	MODE OPERATOIRE	MO-37
	<h2>Préparation d'un échantillon pour tri sur cytomètre trieur</h2>	Version : 02
		MàJ : 15/05/2014
		Page : 1 / 3

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

Diffusion

- Informatique : Le document est accessible à tous en lecture seule sur l'intranet du CRCM
- Papier : Classeur

Groupe de travail

Nom	Fonction
THIBULT Marie Laure	Responsable Trieurs
MALLET Françoise	Technicienne

	MODE OPERATOIRE	MO-37
	<h1>Préparation d'un échantillon pour tri sur cytomètre trieur</h1>	Version : 02
		MàJ : 15/05/2014
		Page : 2 / 3

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
 SAB : Sérum Humain AB
 RPMI 1640
 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

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

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.

	MODE OPERATOIRE	MO-37
	<h2>Préparation d'un échantillon pour tri sur cytomètre trieur</h2>	Version : 02
		MàJ : 15/05/2014
		Page : 3 / 3

Compter et reprendre les cellules à 150.10^6 /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 X μ l d'anticorps /millions de cellules positives pour cet anticorps (en général mettre ½ du volume préconisé par le fabricant). Voir exemple en Annexe1.

Prévoir un contrôle négatif afin de régler les PMT sur le trieur.

Prévoir des cellules ou billes monomarquées pour le calcul des compensations lors de marquage multicouleurs.

Laisser incuber les cellules et les anticorps pendant 30 minutes à 4°C.

Laver 2 fois les cellules avec du PBS 1X.

Récupérer le culot dans du PBS ou milieu sans sérum 1% PS à 6 à 8.10^6 /ml dans un ou plusieurs tubes en polystyrène et maintenir le tout à 4°C (dans de la glace). La concentration dépendra de la buse choisie pour réaliser le tri (se renseigner auprès des opérateurs).

Préparer les tubes ou plaques de collection :

- Pour un tube de 5 ml : 1ml de FCS ou milieu de culture additionné d' 1% PS
- Pour un tube de 15 ml : 2ml
- Pour un tube de 1.5 ml : 100 μ L
- Pour une plaque 96 puits : 50 à 200 μ L selon le nombre de cellules à trier par puits

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

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 II

Annexes

- Annexe 1 : Calcul des quantités d'anticorps à ajouter aux cellules pour un tri NK et VD2
Pour une population de 100.10^6 cellules contenant 30% de CD3, 10% de CD56 et 1,2 % de VD2 il est nécessaire de mettre :
- Pour du VD2 fluoresceïne : 1,2 millions X 10 μ l = 12 μ l
 - Pour du CD3 phycoerythrine : 30 millions X 10 μ l = 300 μ l
 - Pour du CD56 PC5 : 10 millions X 5 μ l = 50 μ l