

# PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO



POP N. 013  
CITÔMETRO CELL SORTER BD FACSMELODY

Elaboração: 11/2022  
Versão: 2.0 (05/2025)

## 1. DESCRIÇÃO

O citômetro de fluxo analisa partículas ou células suspensas em líquido, onde anticorpos específicos com marcadores fluorescentes são utilizados para identificação de proteínas. As partículas entram em fluxo laminar e os marcadores são interrogados por um laser, a fluorescência produzida é capturada resultando nos dados para análise. Usando a função de sorting, células que atendam a critérios definidos podem ser separadas e depositadas em tubos diferentes.

**Modelo:** FACSMelody

### Especificações:

Lasers: Azul (488 nm) e Vermelho (640 nm) na configuração 2-lasers, 6 cores (4-2) (Consultar Anexo II)

Tanque de salina: Tanque de inox autoclavável de 10 L

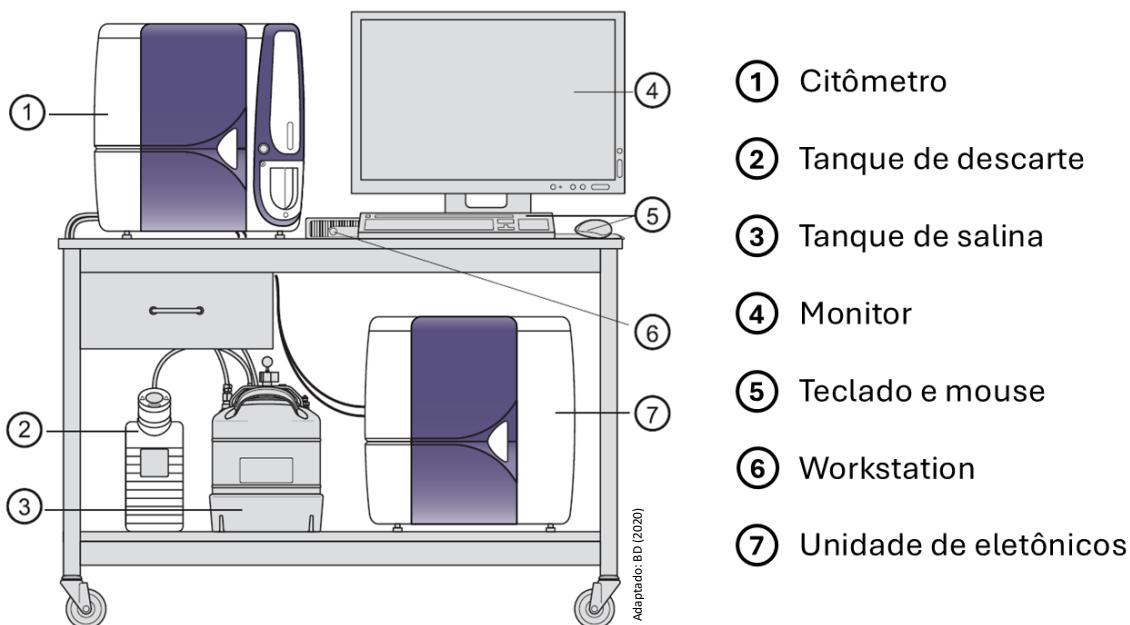
Tanque de descarte: Tanque de polipropileno de 10 L

Entrada de amostra: Tubo de poliestireno de 5,0 mL

Tamanho de células: 0,5 a 40 µm

Sorting: 34.000 gotas por segundo, tamanho da gota 100 µm

Dispositivo de coleta: Tubos de 5,0 mL, placas e lâminas de microscopia



**Figura 1 – Citómetro de Fluxo Cell Sorter BD FACSMelody**

# PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

 Instituto Federal de São Paulo BioRep	POP N. 013	Elaboração: 11/2022
	CITÔMETRO CELL SORTER BD FACSMELODY	Versão: 2.0 (05/2025)

## 2. OPERAÇÃO

### 2.1 MATERIAL NECESSÁRIO

- PBS 1X filtrado e autoclavado (Anexo III);
- Tubo para citômetro c/3 mL de água Milli-Q;
- Tubo para citômetro c/3 mL de hipoclorito de sódio 1%;
- Tubo para citômetro c/4 mL de solução de detergente BD (Anexo IV);
- Tubo para citômetro c/500 µL PBS 1X Filtrado para setup com CS&T RUO BEADS;
- Tubo para citômetro c/500 µL PBS 1X Filtrado para setup com ACCUDROP BEADS;
- Tubos para citômetro com amostra

### 2.2 FLUXO OPERACIONAL



**Figura 2 – Fluxo operacional do citômetro de fluxo**

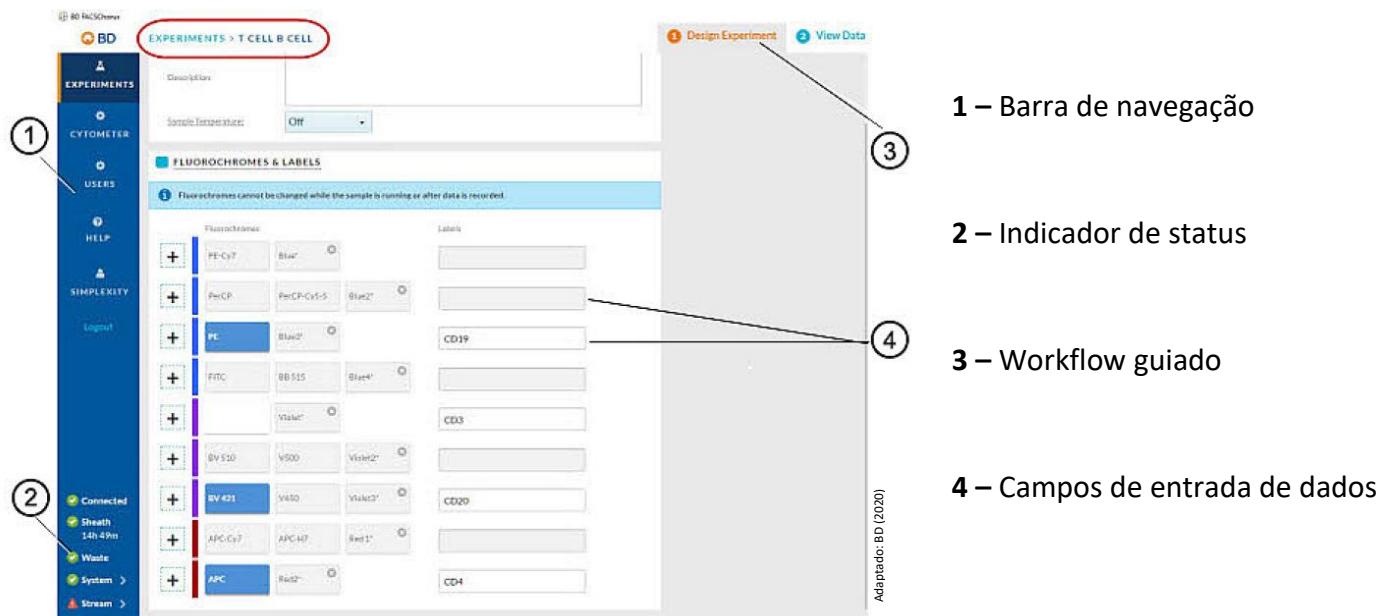
### 2.3 INICIANDO O SISTEMA (STARTUP)

- Verificar o tanque de salina e filtros;
- **Se tiver sido feito desligamento longo:** o tanque estará com etanol 70%, devendo ser esvaziado, enxaguado com água destilada e completado com solução salina/PBS (desplugar todas as conexões, efetuar o procedimento e reconectar novamente);
- **Se tiver sido feito desligamento curto:** estará com solução salina/PBS e pode ser usado diretamente;
- Verificar o nível da solução: cuidar para não ultrapassar limite de volume do tanque (marcação na lateral) e vedar bem;
- Verificar se o filtro está de acordo com o líquido do tanque (salina, etanol, hipoclorito, água) e checar as conexões do tanque (filtro, ar);
- Esvaziar tanque de descarte e colocar hipoclorito numa concentração final de 0,5 a 1% (capacidade do tanque é 10L);
- Ligar o compressor (110V – já está conectado no transformador que é ligado direto na rede 220V);
- Ligar as duas tomadas do citômetro no nobreak ;
- Ligar o citômetro;
- Ligar o computador;

# PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

 	<b>POP N. 013</b> <b>CITÔMETRO CELL SORTER BD FACSMELODY</b>	<b>Elaboração: 11/2022</b> <b>Versão: 2.0 (05/2025)</b>
---	---	--

- Rodar software TERATERM antes de rodar o FACS Chorus para evitar lentidão (tem que aparecer “END UP BOOT”, finalizar o boot);
- Abrir software FACS Chorus;
- Seguir fluxo de checagem e inicialização (a maior parte é automatizado, mas alguns passos requerem ação do usuário):
  1. Fluidics startup
  2. Cleaning
  3. Sort nozzle (inserir nozzle de análise)
  4. Citometer setup (CS&T RUO BEADS) - **Toda vez que for usar equipamento**
  5. Drop delay (Accudrop) – **Somente se for fazer cell sorting**



**Figura 3 – Visão geral do software FACSChorus**

## 2.3.1 Fluidics Startup

Selecionar uma das duas opções:

- Se tiver sido realizado um desligamento longo na última utilização, deverá ser realizado **obrigatoriamente** o “RUN EXTENDED FLUIDICS STARTUP”
- Se tiver sido realizado um desligamento diário na última utilização, poderá ser realizado diretamente o “RUN DAILY FLUIDICS STARTUP”

Ambas as opções possuem 4 tarefas a serem realizadas:

- Fluidics startup;
- Inserir o nozzle de loop-fechado;
- Verificar os tanques de salina e descarte (deve ser preferencialmente realizado antes de ligar);

# PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO



**POP N. 013**  
**CITÔMETRO CELL SORTER BD FACSMELODY**

Elaboração: 11/2022

Versão: 2.0 (05/2025)

- Iniciar a purga do filtro de salina.

Todo o processo é guiado, seguir os comandos exibidos na janela. Ao concluir, clicar em fechar e, depois, continuar.

## 2.3.2 Cleaning

Selecionar uma das 2 opções:

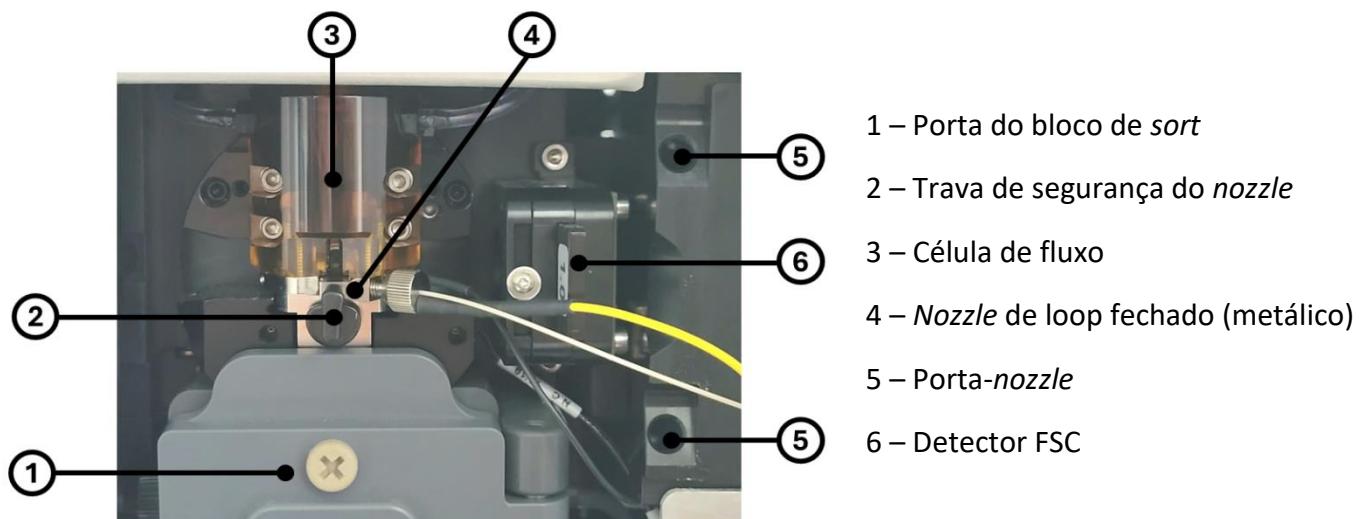
FLOW CELL CLEAN:

- Limpa a linha de amostra e preenche a flow cell com água Milli-Q;
- É recomendado fazer o FLOW CELL CLEAN entre tipos diferentes de amostras e usuários diferentes;
- **Se tiver sido realizado um desligamento longo na última utilização:** efetuar o FLOW CELL CLEAN 3 vezes para garantir que tenha água na célula de fluxo evitando a danificação das borrachas de vedação (O'ring).

PREPARE FOR ASEPTIC SORT:

Limpa as linhas de salina e amostra com hipoclorito 1%, água Milli-Q e etanol 70%, procedimento no Item 3.3.

- Pode ser realizado se necessário para uma limpeza completa do sistema fluídico antes de um experimento de sorting;
- Fazer 1X por mês para limpeza do sistema;
- Não precisa autoclavrar tanque (usar UV por 15min)



**Figura 4 – Câmara da célula de fluxo (flow cell)**

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		
<b>BioRep</b>	<b>POP N. 013</b>	<b>Elaboração: 11/2022</b>
	<b>CITÔMETRO CELL SORTER BD FACSMELODY</b>	<b>Versão: 2.0 (05/2025)</b>

### 2.3.3 Sort Nozzle

Lavar sort nozzle cuidadosamente:

- Em um tubo falcon 15ml com água milli-Q, mergulhar e enxugar nozzle com kimwipes;

**ATENÇÃO:** MUITO CUIDADO NESSE PROCEDIMENTO POIS O NOZZLE É UMA PEÇA SENSÍVEL, DE ALTO CUSTO E SEM REPOSIÇÃO NO LABORATÓRIO!

Retirar o nozzle metálico (closed loop nozzle) e inserir o sort nozzle cuidadosamente:

- Girar a trava de segurança no sentido anti-horário até a posição de 9h;
- Puxar com cuidado o closed loop nozzle e posicioná-lo no suporte no canto superior direito da câmara;
- Inserir cuidadosamente o sort nozzle com as inscrições voltadas para cima;
- Girar a trava de segurança no sentido horário de volta para a posição de 12h.
- Clicar em STREAM para visualizar se o sistema pressurizou corretamente e criou um fluxo/filete de solução salina, bem como a formação das gotas

### 2.3.4 Citometer Setup (CS&T)

Fazer checkup performance com as BEADS **toda vez que for realizar algum experimento** no citômetro

Preparar um tubo de citometria com as BEADS:

- 500µl de PBS (pode ser coletado diretamente do STREAM do equipamento) + 2 gotas das BEADS CS&T;
- Agitar bem antes de inserir no equipamento;
- Pode ser mantido na geladeira por 1 semana (protegido com papel alumínio);

### 2.1.5 Drop Delay (ACCUDROP)

**\*SOMENTE SE FOR FAZER CELL SORTING**

- 500µl de PBS + 1 gota de BEADS ACCUDROP
- Pode ser mantido na geladeira por 1 semana (protegido com papel alumínio)

### OBSERVAÇÃO

Sempre que o equipamento ficar muito tempo desligado fazer SHEATH FILTER PURGE, abrir um experimento e fazer BACKFLUSH várias vezes (retirar bolhas de ar do filtro e célula de fluxo) antes de iniciar o experimento em questão.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO			
 	POP N. 013	Elaboração: 11/2022	
	CITÔMETRO CELL SORTER BD FACSMELODY	Versão: 2.0 (05/2025)	

## 2.2 CONFIGURANDO UM EXPERIMENTO

- Clicar na aba EXPERIMENTS;
- NEW EXPERIMENT → CREATE EXPERIMENT;
- Nomear o experimento e selecionar os fluorocromos desejados;
- Adicionar os plots com os parâmetros desejados;
- **FLOW RATE (ajustar)**
  - Limite do equipamento: 34.000 eventos (acima perde sensibilidade);
  - Máximo indicado para análise: 20.000 eventos;
  - Máximo indicado para sorting: 6.000 eventos (1 célula a cada 5 gotas).
- **BACKFLUSH:** injeta salina para limpar a célula de fluxo;
  - Usar entre um tubo e outro para limpeza;
  - Usar caso haja problema na válvula pint (não estiver sugando a amostra).
- Quando forem usados dois fluorocromos ou mais na amostra é necessário efetuar a COMPENSAÇÃO (pois há sobreposição das faixas de detecção);
  - **Obs.:** Células não marcadas e células marcadas com fluorocromo devem ter valores parecidos ou próximos.
- Inserir o tubo na célula de fluxo e clicar em **LOAD SAMPLE**;
  - As amostras devem estar em PBS ou PBS+BSA (meios de cultivo podem entupir equipamento ou possuir compostos fluorescentes que afetam sinal);
  - Selecionar o tamanho das células;
  - Ajustar Threshold, voltagem (PMT) e gates;
  - **Obs.:** Enquanto o tubo estiver sendo analisado não é possível abrir a porta da célula de fluxo (não forçar, pode quebrar);
  - Clicar em **START RECORDING** para iniciar a contagem/gravação da leitura.
- Fazer limpeza entre um experimento e outro com hipoclorito 1% e em seguida com água Milli-Q (event rate tem que ser <10).

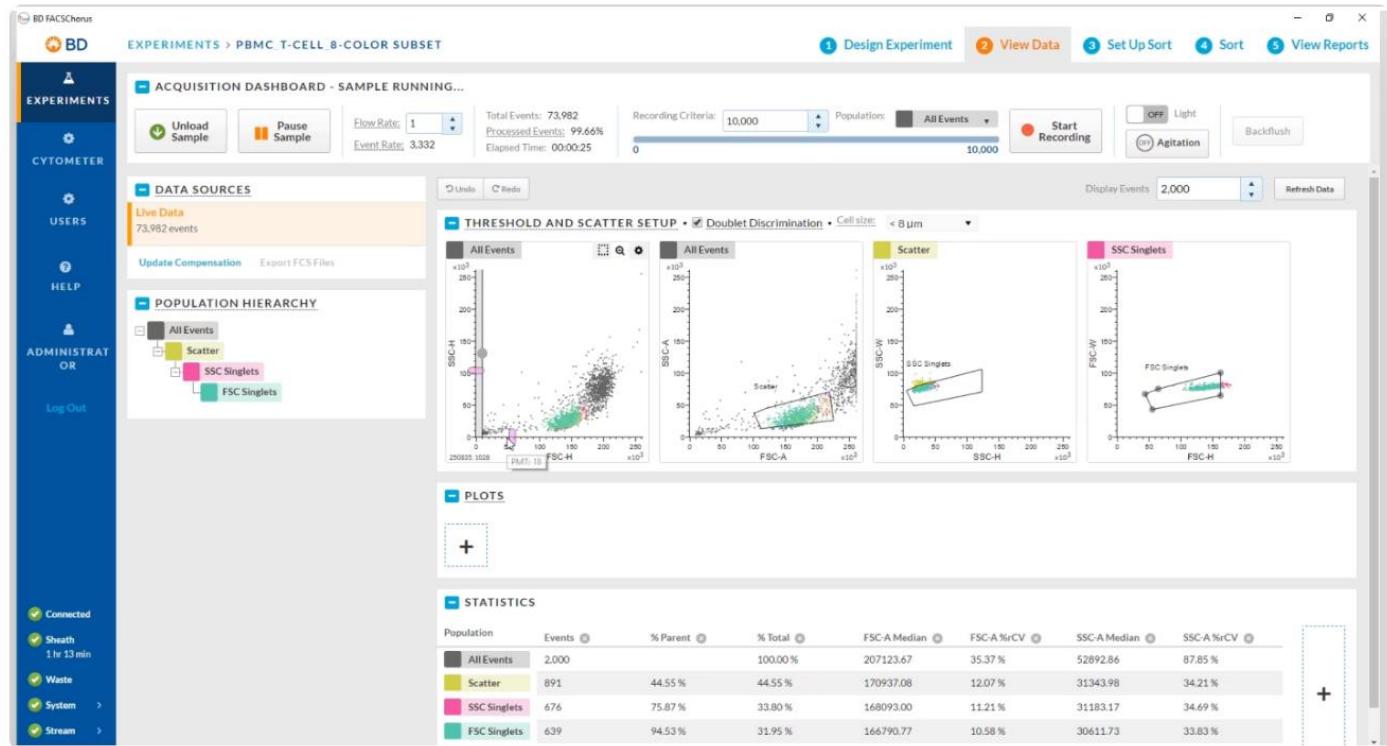
# PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO



**POP N. 013**  
**CITÔMETRO CELL SORTER BD FACSMELODY**

Elaboração: 11/2022

Versão: 2.0 (05/2025)



Adaptado: BD (2020)

**Figura 5 – Visão geral da aba de experimentos**

## 2.3 CONFIGURANDO CELL SORT

- Selecionar tipo de dispositivo (tubo, placa, lâmina)
  - Inserir adaptador para placas
  - Retirar adaptador para uso de tubos
- Selecionar o modo de sorteio
  - **YIELD** → Menos preciso (recupera o máximo de células)
  - **PURITY** → Preciso, mas pode ter doublets (pode sortear gotas com duas células)
  - **SINGLE CELL** → Método mais preciso/PUREZA (menos quantidade de células recuperadas, descarta células próximas na mesma gota)
- Selecionar volume inicial de buffer que deve ser colocado no fundo do dispositivo de coleta para que as células colidam com as paredes dos dispositivos
- Selecionar qual população irá para cada tubo/poço
- INDEX SORTING: Selecionar caso deseja rastrear as células (localização da amostra/célula após sorting, mapear a origem)
  - **SOMENTE PARA PLACAS**
  - Clicar em **VIEW DATA** → **ENABLE INDEX SORTING**
- Clicar em **START SORT** para iniciar sorteio
- Clicar em **START RECORDING** para gravar dados

# PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO



**POP N. 013**

Elaboração: 11/2022

**CITÔMETRO CELL SORTER BD FACSMELODY**

Versão: 2.0 (05/2025)

1 Design Experiment
2 View Data
3 Set Up Sort
4 Sort
5 View Reports

**COLLECTION SETUP**

Format: **Tube**

Volume: **Two Tubes 5.0 mL**

Sort Mode: **Two Tubes 5.0 mL**

**SORT SETUP**

**De cada lista selecione:**

- Formato do aparato de coleta;
- Número de tubos e volume;
- Modo de sort: *yield, purity ou single cell*

**Tubes - two tubes view**

**SORT SETUP**

Tube	1	2
Initial Buffer Volume:	1.00 mL	0.50 mL
Number of Events:	500000	750000
Max: 1.008.000 events		

Selecionar o volume inicial de tampão e número de eventos para cada tubo

Assign a sort population by clicking a tube and selecting the population that you want.

Tregs

CD4+CD1...

**Population Hierarchy**

- All Events
- Scatter
- SSC Singlets
- FSC Singlets
- CD4+
- TRegs
- CD4+CD127+CD25-

Atribua a população de sort clicando no tubo e selecionando a população a partir da **Population Hierarchy**

**Figura 6 – Visão geral da aba de configuração de sort**

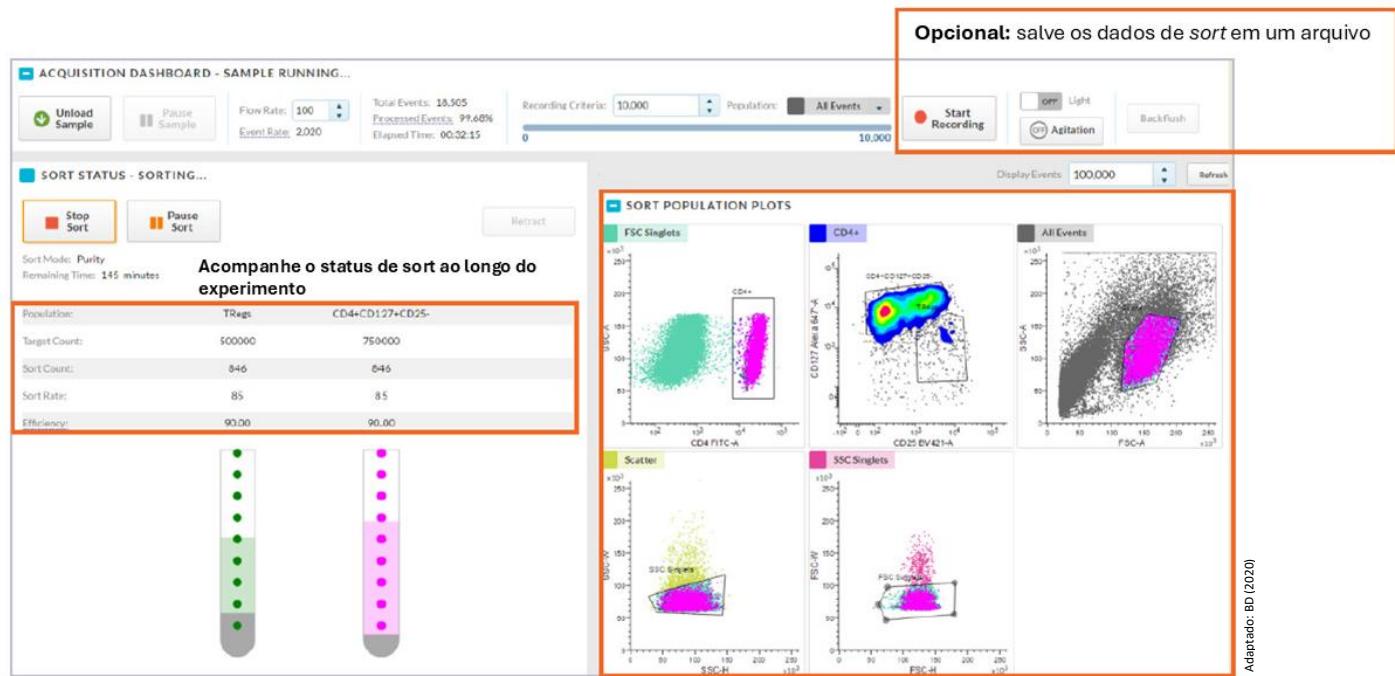
Adaptado: BD (2020)

# PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO



**POP N. 013**  
**CITÔMETRO CELL SORTER BD FACSMELODY**

**Elaboração: 11/2022**  
**Versão: 2.0 (05/2025)**



**Figura 7 – Visão geral da aba de aquisição**

## 2.4 VISUALIZAR RELATÓRIOS (VIEW REPORTS)

Nesta aba são exibidos os relatórios de detalhes e estatísticas de sort, configurações do citômetro, entre outros. Os relatórios podem ser exportados para os formatos .csv ou .pdf, os gráficos não são exportados mas podem ser analisados em outros softwares (Ex.: FlowJo).

- Clique no botão de “EXPORT REPORT” na parte superior do relatório;
- Selecione o formato, local e nome do arquivo para ser salvo;
- Use apenas *pendrive FORMATADO* para a exportação dos dados.

## 2.5 DESLIGANDO O SISTEMA (SHUT DOWN SYSTEM)

Ao final do uso fazer a lavagem com 3 soluções (hipoclorito 1%, água Milli-Q e solução de detergente BD) por 5 minutos cada, configurando o *Flow Rate* para na aba “VIEW DATA” para 100, lavar na seguinte ordem (total 20 min):

- Hipoclorito 1% (tubo com 3 mL)
- Água Milli-Q (tubo com 3 mL)
- Solução de detergente BD (tubo com 4 mL)
- Água Milli-Q (tubo com 3 mL)

Após a lavagem, retirar o *sort nozzle* e lavar conforme descrito no Item 2.3.3. Inserir o *closed loop nozzle* (metálico) e clicar em CYTOMETER e selecione DAILY SHUTDOWN ou LONG-TERM SHUTDOWN.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		
 	POP N. 013 CITÔMETRO CELL SORTER BD FACSMELODY	Elaboração: 11/2022 Versão: 2.0 (05/2025)

## 2.5.1 Daily Shutdown

Realizar quando estiver usando o citômetro diariamente ou for usar dentro de 2 dias;

- Selecionar DAILY SHUTDOWN na aba STARTUP/SHUTDOWN e seguir as instruções em tela;
- Será necessário um tubo para citômetro c/4 mL de solução de detergente BD.

## 2.5.2 Long-Term Shutdown

Realizar sempre que o citômetro for ficar mais de 2 dias sem usar, esta opção vai remover a salina do sistema e substituir com etanol 70%, além de drenar a *flow cell*.

- Selecionar LONG-TERM SHUTDOWN na aba STARTUP/SHUTDOWN e seguir as instruções em tela;
- Será necessário um tubo para citômetro c/3 mL de água Milli-Q, pelo menos 2,5 L de etanol 70% e um filtro exclusivo para etanol para ser usado no tanque de salina.

**Obs.:** sempre que for feito um “*Long-term shutdown*”, na próxima vez o aparelho for ligado deverá ser realizado um “*Extended fluidics startup*”.

Após o processo de limpeza, desligar o equipamento na seguinte ordem:

- Desligar o citômetro (pressionando o botão de Power na parte frontal);
- Desligar o computador;
- Desconectar o tubo transparente do tanque de salina e liberar a pressão do tanque usando a válvula de pressão (puxando o anel metálico)
- Anotar as informações de uso na ficha de uso do equipamento (Anexo I).

## 3. MANUTENÇÃO

### 3.1 LIMPEZA PERIÓDICA

A cada 15 dias deve ser realizada a limpeza do equipamento:

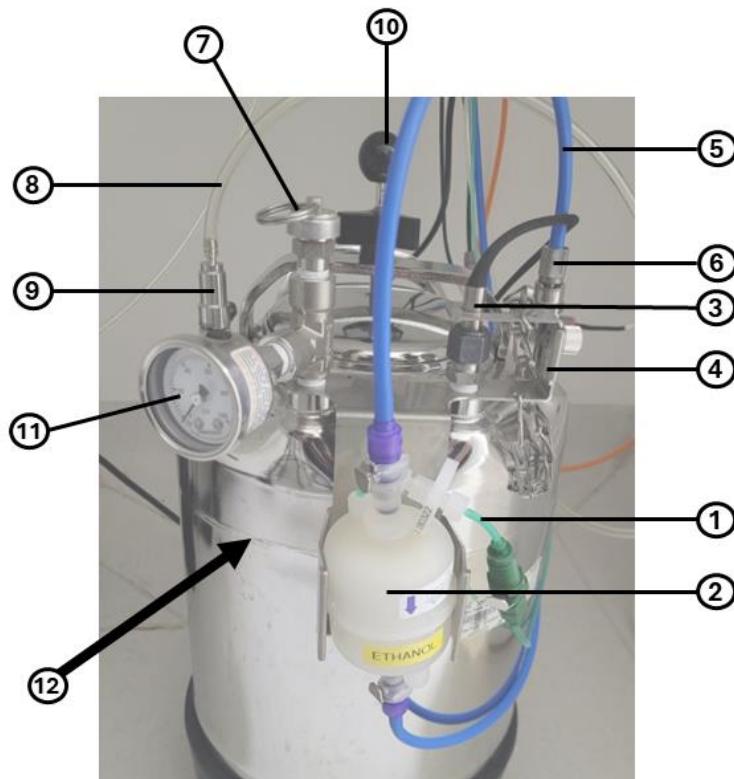
- Ligar o citômetro e fazer o STARTUP selecionando EXTENDED FLUIDICS STARTUP e depois proceder com um LONG-TERM SHUTDOWN para fazer a lavagem;
- Usar água Milli-Q no tanque de salina em vez de PBS, cuidar para utilizar o filtro exclusivo para água no tanque de salina.

### 3.2 MANIPULANDO O TANQUE DE SALINA

O tanque de salina deve conter quantidade suficiente para a realização do experimento, se o nível ficar baixo será acionado um alerta no software para repor a salina, se o aparelho continuar operando com volume baixo, eventualmente será desligado automaticamente.

# PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

O tanque também deve ser limpo regularmente, juntamente com o equipamento, quando ele estiver preenchido com etanol 70%, remover o etanol e enxaguar com água Milli-Q antes de preencher com PBS para usar o equipamento. Para uma melhor limpeza, realizar o procedimento de PREPARE FOR ASSEPTIC SORT periodicamente.



- 1 – Linha de purga do filtro (VERDE)
- 2 – Filtro de fluído
- 3 – Sensor de salina (PRETO)
- 4 – Aparato de contenção
- 5 – Linha de fluído (AZUL)
- 6 – Conector de fluído
- 7 – Válvula de alívio de pressão
- 8 – Linha de ar (TRANSPARENTE)
- 9 – Conector de ar
- 10 – Puxador da tampa
- 11 – Manômetro de pressão
- 12 – Indicador de nível de fluido

**Figura 8 – Tanque de salina**

## 3.2.1 Limpando o Tanque de Salina

- Desconecte a linha de ar (TRANSPARENTE) e a linha de fluido (AZUL), pressionando a trava metálica no conector;
- Remova o filtro de fluido;
- Se pressurizado, remova a pressão puxando o anel metálico da válvula de alívio de pressão;
- Remova o sensor de salina:
  - Afrouxe a porca metálica do detector utilizando uma chave de rosca;
  - Afrouxe o parafuso do aparato de contenção manualmente e remova a parte superior do aparato;
  - Termine de frouxar a porca metálica do detector e remova-o puxando verticalmente;
  - O detector não pode ser autoclavado, limpar com etanol 70% e secar cuidadosamente com kimwipe. A parte superior do detector não pode ficar úmida ou não vai funcionar corretamente.
- Remova o restante de fluido do tanque e lave com água Milli-Q;
- Descontaminar com luz UV por 15 minutos;
- Preencher o tanque com fluido e fechar (cuidar para que o O-ring da tampa esteja vedando bem);
- Reposicionar os detectores e o filtro.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		
 	POP N. 013	Elaboração: 11/2022
	<b>CITÔMETRO CELL SORTER BD FACSMELODY</b>	
	Versão: 2.0 (05/2025)	

### 3.2.2 Preenchendo o Tanque de Salina

Para preencher o tanque de salina durante a operação do citômetro:

- Desligue o fluxo;
- Desconecte a linha de ar (TRANSPARENTE)
- Libere a pressão puxando o anel metálico da válvula, verifique se a pressão foi totalmente liberada puxando uma segunda vez;
- Desrosqueie a trava do puxador da tampa e abra o tanque;
- Preencha o tanque com o fluído até no máximo a linha do indicador de nível no interior do tanque (não ultrapassar a linha pois pode levar a velocidades de fluxo incorretas);
- Feche novamente o tanque, rosqueando a trava e conecte a linha de ar;
- Não mude a elevação do tanque pois pode afetar a calibração;
- Purge o filtro de fluído.

### 3.4 ESVAZIANDO O TANQUE DE DESCARTE

O tanque de descarte deve ser esvaziado sempre que repor o tanque de salina ou quando o equipamento indicar que o tanque está com nível alto;

- Desligue o fluxo;
- Desconecte o sensor (PRETO) e a linha de descarte () pressionando a trava metálica no conector;
- Obs.: o tanque de descarte pode ficar pressurizado quando o aparelho está funcionando, espere pelo menos 1 minuto para a pressão dissipar antes de abrir o tanque;
- Retire a tampa de descarta (grande) e descarte o conteúdo no recipiente identificado no local;
- Dentro da tampa de descarte fica um papel filtro, substituir este papel a cada 30 dias;
- Não inverta a tampa, o filtro não deve ficar molhado, verifique se na câmara na parte de dentro tem líquido acumulado;
- Se observar que tem líquido acumulado na câmara dentro da tampa, remova o plug na parte inferior e drene todo o líquido;
- Adicione aproximadamente 1L de hipoclorito não diluído no tanque;
- Recoloque a tampa do descarte e rosqueie ficar firme (não aperte com muita força para não causar pressurização excessiva);
- Reconecte o sensor e a linha de descarte.

### 3.5 PREPARANDO PARA SORT ASSÉPTICO

Limpa a câmara de fluxo e o sistema inteiro de possíveis contaminantes, para este procedimento será necessário:

- 4 filtros de fluído, um para cada fluído usado;
  - Pelo menos 3 L de Hipoclorito 1%;
  - Pelo menos 3 L de Água Milli-Q;

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		
<b>BioRep</b>	<b>POP N. 013</b>	<b>Elaboração: 11/2022</b>
	<b>CITÔMETRO CELL SORTER BD FACSMELODY</b>	

- Pelo menos 3 L de Etanol 70%;
- Pelo menos 3 L de PBS 1X filtrado e autoclavado;
- Tubo para citômetro c/3 mL de água Milli-Q;
- Ligue o citômetro e abra o software FACS Chorus;
- Complete ou pule (se for apenas limpar) o FLUDICS STARTUP;
- Quando solicitado para selecionar um método de limpeza, selecione PREPARE FOR ASSEPTIC SORT;
- Uma nova janela abrirá;
- Selecione o número 1 e clique em START;
- Siga as orientações fazendo a limpeza com hipoclorito 1%, água e etanol (sempre esvazie o tanque e enxague com água Milli-Q entre as soluções);
- Quando chegar ao passo 6, clique em cancelar e realize um DAILY SHUTDOWN se for continuar para um experimento asséptico ou LONG-TERM SHUTDOWN se estiver apenas limpando;
- Esterilize o tanque de salina conforme o Item 3.2.1, preencha com PBS 1X filtrado e autoclavado conecte novamente ao citômetro;
- Inicie o aparelho novamente e realize um EXTENDED FLUIDICS STARTUP e prossiga com procedimento para fazer o experimento de sort asséptico.

### 3.6 TROCANDO O FILTRO DE FLUÍDO

Os filtros são utilizados para filtração dos fluídos usados antes de entrar no sistema, deve ser utilizado um filtro para cada tipo de fluído.

**Obs.:** o filtro novo pode ser usado para qualquer tipo de fluído, mas após ser usada uma vez deve ser mantido sempre para a mesma solução, devendo ser identificado adequadamente.

O filtro deve ser trocado a cada 3 meses de uso ou quando os gráficos de FSC vs SSC indicarem um aumento de debris.

Para trocar o filtro de fluídos:

- Desligue o fluxo;
- Desconecte a linha de ar do tanque e retire a pressão puxando o anel metálico da válvula;
- Desconecte o filtro da linha de fluído (AZUL) pressionando as travas metálicas e desconecte a linha de purga (VERDE) desrosqueando o conector;
- Instale o filtro novo;
- Preste atenção na seta que indica a direção do fluxo para posicionar o filtro na mesma orientação;
- Reconecte a linha de ar no tanque e espere a pressurização;
- Faça a purga do filtro: no software FACSChorus, selecione CYTOMETER > SEATH FILTER PURGE > START;

#### 3.6.1 Preparando um Novo Filtro

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		
 	POP N. 013	Elaboração: 11/2022
	CITÔMETRO CELL SORTER BD FACSMELODY	Versão: 2.0 (05/2025)

Para preparar um filtro novo para uso, ele deve ser primeiramente molhado para a remoção de bolhas de ar.

- Preencha o tanque com água Milli-Q;
- Remova as tampas do filtro novo e guarde para reutilizar;
- Posicione o filtro novo na linha de fluido;
- No software FACSChorus, selecione CYTOMETER > SEATH FILTER PURGE > START;
- Repetir o passo anterior três vezes para garantir que removeu todo o ar;
- Substitua o fluido no tanque pelo que desejar usar com o filtro novo e repita o passo anterior;
- Identifique o filtro com o tipo de fluido que ele será utilizado para não haver trocas;
- Retire o filtro, recoloque as tampas e armazene para uso futuro.

### 3.7 LIMPANDO A LINHA DE AMOSTRA

A linha de amostra deve ser limpa com hipoclorito 1% ao final de cada experimento.

- Posicione um tubo com 3 mL de hipoclorito 1%;
- Selecione VIEW DATA > LOAD SAMPLE;
- Deixe correr por 5 minutos aproximadamente;
- Após isso, clique em UNLOAD SAMPLE
- Posicione um tubo com 3 mL de água Milli-Q e repita o processo.

### 3.8 FAZENDO O BACKFLUSH DA LINHA DE AMOSTRA

Após retirar um tubo de amostra, a linha de amostra é limpa automaticamente para evitar *carryover* de amostra, porém, é possível repetir o processo manualmente caso seja observado *carryover* ou após rodar amostras com células ou fluorocromos muito aderentes.

Selecione uma das opções:

Em ACQUISITION DASHBOARD > VIEW DATA > BACKFLUSH;

Em CYTOMETER > SAMPLE LINE BACKFLUSH > START.

## REFERÊNCIAS

BD. **BD FACSMelody™ Cell Sorter Technical Specifications.** 23-18451-06, 2020.

BD. **BD FACSMelody™ System Quick Reference Guide.** 23-19032-04, 2020.

BD. **BD FACSMelody™ Cell Sorter User's Guide.** 23-18120-03 Rev. 04, 2020.

## **PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO**



## **POP N. 013 (ANEXO I)**

---

Elaboração: 11/2022

# CITÔMETRO CELL SORTER BD FACSMELODY

Versão: 2.0 (05/2025)

FICHA DE USO DO CITÔMETRO DE FLUXO BD FACSMELODY

# PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO



**POP N. 013 (ANEXO II)**  
**CITÔMETRO CELL SORTER BD FACSMELODY**

**Elaboração: 11/2022**  
**Versão: 2.0 (05/2025)**

## ANEXO II – Guia de Filtros, Quadro de Referência de Fluorocromos, Consumíveis e Links Úteis para o BD FACSMelody

Dyes	Application	Filters	Mirrors
<b>2-laser, 6-color (4-2) configuration</b>			
<b>488 nm</b>			
SSC	Side scatter	488/15	none
FITC, GFP, BD Horizon Brilliant Blue 515, Alexa Fluor® 488	Cell surface markers, fluorescent protein	527/32	507 LP
PE, PI	Cell surface markers, live/dead discrimination, cell cycle	586/42	560 LP
BD Horizon Brilliant Blue 700, PerCP, PerCP-Cy5.5, 7-AAD	Cell surface markers, live/dead discrimination, cell cycle	700/54	665 LP
PE-Cy7	Cell surface markers	783/56	752 LP
<b>640 nm</b>			
APC, Alexa Fluor® 647	Cell surface markers	660/10	660/10
APC-Cy7, APC-H7	Cell surface markers	783/56	752 LP

Adaptado: BD (2020)

**Figura 1 (Anexo II) – Guia de filtros para o BD FACSMelody**

Instrument	Excitation Laser Line (nm)	Fluorescence Channel	Fluorochromes provided by BD Biosciences			
<b>BD FACSVersa™*</b>	<b>488</b>	Green	FITC	Alexa Fluor® 488		
		Yellow	PE	PI		
		Orange	BD Horizon™ PE-CF594 <sup>a</sup>	PE-Texas Red® <sup>a</sup>		
		Red	7-AAD	PE-Cy5	PerCP	PerCP-Cy5.5
		Infrared	PE-Cy7			
	<b>640<sup>a</sup></b>	Red	APC	Alexa Fluor® 647		
		Far Red	Alexa Fluor® 700 <sup>a</sup>			
		Infrared	BD APC-H7	APC-Cy7		
		Blue	Brilliant Violet™ 421	BD Horizon™ V450	VPD450	Pacific Blue™
		Green	BD Horizon™ V500	AmCyan		

Adaptado: BD (2020)

**Figura 2 (Anexo II) – Quadro de referência de fluorocromos BD**

## Consumíveis

- Beads CS&T (661414 / 661415)
- Beads Accudrop (345249)
- Detergent Solution Concentrate (660585)
- FACSFlow (342003)
- FACSClean (340345)
- Tubos poliestireno (352054) e polipropileno (352063 - Mais indicado p/ cell sorting)

## Links Úteis

**Informações do equipamento:** <<https://www.bdbiosciences.com/en-us/products/instruments/flow-cytometers/research-cell-sorters/bd-facsmelody>>

**Treinamento online:** <<https://www.bdbiosciences.com/pt-br/applications/research-applications/multicolor-flow-cytometry>>

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		
<b>BioRep</b>	<b>POP N. 013 (ANEXO III)</b>	Elaboração: 11/2022
	<b>CITÔMETRO CELL SORTER BD FACSMELODY</b>	Versão: 2.0 (05/2025)

## ANEXO III – PREPARO DE PBS 1X PARA USO COM O CITÔMETRO

Em substituição ao BD FACS Flow Sheath Fluid (# 342003) utilizar PBS 1x comercial (filtrado e autoclavado) ou a solução de PBS 1x preparada no laboratório conforme a seguinte formulação:

- **Para cada litro de solução PBS 1X:**
  - 8,0 g NaCl
  - 0,2 g KCl
  - 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- Adicionar **água ultrapura** até 1 litro e ajustar o pH para 7,2;
- Filtrar contra partículas superiores a **0,22 µm**;
- Autoclavar e manter em geladeira (2 a 8 °C).

Alternativamente, pode ser preparada uma solução de PBS 10X para posterior diluição 1:10 e uso:

- **Para cada litro de solução PBS 10X:**
  - 80,0 g NaCl
  - 2,0 g KCl
  - 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O
  - 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- Adicionar **água ultrapura** até 1 litro e ajustar o pH para 7,2;
- Filtrar contra partículas superiores a **0,22 µm**;
- Autoclavar e manter em geladeira (2 a 8 °C).
- **Antes do uso, para cada litro de solução PBS 1X:**
  - Pipetar 100 mL de PBS 10X;
  - Completar o volume para 1L com água Milli-Q

<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO</b>		
<b>BioRep</b> 	<b>POP N. 013 (ANEXO IV)</b>	Elaboração: 11/2022
	<b>CITÔMETRO CELL SORTER BD FACSMELODY</b>	Versão: 2.0 (05/2025)

## **ANEXO IV – DILUIÇÃO DO DETERGENTE CONCENTRADO BD (Ref. 660585)**

### **Para uso repetido do equipamento:**

- Pipetar 3 mL de detergente BD (BD Detergent Solution Concentrate - Ref. 660585);
- Diluir em 197ml de água milli-Q;
- Quantidade suficiente para duas semanas de uso;

### **Para uso único**

Para cada 1 mL de detergente diluído:

- Pipetar 15 µL de detergente BD (BD Detergent Solution Concentrate - Ref. 660585);
- Diluir em 985 µL de água milli-Q;

Para 4 mL total (caso equipamento não seja utilizado em breve ou em duas semanas)

- 60 µL de detergente em 3940 µL de água Milli-Q