

GUÍA DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA CITOMETRÍA

Consideraciones antes de la separación celular

Antes de traer tus células para separar, una serie de parámetros deben ser definidos que nos permitirán elegir las condiciones específicas del sorting. Necesitamos saber:

- Nivel de bioseguridad de la muestra. Esto define el instrumento que podemos usar y las precauciones de bioseguridad que debemos seguir.
- Tipo y tamaño de las células. Esto define el tamaño de nozzle y la presión que debemos usar.
- Marcadores y fluorocromos: esto define los láseres, filtros ópticos, controles requeridos, etc.
- Abundancia relativa de la población de interés y el nivel de pureza requerido. Esto define la precisión del sorting.
- Aplicación de la muestra después del sorting. Esto define condiciones externas del instrumento: esterilidad, refrigeración, etc.

Por favor, asegúrate de poner esa información en tu reserva.

¿Qué necesito traer a mi cita de sorting?

- Las muestras prefiltradas con un filtro de 35 μm si usamos el nozzle de 70 μm nozzle para el sorting (o de 50 μm para el nozzle de 100 μm); tenemos algunos filtros en el laboratorio si lo necesitáis.
- Células en una suspensión monodispersa en PBS o medio que tenga menos del 2% FCS. Normalmente lo llamamos FACS buffer y tiene composición variable en función del tipo celular y del experimento.
- Controles.
- Tubos para recoger las células CON buffer (medio de cultivo/PBS, etc) ¡No con sustancias volátiles y/o dañinas como 2-Mercaptoethanol o Trizol!). Recomendamos humedecer las paredes internas de los tubos de recogida con el buffer de tu elección.

¿Qué controles necesito?

- Células sin marcar, que serán usadas como control negativo.
- Células marcadas con cada uno de los fluorocromos individualmente (Single stained controls) o beads de compensación; para compensar deberían tener poblaciones positivas y negativas.
- FMO controls además de controles experimentales para colocar bien los gates.
- Si tus marcadores se expresarán del mismo modo en las condiciones experimentales (por ejemplo, usando el mismo fluorocromo o la intensidad) solo es necesario traer los controles la primera vez.
- Si se usan beads de compensación en vez de células hay que asegurarse que la intensidad de fluorescencia es equivalente.

¿En qué soportes puedo separar?

- Tubos Eppendorf de 2mL (pueden contener alrededor de 300,000 células) o 1.5mL.
- Tubos de citometría de 5mL (cada uno puede recoger 4 millones de células sin medio de cultivo usando el nozzle de 70 μm)

- Tubos Falcon de 15ml (2 poblaciones simultáneamente)
- Placas (6/12/24/96/384 pocillos).
- Portas o placas de 6cm, 10cm plates.

¿Cuántas células debería traer?

El número de células a preparar para un experiment de citometría de flujo puede variar mucho y depende del propósito del mismo. Habla con nosotros primero si tienes dudas.

- Se pueden separar de 10 a 20 millones de células en 1 hora (dependiendo del tipo de muestra y la población de interés)
- Para análisis celular, es siempre un buen inicio empezar con $0.5 - 1.0 \times 10^6$ células.
- Para eventos raros (<5%) solo es posible si se adquiere una gran cantidad de muestra (planea tu tiempo de reserva en consecuencia). Los FMO controls son útiles aquí para dibujar un gate con confianza sobre la población de interés.

¿Qué densidad de células debería tener?

- Para separar en tubos ('bulk' sort) alrededor de 10-20 millones/ml
- Para separar en placas, 1 – 2 millones/ml
- Por favor, trae buffer adicional para diluir las muestras si fuera necesario.
- Como regla de oro, aproximadamente, se necesita 1 hora de sorting para 1 ml de muestra.
- Si tu muestra solo tiene unos cientos de células, diluye tu muestra entre 200 – 500 μ L.

¿Cuántas poblaciones puedo recoger a la vez?

- 2 poblaciones en 15 mL tubos de Falcon
- 4 poblaciones (Fusion) o 6 poblaciones (Astrios) en tubos de citometría de 5 mL o en tubos eppendorf tubes.
- Sortings en placa sólo una población por pocillo a la vez, para todas las configuraciones de placa.

¿Cuánto tiempo debería reservar?

- Para poner a punto voltajes, compensación y gates = 15 – 30 minutos
- Para separar alrededor de 10 millones de células de la muestra = 1 hora
- Limpieza del instrumento = 15 min

¿Por qué debería teñir las células muertas?

- Mejora la calidad de la muestra separada → más células viables para experimentos posteriores.
- Las células muertas tienden a unirse inespecíficamente a anticuerpos, por lo que puedes tener falsos positivos en tu análisis/sorting.
- Las células muertas pueden perder la expresión de una proteína fluorescente previamente expresada, permitiendo a los falsos negativos separarse.
- Los marcadores de viabilidad suelen ser intercalantes del DNA que NO acceden al DNA de células intactas.

¿Qué hacer cuando tus células forman agregados?

Generalmente se recomienda tener una concentración final de 2-5 mM EDTA en tu FACS buffer. Si tus células tienen mayor tendencia a formar agregados, puedes considerar una de las siguientes modificaciones: Use calcium/magnesium free buffer for your cells

- Añadir EDTA (2 - 5 mM)
- Añadir 25 µg/ml DNase I + 5 mM MgCl₂ (no EDTA entonces).
- Añadir 1% Accutasa en el buffer de sort.

¿El sorting es estéril?

- No. Sin embargo, el buffer en nuestros sorters está filtrado con un filtro de 0,2 µm filter y las sample lines se limpian diariamente con BD FACS Clean (lejía), detergente y agua destilada, y las superficies se limpian generosamente regularmente con Etanol 70%. Los sorters son clasificados técnicamente como limpios y no estériles. Algunos de ellos tienen cabina de seguridad tipo II, la cual está creada para la seguridad del operador (evita flujo de aire hacia fuera); de todas formas, podemos encenderlo para tus muestras si quieres.
- Si quieres cultivar tus células después del sorting, te recomendamos añadir P/S a tu buffer de recogida o medio de cultivo. Periódicamente comprobamos las posibles contaminaciones del sorter incubando en medio de cultivo dentro de un incubador muestras tomadas del equipo, concretamente del chorro (stream) y del buffer (sheath). Hasta el momento, nunca hemos tenido ningún problema de contaminación.

¿Qué puedo hacer si tengo baja eficiencia en mi single-cell sorting?

- Separar una célula en un pocillo y esperar que crezca es difícil de conseguir. Se recomienda incrementar la cantidad de FBS en el medio de cultivo (10-20)%
- Adicionalmente, puedes hacer un “medio condicionado”, el cual es 50% medio completo fresco y 50% medio de cultivo de tus placas de cultivo, previamente filtrado con un filtro de 0,22µm. Esto le da a las células más posibilidades de crecer debido a que le añadimos algunos factores de crecimiento al buffer de recogida.

Muestras de Nivel de Bioseguridad 2 (mayoritariamente muestras humanas).

- Estas muestras solo se pueden reservar para separar en la sala de separación de muestras humanas, con el equipo BD FACS Aria Fusion.
- Deberán travesarse las muestras con tubos con tapa y dentro de un contenedor sellado preparado para ello (por ejemplo, los contenedores de plástico con tapa de las salas de cultivo).
- Las muestras DEBEN estar filtradas antes de venir al servicio.
- Las muestras se separarán en el BD FACS Aria Fusion sorter con la cabina de bioseguridad tipo II encendida.