

Bi9393 Analytická cytometrie

Lekce 2

Karel Souček, Ph.D.

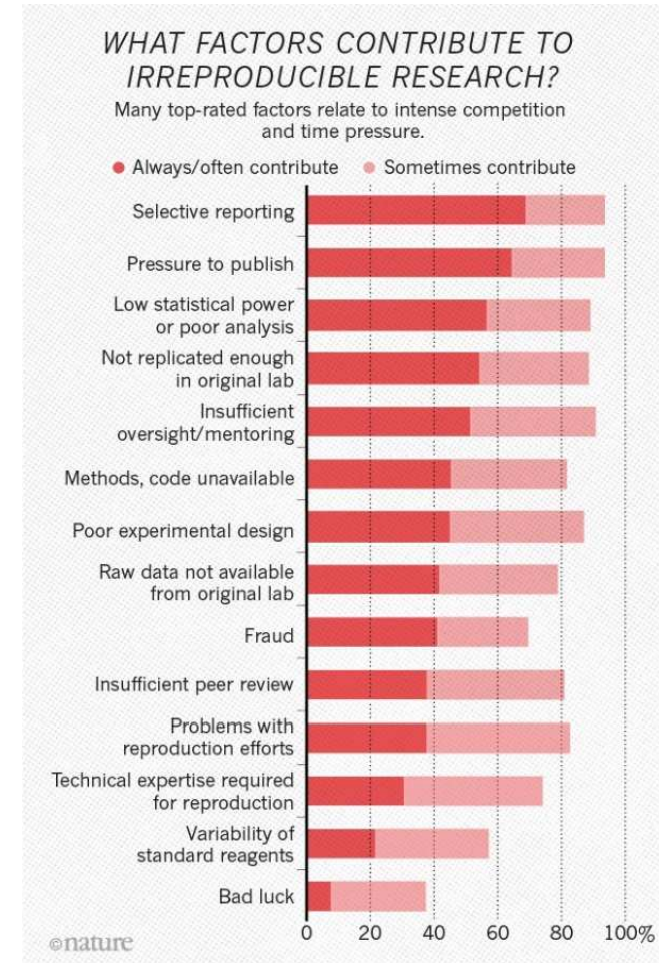
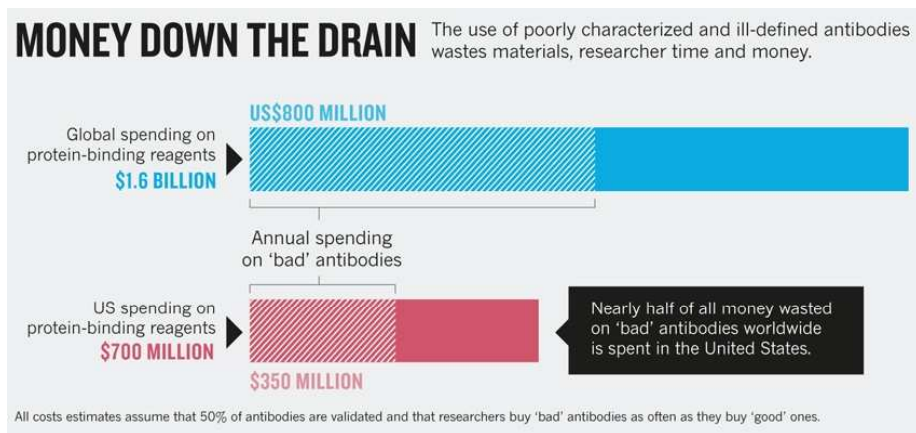
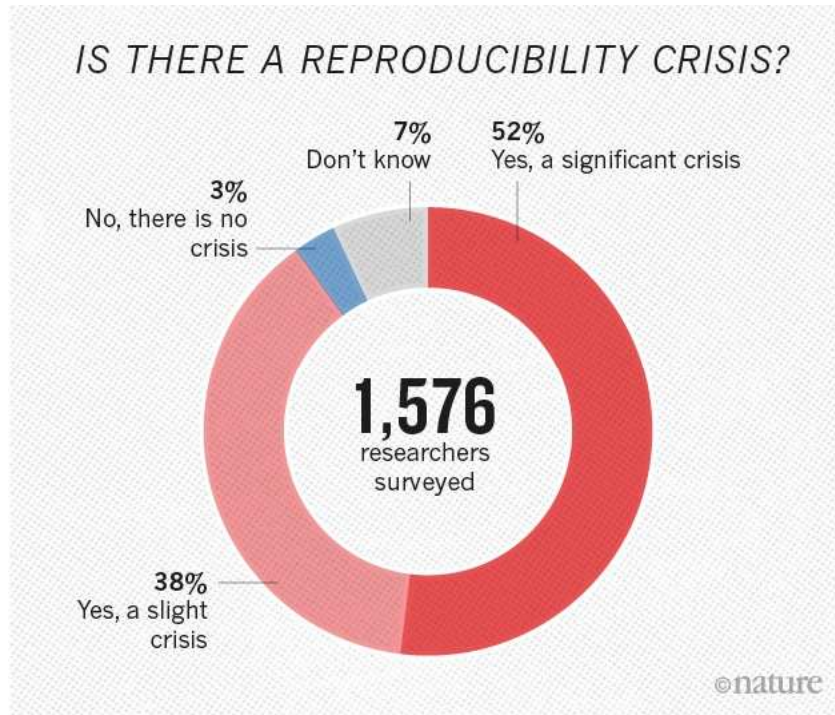
Oddělení cytokinetiky
Biofyzikální ústav AVČR, v.v.i
Královopolská 135
612 65 Brno

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

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](#)¹, [Ioannidis JP](#)².

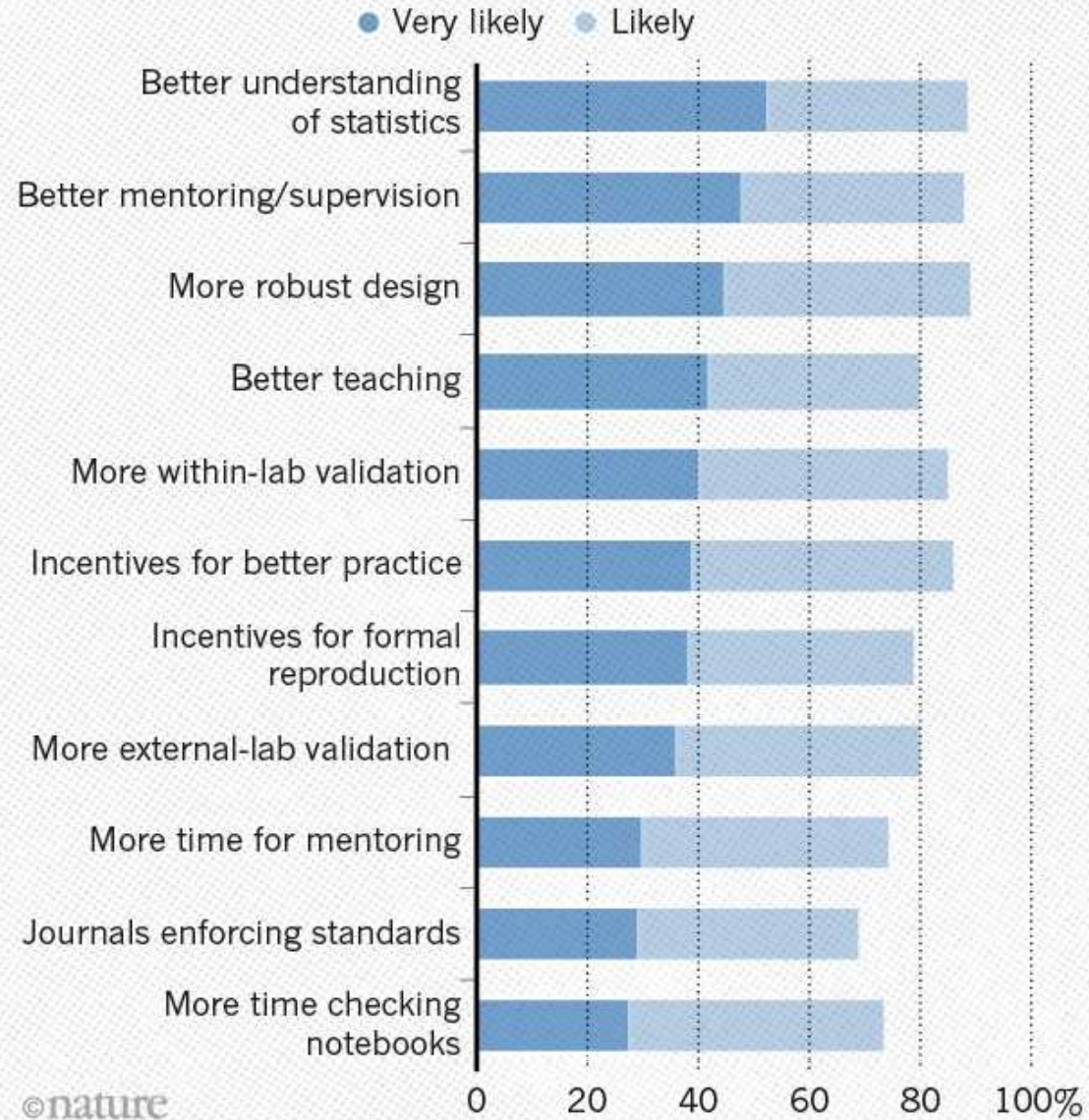
[Nature](#). 2015 Feb 5;518(7537):27-9. doi: 10.1038/518027a.

Reproducibility: Standardize antibodies used in research.

[Bradbury A](#)¹, [Plückthun A](#)².

WHAT FACTORS COULD BOOST REPRODUCIBILITY?

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



WORLD VIEW

A personal take on events

DANIELA ORBEN



A journal club to fix science

ReproducibiliTea can build up open science without top-down initiatives, says Amy Orben.

If science had generations, mine would not be defined by war or Woodstock, but by reproducibility and open science. Early-career researchers such as myself have been trained in an era when scientists are acutely aware of problems in the scientific process. We are taught about replication issues and failures, and are encouraged to question results that have been left unchallenged for decades. Our ability to connect through social media lets us sidestep conventional hierarchies and scrutinize current research practices. Of course, we want to adapt how we do research to improve the scientific landscape that we will be navigating for decades.

But we are often overlooked. I gave a talk at a workshop on open and reproducible science earlier this year; I was a PhD student at the time, and the only invited speaker who was not a tenured faculty member. Another speaker recounted recent changes brought about by lobbying the highest echelons of the scientific community, such as mandates to share data openly. He argued that early-career researchers have little agency to push for such improvements.

I could not disagree more. We need all those who care about better research to stay invested, and this will not happen by telling the next generation of scientists to just sit back and hope. Early-career researchers do not need to wait passively for coveted improvements. We can create communities and push for bottom-up change.

ReproducibiliTea is one way to do this. Sam Parsons, Sophia Crüwell and I (all trainees) started this grass-roots journal club in early 2018, at the experimental psychology department at the University of Oxford, UK. We hoped

backed by real-world examples. Sometimes it works, and sometimes it doesn't. Either way, ReproducibiliTea members tell me how valuable it is to know they are not alone in how they want to see science practised.

ReproducibiliTea works because it is easy and visible. Setting up a journal club does not require jumping over administrative hurdles, and it does not need senior support or funding (although we did very much appreciate a small grant to cover popcorn, strawberries and the like). The group at Oxford consists of about a dozen psychology researchers, but people show up from a range of departments, such as zoology and anthropology, and even other institutions. Beyond attendees, ReproducibiliTea puts open science on the radar of other academics and senior staff. We have posters, e-mails and a weekly slot in our departmental newsletter.

To launch their own ReproducibiliTea group, motivated researchers need only to select some articles and set a time and a place. No minimum group size or meeting frequency is required. They will then join a community of ReproducibiliTea journal clubs that continually discuss improvements and support each other. (For more information, see <https://reproducibilitea.org/>.)

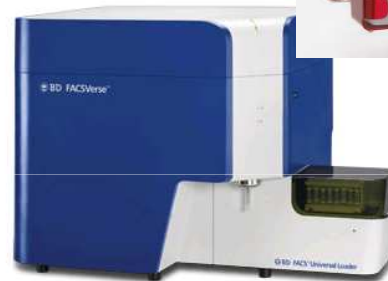
Some of my favourite sessions had representatives from all career stages present — from undergraduate students critical of what they were being taught to very senior professors. Those meetings had a unique feeling of camaraderie, even during intensely personal discussions, including how much blame for subpar

practices should fall on individuals versus a broken system.

Similar to other initiatives, such as the Open Science Community

OPEN SCIENCE IS A
PROCESS,
NOT A ONE-TIME
ACHIEVEMENT OR
A CLAIM TO
VIRTUE.

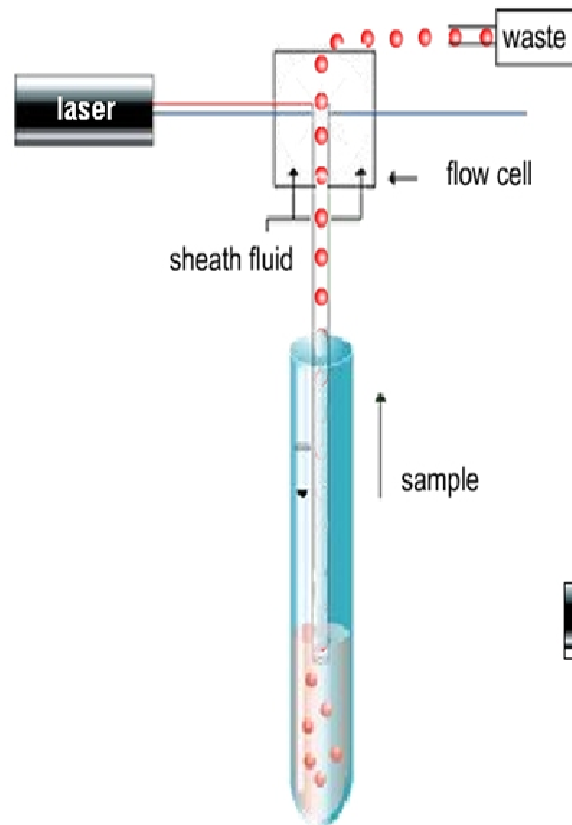
Dostupná technologie



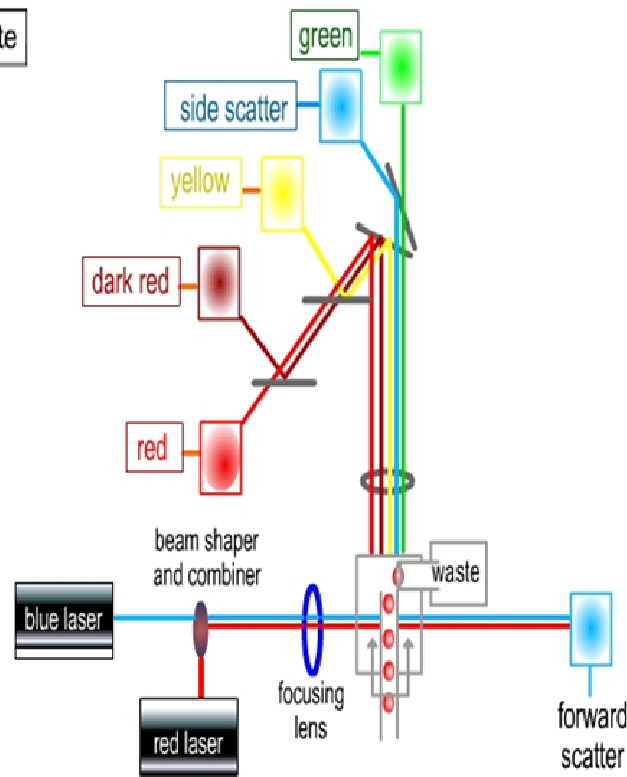
COMING SOON



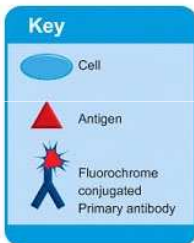
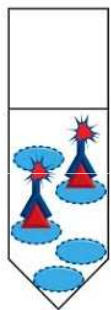
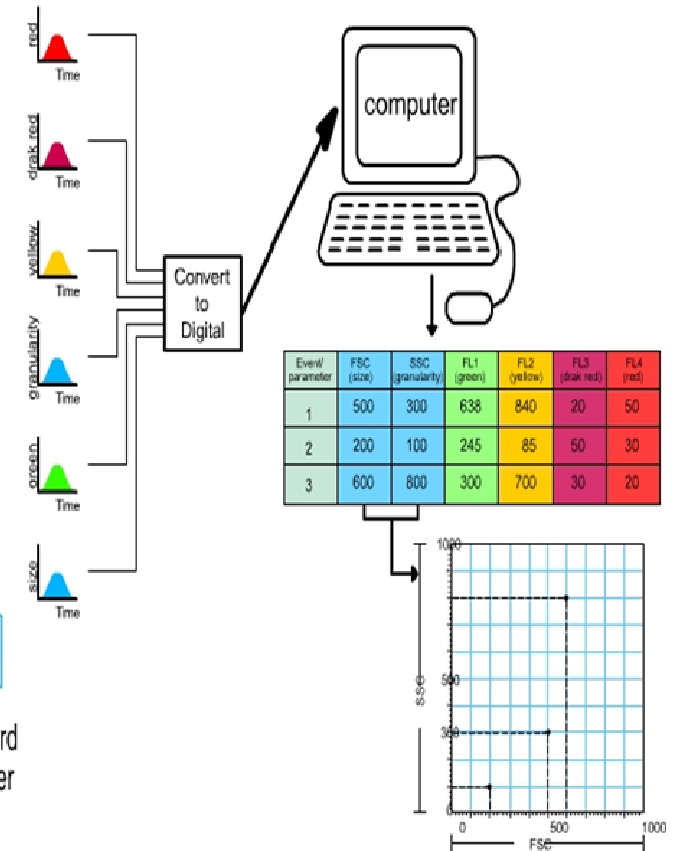
fluidics



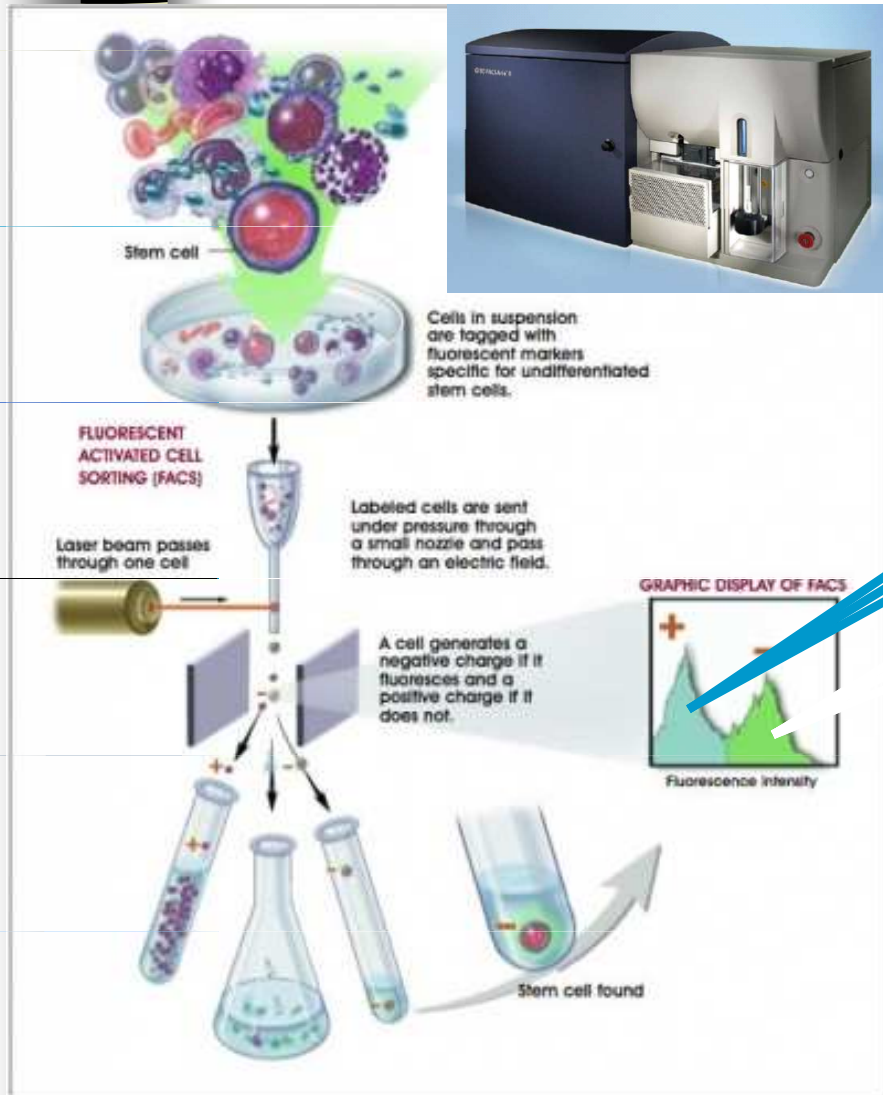
optics



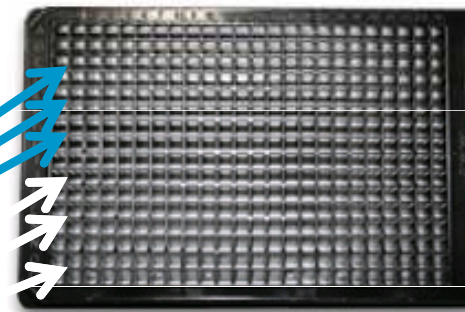
electronics



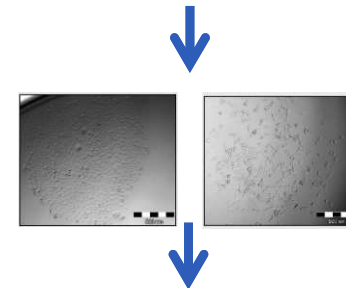
new automatic cell cloning assay (ACCA) for determination of clonogenic capacity of CSCs



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 (3×10^8 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

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


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

- 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?

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

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

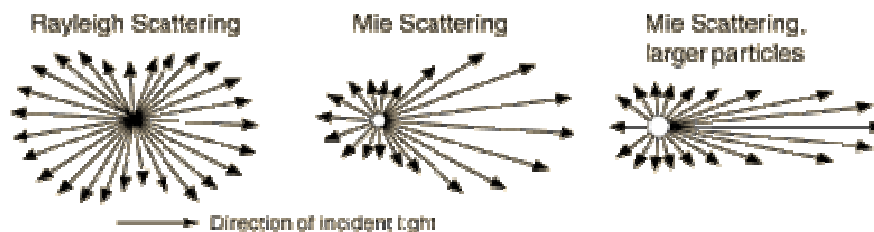
What about a He-Ne laser?

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

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

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*



Rayleightův a Mieův rozptyl

- **Rayleightův 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>

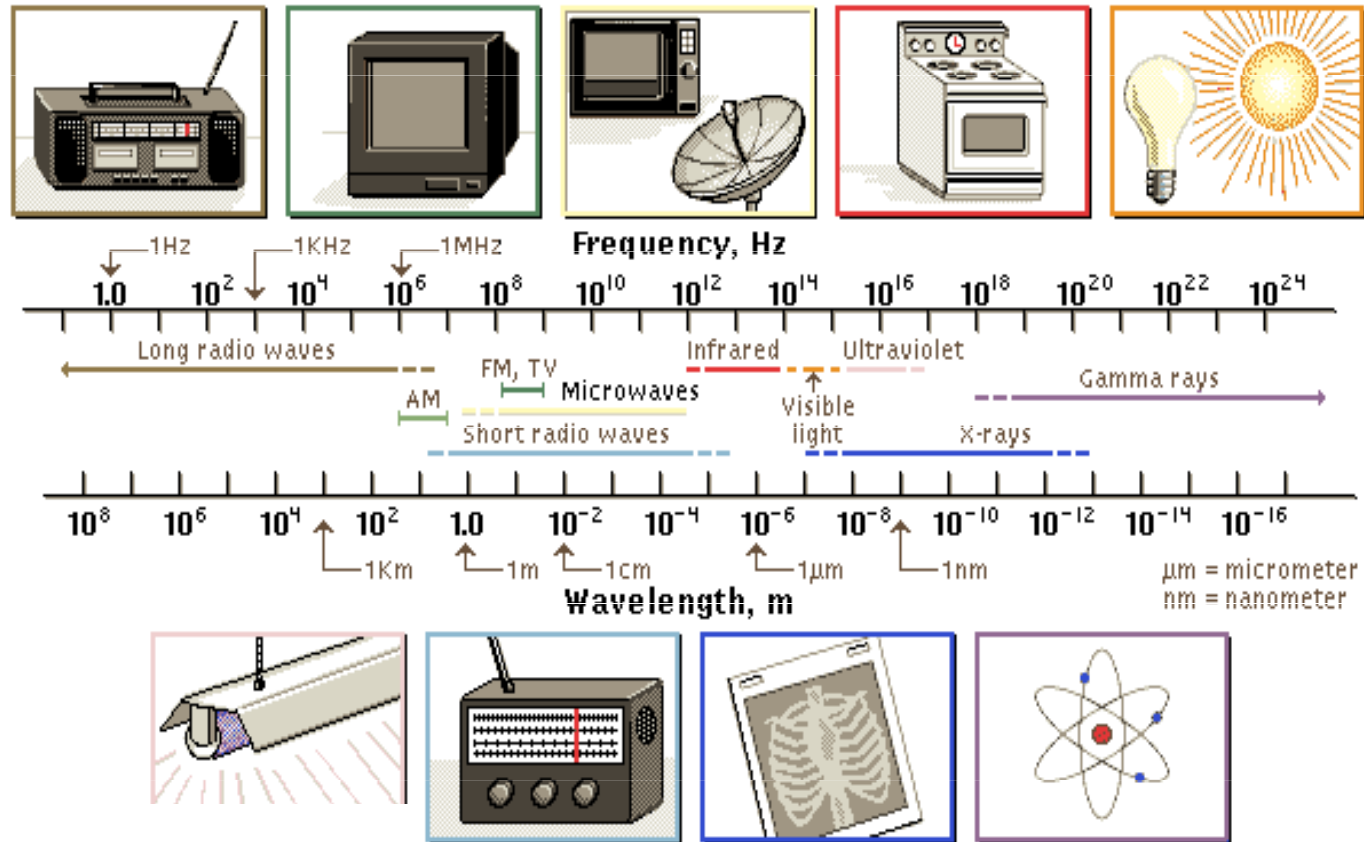


Ohyb a rozklad světla

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

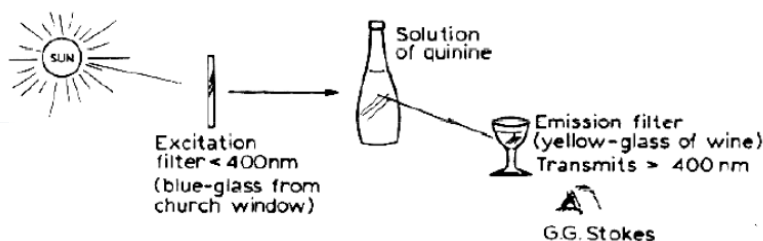


<http://www.nndb.com/people/131/000097837/>

1852 – popsal fluorescenci

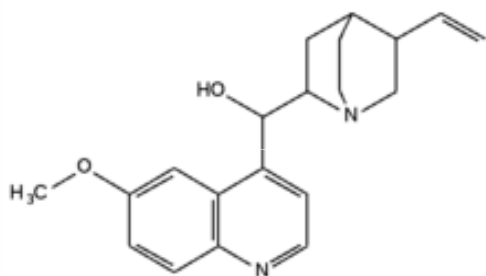
Název vznikl z anglického slova *fluospar*
(fluorit, kazivec = nerost CaF_2)

- 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



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

[463]

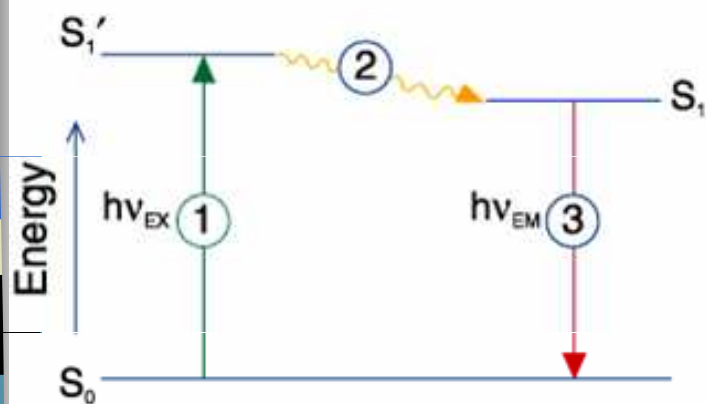


XXX. *On the Change of Refrangibility of Light*. By G. G. STOKES, M.A., F.R.S.,
Fellow of Pembroke College, and Lucasian Professor of Mathematics in the
University of Cambridge.

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 (S1')**. This process distinguishes fluorescence from chemiluminescence, in which the excited state is populated by a chemical reaction.

Stage 2 : Excited-State Lifetime

The excited state exists for a finite time (typically $1-10 \cdot 10^{-9}$ 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 $S1'$ is partially dissipated, yielding a relaxed singlet excited state ($S1$) from which fluorescence emission originates. Second, not all the molecules initially excited by absorption (Stage 1) return to the ground state ($S0$) by fluorescence emission. Other processes such as collisional quenching, fluorescence energy transfer and intersystem crossing (see below) may also depopulate $S1$. 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 $S0$. 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.





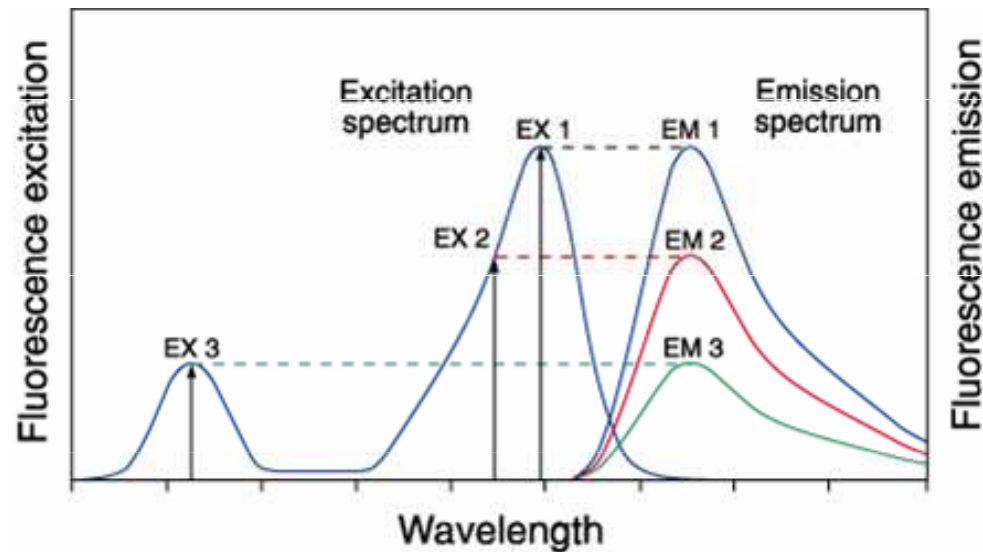
Charakteristiky fluorescence

- **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 (NH_2 , OH , 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 cytometer měří fluorescenci v proudícím toku, umožňuje detekovat a kvantifikovat subpopulace uvnitř velkého vzorku

Fluorescenční signál

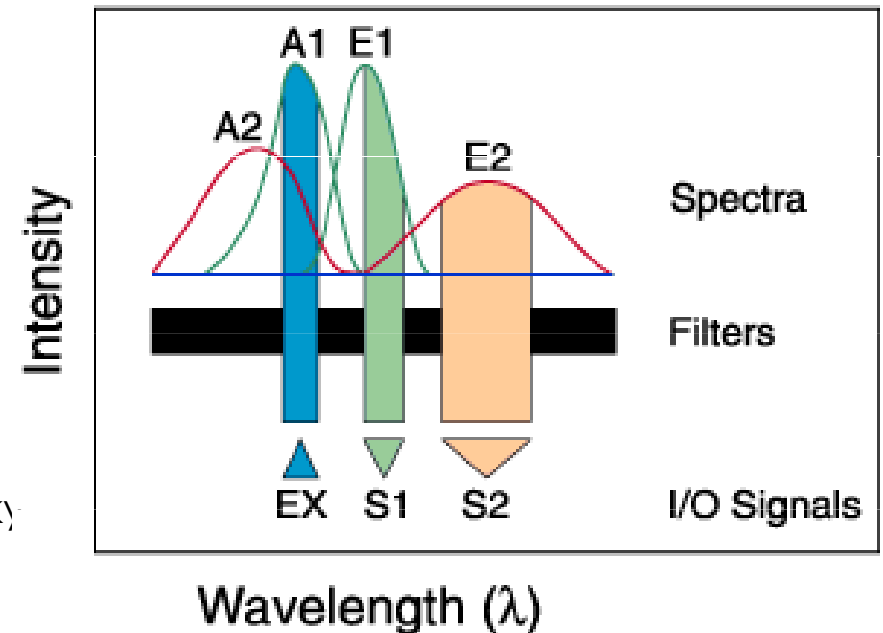
- spektrofluorometer je flexibilní, umožňuje měřit v kontinuálním spektru excitačních a emisních vlnových délek
- flow cytometr potřebuje fluorescenční značky excitovatelné určitou vlnovou délkou.

Fluorescence pozadí

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

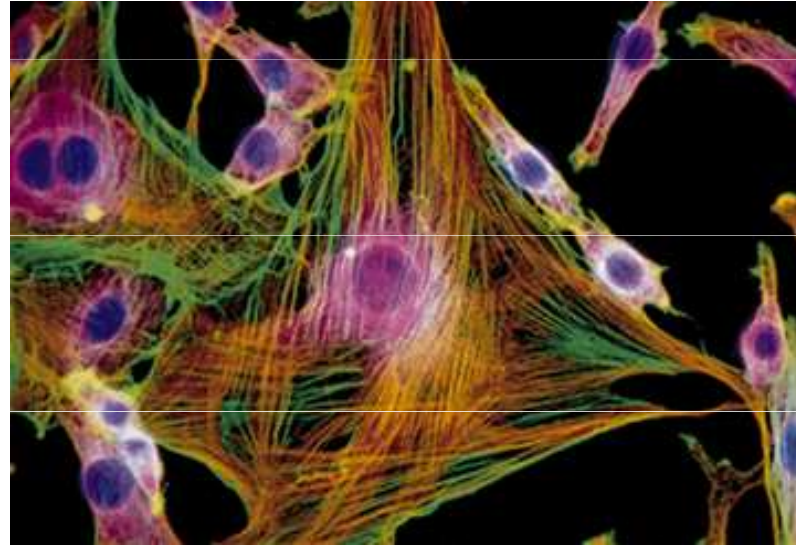
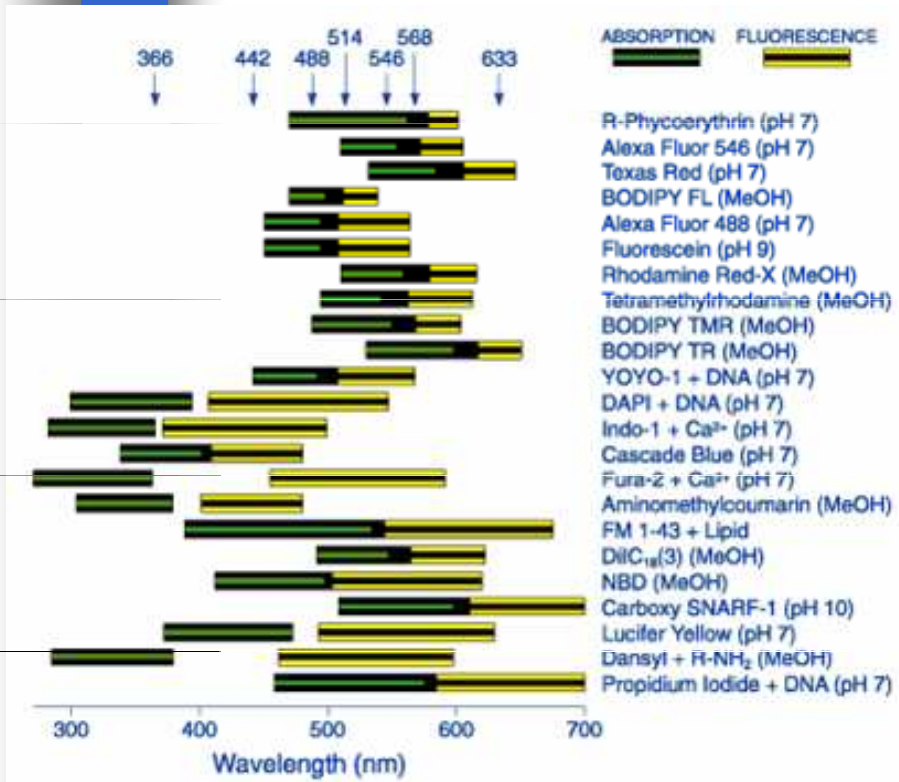
Vícebarevné značení

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



Fluorescence Output of Fluorophores

Comparing Different Dyes



Mouse 3T3

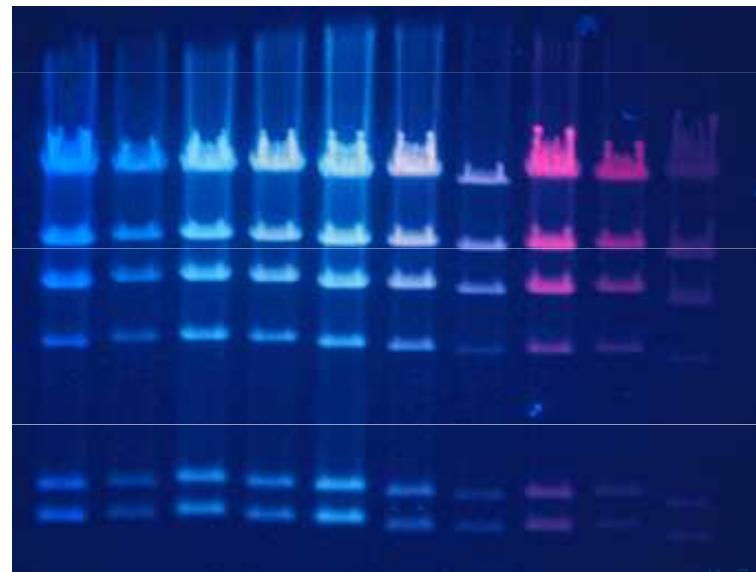
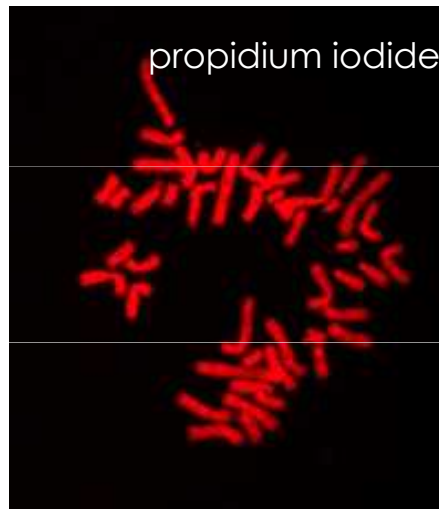
F-actin ~
BODIPY FL phalloidin

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

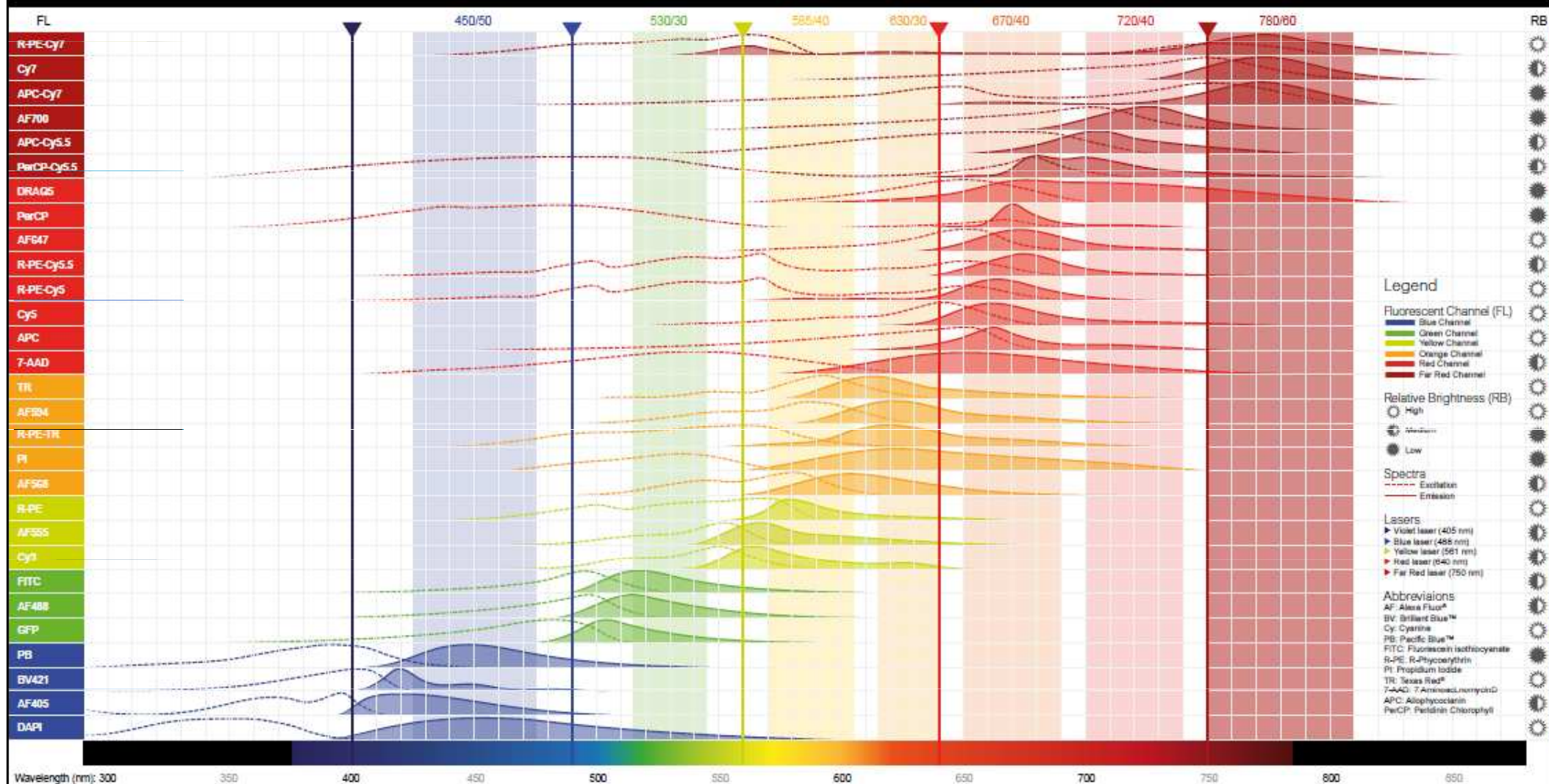
DNA ~
DAPI

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

λ Hind III



Fluorochrome chart



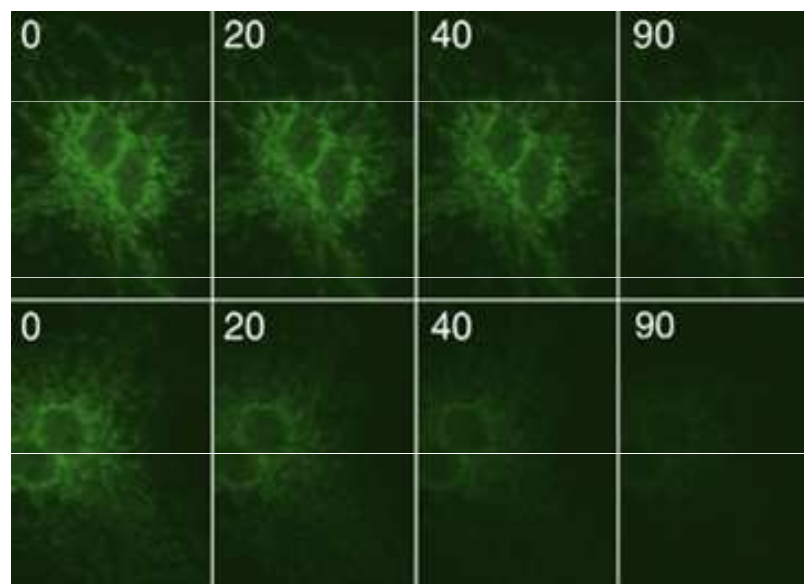


Procesy interferující a detekcí fluorescence

- **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



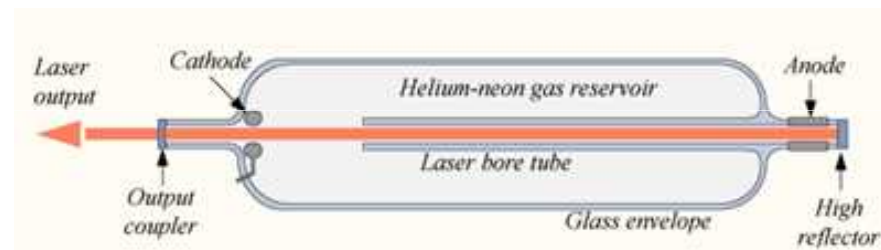
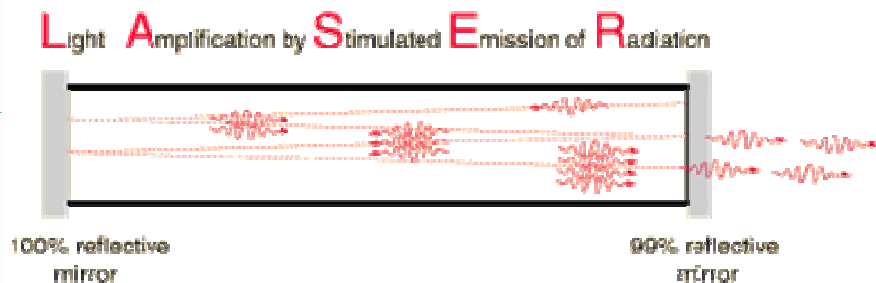
Optika - zdroj světla

- 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

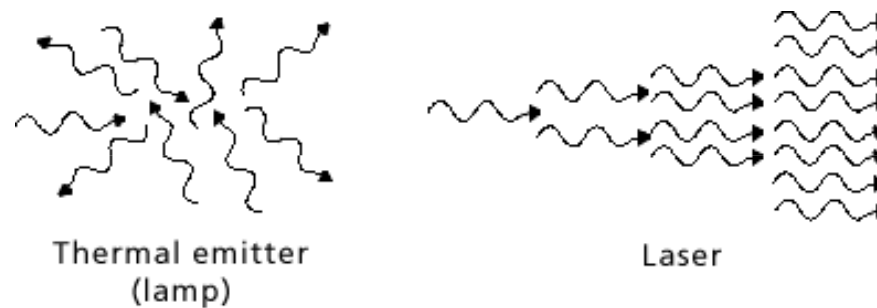
LASER(y)



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

- koherentní (souvislý světelný tok)
- monochromatický
- soustředěný

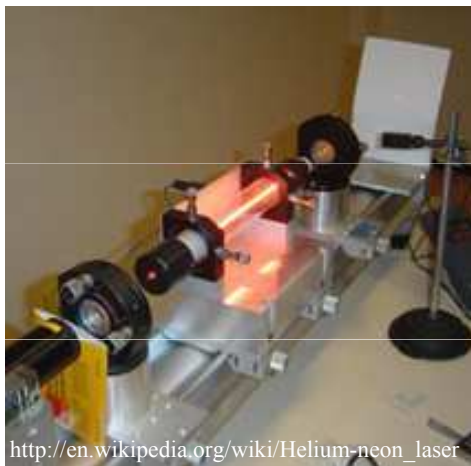
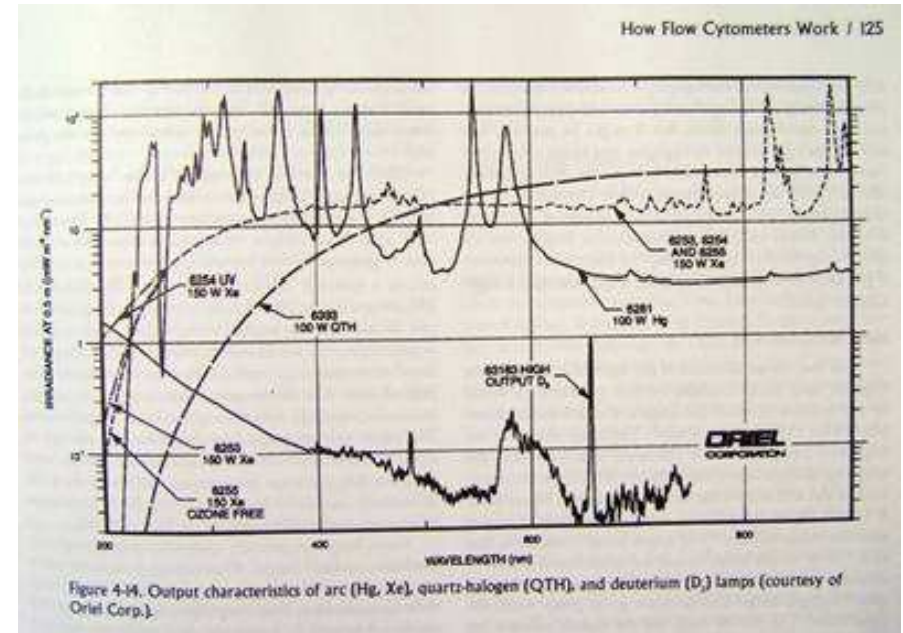
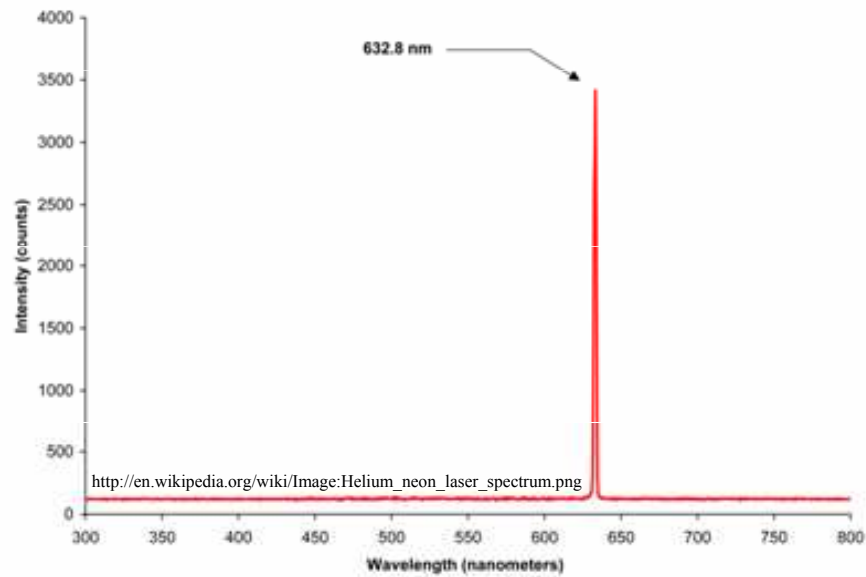
<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/hframe.html>



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



LASER vs. Arc lamp



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



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

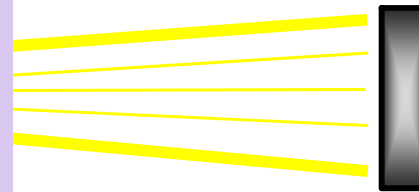
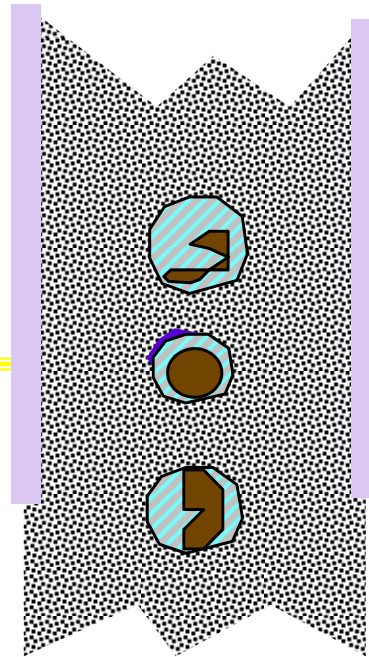
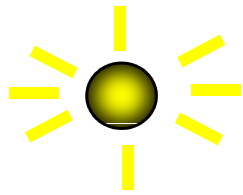


Optika - „Forward Scatter“ kanál

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

Forward Angle Light Scatter

Laser



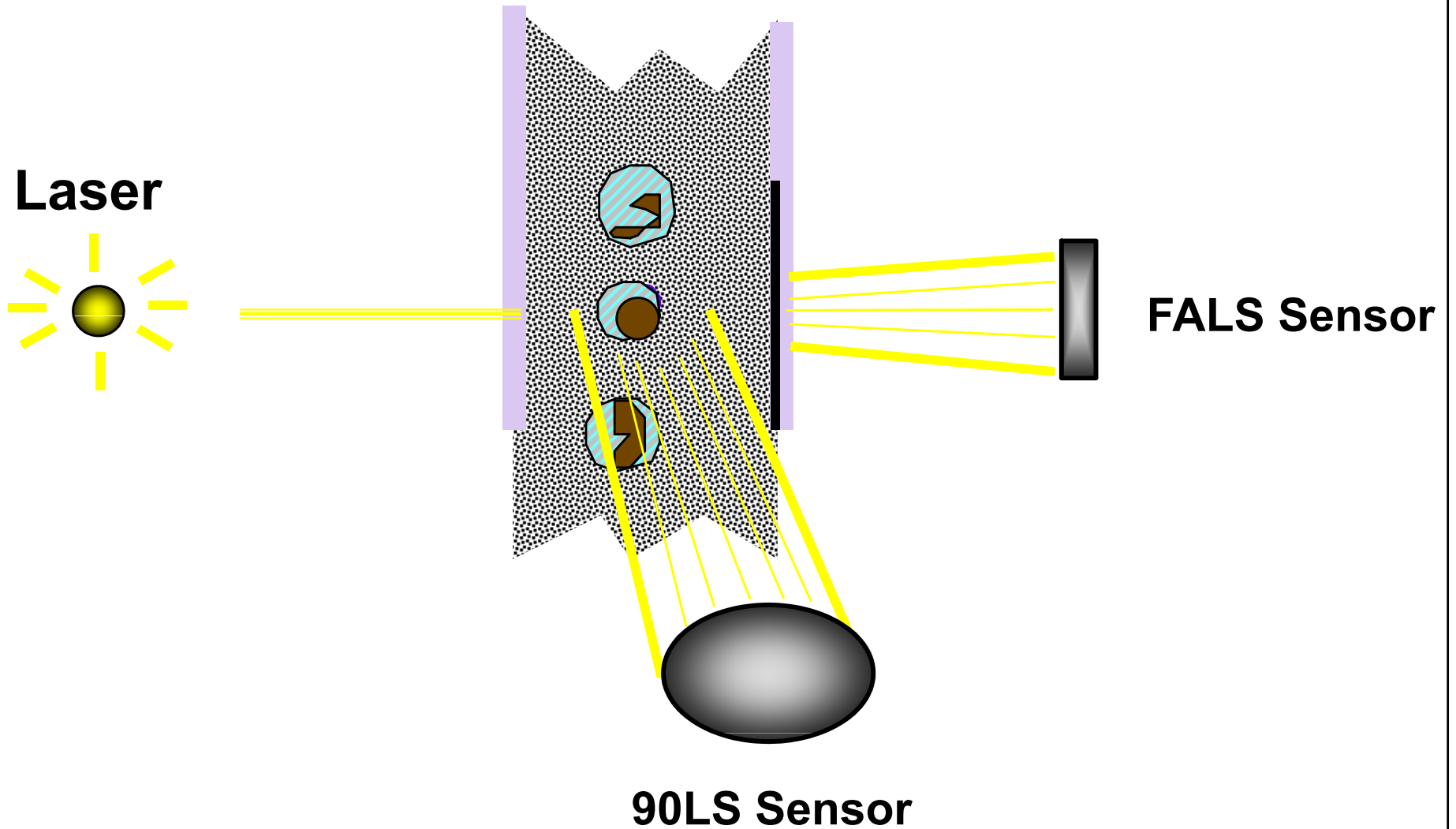
**FALS
Sensor**



Optika - „Side Scatter“ kanál

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

90 Degree Light Scatter





Optika - Light Scatter

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

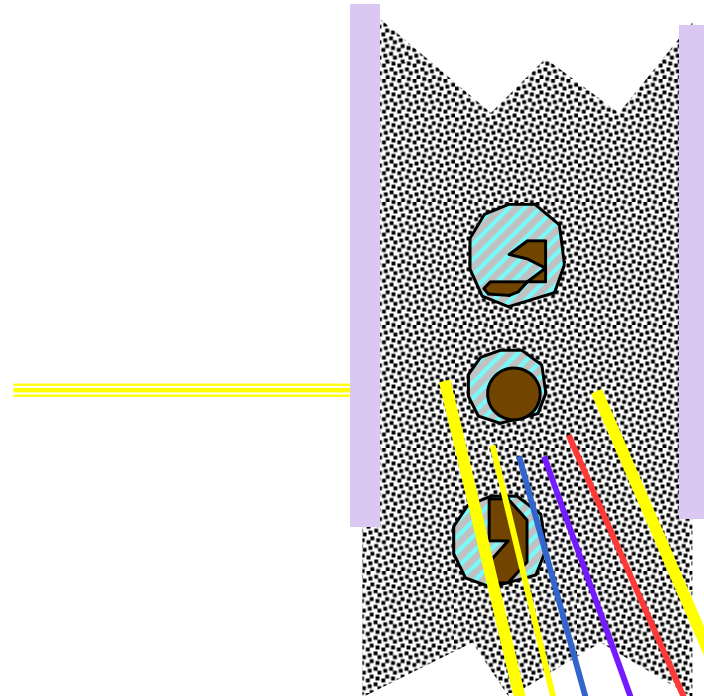
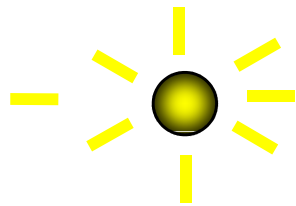


Optika - fluorescenční kanály

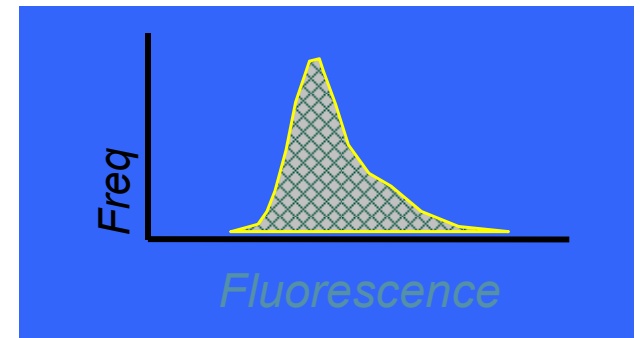
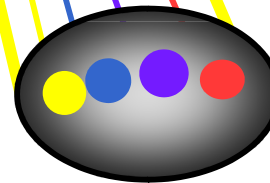
- fluorescence emitovaná z každého fluorochromu je detekována pomocí specifického **fluorescenčního kanálu**
- specifita detekce je kontrolována vlnovou selektivitou filtru a zrcadel

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

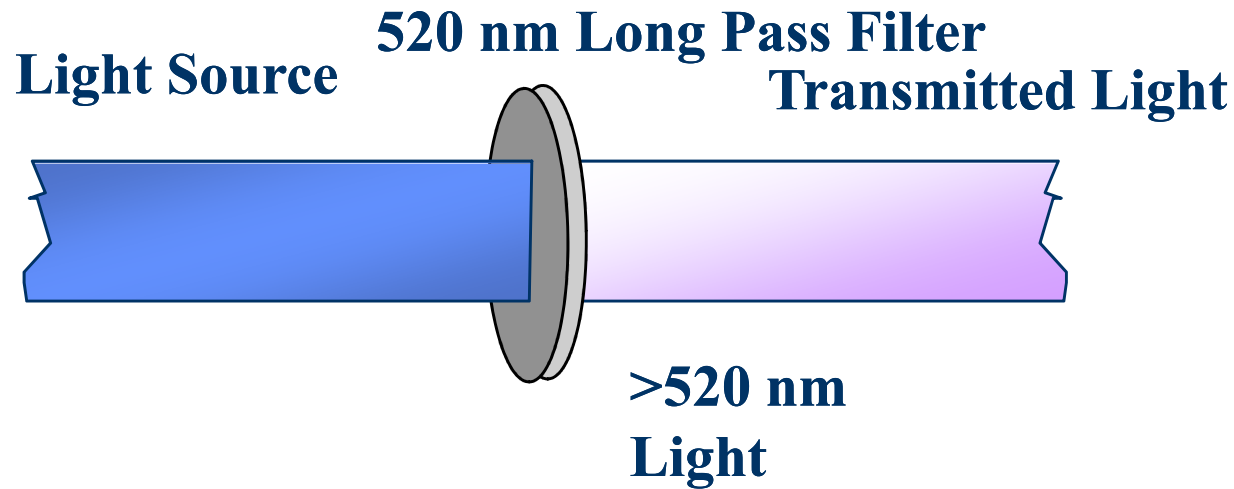




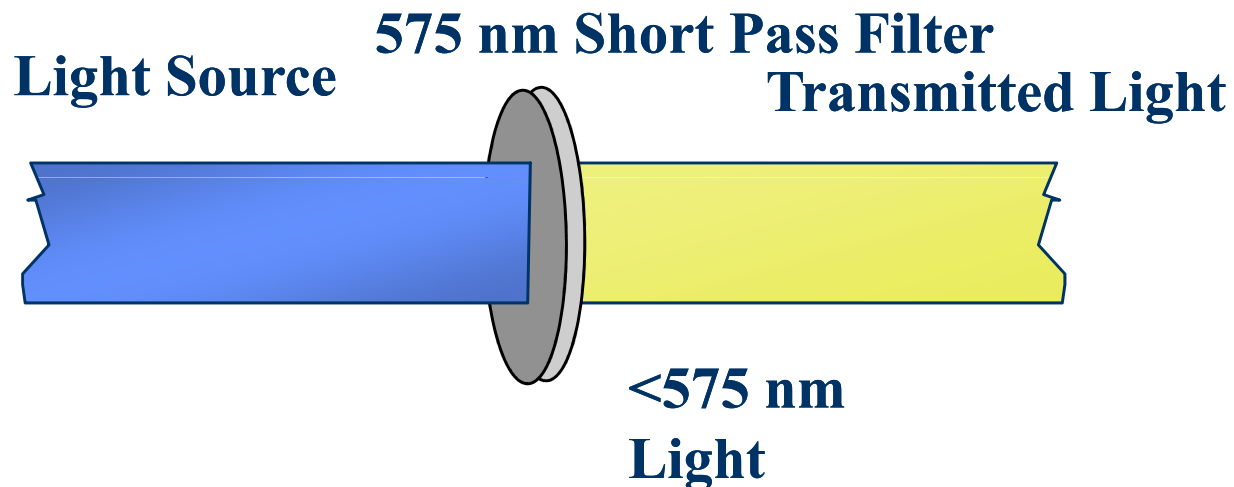
Optics - vlastnosti filtrů

- „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

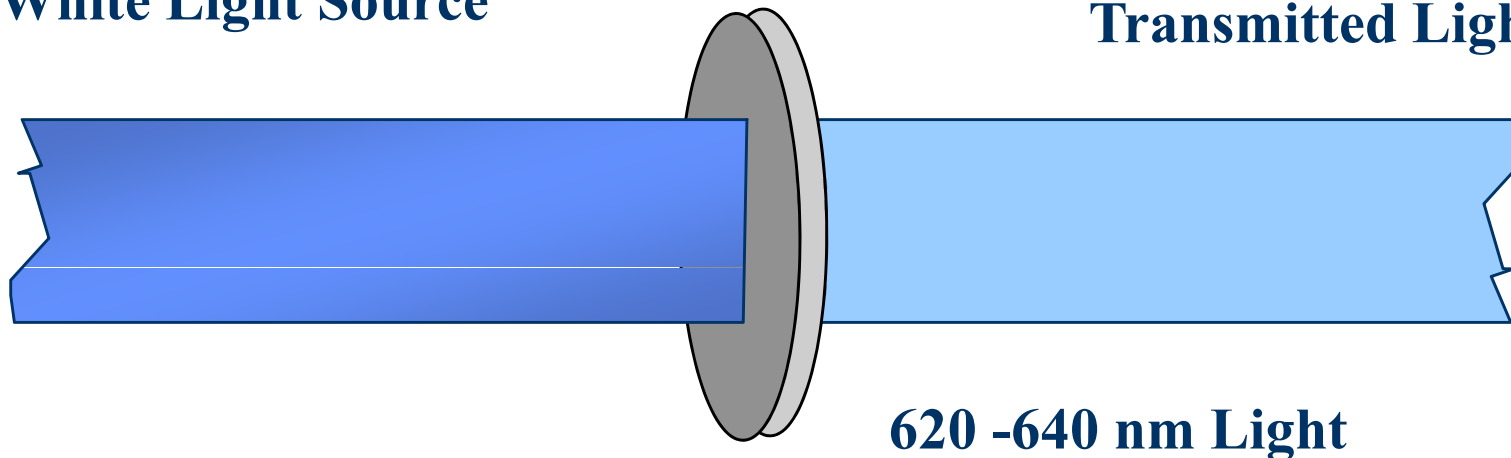


Standard Band Pass Filters

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 blokovávané světlo je odraženo v 90° úhlu
- **dichroické filtry, dichroická zrcadla**

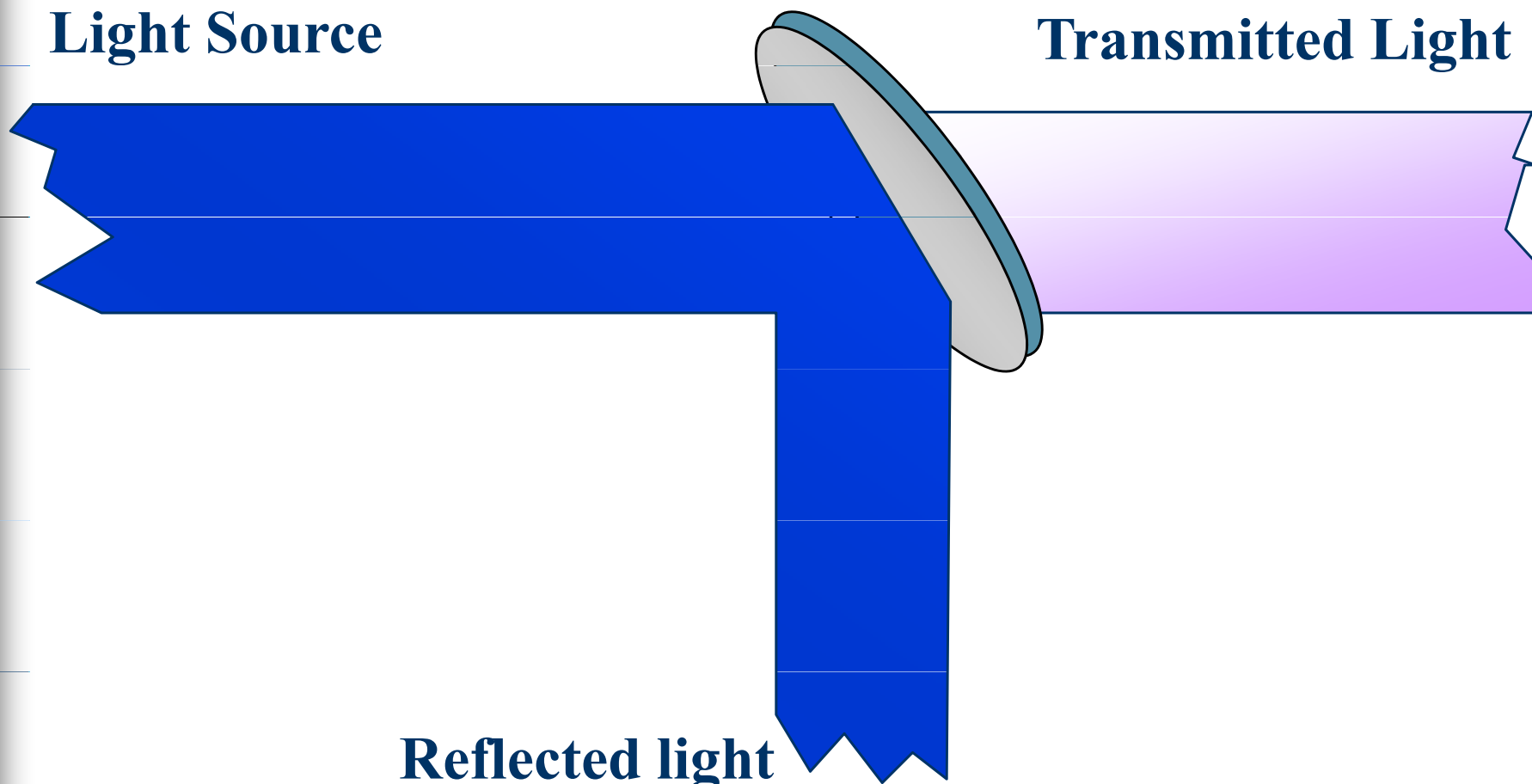
Dichroic Filter/Mirror

Filter placed at 45°

Light Source

Transmitted Light

Reflected light





Optika - uspořádání filtrů

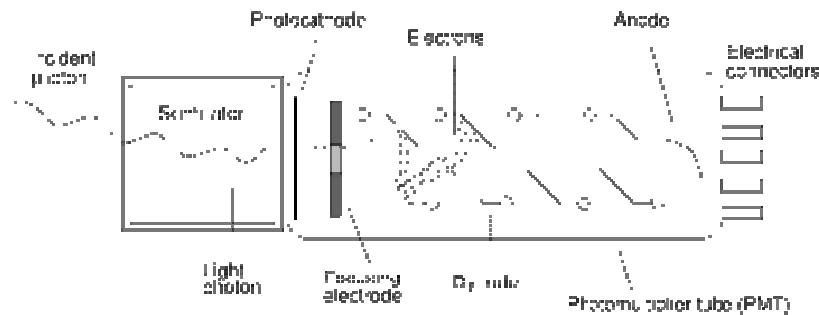
- k společnému měření více než jednoho „scatteru“ nebo fluorescence , používáme **mnohonásobné kanály** (a detektory)
- multikanálové uspořádání musí splňovat
 - **spektrální vlastnosti** použitého fluorochromu
 - **správný řád uspořádání** filtrů a zrcadel



Optika - detektory

- dva obecné typy detektorů
 - **fotodioda**
 - v minulosti zejména pro silný signál (forward scatter detector)
 - současnost – vysoce citlivé AVALANCHE“ fotodiody (APD)
 - **fotonásobič (photomultiplier tube - PMT)**
 - citlivější než běžná fotodioda, může být poškozen přesvícením

Photomultiplier tubes (photomultipliers, PMTs)

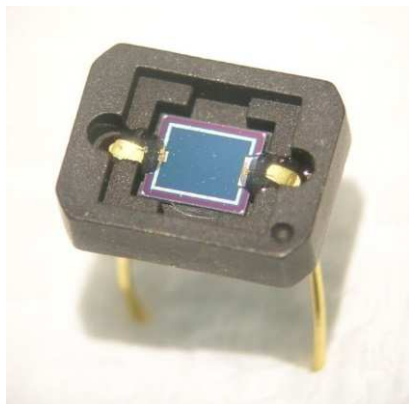


Základní charakteristika:

- 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>

“bežná“ fotodioda

Porovnání s PMT

Výhody:

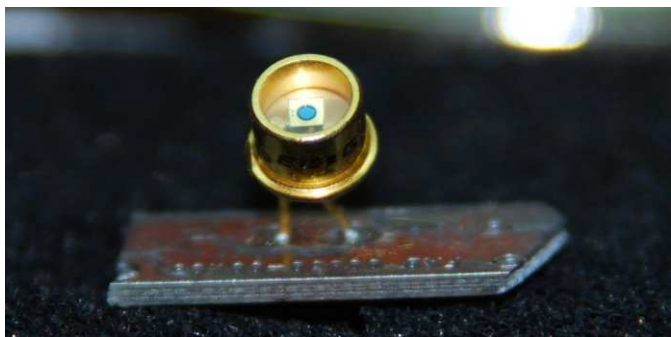
1. excelentní linearita signálu
2. rozsah spektrální detekce 190 nm to 1100 nm (silicon)
3. nízký šum
4. Odolnost vůči mechanickým vlivům
5. nízká cena
6. malá velikost a hmotnost
7. dlouhá životnost
8. Vysoká kvantová účinnost (~80%)
9. Nepotřebuje vysoká napětí

Nevýhody

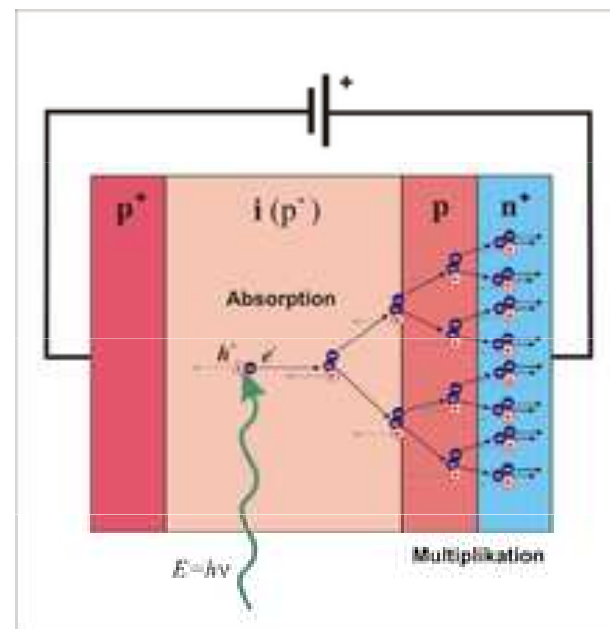
1. Malá plocha
2. Nemožnost integrálního zesílení
3. Mnohem nižší citlivost
4. Počítání fotonů pouze u speciálních produktů
5. Kratší čas odpovědi

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

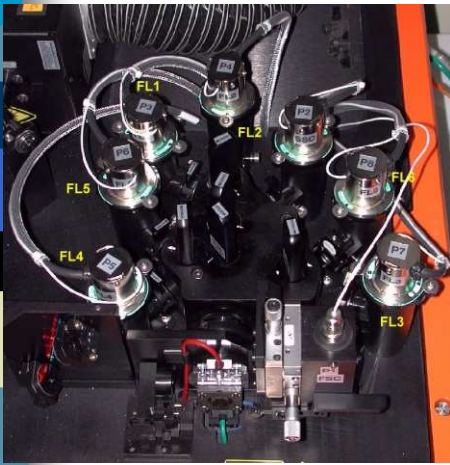
- Vysoce citlivé polovodiče - srovnatelné s PMT



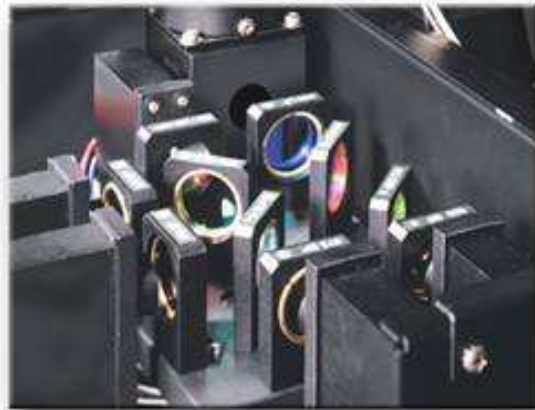
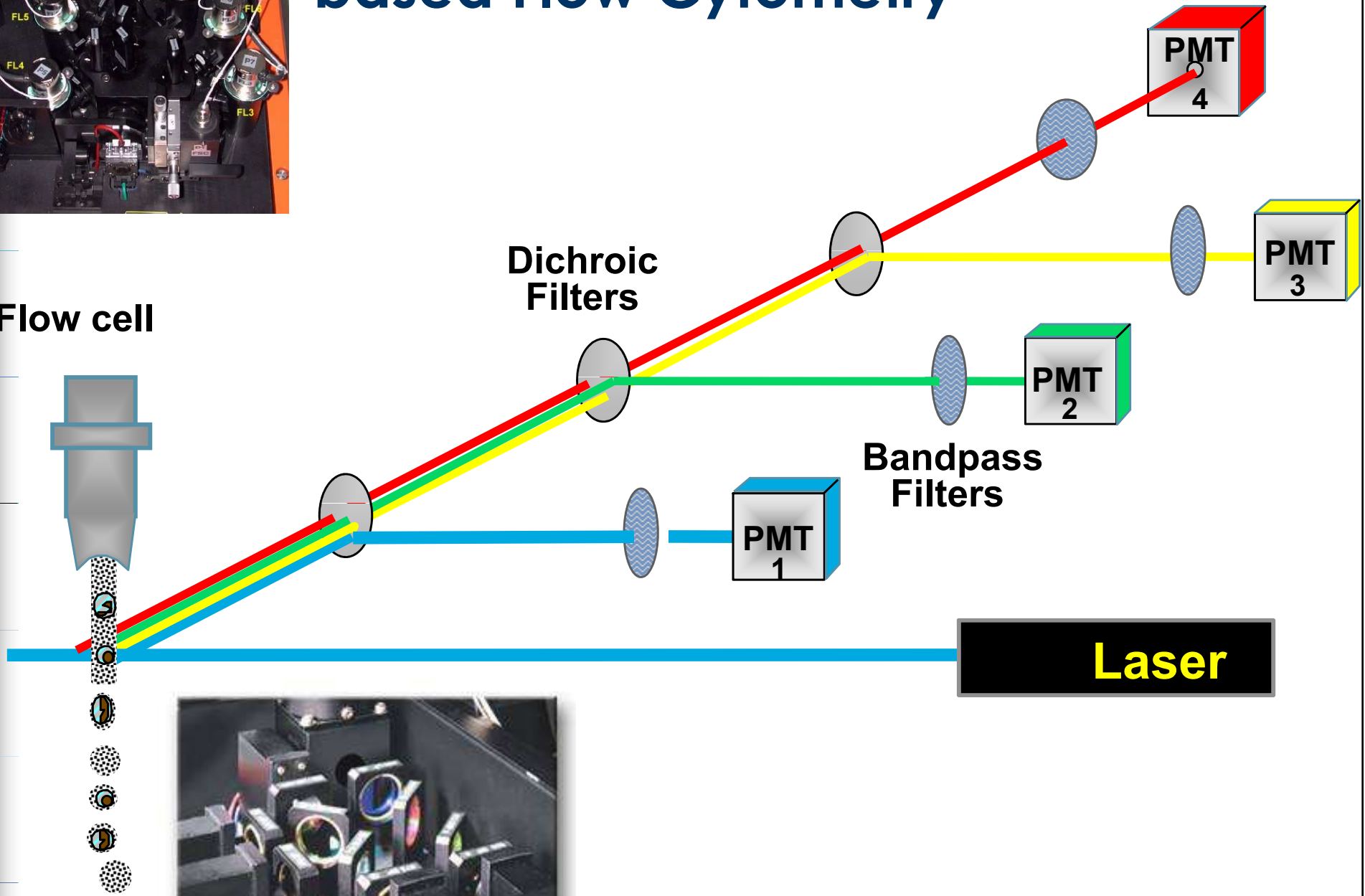
https://en.wikipedia.org/wiki/Avalanche_photodiode



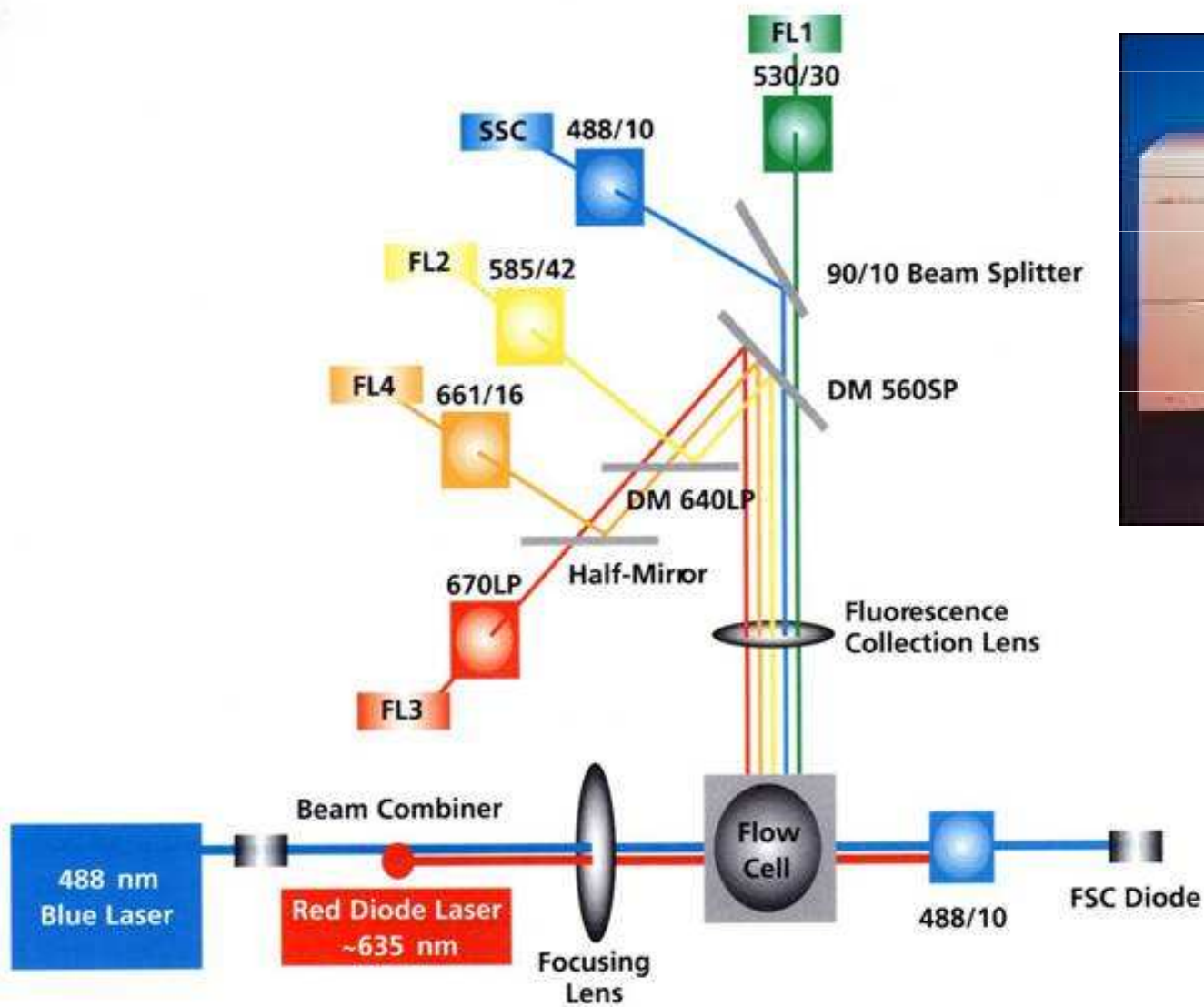
Example Channel Layout for Laser-based Flow Cytometry



Flow cell

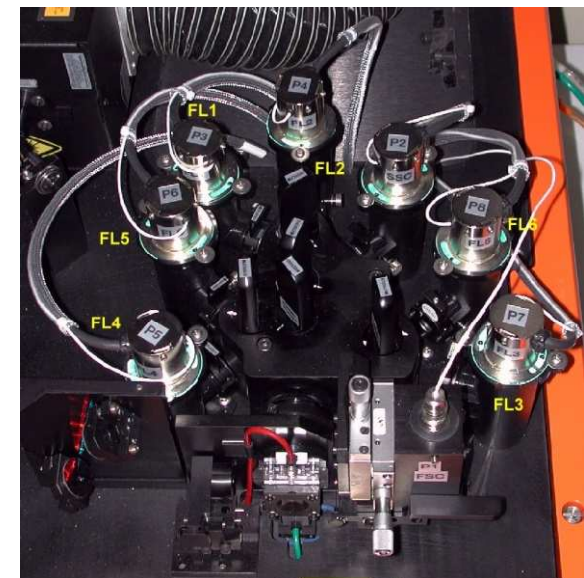
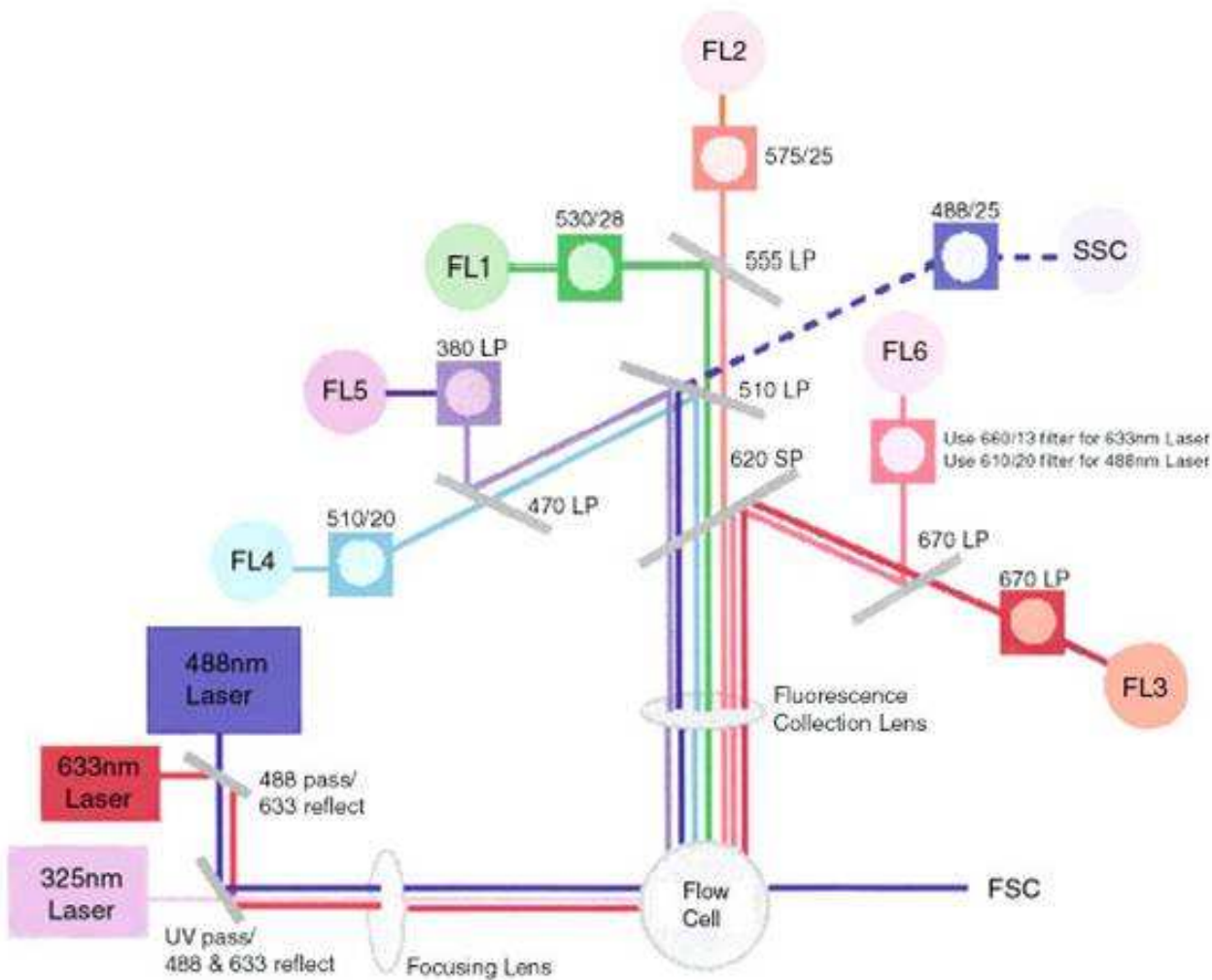


BD FACSCalibur system

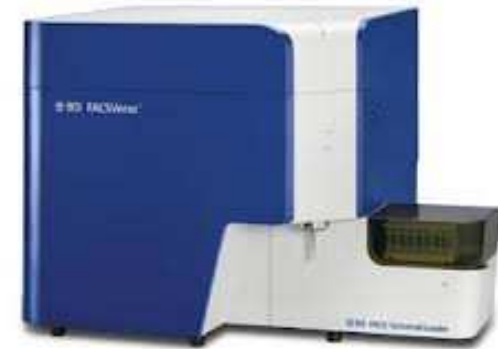


http://www.bdbiosciences.com/immunocytometry_systems/

BD LSR II system

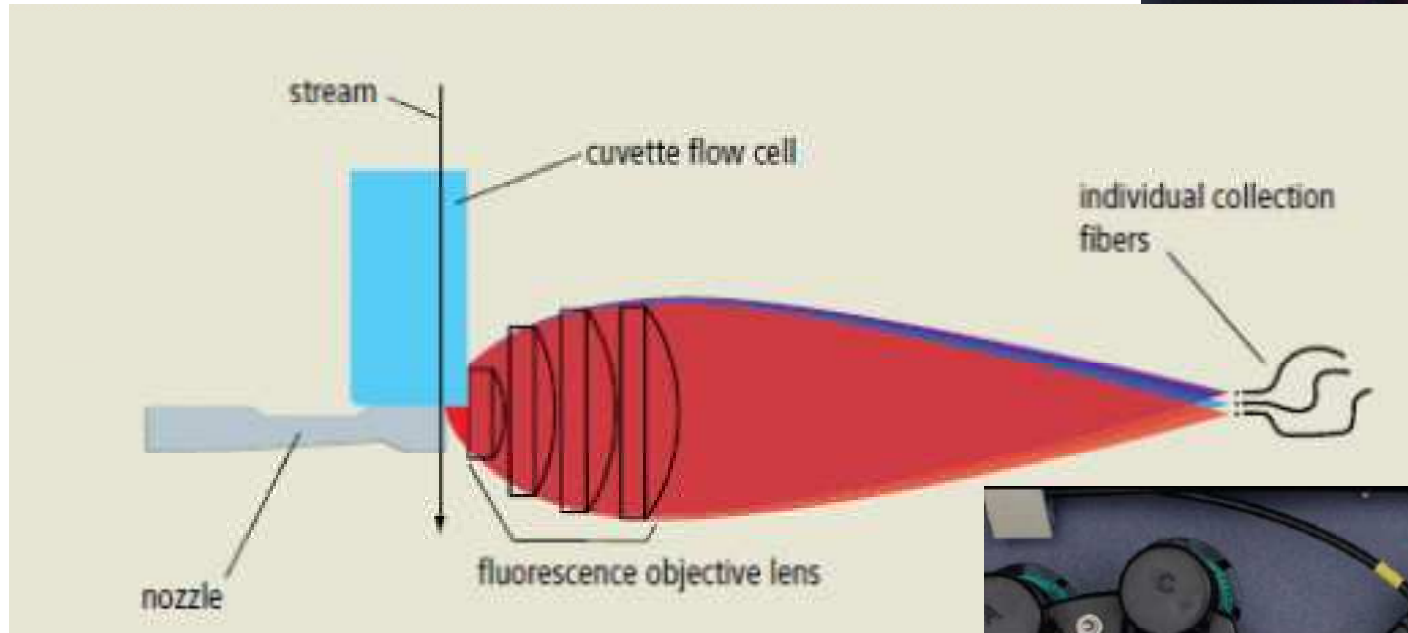


BD FACSVerser system



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

Aria II



SP6800 spectral analyzer

The 405nm, 488nm and 638nm excitation lasers are positioned to reduce fluorescent noise. They enable the system to support 16 or more fluorescent parameters.

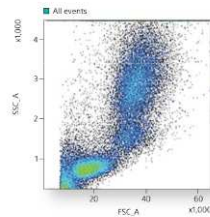
Microfluidics flow cell chip maximizes signal with auto positioning to guarantee high sensitivity. Made of durable plastic with an embedded quartz cuvette, the chip is easy to replace when needed.



The **Flowpoint detection system** precisely tracks the core stream shape and position in the flow cell as well as the cross sectional position of each passing particle to provide highly reliable measurements. This patented technology visualizes core stability and enables the highest resolution.

Scatter analysis

Forward and Side Scatter parameters to allow relative size and complexity measurements.



Emitted light is directed through a **32 Channel PMT** that produces 66 data points of signal detection to analyze emitted photons from 420nm to 800 nm to ensure accurate visualization.



A unique prism collection system
Delivers light through 10 consecutive prisms allowing optimal signal separation while minimizing light loss.

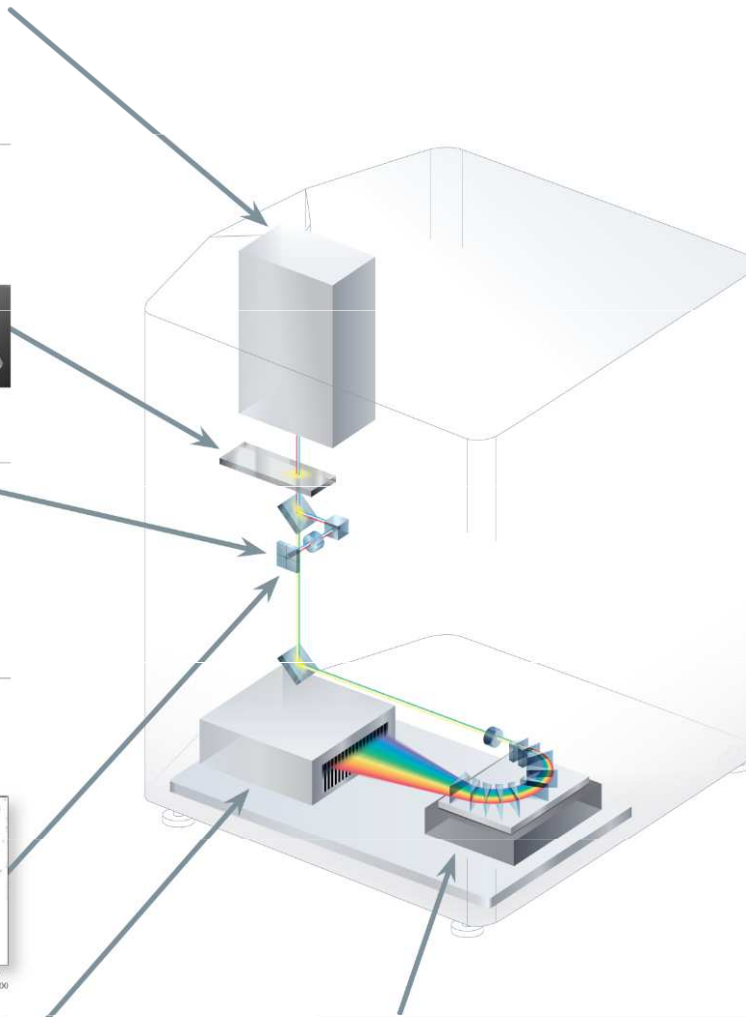
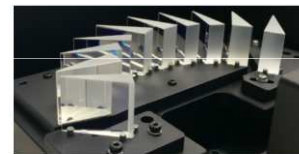


Image Stream & Flowsight Amnis – kombinace průtokové cytometrie a analýzy obrazu

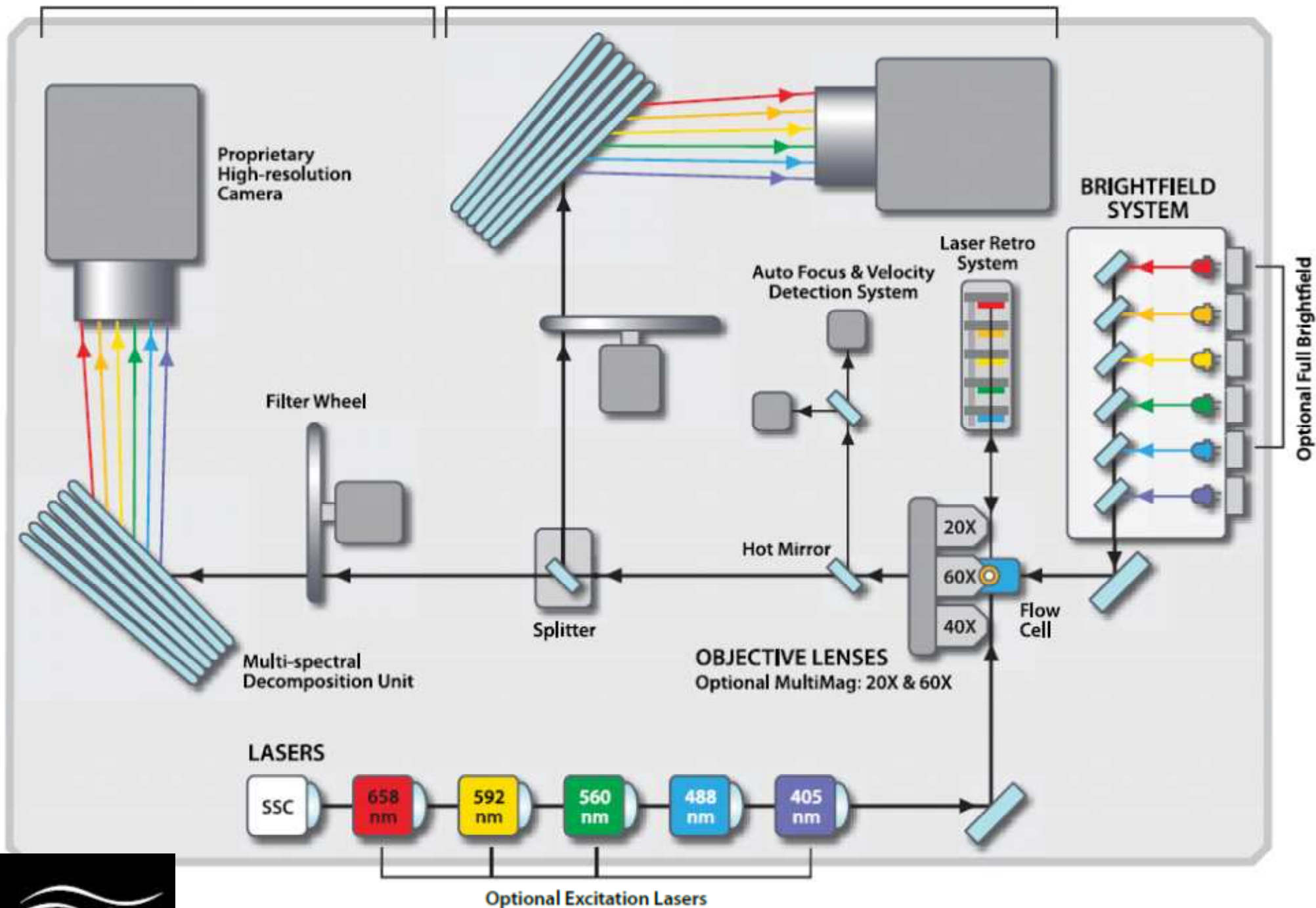


STANDARD COLLECTION SYSTEM

Image Channels: 1-6

OPTIONAL COLLECTION SYSTEM

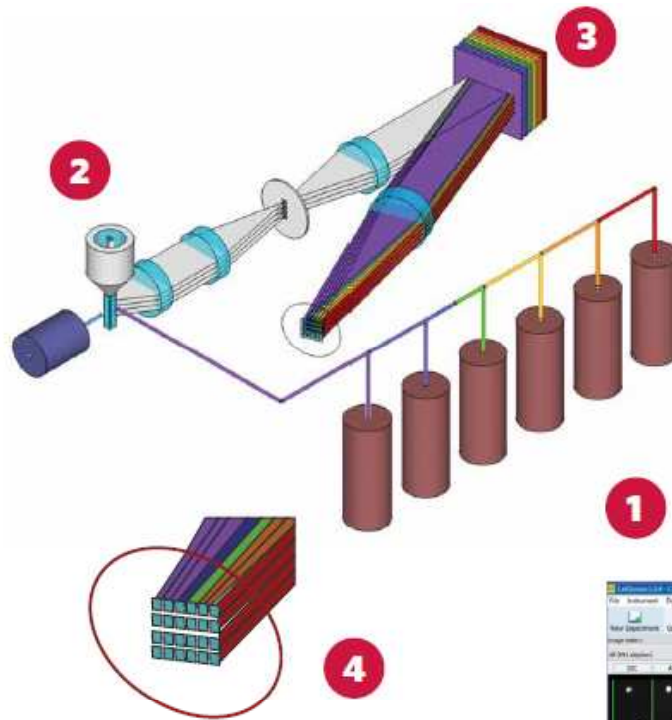
Image Channels: 7-12



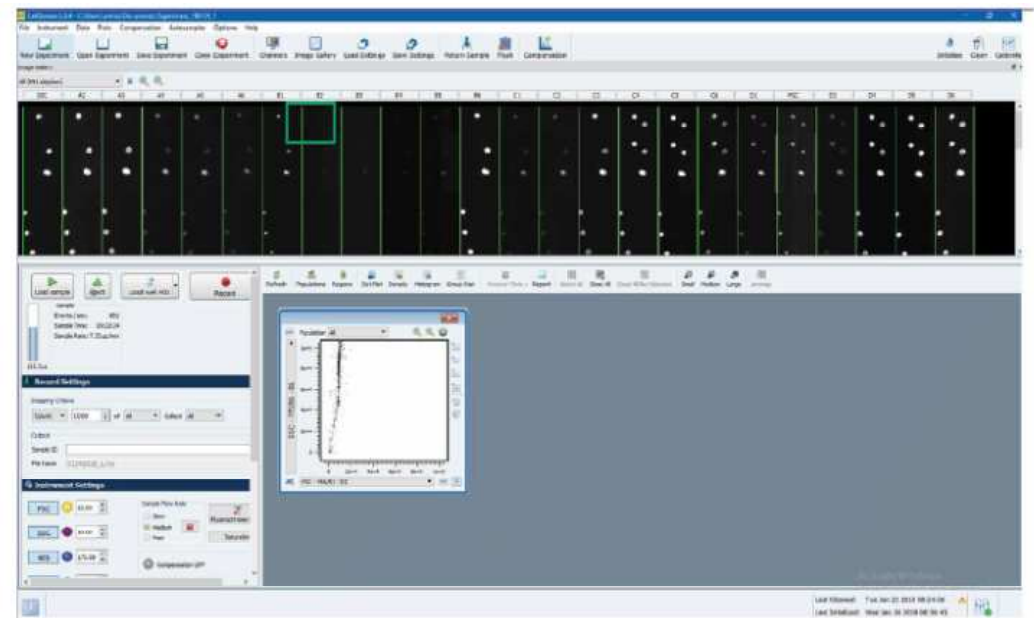
Amnis - aplikace



CellStream, Luminex

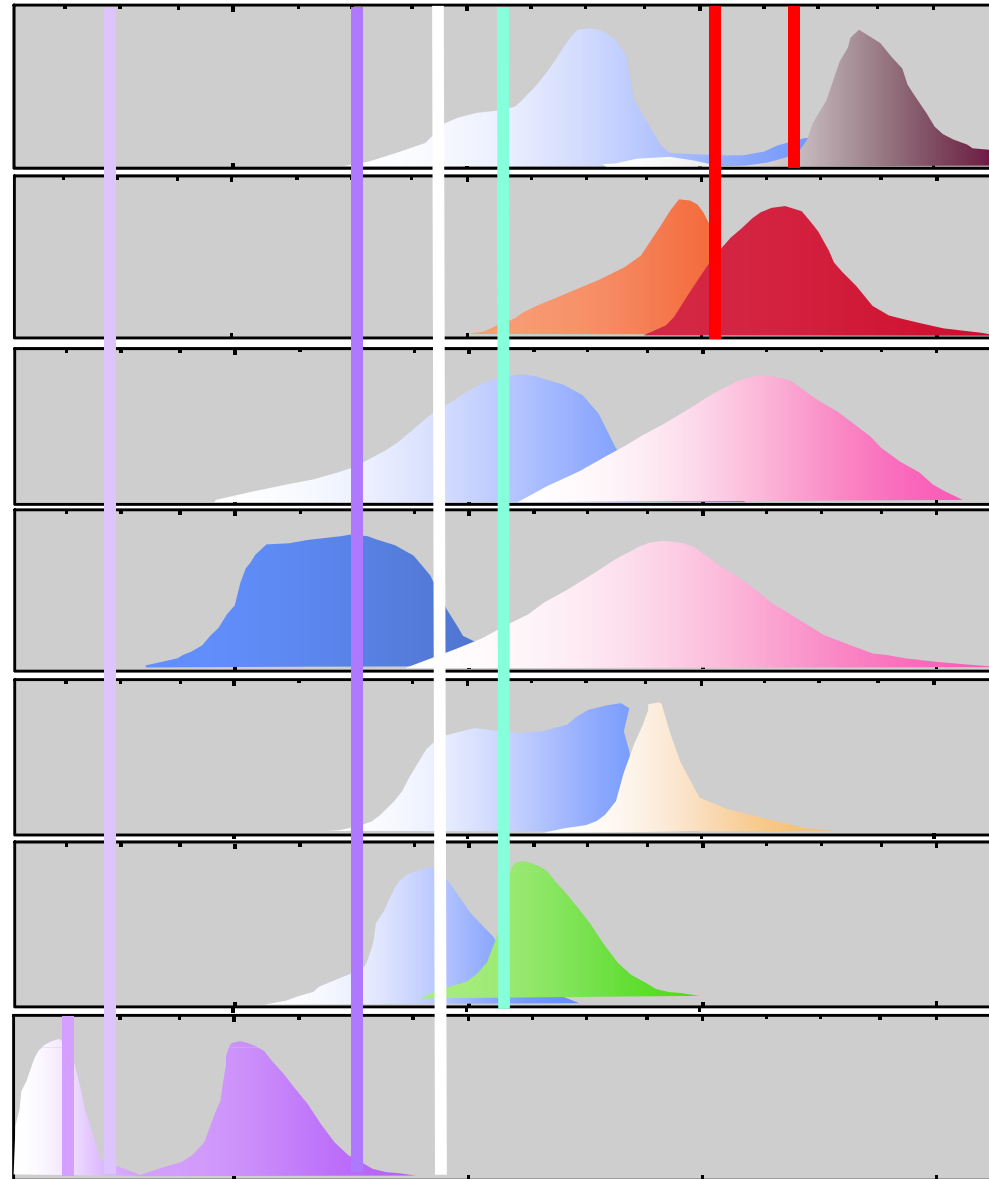


Inside the 7-Laser CellStream® System



**Common
Laser
Lines**

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



PE-TR Conj.

Texas Red

PI

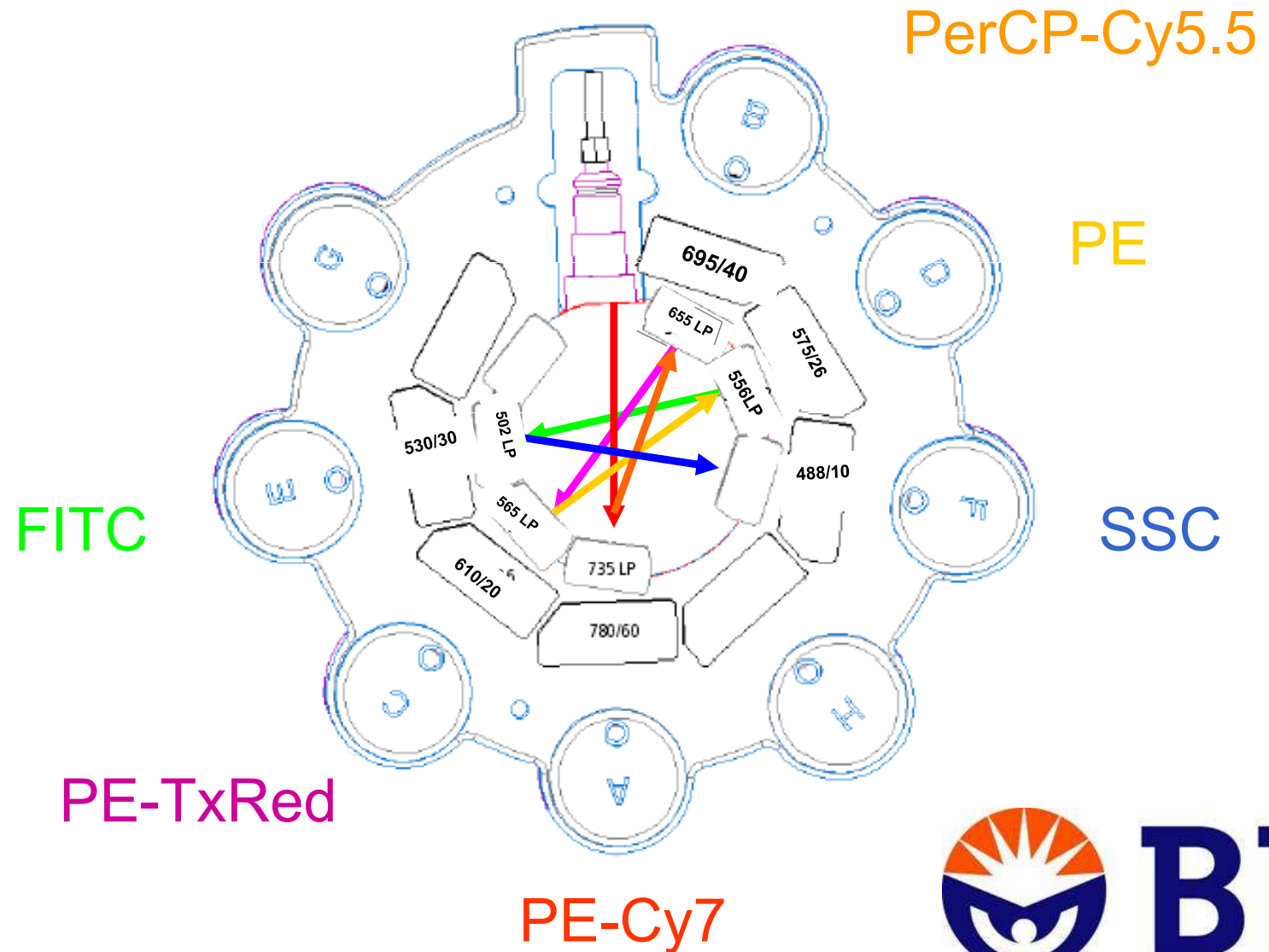
Ethidium

PE

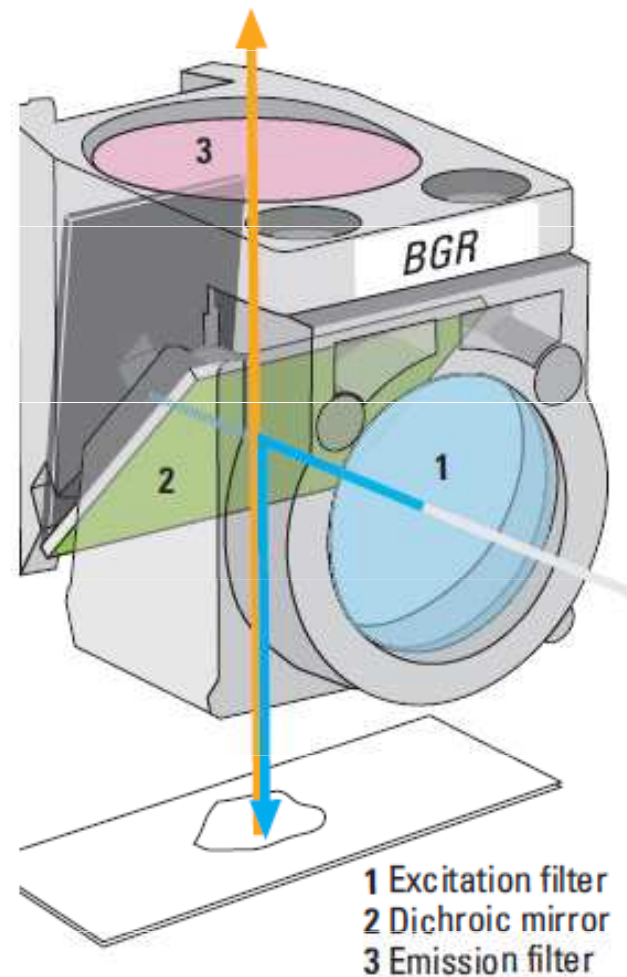
FITC

cis-Parinaric acid

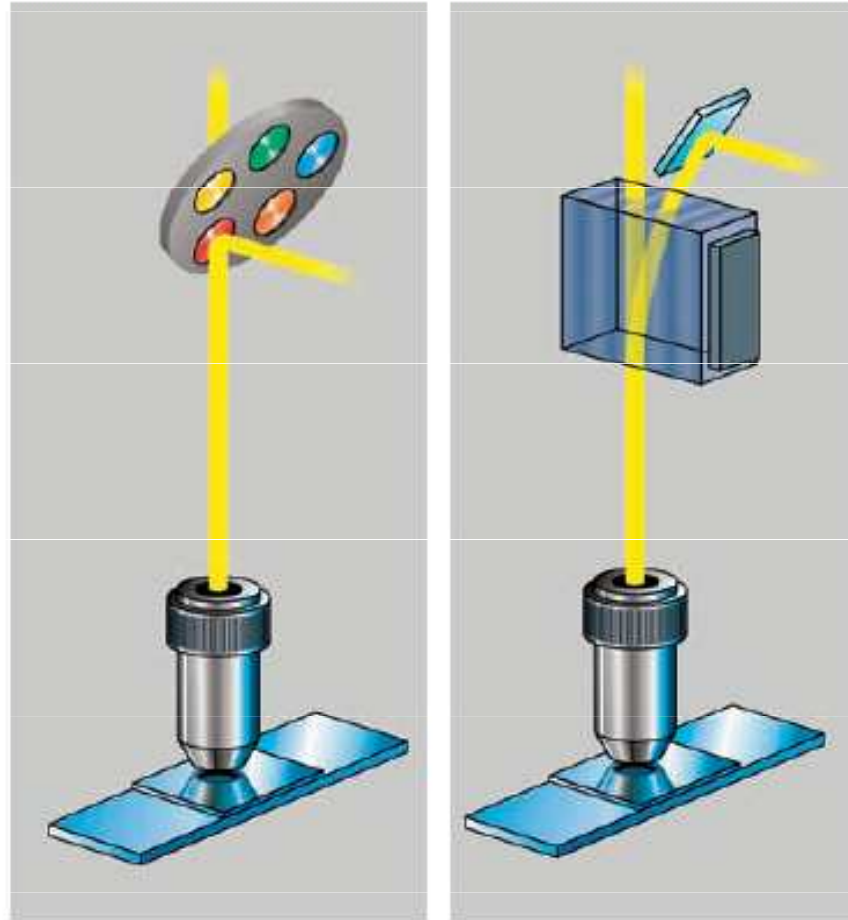
Octagon Detection System



“kostka” pro konvenční fluorescenční mikroskop



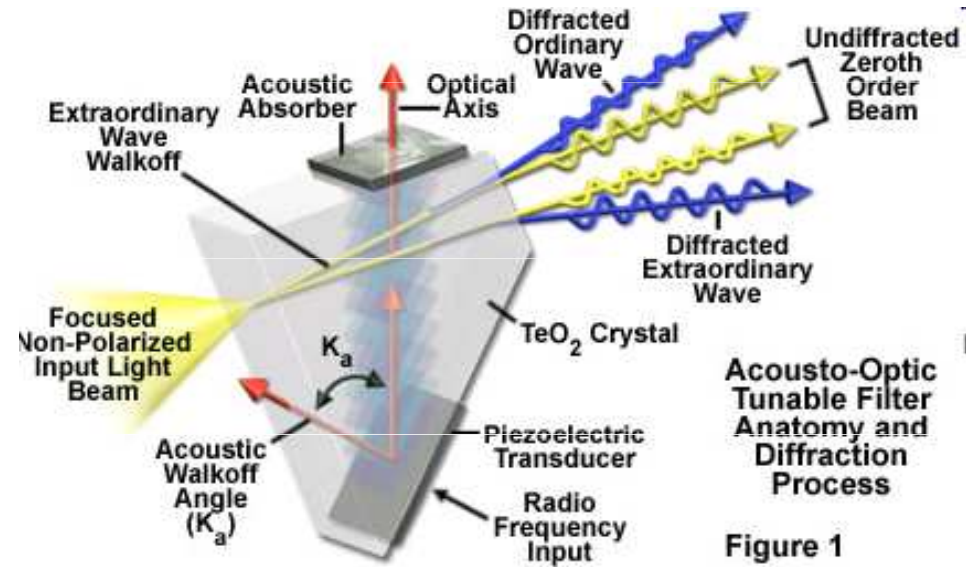
Acousto Optical Beam Splitter AOBS®



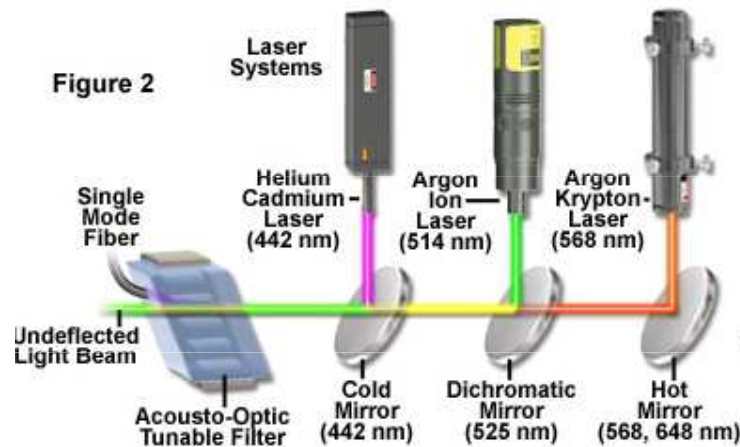
Left: conventional beam splitting by dichroic mirrors requires many optical elements with fixed properties.

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

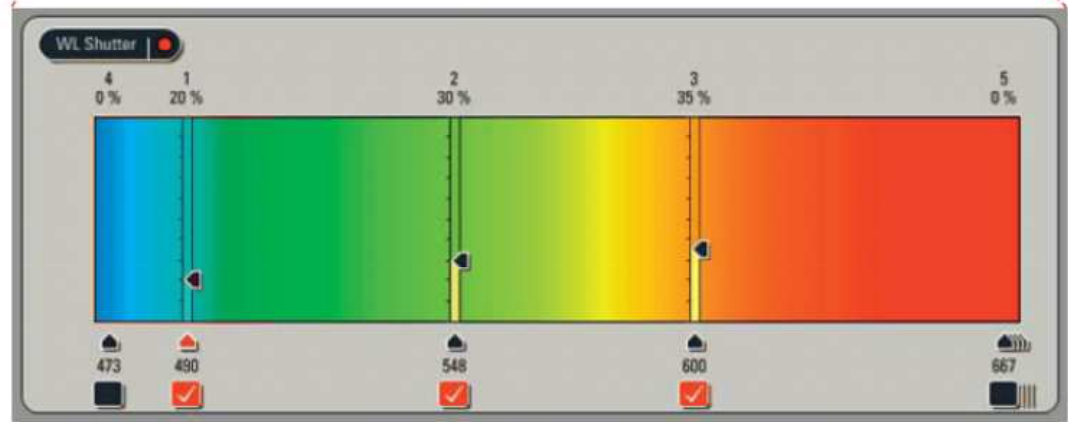
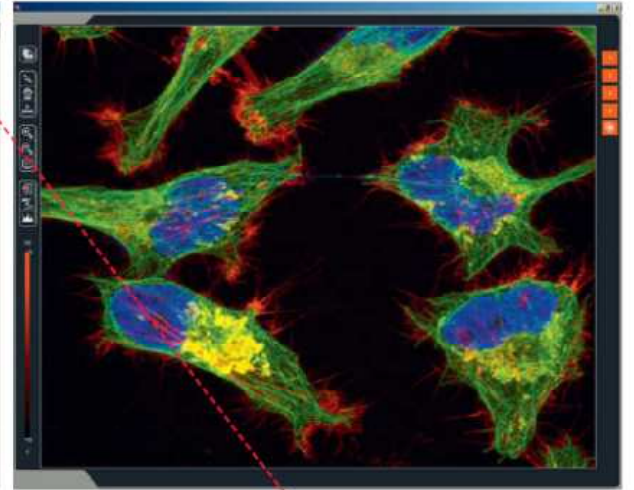
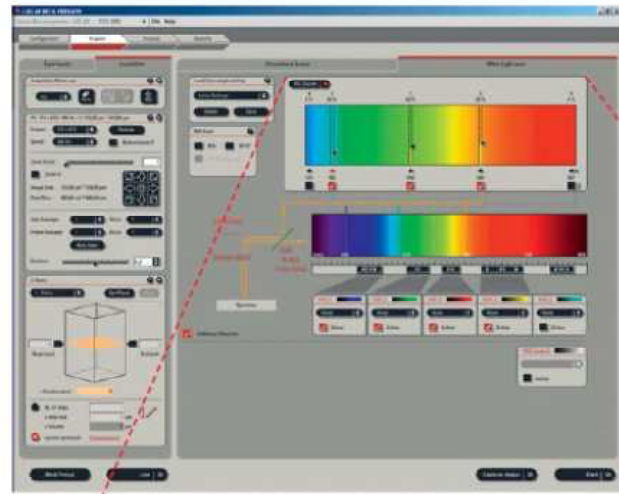
Cytometry

PART A
Journal of the
International Society for
Advancement of Cytometry

Supercontinuum White Light Lasers for Flow Cytometry

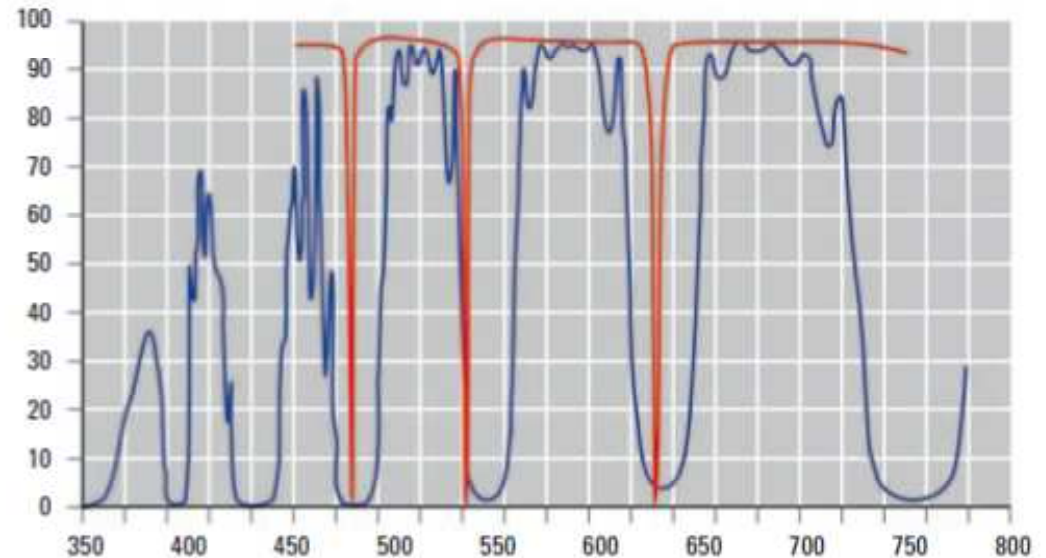
William G. Telford,^{1*} Fedor V. Subach,² Vladislav V. Verkhusha²

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 Viewers



<https://www.bdbiosciences.com/en-us/applications/research-applications/multicolor-flow-cytometry/product-selection-tools/spectrum-viewer>



<https://www.thermofisher.com/cz/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>



<https://fluorofinder.com>

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.

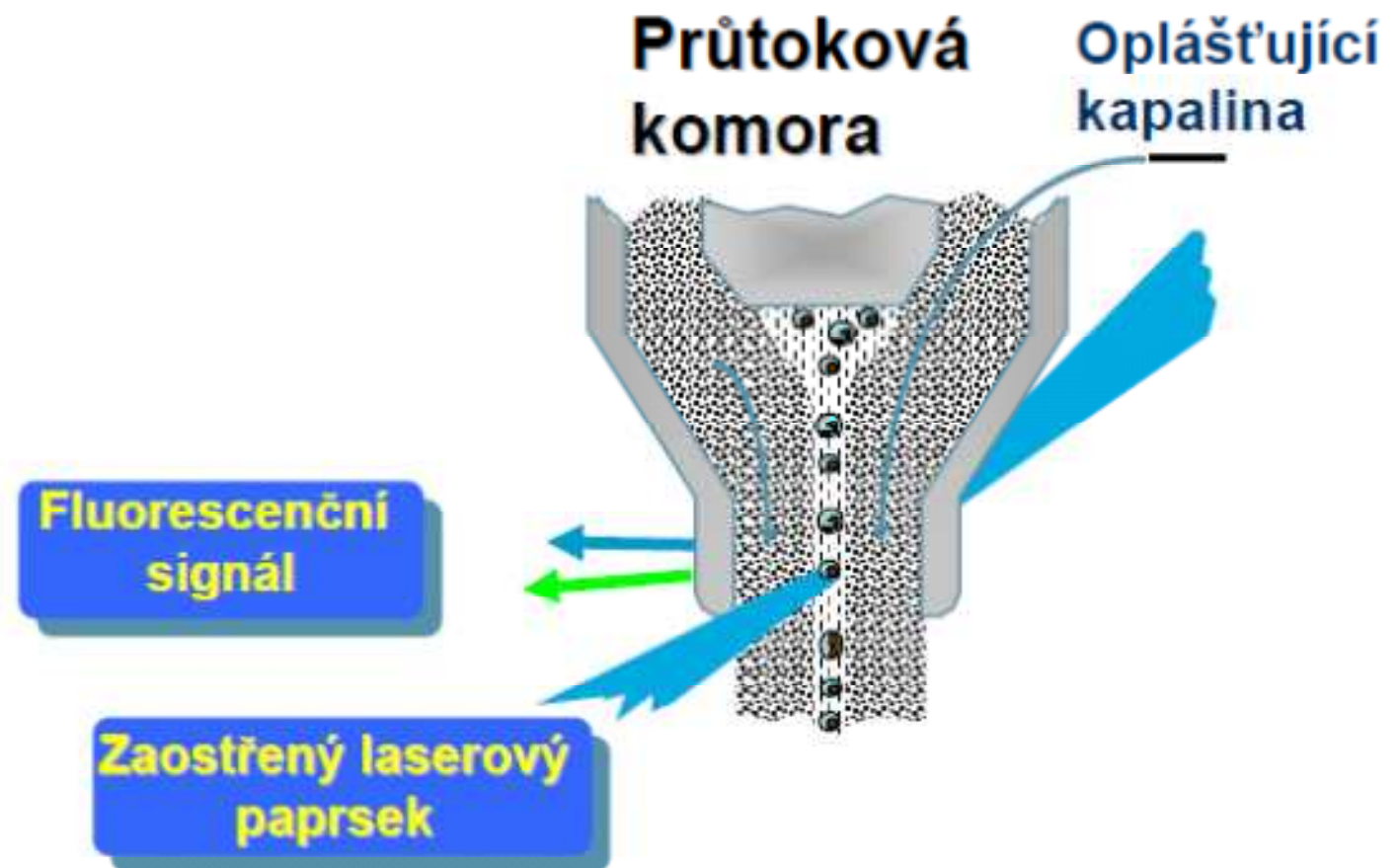


Průtokové systémy a hydrodynamika

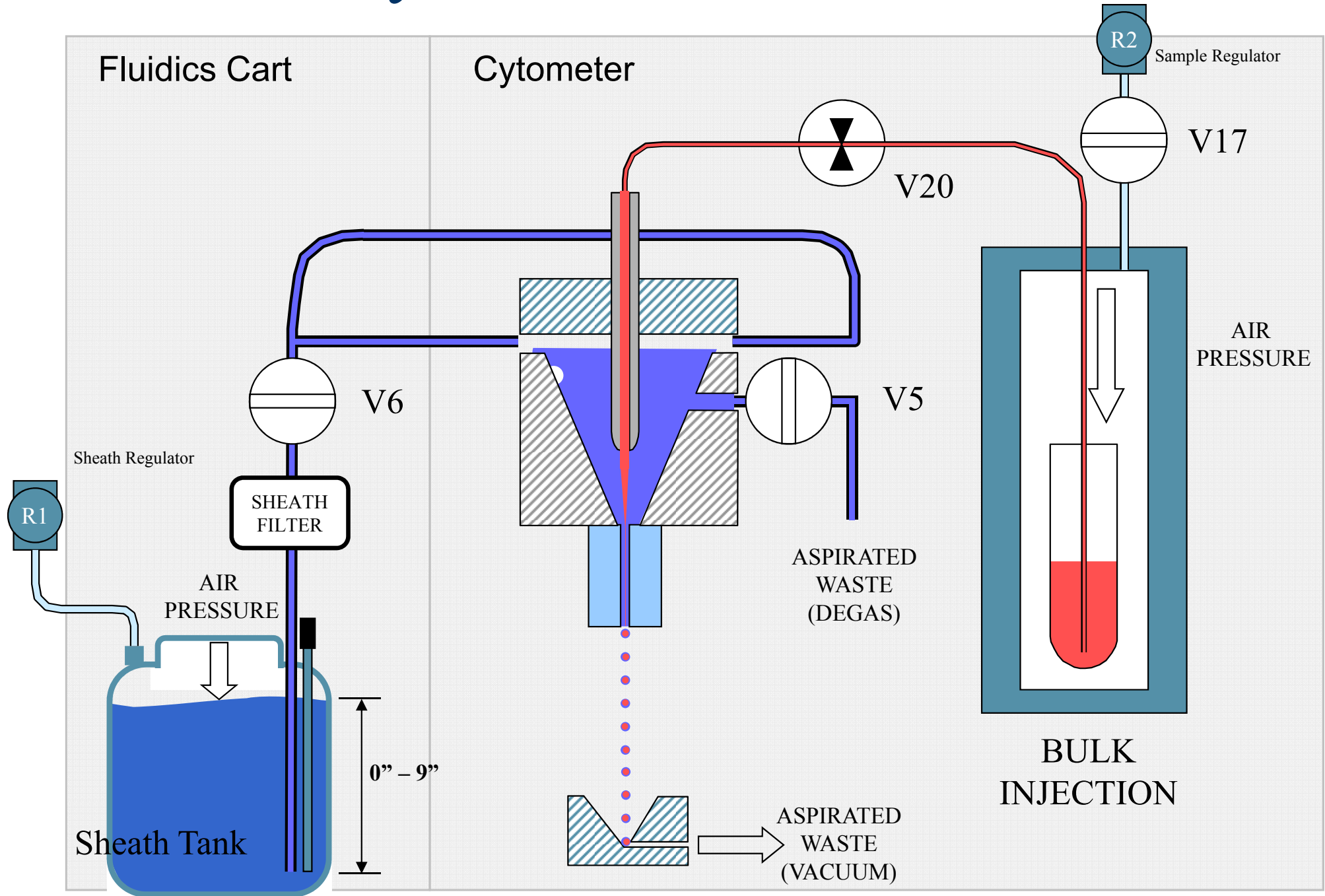
Getting the cells in the right place (at the right time)! (Shapiro, pp 133-143 - 3rd ed)

Průtoková cytometr:

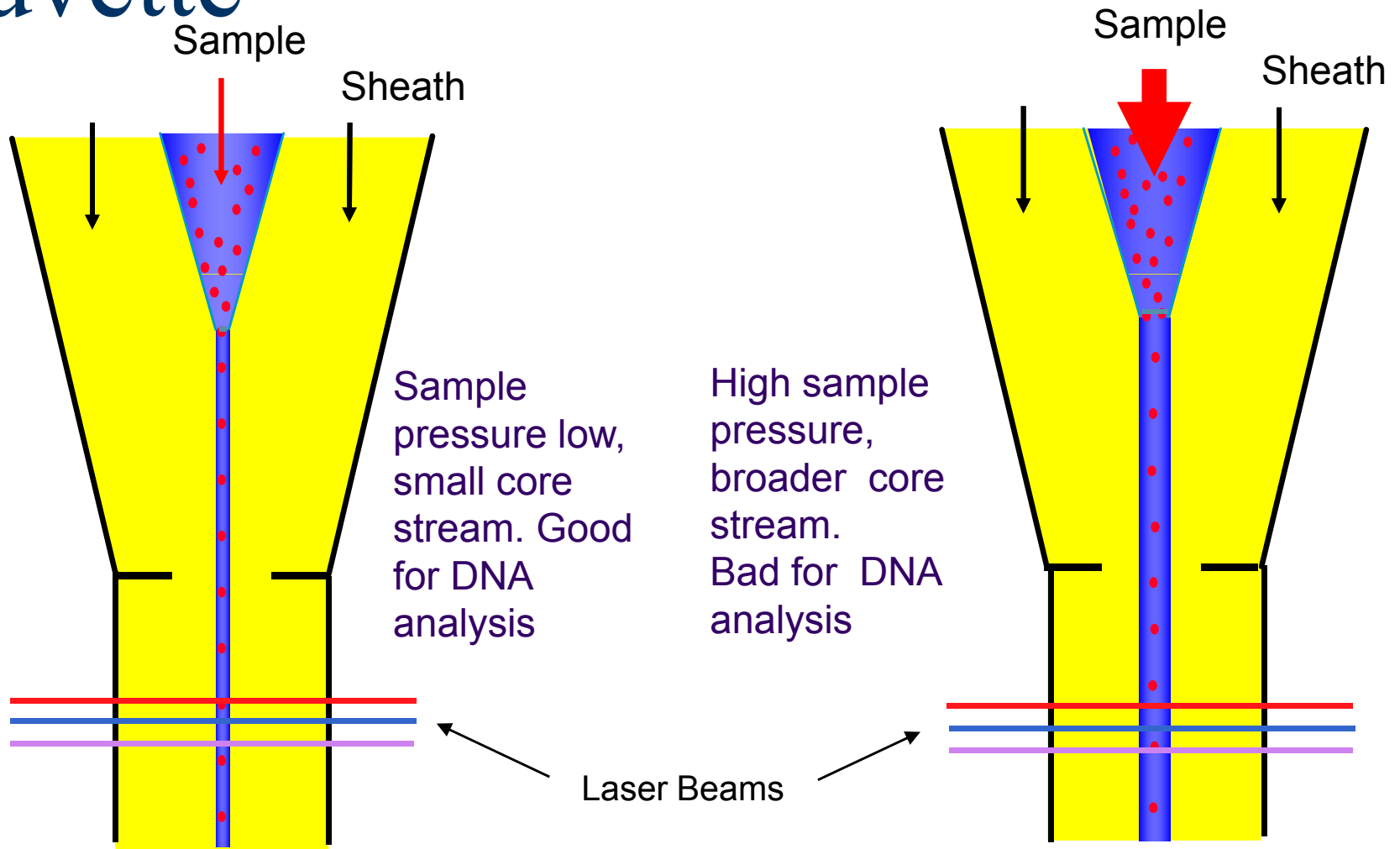
Pomocí hydrodynamicky zaostřeného fluidního systému analyzuje buňky v zaostřeném světelném paprsku (laseru).



Fluidní systém: BD FACSAria II



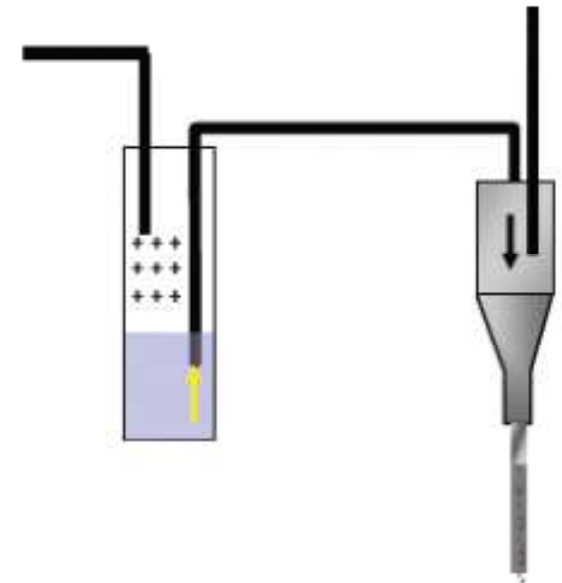
Hydrodynamic focussing in the cuvette



Fluidní systém

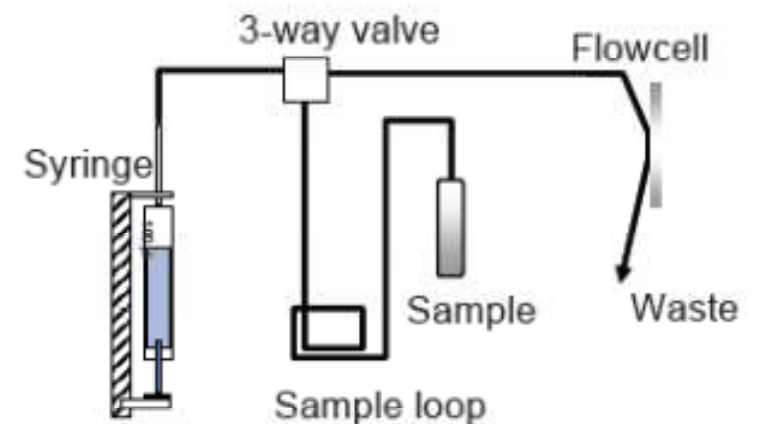
Pozitivní tlakový systém

- 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



wikipedia.org

Fluidika - Laminární vs. turbulentní proudění

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



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



Fluidika - Laminární proudění

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

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

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

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



Fluidika

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

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

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

Hydrodynamic Focusing and Electronic Cell-Sizing Techniques

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

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

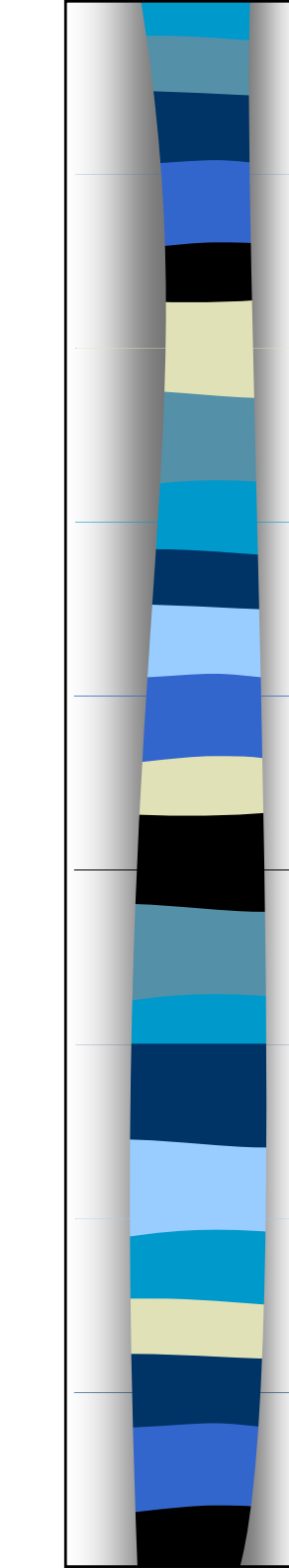
Received for publication 24 May 1972

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



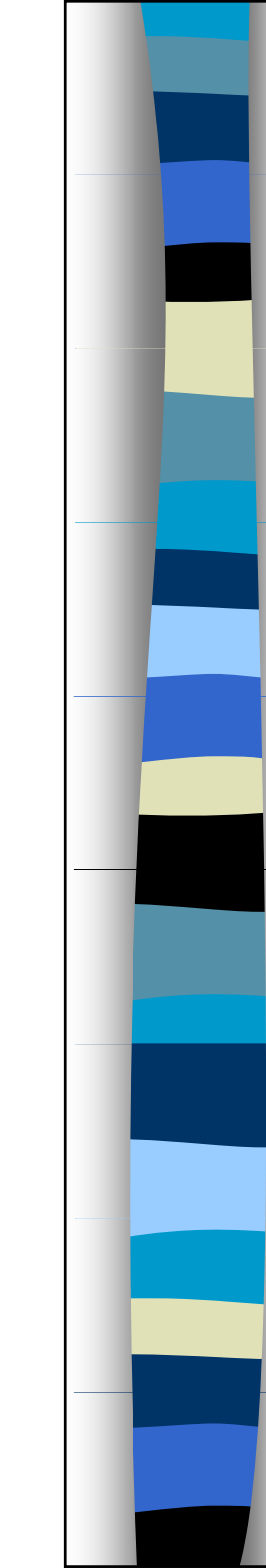
Fluidika

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



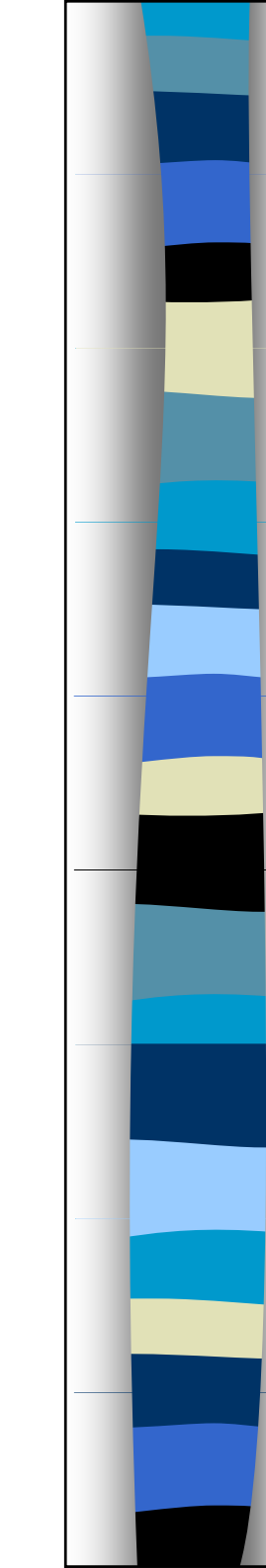
Fluidika – systém s rozdílným tlakem

- Pomocí vzduchu se ntlakuje 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

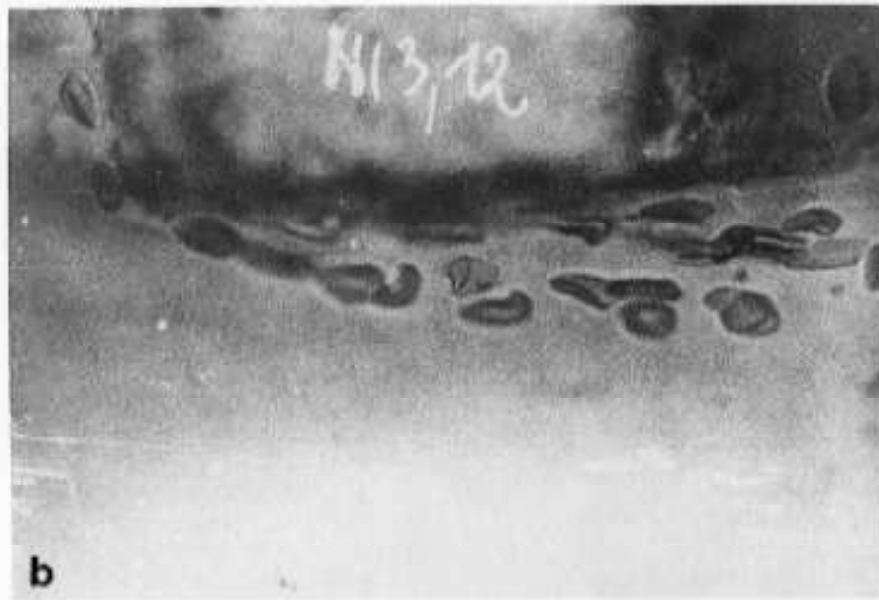
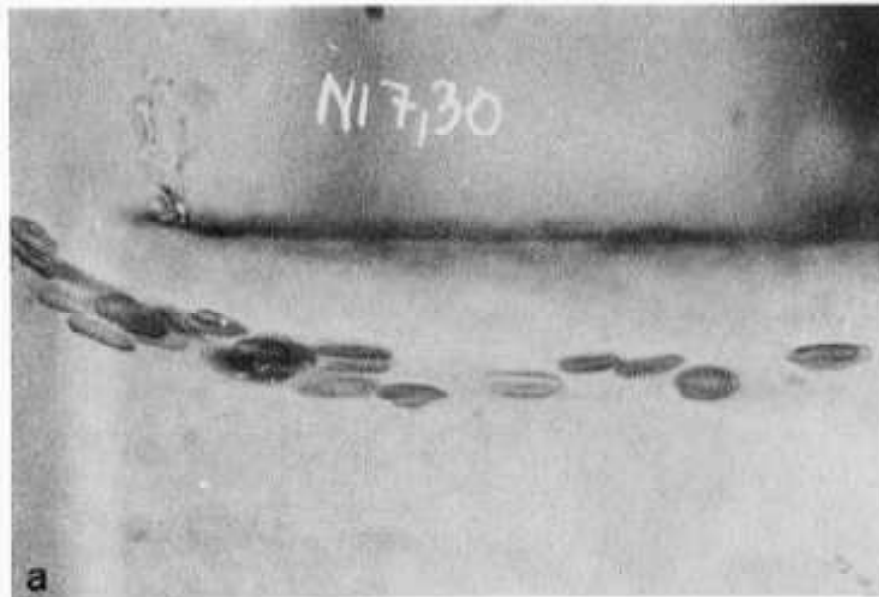
- Pomocí vzduchu tlakuje nosnou kapalinu
- Pomocí pístu injikuje vzorek
- **Objem proudícího vzorku** může být regulován rychlostí pohybu pístu
- Kontrola je úplná (za normálních podmínek)



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.”

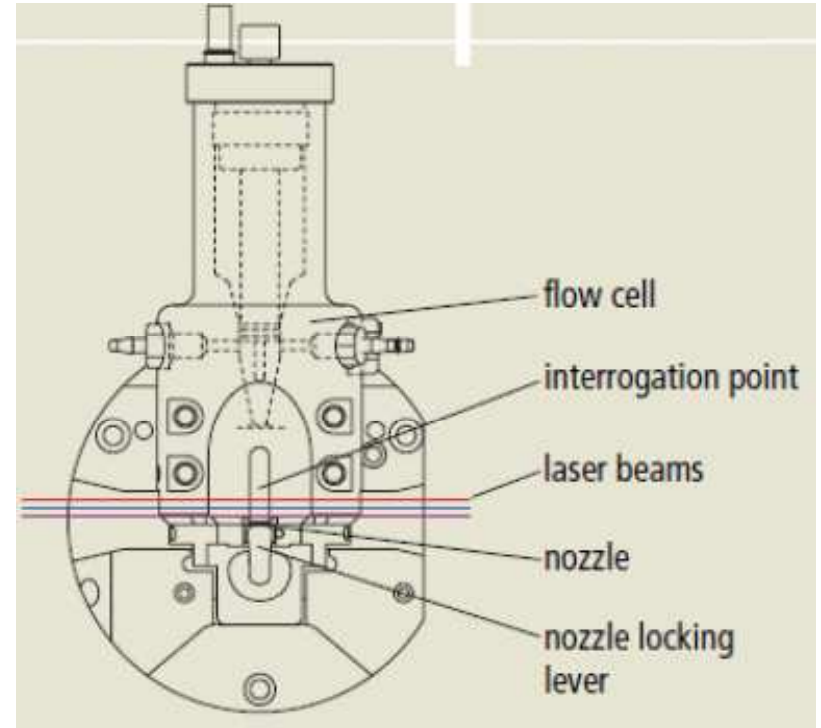
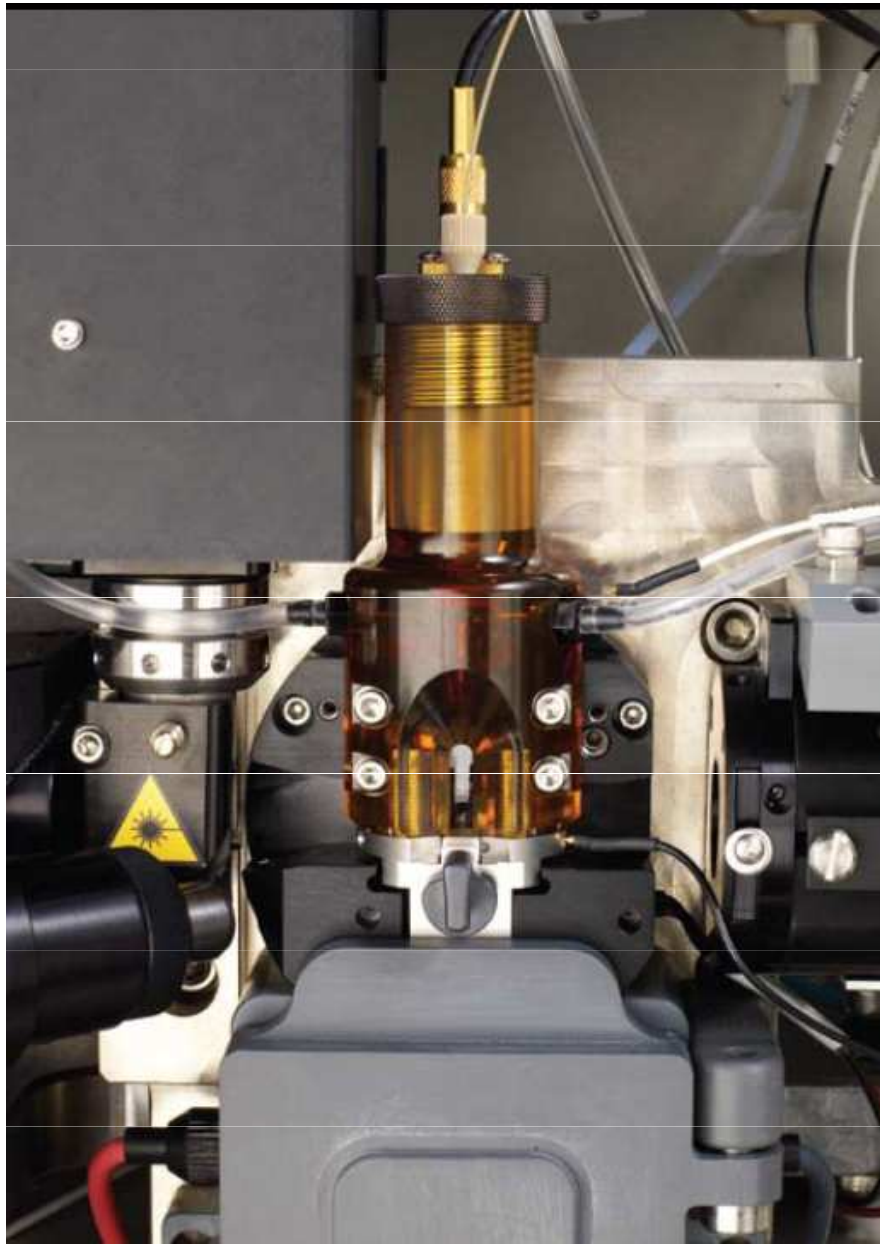
Image from V. Kachel, et al. – **Melamed**
Chapt. 3



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

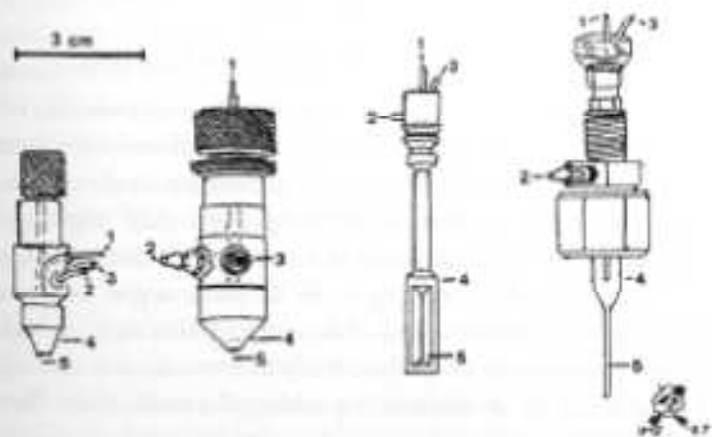
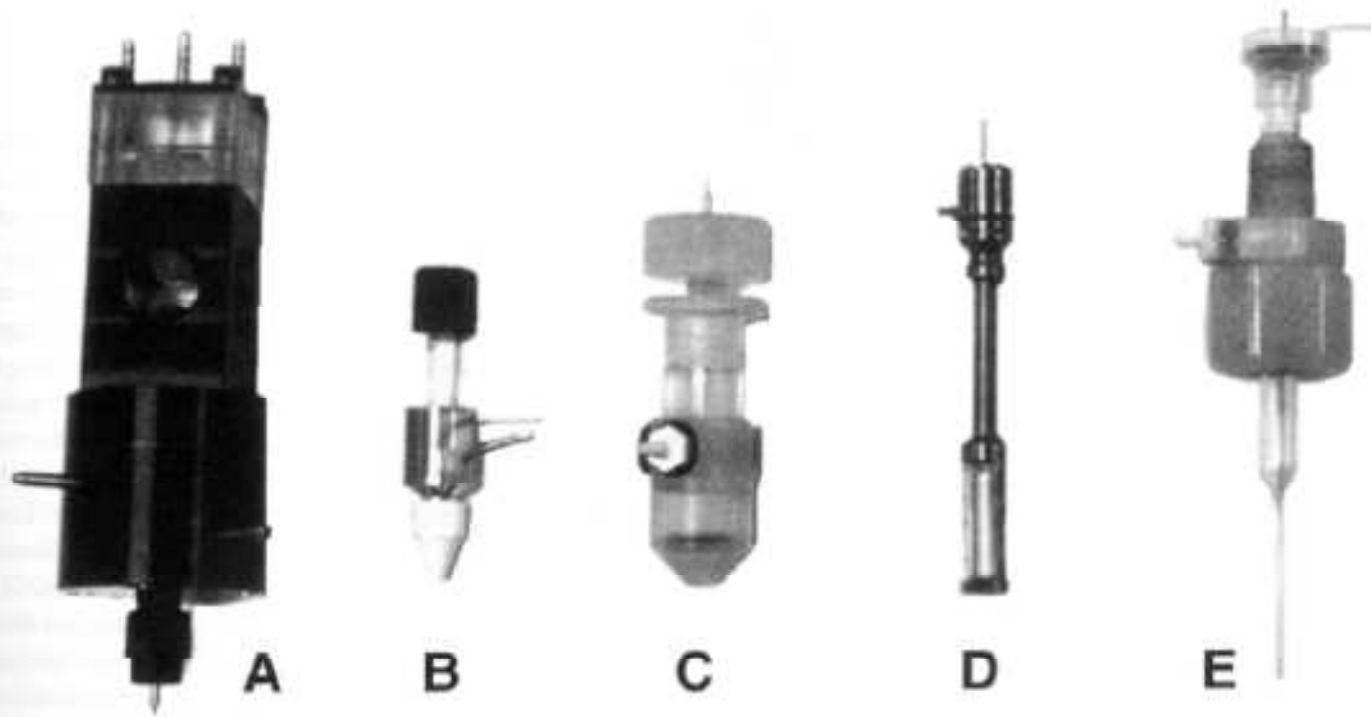
- Výborné optické vlastnosti, může být použita pro sortování

– Closed cross flow

- Nejlepší optické charakteristiky, nelze sortovat

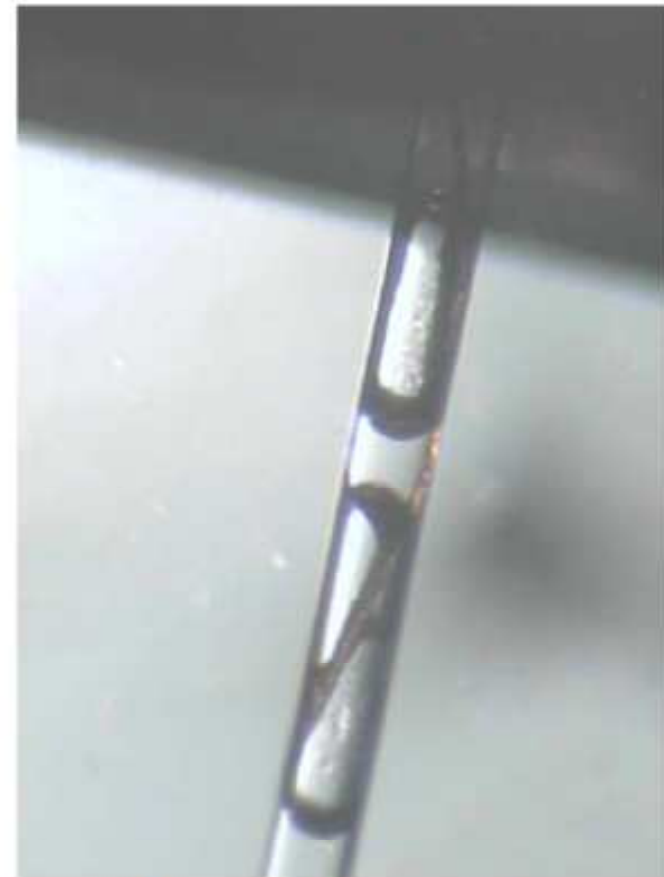
– Open flow across surface

- Nejlepší optické charakteristiky, nelze sortovat



Cuvette flow cell and nozzle

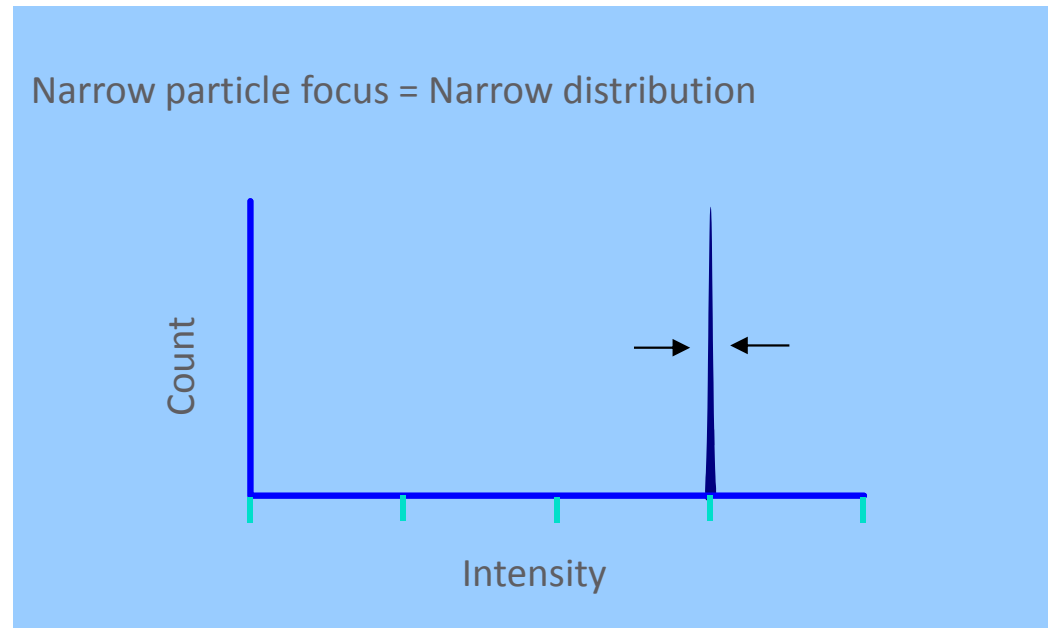
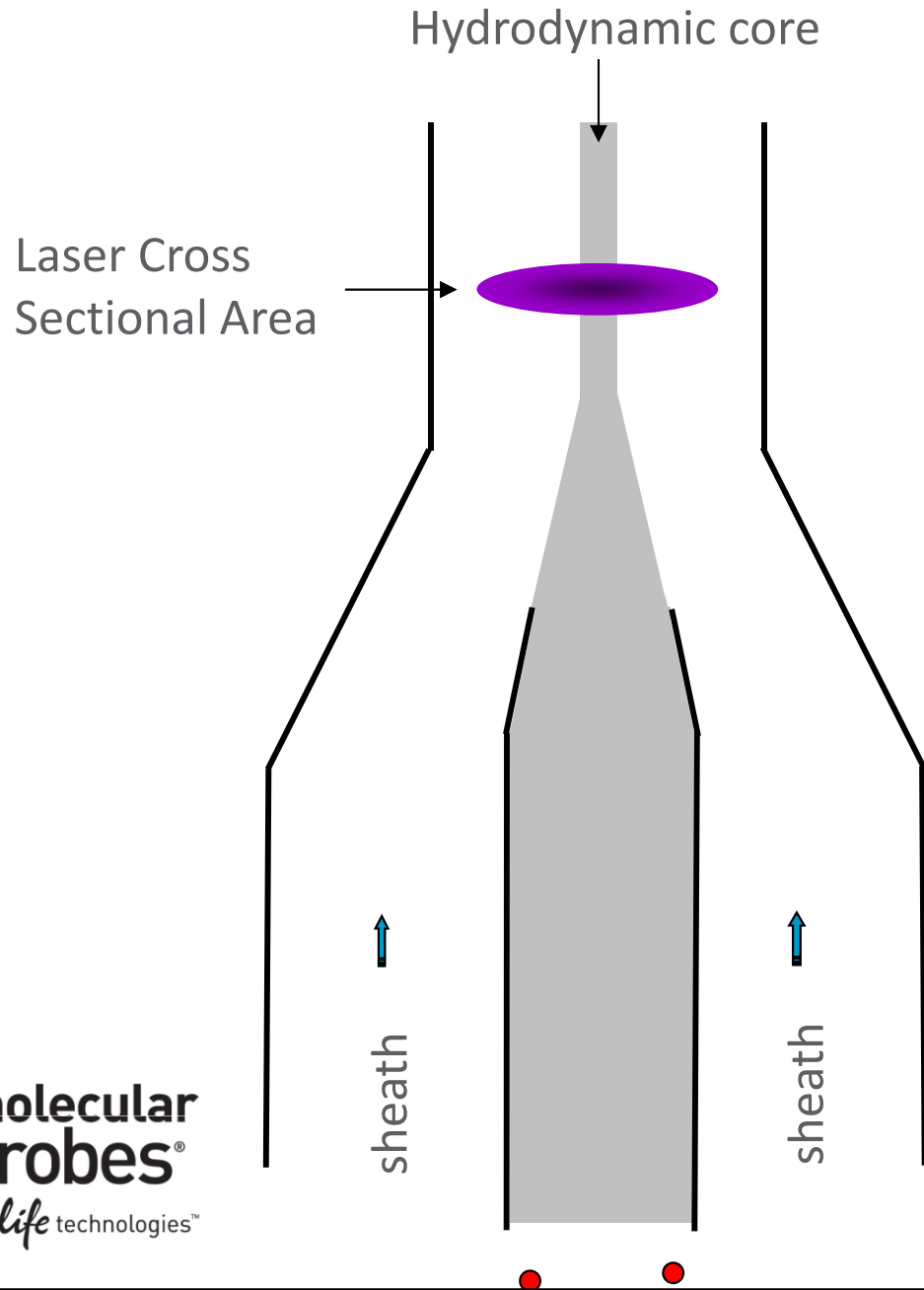
Zanesení průtokové komory



Lidský vlas zablokuje komoru a kompletně naruší kvalitu proudění.

Particle Delivery: Hydrodynamic Focusing

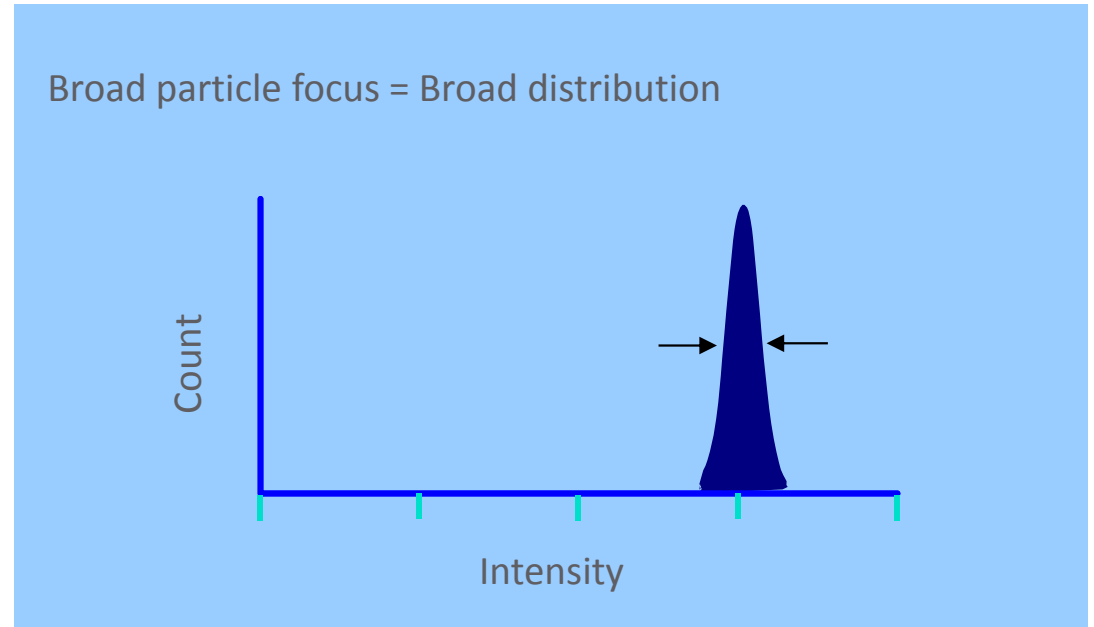
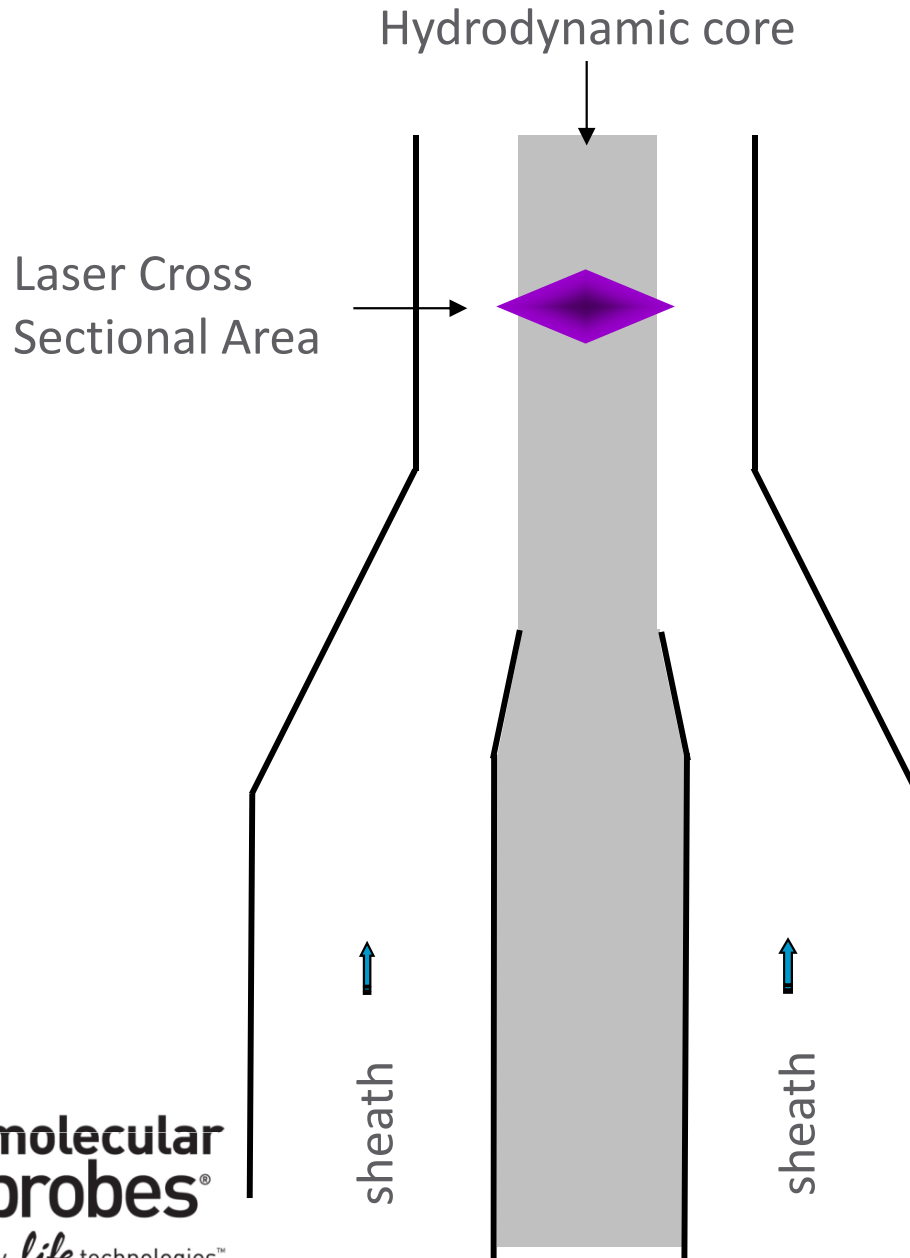
Conventional Instrumentation: **Low Flow Rates (12 μ L/min)**



- 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

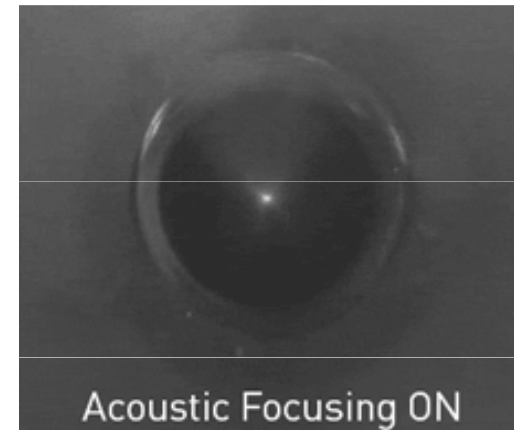
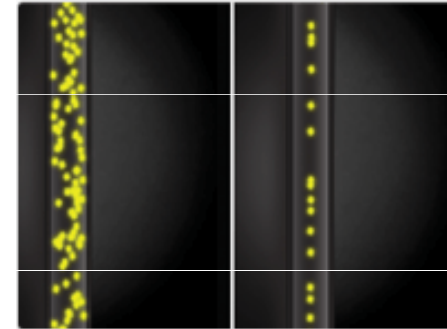
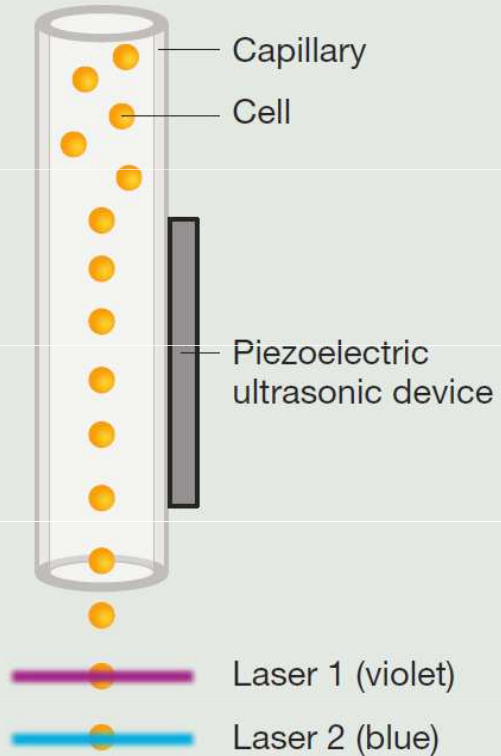
Conventional Instrumentation: **High Flow Rate (60 μ L/min)**



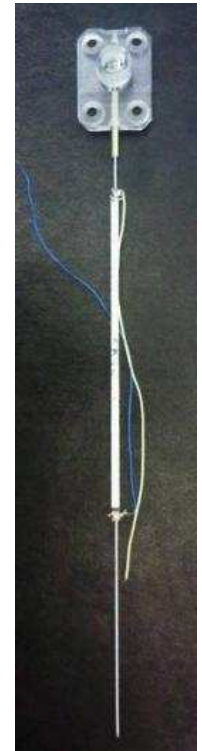
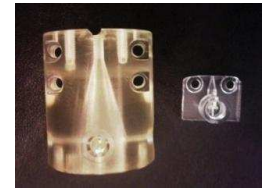
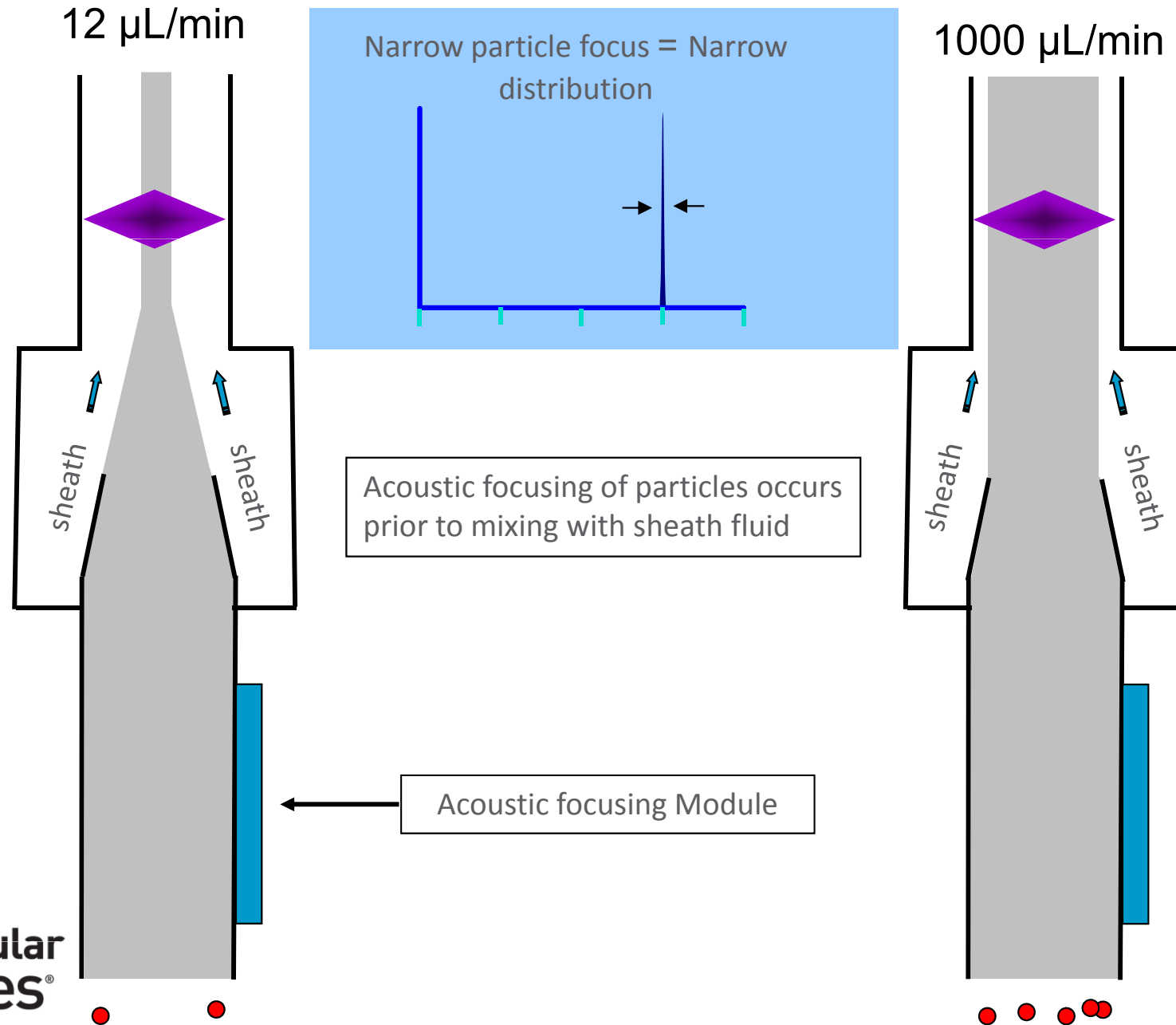
- Increased sample input = increase core size
- Particle distributions broadened, CVs increase
- Instrument resolution decreased
- Historically, low volumetric sample rates used (25 μ L/min – 150 μ L/min)

Attune® Acoustic Focusing Cytometer

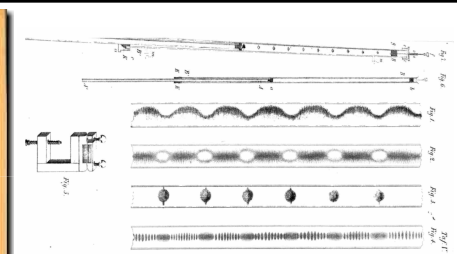
Acoustic focusing cytometry



Acoustic Focusing = Better Precision



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.



Using acoustic radiation force as a concentration method for erythrocytes

Kenji Yasuda,^{a)} Stephan Shuichi Haupt, and Shin-ichiro Unemura
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 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]

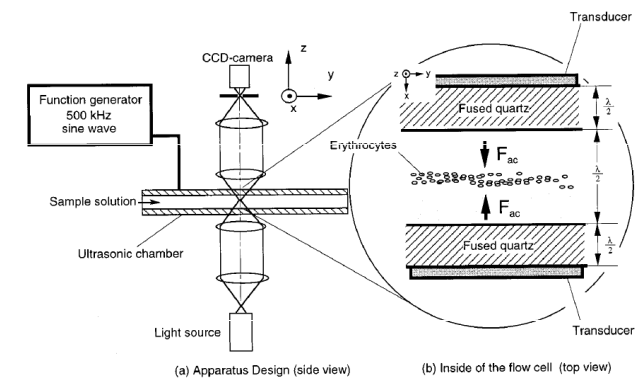
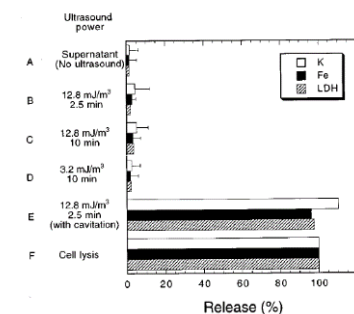
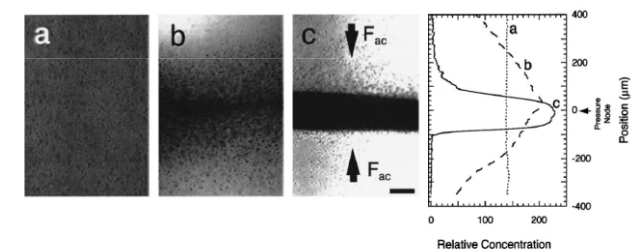


FIG. 1. Schematic diagram of the apparatus for concentration of erythrocytes.





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**

(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

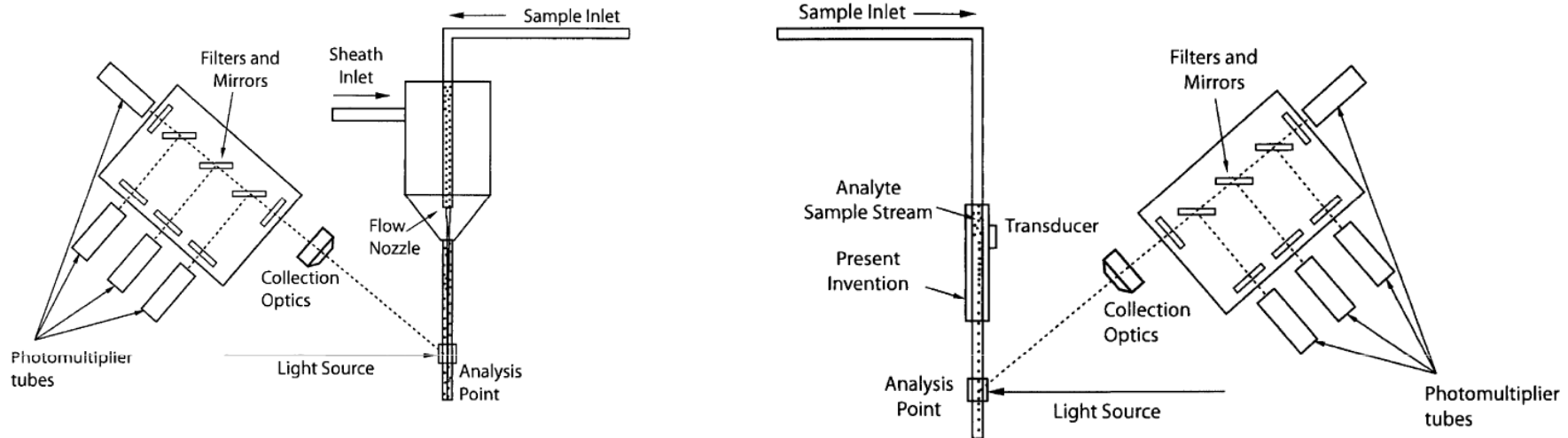
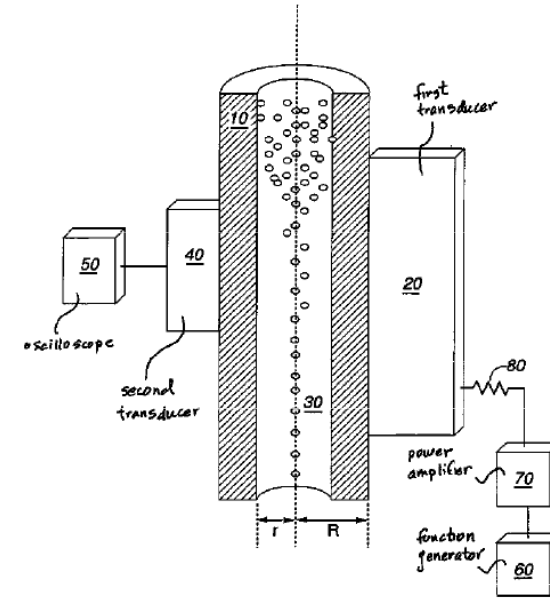
FOREIGN PATENT DOCUMENTS

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

OTHER PUBLICATIONS

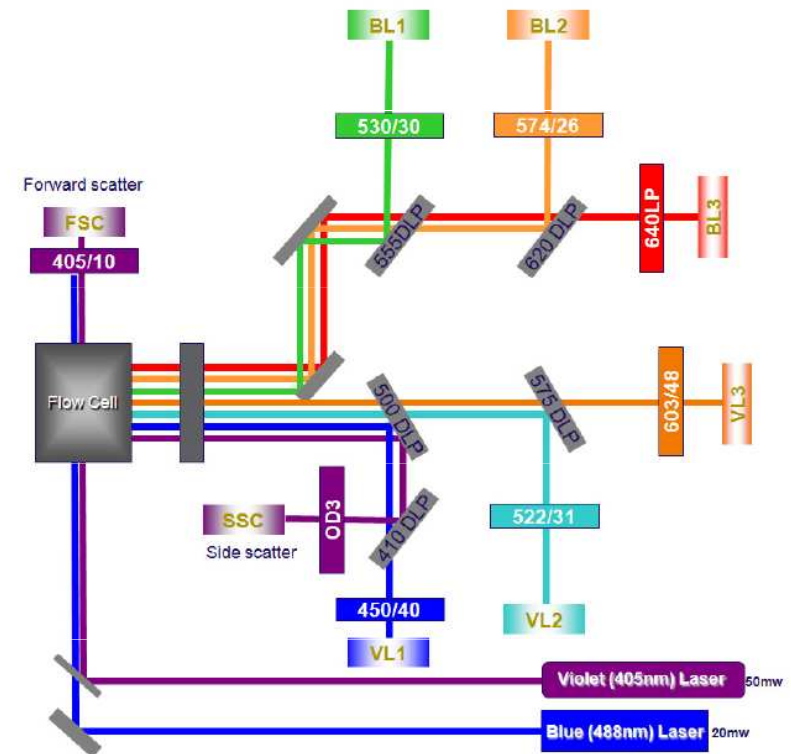
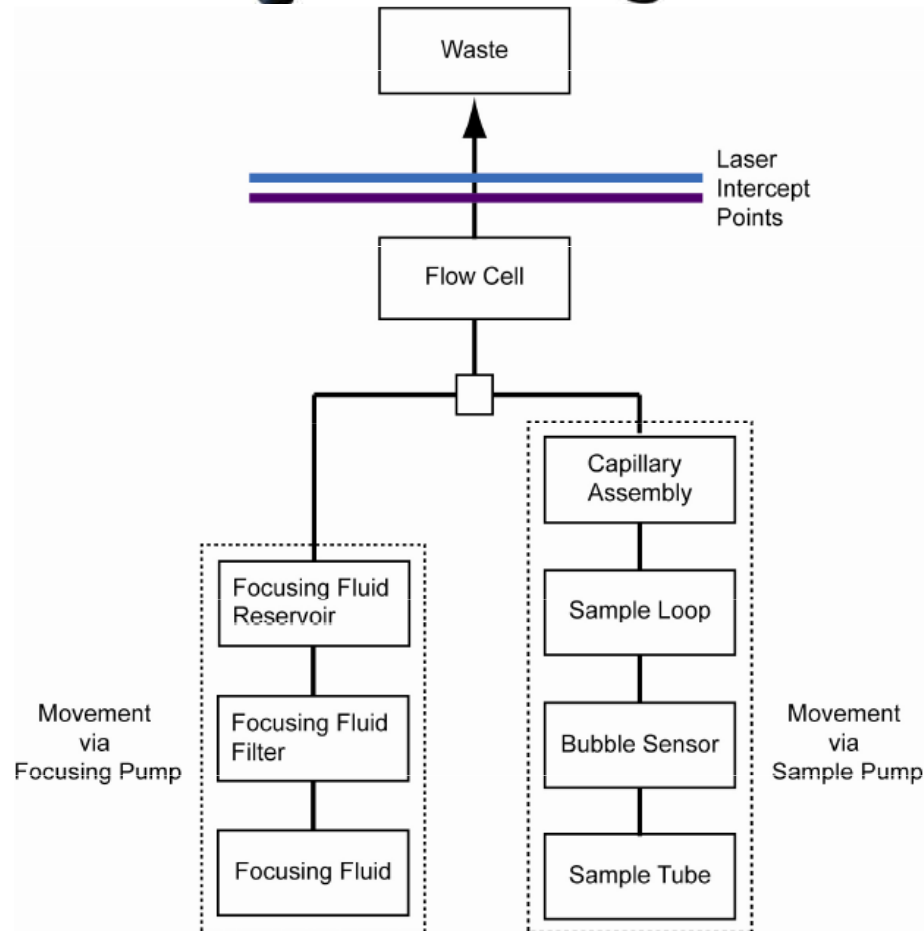
King, L. V., "On the acoustic radiation on spheres," *Proc. R. Soc. A.*, 147, 212-240, (1933).

(Continued)





life
technologies



Attune NxT (2nd generation)

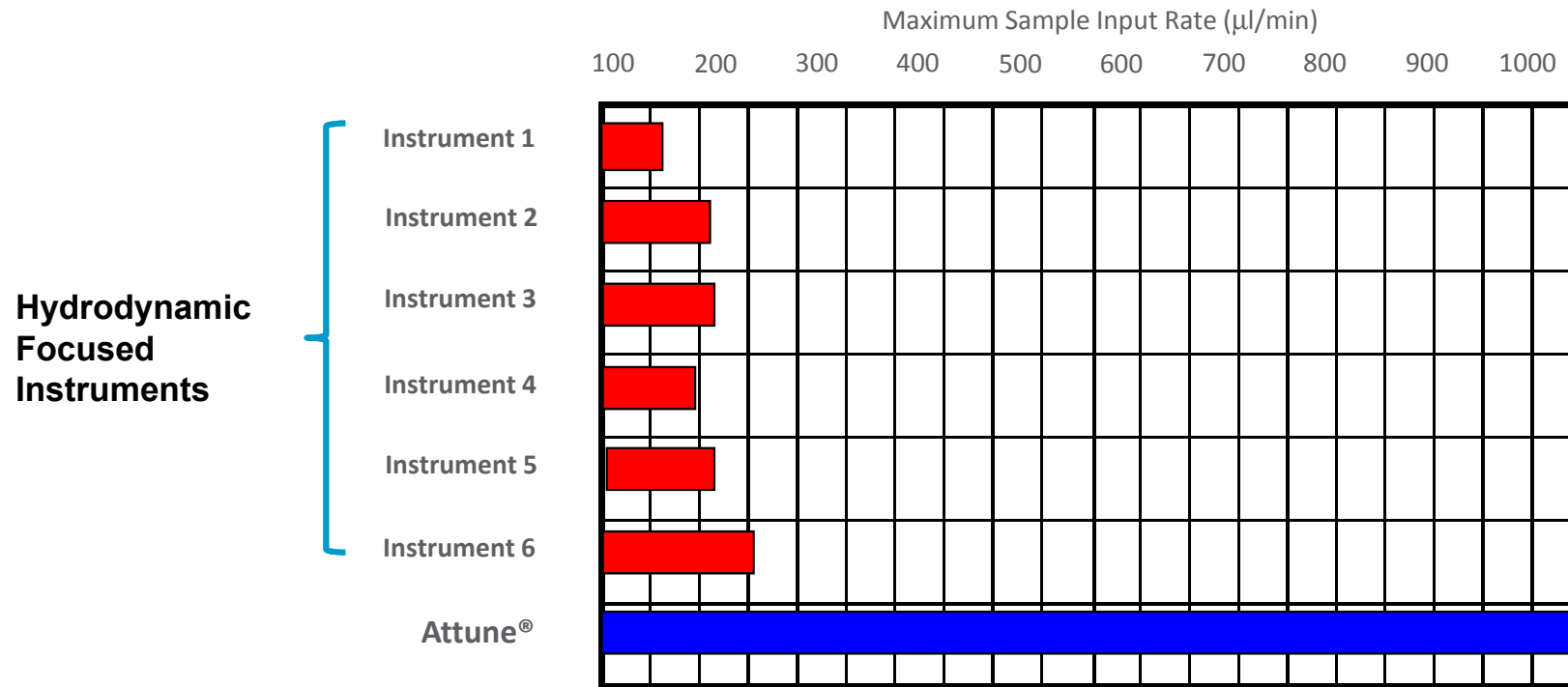
ThermoFisher
SCIENTIFIC



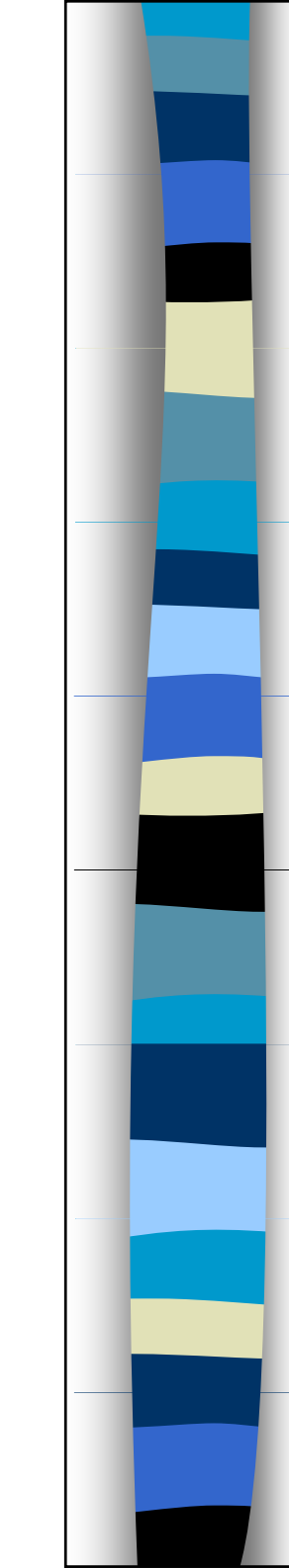
Lasers	Laser configuration (Cat. No.)	Violet 405 nm	Blue 488 nm	Yellow 561 nm	Green 532 nm	Red 637 nm	Total detection channels*
1	Blue (A24864)	Available as upgrade	4	Available as upgrade	Available as upgrade	Available as upgrade	6
2	Blue/green (A28995)	Available as upgrade	3	–	4	Available as upgrade	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 zároveň buňky v kyvetě „jako perly na šňůrce“ předtím než dojdou do bodu kde protnout paprsek laseru.
monika.dolejska@gmail.com
- Hydrodynamické zaostření nemůže oddělit buněčné agregáty. Průtoková cytometrie vyžaduje suspenzi jednotlivých buněk!



Elektronika

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



Sběr dat

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

Flow Cytometry Standard data file format. FCS 3.1

http://www.isac-net.org/images/stories/documents/Standards/fcs3.1_normativespecification_20090813.pdf

Spidlen, J. *et al.* *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **77**, 97-100, (2010).

```

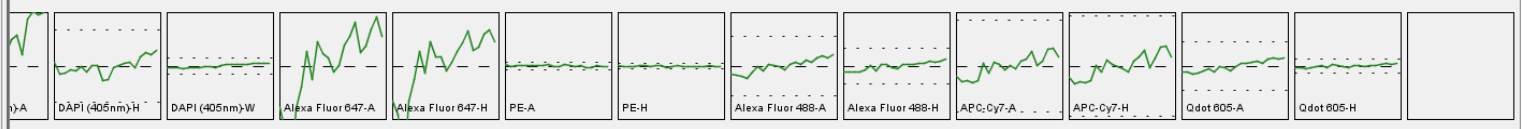
Date:17-JUL-2015
System:Windows XP 5.1
Cytometer:FACSAriaII SORP (FACSAriaII)
File:150717_DU145 Ctrl.fcs
File URI:file://C:/Users/user/Desktop/install/Infinicyt/150717_DU145%20Ctrl.fcs
-----
$BEGINANALYSIS: 0
$BEGINDATA: 4148
$BEGINTEXT: 0
$BTIM: 13:25:01
$BYTEORD: 4,3,2,1
$CYT: FACSAriaII SORP (FACSAriaII)
$DATATYPE: F
$DATE: 17-JUL-2015
$ENDANALYSIS: 0
$ENDDATA: 6055267
$ENDTEXT: 0
$ETIM: 13:28:55
$FIL: 150717_DU145 Ctrl.fcs
$INST: IBP
$MODE: L
$NEXTDATA: 0
$OP: fedr
$PAR: 19
$SRC: 150717
$SYS: Windows XP 5.1
$TIMESTEP: 0.01
$TOT: 79620
APPLY COMPENSATION: TRUE
AUTOBS: TRUE
CREATOR: BD FACSDiva Software Version 6.1.3
CST BASELINE DATE: 03_24_2015 12:52:48 PM
CST BEADS LOT ID: 91725
CST SETUP DATE: 03_25_2015 03:01:55 PM
CST SETUP STATUS: SUCCESS WITH WARNING
CYTNUM: PSY500001
CYTOMETER CONFIG CREATE DATE: 05_13_2013 01:32:45 PM
CYTOMETER CONFIG NAME: RF_85u 45 psi_SORP Aria_5-laser (2uv-6v-3b-5yg-3r)
EXPERIMENT NAME: DU145_POPRO1_LDYellow_AF488_AF594_PE_APCCy7
EXPORT TIME: 17-JUL-2015-14:30:11
EXPORT USER NAME: fedr
FJ_FCS_VERSION: 3
FSC ASF: 0.57
GUID: dc7612a3-65af-4520-bc0f-51d53273ebee
LASER1ASF: 0.86
LASER1DELAY: 0.00
LASER1NAME: Blue
LASER2ASF: 0.86
LASER2DELAY: -38.47
LASER2NAME: Red
LASER3ASF: 1.02
LASER3DELAY: 77.49
LASER3NAME: UV
LASER4ASF: 0.63
LASER4DELAY: 45.00
LASER4NAME: Violet
LASER5ASF: 0.83
LASER5DELAY: -76.49
LASER5NAME: YG
P10BS: 602
P10DISPLAY: LOG
P10MS: 0
P11BS: 38
P11DISPLAY: LOG
P11MS: 0
P12BS: 5
P12DISPLAY: LOG
P12MS: 0
P13BS: 1118
P13DISPLAY: LOG
    
```

Compensation Matrix

	Alexa Fluor 594-A	DAPI (405nm)-A	Alexa Fluor 647-A	PE-A	Alexa Fluor 488-A	APC-Cy7-A	Qdot 605-A
Alexa Fluor 594-A	100	0.42	1.03	1.34	0.02	0.32	0.30
DAPI (405nm)-A	1.1	100	0.27	0.05	0.01	0.08	0.96
Alexa Fluor 647-A	2.45	22.87	100	0.1	0.08	15.14	0.85
PE-A	440.67	0	0.14	100	8.03	0.03	32.23
Alexa Fluor 488-A	-0.01	0.09	0.01	0	100	0	0.05
APC-Cy7-A	0.01	0.04	2.67	0	0.05	100	0.01
Qdot 605-A	0	41.05	0	0	2.34	0	100

Parameters and Stains

Parameter (\$PnI)	Stain (\$PnS)	Range (\$PnR)	Bits (\$PnB)	Decades (\$PnE)	Gain (\$PnG)	Voltage (\$PnV)	Derived From
FSC-A		262144	32	0.0	1.0	280	
FSC-H		262144	32	0.0	1.0	280	
SSC-A		262144	32	0.0	1.0	210	
Alexa Fluor 594-A		262144	32	0.0	1.0	460	
Alexa Fluor 594-H		262144	32	0.0	1.0	460	
DAPI (405nm)-A		262144	32	0.0	1.0	650	
DAPI (405nm)-H		262144	32	0.0	1.0	650	
DAPI (405nm)-W		262144	32	0.0	1.0	650	
Alexa Fluor 647-A		262144	32	0.0	1.0	538	
Alexa Fluor 647-H		262144	32	0.0	1.0	538	
PE-A		262144	32	0.0	1.0	330	
PE-H		262144	32	0.0	1.0	330	
Alexa Fluor 488-A		262144	32	0.0	1.0	366	
Alexa Fluor 488-H		262144	32	0.0	1.0	366	
APC-Cy7-A		262144	32	0.0	1.0	700	
APC-Cy7-H		262144	32	0.0	1.0	700	
Qdot 605-A		262144	32	0.0	1.0	410	
Qdot 605-H		262144	32	0.0	1.0	410	
Time		262144	32	0.0			
Comp-Alexa Fluor 594-A		262144			0.01		
Comp-DAPI (405nm)-A		262144					
Comp-Alexa Fluor 647-A		262144					
Comp-PE-A		262144					
Comp-Alexa Fluor 488-A		262144					
Comp-APC-Cy7-A		262144					
Comp-Qdot 605-A		262144					

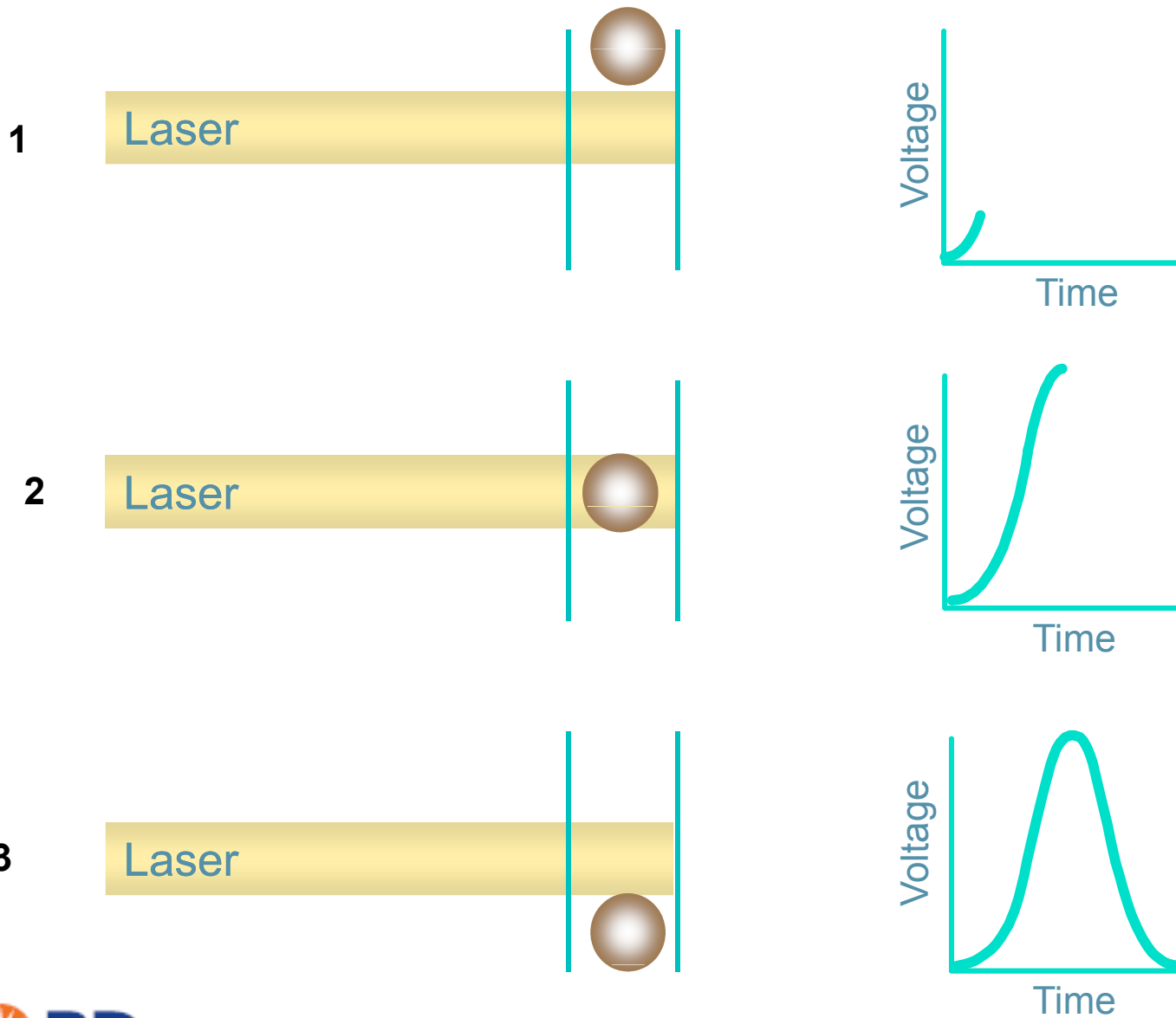




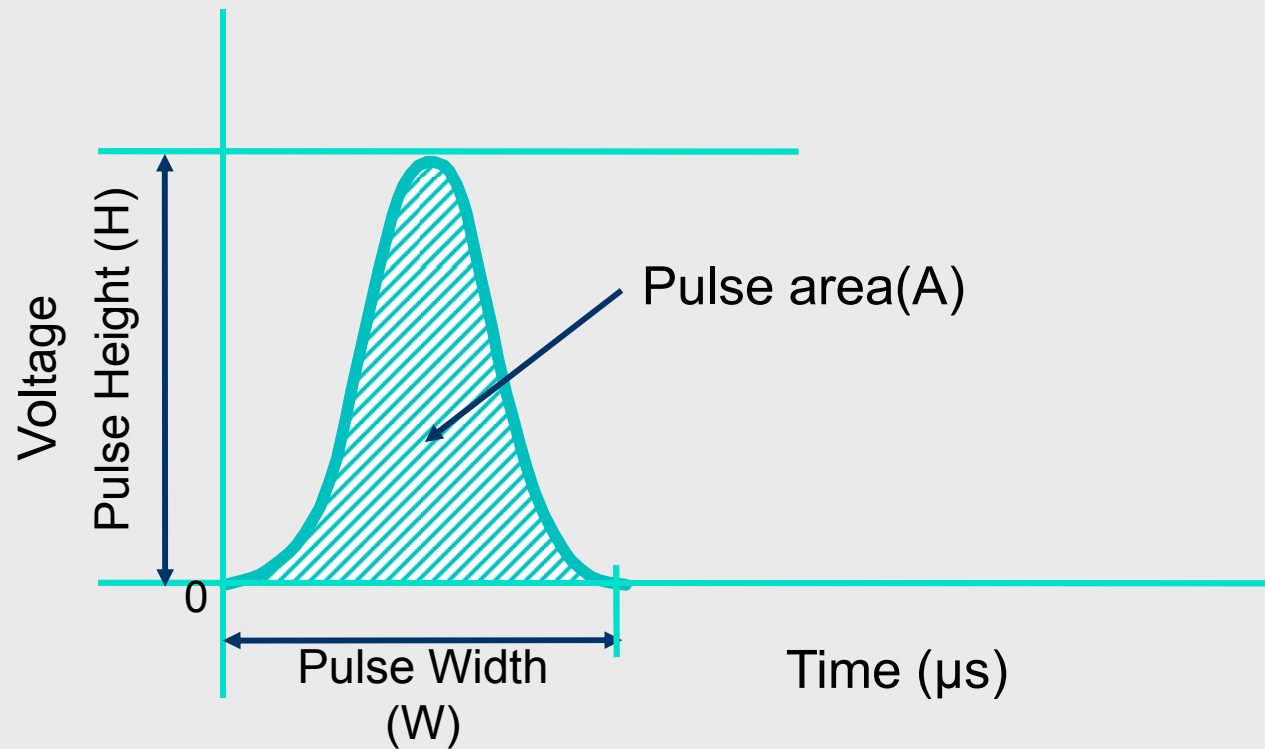
Data Acquisition - Listmode

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

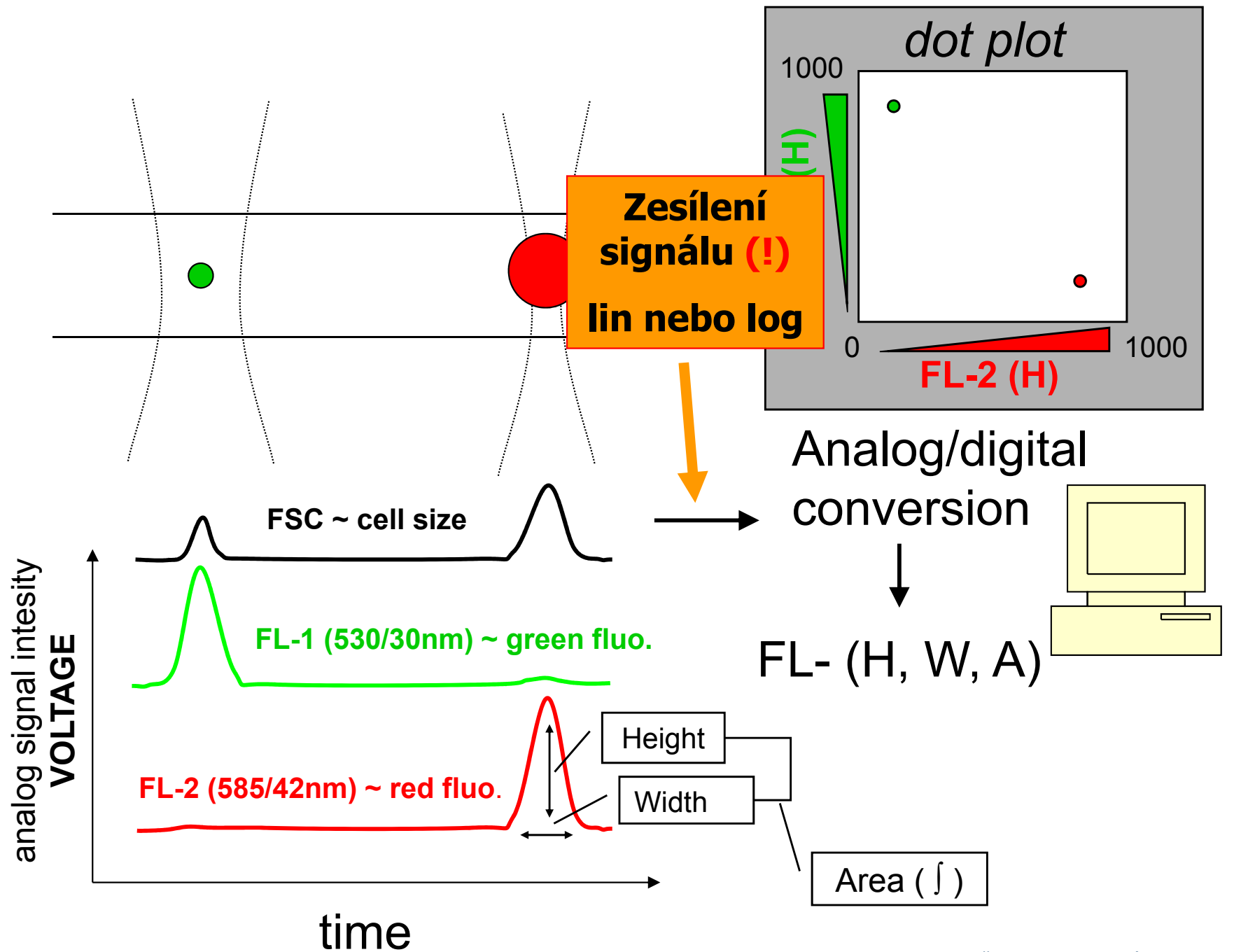
Creation of a Voltage Pulse



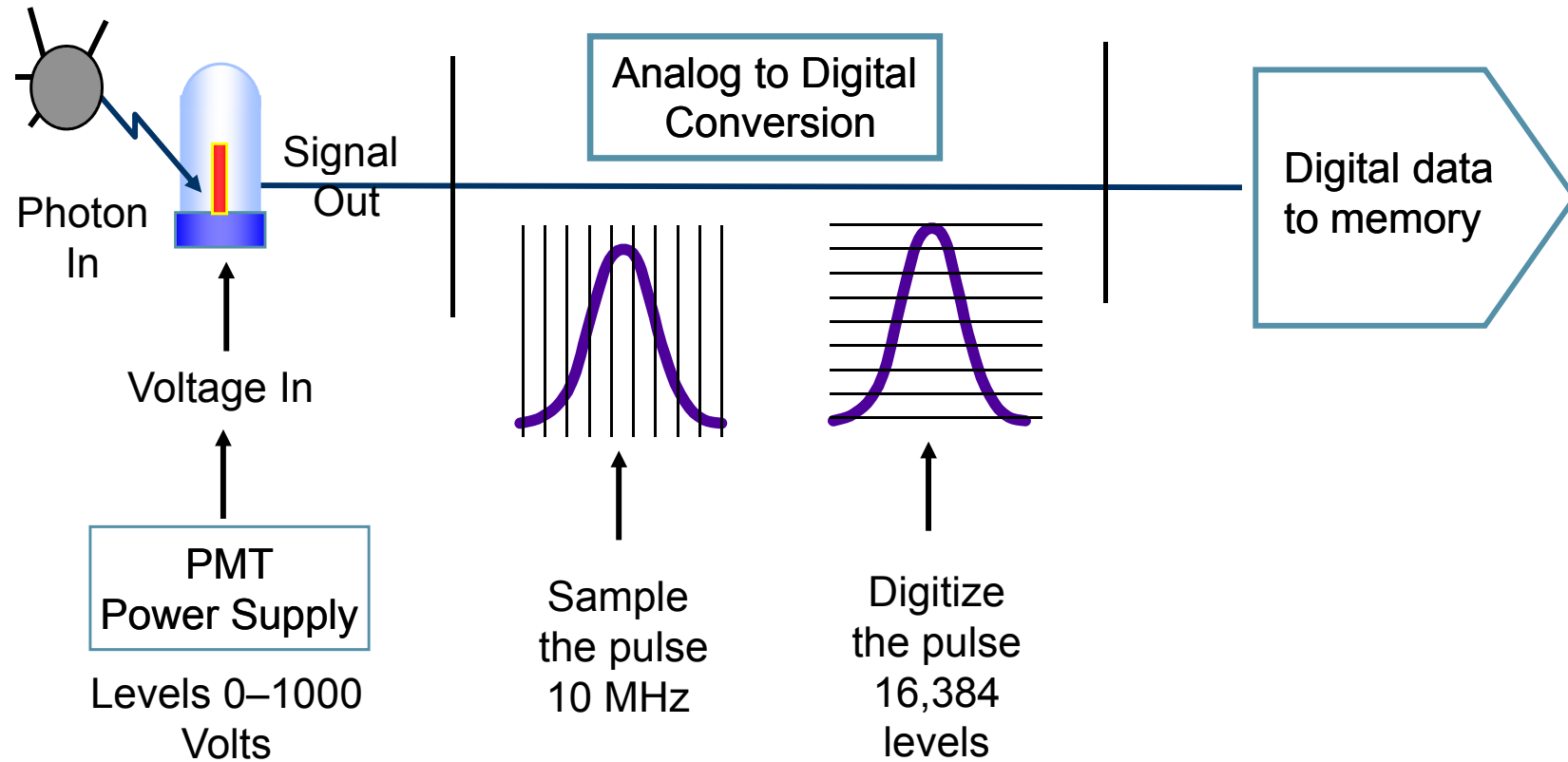
Height, Area, and Width



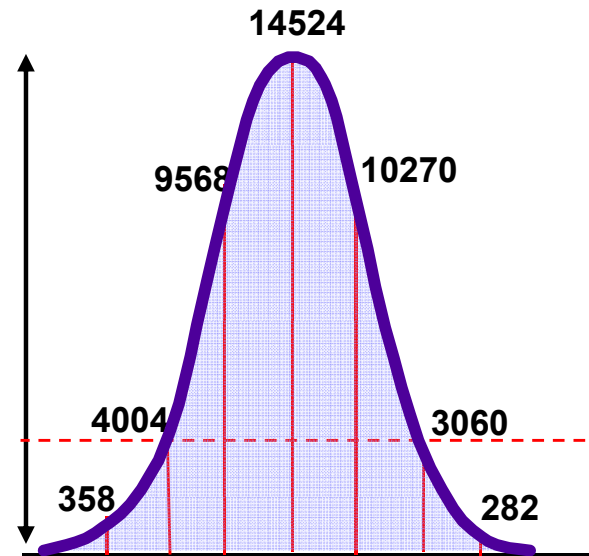
Signal processing



Analog to Digital Converter



Parameters



- Area: Sum of all height values
- Height: Maximum digitized value
X 16
- Width: Area/Height X 64K

Data is displayed on 262,144 scale

$$2^8 = 256$$

$$2^{10} = 1024$$

AD převodníky

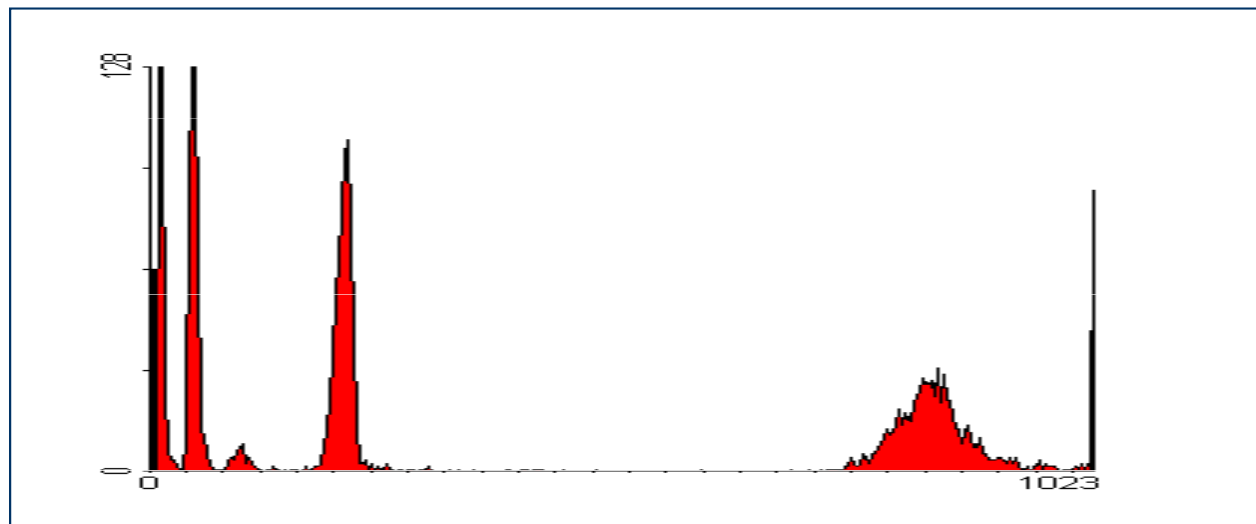
Počet bitů	# kanálů	rozlišení
8	256	39.1 mV
10	1024	9.77 mV
12	4096	2.44 mV
14	16384	610 μ V
16	65536	153 μ V
18	262144	38.1 μV
20	1048576	9.54 μ V
22	4194304	2.38 μ V
24	16777216	596 nV

Full scale measurement range = 0 to 10 volts

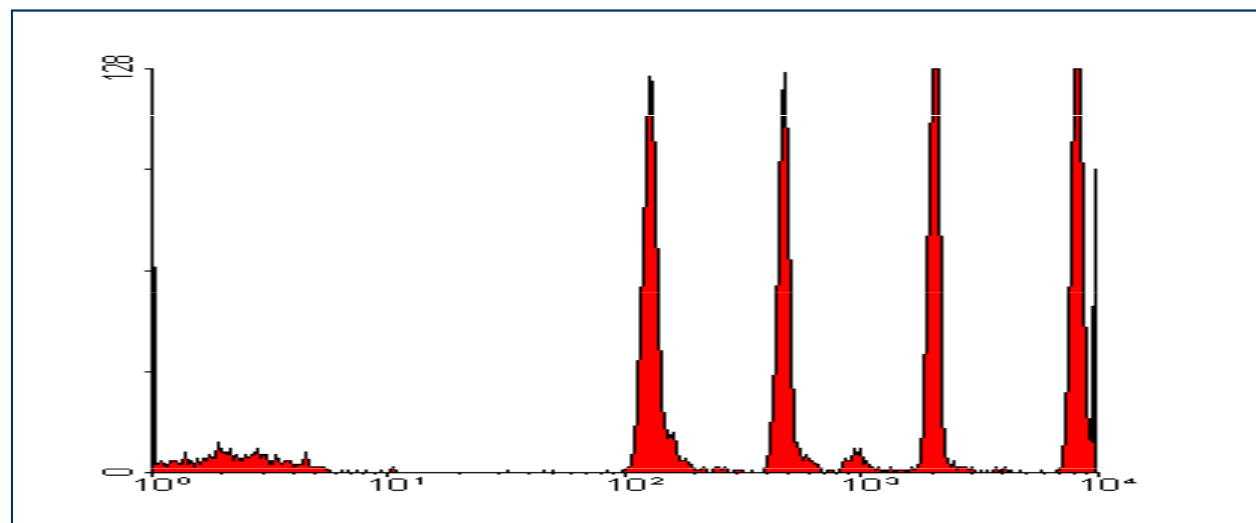
ADC resolution is 12 bits: $2^{12} = 4096$ quantization levels

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

Logaritmické zesílení & dynamický rozsah



lin



log



Charakteristiky pulsu

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



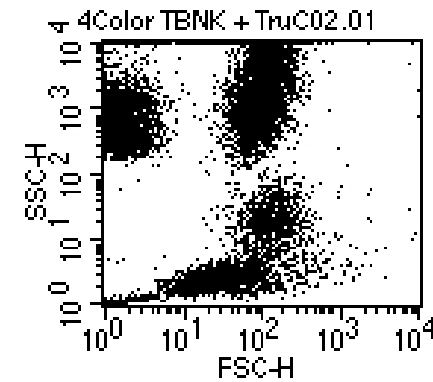
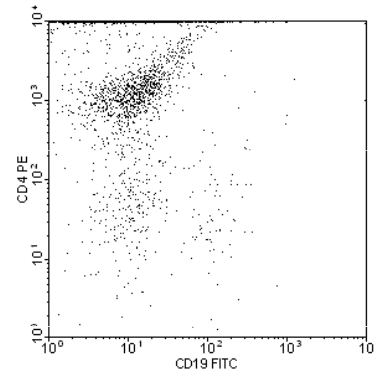
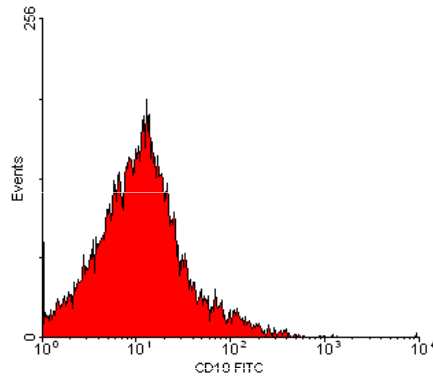
Analýza dat

■ Zobrazení dat

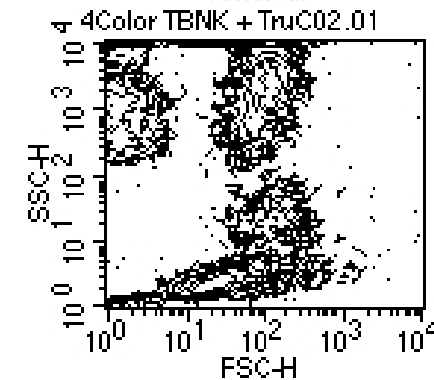
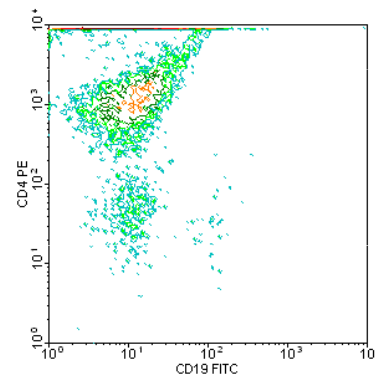
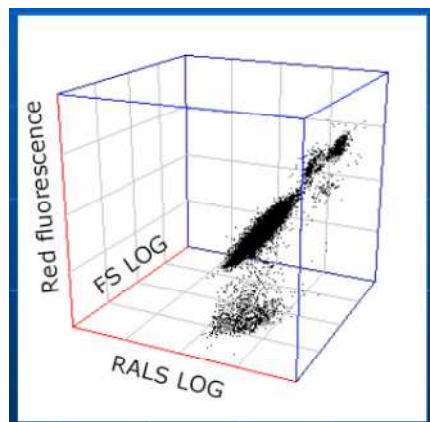
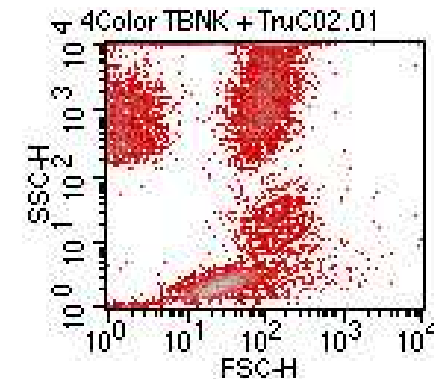
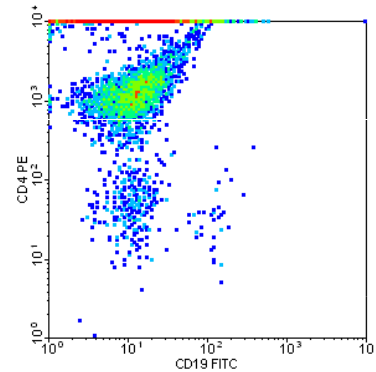
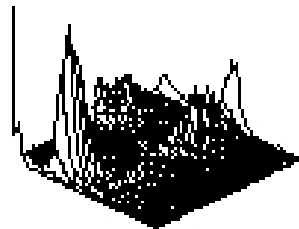
- histogram
- dot plot
- isometric display
- contour plot
- chromatic (color) plots
- 3 D projection

■ Gating

Způsoby pro zobrazení dat



4Color TBNK + TruCD2.01





Shrnutí

- Světlo
- Fluorescence
- Zdroje světla a optické systémy průtokového cytometru
- Fluidní systémy
- Signál, data – základní princip

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.
6. Znat základní princip zpracování a vizualizace dat