



UNIDAD DE CITOMETRÍA

**CITÓMETROS ANALIZADORES
CITÓMETRO SEPARADOR/ANALIZADOR**

UNIDAD DE MICROSCOPIA

**M. CONVENCIONAL: M. LASER CONFOCAL
EPIFLUORESCENCIA Y MULTIFOTÓN
CAMPO CLARO
Contraste de Fase
(DIC-Ph)**

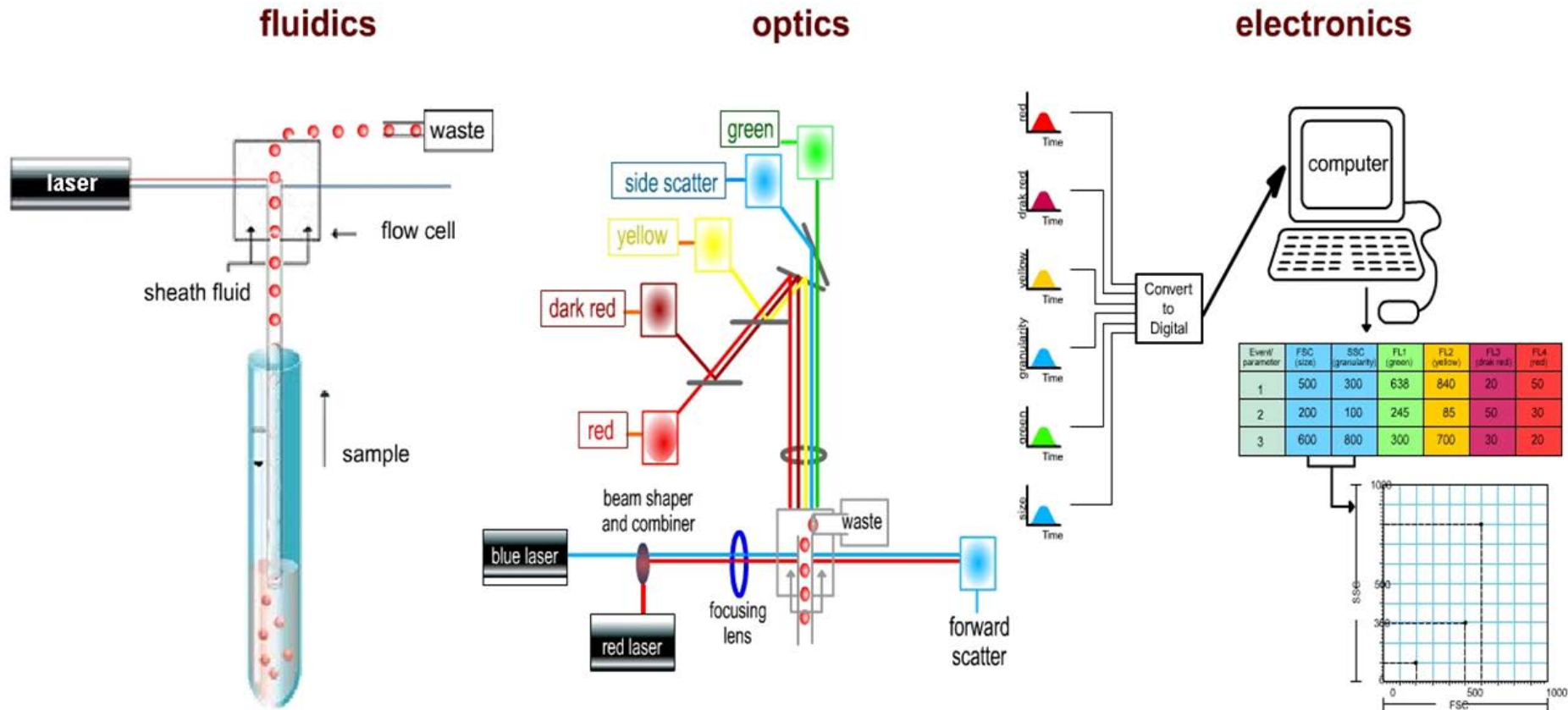
EQUIPAMIENTO COMPLEMENTARIO

**AUTOMacs
LABORATORIO**

CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es una técnica analítica que permite la cuantificación de características físicas y químicas de células o partículas en suspensión que producen una señal individual al interferir con una fuente de luz.

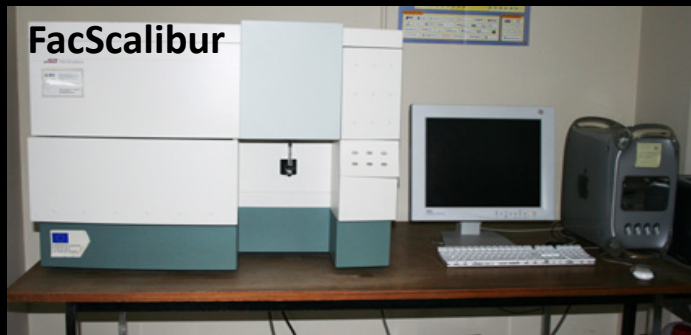
ESQUEMA DE UN CITÓMETRO DE FLUJO



Citómetros de flujo analizadores



- **FACScan** equipado con un láser azul 488 nm (3 detectores de fluorescencia)

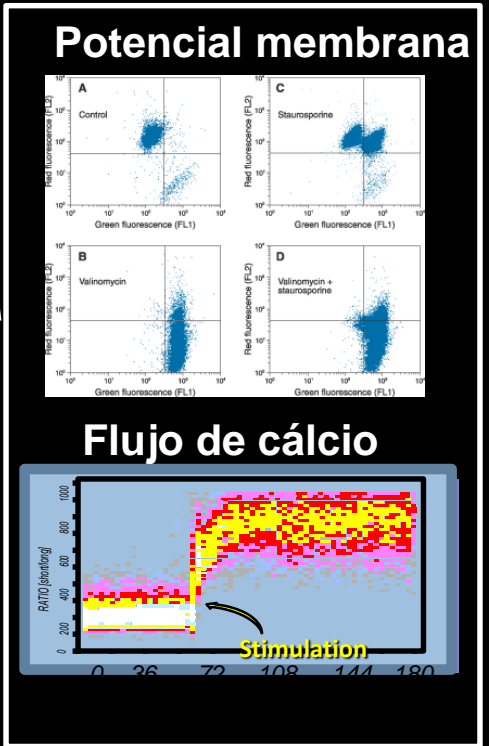
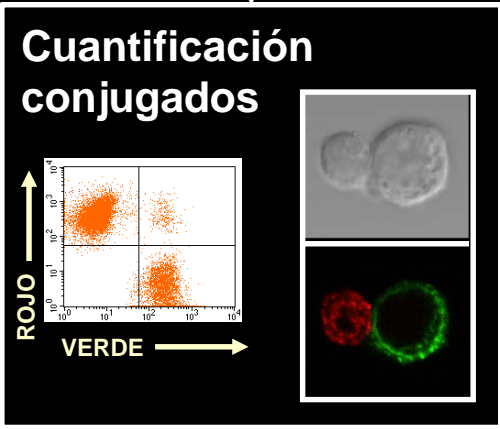
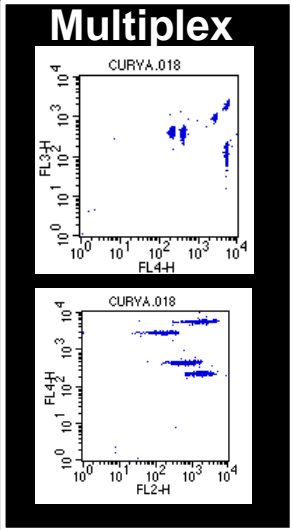
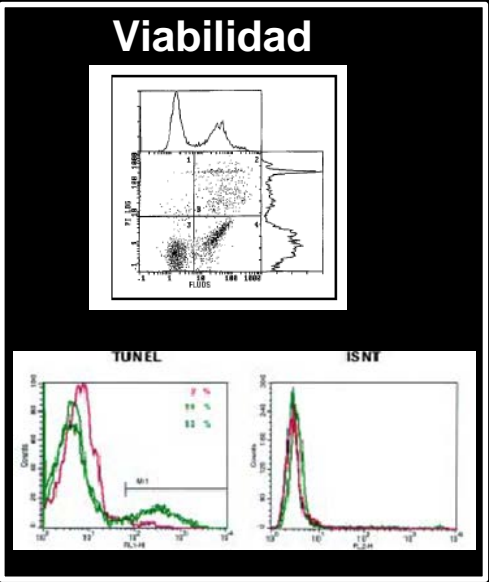
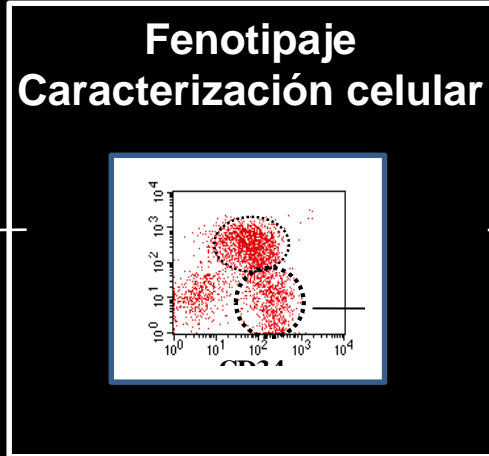
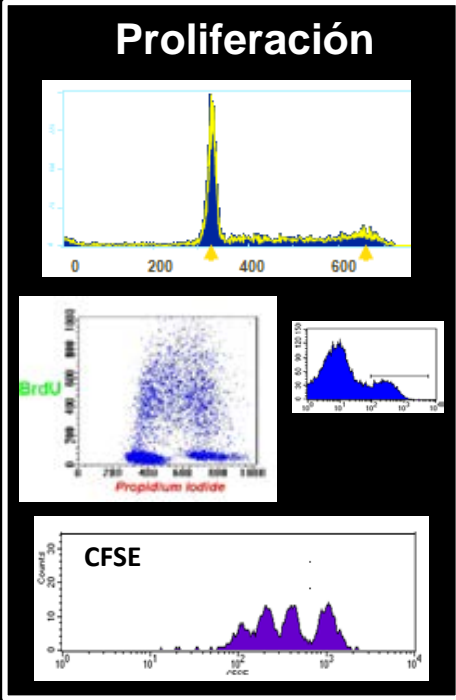


- **FACScalibur** equipado con dos láseres: 488 y 630nm (4 detectores de fluorescencia)



- **FACSria III** equipado con 3 láseres: 488, 630 y 405 nm (11 detectores de fluorescencia)
 - > N° de fluorocromos
 - análisis de > N° poblaciones
 - ↑ **sensibilidad y resolución**

Aplicaciones de la citometría de flujo (Análisis):



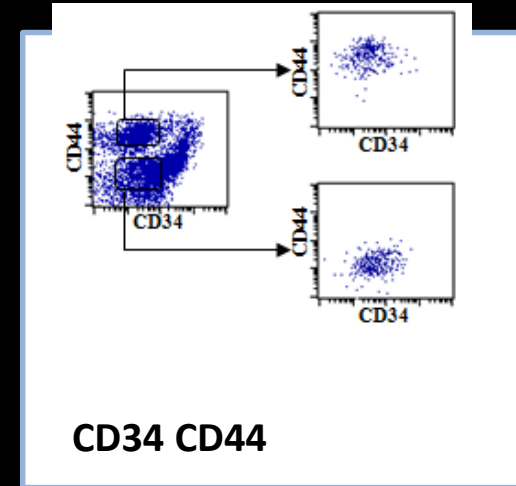
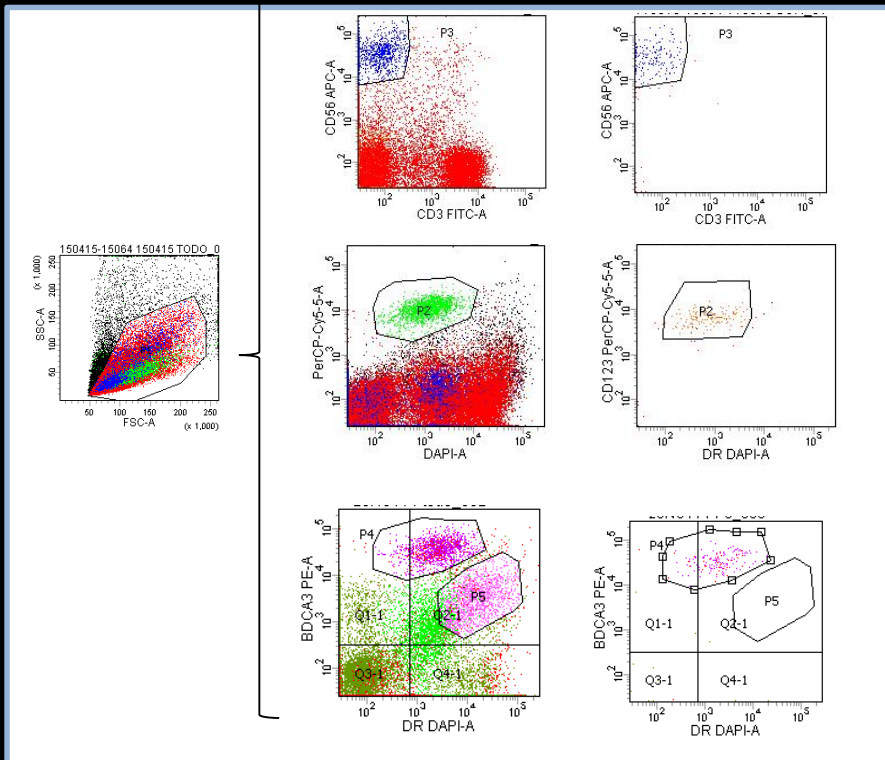
FACS Aria III sorting: >velocidad

Separa hasta 4 poblaciones
Unidad de clonaje en placa

➤ Digitalización de la señal en los detectores

↑ velocidad de procesamiento y facilita las decisiones de "sorting"

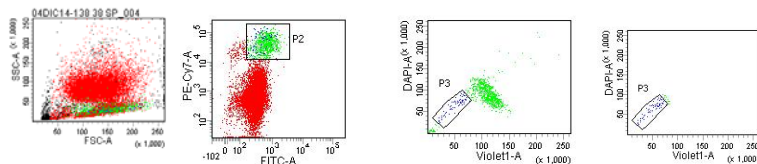
CD3 BDCA3 CD56 CD123 MHCII



Células aisladas para:

- Cultivo:
 - diferenciación
 - expresión de transgenes
 - clonaje (single cell)
 - líneas
 - ensayos específicos

SP BM



- DNA- RNA. Genómica.
- Proteínas- proteómica.
- Imagen

Microscopía de fluorescencia



Zeiss Axioplan 2 (1999)

Campo claro, oscuro y fluorescencia

Permite adquirir imágenes en distintos planos focales (Platina motorizada en eje-z)

Cubos de fluorescencia para azul, verde, rojo y triple

2 Cámaras digitales: B/N y color

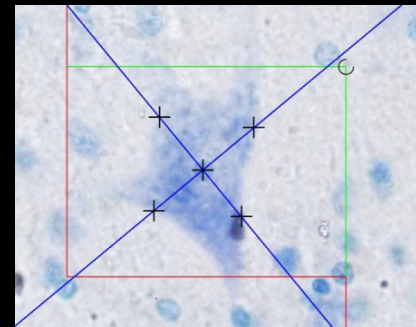
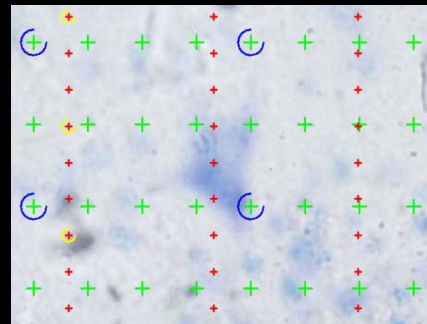


Olympus BX61 TRF-1-5 (2013) para ESTEREOLOGÍA:

permite la cuantificación de parámetros morfométricos mediante muestreo aleatorio y sistemático, aplicando cálculos estadísticos

Platina que permite hasta ocho portas

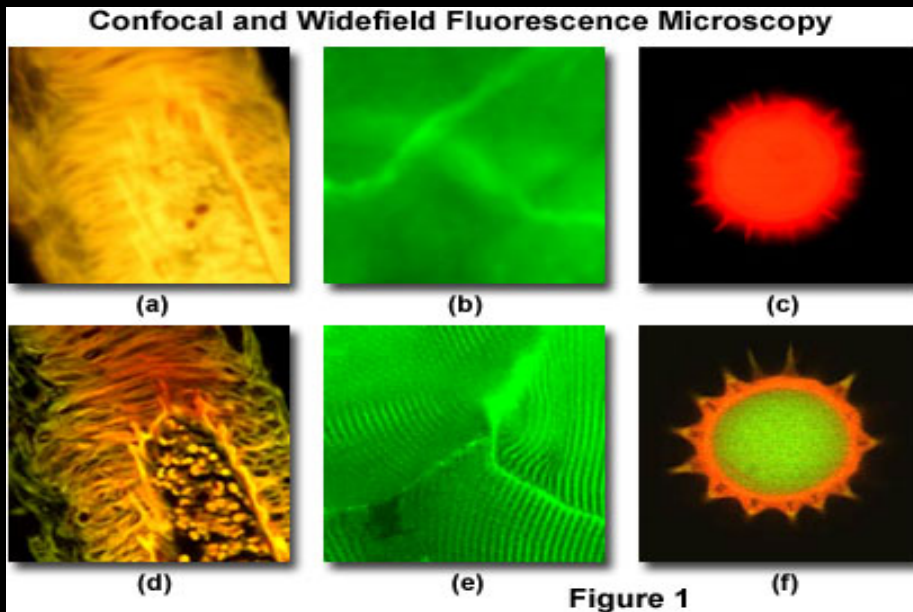
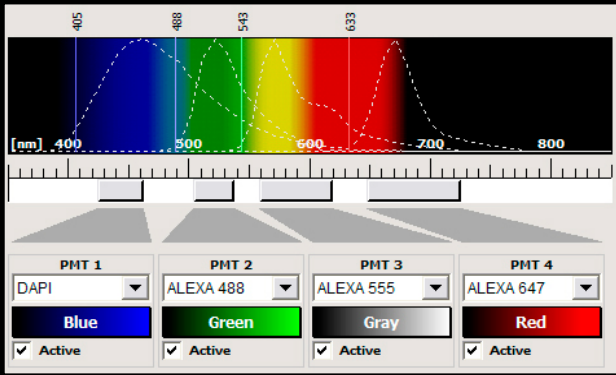
Software para adquisición y tratamiento estereológico de las imágenes NewCAST



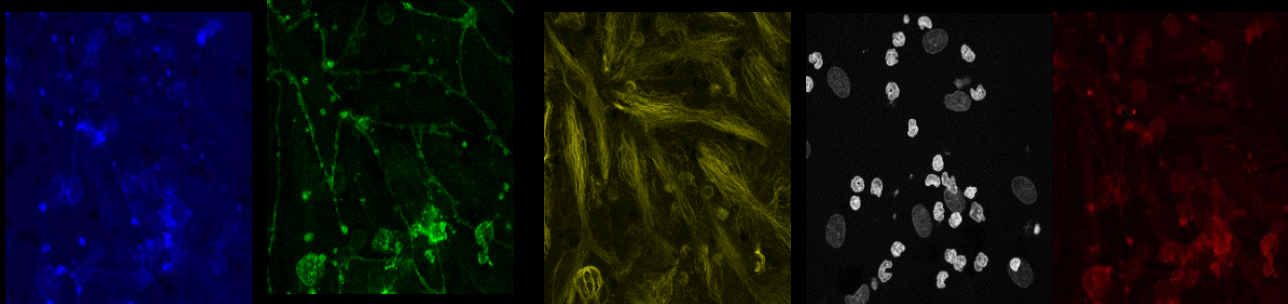
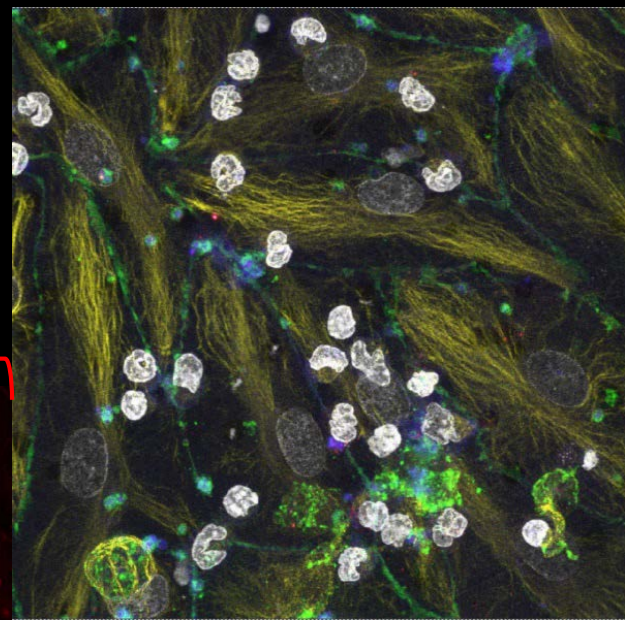
Microscopia confocal multispectral

Iluminación por láseres

Recoge fluorescencia en planos concretos

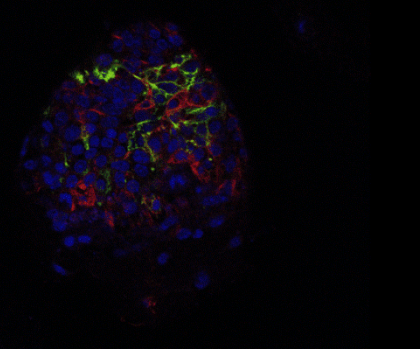
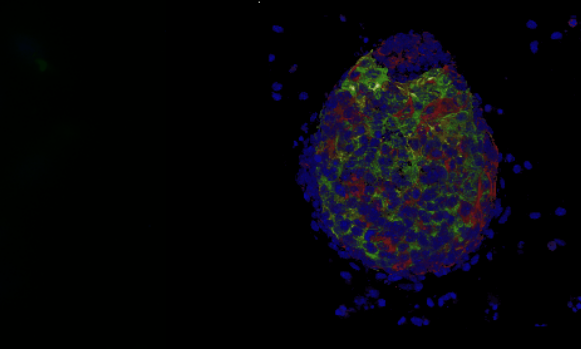
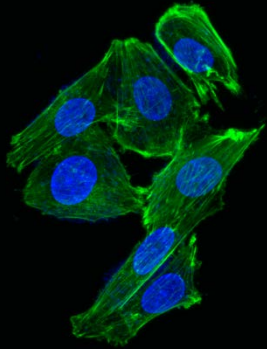


Permite elegir la longitud de onda que se quiera utilizar usando cualquier fluorocromo y sus combinaciones

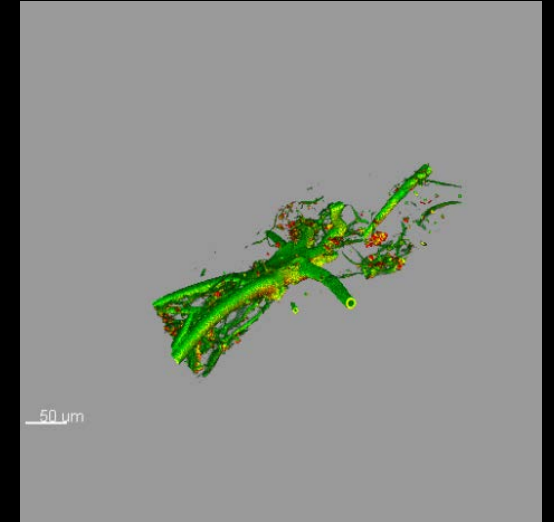
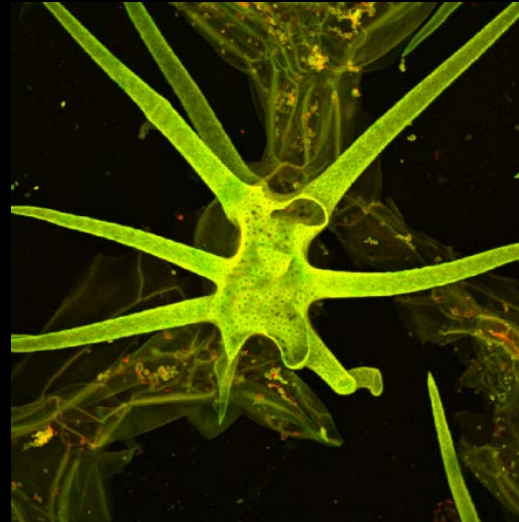
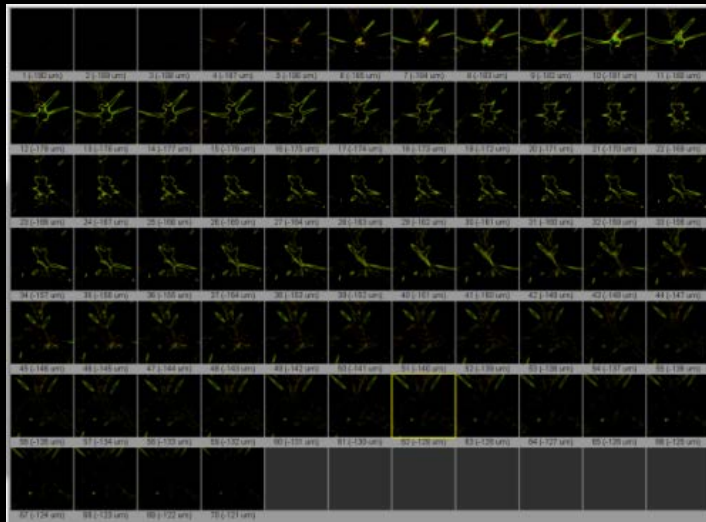


Microscopía Confocal Multiespectral: Aplicaciones I

Secciones ópticas

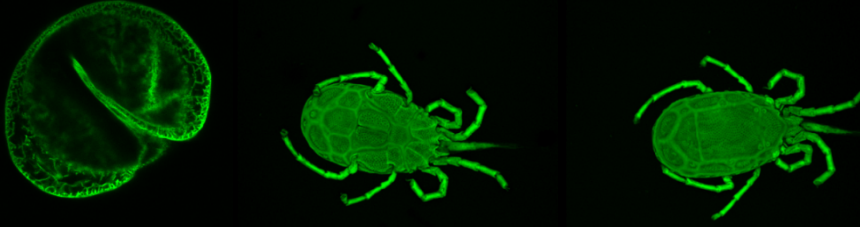


Reconstrucción 3D

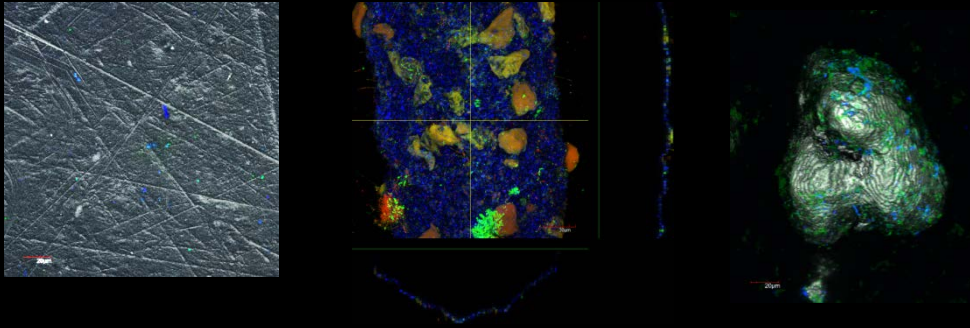


Microscopía Confocal Multiespectral: Aplicaciones II

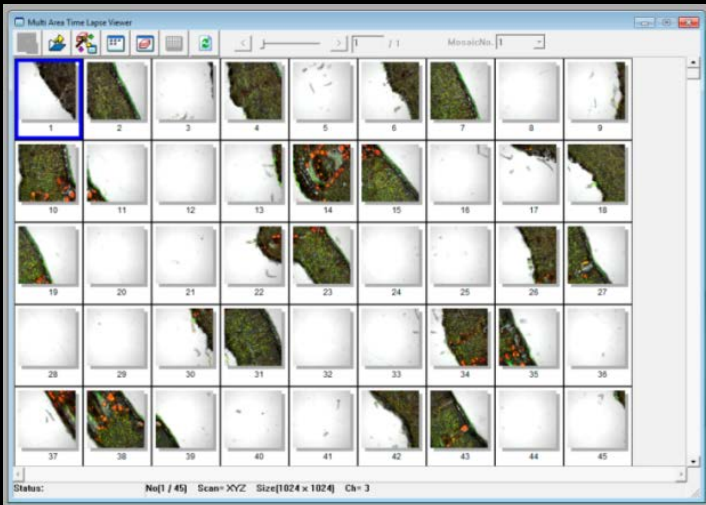
Proteínas fluorescentes y autofluorescencia



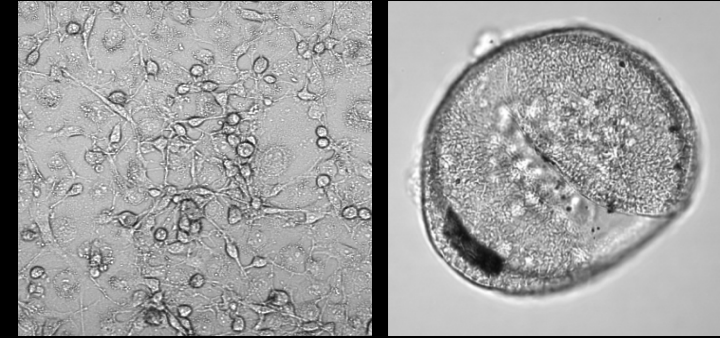
Reflexión de laser: Estudio superficie



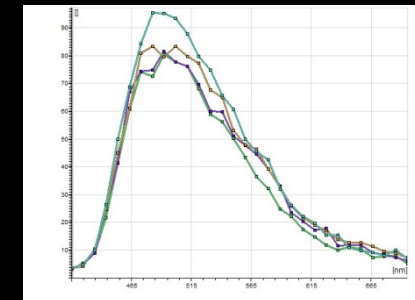
Integración multiáreas



Luz Transmitida

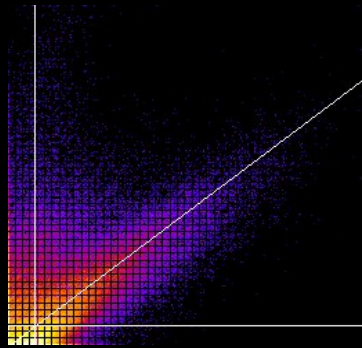
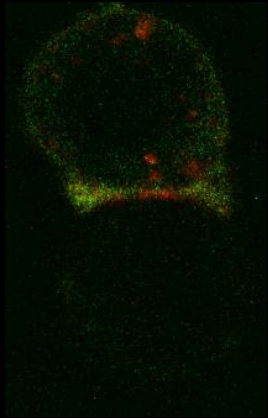


λ scan: Espectro de emisión



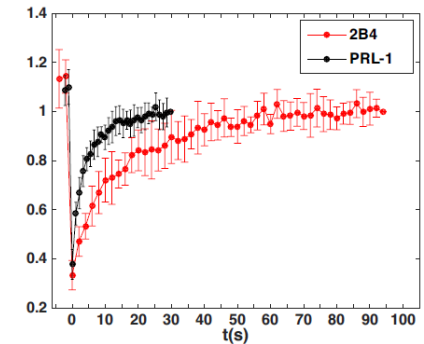
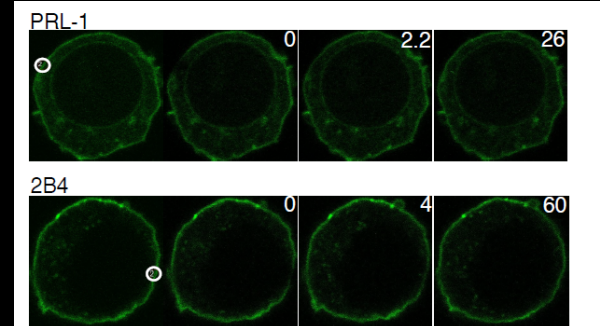
FRAP: Fluorescence recovery after photobleaching

Colocalización

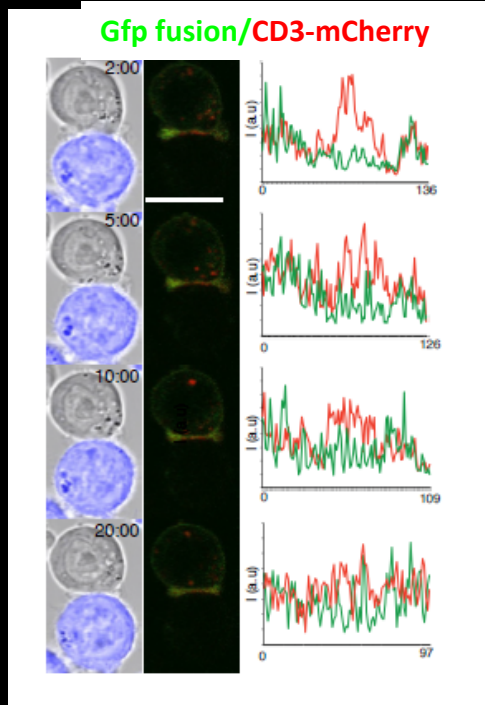


Proteína 1

Proteína 2



Incubador células vivas: Cinéticas



FRET: Fluorescence resonance energy transfer . Interacciones moleculares

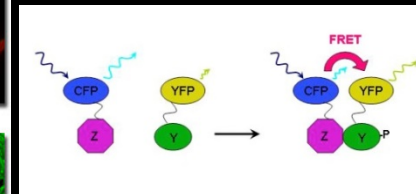
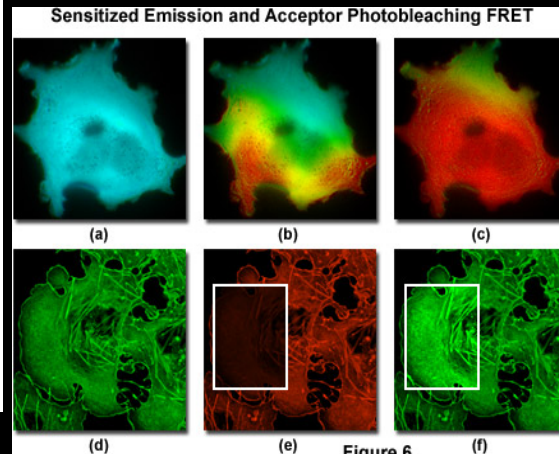


Figure 6

Microscopio Confocal Leica SP-2

- 9 líneas de láseres
- Láser multifotón
- 7 detectores
- Motorización completa
- Cámara incubación

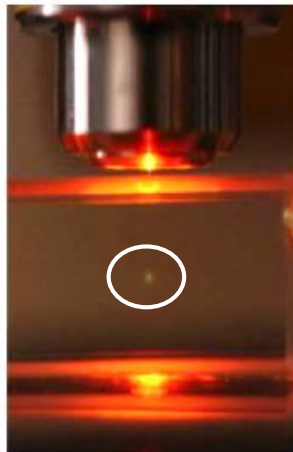


Láser multifotón que ilumina solo un plano permitiendo mayor penetración, análisis de muestras más gruesas y menos photobleaching

1-photon vs. 2-photon

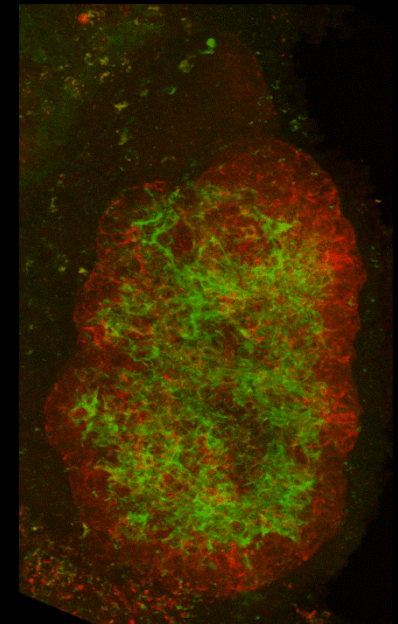


Fluorescence from out of focus planes



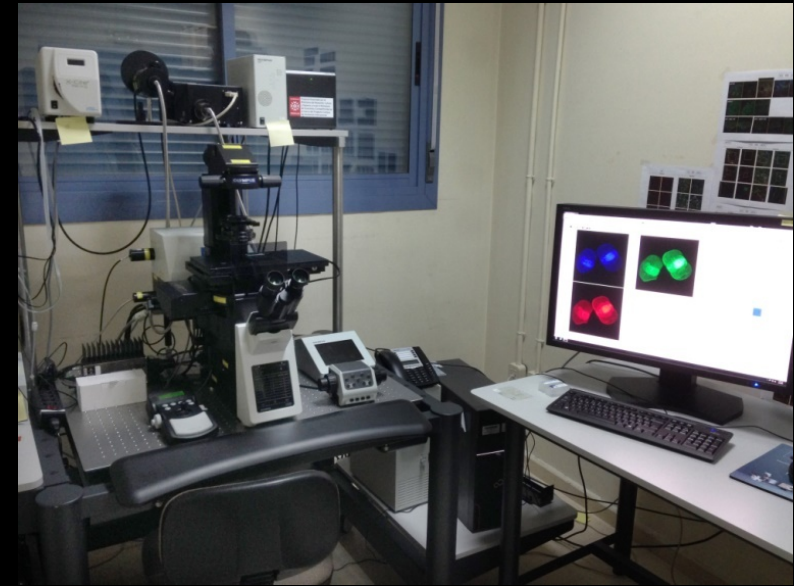
Fluorescence from focal spot only

Photos by Steve Ruzin



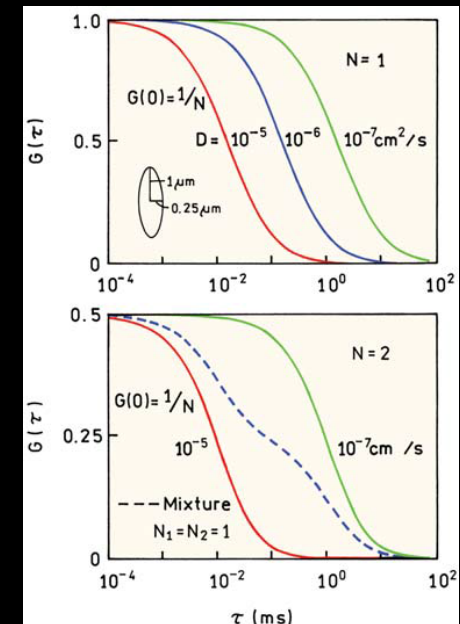
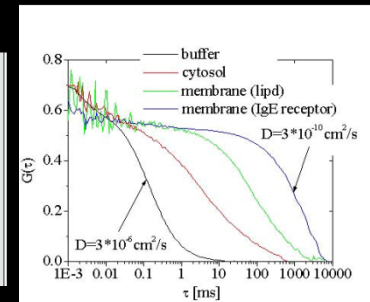
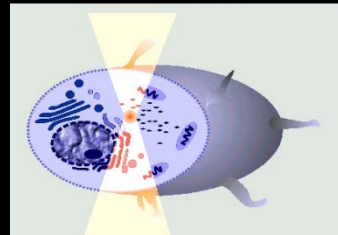
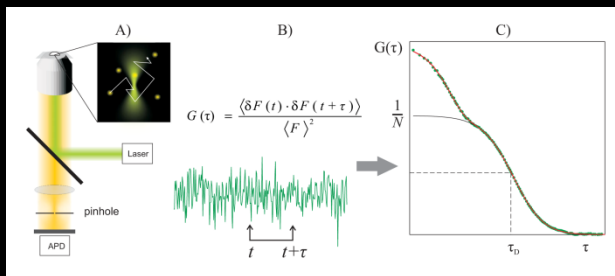
Microscopio confocal Olympus FV1200

- 7 líneas de láseres
- 4 detectores
- Motorización completa
- Cámara incubación (Tª , CO2)
- Módulo FCS con dos detectores



Módulo FCS (Fluorescence correlation spectroscopy)

Detección de las fluctuaciones que se producen en la señal cuando las partículas fluorescentes pasan por el volumen confocal. **Análisis de movilidad de moléculas**



Different diffusion among compartments

Software de análisis de imagen (IMARIS, Metamorph, Fluoview y LCS)

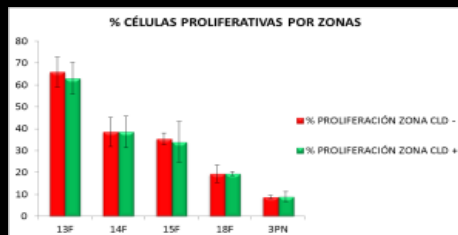
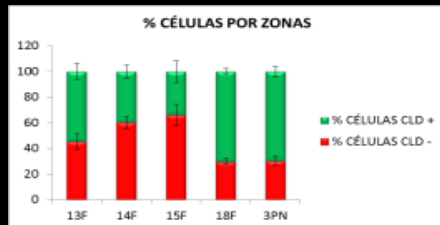
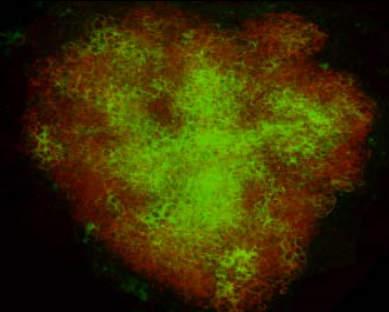
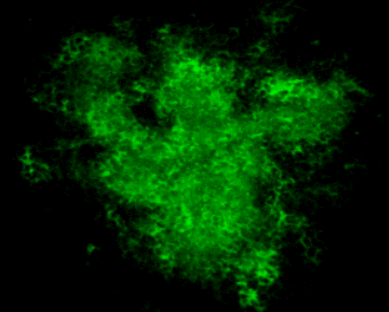
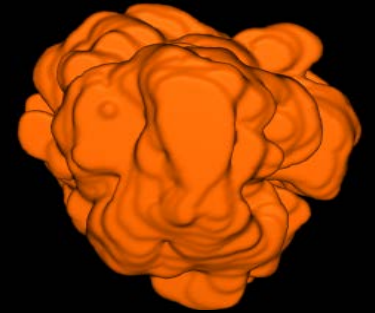
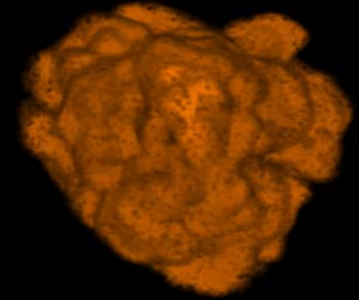
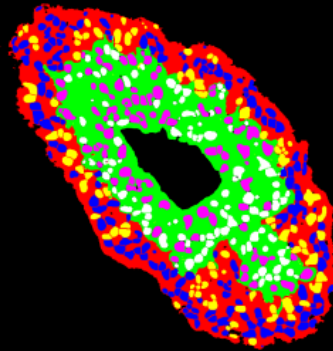
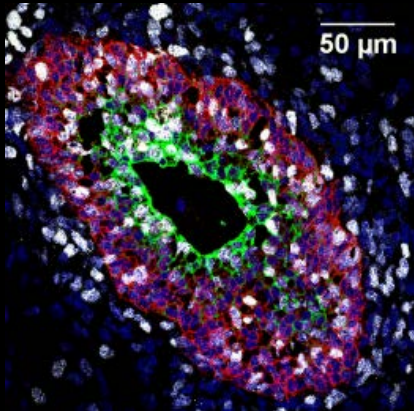
Reconstrucción 3d

Segmentación

Aplicar filtros

Análisis morfométrico: Áreas, partículas, número, etc

3D, Colocalización, FRET



EQUIPAMIENTO COMPLEMENTARIO

LABORATORIO general

- Centrífugas
- Minifugas
- Cabina de flujo laminar
- Campana de extracción de gases
- Lector de placas ELISA
- Espectrofotómetro
- Termocicladores
- Transiluminador
- Criostato (criocortes)
- AutoMACS (separación magnética)



SALA de CULTIVOS

- Cabina de flujo laminar
- Incubadores
- Microscopio invertido con cámara CCD





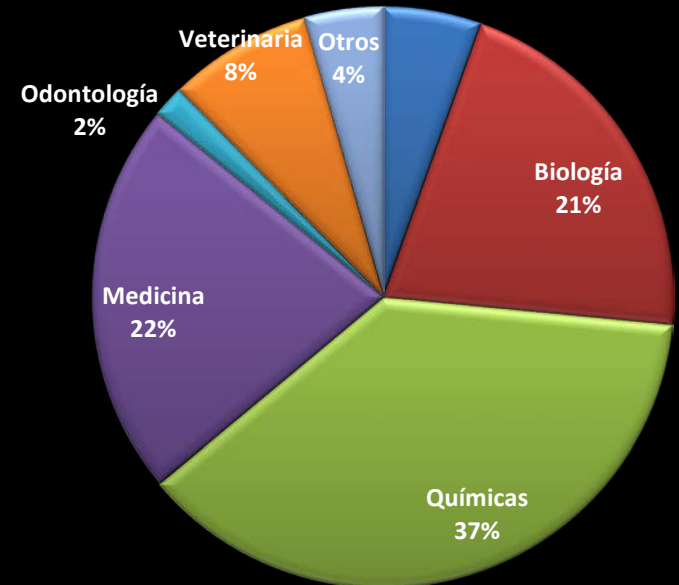
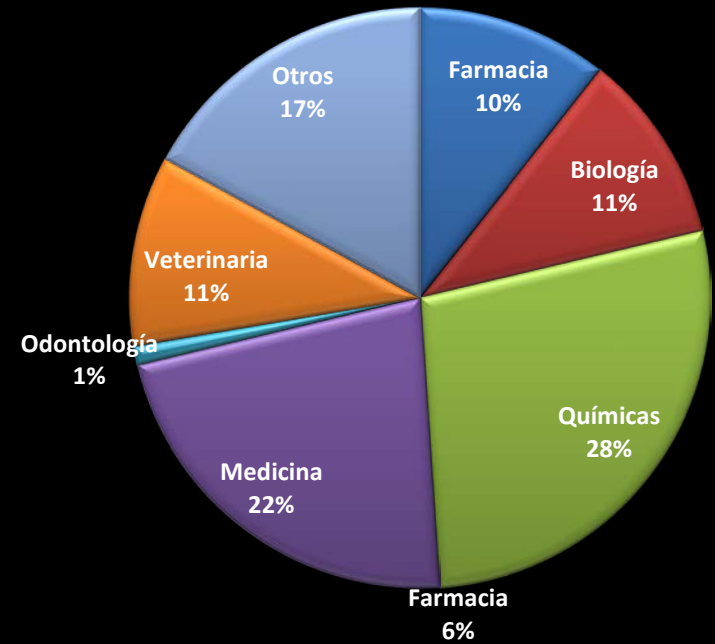
Área biosanitaria

- Estudio de las diferentes poblaciones celulares de diferentes órganos y tejidos
- Comportamiento de poblaciones celulares frente a la exposición a agentes externos (contaminación, nutrición, fármacos, materiales artificiales, prótesis, etc.)
- Crecimiento de distintos tipos celulares sobre diferentes biomateriales

Área biotecnológica

- Caracterización de poblaciones microbiológicas de interés industrial o ambiental (levaduras, bacterias, etc.), de distintas muestras como cultivos, suelos, aguas, o birreactores.
- Análisis del efecto sobre distintas poblaciones de agentes externos (contaminantes, susceptibilidad a agentes descontaminantes, etc)
- Reproducción animal. Evaluación de calidad de esperma *ex vivo* y tras su almacenamiento, selección de sexo, etc
- Análisis y biotecnología de plantas como el estudio del nivel de ploidía

PROYECTOS 2016 (94)



HORAS FACTURADAS 2016



<https://www.ucm.es/citometriamicro>

PERSONAL TÉCNICO DEL CCMF

Amalia Vázquez Gutiérrez
Licenciada en Farmacia
Área de Citometría

Carmen Hernández López
Doctora en Biología
Área de Citometría

Juan José Muñoz Oliveira
Doctor en Biología
Área de Microscopía de
Fluorescencia

Alfonso Cortés Peña
Licenciado en Biología
Área de Microscopía de
Fluorescencia

Luis Miguel Alonso Colmenar
Doctor en Biología
Área de Microscopía de
Fluorescencia

Carlos Pérez Martín
Doctor en Biología
Técnico PICATA CEI

DIRECTOR DEL CCMF

Agustín Zapata González
Catedrático de Biología Celular
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid

2 Técnicos en formación:
Empleo Juvenil MINECO (Licenciado)
Empleo Juvenil CM (FP2)