

FICHE PRODUIT: RT-PCR QUANTITATIVE

La plateforme GenomEast propose une prestation de RT-PCR quantitative à haut débit avec la technologie Fluidigm (<https://www.fluidigm.com/products/biomark-hd-system>) pour l'analyse de l'expression génique.

1 La technologie Fluidigm

Le système BioMark™ HD développé par Fluidigm est un équipement de PCR en temps réel automatisé qui utilise la technologie microfluidique pour analyser simultanément des dizaines d'échantillons dans des réactions à l'échelle du nanolitre. Ce système est compatible avec de multiples chimies (Taqman, EvaGreen, SybrGreen, UPL, etc.) et tout type d'échantillons pour des applications diverses. Il est ainsi particulièrement adapté pour quantifier simultanément l'expression de dizaines de gènes dans un grand nombre d'échantillons.

Les réactions PCR sont conduites dans des circuits fluidiques intégrés (IFC), les Dynamic™ Arrays. Le chargement et le mélange des amorces, des échantillons et des réactifs dans les arrays sont automatisés à l'aide d'un IFC Controller. En raison du faible volume final des réactions PCR (6 à 9 nl), il est nécessaire d'augmenter la concentration des gènes cibles dans chaque échantillon avant chargement sur les arrays et analyse sur le BioMark™ HD. Cette pré-amplification spécifique (STA: « Specific Target Amplification ») consiste en une PCR multiplex avec un nombre réduit de cycles (10 à 20 cycles) utilisant un pool de toutes les couples d'amorces ou sondes qui seront utilisés par la suite sur le BioMark™ HD.




	Flex Six IFC	48.48 IFC	96.96 IFC
			
Nombre de puits « échantillon »	6x12	48	96
Nombre de puits « amorce »	6x12	48	96
Nombre de réactions PCR	864	2304	9216
Note	Possibilité d'exécuter les 6 partitions de 12x12 indépendamment dans un délai de 3 mois.		

Table 1 : Formats des IFCs disponibles sur la Plateforme GenomEast.

Le manuel « Real-time PCR analysis User Guide » (PN 68000088), accessible sur le site internet de la Société Fluidigm, fournit toutes les informations nécessaires sur le logiciel d'analyse et les protocoles de PCR en temps réel utilisés sur le BioMark™ HD.

2 Planification expérimentale

Afin de faciliter l'évaluation de la qualité et l'interprétation des résultats finaux, il est recommandé de réserver plusieurs puits « échantillon » et « amorce » sur chaque Dynamic™ Array pour des points contrôles.

De plus, en raison de la réaction de PCR multiplex à l'étape de la pré-amplification spécifique des gènes cibles, il est difficile de prévoir le comportement des amorces choisies pour l'essai. En conséquence, il est recommandé de prévoir un array supplémentaire pour la validation des amorces et des conditions de pré-amplification, sur un ou plusieurs échantillons de référence connus qui pourront être déposés à plusieurs dilutions sériées.

2.1 Contrôles dans les puits « échantillon »

- Prévoir au moins un puit pour un contrôle négatif sur l'array à l'étape de la PCR en temps réel. Les contrôles possibles sont :
 - Blanc = Uniquement Tampon TE dans la chambre
 - NAC = No Amplification Control = Tout sauf la Taq polymérase
 - NTC = No Template Control = Tout sauf l'échantillon
- Prévoir 6 à 8 puits pour une courbe de calibration réalisée avec des dilutions sériées au 1/2 d'un même échantillon pour vérifier l'efficacité des amorces.
 - Cette courbe peut être réalisée à partir d'un échantillon de référence spécifique ou bien sur le pool de l'ensemble des cDNA distribués sur l'array.
- Dans un projet utilisant plusieurs arrays, prévoir un minimum de 3 puits par array pour des calibrateurs inter-array qui seront chargés sur tous les arrays pour normaliser l'intensité entre arrays indépendamment des échantillons tests.
 - Il est par exemple judicieux de répéter 3 points de la courbe de calibration ci-dessus sur tous les arrays en utilisant le même stock de cDNA. La quantité de cDNA contrôle préparée devra alors être suffisante pour l'ensemble des arrays à venir et ce cDNA devra être aliquoté pour limiter les cycles de congélation/décongélation à 2 maximum et conservé à -80°C.
- En plus d'inclure des répliquats biologiques pour chaque groupe expérimental afin d'évaluer la variabilité biologique, il est fortement conseillé de réaliser la réaction de transcription inverse au moins en duplicat sur chaque échantillon.

2.2 Contrôles dans les puits « amorce »

- Prévoir au moins un puit « amorce » pour un contrôle négatif sur l'array à l'étape de la PCR en temps réel (NRC = No reagent Control = No primer)
- Prévoir un minimum de 3 ou 4 paires d'amorces ou sondes pour des gènes de ménage, si possible avec des niveaux d'expression équivalents à ceux des gènes cibles interrogés.

3 Services proposés

1. La vérification des échantillons de départ :
 - Quantification et vérification des ARN totaux par fluorimétrie (Qubit ou Varioskan, Thermofisher) et électrophorèse capillaire (Bioanalyzer, Agilent).
 - Cette vérification est conduite par échantillonnage sur un lot de 12 ARN totaux choisis au hasard sur la plaque 96 puits.
 - L'ensemble des échantillons peut être validé pour un coût additionnel sur simple demande lors de la soumission de projet.
2. La transcription inverse (RT) des ARN totaux en ADNc dans un volume total de 5 µl.
3. La pré-amplification spécifique des cibles par PCR multiplex avec un nombre réduit de cycles (10 à 20).

4. Quand la chimie Evagreen est utilisée, le traitement des amplicons pré-amplifiés à l'exonucléase pour éliminer les amorces non utilisées.
5. L'amorçage de l'array Dynamic™ et son chargement avec les amplicons pré-amplifiés et les paires d'amorces ou les sondes Taqman à l'aide de l'IFC controller approprié.
6. La PCR en temps réel sur le Biomark™ HD.
7. La génération des données de Ct à l'aide du « Real-Time PCR Analysis Software » de Fluidigm.
 - Ce logiciel est librement accessible sur le site internet <https://www.fluidigm.com/software> (Package « Biomark & EP1 Software »)
 - Cet outil permet de visualiser les courbes individuelles d'amplification et de fusion et éventuellement de ré-analyser les données avec des paramètres différents.
8. L'analyse ultérieure des données (optionnelle, voir le paragraphe 7 pour plus d'informations).

4 Echantillons de départ et amorces à fournir par le porteur de projet

4.1 Caractéristiques des ARN totaux

Les utilisateurs doivent fournir l'ensemble de leurs échantillons d'ARN totaux à une concentration identique dans une plaque 96-puits accompagnée d'un plan de la plaque sous format Excel.

Dans la mesure où les échantillons seront manipulés avec des pipettes à 8 canaux, si la plaque 96-puits fournie est incomplète, il est demandé à ce que les ARNs soient organisés par colonne de 8 puits et non par ligne de 12 puits sur la plaque.

Caractéristiques des ARN totaux à fournir	
Concentration optimale	25 à 100 ng/μl
Volume optimal	4 à 10 μl/puits
Qualité optimale	RIN ≥ 7 et absence de contamination à l'ADN génomique sur un profil de Bioanalyzer (Agilent)
Quantité nécessaire pour une validation quantitative par fluorimétrie	5 à 200 ng d'ARN par échantillon
Quantité nécessaire pour une validation qualitative par électrophorèse capillaire	5 à 200 ng d'ARN par échantillon
Quantité nécessaire par réaction de RT *	2 ng à 250 ng, prévoir de 10 à 14 cycles de pré-amplification 2.5 pg à 2 ng, prévoir de 15 à 20 cycles de pré-amplification
Volume total par réaction de RT	1 à 4 μl

* Sur la base de notre expérience passée, nous recommandons d'utiliser 50 à 100 ng d'ARN total de départ par réaction avec 14 cycles de pré-amplification. Les quantités indiquées dans ce tableau correspondent aux recommandations de la Société Fluidigm. Il peut être nécessaire de prévoir une expérience préliminaire pour déterminer les quantités d'ARN et les conditions optimales de pré-amplification.

4.2 Caractéristiques des amorces ou sondes

Les utilisateurs doivent faire eux-mêmes le design des amorces ou sondes Taqman et les transférer à la plateforme en même temps que leurs échantillons.

Caractéristiques des amorces à fournir	
Recommandations pour le design des amorces	<p>Tm : 60–63°C ; ≤3°C de différence entre les différentes amorces utilisées sur l'array Contenu en GC : < 50% Longueur : 18–30 nucléotides Résidu G ou C à l'extrémité 3' des amorces Longueur des amplicons : 70 à 200 pb Les amplicons doivent si possible traverser un intron afin d'éviter l'amplification d'ADN génomique Éviter l'auto-complémentarité entre les amorces pour réduire le risque de formation de dimères</p>
Concentration	<p>Chimie Taqman : mélange 20X composé des amorces PCR non marquées et de la sonde TaqMan® MGB (FAM-MGB ou VIC-MGB) Chimie Evagreen : mélange d'amorces sens et antisens chacune à une concentration finale de 100 µM</p>
Volume total	10 à 15 µl par paire d'amorces ou par sonde

5 Contrôles qualité

La nature et le nombre des contrôles qualité effectués par la plateforme sont dépendants de la planification initiale de l'expérience.

La validation de la spécificité des amorces utilisées (concordance Tm mesurée versus Tm attendue, absence de produits d'amplification secondaires ...) est à la charge du porteur de projet.

1. Vérification des échantillons de départ	
Quantité (Fluorimétrie)	≥ quantité minimale requise <30% d'écart sur la concentration entre les différents échantillons vérifiés
Qualité (électrophorèse capillaire)	RIN ≥ 7
2. Vérification des Q-PCR	
Contrôles négatifs	Absence de signal dans les puits sans ADN, sans enzyme et/ou sans amorce/sonde
Référence passive ROX (présente dans le PCR Master Mix)	Vérification de la distribution homogène du milieu réactionnel dans toutes les chambres de l'array
Contrôles positifs	Linéarité de la courbe de calibration sur l'ADNc de référence Détection des gènes de ménage dans la gamme de CT optimale : 6 à 25
Réplicas techniques de RT	<0.5 CT de différence entre les réplicas

6 Livraison des résultats

Pour chaque array, les résultats suivants sont mis à la disposition du porteur du projet via un serveur ftp:

- Les données brutes de Q-PCR issues du BioMark™ HD pour une analyse et visualisation des résultats dans le logiciel Fluidigm « Real-Time-PCR analysis Software ».
- Représentation graphique des résultats de Q-PCR sous forme de « heat maps ».
- Image de chargement de la référence passive ROX dans toutes les chambres de l'array.
- Tableau de l'ensemble des valeurs de CT avec leur score de qualité au format csv.
- Copie des protocoles utilisés ainsi que des plans de plaque pour les échantillons et les amorces.

Conformément aux « Conditions Générales de la Plateforme GenomEast », il est rappelé que le porteur du projet est responsable de la sauvegarde et de l'archivage de ses données. La plateforme s'engage à les conserver que pour une durée limitée de six mois après leur mise à disposition.

7 Analyse ultérieure des données (optionnelle)

L'analyse ultérieure des données n'est pas prise en charge dans la prestation standard. Néanmoins, elle peut être réalisée sous la forme d'une collaboration avec des membres de la plateforme. Elle peut comprendre :

- La normalisation inter-plaque
- Le calcul du ΔCt
- L'analyse statistique des résultats d'expression

Cette liste n'est pas exhaustive et nous recommandons aux porteurs de projet qui souhaiteraient initier une collaboration avec la plateforme de nous contacter avant de commencer leur projet pour que nous puissions les aider à définir les analyses qui pourraient répondre au mieux aux questions biologiques posées.