



Preparación de muestras para separación celular

Antes de realizar una separación celular hay que definir una serie de parámetros que permitirán elegir adecuadamente cuales deben de ser las condiciones específicas de la separación. Los parámetros más importantes que debes de comunicar al Servicio de Citometría son:

- **Tipo y tamaños de la célula o partícula a separar:** *determina el tamaño boquilla, el tampón de sorting y las medidas de bioseguridad.*
- **Fluorescencias** en base a las cuales se define la selección: *define la línea de láser, los filtros, los controles de fluorescencia necesarios, etc.*
- **Abundancia relativa de la población de interés. Numero de células necesarias y pureza requerida:** *define el modo de sorting, la velocidad, la concentración celular de la muestra...*
- **Aplicación después del sorting:** *"esterilización del equipo", tampón de recogida, refrigeración.*
- Agentes biológicos de la muestra: rellenar **documento control Seguridad Biológica** (dicho documento ha de ser firmado por el jefe de línea).

Es posible que sea necesario realizar una prueba a pequeña escala antes del experimento definitivo para establecer alguno de estos parámetros.

Parámetros importantes de la preparación de muestras para sorting

- Es importante que la muestra no contenga muchas células muertas o dañadas, en el caso que las hubiera deben intentar eliminarse previamente.
- En caso de no poder ser eliminadas puede añadirse 10U/mL DNAsa II al tampón de sorting para evitar la agregación.
- En el caso de células adherentes es muy importante tripsinizar bien para evitar agregados celulares. No parar la reacción con medio con suero. Diluir la muestra y lavar las células en PBS 1x (sin Ca/Mg⁺⁺).
- Resuspender la muestra en *tampón de sorting**:
 - ✓ **células adherentes:** PBS, 5mM EDTA, 25mM HEPES pH7.0. suplementado con un 2-5% de suero fetal bovino (puede sustituirse por BSA.)
 - ✓ **para células en suspensión:** PBS, 1mM EDTA, 25mM HEPES pH7.0 también suplementado con un 2-5% de suero fetal bovino. (puede sustituirse por BSA.)

*El Servicio de Citometría te puede proporcionar el tampón de sorting y el filtro adecuado para tu muestra). Haz pasar tampón de sorting por el filtro antes de pasar tu muestra con objeto de "arrancar el flujo" (las muestras se pueden filtrar en el Servicio).

- Filtrar las muestras por un filtro 30 um inmediatamente antes de pasarlas por el citómetro
- La concentración celular de la muestra (4-20 millones de células/ml) dependerá del tipo de célula y del modo de sorting y determinará la duración de la separación.
- Recogida de muestras puede realizarse en función de las aplicaciones posteriores en:
 - ✓ falcons de 15 ml
 - ✓ tubos de citómetro de 4ml
 - ✓ eppendorfs de 2ml,
 - ✓ eppendorfs de 1.5,
 - ✓ placas de cultivo (6,12,24,48, 96 pocillos),
 - ✓ portaobjetos para microscopia
- El tampón de recogida se determinará en función de los requerimientos posteriores a la separación y de la naturaleza de la muestra (cultivos, extracción de RNA, western blot etc). De manera general para líneas celulares que vayan a ser cultivadas posteriormente se aconseja un falcon de 15ml con 2ml de FBS suplementado con antibióticos.