

Instituto
de Investigación Sanitaria
de Palma

IdISP a

Institut d'Investigació Sanitària de Palma (IdISP a)

Plataforma Citometría y cultivos celulares



**Govern
de les Illes Balears**

FISIB
Fundació d'Investigació Sanitària
de les Illes Balears

ÍNDICE

- * Descripción Plataforma
- * Citometría de flujo
 - * Introducción
 - * Análisis: características analizador y aplicaciones
 - * Sorting: características sorter y aplicaciones
 - * Nuevas aplicaciones
- * Cultivos celulares

Institut d'Investigació Sanitària de Palma (IdISPa)

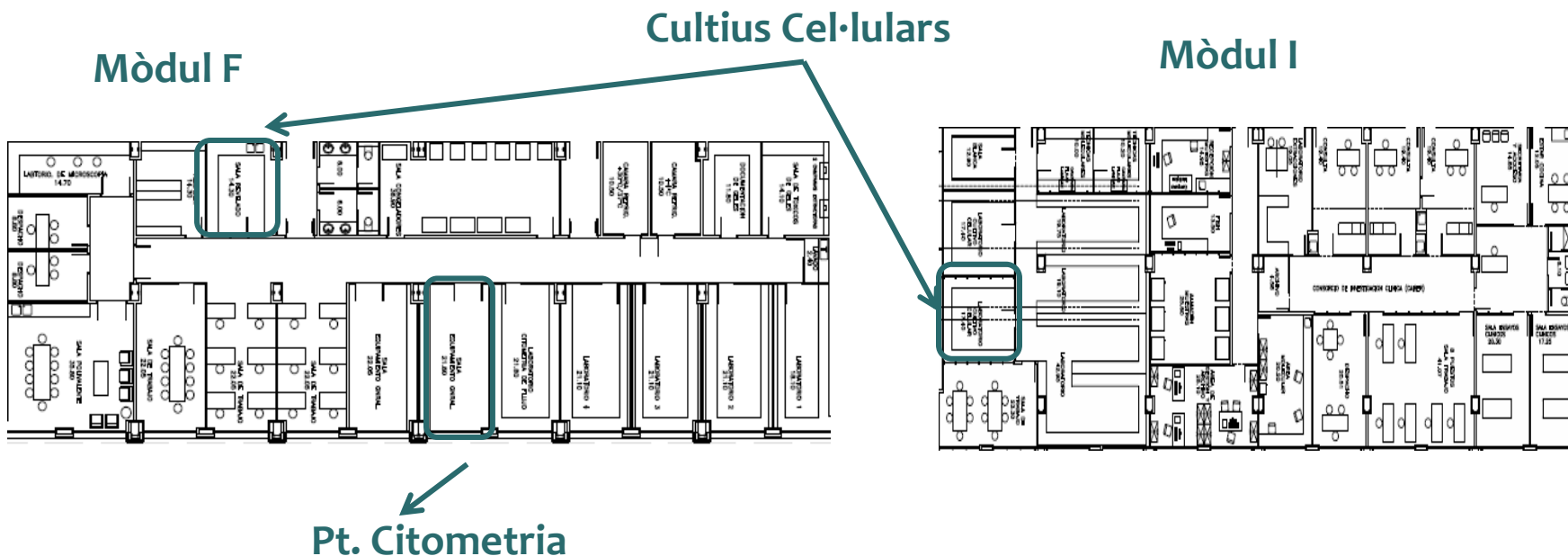
Plataformes Científico-Tècniques:

Citometria i Cultius Cel·lulars



1. Espais

La Plataforma de Citometria i Cultius Cel·lulars de l'IdISPa està ubicada en el mòdul F de la planta -1 de l'Hospital Universitari Son Espases i ocupa una superfície útil: Citometria, 21,60m² i Cultius Cel·lulars, 17,25m² al mòdul I, i 14,15m² al mòdul F.



Institut d'Investigació Sanitària de Palma (IdISPa)

Plataformes Científico-Tècniques:

Citometria i Cultius Cel·lulars



2. Equipament:

* Citometria i Cultius Cel·lulars:

- Citòmetre analitzador BD FACSVersè (Làsers 488, 640 i 405nm i 8 fluorescències).
- Citòmetre analitzador Cytomics FC500. Beckman Coulter
- Citòmetre Sorter BD FACSAria Fusion (Làsers 488, 640 i 405nm i 14 fluorescències).
- Citòmetre Sorter FACS Influx. BD Biosciències
- Preparació de mostres BD FACS Assistant Lyse Wash

- Cabines de flux laminar
- Incubadors
- Microscopis
- Equips migració cel·lular: RTCA ACEA
- Comptador de cèl·lules
- Electroporador per a cèl·lules eucariotes: Lonza Nucleofector
- Electroporador Cell pulser: BioRad
- Dissociador de teixits
- Irradiador de cèl·lules

Institut d'Investigació Sanitària de Palma (IdISPa)

Plataformes Científico-Tècniques:

Citometria i Cultius Cel·lulars



3. Serveis

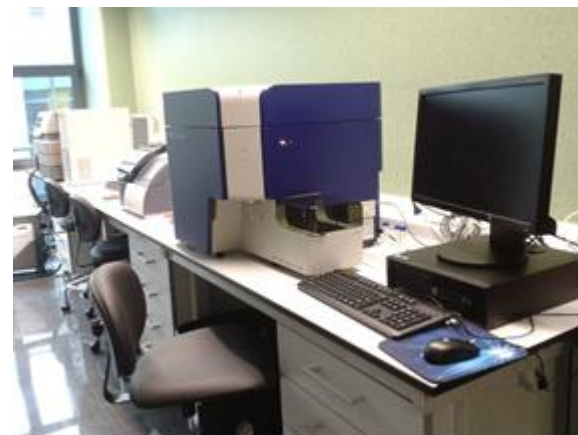
- Preparació de mostres per a Citometria de flux
- Separació Cel·lular
- Immunofenotipat (de membrana o intracel·lular)
- Estudi del cicle i funcionalitat cel·lular
- Proliferació
- Apoptosi

- Ús d' Incubadors i de cabines per a cultius primaris i per a manteniment de línies cel·lulars
- Dissociació de teixits
- Electroporació
- Comptador de cèl·lules
- Estudis de Migració Cel·lular (RTCA)
- Conservació de cèl·lules i de línies cel·lulars a -150°C (criocongelador o en N_2 líquid)
- Assessorament tècnic i Formació dels usuaris en el maneig dels equips

4. Personal Tècnic

- Tècnic de suport

Sala citometría



CITOMETRÍA DE FLUJO

- Citometría de Flujo (Flow Cytometry)
 - Medición de propiedades de células en suspensión
- Separación Celular (Cell Sorting)
 - Separación de células en función de las propiedades medidas

[Video](#)

BASES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

FLUIDOS

- Células (partículas) en suspensión
- alineadas en un flujo atravesado

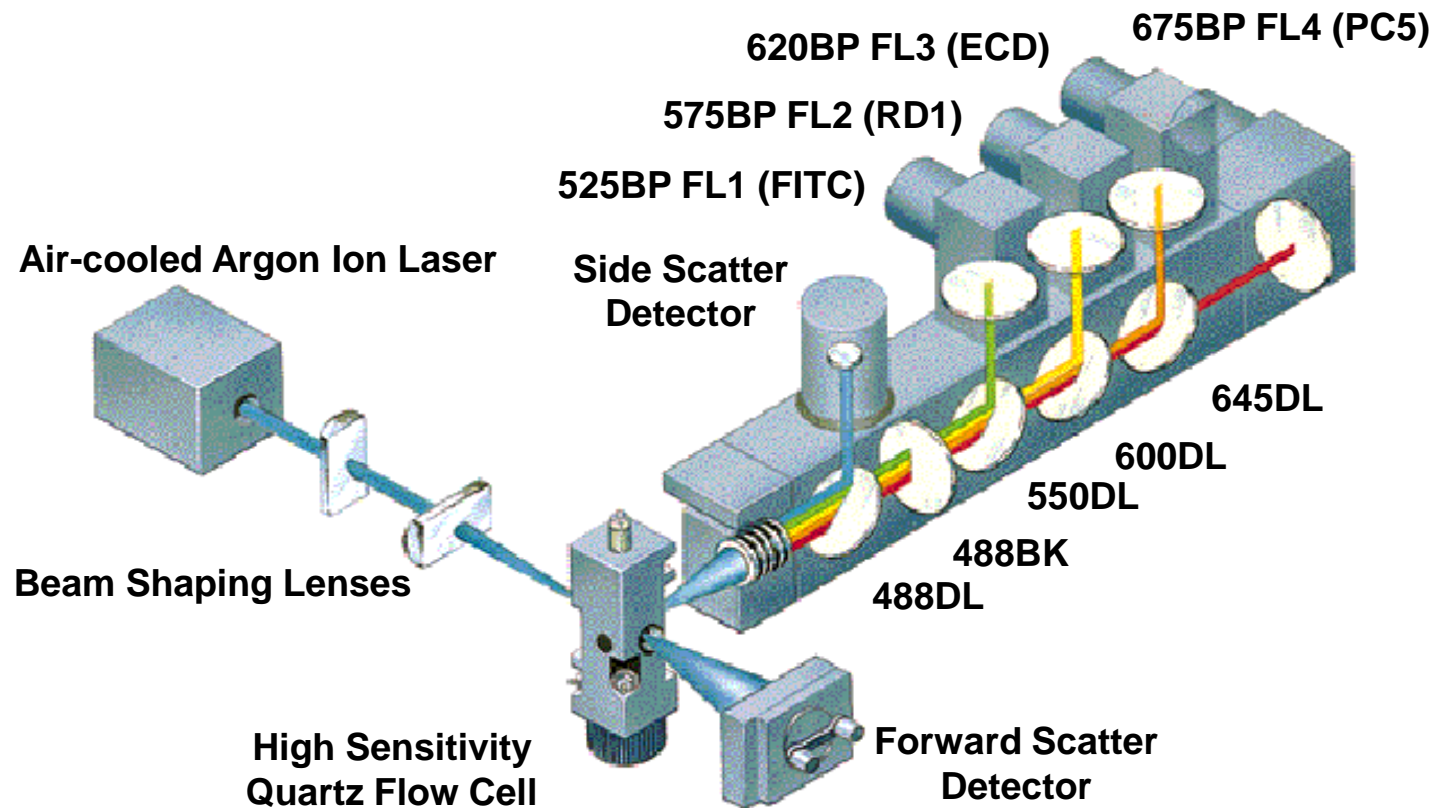
ÓPTICA

- por una fuente luminosa con
- dispersión de luz y emisión de fluorescencia
- filtrada, captada y

ELECTRÓNICA

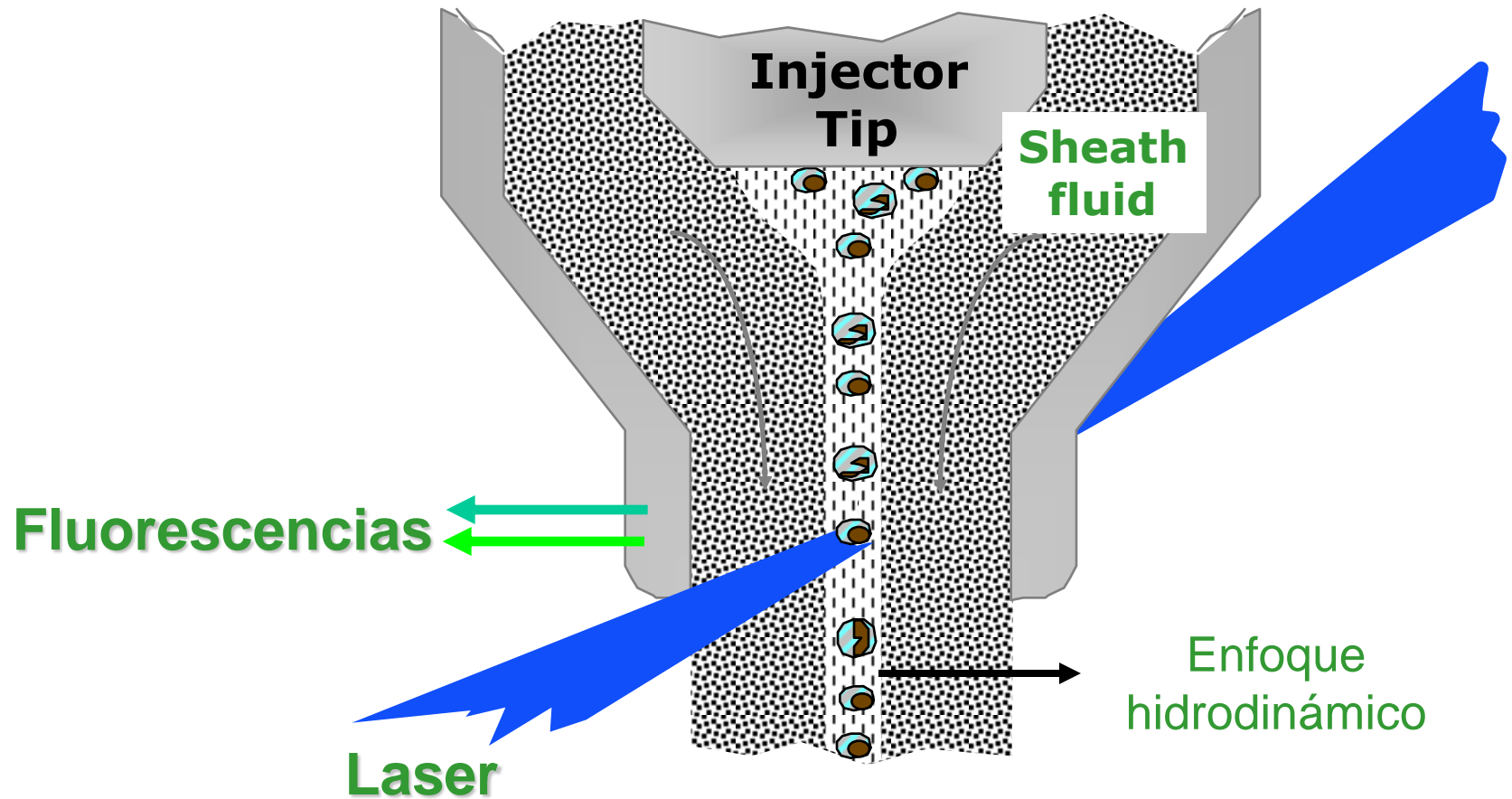
- convertida a señales digitales
- almacenadas en un ordenador.

ESQUEMA CITÓMETRO DE FLUJO

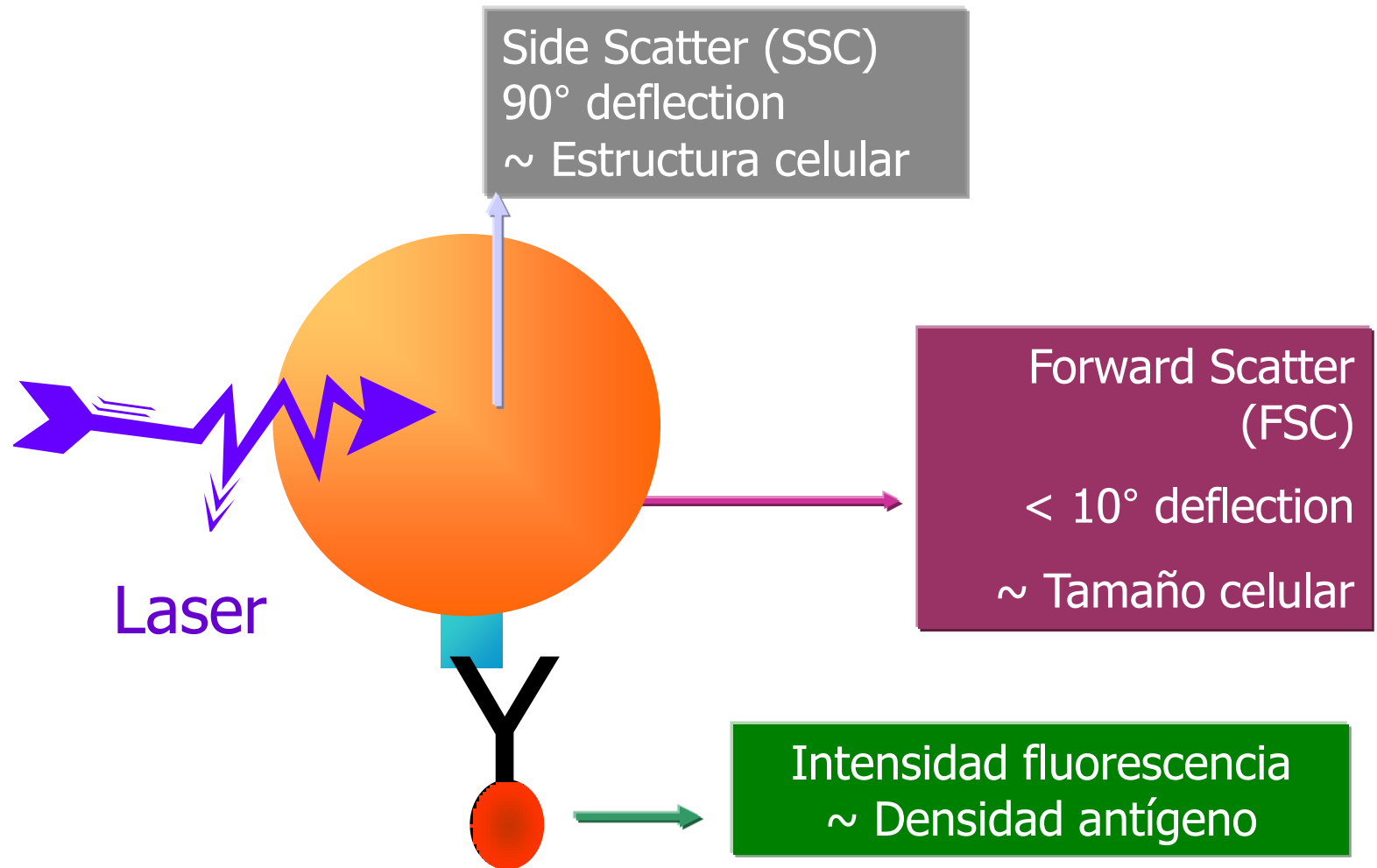


Emisión de fluorescencia y bancada óptica

¿CÓMO FUNCIONA UN CITÓMETRO DE FLUJO?

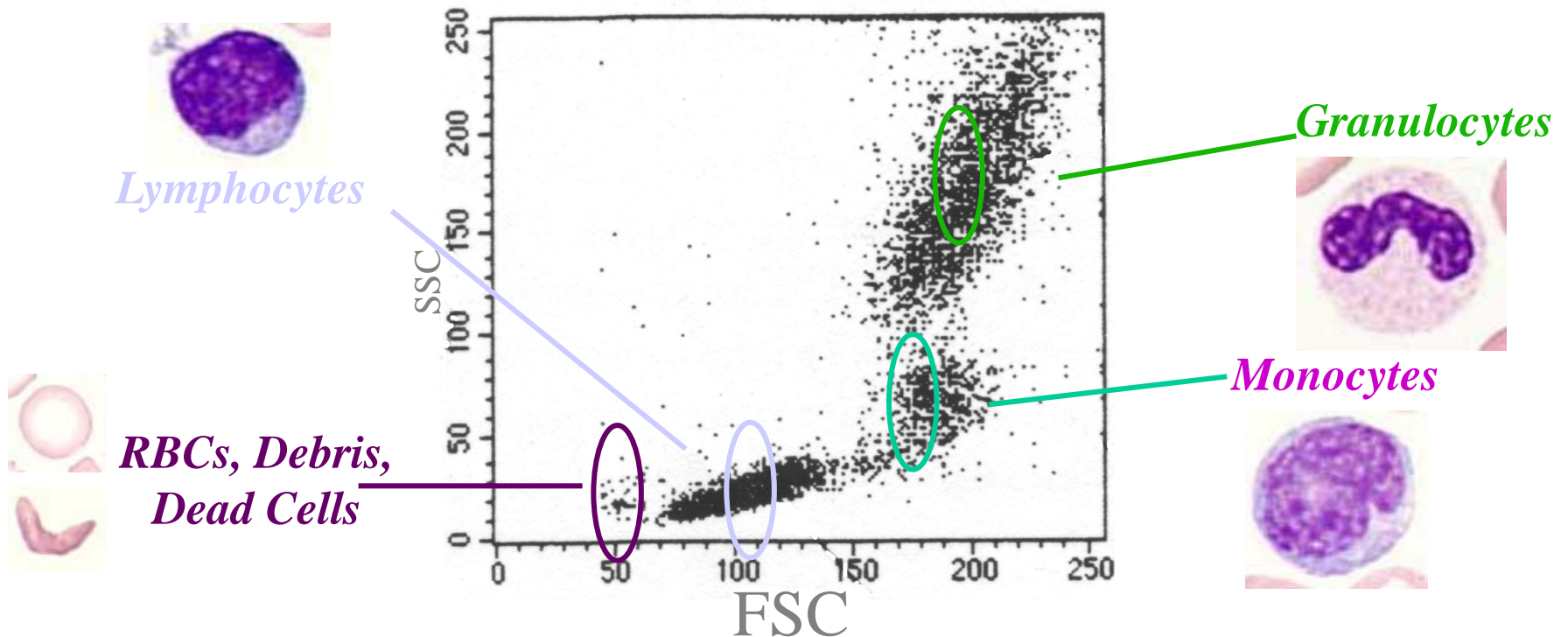


PARÁMETROS ANALIZADOS



FSC/SSC

Since **FSC ~ size** and **SSC ~ internal structure**, a correlated measurement between them provides a basis for a simple differentiation between the major populations



OCTÁGONOS Y TRÍGONOS

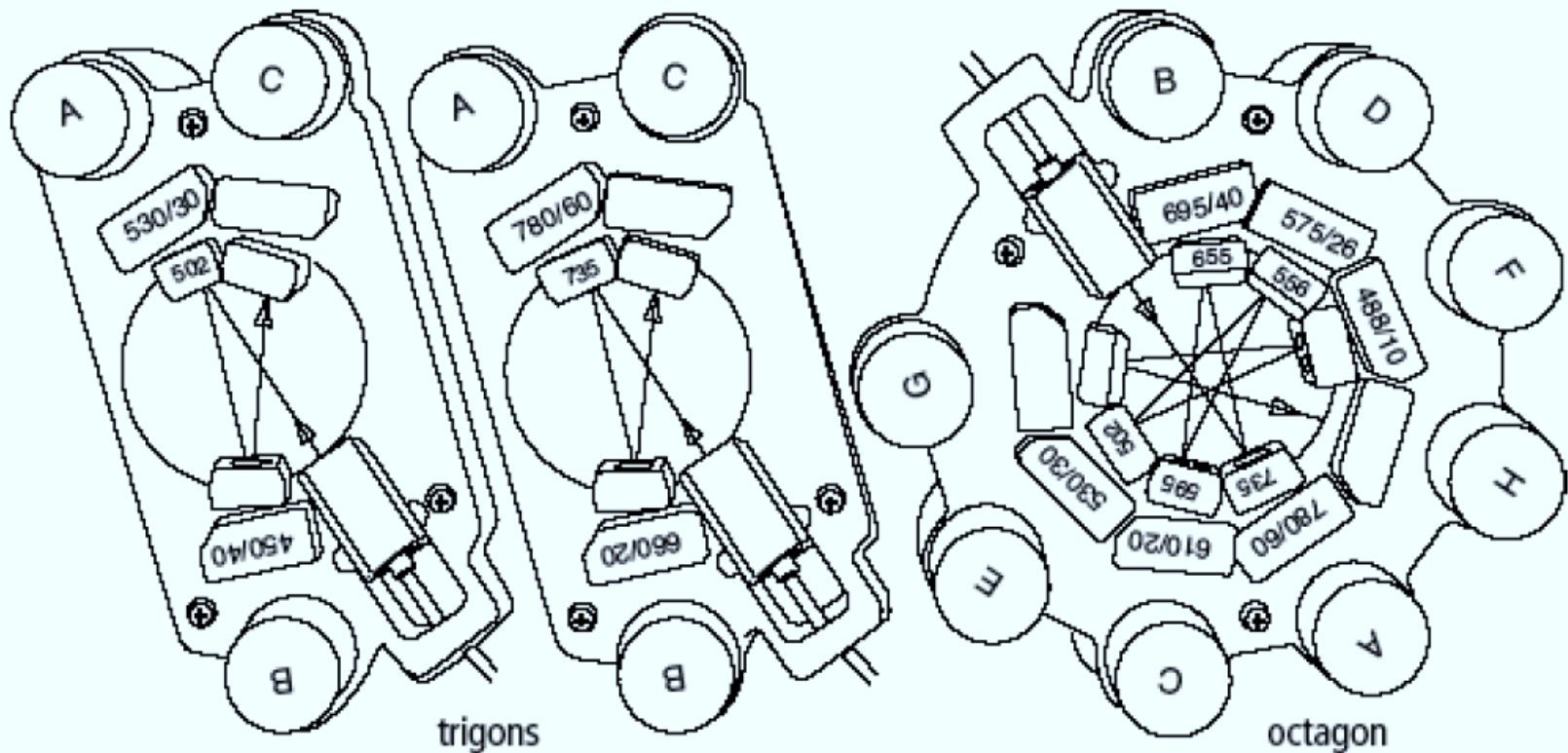
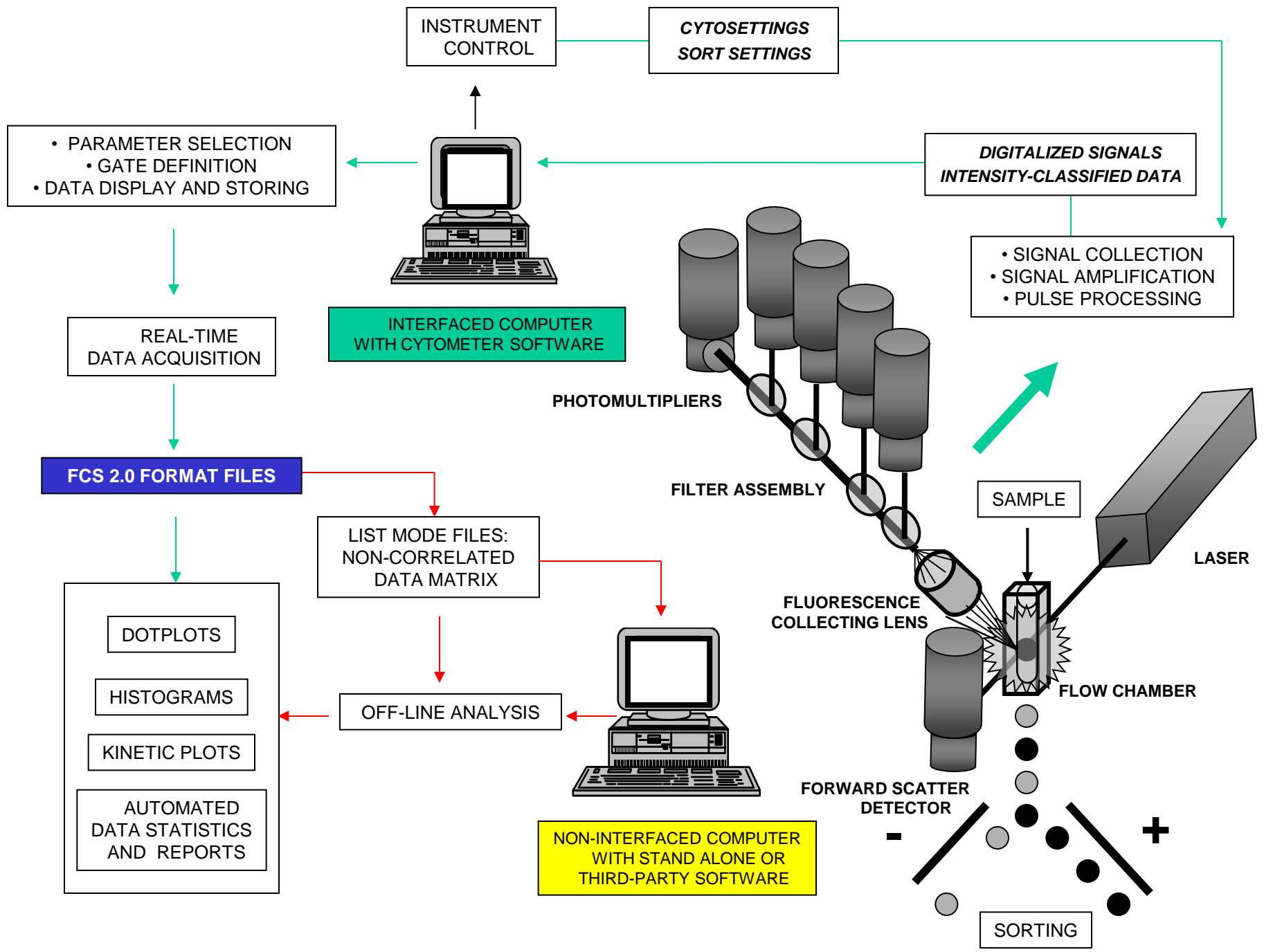


Figure 1-16 Fully-loaded detector arrays

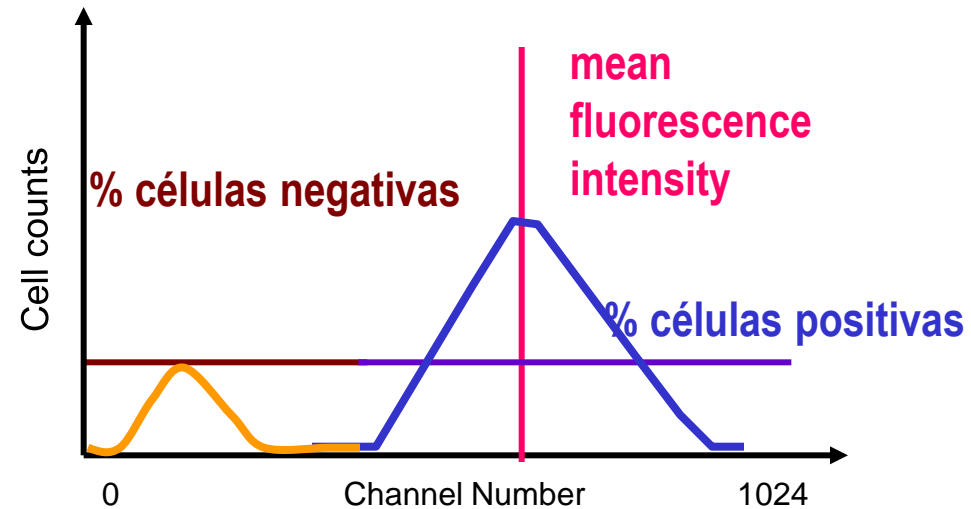
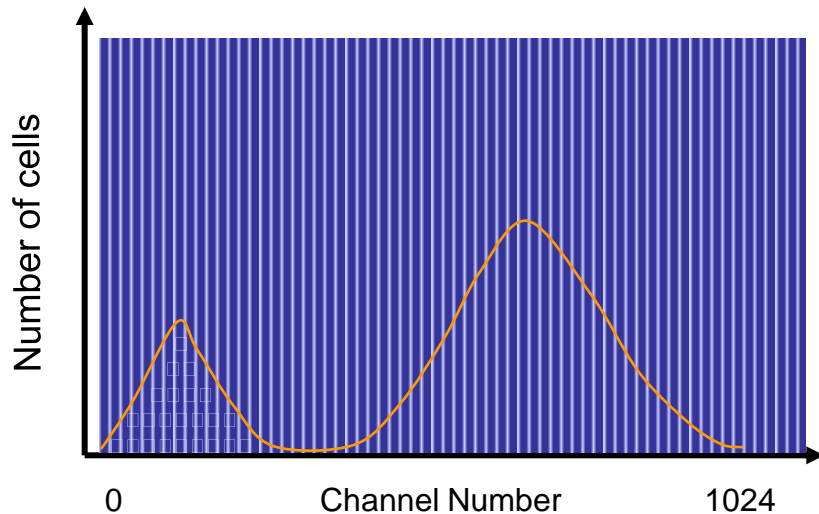
- Minimizar pérdidas luz
- Fibra óptica
- Sistemas compactos
- Reflexión vs transmisión



ANÁLISIS SEÑAL

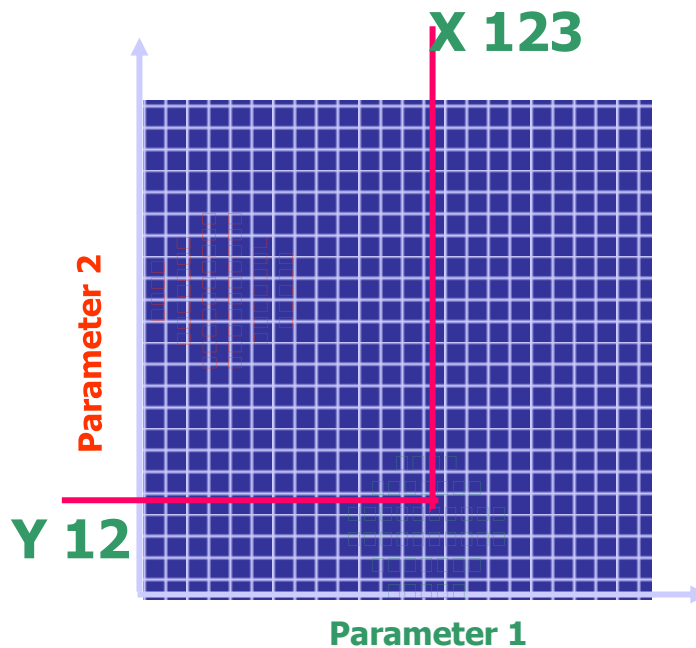
ESTADÍSTICA

- Células Negativas o Positivas (%)
- Densidad antígeno ~ Intensidad media (o mediana) fluorescencia (MFI) ~ Canal

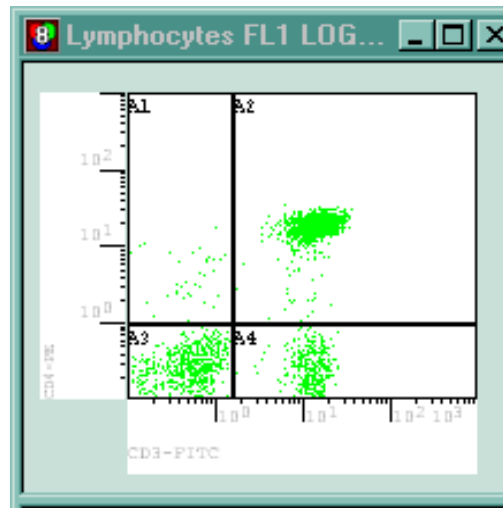


ANÁLISIS SEÑAL

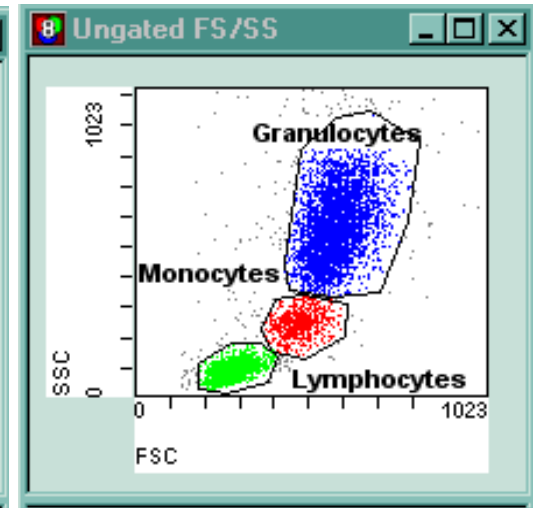
Correlación dos parámetros



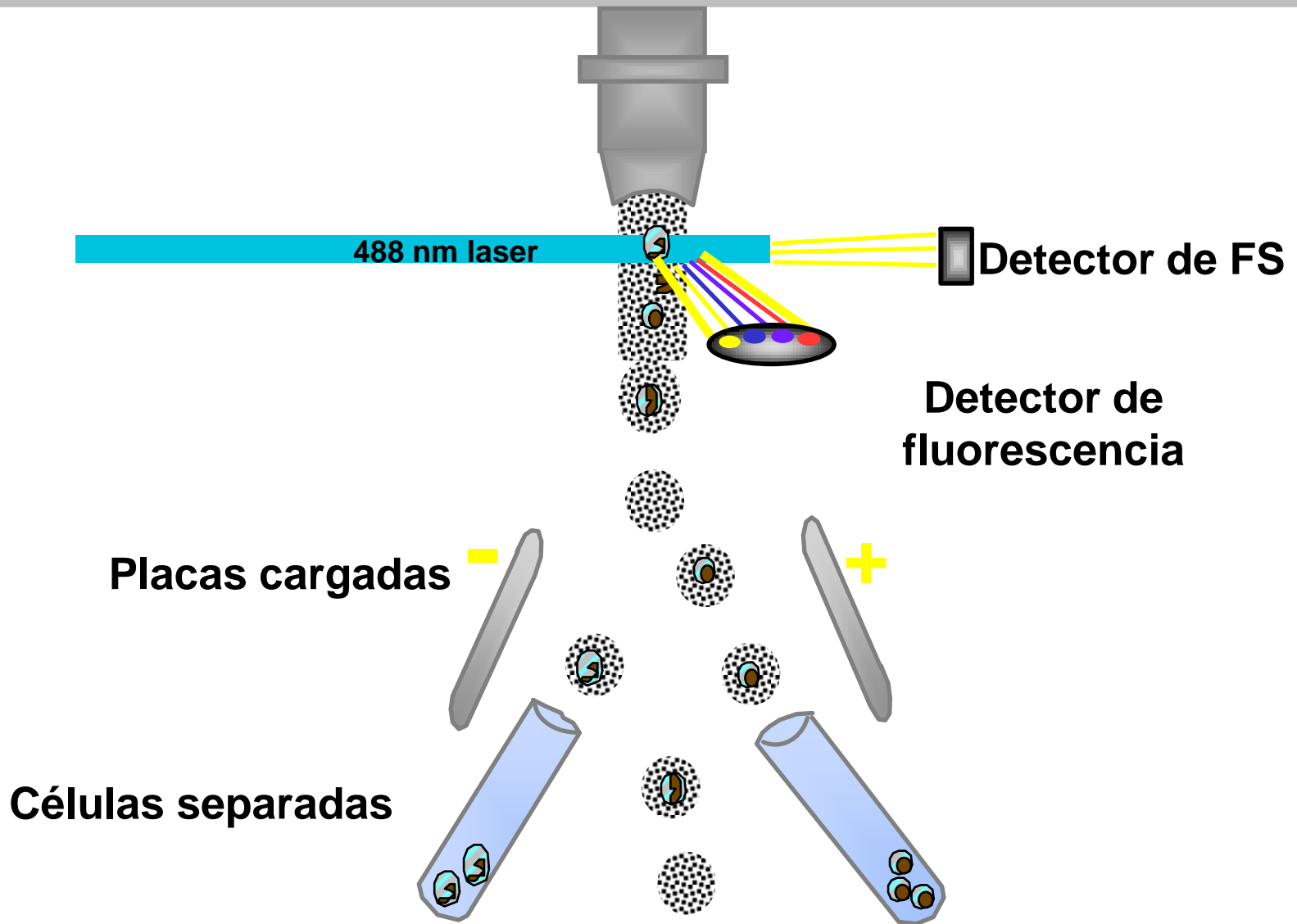
Análisis 2-colores :
Coexpresión
de 2 antígenos



Morfología: FSC-SSC



SEPARACIÓN CELULAR



CITOMETRÍA DE FLUJO

Ventajas

- Análisis de gran número de células (10^7 células)
- Tiempo análisis (sec) 10.000-25.000 e/s
- Gateo permite detección de subpoblaciones celulares
- Medida de eventos raros
- Medida objetiva y cuantitativa de la intensidad de fluorescencia
- Detección simultánea de hasta 18 fluorescencias por célula
- Poco invasivo

APLICACIONES

- Antígenos de superficie o intracelulares (anticuerpos monoclonales)
- Contenido celular DNA, RNA (ciclo celular o apoptosis)
- Parámetros funcionales:
 - Concentración Ca^{+} intracelular
 - Proliferación, viabilidad
- Cuantificación proteínas solubles (unión microesferas)
- Separación celular

CITOMETRÍA DE FLUJO Y SEPARACIÓN CELULAR



ANALIZADOR FACSVerse

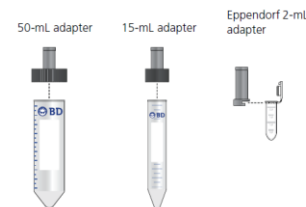


CARACTERÍSTICAS ANALIZADOR

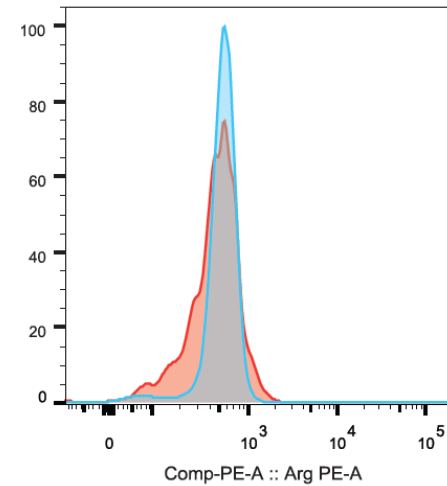
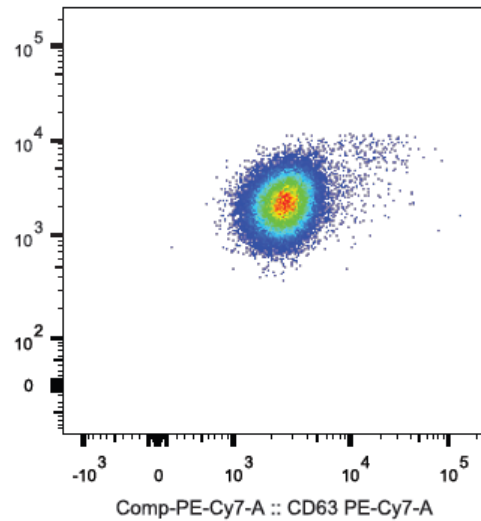
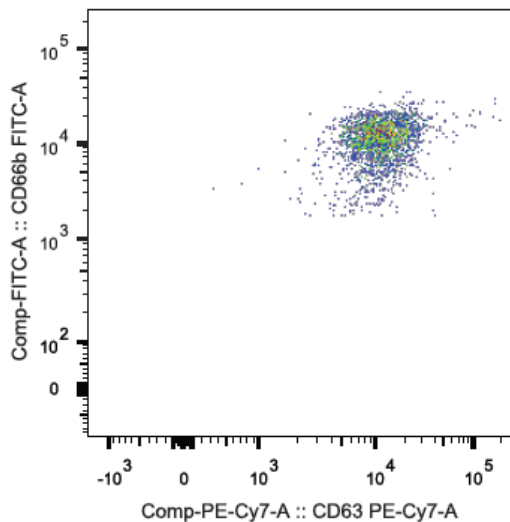
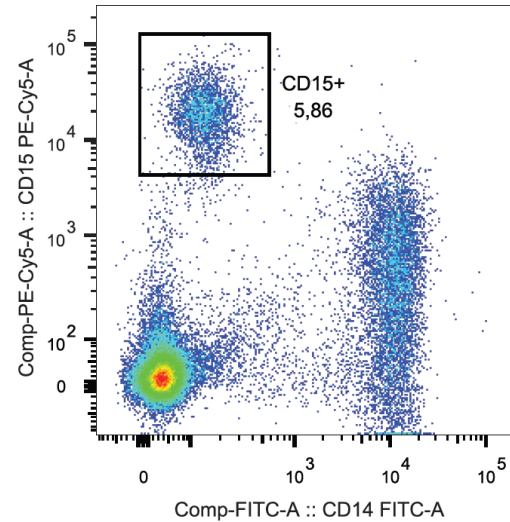
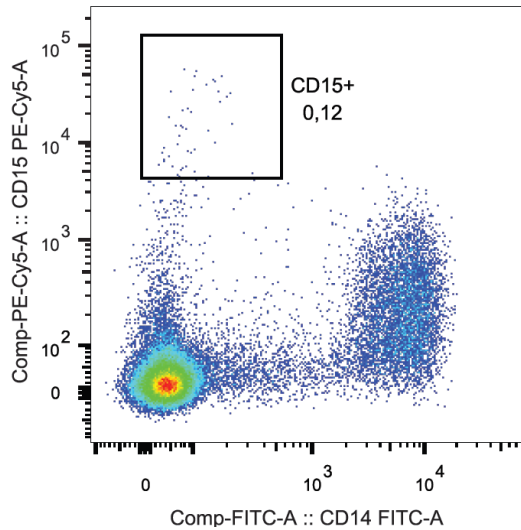
3-laser, 8-color (4-2-2) configuration

488 nm			
SSC	Cell surface markers, live/dead discrimination, cell cycle	488/15	NONE
FITC, Alexa Fluor® 488	"	527/32	507 LP
PE, PI	"	568/42	560 LP
PerCP, PerCP-Cy5.5, PE-Cy5, 7-AAD	"	700/54	665 LP
PE-Cy7	"	783/56	752 LP
633 nm			
APC, Alexa Fluor® 647	Cell surface markers	660/10	660/10
		660/10	660/10
APC-Cy7, APC-H7	"	783/56	752 LP
405 nm			
BD Horizon™ V450, Pacific Blue™, DAPI Violet Proliferation Dye 450, Fixable Viability Stain 450, Brilliant Violet™ 421	Cell surface markers, live/dead discrimination, cell cycle	448/45	448/45
BD Horizon™ V500, AmCyan	Cell surface markers	528/45	500

Ventajas:
 3 láseres, 8 fluorescencias
 Universal loader
 Alta sensibilidad
 Velocidad: hasta 30.000 eventos/segundo
 Contaje absoluto



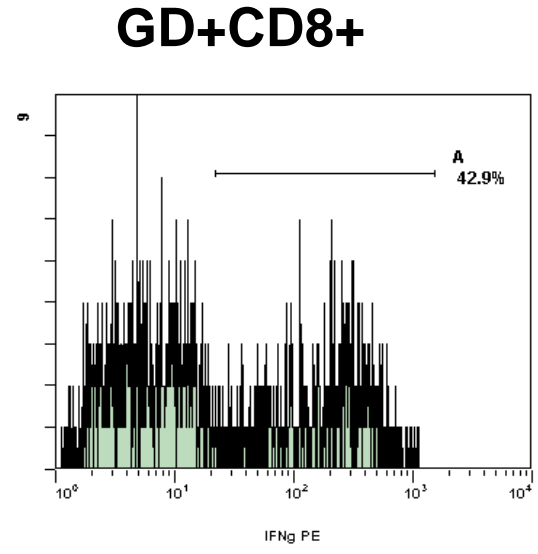
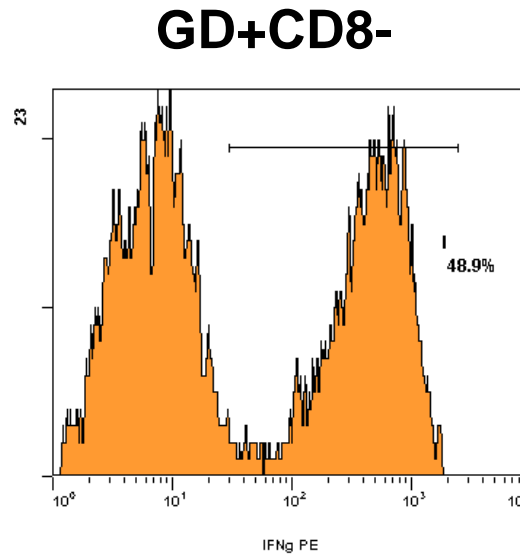
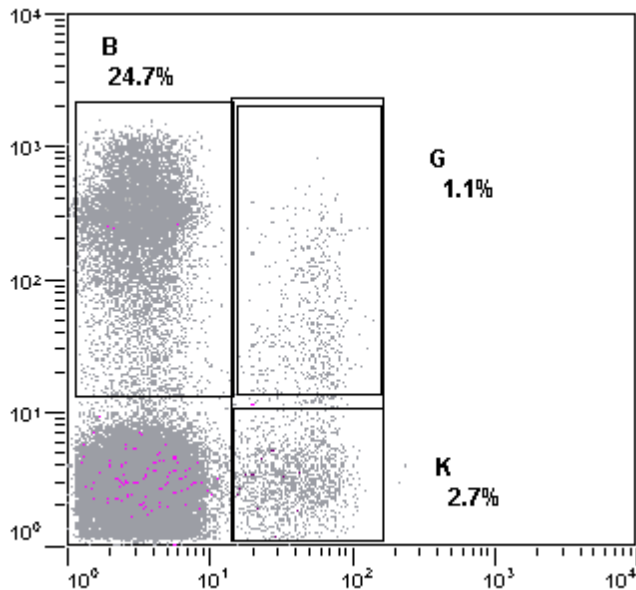
INMUNOFENOTIPO



Sample Name
NDG 15 Arg_LDG 64.fcs
LDG 14 15 Arg_LDG 64.fcs

Sergio Scrimini “Caracterización de granulocitos periféricos de baja densidad productores de Arginasa 1 en EPOC”. Financiación: Grups Competitius MAR (Govern Balear) Ref PRE-R-22528-2011

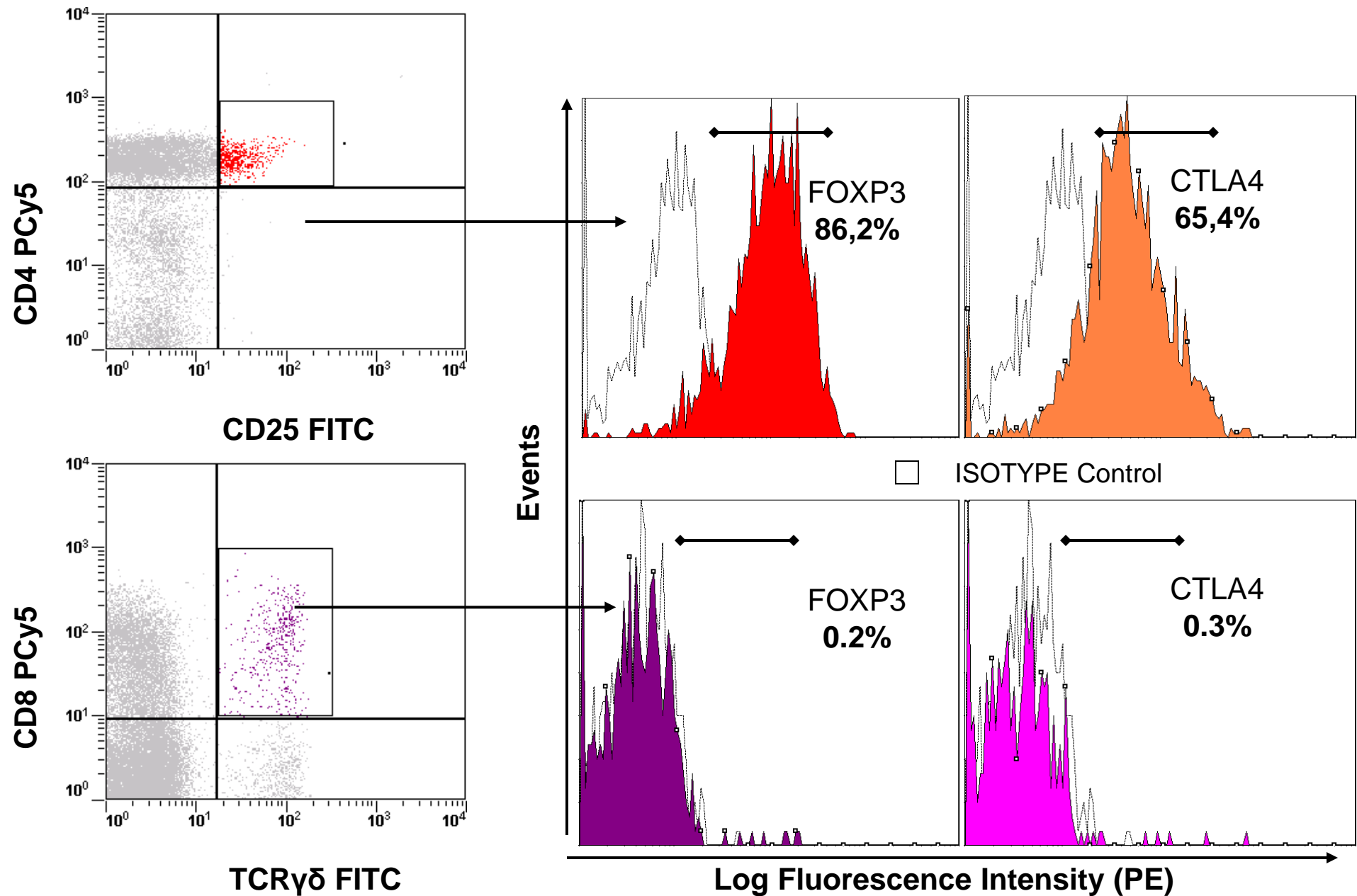
INMUNOFENOTIPO INTRACELULAR



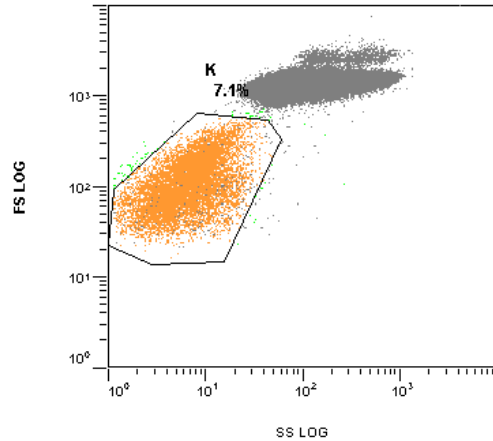
Phenotype markers and cytokine intracellular production by CD8+ gamma delta T lymphocytes do not support a regulatory T profile in Behçet's disease patients and healthy controls. Immunol Lett. 2010 Apr 8;129(2):57-63.

Clemente A, Cambra A, Munoz-Saá I, Crespí C, Pallarés L, Juan A, Matamoros N, Julià MR.

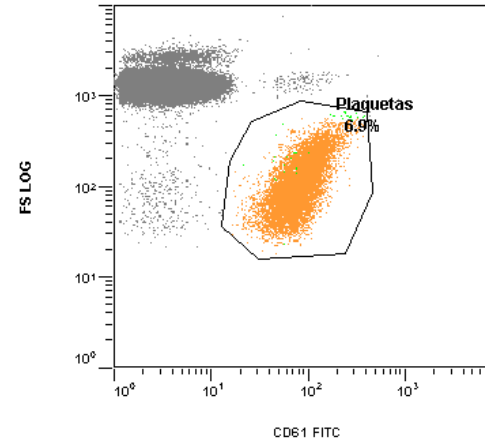
INMUNOFENOTIPO INTRACELULAR



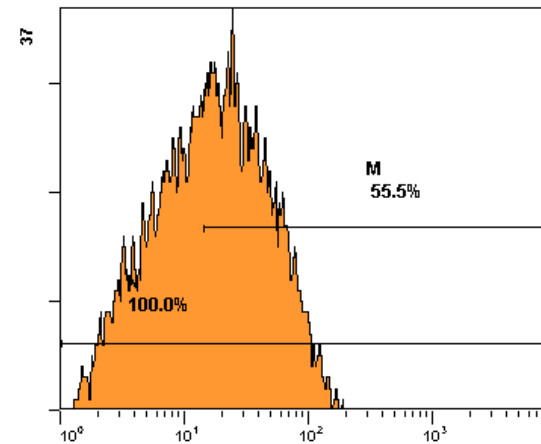
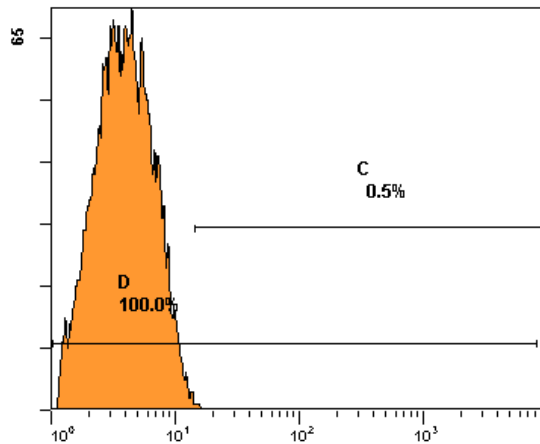
PLAQUETAS



(F1)[K AND Plaquetas] P 7 A Basal P 1.003 : FL2 LOG - ADC



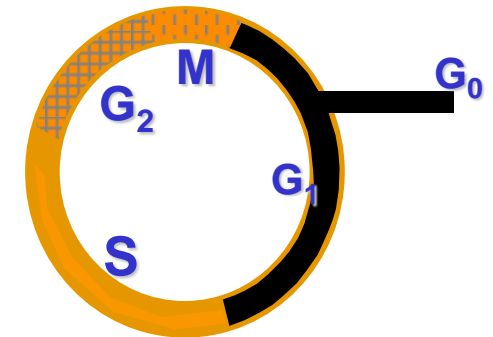
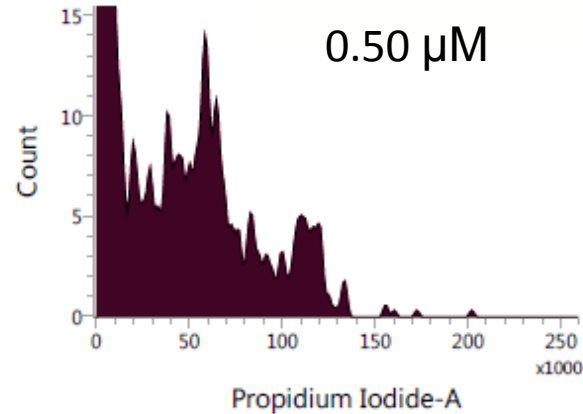
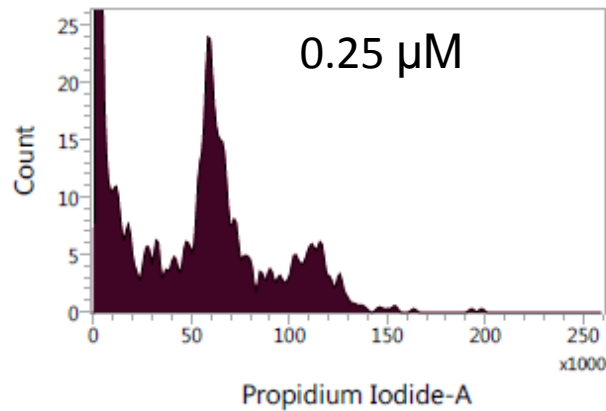
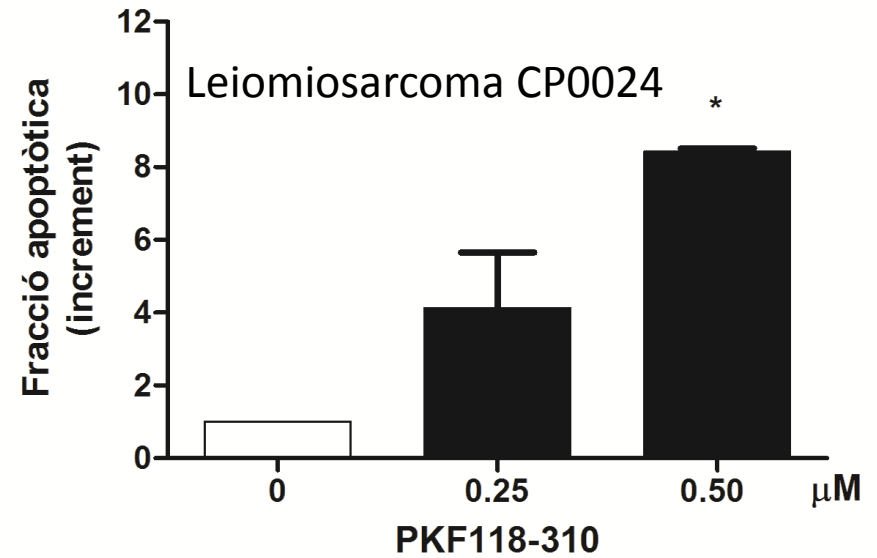
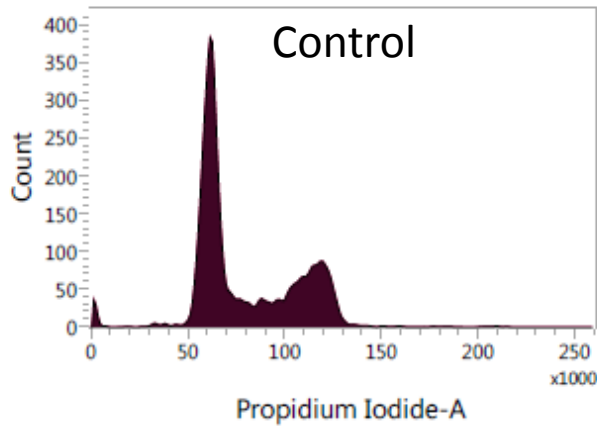
(F3)[K AND Plaquetas] P 7 A ADP 2 P 1.011 : FL2 LOG - ADC



Impaired circadian variation of platelet activity in patients with sleep apnea. Sleep Breath. 2012 Jun;16(2):355-60.

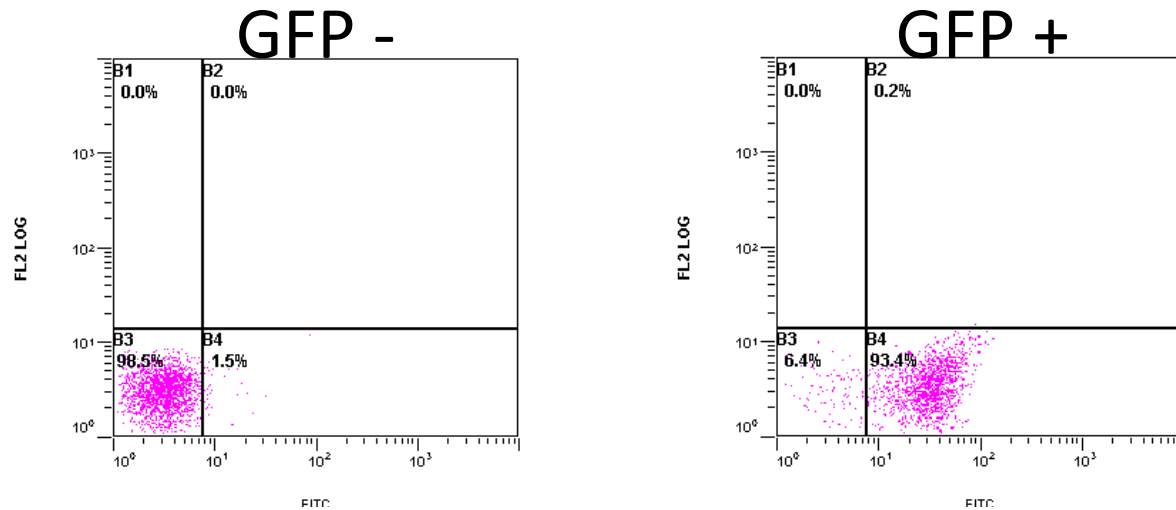
Barceló A, Piérola J, de la Peña M, Frontera G, Yañez A, Alonso-Fernández A, Ayllon O, Agusti AG.

CICLO CELULAR/ APOPTOSIS

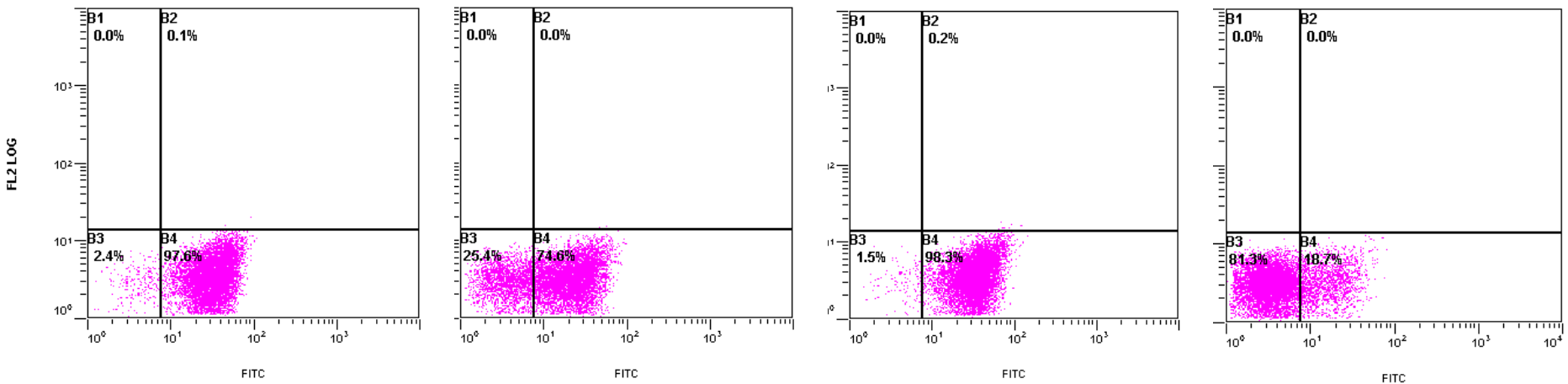


La inhibició de la interacció TCF- β -catenina indueix apoptosi en cèl·lules de sarcomes de parts toves. A. Obrador.

BACTERIAS



CEPAS CLÍNICAS



Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(11):5527-35.

Mulet X, Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Zamorano L, Juan C, Tubau F, Rodríguez C, Moyà B, Peña C, Martínez-Martínez L, Oliver A; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI).

FACSAria Fusion

Ventajas:

3 láseres, 14 fluorescencias

Alta sensibilidad

Velocidad teórica: hasta 70.000 e/s
(252×10^6 por hora)

Control automático delay

Hasta 4 vías de recogida muestra

Recogida en tubos, placa, porta...



Característiques FACS Aria Fusion

Laser and optics device	PMTs	LP mirrors	BP filters	Fluorochromes
488-nm octagon	A	735	780/60	PE-Cy7
	B	655	675/20 or 695/40	<ul style="list-style-type: none"> • PerCP • PerCP-Cy5.5
	C	610	616/23	<ul style="list-style-type: none"> • PE-CF594 • PE-Texas Red® • PI
	D	556	585/42	PE
	E	502	530/30	<ul style="list-style-type: none"> • FITC • Alexa Fluor® 488
	F	—	488/10	SSC
	G, H - Unavailable			

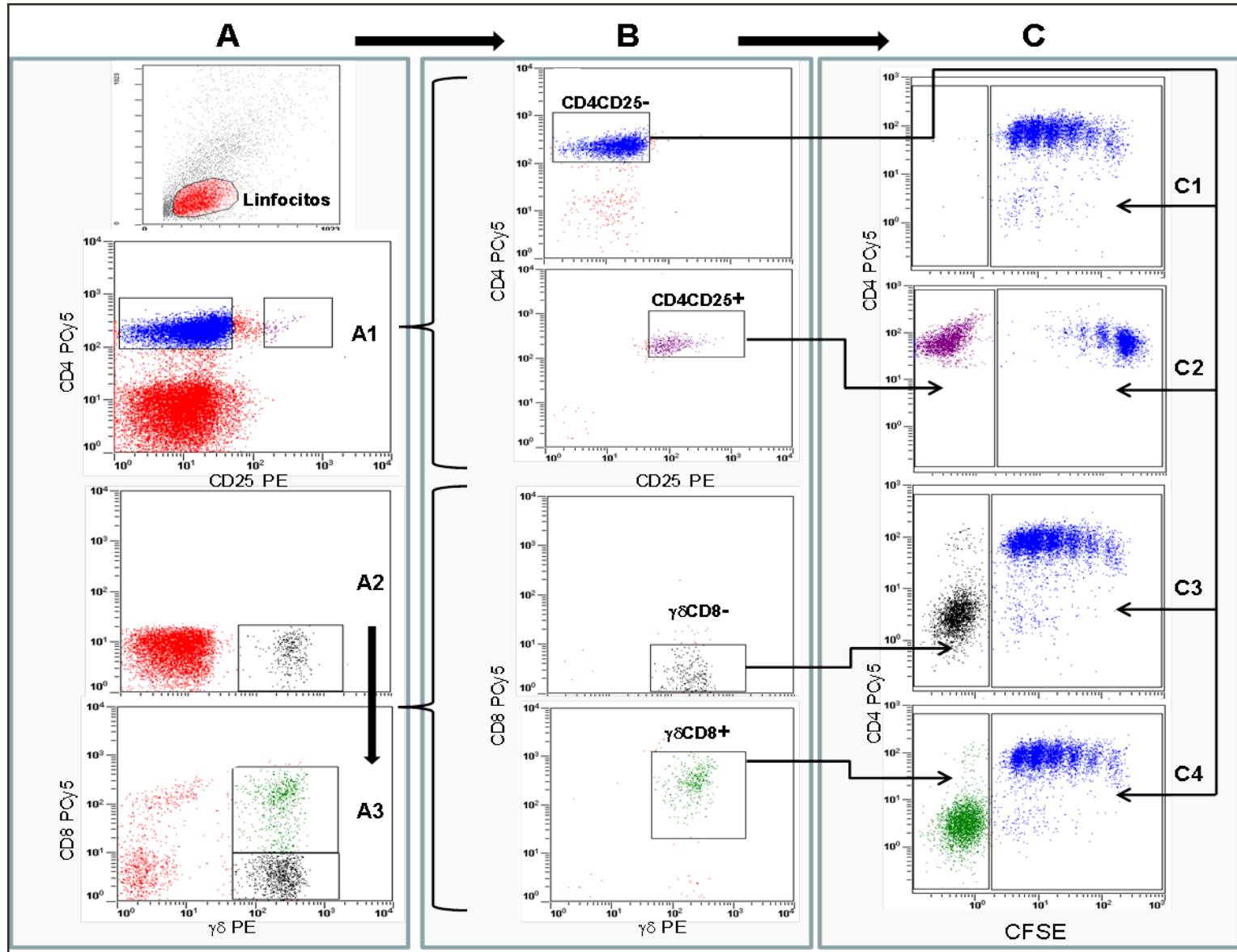
Laser and optics device	PMTs	LP mirrors	BP filters	Fluorochromes
640-nm octagon	A	755	780/60	<ul style="list-style-type: none"> • APC-Cy7 • APC-H7
	B	690	730/45	Alexa Fluor® 700
	C	—	670/30	<ul style="list-style-type: none"> • APC • Alexa Fluor® 647
405-nm octagon	A	750	780/60	• BD Horizon™ BV786
	B	690	710/50	• BD Horizon™ BV711
	C	630	660/20	• BD Horizon™ BV650
	D	595	610/20	• BD Horizon™ BV605
	E	505	525/50	<ul style="list-style-type: none"> • AmCyan • BD Horizon BV510 • BD Horizon™ V500
	F	—	450/40	<ul style="list-style-type: none"> • DAPI • BD Horizon™ V450 • Pacific Blue™ • BD Horizon BV421 • BD Horizon VPD450
	G, H - Optional			



Característiques FACS Aria Fusion



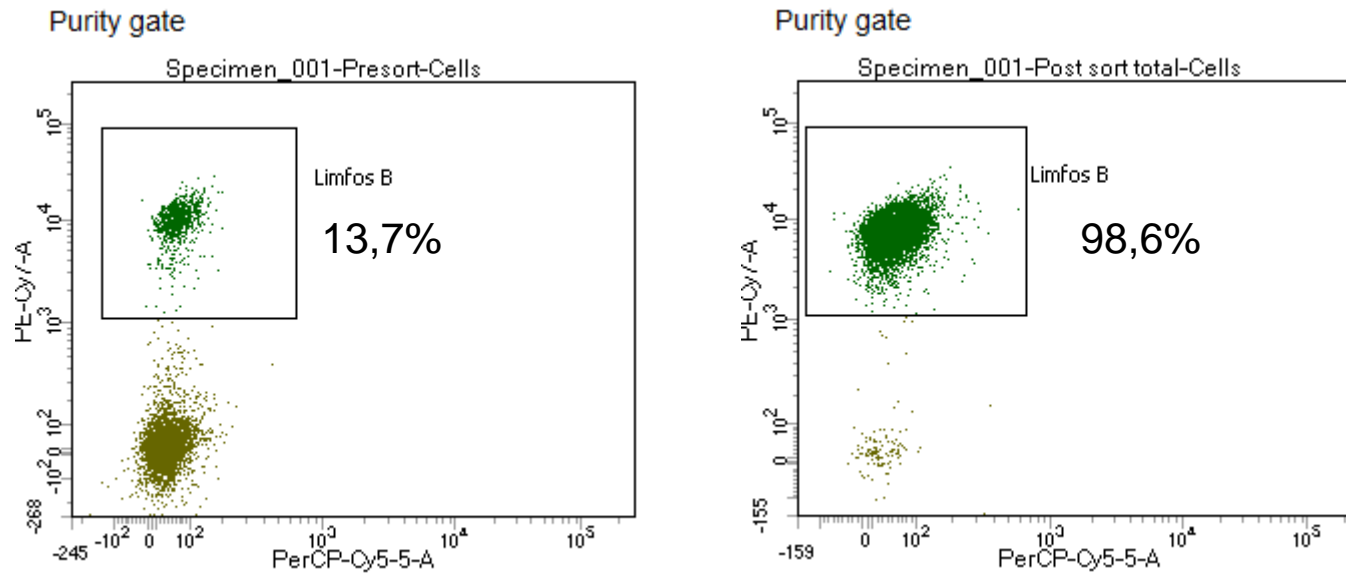
SEPARACIÓN CELULAR



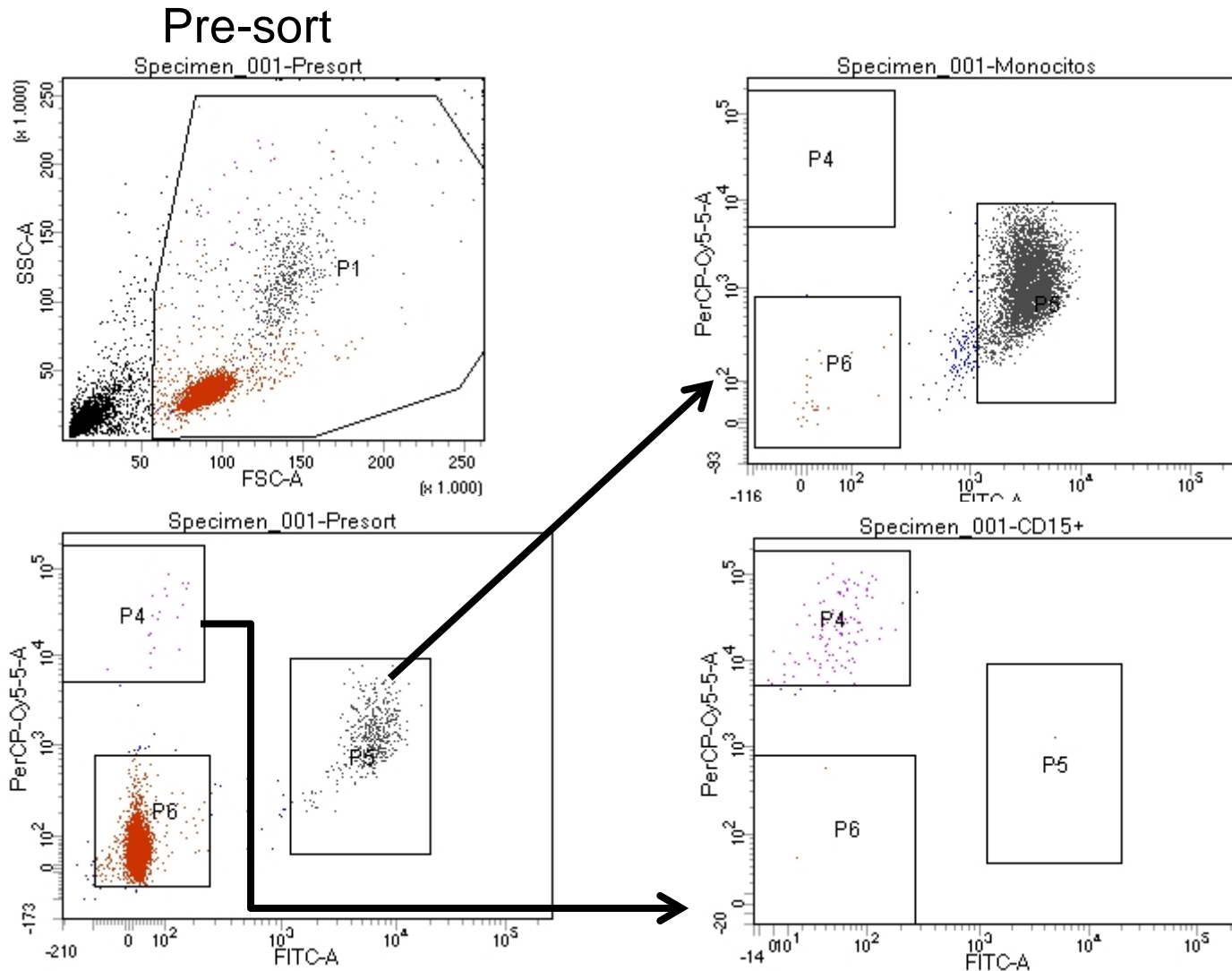
In vitro evaluation of $\gamma\delta$ T cell regulatory function in Behçet's disease patients and healthy controls.
Clemente A, Crespí C, Cambra A, Pallarés L, Juan A, Olea JL, Julià MR

SEPARACIÓN CELULAR

Linfocitos B



SEPARACIÓN CELULAR



Sergio Scrimini "Caracterización de granulocitos periféricos de baja densidad productores de Arginasa 1 en EPOC". Financiación: Grups Competitius MAR (Govern Balear) Ref PRE-R-22528-2011

"I have been...



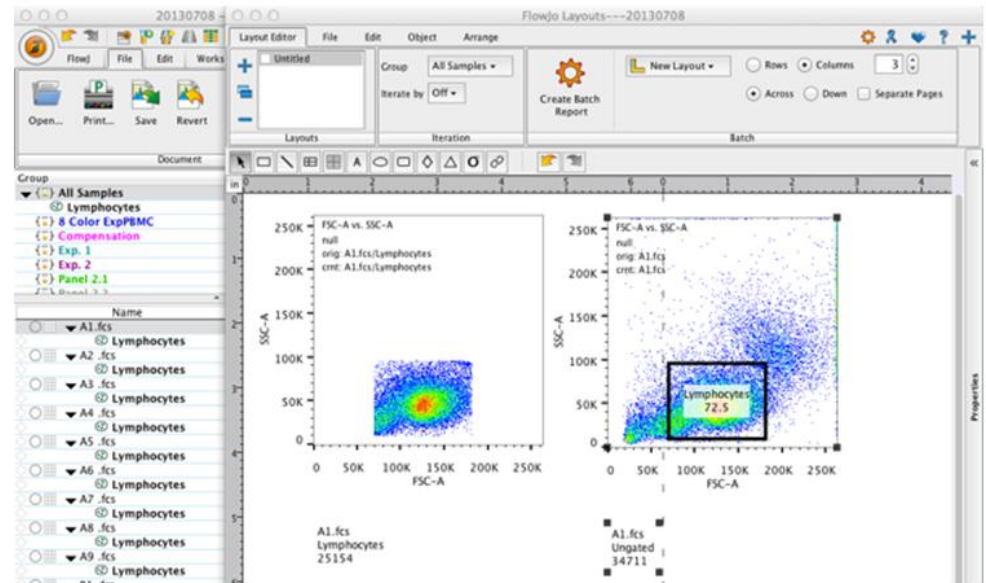
**... and now you
expect me to do
WHAT?!?!?!?"**

FACS Assistant Lyse Wash



ESTACIÓN DE ANÁLISIS

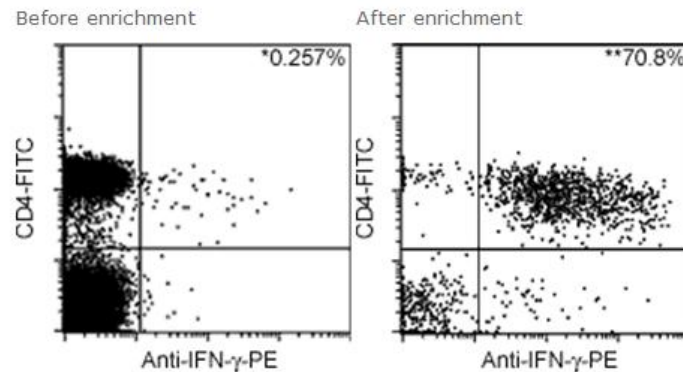
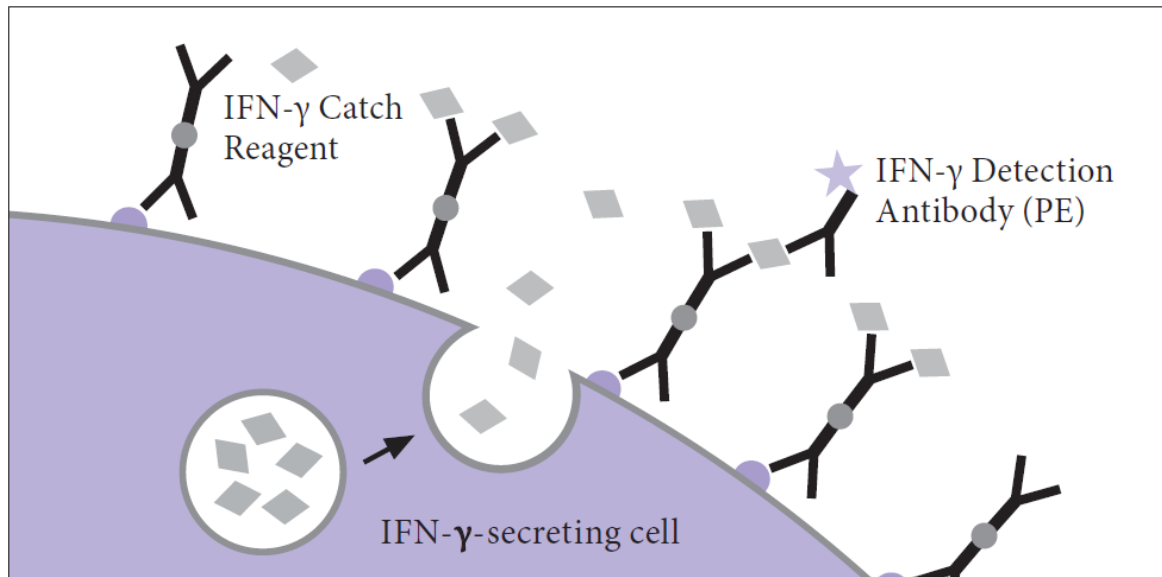
- * FACSDIVA
 - * Adquisición y análisis
- * FLOWJO
 - * Análisis
 - * Representación gráfica
 - * Batch
- * MODFIT
 - * Análisis ciclo celular



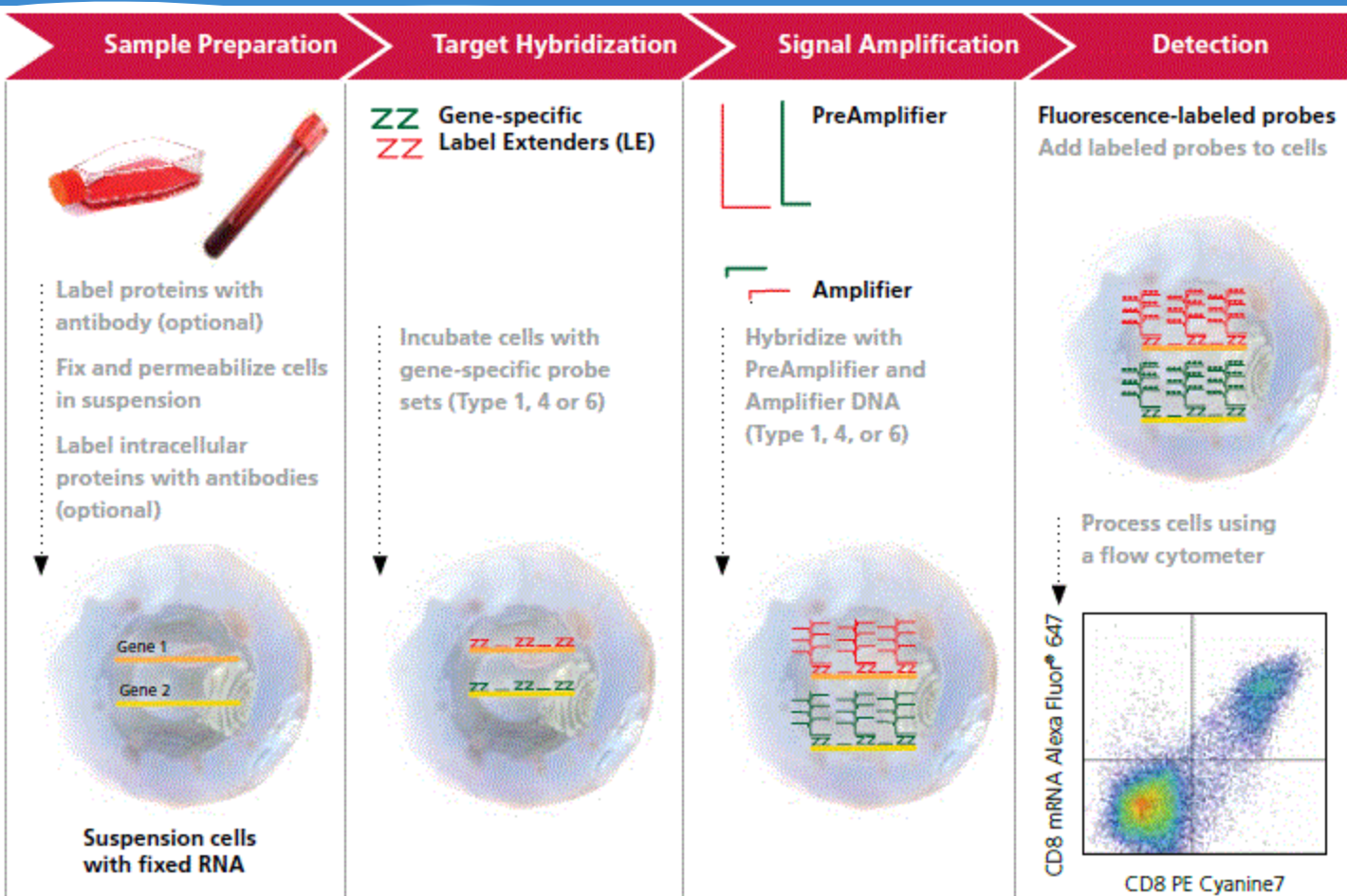
APLICACIONES

- Antígenos de superficie o intracelulares (anticuerpos monoclonales)
- Contenido celular DNA, RNA (ciclo celular o apoptosis)
- Parámetros funcionales:
 - Concentración Ca^{+} intracelular
 - Proliferación, viabilidad
- Cuantificación proteínas solubles (unión microesferas)
- Separación celular

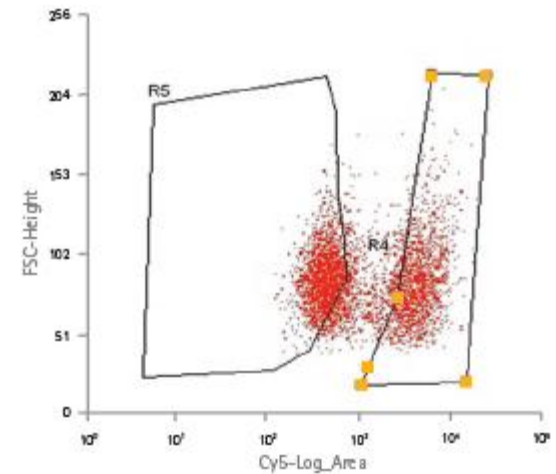
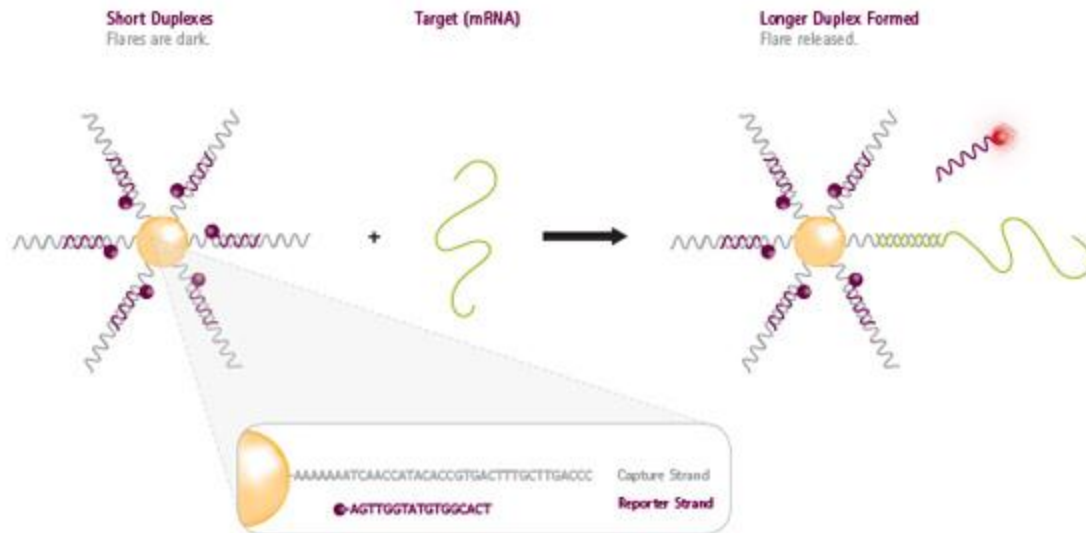
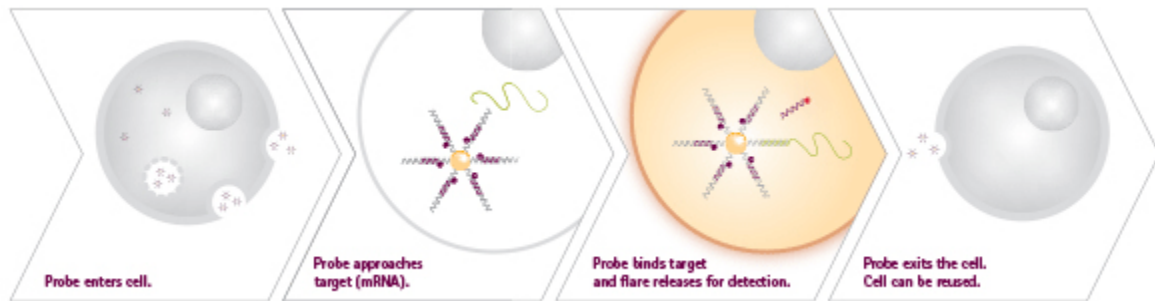
MACS® Cytokine Secretion Assays (Miltenyi)



PrimeFlow™ RNA Assay Principle (Affymetrix)



SmartFlare™ RNA Detection Probes (Millipore)



Institut d'Investigació Sanitària de Palma (IdISPa)

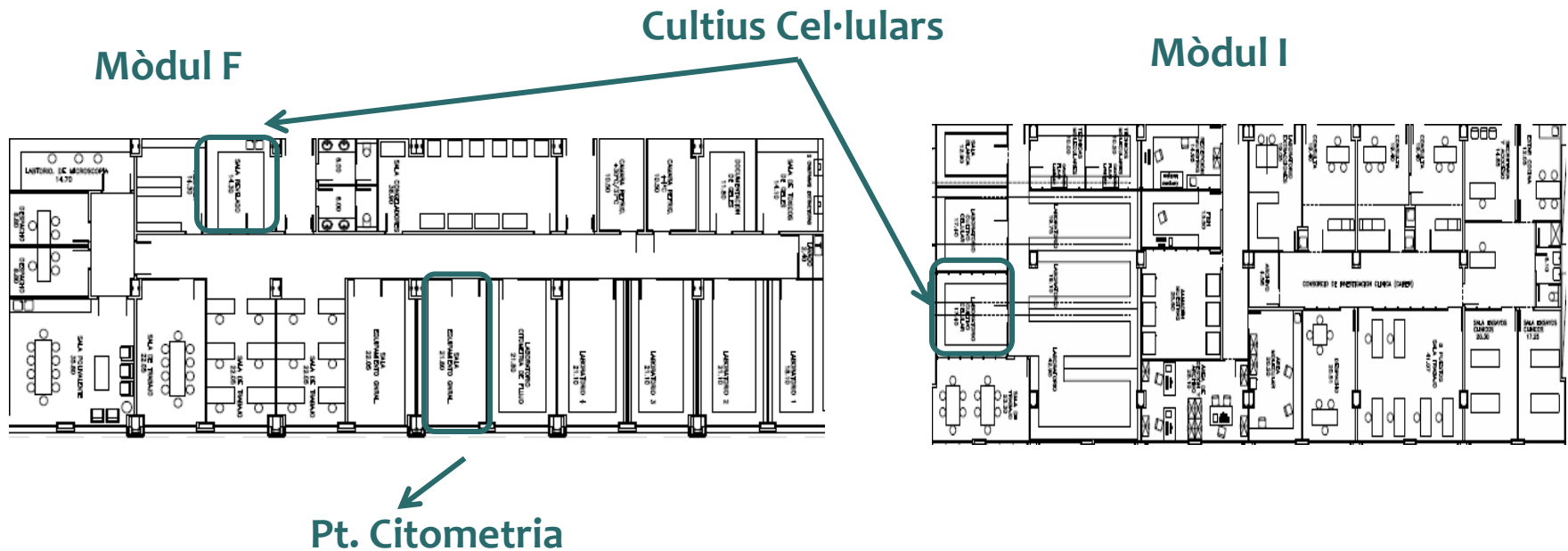
Plataformes Científico-Tècniques:

Citometria i Cultius Cel·lulars



1. Espais

La Plataforma de Citometria i Cultius Cel·lulars de l'IdISPa està ubicada en el mòdul F de la planta -1 de l'Hospital Universitari Son Espases i ocupa una superfície útil: Citometria, 21,60m² i Cultius Cel·lulars, 17,25m² al mòdul I, i 14.15m² al mòdul F.



Plataformes Científico-Tècniques:

Citometria i Cultius Cel·lulars



2. Equipament:

* Citometria i Cultius Cel·lulars:

- Citòmetre analitzador BD FACSVersè (Làsers 488, 640 i 405nm i 8 fluorescències).
- Citòmetre analitzador Cytomics FC500. Beckman Coulter
- Citòmetre Sorter BD FACSAria Fusion (Làsers 488, 640 i 405nm i 14 fluorescències).
- Citòmetre Sorter FACS Influx. BD Biosciències
- Preparació de mostres BD FACS Assistant Lyse Wash

- Cabines de flux laminar
- Incubadors
- Microscopis
- Equips migració cel·lular: RTCA ACEA
- Comptador de cèl·lules
- Electroporador per a cèl·lules eucariotes: Lonza Nucleofector
- Electroporador Cell pulser: BioRad
- Dissociador de teixits
- Irradiador de cèl·lules

Salas de cultivo



Equipos migración y proliferación celular: RTCA ACEA



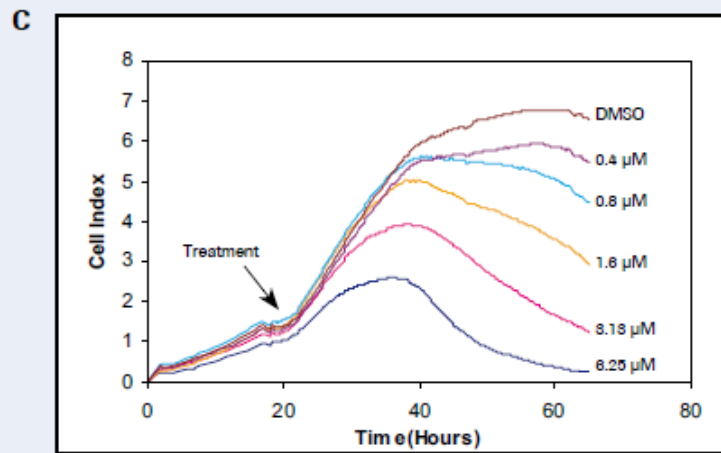
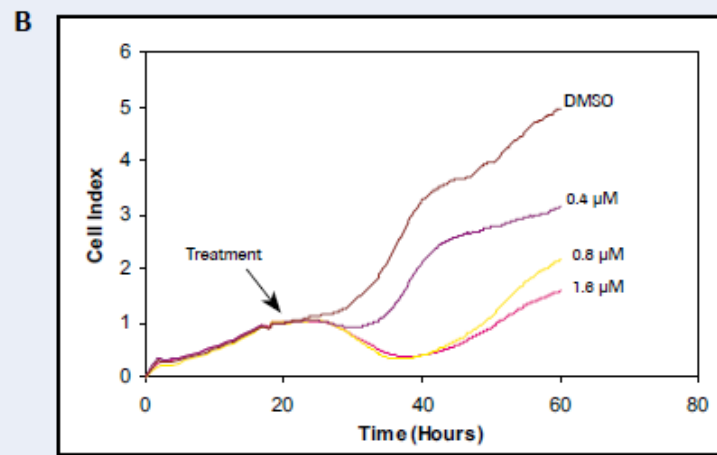
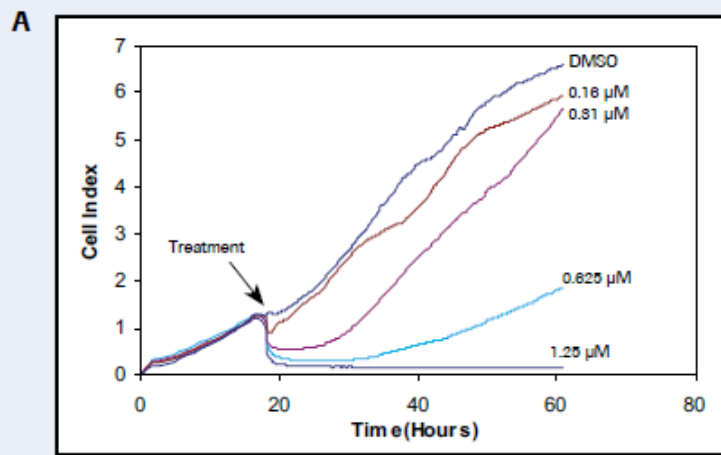
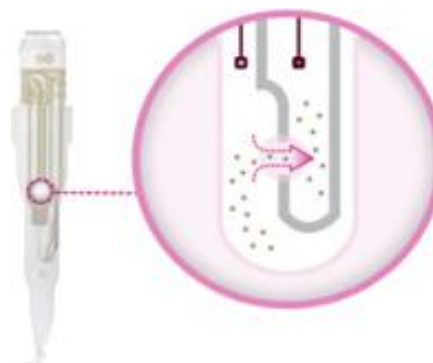


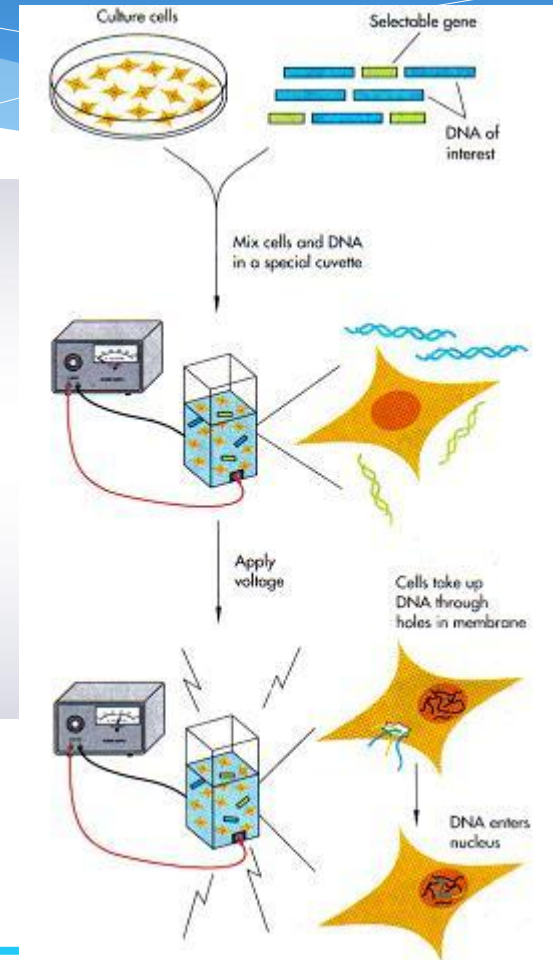
Figure 5. Dynamic monitoring of cytotoxic compounds with target cells. A549 cells were seeded in 96X E-Plates and continuously monitored using impedance technology. The cells were treated with the indicated final concentrations of (A) staurosporine, (B) vinblastine and (C) 5-fluorouracil.



Contador de células: Millipore Scepter



Electroporador para células eucariotas: Lonza Nucleofector



Disociador de tejidos: Miltenyi



Equipos ultracongelación y criocongelación



BIBLIOGRAFÍA

- * Flow Cytometry - A Basic Introduction. Michael G Ormerod (<http://flowbook.denovosoftware.com>)
- * Practical flow cytometry. 4th edition. Howard M. Shapiro (<http://www.beckmancoulter.com>)
- * Flow cytometry: First principles. 2nd edition. Alice L. Givan

- * ©1990-2012 J. Paul Robinson, Purdue University (<http://www.cyto.purdue.edu>)
- * Beckmann-Coulter
- * Becton-Dickinson
- * Millipore
- * Miltenyi
- * Lonza
- * FlowJo
- * Acea

