

Protocole *in vitro* rapide – tests CustomPanel / ThemaPanel

1. Transcription inverse

Réactifs:

- Kit M-MLV RT
- dNTPs (10mM)
- Hexamères (100µM)
- ARN à tester

Étapes :

- Décongeler les réactifs
- Préparer le mix de transcription inverse
 - Tampon de RT (1,25 µL)
 - DTT (0,5 µL)
 - dNTPs (1 µL)
 - Hexamères (1 µL)
- Distribuer un volume de 3,75 µL par tube
- Ajouter 2 µL d'ARN
- Vortexer et centrifuger
- Placer dans le thermocycler et lancer le programme 1 étape 1a
- Ajouter 0,5 µL M-MLV RT
- Centrifuger
- Placer dans le thermocycleur et lancer le programme 1 étape 1b
- Une fois le programme terminé et la température du bloc redescendue à 4°C, sortir les tubes
- Centrifuger
- Placer les tubes sur glace ou portoir réfrigérant



Procéder ensuite directement à l'étape 2 ou conserver les ADNc entre -30°C et -15°C.

2. Hybridation des sondes

Réactifs:

- SALSA MLPA Buffer
- Mix de sondes **GEP-CPPM**

- Décongeler les réactifs
- Préparer le mix d'hybridation
 - Salsa MLPA Buffer (1,5 µL)
 - Mix de sonde **GEP-CPPM** (1,5 µL)
- Vortexer, centrifuger
- Distribuer 3 µL dans les tubes d'ADNc
- Centrifuger
- Placer dans le thermocycleur et lancer le programme 1 étape 2

3. Ligation

Réactifs:

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> SALSA Ligase Buffer A | <input type="checkbox"/> Décongeler les réactifs |
| <input type="checkbox"/> SALSA Ligase Buffer B | <input type="checkbox"/> Préparer le mix de ligation |
| <input type="checkbox"/> SALSA Ligase 65 | <input type="checkbox"/> Eau nuclease free (25 µL) |
| <input type="checkbox"/> Eau nuclease free | <input type="checkbox"/> Salsa Ligase Buffer A (3 µL) |
| | <input type="checkbox"/> Salsa Ligase Buffer B (3 µL) |
| | <input type="checkbox"/> Vortexer, centrifuger |
| | <input type="checkbox"/> Salsa Ligase 65 (1 µL) |
| | <input type="checkbox"/> Après 1h d'hybridation, distribuer 32 µL dans les tubes d'ADNc |
| | <input type="checkbox"/> Lancer le programme 1 étape 3 |



Procéder ensuite directement à l'étape 4 ou conserver les produits de ligation entre -30°C et -15°C.



Après cette étape, ne pas conserver les produits à des températures plus élevées (par exemple 4°C ou à température ambiante) afin d'éviter les ligations non spécifiques qui pourraient résulter d'une activité résiduelle de l'enzyme.

4. Amplification et incorporation des barcodes et adaptateurs

Réactifs:

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Barcodes GEP-BC-xxx | <input type="checkbox"/> Décongeler les réactifs |
| <input type="checkbox"/> Q5 MasterMix | <input type="checkbox"/> Préparer le mix d'amplification |
| <input type="checkbox"/> eau nuclease free | <input type="checkbox"/> Q5 MasterMix (12,5 µL) |
| | <input type="checkbox"/> Eau nuclease free (5,5 µL) |
| | <input type="checkbox"/> Vortexer, centrifuger |
| | <input type="checkbox"/> Distribuer 18 µL dans les puits d'une plaque PCR |
| | <input type="checkbox"/> Ajouter 5 µL de produits de ligation dans chacun des puits |
| | <input type="checkbox"/> Ajouter 2 µL de barcode (GEP-BC-xxx) dans chacun des puits |
| |  Utiliser des barcodes BEP-BC-xxx différents pour chacun des échantillons testés. |
| | <input type="checkbox"/> Placer dans le thermocycleur et lancer le programme 2 |



Procéder ensuite directement à l'étape 5 ou conserver les produits de PCR entre -30°C et -15°C.



Ne pas conserver ces produits de façon prolongée à des températures plus élevées (par exemple 4°C dans le thermocycleur ou à température ambiante).

5. Purification et dosage des librairies de séquençage

Réactifs:

- Ethanol 100%
- Eau nuclease free
- Billes AMPure XP
- Tampon TE
- Qubit dsDNA HS Assay

Etapes :



S'assurer que les billes sont complètement re-suspendues avant utilisation.

- Purifier 25 μ L de produits de PCR avec 45 μ L de billes AMPure
- Eluer les produits de PCR purifiés dans 50 μ L de tampon TE



Après purification, les librairies peuvent être conservées entre -30°C et -15°C avant séquençage.

- Doser 10 μ L de chaque librairie par fluorimétrie



Ce protocole rapide est un complément de la notice. Il ne dispense pas de la lecture complète de la notice.