



FONCTIONNEMENT ET RECOMMANDATIONS DE LA PLATE-FORME

La Plate-forme Biopuces réalise vos expériences depuis le dépôt des sondes sur des lames de verre jusqu'à l'analyse des images générées ou met à votre disposition l'équipement nécessaire pour réaliser vos expériences. Avant tout démarrage de projet, il est nécessaire de contacter soit la responsable Véronique Le Berre (leberre@insa-toulouse.fr).

Afin de répondre au mieux à votre demande, nous définissons ensemble le contenu des expériences à réaliser. A l'issue de notre discussion, vous remplissez la partie de la fiche projet qui récapitule les expériences que vous nous demandez d'effectuer, vous la signez et vous nous l'envoyez ainsi que vos échantillons.

Vos échantillons d'ARN sont contrôlés. S'ils ne sont pas corrects nous attendons de votre part que vous nous fassiez parvenir des échantillons qui permettent de réaliser votre demande.

S'ils sont corrects nous vous communiquons une proposition de facture. En retour vous nous faites parvenir un bon de commande pour la facturation. Vos expériences sont alors planifiées et réalisées et vos résultats vous sont envoyés.

Bien entendu si à une étape nous rencontrons des difficultés nous vous en faisons part et nous décidons ensemble de la suite à mener.

Fabrication des puces

Nous disposons à la Plate-forme d'un certain nombre de biopuces de systèmes biologiques (<http://biopuce.insa-toulouse.fr/projet.php>) que vous pouvez utiliser pour votre projet.

Nous réalisons aussi vos puces à façon après avoir défini ensemble leur contenu, le système biologique, le type de sondes, le nombre de dépôts, le choix du tampon de dépôt, le type et la quantité de lames à produire.

Vous pouvez aussi nous fournir les plaques contenant les sondes à spotter ainsi que les lames support des puces pour votre organisme d'étude.

Le robot spotteur utilisé pour le dépôt sérié des oligonucléotides ou des ADNc sur lames de verre est le « QArray mini » de chez Genetix. Il est équipé au maximum de 48 aiguilles, creuses (Telechem SMP3) ou plates (Telechem SSP015).

Les lames que nous utilisons possèdent un code-barres permettant :

- Une identification unique de chaque lame
- Une orientation de la lame.

En routine, les lames sont spottées avec le code-barres vers le bas.

Le fichier « *.gal » (plan de dépôt des sondes sur la puce) est disponible et téléchargeable sur le



FONCTIONNEMENT ET RECOMMANDATIONS DE LA PLATE-FORME

site web de la Plate-forme (<http://biopuce.insa-toulouse.fr/public/>). Sa localisation exacte est inscrite sur le bon de livraison avec les lames lors de leur envoi. Pour toutes demandes relatives au fichier « *.gal », veuillez vous adresser à la responsable Production Lidwine Trouilh (lidwine.trouilh@insa-toulouse.fr) ou à la responsable Informatique Delphine Labourdette (delphine.labourdette@insa-toulouse.fr) de la Plate-forme.

Contrôle qualité du spotting

La qualité du spotting est déterminée par :

-Un premier scan juste après dépôt. Ce scan est réalisé sur chaque lame avant et après rechargement des aiguilles

- un test Panomer qui permet de vérifier la présence, l'intensité globale, la forme des spots ainsi que l'absence de signaux dans les spots contrôles négatifs et l'intensité du bruit de fond. Il consiste en une hybridation avec le « Panomer™ 9 random oligodeoxynucleotide, Alexa Fluor® 555 conjugate » (Réf. P21687 de chez Invitrogen) sur la première lame du lot.

Selon le test contrôle-qualité défini ci-dessus, le lot de lames est validé lorsque 95% des spots attendus sont présents.

La dernière lame du lot est conservée à la Plate-forme afin de réaliser des contrôles supplémentaires si le besoin se présente.

Stockage des lames

Nous recommandons de conserver les lames dans un dessiccateur à température ambiante et de les utiliser dans l'année suivant la réception.

Extraction et contrôle qualité des ARNs

Nous **ne réalisons pas** les extractions des ARN mais nous mettons à disposition sur le site web de la Plate-forme (<http://biopuce.insa-toulouse.fr/protocoles.php>) des protocoles éprouvés dans différents laboratoires sur différents systèmes biologiques. Les ARN doivent nous être livrés congelés dans de l'eau.

Les contrôles qualité réalisés sur puces « RNA 6000 Lab-on-Chip » de chez Agilent (Bioanalyzer) et sur le « Nanodrop™ » permettent une validation qualitative et quantitative des ARNs..

Les ARNs sont contrôlés d'abord sur le « Nanodrop™ ». Le minimum requis est :

- un **ratio 260nm/230nm et 260nm/280nm > ou égal à 1,8**
- une **concentration minimale d'échantillon** nécessaire pour le marquage choisi (celle-ci est fournie dans les recommandations d'utilisation du fournisseur du kit).

Si la qualité des ARNs est validée au « Nanodrop™ », les ARNs sont contrôlés au « Bioanalyzer » sur puces AGILENT « RNA 6000 Lab-on-Chip ».

Un ARN de qualité correcte et utilisable dans une expérience de puce à ADN doit avoir :

- un ratio **18S/28S** > ou égal à **1,7** pour les **Eucaryotes** ou un ratio **16S/23S** > ou égal à **1,2** pour les **Procaryotes**
- un **RIN (RNA Integrity Number)** > ou égal à **9** pour les **cellules** et > ou égal **8** pour les **tissus** (uniquement valable pour les eucaryotes)

Marquage et contrôle du marquage

Nous utilisons les Kits « ChipShot™ Direct Labeling and Clean-Up System » (Réf. Z4100 de chez Promega) et « QuickAmp Labeling Kit » (Réf. 5190-0444 de chez Agilent).

Pour le marquage Promega une quantité de 5µg (soit une concentration minimum de 300ng/µl) est nécessaire. Le marquage Agilent fait intervenir une étape d'amplification et n'est valable que pour des ARN polyA (pour les Eucaryotes), nécessitant une quantité d'ARN minimale de 300ng.

Chaque marquage est contrôlé au « Nanodrop™ » afin de déterminer la quantité de cDNA (ou cRNA) produite et la quantité de fluorochrome incorporé.

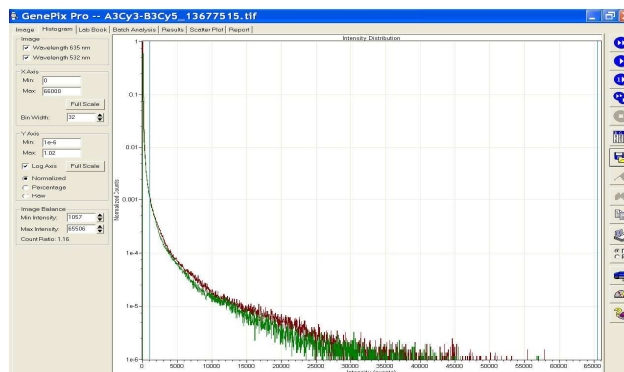
Hybridation

Les hybridations réalisées sur la Plate-forme sont faites en chambre d'hybridation automatique (« Discovery » de chez Ventana) ou four Agilent selon les spécifications de ces distributeurs.

Si vous réalisez vous même vos hybridations manuelles dans votre laboratoire, merci de vous référer au manuel d'instruction du kit de marquage utilisé.

Scan

Nous recommandons de scanner les lames en choisissant les PMT du scanner de telle sorte que les courbes d'intensités dans le canal rouge et le canal vert soient le plus superposées possible et que ces courbes « s'éteignent » autour de 50000 sur l'axe des abscisses afin d'éviter la saturation tout en ayant la gamme dynamique la plus large possible.



Analyse d'image

Les analyses d'images peuvent être réalisées sur la Plate-forme par la responsable Informatique Delphine Labourdette (delphine.labourdette@insa-toulouse.fr) ou par vous même. Les logiciels à votre disposition sont soit GenePixPro (axon), soit Mapix (Innopsys), soit FeatureExtraction (Agilent), soit XDotReader (Cose) pour les membranes. Il en résulte des fichiers résultats et des images au format .jpg, qui peuvent être exploités avec le logiciel de votre choix. Ces données peuvent aussi être pré-formatées afin d'être exploitables par les logiciels BioPlot/Bioclust disponibles sur le site web de la Plate-forme.

Remarques importantes

- Les échantillons seront stockés par la plateforme durant la durée du projet dans des congélateurs « -20°C » et des réfrigérateurs. Le responsable du projet est invité à récupérer ses échantillons à la fin de la réalisation du projet, si non ces derniers seront conservés pendant un mois avant d'être jetés à la poubelle.
- Nos congélateurs et réfrigérateurs ne sont pas reliés à un système de suivi des températures.
- En moyenne à partir du moment où le contrôle qualité des ARN est validé les expériences sont réalisées dans un délai de 4 semaines.
- La durée de stockage des données de scan et d'analyse d'image est de 1 an et 5 ans pour les données de Bioplot. Au delà les données sont archivées sur des supports DVD.
- Nous vous remercions de bien vouloir accuser réception de vos données et/ou échantillons.
- Merci de prendre connaissance du plan d'évacuation de la plateforme

