



Introducción

En la Citometría de Flujo de Impedancia (IFC), los granos de polen se encuentran suspendidos durante la medición, en un tampón de medición (buffer). Los tampones de medición AmphaFluid han sido cuidadosamente desarrollados en orden de mantener las células estables hasta que sean medidas. Para ciertas especies y estados de desarrollo, se ha observado que los granos de polen pierden su viabilidad o estallan después de un tiempo de estar suspendidos en el tampón. Salvo que las muestras sean medidas inmediatamente después de la preparación, la estabilidad de las células debe ser verificado para prevenir sesgos en los experimentos.

Los siguientes protocolos pueden ser utilizados para determinar el tiempo máximo de suspensión de los granos de polen utilizando IFC y microscopia. Es recomendado de seguir los procedimientos (A y B).

Materiales

- Muestra de Polen
- Tampón de medición, chips y filtros
- Material para la preparación de la muestra
- Plantillas (templates) de medición
- Tubo Falcon de 50 ml
- Microscopio y portaobjeto de microscopia o plato con 12 cuencos


Protocolo para la determinación de la estabilidad de las células en el buffer

A) Viabilidad medida con IFC

1	Preparar el Instrumento	<ul style="list-style-type: none">• Preparar su instrumento Ampha Z32 de acuerdo a las instrucciones descritas en la Guía Rápida Inicialización.
2	Prepare las Muestras	<ul style="list-style-type: none">• Tomar una muestra de polen con suficiente material para unas 10 mediciones en un tubo de Eppendorf de 1,5 ml.• Agregar 1 ml de tampón en el tubo, disperse las células y filtre la muestra en un tubo Falcon de 50 ml.• Sugerencia: Cantidad de polen recomendado y metodología de la preparación de la muestra puede ser encontrado en la Guía Rápida Preparación de la Muestra.• Diluya la muestra utilizando 20 ml de tampón (buffer) de medición.• Tome nota de la hora, p.e. 3.00 pm.
3	Mida la Primera Muestra	<ul style="list-style-type: none">• Inmediatamente tome una submuestra y mídala.
4	Medición de Otras Muestras	<ul style="list-style-type: none">• Tomar otras submuestras después de 5, 10, 15, 20, 30, 45 and 60 minutos (o sus propios períodos de tiempo relevantes) y mídalos.• Sugerencia: Asegúrese de homogeneizar bien la muestra principal antes de tomar las submuestras.
5	Repetición	<ul style="list-style-type: none">• Si fuese necesario, repita el procedimiento para otras muestras.
6	Análisis de Datos	<ul style="list-style-type: none">• Determine la viabilidad de las células colocando el gating.• Crear un report .csv.• Sugerencia: Encontrará sugerencias y trucos para el análisis de datos en las Guía Rápida Análisis de Datos.• Trazar la viabilidad celular medida en función del tiempo de suspensión, por ejemplo, utilizando Microsoft Excel o R.• El tiempo durante el cual se mantiene la máxima viabilidad medida es el tiempo de suspensión máximo recomendado.

Sugerencia: Si las células no son lo suficientemente estables para su aplicación, no dude en ponerse en contacto con el Soporte de Amphasys

B) Estallido de células observado con microscopio

- | | | |
|--|--------------------|--|
| 1 | Prepare la Muestra | <ul style="list-style-type: none">• Prepare 1 ml de muestra de polen según su metodología de preparación de la muestras.• Tome nota de la hora, p.e. 3.00 pm. <p>Sugerencia: Metodologías recomendadas de preparación de muestras pueden ser encontradas en la Guía Rápida Preparación de la Muestra.</p> <p>Sugerencia: La concentración de células puede ser mayor que en las mediciones regulares con IFC.</p> |
| 2 | Microscopio | <ul style="list-style-type: none">• Agitar bien la muestra y agregar 100 µl de la misma en un portaobjetos de microscopia o agréguela en uno de los cuencos de una placa de 12 cuencos.• Deje sedimentar las células y compruebe si puede observar la rotura de células durante el periodo de tiempo correspondiente.• Observe el tiempo después del cual una parte considerable de las células ha estallado (se ha roto) |
| <p>Polen de trigo reventado</p>  | | |
| 3 | Repetición | <ul style="list-style-type: none">• Repita el procedimiento para otras muestras si fuese necesario. <p>Sugerencia: La rotura o estallido de las células depende de las especies y el estado de desarrollo del polen entre otros factores.</p> |
| 4 | Conclusión | <ul style="list-style-type: none">• El polen sólo debe suspenderse durante el tiempo que no se observe una rotura celular importante.. |