



ProPP

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
REDE DE LABORATÓRIOS MULTIUSUÁRIOS-RELAM  
Av. Amazonas, s/nº BL.6Z - Campus Umuarama 38400-902  
Fone: (34) 3239-1360 - Uberlândia - MG  
relam@propp.ufu.br - <http://www.propp.ufu.br/relam>



## MATERIAL NECESSÁRIO PARA ANÁLISE DE CITOMETRIA DE FLUXO COM CELL SORTING:

❖ **PBS** estéril por filtração ou autoclavado\*, volume de 05 a 10 litros

\* Preparar 1 L de PBS 10x concentrado (0,15M; pH 7,2), de acordo com a seguinte formulação:

- Cloreto de sódio (NaCl): 80g
- Cloreto de potássio (KCL): 2,0 g
- Fosfato dibásico de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>): 11,5 g
- Fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>): 2,0 g
- H<sub>2</sub>O dd qsp: 1000 mL
- Filtrar em membrana clarificante (0,45 um) para retirar impurezas

Após completa diluição do reagente, fazer uma solução 10X diluída (100 mL PBS 10X concentrado : 900 mL H<sub>2</sub>O dd).

- Acondicionar em frascos e autoclavar. Não usar período de secagem no programa da autoclave, pois poderá alterar a molaridade da solução.

❖ **Água destilada autoclavada: 5L**

❖ **Álcool etílico a 70%: 5 L**

## PREPARO DA AMOSTRA A SEREM SUBMETIDAS A CITOMETRIA DE FLUXO

### 1- Filtragem das amostras:

Previamente ao procedimento de *sorting*, as amostras deverão ser filtradas **duas vezes em filtro de 70um** para evitar a passagem de grumos de células e/ou impurezas. **Amostras que contenham grupos ou apresente uma alta densidade de células não serão analisadas pelo risco de comprometer o funcionamento do aparelho.**



ProPP

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
REDE DE LABORATÓRIOS MULTIUSUÁRIOS-RELAM  
Av. Amazonas, s/nº BL.6Z - Campus Umuarama 38400-902  
Fone: (34) 3239-1360 - Uberlândia - MG  
relam@propp.ufu.br - <http://www.propp.ufu.br/relam>



## 2- Solução de diluição das amostras:

As amostras poderão ser diluídas em PBS ou meio de cultura (suplementadas ou não com Soro Fetal Bovino em concentração máxima de 2%)

## 3- Diluição das amostras:

A concentração de células da amostra poderá ser modificada conforme suas características, no entanto, é recomendável que sejam diluídas em número **de  $2 \times 10^7$  células por 1 mL do meio de suspensão.**

**Obs 1:** Faça a contagem das células antes do *sorting*, não antes do procedimento de marcação e filtração. Esses procedimentos geralmente resultam na redução da concentração de células. **Sempre inicie a marcação com o dobro de células** que necessita para iniciar o *sorting*.

**Obs 2:** As células a serem adquiridas devem vir ressuspensas em PBS (sem Ca/Mg++) ou meio de cultura (RPMI) **SEM vermelho de fenol** e preferencialmente SEM soro, porém até 1% de FCS (soro fetal bovino) é tolerado. Se estiver trabalhando com células aderentes ou suspensões viscosas adicione 5 mM de EDTA (para prevenir aglutinação e adesão ao sistema do citômetro).

**Obs 3:** É recomendável trazer quantidade extra de tampão ou meio para diluir as amostras, no caso estejam muito concentradas ao serem adquiridas

## 4- Controles de compensação:

- ⇒ Os usuários deverão trazer células não marcadas e marcadas individualmente com cada fluoróforo utilizado no experimento, com a finalidade de realizar a compensação das fluorescências, ou seja, minimização da interferência entre os fluoróforos (spillover).
- ⇒ As células submetidas ao **BD FACSAria III não podem ser marcadas com iodeto** de propídeo (PI),