

# Bi9393 Analytická cytometrie

**Karel Souček, Ph.D.**

Lukáš Kubala, Ph.D.

Pavla Gajdušková, Ph.D.

Eva Bártová, Ph.D.

Eva Slabáková, Ph.D.

Alena Vaculová, Ph.D.

Oddělení cytokinetiky  
Biofyzikální ústav AVČR  
Královopolská 135  
612 65 Brno

**e-mail: [ksoucek@ibp.cz](mailto:ksoucek@ibp.cz)**

tel.: 541 517 166



# Struktura kurzu

## ■ Přednášky

- 8 lekcí o průtokové cytometrii a aplikacích
- 1 lekce o mikroskopii
- 3 lekce zaměřené na „microarrays“

## ■ Cvičení

Součástí kurzu je praktické cvičení. Přesto bude jedna přednáška věnována praktické demonstraci. Vybraná zařízení budou demonstrována přímo v laboratořích BFÚ

## ■ Test

Kurz bude zakončen zkouškou ve formě testu shrnujícího látku za celý semestr. Výsledek testu bude tvořit 75% celkového hodnocení.

## ■ Seminář

Každý student bude prezentovat krátký seminář jehož téma bude konzultováno s přednášejícím a bude se týkat zaměření kurzu. Téma semináře bude shrnuto v krátkém textu ve stylu hesla pro CZ Wikipedii. Na základě této prezentace a odevzdaného textu bude udělen zápočet a hodnocení vlastního semináře se bude také z 25-ti % odrážet v celkové známce.



# Seminář studentů

- Téma semináře musí vycházet z probírané technologie a musí být schváleno přednášejícím.
- Cílem je demonstrovat pochopení principů ze kterých vychází a jejich uplatnění v biologii.
- Prezentace musí být připravena např. v PowerPoint(u). Prezentaci je nutné předložit v předstihu přednášejícímu ke konzultaci a posouzení.
- Maximální délka prezentace je 15 minut a nesmí být kratší 10-ti minut.
- Obsah prezentace shrnout v krátkém „Wiki“ textu.

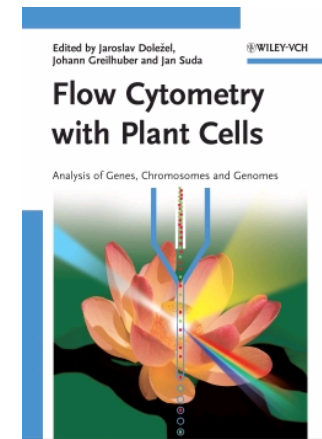
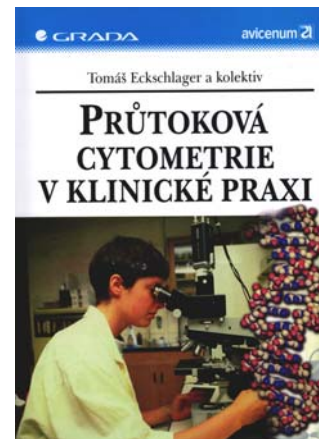
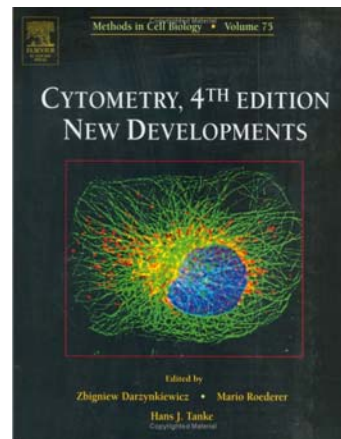
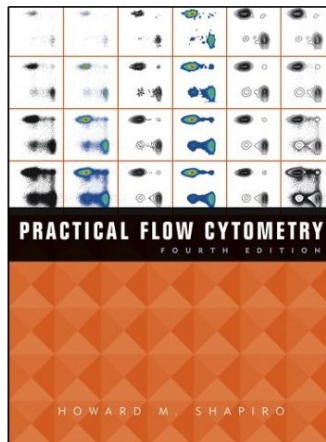


# Seminář studentů – příklady témat

- Základní principy průtokové cytometrie
- Analýza dat z průtokového cytometru
- Základní principy separace pomocí průtokové cytometrie
- Principy fluorescence a fluorescenční značky
- Základy detekce fluorescence a zpracování signálu.
- Aplikace průtokové cytometrie
  - Imunofenotypová analýza krevních destiček.
  - Využití průtokové cytometrie v diagnostice alergických onemocnění.
  - Analýza DNA pomocí průtokové cytometrie.
  - Aplikace průtokové cytometrie při studiu imunologie bezobratlých.
  - Chromozómová analýza pomocí fluorescenční mikroskopie a průtokové cytometrie.
  - Extracelulární detekce cytokinů.
  - Monoklonální protilátky v průtokové cytometrii.
  - Imunofenotypová analýza periferních lymfocytů.
  - Využití průtokové cytometrie v cytogenetice.
  - Stanovení buněčné viability.
  - Metody detekce apoptózy.
  - Měření enzymatických aktivit pomocí průtokové cytometrie.
  - Zdroje excitace a optické systémy v průtokové cytometrii.
  - Detekce CD4+ T buněk u HIV pozitivních pacientů.
  - Aplikace FRET a FRAP.
  - Víceparametrové analýzy v průtokové cytometrii.
  - Průtoková cytometrie v diagnostice nádorových onemocnění.
  - Intracelulární detekce cytokinů.
  - Imunofenotypová analýza krevních destiček.
  - Využití průtokové cytometrie v diagnostice alergických onemocnění.

# Informační zdroje – průtoková cytometrie

- Practical Flow Cytometry, Howard M. Shapiro, Wiley-Liss; 4th edition
- Cytometry: New Developments, Volume 75, Fourth Edition (Methods in Cell Biology), Zbigniew Darzynkiewicz, Academic Press; 4th edition
- Průtoková cytometrie v klinické praxi, T. Eckschlager a kol., Grada 1999
- Flow Cytometry with Plant Cells: Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes; Jaroslav Dolezel (Editor), Johann Greilhuber (Editor), Jan Suda (Editor), February 2007



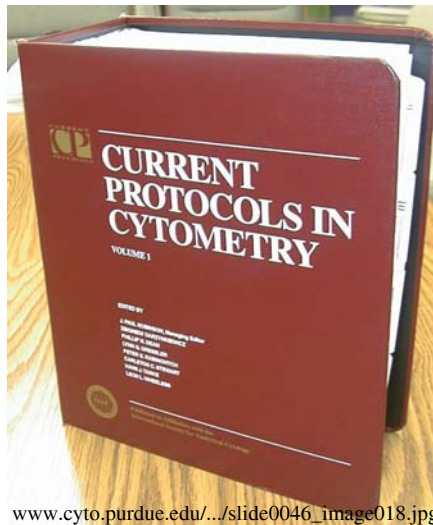
Tyto knihy je možné zapůjčit po domluvě ke studiu do knihovny BFÚ.

Více informací o knihách o průtokové cytometrii najdete na:

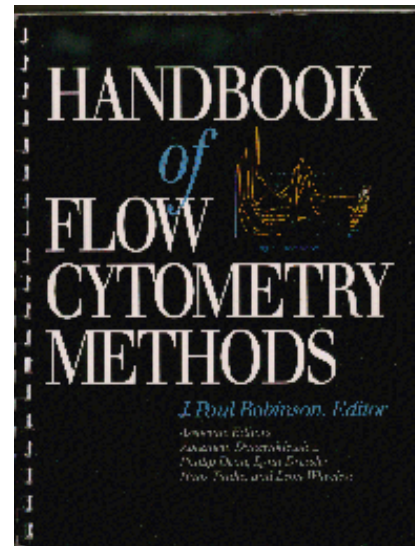
<http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/books/bookindx.htm>

# Informační zdroje – průtoková cytometrie (metody a protokoly)

- The Handbook of Flow Cytometry Methods
- Current Protocols in Cytometry



[www.cyto.purdue.edu/.../slide0046\\_image018.jpg](http://www.cyto.purdue.edu/.../slide0046_image018.jpg)



Tyto knihy je možné zapůjčit po domluvě ke studiu do knihovny BFÚ.

Více informací o knihách o průtokové cytometrii najdete na:

<http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/books/bookindx.htm>

# Informační zdroje – cytometrie (časopisy)

## ■ Cytometry Part A

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/jhome/33945>



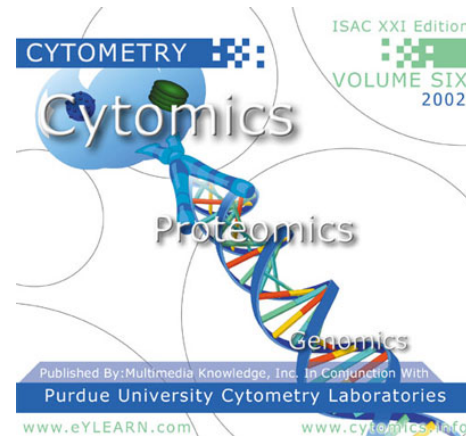
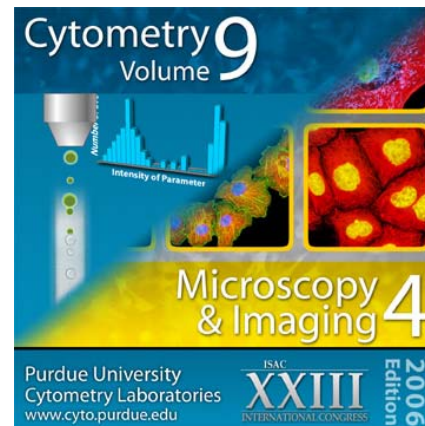
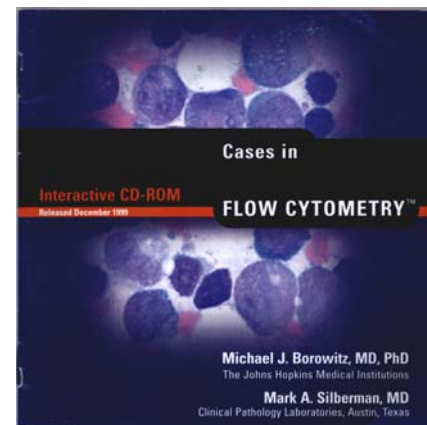
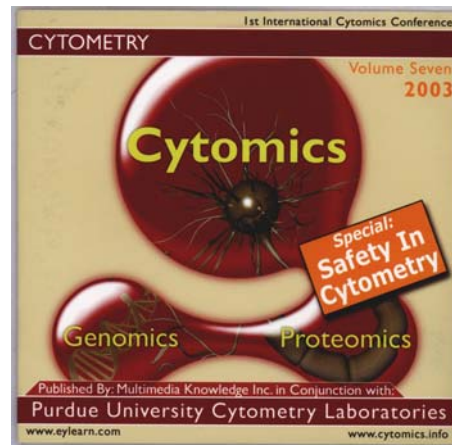
## ■ Cytometry Part B: Clinical Cytometry

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/jhome/102019902>



Jednotlivá čísla Cytometry Part A (od roku 2000 je možné zapůjčit po domluvě ke studiu do knihovny BFÚ).

# Informační zdroje – cytometrie (CD-ROM)



Je možné zapůjčit po domluvě.





## Informační zdroje – (Internet)

- Purdue University, Cytometry Labs

<http://www.cyto.purdue.edu/>

- International Society for Analytical Cytology

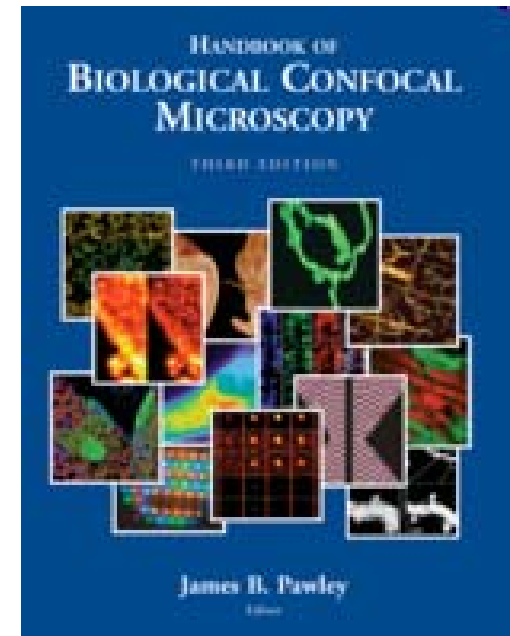
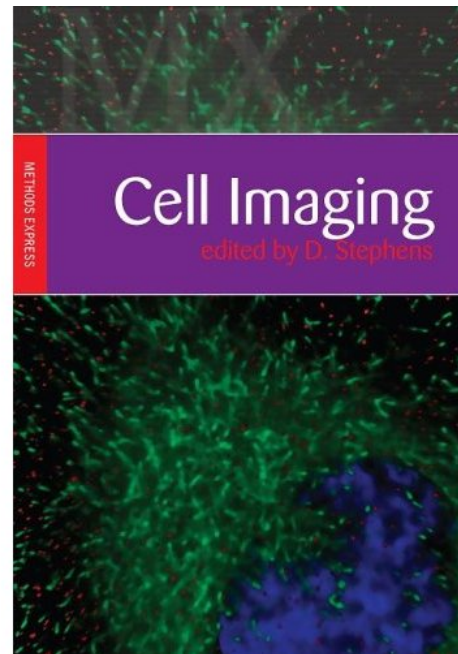
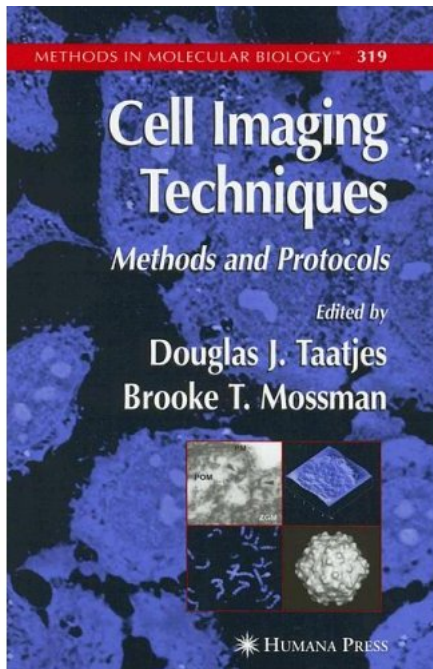
<http://www.isac-net.org/>

- Molecular Probes (Invitrogen)

<http://probes.invitrogen.com/handbook/>

# Informační zdroje - mikroskopie

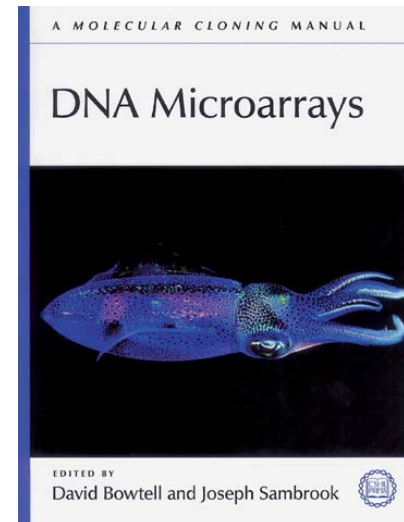
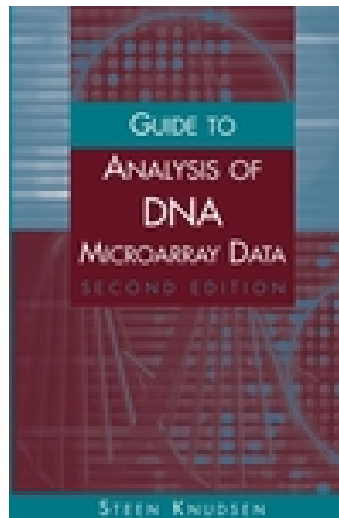
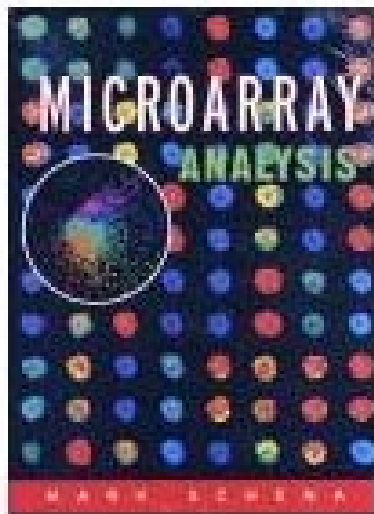
- Taatjes D. J. Cell Imaging Techniques, Methods and Protocols, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2005
- Stephens D. Cell Imaging, Scion Publishing Ltd., 2006.
- Pawley, J. (Ed.), Handbook of Biological Confocal Microscopy, 3rd ed., 2006



Tyto knihy je možné zapůjčit ke studiu do knihovny BFÚ.

# Informační zdroje - microarrays

- Microarray Analysis, Mark Schena, Wiley-Liss 2003
- Guide to Analysis of DNA Microarray Data, Second Edition, Steen Knudsen, Wiley-Liss 2004
- DNA microarrays: a molecular cloning manual. Bowtell D, Sambrook J., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2003.



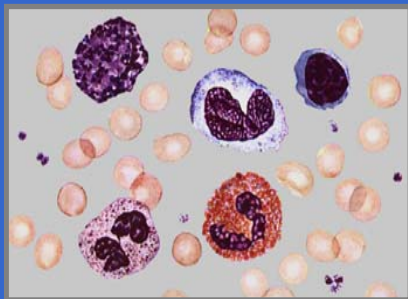
Tyto knihy je možné zapůjčit po domluvě ke studiu do knihovny BFÚ.



# Obecný úvod do průtokové cytometrie

- Základní principy, možnosti průtokové cytometrie a její aplikace
- Historie

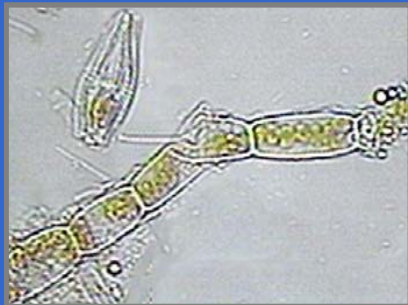
# Tyto částice mají něco společného ...



Blood cells



Chromosomes



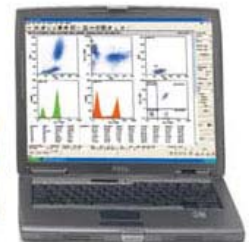
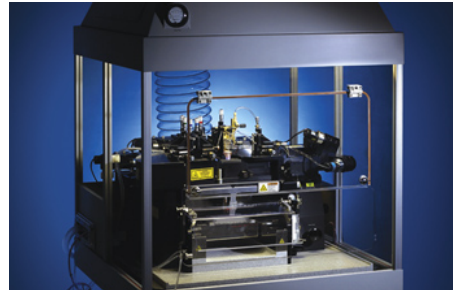
Algae



Protozoa

... určité parametry těchto částic mohou být měřeny pomocí průtokové cytometrie.

# Komerční zařízení





# Co můžeme analyzovat pomocí průtokové cytometrie?

- Počítat částice v suspenzi
- Oddělit živé částice od neživých
- Hodnotit  $10^5$  až  $10^6$  částic za méně než 1 minutu
- Kvantifikovat rozptyl světla, ale i intenzitu fluorescence
- Fyzicky separovat jednotlivé částice (populace) pro další analýzu



# Jaké jsou principy?

- Rozptyl světla (Light scatter) pomocí laseru nebo UV lampy
- Detekce specifické fluorescence
- Hydrodynamicky zaostřený proud částic
- Elektrostatická separace částic
- Možnost multivariační analýzy dat





# Definice

- **Průtoková cytometrie (flow cytometry)**
  - Meření vlastností proudících částic (buněk)
- **Průtokový sorting (flow sorting)**
  - Separace částic (buněk) na základě parametrů měřených průtokovou cytometrií
  - také známo jako **Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)**



# Technické součásti

- Zdroje světla
- Detekční systémy
- Fluidní systém
- Separace
- Sběr dat
- Analýza dat



# Technické součásti

## ■ Detekční systémy

### **Fotonásobiče (Photomultiplier Tubes (PMTs))**

dříve 1-2

nyní 3-6

### **Diody**

detekce rozptylu světla (light scatters)

## ■ Zdroje světla

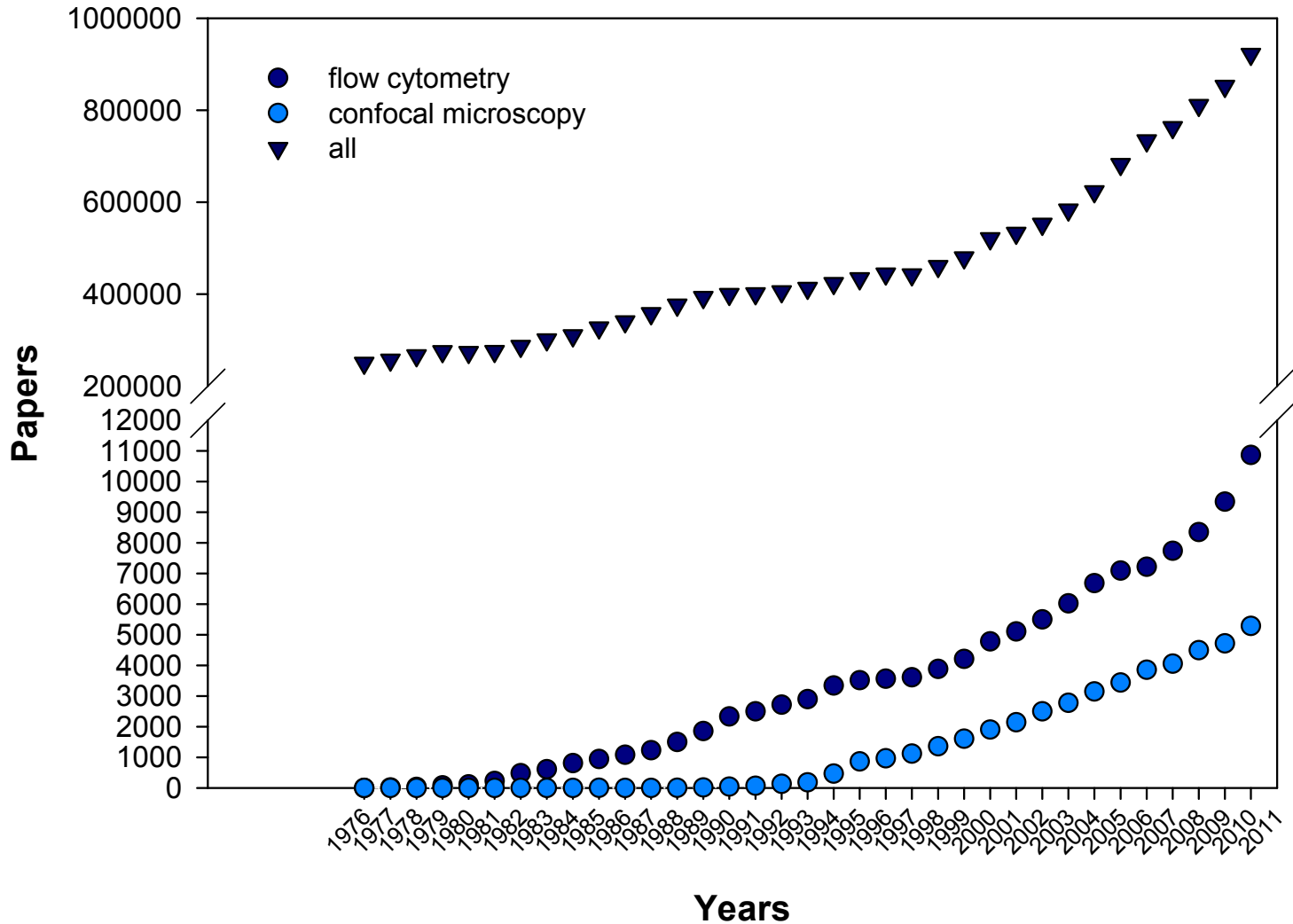
**Lasery** (350-363, 420, 457, 488, 514, 532, 600, 633 nm)

Argon ion, Krypton ion, HeNe, HeCd, Yag

**UV (Arc) Lampy**

Mercury, Mercury-Xenon

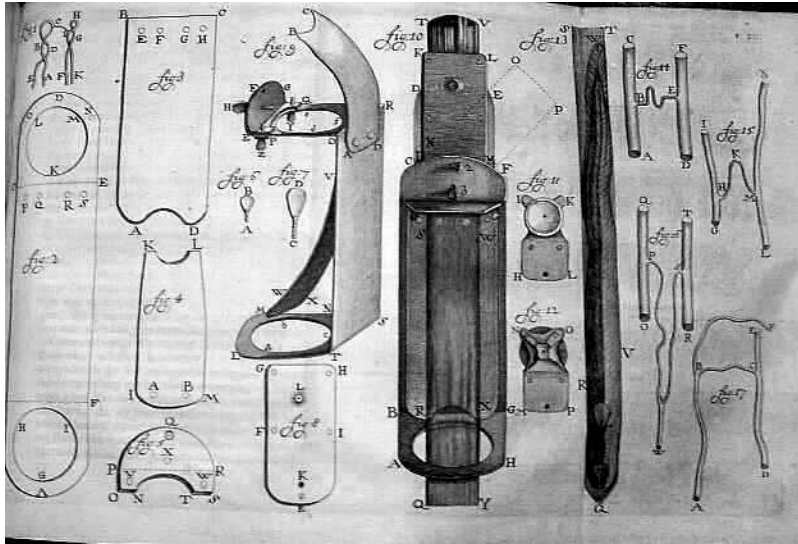
# Cytometry Publications/Year



# Historie barvení biologických materiálů

Až do poloviny 19. století – *byly používány pouze přírodní barviva*

*A. van Leeuwenhoek* použil v roce 1719 šafrán na obarvení svalových buněk

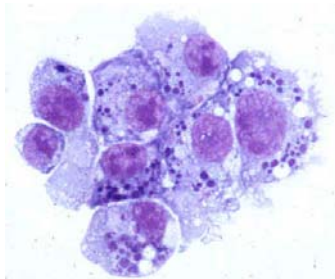


Leeuwenhoek  
Microscope  
(circa late 1600s)



# Historie barvení biologických materiálů

**Paul Ehrlich** - 1879 použil kyselá a zásaditá barviva pro odlišení acidofilních, eosinofilních a neutrofilních leukocytů



Clin Lab Med. 1993 Dec;13(4):759-71.

**The Ehrlich-Chenzinsky-Plehn-Malachowski-Romanowsky-Nocht-Jenner-May-Grunwald-Leishman-Reuter-Wright-Giemsa-Lillie-Roe-Wilcox stain. The mystery unfolds.**

Woronzoff-Dashkoff KP.

# Historie barvení biologických materiálů

## Princip fluorescenčního Mikroskopu - August Köhler - 1904



August Köhler  
(1866-1948)

Köhler's Original Woodcut

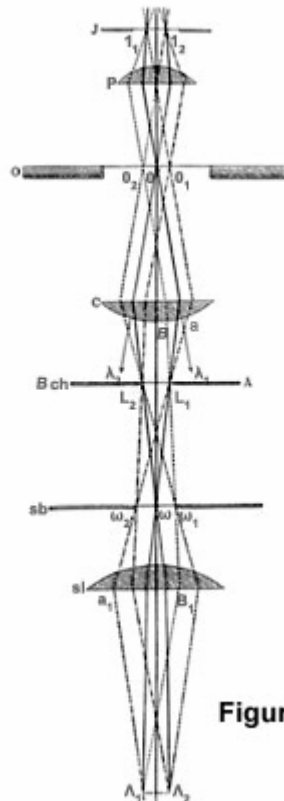
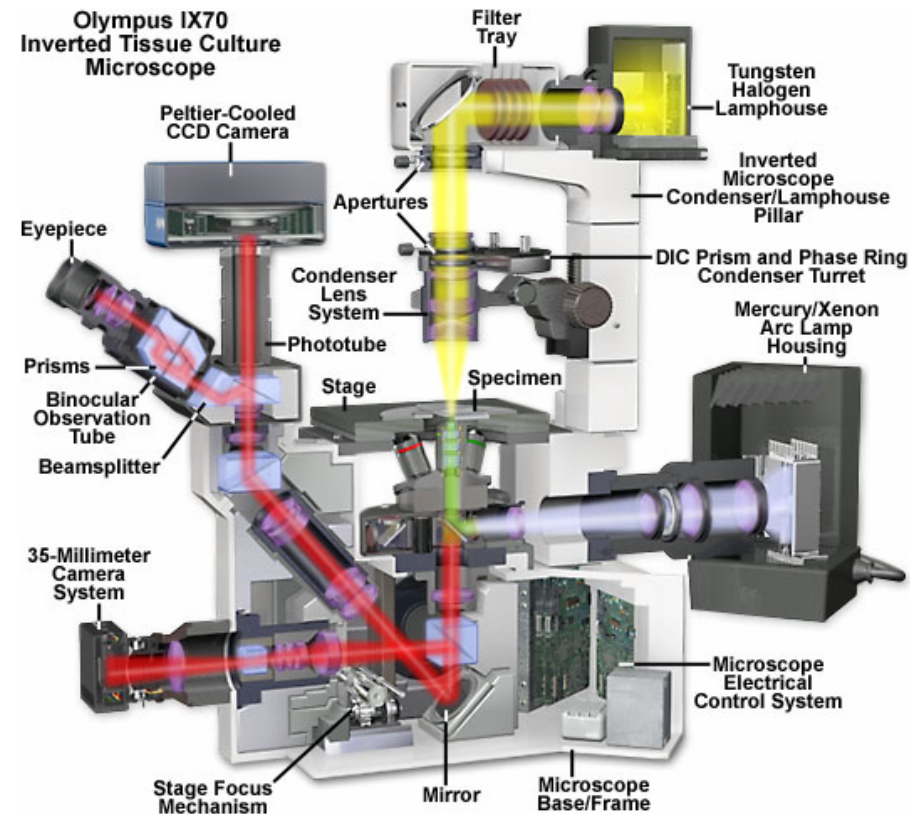


Figure 1



# Andrew Moldavan

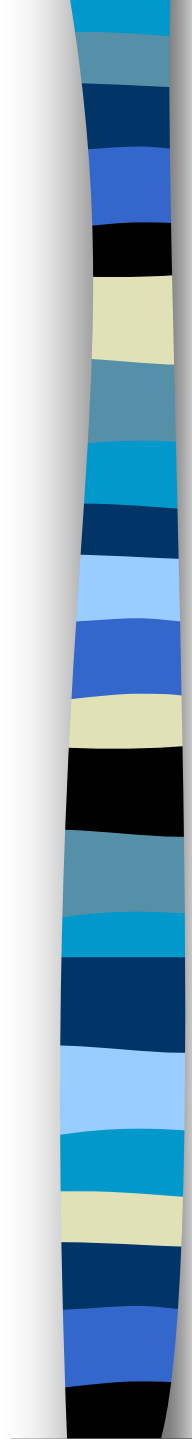
Není jasné zda  
Moldavan vůbec svůj  
„počítač buněk“ sestrojil.  
Ve svém, článku popisuje  
mnoho problémů, ale  
žádné výsledky.

*“The purpose of the experiment is to have each microscopical cell passing through the capillary tube, register itself automatically on the photoelectric apparatus, thus creating a micro-current which can be amplified and recorded.”*

## Photo-Electric Technique for the Counting of Microscopical Cells

Andrew Moldavan  
Montreal, Canada  
Science 80:188-189, 1934





**Coons et al 1941** – vyvinuli techniku fluorescenčního značení protilátek - označili anti-pneumokokové protilátky pomocí antracénu. To jim umožnilo detekovat protilátky i patogeny v tkáni pomocí UV fluorescence.

*“Moreover, when Type II and III organisms were dried on different parts of the same slide, exposed to the conjugate for 30 minutes, washed in saline and distilled water, and mounted in glycerol, individual Type III organisms could be seen with the fluorescence microscope.....”*

### **Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group**

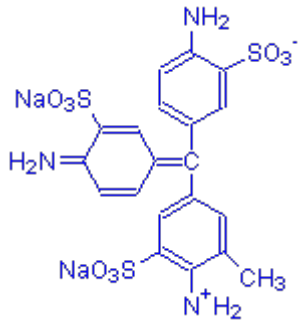
**Albert H. Coons, Hugh J. Creech and R. Norman Jones**

Department of Bacteriology and Immunology, Harvard Medical School, and the Chemical Laboratory, Harvard University  
Proc. Soc. Exp.Biol.Med. 47:200-202, 1941

**Coons a Kaplan (1950)** - konjugovali fluorescein s isokyanátem (FITC) – získali lepší signál – dále od autofluorescence.

# Friedman

**Friedman (1950)** – kombinoval kyselý fuchsin, akridinovou žlutá a berberin pro detekci buněk nádorů dělohy pomocí fluorescenčního mikroskopu



**Acid Fuchsin**

Acid magenta

Acid rubin

Acid roseine

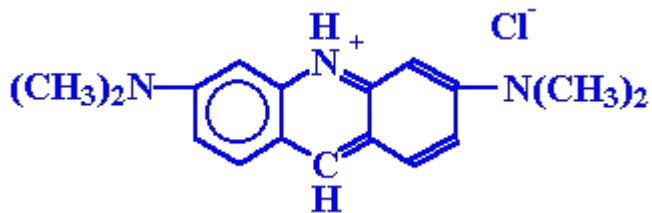
Absorption Max 540-545

# von Bertalanffy & Bickis

**Ludwig von Bertalanffy (1901-1972)**

von Bertalanffy & Bickis (1956)

- metachromatic fluorescence Akridinové oranže byla použita pro detekci RNA v tkáni
- použili ji také pro rozlišení normálních a nádorových buněk



Absorption Max 467 nm

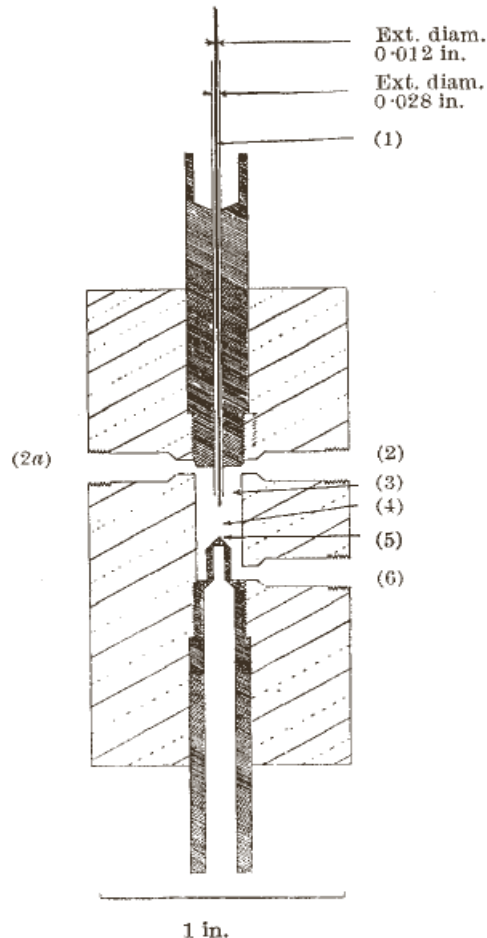
# Gucker - 1947

- Vyvinul průtokový cytometr pro detekci bakterií v aerosolu.
- Utajená práce vynikala během Druhé světové války a byla publikována v roce 1947.
- Cílem byla rychlá detekce vzdušných spór a bakterií během válečného konfliktu.
- Instrument: Proudí vzduch procházel skrz osvětlenou komůrku. Jako zdroj světla sloužila lampa ze světlometu a pro detekci byl použit fotonásobič.

# P.J. Crossland-Taylor

## „Sheath Flow“ princip

*“Provided there is no turbulence, the wide column of particles will then be accelerated to form a narrow column surrounded by fluid of the same refractive index which in turn is enclosed in a tube which will not interfere with observation of its axial content.”*



(1) Needle in holder; (2) and (2a) inflow tubes; (3) wide-bore tube; (4) observation area for (3); (5) vortex; (6) flushing tube

### A Device for Counting Small Particles suspended in a Fluid through a Tube

ATTEMPTS to count small particles suspended in fluid flowing through a tube have not hitherto been very successful. With particles such as red blood cells the experimenter must choose between a wide tube which allows particles to pass two or more abreast across a particular section, or a narrow tube

P. J. CROSLAND-TAYLOR\*

Bland-Sutton Institute of Pathology,  
Middlesex Hospital,  
London, W.1.  
June 17.

No. 4340 January 3, 1953

NATURE

# Wallace Coulter



- Wallace Coulter - Coulter orifice - 1956 -
- (patent 1953) – měření změny vodivosti během průchodu buněk v suspenzi malým otvorem

Originální  
patentová  
aplikace  
W.Coultera 1953

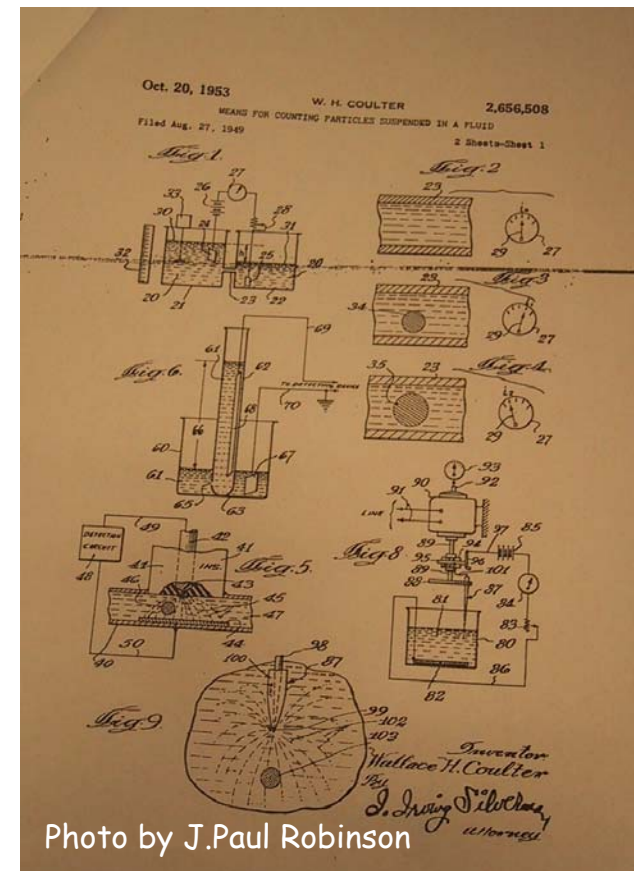
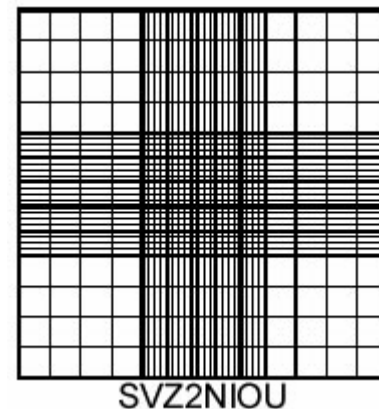
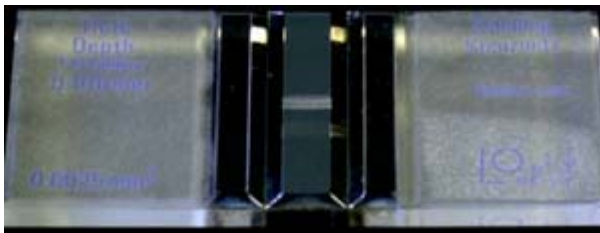


Photo by J.Paul Robinson

# Jak počítat buňky?

- Hemocytometer (Bürkerova komůrka) byla standardem pro počítání buněk do ~ 1950
- Rozměry jsou 3x3x0.1 mm. Obvykle jsou červené krvinky ( $1 \times 10^6/\text{mm}^3$ ) počítány po naředění 1:200
- Leukocyty ( $5 \times 10^3/\text{mm}^3$ ) jsou ředěny 1:10 v roztoku lyzujícím červené krvinky
- Statistická chyba:
  - koeficient variance (CV) je při 500 spočítaných buňkách 4.4%
  - chyba pipetování a ředění je ~ 10%



# Roche Innovatis Cedex



**High Resolution Color Image**



**Visual Labeling**

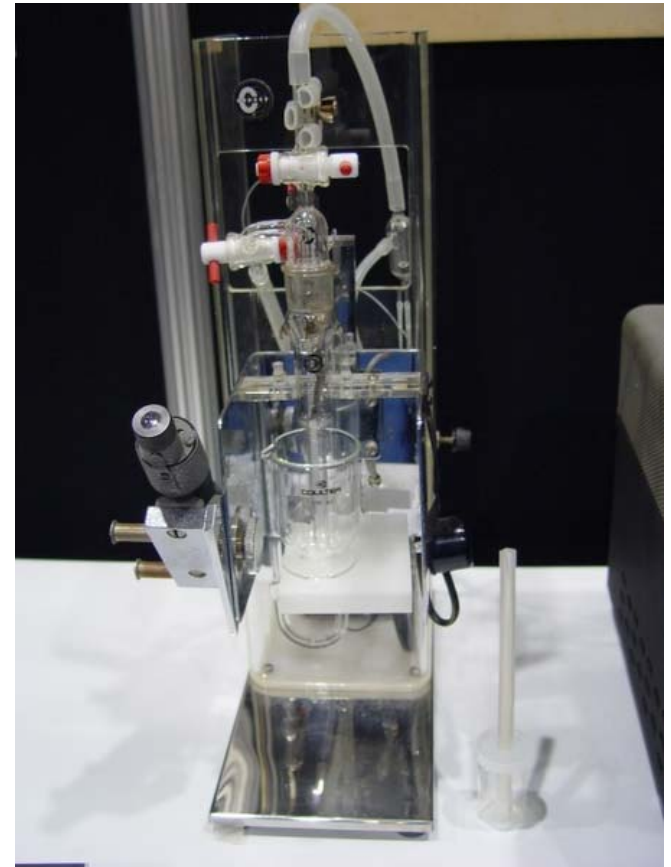




# Coulter Counter



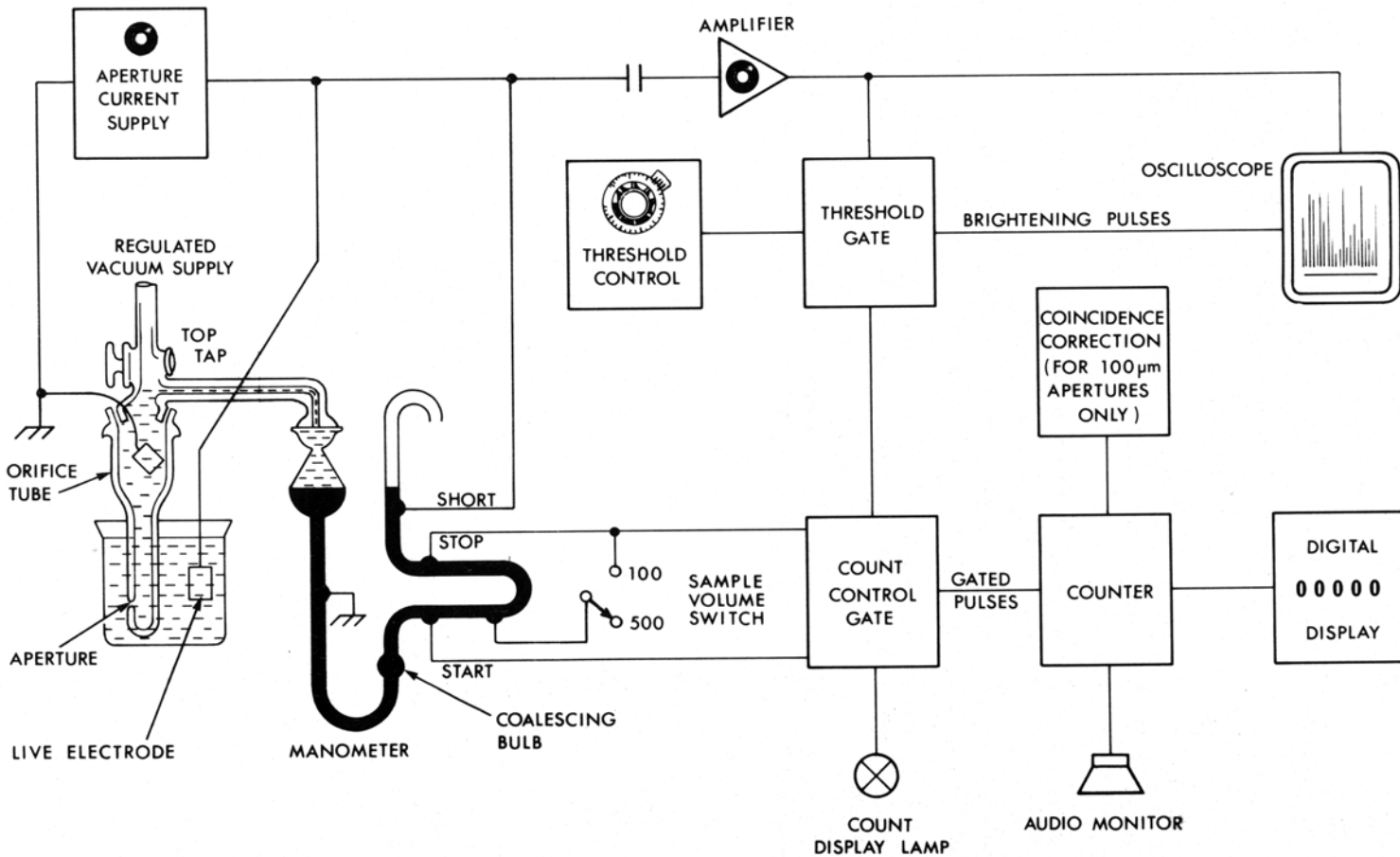
První komerční verze CC



# Coulter Counter

1-2

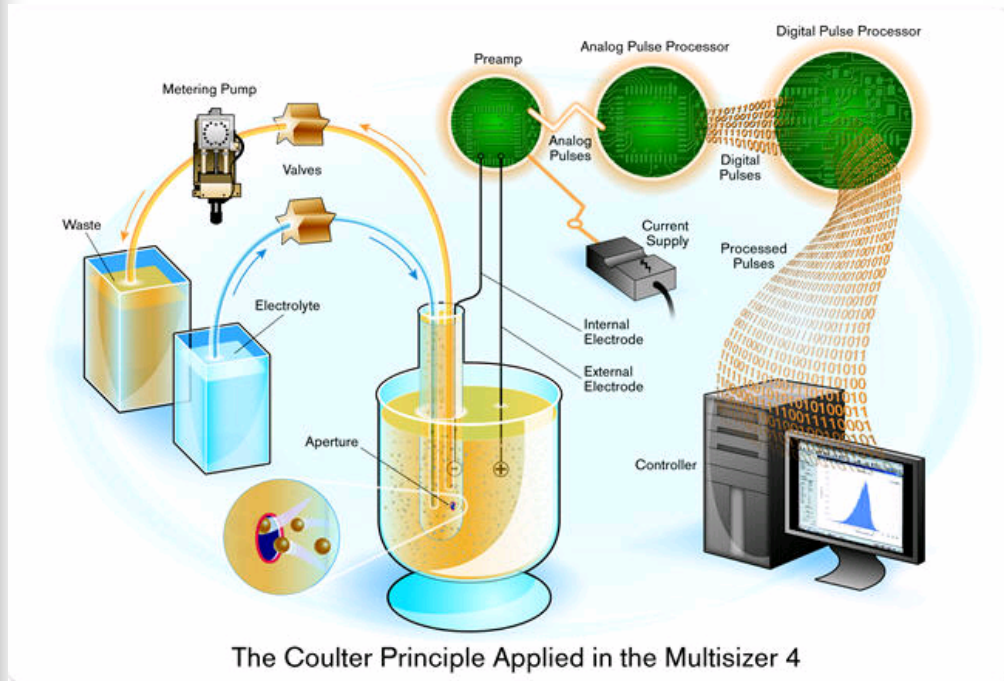
FIG.1-1 FUNCTIONAL BLOCK DIAGRAM FOR MODEL ZF COUNTER



July '80

# Beckman Coulter

## ■ Multisizer™ 3&4 COULTER COUNTER®

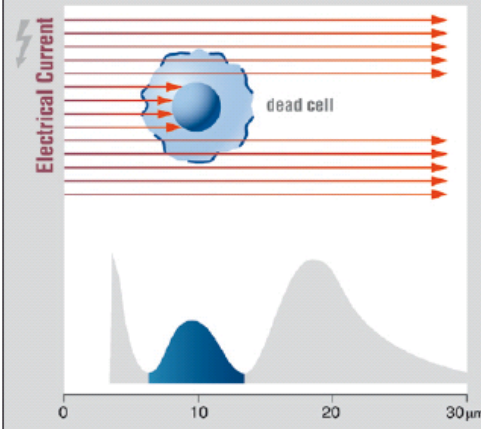


# Roche Innovatis

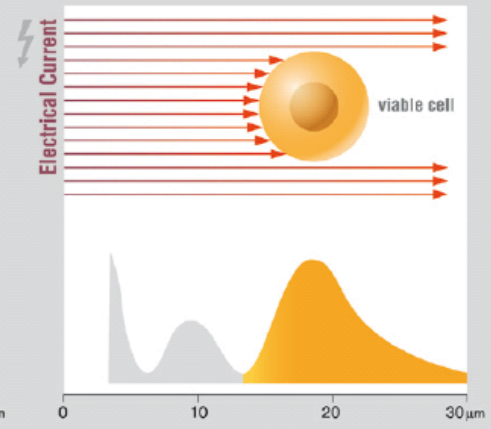
## CASY TT



Dead cells have a membrane that is permeable for the electrical current. They are measured by the size of the cell nucleus.



Viable cells have an intact membrane, which excludes the electrical current. They are measured by the true cell volume.



**Figure 1: Viability Measurement by Electrical Current Exclusion.** The status of the cell membrane distinctively affects the electrical signal generated when a cell is passing the measuring pore.

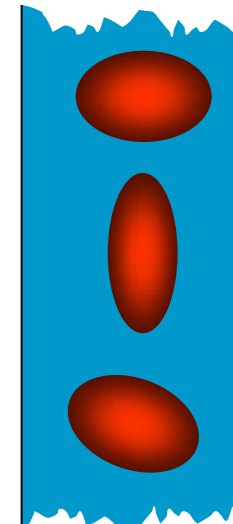
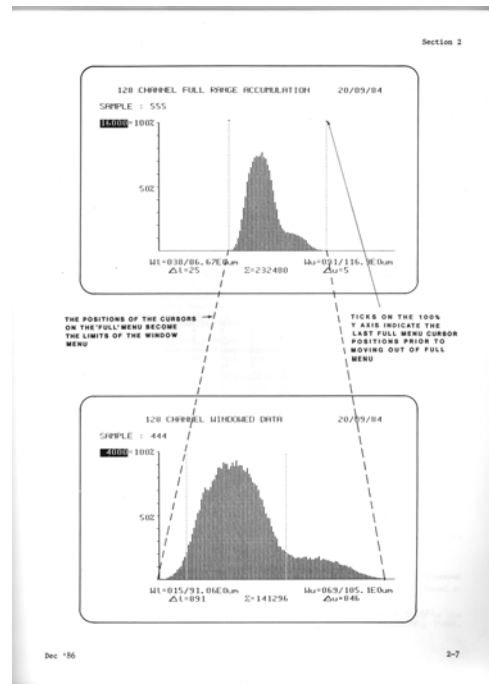


Cytograph. Stolní přístroj schopný měřit rozptyl světla **He-Ne laseru** (1970).

# Mack Fulwyler- sorter

**Mack Fulwyler - sorter 1965** - Los Alamos National Labs – jeho sorter separoval částice na základě elektronicky měřeného objemu (stejný princip jako Coulter counter) a separoval pomocí elektrostatičkého vychýlení.

Cílem bylo sortovat červené krvinky, protože u nich byla naměřena bimodální distribuce buněčného objemu. Princip separace byl založen na principu inkoustové tiskárny Richarda Sweeta ze Stanfordu (1965)



Po té co bylo objasněno, že bimodalita červených krvinek je artefakt byla tato skupina schopna separovat **neutrofil** a **lymfocyty** z krve.

# Richard Sweet

Richard Sweet vyvinul elektrostatickou inkoustovou tiskárnu jejíž princip využil Mack Fulwyler pro svůj buněčný sorter.

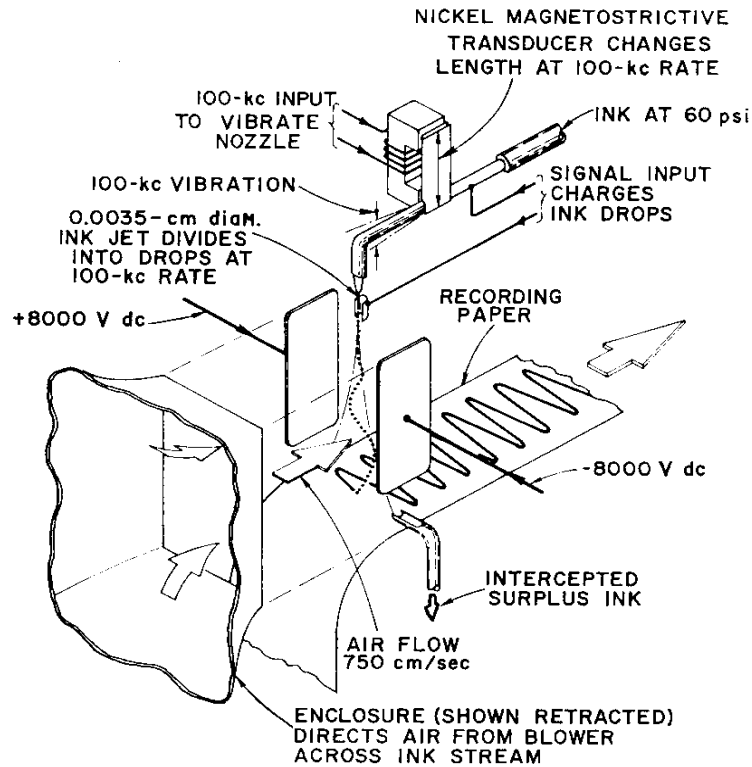


FIG. 1. Ink-jet oscillograph.

## THE REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS

VOLUME 36, NUMBER 2

FEBRUARY 1965

### High Frequency Recording with Electrostatically Deflected Ink Jets\*

RICHARD G. SWEET  
Systems Techniques Laboratory, Stanford Electronics Laboratories, Stanford University, Stanford, California  
(Received 28 September 1964)

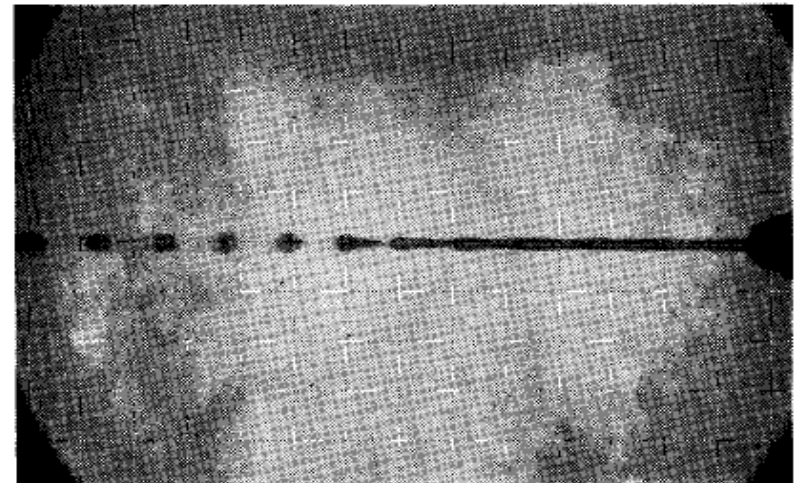
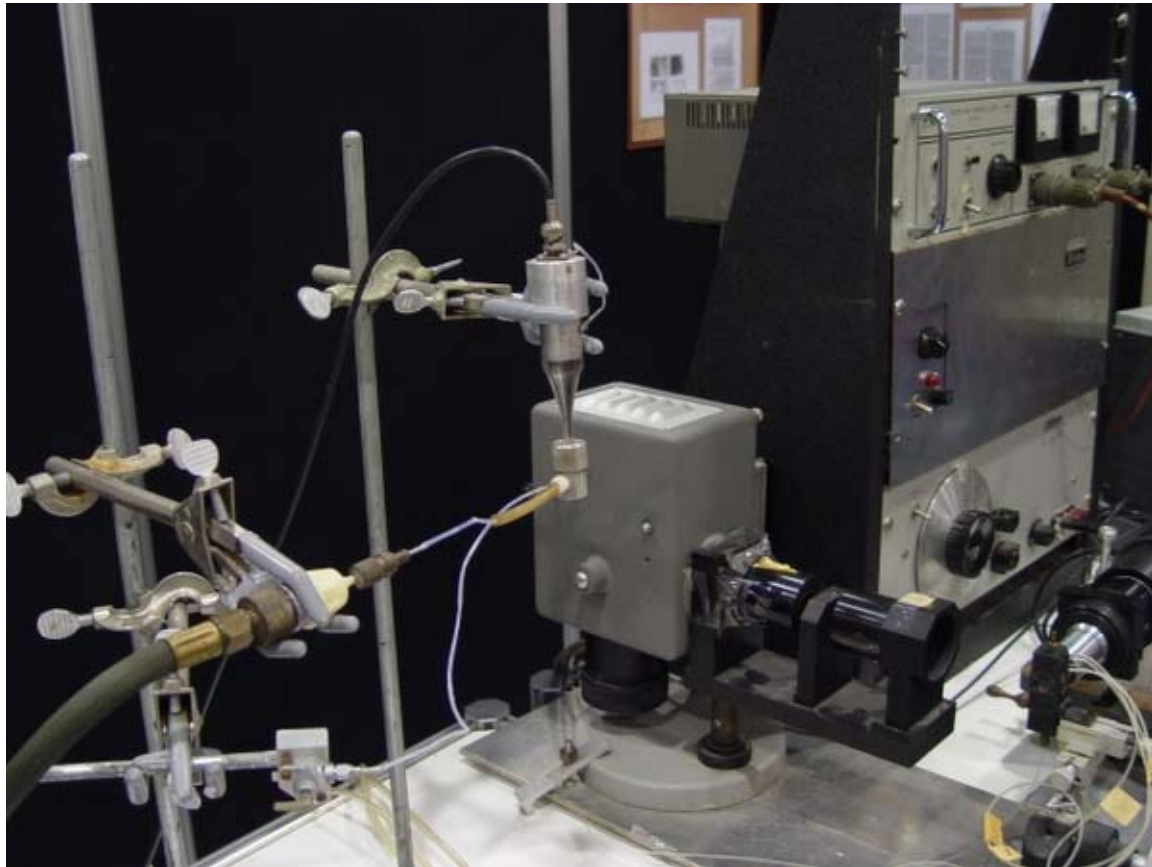


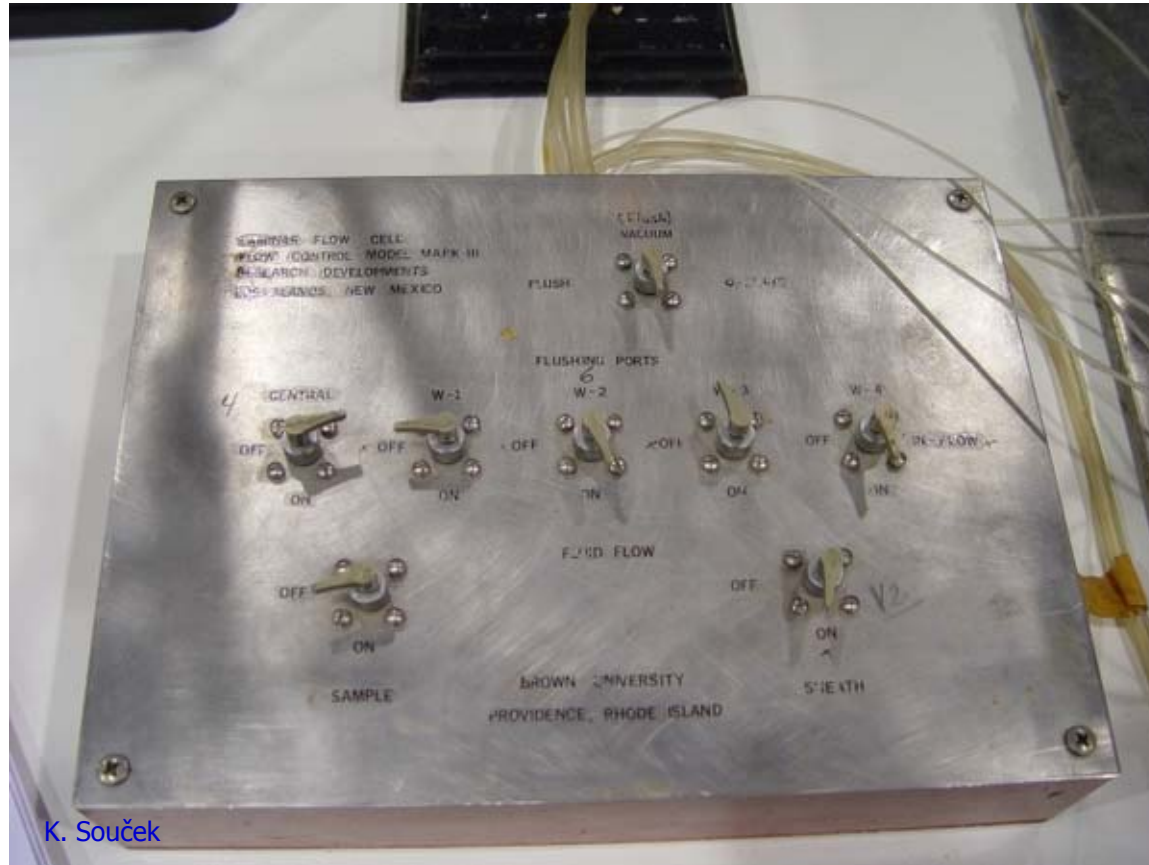
FIG. 3. Ink-drop formation.

# Mack Fulwyler- sorter





# Mack Fulwyler- sorter



K. Souček

# Mack Fulwyler in His Own Words

J. Paul Robinson

Purdue University Cytometry Laboratories, Bindley Biosciences Center, Purdue University, West Lafayette, Indiana

Received 12 July 2005; Revision 15 July 2005; Accepted 15 July 2005

MACK FULWYLER IN HIS OWN WORDS

65

FIG. 1. The Fulwyler instrument as installed in Dr. Boris Rotman's Laboratory in Brown University, immediately prior to disassembly in March 2005. The instrument had not been altered or moved since installation in 1967, except for the addition of a laser instead of the UV lamp.



April 30, 1968

M. J. FULWYLER  
PARTICLE SEPARATOR

3,380,584

Filed June 4, 1965

5 Sheets-Sheet 1

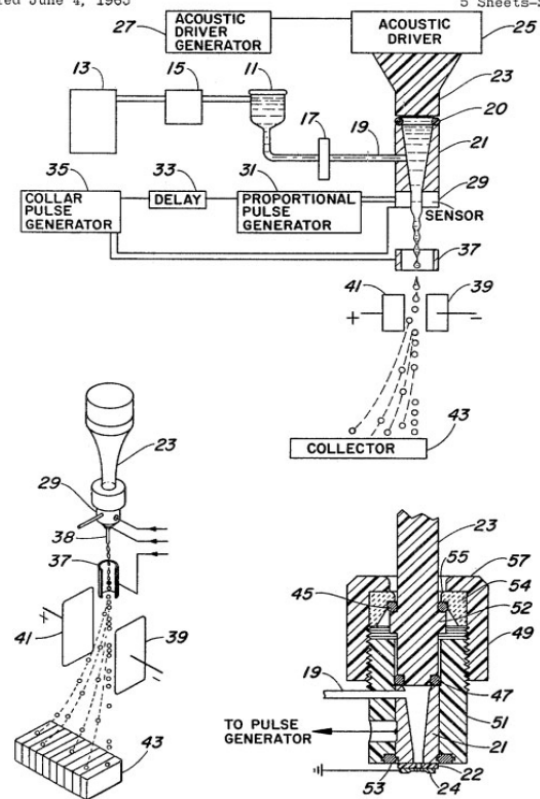


FIG. 4. A page from Fulwyler's patent on the cell separation technology patent #3,380,584 showing the fundamental components of the invention of the cell sorter.

INVENTOR,  
Mack J. Fulwyler  
BY  
*Richard A. Robinson*  
Attorney

# Leonard Arthur "Len" Herzenberg

From Hulett, HR, Bonner, WA, Barrett, J, and Herzenberg, LA. Cell Sorting: Automated Separation of Mammalian Cells as a Function of Intracellular Fluorescence. Science 1969; 166: 747-749. Reprinted with permission from AAAS.

## **Cell Sorting: Automated Separation of Mammalian Cells as a Function of Intracellular Fluorescence**

*Abstract. A system for high-speed sorting of fluorescent cells was able to sort mouse spleen cells from Chinese hamster ovarian cells after development of fluorochromasia. Highly fluorescent fractions separated after similar treatment from mouse spleen cells immunized to sheep erythrocytes were enriched in antibody-producing cells by factors of 4 to 10.*



# Klíčové „cytometrické“ publikace

- 1934: Moldovan – Fotoelektrické měření buněk v kapiláře
- 1947: Gucker – fotoelektrické počítání buněk
- 1949: Coultrův počítač částic
- 1961: Rotman poprvé používá fluorescenci pro kvantifikaci enzymatické reakce
- 1964: Sweet – elektrostatická inkoustová tiskárna
- 1965: Fulwyler – květen 1965 - patent elektrostatického sorteru
- 1965: Kanetsky – spektrofotometrické měření buněk
- 1965: Fulwyler – listopad 1965 – publikace o buněčné separaci v časopise Science
- 1968: Gohde – první článek o fluorescenční průtokové cytometrii (v němčině)
- 1969: Gohde – patent
- 1969: Van Dilla – druhý článek o fluorescenční průtokové cytometrii
- 1969: Mullaney – první článek věnující se popisu rozptylu světla jako cytometrického parametru
- 1969: Heryenberg – třetí článek o fluorescenční průtokové cytometrii
- 1973: Gohde – patent dvojího značení
- 1977: Gohde – popis kompenzací signálu při dvojtém značení
- 1978: Kachel – flow imaging – kombinace průtokové cytometrie a analýzy obrazu
- 1983: izolace a detekce jader (DNA) z tkání zalitých v parafínu
- 1984: kongres o nomenklatuře cytometrie DNA
- 1987: Graz - vysokorychlostní sortování chromozómů
- 1991: Robinson – automatizace klinických systémů – průtokový cytometr a čtečka čárkových kódů

# K čemu to všechno je... například...

## Position Available

### FLOW CYTOMETRY TECHNICIAN

#### Oceanography, MIT

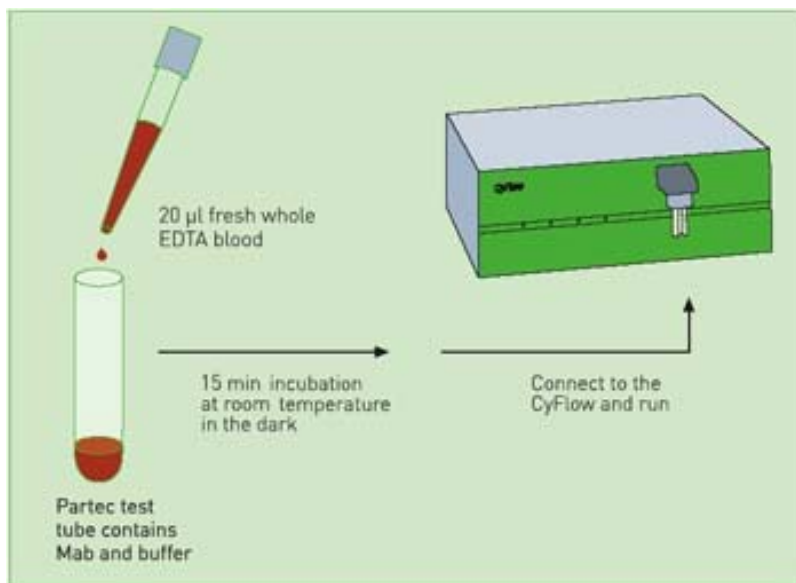


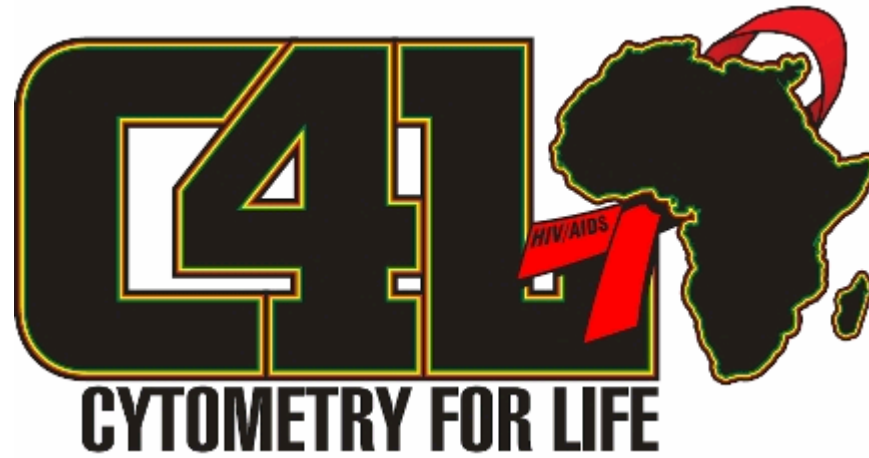
The Chisholm Laboratory at MIT (<http://web.mit.edu/chisholm/www/>) is seeking a full-time flow cytometry technician to participate in research involving oceanic cyanobacteria. The position requires a Bachelors degree in science or engineering and two years experience. Applicants must have a solid background in and experience with flow cytometry, including extensive knowledge of hardware, data analysis, and experimentation. Duties include maintenance of flow cytometry instruments, experimentation, and assisting other lab members with flow cytometry as needed. Must be able to work as a member of a multidisciplinary team. Opportunities for travel to field sites in Hawaii and Bermuda, and participation in oceanographic research cruises.

Please send a resume and 3 letters of recommendation to Dr. Marcia Osburne (mosburne@mit.edu), or Dr. Marcia Osburne, MIT, 15 Vassar St. rm 48-336B, Cambridge, MA 02139

# K čemu to všechno je... například...

- 43 miliónů lidí na světě je infikováno virem HIV (WHO)
- ročně zemře ~ 2 miliónu lidí na HIV/AIDS (v Africe je ~ 11 miliónu AIDS sirotků)
- kvantifikace CD4 T lymfocytů je klíčový parametr při monitorování léčby
- Průtoková cytometrie je „zlatý standard“
- Optimalizované postupy a zařízení pro levné (< 3 EUR / vzorek) a rychlé detekce (250 vzorků / den)





- <http://www.cytometryforlife.org/>



# Co tomu předcházelo...

- Rozvoj techniky umožňující rychlou a reprodukovatelnou detekci cytometrických parametrů.
- Nové vědecké poznatky vedoucí k definici vhodných diagnostických markerů.



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

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





# Shrnutí přednášky

- Úvod do kurzu
- Zdroje literatury
- Historie průtokové cytometrie
- Základní principy

## **Na konci dnešní přednášky by jste měli:**

1. vědět jaké jsou požadavky pro tento kurz
2. znát základní zdroje informací
3. mít stručný přehled o historii průtokové cytometrie
4. orientovat se v některých základních principech průtokové cytometrie

# Bi9393 Analytická cytometrie

## Lekce 2



**Karel Souček, Ph.D.**

Oddělení cytokinetiky  
Biofyzikální ústav AVČR, 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

- Světlo
- Fluorescence
- Zdroje excitace, optické systémy a způsoby detekce fluorescence
- Fluidní systémy

# Pojmy

## Fotometrie:

- **Světlo** – elektromagnetické záření viditelné lidským okem (400-750 nm, nejcitlivější ~ 550 nm). Při měření pod 400 nm (UV, IF) se v podstatě detekci záření (radiometrie).
- Energie záření se vyjadřuje v *joulech*
- Světelný tok (**radiant flux**) je udávána jako hodnota energie v čase ve *wattech* (1 watt= 1 joule/sekundu)
- **foton** – elementární částice. Popisuje je jejich vlnová délka, frekvence, energie a hybnost. Životnost fotonu je nekonečná (přesto vznikají a zanikají), existují pouze v pohybu. Má nulovou klidovou hmotnost, ale nenulovou energii, definovanou vztahem  $E = hv$ , kde  $h$  je Planckova konstanta a  $v$  frekvence. Neboť má energii, působí na něj gravitace dle obecné teorie relativity a on sám gravitačně působí na okolí.  
(<http://cs.wikipedia.org/wiki/Foton>)
- Energie fotonu je vyjádřena jako  $E = hv$  a  $E = hc/\lambda$  [ $v$ -frequency (Hz),  $c$  – rychlost světla ( $3 \times 10^8$  m/s),  $\lambda$ -wavelength (nm),  $h$ -Planckova konstanta ( $6.63 \times 10^{-34}$  J/s)]
- **Energie** je vyšší při kratších vlnových délkách a nižší při delších vlnových délkách.

# Laser power

$$E=h\nu \text{ and } E=hc/\lambda$$


- One photon from a 488 nm argon laser has an energy of

$$E = 6.63 \times 10^{-34} \text{ joule-seconds} \times 3 \times 10^8$$

$$\xrightarrow{488 \times 10^{-3}} = 4.08 \times 10^{-19} \text{ J}$$


- To get 1 joule out of a 488 nm laser you need  **$2.45 \times 10^{18}$  photons**
- 1 watt (W) = 1 joule/second a 10 mW laser at 488 nm is putting out  $2.45 \times 10^{16}$  photons/sec

# What about a UV laser?

$$E = \frac{6.63 \times 10^{-34} \text{ joule-seconds} \times 3 \times 10^8}{325 \times 10^{-3}}$$


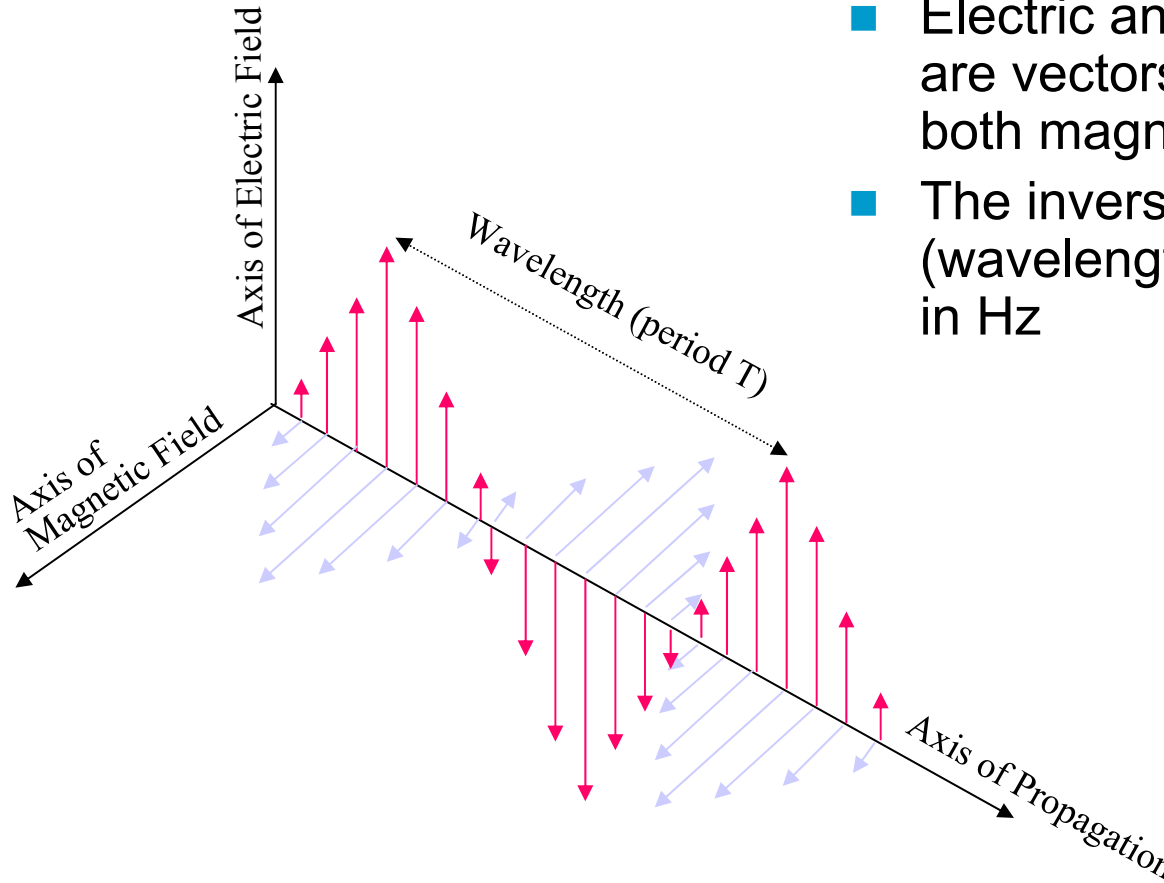
=  $6.12 \times 10^{-19}$  J so 1 Joule at 325 nm =  $1.63 \times 10^{18}$  photons

# What about a He-Ne laser?

$$E = \frac{6.63 \times 10^{-34} \text{ joule-seconds} \times 3 \times 10^8}{633 \times 10^{-3}}$$


=  $3.14 \times 10^{-19}$  J so 1 Joule at 633 nm =  $3.18 \times 10^{18}$  photons

# Polarization and Phase: Interference



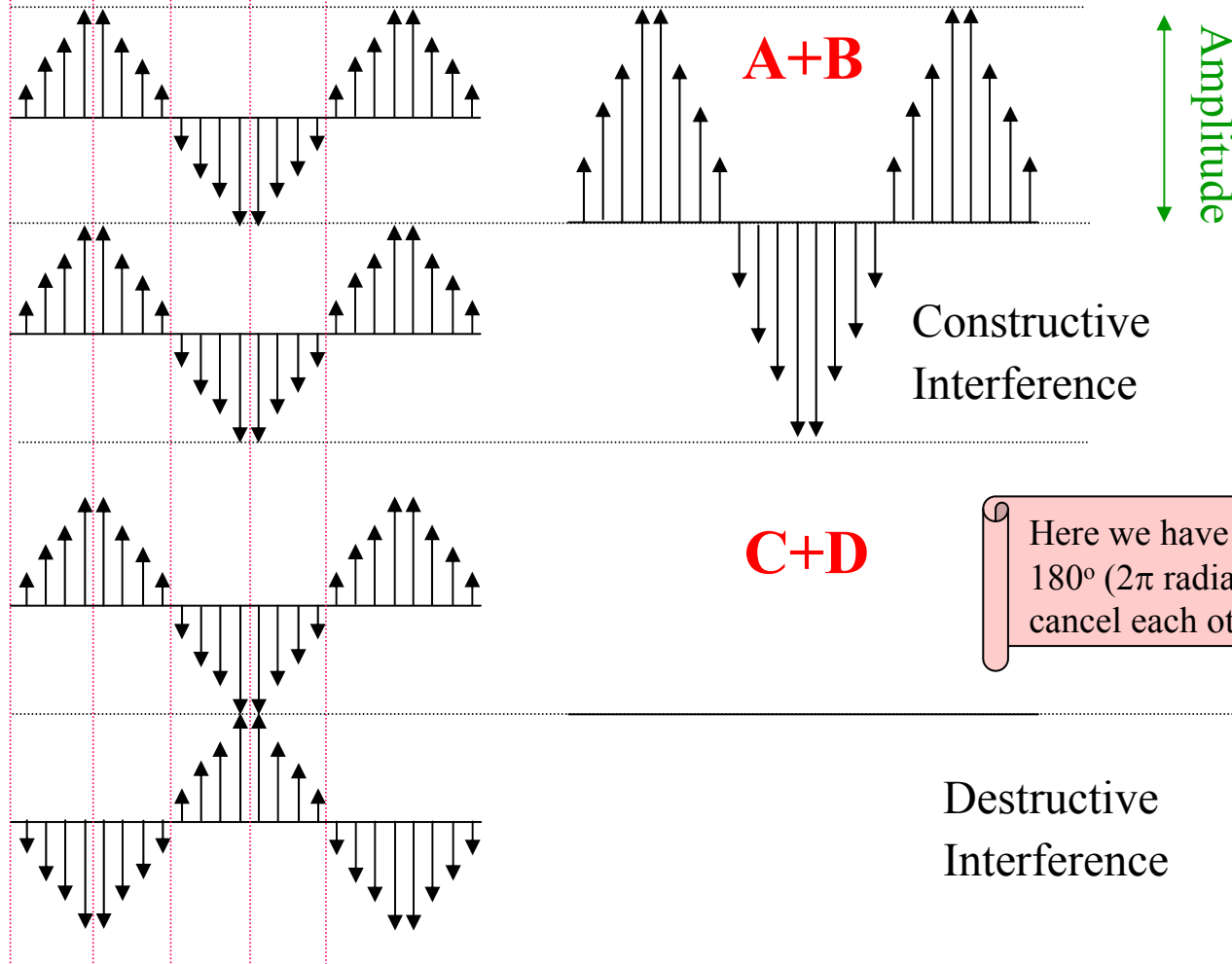
- Electric and magnetic fields are vectors - i.e. they have both magnitude and direction
- The inverse of the period (wavelength) is the frequency in Hz



# Interference

0° 90° 180° 270° 360°

Wavelength



The frequency does not change, but the amplitude is doubled

Constructive Interference

Here we have a phase difference of 180° ( $2\pi$  radians) so the waves cancel each other out

Destructive Interference

Figure modified from Shapiro "Practical Flow Cytometry" Wiley-Liss, p79

# Rozptyl světla

- Hmota rozptyluje světlo vlnových délek které není schopna absorbovat
- Viditelné spektrum je 350-850 nm proto malé částice a molekuly ( $< 1/10 \lambda$ ) spíše viditelné světlo rozptylují
- Pro malé částice byl popsán tzv. **Rayleighův rozptyl (scatter)** jehož intenzita je  $\sim$  stejná všemi směry
- Rozptyl větších částic charakterizuje tzv. **Mieův rozptyl**. Jeho množství je větší ve směru v jakém dopadá světlo na ozářenou částici  $\Rightarrow$  *na tomto principu je založeno měření velikosti částic pomocí průtokového cytometru*



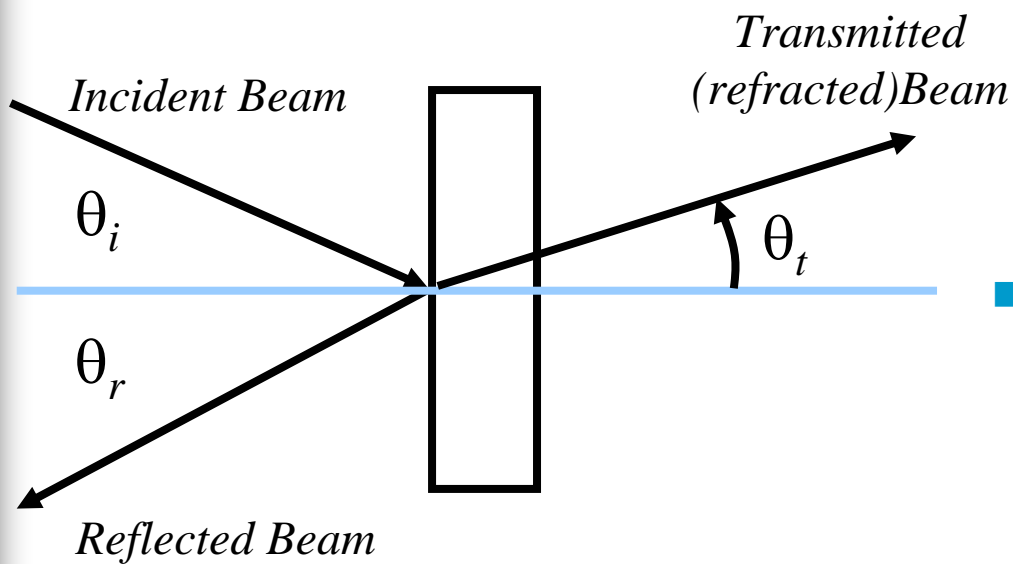
# Rayleighův a Mieův rozptyl

- **Rayleighův rozptyl** – molekuly a velmi malé částice neabsorbují, ale rozptylují světlo které má menší vlnovou délku než je jejich velikost (modré nebe - vzduch rozptyluje lépe kratší vlnové délky)
- **Mieův rozptyl** je charakteristický pro částice větší než je vlnová délka světla (bílá záře kolem slunečního kotouče, mlžné světlo)

<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/atmos/blusky.html>



# Odraz a lom



$$n_1 \sin \theta_i = n_2 \sin \theta_t$$

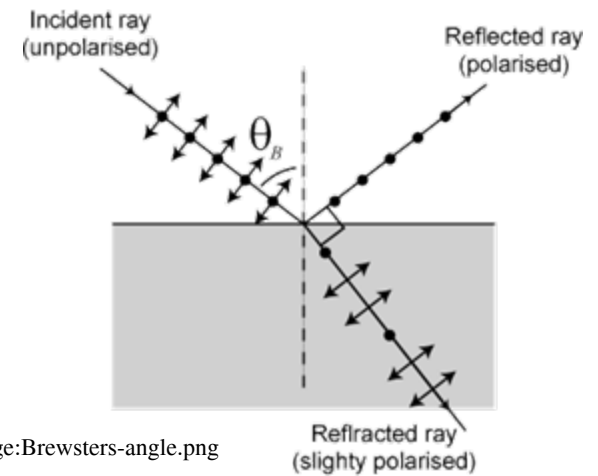
Látka	index lomu
Vzduch (normální tlak)	1,0003
led	1,31
voda	1,33
etanol	1,36
sklo	1,5 až 1,9
sůl	1,52
safir	1,77
diamant	2,42

## Snellův zákon

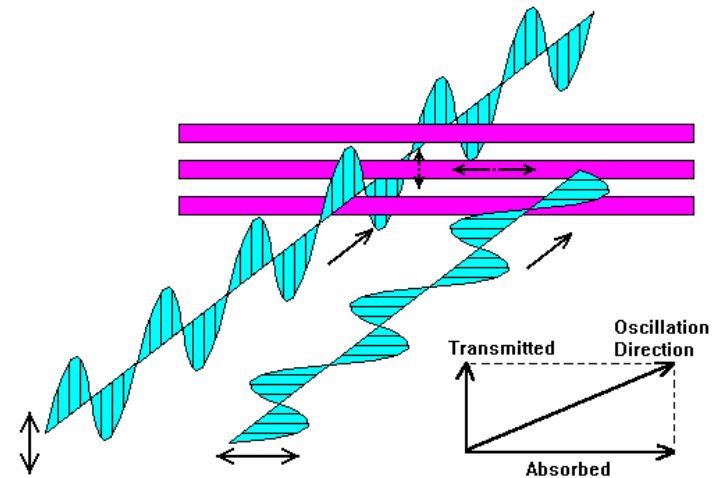
- Při šíření záření z prostředí *opticky řidšího* do *opticky hustšího* prostředí se paprsky lámou směrem ke kolmici.
- Při šíření záření z prostředí *opticky hustšího* do *opticky řidšího* prostředí se paprsky lámou směrem od kolmice.

# Brewster's Angle

Polarizační úhel – úhel dopadu při kterém částečně polarizované světlo prochází povrchem bez odrazu.

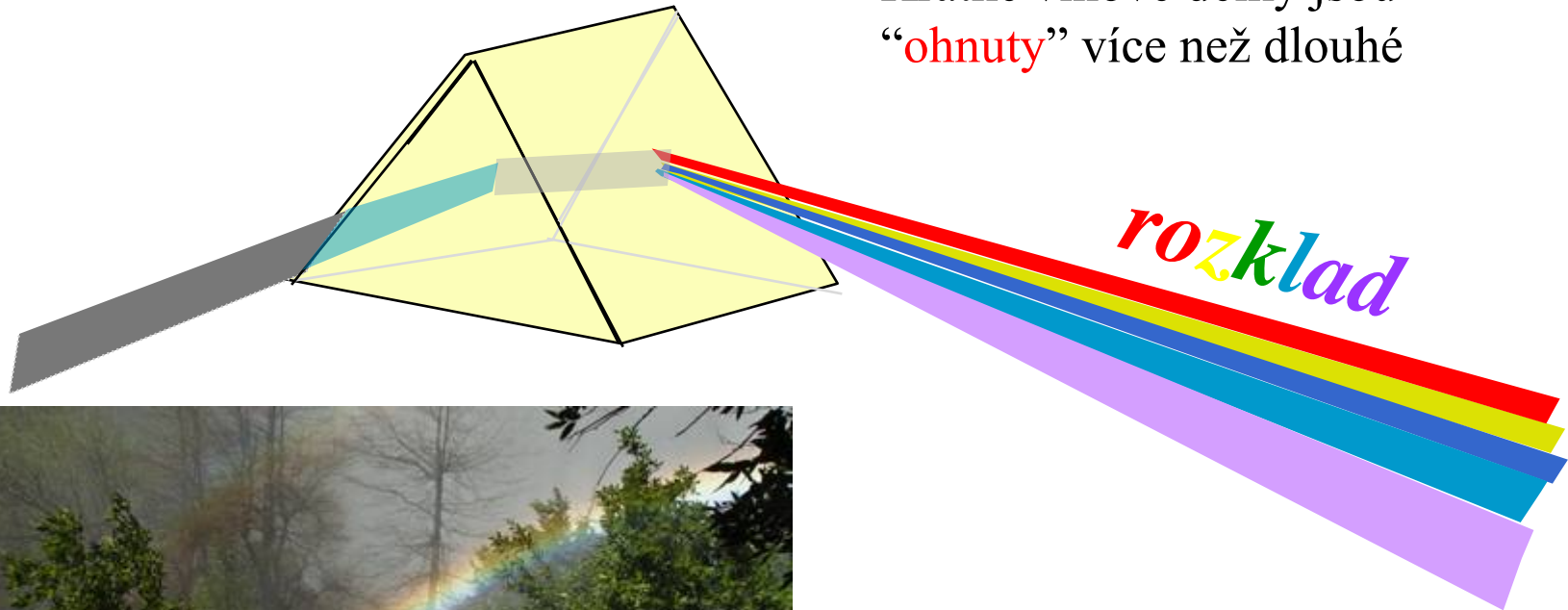


<http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Brewsters-angle.png>

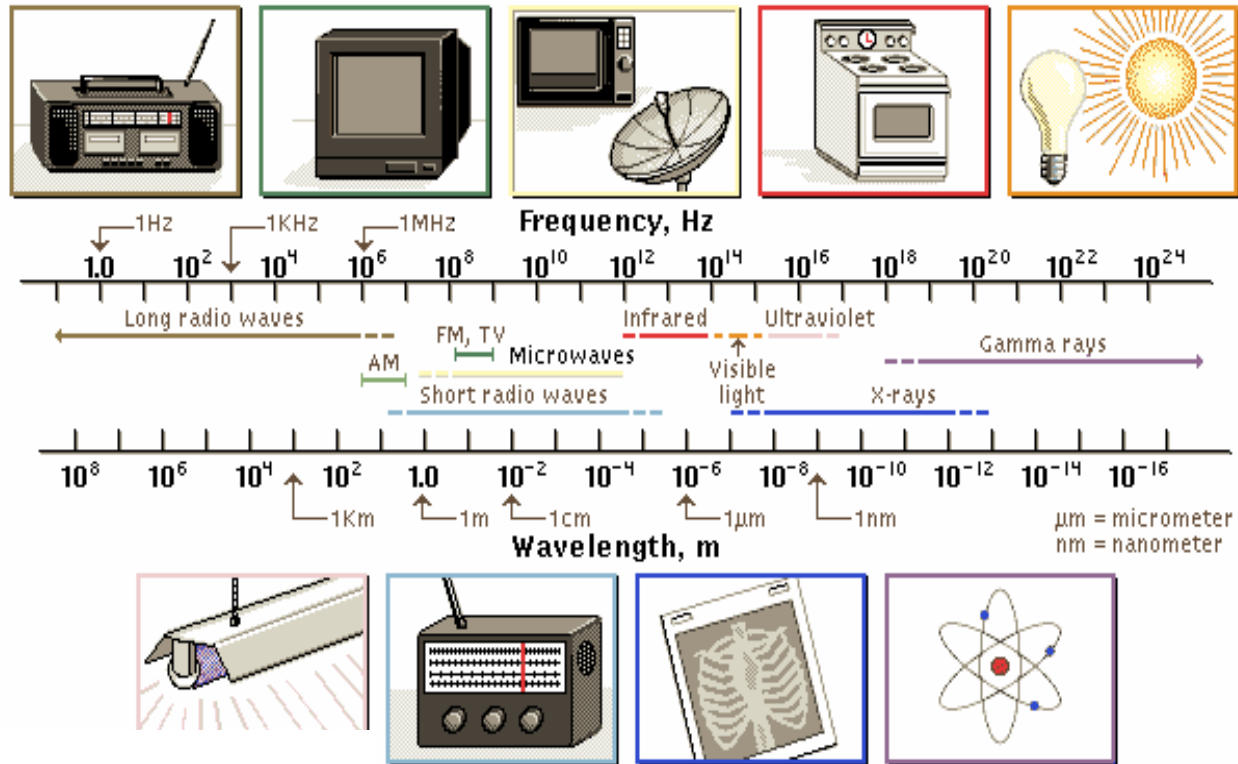


# Ohyb a rozklad světla

Krátké vlnové délky jsou  
“ohnuty” více než dlouhé



# Electromagnetic Spectrum



© Microsoft Corp, 1995



**Only a very small region within the ES  
is used for flow cytometry applications**

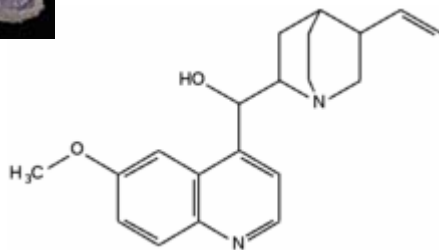
# George Gabriel Stokes (1819 – 1903)

Anglický fyzik a matematik  
působící na univerzitě v Cambridge

1852 – popsal fluorescenci

Název vznikl z anglického slova *fluospar*  
(fluorit, kazivec = nerost  $\text{CaF}_2$ )

- ke svému pozorování použil roztok **chininu**,  
jako zdroj světla sluneční paprsky, jako  
excitační filtr sloužilo tmavě modré okenní  
sklo a jako emisní filtr byla použita sklenice  
bílého vína



<http://www.nndb.com/people/131/000097837/>

G. C. Stokes „*On the Change of Refrangibility of Light*“ *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 1852, vol. 142, p. 463.)

[ 463 ]

XXX. *On the Change of Refrangibility of Light.* By G. G. STOKES, M.A., F.R.S.,  
Fellow of Pembroke College, and Lucasian Professor of Mathematics in the  
University of Cambridge.

Received May 11,—Read May 27, 1852.

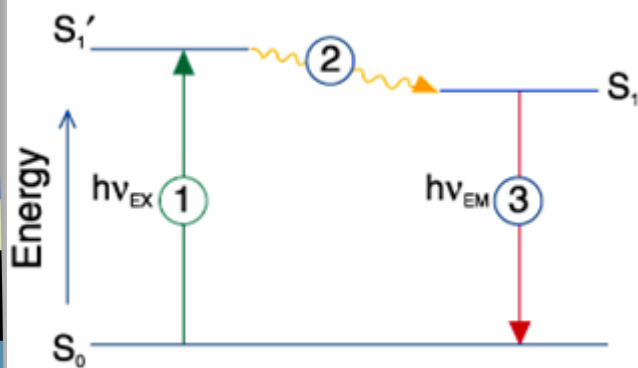


# Princip fluorescence

**Fluorescence** je výsledek tří fázového u jevu některých chemických látek - **fluorochromů**, fluorescenčních barev. **Fluorescenční značka (próba)** -fluorochrom schopný lokalizace do určitého biologického vzorku nebo odpovídat na specifický podnět.

## Stage 1 : Excitation

A photon of energy  $h\nu_{EX}$  is supplied by an external source such as an incandescent lamp or a laser and absorbed by the fluorophore, creating an **excited electronic singlet state (S1')**. This process distinguishes fluorescence from chemiluminescence, in which the excited state is populated by a chemical reaction.



## Stage 2 : Excited-State Lifetime

The excited state exists for a finite time (typically 1–10  $10^{-9}$  seconds). During this time, the fluorophore undergoes conformational changes and is also subject to a multitude of possible interactions with its molecular environment. These processes have two important consequences. First, the energy of  $S_1'$  is partially dissipated, yielding a relaxed singlet excited state ( $S_1$ ) from which fluorescence emission originates. Second, not all the molecules initially excited by absorption (Stage 1) return to the ground state ( $S_0$ ) by fluorescence emission. Other processes such as collisional quenching, fluorescence energy transfer and intersystem crossing (see below) may also depopulate  $S_1$ . The fluorescence quantum yield, which is the ratio of the number of fluorescence photons emitted (Stage 3) to the number of photons absorbed (Stage 1), is a measure of the relative extent to which these processes occur.

## Stage 3 : Fluorescence Emission

A photon of energy  $h\nu_{EM}$  is emitted, returning the fluorophore to its ground state  $S_0$ . Due to energy dissipation during the excited-state lifetime, the energy of this photon is lower, and therefore of longer wavelength, than the excitation photon  $h\nu_{EX}$ . The difference in energy or wavelength represented by  $(h\nu_{EX}-h\nu_{EM})$  is called the **Stokes shift**. The Stokes shift is fundamental to the sensitivity of fluorescence techniques because it allows emission photons to be detected against a low background, isolated from excitation photons. In contrast, absorption spectrophotometry requires measurement of transmitted light relative to high incident light levels at the same wavelength.

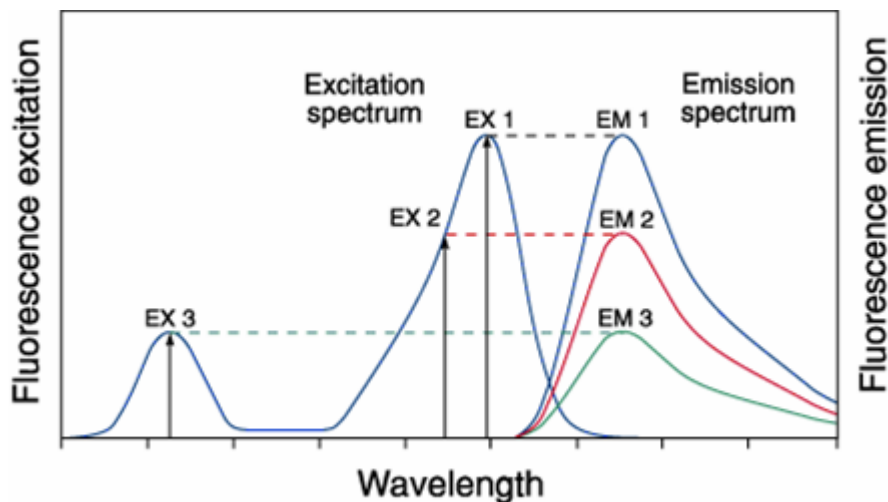
**Jablonski diagram** illustrating the processes involved in the creation of an excited electronic singlet state by optical absorption and subsequent emission of fluorescence. The labeled stages 1, 2, 3 are referred to in the text.



# Fluorescenční spektra

Fluorescenční proces je cyklický.

Kromě fluorochromu nevratně zničeného (photobleaching - „vysvícení“) může být opakovaně excitován.



Excitation of a fluorophore at three different wavelengths (EX 1, EX 2, EX 3) does not change the emission profile but does produce variations in fluorescence emission intensity (EM 1, EM 2, EM 3) that correspond to the amplitude of the excitation spectrum.

# Detekce fluorescence

## Vybavení pro fluorescenci

- (1) zdroj excitace
- (2) fluorochrom
- (3) vlnové filtry pro izolaci emitovaných fotonů od excitovaných
- (4) detektory pro registraci emitovaných fotonů

## Fluorescenční přístroje

- spektrofluorometer měří průměrné vlastnosti objemu vzorku v kyvetě.
- fluorescenční mikroskop popisuje fluorescenci jako jev v prostorovém systému souřadnic
- flow cytometer měří fluorescenci v proudícím toku, umožňuje detekovat a kvantifikovat subpopulace uvnitř velkého vzorku

## Fluorescenční signál

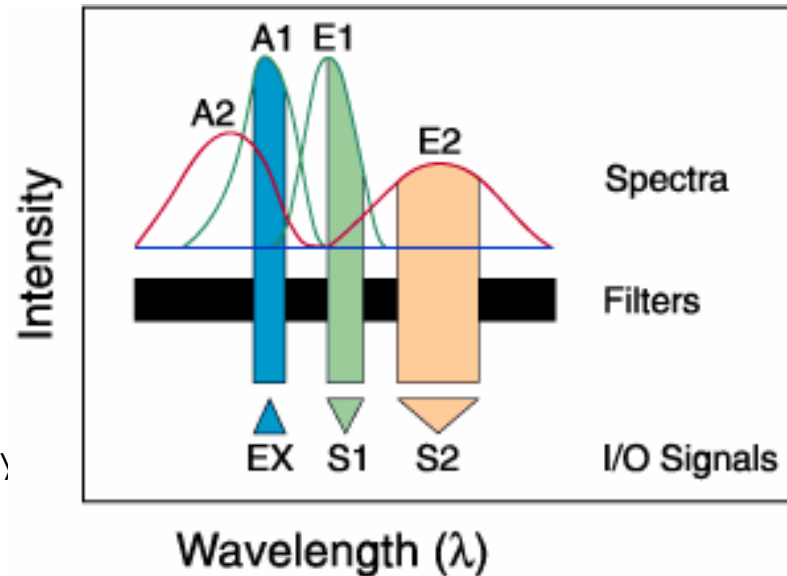
- spektrofluorometer je flexibilní, umožňuje měřit v kontinuálním spektru excitačních a emisních vlnových délek
- flow cytometr potřebuje fluorescenční značky excitovatelné určitou vlnovou délkou.

## Fluorescence pozadí

- endogenní složky - autofluorescence
- nenávanané nebo nespecificky vázané značky = reagenční pozadí

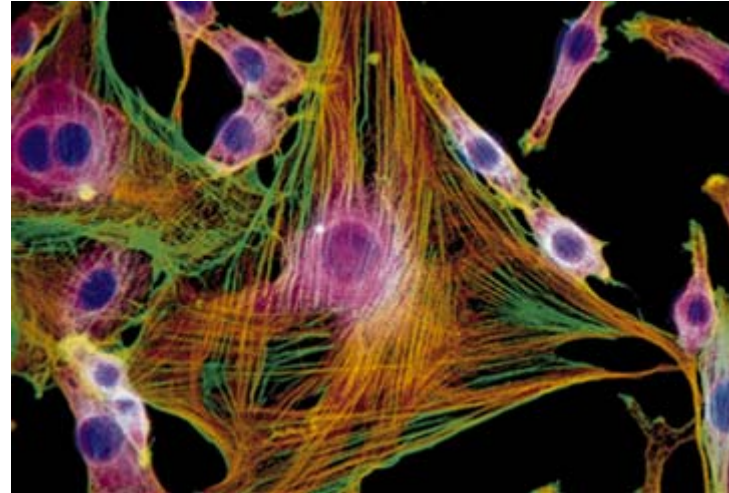
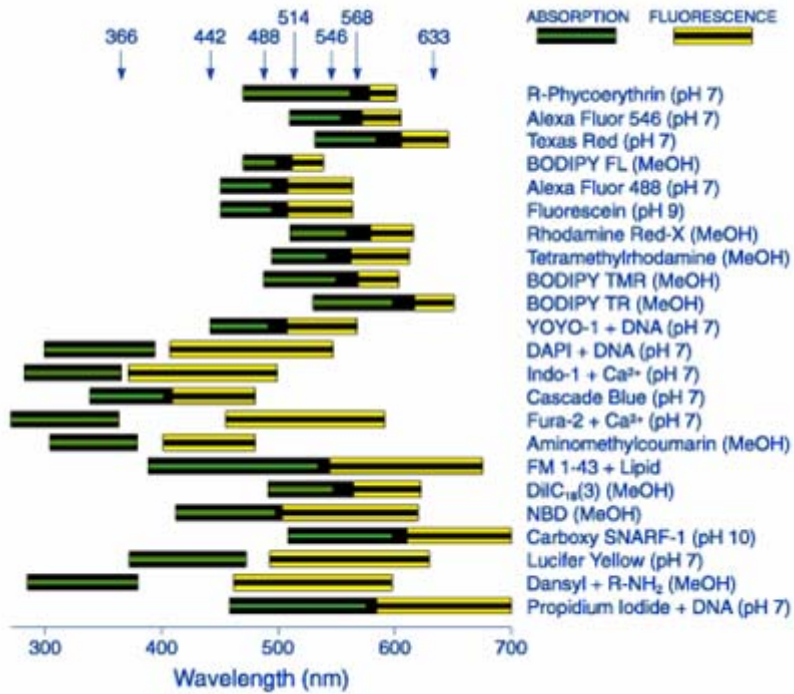
## Vícebarevné značení

- dvě a více značek, zároveň monitoruje různé funkce
- nutné: vhodně zvolit značky zdroj excitace a separační filtry



# Fluorescence Output of Fluorophores

## Comparing Different Dyes



Mouse 3T3

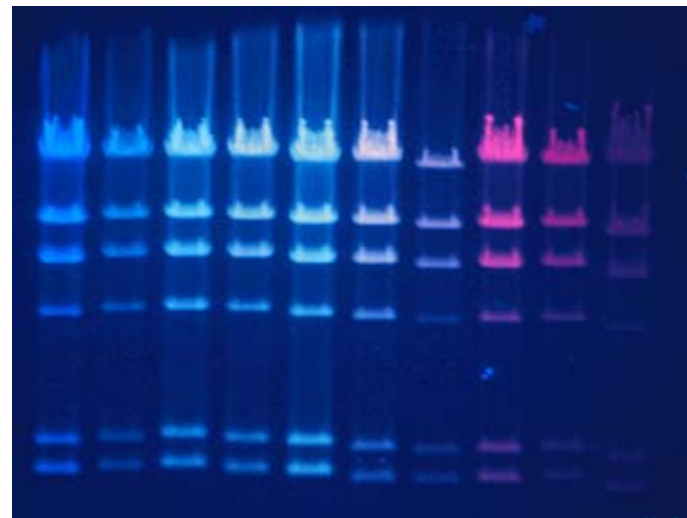
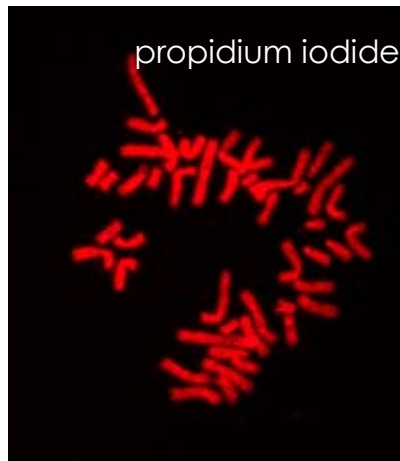
F-actin ~  
BODIPY FL phalloidin

anti-β tubulin ~  
Texas Red  
goat anti-mouse IgG

DNA ~  
DAPI

POPO-1  
BOBO-1  
YOYO-1  
TOTO-1  
JOJO-1  
POPO-3  
LOLO-1  
BOBO-3  
YOYO-3  
TOTO-3

λ Hind III





# Table of Fluorochromes

<http://pingu.salk.edu/fcm/fluo.html>

# Create Your Virtual Cell

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Cell-Staining-Tool.html>



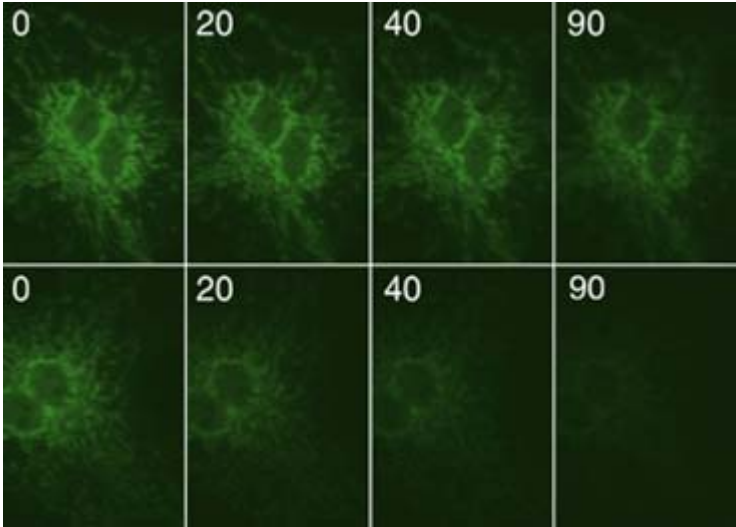


# Procesy interferující a detekcí fluorescence

- **Quenching** - „zhášení“ fluorescence pomocí polárních rozpouštědel, těžkých iontů.
- **Bleaching** – změna struktury fluorescenční molekuly vedoucí ke ztrátě fluorescence (působením světla a nebo chemickou interakcí).
- **Photon saturation** – stav kdy množství molekul v excitovaném stavu odpovídá množství molekul v bazální hladině

# Photobleaching

- irreversible destruction or photobleaching of the excited fluorophore



**anti-human cytochrome oxidase subunit I**

**Oregon Green 514 goat anti-mouse IgG**

**fluorescein goat anti-mouse IgG**



# Základ průtokové cytometrie



**Fluidics**

**Optics**

**Electronics**

Buňky v suspenzi

protékají jednotlivě napříč

osvětlenou částí kde

rozptylují světlo a emitují  
fluorescenci,

která je detekována, filtrována a

převedená na digitální hodnoty

uložené do počítače



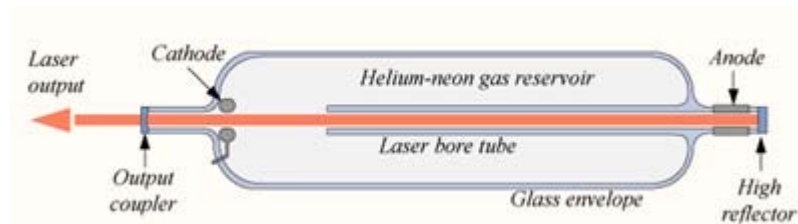
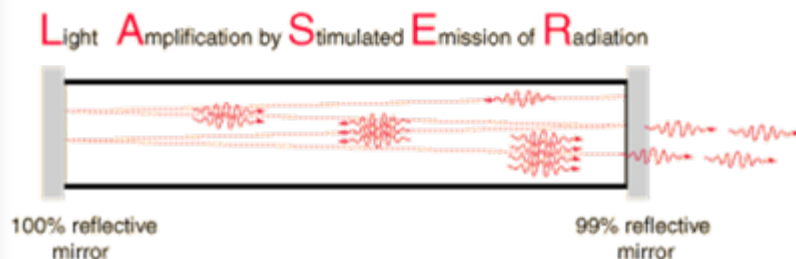
# Optika - zdroj světla

- nutnost zaostřit zdroj světla na stejné místo, kde je zaostřen průtok buněk
- Lasery
  - produkují jednotlivou vlnovou délku světla (325, 488, ~630nm)
  - poskytují mW - W světla
  - mohou být "levné" - air-cooled , nebo drahé - water-cooled
  - poskytují koherentní světelný proud
- Obloukové lampy (Arc-lamps)
  - produkují **směs** vlnových délek, které musí být filtrovány
  - poskytují mW světla
  - levné - air-cooled
  - nekoherentní světelný proud

## - optické kanály

- cesta světla z místa ozáření buněk k detektoru
- optické části **separují** určité vlnové délky

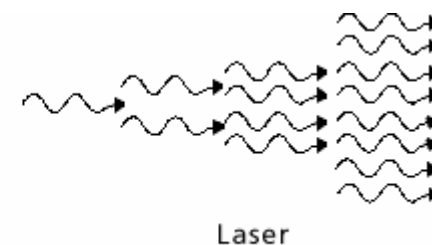
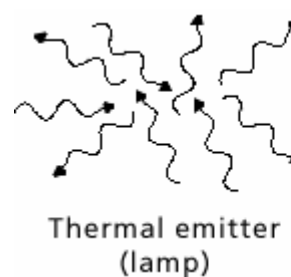
# LASER(y)



[http://en.wikipedia.org/wiki/Helium-neon\\_laser](http://en.wikipedia.org/wiki/Helium-neon_laser)

- koherentní (souvislý světelný tok)
- monochromatický
- soustředěný

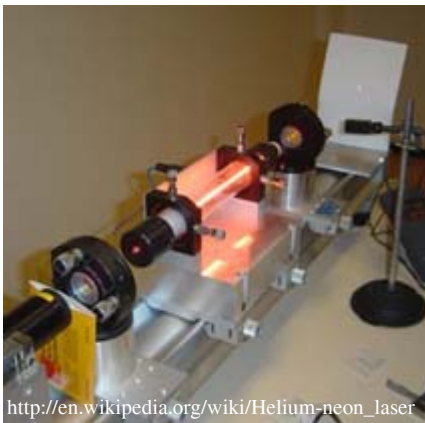
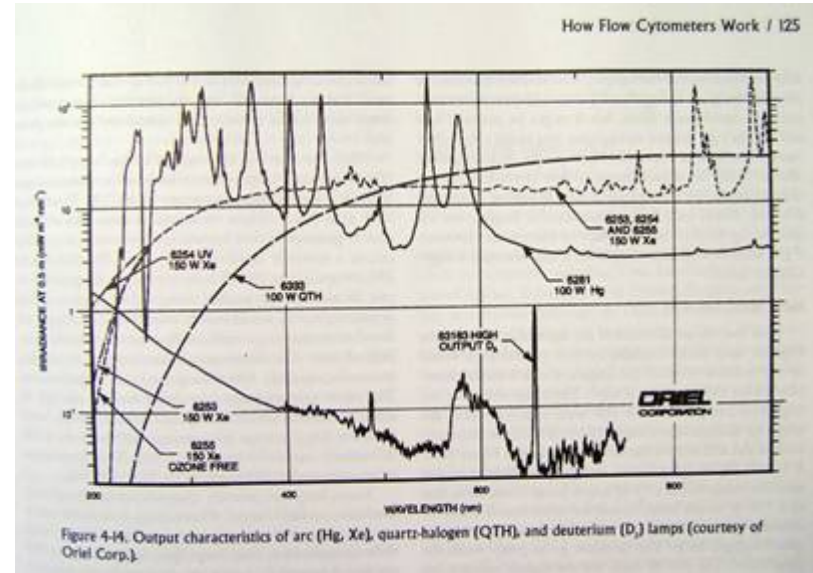
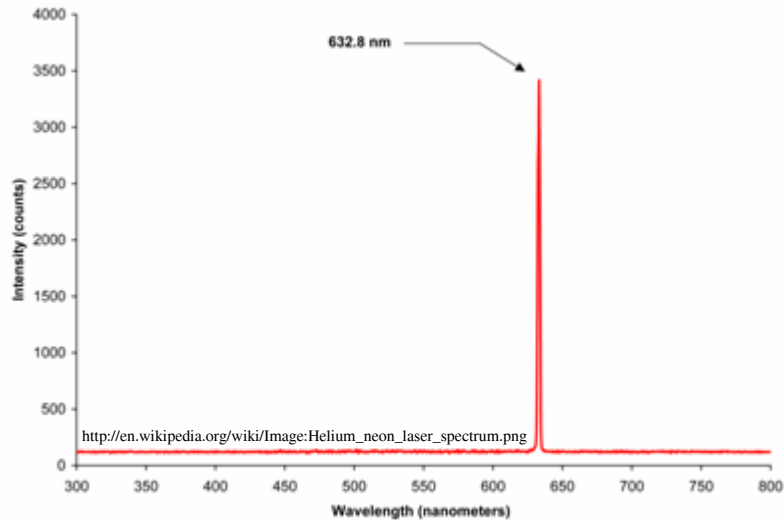
<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/hframe.html>



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



# LASER vs. Arc lamp



H.M. Shapiro, Practical Flow Cytometry, 4th ed.



<http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/sources.html>

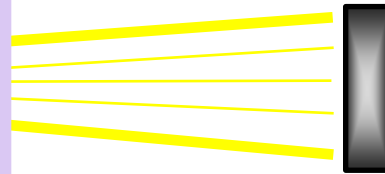
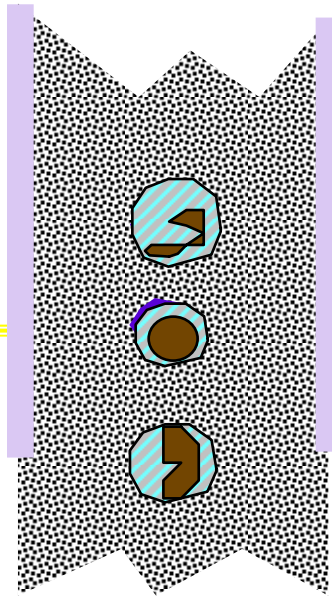
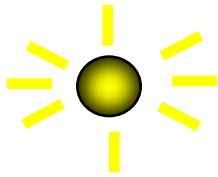


# Optika - „Forward Scatter“ kanál

- část světla rozptýlená ve stejné ose jako je směr světelného paprsku
- intenzita „forward scatteru“ odpovídá velikosti, tvaru a optické homogenitě buněk

# Forward Angle Light Scatter

Laser



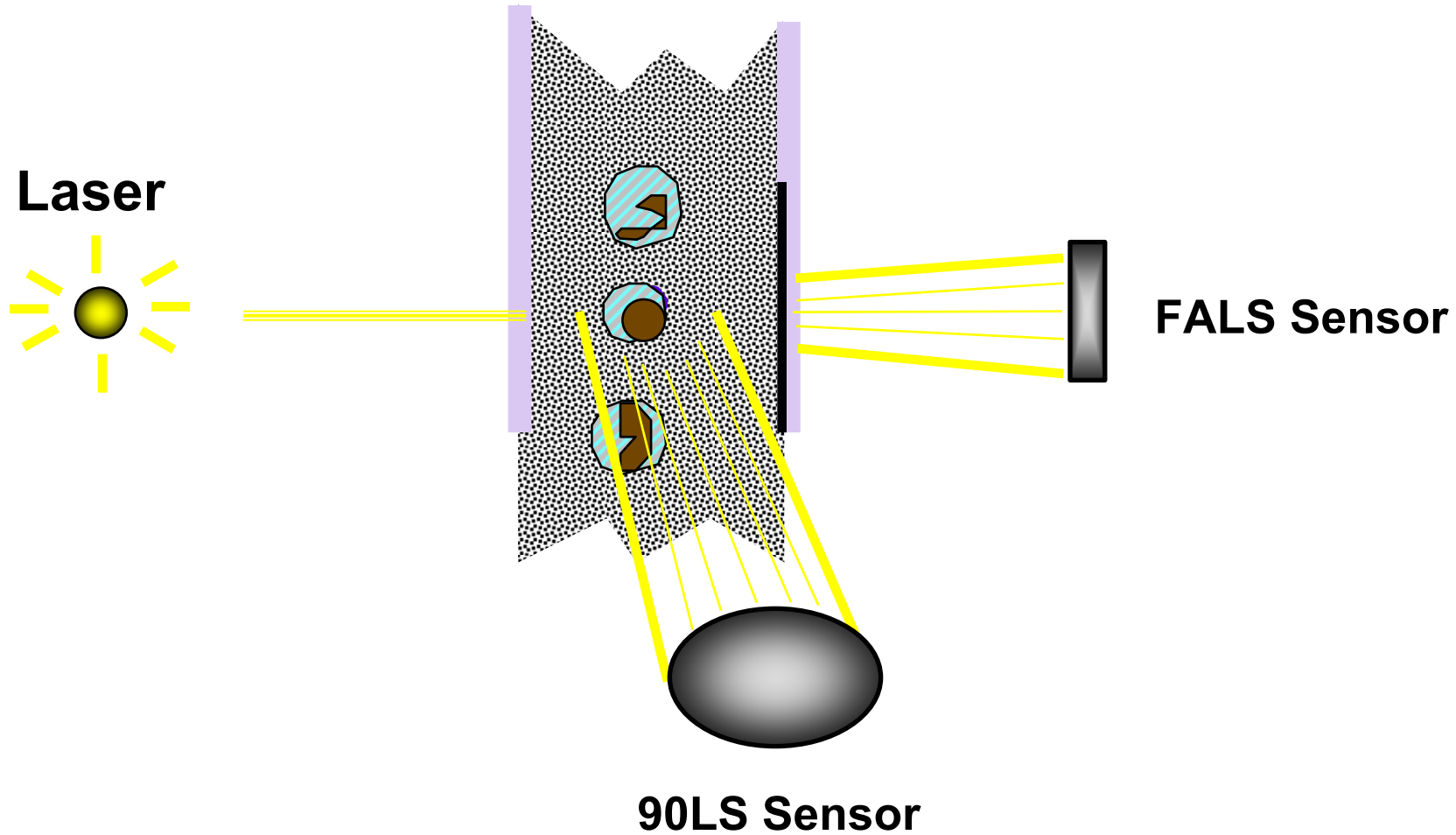
FALS  
Sensor



# Optika - „Side Scatter“ kanál

- část světla rozptýlená kolmo do strany od osy směru světelného paprsku **side (90°) scatter channel**
- intenzita „side scatteru“ odpovídá **velikosti, tvaru a optické homogenitě** buněk

# 90 Degree Light Scatter







# Optika - Light Scatter

- „Forward scatter“ zachycuje **povrchové vlastnosti a velikost** částic
- může být použit k rozlišení živých a mrtvých buněk
- „Side scatter“ odpovídá **inkluzím uvnitř** buněk
  - možno odlišit **granulární** a **negrnulární** populaci

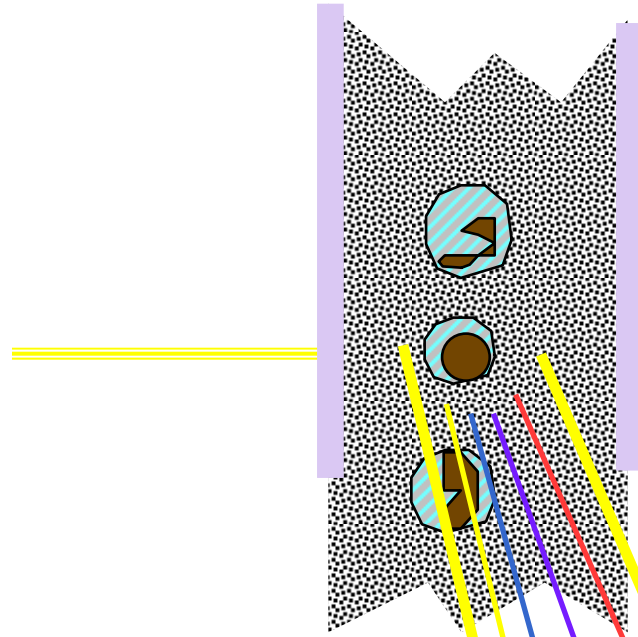
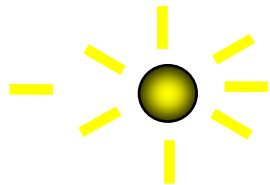


# Optika - fluorescenční kanály

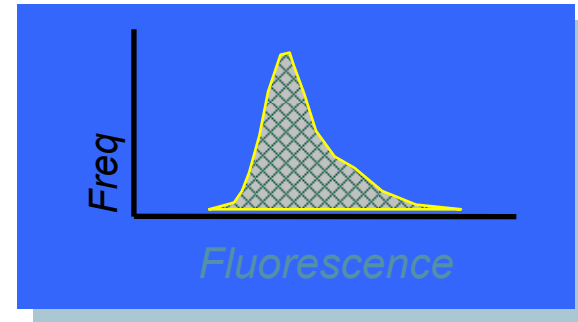
- fluorescence emitovaná z každého fluorochromu je detekována pomocí specifického **fluorescenčního kanálu**
- specifita detekce je kontrolována vlnovou selektivitou filtru a zrcadel

# Fluorescence Detectors

Laser



FALS Sensor



Fluorescence detector  
(PMT3, PMT4 etc.)

# Optika - vlastnosti filtrů

- jsou konstruovány z materiálů absorbujících určitou vlnovou délku (a propouštějí jinou)
- přechod mezi absorbancí a transmisí není přesný; nutné specifikovat lom světla při konstrukci filtru

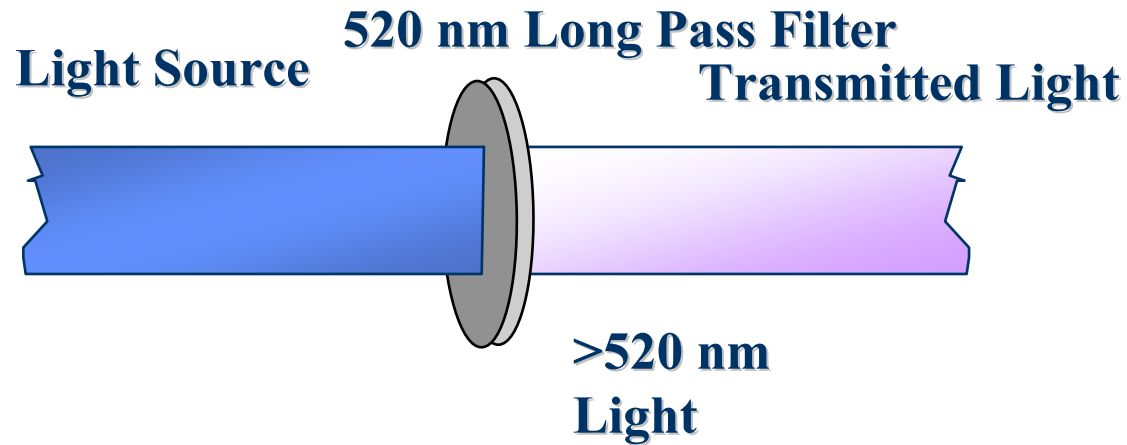




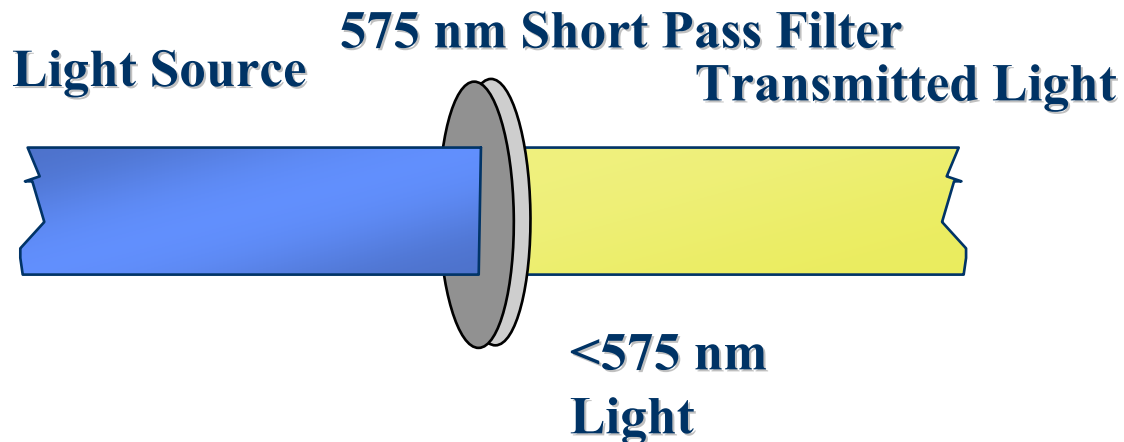
# Optics - vlastnosti filtrů

- „Long pass“ filtr propouští vlnovou délku **nad** „řezanou“ délkou
- „Short pass“ filtr propouští vlnovou délku **pod** „řezanou“ délkou
- „Band pass“ filtr propouští vlnovou délku v **úzkém rozmezí** okolo specifické vlnové délky

# Standard Long Pass Filters



# Standard Short Pass Filters

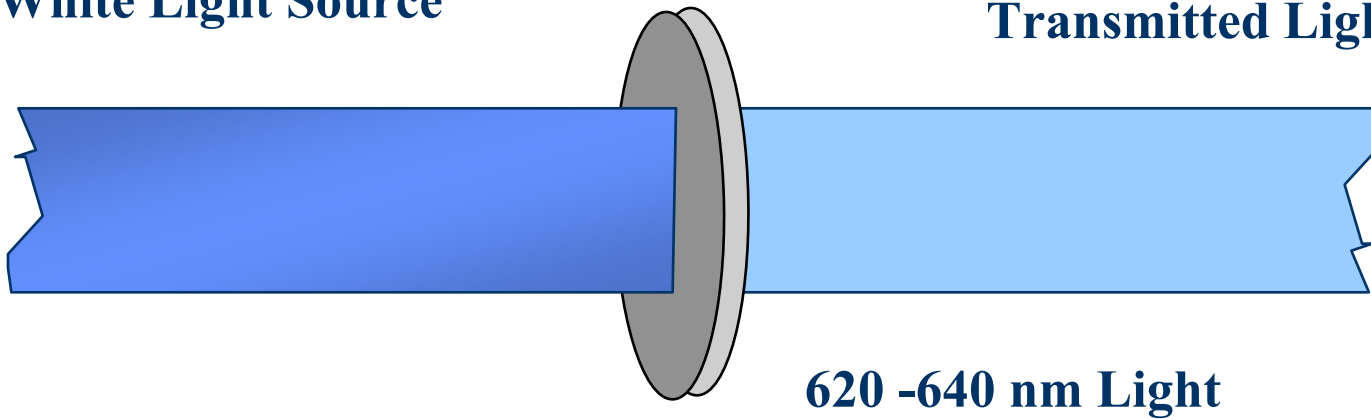


# Standard Band Pass Filters

## 630 nm BandPass Filter

White Light Source

Transmitted Light





# Optika - vlastnosti filtrů

- pokud je filtr umístěn v  $45^\circ$  úhlu ke zdroji světla, světlo, které má projít tak projde, ale blokované světlo je odraženo v  $90^\circ$  úhlu
- **dichroické filtry, dichroická zrcadla**



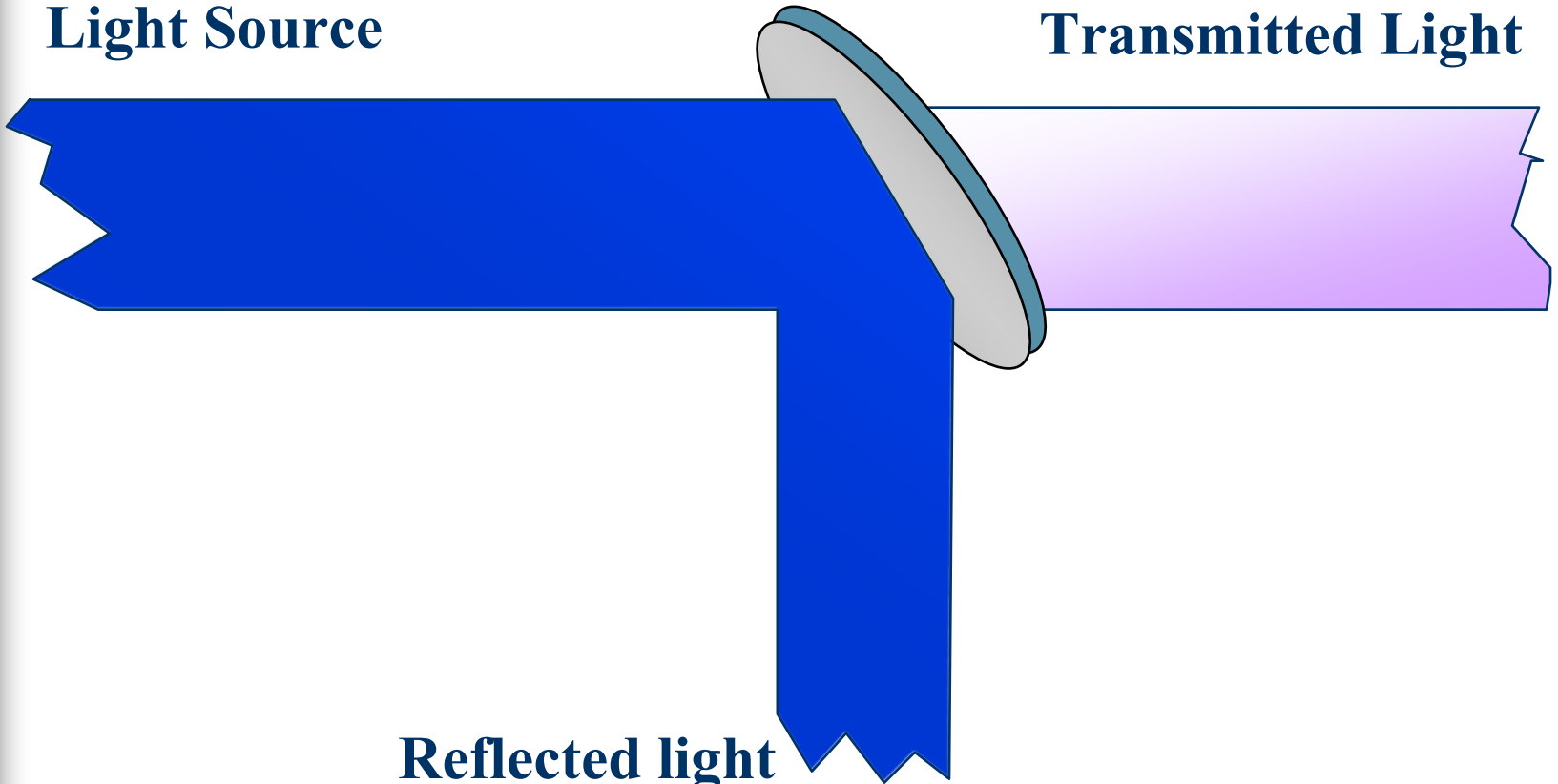
# Dichroic Filter/Mirror

**Filter placed at 45°**

**Light Source**

**Transmitted Light**

**Reflected light**





# Optika - uspořádání filtrů

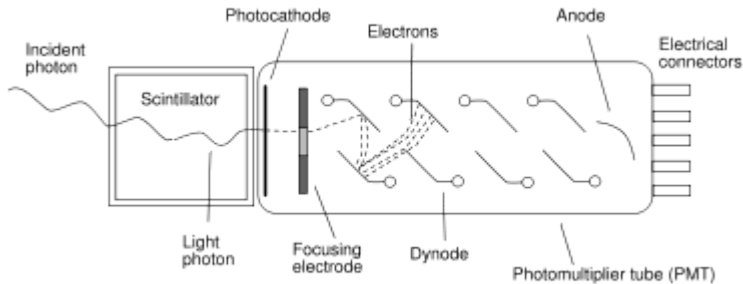
- k společnému měření více než jednoho „scatteru“ nebo fluorescence , používáme **mnohonásobné kanály** (a detektory)
- multikanálové uspořádání musí splňovat
  - **spektrální vlastnosti** použitého fluorochromu
  - **správný řád uspořádání** filtrů a zrcadel



# Optika - detektory

- dva obecné typy detektorů
  - **fotodioda**
    - používá se pro silný signál (forward scatter detector)
  - **fotonásobič (photomultiplier tube - PMT)**
    - citlivější než fotodioda, může být poškozen přesvícením

# Photomultiplier tubes (photomultipliers, PMTs)



Základní charakteristika:

- vysoce citlivé detektory (jeden foton)
- velké zesílení signálu/nízký šum
- velká plocha detekce
- rychlá frekvence odpovědi
- velké pracovní napětí (1000 – 2000 V)



<http://en.wikipedia.org/wiki/Photomultiplier>

# Fotodioda

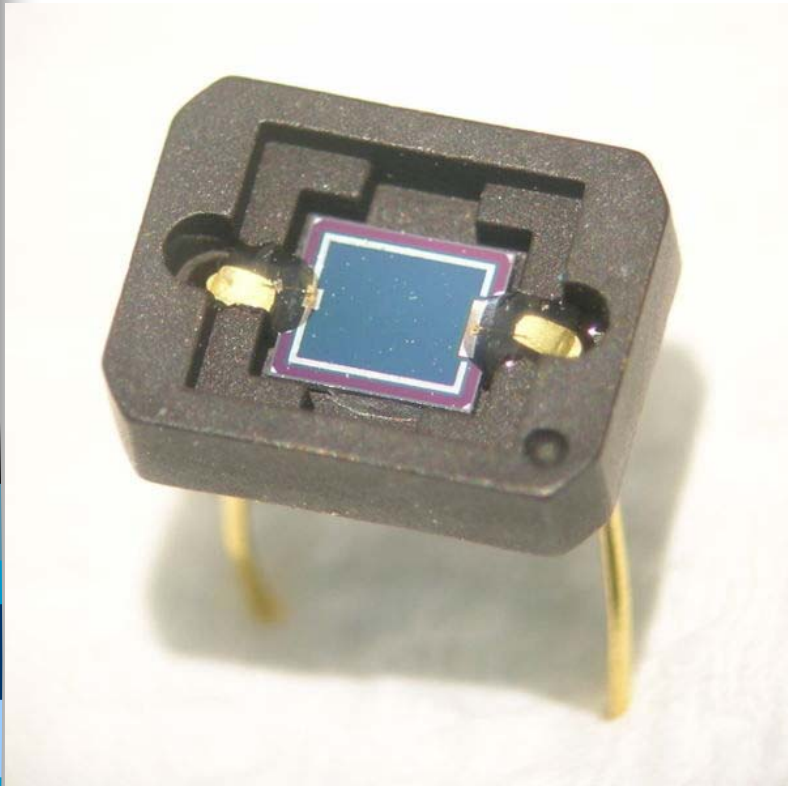
Porovnání s PMT

Výhody:

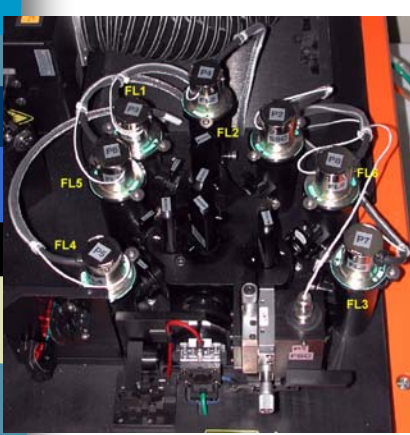
1. excelentní linearita signálu
2. rozsah spektrální detekce 190 nm to 1100 nm (silicon)
3. nízký šum
4. Odolnost vůči mechanickým vlivům
5. nízká cena
6. malá velikost a hmotnost
7. dlouhá životnost
8. Vysoká kvantová účinnost (~80%)
9. Nepotřebuje vysoká napětí

Nevýhody

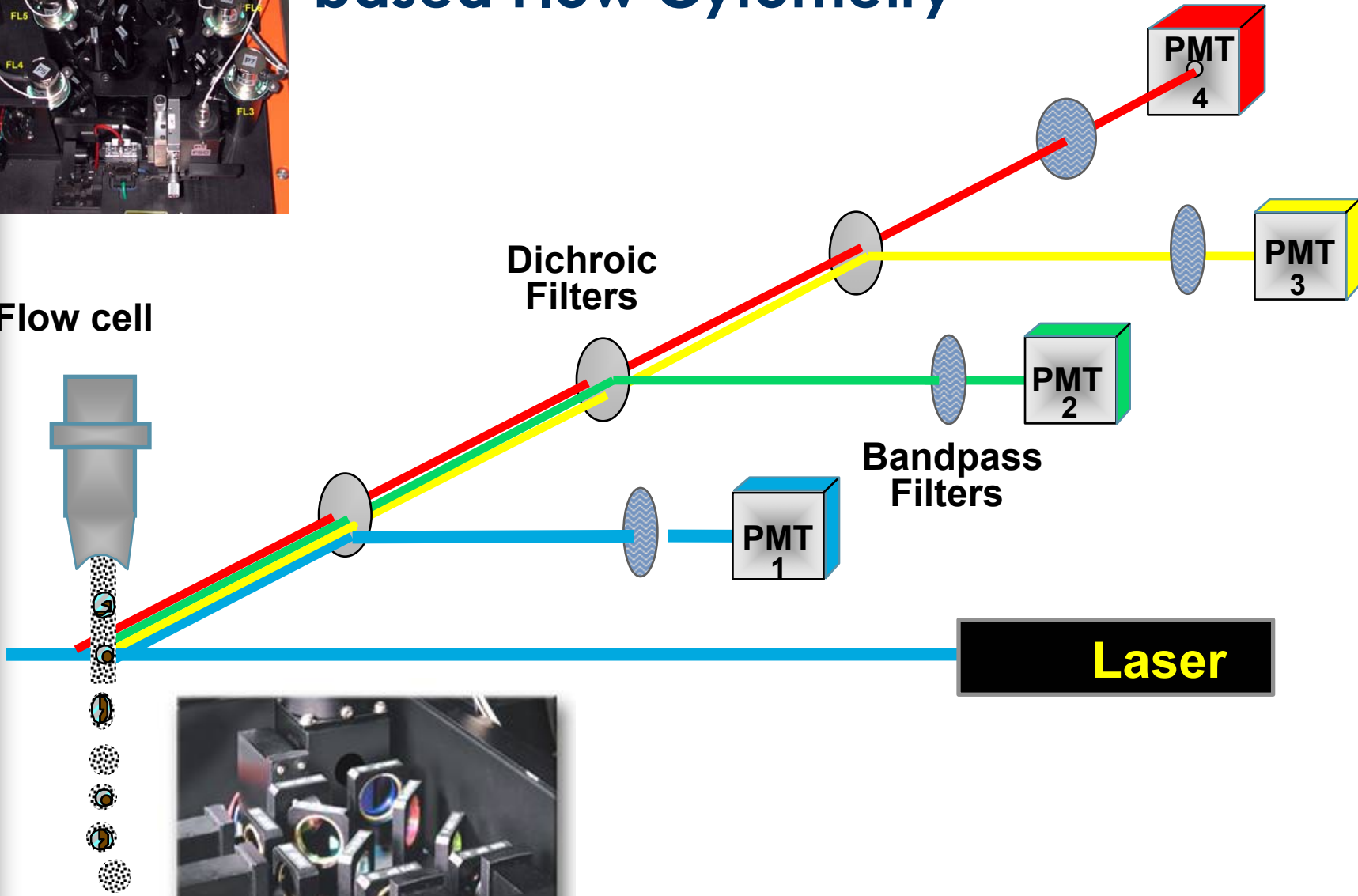
1. Malá plocha
2. Nemožnost integrálního zesílení
3. Mnohem nižší citlivost
4. Počítání fotonů pouze u speciálních produktů
5. Kratší čas odpovědi



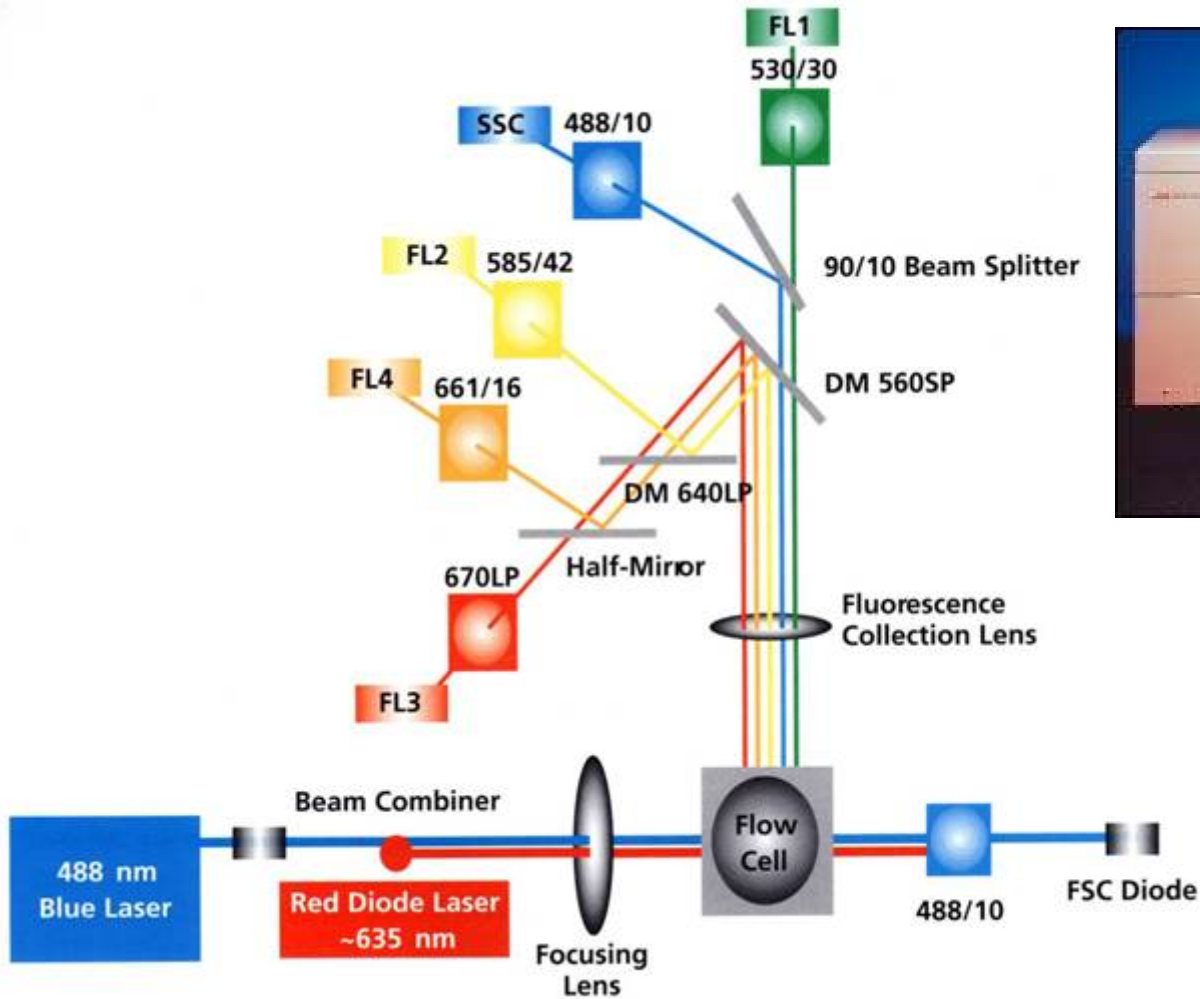
# Example Channel Layout for Laser-based Flow Cytometry



Flow cell



# BD FACSCalibur system

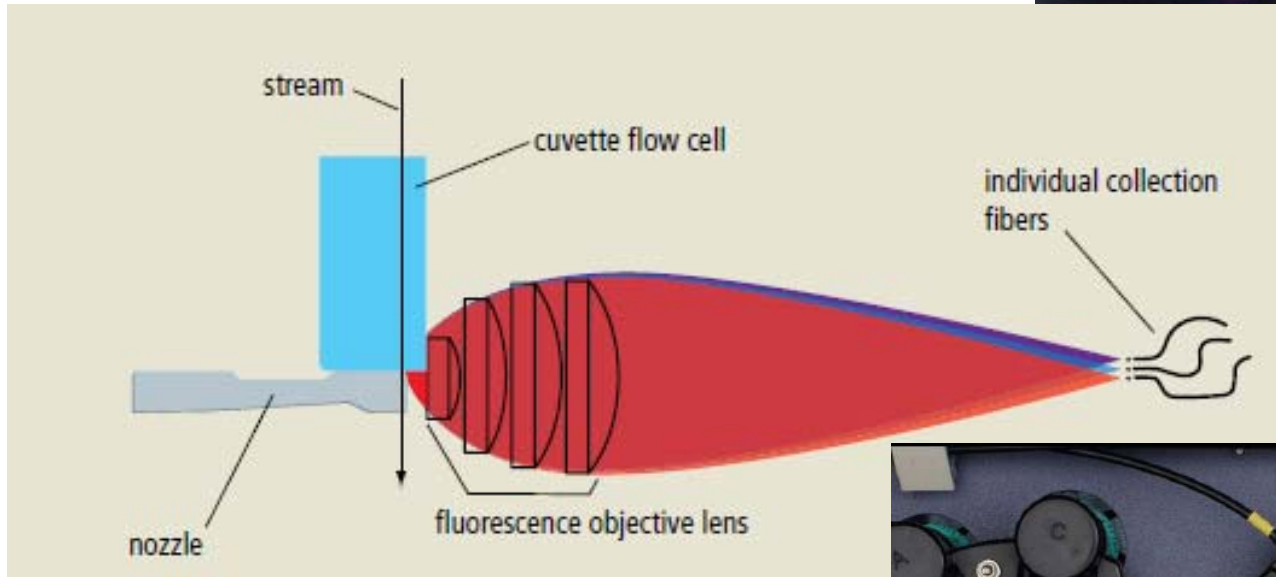


[http://www.bdbiosciences.com/immunocytometry\\_systems/](http://www.bdbiosciences.com/immunocytometry_systems/)

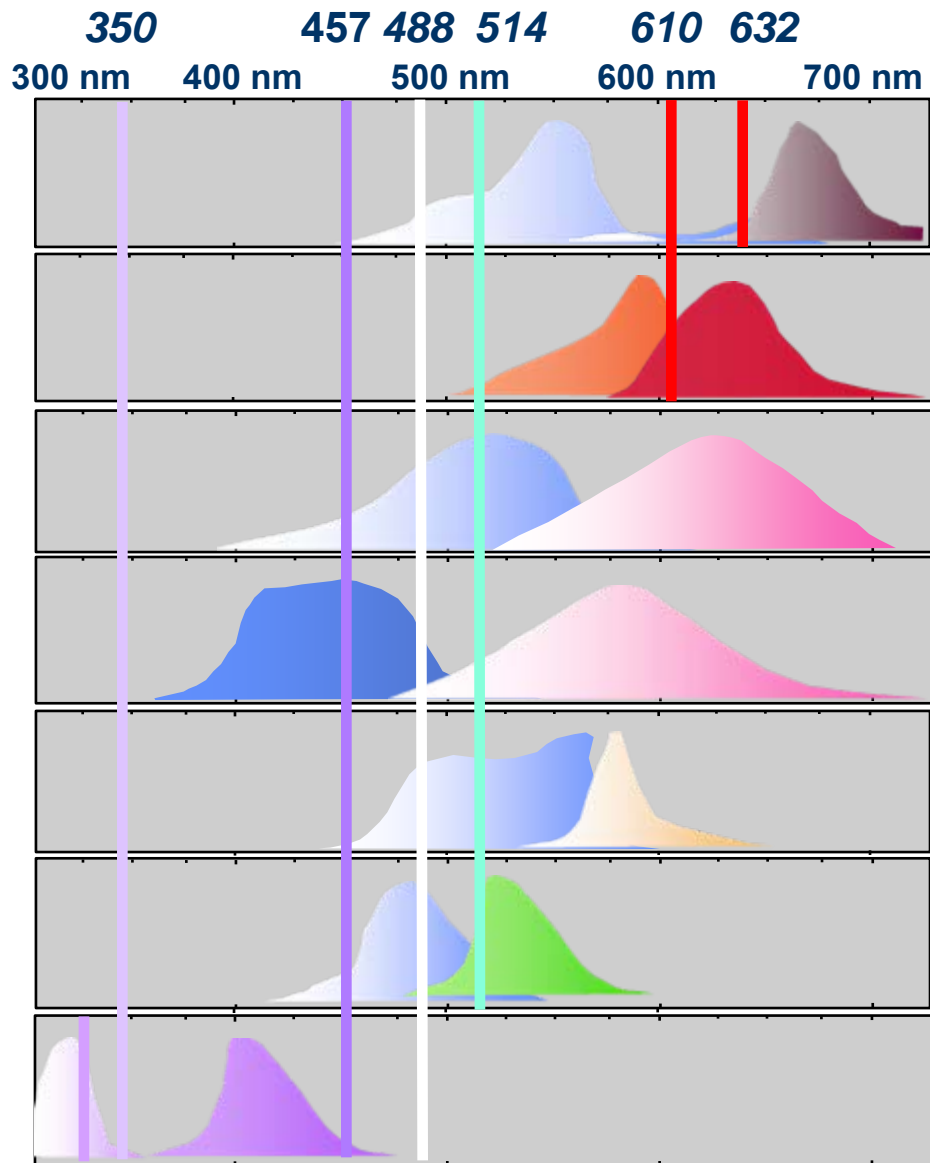




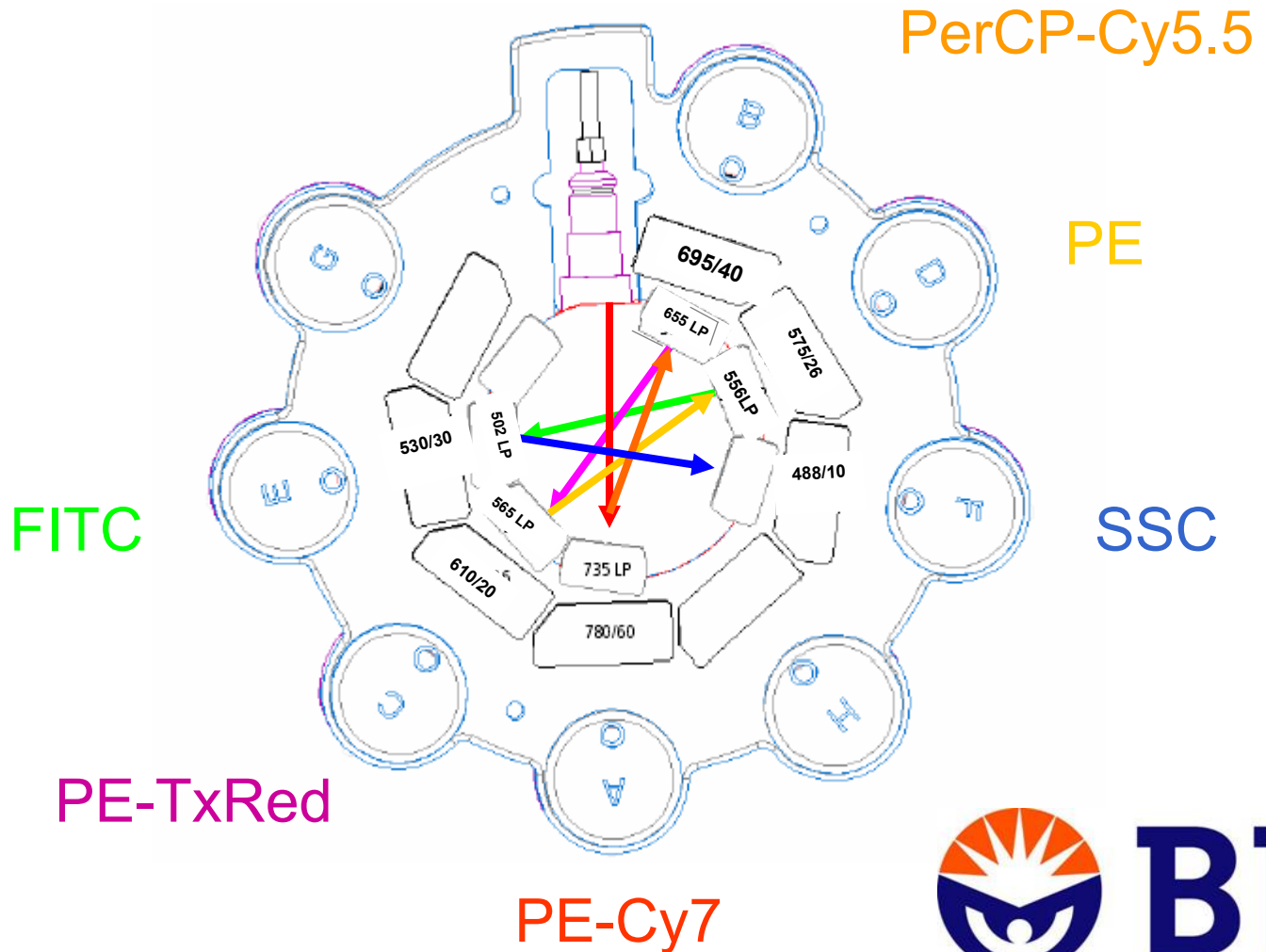
# Aria II



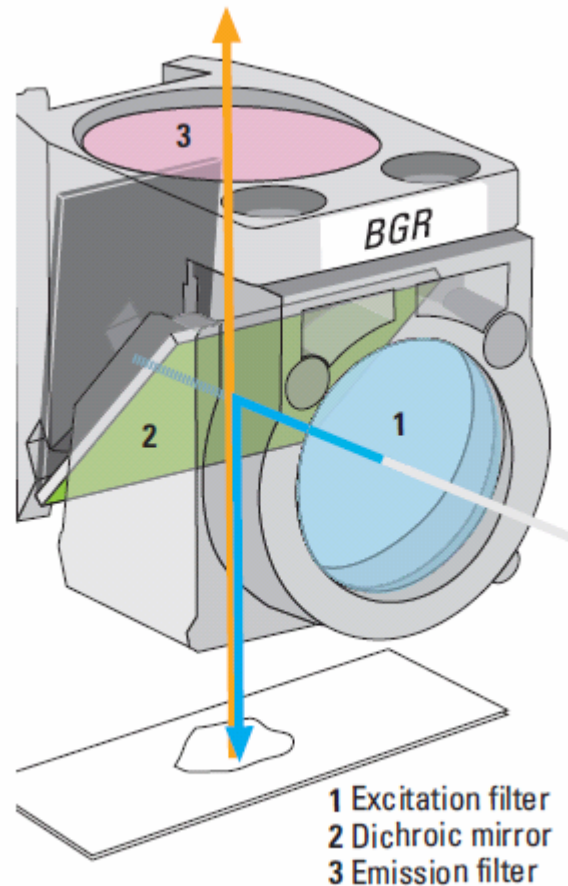
**Common  
Laser  
Lines**



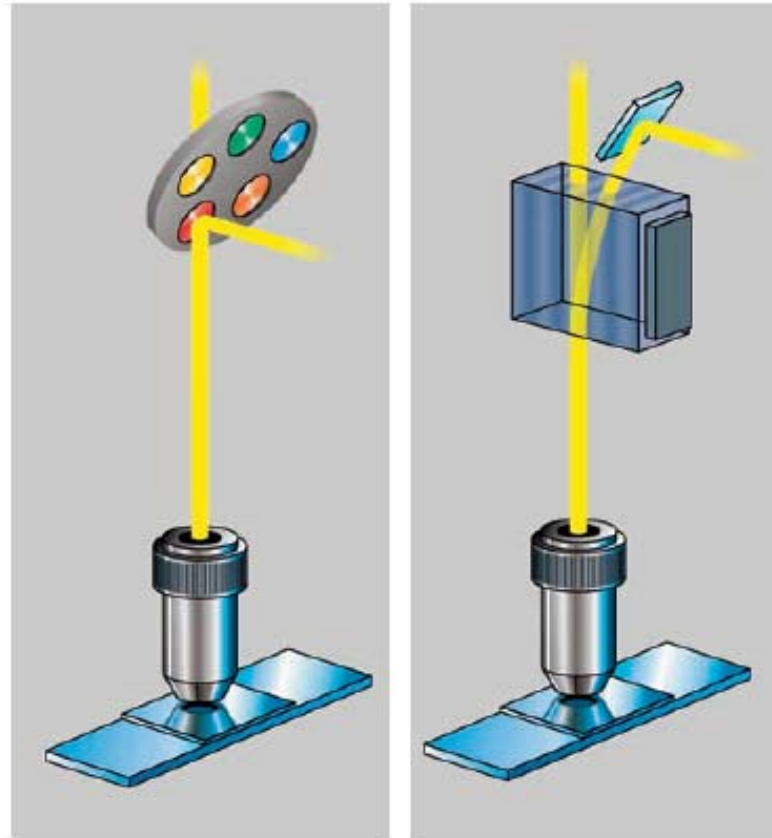
# Octagon Detection System



# “kostka” pro konvenční fluorescenční mikroskop



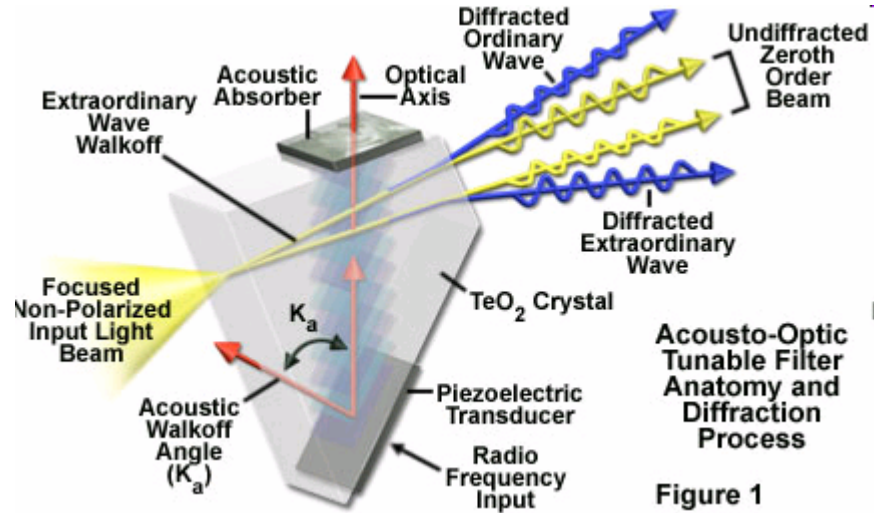
# Acousto Optical Beam Splitter AOBS®



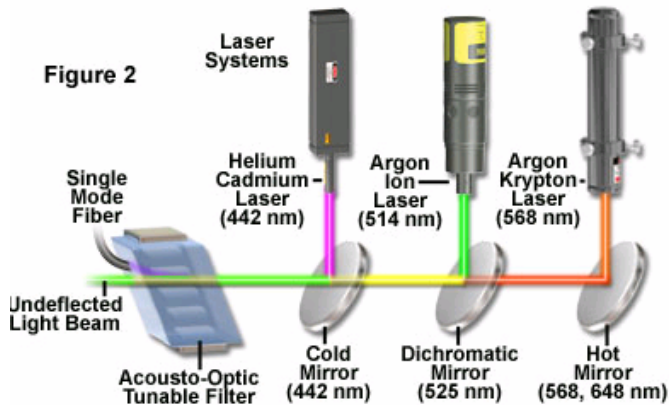
Left: conventional beam splitting by dichroic mirrors requires many optical elements with fixed properties.

Right: the AOBS® is electronically adaptable to all tasks.

# Acousto Optical Beam Splitter AOBS®



Acousto-Optic Tunable Filters in Confocal Microscopy

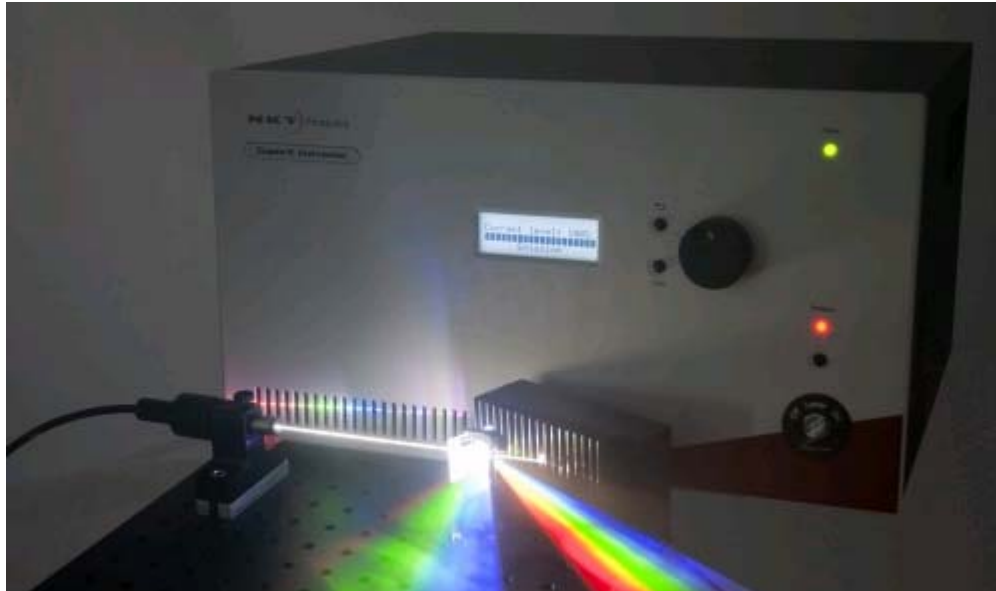


<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/filters/aotf/index.html>

<http://simple.wikipedia.org/wiki/Tellurium>

# Supercontinuum Generation

-a nonlinear process for strong spectral broadening of light



**TECHNICAL NOTE**

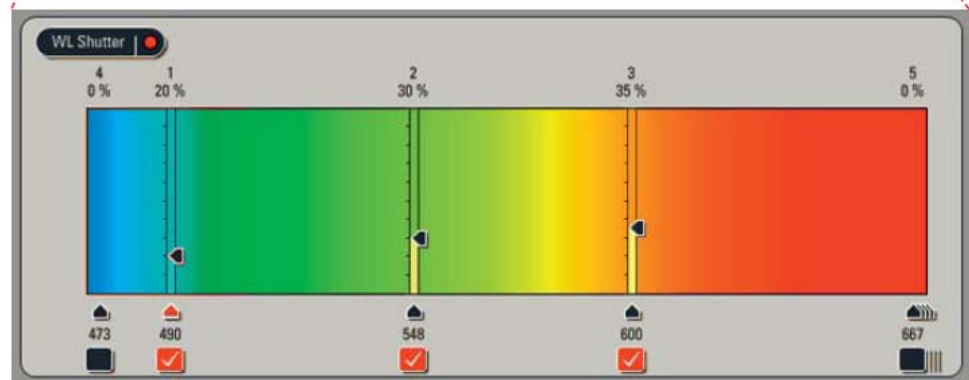
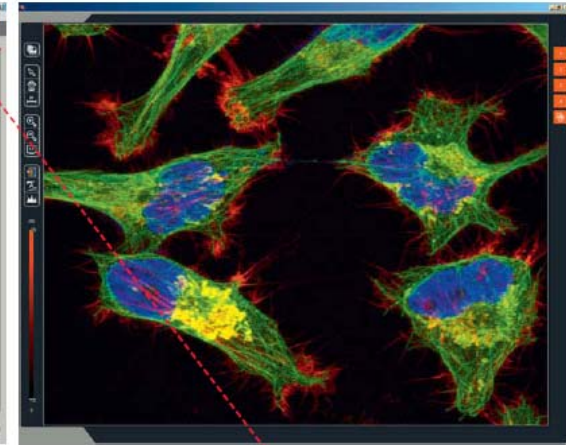
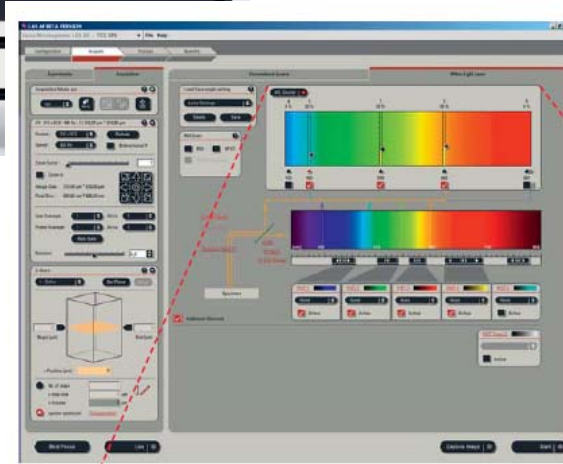
**Cytometry**

PART A  
Journal of the  
International Society for  
Advancement of Cytometry

## Supercontinuum White Light Lasers for Flow Cytometry

William G. Telford,<sup>1\*</sup> Fedor V. Subach,<sup>2</sup> Vladislav V. Verkhusha<sup>2</sup>

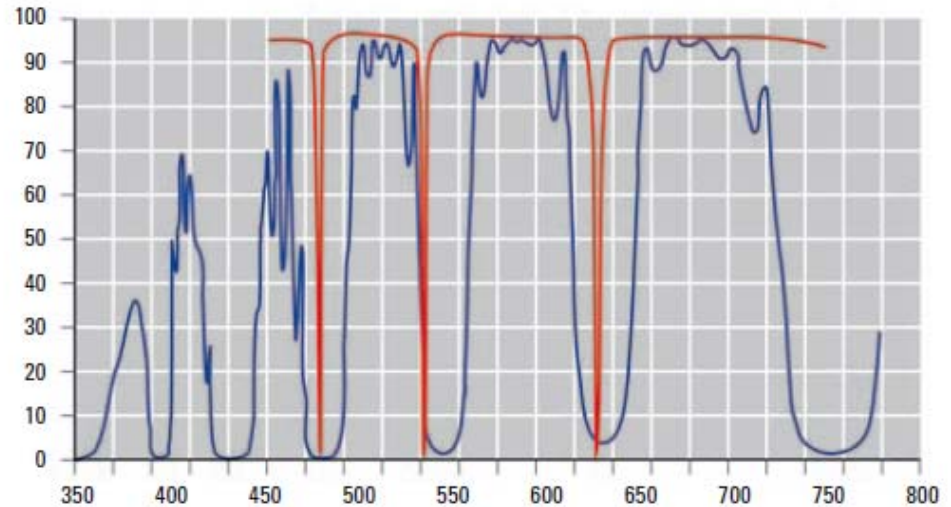
Cytometry Part A • 75A: 450–459, 2009





# The benefits of AOBS®

- Adaptable to any new dye
- 8 lines simultaneously
- Reflected light imaging
- High transmission
- Truly confocal – real optical sectioning
- Fast switching
- Freely tunable
- Fluorescence correlation spectroscopy with multi-line lasers



Transmission curves

Blue: triple dichroic, blue, green, red

Red: AOBS® tuned to 488, 543, 594, 633 nm

Higher transmission, wider bands and steeper slopes with AOBS®



## Fluorescence Spectrum Viewer

<http://www.bdbiosciences.com/spectra/>

# Základ průtokové cytometrie

**Fluidní  
systém**

**Optika**

**Elektronika**

**Sortovací  
modul**

Buňky v suspenzi  
protékají jednotlivě napříč  
osvětlenou částí kde  
rozptylují světlo a emitují  
fluorescenci,  
která je detekována, filtrována a  
převedena na digitální hodnoty  
uložené do počítače.

Na jejich základě je vybraná  
populace separována.

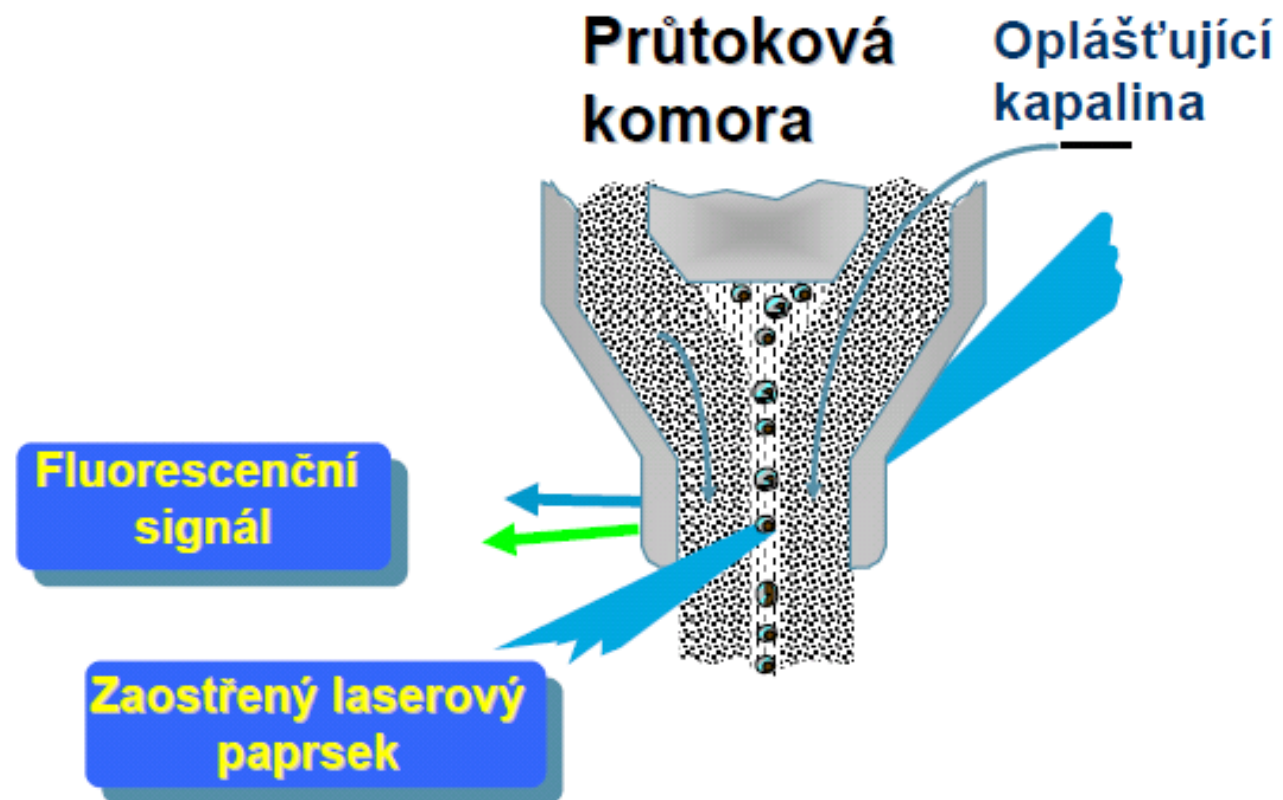


# Průtokové systémy a hydrodynamika

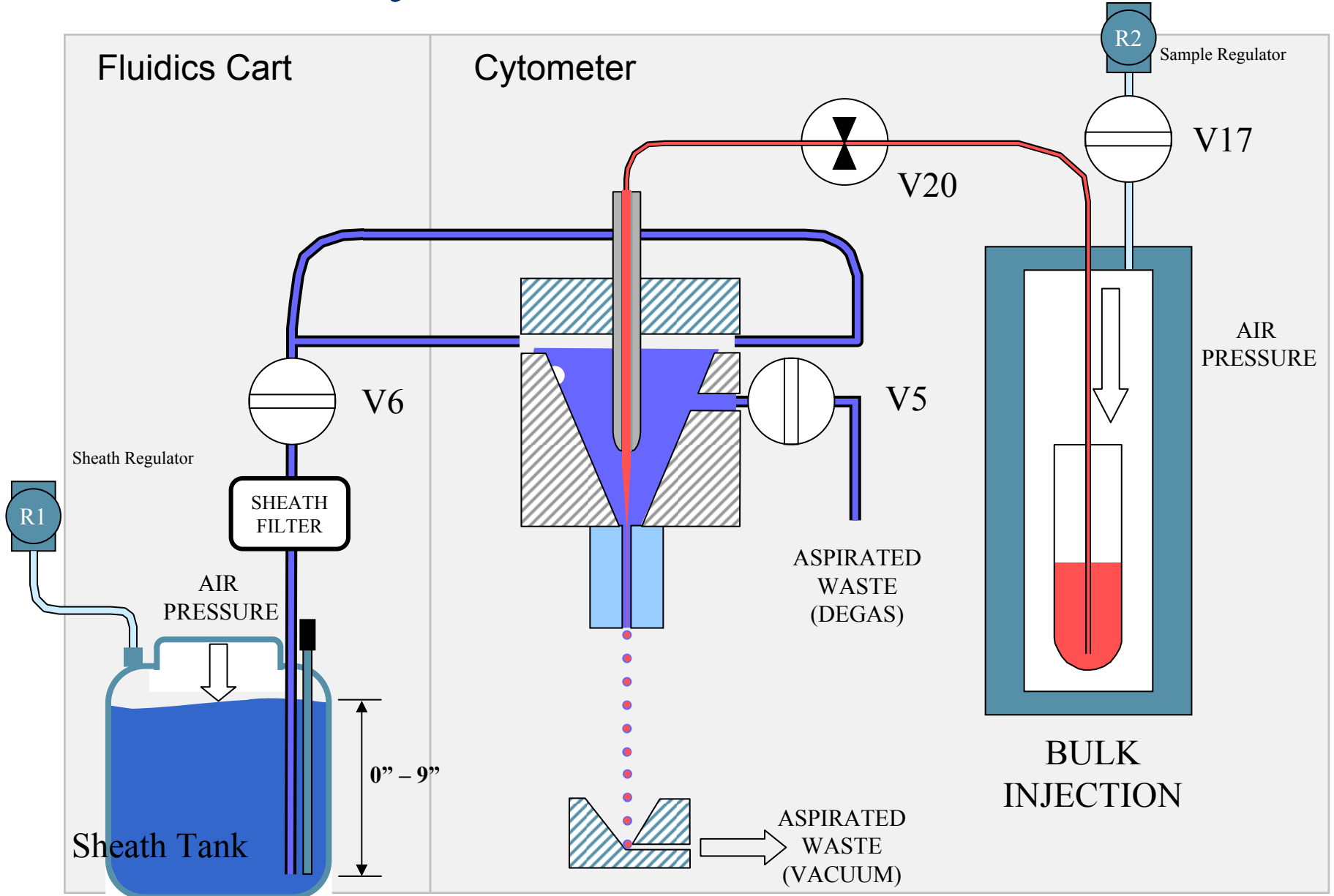
Getting the cells in the right place (at the right time)! (Shapiro, pp 133-143 - 3rd ed)

## Průtoková cytometr:

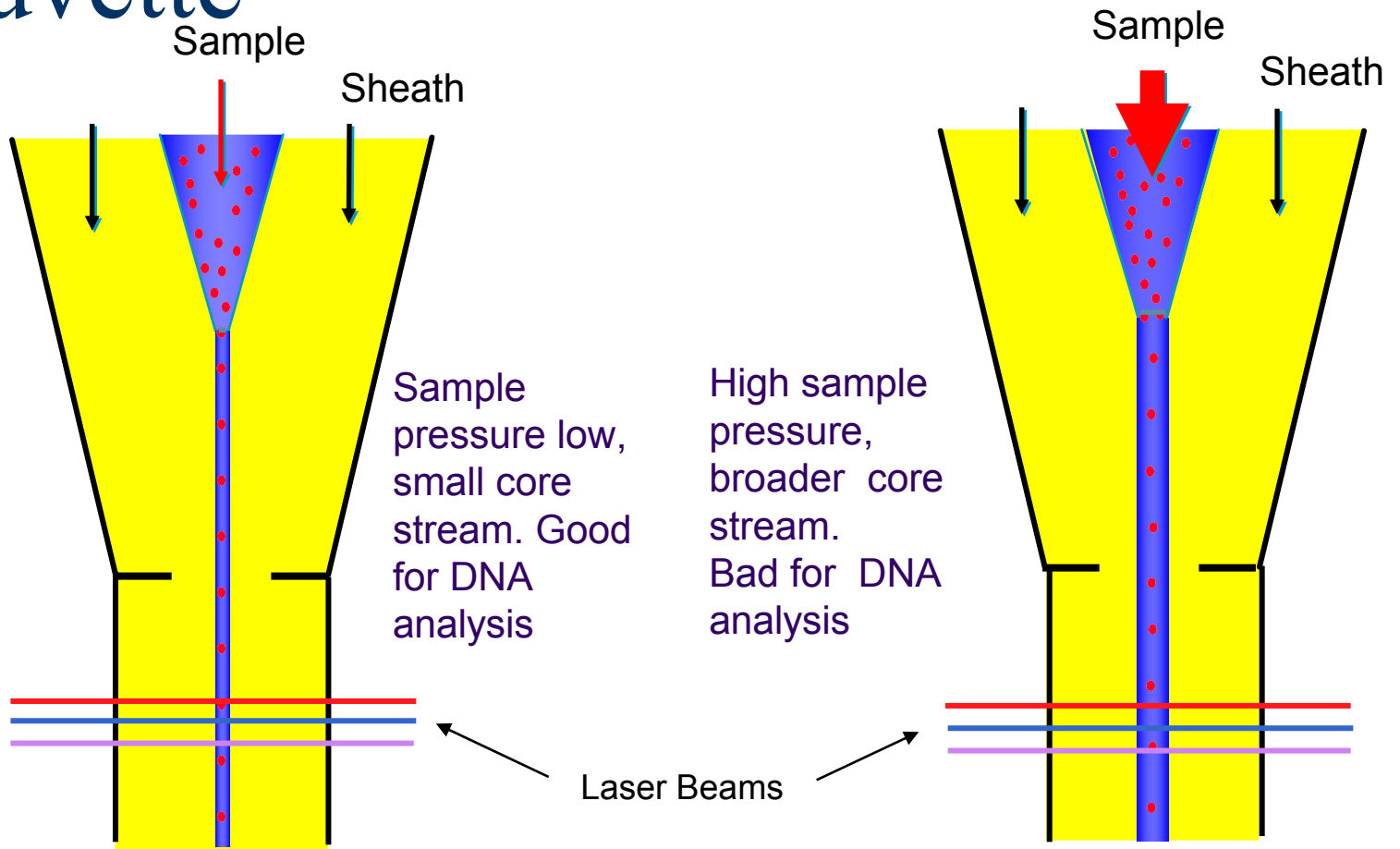
Pomocí hydrodynamicky zaostřeného fluidního systému analyzuje buňky v zaostřeném světelném paprsku (laseru).



# Fluidní systém: BD FACSAria II



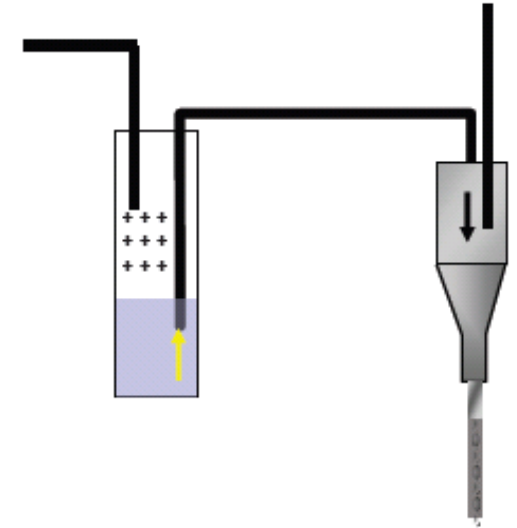
# Hydrodynamic focussing in the cuvette



# Fluidní systém

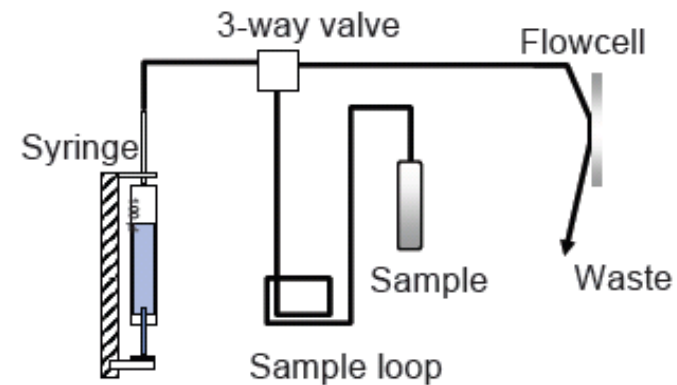
## Pozitivní tlakový systém

- založen na rozdílném tlaku mezi nosnou kapalinou a vzorkem
- vyžaduje zdroj vyrovnaného tlaku (vzduch, dusík)
- rychlost průtoku mezi 6-10 m/s



## Pozitivní vytlačování injekční systém

- průtok 1-2 m/s
- fixní objem (50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l)
- možnost určení absolutních počtů buněk







# Hydrodynamický a fluidní systém

- buňky jsou vždy v suspenzi
- vzorek je obvykle ve fyziologickém roztoku
- nosná kapalina je voda nebo fyziologický roztok
- nosná kapalina pro sortování musí být fyziologický roztok
- vzorky jsou hnány tlakem nebo pomocí pístu



# Fluidika

- potřebujeme buňky v suspenzi, protékající v jednom sloupci napříč osvětleným místem
- u většiny zařízení je toho dosaženo injekcí vzorku do proudu nosné kapaliny skrz malý otvor (50-300  $\mu\text{m}$ )



# Fluidika

- Pokud jsou podmínky optimální pak vzorek proudí středem bez směšování s nosnou kapalinou
- takový stav nazýváme laminární proudění (**laminar flow**)

# Fluidika - Laminární vs. turbulentní proudění

- **Turbulentní** proudění je charakteristické chaotickými (stochastickými) změnami
- **Laminární** proudění – kapalina proudí v paralelních vrstvách které se vzájemně nemísí



# Fluidika - Laminární vs. turbulentní proudění

- Osborne Reynolds (1842 -1912) definoval podmínky laminárního proudění (1883)



"[http://en.wikipedia.org/wiki/Osborne\\_Reynolds](http://en.wikipedia.org/wiki/Osborne_Reynolds)"

# Fluidika - Laminární proudění

- Zda bude průtok laminární je možné určit pomocí **Reynoldova čísla**

$$R_e = \frac{d\rho\bar{v}}{\eta} \quad \text{where}$$

$d$  = tube diameter  
 $\rho$  = density of fluid  
 $\bar{v}$  = mean velocity of fluid  
 $\eta$  = viscosity of fluid

- když  $R_e < 2300$ , průtok je vždy **laminární** (v trubici)
- $R_e > 2300$ , průtok může být **turbulentní**

# Fluidika

- Zavedení malého objemu kapaliny do velkého způsobem, kdy se stává „zaostřeným“ ve směru toku, nazýváme **hydrodynamické zaostřování**.

APPLIED MICROBIOLOGY, Sept. 1972, p. 384-388  
Copyright © 1972 American Society for Microbiology

Vol. 24, No. 3  
Printed in U.S.A.

## Hydrodynamic Focusing and Electronic Cell-Sizing Techniques

M. L. SHULER, R. ARIS, AND H. M. TSUCHIYA

*Department of Microbiology, Department of Chemical Engineering and Materials Science, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota 55455*

Received for publication 24 May 1972

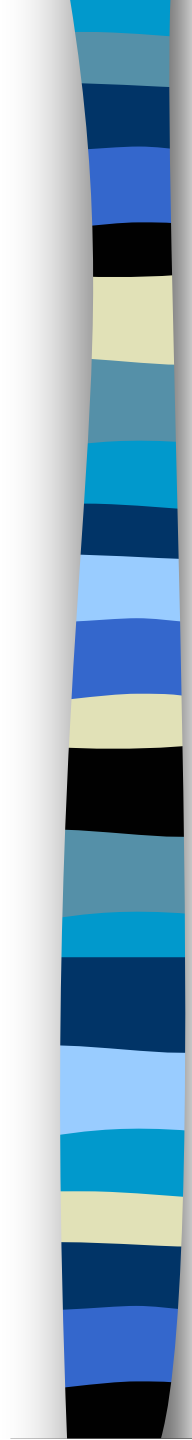
The technique of hydrodynamic focusing, used to improve the resolution of the Coulter counter for the sizing of bacteria, was examined. Latex particles of  $0.26 \mu\text{m}^3$  to  $6.7 \mu\text{m}^3$  volume were used to examine the characteristics of the system with and without hydrodynamic focusing. The system then was evaluated for sizing mixed bacterial populations as well as single populations. Possible applications are also discussed.



# Fluidika

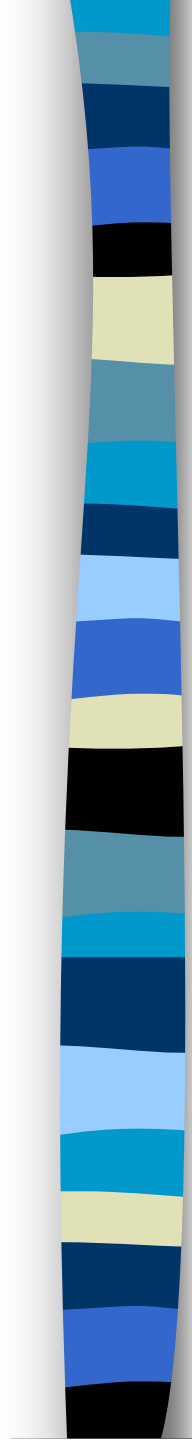
- Jak vstříkovat vzorek a regulovat rychlost proudění?
  - **Rozdílným tlakem**
  - **Volumetrickou injekcí**





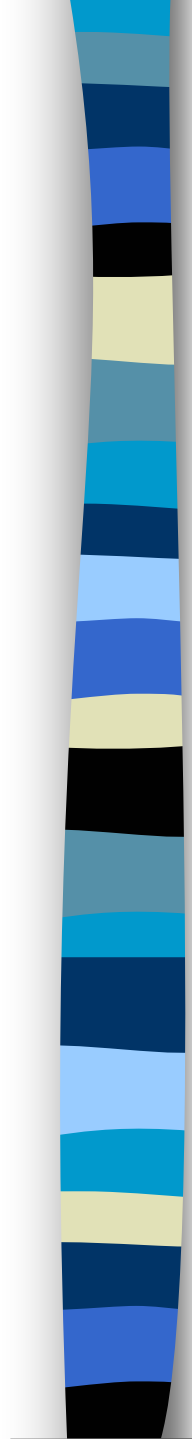
# Fluidika – systém s rozdílným tlakem

- Pomocí vzduchu se natlakuje vzorek a zásobník s nosnou kapalinou
- Pomocí tlakových regulátorů se tlak kontroluje odděleně



# Fluidika – systém s rozdílným tlakem

- Tlak nosné kapaliny určuje objem v jakém proudí
- Rozdíl v tlaku mezi nosnou kapalinou a vzorkem určuje objem proudícího vzorku
- Kontrola není úplná – změny tření mohou způsobit změny v rychlosti proudění vzorku



# Fluidika – systém s volumetrickou injekcí

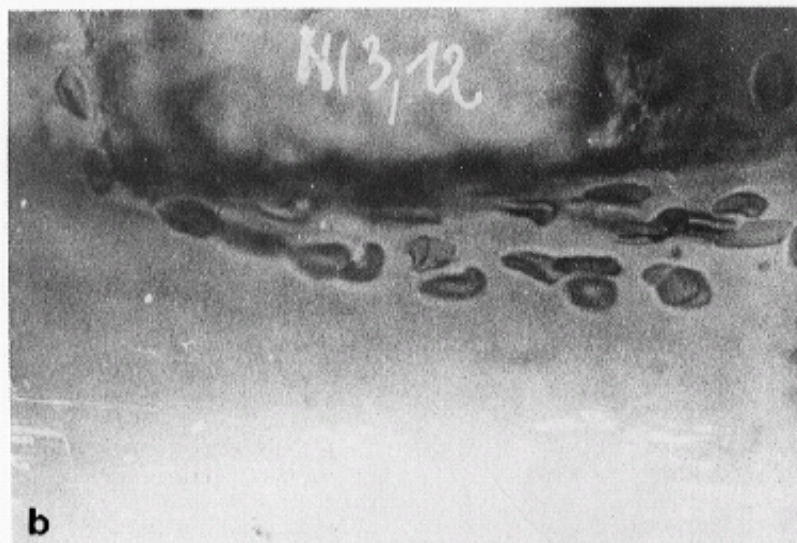
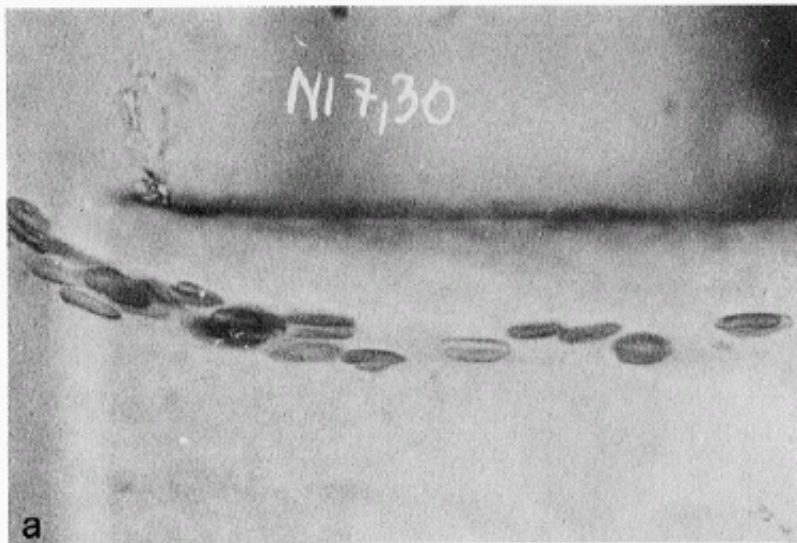
- Pomocí vzduchu tlakuje nosnou kapalinu
- Pomocí pístu injikuje vzorek
- **Objem proudícího vzorku** může být regulován rychlostí pohybu pístu
- Kontrola je úplná (za normálních podmínek)



# Fluidika – orientace a deformace částic

- Během hydrodynamického ostření jsou buňky vystaveny třecímu stresu na různých místech jejich povrchu.
- Tření způsobuje jejich orientaci delším koncem ve směru proudění.
- Stres může také způsobit jejich deformaci.

# Fluidika – orientace a deformace částic



“a: Native human erythrocytes near the margin of the core stream of a short tube (orifice). The cells are uniformly oriented and elongated by the hydrodynamic forces of the inlet flow.

b: In the turbulent flow near the tube wall, the cells are deformed and disoriented in a very individual way.  $v > 3$  m/s.”

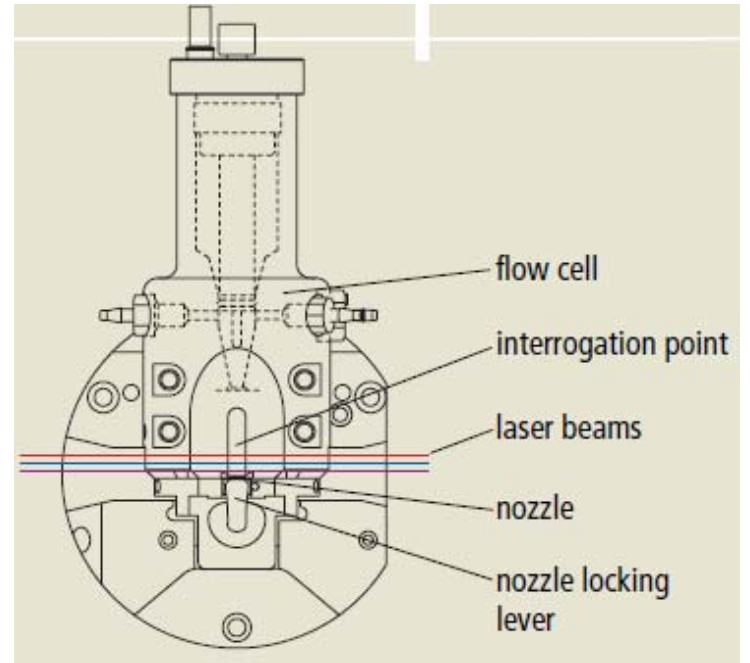
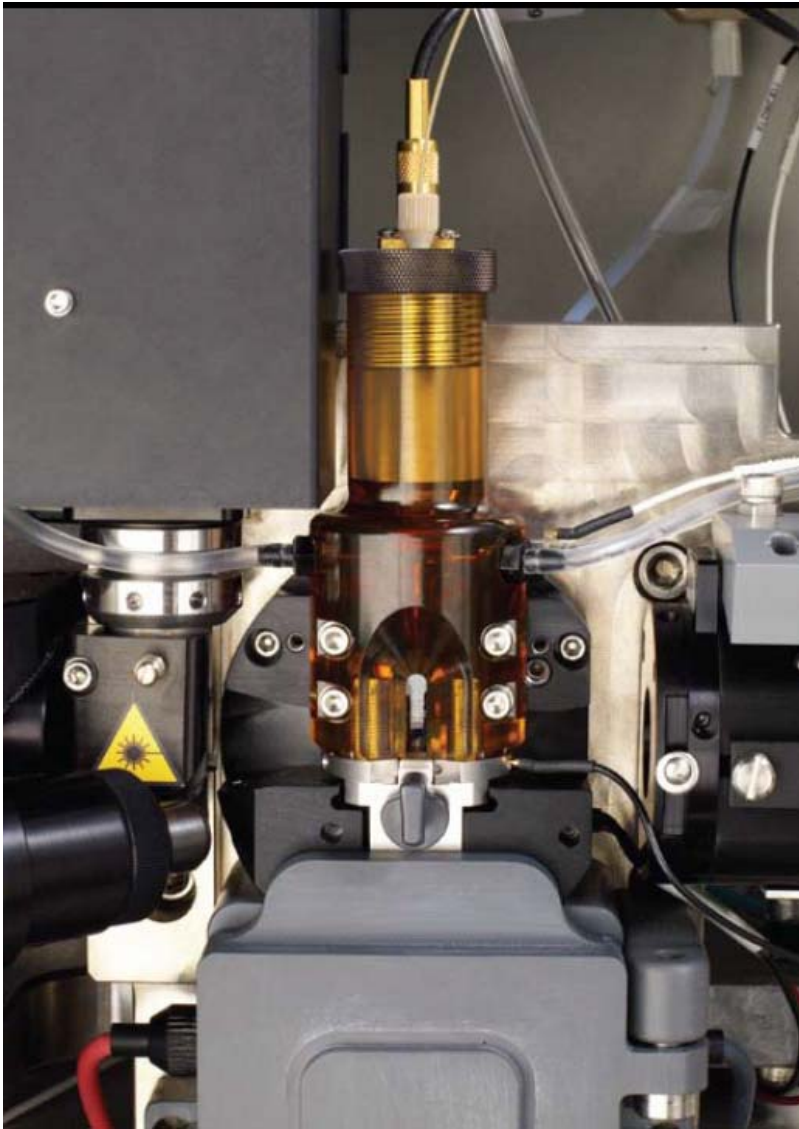
Image from V. Kachel, et al. – **Melamed**  
Chapt. 3



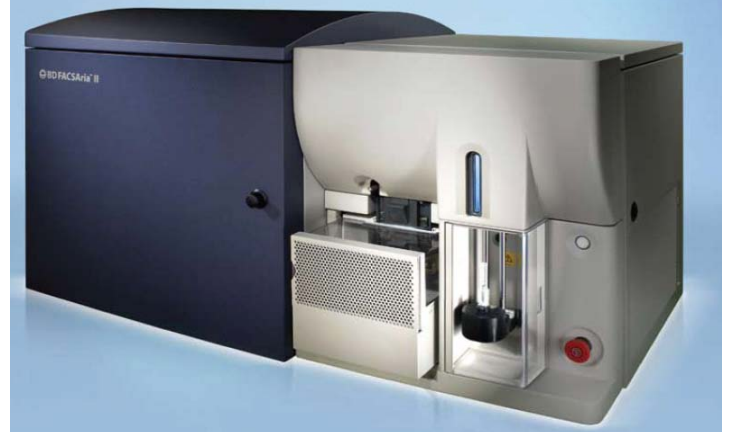
# Fluidika – průtokové komory

## ■ Průtokové komory

- Určují osu a velikost průtoku nosné kapaliny a vzorku
- Vymezují místo pro hydrodynamické zaostření
- Slouží také jako místo kde dochází k ozáření buněk zdrojem světla



## BD FACSAria II





# Fluidika – průtokové komory

## Základní typy průtokových komor

### – **Jet-in-air**

- Nejlepší pro sortování, horší optické vlastnosti

### – **Flow-through cuvette**

- Výborné optické vlastnosti, může být použita pro sortování

### – **Closed cross flow**

- Nejlepší optické charakteristiky, nelze sortovat

### – **Open flow across surface**

- Nejlepší optické charakteristiky, nelze sortovat





A



B



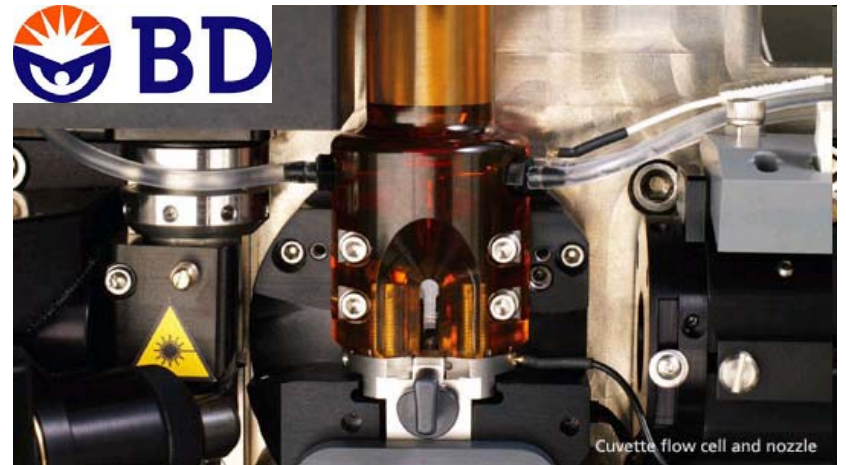
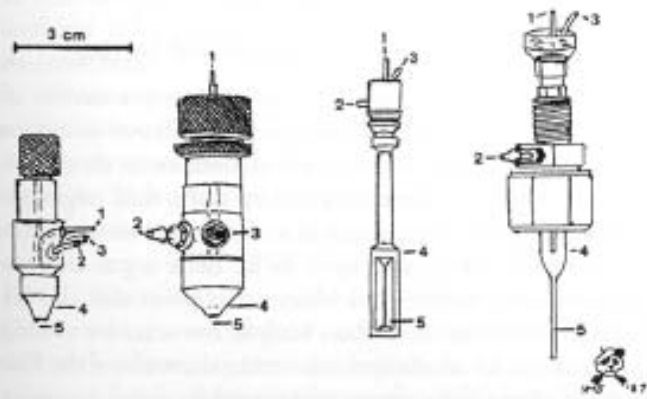
C



D

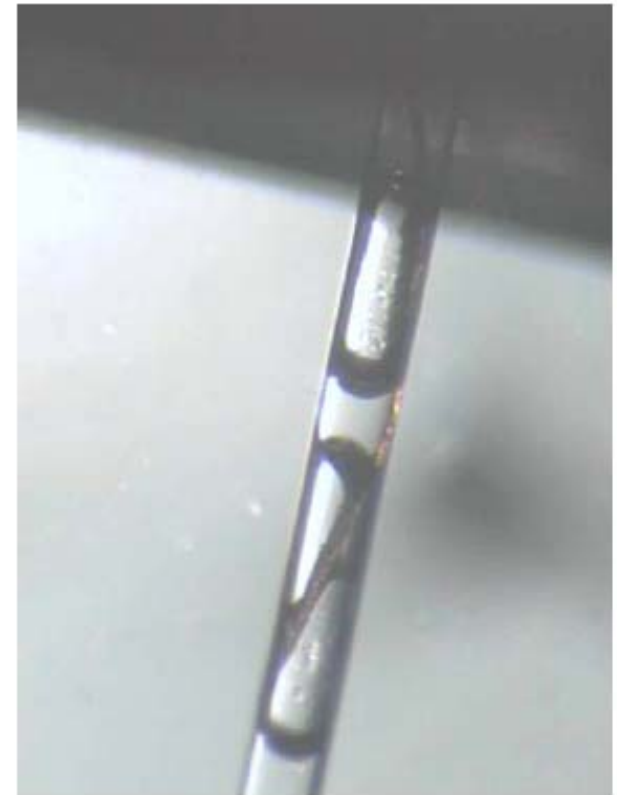


E



Cuvette flow cell and nozzle

# Zanesení průtokové komory



Lidský vlas zablokuje komoru a kompletně naruší kvalitu proudění.



# Fluidika - shrnutí

- Průtok musí být laminární (Reynoldovo #)
  - $R_e < 2300$ , flow je vždy **laminární**
- Vzorky mohou být injikovány a nebo proudit na základě rozdílných tlaků
- Existuje mnoho typů průtokových komor
- Pro přesnost měření je nutné odstranit a zabránit ucpání komory



## Fluidika – shrnutí 2

- tlak nosné (oplašťující) kapaliny vede pufr kyvetou a vyšší tlak ve zkumavce se vzorkem zavádí vzorek do kyvety.
- Princip hydrodynamického zaostření zároveň buňky v kyvetě „jako perly na šňůrce“ předtím než dojdou do bodu kde protnout paprsek laseru.
- Hydrodynamické zaostření nemůže oddělit buněčné agregáty. Průtoková cytometrie vyžaduje suspenzi jednotlivých buněk!

# Shrnutí přednášky

- Světlo
- Fluorescence
- Zdroje světla a optické systémy průtokového cytometru
- Fluidní systémy

## Na konci dnešní přednášky by jste měli:

1. znát základní principy rozptylu světla a
2. fluorescence;
3. vědět jaké zdroje světla se využívají v průtokové cytometrii;
4. a jakým způsobem je detekováno;
5. znát základní principy fluidních systémů a laminárního proudění.

# Bi9393 Analytická cytometrie

## Lekce 3

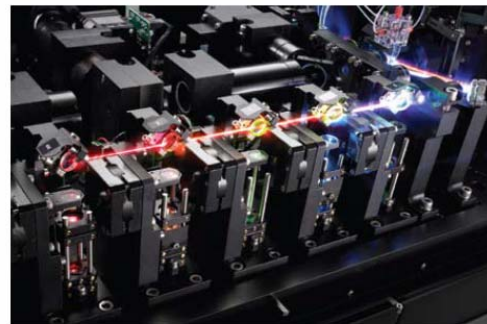


**Karel Souček, Ph.D.**

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

# Image Stream & Flowsight Amnis – kombinace průtokové cytometrie a analýzy obrazu

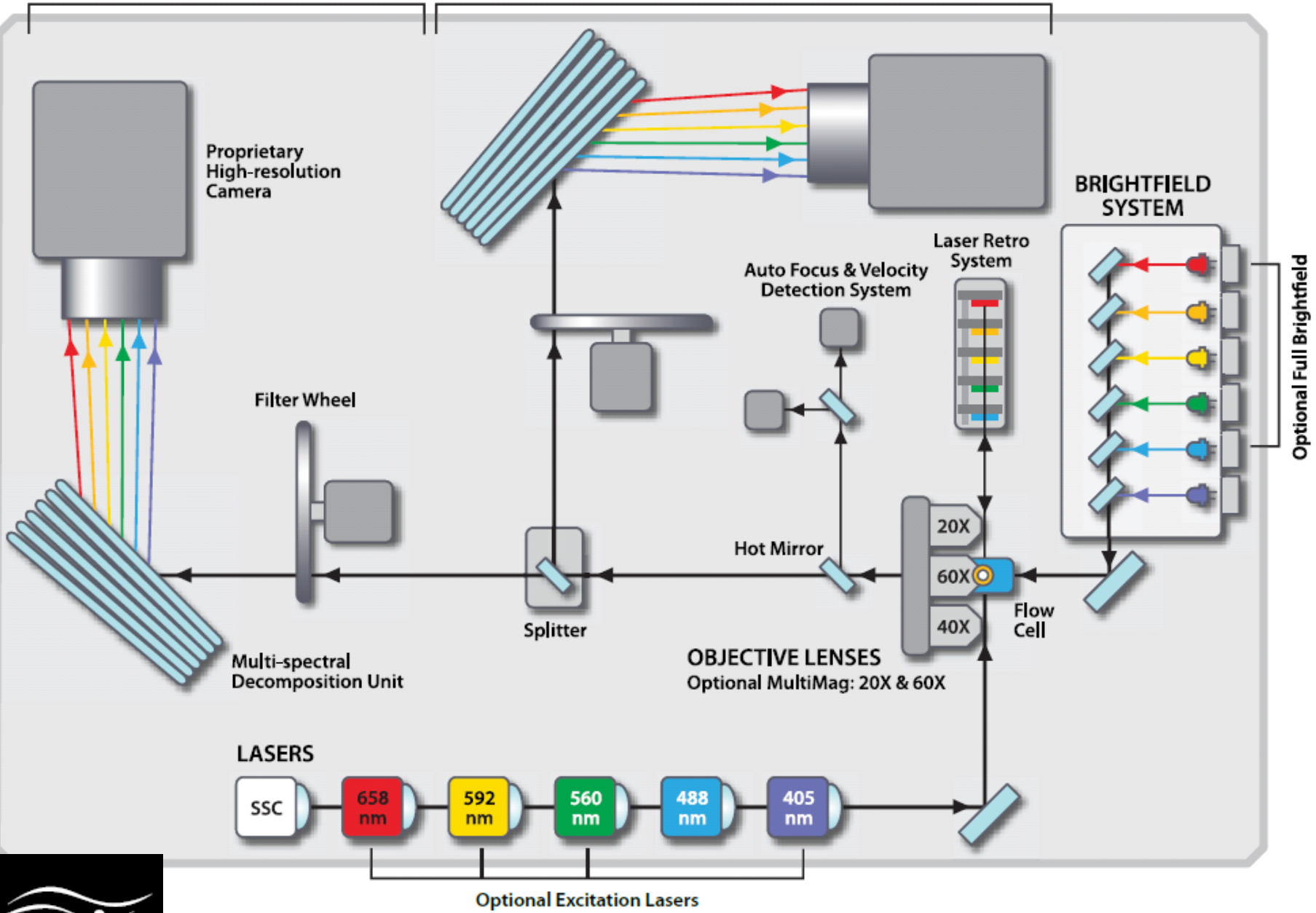


# STANDARD COLLECTION SYSTEM

Image Channels: 1-6

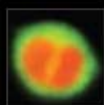
# OPTIONAL COLLECTION SYSTEM

Image Channels: 7-12





# Amnis - aplikace



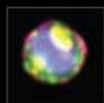
Cell Signaling



DNA Damage and Repair



Cell Death



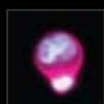
Co-localization



Cell Cycle and Mitosis



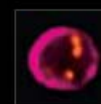
Parasitology



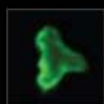
Cell-Cell Interactions



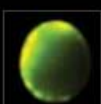
Autophagy



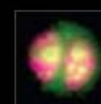
Microbiology



Morphology



Targeted Immunotherapy



Oncology



Internalization



Stem Cell Differentiation



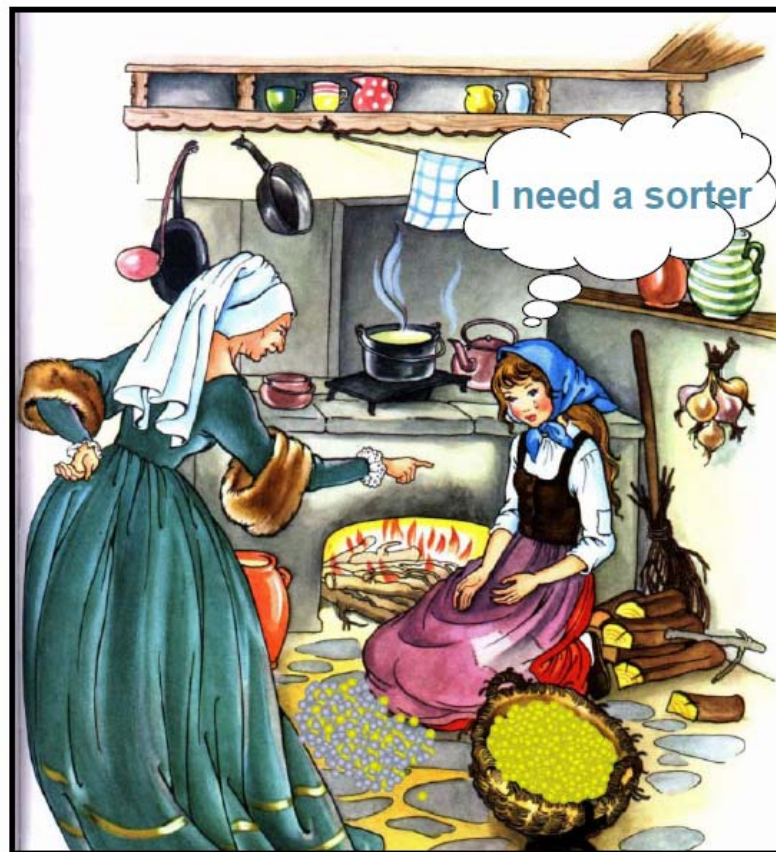
Oceanography

 amnis



# Principy průtokové cytometrie a sortování

- sorting
- zpracování signálu
- analýza dat
- kompenzace signálu



Doležel (1999)

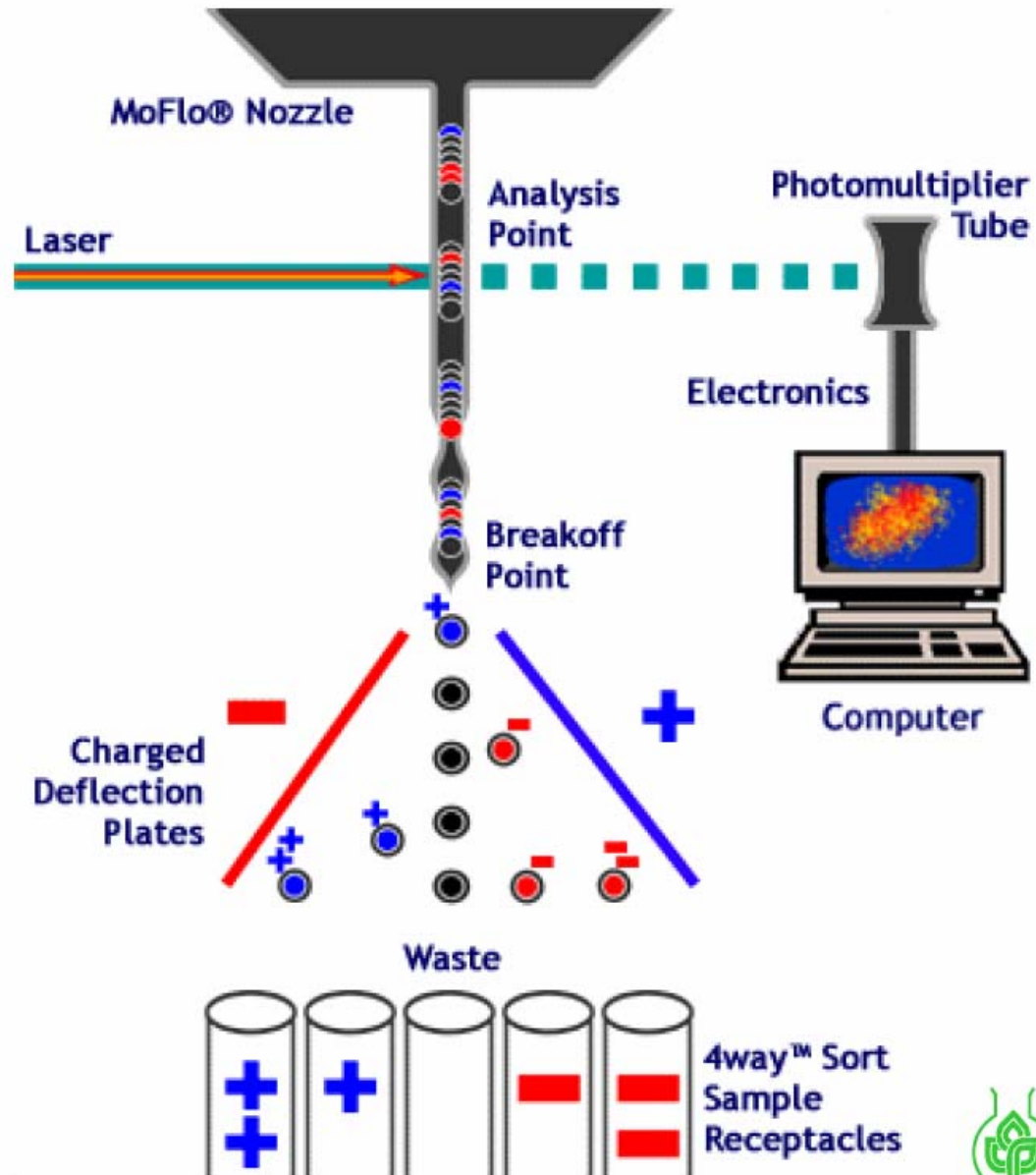


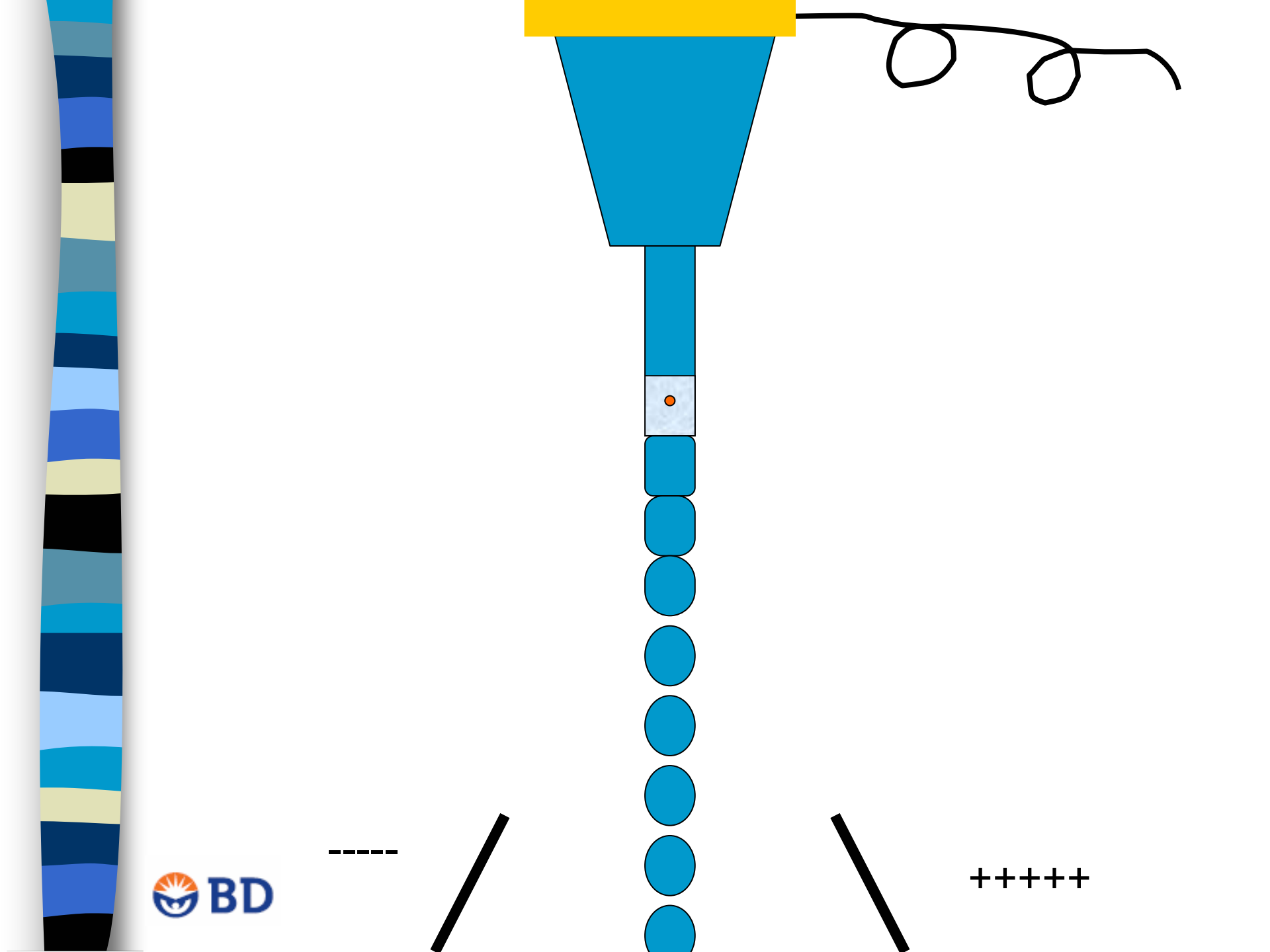
# ELECTROSTATIC DROPLET SORTER

- 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)

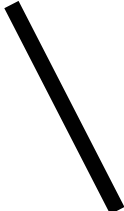


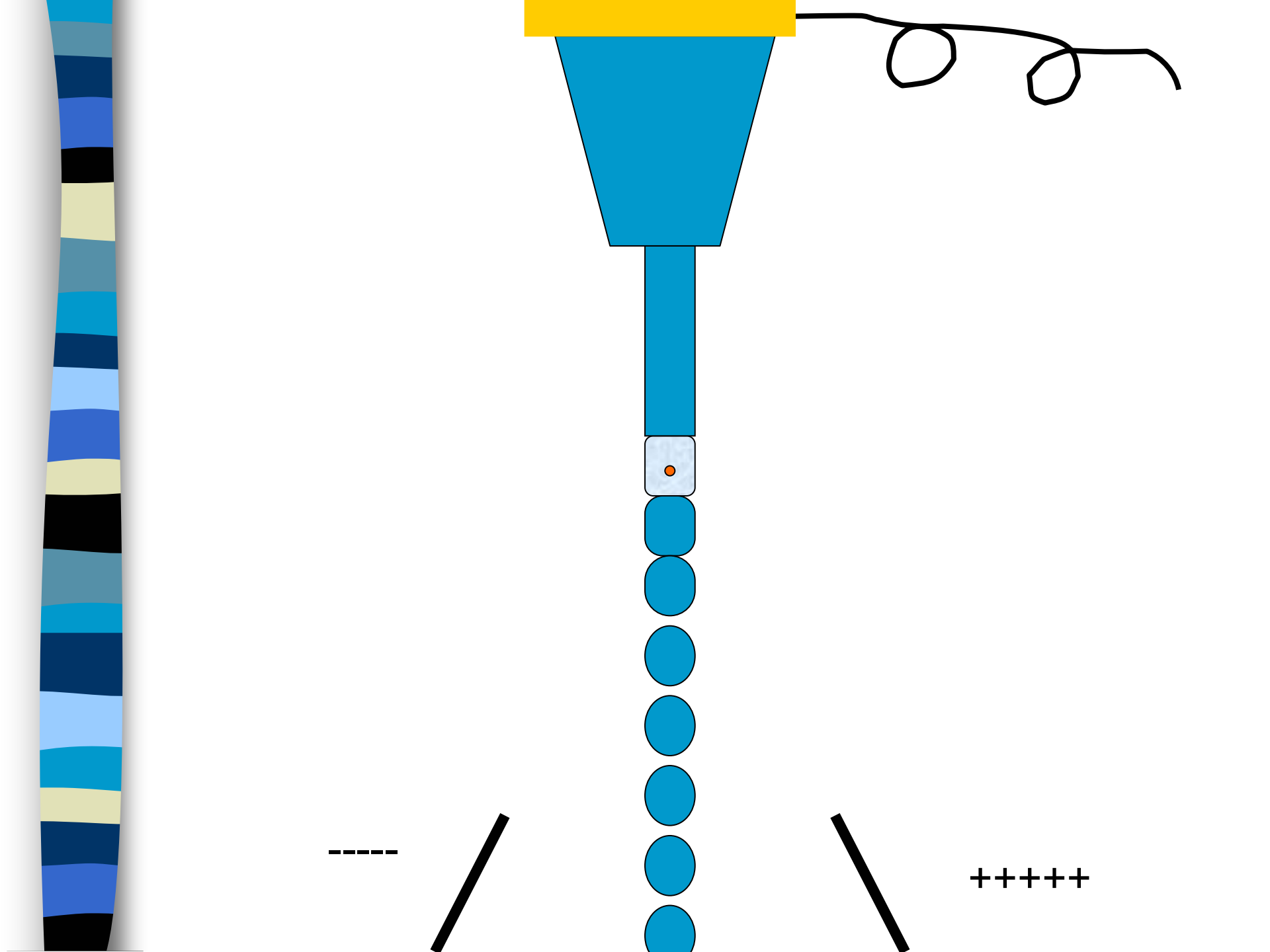


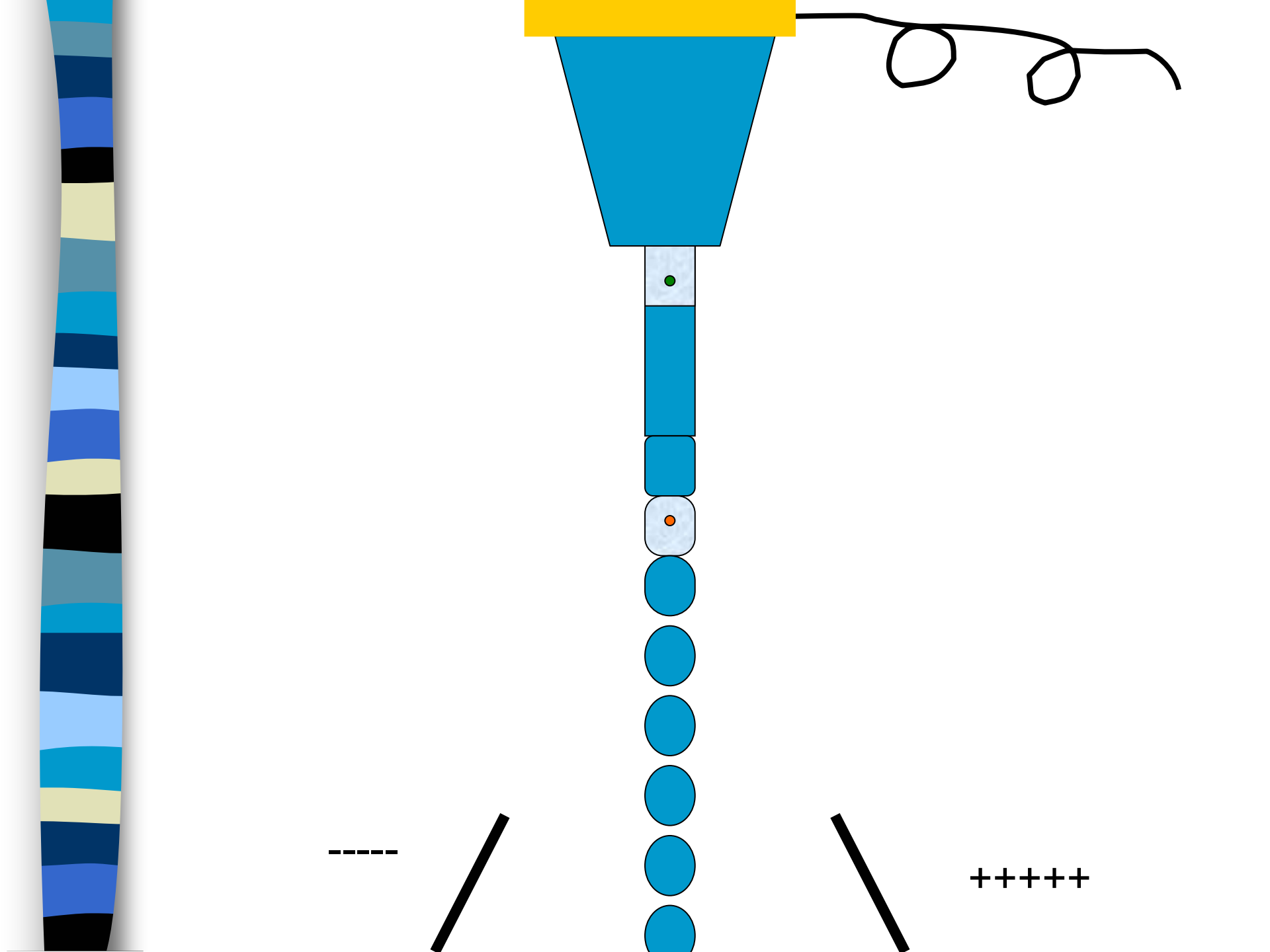
-----

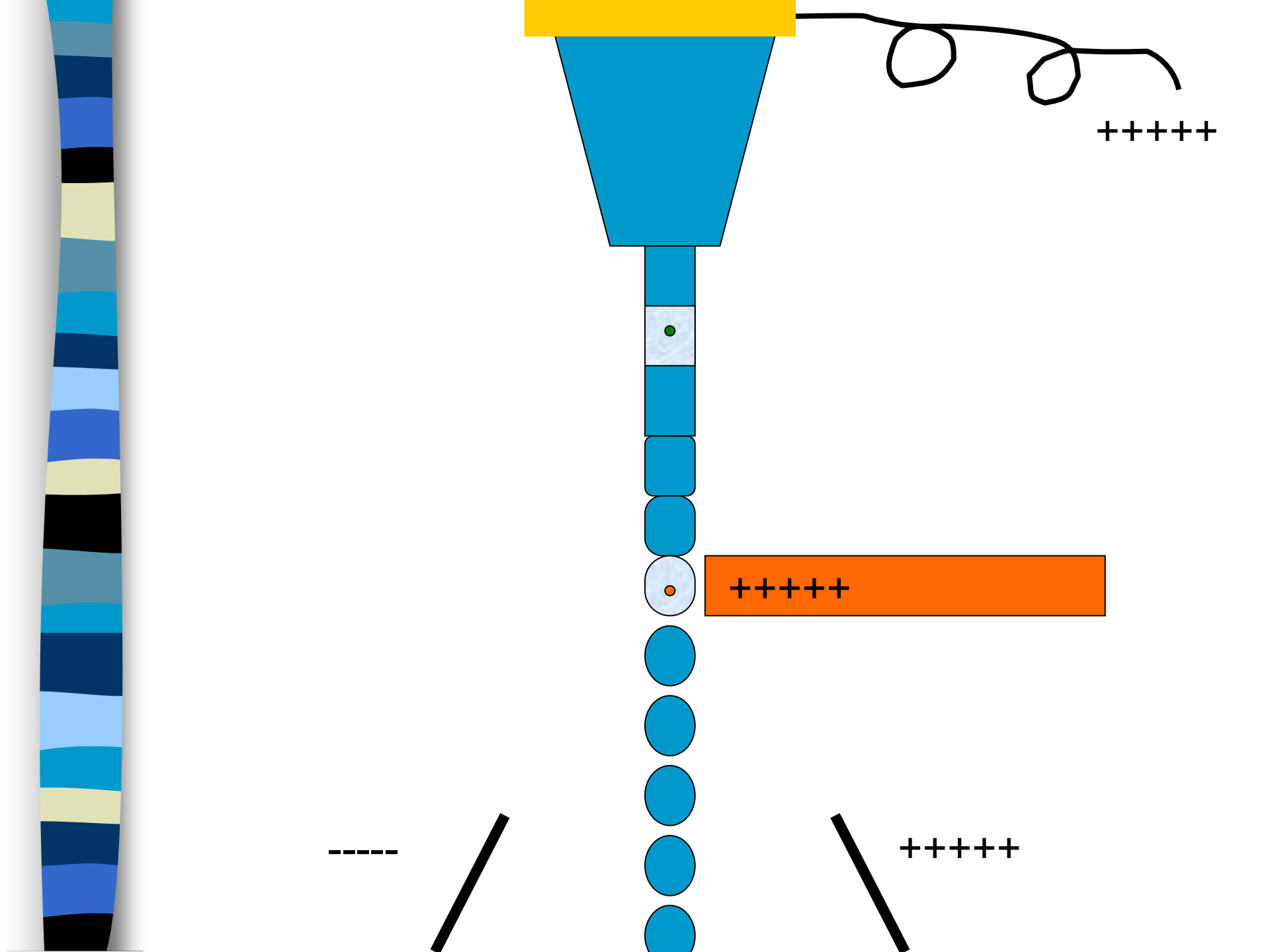


+++++

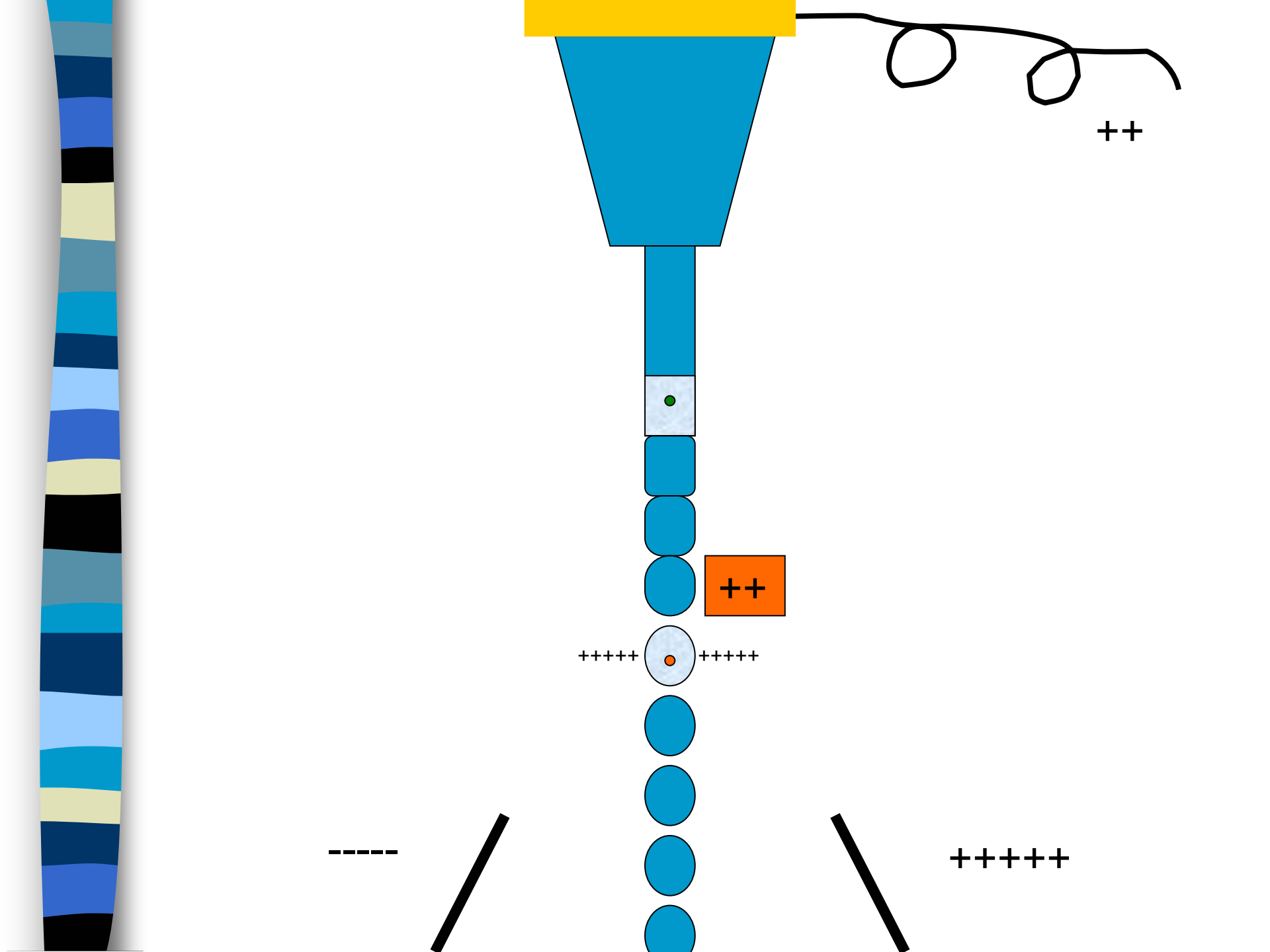


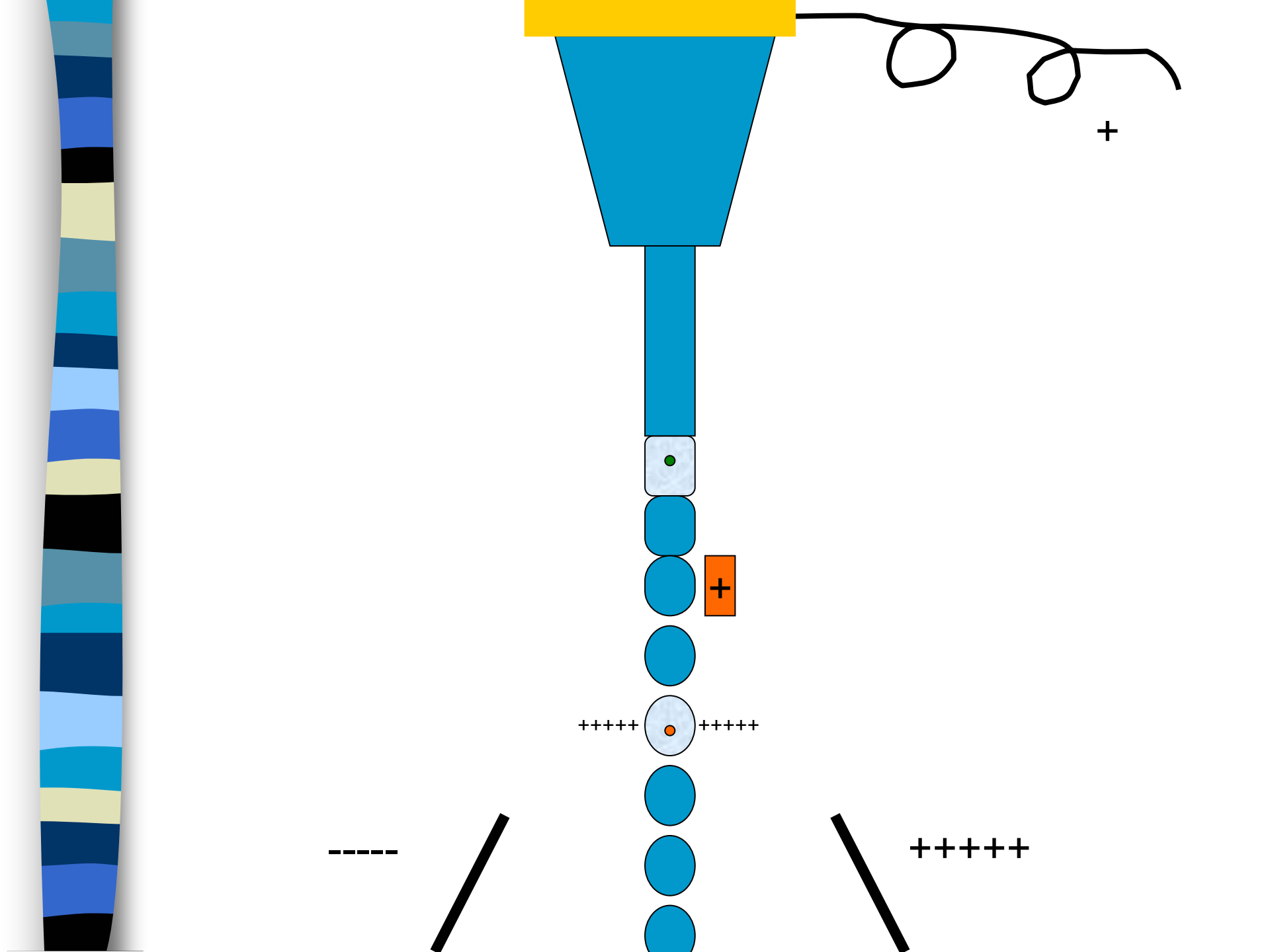


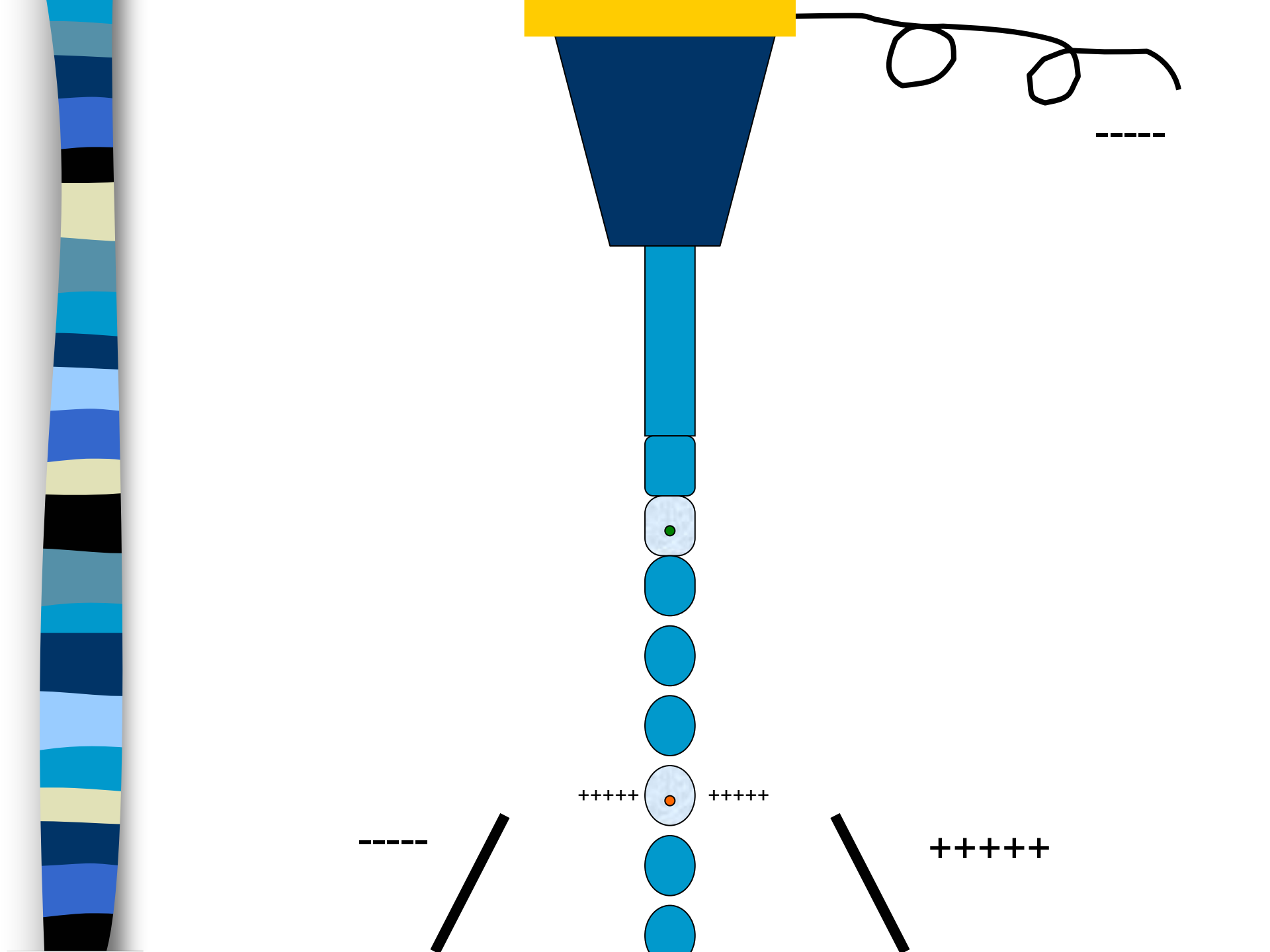




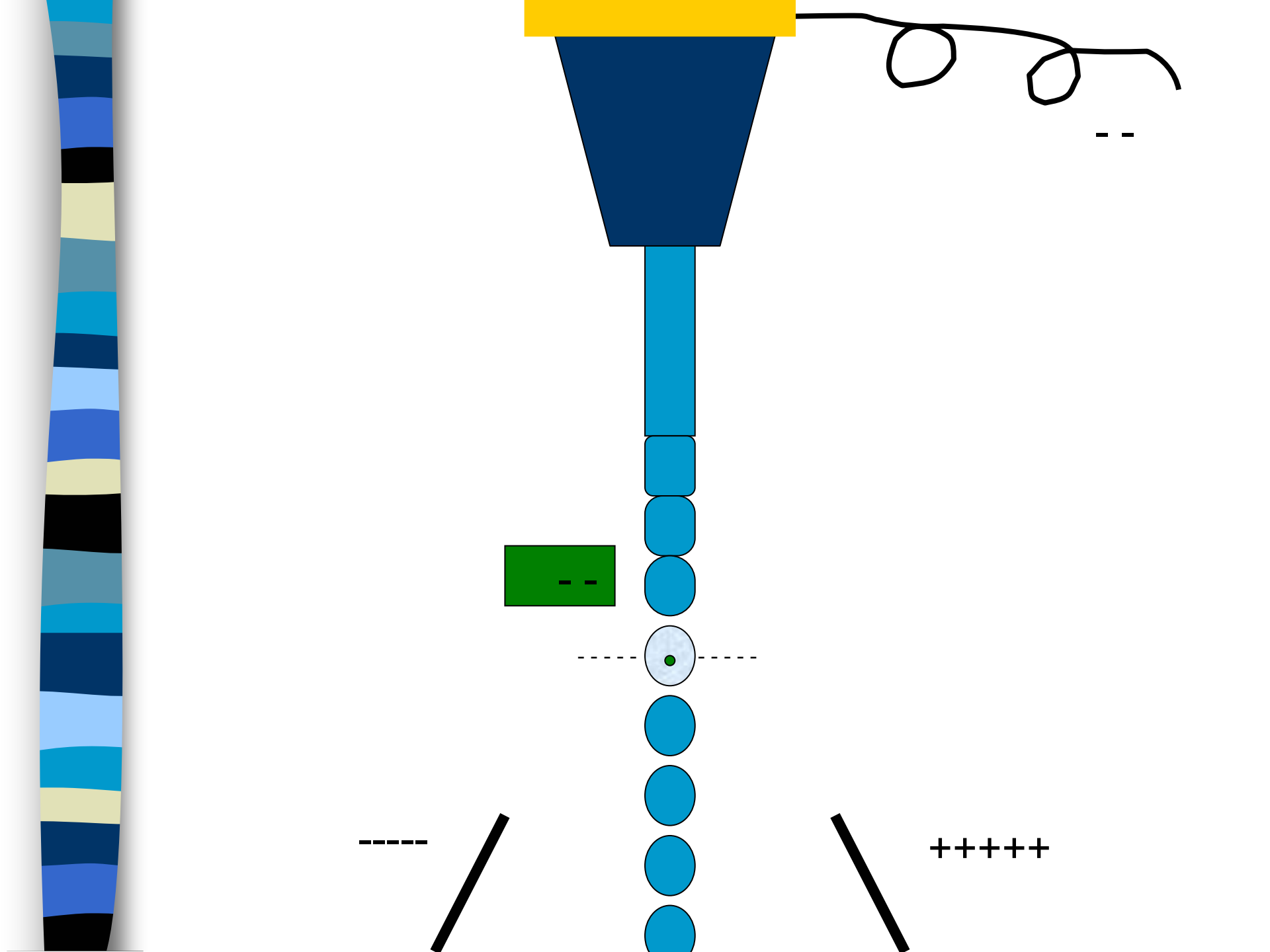


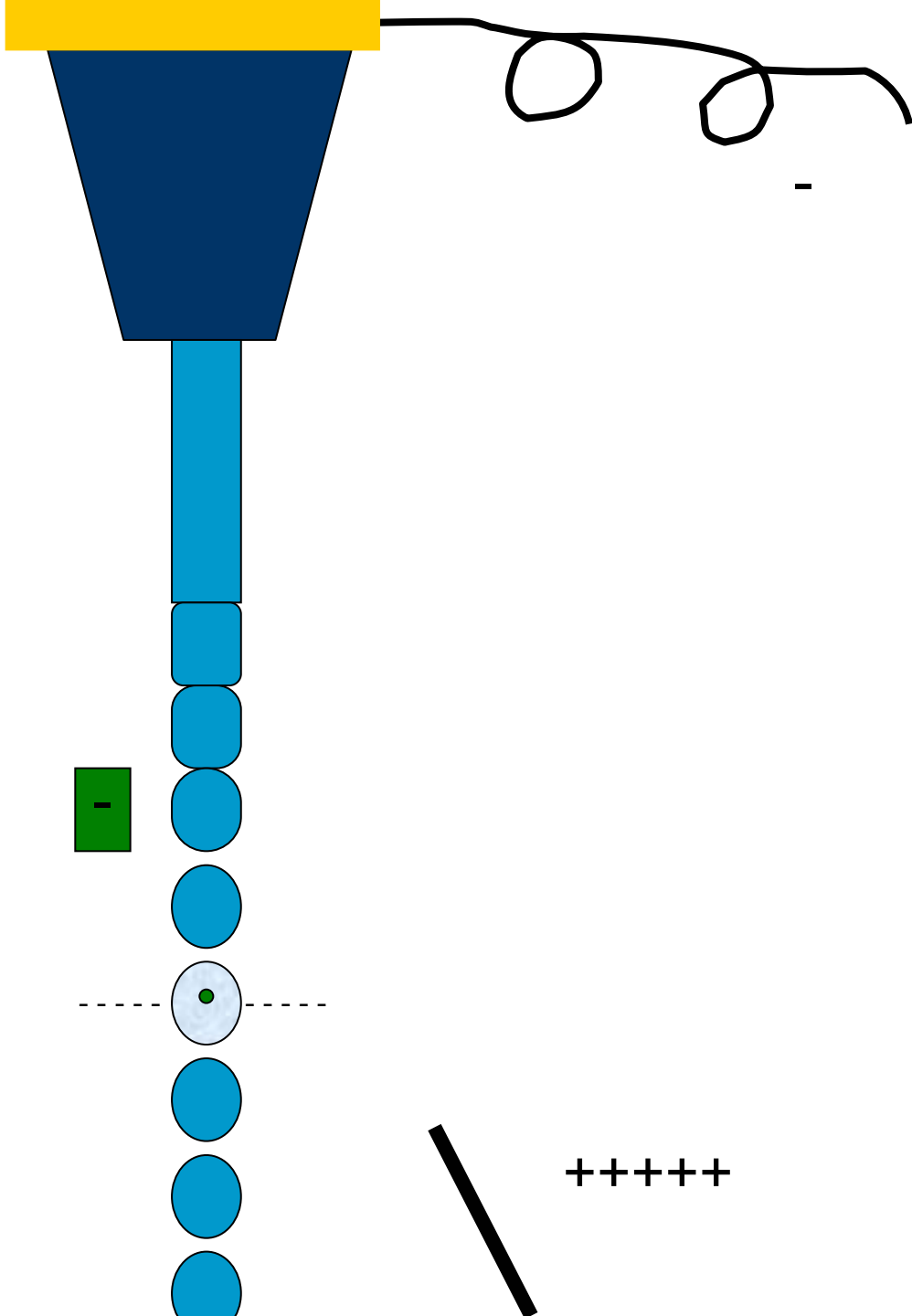
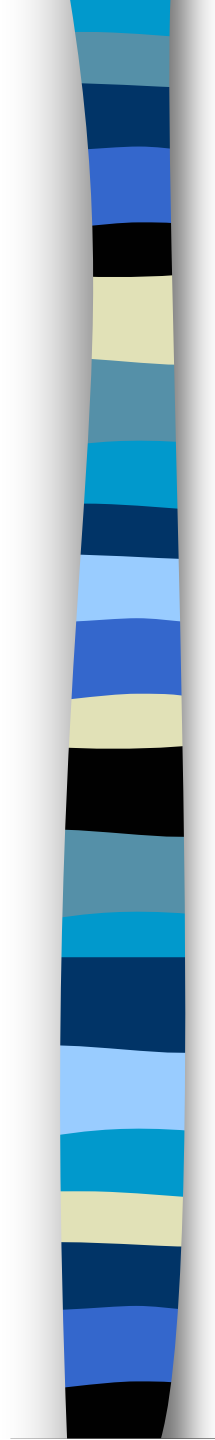


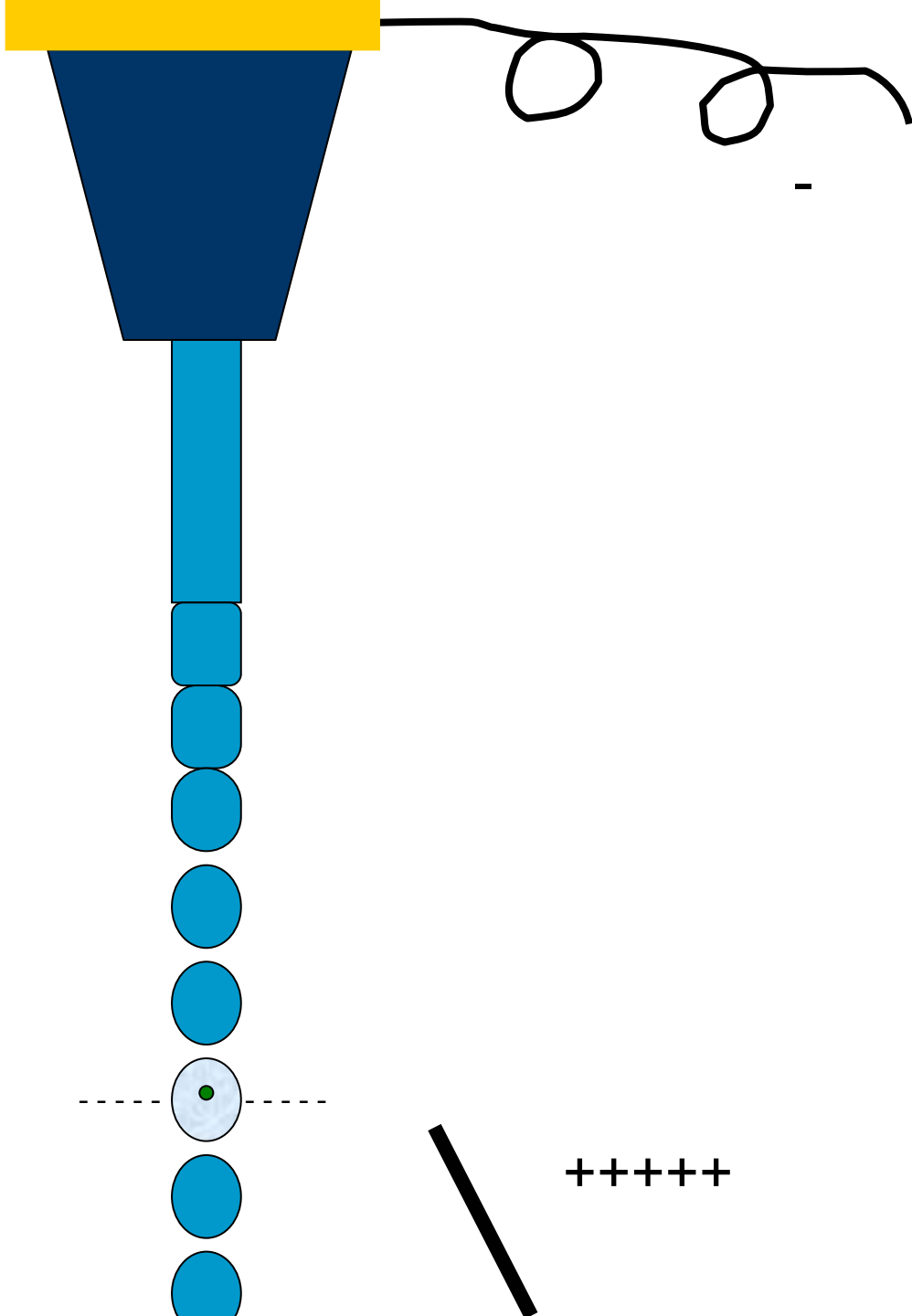
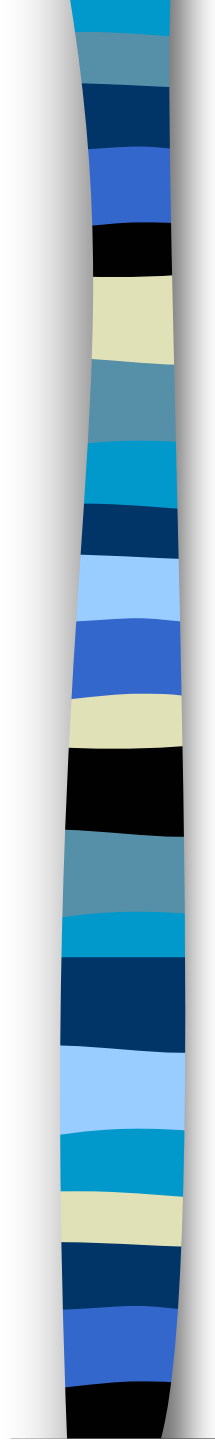


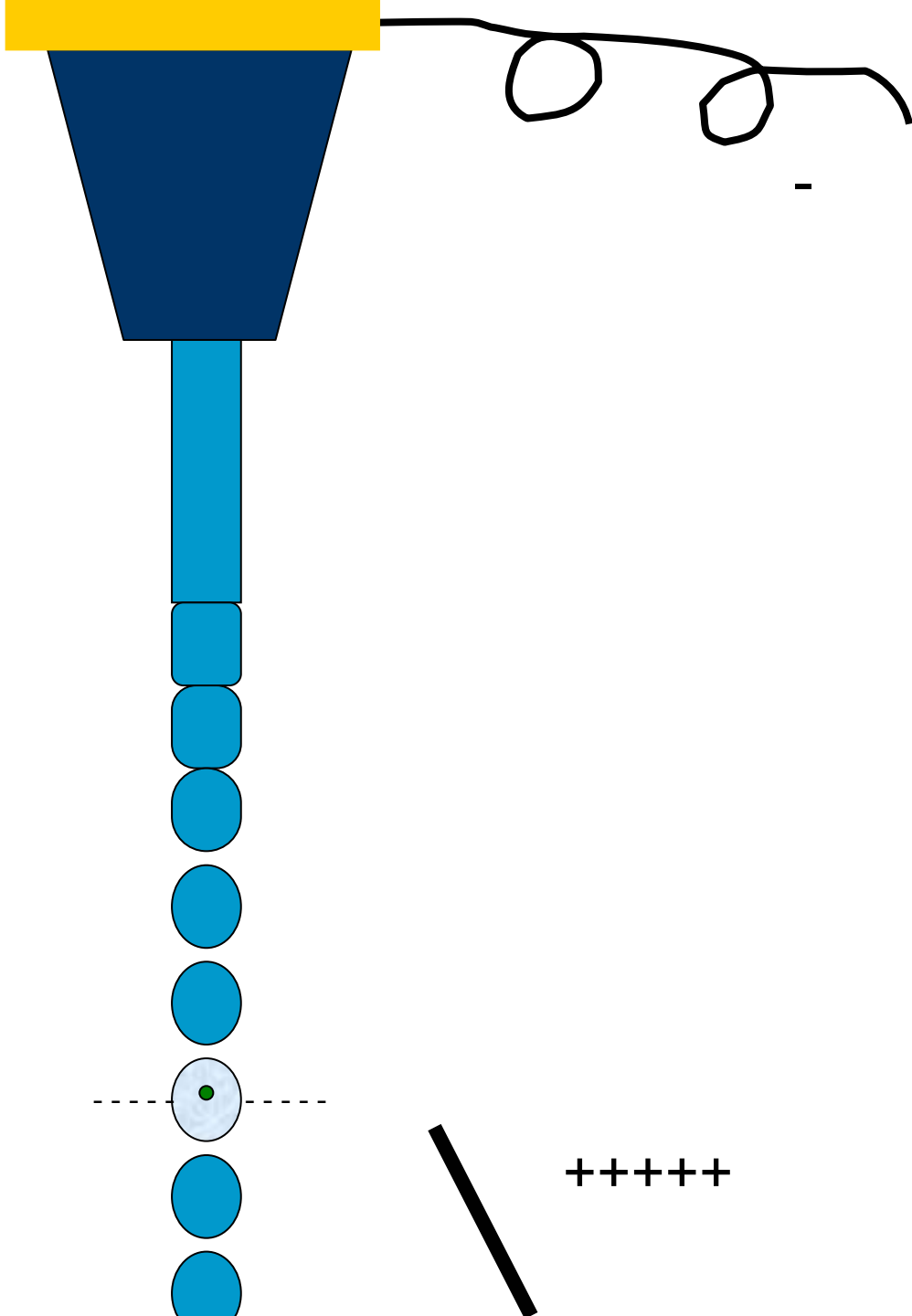
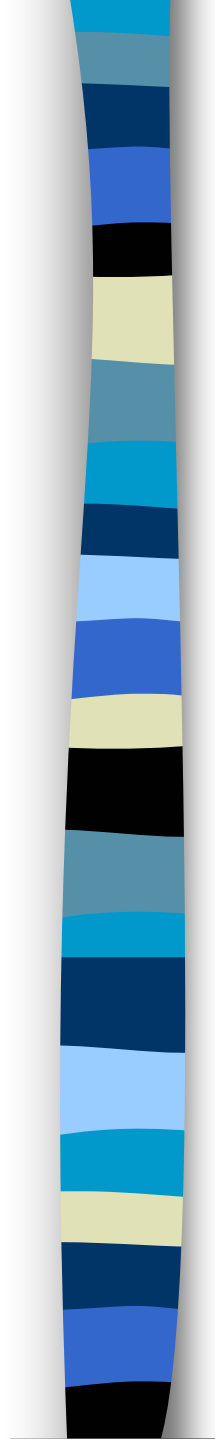




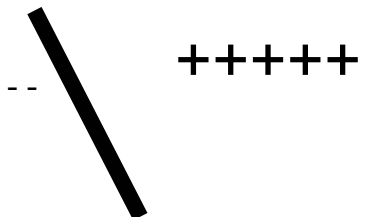
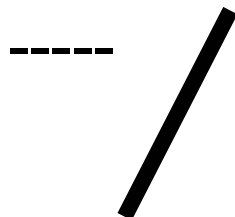
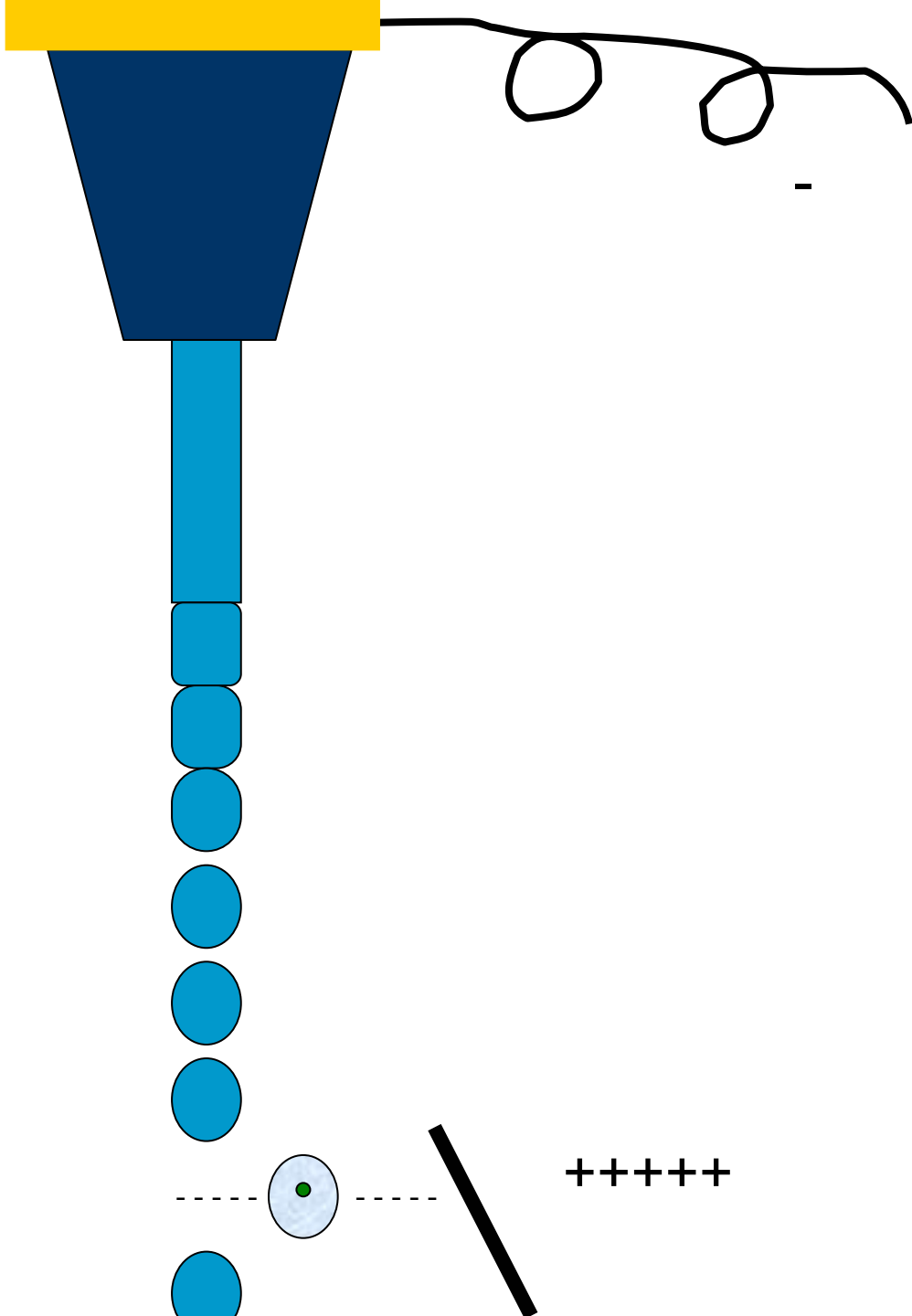
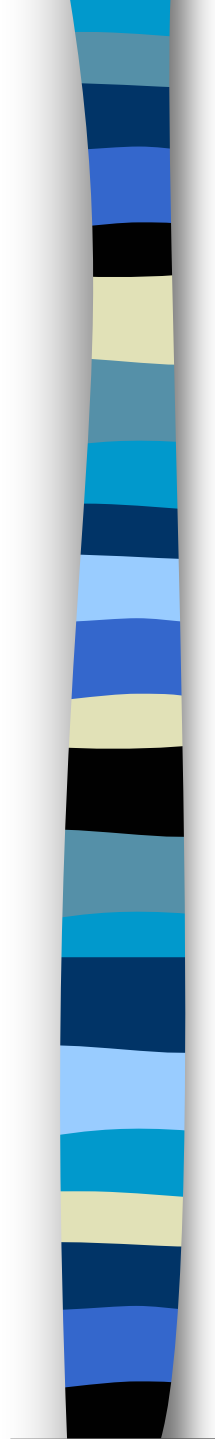










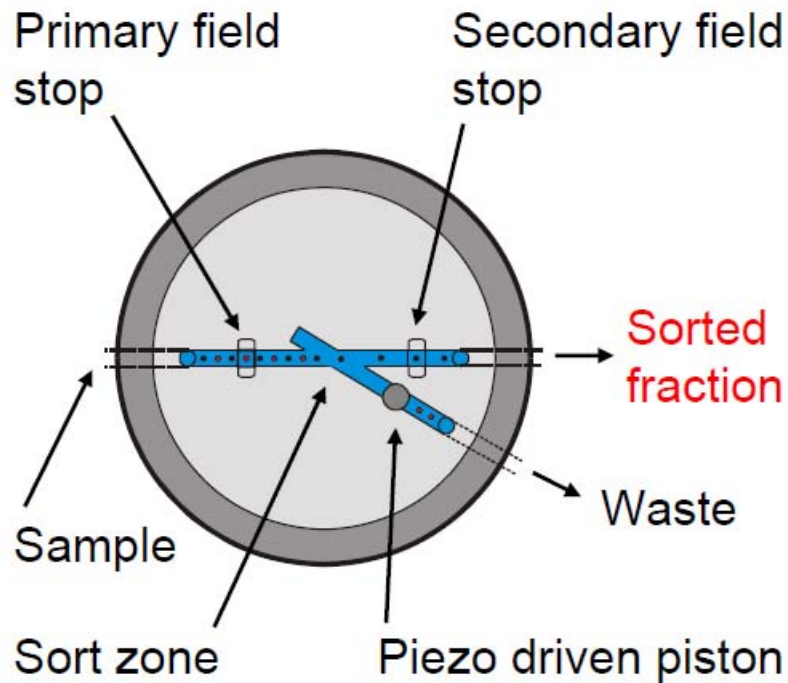


# ISAC presents: Mack Fulwyler - Innovator, Inventor & Pioneer

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



# FLUIDIC SWITCH SORTER

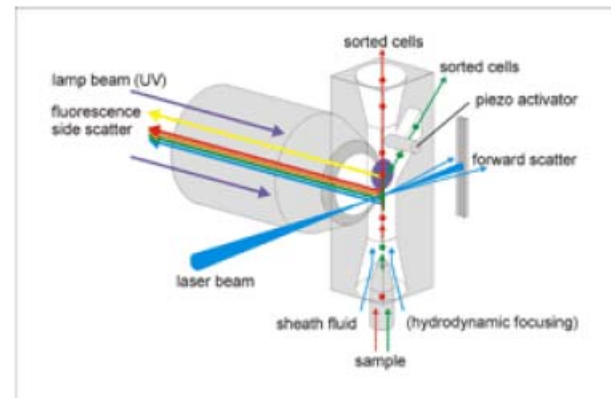
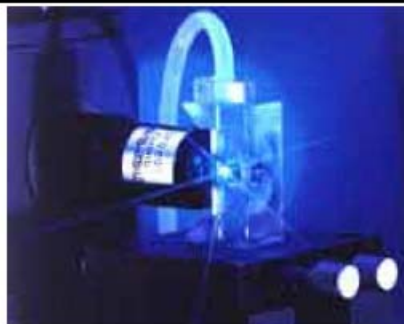


- Safety (enclosed stream)
- Gentle to cells
- Sorting of large particles (>100  $\mu\text{m}$ )

Low speed (~100/sec)

- Dilute sorted fraction
- Noisy

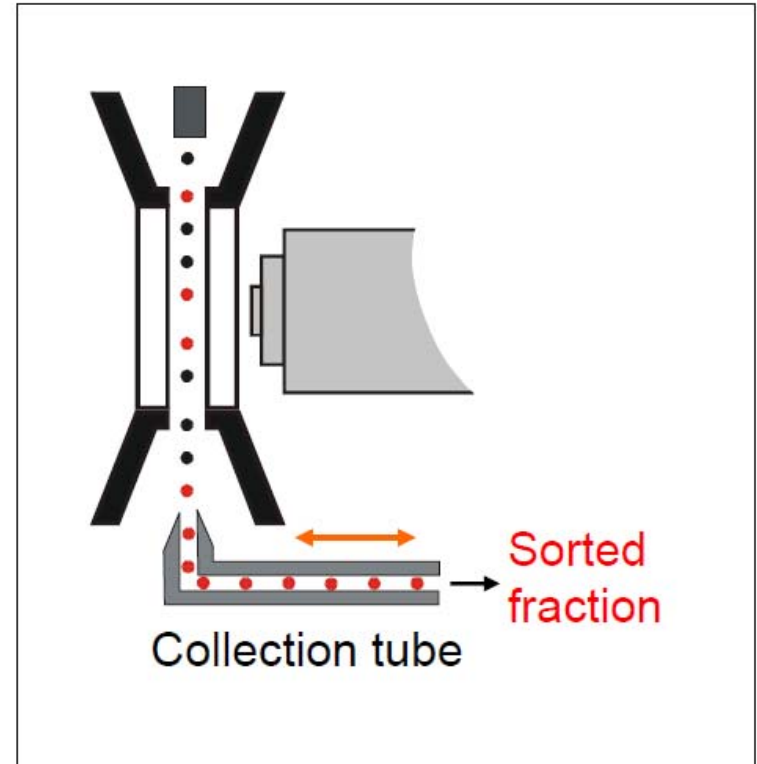
Used by: Partec



# FLUIDIC SWITCH SORTER

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

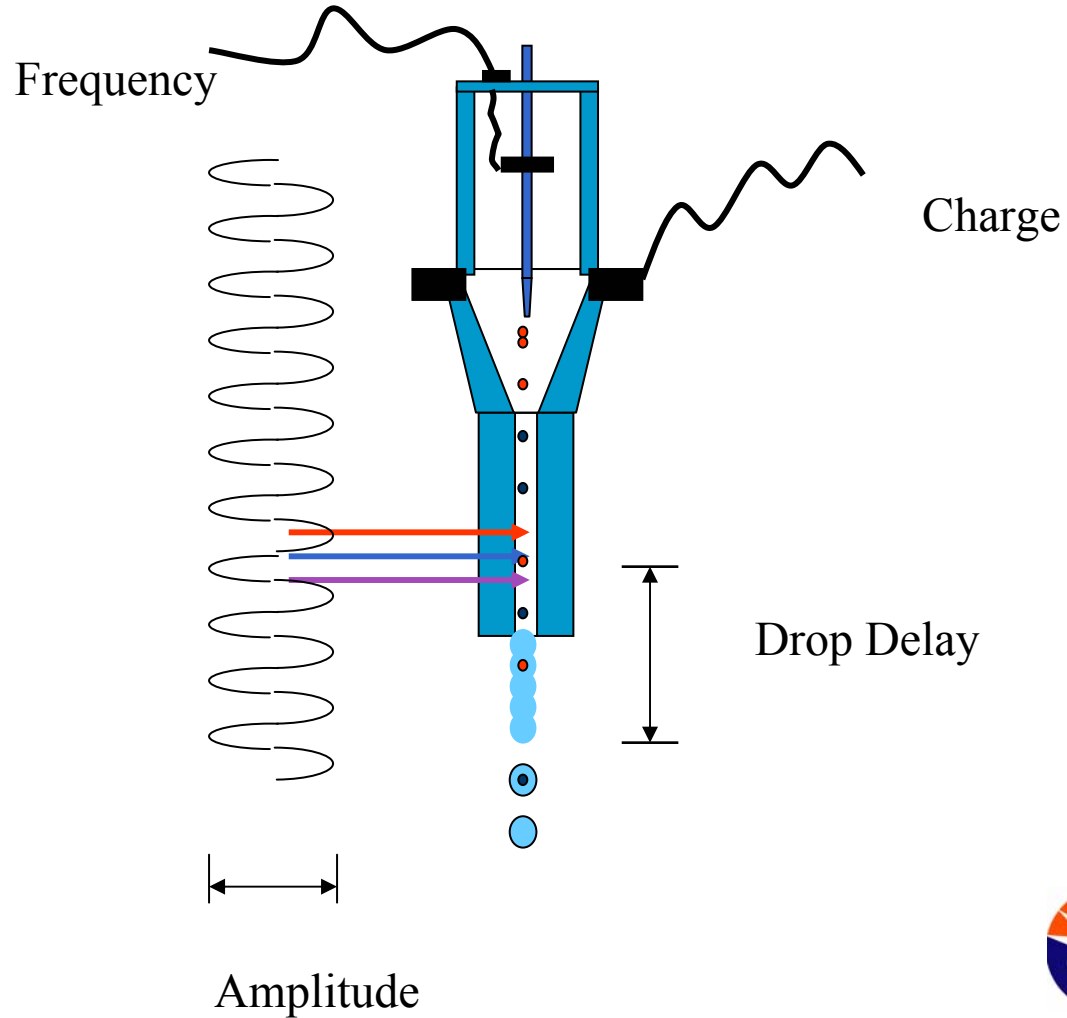
Used by: Becton Dickinson



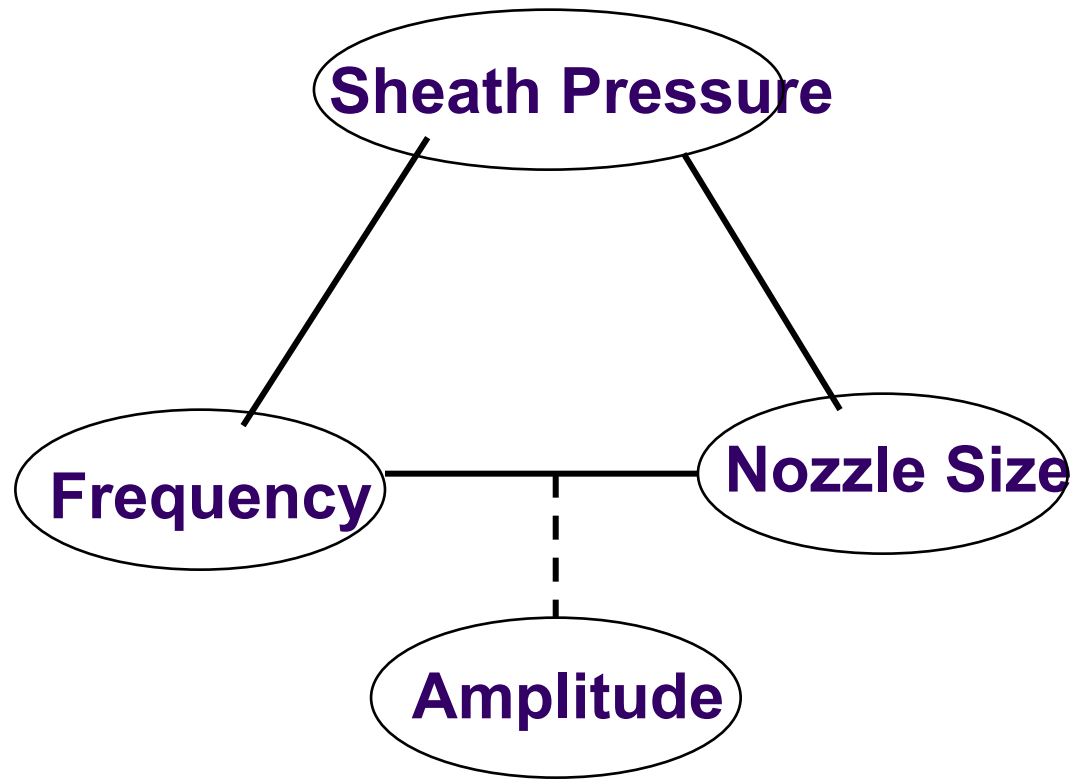
# *SORTING*



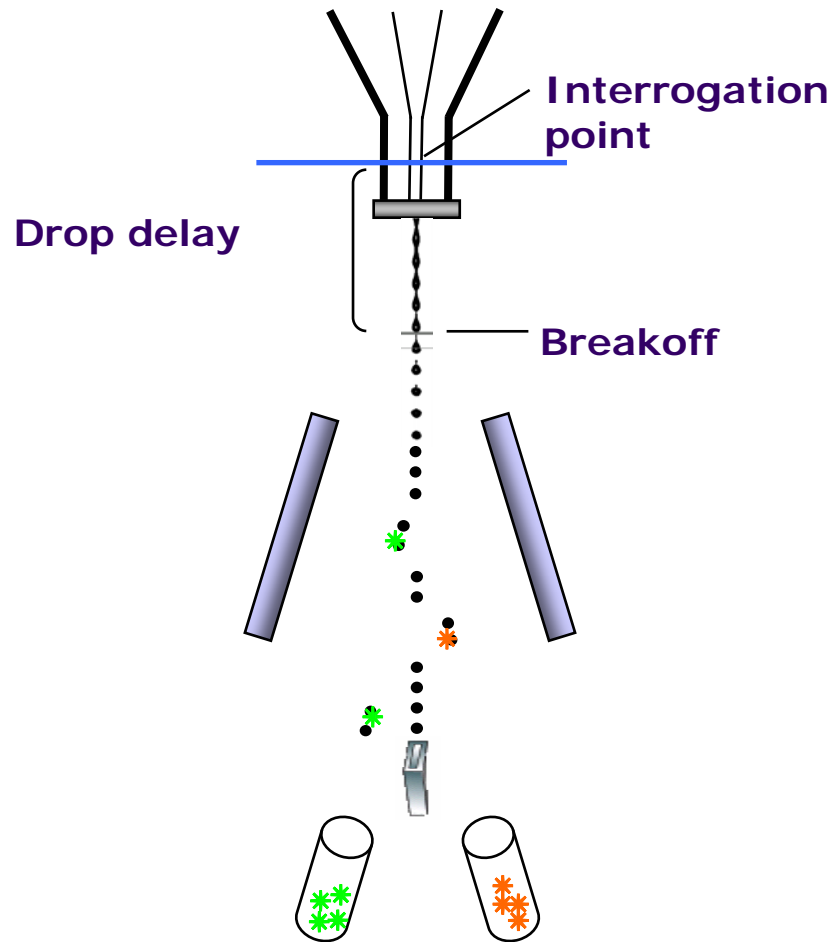
# *SORTING*



# ***SORTING***

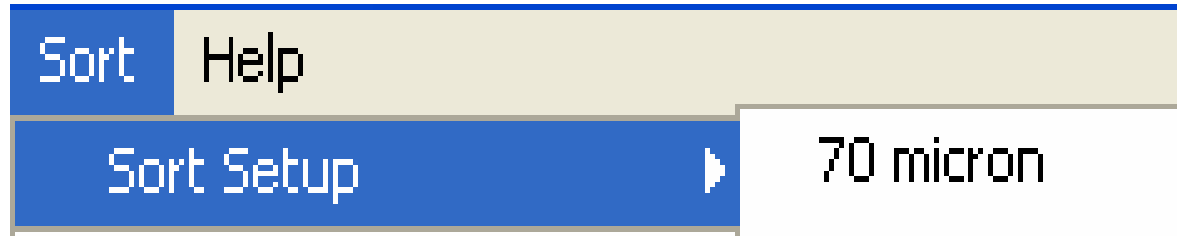


# *SORTING*





# *SORTING*



Sort Setup mode	Default Sheath Pressure
70 micron 70 custom	70 psi
85 micron 85 custom	45 psi
100 micron 100 custom	20 psi
130 micron 130 custom	10 psi

- 70 micron
- 85 micron
- 100 micron
- 130 micron
- 70 custom
- 85 custom
- 100 custom
- 130 custom



# ***SORTING***

**Each sort setup includes:**

**Sheath pressure**

**Breakoff window values**

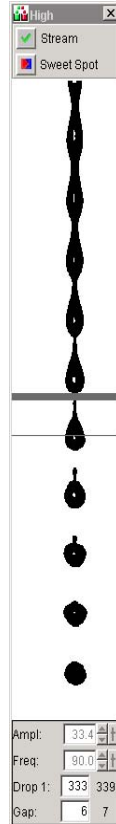
**Side Stream window values**

**Table 3-2** Default Sort Setup values

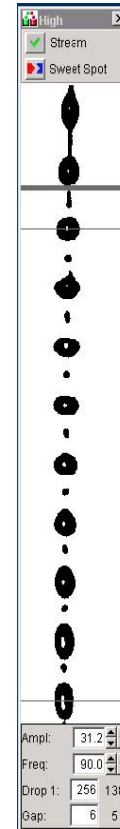
<b>Setting</b>	<b>70 micron</b>	<b>85 micron</b>	<b>100 micron</b>	<b>130 micron</b>
Sheath Pressure	70	45	20	10
Amplitude	60	32	12	24
Frequency	87	47	30	12
Drop 1	150	150	150	150
Gap (upper limit)	6 (14)	7 (17)	10 (21)	12 (21)
Attenuation	Off	Off	Off	Off
Drop Delay	47.00	30.00	27.00	16.00
Far left voltage	100	100	80	60



# *SORTING - Streams*

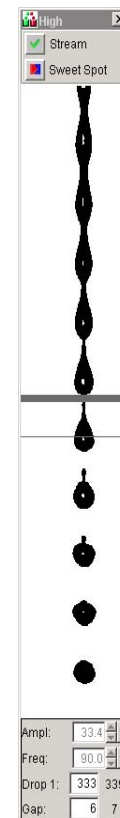
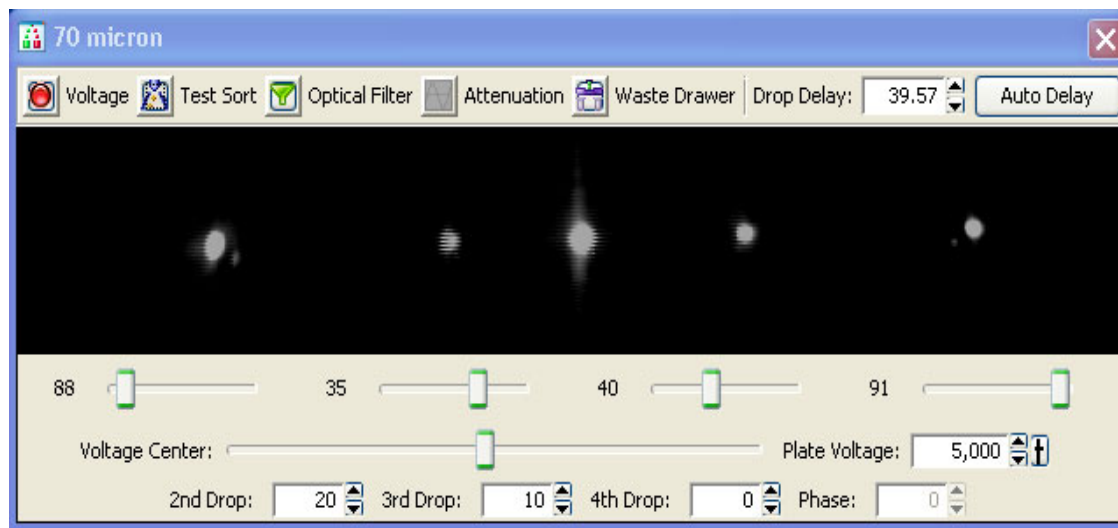


Good



Bad

# *SORTING - Setup Side Streams*

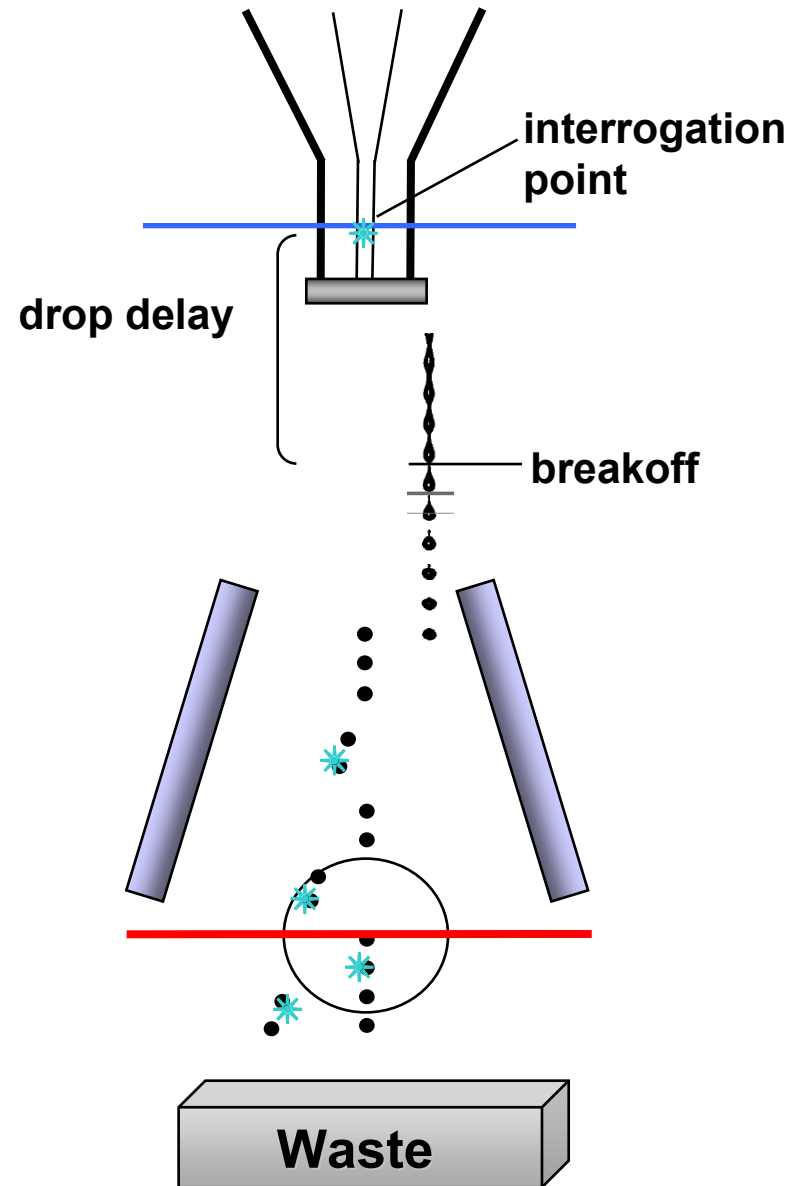


# Drop Delay

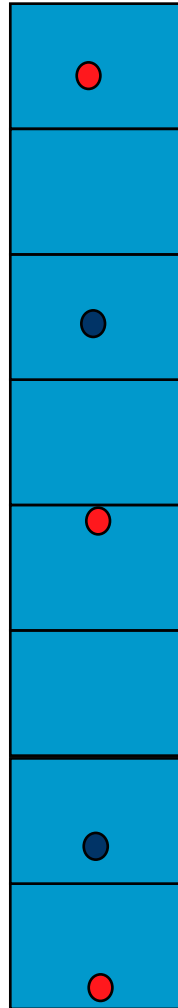
BD FACS™

Accudrop  
technology

- Accudrop beads
- Diode laser
- Camera
- Optical filter

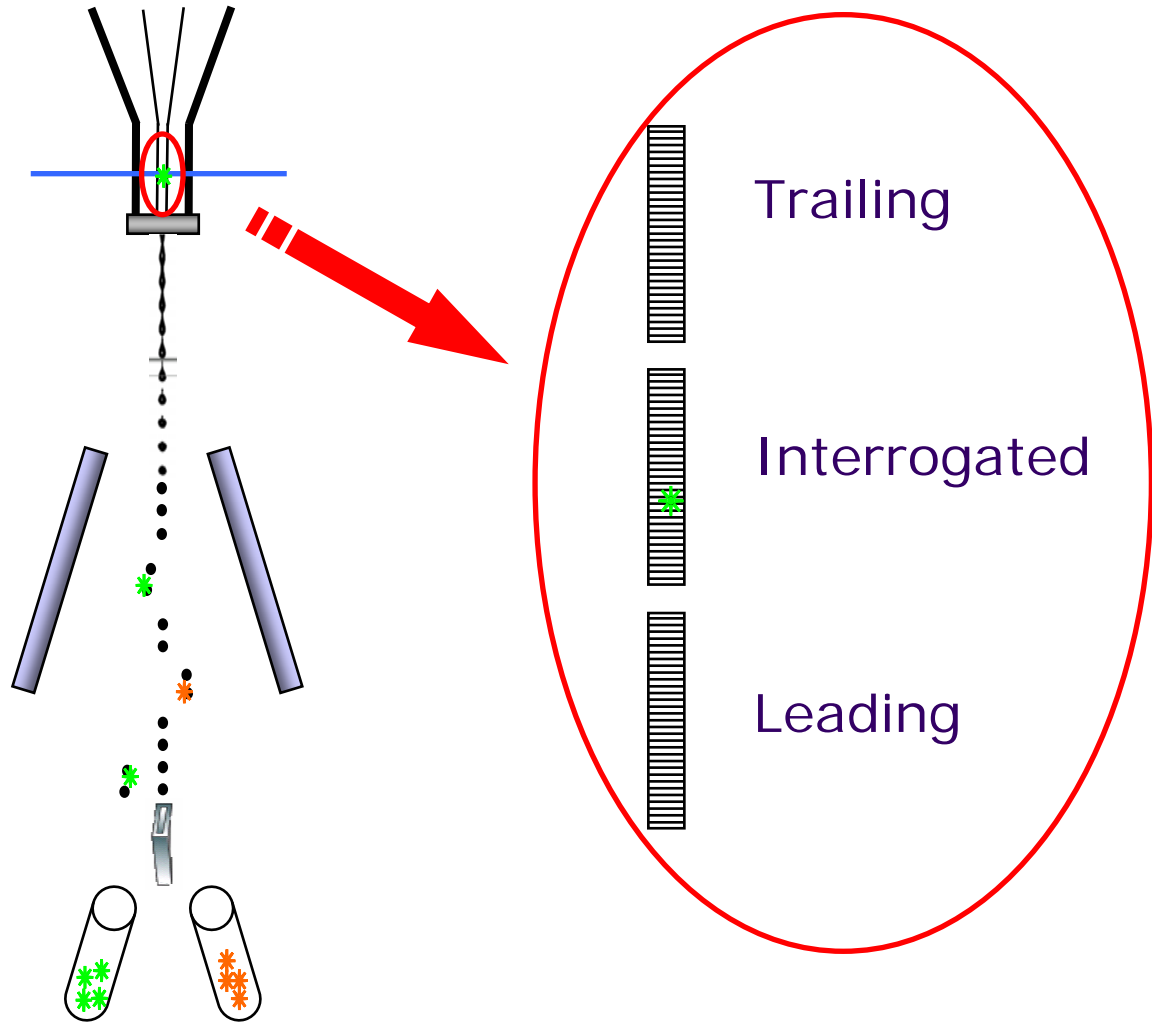


# *Sorting - Sort Masks*



Cells are randomized  
distributed over the stream

# Sorting - Sort Masks

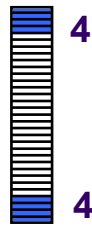


# Mask

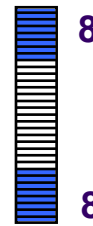
- A region of the stream monitored for the presence of cells
- Determines how drops will be deflected if a sorting conflict occurs
- Measured in 1/32 drop increments



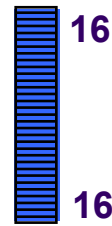
Mask = 0



Mask = 8



Mask = 16



Mask = 32



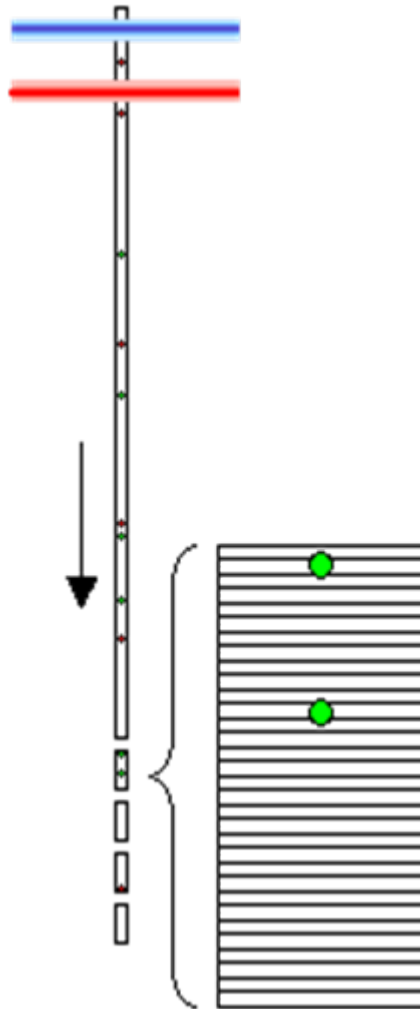
# Conflict Resolution

- Precision modes include three types of masks
  - Yield
  - Purity
  - Phase

	Precision Mode				
	Purity	Yield	Single Cell	Initial	Fine Tune
Yield Mask:	32	32	0	32	0
Purity Mask:	32	0	32	0	0
Phase Mask:	0	0	16	0	0
Single Cell:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

# *Sorting - Sort Masks*

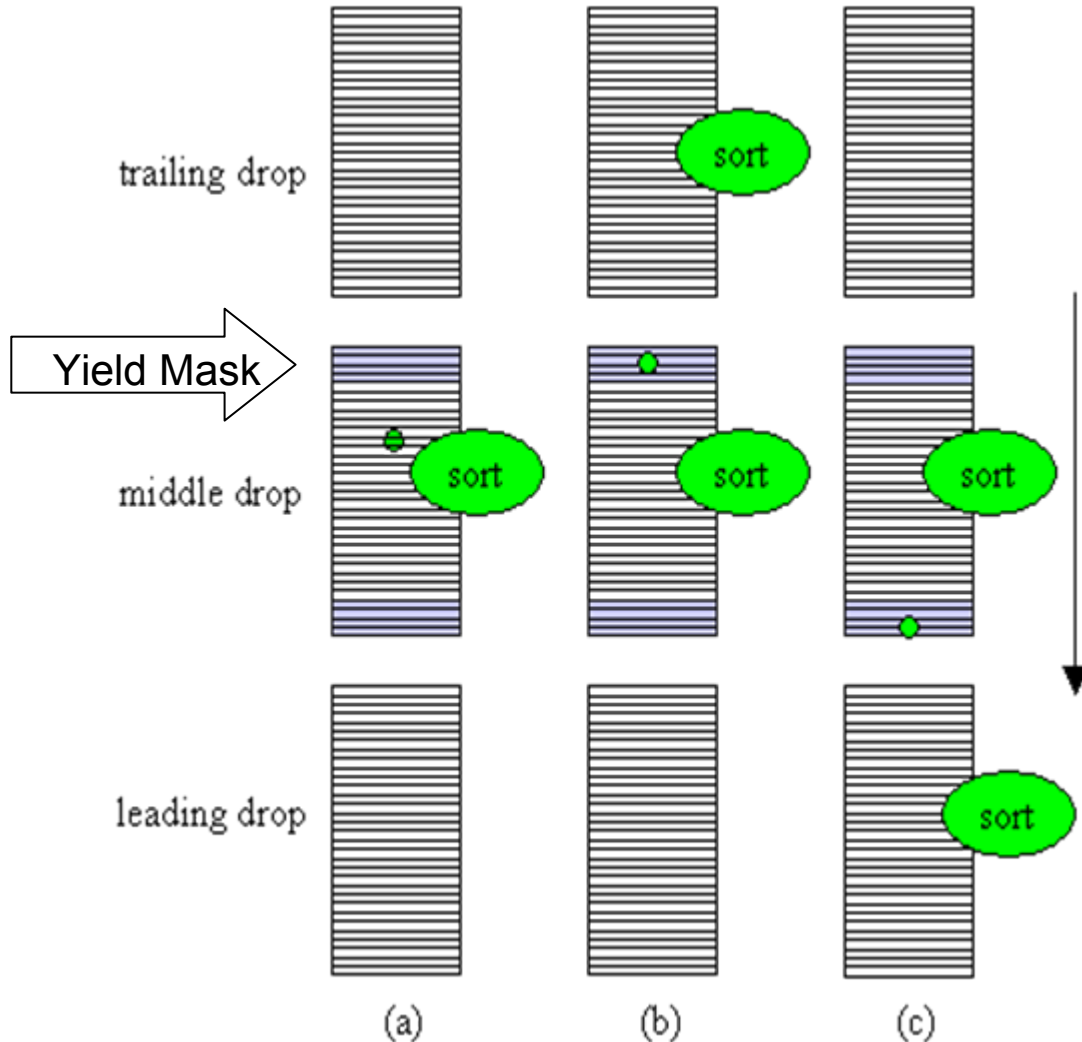
Sort decisions are determined by sort masks



Target particles in a drop with  
1/32-drop resolution

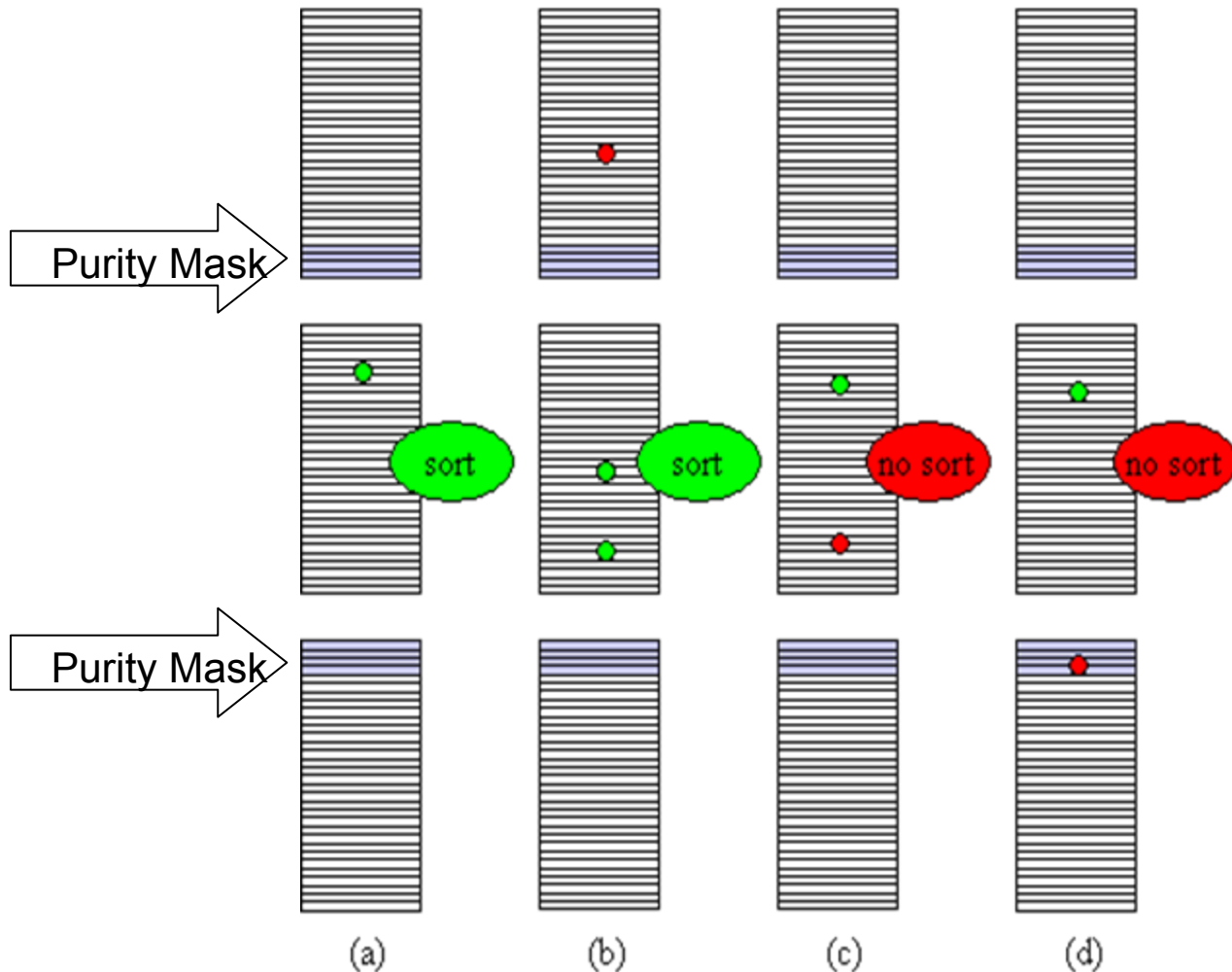
# Sorting - Yield Mask

The yield mask defines how many drops will be sorted. Yield mask of 8/32 indicated in blue; target particle shown in green



# Sorting - Purity Mask

Purity mask of 8/32 in blue, 4/32 in each adjacent drop;  
target particles in green, non-target particles in red





# Elektronika

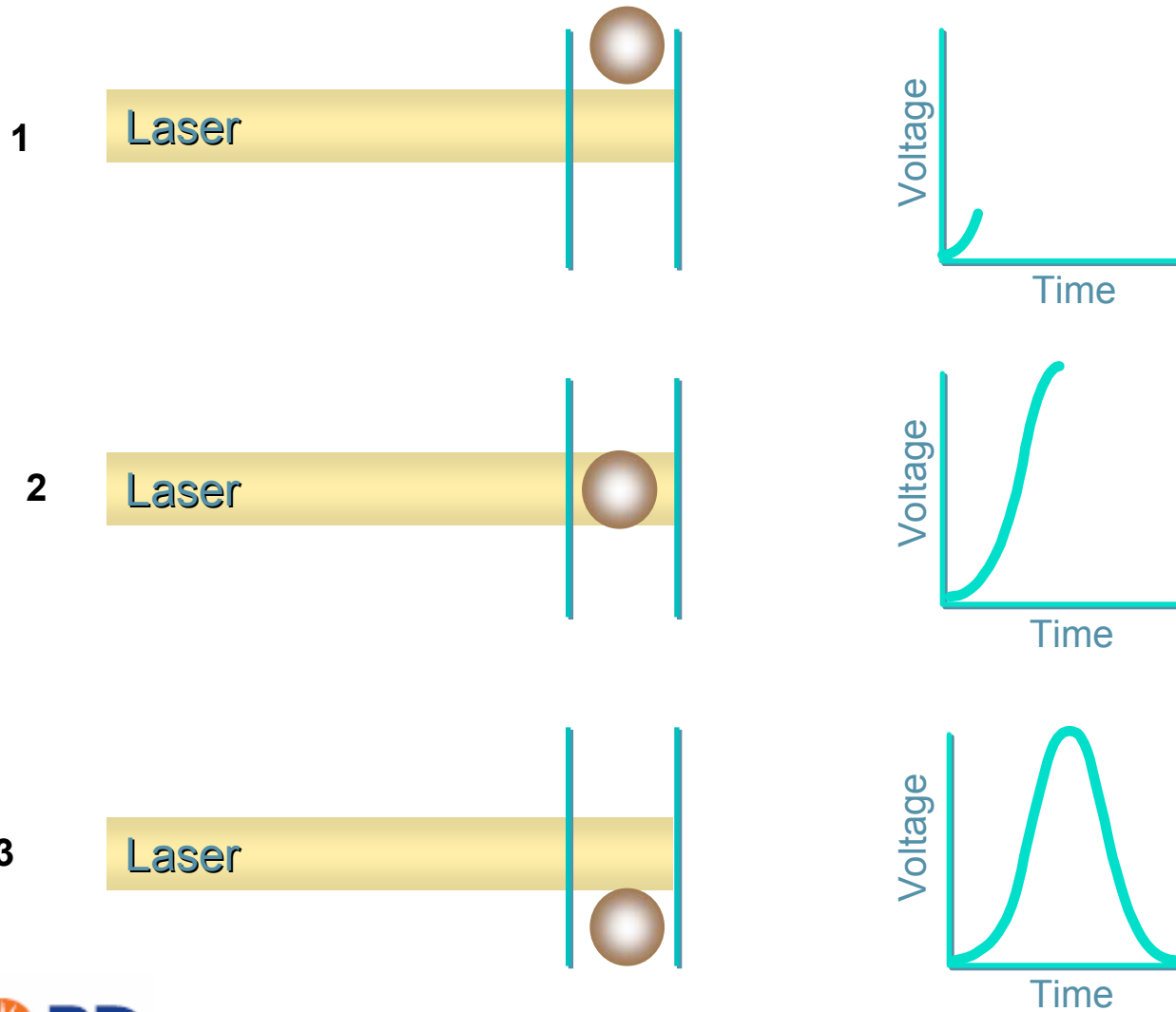
- Zpracování signálu z detektorů
  - Předzesílení
    - zesiluje signál pro přenos z detektorů do centralní elektronické části
  - Zesílení
    - úprava intensity signálu
    - lineární nebo logaritmické
  - Generování integrálu a šířky pulsu
  - Analog-digital konverze



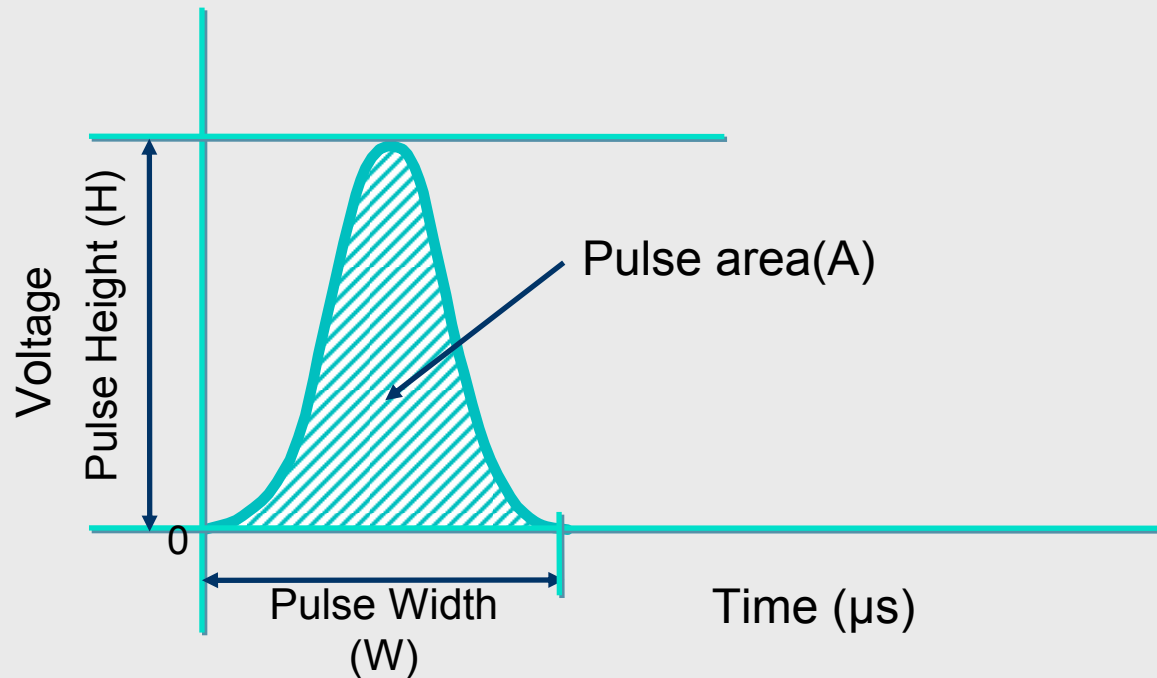
# Sběr dat

- 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

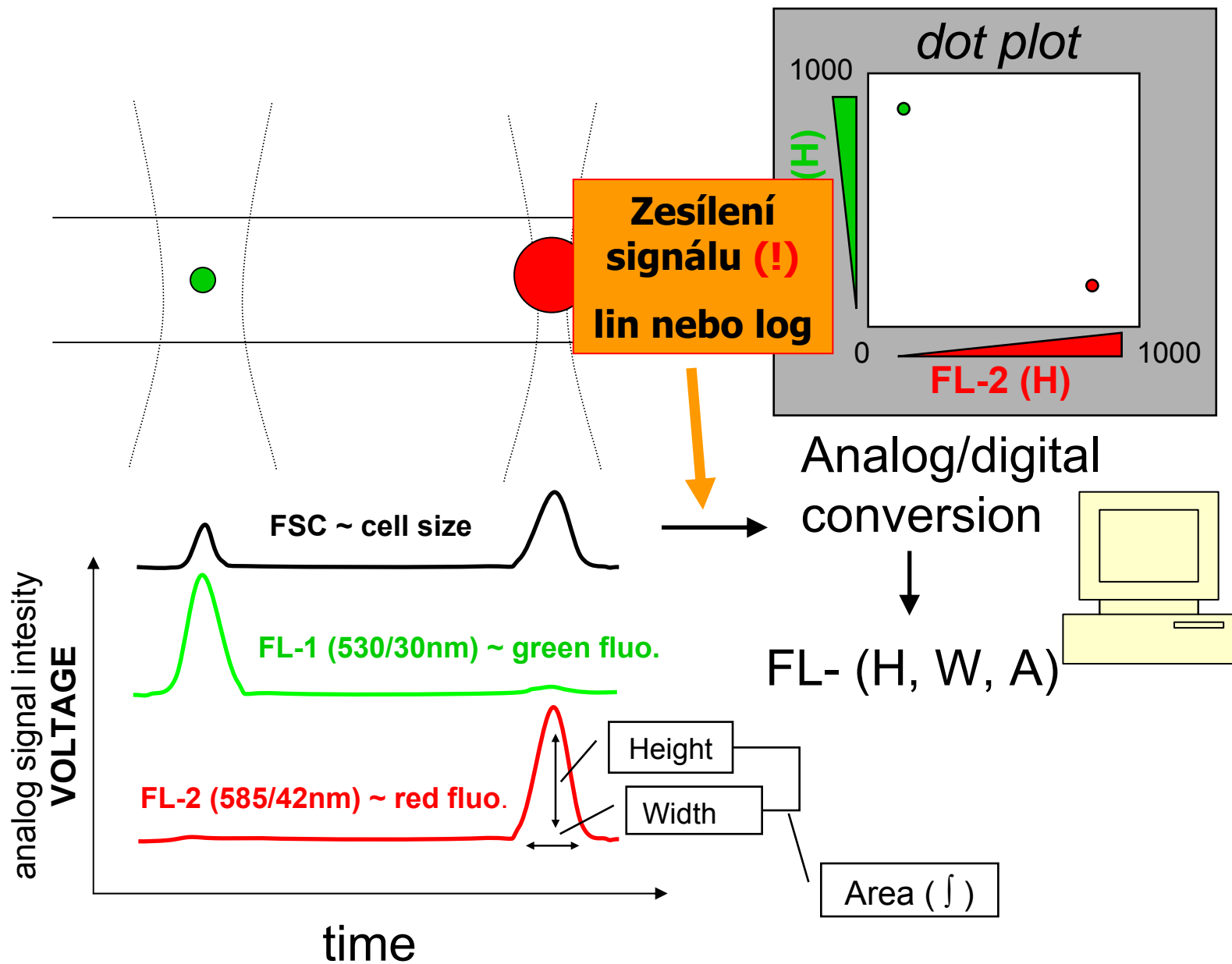


# Height, Area, and Width





# 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.



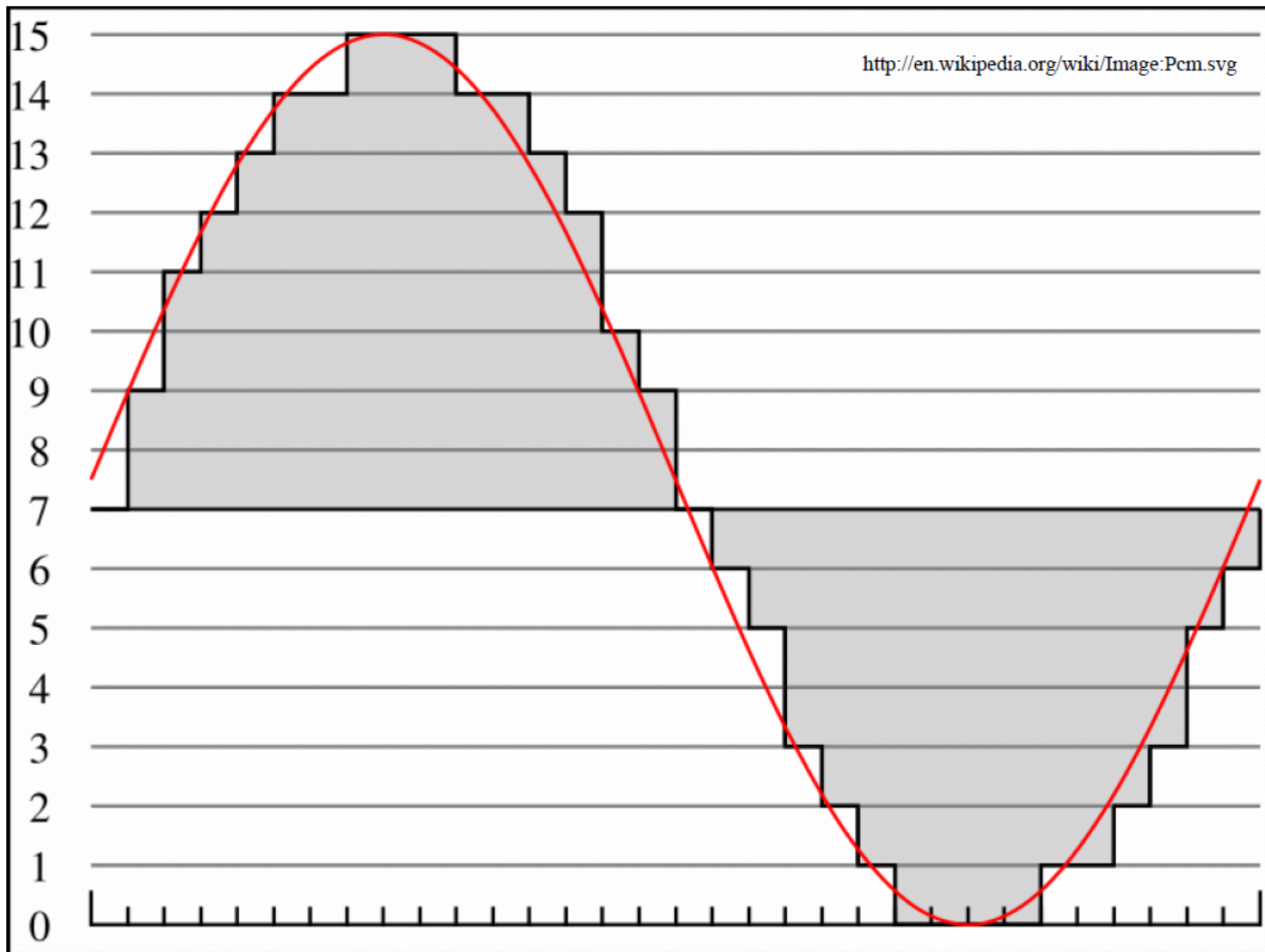
# Měření integrálu a šířky (width) píku

- 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

$$2^4=16$$



# 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

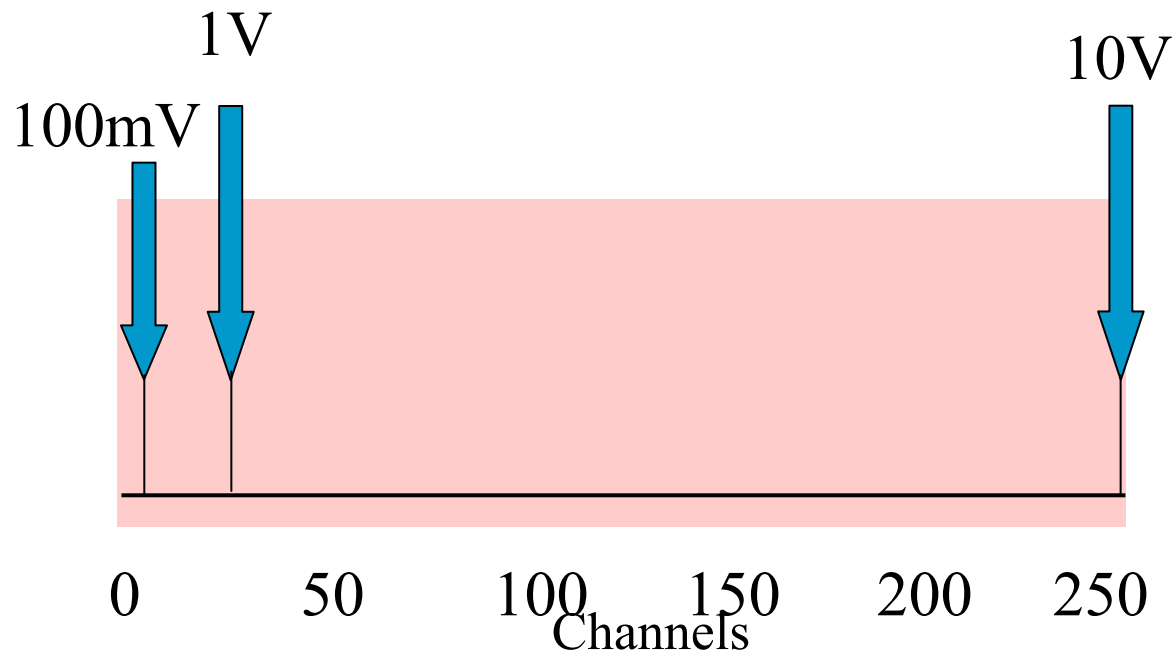
ADC voltage resolution is:  $(10-0)/4096 = 0.00244$  volts = 2.44 mV

# Proč používat lineární obvody?

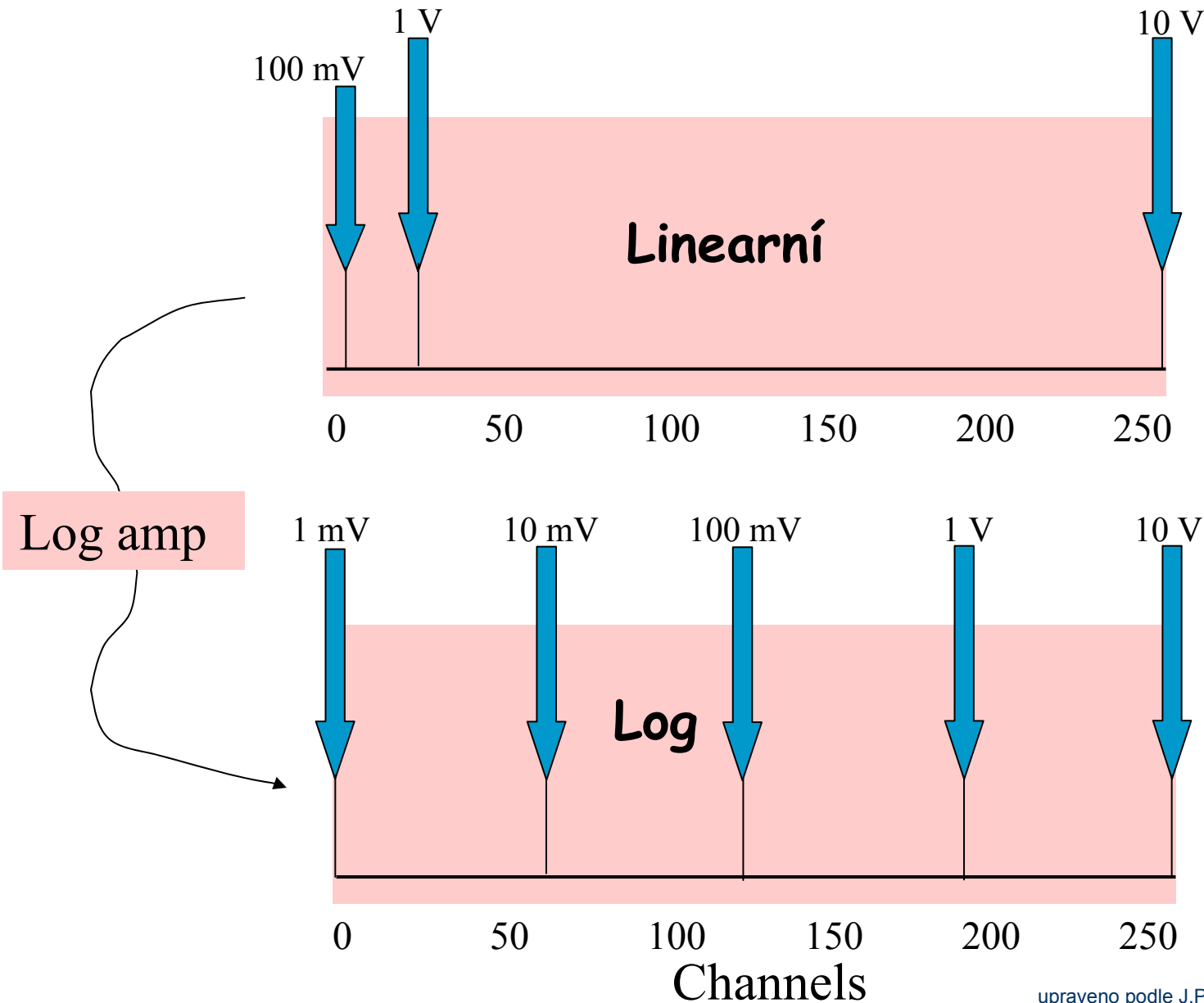
- Kompenzace signálu musí být prováděny na lineárních datech. Tzn. že celá elektronika musí být lineární (> 14-ti bit ADC) nebo musí být doplněn speciální obvod mezi předzesilovač a display.
- Pro imunologické fenotypizace potřebujeme velký dynamický rozsah.
- průtokový cytometr zesiluje signál na hodnoty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

# Kolik bitů?

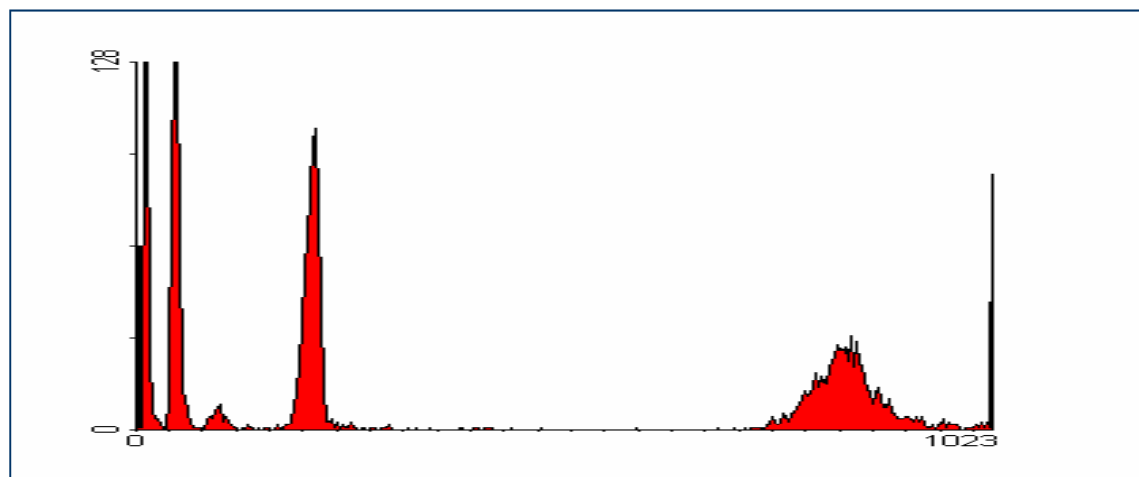
- Pokud konvertujeme analogový signál pomocí 8 bitového ADC – máme 256 kanálů ( $2^8=256$ ) odpovídajících rozsahu 0-10 V
- Rozdíl mezi kanály je  $10/256 \approx 40\text{mV}$



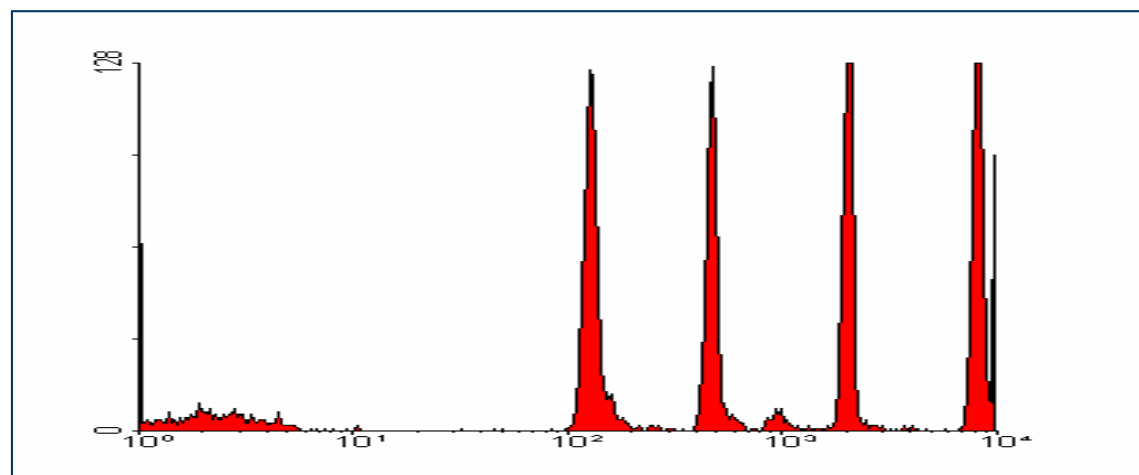
# Ideální logaritmický zesilovač



# Logaritmické zesílení & dynamický rozsah



**lin**



**log**

# „Ratio circuits“

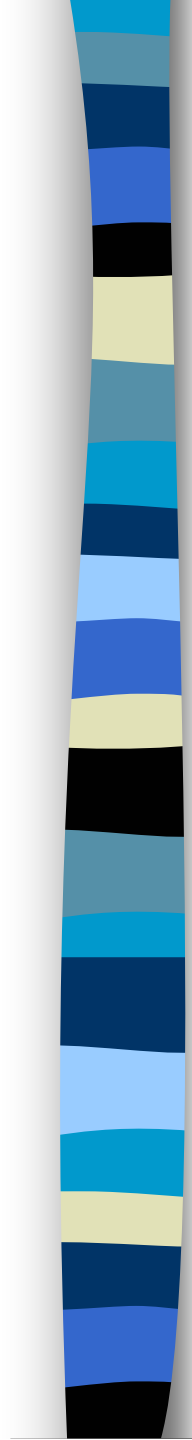
- jsou analogové obvody generující výstupní signál odpovídající poměru ze dvou vstupních signálů (dvou detektorů)
- Tvořeno speciálními moduly tzv. analogové násobiče.
- např. pro výpočet povrchové denzity navázaných antigenů dělíme počet navázaných molekul velikostí povrchu buněk (není běžné)
- **Detekce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



# Kompenzace fluorescenčního signálu

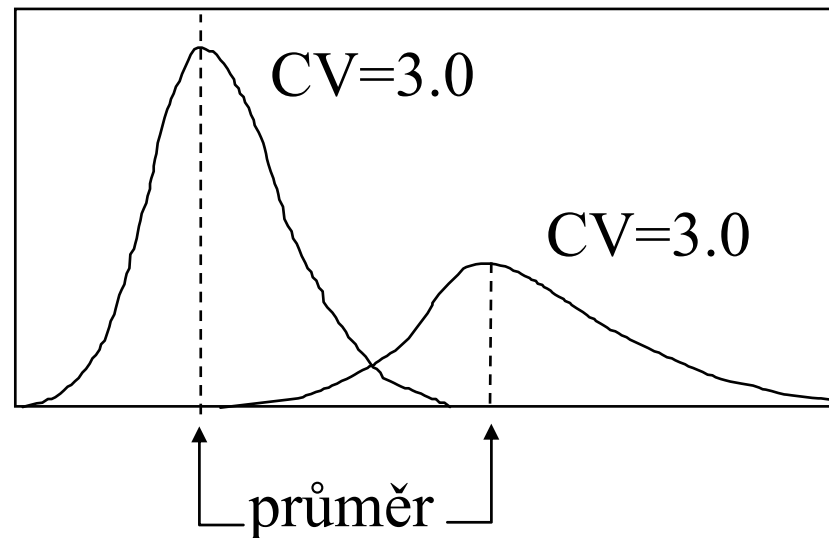
...později



- 
- 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

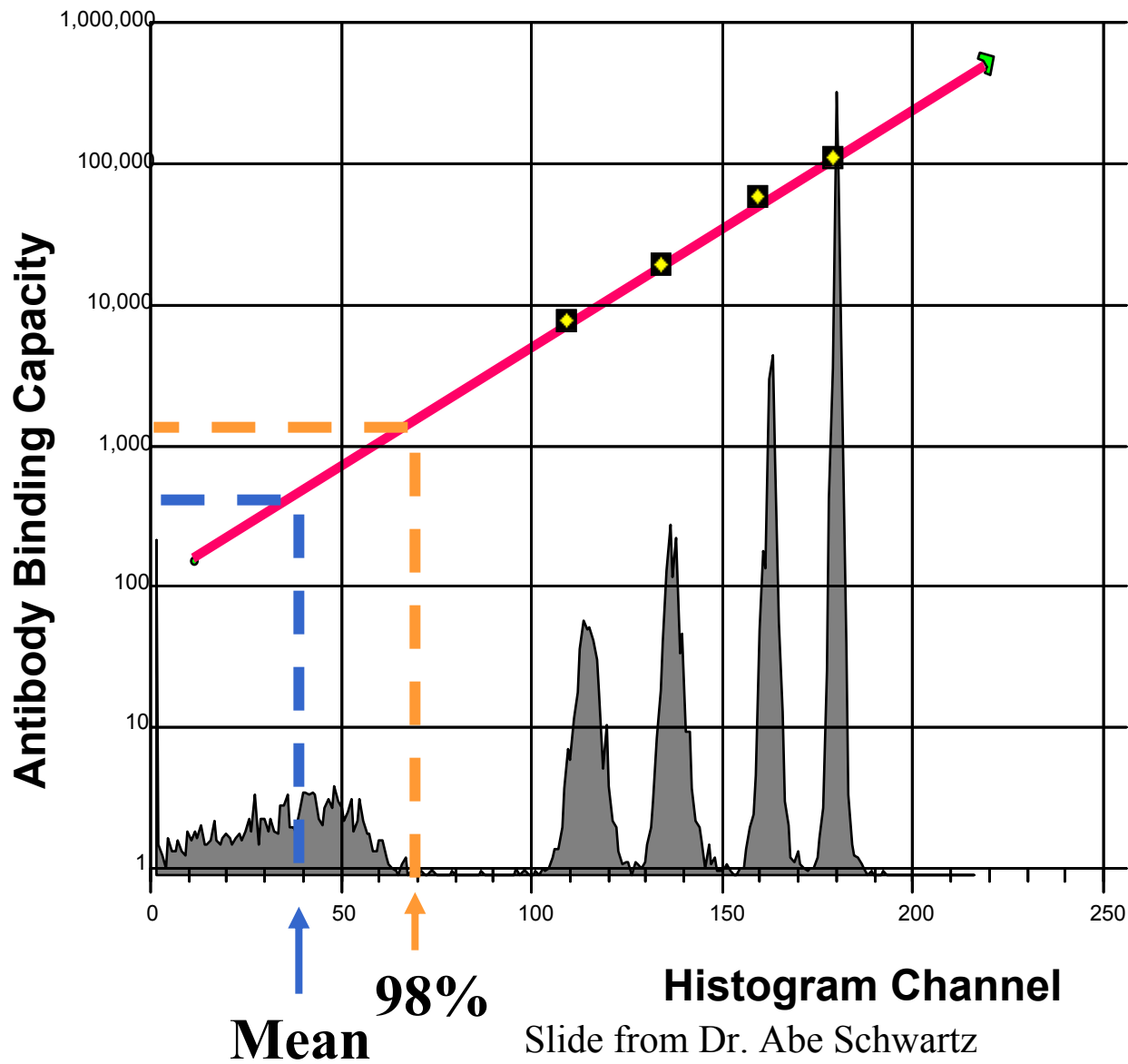


# Kvantitativní jednotky - ABC

Antibody Binding Capacity

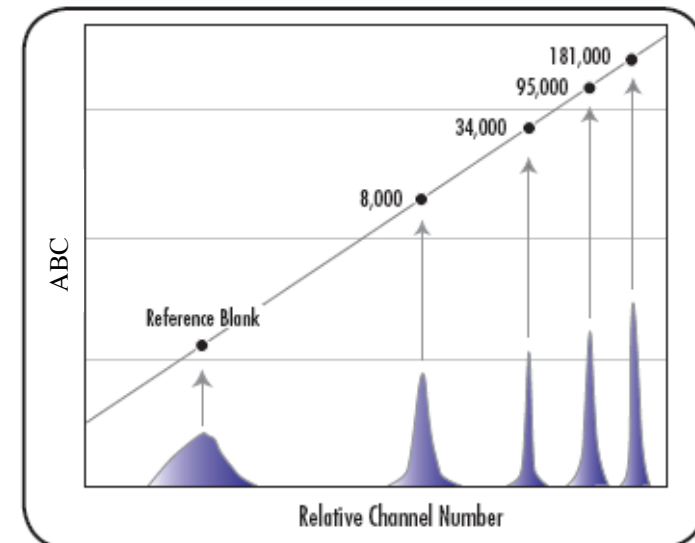
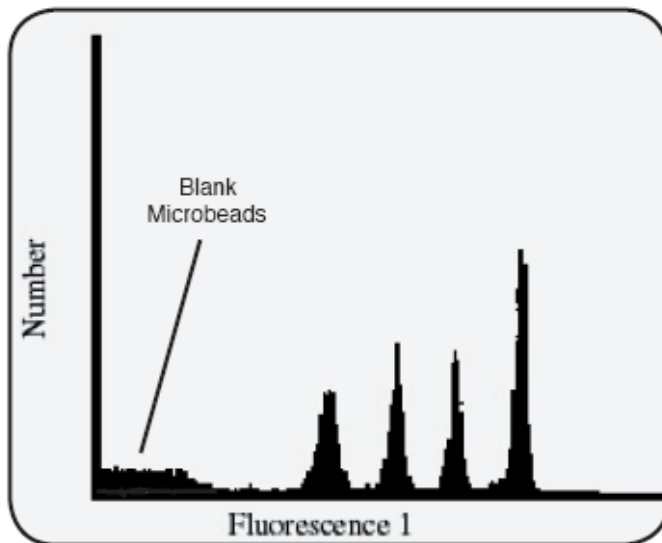
- množství protilátky, které se specificky váže na populaci buněk (nebo mikročástic)
- pozn.: Hodnota ABC nemusí odpovídat skutečnému množství antigenů na povrchu buněk nebo částic

# Detekce prahu (šumu)



# Určení ABC

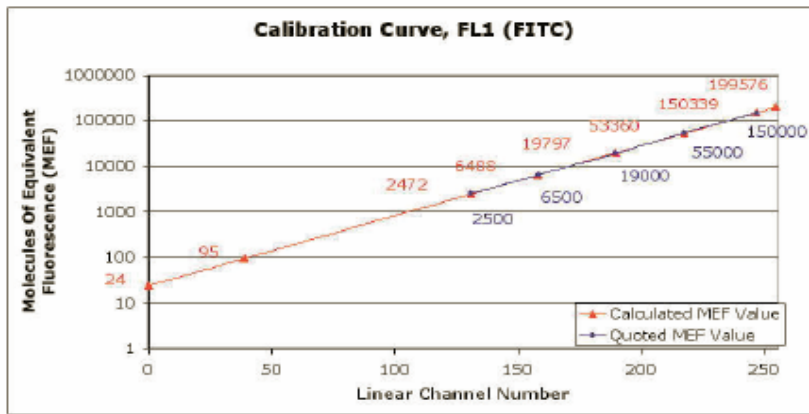
Quantum™  
Simply Cellular®  
Mouse Antibody-Binding Standards





# 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

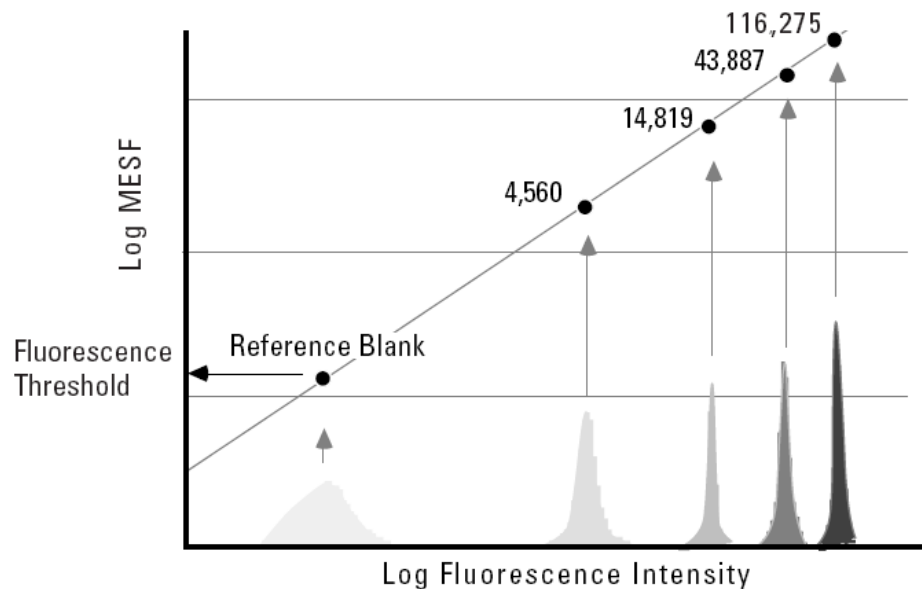
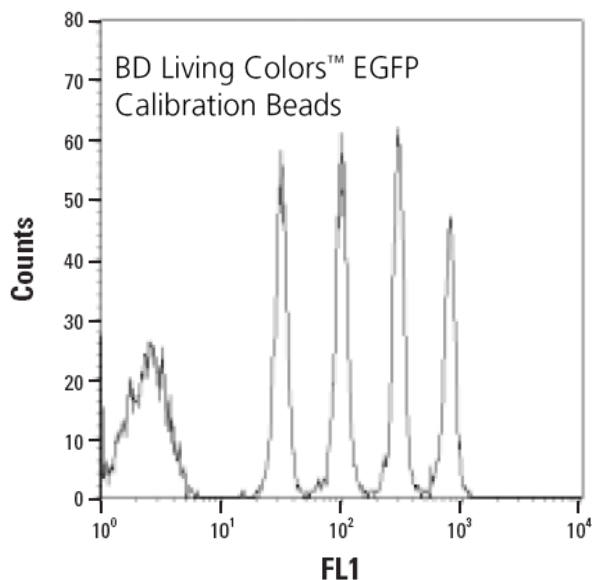
Figure 1. Calibration Curve and Calculations for FL1 Channel (FITC)

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.

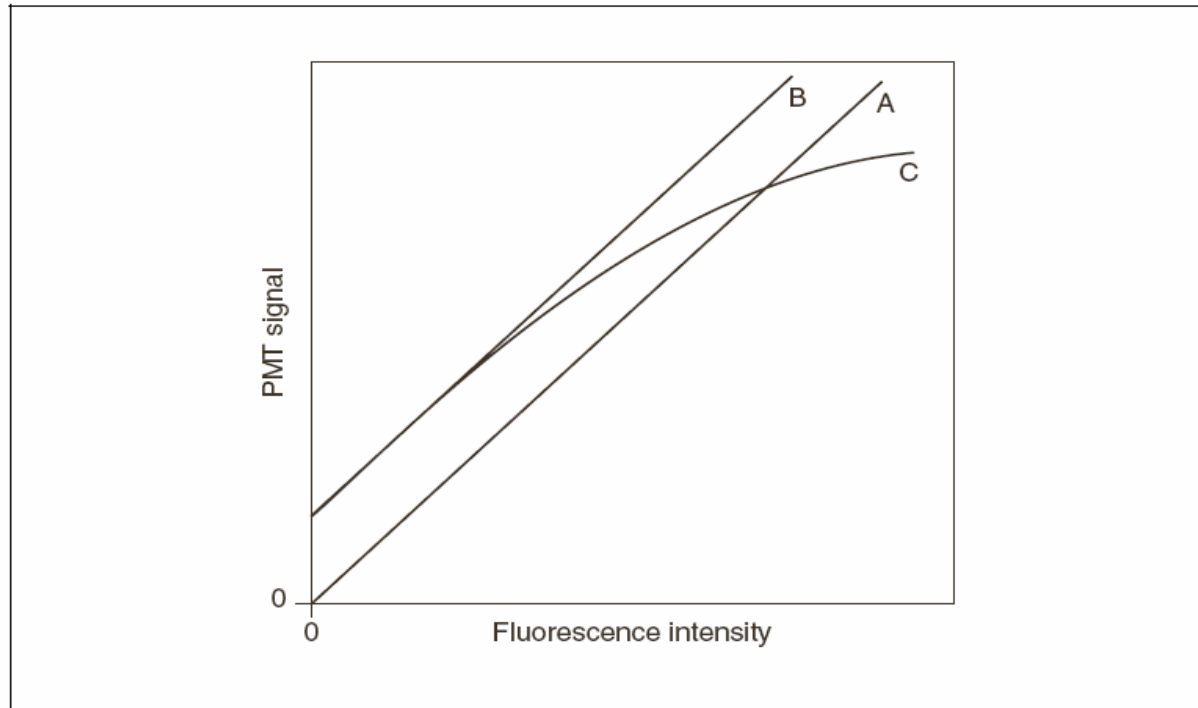
# MEFS Units

- 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 II 85 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



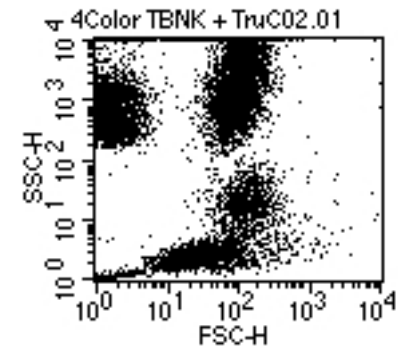
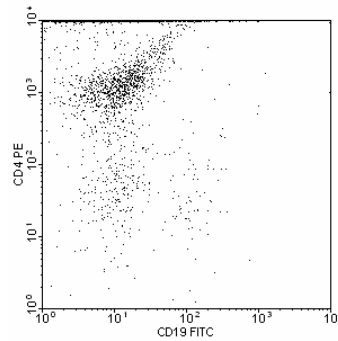
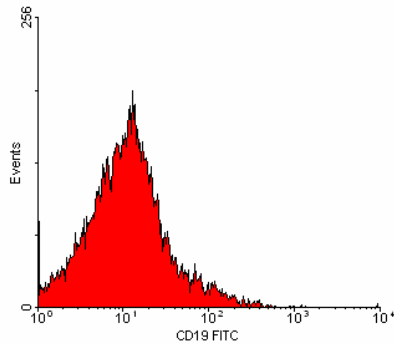
# Analýza dat

## ■ Zobrazení dat

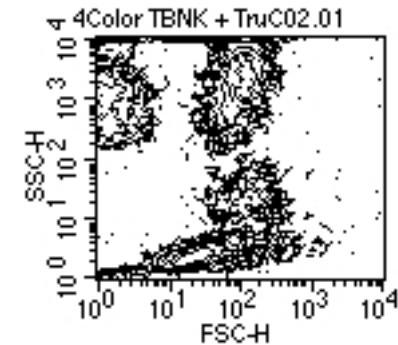
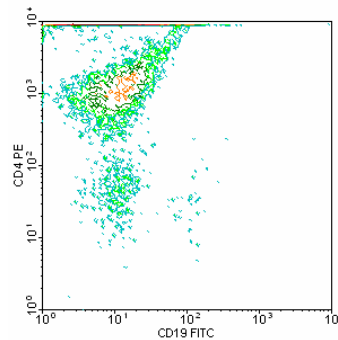
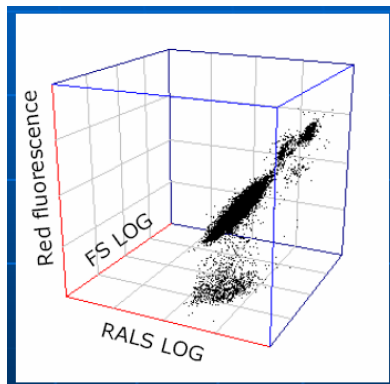
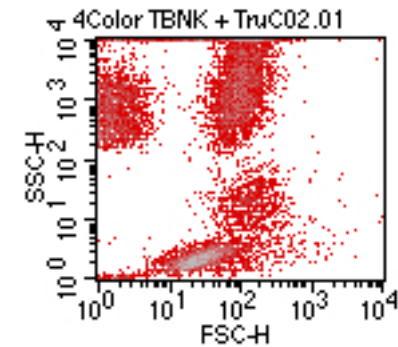
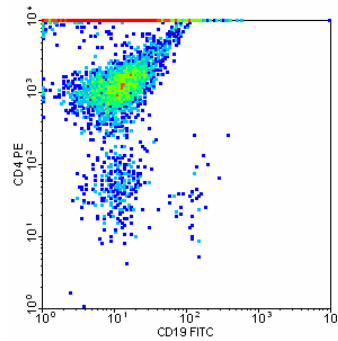
- histogram
- dot plot
- isometric display
- contour plot
- chromatic (color) plots
- 3 D projection

## ■ Gating

# Způsoby pro zobrazení dat

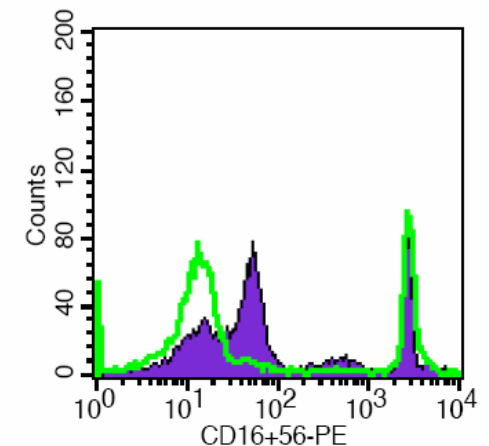
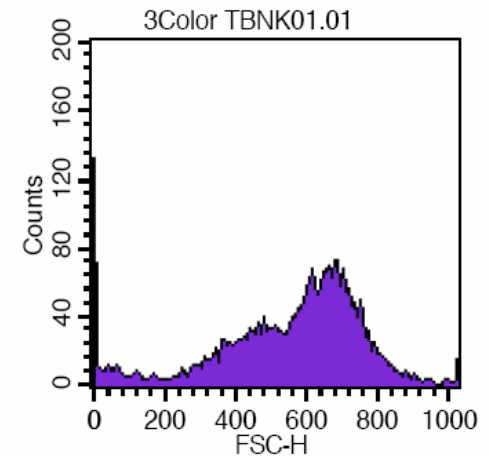


4Color TBNK + TruCO2.01



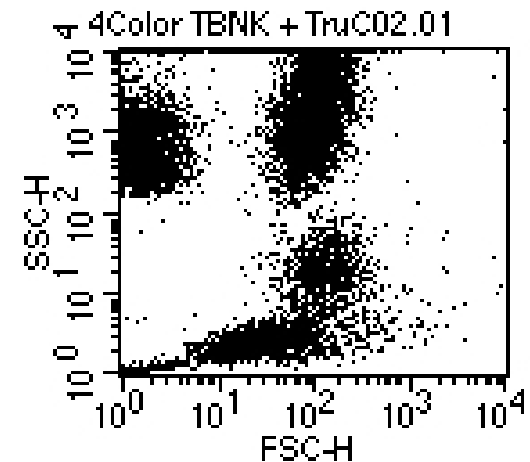
# Histogram distribuce četnosti

- 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 denzitě částic
- Problémy s vykreslením v případě velkých objemů dat



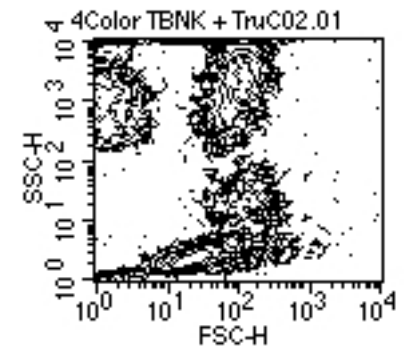
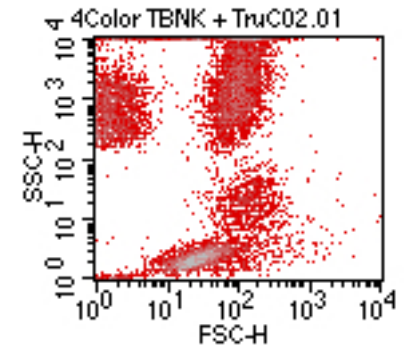
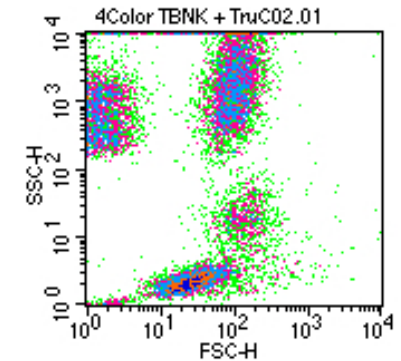
# Density & contour plot

## Density plot:

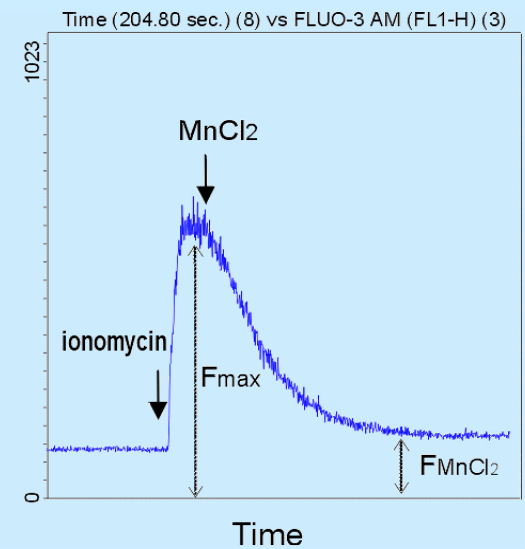
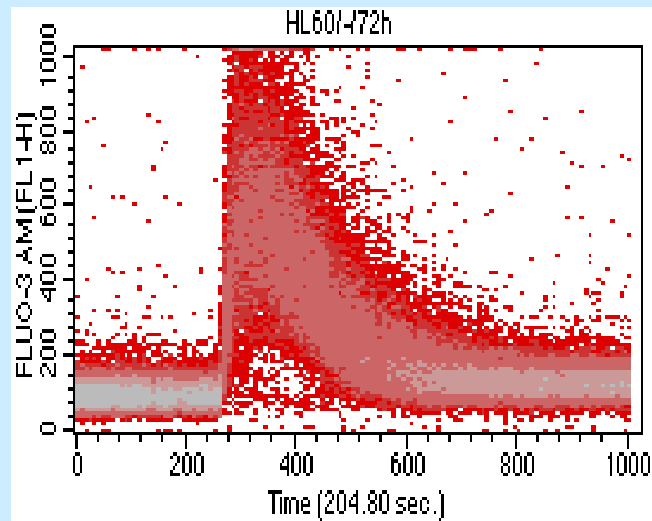
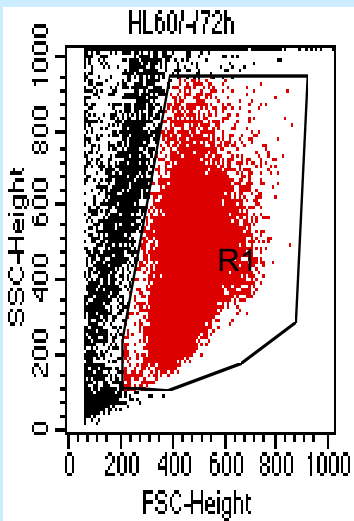
- Zobrazuje dva parametry jako frekvenci četnosti
- barva a nebo její odstín odpovídá četnosti částic

## Contour plot:

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



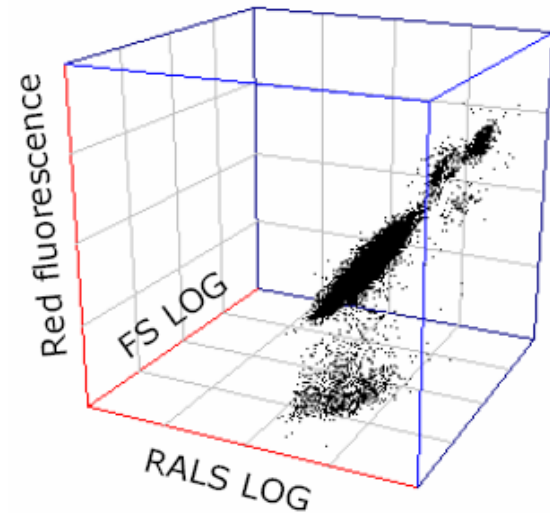
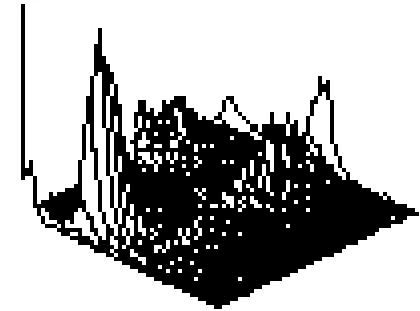
# Čas jako jeden z parametrů



# 3D zobrazení

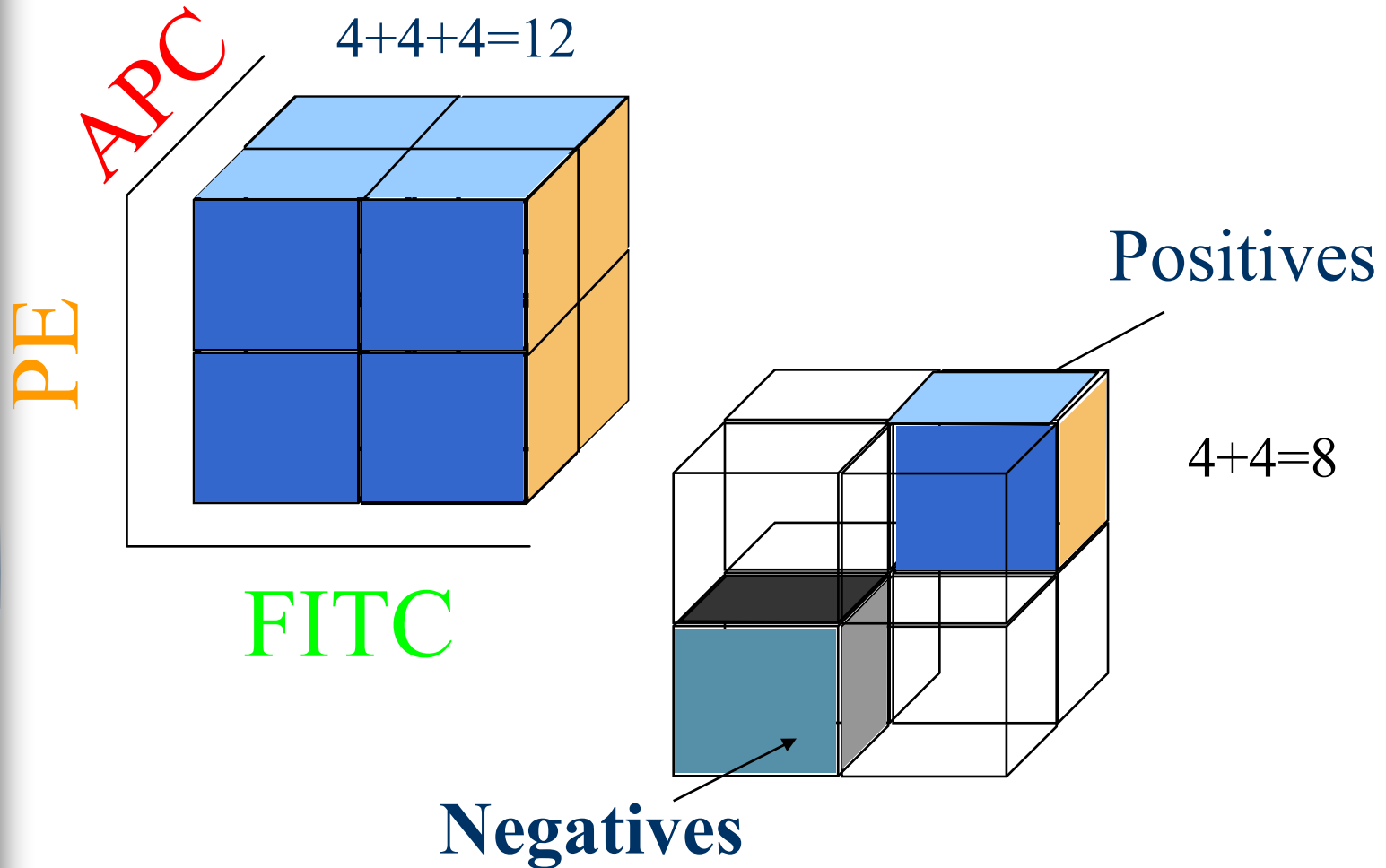
- 2 parametry + četnost
- 3 parametry společně

4Color TBNK + TruCO2.01

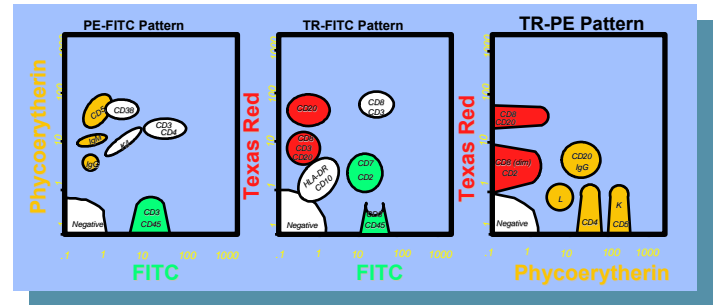
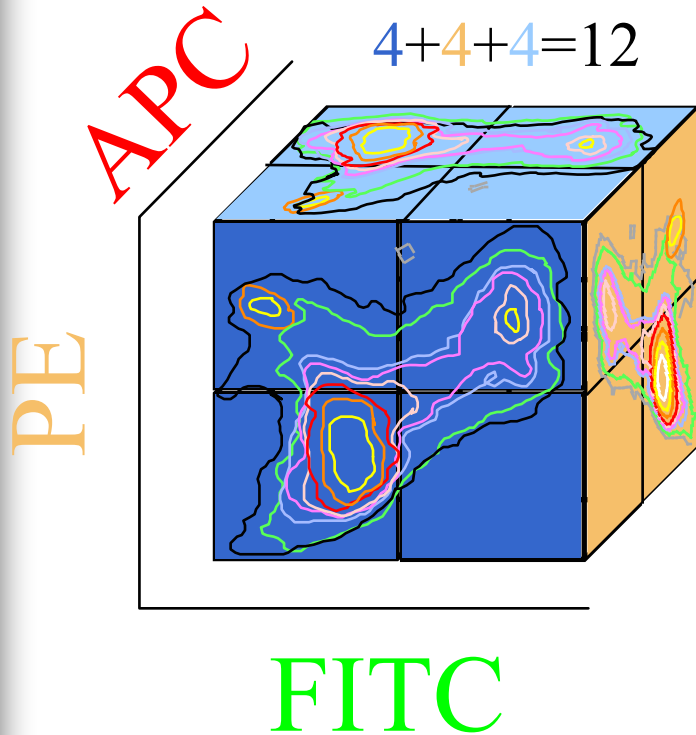




# 3 Color Combinations



# 3 Color Combinations





# „Gating“

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

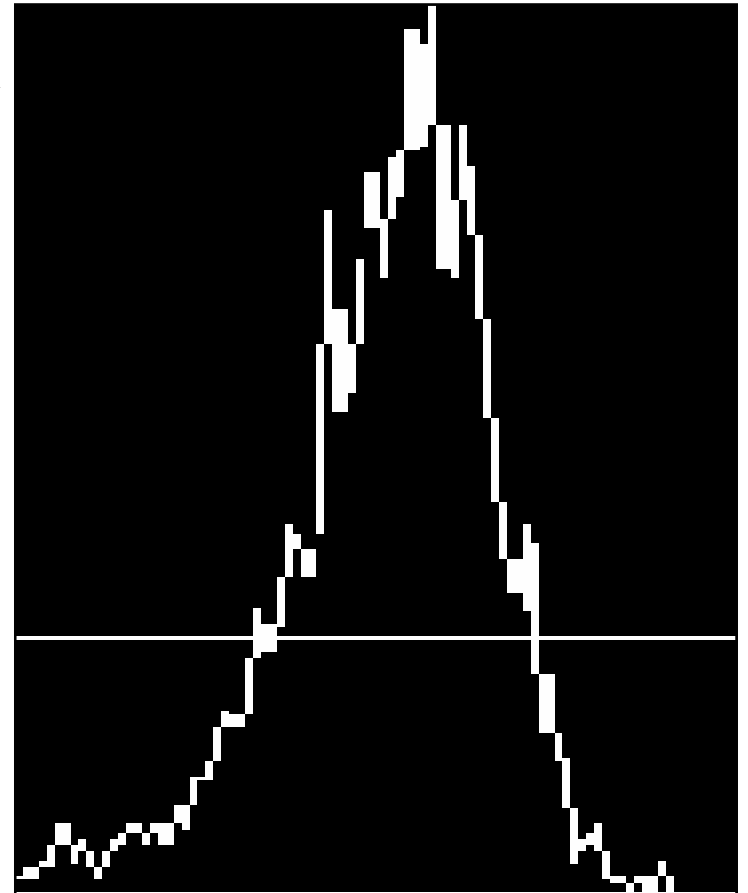


# Real-Time vs. Software Gating

- 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, ....



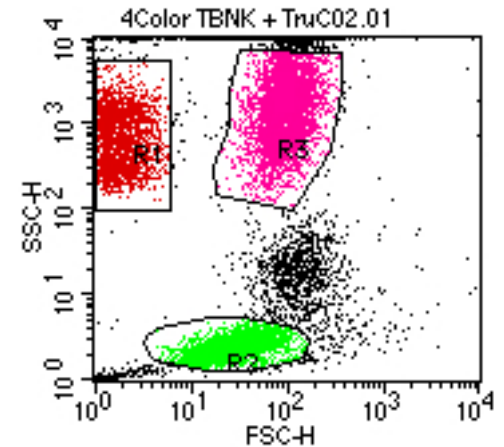
# Region vs. gate

## Region

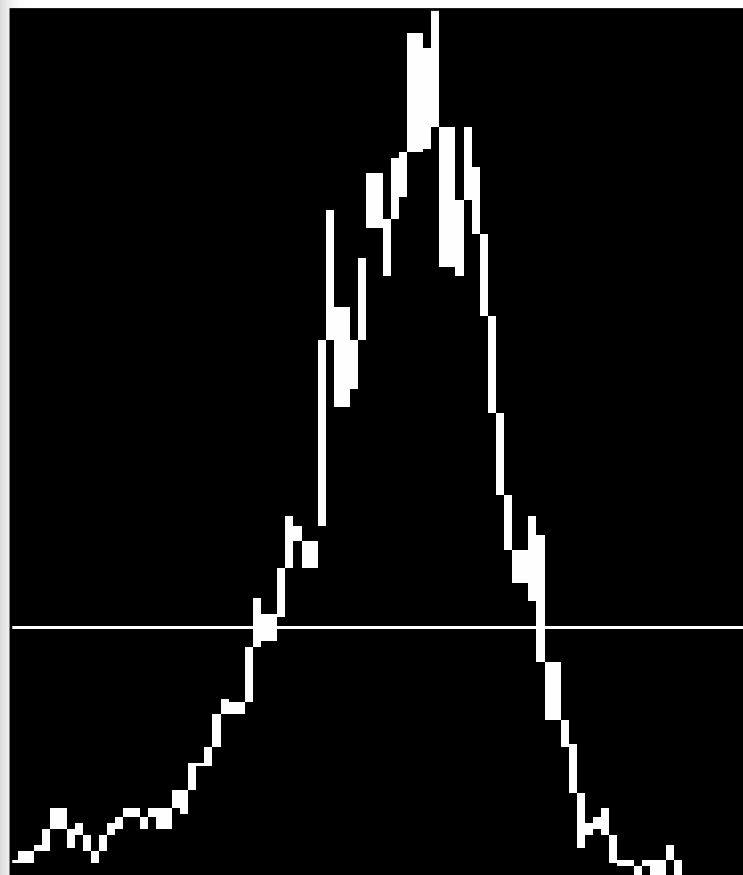
- oblast (plocha) v grafu definovaná uživatelem
- mnoho regionů v jedné grafu
- ohraničujeme pomocí nich populace našeho zájmu
- je možné je barevně odlišit
- je definován stejně pro všechny vzorky v analýze

## Gate

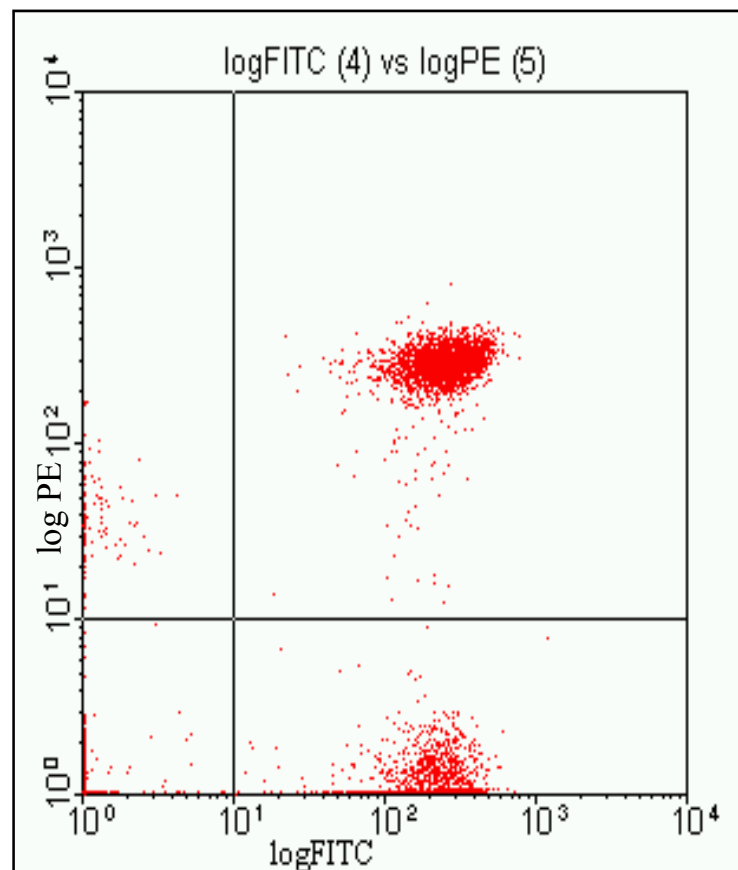
- je definován jako jeden a nebo více regionů zkombinovaných pomocí logických operátorů (AND, OR, NOT; Booleova logika)



# Using Gates



Region 1 established



Gated on Region 1

# Statistika

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

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

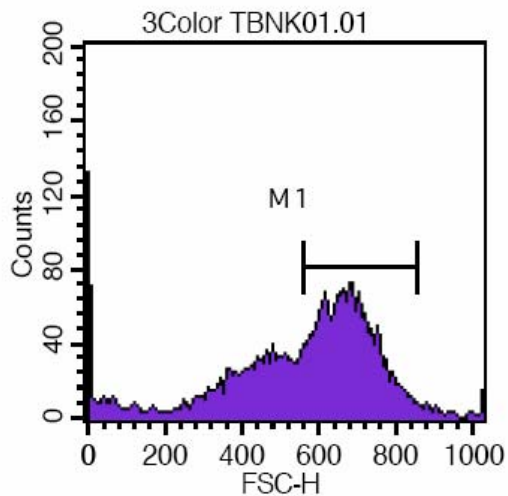
$$(a_1 \cdot a_2 \cdot \dots \cdot a_n)^{\frac{1}{n}} = \sqrt[n]{a_1 \cdot a_2 \cdot \dots \cdot a_n} = \left( \prod_{i=1}^n a_i \right)^{\frac{1}{n}}$$

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

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



# 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:

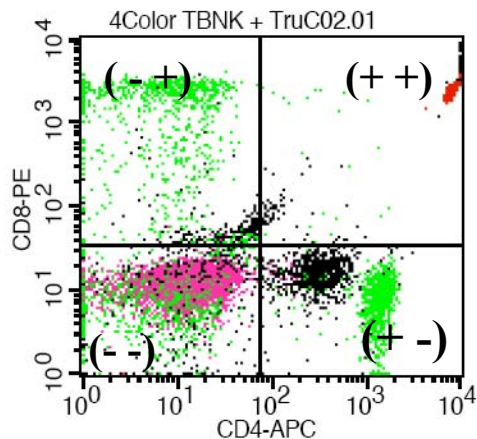
Panel: 3 Color TBNK

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



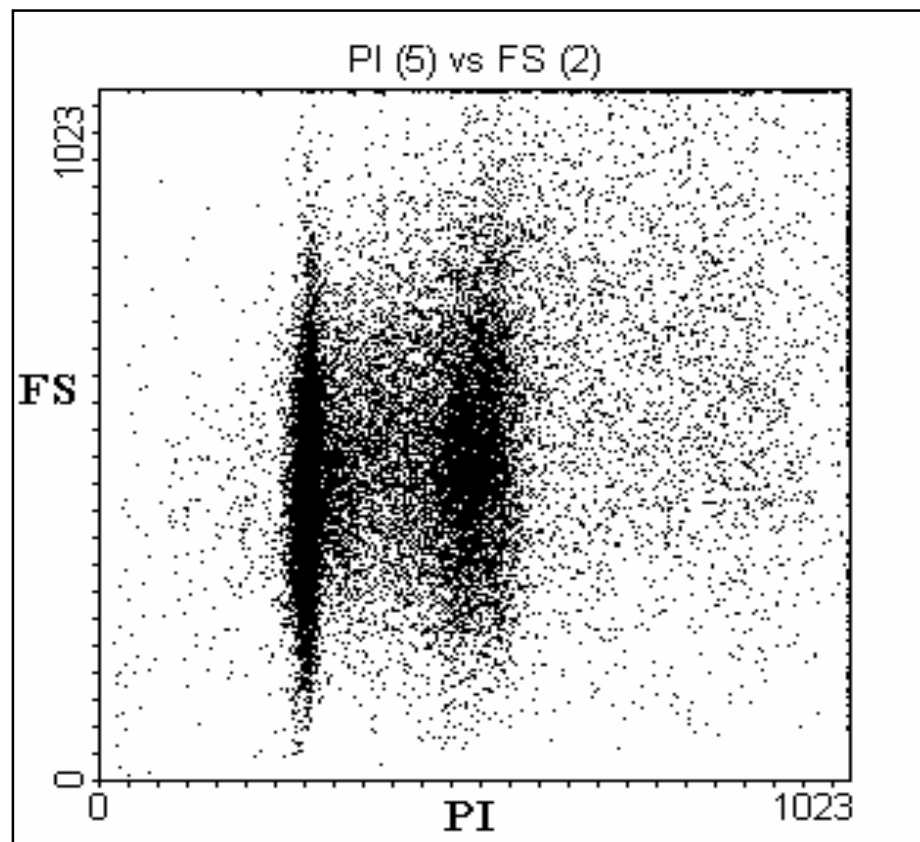
## Quadrant Statistics

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

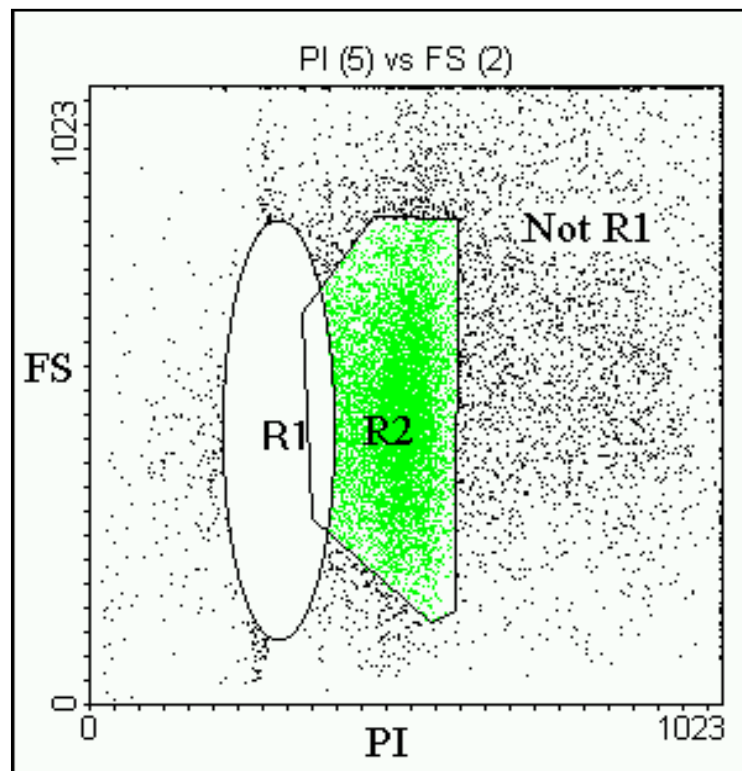
# Logický „Gating“ (Booleova logika)

S překrývajícími se oblastmi máme mnoho možností:



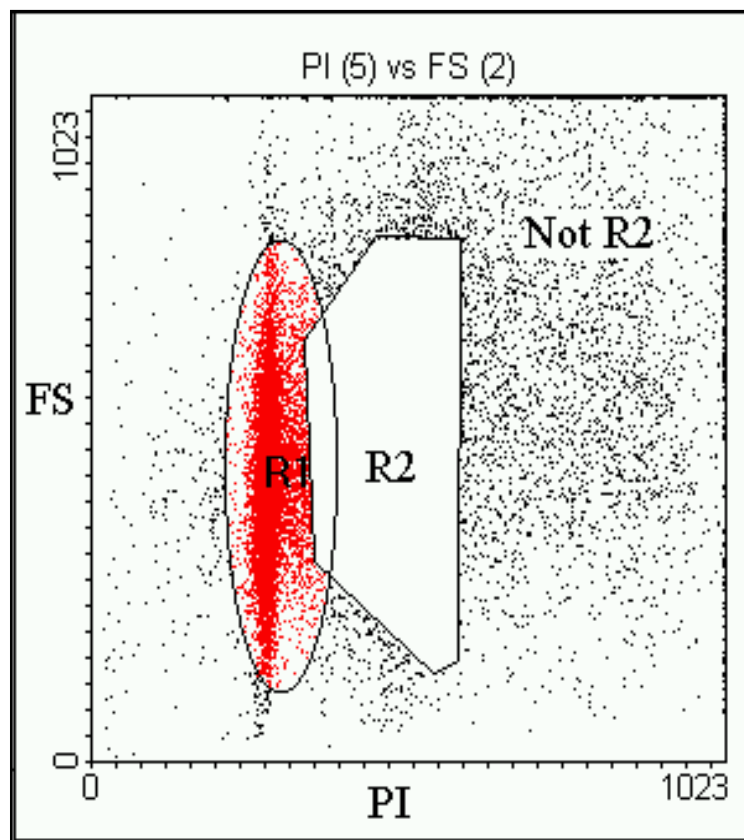
# Boolean Gating

Not Region 1:



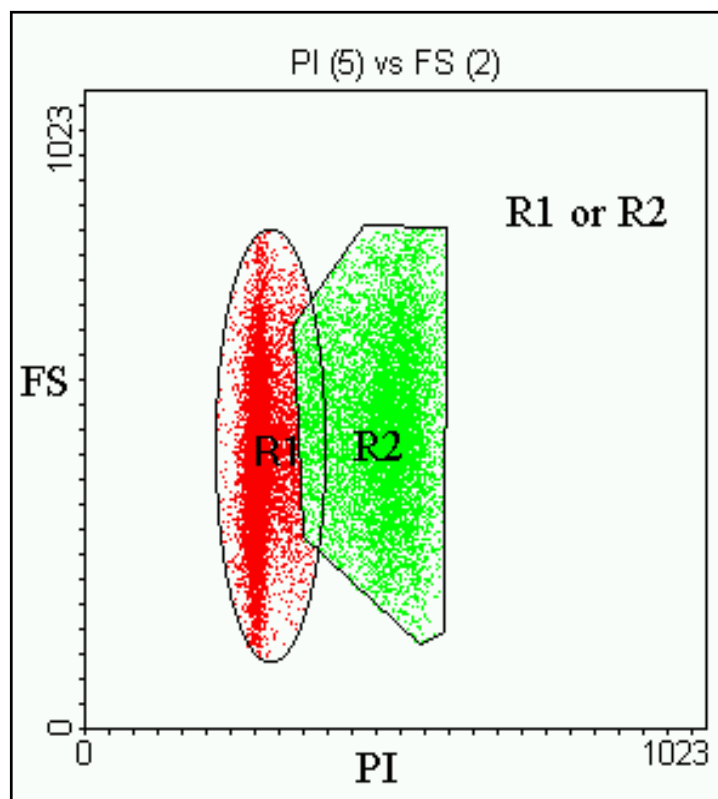
# Boolean Gating

Not Region 2:



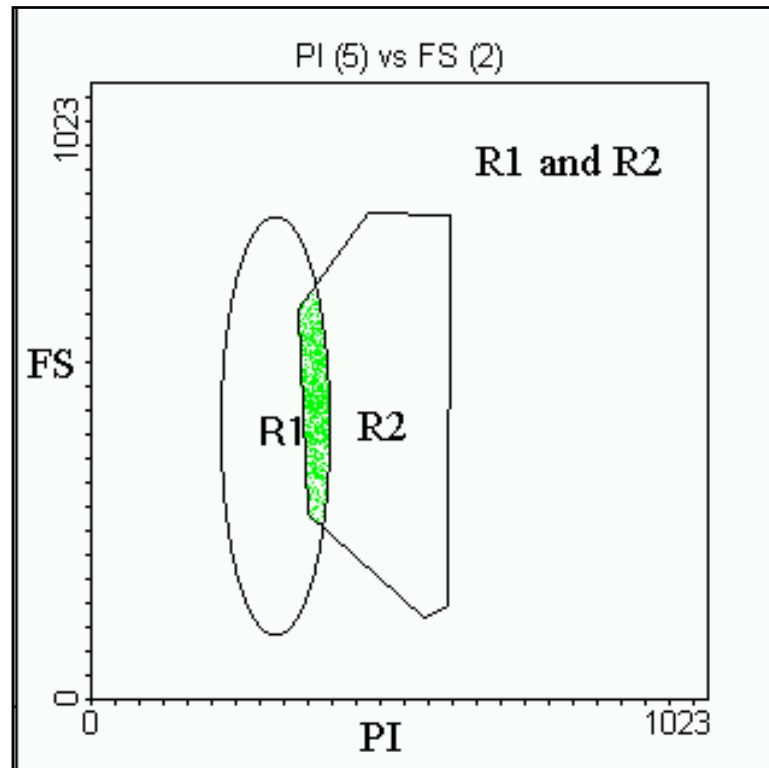
# Boolean Gating

Region 1 or Region 2:



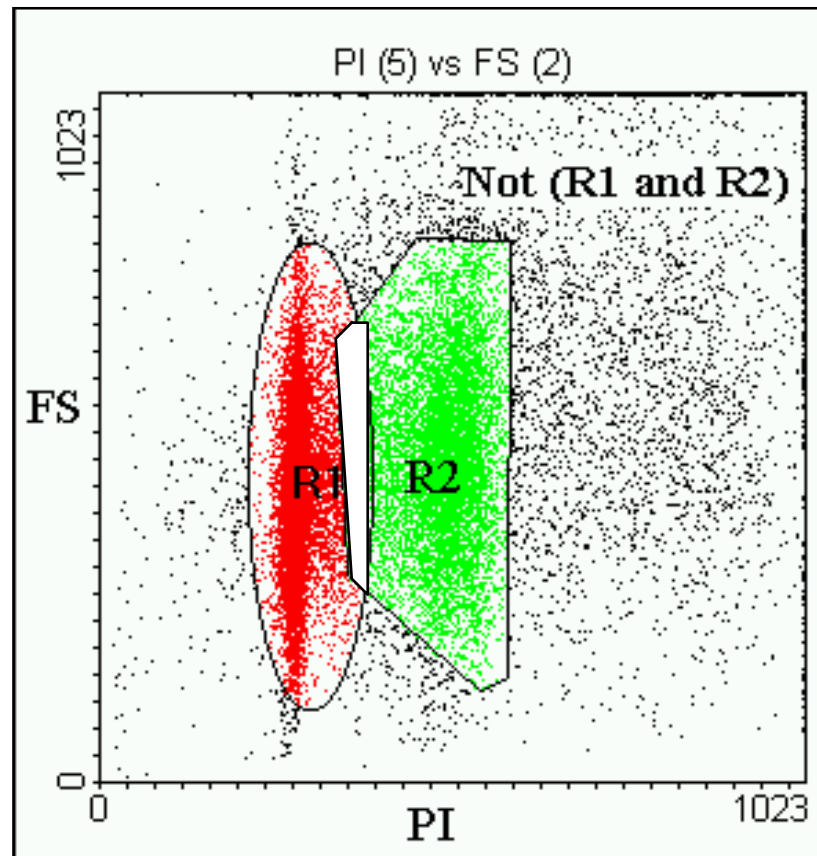
# Boolean Gating

Region 1 and Region 2:



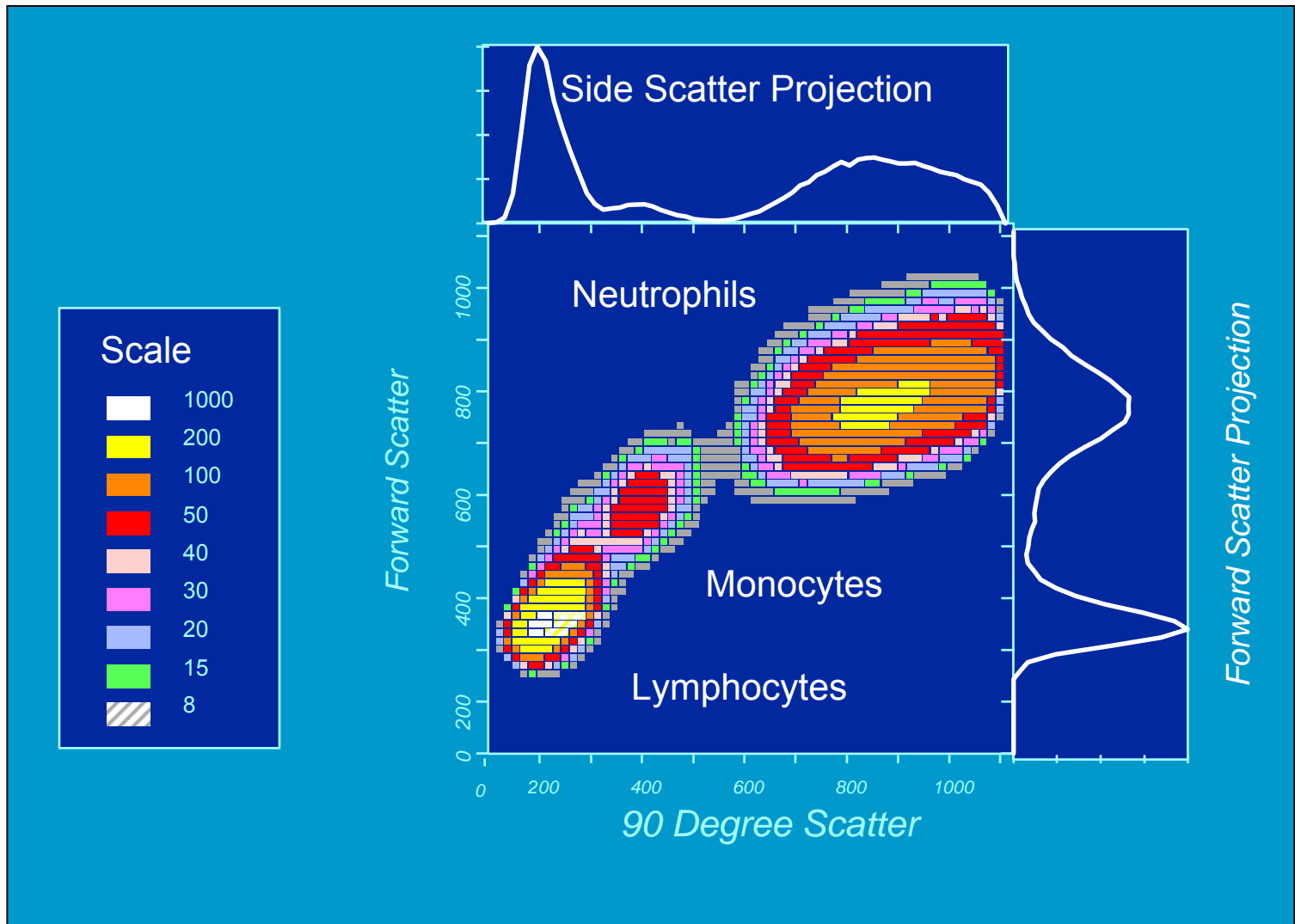
# Boolean Gating

Not (Region1 and Region 2):

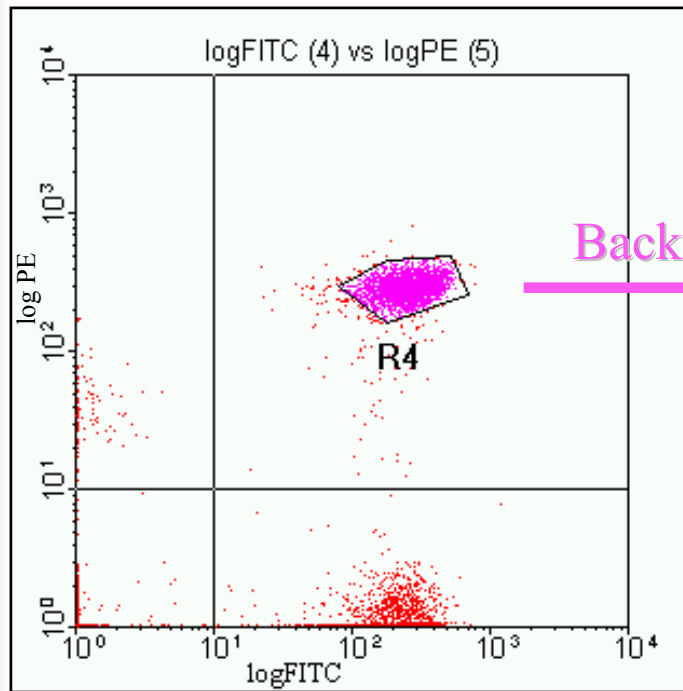




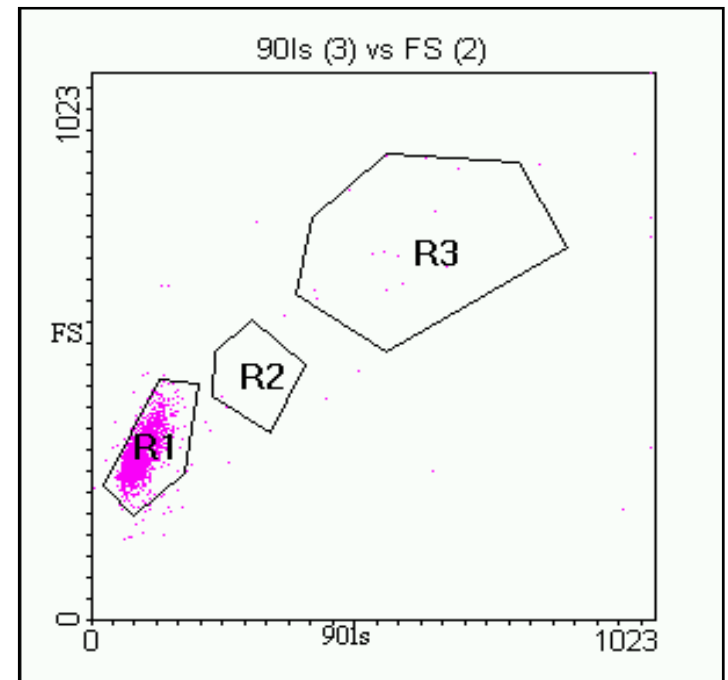
# Light Scatter Gating



# Back Gating

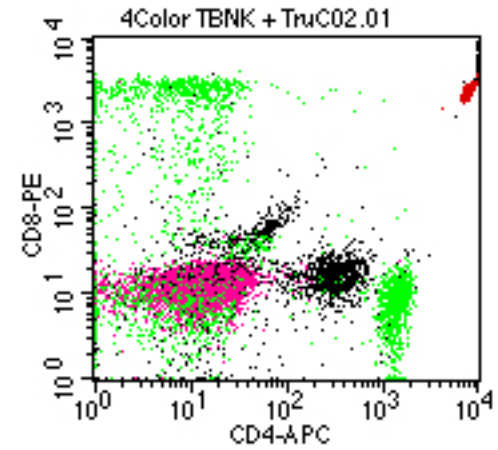
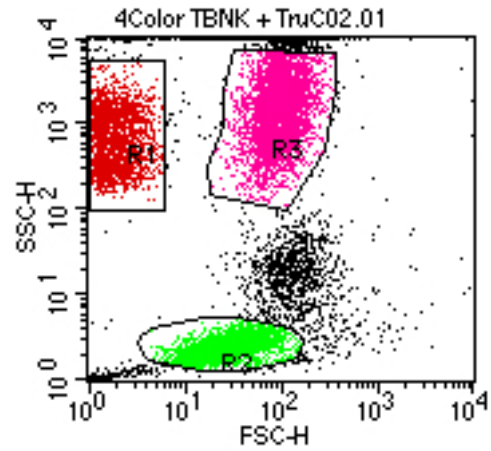


Region 4 established

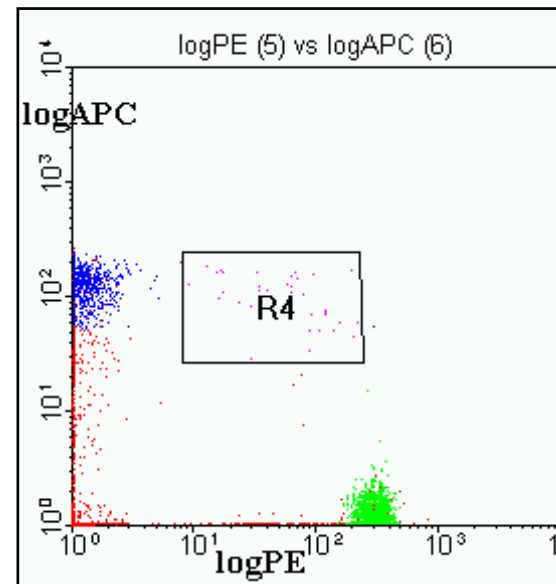
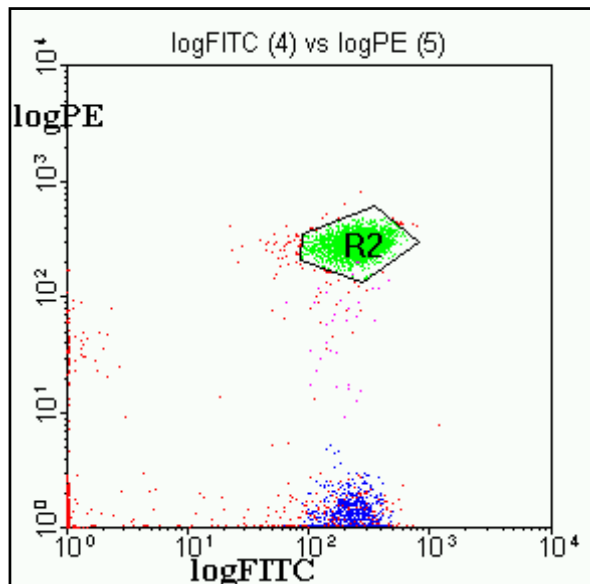
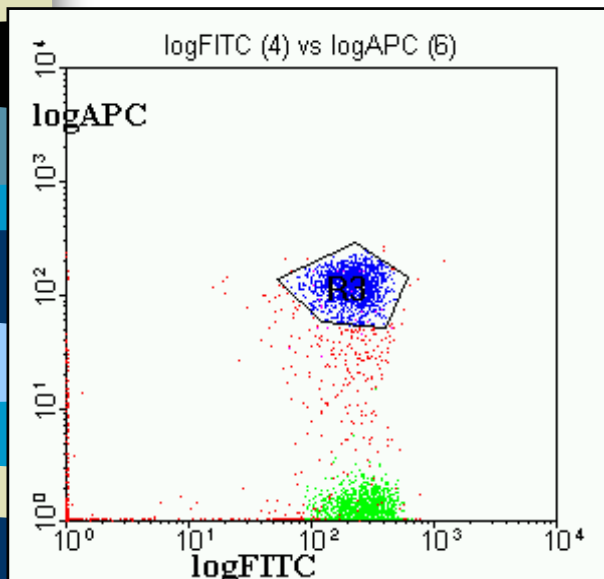
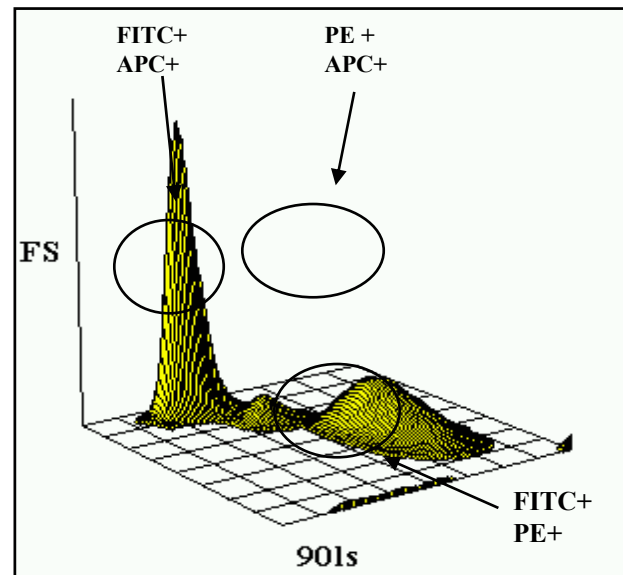
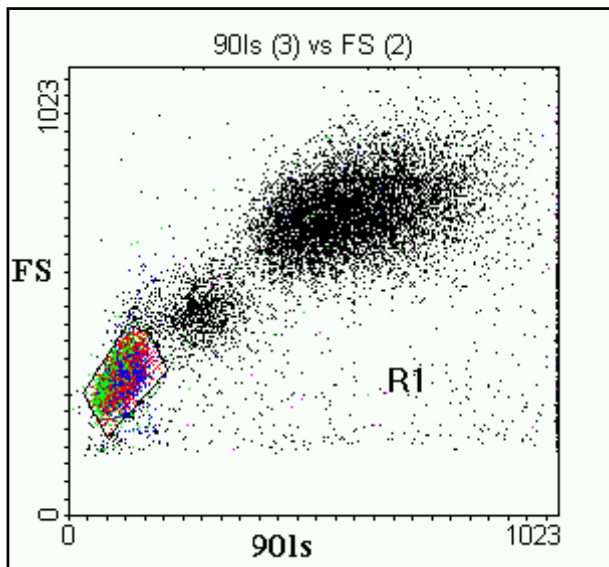


Back-gating using Region 4

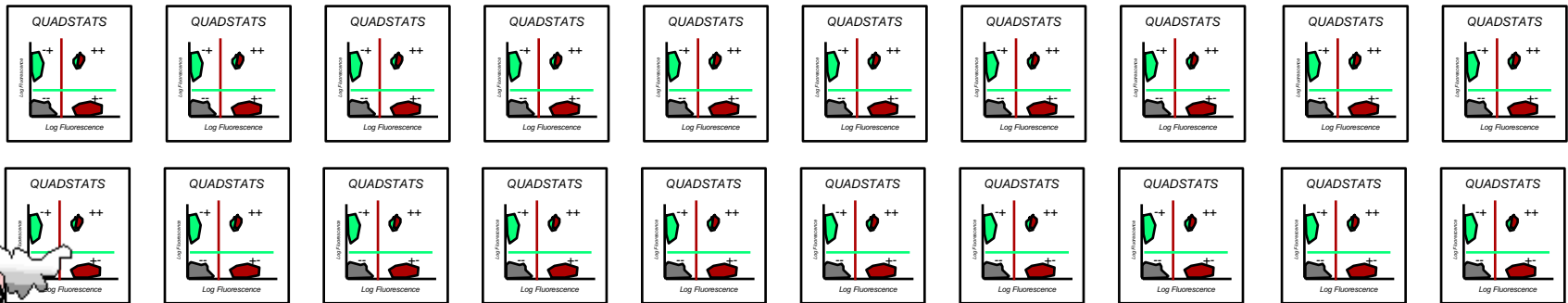
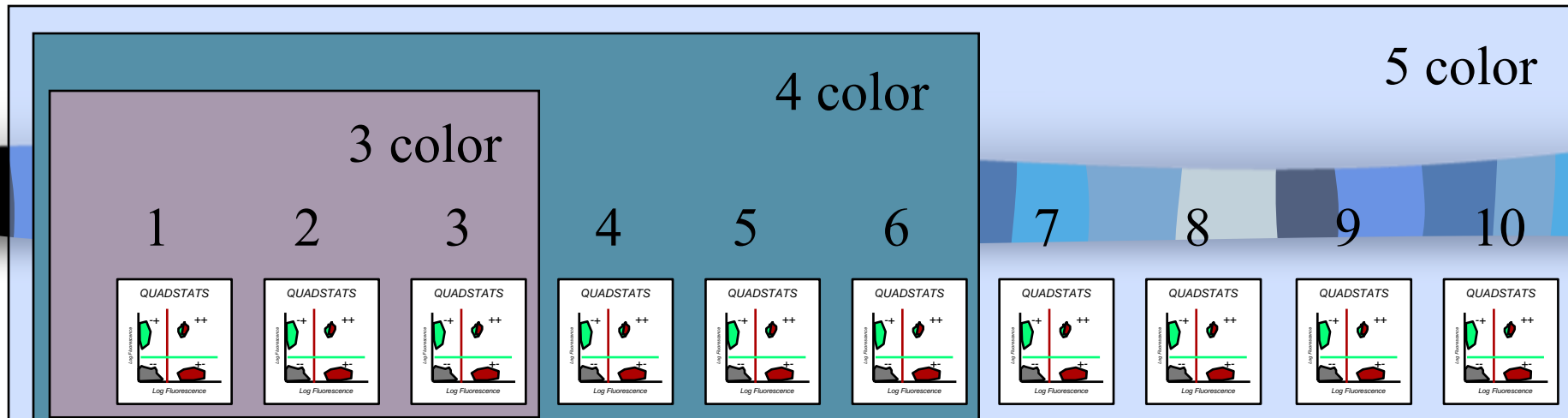
# Back Gating



# 3 Parameter Data Display



# Vícebarevné analýzy generují mnoho dat...





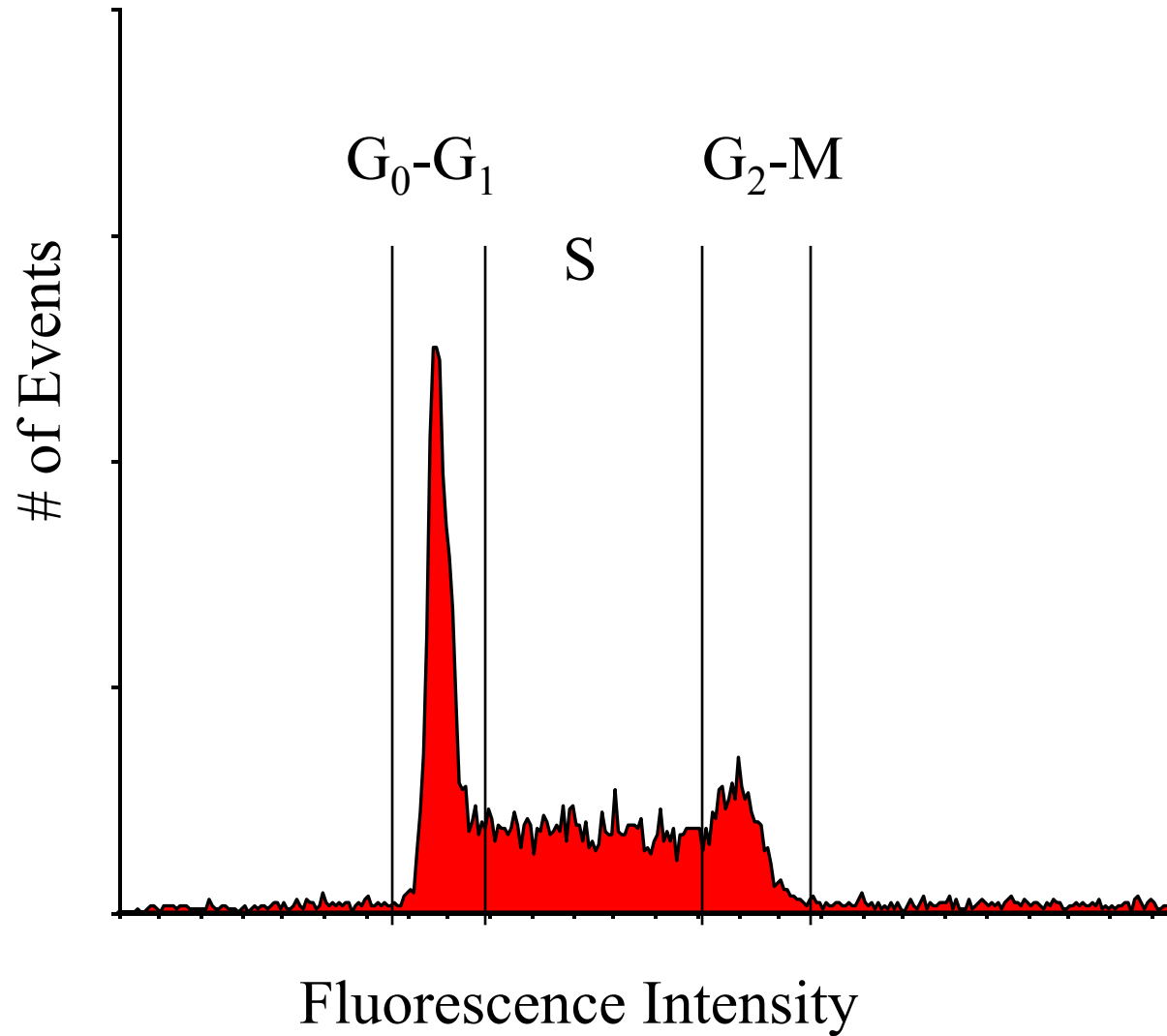
# Způsoby pomocí kterých lze upravit výsledky:

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

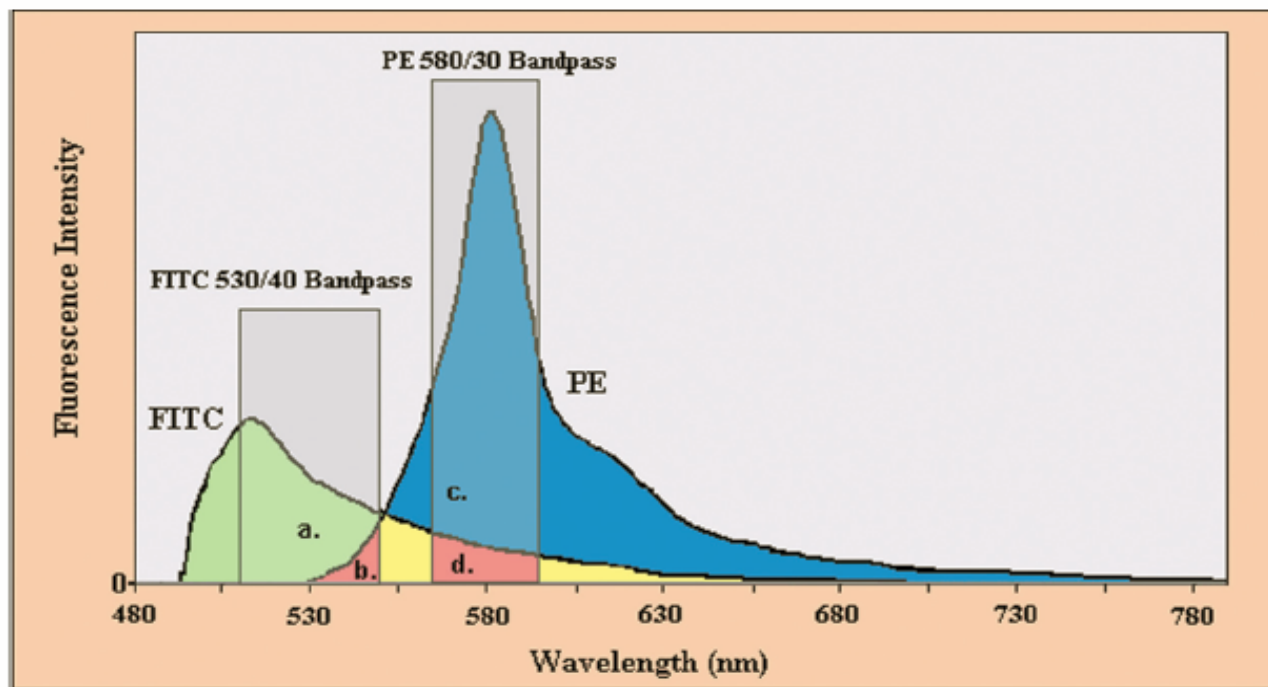
Příklad - pro DNA analýzu je třeba:

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

# DNA Histogram

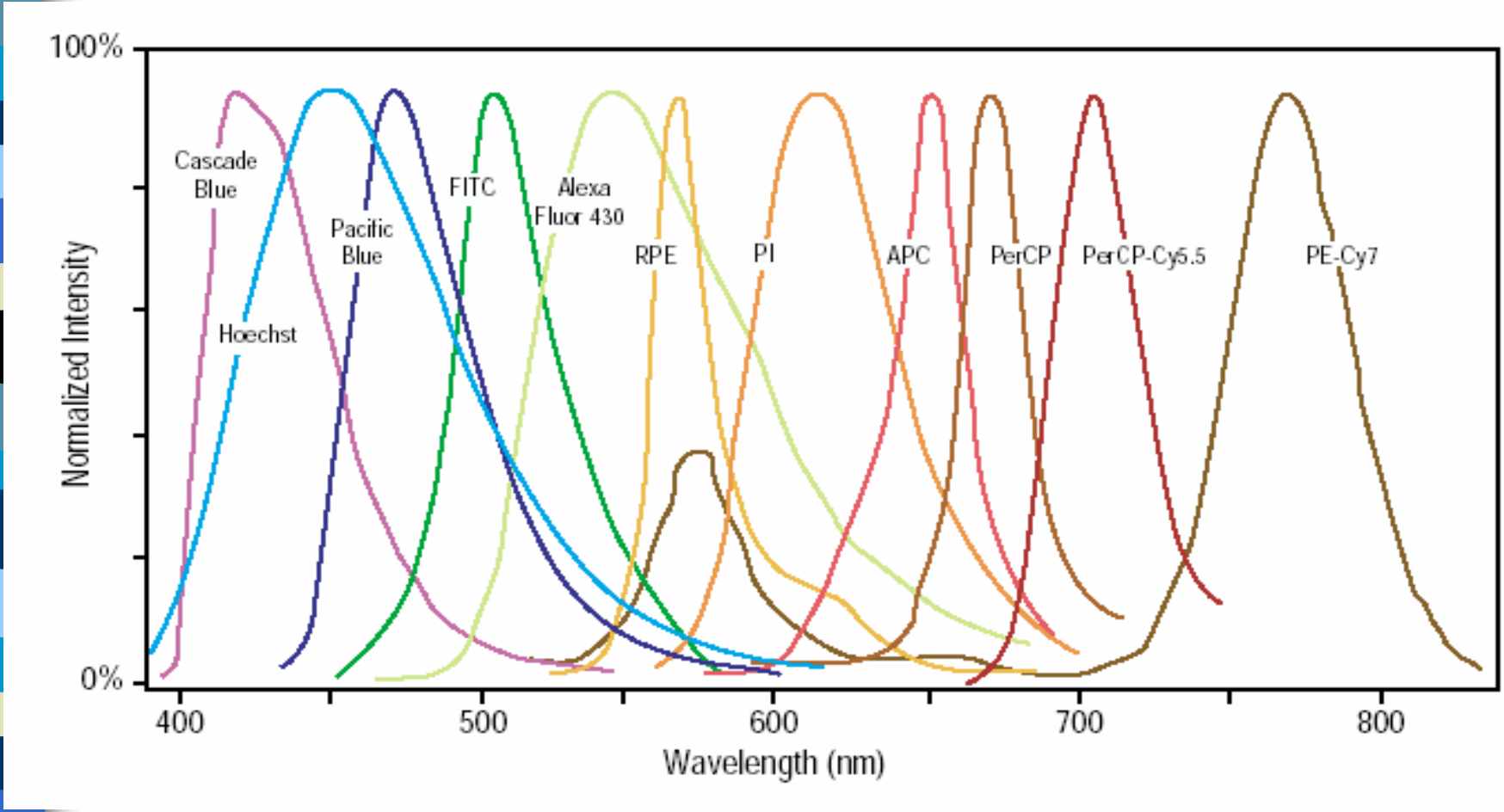


# Co je problém při vícebarevné detekci?





# 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%.

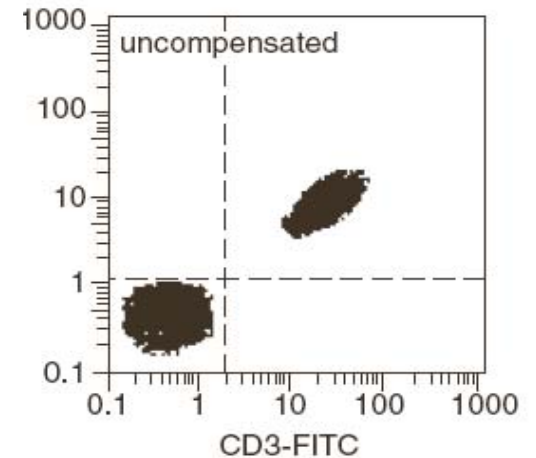
Current Protocols in Cytometry

# Kompenzace fluorescenčního signálu

#2

FITC positive & negative

PE negative beads



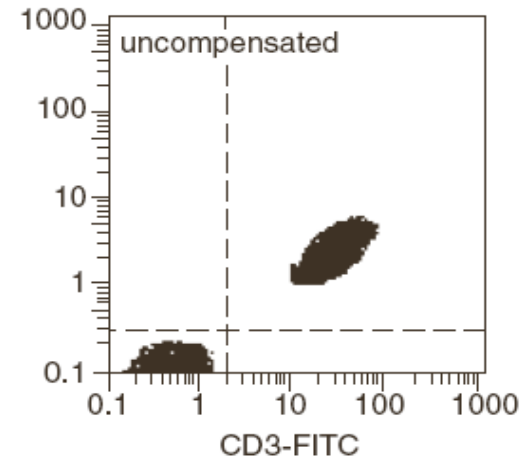
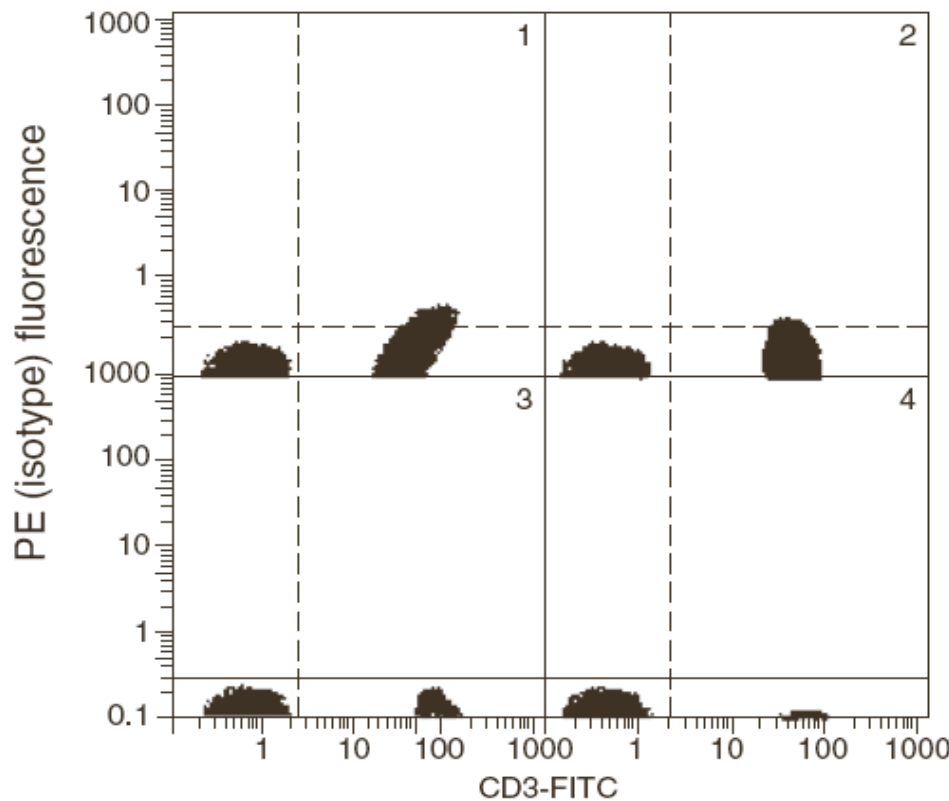
Current Protocols in Cytometry

# Kompenzace fluorescenčního signálu

FITC positive & negative

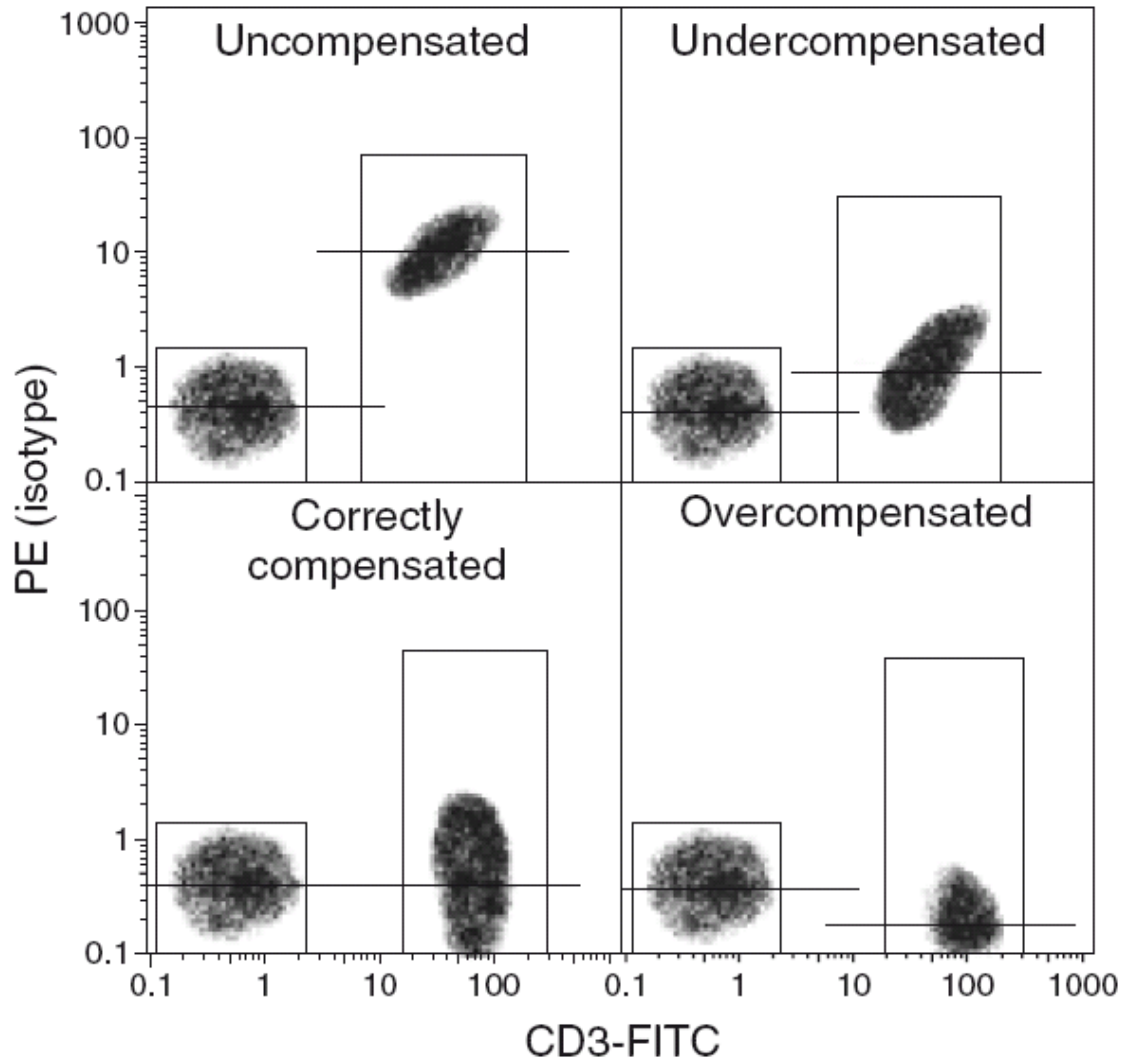
PE negative beads

**NONE!**



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

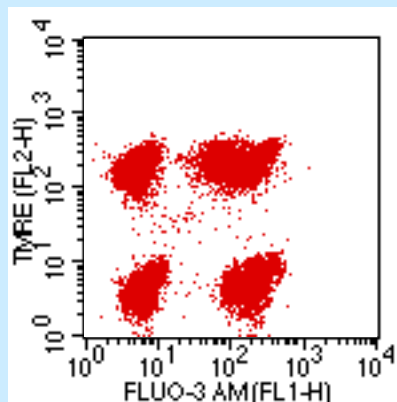
CaliBRITE APC Beads–Catalog No. 340487

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

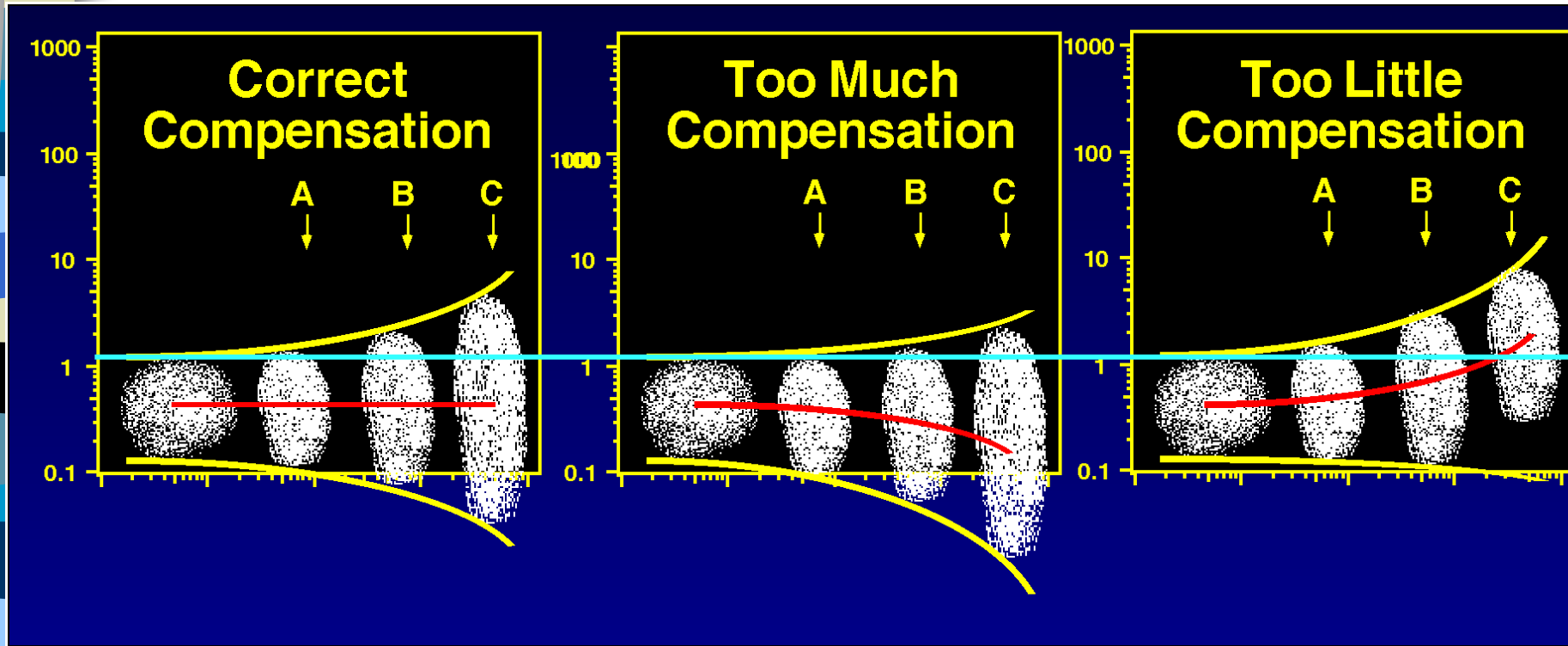
FL2 - 434

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

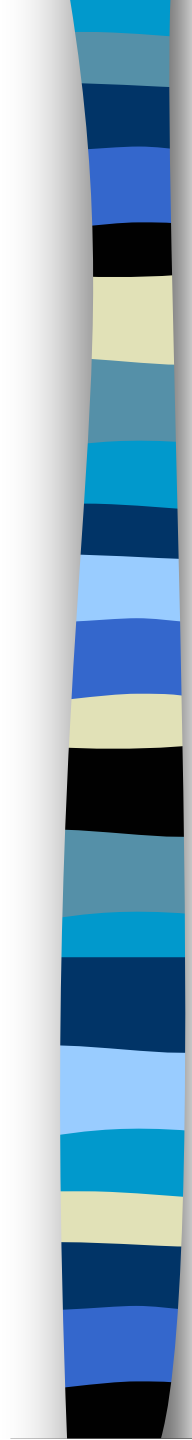
**Current Protocols in Cytometry** (2002) 1.14.1-1.14.20 John Wiley & Sons, Inc.

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.