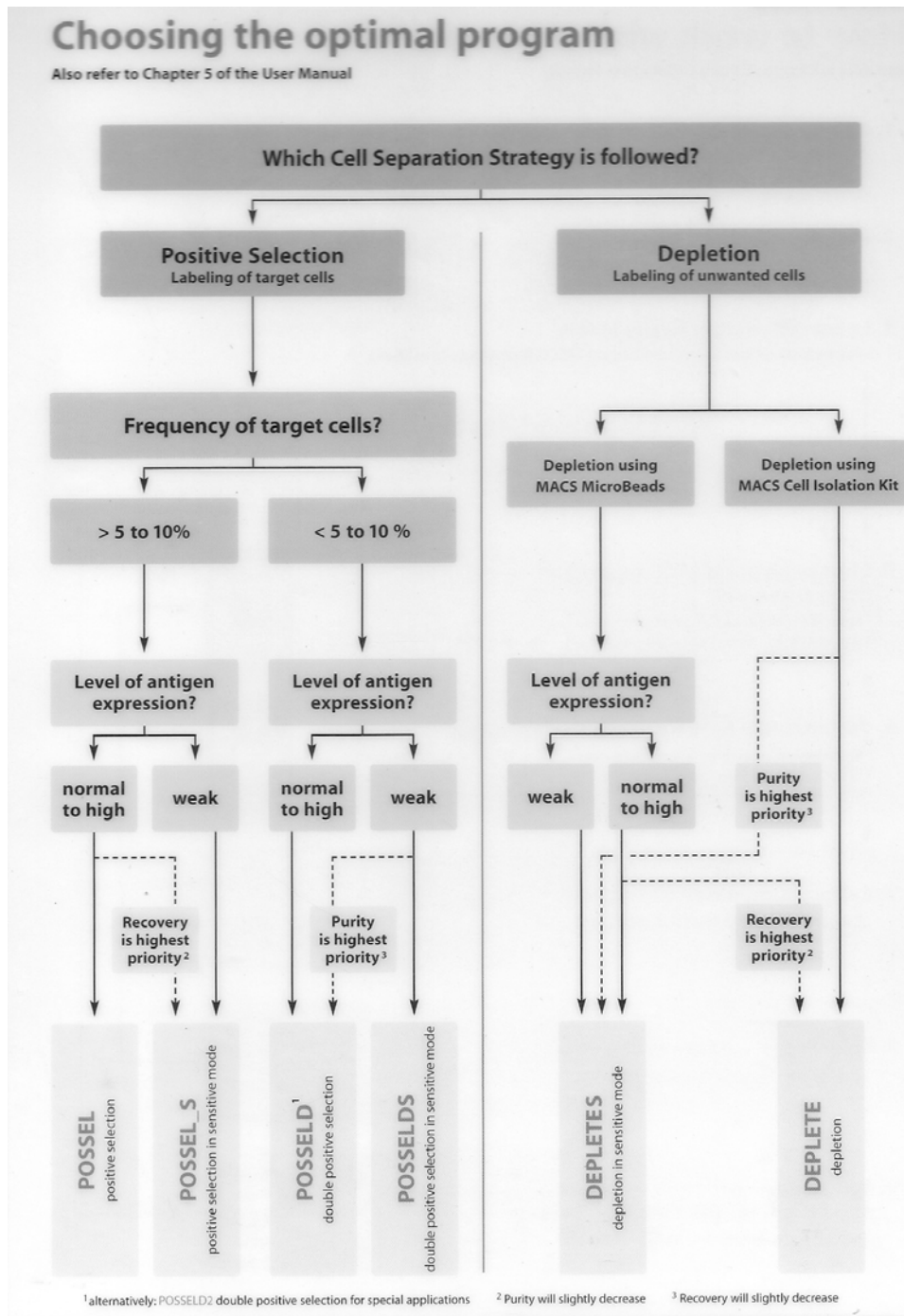


El AutoMACS permite la separación biomagnética de células marcadas con “microbeads” (bolitas magnéticas)

FUNCIONAMIENTO:

1. Elegir la separación apropiada:



2. Preparar la muestra celular a separar:

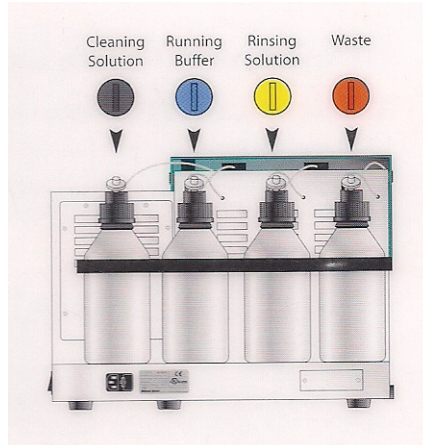
Las células deben estar en suspensión, evitando agregados y células muertas. Para una cantidad superior a 10^8 células resuspender en 500ul de PBS, 2mM EDTA, 0.5 % BSA, antes de llevar a cabo la separación. Escalar el volumen en el cual se resuspenden las células dependiendo del número de células con el que estemos trabajando.

3. Marcaje de las células magnéticamente:

Seguir las instrucciones de la casa comercial donde se adquirieron las MicroBeads (data sheet).

4. Preparar el AutoMACS para la separación :

- Comprobar que las botellas tienen sus correspondientes soluciones:
 - **Running Buffer:** MACS Running Buffer. Alternativamente: PBS 2mM EDTA, 0.5% BSA. (botella marcada azul)
 - **Rinsing Solution:** PBS 2mM EDTA (botella marcada amarilla)
 - **Cleaning Solution:** 70% etanol, diluida a partir de etanol 100%
 - **Comprobar que la botella de residuos esté vacía (waste)**



- Quitar los eppendorfs situados en las agujas y colocar tubos falcon vacíos en cada una de ellas, y en la aguja que va a coger la muestra.
- Encender el AutoMacs (botón ON/OFF) en el lateral derecho.
- En la pantalla aparecerá un menú principal (Fig 1). Seleccionar el proceso a realizar tocando en la pantalla. Si es la primera separación del día, hay que seleccionar para hacer un **CLEAN**. El AutoMACS llenará primero el circuito (tubos, columnas y puertos) de etanol, después lo llenará con Rinsing Solution (PBS 2mM EDTA) y después lo dejará todo en Running Buffer listo para la separación. Todo este proceso tardará más o menos 5 minutos.

- Coloca el tubo con las células que vas a separar en la aguja que cogerá la muestra, y coloca dos tubos vacíos en el puerto “neg” y “pos” que corresponda.
- Una vez realizado este proceso, seleccionar **SEPARATION**, del menú principal (fig1), y se abre otro menú, donde hay que seleccionar el tipo de separación a realizar (fig2). Pulsar donde pone **OK**, y la separación empieza.

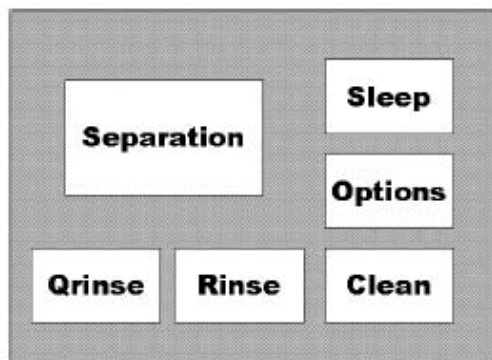


Fig.1 Main menu.

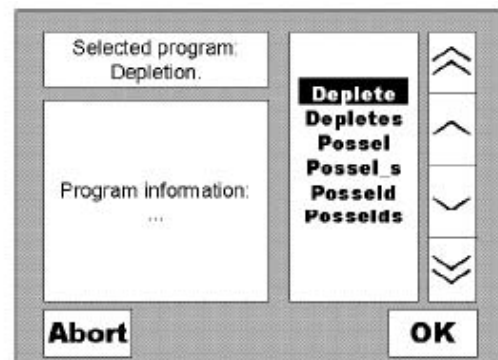



Fig.2 Separation menu.

- La fracción positiva de células (aquella que ha sido marcada con las “beads”) saldrá por el puerto **pos1** o **pos2** dependiendo del tipo de separación que se haya seleccionado. El AutoMACS te lo indicará. La fracción negativa (células sin “beads”) siempre saldrá por el puerto **neg**.
- Cuando la separación ha terminado aparece en la pantalla el menú principal (fig1).
- Colocar nuevamente tubos falcon en cada uno de los puertos y en la aguja que coge la muestra y realizar el lavado del aparato. Si se va a volver a utilizar, seleccionar **Qrinse** o **Rinse**. Si lo va a usar otro usuario el mismo día, seleccionar **Clean**. Si eres el último usuario del día, seleccionar **Sleep**. Una vez que termine el aparato de realizar este proceso, quitar los tubos y colocar eppendorfs con etanol en cada uno de los puertos y colocar un tubo con etanol en la aguja que adquiere la muestra. Apagar el AutoMACS.
- **NO OLVIDAR: vaciar la botella de residuos.**

	AUTOMACS	Pag. 1 de

PROGRAMAS DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN

1. Programas de limpieza (Rinsing programs):

- ❖ **Orinse:** programa de limpieza corto con Running Buffer. Duración aproximada de 2,5 min. Se realiza entre separaciones de células frecuentes (> 5-10%)
- ❖ **Rinse:** programa de limpieza con Rinsing Solution y Running Buffer. Duración aproximada de 5 min. Entre separaciones de células menos frecuentes (< 5-10%)
- ❖ **Clean:** programa de limpieza entre separaciones para evitar contaminaciones y entre diferentes tipos de separaciones. Duración aproximada de 7,5 min
- ❖ **Safe:** programa de limpieza en caso de contaminación. Se realiza con Safe Solution (lejía 10%). Se llenan las tres botellas con lejía y se coloca un tubo con lejía en la aguja por donde se adquiere la muestra. Se realiza uno o varios Clean. Para eliminar esta solución del sistema, se sustituyen las botellas por los líquidos correspondientes: Running Buffer, Rinsing Solution y etanol 70% y se realizan varios Clean. Una vez finalizado el proceso se colocan eppendorfs con etanol en los puertos y un tubo con etanol en la aguja de adquisición de la muestra. Duración aproximada de 30 min.


MANTENIMIENTO

1. Mantenimiento diario:

- **Clean:** Se realiza siempre que se enciende el aparato. Dura 7,5 min, y limpia las columnas y el circuito con Rinsing Solution y Running Buffer.
- **Sleep:** Se realiza siempre antes de apagar el AutoMACS. Se lava con Rinsing Solution y se llena el circuito de Cleaning Solution (etanol 70%) antes de ser apagado.

2. Mantenimiento periódico:

- **Cambio de columnas: (Column Exchange):** cambio de las columnas de separación. Cada 2 semanas o después de más de 100 separaciones. (seguir instrucciones según manual).15 min de duración
- **Store:** cambiar las columnas y llenar el circuito con Cleaning Solution. Cuando el aparato no se usa frecuentemente. 10 min. de duración
- **Safe:** programa de descontaminación con lejía. Cada 6 meses. 30 min de duración.

	AUTOMACS	Pag. 1 de

MODO DE ACTUACIÓN ANTE UN ACCIDENTE COMÚN

Trabajar siempre con guantes y bata/pijama para protegernos ante posibles riesgos.

Estos posibles riesgos que podemos tener al trabajar con el AutoMACS pueden ser:

- Que al manipular la muestra a separar se derrame, o que se derrame la muestra ya separada. Si esto ocurre, recoger con un papel, limpiar y desinfectar la zona. Seguir el protocolo establecido para derrame de sustancias biológicas:
 - ponerse dos pares de guantes y cubrir el derrame con papel absorbente.
 - verter un desinfectante (por ejemplo lejía) para neutralizar y dejar actuar unos minutos.
 - retirar el papel y eliminarlo en el contenedor de residuos biosanitarios.
 - limpiar y desinfectar las superficies contaminadas.
- Que al manipular las botellas de vidrio se nos caigan y se rompan, esto puede producirnos cortes o heridas. Las labores de limpieza del material roto se realizarán con los Equipos de Protección adecuados (por ej., guantes para protección contra riesgos mecánicos). Recoger con mucho cuidado los trozos de cristal (sin cortarnos) y desechar en el cubo para material de vidrio. Limpiar la zona.
 - Ante un corte se aconseja lavar bien, con abundante agua corriente, durante 10 minutos como mínimo.
 - Observar si existieran fragmentos de cristal. Si los fragmentos son pequeños, retirarlos con gasa y pinzas, lavar la herida con agua y jabón y tapar con una venda o apósito. Si son grandes y la herida no deja de sangrar, colocar un apósito en la herida, aplicando una presión firme, y buscar asistencia médica inmediata.
- Que se nos caiga la botella de residuos. Implica los riesgos antes mencionados: que se derramen desechos biológicos y posible rotura de la botella de cristal. Actuar del modo antes mencionado.
- Al ser un aparato eléctrico, riesgo de electrocución por contacto directo e indirecto, generado por todo aparato que conlleva una conexión eléctrica. Efectuar el mantenimiento adecuado del aparato y realizar inspecciones y comprobaciones periódicas (comprobar que los cables no estén cortados/pelados y que estén en perfecto estado para poder enchufar el aparato a la red eléctrica sin riesgo alguno). Comprobar siempre que la zona donde esté situado el aparato no esté húmeda.