

PROTOCOLE DE MARQUAGE DE L'ADN POUR MICROARRAYS

- Mélanger par aspiration/refoulement dans chaque tube Eppendorf placé dans la glace :

ADN (0,5 - 1 μ g)	dans vol max de 18 μ l
oligonucléotides pd(N) ₆	1,5 μ l
H ₂ O	qsp 19,5 μ l
- Incuber à 95°C pendant 3 min afin de dénaturer l'ADN.
- Centrifuger pendant quelques secondes puis mettre dans la glace. Ajouter dans l'ordre :

tampon 10 X	3 μ l
mélange des 4 dNTP	3 μ l
dUTP-Cy (Cy5 : test, Cy3: témoin)	3 μ l
<i>Klenow</i> exonucléase free (10 unité/ μ l)	1,5 μ l
- Mélanger par aspiration/refoulement. Incuber à 37°C pendant au moins 1 h. La sonde peut être conservée à -20°C.

PROTOCOLE DE PURIFICATION DE L'ADN MARQUE

- Mélanger dans le même tube les 2 sondes Cy3 et Cy5.
- Insérer la colonne dans le tube de récupération.
- Remplir le réservoir de la colonne avec 440 μ l d'eau sans toucher le filtre avec la pipette.
- Ajouter le mélange des sondes (60 μ l) et fermer le tube.
- Centrifuger à 1000 g pendant 15 min.
- Placer le réservoir dans un nouveau tube.
- Ajouter 20 μ l d'eau distillée sans toucher la membrane afin d'éluer l'ADN purifié.
- Retourner le réservoir (partie blanche en haut) et centrifuger à 1000 g pendant 2 min.
- Prélever 2 μ l d'ADN purifié pour déposer sur gel d'agarose.
- Placer le tube au SpeedVac jusqu'à ce qu'il ne reste qu'un fond d'eau (~5 μ l).

TEST DU MARQUAGE

- Mélanger les 2 μ l d'ADN purifié avec 3 μ l d'eau et 1 μ l de tampon de charge xylène-cyanol
- Déposer sur un minigel d'agarose à 1%
- Migration 30 min à 80 volts
- Visualisation des produits de marquage sous UV 260 nm