

# Bi9393 Analytická cytometrie

## Lekce 2



**Karel Souček, Ph.D.**

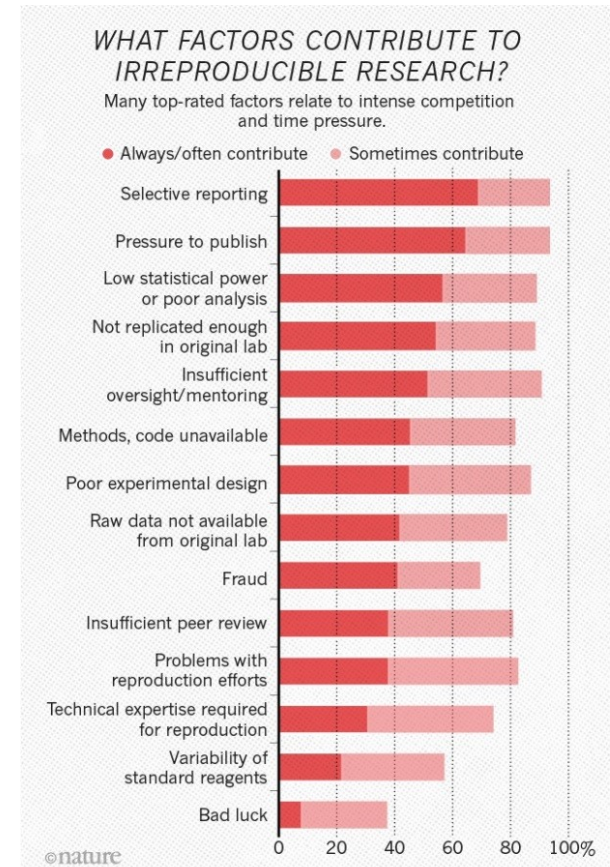
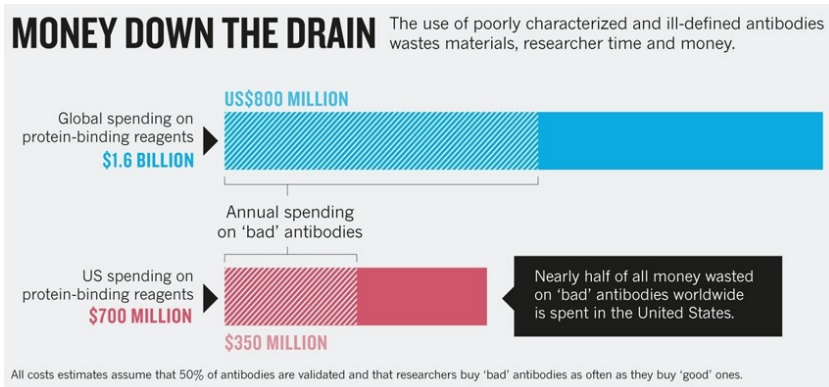
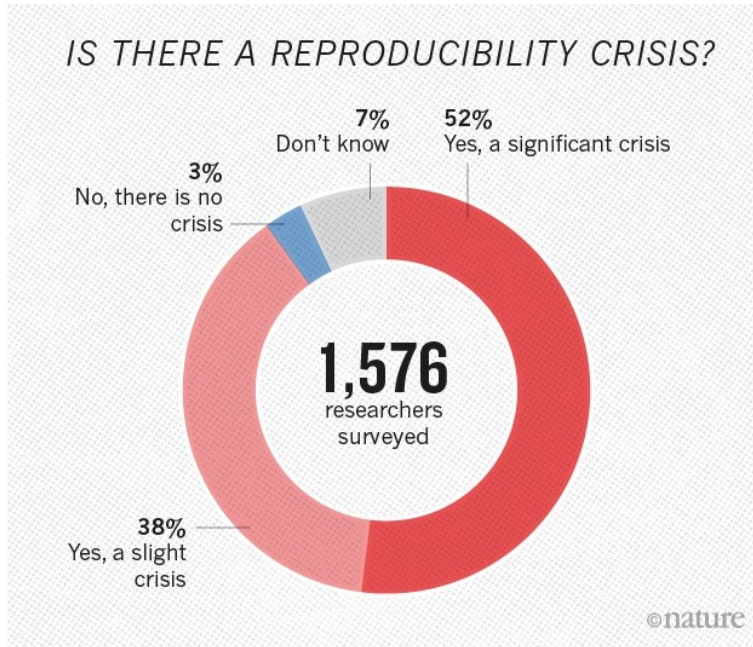
Oddělení cytokinetiky  
Biofyzikální ústav AVČR, v.v.i  
Královopolská 135  
612 65 Brno

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

# Reprodukovatelnost výsledků

Nature 533, 452–454 (26 May 2016)

doi:10.1038/533452a



[Circ Res.](#) 2015 Jan 2;116(1):116-26. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.303819.

**Reproducibility in science: improving the standard for basic and preclinical research.**

[Begley CG](#)<sup>1</sup>, [Ioannidis JP](#)<sup>2</sup>.

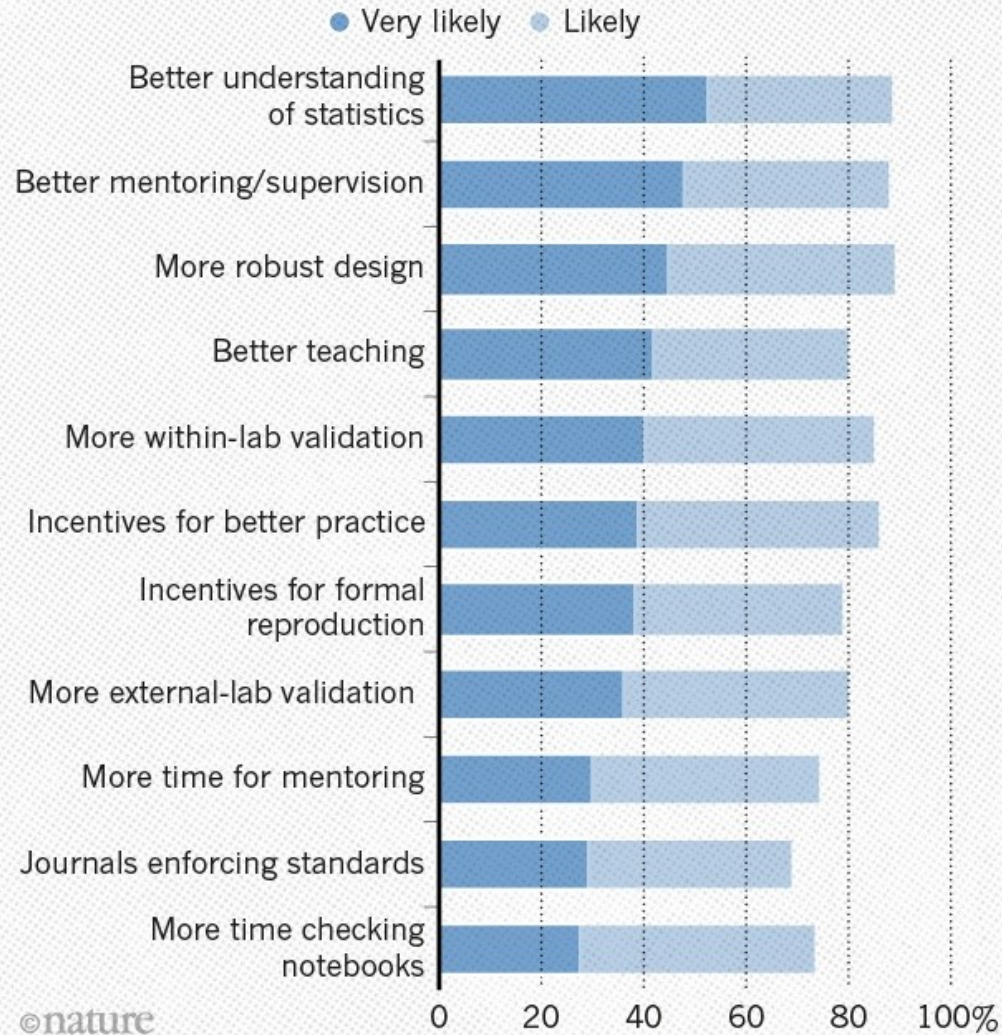
[Nature.](#) 2015 Feb 5;518(7537):27-9. doi: 10.1038/518027a.

**Reproducibility: Standardize antibodies used in research.**

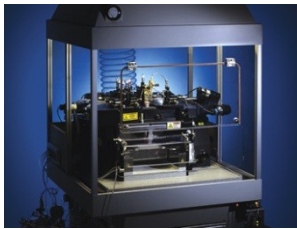
[Bradbury A](#)<sup>1</sup>, [Plückthun A](#)<sup>2</sup>.

# WHAT FACTORS COULD BOOST REPRODUCIBILITY?

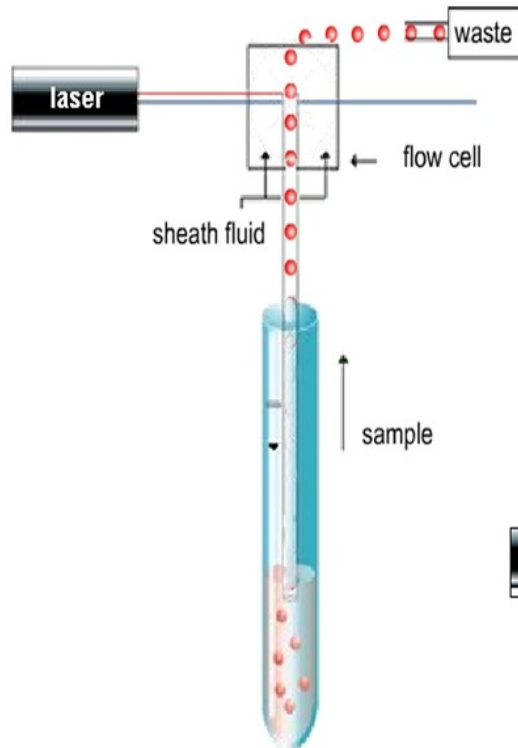
Respondents were positive about most proposed improvements but emphasized training in particular.



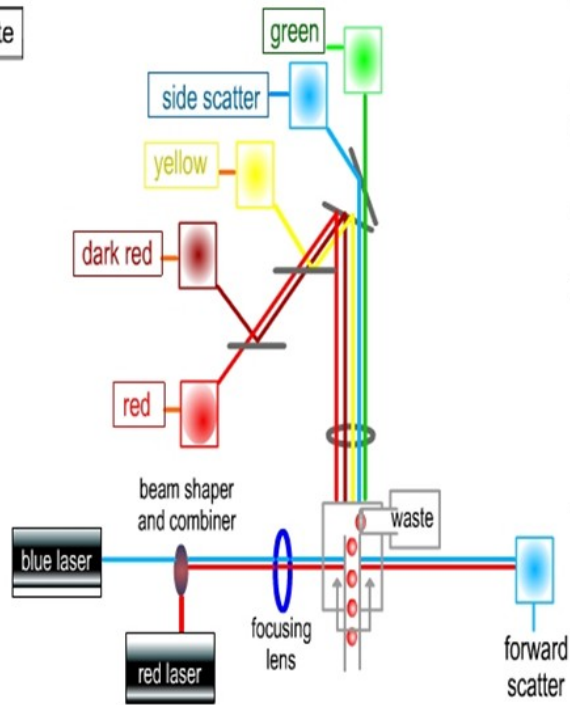
# Dostupná technologie



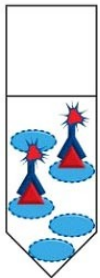
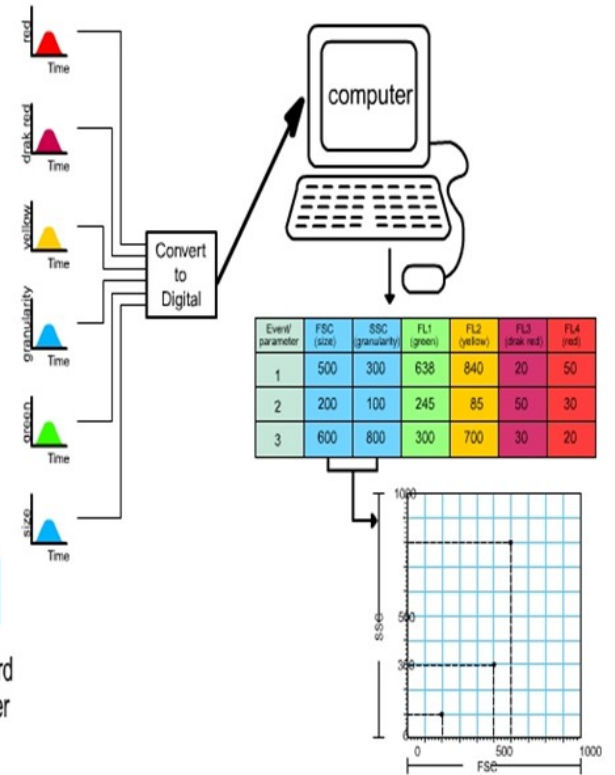
## fluidics






## optics



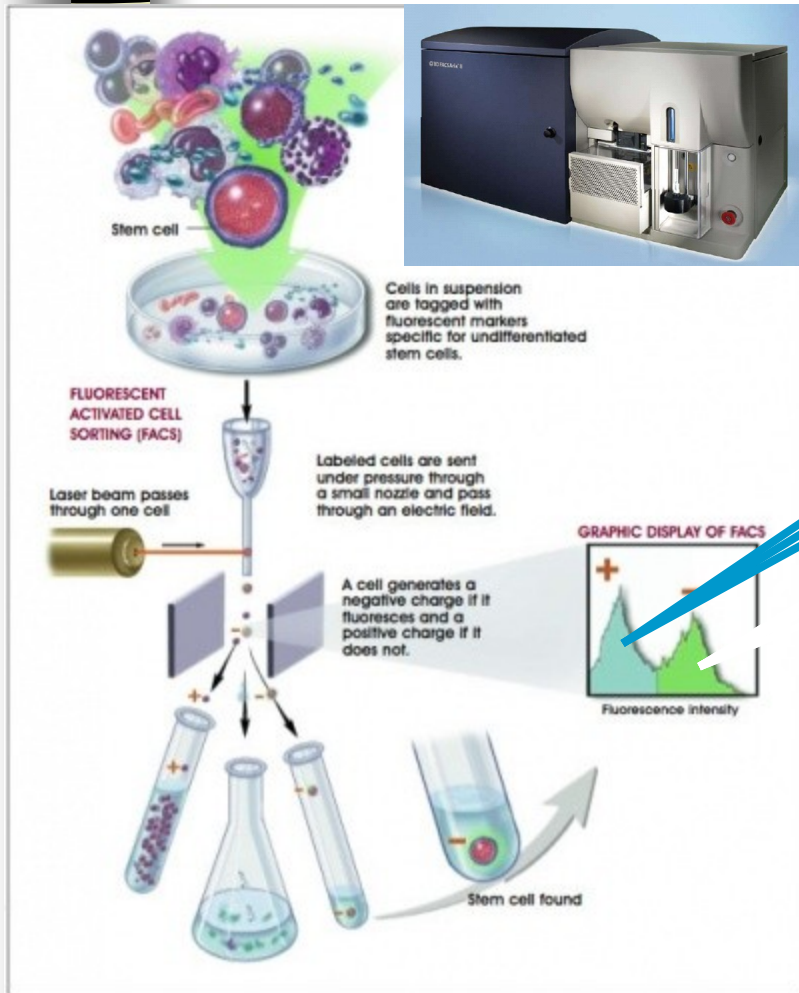
## electronics



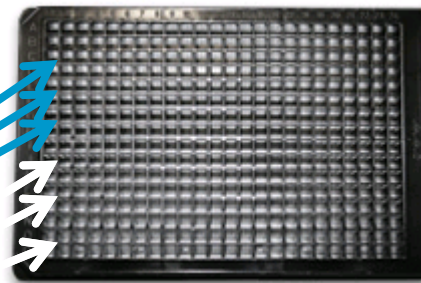
### Key

-  Cell
-  Antigen
-  Fluorochrome conjugated Primary antibody

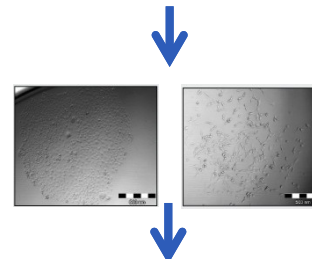
# new automatic cell cloning assay (ACCA) for determination of clonogenic capacity of CSCs



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 jedná 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

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


$$488 \times 10^{-9} \longrightarrow = 4.08 \times 10^{-19} \text{ J}$$


- 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?

$$E = \frac{6.63 \times 10^{-34} \text{ joule-seconds} \times 3 \times 10^8}{325 \times 10^{-9}}$$


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

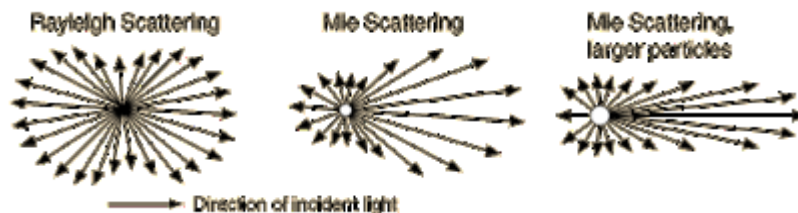
# What about a He-Ne laser?

$$E = \frac{6.63 \times 10^{-34} \text{ joule-seconds} \times 3 \times 10^8}{633 \times 10^{-9}}$$


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

# 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

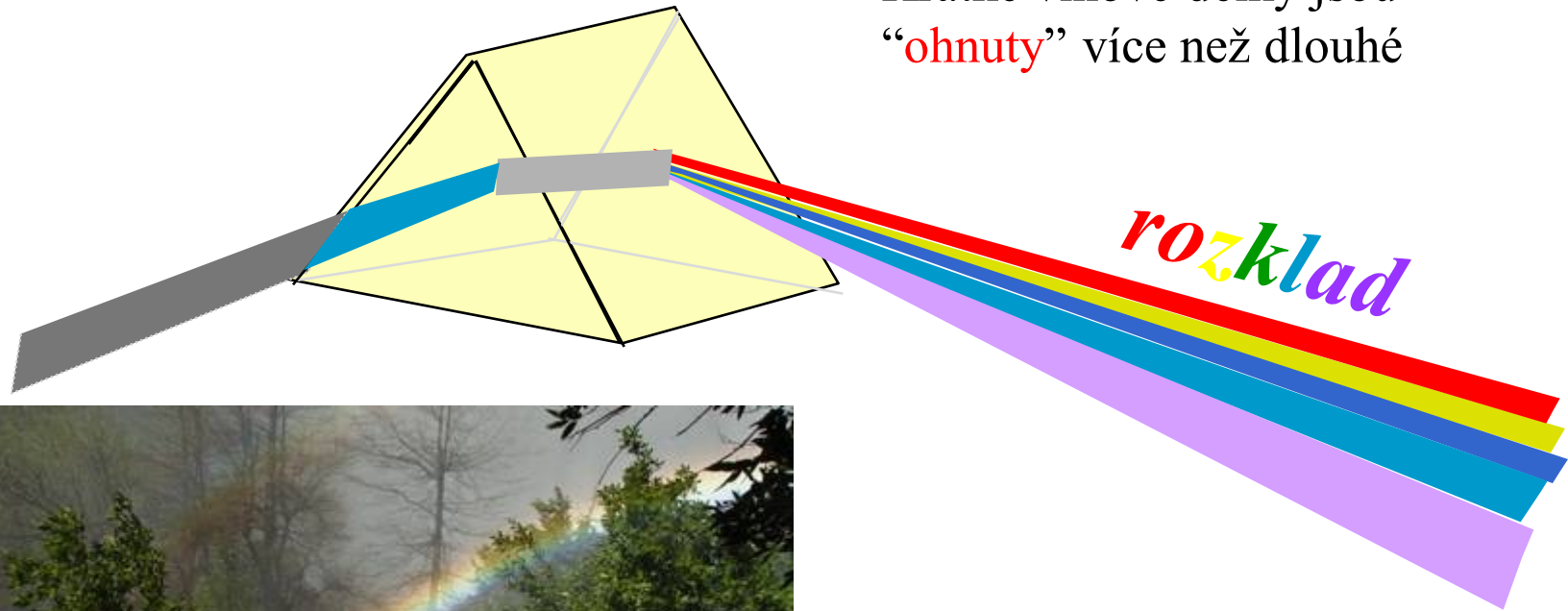
- **Rayleighův rozptyl** – molekuly a velmi malé částice neabsorbují, ale rozptylují světlo které má menší vlnovou délku než je jejich velikost (modré nebe - vzduch rozptyluje lépe kratší vlnové délky)
- **Mieův rozptyl** je charakteristický pro částice větší než je vlnová délka světla (bílá záře kolem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

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

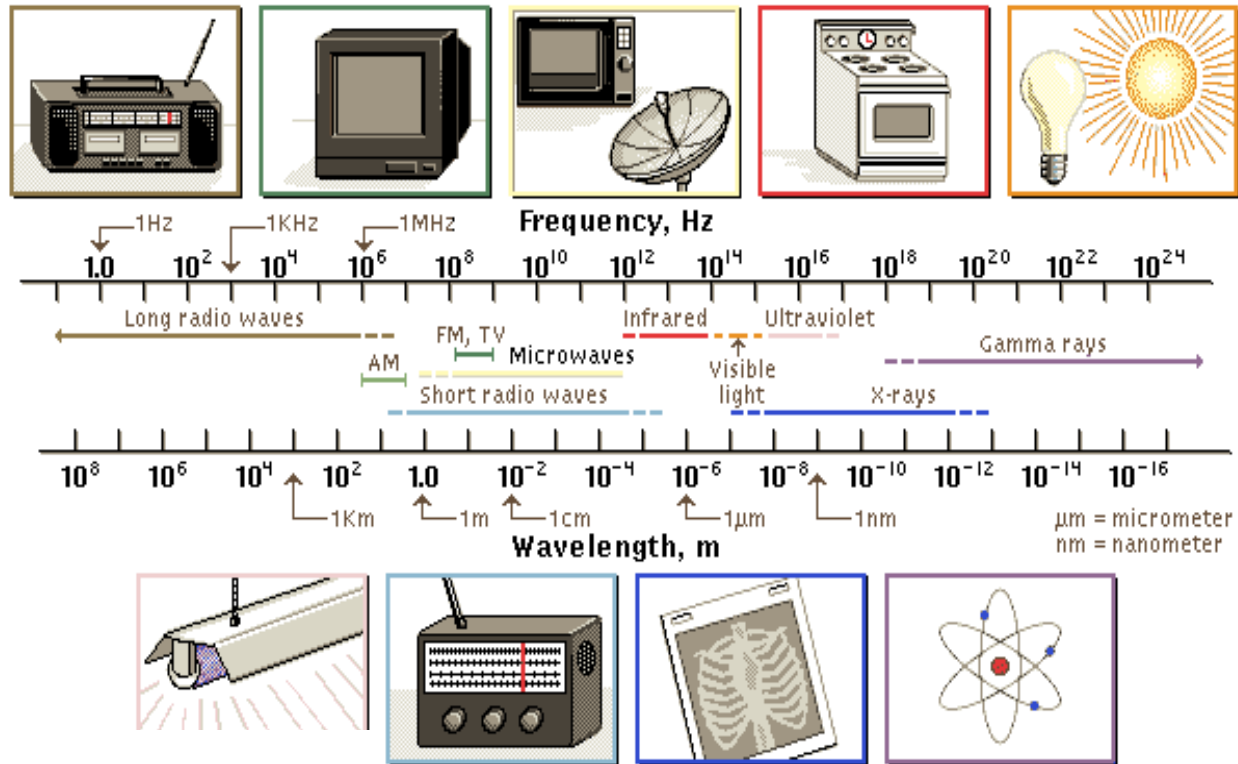


# Ohyb a rozklad světla

Krátké vlnové délky jsou  
“ohnuty” více než dlouhé



# Elektromagnetické spektrum



© Microsoft Corp, 1995



**Pouze malá oblast spektra je používána pro cytometrické aplikace**

# George Gabriel Stokes (1819 – 1903)

Anglický fyzik a matematik  
působící na univerzitě v Cambridge



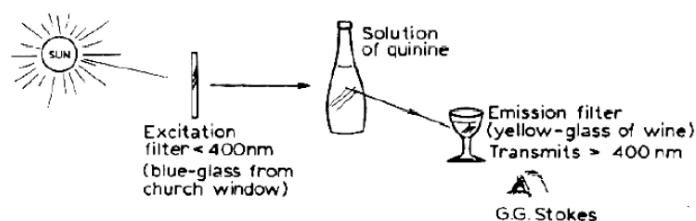
1852 – popsal fluorescenci

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

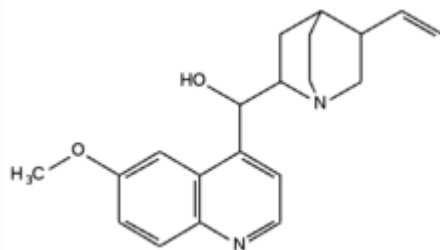


<http://www.nndb.com/people/131/000097837/>



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

[ 463 ]

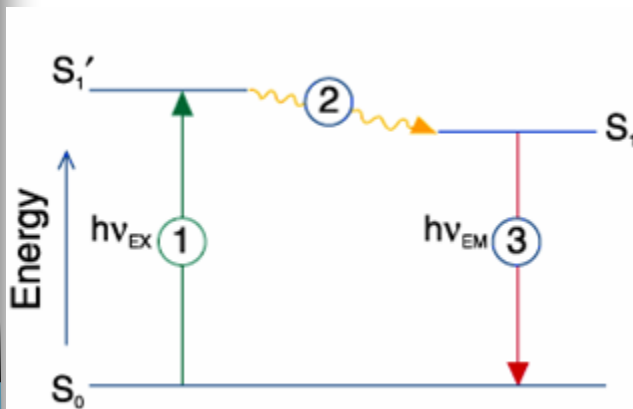


XXX. *On the Change of Refrangibility of Light*. By G. G. STOKES, M.A., F.R.S.,  
Fellow of Pembroke College, and Lucasian Professor of Mathematics in the  
University of Cambridge.

Received May 11,—Read May 27, 1852.

# Princip fluorescence

**Fluorescence** (patří mezi fotoluminiscenční záření, které je vyvoláno buď účinkem jiného dopadajícího záření, nebo účinkem dopadajících částic) 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.



**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.

## 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  $10^{-9}$  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.







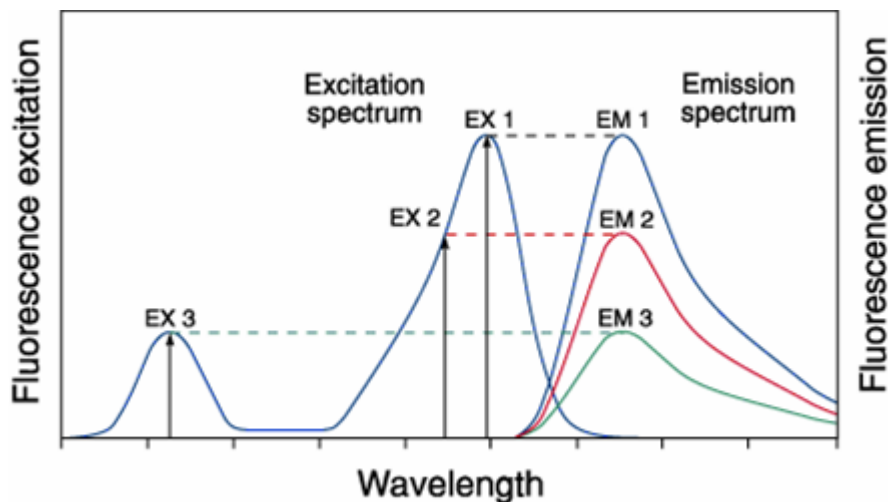
## Charakteristiky fluorescence

- **intenzita** – počet fotonů procházejících v daném směru jednotkovou plochou za jednotku času
- **spektrální složení** – spektrální hustota fotonového toku na jednotkový interval vlnových délek nebo frekvencí
- **polarizace** – směr kmitání elektrického vektoru elektromagnetické vlny
- **doba dohasínání** – je dána vnitřní dobou života excitovaného stavu, z něhož dochází k emisi; úzce souvisí s pochody vedoucími k nezářivé deaktivaci tohoto stavu
- **koherenční vlastnosti** – vztahy mezi fázemi světelných vln

# 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.



## Fluorescenční barviva

- Fluorescenční barviva (fluorofory, fluorochromy) jsou chemické sloučeniny, které obsahují ve své molekule reaktivní skupinu, která je schopna reagovat s nukleofilními skupinami ( $\text{NH}_2$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{SH}$ ).
- Obecně se fluorofory dělí na vnitřní (vlastní, intrinsic) a vnější (nevlastní, extrinsic).

## Vnitřní fluorescence

- Vnitřní fluorescence buněk je dána přítomností vnitřních fluoroforů, mezi které patří proteiny, redukované formy NADH a NADPH, vitamin A, cytochromy, peroxidáza, hemoglobin, myoglobin či chlorofyl.
- Proteiny vyzařují fluorescenční záření v UV oblasti spektra. Hlavními fluorofory v proteinech jsou aromatické aminokyseliny (fenylalanin, tryptofan, tyrosin), jejichž absorpční i emisní pás leží mezi 240 a 300nm.
- Ostatní uvedené látky vyzařují ve viditelné oblasti spektra (modrá, žlutá či červená).

## Vnější fluorescence

Vnější fluorofory jsou používány mnohem častěji než vnitřní.

Jsou přidávány ke studovanému vzorku a podle typu vazby jsou děleny na fluorescenční značky a fluorescenční sondy.

## Fluorescenční značky

- Nejčastěji se používají k fluorescenčnímu značení proteinů, ke kterým se vážou kovalentní vazbou.
- Nejznámějšími fluorescenčními značkami jsou FITC (fluorescein-5-isothiokyanát) a TRITC (tetramethylrhodamin-5-isothiokyanát, tetramethylrhodamin-5-isothiokyanát).

## Fluorescenční sondy

- vnější fluorofory, které se váží ke struktuře nekovalentní vazbou a často při tom mění své fluorescenční vlastnosti. Tyto fluorofory jsou používány ke studiu změn konformace bílkovin, tloušťky membrán, membránového potenciálu apod.
- K identifikaci a vizualizaci nukleových kyselin se používá řada fluorescenčních sond (např: akridinová oranž, ethidium bromid, DAPI a další).
- Nejznámější a také nejpoužívanější fluorescenční sondou pro vizualizaci veškeré jaderné DNA je DAPI. Chemicky se jedná o 4',6-Diamidino-2-fenylindol. Jeho absorpční maximum je při 345 nm, maximální fluorescence je při 455 nm (modrý fluorofor)
- Dalším často používaným fluoroforem je akridinová oranž. Jedná se o fluorescenční sondu, jejíž absorpční a emisní pásma se liší podle substrátu, ke kterému je vázána DNA/RNA. Obě jmenované jsou většinou dodávány v podobě chloridových solí.

# 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

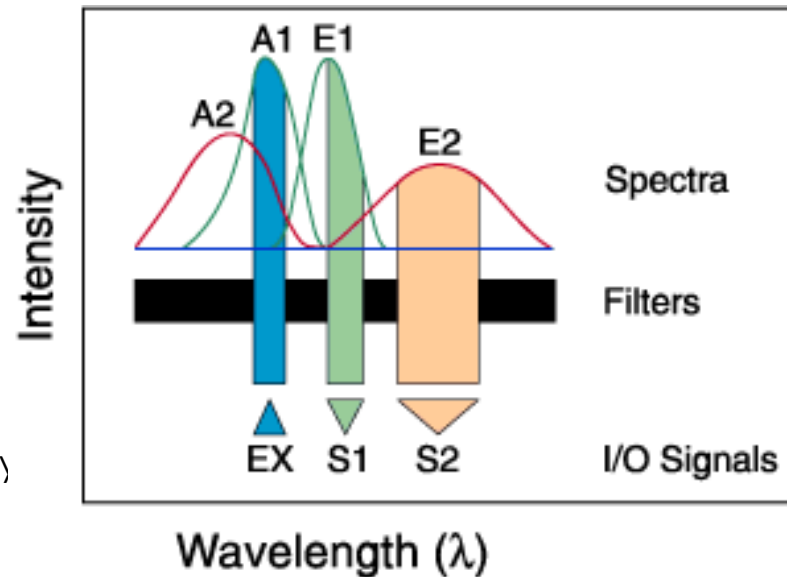
- spektrofluorometer je flexibilní, umožňuje měřit v kontinuálním spektru excitačních a emisních vlnových délek
- flow cytometr potřebuje fluorescenční značky excitovatelné určitou vlnovou délkou.

## Fluorescence pozadí

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

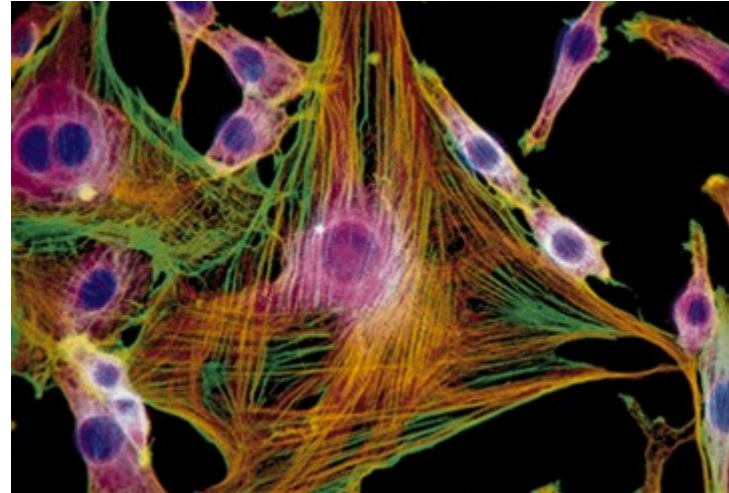
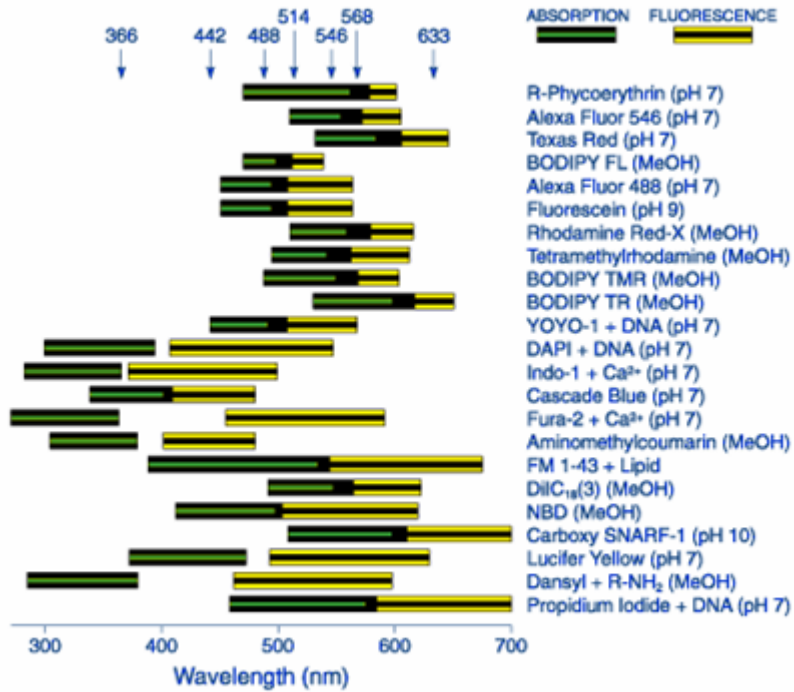
## Vícebarevné značení

- 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

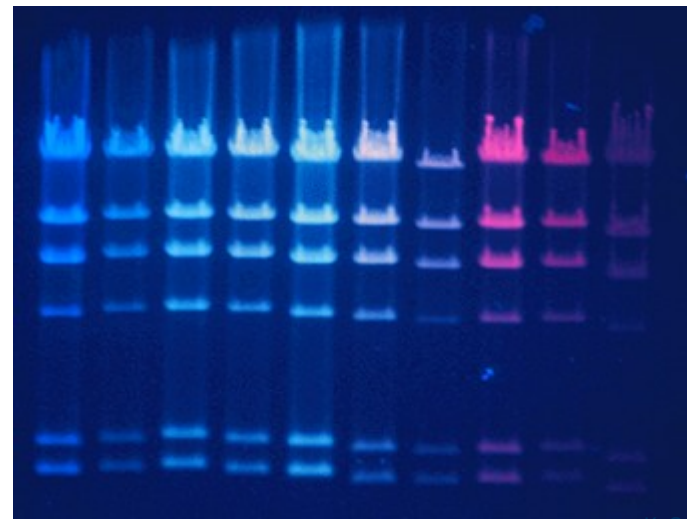
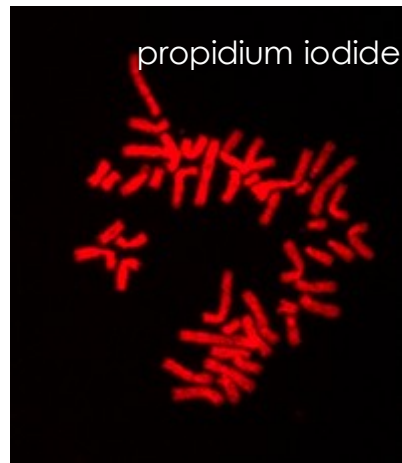
F-actin ~  
BODIPY FL phalloidin

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

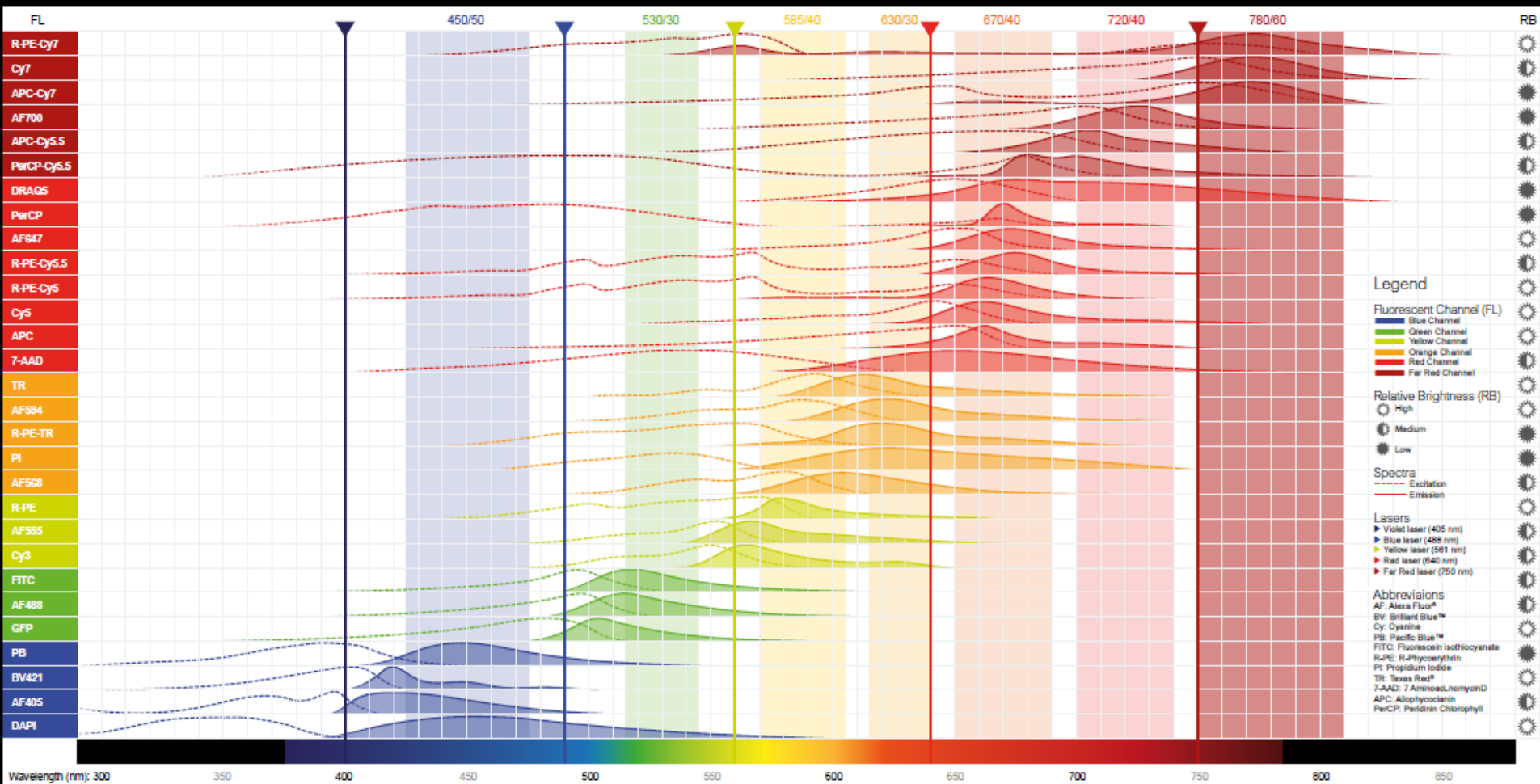
DNA ~  
DAPI

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

λ Hind III



# Fluorochrome chart



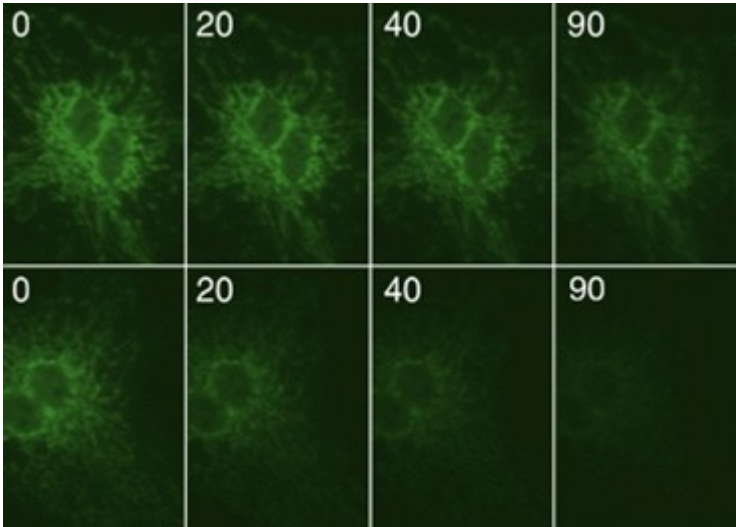


# Procesy interferující a detekcí fluorescence

- **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



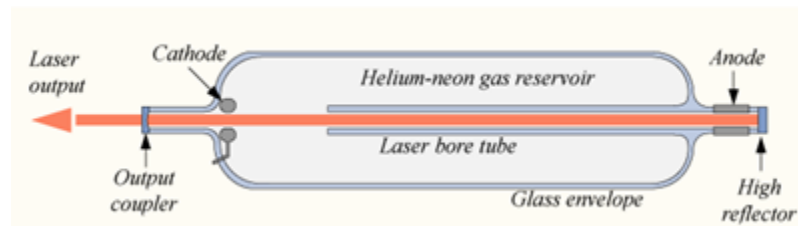
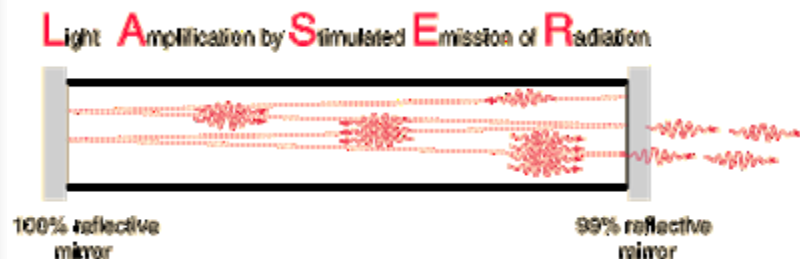
# Optika - zdroj světla

- 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)



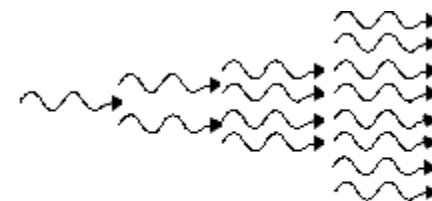
[http://en.wikipedia.org/wiki/Helium-neon\\_laser](http://en.wikipedia.org/wiki/Helium-neon_laser)

- koherentní (souvislý světelný tok)
- monochromatický
- soustředěný

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



Thermal emitter (lamp)

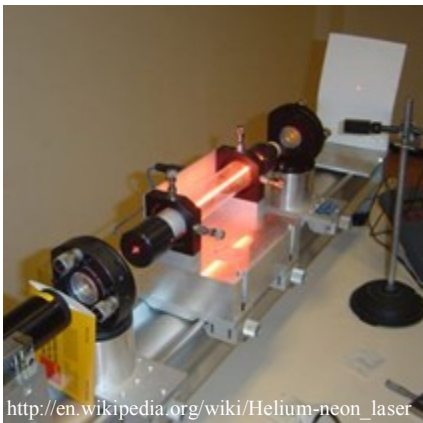
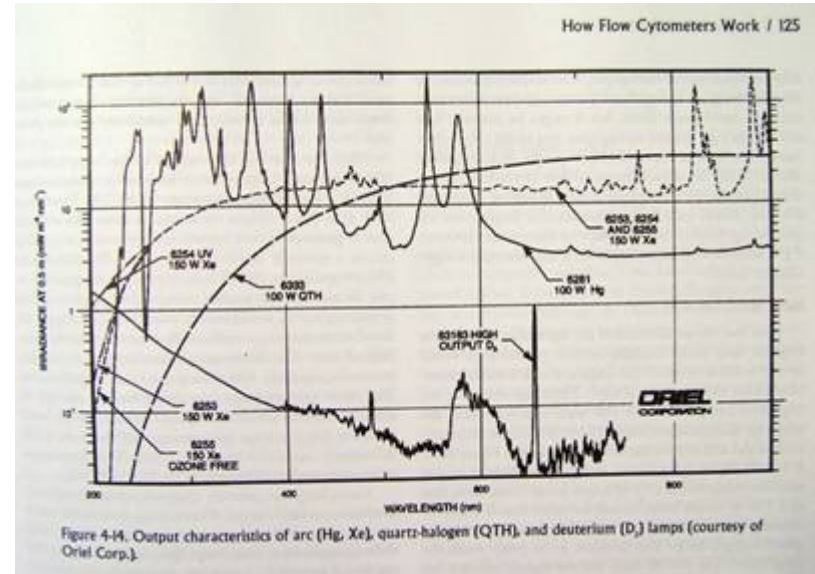
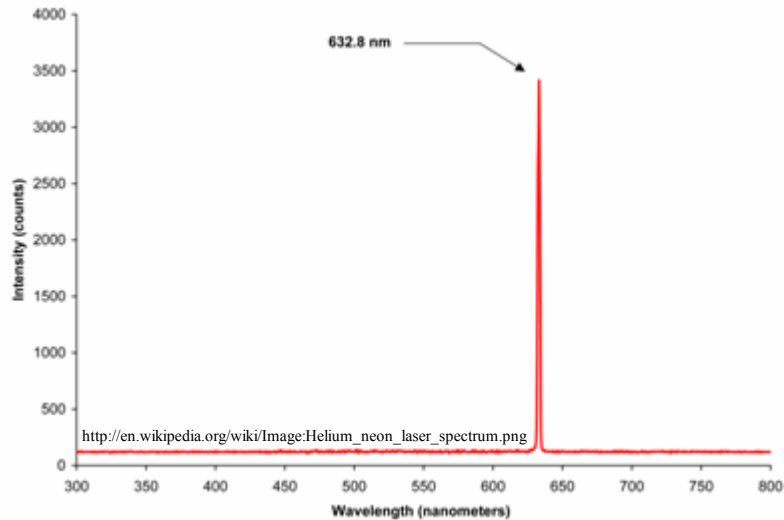


Laser

<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>

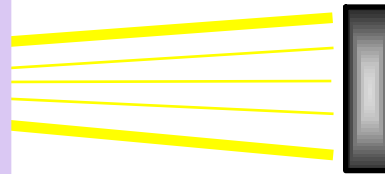
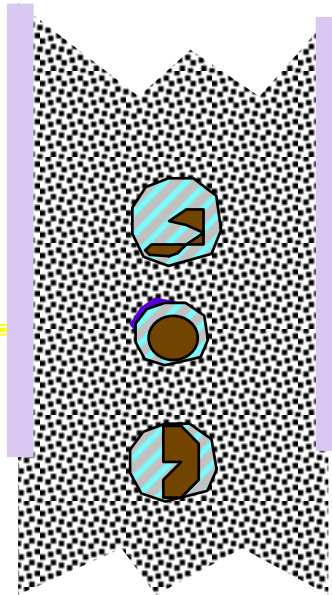
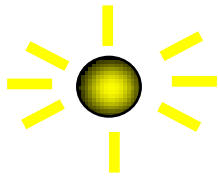


# Optika - „Forward Scatter“ kanál

- 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



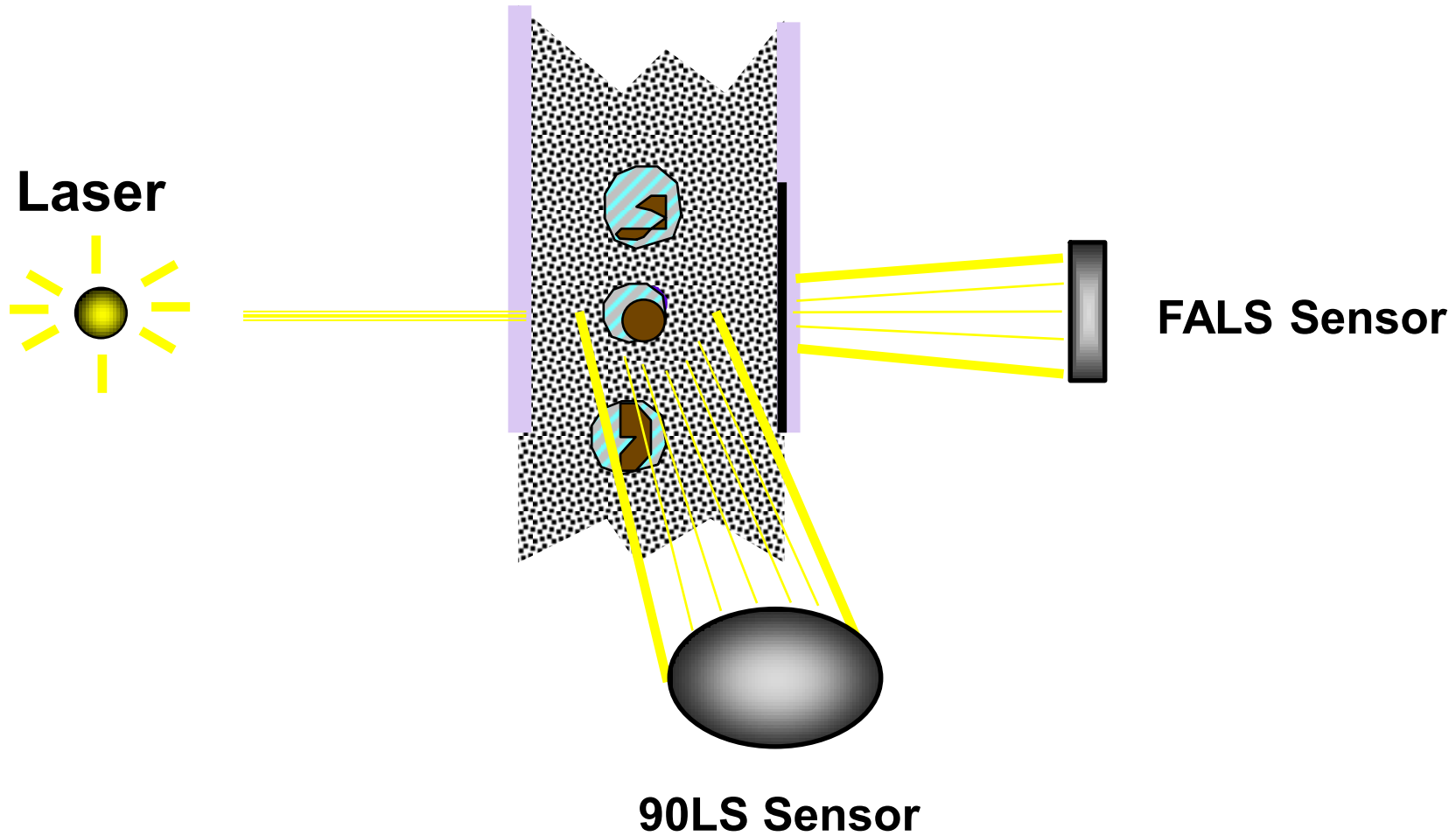
FALS  
Sensor



# 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 **negrnulární** populaci

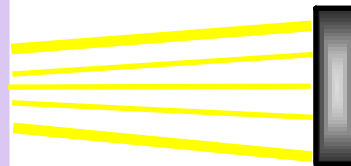
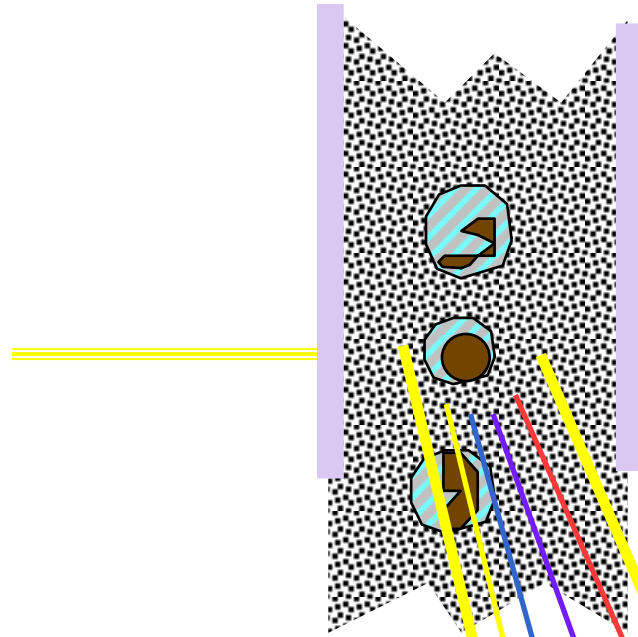
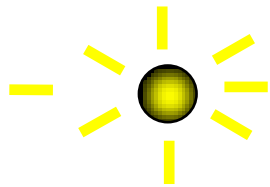


# Optika - fluorescenční kanály

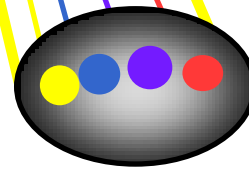
- fluorescence emitovaná z každého fluorochromu je detekována pomocí specifického **fluorescenčního kanálu**
- specifita detekce je kontrolována vlnovou selektivitou filtru a zrcadel

# Fluorescence Detectors

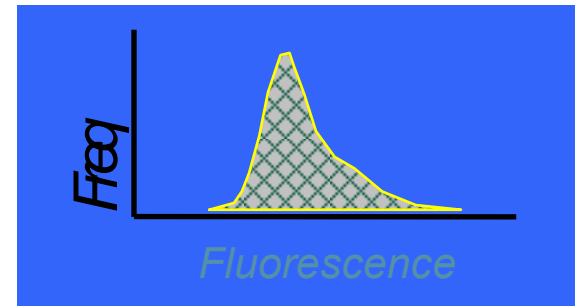
Laser



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

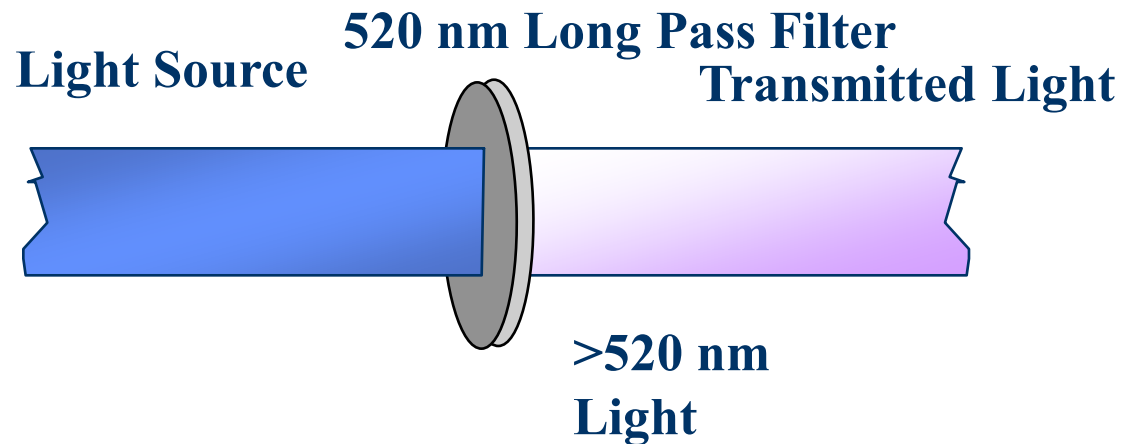




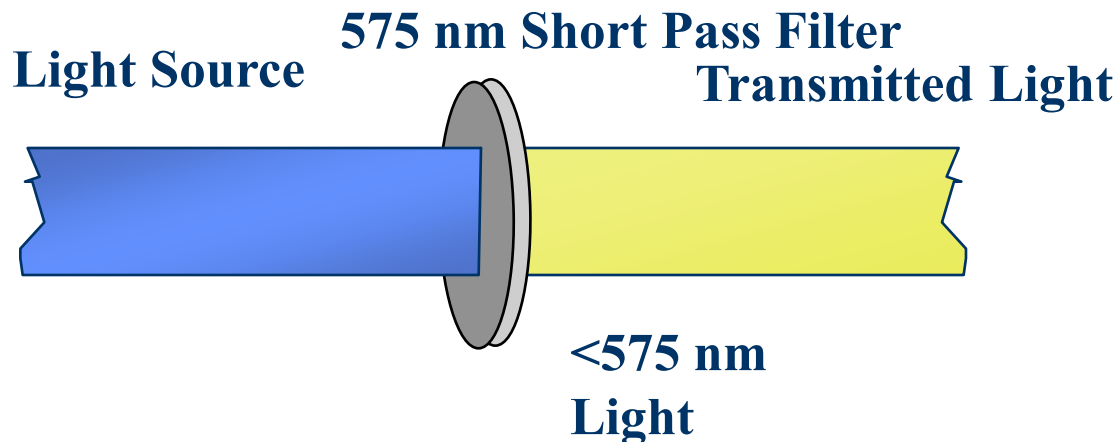
# Optics - vlastnosti filtrů

- „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

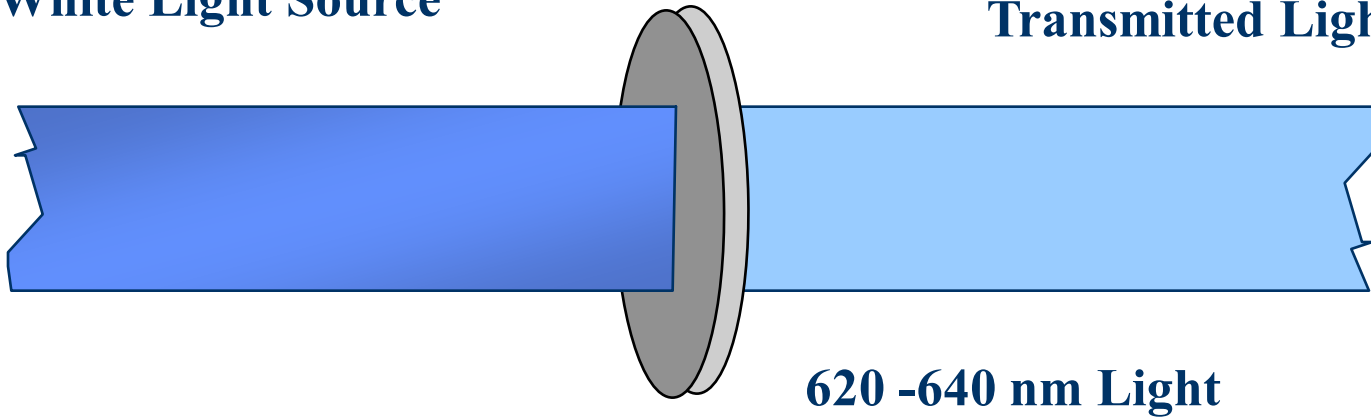


# Standard Band Pass Filters

## 630 nm BandPass Filter

White Light Source

Transmitted Light





# Optika - vlastnosti filtrů

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



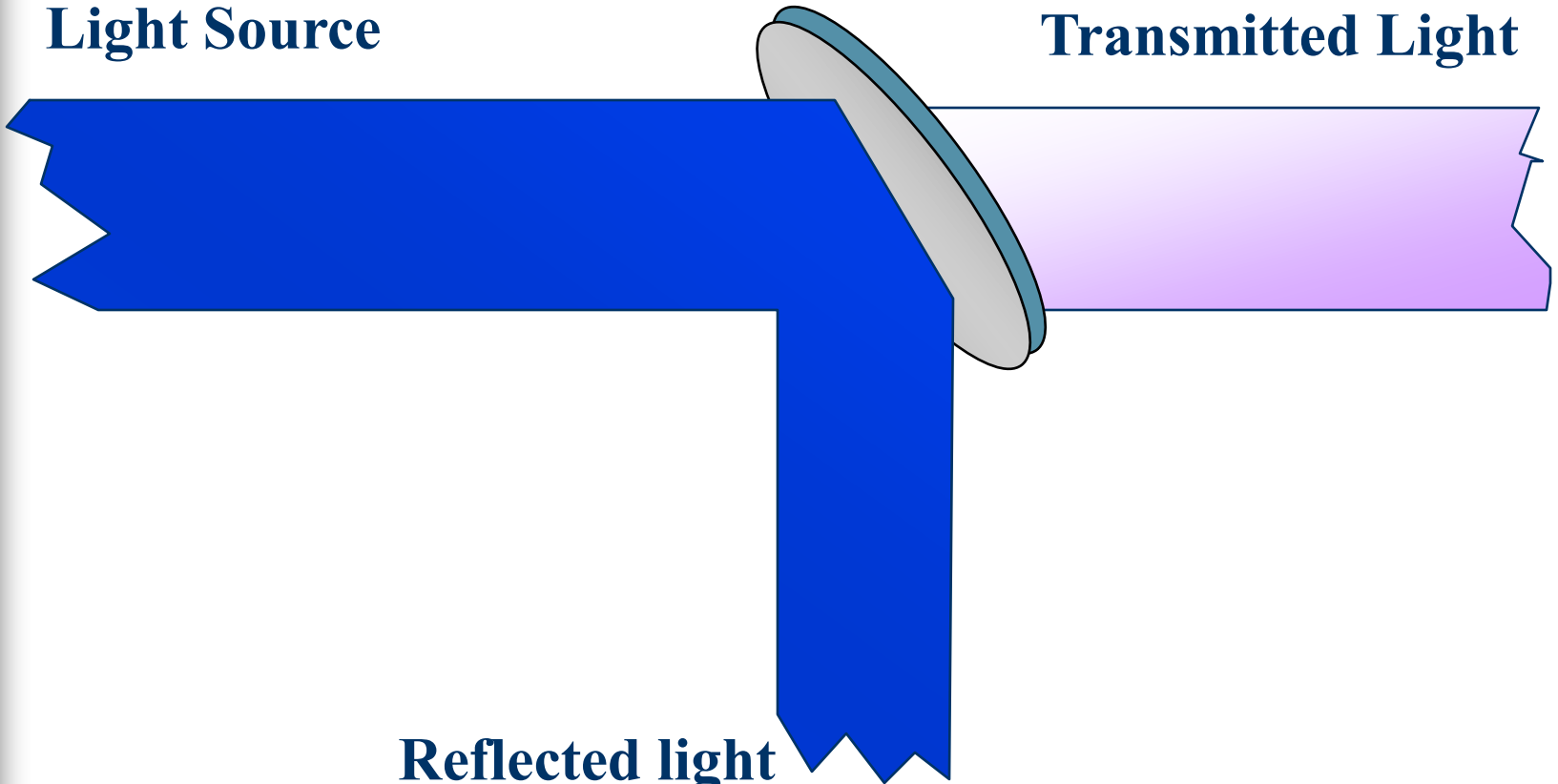
# Dichroic Filter/Mirror

**Filter placed at 45°**

**Light Source**

**Transmitted Light**

**Reflected light**





# Optika - uspořádání filtrů

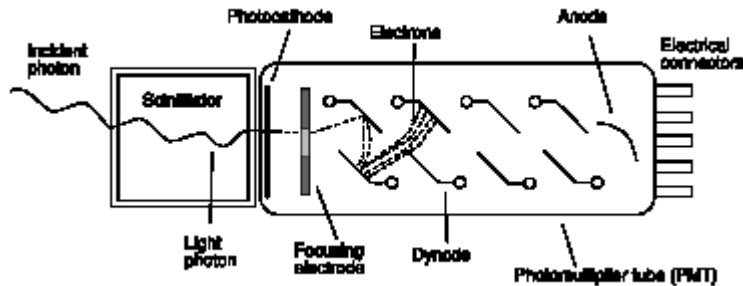
- k společnému měření více než jednoho „scatteru“ nebo fluorescence , používáme **mnohonásobné kanály** (a detektory)
- multikanálové uspořádání musí splňovat
  - **spektrální vlastnosti** použitého fluorochromu
  - **správný řád uspořádání** filtrů a zrcadel



# Optika - detektory

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

# Photomultiplier tubes (photomultipliers, PMTs)

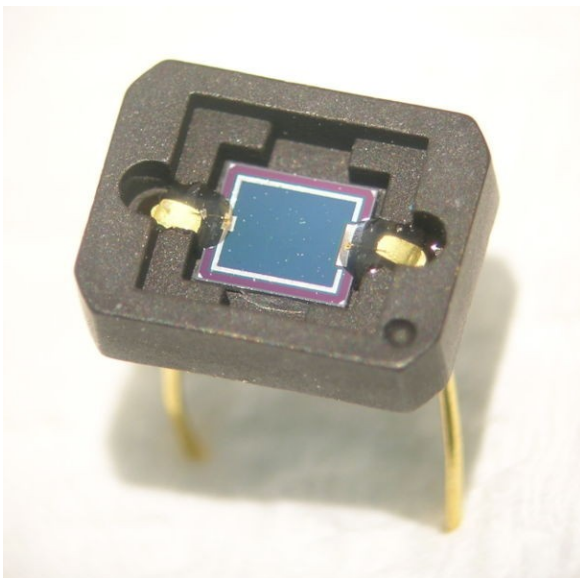


Základní charakteristika:

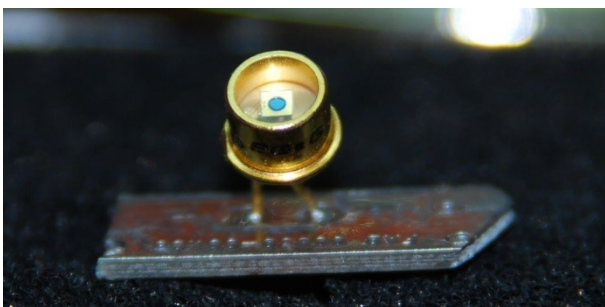
- vysoce citlivé detektory (jeden foton)
- velké zesílení signálu/nízký šum
- velká plocha detekce
- rychlá frekvence odpovědi
- velké pracovní napětí (1000 – 2000 V)



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



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



[https://en.wikipedia.org/wiki/Avalanche\\_photodiode](https://en.wikipedia.org/wiki/Avalanche_photodiode)

## “bežná“ 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

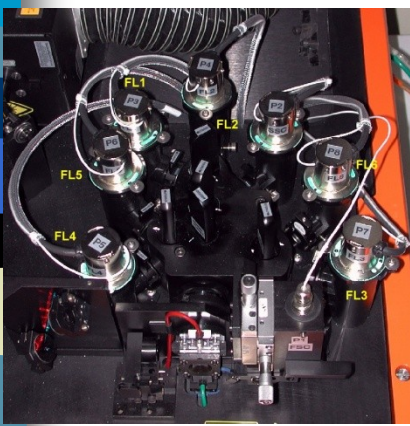
Nevýhody

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

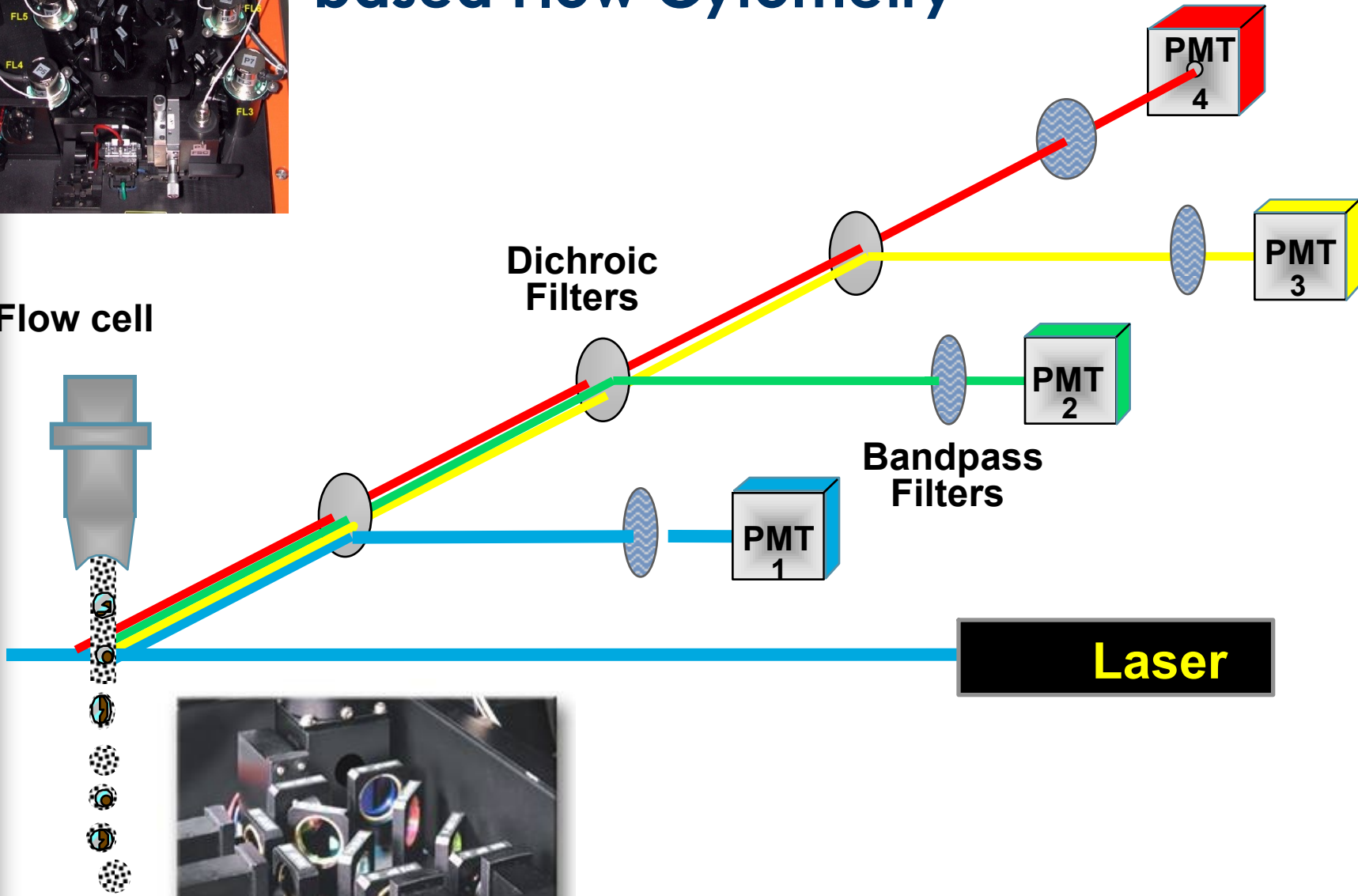
Současnost: „**AVALANCHE**“ fotodiody (APD)

- Vysoce citlivé polovodiče - srovnatelné s PMT

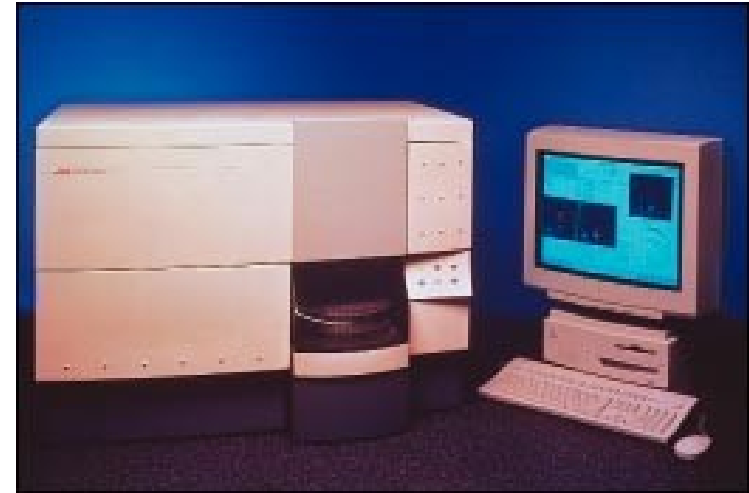
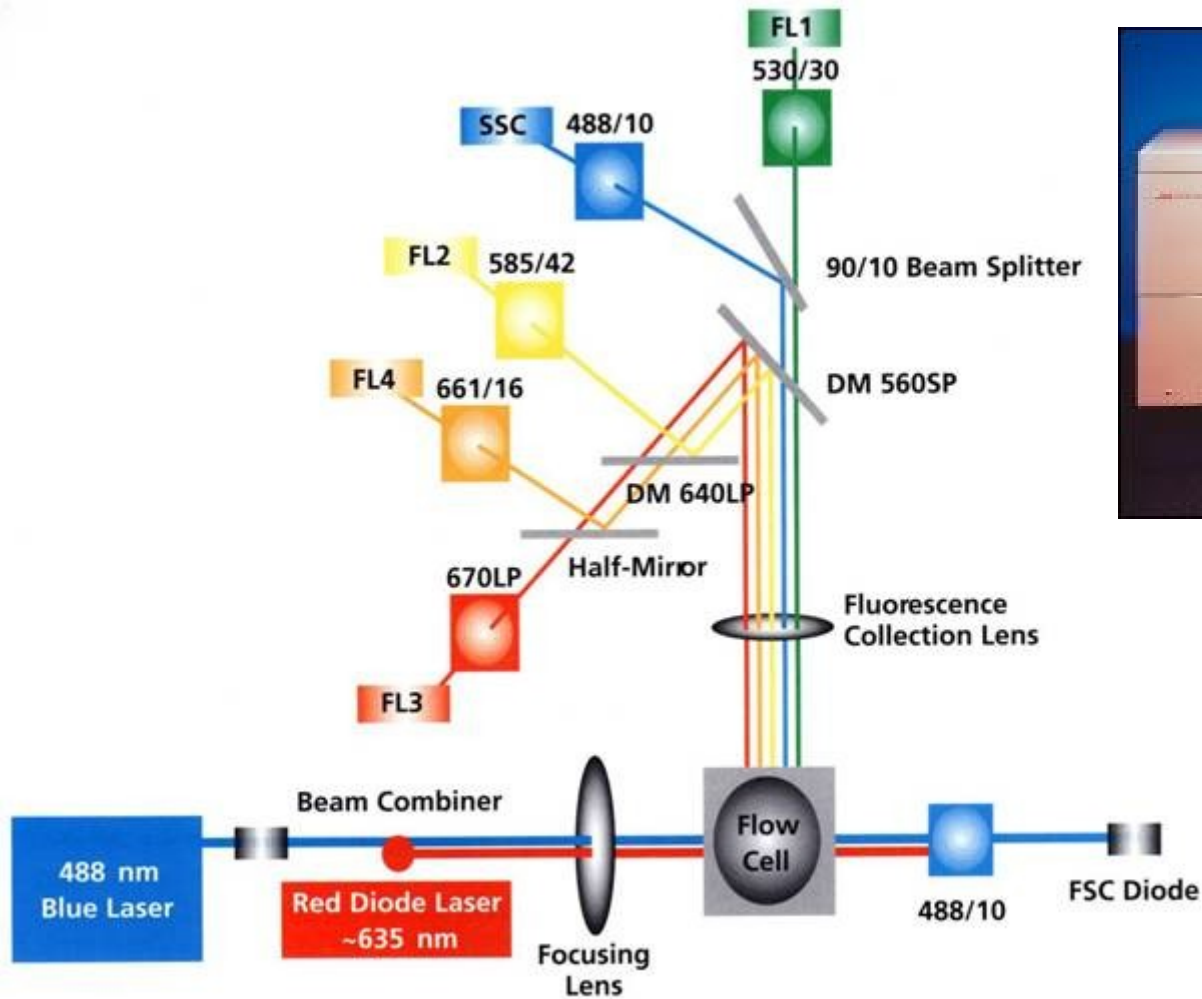
# Example Channel Layout for Laser-based Flow Cytometry



Flow cell

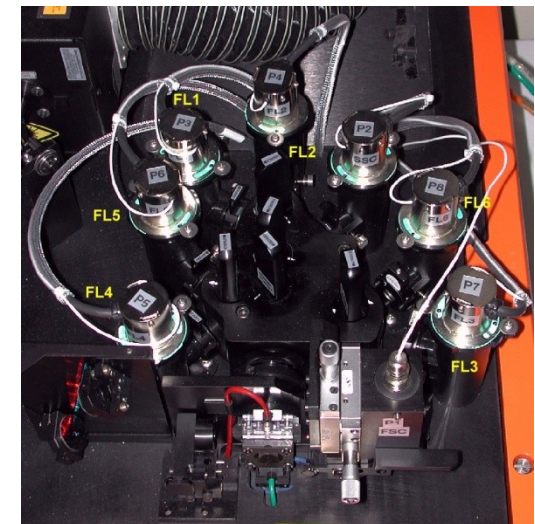
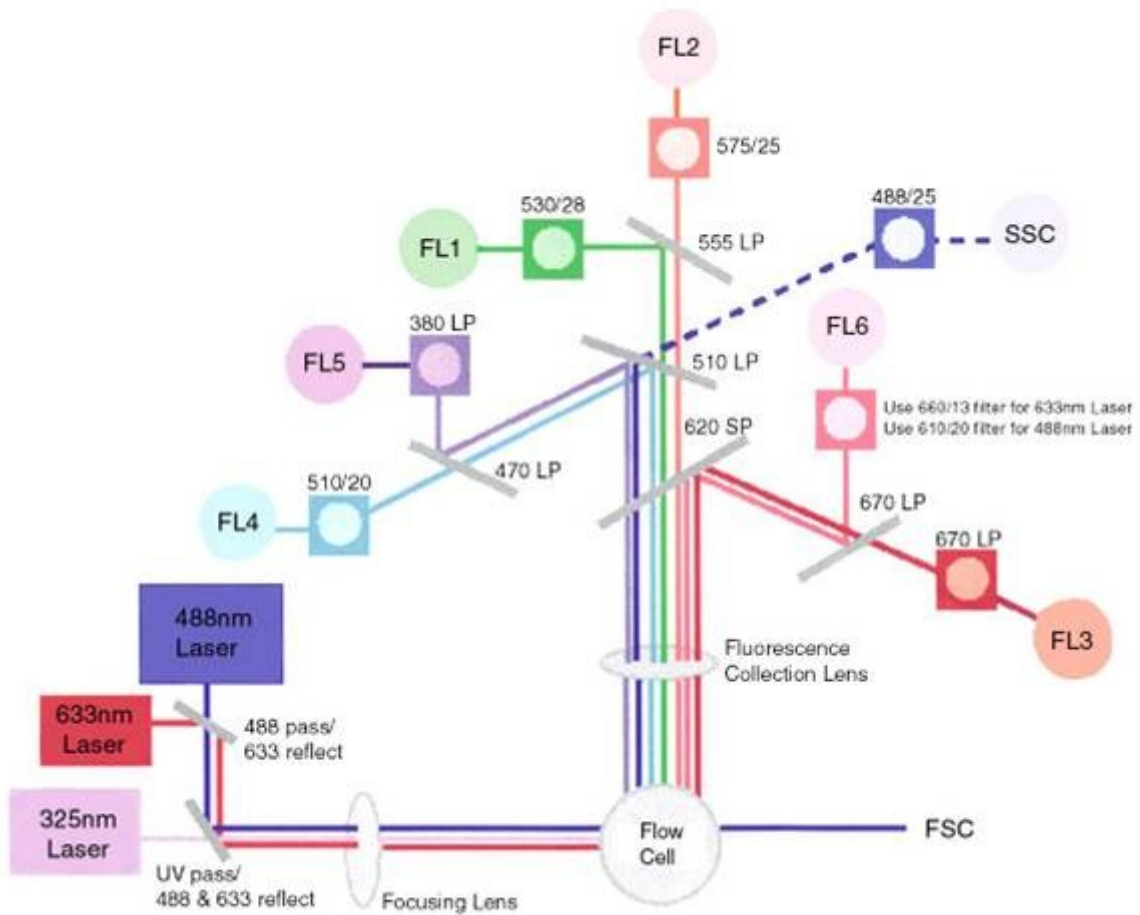


# BD FACSCalibur system



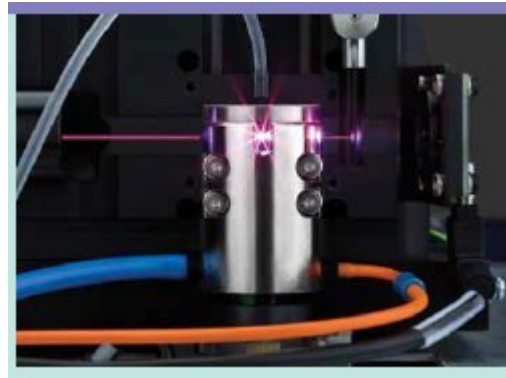
[http://www.bdbiosciences.com/immunocytometry\\_systems/](http://www.bdbiosciences.com/immunocytometry_systems/)

# BD LSR II system



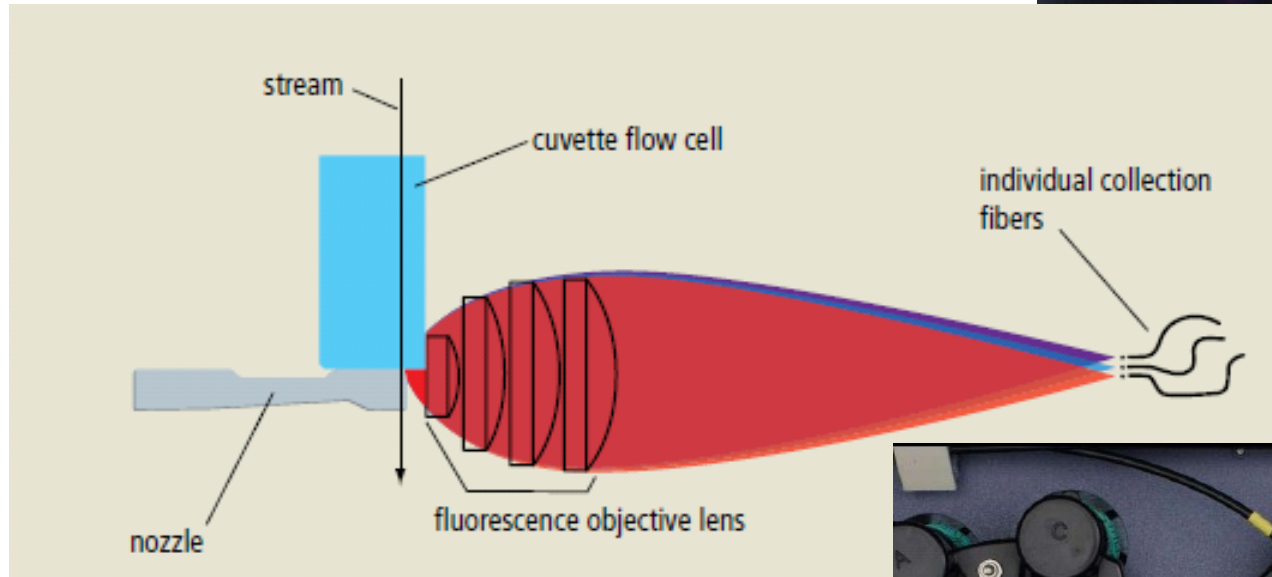


# BD FACSVerse system

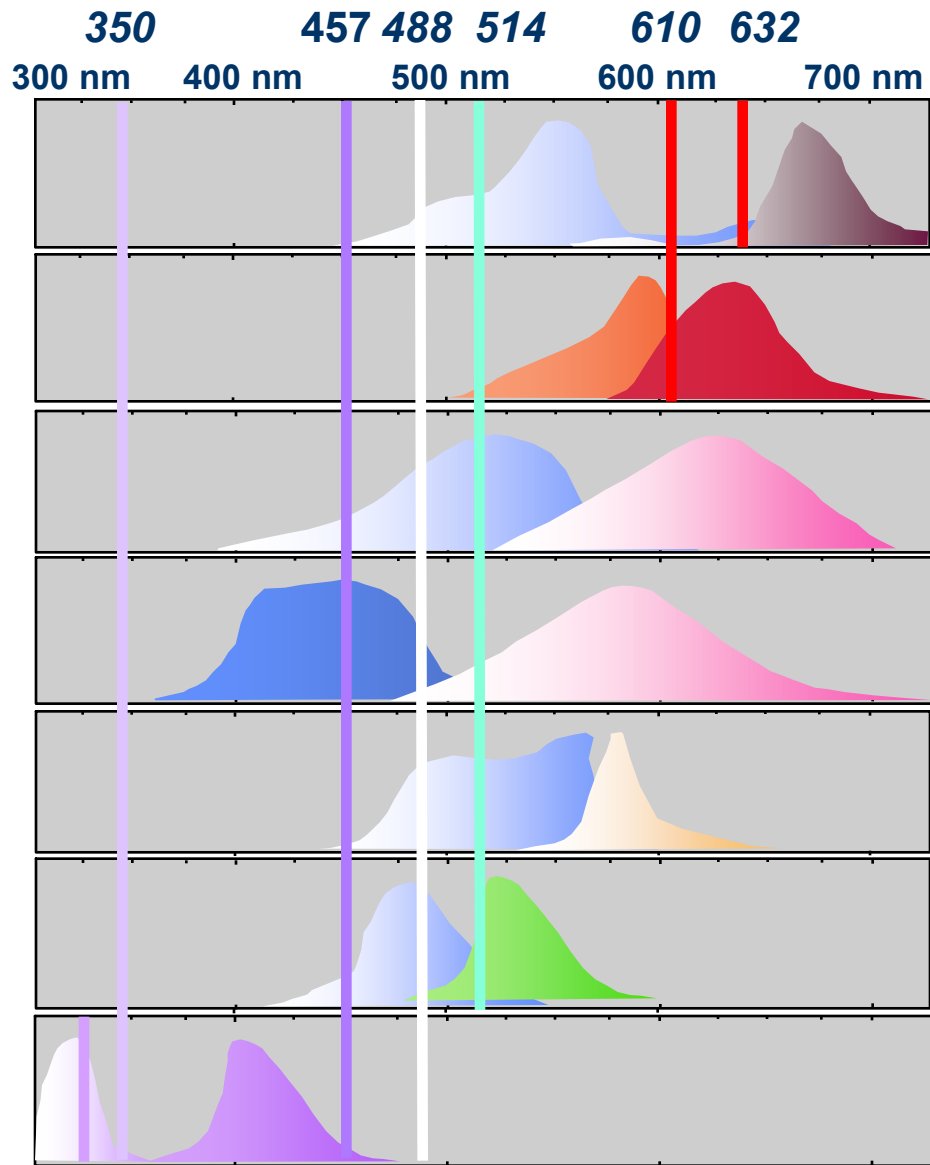


<http://www.bdbiosciences.com/instruments/facsverse/features/index.jsp>

# Aria II



**Common  
Laser  
Lines**



***PE-TR Conj.***

***Texas Red***

***PI***

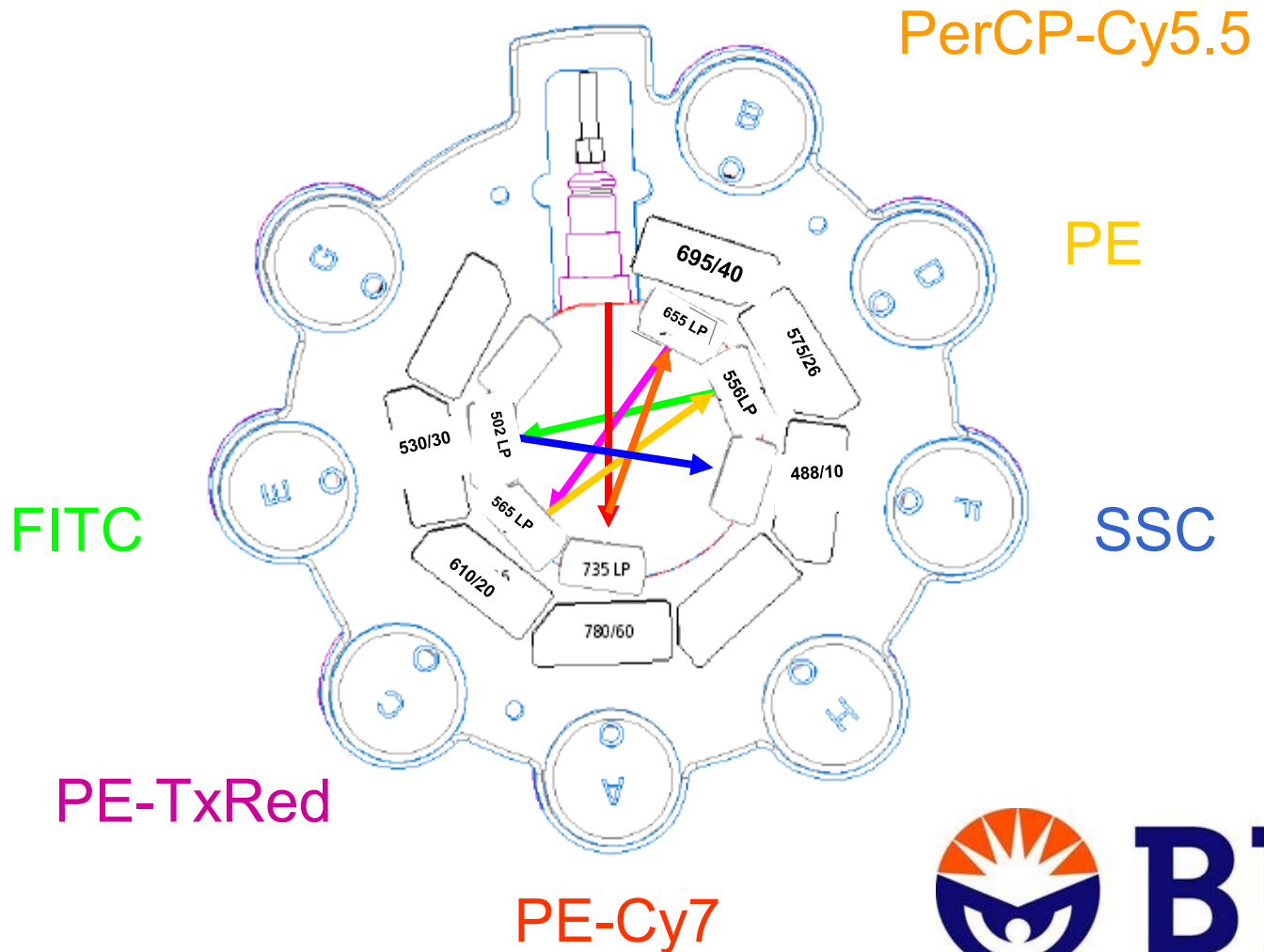
***Ethidium***

***PE***

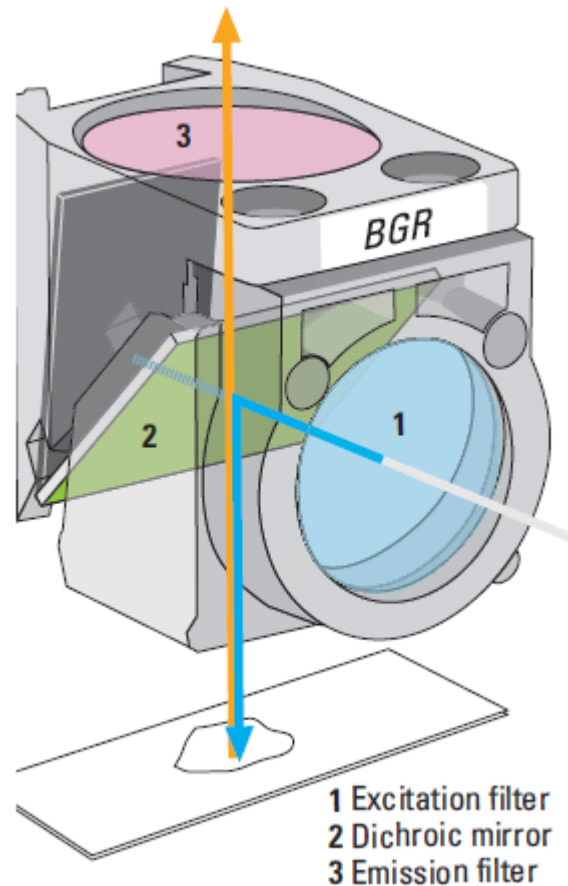
***FITC***

***cis-Parinaric acid***

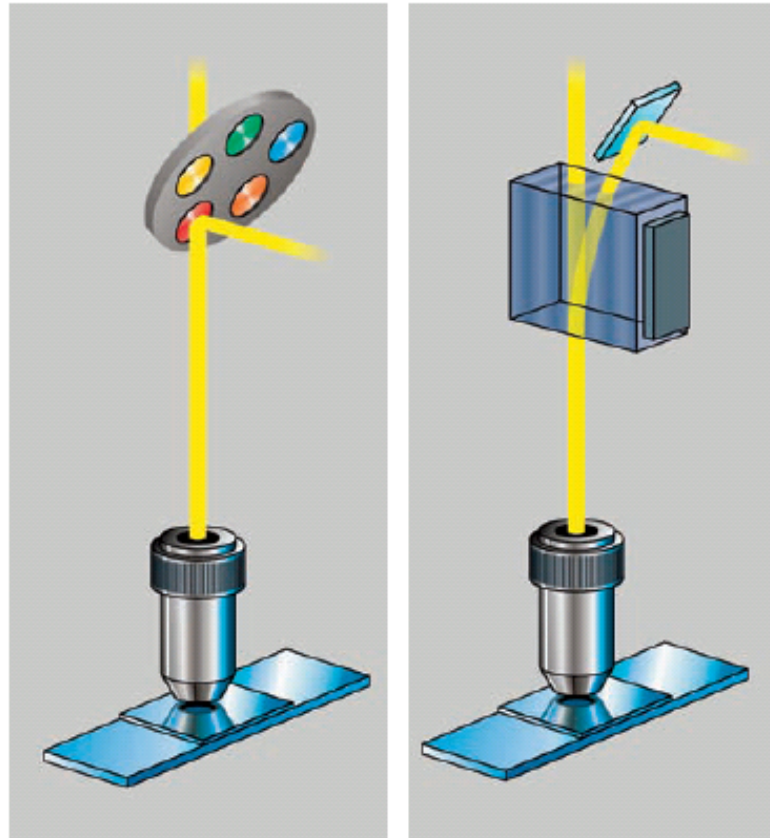
# Octagon Detection System



# “kostka” pro konvenční fluorescenční mikroskop



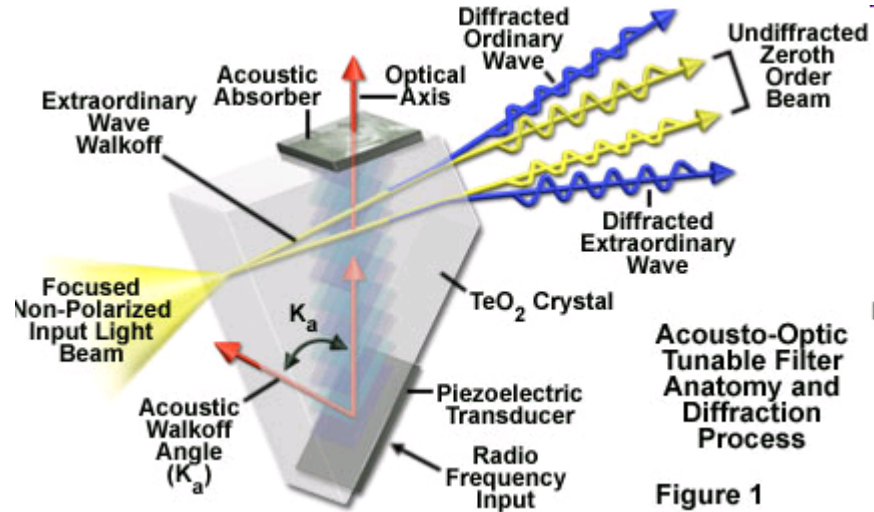
# Acousto Optical Beam Splitter AOBS®



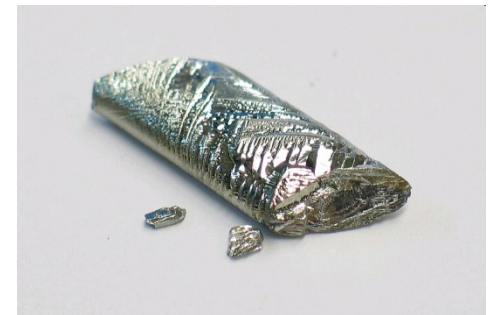
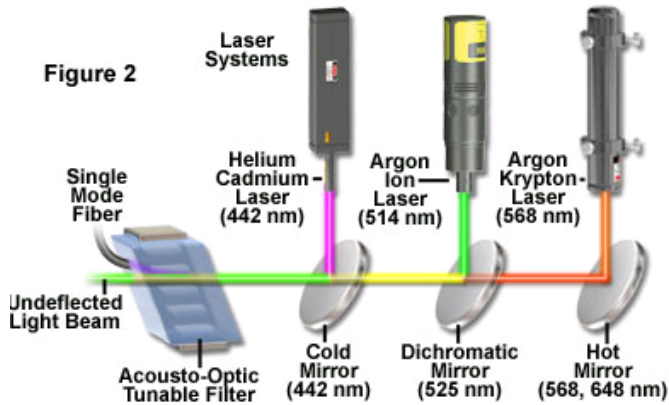
Left: conventional beam splitting by dichroic mirrors requires many optical elements with fixed properties.

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

# Acousto Optical Beam Splitter AOBS®



Acousto-Optic Tunable Filters in Confocal Microscopy

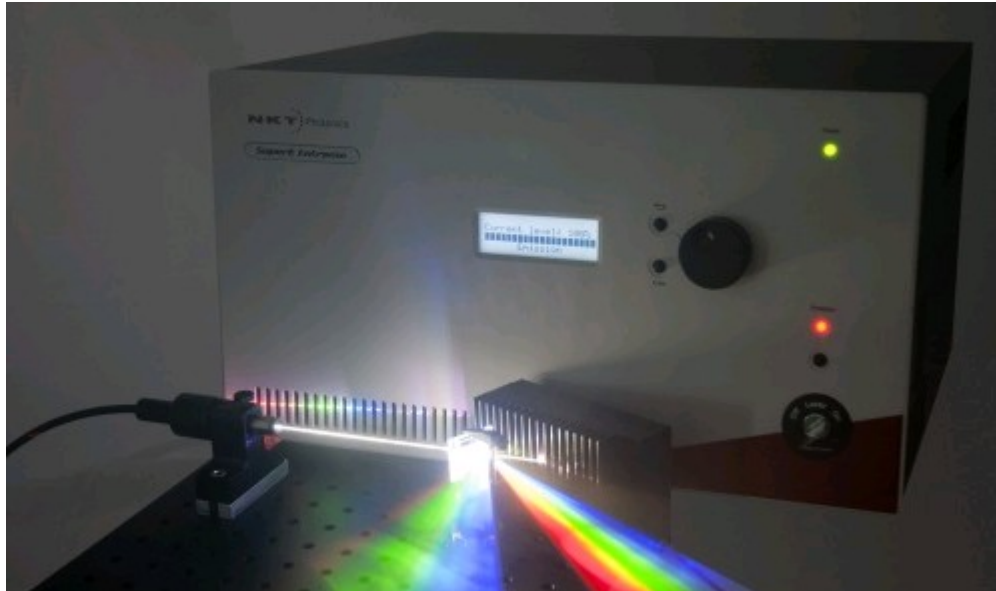


<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/filters/aotf/index.html>

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

# Supercontinuum Generation

-a nonlinear process for strong spectral broadening of light



**TECHNICAL NOTE**

**Cytometry**

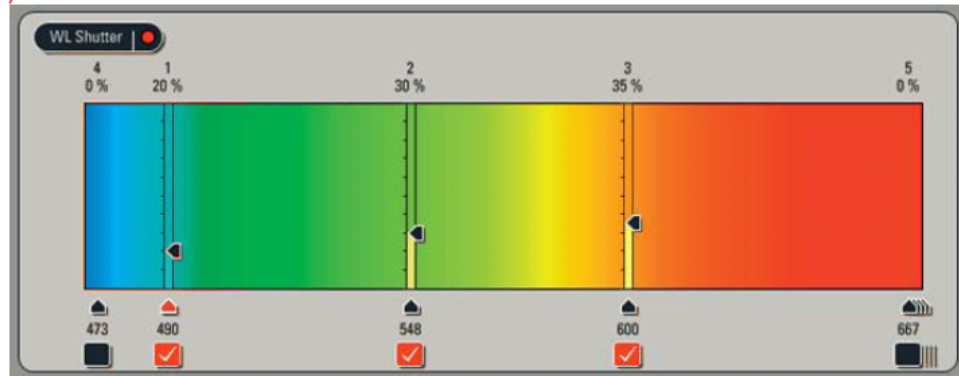
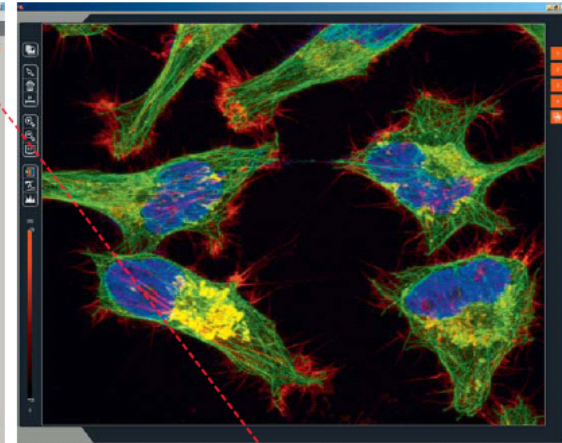
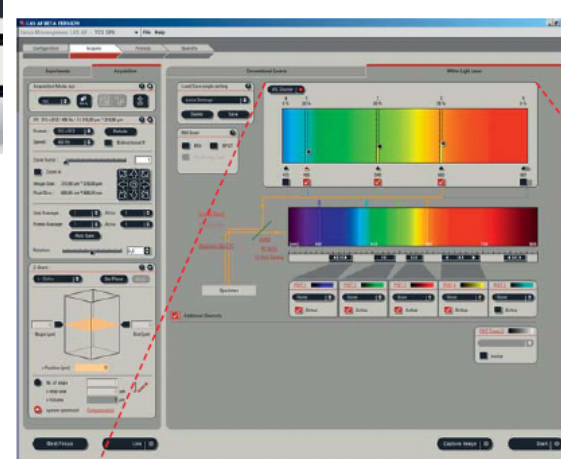
PART A  
Journal of the  
International Society for  
Advancement of Cytometry

## Supercontinuum White Light Lasers for Flow Cytometry

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

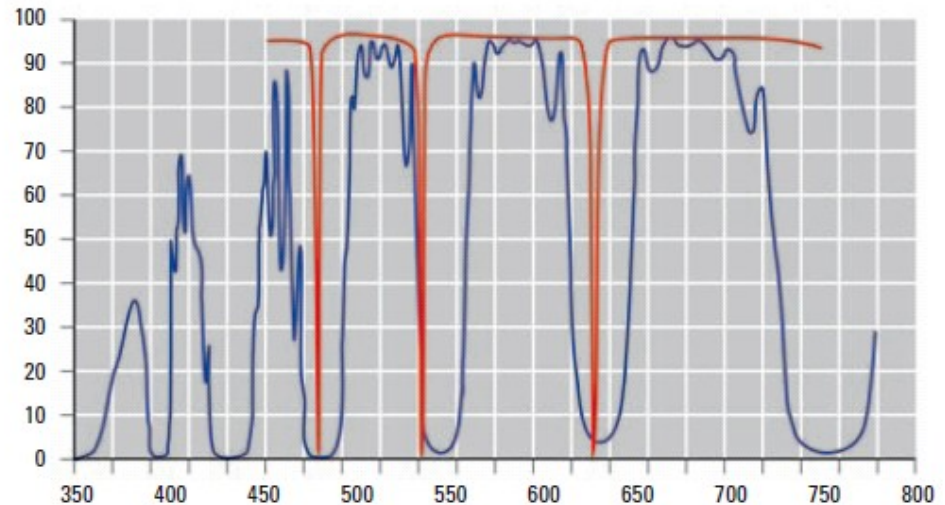
Cytometry Part A • 75A: 450–459, 2009





# 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/>



<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.

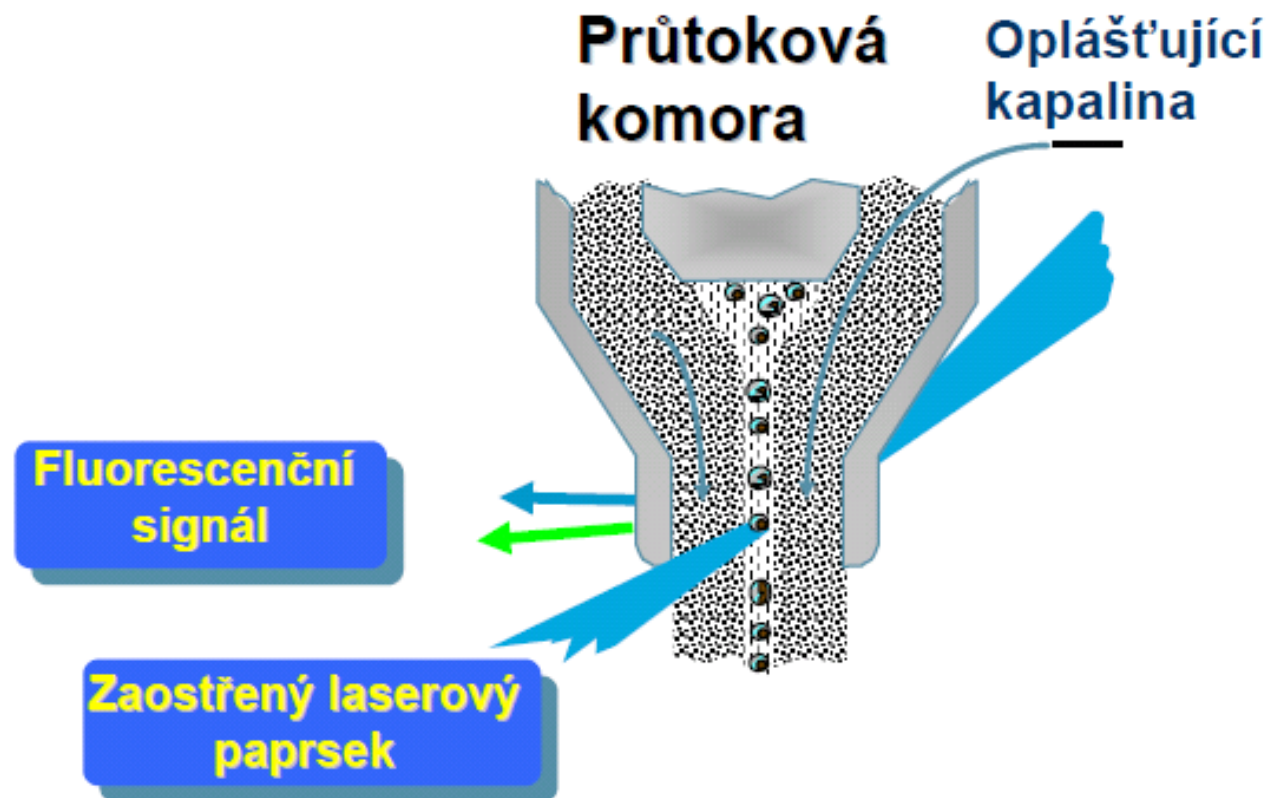


# Průtokové systémy a hydrodynamika

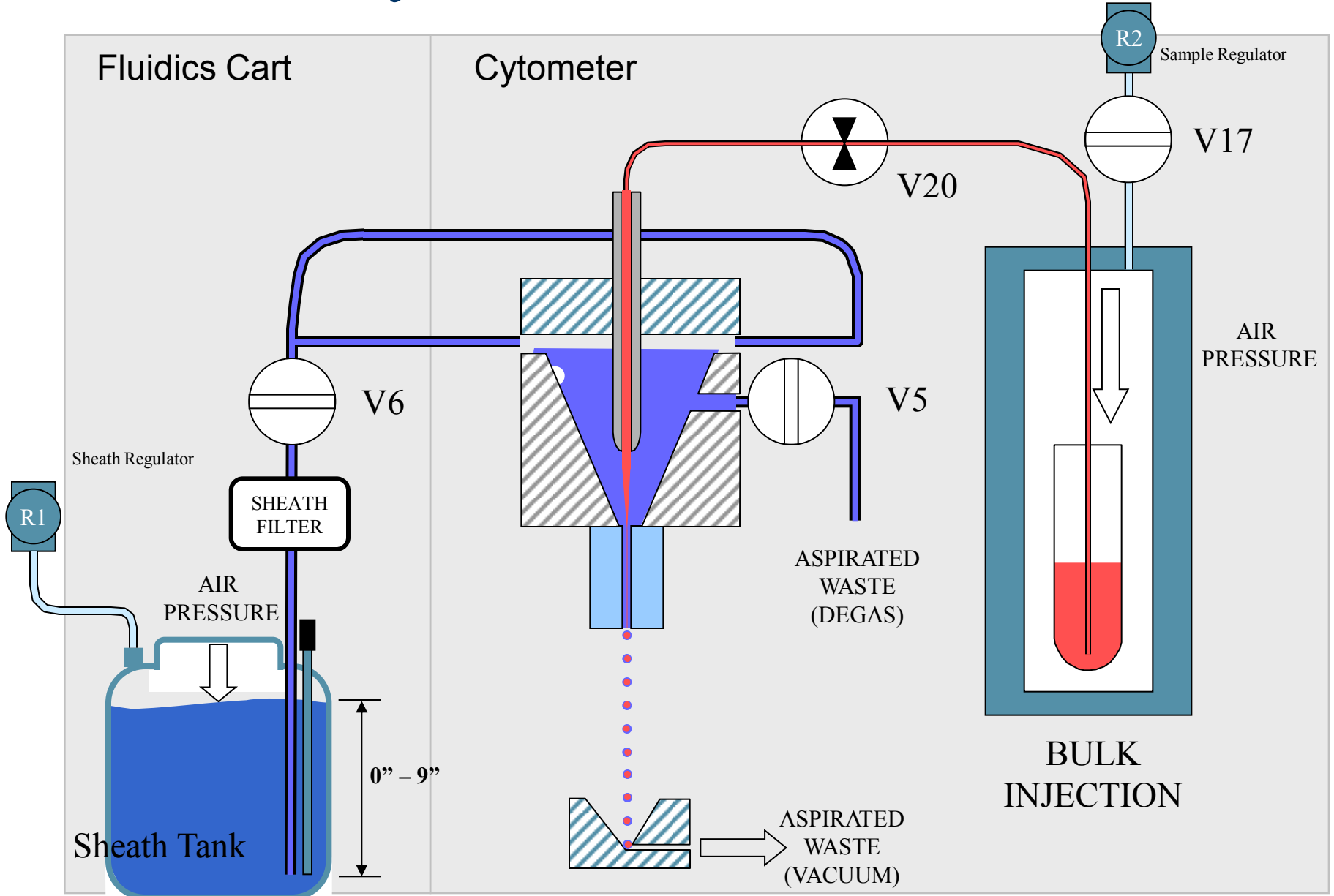
Getting the cells in the right place (at the right time)! (Shapiro, pp 133-143 - 3rd ed)

## Průtoková cytometr:

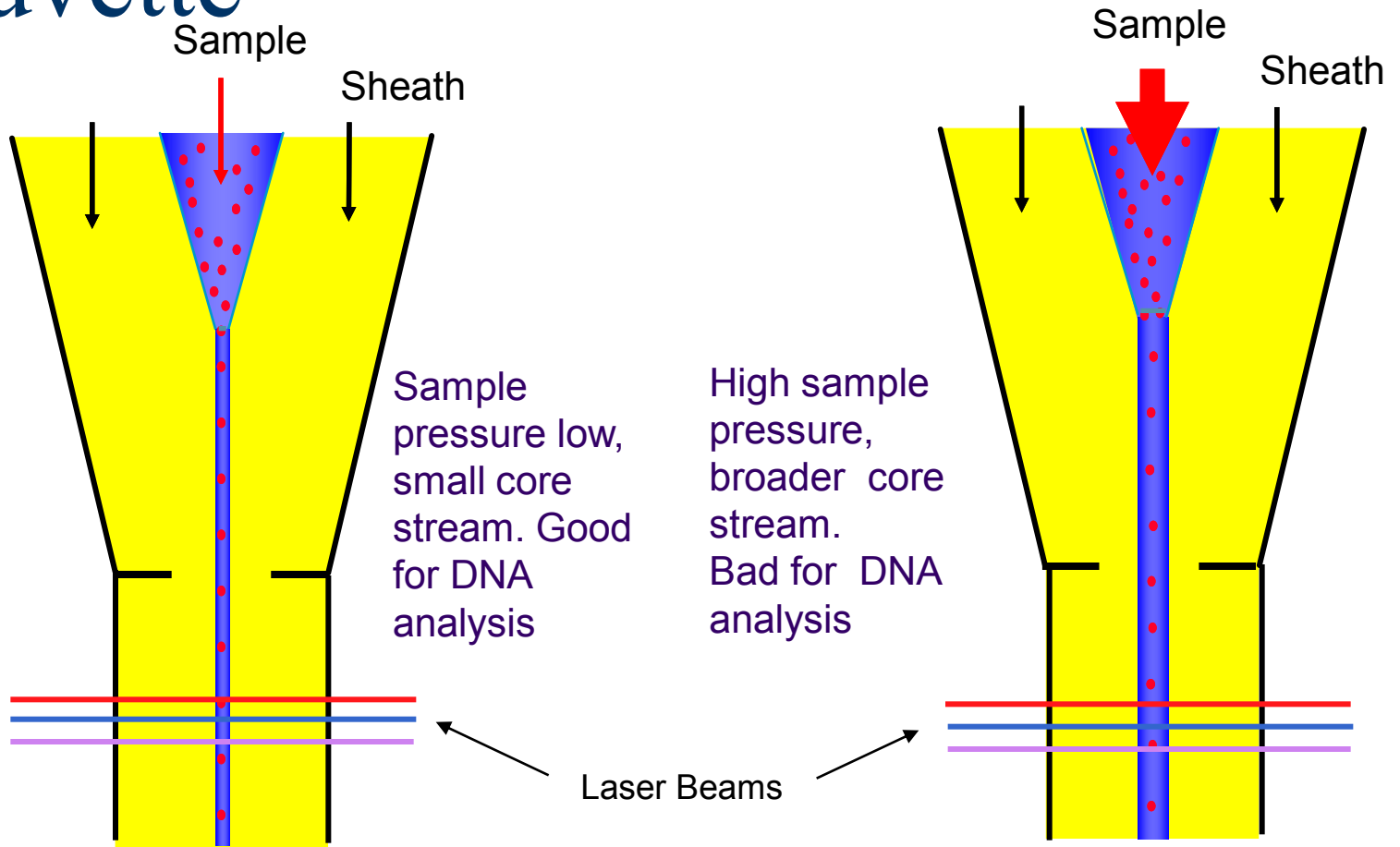
Pomocí hydrodynamicky zaostřeného fluidního systému analyzuje buňky v zaostřeném světelném paprsku (laseru).



# Fluidní systém: BD FACSAria II



# Hydrodynamic focussing in the cuvette

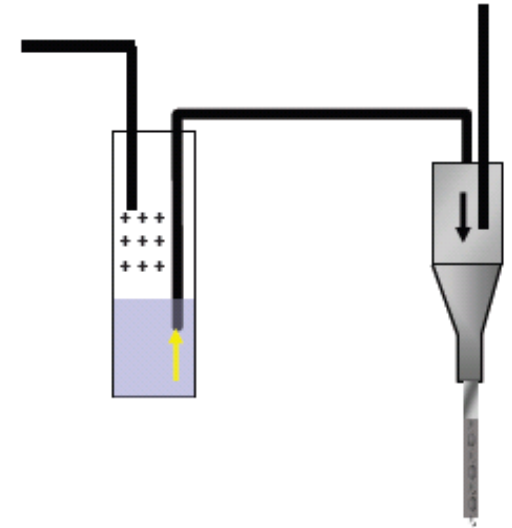




# Fluidní systém

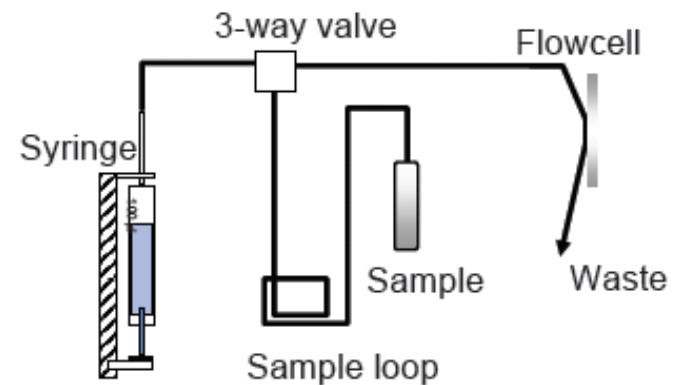
## Pozitivní tlakový systém

- 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  $\mu$ 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**

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

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

- když  $Re < 2300$ , 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

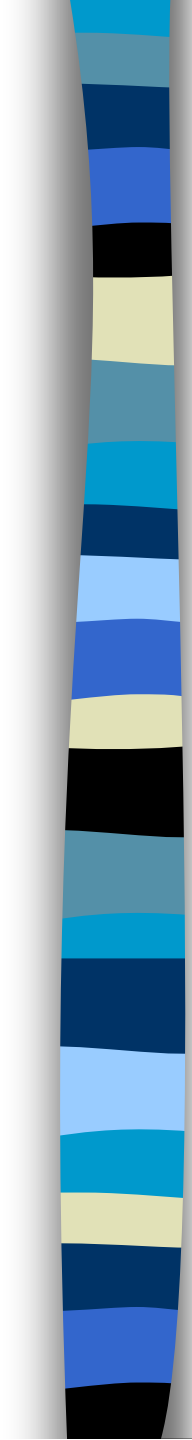
The technique of hydrodynamic focusing, used to improve the resolution of the Coulter counter for the sizing of bacteria, was examined. Latex particles of  $0.26 \mu\text{m}^3$  to  $6.7 \mu\text{m}^3$  volume were used to examine the characteristics of the system with and without hydrodynamic focusing.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





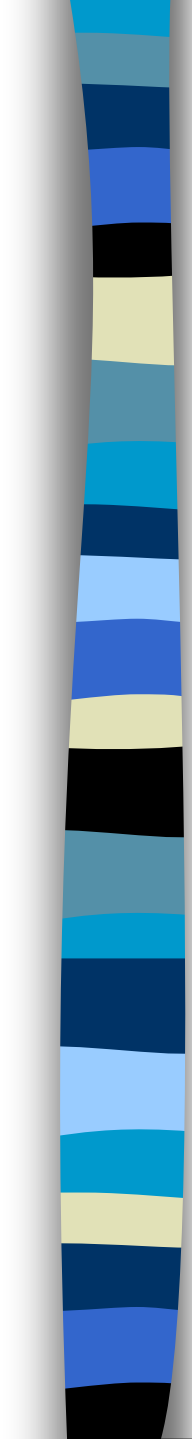
# Fluidika

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



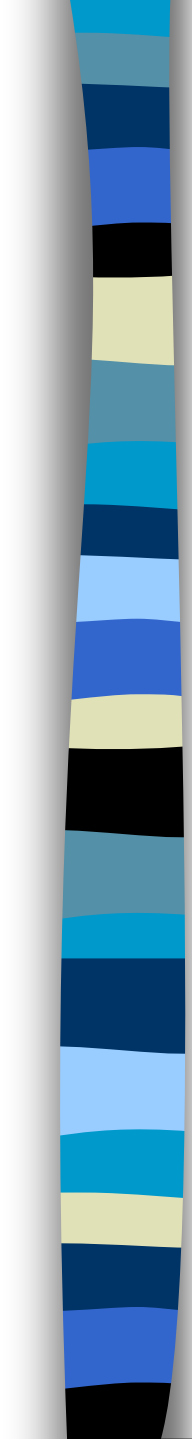
## Fluidika – systém s rozdílným tlakem

- 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

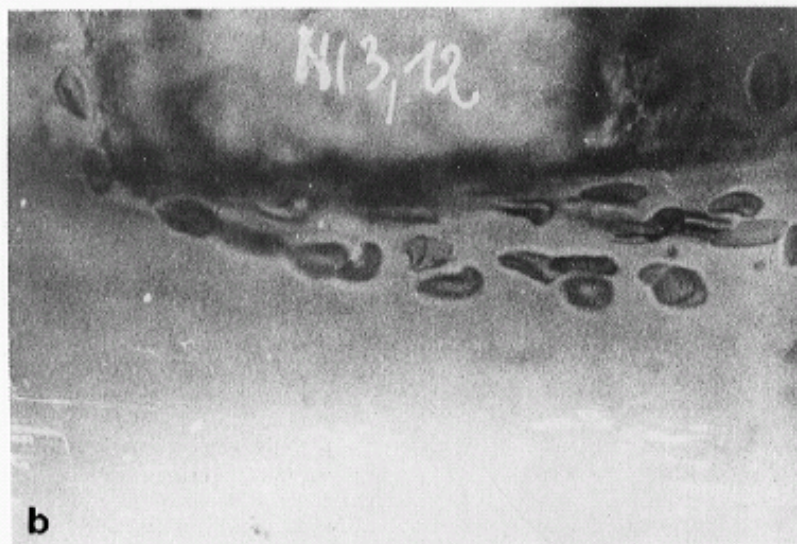
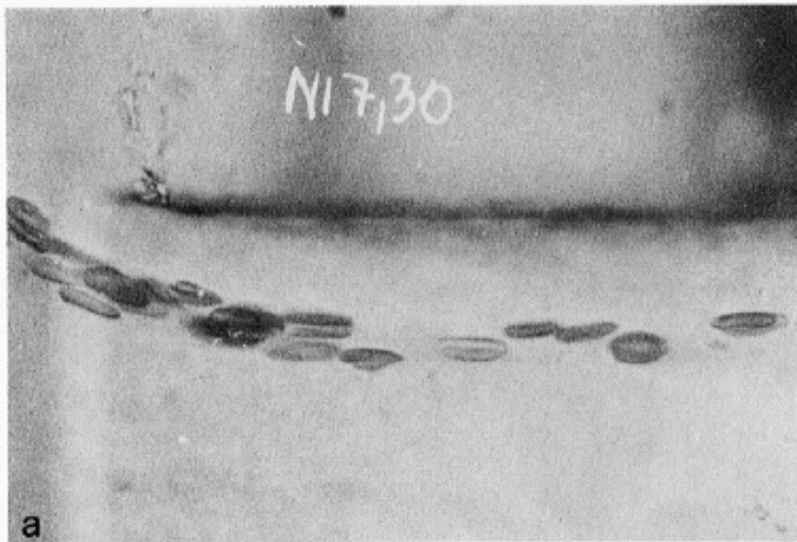
- Pomocí vzduchu tlakuje nosnou kapalinu
- Pomocí pístu injikuje vzorek
- **Objem proudícího vzorku** může být regulován rychlostí pohybu pístu
- Kontrola je úplná (za normálních podmínek)



# 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.”

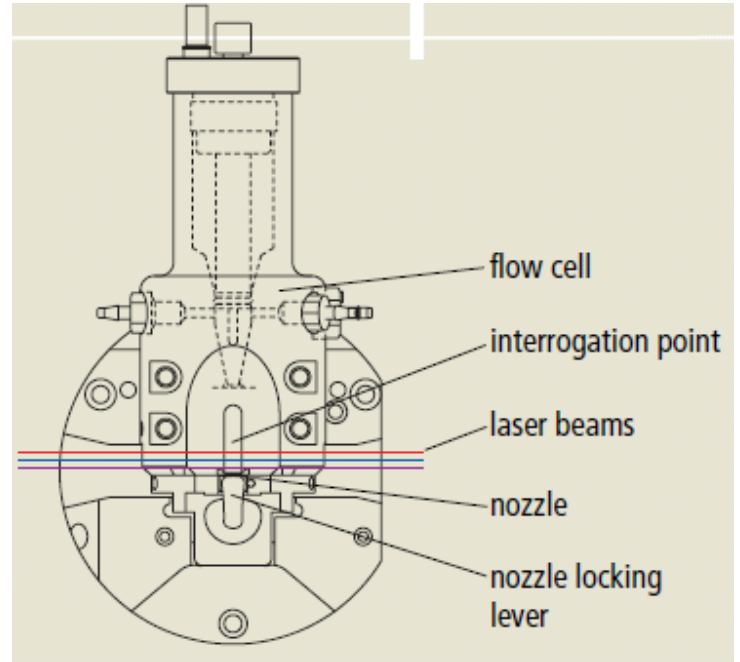
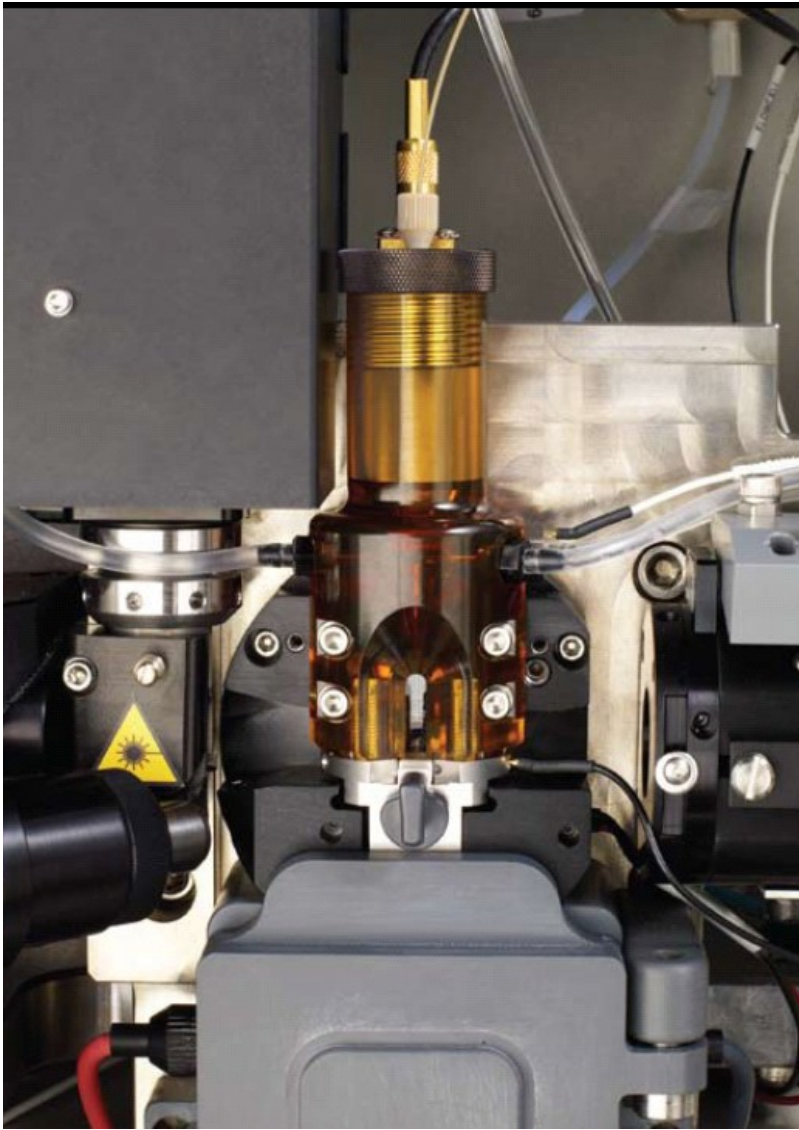
Image from V. Kachel, et al. – **Melamed** Chapt. 3



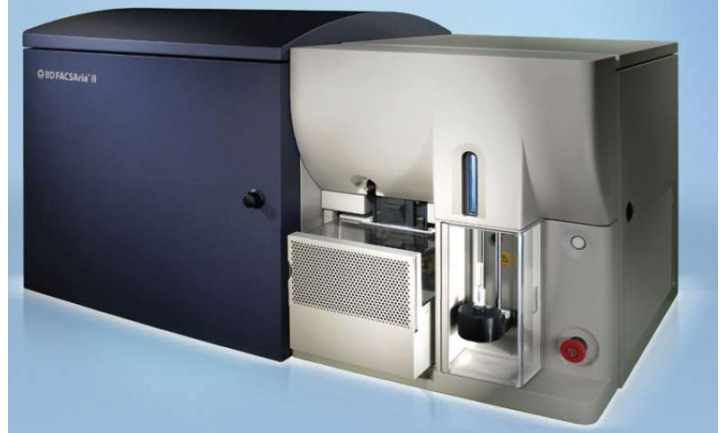
# Fluidika – průtokové komory

## ■ 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**

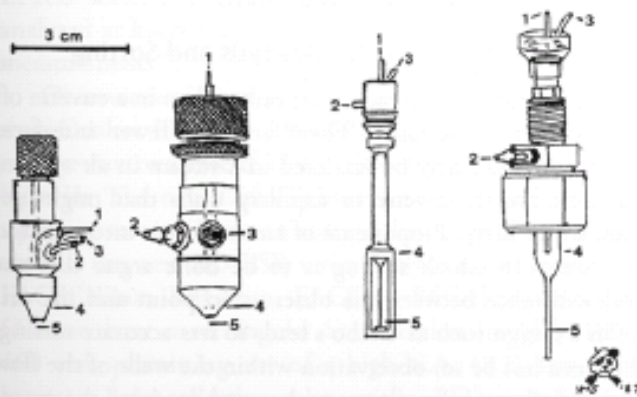
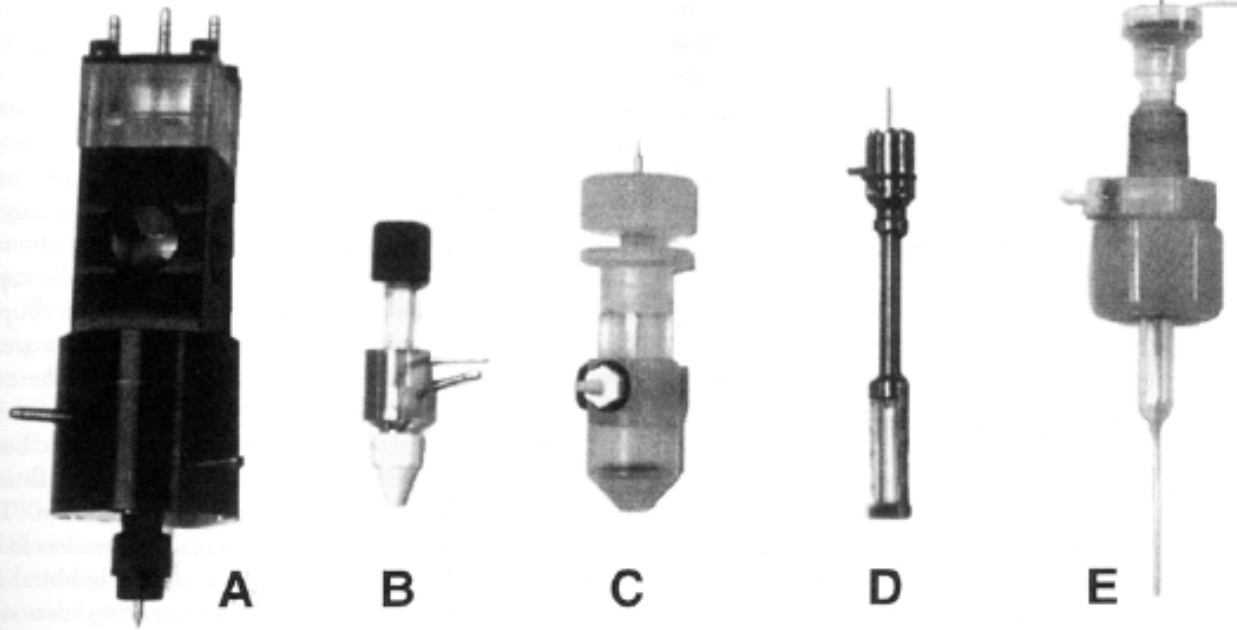
- Výborné optické vlastnosti, může být použita pro sortování

### – **Closed cross flow**

- Nejlepší optické charakteristiky, nelze sortovat

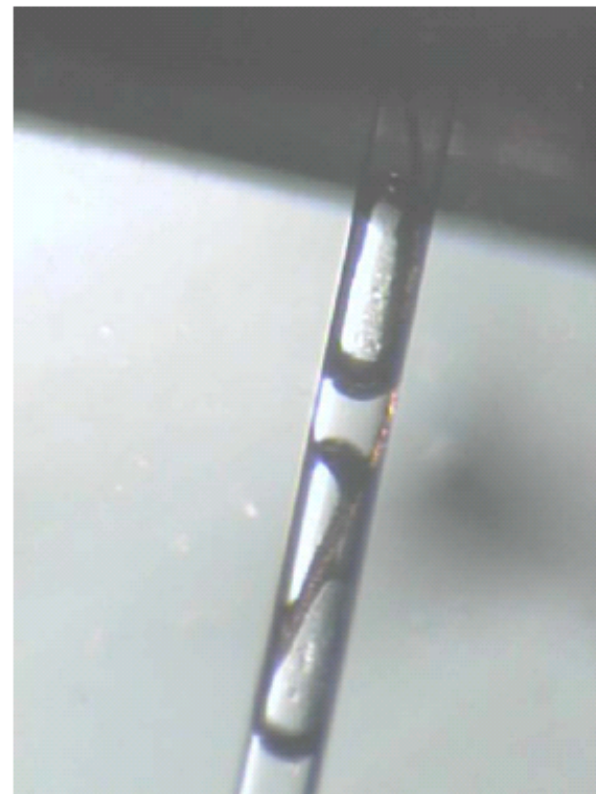
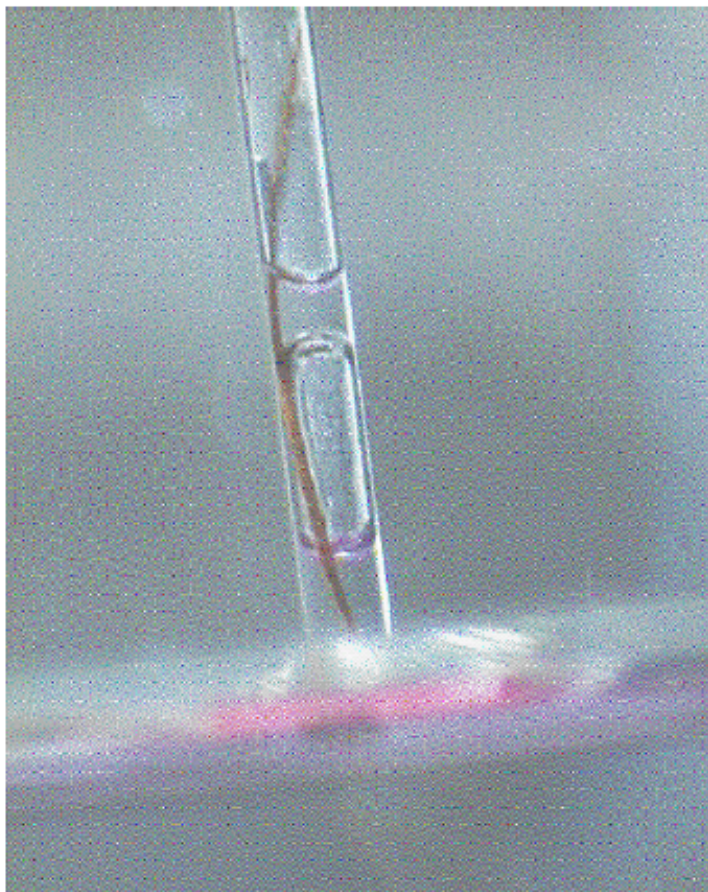
### – **Open flow across surface**

- Nejlepší optické charakteristiky, nelze sortovat



Cuvette flow cell and nozzle

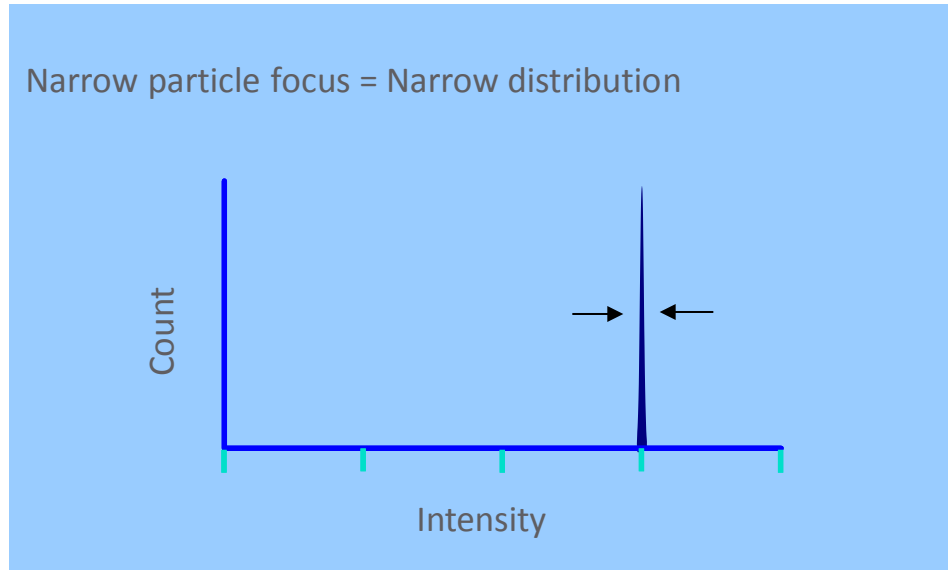
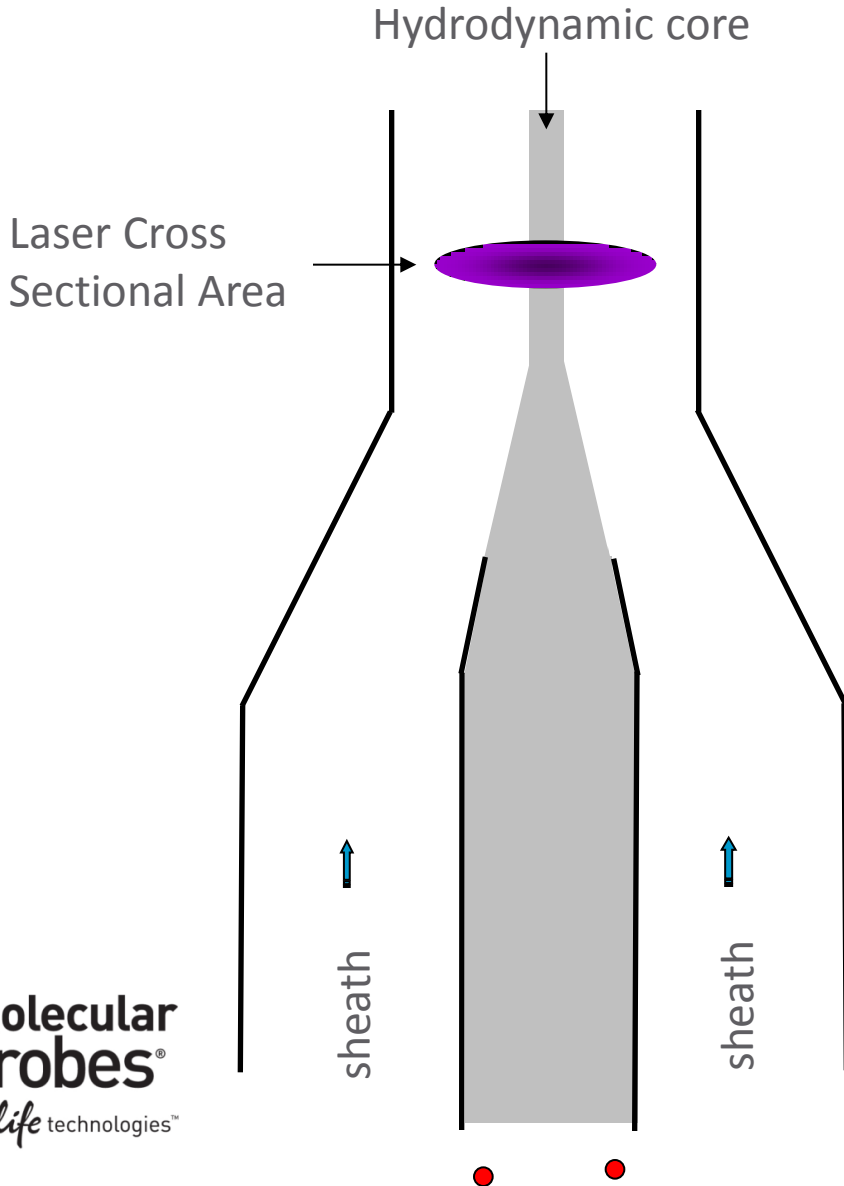
# Zanesení průtokové komory



Lidský vlas zablokuje komoru a kompletně naruší kvalitu proudění.

# Particle Delivery: Hydrodynamic Focusing

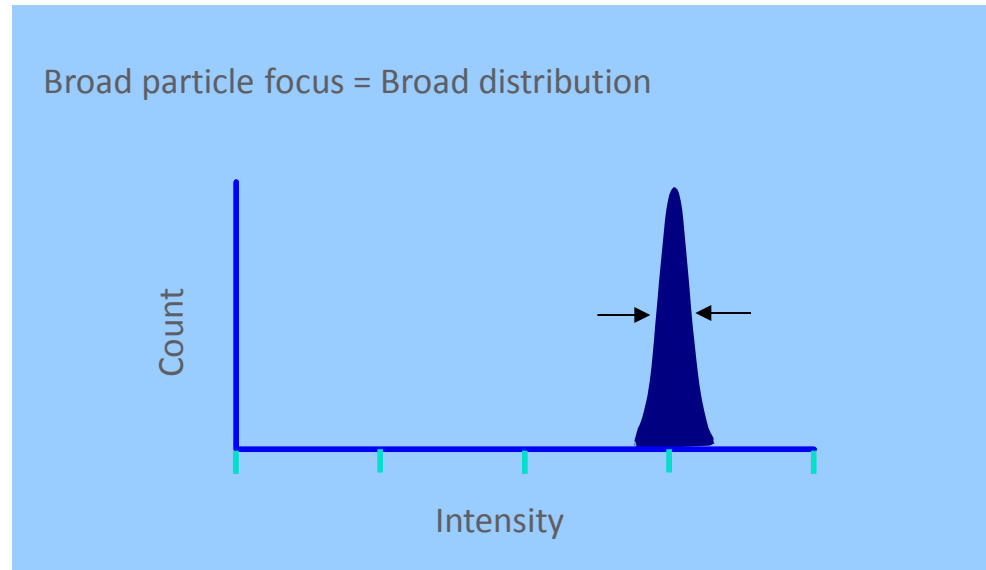
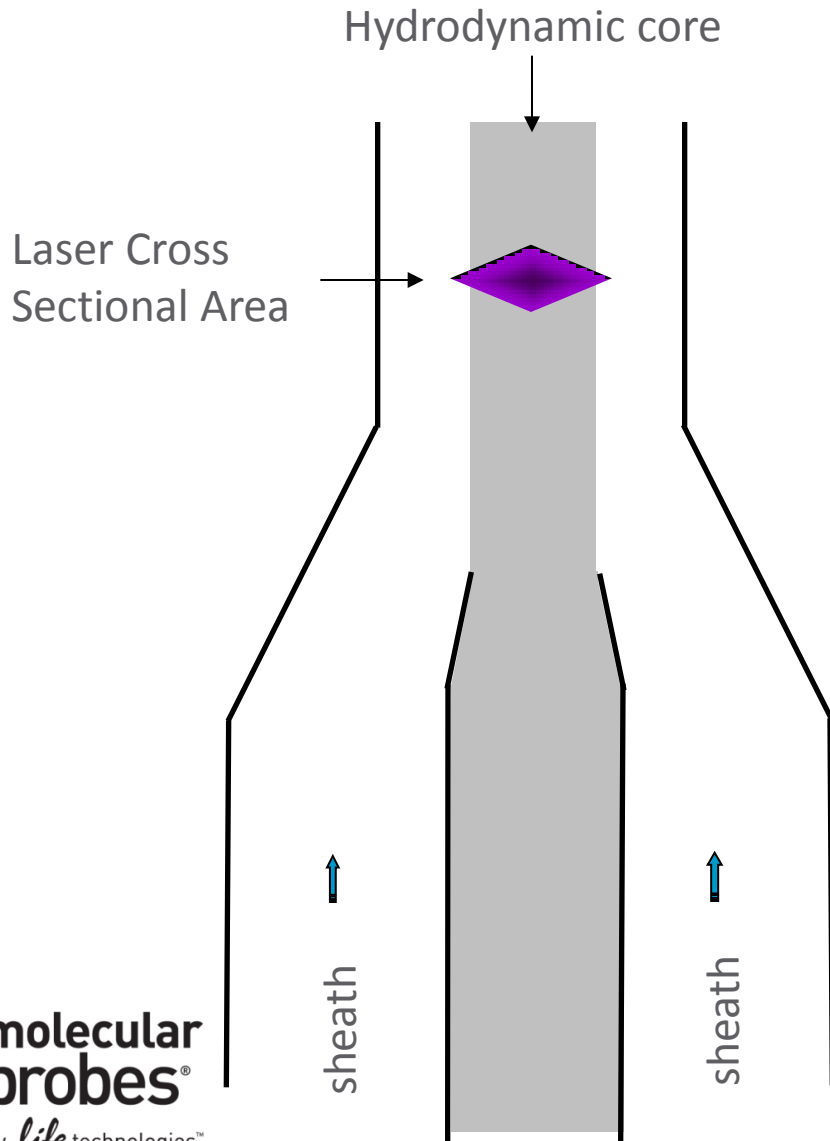
Conventional Instrumentation: **Low Flow Rates (12 $\mu$ L/min)**



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

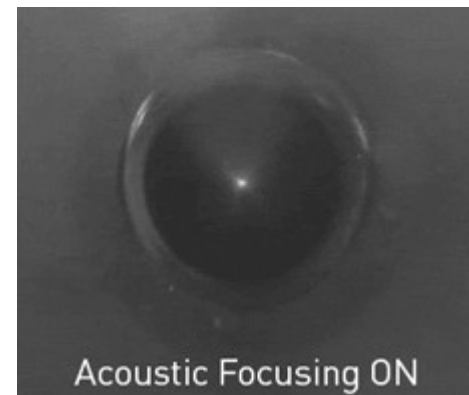
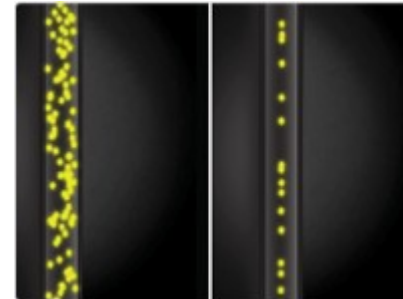
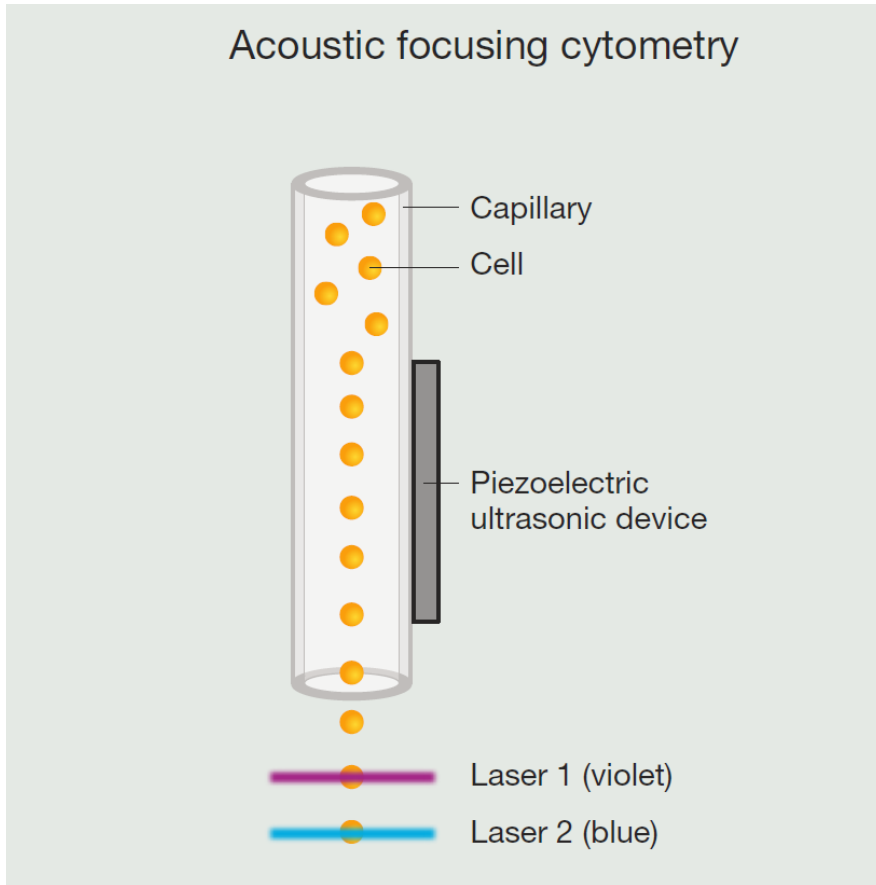
# Particle Delivery: Hydrodynamic Focusing

Conventional Instrumentation: **High Flow Rate (60 $\mu$ L/min)**

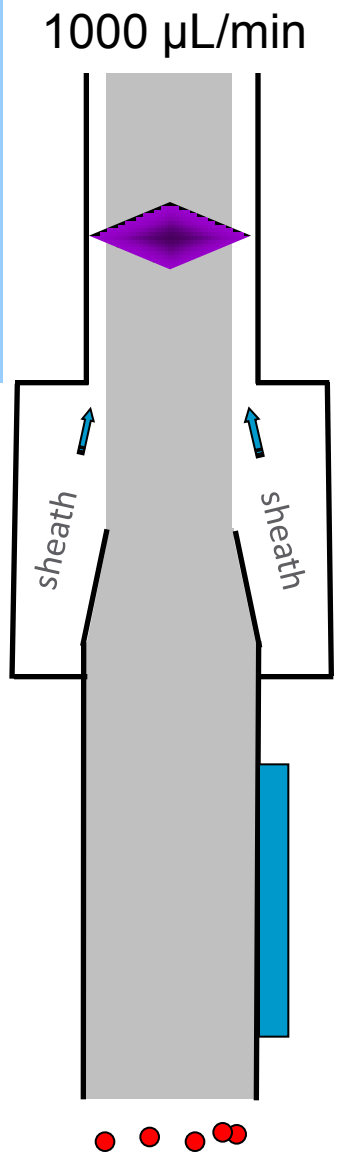
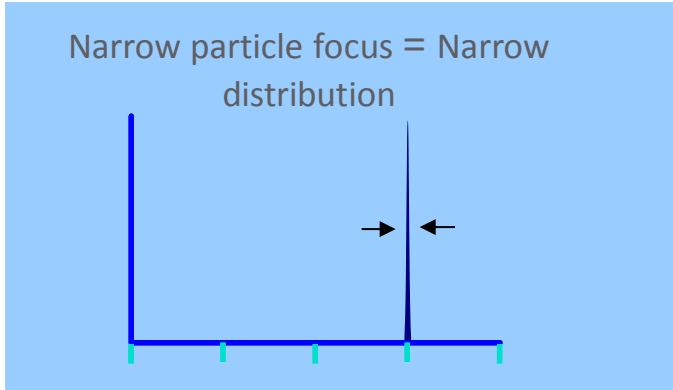
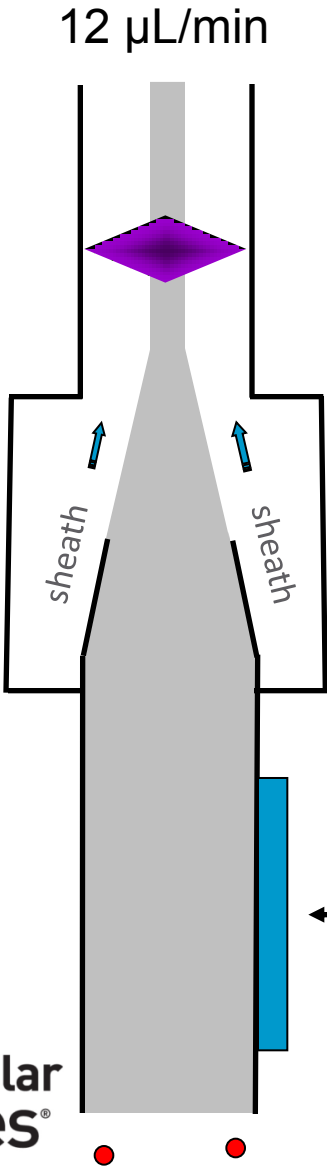


- Increased sample input = increase core size
- Particle distributions broadened, CVs increase
- Instrument resolution decreased
- Historically, low volumetric sample rates used (25  $\mu$ L/min – 150  $\mu$ L/min)

# Attune® Acoustic Focusing Cytometer

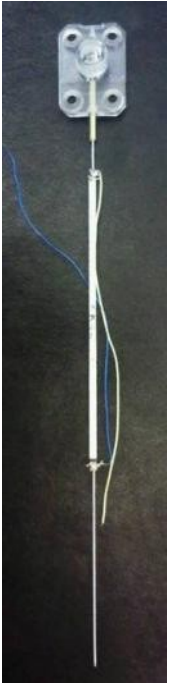


# Acoustic Focusing = Better Precision

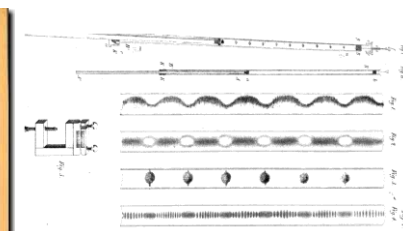


Acoustic focusing of particles occurs prior to mixing with sheath fluid

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, Umemura 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.



## Using acoustic radiation force as a concentration method for erythrocytes

Kenji Yasuda,<sup>a)</sup> Stephan Shuichi Haupt, and Shin-ichiro Umemura  
*Advanced Research Laboratory, Hitachi, Ltd., 2520 Akanuma, Hatoyama, Saitama 350-03, Japan*

Toshiki Yagi  
*Zoological Institute, Faculty of Science, University of Tokyo, Hongo, Tokyo 113, Japan*

Masaharu Nishida and Yasuhisa Shibata  
*Instrument Division, Hitachi, Ltd., 882 Ichige, Hitachinaka, Ibaraki 312, Japan*

(Received 20 May 1996; accepted for publication 7 March 1997)

We investigated the potential damage inflicted on erythrocytes by acoustic radiation force when the cells are concentrated by a 500-kHz ultrasonic standing wave at the pressure node. The extent of the damage was estimated from the concentrations of potassium ions, iron complexes, and lactate dehydrogenase released from the cells. After 2 min of ultrasound irradiation at  $12.8 \text{ mJ/m}^3$ , the cells concentrated on the pressure node, with a cell distribution half-width of  $138 \mu\text{m}$ ; no significant release of intracellular components was detected, even after 15 min of irradiation. The results indicate that even small ions like potassium are not released as a result of ultrasound irradiation on cell membranes without cavitation, and they demonstrate the potential use of acoustic radiation force for concentrating living cells in biomedical applications. © 1997 Acoustical Society of America. [S0001-4966(97)01407-0]

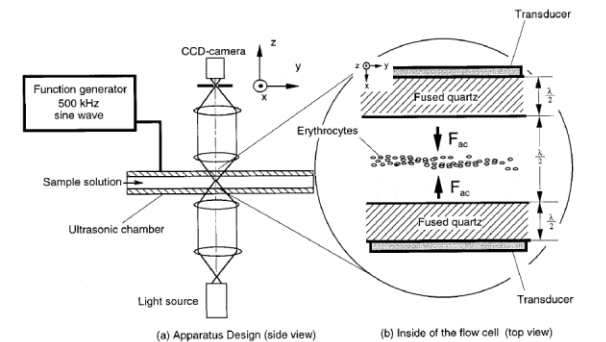
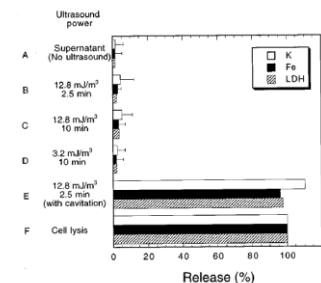
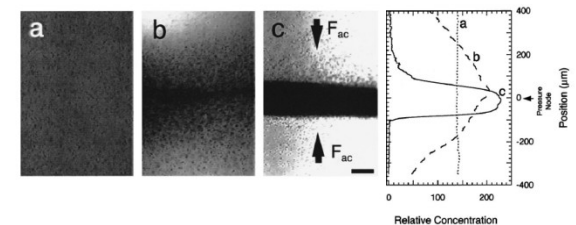


FIG. 1. Schematic diagram of the apparatus for concentration of erythrocytes.







US007340957B2

(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**

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

(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**

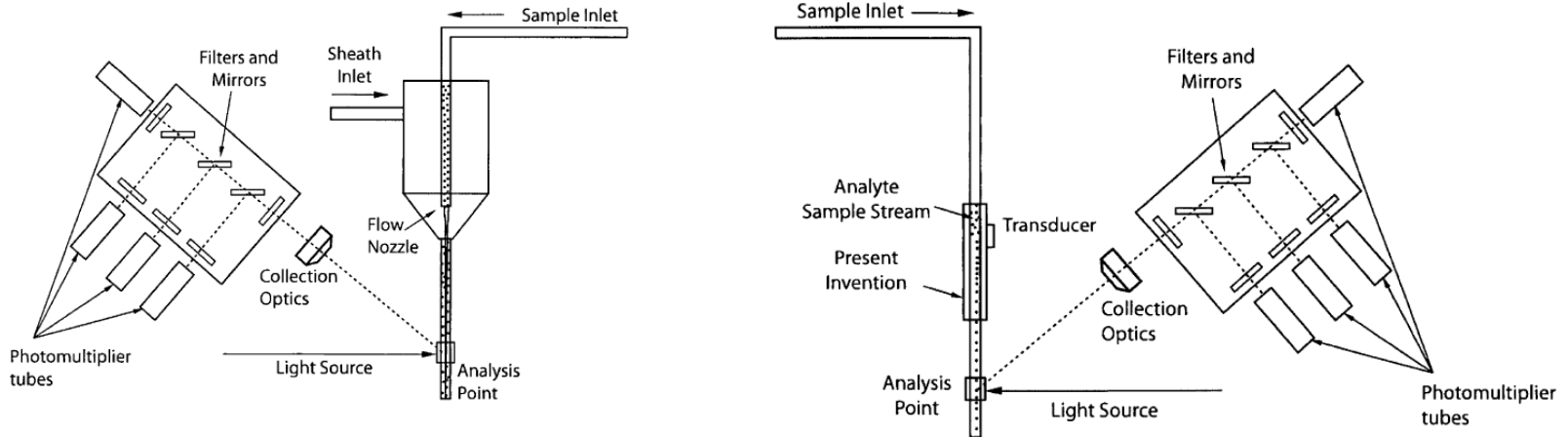
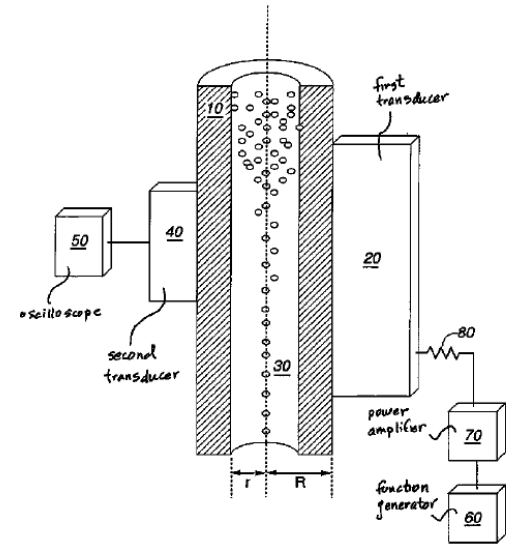
FOREIGN PATENT DOCUMENTS

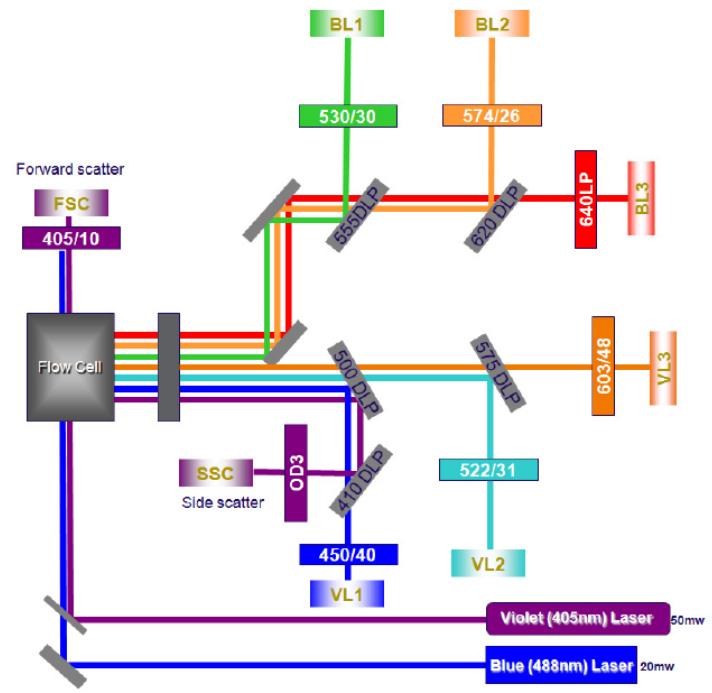
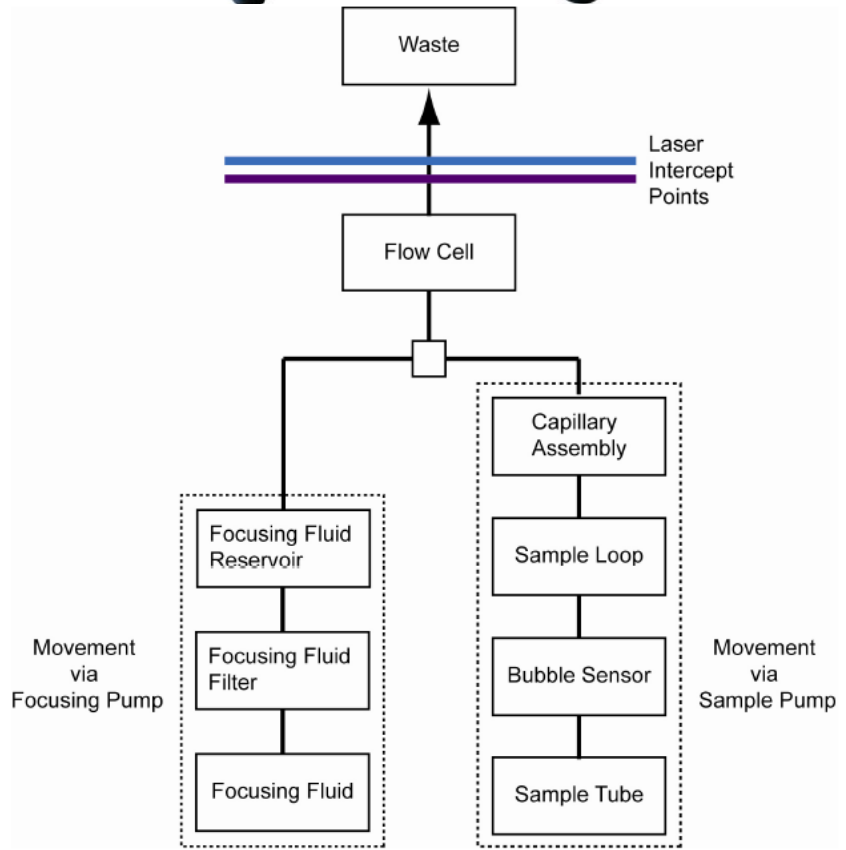
JP	63139231 A *	6/1988
JP	06241977 A *	9/1994
JP	08266891 A *	10/1996

OTHER PUBLICATIONS

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

(Continued)





# Attune NxT (2nd generation)

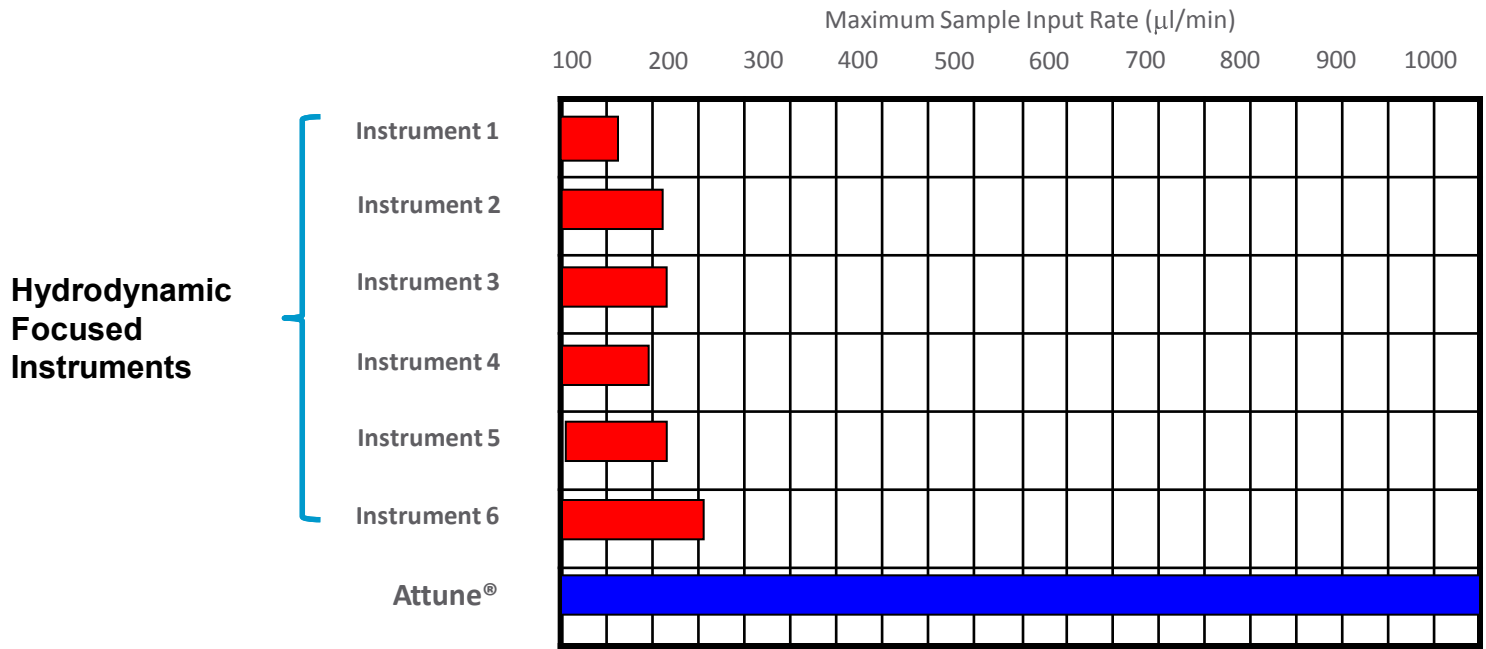
**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC



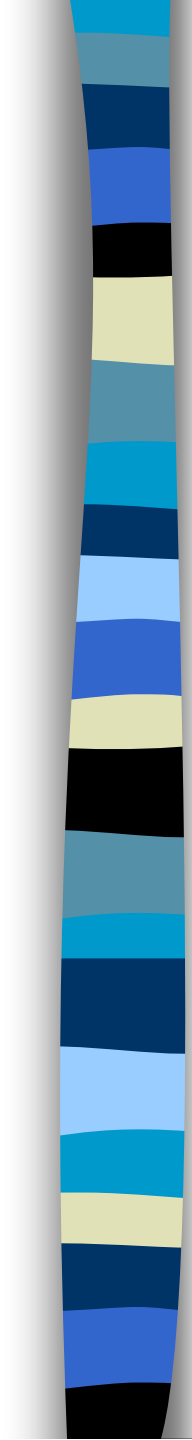
Lasers	Laser configuration (Cat. No.)	Violet 405 nm	Blue 488 nm	Yellow 561 nm	Green 532 nm	Red 637 nm	Total detection channels*
1	Blue (A24864)	Available as upgrade	4	Available as upgrade	Available as upgrade	Available as upgrade	6
2	Blue/green (A28995)	Available as upgrade	3	–	4	Available as upgrade	9
	Blue/yellow (A24861)	Available as upgrade	3	4	–	Available as upgrade	9
	Blue/violet (A24862)	4	4	Available as upgrade	Available as upgrade	Available as upgrade	10
	Blue/red (A24863)	Available as upgrade	4	Available as upgrade	Available as upgrade	3	9
3	Blue/green/red (A28997)	Available as upgrade	3	–	4	3	12
	Blue/green/violet (A28999)	4	3	–	4	Available as upgrade	13
	Blue/red/yellow (A28993)	Available as upgrade	3	4	–	3	12
	Blue/violet/yellow (A24859)	4	3	4	–	Available as upgrade	13
	Blue/red/violet (A24860)	4	4	Available as upgrade	Available as upgrade	3	13
4	Blue/red/violet/green (A29001)	4	3	–	4	3	16
	Blue/red/yellow/violet (A24858)	4	3	4	–	3	16

\* Includes forward scatter (FSC) and side scatter (SSC).

# Attune® Throughput Compared to Hydrodynamic Focused Instruments



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



# 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!

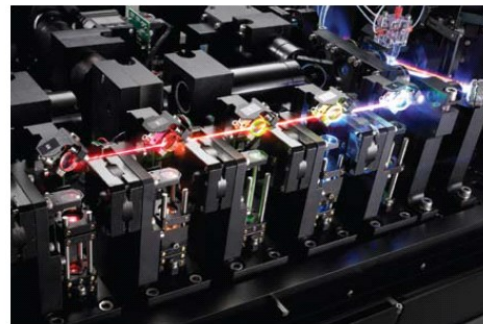
# Shrnutí

- 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.

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



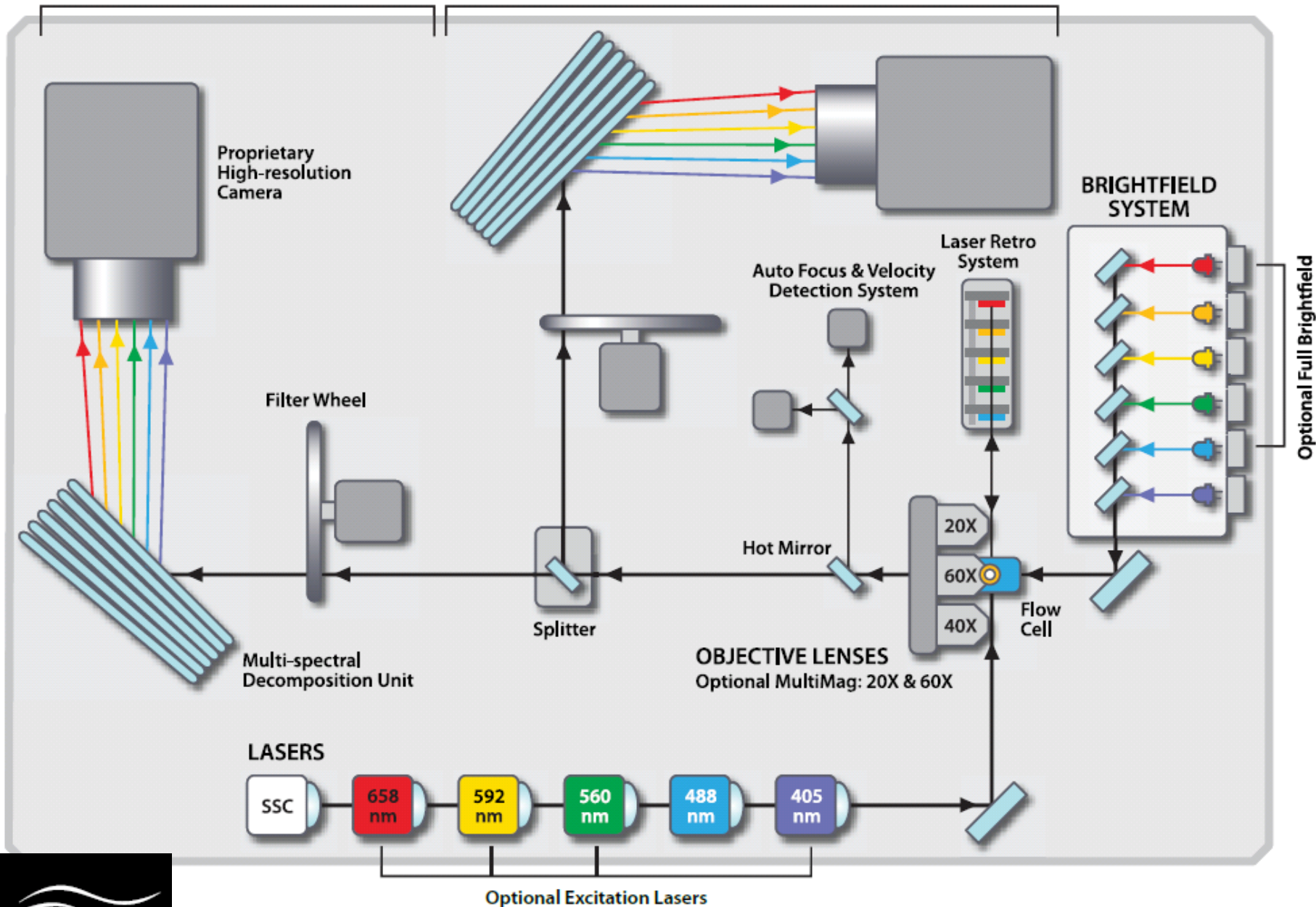


# STANDARD COLLECTION SYSTEM

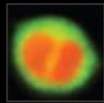
Image Channels: 1-6

# OPTIONAL COLLECTION SYSTEM

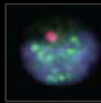
Image Channels: 7-12



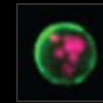
# Amnis - aplikace



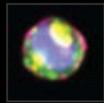
Cell Signaling



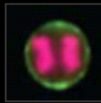
DNA Damage and Repair



Cell Death



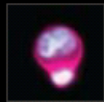
Co-localization



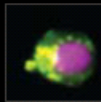
Cell Cycle and Mitosis



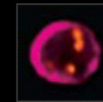
Parasitology



Cell-Cell Interactions



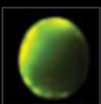
Autophagy



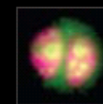
Microbiology



Morphology



Targeted Immunotherapy



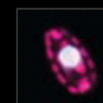
Oncology



Internalization



Stem Cell Differentiation



Oceanography

 amnis