

## **HYBRIDATION PUCES A ADN**

### **PRINCIPE**

La technologie des puces à ADN (microarrays) consiste à déposer sur des lames de verre des sondes constituées de produits PCR ou d'oligonucléotides longs (50mer-70mer) à des densités pouvant atteindre 6000 dépôts par cm<sup>2</sup>. Ces lames sont ensuite hybridées avec des cibles fluorescentes (cDNAs ou ADNs génomique). Les molécules fluorescentes les plus couramment utilisées appartiennent à la famille des cyanines, Cy3 et Cy5. Après hybridation, les signaux d'hybridation sont détectés à l'aide d'un scanner de fluorescence. L'utilisation de deux fluorochromes différents permet la détermination des signaux d'hybridation de deux souches distinctes au cours d'une seule expérience.

Une fois les intensités d'hybridation obtenues, un important travail d'analyse des données est nécessaire pour en extraire les informations biologiques.

### **MATÉRIEL**

- Bain marie à 42°C
- Casette d'hybridation pour puces à ADN
- Scanner
- lamelles 25 x 60
- Station de lavage ou Jarres de Coplin

### **SOLUTIONS**

- Solution de blocage préchauffée à 42°C :

SSC	5 X	pour 50 ml	12,5 ml de 20X
SDS	0,1%		0,5 ml de 20%
BSA (Sigma A-9576)	1%		1,66 ml de 30%
- Solution d'hybridation DIG Easy Hyb (Roche-Applied Science)
- Solution de lavage 1 préchauffée à 42°C :

SSC	1 X	pour 50 ml	2,5 ml de 20X
SDS	0,2%		1 ml de 20%
- Solution de lavage 2 :

SSC	0,1 X	pour 50 ml	250 µl de 20X
SDS	0,2%		1 ml de 20%
- Solution de lavage 3 :

SSC	0,1 X	pour 50 ml	250 µl de 20X
-----	-------	------------	---------------

### ***PROTOCOLE DE PREHYBRIDATION DES PUCES***

- Cette étape ne doit pas être faite plus de 2 h. avant d'être prêt pour l'hybridation. Les lames ne peuvent être conservées plus de 3 h.
- Mettre la puce à ADN dans un tube Falcon contenant 50 ml de la solution de blocage préchauffée. Incuber à 42°C pendant 45 min.
- Remplir 5 tubes Falcon avec de l'eau distillée et 1 tube avec de l'isopropanol.
- Rincer la lame cinq fois dans de l'eau distillée (effectuer 10 retournements du tube pour chaque étape de rinçage).
- Rincer la lame dans de l'isopropanol (effectuer 10 retournements du tube) puis laisser sécher verticalement sur un mouchoir non "peluchable".
- Ranger la lame dans une boîte à l'abri de la poussière avant l'hybridation.

### ***PROTOCOLE D'HYBRIDATION DES PUCES***

- Mélanger les 5 µl d'ADN marqué avec 45 µl de solution DIG Easy.
- Dénaturer la sonde 2 min à 95 °C, placer dans la glace.
- Positionner lame contre lamelle (côté spots) et déposer la sonde par capillarité.
- Placer la puce à ADN dans une chambre d'hybridation, ajouter 15 µl d'H<sub>2</sub>O dans les fentes de la cassette pour humidification.
- Fermer hermétiquement la chambre d'hybridation et l'immerger à 42 °C pendant la nuit.

### ***PROTOCOLE DE LAVAGE DES PUCES***

- Retirer la puce à ADN de la chambre et la placer dans un tube Falcon contenant 50 ml de la solution de lavage 1 préchauffée. Attention à la lamelle qui va se détacher. Une fois qu'elle est tombée dans le liquide, retourner la lame pour éviter que la lamelle ne se retrouve en contact avec les spots de la puce.
- Rincer la lame dans la solution de lavage 2 puis 3 (effectuer 10 retournements du tube pour chaque étape de rinçage).
- Essorer la puce en la plaçant dans un tube Falcon 50 ml contenant un morceau de papier absorbant et centrifuger à 500 g pendant 3 min.
- Scanner la puce