

Consejos para un buena purificación por citometría de flujo.

1. Utilice el método de disociación celular adecuado

Si se utiliza un método de disociación celular incorrecto, el experimento puede fracasar antes de empezar. Por lo tanto, es importante tener en cuenta el tipo de método de disociación utilizado en función del tipo de célula que se esté purificando.

Las células adherentes se desprenden normalmente con una combinación de tripsina y EDTA. Sin embargo, se sabe que la tripsina elimina las proteínas de la superficie celular que son importantes para la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) (Luckey et al. 2001). Si tiene que utilizar un método enzimático, probablemente le convenga más utilizar una alternativa a la tripsina, ya que son mejores para mantener los niveles de marcadores de superficie sin cambios y, al mismo tiempo, preservar la viabilidad celular. Un método de disociación no enzimático, como el tampón de disociación celular Gibco, es mejor para la disociación suave de células de mamíferos para estudios que requieren proteínas de superficie celular intactas (por ejemplo, citometría de flujo).

Si utiliza tripsina, es posible que también desee utilizar un inhibidor de tripsina a base de soja para neutralizar su actividad. El método de neutralización de tripsina más rápido y común es agregar suero bovino fetal (FBS) a las células. Sin embargo, a diferencia de los inhibidores de tripsina a base de soja, el FBS reintroduce factores que hacen que las células se vuelvan a adherir entre sí, lo que puede provocar la aglomeración celular.

Si el tipo de célula que se cultiva no responde a ninguno de los métodos mencionados anteriormente, se puede utilizar otro método no enzimático, como la disociación mecánica suave (es decir, raspar la placa). El raspado de células provoca más daño físico a las células, pero en general, su efecto sobre la expresión o actividad de las proteínas de la membrana celular es pequeño. Este método es particularmente útil para las células cultivadas en medios sin suero, en los que se desea evitar el uso de suero para neutralizar la tripsina.

2. Titula tus anticuerpos

El exceso de anticuerpos se unirá con baja afinidad, aumentará el nivel de fondo y reducirá la resolución de la población deseada. La titulación de anticuerpos mejora la relación señal-ruido, reduce la unión no específica y aumenta la sensibilidad.

Asegúrese de utilizar la concentración correcta de cada reactivo. La concentración ideal de anticuerpos se determina mediante el cálculo del [índice de tinción](#) que es la relación de separación entre las poblaciones positivas y negativas. El procedimiento para titular los anticuerpos requiere que se tiña una cantidad igual de células en una dilución seriada de anticuerpos mientras se mantiene un volumen de tampón de muestra constante. La dilución que represente el mejor índice de tinción es la dilución que se debe utilizar. Tenga en cuenta que algunos reactivos funcionan mejor a temperatura ambiente. Esto puede ser cierto tanto para la tinción de anticuerpos como para la tinción de células vivas/muertas. Asegúrese de revisar la hoja de datos del producto del reactivo para conocer las condiciones óptimas de uso

3. Filtra y controla tus muestras

Las obstrucciones son la peor pesadilla de citómetro de flujo. Interrumpen el proceso de purificación y las interrupciones en la clasificación prolongan el tiempo en que las células están fuera de las condiciones ideales de la cámara de incubación. Filtrar la muestra con un colador de células justo antes de la purificación elimina los grumos de células y ayuda a garantizar la suspensión de células individuales.

Junto con la filtración, las compuertas de una sola célula ayudan a garantizar que la gota que clasifique contenga solo una célula de la población que le interesa y no un doblete que contenga una célula correcta y una célula no deseada.

4. Utilice EDTA para evitar grumos.

Si es posible, utilice una concentración de EDTA de 1 a 5 mM en el tampón de Purificación para ayudar a deshacer los grumos de células si las células están grumosas y la filtración no resuelve el problema. Solo tenga en cuenta que se sabe que el EDTA regula negativamente algunos receptores y no debe utilizarse para detectar citoquinas intracelulares o algunos marcadores de superficie que requieren iones Ca^{2+} , como las integrinas. En esta situación, utilice un tampón sin Ca^{2+} y Mg^{2+} (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato sin magnesio ni calcio) o citrato de sodio para inhibir los grumos.

5. Incluya suero o proteína en sus buffers

Esto aumentará la viabilidad de las células en todas las fases del experimento, desde el filtrado y el lavado hasta la clasificación. El uso de 1-3 % de BSA (preferiblemente) o FBS en los tampones ayudará a mantener las células sanas y viables sin hacerlas demasiado pegajosas. Recubrir los tubos de recolección con proteína antes de la clasificación ayudará a reducir la posibilidad de que las células clasificadas se adhieran a los lados del tubo, donde podrían secarse. Esto aumentará el rendimiento de la clasificación y la recuperación celular.

6. Utilice un tinte de viabilidad

La presencia de células muertas afecta la tinción y, por lo tanto, la calidad de los datos. Los anticuerpos se unen a las células muertas de forma indiscriminada. Las células muertas tienen mayor autofluorescencia y mayor unión no específica que las células vivas, lo que conduce a falsos positivos y menor pureza de clasificación. Por lo tanto, eliminarlas es imprescindible. Al incluir un colorante de viabilidad en la muestra, puede eliminar las células muertas y los desechos y asegurarse de que solo se aíslen las células viables.

Vale la pena destacar que para los experimentos de clasificación, la mayoría de los colorantes de viabilidad requieren una tinción sin suero. Esto puede ser un problema para algunos tipos de células, donde la falta de suero puede desencadenar la apoptosis. Como mínimo, puede alterar el metabolismo celular basal, lo que podría afectar su experimento ([Pirkmajer y Chibalin 2011](#)). Por lo tanto, es un equilibrio. Siempre puede usar más colorante de viabilidad para compensar el colorante absorbido por las proteínas en solución. O puede aprovechar un colorante de viabilidad que se pueda usar con un tampón que contenga suero. Use la concentración correcta de colorante de viabilidad y siga el protocolo del fabricante.

Algunos colorantes, como [el 7-AAD](#), pueden penetrar las células con el tiempo si no se eliminan con agua, lo que reduce el conjunto de células vivas disponibles para purificar. Debido a esto, los colorantes de viabilidad como el 7-AAD y el yoduro de propidio ([PI](#)) deberían agregarse inmediatamente antes de analizar la muestra. Además, agregar demasiado puede dificultar la compensación. Sin embargo, esto puede ser una ventaja ya que estos colorantes ofrecen una evaluación en tiempo real de las poblaciones vivas/muertas. Los colorantes de amina que se eliminan con agua durante el proceso de tinción no podrían teñir las células que mueren posteriormente.

En general, utilice DAPI, PI o 7-AAD para células no fijadas. Para células fijadas, utilice colorantes compatibles fijables, colorantes de amina.

En nuestros equipos del FACS Lab se evita usar PI, dado la alta contaminación que produce en todos los plásticos y mangueras de los equipos, por lo cual se sugiere encarecidamente reemplazarlo por 7-AAD.

7. Utilice controles de compensación

La falta de compensación o una compensación incorrecta del derrame por el uso de tinciones individuales antes de la clasificación puede provocar la clasificación de la población incorrecta, lo que reduce la pureza de la clasificación final. Para los fluoróforos que tienen espectros de emisión superpuestos, debe utilizar controles de tinción única. El software del instrumento puede calcular los valores de derrame correctos para garantizar la calidad de los datos. La compensación debe realizarse utilizando la muestra experimental siempre que sea posible. Esto garantiza que el brillo de los marcadores coincida estrechamente con el de la muestra que se va a clasificar. Pero si se encuentra en una situación en la que no tiene suficiente muestra (por ejemplo, el número de células es demasiado bajo o la población es demasiado escasa), se pueden utilizar perlas de compensación teñidas con su anticuerpo experimental como sustituto.

8. Utilice FMO

Los controles de fluorescencia menos uno (FMO) son importantes al crear paneles de citometría de flujo multicolor, ya que lo ayudarán a determinar dónde establecer sus límites. Los controles FMO se utilizan cuando se intenta identificar un positivo verdadero de una población negativa y cuando los niveles de expresión son bajos. La propagación de la fluorescencia, especialmente con fluoróforos más brillantes, ocurre al adquirir datos. Es particularmente notable después de la compensación y la excitación cruzada por láser. Un diseño experimental cuidadoso y evitar los canales que tienen una gran cantidad de propagación ayudarán a reducir esta influencia, pero los controles FMO siguen siendo importantes.

9. Utilice la temperatura adecuada

Obtener la temperatura correcta para su tipo de célula es importante, ya sea caliente o fría. Mantener las células en hielo puede ralentizar los procesos metabólicos, reducir los cambios en la expresión de genes y proteínas y preservar la viabilidad. Pero asegúrese de que su tipo de célula pueda tolerar bajas temperaturas. Las células de mamíferos son más felices a 37 °C, y algunos tipos de células morirán rápidamente si se clasifican en un tampón a 4 °C. La temperatura fría les impide reparar el daño inducido por la purificación. Por lo tanto, cuanto más larga sea la purificación, más daño podría haber y no se puede reparar. Si está utilizando una sonda celular mecanística, será mejor que mantenga la célula caliente también. Además, tenga en cuenta que la temperatura y la duración de la unión también pueden afectar la cinética del reactivo. Siempre puede consultar la literatura sobre protocolos de purificación

para el tipo de célula de su interés para ver cómo se han llevado a cabo separaciones exitosas históricamente.

10. Conozca su equipo de citometría

Por último, asegúrese de saber todo lo que pueda sobre el citómetro de flujo que está utilizando para su experimento. Comprenda las longitudes de onda de excitación y emisión que puede admitir el instrumento FACS, ya que esto determina los tintes que puede utilizar. Además, no todos los citómetros de flujo están contruidos de la misma manera. Algunos instrumentos son muy sofisticados y requieren una persona capacitada y dedicada para operarlos, mientras que otros fueron diseñados para facilitar su uso y son más adecuados para purificaciones simples (por ejemplo, clasificar uno o dos marcadores de proteínas fluorescentes) (Brampton y Williams 2019).