

# Bi9393 Analytická cytometrie

## Lekce 3



**Karel Souček, Ph.D.**

Oddělení cytokinety  
Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i.  
Královopolská 135  
612 65 Brno

**e-mail: [ksoucek@ibp.cz](mailto:ksoucek@ibp.cz)**  
tel.: 541 517 166



# Principy průtokové cytometrie a sortování

- sorting
- zpracování signálu
- analýza dat
- kompenzace signálu



Doležel (1999)

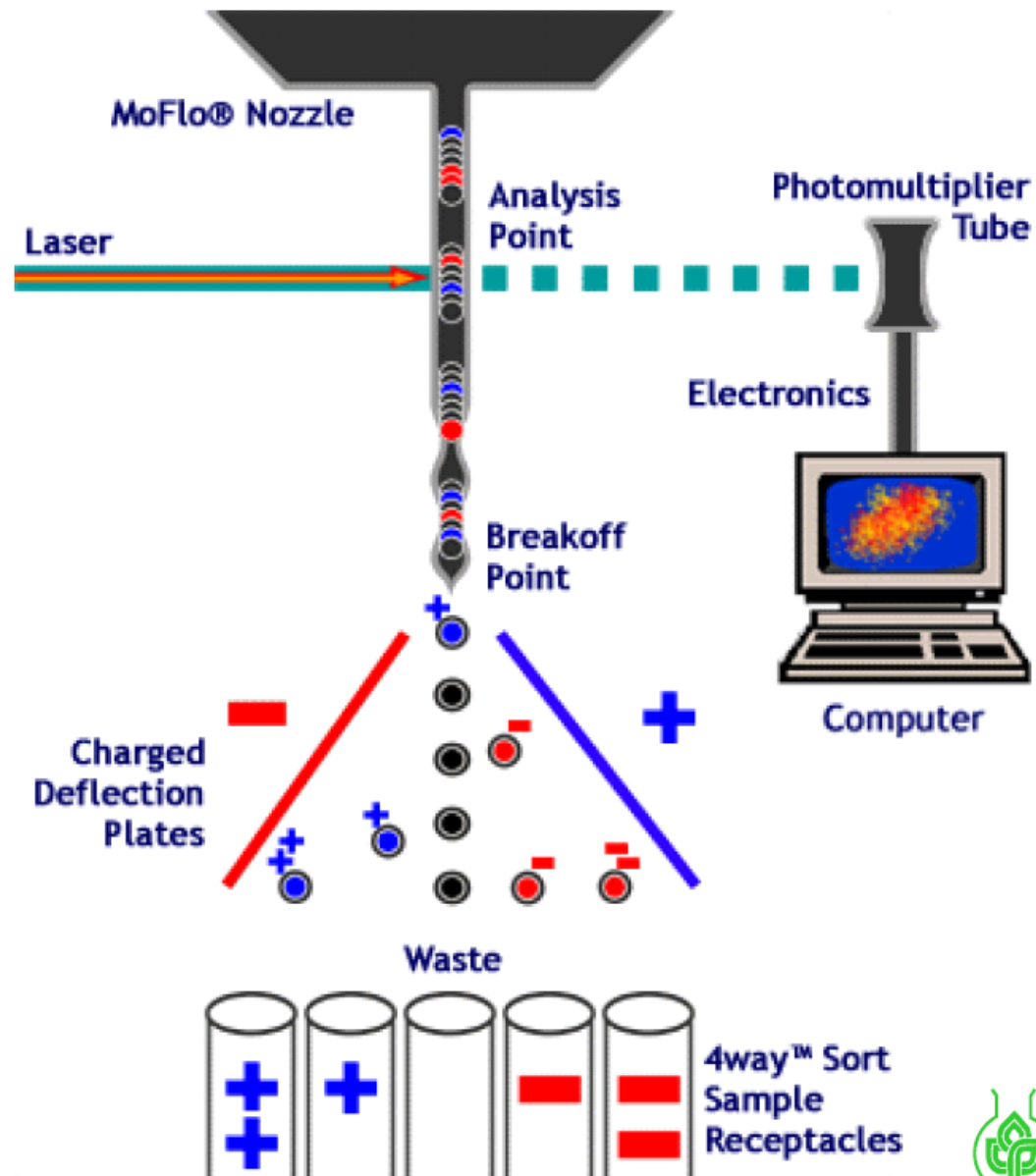


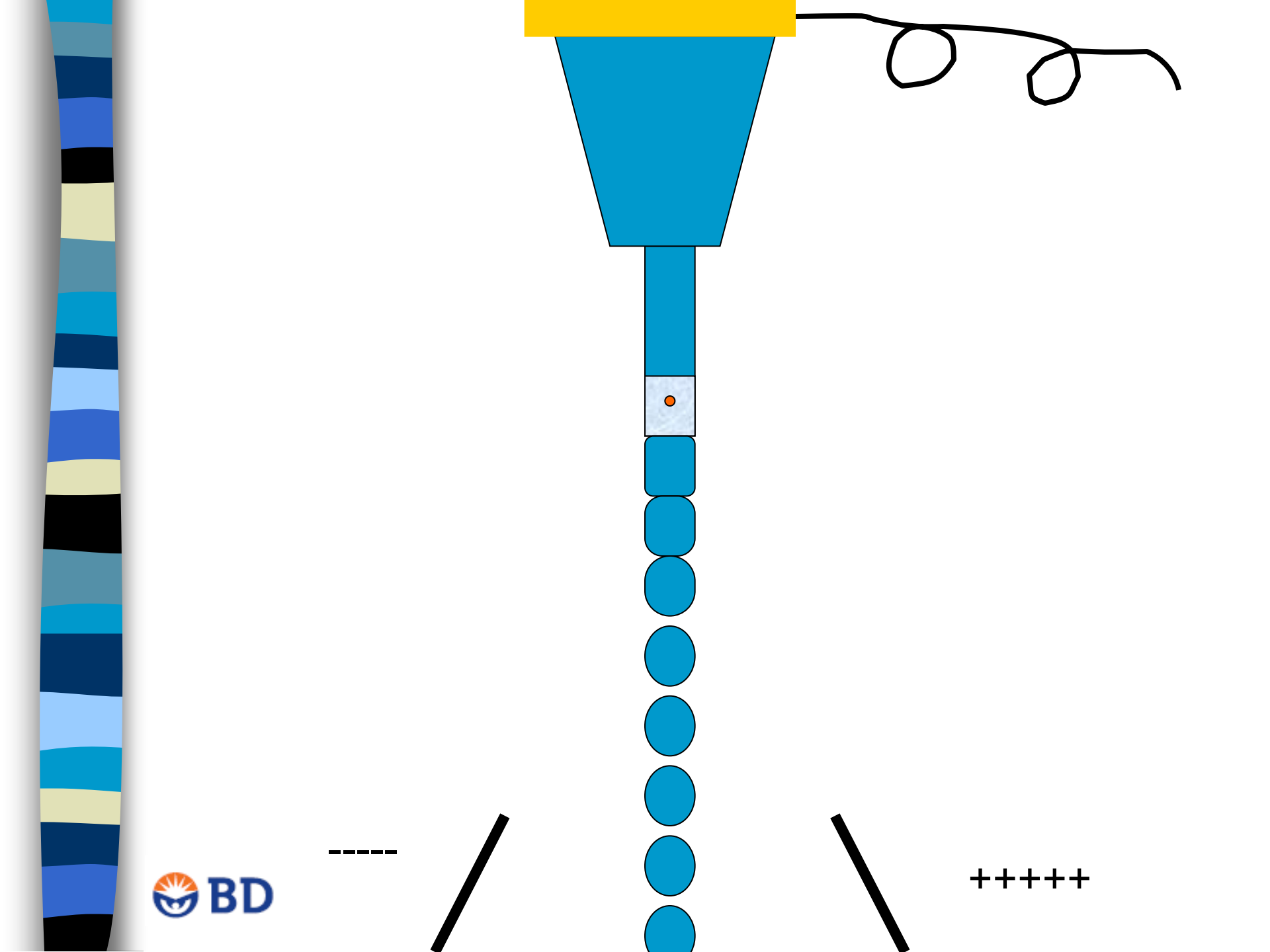
# ELECTROSTATIC DROPLET SORTER

- High speed ( $\sim 10^4/\text{sec}$ )
  - Concentrated sorted fraction
  - Biosafety hazard
  - Mechanical shearing
- Problems to sort large particles

Used by:  
Becton Dickinson  
Beckman Coulter  
Cytomation

Doležel (1999)

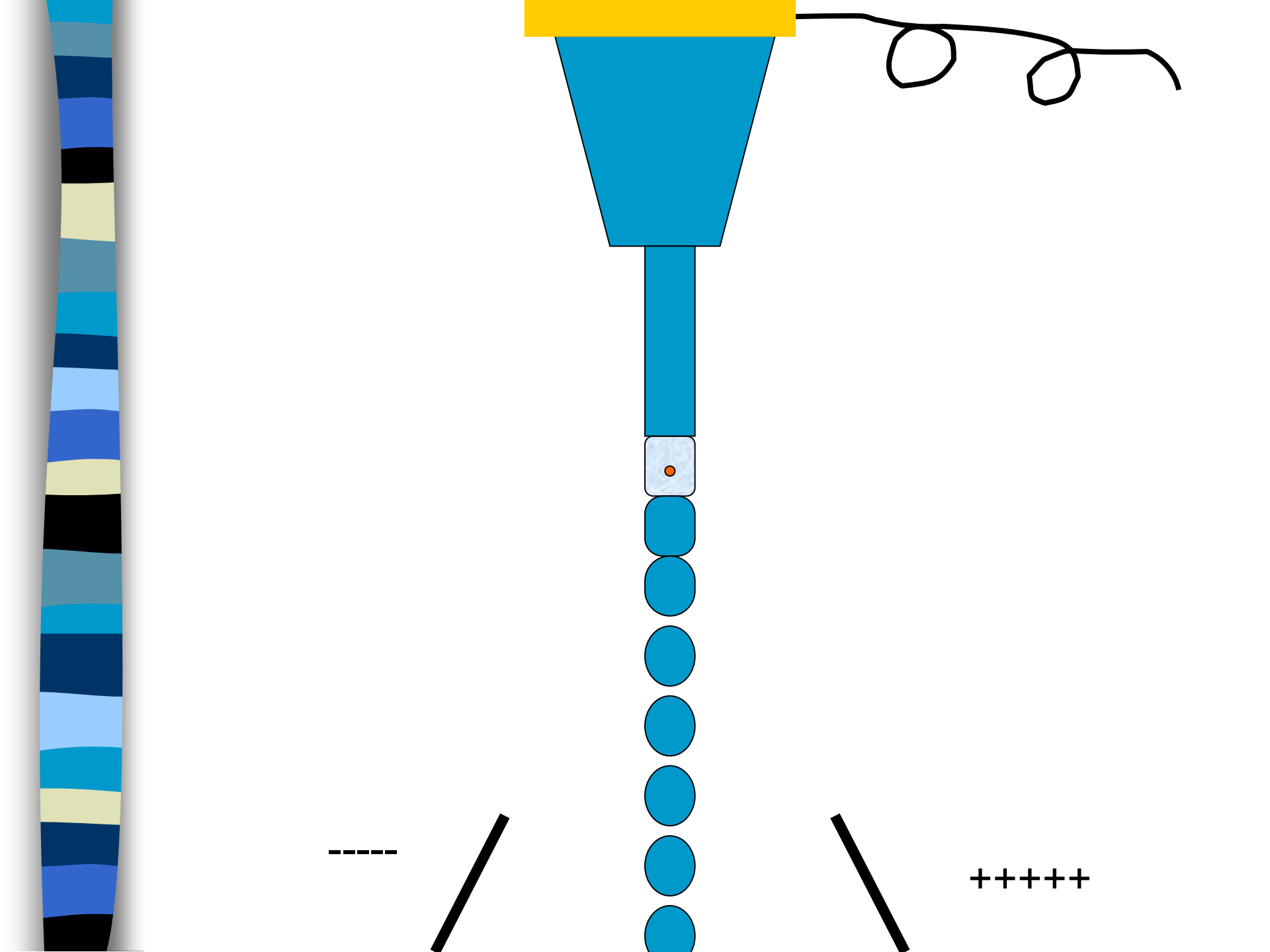


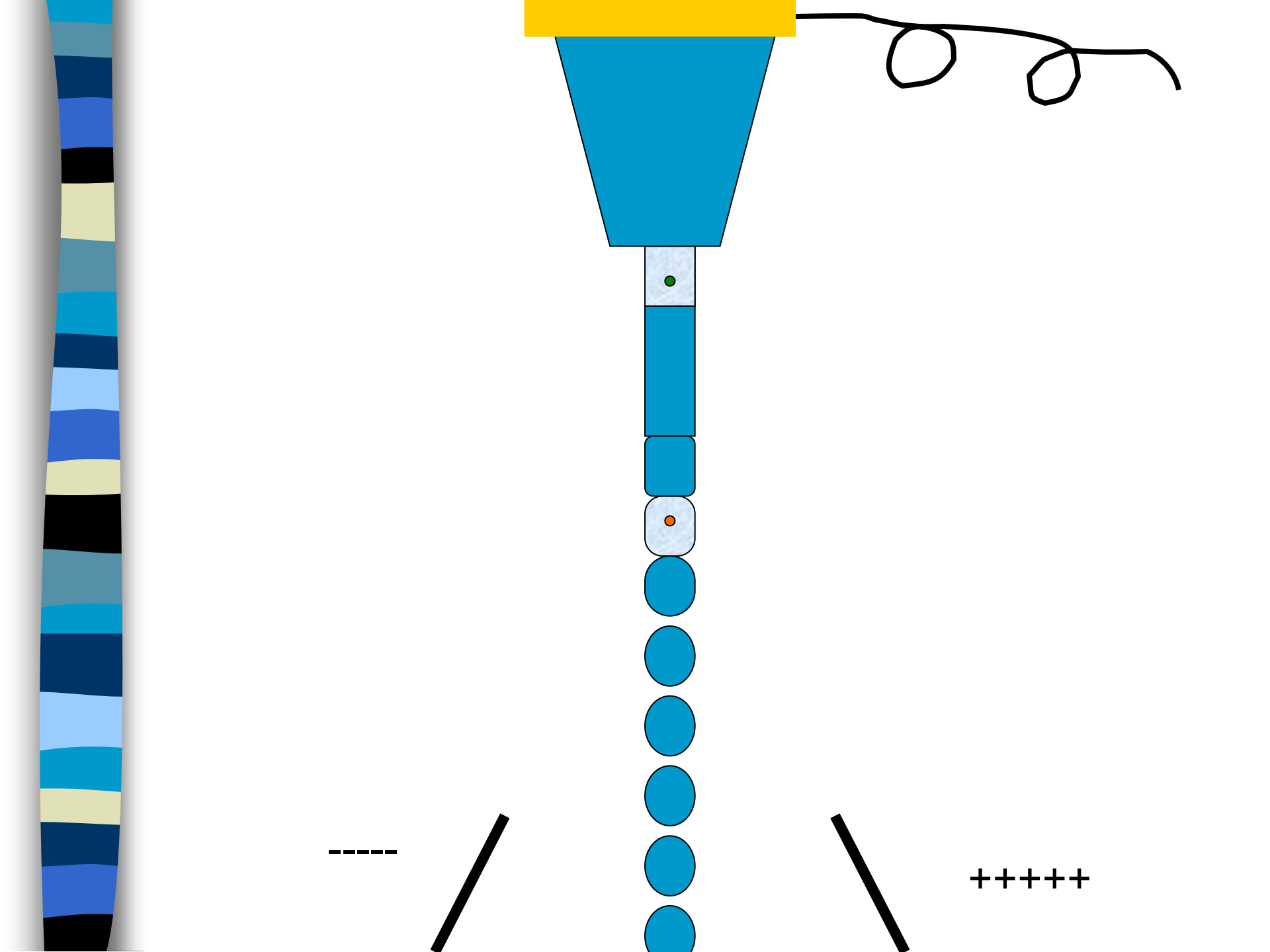


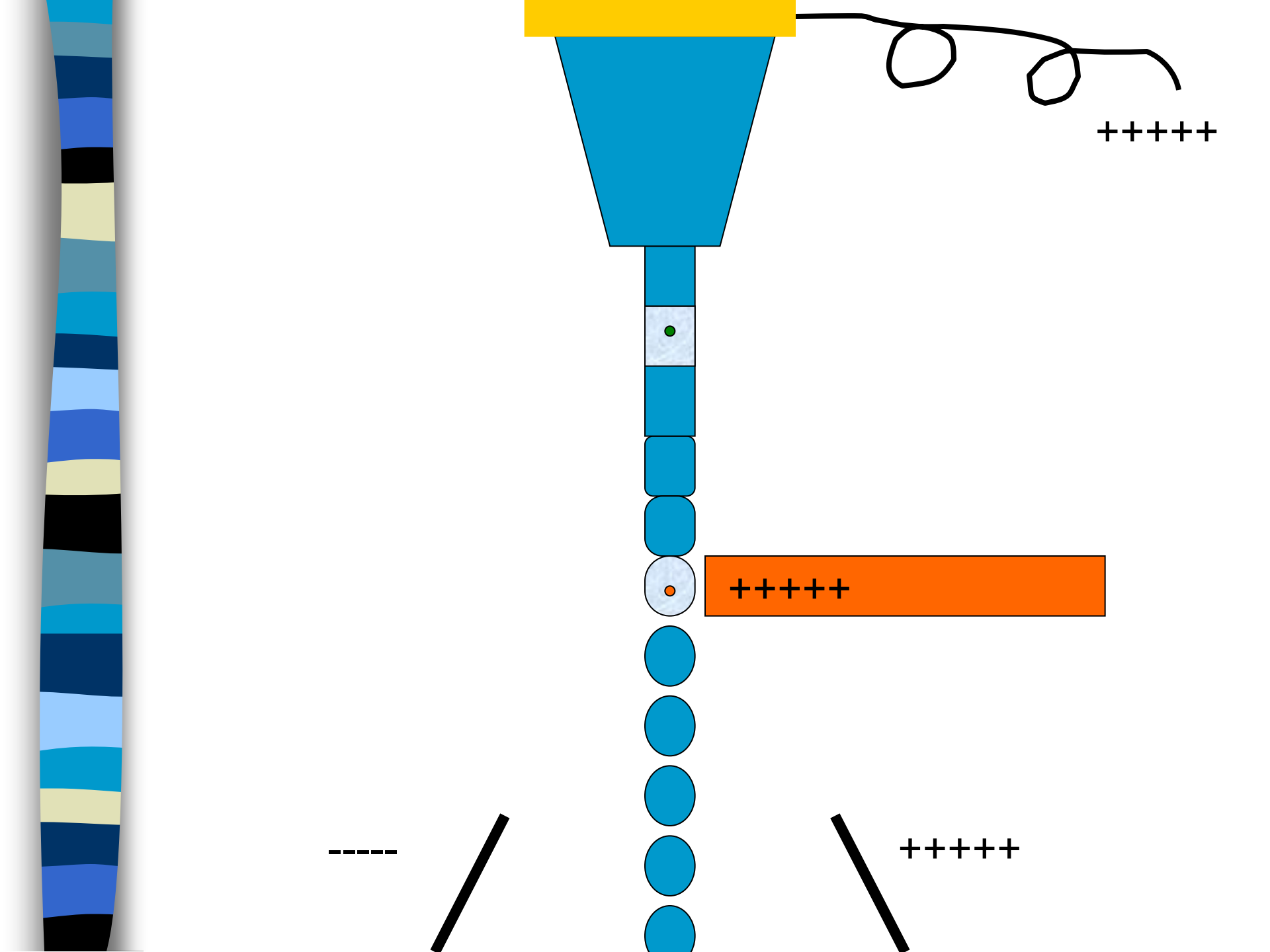
-----



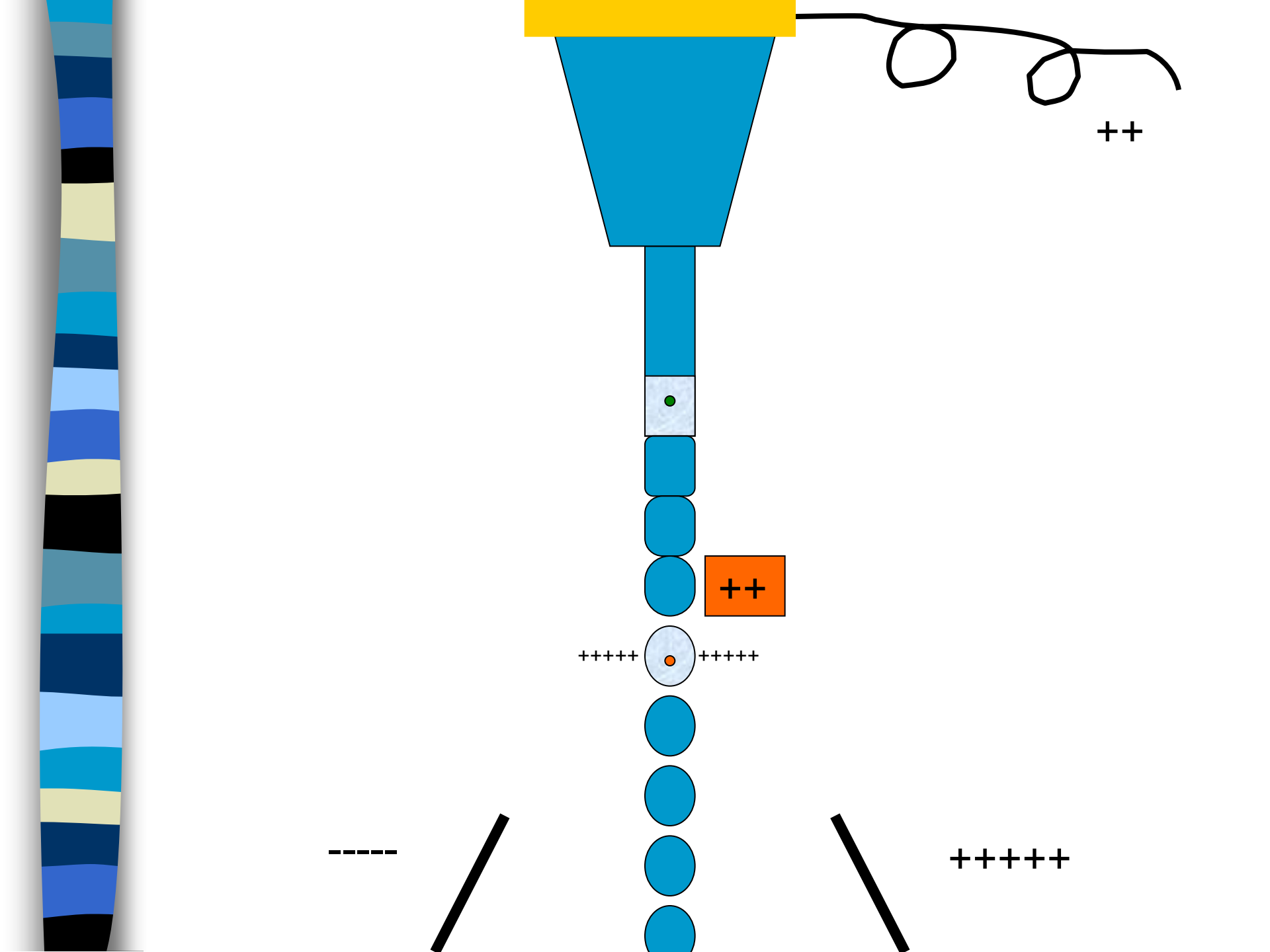
+++++

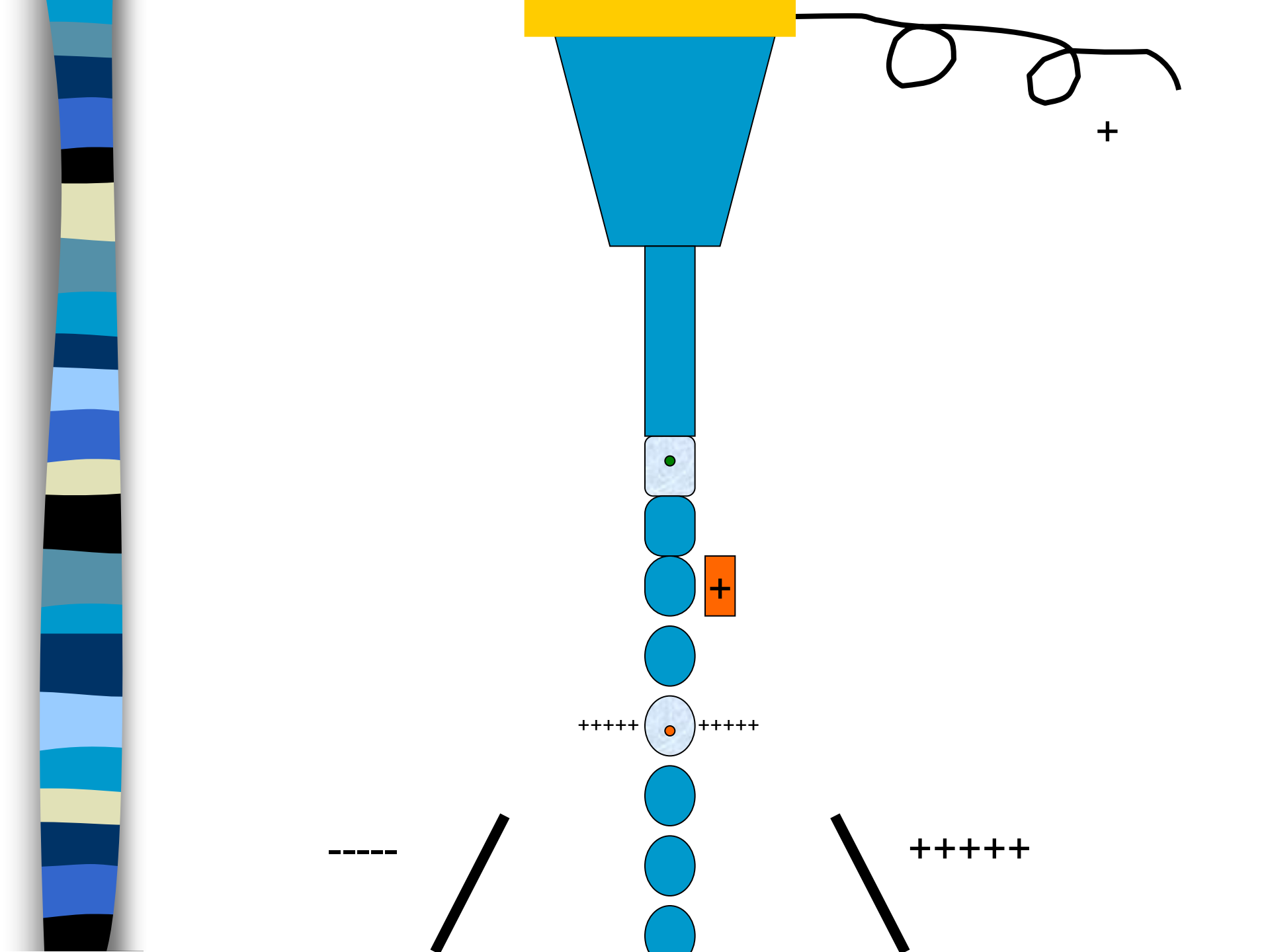


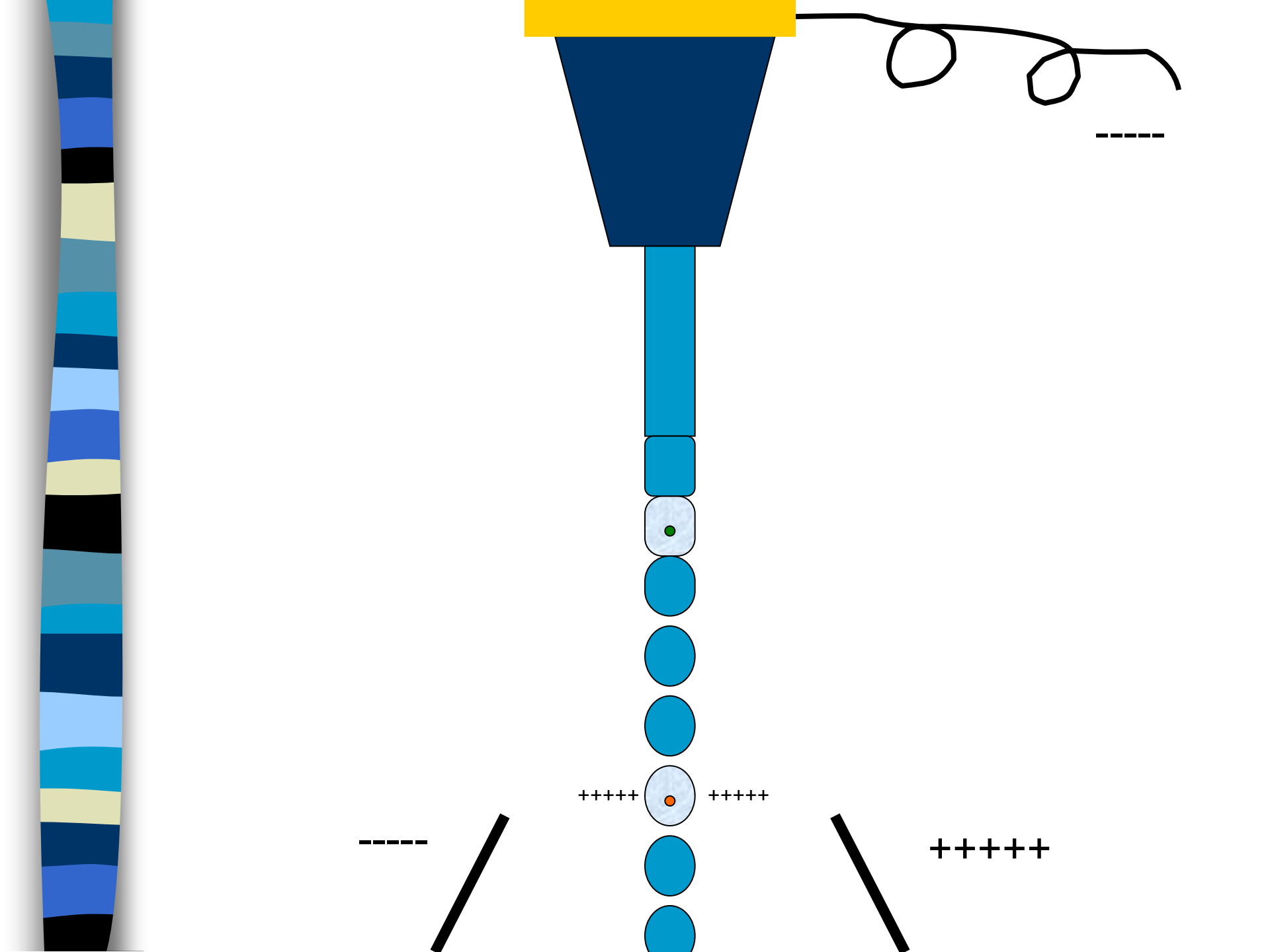


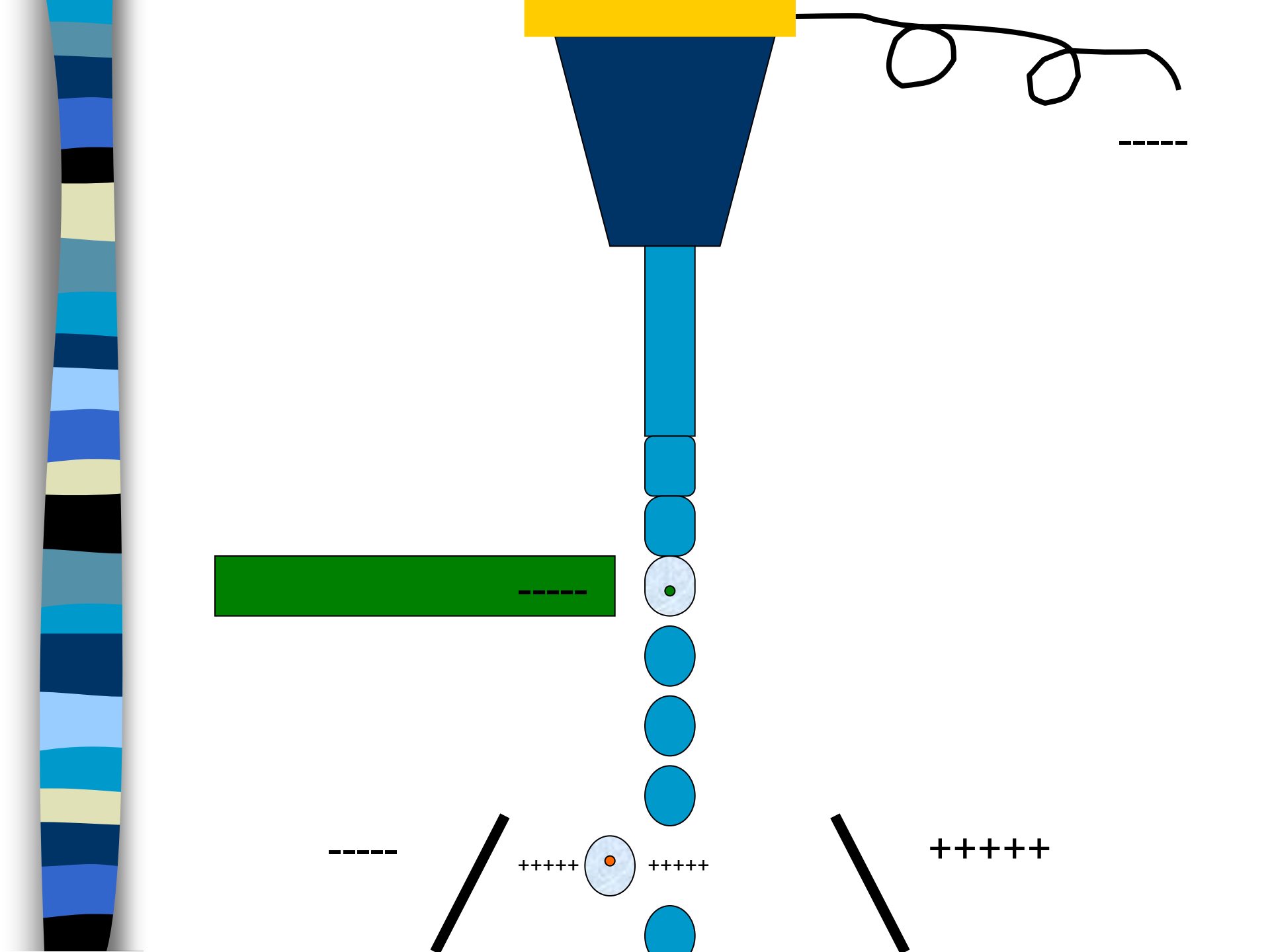


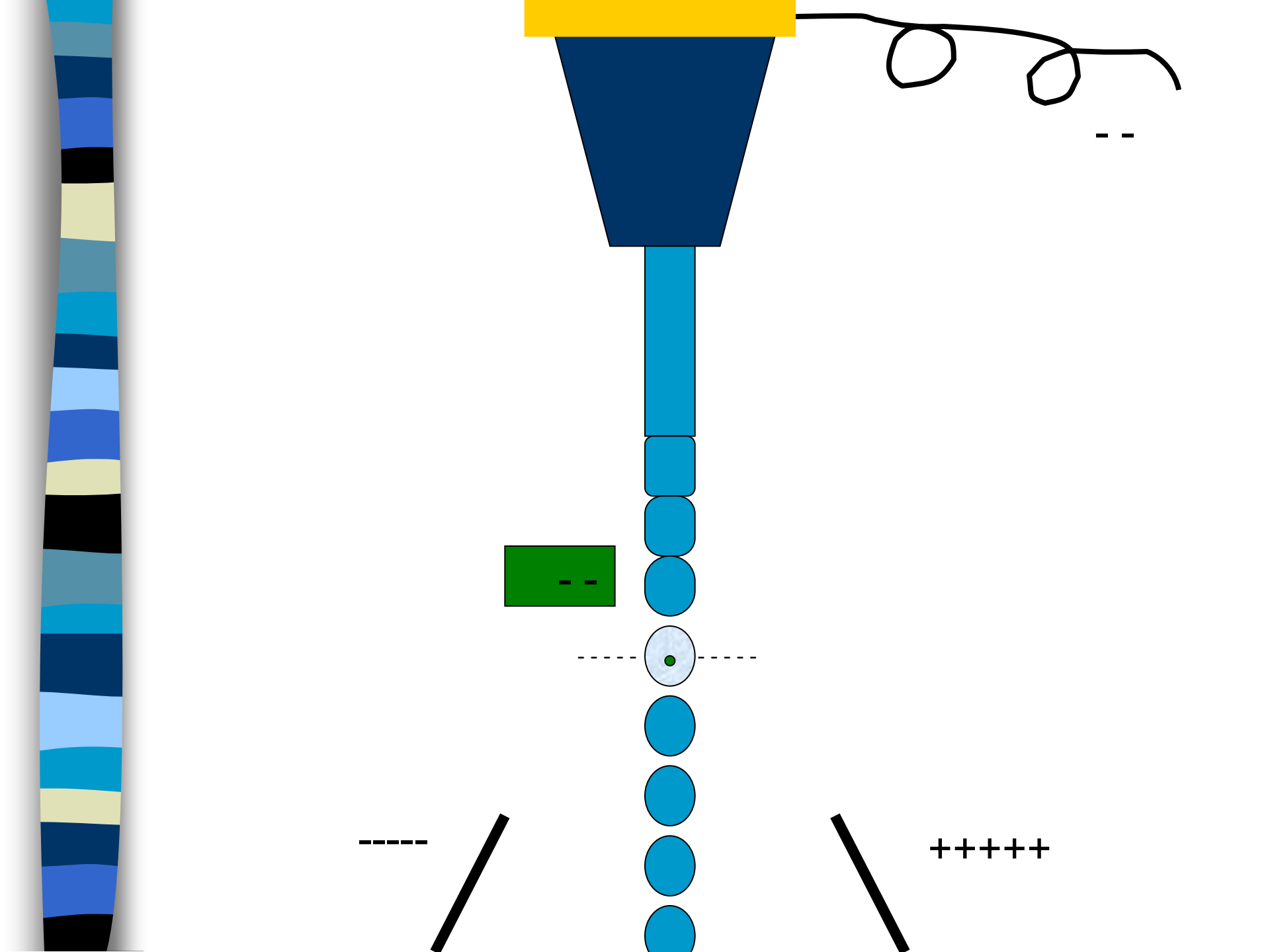


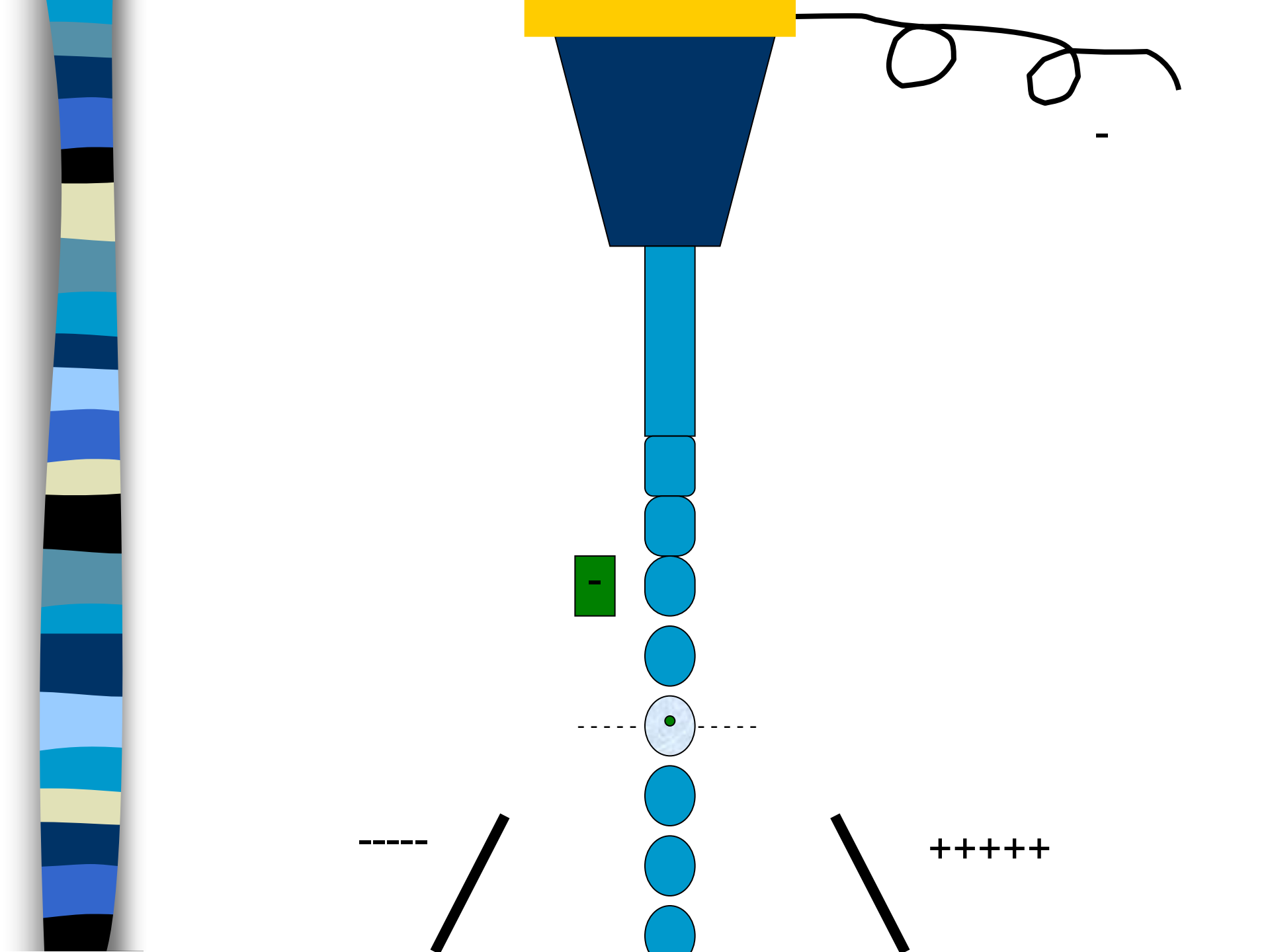


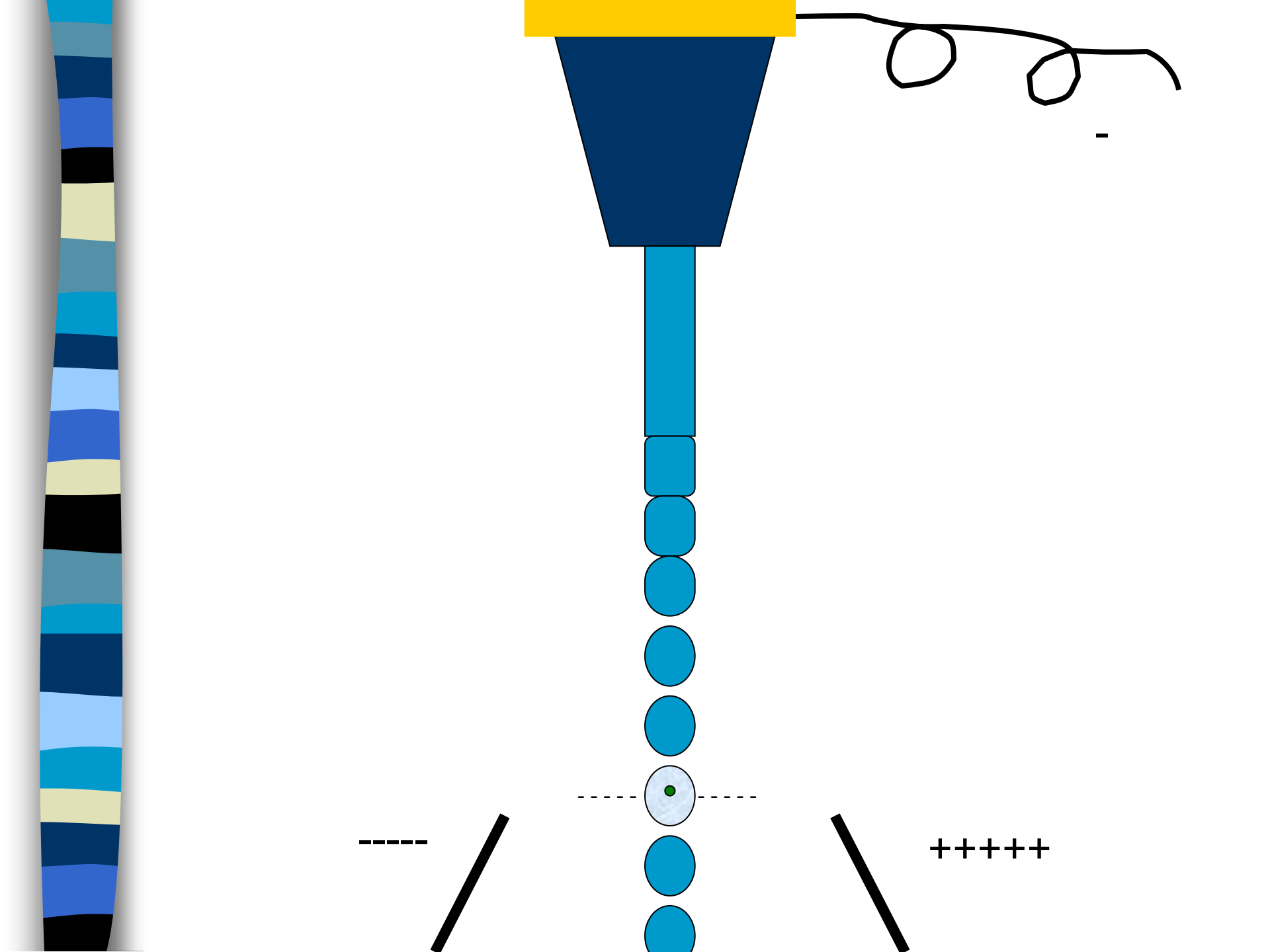


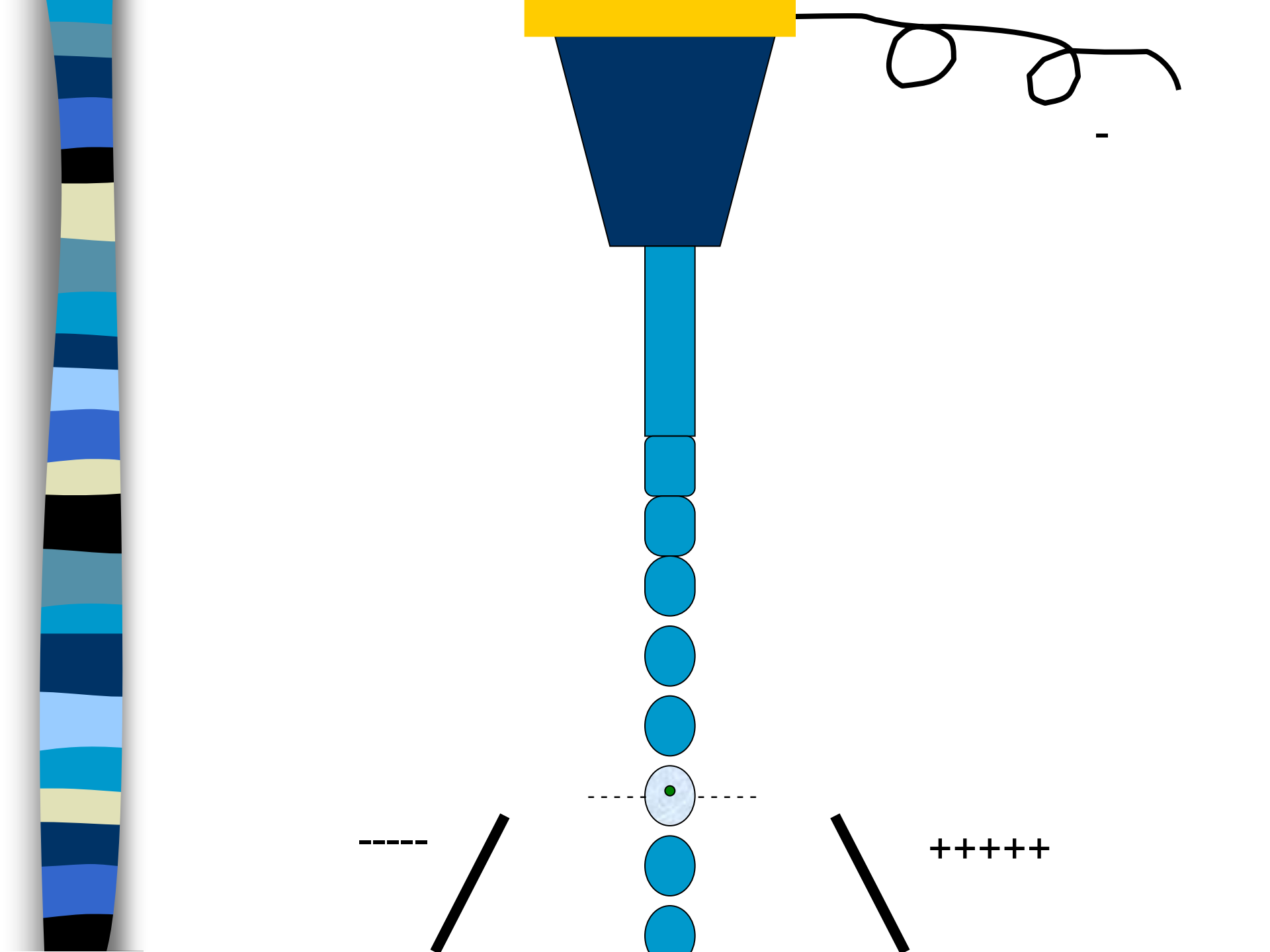




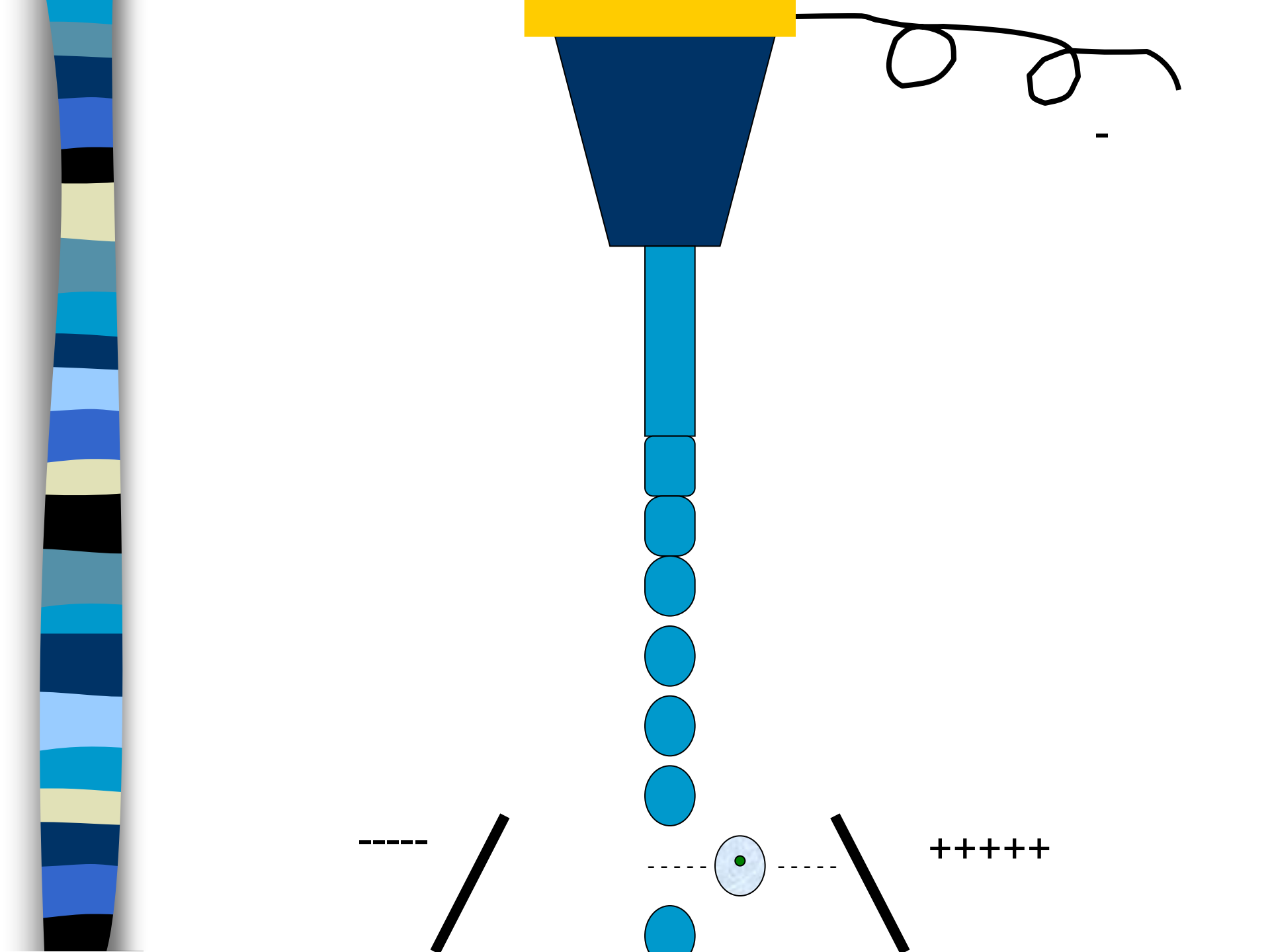










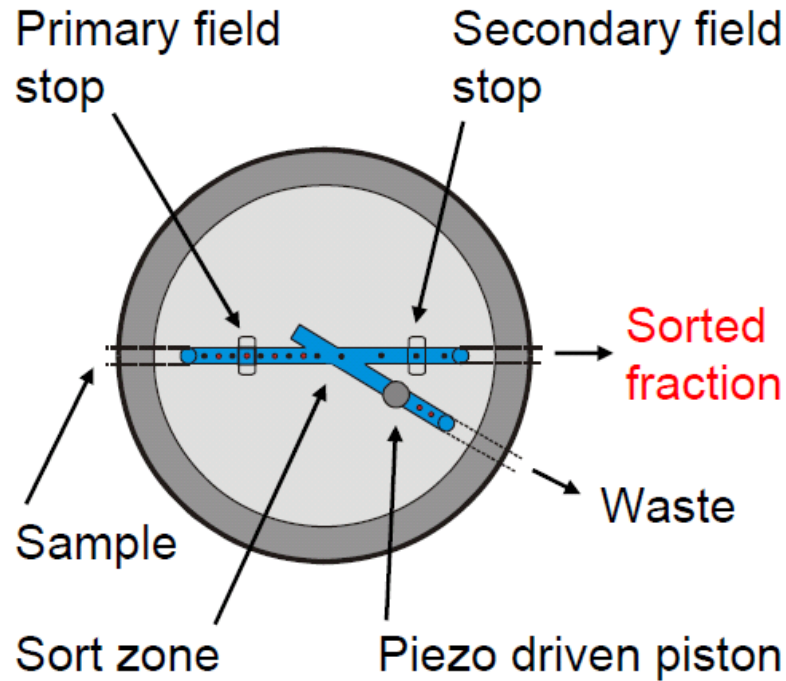


# ISAC presents: Mack Fulwyler - Innovator, Inventor & Pioneer

<http://www.isac-net.org/index.php?option=content&task=view&id=498>



# FLUIDIC SWITCH SORTER

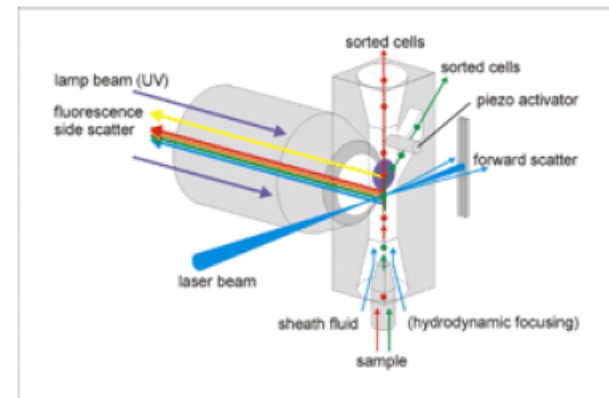
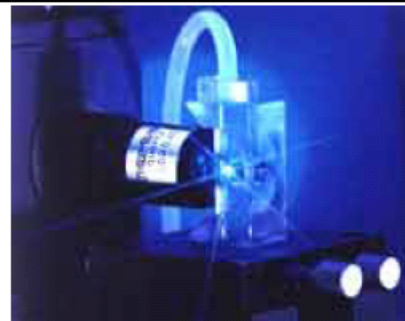


- Safety (enclosed stream)
- Gentle to cells
- Sorting of large particles ( $>100 \mu\text{m}$ )

Low speed ( $\sim 100/\text{sec}$ )

- Dilute sorted fraction
- Noisy

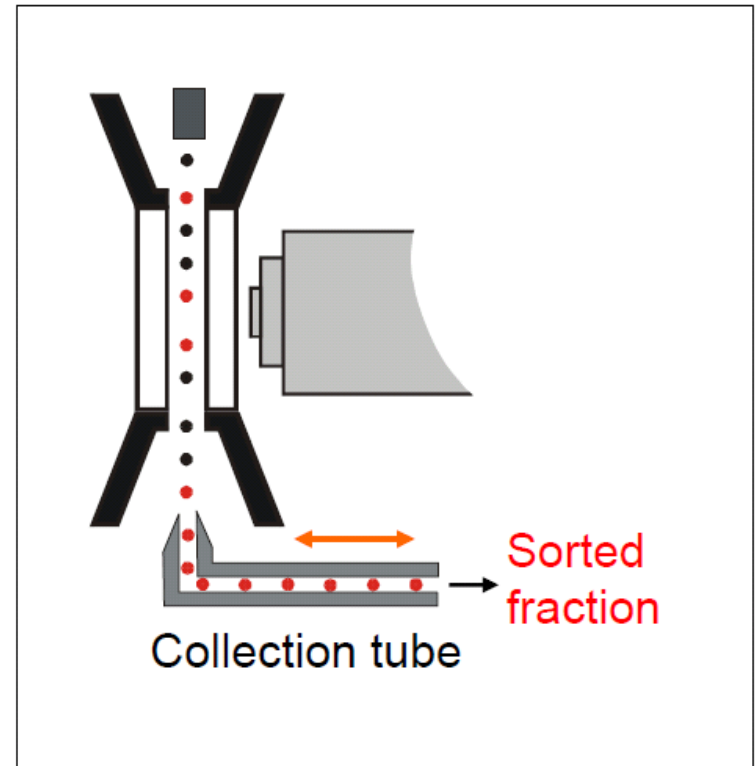
Used by: Partec



# FLUIDIC SWITCH SORTER

- Safety (enclosed stream)
- Gentle to cells
- Low speed ( $\sim 100$  / sec)
- Dilute sorted fraction
- Noisy

Used by: Becton Dickinson





# Elektronika

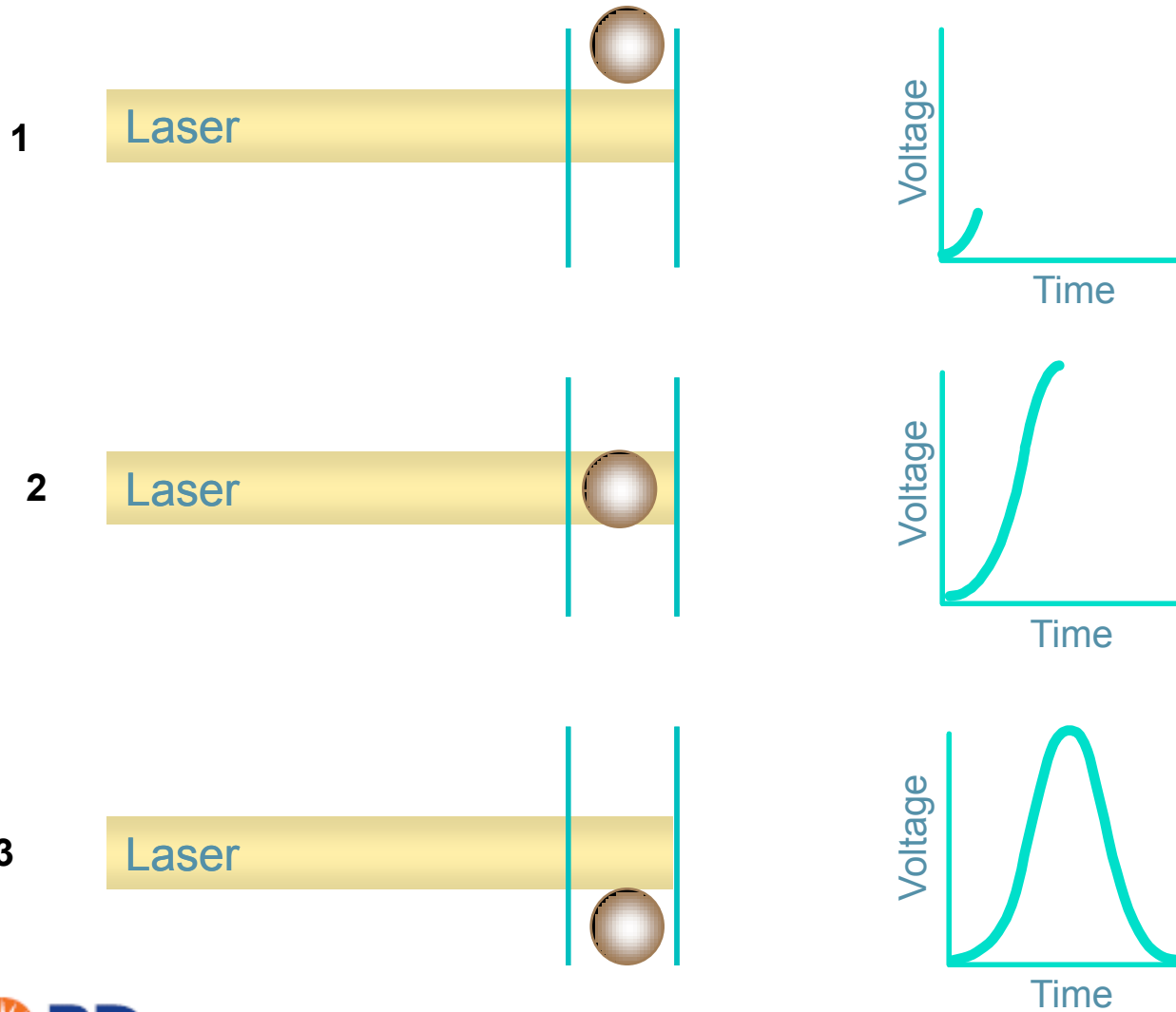
- Zpracování signálu z detektorů
  - Předzesílení
    - zesiluje signál pro přenos z detektorů do centralní elektronické části
  - Zesílení
    - úprava intensity signálu
    - lineární nebo logaritmické
  - Generování integrálu a šířky pulsu
  - Analog-digital konverze



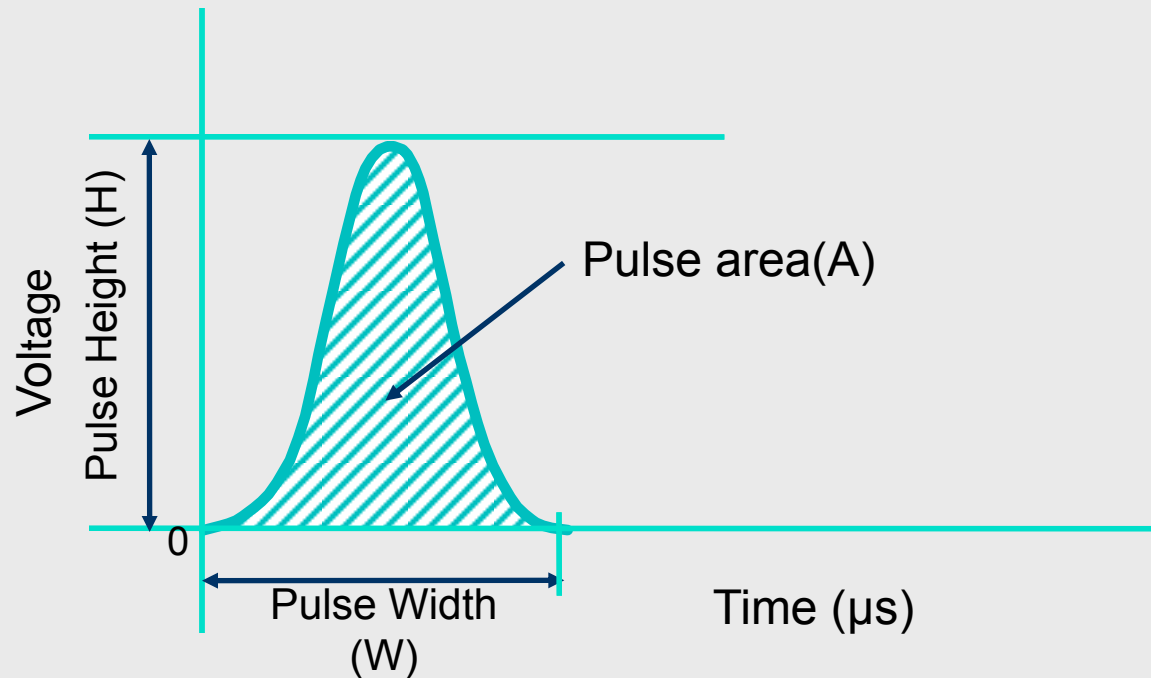
# Sběr dat

- Data jsou sbírána jako “list” hodnot, pro každý “parametr” a pro každou “event” (buňku)
- každé měření z každého detektoru je označeno jako “parameter”

# Creation of a Voltage Pulse

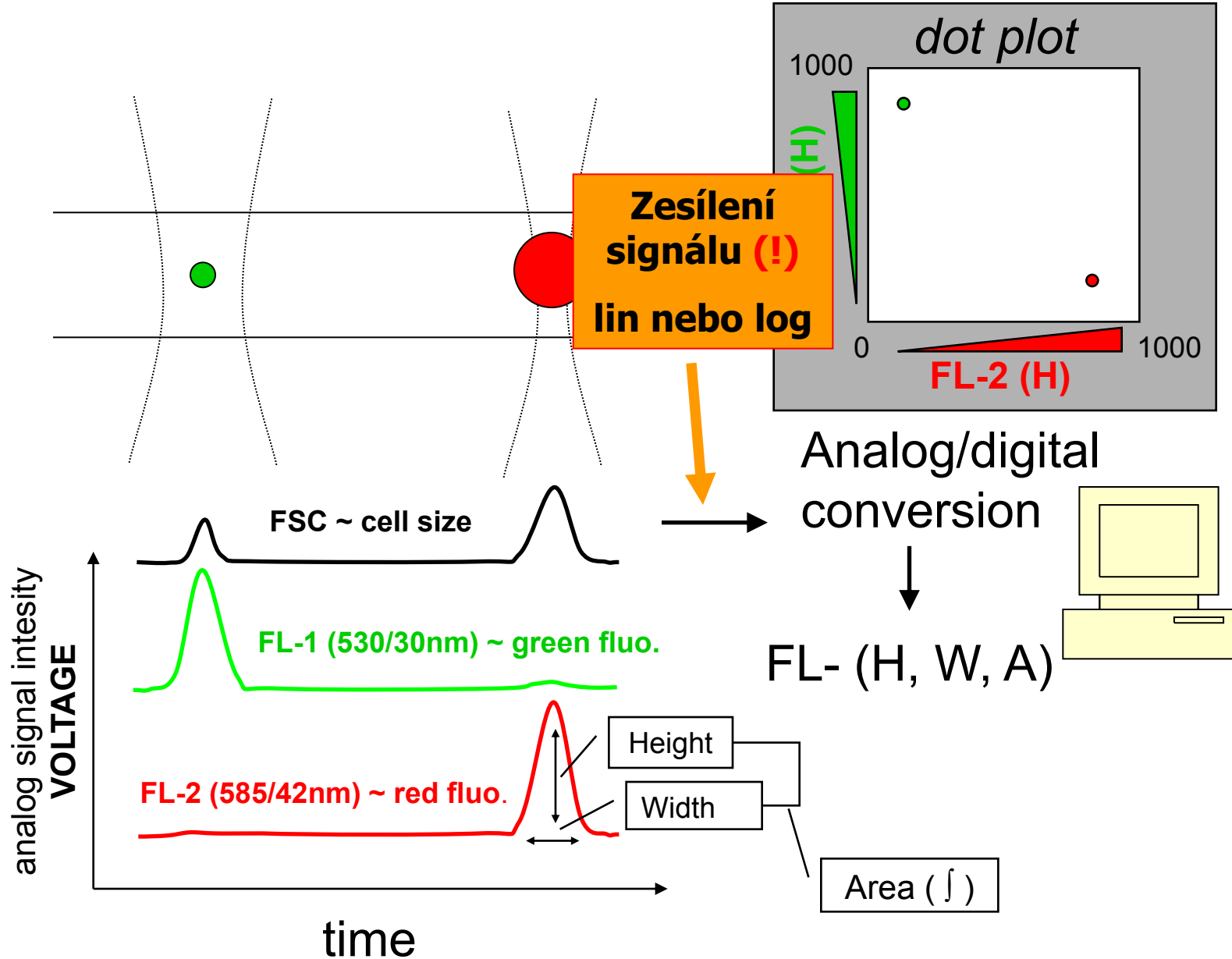


# Height, Area, and Width





# Signal processing



# Data Acquisition - Listmode

<i>Event</i>	<i>Param1</i> <i>FS</i>	<i>Param2</i> <i>SS</i>	<i>Param3</i> <i>FITC</i>	<i>Param4</i> <i>PE</i>
1	50	100	80	90
2	55	110	150	95
3	110	60	80	30



# Charakteristiky pulsu

- Pulsy detekované na průtokovém cytometru jsou analogové jevy detekované pomocí analogových zařízení
- Tyto pulsy trvají několik mikrosekund
- Pokud nemůžeme digitalizovat tento puls v reálném čase musíme kombinovat analog-digitalní zpracování pulsu
- běžně trvalo několik mikrosekund digitalizovat puls – to nebylo dostatečně průchodné pro vysokorychlostní sběr dat
- Nové – plně digitální systémy mohou digitalizovat puls přímo pomocí MHz frekvence



# Zpracování signálu: detekce píku

- Protože analogový puls je velice krátký ( $\mu\text{s}$ ) je nabití kondenzátoru jediným způsobem jak zadržet.
- Kondenzátor je paměť pro puls.
- Pro detekci píku (maxima) jsou kondenzátory nabíjeny v obvodu umožňujícím detekci zesilujícího signálu.



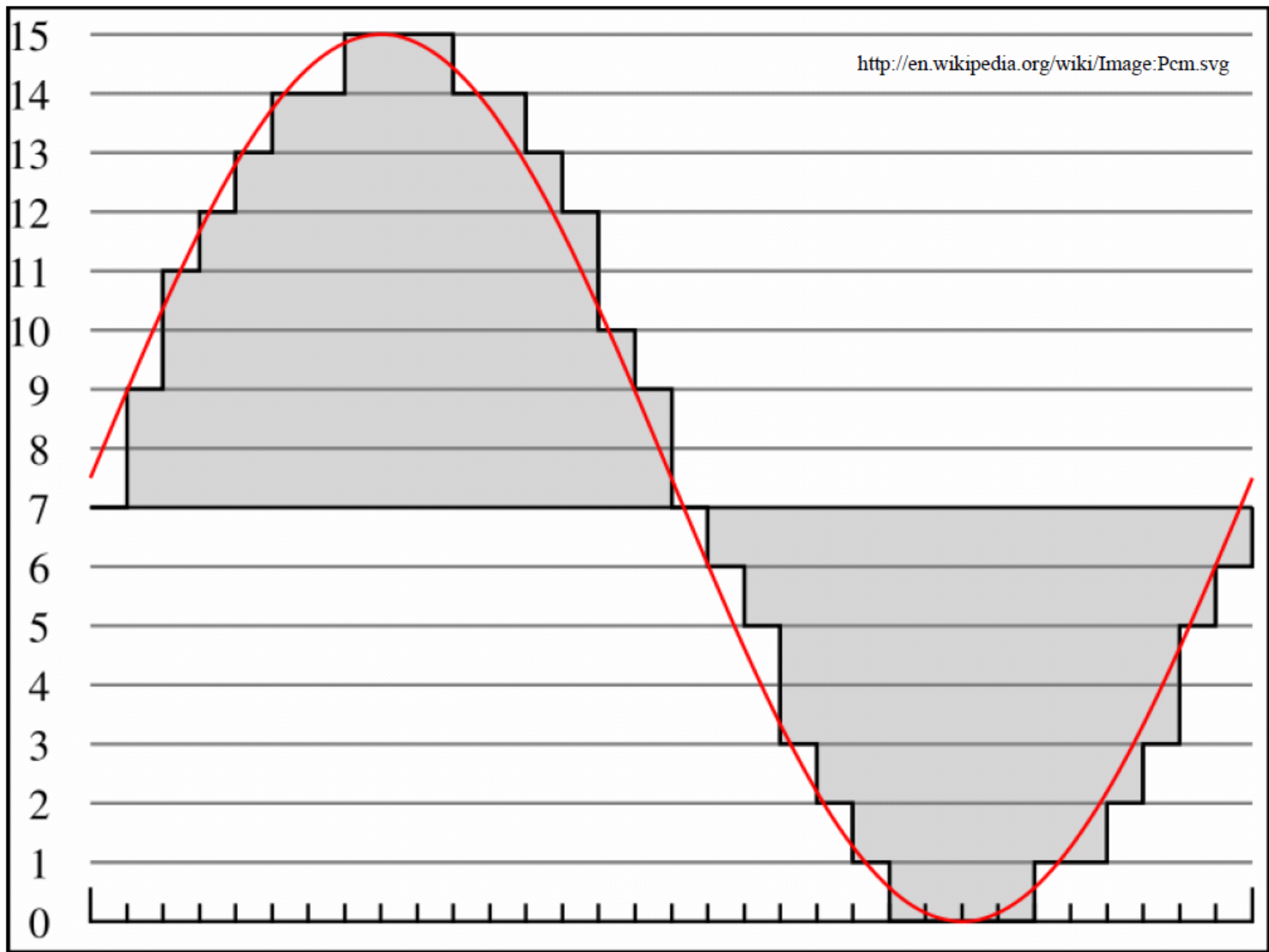
# Měření integrálu a šířky (width) píku

- V obvodu integrátoru odpovídá nabití kondenzátorů integrálu signálu mezi resetem a držením signálu.
- Šířka píku je detekována nabitím kondenzátoru připojeného k lineárnímu generátoru který spíná na začátku pulsu a vypíná při dosažení minima. Napětí na kondenzátoru pak odpovídá době trvání pulsu.



# Analogově-digitální převod

- Analogový signál musí být konvertován na digitální puls, aby bylo umožněno jeho další zpracování
- Pomocí analog-digitální konverze (ADC) – analogový vstup/digitální výstup
- Obvod rozděljuje signál do předvolených kanálů
- 8 bitů = 256 kanálů
- 10 bitů = 1024 kanálů



4 bitová pulzně kódová modulace analogového signálu

$$2^4=16$$

$$2^8 = 256$$
$$2^{10} = 1024$$

# AD převodníky

Počet bitů	# kanálů	rozlišení
8	256	39.1 mV
10	1024	9.77 mV
12	4096	2.44 mV
14	16384	610 $\mu$ V
16	65536	153 $\mu$ V
18	262144	38.1 $\mu$ V
20	1048576	9.54 $\mu$ V
22	4194304	2.38 $\mu$ V
24	16777216	596 nV

Full scale measurement range = 0 to 10 volts

ADC resolution is 12 bits:  $2^{12} = 4096$  quantization levels

ADC voltage resolution is:  $(10-0)/4096 = 0.00244$  volts = 2.44 mV





# Lineární a logaritmický obvod

- lineární
- logaritmický
- dynamický rozsah
- kompenzace fluorescenčního signálu

# Lineární obvody

- výstupní signál odpovídá (poměrově) vstupnímu signálu
- detekce signálu založeného na kvantitativním vztahu (DNA značení) vyžaduje 10 bitové rozlišení
- vyšší přesnost vyžaduje vyšší množství bitů
- současná zařízení mají rozlišení 4 řádů v logaritmické škále - ADC musí mít schopnost rozlišení nejméně 1/10,000 což odpovídá 1 mV v 0-10 V škále.
- pro dosažení této přesnosti je nutné 14ti bitové rozlišení

$$2^8 = 256$$

$$2^{10} = 1024$$

# AD převodníky

Počet bitů	# kanálů	rozlišení
8	256	39.1 mV
<b>10</b>	<b>1024</b>	<b>9.77 mV</b>
12	4096	2.44 mV
14	16384	610 $\mu$ V
16	65536	153 $\mu$ V
<b>18</b>	<b>262144</b>	<b>38.1 <math>\mu</math>V</b>
20	1048576	9.54 $\mu$ V
22	4194304	2.38 $\mu$ V
24	16777216	596 nV

Full scale measurement range = 0 to 10 volts

ADC resolution is 12 bits:  $2^{12} = 4096$  quantization levels

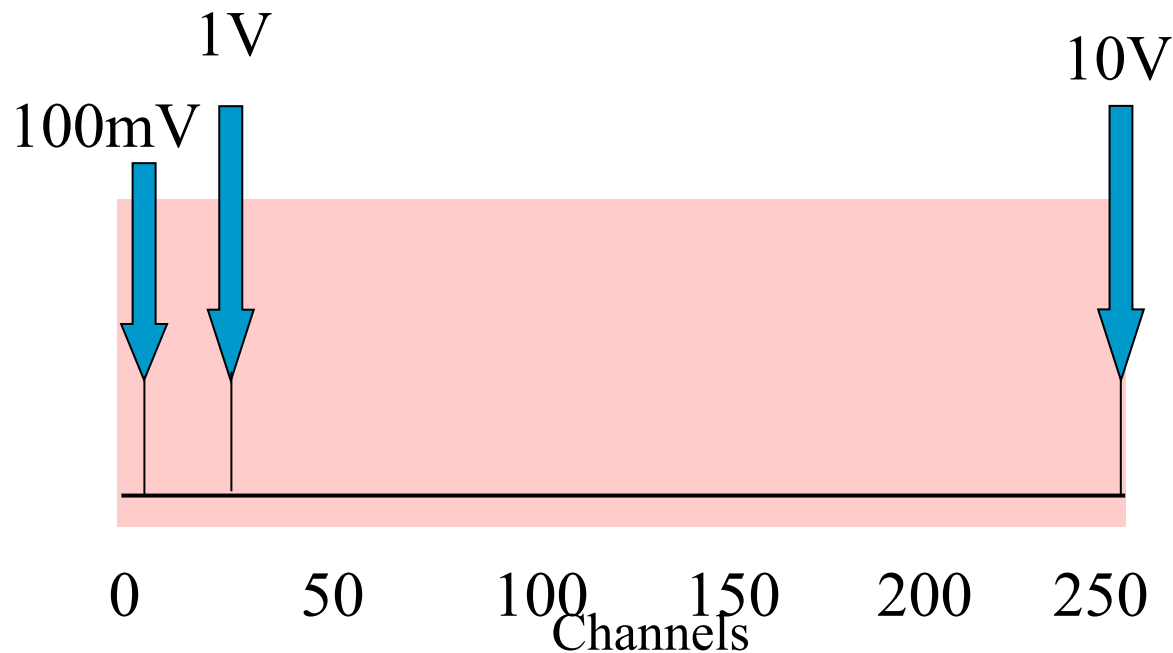
ADC voltage resolution is:  $(10-0)/4096 = 0.00244$  volts = 2.44 mV

# Proč používat lineární obvody?

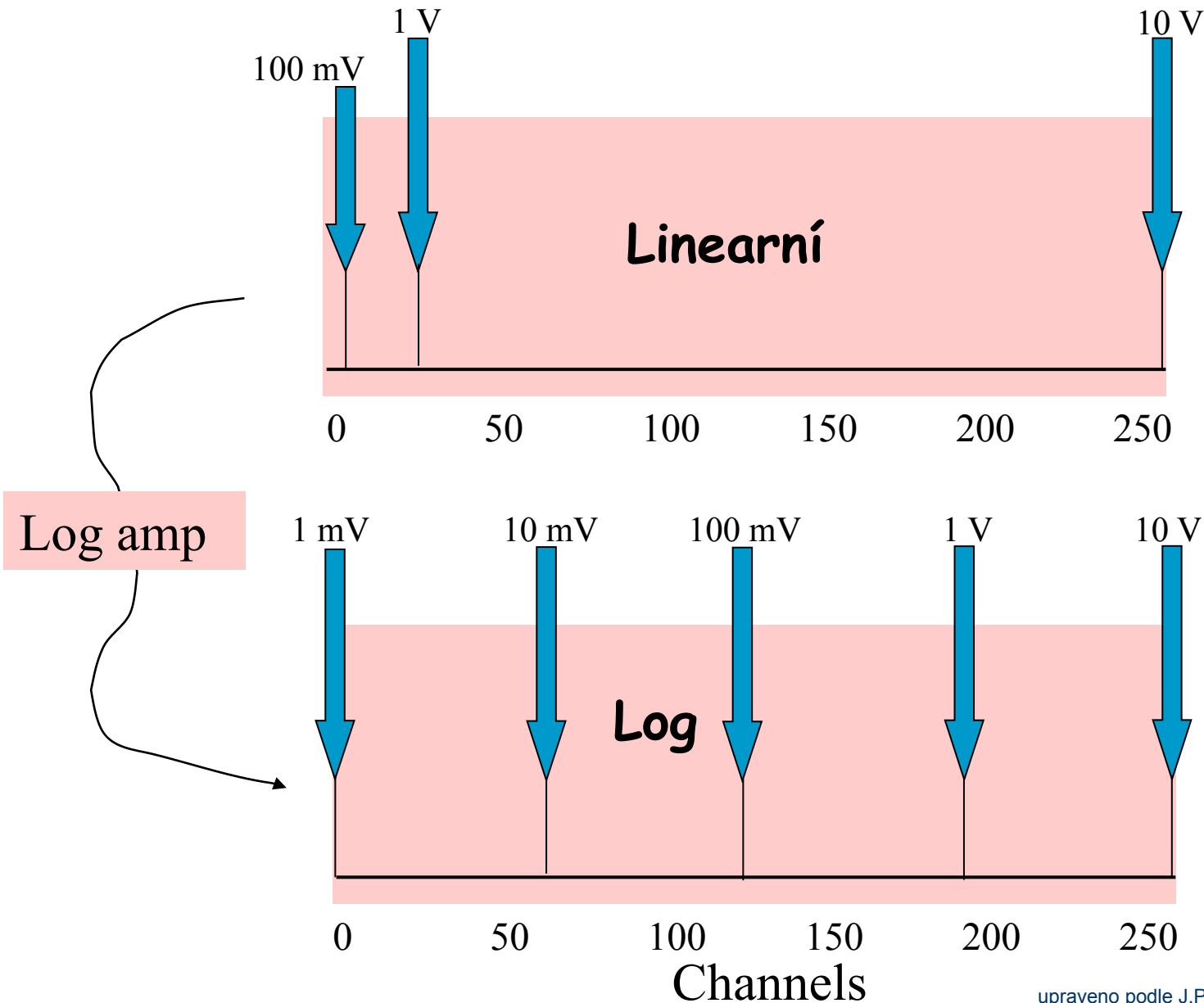
- Kompenzace signálu musí být prováděny na lineárních datech. Tzn. že celá elektronika musí být lineární (> 14-ti bit ADC) nebo musí být doplněn speciální obvod mezi předzesilovač a display.
- Pro imunologické fenotypizace potřebujeme velký dynamický rozsah.
- průtokový cytometr zesiluje signál na hodnoty mezi 0-10 V před ADC.

# Kolik bitů?

- Pokud konvertujeme analogový signál pomocí 8 bitového ADC – máme 256 kanálů ( $2^8=256$ ) odpovídajících rozsahu 0-10 V
- Rozdíl mezi kanály je  $10/256 \approx 40\text{mV}$



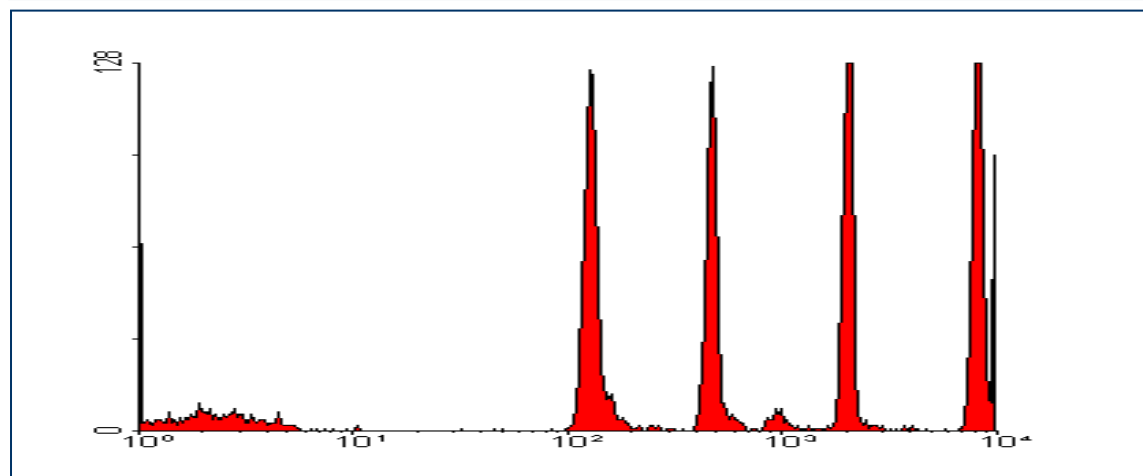
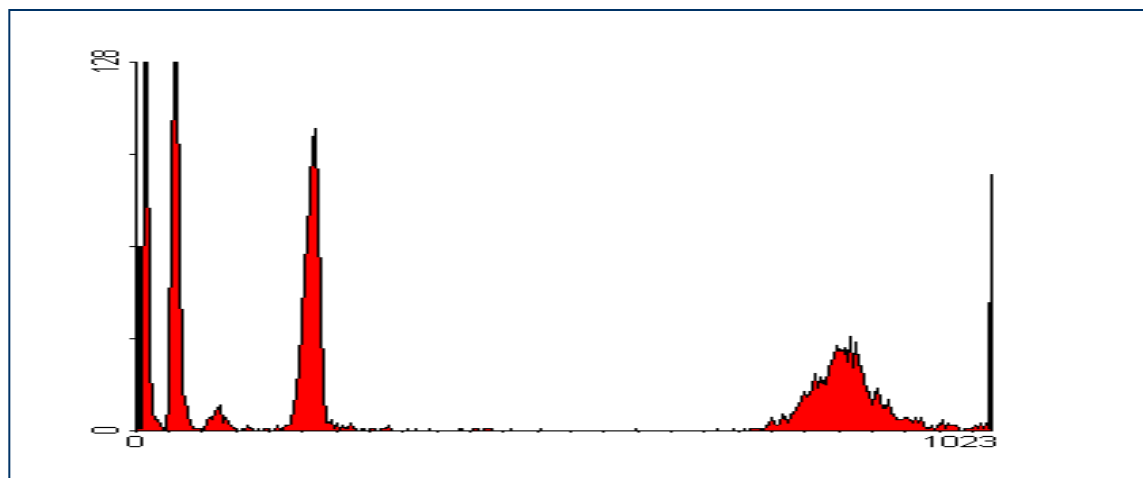
# Ideální logaritmický zesilovač



# Kde je nepřesnost?

- Předpokládejme že pracujeme se 14-ti bitovými daty (16,384 kanálů).
- Nejmenší rozlišení na 0-10V škále bude  $610 \mu\text{V}$ .
- Prvních 10mV škály je reprezentováno kanály 1-16.
- Tomu je možné předejít např. digitalizací v 16-ti bitech (65,536 kanálů)

# Logaritmické zesílení & dynamický rozsah





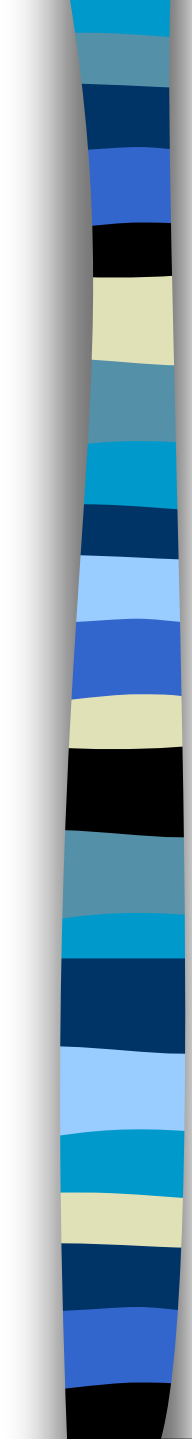
# „Ratio circuits“

- jsou analogové obvody generující výstupní signál odpovídající poměru ze dvou vstupních signálu (dvou detektorů)
- Tvořeno speciálními moduly tzv. analogové násobiče.
- např. pro výpočet povrchové denzity navázaných antigenů dělíme počet navázaných molekul velikostí povrchu buněk (není běžné)
- **Detekce intracelulárního pH**
- **Detekce intracelulárních  $\text{Ca}^{2+}$**  (Indo-1)
- lze také kalkulovat pomocí speciálních softwarových nástrojů



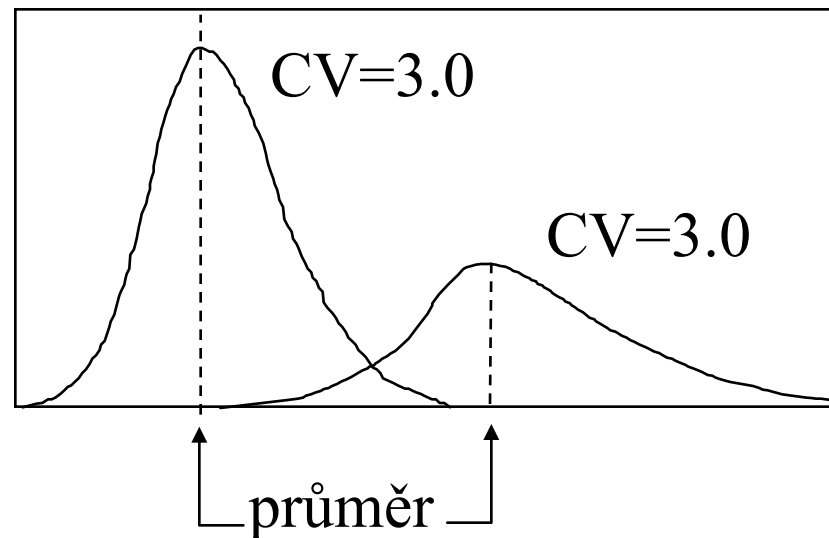
# Kompenzace fluorescenčního signálu

...později

- 
- přesnost – koeficient variance (CV)
  - citlivost, šum, pozadí
  - MESF jednotky
  - Přesnost a linearita

# Koeficient variance

$$\%CV \text{ definice} = \frac{\text{St.chyba} \times 100}{\text{průměr}}$$



**Klíčové pro jeho hodnotu je:**

- stabilita fluidního systému
- obarvení (označení) buněk

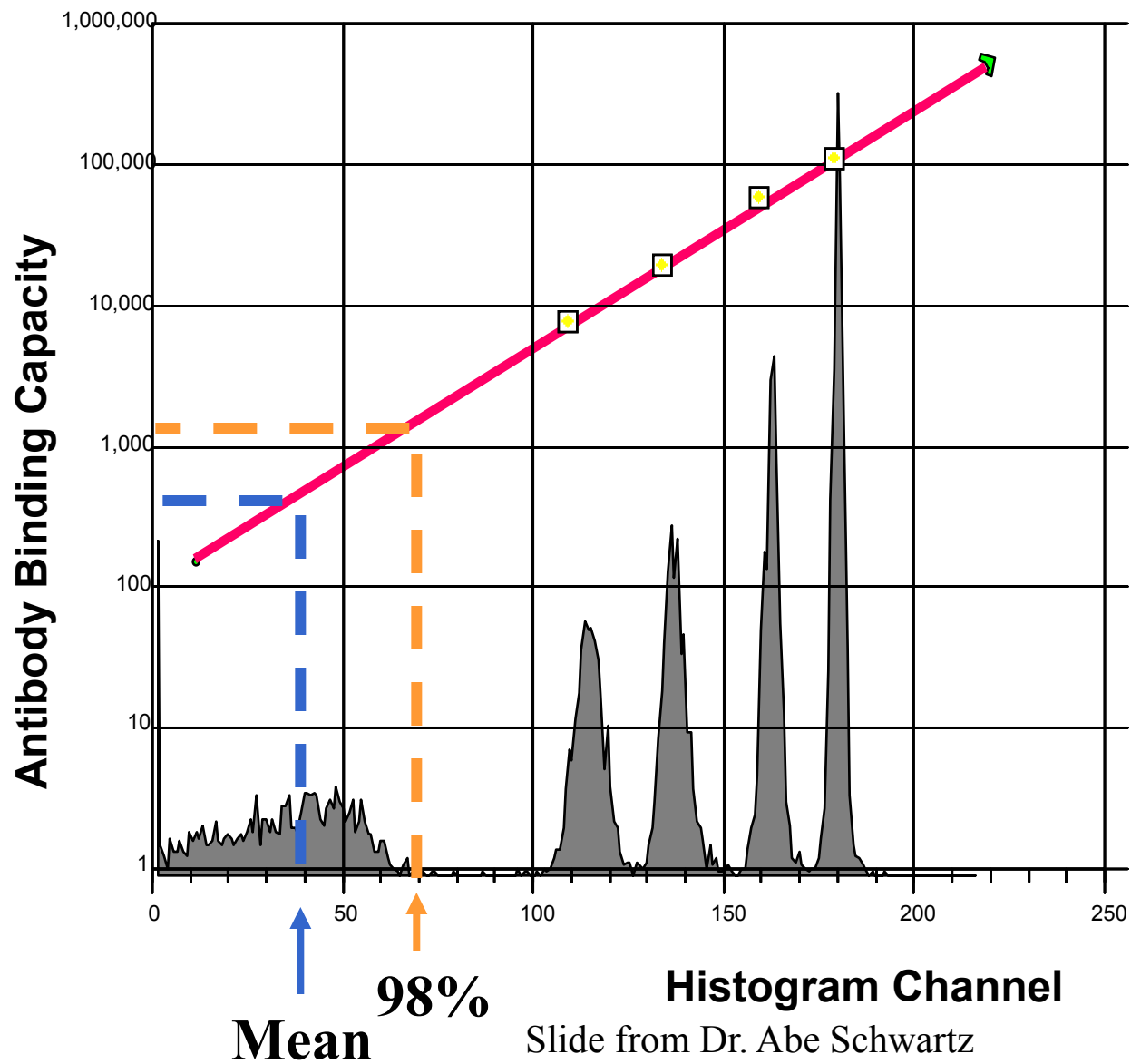


# Kvantitativní jednotky - ABC

Antibody Binding Capacity

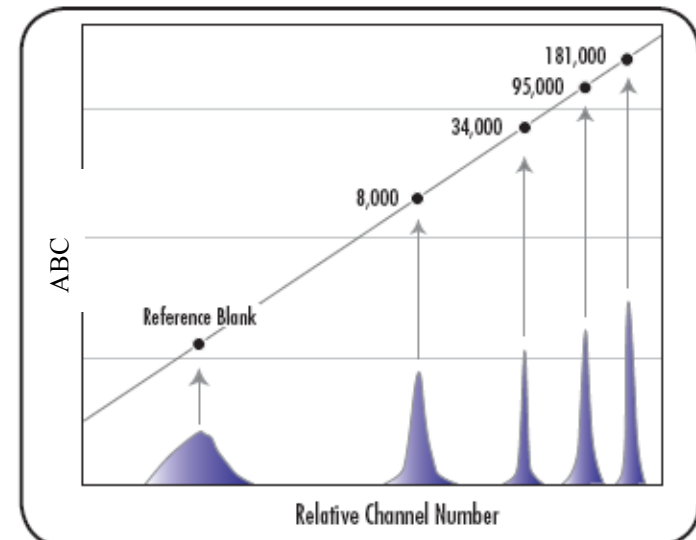
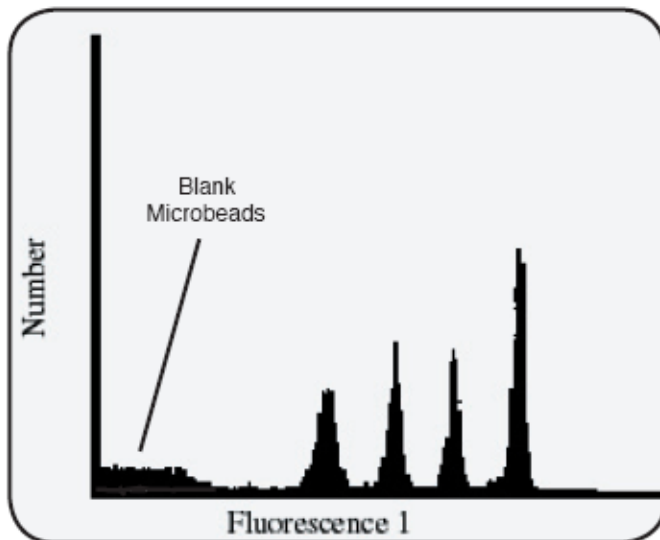
- množství protilátky, které se specificky váže na populaci buněk (nebo mikročástic)
- pozn.: Hodnota ABC nemusí odpovídat skutečnému množství antigenů na povrchu buněk nebo částic

# Detekce prahu (šumu)



# Určení ABC

Quantum™  
Simply Cellular®  
Mouse Antibody-Binding Standards

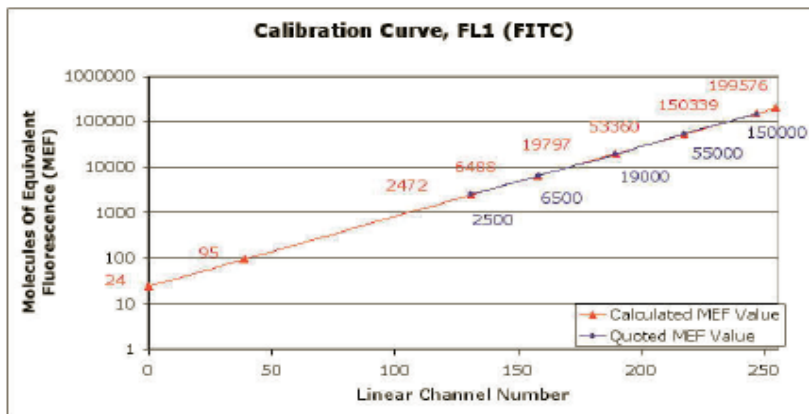




# Proč je důležité určit práh?

- určuje nejnižší množství značky (protilátky) detekovatelné přístrojem
- určí, zda pozadí (šum) interferuje s analýzou





Performance Parameter	Value
$r^2$	0.9997
Coefficient of Response	65
Detection Threshold	95
Zero Channel	24
Maximum Fluorescence	199576
Log Decades	3.94
Average Residual %	1.73

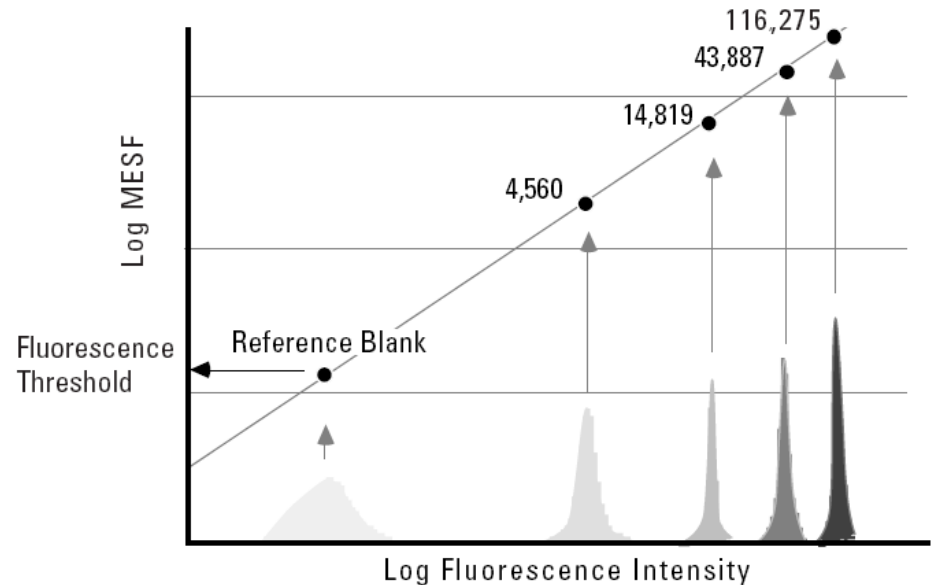
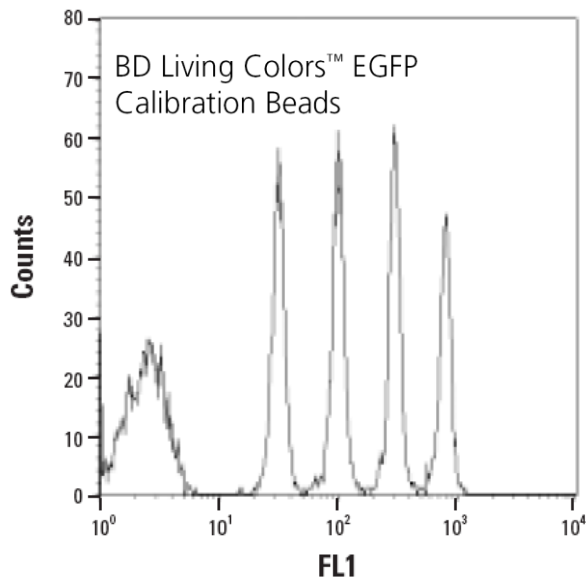
Figure 1. Calibration Curve and Calculations for FL1 Channel (FITC)

Table 1. Performance Parameters

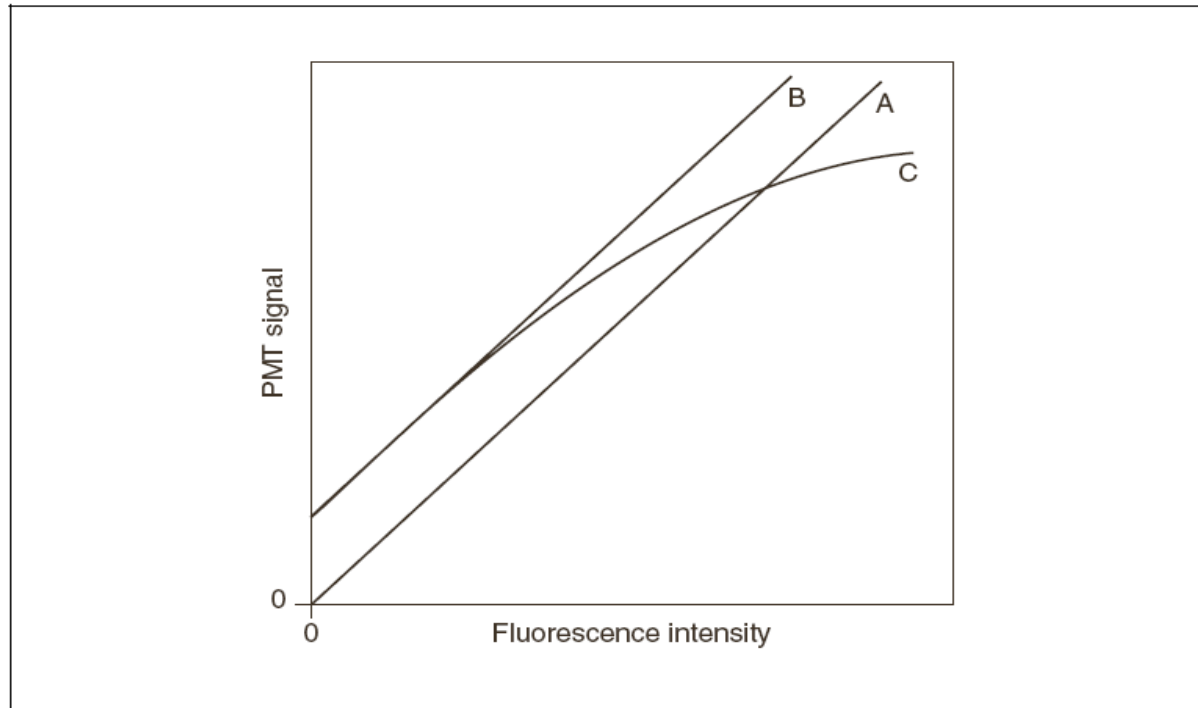
Average Residual %	The absolute average % that the calculated regression line varies from the actual data points. Indication: The fit of the calibration line and the confidence of the instrument's response across the fluorescence range.
Detection Threshold	The value of the blank bead in units of fluorescence intensity. Indication: The lowest level of fluorochrome that can be detected by the instrument.
Coefficient of Response	The slope of the calculated regression line, determined using a 256-channel scale. Indication: The range of sample space covered by the instrument. For a four-log- decade instrument, the coefficient of response should theoretically be 64. ( $256/4 = 64$ ).
Zero Channel	The value in units of fluorescence intensity where the calculated regression line intercepts the fluorescence intensity axis in channel zero. Indication: The left-hand boundary of the instrument's sample space.
Maximum Fluorescence	The value in units of fluorescence intensity where the calculated regression line intercepts the fluorescence intensity axis in channel 255. Indication: The right-hand boundary of the instrument's sample space.
Log Decades	Calibrated full-scale or dynamic range of the detector being examined.

# MEFS Units

- Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome (MESF) Units
  - metoda pro určení citlivosti přístroje (Abraham Schwartz)
  - směs částic označených známým množstvím molekul fluorescenční značky
  - práh určený pomocí MESF znamená nejmenší detekovatelné množství fluorochromu (BD FACS Aria 125 MEFS – FITC)



# Linearita detekce



- praktický příklad nelinearity může být během měření množství DNA v buňkách v G0/G1 a G2/M fázi buněčného cyklu
- lze použít mikročástice nebo jiné vnitřní standardy pro kalibraci



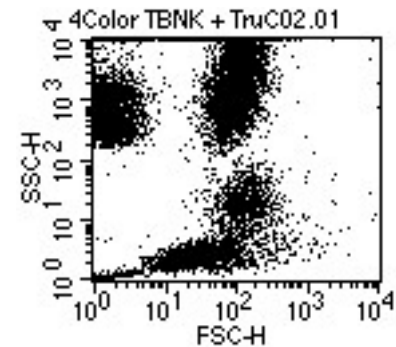
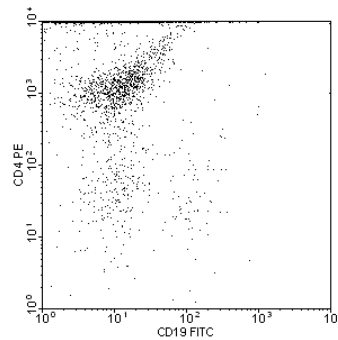
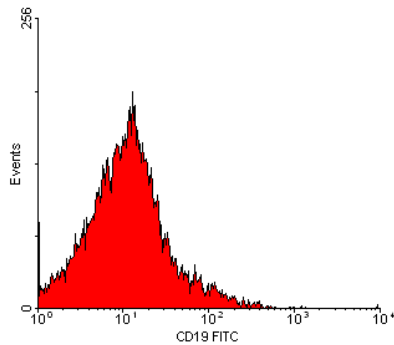
# Analýza dat

## ■ Zobrazení dat

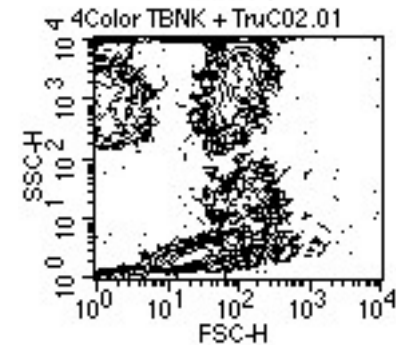
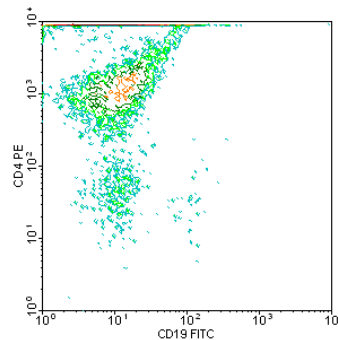
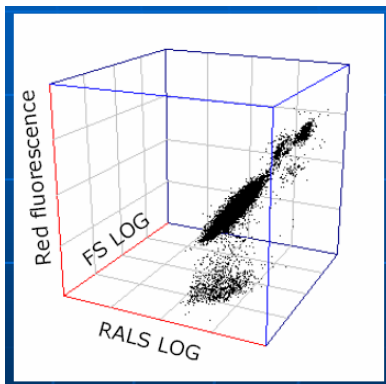
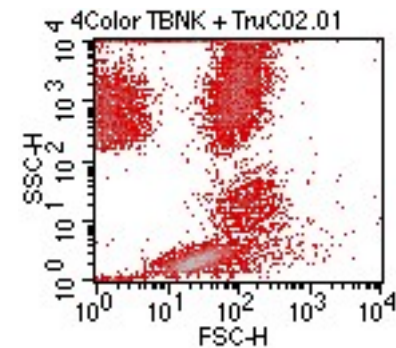
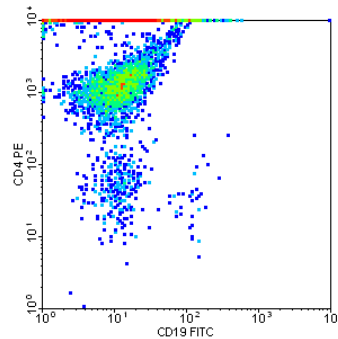
- histogram
- dot plot
- isometric display
- contour plot
- chromatic (color) plots
- 3 D projection

## ■ Gating

# Způsoby pro zobrazení dat

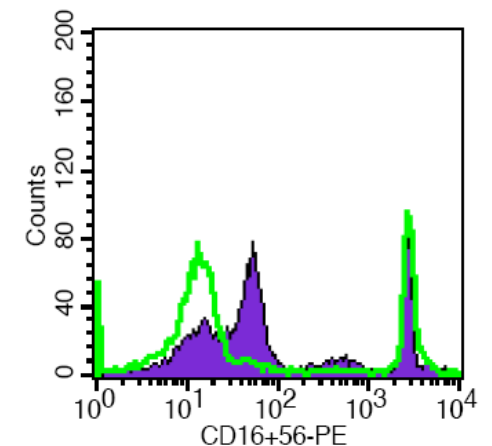
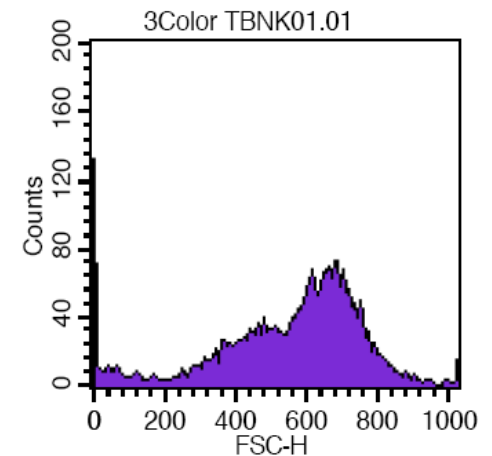


4Color TBNK + TruC02.01



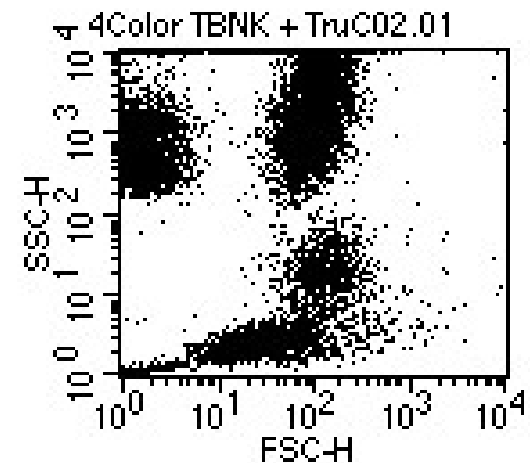
# Histogram distribuce četnosti

- Histogram zobrazuje četnost částic pro jeden parametr
- Jednoduchý výstup
- Nekoreluje s dalším parametrem
- Problém s identifikací populací



# Dot plot

- Zobrazuje korelaci dvou libovolných parametrů
- Jednotlivé tečky představují konkrétní změřené buňky (částice)
- Hodnoty pro řadu částic mohou ležet ve stejném místě
- Nemáme informaci o relativní densitě částic
- Problémy s vykreslením v případě velkých objemů dat



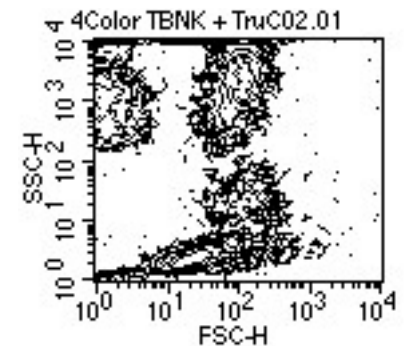
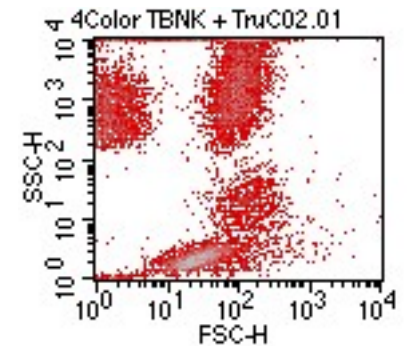
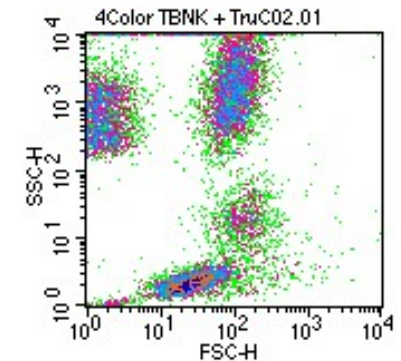
# Density & contour plot

## Density plot:

- Zobrazuje dva parametry jako frekvenci četnosti
- barva a nebo její odstín odpovídá četnosti částic

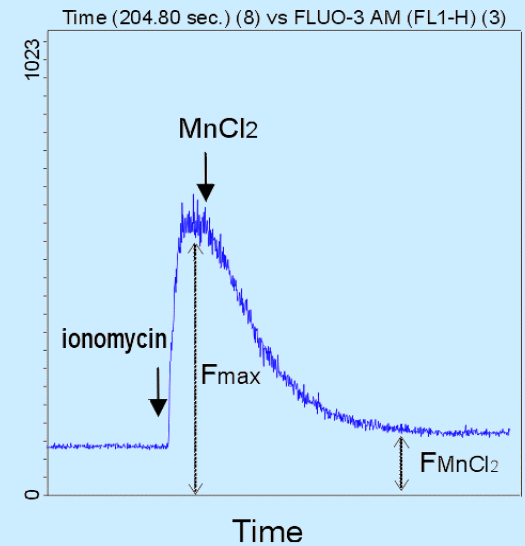
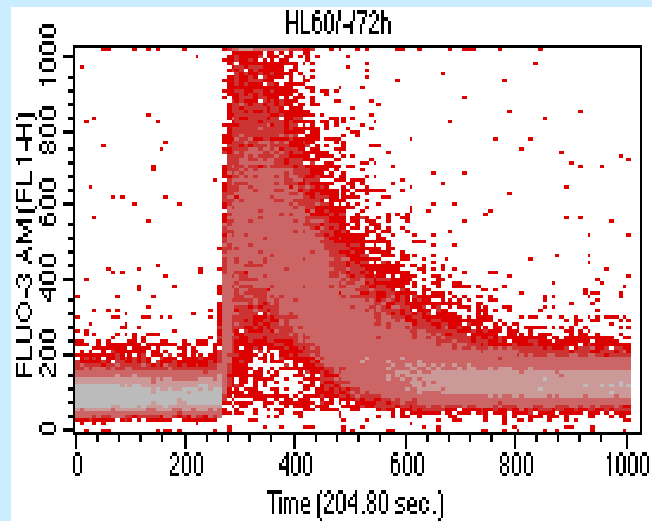
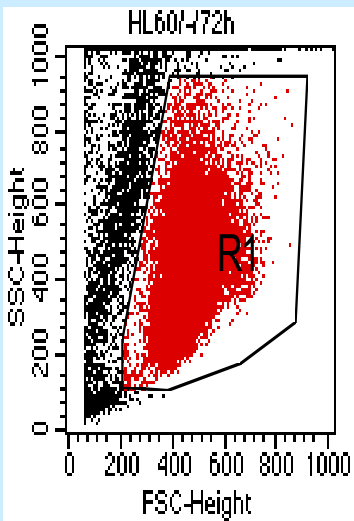
## Contour plot:

- spojnice spojuje body (částice) se stejnou hodnotou signálu
- V podstatě simulujeme 3D graf – třetí rozměr je frekvence





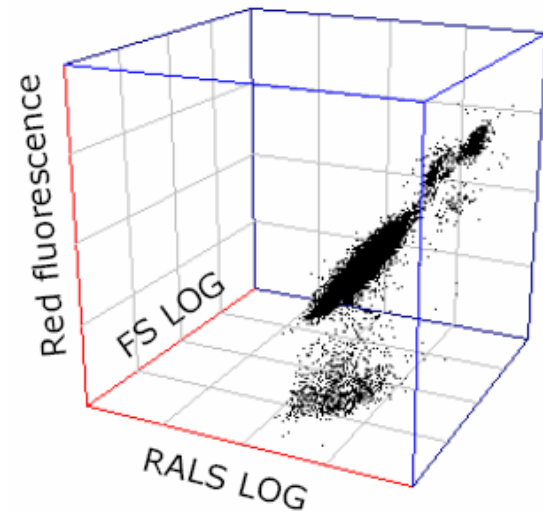
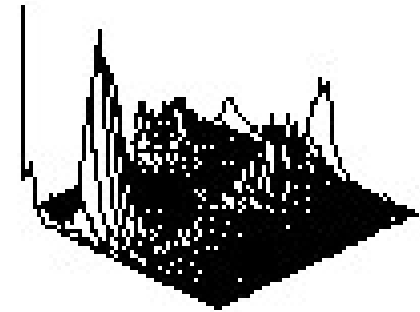
# Čas jako jeden z parametrů



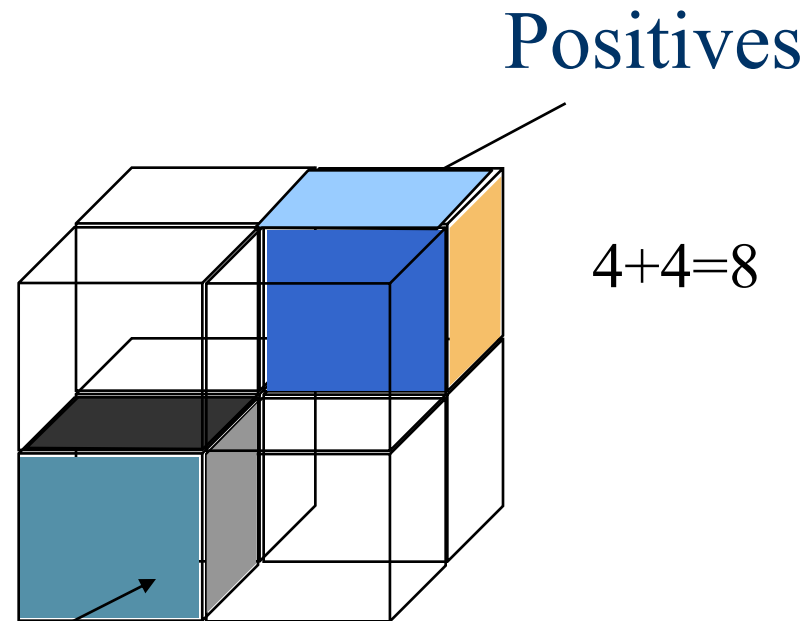
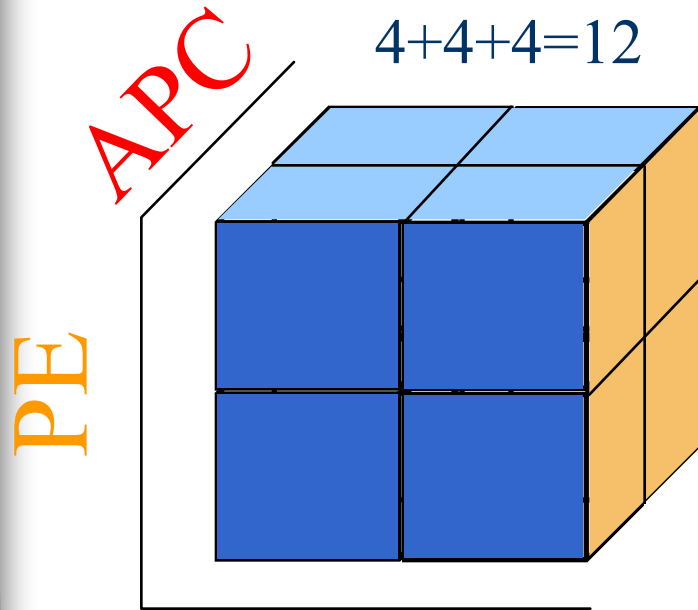
# 3D zobrazení

- 2 parametry + četnost
- 3 parametry společně

4Color TBNK + TruCO2.01

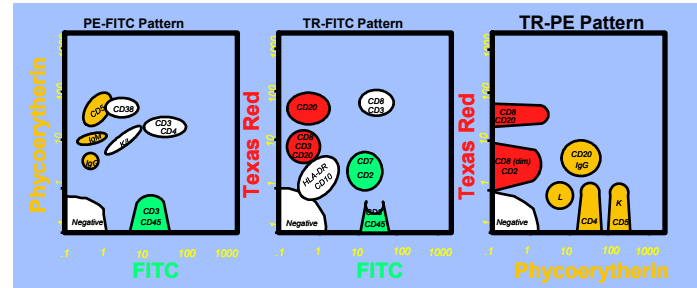
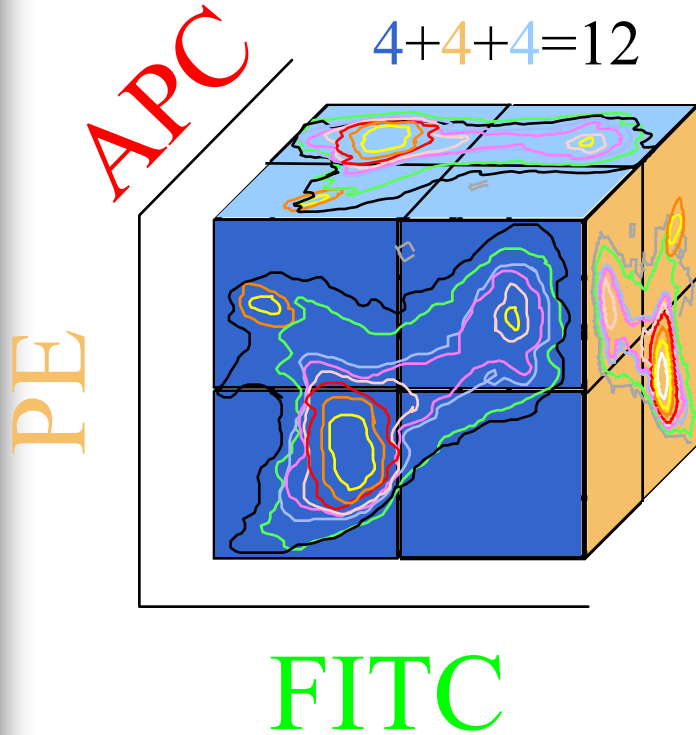


# 3 Color Combinations



Negatives

# 3 Color Combinations





# „Gating“

- Real-time gating vs. softwarový „gating“
- Určení regionů
- Strategie „gatingu“
- Analýza kvadrantů
- Boolean „gating“
- zpětný „gating“

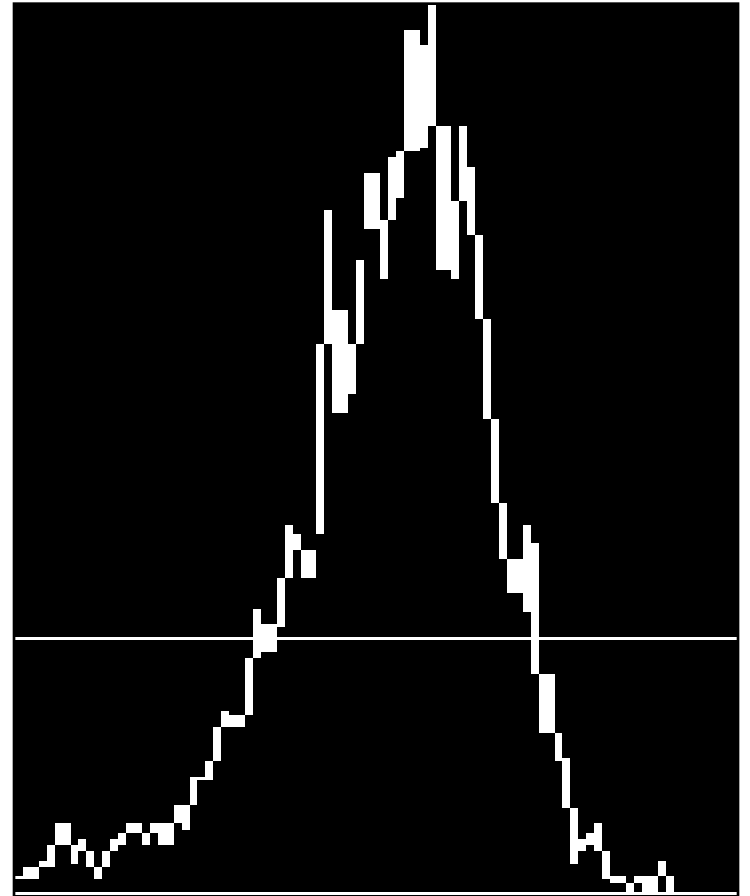


# Real-Time vs. Software Gating

- Real-time (live) gating:
  - omezuje akceptovaná data během měření
- Software (analysis) gating:
  - vyřazuje určitá data během následné analýzy

# Určení regionů

- Objektivní nebo subjektivní?
  - školení/schopnosti/trénink
- Možné tvary:
  - obdelník
  - elipsa
  - “free-hand” (polygon)
  - kvadrant
- Statistika
  - počet
  - podíl (%)
  - průměr, medián, S.D., CV, ....



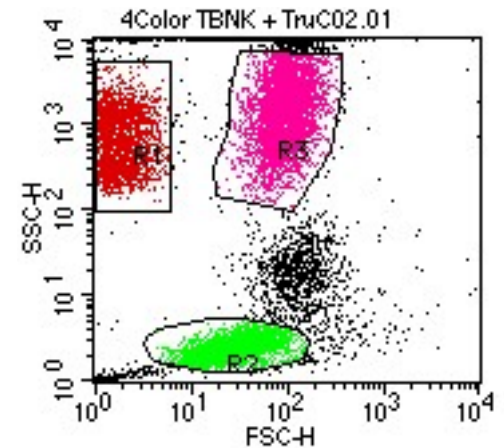
# Region vs. gate

## Region

- oblast (plocha) v grafu definovaná uživatelem
- mnoho regionů v jedné grafu
- ohraničujeme pomocí nich populace našeho zájmu
- je možné je barevně odlišit
- je definován stejně pro všechny vzorky v analýze

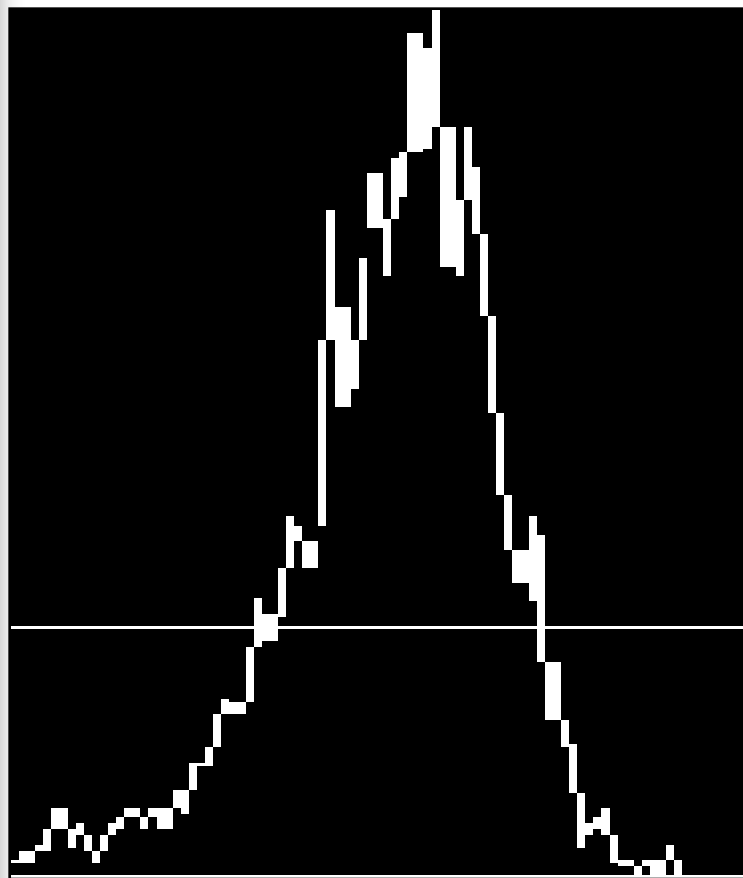
## Gate

- je definován jako jeden a nebo více regionů zkombinovaných pomocí logických operátorů (AND, OR, NOT; Booleova logika)

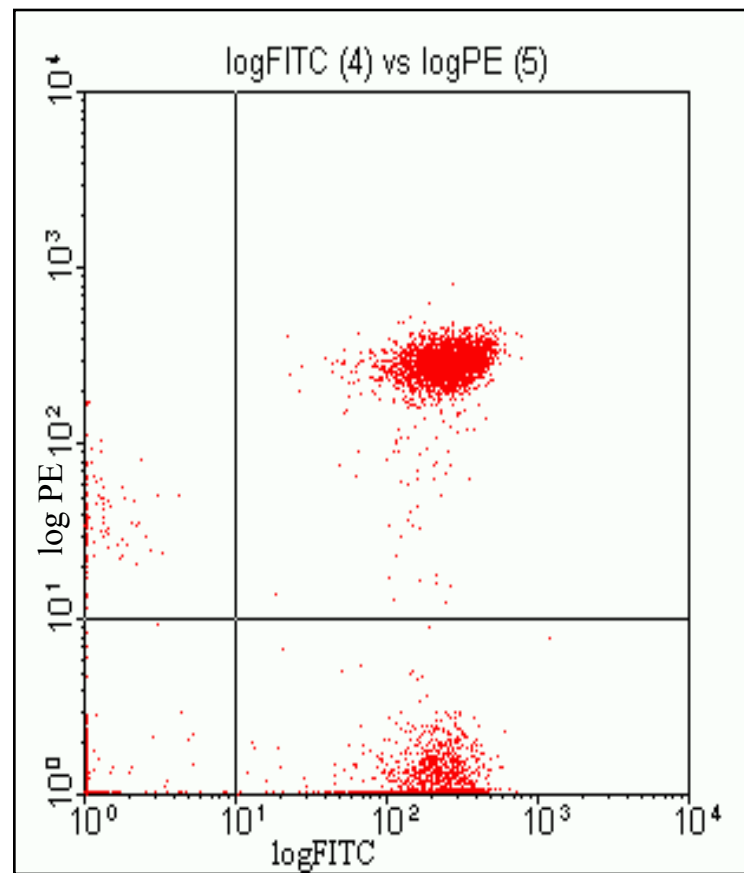




# Using Gates



Region 1 established



Gated on Region 1

# Statistika

- Aritmerický průměr
- Geometrický průměr
- Medián
  - odhad střední hodnoty
  - není ovlivněn extrémními hodnotami
- Směrodatná odchylka
- Koeficient variance
- Modus – nejčastější hodnota

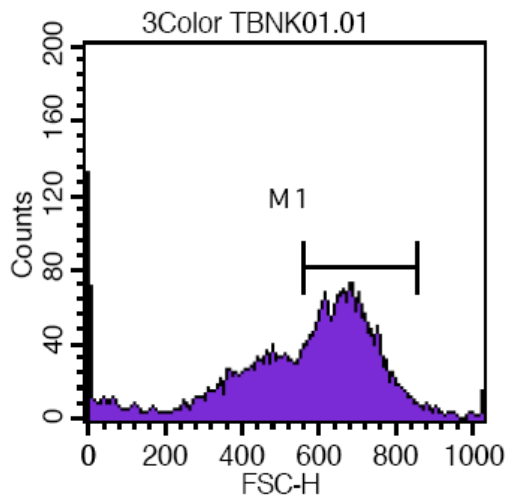
$$\bar{x} = \frac{1}{n} (x_1 + x_2 + \dots + x_n) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$$(a_1 \cdot a_2 \cdot \dots \cdot a_n)^{\frac{1}{n}} = \sqrt[n]{a_1 \cdot a_2 \cdot \dots \cdot a_n} = \left( \prod_{i=1}^n a_i \right)^{\frac{1}{n}}$$

$$\int_{-\infty}^m f(x) dx = 0,5$$

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

# Statistika pro histogram



## Histogram Statistics

File: 3Color TBNK01.01

Sample ID:

Tube: CD3/CD4/CD45

Acquisition Date: 21-Apr-98

Gated Events: 15000

X Parameter: FSC-H (Linear)

Log Data Units: Linear Values

Patient ID:

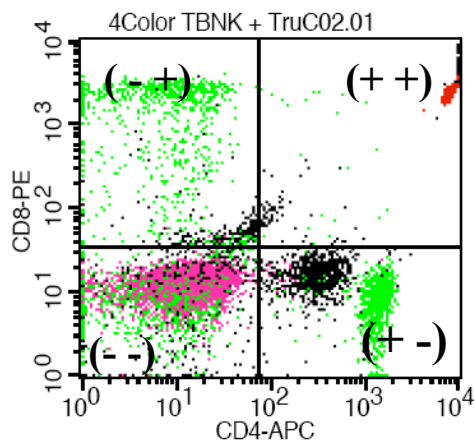
Panel: 3 Color TBNK

Gate: No Gate

Total Events: 15000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	0, 1023	15000	100.00	100.00	570.49	500.40	29.98	612.00	0
M1	559, 855	9306	62.04	62.04	670.83	667.81	9.56	667.00	672

# Analýza kvadrantů



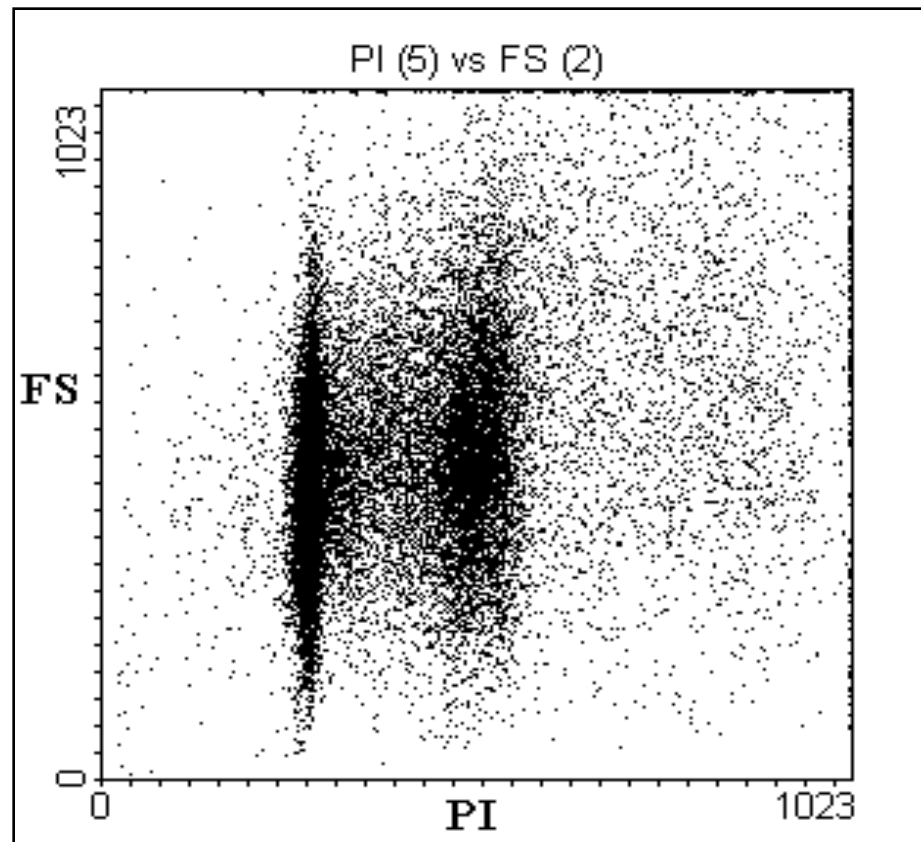
## Quadrant Statistics

File: 4Color TBNK + TruC02.01      Log Data Units: Linear Values  
 Sample ID:      Patient ID:  
 Tube: CD8/CD8/CD45/CD4 TruC      Panel: 4 Color TBNK + TruC  
 Acquisition Date: 08-Oct-98      Gate: No Gate  
 Gated Events: 10000      Total Events: 10000  
 X Parameter: CD4-APC (Log)      Y Parameter: CD8-PE (Log)  
 Quad Location: 74, 35

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	1149	11.49	11.49	16.67	9.14	1474.42	618.99
UR	2222	22.22	22.22	7621.69	6806.34	2386.22	2160.04
LL	4783	47.83	47.83	15.00	10.87	12.01	10.64
LR	1846	18.46	18.46	879.87	646.31	12.24	10.28

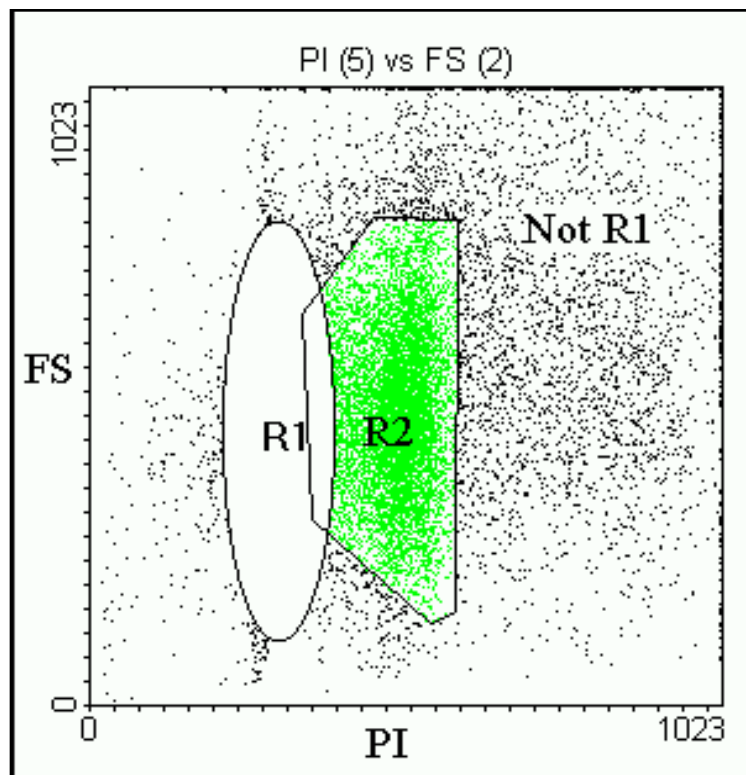
# Logický „Gating“ (Booleova logika)

S překrývajícími se oblastmi máme mnoho možností:



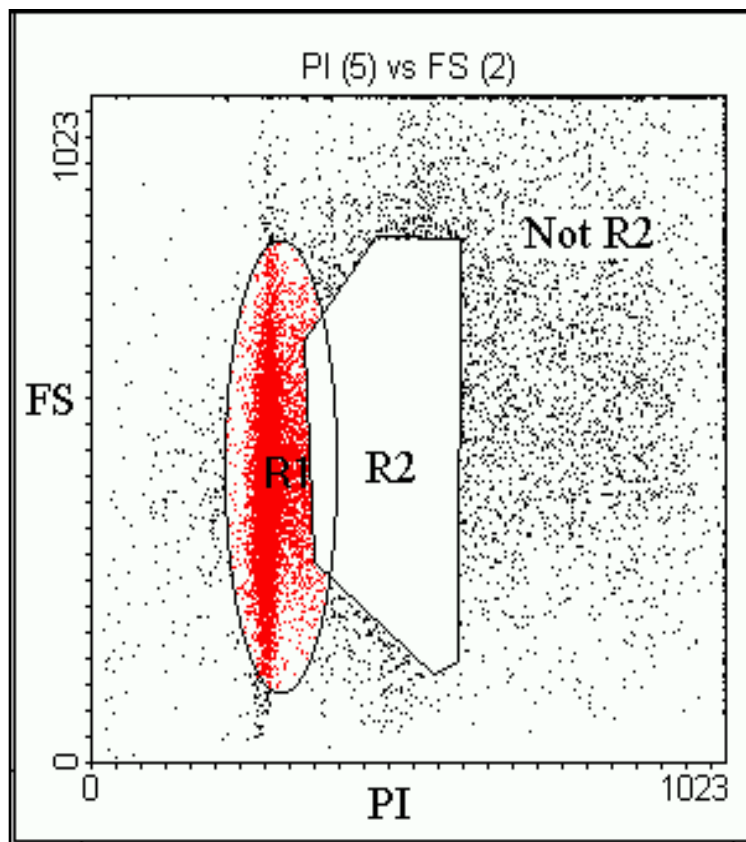
# Boolean Gating

Not Region 1:



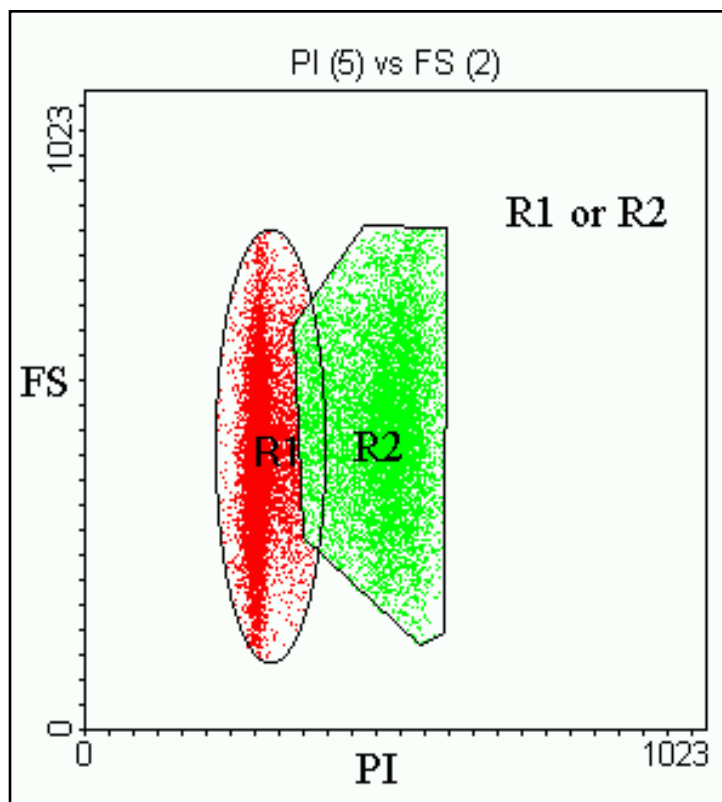
# Boolean Gating

Not Region 2:



# Boolean Gating

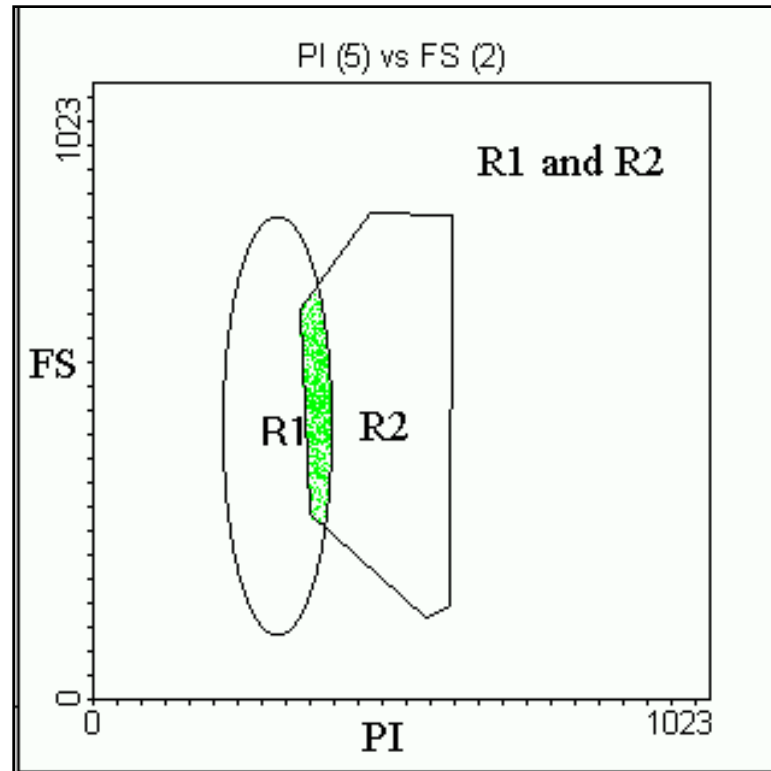
Region 1 or Region 2:





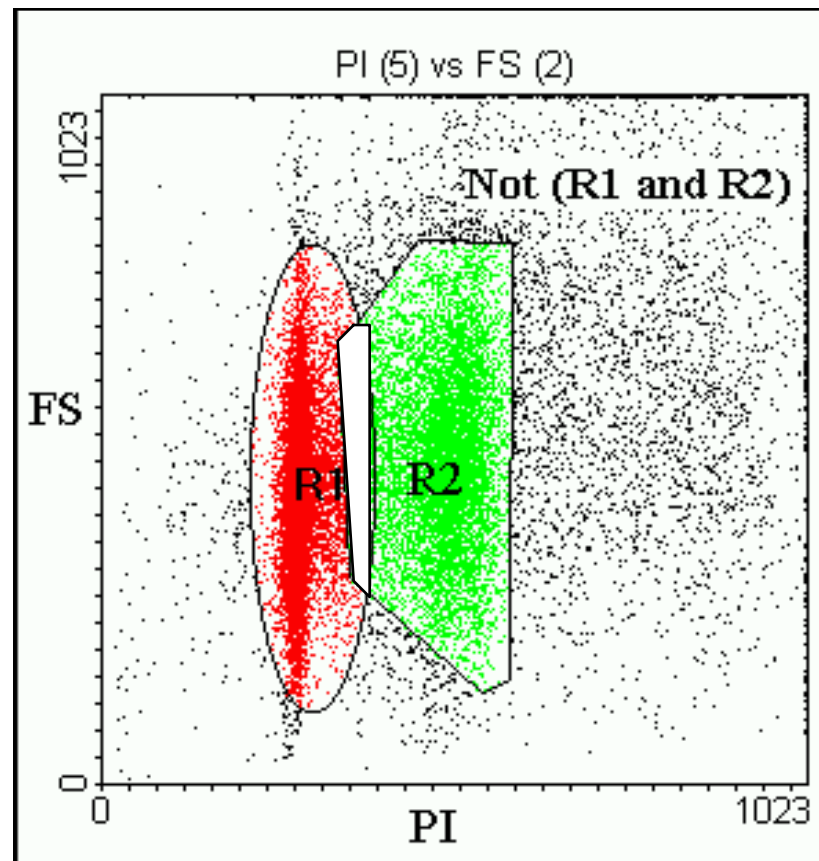
# Boolean Gating

Region 1 and Region 2:

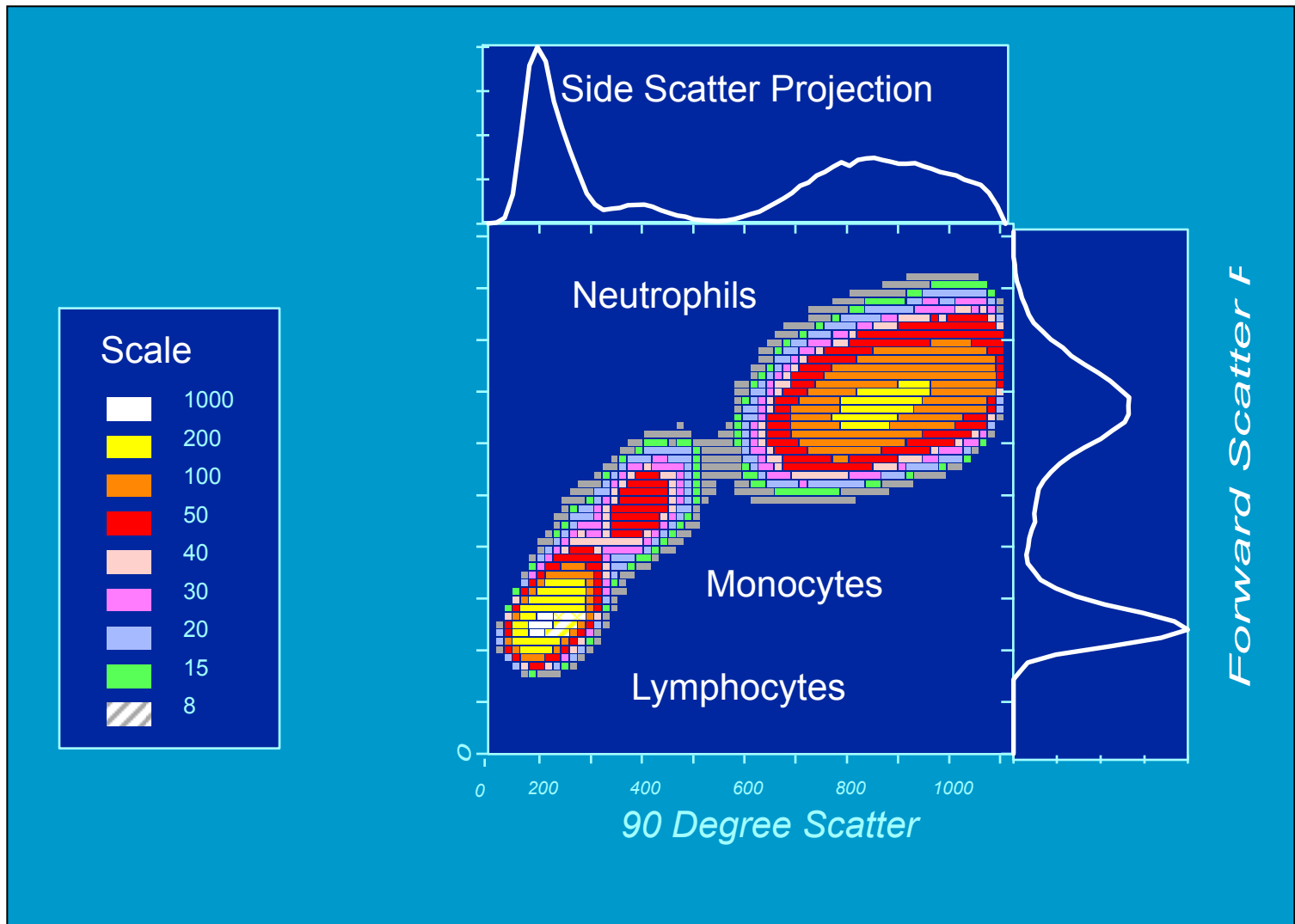


# Boolean Gating

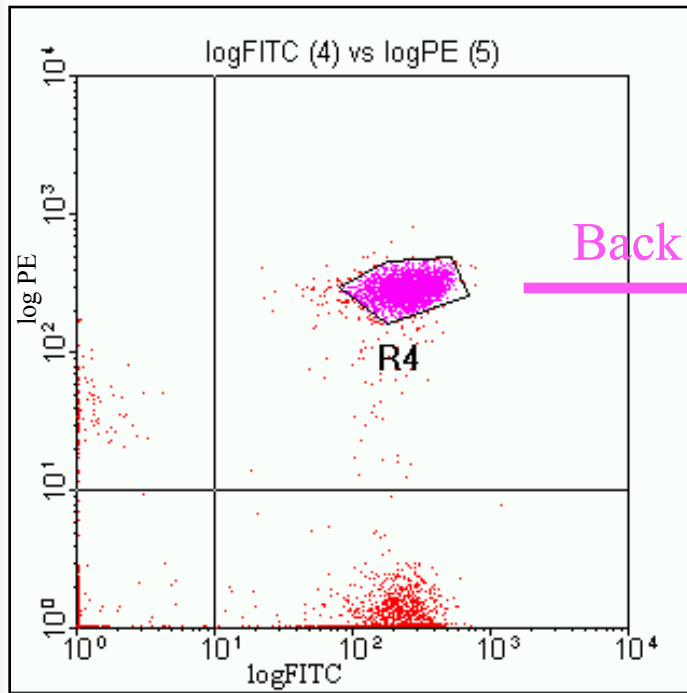
Not (Region1 and Region 2):



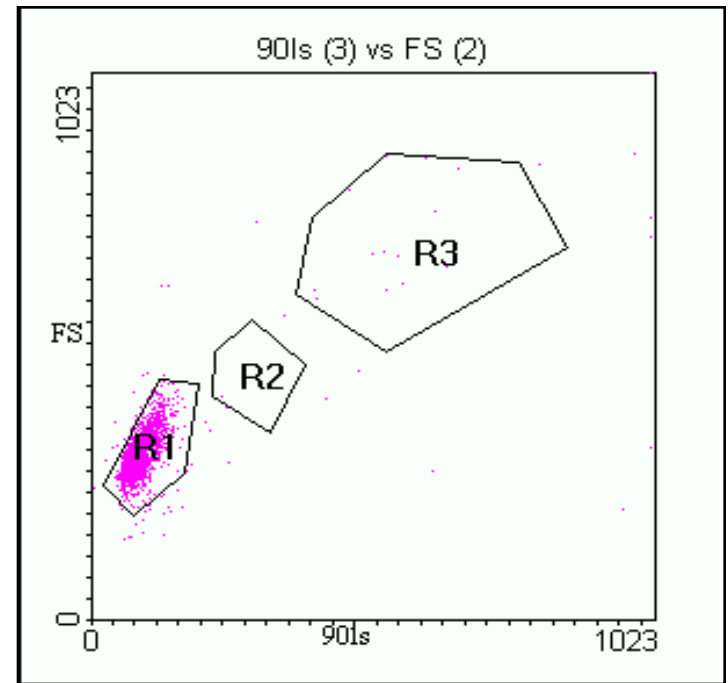
# Light Scatter Gating



# Back Gating

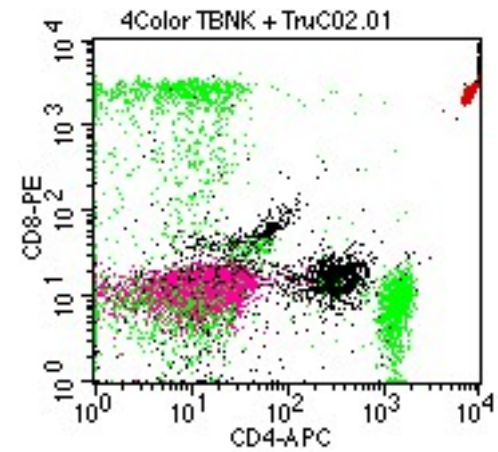
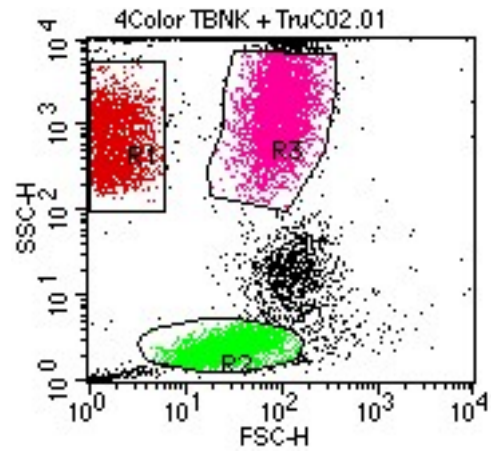


Region 4 established

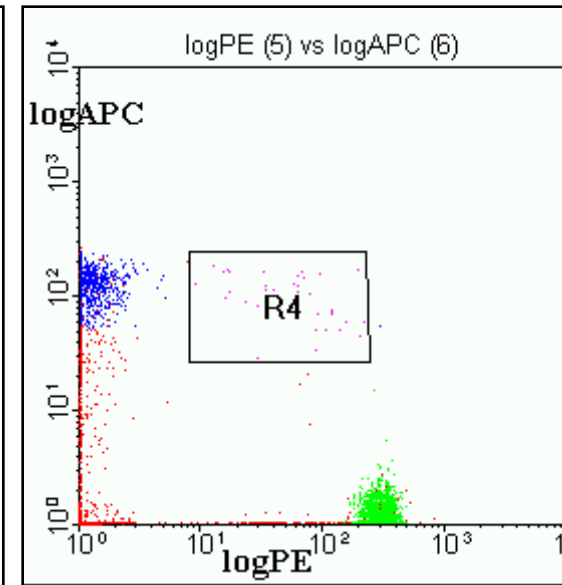
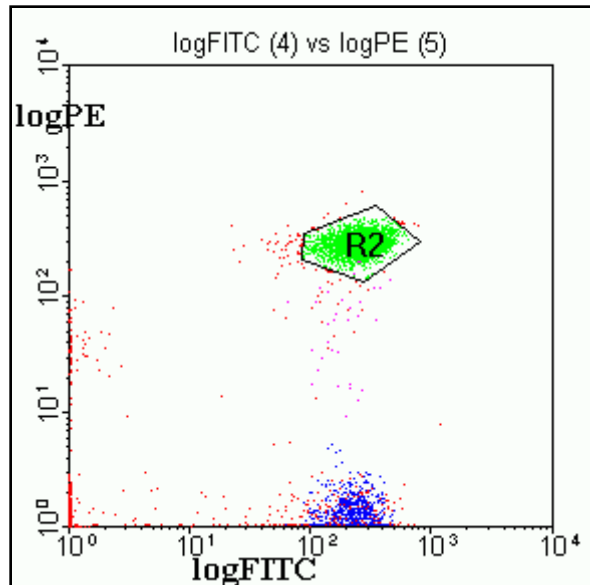
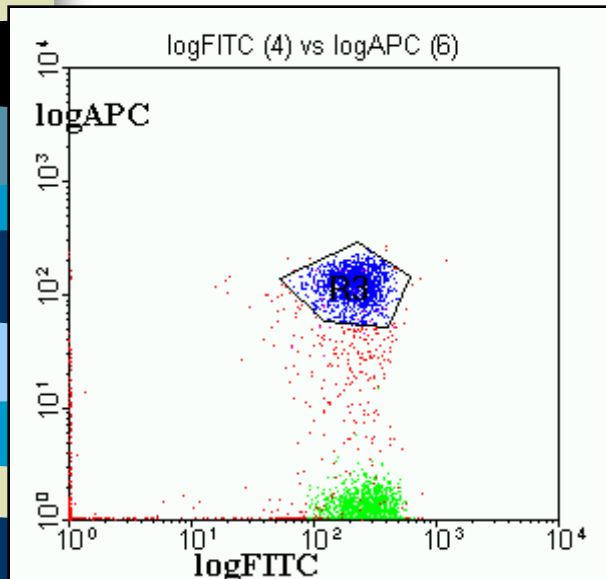
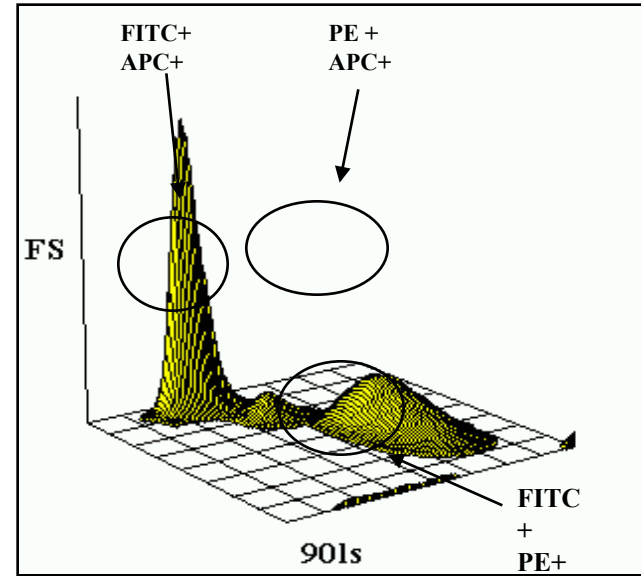
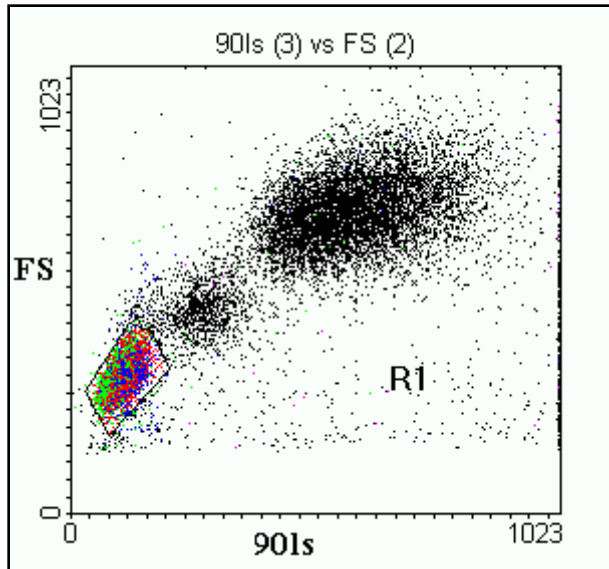


Back-gating using Region 4

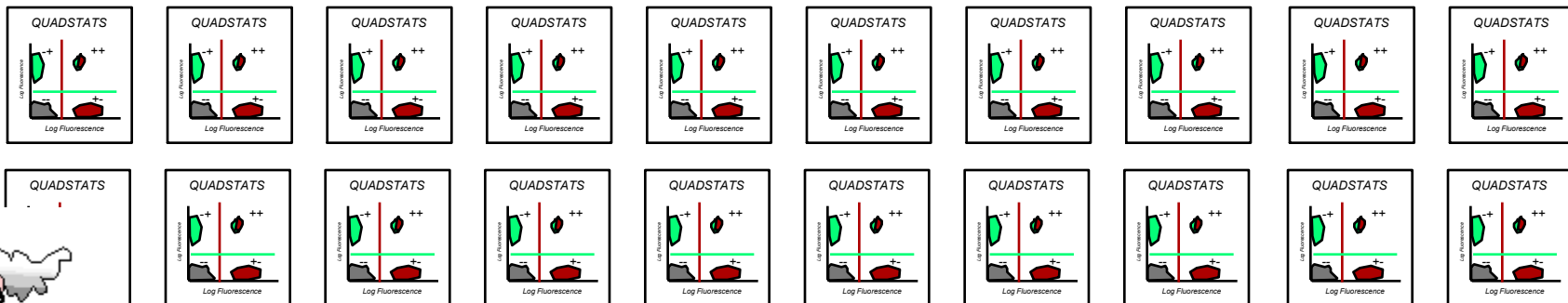
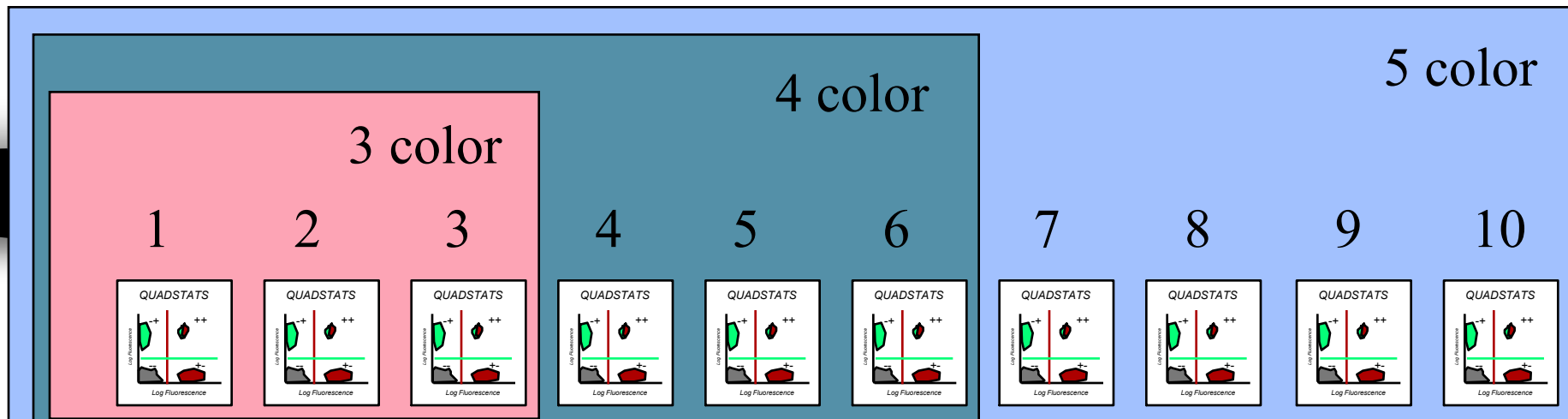
# Back Gating



# 3 Parameter Data Display



# Vícebarevné analýzy generují mnoho dat...





# Způsoby pomocí kterých lze upravit výsledky:

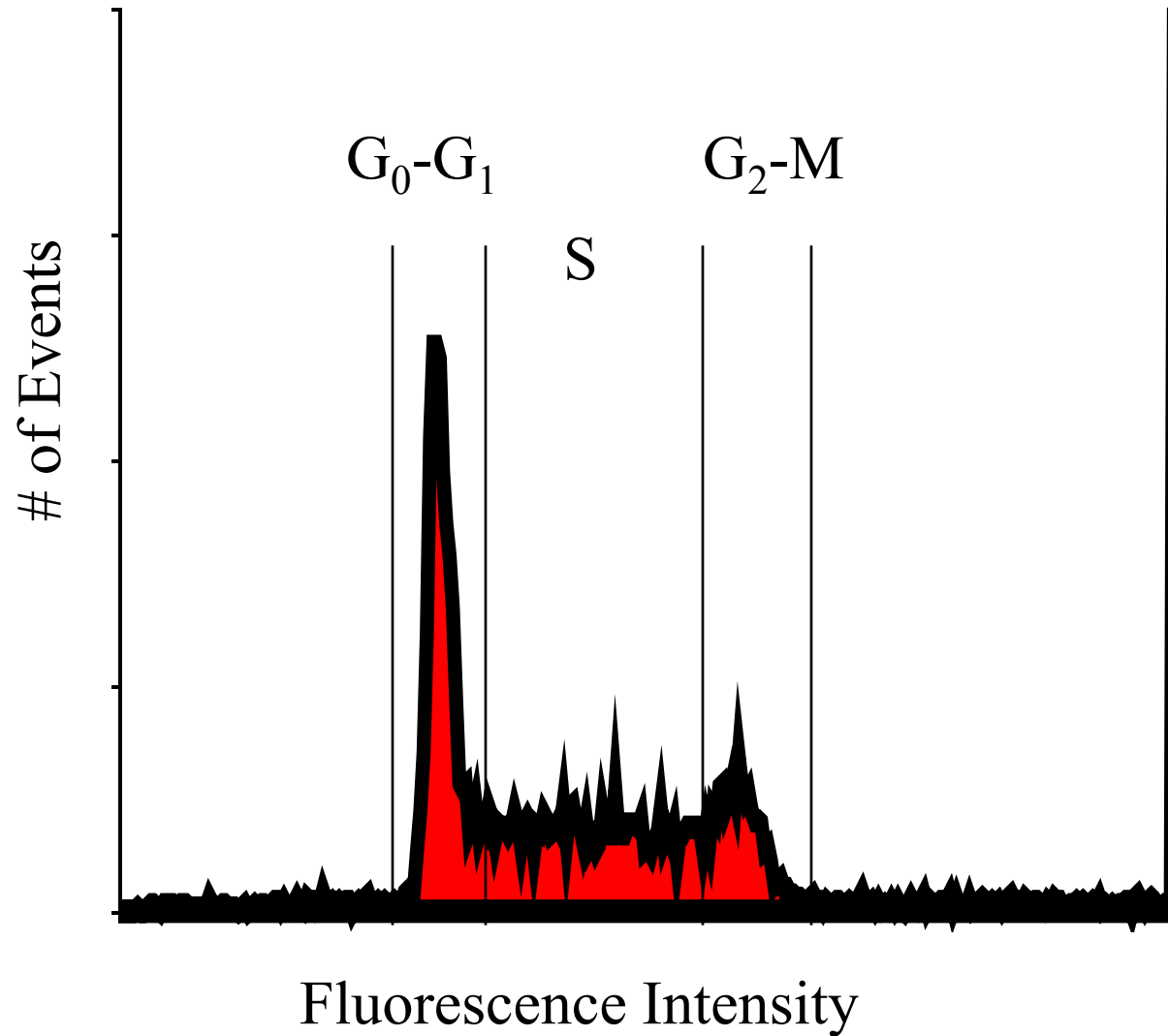
1. Odstranění „doublets“
2. Čas jako parametr pro kontrolu kvality

Příklad - pro DNA analýzu je třeba:

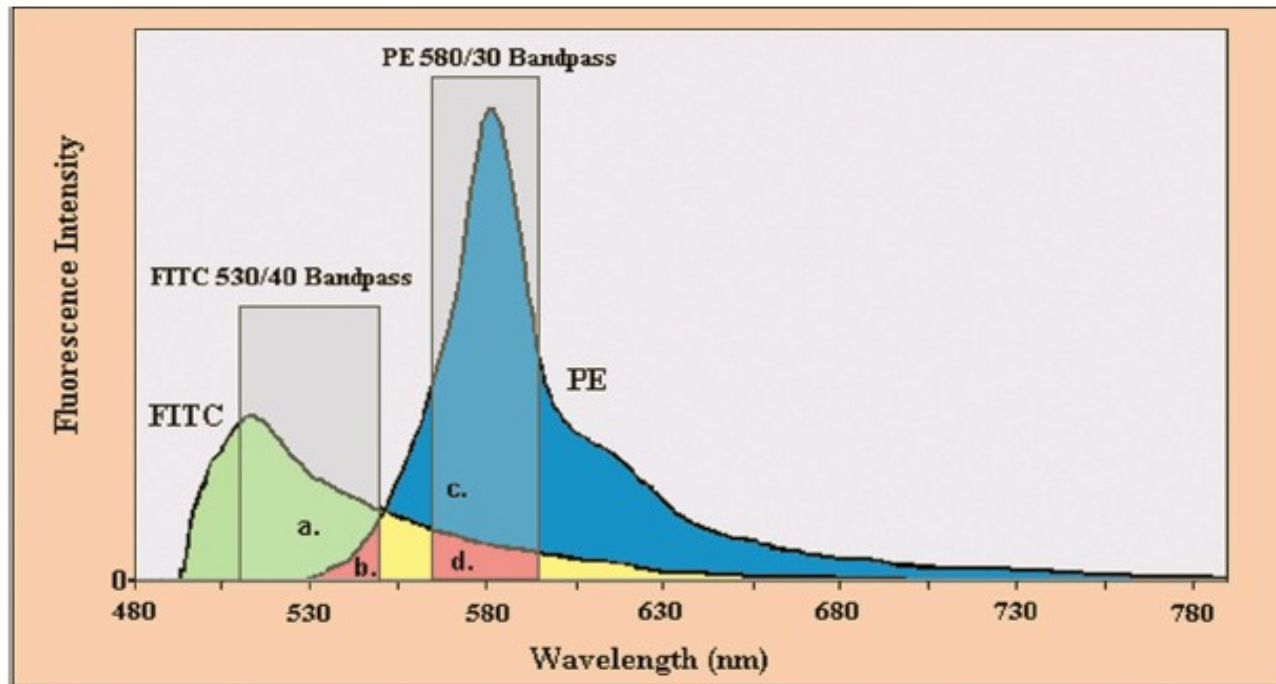
- odstranit „debris“ a shluky
- odstranit „doublets“
- udržovat konstantní průtok



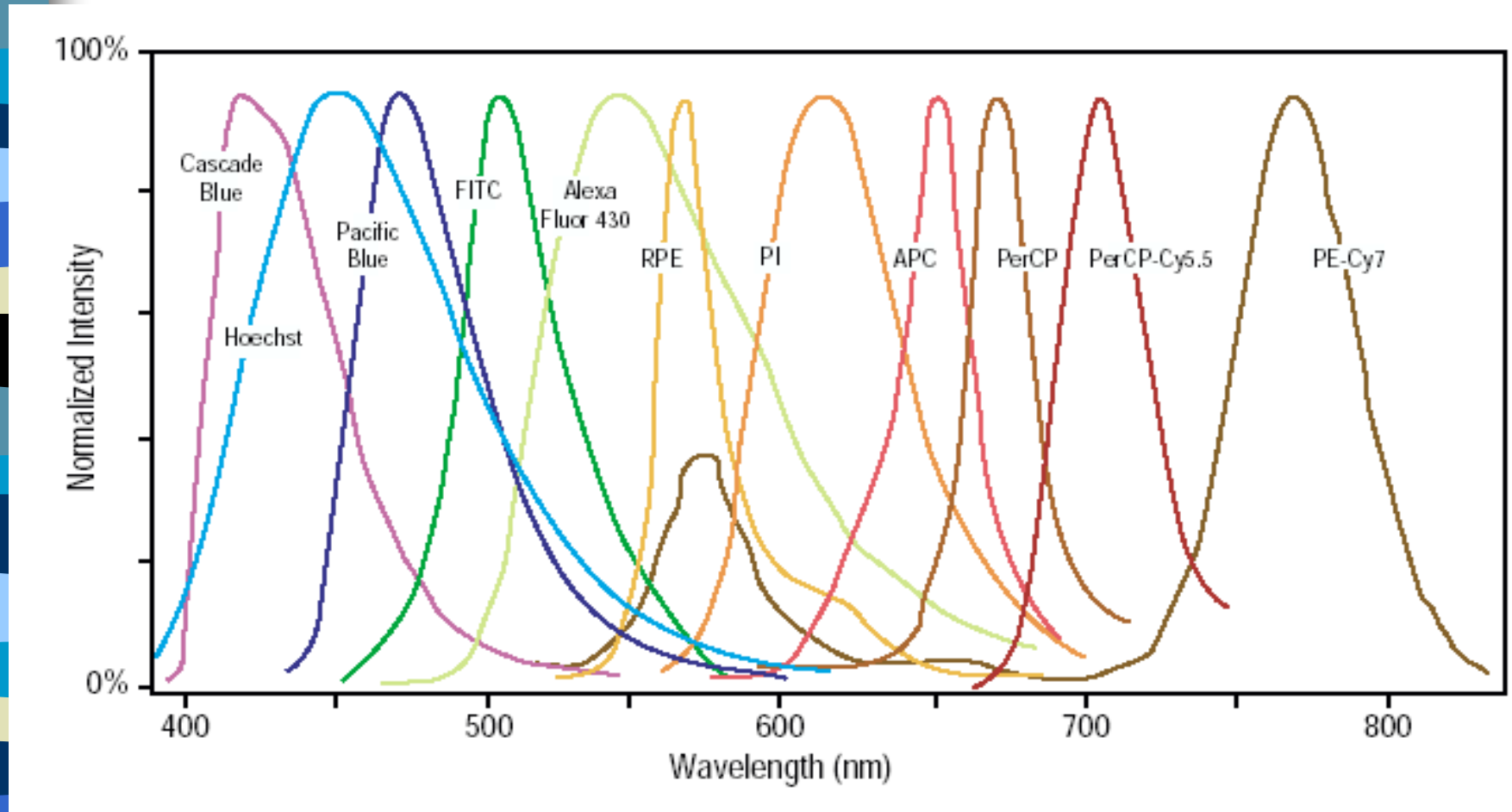
# DNA Histogram



# Co je problém při vícebarevné detekci?



# Emission Spectra–Spectral Overlap





# Kompenzace fluorescenčního signálu při vícebarevné detekci

- Proces při kterém dochází k eliminaci všech fluorescenčních signálů kromě signálu z fluorochromu který má být na příslušném detektoru detekován
- Nastavení pomocí mixu mikročástic či buněk označených/neoznačených příslušnými fluorochromy.

# Kompenzace fluorescenčního signálu při vícebarevné detekci

**Table 1.14.1** Typical Spillover Matrix for a Three-Color Compensation<sup>a</sup>

Fluorophore	Detector		
	Green	Orange	Red
FITC	1.000	0.180	0.040
PE	0.009	1.000	0.213
PE-Cy5	0.005	0.029	1.000

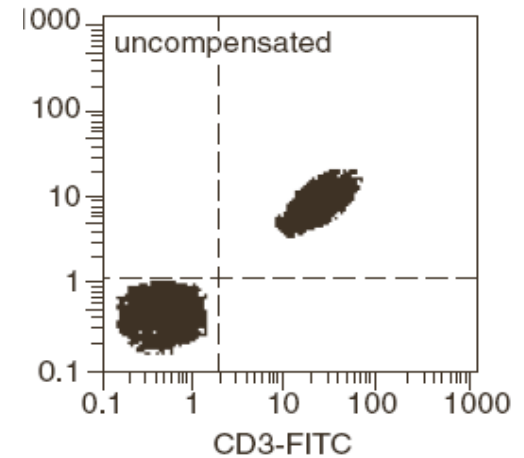
<sup>a</sup>Note: The diagonal elements are 1, since the contribution of each fluorophore to its cognate detector is defined to be 100%. In this table, the FITC into PE spillover is 18%; the PE into FITC spillover is 0.9%.

Current Protocols in Cytometry

# Kompenzace fluorescenčního signálu

FITC positive & negative

PE negative beads

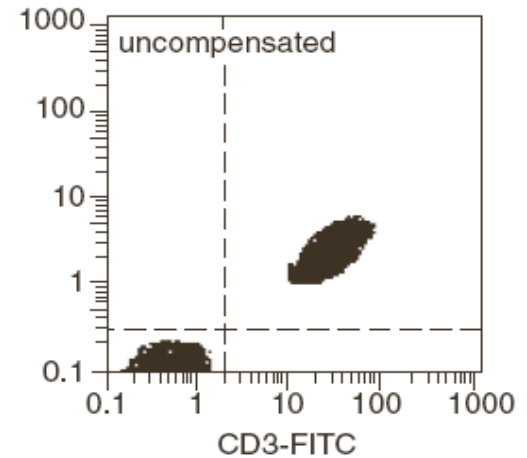
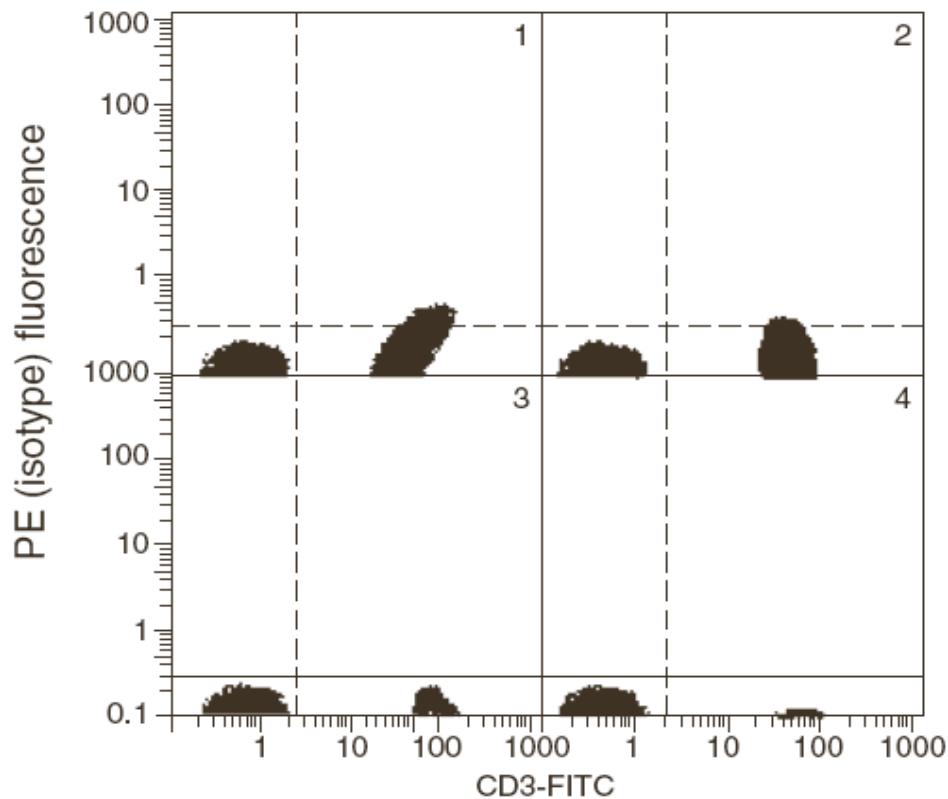


Current Protocols in Cytometry

# Kompenzace fluorescenčního signálu

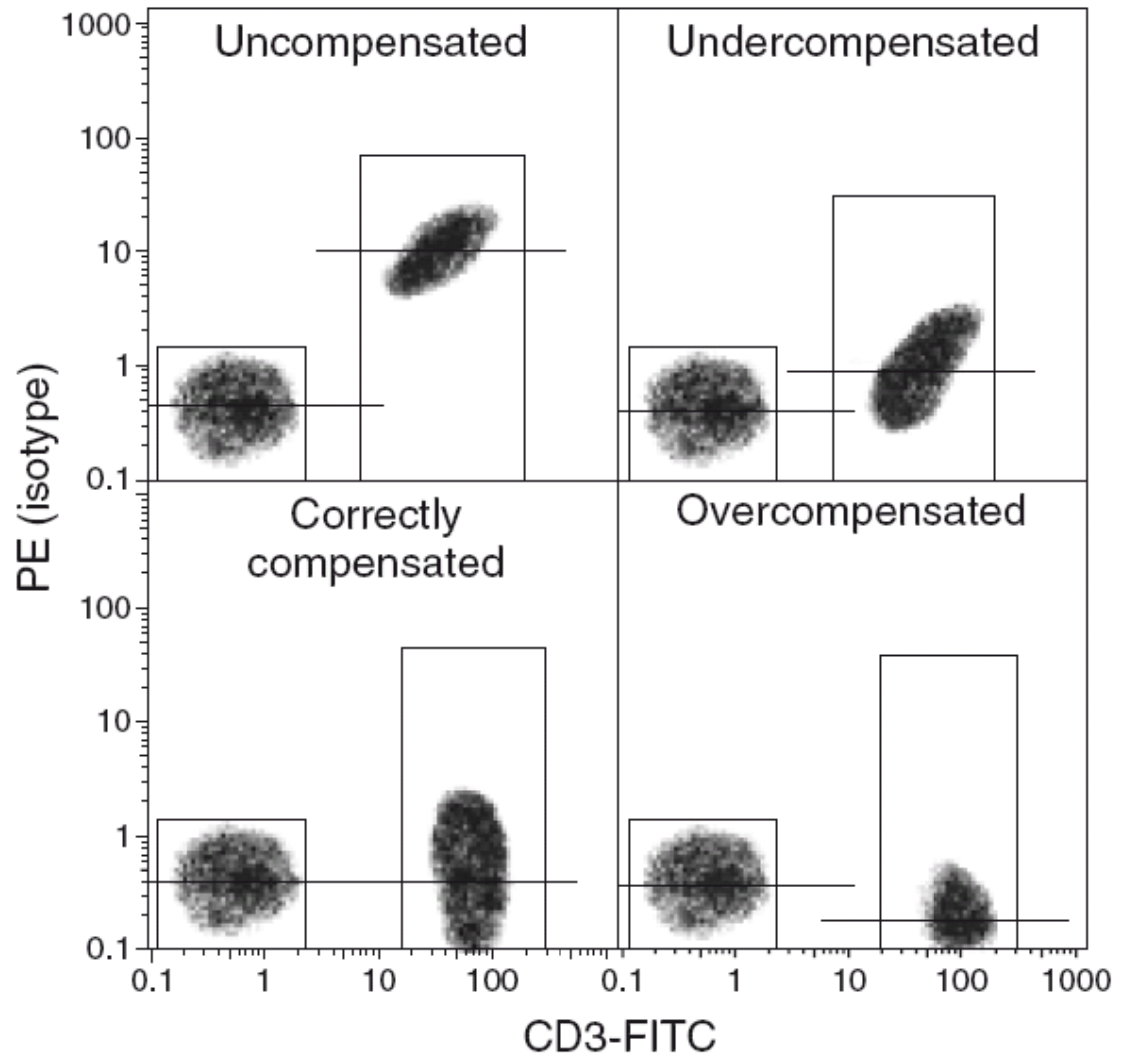
FITC positive & negative

PE negative beads



Current Protocols in Cytometry

# Kompenzace fluorescenčního signálu





# Nastavení kompenzací

- značené mikročástice – pro běžně konjugované fluorochromy



## CaliBRITE Beads

CaliBRITE 3 three-color kit–Catalog No. 340486

CaliBRITE two-color kit–Catalog No. 349502

CaliBRITE PerCP Beads–Catalog No. 340497

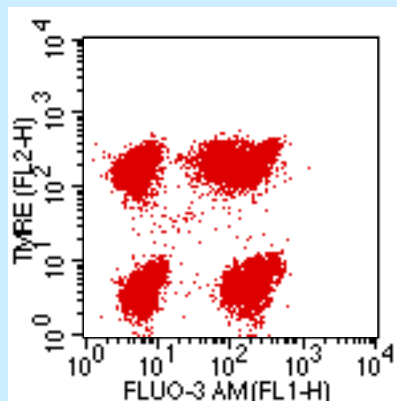
CaliBRITE APC Beads–Catalog No. 340487

CaliBRITE PerCP-Cy5.5 Beads with Bead Dilution Buffer–Catalog No. 345036

For In Vitro Diagnostic Use with FACS brand flow cytometers

Setup	Tube <sup>a</sup>	Unlabeled	FITC	PE	PerCP or PerCP-Cy5.5 <sup>b</sup>	APC
two-color	A	1 drop				
	B	1 drop	1 drop	1 drop		
three-color	A	1 drop				
	B	1 drop	1 drop	1 drop	1 drop	
four-color	A	1 drop				1 drop
	B	1 drop	1 drop	1 drop	1 drop	1 drop

- značené buňky – pro vitální značení



parametr - detektor amp.

FL1 - 544

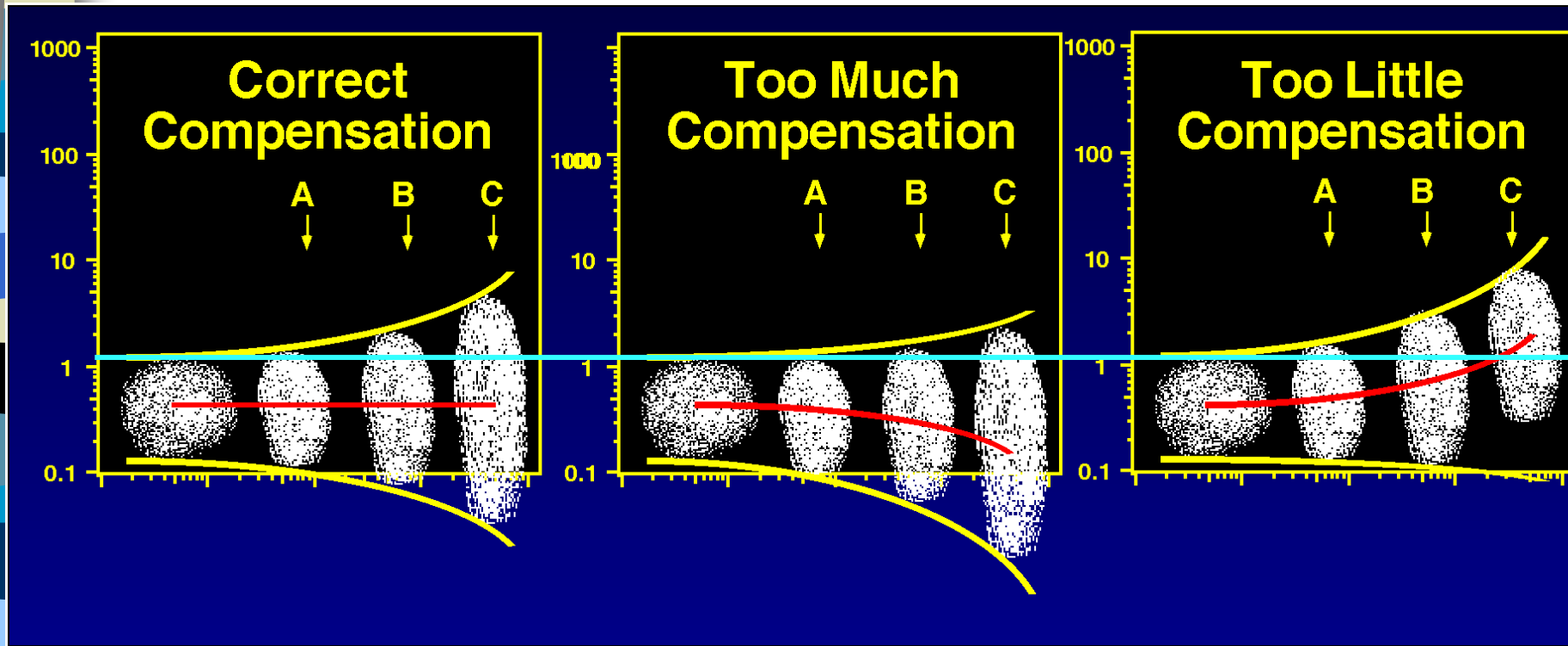
FL2 - 434

kompenzace

FL1 - 1.1%FL2

FL2 - 17.5%FL1

# Which marker for compensation?



Small errors in compensation of a dim control (A) can result in large compensation errors with bright reagents (B & C).

**Use bright markers to setup proper compensation.**



# Kompenzace - literatura

Mario Roederer - Compensation in Flow Cytometry  
**Current Protocols in Cytometry** (2002) 1.14.1-1.14.20 John Wiley & Sons, Inc.

M. Loken, D. R. Parks, & L. A. Herzenberg (1977). Two-color immunofluorescence using a fluorescence-activated cell sorter. *J. Histochem. Cytochem.* **25**:899-907.

M. Roederer & R. F. Murphy (1986). Cell-by-cell autofluorescence correction for low signal-to-noise systems: application to EGF endocytosis by 3T3 fibroblasts. *Cytometry* **7**:558-565.

S. Alberti, D. R. Parks, & L. A. Herzenberg (1987). A single laser method for subtraction of cell autofluorescence in flow cytometry. *Cytometry* **8**:114-119.

C. B. Bagwell & E. G. Adams (1993). Fluorescence spectral overlap compensation for any number of flow cytometry parameters. *in: Annals of the New York Academy of Sciences*, **677**:167-184.

*No Data Analysis  
Technique Can Make  
Good Data Out of  
Bad Data!*

Shapiro's 7th Law of Flow Cytometry



# Shrnutí přednášky

- Sorting
- zpracování signálu
- vizualizace dat a „gating“
- kompenzace

## Na konci dnešní přednášky by jste měli:

1. Znat základní principu sortování,
2. popsat způsob zpracování signálu,
3. rozumět lin / log zesílení signálu,
4. rozeznat jednotlivé způsoby vizualizace dat,
5. chápat základní principy „gatingu“,
6. znát princip kompenzace signálu při vícebarevné detekci.