

## Protocole *in vitro* rapide – test SarcomaFusion

### 1. Transcription inverse

#### Réactifs:

- 5X Vilo reaction mix
- 10X super script
- eau nucléase free
- ARN à tester

#### Etapes :

- Décongeler les réactifs
- Préparer le mix de transcription inverse
- 5X Vilo reaction mix (1 µL)
- Eau nucléase free (1 µL)
- 10X super script (0,5 µL)
- Distribuer un volume de 2,5 µL du mix par tube
- Ajouter 2,5 µL d'ARN
- Vortexer et centrifuger
- Placer dans le thermocycleur et lancer le programme 1 étape 1
- 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-SFPM**

#### Etapes :

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

#### Etapes :

- 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**
- Barcodes GAPDH **GEP-BCC-xxx**
- Red'y' Star PCR Mix
- eau nuclease free

##### Etapes :

- Décongeler les réactifs
- Préparer le mix de PCR
  - Red'y' Star PCR Mix (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
- Ajouter 2 µL de barcode (**GEP-BC-xxx** ou **GEP-BCC-xxx** selon le test) dans chacun des puits



Utiliser des barcodes **GEP-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 bibliothèques 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 µL de produits de PCR avec 45 µL de billes AMPure
- Eluer les produits de PCR purifiés dans 50 µL de tampon TE



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

- Doser 10 µL de chaque bibliothèque par fluorimétrie



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