

	Protocoles	Indice 01
	Conditions de préparation des échantillons pour le Tri cellulaire	

PF de cytométrie I2MC	
-----------------------	---

1- Matériel

- Les cellules à trier doivent être dans un tube 5ml en polypropylène Falcon
Référence : **352063**
- La collecte peut s'effectuer en plaque, microtubes 0,5ml à 2ml, tubes 5ml, 15ml ou 50ml (variable selon le nombre de population à trier et la quantité de cellules par population). A discuter lors du rendez-vous pré-tri.
Placer dans les tubes quelques μ l à quelques ml du milieu adapté à vos cellules et à votre expérience.

2- Cellules

- Les cellules doivent être **préalablement filtrées sur tamis cellulaire 40 μ m** (filtration à effectuer après les marquages, juste avant de venir trier)
- Les cellules doivent être en suspension dans du tampon FACS
(exemple : PBS, 2mM EDTA, 0,5%BSA)
- Le volume minimal dans le tube est de 300 μ l et la concentration maximale est de 10x10⁶cell/ml

	Protocoles	Indice 01
	Conditions de préparation des échantillons pour le Tri cellulaire	

PF de cytométrie CPTP	
-----------------------	---

Trieur ARIA-SORP ou ARIAll -Configuration (nozzle 70µm)

Cellules en suspension

- 1- Après marquage, resuspendre les cellules en tampon stérile **PBS 1X - 5% SVF** (= FACS buffer) à une concentration de **20.10⁶ cells/ml**, dans des tubes FACS stériles (tubes 5 ml stériles **polystyrène**).
- 2- Les cellules peuvent être également laissées dans leur milieu de culture selon l'application.
- 3- **Filtrer** les cellules sur un **tamis** de **40µm** ou **70µm** (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 effectuée au plus tôt 30 minutes avant le tri.
- 4- Préparer 1 tube FACS stérile de **PBS 1X - 10% gentamycine** pour nettoyer la tubulure avant de passer l'échantillon à trier.
- 5- Prévoir plusieurs tubes stériles contenant du SVF pour récupérer les cellules triées :
 - ☛ tubes de **5 ml en polypropylène** avec **250 µl of SVF** (pour **3.10⁶ cells/tube**)
 - ☛ tubes de **15 ml** avec **1 ml of SVF** (pour **10.10⁶ cells/tube**)

Si vous voulez que les fractions triées soient maintenues à une température donnée, nous prévenir avant le tri.

IMPORTANT POUR LES REGLAGES !!!

- Toujours prévoir un tube de cellules non-marquées (0,5 - 1.10⁶ cellules dans 500 µl).
- Dans le cas de multi-marquages, prévoir des cellules marquées avec chacun des fluorochromes séparément (ou les compbeads, BD Biosciences) pour réaliser les compensations.

	Protocoles	Indice 01
	Conditions de préparation des échantillons pour le Tri cellulaire	

PF de cytométrie CPTP	
-----------------------	---

Trieur ARIA-SORP ou ARIAll -Configuration (nozzle 85µm)

Cellules en suspension

- 1- Après marquage, resuspendre les cellules en tampon stérile **PBS 1X - 5% SVF** (= FACS buffer) à une concentration de **10 à 15.10⁶ cells/ml**, dans des tubes FACS stériles (tubes 5 ml stériles **polystyrène**).
Les cellules peuvent être également laissées dans leur milieu de culture selon l'application.
- 2- **Filtrer** les cellules sur un **tamis** de **40µm** ou **70µm** (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 effectuée au plus tôt 30 minutes avant le tri.
- 3- Préparer 1 tube FACS stérile de **PBS 1X - 10% gentamycine** pour nettoyer la tubulure avant de passer l'échantillon à trier.
- 4- Prévoir plusieurs tubes stériles contenant du SVF pour récupérer les cellules triées :
 - ☛ tubes de **5 ml en polypropylène** avec **250 µl of SVF** (pour **1,5.10⁶ cells/tube**)
 - ☛ tubes de **15 ml** avec **1 ml of SVF** (pour **5.10⁶ cells/tube**)

Si vous voulez que les fractions triées soient maintenues à une température donnée, nous prévenir avant le tri.

Cellules adhérentes

Même procédure que pour les cellules en suspension, mais pour certains types cellulaires qui ont tendance à s'agréger facilement, ajouter de l'EDTA dans le tampon FACS.

IMPORTANT POUR LES REGLAGES !!!

- Toujours prévoir un tube de cellules non-marquées (0,5 - 1.10⁶ cellules dans 500 µl).
- Dans le cas de multi-marquages, prévoir des cellules marquées avec chacun des fluorochromes séparément (ou les compbeads, BD Biosciences) pour réaliser les compensations.