



Servizio di Citometria a Flusso e Cell Sorting

Dettagli richiedente

Nome	
Cognome	
Dipartimento/Afferenza	
E-mail	
Telefono	
Titolo del Progetto	
Codice Utenza	

Istruzioni Preparazione Campioni per la Citometria a Flusso (CFM)

- Fornire allo staff del laboratorio le informazioni riguardo l’origine dei campioni (specie e livello di sicurezza biologica). Il Moflo Astrios è dotato del sistema aerosol vacuum system e può processare anche cellule non fissate di livello BSL1 e BSL2, non oltre poiché non è racchiuso dentro una cappa a flusso laminare. L’ISX può processare unicamente cellule non fissate di livello BSL1 e fissate di livello BSL2.
- La sospensione cellulare deve essere a singole cellule. La concentrazione cellulare dipende dalla tendenza intrinseca delle cellule a formare aggregati, e dalla quantità di cellule morte già presente nella sospensione, dovuta per esempio all’utilizzo di sistemi enzimatici aggressivi (a tal proposito è preferibile utilizzare sistemi meno aggressivi quali Accumax/Accutase al posto di Tripsina/EDTA). Tipicamente le cellule di linea in adesione e le cellule tumorali tendono ad aggregare facilmente, necessitano pertanto l’aggiunta di sostanze in grado di preservare la formazione di aggregati al buffer utilizzato per la marcatura. Solitamente si consiglia la BSA < 2% (p.e. 0,1%), o EDTA 0.5-5 mM, o DNAsi (20-100 ug/ml) e l’assenza di siero e proteine nel buffer di marcatura finale. Solitamente utilizzato tampone PBS 1X Ca²⁺/ Mg²⁺- free filtrato a 0,22 µm. In alternativa si può utilizzare tampone HBSS (Hank’s Balanced Salt Solution)
- Per analisi di cellule vive non fissate, per evitare che la quantità di DNA che viene rilasciato dalle cellule morte aumenti la quota di autofluorescenza utilizzare sempre, come ultimo step prima dell’analisi, un marcatore di vitalità cellulare, per eliminare le cellule morte, o le cellule con membrana parzialmente danneggiata. In commercio esistono marcatori permeabili che entrano solo nelle cellule con membrana danneggiata (PI, 7AAD); permeabili che entrano nelle cellule vive (DRAQ5) o impermeabili nucleari (DAPI, HOECHST). Di nuova tipologia esistono in commercio marcatori a duplice scopo utilizzabili sia per colorazioni vitali che su cellule fissate su tutti i laser disponibili (fixable per esempio Live-Dead staining kit)
- Effettuare sempre la titolazione anticorpale con un esperimento di prova da condurre con il sistema utilizzato, specie se è prevista marcatura multipla, per ottenere una buona separazione tra i negativi (autofluorescenza) e i positivi. Questo passaggio è fondamentale per definire il set-up strumentale, il protocollo di analisi e la strategia di gating da utilizzare.

- E' indispensabile conoscere la natura esatta della sospensione cellulare a singole cellule, in termini di dimensione, per la corretta selezione del nozzle-tip (70 o 100 μM), per evitare di intasarlo con aggregati e sottoporre ad eccessive pressioni cellule eventualmente fragili. Le condizioni ottimali di analisi sono inoltre strettamente correlate al buffer di marcatura selezionato e alla temperatura da impostare nel bagno termostatico nel range di temperatura +5 - +37°C. Avvisare in tempo il tecnico che effettuerà l'analisi se occorre accendere il bagno termostatico refrigerato a 4°C. Cellule staminali o particolarmente fragili possono eventualmente invece essere processate a temperatura ambiente (24°C) o di crescita (37°C).
- E' sempre preferibile portare il campione concentrato e un abbondante aliquota di buffer di marcatura (o PBS 1X filtrato) per eventuale diluizione durante la definizione delle condizioni ottimali di analisi/sorting. Portare sempre: 1 campione non marcato (definito unstained/mock/control ecc), 1 campione con ogni singolo marcatore fluorescente utilizzato nel protocollo per effettuare la compensazione, e un campione con tutte le marcature che occorrono nell'analisi sperimentale (fully stained). Eventualmente includere nell'analisi ulteriori controlli interni di reazione (controlli negativi, isotipi anticorpali, non trasfettati ecc, e opportuni controlli positivi). Solitamente occorrono almeno 10^6 cellule/ml del campione non marcato (in caso di campioni molto rari anche 5×10^5 cellule/500 μl), utilizzato come controllo negativo, e se disponibile, è sempre preferibile disporre di un campione positivo: un campione in cui è stata già testata la marcatura/fluorescenza del fluorocromo utilizzato, idealmente titolato in modo da avere le condizioni ottimali in termini di Staining Index (indicatore della bontà di separazione tra la popolazione negativa/autofluorescente vs la popolazione di interesse positiva/fluorescente). Isotipi e controlli positivi vengono utilizzati per la definizione dei parametri ottici e la creazione del protocollo; per il sorting concentrare molto il campione in piccoli volumi (almeno $5-6 \times 10^6$ cellule/1 o 2 ml)
- Lavare sempre almeno due volte con PBS 1X $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free la sospensione cellulare per allontanare componenti indesiderati eventualmente presenti nel terreno di coltura del campione o durante le fasi di preparazione/marcatura (p. e. indicatori di colore che aumentano l'autofluorescenza; proteine contenute nel siero che tendono a far aggregare le cellule e creare intasamento del sistema fluidico).
- Filtrare sempre la sospensione cellulare, marcata e non, con setacci di 70 o 40 μm (in base alla dimensione del campione di partenza), per evitare intasamento delle fluidiche strumentali durante il processamento dei campioni. Effettuare la conta cellulare sempre dopo la filtrazione dei campioni con i setacci cellulari e prima del protocollo di marcatura con sostanza/anticorpo/marcatore fluorescente.
- Preparare il buffer di raccolta tenendo a mente la composizione cellulare e le applicazioni successive al sorting cellulare (in caso di propagazione in coltura: raccolta in terreno di coltura con aggiunta di antibiotici e 20% di siero o 100% di siero; per raccolta e successiva analisi molecolare si può utilizzare il buffer di lisi ecc...).
- Per aumentare la % di vitalità cellulare post-sorting è fortemente raccomandato avvinare i contenitori di raccolta con il buffer di raccolta opportuno per almeno il 70% della capienza totale, mantenerli a 4°C, e svuotarli a 1/3 della capienza massima poco prima dell'analisi. Solitamente la preparazione tipica del campione in CFM prevede il blocco della reazione a 4°C e analisi/sorting a 4°C per prevenire attivazione di vie metaboliche indesiderate e preservare la funzionalità cellulare.
- Concentrazione e volume del campione: per analisi è consigliabile una sospensione cellulare di 10^6 cellule/ml (minima accettabile: 3×10^5 cell/500 μl); per cell sorting dipende dalle applicazioni: solitamente almeno 5×10^6 cellule (consigliabile 20×10^6 cellule).

- Sono da preferire contenitori per la preparazione (tubi FACS da 5ml, provette da 1,5 ml, tubi da 15 e 50 ml) e la raccolta (tubi, provette e piastre a multipozzetto) del campione costituiti da polipropilene (PP) anziché polistirene (PS), in particolar modo per esperimenti di cell sorting. E' stata dimostrata una maggiore resa e vitalità conseguente al loro utilizzo in tutte le fasi sperimentali.
- Tempo di analisi: è strettamente correlato alla concentrazione e natura del campione iniziale, strategia di analisi selezionata (high speed vs low-speed) e applicazioni successive all'analisi. Il MoFlo Astrios EQ ha la massima velocità di sorting con il nozzle da 70 µm di 25.000 eventi al secondo; con il nozzle da 100 µm la massima velocità è 10.000 eventi/secondo.

ELENCO CAMPIONI				
Nome Campione	Specie	Marcatori utilizzati	Volume fornito (ml)	Concentrazione (cellule/ml)

Note

1. Il Laboratorio non è responsabile di eventuali non conformità del campione dovute alla modalità di preparazione e/o alla modalità di conservazione adottate dall'utente.
2. Il MoFlo AStrios EQ per sua natura, genera droplet durante l'analisi arrecanti potenziale rischio biologico per l'operatore. In caso di processamento e cell sorting di cellule vitali non fissate di campioni geneticamente trasformati o ingegnerizzati con virus patogeni non inattivati, informare l'operatore dei rischi e livelli di biosicurezza.
3. **I campioni non conformi, danneggiati o non chiaramente identificati nel presente modulo non verranno processati.**
4. I campioni eventualmente avanzati, terminate le analisi richieste dall'utente, verranno prontamente riconsegnati allo stesso, se non diversamente disposto dallo stesso (per es. conferimento nel contenitore rifiuti speciali sanitari all'interno del laboratorio) salvo diverse disposizioni (le modalità di conservazione dei campioni sono stabilite esclusivamente dal Laboratorio).
5. La consegna dei risultati sperimentali verrà concordata in sede di attivazione del codice di servizio FS da parte dell'utente (file xls, word, .fcs).

Luogo e Data _____

Firma _____