

**CITOMETRIA DE FLUXO COM CELL SORTING – BD FACSAria III - RAMAL 3060**

**INFORMAÇÕES SOBRE O USUÁRIO**

Nome:

Departamento:

Instituição:

Tel:

Cel:

E-mail:

**INFORMAÇÕES DO PRÉ-SORTING**

Tipo de amostra: \_\_\_\_\_

Espécie: Nível de Biossegurança: \_\_\_\_\_

Presença de patógenos? ( ) sim ( ) não

Qual(s): \_\_\_\_\_

Se realizado, descreva o processo de enriquecimento: \_\_\_\_\_

Marcações realizadas (parâmetro-fluoróforo). Ex.: CD4-FITC; CD8-PE e B220-APC:

Número total e concentração de células em cada tubo. Ex.: Tubo 1 =  $2 \times 10^8$  ( $2 \times 10^7$ /mL); Tubo 2 =  $10^8$  ( $10^7$ /mL); Tubo 3 =  $8 \times 10^7$  ( $2 \times 10^7$ /mL).

**ESTRATÉGIA DE GATE**

Descreva sucintamente como pretende separar a(s) subpopulação(ões). Ex.: subpopulação 1 = Linfócitos > TCD4+ > CD25+ > FoxP3+ / subpopulação 2 = Linfócitos > TCD4+ > CD25- / subpopulação 3 = Linfócitos > TCD8+ e subpopulação 4 = Linfócitos > B220

Descrição:

**INFORMAÇÕES PARA O SORTING**

Sorting Asséptico: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	Duração: <input type="checkbox"/> 2h <input type="checkbox"/> 3h <input type="checkbox"/> 4h <input type="checkbox"/> 5h	Hora de início: _
Origem das Células:	Tamanho das Células:	
Tamanho do Nozzle <input type="checkbox"/> 70µm <input type="checkbox"/> 85µm <input type="checkbox"/> 100µm		
Controle de temperatura <input type="checkbox"/> 4 °C <input type="checkbox"/> 20 °C <input type="checkbox"/> 37 °C <input type="checkbox"/> 42 °C		
Recipiente de separação	<input type="checkbox"/> tubo cônico de 15 mL <input type="checkbox"/> microtubo (1,5 ou 2 mL) <input type="checkbox"/> tubo FACS ( 12 x 75 mm) <input type="checkbox"/> placa ____ nº de poços	

**INFORMAÇÕES IMPORTANTES**

**Preparação das amostras a serem submetidas a citometria de fluxo.**

**- Filtragem da amostra.**

Previamente ao procedimento de *sorting*, as amostras deverão ser filtradas **duas vezes** em **filtro de 40µm** para evitar a passagem de grumos de células e/ou impurezas. Amostras que contenham grupos ou apresente uma alta densidade de células não serão analisadas pelo risco de comprometer o funcionamento do aparelho.

**- Solução de diluição das amostras**

As amostras podem ser diluídas em PBS ou meio de cultura (suplementados ou não com soro bovino fetal em concentrações de até 3%).

**- Diluição das amostras**

A concentração de células da amostra poderá ser modificada conforme suas características, no entanto, é recomendável que sejam diluídas em número de **2 x 10<sup>7</sup> células por 1 mL do meio de suspensão.**

**OBSERVAÇÕES IMPORTANTES**

- o usuário deverá trazer amostras de células para serem utilizadas na compensação das fluorescências (interferência entre fluorescências). Uma das amostras deve conter células não marcadas e para cada fluoróforo utilizado deverá haver uma amostra com esta marcação individual, por exemplo,

somente FITC, ou somente PE ou somente APC;

- as células submetidas ao BD FACSAria III não podem ser marcadas com **iodeto de propídeo (PI)**;

- recomenda-se o enriquecimento prévio da população de interesse. O não enriquecimento implica em maior tempo de *sorting* e menor rendimento (menor número de células separadas);

- Para aumentar a viabilidade das células separadas destinadas a cultura celular e minimizar contaminação, recomenda-se que os recipientes destinados a coleta dessas, contenham meio apropriado (ex.: RMPI suplementado com antibiótico e SBF).

- Células de cultura ou propensas a rompimento, dependendo da aplicação, podem ser tratadas com DNase para diminuir a formação de grumos.

**Armazenamento de dados:**

- CD ou DVD

- Não será permitido o uso de *pendrives* ou quaisquer unidades de disco removível.