
	<p>SERVICIOS CIENTÍFICO TÉCNICOS</p> <p>Citometría de Flujo</p> <p>Laboratorio N -1 F40 cmartinsorting@finba.es 985652413 (Ext:39793)</p>	
---	---	---

RECOMENDACIONES PREVIAS A LA SOLICITUD DE SORTING

1. INTRODUCCIÓN

El proceso de *sorting* permite la separación física de una célula o partícula de interés de una muestra heterogénea. La selección de la población de interés se realiza en función de distintas características como la expresión de una proteína, el contenido de DNA o RNA, la funcionalidad celular, alteraciones celulares, etc. En el caso del citómetro separador FACSAria II, la separación celular es de tipo electrostática, es decir, la separación se realiza porque a la población de interés se le confiere una determinada carga eléctrica.

2. PLANIFICACIÓN DEL ENSAYO DE SORTING

La separación celular o *sorting* puede realizarse en condiciones asépticas o no asépticas; ambas requieren una serie de preparativos previos, por lo que el ensayo de *sorting* ha de ser planificado con suficiente anterioridad y se ha de solicitar la reserva del Equipo en la Unidad al menos tres días hábiles antes. En algunas ocasiones, es posible que se requiera una prueba previa de citometría analítica o *pre-sort** para valorar la calidad de la muestra. Por otra parte, en todos los casos, la Unidad evaluará la viabilidad del ensayo de *sorting*, por si por alguna circunstancia éste no pudiera llevarse a cabo.

Los preparativos que han de realizarse antes del ensayo de *sorting* son los siguientes:

A. Llevados a cabo por la Unidad de Citometría de Flujo y Separación celular:

- Preparación del citómetro (el mismo día del *sorting*). El proceso completo dura una o dos horas (dependiendo de la condición aséptica o no) e incluye las siguientes etapas:

- Desinfección de toda la superficie de trabajo con etanol 70%
- Descontaminación del citómetro (con lejía al 10% o etanol 70%) y sonicado del *nozzle* (aproximadamente 30-45 minutos)
- Ajuste del *stream* (entre 30 minutos y una hora)
- *Test Sort* (unos 5-10 minutos)
- Ajuste del *Drop Delay* (5-10 minutos)
- Refrigeración de la cámara de inyección de muestra (al menos 15 minutos)

B. Llevados a cabo por el Usuario:

o Obtención de la muestra sobre la que se va a realizar el *sorting* (se realizará el mismo día del *sorting*). La muestra se obtendrá en estéril (para requerimientos asépticos), en medio de cultivo o en PBS frío (dependiendo de los requerimientos de la misma), evitando en la medida de lo posible la formación de *debris* y, sobre todo, de agregados celulares, que interfieren en gran medida con el funcionamiento del Equipo. Nuestra recomendación es que sean resuspendidas en PBS con 2-4% de FBS o BSA, opcional, y si son células adherentes, es conveniente añadir también EDTA a 1 mM.

o Para minimizar la posibilidad de atascos en el *nozzle*, las muestras deberán llegar filtradas, con un tamaño de poro dependiente de su tamaño celular, para PBMCs es conveniente un filtro de nylon de unos 35 µm. En la unidad se trabaja con filtros Falcon nº catálogo 352235. Si no van a pasarse de forma inmediata, se mantendrán en hielo y oscuridad.

o La muestra deberá llegar en tubos de poliestireno de 12x75 mm de 4 ml y la concentración celular ideal deberá estar en torno a las 10^7 células por ml para conseguir un rango de entre 10 a 15000 eventos por segundo. En el caso de células adherentes es conveniente una concentración de $7-8 \times 10^6$ células/ml. Para tamaños celulares grandes la concentración deberá ser menor, pero en la medida de lo posible no debe ser inferior a 10^6 células/ml para un ensayo de *sorting* viable.

o Para la recogida de las células separadas, y siempre que la población celular lo requiera, el Usuario suministrará a la Unidad 1-2 ml de PBS-BSA 2-4% o de Medio de cultivo (1 a 4, en función de los requerimientos del Usuario); estos tubos pueden ser tubos de poliestireno de 12x75 mm de 4 ml o bien tubos de 15 ml.

*NOTA: para un ensayo de calidad y mejores resultados es conveniente realizar un ensayo pre-sort, sobre todo en aquellos requerimientos con paneles de marcaje con varios fluorocromos. Esto es necesario para ajustar voltajes y compensaciones; para ello es conveniente suministrar a la unidad en días previos a la separación:

- tubo *unstained*: Se trata de la suspensión celular de partida (4×10^5 células en 500ul es suficiente) sin ningún tipo de marcaje.

-tubos *single stain*: Igual que el anterior, pero con un único marcador por cada tubo. El total de tubos, dependerá del número de marcadores en el panel de ensayo.

3. ESTIMACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS QUE PUEDEN OBTENERSE EN LA SEPARACIÓN Y DURACIÓN DEL PROCESO

Para realizar el cálculo del número aproximado de células que podrán ser recogidas, hay que tener en cuenta las siguientes variables:

- El porcentaje de la población de interés (células que cumplen el criterio de *sorting* definido por el usuario). Este porcentaje se ve afectado, entre otras variables, por el porcentaje de células viables y por el porcentaje de dobletes (agregados celulares) presentes en la muestra
- El filtro o “Máscara” de *sorting* empleado (“Rendimiento” o “Pureza”)

Rendimiento	Intenta capturar todos los eventos positivos posibles a pesar de la presencia de eventos negativos	Mayor eficiencia del ensayo en cuanto a concentración celular separada a expensas de una menor pureza.
Pureza	Captura sólo los eventos deseados en la ausencia de eventos negativos	Se recoge una menor población deseada, pero altamente pura.
Single-Cell	Igual que pureza, pero sólo un evento cada vez	de 1 a 100células por pocillo, en placa.

En la unidad recomendamos una combinación de máscaras de 16-16-0.

- La eficiencia media del *sorting*, que a su vez depende de la pureza de la muestra de partida, de la diferencia de intensidad media de fluorescencia entre la población negativa y la positiva, de la velocidad de flujo (*flow rate*) utilizada y de la concentración celular.
- La viabilidad celular *post-sorting*, dependiente del tipo celular utilizado. Debido al propio procedimiento las células son sometidas a presión, se les confiere una carga eléctrica y atraviesan un campo eléctrico de unos 12.000 voltios. En general se sitúa entre un 50-80%; a mayor tamaño celular menor viabilidad.

En cuanto a la duración total del proceso de separación, ésta depende de:

- El número de células separadas que quiera obtenerse
- El volumen de muestra
- La concentración celular de la muestra
- La velocidad de flujo (*flow rate*) utilizada, que puede ir de 1 a 11 (entre 10 y 80ul/min)

En la siguiente tabla se muestran los tiempos aproximados para un ensayo con una velocidad de flujo de 10.000 eventos/segundo, en base a la concentración de partida y la cantidad celular requerida a separar.

<u>%partida</u> Nº células a separar	<u>0,1%</u>	<u>1%</u>	<u>5%</u>	<u>10%</u>	<u>20%</u>
1.000	5,5 min	33seg	6,5 seg	3.3 seg	1,7seg
10.000	55min	5,5 min	1,1 min	33 seg	17 seg
100.000	9,8h	55min	11min	5.5min	2,8min
1.000.000	3,8días	9,2horas	1, 8horas	55 min	28min
10.000.000	38 días	3,8 días	18horas	9,2 horas	4,6 horas

4. CONDICIONES DE RECOGIDA DE LA POBLACIÓN SEPARADA

- SOPORTES DE RECOGIDA: Como ya se ha mencionado, la población separada puede recogerse en tubos de 4 ml o de 15 ml y también habría posibilidad de recogida en tubos de 1,5ml. En cualquier caso, para un tamaño de *nozzle* de 70 µm, podrán recogerse aproximadamente 3x10⁶, 8x10⁶ y 10⁶ células/tubo respectivamente. Para tamaños mayores de *nozzle*, la cantidad recogida sería menor. Se debe tener en cuenta este aspecto a la hora de suministrar el número correcto de tubos.
- TEMPERATURA DE RECOGIDA: A pesar de que la muestra de partida sí puede mantenerse en frío durante el proceso de separación, la recogida sólo podrá ser llevada a cabo a temperatura ambiente, debido al propio diseño del equipo. Esto significa que, en algunas ocasiones, las células separadas se mantienen a temperatura ambiente durante tiempos relativamente largos (más de 1 h) por lo que el usuario tendrá que valorar si quiere detener el proceso de *sorting* antes, para poder sembrar las células ya recogidas o suministrar a la unidad un soporte con hielo, compatible con el soporte de recogida.
- PUREZA DE LA POBLACIÓN SEPARADA: La pureza de la población separada se ve comprometida en las siguientes condiciones:
 - o Muestras con un porcentaje de *debris* elevado (por encima del 80-90%). Esto suele suceder en muestras procedentes de tejido disgregado
 - o Muestras con porcentajes reducidos de células positivas (inferiores al 10%). En estos casos puede requerirse de algún método de enriquecimiento previo
 - o Muestras en las que la diferencia de intensidad media de fluorescencia entre la población negativa y la positiva sea escasa o incluso solapante

En general, y con la excepción de las muestras en las que se cumplan alguna o todas las condiciones anteriores, las purezas que se obtienen suelen ser superiores al 90-95%.

5. ASEPSIA DEL PROCEDIMIENTO

La separación celular que se lleva a cabo en la Unidad no se puede considerar estéril sino aséptica, ya que no todo el material empleado en la misma puede esterilizarse (parte del equipo, instalaciones, etc). El proceso de *sorting* no está exento de riesgos de contaminación bacteriana, y aunque existen procedimientos para minimizarlos, siempre se recomienda la utilización de antibióticos en los cultivos que se realicen de la población separada.

Cristina Martín Martín
Responsable de la Unidad
de Citometría y Separación
celular
ISPA-FINBA
Febrero 2018