

LINEE GUIDA PER LA PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

NB: Una bassa vitalità cellulare, l'autofluorescenza e gli aggregati cellulari tendono a ridurre la definizione delle analisi citometriche e, di conseguenza, la purezza dei sorting.

Di seguito sono riportati alcuni suggerimenti generali sulla preparazione del campione. Naturalmente si tratta solo di indicazioni di massima, per ogni tipo cellulare sarà necessario trovare la giusta combinazione di reagenti.

- Se non diversamente richiesto da particolari protocolli, preparare sempre il campione in ghiaccio.
- Molte sostanze come i mononucleotidi flavina e piridina (coenzimi che possono essere presenti in grandi quantità nella cellula) o terreni contenenti rosso fenolo (come l'RPMI) possono aumentare molto l'autofluorescenza delle cellule. Per ridurre, quando si presentano, i problemi legati all'autofluorescenza è consigliabile marcare le cellule con fluorocromi eccitati dal laser rosso. L'auto fluorescenza è, infatti, solitamente confinata nei canali dei laser UV (es: piridina) e blu (es: rosso fenolo e flavina).

NB: In alternativa è possibile trovare in commercio terreni privi di rosso fenolo e/o privi di flavina e NADH.

PREPARAZIONE DEL BUFFER

Per **cellule di origine linfoide** che non hanno particolari problemi di formazione di aggregati anche una semplice soluzione salina come HBSS (Hank Balanced Salt Solution) è sufficiente.

Per **cellule attivate o aderenti** usare terreni o PBS privi di Ca/Mg⁺⁺ a meno che non sia specificatamente richiesto dal protocollo.

- Se il sort richiede molto tempo meglio utilizzare un terreno al posto del PBS avendo l'accortezza di aggiungere un tampone (es: HEPES) per mantenere il pH e quindi aumentare la vitalità finale. I carbonati presenti nei terreni infatti funzionano bene da tamponi solo in atmosfera ricca di CO₂.
- Usare BSA (0.1-1%) o siero scomplementato (0.1-2%) come supporto proteico al buffer. Usare concentrazioni più basse possibile di BSA per aumentare la qualità dei dati.
 - ✓ Se le cellule tendono a formare aggregati scegliere sieri privi di cationi e aggiungere EDTA.
 - ✓ Se le cellule sono particolarmente aderenti è possibile prendere in considerazione l'idea di sortarle direttamente in Accutase.

Per **campioni con alte concentrazioni di cellule morte** (es: cellule trasfettate), se non esplicitamente vietato dai protocolli di preparazione del campione, aggiungere DNAsi I (25-50ug/ml) per prevenire gli aggregati dovuti al DNA libero.

NB: Se possibile in questi campioni utilizzare marcatori atti a discriminare le cellule morte dalle vive tenendo sempre in considerazione le combinazioni di fluorocromi presenti nel pannello.

- Per cellule non fissate: PI, 7AAD, DAPI, SYTOX Blue, Green o Red,
- Per cellule fissate: LIVE/DEAD Fixable Blue, Aqua, Violet, Green, or Red

SOSPENSIONE CELLULARE

- Risospendere 4-5 volte le cellule con l'ago sottile di una siringa.
- Nel caso di campioni di cellule aderenti filtrare il campione immediatamente prima del sorting per eliminare gli aggregati residui.

NB: *Per non perdere troppe cellule, negli aggregati, durante la filtrazione seguire le indicazioni date sopra per la preparazione del campione.*

- Mantenere le cellule a una concentrazione "vitale" ragionevole, compatibilmente con le necessità di sorting, evitando di concentrarle troppo per periodi troppo prolungati.

LA CONTA DEV'ESSERE SEMPRE EFFETTUATA COME ULTIMA COSA DOPO LA FILTRAZIONE

EVITARE ASSOLUTAMENTE

- Vortexare troppo forte
- Velocità troppo alte della centrifuga. Usare, per la sedimentazione delle cellule, gli r.p.m. più bassi possibili (es. per i linfociti 5 minuti a 1200rpm sono sufficienti)
- La formazione di bolle. La tensione superficiale tende a uccidere le cellule.

Sarebbe buona regola concordare preventivamente i dettagli della preparazione del campione per il sort con il personale della Core Facilities