

Sistema de perfusión POC Mini.



Servicio de Microscopía Óptica y Confocal

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”. Madrid. Spain.



ÍNDICE

Materiales.

1.1 Bombas de inyección del medio

1.2 Sistema de llaves de control del medio

Metodología.

2.1 Calibración de las bombas de inyección del medio.

2.2 Montaje del sistema de perfusión (jeringuillas, tubos y llaves de paso)

2.3 Drenaje del sistema de flujo.

2.4 Montaje del dispositivo de sujeción de la muestra POC mini.

2.5 Experimento.

1. MATERIALES.

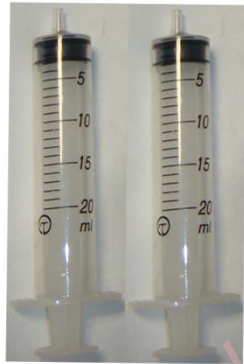
Lo que necesitamos para montar el sistema de perfusión cerrado es:

1. Dos bombas de inyección.
2. Dos jeringuillas del volumen que requiera nuestro experimento.
3. 2 Tubos de plástico con un adaptador en cada uno de sus extremos.
4. 1 Tubo de plástico con un solo adaptador.
5. 1 Tubo de plástico sin adaptadores.
6. Dispositivo de montaje de la muestra que se compone de varios elementos:
 - 6.1 Base metálica negra.
 - 6.2 Cubreobjeto de 30 mm de diámetro.
 - 6.3 Arandela de silicona grande de marco fino.
 - 6.4 Anillo de perfusión.
 - 6.5 Cubreobjeto de 20 mm de diámetro.
 - 6.6 Arandela de silicona pequeña
 - 6.7 Anillo de cierre.
 - 6.8 Rueda de cierre.
- 7 Sistema de llaves reguladores del medio.
- 8 Vaso de precipitados.
- 9 Pinzas de punta fina.

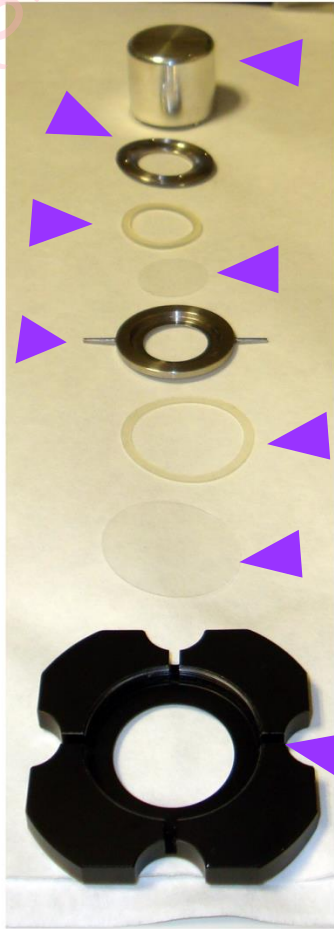
1



2



6



6.7

6.8

6.6

6.5

6.4

6.3

6.2

6.1

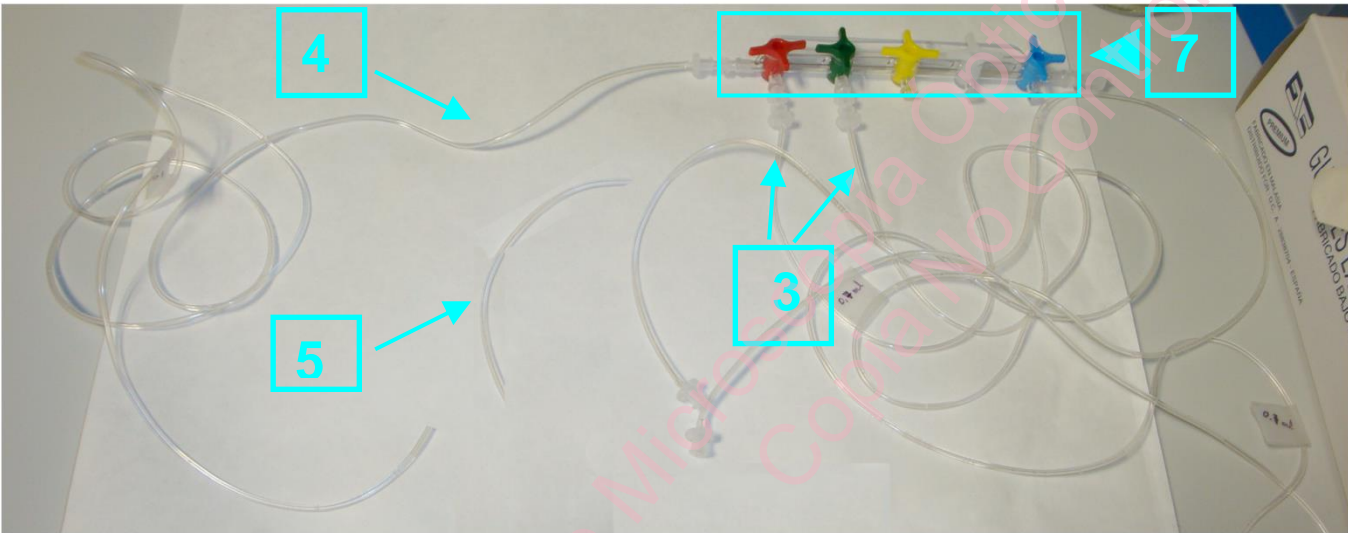
4



7

5

3

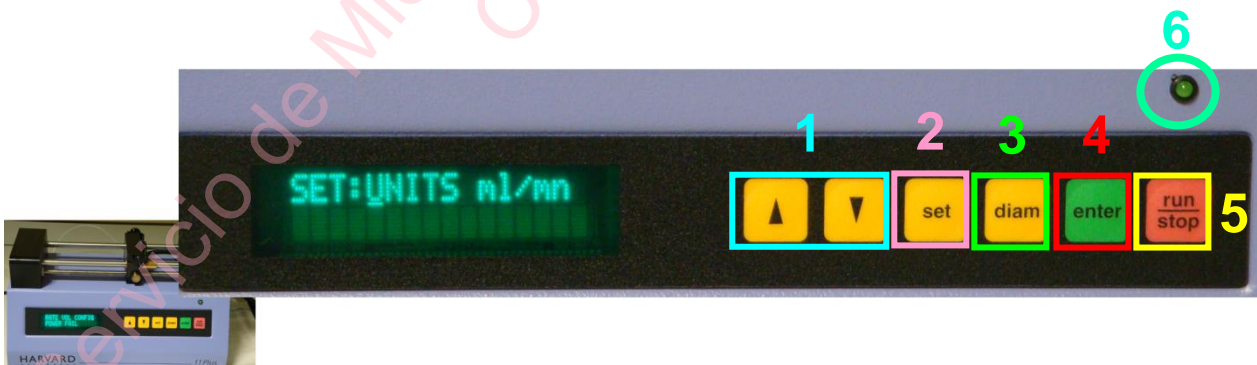


Servicio de Microscopía Óptica y Confocal (SMOC)

1.1 BOMBAS DE INYECCIÓN DE MEDIO.

En las bombas de inyección podemos encontrar las siguientes partes:

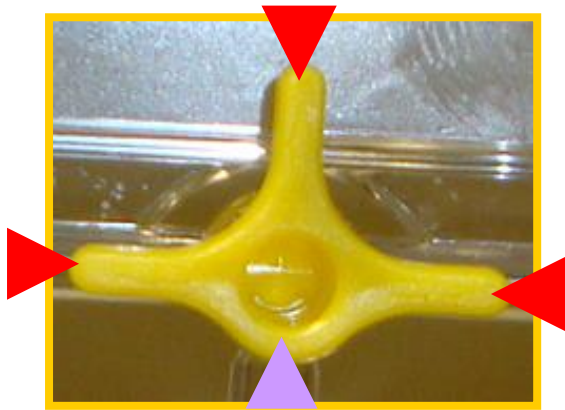
- 1. Flechas:** Permiten el movimiento, en ambos sentidos, del cursor en el menú. También se emplean para cambiar los números que aparecen en la pantalla (la flecha ascendente incrementa ese valor y la descendente lo disminuye)
- 2. Set:** Permite seleccionar la opción del menú sobre la que se encuentre el cursor en ese momento.
- 3. Diam:** Permite ajustar el diámetro de la jeringuilla que se está utilizando en el experimento. De esta forma la bomba podrá calcular la velocidad de flujo del medio.
- 4. Enter:** Este botón permite que el nuevo dato que hemos introducido para ajustar un setting del menú quede almacenado en la memoria del programa. También se utiliza para consultar el valor del flujo que hemos guardado anteriormente.
- 5. Run/Stop:** Activa o desactiva el motor que permite el empuje de medio hacia la muestra.
- 6. Indicador del flujo:** Cuando la bomba está inyectando medio la bombilla se enciende observándose una luz verde.



1.2 SISTEMA DE LLAVES DE CONTROL DEL MEDIO.

Según coloquemos las llaves de paso estaremos controlando que medio, de los dos que tenemos, es el que estamos o no dejando circular hacia las células.

Cada llave posee cuatro posiciones, de las cuales, tres tienen un agujero que permite el movimiento del flujo (la posición restante no tiene ese orificio, por lo que el paso del medio queda totalmente bloqueado)



Posición que permite el flujo del medio



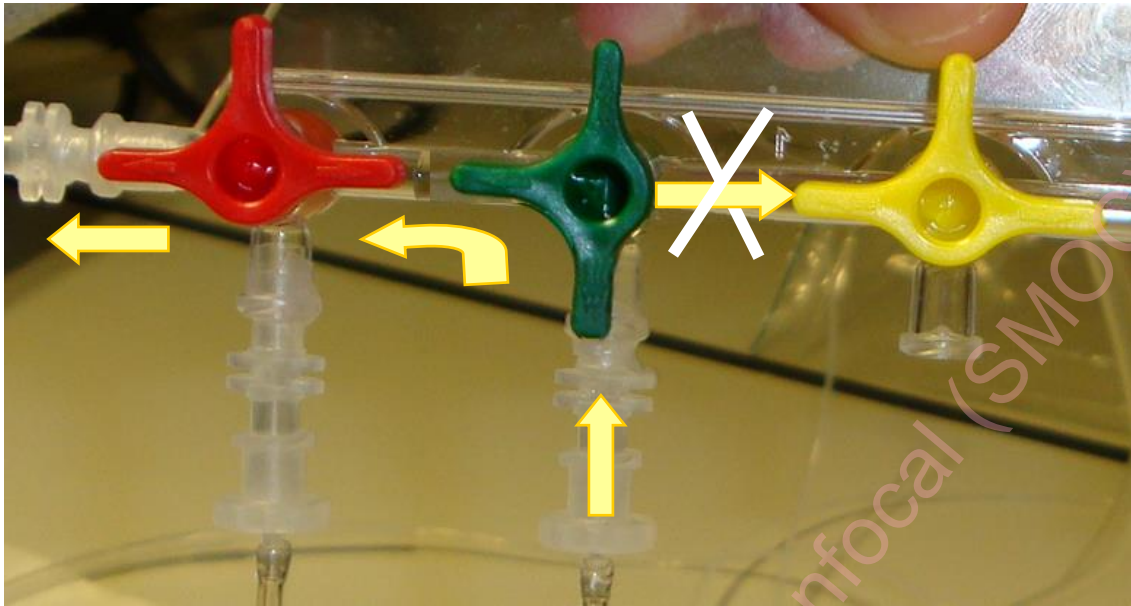
Posición bloqueo del medio.

Habitualmente asignaremos el “**medio con tratamiento**” a la llave que esté más próxima a la salida (en nuestro ejemplo la **llave roja**) y el “**medio normal**” a la llave contigua a la anterior (en nuestro caso la **llave verde**) (ver imagen inferior)



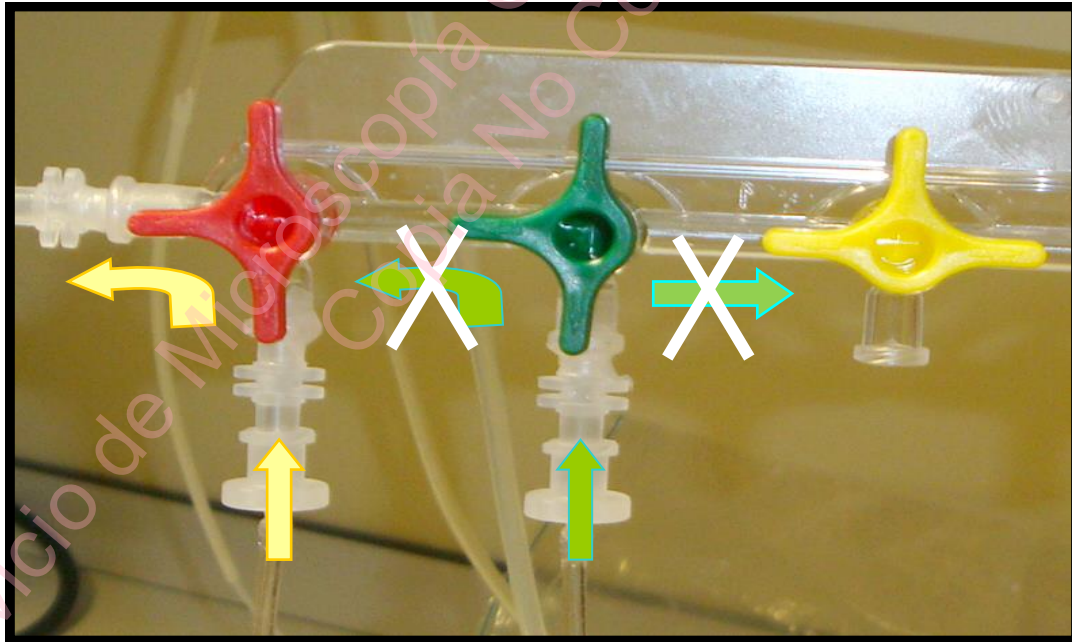
Los esquemas que mostramos a continuación nos indican cuales son las posibilidades que nos permite llevar a cabo el sistema de llaves:

Esquema 1:



Esquema 1: Con esta configuración permitimos, hacia la salida, el paso solo del medio que atraviesa la llave verde (no hay flujo hacia la derecha de ésta porque esa posición de la llave está obturada y por tanto bloquea el camino del medio.) La llave roja tiene su posición cegada en la entrada del otro medio y las dos posiciones abiertas en horizontal, permitiendo así, que el medio que proviene de la llave verde pase sin dificultad pero sin mezclarse con el que pasa a través de ella.

Esquema 2:



Esquema 2: Con esta configuración permitimos hacia la salida el paso solo del medio de la llave roja (no hay flujo hacia la derecha de ésta porque esa posición está obturada y por tanto bloquea el camino al medio) La llave verde también está abierta y dirige su flujo hacia la izquierda (es decir, dirección hacia la roja) pero no avanza porque se encuentra con la posición cerrada de esta última.

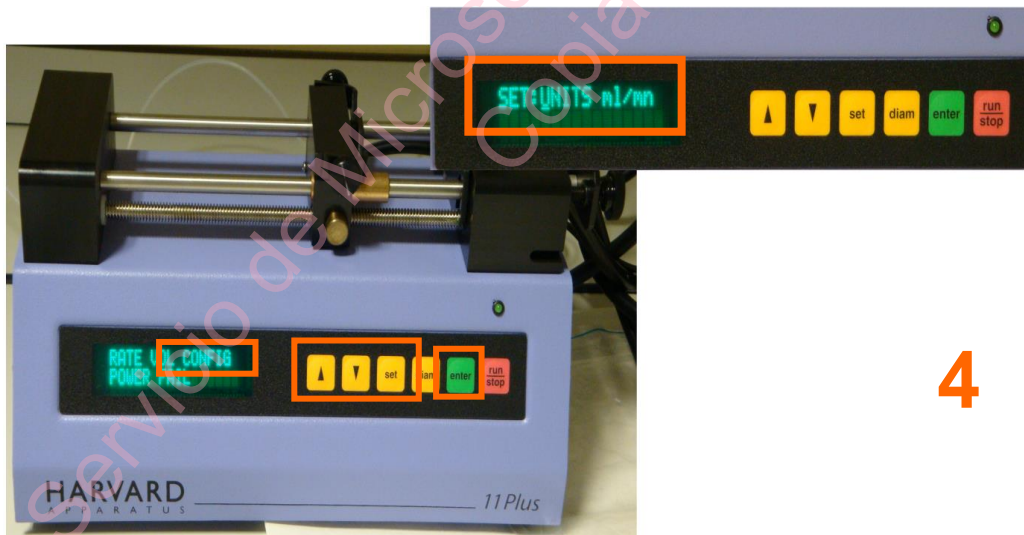
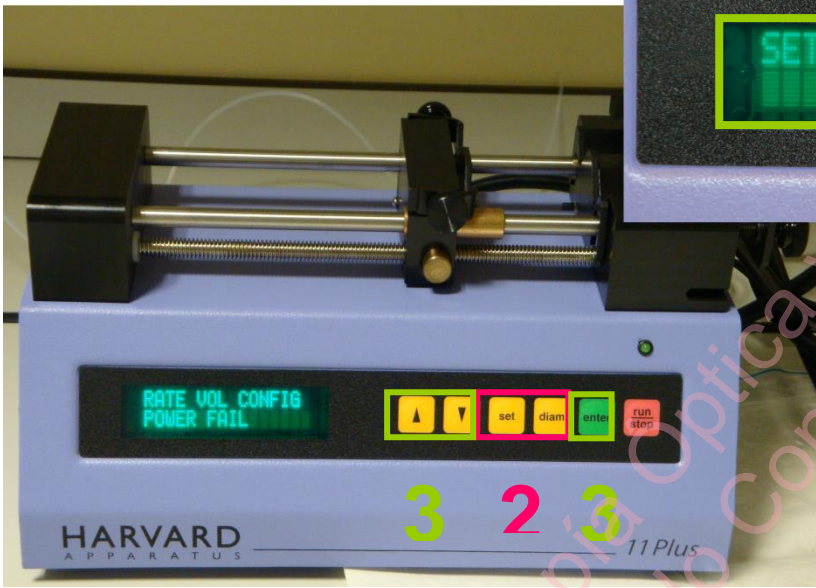
2. METODOLOGÍA.

A continuación, explicaremos como se montaría el sistema de perfusión cerrado en el caso de tener dos medios de cultivo distintos: 1) medio de cultivo estándar; y 2) medio de cultivo con tratamiento.

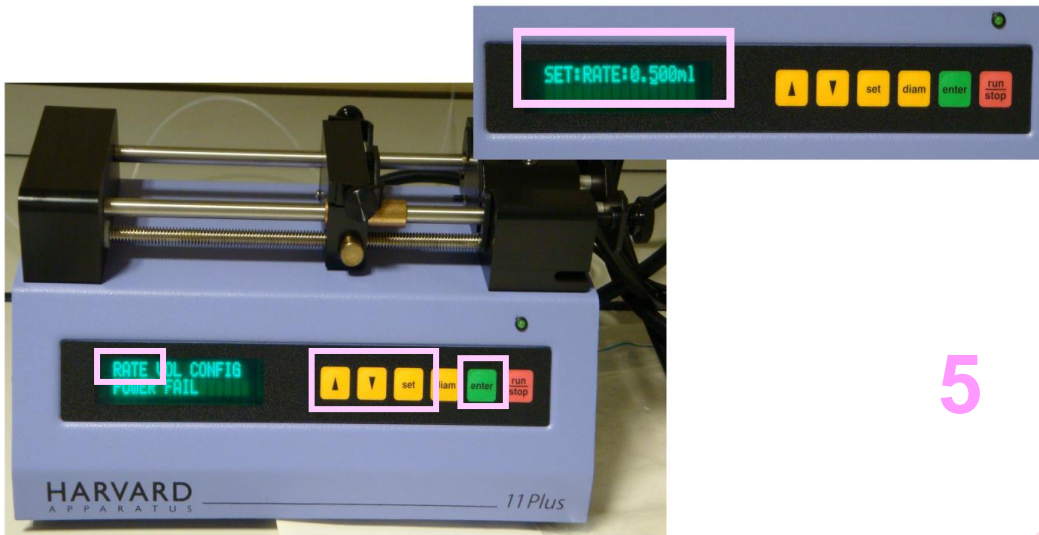
2.1 CALIBRACIÓN DE LAS BOMBAS DE INYECCIÓN DEL MEDIO.

1. Encendemos las dos bombas presionando sobre el **interruptor** que se encuentra en la parte trasera de ambos sistemas.
2. Presionamos en cada bomba el botón **Set** e inmediatamente el botón **Diam** para poder introducir el diámetro de cada una de las jeringuillas que utilizaremos para el experimento.
3. Aparecerá en pantalla el último diámetro que se haya configurado y el cursor se posicionará debajo del dígito que se encuentre más a la izquierda. Con las **flechas ascendente y descendente** seleccionaremos el dígito que sea necesario para el primer número y con el **Set** iremos moviendo el cursor un lugar hacia la derecha para poder ajustar el siguiente dígito de la forma explicada anteriormente. Cuando hayamos configurado el diámetro pulsaremos la tecla **Enter**, para que quede almacenado en la memoria del programa. El diámetro va a depender del tamaño de la jeringuilla y de la casa comercial a la que pertenezca (ver tabla) En nuestro ejemplo las jeringuillas que se utilizan son de 20ml de volumen y de la marca BD (Becton Dickinson) por lo que el valor de diámetro que hay que meter es 19.13
4. En el menú principal nos desplazamos con las flechas hasta situarnos en la opción de **Config**. Presionamos el botón **Set** y nos desplazamos con las **flechas** hasta que encontremos entre todas las opciones las unidades de flujo deseadas (ml/min; µl/min; ml/hr). Una vez seleccionado el parámetro que mejor nos convenga para el experimento pulsamos de nuevo la tecla de **Enter** para que quede almacenado en la memoria del aparato. Generalmente se utiliza **ml/min**.
5. En el menú principal nos desplazamos con las **flechas** hasta situarnos en la opción de **Rate** para ajustar los mililitros de medio por minuto que queremos introducir. Pulsamos en el botón de **Set** y el cursor aparecerá bajo el primer dígito del número que se muestra en pantalla. Con las **flechas** iremos buscando el número para ese dígito y con el botón **Set** vamos desplazando el cursor para configurar el dígito siguiente. Cuando lo tengamos ajustado pulsamos en **Enter** para que el dato quede almacenado. Generalmente se suele utilizar 0.5 ml/min para purgar el sistema y 0.1-0.2 ml/min para hacer el experimento.
7. En el menú principal nos desplazamos con las **flechas** hasta situarnos en la opción de **Vol.** donde meteremos el volumen que tenemos en la jeringuilla. Pulsamos en el botón de **Set** y el cursor aparecerá bajo el primer dígito del número que se muestra en pantalla. Con las **flechas** iremos buscando el número para ese dígito y con el botón **Set** vamos desplazando el cursor para configurar el dígito siguiente. Cuando tengamos el volumen ajustado pulsamos en **Enter** para que el dato quede almacenado. En nuestro ejemplo, para la jeringuilla de 20 ml ponemos 19 y de esta forma le indicamos al aparato que vaya inyectando medio hasta llegar a un volumen como máximo de 19ml.

CASA COMERCIAL	VOL.	DIÁMETRO	CASA COMERCIAL	VOL.	DIÁMETRO	CASA COMERCIAL	VOL.	DIÁMETRO
Terumo	3 cc	8.95 mm	Sherwood Monoject Plastic			Hamilton Microliter Series Gastight		
	5 cc	13.00 mm		1 cc	4.65 mm		0.5µl	0.103 mm
	10 cc	15.80 mm		3 cc	8.94 mm		1µl	0.1457 mm
	20 cc	20.15 mm		6 cc	12.70 mm		2µl	0.206 mm
	30 cc	23.10 mm		12 cc	15.90 mm		5µl	0.3257 mm
	60 cc	29.10 mm		20 cc	20.40 mm		10µl	0.460 mm
Stainless Steel	8 cc	9.525 mm		35 cc	23.80 mm		25µl	0.729 mm
	20 cc	19.130 mm		60 cc	26.60 mm		50µl	1.031 mm
	50 cc	28.600 mm		140 cc	38.40 mm		100µl	1.46 mm
	100 cc	34.900 mm					250µl	2.3 mm
SGE (Scientific Glass Engineering)	25µl	0.73 mm	BD (Becton Dickinson Plastic "Plasticpak")	1 cc	4.78 mm	500µl	3.26 mm	
	50µl	1.03 mm		3 cc	8.66 mm	1.0 ml	4.61 mm	
	100µl	1.46 mm		5 cc	12.06 mm	2.5 ml	7.28 mm	
	250µl	2.30 mm		10 cc	14.50 mm	5 ml	10.3 mm	
	500µl	3.26 mm		20 cc	19.13 mm	10 ml	14.57 mm	
	1.0 ml	4.61 mm		30 cc	21.70 mm	25 ml	23.00 mm	
	2.5 ml	7.28 mm	50/60 cc	26.70 mm	50 ml	32.6 mm		
	5 ml	10.30 mm	Air Tite "All Plastic"	2.5 cc	9.60 mm	Popper & Sons, Inc. "Perfektum" Glass	0.25 cc	3.45 mm
	10 ml	14.57 mm		5.0 cc	12.45 mm		0.5 cc	3.45 mm
				10 cc	15.90 mm		1 cc	4.50 mm
		20 cc		20.05 mm	2 cc		8.92 mm	
		30 cc		22.50 mm	3 cc		8.99 mm	
Unimetrics Series 4000 & 5000	10	0.460 mm	50 cc	29.00 mm	5 cc		11.70 mm	
	25	0.729 mm			10 cc		14.70 mm	
	50	1.031 mm			20 cc		19.58 mm	
	100	1.460 mm			30 cc		22.70 mm	
	250	2.300 mm			50 cc		29.00 mm	
	500	3.260 mm			100 cc	35.70 mm		
	1000	4.610 mm						



4



Servicio de Microscopía Óptica y Confocal (SMOC)
Copia No Controlada

2.2 MONTAJE DEL SISTEMA DE PERFUSIÓN (JERINGUILLAS, TUBOS Y LLAVES DE PASO)

1. En un vaso de precipitados añadimos el medio de “cultivo normal” (lo llamaremos vaso 1) y en otro el “medio de cultivo con tratamiento” (nombrado como vaso 2)

2. Echamos un poco hacia atrás el émbolo de la jeringuilla y metemos la punta en el vaso de precipitados 1. Sin sacar del líquido la punta de la jeringa (para evitar lo máximo posible que se nos formen burbujas) vamos absorbiendo, despacito, el medio y rellenando la jeringuilla.

Comprobamos que no haya ninguna burbuja en la jeringuilla porque nos puede dar problemas a la hora de hacer el experimento (para quitar las burbujillas que siempre suelen aparecer podemos orientar la jeringuilla hacia arriba y dar golpecitos al cuerpo de ésta hasta que las burbujas se queden en la punta y expulsar un poco de medio con la esperanza de que se lleve las burbujas también)

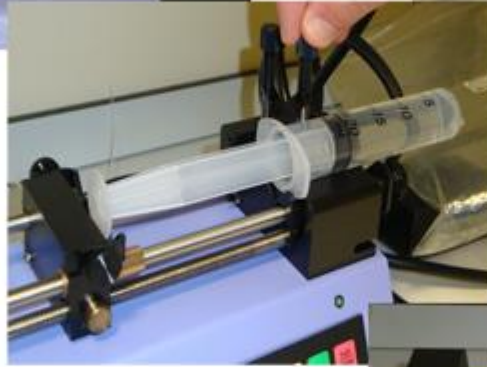
3. Montamos la jeringuilla con el medio del vaso 1 en una de las bombas de inyección.

4. Conectamos a la jeringuilla uno de los extremos de un tubo con dos conectores y el otro extremo lo conectamos a la llave que le corresponda (en nuestro ejemplo tendríamos que conectar un extremo del tubo a la jeringuilla del medio de cultivo normal o vaso 1 y el otro extremo del mismo tubo a la llave de color verde)

5. Repetimos los pasos del 2 al 4 para el “medio de cultivo con tratamiento” o vaso 2 pero con la salvedad de que ahora esta jeringuilla tendrá que colocarse sobre la bomba restante y que además hemos de conectar uno de los extremos de su tubo a la llave roja.

6. Conectamos el tubo que tiene un solo conector a la salida de las llaves de paso (la parte sin conector del tubo irá unida a la base metálica del sistema de perfusión)





3



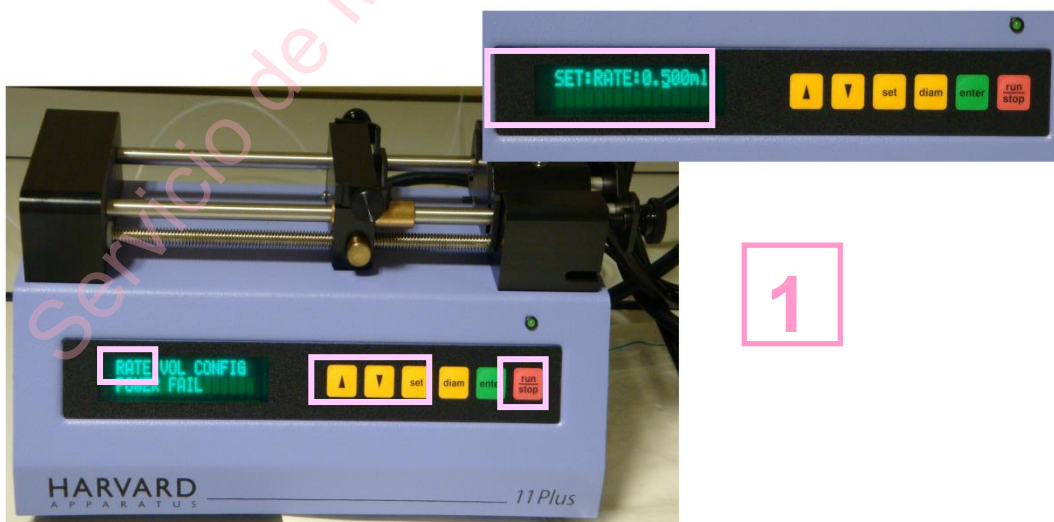
- El **volumen de medio** que albergan los tubos que nosotros tenemos cortados es de 0.7 ml. El volumen entre llaves es de 0.2 ml. El volumen del circuito completo es de 1.3 ml.

2.3 DRENAJE DEL SISTEMA DEL FLUJO.

Una vez que hemos montado todo el sistema tenemos que rellenar los tubos con sus medios correspondientes y comprobar que no hay ni fugas ni burbujas a través de todo el circuito. Primero pasaremos el “medio de cultivo normal” (vaso1) y luego haremos lo mismo con el “medio de cultivo con tratamiento” (vaso2) para terminar pasando de nuevo el “medio de cultivo normal”.

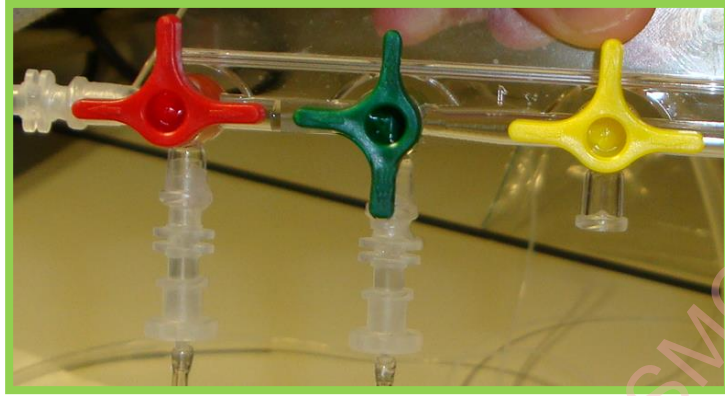
Los pasos a seguir son:

1. En las dos bombas de inyección configuramos el flujo del medio a 0.5 ml/min (ver puntos 4 y 5 del apartado 2.1)
2. Metemos el extremo libre del tubo de un solo conector en un vaso de precipitados para ir recogiendo el medio que salga.
3. Recolocamos las llaves de paso según muestra la **Figura 1**
4. Pulsamos la tecla RUN/STOP del inyector que tenga la jeringuilla con el “medio de cultivo normal” y esperamos a que éste pase a través de todo el circuito (esto sucede cuando hayan salido unos mililitros de medio al vaso de precipitado) Pulsamos el botón RUN/STOP del inyector que tenga la jeringuilla con el “medio de cultivo normal” para parar el flujo del medio de cultivo normal. Ver **Figura 2**
5. Giramos las llaves de paso según muestra la **Figura 3**.
6. Repetimos el paso 4 con la bomba de inyección que tenga la jeringuilla con el “medio de cultivo con tratamiento” (vaso2)
7. Volvemos a pasar por todo el circuito el “medio de cultivo normal” para quitar los restos del “medio de cultivo con tratamiento” y para ello repetimos los pasos 3 y 4.



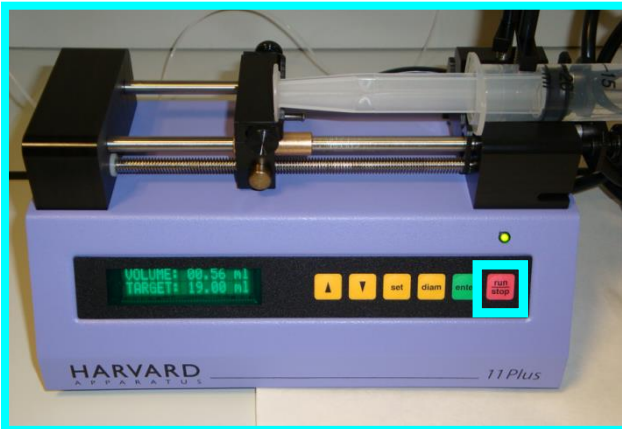
3

FIGURA 1



4

FIGURA 2



5

FIGURA 3



2.4 MONTAJE DEL DISPOSITIVO DE SUJECCIÓN DE LA MUESTRA POC MINI.

Cuando hayamos drenado el circuito y comprobado que todo funciona perfectamente podemos montar el sistema donde mantendremos a nuestras células (las cuales han sido previamente crecidas en un cubre de cristal de 30mm de diámetro)

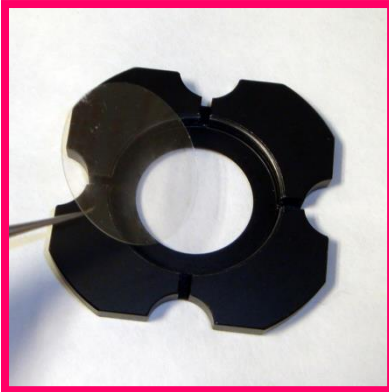
Para ello:

1. Colocamos sobre la mesa la base metálica negra.
2. Sobre la base, ponemos el cubre de 30 mm donde hemos cultivado las células (la parte del cubre donde están las células debe de colocarse hacia arriba, es decir, mirando hacia nosotros)
3. A continuación, ponemos la arandela de silicona grande de marco fino, de tal forma que quede bien encajada y que no se levante (si esto último ocurre, es decir, si no encaja bien, cogemos una goma nueva porque la anterior se ha dado de sí con el uso)
4. Colocamos el anillo de perfusión.
5. Encima ubicamos el cubreobjetos de 20mm. El anillo de perfusión tiene como dos circunferencias de distinto tamaño. Nuestro cubre ha de encajarse en la más pequeña e interna.
6. Colocamos la arandela de silicona pequeña.
7. Y por último el anillo de cierre. Hay que apretarlo para que quede todo bien encajado. El anillo quedará levantado un poquito con respecto al borde de la base metálica (debido a todos los componentes del sistema que hemos ido metiendo) por lo que es necesario hacer un poco de fuerza y presión a la hora de apretar- pero sin pasarnos porque podemos romper el cubre con las células.
8. Unimos el extremo libre del tubo de silicona que está enganchado a la salida del sistema de llaves reguladores del medio a uno de los extremos metálicos del dispositivo del sistema de perfusión.
9. El volumen interno de medio que alberga esta configuración es de 0.5 ml.

1



2



3



4



5



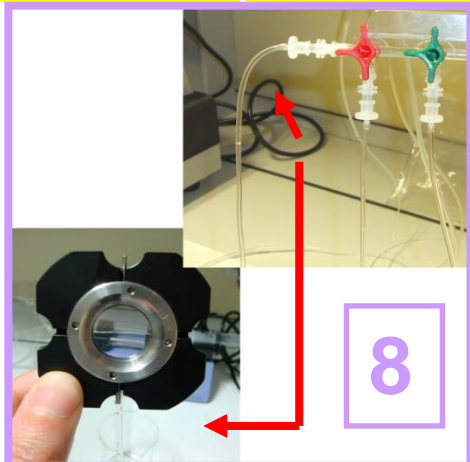
6



7



8



Servicio de Microscopía Óptica y Confocal (SMOC)

2.5 EXPERIMENTO.

1. Configuramos en las dos bombas de inyección el flujo del medio a 0.1-0.2 ml/min (ver puntos 4 y 5 del apartado 2.1)
2. Recolocamos las llaves de paso según muestra la **Figura 1**
3. Secamos con papel el medio de sujeción de la muestra para limpiar las posibles gotas que nos hayan quedado al montarlo (así veremos mejor si hay escapes y hay que volver a ajustarlo)
4. Colocamos el dispositivo de montaje de las células en posición vertical para facilitar el paso del flujo y la salida de posibles burbujas de aire,
5. Pulsamos el botón RUN de la bomba de inyección que contiene el “medio de cultivo normal” y esperamos a que el medio rellene toda la cámara del sistema de perfusión.
6. Si todo va bien y no hay ninguna clase de fugas en el sistema donde están montadas las células, hemos de ver que salen gotas de medio de cultivo por el extremo libre de dicho dispositivo. Cuando esto ocurra, podemos enganchar a ese extremo el tubo de plástico que no tiene ningún adaptador.
7. Situamos de nuevo en posición horizontal todo el dispositivo de las células, lo ajustamos al portamuestras y metemos el extremo libre del tubo en un vaso de precipitados para ir recogiendo el medio que vaya saliendo.
8. Enfocamos la preparación, ajustamos los settings y empezamos a hacer el in vivo.
9. Cuando queramos cambiar de medio e inyectar “medio de cultivo con tratamiento” apretamos el botón de STOP de la bomba de inyección con medio de cultivo normal (para cortar el flujo de este medio) A continuación, giramos primero la llave verde y luego la roja, de tal forma que se llegue a la configuración que se muestra en la **Figura 2** y apretamos el botón de RUN en la bomba de inyección que tiene la jeringuilla con el “medio de cultivo con tratamiento”
10. Para parar el flujo del medio del tratamiento e introducir de nuevo medio normal hemos de pulsar la tecla STOP de la bomba de inyección con medio con tratamiento y girar primero la llave roja y luego la verde para alcanzar la configuración que se muestra en la **Figura 1**. Pulsamos la tecla RUN de la bomba con medio normal
11. Repetimos estos dos últimos pasos tantas veces como queramos cambiar de medio de cultivo.
12. Cuando hayamos terminado de filmar el in vivo debemos desmontar todo con mucho cuidado y limpiar perfectamente cada uno de los componentes del dispositivo de sujeción de la muestra, los tubos, los vasos de precipitados, etc.... y dejarlos secando a RT.

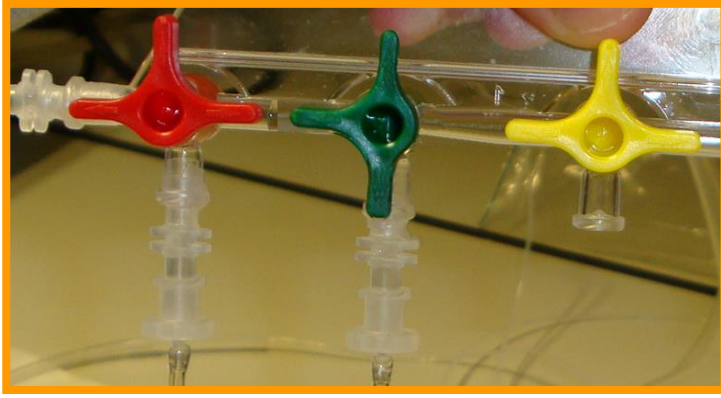
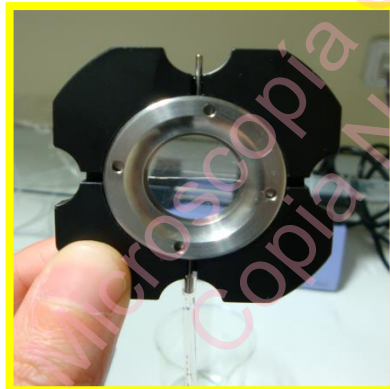


Figura 1



Figura 2



Sistema de perfusión Warner Instruments y bomba Peristáltica MiniPlus Evolution



Servicio de Microscopía Óptica y Confocal

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”. Madrid. Spain.



ÍNDICE

Materiales.

1.1 Componentes.

1.2 Bomba peristáltica de succión del medio Minipuls Evolution (GILBSON)

Metodología.

2.1 Montaje del sistema de perfusión (jeringuillas y tubos)

2.2 Sistema controlador del flujo y su drenaje.

2.3 Montaje de la bomba peristáltica de succión del medio Minipulps Evolution (GILBSON)

2.4 Montaje del dispositivo de sujeción de la muestra.

2.5 Experimento.

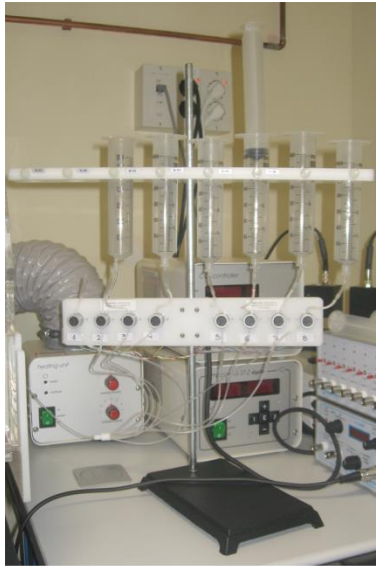
1. MATERIALES.

1.1 COMPONENTES.

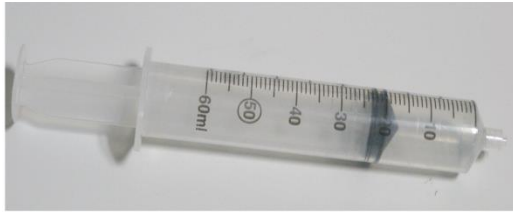
Lo que necesitamos para montar el sistema de perfusión abierto es:

8. Brazo sujeta-jeringuillas con 8 adaptadores para sendas jeringuillas.
9. Jeringuillas de 50 ml de volumen.
10. Sistema controlador termostatzado de los medios.
11. Sistema controlador del flujo de los medios.
12. Bomba de succión del medio "Minipuls Evolution (Gilbson)".
13. Vaso de precipitados o recipiente para recoger los medios celulares.
14. 1 Tubo de plástico sin adaptadores para la salida de los medios.
15. Dispositivo de montaje de la muestra que se compone de varios elementos:
 - 8.1 Base circular metálica negra.
 - 8.2 Base metálica negra.
 - 8.3 Base de plástico blanco.
 - 8.4 Mecanismo de succión del medio del dispositivo de montaje.
 - 8.5 Cubreobjetos de 15 mm de diámetro.
 - 8.6 Destornillador.
16. Pinzas de punta fina.

1



2



5



6



4



7

8.1

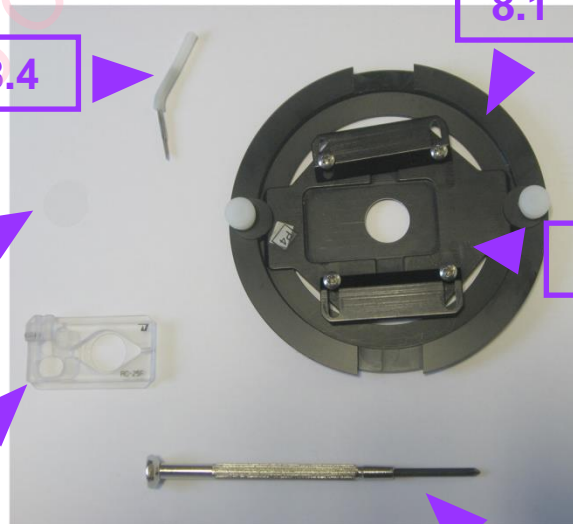
8.4

3

8.5

8.2

8.3



8.6

9




Servicio de Microscopía Óptica y Controlada (SMOC)

1.2 BOMBA PERISTÁLTICA MINIPULS EVOLUTION (GILBSON)

1. **START/STOP:** activa/desactiva el motor que permite la succión del medio.

2. **-/+:** decrece/aumenta la velocidad de succión de la bomba.

3.  : selecciona el sentido del flujo de succión.

4. **PRIME:** aumenta la velocidad de succión al máximo (60 rpm).



2. METODOLOGÍA.

A continuación, vamos a explicar el mecanismo de montaje de este sistema de perfusión abierto con varios medios de cultivos.

2.1 MONTAJE DEL SISTEMA DE PERFUSIÓN (JERINGUILLAS Y TUBOS)

1. En un vaso de precipitados añadimos el medio con el que queremos rellenar la jeringuilla (en nuestro caso podemos tener hasta un total de 8 medios distintos ya que el brazo posee capacidad para 8 jeringuillas)

2. Echamos un poco hacia atrás el émbolo de la jeringuilla y metemos la punta en el vaso de precipitados. Sin sacar la punta de la jeringuilla del líquido (para evitar lo máximo posible que se nos formen burbujas) vamos absorbiendo, despacito, el medio y rellenando la jeringuilla.

Comprobamos que no haya ninguna burbuja en la jeringuilla porque nos puede dar problemas a la hora de hacer el experimento (para quitar las burbujillas que siempre suelen aparecer podemos orientar la jeringuilla hacia arriba y dar golpecitos al cuerpo de ésta, hasta que las burbujas se queden en la punta, y expulsar un poco de medio con la esperanza de que se lleve las burbujas también)

1



2



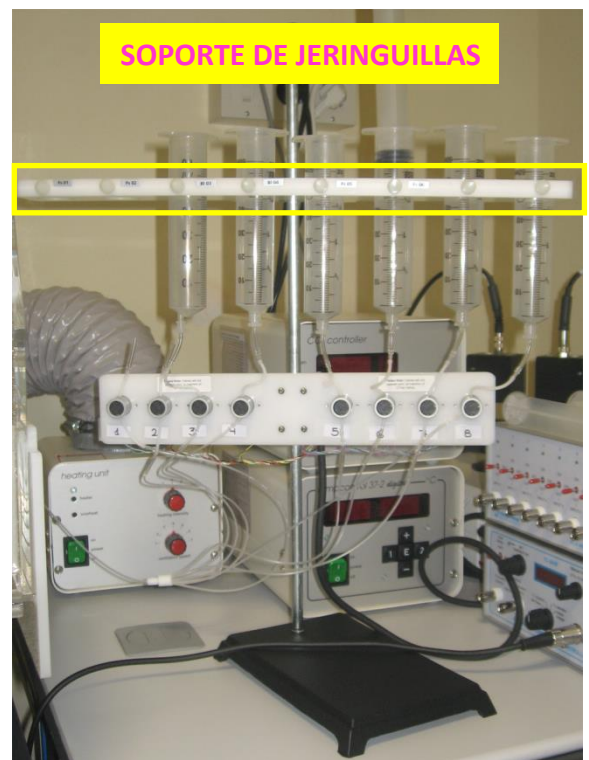
3. Colocamos la jeringuilla en uno de los 8 adaptadores que tiene el soporte del pie de jeringuillas. La velocidad del flujo del medio dependerá de la altura a la que situemos el soporte en el que va sujeta la jeringuilla, siendo mayor cuanto más alto lo coloquemos.

4. Repetimos los pasos del 1 al 3 tantas veces como medios tengamos.

↑ Altura => ↑ velocidad flujo

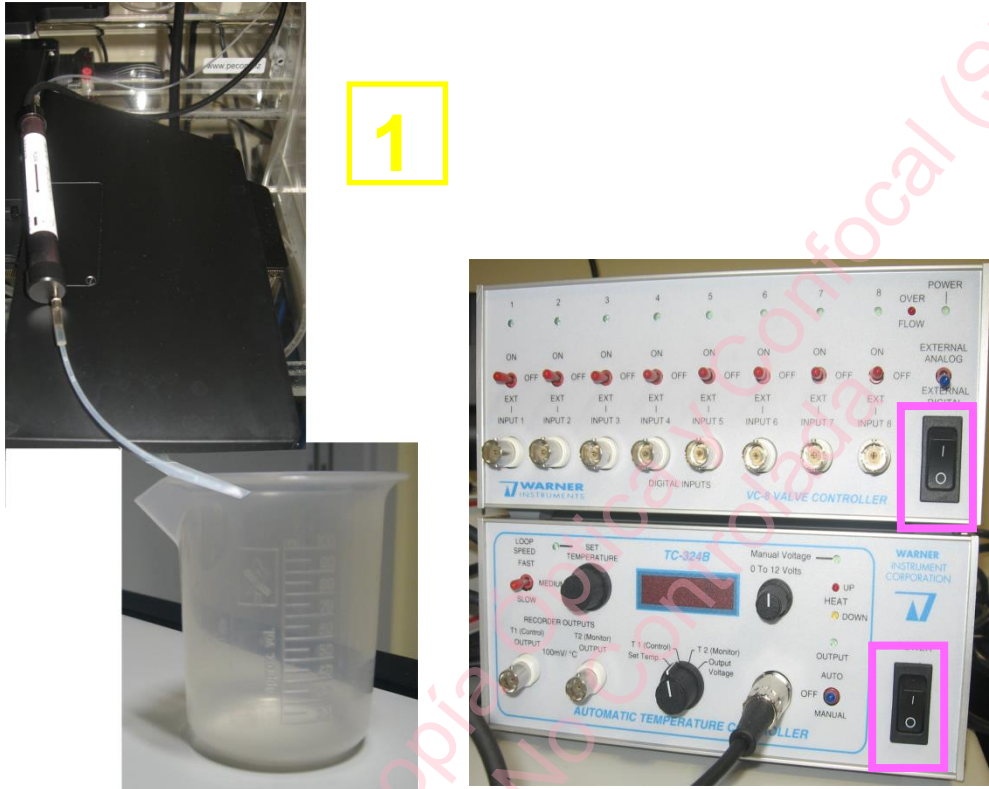
↓ Altura => ↓ velocidad flujo

3



2.2 SISTEMA CONTROLADOR DEL FLUJO Y SU DRENAJE.

1. Colocamos un vaso de precipitados al final del tubo donde se unifican los tubos que parten de las 8 jeringuillas para recoger el medio que salga por él.



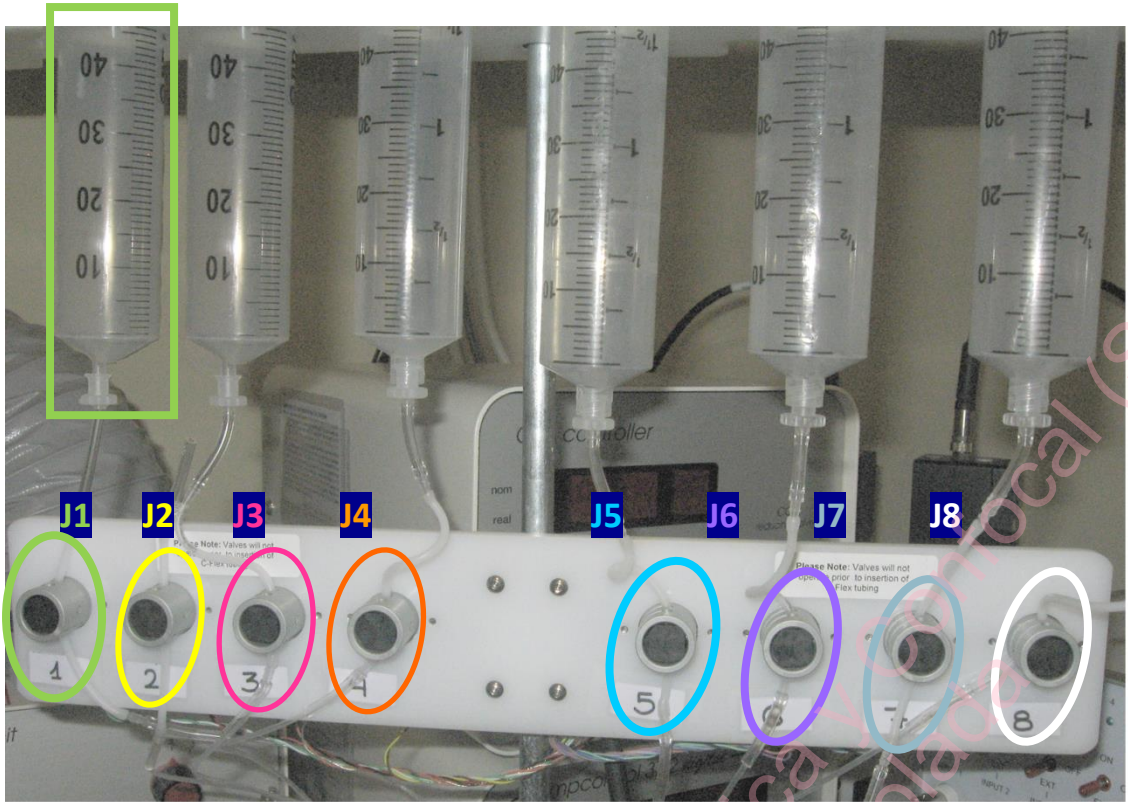
2. Encendemos el controlador termostatzado de flujo de los medios y el controlador del paso de éstos presionando sobre los interruptores que se encuentran en la parte delantera.

3. Para empezar con el rellenado de los tubos que salen de cada una de las jeringuillas que vamos a utilizar, subimos de forma consecutiva la palanca que posee cada uno de los ocho adaptadores de jeringuillas en el sistema controlador del flujo de los medios, de tal forma, que al subir la palanca hasta la posición ON del controlador de la jeringuilla número 1 lo que estamos haciendo es permitir el paso del medio de cultivo desde la jeringuilla 1 hacia las células. Una vez que hemos comprobado que el medio de la jeringuilla 1 fluye correctamente por el sistema, bajamos su palanca a la posición OFF para cortar el flujo y subimos la de la jeringuilla número 2 para conseguir lo mismo que anteriormente. Realizamos sucesivamente esta operación hasta verificar el correcto flujo de todas las jeringuillas que hayamos colocado en el brazo.

En ocasiones hay que hacer un poco de presión con el émbolo de la jeringuilla para que el medio empiece a fluir.

Jeringuilla 1

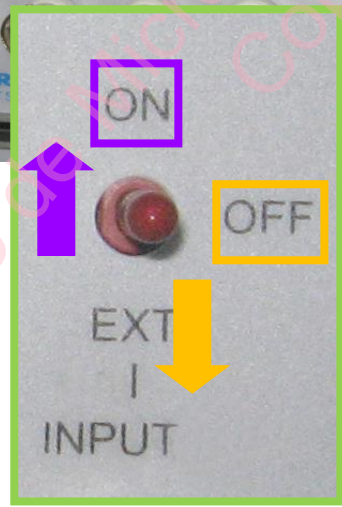
3



Válvula 1

Permite paso medio

Bloquea paso medio






2.3 MONTAJE DE LA BOMBA PERISTÁLTICA DE SUCCIÓN DEL MEDIO (Minipuls Evolution)

1. Enchufar el cable gris a la red eléctrica.
2. Encender la bomba pulsando el interruptor de la parte trasera.



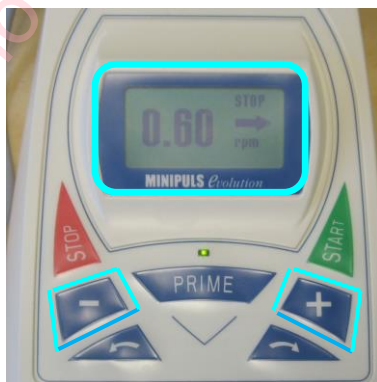
2

3. A continuación, seleccionar con las flechas  la dirección de succión del medio.
: el medio que se va a eliminar entra por la izquierda y sale por la derecha.
: el medio que se va a eliminar entra por la derecha y sale por la izquierda.

4. Ajustamos la velocidad de absorción del medio pulsando en los botones $-/+$ Generalmente se suele utilizar velocidad de 1.00



3



4

2.4 MONTAJE DEL DISPOSITIVO DE SUJECCIÓN DE LA MUESTRA.

Cuando hayamos drenado el circuito, montado la bomba de succión y comprobado que todo funciona perfectamente podemos montar el sistema donde vamos a mantener a nuestras células (las cuales han sido previamente crecidas en cubres de cristal de 15mm de diámetro)

Para ello:

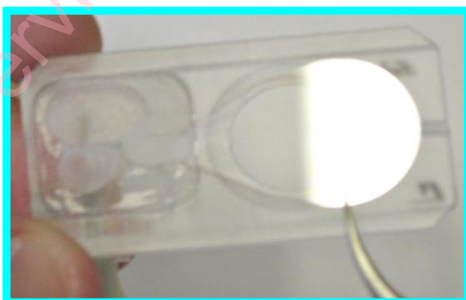
1. Colocamos sobre la mesa la base metálica negra que ya la tenemos encajada en la base circular metálica negra.
2. Desatornillamos los cuatro tornillos de la base y echamos hacia atrás las barras metálicas (▼)



3. A continuación, volteamos la base de plástico blanca.

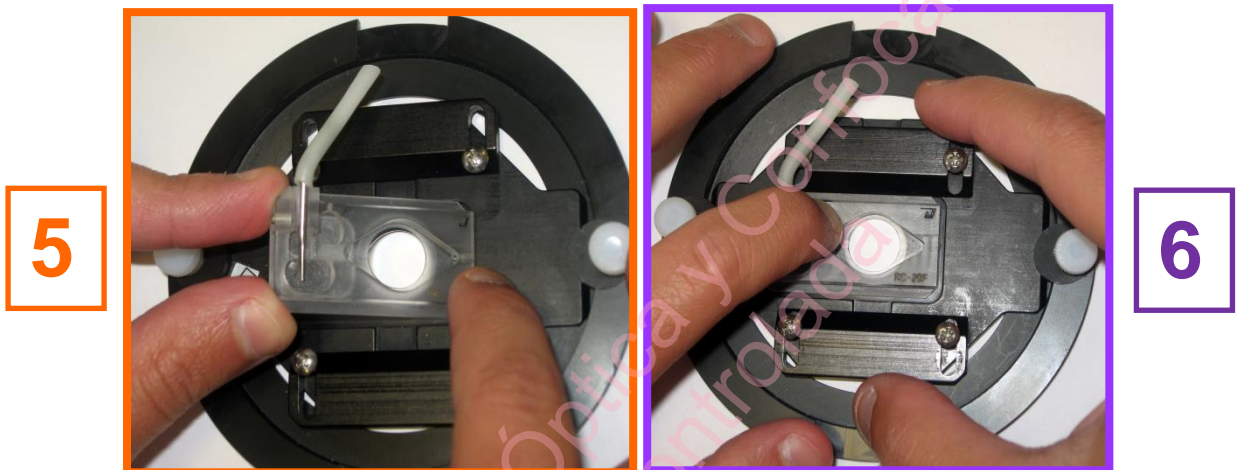


4. Ponemos el cubre con las células ligeramente humedecido con el medio sobre la hendidura circular que hay en la base de plástico blanco de tal forma que la capa de células quede en contacto con la base de plástico. Hacemos un poco de presión con las pinzas sobre el borde del cubre para asegurarnos de que se quede bien pegado al soporte de plástico.



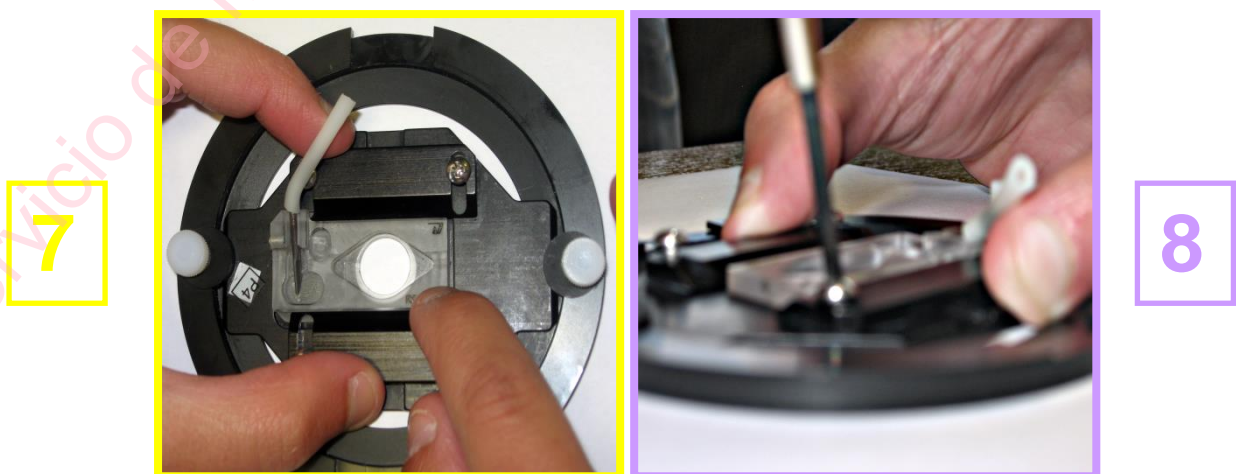
5. Volteamos de nuevo el soporte de plástico blanco que ya tiene el cobre pegado en su parte inferior.

6. Apoyamos el extremo del soporte de plástico blanco sobre uno de los extremos de la base metálica negra (hay que tener cuidado de la posición en la que ponemos el soporte de plástico ya que nos tienen que coincidir la circunferencia de este soporte con la de la base metálica negra) y después apoyamos el extremo contrario intentando que sea un movimiento lo más seco posible (pero no brusco) para evitar deslizamientos del cobre.



7. Con el dedo apoyado en uno de los extremos de la base de plástico seguimos haciendo presión y con los dedos de la otra mano acercamos hacia la base de plástico las barras metálicas hasta que quede el soporte bien encajado entre las barras.

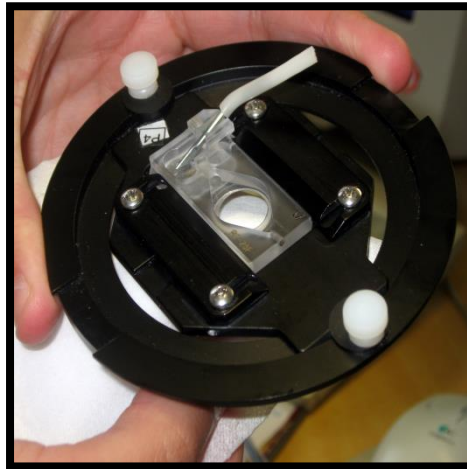
8. Atornillamos los tornillos manteniendo las barras metálicas presionadas hacia el soporte metálico.



9. Pasamos un clínex por debajo del cubre para limpiar el exceso de medio.

10. Añadimos medio de cultivo para mantener vivas a las células y volvemos a pasar el clínex para asegurarnos de que no hay escapes de medio y el sistema está bien montado

9



10

11. Colocamos todo el dispositivo en el microscopio.

Servicio de Microscopía Óptica y Confocal (MOC)
Copia No Controlada

2.5 EXPERIMENTO.

1. Encendemos el equipo.
2. Encendemos el controlador del sistema de jeringuillas (ver punto 2 del apartado 2.2)
3. Encendemos la bomba peristáltica y la ajustamos (ver apartado 2.3)
4. Rellenar las jeringuillas con los medios correspondientes (ver apartado 2.1)
5. Comenzamos con el drenaje del sistema (ver punto 1 y 3 del apartado 2.2)
6. Montamos el dispositivo de sujeción de la muestra (ver apartado 2.4)
7. Metemos el extremo libre del tubo recolector de los tubos de las jeringuillas en el orificio que hay en el soporte de silicona blanco.
8. Introducimos el extremo del tubo del soporte de silicona blanco en el tubo de entrada del medio de la bomba peristáltica.
9. El extremo del tubo de salida del medio de la bomba peristáltica lo colocamos en un vaso de precipitados para recoger el medio que se desecha.
10. Subimos la palanca a la posición ON del controlador de la jeringuilla en la que tenemos el medio con el cual queremos empezar a realizar el experimento.
11. Apretamos el botón de RUN de la bomba peristáltica para que empiece a succionar el medio.
12. Enfocamos la preparación y ajustamos las condiciones para el in vivo.
13. Cuando queramos cambiar de medio lo que tenemos que hacer será bajar la palanca del controlador de la jeringuilla con la que se esté inyectando medio y subir la de la jeringuilla del nuevo medio que se desea inyectar. Repetiremos esta operación tantas veces como queramos cambiar de medio de cultivo.
14. Una vez que hemos acabado el in vivo recogemos todo el material y lo lavamos con agua MQ.
15. Limpiamos de nuevo el sistema de flujo drenándolo con agua MQ.