

LINEE GUIDA PER SORTING

- È necessario conoscere le dimensioni cellulari al fine di scegliere il nozzle più idoneo.
- Le cellule dei campioni da sortare devono trovarsi in sospensione e non ci devono essere aggregati cellulari. (per la preparazione guardare le *linee guida per la preparazione del campione*).
- Se c'è la possibilità di quantità significative di cellule morte nel campione (<5%), si consiglia di aggiungere DNAsi. Questo trattamento non solo riduce la formazione di aggregati ma diminuisce la viscosità del mezzo e aumenta il grado di purezza del sorting.

NB: se il sort viene effettuato per poi studiare DNA o RNA è meglio evitarla.

- Per aiutare il mantenimento di un pH costante è possibile aggiungere 10-25mM of HEPES (pH range 6.8 - 8.2). I normali tamponi (es. PBS) possono non agire perfettamente alle alte pressioni di sorting.

➤ CONTROLLI DI COMPENSAZIONE

- se si usano le cellule marcate come controllo sarà necessario fornire:

1. Un campione di cellule non marcate
2. Un campione di cellule con singola marcatura, per ogni fluorocromo utilizzato

NB: La concentrazione del controllo dovrebbe essere intorno a 1×10^6 cellule/ml e il volume fornito dovrebbe essere di circa 300ul

- Se si usano le biglie come controllo sarà necessario fornire:

1. Un campione di cellule non marcate preferibilmente alla concentrazione di 1×10^6 cellule/ml
2. Un campione di biglie non marcate
3. Un campione di biglie con singola marcatura, per ogni fluorocromo utilizzato

NB: per la concentrazione delle biglie riferirsi alle linee guida

- La concentrazione del campione deve aggirarsi intorno a 1×10^7 cellule/ml
- Fornire una Falcon con almeno ulteriori 15 ml del buffer/terreno in cui sono sospesi i campioni da sortare
- Fornire i tubi di raccolta considerando che la diluizione finale sarà almeno 10 volte superiore a quella iniziale (variando notevolmente a seconda del nozzle usato)
 - Tubi di raccolta:
 - Tubi da 12 x 75 mm (hanno volume pari a 4.5 ml)
 - Se si sorta in sterilità fornire i suddetti tubi sterili con tappo a pressione
 - Tubi da 15ml
 - Le caratteristiche dei tubi variano a seconda del materiale da raccogliere:
 - Per sort sterile è necessario che i tubi siano sterili
 - Per lavorare sull'RNA i tubi devono essere RNA free
 - Per western Blot non devono essere trattati con proteine esterne
 - Pre-trattamento dei tubi:

- Per evitare che le cellule sortate si attacchino alle pareti laterali del tubo, è possibile pretrattare i tubi con PBS/BSA(1%)
- Mantenerli pieni e capovolti per almeno mezzora prima del sorting
- Fornire i tubi di raccolta considerando che la diluizione finale sarà almeno 10 volte superiore a quella iniziale
- Le soluzioni per il sort vanno valutate attentamente a seconda del campione trattato e dei risultati di sort attesi, es:
 - Terreno completo (aumenta la vitalità cellulare) per cellule che verranno rimesse in coltura
 - PBS per utilizzi vari
 - PCR mix
 - Trysol per sorting di RNA
 - Accutase per campioni aderenti
 -