|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Dati del richiedente: | | | |
| Nome: |  | **Cognome:** |  |
| Telefono: |  | **Mail:** |  |
| Istituto/Dipartimento/Centro: | | | |
| Responsabile scientifico: | |  |  |
| Data: |  |  |  |

**Servizio Richiesto**: Analisi Cell Sorting

**Descrizione breve del campione:**

1. Campione: **fresco** \_\_\_\_\_ **fissato**\_\_\_\_\_\_

(specificare il fissativo\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_)

1. Tipologia e nome delle cellule da analizzare\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

(es. linfociti, fibroblasti, ecc..) \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

1. Specie/origine del campione \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

(uomo, topo/cellule primarie, linea stabilizzata, ecc …)

1. È stato effettuato lo **screening per patogeni**? **sì** \_\_\_\_\_ **no**\_\_\_\_\_

Se sì, il risultato è: negativo \_\_\_\_\_ positivo \_\_\_\_\_

1. Si tratta di cellule **trasdotte con un vettore**? **sì**\_\_\_\_\_ **no**\_\_\_\_\_

(Se sì descrivere il gene introdotto:\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_)

(il virus è stato reso non infetto, non in grado di replicare: **sì**\_\_\_\_\_ **no** \_\_\_\_\_

1. Si tratta di **cellule infette**?: **sì**\_\_\_\_\_ **no** \_\_\_\_\_

(es. batteri, virus, parassiti, prioni, ecc..)

[Se sì, Indicare l’agente biologico e la sua classificazione come indicato dall’allegato XLVI del D.lgs 81/08 (<http://www.bio.unipd.it/safety/man/allegato2.html>) e nel caso di attività di attenuazione, inattivazione o fissazione indicare la classificazione del campione post lavorazione rispetto ai gruppi sotto riportati

Agente \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Classificazione\* 81/08 1****

Classificazione post lavorazione 1****

Descrivere eventuali procedure di attenuazione, inattivazione o fissazione utilizzate a tutela dell’operatore

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

**gruppo 1**: un agente che presenta poche probabilità di causare malattie in soggetti umani;

**gruppo 2**: un agente che può causare malattie in soggetti umani e costituire un rischio per i lavoratori; è poco probabile che si propaga nella comunità; sono di norma disponibili efficaci

misure profilattiche o terapeutiche;

**gruppo 3**: un agente che può causare malattie gravi in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori; l'agente biologico può propagarsi nella comunità, ma di norma sono disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche;

**gruppo 4**: un agente biologico che può provocare malattie gravi in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori e può presentare un elevato rischio di propagazione nella comunità; non sono disponibili, di norma, efficaci misure profilattiche o terapeutiche.

1. Altro di rilevante ai fini dell’analisi e della sicurezza del personale:

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

**LISTA CAMPIONI**

Dati del richiedente:\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Strumento: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Nome Esperimento:\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Data:\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Serie / Tubo | | ID campione | Anticorpi + Fluorocromi | | | | | | | | | |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

**Suggerimenti per la preparazione dei campioni per l’analisi e il cell sorting:**

**PREPARARE GLI ADEGUATI CONTROLLI:**

1. CELLULE NON COLORATE: utile per valutare l’autofluorescenza del campione, quando eccitato dalla lunghezza d’onda utilizzata.
2. CONTROLLO ISOTIPICO: importante per valutare il legame aspecifico.
3. SINGLE COLOR: per ogni anticorpo che verrà utilizzato nell’analisi.
4. CONTROLLO LEGAME ASPECIFICO SECONDARIO: indispensabile nel caso in cui non si utilizzano anticorpi diretti (quindi secondario marcato o anticorpi biotinilati).
5. FLUORESCENCE MINUS ONE (FMO): il campione viene marcato con tutti gli anticorpi tranne uno. Questo controllo risulta utile nel caso in cui l’espressione di un antigene sia bassa o molto variabile e consente di stabilire il corretto limite del negativo.

**CONCENTRAZIONE MEDIA DELLA SOSPENSIONE CELLULARE:**

1. Analisi: 5x106 cells/ml max (volume minimo 150 µl)

2. Sorting: 107 cells/ml (se necessario sarà diluita).

*Per concentrazioni particolari consultare il personale della struttura*.

**FILTRARE IL CAMPIONE:**

Per rimuovere eventuali clumps and debris, è consigliabile filtrare il campione attraverso un filtro da 70um (eventuali aggregati potrebbero causare problemi con la fluidica e causare il blocco dello strumento).

**PROVETTE PER L’ACQUISIZIONE:**

Le provette in polistirene presentano cariche elettrostatiche che favoriscono l’adesione delle cellule alle pareti e al fondo delle provette. Valutare quindi con attenzione il tipo di provette da utilizzare.

Per esempio, sarebbe consigliato risospendere un campione di cellule con forte propensione all’adesione in provette in polipropilene prima di acquisire.

Durante il sorting le provette in polistirene per la raccolta del campione andrebbero saturate O/N in PBS + FBS/BSA a 4°C per bloccare le cariche elettrostatiche. Le gocce polarizzate in un campo elettrostatico contenti le cellule da separare potrebbero essere attirate verso le pareti delle provette o respinte da cariche opposte riducendo l’efficienza del sorting.

Laddove è possibile utilizzare provette in polipropilene.