

Bi9393 Analytická cytometrie

Lekce 2

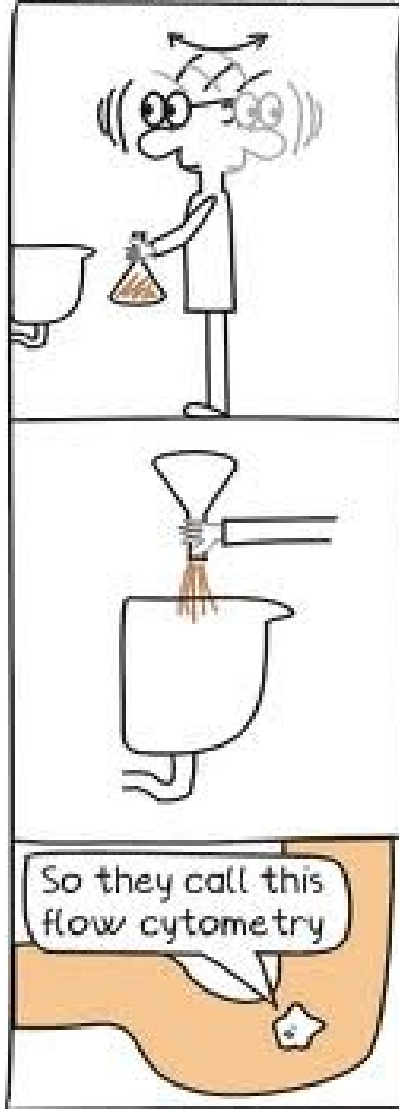


Karel Souček, Ph.D.

Oddělení cytokinetiky
Biofyzikální ústav AVČR, v.v.i
Královopolská 135
612 65 Brno

e-mail: ksoucek@ibp.cz
tel.: 541 517 166

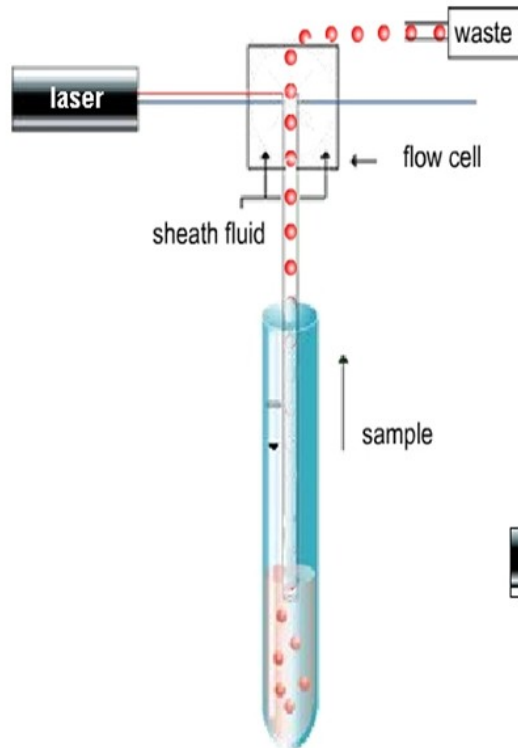
Flow cytometry



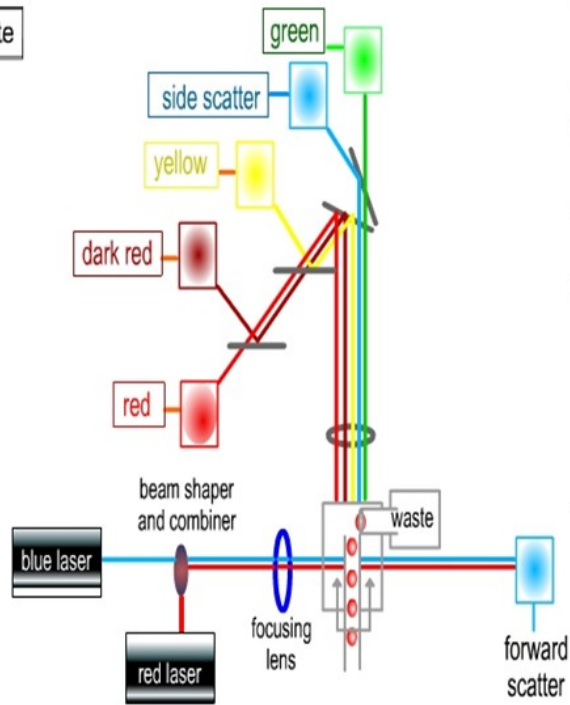
Stripped Science

by Viktor S. Podr

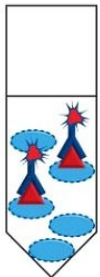
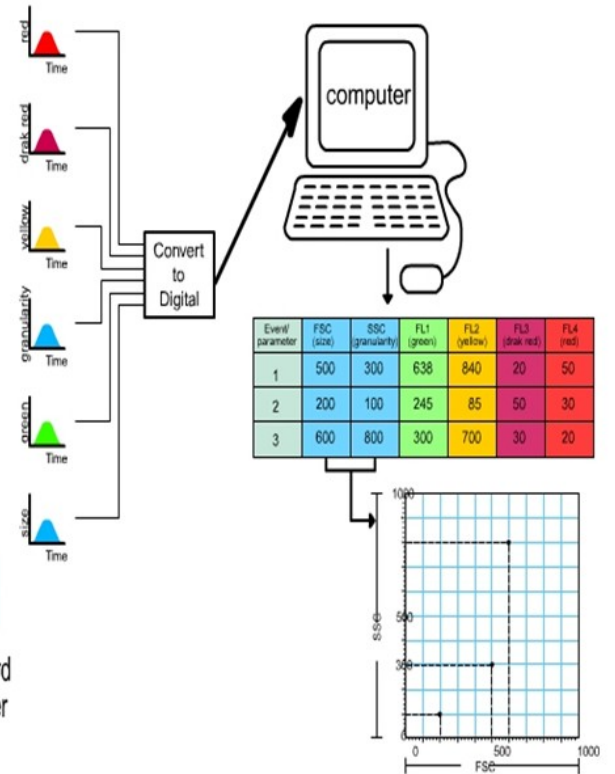
fluidics



optics



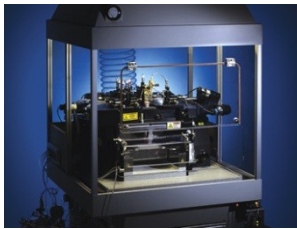
electronics



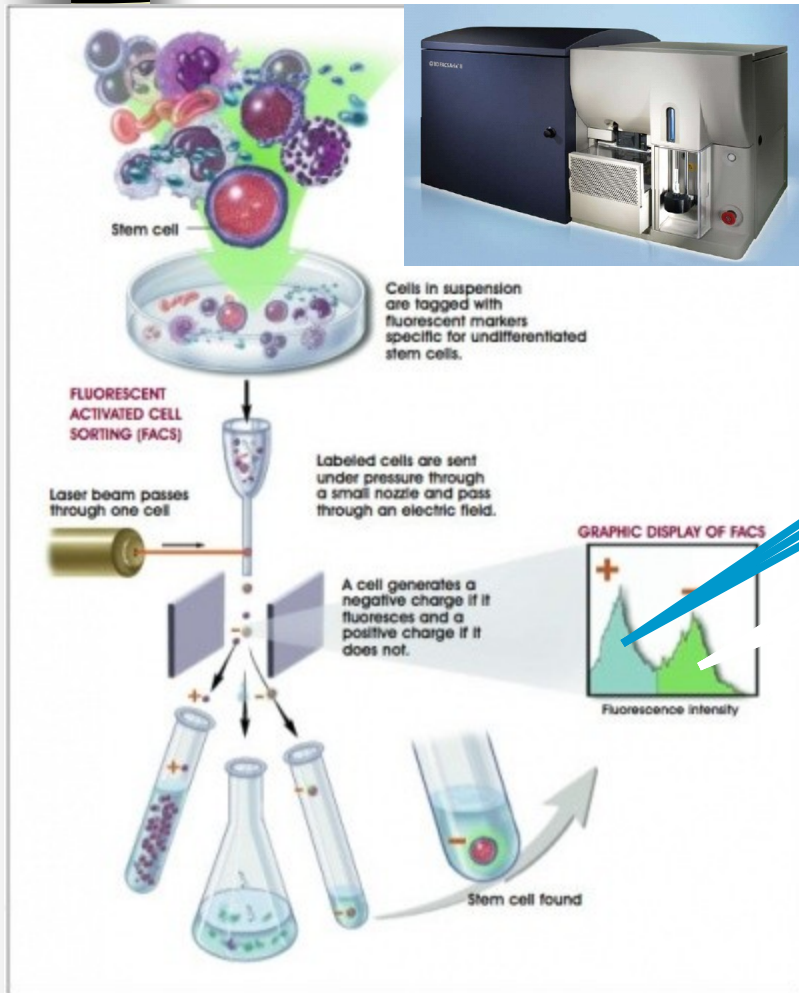
Key

- Cell
- Antigen
- Fluorochrome conjugated Primary antibody

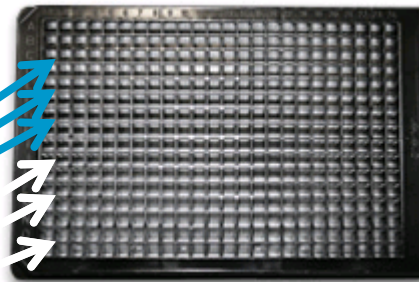
Available technology



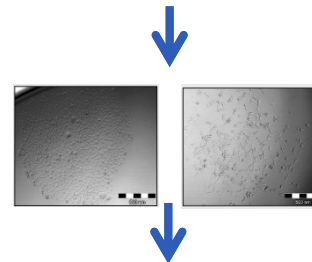
new automatic cell cloning assay (ACCA) for determination of clonogenic capacity of CSCs



single cell/well
up to 384 well plate



re-culture after sorting (2D, 3D)



analysis: CyQuant, ATP, xCelligence, microscopy





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 $E = h\nu$, kde h je Planckova konstanta a ν 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 $E=h\nu$ a $E=hc/\lambda$ [ν -frequency (Hz), c – rychlost světla (3×10^8 m/s), λ -wavelength (nm), h -Planckova konstanta (6.63×10^{-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 **2.45×10^{18} photons**
- 1 watt (W) = 1 joule/second a 10 mW laser at 488 nm is putting out 2.45×10^{16} photons/sec

What about a UV laser?

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

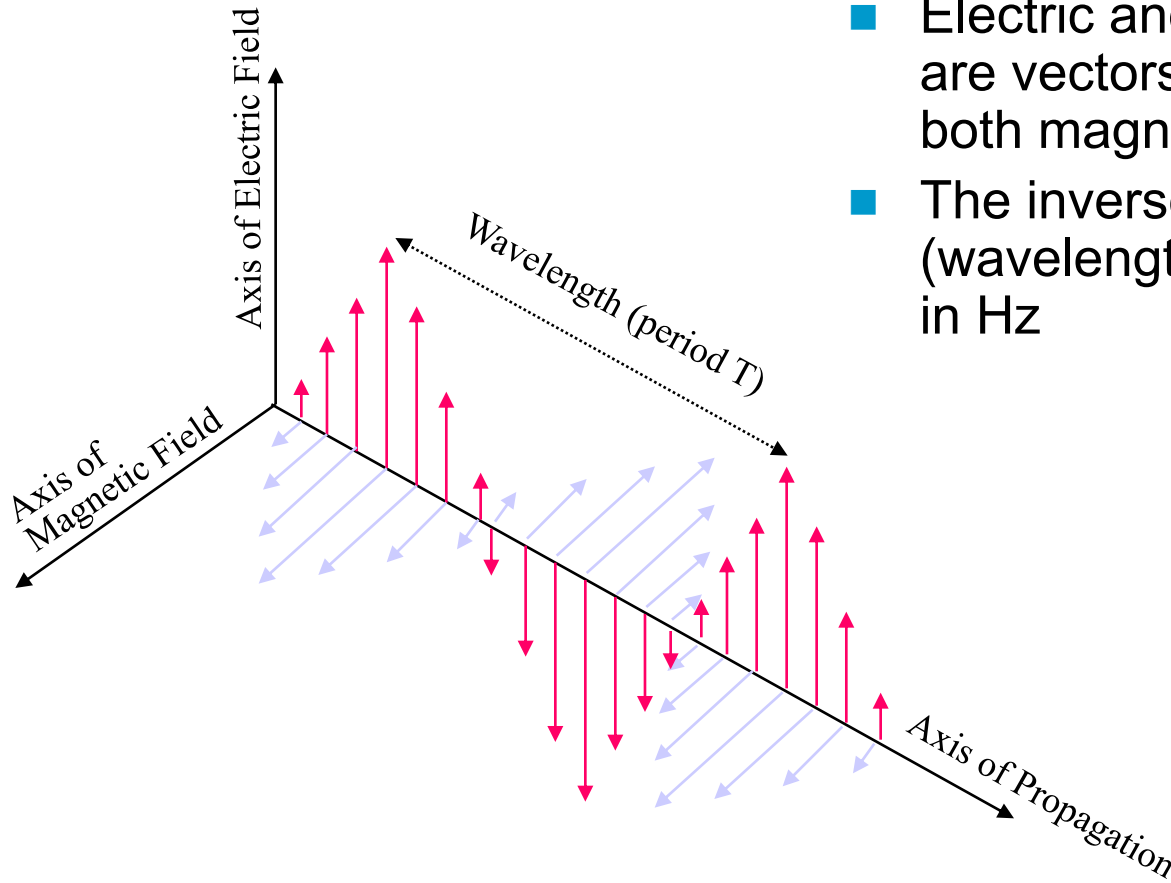
$$= 6.12 \times 10^{-19} \text{ J} \quad \text{so 1 Joule at 325 nm} = 1.63 \times 10^{18} \text{ photons}$$

What about a He-Ne laser?

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

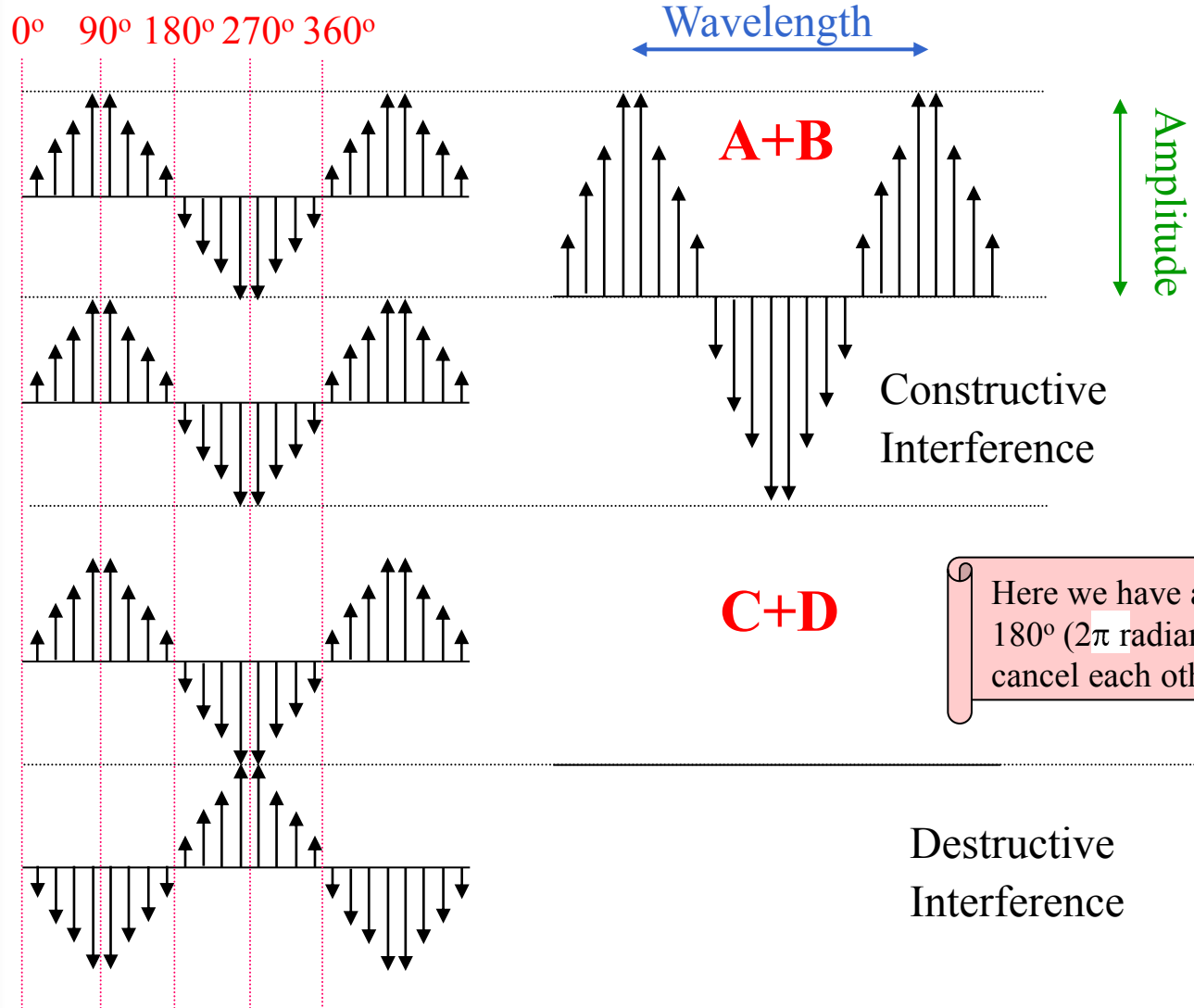
$$= 3.14 \times 10^{-19} \text{ J} \quad \text{so 1 Joule at 633 nm} = 3.18 \times 10^{18} \text{ photons}$$

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



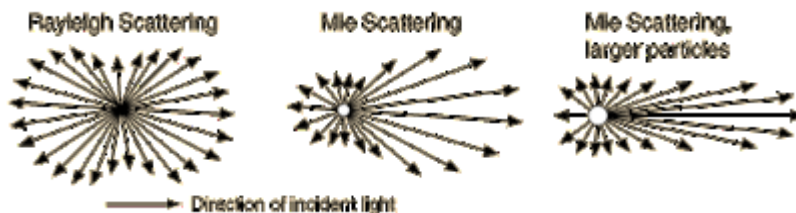
The frequency does not change, but the amplitude is doubled

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

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*



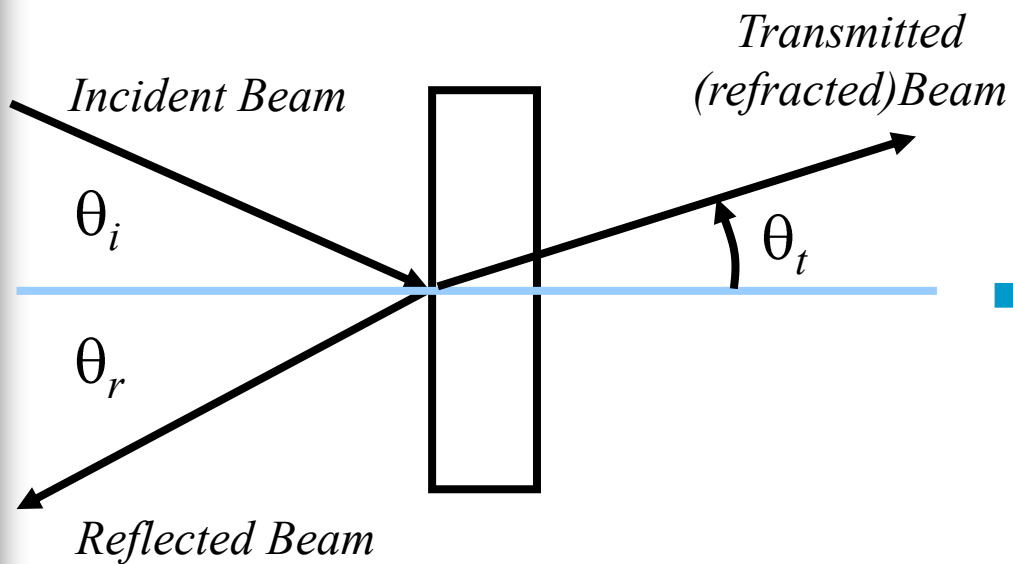
Rayleighův a Mieův rozptyl

- **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



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

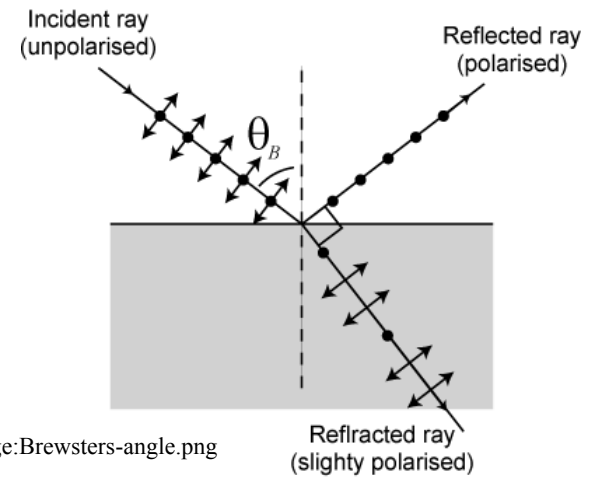
Látka	index lomu
Vzduch (normální tlak)	1,0003
led	1,31
voda	1,33
etanol	1,36
sklo	1,5 až 1,9
sůl	1,52
safir	1,77
diamant	2,42

Snellův zákon

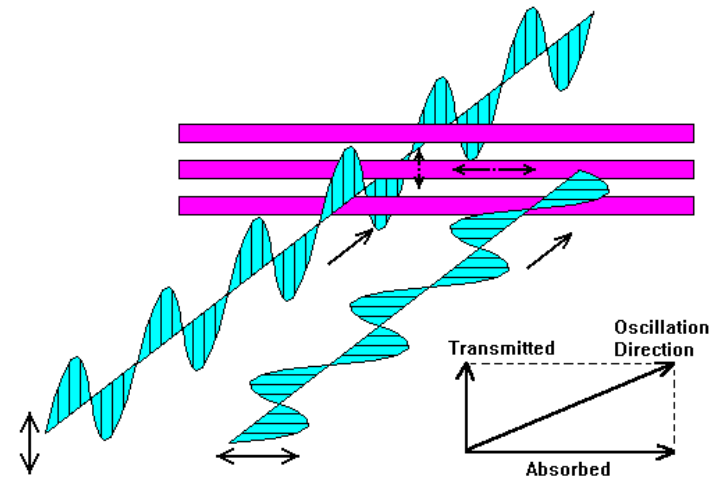
- Při šíření záření z prostředí opticky řidšího do opticky hustšího prostředí se paprsky lámou směrem ke kolmici.
- Při šíření záření z prostředí opticky hustšího do opticky řidšího prostředí se paprsky lámou směrem od kolmice.

Brewster's Angle

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

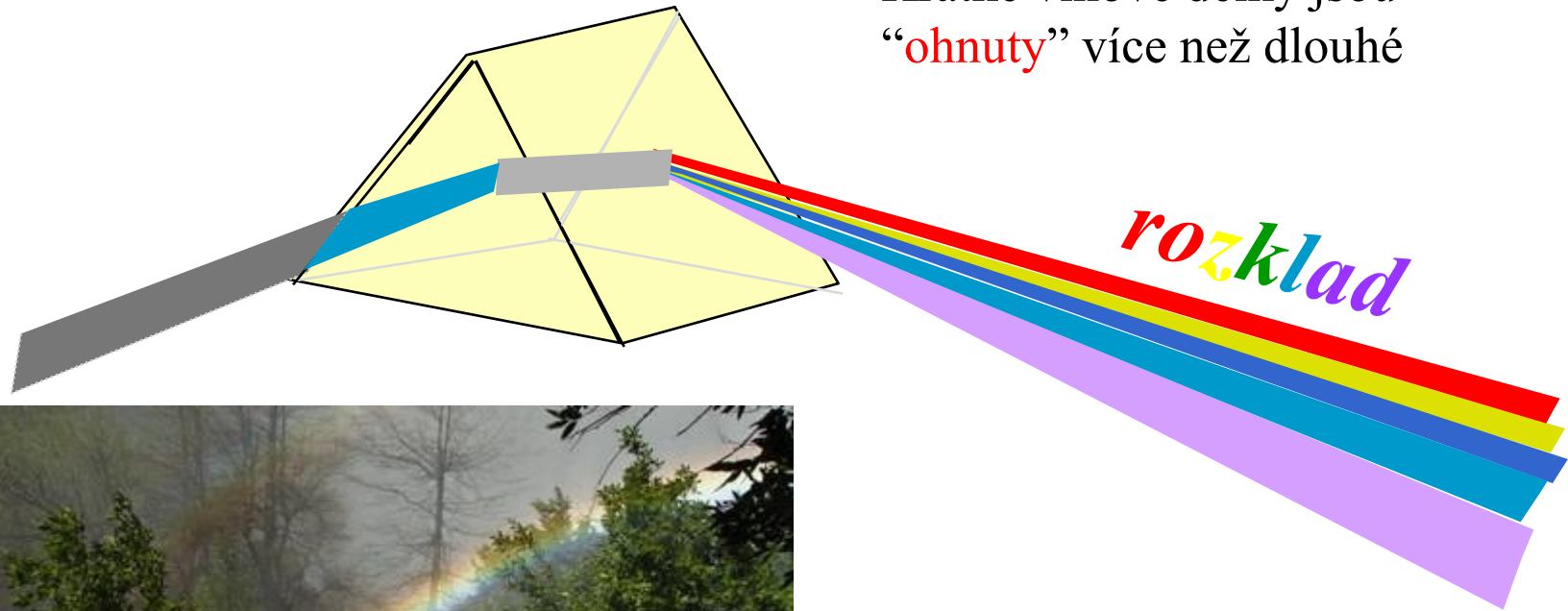


<http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Brewsters-angle.png>

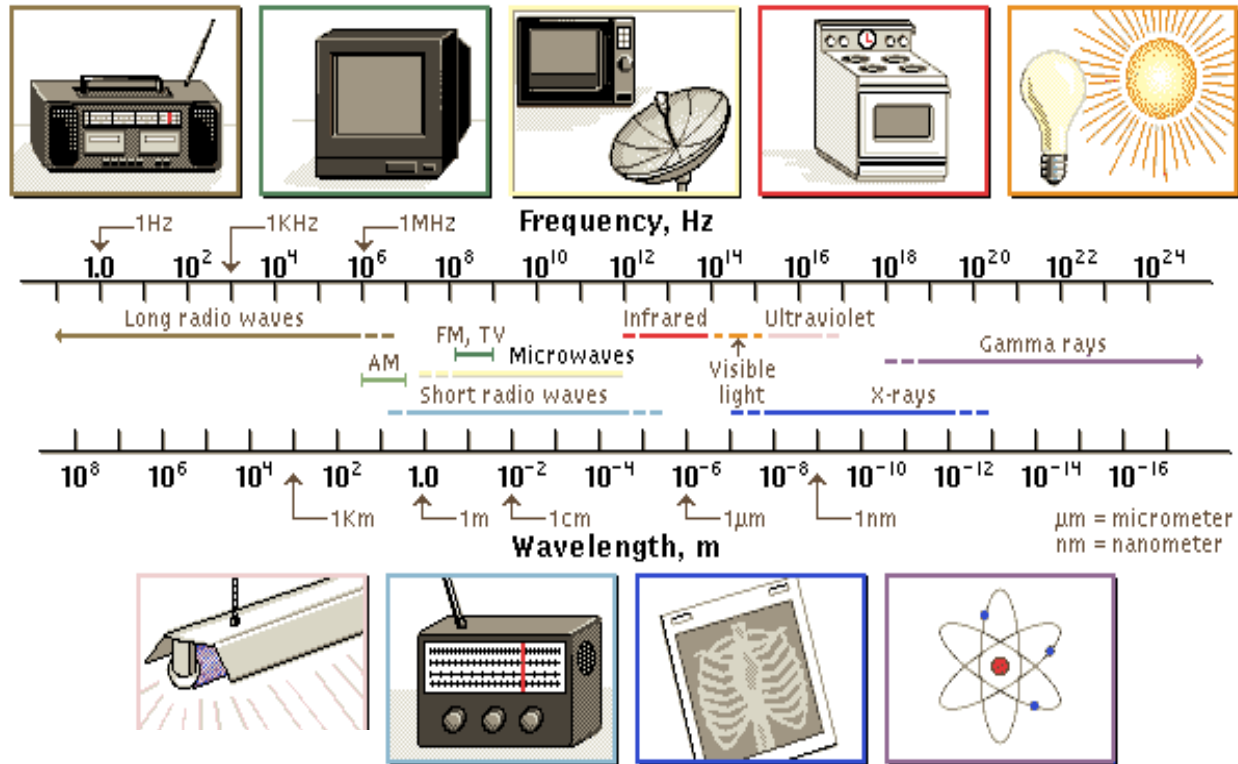


Ohyb a rozklad světla

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**

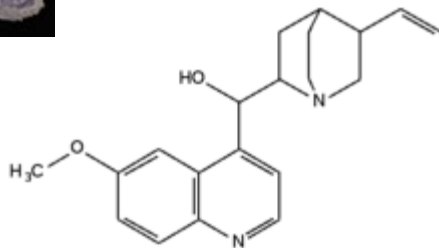
George Gabriel Stokes (1819 – 1903)

Anglický fyzik a matematik
působící na univerzitě v Cambridge

1852 – popsal fluorescenci

Název vznikl z anglického slova *fluospar*
(fluorit, kazivec = nerost 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.

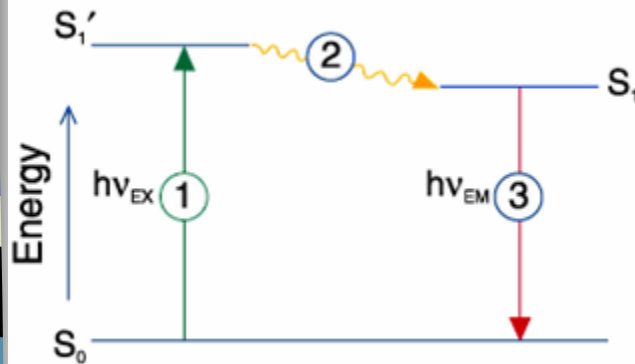
Received May 11,—Read May 27, 1852.

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 (S_1')**. 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 $1-10 \cdot 10^{-9}$ 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.

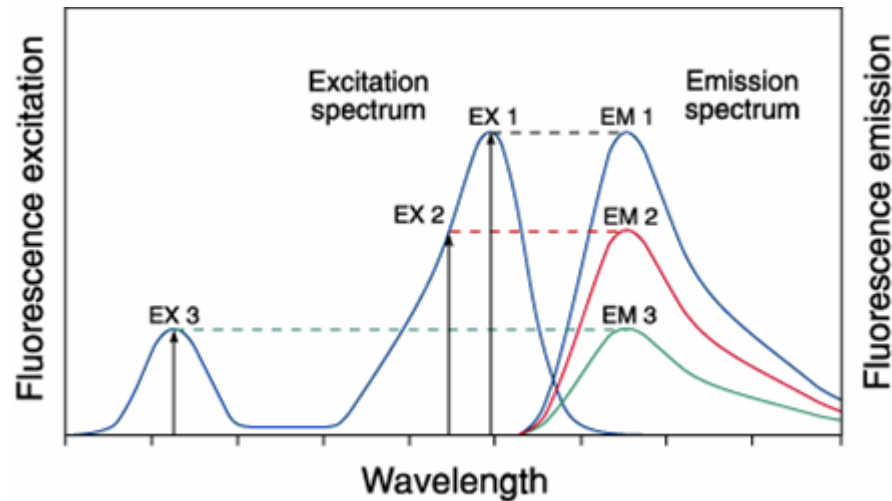
Jablonski diagram illustrating the processes involved in the creation of an excited electronic singlet state by optical absorption and subsequent emission of fluorescence. The labeled stages 1, 2, 3 are referred to in the text.



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 cytometr měří fluorescenci v proudícím toku, umožňuje detekovat a kvantifikovat subpopulace uvnitř velkého vzorku

Fluorescenční signál

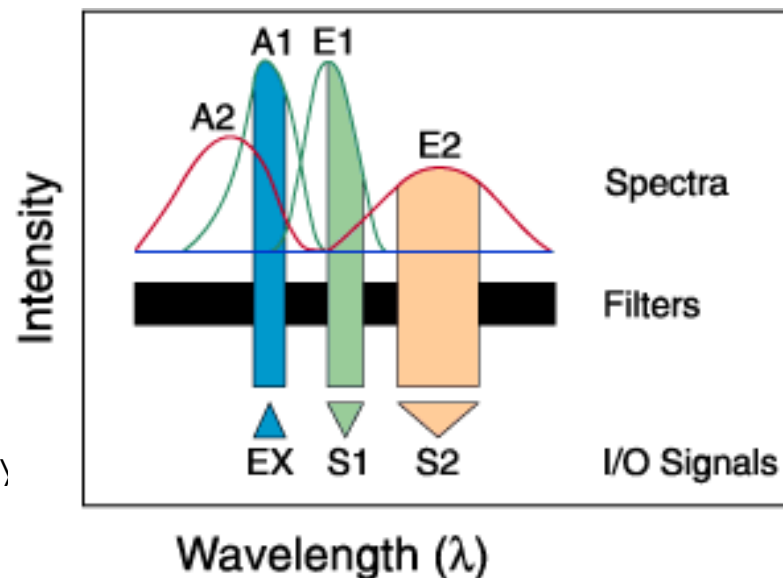
- spektrofluorometer je flexibilní, umožňuje měřit v kontinuálním spektru excitačních a emisních vlnových délek
- flow cytometr potřebuje fluorescenční značky excitovatelné určitou vlnovou délkou.

Fluorescence pozadí

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

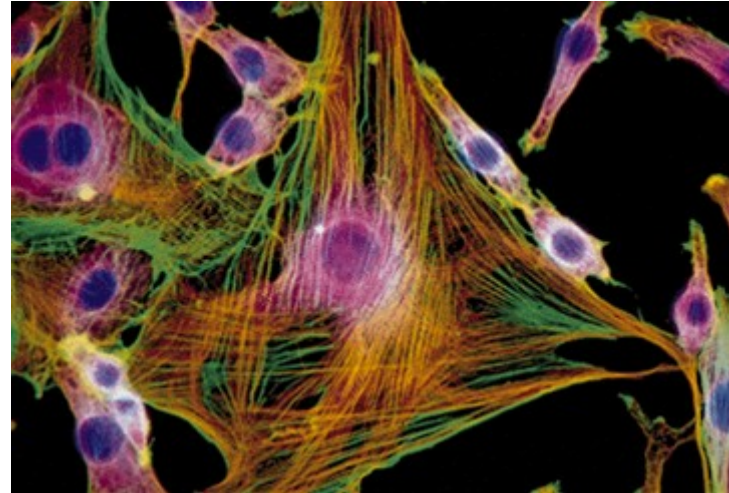
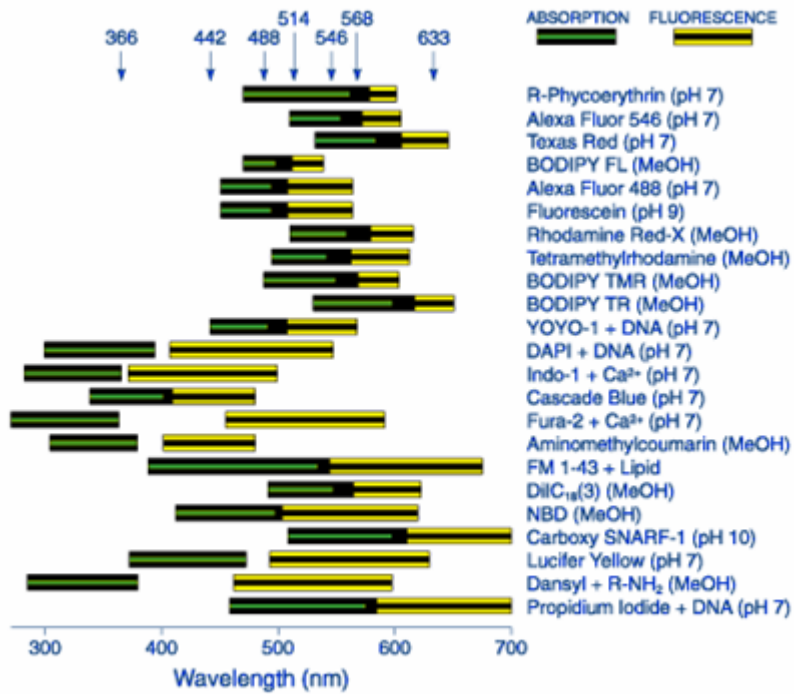
Vícebarevné značení

- 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

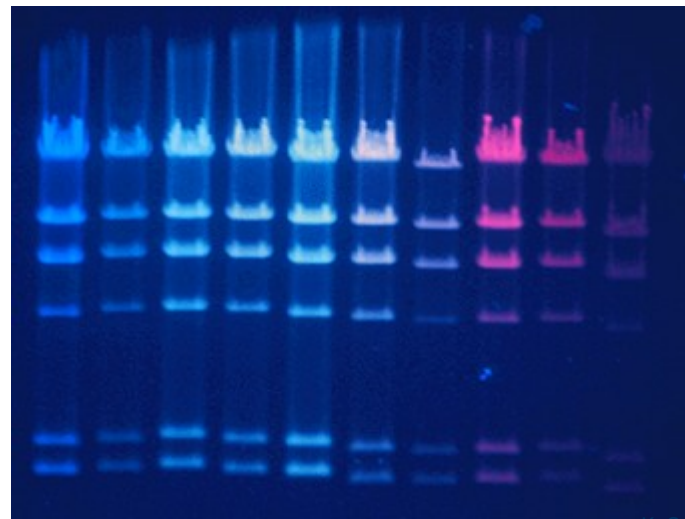
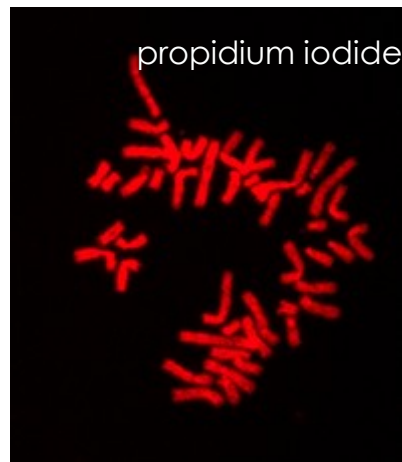




Table of Fluorochromes

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

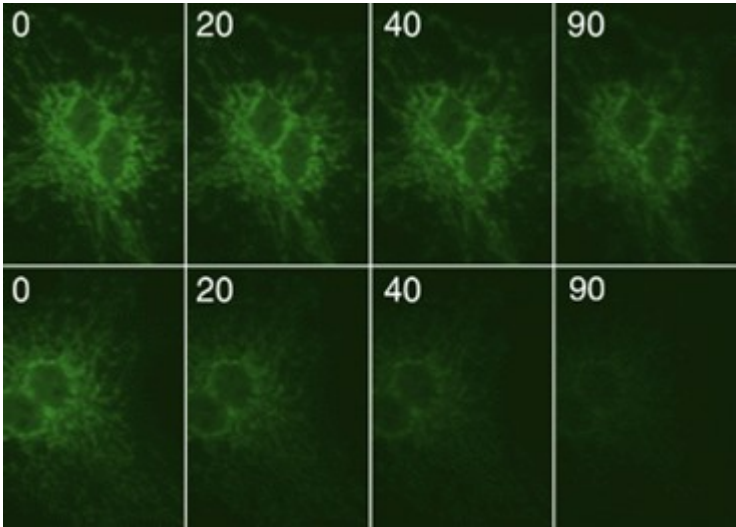


Procesy interferující a detekcí fluorescence

- **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



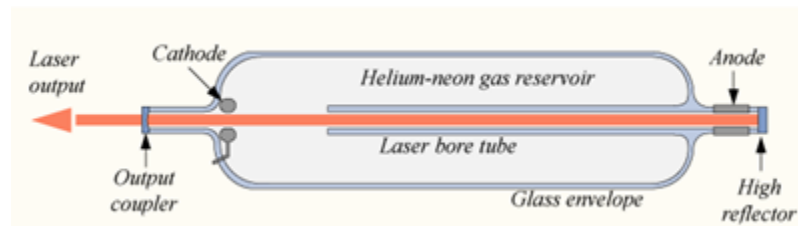
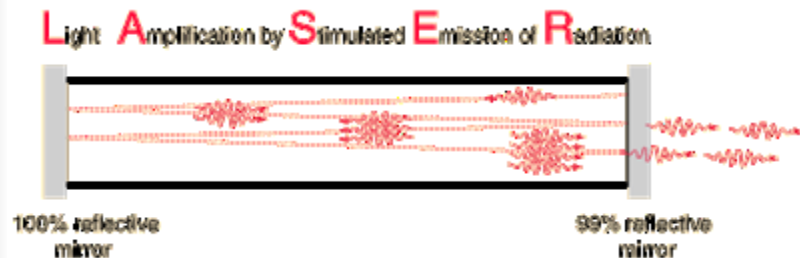
Optika - zdroj světla

- 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)



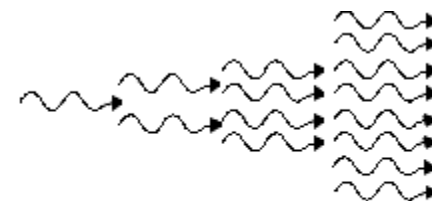
http://en.wikipedia.org/wiki/Helium-neon_laser

- koherentní (souvislý světelný tok)
- monochromatický
- soustředěný

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



Thermal emitter (lamp)

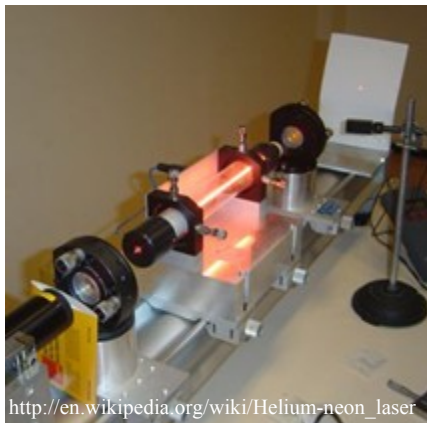
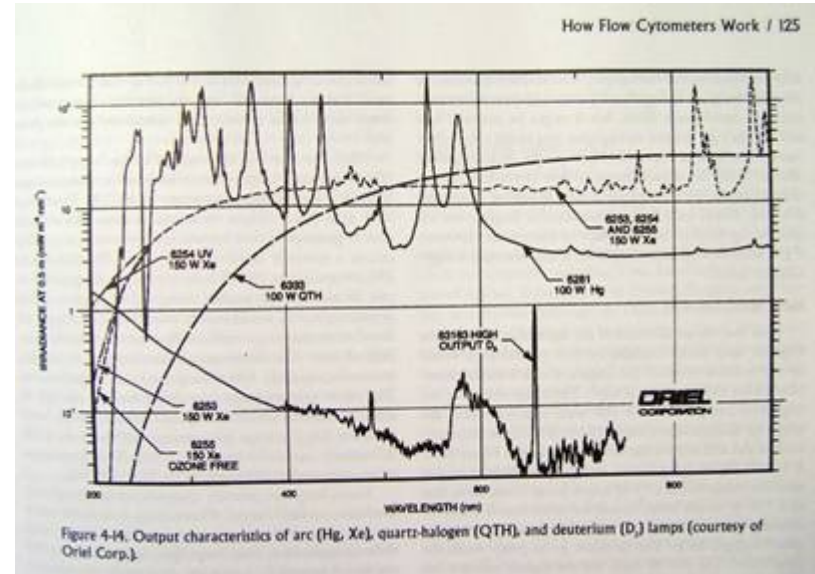
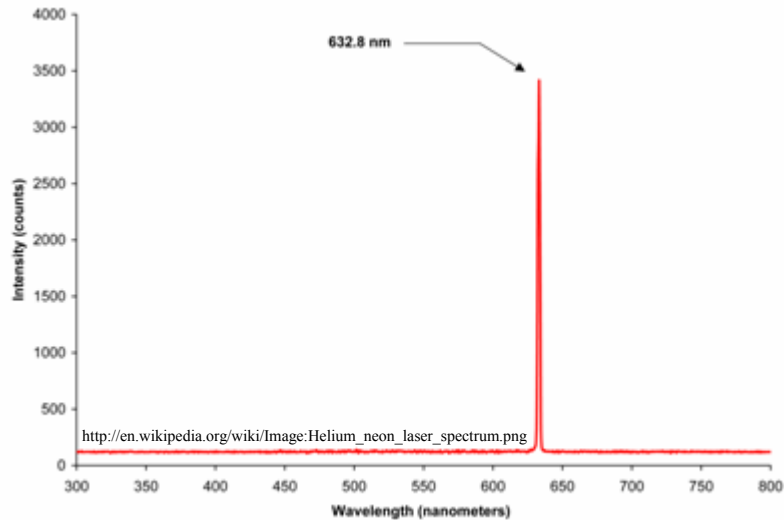


Laser

<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>

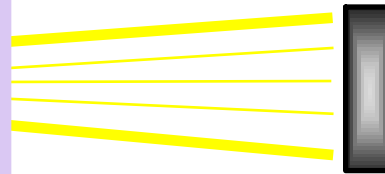
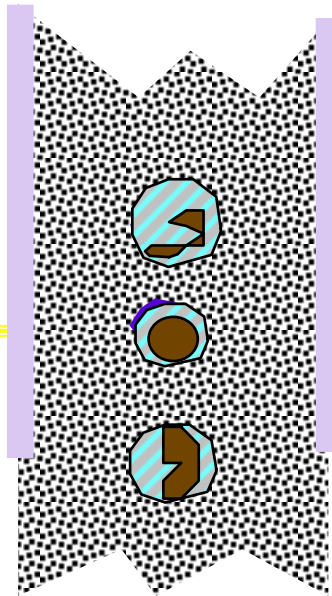
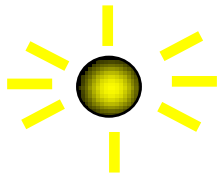


Optika - „Forward Scatter“ kanál

- 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



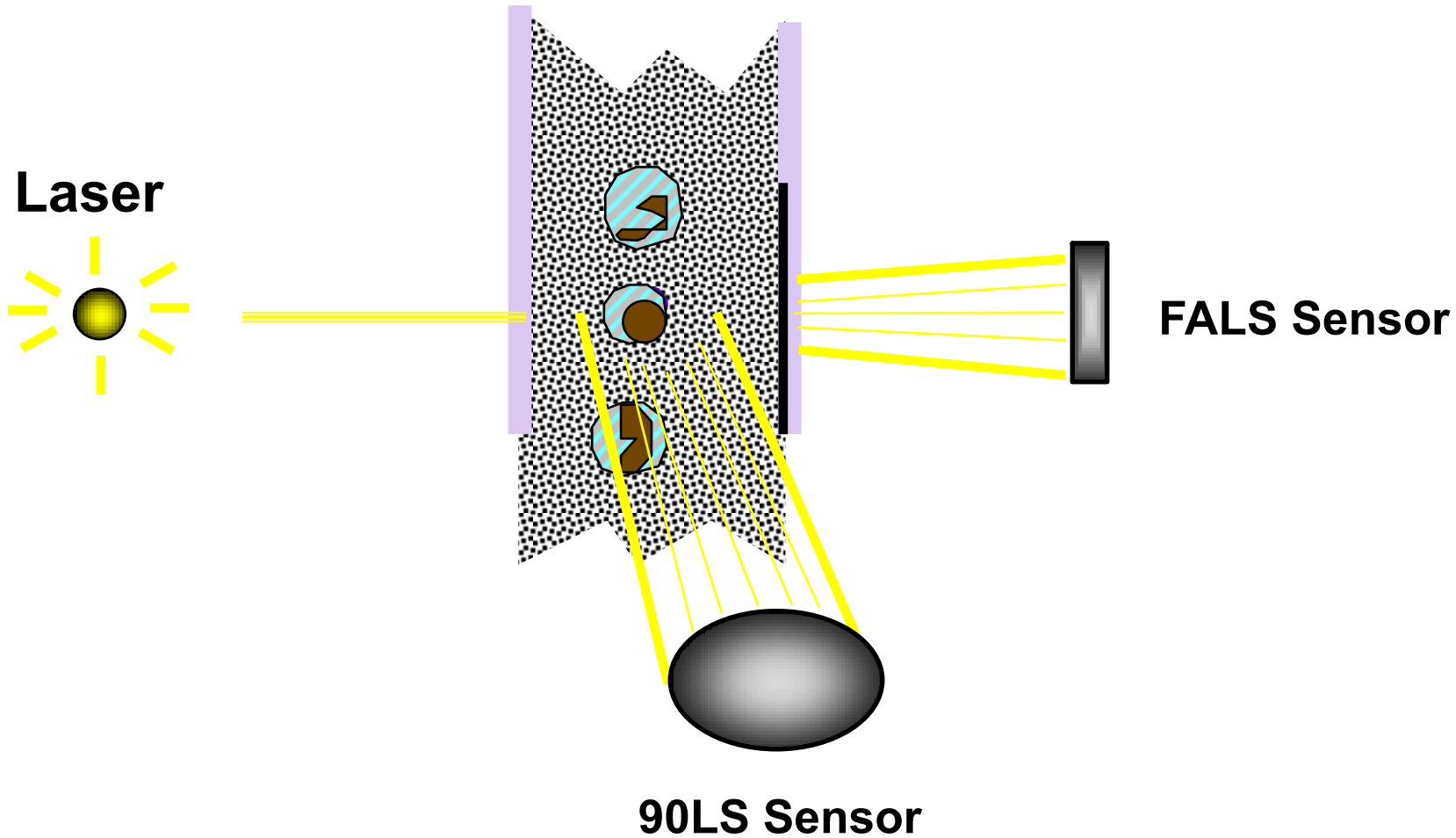
FALS
Sensor



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 ngranulární** populaci

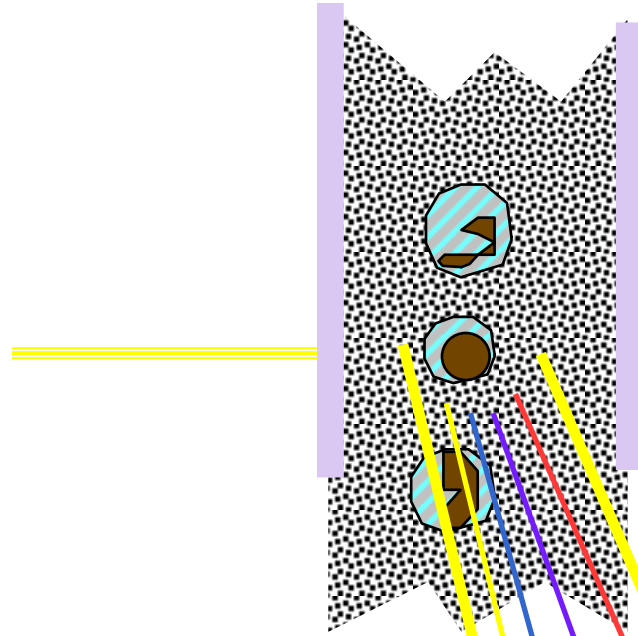
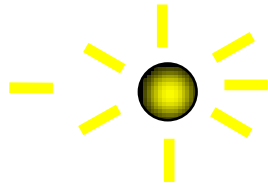


Optika - fluorescenční kanály

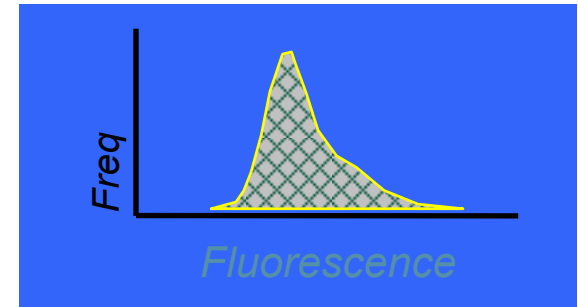
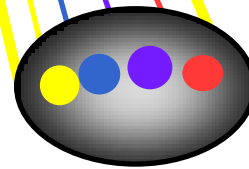
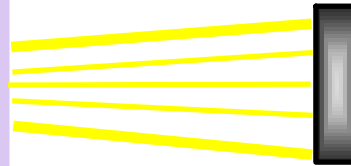
- fluorescence emitovaná z každého fluorochromu je detekována pomocí specifického **fluorescenčního kanálu**
- specifita detekce je kontrolována vlnovou selektivitou filtru a zrcadel

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

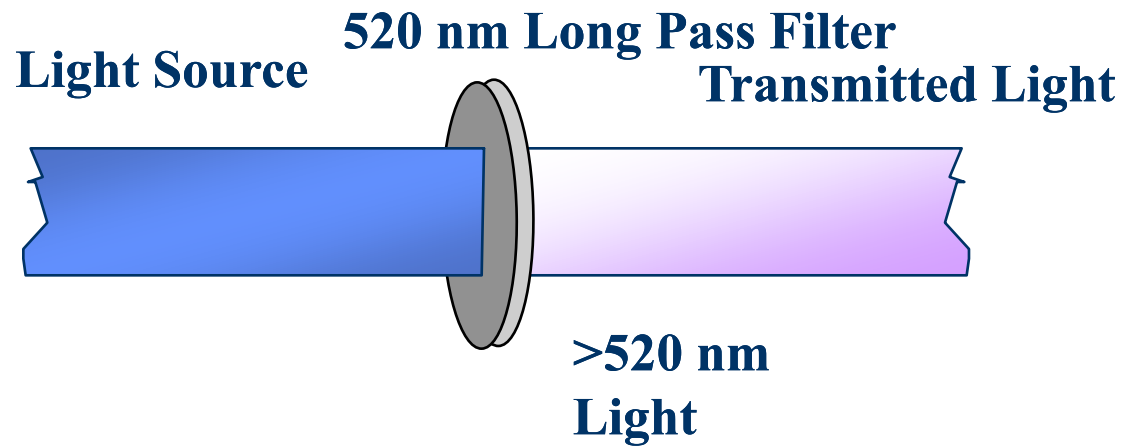




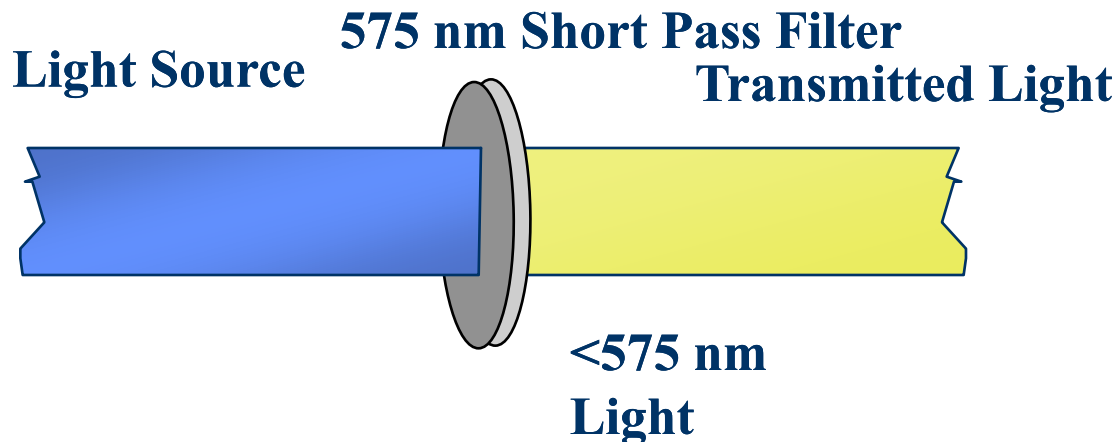
Optics - vlastnosti filtrů

- „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

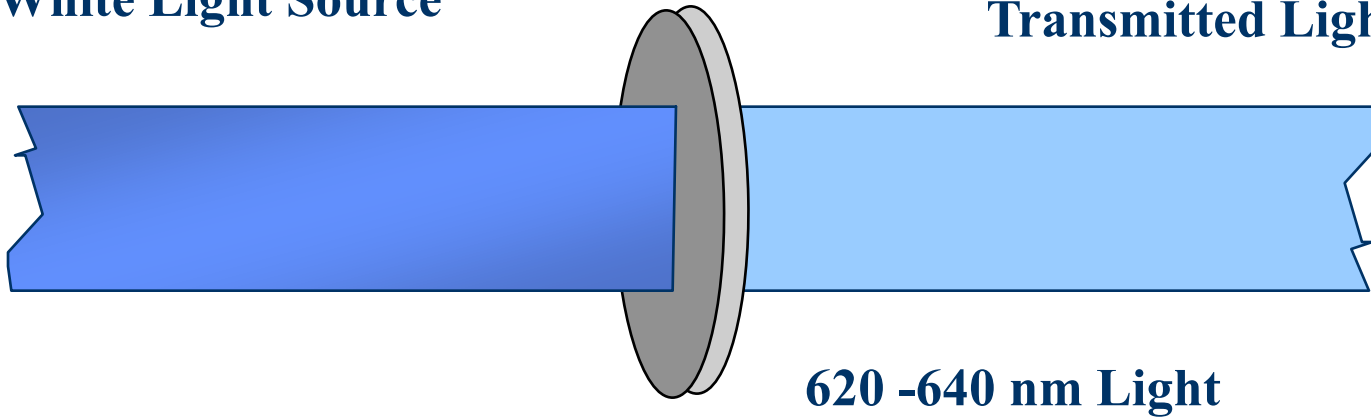


Standard Band Pass Filters

630 nm BandPass Filter

White Light Source

Transmitted Light





Optika - vlastnosti filtrů

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

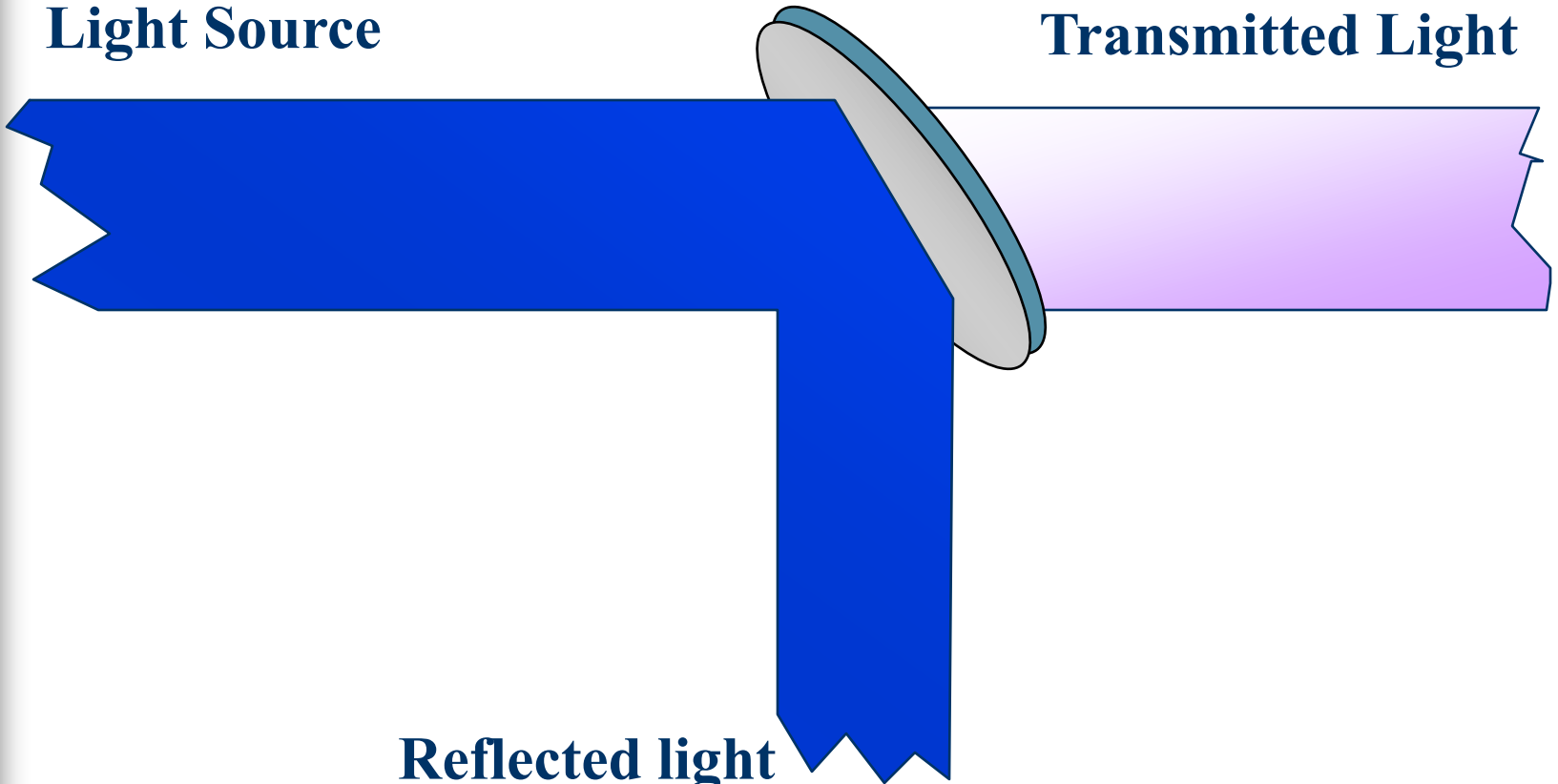
Dichroic Filter/Mirror

Filter placed at 45°

Light Source

Transmitted Light

Reflected light





Optika - uspořádání filtrů

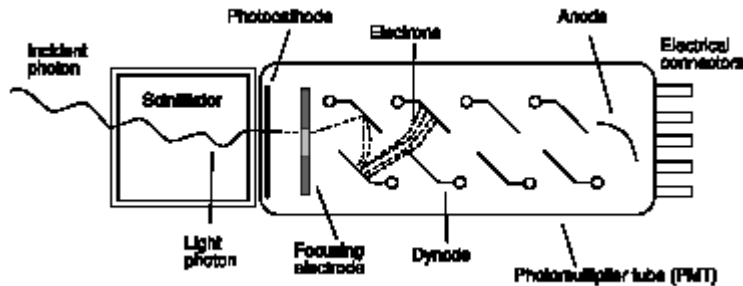
- k společnému měření více než jednoho „scatteru“ nebo fluorescence , používáme **mnohonásobné kanály** (a detektory)
- multikanálové uspořádání musí splňovat
 - **spektrální vlastnosti** použitého fluorochromu
 - **správný řád uspořádání** filtrů a zrcadel



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 přесvícením

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

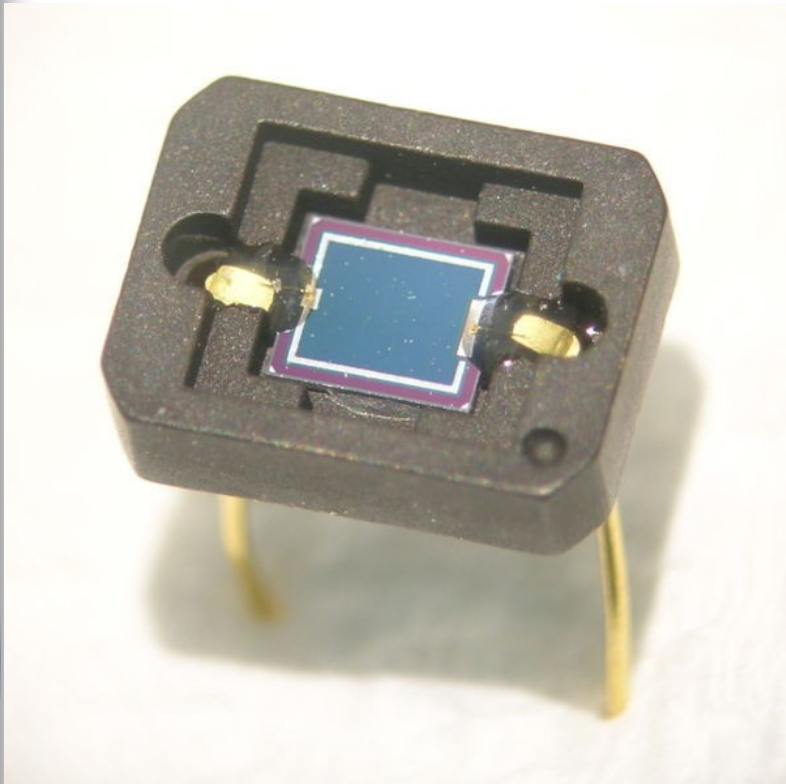
Porovnání s PMT

Výhody:

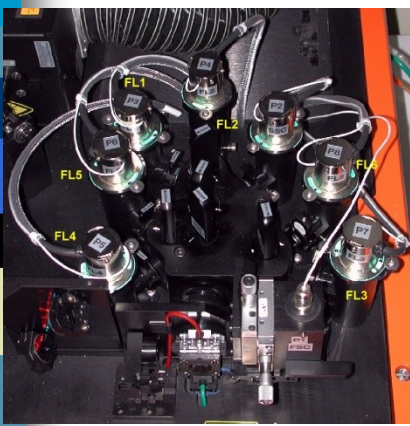
1. excelentní linearita signálu
2. rozsah spektrální detekce 190 nm to 1100 nm (silicon)
3. nízký šum
4. Odolnost vůči mechanickým vlivům
5. nízká cena
6. malá velikost a hmotnost
7. dlouhá životnost
8. Vysoká kvantová účinnost (~80%)
9. Nepotřebuje vysoká napětí

Nevýhody

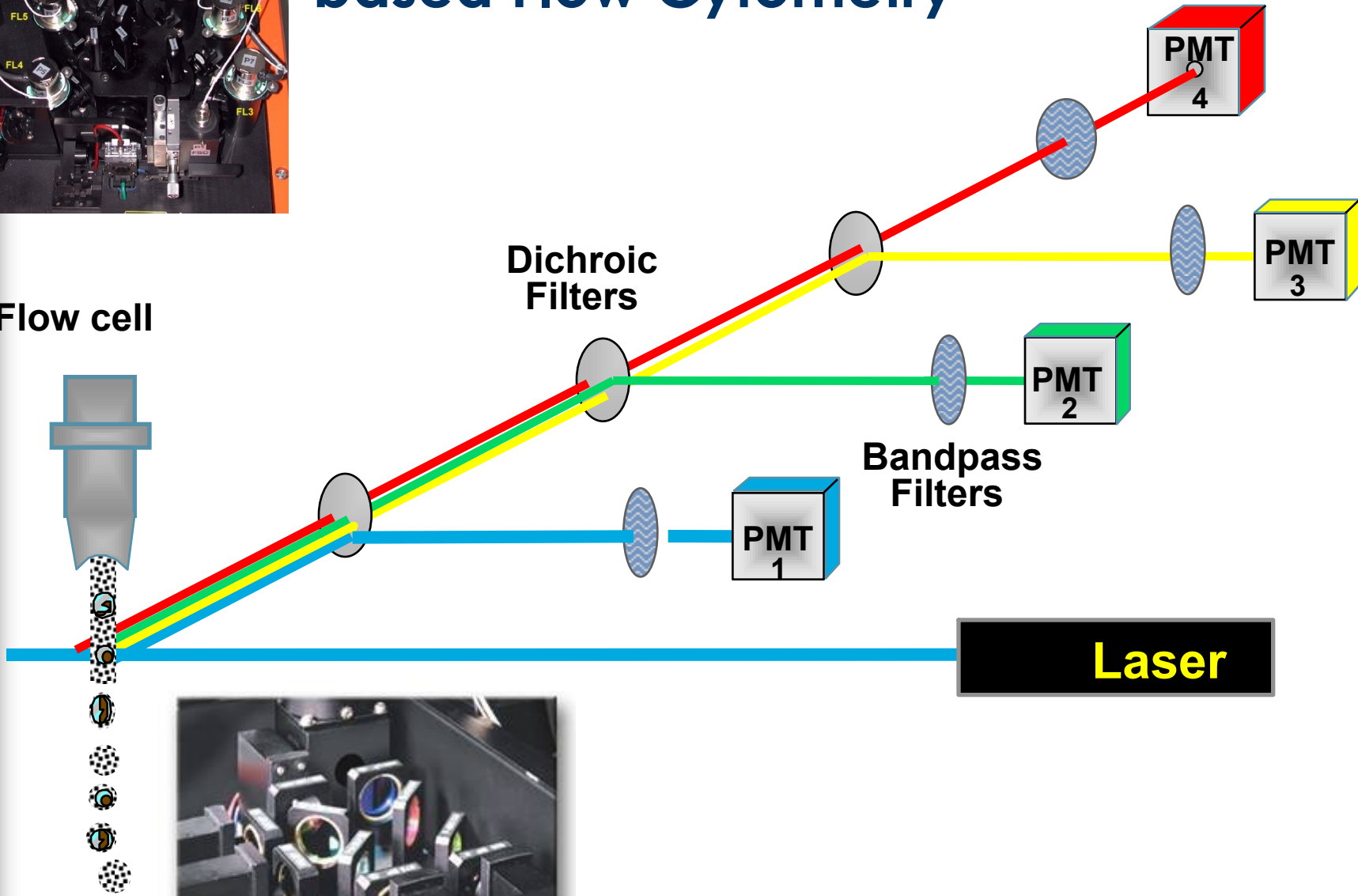
1. Malá plocha
2. Nemožnost integrálního zesílení
3. Mnohem nižší citlivost
4. Počítání fotonů pouze u speciálních produktů
5. Kratší čas odpovědi



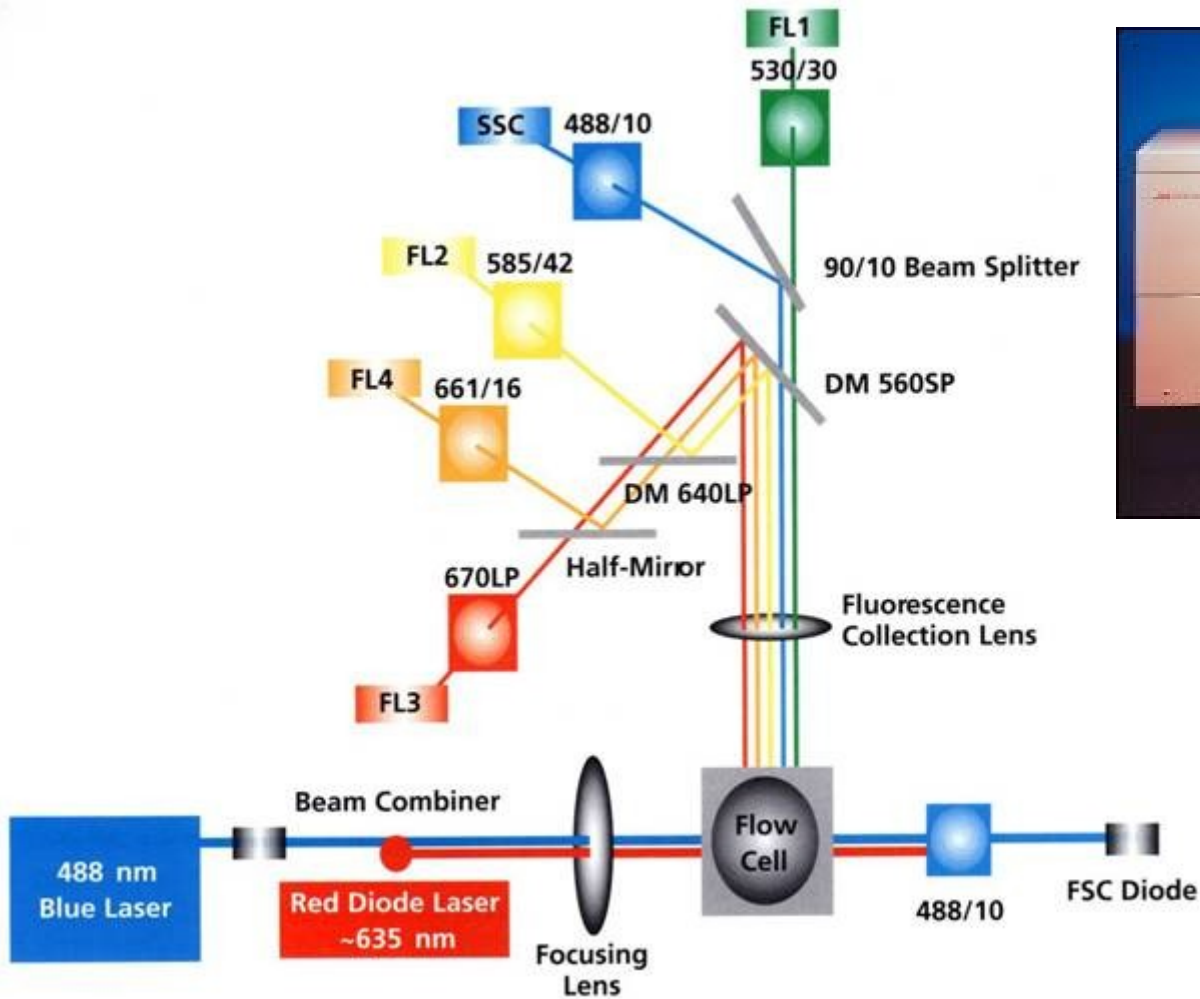
Example Channel Layout for Laser-based Flow Cytometry



Flow cell

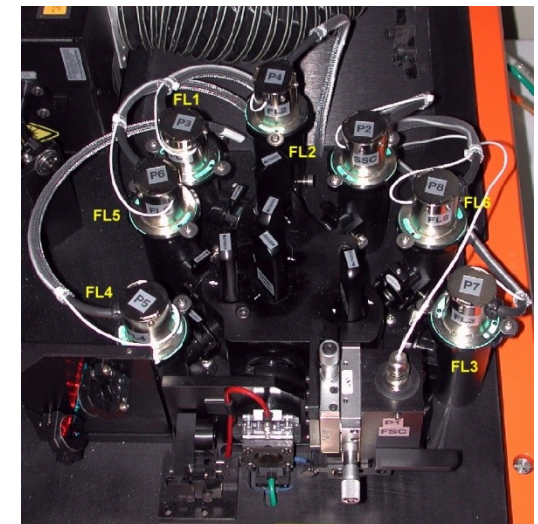
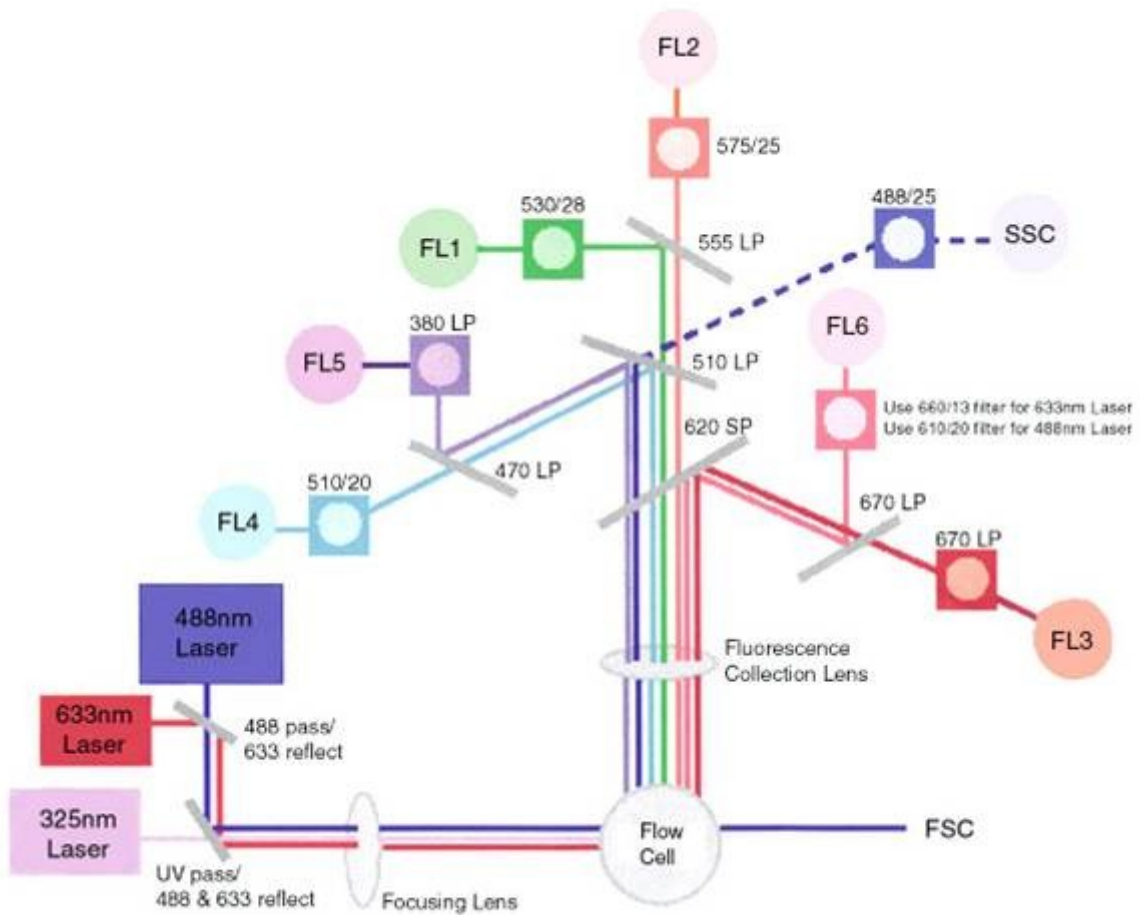


BD FACSCalibur system

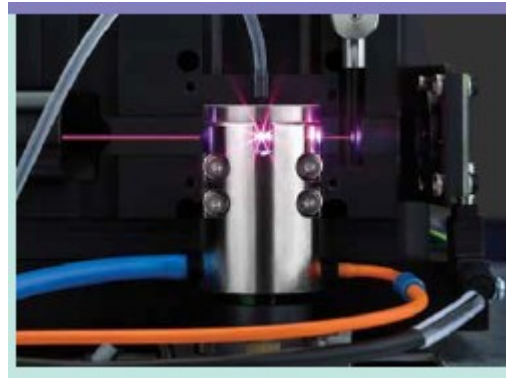


http://www.bdbiosciences.com/immunocytometry_systems/

BD LSR II system

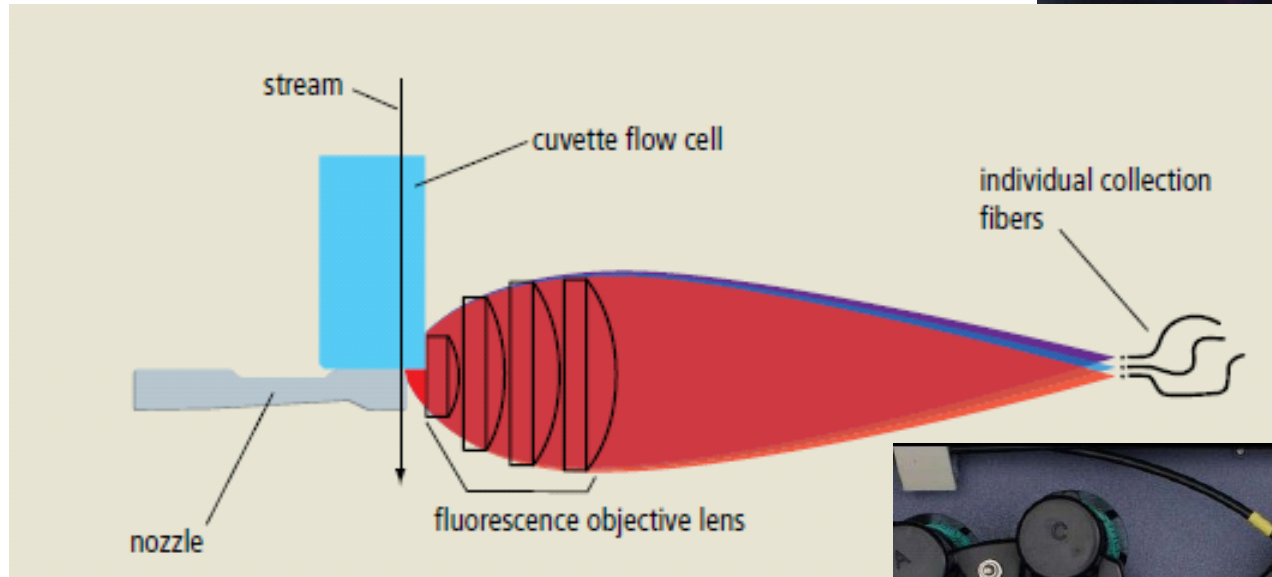
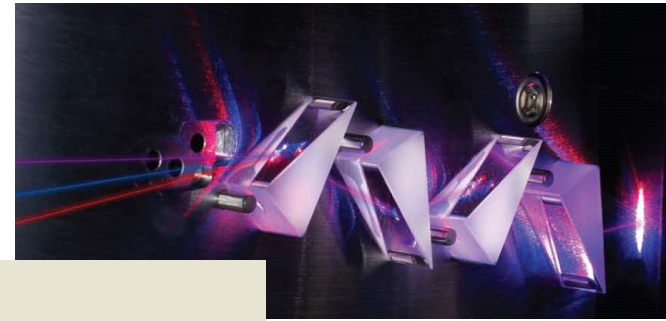


BD FACSVerse system



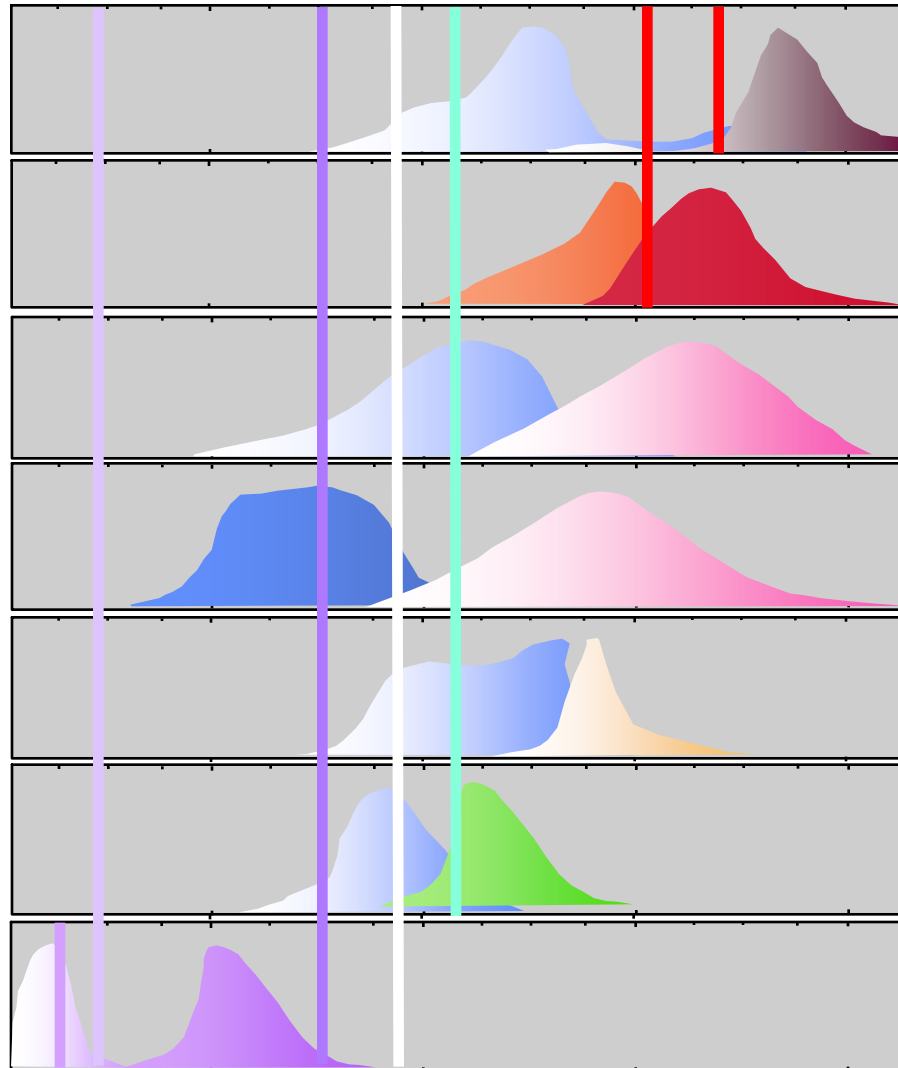
<http://www.bdbiosciences.com/instruments/facsverse/features/index.jsp>

Aria II



**Common
Laser
Lines**

300 nm 350 400 nm 457 488 514 500 nm 600 nm 610 632 700 nm



PE-TR Conj.

Texas Red

PI

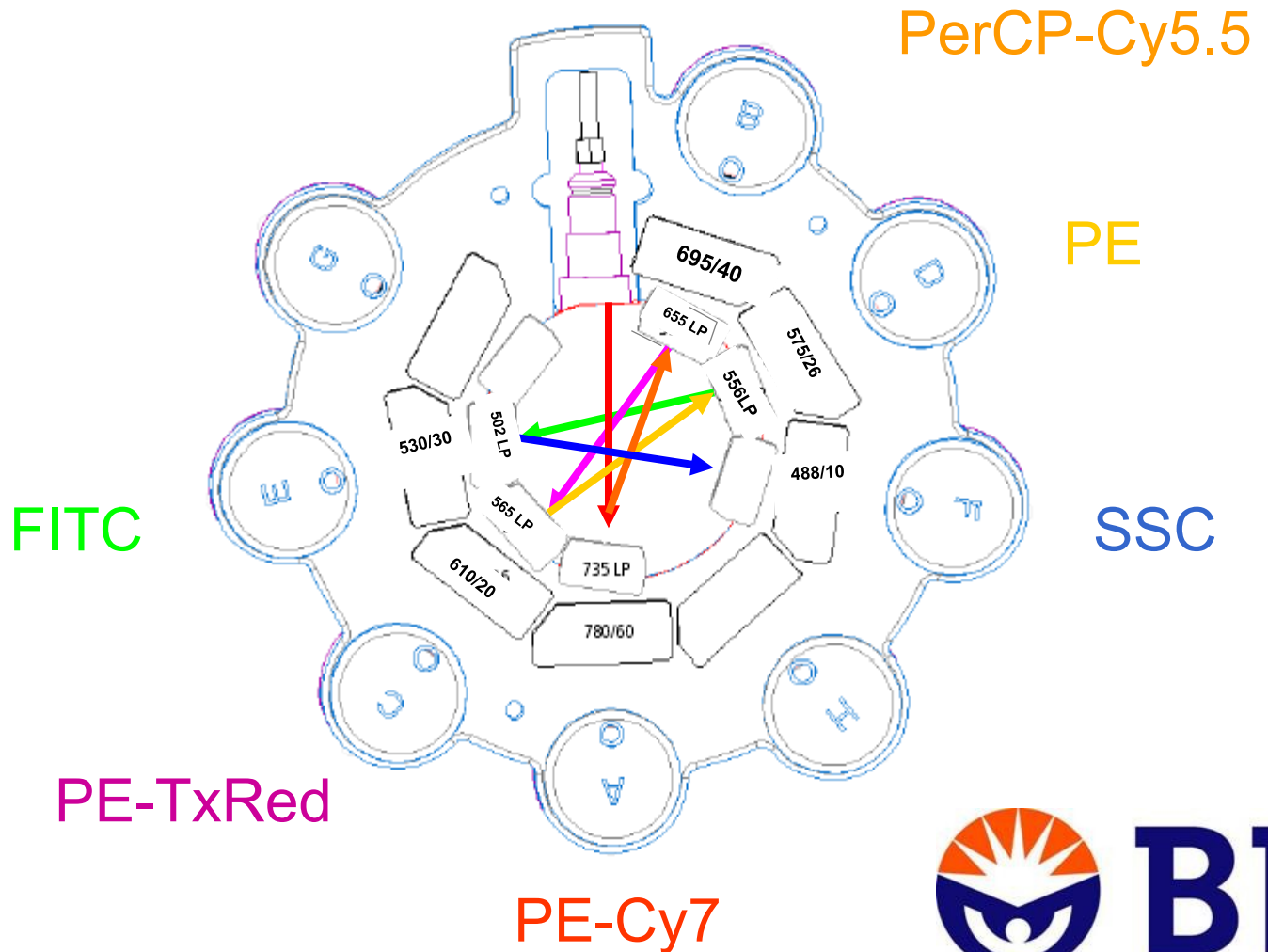
Ethidium

PE

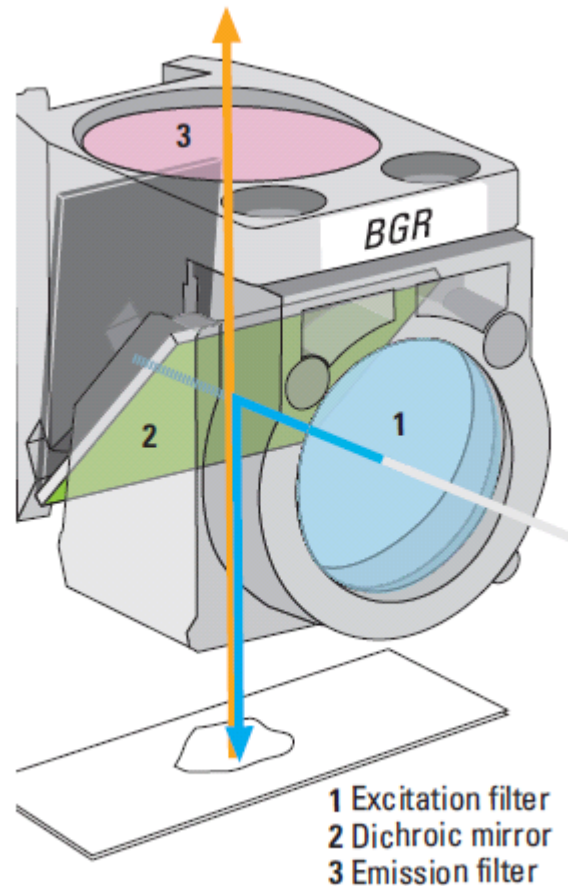
FITC

cis-Parinaric acid

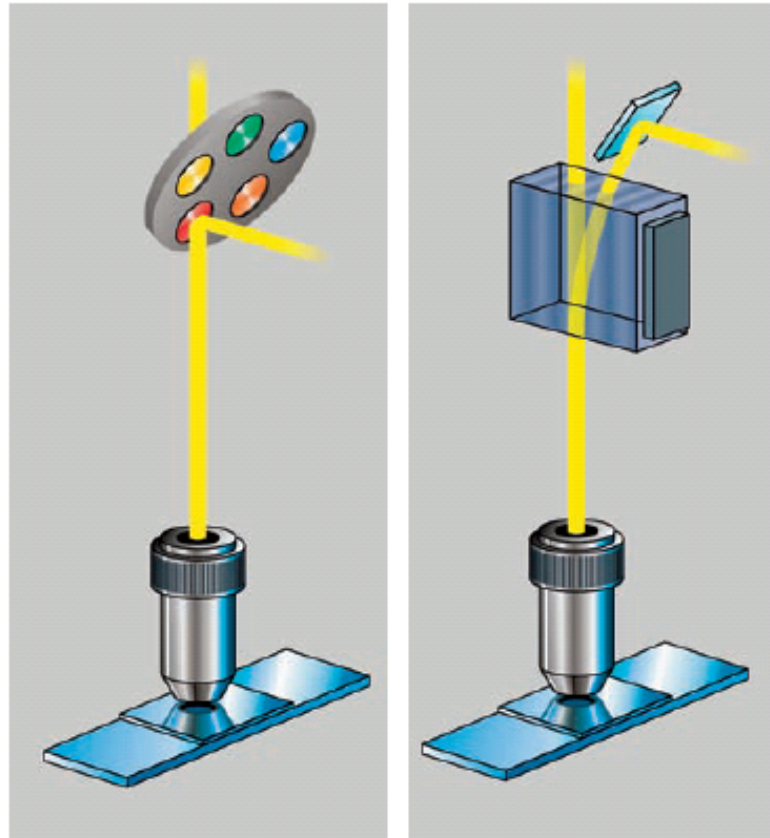
Octagon Detection System



“kostka” pro konvenční fluorescenční mikroskop



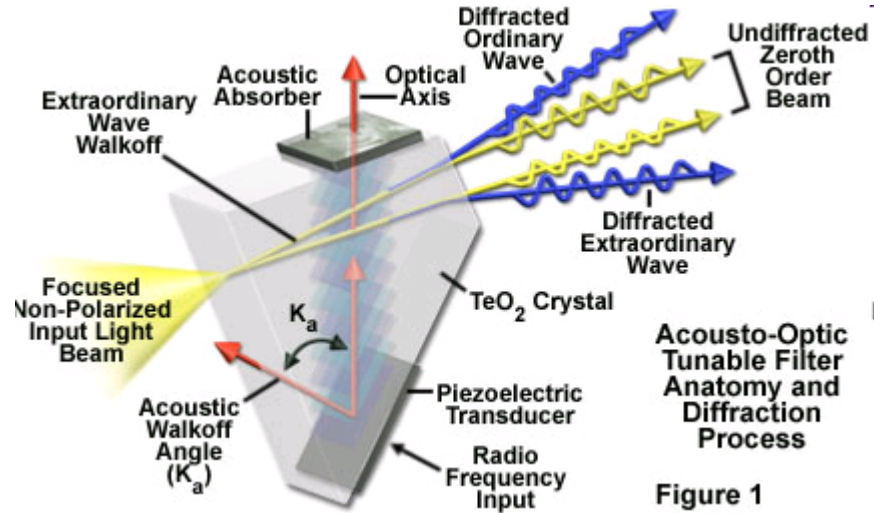
Acousto Optical Beam Splitter AOBS®



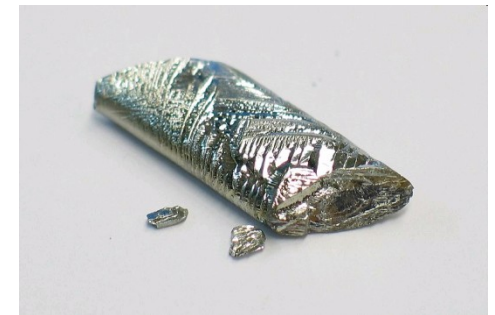
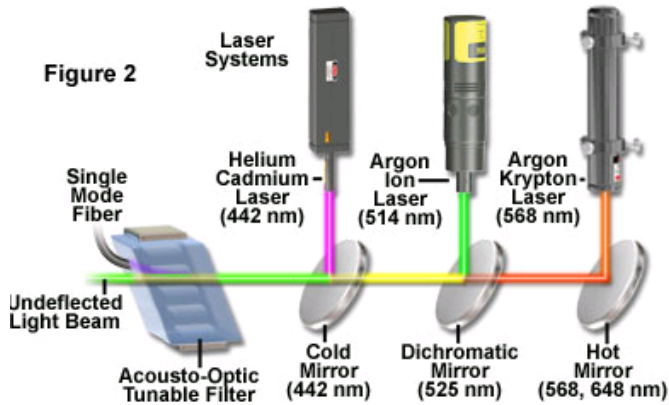
Left: conventional beam splitting by dichroic mirrors requires many optical elements with fixed properties.

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

Acousto Optical Beam Splitter AOBS®



Acousto-Optic Tunable Filters in Confocal Microscopy

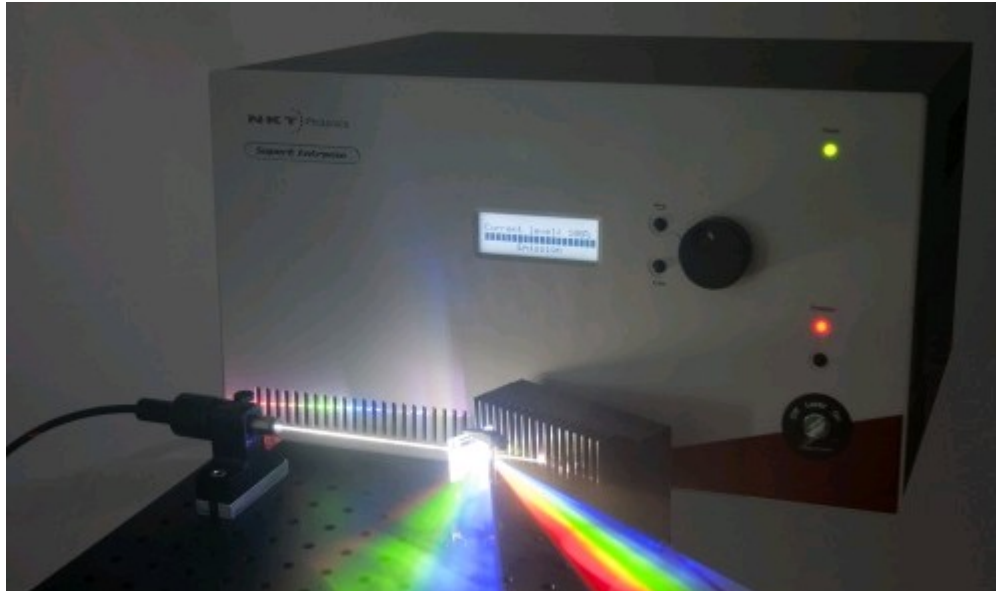


<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/filters/aotf/index.html>

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

Supercontinuum Generation

-a nonlinear process for strong spectral broadening of light



TECHNICAL NOTE

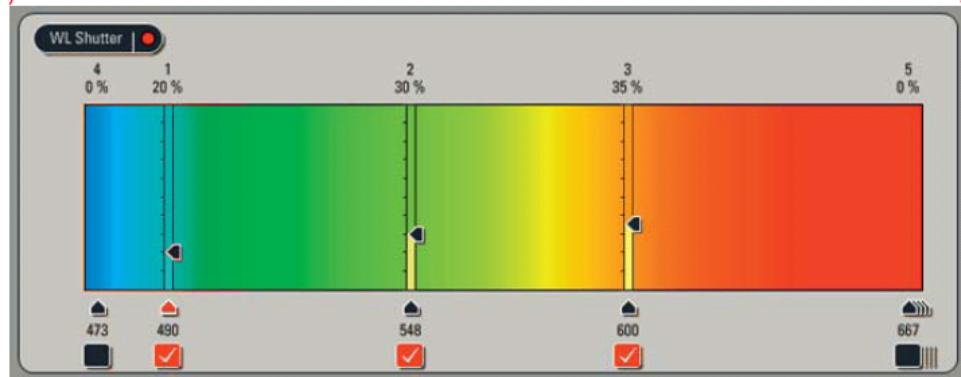
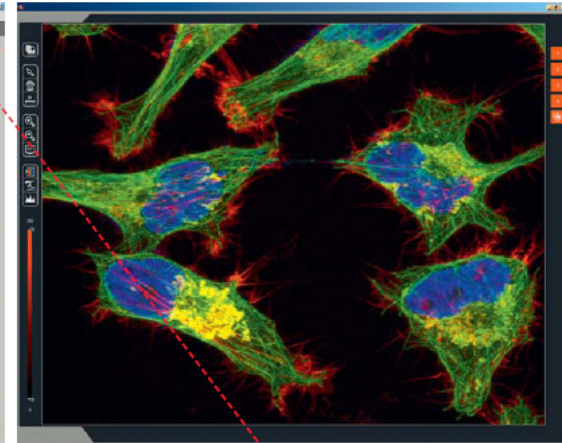
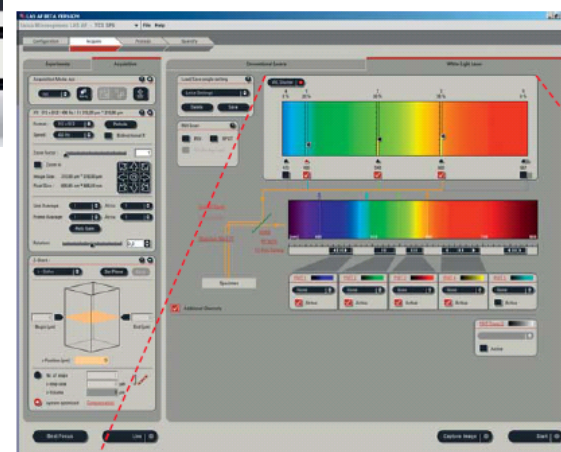
Cytometry

PART A
Journal of the
International Society for
Advancement of Cytometry

Supercontinuum White Light Lasers for Flow Cytometry

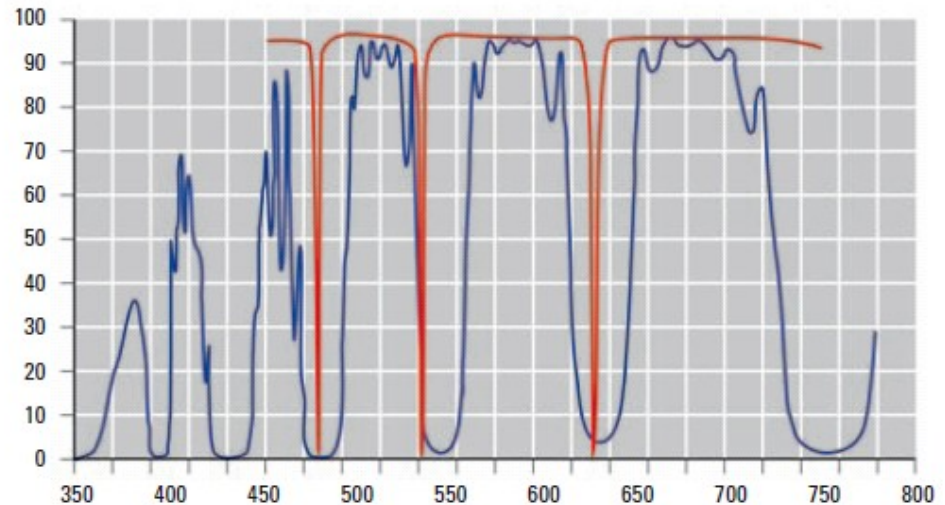
William G. Telford,^{1*} Fedor V. Subach,² Vladislav V. Verkhusha²

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/>



<http://www.lifetechnologies.com/us/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>



<http://www.biolegend.com/panelselector>

<http://www.biolegend.com/spectraanalyzer>

<http://www.biolegend.com/webtoolstab>

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
převedená na digitální hodnoty
uložené do počítače.

Na jejich základě je vybraná
populace separována.

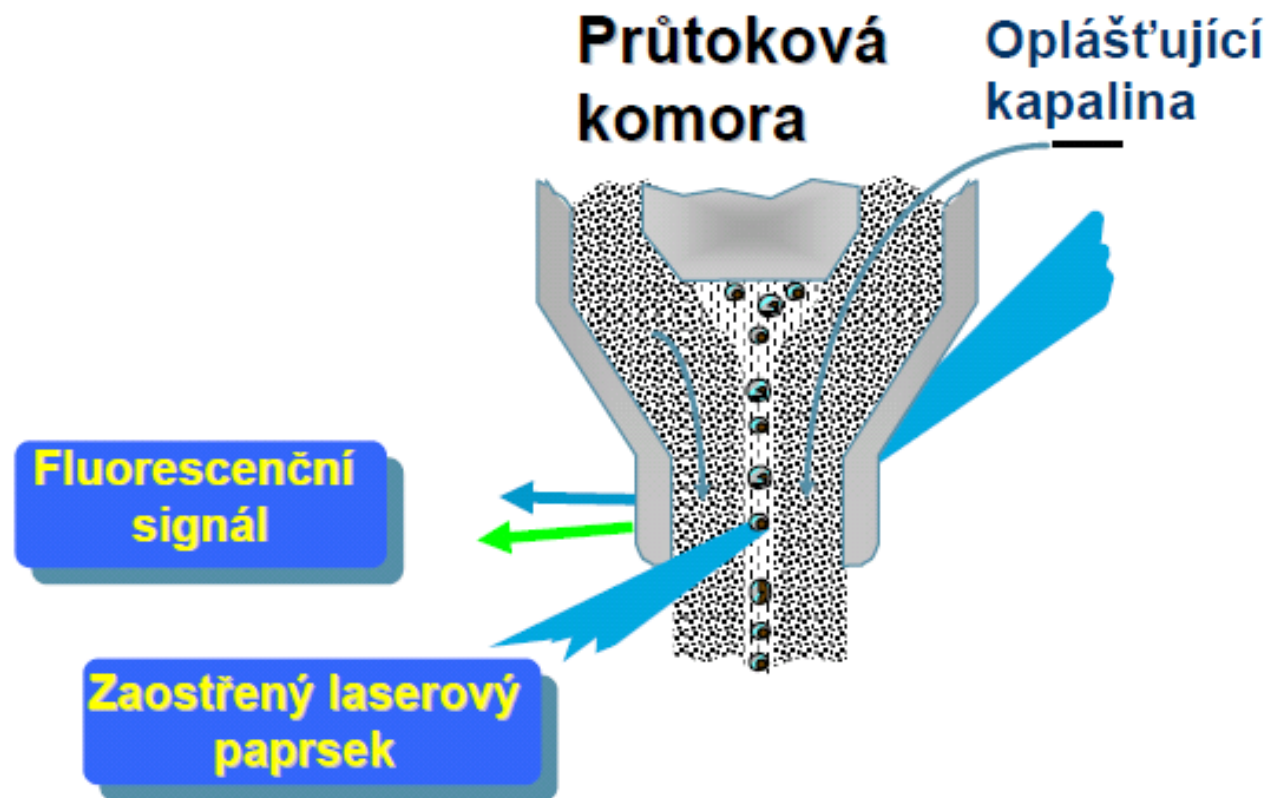


Průtokové systémy a hydrodynamika

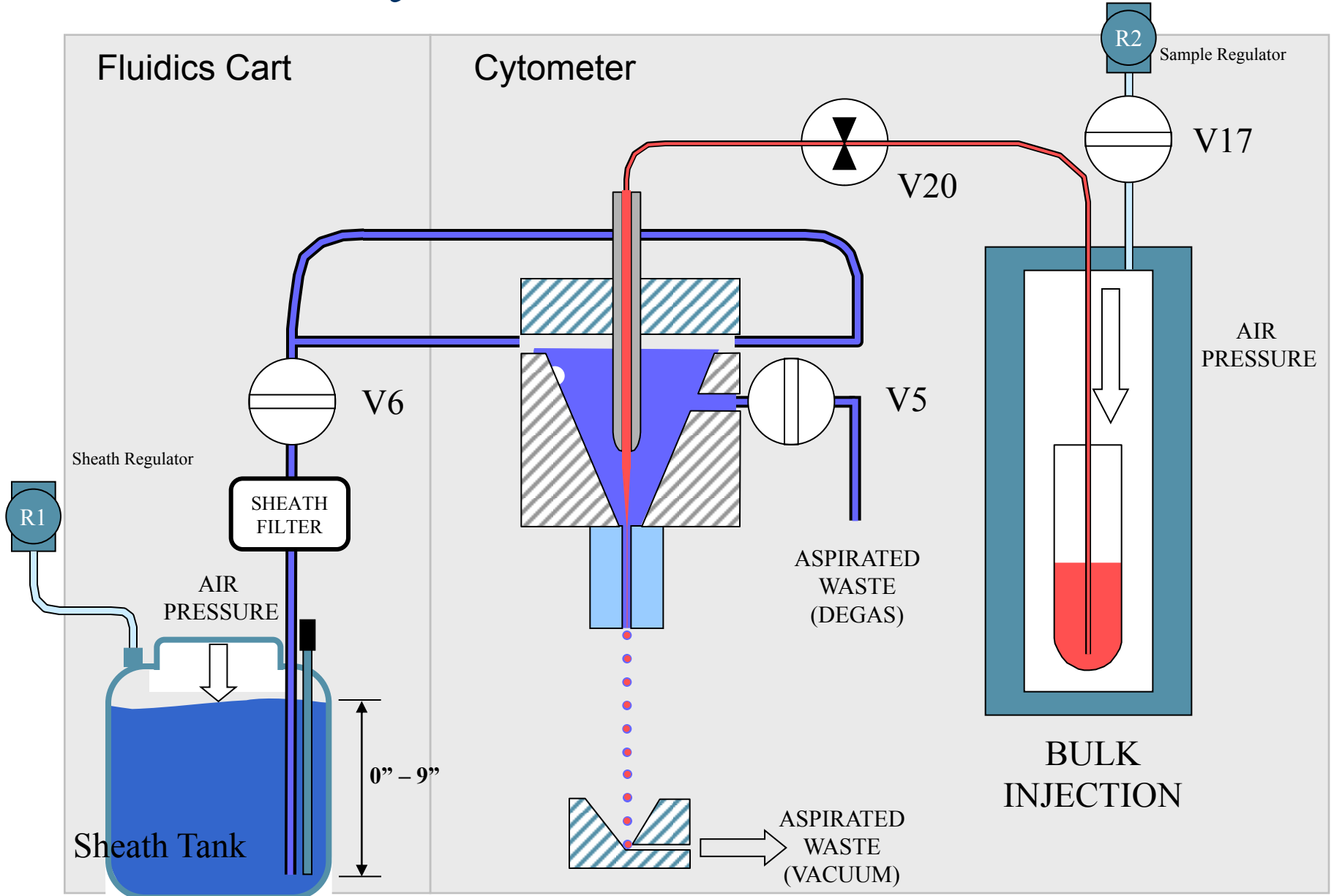
Getting the cells in the right place (at the right time)! (Shapiro, pp 133-143 - 3rd ed)

Průtoková cytometr:

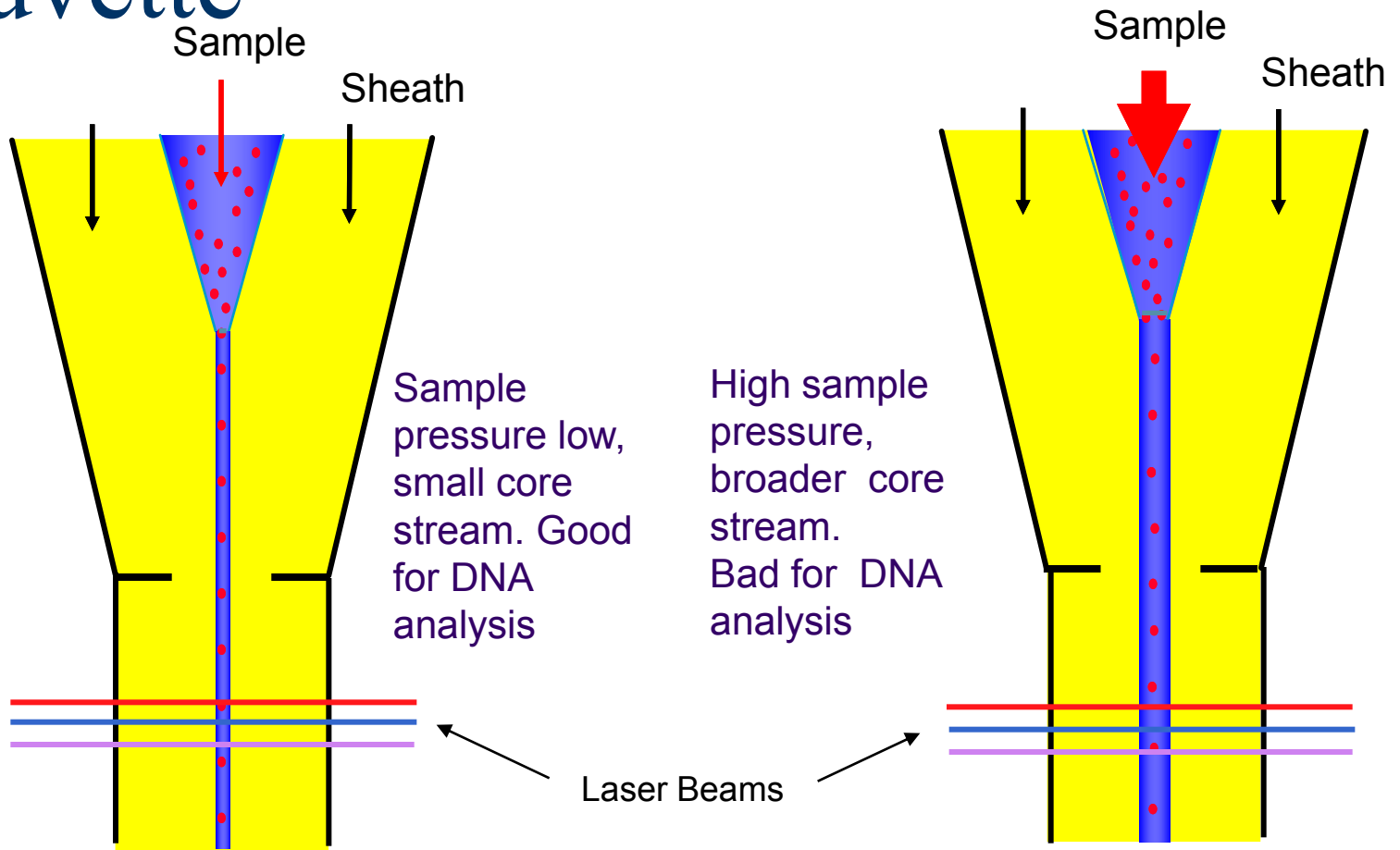
Pomocí hydrodynamicky zaostřeného fluidního systému analyzuje buňky v zaostřeném světelném paprsku (laseru).



Fluidní systém: BD FACSAria II



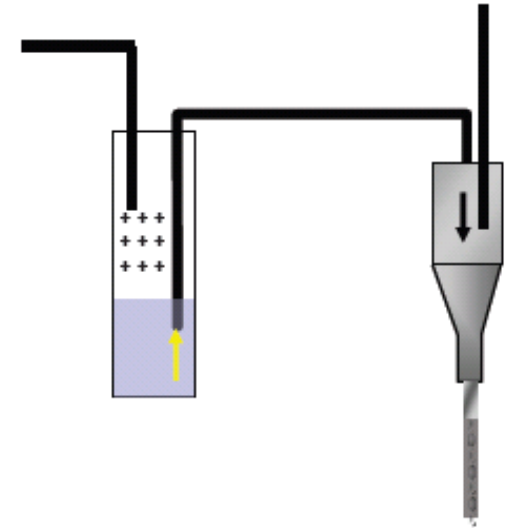
Hydrodynamic focussing in the cuvette



Fluidní systém

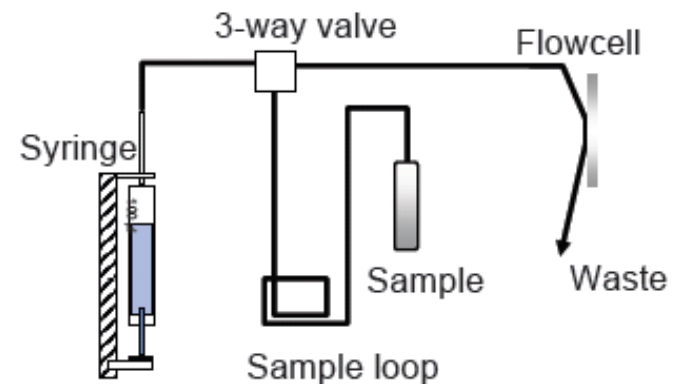
Pozitivní tlakový systém

- 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 μ l, 100 μ 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 μm)



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"

Fluidika - Laminární proudění

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

$$Re = \frac{d\rho\bar{v}}{\eta}$$

where

d = tube diameter
 ρ = density of fluid
 \bar{v} = mean velocity of fluid
 η = viscosity of fluid

- když $Re < 2300$, průtok je vždy **laminární** (v trubici)
- $Re > 2300$, 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

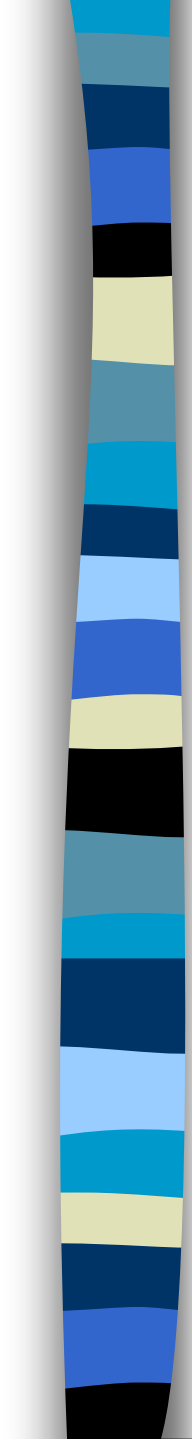
Received for publication 24 May 1972

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.



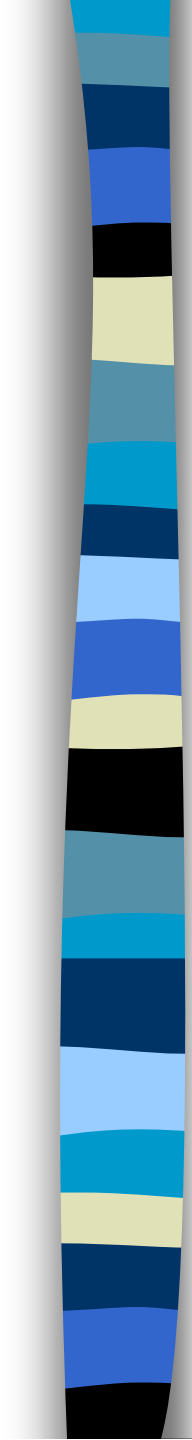
Fluidika

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



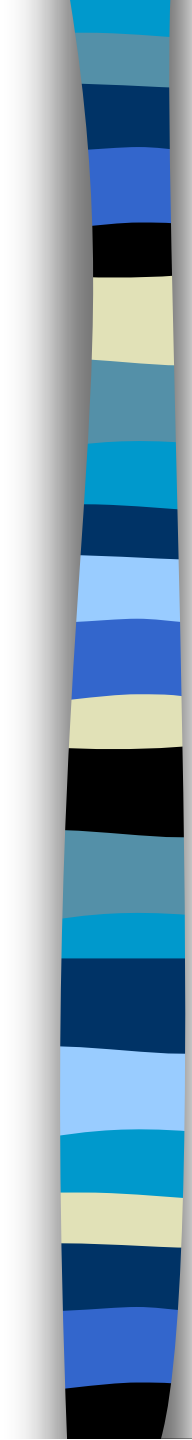
Fluidika – systém s rozdílným tlakem

- 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

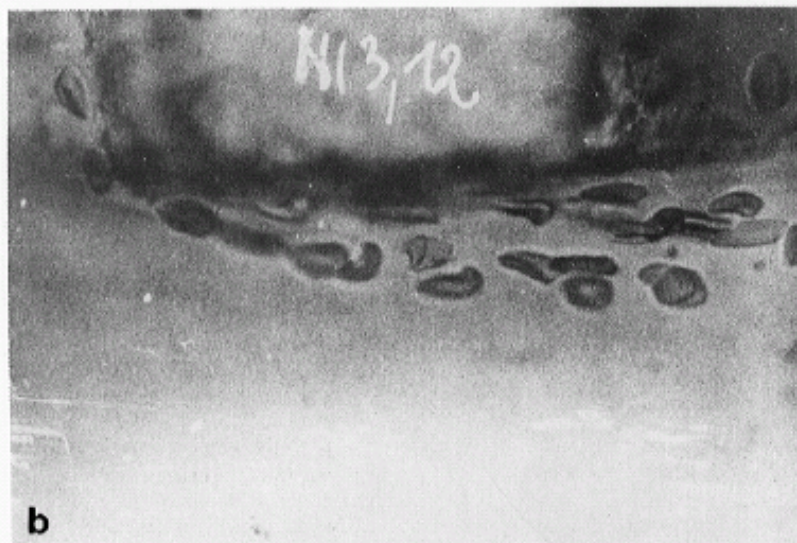
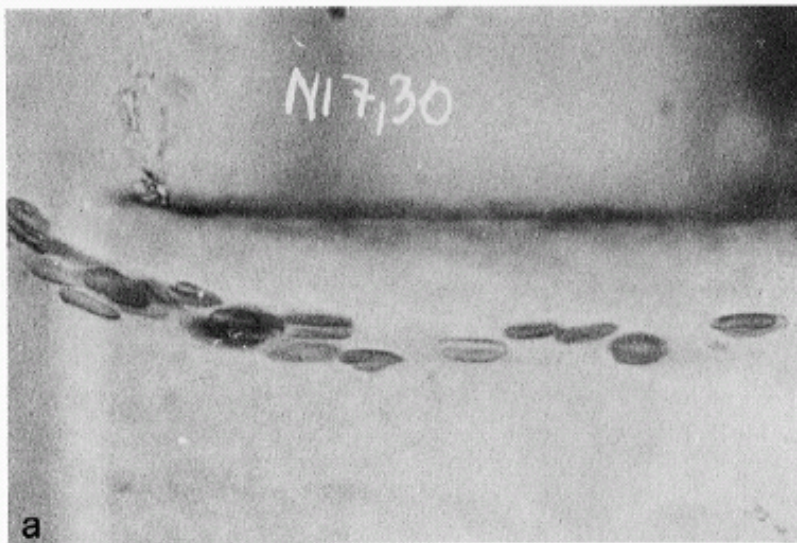
- Pomocí vzduchu tlakuje nosnou kapalinu
- Pomocí pístu injikuje vzorek
- **Objem proudícího vzorku** může být regulován rychlostí pohybu pístu
- Kontrola je úplná (za normálních podmínek)



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.”

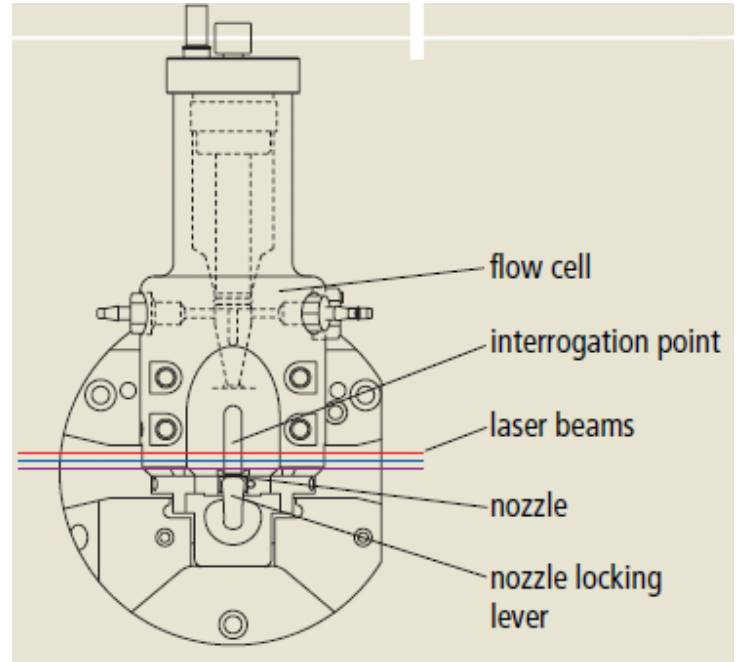
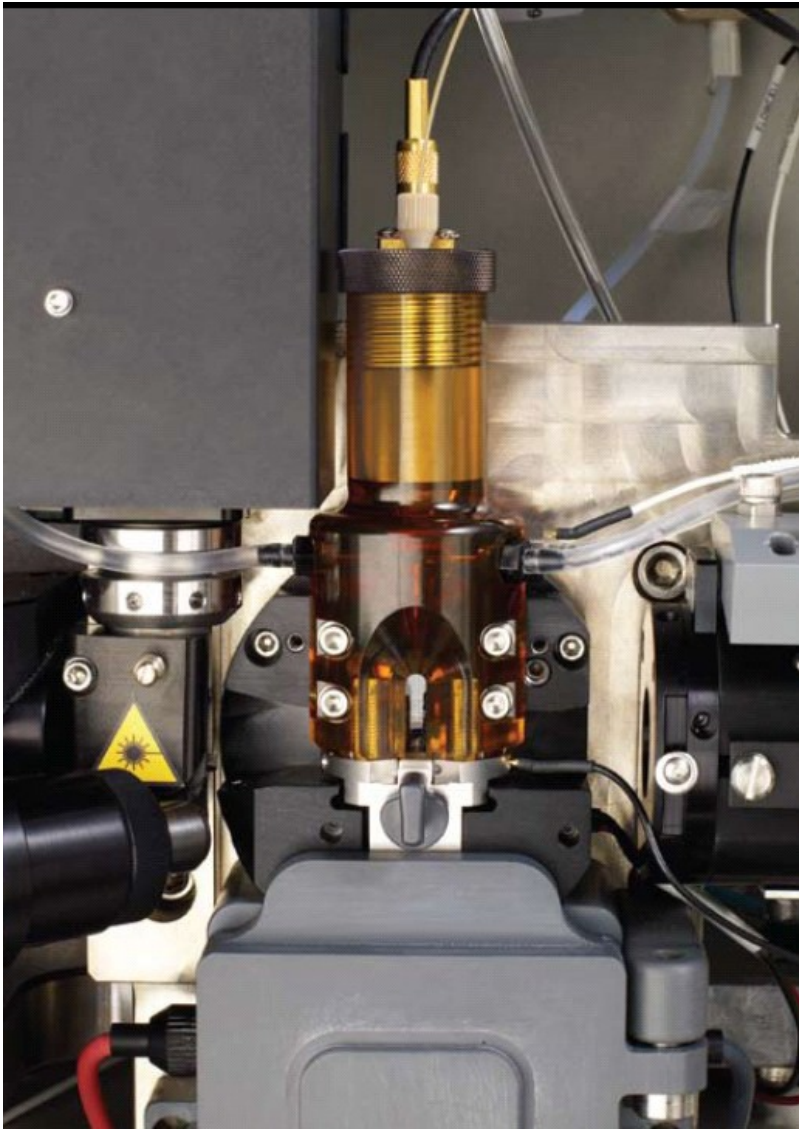
Image from V. Kachel, et al. – **Melamed**
Chapt. 3



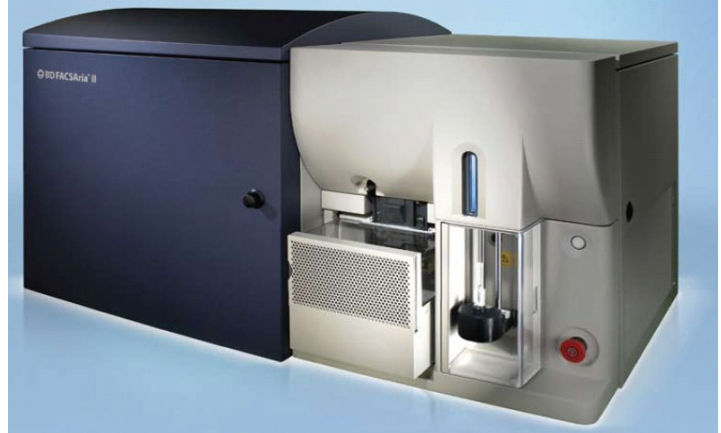
Fluidika – průtokové komory

■ 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**

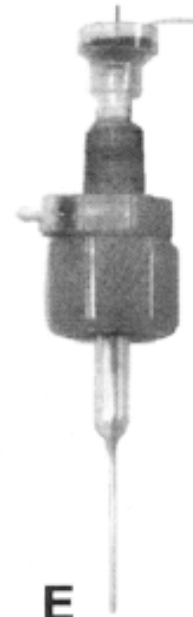
- Výborné optické vlastnosti, může být použita pro sortování

– **Closed cross flow**

- Nejlepší optické charakteristiky, nelze sortovat

– **Open flow across surface**

- Nejlepší optické charakteristiky, nelze sortovat



A

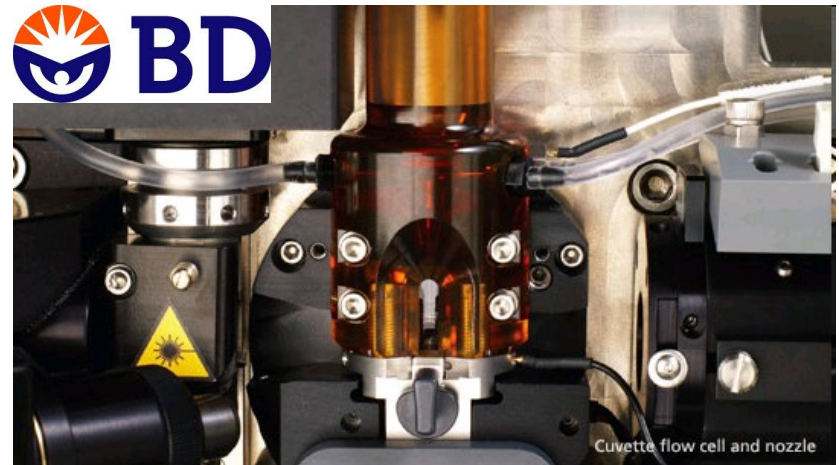
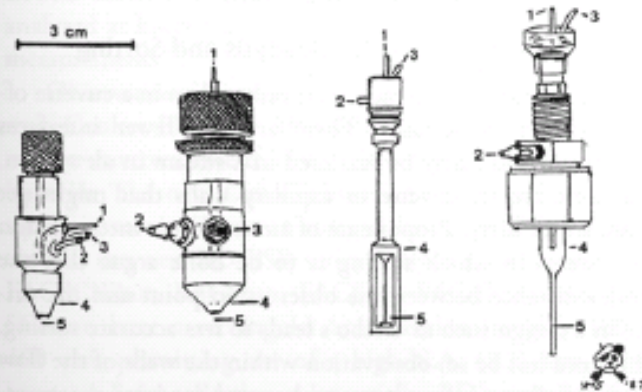
B

C

D

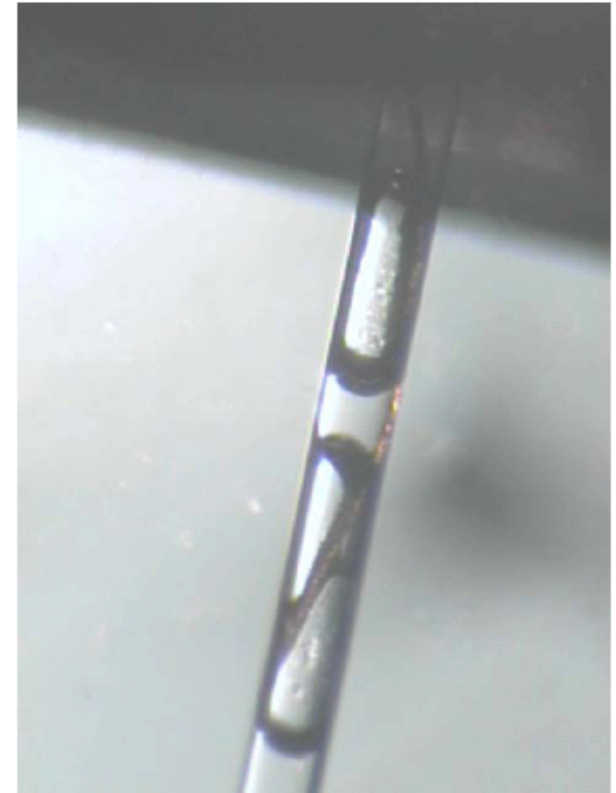
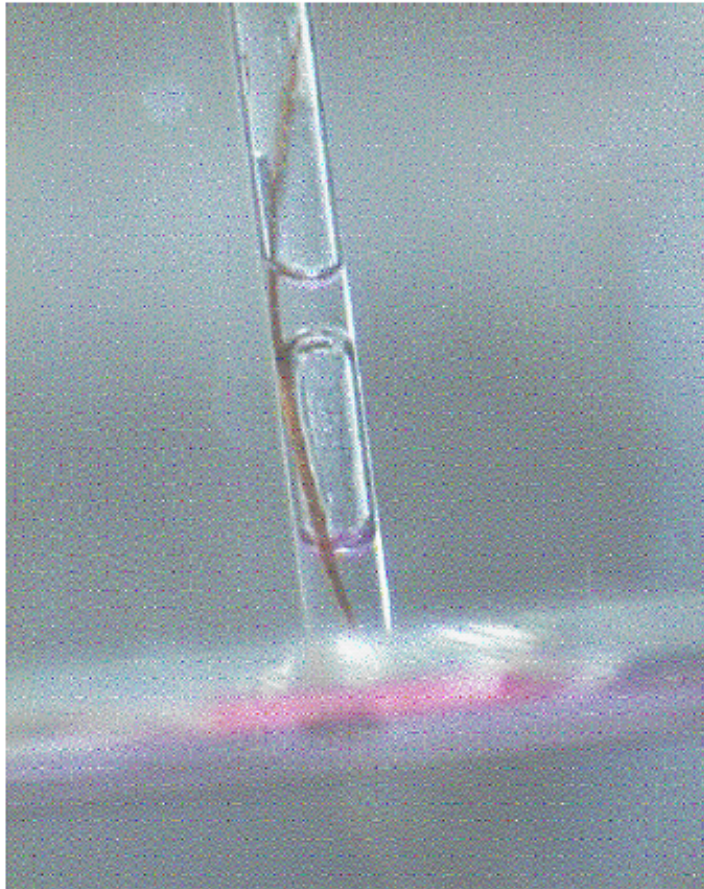
E

3 cm



Cuvette flow cell and nozzle

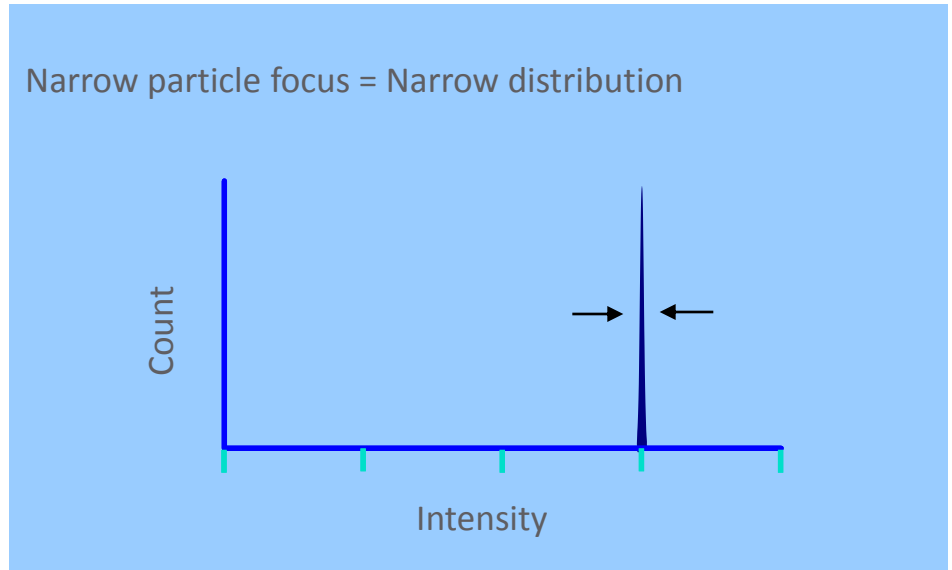
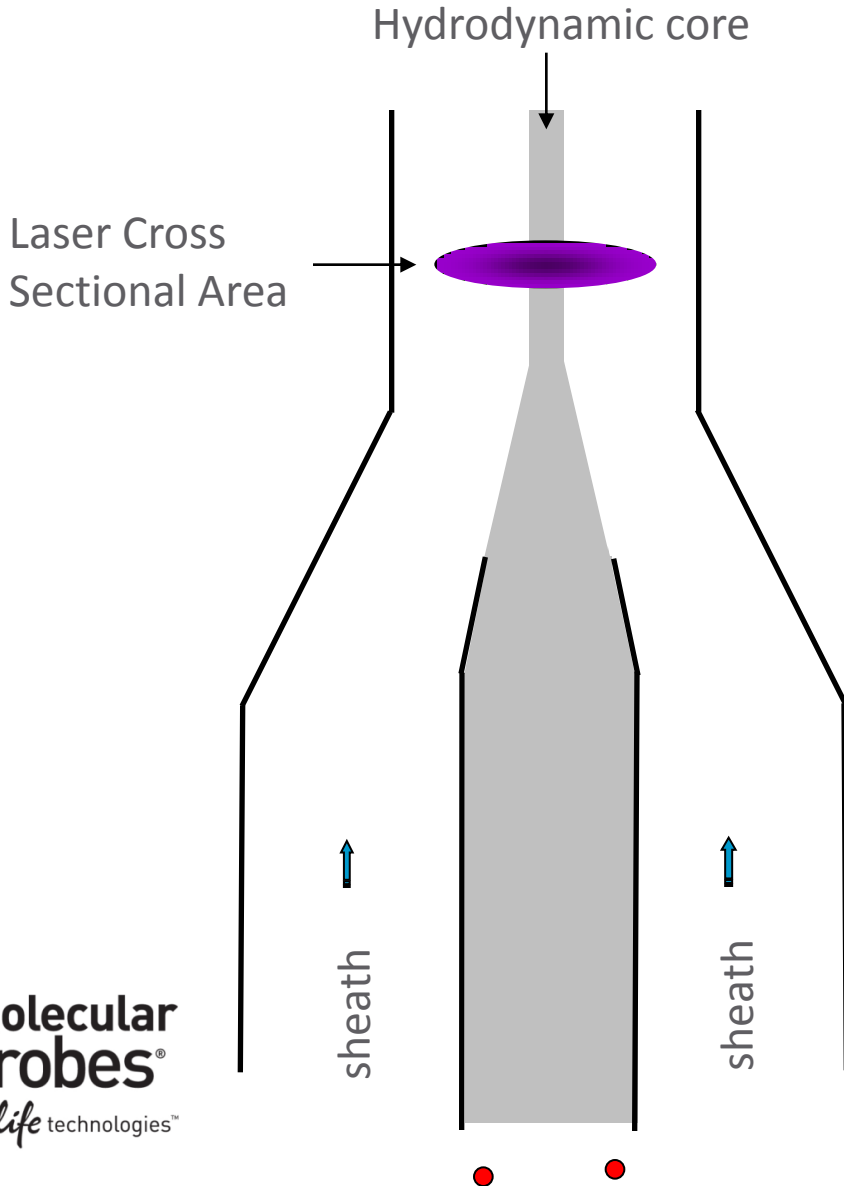
Zanesení průtokové komory



Lidský vlas zablokuje komoru a kompletně naruší kvalitu proudění.

Particle Delivery: Hydrodynamic Focusing

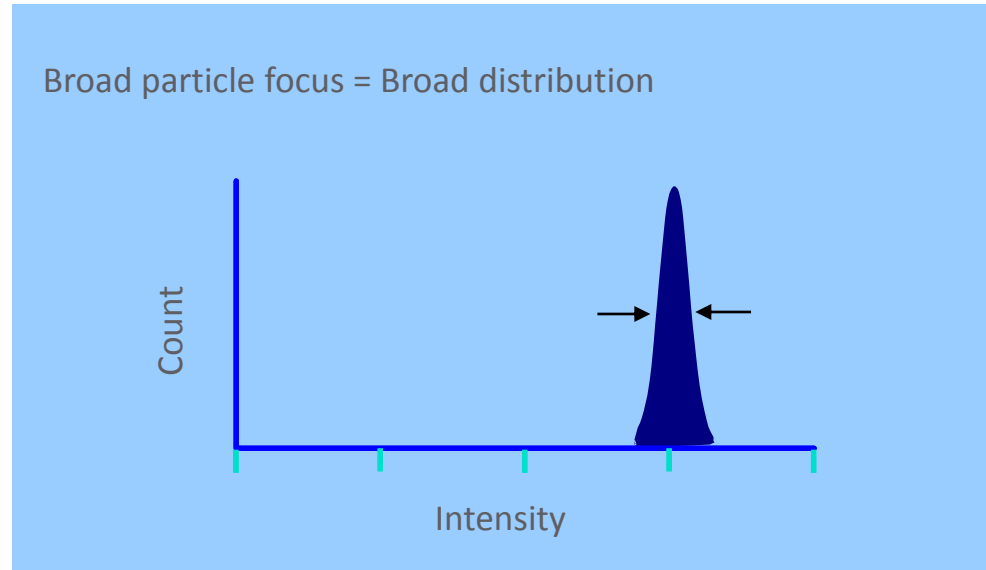
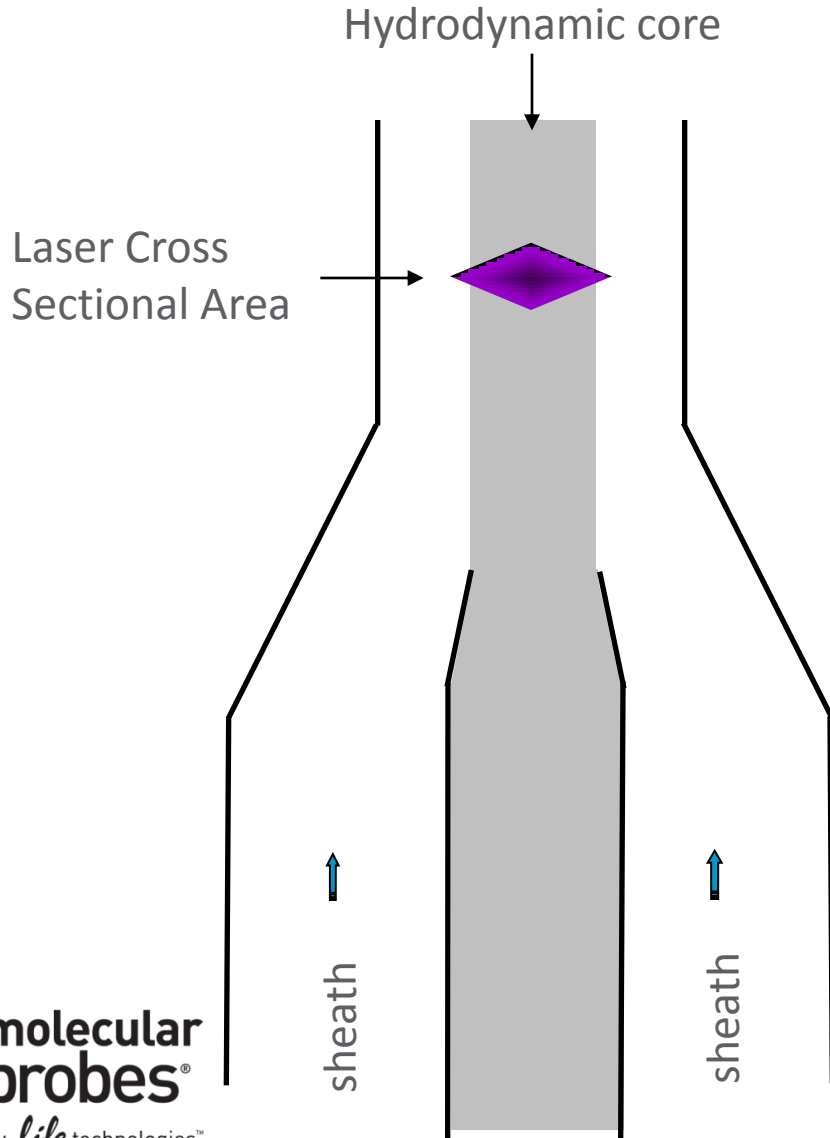
Conventional Instrumentation: **Low Flow Rates (12 μ L/min)**



- Sample core is 'pinched' by fast flowing sheath
- Sample volume ratios of 100 – 1000
- Large ratios => low sample inputs
- Resolution of particle populations

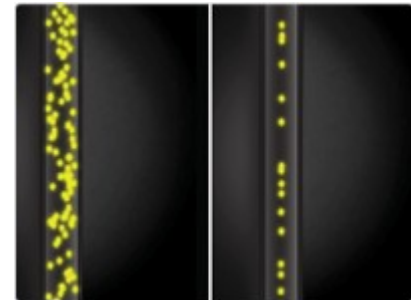
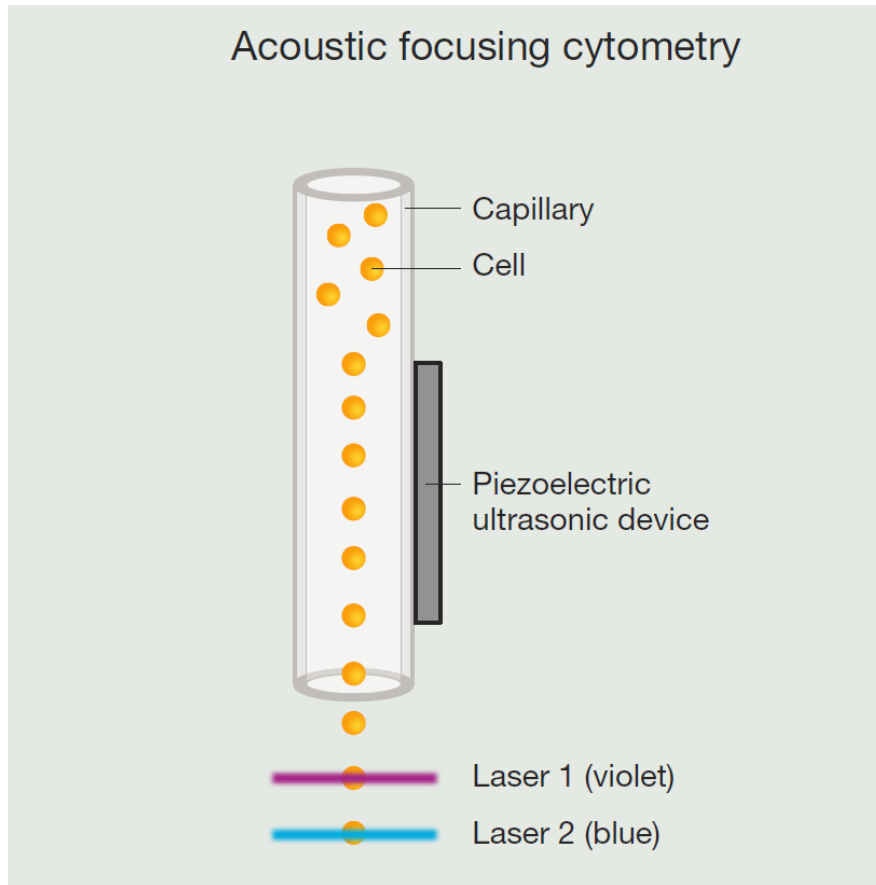
Particle Delivery: Hydrodynamic Focusing

Conventional Instrumentation: **High Flow Rate (60 μ L/min)**

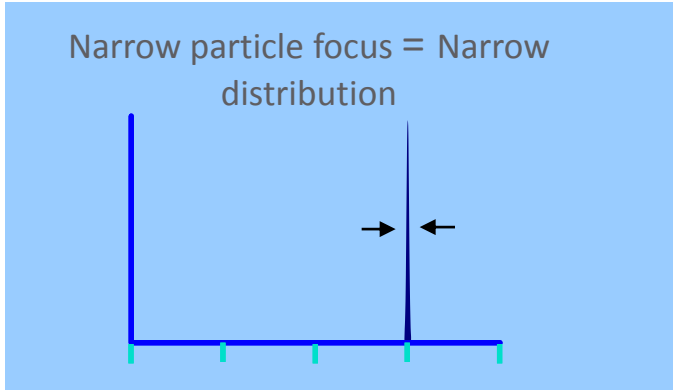
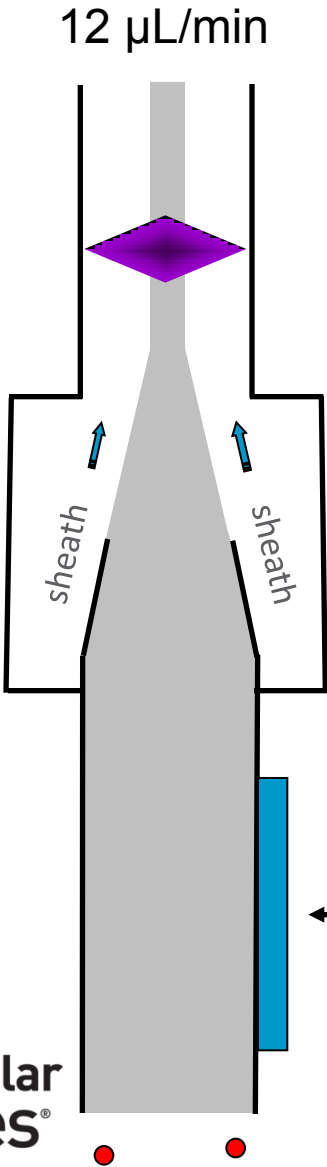


- Increased sample input = increase core size
- Particle distributions broadened, CVs increase
- Instrument resolution decreased
- Historically, low volumetric sample rates used (25 μ L/min – 150 μ L/min)

Attune® Acoustic Focusing Cytometer

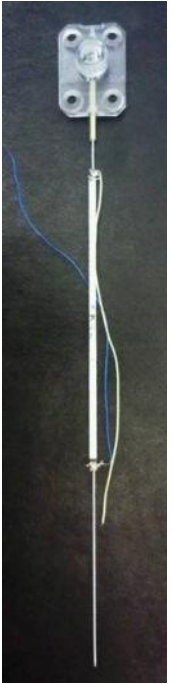
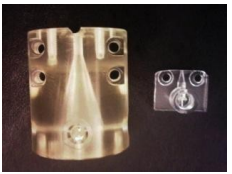
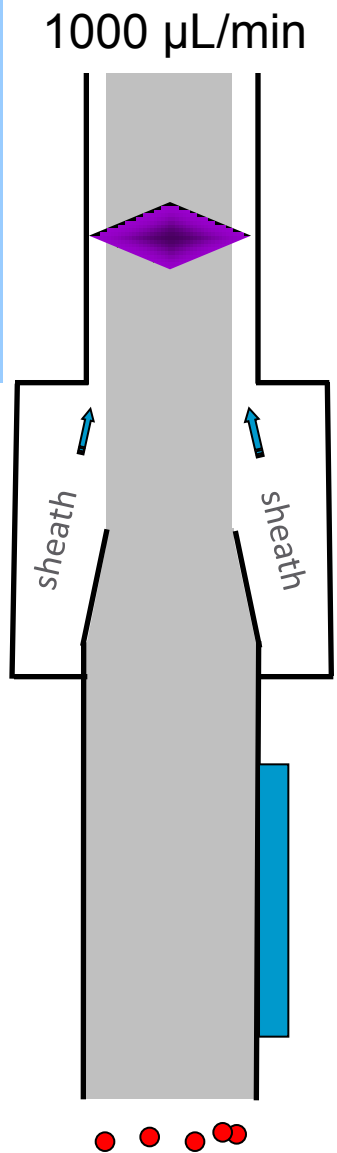


Acoustic Focusing = Better Precision



Acoustic focusing of particles occurs prior to mixing with sheath fluid

Acoustic focusing Module



1. Kundt A, Lehmann O (1874) *Annalen der Physik und Chemie (Poggendorff's Annalen)* 153:1–11.
2. Curtis HW, Stephans EJ (1982) *IBM Technical Disclosure Bulletin* 25(1).
3. Yasuda K, Haupt SS, Unemura S (1997) *J Acoust Soc Am* 102:642–645.
4. Jonsson H, Nilsson A, Petersson F et al. (2005) *Perfusion* 20:39–43.
5. Kaduchak G, Goddard G, Salzman G et al. (2008) US Patent 7,340,957.



(12) **United States Patent**
Kaduchak et al.

(10) **Patent No.:** US 7,340,957 B2
(45) **Date of Patent:** Mar. 11, 2008

(54) **ULTRASONIC ANALYTE CONCENTRATION AND APPLICATION IN FLOW CYTOMETRY**

(75) Inventors: **Gregory Kaduchak**, Los Alamos, NM (US); **Greg Goddard**, Los Alamos, NM (US); **Gary Salzman**, White Rock, NM (US); **Dipen Sinha**, Los Alamos, NM (US); **John C. Martin**, Los Alamos, NM (US); **Christopher Kwiatkowski**, Los Alamos, NM (US); **Steven Graves**, San Juan Pueblo, NM (US)

(73) Assignee: **Los Alamos National Security, LLC**, Los Alamos, NM (US)

(*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 143 days.

(21) Appl. No.: 10/979,065

(22) Filed: Nov. 2, 2004

4,523,982 A *	6/1985	Lee	522/21
5,831,166 A *	11/1998	Kozuka et al.	73/570
6,003,388 A *	12/1999	Oeftering	73/864.01
6,216,538 B1 *	4/2001	Yasuda et al.	73/570.5
6,449,563 B1 *	9/2002	Dukhin et al.	702/22
2004/0139792 A1 *	7/2004	Cobb	73/61.75

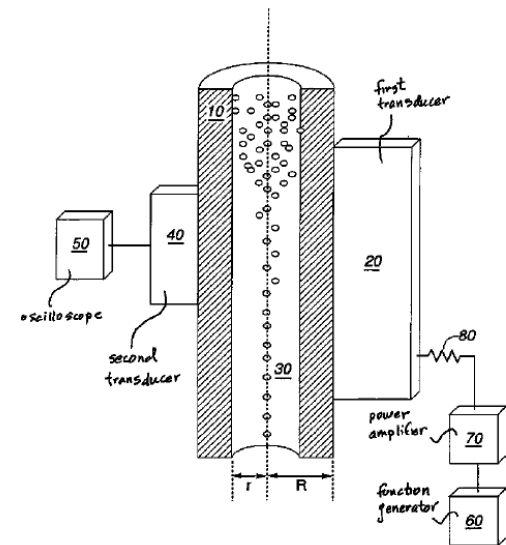
FOREIGN PATENT DOCUMENTS

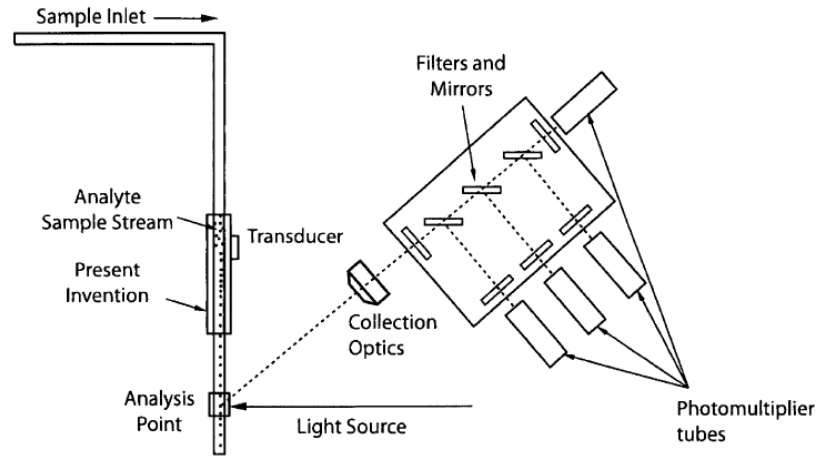
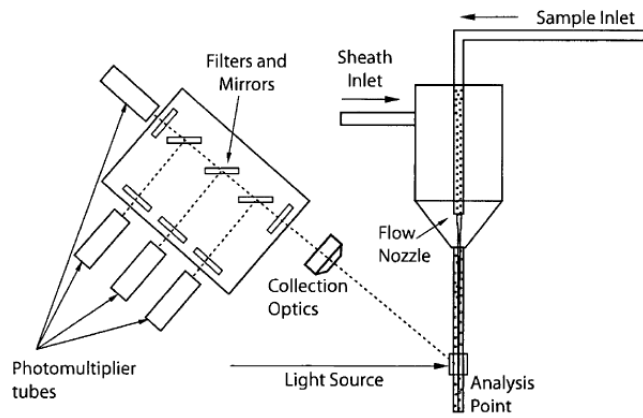
JP	63139231 A *	6/1988
JP	06241977 A *	9/1994
JP	08266891 A *	10/1996

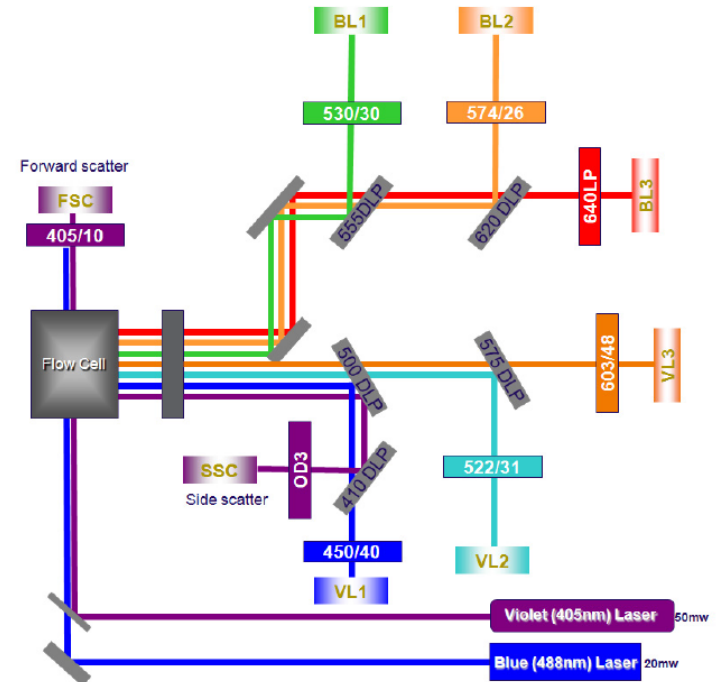
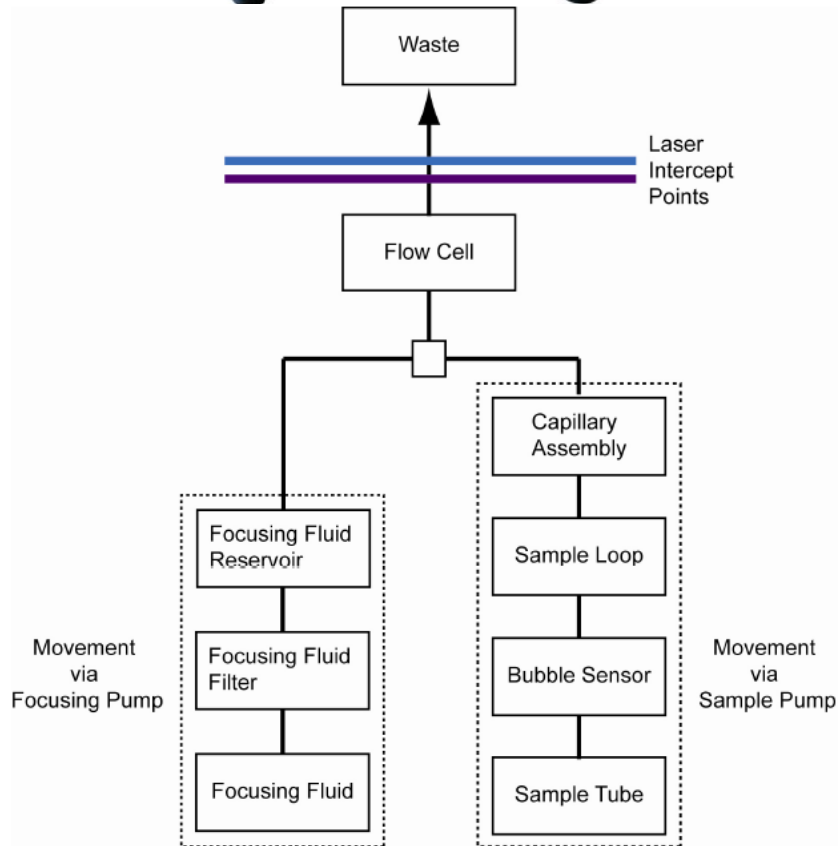
OTHER PUBLICATIONS

King, L. V., "On the acoustic radiation on spheres," *Proc. R. Soc. A.*, 147, 212-240, (1933).

(Continued)







Attune (2 lasers, 6 detectors setup)

laser	detector	fluorochrome
405		
	VL1	450/50 Pacific Blue, Alexa Fluor 405, Brilliant Violet 421
	VL2	522/31 Horizon V500, LIVE/DEAD Aqua
	VL3	603/48 LIVE/DEAD Yellow, Qdot 605
488		
	BL1	530/30 FITC, GFP, Alexa Fluor 488, Calcein, LIVE/DEAD Green, ALDEFLUOR, HiLyte 488
	BL2	574/26 PE, propidium iodide, Hilyte 555
	BL3	640 LP PerCP, Pe-Cy7, PerCP-eFluor 710, LIVE/DEAD Red, 7-AAD

Attune - Key performance features include:

- Breakthrough acoustic technology that focuses cells or particles
- **Highest sample delivery rates commercially available (up to 1,000 μ L/minute)**
- User-selectable collection rates
- Equipped with: Blue/Violet: 488 nm (20 mW) and 405 nm (50 mW) lasers
- 8 parameters—6-color detection plus side scatter and forward scatter
- **User-changeable bandpass and dichroic filters**
- Simplified fluorescence compensation
- Manual and automated compensation
- Adjustable PMT voltage settings
- Detection of up to 20,000 events/sec and 20 million events/file
- **Calibrated delivery volumes for volumetric analysis and absolute cell counts**
- Electronic resolution of 6 decades
- Low fluid consumption (about 1 L/day); self-contained fluids
- Countertop instrument—fits on standard lab bench or in laminar

Software:

- **No software licensing fees**
- Output file format: FCS 3.0
- Live gating with automatic saving
- User and administrator log-in

Cancer

The Attune® Acoustic Focusing Cytometer, with its fast acquisition times and increased precision, overcomes the technological hurdles involved in analyzing CECs.

Stem Cells

Side Population Analysis

In this study, we demonstrate the ability of the Attune® Acoustic Focusing Cytometer with the blue/ violet laser configuration to quickly analyze a large number of events in search of very rare populations of stem cells.

Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs)

Adult human mesenchymal stem cells (hMSCs) are rare fibroblast-like cells capable of differentiating into a variety of cell tissues, including bone, cartilage, muscle, ligament, tendon, and adipose.

Cell Cycle Analysis

Cell cycle analysis is just one example of an application in which precise detection of differences in fluorescence intensity between multiple cell populations is critical...

Cell Proliferation

Successful proliferation analysis by dye dilution requires sensitive instrumentation and an extremely bright dye to accurately distinguish fluorescently labeled cells from autofluorescence after several cell divisions...

Marine Sample Analysis

Flow cytometry is a powerful tool for studying the biology, ecology, and biogeochemistry of marine photosynthetic picoplankton...

Immunophenotyping

The Attune® Acoustic Focusing Cytometer exhibits excellent segregation of populations in immunophenotyping experiments (with up to 6 colors)...

Apoptosis

The Attune® Acoustic Focusing Cytometer is compatible with a broad offering of reagents and kits for flow cytometric apoptosis testing...

GFP & RFP Detection

Data for GRP and RFP detection were collected from the Attune® Acoustic Focusing Cytometer using human osteosarcoma cells (U2OS) and BacMam CellLight® reagents...

Microbiological Applications

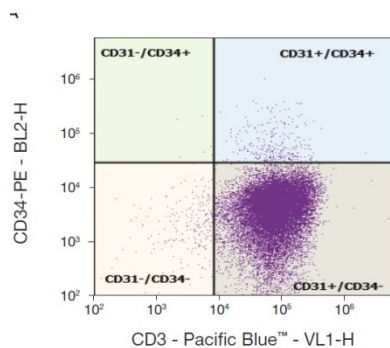
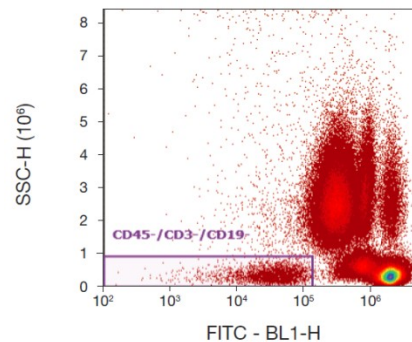
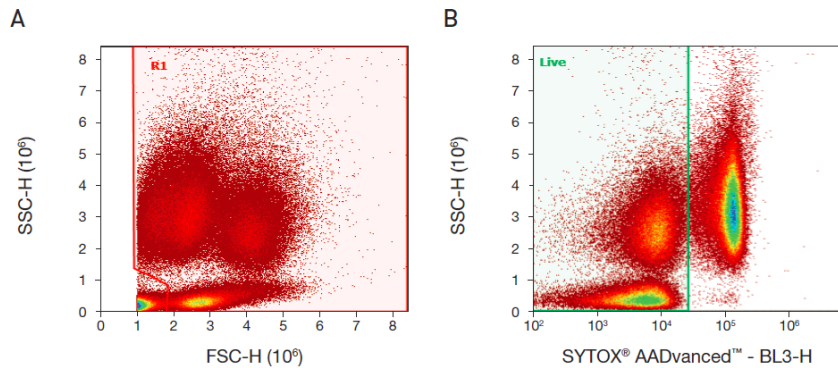
In recent years the application of flow cytometry to the study of various microbiological phenomena has increased, finding utility in studies that include detection and quantification...

Example: Detecting human circulating endothelial cells using the Attune® Acoustic Focusing Cytometer



Circulating endothelial cells (CECs) are mature cells shed from blood vessel walls during the natural process of endothelial cell turnover. Elevated levels of CECs have been reported in a host of pathological conditions including cardiovascular disorders, infectious diseases, immune disorders, post transplantation analysis, and cancer.

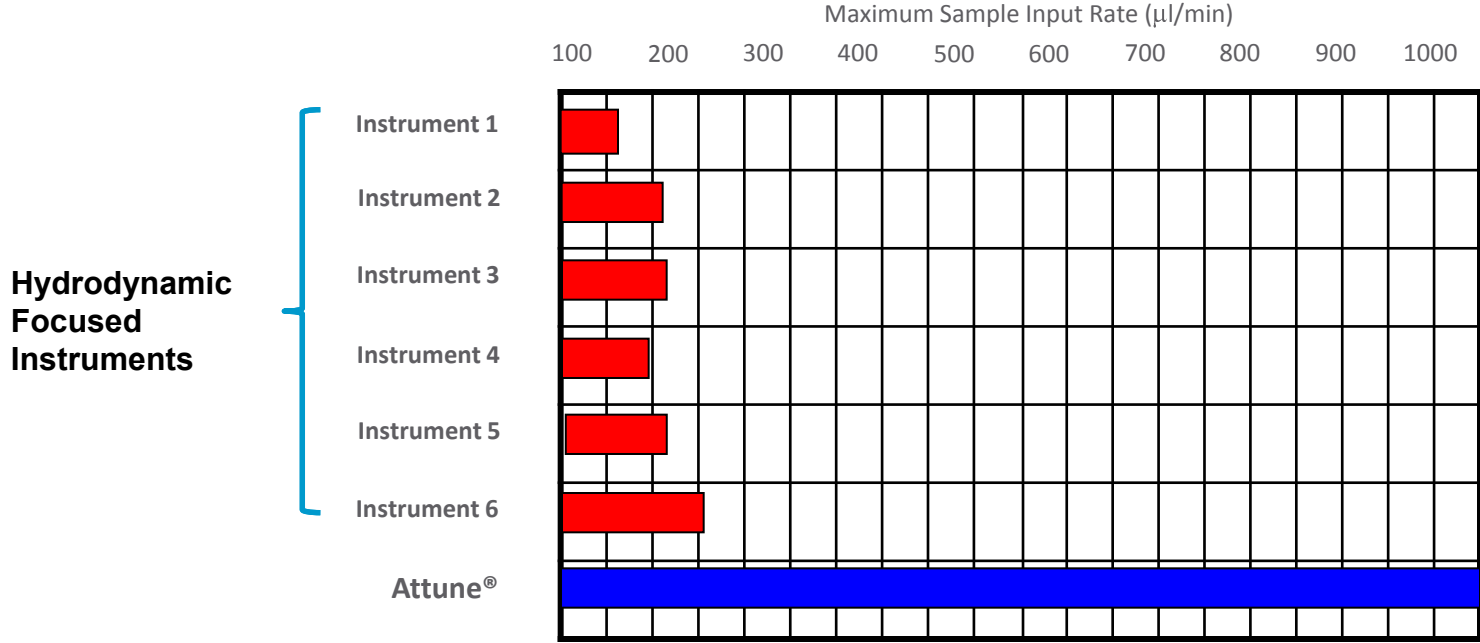
CECs are reported to be present in very low numbers: 0.01%–0.0001% of all peripheral blood mononuclear cells



B

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	8,600,152	---	100.000%
R1	7,372,407	85.724%	85.724%
Live	4,029,176	54.652%	46.850%
CD45-/CD3-/CD19-	76,852	1.907%	0.894%
CD31-/CD34+	24	0.031%	0.000%
CD31+/CD34+	444	0.578%	0.005%
CD31-/CD34-	1,442	1.876%	0.017%
CD31+/CD34-	74,942	97.515%	0.871%

Attune® Throughput Compared to Hydrodynamic Focused Instruments



- Attune® can analyze at sample rates from 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ to 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$ without losing accuracy
- Traditional Flow Cytometers can only run at most 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ and will sacrifice data quality
- Higher sample rates enable dilution of limited samples and analysis of Rare Events Faster

Table 1. Comparison of acquisition times using a hydrodynamic focusing cytometer or the Attune® Acoustic Focusing Cytometer. A blood sample was taken from an individual with aplastic anemia, and each instrument had a stop gate set on 1 million granulocyte events.

Instrument (collection rate)	Time to acquire 1 million granulocyte events	Relative rate compared to hydrodynamic focusing
Hydrodynamic focusing cytometer (high)	63 min 33 sec	–
Attune® Acoustic Focusing Cytometer (200 µL/min)	13 min 20 sec	4.8x
Attune® Acoustic Focusing Cytometer (500 µL/min)	5 min 47 sec	11.0x
Attune® Acoustic Focusing Cytometer (1,000 µL/min)	3 min 13 sec	19.7x

Attune souhrn

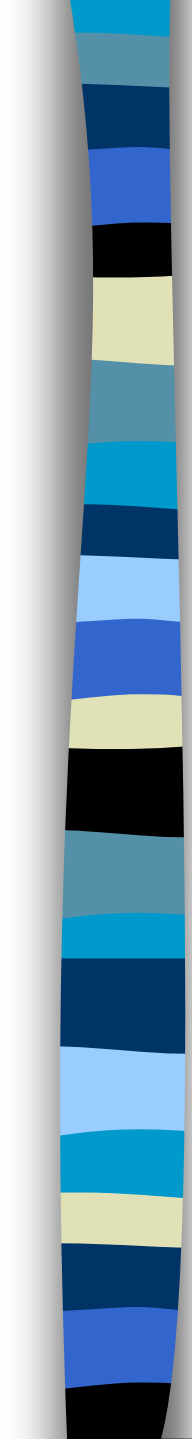
Výhody:

- rychlost měření
- jednoduché ovládání
- sw licence bez omezení
- snadná výměna emisních filtrů
- nízká spotřeba nosné kapaliny (cca 1L denně)

Limitace:

- jen dva lasery (6 barev)
- pouze originální roztoky
- dlouhý (i když automatický) shutdown
- sw nedokáže importovat FCS data
- nutnost nastavit určitý akviziční objem vzorku

Note: The minimum sample analysis volume is 50 μ L. However, the system requires that at least 220 μ L is used to account for the analysis volume + boost volume + safety volume.



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 zarovná 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 byste 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.