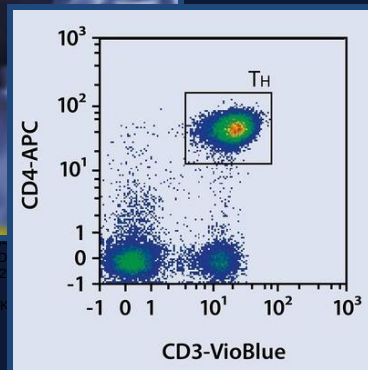
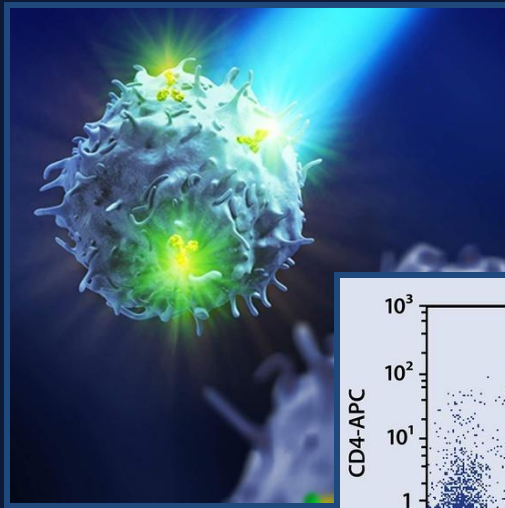


Co i jak mierzy cytometr przepływowy?

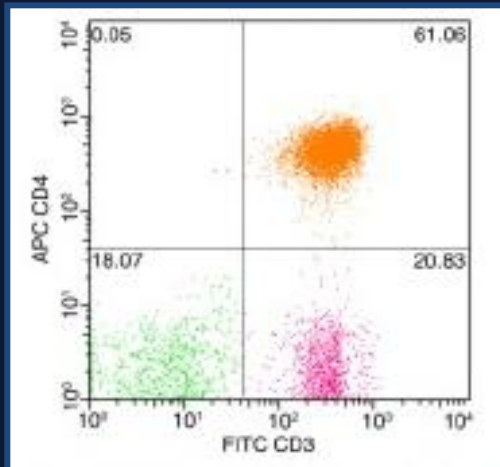
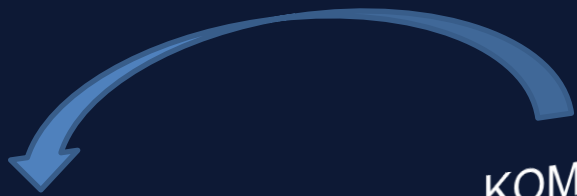
Ćwiczenia z Immunologii



dr Ewelina Kiernozek

Zakład Immunologii
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski

Technika Cytometrii Przepływowej



ANALIZA

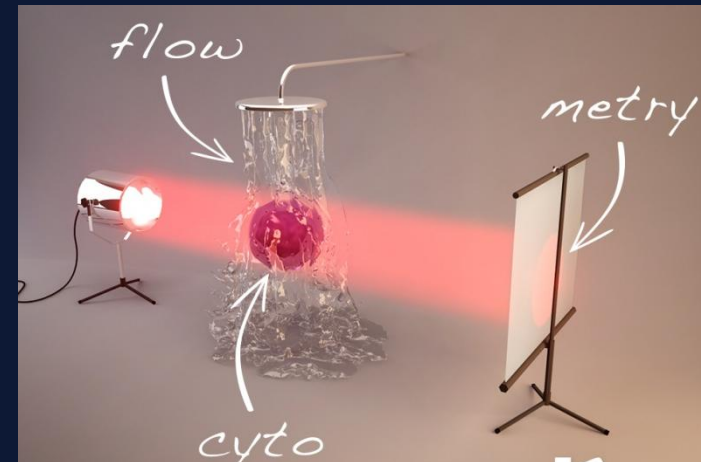


PRZECIWCIAŁO

Technika Cytometrii Przepływowej

Cytometria przepływowa (ang. „flow cytometry”)

- ✓ Szybki pomiar dużej liczby pojedynczych komórek lub "cząstek" biologicznych w strumieniu cieczy w krótkim czasie
- ✓ Wykrywanie bardzo rzadkich populacji
- ✓ Ilościowa i jakościowa analiza



Cytometry przepływowe w Zakładzie Immunologii

- ANALIZATORY: FACSCalibur
FACSVerse
- SORTER: FACS Aria

Analizator FACSCalibur



cytometr przepływowy

- 2 lasery wzbudzające:
Blue 488nm i Red 635nm
- detekcja fluorescencji:
530/30, 585/42, 650LP (Blue)
661/16 (Red)
- jednoczesna analiza 6 parametrów
- oprogramowanie CellQuest

Analizator FACSVerse



cytometr przepływowy z automatycznym
podajnikiem

- 3 lasery wzбудzające:

Violet 405nm, Blue 488nm i Red 640nm

- detekcja fluorescencji:

448/45, 528/45 (Violet),

488/15, 527/32, 585/42, 700/54, 783/56 (Blue),

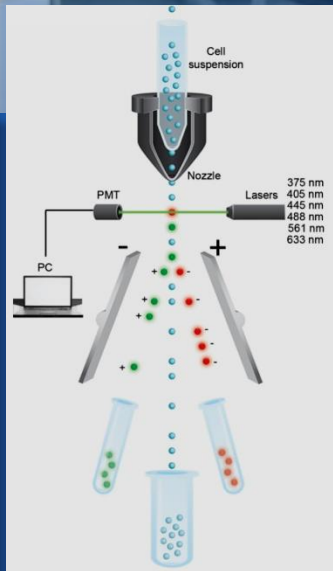
660/10, 783/56 (Red)

- jednoczesna analiza 11 parametrów

- oprogramowanie FacsSuite

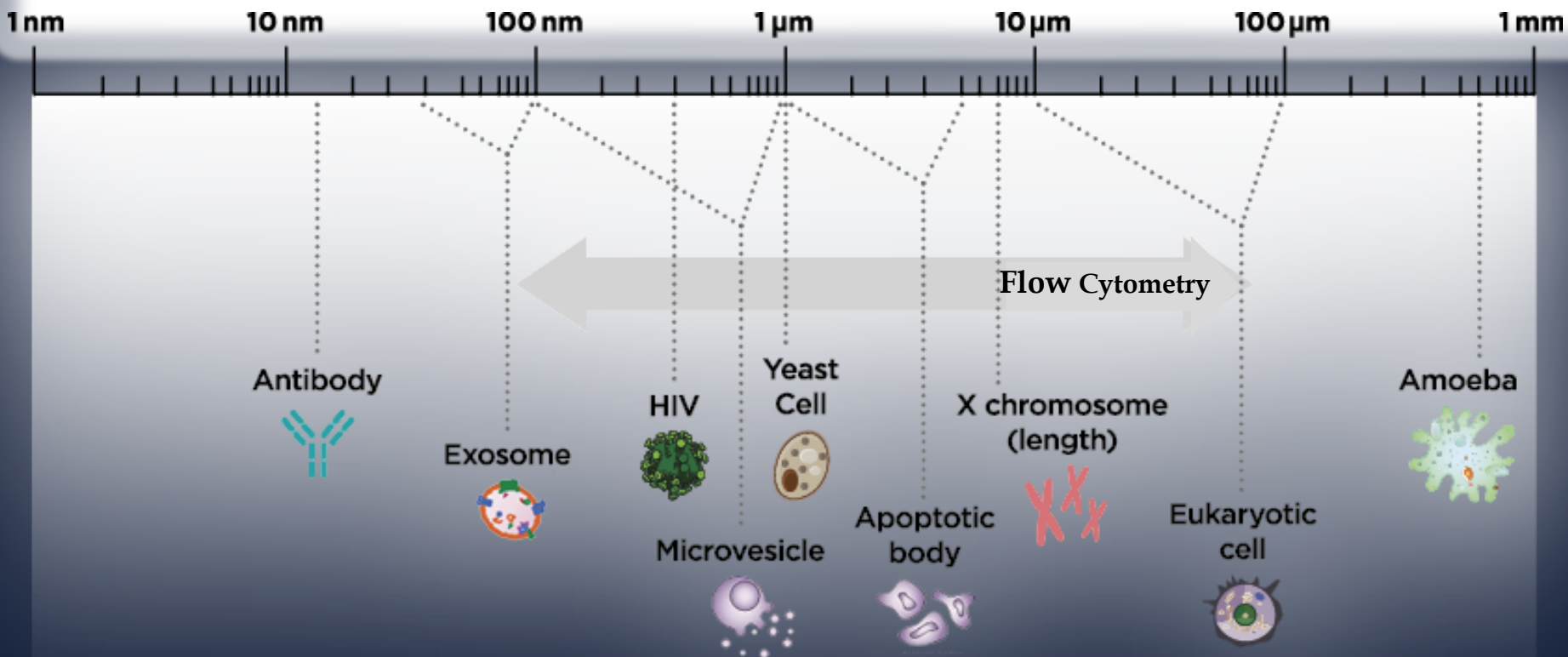
Sorter FACSAria

sortujący cytometr przepływowy



- 3 lasery wzbudzające:
Violet 405nm, Blue 488nm i Red 640nm
- detekcja fluorescencji :
450/40, 530/30 (Violet),
530/30, 585/42, 616/23, 695/40, 780/60 (Blue),
660/20, 780/60 (Red)
- jednoczesna analiza 11 parametrów
- oprogramowanie FacsDiva

Parametry mierzone za pomocą cytometru



https://www.google.com/search?q=flow+cytometry+range+of+particles&tbm=isch&ved=2ahUKEwjnfqwwqVfoAhVMtaQKHePcDwUQ2cCegQIABAA&oeq=flow+cytometry+range+of+particles&gs_lcp=CgNpbWcQA1CWpQJYkK0DYNNqtA2gCcAB4AIAB6QKIAIEOkEIIM4xMC4wLjGYAQcGqAQGqAQnd3Mtd2l6LWltZw&scient=img&ei=QcGdXqeJMsZqkgXjub8o&bih=654&biw=1366&client=firefox-b-d#imgc=EzRZGFCv7CX3pM

Budowa cytometru przepływowego

Układ cieczy

- Wprowadza materiał badany (komórki, bakterie, kulki analityczne) do komory lasera oraz warunkuje przepływ liniowy

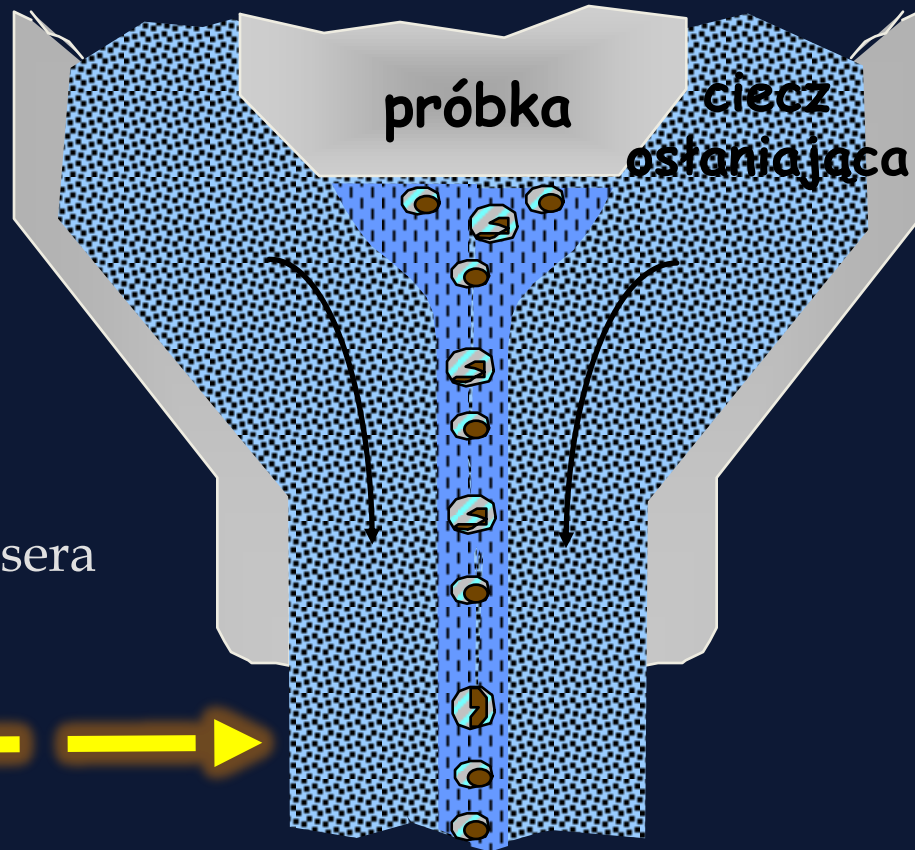
Układ optyczny

- Generuje i zbiera sygnały świetlne (rozproszenie i fluorescencję)

Układ elektroniczny

- Zamienia sygnały świetlne na elektroniczne impulsy, które dalej konwertowane są na znaki graficzne (PMT)

Układ cieczy



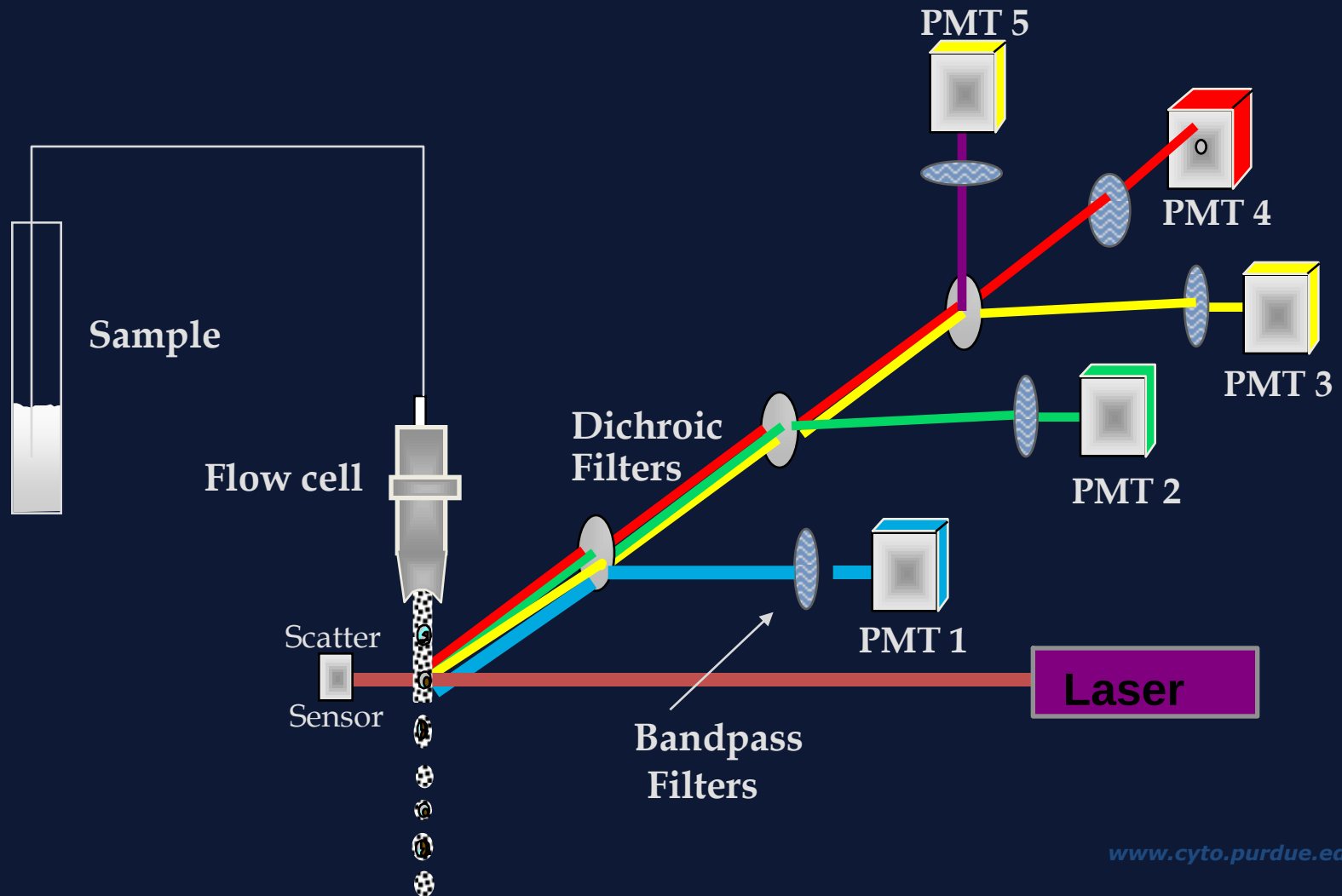
W przepływie liniowym
badanego materiału
zogniskowana wiązka lasera
„uderza” w pojedynczą
komórkę



<https://player.vimeo.com/video/82369615>

www.cyto.purdue.edu

Układ optyczny

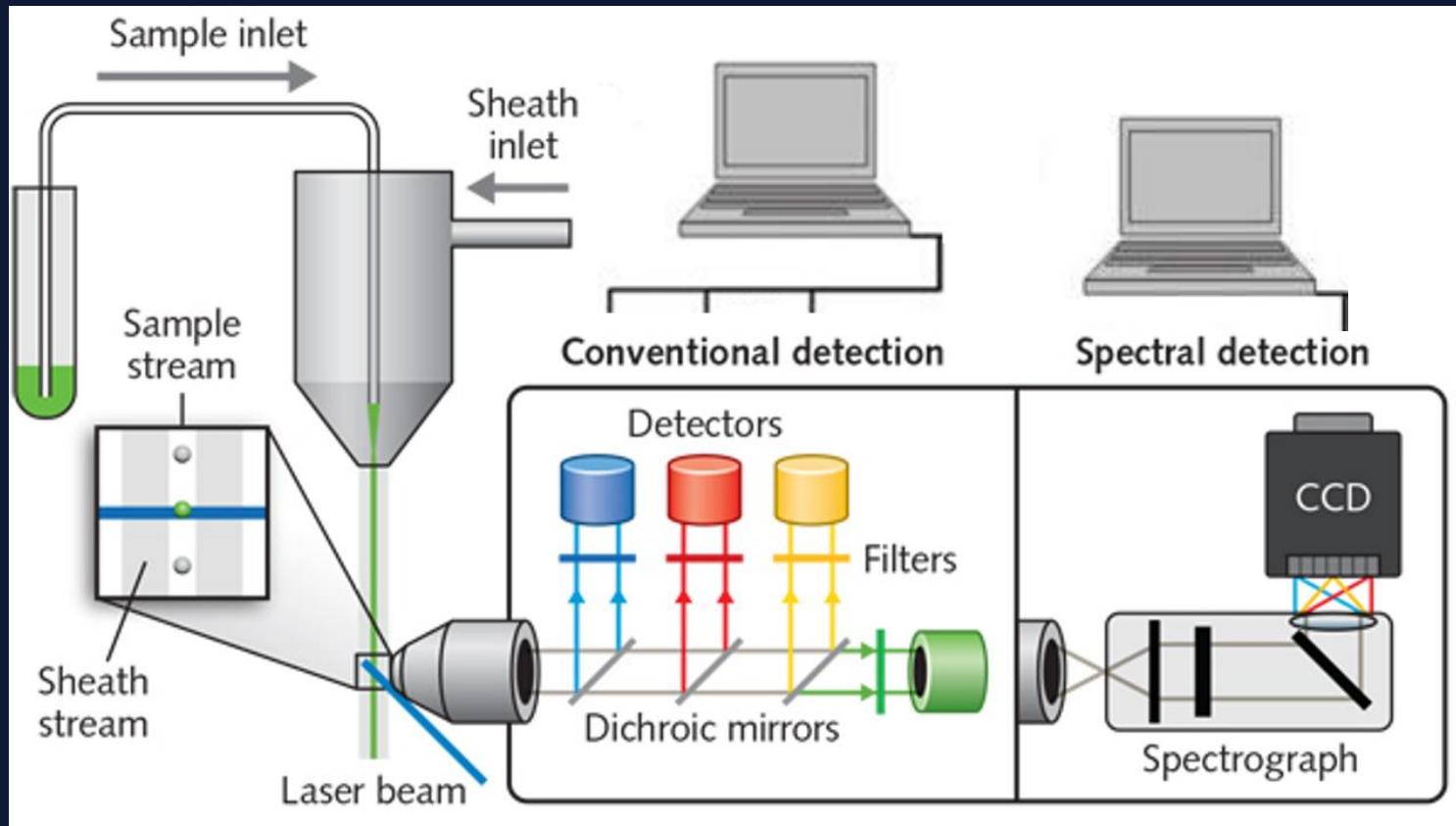


Układ elektroniczny

- Urządzenia do przetwarzania sygnału na obraz (wartości) cyfrowe,
- System komputerowy do przechowywania i obróbki danych



Cytometria spektralna

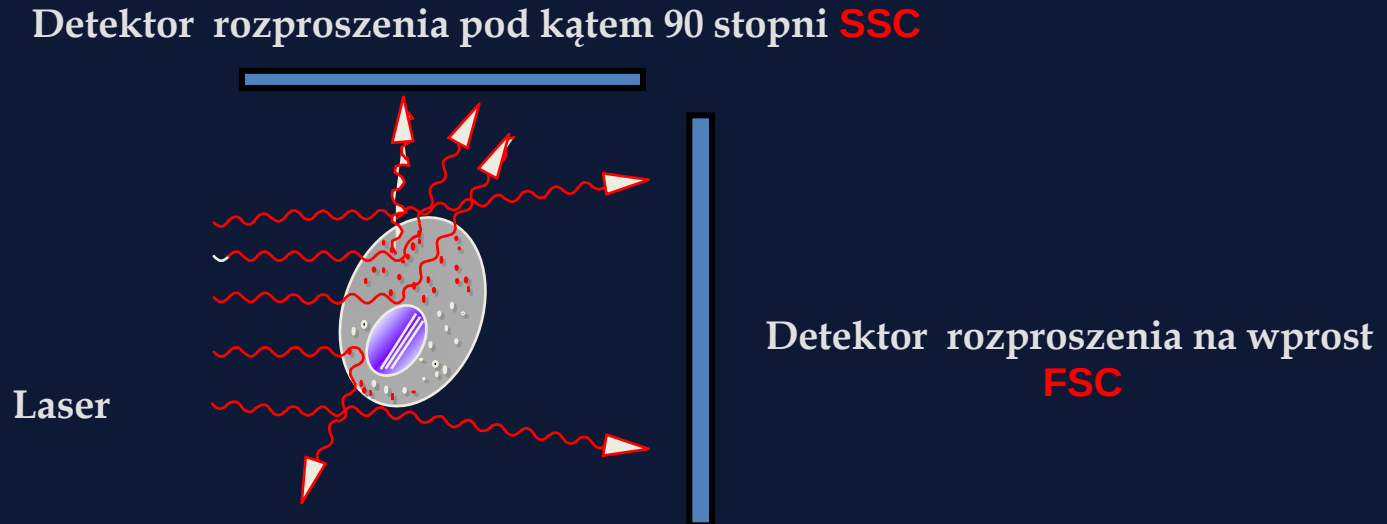


- Spectral flow cytometry measures all of the emission from cells
- Spectral unmixing replaces compensation
- Performance is equivalent or better than conventional flow cytometry
- Autofluorescence becomes an additional parameter rather than a source of background

Jakich informacji o komórce lub cząsteczkach analizowanych może dostarczyć nam badanie cytometryczne?

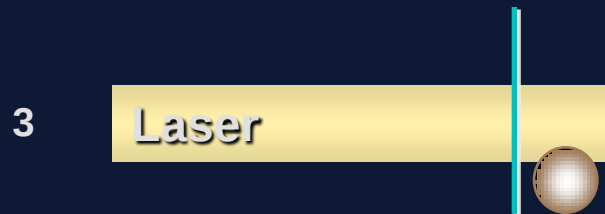
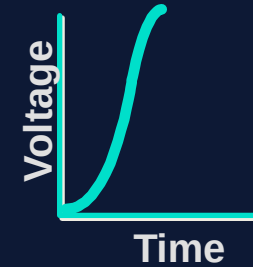
- Względna wielkość (Forward Scatter – FSC)
- Względna granulacja (Side Scatter – SSC)
- Względna wartość fluorescencji różnych fluorochromów połączonych z przeciwciałami

Właściwości FSC i SSC

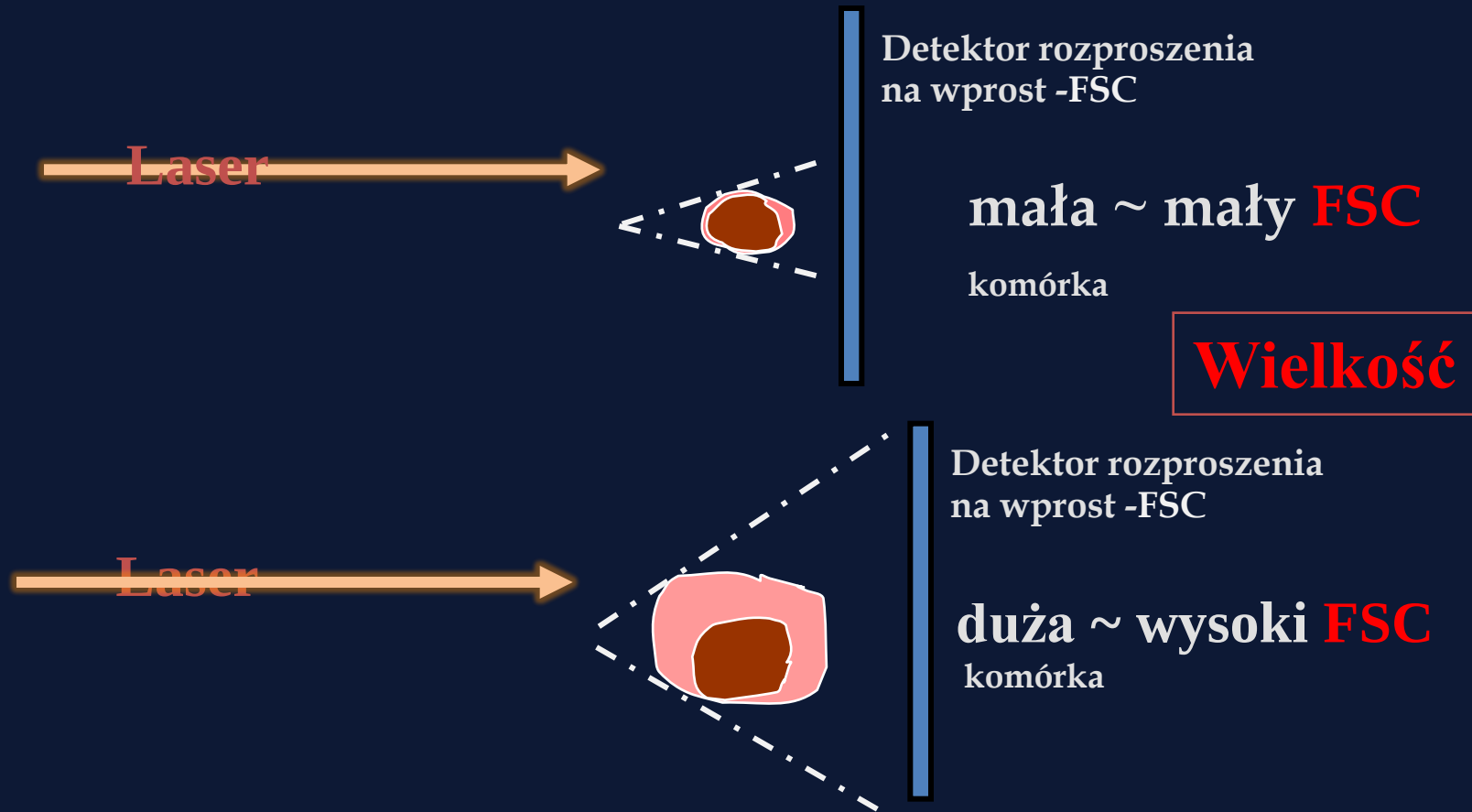


- **Rozproszenie na wprost**
Określa wielkość komórki
Mierzone wzdłuż osi padającego lasera na wprost
- **Rozproszenie boczne** — światło laserowe odbite i rozproszone
Określa gęstość i liczbę ziarnistości (względnie)
Mierzona pod kątem 90° w stosunku do wiązki laserowej

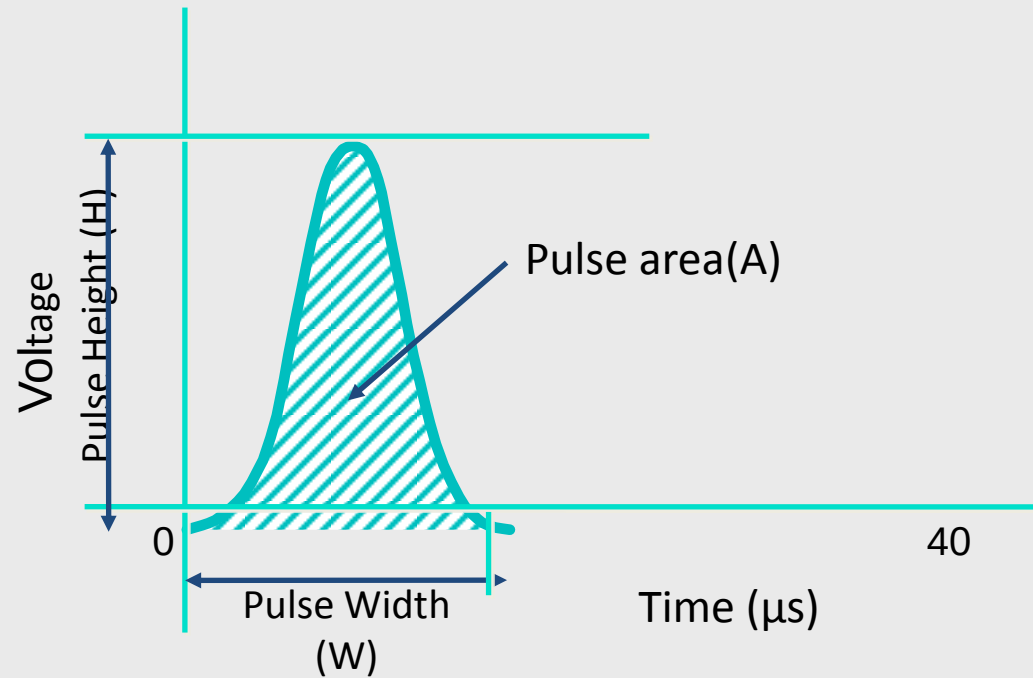
Tworzenie impulsu napięcia



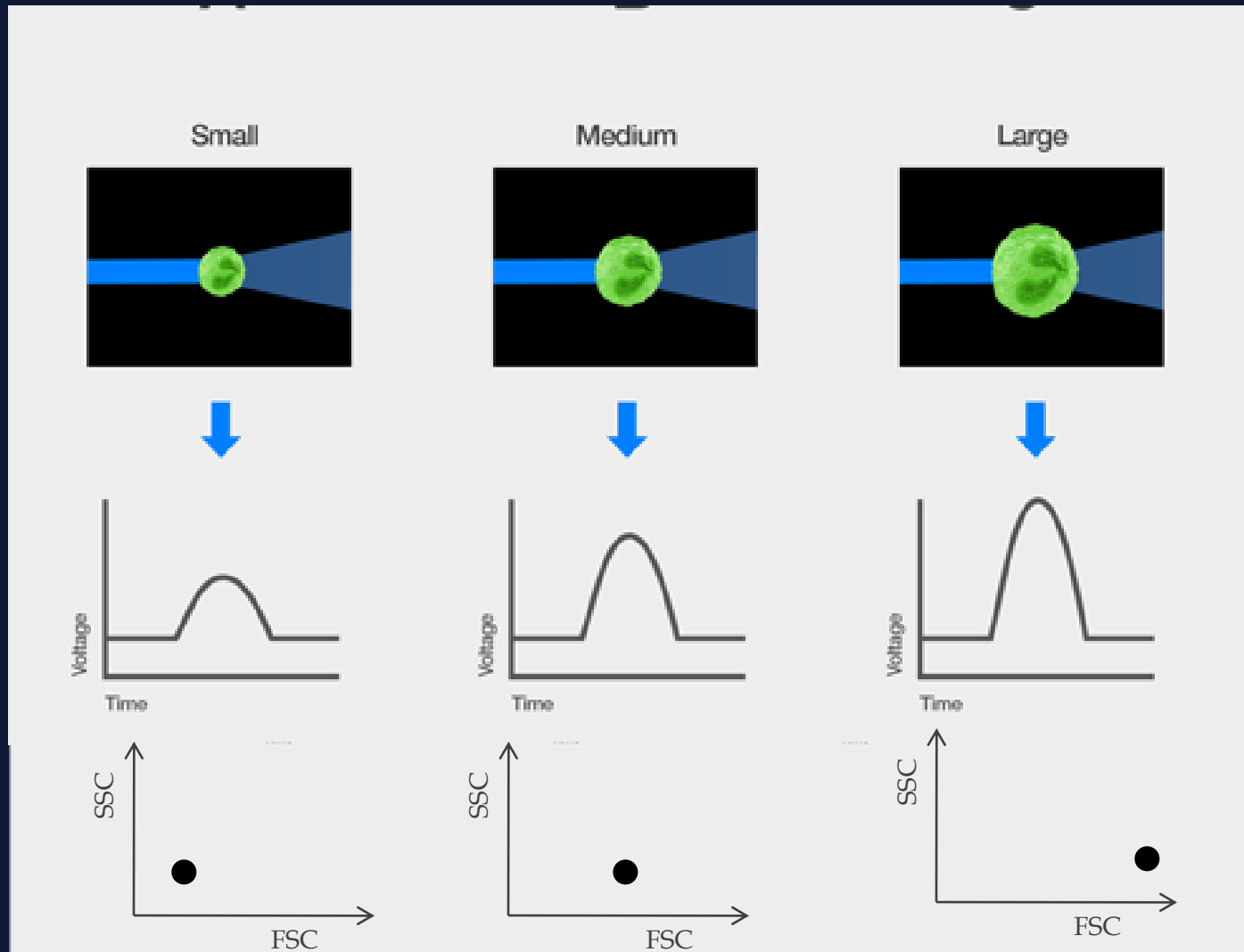
Rozproszenie na wprost (FSC)



Przetwarzanie sygnału

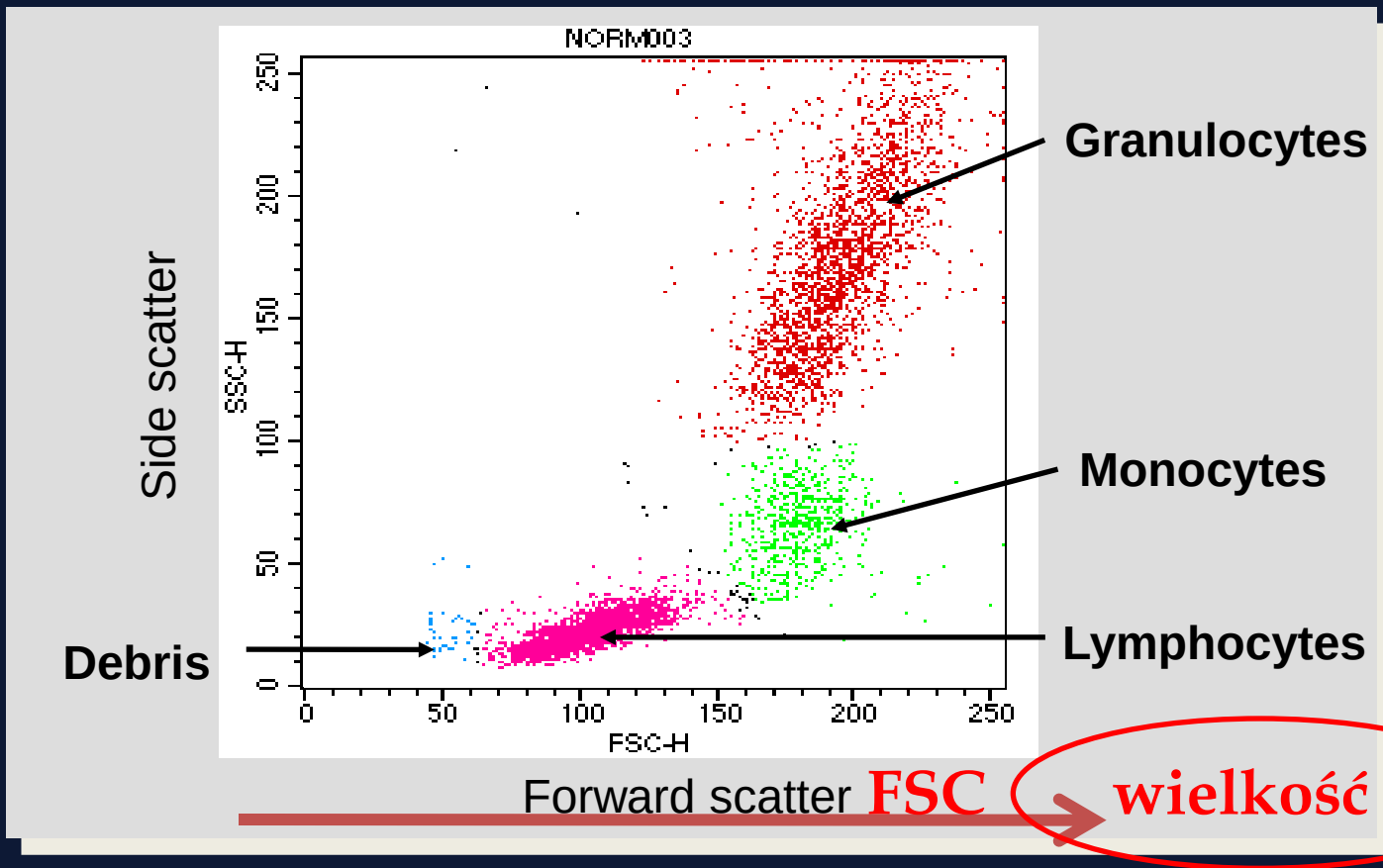


Wielkość komórki - FSC



<https://www.thermofisher.com/pl/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/electronics-flow-cytometer.html>

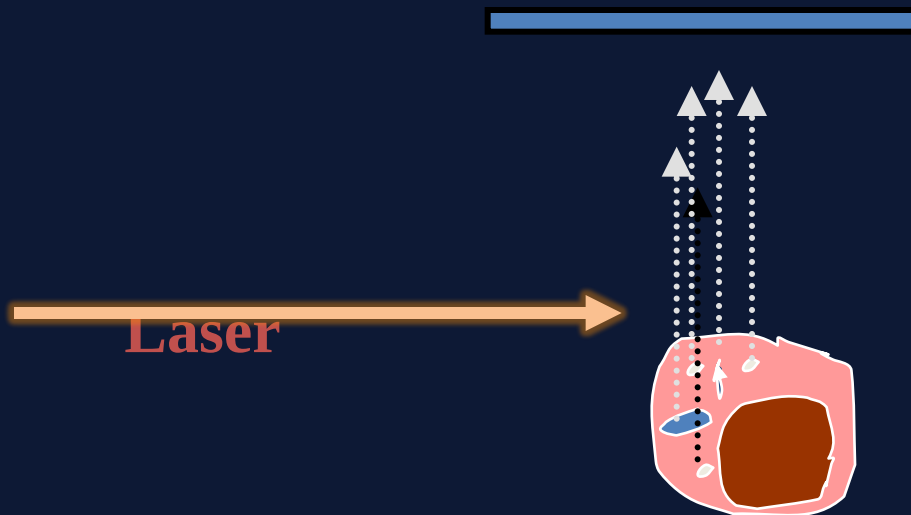
Właściwości FSC i SSC



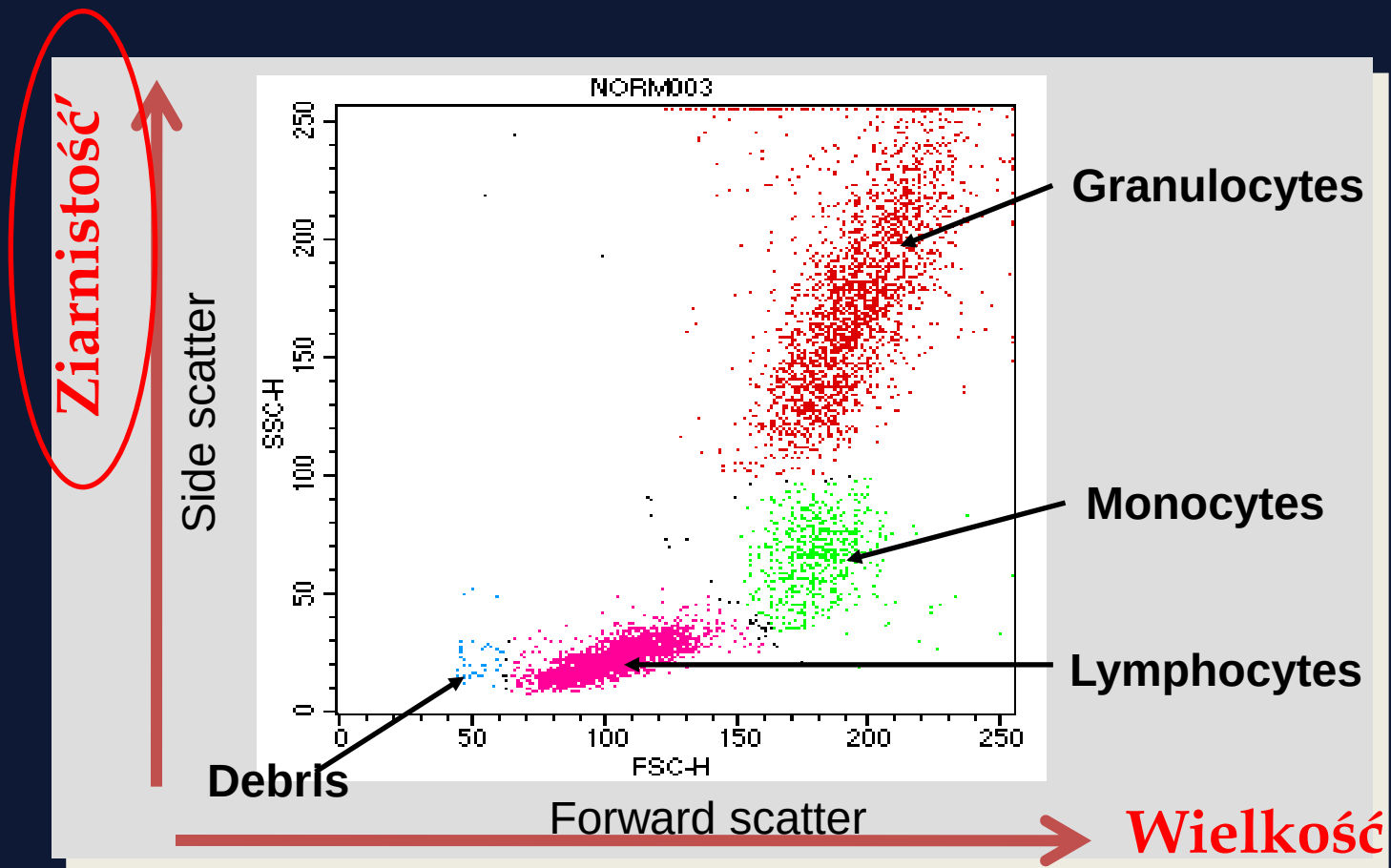
Rozproszenie boczne - SSC

Światło odbite i rozproszone
Pod kątem 90° w stosunku do wiązki

SSC
Ziarnistość



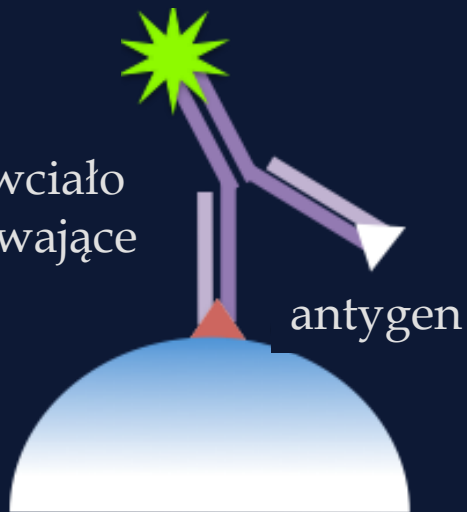
Właściwości FSC i SSC



Względna wartość fluorescencji

Fluorochrom FITC

Przeciwciało
wykrywające

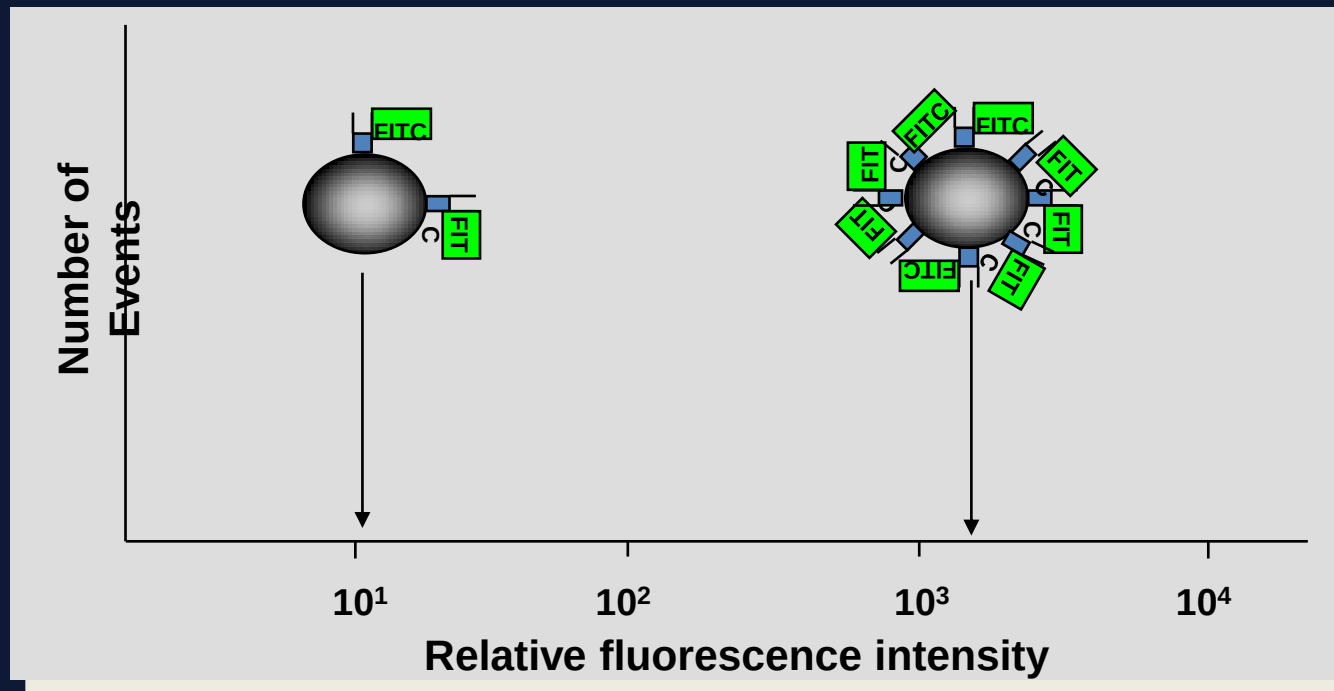


Fluorescencja

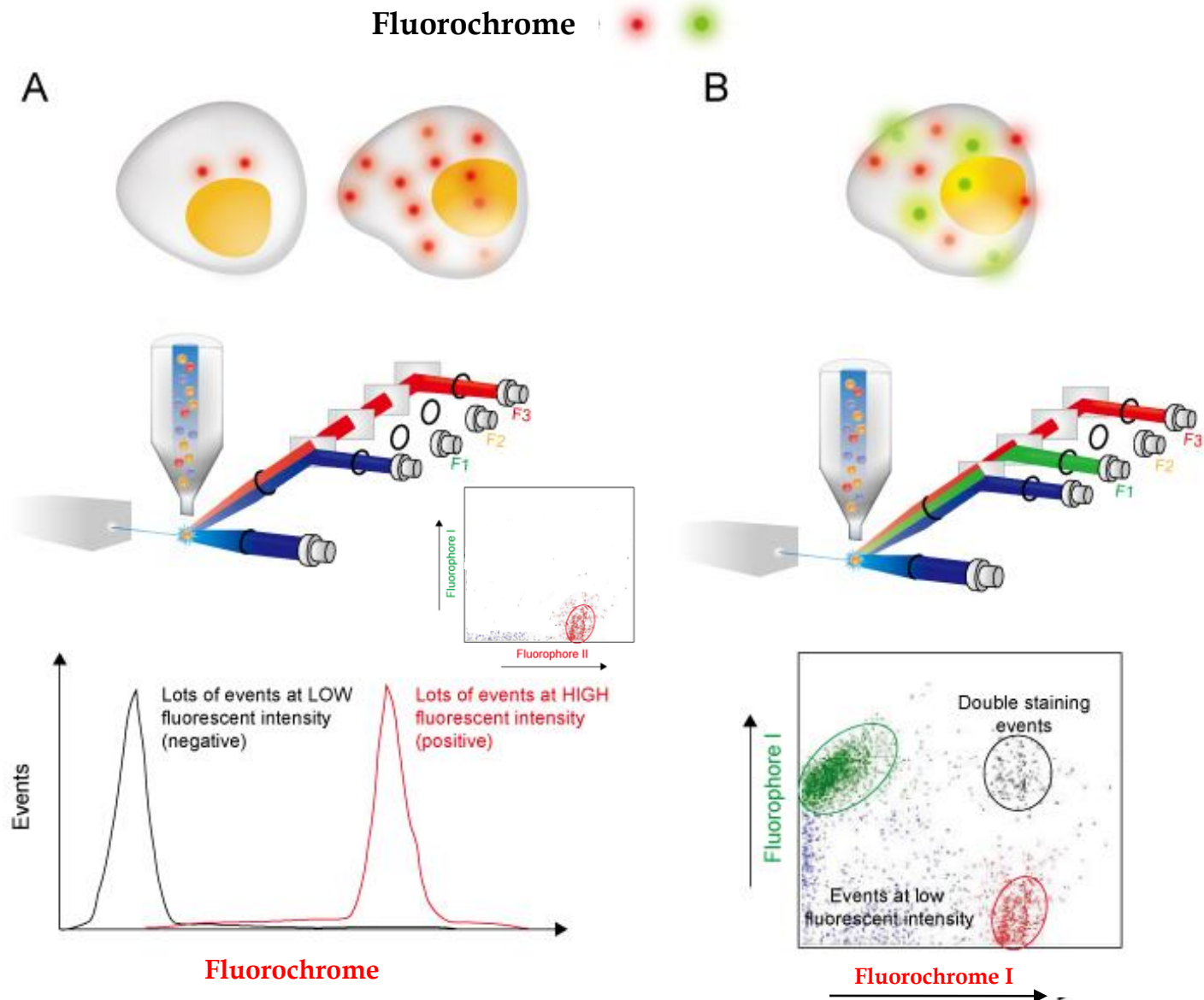
pochodząca od różnych fluorochromów
połączonych z przeciwciałami

Fluorescencja

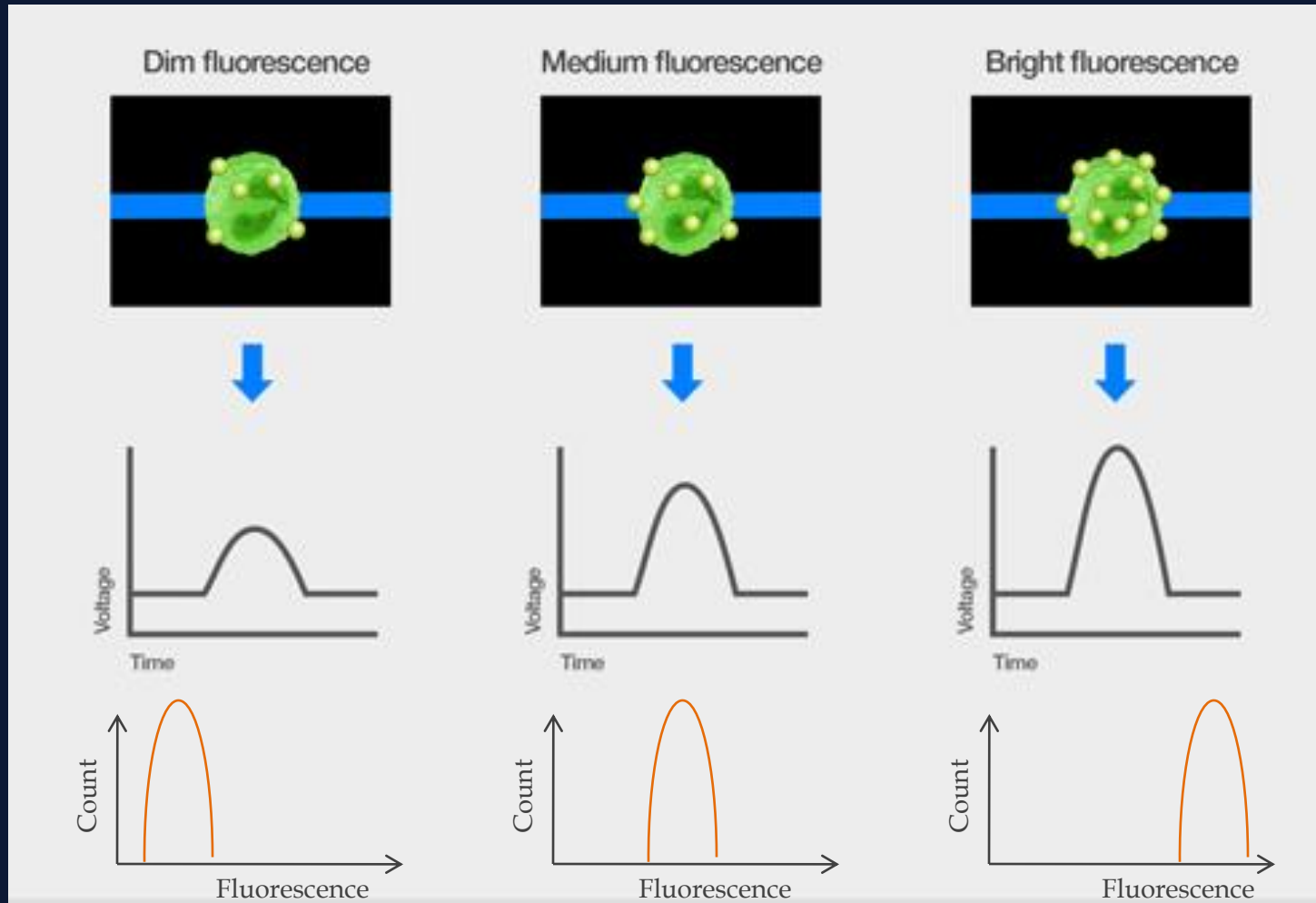
Zjawisko emisji światła przez cząsteczkę w wyniku jej pobudzenia (powrót elektronu z wyższej orbity (stan wzbudzenia) na niższą (stan spoczynku))



Znakowanie markerów powierzchniowych komórek



Fluorescencja pochodząca od przeciwciał sprzężonych z fluorochromami

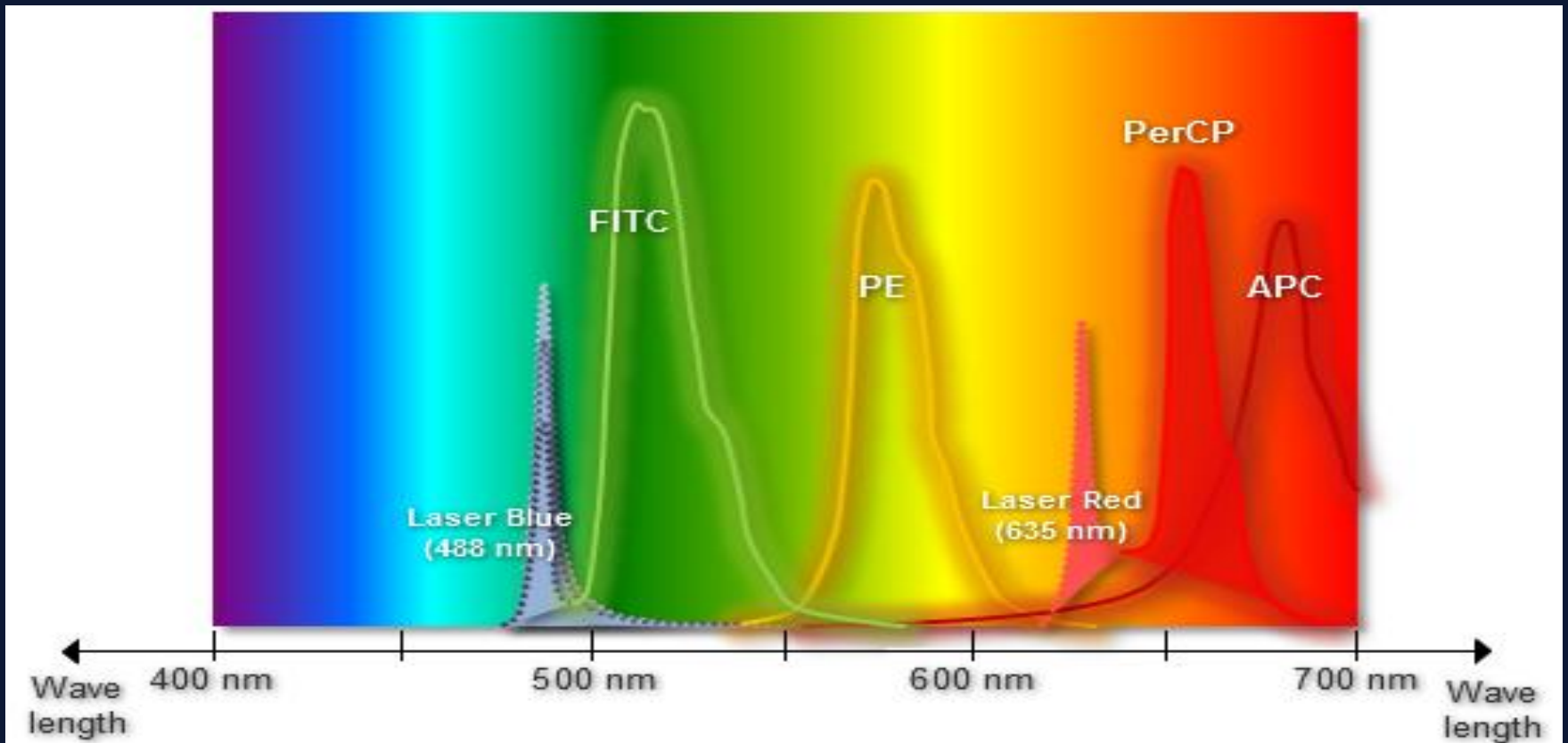


<https://www.thermofisher.com/pl/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/electronics-flow-cytometer.html>

Popularne fluorochromy

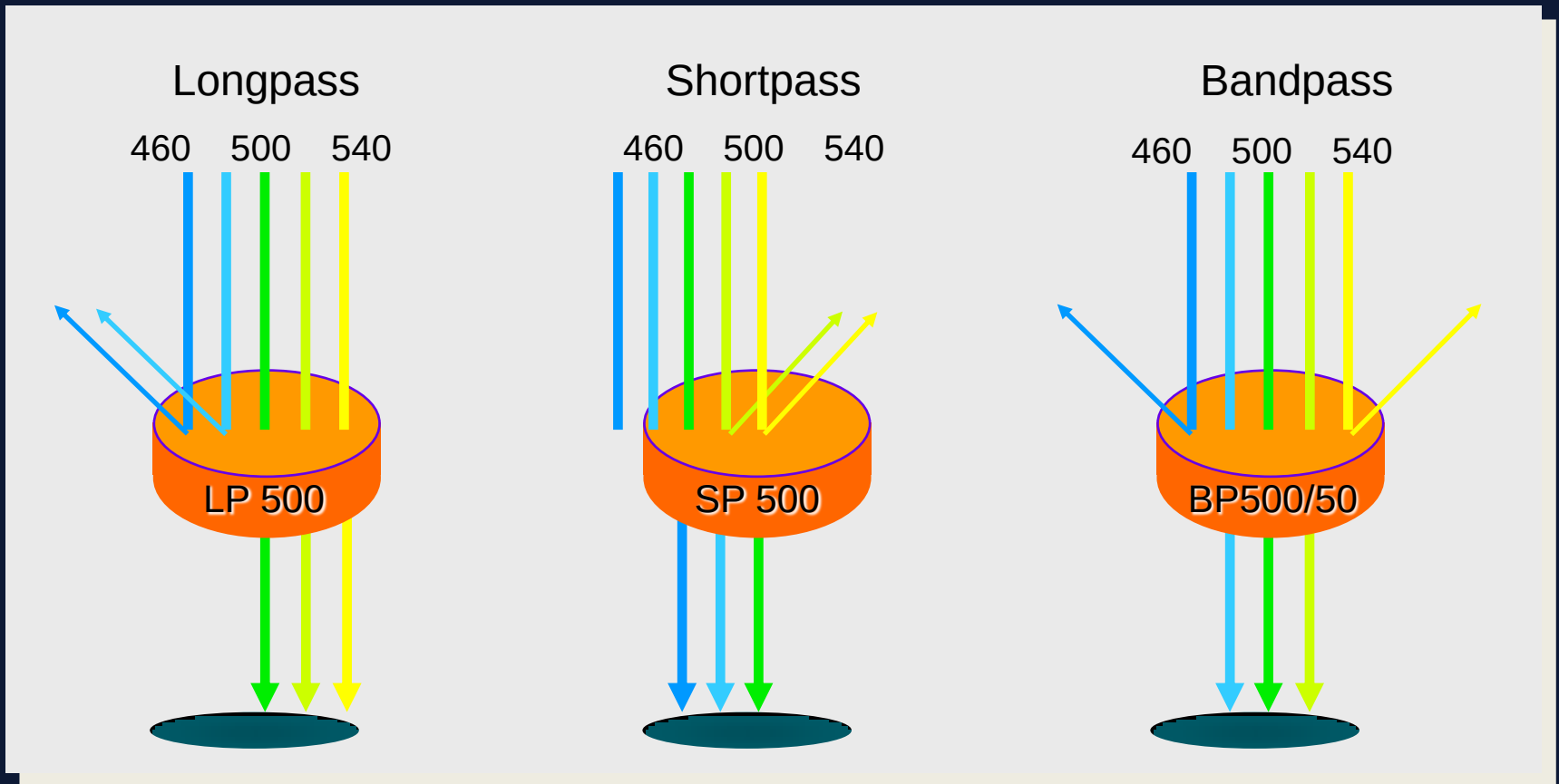
FLUOROCHROME		Excite	Emit	Colour	Channel
FITC	Fluorescein isothiocyanate	488	525	Green	FL1
PE	Phycoerythrin	488	575	Orange	FL2
PC5	PE-Cy5 Conjugate	488	665	Red	FL3
PerCP	Peridinin Chlorophyll	488	670	Red	FL3
APC	Allophycocyanin	* 633	675	Red	FL4

Popularne fluorochromy

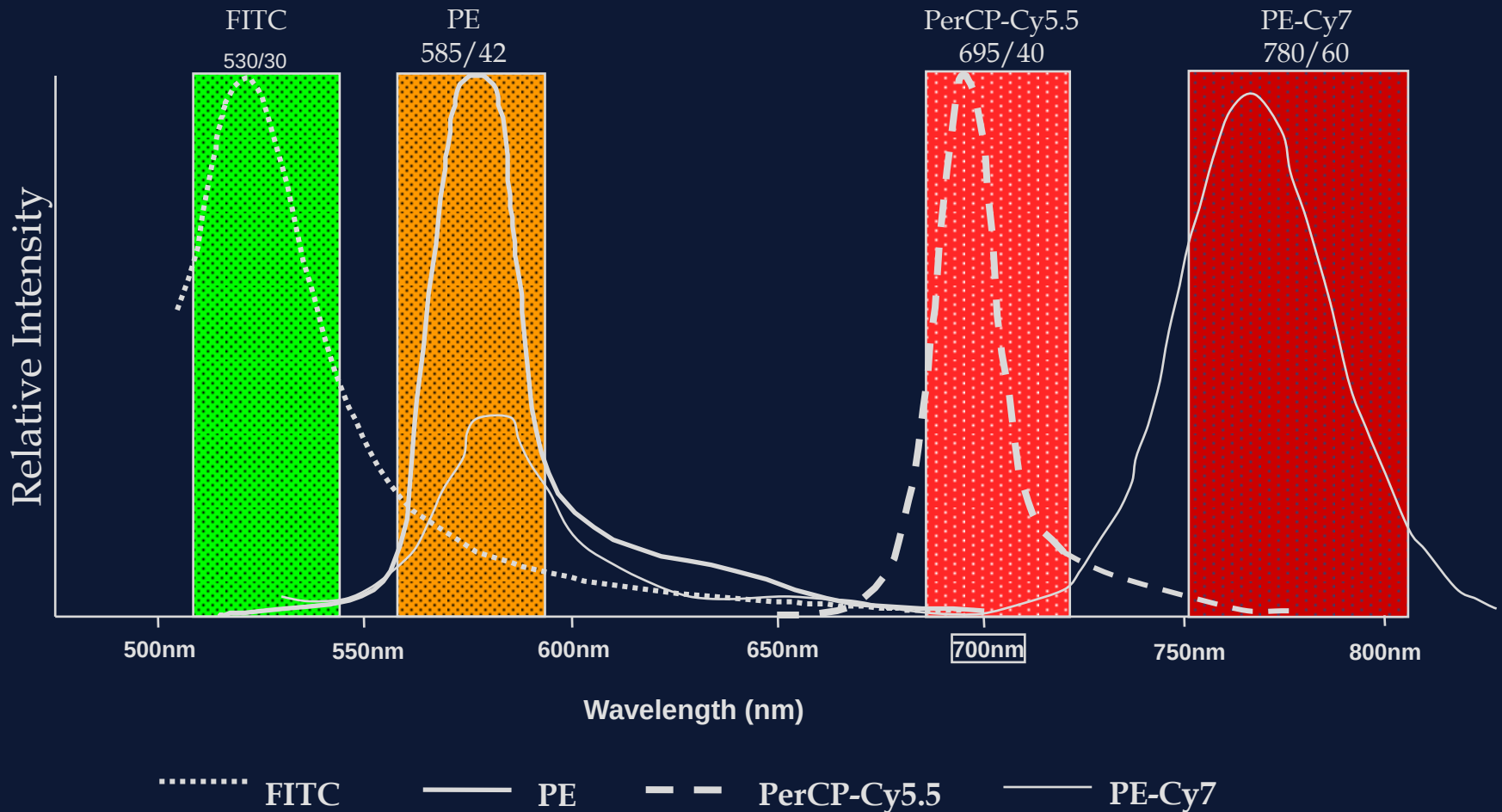


<https://www.sinobiological.com/category/fcm-facs-fluorochrome-selection>

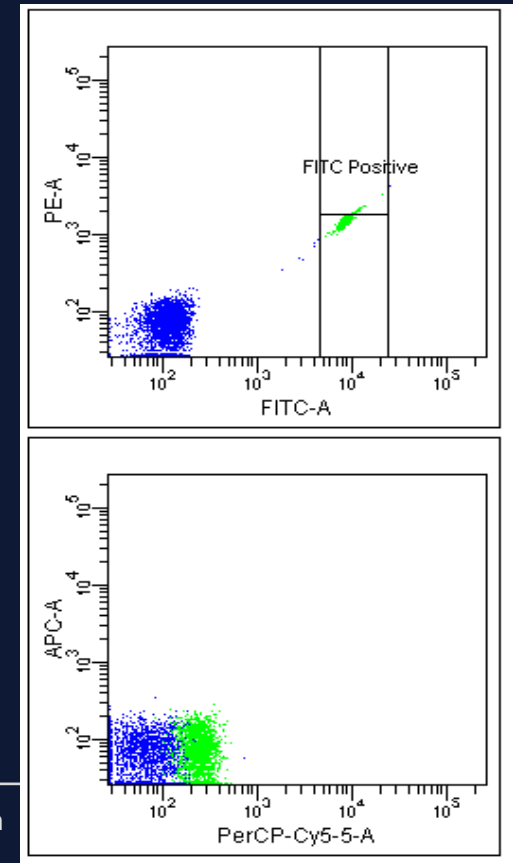
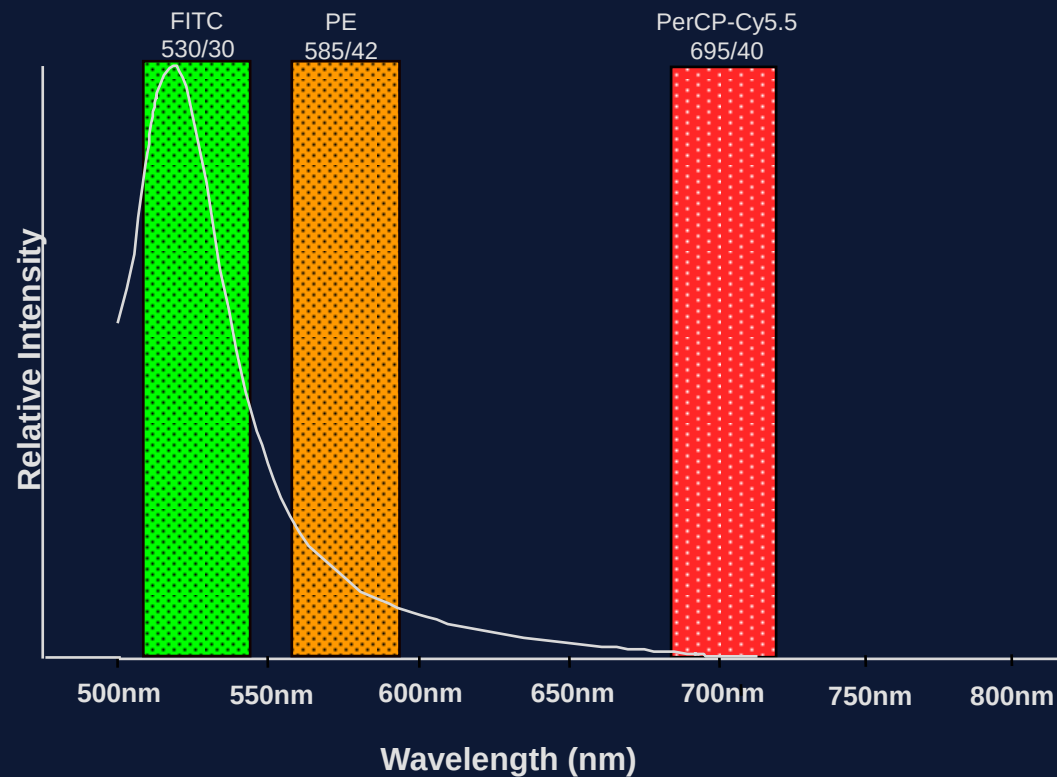
Selektywność sygnału zapewniają odpowiednio dobrane filtry optyczne i lustra



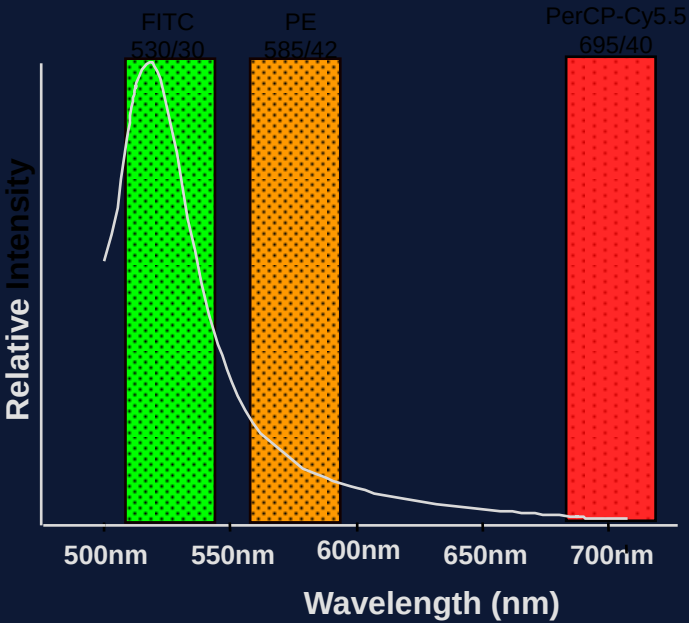
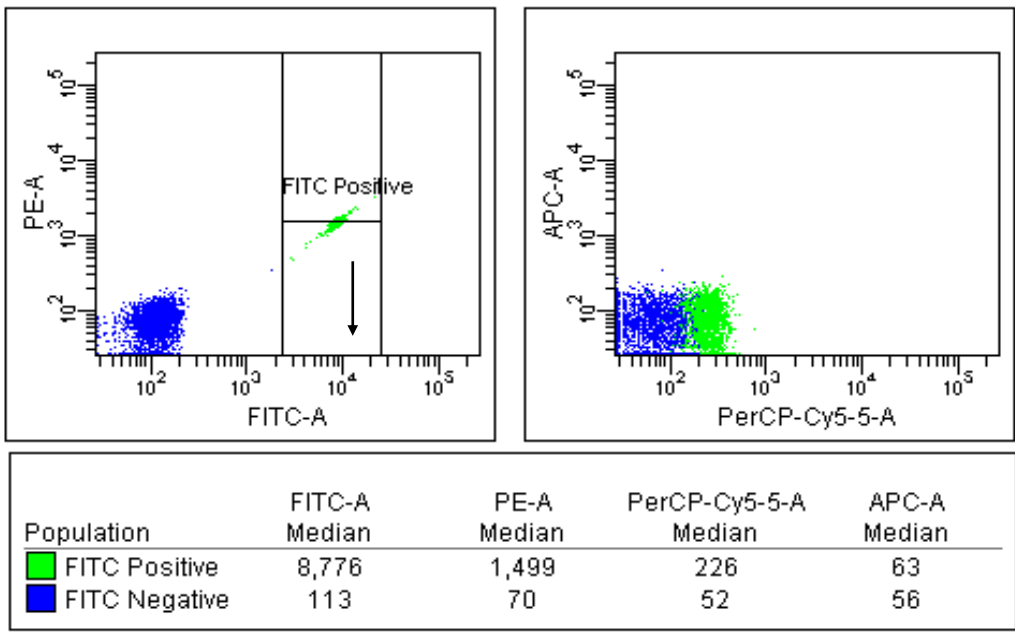
Nakładanie się spektrum emisji



Nakładanie się spektrum FITC

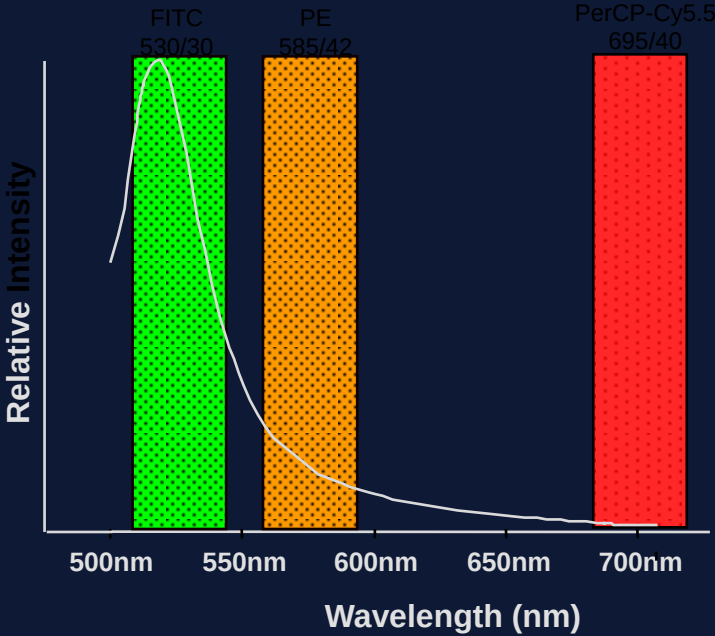
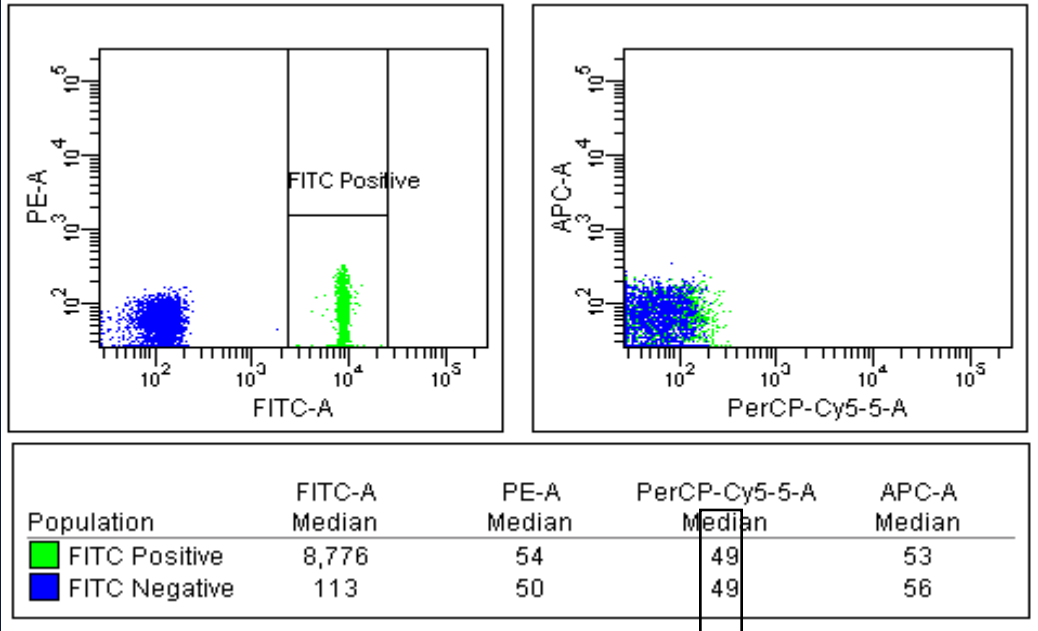


Kompensacja FITC



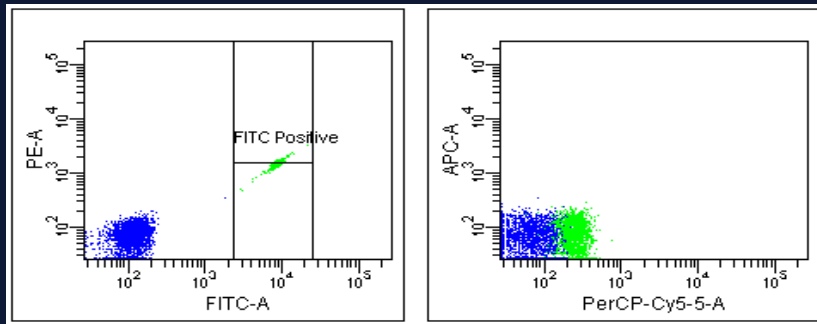
	Fluorochrome	- % Fluorochrome	Spectral Overlap
•	PE	FITC	0.00
•	PerCP-Cy5-5	FITC	0.00
•	APC	FITC	0.00

Kompensacja FITC

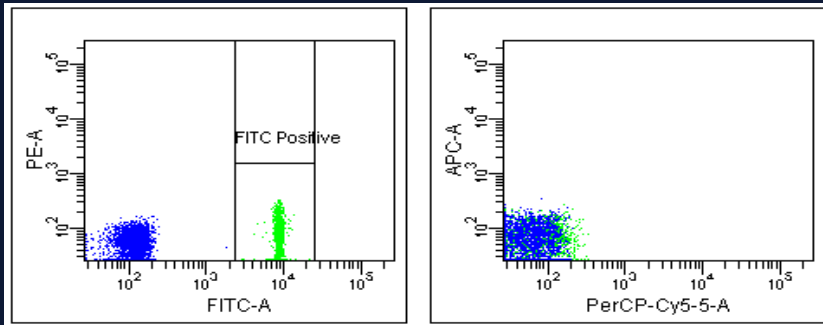


	Fluorochrome	- % Fluorochrome	Spectral Overlap
•	PE	FITC	16.50
•	PerCP-Cy5-5	FITC	2.00
•	APC	FITC	0.11

Kompensacja FITC

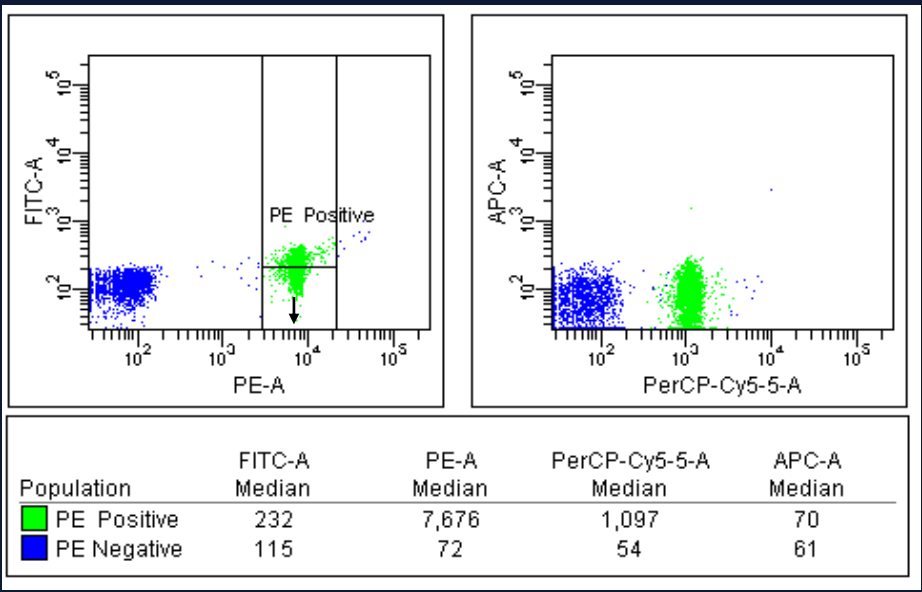
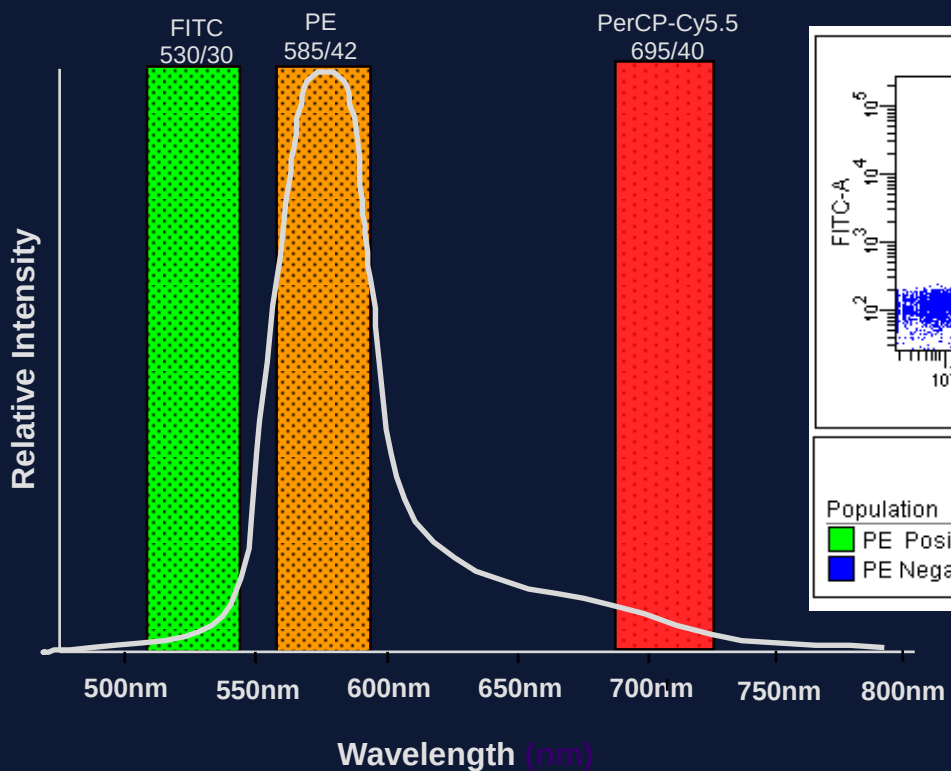


Dot plot showing
uncompensated FITC data

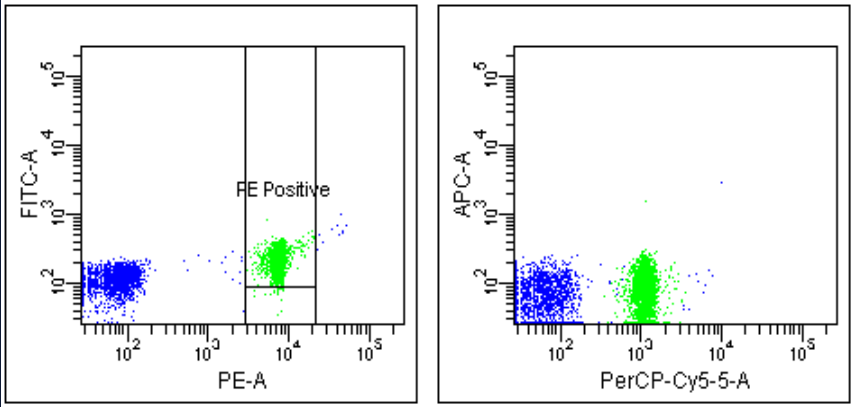


Dot plot showing compensated
FITC data

Nakładanie się spektrum PE

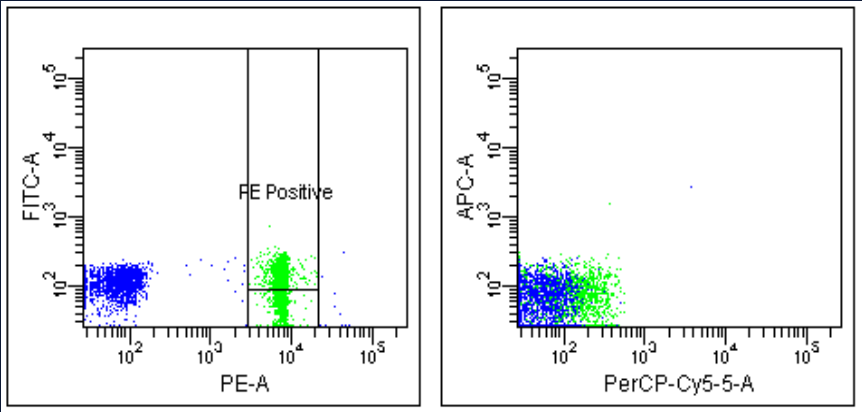


Nakładanie się spektrum PE



Dot plot showing uncompensated PE data

Population	FITC-A Median	PE-A Median	PerCP-Cy5-5-A Median	APC-A Median
PE Positive	232	7,676	1,097	70
PE Negative	115	72	54	61

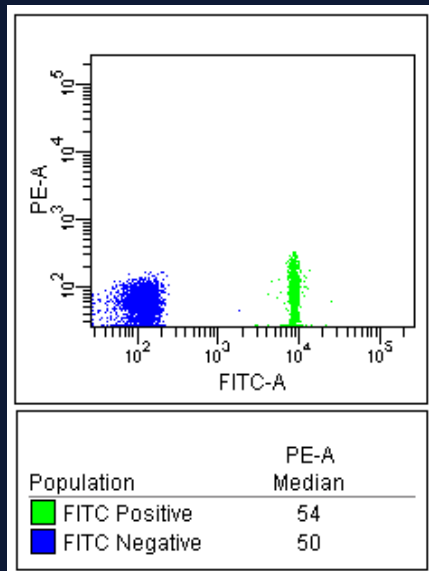


Dot plot showing compensated PE data

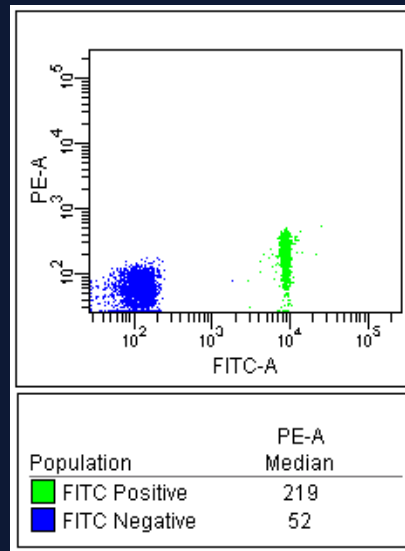
Population	FITC-A Median	PE-A Median	PerCP-Cy5-5-A Median	APC-A Median
PE Positive	114	7,676	45	60
PE Negative	113	72	44	60

Kompensacja

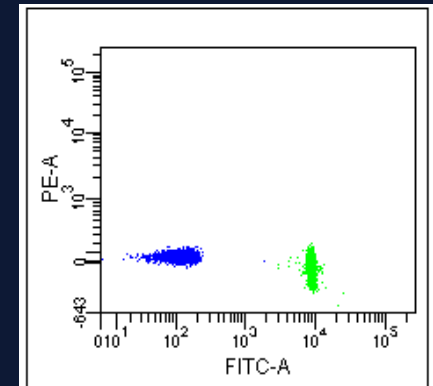
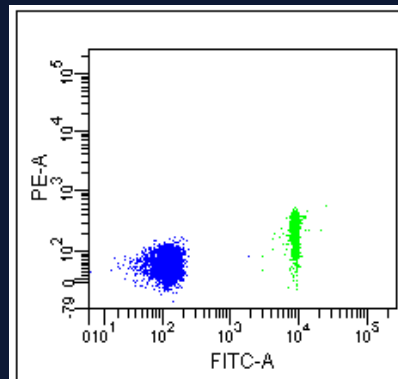
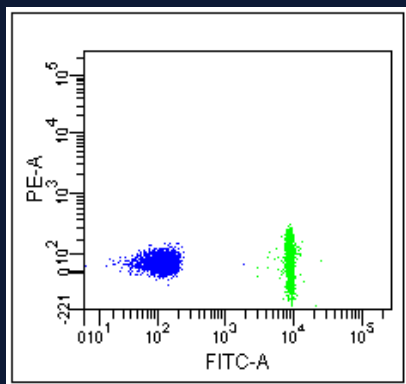
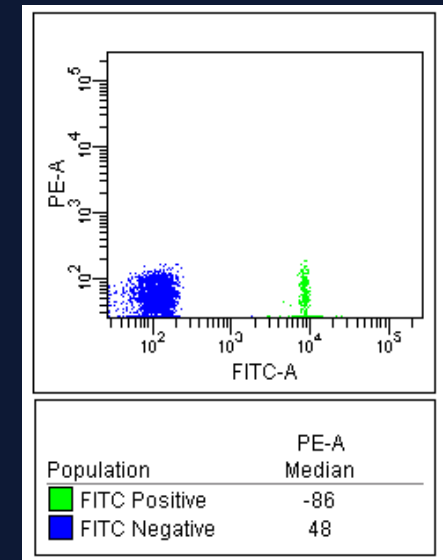
Correct Compensation



Under Compensation

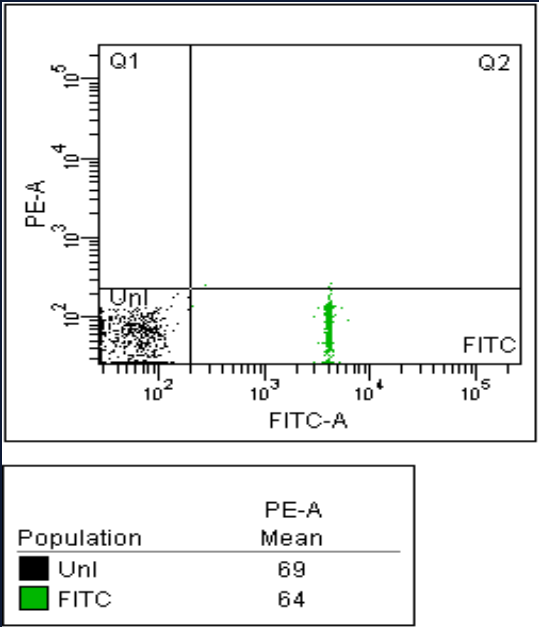


Over Compensation

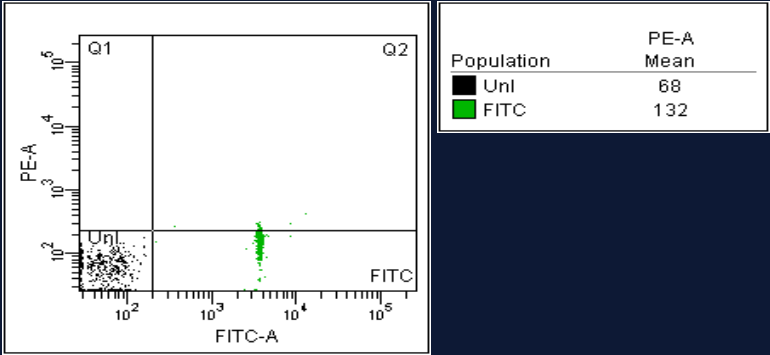


Efekty zmiany wartości PMT

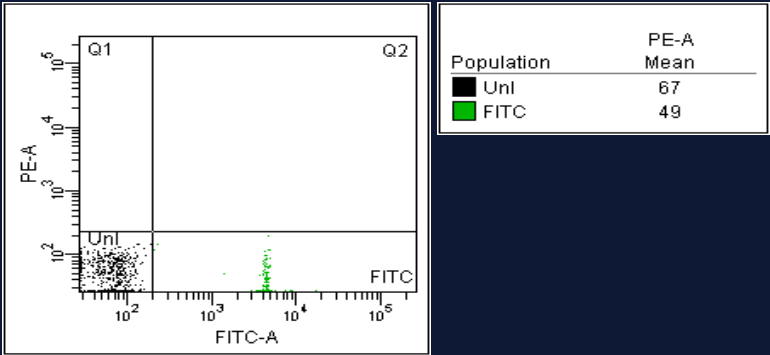
Correct Compensation



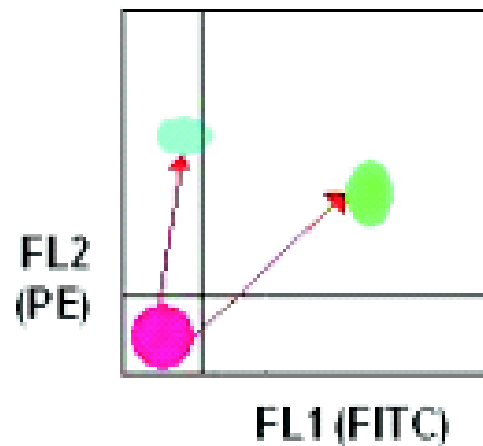
FITC Voltage Decreased by 5 V



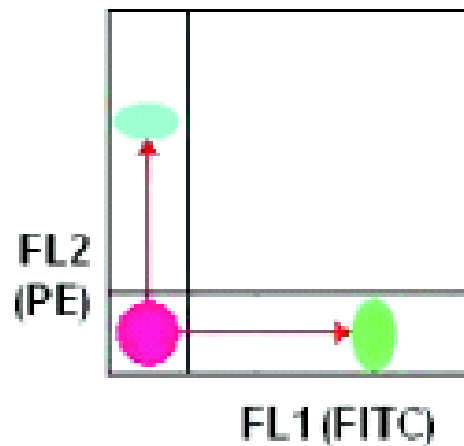
FITC Voltage Increased by 5 V



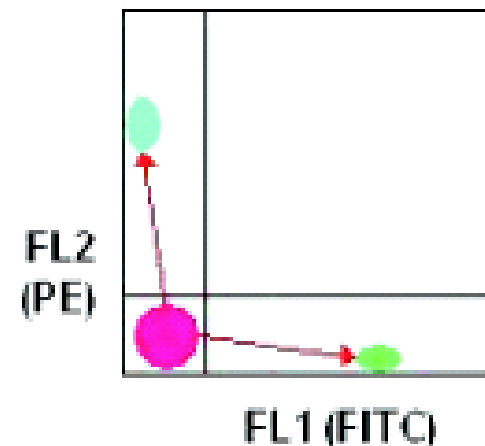
Kompensacja



niewystarczająca
kompensacja

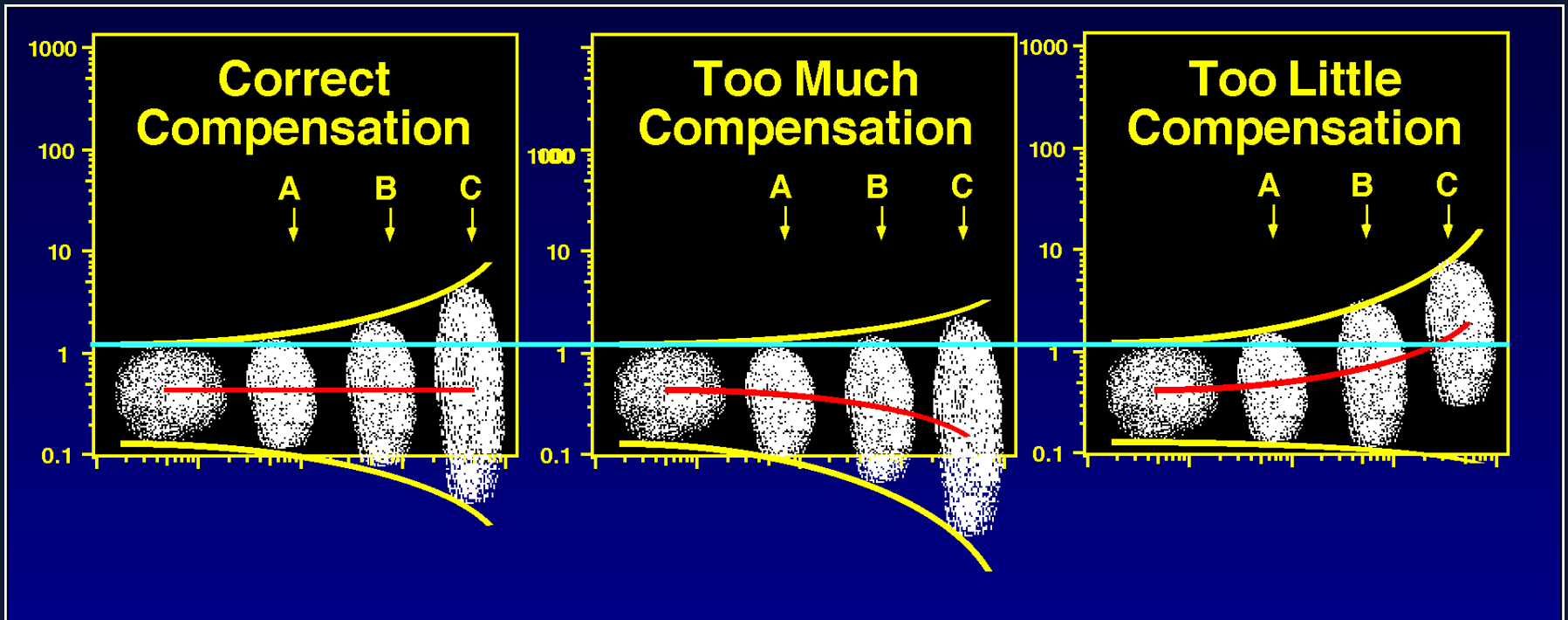


prawidłowa
kompensacja



nadmierna
kompensacja

Kompensacja



Film – cytometria przepływowa

<https://www.youtube.com/watch?v=sfWWxFBtpQ&t=18s>