Tinción para

citometría de flujo

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Elaboró: | Revisó: | Autorizó: |
| Nombre: | Dr. Oscar Medina Contreras | Dr. Oscar Medina Contreras | Dra. Jenny Vilchis Gil |
| Firma: |  |  |  |
| Fecha: | 2020-04-08 | 2020-04-08 | 2020-05-01 |

1. **Propósito**

Realizar una tinción de superficie e intracelular de células linfoides para su posterior análisis por citometría de flujo.

1. **Alcance**

Este procedimiento involucra a todo el personal técnico, científico y estudiantes que deseen Realizar una tinción de superficie e intracelular de células linfoides para su posterior análisis por citometría de flujo en la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Instituto Nacional de Salud Hospital Infantil de México Federico Gómez.

1. **Políticas de operación, normas y lineamientos**

Es responsabilidad de todo el personal técnico, científico y estudiantes adscritos a la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Instituto Nacional de Salud Hospital Infantil de México Federico Gómez conocer y dar seguimiento a este procedimiento.

Los residuos de tipo CRETI (Corrosivas, Reactivas, Explosivas, Toxicas e Inflamables) se deberán eliminar con base en su clasificación y especificaciones de manejo según la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; así como sus características intrínsecas y su toxicidad al ambiente según la NOM-052-SEMARNAT- 2005.

Se debe de dar seguimiento a la norma oficial mexicana NOM-087-ECOL-1995, que establece los requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos, que se generan en establecimientos que presten atención médica.

1. **Descripción del Protocolo**

Tinción de superficie

* Colocar 1.5 x10⁶ células en tubos para citometría de flujo, centrifugar a 1500rpm/4°C /5 minutos. Resuspender en PBS 1X y SFB 2% (200µl).
* Colocar 2µl gama globulinas humanas e incubar 20 minutos/obscuridad/4ºC.
* Colocar anticuerpos de superficie titulados, incubar 30 minutos/obscuridad/4ºC. Lavar una vez con PBS 1X y SFB 2% (3ml).
* Centrifugar a 1500 rpm/4°C/ 5 minutos.
* Adicionar solución fijadora (Biolegend; 500µL), incubar 20 minutos/obscuridad/4ºC.
* Centrifugar 1500rpm/20°C/5minutos, eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 200µl de PBS 1X y SFB 2%.
* Analizar la muestra inmediatamente o en los 2 días posteriores a la tinción. Conservar la muestra hasta realizar el análisis.

Tinción intracelular

* Realizar tinción de superficie.
* Resuspender las células en el buffer de permeabilización (Biolegend; 1 ml). Lavar una vez con PBS1X (3 ml). Centrifugar a 1500rpm/ 5 minutos.
* Colocar marcadores intracelulares e incubar 30 minutos/obscuridad/4ºC.
* Lavar una vez con PBS 1X (3 ml). Centrifugar a 1500RPM/ 5 minutos.
* Resuspender el pellet en 200µL de solución fijadora.
* Analizar la muestra inmediatamente o en los 2 días posteriores a la tinción. Conservar la muestra hasta realizar el análisis.

1. **Diagrama de Flujo**
2. **Documentos de Referencia**

*Bushnell, T. Modern Flow Cytometry. 1–67 (Excyte, 2015)*.

1. **Nomenclatura**

SFB: suero fetal bovino

Min: minutos

TA: temperatura ambiente