Protocole cytométrie CD39/ATF4/PI/ANNEXINE V

# Liste des tubes :

**Contrôles**

* U937 WT PBS Unstained
* U937 ATF4.12 PBS Unstained
* U937 ATF5.14 PBS Unstained
* U937 WT PBS + CD39
* U937 WT PBS + DMSO + Annexin V APC
* U937 WT PBS + DMSO + PI

**Échantillons**

* U937 WT PBS + CD39/PI/Annexin V APC
* U937 ATF4.5 PBS + CD39/PI/Annexin V APC
* U937 ATF4.12 PBS + CD39/PI/Annexin V APC
* U937 ATF5.14 PBS + CD39/PI/Annexin V APC
* U937 WT AraC + CD39/PI/Annexin V APC
* U937 ATF4.5 AraC + CD39/PI/Annexin V APC
* U937 ATF4.12 AraC + CD39/PI/Annexin V APC
* U937 ATF5.14 AraC+ CD39/PI/Annexin V APC

# Protocoles :

* Mettre 500µL des témoins et d’échantillons dans des tubes cytométries
* Dans les tubes Annexin V et PI ajouté 50µL de DMSO et incubé 10min
* Laver les cellules dans du PBS (2x)
* Dans un Falcon 15, préparer le buffer 1568µL HBSS + 32µL SVF
* Pour le marquage CD39 (Témoin + échantillons) : préparer 100µL de buffer HBSS+2%SVF avec 3µL d’anticorps CD39 par tubes
  + - Pour 16 tubes : 1568µL HBSS + 32µL SVF. De ce buffer, prendre 1000µL et ajouter 30µL d’anticorps CD39.
* Ajouter 100µL du mix CD39 dans les tubes et incuber 15min à 37°C dans l’obscurité.
* Laver les cellules dans du PBS (2x)
* Préparer l’Annexin Buffer : 46mL eau miliQ + 4mL Annexin Buffer 10x
* Diluer à 1:4 le PI dans ce buffer
* Dans deux tubes eppendorf mettre 300µL de ce buffer et ajouter 1.2µL d’Annexin V dans le premier tube et 0.3µL 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 10 tubes : 2mL de buffer + 8µL d’annexin V et 2µL de PI dilué
* Ajouter les 200µL par tubes (Buffer Annexin V seul ou avec PI et Annexin V et lire au cymomètre