### **CYTOFLUOROMÉTRIE**

FACS = fluorescence-activated cell SCANNER

**Attention aux eppendorfs !** Ceux avec les rebords vont rehausser de 0,5 mm le positon de tube dans le cytomètre et ceci bloquera la sonde de ce dernier. Vous allez acquérir 0 évènements et vous serez triste.



1. Ensemencer une culture de cellules XXX à 35\*103/cm2 à 2\*105 cellules dans 1 ml de milieu de culture avec 10% FBS (MC) par puits de plaque de 6 puits.
2. Cultiver les cellules 24 heures dans l'incubateur (5% CO2; 37°C)

*Éviter l’utilisation d’un agent de sélection (p.ex. G418)*

* + Rincer la monocouche de cellules 2 fois avec 3 ml du PBS, afin d'enlever les cellules mortes. **TP**

|  |  |
| --- | --- |
| 1. Ajouter 150 ul de trypsine dans chaque puits, incuber selon le type cellulaire.
 | Ajouter 300 ul de VERSENE 1 dans chaque puits, incuber selon le type cellulaire. |
| 1. Neutraliser la trypsine avec 850 ul de MC
 | Enlever le VERSENE, «tapotez» la plaque. Ajouter 850 ul de MC |

 **TP**

1. Décoller les cellules en pipetant la suspension plusieurs fois et transférer les dans un tube 5 ml.
2. Rincer le puits avec 500 ul de MC. **TP**
3. Centrifuger 10 min à 300 x g

ou «*quick spin» 12 000 rpm -- 10 sec*

Dans la centrifugeuse placer les eppendorfs5 en les mettant de façon que les languettes de bouchons se trouvent en haut). Centrifuger («*quick spin» -- 30 sec*) Faite une rotation de 180o aux eppendorfs (bouchon en bas) et effectuer un autre «*quick spin»* de 30 sec. **4°C**

1. Aspirer le surnageant et ajouter 1 ml de PBS-2%FBS. **4°C**
2. Déterminer la concentration de la suspension et ramener la à optimum (5 x 106 par ml). Distribuer 1 ml par eppendorf.

L’échantillon qui est meilleur du meilleur c’est 5\*106 / 150 uL PBS / tube >>> 5000 – 7000 evs/sc à **Slow**

1. Centrifuger (300 x g – 10 min / *quick spin 12 000 rpm -- 10 sec*) **4°C**
2. Aspirer le surnageant en laissant 20ul, «raclez» (gratter rapidement l’eppendorf sur un support bosselé afin de résuspendre les cellules)
3. Pour les cellules NON-FIXÉES; NON-PERMIABILISÉES aller à **l’étape 20**

*Pour les mélanges magiques commerciaux de perméabilisation&fixation voir la liste au bas de la page*

1. Ajouter 180 ul de 1,2 % paraformaldéhyde (PFA) froid **sur la glace**
2. Incuber 30 min **sur la glace**
3. Laver :

— Ajouter 1ml de PBS froid

— Centrifuger (300 x g – 15 min / *quick spin 12 000 rpm -- 30 sec*)

— Aspirer le surnageant en laissant 20ul, «raclez». **4°C** *ou* ***(TP)***

1. Pour les cellules NON-PERMIABILISÉES aller à **l’étape 20**
2. Ajouter 200ul de PBS 0.1%Triton X-100 ou 0.1% saponin 2
3. Incuber 15-20 min **sur la glace**
4. Lavez
5. Ajouter le 1er Anticorps (30-50ul) dilué dans PBS 2% FBS.
6. Incuber 30-180 minutes **sur la glace**
7. Laver
8. Ajouter le 2ème Anticorps-Fluorescent (30-50ul) dilué dans PBS-2%FBS.
9. Incuber 30 minutes à l’abrie de lumière **sur la glace**
10. Laver
11. Aspirer le surnageant et ajouter 150ul de PBS-2%FBS froid
12. Au besoin, filtrer la suspension 4
13. Lire au FACS

**Contrôles:**

*-- isotype —* IgG du même espèce que le premier anticorps + 2ème anticorps

-- *non-spécifique —* seulement le 2ème anticorps

-- *autofluorescence* — cellules non marquées pour placer les paramètres de départ du FACS : FSC, SSC, FL-1

*-- Perméabilisation --* Lors de l’incubation avec le 2ème anticorps ajouter l’iodure de propidium 10ug/ml; RNAse 10 ug/ml. Ou juste le DAPI à 2 ug/ml

**Perméabilisation&fixation buffer**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| eBioscience Fixation/Permealilization DiluenteBioscience Fixation/Permealilization ConcentrateeBioscience Permealilization Buffer | 00-5223-5600-5123-4300-8333-56 | ThermoFisher |
| BD Transcription Factor Buffer Set4X TF Fix/Perm; TF Diluent Buffer,5X TF Perm/Wash buffer | 562574 | BD |
| BD CytofixBD Perm/wash | 554655 | BD |
| PerFix\_nc Kit (no centrifuge assay kit) | B31168 | Beckman Coulter |
| True\_Nuclear TF buffer Set4X Fix Concentrat, Fix Diluent, 10 Perm buffer | 424401 | Biolegend |

**Antibody Capture Beads for compensation**. Une goute (50 uL) ≈ 50\*104 beads. Vos besoins : 2.5\*104 beads/tube

<https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=B25652AA.pdf>

https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/01-1111-42

1) Vortexer 30 sc les flacons des billes négatives et des billes positives.

2) Mettre 1 mL de buffer (D-PBS 1X/BSA 1%) dans un tube Eppendorf de 1.5 mL.

3) Ajouter une goutte de bille négative et une goutte de bille positive dans le tube Eppendorf de 1.5 mL. 4) Vortexer 30 sc après l’ajout de deux gouttes.

5) Répartir 10 × 100 μL dans des tubes Eppendorf de 1.5 mL

6) ajouter le volume correspondant pour chaque anticorps utilisé.

7) Vortexer 5 sc chaque tube.

8) Incuber les tubes pendant 30 minutes dans l'obscurité à tRT sur un roux de mixage ou en les remuant occasionnellement.

9) Lire au FACS

Préparation de la PFA 12% (paraformaldéhyde)

*La fixation à l’éthanol est connue pour causer des agrégats protéiques. De plus elle cause une déformation des cellules. Enfin les signaux de fluorescence sont en général diffus avec l’éthanol. C’est pour cela que nous préférons la fixation à la paraformaldéhyde (PF), puisque cette dernière permet de réduire les effets énumérés plus haut.*

PFA …………… 12 g

H2O …………. Jusqu’à 100ml

Chauffer 20 min dans un bain-marie à une température inférieure à 56°C\* Lors de la préparation une agitation douce ou occasionnelle est recommandée.

Ajouter 10 ul de NaON 5M et agitez.

Chauffer 10 min. Si la solution n’est pas lucide rajouter 5 ul de NaOH.

Chauffer encore 10 min.

Après dissolution complète de PFA, filtrer la solution (0,2 um) et aliquoter la, puis entreposer à -80°C.

-----------------------------------------------------

*\* A la t° supérieure la PFA se décompose en libérant certains dérivés (formaldéhyde, H2O2, anhydride, radicaux) qui ont une forte fluorescence de base ou qui affecte la fixation. De plus, utiliser toujours de la PFA de bonne qualité et bien purifié.*

Préparation de la saponine

*La saponine crée des pores là où la molécule de cholestérol est incluse dans la membrane. Donc, la saponin permet de perméabiliser la membrane plasmique mais pas la membrane nucléaire. De plus, ces pores se referment presque instantanément en absence de saponine. Donc, la présence de saponin 0.05% est nécessaire à tous les stades après la perméabilisation.*

Préparer une solution de saponine 10% dans PBS. Stériliser par filtration sur 0.22um, aliquoter et entreposer à 4oC.

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

1 VERSEN 15040-066 (Gibco) 0,2 g/l (0,53 mM) EDTA\*4Na dans PBS

2 Saponine Sigma S 7900

3 Paraformaldéhyde Sigma P 6148 ou Eastman\* 0650002-053

4 \* Nylon mesh 38 um **U-CMN-38** 34.70$USD pour 1/2 yard

<http://www.componentsupplycompany.com/product_pages/Nylon-screening-mesh.html>

ou

<http://morgansfilterscanada.com/MORGANS-SEPARATION.html>

Propidium iodide  P4170 Sigma

5 Il arrive parfois que certains types de cellules collent aux parois des eppendorfs lors d’une incubation. Dans les cas extrêmes les pertes peuvent atteindre 75%. Utiliser les eppendorfs de chez Ultident, ou carrément les eppendorfs siliconisés de Fisherbrand   (05-541-64 sis)

Pour en savoir plus :

**Defining human dendritic cell ...** ( <https://www.nature.com/articles/nprot.2015.092.pdf> )

**Isolation and analysis of ...** ( <https://www.nature.com/articles/nprot.2015.047.pdf> )

**Multiplexed immunophenotyping ...** ( <https://www.nature.com/articles/nprot.2009.246.pdf> **)**