

Titre	Traitement des échantillons sanguins
Codification	PN07-WEB
Pages	5

Historique des versions

Date jj/mm/aaaa	Version	Page	Description de la modification
27/07/2020	01	5	Création d'une version courte web du PON07

Historique de la mise en place de la PON

Version	Date jj/mm/aaaa	Version	Date jj/mmm/aaaa	Version	Date jj/mmm/aaaa

Approbation de la PON du laboratoire

	Signature	Date jj/mmm/aaaa

Table des matières

1. TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS	2
PRÉPARATION DES SOLUTIONS	2
PROCÉDURE.....	3
<i>Tubes PAXgene RNA</i>	3
<i>SÉRUM : Tubes de sérum à bouchons rouge</i>	3
<i>SANG COMPLET : Tubes ACD</i>	4
<i>Décompte des PBMC</i>	5
<i>Congélation des PBMCs</i>	5

1. Traitement des échantillons

Selon les possibilités pour les échantillons sanguins qui doivent être traités, nous recueillons **1 tube PAXgene® RNA**, **4 tubes ACD** et **1 tube à bouchon rouge** (sérum): pour réaliser le profilage ADN, le profilage ARN, isoler le plasma et les PBMCs et recueillir du sérum.

Tous les tubes doivent rester à température ambiante avant leur traitement ; le plus vite est le mieux, **idéalement <6 heures** ; <12heures est bien pour la plupart des expériences ; >12h : un nombre significatif d'expériences seront moins réalisables ou fiables SVP indiquer dans la section commentaire sur le prélèvement le délai entre le traitement et la ponction veineuse.

Type de prélèvements recueillis
PAXgene (extrait ARN disponible)
Sang complet (extrait ADN disponible)
Plasma
PBMC
Sérum

Préparation des solutions

HEPES 1M

1. Diviser en volume de 5ml et conservé à 4°C

Penicillin Streptomycin (10 000U/ml)

2. Diviser en volume de 5ml et conservé à 4°C ou -20°C.

FBS :

1. Faire chauffer à 56°C pendant 30 minutes pour décomplémenté.
2. Diviser en volume de 50 ml et conserver à -20°C. Décongelé avant l'utilisation.

R+ :

1. Prendre une bouteille de 50ml de RPMI 1640
2. Ajouter 5mL d'HEPES 1M
3. Ajouter 5mL de Pen/Strep 10000U
4. Se conserve à 4°C

R10FBS

1. Prélever 45ml de milieu R+ préparé
2. Ajouter 5mL de FBS décomplémenté

FBS 20%DMSO :

1. Prélever 40ml de FBS décomplémenté
2. Ajouter 10mL de DMSO
3. Conserver à 4°C pendant 1 semaine
4. Il sera utilisé comme milieu de congélation
5. Noter la date à laquelle la solution est préparée.

Procédure

TUBES PAXGENE RNA

1. Laisser le tube reposer à température de la pièce, « over night ». Noter la date et l'heure sur la feuille de travail (BQC19 – Feuille de suivi des échantillons).
2. Après être resté une nuit à température ambiante, transférer les tubes PAXgene® RNA à -20°C pendant 24 heures. Noter la date et l'heure sur la feuille de travail (BQC19 – Feuille de suivi des échantillons).
3. Transférer à -80°C pour un stockage à long terme. Noter la date, l'heure et l'emplacement dans Feuille de suivi des échantillons.

SÉRUM : TUBES DE SÉRUM À BOUCHONS ROUGE

1. Centrifuger le tube de sérum à bouchon rouge à 2000g pendant 10 minutes à température pièce avec frein.
2. Transférer le sérum par inversion dans un tube de 15 ml. ATTENTION de ne pas déranger le culot/caillot dans le fond du tube.
3. Aliquoter le sérum en volumes de 250µl et volumes de 500µl dans les cryovials identifiés selon la procédure BQC19.
4. Indiquer sur la feuille de travail (BQC19 – Feuille de suivi des échantillons).

SANG COMPLET : TUBES ACD

1. Transférer le sang du ou des tubes ACD dans un tube Falcon de 50 ml. Noter le volume recueilli sur le feuille de travail (BQC19 – Feuille de suivi des échantillons).
2. Transférer en aliquotes de 500µL de sang complet dans les cryotubes.

PLASMA : TUBES ACD

3. Centrifuger les tubes de sang total à 850g (2000rpm) pendant 10min à température ambiante. SANS FREIN.
4. Aspirer le plasma avec une pipette de transfert en plastique (10mL) et transférer le plasma dans un tube de 50mL
5. Transférer le plasma dans des tubes avec bouchons vissés, en volumes de 500µL et en volume de 250µL/tube.
6. Entreposer les cryotubes à -80°C et noter leur emplacement dans la feuille de travail (BQC19 – Feuille de suivi des échantillons).

MÉTHODE DE FICOLL-HYPAQUE POUR L'ISOLATION DES PBMCS :

1. Après le recueil du plasma, compléter le Falcon de sang avec du milieu HBSS jusqu'à 30mL (**30mL au total**). Mélanger doucement.
2. Prendre un tube 50mL contenant 15mL de Ficoll. Le but est d'avoir 2 volumes de sang dilué pour un volume de Ficoll.
3. Doucement et délicatement déposer, en laissant couler lentement le long de la paroi du tube, le sang dilué sur la solution de Ficoll dans le tube 50mL et ce en évitant de mélanger le Ficoll avec le sang dilué.
4. Centrifuger les tubes à température ambiante pendant **30min à 400g SANS FREIN**. Manipuler de façon précautionneuse et s'assurer que les godets de la centrifugeuse soient bien équilibrés.
5. Après la séparation du Ficoll, collecter doucement la couche de PBMCS par aspiration à l'aide d'une pipette pasteur en plastique. Commencer à environ 1mm de la paroi du tube. Transférer les cellules dans un tube 50mL propre (maximum 20mL/tube).
6. **Effectuer un premier lavage** : Compléter le tube jusqu'à 45mL avec du milieu **HBSS**. Centrifuger à 400g pendant 10min **AVEC FREIN**.
7. Éliminer le milieu après centrifugation.
8. **Effectuer un deuxième lavage** : Utiliser une pipette avec un cône de 1000µL pour resuspendre le culot. Laver à nouveau en ajoutant 44mL de **R+**. Centrifuger à 400g pendant 10min, **AVEC FREIN**.
9. Éliminer le milieu et resuspendre le culot de cellules dans **5mL** de milieu R10SVF. Mettre la centrifugeuse à 4°C.

MÉTHODE ALTERNATIVE POUR L'ISOLEMENT DES PBMCS : SEPMATE

1. Après le recueil du plasma, compléter le Falcon de sang avec du PBS 2%SVF jusqu'à 30mL (30mL au total). Mélanger doucement.
2. Prendre 2 tubes de 50mL SepMate par échantillon et ajouter, au travers le trou central, 15mL de Ficoll dans chacun des tubes.

3. Conserver les tubes SepMate à la verticale, ajouter 15mL de sang dilué en le pipetant sur le côté de chaque tube.
4. Centrifuger les tubes à température ambiante pendant 10min à 1200g SANS FREIN. Manipuler de façon précautionneuse et s'assurer que les plots de la centrifugeuse soient bien équilibrés.
5. Après la centrifugation, verser la couche supérieure dans un nouveau tube en inversant le tube pas plus de 2 secondes.
6. Premier lavage : Compléter le tube contenant la suspension cellulaire jusqu'à 45ml avec du PBS 2%SVF. Centrifuger à 300g pendant 8min, AVEC le FREIN.
7. Second lavage : Répéter l'étape 6
8. Éliminer le milieu et resuspendre les cellules dans 5mL de milieu R10SVF. Mettre la centrifugeuse à 4°C.

DÉCOMPTE DES PBMC

1. *Comptage manuel des cellules* : Compter et enregistrer le nombre de PBMC viable par mL. Si fait via un compteur de cellules automatique, suivre les instructions du fournisseur.

CONGÉLATION DES PBMCS

1. Conserver les cellules comptées au frigidaire jusqu'à ce qu'on soit prêt à centrifuger et congeler. Indiquer le nombre de tubes nécessaires sur feuille de travail (BQC19 – Feuille de suivi des échantillons).
2. A noter : **habituellement nous congelons minimum 10 millions de PBMCS par tube pour le stockage dans les cuves à azote**. Une quantité de cellules par tube moins importante conduit à une récupération relative plus faible en termes de nombre de cellule.
3. Centrifuger la suspension cellulaire restante dans une centrifugeuse à 4°C pendant 10min à 1500rpm.
4. Après la centrifugation, aspirer le surnageant et laisser 100µL de volume résiduel, resuspendre le culot.
5. Resuspendre les PBMCS dans du SVF préalablement décomplémenté froid à la concentration de 20 millions de cellules/mL :
6. Ajouter la solution de congélation (SVF 20%DMSO) 1:1 (même volume de SVF qu'à l'étape 6) goutte à goutte en agitant CONTINUELLEMENT le tube.
7. Transférer 1mL dans chaque tube identifié de cryoconservation Nalgene.
8. Une fois que les cellules sont dans la solution de congélation, les placer dans les boîtes Mr Frosty dans le -80°C.
9. Ne pas conserver les tubes contenant les cellules et la solution de congélation dans de la glace trop longtemps avant d'être placé à -80°C. Le DMSO est toxique pour les cellules, donc leur viabilité sera moins bonne si elles ne sont pas congelées rapidement. Ne pas préparer trop de tubes simultanément.
10. Les cellules sont transférées au l'azote liquide le jour suivant