

1. OBJECTIF

Déterminer le contenu en ADN des cellules pour étudier les différentes phases du cycle, la polyploïdie. La coloration doit être spécifique de l'ADN, il faut éliminer l'ARN, le fluorochrome doit être en quantité saturante afin que la coloration soit quantitative.

Comme témoin il est impératif, un échantillon standard dont le contenu en ADN est connu doit être inclus dans chaque expérience

2. REACTIFS

Colorant : iodure de propidium, solution stock 10mg/ml dans H₂O

Solution de RNase 10mg/ml dans du PBS, Utiliser une RNase non contaminée par protéases ou DNases. La solution de RNase peut être débarrassée des contaminants par chauffage à 75° pendant 30mn, laisser refroidir la solution pour renaturer la RNase

Ethanol 70% (30% PBS) : stocker à -20°

3. COLORATION

Compter les cellules, le protocole est donné pour 1 million de cellules. Trypsiner les cellules adhérentes, la trypsine est arrêtée par du milieu complet avec sérum, puis les cellules sont centrifugées et remises en suspension à l'aide d'un cône jaune dans environ 100µl du surnageant

Fixer les cellules en ajoutant goutte à goutte 2mL d'éthanol 70% froid tout en vortexant lentement. Fixer les cellules au moins 30mn à -20° ou 1H dans la glace ; les cellules peuvent être stocker à -20 pendant plusieurs semaines

COLORATION : centrifuger les cellules fixées, éliminer le surnageant et reprendre le culot dans 1ml de PBS contenant 100µg/ml de RNase (10µl de la solution à 10mg/ml stock) et 10µg/ml(1µl) de la solution stock IP à 10mg/ml

Incuber 1h à 37° ou stocker les cellules dans la solution colorante d'une nuit à 3 jours avant l'analyse ; stocker à 4° à l'abri de la lumière

4. ANALYSE DES RESULTATS

L'excitation de l'IP est réalisée avec la raie 488nm d'un laser argon. L'émission de la fluorescence rouge à 610nm est recueillie à l'aide de filtres dichroïques et bande passe spécifiques.

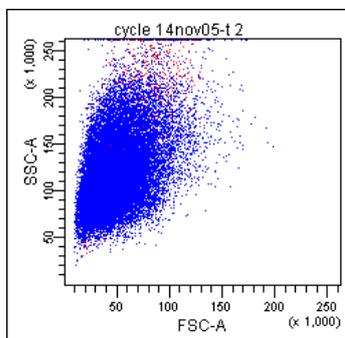
Toujours travailler en échelle linéaire !

- Dot plot 1: X1= FSC-A
Y1= SSC-A
- Dot plot 2: X2= Fluorescence rouge IP, mode intégral ou surface (area),
Y2= fluorescence rouge (IP), mode hauteur pic (peack).

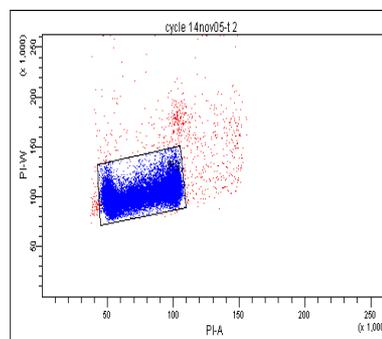
Faire une fenêtre d'analyse sur l'histogramme 2 afin d'éliminer les doublets, les agrégats et les débris cellulaires qui interfèrent avec l'analyse précise de la phase S du cycle cellulaire.

- Histogramme 3: X3=fluorescence (IP), mode intégral conditionné sur la fenêtre de l'histogramme 2.

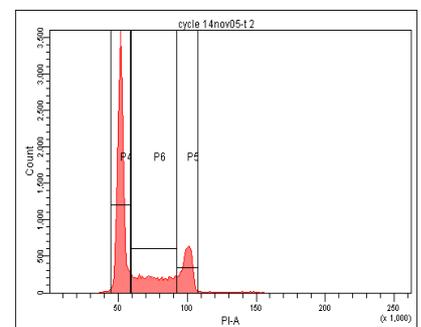
Dot Plot 1



Dot Plot 2



Histogramme 3



5. EXPRESSION DES RESULTATS

Cellules :	Cytomètre :	
P4 :% G0 G1=60%	P6 : S= 19.5%	P5 :% G2 M= 20.3%
Commentaires :		
<p>Résultats bruts de l'analyse en CMF du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire (hist. 3 est conditionnée su la fenêtre P3 de l'hist. 2. Le fichier LMD peut être ensuite analysé à l'aide de logiciel <i>MODFITTM</i>, afin de modéliser de façon précise chacune des phases du cycle y compris l'apoptose.</p>		