	MODE OPERATOIRE	MO-37
	<h2>Préparation d'un échantillon pour tri sur cytomètre trieur</h2>	Version : 04
		MàJ : 19/04/2018
		Page : 1 /4

### Évolution du document


N° de la Version	Date	Objet de la révision
01	18/04/2014	Création initiale du document
02	15/05/2014	Mise à jour
03	18/01/2017	Mise à jour responsable plateforme et localisation document sur serveur page 1
04	19/04/2018	Mise à jour du MO précision sur les concentrations cellulaire, la filtration et les contrôles

### Diffusion

- Informatique : Le document est accessible à tous en lecture seule dans le dossier Qualité se trouvant sur le réseau du CRCM et dans le dossier PF\_cytométrie/Open Access
- Papier : Classeur

### Groupe de travail

Nom	Fonction
THIBULT Marie Laure	Responsable Trieurs jusqu'en sept.2016
MALLET Françoise	Technicienne
RICHAUD Manon	Responsable Trieurs à partir de Nov.2016

	MODE OPERATOIRE	MO-37
	<h1>Préparation d'un échantillon pour tri sur cytomètre trieur</h1>	Version : 04
		MàJ : 19/04/2018
		Page : 2 /4

## 1. OBJET

Préparation d'un échantillon pour une séparation de cellules à partir d'une population hétérogène

## 2. MOYENS

### 2.1. Equipement

- Centrifugeuse à rotor
- Hotte à flux laminaire PSM
- Pipet-aid
- Pipettes
- Microscope
- Lame de Malassez


### 2.2. Consommables et réactifs nécessaires

- FCS : Sérum de Veau Foetal décomplémenté
- RPMI 1640 ou milieu adapté à vos cellules
- PBS 1X
- Pénicilline et streptomycine (PS)
- Bleu de trypan
- Pipettes de 25, 10, 2 ml
- Pointes pour pipettes
- Préfiltres
- Tubes FALCON de 50 ml et 15 ml
- Tubes polystyrène ou polypropylène 5 ml
- Plaques 96 puits
- Ependorfs 1.5 ml
- **Tampon FACS (exemple: PBS, 2mM EDTA, 0,5%BSA)**

### 2.3. Cellules

- **Les cellules doivent être dans un tube 5ml en polypropylène Falcon Référence : 352054 et le volume minimum est de 200 µl.**
- **Les cellules doivent être préalablement filtrées sur tamis cellulaire 40µm ou 70 µm Ref. 40µm: BD FalconTM 352340, 70µm: BD FalconTM 352350 (filtration à effectuer après les marquages, juste avant de venir trier)**
- **Les cellules doivent être en suspension de préférence dans du tampon FACS**

**Remarque :** La concentration cellulaire avant tri est définie par la buse choisie pour trier. La collecte peut s'effectuer en plaque, microtubes 1.5ml, tubes 5ml, tubes 15ml (variable selon le nombre de population à trier et la quantité de cellules à récolter par population). A définir lors de votre demande de tri ou rendez-vous pré-tri avec le personnel de la plateforme.

	MODE OPERATOIRE	MO-37
	<h2>Préparation d'un échantillon pour tri sur cytomètre trieur</h2>	Version : 04
		MàJ : 19/04/2018
		Page : 3 /4

### 3. MISE EN ŒUVRE

#### 3.1. Précautions

- Travailler stérilement avec une blouse et des gants
- Tous les milieux utilisés sont filtrés et les flacons d'anticorps doivent être stériles
- **Les tubes contenant les cellules à trier doivent être bouchonnés.**

#### 3.2. Technique

##### 3.2.1 Récupération des cellules

- Récupérer les cellules à trier : soit en culture soit après décongélation
- Laver les cellules en PBS 1X et les filtrer sur des préfiltres pour cellules.
- Compter et reprendre les cellules à  $10 \cdot 10^6$  /ml dans du PBS 30% SAB filtré. Laisser les cellules à 4°C pendant 10 min.

##### 3.2.2 Marquage des cellules


- Mettre en contact les cellules avec le ou les anticorps : mettre Xµl d'anticorps /millions de cellules positives pour cet anticorps (Concentration établie lors de la titration de l'anticorps).
- Laisser incuber les cellules et les anticorps pendant 30 minutes à 4°C.
- Laver 2 fois les cellules avec du PBS 1X.

##### 3.2.3 Préparation des cellules pour le tri

- Après marquage, resuspendre les cellules dans du PBS ou milieu sans sérum 1% PS.

Concentration cellulaire selon le type de buse :

- Buse 100 : 8 à  $10 \cdot 10^6$  cellules/ml
- Buse 85 :  $15 \cdot 10^6$  à  $20 \cdot 10^6$  cellules/ml
- Buse 70 :  $20 \cdot 10^6$  à  $30 \cdot 10^6$  cellules/ml
- **Filtrer** les cellules sur un tamis de 40 µm ou 70 µm Ref. 40µm: BD Falcon™ 352340, 70µm: BD Falcon™ 352350 pour éliminer les agrégats afin d'éviter les bouchages de l'appareil **Cette étape doit être réalisée au plus tôt 30 minutes avant le tri**
- Maintenir le tout à 4°C (dans de la glace).

	MODE OPERATOIRE	MO-37
	<h2>Préparation d'un échantillon pour tri sur cytomètre trieur</h2>	Version : 04
		MàJ : 19/04/2018
		Page : 4 / 4

- Préparer les tubes ou plaques de collection contenant du FCS + 1% PS pour récupérer les cellules triées
  - tube de 5 ml : 500µl à 1ml
  - tube de 15 ml : 2ml
  - tube de 1.5 ml : 100µL
  - plaque 96 puits : 50 à 200µL selon le nombre de cellules à trier par puits.

Remarque : Les cellules peuvent également être récoltées dans leur milieu de culture, un coating au préalable des tubes ou des plaques avec du FCS est fortement conseillé.

Le nombre de tubes ou plaques nécessaires dépendra du nombre de cellules triées (se renseigner auprès des opérateurs)

#### IMPORTANT POUR LES REGLAGES

- Toujours prévoir un tube de cellules non marquées ( $0.5-1.10^6$  dans 500 µl)
- Dans le cas d'un multi marquage, prévoir des cellules ou des billes marquées avec chacun des fluorochromes séparément pour réaliser les compensations.

#### **3.2.3 Récupération des cellules après le tri**

- Récupérer les cellules en groupant les tubes de tri similaires.
- Laver les cellules avec du milieu contenant 1% de pénistreptomycine
- Utiliser les cellules selon le protocole nécessaire : ARN, culture cellulaire...

#### **4. DOCUMENTS ASSOCIES**

MO-59\_Utilisation des cytomètres trieurs Facs Aria II et III