

## HYBRIDATION AFFYMETRIX

### PRECAUTIONS GENERALES :

- **Toutes les manipulations** se font avec **des gants** de façon à limiter le risque de dépôt de RNAses présentes en grande quantité sur notre peau.
- Tout le **matériel** utilisé (pointes, tubes...) doit être **exempt de RNase**, de même que l'**eau** utilisée dans le protocole (dilutions, éluions, qsp...).
- Après chaque addition ou préparation de **mélanges** dans les tubes, les **homogénéiser** puis les **centrifuger** quelques instants.
- **Eviter** de laisser les **ARN à température ambiante** trop longtemps pour limiter leur dégradation. Les stocker dès que possible dans un bac à glace (sauf si indications contraires précisées dans le protocole).
- Les **ARN** utilisés pour être **hybridés** doivent d'abord subir une étape de **Contrôle Qualité** selon l'instruction « Gestion des ARN à hybrider ».

### MATERIELS ET REACTIFS UTILISES :

**Attention** l'eau utilisée dans ce protocole est de l'**eau exempte de RNase**,

- IVT labeling kit (Affymetrix, P/N 900449)
- One cycle cDNA synthesis kit (Affymetrix, P/N 900431)
- Sample clean-up Module (Affymetrix, P/N 900371)
- Poly-A RNA Control Kit (Affymetrix, P/N 900433)
- Hybridization Control Kit (Affymetrix, P/N 900454)

## 1. Préparation des "Spike in controls"

**Kit utilisé: one cycle cDNA synthesis kit et Poly-A RNA Control Kit**

Diluer les « Spike in poly A » (polyA RNA control stock) dans le poly-A control dilution buffer selon la quantité d'ARN utilisé pour la réaction, selon le tableau ci-dessous :

Starting Amount total RNA	Serial Dilutions			Spike-in Volume
	First	Second	Third	
1 µg	1:20	1:50	1:50	2 µl
2 µg	1:20	1:50	1:25	2 µl
5 µg	1:20	1:50	1:10	2 µl
10 µg	1:20	1:50	1:5	2 µl

La première dilution des contrôles peut être stockée 6 semaines à -20°C et décongelée 8 fois. Les autres seront jetées.

## 2. Synthèse du premier brin d'ADN

**Utiliser de 1 à 8.0 µg d'ARN total** et utiliser des tubes PCR.

- 1 à 15 µg d'ARN total
- 2 µl "Spike in controls" (3<sup>ème</sup> dilution)
- 2µl T7-oligo(dT) Primer, 50 µM
- Qsp 12 µl H2O

→12 µl final

Incuber **10 min à 70°C**

---

**PCR machine, heated lid ON**  
+ Centrifugation rapide  
Refroidir **2 min à 4 °C**  
+ Centrifugation rapide

Préparer le mélange First-strand Master Mix pendant l'incubation :

- 4  $\mu$ l 5X first Strand Reaction Mix
- 2  $\mu$ l DTT 0.1 M
- 1  $\mu$ l dNTP 10 mM

Ajouter 7  $\mu$ l de ce mélange dans chaque tube à réaction →19  $\mu$ l final

Incuber **2 min à 42°C**

---

**PCR machine, heated lid OFF**

Ajouter pendant l'incubation :

- 1  $\mu$ l SuperScript II

→20  $\mu$ l final

Incuber **1h à 42°C**

---

**PCR machine, heated lid OFF**  
+ Centrifugation rapide  
Refroidir **2 min à 4 °C**  
+ Centrifugation rapide

### 3. Synthèse du second brin d'ADN

Kit utilisé: one cycle cDNA synthesis kit

- 91  $\mu$ l H<sub>2</sub>O
- 30  $\mu$ l 5X 2nd Strand Reaction Mix
- 3  $\mu$ l dNTP 10 mM
- 1  $\mu$ l *E. Coli* DNA ligase
- 4  $\mu$ l *E. Coli* DNA polymerase I
- 1  $\mu$ l RNase H

Ajouter 130  $\mu$ l de ce mélange dans chaque tube à réaction →150  $\mu$ l final

Incuber **2h à 16°C**

---

**PCR machine, heated lid OFF**

+ agitation rapide

**Ajouter:**

- 2 µl T4 DNA Polymerase

→152 µl final  
Incuber 5 min à 16°C

---

**PCR machine, heated lid OFF**

**Ajouter:**

- 10 µl EDTA 0.5 M

→162 µl final

**Procéder immédiatement à l'étape de purification des cDNA double brins**

**4. Purification des cDNA double brins**

**Kit utilisé: Cleanup of double-stranded cDNA for both the one-cycle and two-cycle target labeling assays**

**Utiliser les colonnes et les produits spécifiques aux cDNAs**

- Ajouter 600 µl **cDNA Binding Buffer**. Vortexer 3 secondes.  
Vérifier que la couleur est jaune sinon rajouter 10 µl de 3M sodium acetate pH 5

Charger 500 µl de ce mix sur la colonne  
Centrifuger à 10 000 rpm 1 min.  
Jeter l'éluat

Charger le reste du mix sur la colonne  
Centrifuger à 10 000 rpm 1 min.  
Transférer la colonne dans un tube vide de 2 ml.

- Ajouter 750 µl **cDNA Wash Buffer**  
**(S'assurer d'avoir dilué la solution mère dans l'éthanol).**  
Centrifuger à 10 000 rpm 1 min.  
Jeter l'éluat

**NOMMER TOUS LES TUBES**

Ouvrir les bouchons des colonnes  
Centrifuger à 14 000 rpm 5 min.

Transférer la colonne dans un tube vide de 1.5 ml.

- Ajouter 14 µl **cDNA Elution Buffer**.  
Laisser 1 min à température ambiante.  
Centrifuger à 14 000 rpm 1 min.

Le volume moyen élué est environ de 12  $\mu$ l sur les 14  $\mu$ l d'élué Buffer.

→12  $\mu$ l final

## 5. Transcription In Vitro

Kit utilisé: genechip IVT labeling

- 12  $\mu$ l ADN double brin

Préparer le mélange IVT reaction :

- 8  $\mu$ l H<sub>2</sub>O
- 4  $\mu$ l 10 X IVT Labeling Buffer
- 12  $\mu$ l IVT Labeling NTP Mix
- 4  $\mu$ l IVT Labeling Enzyme Mix

→40  $\mu$ l final

Incuber **16h à 37°C**

---

**A cette étape, il est possible de conserver les tubes au congélateur (-20°C ou -80°C)**

## 6. Purification des cRNA

Kit utilisé: Cleanup of Biotin-Labeled cRNA

**Utiliser les colonnes et les produits spécifiques aux cRNAs**

Préparer de l'éthanol 100 % et de l'éthanol 80%.

- Ajouter 60  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Vortexer 3 secondes.
- Ajouter 350  $\mu$ l IVT cRNA Binding Buffer. Vortexer 3 secondes.
- Ajouter 250  $\mu$ l Ethanol (96 – 100 %). Bien mélanger.

Charger ce mix (700  $\mu$ l) sur la colonne

Centrifuger à 10 000 rpm 15 sec.

Transférer la colonne dans un tube vide de 2 ml.

- Ajouter 500  $\mu$ l cRNA Wash Buffer  
(S'assurer d'avoir dilué la solution mère dans l'éthanol).

Centrifuger à 10 000 rpm 15 sec.

Jeter l'éluat

- Ajouter 500 µl **Ethanol (80 %)**

Centrifuger à 10 000 rpm 15 sec.

Jeter l'éluat

### **NOMMER TOUS LES TUBES**

Ouvrir les bouchons des colonnes

Centrifuger à 14 000 rpm 5 min.

Transférer la colonne dans un tube vide de 1.5 ml.

- Ajouter 11 µl **H2O**

Laisser 1 min à température ambiante.

Centrifuger à 14 000 rpm 1 min.

- Ajouter 10 µl **H2O**

Laisser 1 min à température ambiante.

Centrifuger à 14 000 rpm 1 min.

→20 µl final

**A cette étape, il est possible de conserver les tubes au congélateur (-20°C ou -80°C)**

### **7. Mesure de la concentration en cRNA**

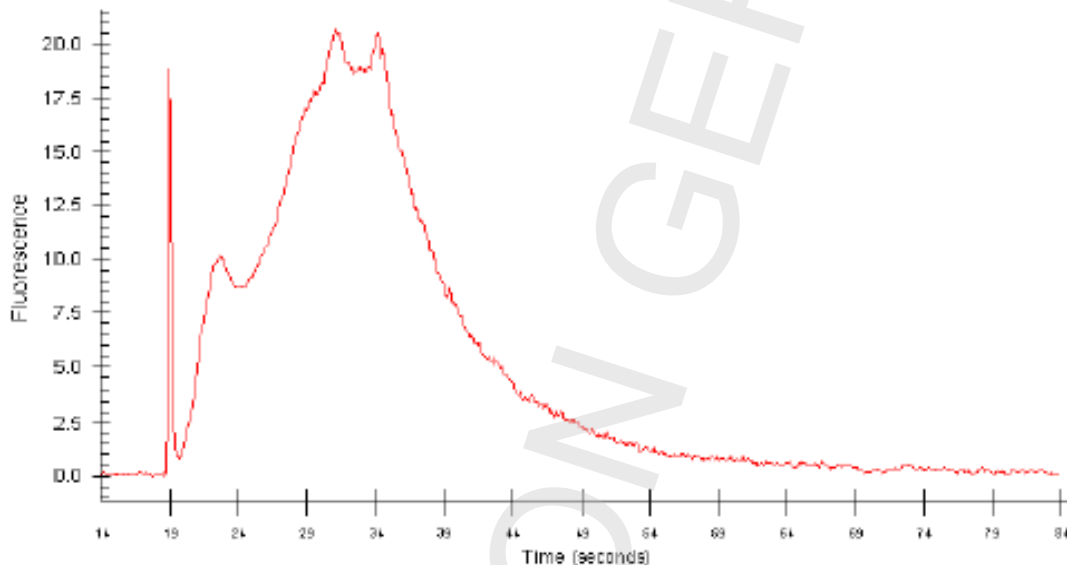
Prendre la DO à 260 nm (1 DO = 40 µg/ml)

Le **Nanodrop RNA** (programme « nucleic acids ») est fortement recommandé pour cette mesure

**A cette étape, il est possible de conserver les tubes au congélateur (-20°C ou -80°C)**

## 8. Contrôle qualité des cRNA

Faire une puce RNA nano sur Bioanalyzer sur une dilution au 1/10<sup>ème</sup>  
Voir fascicule REF-PROD-02



## 9. Fragmentation des cRNA

Pour une puce de format 49/64

Utiliser **20 µg d'ARNc** (dans un volume de 1 à 21 µl) et utiliser des tubes PCR.

- 20 µg d'ARNc
- 8 µl 5X Fragmentation Buffer
- Qsp 40 µl H2O

→40 µl final

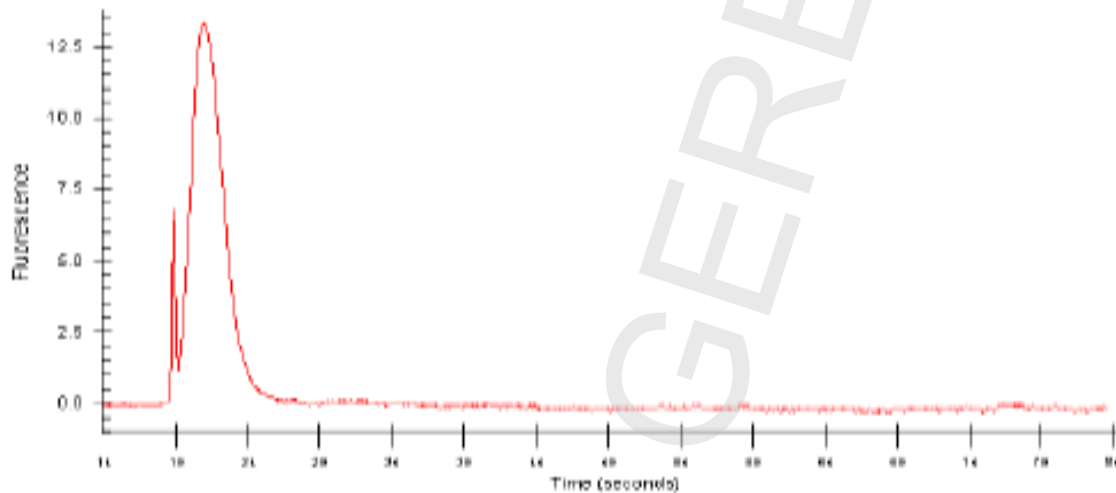
Incuber **35 min à 94°C**

**PCR machine, heated lid ON**  
**+ Centrifugation rapide**  
Refroidir **2 min à 4 °C**

**A cette étape, il est possible de conserver les tubes au congélateur (-20°C ou -80°C)**

## 10. Contrôle qualité des cRNA fragmentés

Faire une puce RNA nano sur Bioanalyzer à partir de 1.0 µl de mix.



## 11. Hybridation des cRNA fragmentés

Faire un « Priming » de la station fluide Affymetrix (PRIME\_450)  
cf « **fiche explicative de la station fluide** »

Faire chauffer le four à 45 °C rotation 60 RPM

Mettre la (les) puce(s) à température ambiante pour éviter les fuites au niveau des joints

### 11.1 Préparation du mélange d'hybridation

Pour une puce de format 49/64 :

- 15 µl **20X Eukaryotic Hybridization Controls**

Chauffer 5 **min à 65°C**

---

**PCR machine, heated lid OFF**

Puis:

- 30 µl (15 µg) **cRNA fragmentés**

Préparer le mélange « Hybridization Cocktail for Single Probe Array » dans un eppendorf 1.5 ml :

- 5 µl Control Oligonucleotide B2 (3nM)
- 15 µl 20X Eukaryotic Hybridization Controls préchauffés
- 150 µl 2X Hybridization Mix
- 30 µl DMSO
- 70 µl H2O

→300 µl final

Transférer le mélange « Hybridization Cocktail for Single Probe Array » dans 2 eppendorfs 200 µl :

Incuber **5 min à 99°C**

Incuber **5 min à 45°C**

---

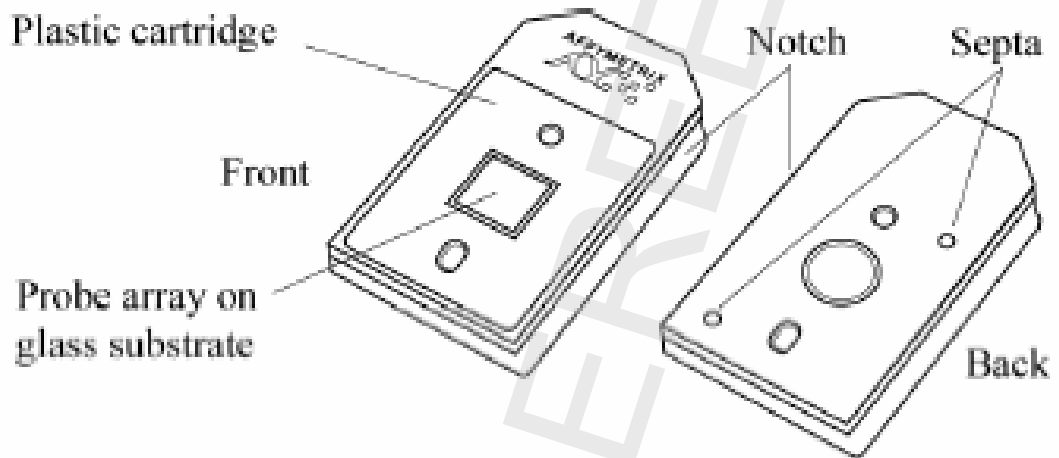
**heated lid ON**

Retransférer le mélange dans un eppendorf 1.5 ml

**Centrifuger à 14 000 rpm 5 min.**

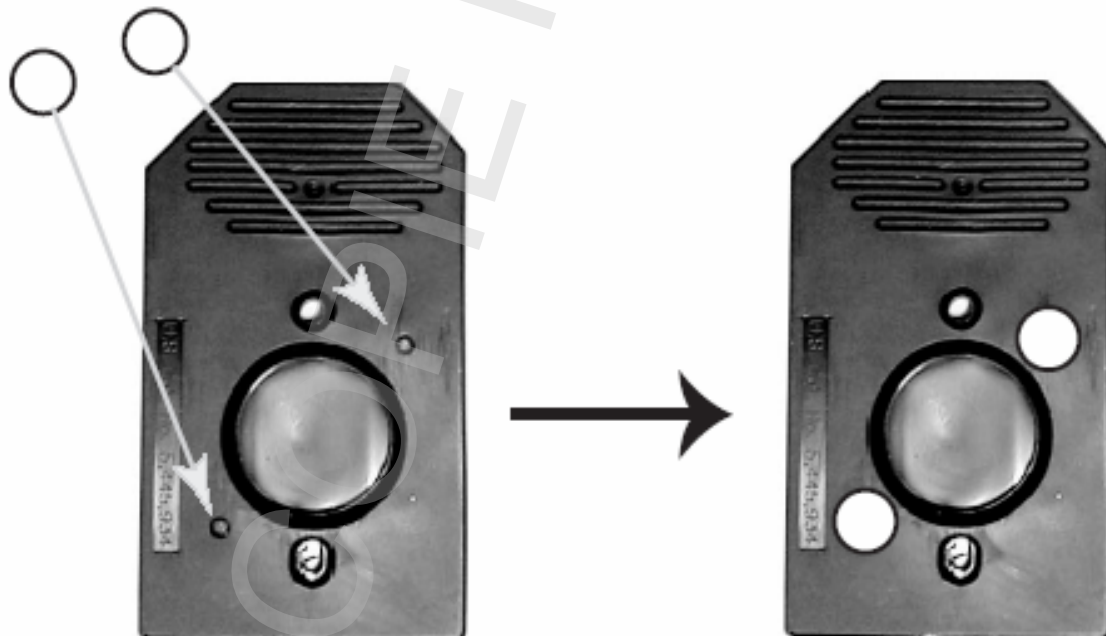
## 11.2 Préparation de la puce

- Sortir la puce du sachet.
- Noter sur le sachet le code barre de la puce, la condition hybridée, la date et le numéro de projet
- Noter sur la puce la condition hybridée
- Mettre 200 µl de **prehybridization Mix** dans la puce (format 49/64) :
  - i. Mettre une pointe jaune dans un « septa »
  - ii. Mettre le mix dans l'autre « septa »



Incuber dans le four **10 min à 45°C**  
**Rotation 60 rpm**

- Enlever les 200 µl de **prehybridization Mix** de la puce
- Mettre 200 µl d' **hybridization Mix avec cRNA fragmentés** dans la puce
- Mettre des gommettes sur les trous de la puce



Incuber dans le four **16h à 45°C**  
**Rotation 60 rpm**

## 12. Préparation de la station Affymetrix

Après les 16h d'hybridation,

- Faire un « **Priming** » de la station fluidique Affymetrix (PRIME\_450)  
**cf « fiche explicative de la station fluidique »**
- entrer les expériences dans la station

## 13. Marquage de la puce

- Enlever les 200 µl d' **hybridization Mix avec cRNA fragmentés** de la puce
- Les conserver à -20 °C ou - 80 °C
- Mettre 250 µl de Wash Buffer A dans la puce

**A cette étape, il est possible de conserver les puces 3h à 4°C.**

Préparer les « Stain reagents »

- 600 µl de **Stain Cocktail 1** dans un tube 1.5 ml ambré  
(Attention : sensible à la lumière)
- 600 µl de **Stain Cocktail 2** dans un tube 1.5 ml
- 800 µl de **Array Holding Buffer** dans un tube 1.5 ml

Centrifuger pour enlever les bulles

**Lancer le protocole FS450\_0001 (dure 1h30)  
Suivre les instructions de la station**

Pour l'hybridation et les lavages post hybridation voir le « **protocole d'hybridation des puces AFYMETRIX** ».

## MARQUAGE AFFYMETRIX

### PRECAUTIONS GENERALES:

- **Toutes les manipulations** se font avec **des gants**.
- Tout le **matériel** utilisé (pointes, tubes...) doit être **exempt de RNase**.

### MATERIELS ET REACTIFS UTILISES :

- La **javel** utilisée doit avoir une concentration de **2.6%** de chlore actif.
- L'eau utilisée est de l'**eau milliQ**
- **Microtubes** coniques de 1.5 ml en polypropylène exempt de RNase et DNase (de type eppendorf) naturels et ambrés.
- **Gene Chip Hybridization Wash and Stain kit Affymetrix** ref 900720
- **Bouteilles** propres et sèches pour mettre les tampons Wash A, Wash B, eau et poubelle
- **Puces** de format 49 HGU133 plus2 Ref : 900470(X2) ; 900466 (X6) ; 900467(X30)
- **Gommettes**

### SOMMAIRE :

1. Démarrage de la station fluidique .....	12
2. Définition d'une expérience .....	13
3. Amorçage de la station fluidique (Priming) : .....	13
4. Lavage et marquage des puces : .....	13
5. Scan des puces à ADN .....	15
6. Fermeture de la machine (« Shutting Down ») à la fin de toute session : ..	15
7. Faire un « Bleaching » chaque semaine : .....	16
8. Fermeture de la machine (« Shutting Down à l'air ») si pas d'utilisation prévue rapidement : .....	17

### 1. Démarrage de la station fluidique

- Allumer la station : la fenêtre LCD indique « Power-on Done ; not primed 25°C »
- Allumer l'ordinateur et démarrer Genechip Operating Software

## 2. Définition d'une expérience

- Sous le menu GeneChip Software (à gauche), cliquer sur « **Experiments** »  
Ou aller dans file/ New experiment
- Dans la fenêtre « **Experiment Information** » :
  - Remplir le nom de l'expérience
  - Sélectionner le type de puce dans le menu déroulant.
  - sauvegarder l'expérience,  
L'expérience apparaît alors dans la fenêtre à gauche en haut
- Fermer la fenêtre

## 3. Amorçage de la station fluidique (Priming) :

**Dure environ 10 min**

- Vérifier que tous les tuyaux de lavage sont dans les bouteilles de lavage appropriées.
- Cliquer sur « **Fluidics** » sous le menu « **Instrument control** »
- Dans la fenêtre de dialogue de la station fluidique, cliquer sur « **Protocol** », et choisir « **Prime\_450** » pour chaque module (ou sélectionner « **All Modules** » pour amorcer tous les modules simultanément). « **No Probe Array** » apparaît dans le nom de l'expérience.
- Cliquer sur « **Run** ».
  - Quand la fenêtre LCD le demande : mettre des tubes 1,5 ml dans les « **Sample Holders** » de chaque module au début et à la fin du priming.

## 4. Lavage et marquage des puces :

**Dure environ 1h30**

- Cliquer sur « **Fluidics** » sous le menu « **Instrument control** »
  - Dans la fenêtre de dialogue de la station fluidique, sélectionner l'expérience dans le menu déroulant « **Experiment** ».
  - Dans la fenêtre de dialogue de la station fluidique, sélectionner le protocole dans le menu déroulant « **Protocol** », et choisir « **FS450\_0001** » pour chaque module (pour les puces de format 49 HGU133 plus2)

- Utiliser une puce hybridée sur la nuit, et reprise dans le tampon Wash Buffer A et sans les gommettes
- Si celle-ci a été conservée à 4°C, la laisser quelques minutes s'équilibrer à température ambiante
- Mettre la puce dans le module amorcé
- Cliquer sur « **Run** »
- Suivre les instructions de la station fluidique
- Enlever les tubes de 1.5 ml
- Mettre de nouveaux tubes 1.5ml comme suivant (sans bulles):

Dans sample holder 1 : 600 µl de **Stain Cocktail 1** dans un tube 1.5 ml ambré  
(Attention : sensible à la lumière)

Dans sample holder 2 : 600 µl de **Stain Cocktail 2** dans un tube 1.5 ml

Dans sample holder 3 : 800 µl de **Array Holding Buffer** dans un tube 1.5 ml

- Quand le lavage et le marquage des puces sont finis : (« **Eject & Inspect Cartridge** » affiché sur la station)
- Retirer la puce
- Vérifier qu'il n'y ait pas de bulle dans la puce
  - si bulle :
    - Remettre la puce dans la station
    - Remettre dans sample holder 3 : 800 µl de **Array Holding Buffer** dans un tube 1.5 ml
    - Revérifier la puce
  - si pas bulle :
    - Remettre la chambre d'hybridation en place
    - « **Engage Washblock** » s'affiche sur la station
- Suivre les instructions de la station fluidique
  - enlever les tubes
  - mettre des nouveaux tubes 1.5 ml vides

## 5. Scan des puces de format 49 HGU133 plus2

### Préchauffer les lasers au moins 15 min avant le scan

#### Avant le scan :

- Utiliser les puces marquées, et reprises dans le tampon Array Holding Buffer (sans bulle visible)
- Si les puces ne sont pas scannées tout de suite, les conserver à 4°C.
- Mettre des gommettes sur les joints.
- Vérifier que la puce est propre (attention, ne pas utiliser d'alcool !), dans le cas échéant la frotter à l'aide d'un chiffon doux.

#### Pour scanner :

- cliquer sur « **Scan** » sous le menu « **Instrument control** »
- Sélectionner l'expérience
- Load / Eject
- Insérer la puce
- START
- OK

## 6. Fermeture de la machine (« Shutting Down ») à la fin de toute session :

#### Dure environ 8 min

- Mettre les tubes de lavage dans une bouteille remplie d'eau déionisée
- Cliquer sur « **Fluidics** » sous le menu « **Instrument control** »
  - Dans la fenêtre de dialogue de la station fluïdique, cliquer sur « **Protocol** », et choisir « **Shutdown\_450** » pour chaque module (ou sélectionner « **All Modules** » pour amorcer tous les modules simultanément). « **No Probe Array** » apparaît dans le nom de l'expérience.

- Cliquer sur « **Run** ».
- Suivre les instructions de la station fluidique
  - Enlever les tubes
  - Mettre de nouveaux tubes vides
- Quand le lavage est fini,
  - Enlever les tubes
  - Mettre des nouveaux tubes vides
- Quand le programme est fini, la fenêtre LCD indique « Power-on Done ; not primed 25°C »
- Eteindre la station fluidique

#### 7. Faire un « Bleaching » chaque semaine :

##### **Dure 1h40**

- Préparer **500 ml de javel 0.525 %** (200 ml de javel 2.6% + 800 ml d'eau) (attention : ne pas garder plus de 24h)
- Préparer une bouteille vide « poubelle », une bouteille de 500 ml de javel 0.525% et une bouteille de 1l d'eau
- Mettre les trois tubes de lavage dans la bouteille de **javel** (attention, laisser le tube « poubelle » dans la bouteille « poubelle »).
- Cliquer sur « **Fluidics** » sous le menu « **Run** »
  - Dans la fenêtre de dialogue de la station fluidique, cliquer sur « **Protocol** », et choisir « **BLEACHv2\_450** » pour chaque module (ou sélectionner « **All Modules** » pour amorcer tous les modules simultanément).
  - Cliquer sur « **Run** ».
- Enlever les tubes
- Mettre de nouveaux tubes 1.5 ml vides
- Apres environ 30 min, la station fluidique demandera de mettre les trois tubes de lavage qui étaient dans la javel (ne pas faire attention à la javel qui est restée dans les tubes de lavages) dans la bouteille d'**eau** (attention, laisser le tube « poubelle » dans la bouteille « poubelle »).

- Quand le programme est fini :
  - Recommencer une expérience (remettre les trois tubes de lavage dans les bonnes solutions de lavage)
- OU - Eteindre la station si utilisation rapide de la station prévue
- OU - Faire un « **shutting down à l'air** » si pas d'utilisation rapide de la station prévue

**8. Fermeture de la machine (« Shutting Down à l'air ») si pas d'utilisation prévue rapidement :**

**Dure environ 8 min**

- Mettre les tubes de lavage dans une **bouteille vide**
- Cliquer sur « **Fluidics** » sous le menu « **Instrument control** »
  - Dans la fenêtre de dialogue de la station fluidique, cliquer sur « **Protocol** », et choisir « **Shutdown\_450** » pour chaque module (ou sélectionner « **All Modules** » pour amorcer tous les modules simultanément). « **No Probe Array** » apparaît dans le nom de l'expérience.
  - Cliquer sur « **Run** ».
- Suivre les instructions de la station fluidique
  - Enlever les tubes
  - Mettre des nouveaux tubes vides
- Quand le lavage est fini,
  - Enlever les tubes
  - Mettre des nouveaux tubes vides
- Quand le programme est fini, la fenêtre LCD indique « Shut-down Done ; not primed 25°C »
- Eteindre la station fluidique