



Introducción

Aparte de la viabilidad, el número de polen es otro parámetro interesante dentro del análisis de polen. Algunos ejemplos:

- Evaluación del desprendimiento de polen mediante trampas de polen
- Cuantificación del número de granos de polen en el estigma después de una polinización manual

Esta Guía Rápida describe la función de *Conteo* del Ampha Z32 para obtener el número preciso de células. La función *Conteo* es utilizada para cuantificar todas las partículas en un volumen definido de muestra con una mínima pérdida.

Comentarios

- El *Conteo* es compatible con los chips F, D, E y G. Para la aplicación del *Conteo* con los chips E y G, Amphasys recomienda utilizar el buffer de *Conteo*, el cual reduce la sedimentación y aumenta la capacidad de recuperar el polen presente en la muestra.
- Amphasys proporciona plantillas (templates) de *Conteo* específicas para cada aplicación. Consulte la selección de plantillas en nuestra página web.
- La aplicación *Conteo* no es compatible con el autosampler y la autocalibración.

Si la plantilla (template) que está buscando no está disponible en nuestra página web, o si quisiera discutir sobre la configuración de su proyecto, por favor contacte a nuestro equipo de soporte (p.e. buffer recomendado y sugerencias adicionales para la preparación de las muestras).

Proceso de Medición

1. **Purga:** Al iniciar una medición de *Conteo*, el sistema fluido del Ampha Z32 es purgado con aire. Por lo tanto, el tubo con la muestra no debe ser colocado. Después de la purga, aparece una notificación solicitando la muestra.
2. **Carga y Medición:** Una vez confirmada la solicitud de colocar el tubo con la muestra, se iniciará la medición. Durante los primeros segundos, ninguna partícula será detectada, pues la muestra está siendo cargada al chip. Al alcanzar el chip, las partículas serán detectadas.
3. **Finalización de la Medición:** La medición continuará hasta que la muestra completa es consumida y haya sido medida. La medición se para automáticamente si en un periodo de 10 segundos no se detectan más partículas.
4. **Resultados:** El número de células aceptadas (*Accepted*) es el número total de partículas en la muestra. La concentración (*Concentration*) es calculada utilizando (a) el número de *Accepted*, (b) la condición de parada (*Stop Condition*) en microlitros y (c) el factor de dilución (*Dilution factor*).

Creación y Modificación de las Plantillas

A) Plantillas para cultivos específicos de Amphasys

- En el caso de que su especie es parte de nuestra colección, usted puede descargar las plantillas de *Conteo* desde el sitio web de Amphasys. Si su especie aún no está disponible en nuestra lista, por favor entre en contacto con el soporte de Amphasys para obtener una plantilla personalizada.
- Descargue y descomprima la colección de plantillas y copie la plantilla de su especie en su escritorio.
- Puede crear una copia de las plantillas y darle un nuevo nombre a su copia. Este será su nuevo espacio de trabajo (workspace).
- Abra el workspace y luego abra la lista de trabajo (worklist). En caso de que usted quiera preparar muestras con volúmenes de muestra no determinados, ajuste la condición de parada de microlitros. Si ha ajustado la configuración de este espacio de trabajo, puede guardarlo para su uso posterior creando una plantilla a partir de ellos (en el menú de AmphaSoft, haga clic en *Workspace > Save as Template*).

B) Activación del Conteo en su plantilla

- Origine una copia de su plantilla validada y luego debe proporcionar un nuevo nombre a la copia. Este será el workspace que usará para configurar el *Conteo*.
- Abrir el workspace. Abrir el worklist y asegúrese de que las columnas de *Stop Cond Cells*, *Stop Cond ul*, *Stop Cond Min*, *Stop Cond Sec* y *Counting* estén desplegadas. Si las columnas no aparecen, haga clic en *Settings (+/-)* (el cual se encuentra en la parte inferior del worklist) y seleccione los nombres de la lista en la ventana desplegada. Dar clic en *OK*. Er 1 (one) into each field of the *Counting* column. This will switch on the *Counting* mode.
- Asegúrese de que todas las condiciones de parada de células, min y seg estén en cero.
- Defina la condición de parada apropiada en microlitros (*Stop Cond ul*) en todas las mediciones. La condición de parada en microlitros será utilizada para calcular la concentración, por lo tanto, si se requiere una concentración exacta de células, esta debe coincidir con el volumen de la muestra. Las condiciones de parada típicas para los chips F y D son 500 μ l y para los chips E y G son 2000 μ l. Si usted prepara muestras más grandes o pequeñas, ajuste la condición de parada de microlitros.
- Guardar el workspace con la nueva configuración (*Settings*), haciendo clic en el menú de AmphaSoft *Workspace > Save as template*.
- Crear una copia de la plantilla y darle un nuevo nombre. Este será su nuevo workspace para el *Conteo*.



Preparación de la Muestra

Recomendación: Las muestras de polen de las trampas, anteras simples o de los estigmas pueden tener pocos granos de polen. En el caso de que el análisis de datos sea difícil con números bajos, puede realizar una medición de referencia. Para ello, debe comenzar con una muestra con un número alto de polen, p.e. agrupando varias anteras, flores o estigmas. Utilice esta muestra de referencia para aplicar límites de eje y gatings a las mediciones, y para identificar residuos. Se recomienda realizar un enjuague (Rinsing) del instrumento después de la medición de referencia, para evitar su contaminación.

Para las aplicaciones de Conteo de polen para los chips E y G, Amphasys proporciona buffers de Conteo que reducen la sedimentación y aumentan la recuperación de polen. Usted puede contactar al soporte de Amphasys para discutir su aplicación.

A) Trampas de Polen

- Homogenizar el contenido de las trampas de polen mediante una agitación efectiva.
- Poner un filtro en un tubo de 5 ml y transferir una cantidad determinada de muestra de la trampa del polen a través del filtro. El volumen transferido debe coincidir con la condición de parada de microlitros configurada, por ejemplo 2000 µl.
- Asegúrese de recuperar la muestra completa del filtro, p.e. colocando más buffer a través del filtro. Si diluye la muestra con más buffer, asegúrese de calcular la concentración final sin diluir o utilice el campo del factor de dilución (por ejemplo, añada un factor de dilución de 2 si diluyó 1 ml de la muestra de la trampa de polen con 1 ml de buffer nuevo)

Recomendación: Dependiendo del tipo de fluidos extras (no Amphasys) usado en las trampas de polen, es posible que necesite ajustar los parámetros del instrumento. Por favor, discuta su propuesta de aplicación con el soporte de Amphasys.

B) Polen de anteras o flores

- Colocar las anteras o flores en un tubo Eppendorf y extraiga el polen utilizando las instrucciones de la *Guía Rápida Preparación de la Muestra*.

Importante: El volumen total del buffer utilizado para la extracción del polen debe coincidir con los microlitros de la condición de parada (µl Stop Condition)

Recomendación: Para evitar la pérdida de polen en el tubo Eppendorf o el filtro, puede realizar la extracción de polen con la mitad del volumen final. Luego, pipetee el volumen restante en el tubo Eppendorf que ya había usado para así recuperar más polen. Mezclar la suspensión recuperada con la otra parte de la muestra vertiéndola a través del mismo filtro en el tubo FACS.

C) Polen del estigma después de hacer una polinización manual

- Recolectar los estigmas polinizados en tubos Eppendorf.

Recomendación: Si el conteo de polen del estigma es muy bajo, usted puede colocar varios estigmas y calcular el número promedio de granos por estigma.

Por favor asegúrese de recolectar y procesar los estigmas directamente después de la polinización, p.e. antes de que el polen germine, pues esto puede conllevar a un resultado incorrecto.

- Suspendar las células y filtrar la muestra siguiendo las instrucciones de la *Guía Rápida Preparación de la Muestra*.

Importante: El volumen total del buffer utilizado para la extracción del polen debe coincidir con los microlitros de las condiciones de parada (Stop Condition µl)

Recomendación: Para evitar la pérdida de polen en el tubo Eppendorf o el filtro, puede realizar la extracción de polen con la mitad del volumen final. Luego, pipetee el volumen restante en el tubo Eppendorf que ya había usado para así recuperar más polen. Mezclar la suspensión recuperada con la otra parte de la muestra vertiéndola a través del mismo filtro en el tubo FACS.

Medición y Análisis de Datos

- Dar clic en *Start Measurement*
- Un mensaje emergente aparecerá y le pedirá que se asegure de que no haya ninguna muestra adjunta en el porta-muestras. Retire cualquier tubo del soporte. Después de confirmar esta solicitud, el sistema de fluidos se purgará con aire.
- Después de la purga, otro mensaje emergente le pedirá que coloque la muestra en el conector porta-muestras. La muestra se cargará y medirá después de confirmar el mensaje.

Nota: En los primeros segundos de la medición, la muestra es cargada y por lo tanto aún no se pueden detectar las células. La medición se detendrá automáticamente cuando la muestra se consuma completamente y cuando no haya detección de células durante 10 segundos. El número de *Accepted* le indicará el número total de partículas medidas.

- La *Concentration* indicará el número de células por mililitros de muestra.
- Utilice el gating polygonal y la función *Hide Cells*, para ocultar datos no deseados (por ejemplo desechos, burbujas de aire, etc.).