**Protocole complet pour RNA-seq**

*Pierre-Louis Stenger*

November 1, 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 a` un coma, voire entraîner des troubles respiratoires et cardiaques qui peuvent s’avérer mortels.  **Ethanol** (75 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 trait ́e a` 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.  **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

Il existe deux techniques, soit par le broyage des billes, soit par cryobroyage:

**Extraction d'ARN total**

*Broyage*

Il existe deux techniques, soit par le broyage des 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. Labélisation des eppendorf 2 ml et 1.5 ml (correspondant au nombre d'échantillon). Placer 4 billes de fer à l'aide d'une pince dans chaque tube 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 chaque tube eppendorf de 2 ml (ceux avec les billes). Placer les tubes dans la glace.

Prendre une boite 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 4ième 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 boite 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.

Centrifuger ensuite à 12 000 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 le dans les tubes eppendorf. 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).

Essayer l'échantillon avec du papier absorbant. Placer l'échantillon dans du papier aluminium qui a été pré-traité 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 raccourcicement 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. Stocker dans la glace.

**Extraction**

**Séparation des phases**

Ajouter 300 microL de chloroforme (1V/5V) dans chaque tube. 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, à l'aide d'une pipette 1000 microL. 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 275 microL d'alcool isopropylique et 275 microL de solution HIGH SALT.

Agiter vigoureusement par inversion des tubes.

Incuber pendant 10 minutes à température ambiante.

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

**Lavage des échantillons**

Retirer le surnageant pour ne garder que le culot. Jeter le surnageant dans un bêcher 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 microL d'éthanol 75 pour-cent et mélanger doucement.

Centrifuger à 7.500 g pendant 10 minutes à 4° C.

**Solubilisation d'ARN**

Retirer l'éthanol en utilisant une pipette.

Sécher le culot au SpeedVac (Savant DNA SpeedVac Concentrator) pour enlever les vapeurs (il faut donc laisser les tubes ouverts) pendant 4 minutes. Vérifier qu'il n'y a plus de gouttes. Recommencer l'opération si besoin.

Ajouter 90 microL d'eau RNase-free directement sur le culot.

Incuber dans un bain-marie pendant 4 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 socium 3 M**

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

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

Incuber pendant 10 minutes.

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 microL d'éthanol à 75 pour-cent 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 au SpeedVac pendant 4 minutes.

Ajouter 25 microL d'eau RNase-free directement sur le culot. Incuber dans un bain marie pendant 6 minutes à 65° C.

Doser les échantillons au NanoDrop en utilisant 1 microL.

Aliquoter 2 microL dans un autre tube pour vérifier plus tard au Bioanalyzer avant traitement, marquer un signe plus dessus, signifiant que l'échantillon n'a pas été traité à la DNase.

Nous avons donc pour chaque échantillon, un tube de 2 micro L et un autre tube de 22 microL.

Congeler les échantillons à 4 °C.

**Traitement à la DNase**

**DNase par le kit Ambion RNA de Life Tecnologies AM 1906**

Ajouter 0.1 volume de DNase Tampon 1 10X (10X DNase 1 Buffer) (donc un ajout de 2.5 microL de Tampon; attention ce tampon contient du glycérol) et de 0.5 micoL de DNase 1 dans chaque tube d'échantillon des 22 microL. Nous avons donc au final 25 microL pour chaque tube.

Faire une mini centri de paillasse pendant 10 secondes puis incuber à 37° pendant 25 minutes.

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

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

Centrifuger à 10.000 g pendant 1.5 minute à température ambiante.

Récupérer le surnageant (prendre 24 micro L) et les placer dans des nouveaux tubes. Le reste est jeté.

Aliquoter dans de nouveaux tubes 2 micro L et noter sur le tube deux signes plus signifiant que l'échantillon a été traité à la DNase.

Passer les échantillons au NanoDrop en prenant 2 micro L.

Il ne reste donc que 20 micro L d'échantillon. Rajouter 60 micro L d'eau pour avoir un volume final de 100 micro L.

**Nettoyage**

**Nettoyage par le kit PureLink RNA Mini Kit, Ambion de Life Tecnologies**

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

Nous avons donc 400 micro L. Ajouter 1 volume d'éthanol 70 pour-cent, donc 400 micro L. Nous avons alors 800 micro L. Homogénéiser avec une pipette.

Transférer sur les colonnes filtres 400 micro L et centrifuger à 12.000 g pendant 15 secondes. Répéter l'opération une deuxième fois pour pouvoir passer les 800 micro L.

Ajouter 700 micro L de Tampon 1 (Buffer 1)

Centrifuger à 12.000 g pendant 15 secondes.

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

Centrifuger à 12.000 g pendant 15 secondes.

Ajouter une nouvelle fois 500 micro L de Tampon 2 (Buffer 2)

Centrifuger à 12.000 g pendant 15 secondes.

Jeter le liquide et 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. Mettre 30 micro L de RNase-free. Incuber pendant 2 minutes. Centrifuger à 12.000 g pendant 2 secondes.

Passer les échantillons au NanoDrop en prenant 2 micro L. Le volume final sera donc de 28 micro L.

**Obtention de résultats préliminaires au Bioanalyzer**

**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 4° 30 minutes avant, car il y a du DMSO qui cristallise à 4°. 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 micro L 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 micro L et mettre 1 micro L 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 micro L 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°C 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 micro 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 \micro L de gel par puits dans les deux autres puits avec le ``G''. Placer 5 micro L de Marker dans tous les puits y compris dans le puits prévu pour recevoir le marqueur de taille.

Mettre 1 micro L d'échantillon dans les puits à échantillons. Puis mettre 1 micro 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 ``Eucaruote 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.