
	MANUAL BENVINGUDA DE LA PLATAFORMA DE CITÒMICA	Codi: VHIR-UAT-DOC-018	Revisió: 01
		Data de redacció: 28/04/2020	Pàgina: 1 de 12

Manual de Benvinguda de la Plataforma de Citòmica

REDACTADO POR	REVISADO POR	APROBADO POR
Nombre: Irene Sales Cargo: Responsable Plataforma Citòmica UAT Firma:	Nombre: Mònica Anglada Cargo: Responsable de Calidad Firma:	Nombre: Rosa Prieto Cargo: Responsable UAT Firma:

	MANUAL BENVINGUDA DE LA PLATAFORMA DE CITÒMICA	Codi: VHIR-UAT-DOC-018	Revisió: 01
		Data de redacció: 28/04/2020	Pàgina: 2 de 12

Si us plau, llegiu detingudament aquest document, donat que les normes d'ús, de treball i de gestió de les dades generades són diferents per cada equip.

Introducció

La Plataforma de Citòmica de la UAT ofereix el següent equipament:


- Analitzadors (FacsCalibur i LSRII Fortessa, Autoservei/amb tècnic)
- Separador cel·lular (FacsAria)

La configuració detallada d'aquests equips es pot consultar a la web de la UAT.

- **La primera vegada que es vulgui utilitzar qualsevol aparell cal contactar amb el personal responsable de la plataforma de Citòmica (Dra Irene Sales, ext 4179, citomica@vhir.org). Tanmateix, a l'inici d'un nou projecte s'haurà de contactar amb el personal de la plataforma per tal d'emplenar el qüestionari de bioseguretat corresponent (VHIR-UAT-FOR-031).**
- L'horari general de la plataforma és:
 - Equips en autoservei (analitzadors): els equips es poden reservar de 7:30 a 21h, de dilluns a divendres laborables. El usuari que necessiti accedir-hi fora d'aquest horari o en festiu/cap de setmana necessiten una autorització. Per obtenir-la haureu d'enviar un correu a citometria@vhir.org abans de les 12h del dia laborable anterior al que es vulgui accedir-hi, detallant el nom i DNI de la persona que vulgui entrar-hi, i l'horari previst. En cas de voler accedir en cap de setmana, el dia límit per comunicar-ho serà el divendres previ abans de les 12h.
 - Serveis amb tècnic (analitzadors/separador): l'horari de reserva és de 9 a 17h de dilluns a divendres laborables.

Consideracions generals

- Es treballa amb tubs de citometria (ref. 352052, Thermo Fisher) en tots els citòmetres o bé en placa de 96 en cas del Fortessa (qualsevol placa funciona).
- En citometria és molt important preparar els controls necessaris ja que l'equip per si sol no pot determinar l'especificitat de la senyal detectada.
 - En el cas de marcatges simples, el més important és el control negatiu. Serien les mateixes cèl·lules de la teva mostra problema sense el marcador (anticòs, proteïna fluorescent...) per poder veure la seva autofluorescència. En el cas d'anticòssos que requereixin un marcatge de primari i secundari, portar les cèl·lules marcades només amb el secundari.
 - En el cas de marcatges múltiples, recomanem que us poseu en contacte amb la UAT per dissenyar l'experiment per tal d'incloure tots els controls de compensació pertinents.
- Es recomana sempre afegir un marcador de viabilitat que no es solapi amb la resta de fluorocroms emprats, per tal d'excloure les cèl·lules mortes. Les cèl·lules mortes presenten major autofluorescència i poden tenir una unió inespecífica amb l'anticòs o sonda. Aquest fet, pot afectar a la nostra detecció de la senyal específica desitjada,

	MANUAL BENVINGUDA DE LA PLATAFORMA DE CITÒMICA	Codi: VHIR-UAT-DOC-018	Revisió: 01
		Data de redacció: 28/04/2020	Pàgina: 3 de 12

portant-nos a una resolució subòptima de la població positiva respecte la negativa o de marcatge més lleu.

1) CITOMETRIA D'ANÀLISI

Normes d'ús generals


- Tots els nous usuaris han de rebre una formació de normes generals de la plataforma de Citòmica i d'ús de cada equip en particular que vulgui fer servir. Per tant, caldrà realitzar sempre una primera reserva amb tècnic, la durada de la qual vindrà definida per l'experiència prèvia de l'usuari i de les seves necessitats. En aquesta primera reserva, es realitzarà una formació per aprendre a engegar l'equip, crear una plantilla, adquirir mostres, netejar-lo i apagar-lo.

Normes d'ús del FacsCalibur:

- El citòmetre FacsCalibur romandrà apagat entre usuaris. És a dir, cada usuari haurà d'engegar l'equip i l'ordinador, entrant en la seva sessió personal del VHIR (DNI i paraula clau) i passar les seves mostres. En acabant haurà de netejar l'equip i apagar l'ordinador i l'equip, tal i com es detalla en les Instruccions de Treball (ITE) del mateix: buidant el tanc dels desfets, deixant-lo amb uns 100ml de Solució Rentadora i re-omplint el tanc del FacsFlow fins la ratlla indicada en el tanc. Cal deixar-lo a punt per al següent usuari.
- Pel que fa a la gestió dels arxius, s'han de guardar en un disc de l'ordinador del FacsCalibur anomenat 'Sin Título', on creareu una carpeta amb el vostre nom. Per evitar la pèrdua accidental de dades per avaria de l'ordinador, us recomanem que **SEMPRE US ENDUGUEU LES DADES EN EL MOMENT AMB UN PENDRIVE**, mantenint en l'ordinador de l'equip el mínim indispensable per poder treballar. I **MAI DEIXEU ELS ARXIVS A L'ESCRITORI**.

Normes d'ús del Fortessa

- El citòmetre Fortessa romandrà encès entre usuaris. És a dir, el primer usuari del dia o bé el tècnic de la UAT engegarà l'equip. L'ordinador automàticament obre una sessió general per a tots els usuaris. En acabar, cada usuari, independentment del número de mostres que hagi passat o el temps que hagi emprat l'equip, haurà de netejar l'equip, tal i com es detalla en les Instruccions de Treball (ITE) del mateix, buidar el tanc dels desfets (afegir-ne uns 100ml de Solució Rentadora) i re-omplir el tanc del FacsFlow fins a dalt. Es deixarà l'ordinador i la sessió del DIVA oberta i l'equip en STANDBY amb un tub d'aigua posat en la zona d'adquisició de mostres (veure ITE de l'equip), de manera que el següent usuari el trobi a punt per a poder treballar.
- **L'ÚLTIM USUARI DEL DIA HAURÀ D'APAGAR L'EQUIP**, així doncs es demana revisar el calendari de reserves per assegurar-vos que hi ha algú darrera. Donat que el sistema de reserves és flexible per adaptar-se el millor possible a les necessitats dels usuaris, les reserves es poden anul·lar en qualsevol moment.

	MANUAL BENVINGUDA DE LA PLATAFORMA DE CITÒMICA	Codi: VHIR-UAT-DOC-018	Revisió: 01
		Data de redacció: 28/04/2020	Pàgina: 4 de 12

- Si un usuari anul·la una reserva abans de les 17h, avisarà al tècnic de la UAT perquè l'apagui.
- Si la reserva s'anul·la després de les 17h, demanem especial coordinació entre els usuaris d'autoservei per avisar a la persona anterior perquè apagui l'equip i, sinó anar a la UAT apagar-lo.

Si l'equip es troba encès indègudament, es podrà facturar al grup responsable de no haver-lo apagat totes les hores extres que hagi estat funcionant.


- Pel que fa a la gestió dels arxius, en el cas d'autoservei cada usuari s'exportarà els seus arxius a la carpeta 'aparellscomuns' (Export-FCS). Recordeu que aquesta carpeta és temporal (només de transferència, no d'emmagatzematge) i els arxius de més de 15 dies d'antiguitat s'esborren cada divendres. Així doncs us recomanem que us els deseu al vostre ordinador i els esborreu de la carpeta 'aparellscomuns' el més aviat possible. En cas de servei amb tècnic, el tècnic de la UAT penjarà els resultats a la carpeta corresponent de 'servcomuns'.
- Pel que fa a la gestió dels experiments, l'experiment és l'arxiu que conté la plantilla amb els *dot plots*, les *gates* i els *Settings* del citòmetre, així com les compensacions. Cada usuari ha d'exportar els experiments (Export-Experiment) a la carpeta d'Experiments que es troba a la unitat D:BDEExport/FCS/Experiments. Donat que cada 2-3 mesos s'instal·larà una nova base de dades buida del DIVA i desapareixeran totes les dades, aquells experiments que hagin estat exportats com s'ha detallat prèviament, es podran importar des del DIVA (menú principal File-Import-Experiments) i per tant, estaran accessibles en qualsevol moment. Us recordem que és responsabilitat de l'usuari en autoservei fer-se la seva còpia de seguretat de tots els arxius .fcs i tots els seus experiments.

2) SEPARACIÓ CEL·LULAR (SORTING): FACSARIA.

El servei de separació cel·lular sempre es realitza amb tècnic i el seu horari per poder reservar és de 9-17h.

Cal tenir present que les configuracions del Fortessa i del FacsAria no són les mateixes. Per tant, si es desitja dissenyar un experiment compatible amb ambdós equips, perquè es preveu fer sorting en el futur, recomanem posar-se en contacte amb la UAT.

A continuació es detallen les preguntes més freqüents que es donen a l'hora de fer sorting de marcatges simples. En qualsevol cas, especialment si l'experiment a realitzar és un marcatge múltiple, recomanem posar-se en contacte amb el tècnic responsable de la Plataforma de Citòmita (Dra. Irene Sales, ext. 4179, citomica@vhir.org).

	MANUAL BENVINGUDA DE LA PLATAFORMA DE CITÒMICA	Codi: VHIR-UAT-DOC-018	Revisió: 01
		Data de redacció: 28/04/2020	Pàgina: 5 de 12


Coses a tenir en compte abans de reservar un sortint:

Què necessito portar?

- En citometria sempre es treballa amb suspensió cel·lular. Per tant, cal portar la suspensió cel·lular en tubs de citometria (ref. 352052, Fisher Scientific). Tots els tubs, els controls necessaris i les mostres per sortint s'hauran de filtrar just abans de realitzar el sortint en cabina de bioseguretat. Per tant, cal portar els filtres de 30 µm per filtrar totes les mostres i controls. Ocasionalment, si no tens filtres podem facilitar-te'n.
- Necessites portar els controls necessaris, els mateixos que necessaries per una citometria d'anàlisi. En el cas de marcatges simples, el més important és el control negatiu. Serien les mateixes cèl·lules de la teva mostra problema sense el marcador (anticòs, proteïna fluorescent...) per poder veure la seva autofluorescència. En el cas de marcatges múltiples, recomanem que et posis en contacte amb la UAT per dissenyar l'experiment.
- També s'ha de portar un suport de recollida amb el medi o tampó adient per als experiments que vulguis realitzar a continuació amb les cèl·lules que es recuperin del sortint. Els suports de recollida adients són: tubs de citometria, falcon de 15 ml, eppendorfs 1,5 ml i plaques de 96 (veure apartat separació en placa de cèl·lula única).
- Sempre és recomanable afegir un marcador de viabilitat, quan es treballa amb cèl·lula viva.
- Tots els tubs que s'adquireixin en el separador han de portar una etiqueta identificadora que serà facilitada per la UAT, per ex UAT-2020-0001 (que s'ha d'indicar a la sol·licitud a l'apartat CODI MOSTRA). Tanmateix, els tubs o suport de recollida s'ha d'etiquetar degudament amb el mateix número d'etiqueta que la mostra d'origen i la informació pertinent, per exemple: *mostra d'origen del sortint és la UAT-2020-0001, separada en 2 tubs (població positiva i negativa per GFP); els meus tubs de recollida estaran rotulats com UAT-2020-0001 GFP+, UAT-2020-0001 GFP- respectivament.*

Quina concentració de cèl·lules és la indicada i quin és el volum que he de posar en els tubs de recollida?

- Els controls que no es vulguin separar poden tenir un mínim de 100.000 cèl·lules en un volum mínim de 500 µl.
- Per separar en tub:
 - La concentració cel·lular habitual és de 5 milions/ml. En el cas que les teves cèl·lules tinguin tendència a agregar-se, formar grumolls com és el cas de les cèl·lules tumorals derivades de mama o colon... la recomanació és disminuir la concentració a 2,5 milions/ml. Sempre cal portar medi de dilució per si cal diluir més.
 - Els tubs de recollida han de portar medi o la solució adient per continuar el vostre experiment. Penseu que en la separació la cèl·lula va acompanyada de líquid

	MANUAL BENVINGUDA DE LA PLATAFORMA DE CITÒMICA	Codi: VHIR-UAT-DOC-018	Revisió: 01
		Data de redacció: 28/04/2020	Pàgina: 6 de 12

d'arrossegament semblant al PBS, per tant, es diluirà. El volum recomanable seria: 2 ml en tubs de 14ml, 1 ml en tubs de citometria, 0,5 ml en tubs eppendorf de 1,5 ml.

- Per separar en placa per obtenir una cèl·lula per pou:
 - La concentració cel·lular ha de ser d'1 milió/ml.
 - La placa de 96 ha de tenir un màxim de 150 µl de medi per pouet.

Quantes cèl·lules he de portar com a mínim i quin és el volum mínim en el que les puc diluir?


- La quantitat de cèl·lules dependrà de la quantitat que vulguis recollir. Quantes més millor, sempre tenint en compte les recomanacions de concentració esmentades anteriorment. Per poder fer-ne una estimació hem de fer una prova primer, ja que l'eficiència de recuperació depèn de diversos factors, com per exemple: la viabilitat de les cèl·lules, la representada que estigui la població que es vulgui separar, la capacitat d'agregació de la mostra, l'eficiència de separació (normalment quan més agregació més baixa és l'eficiència). Inclús en la millor situació, per exemple cèl·lules de la sang, la recuperació no és mai del 100%, com a màxim sol ser d'un 85-90%. En el pitjor cas pot ser de 10 vegades menys del que teòricament veiem en el citòmetre.
- El volum mínim és de 500 µl.

És el sortint estèril? Puc cultivar les cèl·lules després de sortejar-les?

- El sortint es realitza en les màximes condicions d'esterilitat que són possibles per l'equipament i les instal·lacions disponibles. La manipulació de les mostres prèvia a posar-les al separador (filtratge, dilucions,..) es realitza sempre sota cabina de bioseguretat tipus IIA. El separador no es troba dins d'una cabina de bioseguretat, per tant, l'apertura del tub per posar-lo al separador es realitza a l'aire. Tot i així, la majoria d'usuaris realitzen sortings amb cèl·lules que després cultiven, o implanten en ratolins i no tenen problemes de contaminacions. Es recomana que les cèl·lules es centrifuguin en arribar al laboratori per substituir el medi diluït per la separació amb medi nou i que presenti antibiòtic.


Quan temps necessito reservar?

- El temps mínim de reserva és de 30 min, ja que cal passar els controls i determinar els Settings per separar.
- Cal distingir entre separació en tub o en placa de 96.
 - En la separació en tub: El temps dependrà del volum de la mostra que es vulgui separar. Aproximadament és de 30 min/ml. Pot variar en funció de la mostra.
 - En la separació de cèl·lula única en placa: dependrà del número de plaques que es vulguin separar, de la representada que estigui la població problema i de la capacitat d'agregació de la mostra. En els 30 min mínims de reserva podríem separar entre 1 placa, en el pitjor dels casos, i 3-4 en el millor.

	MANUAL BENVINGUDA DE LA PLATAFORMA DE CITÒMICA	Codi: VHIR-UAT-DOC-018	Revisió: 01
		Data de redacció: 28/04/2020	Pàgina: 7 de 12

D'acord amb el nivell de bioseguretat del que disposem, quines mostres NO es poden separar?

- Cal considerar que en la separació cel·lular es generen aerosols i per tant, és molt important tenir en compte el material biològic amb el que es treballa per poder avaluar adequadament els riscos i les mesures de bioseguretat. Per aquest motiu, es demana emplenar el qüestionari de bioseguretat amb el personal de la plataforma. En qualsevol cas, es realitzarà una avaluació de cada cas en particular i, si cal, es consultarà amb la UBP per evitar qualsevol risc i adoptar les mesures pertinents dins de les nostres possibilitats.
- **No es podran dur a terme sortings amb mostres de organismes patògens del grup 3, o mostres que per les seves característiques puguin ser altament infectives egut a la generació d'aerosols (per exemple cèl·lules vives que continguin virus viables tipus HIV, hepatitis C, COVID-19...).** Per poder fer sorting d'aquestes mostres caldria reduir el risc (per exemple fixant les mostres) i reforçar les mesures de protecció (ús d'EPIs, extractor d'aerosols). En tot cas es farà una avaluació del risc a cada cas particular a partir del qüestionari de bioseguretat.
- En el cas de treballar amb organismes genèticament modificats (OMGs), cal indicar totes les dades al qüestionari de bioseguretat per tal de poder determinar si és possible fer el sorting i quines mesures s'han d'aplicar.

	MANUAL BENVINGUDA DE LA PLATAFORMA DE CITÒMICA	Codi: VHIR-UAT-DOC-018	Revisió: 01
		Data de redacció: 28/04/2020	Pàgina: 8 de 12

Welcome handbook-Cytomics Platform

Please read this document carefully, since the user guidelines and data management are different for each machine.

Introduction

The UAT's Cytomics Platform offers the following equipment:


- Analyzers (FacsCalibur and LSRII Fortessa, both self-service/technician-assisted)
- Cell sorter (FacsAria)

The detailed configuration of each cytometer is available at the UAT website.

- **The first time you want to use any appliance you must contact the technician in charge of the Cytomics Platform (Dra. Irene Sales, ext 4179, citomica@vhir.org). However, at the beginning of a new project, you must contact the platform staff to fill in the corresponding biosafety questionnaire (VHIR-UAT-FOR-031).**
- **The general schedule of the platform is:**
 - Self-service instruments (analyzers): The equipment can be booked from 7:30 to 21h, Monday to Friday (working days). Users who need to access it outside these hours or on non working days need authorization. To obtain it, you must send an email to citometria@vhir.org before 12h a.m. on the previous working day that you want to access UAT, detailing the name and DNI, and the schedule of the person who wants to enter.
 - Technician-assisted services (analyzers, sorter): The booking schedule is from 9 to 17h from Monday to Friday, working days.

General considerations

- The samples must be contained within specific 5ml cytometry tubes (ref. 352052, Fisher Scientific) for all the cytometers or in any kind of 96-well plate in case of the Fortessa.
- In cytometry it is very important to prepare the necessary controls since the equipment by itself cannot determine the specificity of the detected signal.
 - In the case of simple staining, the most important is the negative control. It should be your test sample without staining with the marker (antibody, fluorescent protein...), to be able to see its autofluorescence. If your staining uses primary and secondary antibodies, bring the sample stained just with the secondary antibody as the autofluorescence control.
 - In the case of multiple stainings, we recommend you to contact with the specialized staff of the Citometry Platform to design the panel for your experiment including all relevant compensation controls.
- It is always recommended to add a viability marker that does not overlap with the rest of fluorochromes used, to exclude the dead cells. Dead cells present greater autofluorescence and may inespecifically bind to the antibody or probe. This fact can affect the detection of the desired specific signal, leading to a suboptimal resolution of the positive population compared to the lowest or negative signal.

	MANUAL BENVINGUDA DE LA PLATAFORMA DE CITÒMICA	Codi: VHIR-UAT-DOC-018	Revisió: 01
		Data de redacció: 28/04/2020	Pàgina: 9 de 12

1) FLOW CITOMETRY ANALYZERS

General Guidelines


- Each new user must receive information about the general rules of the Cytomics Platform and specific training about the specific equipment to be used. Therefore, a first booking technician-assisted must be done, the duration of which will be defined by the previous experience of the user and his/her needs. In this first booking, the user will be shown how to start the equipment, to create a template, to acquire the samples, to clean it and to turn it off.

FacsCalibur's Guidelines:

- The FacsCalibur cytometer will remain shut down between users. That is, each user will have to start the equipment and the computer, entering in his/her VHIR's session credentials (DNI and key word), and acquire the samples. After finishing, each user will have to clean the cytometer and turn off the computer and the machine, as detailed in its specific working instruction document (ITE): emptying the waste tank, leaving it filled with 100ml of Washing Solution and re-filling the FascFlow tank up to the line. Each user must leave it ready for the following person.
- Regarding file management, they must be saved in a disk of the FacsCalibur computer called ' Sin Título ', where each user must create a folder with his/her name. To avoid unexpected data loss due to computer breakdown, we recommend **TO SAVE YOUR DATA IN A PENDRIVE AT THE END OF EACH BOOKING**, keeping in the computer the minimum information necessary to work. **NEVER LEAVE THE FILES IN THE DESKTOP.**

Fortessa's Guidelines:

- The Fortessa cytometer will remain switched-on between users. So, the first user of the day or the UAT technician will turn on the equipment. The computer automatically opens a general session for all users. At the end of the samples acquisition, each user, regardless of the number of samples processed or the time booked, must clean the equipment, as detailed in its work instruction document (ITE), empty the waste tank (add 100ml of cleaning solution) and re-fill the FacsFlow tank up to the top. The computer and the DIVA session have to be left open, and the cytometer in STANDBY with a tube filled with water placed in the sample acquisition area (see ITE), so that the next user finds it ready to work.
- THE LAST USER OF THE DAY MUST TURN OFF THE EQUIPMENT**, so it is requested to review the calendar of bookings to make sure there is someone behind you. Since the booking system is flexible to fit best possible to the users' needs, bookings can be cancelled at any time.
 - If a user cancels a booking before 17h, he/she has to contact the UAT technician so it can be turned off.
 - If the reservation is cancelled after 17h, we ask for careful coordination between self-service users to warn the previous person to turn off the

	MANUAL BENVINGUDA DE LA PLATAFORMA DE CITÒMICA	Codi: VHIR-UAT-DOC-018	Revisió: 01
		Data de redacció: 28/04/2020	Pàgina: 10 de 12

equipment. If this is not possible, the user who has cancelled must go to the UAT to switch the cytometer off.

If the cytometer is left turned on overnight, it will be possible to charge the responsible group for all the extra hours that it has been improperly on.

- Regarding file management, self-service users must export their files to the folder 'aparellscomuns' (Export-FCS). Please note that this folder is temporary (transfer only, not storage) and files older than 15 days old are erased every Friday. So we recommend to save them in your computer and clear them from the 'aparellscomuns' folder as soon as possible. If your booking is technician-assisted, your results will be hung in your group folder in 'Servcomuns'.
- For experiment management, the experiment is the file that contains the template with the dot plots, the gates and the cytometer's settings, as well as the compensation data. Each user must export the experiments (Export-Experiment) to the Experiments folder found in the D: BDExport/FCS/Experiments. Please take into account that every 2-3 months a new DIVA empty database will be installed, so all data will be erased. Those experiments that have been exported as detailed above will be available to be imported from the DIVA (Main menu File-Import-Experiments) and therefore, will be accessible at any time.

We remind you that it is the responsibility of self-service users to back up all the .fcs files and all the experiments generated.

2) CELL SORTING:FACSARIA.

The cell sorting service is always technician-assisted and can be booked from 9 to 17h.


Please keep in mind that Fortessa and FacsAria settings are not the same. Therefore, if you want to design an experiment compatible with both equipments, because you are planning to do sorting in the future, we recommend contacting the UAT.

The following are the most frequently asked questions when planning to sort single stained samples. In any case, particularly if the experiment to perform is a multiple staining, we recommend contacting the technician responsible for the Cytomics platform (Dr. Irene Sales, ext. 4179, citomica@vhir.org).

Things to keep in mind before booking a sorting:

What do I need to bring?

- The sample must be a cell suspension. Therefore, it is necessary to bring the cell suspension in cytometry tubes (ref. 352052, ThermoFisher). All the tubes, the necessary controls and samples for sorting must be filtered just before performing the sorting inside a biosafety cabinet. So, it is necessary to bring your own 30 µm filters in order to filter all the samples and controls. If you do not have filters we can occasionally provide them.
- You need to bring the necessary controls, the same that you would need for an analysis cytometry. In the case of simple staining, the most important is the negative control. They have

	MANUAL BENVINGUDA DE LA PLATAFORMA DE CITÒMICA	Codi: VHIR-UAT-DOC-018	Revisió: 01
		Data de redacció: 28/04/2020	Pàgina: 11 de 12

to be the same cells of your test sample without the marker (antibody, fluorescent protein...) to be able to see their autofluorescence. In the case of multiple staining, we recommend you to contact the UAT to help you to design the experiment.


- You must also bring a collection support with the culture medium or reagent or a suitable buffer for the following experiments you want to do with the cells recovered from the sorting. The suitable collection supports are: cytometry tubes, 15 ml Falcon, 1.5 ml eppendorfs and 96-well plates (see section 96-well plate single cell sorting).
- It is always advisable to add a viability marker, when working with living cells.
- All the tubes to be acquired in the sorter must have an identification label which will be provided by the UAT, i.e. UAT-2020-0001 (which must be indicated in the request in the SAMPLE CODE section). Therefore, the tubes or collection support must be properly labeled with the same code as the source sample, together with the relevant information, i.e.: *the sample source for sorting is the UAT-2020-0001, we have two collection tubes for positive and negative population for GFP, the collection tubes will be labeled as UAT-2020-0001 GFP + and UAT-2020-0001 GFP-, respectively.*

What concentration of cells do I have to bring? What volume should I put in the collection tubes?

- The controls tubes or any tube that will not be sorted can have a minimum of 100.000 cells in a minimum volume of 500 µl.
- To sort in tube:
 - The usual cellular concentration is 5 million/ml. In the event that your cells have a tendency to aggregate, they form lumps such as tumor cells derived from breast or colon tissue... the recommendation is to decrease the concentration down to 2,5 million. You always have to bring a dilution medium in case you need to dilute the sample even more.
 - The collection tubes must contain cell culture medium or the appropriate solution to continue your experiment. Remember that the cell sorting is accompanied by a drag fluid similar to PBS, so it will be diluted. The recommended volume is: 2ml in 14ml tubes, 1 ml in cytometry tubes, 0,5 ml in eppendorf tubes of 1,5 ml.
- To do a 96-well plate single cell sorting:
 - Cell concentration must be 1 million/ml.
 - The 96-well plate must have a maximum of 150 µl of medium per well.

How many cells do I have to bring and what is the minimum volume in which I can dilute them?

- The amount of cells to start with depends on the desired amount to collect. The more the better, always taking into account the concentration recommendations listed above. In order to be able to estimate it, we must first do a test, since recovery efficiency depends on several factors, such as: the viability of the cells, how represented is the population you want to separate, the sample aggregation capacity, the sorting efficiency (usually, the higher is the

	MANUAL BENVINGUDA DE LA PLATAFORMA DE CITÒMICA	Codi: VHIR-UAT-DOC-018	Revisió: 01
		Data de redacció: 28/04/2020	Pàgina: 12 de 12

aggregation, the lower is the sorting efficiency). Even in the best situation, for example blood cells, the recovery is never 100%, at most 85-90%. In the worst scenario it can be 10 times less than what we can theoretically see in the cytometer.

- The minimum volume is 500 µl.

Is the sorting sterile? Can I cultivate sorted cells?

- The sorting is done in the maximum sterile conditions that are possible for the equipment/facilities that we have. Sample manipulation before sorting (filtering, dilution...) is always done under biosafety cabin. The sorter is not installed inside a biosafety cabin, therefore, tube opening before being placed in the sorter is carried out in the air. However, most users perform sortings with cells that then cultivate, or implant in mice, and have no problems of contamination. It is recommended that cells are centrifuged when arriving at the cytometry laboratory to replace the diluted medium with a fresh medium with antibiotic.

How long does it take to do a sorting? How do I know how long it will take to sort my cells?

- The minimum booking time is 30 minutes, because the controls must be acquired in order to define the sorting settings.
- Sorting in tubes or in 96-well plates does not take the same time:
 - When sorting in tube: the time will depend on the volume of the sample that you want to sort (approximately 30 min/ml). It may vary depending on the sample.
 - In the 96-well plate single cell sorting: it will depend on the number of plates to be separated, on how represented is the target population, and on the degree of aggregation of the sample. In 30 min we could sort between 1 plate, in the worst case, and 3-4 at best.

According to the maximum level of biosafety that we can reach, what samples CANNOT be sorted?

- It should be born in mind that aerosols are generated during the cell sorting process. Therefore, it is very important to know the characteristics of the biological material that we are working with to be able to adequately evaluate the risks and measures of biosafety. For this reason, it is requested to complete the biosafety questionnaire (VHIR-UAT-FOR-031) with the help of the platform staff. In any case, there will be an assessment of each specific case and the Risk Basic Prevention Unit will provide advice, if necessary, to take the appropriate measures in order to avoid risks.
- **UNSUITABLE samples for sorting are all those containing pathogens corresponding to group 3, or those samples that can be highly infective due to aerosol generation (i.e. living cells containing viable viruses such as HIV, hepatitis C, COVID-19...).** To sort these samples, it is mandatory to decrease the risk level (i.e. fixing samples) and to increase the protective measures (individual protection equipment, aerosol management system on). Anyway, each particular case will be evaluated according to the biosafety questionnaire.
- In the case of working with genetically modified organisms (OMGs), all data concerning the samples must be indicated in the biosafety questionnaire in order to determine whether it is possible to sort those samples and what biosafety measures should be applied.