

INSTRUÇÕES PARA SORTING

Cell Sorting no Citômetro de Fluxo MoFlo ASTRIOS

Todos os experimentos de *Sorting* neste equipamento serão **somente** realizados por integrantes da Plataforma. Os usuários serão bem-vindos e devem estar presentes durante os experimentos para fornecerem informações acerca dos experimentos, como populações de interesse (estratégia de *gates*), concentração de células pré e pós-*sorting*; e anticorpos e fluorocromos utilizados. As amostras para *sorting* devem ser preparadas de modo que sejam entregues à Plataforma às por volta das 11:00 h do dia agendado.

O que trazer para o *sorting*:

- 1- Amostras em 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 células ativadas, em proliferação ou linhagens celulares de pequeno tamanho

5 a 10 x 10⁶/mL para células de tamanho grande e/ou aderentes

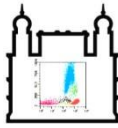
1 x 10⁶/mL para aplicações especiais (p.ex. células do pâncreas, fígado ou cardíacas)

Obs1: Faça a contagem das células antes do *sorting*, não antes do procedimento de marcação e filtração. Esses procedimentos geralmente resultam na redução da concentração de células. Sempre inicie a marcação com o dobro de células que necessita para iniciar o *sorting*.

Obs2: As células a serem adquiridas devem vir resuspendidas em PBS (sem Ca/Mg⁺⁺) ou meio de cultura (RPMI) SEM vermelho de phenol e preferencialmente SEM soro, porém até 1% 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).

Obs3: É recomendável trazer quantidade extra de tampão ou meio para diluir as amostras, no caso estejam muito concentradas ao serem adquiridas.

Nota: Se suas amostras precisam de procedimentos especiais, discuta conosco antes de realizar o experimento.



2- Amostra com células não marcadas e controles isotipos para controles de marcação do experimento, assim como amostras-controles marcadas com apenas um fluorocromo para ajustes de compensação. Caso seja necessário faça o procedimento de FMO.

3- Tubos de aquisição de amostras compatíveis com o MoFlo ASTRIOS:

Tubo Falcon de polipropileno, 12x75 mm, de 5 mL, fundo U, com tampa, estéril (Fornecedor SPECTRUM Ref. 352063).

Tubo Falcon de polipropileno de 15 mL

Tubo Falcon de polipropileno de 50 mL

Tubo cônico tipo Eppendorf de 1,5 mL

4- Tubos para coletar células pós-sorting:

Nota: Usar sempre tubos em polipropileno

Possibilidades de sorting simultâneos: até 6 tubos de 5 mL; até 2 tubos de 15 mL; até 2 tubos 50 mL; 1 tubo de 50 mL junto com até 4 tubos de 5 mL.

Sorting em placas (Corning Constar): 6, 24, 96, 384, 1536 poços.

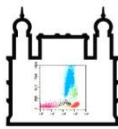
Single Cell Sorting – A “clonagem” de células ou parasitos deverá ser feita em placa de 96 poços fundo U, contendo 150 µL de meio apropriado para cultivo com o dobro da concentração de soro.

5- **Meio para coleta do material pós-sorting:**

Para Cultivo de Células: meio de cultura com o dobro da concentração usual de antibióticos e de soro ou FCS puro (para otimizar a recuperação celular, *rinse* as paredes dos tubos de coleta com FCS).

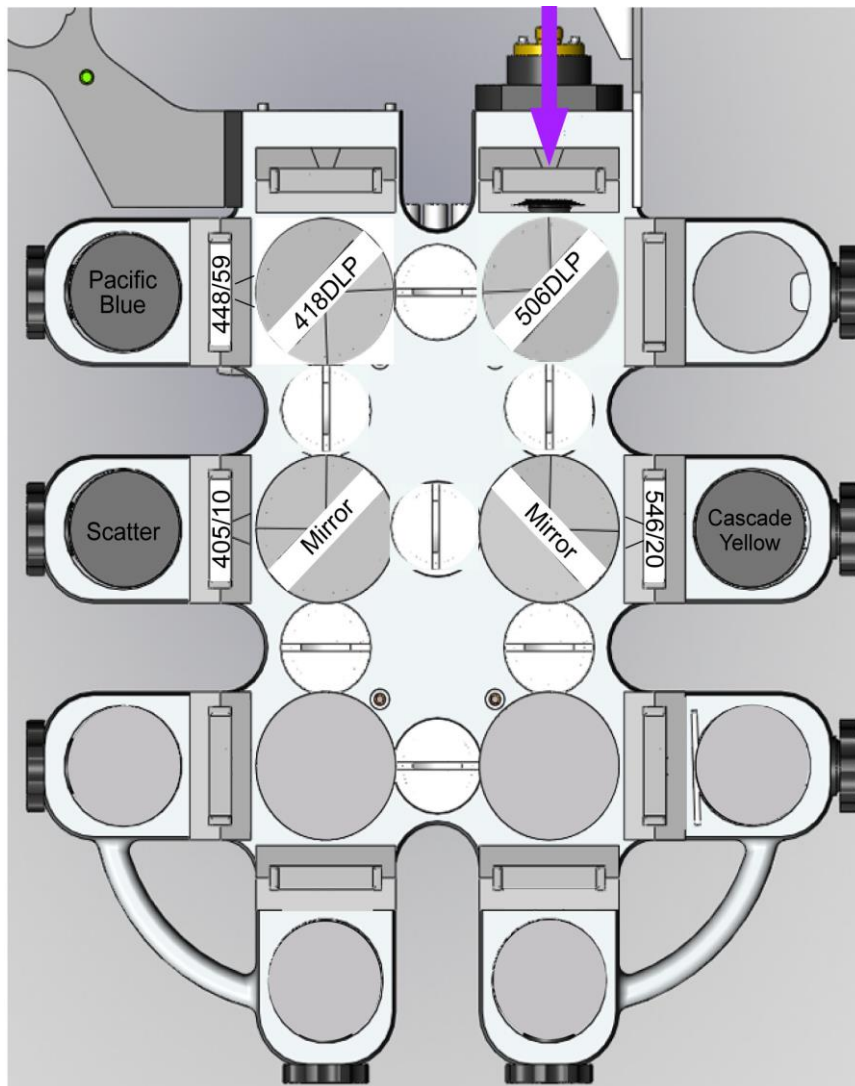
Para isolamento de RNA ou DNA: PBS ou outro tampão específico.

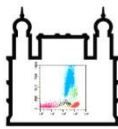
Traga quantidade extra de tampão ou meio para coletar as amostras.



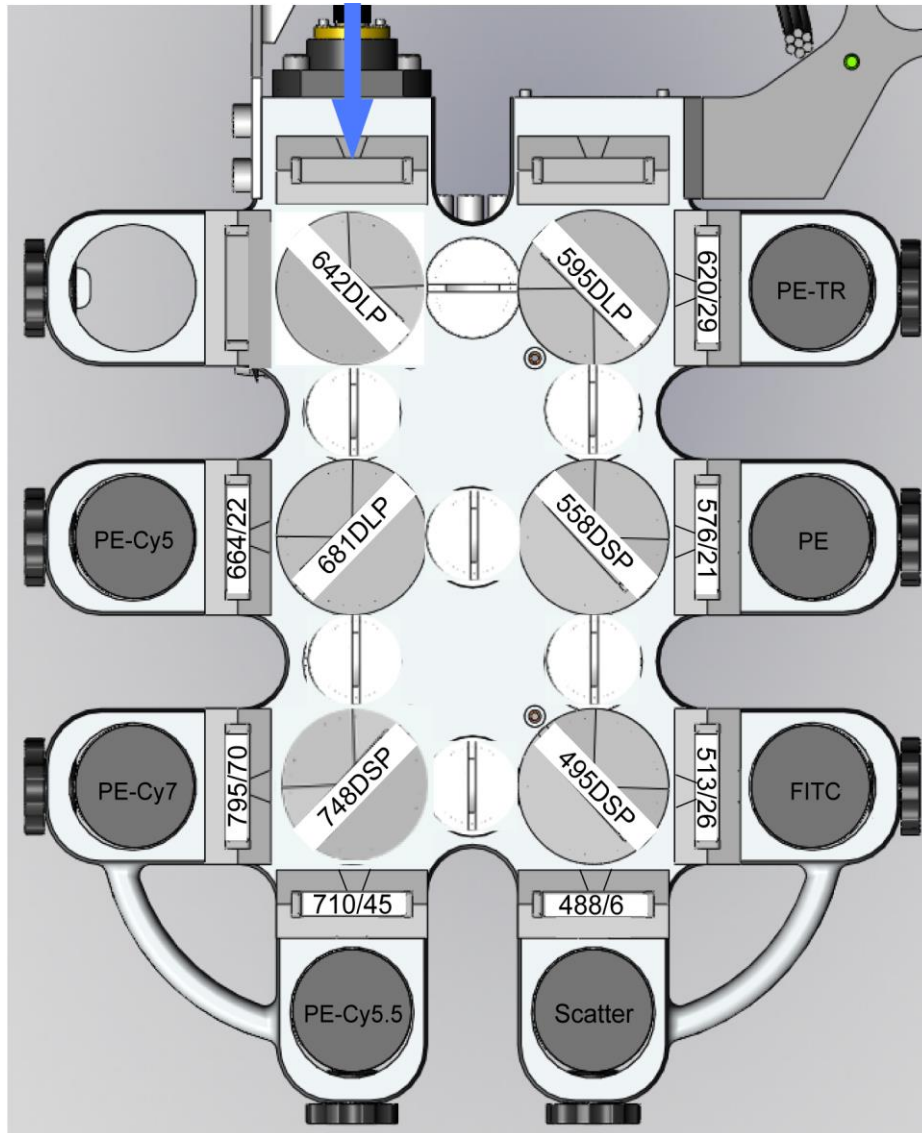
**CONFIGURAÇÃO ÓTICA NO CITÔMETROS DE FLUXO MOFLO ASTRIOS EQ
CELL SORTER, 3 LASERS**

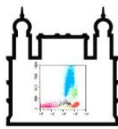
Laser 405 nm - Violeta



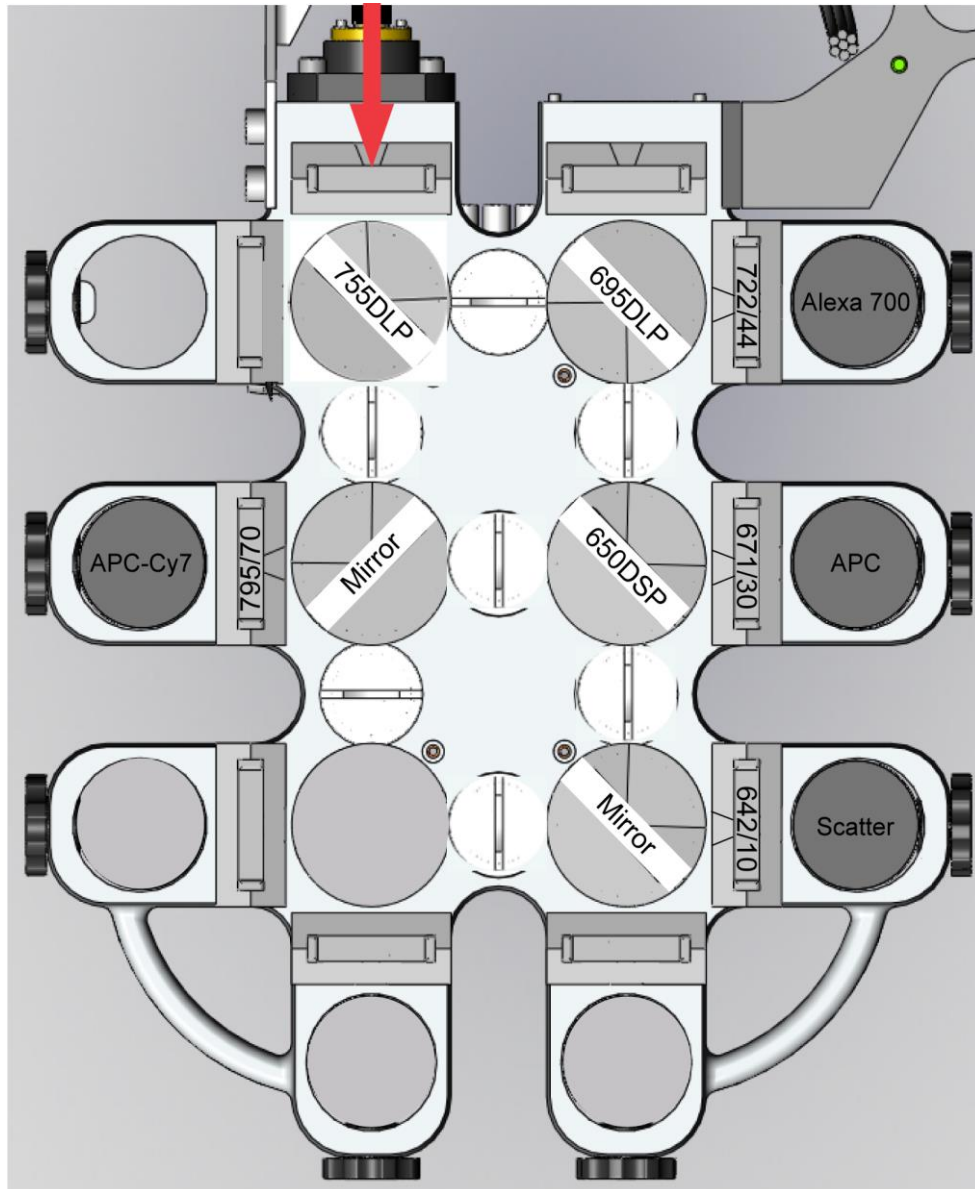


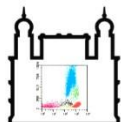
Laser 488 nm - Azul



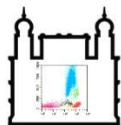


Laser 640 nm - vermelho





Canal de Fluorescência	Filtros	Fluorocromos	Outros corantes fluorescentes
Laser Violeta 405 nm - 2 CANAIS DE FLUORESCÊNCIA			
Azul	448/59	Pacific Blue	TO-PRO-1
		BV 421	
		Alexa Fluor 405	DAPI
		Cascade Blue	Hoescht 33342
		e-Fluor 450	
Amarelo	546/20	Krome Orange	
		Pacific Orange	
		Cascade Yellow	
		BV 510	
Laser Azul 488 nm – 6 CANAIS DE FLUORESCÊNCIA			
Verde	513/26	FITC	Fluo-3 ou Fluo-4
		BB515	
		Alexa Fluóor 488	CFSE
			GFP
			Rhodamine 123
			TO-PRO-1
			YO-PRO-1
Amarelo	576/21	PE	PI
			Fura Red
			SNARF
Laranja	620/29	ECD (PE-Texas Red)	PI



		PE-Alexa Fluor 610	
Vermelho	664/22	PE-Cy5	7-AAD
		PI	
Vermelho forte	710/45	PE-Cy5.5	7-AAD
		PerCP 5.5	
		PerCP-eFluor 710	
Infravermelho	795/70	PE-Cy7	
		Alexa Fluor 750	
LASER Vermelho 640 nm – 3 CANAIS DE FLUORESCÊNCIA			
Vermelho	660/16	APC	TO-PRO-3
		Alexa Fluor 647	
		Cy5	
Vermelho intenso	710/20	Alexa 700	SNARF
		APC-Alexa Fluor 700	7-AAD
		Cy5.5	PI
Infravermelho	780/60	APC-Cy7	
		APC-Alexa Fluor 750	
		APC-eFluor 780	

Negrito = fluorocromos recomendados para o canal; em vermelho = referências nos PMTs

ATENÇÃO: Este equipamento não lê o PerCP, nem o V500 ambos da BD