Protocole cytométrie CD39/ATF4/MTX/ANNEXINE V

# Liste des tubes par conditions CC ou MC :

**Contrôles MC**

* U937 WT PBS Unstained
* U937 ATF4.12 PBS Unstained (BFP control)
* U937 ATF5.14 PBS Unstained (BFP+GFP control)
* U937 WT PBS + anti-CD39-APC
* U937 WT PBS + DMSO + Annexin V-APC-Fire/750
* U937 WT PBS + MTX
* U937 WT PBS + Cellr ox
* U937 WT PBS + DMSO + PI

**Échantillons** MC Panel 1

* U937 WT PBS + CD39-APC/MTX/Annexin V -APC-Fire/750
* U937 ATF4.5 PBS + CD39-APC/MTX/Annexin V-APC-Fire/750
* U937 ATF4.12 PBS + CD39-APC/MTX/Annexin V -APC-Fire/750
* U937 ATF5.14 PBS + CD39-APC/MTX/Annexin V -APC-Fire/750
* U937 WT AraC + CD39-APC/MTX/Annexin V -APC-Fire/750
* U937 ATF4.5 AraC + CD39-APC/MTX/Annexin V -APC-Fire/75

**Échantillons** CC Panel 1

* U937 WT PBS + CD39-APC/MTX/Annexin V -APC-Fire/750
* U937 ATF4.5 PBS + CD39-APC/MTX/Annexin V-APC-Fire/750
* U937 ATF4.12 PBS + CD39-APC/MTX/Annexin V -APC-Fire/750
* U937 ATF5.14 PBS + CD39-APC/MTX/Annexin V -APC-Fire/750
* U937 WT AraC + CD39-APC/MTX/Annexin V -APC-Fire/750
* U937 ATF4.5 AraC + CD39-APC/MTX/Annexin V -APC-Fire/750

**Échantillons** MC Panel 2

* U937 WT PBS + Cell rox-APC/PI/Annexin V -APC-Fire/750
* U937 ATF4.5 PBS + Cell rox-APC/PI/Annexin V -APC-Fire/750
* U937 ATF4.12 PBS + Cell rox-APC/PI /Annexin V -APC-Fire/750
* U937 ATF5.14 PBS + Cell rox-APC/PI /Annexin V -APC-Fire/750
* U937 WT AraC + Cell rox-APC/PI /Annexin V -APC-Fire/750
* U937 ATF4.5 AraC + Cell rox-APC/PI /Annexin V -APC-Fire/750

**Échantillons** CC Panel 2

* U937 WT PBS + Cell rox-APC/PI/Annexin V -APC-Fire/750
* U937 ATF4.5 PBS + Cell rox-APC/PI/Annexin V -APC-Fire/750
* U937 ATF4.12 PBS + Cell rox-APC/PI /Annexin V -APC-Fire/750
* U937 ATF5.14 PBS + Cell rox-APC/PI /Annexin V -APC-Fire/750
* U937 WT AraC + Cell rox-APC/PI /Annexin V -APC-Fire/750
* U937 ATF4.5 AraC + Cell rox-APC/PI /Annexin V -APC-Fire/750

# Protocole:

* Mettre 200µL des témoins et d’échantillons dans des tubes cytométries
* Dans les tubes controles Annexin V et PI ajouter 50µL de DMSO et incuber 5min
* Laver les cellules dans du PBS (1x) 2.5-3 ml/tube
* Dans un Falcon 15, préparer le buffer 4020µL HBSS + 80µL SVF

**Panel 1**

* Pour le marquage CD39 MTX (Témoin + échantillons) : preparer 100µL de buffer HBSS+2%SVF avec 3µL d’anticorps CD39 par tubes
  + - Pour 16 tubes : 1600µL HBSS+2%SVF et ajouter 48µL d’anticorps CD39.
    - Diluer 2µL MTX dans 2µL HBSS+2%SVF puis de cette dilution, ajouter 1.6µL dans le CD39 mix
* Ajouter 100µL du mix CD39 dans les tubes et incuber 20min à 37°C dans l’obscurité.
* Laver les cellules dans du PBS (1x)
* Dans deux tubes eppendorf mettre :
  + 1) AnnexV control : 300µL de buffer ABB et ajouter 1.2µL d’Annexin V ;
* Prendre 200µL par tube de ce buffer et ajouter 0.8µL d’Annexin V et 0.2µL PI préalablement dilué au 1:4 dans le même buffer.
  + - Pour 15 tubes : 3mL de buffer + 12µL d’annexin V et 2µL de PI dilué
* Ajouter les 200µL par tubes (Buffer Annexin V seul et Annexin V et lire au cymomètre

**Panel 2**

* Pour le marquage Cellrox (Témoin + échantillons) :
  + - Pour 16 tubes : 1600µL HBSS+2%SVF ajouter 1.28µL de CellRox.
* Ajouter 100µL du mix ceelrox dans les tubes et incuber 20min à 37°C dans l’obscurité.
* Laver les cellules dans du PBS (1x)
* Diluer PI ; 2µL dans 6µL de HBSS+SVF
* Dans deux tubes eppendorf mettre :
  + 1) AnnexV control : 300µL de buffer ABB et ajouter 1.2µL d’Annexin V ;
  + 2) PI control : 900 ul + 0.9µL de PI dilué au ¼ dans le 2nd.
* Prendre 200µL par tube de ce buffer et ajouter 0.8µL d’Annexin V et 0.2µL PI préalablement dilué au 1:4 dans le même buffer.
  + - Pour 15 tubes : 3mL de buffer + 12µL d’annexin V et 3µL de PI dilué
* Ajouter les 200µL par tubes (Buffer Annexin V seul et Annexin V et lire au cymomètre