

Protocole *in vitro* rapide – test LymphoSign

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-LSPM**

- Décongeler les réactifs
- Préparer le mix d'hybridation
 - Salsa MLPA Buffer (1,5 µL)
 - Mix de sonde **GEP-LSPM** (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:

- SALSA Ligase Buffer A
 - SALSA Ligase Buffer B
 - SALSA Ligase 65
 - Eau nuclease free
- Décongeler les réactifs
 - Préparer le mix de ligation
 - Eau nuclease free (25 µL)
 - Salsa Ligase Buffer A (3 µL)
 - Salsa Ligase Buffer B (3 µL)
 - Vortexer, centrifuger
 - Salsa Ligase 65 (1 µL)
 - Après 1h d'hybridation, distribuer 32 µL dans les tubes d'ADNc
 - 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:

- Barcodes **GEP-BC-xxx**
 - Q5 MasterMix
 - eau nuclease free
- Décongeler les réactifs
 - Préparer le mix d'amplification
 - Q5 MasterMix (12,5 µL)
 - Eau nuclease free (5,5 µL)
 - Vortexer, centrifuger
 - Distribuer 18 µL dans les puits d'une plaque PCR
 - Ajouter 5 µL de produits de ligation dans chacun des puits
 - Ajouter 2 µL de barcode (**GEP-BC-xxx**) dans chacun des puits
-  Utiliser des barcodes **BEP-BC-xxx** différents pour chacun des échantillons testés.
- 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.