

Le rôle premier du service commun de cytométrie est de permettre aux utilisateurs d'acquérir les notions et compétences de cytométrie en flux nécessaires pour leurs futures analyses.

Pour vous aider à préparer vos échantillons, vous trouverez ci-dessous les règles de base pour réaliser vos expériences dans les meilleures conditions.

LES ANALYSES par CYTOMETRYRIE EN FLUX SE FONT UNIQUEMENT à partir DE SUSPENSIONS CELLULAIRES.

1. Echantillons

a) Analyses

Vous pouvez utiliser au choix les tubes disponibles au service

- Tubes non stériles 5ml référence 352008
- Microtubes, référence 352008 pour tubes non stériles

b) Tri de cellules

Vous pouvez utiliser tout type de tubes

- tubes 5ml, Falcon 15ml avec bouchon bleu, tubes eppendorfs, microtubes etc.....
- tubes référence 352054 pour les préparations stériles (tubes avec bouchon)

Il est impératif d'utiliser les tubes appropriés pour vos analyses.

2. Concentration cellulaire

a) Analyses

Phénotypage, cycle cellulaire, apoptose, GFP ou expériences similaires

Les cellules sont resuspendues à une concentration minimale de 1×10^6 cellules/ml et dans un volume minimal de 300 μ l.

b) Tri de cellules

- Pour les lignées cellulaires, l'échantillon est à resuspendre à $5-10 \times 10^6$ cellules / ml et dans un volume minimal de 300 μ l.
- Pour les lymphocytes, la concentration recommandée est de $20-30 \times 10^6$ cellules / ml avec un volume minimal de 300 μ l.

3. Tampon

Pour l'analyse et le tri de cellules, le tampon utilisé de façon générale est PBS 1x, 0.5% BSA, 2mM EDTA.

Mais dans le cas où vous remettez vos cellules en culture après un tri, ou pour des tests fonctionnels, **NE RAJOUTEZ PAS D'EDTA** dans votre tampon.

Vous pouvez aussi laisser vos cellules dans leur milieu de culture, néanmoins avec moins de 5 % de SVF et en additionnant de l'HEPES pour maintenir le pH constant.

4. Contrôles

Les contrôles négatifs sont nécessaires et très importants pour distinguer les signaux positifs des négatifs !

Pour chaque échantillon, un minimum de 2×10^5 cellules est requis pour une analyse correcte.

Préparer également les contrôles suivants (minimum 2×10^5 cellules par contrôle).

- a) Cellules non marquées
- b) Un tube avec l'Anticorps secondaire seul pour les marquages indirects
- c) Contrôles marqués avec chaque fluorochrome séparément pour les marquages multi couleur pour le calcul des compensations.
- d) Contrôles négatifs adéquats pour chaque type de lignées pour les réglages de l'autofluorescence.

5. Tampon de récupération

- Milieu de culture avec FCS et Penicillin Streptomycin ou
- PBS/0.5% BSA

Tris stériles ou non stériles

- "Coatez " vos tubes avec le tampon de votre choix.
- Remplissez entièrement les tubes de collection et gardez-les à +4°C ON ou laissez-les au moins 3 heures à température ambiante.

6. A propos de vos échantillons

Les renseignements suivants sont demandés pour toute réservation de tri de cellules

- Type de cellules
- Taille des cellules
- Nombre de cellules à trier et nombre de cellules requis après le tri
- Fluorochromes utilisés
- Pourcentage de la population à trier
- Sterile ou non-sterile
- Température requise pour le tri (4° or 37°)

- Veuillez à respecter vos heures de réservation

- En cas de retard, vous risquez de vous pénaliser vous-même (tri écourté) et l'utilisateur suivant également !

-

7. Filtrez vos échantillons

- Pour les Cytomètres-Analyseurs, filtrez les échantillons avec la toile en nylon (80µm)
- Pour les tris, filtrez les échantillons avant le tri avec les filtres de 50µm
- (Stériles ou non stériles selon votre tri).

Tous les filtres sont disponibles au service.

Pour une meilleure analyse ou tri de vos échantillons Merci de respecter toutes ces consignes !