CYBIO Core Facility	**Procédure : PREPARATION DES LIQUIDES DE GAINE**	Institut Cochin
	Référence : PRCYBIO/PcD/073/7 — Création/modif : 19/03/2025	
	Version : 7 — Nb de pages : 1/4	

	Fonction	Nom
Rédacteur	Assistant-ingénieur	C. VAZ
Vérificateur	Ingénieur d'études	S.Many
Approbateur	Responsable plate-forme	M. ANDRIEU

Révisions			
Version	Description	Auteur	Date
1	Création	Clément Vaz	25/11/21
2	Ajout de masses en gramme	Jaya jeremias	11-04-22
3	Modification de logo CYBIO	H.SAHI	27/07/2023
4	Modification du point 1 Modification du point 2 Ajout du point 4.1 Modification et correction du point 4.2 Correction du point 4.3	Y.HADJOU	14/11/2023
5	Modification du titre Modification du point 1 Modification du point 2 Modification du point 4.1 Modification du point 4.2 Modification du point 4.3 Ajout du point 4.4	A. TROULLIER	21/11/2024
6	Modification du titre Modification du point 1 Modification du titre 4.2 Modification du point 4.2 Modification du point 4.3	Y. HADJOU	02/12/2024
7	Diminution de la quantité de NaCl utilisée	A. GUEDON	19/03/2025

1. Objet et domaine d'application

La présente procédure décrit la préparation des liquides de gaines utilisé pour le Bio-Plex 200, les cytomètres spectraux « Aurora », les cytomètres conventionnels « Fortessa et LSRII» et les trieurs cellulaires « BD ARIA III » , localisés dans les bâtiments Gustave Roussy et Cassini.

2. Matériel

- Flacons en verre de 500mL
- Bouteilles en verre de 1L
- Pissette d'H_2O désionisée Milli-Q®
- H_2O désionisée Milli-Q®
- Acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) en poudre (Sigma-Aldrich, ref. E6635)
- Fluorure de Sodium (NaF) en poudre (Sigma-Aldrich, ref. 201154)
- Chlorure de Sodium (NaCl) en poudre (Sigma-Aldrich, ref. S9888, Calcium ≤ 0.002 %, Magnesium ≤ 0.001 % = ancienne référence, ou Sigma-Aldrich ref. S9625 ReagentPlus®, ≥ 99.9% nouvelle référence).
- Solution de soude (NaOH) 1 N

- Hotte de sécurité biologique
- Balance, spatules, coupelles de pesée
- Entonnoirs
- Lunettes de protection, blouse, gants, masque FFP3

3. Documents associés

4. Description

4.1. Préparation des solutions stock EDTA et NaF

Note : Travailler sous sorbonne éteinte (pour éviter les projections de poudre), **en portant un masque FFP3 et des lunettes de protection.**

1. **Solution stock EDTA 0.25 M**
   Le poids moléculaire de l'EDTA est de 372,24 g/mol, sa solubilité dans l'eau à 20 °C est de 100 g/L.
   Peser 93.06 g de poudre d'EDTA (372.24/4), la verser dans une bouteille de 1 L (utiliser un entonnoir) puis compléter le volume à 1 L avec de l'H_2O Milli-Q®.
2. **Solution stock NaF 0.6 M**
   Le poids moléculaire du NaF est de 41.99 g/mol, sa solubilité dans l'eau à 20 °C est de 42 g/L.
   Peser 27 g de poudre de NaF (41.99 x 0.6), la verser dans une bouteille de 1 L (utiliser un entonnoir) puis compléter le volume à 1 L avec de l'H_2O Milli-Q®.
3. **Dissolution des poudres de NaF et EDTA**
   Placer un barreau aimanté dans chaque bouteille.

   Hors hotte, laisser les bouteilles sur un agitateur jusqu'à dissolution. On peut simplement agiter manuellement la bouteille de NaF dûment fermée.

4.2. Préparation des solutions "FACS Flow 20X " et "Aurora 20X "

4.2.1. Préparer des flacons de 500 mL étiquetés "Aurora 20X" (Aurora) et "Facsflow 20X" (Fortessa et LSRII)

Note : Travailler sous sorbonne allumée, en portant un masque FFP3 et des lunettes de protection.

	Aurora 20X		**FACS Flow 20X**	
	Poids ou volume à ajouter	Concentration	**Poids ou volume à ajouter**	Concentration
4.2.2. Ajout de NaCl (poudre)	non	non	20 g	0.68 M = 40 g/L
Note : Utiliser le bécher annoté NaCl. Ajouter de la poudre de NaCl jusqu'au trait sur le bécher qui correspond à 20 g de NaCl. Verser ces 20 g de poudre dans chacun des flacons de 500 mL concernés. Poids moléculaire du NaCl 58,44 g/mol.				
4.2.3. Ajout d'EDTA (solution stock 0.25 M)	non	non	28 mL	0.014 M
Note : Pipeter 28 mL et les ajouter dans chacun des flacons de 500 mL concernés.				
4.2.4. Ajout de NaF (solution stock 0.6 M)	100 mL	0.12 M	100 mL	0.12 M
Note : Utiliser une éprouvette pour mesurer 100 mL et les ajouter dans chacun des flacons de 500 mL concernés.				
4.2.5. Compléter les flacons avec de l'H_2O Milli-Q® pour un volume final de 500 mL.				
4.2.6. Sous la hotte, rincer deux fois l'éprouvette utilisée pour le NaF avec de l'eau et jeter l'eau de rinçage dans la poubelle liquide de déchets chimiques. 4.2.7. Nettoyer le plan de travail de la hotte.				

4.2.8. Ranger les solutions "Aurora 20X" et "Facs Flow 20X" sur l'étagère au-dessus de l'évier et éventuellement dans le placard du passage.

4.3. Préparation des solutions finales " 1X "de liquide de gaine Aurora et FACS Flow

4.3.1. Remplir les bidons de 10 L vides avec 9,5 L d'H_2O Milli-Q®.
(les bidons vides et ceux contenant 9.5 L d'H_2O Milli-Q® sont dans la pièce du fond côté bureau 312)
4.3.2. Au moment de l'utilisation, ajouter dans chaque bidon le contenu d'un flacon en verre de 500 mL de solution "Aurora 20X" ou "Facsflow 20X" (pour le Fortessa et le LSRII) en utilisant l'entonnoir marqué Facs Flow.

Concentrations finales :
- Aurora 1X : NaF 0.006 M
- Facsflow 1X : NaCl 4 g/L (0.4 %) EDTA 0.0007 M NaF 0.006 M.

4.3.3. Apposer impérativement une étiquette "Aurora 1X" ou "Facsflow 1X" sur les bidons de liquide de gaine.
Laisser les bidons "Aurora" dans la pièce du fond et les bidons "Facsflow" dans le passage.

4.3.4. Rincer l'entonnoir et les flacons en verre vides avec de l'eau du robinet.
4.3.5. Enlever l'étiquette des flacons vides et les placer dans le bac à vaisselle sale à côté de l'évier.

4.4. Préparation des solutions "10X" de liquide de gaine du **trieur Aria, sans calcium ni magnesium**

4.4.1. Préparer des flacons de 500 mL étiquetés "NaCl 10X"

4.4.2. Ajout de NaCl

	NaCl 10X	
	Poids à ajouter	Concentration
Ajout de NaCl (poudre)	45	1.54 M = 90 g/L
Note : Utiliser le bécher annoté NaCl. Ajouter de la poudre de NaCl jusqu'au trait sur le bécher qui correspond à 45 g de NaCl. Verser ces 45 g de poudre dans chacun des flacons de 500 mL concernés. Poids moléculaire du NaCl 58,44 g/mol.		

4.4.3. Compléter les flacons avec de l'H_2O Milli-Q® pour un volume final de 500 mL.
4.4.4. Ajouter 80 µL de NaOH 1 N (pour obtenir un pH d'environ 7.2 du liquide de gaine final 1X)
4.4.5. Autoclaver les flacons pour les stériliser.

4.5. Préparation des solutions finales 1 X de liquide de gaine Aria

4.5.1. Remplir les bidons de 5 L vides avec 4,5 L d'H_2O Milli-Q®.

4.5.2. Autoclaver les bidons pour les stériliser.

4.5.3. Au moment de l'utilisation, ajouter dans chaque bidon le contenu d'un flacon en verre de 500 mL de solution "NaCl 10X".

Concentration finale : NaCl 9 g/L (0.9 %)
pH enV; 7 à 7.4