

HYBRIDATIONS DES PUCES

MATERIELS ET REACTIFS UTILISES :

- Four à hybrider (Agilent) **Attention à préchauffer 2 à 3H avant utilisation.**
- Chambres d'hybridation (#G2534A)
- Lamelles Agilent (#G2534-60003)
- Oligo Wash 1 : (#5188-5221)
- Oligo Wash 2 : (#5188-5222)
- Puces préalablement « post-processées » selon le protocole de marquage adapté
- ARN amplifiés et marqués selon le protocole de marquage adapté

1. Utilisation des chambres d'hybridation



- Placer délicatement la lamelle dans la base de la chambre (entre les 4 encoches), étiquette vers le haut, en alignant l'étiquette à l'extrémité rectangulaire de la chambre :



- Pipeter le volume réactionnel de solution d'hybridation (500.0 μ l) préalablement préparée comme décrit dans le protocole de marquage adopté et les déposer sur la lamelle lentement d'un bout à l'autre de la surface (sans vider complètement le cône afin d'éviter la formation de bulles) :



- Ajouter la puce post-traitée, spots face au liquide, en superposant l'étiquette à celle de la lamelle.
- Vérifier l'étanchéité.
- Placer le dessus de la chambre et assembler le tout à l'aide du « serre-joint » :



NE JAMAIS SERRER A L'AIDE D'OUTILS !!

COPIE

- Faire pivoter l'ensemble 2 ou 3 fois à la verticale afin de répandre la solution d'hybridation sur toute la surface entre lame et lamelle :



- Vérifier qu'aucune bulle n'est restée coincée, elles sont acceptables à partir du moment où elles sont mobiles lors de la rotation de la chambre. Si ce n'est pas le cas faire à nouveau pivoter la chambre de façon à ce que la bulle d'air permettant la circulation la déloge.



- Placer les chambres alors assemblées dans le four à hybridation.

Attention :

- * dans le four d'hybridation, les chambres s'équilibrent en diagonale par rapport au centre.
- * La vitesse du rotor doit être réglée sur 4.

- Fermer la porte du four et laisser hybrider **17 heures à 62°C**.



2. Lavages Post-Hybridation

2.1 Lavage des lames

Une fois l'hybridation terminée, désassembler les chambres et les lames/lamelles et placer les puces hybridées dans leur bain de lavage

- Solution de lavage 1 : **5 min** (sous agitation magnétique modérée) à l'abri de la lumière.
- Solution de lavage 2 : **1 min, 37°C** (sous agitation magnétique modérée) à l'abri de la lumière.
- Sécher les puces une à une entre 15 et 20 secondes à l'aide de la centrifugeuse pour puce ou en batch dans une centrifugeuse à plaques (5 minutes à 900 rpm).

Ne jamais laisser sécher les puces

Une fois les puces lavées, les scanner comme décrit dans le protocole de lecture et quantification des puces.

2.2 Lavage des lamelles

- Les tremper dans un bain de SDS à 1% pendant 30 min.
- Rincer avec de l'eau désionisée.
- Les tremper dans un bain de NaOH 0.5M pendant 30 min.
- Rincer 5 fois avec de l'eau désionisée.
- Rincer à l'éthanol 95%.
- Eliminer l'éthanol en centrifugeant à 900 rpm 5 min.
- Stocker les lamelles propres jusqu'à utilisation.

2.3 Lavage des chambres d'hybridation

Laver les différentes parties des chambres à l'eau distillée, en prenant bien soin d'éviter de les entrechoquer. Les laisser sécher en les étalant sur du papier absorbant avant de les ranger.

