Alexis 56-11 et M14 R132 +/- AGI 1 wks : Scenith, Rhod2, ATP, PpIX

* Lundi : ensemencement à 0.4 M/mL

16.11.2021 :

1- Compter les cellules en malassez

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **R1** | **R2** | **viability** | **M/mL** | **Vol qsp 0.5 M** | **Vol qsp 2 M** | **Vol qsp 5 M** |
| **56-11 DMSO J+7** |  |  |  |  |  |  |  |
| **56-11 AGI J+7** |  |  |  |  |  |  |  |
| **M14R132 + DOX DMSO J+7** |  |  |  |  |  |  |  |
| **M14R132 + DOX AGI J+7** |  |  |  |  |  |  |  |

2- Scenith

Centrifuger 2 millions de cellules

Ressuspendre dans 500 µL de milieu MEMa+5%SVF

Mettre 100 µL de suspension cellulaire/tube

1 : Co

2 : DG

3 : Oligo

4 : DG + Oligo (« DGO)

5 : Hr

Ajouter les inhibiteur 20X (2.5 µL/50 µL, 5 µL/100 µL)

Incuber 15 min @ 37°C

Ajouter Puromycine 20X (Cf=10 µg/mL) (2.5 µL/50 µL, 5 µL/100 µL) + Viability v510 (canal KO : d=1/500e)

Incuber 20 min à 37°C

Faire 2 lavages avec 2 mL de PBS

Ressuspendre le culot dans 100 µL FoxP3 fixation/permeabilization working solution (dilution au ¼ dans buffer).

Vortexer et incuber 20 min @ RT

Faire 2 lavages avec 100µL de « permeabilization buffer 1X » (buffer dilué au 1/10e dans H2O)

Ajouter anti-Puro AF488 (1/500 dilué en permeabilization buffer)

Incuber 1h00 à RT

Faire 2 lavages avec 100 µL de permeabilization buffer

Ressuspendre dans 100 µL de PBS 1X

Analyser au cytométre

3- ATP

Centrifuger 0.5 millions de cellules

Ressuspendre dans 1.6 mL de milieu MEMa+5%SVF (0.3M :mL)

Repartir 80 µL/puits

Ajouter les inhibiteurs

Incuber 1h @ 37°C

Ajouter 100 µL de cell titer glo et incuber 10 min @ RT

Lire la luminescence

4- PpIX

* 4h avant le FACS : Faire 2 puits par condition avec 500 µL suspension cellulaire (+/- ALA)
* Ajouter ALA 1 µM (0.5µL ALA 1 M)
* Incuber 4h à 37°C
* Ajouter 2 mL PBS 1X – centrifuger 1200 RPM, 5 min
* Eliminer le surnageant
* Ajouter 100 µL ABB 1X + 1 µLAnnexinV-BV510/t

5- RPA

* Prélever 500 µL de suspension cellulaire
* Laver avec 2 mL PBS 1X – centrifuger 1200 RPM, 5 min
* Eliminer le surnageant
* Ajouter 100 µL de solution RPA (dilution au 1/50000 du stock à 5 mMen HBSS) + 2 µL anti-CD71-APCH7
* Incuber 20 min @ 37°C
* 2x lavages avec 2 mL PBS 1X
* Ajouter 100 µL ABB 1X + 1 µLAnnexinV-BV510/t

6- Immunophenotypage/différencisation

* Prélever 200 µL suspension cellulaire
* Ajouter 2 mL PBS 1X – centrifuger 1200 RPM, 5 min
* Eliminer le surnageant
* Ajouter 100 µL de solution de marquage (Mix=Anticorps + HBSS)
* Incuber 20 min à 37°C
* Faire 2 lavages avec 2 mL de PBS
* Ajouter 100 µL ABB 1X + 1 µLAnnexinV-BV510/t

7- Rhod2

* Prélever 200-500 µL de suspension cellulaire
* Laver avec 2 mL PBS 1X – centrifuger 1200 RPM, 5 min
* Eliminer le surnageant
* Ajouter 100 µL de solution Rhod2 (dilution au 1/100e du stock en HBSS) + 2 µL anti-CD71-APCH7
* Incuber 20 min @ 37°C
* 2x lavages avec 2 mL PBS 1X

8- Culots ARN et protéines

**Note tout doit être à 4°C : PBS, centri – Utiliser de la glace !!**

**Les tubes doivent être bien annotés (cellules ? Tx ? temps de Tx ? date ?)**

* Compter les cellules
* Prélever 2 Millions de cellules (protéines) – 5 Millions (ARN)
* Centrifuger 1200 RPM, 5 min, 4°C
* Faire 2 lavages avec 1 mL de PBS froid
* Freezer les culots à l’azote ou les Ressuspendre directement dans :

Protéines : LDS 1X ou RIPA -> dosage + western blot

ARN : 1 mL de Trizol -> extraction ARN + qPCR

* Conserver à -80°C