

# Bi9393 Analytická cytometrie

## Lekce 2

**Karel Souček, Ph.D.**

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

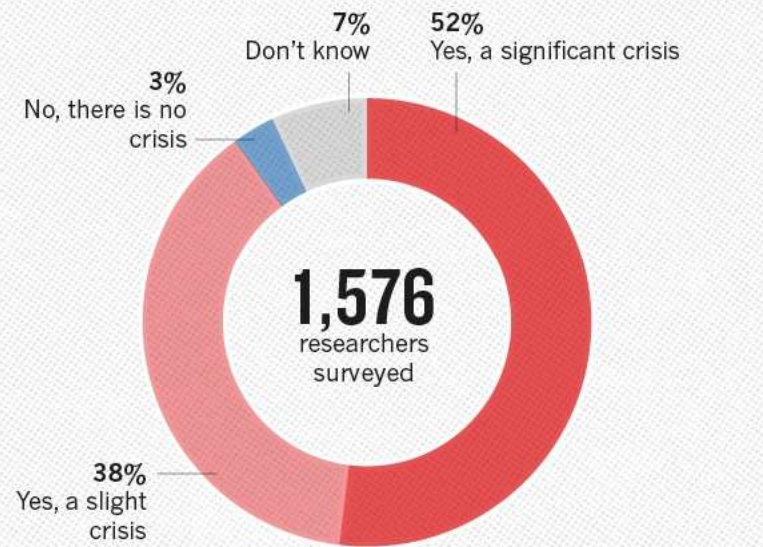
**e-mail: [ksoucek@ibp.cz](mailto:ksoucek@ibp.cz)**  
tel.: 541 517 166

# Reprodukovatelnost výsledků

Nature 533, 452–454 (26 May 2016)

doi:10.1038/533452a

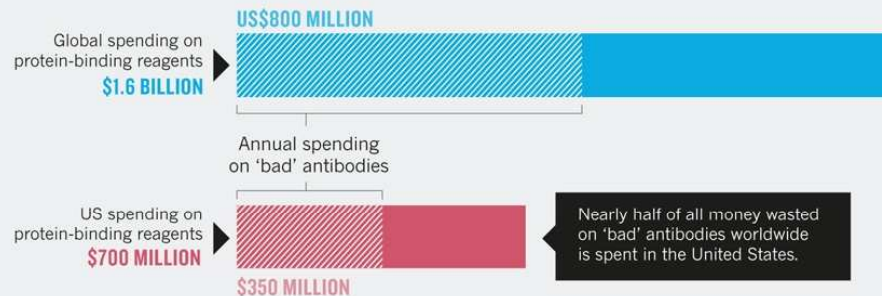
## IS THERE A REPRODUCIBILITY CRISIS?



©nature

## MONEY DOWN THE DRAIN

The use of poorly characterized and ill-defined antibodies wastes materials, researcher time and money.

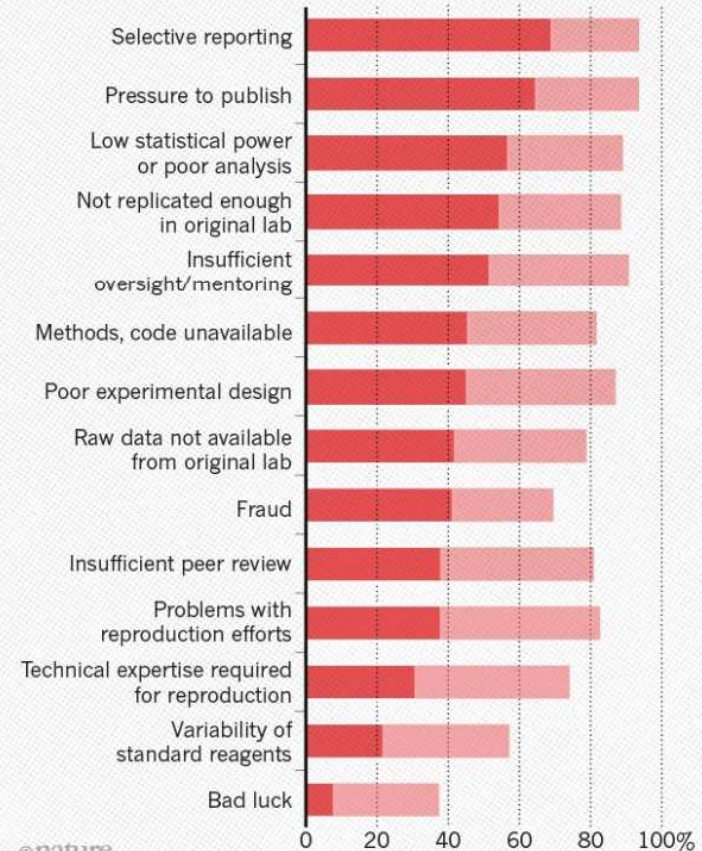


All costs estimates assume that 50% of antibodies are validated and that researchers buy 'bad' antibodies as often as they buy 'good' ones.

## WHAT FACTORS CONTRIBUTE TO IRREPRODUCIBLE RESEARCH?

Many top-rated factors relate to intense competition and time pressure.

● Always/often contribute ● Sometimes contribute



©nature

[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>.

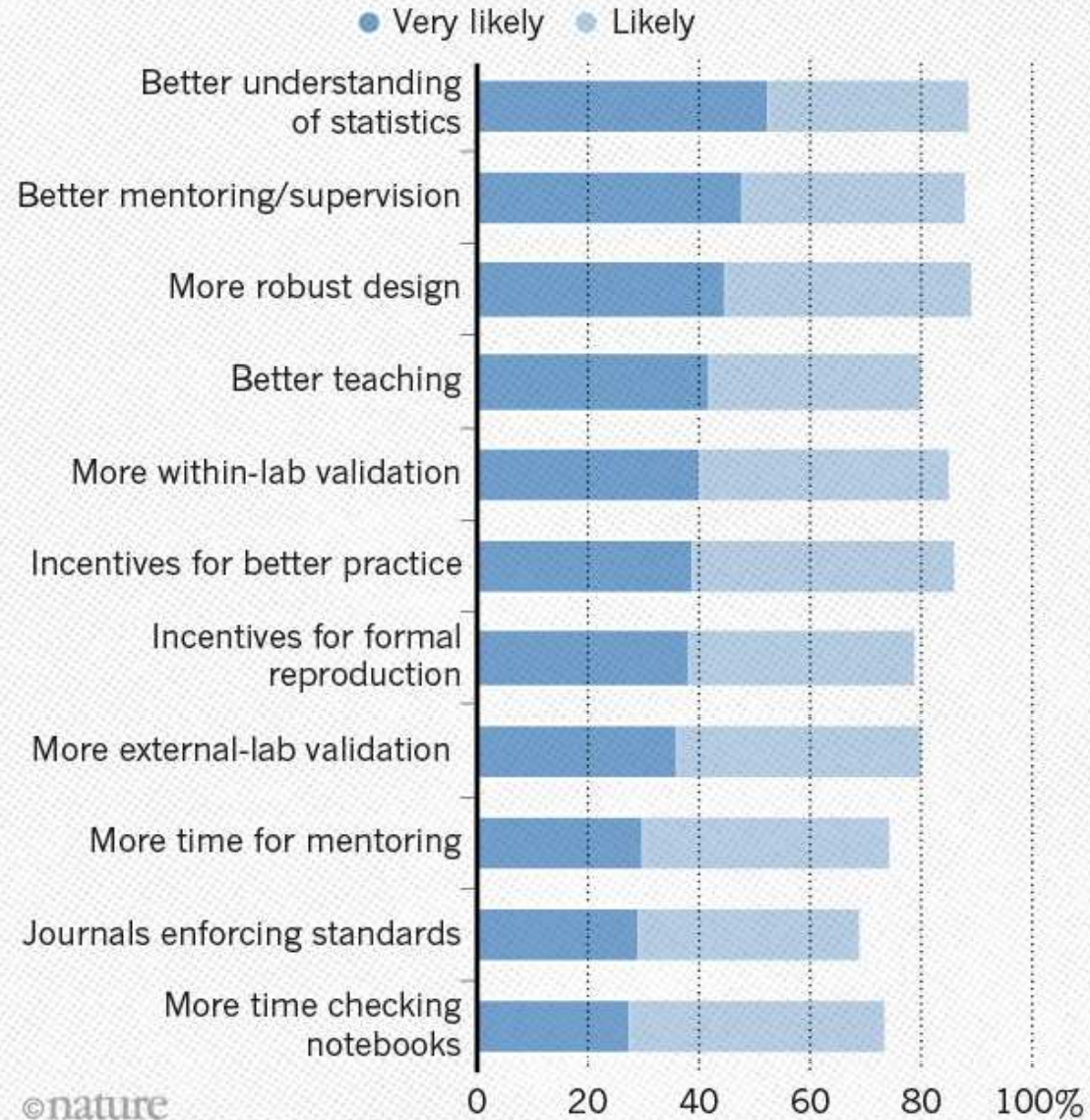
[Nature](#). 2015 Feb 5;518(7537):27-9. doi: 10.1038/518027a.

**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.





# A proposal for validation of antibodies

Mathias Uhlen<sup>1</sup>, Anita Bandrowski<sup>2</sup>, Steven Carr<sup>3</sup>, Aled Edwards<sup>4</sup>, Jan Ellenberg<sup>5</sup>, Emma Lundberg<sup>1</sup>, David L Rimm<sup>6</sup>, Henry Rodriguez<sup>7</sup>, Tara Hiltke<sup>7</sup>, Michael Snyder<sup>8</sup> & Tadashi Yamamoto<sup>9</sup>

We convened an *ad hoc* International Working Group for Antibody Validation in order to formulate the best approaches for validating antibodies used in common research applications and to provide guidelines that ensure antibody reproducibility. We recommend five conceptual 'pillars' for antibody validation to be used in an application-specific manner.

**Table 1** | Proposed conceptual pillars for validation of antibodies

Validation strategy	Genetic	Orthogonal	Independent antibody	Tagged protein expression	IMS
Validation principle	The expression of the target protein is eliminated or significantly reduced by genome editing or RNA interference	Expression of the target protein is compared with an antibody-independent method	Expression of the target protein is compared using two antibodies with nonoverlapping epitopes	The target protein is expressed using a tag, preferably expressed at endogenous levels	The target protein is captured using an antibody and analyzed using MS
Validation criteria	Elimination or significant reduction in antibody labeling after gene disruption or mRNA knockdown	Significant correlation of protein levels detected by an antibody and an orthogonal method (e.g., MS)	Significant correlation of protein levels detected by two different antibodies recognizing independent regions of the same target protein	Significant correlation between antibody labeling and detection of the epitope tag	Target protein peptides among the most abundant detected by MS following immunocapture
Suitable for these applications	WB, IHC, ICC, FS, SA, IP/ChIP, RP	WB, IHC, ICC, FS, SA, RP	WB, IHC, ICC, FS, SA, IP/ChIP, RP	WB, IHC, ICC, FS	IP/ChIP

WB, western blot; IHC, immunohistochemistry; ICC, immunocytochemistry, including immunofluorescence microscopy; FS, flow sorting and analysis of cells; SA, sandwich assays, including ELISA; IP, immunoprecipitation; ChIP, chromatin immunoprecipitation; and RP, reverse-phase protein arrays.

# CST Antibody Validation Principles



## Hallmark Strategy

## Description



**Binary Model:** Antibody signal is measured in model systems with known presence/absence of target signal. Includes wild-type vs. genetic knockout, targeted induction or silencing.



**Ranged Expression:** Antibody signal strength is measured in cell lines or tissues representing a known continuum of target expression levels. Includes siRNA and heterozygous knockout assays.



**Orthogonal Data:** Antibody signal is correlated to target expression in model systems measured using antibody independent assays. Includes mass spectrometry and in situ hybridization.



**Multiple Antibodies:** Antibody signal is compared to the signal observed using antibodies targeting nonoverlapping epitopes of the target. Includes IP, ChIP, and ChIP-seq.



**Heterologous Expression:** Antibody signal is evaluated in cell lines following heterologous expression of native (or mutated) target protein.





**Complementary Assays:** Antibody specificity may be validated using complementary assays. Includes competitive ELISA, peptide dot blots, peptide blocking, or protein arrays.


Refine Results

Search Within 

CLEAR ALL

Category 

- Research 
- Cancer (1)
  - Cell Biology (1)
  - Fibrosis (4)
  - Immunology and Immuno-Oncology (4)
  - Metabolism (1)
  - Neuroscience (2)
  - All Research Areas

- Application 
- Flow Cytometry (Fixed/Permeabilized) (1)
  - Flow Cytometry (Live) (1)
  - IHC-paraffin (1)
  - Immunofluorescence (Immunocytochemistry) (1)
  - Western blot (3)

Products (4)
Content (1)

Sort By: Relevance

#	Product Name	Application	Reactivity	
98327	CD9 (E8L5J) Rabbit mAb	<span style="background-color: #003366; color: white; padding: 2px;">WB</span> <span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">IP</span> <span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">IHC</span> <span style="background-color: #003366; color: white; padding: 2px;">IF</span> <span style="background-color: #003366; color: white; padding: 2px;">F</span> <span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">ChIP</span>	M, R	<input type="checkbox"/> COMPARE <span style="background-color: #006633; color: white; padding: 2px;">ADD</span>
13403	CD9 (D3H4P) Rabbit mAb	<span style="background-color: #003366; color: white; padding: 2px;">WB</span> <span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">IP</span> <span style="background-color: #003366; color: white; padding: 2px;">IHC</span> <span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">IF</span> <span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">F</span> <span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">ChIP</span>	H	<input type="checkbox"/> COMPARE <span style="background-color: #006633; color: white; padding: 2px;">ADD</span>
13174	CD9 (D8Q1A) Rabbit mAb	<span style="background-color: #003366; color: white; padding: 2px;">WB</span> <span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">IP</span> <span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">IHC</span> <span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">IF</span> <span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">F</span> <span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">ChIP</span>	H	<input type="checkbox"/> COMPARE <span style="background-color: #006633; color: white; padding: 2px;">ADD</span>
74220	Exosomal Marker Antibody Sampler Kit			<input type="checkbox"/> COMPARE <span style="background-color: #006633; color: white; padding: 2px;">ADD</span>

Results per page: 30 60 100 200

Revision 3

Store at -20°C

#98327

## CD9 (E8L5J) Rabbit mAb

**Cell Signaling**  
TECHNOLOGY®**Orders:** 877-616-CELL (2355)  
orders@cellsignal.com**Support:** 877-678-TECH (8324)**Web:** info@cellsignal.com  
www.cellsignal.com

3 Trask Lane | Danvers | Massachusetts | 01923 | USA

**For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures.**

<b>Applications:</b> WB, IF-IC, FC-FP, FC-L	<b>Reactivity:</b> M/R	<b>Sensitivity:</b> Endogenous	<b>MW (kDa):</b> 22-27	<b>Source/Isotype:</b> Rabbit IgG	<b>UniProt ID:</b> P40240	<b>Entrez-Gene Id:</b> 12527
--	---------------------------	-----------------------------------	---------------------------	--------------------------------------	------------------------------	---------------------------------

### Product Usage Information

Application	Dilution
Western Blotting	1:1000
Immunofluorescence (Immunocytochemistry)	1:50
Flow Cytometry (Fixed/Permeabilized)	1:50 - 1:200
Flow Cytometry (Live)	1:50 - 1:200

### Storage

Supplied in 10 mM sodium HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 100 µg/ml BSA, 50% glycerol and less than 0.02% sodium azide. Store at -20°C. *Do not aliquot the antibody.*

### Specificity / Sensitivity

CD9 (E8L5J) Rabbit mAb recognizes endogenous levels of total CD9 protein.

**Species Reactivity:**  
Mouse, Rat

### Source / Purification

Monoclonal antibody is produced by immunizing animals with a synthetic peptide corresponding to residues surrounding Leu119 within the extracellular domain of mouse CD9 protein.

### Background

The CD9 antigen belongs to the tetraspanin family of cell surface glycoproteins, and is characterized by four transmembrane domains, one short extracellular domain (ECL1), and one long extracellular domain (ECL2). Tetraspanins interact with a variety of cell surface proteins and intracellular signaling molecules in specialized tetraspanin-enriched microdomains (TEMs), where they mediate a range of processes including adhesion, motility, membrane organization, and signal transduction (1). Research studies demonstrate that CD9 expression on the egg is required for gamete fusion during fertilization (2-4). CD9 was also shown to play a role in dendritic cell migration, megakaryocyte differentiation, and homing of cord blood CD34+ hematopoietic progenitors to the bone marrow (5-7). In addition, downregulation of CD9 expression is associated with poor prognosis and progression of several types of cancer (8-10). Additional research identified CD9 as an abundant component of exosomes, and may play some role in the fusion of these secreted membrane vesicles with recipient cells (11).

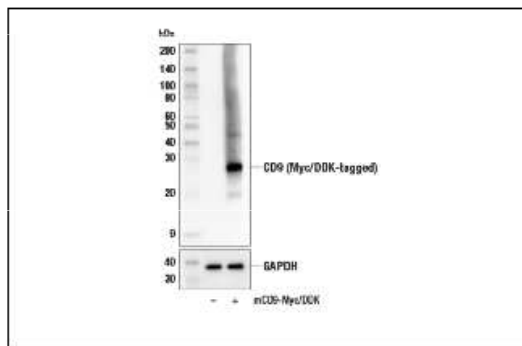
- Hemler, M.E. (2005) *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 801-11.
- Le Naour, F. et al. (2000) *Science* 287, 319-21.
- Miyado, K. et al. (2000) *Science* 287, 321-4.
- Kaji, K. et al. (2000) *Nat Genet* 24, 279-82.
- Mantegazza, A.R. et al. (2004) *Blood* 104, 1183-90.
- Clay, D. et al. (2001) *Blood* 97, 1982-9.
- Leung, K.T. et al. (2011) *Blood* 117, 1840-50.
- Miyake, M. et al. (1995) *Cancer Res* 55, 4127-31.
- Higashiyama, M. et al. (1995) *Cancer Res* 55, 6040-4.
- Uchida, O. et al. (1999) *Dr J Cancer* 79, 1160-73.
- Théry, C. et al. (1999) *J Cell Biol* 147, 599-610.



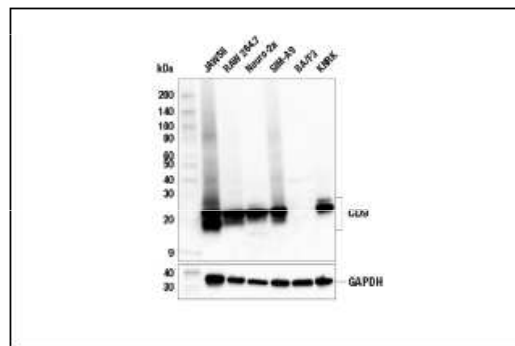
Revision 3

# #98327

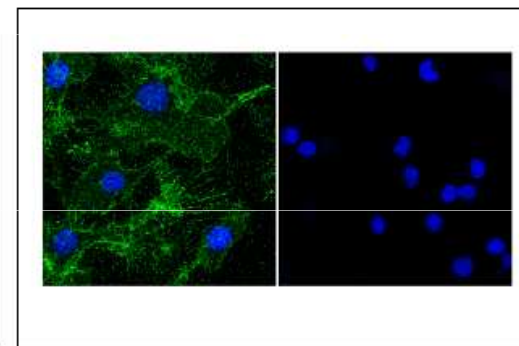
## CD9 (E8L5J) Rabbit mAb



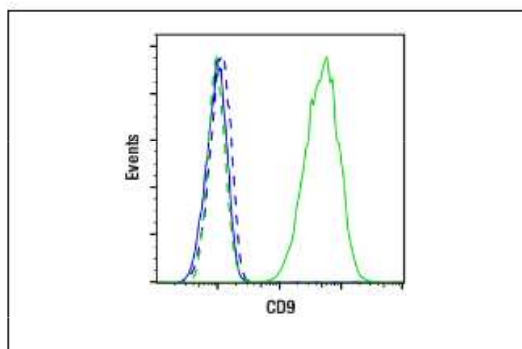
Western blot analysis of extracts from 293T cells, mock transfected (-) or transfected with a construct expressing Myc/DDK-tagged full-length mouse CD9 protein (mCD9-Myc/DDK; +), using CD9 (E8L5J) Rabbit mAb (upper) and GAPDH (D16H11) XP<sup>®</sup> Rabbit mAb #5174 (lower).



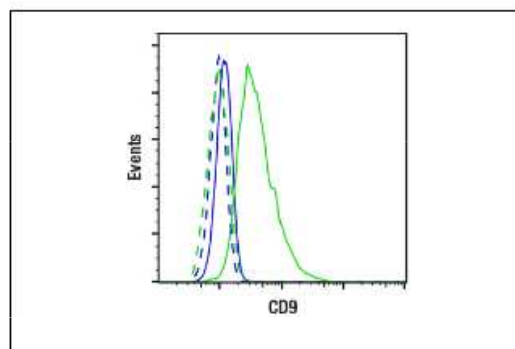
Western blot analysis of extracts from various cell lines using CD9 (E8L5J) Rabbit mAb (upper) and GAPDH (D16H11) XP<sup>®</sup> Rabbit mAb #5174 (lower). Absence of signal in RAW267 cells is predicted from RNAseq data and confirms the specificity of the antibody.



Confocal immunofluorescent analysis of RAW 264.7 cells (left, positive) or RAW267.3 cells (right, negative) using CD9 (E8L5J) Rabbit mAb (green) and DAPI #4083 (blue).



Flow cytometric analysis of live RAW 267.3 cells (blue, negative) and JAWSII cells (green, positive) using CD9 (E8L5J) Rabbit mAb (solid lines) or concentration-matched Rabbit (DA1E) mAb IgG XP<sup>®</sup> Isotype Control #3900 (dashed lines). Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')<sub>2</sub> Fragment (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Conjugate) #4412 was used as a secondary antibody.



Flow cytometric analysis of fixed and permeabilized RAW 267.3 cells (blue, negative) and JAWSII cells (green, positive) using CD9 (E8L5J) Rabbit mAb (solid lines) or concentration-matched Rabbit (DA1E) mAb IgG XP<sup>®</sup> Isotype Control #3900 (dashed lines). Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')<sub>2</sub> Fragment (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Conjugate) #4412 was used as a secondary antibody.



# Comment



## Reproducibility: expect less of the scientific paper

Olavo B. Amaral & Kleber Neves

Make science more reliable by placing the burden of replicability on the community, not on individual laboratories.

In 2018, we embarked on a journey to assess the reproducibility of biomedical research papers from Brazil. This began a multicentre collaboration of more than 60 laboratories to replicate 60 experiments from 2 decades of Brazilian publications<sup>1</sup>. We randomly selected experiments that used three common laboratory techniques: the MTT assay for cell viability, RT-PCR to measure specific messenger RNAs and the elevated plus maze to assess anxiety in rodents.

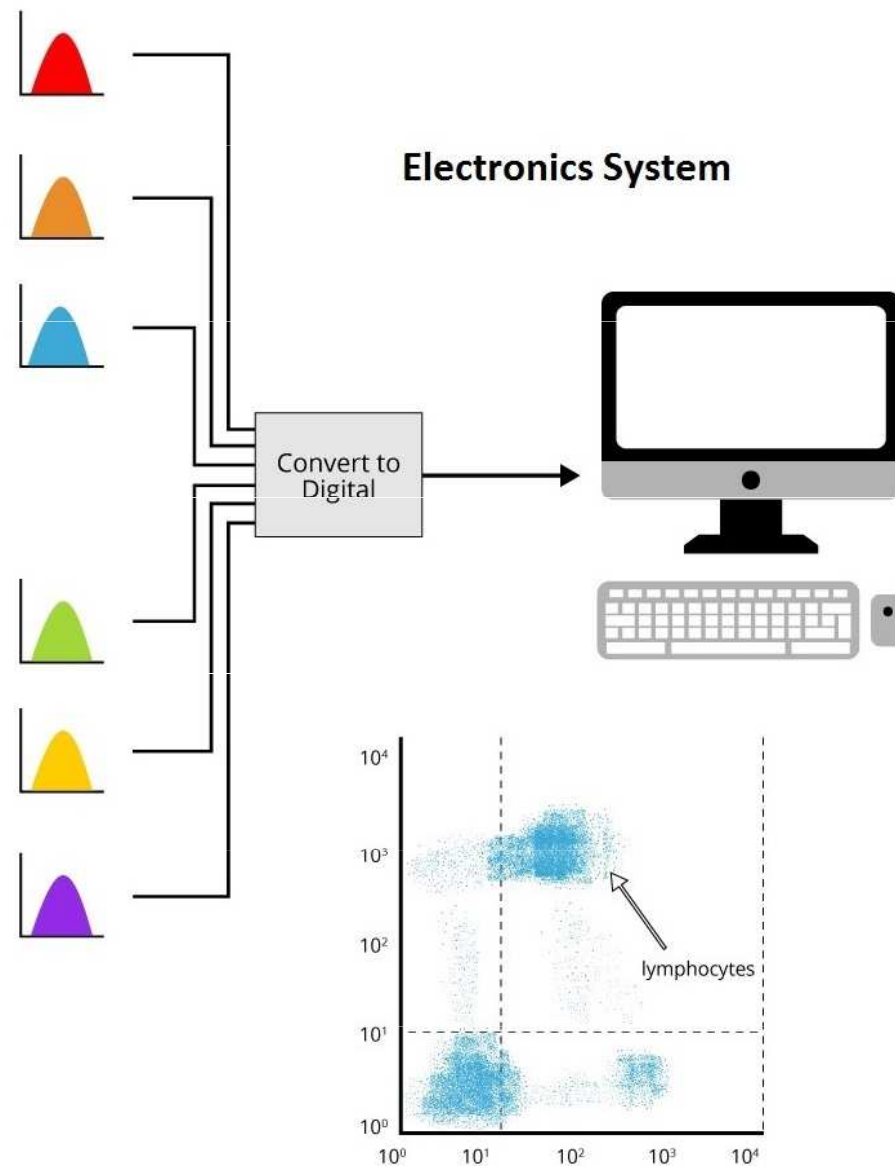
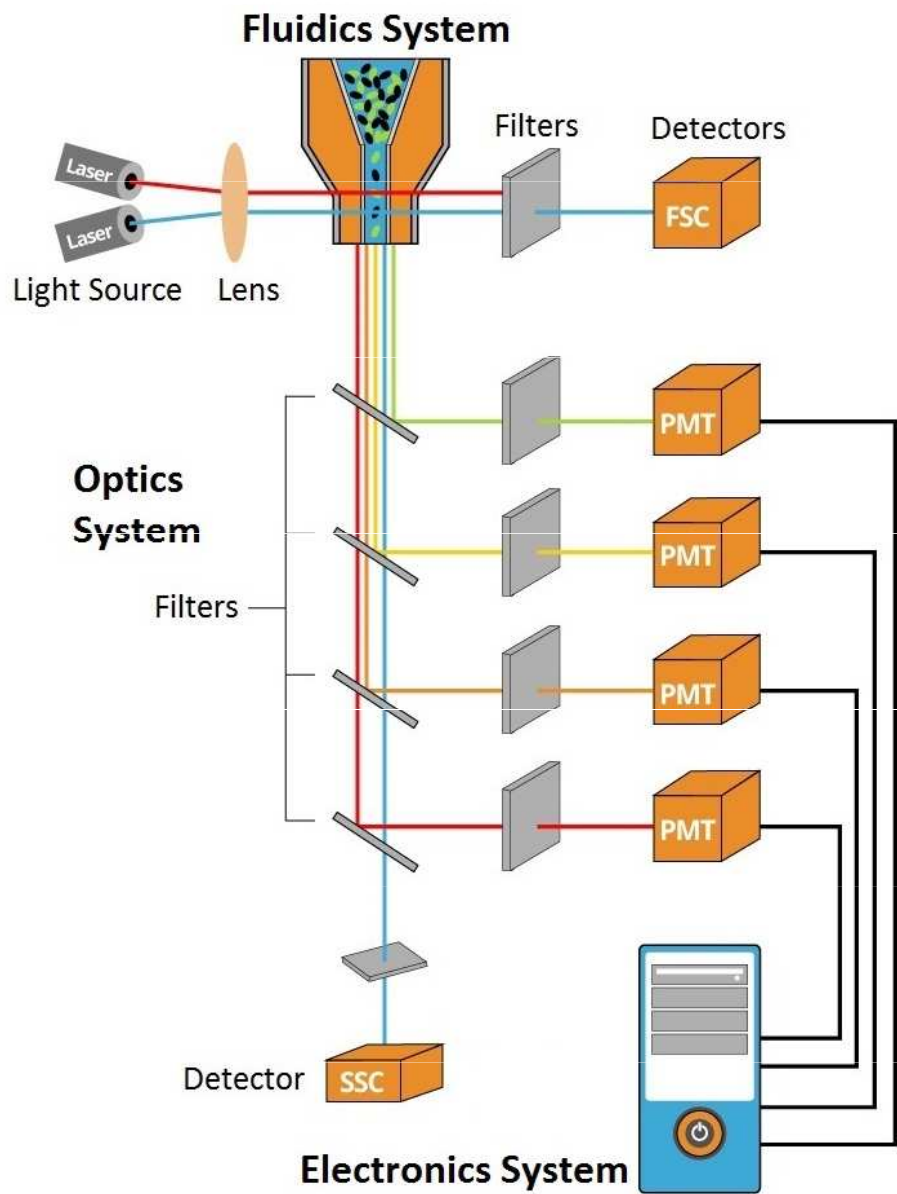
Each experiment will be repeated in three labs, and each lab has developed replication

protocols based on the original article's written methods. The process of building, reviewing and preregistering these protocols has taken months of communication between the coordinating team and the labs performing replications. We had intense arguments around the meaning of positive and negative controls and the merits of different metrics to define replication success. We also spent many hours on mundane tasks, such as studying the nutritional content of different brands of bologna sausage to better emulate a cafeteria diet fed to rats in one experiment.

These are just some of the obstacles we

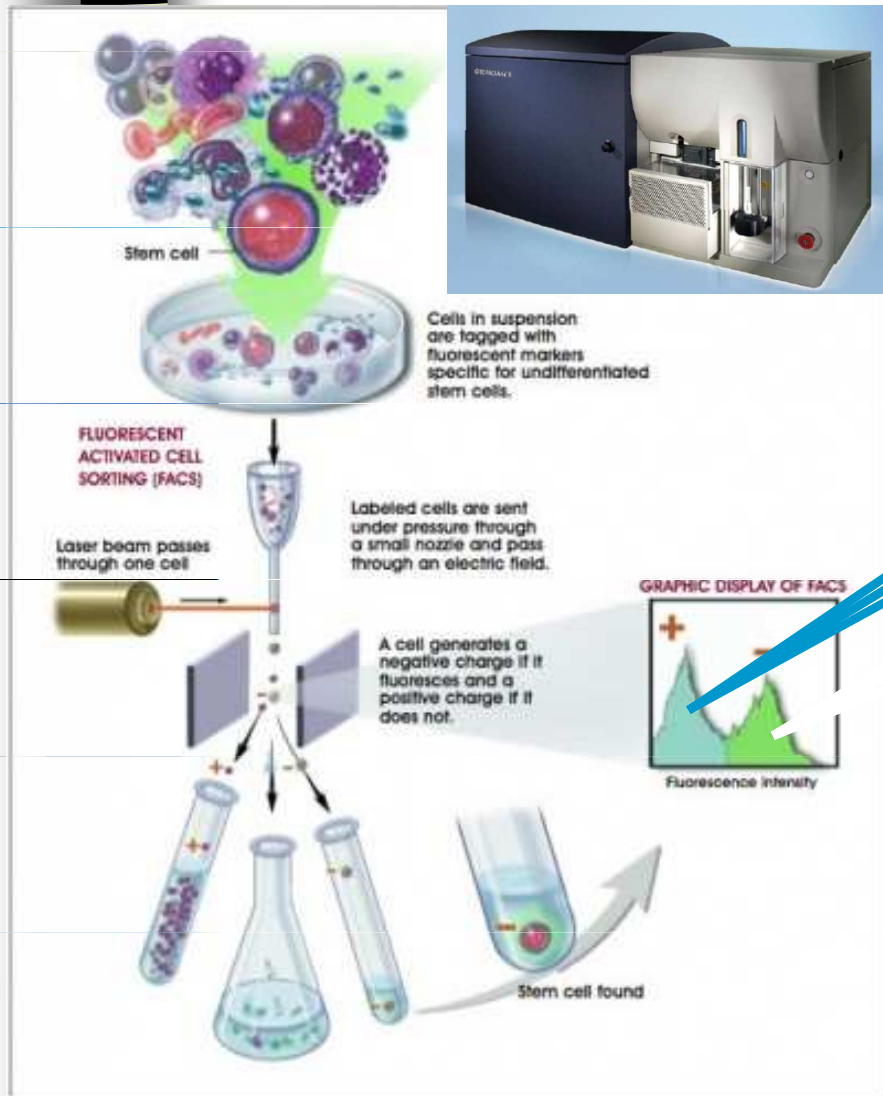
# Dostupná technologie







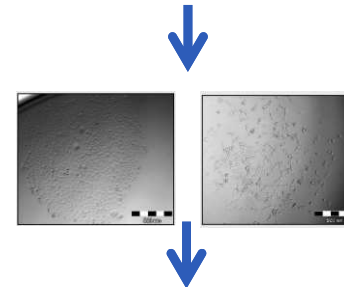
# new automatic cell cloning assay (ACCA) for determination of clonogenic capacity of CSCs



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  $E = h\nu$ , kde **h** je Planckova konstanta a **ν** frekvence. Neboť má energii, působí na něj gravitace dle obecné teorie relativity a on sám gravitačně působí na okolí.  
(<http://cs.wikipedia.org/wiki/Foton>)
- Energie fotonu je vyjádřena jako  $E=h\nu$  a  $E=hc/\lambda$  [ $\nu$ -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

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


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

- 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

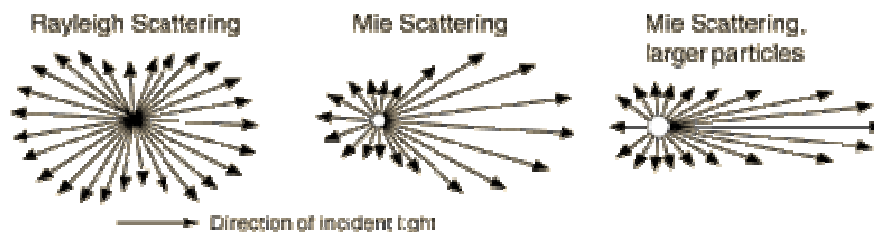
## What about a He-Ne laser?

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

=  $3.14 \times 10^{-19}$  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*





# 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>

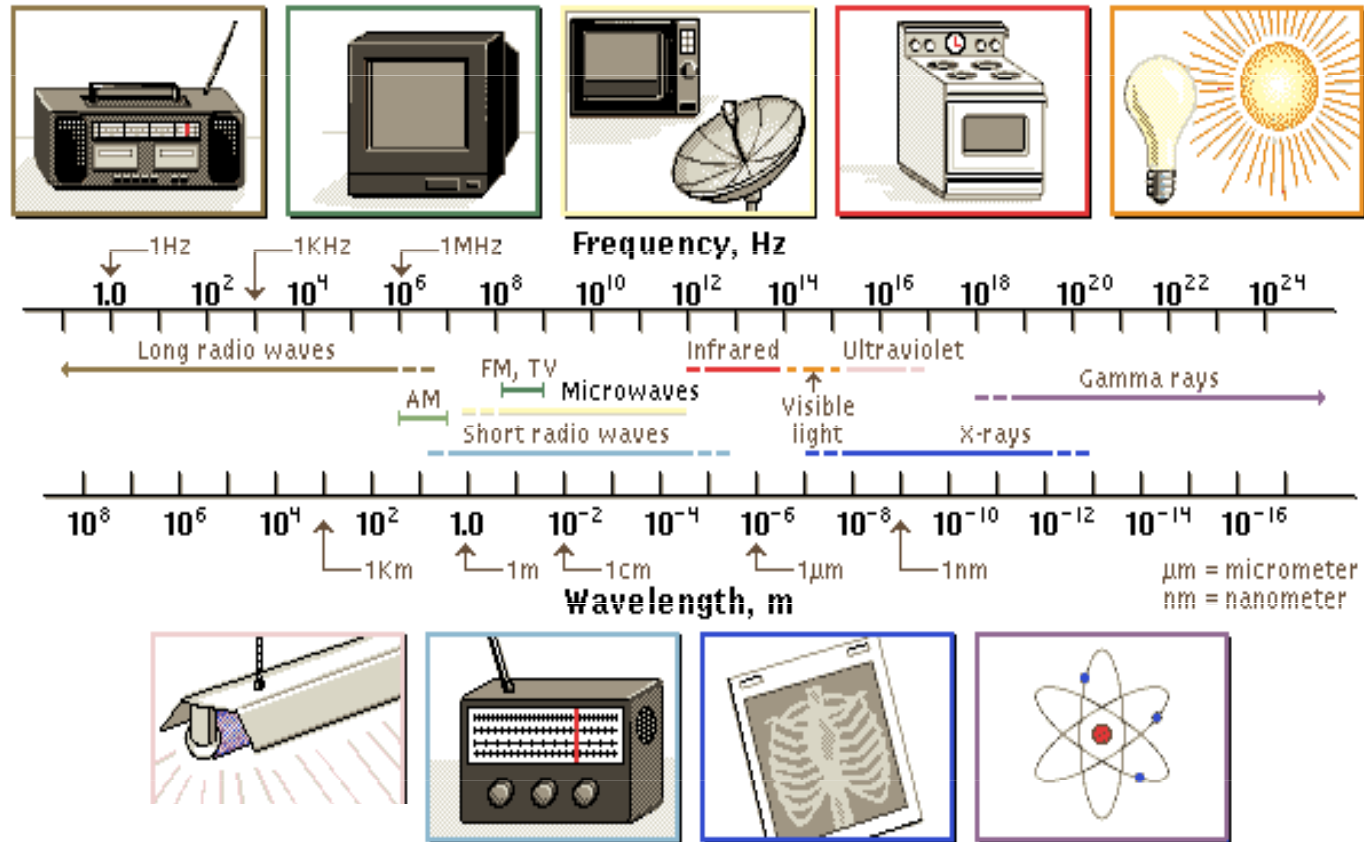


# Ohyb a rozklad světla

Krátké vlnové délky jsou  
“ohnuty” více než dlouhé



# Elektromagnetické spektrum



© Microsoft Corp, 1995

Pouze malá oblast spektra je používána pro cytometrické aplikace



# Fluorescence



# George Gabriel Stokes (1819 – 1903)

Anglický fyzik a matematik  
působící na univerzitě v Cambridge

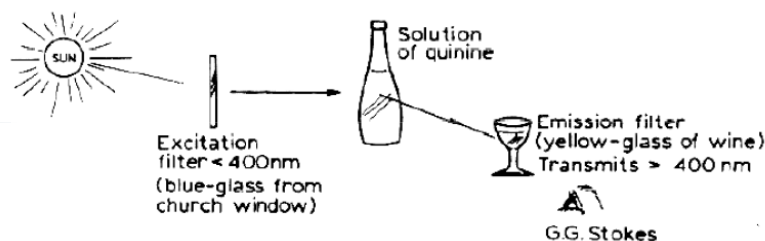


<http://www.nndb.com/people/131/000097837/>

1852 – popsal fluorescenci

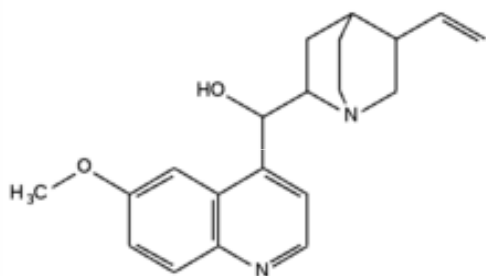
Název vznikl z anglického slova *fluospar*  
(fluorit, kazivec = nerost  $\text{CaF}_2$ )

- 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



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

[ 463 ]

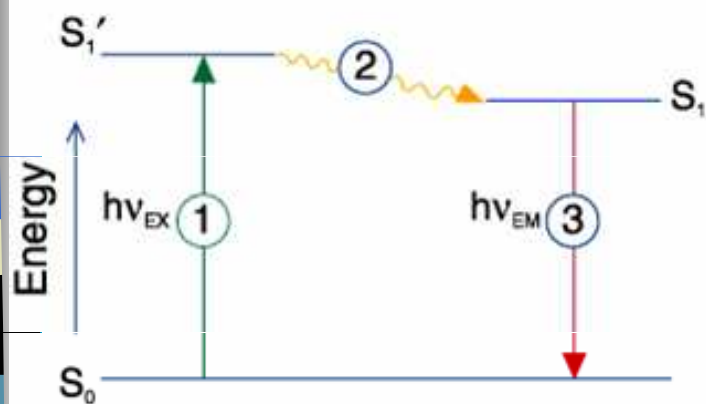


XXX. *On the Change of Refrangibility of Light*. By G. G. STOKES, M.A., F.R.S.,  
Fellow of Pembroke College, and Lucasian Professor of Mathematics in the  
University of Cambridge.

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  $10^{-9}$  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

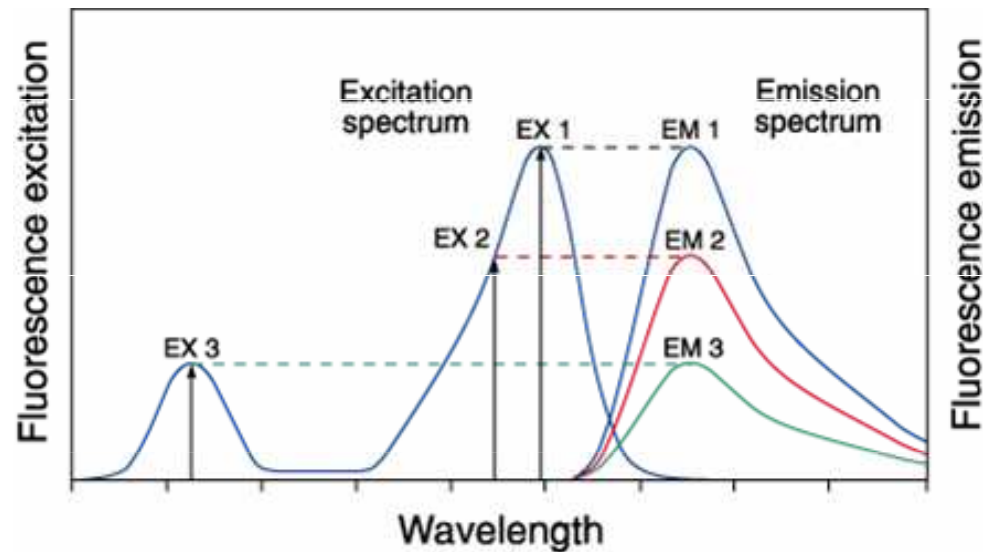
- **intenzita** – počet fotonů procházejících v daném směru jednotkovou plochou za jednotku času
- **spektrální složení** – spektrální hustota fotonového toku na jednotkový interval vlnových délek nebo frekvencí
- **polarizace** – směr kmitání elektrického vektoru elektromagnetické vlny
- **doba dohasínání** – 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 ( $\text{NH}_2$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{SH}$ ).
- 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 cytometer měří fluorescenci v proudícím toku, umožňuje detekovat a kvantifikovat subpopulace uvnitř velkého vzorku

## Fluorescenční signál

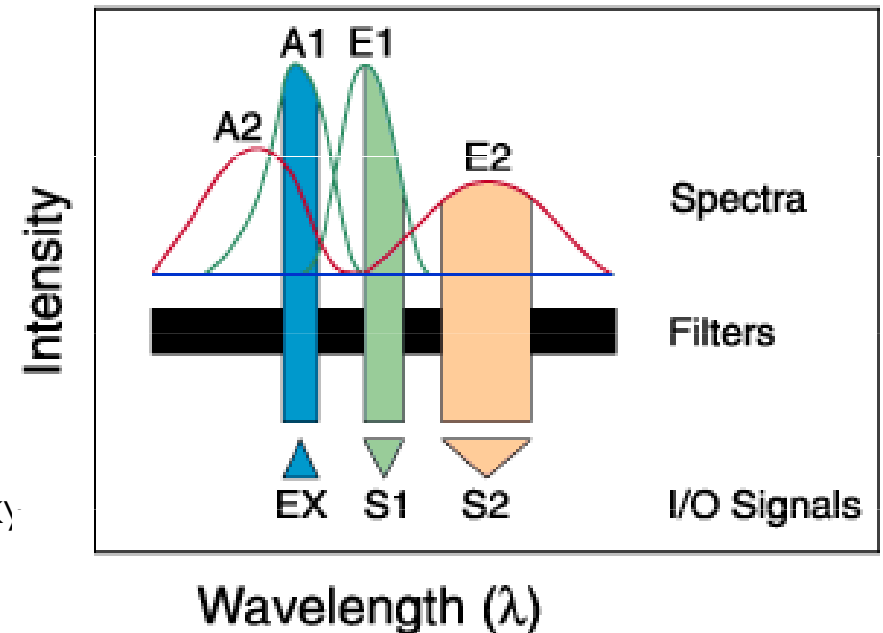
- spektrofluorometer je flexibilní, umožňuje měřit v kontinuálním spektru excitačních a emisních vlnových délek
- flow cytometr potřebuje fluorescenční značky excitovatelné určitou vlnovou délkou.

## Fluorescence pozadí

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

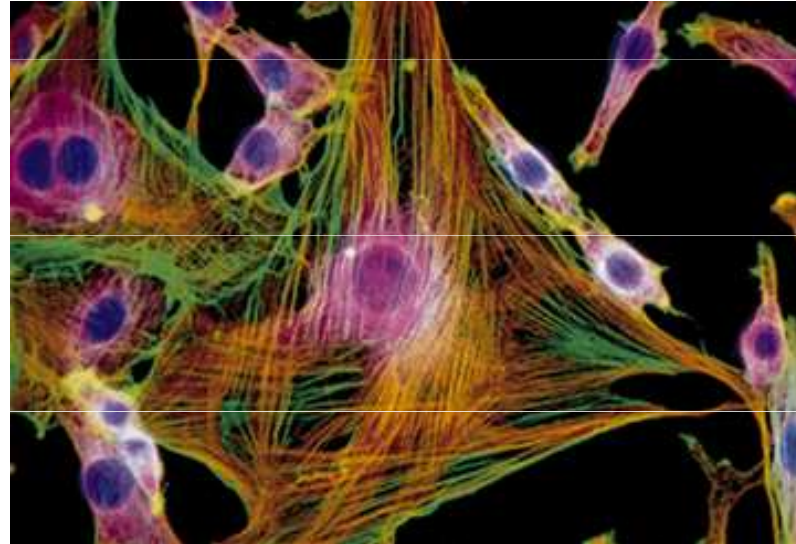
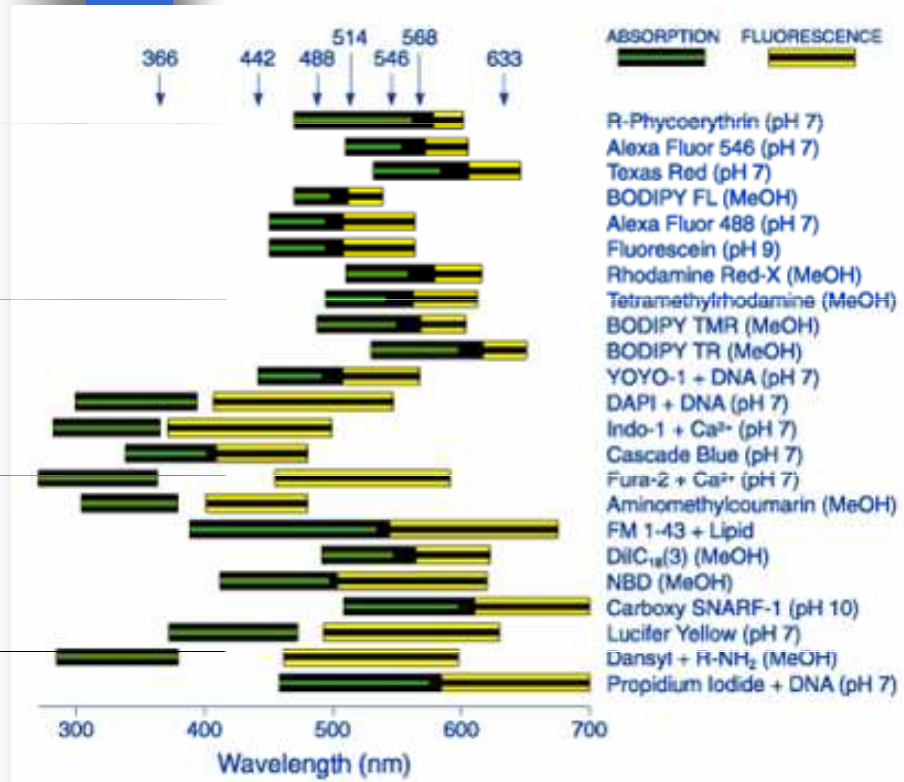
## Vícebarevné značení

- 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

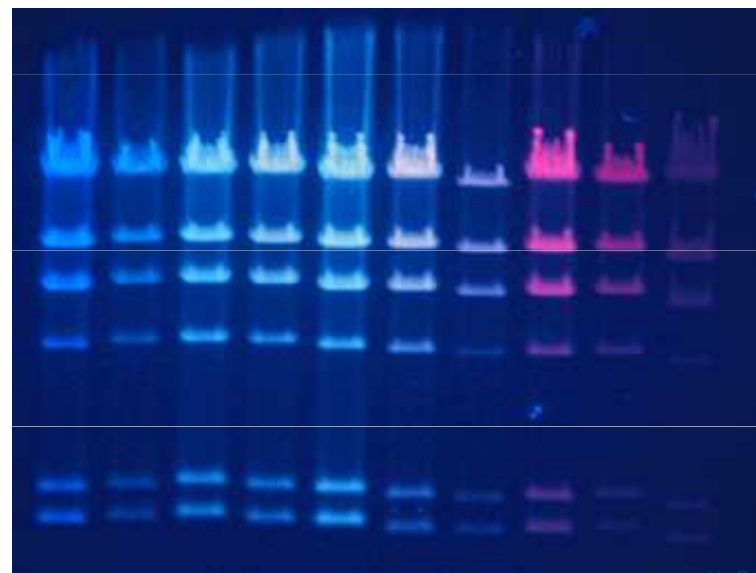
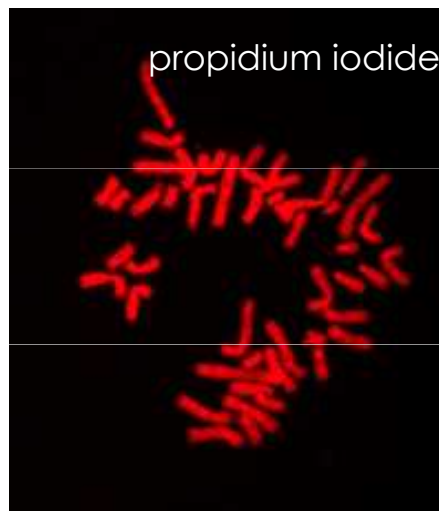
F-actin ~  
BODIPY FL phalloidin

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

DNA ~  
DAPI

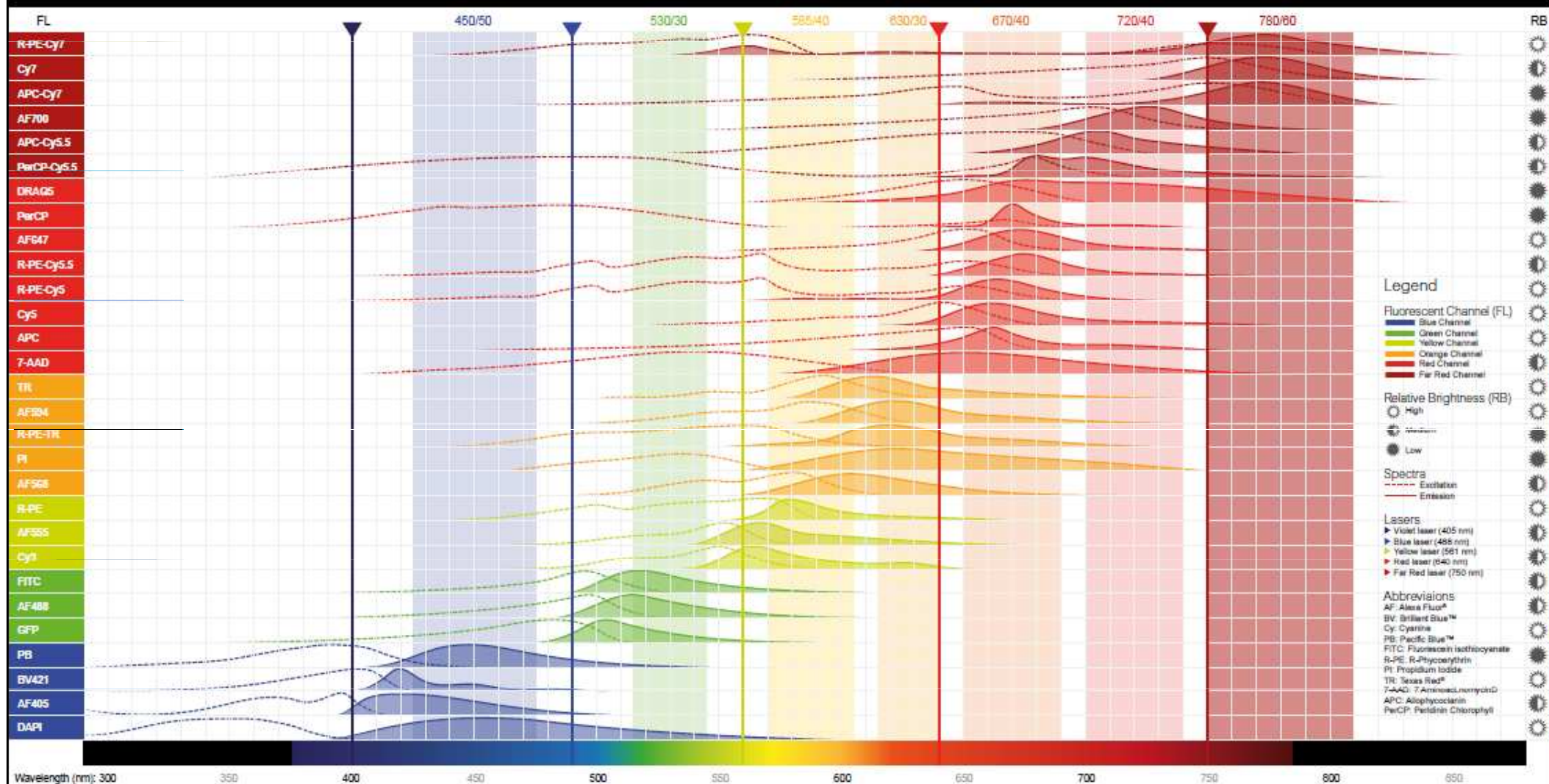
POPO-1    BOBO-1    YOYO-1    TOTO-1    JOJO-1    POPO-3    LOLO-1    BOBO-3    YOYO-3    TOTO-3

λ Hind III





# Fluorochrome chart





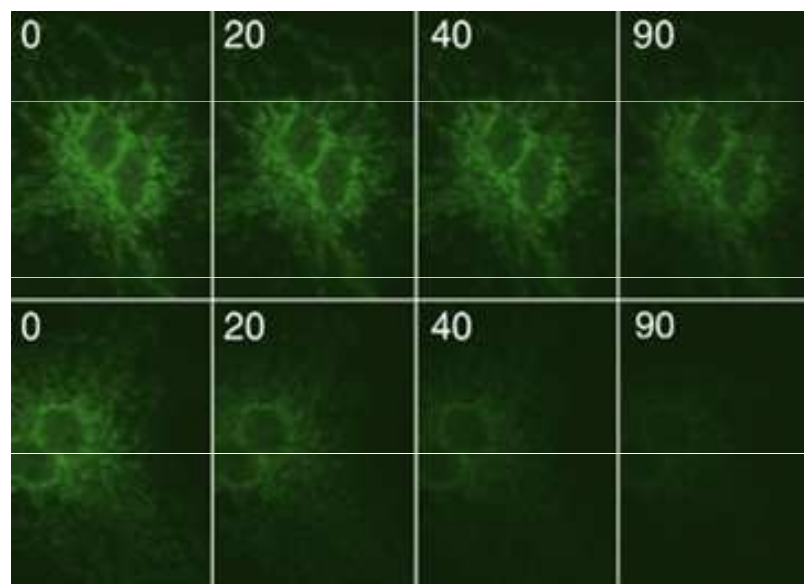


# Procesy interferující a detekcí fluorescence

- **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

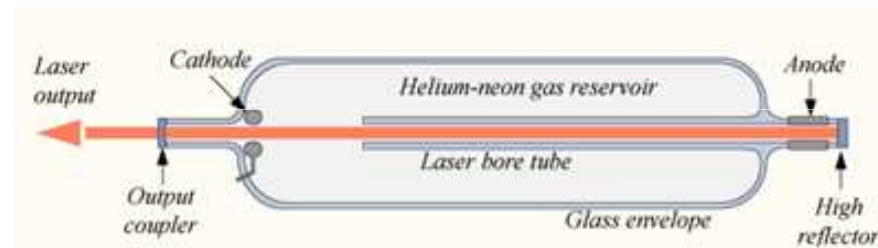
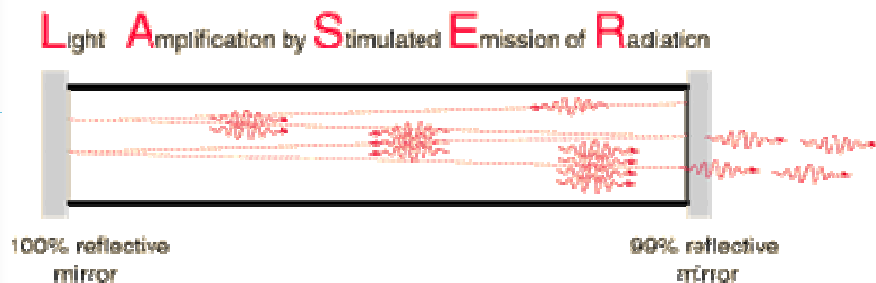
- nutnost zaostřit zdroj světla na stejné místo, kde je zaostřen průtok buněk
- Lasery
  - produkují jednotlivou vlnovou délku světla (325, 488, ~630nm)
  - poskytují mW - W světla
  - mohou být “levné” - air-cooled , nebo drahé - water-cooled
  - poskytují koherentní světelný proud
- Obloukové lampy (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



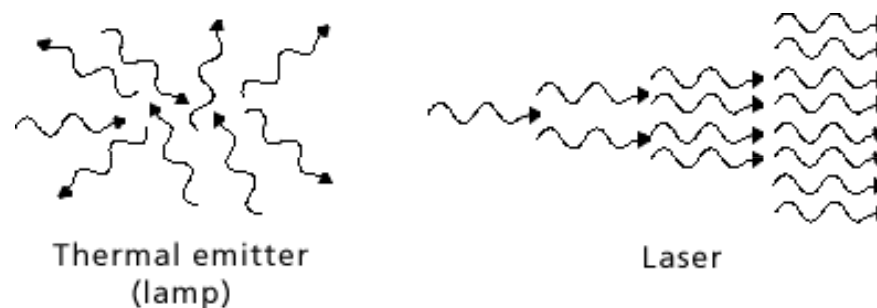
# LASER(y)



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

- koherentní (souvislý světelný tok)
- monochromatický
- soustředěný

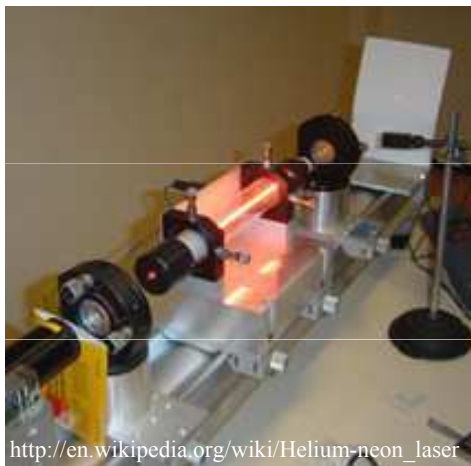
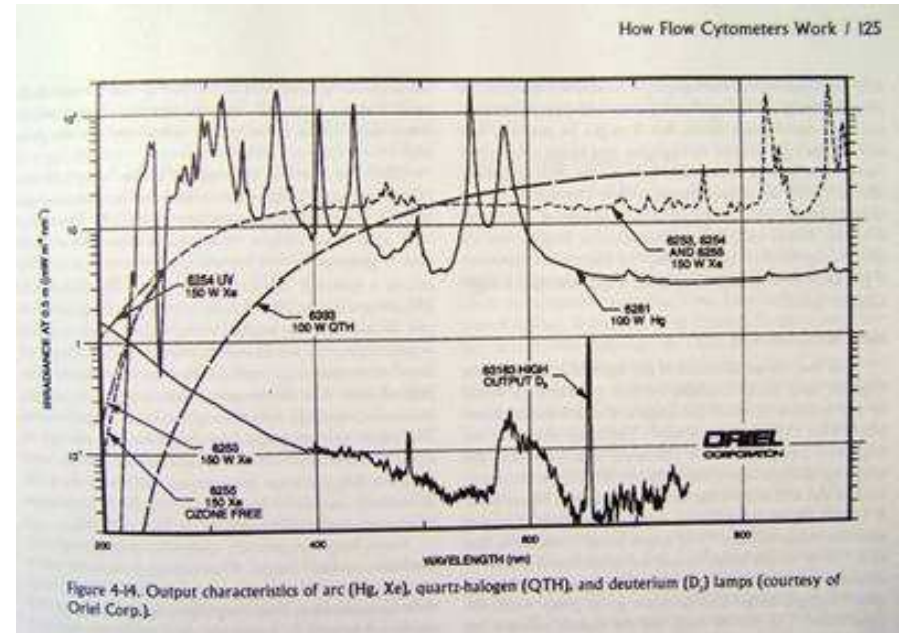
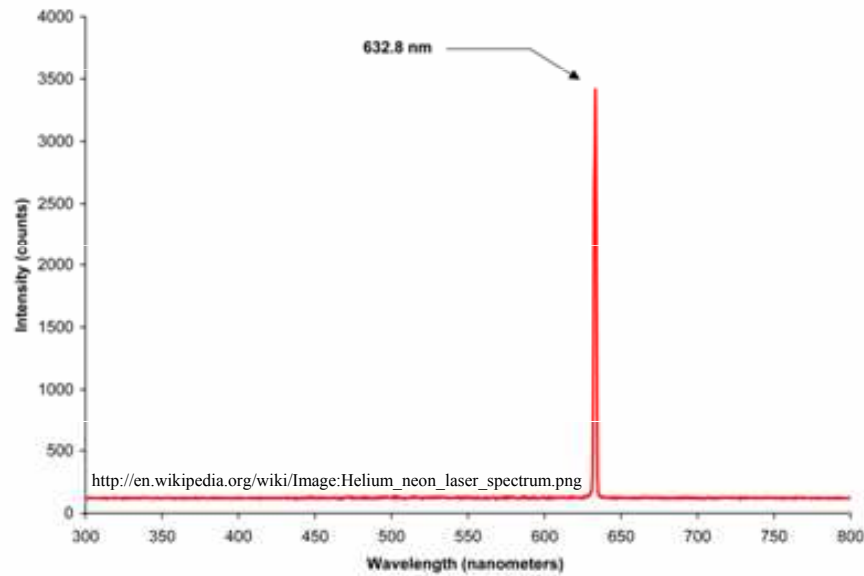
<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/hframe.html>



<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>

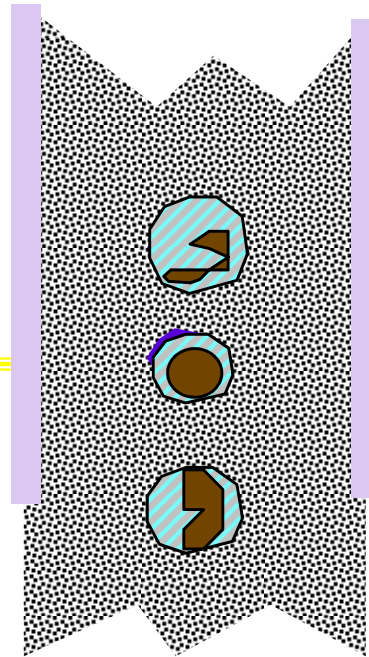
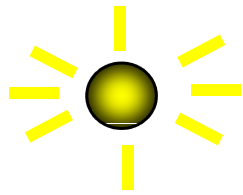


# Optika - „Forward Scatter“ kanál

- 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**



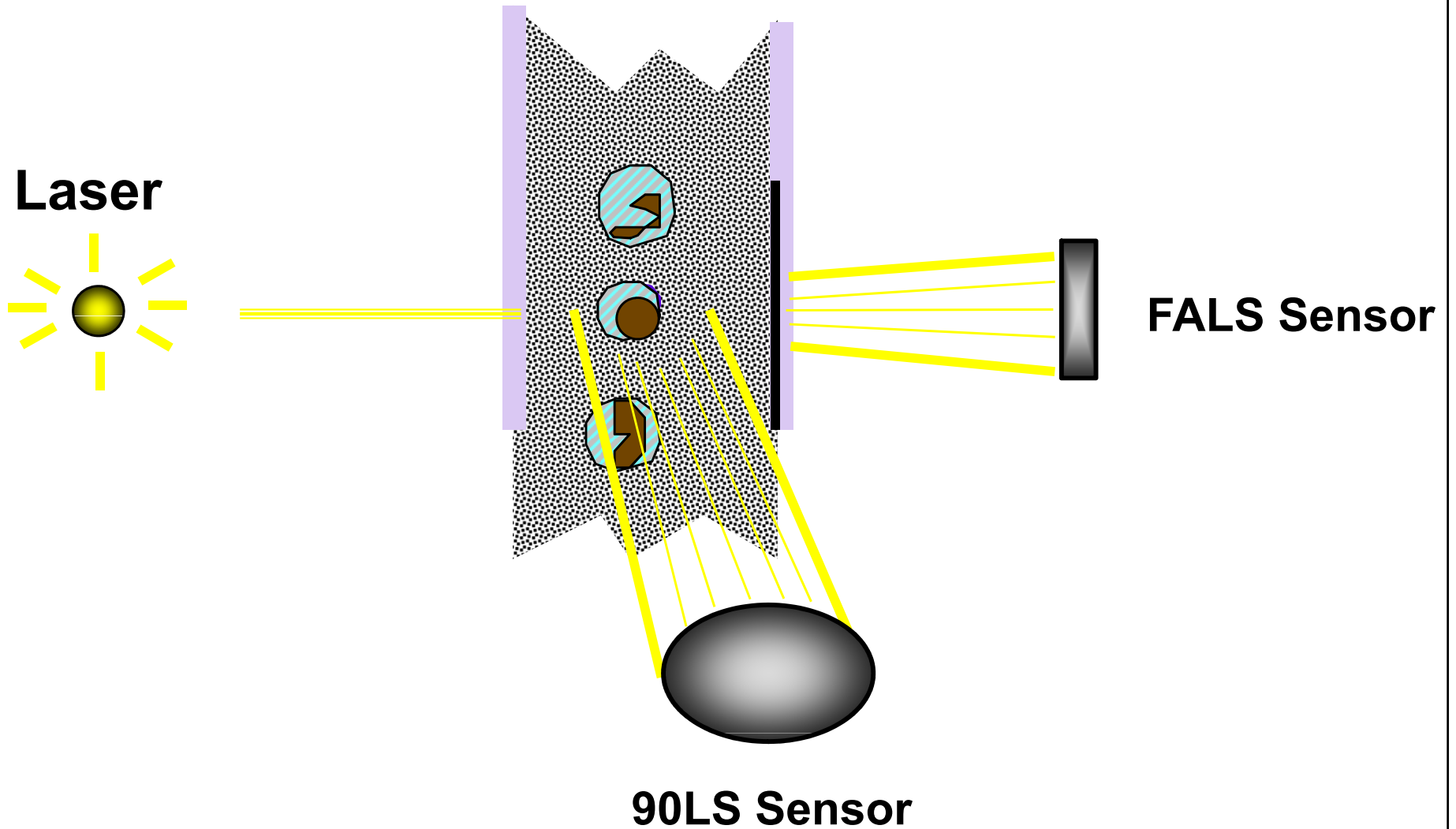




# Optika - „Side Scatter“ kanál

- 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

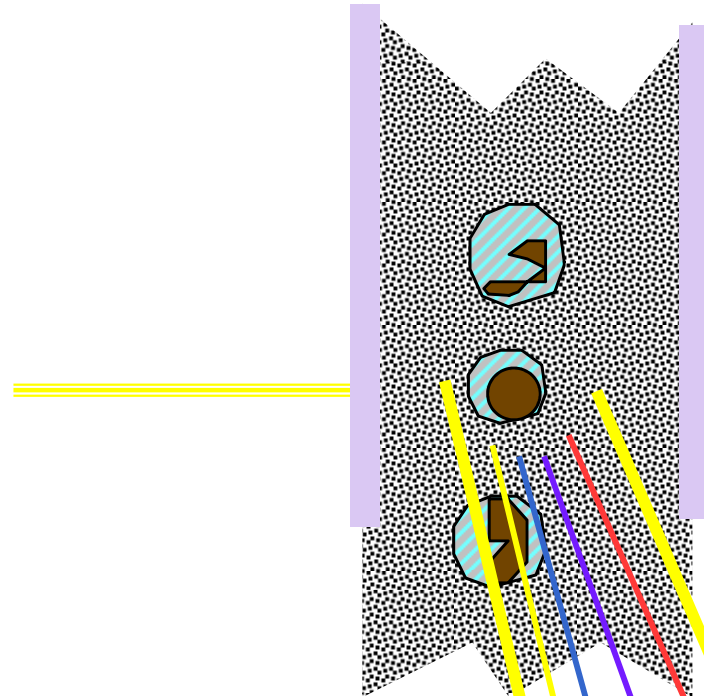
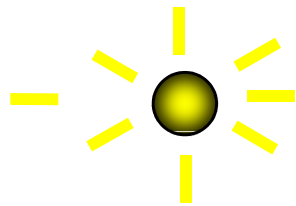


# Optika - fluorescenční kanály

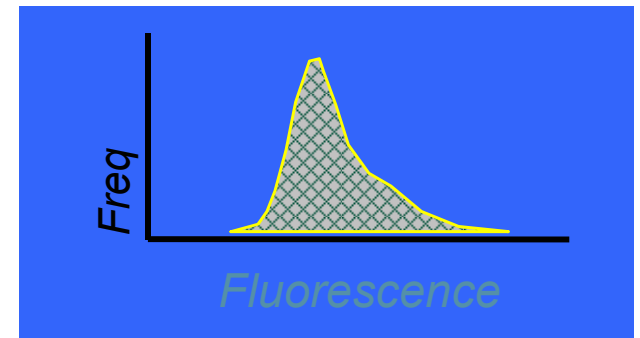
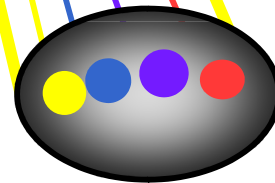
- fluorescence emitovaná z každého fluorochromu je detekována pomocí specifického **fluorescenčního kanálu**
- specifita detekce je kontrolována vlnovou selektivitou filtru a zrcadel

# 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

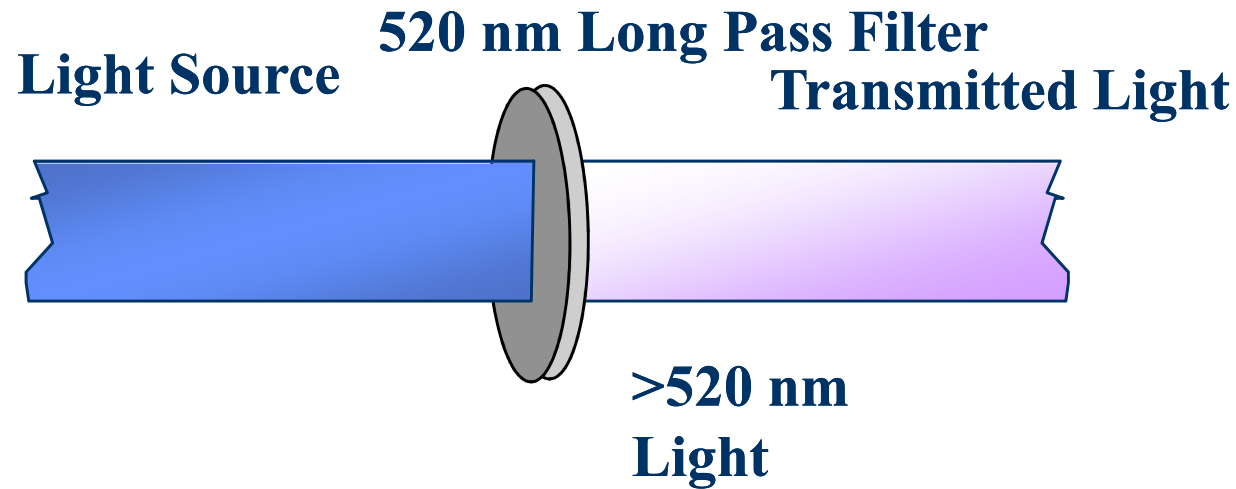




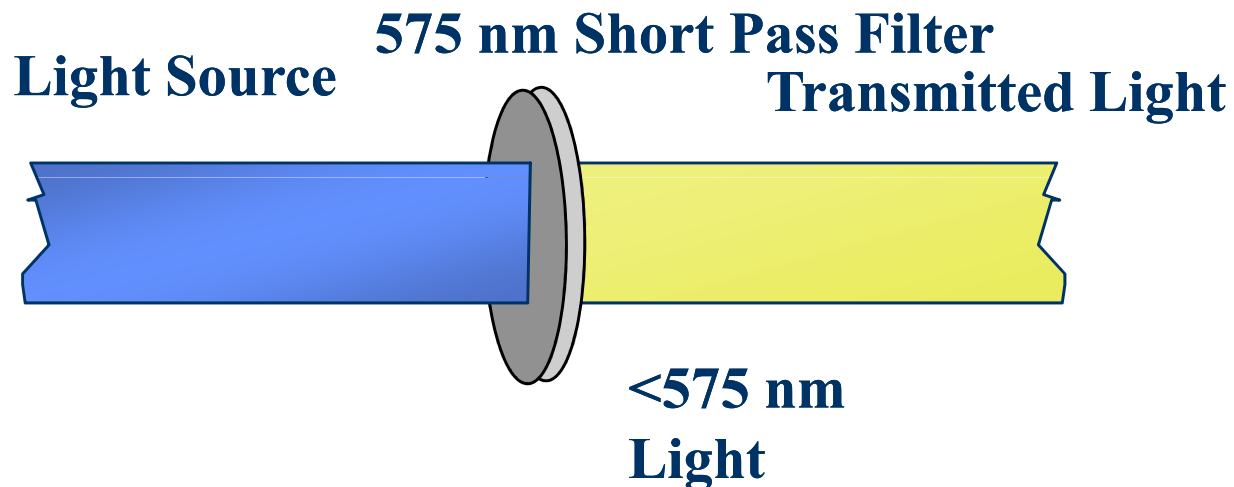
# Optics - vlastnosti filtrů

- „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

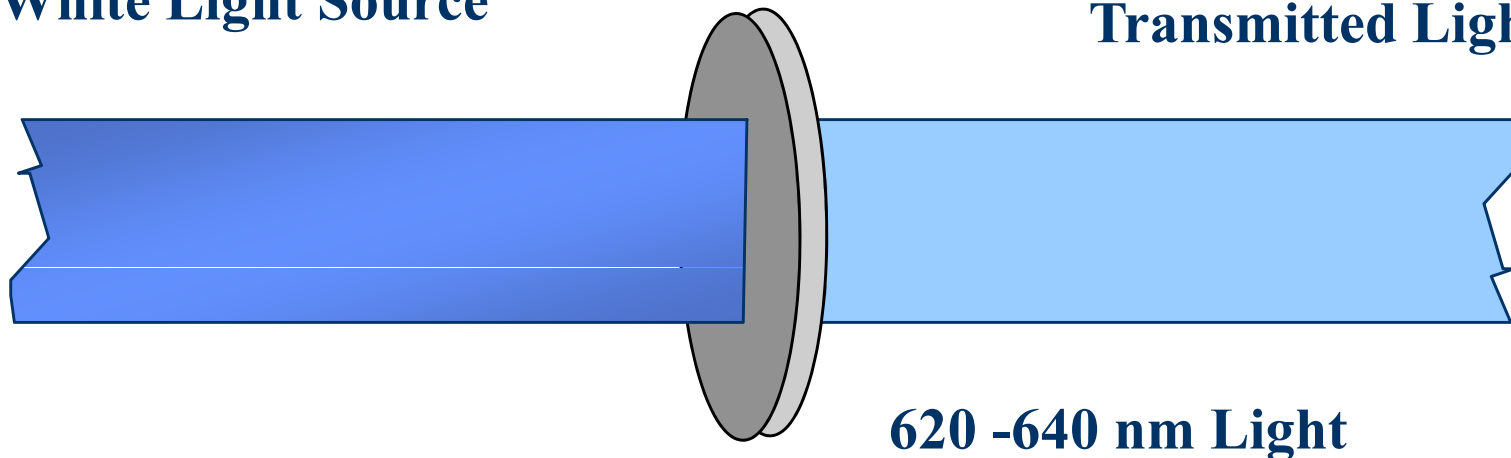


# Standard Band Pass Filters

## 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**



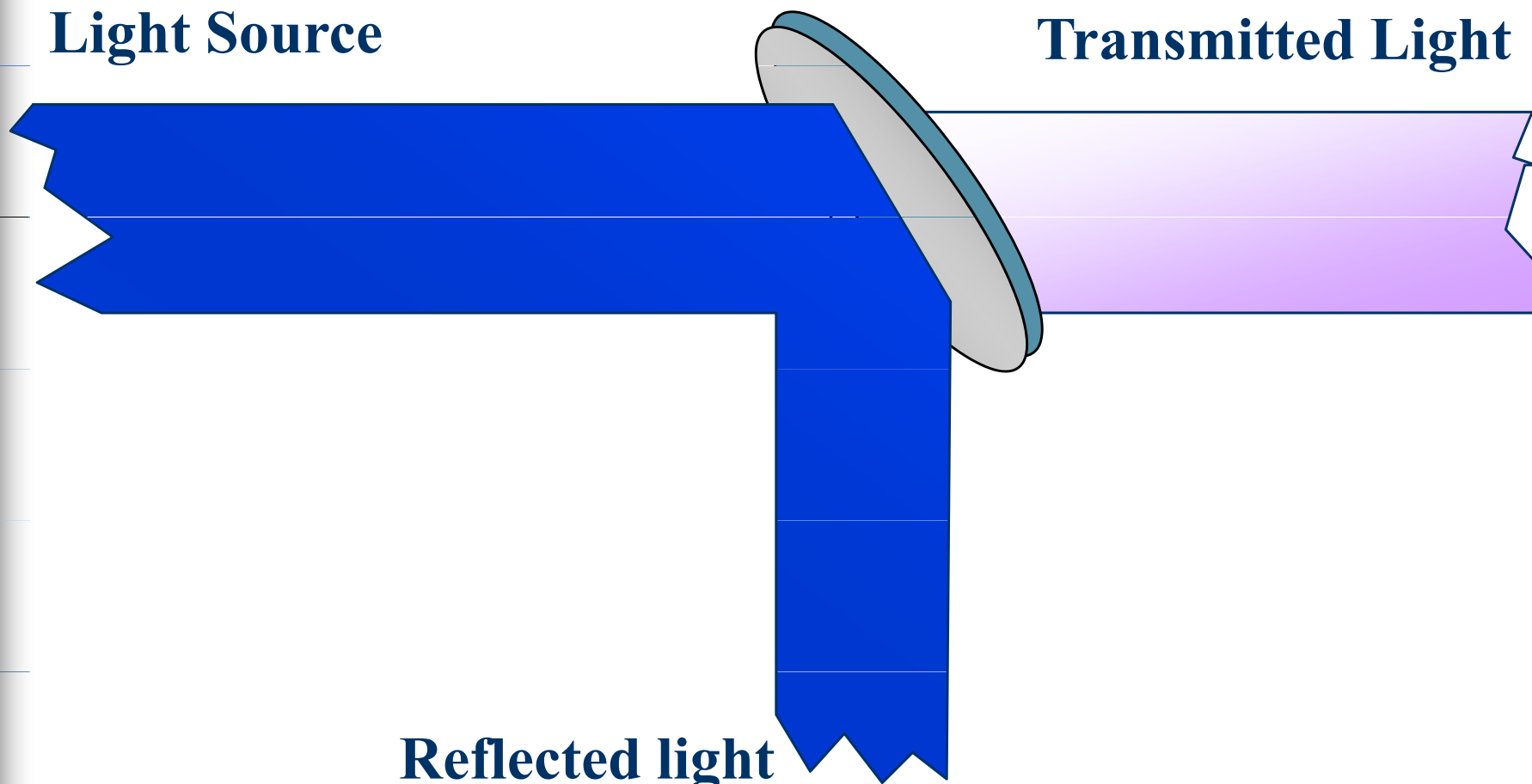
# Dichroic Filter/Mirror

**Filter placed at 45°**

**Light Source**

**Transmitted Light**

**Reflected light**





# Optika - uspořádání filtrů

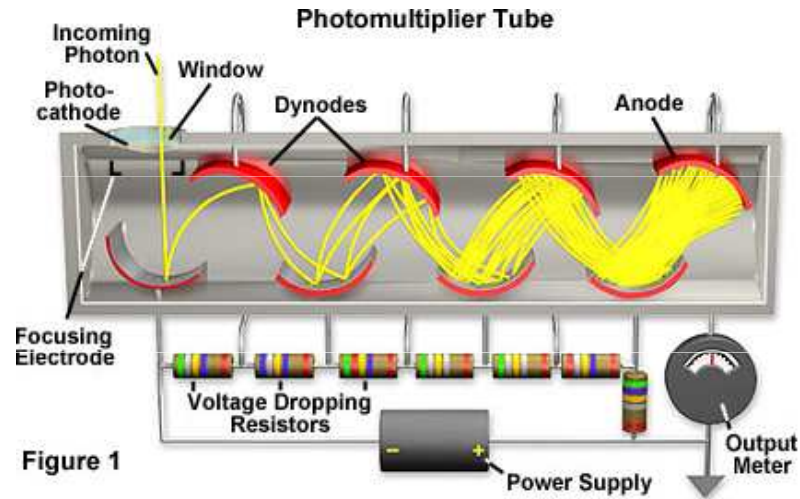
- k společnému měření více než jednoho „scatteru“ nebo fluorescence , používáme **mnohonásobné kanály** (a detektory)
- multikanálové uspořádání musí splňovat
  - **spektrální vlastnosti** použitého fluorochromu
  - **správný řád uspořádání** filtrů a zrcadel



# 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)



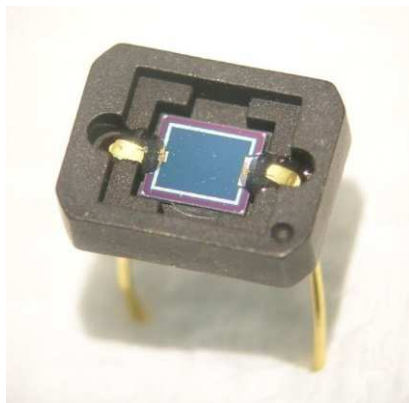
Základní charakteristika:

- 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://hamamatsu.magnet.fsu.edu/articles/photomultipliers.html>





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

## “bežná“ fotodioda

Porovnání s PMT

Výhody:

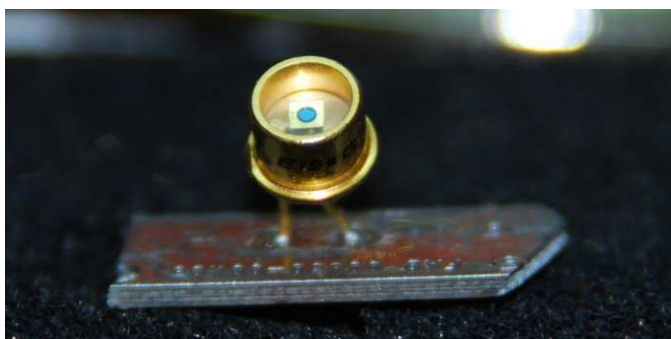
1. excelentní linearita signálu
2. rozsah spektrální detekce 190 nm to 1100 nm (silicon)
3. nízký šum
4. Odolnost vůči mechanickým vlivům
5. nízká cena
6. malá velikost a hmotnost
7. dlouhá životnost
8. Vysoká kvantová účinnost (~80%)
9. Nepotřebuje vysoká napětí

Nevýhody

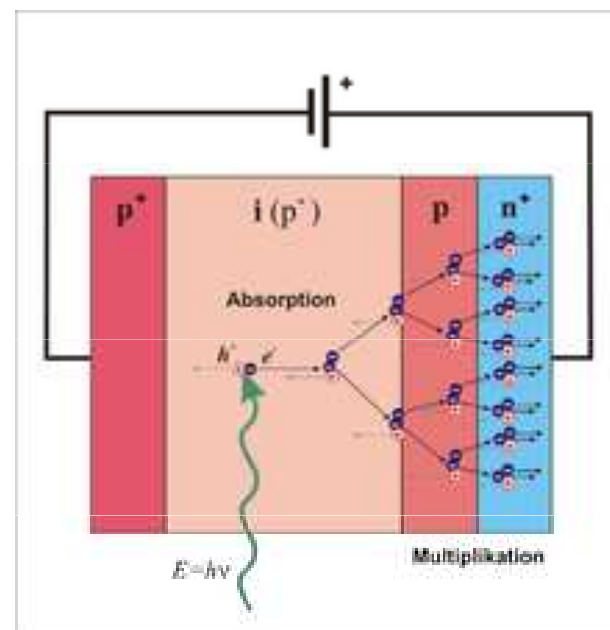
1. Malá plocha
2. Nemožnost integrálního zesílení
3. Mnohem nižší citlivost
4. Počítání fotonů pouze u speciálních produktů
5. Kratší čas odpovědi

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

- Vysoce citlivé polovodiče - srovnatelné s PMT



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

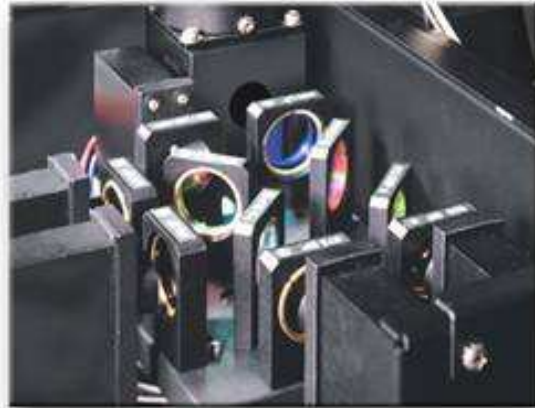
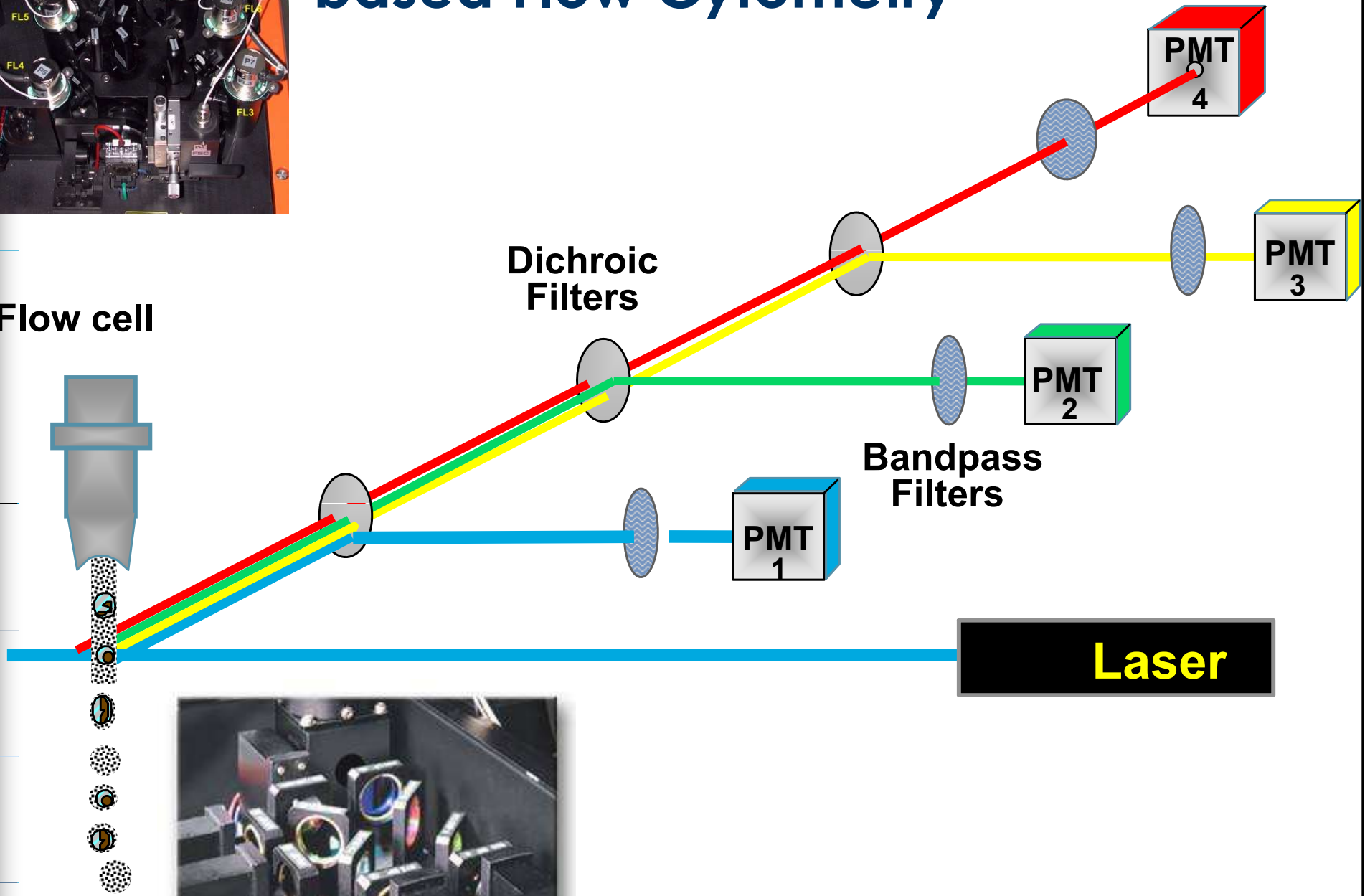




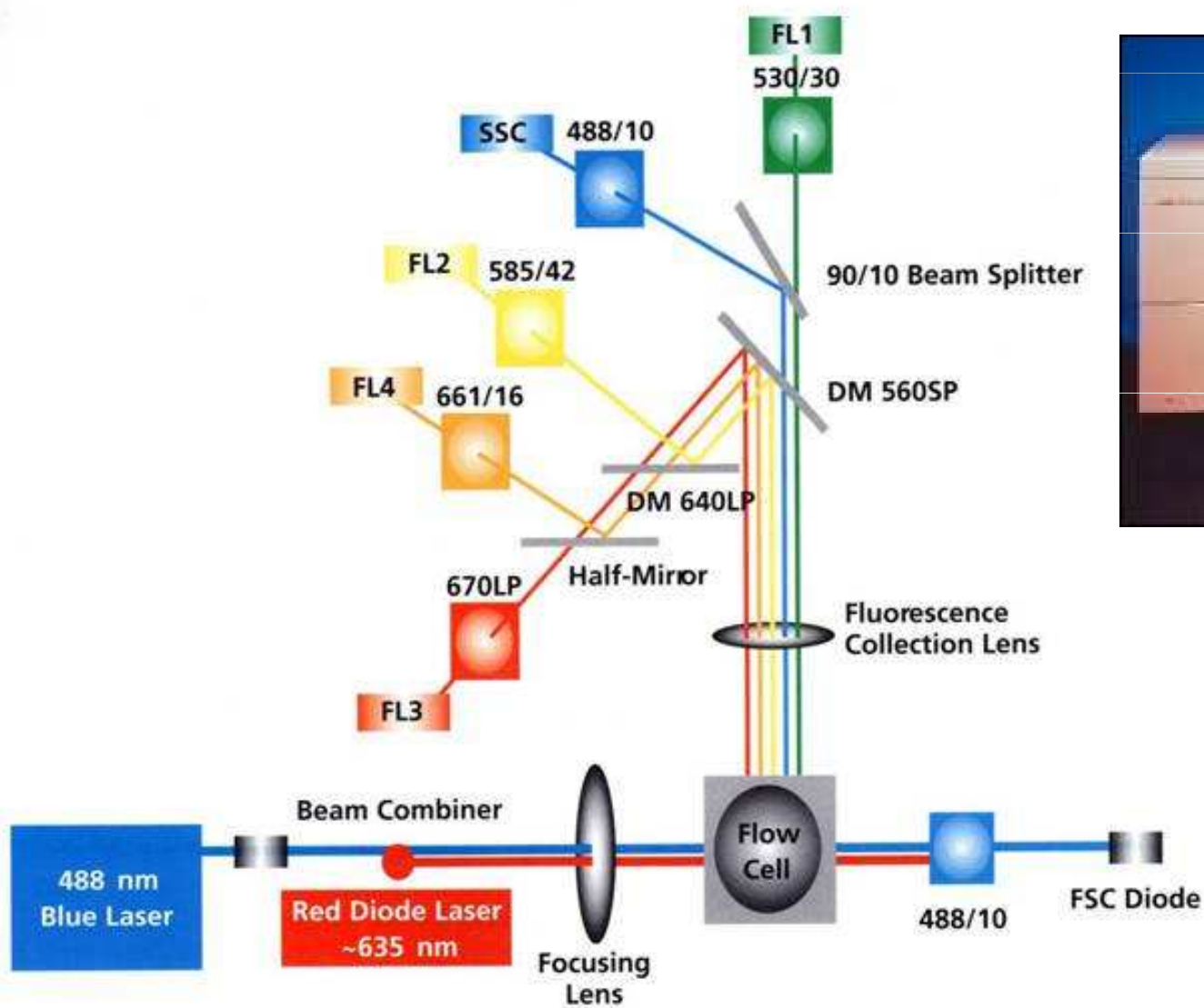
# Example Channel Layout for Laser-based Flow Cytometry



Flow cell

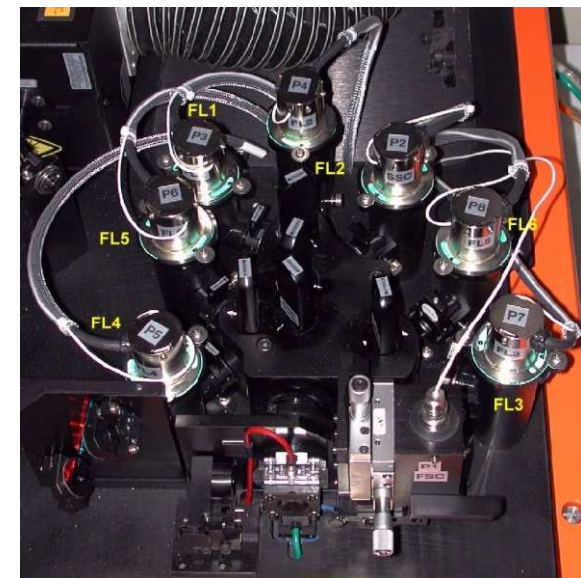
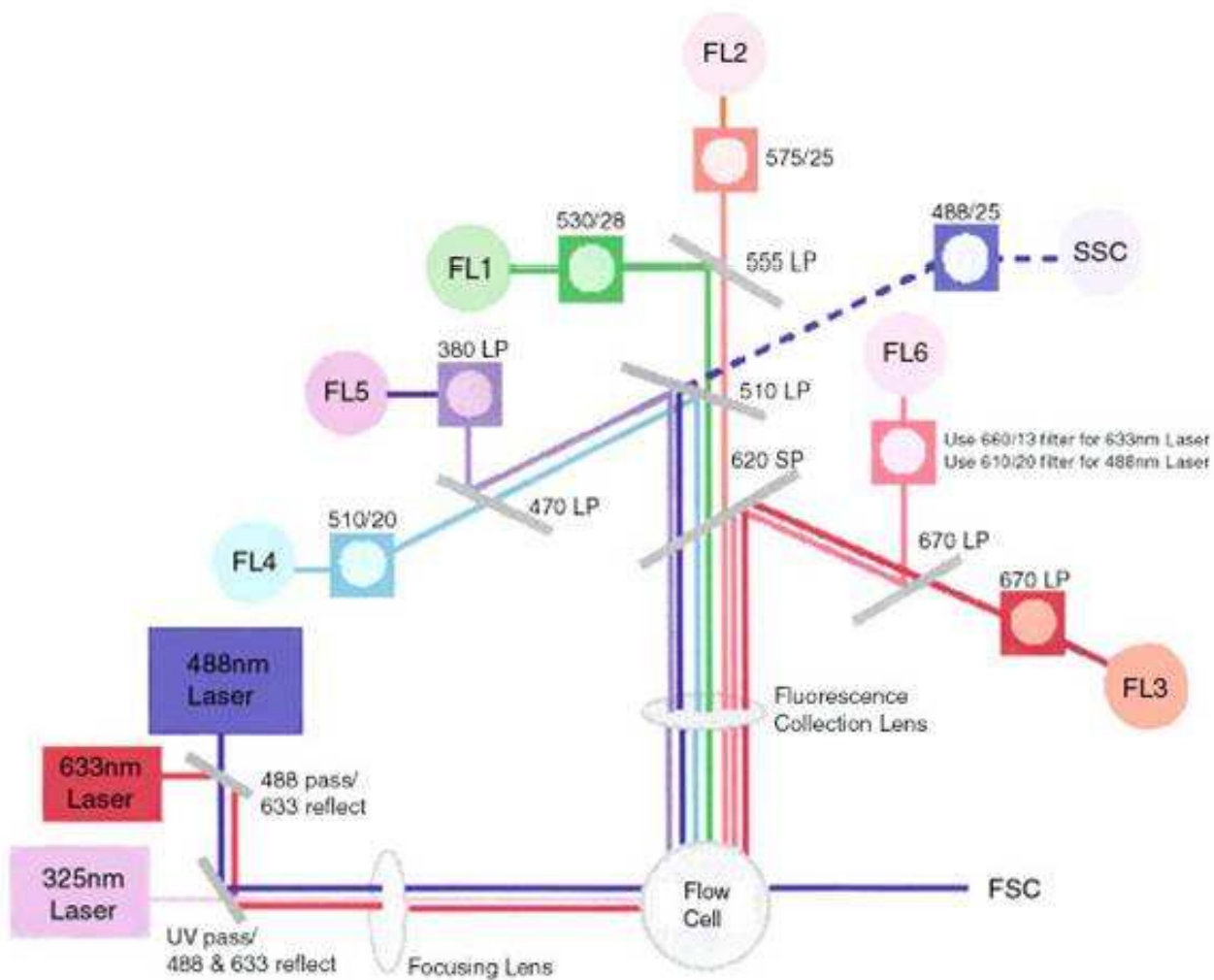


# BD FACSCalibur system

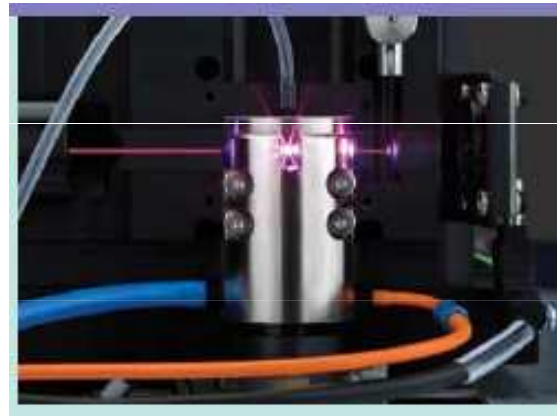
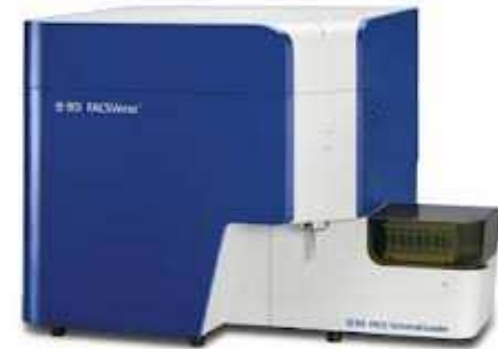


[http://www.bdbiosciences.com/immunocytometry\\_systems/](http://www.bdbiosciences.com/immunocytometry_systems/)

# BD LSR II system



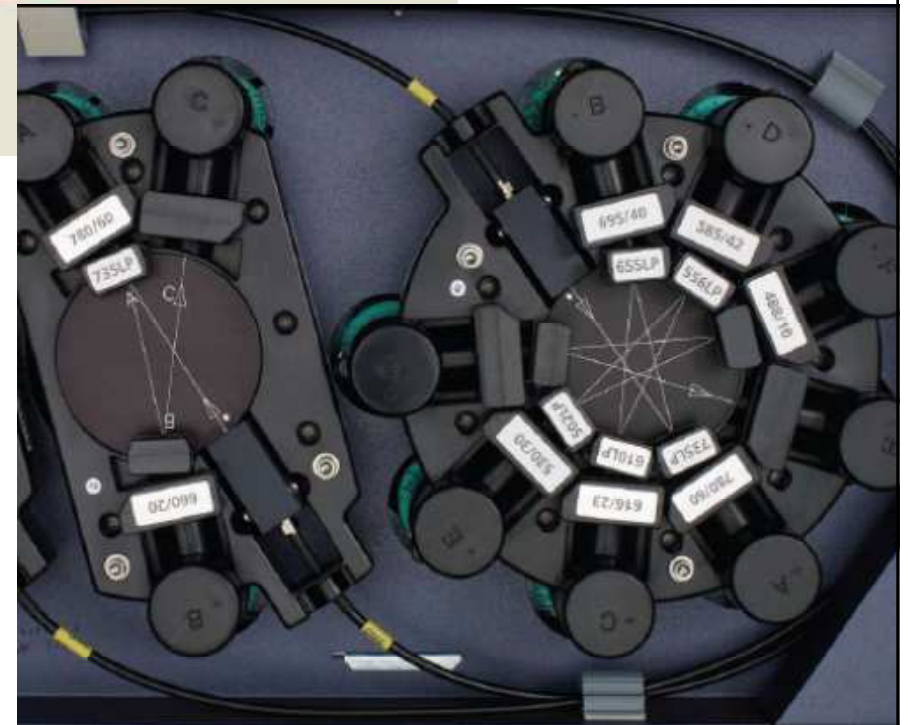
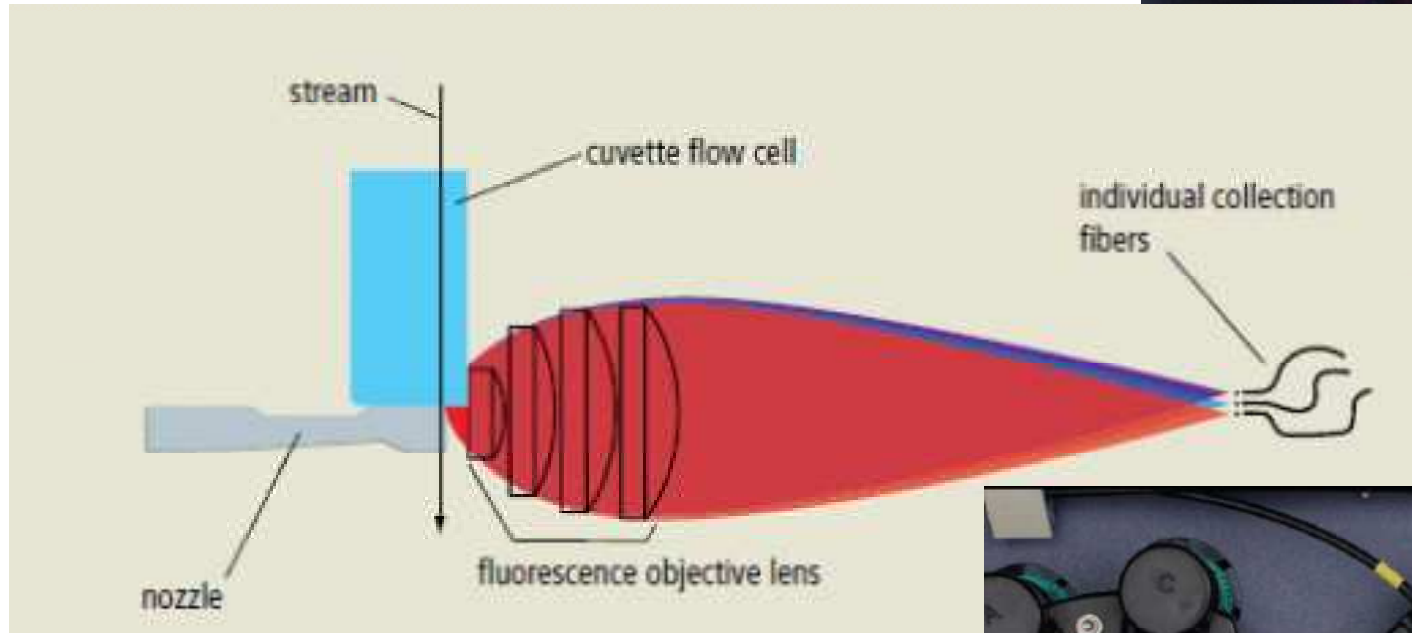
# BD FACSVerser system



<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.

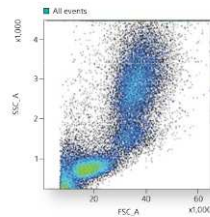
**Microfluidics flow cell chip** maximizes signal with auto positioning to guarantee high sensitivity. Made of durable plastic with an embedded quartz cuvette, the chip is easy to replace when needed.



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.

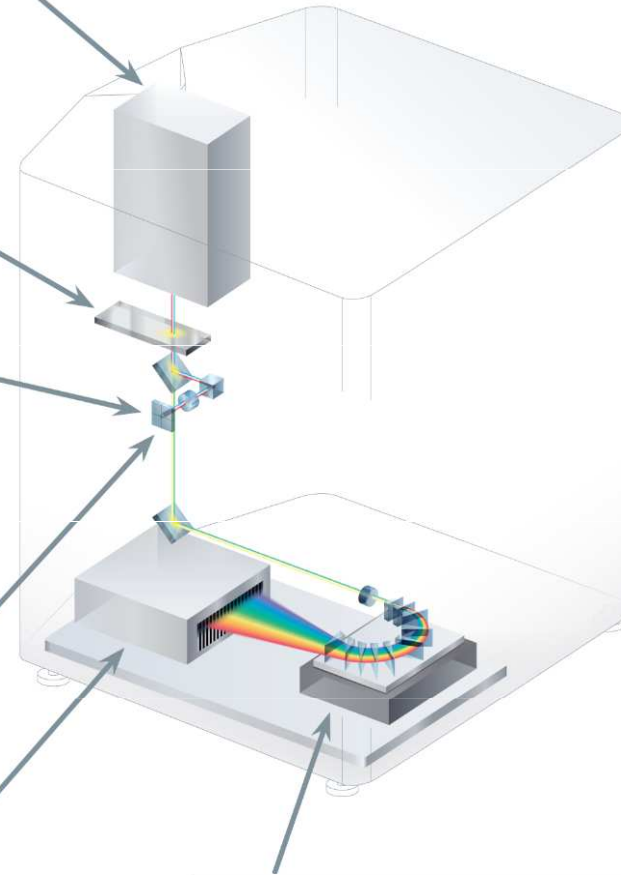
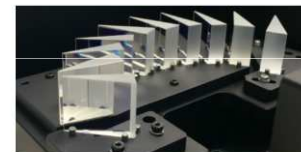


Emitted light is directed through a **32 Channel PMT** that produces 66 data points of signal detection to analyze emitted photons from 420nm to 800 nm to ensure accurate visualization.

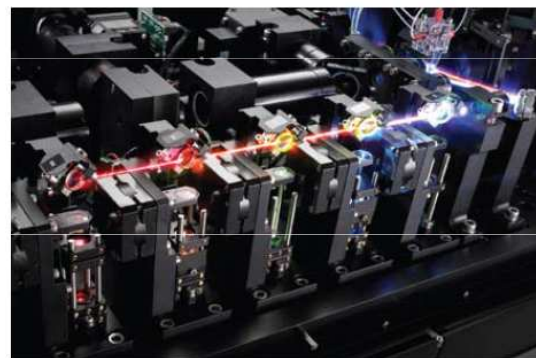


## A unique prism collection system

Delivers light through 10 consecutive prisms allowing optimal signal separation while minimizing light loss.



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

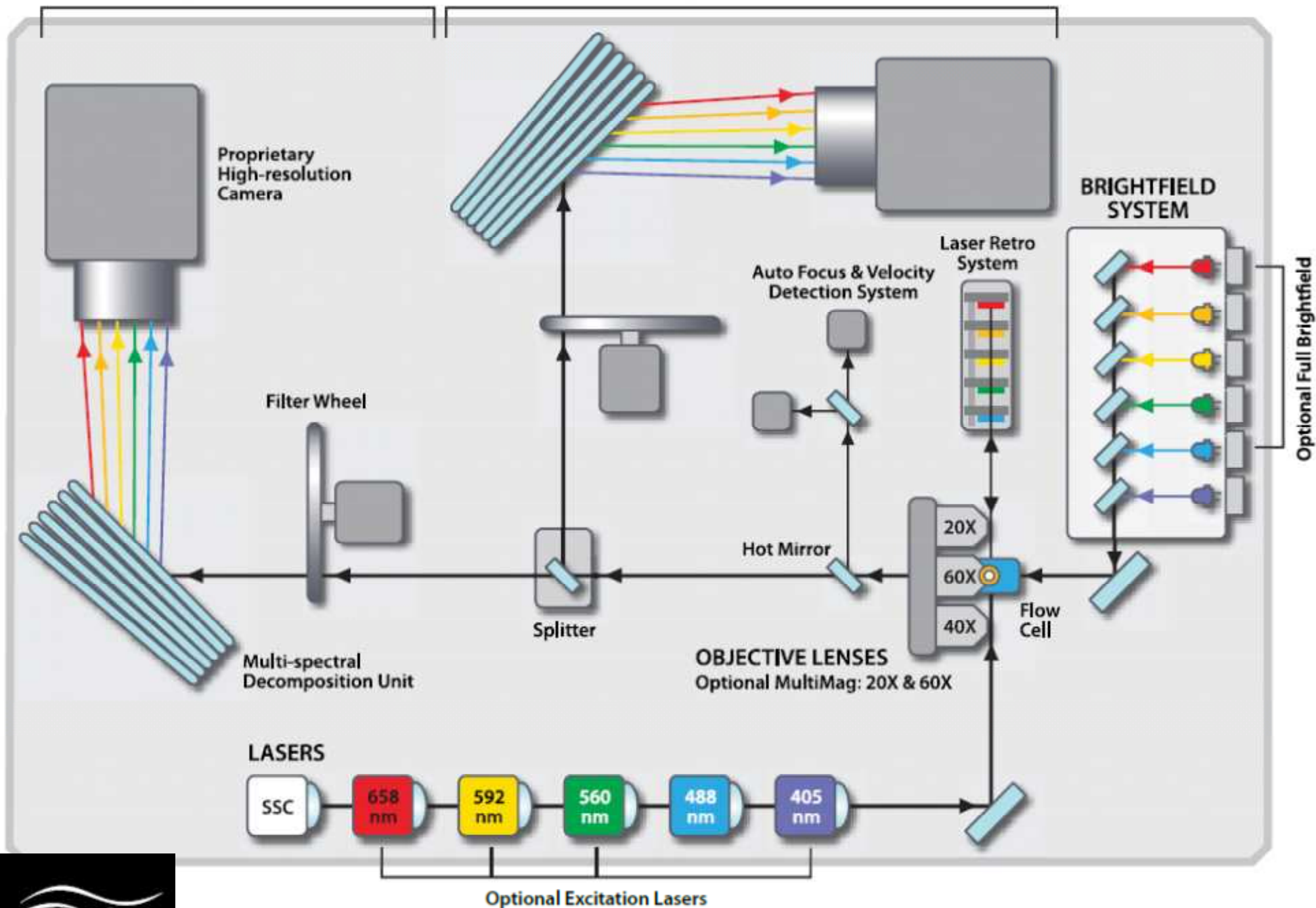


# STANDARD COLLECTION SYSTEM

Image Channels: 1-6

# OPTIONAL COLLECTION SYSTEM

Image Channels: 7-12

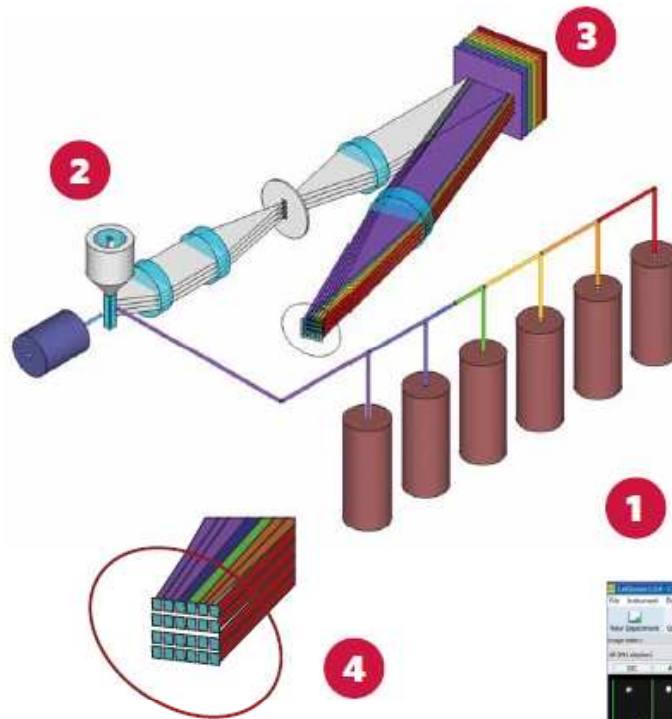


# Amnis - aplikace

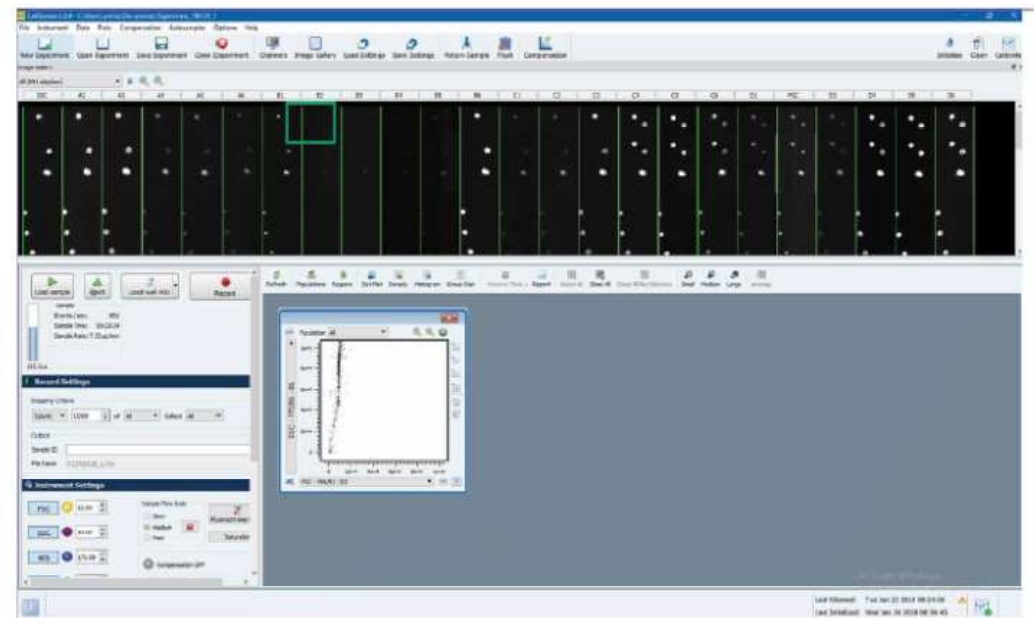




# CellStream, Luminex

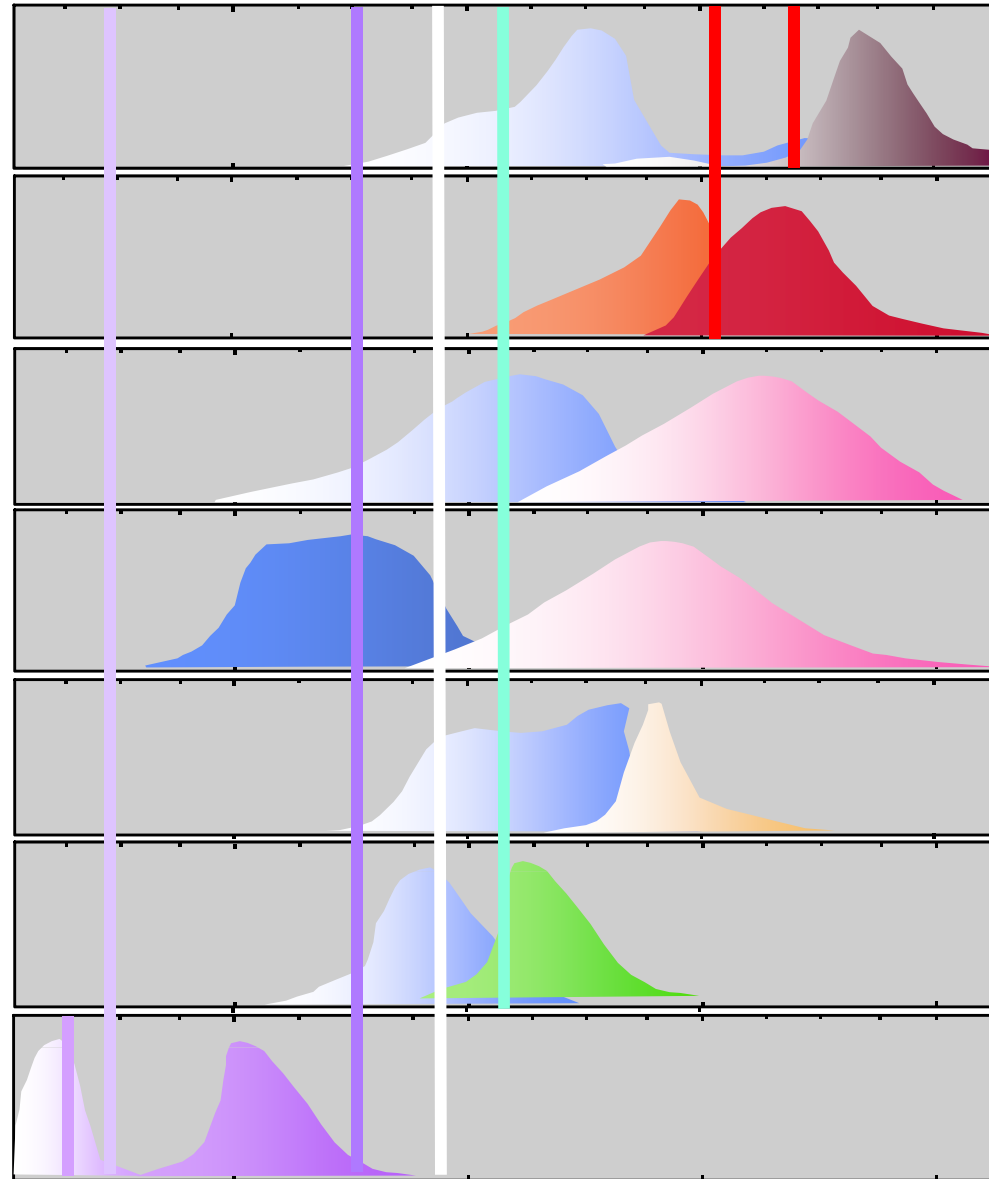


Inside the 7-Laser CellStream\* System



**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***

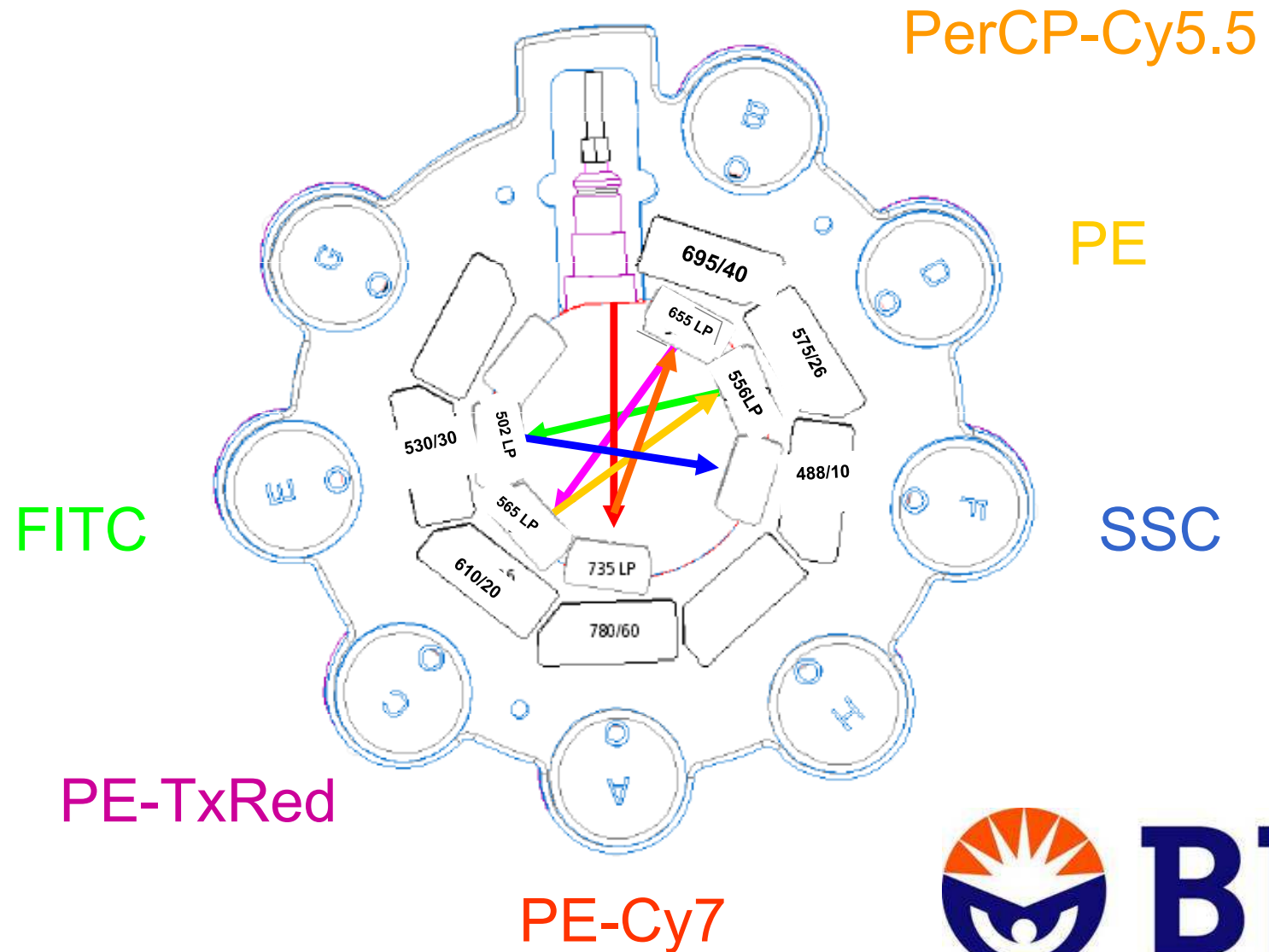
***PE***

***FITC***

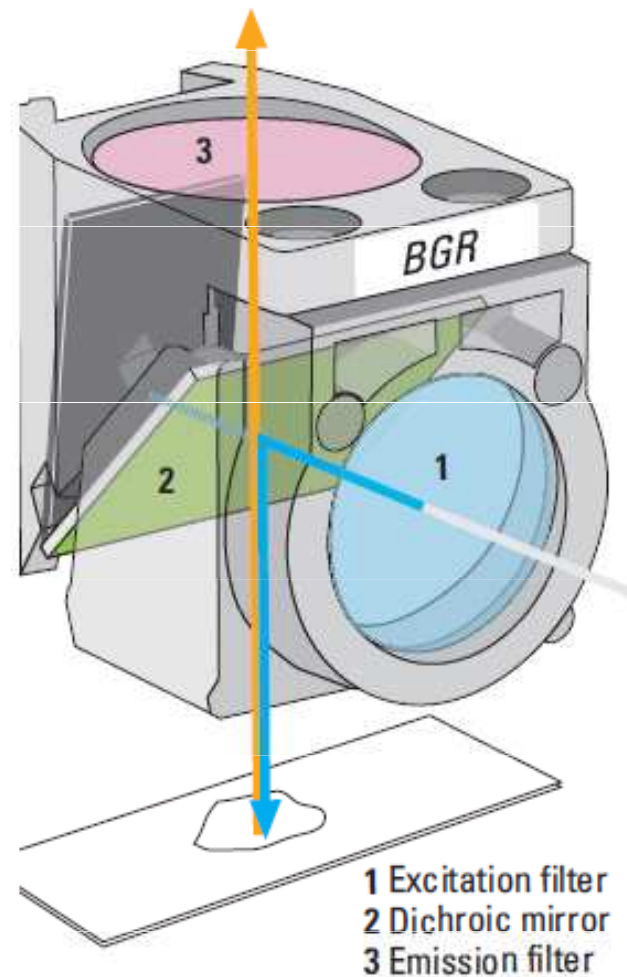
***cis-Parinaric acid***



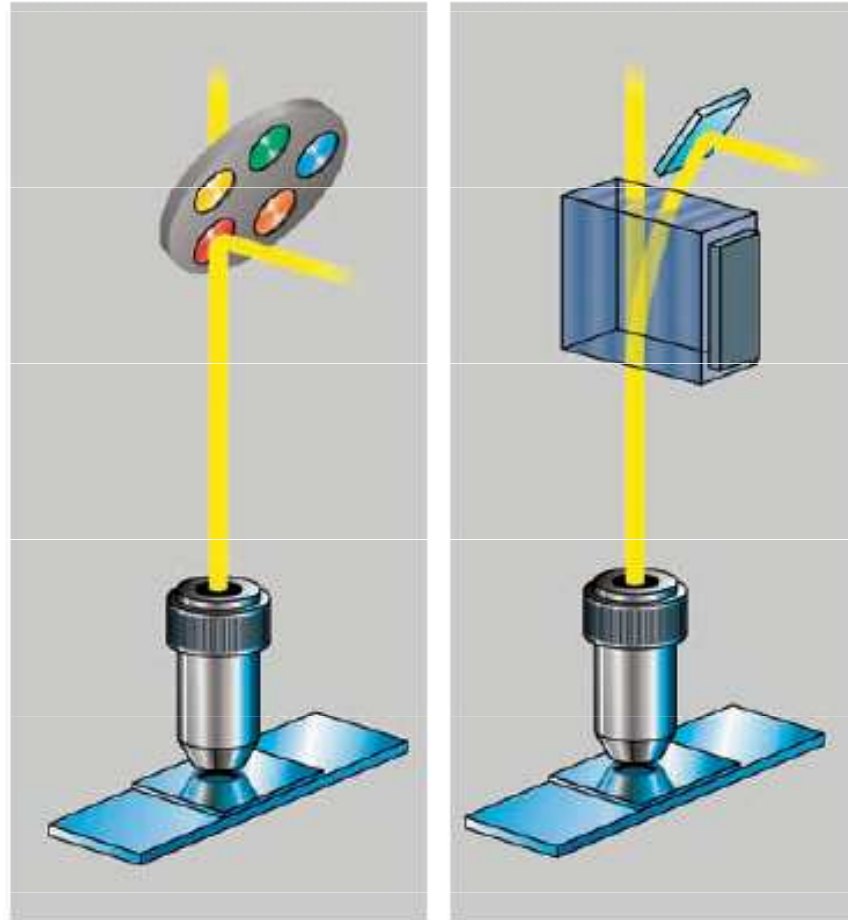
# Octagon Detection System



# “kostka” pro konvenční fluorescenční mikroskop



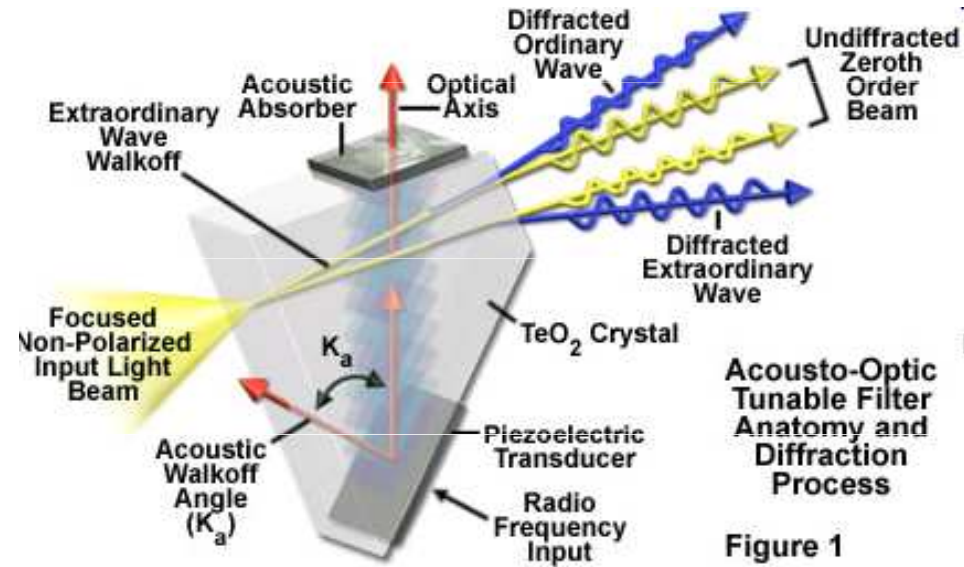
# Acousto Optical Beam Splitter AOBS®



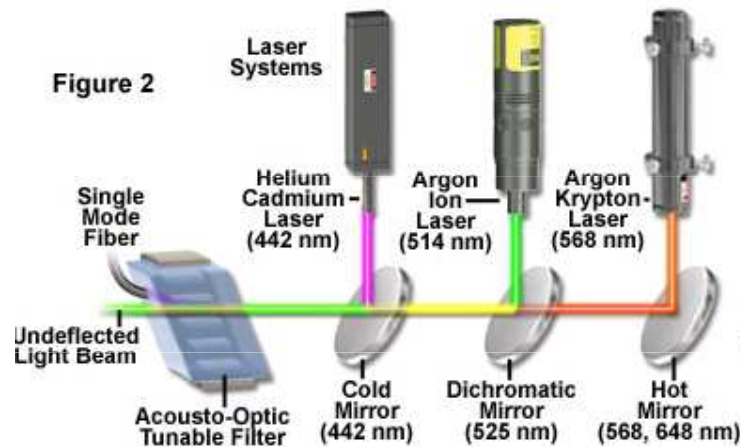
Left: conventional beam splitting by dichroic mirrors requires many optical elements with fixed properties.

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**

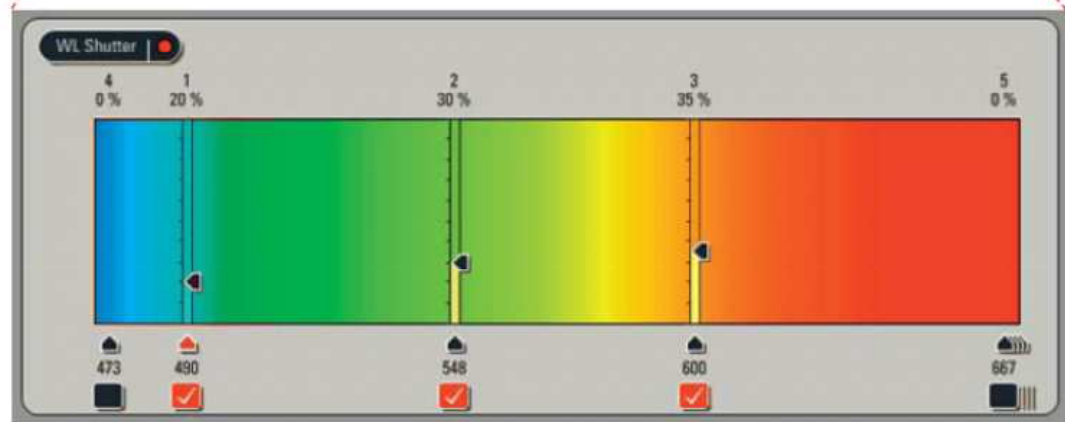
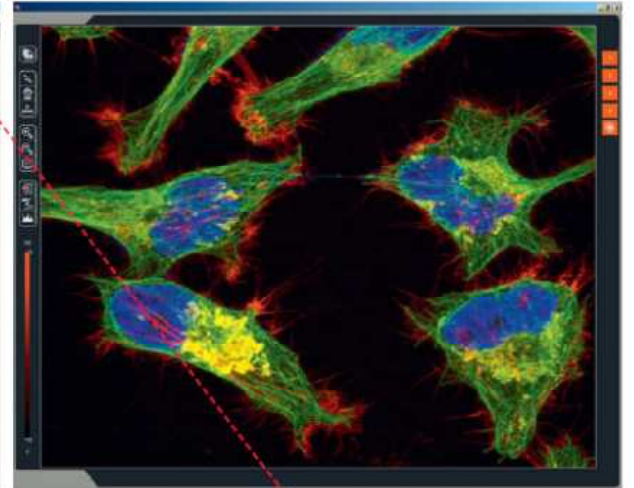
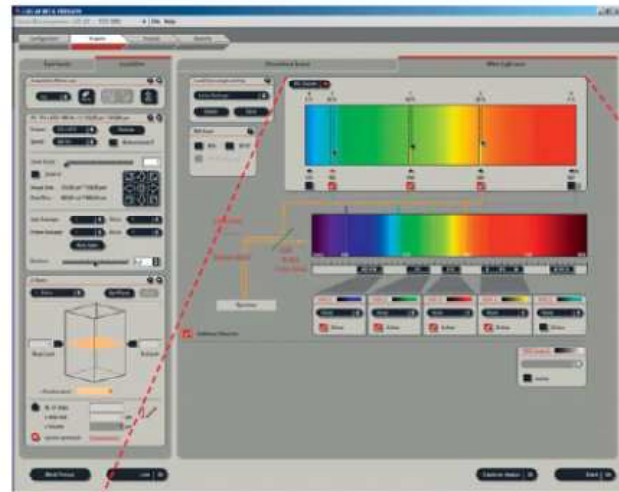
**Cytometry**

PART A  
Journal of the  
International Society for  
Advancement of Cytometry

## Supercontinuum White Light Lasers for Flow Cytometry

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

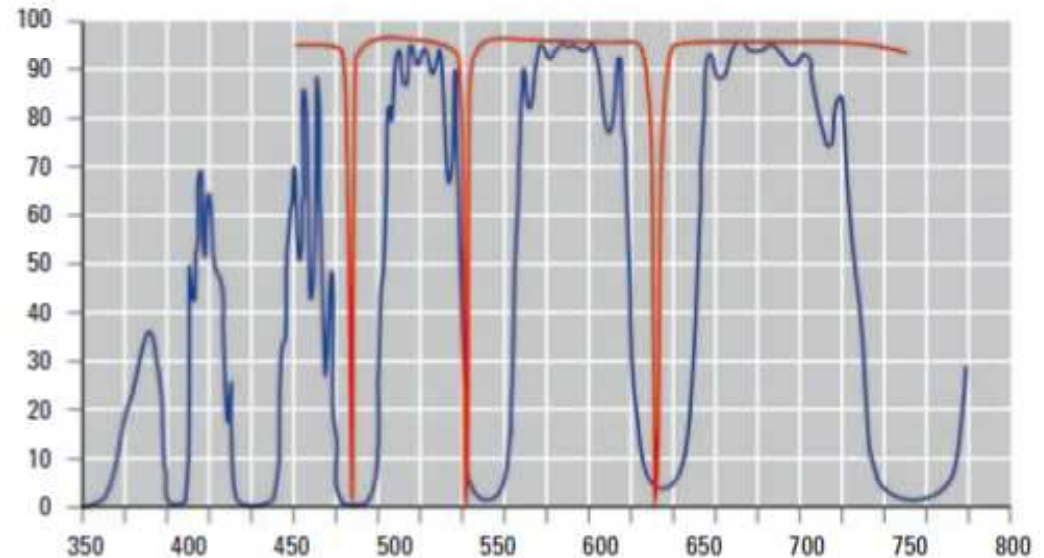
Cytometry Part A • 75A: 450–459, 2009





# 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 Viewers



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

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

<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.