. Mettre des **gants anti-froid sous les gants nitriles**. Les broyeurs en inox sont plongés dans l'azote liquide. Tant que l'azote bout, les broyeurs ne seront pas disponibles (prêts). De même, les spatules et pinces sont à plonger dedans. Il faut laisser refroidir longtemps, sinon l'échantillon va venir se coller aux instruments et faire une pâte.

Penser à faire tourner la centrifugeuse à vide à 4°C pour la faire refroidir.

Récupérer l'échantillon selon le même protocole que pour le broyage aux billes, mais sans hacher l'échantillon (Nettoyage au PBS..etc).

Sécher l'échantillon avec du papier absorbant. Placer l'échantillon dans du papier aluminium qui a été prétraité au RNASE Away[®]. Fermer l'aluminium, puis le plonger dans l'azote liquide.

Récupérer l'échantillon avec une pince (préalablement plongée dans l'azote liquide) puis le mettre dans les broyeurs en acier avec une grosse bille. Agir vite. Faire un broyage pendant 20 secondes (fréquence 30 par secondes). L'échantillon pourrait possiblement moins coller avec un raccourcissement du temps de broyage (15 secondes).

Prendre une spatule et gratter un maximum d'échantillon. Dès que la poudre d'échantillon colle à la spatule, il faut replonger la spatule dans l'azote. Placer la poudre dans un tube eppendorf[®] préalablement rempli d'1.5 ml de Trizol[®] et taré sur une balance (le tout sur un portoir en polystyrène). Reporter la mesure de la masse de la poudre.

Placer les tubes eppendorf[®] dans la glace.

Centrifugation 12.000 G, à 4 °C, pendant 10 minutes.

Récupérer le surnageant et le placer dans des nouveaux tubes eppendorf[®] 2 ml. Stocker dans la glace.

2.2 Extraction

Séparation des phases

Faire tourner la centrifugeuse à vide à 4 °C pour la refroidir.

Ajouter 300 µL de chloroforme (1V/5V) dans chaque tube placé dans la glace (tout comme le tube de chloroforme).

Agiter par inversion les tubes une vingtaine de fois, délicatement, sans faire mousser.

Incuber pendant 3 minutes à température ambiante.

Centrifuger à 12.000 G pendant 12 minutes à 4 °C.

Précipitation d'ARN

Transférer avec beaucoup d'attention la phase aqueuse supérieure dans un nouveau tube de 1.5 mL (ceux notés avec "S"), à l'aide d'une pipette 1000 μ L (penser à changer de cônes à chaque fois). Il ne faut aspirer que la surface, si le précipité blanc/rose est aussi aspiré, il faut re-centrifuger.

Placer les échantillons sur la glace.

Ajouter 375 μ L d'alcool isopropylique et 375 μ L de solution HIGH SALT.

Agiter vigoureusement par inversion des tubes.

Incuber pendant 12 minutes à température ambiante.

Centrifuger à 12.000 G pendant 10 minutes à 4 °C.

Lavage des échantillons

Retirer le surnageant par inversion des tubes pour ne garder que le culot. Jeter le surnageant dans un bécher en faisant attention que le culot ne se détache pas. Sécher le bout du tube avec du papier absorbant. Placer les échantillons sur la glace.

Ajouter 900 μ L d'éthanol 75 % et mélanger doucement.

Centrifuger à 10.000 G pendant 10 minutes à 4°C.

Solubilisation d'ARN

Chercher le RNA secure reagent pour qu'il décongèle.

Retirer l'éthanol en utilisant une pipette.

Sécher pendant 10 minutes en laissant les tubes ouverts sur la glace pour enlever les vapeurs. Vérifier qu'il n'y a plus de gouttes. Laisser encore ouvert si besoin.

Ajouter 90 μ L de RNA secure reagent (inhibiteur de RNase) directement sur le culot. Bien homogénéiser en faisant des aller-retours avec la pipette (Changer de cône à chaque fois).

Incuber dans un bain-marie pendant 5 minutes à 65°C tout en agitant régulièrement les échantillons (mais ne pas vortexer). Possibilité de doser avant la re-précipitation si il y a une problème de culot ou une faible quantité de tissu.

Précipitation de l'ARN avec l'Acétate de sodium 3 M

Ajouter 10 μL d'acétate de sodium 3 M (change le pH pour faciliter la précipitation d'ARN). Agiter doucement et faire une mini-centrifugeuse de paillasse (10 secondes.)

Ajouter 100 μL d'alcool isopropylique (v/v), puis bien mélanger avec une pipette.

Incuber pendant 10 minutes à température ambiante.

Centrifuger à 12.000 G pendant 10 minutes à 4 °C.

Retirer l'alcool isopropylique par inversion des tubes sur du papier absorbant.

Placer les échantillons sur la glace. Ajouter 500 μL d'éthanol à 75 % et mélanger doucement.

Centrifuger à 10.000 G pendant 5 minutes à 4 °C.

Retirer l'éthanol en utilisant une pipette.

Placer les échantillons avec les tubes ouverts sur glace pendant 4 minutes.

Ajouter 25 μL d'eau RNase-free (= eau biomol) directement sur le culot.

Incuber dans un bain marie pendant 4 minutes à 65 °C. Remuer les échantillons en tapotant sur le culot.

Placer directement les échantillons sur glace.

Doser les échantillons au NanoDrop[®] en utilisant 1 μL .

Aliquoter 2 μL dans un autre tube 1.5 mL pour vérifier plus tard au Bioanalyzer[®] avant traitement, ceux notés "Ag-Avt" pour Avant agilent, signifiant que l'échantillon n'a pas été traité à la DNase.

Nous avons donc pour chaque échantillon, un tube de 2 μL et un autre tube de 22 μL (ceux notés avec "S").

Congeler les échantillons à 4 °C.

3 Traitement à la DNase

Il faut d'abord faire des calculs afin de connaître le volume que nous prendrons des tubes d'ARN stock (ceux notés "S") pour avoir la même quantité d'ARN dans tous les tubes. Ici nous cherchons à avoir une quantité équivalente (en μL) pour 4 μg d'ARN. A partir des données du Nanodrop, et de la colonne des concentrations ng/ μL , convertir dans une autre colonne en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (diviser par 1000), dans une autre colonne multiplier ces données par 25 pour avoir la quantité d'ARN totale en μg . Dans une autre colonne, afin d'avoir le volume équivalent pour 4 μg en μL , faire 4 divisé par la concentration en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Dans la colonne suivante, calculer le volume d'eau à compléter pour avoir 22 μL au total.

Réaliser ces dilutions dans des nouveaux tubes eppendorf[®] 1.5 ml labélisé avec un plus ce qui signifie qu'il n'a pas encore été traité à la DNase.

3.1 DNase par le kit Ambion[®] RNA de Life Technologies[™](AM1906)



Figure 1: kit Ambion[®] RNA de Life Technologies[™](AM1906)

Ajouter 1/10 volume de DNase Tampon 1 10X (10X DNase 1 Buffer, penser à la vortexer) (donc un ajout de 2.5 μ L de Tampon; attention ce tampon contient du glycérol) et de 0.5 μ L de DNase 1 (à ne surtout pas vortexer !) dans chaque tube d'échantillon des 22 μ L (possibilité de faire un mix avant). Nous avons donc au final 25 μ L pour chaque tube.

Faire une mini centrifugeuse de paillasse pendant 10 secondes.

Incuber à 37 °C pendant 25 minutes.

Vortexer le tube mère de résine qui correspond à des micro-billes (reagent). Ajouter 0.1 volume de cette résine (soit 2.5 μ L). Nous avons donc maintenant 27.5 μ L.

Incuber pendant 2 minutes à température ambiante en remuant manuellement les échantillons régulièrement.

Centrifuger à 10.000 G pendant 1.5 minutes à température ambiante.

Récupérer le surnageant (prendre 24 μ L) et les placer dans des nouveaux tubes 1.5 mL, ceux notés avec deux signes plus signifiant que l'échantillon a été traité à la DNase. Le reste est jeté.

Aliquoter dans de nouveaux tubes (1.5 mL) 2 μ L, ceux notés "Ag-Ap" pour "Agilent après" qui seront analysés au Bioanalyzer[®].

Passer les échantillons au NanoDrop[®] en prenant 2 μ L.

Il ne reste donc que 20 μ L d'échantillon. Rajouter 80 μ L d'eau pour avoir un volume final de 100 μ L.

4 Nettoyage

4.1 Nettoyage par le kit PureLink[™]RNA Mini Kit, Ambion[®] de Life Technologies[™]

Prendre les échantillons de 100 μ L. Ajouter 300 μ L de Tampon de lyse (Lysis Buffer), car il y a des sels qui favorisent la précipitation.

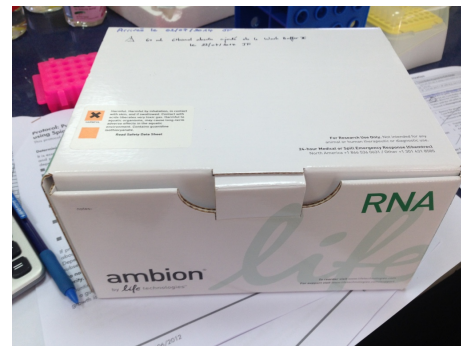


Figure 2: kit PureLink™RNA Mini Kit

Nous avons donc 400 μL . Ajouter 1 volume d'éthanol 70 %, donc 400 μL . Nous avons alors 800 μL . Homogénéiser avec une pipette.

Transférer sur les colonnes filtres 400 μL et centrifuger à 12.000 g pendant 15 secondes. Jeter le liquide dans un becher. Répéter l'opération une deuxième fois pour pouvoir passer les 800 μL .

Ajouter 700 μL de Tampon 1 (Buffer 1).

Centrifuger à 12.000 G pendant 15 secondes. Jeter le liquide dans un becher.

Prendre des nouvelles colonnes. Ajouter 500 μL de Tampon 2 (Buffer 2).

Centrifuger à 12.000 G pendant 15 secondes. Jeter le liquide dans un becher.

Ajouter une nouvelle fois 500 μL de Tampon 2 (Buffer 2).

Centrifuger à 12.000 G pendant 15 secondes. Jeter le liquide dans un becher.

Refaire une nouvelle centrifugation à vide pour sécher les échantillons pendant 2 minutes à 12.000 G.

Mettre les colonnes filtres dans un tube eppendorf® de 1.5 ml, ceux notés "Fin" pour "Final" sur les tubes. Mettre 30 μL de RNase-free.

Incuber pendant 2 minutes.

Centrifuger à 12.000 G pendant 2 secondes.

Faire des aliquots de 2 μL dans des tubes eppendorf® de 1.5 ml, ceux notés "Ap. Pu" pour "Après Purification" sur les tubes.

Passer les échantillons au NanoDrop® en prenant 2 μL . Le volume final sera donc de 26 μL .



Figure 3: BioAnalyser, seringue et puce, kit de réactifs

5 Obtention de résultats préliminaires au Bioanalyzer®

5.1 Via Agilent 2100 Bioanalyzer® de Agilent Technologies™

Le Bioanalyzer® est une électrophorèse capillaire à puce. La puce comprend 12 puits pour recevoir les échantillons, 2 puits nommés par un “G” entouré de blanc, un puits avec un “G” entouré de noir et un dernier puits pour mettre le marqueur (échelle).

Penser à sortir le kit Agilent Technologie® du frigidaire 30 minutes avant, car il y a du DMSO qui cristallise à 4°C. Le tube rouge contient le gel, le tube bleu du DYE (qui est photosensible, donc ne pas l'exposer à la lumière et le laisser dans de l'aluminium) et le tube vert comprend le marqueur qui est une petite séquence à mettre dans tous les puits pour l'alignement.

Dans une nouvelle puce, mettre le marqueur de taille dans tous les puits.

Il faut tout ensuite décontaminer les électrodes à l'aide des 2 puces de nettoyage (mettre du RNase zap (= RNase Away = RNase Zoé) dans l'une et de l'eau ultra pure dans l'autre, et mettre le liquide en bas à droite à la place de l'échelle sur la puce). Ne pas mettre plus de 350 µL sinon cela débordera et cristallisera dans l'appareil. La puce avec du RNase zap doit rester dans l'appareil pendant une minute, et la puce avec de l'eau ultra pure pendant 10 secondes. Laisser ensuite l'appareil ouvert durant 10 secondes afin que le reste d'eau s'évapore. Refermer l'appareil.

Prendre le gel (tube rouge), qui doit être filtré. Un gel filtré se garde pendant un mois. Alicoter 65 µL et mettre 1 µL de DYE préalablement vortexé (tube bleu), puis mettre le tube dans de l'aluminium. Avec le DYE, ce réactif ne se garde qu'une seule journée (avec 65 µL on peut faire 2 gels). Faire une centrifugation pendant 10 minutes à 13.000 G à température ambiante.

Mettre les échantillons à dénaturer à 70° pendant 2 minutes, puis les placer dans la glace pour stopper la dénaturation.

Placer la puce sur la station de priming (Chip Printing Station[®]), attention de ne pas mettre les doigts sous la puce. Mettre 9 μ L de gel dans le puits avec le “G noir”. Mettre la seringue sur 1 mL puis fermer la station. Baisser doucement le piston, attendre 30 secondes, enlever la sécurité, attendre 5 secondes, puis remonter le piston jusqu’à 1 mL. Appuyer sur le côté gauche puis ouvrir en enlevant la sécurité (pour éviter les explosions de gel). Puis mettre 9 μ L de gel par puits dans les deux autres puits avec le “G”. Placer 5 μ L de Marker dans tous les puits y compris dans le puits prévu pour recevoir le marqueur de taille.

Mettre 1 μ L d’échantillon dans les puits à échantillons. Puis mettre 1 μ L de marqueur de taille dans les puits à échantillons.

Mettre la puce dans le IKA MS3 Vortexer[®] pendant 1 minute à 24.000 RPM (l’appareil s’arrêtera tout seul). Mettre ensuite la puce dans l’Agilent 2100 Bioanalyzer[®].

À l’aide de l’interface numérique, aller dans “Assay”, puis “RNA”, puis “Eucaryote Total RNA Nano” et enfin sur “Start”.

La fluorescence (ordonnée sur le graphique) correspond à la quantité d’ARN. Si il y a un double pic, il pourrait y avoir un problème de dénaturation. Le premier pic correspond au Marker. Il devrait y avoir deux pics chez les mollusques (un pour l’ARN 16S et une pour le 28S), mais l’ARN 28S est auto-catalytique chez les mollusques, on ne le voit donc jamais. La valeur de confiance des résultats correspond au RIN (qui est une échelle de 1 à 10) se trouve dans l’onglet “Data”, puis dans “Chip Summary”.

Il faut ensuite nettoyer l’appareil avec la même procédure qu’au deuxième alinéa. Aspirer ensuite avec une pipette l’eau dans les puces.