

FICHE PRODUIT: ANALYSE PAR Q-PCR SUR CELLULES INDIVIDUELLES SUR LE SYSTEME FLUIDIGM

1 La technologie Fluidigm

Le système BioMark™ est un équipement de PCR en temps réel développé par la Société Fluidigm. Il est compatible avec de multiples chimies de PCR (Taqman, SybrGreen, EvaGreen, UPL, etc.) et tous les types d'échantillon. Il est particulièrement adapté pour quantifier simultanément l'expression de centaines de gènes dans un grand nombre d'échantillons. Quand il est utilisé en combinaison avec le C1™ Single-Cell Auto Prep System de Fluidigm, il offre la possibilité de quantifier jusqu'à 96 gènes dans 96 cellules individuelles.

Les réactions PCR sont conduites dans des arrays dédiés, les Dynamic™ Arrays, des circuits fluidiques intégrés (IFC). Pour l'analyse d'expression, ces arrays existent en plusieurs formats: 48x48, 96x96 ou FlexSix contenant 6 partitions indépendantes de 12x12. Le chargement des amorces, des échantillons d'ADN et des réactifs est automatisé à l'aide d'un IFC Controller.

En raison du faible volume final des réactions PCR (9 à 6 nl), il est recommandé d'augmenter la concentration des gènes cibles dans chaque échantillon avant d'utiliser le BioMark™ HD. Cette pré-amplification spécifique (STA: Specific Target Amplification) consiste en une PCR multiplex utilisant un pool de tous les couples d'amorces qui seront utilisés par la suite sur le BioMark™ HD.

Quand les analyses sont conduites sur des cellules individuelles, la capture des cellules, la lyse cellulaire, la synthèse d'ADNc par transcription inverse et la pré-amplification spécifique sont réalisés dans le C1™ Single-Cell Auto Prep System en utilisant des dispositifs microfluidiques dédiés. Plusieurs types d'arrays (IFC C1™) sont disponibles selon la taille des cellules à capturer (5-10 µm, 10-17 µm et 17-25 µm), mais aussi selon l'application finale désirée, Q-PCR sur un ensemble de gènes cibles ou bien analyse mRNA-seq.

2 Equipement et matériel disponibles

Le système Fluidigm complet disponible sur la Plateforme GenomEast comprend:

- Un Biomark™ HD.
- Deux IFC Controllers MX and HX.
- Un C1™ Single-cell Autoprep system.

En plus de cet équipement, la Plateforme donne accès à:

- Une paillasse dédiée et une hotte « sans ADN ».
- Un thermocycler GeneAmp® PCR System 9700.
- Une centrifugeuse réfrigérée pour plaques 96-puits.
- Deux pipettes multicanal avec des cônes adaptés (1-10 µl et 5-50 µl).
- Un ensemble complet de pipettes avec les cônes adaptés (1-10 µl, 5-20 µl, 20-200µl, 200-1000 µl).
- Du petit matériel (barettes de 8-tubes, plaques PCR, etc.) et équipement de laboratoire réguliers (vortex, microcentrifugeuse, etc.).

3 Conditions pour l'utilisation de l'équipement

Le système Fluidigm est en accès libre, seulement après réservation du lundi 08:00 au vendredi 17:00. Les membres de l'IGBMC peuvent accéder au calendrier de réservation via l'intranet à partir du site web de la Plateforme. Pour les utilisateurs externes, merci de contacter la Plateforme par e-mail (thibault@igbmc.fr).

Veillez noter que la Plateforme ne maintient qu'un stock limité d'arrays dynamics, d'IFC C1 et de réactifs. Il est donc nécessaire de planifier votre expérience suffisamment en avance et de contacter la Plateforme pour évaluer vos besoins spécifiques. Toute demande de réactifs et de consommables doit être accompagnée d'une feuille de soumission de projet disponible sur le site web de la Plateforme sur la page "Project submission".

A la première utilisation, l'expérimentateur doit toujours être accompagné d'un utilisateur qualifié. L'utilisation du système Fluidigm est soumise aux conditions générales de la Plateforme GenomEast (DOC05) accessible sur son site web. Tout dommage sur l'équipement résultant de la négligence, d'un défaut de soin ou d'une utilisation inappropriée par un utilisateur sera facturé automatiquement sur le budget de son chef d'équipe.

4 Analyse par Q-PCR sur cellules individuelles

4.1 Plan de travail

1. Amorçage de l'array IFC C1™.
2. Préparation et chargement des cellules sur l'array IFC C1™.
3. Inspection des cellules sous microscope.
4. Lyse cellulaire, transcription inverse, pré-amplification spécifique des gènes cibles sur le C1™.
5. Récupération des amplicons pré-amplifiés.
6. Dilution et chargement des amplicons pré-amplifiés ainsi que des paires d'amorces sur l'array Dynamic à l'aide de l'IFC controller approprié.
7. PCR en temps réel sur le Biomark™ HD.

4.2 Exigences pour les cellules et les amorces

Les utilisateurs doivent déterminer la taille exacte de leurs cellules afin de pouvoir sélectionner le type d'array IFC C1™ approprié pour la capture des cellules (5-10 µm, 10-17 µm or 17-25 µm). La détermination de la concentration cellulaire est également essentielle pour obtenir un taux de capture optimal. Un "Scepter™ 2.0 Cell Counter" de Merck Millipore est disponible à cet effet sur la Plateforme.

Un soin particulier doit être apporté pour éviter les débris cellulaires qui peuvent boucher les canaux de l'array IFC C1™. Il peut être nécessaire de filtrer la suspension cellulaire sur un filtre 20-30 micron tel que les PARTEK CellTrics® (non fournis par la Plateforme).

Le nombre optimal de cellules à charger sur l'array est de 1000, le nombre minimal est de 200. Le volume de suspension cellulaire à charger sur l'array peut varier de 5 à 20 µl. Cependant, le volume final qui sera retenu dans l'array est seulement de 5 µl. La suspension cellulaire finale est composée d'un mélange de "C1 Cell Suspension Reagent" et des cellules dans leur milieu de culture, selon un ratio de 4:6 (Réactif:Cellules). Ce ratio doit toujours être respecté quel que soit le volume final de cellules chargé sur l'array.

Des recommandations utiles peuvent être trouvées sur "Fluidigm single-cell preparation guide", Fluidigm PN 100-7697 C1.

Suspension initiale de cellules dans le milieu de culture	Mélange C1 Cell Suspension Reagent : Cellules (40µl:60µl)	Quantité finale de cellules chargées sur l'array (5µl)
333 K cellules/ml	20,000 cellules/100 µl	1,000 cellules
250 K cellules/ml	15,000 cellules/100 µl	750 cellules
166 K cellules/ml	9,960 cellules/100 µl	498 cellules
66 K cellules/ml	3,960 cellules/100 µl	198 cellules

Les utilisateurs doivent choisir leur chimie de PCR préférée, puis faire le design des amorces et les commander. Les amorces doivent être choisies de façon à limiter la formation de dimères d'amorces.

Pour la chimie Taqman, les "Applied TaqMan® Gene Expression Assays" doivent être disponibles sous la forme d'un mélange 20X composé des amorces PCR non marquées et de la sonde TaqMan® MGB probe (FAM™ dye-labeled). Pour la chimie EvaGreen, les amorces doivent être disponibles sous la forme d'un mélange d'amorces sens et antisens dans lequel chaque amorce a une concentration finale de 100 µM.

4.3 Arrays et réactifs fournis par la Plateforme

La Plateforme fournit l'array IFC C1™ adapté à la taille des cellules à capturer: 5-10µm, 10-17 µm or 17-25 µm.

Elle distribue également l'ensemble des réactifs pour analyser les cellules dans le C1™ sous la forme d'un kit reconditionné contenant des aliquots de solutions CT1 à CT14 (voir ci-dessous) suffisants pour un array.

Enfin, elle fournit tous les réactifs nécessaires à l'analyse par Q-PCR sur le Biomark™ HD avec les chimies EvaGreen ou TaqMan.

Si besoin, des spikes ARNs et leurs amorces correspondantes, tels que recommandés dans le protocole Fluidigm utilisant la chimie EvaGreen, sont également disponibles sur la Plateforme.

Réactifs	Référence	Arrays	Chimie de PCR
C1 Single-Cell Auto Prep Reagent Kit: <ul style="list-style-type: none"> • C1 DNA Dilution Reagent (CT1) • C1 Lysis Plus Reagent (CT3) • C1 Loading Reagent (CT7) • C1 PreAmp Dilution Reagent (CT9) • C1 Harvest reagent (CT10) • C1 PreLoading Reagent (CT11) • C1 Blocking Reagent (CT12) • C1 Cell Wash Buffer (CT13) • C1 Cell Suspension Reagent (CT14) 	Fluidigm, PN 100-5319	C1™ IFC arrays	-
Single Cell-to-CT kit: <ul style="list-style-type: none"> • Single Cell Lysis Solution (CT2) • Single Cell Stop Solution (CT4) • Single Cell Vilo (CT5) • Single cell SuperScript RT (CT6) • Single Cell PreAmp Mix (CT8) 	Ambion, PN 4458237	C1™ IFC arrays	-

Arraycontrols RNA spikes (optionnel): <ul style="list-style-type: none"> Premix of RNA Spikes (#1, #4, #7) ready to use 	Ambion, PN AM1780	C1™ IFC arrays	EvaGreen
RNA spike assays kit (optionnel)	Fluidigm, PN 100-5582	C1™ IFC and Dynamic™ arrays	EvaGreen
DNA Suspension Buffer (10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, pH 8.0)	InVitrogen P/N 12090-015	-	-
2X Assay Loading Reagent	Fluidigm, PN 100-5359 = PN 85000736	Dynamic™ arrays	EvaGreen and TaqMan
20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent	Fluidigm, PN 100-3738	Dynamic™ arrays	EvaGreen
20X GE Sample Loading Reagent	Fluidigm, PN 85000735 = PN 85000746	Dynamic™ arrays	TaqMan
SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low ROX	Bio-Rad Laboratories, PN 172-5211	Dynamic™ arrays	EvaGreen
TaqMan Gene Expression PCR Master Mix (2X)	Life Technologies, PN 4369016	Dynamic™ arrays	TaqMan

4.4 Protocoles de référence

- Using C1 to Capture Cells from Cell Culture and Perform Pre-amplification Using Delta Gene Assays (Fluidigm, PN 100-4904).
- Using C1 to Capture Cells from Cell Culture and Perform Pre-amplification Using TaqMan Assays (Fluidigm, PN 100-6117).
- Real-time PCR analysis (Fluidigm, PN 68000088 J1).