



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 celular: *determina el tamaño boquilla y el tampón de sorting.*
- * 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"*
- * 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 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 (PBS, 5mM EDTA, 25mM HEPES pH7.0 en el caso de células adherentes o PBS, 1mM EDTA, 25mM HEPES pH7.0 para células en suspensión) suplementado con un 2% de suero fetal bovino y pasar por un filtro de 30 o 70 μ m (el Servicio de Citometría te proporcionará 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. La concentración celular de la muestra (4-10 millones de células/ml) dependerá del tipo y modo de sorting.
- Recogida de muestras en falcons de 15 ml con 2-4 ml de suero fetal (2 tubos por muestra a recoger) suplementado con antibióticos.