

FAQ

- **Il n'y a aucun spot allumé sur la lame après hybridation**

- 1- Tester l'intégrité des ARN
- 2- Tester la qualité de l'incorporation des fluorochromes
 - Verifier l'activité de la RT
 - Verifier l'incorporation du cy5 sur la puce du BioAnalyser Agilent
 - Bien reprendre les culots après purification
- 3 -Revoir le traitement des lames
 - La réhydratation a-t-elle été suffisante ?
 - Le borate de sodium est-il au bon pH, a-t-il été fait avec de l'acide borique ajusté à pH 8 avec de la soude et non pas avec du borax de sodium ?

- **Il y a des spots sur la lame après hybridation mais faiblement allumés**

- 1- Tester l'intégrité des ARN
- 2- Tester la qualité de l'incorporation des fluorochromes
 - Verifier l'activité de la RT
 - Tester l'incorporation du cy5 sur la puce du BioAnalyser Agilent
 - Bien reprendre les culots après purification

- **Après marquage, le culot n'est pas coloré**

Il n'est pas indispensable que le culot soit coloré pour que l'expérience soit réussie

- **Le bruit de fond est important**

Différencier un bruit de fond de la lame d'un bruit de fond de l'expérience (intensité des spots des contrôles négatifs, en absence d'ADN)

- 1- Revoir le traitement des lames
- 2- Effectuer des lavages plus stringents ou relaver les lames, éventuellement en DMSO ou en H₂O
- 3- Vérifier que les lames ne sont pas spottées depuis trop longtemps (Plus de 3 mois)
- 4- Eviter le séchage intensif des lames durant l'hybridation

- **L'image est de qualité médiocre, tache, traces, bulles...**

- 1- Effectuer des lavages plus stringents ou relaver les lames, éventuellement en DMSO ou en H₂O
- 2- Ne pas laisser sécher les lames entre les lavages
- 3- S'assurer que le volume d'hybridation est suffisant
- 4- Ne pas retoucher la lamelle après montage
- 5- Ne pas décoller la lamelle avec un scalpel
- 6- Vérifier que la chambre d'hybridation est bien à plat pendant l'incubation

- **L'image en cy3 est beaucoup plus intense que celle en cy5**

C'est ce qui généralement observé en marquage direct. Cependant tester :

- 1- Le rendement de marquage de la cible en cy5 pour voir s'il n'est pas trop faible
- 2- Revoir les paramètres de scan
- 3- Vérifier si la quantité d'ARN marquée pour les 2 fluorochromes est bien équivalente

- **L'image en cy5 est beaucoup plus intense que celle en cy3**

1- Revoir les paramètres de scan

2- Vérifier si la quantité d'ARN marquée pour les 2 fluorochromes est bien équivalente

- **Les spots TE/DMSO s'allument**

Combien de spots s'allument ? Si c'est un nombre conséquent, revoir les conditions de lavage

- **Quelle méthode de préparation des ARN utiliser ?**

Nous conseillons une préparation des ARN totaux sur colonne RNeasy de Qiagen. Néanmoins, si les ARN ont été préparés par une autre méthode (gradient de chlorure de césium, Trizol etc...), ils peuvent être utilisés mais nous conseillons de les passer sur colonne RNeasy de Qiagen en fin de préparation.

- **Les gènes d'intérêt pour mon étude sont-ils sur la puce ?**

Nous pouvons vérifier leur présence dans notre base de données

- **Peut-on rajouter des gènes d'intérêt sur la puce ?**

Uniquement sous forme de 96 clones ordonnés dans une plaque de microtitration. Tous les inserts devront pouvoir être amplifiés par PCR avec le même couple de primers.