

Agilent Array Hybridisierungs-Protokoll

Vorbereitungen:

- Vorlaufzeit Hybridisierungssofen 65°C beachten!
- Die zu verwendenden Volumina hängen von der Plex-Anzahl ab!

10x Blocking Agent vorbereiten (wenn nicht noch etwas da ist)

- 500 µL Nuklease-freies Wasser zu 10x Blocking Agent lyophilisiert
- vortexen
- kurz anzentrifugieren, aliquotieren
- Lagerung bei -20°C bis aufgebraucht

Probenvorbereitung

Table 5 mix for 4x44K or 2x105K microarrays

Components	Volume/ Mass 2x105K	Volume/ Mass 4x44K
cyanine-labeled, mix (Sonde)	µL	µL
10X Blocking Agent	25 µL	11 µL
Nuclease-free water	bring volume to 125 µL	bring volume to 55 µL
Total Volume	125 µL	55 µL

Zum Schluss 2x GEx Hyb.puffer HI-RPM

max. Volumen der sonde?

Table 7 Hybridization mix

		Volumes per hybridization		
Components		2x105K	4x44K	8x15K
cRNA	Mix	125 µL	55 µL	25 µL
2x GEx Hybridization Buffer HI-RPM		125 µL	55 µL	25 µL

- mischen durch Auf-und Abpipettieren
- zentrifugieren 1 min bei 13000 rpm
- unverzüglich Array beladen

aufkodieren?

Table 8 Hybridization Sample

Components	Volumes per hybridization				
	1x22K	1x44K	1x244K	2x105K	4x44K
Volume Prepared	500 μ L	500 μ L	500 μ L	250 μ L	110 μ L
Hybridization Sample Volume	490 μ L	490 μ L	490 μ L	245 μ L	100 μ L

↑

Array beladen

- Slide mit dem Label nach oben in die Agilent Hybridisierungskammer legen
- Sonden in die Mitte der jeweiligen Kammer laufen lassen (vorsichtig! Nicht die Ränder berühren)
- Vorsichtig den Array (mit dem numerischen Barcode nach oben; Agilent Barcode nach unten) auflegen.
- Kammer einspannen und festziehen
- Es sollte mindestens eine frei bewegliche Luftblase in jeder Kammer zu erkennen sein
- Im Hybridisierungssofen bei 65°C über Nacht (17h) hybridisieren
- Waschpuffer 2 über Nacht bei 37°C vorwärmen

Waschschritte nach der Hyb.

- Alle Kammern gut mit Milli-Q-Wasser ausspülen und trocknen
- 3 Kammern benötigt:
 1. mit Waschpuffer 1 füllen
 2. mit Waschpuffer 1 füllen (mit Rührfisch)
 3. mit Waschpuffer 2 füllen (erst im 2. Schritt einfüllen, da 37°C; mit Rührfisch)
- Kammer 2 und 3 auf Magnetrührer mit Rührfisch
- Waschpuffer 1 in Kammer 1 und 2 füllen
- Slide aus der Hybridisierungskammer nehmen und in Kammer 1 mit Waschpuffer 1 tauchen
- Mit stumpfer Pinzette zwischen den zwei Slides aufhebeln
- Sofort den Array in Kammer 2 mit Waschpuffer 1 überführen (auf Halterung)
- 1 min inkubieren
- Währenddessen Waschpuffer 2 in Kammer 3 einfüllen
- Array 1 min in Waschpuffer 2 inkubieren (Halterung)
- Danach Abtropfen lassen und einscannen

Falcon?

Zentrifugieren?

Letzter Waschpuffer mit Triton, langsam rausziehen → Chips trocknen