

## PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL SORTER

La tecnología de sorter es una herramienta de citometría muy potente y, debido a la complejidad del análisis de datos y principalmente aquellos multifluorescentes, es muy importante planificar con antelación y preparar todos los controles necesarios. Mediante sorter podemos separar a velocidades muy altas con una pureza excepcional hasta 4 poblaciones simultáneas. Para ello, la muestra debe estar preparada de forma óptima y tener en cuenta las condiciones que pueden afectar negativamente a la muestra celular antes de la separación como son los medios celulares, la capacidad tampón y la concentración de proteínas. Una baja viabilidad celular, la autofluorescencia y los agregados celulares también afectarán a la calidad de la separación. La identificación de estos factores y la adopción de las medidas adecuadas para solucionar los problemas mejorarán la pureza, el rendimiento y la viabilidad celular durante el sorter.

### 1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

**Nota:** Este es un protocolo general de preparación y consejos para realizar el sorter. **SIEMPRE** deberías ajustar y optimizar el protocolo con tus muestras.

#### ✓ Formato de tubo

Las muestras deben venir en tubos de citometría de 5ml.

#### ✓ Protocolo

Seguir el protocolo de marcaje habitual o el general que detallamos a continuación, pero **SIEMPRE** adaptado y optimizado al tipo celular con el que se trabaja.

##### ○ Protocolo general de marcaje

Células en cultivo:

Se aconseja hacer el pase de las células 1-2 días antes del sorter siempre que sea posible. Esto favorece la salud de las células y reduce el sobrecrecimiento así como la muerte celular. Para células adherentes se deben tripsinizar para levantarlas de la placa. Parar con suero. Lavar en medio o PBS antes del marcaje. Si las células son pegajosas o adherentes, se aconseja resuspender en sorting buffer con DNase I\*\* para evitar la agregación de células durante el sorter.

Células primarias:

Disgregar las células del tejido utilizando el método más respetuoso con las células de interés. Para sangre total o bazo, quitar los glóbulos rojos cuando sea posible. Si las células son pegajosas o se agregan fácilmente, resuspender en sorting buffer con DNase I\*\* para evitar la agregación de células durante el sorter.

1	Las células deben estar en solución de una en una.
2	Lavar las células con Staining buffer.
3	Centrifugar las células. Quitar el sobrenadante.
4	Resuspender en agente bloqueador (suero or Fc block). Esta parte es opcional, y se hará en función del tipo celular y las uniones inespecíficas.
5	Añadir ~50µl/1E6cells (la concentración depende la de especificidad del anticuerpo) Se recomienda la titulación de los anticuerpos para utilizar la concentración adecuada. La reducción de cantidad de anticuerpo y de los tiempos de incubación, puede aumentar la supervivencia de la célula.
6	Incubar las células en oscuridad a 4°C durante 30-60 min.
7	Lavar las células con Staining buffer 3 veces.
8	Añadir el anticuerpo secundario si fuera necesario. Repetir el paso 5-7.
9	Resuspender las células en una concentración final aproximadamente ~10-15E6/ml (ver Notas/FAQ) en el sorting buffer adecuado. Si es para posterior cultivo y tus células lo permiten, con el doble de antibiótico.
10	<b>Filtrar</b> la muestra para prevenir atascos causados por las células agregadas, las muestras deben ser filtradas en filtros (nylon) de aproximadamente 40 micras de poro o por tubos de citómetro con filtro (35micras), aunque si no quieres perder muchas células puedes pasarlo por uno de 100 µm, pero avísanos antes. Si no tienes filtros, nos los puedes pedir.

✓ **Sorting Buffers**

HANKS SORTING BUFFER	PBS SORTING BUFFER	STAINING BUFFER
1X HBSS (Hanks' Balanced Salt solution) con/sin Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> * <2% FCS (Inactivado con calor) o 1% Albumina 1mM EDTA 25 mM HEPES** pH7.0 Filtrar/esterilizar por 0.2 µM Almacenar a 4°C	1X PBS sin Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> <2% FCS (Inactivado con calor) o 1% Albumina 1mM EDTA 25mM HEPES* pH 7.0 10ug/ml DNase I*** Filtrar/esterilizar por 0.2 µM Almacenar a 4°C	1X HBSS o 1X PBS w/ 2-5% serum.
* Para algunos tipos celulares es preferible utilizar HBSS sin Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> .		
** HEPES es opcional, ayuda a proteger las células del medio ácido bajo condiciones de presión.		
*** DNase I es opcional para las líneas celulares que son adherentes o si hay células muertas que están liberando DNA, lo que causa grumos en la muestra.		

El medio de cultivo no es ideal como sorting buffer por dos motivos: no es capaz de regular el pH bajo condiciones atmosféricas normales haciendo que el medio se vuelva básico y el cloruro cálcico de la mayoría de los medios de cultivo no es compatible con los compuestos fosfato presentes en el buffer del sorter o (FACSFlow), dando lugar a precipitación de cristales de fosfato cálcico.

- **Modificaciones en el buffer según el tipo celular**

- 1) Población pura linfocito

El buffer se puede simplificar a HBSS con 1% FBS. El resto de cationes de la receta aumentarían la viabilidad. Como estas células no tienden a agregarse, no sería necesario añadir EDTA.

- 2) Células que tienden a agregarse

Aumentar la concentración de EDTA 5mM y utilizar 1% BSA (EDTA ayuda a prevenir la interacción célula-célula dependiente de cationes).

- 3) Células adherentes

La tripsina se utiliza para levantar las células de la superficie de la placa y se neutraliza con medio que contenga FBS. El FBS reintroduce cationes que ayudan a la adhesión al plástico y pueden hacer que las células se reagrupen antes del sorter. Se puede solucionar:

- Utilizar 5mM EDTA. Nota: demasiado EDTA puede matar tus células.
- Accutase y Accumax son productos para la disociación de células y pueden ayudar a mantener las células en suspensión sin agregarse.
- FBS catión-free.

- 4) Muestras con alta concentración de células muertas

Las células muertas pueden liberar su DNA en el medio de sorter y esto puede hacer que las células se agreguen. Añadiendo DNase I en presencia de  $MgCl_2$  puede ayudar a reducir la agregación. Por lo tanto se pueden tratar las células de la siguiente forma:

- Durante 15-30 minutos con una solución estéril 100  $\mu g/mL$  DNase y 5 mM  $MgCl_2$  en HBSS a temperatura ambiente.
- Lavar las células en 1X HBSS con 5mM  $MgCl_2$ .
- Resuspender las células en HBSS con 25-50  $\mu g/mL$  DNase y al menos 1mM  $MgCl_2$  antes y durante el sorter (5mM  $MgCl_2$  es optimo)

## 2. RECOGIDA DE LA MUESTRA

### ✓ Formato de tubo

Para recoger la muestra, se puede realizar en varios formatos:

- Tubos cónicos de 15 ml para adquisiciones largas (1 o 2 vías de sorter)
- Tubos 5 ml para volúmenes pequeños o 4 vías de sorter
- Tubos Eppendorf (4 vías de sorter)
- Placas multipocillos (96, 48, 24, 12, 6)
- Slides

Hay que tener en cuenta que una gota de sorter (= partícula sorteada) es aproximadamente 3.88nl (1E6 partículas sorteadas aprox. 3.9ml (100 micro meter nozzle).

Si las queremos cultivar de nuevo, traer los tubos con medio de cultivo para evitar la muerte de las células y el doble de antibiótico.

Poner en el tubo de recogida:

- Medio concentrado o con alto contenido de FBS (~50%) para ayudar a que las células se recuperen del sorter.
- Echar entre 2-5 ml para tubos de 15 ml y 750  $\mu$ L – 1mL para tubos de 5 mL.

En el caso de recoger las muestras en placa:

- La concentración de la muestra para este sorter no debería superar 1,5E6 cells/ml y no ser menor de 0,5E6 cells/ml.
- Echar el antibiótico y el medio en el pocillo deseado (se aconseja medio condicionado con una mayor concentración de suero).
- Para Single cell prepara por lo menos tres placas/muestra. El ratio de supervivencia o la eficiencia de clonaje depende mucho del tipo celular (en línea celulares se ha visto no más de 5-6 células vivas (pocillos) en una placa, y nunca más de 20%, sin embargo las líneas resistentes o células en suspensión tienen más de 90% de supervivencia.
- La concentración del suero y el pH afectan también a la supervivencia. Se puede aumentar la concentración de suero de 10-20% en el medio de recolección y esto puede ayudar a que aumente la eficiencia de clonaje.

Si vas a sortear más de una muestra, mi consejo es ir preparándolas de forma gradual, porque si las preparas todas a la vez la supervivencia será menor, ya que tienen que esperar en el tubo para ser sorteadas y luego el tiempo que transcurre hasta que las vuelvas a cultivar.

### 3. NOTAS/FAQ

#### ✓ **Concentración muestra**

La concentración y volúmenes adecuados para realizar un sorting (siempre que se pueda), aproximadamente en una relación entre 10-15 millones de células viables por mililitro y un máximo de 2ml por tubo. Las células pegajosas o muy agregantes 7-8 millones/ml y si son grandes 4-7 millones/ml. Si es menos no pasa nada, pero no lo diluyas ni lo concentres demasiado. Esto es muy importante ya que si traes la muestra demasiado concentrada, la separación va a ser más difícil para el sorter, si la traes con grumos el sorter se atasca y puede que no podamos realizar la separación.

#### ✓ **Células transfectadas**

Si vas a aislar células transfectadas utilizando EGFP, mCherry, u otra proteína fluorescente, lo ideal sería incluir un control con células que pasen una falsa transfección. Este puede ser de gran ayuda cuando la eficiencia y/o la expresión de la proteína es baja. Limita la cantidad de suero en la suspensión final del sorting buffer. Idealmente debería contener menos de 2% de FCS o 0,5% de BSA. Un exceso de suero puede crear interferencia óptica y como resultado una distorsión dinámica de la señal de Scatter y por lo tanto una disminución en la resolución de tus datos. Demasiado suero también interfiere en la estabilidad del stream e incrementa la posibilidad de agregación de las células, estos factores afectan a la pureza y eficiencia del sorter.

#### ✓ **Prueba tus anticuerpos y fluorocromos**

Lo ideal es probar la combinación de anticuerpo y fluorocromos antes de iniciar un sorter, sobre todo si es importante y limitante, aunque deberías hacerlo en todos los sorter para evitar una pérdida de tiempo y dinero. Debes probar los nuevos lotes de anticuerpos y entender que algunos fluorocromos tienen variaciones entre diferentes lotes y podría ser necesario hacer la titulación cada vez que abres un nuevo vial (ej. PE-Cy5 o PE-Cy7).

#### ✓ **Trae siempre tus controles**

Para poder realizar el sorter correctamente hay que diferenciar bien la población a sortear mediante una estrategia de gating. Para poder hacerlo correctamente es necesario una serie de controles. Entre ellos:

- Células sin marcar del mismo tipo y/o células tratadas en las mismas condiciones que la muestra, pero sin el marcaje. Si vas a sortear células primarias, no traigas una línea celular como control negativo, nunca van a ser equivalentes.
- El isotipo control de la muestra.

- Es necesario una muestra positiva marcada de forma individual por cada fluorocromo que utilices. Lo ideal es hacerlo con la misma población de interés que vas a sortear. El anticuerpo puede ser irrelevante para el experimento siempre que esté muy expresado en las células. Estos controles son para compensación del overlap entre los fluorocromos. Por ejemplo, si estas sorteando células T puedes utilizar CD3 conjugado con cada fluorocromo como control individual. La otra opción es utilizar beads que se unirán directamente al anticuerpo conjugado. Si utilizas células con alta expresión de autofluorescencias, las beads que utilices deben expresar esta fluorescencia de forma equivalente.

#### ✓ **Tamaño de la célula**

El tamaño de la célula es importante. Las células más grandes que se pueden sortear con la configuración de un FACSria es  $<30 \mu\text{m}$ .

#### ✓ **Sorter no es eficiente 100%**

El sorter no será eficiente y hay pérdida de células antes y después del proceso. Cuanto más sanas estén las células, se van a obtener mejores resultados en el sorter. Hay algunos valores clave que el sorter muestra cuando se inicia el sorter, después de iniciarse el sorter, estos valores suelen bloquearse y se calcula la estimación de la eficiencia. El cálculo de células justo antes de la resuspensión final puede ayudar determinar el número de células con las que comienzas, el volumen en el que resuspenderlas y estimar la máxima eficiencia para cada población sorteada de forma aproximada.

La calidad del sorter depende mucho de la población que se va a sortear. Utilizando un marcador de viabilidad tal como PI (Propidium Iodide), 7AAD o DAPI en el buffer de sorting, podemos tener información muy útil de la viabilidad de las células. Utilizando estos marcadores se puede eliminar los marcajes inespecíficos así como las células muertas que pueden dar un valor erróneo de eficiencia total de la población sorteada y de los datos analizados. Asegúrate que el marcaje de viabilidad no interfiere con ningún fluorocromo que estés utilizando.

#### ✓ **Sorter estresa las células**

Algunos tipos celulares les afectan más el sorter que a otros. Por lo tanto hay que tenerlo en cuenta a la hora de pensar en crecimiento, viabilidad y cantidad de células de inicio.

Podemos calcular de forma aproximada la cantidad de células que vas a necesitar para realizar tu sorter. Determinando la frecuencia de tu población diana y ver cuánto material de partida necesitaras para obtener el número de células necesarias para tu experimento. También puedes saber de forma aproximada el tiempo que tardara en realizarse el sorter.

Generalmente incluyendo todos los tipos celulares, se puede sortear a un ratio de 10.000 eventos/segundo. Esto se traduce en 36E6 células/hora que pasan a través del sorter.

$$(Eventos/hora) \times (\% \text{ de población}) = \text{Eficiencia teórica/ hora}$$

Ejemplo: para calcular cuantas células se pueden sortear por hora de una población al 2% con un ratio de 10.000 eventos/segundo:

$$(36E6/hora) \times (,02) = 720.000 \text{ células}$$

Este número es teórico y no tiene en cuenta la pérdida de células que pueden ocurrir debido a los siguientes factores:

- **Abort rate.** Eventos que el citómetro no puede identificar, estos eventos son ignorados y pueden ser sorteados en la muestra incluso si no están en la población de interés haciendo que disminuya la pureza. Ya que estos eventos no están incluidos en los datos, una alta tasa de ratio de abortos pueden dar lugar a datos engañosos.

- **Conflict events/efficiency.** Se calcula para cada población de interés que está siendo sorteada, las células de interés que tienen otro evento/célula muy cerca para la máscara de sorter utilizada (yield, purity, single cells, etc), no será sorteada, por lo tanto, disminuyendo la eficiencia. Las posibles causas por lo que ocurre esto son:

- Agregados celulares
- Alto porcentaje de debris
- Concentración celular alta

Posibles soluciones:

- Filtrar las células
- Utilizar DNase I y filtrar
- Diluir las células para disminuir la concentración
- Disminuir la concentración de suero
- Disminuir la velocidad de adquisición

- **Calidad de la población celular.** La población a sortear dictamina como de bien ira el sorter. Cuanto más sanas estén las células al inicio mejor llevaran el proceso de sorter y la recuperación posterior. Las células que están poco sanas o viables tendrán una menor viabilidad después del sorter. Algunos tipos celulares tienen una mayor muerte, disminuyendo la eficiencia y funcionalidad después del sorter. Si este es el caso en tus células, manteniendo la presión del sorter baja ayuda a minimizar estos efectos, házselo saber al técnico para que pueda modificar este setting en el sorter. Este factor debe tenerse en cuenta cuando calculamos el tiempo necesario para realizar el sorter y la concentración de células.

Algunas líneas celulares necesitan ser sorteadas a una baja concentración y presión lo que da lugar a bajos ratios de menos de 5000 células/segundo.

- **Adherencias o tubos secos.** Algunas células se pegan más a las paredes de los tubos de polietileno lo que da lugar a que no se sorteen y permanecen en el tubo de la muestra. Si tus células son pegajosas, es mejor utilizar tubos de polipropileno. Hacer el sorter de una población con bajo porcentaje en tubos sin el medio adecuado y con las paredes secas, puede disminuir la eficiencia. Las células pueden terminar pegadas en los lados del tubos y secarse el fluido del sorter en el que están embebidas, resultando la muerte de las mismas.

#### **4. BIBLIOGRAFIA**

BD FACService TECHNOTES, Customer Focused Solutions, Special Sorting Issue, Vol.9 No.4, October 2004, BD Biosciences.

Contributed by Ingrid Schmid, Claude Lambert, David Ambrozak, and Stephen P. Perfetto  
Current Protocols in Cytometry (2007) 3.6.1-3.6.20