Protections

Port de la **blouse** obligatoire

Port des **gants** obligatoire

Port des **lunettes de sécurité**

Travailler dans des conditions Rnase-Free

Réactifs requis (en rouge fait parti du kit)

Kit Amino Allyl MessageAmp TM II Arna Amplification (#1753) :

- T7 Oligo(dT) Primer
- Eau Rnase-free
- Array Script
- Rnase Inhibitor
- 10X first Strand bufer
- Aminoallyl-d UTP(Sigma)
- DNA polymerase
- RNase H
- T7 enzyme mix
- T7 10X reaction buffer
- UTP Sloution (50mM)
- aaUTP (50mM)
- ATP,CTP,GTP mix (25 mM)
- Secound Round Primers
- Hydroxylamine 4M
- coupling Buffer
- cDNA Binding Buffer
- aRNA Binding Buffer
- Wash Buffer
- Isopropanol(Sigma)
- Fluorochromes :

-Cy3 mono-Reactive dye Pack(Amersham)
-Cy5 mono-Reactive dye Pack(Amersham)

- DMSO(Sigma)
- Kit Rneasy Mini Kit (Qiagen)
- Poly d(A) (10µg /µl) (Amersham)
- Yeast tRNA (1µg/µl) (Amersham)
- Human cot-1 ou Mouse cot-1(Invitrogen)
- Amonium acétate 7.5M(sigma)
- EtOH 100%,70%(Sigma)
- Tampon d'hybridation :

-ADN de Sperme de Saumon (Invitrogen)
- SSC 20X(Eurobio)

- SDS 20%(Eurobio)

Equipement requis

- Système qualitatif et quantitatif des ARN(spectro, Nanodrop, Station Agilent de type RNA Nano LabChip..ect)
- tube 0.5 ml RNase-Free
- Bloc chauffant
- bain marie à 42°C, 37°C
- Bloc PCR à 16°C
- Centrifugeuse
- Cristallisoir
- Spectrophotometre (type Nanodrop)
- Etui plastique de 30 ml
- Eprouvette de 1000 ml
- Four
- agitateur orbitale
- Bac de coloration
- Scanner pour lecture des lames
- Supports en acier inoxydable
- Chambre d'hybridation (Corning ou Agilent)
- Speed vac
- Lamelle (60*22 mm)
- Chambre humide (fabrication maison)
- dessicateur
- Four d'hybridation Agilent

" ➡ ": possibilité à cette étape de s'arrêter pour poursuivre le lendemain

PREMIER JOUR (5 heures)

1. PREPARATION DES ECHANTILLONS KIT AMBION

Penser à :
-Allumer bloc chauffant 70°C
-Allumer bloc PCR 42°C,16°C

Kit Amino Allyl MessageAmp TM II Arna Amplification (#1753)
Les Quantités décrites dans ce protocole ont été divisées par deux par rapport au protocole initial sans craindre une diminution de rendement

A. REVERSE TRANSCRIPTION ET SYNTHESE DU PREMIER BRIN

Prendre 1µg d'ARN total (après vérification de la quantité au Nanodrop ou autre système quantitatif et **qualitatif** sur puce RNA 6000 Nano LabChip de Agilent)

Dans un tubes 0.5ml RNase free :

ARN (µl)	Qté pour 1µg
T7 oligo(dT) primer	0.5µl
Eau (µl)	Qsp 6µl

Incuber 10 min à 70°C (bloc chauffant)

a. Préparer le mix pour la synthèse du 1er brin.

	Pour 1 éch.	Pour 4 éch.	Pour 10 éch.
10X 1st strand buffer	1 µl	5 µl	11 µl
Ribonuclease inhibitor	0.5 µl	2.5 µl	5.5 µl
dNTPs mix	2 µl	10 µl	22 µl
Arrayscript	0.5 µl	2.5 µl	5.5µl

Mettre 4µl du mix dans chaque tube, agiter, à la pipette
Incuber 2h à 42°C – dans l'appareil à PCR (la température est plus stable)
Centrifuger

b. Préparer le mix pour la synthèse du 2nd brin.

	Pour 1 éch	Pour 4 éch	Pour 10 éch
Eau (µl)	31.5 µl	157.5µl	346.5 µl
10X 2nd strand buffer	5 µl	25µl	55 µl
dNTPs mix	2 µl	10 µl	22 µl
DNA Polymerase	1 µl	5 µl	11 µl
RNase H	0.5 µl	2.5 µl	5.5 µl

Mettre 40µl du mix dans chaque tube
Incuber 2h à 16°C – dans l'appareil à PCR (la température est plus stable)

c. Purification des cDNA sur colonnes AMBION « cDNA filter cartridges + tubes »

Préchauffer l'eau à 50°C (dans tube 1.5ml)
Prendre 1 colonne par cDNA (cDNA filter cartridges + tubes)
Y mettre 50µl de cDNA Binding Buffer, Incuber 5 minutes

Mettre 250µl de cDNA Binding Buffer dans chaque tube
Déposer le tout sur la colonne
Centrifuger 1 min à 10 000g

Jeter le surnageant

Laver avec 500 µl de Wash Buffer (vérifier que l'alcool a bien été ajouté avant la 1ière utilisation)
Centrifuger 1 min à 10 000g
Jeter le surnageant

Re centrifuger 1 min à 10 000g, pour enlever toute trace d'alcool
Jeter le surnageant
Transférer la colonne dans un tube pour l'élution du cDNA

Elution
Déposer 9 µl d'eau RNase free préchauffée à 50°C, incuber 2 min
Centrifuger 2 min à 10 000g
Répéter l'opération.

Speed vac complet des ARN.
Reprendre le culot dans 7µl d'eau

d. Synthèse de l'ARN amplifié in vitro

	Pour 1 éch	Pour 4 éch	Pour 10 éch
aaUTP	1.5 µl	7.5 µl	16.5 µl
ATP, CTP, GTP mix	6 µl	30 µl	66 µl
UTP	1.5 µl	7.5 µl	16.5 µl
T7 10X reaction buffer	2 µl	10 µl	22 µl
T7 enzyme mix	2 µl	10 µl	22 µl

Mettre 13µl du mix dans chaque tube
Incuber 4 à 16h à 37°C
Stopper la réaction en ajoutant 30µl d'eau (Nuclease-free) et en vortexant doucement

DEUXIEME JOUR (8 heures)

Penser à :
-Allumer Baim marie à 50°C
-Faire préchauffer l'eau à 50°C

e. Purification des ARNa sur colonnes AMBION « aRNA filter Cartridge »

Ajouter 350 µl d'aRNA binding buffer à chaque tube, mélanger
Ajouter 250 µl d'EtOH 100% RNase free

Mettre le tout sur une colonne « aRNA filter Cartridge » posée sur un tube « aRNA collection »
Centrifuger 1 min à 10 000 g
Jeter le surnageant

Laver avec 650 µl de Wash Buffer (vérifier que l'alcool a bien été ajouté avant la 1ière utilisation)
Centrifuger 1 min à 10 000 g
Jeter le surnageant

Re-centrifuger 1 min à 10 000g, pour enlever toute trace d'alcool
Jeter le surnageant
Transférer la colonne dans un nouveau tube pour l'élution des aRNA

Elution
Déposer 50µl d'eau préchauffée à 50°C sur la colonne
Incuber 2 min à RT puis centrifuger 2 min à 10 000 g
Répéter l'opération.
L'ARN amplifié est donc dans 100 µl d'eau.
Mesurer sa concentration au Nanodrop

On peut stocker ici l' ARN à -80°C

f. Couplage avec les dyes

Préparer les fluorochromes (dyes) : AMERSHAM : re-suspendre un sachet de fluorochrome pendant 1h dans 88µl de DMSO, faire des aliquots de 11µl. (conservation à -20°C)

Préparer les ARNS
Prévoir 5µg d'ARN amplifié de chaque dye pour une puce. Ne pas dépasser 20µg par tube (équivalent de 2 dye-swap)
Speed-vaquer les ARN complètement (Position séchage ' medium ou low'), en vérifiant toutes les 5 min

Les reprendre dans 9 µl de Tampon de couplage puis rajouter les 11µl de dye.
Incuber 30 min à RT dans le noir

Ajouter 4.5µl d'Hydroxylamine 4M
Incuber 15 min à RT dans le noir

Ajouter 5.5 µl d'eau pour compléter le volume à 30µl

g. Purification des ARN marqués sur colonne AMBION « labeled aRNA Filter Cartridge »

Alternative : Le kit AMBION ne proposant que 20 colonnes de purification il vous est possible de suivre une méthode de purification alternative des ARN marqués en prenant des colonnes Qiagen de type Rneasy Mini Kit Réf 74104 (50 colonnes) ou 74106 (colonnes 250) et en suivant les instructions du protocole RNA clean up (volume d'élution en H2O final par tube d'ARN = 20µl)

Préchauffer l'eau à 50°C

Ajouter 105µl d'aRNA Binding Buffer à chaque échantillon
75µl d'EtOH 100% et mélanger 3 fois

Déposer le tout au centre de la colonne « labeled aRNA Filter Cartridge »
Centrifuger 1 min à 10 000g
Jeter le FT

Laver avec 500µl de « Wash Buffer »
Centrifuger 1 min à 10 000g
Jeter le FT
Re centrifuger 1 min à 10 000g pour bien éliminer l'alcool

Transférer la colonne sur un tube « Labeled aRNA Elution Tube »
Eluer
Mettre 10µl d'eau préchauffée à 50°C
Attendre 2 min à RT
Centrifuger 2 min à 10 000g
} 2 fois

Les ARNs marqués sont donc dans 20µl, les garder dans la glace.
Mesurer l'incorporation des dye au Nanodrop (programme '. Microarray')

Nbre mol dye pour 1000nt (I) = (DO dye / DO 260) * 60 pour Cy3

Nbre mol dye pour 1000nt (I)= (DO dye / DO 260) * 36 pour Cy5

Nous déconseillons une hybridation avec des échantillons marqués pour lesquelles l'incorporation (I) est très différente entre les deux échantillons (ex Iéchantilloncy3=5 et Iechantilloncy5=10)
Nous déconseillons également une hybridation avec des échantillons marqués dont la quantité en terme de pmol de dye est inférieure à 20 pmol

Ex :Iéchantillon cy3=1.3 équivaud selon Nanodrop à 0.8 pmol/µl*50µ=40 pmol
Iéchantillon cy5=1.5 équivaud selon Nanodrop à 0.9 pmol/µl*50µl=45 pmol

Hybridation possible

Speed-vaquer complètement les ARN marqués 5 à 10 mn

f. Fragmentation

Compléter à 9 µl avec de l'eau RNase free
Mettre 1µl de Fragmentation reagent (kit # 9938, Ambion)
Mélanger et centrifuger rapidement
Incuber 15 min à 70°C (bloc chauffant)
Ajouter 1µl de Stop Solution
Placer sur glace jusqu'à utilisation

g. Mélange des 2 ARNs marqués

h. Précipitation

Penser à :
- Mettre la centrifugeuse à 4°C

Ajouter 10µg de poly d(A), 10µg de yeast tRNA et 10µg de Human cot1 ou Mouse cot1 selon la nature des échantillons
Ajouter à ce volume final 0.5 fois d'ammonium acétate 7.5M et 2.5 fois le volume ainsi obtenu d'éthanol 100%.
Centrifuger 1h à 4°C et 13000rpm.
Remarque : pendant la précipitation, les lames traitées peuvent être pré hybridées.

Laver le culot (il doit être coloré) avec 700µl d'éthanol 70% pendant 15 min à 4°C et 13000rpm.
Jeter le surnageant, centrifuger à nouveau 30s à 13000 rpm et retirer avec la pipette le reste de surnageant.
Passer l'échantillon au speed vac 1 minute maxi

2. PREPARATION DES LAMES

Attention ! ce type de lame nécessite un traitement particulier , elles ne doivent pas être réhydratées au dessus de vapeur d'eau ni passées aux U.V mais placées en chambre humide et pré-hybridées comme suit :

A. RE-HYDRATATION :

Cette étape permet une meilleure fixation des oligonucléotides à leur support et consiste à placer les lames deux heures dans une chambre humide garnie d' un sopalin mouillé placé au fond de la chambre permettant de maintenir une certaine humidité
Ces lames sont par la suite maintenues 1 heure au minimum dans un dessiccateur avant leur traitement avec la solution de blocage

B. SOLUTION DE BLOCAGE :

Préparer la solution de blocage suivant le nombre de lames à traiter sachant qu'un étui permet de préparer 5 lames simultanément :

	Volume (ml)	
	Réactif	1 étui
1	Ethanolamine	150µL
2	NaBorate(p H 9)	12.5 ml
4	H_2O osmosée	37.35 ml
	Total	50ml

Mélanger et filtrer cette solution avant utilisation avec une seringue 50 ml fixée à un filtre millipore 0,22 µm.
Récupérer la solution de blocage dans un étui plastique
Transférer les lames dans cette solution et laisser incuber 1 heure à température ambiante
Rincer les lames dans de l'eau osmosée 1 min et sécher les par centrifugation 7 min à 700rpm ou 2 min à 1200 rpm.

3. HYBRIDATION STATIQUE SOUS LAMELLE

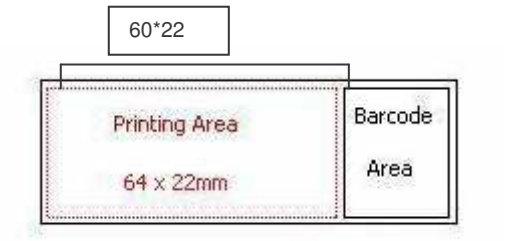
Alternative : Si vous disposez de chambre d'hybridation de type Agilent (hybridation en mouvement) dans four Agilent suivre les indications du protocole intitulé « Amplification ARNm et hybridation » sur le site Mediante p7 et p 8 (attention volume finale de reprise des ARN marqués 500µl et hybridation à 60°C)

Penser à :
- Chauffer un bain marie à 5O °C et mettre de l'eau à bouillir
- Faire chauffer le tampon d'hybridation à 50°C

Préparer et filtrer sur Millipore 0.22µm le mix d'hybridation 1X (stocké à –20°C) :

Mix d'hybridation 1X:
2X SSC
0.1% SDS
0.1% ADN de sperme de saumon

Reprendre le culot séché dans 50 µl de ce mix d'hybridation préchauffé, si la zone de dépôt est grande (c'est le cas pour les lames oligos que vous détenez).



Vortexer et laisser incuber à 42°C de façon à ce que le culot soit bien repris

Remarque : cette étape est très importante, le culot doit être bien repris. Ne pas hésiter à vortexer longtemps et à dissoudre le culot à l'aide de la pipette. Pour faciliter la dissolution, maintenir à 42°C jusqu'à ce que le culot soit bien repris.

Centrifuger à 13000rpm chaque tube contenant les cDNA afin d'éliminer les bulles.
Placer l'échantillon 2 min dans l'eau bouillante.
Attention : *à ce stade, une bulle a des conséquences négatives sur le bruit de fond. Il est conseillé d'éliminer les bulles (même petites) de la solution d'hybridation en re centrifugeant les tubes 1 min à 13000rpm.*

Sortir les chambres à hybrider (1 par lame) , les jointures, et les lamelles 22*60 mm
Placer une goutte d'eau (15µl) dans les 2 puits de chaque chambre d'hybridation.
Placer la lamelle sur un support en hauteur bien sec.
Déposer sur toute la longueur de la lamelle le mélange d'ADNc le plus rapidement possible mais sans précipitation.

Approcher délicatement la lame, face de dépôt (côté étiquette) au contact de la solution d'hybridation déposée sur la lamelle
Retourner la lame délicatement et placer la lame dans la chambre d'hybridation face de dépôt vers le haut.

Remarque : ne pas retoucher la lamelle une fois qu'elle est en place

Refermer la chambre de façon hermétique.
Placer la chambre dans un bain marie à 50°C (faire attention à ce qu'elle soit bien à plat)
Incuber de 8 à 16h.

4. LAVAGES DES LAMES APRES HYBRIDATION (J+1)

Penser à :
-Allumer le scanner

Préparer 650 ml de solution de lavage n°1 :2X SSC, 0.1%SDS

20X SSC	65ml
20% SDS	3.25ml
H2O	581.75ml

Verser 150ml de cette solution dans un petit bac à coloration en verre et le reste dans un grand bac.
Ouvrir la chambre d'hybridation qui était à 50°C , transférer la lame dans un support en acier (le même qui sert à la centrifugation) et plonger la lame le plus rapidement possible dans les 150ml du petit bain n°1 pour enlever la lamelle (plusieurs lames peuvent être laver en même temps)
Transférer la lame sans lamelle dans le grand bain n°1
Placer sur agitateur orbital 5 min à l'abri de la lumière

En attendant, préparer 250 ml de solution de lavage n°2 : 1X SSC

20X SSC	12.5ml
H2O	237.5ml

Verser 250ml du bain n°2 dans un grand bac à coloration en verre
Transférer les lames du bain n°1 dans le bain n°2 et placer sur agitateur orbital 5 min

Préparer 250 ml de solution de lavage n°3 : 0.2X SSC

20X SSC	2.5ml
H2O	247.5ml

Verser 250ml du bain n°3 dans un grand bac à coloration en verre
Transférer les lames du bain n°2 dans le bain n°3 et placer sur agitateur orbital 5 min

Préparer 250 ml de solution de lavage n°4 : 0.05X SSC

20X SSC	0.6ml
H2O	249.4ml

Verser 250ml du bain n°4 dans un grand bac à coloration en verre
Transférer les lames du bain n°3 dans le bain n°4 et placer sur agitateur orbital 5 min

Sécher les lames par centrifugation à 700rpm 7 min ou en utilisant une bombe à air de type « Gaz sec » ODP « O » (Fournisseur Jelt)

Vos lames sont prêtes à être lues par un scanner **(lire vos lames étiquette vers le haut sinon le fichier d'analyse fichier.gal à télécharger sur le site Mediante ne sera pas compatible).**

Contrôle Qualité des ARN				
Catégorie	**Fournisseur**	**Produit**	**Conditionnement**	**Référence**
Puce	Agilent	RNA 6000 Nano Labchip Kit	kit	5065-4476
Réactif	Ambion	RNA 6000 ladder	3x20µl	7152
Amplification des ARN				
	Ambion	**Kit Amino Allyl MessageAmp TM II Arna Amplification (#1753)**		

Marquage - Hybridation				
Catégorie	**Fournisseur**	**Produit**	**Conditionnement**	**Référence**
Fluorochrome	Amersham	Cy3-Monoreactive Dye Pack	5	PA23001
Fluorochrome	Amersham	Cy5-Monoreactive Dye Pack	5	PA25001
Réactif	Eurobio	DMSO	1L	GAUDMS00-07
Purification	Macherey-Nagel	Nucleospin Extract ou autre système de Purification (ex :Qiagen)	250p	740 590.250
Réactif	Amersham	Poly(dA)	100 A260 units	27-7836-03
Réactif	Invitrogen	Yeast tRNA	50mg	15401029
Réactif	Invitrogen	Yeast tRNA	25mg	15401011
Réactif	Invitrogen	ADN Cot1 humain	500µg	15279011
Réactif	Invitrogen	ADN Cot1 murin	500µg	18440016
Réactif	Eurobio	20X SSC	1L	GHYSSC00-07
Réactif	Eurobio	20% SDS	1L	GHYSDS02-07
Purification	Dutscher	Seringue Terumo sans aiguille 5mL	100	50006
Purification	Dutscher	Seringue Terumo sans aiguille 50mL	100	50012
Traitementlame	Sigma	Ethanolamine		E9508
Traitementlame	Sigma	Acide borique		B6768
Hybridation	Sigma	Sperme de saumon		D9156
Purification	Dutscher	Filtres seringue 0,22µ AC diam.33mm stériles	50	146560
Lamelles	Sigma	Hybrislips 22x60mm	100	Z37027-4