

## Formulário para realização de experimento de Cell Sorting utilizando o Citômetro de Fluxo MoFlo ASTRIOS EQ

**Este formulário deve ser totalmente preenchido e recebido pela Plataforma até 72 horas antes da data agendada.**

Enviar para [citometria.sorting@ioc.fiocruz.br](mailto:citometria.sorting@ioc.fiocruz.br)

Nome/Laboratório/Instituição do Usuário:

---

---

---

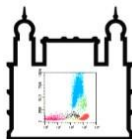
Título do Projeto:

---

---

---

[Digite aqui]



**Data e Hora Agendada do Experimento:**     /     /     , das : às : hs

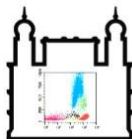
**Laboratório/Instituição/Investigador Principal (ou Orientador):**

---

---

**Telefone e email para contato:** \_\_\_\_\_

[Digite aqui]



## Diretrizes para o *Cell Sorting*

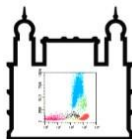
**Sorting Estéril:** Todos os tubos (aquisição e coleta), meios de cultura e amostras controle para ajustes precisam estar estéreis.

A Plataforma conta com uma Cabina de Segurança Biológica NB-2 para manuseio das amostras e reagentes para o pré- e pós-sorting.

**Amostras com suspensão celular.** Não existe uma concentração ótima para todos os tipos celulares e diferentes *sorting set-ups*, mas recomendamos iniciar com as seguintes concentrações:

- 20 a 40 x 10<sup>6</sup>/mL para linfócitos
- 10 a 15 x 10<sup>6</sup>/mL para ativadas, em proliferação ou linhagens celulares de pequeno tamanho
- 5 a 10 x 10<sup>6</sup>/mL para células de tamanho grande e/ou aderentes
- 1 x 10<sup>7</sup>/mL para aplicações especiais (p.ex. células do pâncreas, fígado ou cardíacas)
- A concentração celular da amostra a ser adquirida deve ser no mínimo 10 vezes (1 log) maior do que a concentração de células desejadas no pós-sorting. Levando em consideração o percentual da população celular de interesse dentro da amostra.
- Faça a contagem das células antes do *sorting*, não antes do procedimento de marcação, durante o qual geralmente resulta em perda de células. Sempre inicie a marcação com mais células que necessita para o *sorting* (o dobro é recomendado).
- **As células devem ser resuspensas em tampão PBS (sem Ca/Mg++) e SEM soro, porém até 2% de FCS (soro fetal bovino) é tolerado. Se estiver trabalhando com células aderentes ou suspensões viscosas adicione 5 mM de EDTA (para prevenir aglutinação e adesão ao sistema do citômetro).**
- Trazer uma quantidade extra de tampão, caso estejam muito concentradas.
- Trazer uma alíquota de 400 µL da amostra a ser purificada/sorteada para aquisição analítica e definições para o *sorting*. Controles experimentais são fundamentais, como células não marcadas, células marcadas com anticorpos isotípicos, tubos com marcação simples para ajustes da compensação, se necessário.
- **As amostras podem ser adquiridas a partir de tubos Falcon de 5; 15; ou 50 mL de polipropileno.**

[Digite aqui]

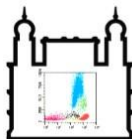


- O equipamento permite coleta de células (pós-sorting) nos seguintes tubos: até 6 tubos de citometria de 5 mL simultaneamente; 2 tubos de 15 mL; 3 tubos de 5 mL + 1 de 50 mL; 2 tubos de 50 mL. **TODOS OS TUBOS DE COLETA DEVEM SER DE POLIPROPILENO (tubo fosco Falcon-BD). NÃO UTILIZAR TUBOS DE POLIESTIRENO!!!**
- Para Sorting em placas utilizar placas Constar de 12, 24, 96, 384, ou 1536 poços. Os poços já devem vir com a quantidade recomendada de meio de cultura com 20% de soro apropriado. **TUDO ESTÉRIL.**
- Clonagem (*single cell sorting*) de parasitas são realizadas em placas de 96 poços contendo 200 µL de meio de crescimento específico para o parasita, com 20% de soro utilizado rotineiramente na manutenção do microorganismo. **TUDO ESTÉRIL!!!**

### FAVOR PREENCHER TODOS OS CAMPOS ABAIXO

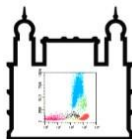
Tipo da amostra	
Número de tubos de amostras para sorting Concentração da amostra <i>pré-sorting</i>	
Origem (cultura de células, órgão, murino, humana etc.)	
Amostras patogênicas? Se SIM, indicar o agente infeccioso.	( ) SIM ( ) NÃO  Ag. Infeccioso: _____
Nível de Segurança Biológica	( ) NB1 ( ) NB2 ( ) OGM
Tratamento das células (ex., infectadas; estimuladas, tratamento com citocinas etc.)	
Número de células no tubo pré-sorting (aquisição)	
Sorting estéril	( ) SIM ( ) NÃO

[Digite aqui]



<i>Single Cell Sorting</i> (Clonagem) - somente em placa de 96 poços	( ) SIM ( ) NÃO
Tipo de tubo ou placa que será coletada amostra	( ) Tubo de 5mL ( ) Tubo de 15mL ( ) Tubo de 50mL ( ) Tubo de 50 mL ( ) Placa de _____ poços
Número desejado de células pós Sorting – tubo 1	
Número desejado de células pós Sorting – tubo 2	
Número desejado de células pós Sorting – tubo 3	
Número desejado de células pós Sorting – tubo 4	
Número desejado de células pós Sorting – tubo 5	
Número desejado de células pós Sorting – tubo 6	
Percentual da população-alvo dentro da amostra total	
Temperatura do sorting (°C)	( ) 4 ( ) 12 ( ) 20 ( ) 37 ( ) outra_____
Molécula-alvo e Fluorocromo utilizado	p.ex. CD3/FITC
Molécula-alvo 1/Fluorocromo 1	
Molécula-alvo 2/Fluorocromo 2	
Molécula-alvo 3/Fluorocromo 3	
Molécula-alvo 4/Fluorocromo 4	
Molécula-alvo 5/Fluorocromo 5	
Molécula-alvo 6/Fluorocromo 6	
Molécula-alvo 7/Fluorocromo 7	
Molécula-alvo 8/Fluorocromo 8	

[Digite aqui]



Molécula-alvo 9/Fluorocromo 9	
Molécula-alvo 10/Fluorocromo 10	
Molécula-alvo 11/Fluorocromo 11	

**ATENÇÃO:** O MoFlo ASTRIOS não lê os fluorocromos PerCP, nem o V500 (ambos da BD), mas lê o *tandem* PerCP/Cy5.5

[Digite aqui]