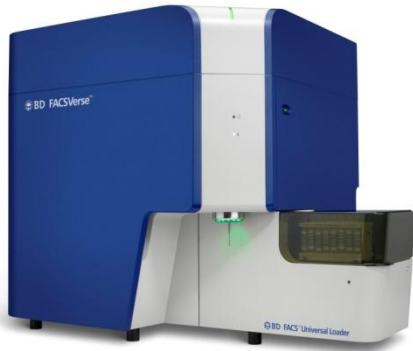




**Fakultet: Cytometria – zastosowanie
w badaniach biologicznych**

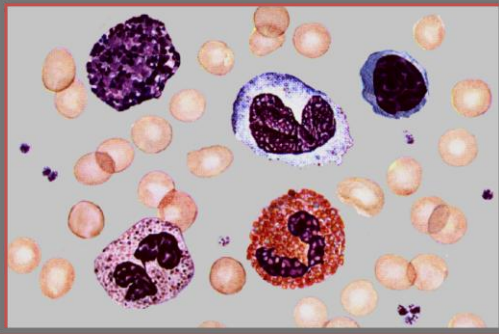
Wprowadzenie do cytometrii przepływowej: co i jak mierzy cytometr?

Prof. dr hab. Nadzieja Drela
Wydział Biologii UW
Instytut Biologii Funkcjonalnej i Ekologii
Zakład Immunologii
ndrela@biol.uw.edu.pl

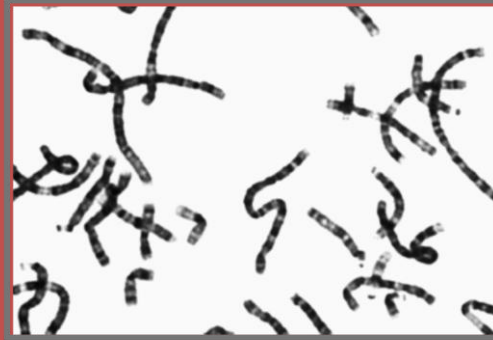
FLOW = fluid
CYTO = cell
METRY = measure

**Główna cecha techniki cytometrii
przepływowowej: zdolność do pomiaru
właściwości pojedynczych cząstek**

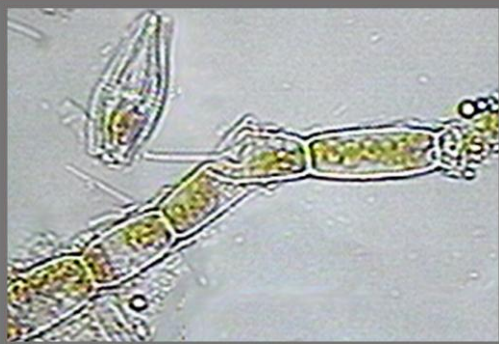
Czy są jakieś cechy wspólne?



Blood cells



Chromosomes

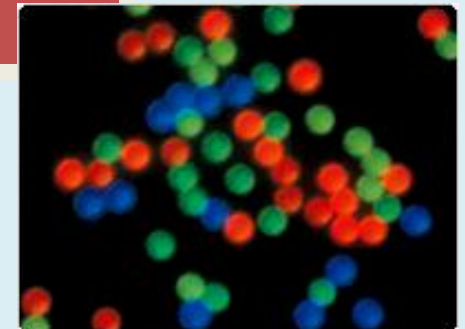


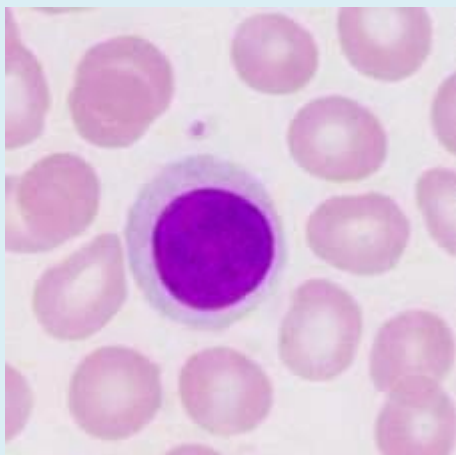
Algae



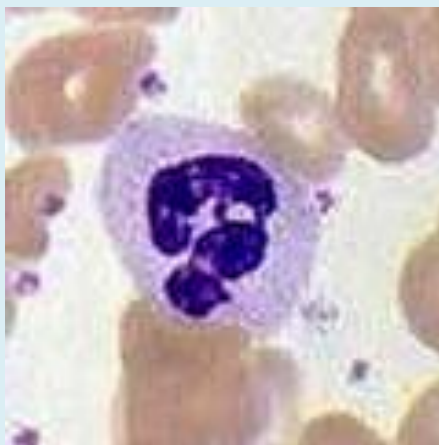
Protozoa

beads

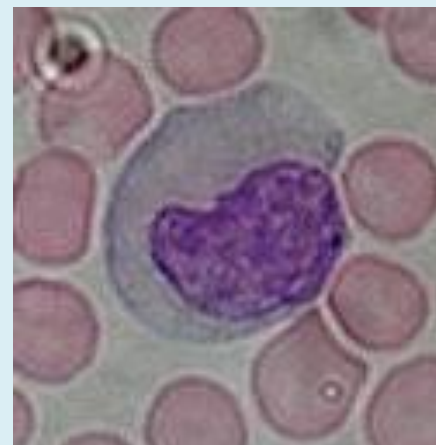




8 μm



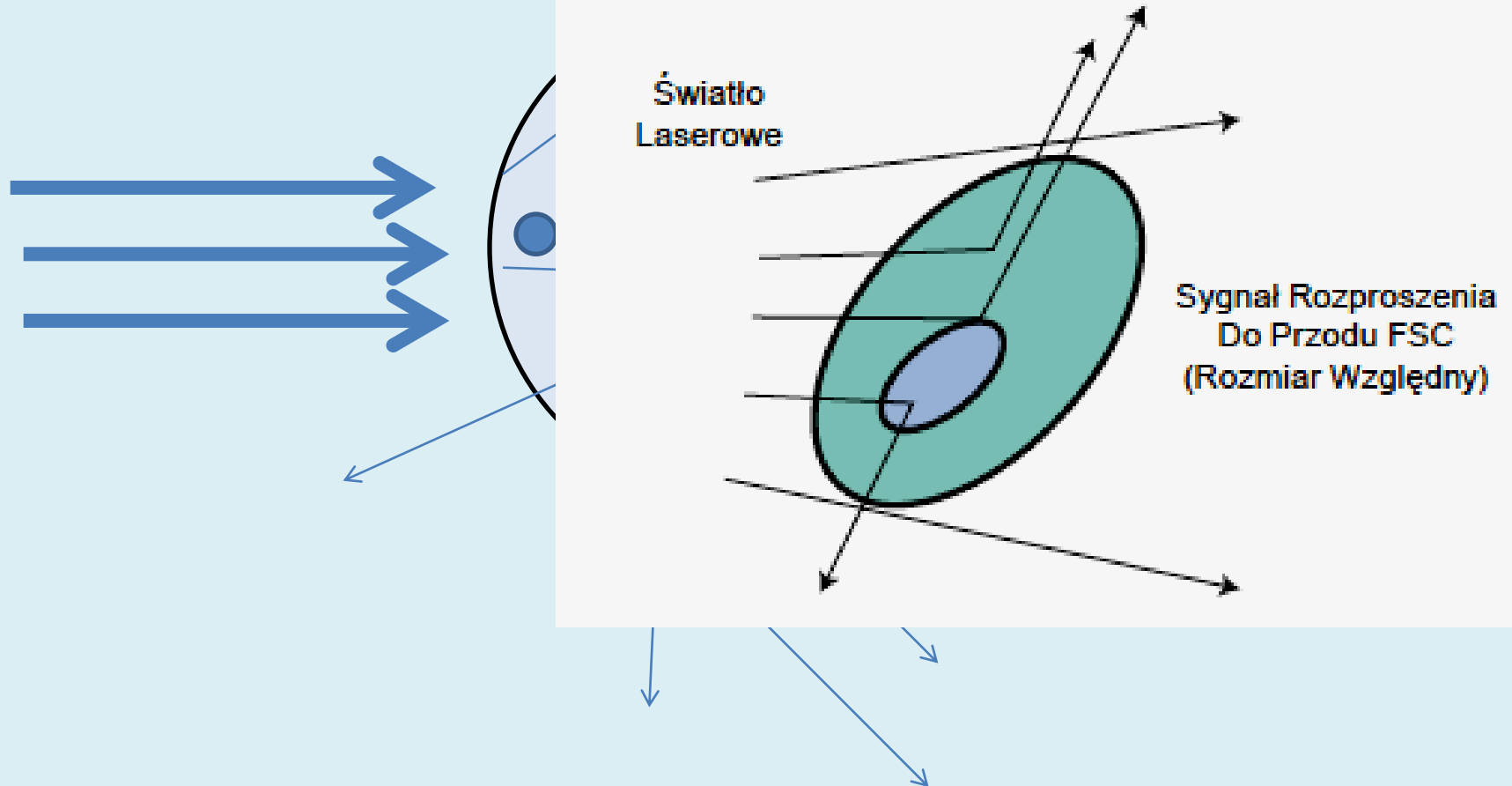
12 μm



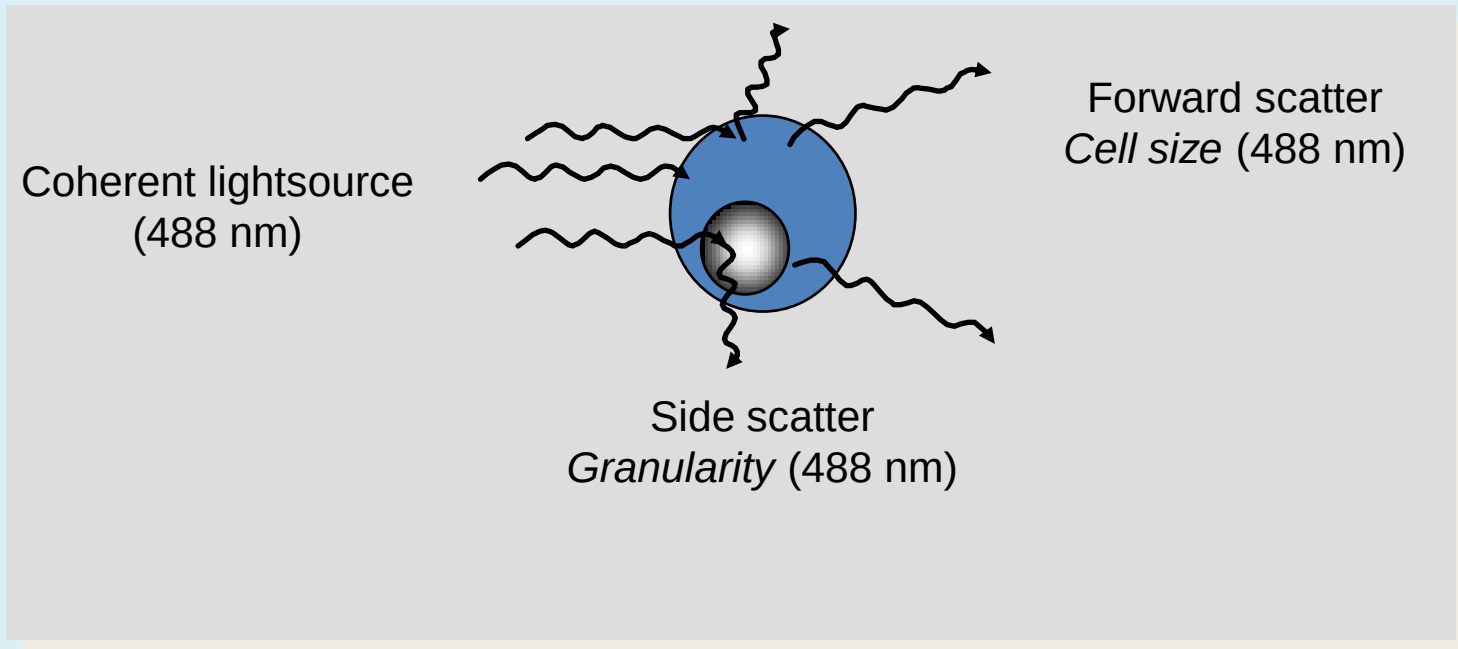
14 μm

- **wielkość** względna
- **ziarnistość** względna wewnętrzna organizacja

Co się dzieje, gdy na komórkę pada wiązka światła?



Pomiar światła rozproszonego „do przodu” (FSC) i „na boki” (SSC)



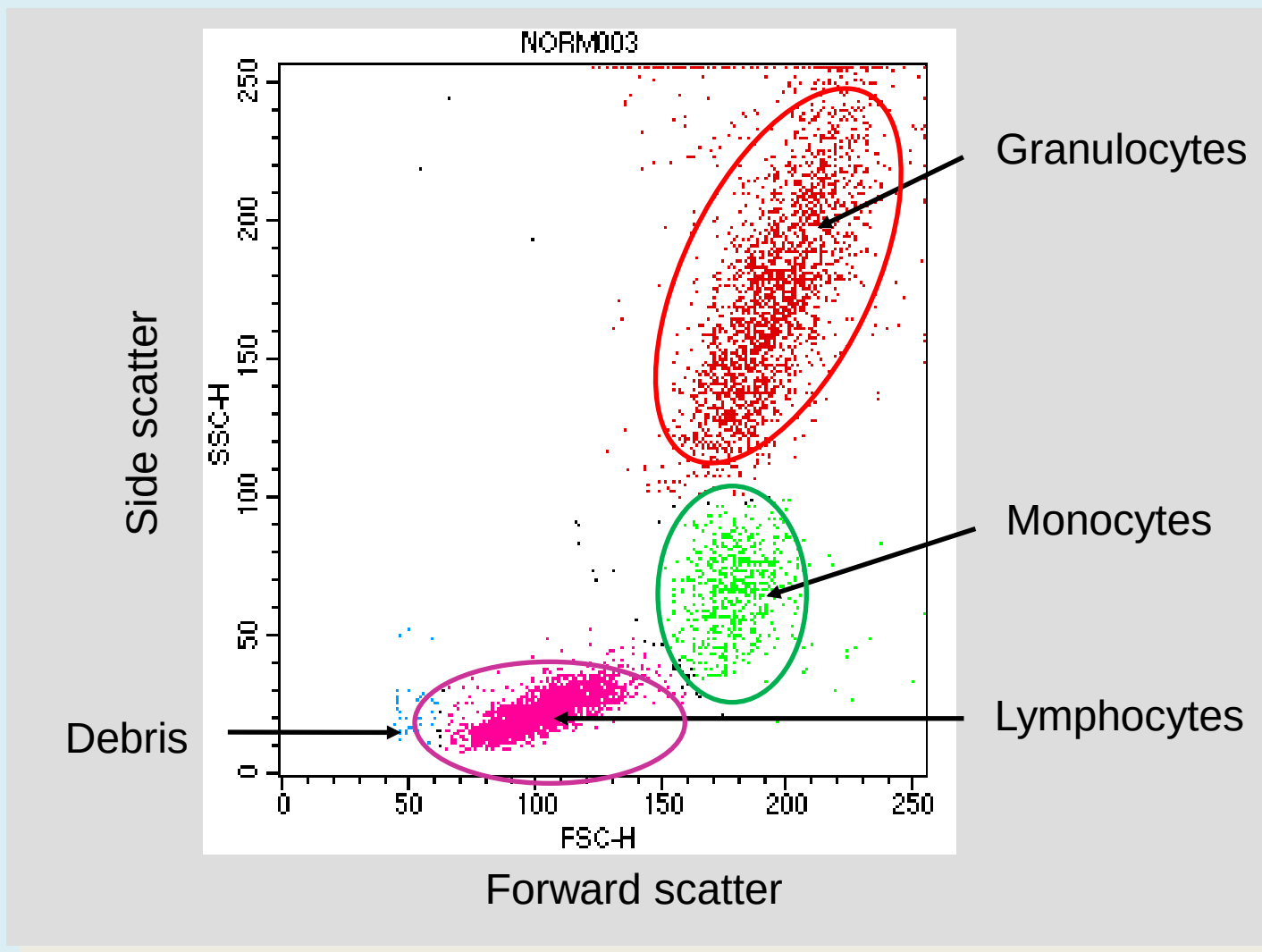
Forward scatter (FSC)

- measured along the axis of the incoming light
- proportional to the cell size / cell surface (only true for perfect round cells)

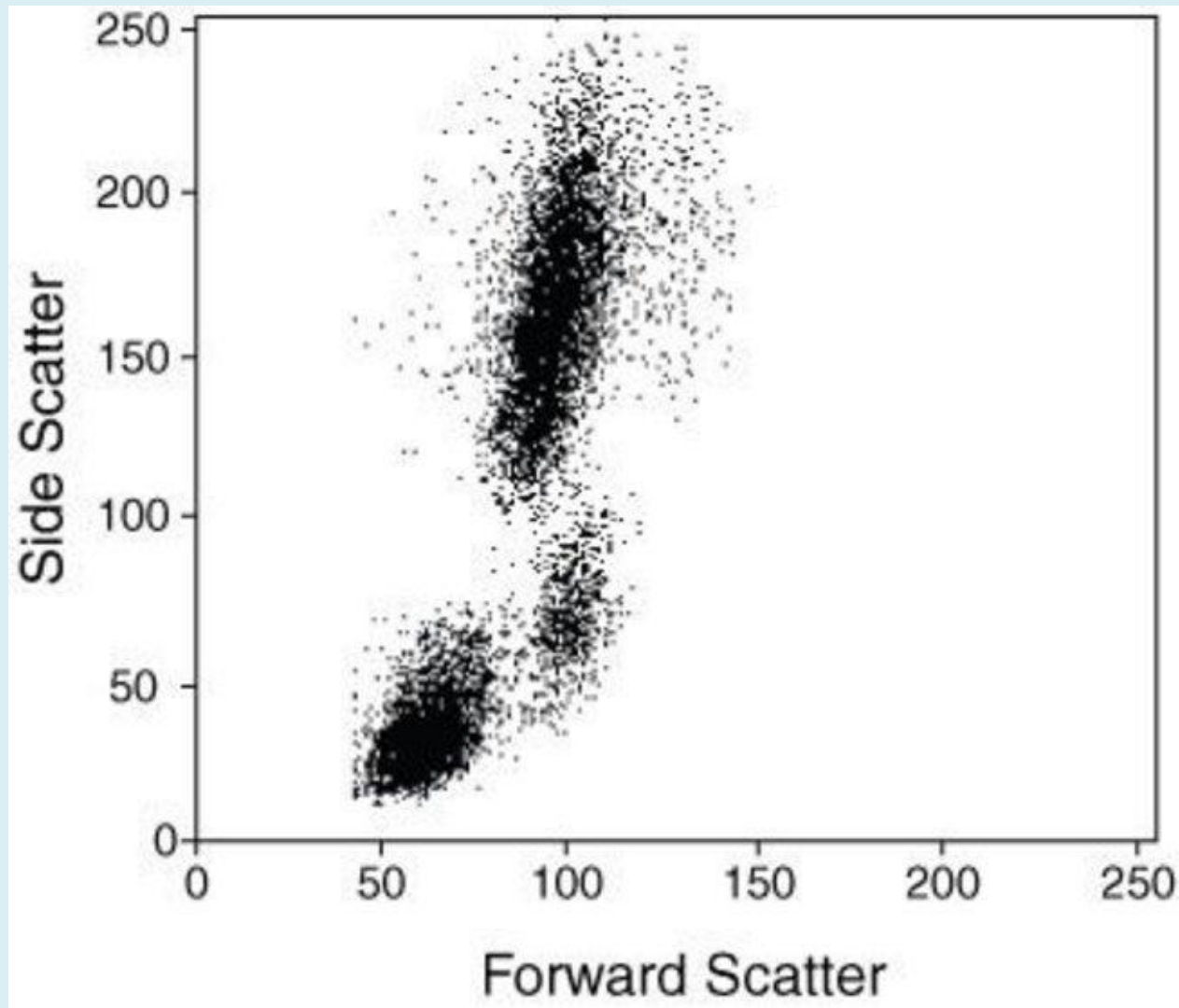
Side scatter (SSC)

- measured in 90° direction to the excitation light
- proportional to cell „complexity” or granularity

Jak wykorzystać informacje o rozproszeniu światła przez różne obiekty (komórki)?

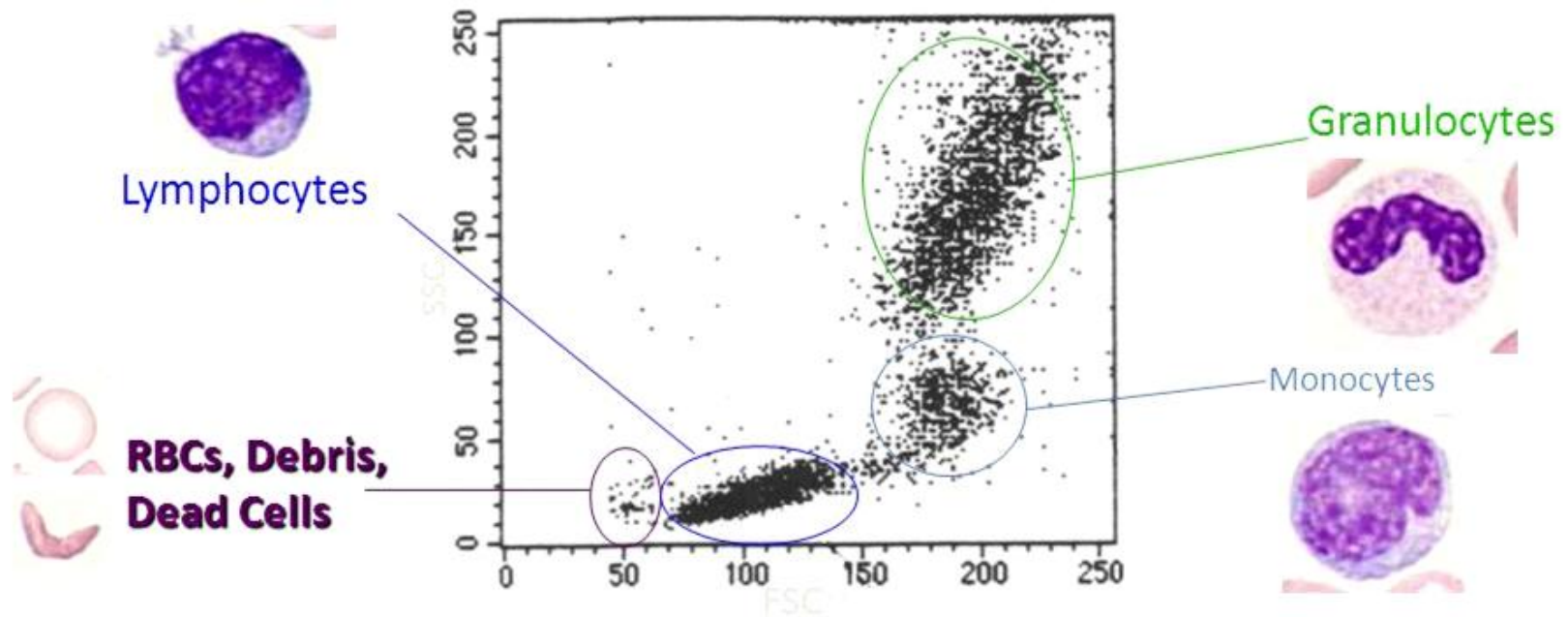


Co wynika z pomiaru FSC i SSC?

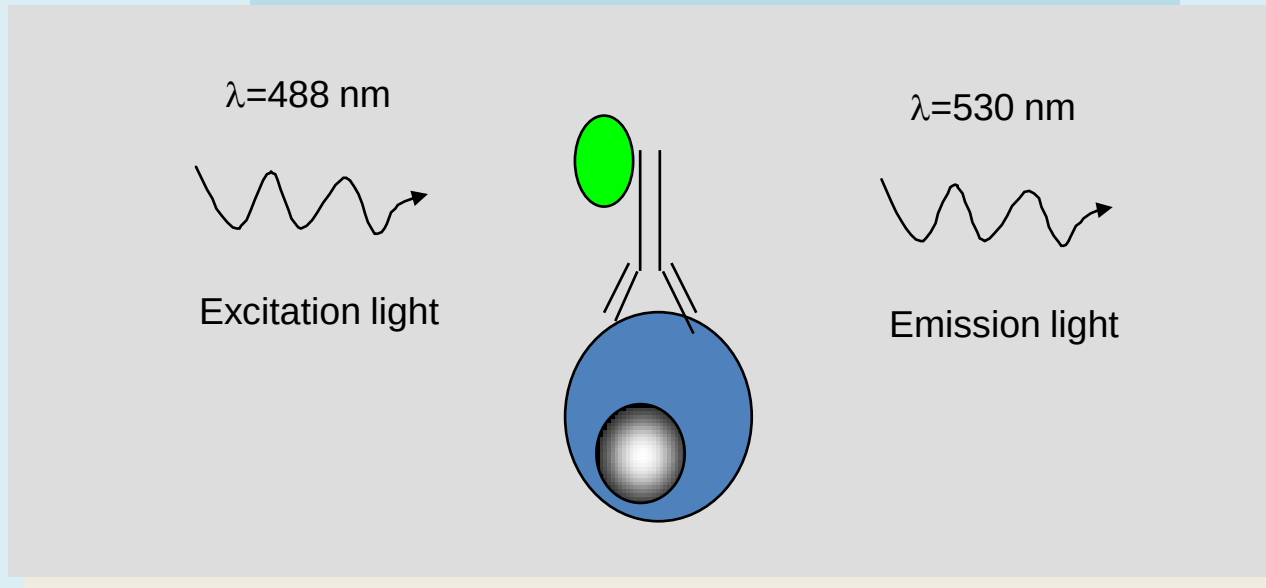


Leukocyty: jaką pozycję zajmują na wykresie

- Since FSC $\sim$ size and SSC $\sim$ internal structure, a correlated measurement between them can allow for differentiation of cell types in a heterogenous cell population

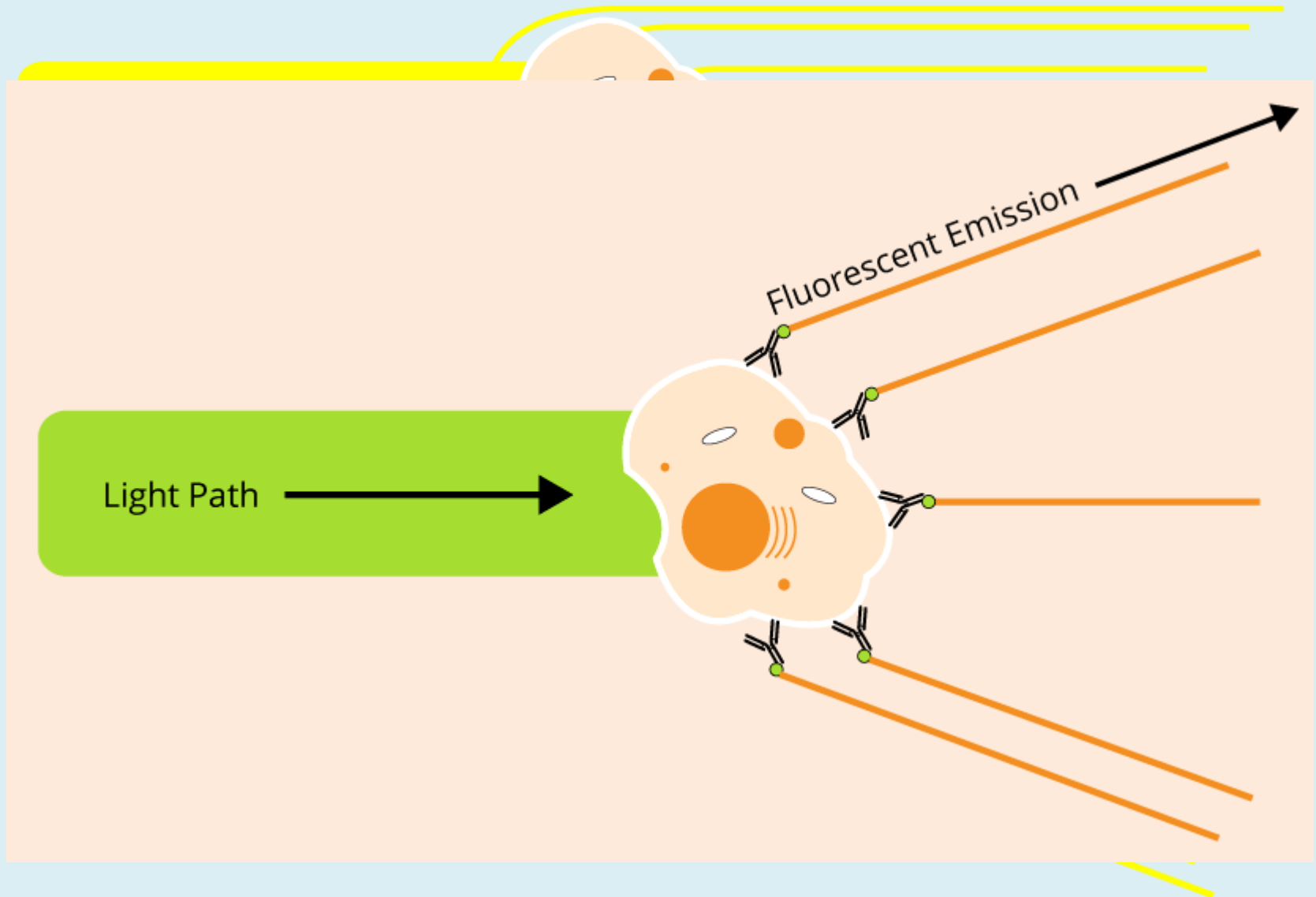


Fluorescencja



- The fluorochrome molecule absorbs the energy of the incoming light
- It releases the absorbed energy by:
 - vibration and dissipated heat
 - emission of a photon with a higher wavelength (= less energetic)

Pomiar intensywności światła



Fluorescencja

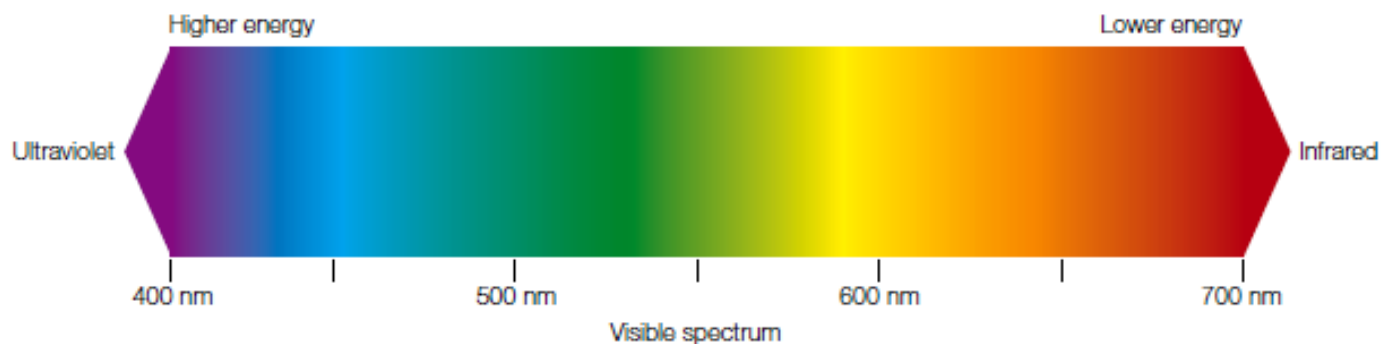
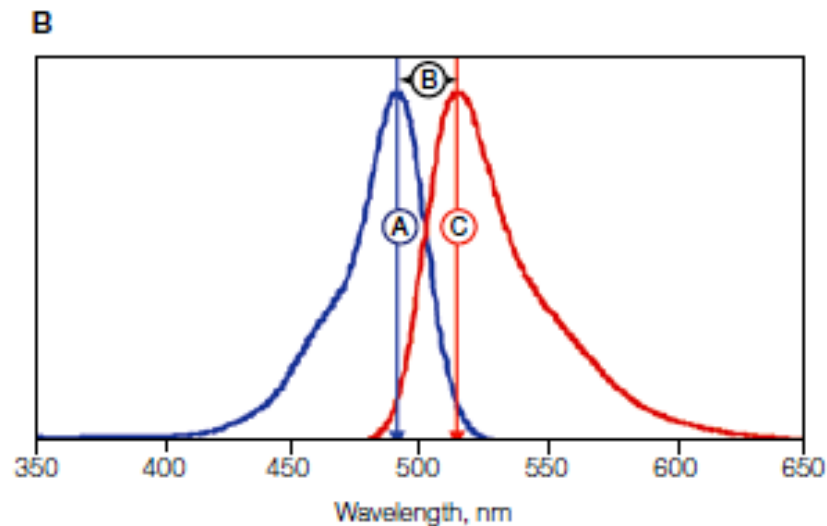
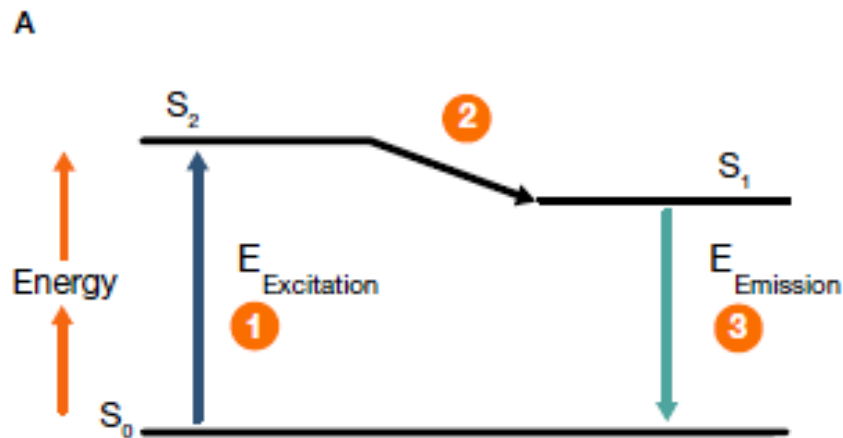
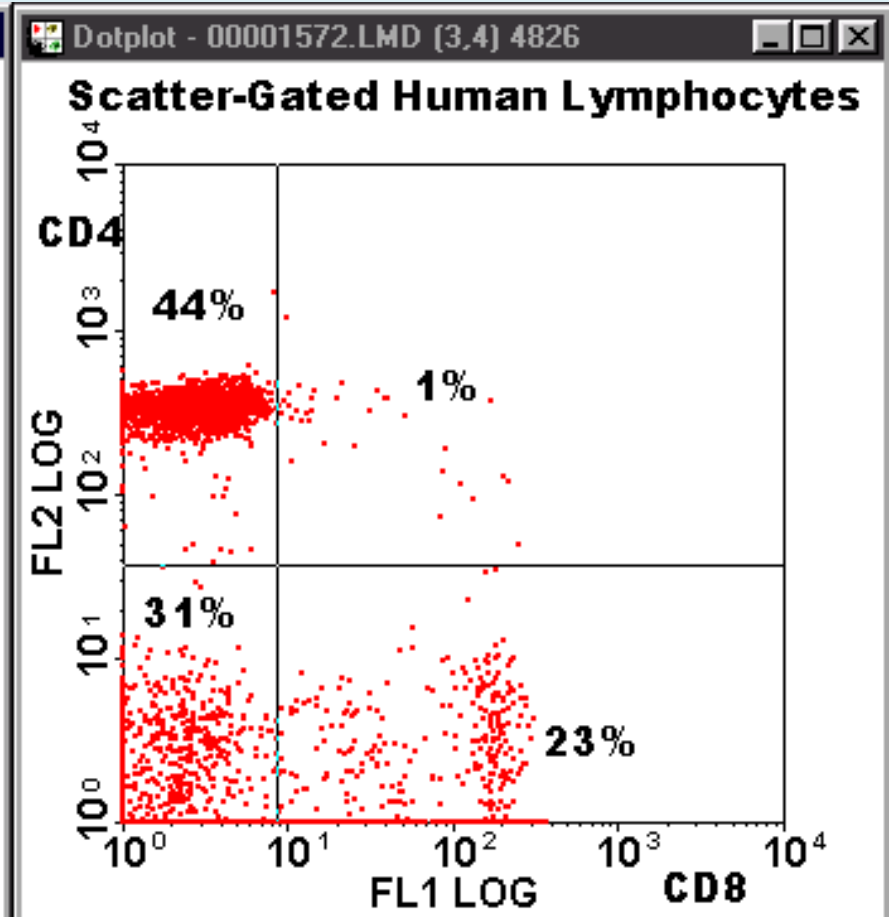
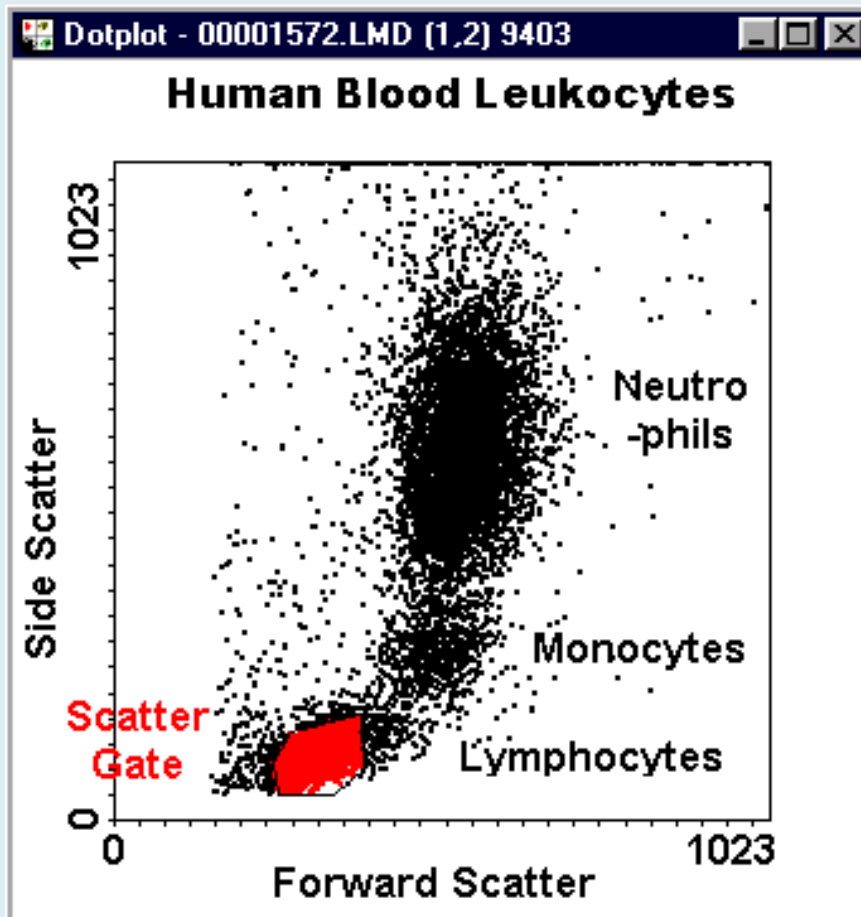


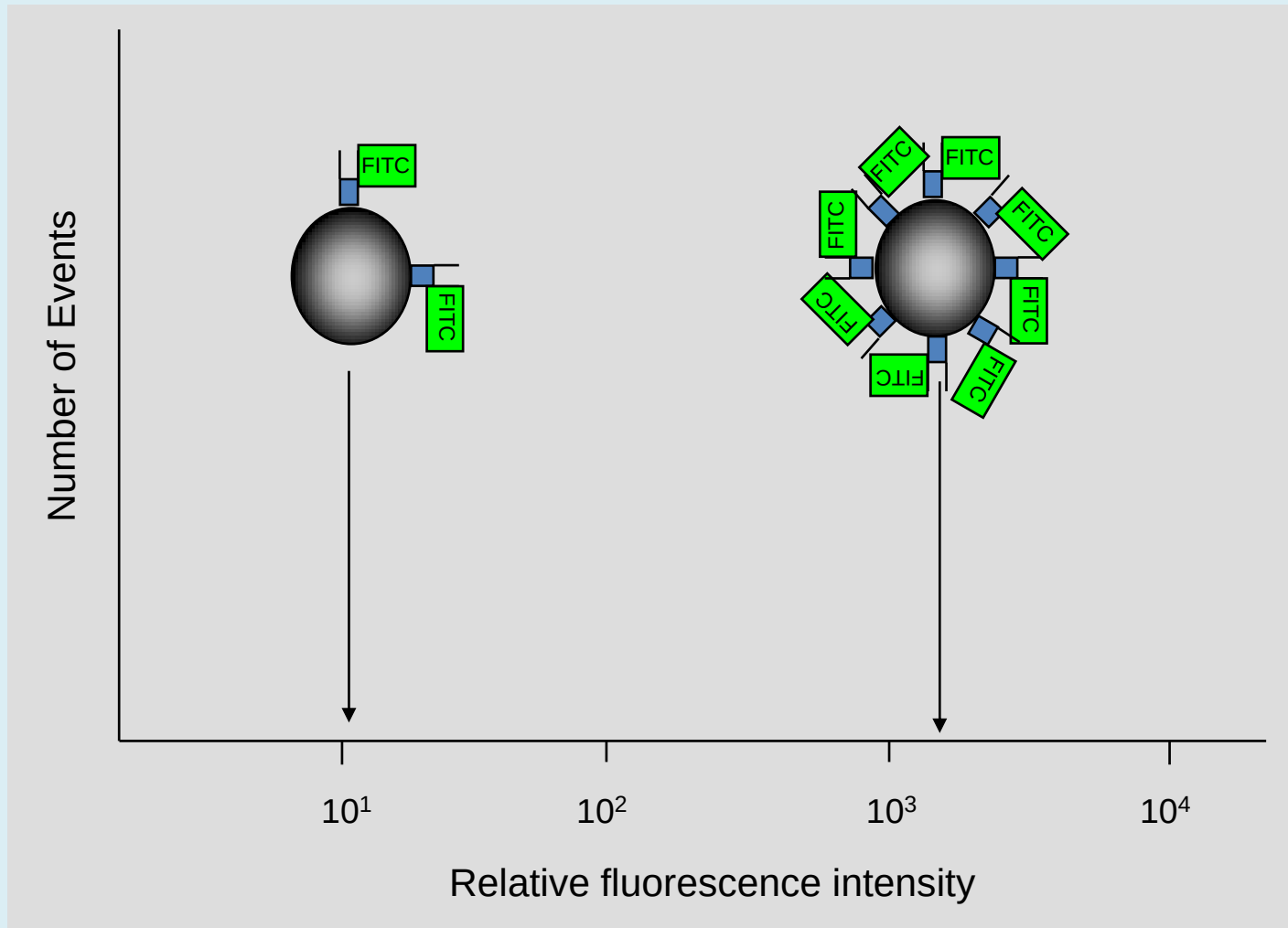
Fig. 7. The electromagnetic spectrum.



Co wynika z pomiaru fluorescencji?

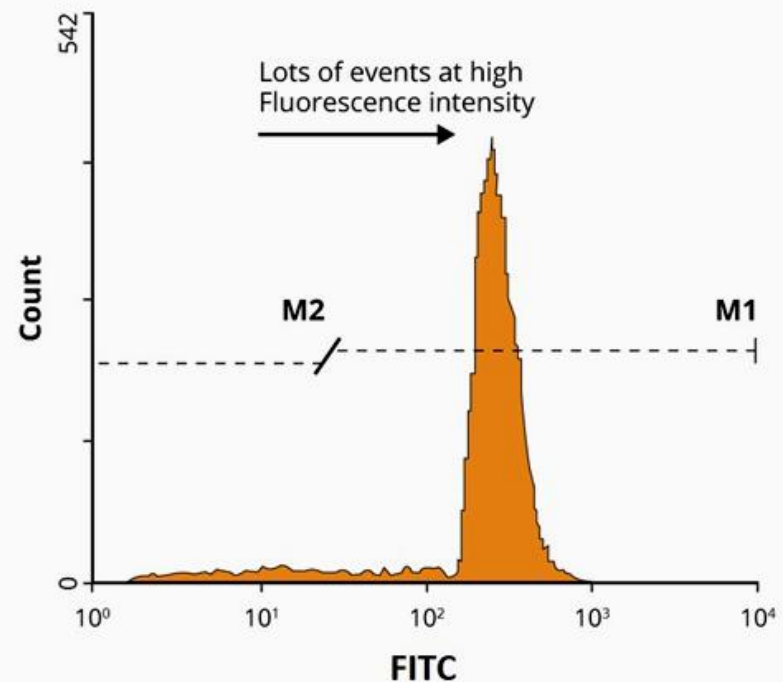
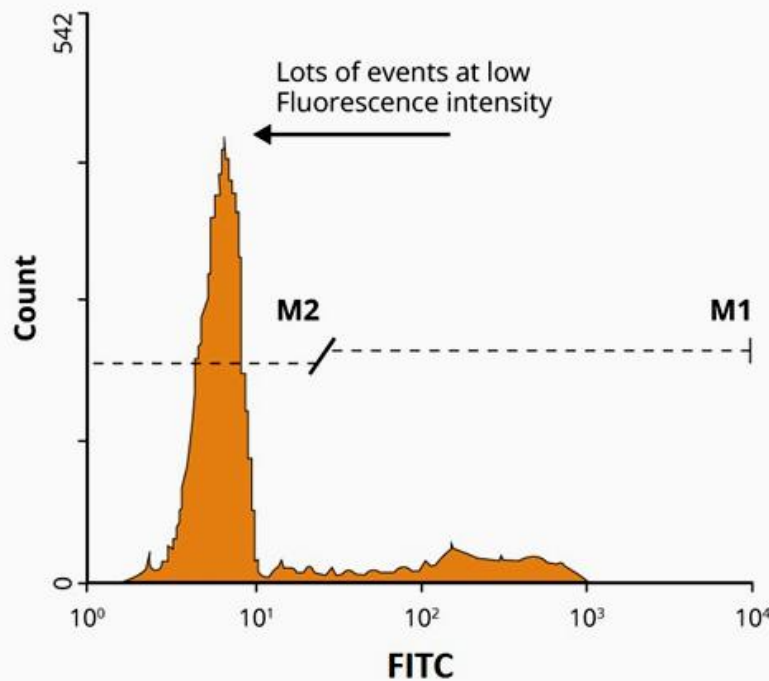


Intensywność fluorescencji



Co wynika z pomiaru intensywności fluorescencji?

Histogram Plot



Główna cecha techniki cytometrii przepływowej: zdolność do pomiaru właściwości pojedynczych cząstek

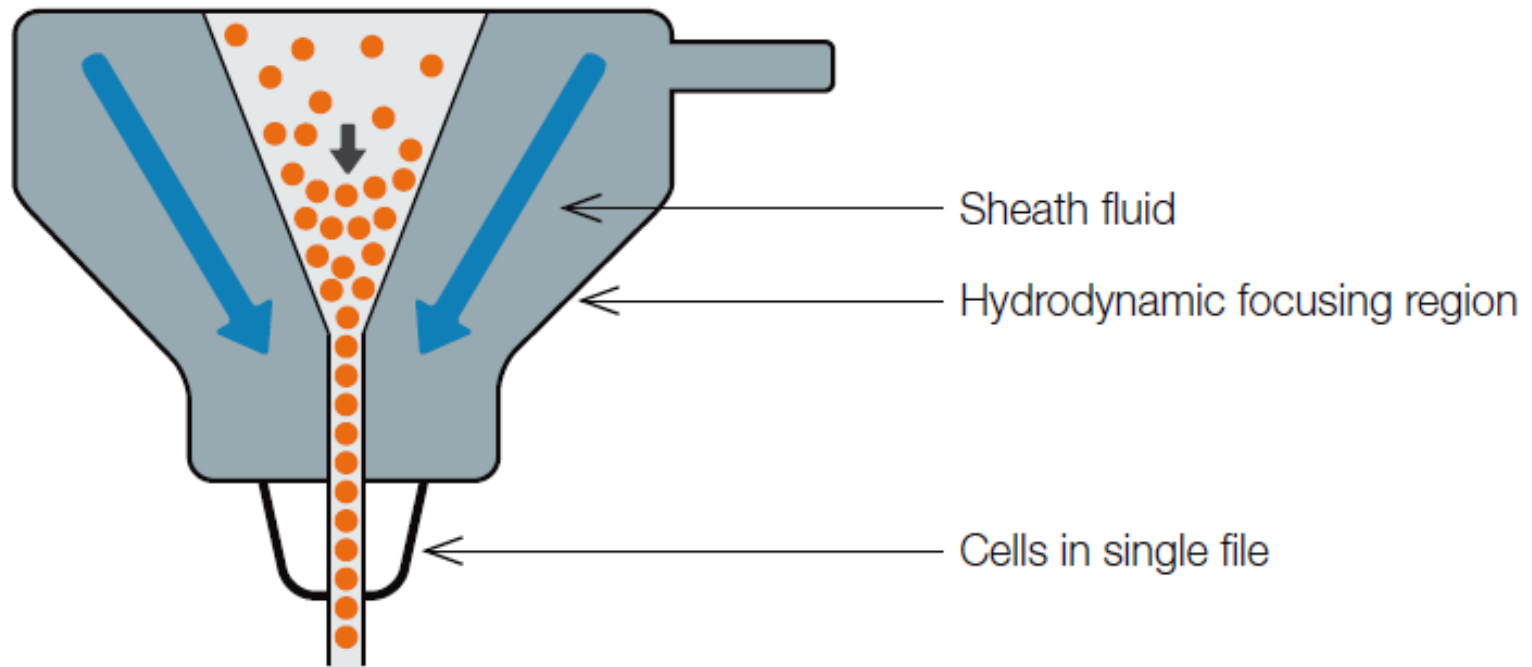
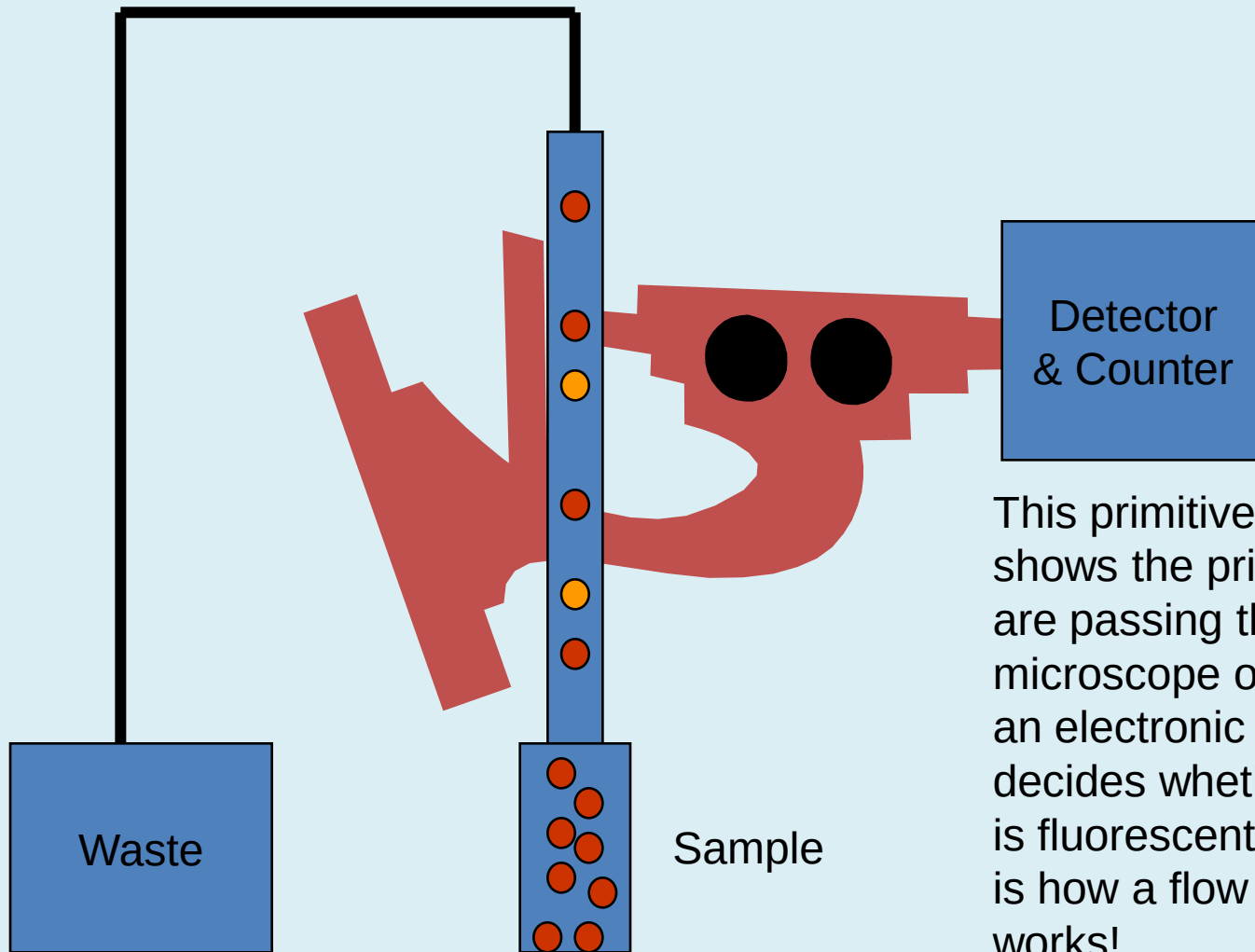


Fig. 1. Hydrodynamic focusing produces a single stream of particles.

„Automatyczny mikroskop”



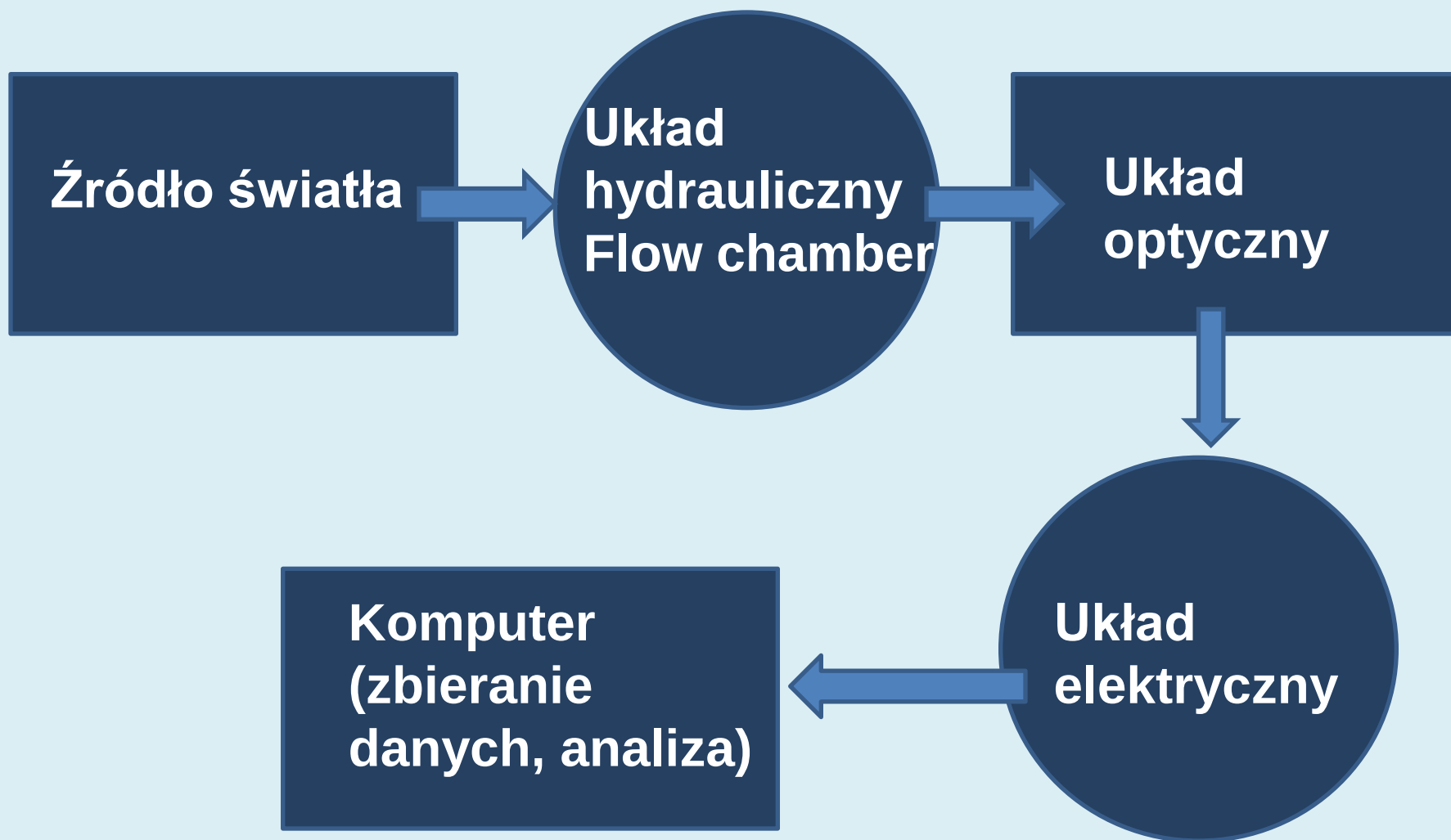
This primitive diagram shows the principle: Cells are passing the microscope objective, and an electronic circuit decides whether the cells is fluorescent or not. This is how a flow cytometer works!

Jak to jest mierzone?

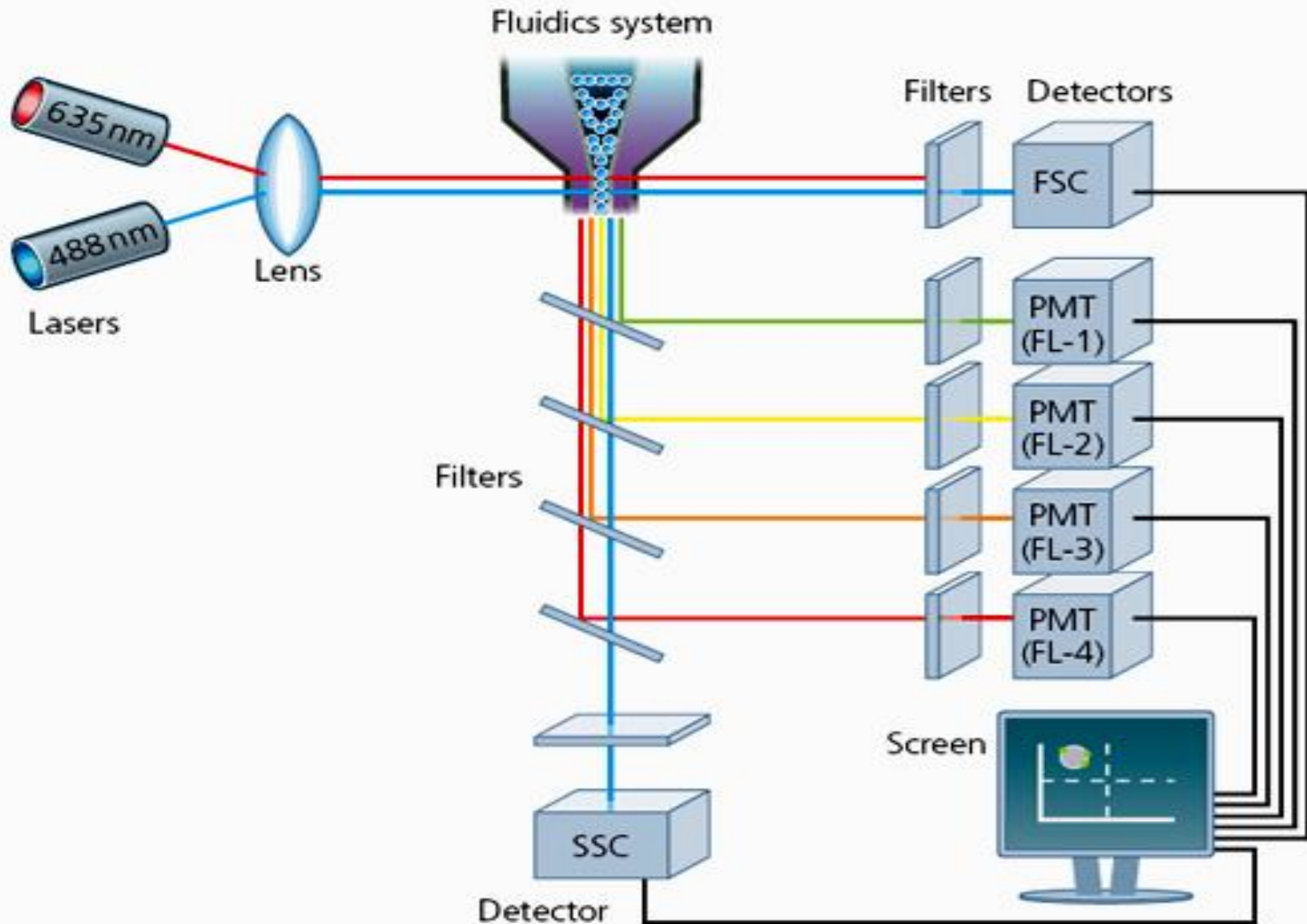
Elementy typowego cytometru przepływowego:

- Źródła światła
- Układ hydrauliczny (układ płynów)
- Układ optyczny
- Układ elektryczny (przetwarzanie sygnałów świetlnych na impulsy elektryczne)
- System analizy danych

Cytometr – schemat budowy



Cytometr – schemat budowy



Źródła światła

Blue laser (488 nm)

Red laser (637 nm)

Blue laser (488 nm) (argon laser)

Red laser (635 nm) (diode laser)

Yellow laser (561 nm)

Violet laser (407 nm) near UV (325 nm)

Głównym źródłem światła są lasery emitujące światło monochromatyczne o dużym natężeniu. Światło laserowe charakteryzuje się ograniczonym „spot size”, co oznacza, że wiązka światła jest zogniskowana w małej objętości płynu, przez który przechodzi komórka. W efekcie, w wiązce światła znajduje się tylko jedna komórka.

Najczęściej używane lasery są chłodzone powietrzem:

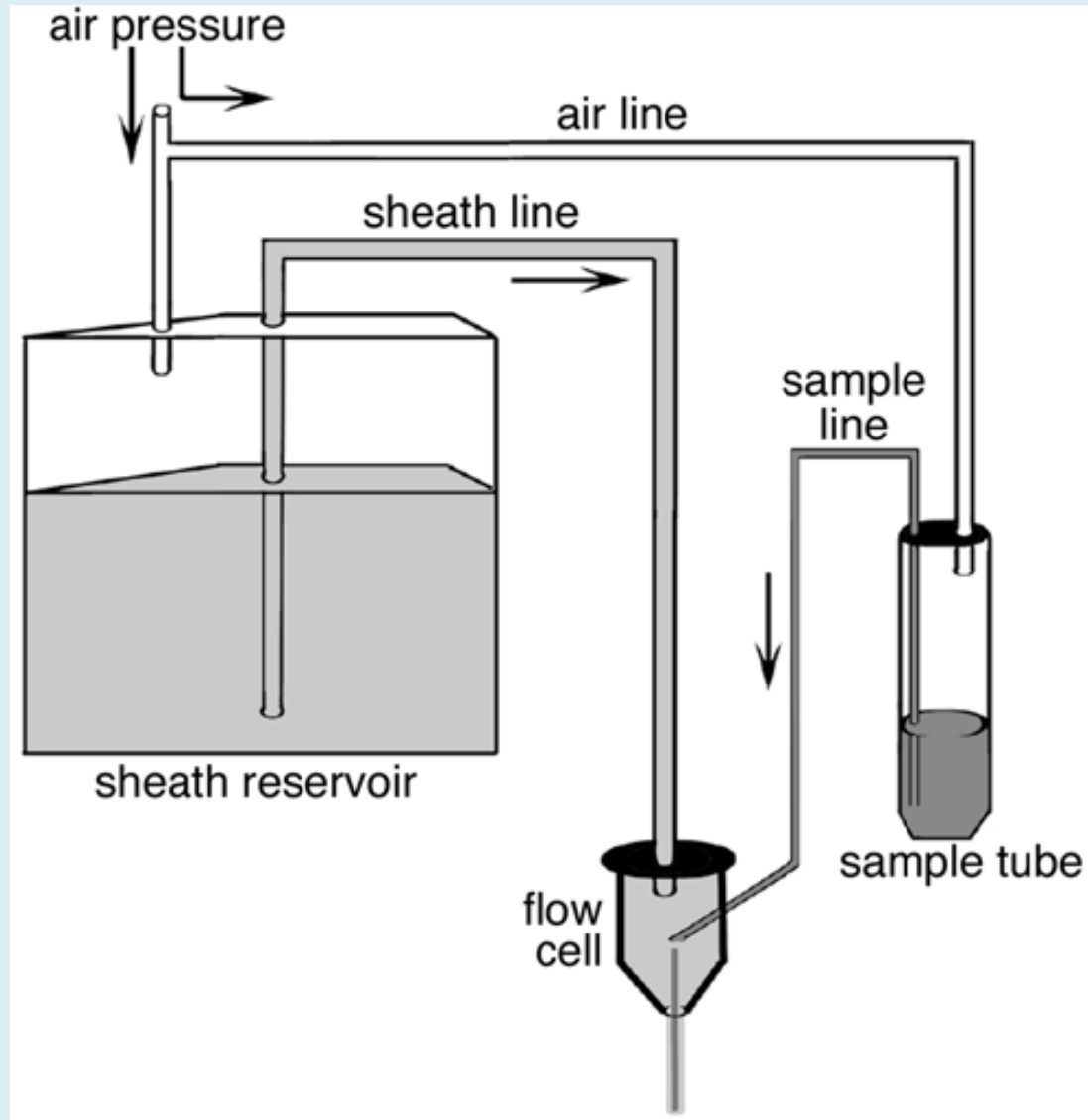
Argonowy, blue laser – 488 nm

He-Ne – 633 nm

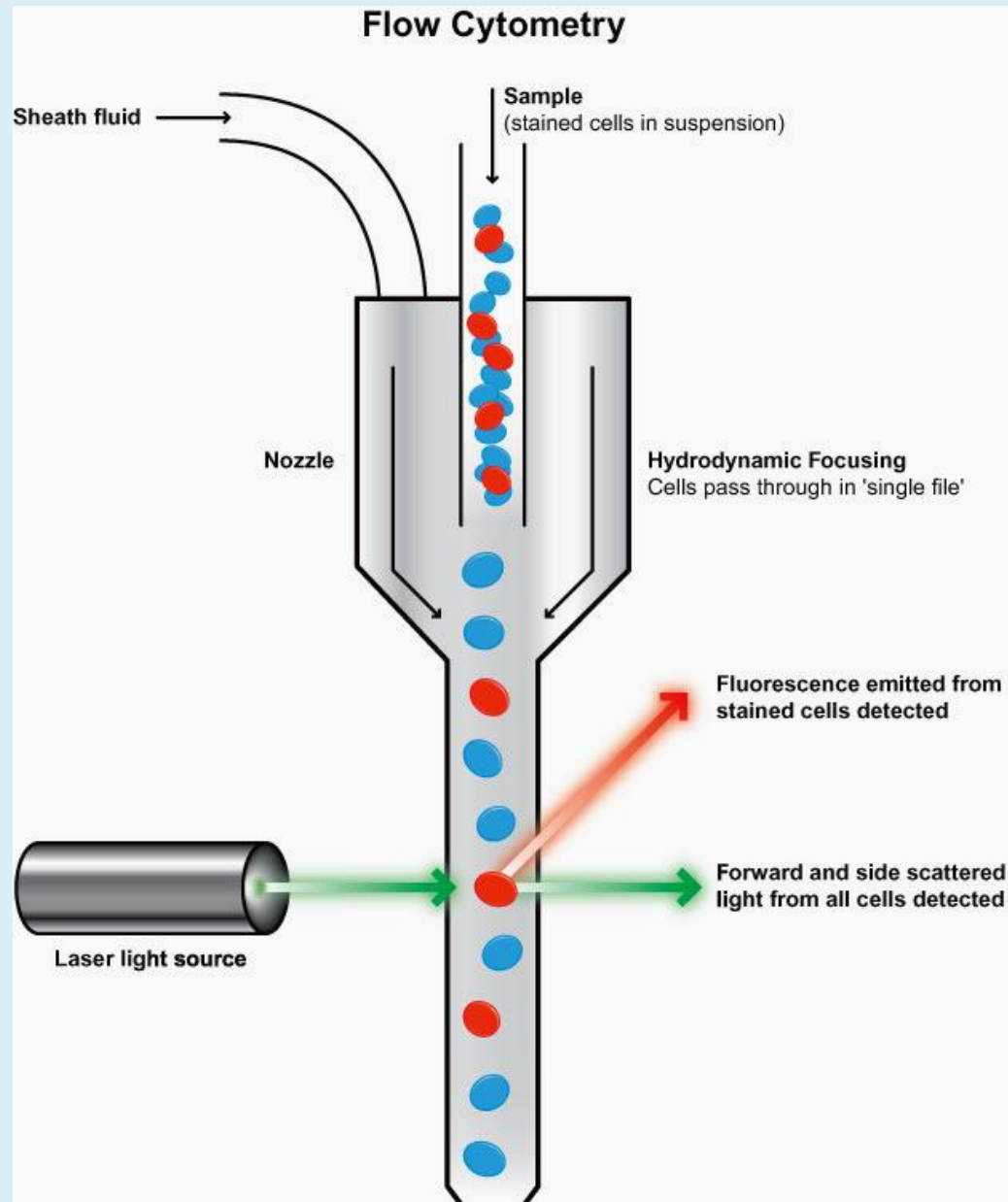
Moc laserów: 10-25 mW

Laser diodowy, 635 nm, 200 mW (większa moc lasera zwiększa jego czułość. Lasery o dużej mocy używane są do analizy chromosomów i ich sortowania.

Układ hydrauliczny (flow chamber/ flow cell)



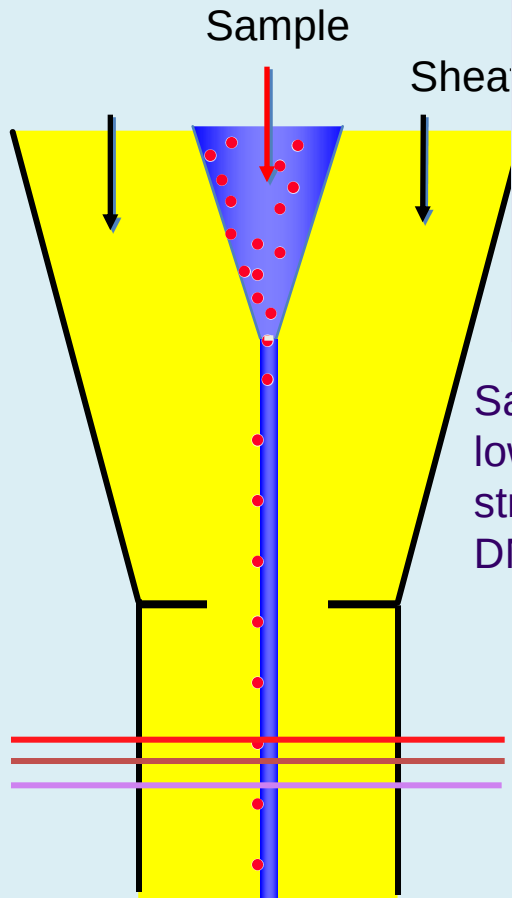
Ogniskowanie hydrodynamiczne



Ogniskowanie hydrodynamiczne

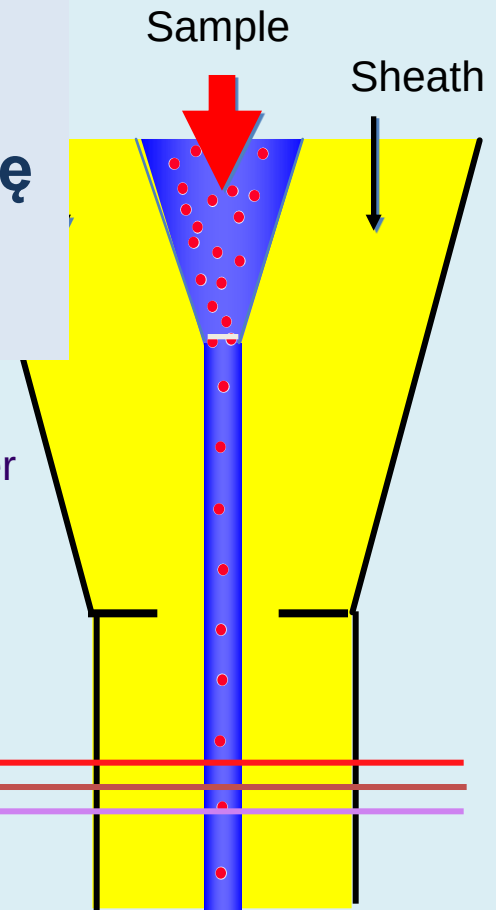
Prędkość przepływu komórek:

Low - 240/sekundę
Medium - 700/sekundę
High - 1200/sekundę



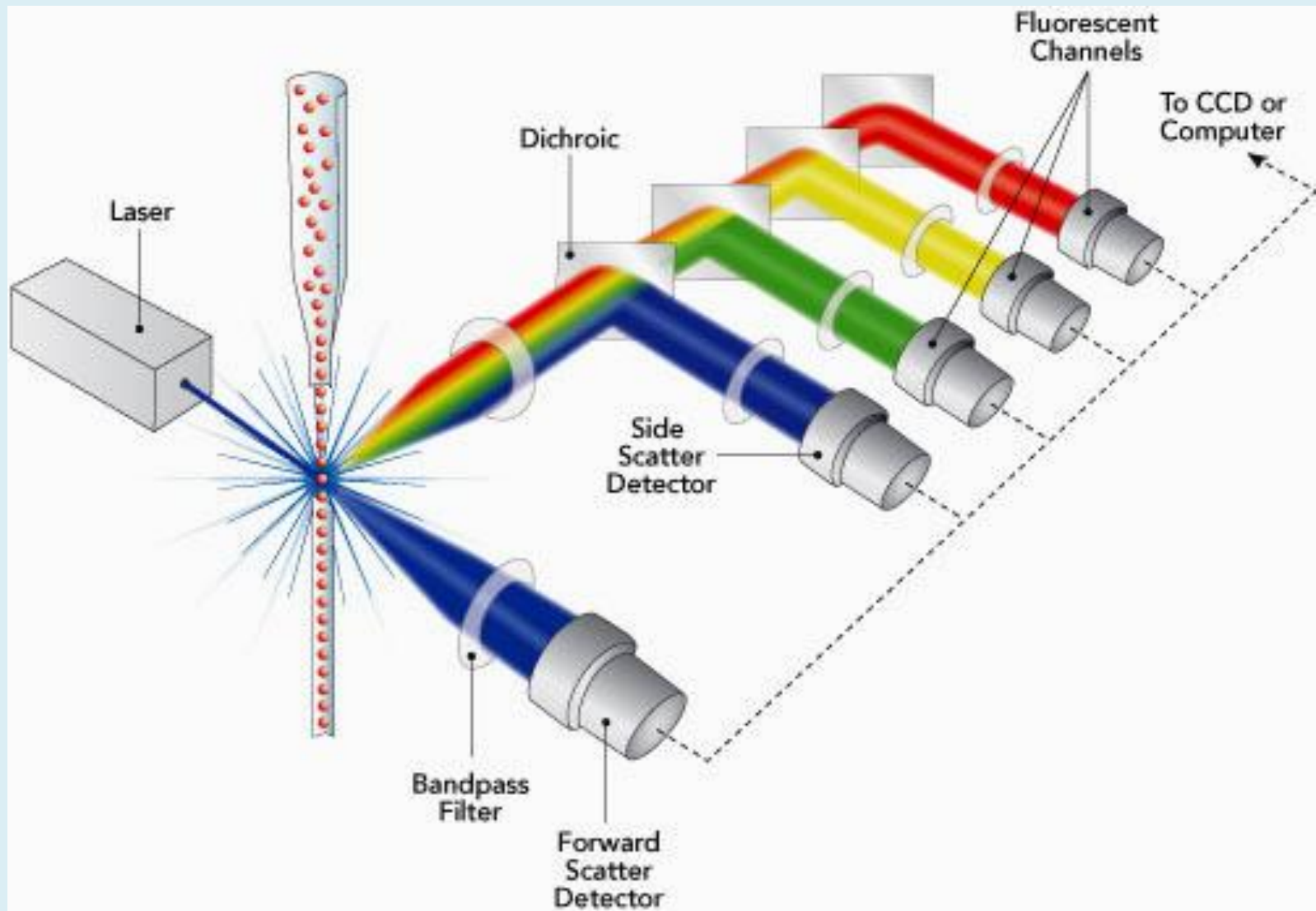
Sample pressure
low, small core
stream. Good for
DNA analysis

High sample
pressure, broader
core stream.
Bad for DNA
analysis

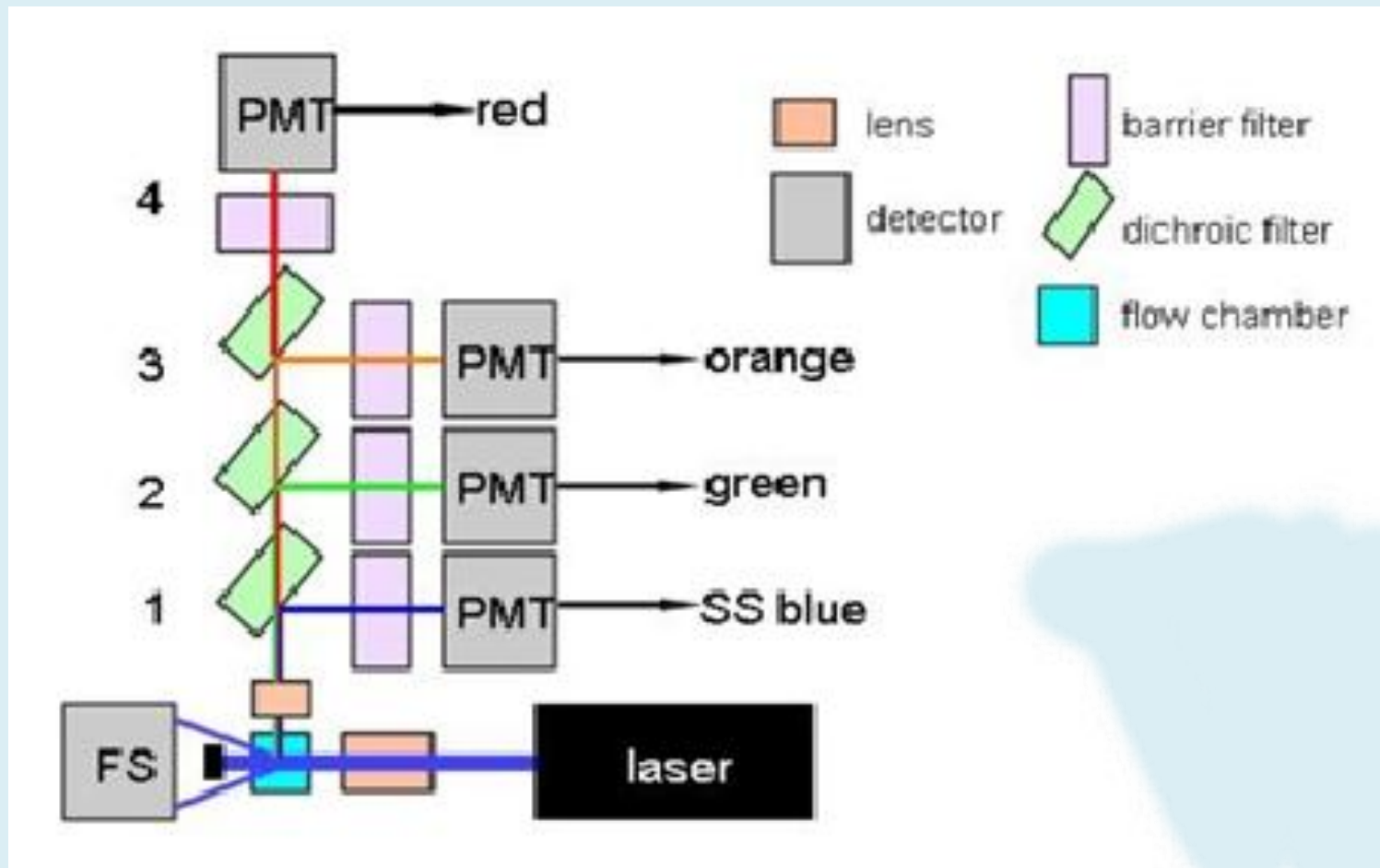


Laser Beams

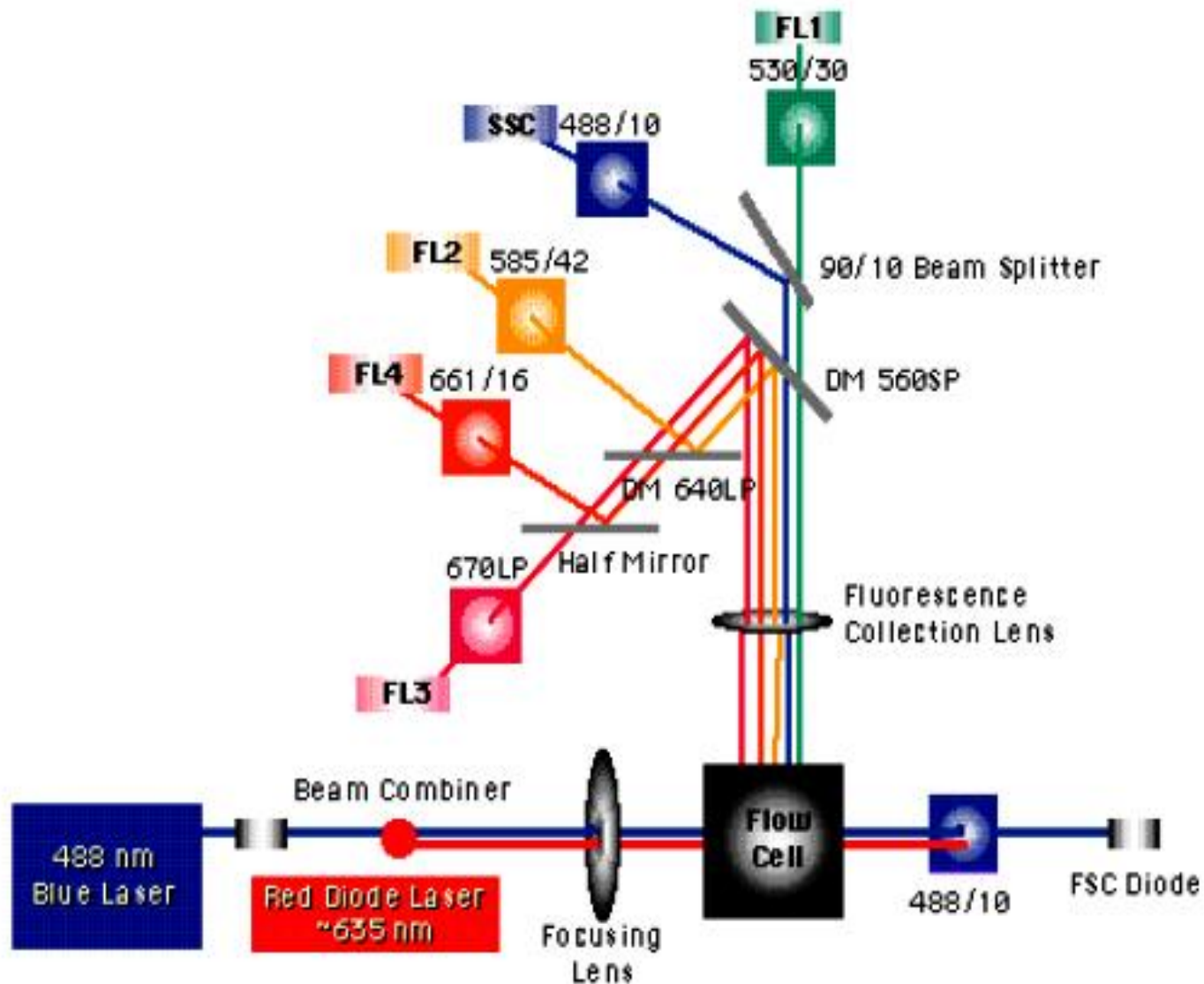
Układ optyczny



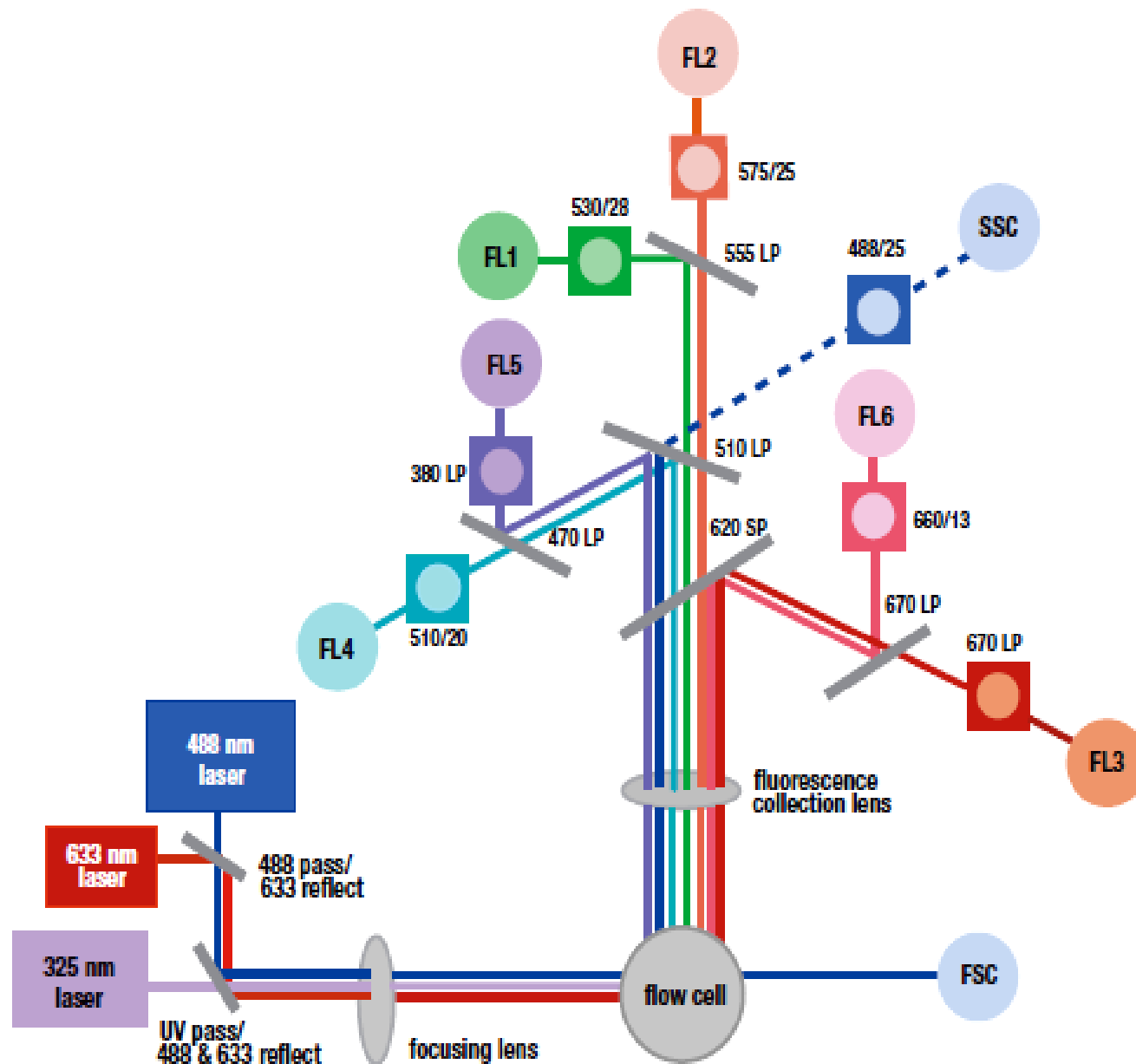
Układ optyczny



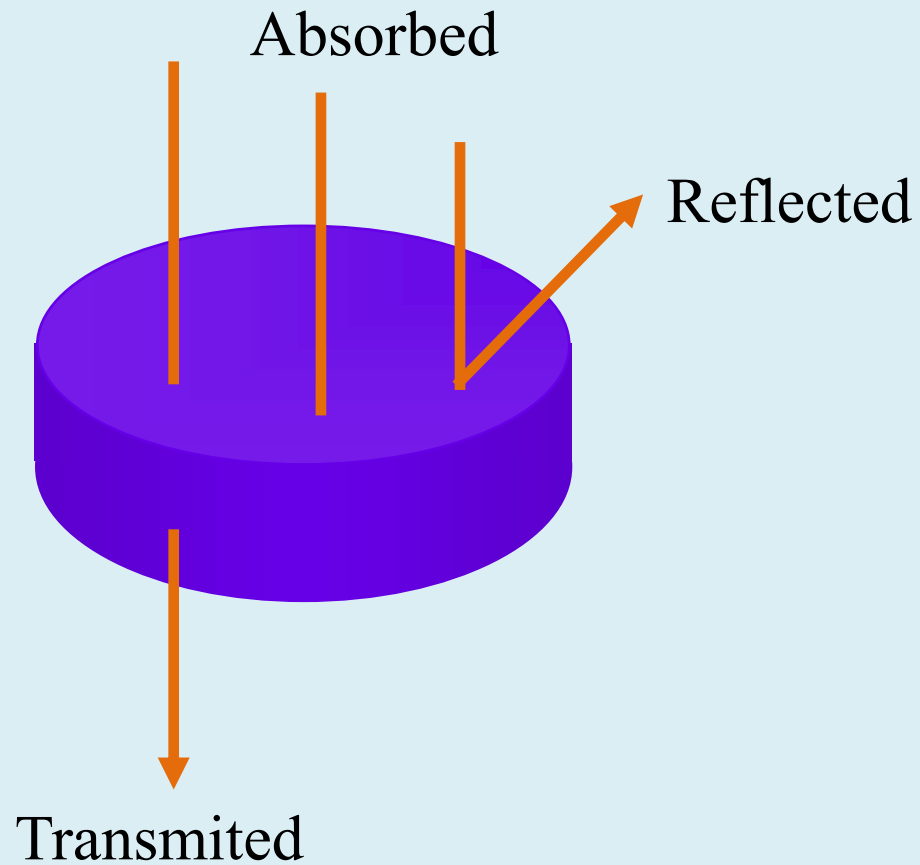
Układ optyczny FACSCalibur (2-laserowy)



Układ optyczny cytometrów 3-laserowych

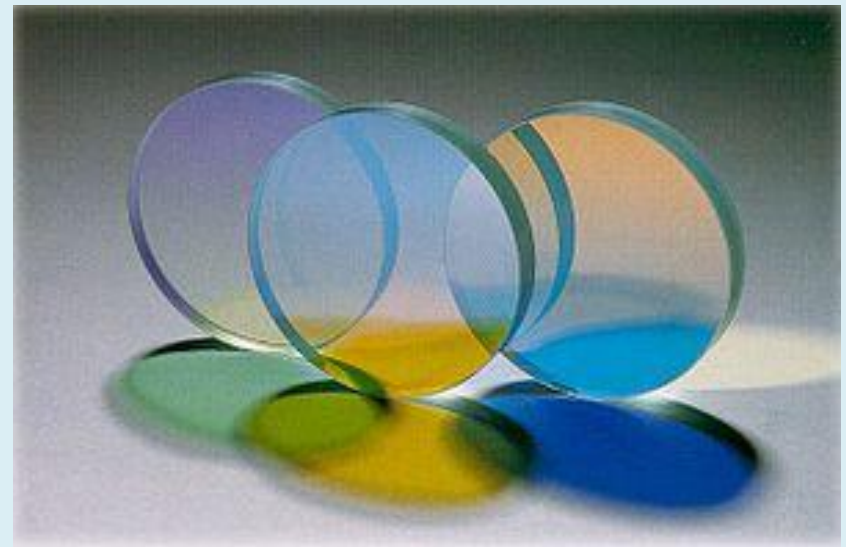


Filtry optyczne



Typowy układ filtrów selekcyjujących światło o określonej długości fali

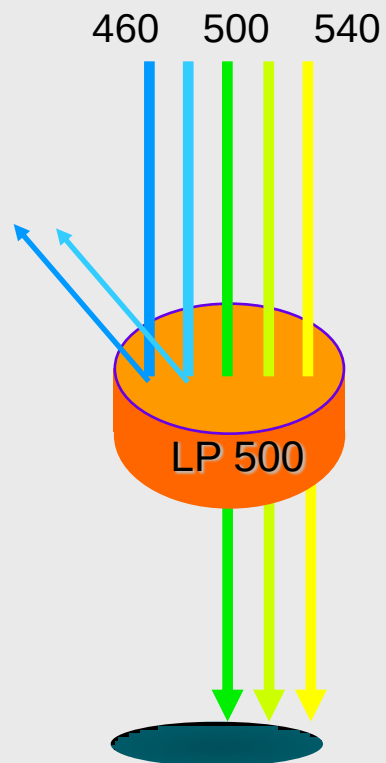
filter type	wavelength	Selection
dichroic 1	500 nm LWP	<500 nm
barrier 1	480-500 nm	blue
dichroic 2	560 nm LWP	<560 nm
barrier 2	510-550 nm	green
dichroic 3	610 nm LWP	<610 nm
barrier 3	550-600 nm	orange
barrier 4	620 nm LWP	red



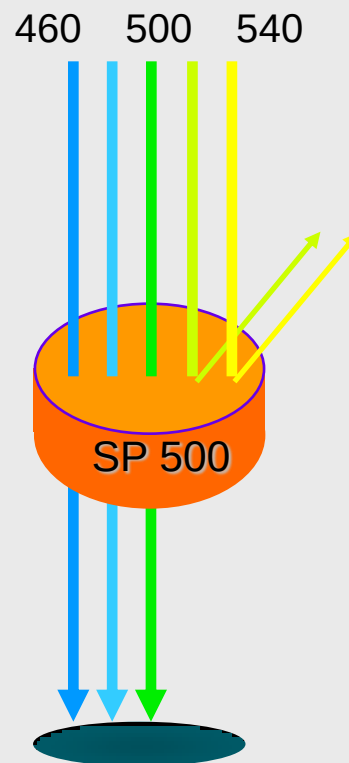
Filtry/zwierciadła dichroiczne – filtry optyczne do selektywnego przepuszczania światła w danym zakresie widma, a odbijania w każdym innym zakresie.

Filtry optyczne

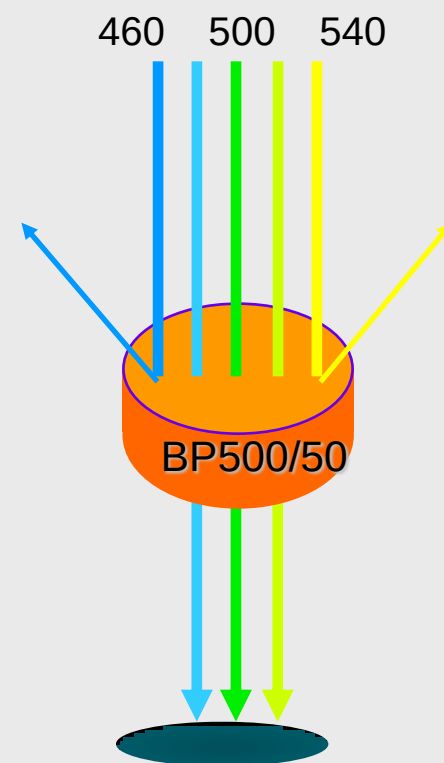
Longpass



Shortpass



Bandpass

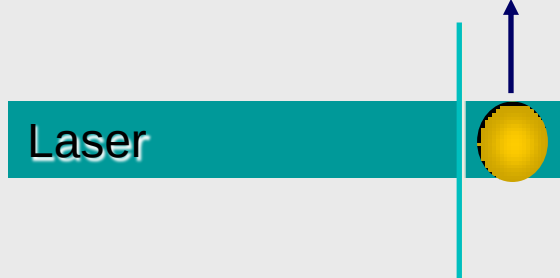


Układ elektryczny: jak powstaje sygnał elektryczny przy pomocy fotopowielacza?

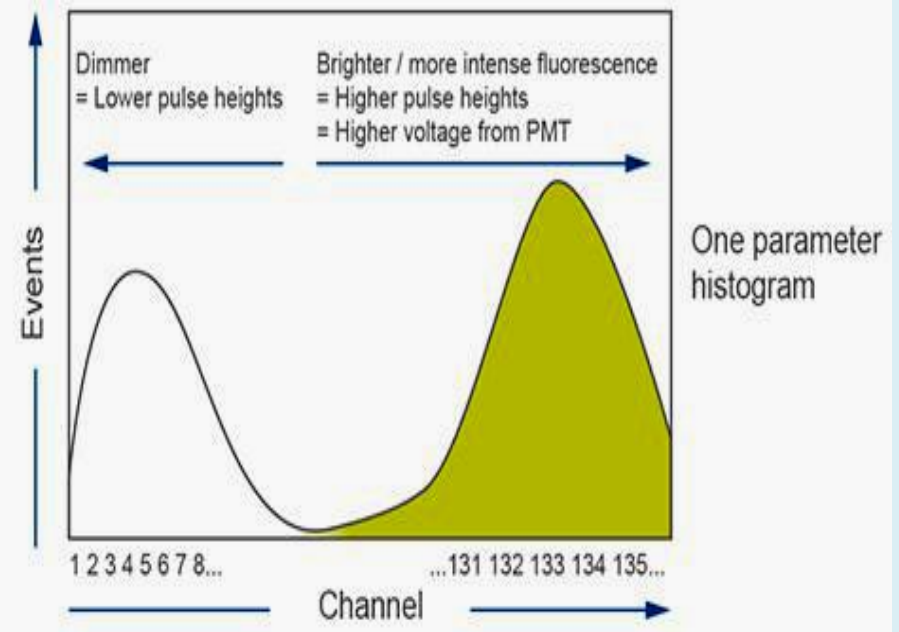
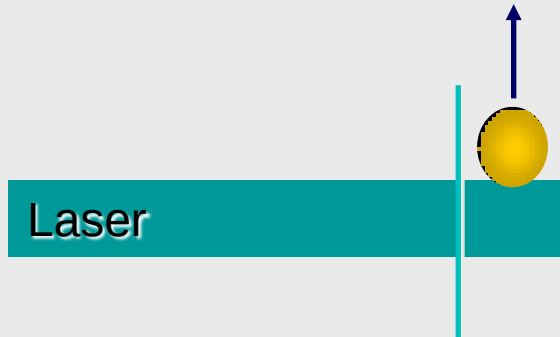
1.



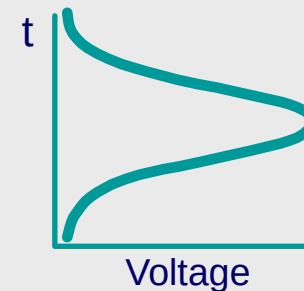
2.



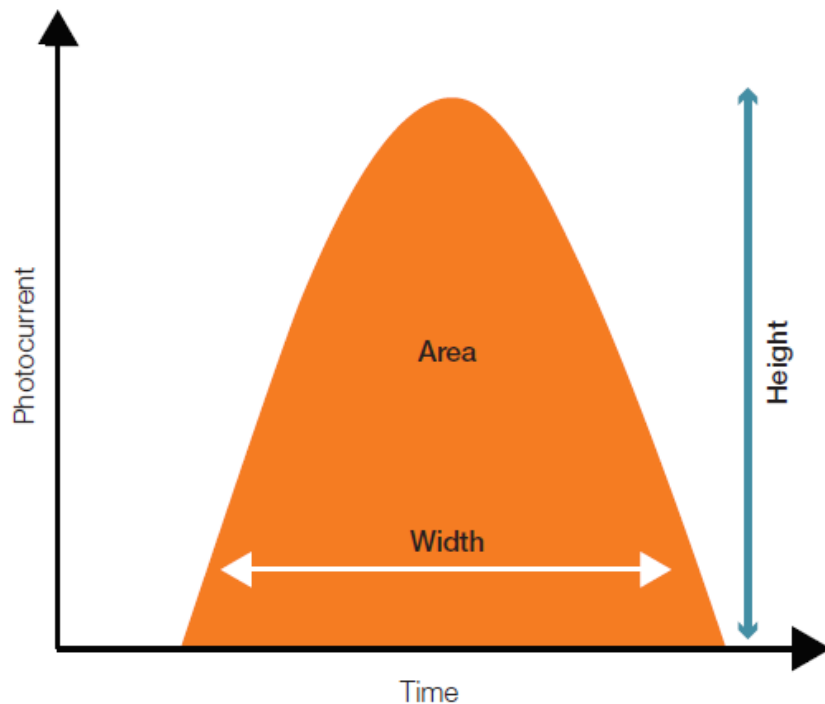
3.



Voltage



Przetwarzanie sygnału przez detektor



Height: The maximum amount of current output by the PMT.

Area: The integral of the pulse.

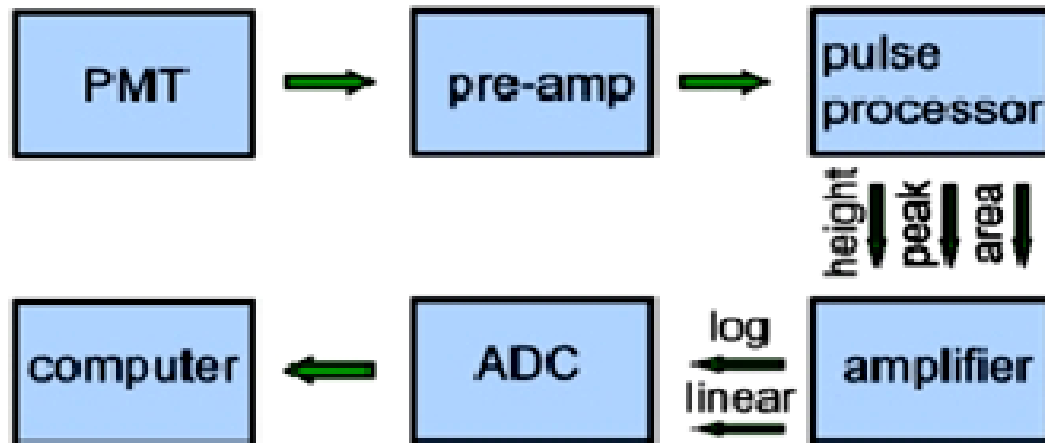
Width: The time interval during which the pulse occurs.

Signal intensity can be measured by either height or area.

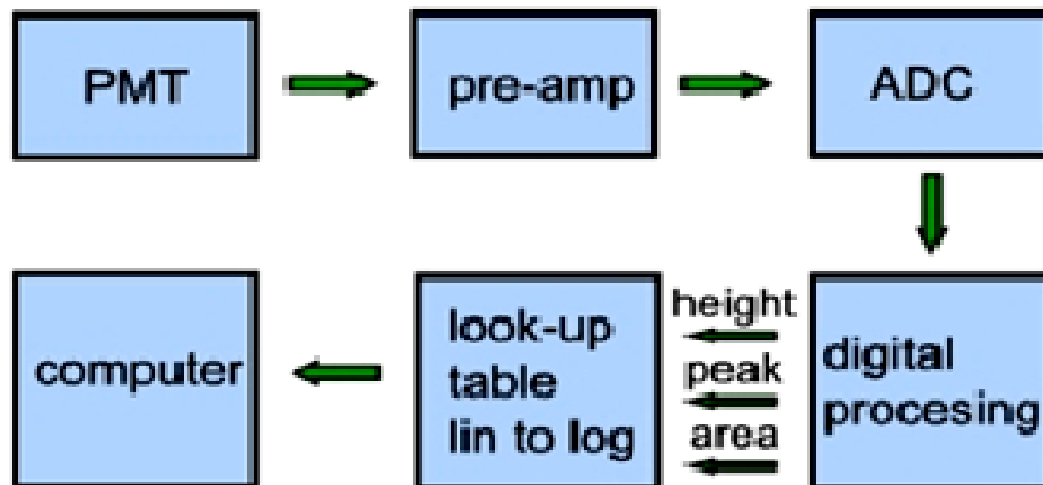
The width parameter measures the **time** that the cell spends in the laser.

Przetwarzanie sygnału

analogue

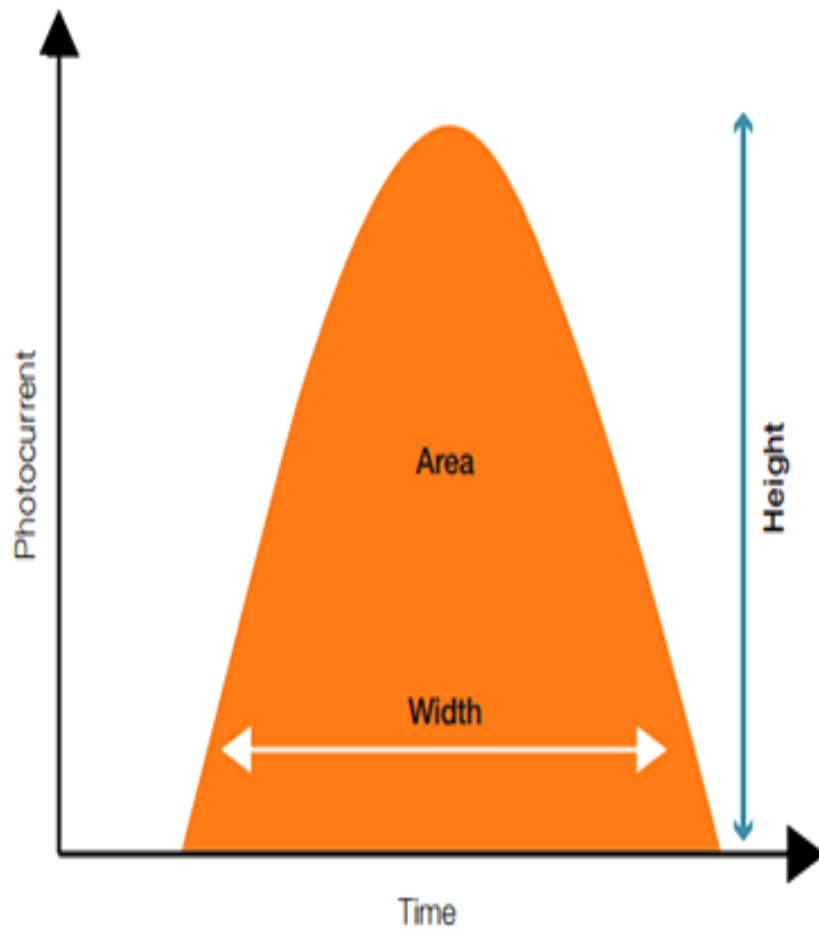


digital



ADC analogue digital converter

3 komponenty pulsu



Height: The maximum amount of current output by the PMT.

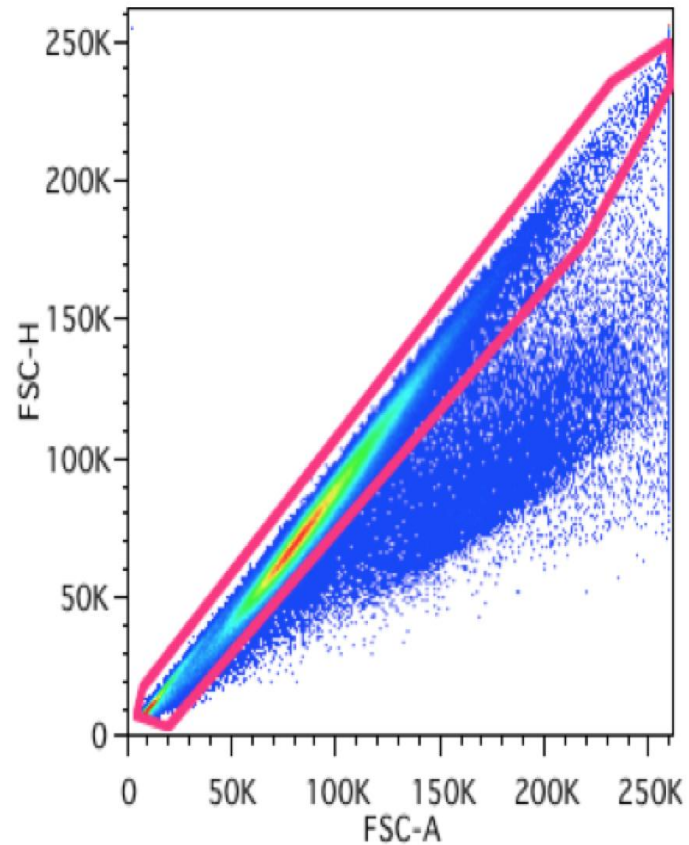
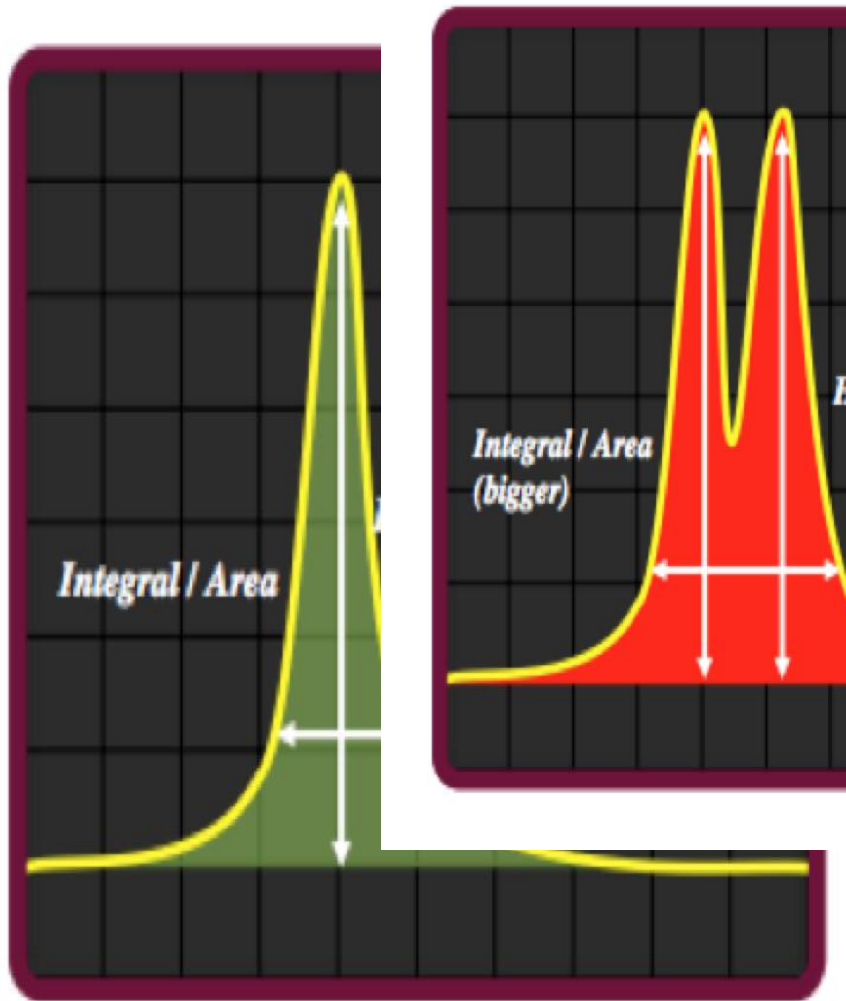
Area: The integral of the pulse.

Width: The time interval during which the pulse occurs.

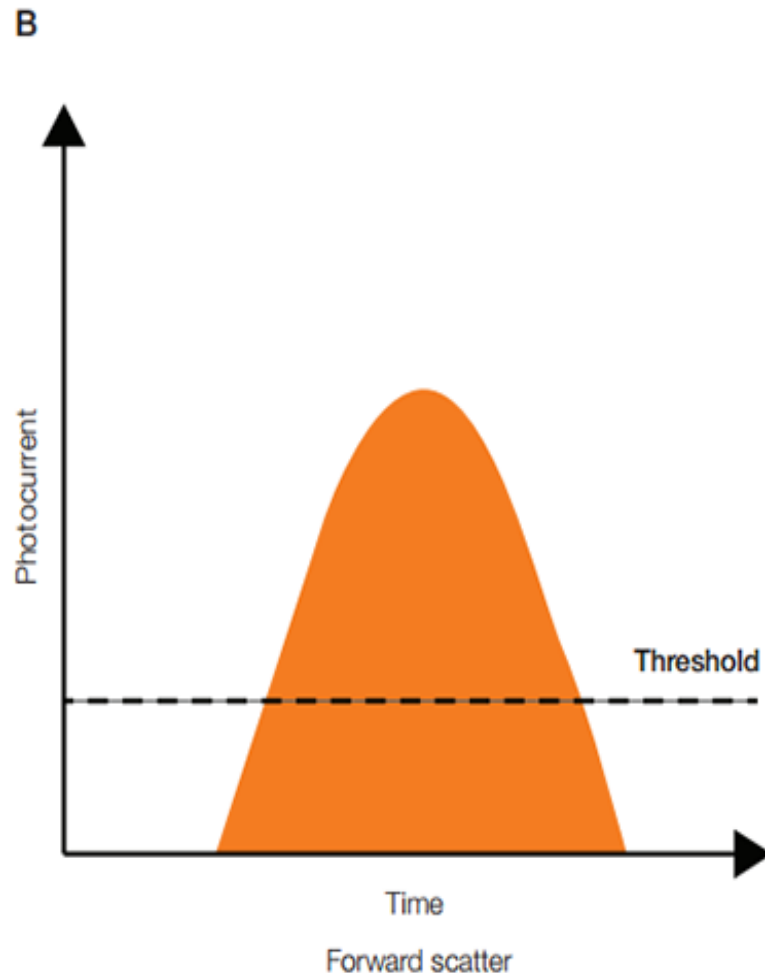
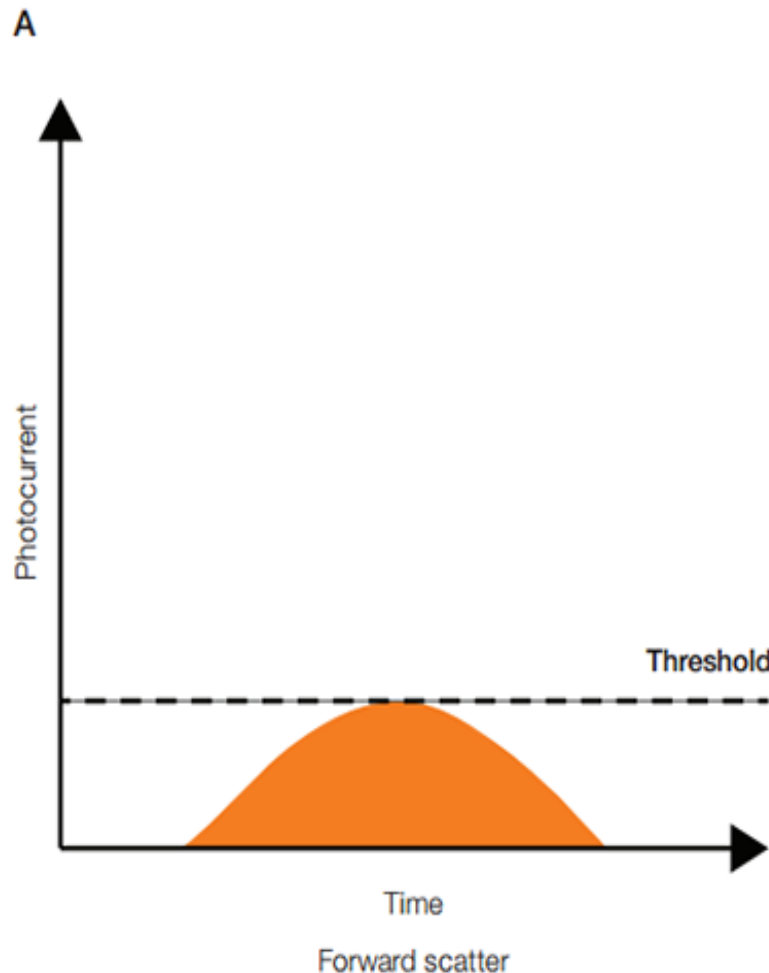
Signal intensity can be measured by either height or area.

The width parameter measures the **time** that the cell spends in the laser.

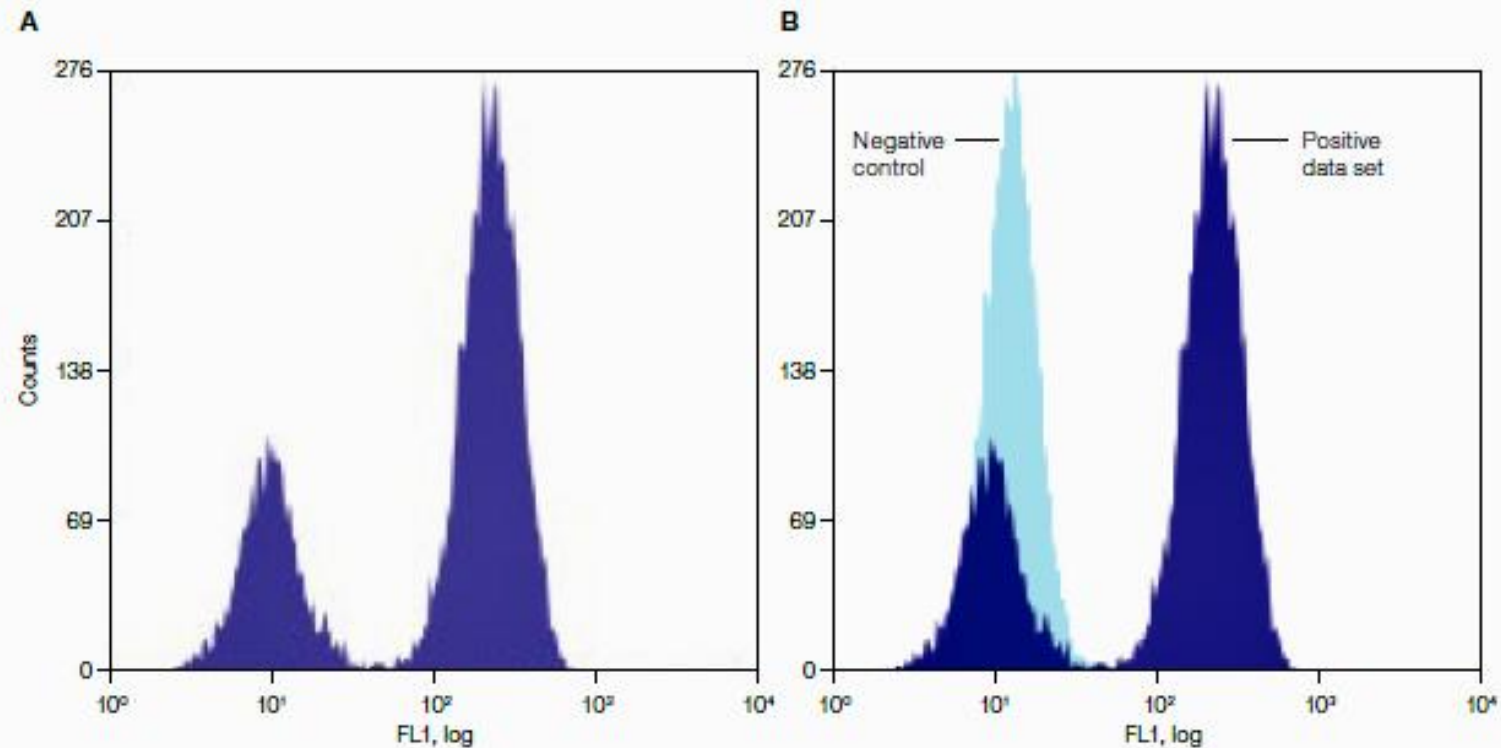
3 komponenty pulsu



Kiedy sygnał ma być ignorowany (A) a kiedy rejestrowany (B)?



Który sygnał jest negatywny, a który pozytywny?



Analizatory – zbierają dane o przepływających komórkach

Sortery – służą do izolacji w wysokim stopniu czystości (do 99%) komórek spełniających określone kryteria



FACS Calibur



FACS Verse



FACS Aria

Początki

1934, Andrew Moldavan, Science, liczenie komórek płynących w kapilarze za pomocą czujnika fotoelektrycznego

1947, L.M.Tucker, J Am Chem Soc, cytofluorymetryczna detekcja bakterii w aerozolach (badania rozpoczęte w czasie II wojny światowej sponsorowane przez USA, szybka detekcja bakterii lub ich zarodników w powietrzu (broń biologiczna). Urządzenie umożliwiało detekcję z 60% prawdopodobieństwem cząstek o średnicy 0,6 mm

1970, firma Technicon wprowadza pierwszy przepływowy licznik hematologiczny różnicujący populację leukocytów

1974, Becton-Dickinson wprowadza sorter komórkowy FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter)

Od 1985, wprowadzenie niesortujących cytometrów przepływowych

1985, FACScan, B-D, pierwszy analizator dostępny komercyjnie, umożliwiał analizę 3-kolorową (laser argonowy 488 nm)

FACSCalibur, 4-kolorowy, laser argonowy 488 nm, diodowy 635 nm, rejestracja fluorescencji: zielonej 515-545 nm, żółto-pomarańczowej 564-606 nm, czerwonej 653-669 nm, dla każdego rodzaju fluorescencji możliwa jest analiza szerokości piku sygnału (pulse width) wykorzystywana do eliminacji agregatów komórkowych. Możliwa jest regulacja prędkości przepływu próbki (low 12 $\mu\text{l}/\text{min}$, intermediate 35 $\mu\text{l}/\text{min}$ i high 60 $\mu\text{l}/\text{min}$).

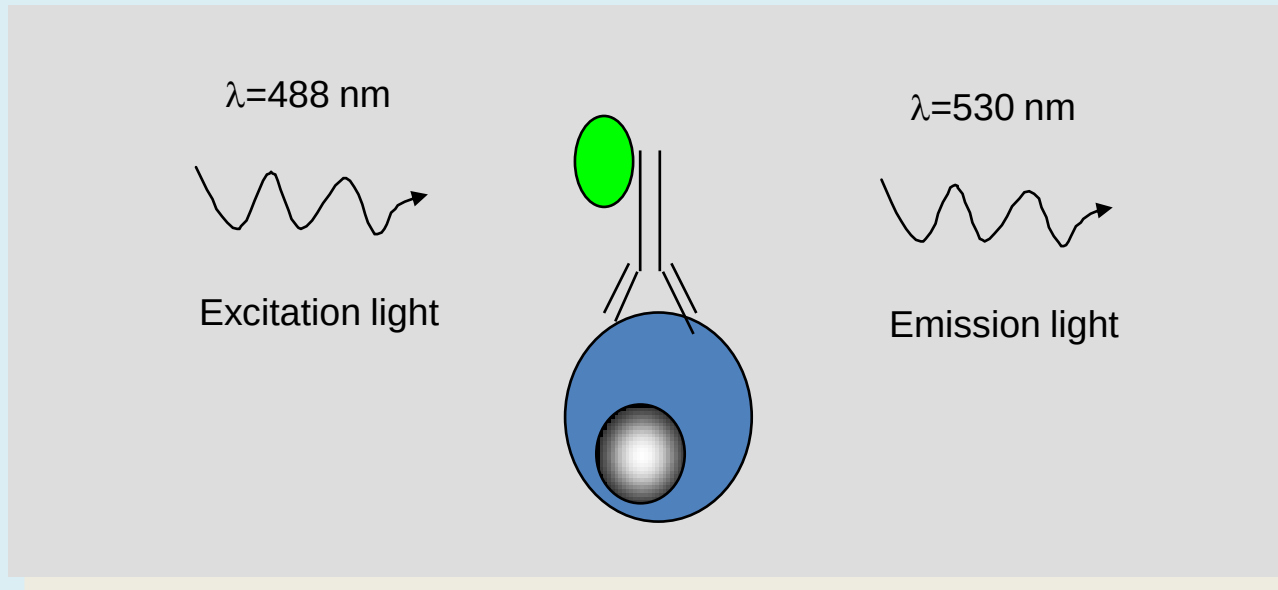
Opcja sortująca działa na zasadzie mechanicznego wychwytu wybranej jednej populacji przez kapilarę poruszającą się ruchem wahadłowym w strumieniu cieczy (catcher tube sorting).

2002 FACS Aria, 2- lub 3-laserowy cyfrowy cytometr sortujący, 20 mW laser niebieski 488 nm, 17 mW laser He-Ne 633 nm, 20 mW diodowy laser fioletowy 407 nm lub 10 mW laser 375 nm „near UV”.

Sorter wyposażony w optykę światłowodową, sygnały będą do detektorów rozmieszczonych po okręgu w układzie oktagonalnym.

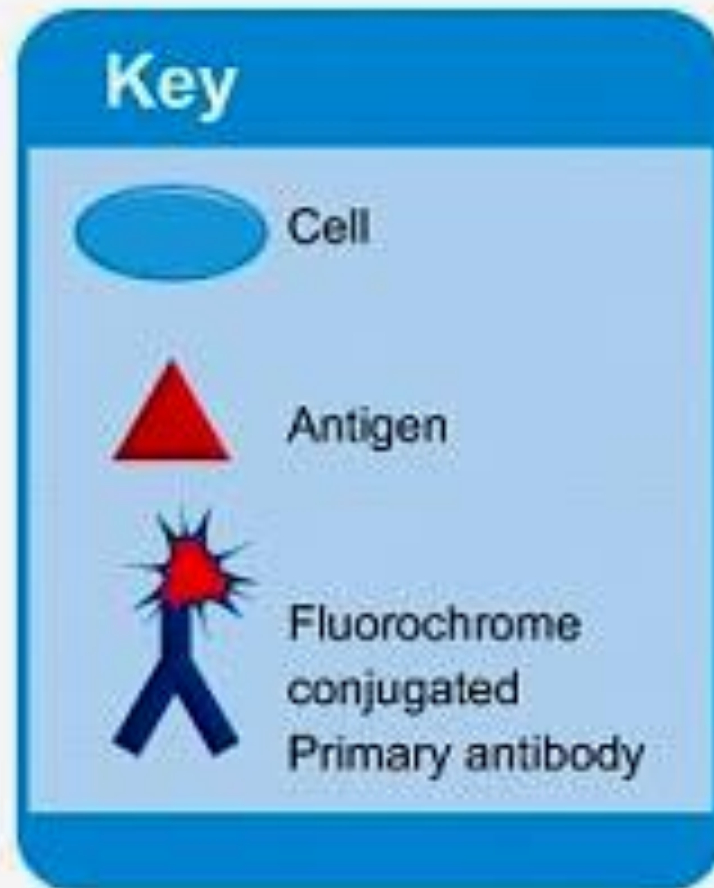
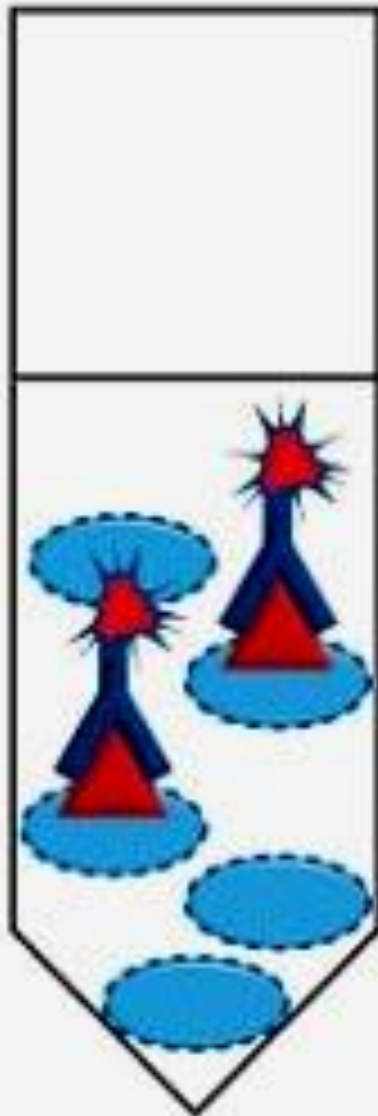
Analizatory komercyjne do specjalnych zastosowań: detekcji mikroorganizmów w wodzie, detekcji komórek somatycznych lub bakterii w mleku, detekcji ilościowej Ag, Ab, w pojedynczej próbce na podstawie różnic w intensywności fluorescencji polistyrenowych mikrokuleczek (beads), detekcji aktywności enzymów, oceny ekspresji genów lub mRNA dla różnych produktów komórkowych.

Fluorescencja jeszcze raz



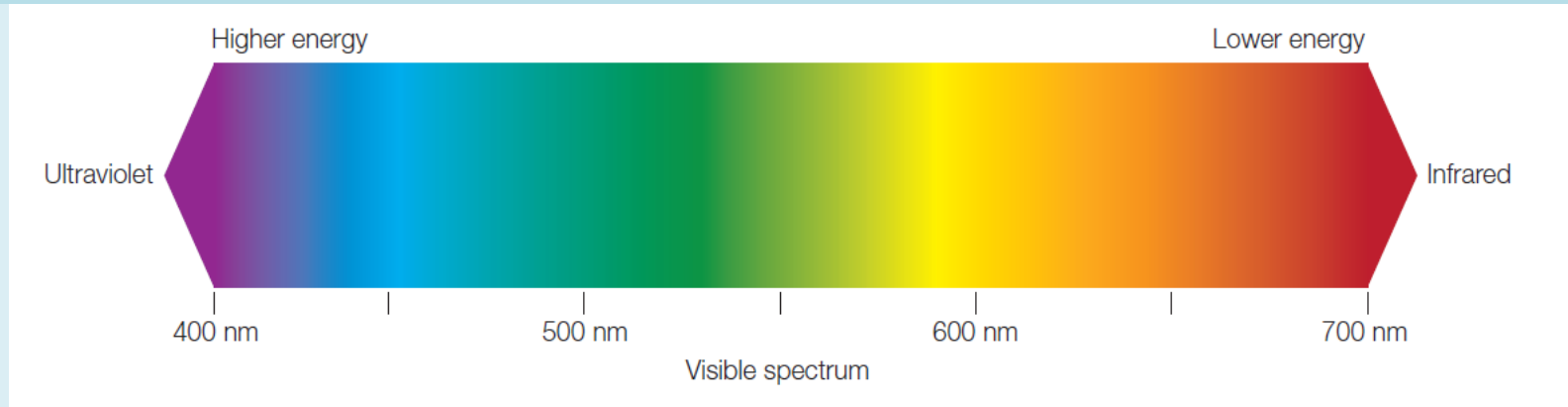
- The fluorochrome molecule absorbs the energy of the incoming light
- It releases the absorbed energy by:
 - vibration and dissipated heat
 - emission of a photon with a higher wavelength (= less energetic)

Wykorzystywanie fluorochromów

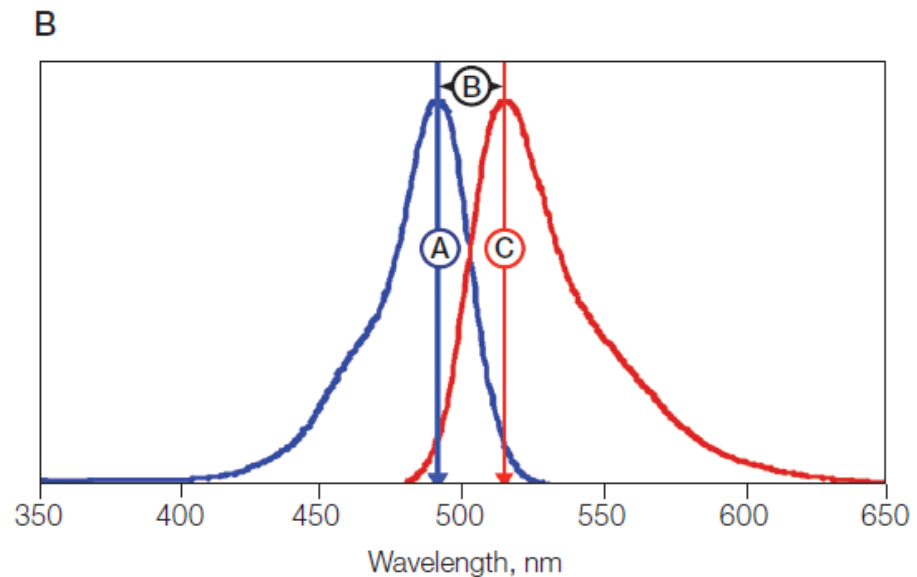


Wykorzystanie fluorescencji

Spektrum elektromagnetyczne

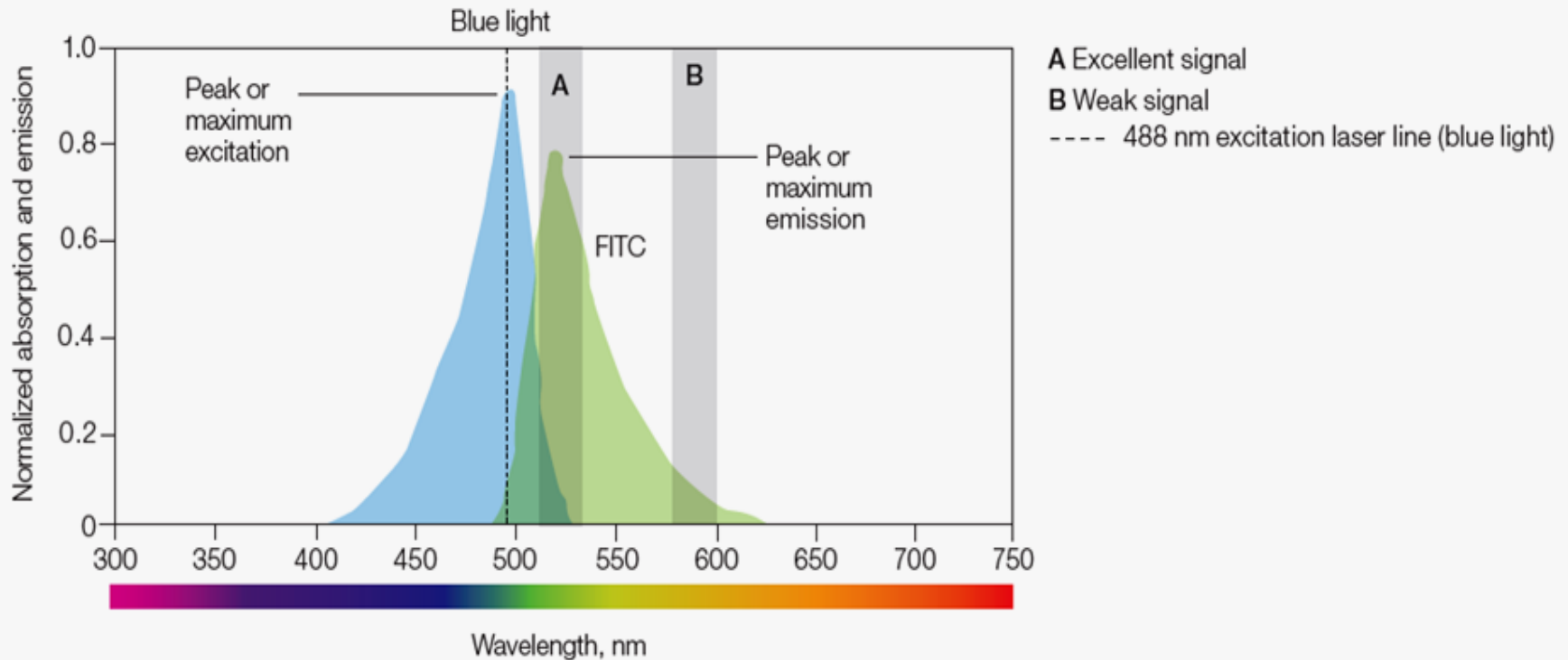


Emisja fluorescencji

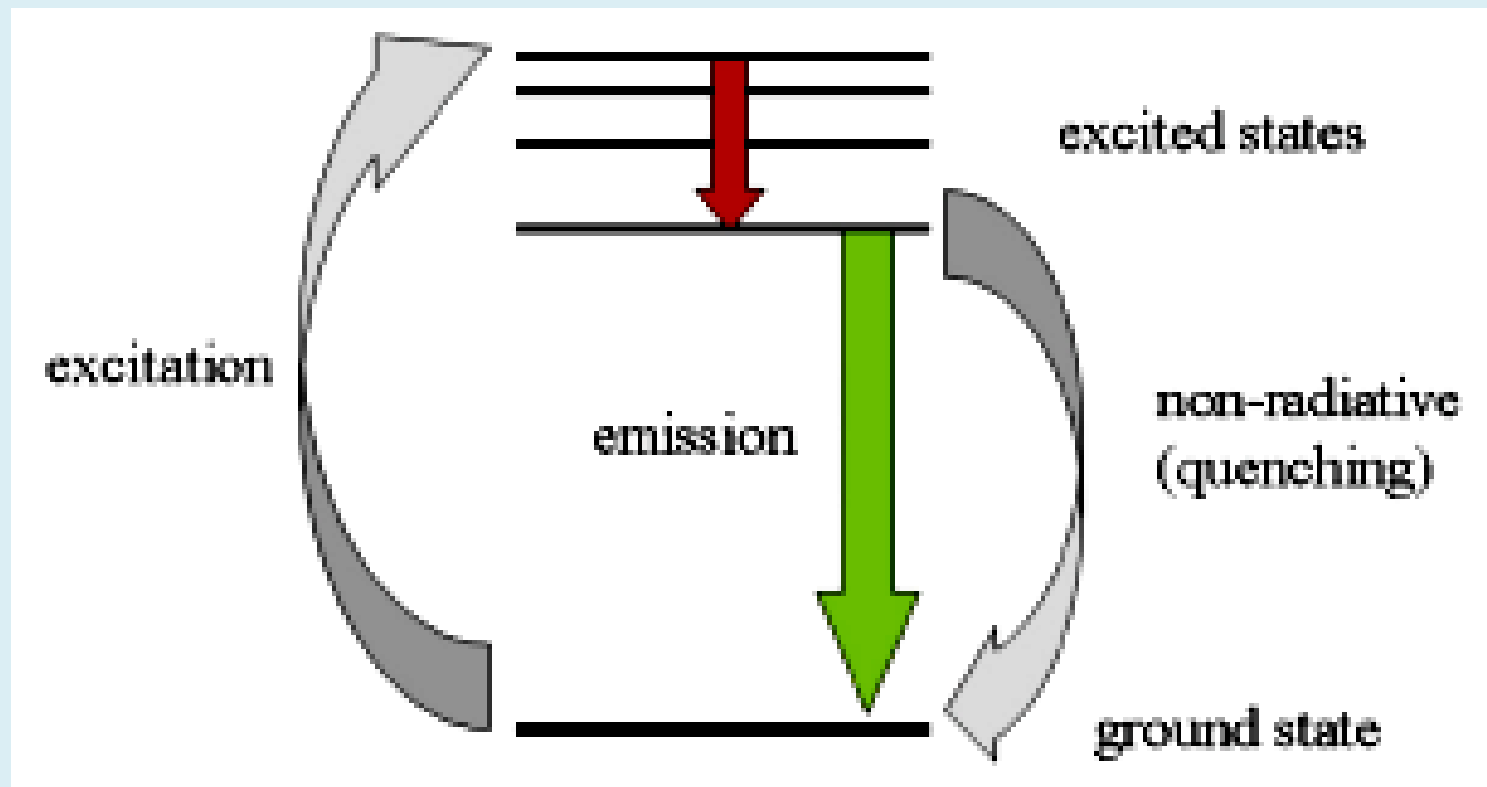


Profile spektralne

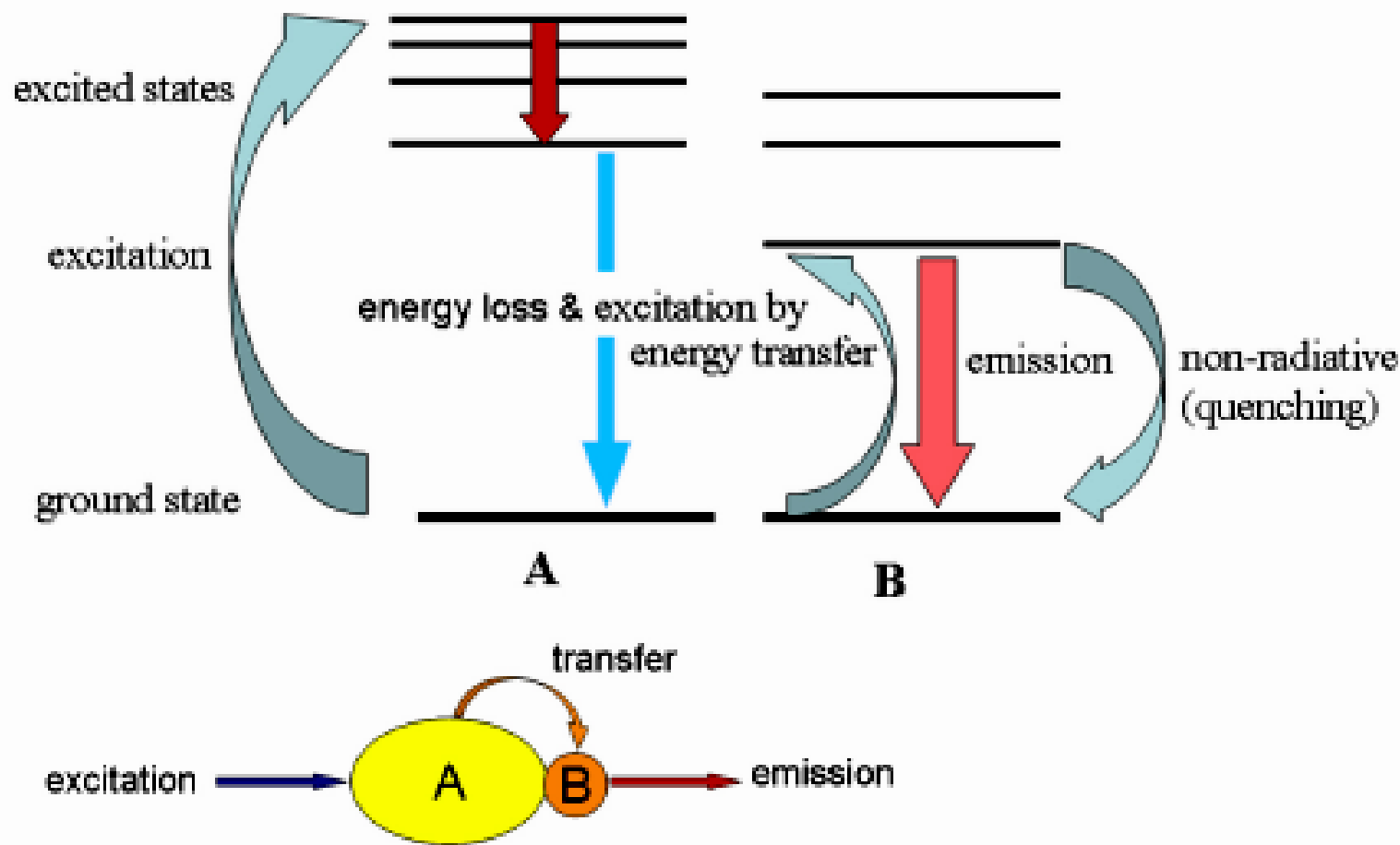
Absorbancja i emisja światła FITC



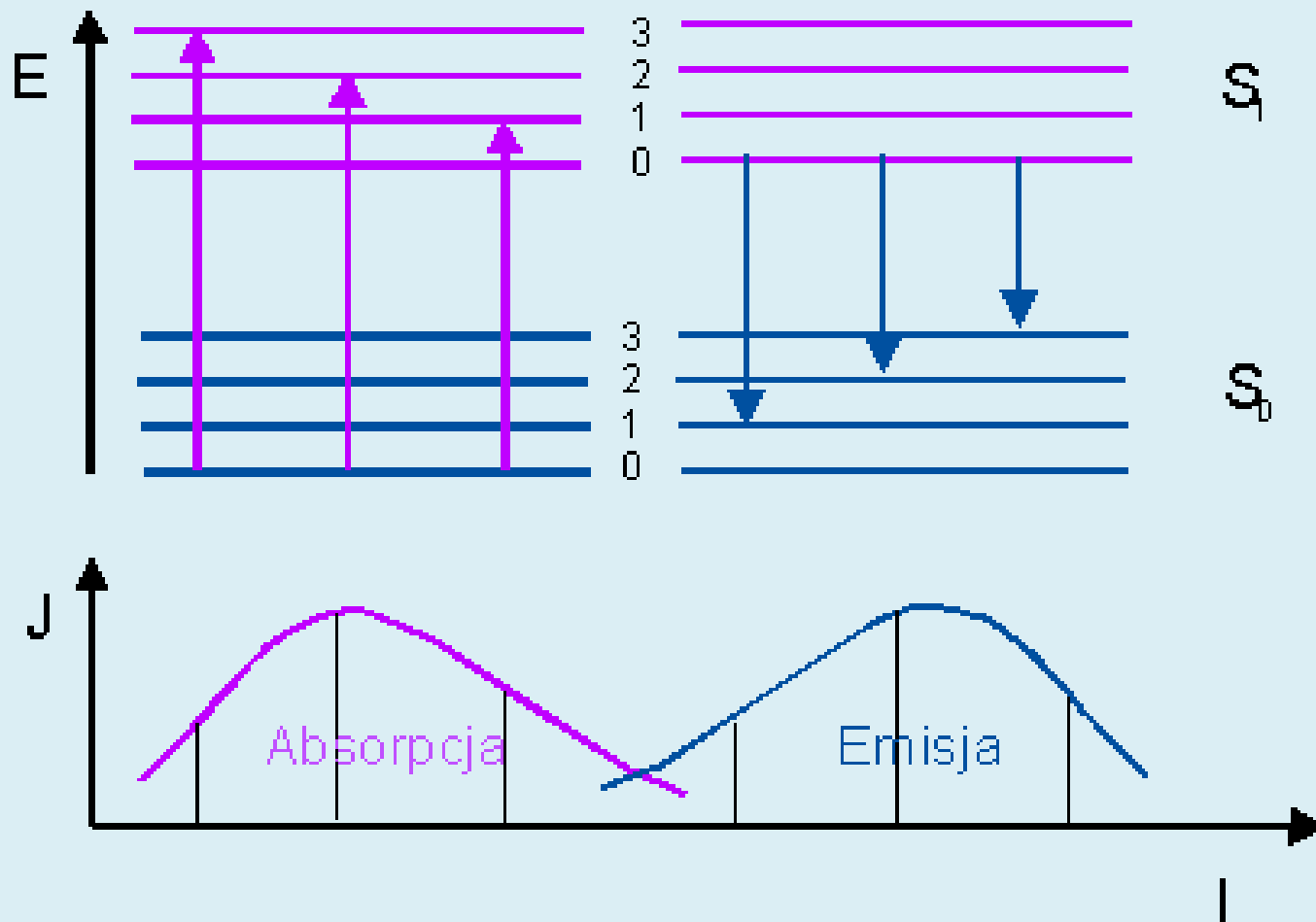
Wzbudzenie fluorescencji



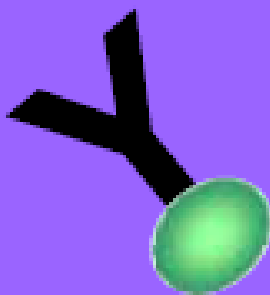
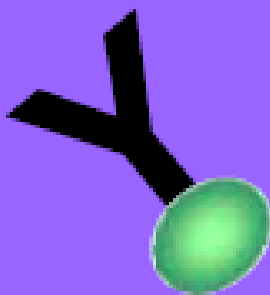
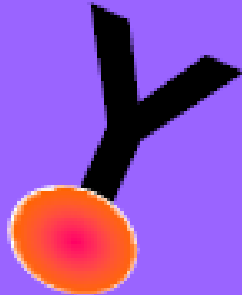
Wzbudzenie fluorescencji



Przesunięcie Stokesa



Fluorochromy

Dye		Excitation	Emission	Molecular Weight
FITC		488 nm	520 nm	389 Da
PE		488 nm	578 nm	240 000 Da
ECD		488 nm	613 nm	250 000 Da
PC5		488 nm	668 nm	105 000 da
PerCP		488 nm	688 nm	35 000 Da
APC		613 nm	665 nm	105 000 Da

FITC	= Fluorescein Isothiocyanate
PE	= Phycoerythrin (RD1)
ECD	= Energy Coupled Dye
PI	= Propidium Iodide
PC5	= Phycoerythrin Cyanin 5 (PC5)

Najczęściej stosowane fluorofory

Table 1. Fluorophores for flow cytometry.

Fluorophores	Fluorescence Color	Maximal Absorbance, nm	Maximal Emission, nm	Relative Brightness
DyLight 405		400	420	3
Alexa Fluor 405		401	421	3
Pacific Blue		410	455	1
Alexa Fluor 488		495	519	3
FITC		490	525	3
DyLight 550		562	576	4
PE*		496, 546	578	5
APC		650	661	4
Alexa Fluor 647		650	665	4
DyLight 650		654	673	4
PerCP		490	675	2
Alexa Fluor 700	Infrared	702	723	2

* PE is the same as R-phycoerythrin.

APC, allophycocyanin; FITC, fluorescein isothiocyanate; PE, phycoerythrin; PerCP, peridinin chlorophyll protein.

Single dyes

Dye	Laser excitation line (nm)	Maximal absorbance (nm)	Maximal emission (nm)	Fluorescence color
Alexa Fluor® 405	405, 407	401	421	
Alexa Fluor® 430	405, 407	433	541	
Alexa Fluor® 488	488	495	519	
Alexa Fluor® 633	633, 635, 647	632	647	
Alexa Fluor® 647	633, 635, 647	650	665	
Alexa Fluor® 660	633, 635, 647	663	690	
Alexa Fluor® 680	633, 635, 647	679	702	
Alexa Fluor® 700	633, 635, 647	702	723	Infrared
APC	633, 635, 647	650	661	
FITC	488	490	525	
Pacific Blue™	405, 407	410	455	
PerCP	488	490	675	
Phycoerythrin	488	490, 565	578	

Tandem dyes

Dye	Laser excitation line (nm)	Maximal absorbance (nm)	Maximal emission (nm)	Fluorescence color
APC-Alexa Fluor® 750	633, 635, 647	650	779	Infrared
APC-Cy5.5	633, 635, 647	650	695	
APC-Cy7	633, 635, 647	650	785	Infrared
PerCP-Cy5.5	488	496, 546	695	
PE-Alexa Fluor® 610	488	496, 546	627	
PE-Alexa Fluor® 647	488	496, 546	667	
PE-Alexa Fluor® 680	488	496, 546	702	
PE-Alexa Fluor® 700	488	496, 546	723	Infrared
PE-Alexa Fluor® 750	488	496, 546	779	Infrared
PE-Cy5.5	488	496, 546	695	
PE-Cy5	488	496, 546	667	
PE-Cy7	488	496, 546	785	Infrared
PE-Texas Red®	488	496, 546	615	

Abbreviations

APC	Allophycocyanin
FITC	Fluorescein isothiocyanate
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-chlorophyll-protein complex

Fluorochromy
pojedyncze i
tandemowe

Większość
tandemowych
wzbudzana przez
488 nm (cel:
zwiększenie
przesunięcia
Stokesa)

Fluorofory tandemowe

Table 2. Tandem dyes for flow cytometry.

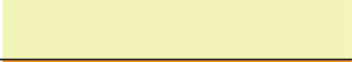
Fluorophores	Fluorescence Color	Maximal Absorbance, nm	Maximal Emission, nm	Relative Brightness
PE–Alexa Fluor 647		496, 546	667	4
PE–Cy5		496, 546	667	5
PerCP–Cy5.5		490	695	3
PE–Cy5.5		496, 546	695	4
PE–Alexa Fluor 750	Infrared	496, 546	779	4
PE–Cy7	Infrared	496, 546	785	4
APC–Cy7	Infrared	650	785	2

* PE is the same as R-phycoerythrin.

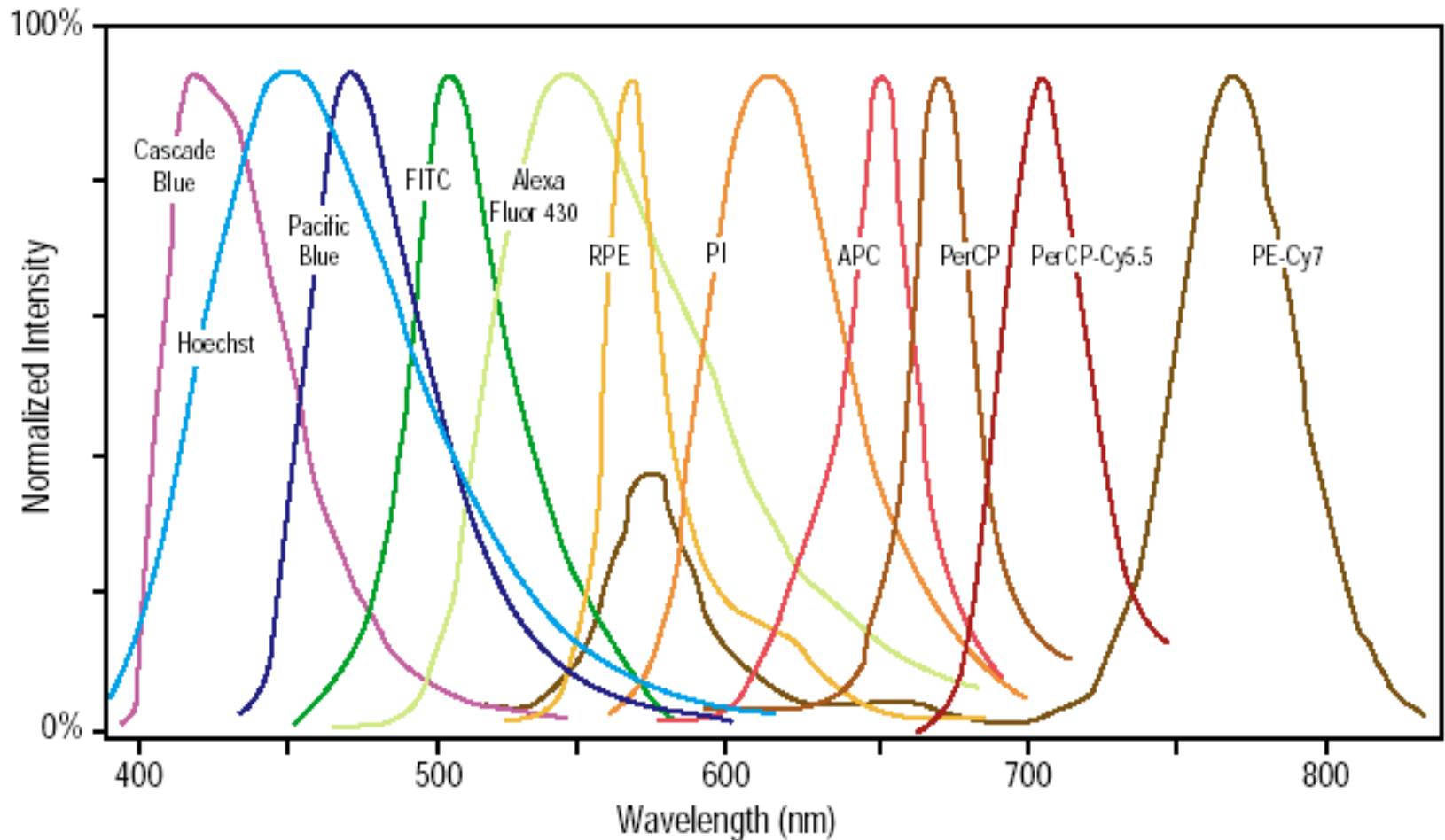
APC, allophycocyanin; PE, phycoerythrin; PerCP, peridinin chlorophyll protein.

Białka fluorescencyjne

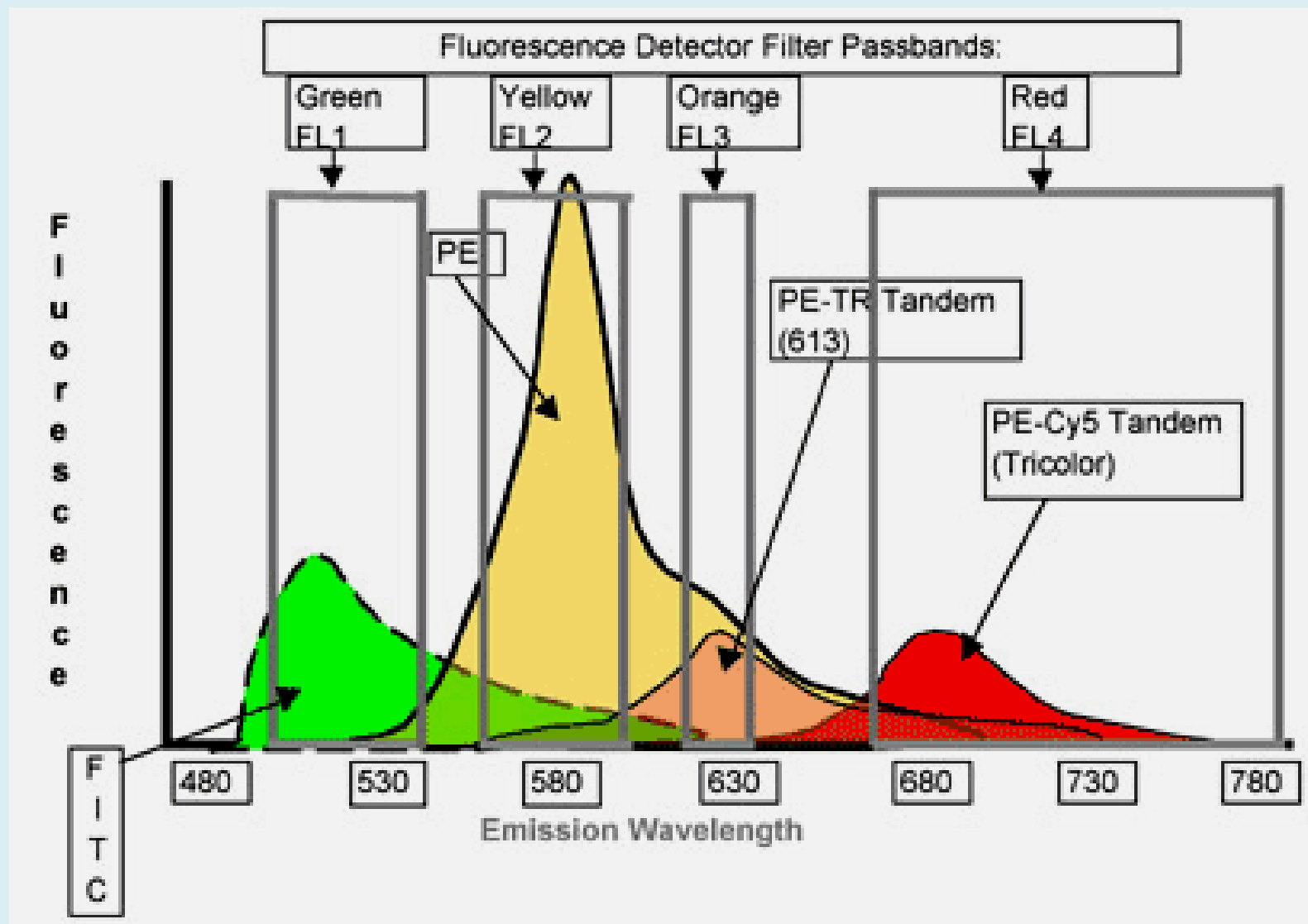
Table 3. Fluorescent proteins in flow cytometry.

Fluorophores	Fluorescence Color	Maximal Absorbance, nm	Maximal Emission, nm	Relative Brightness
EBFP		383	445	2
CFP		439	476	2
EGFP		484	509	4
YFP		514	527	5
RFP		558	583	4
mCHERRY		587	610	3

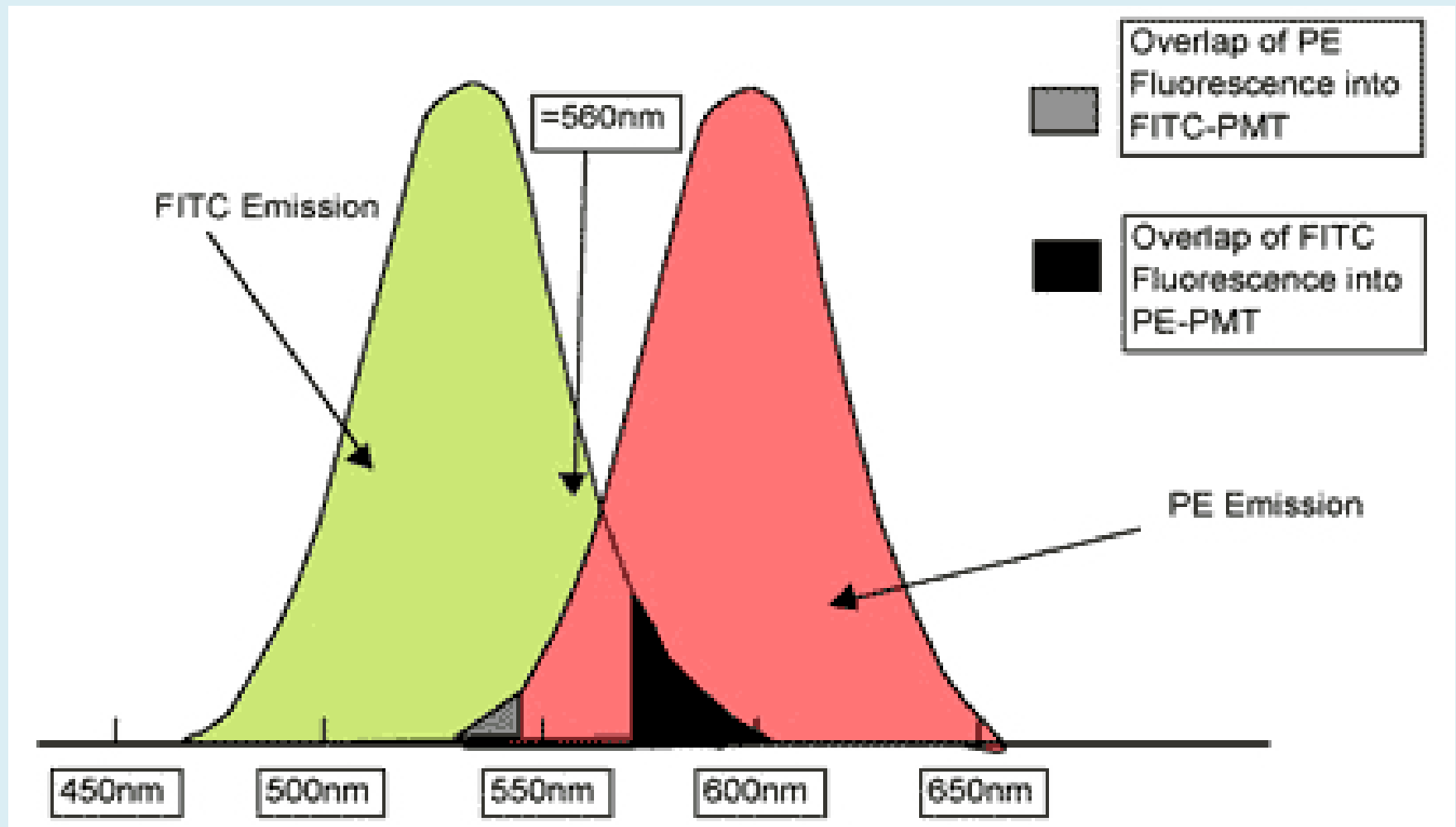
Spektra emisji fluorescencji



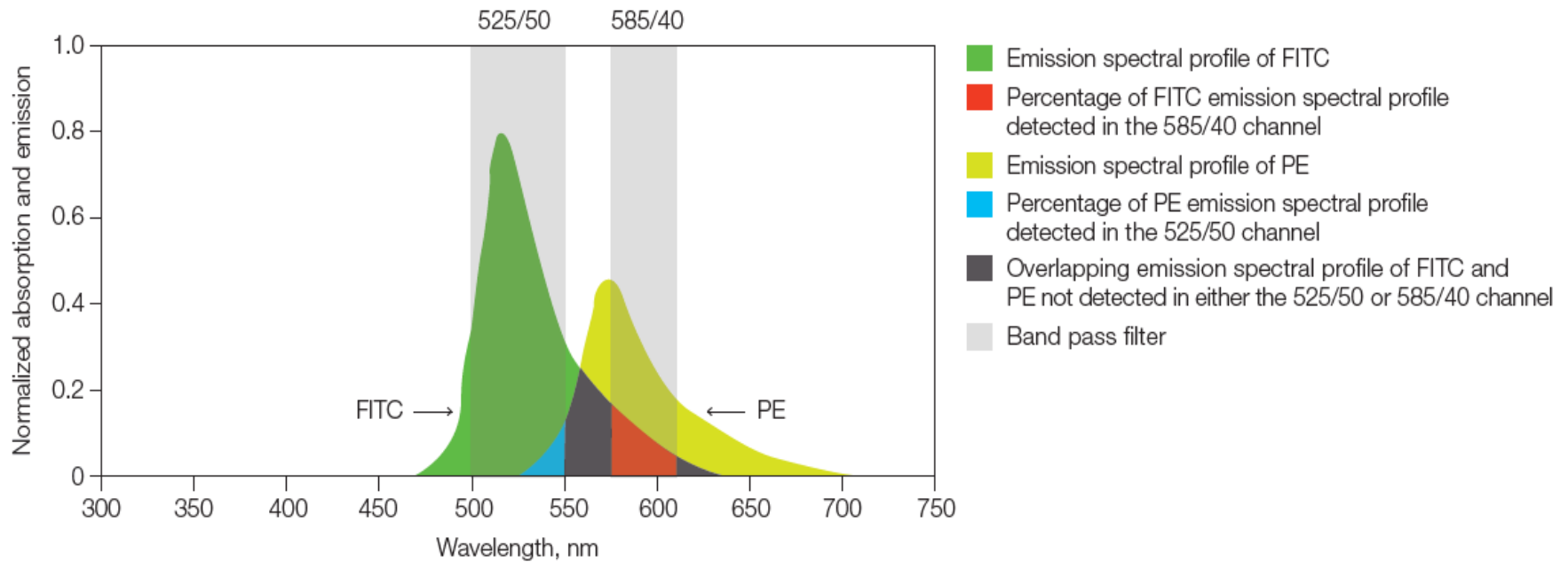
Spektra emisji fluorescencji



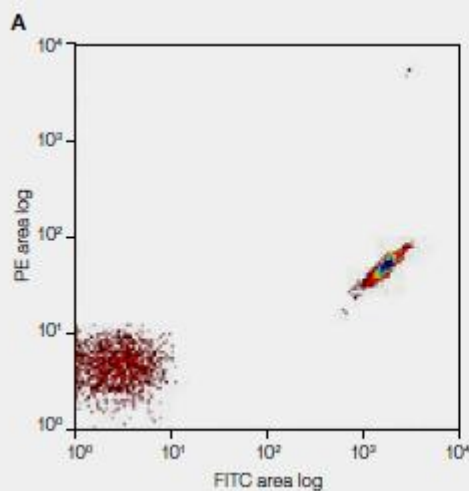
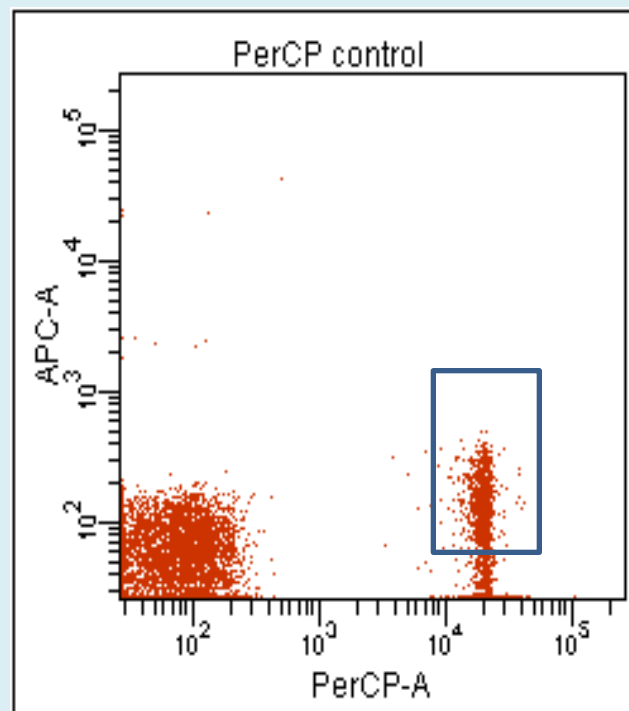
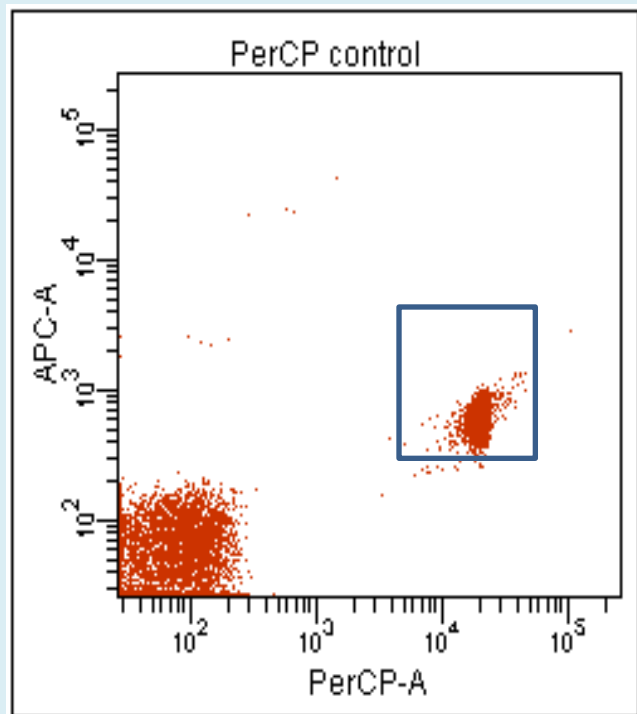
Spektra emisji fluorescencji



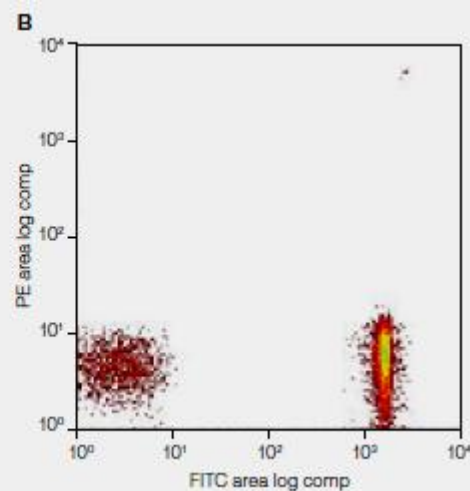
Kompensacija fluorescencji



Kompensacija



Compensation →



Kompensacja

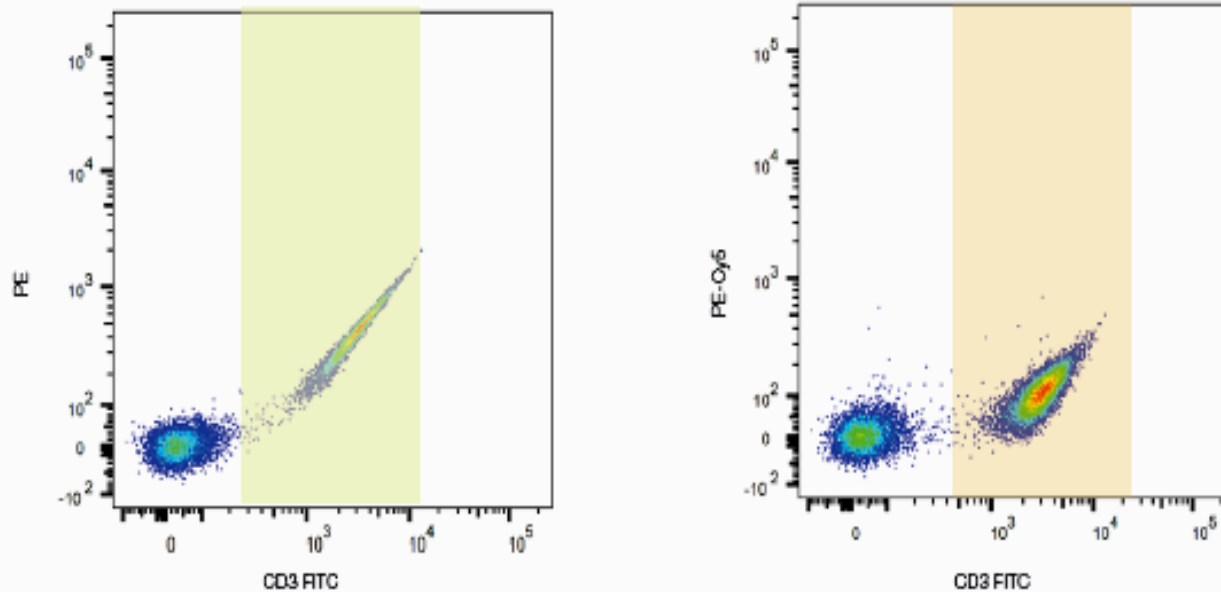


Fig. 10. FITC spillover into other channels. FITC single stained lymphocytes show spillover into PE and PE-Cy5 detectors. Gates are shown to identify the FITC positive cells and their spillover.

Kompensacja

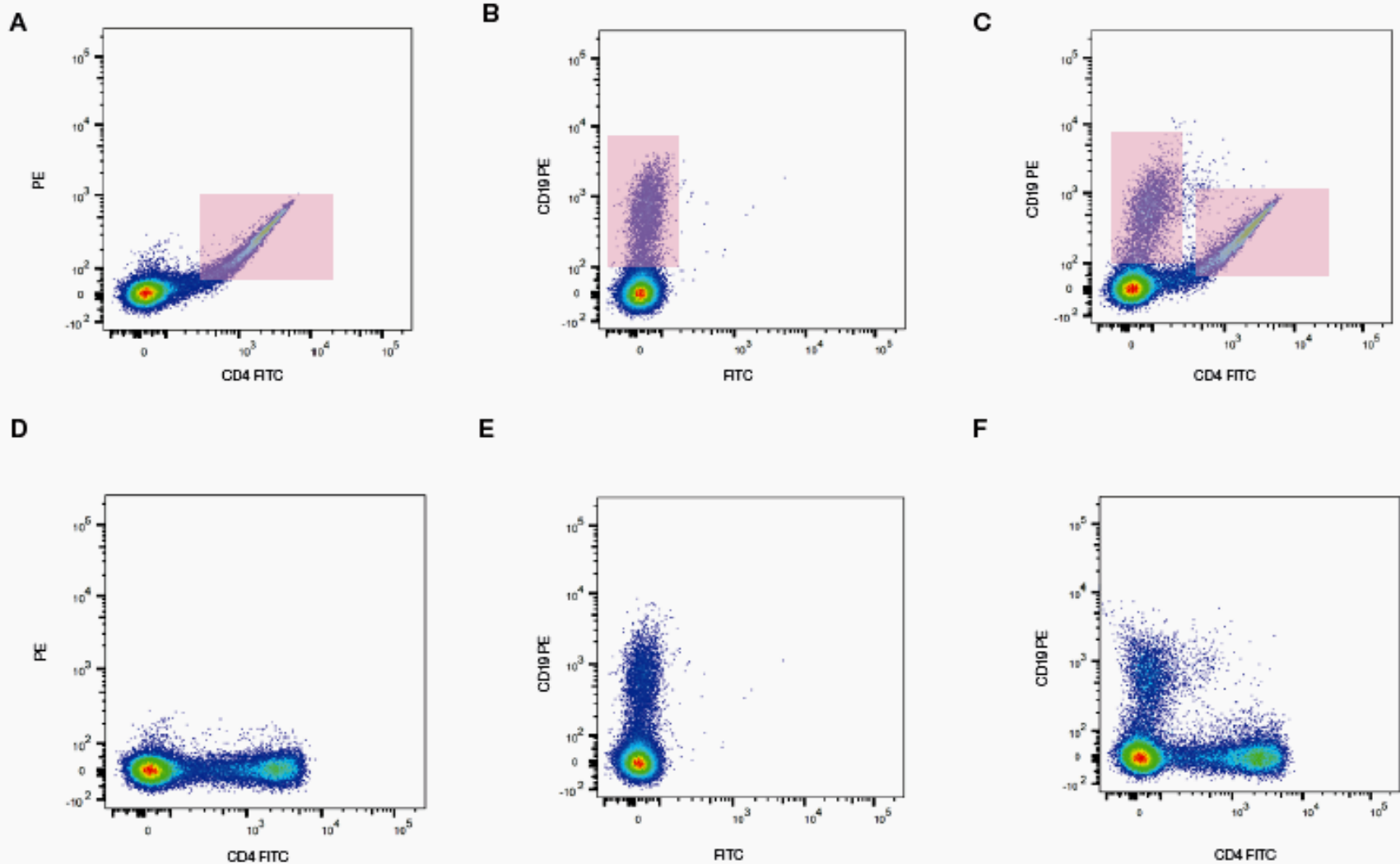
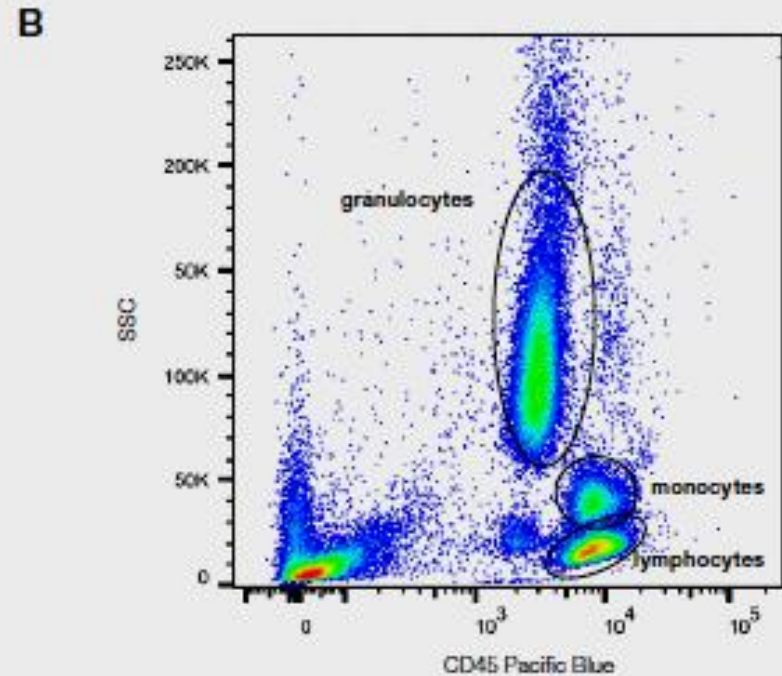
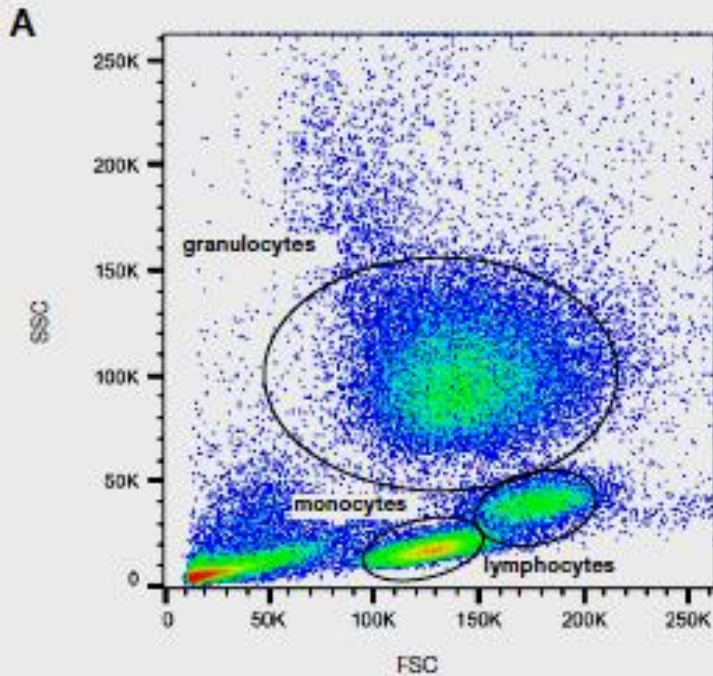


Fig. 12. Fluorescence compensation corrects for spectral overlap. Peripheral blood was singly stained with CD4 FITC, CD19 PE, or both CD4 FITC and CD19 PE. When compensation was not applied, fluorescence spillover can be seen (top panel), which is removed after compensation (bottom panel).

Podstawy analizy

Bramki (gates) i regiony (regions)



Analiza 1-parametrowa (histogramy)

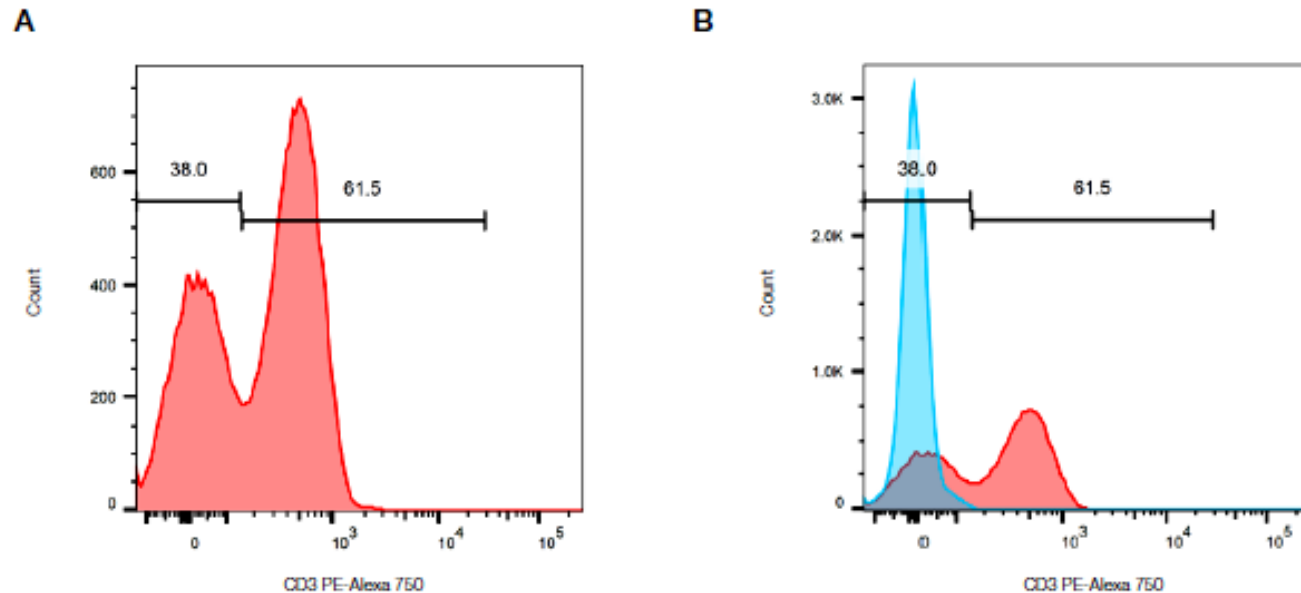


Fig. 15. Single parameter histograms. **A**, cells within the lymphocyte gate defined in Figure 13A, are represented in a histogram to evaluate the relative expression of CD3. **B**, overlay of a control population onto the stained population allows easy identification of the positive cells.

Analiza 2-parametrowa (histogramy 2 zmiennych, cytogramy)

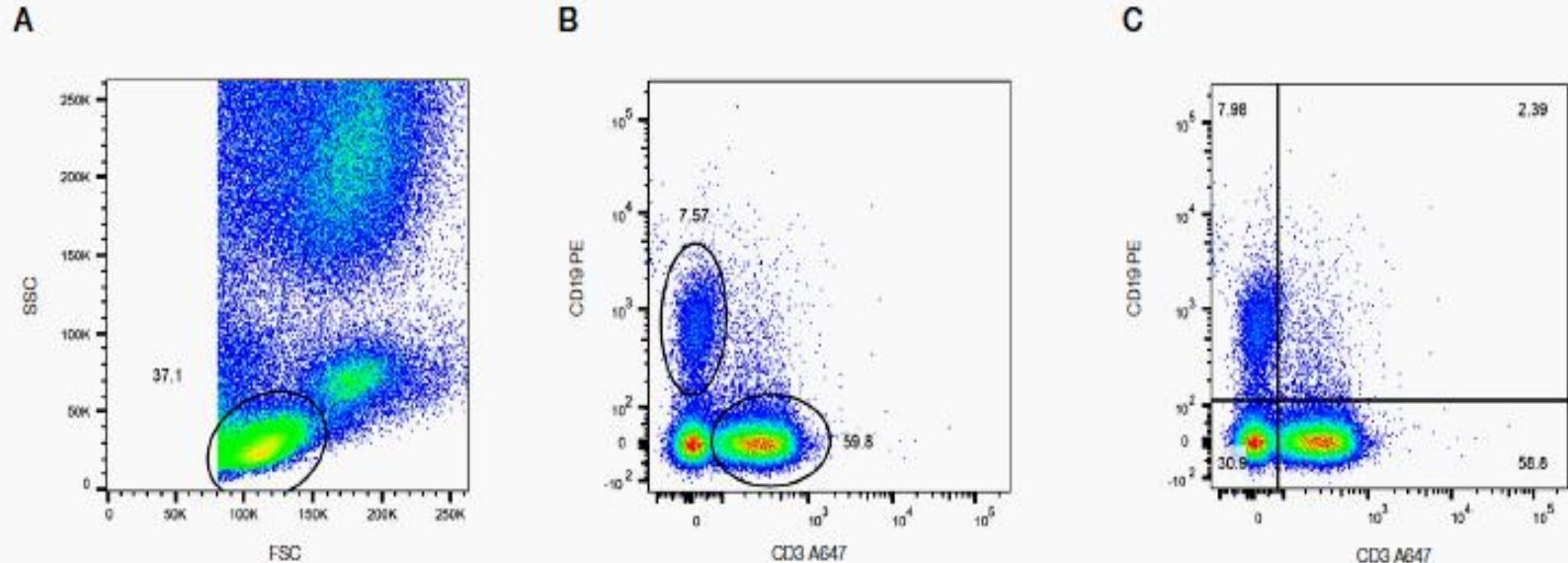
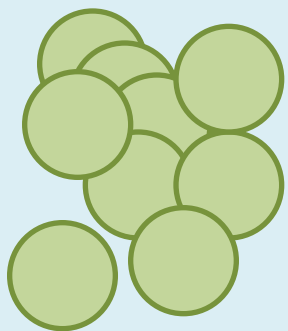


Fig. 16. Two-parameter (dual color fluorescence) density plot. Red cell lysed whole blood was stained with CD3 A647 and CD19 PE. The relative populations were determined using different gating methods.

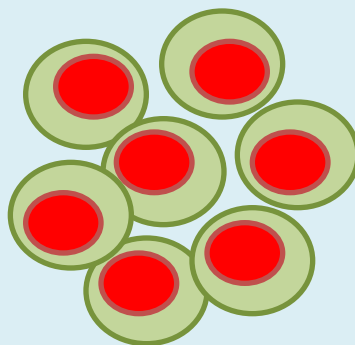
Analiza sygnału 2-parametrowa

Populacja
pojedynczo-
pozytywna

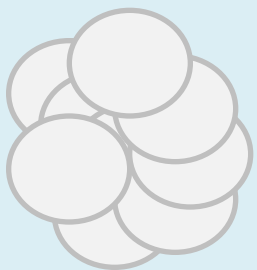
FL1



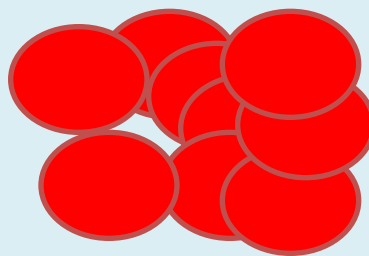
Populacja
podwójnie-
pozytywna



Populacja
negatywna



Populacja
pojedynczo-
pozytywna



FL2

Sekwencyjne bramkowanie

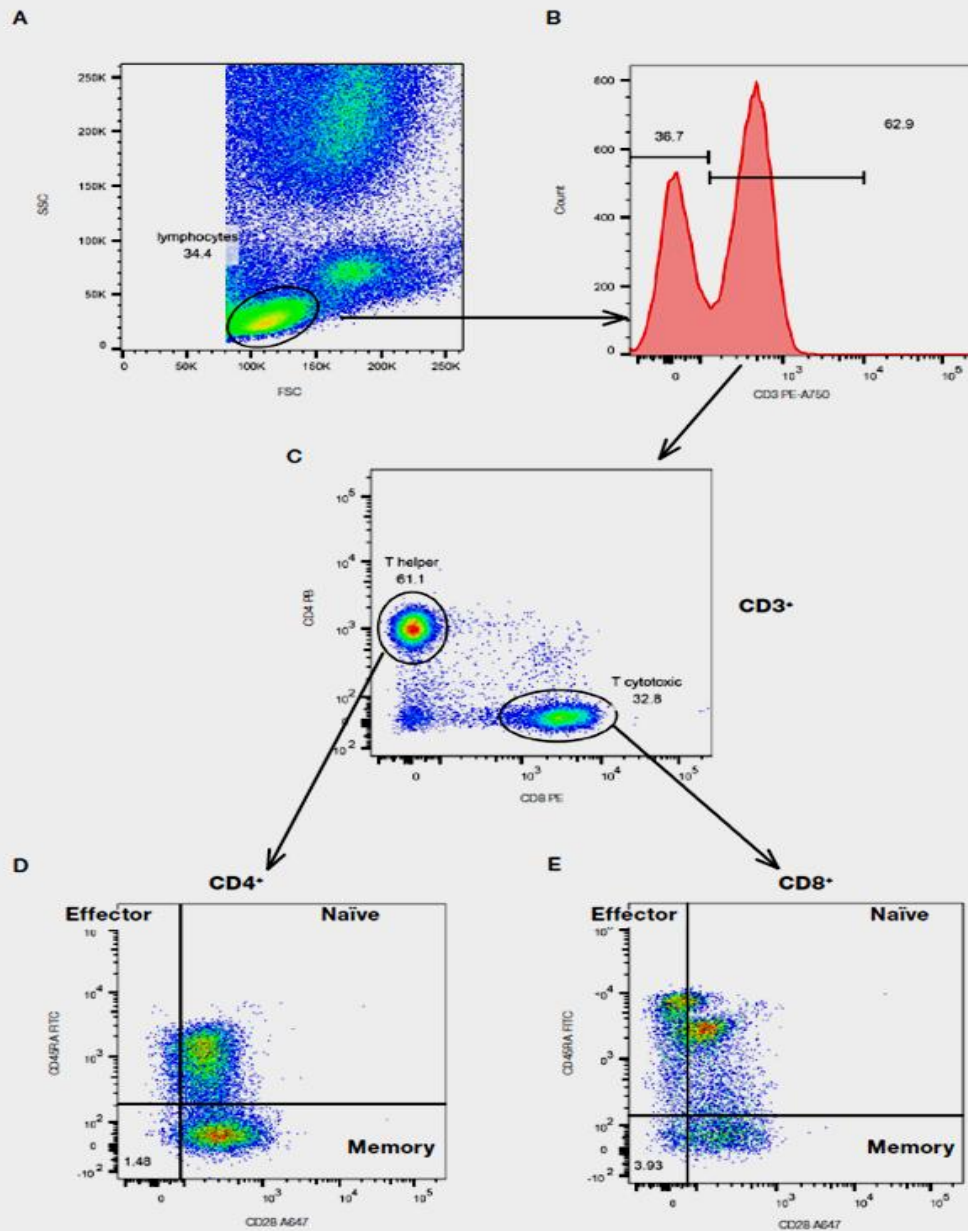


Fig. 17. Sequential gating to identify specific T subsets. Red cell lysed whole blood was stained with CD3, CD4, CD8, CD45RA and CD28 in the presence of propidium iodide to remove the dead cells. The gating strategy is shown by the arrows.

Jak potwierdzić prawidłowość bramkowania? Backgating

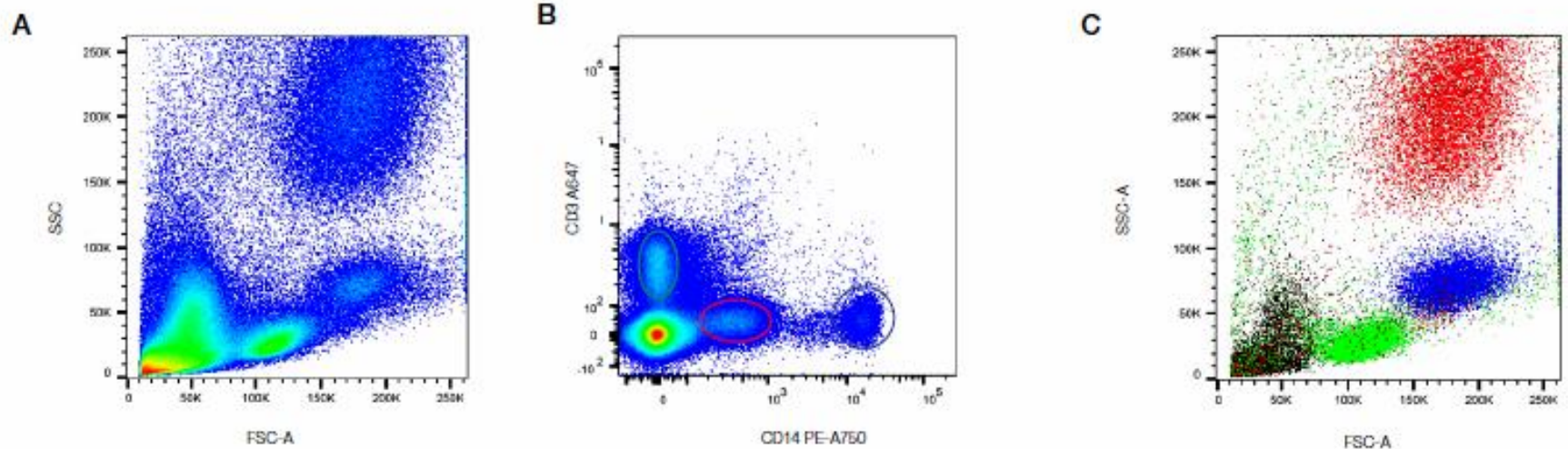
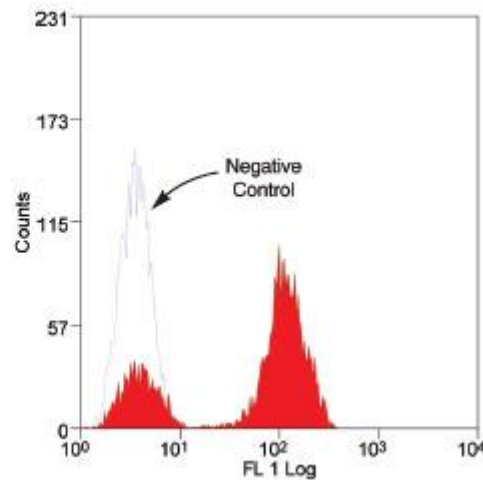
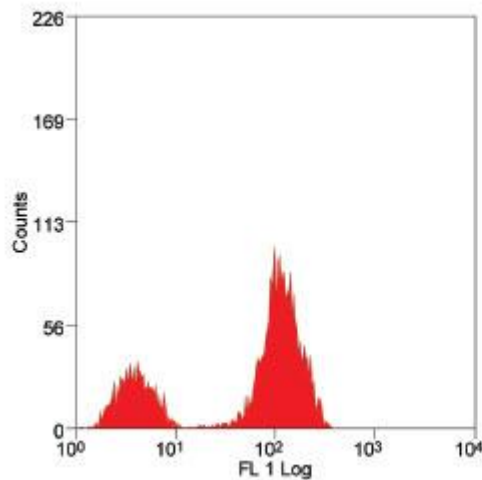


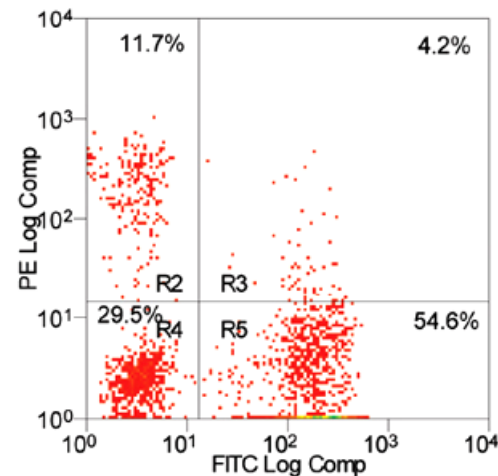
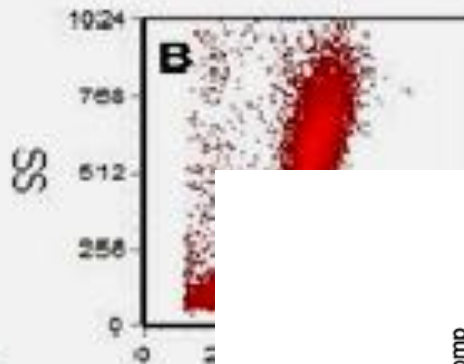
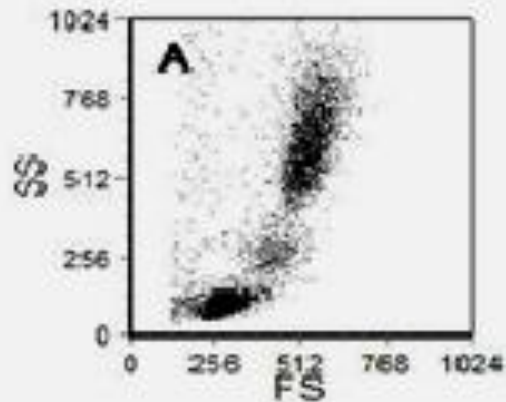
Fig. 18. Backgating to identify leukocyte subsets. A, red cell lysed whole blood. B, stained for CD3 and CD14. C, cells in the green, blue and red gates were backgated onto FSC vs. SSC to confirm leukocyte populations.

Rodzaje wykresów



← Histogram

Cytogram



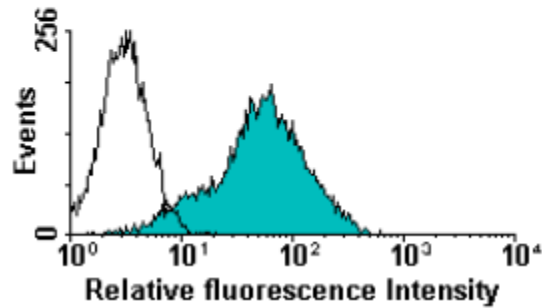
A - dot plot

B - density plot

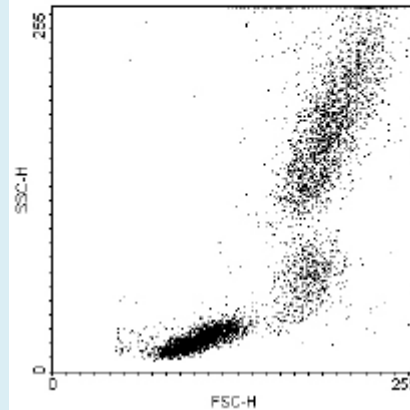
C - contour plot

Rodzaje wykresów

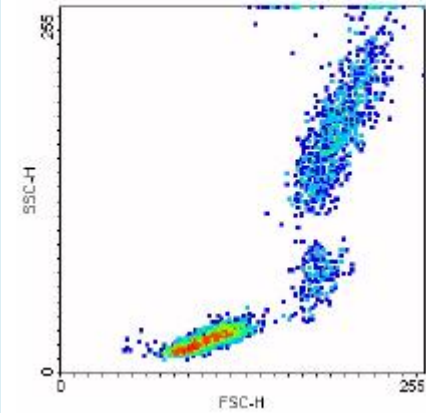
- Univariate histogram



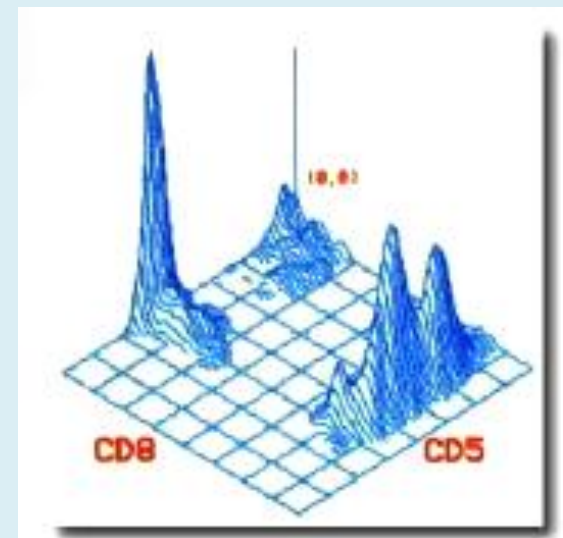
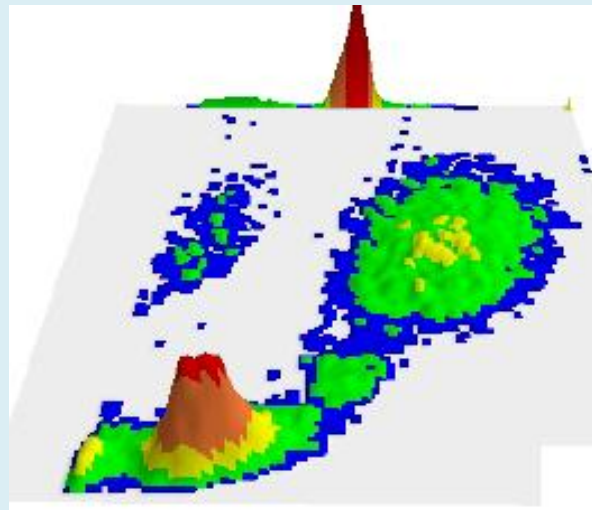
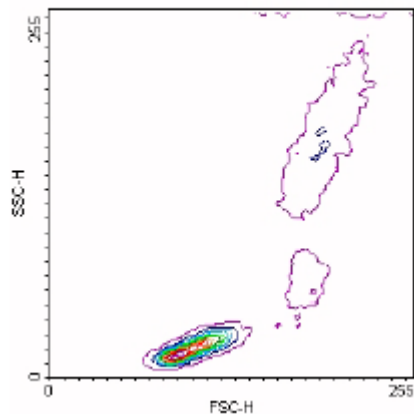
- Dot plot
(Bivariate display)



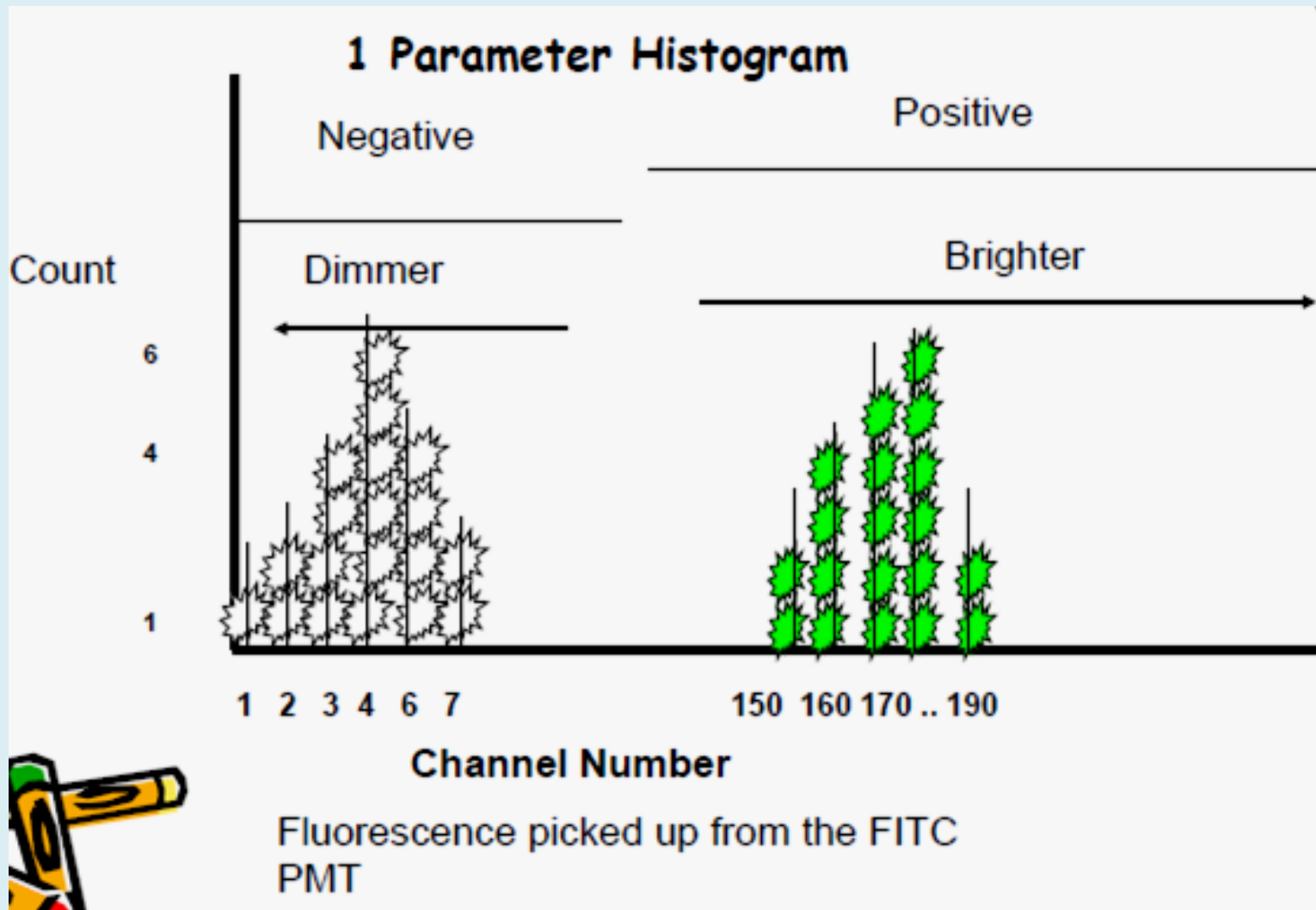
- Density plot



- Contour plot



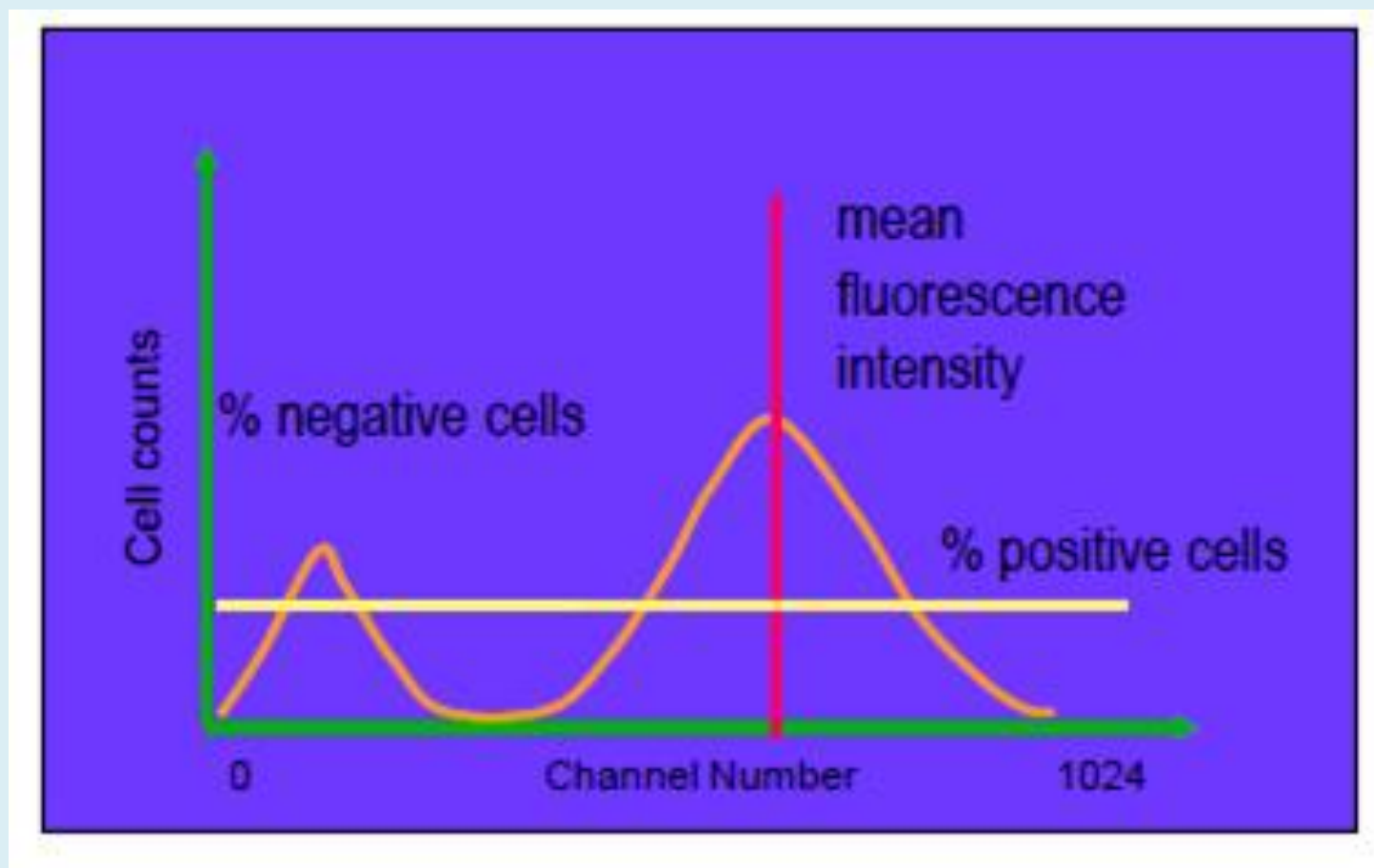
Pomiar jednego parametru



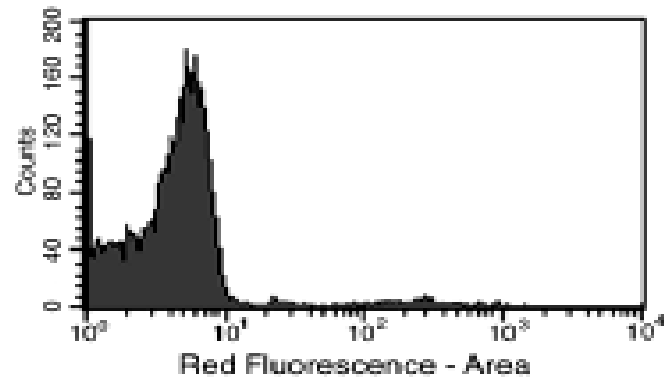
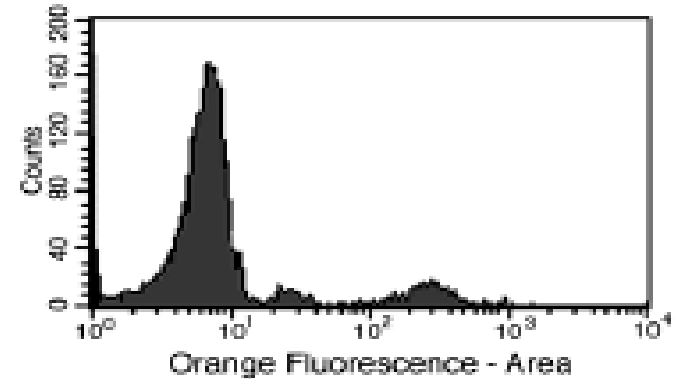
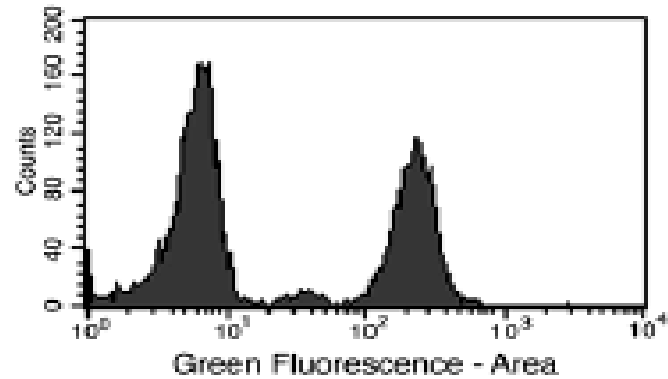
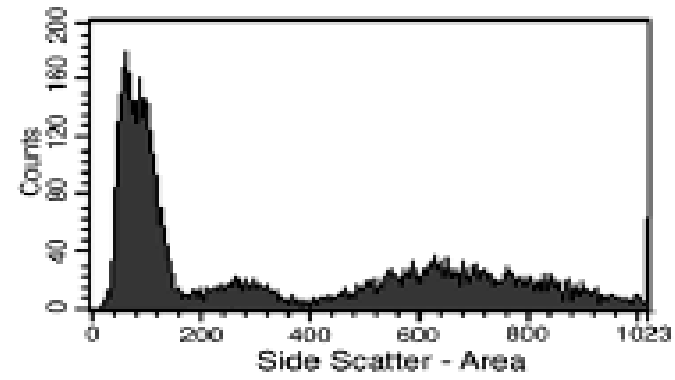
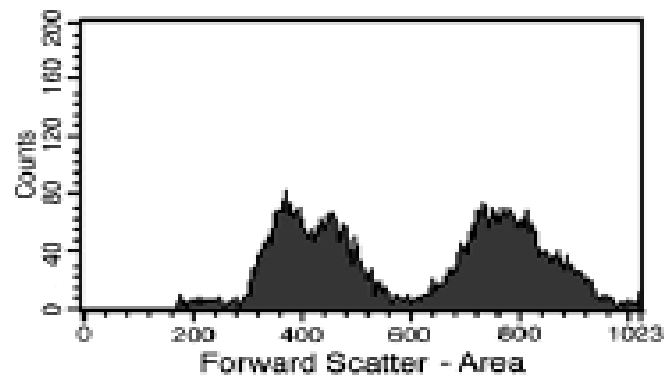
Analiza sygnału

% komórek negatywnych vs % komórek pozytywnych

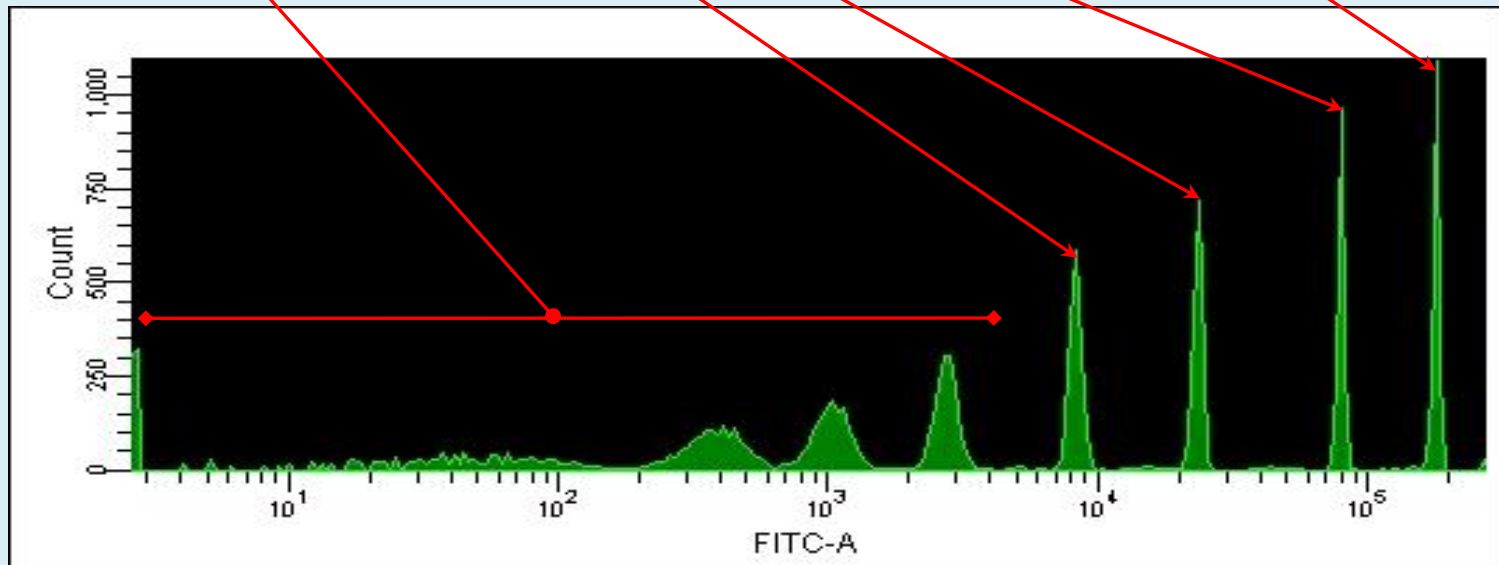
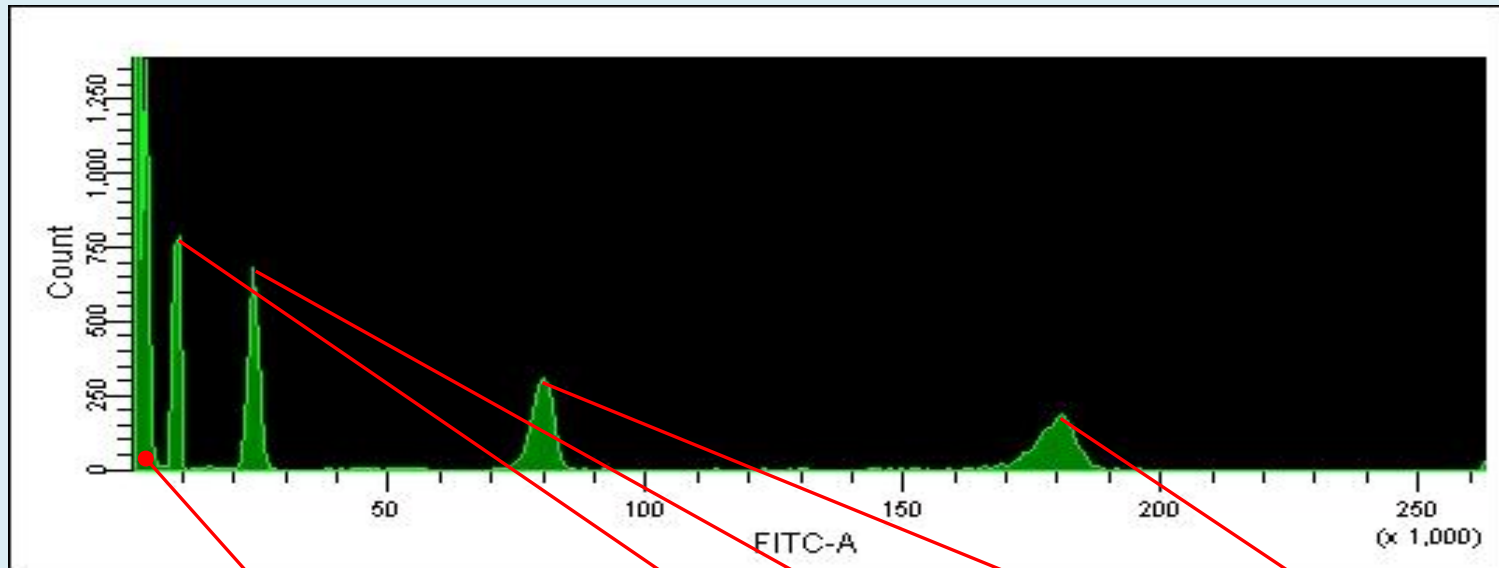
Gęstość markera, ekspresja markera – mean fluorescence intensity



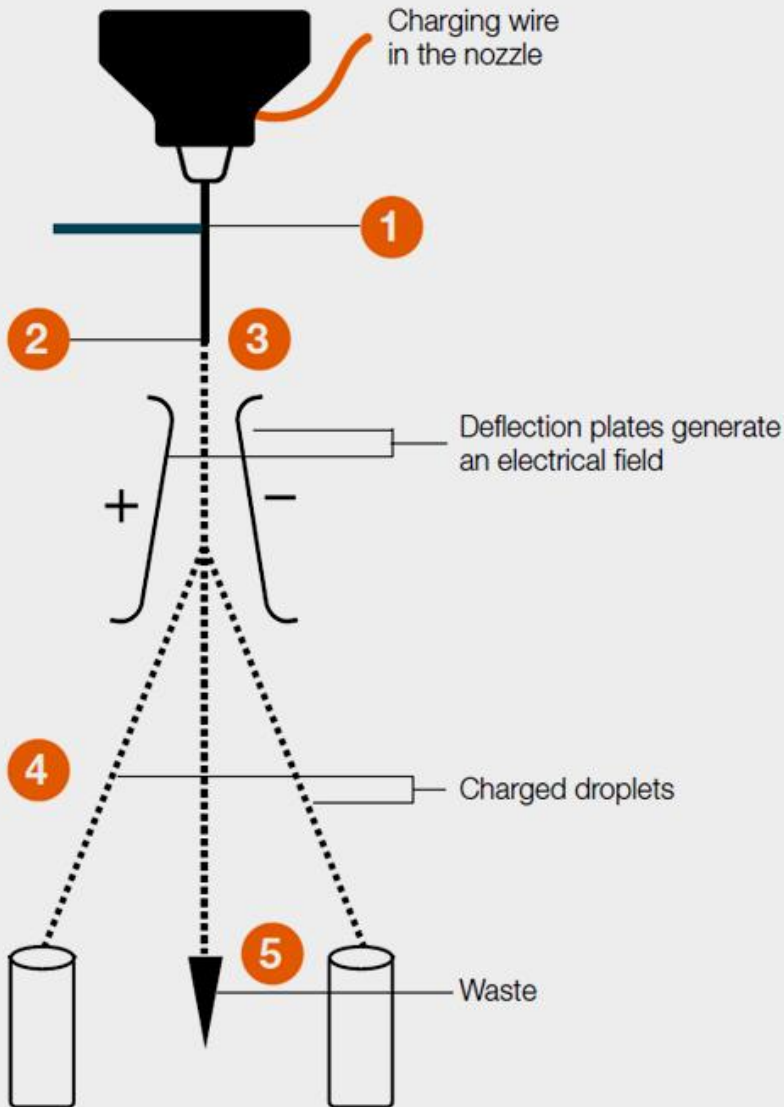
Analiza 5-parametrowa



Skala liniowa vs logarytmiczna



Elektrostatyczne sortowanie komórek



- 1** Optical interrogation and light collection
- 2** Stream partitioning into droplets
- 3** Stream and droplet charging as the target particle passes through the break-off
- 4** Droplet deflection through an electrostatic field
- 5** Uncharged droplets pass into the waste

Cytometria przepływowa

- Pomiar komórek zawieszonych w płynie
- Analiza wielu parametrów jednocześnie (analiza wieloparametrowa)
- Jedna komórka analizowana jest raz: analizowane są komórki w populacji w zawiesinie
- Pomiar światła rozproszonego i pomiar fluorescencji emitowanej przez fluorochromy
- Sortowanie komórek
- Duża szybkość pomiaru (do 10 tys. komórek/sek.)
- Wykrywanie śladowych populacji komórek

Wady cytometrii przepływowej

- Bardzo droga w eksploatacji
- konieczność uzyskania pojedynczych komórek, cząstek do analizy
- brak odniesienia do struktury tkanki
- brak informacji o wewnątrzkomórkowej lokalizacji badanych markerów

Dziękuję za uwagę