

Extraction d'ARN

1. Equipements utilisés

L'extraction des ARN totaux est effectuée à partir d'échantillons sanguins et d'échantillons de tissus congelés ou fixés au formol et inclus en paraffine sur l'automate Maxwell 16[®] (Promega, Lyon, France). Cet appareil bénéficie d'un entretien mensuel réalisé par les techniciens de la PRB et d'une maintenance préventive annuelle effectuée par le fabricant.

2. Personnel

Les extractions d'ARN sont effectuées par les techniciens de laboratoire de la Plateforme de Ressources Biologiques qui sont formés et habilités à fréquence régulière sur chaque technique spécifiquement.

3. Matrices prises en charge

L'automate Maxwell 16[®] permet l'extraction de 16 échantillons maximum simultanément.

Matrice	Sang total		Tissus		Urine
Support du prélèvement	PAXgene ^{®*}	Tempus ^{®**}	Congélation immédiate en azote puis conservation à -80°C*	Fixation au formol et inclusion en paraffine puis conservation à température ambiante	Norgen ^{®*} ; Falcon ^{®**}
Quantité d'échantillon	2,5 mL*	3,0 mL**	10 coupes de 50 µm*	2 coupes de 5 µm*	50 mL*
Nature	Congelé (< 1 mois à -80°C)*	Congelé (< 1 mois à -80°C)**	Congelé (-80°C)*	Température ambiante*	Frais (< 1 mois)*
Volume d'élution	50 µL*	50 µL**	50 µL*	50 µL*	30 µL*
Tampon d'élution	Eau nucléase-free	Eau nucléase-free	Eau nucléase-free	Eau nucléase-free	Eau nucléase-free
Technique	Maxwell 16 [®]	Maxwell 16 [®]	Maxwell 16 [®]	Maxwell 16 [®]	Maxwell 16 [®]
Délai technique interne	2 heures	2 heures	2 heures	4 heures	2 heures

*validation fournisseur +validation en interne, **validation fournisseur uniquement

Points de vigilance :

- Congélation des tubes PAXgene[®] : les tubes PAXgene[®] doivent être congelés en position verticale pendant 24 heures à -20°C avant d'être transférés à -80°C.

4. Contrôles qualité disponibles sur les échantillons d'ARN obtenus

La qualité et la pureté de l'ARN obtenu doivent être adéquates pour l'application prévue en aval. C'est pourquoi la Plateforme de Ressources Biologiques accorde une grande importance aux contrôles qualité réalisés sur les échantillons d'ARN extraits. Les différents contrôles qualité décrits ci-dessous sont disponibles et peuvent être réalisés sur demande.

- Dosage spectrophotométrique (Nanodrop 2000[®])

La zone d'absorbance maximale des acides nucléiques se situe à 260 nm. Les protéines, principaux contaminants des solutions d'acides nucléiques, absorbent à 260 nm mais présentent un maximum d'absorption autour de 280 nm par les acides aminés aromatiques. La mesure du rapport de DO 260/280 permet donc de contrôler la pureté des échantillons

d'ARN obtenus en évaluant la présence de contaminants (solvants organiques, protéines résiduelles) dans la solution d'ARN.

On attend un rapport 260/280 supérieur ou égal à 2,0 dans le cas d'un ARN pur. Un rapport plus faible traduit généralement une contamination en protéines.

- Dosage fluorimétrique (*Quantus*[®], *Qubit*[®])

Il existe des méthodes fluorimétriques sensibles pour le dosage de l'ARN qui sont basées la fixation d'un fluorophore à l'ARN. L'intensité de fluorescence émise est alors proportionnelle à la quantité d'ARN présente. Cette technique est très précise pour quantifier l'ARN, plus sensible et plus spécifique que le dosage spectrophotométrique.

Les techniques d'extraction proposées par la Plateforme de Ressources Biologiques sont optimisées pour permettre d'obtenir la concentration la plus élevée possible de manière à avoir suffisamment de matériel pour toutes les applications prévues en aval.

- Evaluation de l'intégrité de l'ARN

La technologie Agilent[®] permet de déterminer précisément la qualité et la quantité d'ARN à partir de faibles quantités d'échantillon (1 µL) en un temps très court. L'apport majeur est le calcul automatique d'un score qualité appelé RIN (*RNA Integrity Number*). Sa valeur est comprise de 1 à 10, un RIN de 10 correspondant à un ARN de qualité parfaite et un RIN de 1 correspondant à un ARN totalement dégradé.

La Plateforme de Ressources Biologiques veille à ce que les techniques d'extraction d'ARN validées permettent d'obtenir un RIN le plus élevé possible.

- Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction correspond au rapport entre la quantité d'ARN extraite en ng et le volume de la matrice initiale utilisé en mL ou mg. Le rendement d'extraction moyen doit être calculé pour pouvoir comparer entre elles différentes techniques d'extraction d'acides nucléiques. Cette donnée est essentielle car elle permet de s'assurer que la quantité d'ARN obtenue doit être suffisante pour les applications en aval.

La Plateforme de Ressources Biologiques a soigneusement validé les différentes techniques d'extraction proposées pour pouvoir garantir un rendement d'extraction compatible avec les applications en aval souhaitées par les chercheurs.

5. Performances attendues

Le tableau ci-dessous résume les performances des différentes techniques d'extraction d'ARN mises en œuvre par la Plateforme de Ressources Biologiques.

	Rapport DO 260/280	Concentration des ARN	Score RIN	Rendement d'extraction
Sang total sur PAXgene	>2,0	> 50 ng/μL	> 6,0	2267 ng / mL de sang total
Sang total sur Tempus	>2,0	> 50 ng/μL	> 6,0	2993 ng / mL de sang total
Tissus congelés	>2,0	> 50 ng/μL	> 6,0	7900 ng / échantillon tissulaire
Tissus fixés au formol et inclus en paraffine	>1,6	> 20 ng/μL	Non pertinent – ARN très dégradés	5400 ng / échantillon tissulaire
Urine	>1,4	> 4 ng/μL	1,0 – 8,5	8 ng d'ARN / mL d'urine

6. Conclusion

La Plateforme de Ressources Biologiques s'assure que la qualité et la pureté des ARN obtenus avec les techniques d'extraction mises au point sont compatibles avec les applications prévues en aval, telles que la RT-PCR, la qRT-PCR et le *northern blotting*.

L'ensemble des résultats générés lors de la mise au point et de la validation des techniques d'extraction d'ARN mises en œuvre à la Plateforme de Ressources Biologiques fait l'objet d'un rapport détaillé. La mise en œuvre de la technique d'extraction d'ARN est ensuite clairement décrite sous forme d'un mode opératoire standardisé.

Mise à jour : août 2018