

Document de préparation des échantillons
Plateforme de Physiologie Cellulaire

Table des matières

Préparation des pancréas en vue de la détermination de la <i>beta cell mass</i> (BCM) par immunohistochimie	3
Préparation des tissus adipeux pour faire la morphométrie des adipocytes	4
Préparation des plasmas pour ELISA et AlphaLISA	5
Préparation des sérums pour ELISA et AlphaLISA	6
Préparation des plasmas pour ELISA et AlphaLISA via les tubes violet BD	7

Préparation des pancréas en vue de la détermination de la *beta cell mass* (BCM) par immunohistochimie

PRÉPARATION DU FIXATEUR : FORMALINE (formaldéhyde* tamponné)

1- Le jour même de l'expérience (toujours faire frais), préparer sous la hotte chimique une solution de Formaline 10% (vol/vol) en diluant du formaldéhyde* concentré (37%) avec du PBS, concentration finale de formaldéhyde de 3,7%. Prévoir de faire suffisamment de solution Formaline pour tous vos pancréas (30 ml de formaline par pancréas).

*Fisher, F79500

2- Identifier des tubes (en polypropylène (pp)) de 50ml (**ne pas utiliser des 15ml**) et transférer 30 ml de Formaline.

FIXATION DES PANCRÉAS

3- Après la dissection, peser** rapidement les pancréas et les transférer dans leur tube de 50 ml respectif. Tenter le plus possible de récolter le pancréas en un morceau.

ATTENTION : il est très important de bien effectuer la dissection des pancréas en enlevant le maximum de tissus non-pancréatique (gras, intestin, lymph node, etc). Les analyses seront ainsi beaucoup plus précises.

4- Incuber les pancréas dans la formaline pendant 24 heures à température pièce (dans leur tube de 50ml) à l'abri de la lumière.

5- Mettre ensuite les tubes à 4°C jusqu'à leur envoi à la plateforme.

*Fisher, F79500 (formaldéhyde stock) : devrait être renouvelé à toute les années.

**La prise des poids est la responsabilité du client. Si les poids des pancréas ne sont pas disponibles, la plateforme ne pourra pas calculer la BCM absolue mais seulement une quantité relative

Préparation des tissus adipeux pour faire la morphométrie des adipocytes

PRÉPARATION DU FIXATEUR : FORMALINE (formaldéhyde* tamponné)

1- Le jour même de l'expérience (toujours faire frais), préparer sous la hotte chimique une solution de Formaline 10% (vol/vol) en diluant du formaldéhyde* concentré (37%) avec du PBS, concentration finale de formaldéhyde de 3,7%. Prévoir de faire suffisamment de solution pour tous vos tissus (30 ml de Formaline par animal).

*Fisher, F79500

2- Identifier des tubes (en polypropylène) de 50ml (**ne pas utiliser des 15ml**) et transférer 30 ml de Formaline.

FIXATION DES TISSUS ADIPEUX

3- Après la dissection, peser rapidement les tissus et les transférer dans leur tube de 50 ml respectif.

ATTENTION : enlever le maximum de tissus non-adipocytaire (intestin, lymph node, etc). Les analyses seront ainsi beaucoup plus précises.

4- Incuber les tissus dans la Formaline pendant 24 heures à température pièce (dans leur tube de 50ml) à l'abri de la lumière.

5- Mettre ensuite les tubes à 4°C jusqu'à leur envoi à la plateforme.

*Fisher, F79500 (formaldéhyde stock) : devrait être renouvelé à toute les années.

Préparation des plasmas pour ELISA et AlphaLISA

Préparation des échantillons de plasma (le plasma doit être préparé dans l'heure suivant la collection)

1- Le sang doit être prélevé dans un tube eppendorf contenant un anti-coagulant (EDTA 2%, citrate 3.2% ou héparine 3.8%).

Attention le choix de l'anti-coagulant dépend du kit (fournisseur) et de l'analyte à doser. Avant de procéder, toujours vérifier les exigences du kit ou de la procédure.

Pour certains analytes, un inhibiteur de protéases doit être ajouté lors de la récolte des échantillons. Exemples : **Glucagon**, aprotine 500kIU pour chaque ml de sang.

GLP-1 (active), DPP-4 inhibitor (valine pyrrolidide 0.01 mM) + aprotine 500kIU pour chaque ml de sang.

- 2- Mélanger les tubes document par inversions et les placer ensuite sur glace jusqu'à la centrifugation.
- 3- Centrifuger 10 minutes à 4°C à 1000 – 1500 x g sans le frein
- 4- Récolter la phase supérieure jaune, le plasma, dans un nouveau tube 1,5ml.
- 5- **Facultatif** : Transférer l'échantillon sur un filtre de 0.22 micron et centrifuger à 5 000 RPM pendant 1 min à 4°C pour recueillir le plasma filtré.

Conservation

5- Faire des aliquots (tube 1,5ml)* et les congeler à -80°C. Éviter les cycles de gel/dégel lors de différent dosages.

Notes :

- Le Sodium Azide est incompatible avec l'AlphaLISA et certains ELISA.
- Une hémolyse prononcée peut interférer avec l'AlphaLISA et certains ELISA.

Réf : <https://www.thermofisher.com/ca/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/elisa-protocol/elisa-sample-preparation-protocols/plasma-and-serum-preparation.html>

*le volume par aliquot dépend des exigences des dosages/kits utilisés et le nombre de dosages à faire.

Préparation des sérums pour ELISA et AlphaLISA

Préparation des échantillons de sérum

1- Le sang doit être prélevé dans un tube sec de 1,5ml, ne contenant rien.

Pour certains analytes, un inhibiteur de protéases doit être ajouté lors de la récolte des échantillons. Exemples : **Glucagon**, aprotine 500kIU pour chaque ml de sang.

GLP-1 (active), DPP-4 inhibitor (valine pyrrolidide 0.01 mM) + aprotine 500kIU pour chaque ml de sang.

2- Les tubes sont laissés 40-60 minutes à RT° pour laisser le temps au sang de coaguler.

3- Centrifuger 10 minutes à 4°C à 1000xG

4- Le surnageant, le sérum, doit être récolté dans un nouveau tube de 1,5ml.

Conservation

5- Faire des aliquots*(tube 1,5ml) et les congeler à -80°C. Éviter les cycles de gel/dégel.

Notes :

- Le Sodium Azide est incompatible avec l'AlphaLISA.

- Une hémolyse prononcée peut interférer avec l'AlphaLISA.

Réf : <https://www.thermofisher.com/ca/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/elisa-protocol/elisa-sample-preparation-protocols/plasma-and-serum-preparation.html>

*le volume par aliquot dépend des exigences des dosages/kits utilisés et le nombre de dosages à faire.

Préparation des plasmas pour ELISA et AlphaLISA via les tubes violet BD (utilisés souvent en recherche clinique)

1. Recueillir 2 ml de sang à l'aide d'un anticoagulant k2-EDTA (tube violet).
2. Mélanger par inversion uniquement.
3. Centrifuger le sang à 700-1 000 x g pendant 10 minutes à 4°C.
4. Pipeter dans un tube PP de 1,5 ml la couche supérieure de plasma jaune sans perturber la couche leucocytaire blanche.
5. Congeler à -80°C (ou -20°C pendant quelques jours).