

THYMIC CELL SUSPENSION PROTOCOL

FACS Facility, Biopôle III, Epalinges

C Fumey, JB Armengaud, A Wilson (nov. 2017)

Matériel :

Pour chaque thymus :

- 1 coupelle type boîte de Petri
- 1 filtre (mesh) Falcon 40µm (Milian réf : 352340)
- 1 piston de seringue de 10mL
- 1 tube Falcon 50 ml
- 1 tube Falcon 5 ml avec cell-strainer cap (Milian réf : 352235)
- Pipettes de Pasteur courtes non cotonnées (Milian réf : 360035)
- Filtre Sefar pour passer au FACS Sefar Nitrex 115cm x 6m (Sefar AG réf : 03-85/35)
- Milieu de culture (DMEM + 3%FCS + pénicilline 50U/ML + streptomycine 50 UI/ml)

Protocole :

Verser le thymus sans son milieu de transport (PBS + 3%FCS) dans la coupelle via le mesh ; ajouter 5 mL de DMEM+3%FCS pen/strep dans la coupelle.

Broyer prudemment le thymus dans le mesh à l'aide du piston de seringue.

Pipeter régulièrement le broyat dilué et le verser dans un Falcon 50 mL; ajouter du DMEM+3%FCS pen/strep dans la coupelle après chaque phase de broyage. Réaliser 4 phases et compléter avec milieu de culture pour remplir un tube Falcon 50mL pour chaque thymus.

Centrifuger les tubes à 1700 t/mn pendant 2 x 5mn à 4°C.

Aspirer le surnageant (pompe à vide), resuspendre le culot avec 5 mL de DMEM+3%FCS pen/strep.

Filtrer dans un tube Falcon 5mL avec cell-strainer cap.

Comptage des cellules avec la cellule de Neubauer (16 gros carrés).

5ul cellules + 45ul Milieu de culture + 50ul Bleu Trypan (dilué ½ PBS).

Soit dilution 1/20 pour calcul (→ formule d'extrapolation pour chaque tube ??).

Total des 16 carrés (en ne comptant que les cellules à cheval sur 2/4 bordures, par exemple celle du haut et celle à gauche) divisé par 5 = nb de cellules x 10⁶/ml

Déposer :

1 million de cellules dans chaque tube de titration

3 millions de cellules dans chaque tube de compensation

5 millions de cellules dans chaque tube d'analyse.

Laver dans 700 µL PBS+3%FCS puis centrifuger à 1700 t/mn pendant 5 mn à 4°C.

Aspirer le surnageant.

Resuspendre les cellules dans 50ul de mélange contenant l'ab pour la titration (1 million de cellules) ou dans 100ul de mélange d'abs pour les tubes de compensation ou d'analyses (3 ou 5 millions de cellules).

Préparation des tubes pour FACS / Flow cytometry :

Titration :

Matrice de tubes (selon schéma de titration et protocole de gating) (à refaire à chaque changement de lot d'Ac, même si fabricant idem)

- Un tube de cellules « unstained »
- 4 (ou 6) tubes contenant chacun 1 million de cellules et des dilutions croissantes pour chaque Ac (1/10 – 1/30 – 1/100 – 1/300 – 1/1000 – 1/3000)

Exemple de matrice de dilution :

Dilutions		2	3	4	5	6	7
tube							
		1/10	1/30	1/100	1/300	1/1000	1/3000
<u>sur plaque</u>	PBS/FCS 3%	54 µl	58 µl				
	Abs	6 µl	2 µl				
		6 µl	6 µl				
		50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Faire les dilutions d'Ac souhaitées pour les titrations dans PBS/3%FCS

Ajouter 50 µL de chaque dilution dans les tubes ; agiter les tubes et les laisser reposer sur glace dans l'obscurité x 30 mn.

Pour le lavage, ajouter 500 µL PBS+3%FCS

Centrifuger à 1700 t/mn pendant 5 mn à 4°C ; aspirer le surnageant ;

Resuspendre chaque tube dans 200 µL PBS+3%FCS. Garder sur glace dans l'obscurité en attendant de passer au Facs.

CAVE : Tous les tubes de cellules doivent être filtrés juste avant de passer au Facs.

Analyse :

- Un tube de cellules « unstained » + 100 ul PBS/3%FCS
- Un tube avec cellules + 100 ul mix d'Ac (ou plusieurs si fluorochromes/lasers incompatibles)
Mélanger les tubes et les laisser reposer sur glace dans l'obscurité x 30 mn.
- Lavage comme celui des titrations.
- Garder sur glace et obscurité en attendant de passer au Facs.

Compensation :

- Un tube de cellules « unstained »
- Un tube contenant 5 µL de chaque Ac testé + 3 millions de cellules + 100 ul PBS/3%FCS (dil : 1/20)
- Mélanger les tubes et les laisser reposer sur glace dans l'obscurité x 30 mn.
- Lavage comme celui des titrations.
- Garder sur glace et obscurité en attendant de passer au Facs.