Guide d’adaptation des protocoles manuels sur le logiciel Flo400

Sommaire

Avant propos: 3
Les adaptations de protocoles et d'expériences 4
Légende : 4
Généralités sur les Protocoles (ISH, IHC et FISH) 4
Etape du logiciel pour les modifications du protocole (ISH, IHC et FISH) : 4
Temps et Cycles de Lavage (ISH, IHC et FISH) 5
Temps de passage des réactifs : 5
Rinçages : 5
Concentration des Réactifs -exceptés Sondes et Anticorps-(ISH, IHC et FISH) 5
Anticorps et Sondes ARN (ISH, IHC et FISH): 6
Concentration 6
Sondes ARN (ISH et FISH) 6
Sondes Anticorps (ISH, IHC et FISH) 6
Préchauffage des sondes ARN (ISH et FISH) 6
Durée d'Hybridation sondes ARN et Anticorps (ISH, IHC et FISH) 6
Exemple des adaptations autour d'un protocole d'Hybridation *in situ* : 7
Traitement des embryons : 7
Hybridation : 8
Détection par Anticorps : 9
Lavage de l'automate : 10
Contact : 11

Avant propos:

Ce Robot pour les expériences de biologie à haut débit est conçu pour l'automatisation des techniques **d'hybridation in situ, d'immunohistochimie et d'hybridation in situ en fluorescence** sur des échantillons in toto (400µm < X < 3cm) Le Robot FLO400 permet un recyclage des réactifs, notamment sondes ARN et Anticorps, les concentrés sont donc réutilisables. Cette spécificité - liée au processus interne breveté du FLO400 - permet d'obtenir un très bon rapport Signal / bruit de fond lors de la visualisation des résultats sur les échantillons. A noter que la concentration des sondes est largement inférieure à celle utilisée dans des conditions conventionnelles (manuel).

Le Robot Automate FLO400 accepte l'ensemble des réactifs du marché.

Ce guide est une **aide pour l'adaptation des protocoles manuels de laboratoires sur le Robot Automate Flo400**. Il présente un ensemble de recommandations et solutions pour une **optimisation de vos protocoles et expérience ainsi que la sauvegarde des éléments clés**.

Les protocoles pré-enregistrés dans le robot Flo400 ont été mis en place à l'aide de cette méthode et ont été testés et approuvés par un panel de référence de laboratoires de recherches internationaux.

Pour l'utilisation générale du Flo400, vous pouvez vous référer à la notice d'utilisation disponible sur le site web de la société (www.flogentec.com) rubrique guide d'utilisation.

Les adaptations de protocoles et d'expériences

Légende :

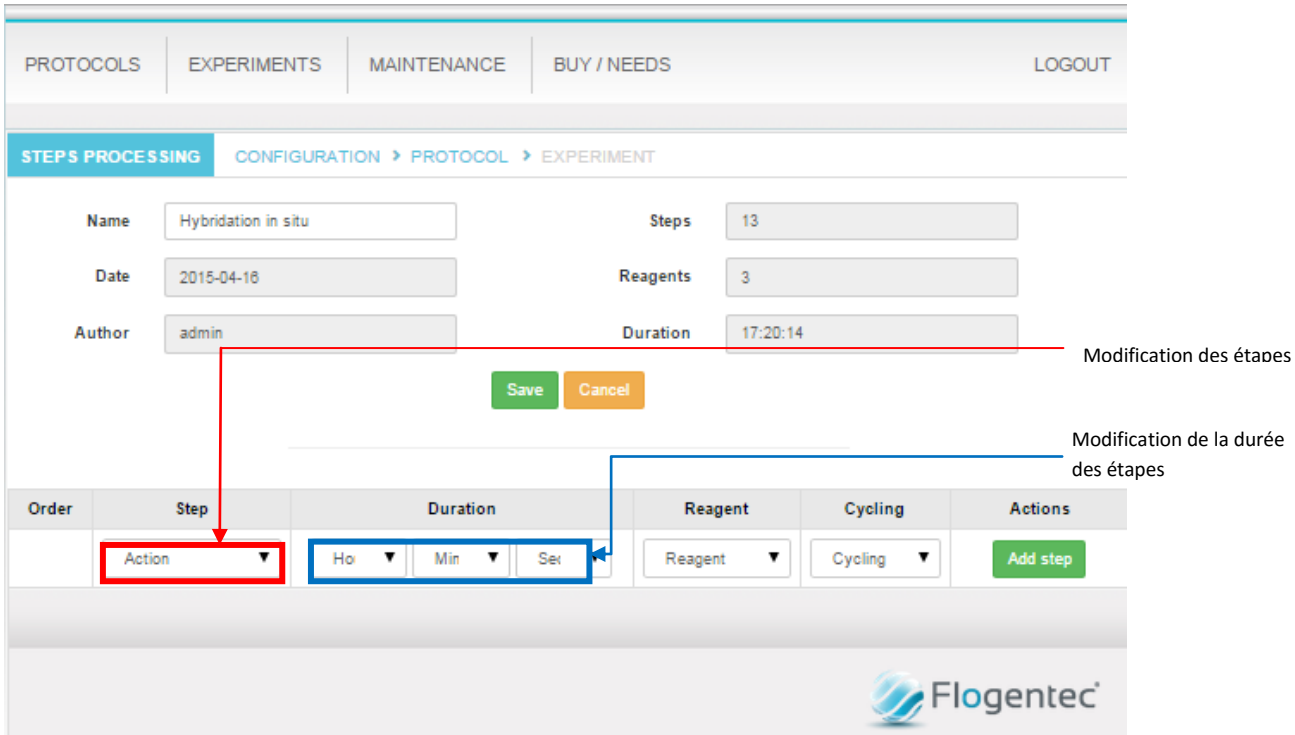
Les adaptations présentées ci-dessous ont été établies à partir de protocoles classiques d'ISH IHC et FISH. Elles vous aideront à adapter des protocoles spécifiques ou de routine sur le FLO400. Il est spécifié entre parenthèse pour chaque rubrique le protocole sur lequel s'effectue les modifications.

- Le protocole manuel sera illustré par l'image :
- Le protocole Flo 400 par l'image :
- Les explications Spécifiques par l'image :

Généralités sur les Protocoles (ISH, IHC et FISH)

Etape du logiciel pour les modifications du protocole (ISH, IHC et FISH) :

Les modifications de protocoles sont à effectuer lors de la mise en place étape par étape de ce dernier sur le logiciel du robot Flo 400.



99 Chemin de Huguenots – 26000 Valence - France
TVA intra FR 60 505 187 682 - Siren 505 187 682 00021 RCS Romans
Tél +33 (0)9 51 94 78 43 – www.flogentec.com

Temps et Cycles de Lavage (ISH, IHC et FISH)

Temps de passage des réactifs :

De manière globale, le système de recyclage installé sur l'automate permet de réduire les ***temps de lavage et de passage des solutions*** aux **2/3 du temps** indiqué dans les protocoles manuels.

Rinçages :

Les rinçages rapides décris dans le protocole sont remplacés par un **passage de 5 minute** de la solution de rinçages **x le nombre de rinçages** indiqué dans le protocole.

Concentration des Réactifs -exceptés Sondes et Anticorps-(ISH, IHC et FISH)

Les ***concentrations des réactifs*** décrites dans le papier ne sont pas modifiées (excepté sondes et Ac, cf plus bas)

Les étapes de ***passage d'une solution similaire*** mais à une ***concentration plus faible***, sont supprimées.

? Ce retrait d'étape est possible par le système en flux permettant un retrait total de la solution précédente sans besoins de dilution de la solution. Ce principe s'applique également lors de l'alternance d'étapes similaires (excepté pour les étapes d'alternance substrat / réactif)

Anticorps et Sondes ARN (ISH, IHC et FISH):

Concentration

De manière générale, **plus la concentration et la force de liaison** sont importantes, moins le temps d'hybridation nécessaire sera long. Les concentrations utilisées (µg/mL) dans les publications peuvent être ***diminuées***.

Sondes ARN (ISH et FISH)

Diminution d'un **facteur 10** pour les ***sondes ARN***

Sondes Anticorps (ISH, IHC et FISH)

Dilution de 1/2500 pour ***les Anticorps I*** (IHC)
Dilution de 1/5000 pour ***les Anticorps II*** *(ISH, IHC et FISH)*.

? Cette performance est possible grâce au système de recyclage des sondes qui permet de réinjecter en continue les réactifs au sein de l'échantillon, favorisant les hybridations spécifiques et cassant les non spécifiques.

Préchauffage des sondes ARN (ISH et FISH)

Il n'est ***pas nécessaire de préchauffer les sondes avant l'hybridation*** (elles doivent être à température ambiante), par contre la ***température d'hybridation des sondes*** doit être réglée sur l'automate, 1 étape avant le passage de la sonde.

? Cela permet de chauffer les échantillons à la température d'hybridation. La solution contenant les sondes sera chauffée par passage au niveau de ces échantillons.

Durée d'Hybridation sondes ARN et Anticorps (ISH, IHC et FISH)

La durée de l'hybridation dépend de ***la sensibilité et de la concentration de la sonde***. En règle générale, la durée de cette étape peut être diminuée d'un facteur 6. Cette diminution est possible grâce au système de recyclage des sondes qui sont continuellement injectées dans l'échantillon. Si les sondes sont ***faiblement concentrées ou très sensibles***, nous vous conseillons d'augmenter le temps d'hybridation des sondes de 4 heures.

Exemple des adaptations autour d'un protocole d'Hybridation *in situ* :

Protocole de routine utilisé : Hybridation *in situ* sur des embryons de poulets, protocole proposé par le GEISHA In Situ Hybridization Project. Disponible ici

Nous considérons comme début du protocole applicable au Flo 400 les étapes suivants la phase de réhydratation des échantillons.

Traitement des embryons :

- *Lavez 2x 10 min dans du PBT frais.*

  Passage de PBT pendant 15 minutes

  ? Les phases de lavages sont remplacées par un passage de 2/3 du temps global.

- *Digestion des embryons par la protéinase K dans un volume de 20 mL*

Stages HH	*Traitement à la Proteinase K*
6 et moins	*0-15 min 10 µg/ml Proteinase K PBS*
7 à 10	*30 min 10 µg/ml Proteinase K PBS*
11 à 12	*30 min 10 µg/ml Proteinase K PBS*
14 à 18	*30 min 10 µg/ml Proteinase K PBS*
19 à 24	*30 min 20 µg/ml Proteinase K PBS*

Stages HH	***Traitement à la Proteinase K***
6 et moins	***0-10*** *min 10 µg/ml Proteinase K PBS*
7 à 10	***20*** *min 10 µg/ml Proteinase K PBS*
11 à 12	***20*** *min 10 µg/ml Proteinase K PBS*
14 à 18	***20*** *min 10 µg/ml Proteinase K PBS*
19 à 24	***20*** *min 20 µg/ml Proteinase K PBS*

Les concentrations de protéinase K utilisées ont été respectées, ce sont les temps d'incubations qui ont été réduits aux 2/3 de la durée.

? *Cette réduction de la durée est permise par le flux continu de l'automate qui permet une meilleure activité de la protéinase K*

- *Rincez 2x 10 min dans PBT suivi par 30 min Fixation. Rincer Brièvement 2x dans du PBT.*

  Passage de PBT pendant 15 minutes suivit par 20 minutes de fixation puis rincé par 10 minutes de PBT.

  ? *Comme indiqué plus haut, les temps de rinçage et de passage de la solution de fixation ont été réduits au 2/3 de la durée indiquée. Nous considérons par expériences qu'un passage*

de 5 minutes de la solution correspond à un bref rinçage dans un protocole manuel. Cela fait donc 2 brefs rinçages, soit 2 x 5 minutes de PBT.

- *Enlevez le PBT et ajoutez 1mL de mix pré hybridation et laissez les embryons couler. Remplacer avec du mix pré hybridation frais et laisser incuber à 65°C pour 2 heures.*

  Chauffer l'automate à 65°C et faites passer le Mix de pré hybridation pendant 1 heure.

  Le Flux continue de l'automate ainsi que la température constante délivrée permet de réduire de moitié le temps de pré hybridation.

Hybridation :

- *Ajouter 100-1000 ng de sonde anti sens par mL de prehybridation et incuber 48 heures à 65°C.*

  Cycler pendant 8 heures la solution de Sondes concentrées à 100 ng par mL sur les échantillons

  La durée de l'hybridation dépend de la sensibilité et de la concentration de la sonde. La durée de cette étape peut être diminuée d'un facteur 6. Cette diminution est possible grâce au système de recyclage des sondes qui sont continuellement injectées dans l'échantillon. Si les sondes sont faiblement concentrées ou très sensibles, nous vous conseillons d'augmenter le temps d'hybridation des sondes de 4 heures.

- *Lavez 3 x 20 minutes dans le mix de préhybridation chauffé à 65°C.*

- *Lavez 3 x 20 minutes dans le mix de préhybridation dilué au 10 ème à 65°C*

  Ces 2 étapes sont remplacées par un passage du mix de préhybridation pendant 40 minutes à 65°C.

  Nous avons établis par expérience que l'utilisation de solutions moins diluées n'est pas nécessaire lors de l'application du protocole sur l'automate.

- *Rincez 2 x 10 minutes avec du KTBT à RT.*

  Le chauffage de l'automate peut être arrêté à partir de cette étape.
  Cette étape a été modifiée par un rinçage au PBT d'une durée d'une heure.

  Le changement de réactif est compensé par la durée de l'étape de rinçage, les résultats restent tout aussi bons.

Détection par Anticorps :

- *Bloquez les embryons pendant 3heures à T° ambiante dans le KTBT contenant 20% de serum de mouton inactivé à 20% par température.*

- *Preabsorbez les fragments Fab anti-DIG-AP par dilution dans le sérum de mouton 20% puis ajoutez 3mg de poudre d'embryon de poulet par 500 µl de solution d'Ac. Incubez pour 2 heures à température ambiante avec agitation. Récupérez et diluez le surnageant à une concentration finale de 1 :2000 à 1 :4000 DIG AB/20% serum de mouton dans le PBT.*

- *Incubez les embryons dans la solution Ac anti DIG durant 3 heures à RT ou 1 nuit à 4°C.*

  Ces 3 étapes sont rassemblées par l'automate en 1 étape unique de cyclage de la solution Anticorps pour une durée de 7 heures à t° ambiante. Cette durée peut être diminuée ou augmentée de plus ou moins une heure suivant la spécificité des Ac et la taille des échantillons. Pour éviter un marquage trop important, ne laissez pas l'incubation avec les Ac plus de 12 heures.

  ? *Les protocoles manuels peuvent préconiser des durées d'hybridation à 4°C durant 24 ou 48 heures suivant le type d'anticorps utilisé. Ces durées peuvent être réduites jusqu'à une durée optimale de 7 heures, plus ou moins une heure suivant la concentration et l'affinité des anticorps.*

- *Lavez 5 fois 1 heure avec le KTBT dans un agitateur à RT*

  Cette étape est remplacée par un lavage de 3 heure à Température Ambiante

- *Rincez 5 x 15 minutes dans du NTMT frais.*

  Les échantillons seront conservés dans le NTMT à la fin des 20 minutes de passage de la solution dans la flowcell jusqu'à la coloration.

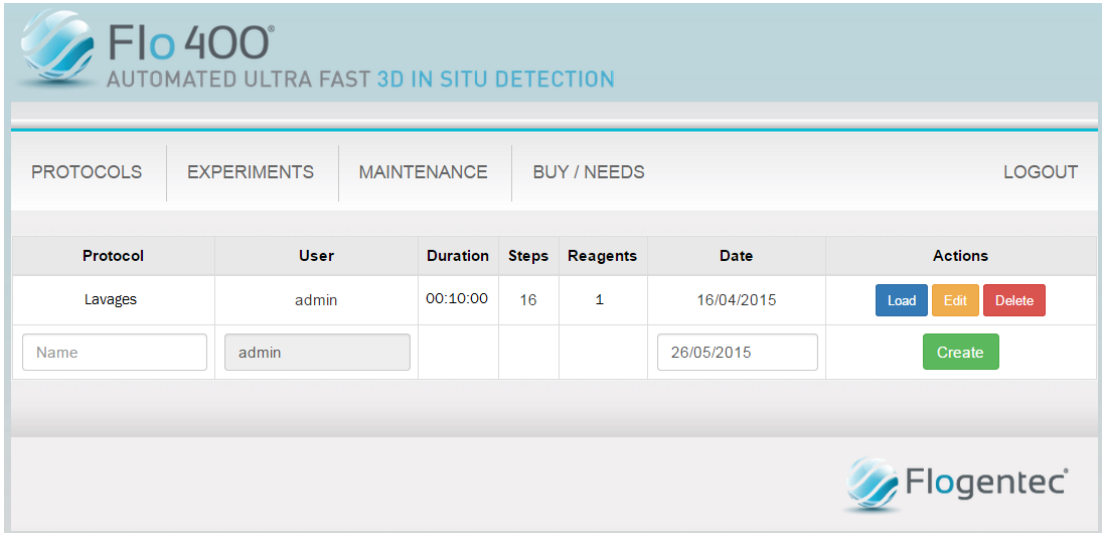
  ? *L'avantage du passage en flux est la certitude que la solution précédente d'Ac a totalement été enlevée, cela permet de diminuer grandement les temps de rinçages au NTMT.*

La suite du protocole ne s'effectue pas sur l'automate et permet la révélation de l'échantillon.

Lavage de l'automate :

Après expérience, nous recommandons un nettoyage de l'automate à l'aide du protocole enregistré au sein de l'automate. Pour rester dans un espace de travail RNAseFree, l'utilisation d'un RNaseZap ou similaire est recommandée.

Cette étape de lavage peut être suivie d'un rinçage à l'eau distillée ou au PBS.
Le protocole de lavage est accessible depuis la base de protocoles :



Contact :

Un conseil à distance peut être effectué par notre société en cas de demande. Nous restons à votre écoute aux coordonnées suivantes :

www.flogentec.com
Info@flogentec.com
Tél +33 (0)9 51 94 78 43
99 Chemin des Huguenots
26000 Valence
France