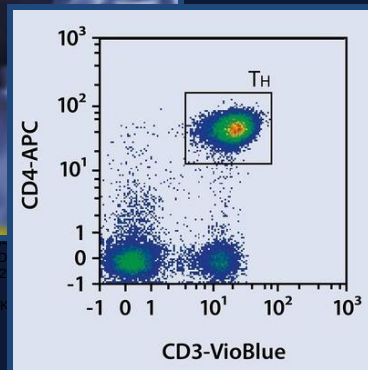
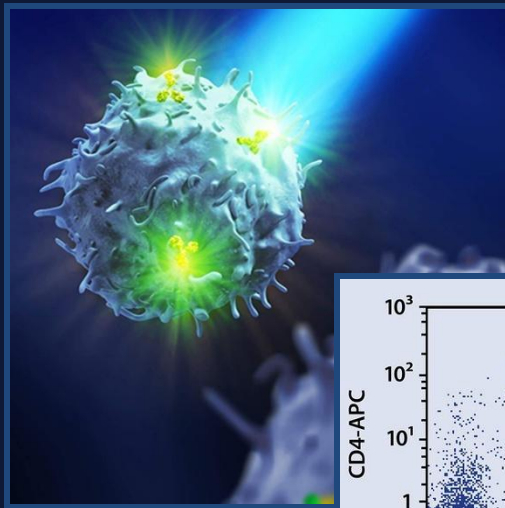


Zastosowanie cytometrii przepływowej

Ćwiczenia z Immunologii



dr Ewelina Kiernozek

Zakład Immunologii
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski

Zastosowanie Cytometrii Przepływowej

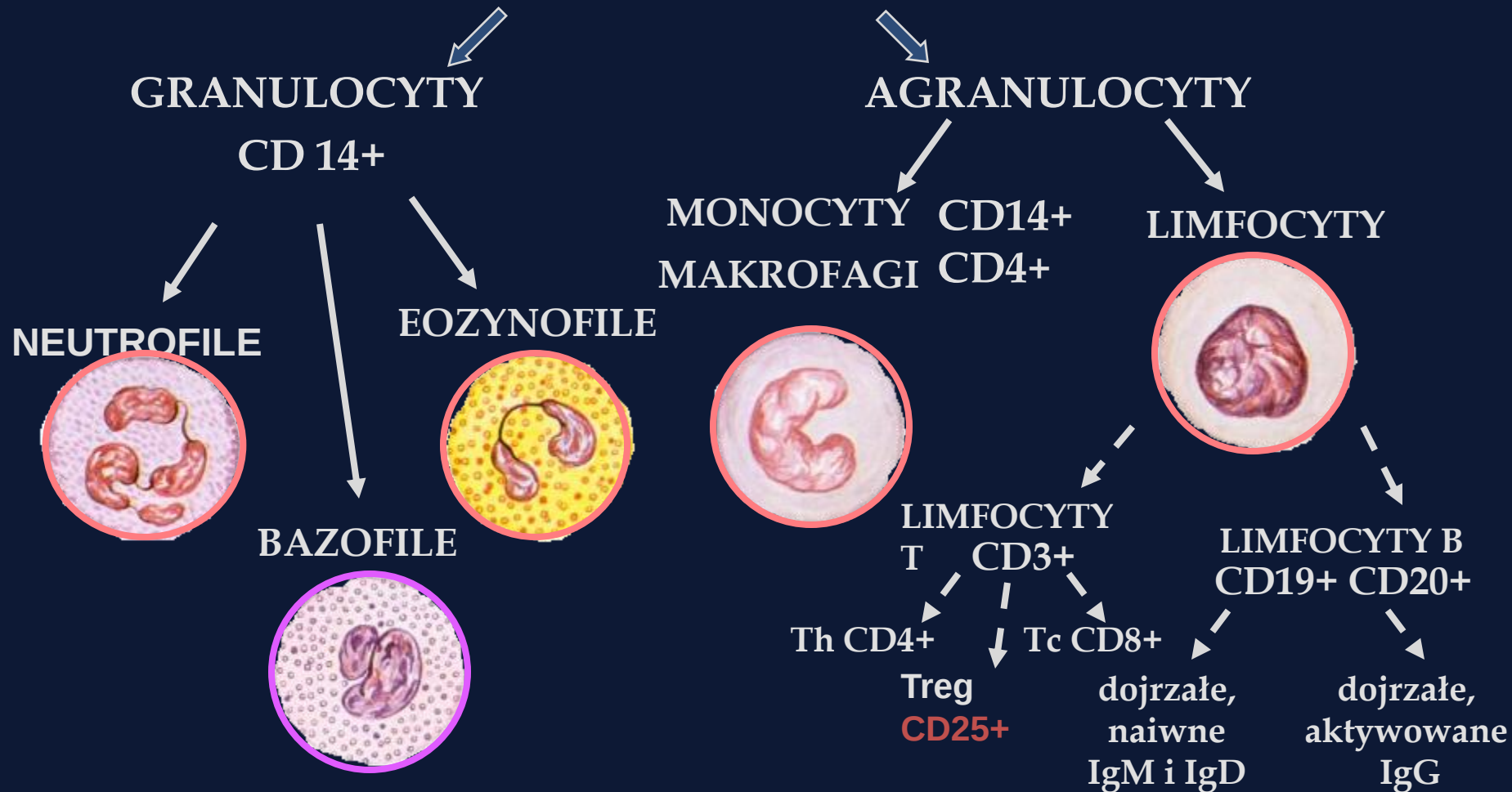
- ✓ Fenotypowanie komórek: morfologia, ekspresja markerów powierzchniowych i wewnątrzkomórkowych
- ✓ Pomiar proliferacji komórek
- ✓ Analiza apoptozy i nekrozy komórek
- ✓ Badanie cyklu komórkowego
- ✓ Oznaczanie produkcji i stężenia cytokin
- ✓ Analiza transdukcji sygnałów wewnątrz komórki
- ✓ Analiza poziomu jonów Ca^{2+} , potencjału błony mitochondrialnej i produkcji ROS
- ✓ Selekcja transfektantów - geny reporterowe (GFP, LacZ)
- ✓ Sortowanie komórek
- ✓ Zastosowanie cytometrii przepływowej w mikrobiologii

Identyfikacja komórek układu immunologicznego

- Na podstawie morfologii
 - wielkości jądra i granularności cytoplazmy (różnice w sygnałach **FSC** i **SSC**)
- Na podstawie obecności markerów powierzchniowych, **CD** (cluster of differentiation) – **antygen różnicowania**

Fenotypowanie

LEUKOCYTY CD 45+

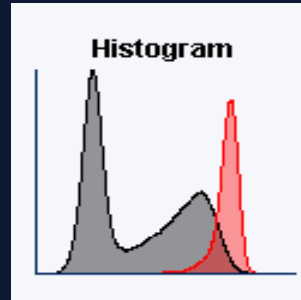


Rozkład populacji limfocytów w poszczególnych narządach limfatycznych

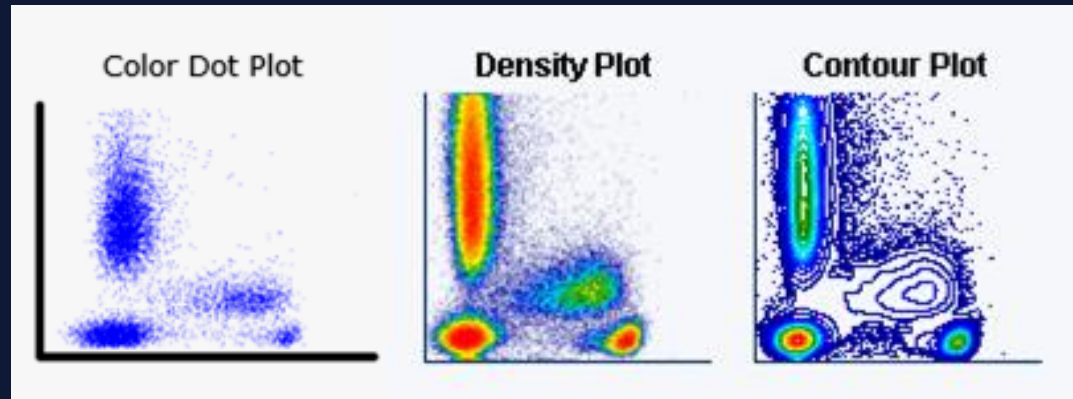
	% limfocytów T	% limfocytów B
Grasica	97	0,1
Węzły chłonne	77	18
Śledziona / spleen	35	38
Krew	70	24
Przewód piersiowy	80	19

Analiza wieloparametrowa – typy wykresów

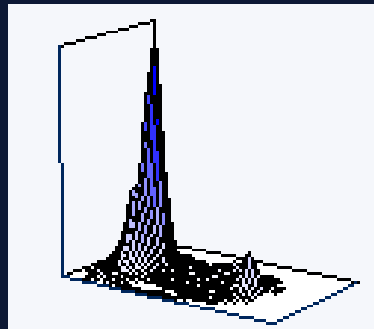
- Wykresy jednowymiarowe
-histogramy



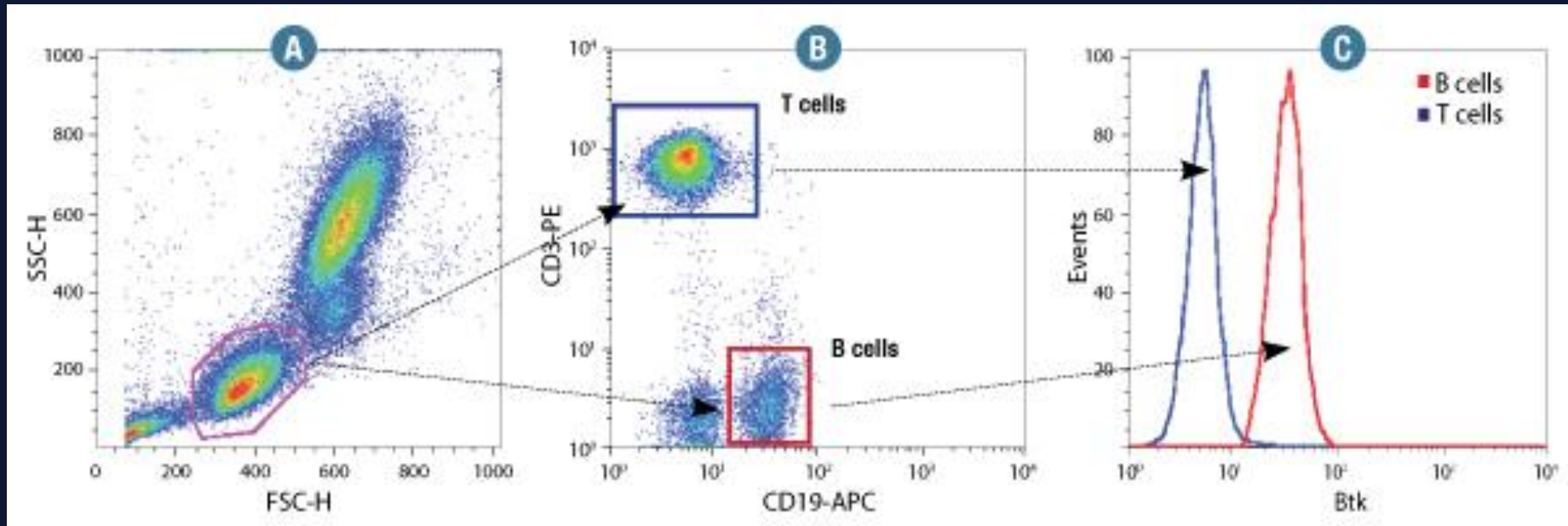
- Wykresy dwuwymiarowe



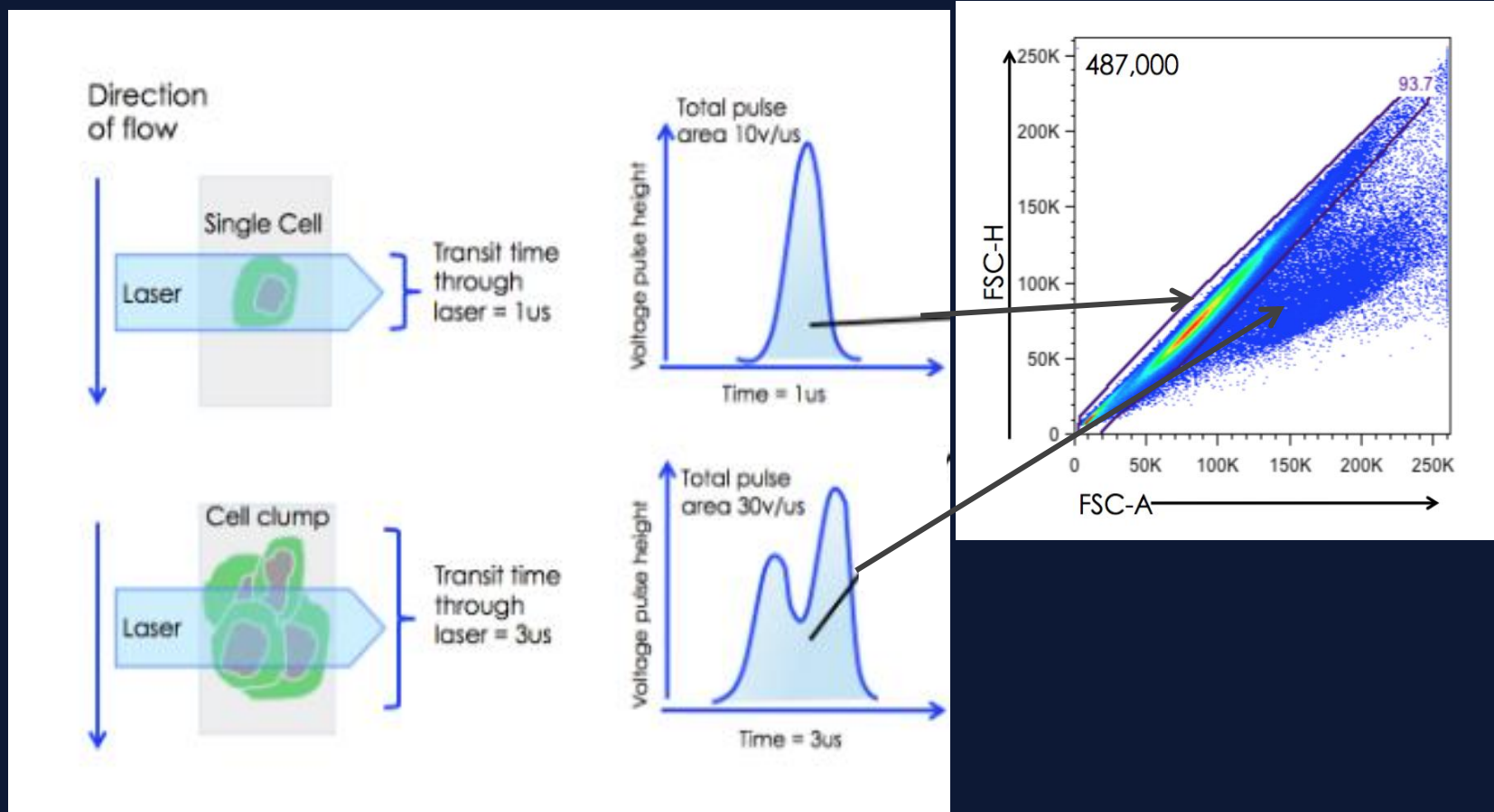
- Wykresy trójwymiarowe



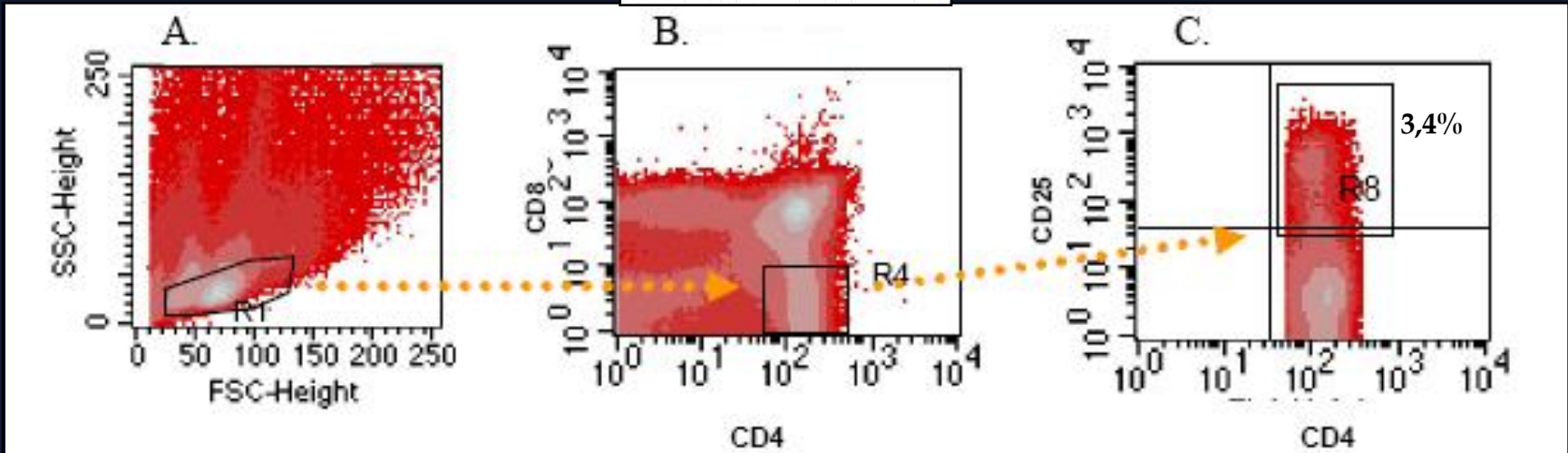
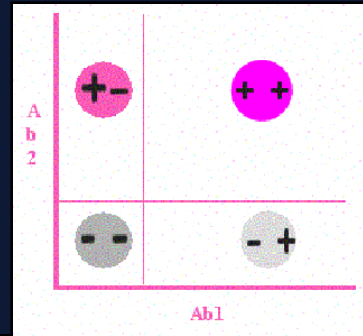
Analiza wieloparametrowa – typy wykresów



Analiza wieloparametrowa- „singlets/doublets”



Metoda bramkowania komórek wyizolowanych z grasicy

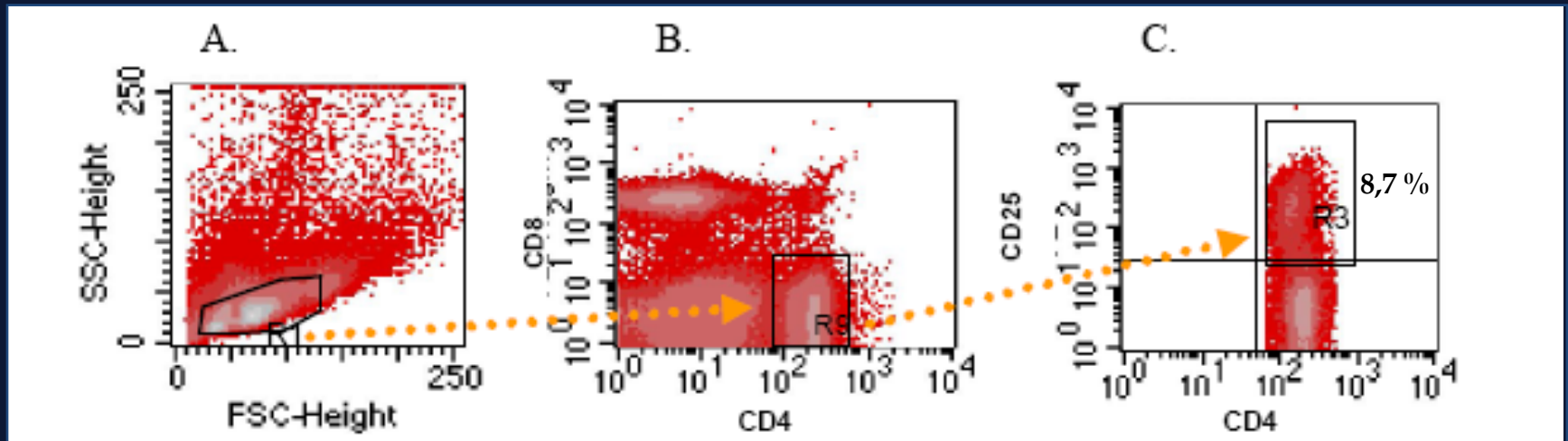


populacja
tymocytów

subpopulacja
limfocytów T
CD4⁺CD8⁻

subpopulacja
limfocytów T
CD4⁺CD25⁺

Metoda bramkowania komórek wyizolowanych z węzła mezenterycznego

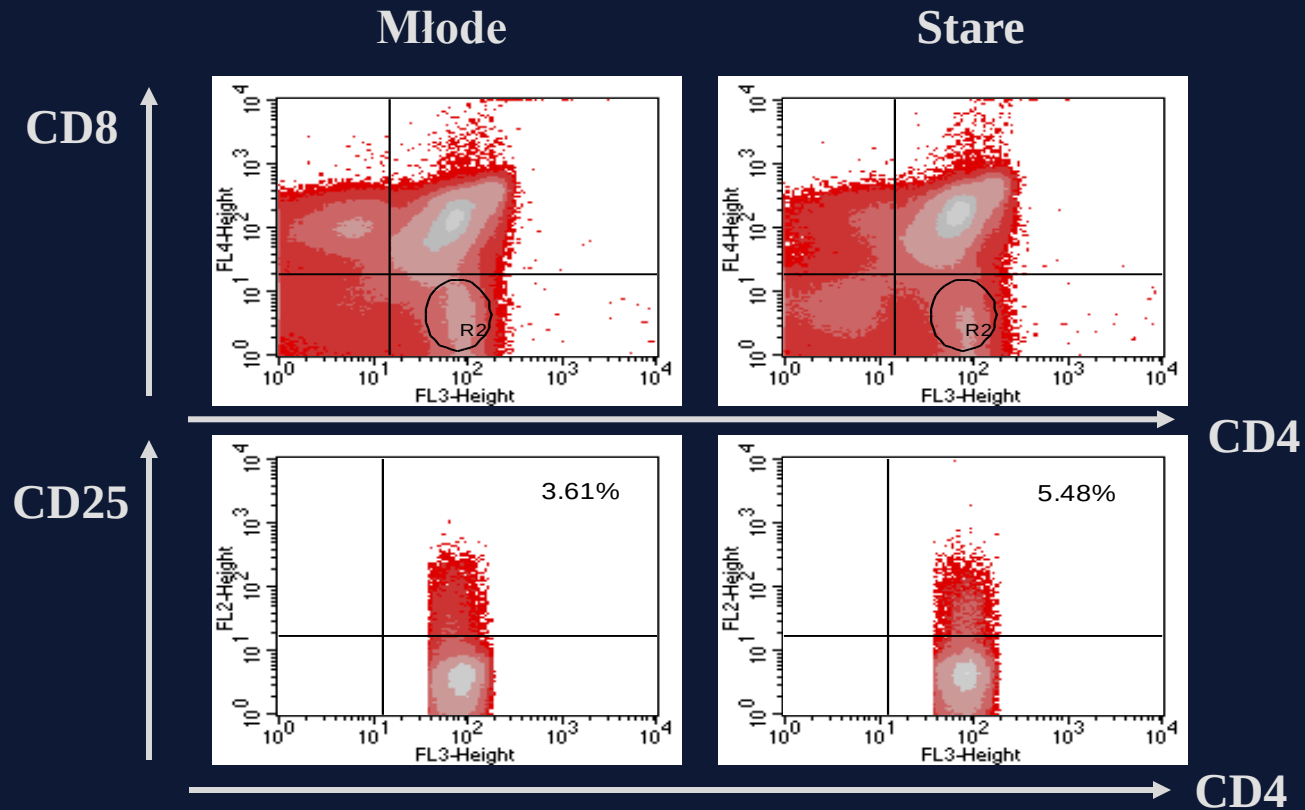


Populacja
limfocytów

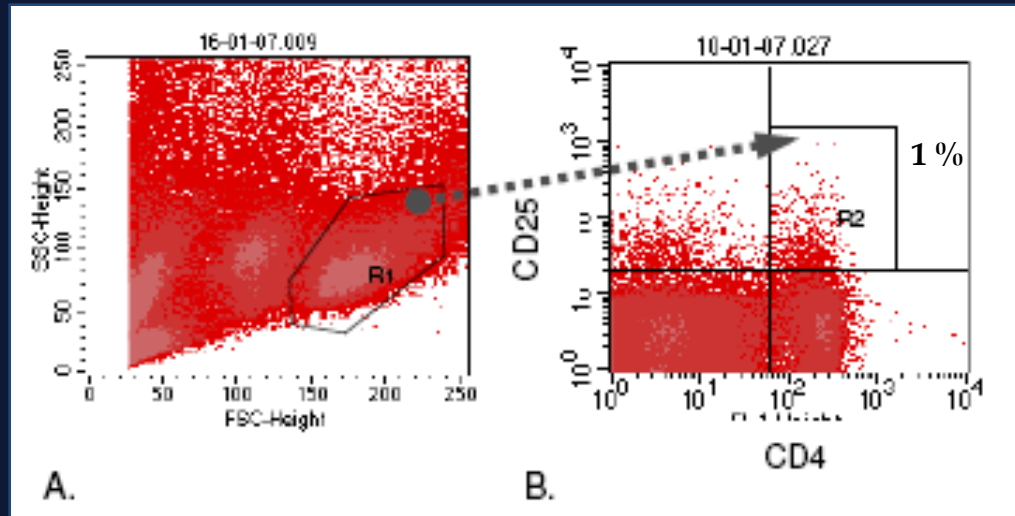
subpopulacja
limfocytów T
CD4⁺CD8⁻

subpopulacja
limfocytów T
CD4⁺CD25⁺

Limfocyty T $CD4^+CD25^+$ w grasicy myszy BALB/c młodych i starych



Metoda bramkowania komórek wyizolowanych z wątroby



populacja
limfocytów

subpopulacja
limfocytów T
 $CD4^+CD25^+$

Odsetek limfocytów Treg $CD4^+CD25^+$ w grasicy i w węźle mezenterycznym po stymulacji LPS

Grasica

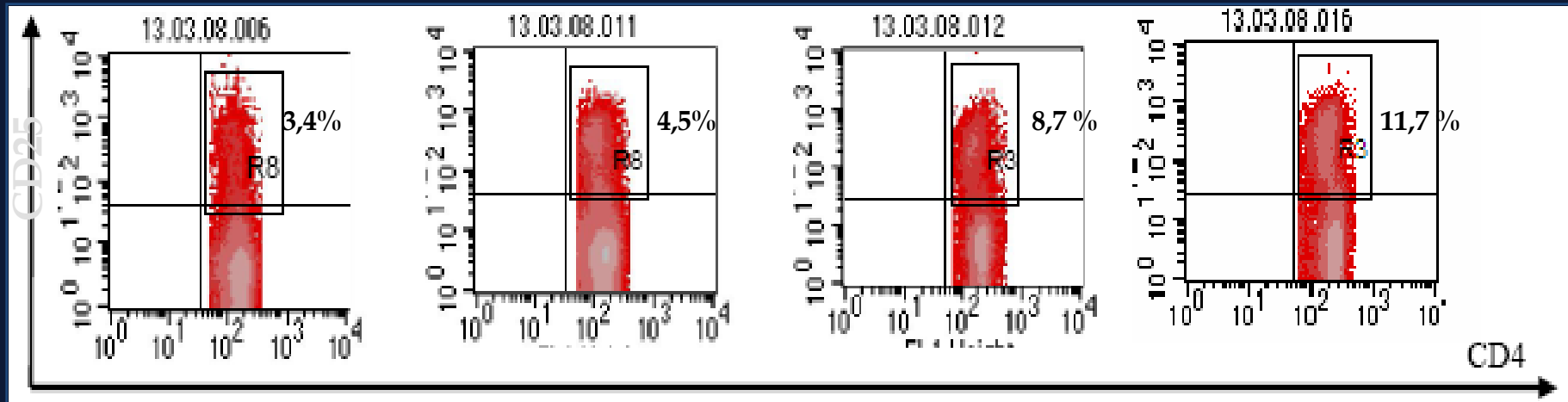
Węzeł mezenteryczny

Kontrola

LPS

Kontrola

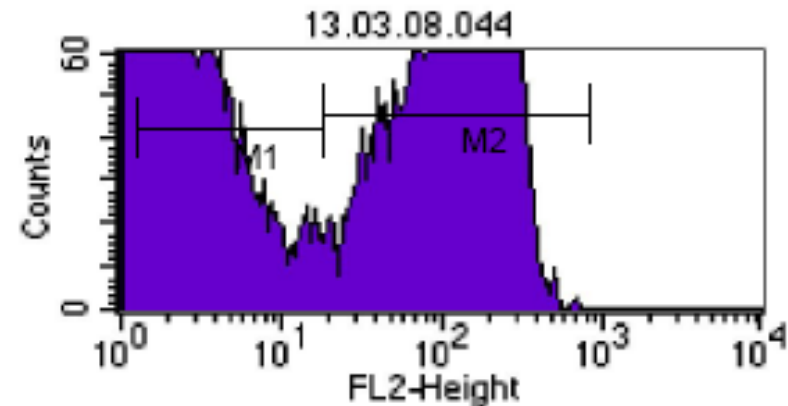
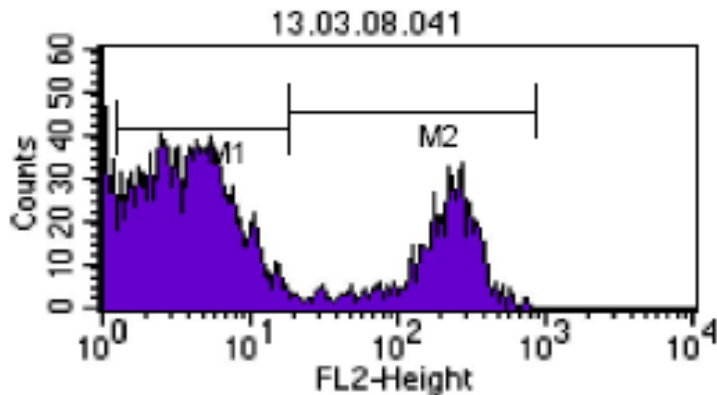
LPS



Poziom ekspresji markera FoxP3 w subpopulacji Treg CD4⁺CD25⁺ w grasicy

Kontrola

LPS



FoxP3

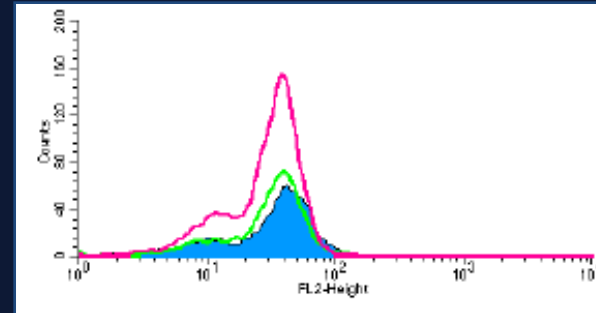
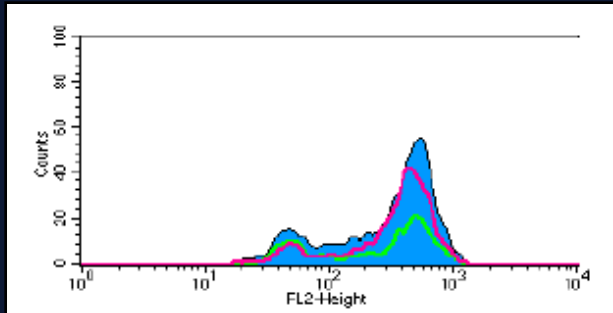
Poziom ekspresji markera FoxP3 w tymocytach CD4⁺CD25⁺ samców po podaniu Dex

ZIMA

WIOSNA

— Kontrola
— Dex 0,025 µg/mysz
— Dex 25 µg/mysz

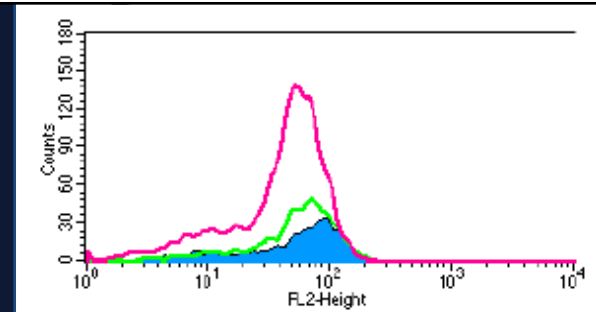
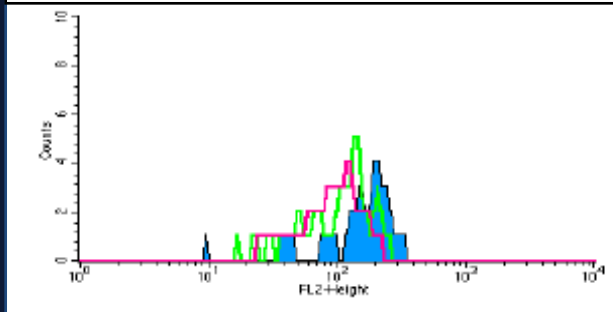
24h od DEX



Kontrola	379,82
Dex 0,025 µg/mysz	373,26
Dex 25 µg/mysz	383,59

Kontrola	41,83
Dex 0,025 µg/mysz	37,09
Dex 25 µg/mysz	35,75

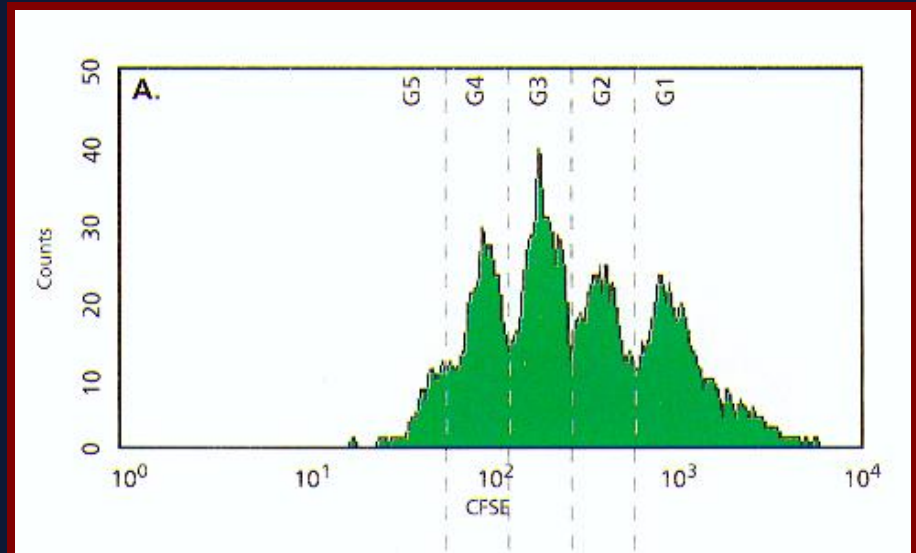
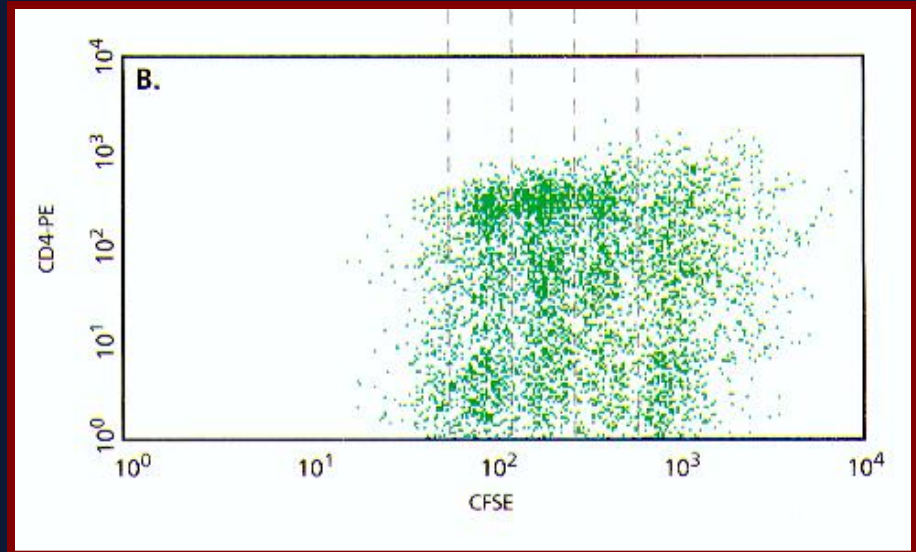
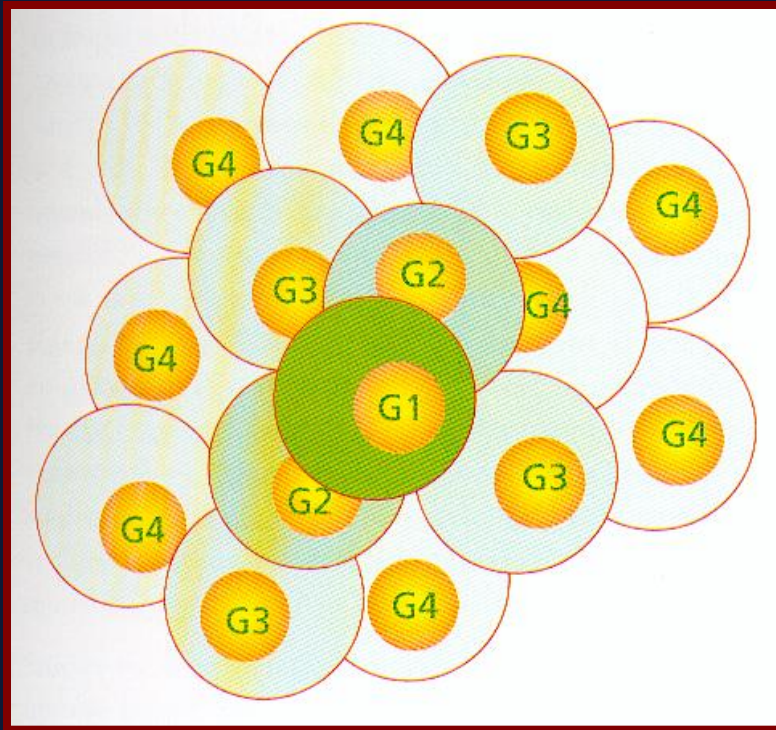
72h od DEX



Kontrola	145,4
Dex 0,025 µg/mysz	96,76
Dex 25 µg/mysz	86,01

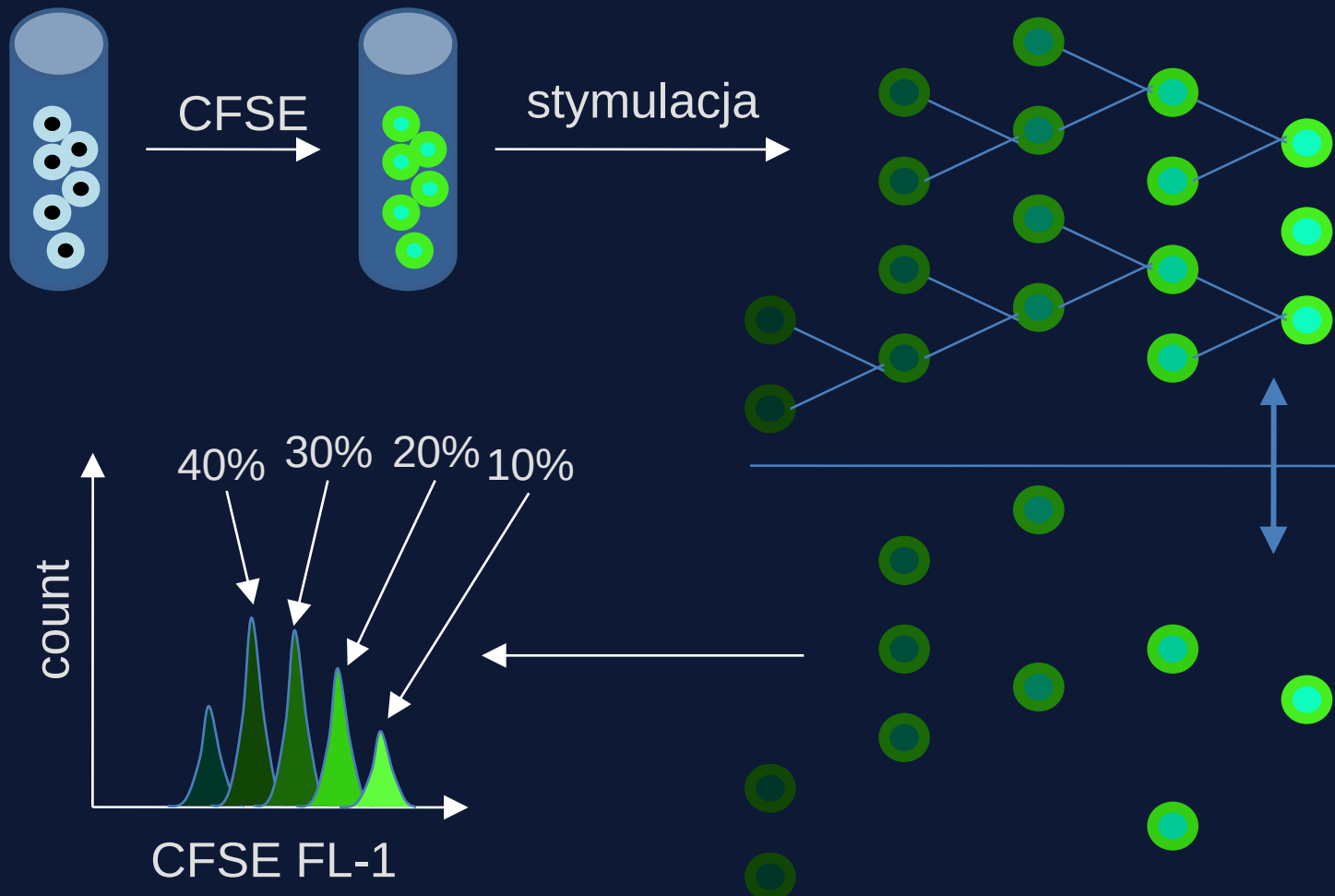
Kontrola	66,74
Dex 0,025 µg/mysz	59,61
Dex 25 µg/mysz	50,87

Proliferacja - znakowanie CFSE

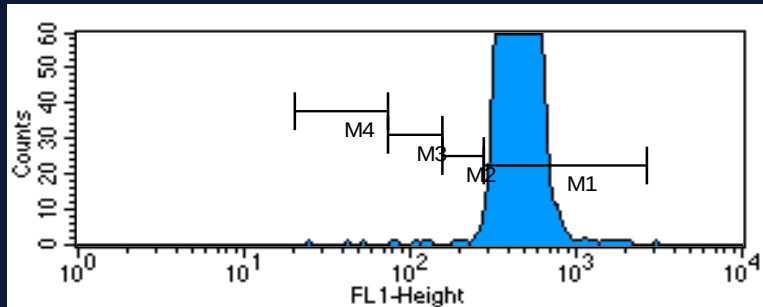


Proliferacja - znakowanie CFSE

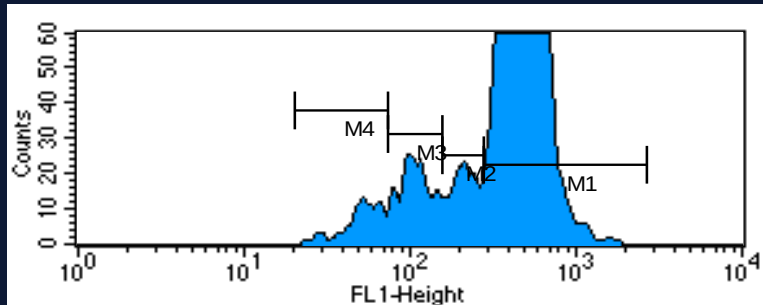
Pomiar ilości komórek po kolejnych podziałach z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych



Proliferacja limfocytów T CD4⁺ węzła chłonnego w obecności Treg CD4⁺CD25⁺

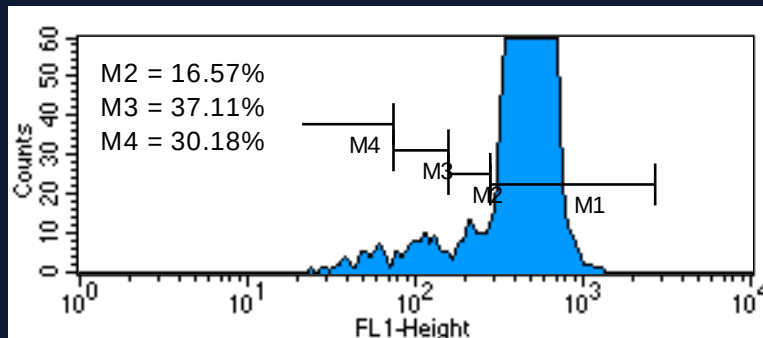


Kontrola



**a-CD3+a-CD28
– aktywowane
limfocyty**

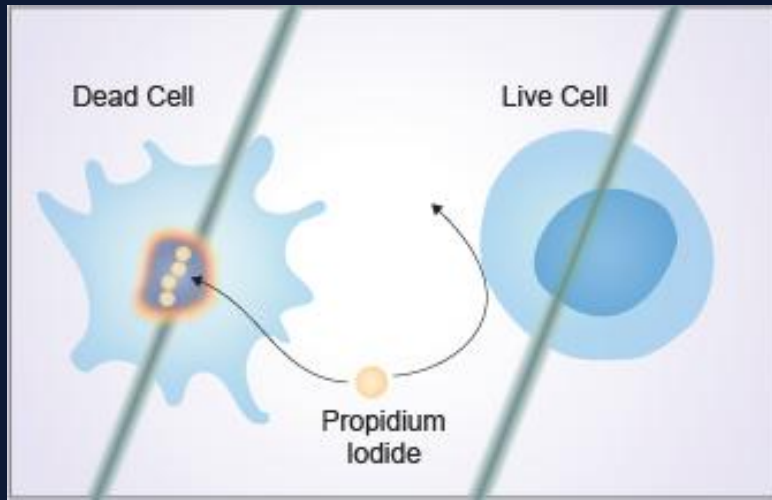
Wartości procentowe
wskazują na stopień
hamowania proliferacji



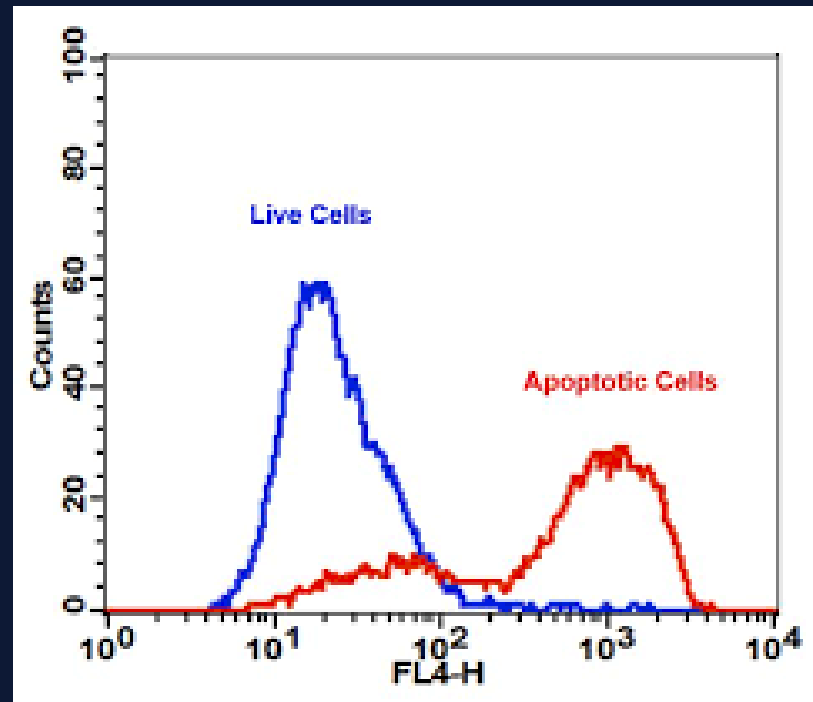
**a-CD3+a-CD28 –aktywowane
limfocyty + limfocyty T CD4⁺CD25⁺**

CFSE

Analiza apoptozy i nekrozy – PI (jodek propidyny)



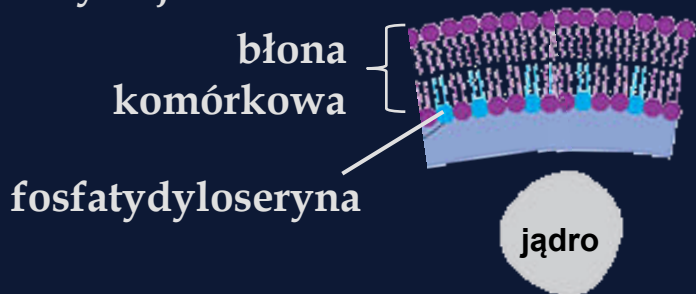
<https://www.rndsystems.com/resources/protocols/flow-cytometry-protocol-analysis-cell-viability-using-propidium-iodide>



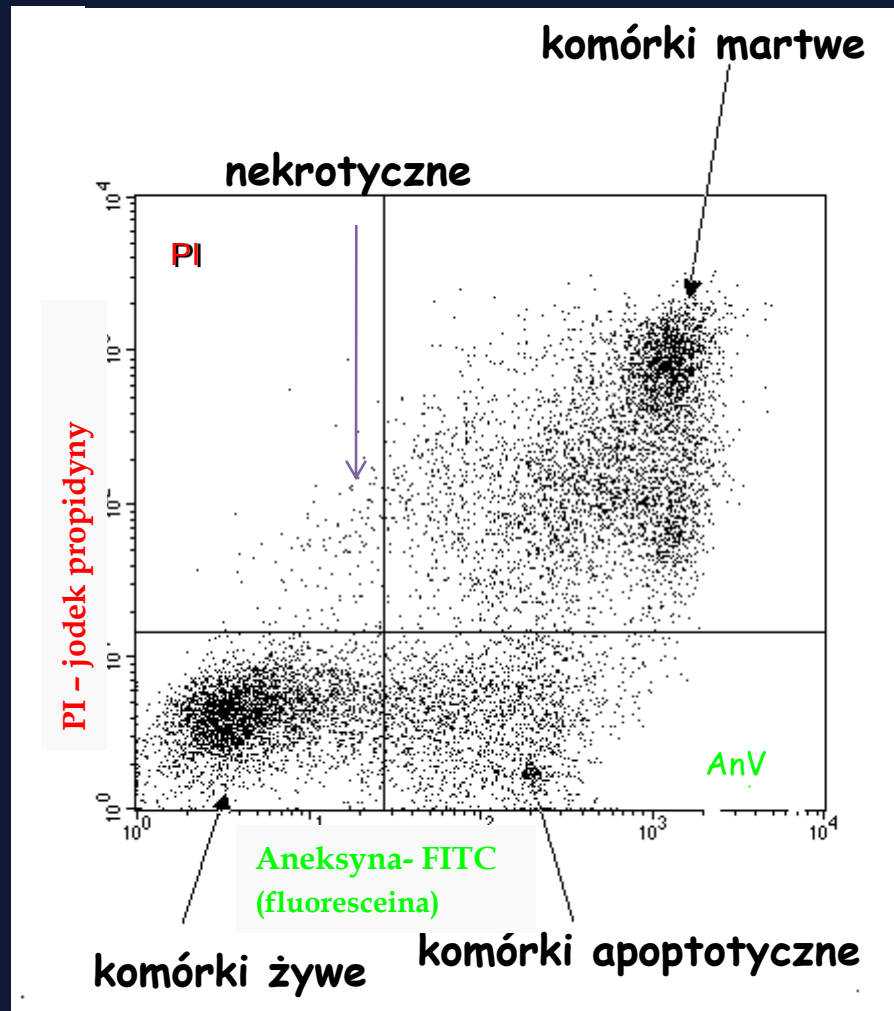
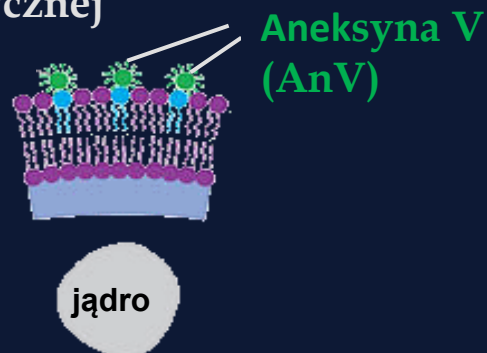
<https://www.aatbio.com/products/cell-meter-apc-annexin-v-binding-apoptosis-assay-kit-optimized-for-flow-cytometry>

Analiza apoptozy i nekrozy – AnV (Aneksyna)

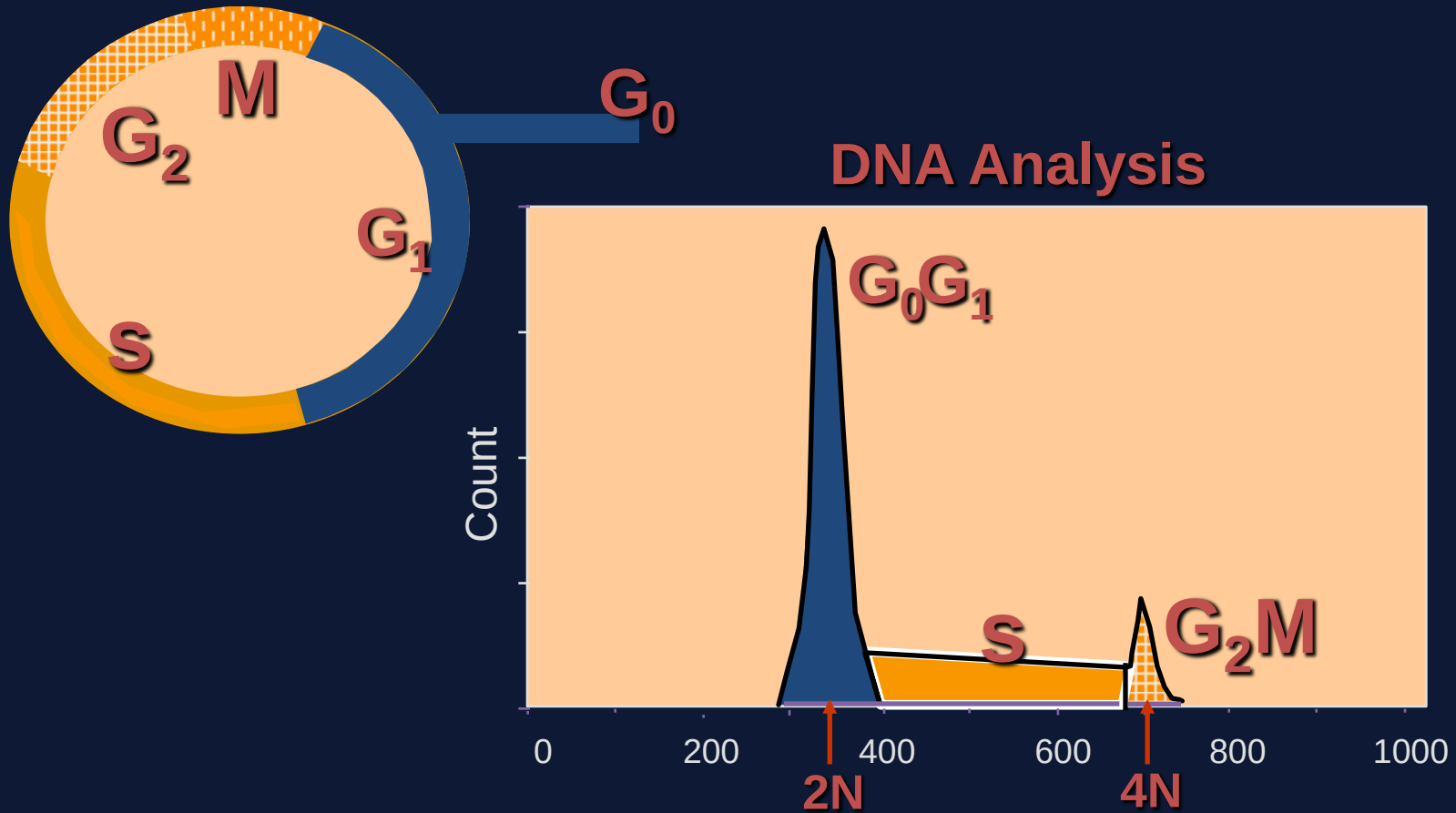
Błona
komórki żywej



Błona
komórki apoptotycznej



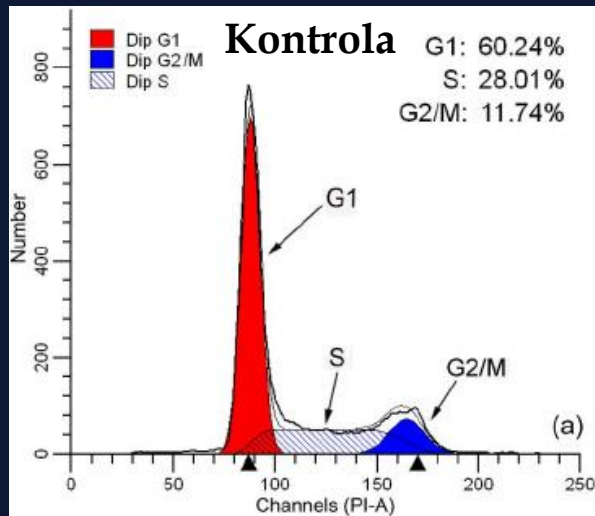
Cykl komórkowy



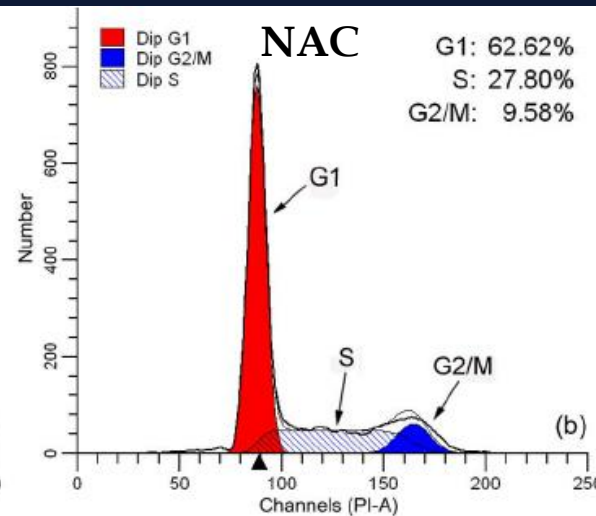
Cykl komórkowy

Analiza cyklu komórkowego ludzkich komórek nowotworu wątroby - HepG2 .

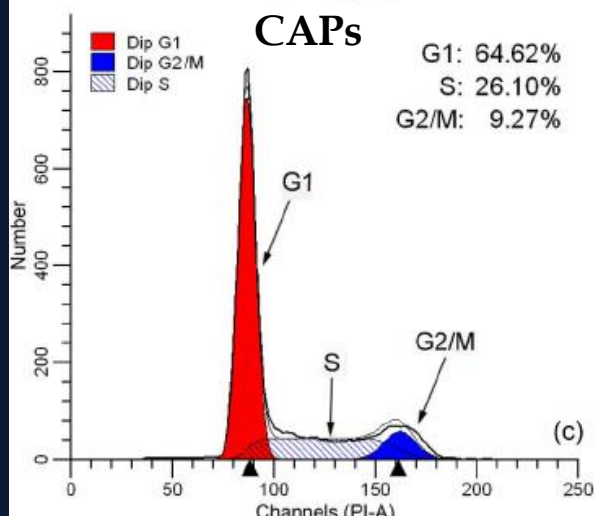
A



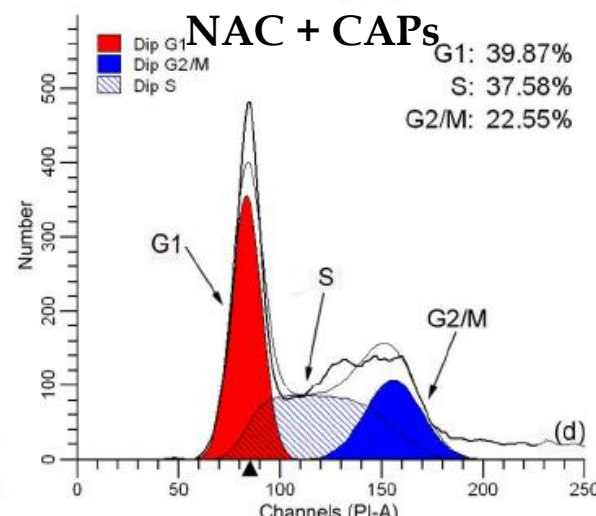
B



C



D



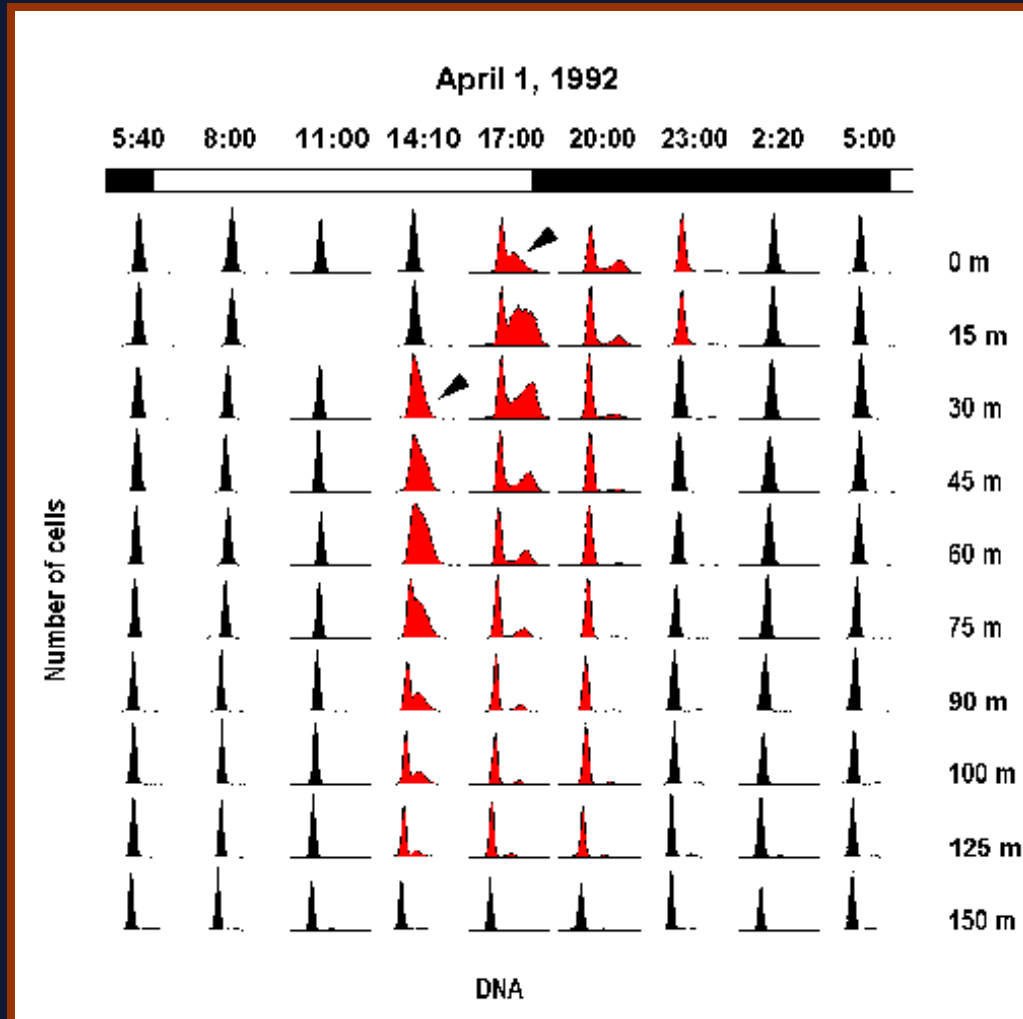
CAPs – Zimna plazma pod ciśnieniem atmosferycznym ang. „Cold atmospheric-pressure plasmas (CAPs)”

Plazma jest to zjonizowany, reaktywny gaz

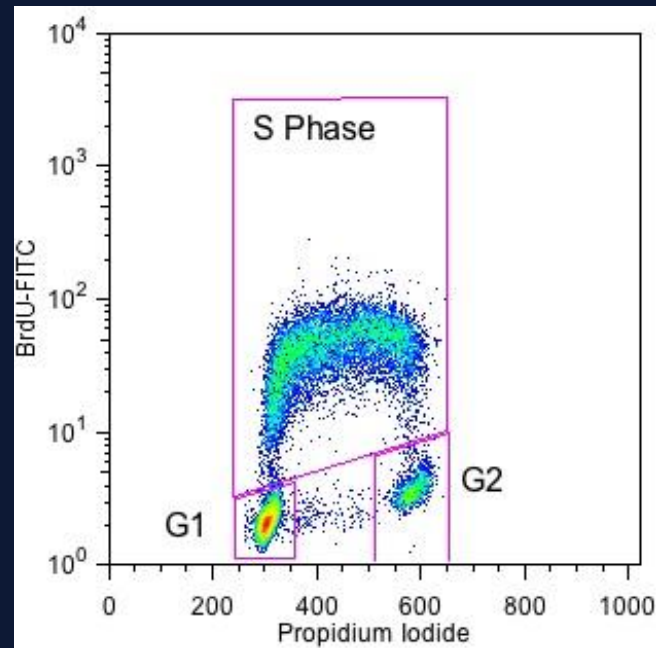
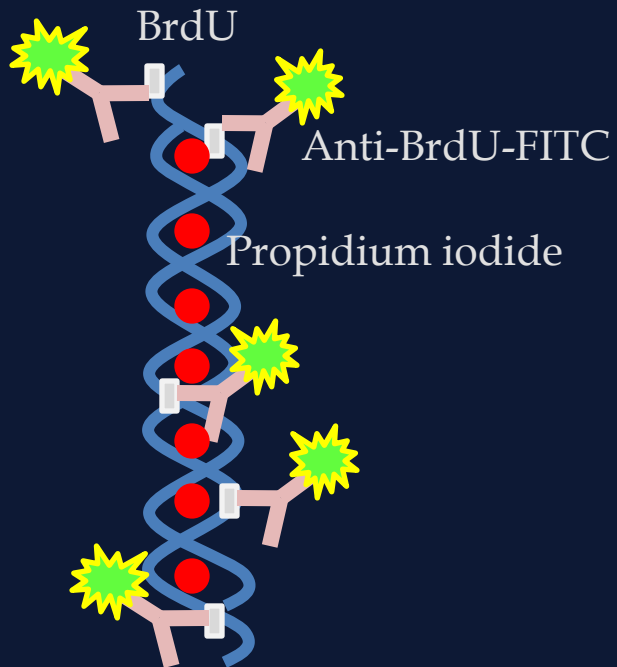
NAC - N-acetylocysteina

Zastosowanie cytometrii w badaniach Oceanograficznych.

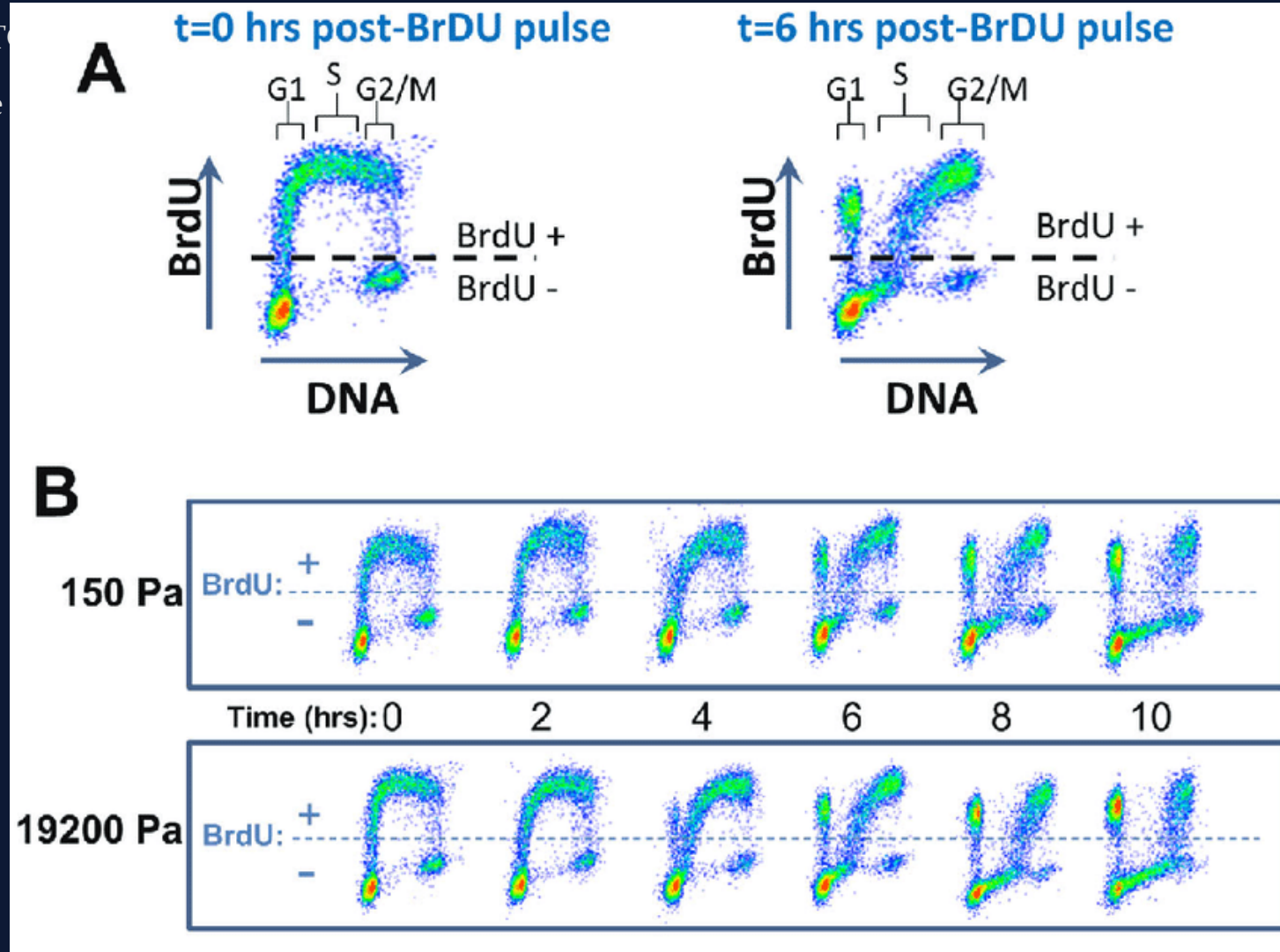
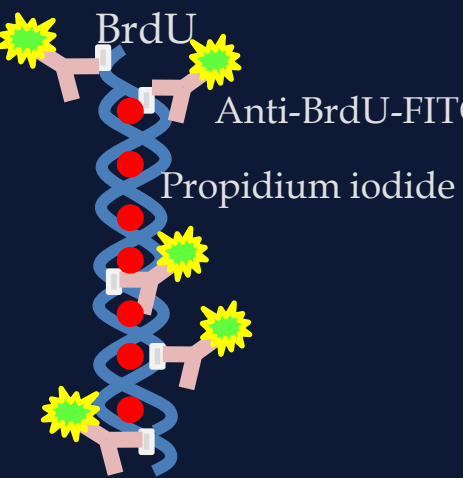
Śledzenie liczby i namnażania się fitoplanktonu , np. badanie zawartości DNA w barwieniu PI



Cykl komórkowy barwienie PI/BrdU



Cykl komórkowy barwienie PI/BrdU

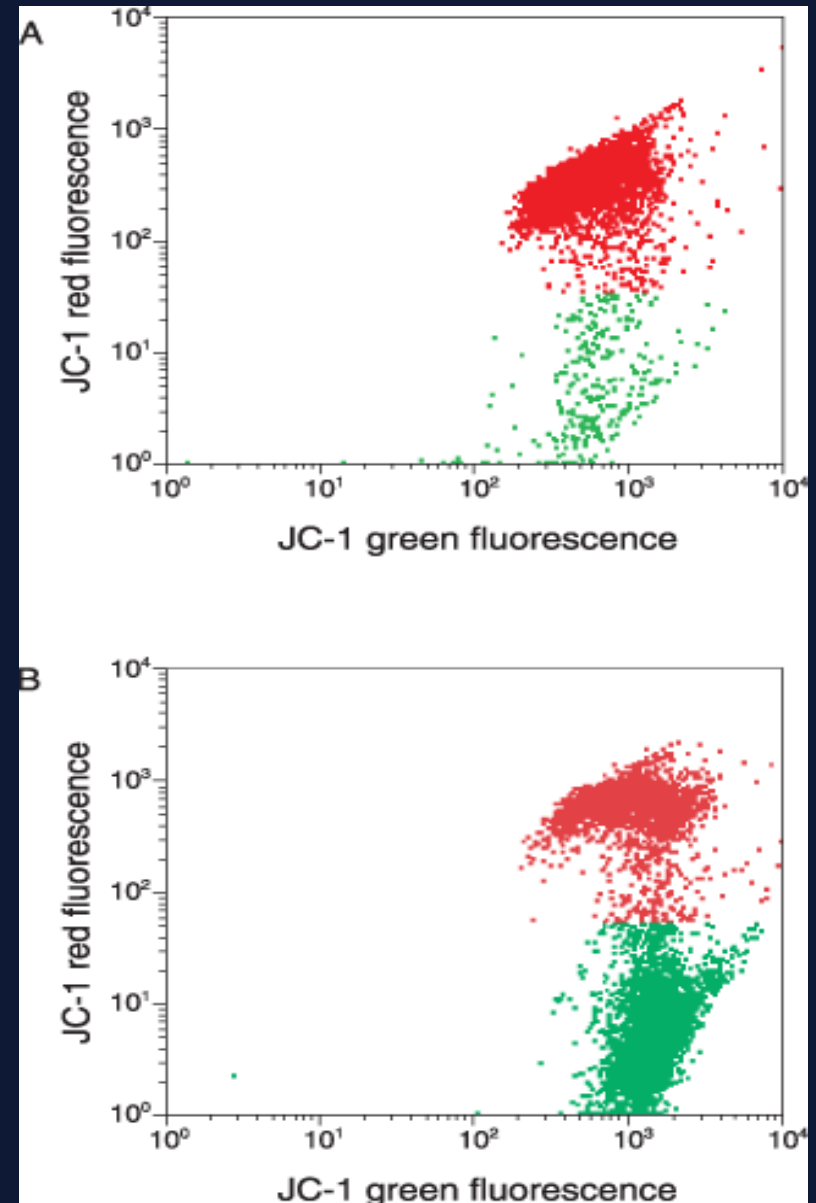


Analiza potencjału błony mitochondrialnej

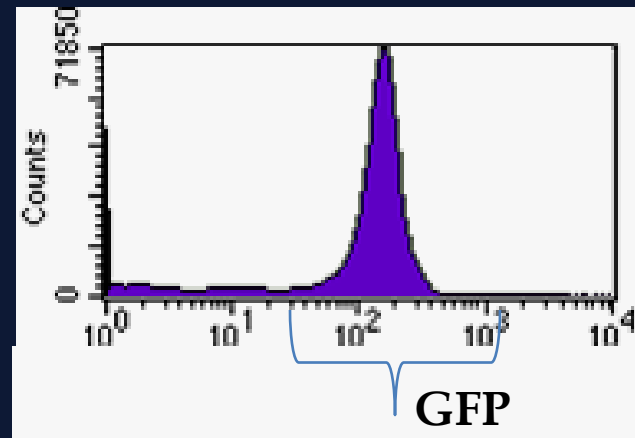
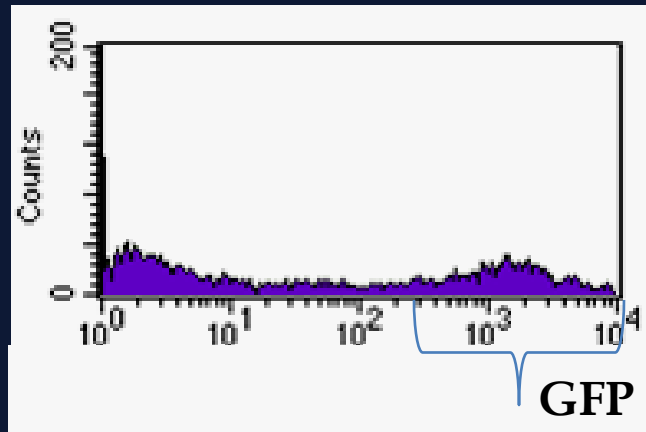
Znakowanie
mitochondriów:

Badanie potencjału
błony
mitochondrialnej (JC-1):

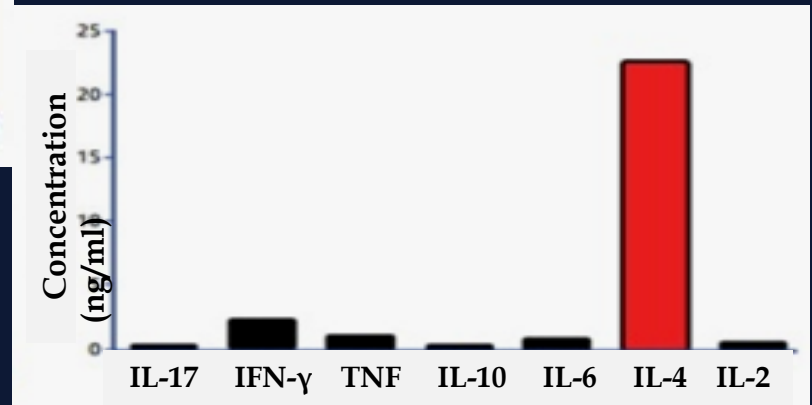
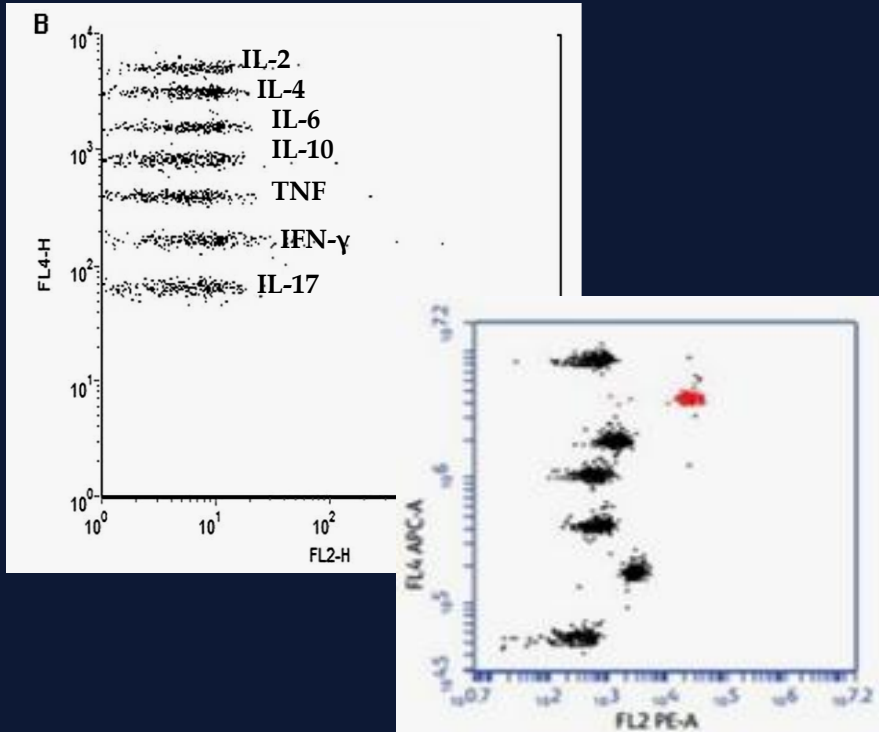
- wysoki potencjał –
czerwone agregaty
- niski potencjał –
zielony monomer



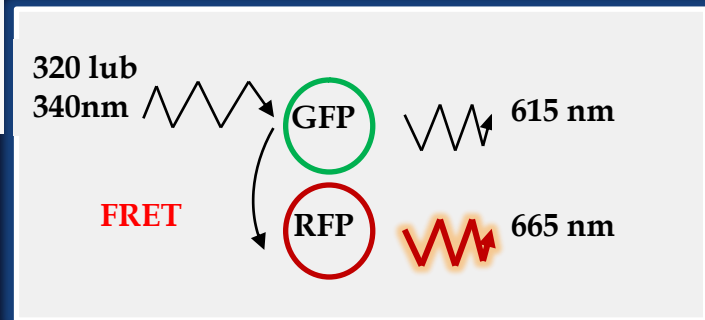
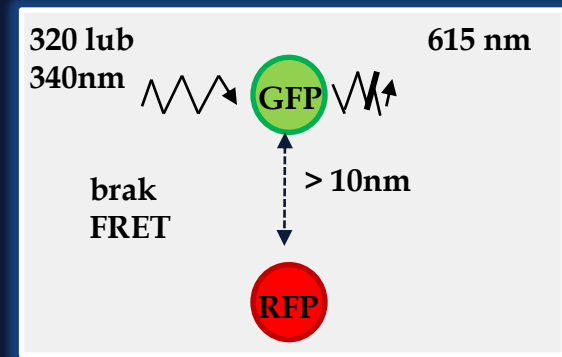
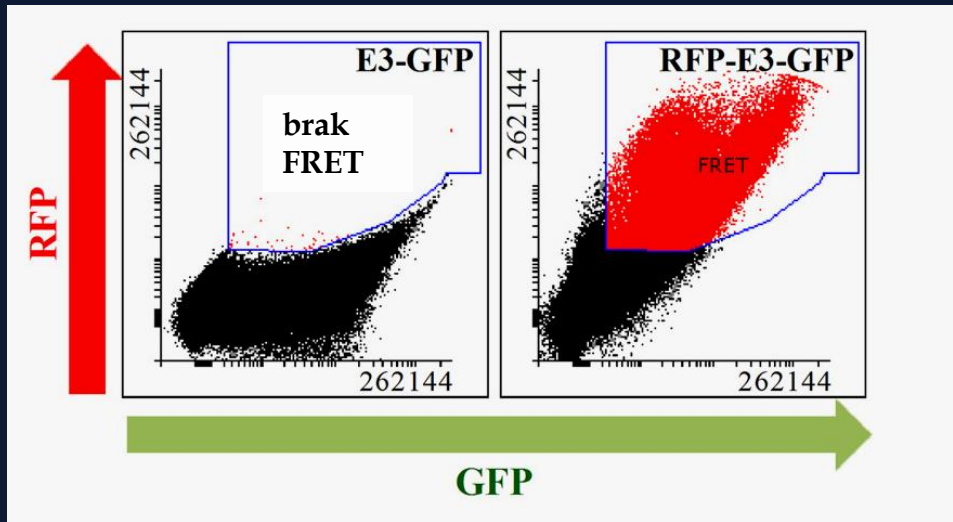
Selekcja tranfektantów



Analiza produkcji i stężenia cytokin



Analiza interakcji białek – metoda FRET

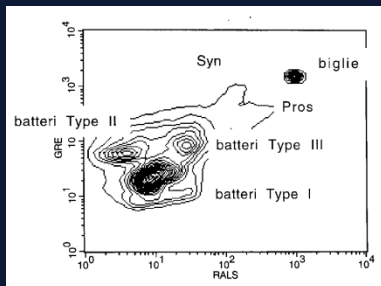


Mikrobiologia żywności, mikrobiologia środowiskowa

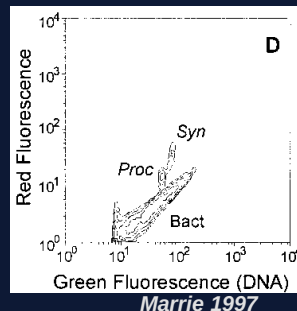
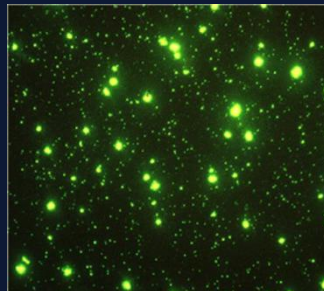
Analiza cytometryczna bakterii, glonów, drożdży :

✓ - na podstawie fluorescencji pierwotnej pochodzącej od barwników naturalnie produkowanych

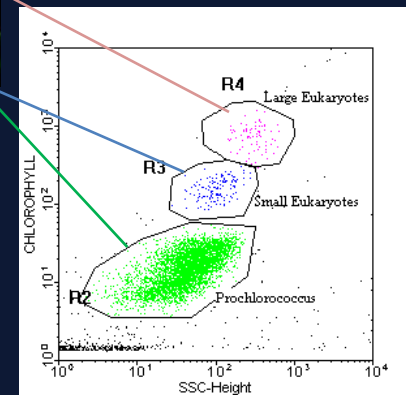
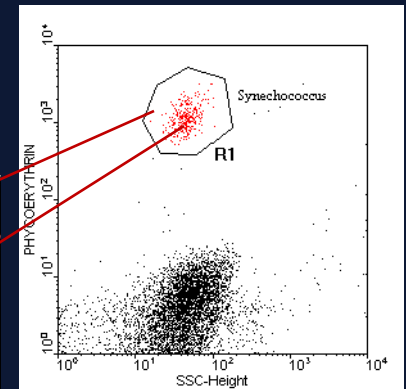
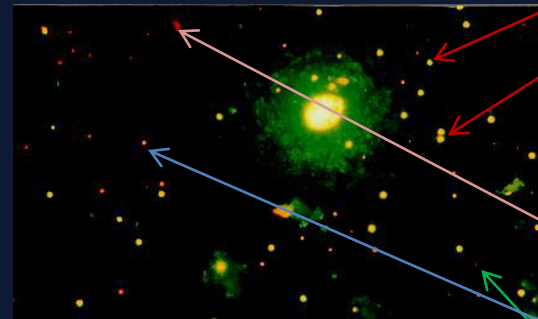
✓ - na podstawie barwienia DNA : jodkiem propidyny, SYBR Green I



Casotti, 2000

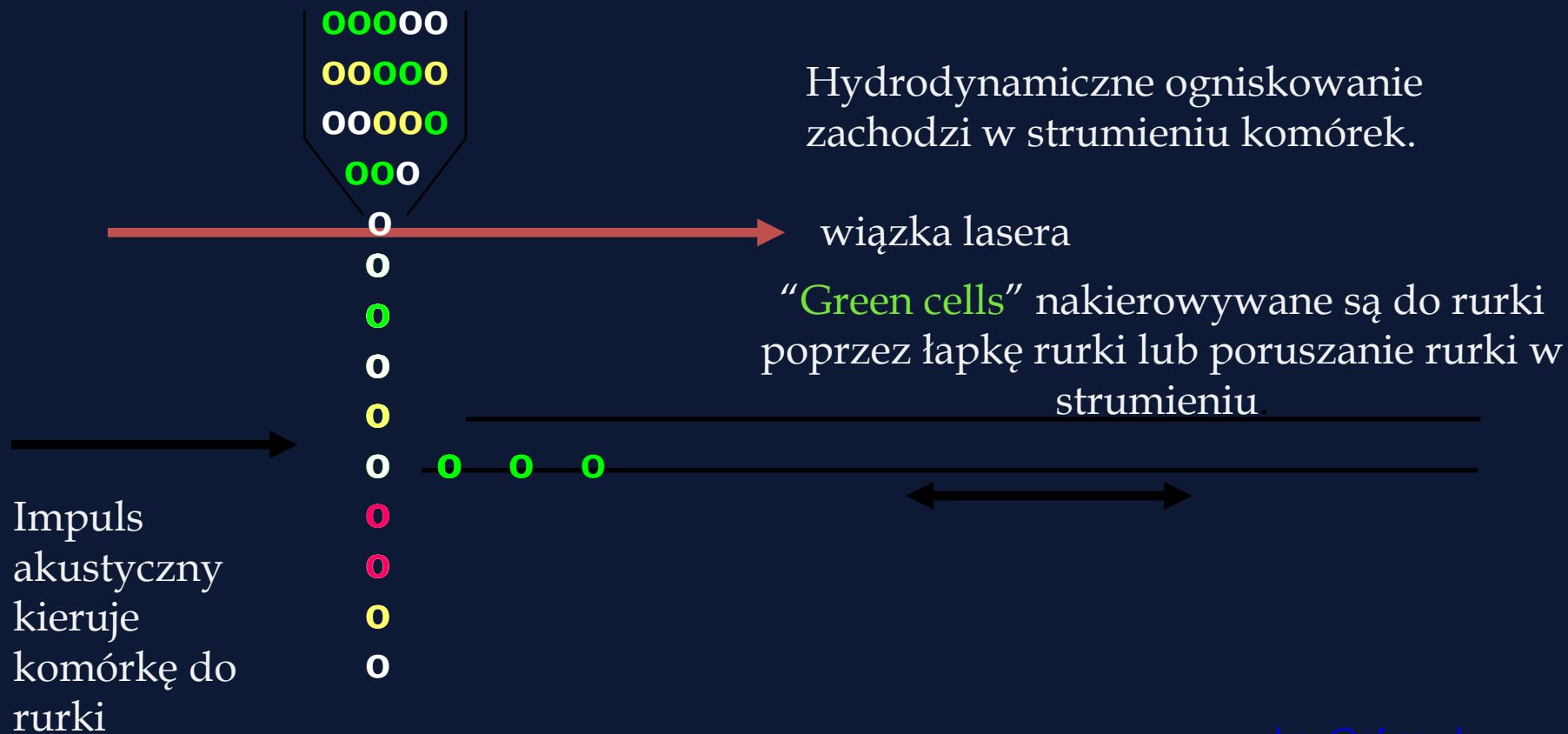


Marrie 1997



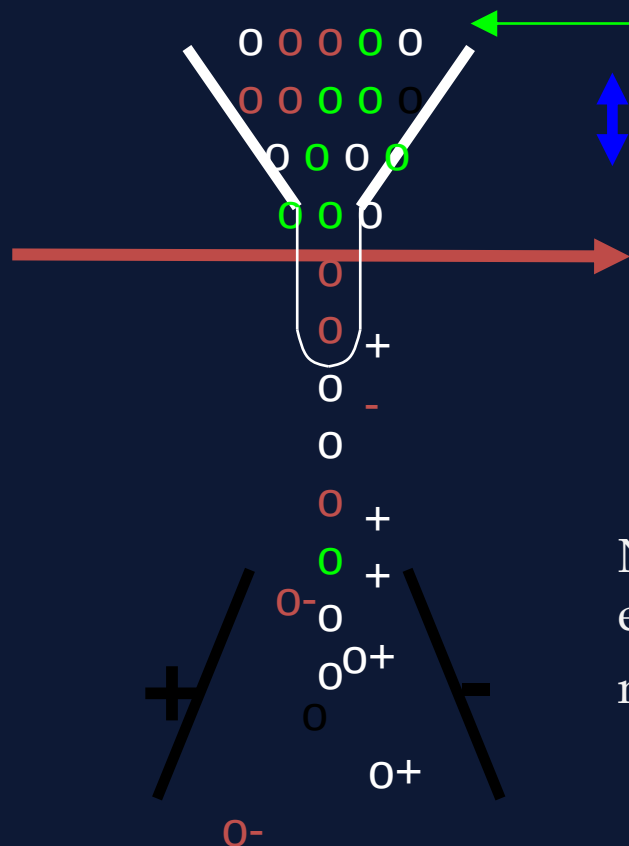
Courtesy of M. Reckermann

Sortowanie - mechaniczne



hoy@cf.ac.uk

Sortowanie - elektrostatyczne



Hydrodynamiczne ogniskowanie w dyszy drgającej zamienia strumień w kropelki

Padanie wiązki lasera-sortowanie:
biały sort na prawo
czerwony sort na lewo
zielony lub czarny brak sortu

Naliczone komórki zbaczają w wyniku działania pola elektrostatycznego z płyt będących pod wysokim napięciem (+/- 3000 volt).

<https://player.vimeo.com/video/82369085>

0000 0000 0000
left waste right

Różne urządzenia odbierające