



Solution de Préhybridation :

Eau	<b>73,35 ml</b>
20X SSC	<b>15,75 ml</b>
10% SDS	<b>900 µl</b>
BSA	<b>0,9 g</b>

- Chauffer la solution de préhybridation à 50°C dans un Bain Marie
- Incuber les lames dans la solution de préhybridation à 50°C pendant 1 h.
- Tremper les lames dans 50 ml d'eau distillée.
- Tremper les lames dans 50 ml d'isopropanol
- Sécher les lames par centrifugation 7 min à 600 rpm puis les conserver dans une boîte propre et à l'abri de la lumière.

## **HYBRIDATION**

- Préparer 140µl de tampon d'hybridation (10 hybridations) :

H <sub>2</sub> O	<b>20µl</b>
Formamide	<b>100µl</b>
50X Denhardts	<b>10µl</b>
10% SDS	<b>10µl</b>

*Filtrer sur colonne millipore*

- Bien reprendre le culot dans :

Tampon d'hybridation **14 µl (21 µl + 9 µl SSPE pour grandes lamelles)**  
SSPE **6 µl**

- Dénaturer 3 min à 100°C puis mettre 5 min dans la glace.
- Maintenir à 42°C le temps d'être prêt à hybrider.
- Mettre 15 à 20 µl d'eau dans chaque puits de la chambre d'hybridation (Corning)

● Déposer la solution d'hybridation contenant le mélange d'ADNc marqué sur une lamelle puis approcher la lame délicatement, celle-ci venant adhérer à la lamelle au contact avec la solution d'hybridation qui s'étale alors d'elle même entre lame et lamelle.

**éviter les bulles et ne jamais retoucher la lamelle une fois le montage effectué.**

● Mettre le montage ainsi effectué dans la chambre d'hybridation et fermer de façon hermétique. Laisser à 42 °C pendant 1 nuit à l'obscurité.

**NB :** Faire attention à ce que la chambre à hybrider soit bien à plat pendant toute la durée de l'hybridation.

---

### **JOUR 3**

#### **LAVAGES**

##### **Solution 1 :**

20X SSC	5 ml
SDS 10%	10 ml
Eau	985 ml

##### **Solution 2 :**

20X SSC	5 ml
Eau	995 ml

● Ouvrir la chambre d'hybridation, mettre la lame sur un portoir et plonger rapidement le portoir dans 10 ml de solution 1 à RT pour décoller la lamelle, puis plonger le portoir dans le reste de solution 1 pendant 15 min à RT

● Transférer le portoir dans 500 ml de solution 2 pendant 15 min à RT.

● Transférer le portoir dans 500 ml de solution 2 pendant 15 min à RT.

● Sécher les lames à 600 rpm pendant 7 min.

Stocker dans une boîte à l'abri de la lumière et de la poussière.

Scanner

