

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

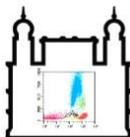
Este formulário deve ser totalmente preenchido e recebido pela Plataforma até 72 horas antes da data agendada.

Enviar para citometria.sorting@ioc.fiocruz.br

Nome/Laboratório/Instituição do Usuário:

Título do Projeto:

[Digite aqui]

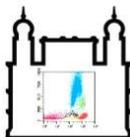


Data e Hora Agendada do Experimento: / / , das : às : hs

Laboratório/Instituição/Investigador Principal (ou Orientador):

Telefone e email para contato: _____

[Digite aqui]



Diretrizes para o *Cell Sorting*

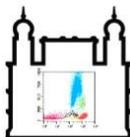
Sorting Estéril: Todos os tubos (aquisição e coleta), meios de cultura e amostras controle para ajustes precisam estar estéreis.

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 10⁶/mL para linfócitos
- 10 a 15 x 10⁶/mL para ativadas, em proliferação ou linhagens celulares de pequeno tamanho
- 5 a 10 x 10⁶/mL para células de tamanho grande e/ou aderentes
- 1 x 10⁷/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]

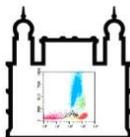


- O equipamento permite coleta de células (pós-sorting) nos seguintes tubos: até 6 tubos de citometria de 5 mL simultaneamente; 2 tubos de 15 mL; 3 tubos de 5 mL + 1 de 50 mL; 2 tubos de 50 mL. **TODOS OS TUBOS DE COLETA DEVEM SER DE POLIPROPILENO (tubo fosco Falcon-BD). NÃO UTILIZAR TUBOS DE POLIESTIRENO!!!**
- 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

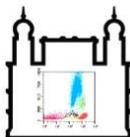
Tipo da amostra	
Número de tubos de amostras para sorting Concentração da amostra <i>pré-sorting</i>	
Origem (cultura de células, órgão, murino, humana etc.)	
Amostras patogênicas? Se SIM, indicar o agente infeccioso.	() SIM () NÃO Ag. Infeccioso: _____
Nível de Segurança Biológica	() NB1 () NB2 () OGM
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]