

1. INTRODUCCIÓN

El centro cuenta con una Unidad de Citometría provista de diversos equipos de adquisición y análisis de datos. Esta Unidad está coordinada por un técnico de Citometría.

2. OBJETO

El objeto del presente documento es definir cuales son las normas básicas de funcionamiento de la Unidad de Citometría.

3. ALCANCE

El contenido de esta norma afecta a todos los usuarios de la Unidad de Citometría del CABIMER.

4. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad de cada usuario conocer y cumplir adecuadamente las normas.

Es responsabilidad del técnico de Citometría detectar malas prácticas respecto al uso de los equipos y ponerlas en conocimiento de los usuarios causantes, del Responsable Científico de la Unidad, de sus investigadores principales y del Gerente.

Es responsabilidad de cada investigador principal que el personal adscrito a su grupo de investigación respete y cumpla las normas de la Unidad de Citometría.

En los casos en que un usuario no cumpla las normas y/o haga un mal uso de los equipos, se podrán tomar medidas que supongan la responsabilidad económica de su grupo por las reparaciones necesarias.

5. EQUIPOS DE LA UNIDAD DE CITOMETRÍA

La Unidad de Citometría está provista para el desarrollo de sus tareas diarias de dos equipos de citometría de flujo FACSCalibur de la casa comercial BD Biosciences que disponen de dos líneas de láser; 488 nm (azul) y 633 nm (rojo) y de cuatro detectores de fluorescencia independientes (FL1, FL2, FL3 y FL4). Uno de estos equipos se localiza en la sala de Citometría de la planta 1 y el otro en la sala Fluor Imager de la planta baja.

En la sala de Citometría de la planta 1 también se localiza un separador celular FACSaria de la casa comercial BD Biosciences que dispone de tres líneas de láser; 488 nm (azul), 633 nm (rojo)

y 407 nm (violeta). Este equipo puede detectar hasta un total de 13 parámetros de fluorescencia y 2 parámetros de dispersión al mismo tiempo así como purificar diferentes tipos de poblaciones celulares en base a características determinadas.

Para facilitar el análisis de datos disponemos de una estación de análisis de datos en la sala de Citometría de la planta 1. En ella se ha instalado el programa de análisis de ciclo celular *ModFit* y un software libre de análisis de datos de citometría llamado *WinMDI*. El número y tipo de software de esta estación de análisis se podría ampliar en función de la demanda de los usuarios de la Unidad de Citometría.

6. NORMAS GENERALES

- No está permitido el uso de los equipos sin tener los conocimientos suficientes para su manejo.
- Es obligatorio que todas las personas que usen algún equipo de esta Unidad por primera vez estén supervisados por el técnico y si no es posible, previo aviso al técnico de la Unidad, al menos por algún usuario experimentado.
- El técnico no se hace responsable de la pérdida imprevista o daño de los archivos de las carpetas de datos de los ordenadores. Por ello es obligatorio que cada usuario grave sus datos al finalizar cada sesión de trabajo.
- Si el usuario detectara cualquier anomalía o tuviera algún problema con alguno de los equipos, es su obligación informar al técnico de la Unidad de Citometría.

7. NORMAS PARA EL USO DE LOS CITÓMETROS DE FLUJO FACSCalibur

- Es obligatorio seguir rigurosamente las normas de uso del citómetro de flujo disponibles en cada equipo.
- Es obligatorio reservar el uso de los citómetros a través de la intranet. Las horas de uso reservadas deben ser coherentes con el número y tipo de muestras que se quiere analizar. Si el usuario decide no utilizar el equipo es muy importante que anule la reserva en la intranet y mande mail informativo al resto de los usuarios para que otra persona interesada pueda hacer uso del equipo.

El técnico de la Unidad anulará la reserva si pasados 30 minutos el usuario que la realizó no ha hecho uso del equipo para que otra persona interesada pueda hacer uso del mismo.

- Es obligatorio que cada usuario realice correctamente la limpieza recomendada al terminar de adquirir sus muestras según el procedimiento indicado en cada equipo siguiendo los pasos 1, 2 y 3 del protocolo de apagado.

- Es obligatorio dejar el equipo en **STANDBY** y despresurizado el contenedor de PBS usando **VENT VALVE** (posición VALVE-CHANGE TANK).
- Es obligatorio **después de cada uso** vaciar el contenedor de desechos, enjuagar y añadir un poco de lejía pura y rellenar el contenedor de PBS (FACSFlow), dejando siempre un cuarto del contenedor vacío.
- Si hay otro usuario apuntado en la siguiente media hora es aconsejable dejar el citómetro encendido con la presión del contenedor de PBS quitada (posición VALVE-CHANGE TANK). **Es obligación del usuario asegurarse que la siguiente persona apuntada en la intranet va a hacer uso del equipo.** Si es así avisarle que se le deja encendido pasando a ser responsabilidad de este segundo usuario el apagado del mismo.
- Si no hay ningún usuario apuntado en la siguiente media hora después de terminar de usarlo, es muy importante no olvidar **apagar el citómetro de flujo y el ordenador.**
- Una vez a la semana se eliminarán los datos del disco duro de los citómetros por lo que no es aconsejable almacenar datos en dichos ordenadores, sólo podrán permanecer los archivos correspondientes a plantillas e instrument settings. Para grabar los datos el usuario podrá utilizar CD, DVD o memoria USB.

8. NORMAS PARA EL USO DEL FACSria (SORTER)

- El técnico de Citometría es la única persona autorizada para el uso del FACSria, o en su ausencia sólo el técnico suplente.
- Es obligatorio que cualquier usuario que necesite el uso de este equipo contacte previamente con la Unidad de Citometría, para planificar las condiciones específicas del experimento de sorting.
- Si se decide no utilizar el equipo es muy importante que se anule la reserva 48 horas antes de la hora prevista para que otros usuarios puedan disponer de él. La no anulación de la reserva al menos con la antelación suficiente para que no se haya iniciado la preparación del equipo supondrá el cobro de la prestación del servicio.
- **La muestra a sortear es obligatorio filtrarla** justo antes de pasarla por el sorter, para evitar agregados que puedan dañar al equipo e impedir la correcta recogida de las muestras. La Unidad de Citometría se encargará de la compra y distribución de filtros de 70 μ m para tal fin.
- La concentración celular de la muestra dependerá del tipo y modo de sorting así como del tipo celular y diseño del experimento. De modo general, se recomienda aproximadamente $3-5 \times 10^6$ células/ml.
- El usuario debe traer los tubos/placas donde se van a recoger las poblaciones, así como el medio de recolección que necesite. Se recomienda suero fetal como medio de recolección porque

aumenta la viabilidad de las células después del sorting. La Unidad de Citometría se encargará de la compra y distribución de tubos de 12x75-mm estériles con tapón para tal fin.

- Si el usuario necesita grabar sus datos debe traer un CD para ello. Una vez a la semana los datos obtenidos en el FACS Aria se eliminarán del disco duro.
- El uso del servicio de sorting o análisis de muestras que implique la utilización del equipo FACS Aria, se facturará según las tarifas en vigor en cada momento. La facturación se hará por horas de uso en intervalos de media hora. En todos los casos de sorting se aplicará a la factura una hora adicional que corresponde al tiempo necesario para la preparación previa del equipo para su uso.

9. NORMAS PARA EL USO DE LA ESTACIÓN DE ANÁLISIS

- Existe una hoja de registro donde el usuario podrá reservar los días y horas de uso del equipo de análisis de datos. Si se decide no utilizar el equipo es muy importante que se anule la reserva para que otros usuarios puedan disponer de él.
- El técnico no se hace responsable de la pérdida imprevista o daño de los archivos de las carpetas de datos de los ordenadores. Por ello es recomendable que cada usuario grave sus datos al finalizar cada sesión de trabajo. Una vez a la semana los datos obtenidos en la estación de análisis se eliminarán.

10. CONOCIMIENTO DE ESTA NORMA

El contenido de esta Norma debe ser conocido por todas las posiciones del CABIMER.

ANEXO I: NORMAS DE ENCENDIDO/APAGADO DEL CITÓMETRO DE FLUJO

PROCEDIMIENTO DIARIO DE ENCENDIDO PARA FACSCalibur

1. **Hacer la reserva del equipo a través de la intranet.**
2. Poner en marcha el citómetro de flujo y el ordenador, por este orden.
3. Comprobar el nivel del contenedor de PBS (FACSFlow), dejando siempre un cuarto del contenedor vacío. Comprobar que se vació el contenedor de desechos la última vez que se usó.
4. Presurizar el contenedor de PBS pulsando **VENT VALVE** (posición PRESSURIZE_RUN) y esperar unos 20 segundos antes de continuar con el siguiente punto .
5. Eliminar todo el aire del filtro salino abriendo y cerrando la válvula blanca del filtro.
6. Poner un tubo con agua destilada y pulsar **PRIME** para que la cámara de flujo se llene correctamente y no quede ninguna burbuja de aire, esperar a que se apague la luz roja y pulsar **PRIME** para repetir el proceso.
7. Correr un tubo nuevo con agua destilada en **RUN HI** durante unos 5-10 minutos.

PROCEDIMIENTO DIARIO DE APAGADO PARA FACSCalibur

1. Poner un tubo con lejía 10% colocando el brazo soporte del tubo hacia la derecha o izquierda (brazo abierto) y dejarlo hasta que aspire casi todo el volumen.
2. Repetir el paso 1 colocando el brazo soporte del tubo hacia la mitad (brazo cerrado) y dejarlo correr en **RUN HI** durante 5-10 minutos.
3. Repetir los pasos 1 y 2 con un tubo de agua destilada.
4. Pulsar **STANBY** y **despresurizar el contenedor de PBS usando VENT VALVE (posición VALVE-CHANGE TANK).**
5. **Vaciar el contenedor de desechos en el fregadero, enjuagar y añadir un poco de lejía pura.**
6. Rellenar el contenedor de PBS (FACSFlow) ayudándose con el embudo y la probeta, dejando siempre un cuarto del contenedor vacío.
7. Apagar el ordenador y el citómetro de flujo.

ANEXO II: RECOMENDACIONES PARA PREPARACIÓN CELULAR PARA SORTING

Células que expresan GFP (o cualquier otro fluorocromo).

-Cultivar las células que expresan GFP y como control células que no expresan GFP hasta la densidad deseada (se recomiendan cultivos en fase exponencial no confluentes).

-Tripsinizar las células para obtener células simples en suspensión de la manera habitual. En el caso de células adherentes es muy importante tripsinizar bien para evitar agregados celulares. No se recomienda parar la reacción con medio con suero. Diluir la muestra (aproximadamente $3 \cdot 10^6$ células/ml) y lavar las células en PBS 1x (sin Ca/Mg⁺⁺).

-Resuspender las células en 0,5-1ml de tampón de sorting:

▪Tampón de sorting para Células Adherentes:

PBS, 5mM EDTA, 25mM HEPES pH7.0

▪Tampón de sorting para Células No Adherentes

PBS, 1mM EDTA, 25mM HEPES pH7.0

-Justo antes de utilizar el sorter, pasar las células a través de un filtro de 70 μ m para evitar agregados. Este paso es imprescindible para hacer el sorting. La Unidad de Citometría te proporcionará los filtros que necesites.

-Llevar a cabo todos los pasos en esterilidad para minimizar problemas de contaminación. Preparar las células en tubos de citometría estériles con tapa. La Unidad de Citometría te proporcionará los tubos que necesites.

Recogida de células tras el sorting

-Preparar tantos tubos de citometría estériles con tapa como poblaciones se desean separar, con 1ml de suero fetal de ternera estéril. Tener previsto algún tubo extra.

-Después del sorting centrifugar las células en estos tubos, eliminar el sobrenadante con mucho cuidado y resuspender las células en medio de cultivo para sembrarlas de la manera habitual. Tener mucho cuidado porque el pellet puede no ser visible.