

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.

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.).

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).

Veuillez 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.

1. Transcription inverse des ARN totaux en ADNc.
2. Pré-amplification des cibles sélectionnées en utilisant un pool des couples d'amorces qui seront utilisés ultérieurement sur le Biomark™ HD.
3. Si nécessaire, traitement à l'exonucléase pour éliminer les amorces non utilisées.
4. Amorçage de l'array Dynamic™.
5. Dilution et chargement des amplicons pré-amplifiés et des paires d'amorces sur l'array Dynamic™ à l'aide de l'IFC controller approprié.
6. PCR en temps réel sur le Biomark™ HD.

Les utilisateurs doivent préparer leurs échantillons d'ARN totaux. Sur demande uniquement et pour un coût additionnel, la Plateforme peut quantifier par fluorimétrie et valider la qualité des échantillons de départ par électrophorèse capillaire. En utilisant les Master Mix recommandés par Fluidigm, les réactions de transcription inverse sont menées dans un volume total de 5 µl avec 1 µl d'ARN total par échantillon. Jusqu'à 1.25 µL de cette réaction est ensuite utilisée dans une réaction de pré-amplification dans un volume final de 5 µL.

Quantité par réaction*	2 ng à 250 ng, prévoir de 10-14 cycles de pré-amplification. 2.5 pg à 2 ng, prévoir de 15-20 cycles of pré-amplification.
Qualité	DO260/DO280 ≥ 1.8. RIN ≥ 7 et absence de contamination à l'ADN génomique sur un profil de Bioanalyzer Agilent.

* Il est conseillé de prévoir une expérience préliminaire pour déterminer les conditions optimales de pré-amplification. Nous conseillons d'utiliser 100 ng d'ARN total avec 14 cycles de pré-amplification comme conditions de départ.

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.

La Plateforme fournit, selon les besoins, les arrays Dynamic™ appropriés pour l'analyse d'expression (96x96, 48x48 or FlexSix) ainsi que tous les réactifs nécessaires aux étapes de la transcription inverse à partir des ARN totaux jusqu'à la Q-PCR sur le Biomark™ HD:

Reverse Transcription Master Mix	Fluidigm, PN 100-6298, 100-6299	-	-
PreAmp Master Mix	Fluidigm, PN 100-5580, PN 100-5581	-	-
Exonuclease I	New England BioLabs, PN M0293L	-	-
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	FlexSix, 96x96, 48x48	EvaGreen and TaqMan
FLEXsix DELTAgene Sample Reagent	Fluidigm, PN 100-7673	FlexSix	EvaGreen
20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent	Fluidigm, PN 100-3738	96x96, 48x48	EvaGreen
20X GE Sample Loading Reagent	Fluidigm, PN 85000735 = PN 85000746	96x96, 48x48	TaqMan
SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low ROX	Bio-Rad Laboratories, PN 172-5211	FlexSix, 96x96, 48x48	EvaGreen
TaqMan Gene Expression PCR Master Mix (2X)	Life Technologies, PN 4369016	FlexSix, 96x96, 48x48	TaqMan

Le manuel suivant, 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 sur le BioMark™ HD:

- Real-time PCR analysis (Fluidigm, PN 68000088 J1)