|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Dati del richiedente: | | | |
| Nome |  | **Cognome** |  |
| Telefono |  | **mail** |  |
| Dipartimento /Centro | | | |
|  |  |  |  |

**Servizio Richiesto**: Analisi Cell Sorting

**Informazioni sui campioni:**

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

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

1. Tipo di cellule da analizzare

(es. linfociti, fibroblasti, ecc..)

1. Specie/origine del campione (uomo, topo/cellule primarie, linea stabilizzata, …)

Descrizione breve del campione:

1. È stato effettuato lo screening per patogeni?

si \_\_\_\_\_ no \_\_\_\_\_

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

1. Si tratta di cellule trasdotte con un vettore ?

si \_\_\_\_\_ no \_\_\_\_\_

(gene introdotto: )

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

1. Si tratta di cellule infette (batteri, virus, parassiti, prioni, ….)

si \_\_\_\_\_ no \_\_\_\_\_

Se si descrivere l’organismo:

1. Altro:

**LISTA DEI CAMPIONI**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| TUBO | ID campione | 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.