

Průtoková cytometrie

Mgr. Ondřej Vymazal

Úvod

- Co je to průtokový cytometr?
- K jakým aplikacím se využívá?
- Jak funguje?

Otázka pro chatGPT: vysvětli, co je analytická cytometrie tak, jako bys to vysvětloval dorostenci ve třetím ročníku obecného gymnázia . Zkus použít jednoduchý jazyk a příklady, které by dorostenec mohl snadno pochopit.

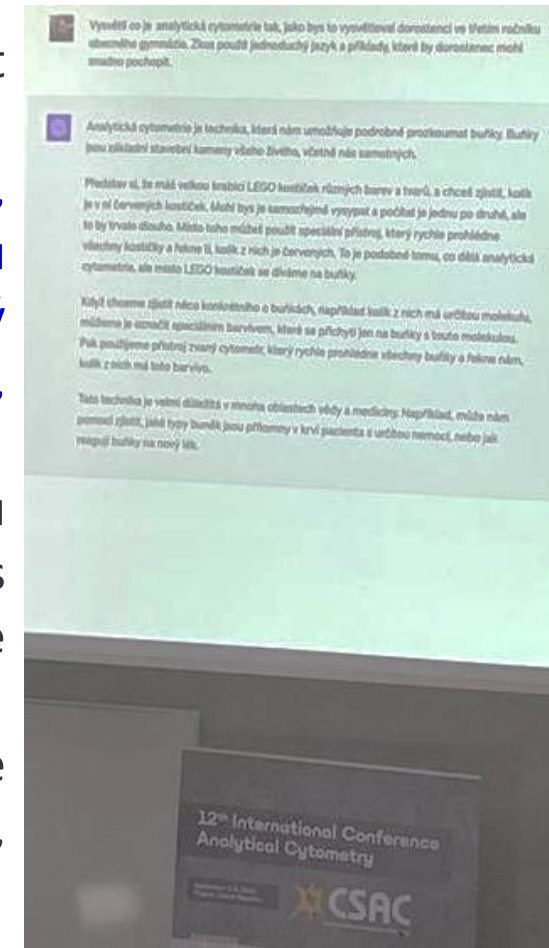


Co je analytická cytometrie je technika, která nám umožňuje podrobně zkoumat buňky. Buňky jsou základní stavební kameny všeho živého, včetně nás samotných.

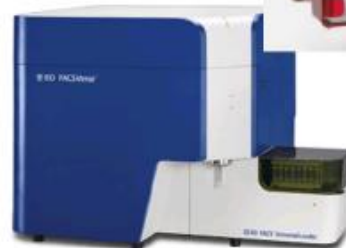
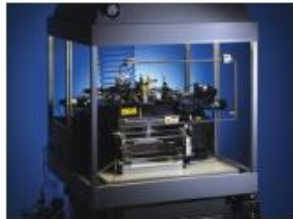
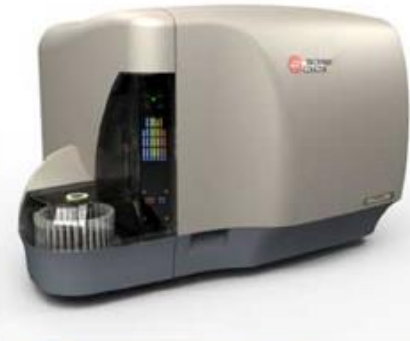
Představ si, že máš velkou krabici LEGO kostiček různých barev a tvarů a chceš zjistit, kolik je v nich červených kostiček. Mohl bys je samozřejmě vysypat a počítat je jednu po druhé, ale to by trvalo dlouho. Místo toho můžeš použít speciální přístroj, který prohlédne všechny kostičky a řekne ti, kolik z nich je červených. To je podobné tomu, co dělá analytická cytometrie, ale místo LEGO kostiček se díváme na buňky.

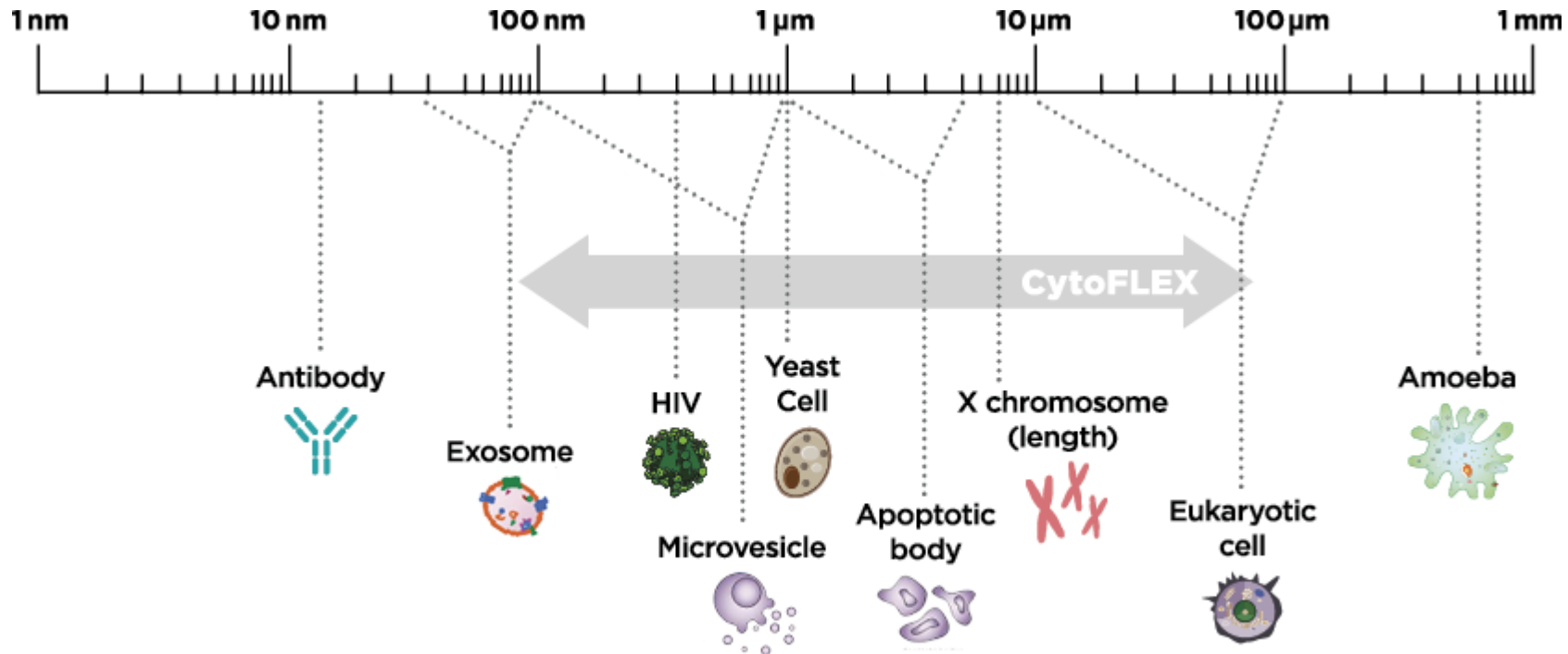
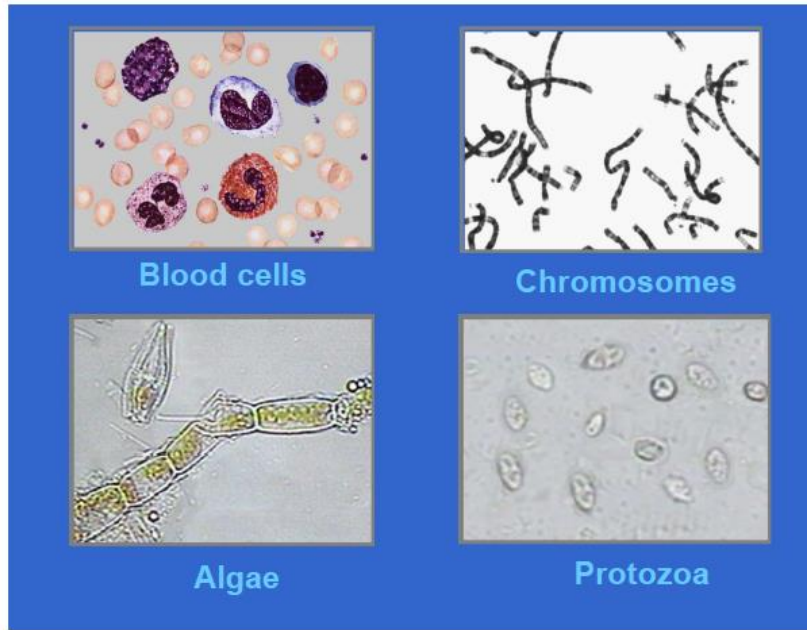
Když chceme zjistit něco konkrétního o buňkách, například kolik z nich má určitou molekulu, můžeme je označit speciálním barvivem , které se přichytí jen na buňky s touto molekulou. Pak použijeme přístroj zvaný cytometr, který rychle prohlédne všechny buňky a řekne nám, kolik z nich má toto barvivo.

Tato technika je velmi důležitá v mnoha oblastech vědy a medicíny. Například, může nám pomoci zjistit, jaké typy buněk jsou přítomny v krvi pacienta s určitou nemocí, nebo jak reagují buňky na nový lék.



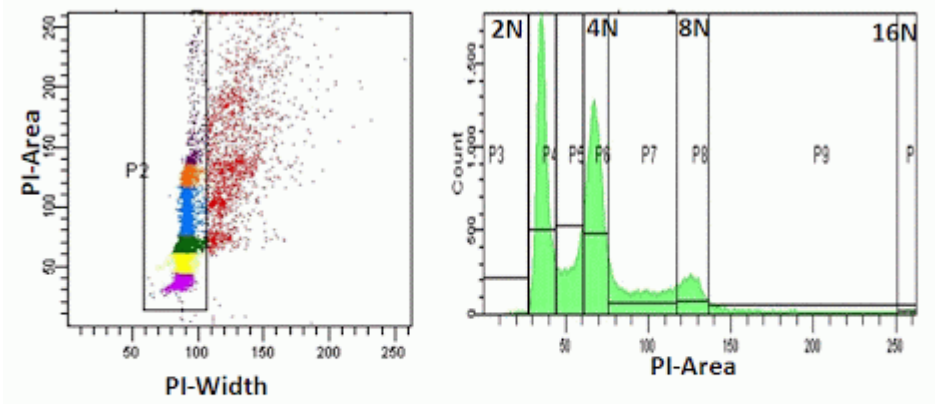
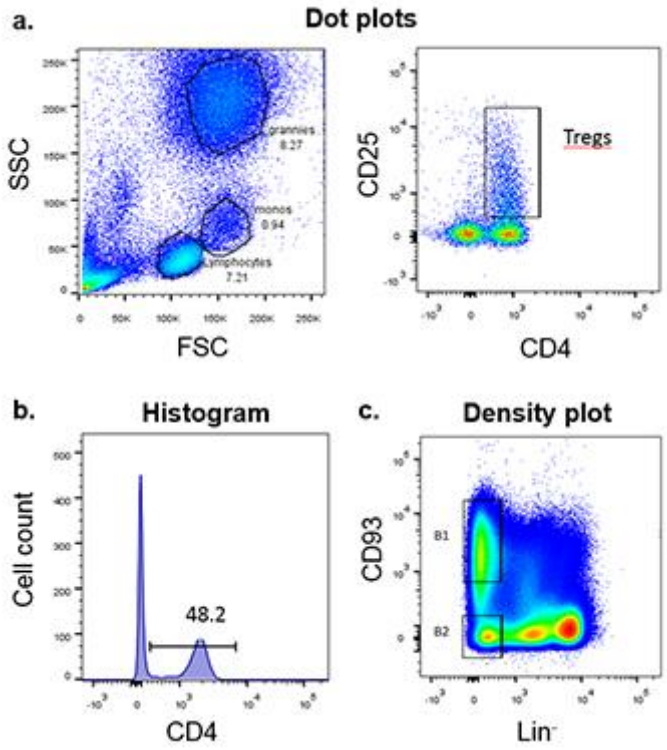
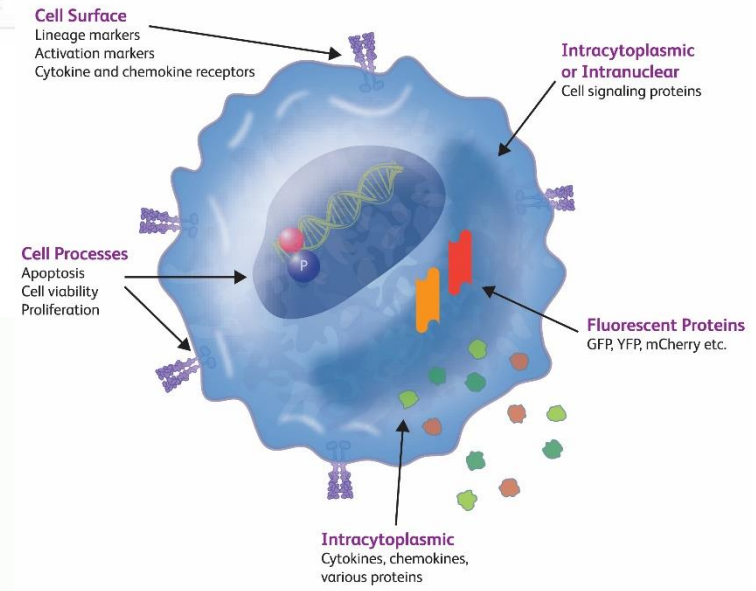
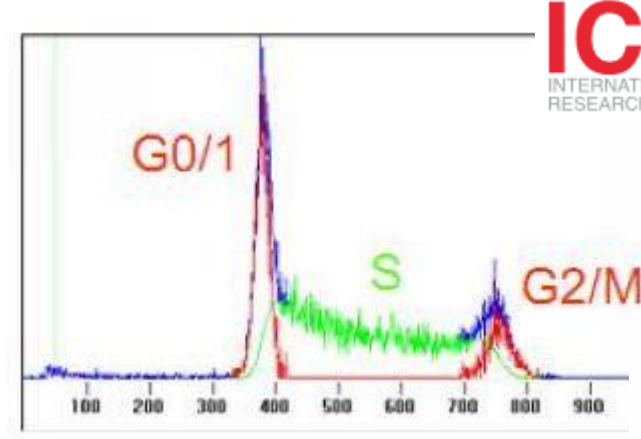
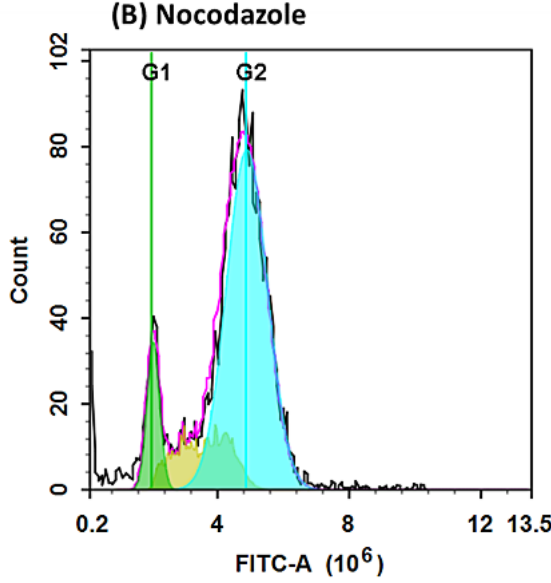
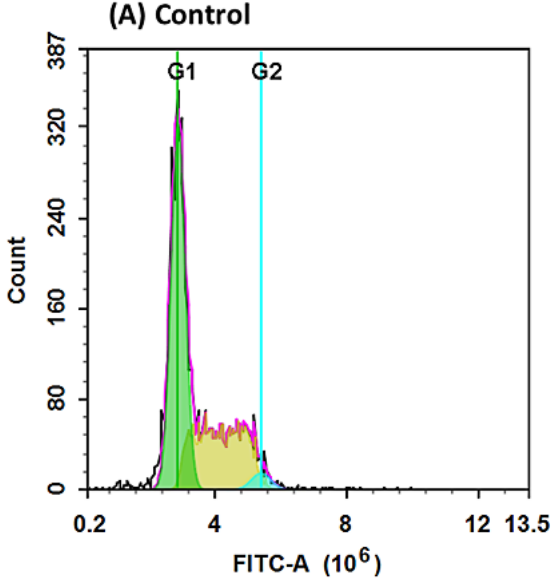
– Co je to průtokový cytometr?





Úvod

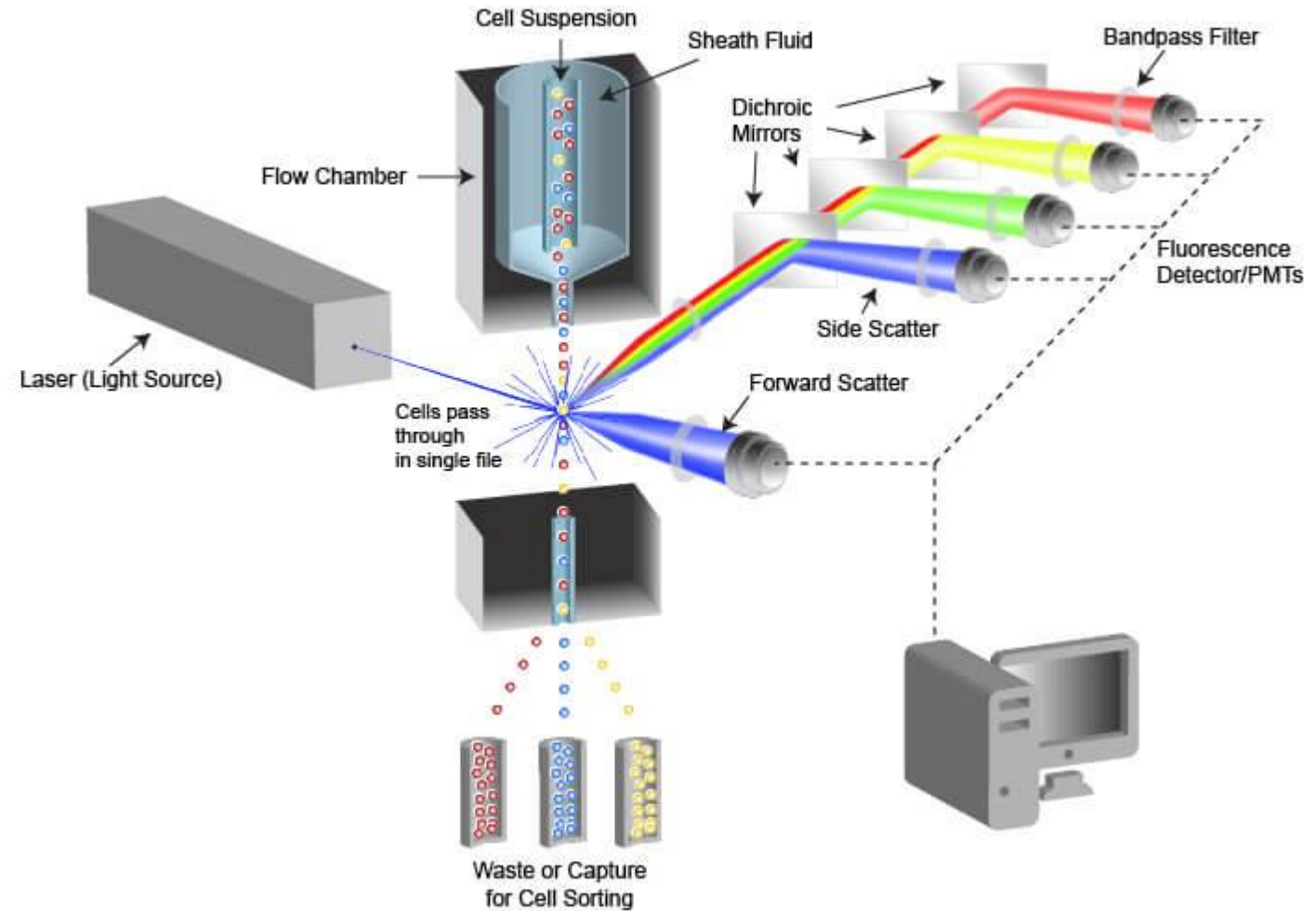
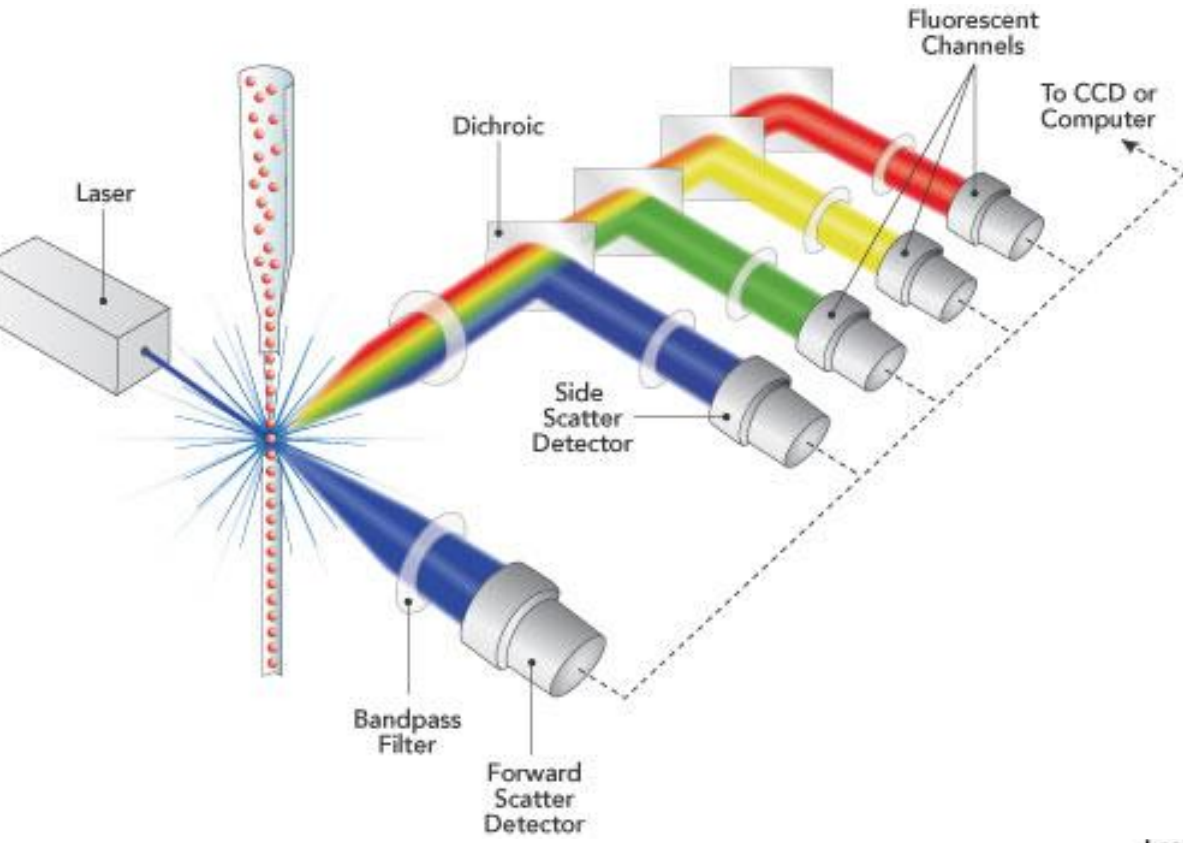
- Co je to průtokový cytometr? Přístroj, který počítá částice/buňky a měří parametry u každé jednotlivé z nich.
- K jakým aplikacím se využívá?
- Jak funguje?



Legend. Gating on Single cells by P2 gate on PI Area v Width parameters shows the degree of Ploidy, from G1 (2N), G₂m (4N), 8N and 16N.
Courtesy to Eleni Pantazi Cutaneous Research, ICMS, 4 Newark Street, London E1 2AT, UK.

Úvod

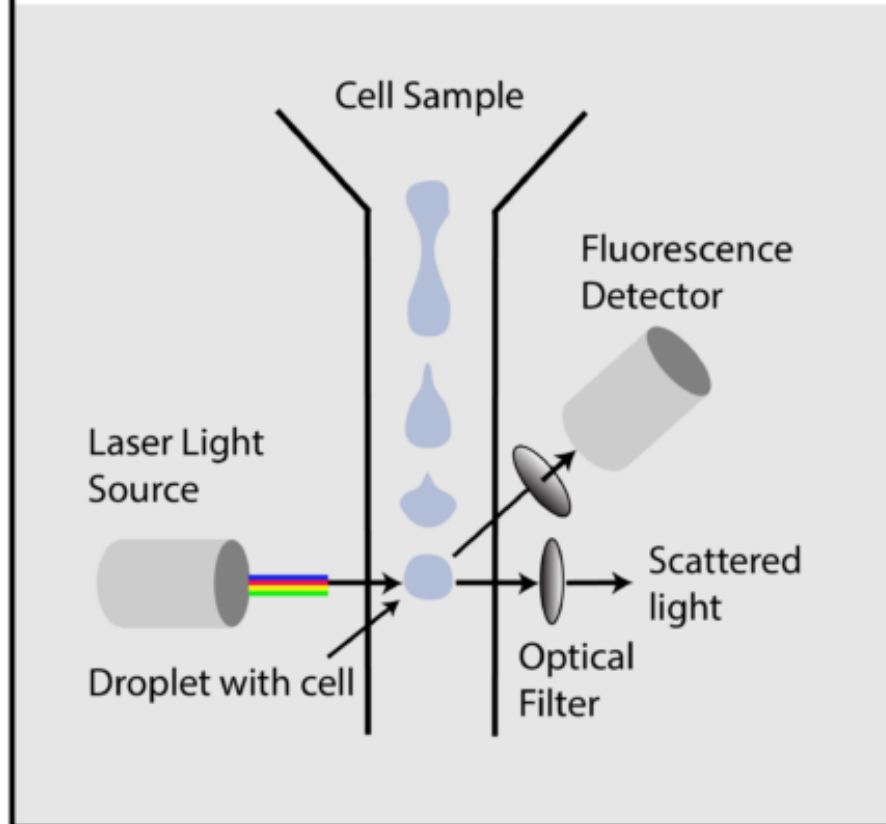
- Co je to průtokový cytometr? Přístroj, který počítá částice/buňky a měří parametry u každé jednotlivé z nich.
- K jakým aplikacím se využívá? Fenotypizace, analýza buněčného cyklu, viabilita, funkční analýzy.
- Jak funguje?



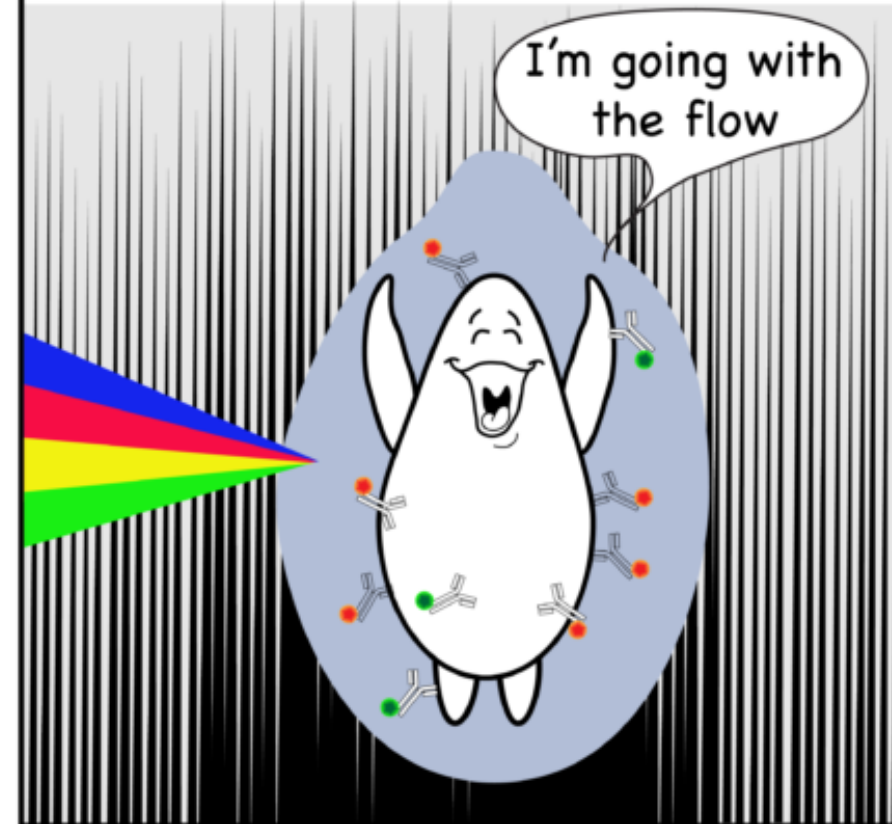
Úvod

- Co je to průtokový cytometr? Přístroj, který počítá částice/buňky a měří parametry u každé jednotlivé z nich.
- K jakým aplikacím se využívá? Fenotypizace, analýza buněčného cyklu, viabilita, funkční analýzy.
- Jak funguje? Proud jednotlivých buněk v suspenzi protéká skrz paprsek světla a na základě rozptylu a odrazu světla buňkou cytometr měří jejich vlastnosti.

What we think happens during flow cytometry



What really happens during flow cytometry



Trocha historie

- **1940-1950** Vývoj principů, které se využívají v průtokové cytometrii, jako jsou fluorescenční barvy, počítání částic v proudu vzduchu.
- **1953** – Laminární proudění.
- **1956 Wallace Coulter** – Měření změn vodivosti během průchodu buněk v suspenzi malým otvorem.
- **1960-1970** Vývoj cytometru.
- Rozšíření a rozvoj průtokové cytometrie.

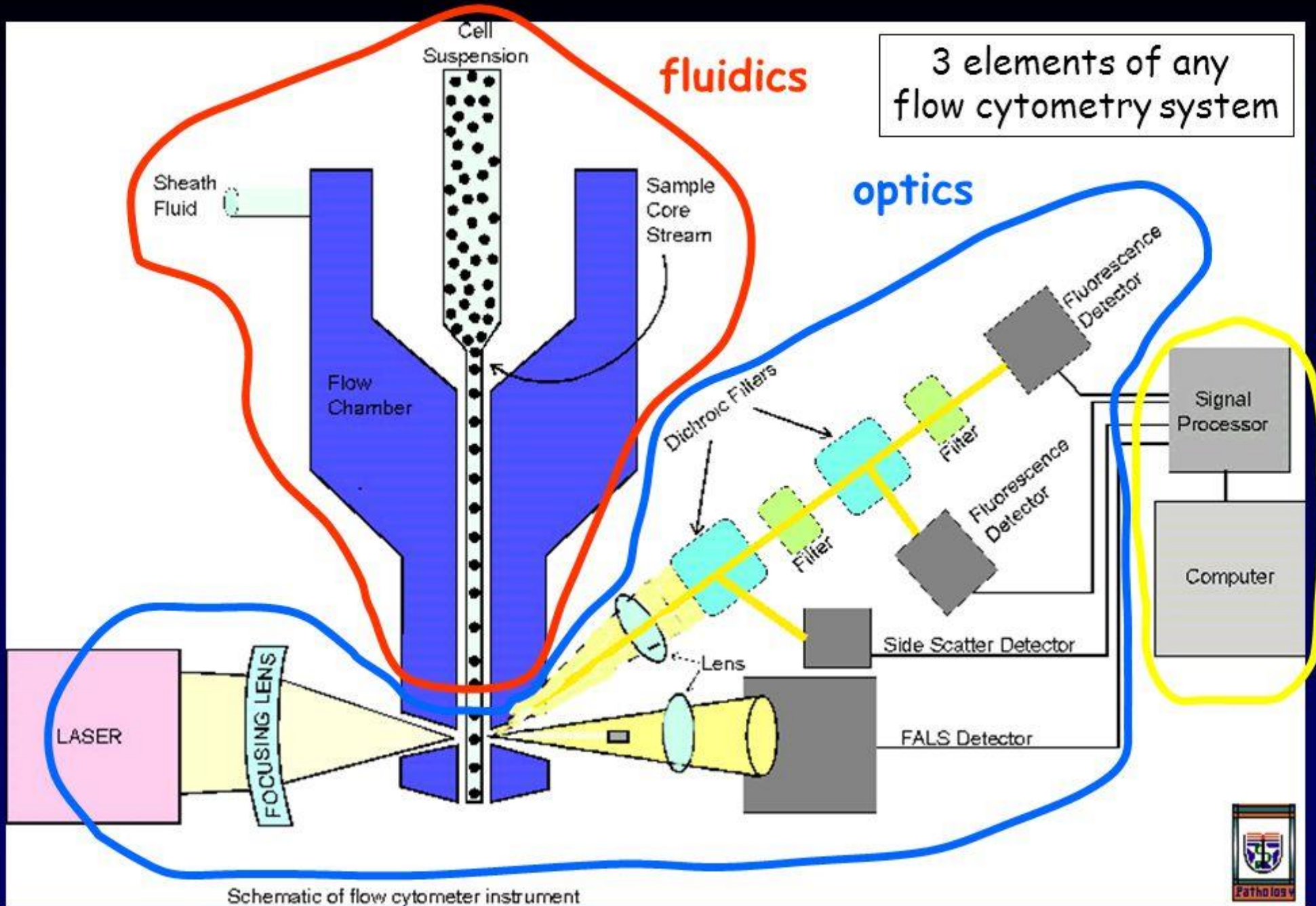
Technické součásti

Buňky v suspenzi proudí jednotlivě přes ozařovanou část, kde rozptylují světlo a emitují fluorescenci, která je detekována, filtrována a převedena na digitální hodnoty, které jsou analyzovány a uloženy v počítači.

Fluidika

Optika

Elektronika



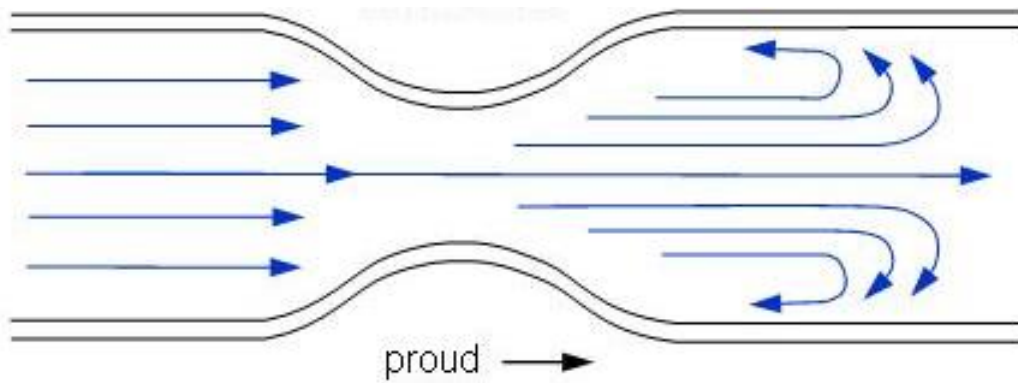
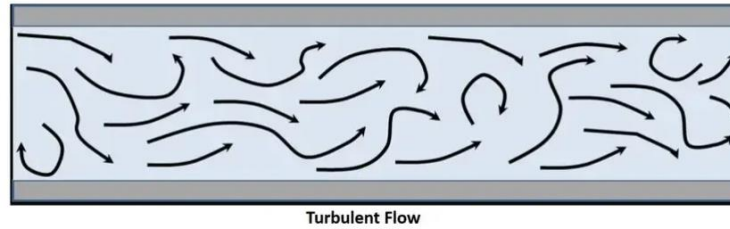
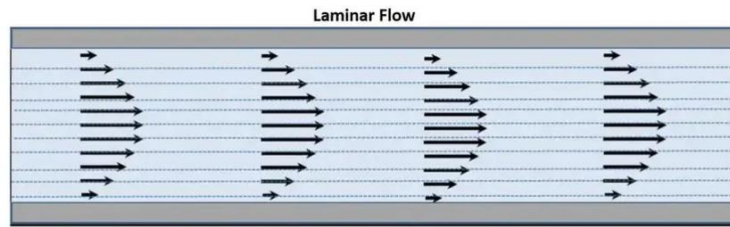
Schematic of flow cytometer instrument

electronics

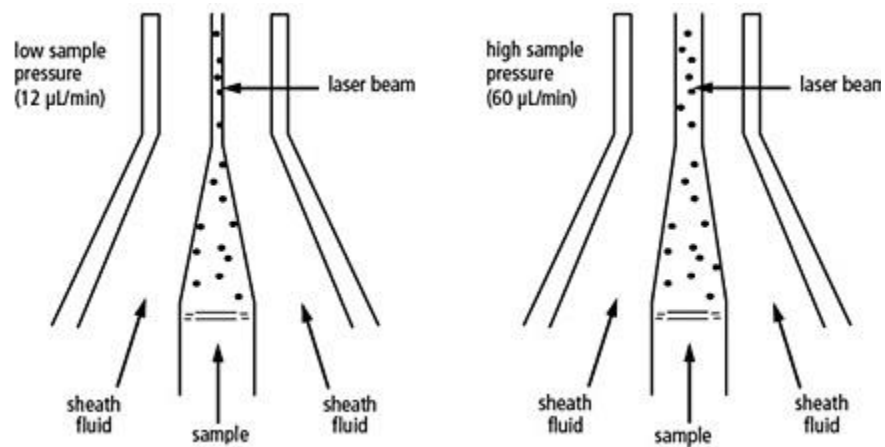


Fluidika

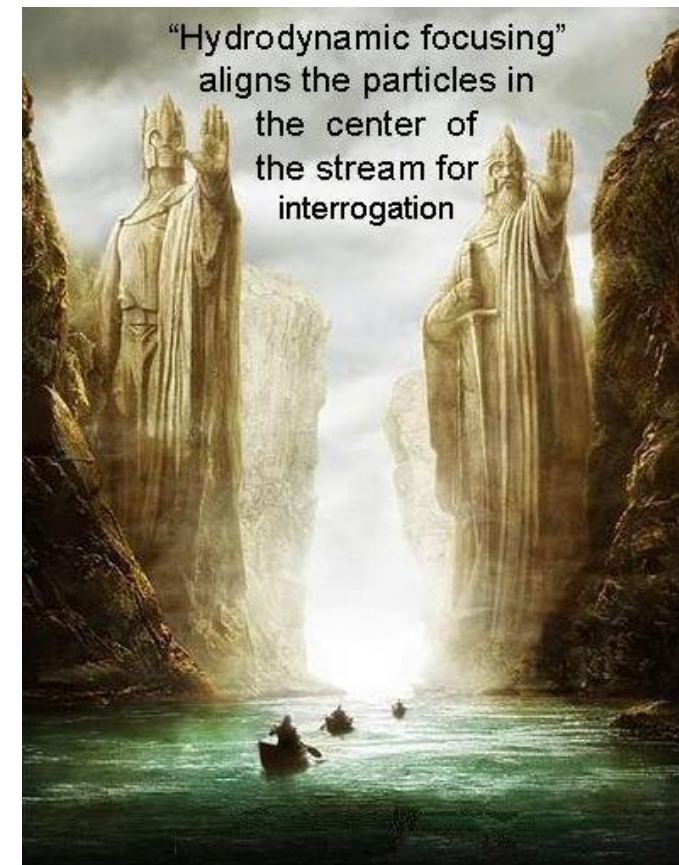
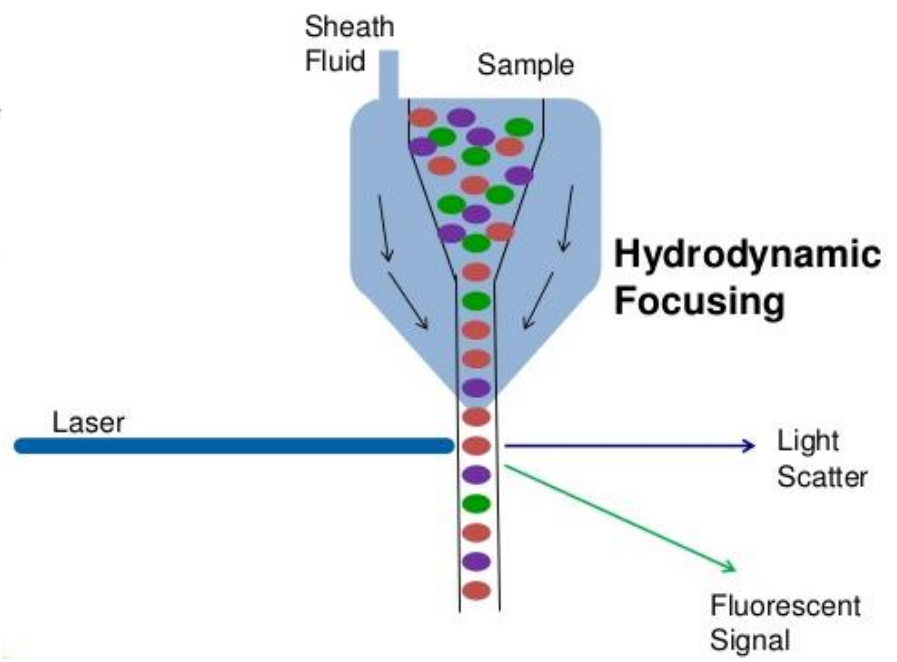
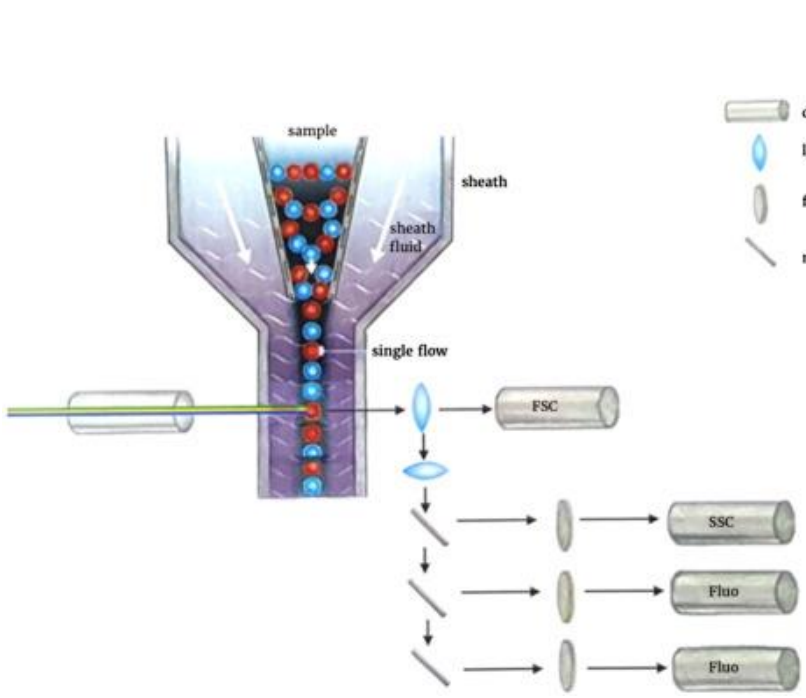
– Laminární proudění.



Fluidika



– Hydrodynamické zaostřování zarovnává buňky v systému fluidiky, kde jsou buňky analyzovány.



Technické součásti

Buňky v suspenzi proudí jednotlivě přes ozařovanou část, kde rozptylují světlo a emitují fluorescenci, která je detekována, filtrována a převedena na digitální hodnoty, které jsou analyzovány a uloženy v počítači.

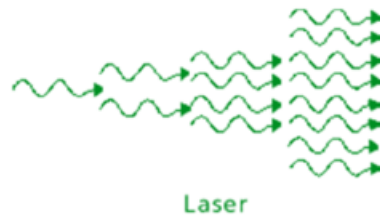
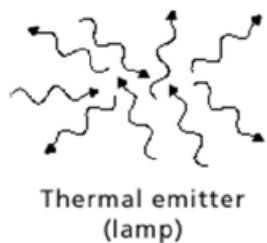
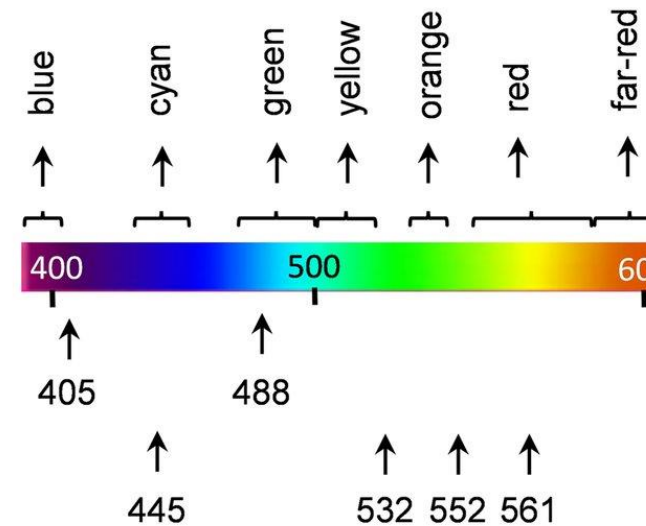
Fluidika

Optika

Elektronika

zdroj světla/laser

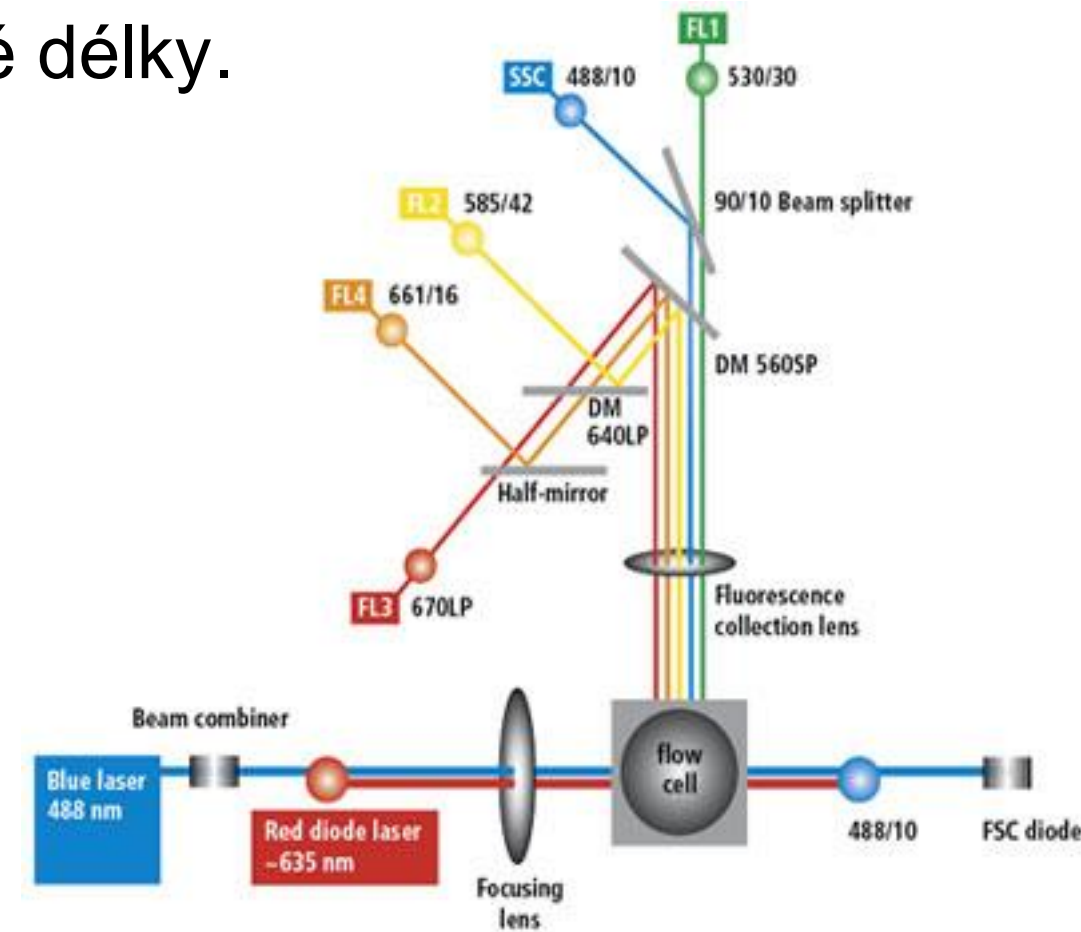
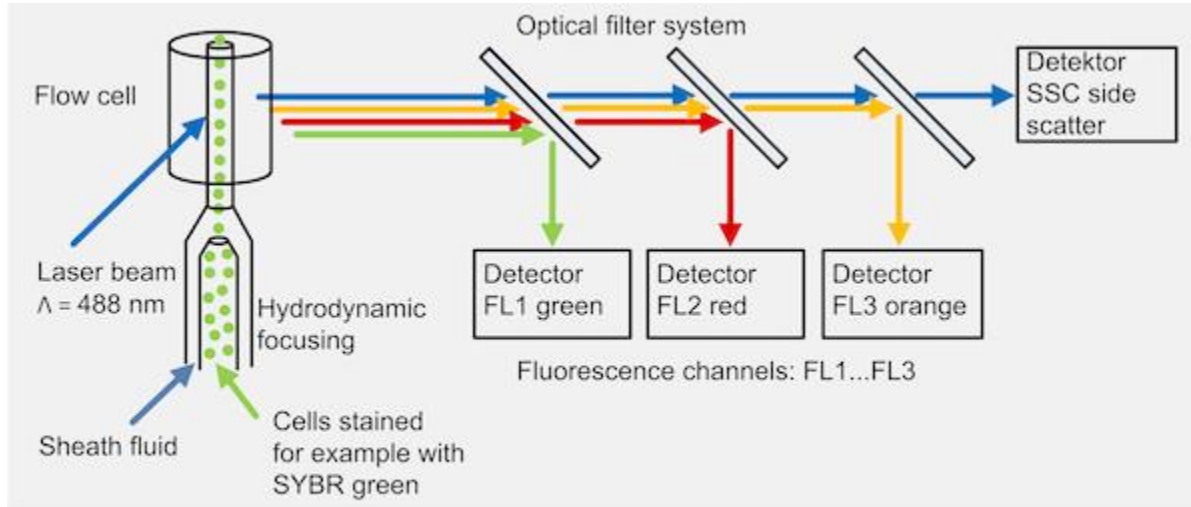
- UV/Arc lamps
- Lasers / (350-363, 420, 457, 488, 514, 532, 600, 633 nm)
 Argon ion, Krypton ion, HeNe, HeCd, Yag

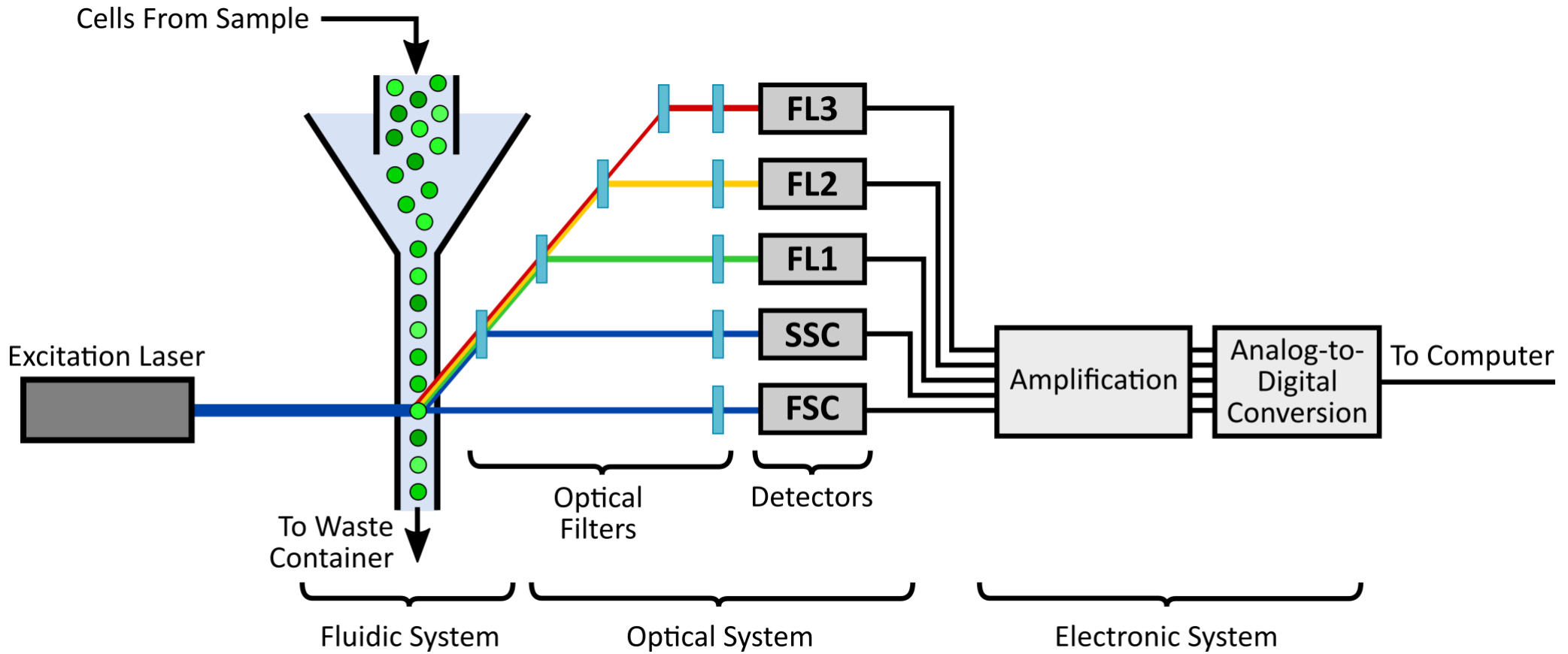


<http://www.ilt.fraunhofer.de/eng/100053.html>

Optické dráhy

- Dráha světla od ozářené buňky až k detektoru.
- Optické části oddělují jednotlivé vlnové délky.

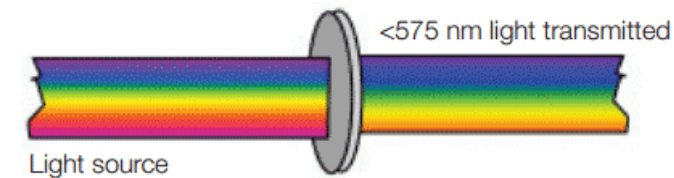




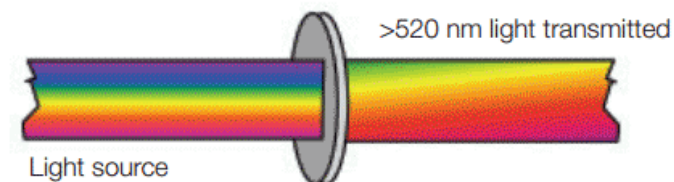
Filtry

- Používají se k oddělení vlnových délek.
- V úhlu 45° fungují jako dichroická zrcátka.

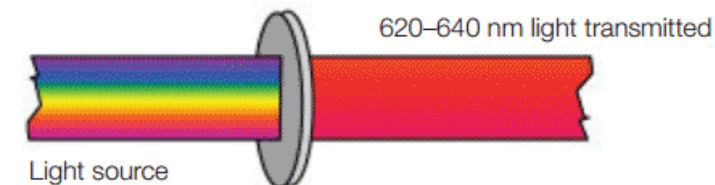
575 nm Short Pass Filter



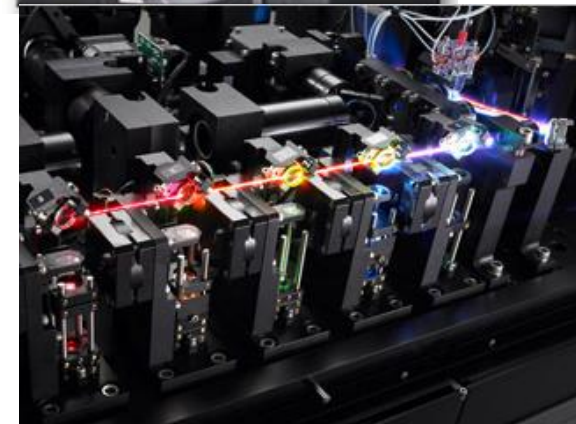
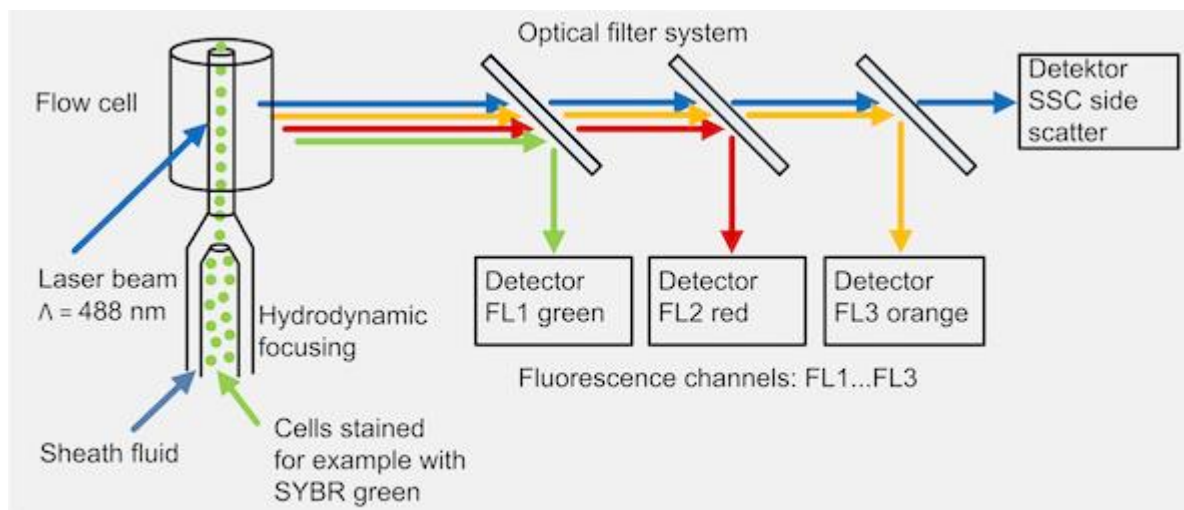
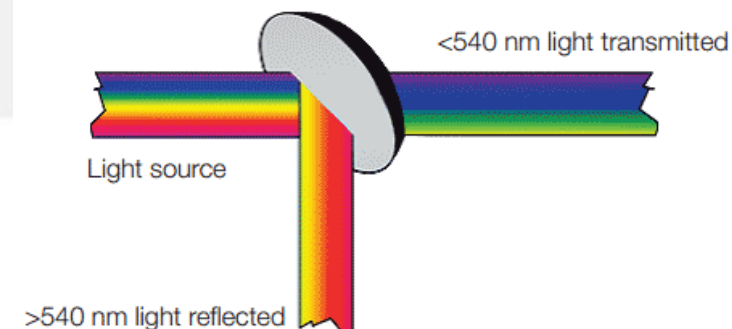
520 nm Long Pass Filter

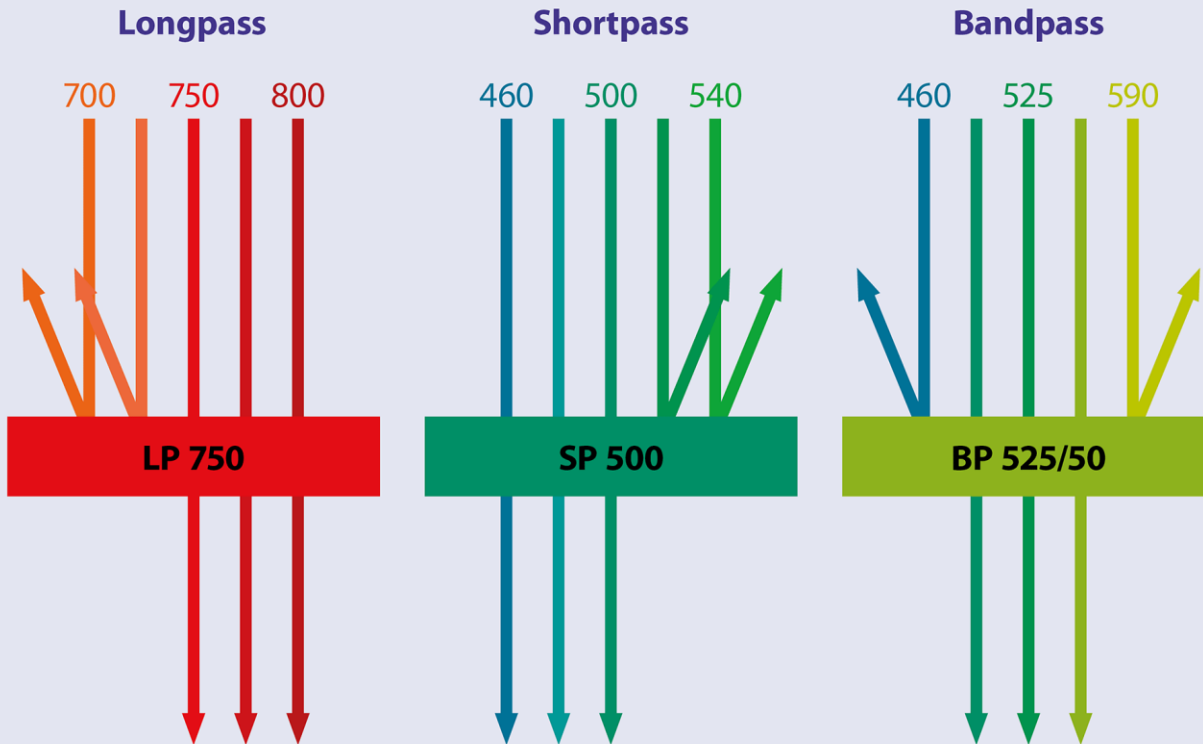


630/20 nm Band Pass Filter



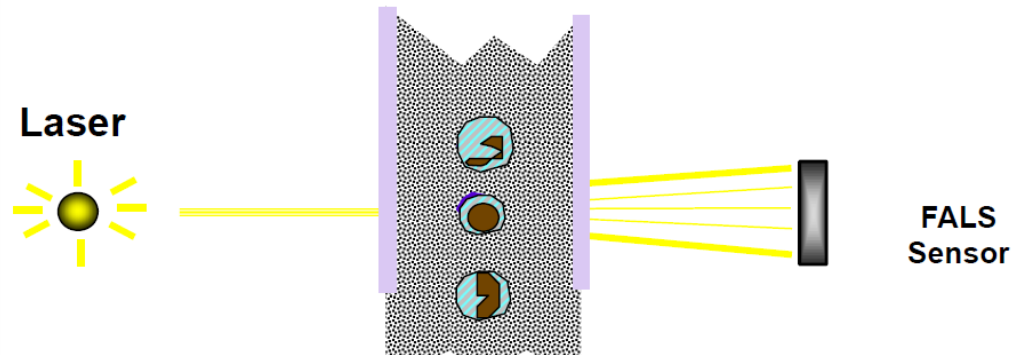
540 nm Dichroic Short Pass Mirror



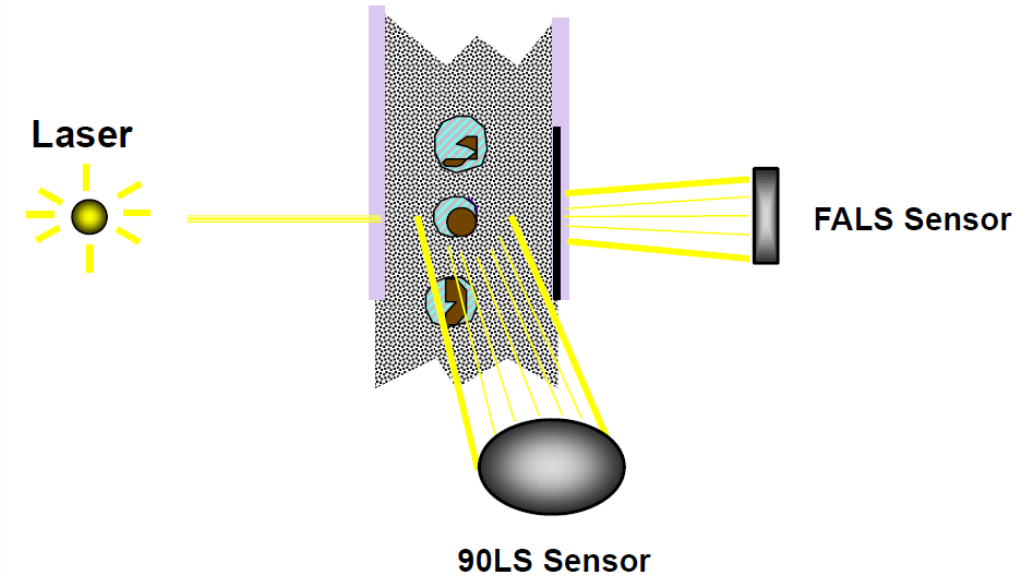


525/50 (rozsah)
 $525 \pm 25 = 500$ až 550

Forward Angle Light Scatter

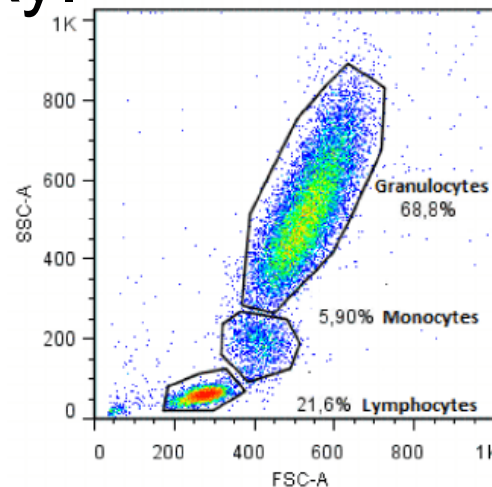


90 Degree Light Scatter



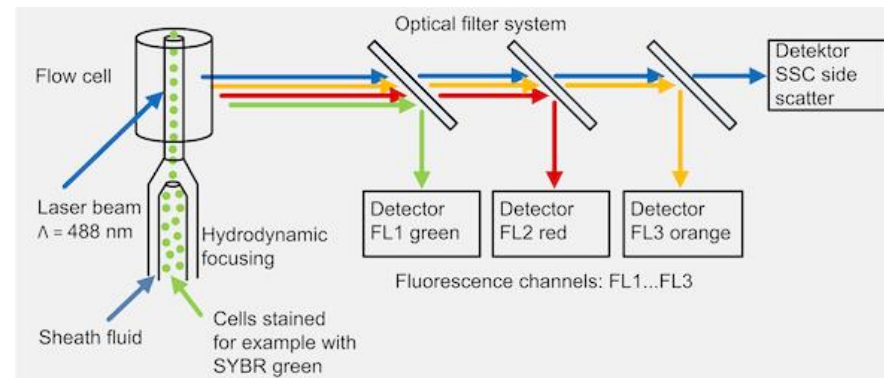
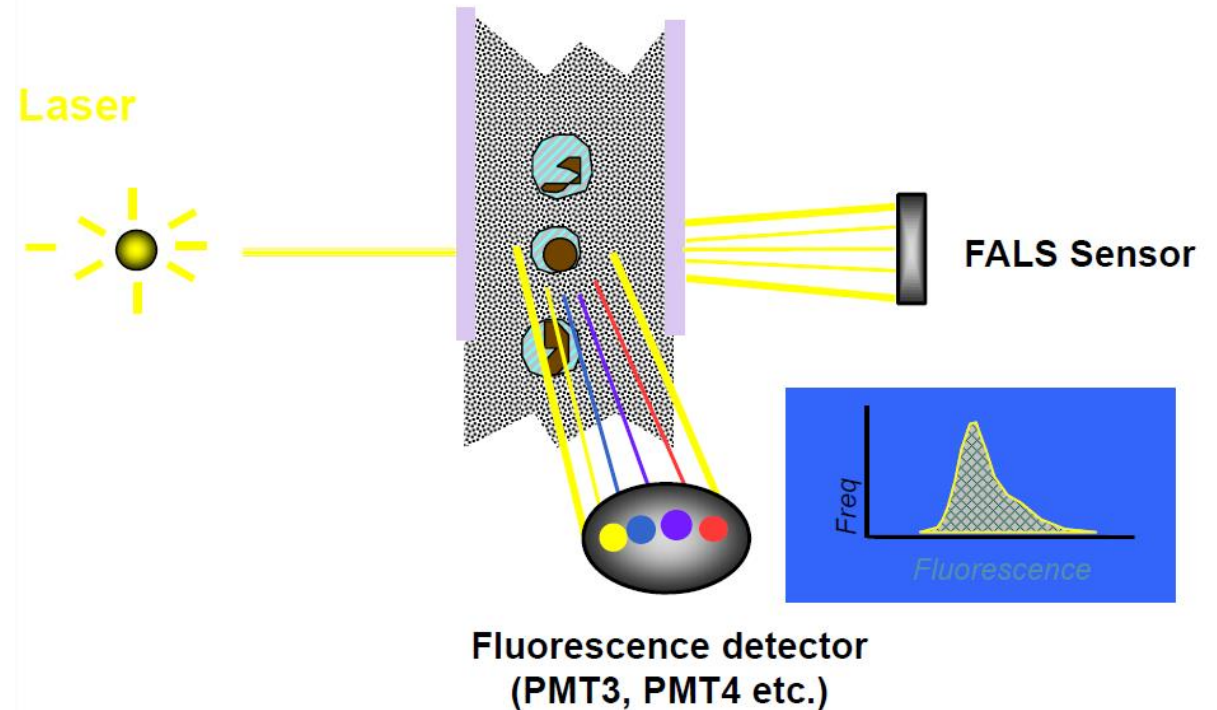
- Informace o povrchových vlastnostech a velikosti buňky.
- Umožňuje rozlišit živé buňky.

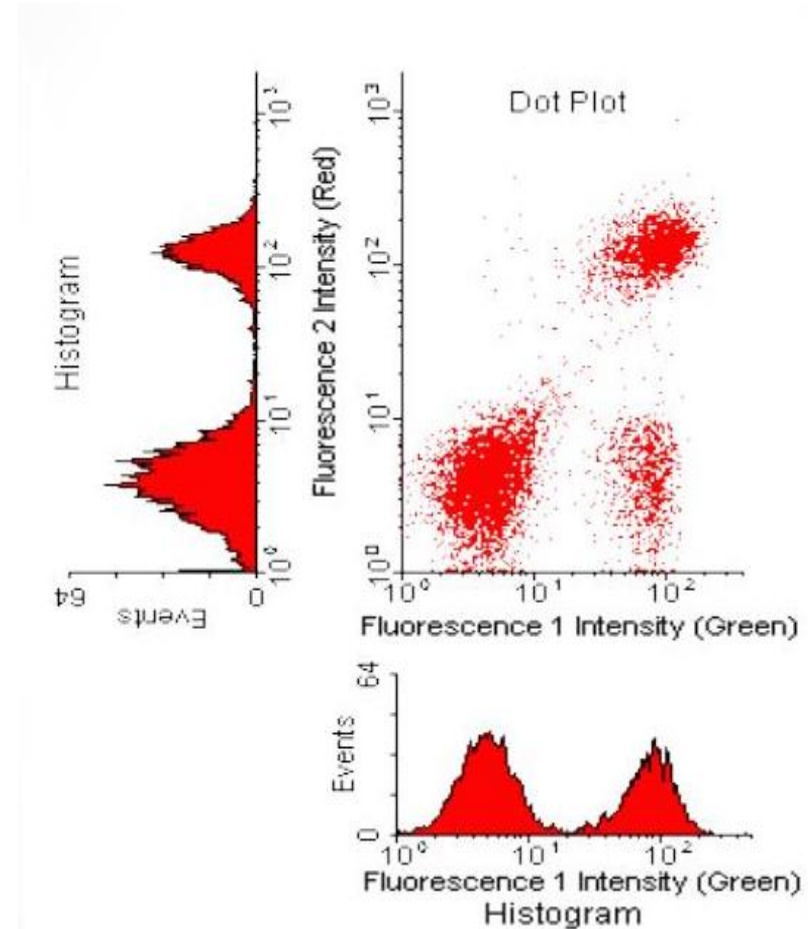
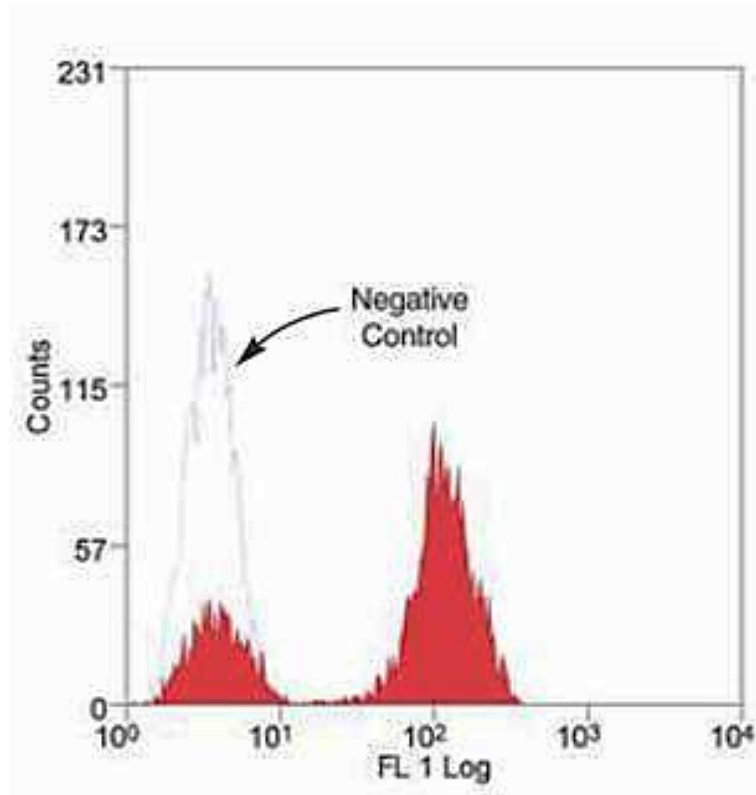
- Informace o granularitě, inkluzích a hustotě buňky.
- Můžeme rozlišit buňky podle granularity.



Fluorescence Detectors

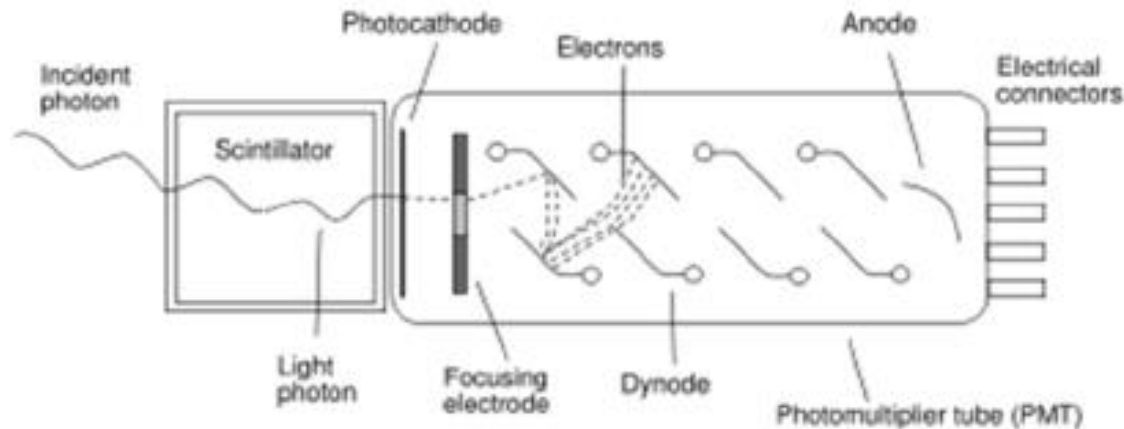
- Fluorescence emitovaná každým flourochromem je detekována specifickým fluorescenčním kanálem.
- Specificita detekce je zaručena selektivitou filtrů a zrcátek.



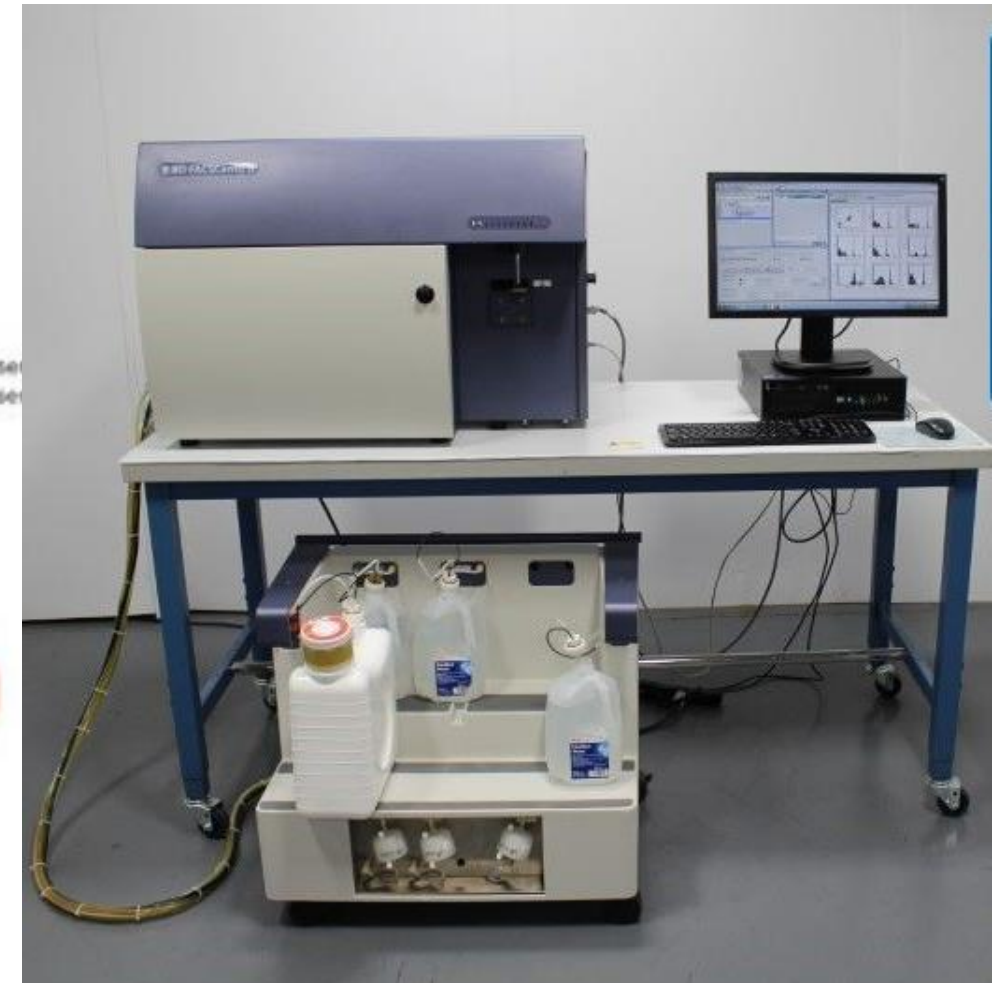
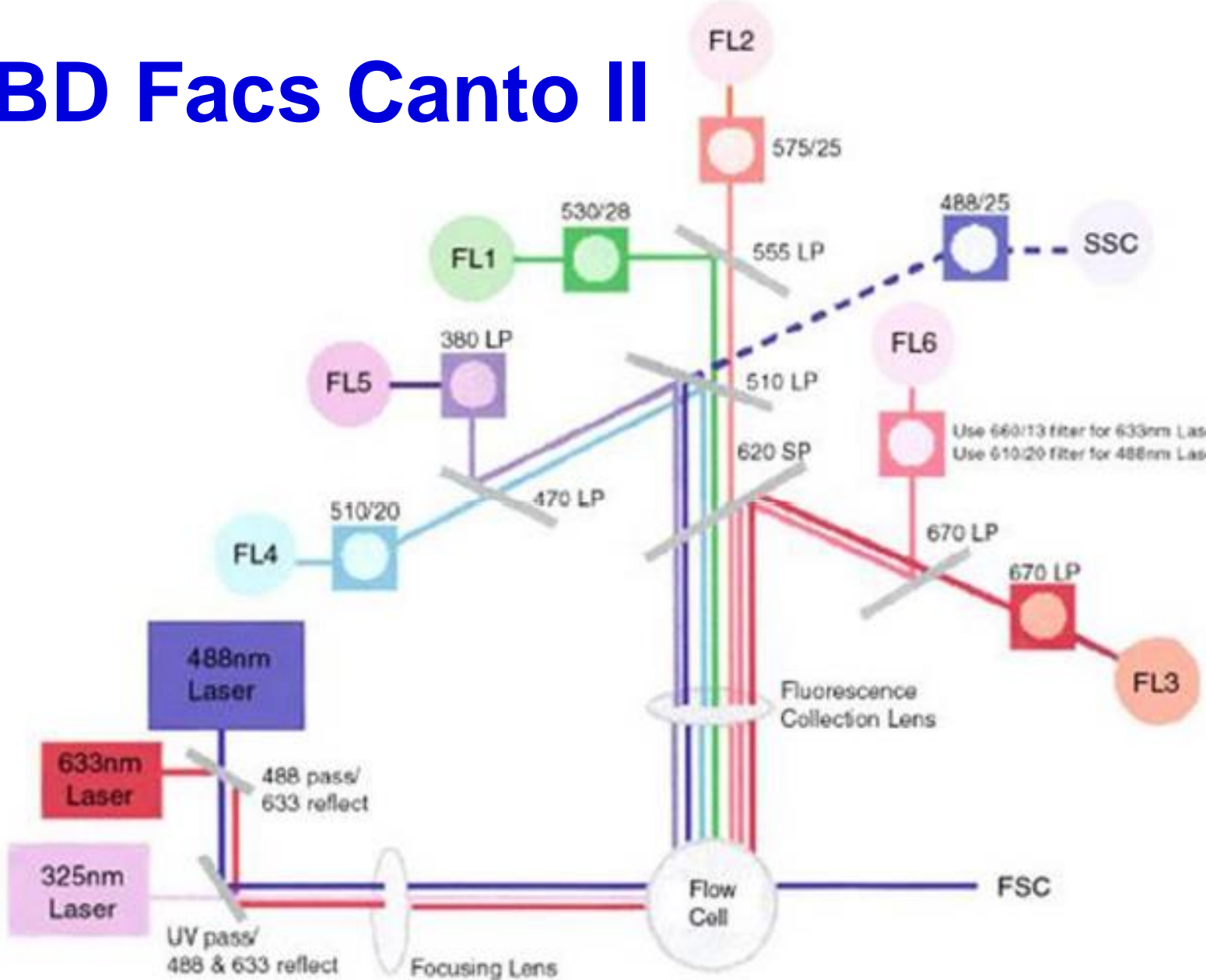


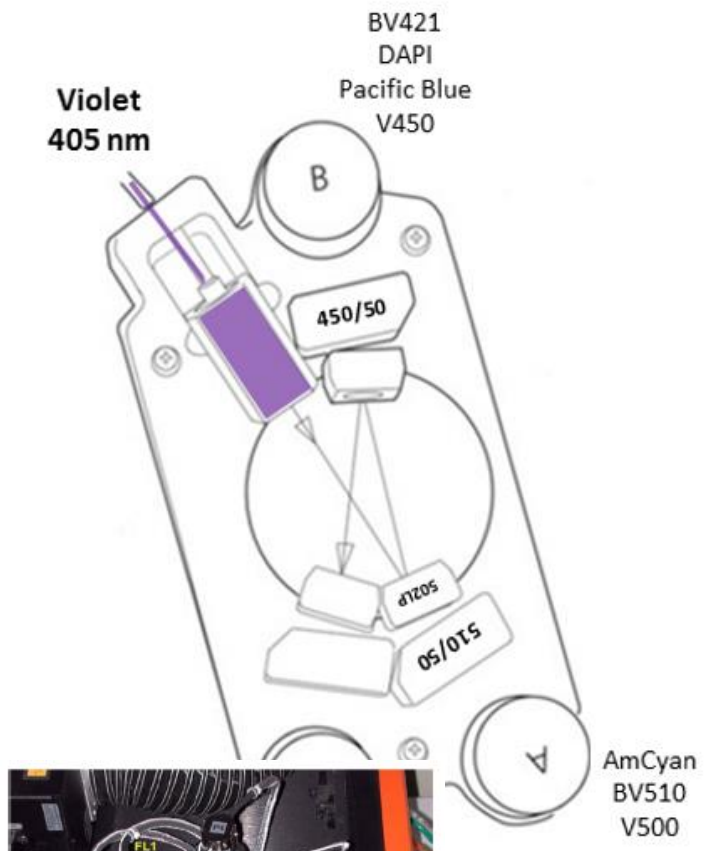
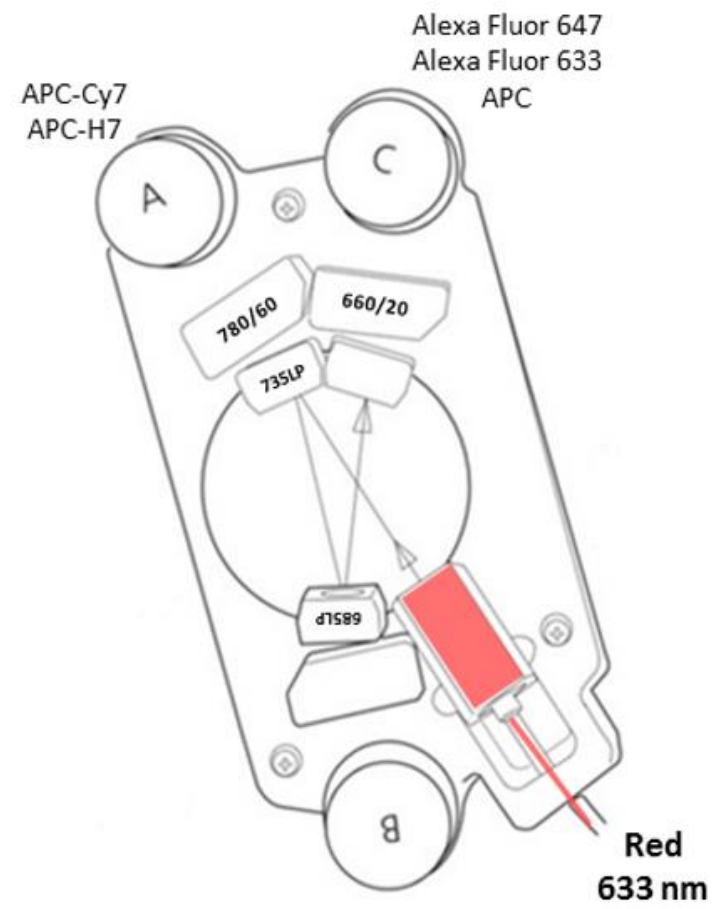
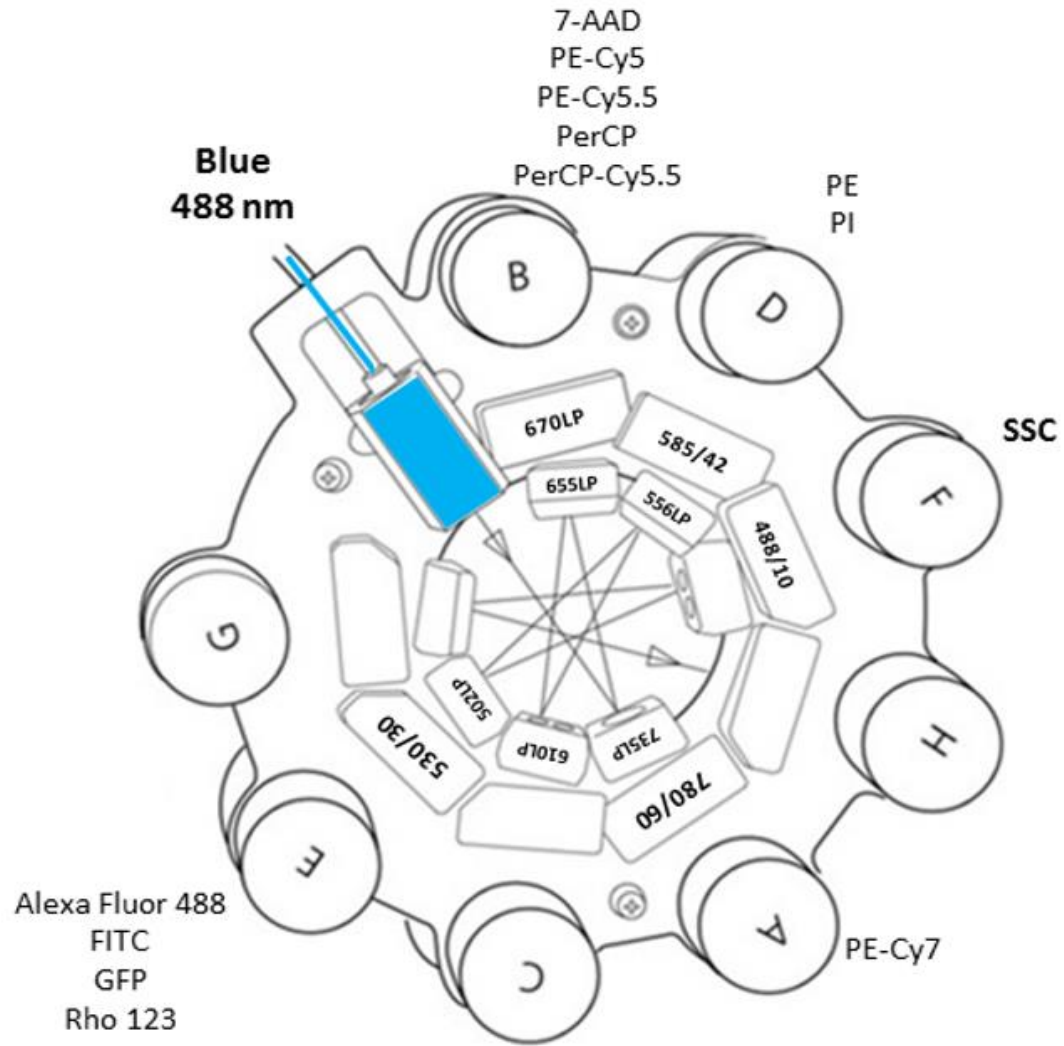
Detektory

- Diody (používají se ve forward scatteru).
 - Pouze pro silné signály, lepší linearita.
- Fotonásobiče (PMT detektory pro fluorescenci).
 - Citlivé, ale mohou se poškodit přeexponováním vysokou silou laseru.



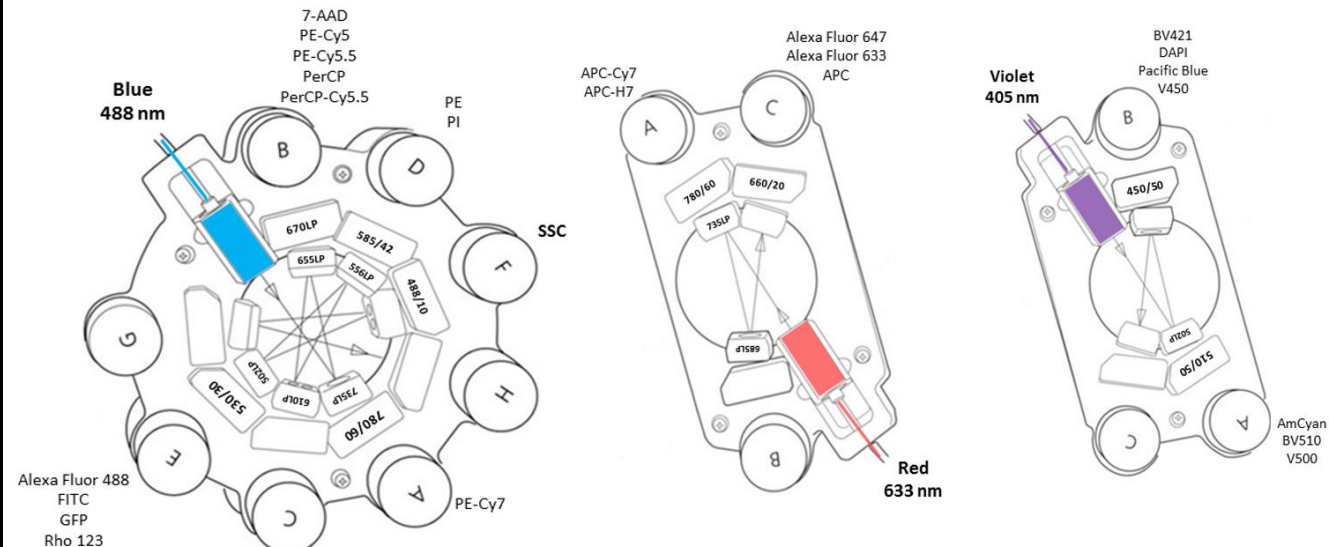
BD Facs Canto II





FACSCanto

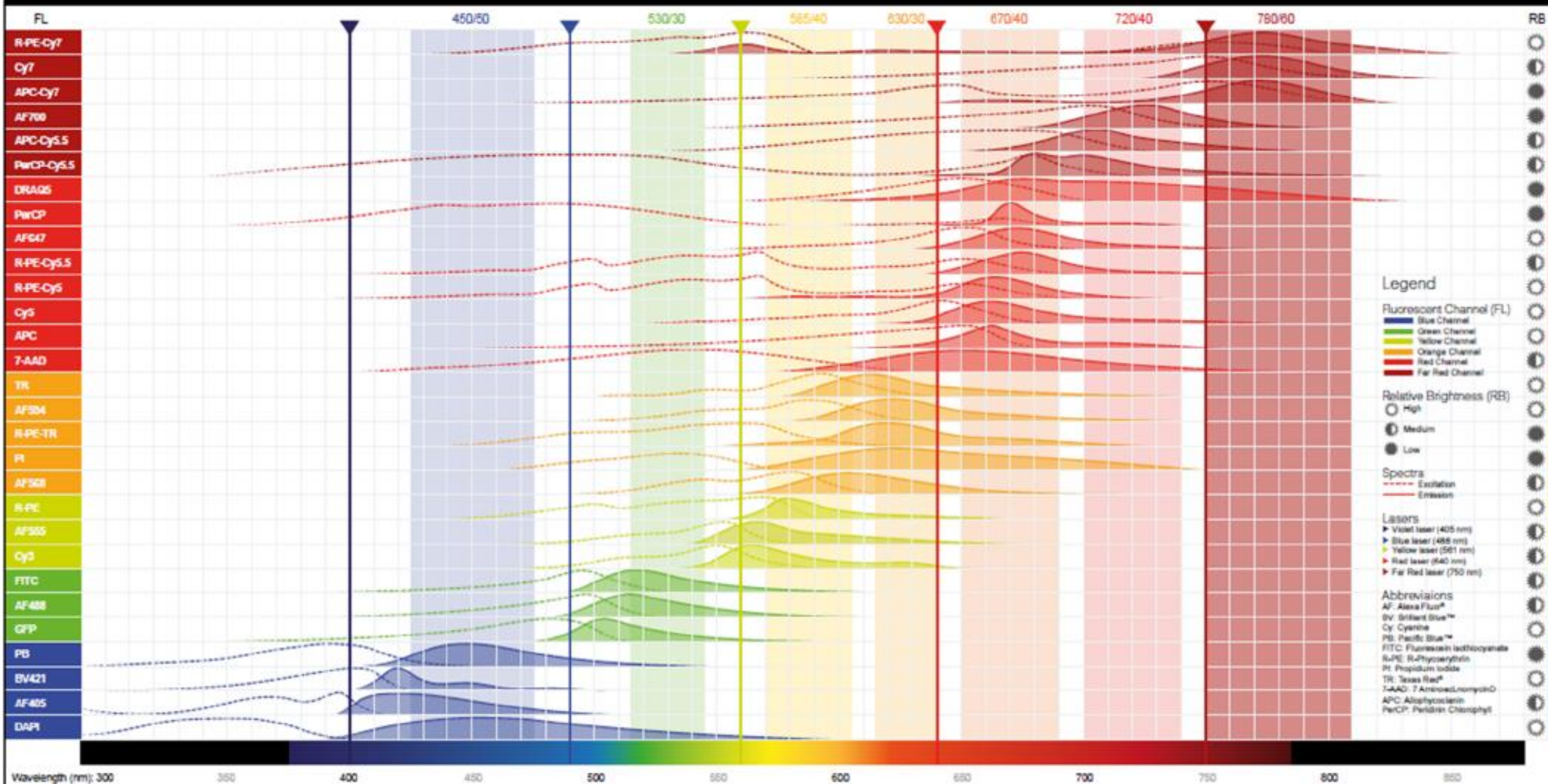
Laser	Detector	Fluorochromes
405		
	450/50	Pacific Blue, eFluor 450, V450, BV 421, Cascade Yellow, (DAPI)
	510/50	AmCyan, BV 510, Krome Orange, V500, Cascade Blue
488		
	530/30	FITC, Alexa Fluor 488, BB 515, CFSE, Fluo-3, GFP
	585/42	PE, PI
	670LP	PerCP, PerCP-Cy 5.5, PC5, 7-AAD
	780/60	PC7
633		
	660/20	APC, Alexa Fluor 647, eFluor 660
	780/60	APC-Cy7, APC-H7, APC - Alexa Fluor 750, APC-eFluor 780



Zdroje fluorescenčního signálu

- Protilátky značené fluorofory.
- Autofluorescence.
- Fluorescenční barvy – PI, GFP,...
- Jiné chemické látky s fluorescenčními vlastnostmi (léčiva, alkaloidy,...).

Fluorochrome chart

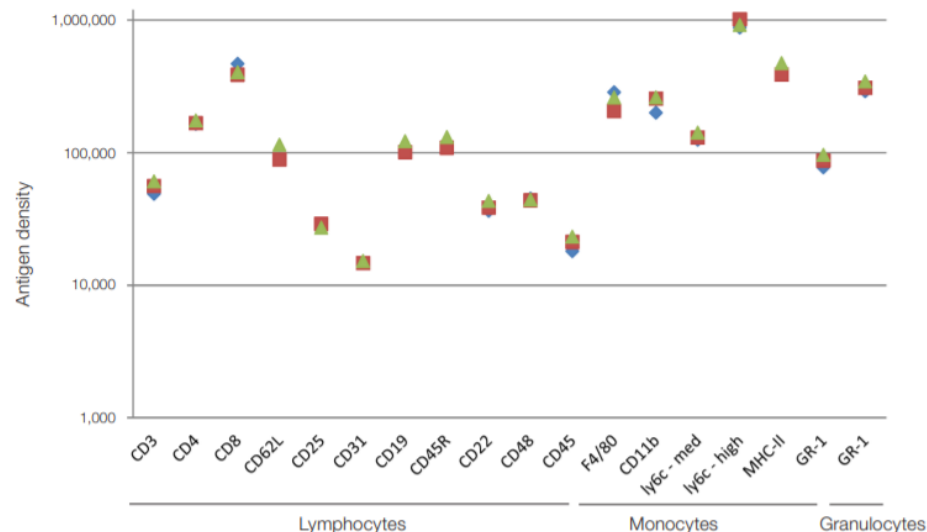


Sestavení mnohobarvného panelu

- Párujeme silné fluorofory (např. PE) s markery, které jsou exprimovány v nízkých hladinách.
- Slabé fluorofory (např. Pacific Blue) párujeme s markery s vysokou expresí.

Antigen Density for Common Murine Markers

Antigen density of common murine markers found on the surface of freshly isolated splenocytes from C57BL/6 mice.

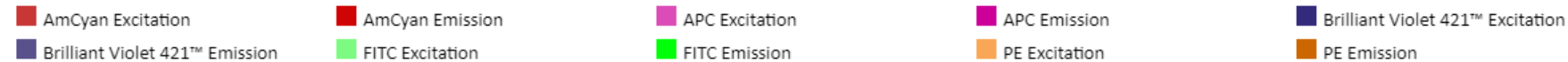
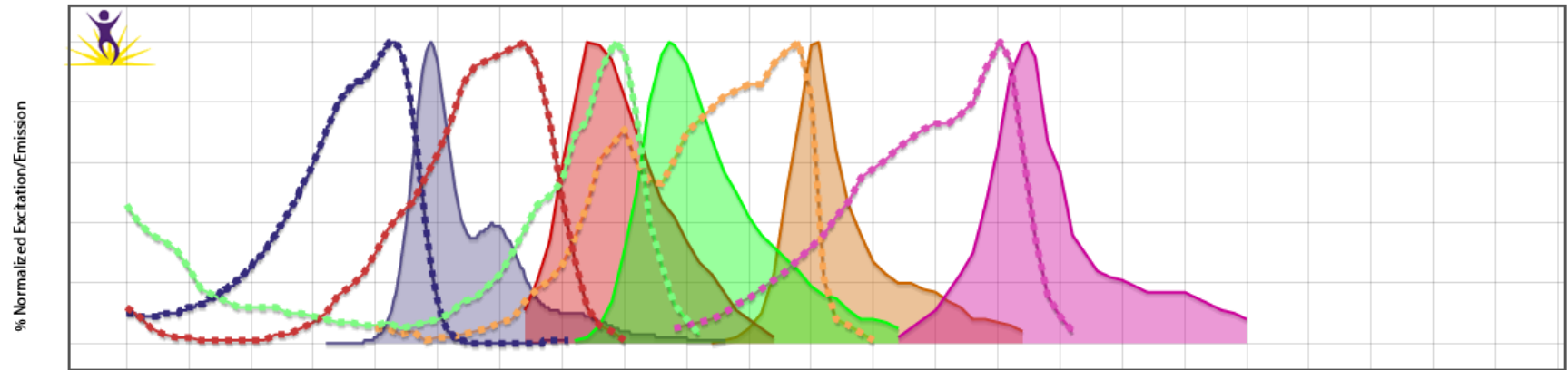


Laser	Fluorochrome			
	Very Bright	Bright	Moderate	Dim
Ultraviolet (355 nm)		BD Horizon™ BUV661 BD Horizon™ BUV737	BD Horizon™ BUV395 BD Horizon™ BUV496	BD Horizon™ BUV805
Violet (405 nm)	BD Horizon™ BV421 BD Horizon™ BV650 BD Horizon™ BV711	BD Horizon™ BV605 BD Horizon™ BV786	BD Horizon™ BV510	BD Horizon™ V450 BD Horizon™ V500
Blue (488 nm)	BD Horizon™ BB515 BD Horizon™ PE-CF594 PE-Cy™5	PE PE-Cy™7	FITC Alexa Fluor® 488 PerCP-Cy™5.5	PerCP
Yellow/Green (561 nm)	PE BD Horizon PE-CF594 PE-Cy5 PE-Cy7			
Red (640 nm)		APC Alexa Fluor® 647 BD Horizon™ APC-R700		Alexa Fluor® 700 APC-H7 APC-Cy7

FACSCanto



Laser	Detector	Fluorochromes
405		
	450/50	Pacific Blue, eFluor 450, V450, BV 421, Cascade Yellow, (DAPI)
	510/50	AmCyan, BV 510, Krome Orange, V500, Cascade Blue
488		
	530/30	FITC, Alexa Fluor 488, BB 515, CFSE, Fluo-3, GFP
	585/42	PE, PI
	670LP	PerCP, PerCP-Cy 5.5, PC5, 7-AAD
	780/60	PC7
633		
	660/20	APC, Alexa Fluor 647, eFluor 660
	780/60	APC-Cy7, APC-H7, APC - Alexa Fluor 750, APC-eFluor 780



Technické součásti

Buňky v suspenzi proudí jednotlivě přes ozařovanou část, kde rozptylují světlo a emitují fluorescenci, která je detekována, filtrována a převedena na digitální hodnoty, které jsou analyzovány a uloženy v počítači.

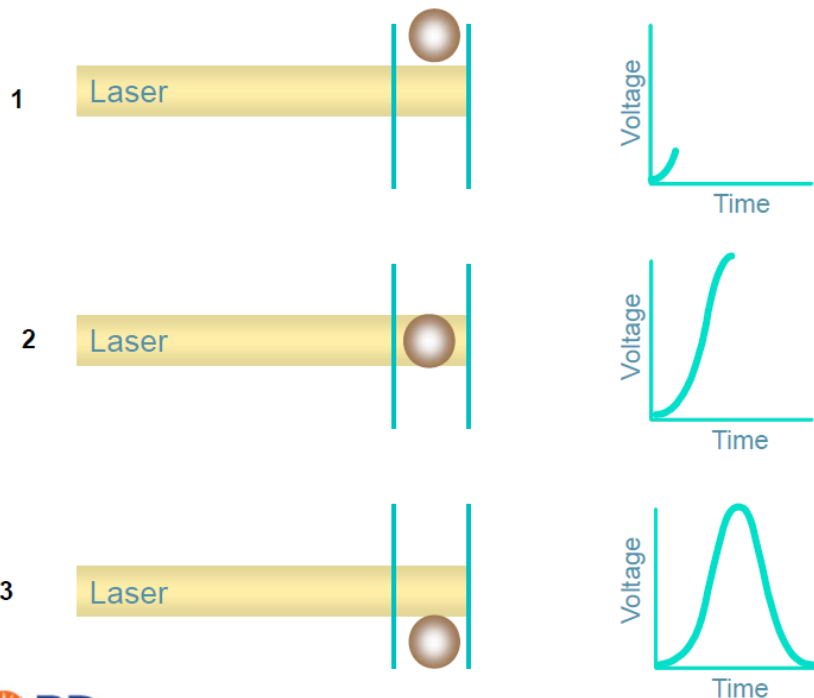
Fluidika

Optika

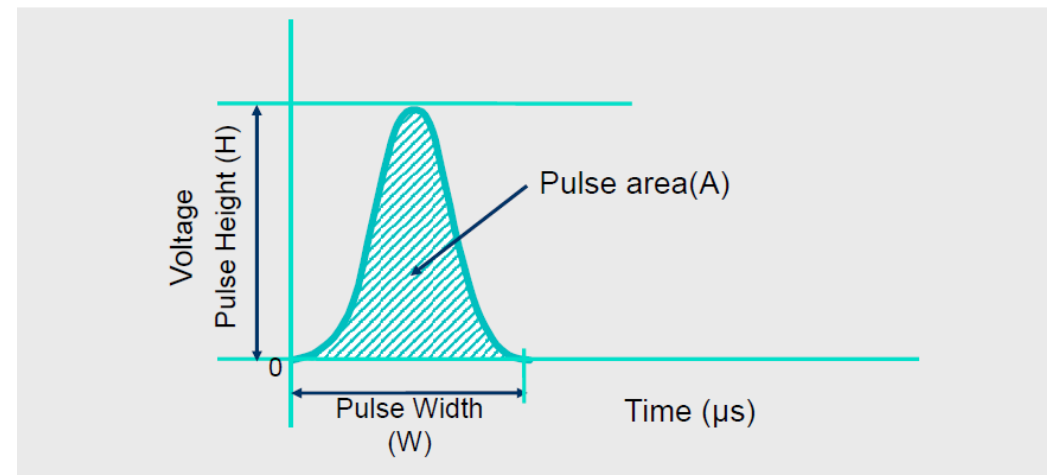
Elektronika

- Když buňka prochází laserem, rozptýlené světlo vytvoří puls na senzoru.

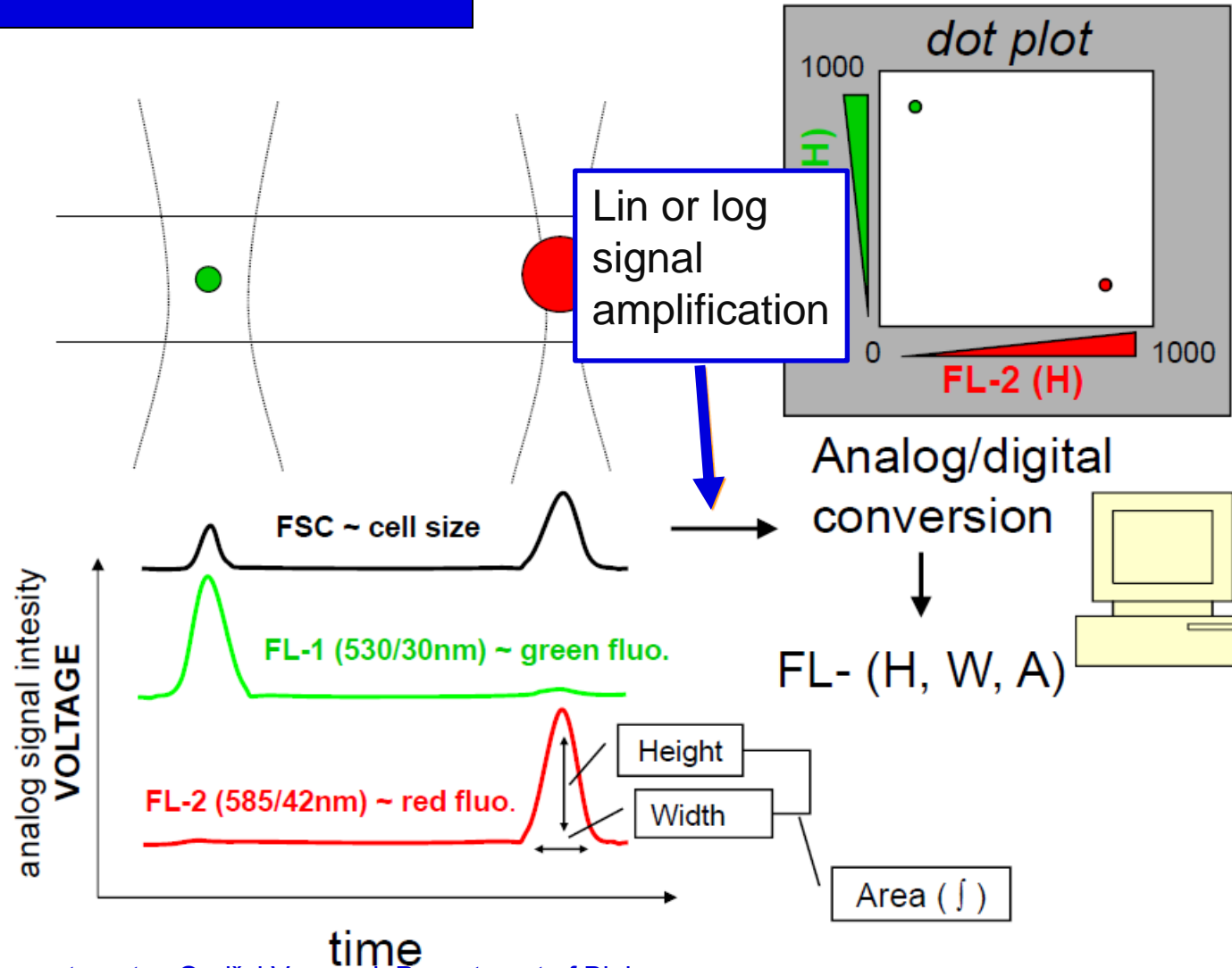
Creation of a Voltage Pulse



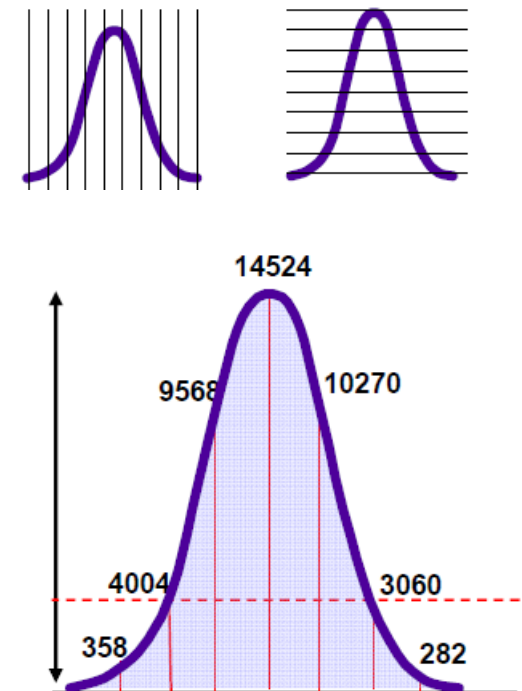
Height, Area, and Width

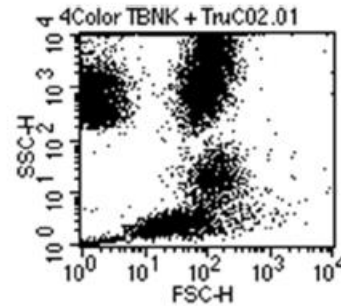
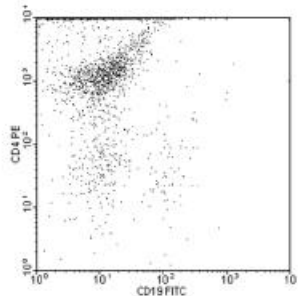
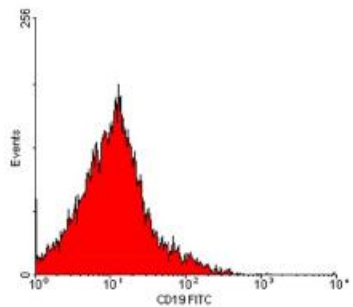


Zpracování signálu

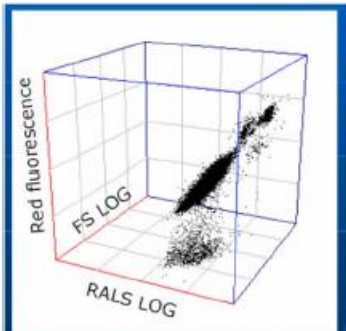
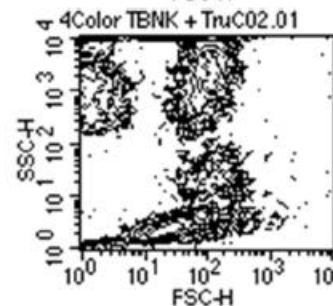
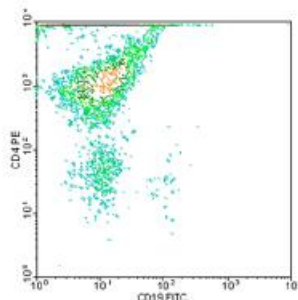
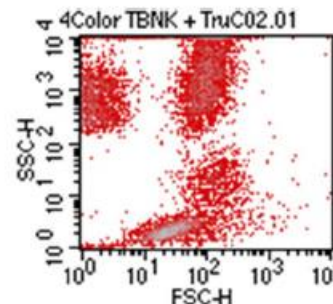
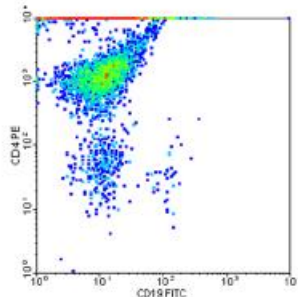


Analog/digital conversion



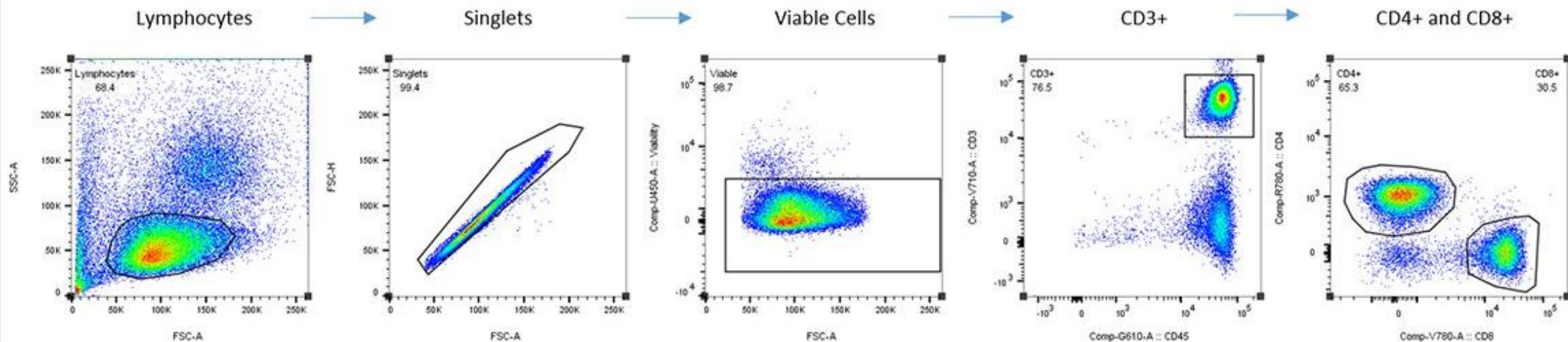


4Color TBNK + TruC02.01



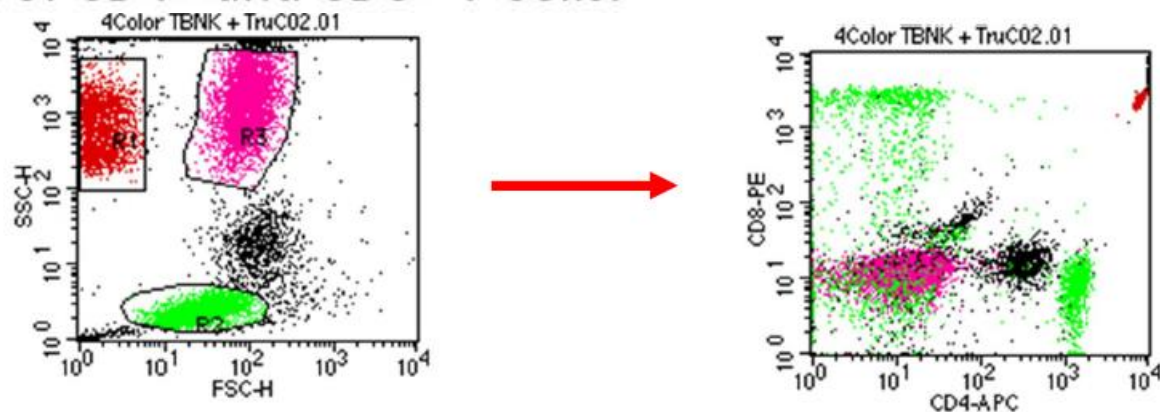
Zobrazení naměřených dat

- histogram
- dot plot
- isometric display
- contour plot
- chromatic (color) plots
- 3D projection

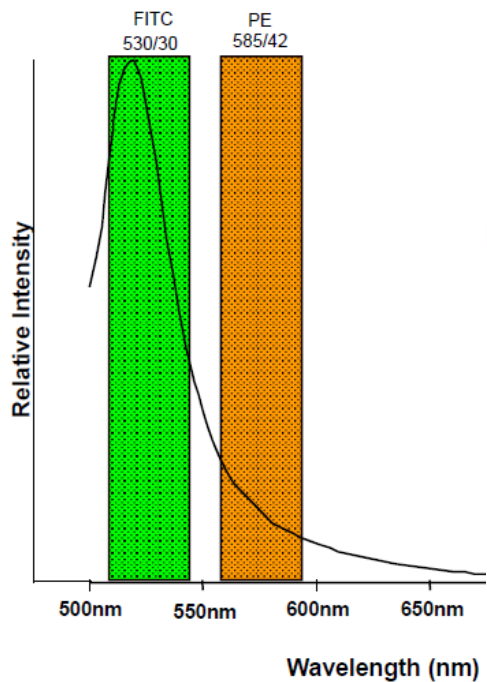
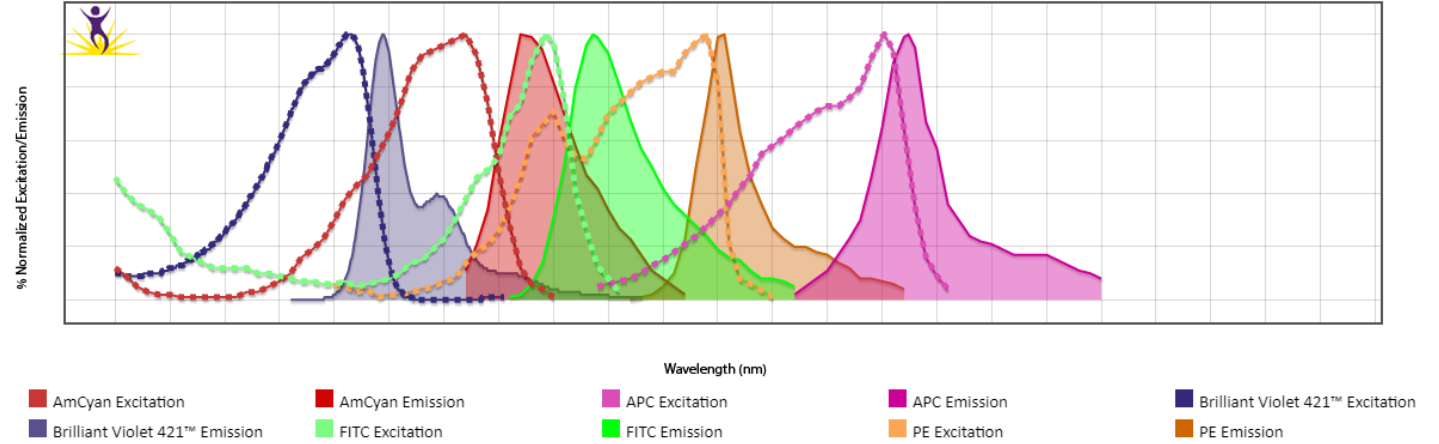
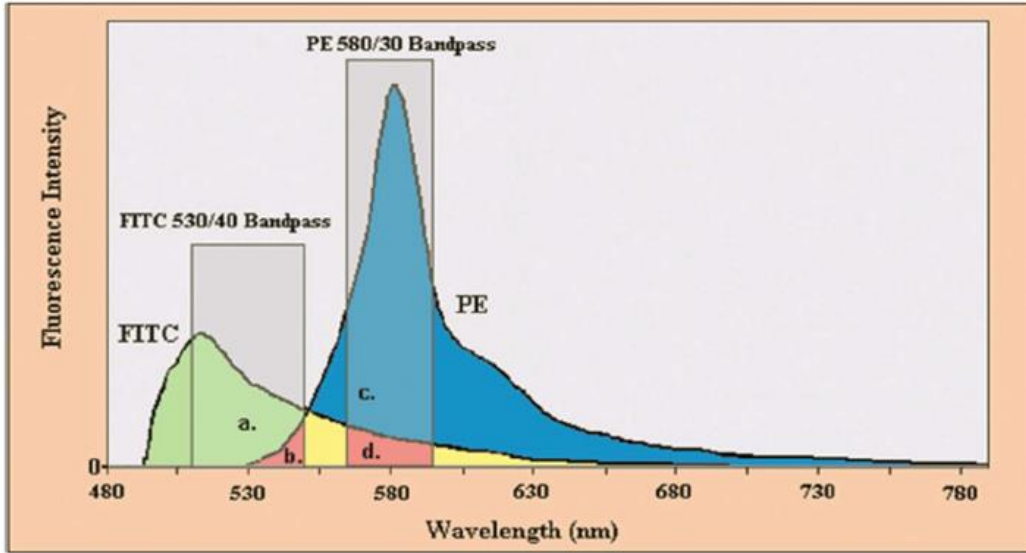


A representative Nested Gating Strategy illustrating lymphocyte population being subgated to the level of CD4+ and CD8+ T Cells.

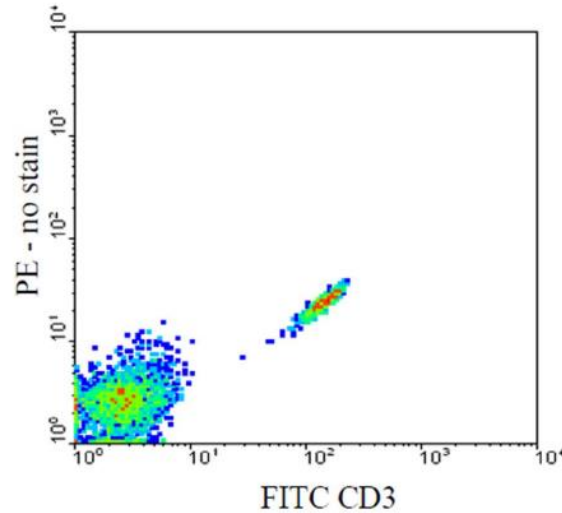
Back gating



Kompenzace

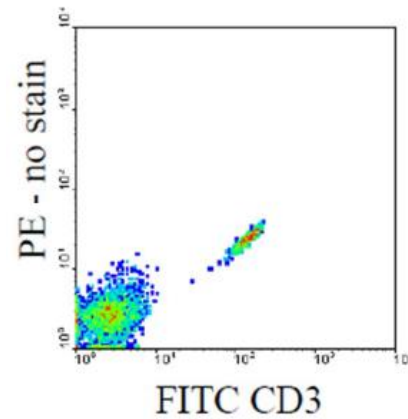


Unwanted signal detected in FL2 roughly 15%



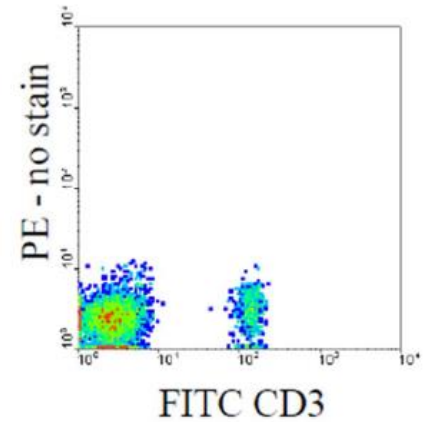
Total signal detected in FL1

Uncompensated



FL2-15%FL1

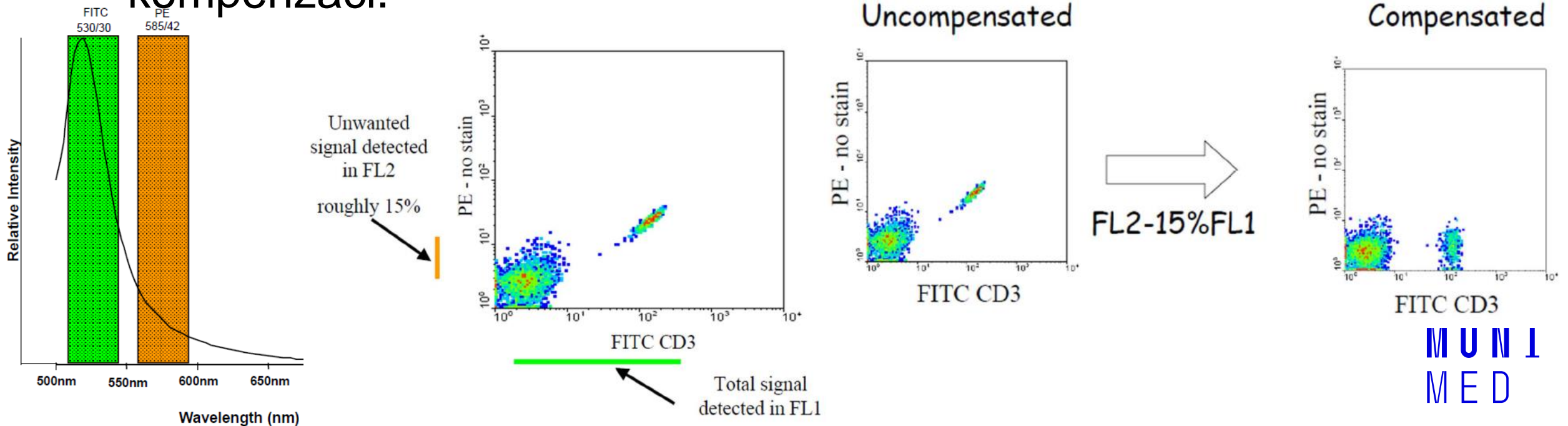
Compensated



MUNI
MED

Kompenzace

- Nutné jsou jednobarevné kontroly pro každý fluorofor, který je použitý v koktailu protilátek pro daný experiment.
- K tomu využíváme značené buňky nebo kompenzační kuličky.
- Kompenzaci pak můžeme používat při opakování pokusu ve stejném nastavení, ale při změně protilátek musíme udělat novou kompenzaci.



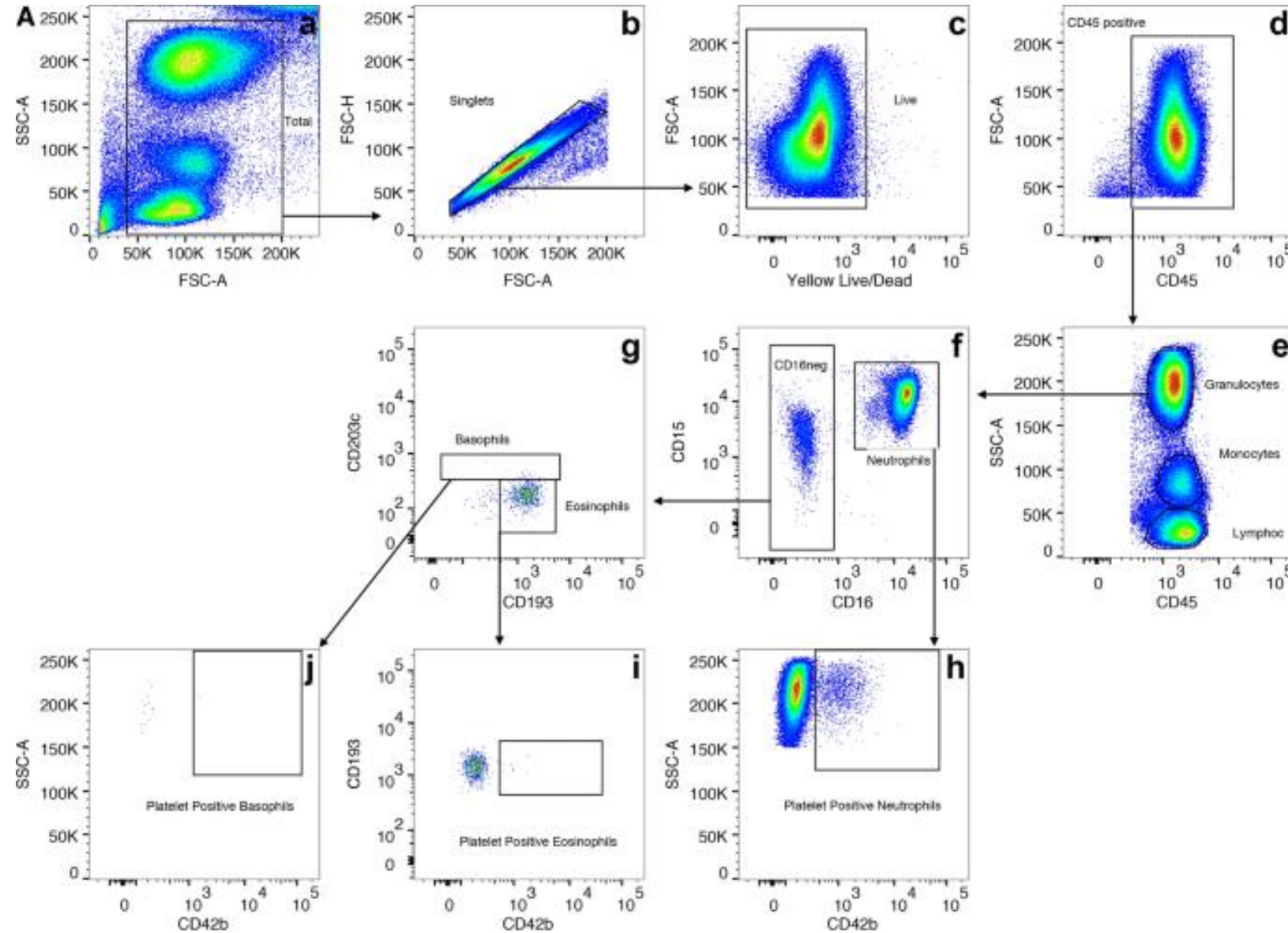
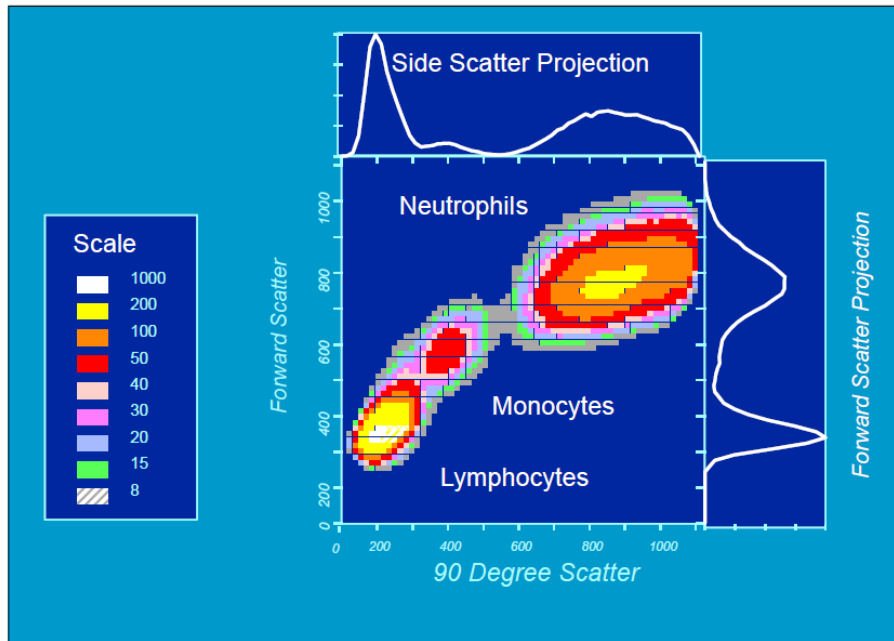
Kompensace

- Video o kompenzaci v BD software
- Compensation of a 7 color panel on the BD LSR II:
<https://youtu.be/5UHw4DIArx4>

Využití

Phenotyping

Light Scatter Gating



upraveno podle J.P.Robinson

Využití

Cell cycle analysis

- Fluorescent dyes binding DNA.
- Cells have to be fixed and permeabilized.

- Quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids (QBAs)
- **I. Slaninova**, J. Slanina and E. Taborska, "Quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids--novel cell permeant and red fluorescing DNA probes," *Cytometry A*, vol. 71, no. 9, pp. 700-708, 2007.
- Can be used to label viable cells.

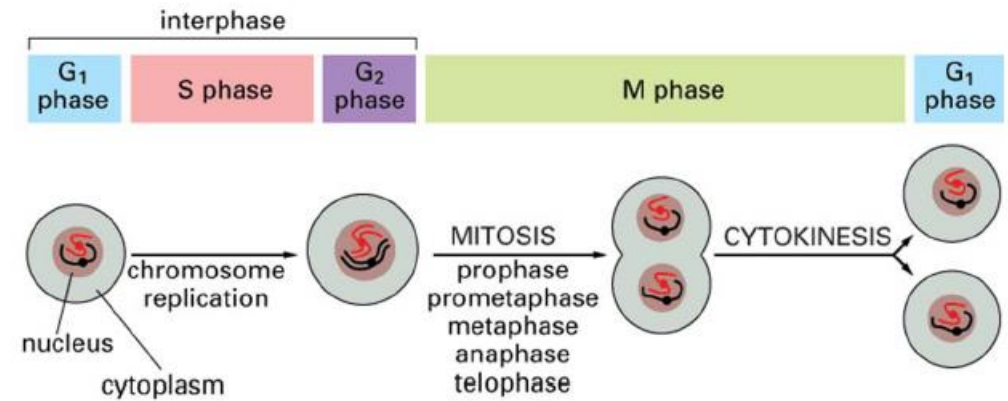
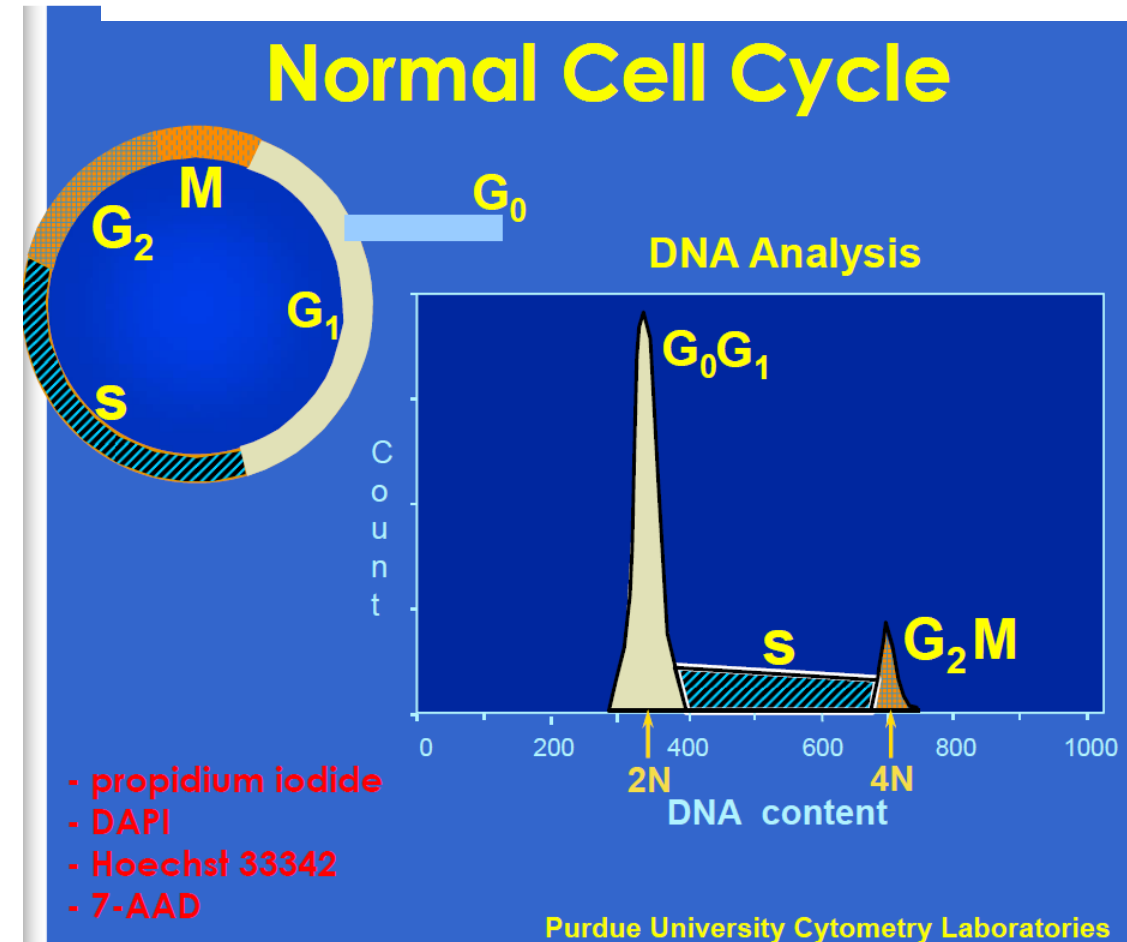


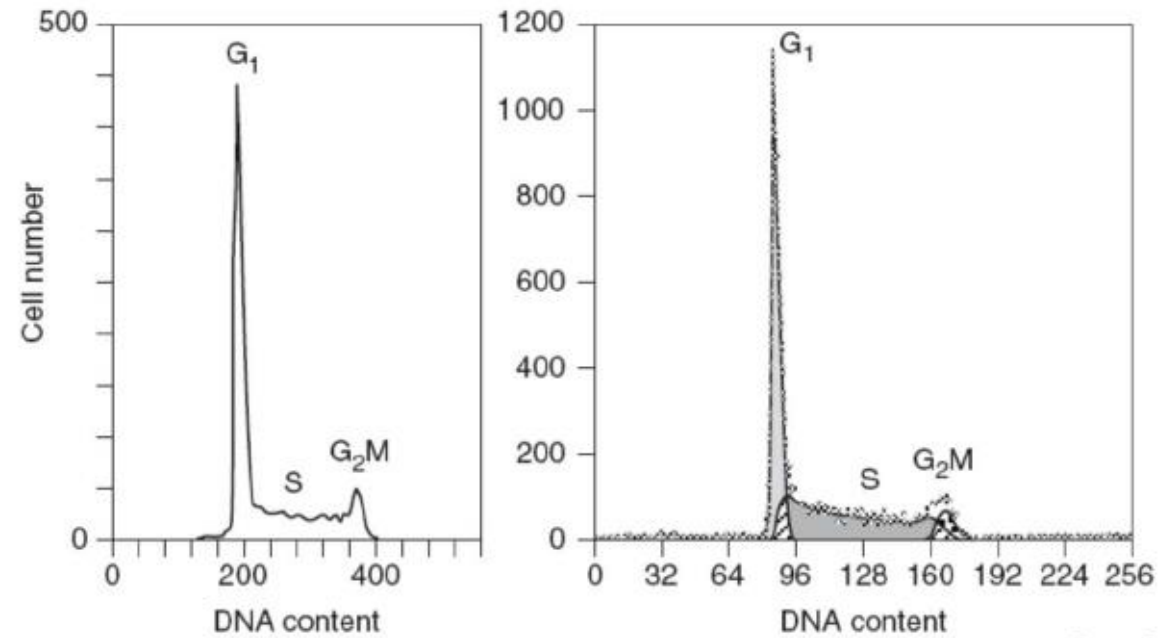
Figure 18-1. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.



Využití

Cell cycle analysis

- Software for analysis of distribution of cells in individual phases.



Current Protocols in Cytometry

Využití

Viability

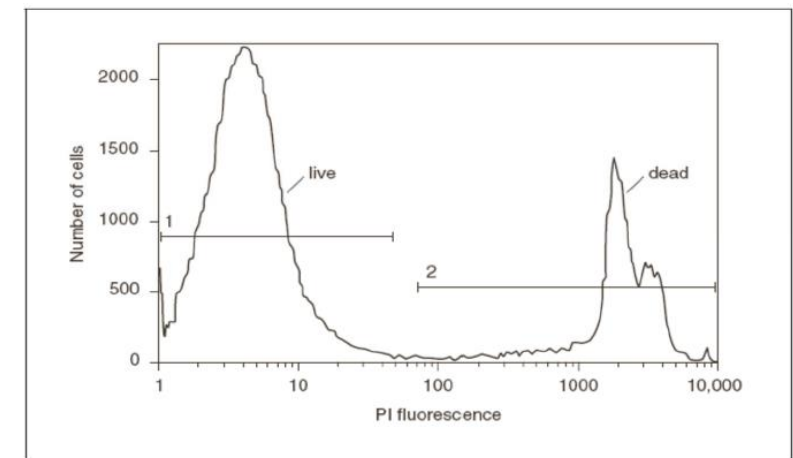
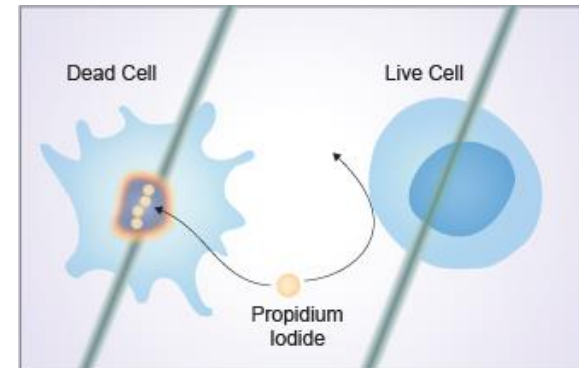
- Based on detection of membrane integrity.
- Some fluorescence dyes (PI, EBr) don't leak into live cells.

LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kits



Reactive dye	Excitation source	Ex*	Em*
blue fluorescent reactive dye (L23105)	UV	350	450
violet fluorescent reactive dye (L34955)	405 nm	416	451
aqua fluorescent reactive dye (L34957)	405 nm	367	526
yellow fluorescent reactive dye (L34959)	405 nm	400	575
green fluorescent reactive dye (L23101)	488 nm	495	520
red fluorescent reactive dye (L23102)	488 nm	595	615
far red fluorescent reactive dye (L10120)	633/635 nm	650	665
near-IR fluorescent reactive dye (L10119)	633/635 nm	750	775

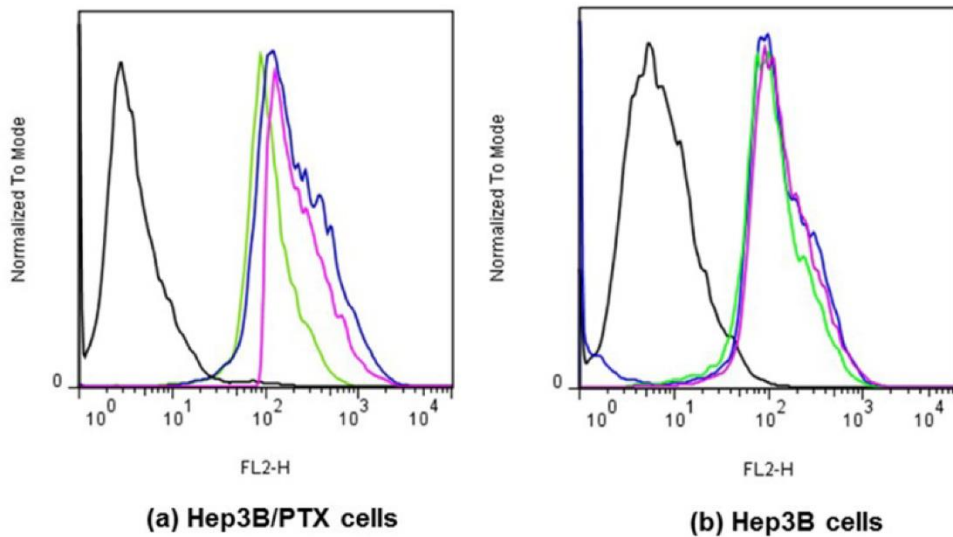
*Approximate fluorescence excitation (Ex) and emission (Em) maxima, in nm.



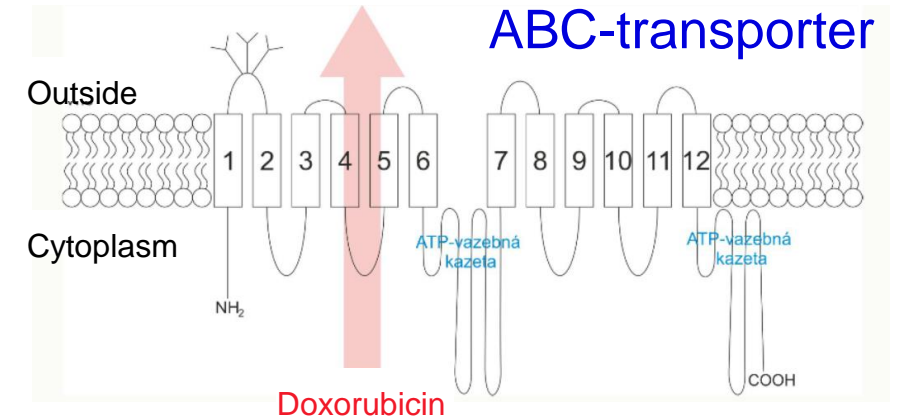
Využití

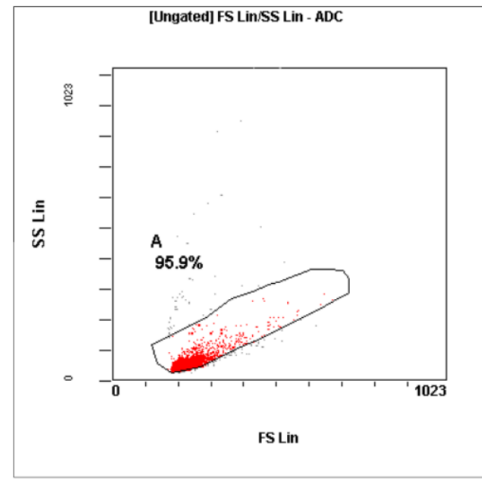
Doxorubicin accumulation

- Chemotherapeutic drug with fluorescent properties.
- Cells get rid of it from intracellular space using ABC-transporters in cytoplasmic membranes.



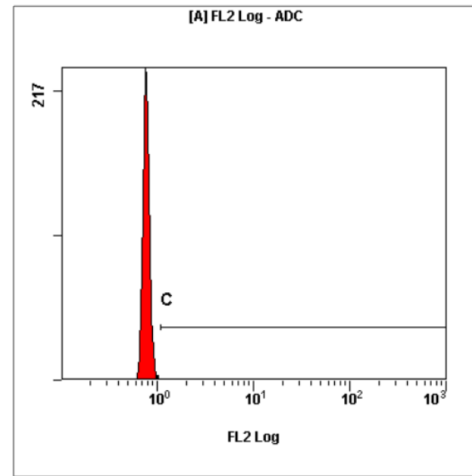
	Sample Name
█	Negative control
█	Doxorubicin
█	Achillin +Doxorubicin
█	Verapamil+ Doxorubicin





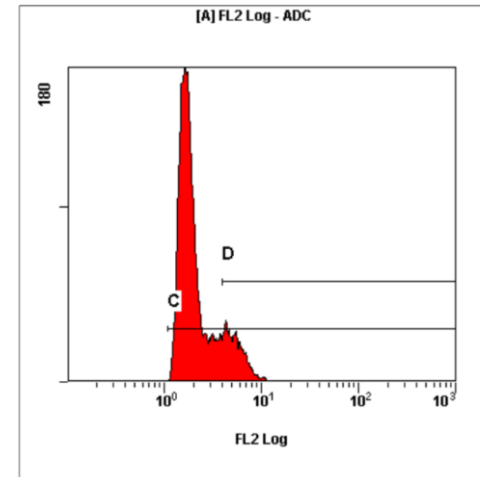
Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	4776	100.00	100.00	241	70.7
A	4578	95.85	95.85	238	64.5

-DOXO

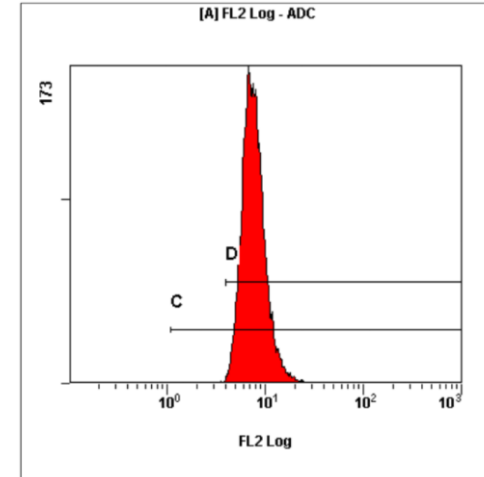


Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	4578	95.85	100.00	0.772	###
C	20	0.42	0.44	1.24	###

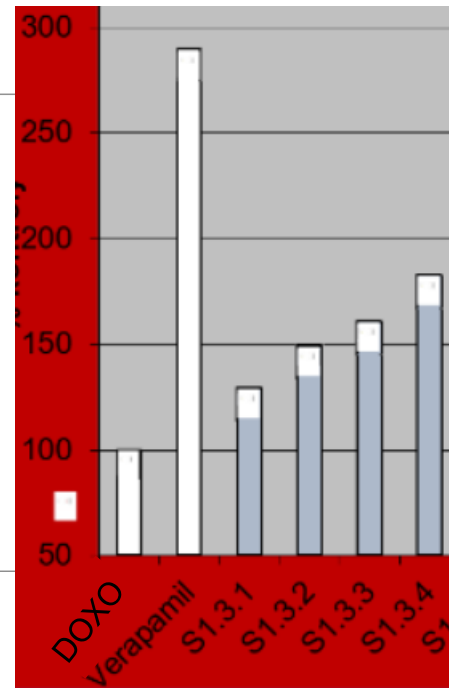
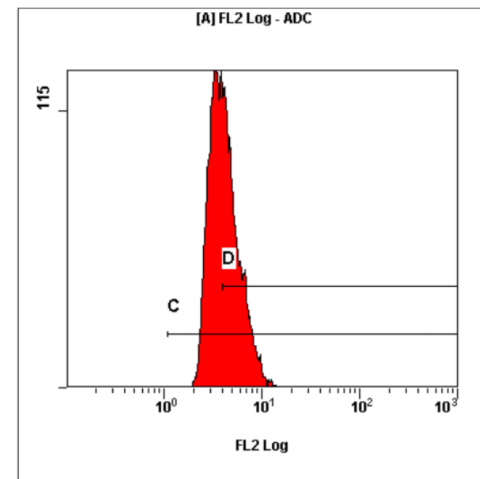
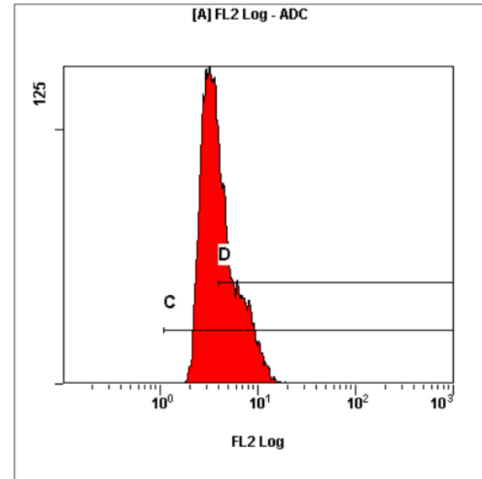
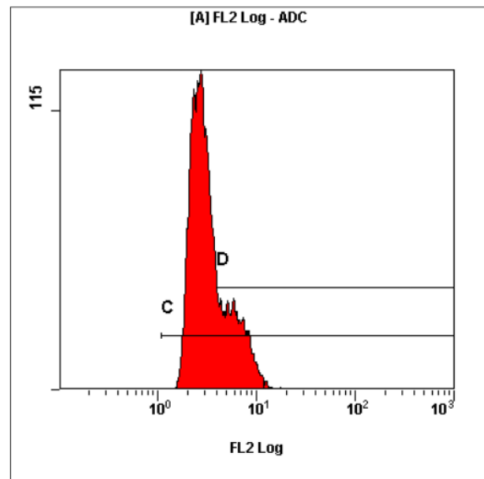
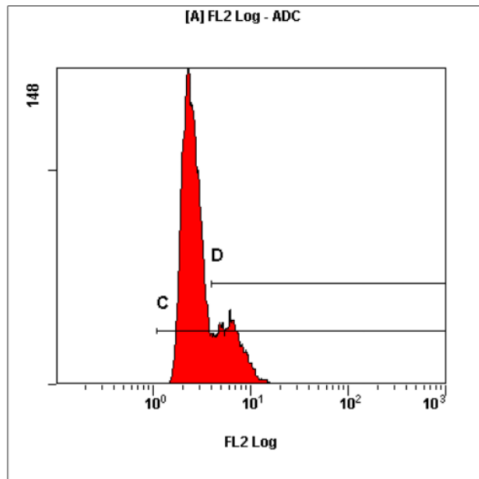
+DOXO



Verapamil



Lignans



Děkuji za pozornost!

