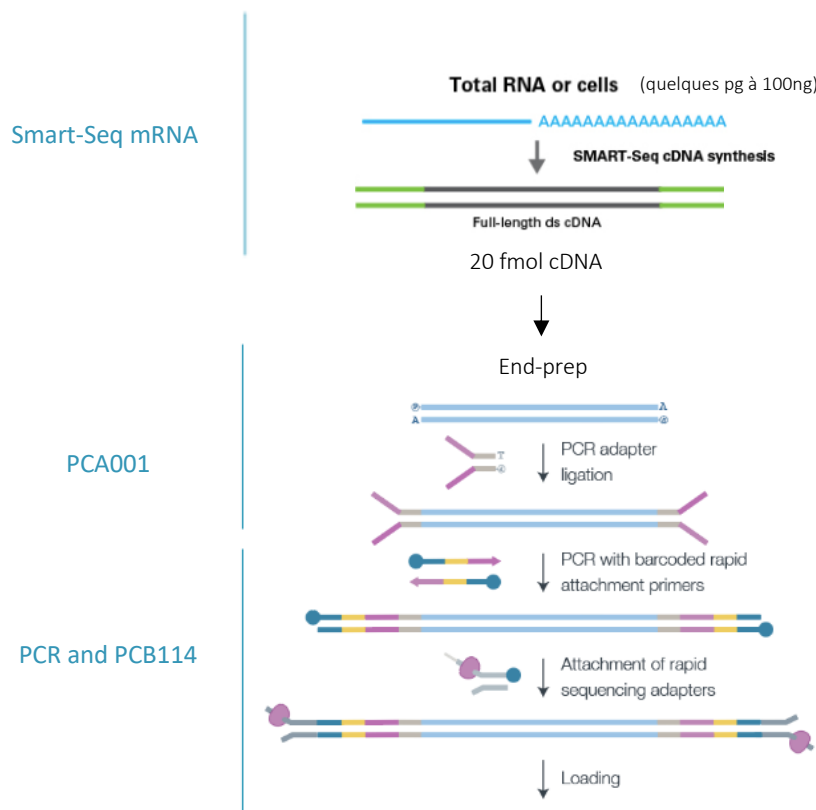


# CDNA-NON-ORIENTE-RAP-CHIMIE14

## PROTOCOLE CDNA LONGUES LECTURES AVEC AMPLIFICATION DU CDNA PAR LE PROTOCOLE SMAR SEQ MRNA, LIGATION DES ADAPTATEURS PCA (EXP-RAP001- ONT) ET MULTIPLEXAGE PAR PCR AVEC LE KIT PCB114- ONT

*Ce document décrit la marche à suivre pour réaliser le protocole de  
bibliothèques cDNA non orientés optimisé par la plateforme*



## Materiel

- ARN total : quelques pg à 100 ng

## Kits

- Smart-Seq mRNA de Takara (634772 ou 634773)
- PCR Adapter (PCA) in the EXP-PCA001 kit d'ONT
- SQK-PCB114 d'ONT

## Réactifs

- NEBNext Ultra II End repair/dA-tailing Module (NEB, cat # E7546)
- NEB Blunt/TA Ligase Master Mix (NEB, cat #M0367)
- LongAmp Hot Start Taq 2X Master Mix (NEB, M0533S)
- Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter™ cat # A63881)
- Eau Nuclease-free
- Ethanol absolu

## I. Amplification de l'ARN total

### Materiel

- ARN total : quelques pg à 100 ng **optimisé pour 10ng**
- Kit Smart-Seq mRNA de Takara (634772 ou 634773)

Table 1. SMART-Seq mRNA components.

SMART-Seq mRNA	634772 (24 rxns)	634773 (96 rxns)	634770 (384 rxns)
<b>Box 1 (Store at -70°C)</b>			
Control Total RNA (1 µg/µl)	5 µl	5 µl	4 x 5 µl
<b>Box 2 (Store at -20°C)</b>			
SMART-Seq v4 Oligonucleotide (48 µM)	24 µl	96 µl	4 x 96 µl
PCR Primer II A (12 µM)	24 µl	96 µl	4 x 96 µl
5X Ultra® Low First Strand Buffer	96 µl	384 µl	4 x 384 µl
SMARTScribe Reverse Transcriptase (100 U/µl)	48 µl	192 µl	4 x 192 µl
3' SMART-Seq CDS Primer II A (12 µM)	48 µl	192 µl	4 x 192 µl
RNase Inhibitor (40 U/µl)	60 µl	240 µl	4 x 240 µl
Nuclease-Free Water	2 x 1 ml	4 ml	4 x 4 ml
10X Lysis Buffer*	460 µl	1.85 ml	4 x 1.85 ml
Elution Buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5)†	2 x 1.7 ml	2 x 6.8 ml	8 x 6.8 ml
SeqAmp™ DNA Polymerase	50 µl	200 µl	4 x 200 µl
SeqAmp CB PCR Buffer (2X)	1.25 ml	5 ml	4 x 5 ml

\*Store 10X Lysis Buffer at -20°C. Once thawed, the buffer can be stored at 4°C.

†Store Elution Buffer at -20°C. Once thawed, the buffer can be stored at room temperature.

Le protocole a été optimisé pour **10ng d'ARN total** avec **12 cycles d'amplification**.

Il est possible d'utiliser d'autres quantité ( de quelques pg à 100 ng), mais il faut ajuster le nombre de cycles de PCR.

L'étape de purification doit être réalisée avec les billes Agencourt AMPure XP

Décongeler à température ambiante :

- 10 X lysis buffer (eviter de faire des bulles en le mélangeant)
- Nuclease free water
- 5X Ultra Low First-Strand Buffer

Décongeler dans la glace :

- SMART-Seq v4 Oligonucleotide (48  $\mu$ M)
- RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l)
- 3' SMART-Seq CDS Primer II A

Sortir l'enzyme SeqAmp DNA Polymerase, dans la glace, juste avant de l'utiliser

Lancer le programme **Incubation** suivant : **3min à 72°C**

#### Synthèse du 1er brin :

Préparer le 10X réaction Buffer

Reactif	Volume
10X lysis Buffer	19 $\mu$ l
RNase Inhibitor	1 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

Préparer les échantillons en plaque

Reactif	Volume
10 ng d'ARN total	x $\mu$ l
Eau nuclease-free	qsp 9,5 $\mu$ l
10X reaction buffer	1 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>10,5 <math>\mu</math>l</b>

Mettre les échantillons dans la glace

Ajouter dans la glace, **2  $\mu$ l** 3' SMART-Seq CDS Primer II A.

(Si le nombre de cycle PCR prévu pendant l'amplification du cDNA est supérieur à 17 cycles ; ajouter seulement **1  $\mu$ l** de 3' SMART-Seq CDS Primer II A).

Mélanger par tapotage et centrifuger (volume final de 12,5  $\mu$ l)

**Incuber à 72°C pendant 3 min** puis immédiatement sur glace pendant 2 min (max 10min)

Lancer le **programme** en préincubation à 42°C du programme **FIRSTSD** suivant :

90min à 42°C  
10 min à 70°C,  
4°C for ever

Pendant l'incubation de 3min préparer le **masterMix +10%**

Reactif	Volume
5X Ultra LowFirst-strand buffer	4 $\mu$ l
SMART-seq v4 oligonucleotide (48uM)	1 $\mu$ l
RNase inhibitor	0,5 $\mu$ l
SMARTScribe Reverse Transcriptase	2ul
<u>(ajouter l'enzyme juste avant d'utiliser le masterMix)</u>	

**Total**

**7,5 µl**

Ajouter aux échantillons **7,5 µl de masterMix par puit**

Mélanger en tapotant puis centrifuger

Placer la plaque dans le thermocycleur et lancer le programme FIRSTSD

Les tubes peuvent rester à 4°C toute la nuit

*Amplification par PCR du cDNA double brin (après synthèse du 1<sup>er</sup> brin):*

Décongeler tous les réactifs pour la PCR dans la glace les vortexer et les centrifuger  
Sortir l'enzyme juste avant utilisation dans la glace (ne pas la vortexer)

Préparer le Mix PCR pour l'ensemble des réactions, + 10%, ajouter dans l'ordre suivant :

<b>Reactif</b>	<b>Volume</b>
2X SeqAmp CB PCR Buffer	25 µl
PCR Primer IIA	1 µl
Nuclease-Free Water	3µl
SeqAmp DNA Polymerase (à sortir que lorsqu'on l'ajoute)	1 µl
<b>Total</b>	<b>30 µl</b>

Ajouter **30µl du mix PCR aux 20µl du 1er brin cDNA** (volume final de 50 µl)

Mixer en vortexant doucement et faire un spin bref

Fermer les puits avec des bouchons

Centrifuger

Mettre dans le thermocycleur préalablement lancé pour être à 95°C le programme

**Programme AMPLI** (durée environ 1h):

	<b>volume final 50 µl</b>		
<b>Step</b>	<b>Temperature</b>	<b>Time</b>	<b>Cycle</b>
Initial denaturation	95°C	1 min	1
Denaturation	98°C	10 sec	12
<b>Annealing</b>	<b>65°C</b>	30 sec	12
<b>Extension</b>	<b>68°C</b>	<b>3 min</b>	<b>12</b>
Final extension	72°C	10 min	1
Hold	4°C	∞	

La plaque peut être stockée à 4°C toute la nuit

*Purification du cDNA amplifié par les billes AMPure XP*

Mettre à température ambiante les billes AMPure XP au moins 15 min et les vortexer avant utilisation.

Sortir l'Elution Buffer du congélateur et le garder à température ambiante.

Préparer de l'EtOH à 80% frais.

Ajouter **50µl de billes magnétiques AMPure XP**. Bien vortexer avant utilisation.

Mélanger en pipetant 10x à l'aide d'une pipette multicanaux (volume final de 100 µl)

Incuber à **température ambiante pendant 8 min** (pour lier l'ADN aux billes).

Placer les échantillons sur le support magnétique **pendant 5 min** jusqu'à ce que la solution soit complètement claire.

Enlever le surnageant en laissant les tubes toujours sur le support magnétique.

Ajouter **200µl d'EtOH 80% frais, attendre 30sec** puis enlever le surnageant.

Répéter une seconde fois le lavage.

Faire un spin rapide et après remise sur l'aimant, éliminer l'EtOH résiduel à la pipette

Laisser les tubes ouverts à température ambiante pendant **2/3 min (jusqu'à ce que les billes soient sèches sans craqueler)**.

Ajouter **17µl d'Elution Buffer** (Tampon EB=Tris,HCL10mM ph8,5) à température ambiante sur les billes.

Mélanger en pipetant, **incuber 2 min à température ambiante**.

Centrifuger et Placer sur le support magnétique 1 min.

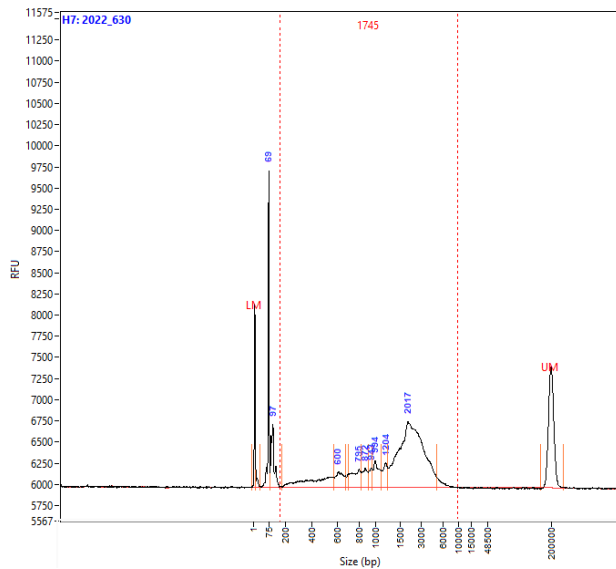
Transférer **16 µl** de l'éluat (contenant les cDNA amplifié) dans le puit voisin

**End point** : Possibilité de conserver les tubes à -20°C longtemps

### QC des cDNA

Quantité : Dosage au Qubit  
Qualité : Fragment Analyzer

*Exemple de profil du fragment analyzer obtenu pour le cDNA de lignée de cellules humaines*



## II. End-Prep +purif 1X

### Réactifs

- NEBNext Ultra II End repair/dA-tailing Module (NEB, cat # E7546)
- Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter™ cat # A63881)
- Eau Nuclease-free
- Ethanol absolu

Préparer de l'éthanol 70% avec de l'eau nuclease free (possibilité de le congeler pour une utilisation ultérieure)

Ramener les billes à température ambiante pendant 15 min

Décongeler les réactifs Ultra End-prep réaction Buffer à température ambiante avant de les mettre dans la glace, sortir l'enzyme dans la glace au dernier moment

Lancer le **programme END-PREP** sur la machine PCR pour le préchauffage :

5min à 20°C  
5min à 65°C  
Refroidir à 4°C

A partir de **20fmol max de cDNA** dans une plaque 96 puits ajouter les réactifs suivant :

Reactif	Volume
Max 20 fmol de cDNA	qsp 50µL H2O
Ultra-End-prep reaction Buffer	7µl
Ultra II End-prep enzyme Mix	3µl
<b>Total</b>	<b>60 µl</b>

Mélanger doucement à la pipette et centrifuger

Mettre dans la machine PCR et démarrer le programme **END-PREP**

Centrifuger

Procéder à l'étape de purification :

Bien ressuspendre les billes AMPure XP avec le vortex

Ajouter **60ul d'AMPure XP Beads (1X)**

Mélanger en pipetant 10X (volume final de 120 µl)

Laisser **5min à RT** sur la paillasse

Centrifuger

Mettre sur le support magnétique **2 min**

Éliminer le surnageant

**Ajouter 200µl d'éthanol 70%** juste préparé et laisser **30 sec**

Enlever l'éthanol 70% avec une pipette

Répéter le lavage une deuxième fois

Bien enlever l'éthanol résiduel avec une pipette de 10µl

Laisser sécher 2 min, mais ne pas laisser le culot se craqueler

Enlever la plaque du support et mettre **16 µl d'H2O**, bien mélanger

Incuber a RT sur la paillasse **2min**

Mettre sur le support magnétique attendre que le liquide devienne clair

Récupérer 15µl de l'éluat

**End point** : il est possible de conserver les échantillons à 4°C la nuit

### III. Ligation des PCA + purif 0,6

#### **Materiel**

- PCR Adapter (PCA) du kit EXP-PCA001 d'ONT
- Agencourt AMPure XP Beads (Beckman CoulterTM, cat # A63881)
- NEB Blunt/TA Ligase Master Mix (NEB, cat #M0367)
- Eau Nuclease-free
- Ethanol absolu

Préparer de l'éthanol 70% avec de l'eau nuclease free (possibilité de le congeler pour une utilisation ultérieure)

Décongeler les réactifs dans la glace sauf les enzymes qui ne sont pas congelées

Ramener les billes au moins 15 min à température ambiante

Ajouter les réactifs dans l'ordre du tableau. **Entre chaque ajout bien mélanger 10-20 fois avec la pipette.**

<b>Reactif</b>	<b>Volume</b>
<b>End-prepped cDNA</b>	15 µl
PCR Adapter (PCA)	10 µl
Blunt/TA Ligase Master Mix	25 µl
<b>Total</b>	<b>50 µl</b>

Bien mixer avec la pipette et centrifuger brièvement

**Incuber 10 min à température ambiante**

Procéder à l'étape de purification :

Bien ressuspendre les billes AMPure XP avec le vortex

**Ajouter 30 µl de billes** ressuspendues pour faire un lavage 0,6X et faire 10 aller retour avec la pipette (volume final de 80 µl)

**Incuber 5 min à température ambiante**

Centrifuger et mettre sur la plaque magnétique jusqu'à ce que les billes forment un culot. Enlever le surnageant

**Ajouter 200µl d'éthanol 70%** juste préparé et laisser **30 sec**

Enlever l'éthanol 70% avec une pipette

Répéter le lavage une deuxième fois

Bien enlever l'éthanol résiduel avec une pipette de 10µl

Laisser sécher 30 sec, mais ne pas laisser le culot se craqueler

Enlever le tube du support magnétique et **ressuspendre dans 23,5 µl d'eau** nucléase-free

**Incuber 2 min à température ambiante**

Centrifuger et mettre sur le support magnétique

Laisser les billes former un culot jusqu'à ce que l'éluat soit clair

**Récupérer 22 µl d'éluat**

Quantifier avec 2 µl au Qubit

Pour le calcul de concentration prendre la taille du cDNA obtenu après amplification de l'ARN. Il n'est pas nécessaire de faire une nouvelle migration en électrophorèse.

Passer à l'étape suivante

#### IV. PCR ajout de barcodes + purif 0,6X

##### Materiel

- Barcode Primers (BP01-24) du kit SQK-PCB114 d'ONT
- Elution Buffer (EB) du kit SQK-PCB114 d'ONT
- Nuclease-free water (e.g. ThermoFisher, cat # AM9937)
- LongAmp Hot Start Taq 2X Master Mix (NEB, M0533S)
- Agencourt AMPure XP beads de Beckman
- Eau Nuclease-free
- Ethanol absolu

Préparer de l'éthanol 70% avec de l'eau nuclease free (possibilité de le congeler pour une utilisation ultérieure)

Décongeler les Barcode Primers (BP01-24) à température ambiante et la LongAmp Hot Start dans la glace

Prendre **2 fmol de cDNA** issue de l'étape précédente de ligation des PCA

Mélanger les réactifs dans une plaque PCR :

Reagent	Volume
<b>PCR PCA Ligated cDNA (2fmol):</b>	<b>xµl</b>
Unique Barcode Primer (BP01-24)	1,5 µl
Nuclease-free water	qsp 25 µl
2x LongAmp Hot Start Taq Master Mix	25 µl
Total	50 µl

### Lancer le programme suivant LIG-Ampl

Step	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	95°C	3 min	1
Denaturation	95°C	15 sec	18
<b>Annealing</b>	<b>62°C</b>	15 sec	18
<b>Extension</b>	<b>65°C</b>	<b>17 min</b>	<b>18</b>
Final extension	65°C	6 min	1
Hold	4°C	∞	

### Le programme dure au moins 5 heures et peut être lancé sur la nuit

Ramener les billes et le Elution Buffer (EB) au moins 15 min à température ambiante

Dans ce protocole nous n'utilisons pas l'Exonucléase 1

#### Procéder à l'étape de purification :

Bien ressuspendre les billes AMPure XP avec le vortex

**Ajouter 30 µl de billes** ressuspendues pour faire un lavage 0,6X et faire 10 aller retour avec la pipette (volume final de 80 µl)

**Incuber 5 min à température ambiante**

Centrifuger et mettre sur la plaque magnétique jusqu'à ce que les billes forment un culot.

Enlever le surnageant

**Ajouter 200µl d'éthanol 70%** juste préparé et laisser **30 sec**

Enlever l'éthanol 70% avec une pipette

Répéter le lavage une deuxième fois

Bien enlever l'éthanol résiduel avec une pipette de 10µl

Laisser sécher 30 sec, mais ne pas laisser le culot se craqueler

Enlever le tube du support magnétique et **ressuspendre dans 51,5 µl de tampon EB**

**Incuber 10 min à température ambiante**

Centrifuger et mettre sur le support magnétique

Laisser les billes former un culot jusqu'à ce que l'éluat soit clair

**Récupérer 50 µl d'éluat**

#### Recommencer un deuxième cycle de purification :

**Ajouter 30 µl de billes** ressuspendues pour faire un lavage 0,6X et faire 10 aller retour avec la pipette (volume final de 80 µl)

**Incuber 5 min à température ambiante**

Centrifuger et mettre sur la plaque magnétique jusqu'à ce que les billes forment un culot.

Enlever le surnageant

**Ajouter 200µl d'éthanol 70%** juste préparé et laisser **30 sec**

Enlever l'éthanol 70% avec une pipette

Répéter le lavage une deuxième fois

Bien enlever l'éthanol résiduel avec une pipette de 10µl

Laisser sécher 30 sec, mais ne pas laisser le culot se craqueler

Enlever le tube du support magnétique et **ressuspendre dans 14,5 µl de tampon EB**

**Incuber 10 min à température ambiante**

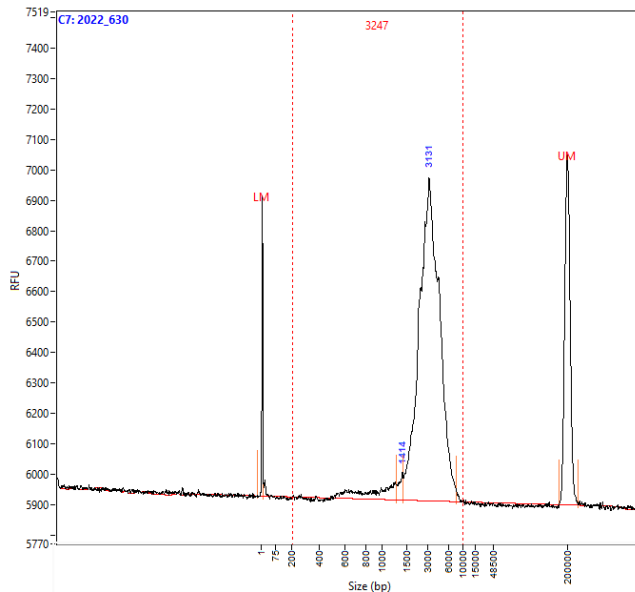
Centrifuger et mettre sur le support magnétique  
Laisser les billes former un culot jusqu'à ce que l'éluat soit clair  
**Récupérer 13 µl d'éluat**

### QC des cDNA

Quantité : Dosage au Qubit avec (2 µl)

Qualité : Fragment Analyzer (1 µl si peu de matériel sinon privilégier 2 µl)

*Exemple de profil du fragment analyzer obtenu pour le cDNA de lignée de cellules humaines*



#### **Attention Stockage :**

Nous recommandons de conserver les bibliothèques dans des tubes Eppendorf DNA LoBind à **4°C pour un stockage à court terme jusqu'à la fin du projet** ou une utilisation répétée, par exemple pour recharger les FlowCells entre deux lavages.

Pour **stockage à long terme**, nous recommandons de conserver les bibliothèques à **-80°C** dans des tubes Eppendorf DNA LoBind

## V. Attachement des adaptateurs RAP (chimie 14)

### **Matériel**

- cDNA amplifié et barcodé
- Rapid Adapter (RA) du kit SQK-PCB114
- Elution Buffer (EB) du kit SQK-PCB114
- Adaptateur Buffer (ADB) du kit SQK-PCB114

Multiplexer **50 fmol** de cDNA amplifiés et barcodés dans du Elution Buffer (EB) selon les conditions suivantes :

-dans un volume final de **11 µl** pour un séquençage sur **Minlon**

-dans un volume final de **31 µl** pour un séquençage sur **Promethlon**

Centrifuger brièvement le tube de Rapid Adapter (RA) ainsi que celui de Adaptateur Buffer (ADB) .Ces tubes ne sont pas congelés. Les mélanger avec la pipette, prélever le volume nécessaire et les remettre a -20°C ensuite.

Diluer le réactif **Rapid Adapter (RA) comme suit :**

Réactif	Volume
Rapid Adapter (RA)	1.5 µl
Adaptateur Buffer (ADB)	3,5 µl
<b>Total</b>	<b>5 µl</b>

Bien mélanger par pipetage et centrifuger

**Ajouter 1 µl du Rapid Adapter (RA) juste dilué au mix de 50 fmol de librairie** de cDNA amplifié et barcodé dans un volume final de **12 µl** pour le **MinION** ou **32 µl** pour le **PromethION**

Bien mélanger par pipetage et centrifuger

**Incuber 5 min à température ambiante**

La librairie est maintenant prête à être séquencée dans la Fow Cell et doit être **conservée dans la glace en attendant le chargement.**

**Suivre le protocole MinION ou PromethION pour la chimie 14**

## VI. Séquençage

**Suivre le protocole MinION ou PromethION pour la chimie 14**