**Flow Cytometric analysis of the cell cycle** **with cell fixation**

*Préparation de la suspension cellulaire.*

**Attention aux eppendorfs !** Ceux avec les rebords vont rehausser de 0,5 mm le positon de tube dans le cytomètre et ceci bloquera la sonde de ce dernier. Vous allez acquérir 0 évènements et vous serez triste.



1. Ensemencez une culture de CHO à 35\*103/cm2

*2\*106 dans 10 ml de milieu de culture (MC) par boîte de Petri 100 x 20 mm: 58.95 cm2.*

1. Cultivez les cellules 24 heures dans l'incubateur (5% CO2; 37°C)

*Les cellules ne doivent pas être confluent*

1. Récupérez le milieu de culture des cellules dans un Falcon 15 ml. Rincer le puits avec PBS et récupérer dans le même Falcon.
2. Ajoutez 1 ml de VERSENE 1, (ou la trypsine) incubez 3-4 min **(TP)**
3. Enlevez le VERSENE, «tapotez» le pétri. Ajoutez 2,5 ml de PBS-2%FBS
4. Décollez les cellules en pipetant plusieurs fois («up and down» avec l’embout bleu de 1 ml), transférez la suspension dans le même Falcon.
5. Rincez la Pétri avec 2,5 ml du PBS-2%FBS, recoupèrant ainsi les restes de la suspension, transférez-les dans le même Falcon.
6. Centrifugez 10 min à 600 g (≈1000 rpm) **(4°C)**
7. Aspirez le surnageant et ajoutez 1.5 ml de PBS-2%FBS. **(4°C)**
8. *Déterminez la concentration de la suspension (avec l’hémacytomètre) et ramenez la à 105 cellules/ml*.

L’échantillon qui est meilleur du meilleur c’est 5\*106 / 150 uL PBS / tube >>> 5000 – 7000 evs/sc à **Slow**

1. En vortexant, ajoutez goutte-à-goutte 4.5 mL d’ice-cold EtOH 100%. Conservez les échantillons à -20oC (2 heures)
2. Centrifugez (1 min. à 600 g) pour culotter les cellules
3. Resuspendre avec 1 ml de PBS-2%FBS et transférez dans un eppendorf
4. Dans la centrifugeuse placez les eppendorfs en les mettant de façon que les languettes de bouchons se trouvent en haut). Centrifugez («*quick spin» -- 30 sec*). Faite une rotation de 180o aux eppendorfs (bouchon en bas) et effectuez un autre «quick spin» de 30 sec.
5. Aspirez le surnageant en laissant 20 ul, «raclez» (grattez rapidement l’eppendorf sur un support bosselé afin de resuspendre les cellules)
6. Ajouter 180 ul de staining solution
7. Incubez de 4h à O/N à **(4°C)**
8. *Au besoin, filtrez la suspension avec une mèche Nitex 60 m coincée entre 2 embouts bleu de 1 ml coupés.*
9. Lire au cytométre.

***Propidium iodide est un cancérigène potentiel. Gantez vous!***

Staining solution (PI) :

RNAse A - 25 ug/ml

PI 20 ug/ml

Triton X-100 0.1%

Pour 12 mL, préparer frais, avec une aliquote de PI 1mg/mL conservé à -80°C

* PBS 1X 11,16 ml
* RNase A 0,5 mg/mL 600 ul
* PI 1 mg/mL 240 ul
* Triton X-100 10% 120 ul

Conserver à 4°C à l’abri de la lumière. Ne pas conserver trop longtemps.

VERSEN 15040-066 (Gibco) 0,2 g/l (0,53 mM) EDTA\*4Na dans PBS

\* Nylon mesh 38 um **U-CMN-38** 34.70$USD pour 1/2 yard

<http://www.componentsupplycompany.com/product_pages/Nylon-screening-mesh.html>

ou

<http://morgansfilterscanada.com/MORGANS-SEPARATION.html>

RNAse A (Roche 10109142001)

*pour qu'elle soit DNase free, tel que proposer par Roche: Chauffer à 100°C, pendant 15 min. Laisser refroidir à température pièce...*

Propidium iodide  P4170 Sigma