

Coloration de cellules de levures au Propidium Iodide pour analyse au FACS.

But : Voir le pourcentage de cellules dans chacune des phases du cycle cellulaire.

Matériel :

- FACS buffer
- Éthanol 70%
- PBS 1X
- RNase A
- Propidium Iodide (PI)

FACS buffer : **500 ml**

Tris 1 M pH 7.5	100 ml
EDTA 0.5 M pH 8.0	20 ml
ddH ₂ O	380 ml

Méthode :

1. Récolter 1 ml de cellules (OD₆₀₀ voulue) dans un Falcon 12 ml. Spin 1 min à 12 000 rpm.
2. Laver 1X avec 5 ml ddH₂O. Spin 1 min à 12 000 rpm.
3. Resuspendre dans 5 ml EtOH 70% (cette suspension peut être conservée de 3h à 3 semaines à 4 °C). Spin 1 min à 12 000 rpm.
4. Laver 1X avec 5 ml PBS. Spin 1 min à 12 000 rpm.
5. Resuspendre dans 1 ml de PBS.
6. Soniquer 10 sec à 6-7%
7. Ajouter RNase A 1 mg/ml. Incuber à 37 °C O/N.
8. Spin 1 min à 12 000 rpm et laver 1X avec 5 ml de PBS.
9. Resuspendre dans 1 ml de PI (50 µg/ml dans du PBS). Incuber 3h à 4 °C.
10. Spin 1 min à 12 000 rpm et resuspendre dans 1 ml de PI (5 µg/ml)
11. Diluer 1:5 en prenant 100 µl de cellules et ajoutant 400 µl de PI dans un eppendorf.
12. Soniquer 5-10 sec à 6-7%.
13. Faire une analyse au FACS.