

Consideraciones para purificar células por citometría de flujo

Información y consejos importantes

Hable sobre la clasificación con suficiente antelación con el operador. Para prepararse para la purificación, el operador deberá saber la tinción que utilizará; el tipo de células que se purificarán; la proporción de células deseadas en la suspensión celular original; la cantidad de células por muestra que llevará a las instalaciones; la cantidad de muestras; si desea clasificar en tubos o placas; qué líquido envolvente mantendrá a sus células felices; si su purificación debe ser estéril o no, etc.

Las células deben estar en una suspensión de una sola célula. Utilice *cells strainers* para filtrar sus células si está manipulando muestras grumosas.

Si puede, traiga al FACS Lab el doble de la cantidad de células sin purificar que calcule que necesita para obtener suficiente de su población purificada. Haga todo lo posible para enriquecer sus células antes de llegar al laboratorio de flujo; esto le ahorrará tiempo y dinero.

Lleve un tubo de control adicional con suficientes células sin teñir si desea purificar una población en función de los niveles de proteína fluorescente o de cualquier tinte fluorescente. Esto nos permitirá trazar una línea entre las células positivas y negativas. No hay un número mínimo de células sin teñir que deba llevar consigo, pero lo ideal es que traiga entre 50 000 y 300 000 células sin teñir.

Sus células deben prepararse hasta una concentración de aproximadamente 20 a 40 millones por ml de PBS en menos del 3 % de suero (más proteínas hacen que la corriente sea inestable y pueden obstruir el clasificador) en un tampón que sea menos sensible al cambio de pH (10 mM HEPES, pH 7,2) y que contenga idealmente 10 µg/ml de DNase I y 1 a 4 mM de EDTA para ayudar a que las células permanezcan en suspensión de células individuales y evitar que las células grumosas, pegajosas, adherentes o moribundas obstruyan el citómetro.

Mantenga siempre sus células en hielo para detener la muerte celular. Planifique su tiempo teniendo en cuenta que las células en la muestra fluirán a través del citómetro a una velocidad de aproximadamente 20 a 100 millones por hora, según la calidad de la muestra, el tamaño de las células, la pureza deseada y la recuperación.

Traiga los tubos de recolección de su elección (tubos Falcon, FACS o Eppendorf de 15 ml) que contenga medio/suero (3 ml por tubo Falcon, 0,5 ml por tubo FACS). No podemos purificar en tubos Falcon de 15 ml si está recolectando más de 2 poblaciones de células.

Las células purificadas estarán en una concentración de 200 000 a 1 millón de células por ml según el *nozzle* instalado en el cabezal de selección. Si utiliza tubos FACS, traiga un tubo por cada 3 millones de células clasificadas (más dos adicionales en caso de problemas) cuando clasifique células pequeñas (tamaño de hasta 15 μm) y un tubo por cada millón de células clasificadas cuando clasifique células grandes (tamaño superior a 15 μm).

En lo posible, una vez obtenida su selección de células analizamos algunas de las células *post sorting* para verificar su pureza. El operador agradece de antemano recibir comentarios sobre la cantidad de células purificadas, lo que Ud. ve en su laboratorio post procedimiento de purificación, que cuenta y sobre su viabilidad (y esterilidad, si corresponde).

Recolección de células clasificadas para la extracción de RNA

Purificación de células:

La extracción de RNA funciona mejor cuando las células se purifican vivas (no fijadas). Extraer RNA de células fijadas es difícil, pero no imposible. Si está fijando muestras antes del *cell sorting*, todo debe prepararse en un entorno libre de RNAasa utilizando tampones libres de RNAasa y tubos Eppendorf o FACS. Agregar inhibidores de RNAasa a todos los tampones, incluidos los medios de recolección y las suspensiones celulares, ayudará a mantener todos los medios libres de RNAasas activas.

Las muestras de buena calidad con cantidades limitadas de desechos, muchas células sanas y sin grumos mejorarán el rendimiento de las células recolectadas. Cualquier paso previo al enriquecimiento también puede ayudar.

El uso de un colorante de viabilidad también mejorará la calidad de las células recolectadas al eliminar las células moribundas; las células moribundas en su tubo de recolección pueden interferir con el proceso de extracción de RNA. El colorante de viabilidad se puede agregar a las células vivas en las instalaciones inmediatamente antes del procedimiento.

Medios de recolección para la extracción de RNA:

Existen diferentes métodos para recolectar células para la extracción de RNA:

- 1) Recolectar las células en tubos con suero puro, medio o un tampón a base de PBS. Las células recolectadas se mantienen en hielo hasta que se puedan centrifugar hasta formar un pellet. El pellet se puede congelar o usar inmediatamente para la extracción de RNA. Algunas células se perderán durante el proceso de centrifugación, pero cualquier exceso de PBS agregado al tubo de recolección por el citómetro se eliminará. Este método funciona mejor cuando las células son robustas o cuando el número de células recolectadas no es un factor limitante.
- 2) Recolectar las células en tubos que contienen tampón de extracción de RNA. Luego, las células recolectadas se agitan normalmente y se colocan en hielo seco para congelarlas rápidamente para su almacenamiento antes de extraer el RNA. El citómetro agregará un volumen de líquido de fluid

al tubo de recolección que diluirá el tampón de extracción de RNA y podría alterar su eficacia. El volumen agregado dependerá del tamaño del *nozzle* utilizado en el citómetro por cada 100.000 células recogidas:

- Nozzle de 70 micrómetros: se añaden 100 μ L de líquido de envoltura (PBS más conservantes) al tubo de recogida (1 nL por célula).
- Nozzle de 85 micrómetros: se añaden 200 μ L de líquido de envoltura (PBS más conservantes) al tubo de recogida (1 nL por célula)
- Nozzle de 100 micrómetros: se añaden 330 μ L de líquido de envoltura (PBS más conservantes) al tubo de recogida (3,3 nL por célula).
- Nozzle de 130 micrómetros: se añaden 660 μ L de líquido de envoltura (PBS más conservantes) al tubo de recogida (6,6 nL por célula).

Se puede asignar un número limitado de células a un tubo de recogida para evitar diluir demasiado el tampón de extracción y/o para mantenerse dentro de los límites para los que está diseñado el kit de extracción, tener presente que si la recolección de células se hace en tampón de extracción no se podrá realizar una prueba de *post sort* para ver la pureza final.

Solución de problemas:

La extracción de RNA después de la purificación no siempre es sencilla y es posible que un miembro de su laboratorio ya haya perfeccionado la técnica. Hable con colegas y personal sobre cualquier problema, preferiblemente antes de planificar su *cell sorting*. A continuación, se muestran algunos problemas comunes.

- Número limitado de células recolectadas

Los desechos, los grumos, las células moribundas y los glóbulos rojos son solo algunos de los factores que afectarán la eficacia de la purificación con éxito en la población objetivo. Se necesita una mejor preparación de la muestra para aumentar el rendimiento.

- No se cuantifica el RNA en NanoDrop

Los usuarios con una pequeña cantidad de células recolectadas pueden no ver ningún rastro de RNA al medir en NanoDrop. Esto generalmente se debe a niveles muy bajos de RNA en la muestra más allá del límite de detección. Varios usuarios informaron de esto y aun así pudieron amplificar DNAC utilizable de sus muestras (con solo 6000 células en nuestro FACS lab y con menos células en otros)

- No hay un pellet de células en el tubo de recolección

Las células recolectadas en PBS, medio o tampón a base de suero deben centrifugarse hasta formar un pellet antes de congelarlas o re-suspenderlas en el tampón de extracción. Si este es el caso, ¿se ha utilizado la fuerza g correcta en la centrifuga? Para asegurarnos de que las células se “purifiquen” y recolecten correctamente, generalmente pasamos algunos microlitros de células

recolectadas nuevamente por el citómetro como una "verificación de pureza" para confirmar la presencia de las células correctas en el tubo de recolección.

Limitaciones teóricas

La purificación por citometría de flujo es un arte, una habilidad y una ciencia. Es, en estos tres niveles, una asociación de trabajo entre el usuario de investigación y el operador del citómetro. Existen ciertas limitaciones teóricas que un usuario debe comprender sobre la técnica en sí y también hay ciertas cosas que un usuario puede hacer para maximizar sus posibilidades de purificar la cantidad requerida de células deseadas en buenas condiciones para una mayor manipulación.

- **Número de células**

Aunque la clasificación por flujo puede parecer mágica, no puede crear vida: nunca terminará con más células de las que tenía al principio. Si su muestra inicial tiene un millón de células y desea clasificar el 10 % de esa población, entonces no podrá recuperar más de 100 000 células al final del procedimiento de clasificación (a menos que su método de conteo no sea confiable). De hecho, existen ciertas condiciones de "aborto" incorporadas, por lo que su máximo teórico podría ser solo el 90 % de este valor (Las tasas de aborto aumentan cuando se clasifica a altas velocidades, se clasifican poblaciones de células relativamente raras, se purifican muestras mal preparadas, o los anticuerpos o fluoróforos mal seleccionados). Debe asegurarse de comenzar con suficientes células para cubrir sus requisitos y algunas adicionales para cubrir las pérdidas por aborto (los operadores experimentados generalmente intentan comenzar con al menos el doble de la cantidad de células que necesitan, solo para estar seguros).

- **Tiempo**

El citómetro de flujo FACSaria III puede clasificar a velocidades de flujo muy altas. Ambos pueden clasificar células a una velocidad sorprendente de hasta 70 000 eventos por segundo, pero la eficiencia de clasificación disminuye con tasas de flujo altas. La velocidad de clasificación celular también está limitada por la calidad de la preparación celular, que afecta la tasa de abortos, y se puede ajustar según la cantidad de células que se purificarán y el tiempo disponible. El clasificador de células suele estar configurado para procesar células a una tasa de abortos inferior al 10 %. Para proporcionar una mayor tasa de flujo, las células no purificadas deben estar en una concentración de aproximadamente 20 a 40 millones por ml. Cuando las células fluyen a una velocidad de 30 000 por segundo, el número total de células originales que se procesarán cada hora es de aproximadamente 100 millones. Sin embargo, si las células deseadas son el 50 % del total, obtendrá aproximadamente 50 millones de células por hora. Si las células deseadas son el 10 % del total, obtendrá aproximadamente 10 millones de células por hora. Si las células deseadas son el 1 % del total, obtendrá aproximadamente 1 millón de células por hora. Consulte la tabla a

continuación para conocer la cantidad específica de tiempo que necesitará para obtener una cantidad de células adecuada. Esta información puede ayudarlo a planificar su tiempo. También puede ayudarlo a planificar su presupuesto y puede convencerlo de hacer todo lo posible para enriquecer su población de células antes de llevar su muestra al laboratorio de flujo. Además de las consideraciones financieras, también es cierto que cuanto menos tiempo dediques a purificar, más viables serán las células ordenadas. Sin embargo todo esto dependerá del tamaño de sus células ya que células mayores a 15 nm que utilicen *nozzle* de 100 um deben pasar a una concentración menor, la mitad de lo anterior (esto para no entorpecer el acceso de las células en la boquilla donde se crea la microgota)

%de celulas en presort/N° celulas deseadas	0.001%	0.01%	0.1%	1%	10%
100	6 min	< 1 min	< 1 min	< 1 sec	< 1 sec
1,000	2 hr	1 hr	< 10 min	< 1 min	< 1 sec
10,000	9 hr	4 hr	30-60 min	< 5 min	< 1 min
100,000	4 days	9 hr	1 hr	15 min	< 3 min
1,000,000	40 days	4 days	9 hr	2 hr	15 min

Tiempo de purificación para *nozzle* de 70 um, dada una fracción positiva inicial y una cantidad deseada de células de interés, cuando el clasificador de células funciona a 30 000 eventos/s y una eficiencia del 100 %.

Consejos

1. Recuperación/Viabilidad

Después de una purificación eficaz, es una pena perder células valiosas como resultado de un manejo descuidado. Teniendo en cuenta los límites teóricos mencionados anteriormente, la recuperación y viabilidad de las células después del procedimiento en el citómetro se puede maximizar con algunos procedimientos simples. Especialmente cuando se clasifican poblaciones raras, es importante purificar las células en tubos que contengan un pequeño volumen de medio apropiado para mantenerlas felices y viables después de que hayan pasado por el rayo láser y se hayan desviado hacia la izquierda o la derecha. Para las células sanguíneas, probablemente sea mejor clasificarlas en aproximadamente 0,5 ml o más de suero al 100%. Es importante darse cuenta de que las células se diluirán en el líquido de envoltura del citómetro (generalmente PBS)

durante la purificación. Los diferentes tipos de células tienen diferentes preferencias. Debe decidir el suero o medio apropiado en el que desea clasificar sus células. También es posible cambiar el líquido de envoltura si a sus células no les gusta el PBS. Depende del usuario considerar las preferencias de las células y discutir las con el operador de clasificación con anticipación.

Otro factor a recordar es que las células que se clasificarán (y las células que ya se clasificaron) no se mantienen bajo dióxido de carbono. Por lo tanto, utilice un tampón HEPES o similar, pero evite el tampón de bicarbonato, ya que no mantendrá un pH adecuado durante mucho tiempo. Como se mencionó anteriormente, un factor final es el tiempo: cuanto más pueda hacer para enriquecer previamente las células antes de clasificarlas, más rápido se clasificarán y más felices estarán.

2. Esterilidad

Aunque el citómetro de flujo es un equipo complejo, se puede esterilizar para proporcionar al usuario células purificadas para un cultivo a largo plazo. El operador debe estar informado de antemano sobre un requisito de esterilidad, ya que las líneas de flujo, los tubos y los filtros deben recibir un tratamiento especial. Debido a que no existe la esterilidad absoluta (y la esterilidad efectiva variará según los antibióticos presentes en su medio de cultivo), si tiene la intención de cultivar células purificadas durante mucho tiempo sin mucha cobertura de antibióticos, es posible que desee utilizar una purificación de prueba corta en algún momento antes de un gran experimento para verificar la esterilidad del flujo en sus propias condiciones de cultivo.

3. Pureza

La clasificación celular producirá, de manera rutinaria, poblaciones con una pureza del 95-99 % para las células deseadas. La aparente falta de pureza puede deberse a diversas razones que no tienen nada que ver con la eficacia del procedimiento de clasificación. Por ejemplo, la pureza será menor si las células purificadas no son una población claramente discreta y se superponen con células no deseadas. Además, los grupos de células que se separan después de la purificación pueden dar la apariencia de una población fluorescente purificada contaminada con células no fluorescentes. La pérdida de viabilidad después de la selección puede resultar en células con propiedades de dispersión diferentes a las de las células originales. La separación de las células de las plaquetas y los restos no suele ser eficaz porque las plaquetas y los restos se adhieren a las células seleccionadas y se caen después de la clasificación. La protección de los marcadores de superficie después del procedimiento de purificación suele dar lugar a células puras que son algo menos fluorescentes que la población seleccionada original. Pero, con estas limitaciones, podemos esperar tomar células que son, por ejemplo, menos del 1% en una muestra original y terminar con una pureza de alrededor del 98%. Sin embargo, no debe dar esto por sentado. Al final de cada purificación, debe pasar una alícuota de las células "puras" por el citómetro para comprobar su pureza en comparación con la muestra original previa a la selección.

4. Controles

La selección de células es una elaboración adicional de la técnica de flujo utilizada para el análisis de células. Por lo tanto, los controles son tan importantes para la purificación como para la citometría de flujo sin purificar. Si desea seleccionar las células fluorescentes, primero debe analizar las células de control o sin teñir para ver dónde "trazar la línea" entre las poblaciones fluorescentes y no fluorescentes. Esto significa que deberá llevar un tubo de aproximadamente 300 000 células sin teñir (con experiencia, necesitará mucho menos, generalmente 100 000) para ayudar al operador a configurar el citómetro para que tome sus decisiones de selección. Si está teñiendo sus células con más de un color, deberá agregar controles adicionales. Por lo general, debe proporcionar un control de un solo color para cada color que esté utilizando. Estas células de control deben, por supuesto, ser estériles si está realizando una selección estéril (para que no contaminen el citómetro limpio). Si sus células son valiosas y no puede desperdiciarlas para preparar controles de un solo color, existen alternativas que utilizan *beads* y que pueden ayudarlo a calcular una matriz de compensación que será válida para sus muestras teñidas de varios colores. Para obtener más información, venga y hable con nosotros.