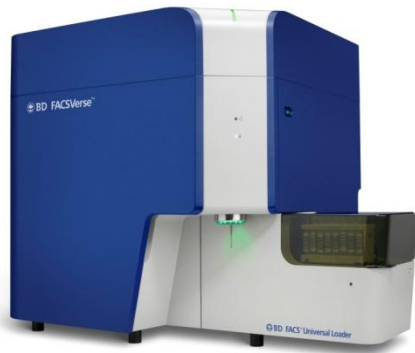




**Fakultet: Cytometria – zastosowanie w
badaniach biologicznych**

Wprowadzenie do cytometrii przepływowej: wybór fluorochromów i podstawowe zasady projektowania doświadczeń

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

Wybór fluorochromów

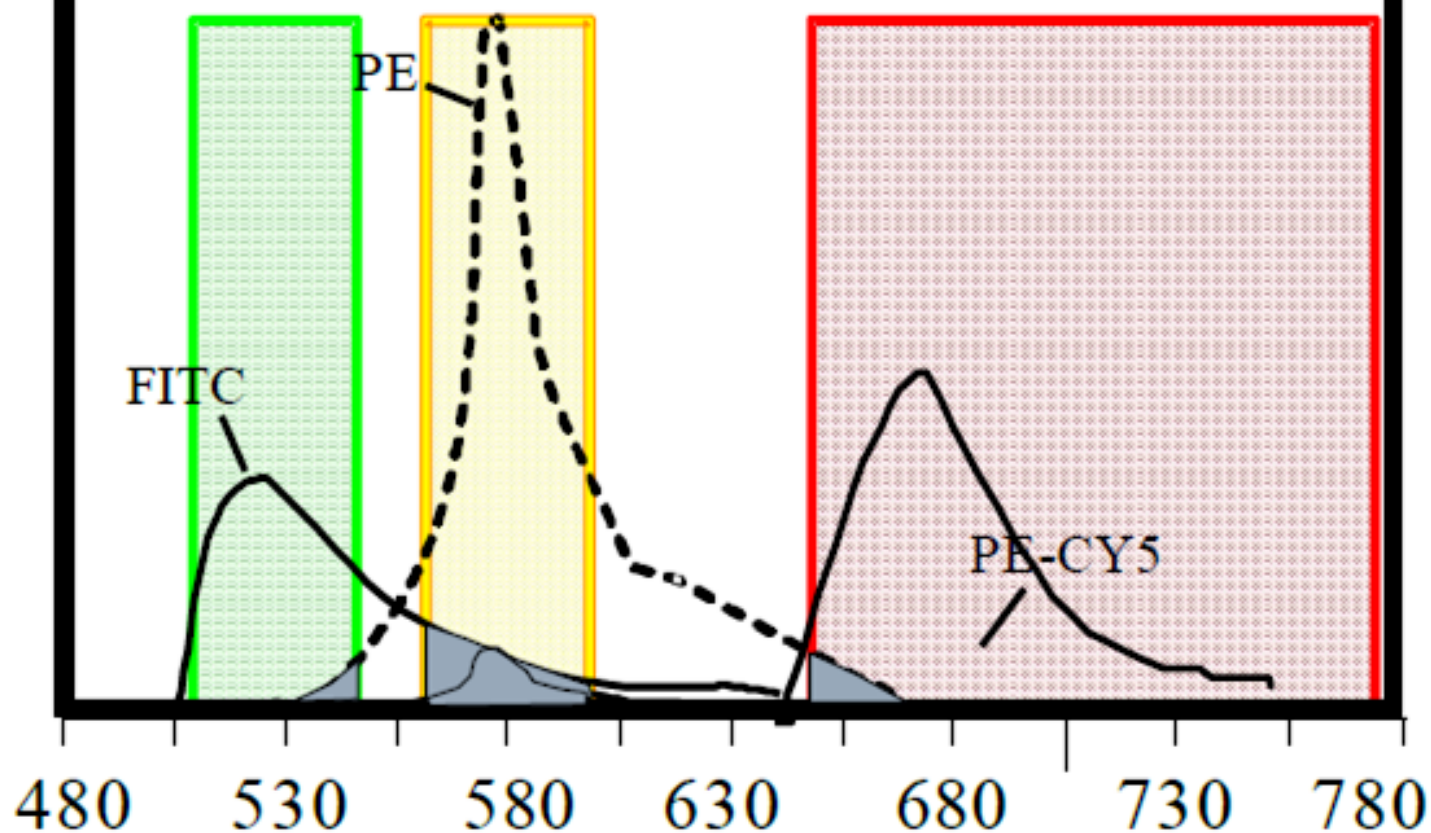
1. Typ i liczba laserów i detektorów
2. Zestaw filtrów optycznych (filtry pasmowe zwiększają czułość detekcji fluorochromu, ale zwiększają ryzyko „spillover”)

Wirtualne testowanie:

Bdbiosciences.com.spectra

FLUORESCENCE

FLUORESCENCE DETECTOR FILTER PASSBANDS:



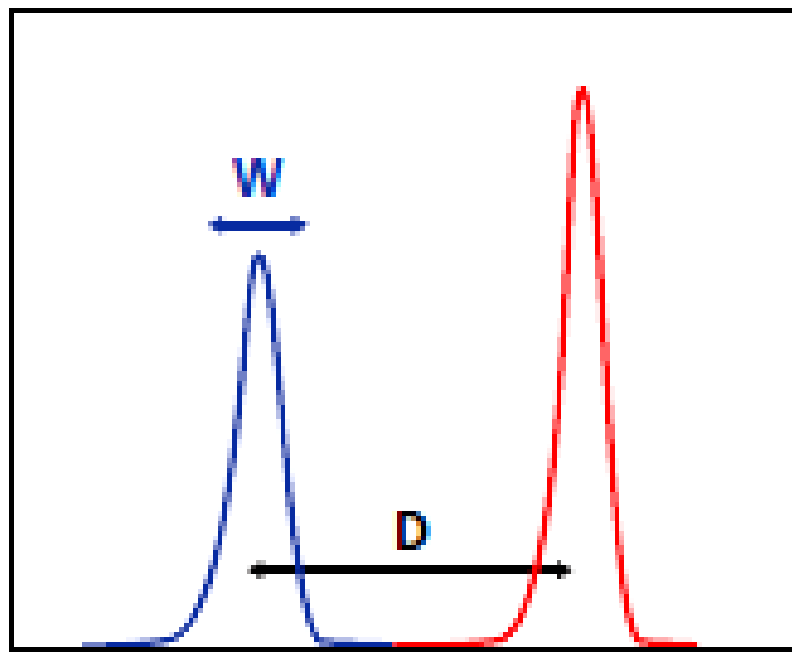
EMISSION WAVELENGTH

Źródła światła i fluorochromy (FACSAria)

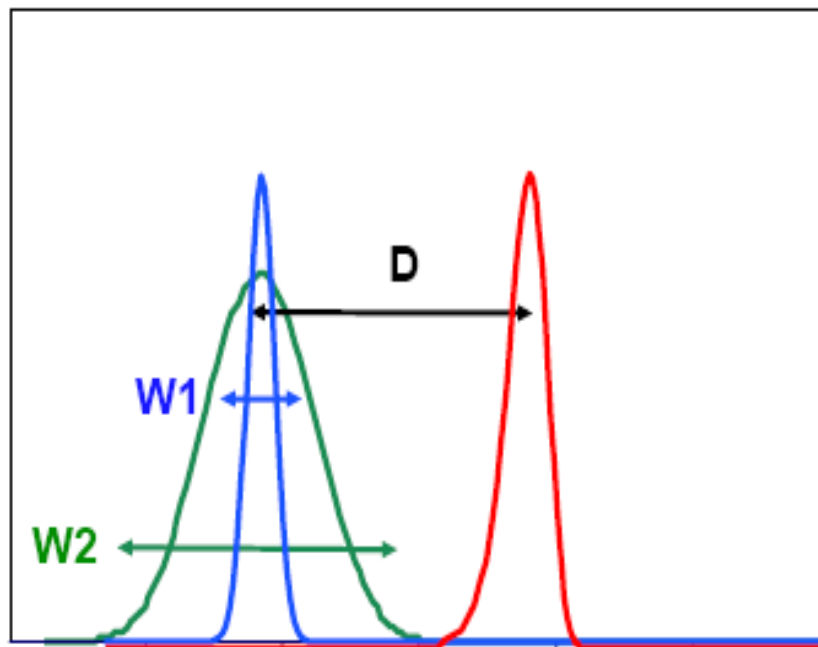
Laser	Wavelength (nm)	Min. Power (mW)	Commonly Used Fluorochromes
Coherent® Sapphire™ Solid State	488 nm (blue)	13	FITC, PE, PE-TxRed, PE-Cy7, PerCP, PerCPCy5.5, PI
JDS Uniphase™ HeNe Air Cooled	633 nm (red)	11	APC, APC-Cy7
Point Source Violet Solid State (optional)	407 nm (violet)	10	Alexa Fluor®, Cascade blue, Pacific blue, DAPI, Hoeschst, AmCyan

Wybór fluorochromu

“Bright” = zapewniają dobrą czułość



$$\text{Stain Index} = D/W$$



$$\text{Stain Index (SI)} = D/W$$

D = różnica między negatywną i pozytywną populacją

W = zasięg negatywnej populacji

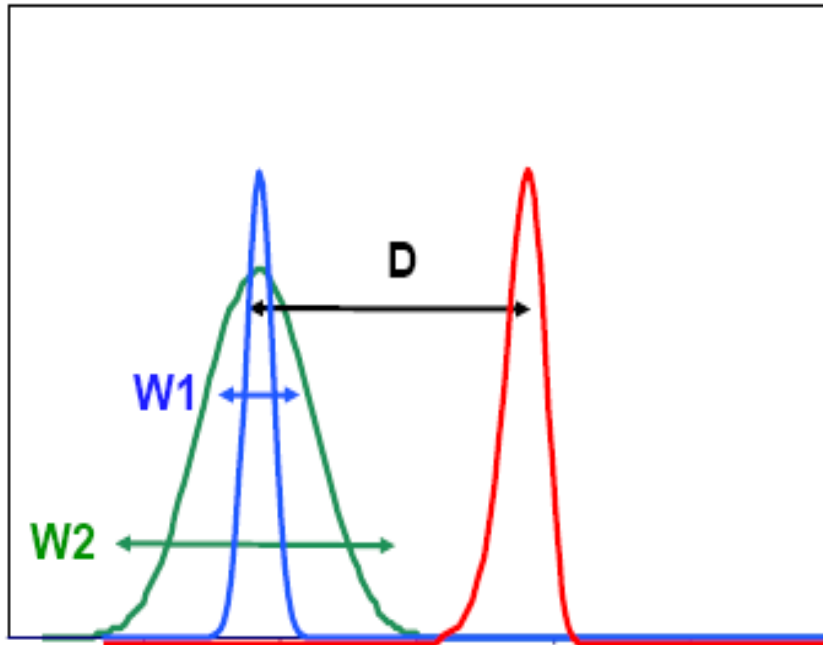
SI = indeks znakowania

Ocena tła w specyficznym „świeceniu”/minimalizacja tła (autofluorescencja, niespecyficzne barwienie, spillover)

Fluorochrome	Filter	Stain Index
PE	575/26	232
BD Horizon PE-CF594	610/20	232
PE-Cy5	670/14	216
APC	660/20	193
PE-Cy7	780/60	86
Alexa Fluor® 647	660/20	85
PerCP-Cy5.5	695/40	82
Alexa Fluor® 488	530/30	53
FITC	530/30	51
BD Horizon V450	450/50	42
Pacific Blue™	450/50	36
Alexa Fluor® 700	730/45	27
PerCP	695/40	25
APC-Cy7	780/60	24
AmCyan	525/20	23
BD Horizon V500	525/20	21
BD APC-H7	780/60	17

<http://www.bdbiosciences.com>

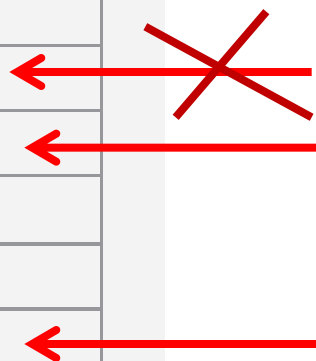
“Bright” ale...minimalizacja „spillover” (spectral overlap, nakładanie spektrum emisji)



$$\text{Stain Index (SI)} = D/W$$

↑
Te dwie zasady
często się wykluczają

Fluorochrome	Filter	Stain Index
PE	575/26	232
BD Horizon PE-CF594	610/20	232
PE-Cy5	670/14	216
APC	660/20	193
PE-Cy7	780/60	86
Alexa Fluor® 647	660/20	85
PerCP-Cy5.5	695/40	82
Alexa Fluor® 488	530/30	53
FITC	530/30	51
BD Horizon V450	450/50	42
Pacific Blue™	450/50	36
Alexa Fluor® 700	730/45	27
PerCP	695/40	25
APC-Cy7	780/60	24
AmCyan	525/20	23
BD Horizon V500	525/20	21
BD APC-H7	780/60	17



Silny marker/słaby fluorochrom
Słaby marker/silny fluorochrom
PE – silny fluorochrom
FITC – słaby fluorochrom

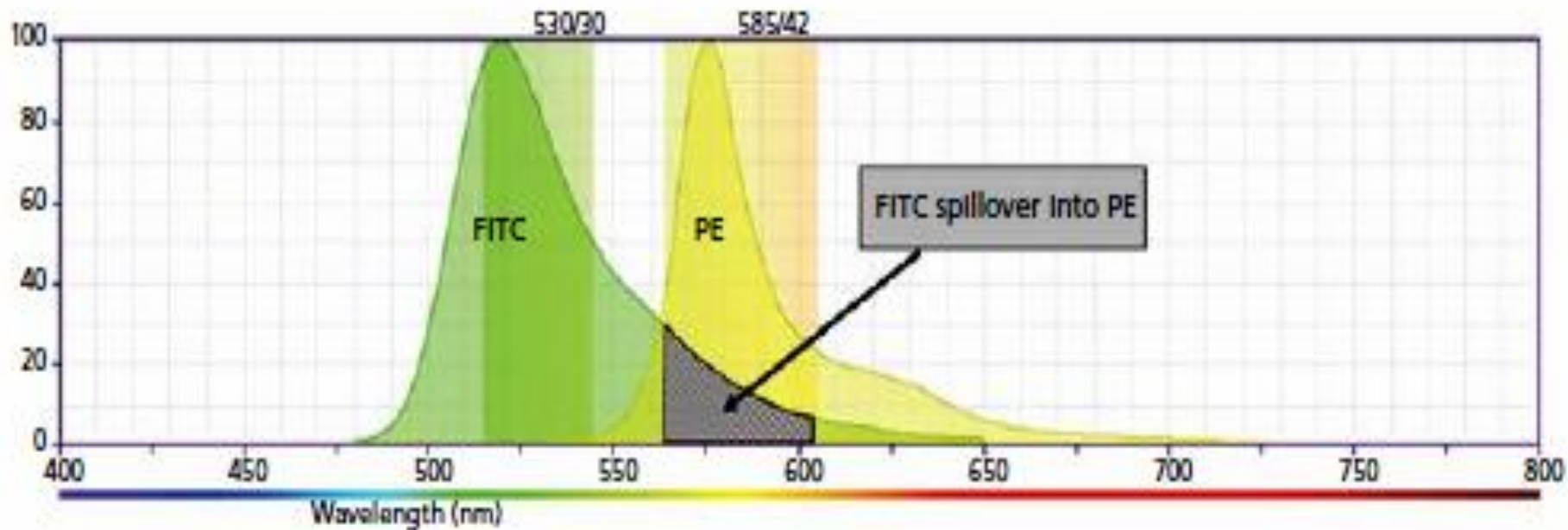


Figure 1. Example of FITC spillover into the PE channel.

Przykład: CD8 bright/CD62L dim – CD62L PE/CD8 FITC

FITC-PE
PE-FITC
Zaburzona
czułość PE,
zmień CD8
na inny
fluorochrom

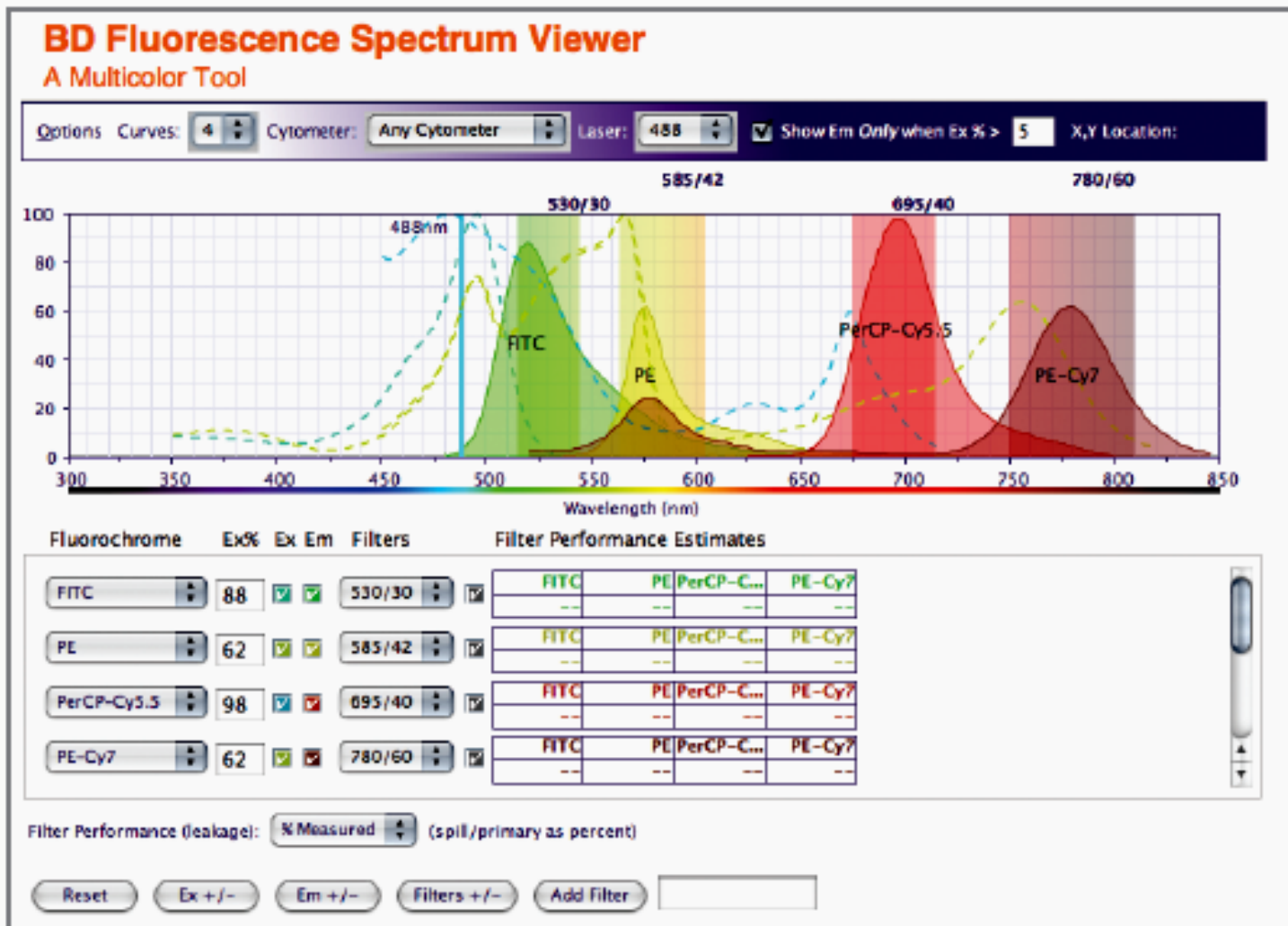


Figure 2. Spectral overlap of FITC into the PE detector. Taken from bdbiosciences.com/spectra

Jeszcze jedna zasada doboru fluorochromów:

Stosuj „bright” fluorochrom dla „dim” Ab

Stosuj „dim” fluorochrom dla „bright” Ab

ale.....

Unikaj „spillover” silnie świecącej populacji do detektora wykrywającego słabo świecąca populację, czyli do detektora wykrywającego z dużą czułością.

PE CD62L / FITC CD8

Table 4. BD Biosciences fluorochrome specifications

BD Biosciences fluorochrome specifications					Analyzers				Sorters			
Fluorochrome	Fluorescence Emission Color	Ex-Max (nm)	Excitation Laser Line (nm)*	Em-Max (nm)	BD Accuri® C6	BD FACSCalibur™	BD FACSVerser™ 5	BD FACSCanto™ II	BD LSRFortessa™ and Special Order BD LSRFortessa	BD FACSAria™ III and Special Order BD FACSAria	BD Influx™	BD FACSJazz™
Hoechst 33342	Blue	350	355, 375	461					●	●	●	
Brilliant Violet 421	Blue	407	405	421			●	●	●	●	●	●
BD Horizon V450	Blue	404	405	448			●	●	●	●	●	●
Pacific Blue™	Blue	401	405	452			●	●	●	●	●	●
BD Horizon V500	Green	415	405	500			●	●	●	●	●	●
AmCyan	Green	457	405	491			●	●	●	●	●	
Alexa Fluor® 488	Green	495	488	519	●	●	●	●	●	●	●	●
FITC	Green	494	488	519	●	●	●	●	●	●	●	●
PE	Yellow	496, 564	488, 532, 561	578	●	●	●	●	●	●	●	●
Brilliant Violet™ 605	Orange	407	405	602					●	●	●	
BD Horizon PE-CF594	Orange	496, 564	488, 532, 561	612			●	●	●	●	●	
PI	Orange	351	488, 532, 561	617	●	●	●	●	●	●	●	
7-AAD	Red	543	488, 532, 561	647	●	●	●	●	●	●	●	
APC†	Red	650	633, 635, 640	660	●	●	●	●	●	●	●	●
Alexa Fluor® 647	Red	650	633, 635, 640	668	●	●	●	●	●	●	●	●
PE-Cy™5†	Red	496, 564	488, 532, 561	667	●†	●	●	●	●	●	●	
PerCP	Red	482	488, 532	678	●	●	●	●	●‡	●	●‡	
PerCP-Cy™5.5	Far Red	482	488, 532	695	●	●	●	●	●	●	●	●
Alexa Fluor® 700	Far Red	696	633, 635, 640	719			●	●	●	●	●	
PE-Cy™7	Infrared	496, 564	488, 532, 561	785	●	●	●	●	●	●	●	●
APC-Cy7	Infrared	650	633, 635, 640	785			●	●	●	●	●	●
BD APC-H7	Infrared	650	633, 635, 640	785			●	●	●	●	●	●

Fluorochromy tandemowe:

APC-Cy7

PE-Cy7

Degradują pod wpływem światła, utrwalania (formaldehydem) i ogrzewania. Wówczas emitują fluorescencję w zakresie barwnika głównego (APC, PE), co skutkuje fałszywym wynikiem pozytywnym.

Zatem: stosuj stabilne pochodne, używaj zalecanych buforów do utrwalania, przechowuj próby w ciemności i odpowiedniej temperaturze, zwykle 4 st. C.

Zasady doboru fluorochromów do analizy wielokolorowej:

1. Wybieraj najsilniej świecące fluorochromy

2. Minimalizuj „spillover”

3. Stosuj silne fluorochromy do słabych przeciwciał i odwrotnie: słabe fluorochromy do silnych przeciwciał

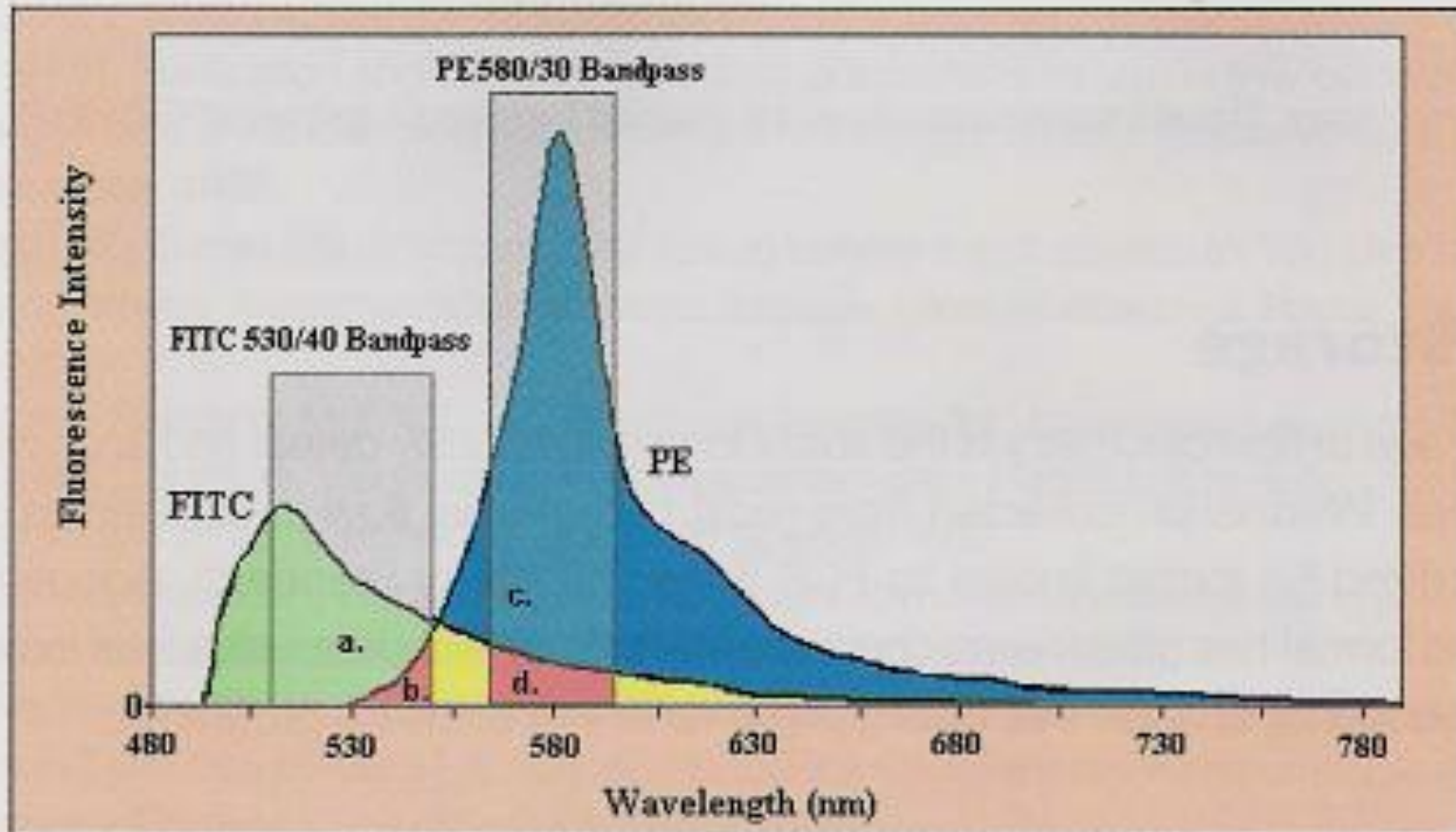
4. Unikaj spillover silnie świecącej populacji do detektorów wykrywających słabo świecące populacje

5. Stosuj procedury zapobiegające degradacji fluorochromów tandemowych

Zasady doboru fluorochromów do analizy wielokolorowej c.d.

- Stosuj fluorochromy, których fluorescencja wzbudzana jest przez różne lasery
- Stosuj fluorochromy o dużej różnicy w spektrum emisji
- Jeżeli fluorochromy wzbudzane są przez odrębne lasery, to nie używaj fluorochromów o podobnym spektrum emisji

Spillover jeszcze raz



Guide to Flow Cytometry; DakoCytomation

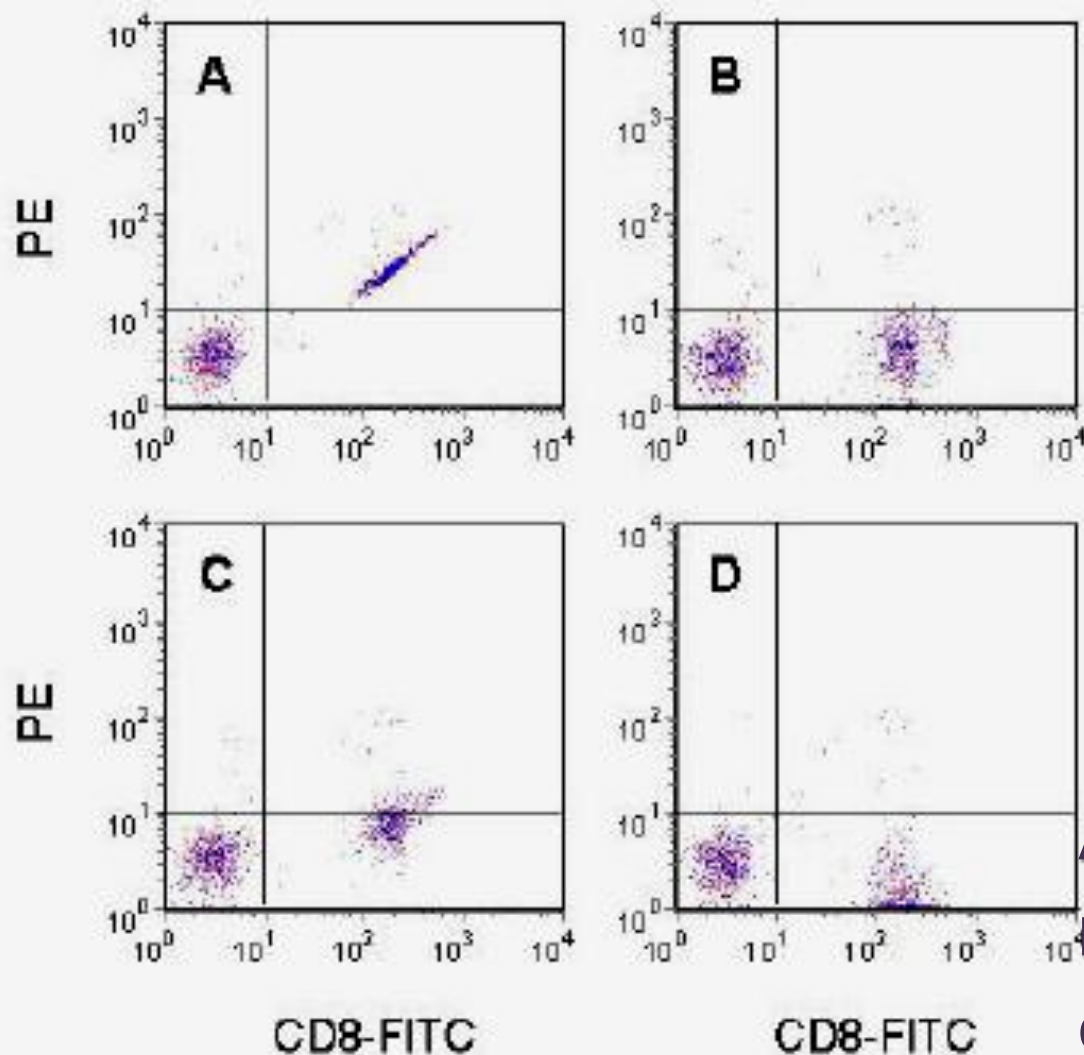
Zakres spillover

FLa-%FLb	Spectral Overlap	Dye being Interfered with	Dye Where Interference Originates
FL1-FL2	<5%	FITC	PE
FL2-FL1	20-40%	PE	FITC
FL2-FL3	20-40%	PE	PE\Texas Red
FL3-FL2	20-50%	PE\Texas Red	PE
FL3-FL4	<20%	PE\Texas Red	PE\Cy5
FL4-FL1	<5%	PE\Cy5	FITC
FL4-FL2	<20%	PE\Cy5	PE
FL4-FL3	<20%	PE\Cy5	PE\Texas Red

Najczęściej używane zestawy barwników

6-color	8-color	10-color
FITC or Alexa Fluor® 488	FITC or Alexa Fluor® 488	FITC or Alexa Fluor® 488
PE	PE	PE
—	—	PE-Texas Red® or BD Horizon PE-CF594
PerCP-Cy5.5	PerCP-Cy5.5	PerCP-Cy5.5
PE-Cy7	PE-Cy7	PE-Cy7
APC or Alexa Fluor® 647	APC or Alexa Fluor® 647	APC or Alexa Fluor® 647
—	—	Alexa Fluor® 680 or 700
APC-Cy7 or APC-H7	APC-Cy7 or APC-H7	APC-Cy7 or APC-H7
—	AmCyan or BD Horizon V500	AmCyan or BD Horizon V500
—	BD Horizon V450 or Brilliant Violet™ 421	BD Horizon V450 or Brilliant Violet 421

Kompensacja



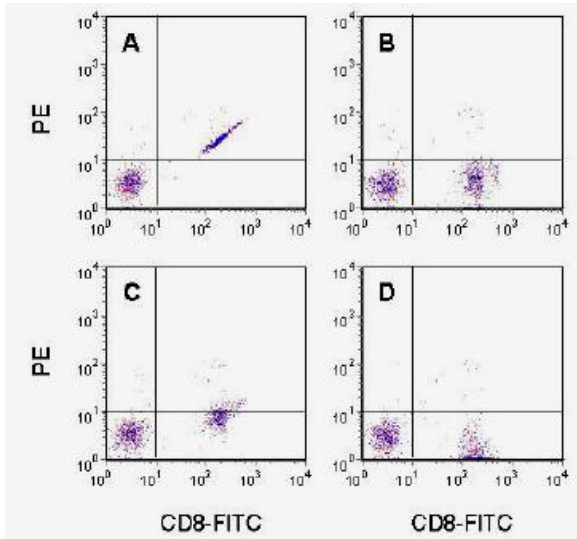
A. Zła kompensacja

B. Prawidłowa kompensacja

C. Niedokompensowane

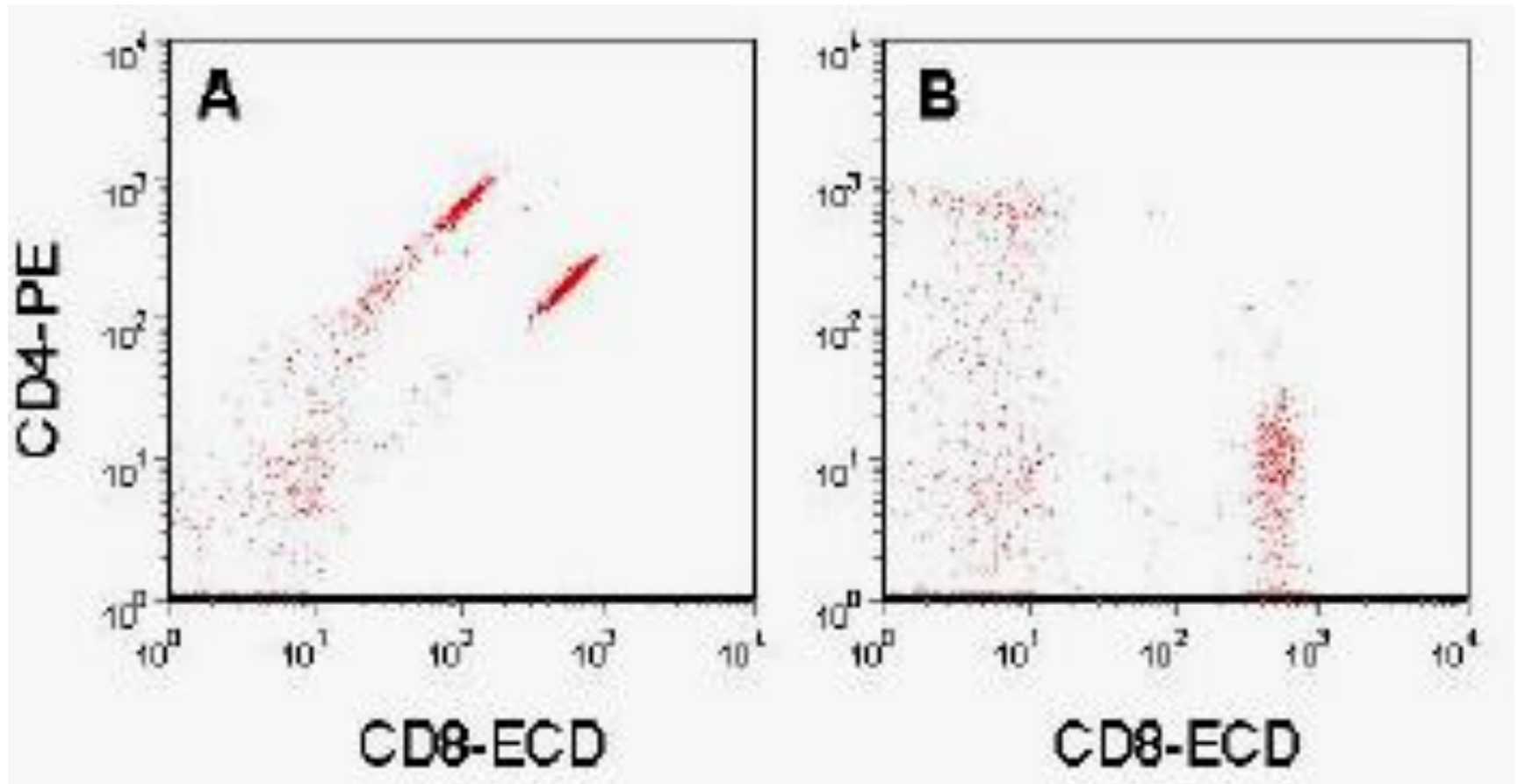
D. Przekompensowane

Kompensacja – kiedy jest nieprawidłowa?

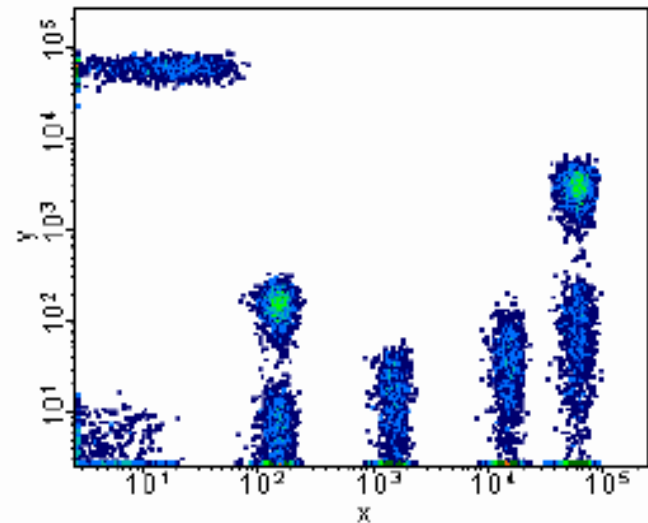
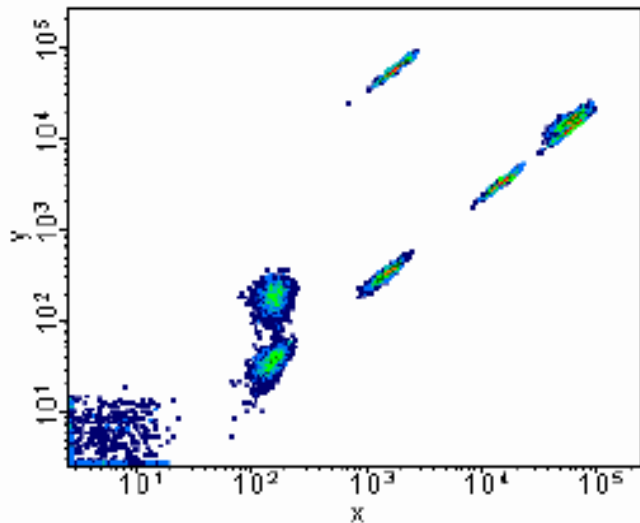


- A. Zła kompensacja – spektra emisji fluorochromów na siebie zachodzą**
- B. Prawidłowa kompensacja**
- C. Niedokompensowane – za mało sygnału FITC odjęto z kanału PE**
- D. Przekompensowane – za dużo sygnału FITC odjęto z kanału PE**

Spillover



8 populacji, w tym 2 podwójnie pozytywne



Problem: prawidłowe ustawienie kompensacji przy słabej autofluorescencji, duży „spillover” X do Y, mały „spillover” Y do X

Występuje duże tło X w Y w pojedynczo pozytywnej populacji X, co skutkuje efektem „data spread”

Kompensacji nie ustawiamy „na oko”

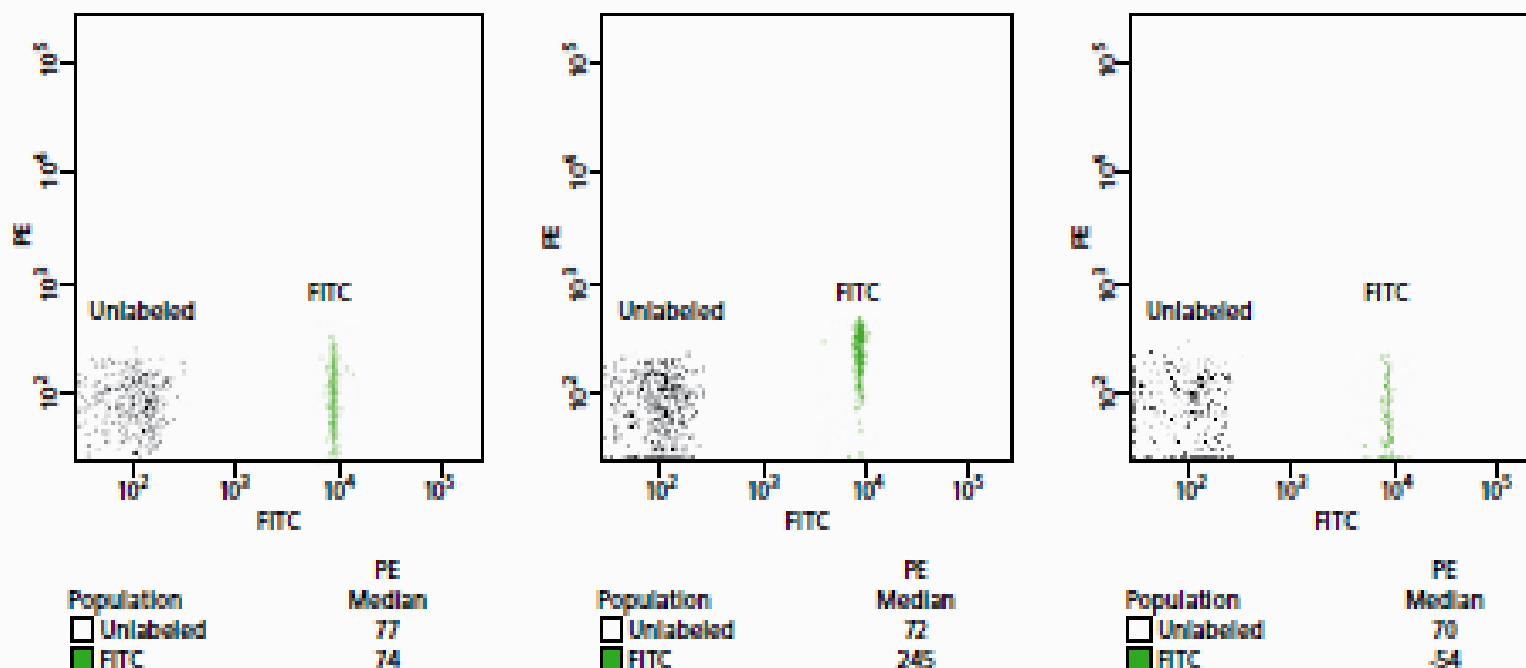


Figure 3.

Compensated properly

The medians of the positive and negative FITC populations are equal in the PE channel.

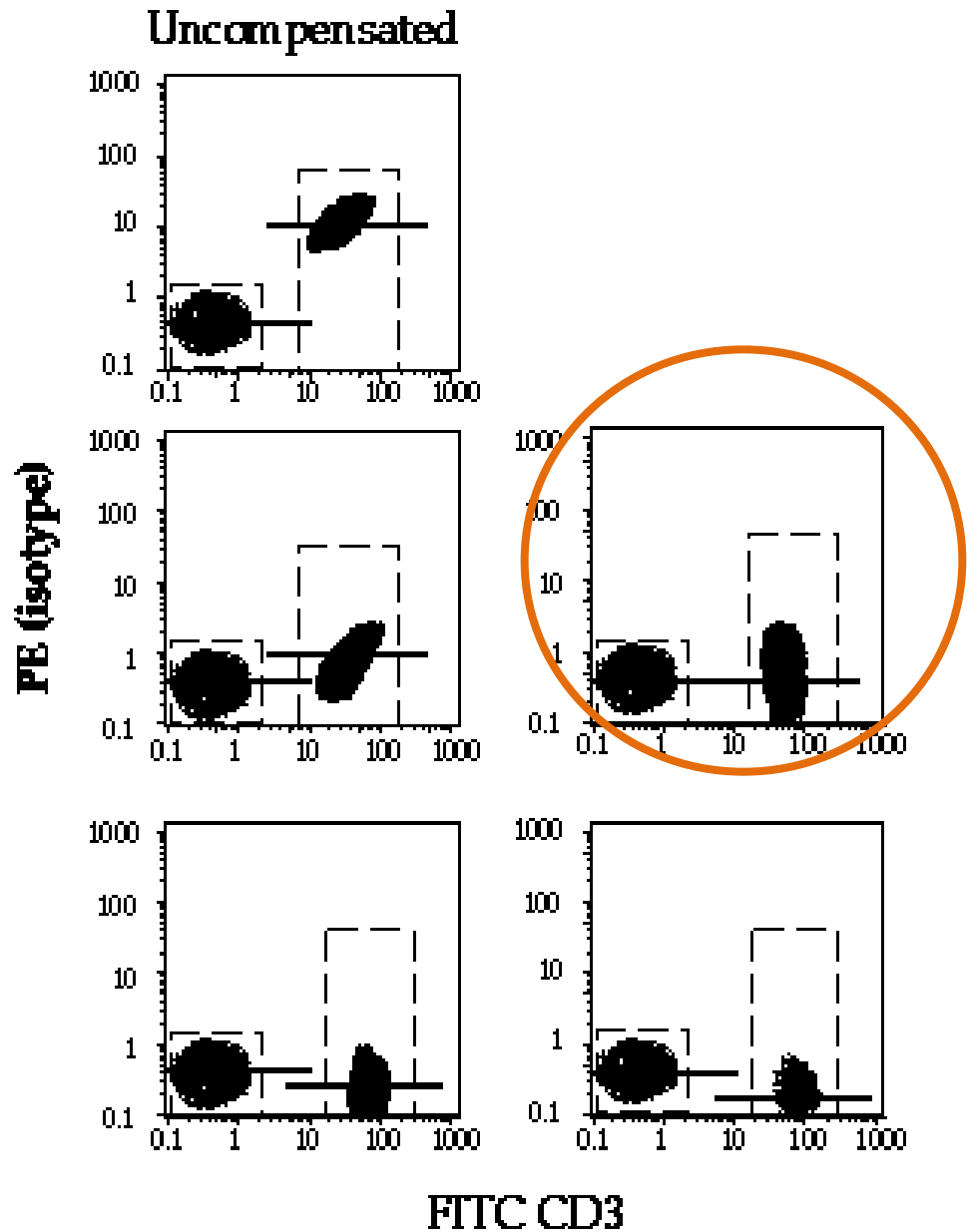
Undercompensated

Not enough fluorescence subtraction. The PE MFI of the positive FITC population is greater than that of the negative FITC population.

Overcompensated

Too much fluorescence subtraction. The PE MFI of the negative FITC population is greater than that of the positive FITC population.

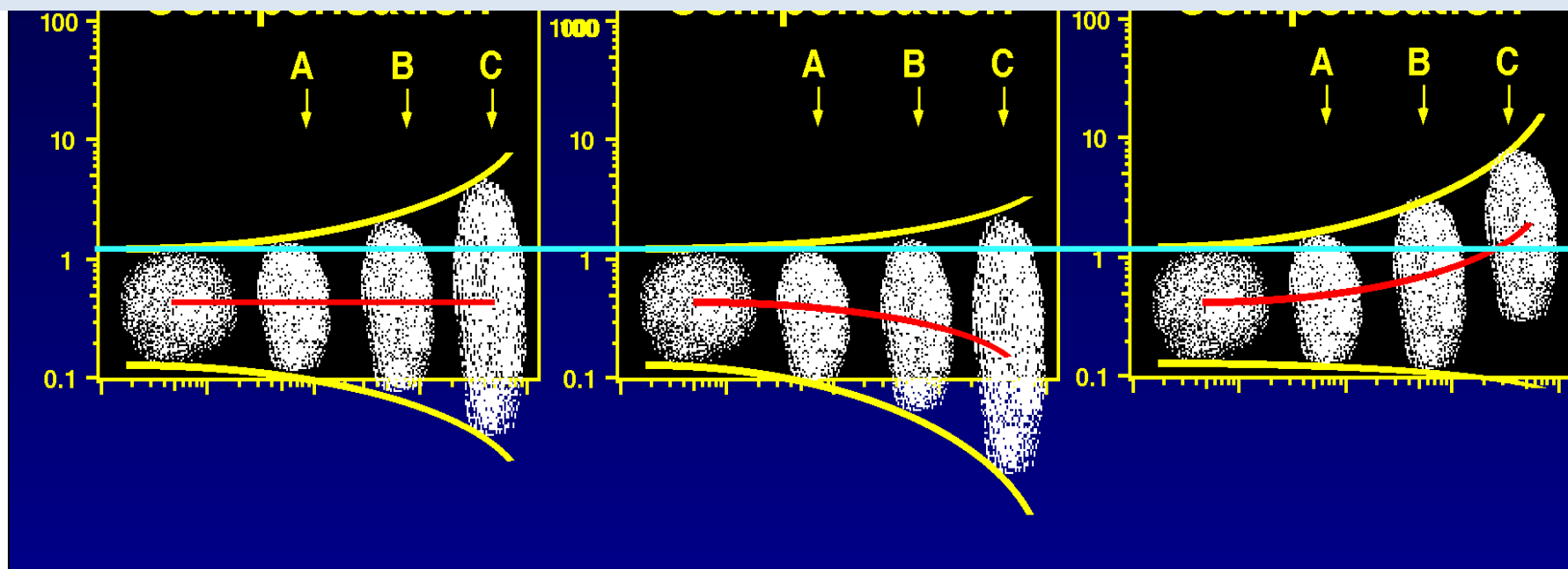
Kompensacja w praktyce



Kompensacja nie zależy od intensywności fluorescencji.

Zależy od doboru fluorochromów i ich spektrów emisji.

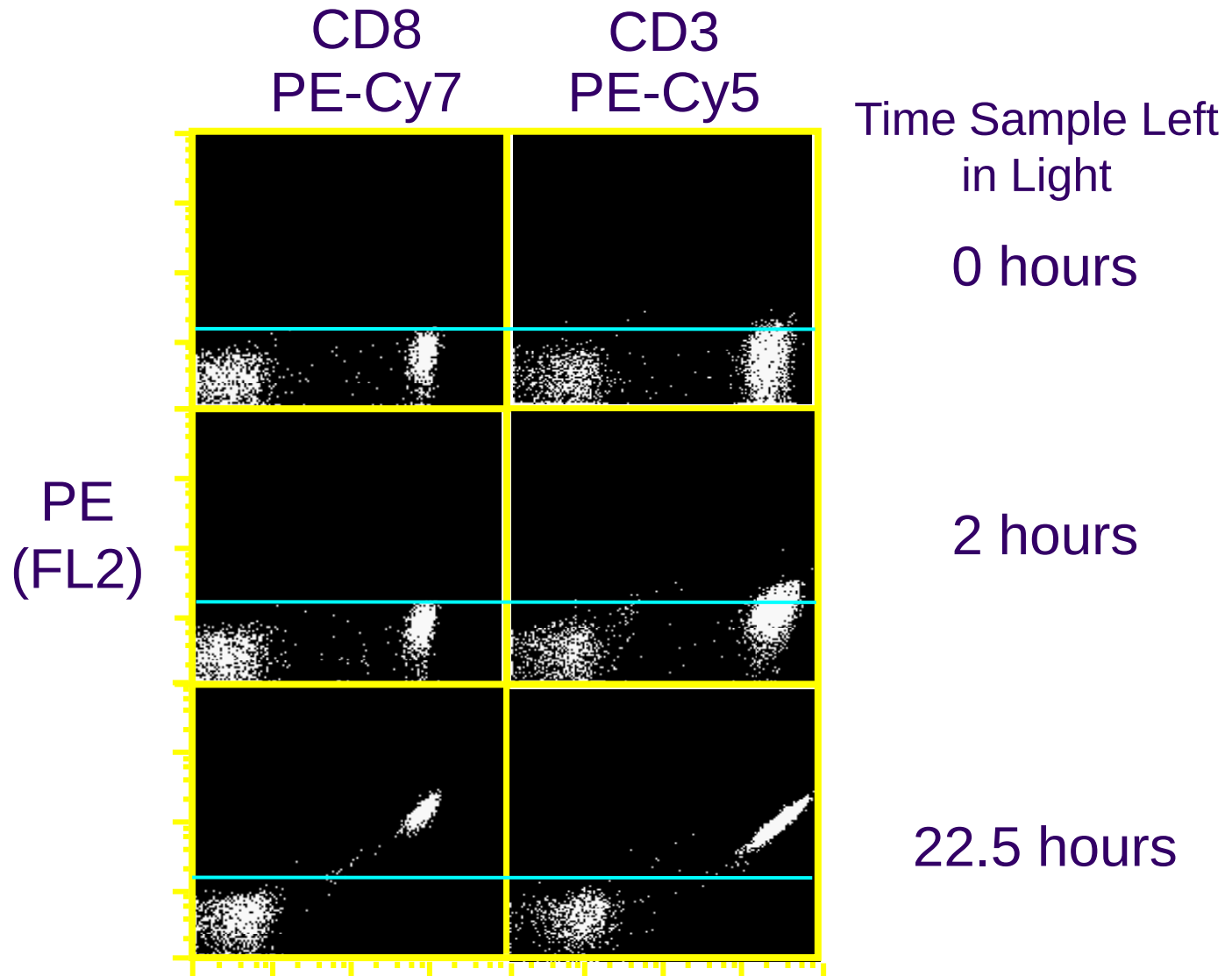
Jednak im większa intensywność fluorescencji danej populacji komórek ($A < B < C$) tym większe znaczenie ma poprawne ustalenie kompensacji, ze względu na fakt, że efekt rozproszenia danych (data spread) jest większy dla populacji o wyższej intensywności fluorescencji.



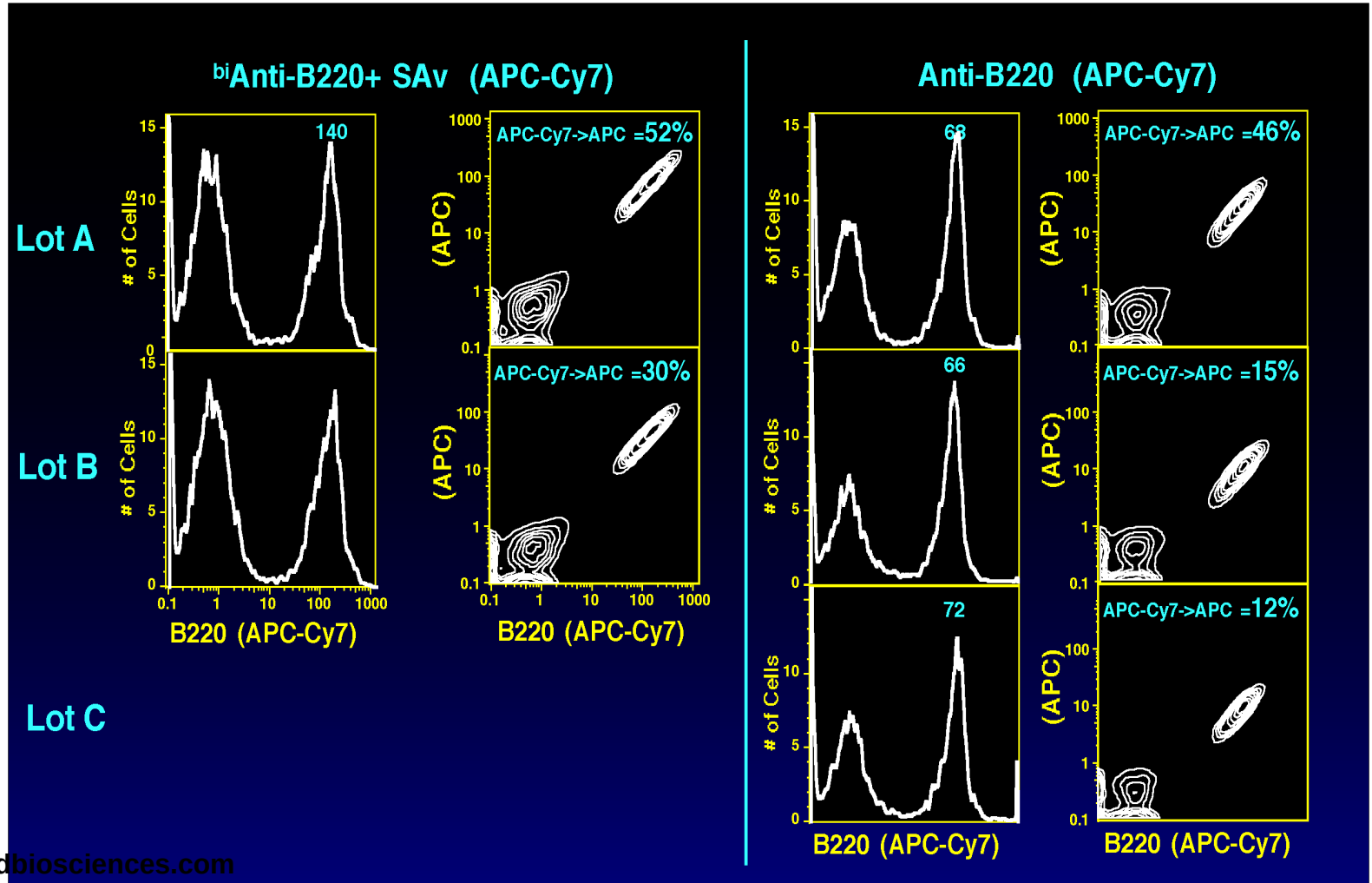
Small errors in compensation of a dim control (A) can result in large compensation errors with bright reagents (B & C).

Use bright markers to setup proper compensation.

Barwniki tandemowe



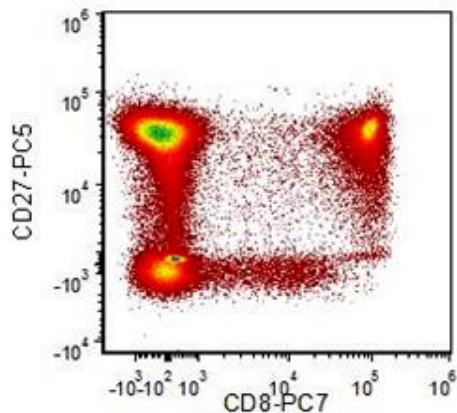
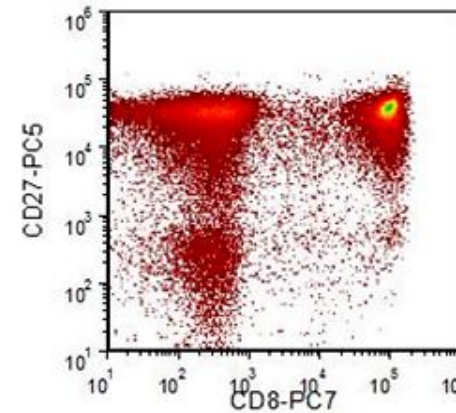
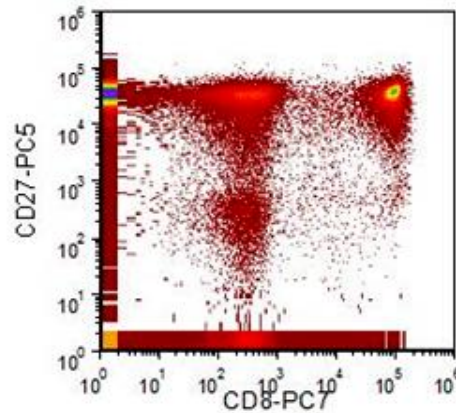
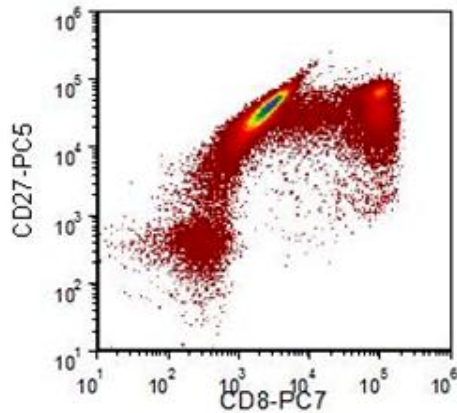
Kompensacja konjugatów tandemowych jest charakterystyczna dla serii



Barwniki tandemowe: stosowanie ze świadomością ograniczeń

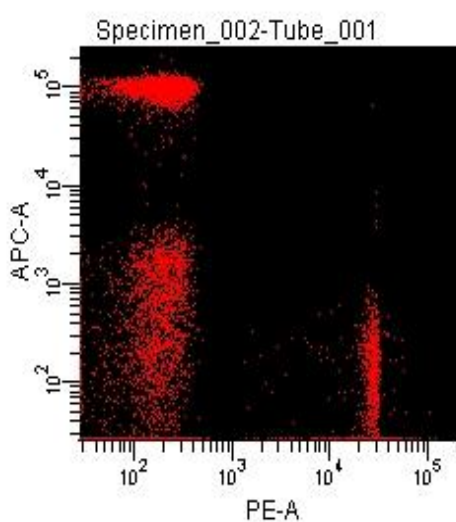
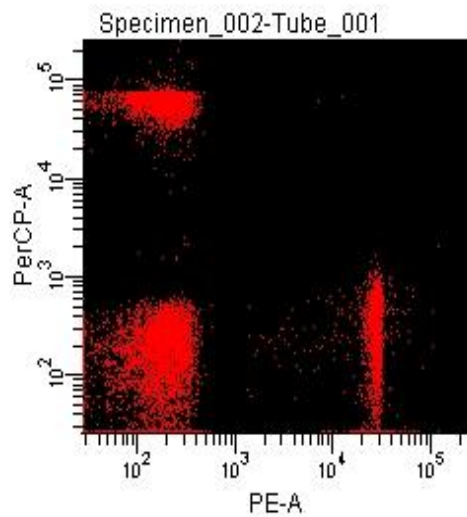
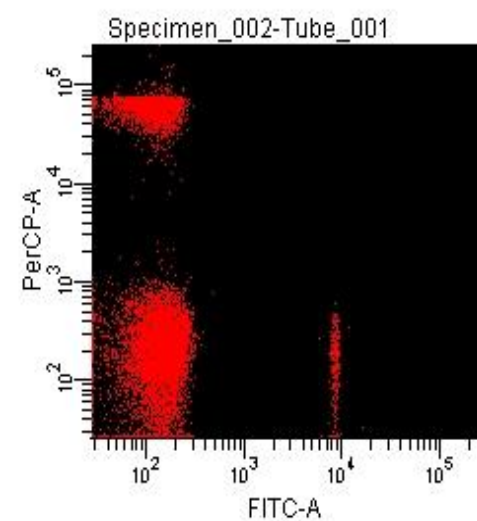
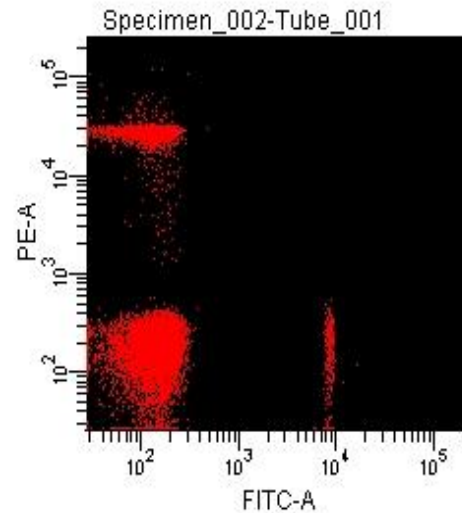
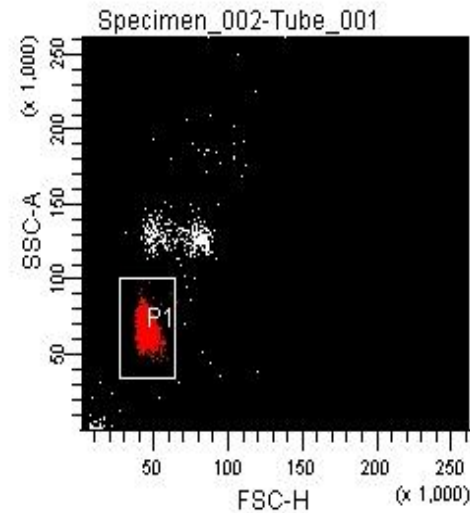
- **Kompensacja może ulegać zmianie zależnie od serii, eksperymentu nawet przy użyciu tego samego Ab**
- **Niektóre koniugaty (APC-Cy7, PE-Cy7) degradują przy ekspozycji na światło (unikaj światła), wysokiej temperaturze (przetrzymuj znakowane komórki w łaźni lodowej), utrwalaniu (analizuj komórki natychmiast po znakowaniu)**
- **Dodawaj Ab sprzężone z fluorochromem tandemowym do zawiesiny komórek, nie do pustej probówki.**

Obraz zależny od kompensacji i rodzaju skali

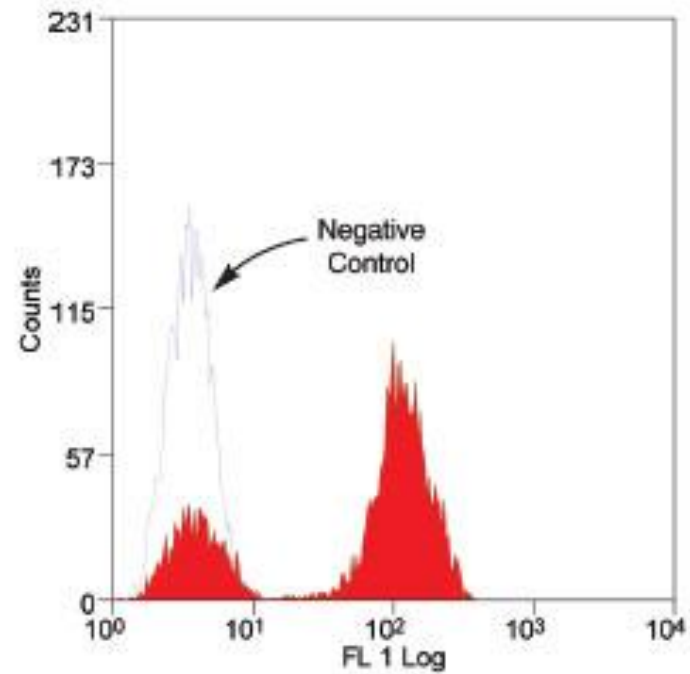
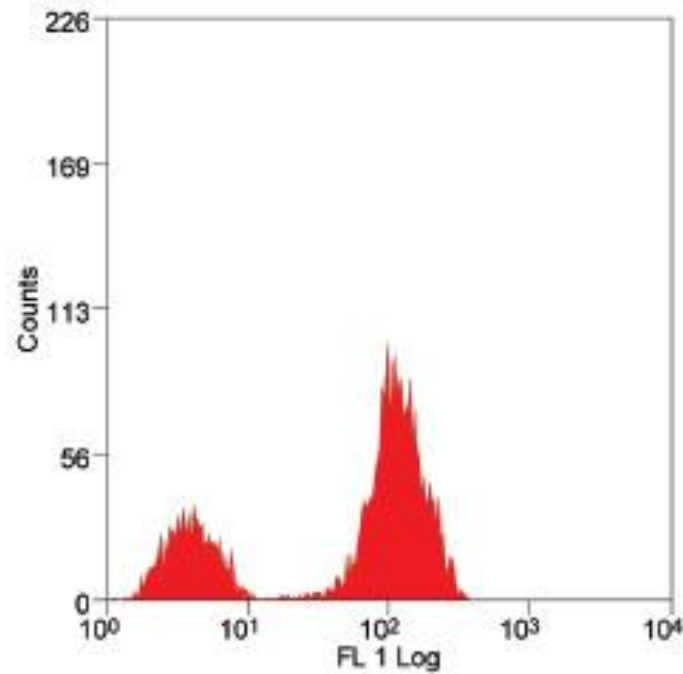


- A. Zła kompensacja – spektra emisji fluorochromów na siebie zachodzą**
- B. Prawidłowa kompensacja off-line**
- C. Prawidłowa kompensacja – jak B, ale inna skala osi**
- D. Prawidłowa kompensacja na skali bieksponecjnej**

Kompensacja przy użyciu kulek kalibracyjnych



Kontrola negatywna



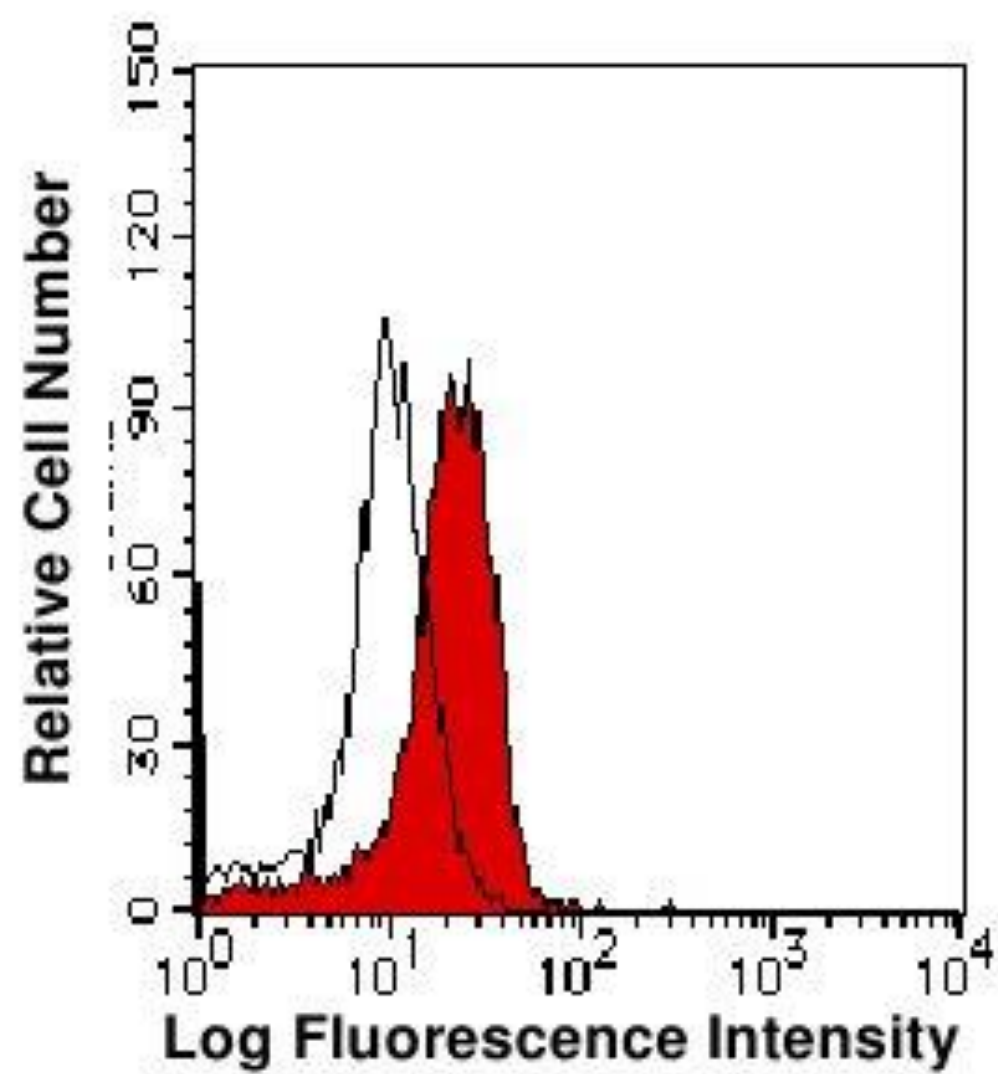
Kontrola izotypowa (kwestionowana przydatność)

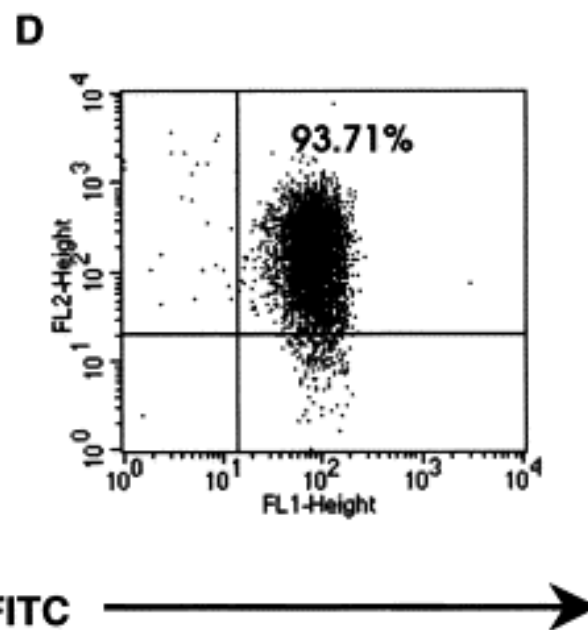
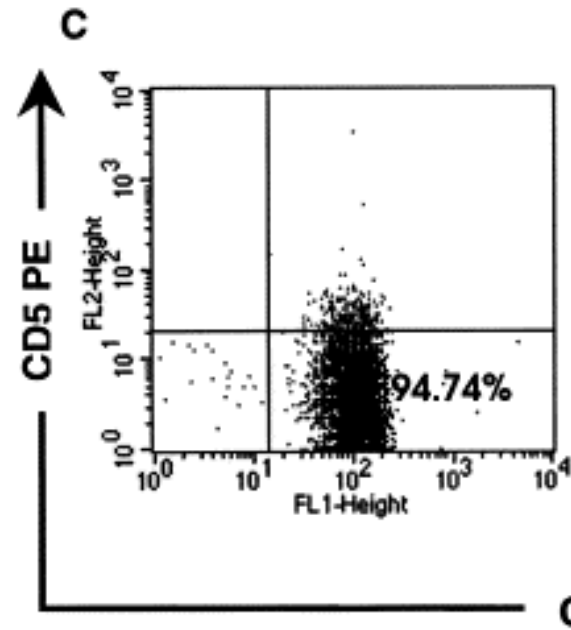
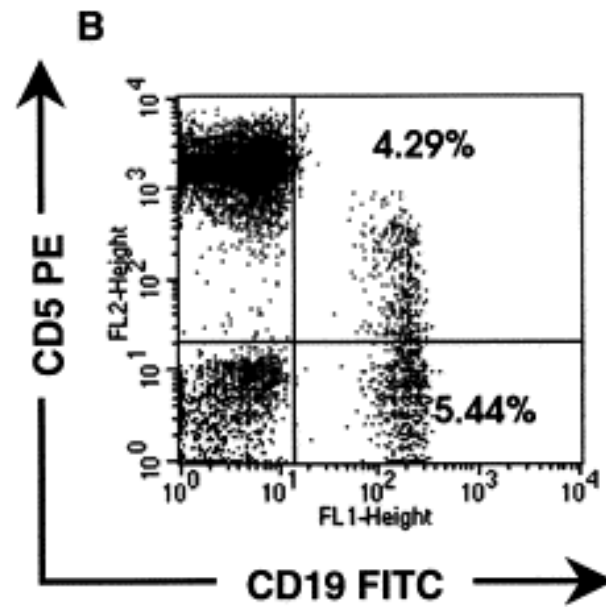
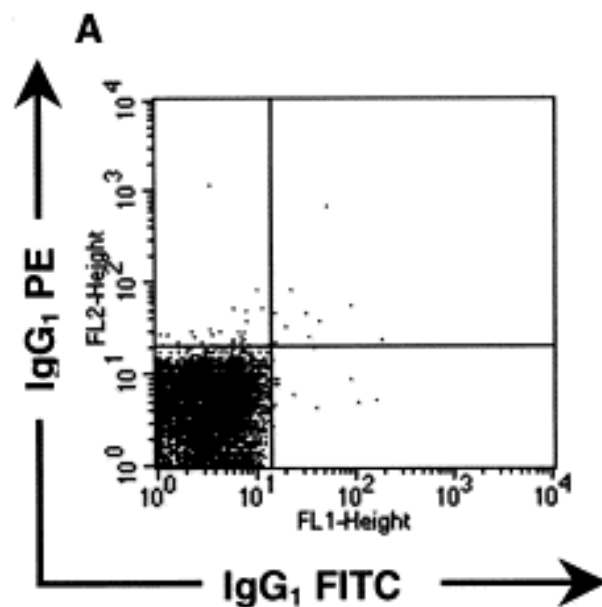
Czynniki wpływające na poziom fluorescencji przeciwciał swoistych:

1. Wiązanie przez receptory komórkowe (dla fragmentu Fc przeciwciał)
2. Nieswoiste interakcje białek z białkami, lipidami i węglowodanami
3. Autofluorescencja

Wybór właściwej kontroli izotypowej

1. Zidentyfikować izotyp przeciwciała użytego do znakowania specyficznego
2. Wybrać przeciwciało do kontroli izotypowej: gatunek (mysz, szczur, chomik, koza itp.), izotyp (IgG1, IgG2a, IgG2b...) i fluorochrom sprzężony z tym przeciwciałem
3. Zastosować takie stężenie p-ciała izotypowego jak specyficznego





Rekomendowane kontrole

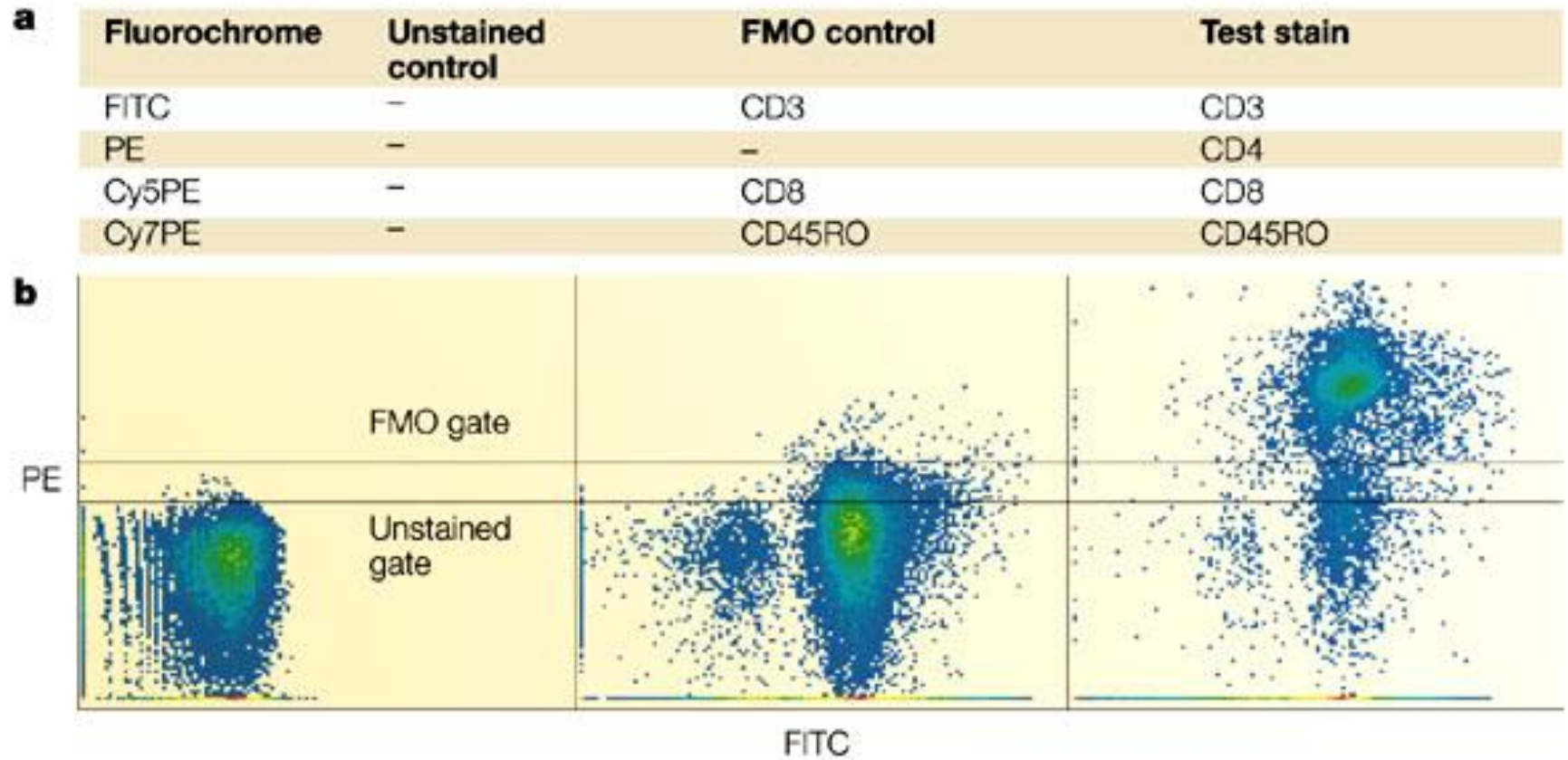
Control	Sample type	Primary Ab	Secondary	Reason
Cells only Use treated and untreated cells	Neg control cells	No	No	Negative Control/Background Autofluorescence control
Primary Ab control	Neg control cells	Yes	No	Check for non specific binding of primary
Treated primary Ab control	Treated cells	No	Yes	Check for non specific binding of secondary Ab on treated cells
Isotype control	Neg control cells	Use Isotype control antibody. This should be the same antibody isotype as primary antibody *	Yes	To confirm that the primary antibody binding is specific and not a results of non-specific Fc receptor binding or other protein interactions.
Compensation controls for each fluorochrome	Positive population of labeled beads or positive control cell sample	Yes	Yes	Positive control to set up cytometer alignment and to remove spectral overlap.
Cell viability control	Cell sample (identical to other samples) stained with both antibody and PI nuclear stain	Yes	Yes	Non-viable cells can be discriminated from live cells on the basis of light scatter (FSC=forward scatter). This discrimination is often lost in fixed or permeabilized cells. In these cases dead cells can be distinguished from live cells by their uptake of fluorescent DNA dyes due to loss of membrane integrity e.g. PI (propidium iodide) is used for dead-cell discrimination in unfixed and non permeabilized cells. 7-AAD (7-aminoactinomycin D, fluorescent) + AD (actinomycin D, nonfluorescent) for fixed or permeabilized cells.
Specificity control	Cell samples	Yes. With excess non-labeled primary.	For direct staining only	Add excess unlabelled primary antibody with normal amount of labeled primary. If staining is specific, the non-labeled primary should compete with labeled primary and reduce the fluorescence observed.
Treated secondary Ab control	Treated cells	No	Yes	Check for non-specific binding of secondary Ab on treated cells

*Isotype controls can also be raised against an antigen known not to be present in the sample, eg KLH.

Rekomendowane kontrole:

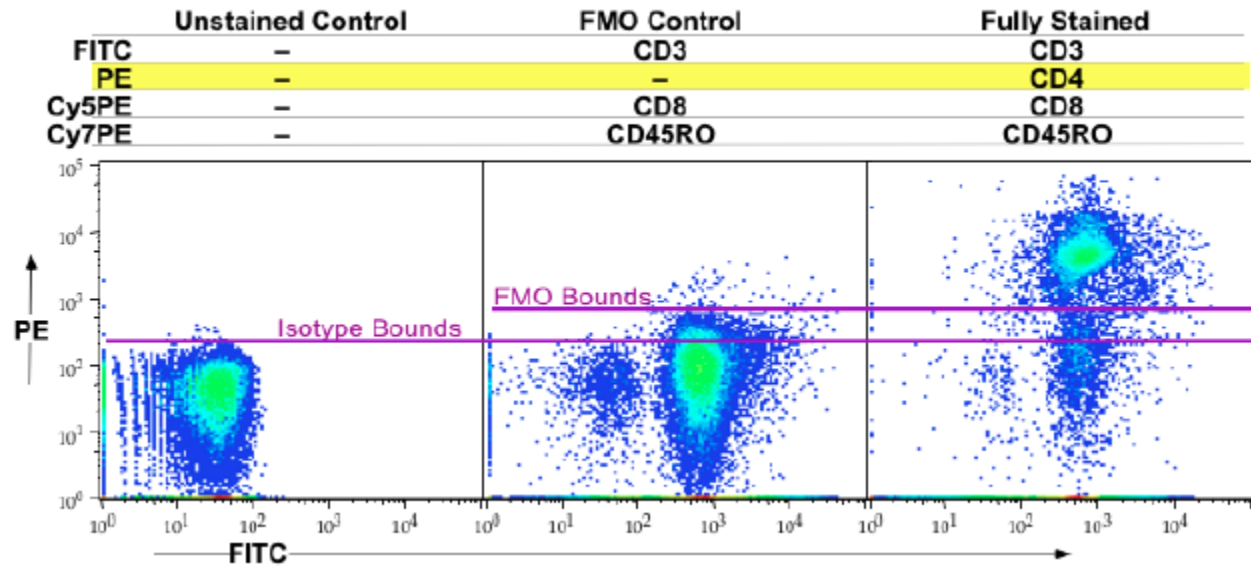
- ✓ **Kontrola negatywna**
- ✓ **Komórki znakowane pojedynczymi fluorochromami**
- ✓ **Kontrola żywotności**
- ✓ **FMO (Fluorescence Minus One)**

Fluorescence Minus One (FMO)

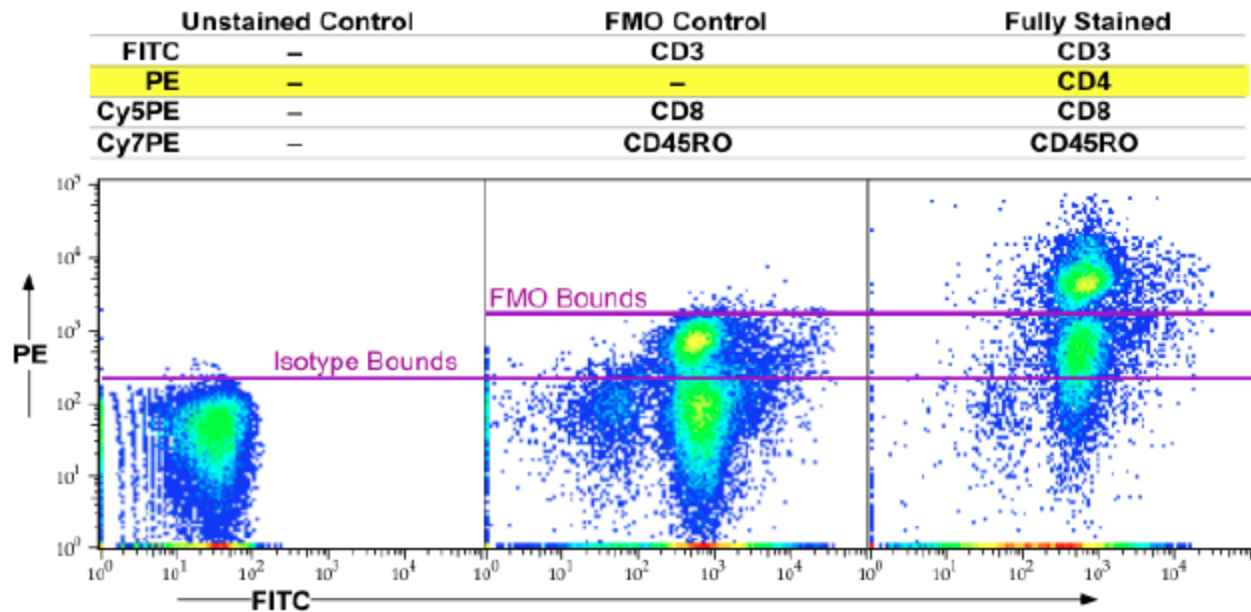


Fluorescence Minus One (FMO)

A



B



Fluorescence Minus One (FMO)

Tube #	Description	FL1	FL2	FL3
1	<i>Experimental Sample</i>	CD3 FITC	CD4 PE	CD8 Cy5PE
2	<i>Compensation Controls</i> (Single stains – one for each fluorochrome used in the experiment)	CD3 FITC	-	-
3		-	CD4 PE	-
4		-	-	CD8 Cy5PE
5	<i>Gating Controls</i> (FMO – leave out one fluorochrome at a time)	-*	CD4 PE	CD8 Cy5PE
6		CD3 FITC	-	CD8 Cy5PE
7		CD3 FITC	CD4 PE	-
8	<i>Experimental Controls</i> (fully stain healthy or untreated samples to compare to experimental sample)	CD3 FITC	CD4 PE	CD8 Cy5PE
9		CD3 FITC	CD4 PE	CD8 Cy5PE
10		CD3 FITC	CD4 PE	CD8 Cy5PE

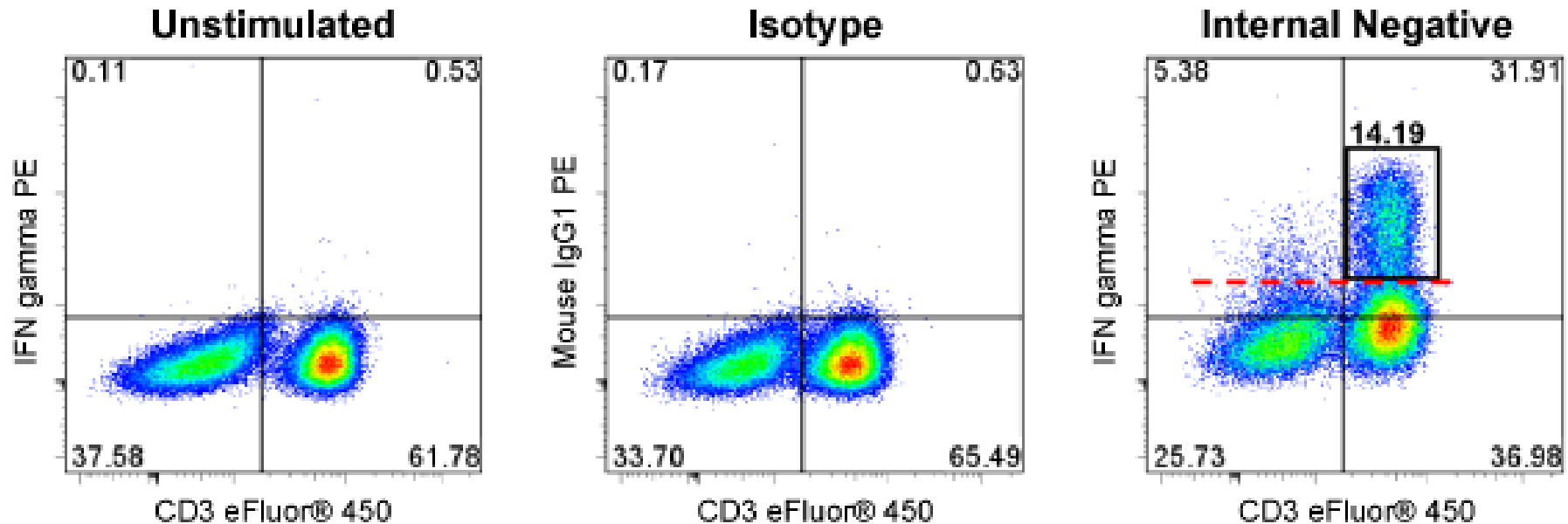
* no stain added or add isotype matched control stain.

3 ważne decyzje przy znakowaniu markerów wewnątrzkomórkowych

- 1. Wybór buforu do permeabilizacji (antygeny cytoplazmatyczne, antygeny jądrowe)**
- 2. Wybór kontroli negatywnych**
- 3. Miareczkowanie przeciwciał przeciwko markerom wewnątrzkomórkowym (zbyt duże stężenie p-ciał nasila tło fluorescencji i utrudnia wyróżnienie populacji komórek pozytywnych)**

Wybór kontroli negatywnych

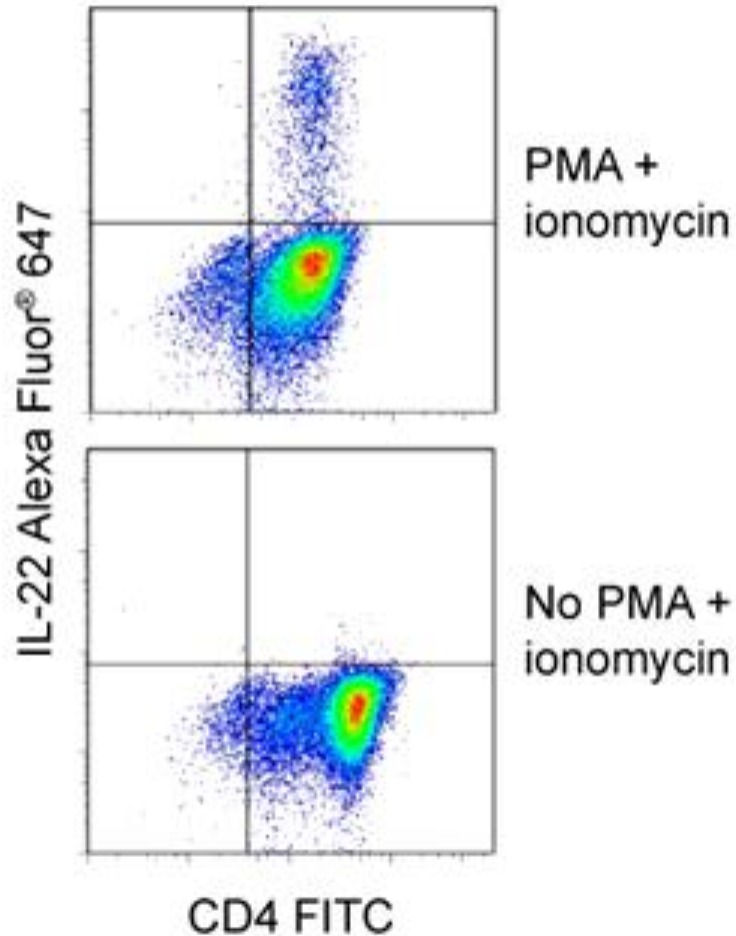
Figure 2



Komórki niestymulowane jako kontrola negatywna
Internal negative – komórki negatywne pod względem
badanego markera nawet w warunkach stymulacji.

Niestymulowana vs stymulowana

Figure 1



Właściwe kontrole - podsumowanie

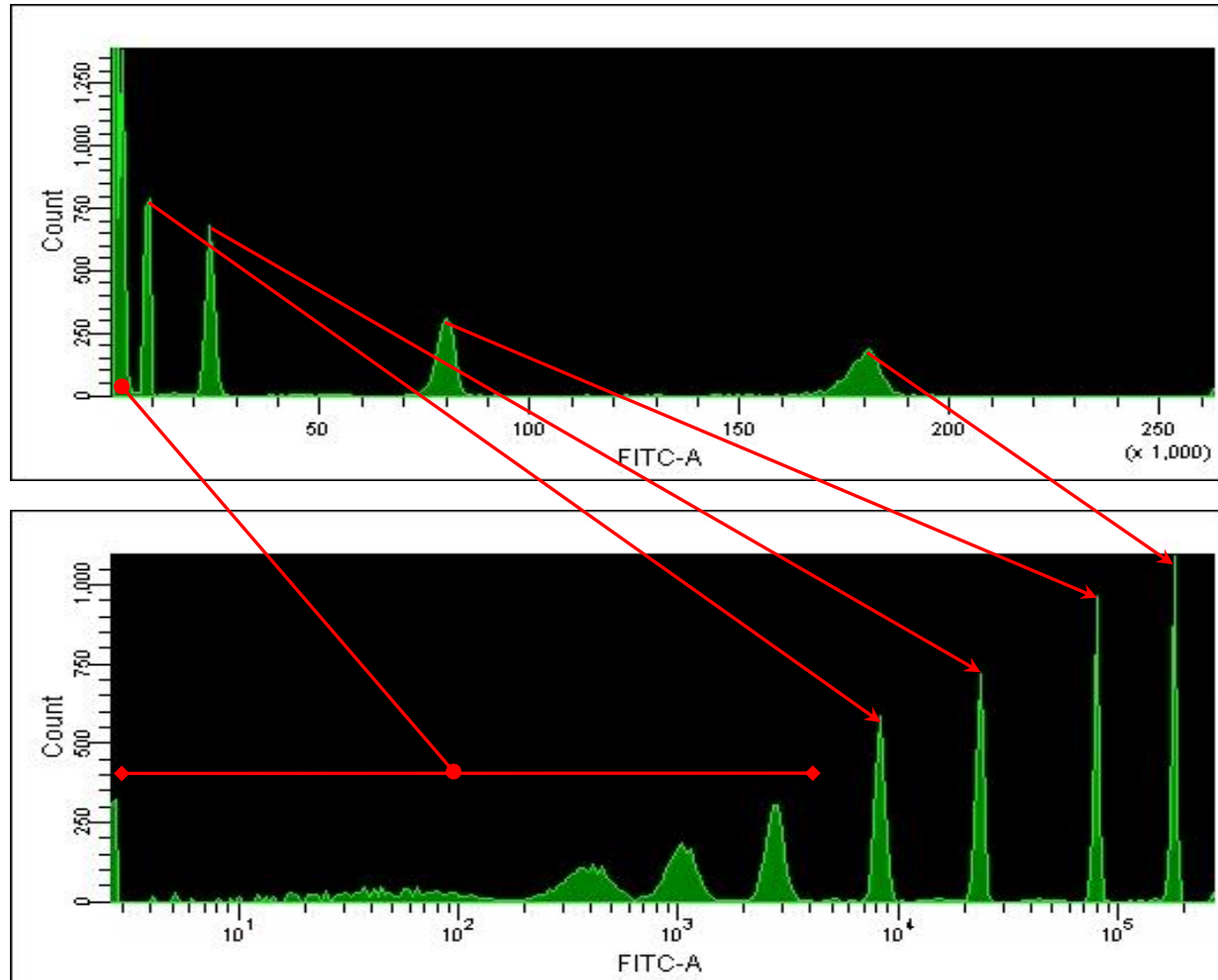
What	Why
Instrument setup controls • CS&T beads • CompBeads • Unstained and single color stained cells	Ensure consistent setup and compensation
Gating controls • FMO • Unstained / Isotype control • Live / Dead stains	Obtain reliable gates for problematic markers
Biological controls • Unstimulated samples • Healthy donors	Make appropriate biological comparisons and conclusions

Obrazowanie danych i analiza

Obrazowanie wyników

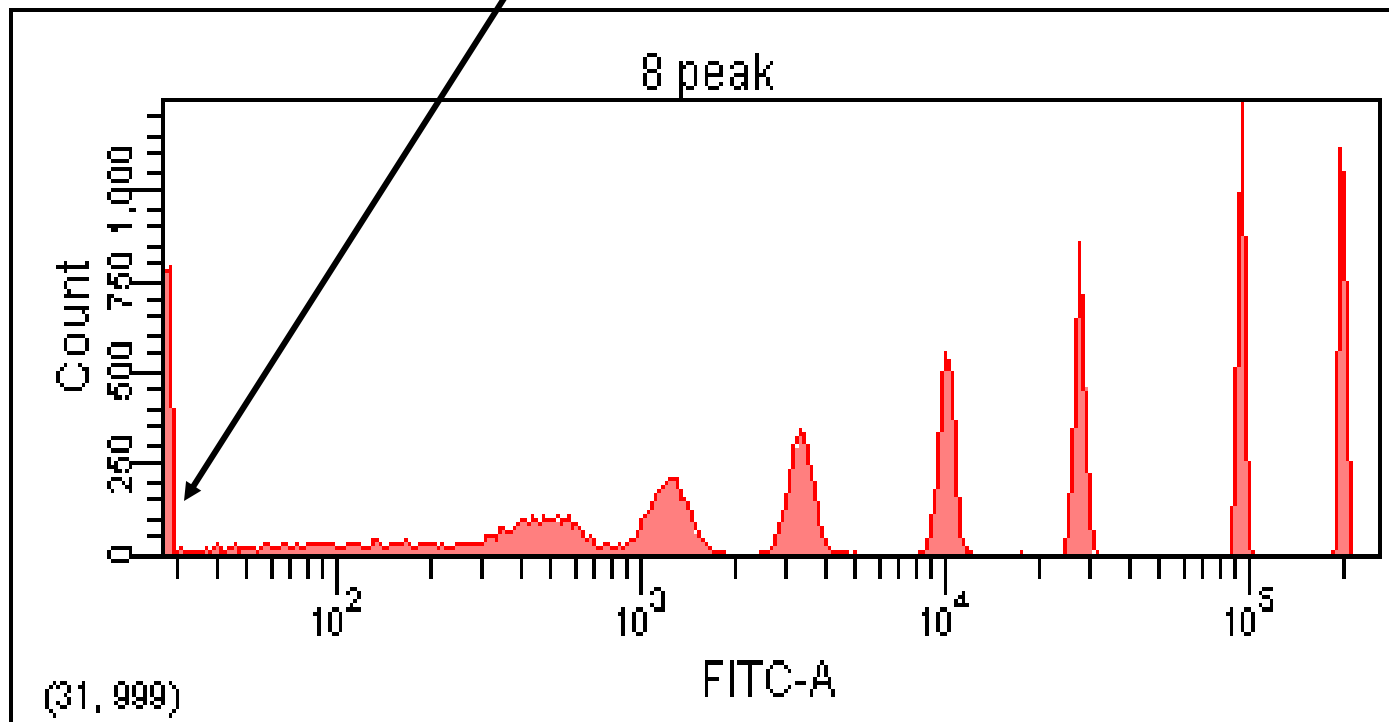
- Linear Scaling
- Log Scaling
- Biexponential Scaling

Skala liniowa vs. log



Wartości negatywne

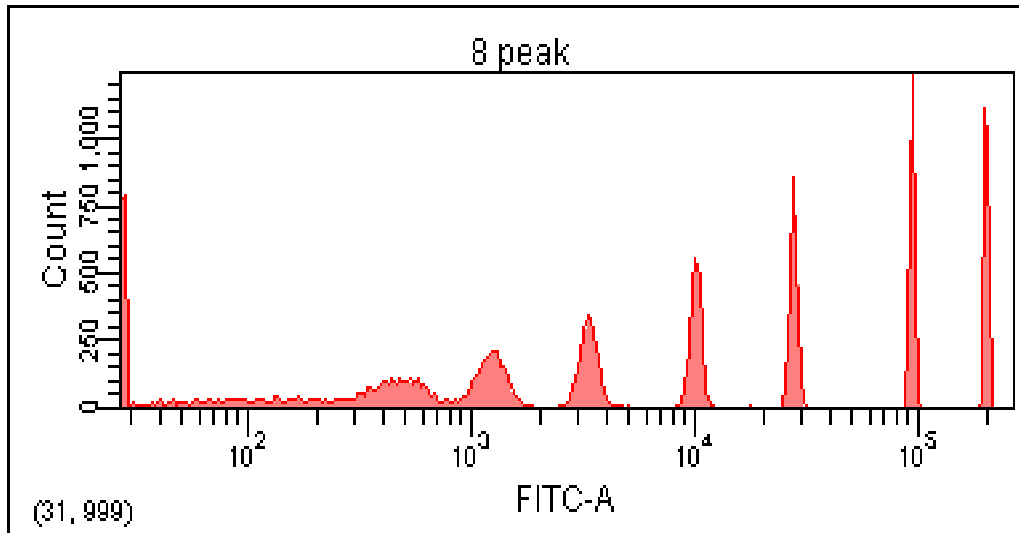
Wynik poza skalą



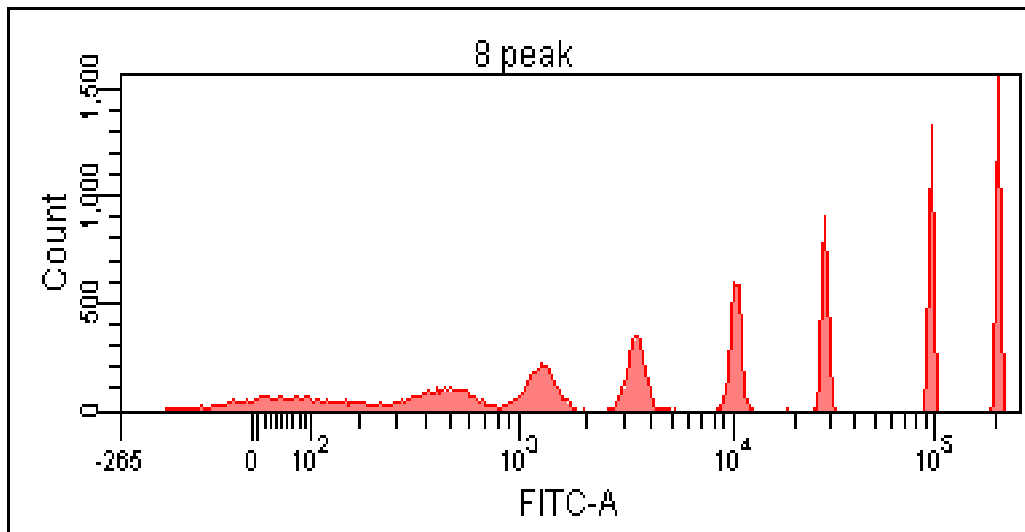
Skala biekspONENTJALNA

- Połączenie skali logarytmicznej i liniowej
- Umożliwia wyróżnienie elementów/komórek na granicy detekcji fluorescencji
- Umożliwia rozróżnienie populacji rozproszonej, słabo wyznakowanej lub o bardzo słabej ekspresji markera

Log vs. Biexponential Scaling



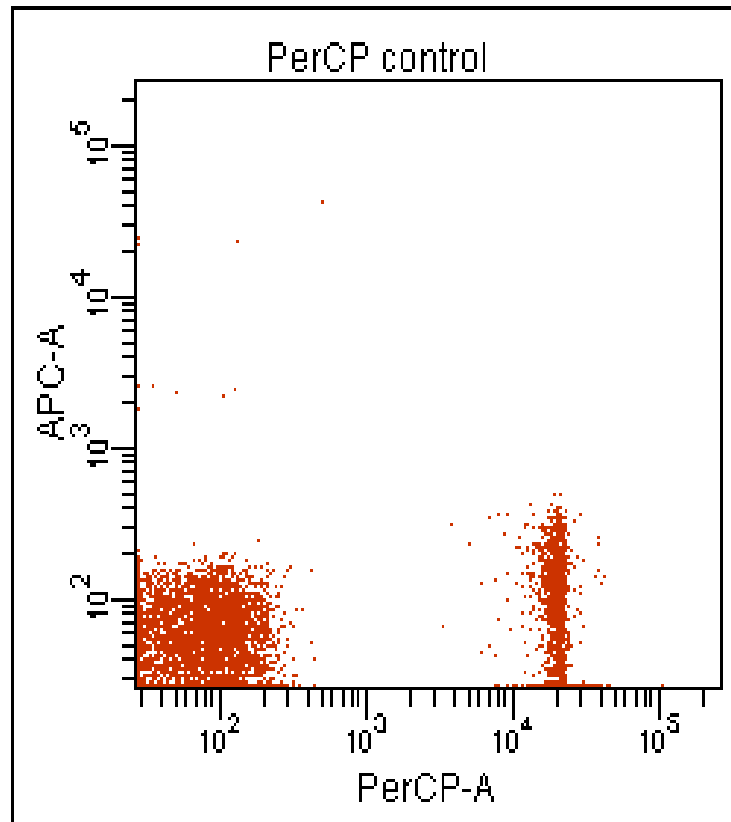
log scaling



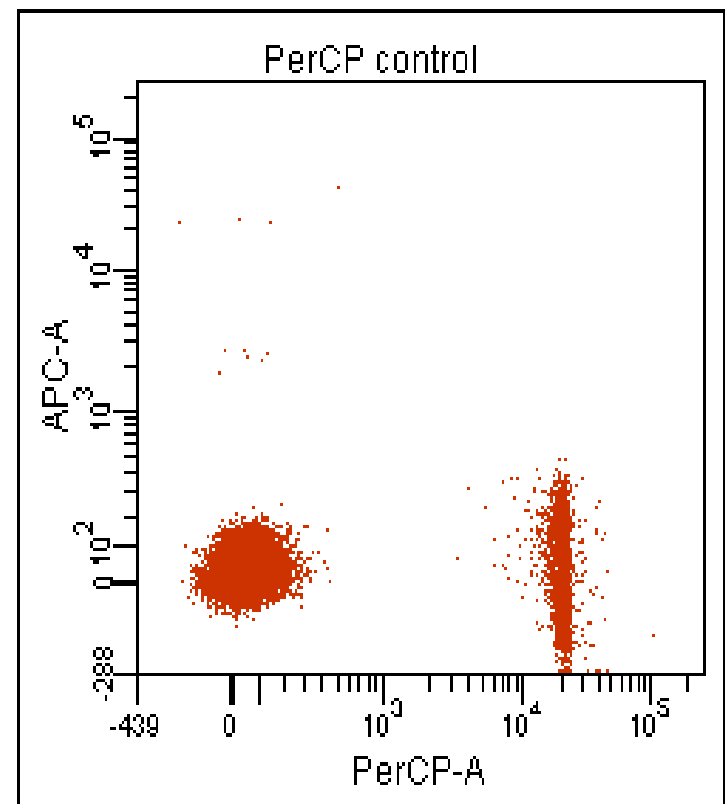
biexponential scaling

Log vs. Biexponential Scaling

log scaling

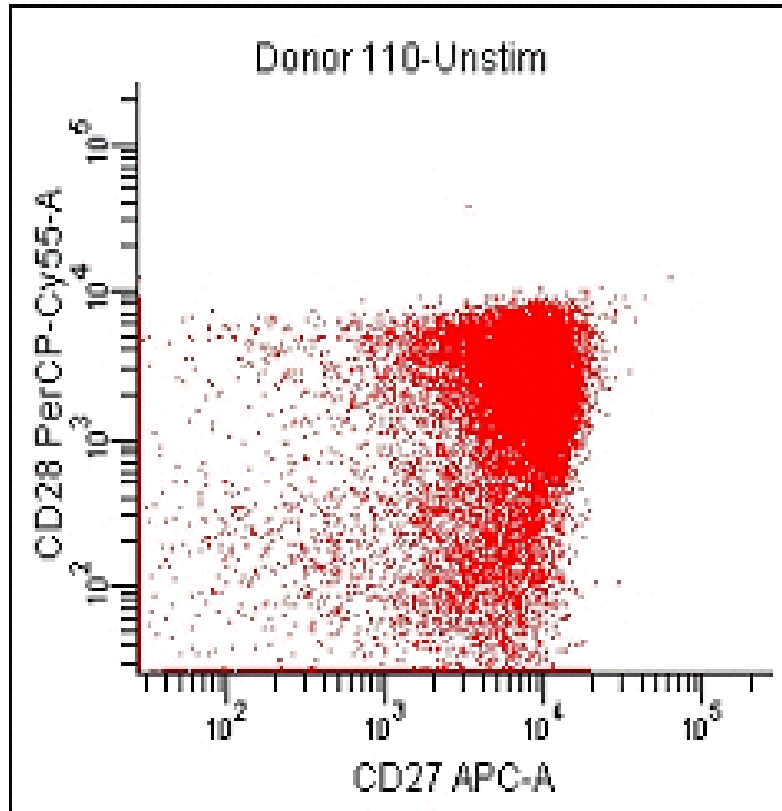


biexponential scaling

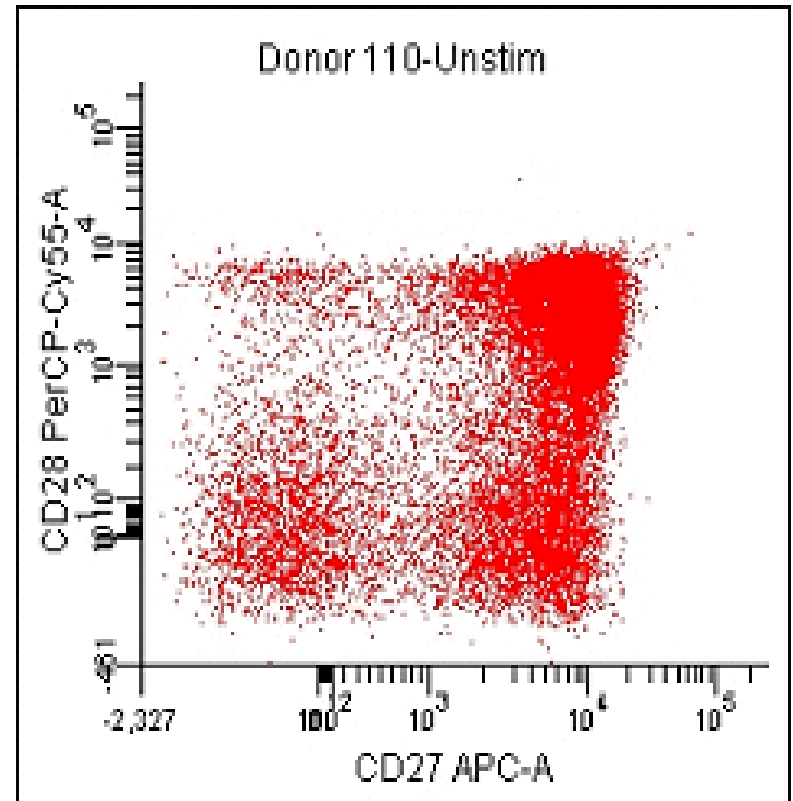


Log vs. Biexponential Scaling

log scaling

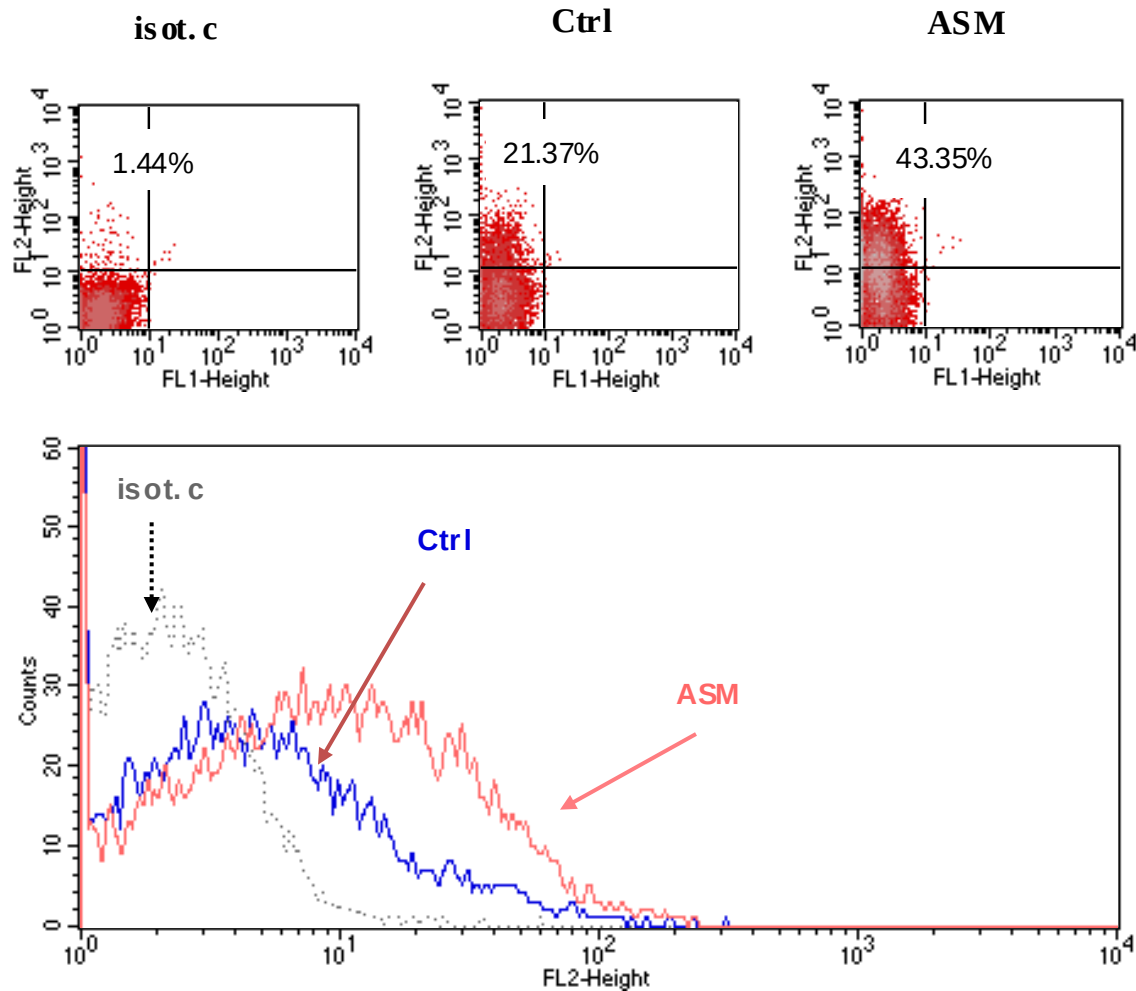


biexponential scaling



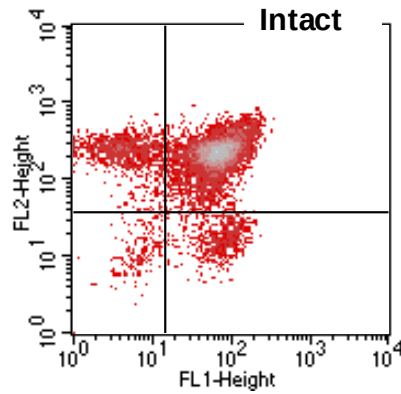
Analiza 1-; 2- i wieloparametrowa

Analiza 1 parametrowa

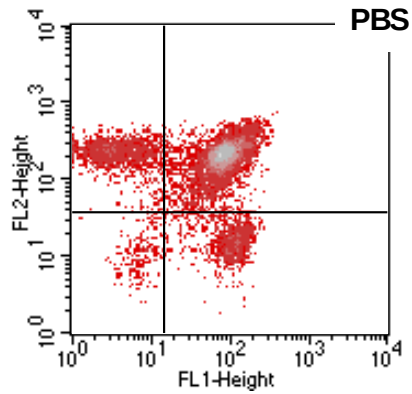


CD127

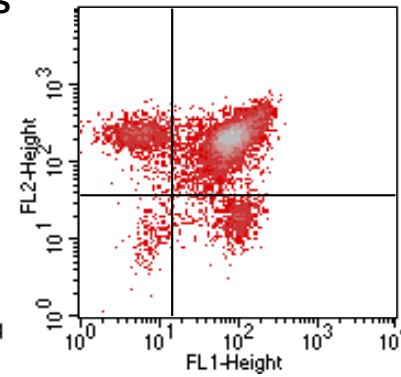
Analiza 2 parametrowa



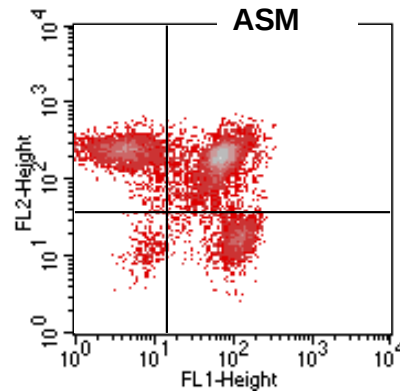
UL = 14.29%
UR = 78.02%
LL = 1.89%
LR = 5.80%



UL = 16.74%
UR = 70.10%
LL = 1.86%
LR = 11.30%



UL = 13.68%
UR = 76.24%
LL = 1.85%
LR = 8.23%

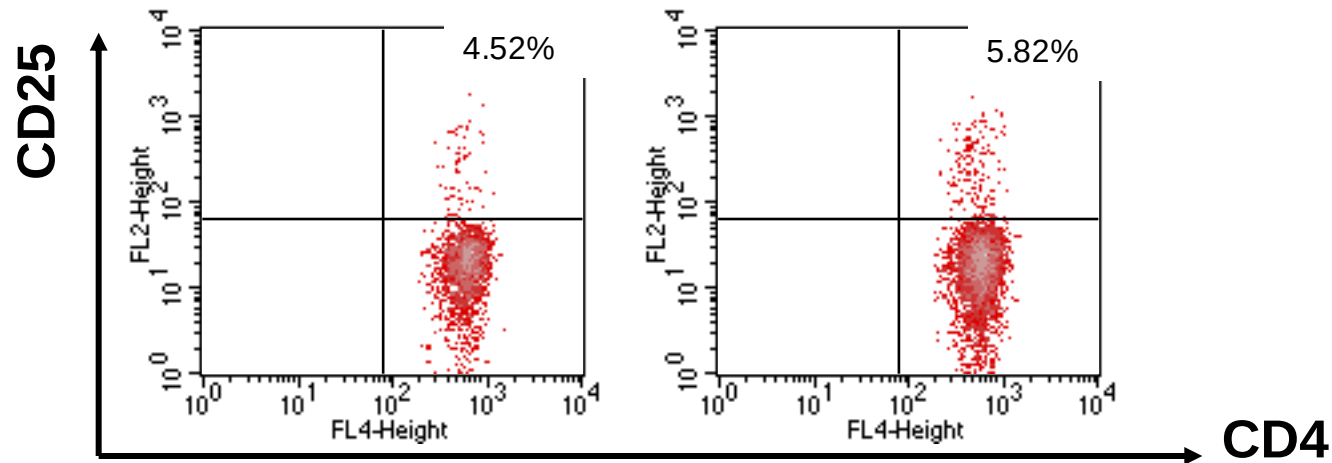
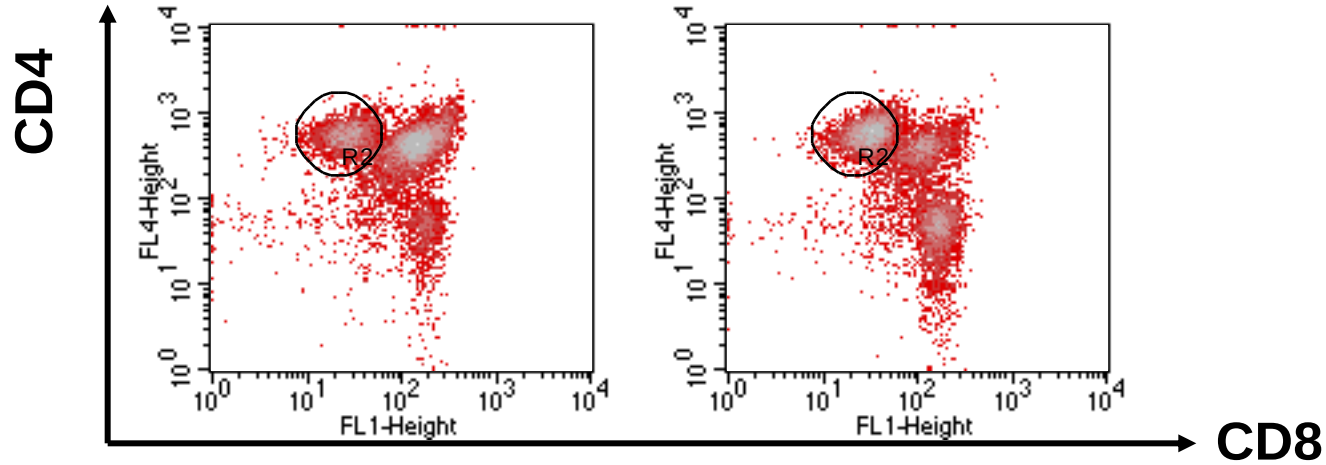


UL = 28.53%
UR = 53.90%
LL = 2.35%
LR = 15.22%

Analiza 3 parametrowa

Ctrl

ASM

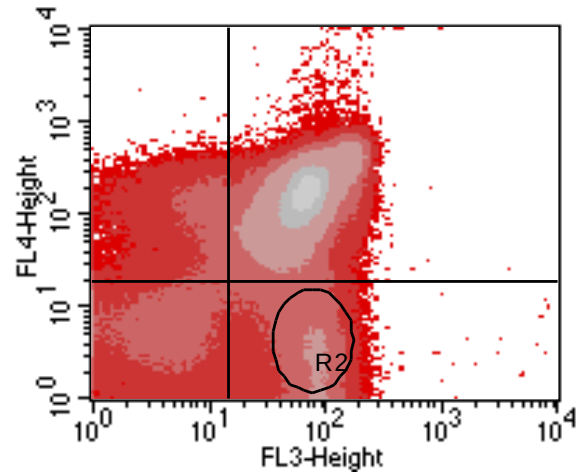
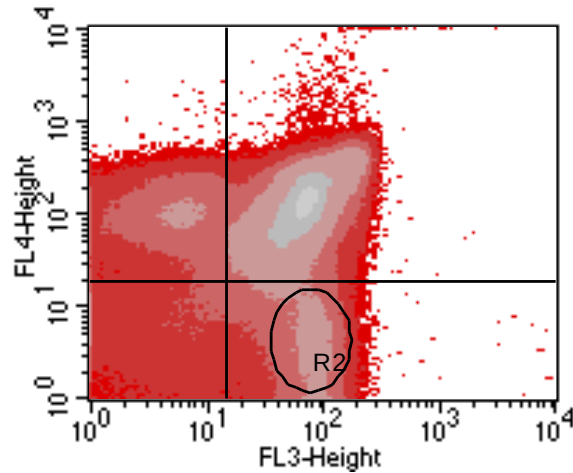


Analiza 3 parametrowa...i więcej

A Young

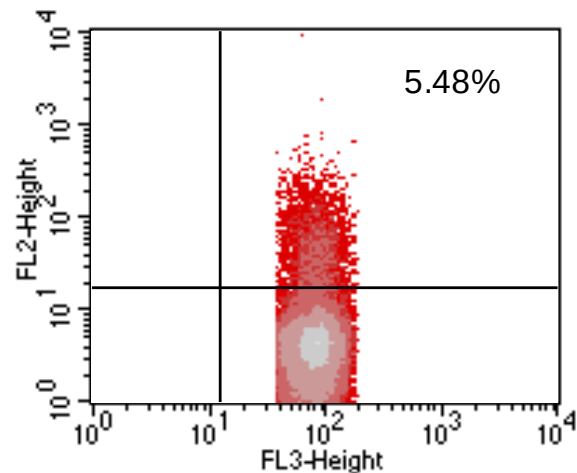
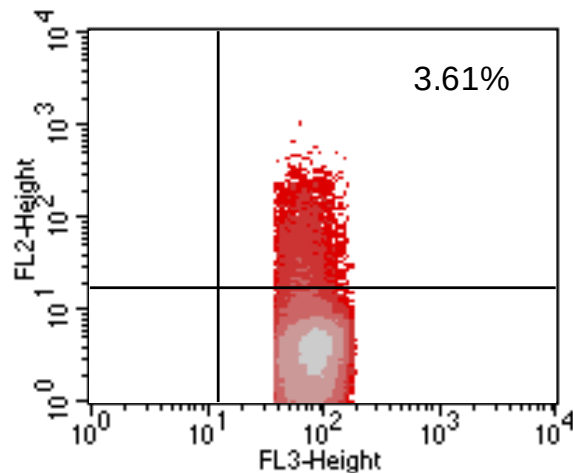
B Old

CD8



CD4

CD25



CD4

BD Horizon Brilliant UV reagents: barwniki polimerowe

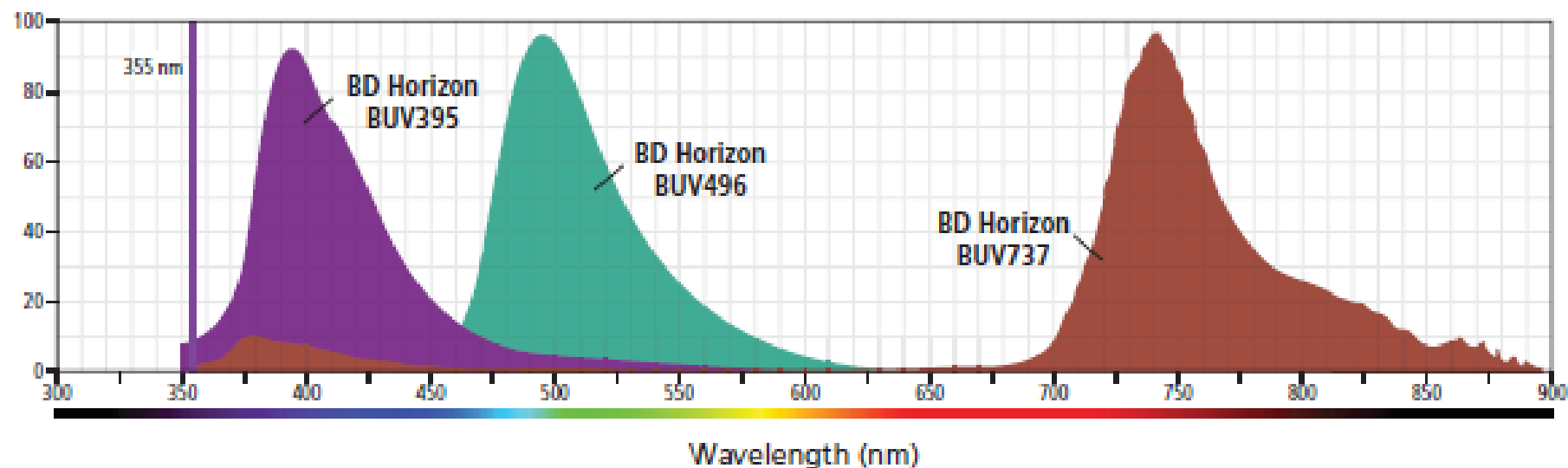
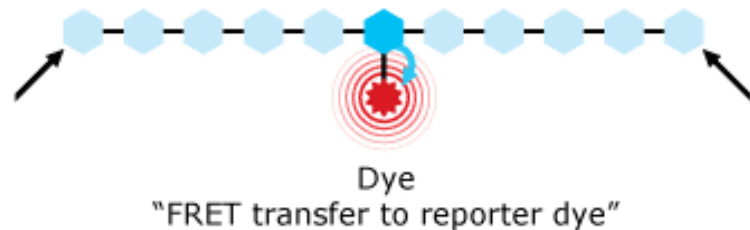
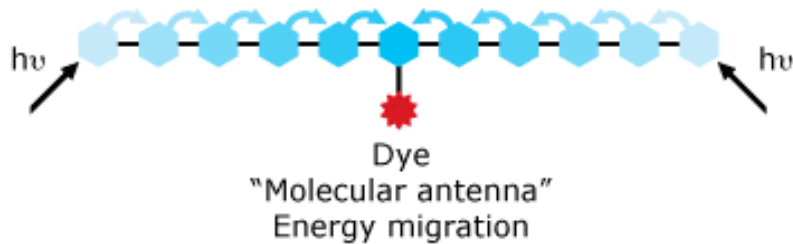
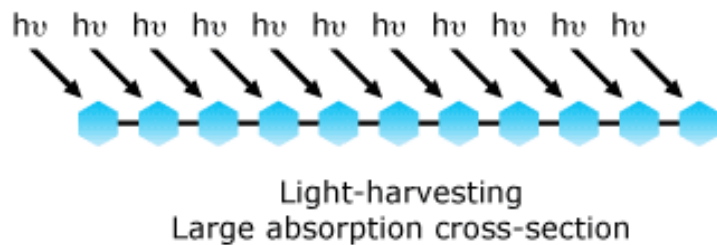
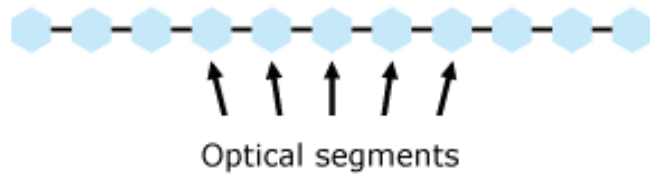


Figure 1. Excitation and emission profiles of BUV395, BUV496, and BUV737. Recommended optics include: BUV395: 379/28 BP; BUV496: 515/30 BP with a 450 LP; BUV737: 740/35 BP with a 690 LP.

Barwniki polimerowe



Porównanie SI

	Stain Index	
Specificity	BUV395	FITC
Human CD4	43	38
Human CD19	25	20
Human CD56	21	10

Specificity	BUV496	FITC
Human CD4	73	38
Human CD19	43	20

Specificity	BUV737	FITC
Human CD4	145	38
Human CD19	69	20
Human CD127	13	5

Table 1. Stain index comparison of CD4, CD19, CD56, or CD127 stained with BUV395, BUV496, BUV737, or FITC reagents.

Relative stain index values are dependent on instrument configuration, including lasers, filters, and laser power.

Porównanie FI

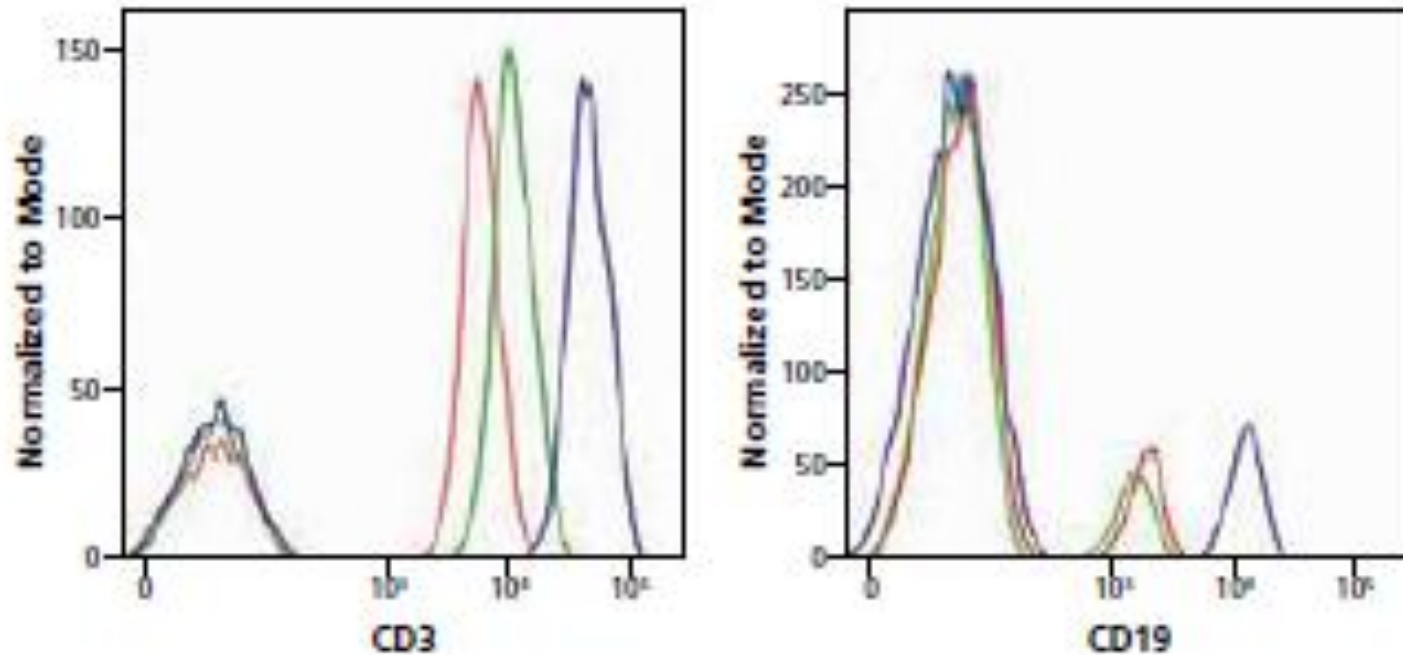


Figure 2. Lysed whole blood stained with Hu CD3 or CD19 FITC (red), BB515 (blue), or Alexa Fluor® 488 (green).

Data shown was gated on lymphocytes.

Porównanie FI: możemy zobaczyć więcej

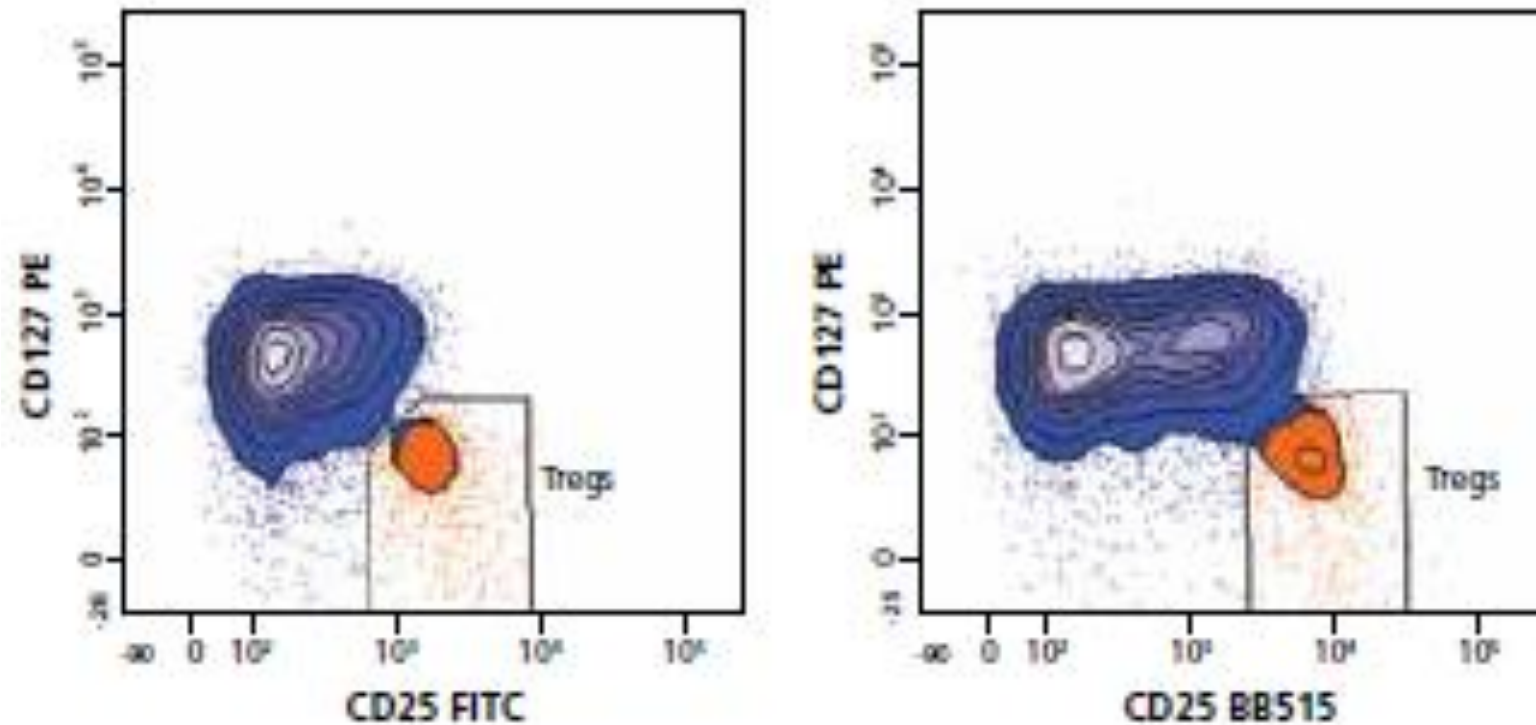


Figure 3. Whole blood was stained with Hu CD4 APC, CD127 PE, CD3 PerCP-Cy5.5, and CD25 FITC or CD25 BB515, and analyzed on a BD FACSVerse flow cytometer.

Data shown was gated on CD4⁺CD3⁺ lymphocytes.

Zwiększenie różnicy między próbą negatywną i znakowaną

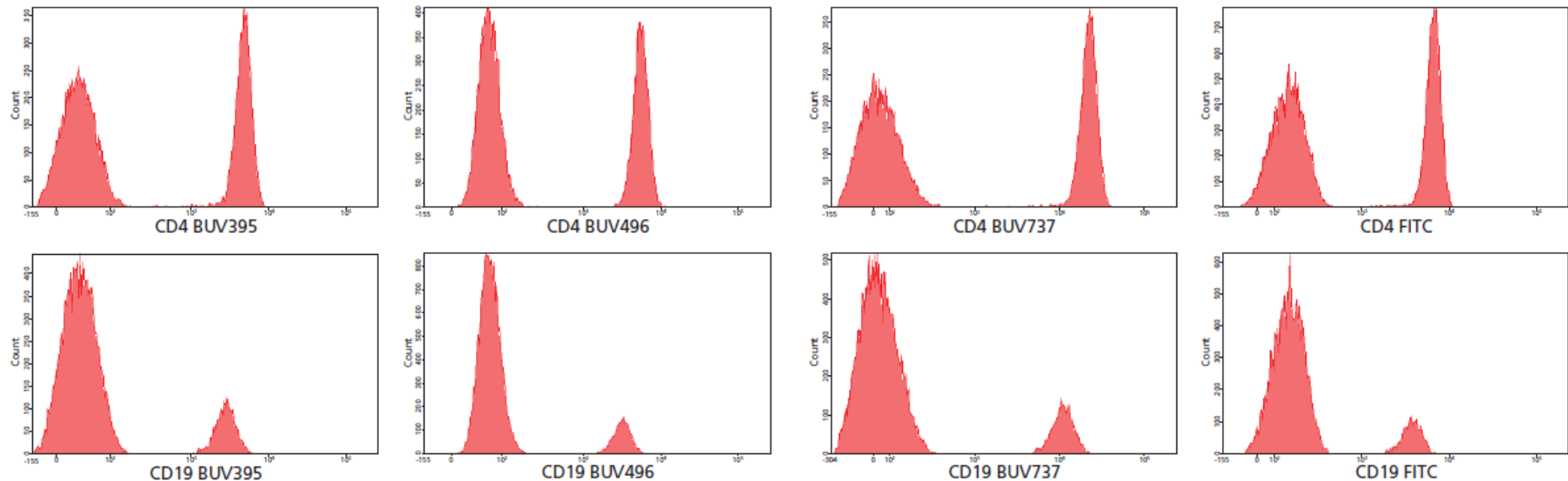


Figure 2. Lysed whole blood stained with CD4 or CD19 in BUV395, BUV496, BUV737, or FITC formats.

Data shown was gated on lymphocytes. BUV395, BUV496, and BUV737 were excited by a 355-nm laser and FITC was excited by a 488-nm laser.

Spillover

Laser		Spillover into other channels					
UV		BUV395	BUV496	BUV737			
	BUV395		21%	0%			
	BUV496	3%		1%			
	BUV737	2%	0%				
Violet		BV421	BV510	BV605	BV650	BV711	BV786
	BUV395	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	BUV496	1%	27%	5%	1%	0%	0%
	BUV737	0%	0%	0%	0%	4%	3%
Blue		FITC	PE	PE-CF594	PE-Cy™5	PerCP-Cy™5.5	PE-Cy™7
	BUV395	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	BUV496	4%	1%	0%	0%	0%	0%
	BUV737	0%	0%	0%	0%	2%	9%
Red					APC	Alexa Fluor® 700	APC-Cy7
	BUV395				0%	0%	0%
	BUV496				0%	0%	0%
	BUV737				1%	45%	11%

Table 2. BUV395, BUV496, and BUV737 spillover into other channels.

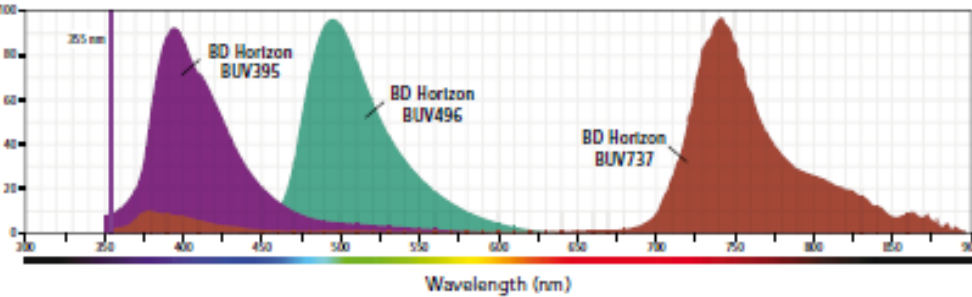
This table shows relative spillover values of the dyes, since spillover values obtained can vary depending on the filter used and PMT voltage. Yellow and red fill colors denote where there is more spectral overlap between dyes. The green fill color denotes a small degree of spectral overlap between dyes.

BD Horizon Brilliant violet reagents: barwniki polimerowe

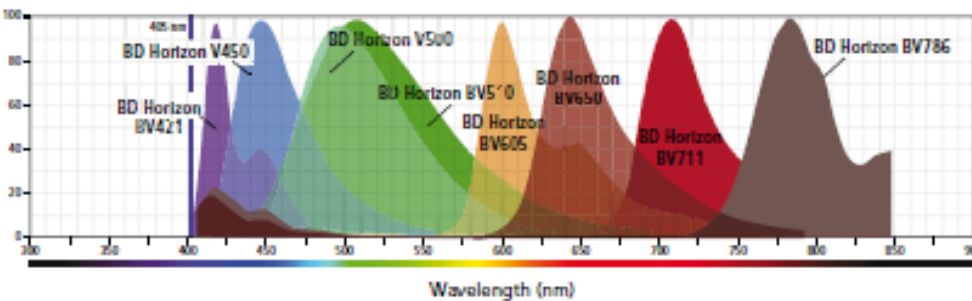
	Fluorochrome	Stain Index	Relative Brightness
	BV421	747	
	BV650	472	
	BV711	407	
	BV786	338	
	BV605	241	
	PE	231	
	BV510	143	
	FITC	39	

Barwniki polimerowe vs konwencjonalne

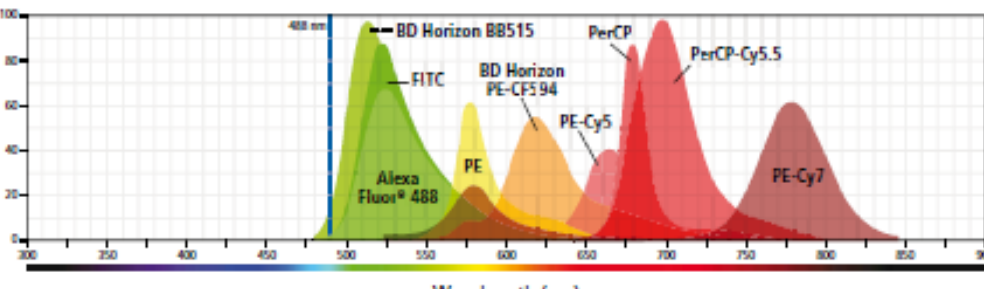
Laser UV 355 nm



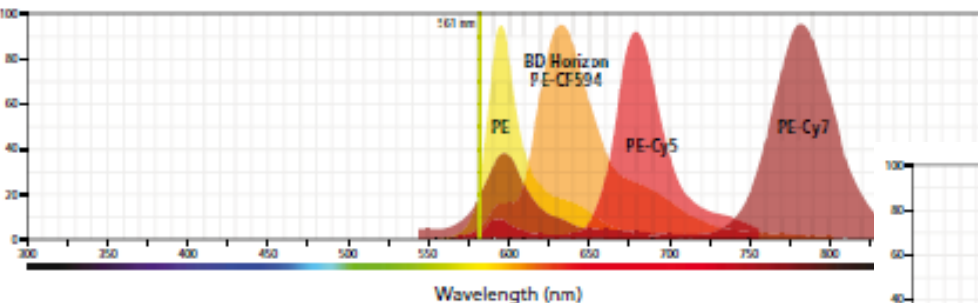
Laser fioletowy 405 nm



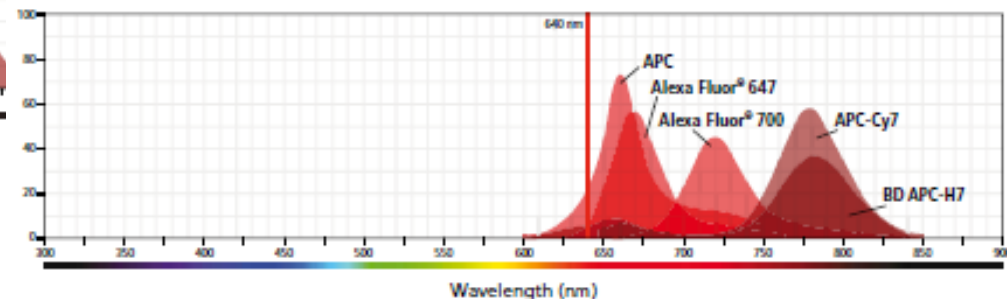
Laser niebieski 488 nm



Laser żółtozielony 561 nm

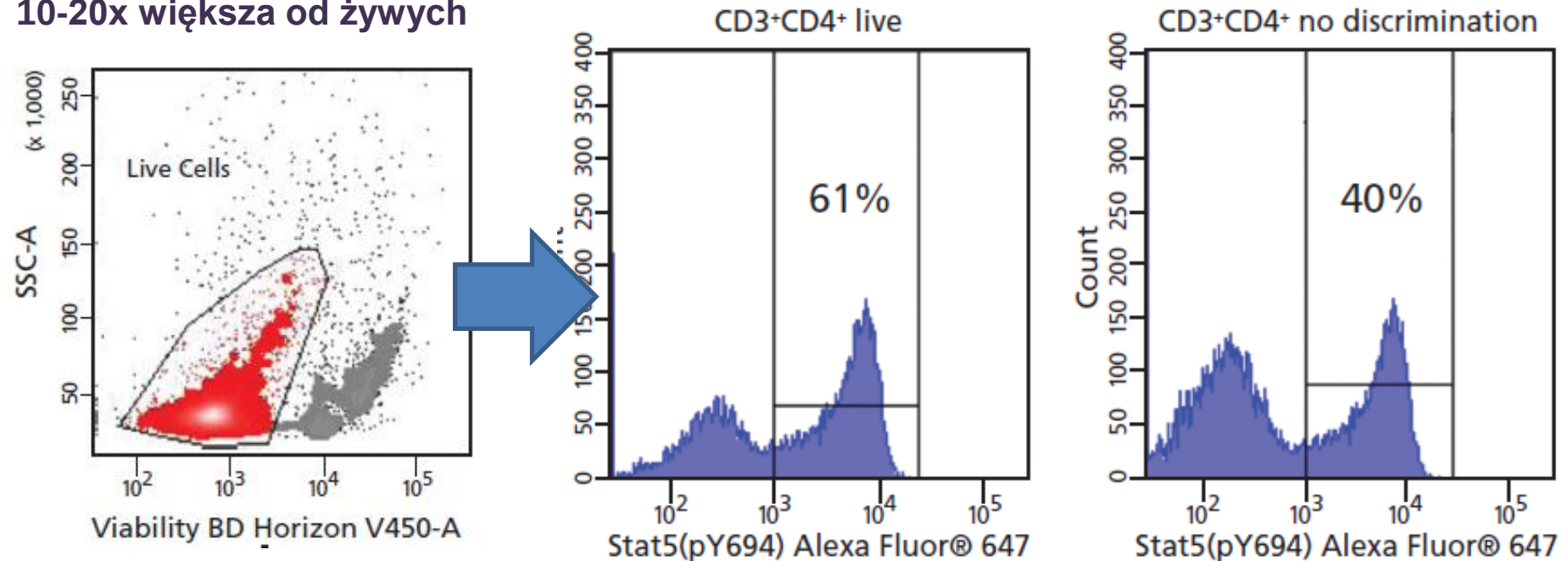


Laser czerwony 640 nm



BD Horizon fixable viability stain (FVS) reagents

**Martwe – intensywność świecenia
10-20x większa od żywych**



FVS450, FVS510 – laser fioletowy

FVS520 - laser niebieski

FVS570 – laser żółtozielony i niebieski

FVS660, FVS700 – laser czerwony

FACSCelesta



5 laserów:
niebieski 488 nm
fioletowy 405 nm

czerwony 640 nm
UV 355 nm
żółtozielony 561nm

14 parametrowy

FACSCelesta – możliwości barwień

Blue/Violet

Laser	Fluorochromes
405 nm	BD Horizon™ BV421, V450, Pacific Blue
	BD Horizon™ BV510, V500
	BD Horizon™ BV605
	BD Horizon™ BV650
	BD Horizon™ BV711
	BD Horizon™ BV786
488 nm	BD Horizon™ BB515, FITC, Alexa Fluor® 488
	PE
	BD Horizon™ PE-CF594, PI
	PerCP, PerCP-Cy™5.5, 7-AAD

Blue/Violet/UV

Laser	Fluorochromes
405 nm	BD Horizon BV421, V450, Pacific Blue
	BD Horizon BV510, V500
	BD Horizon BV605
	BD Horizon BV650
	BD Horizon BV711
	BD Horizon BV786
488 nm	BD Horizon BB515, FITC, Alexa Fluor® 488
	PE
	BD Horizon PE-CF594, PI
	PerCP, PerCP-Cy5.5, 7-AAD
355 nm	BD Horizon BUV395
	BD Horizon BUV737

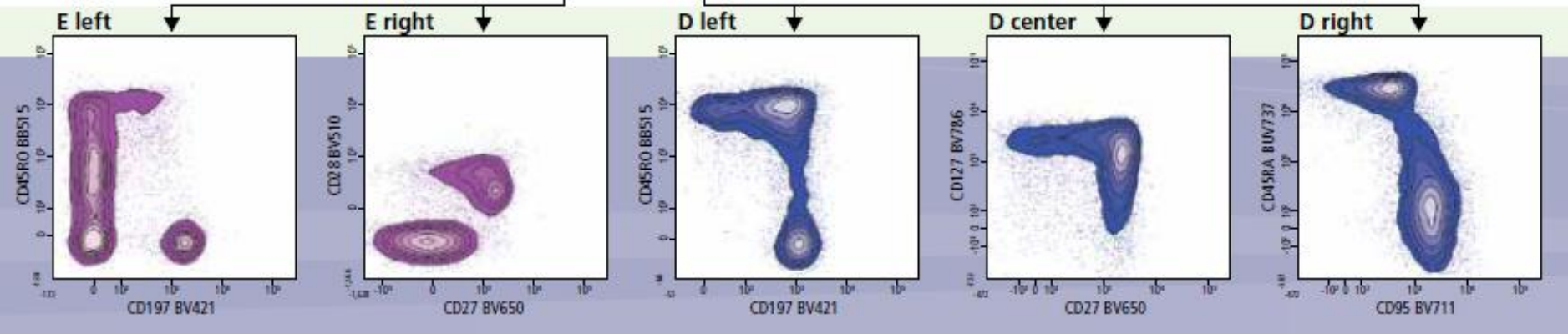
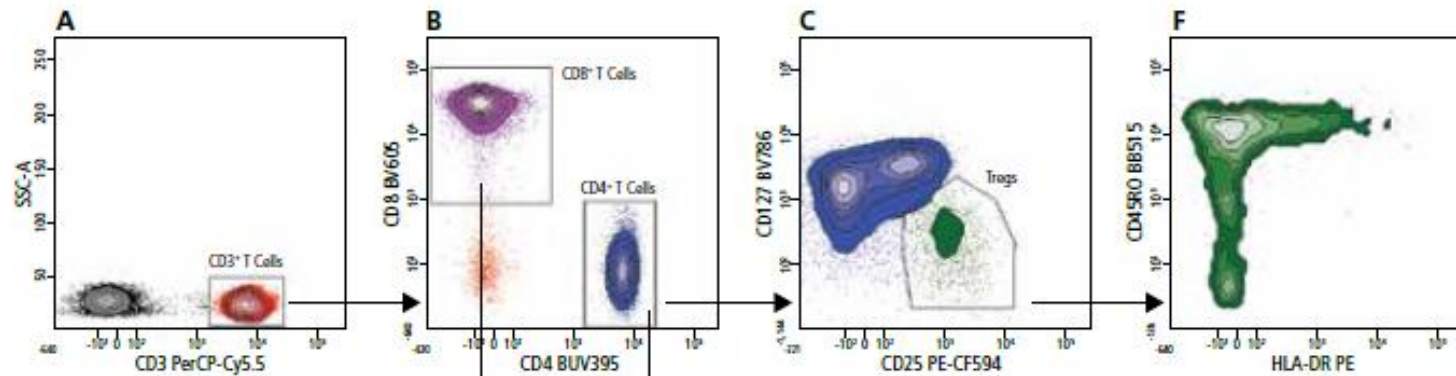
Blue/Violet/Yellow-Green

Laser	Fluorochromes
405 nm	BD Horizon BV421, V450, Pacific Blue
	BD Horizon BV510, V500
	BD Horizon BV605
	BD Horizon BV650
	BD Horizon BV711
	BD Horizon BV786
488 nm	BD Horizon BB515, FITC, Alexa Fluor® 488
	PerCP, PerCP-Cy5.5, 7-AAD
561 nm	PE
	BD Horizon PE-CF594, PI
	PE-Cy™5, 7-AAD
	PE-Cy™7

Blue/Violet/Red

Laser	Fluorochromes
405 nm	BD Horizon BV421, V450, Pacific Blue
	BD Horizon BV510, V500
	BD Horizon BV605
	BD Horizon BV650
	BD Horizon BV786
488 nm	BD Horizon BB515, FITC, Alexa Fluor® 488
	PE
	BD Horizon PE-CF594, PI
	PerCP, PerCP-Cy5.5, 7-AAD
640 nm	APC, Alexa Fluor® 647
	BD Horizon™ APC-R700, Alexa Fluor® 700
	APC-H7

Analiza 12-kolorowa



LSRFortessa



**4 lasery(18 parametrowy):
niebieski 488 nm
fioletowy 405 nm**

**czerwony 640 nm
UV 355 nm**

5 laserów/20 parametrowy

FACSSymphony



5-7 laserów

30-50 parametry

Aktualne możliwości – 27 parametrów

Panele screeningowe do analizy fenotypowej

Plate 1

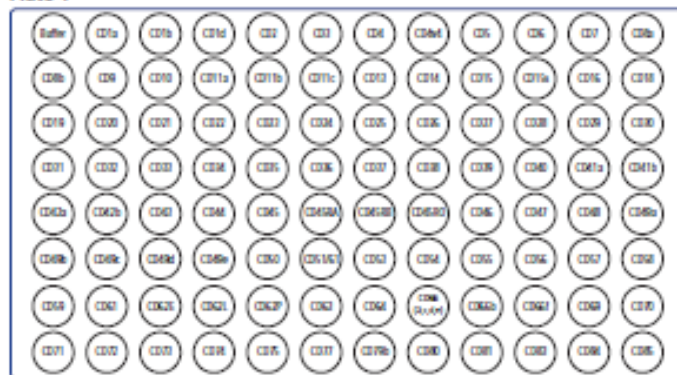
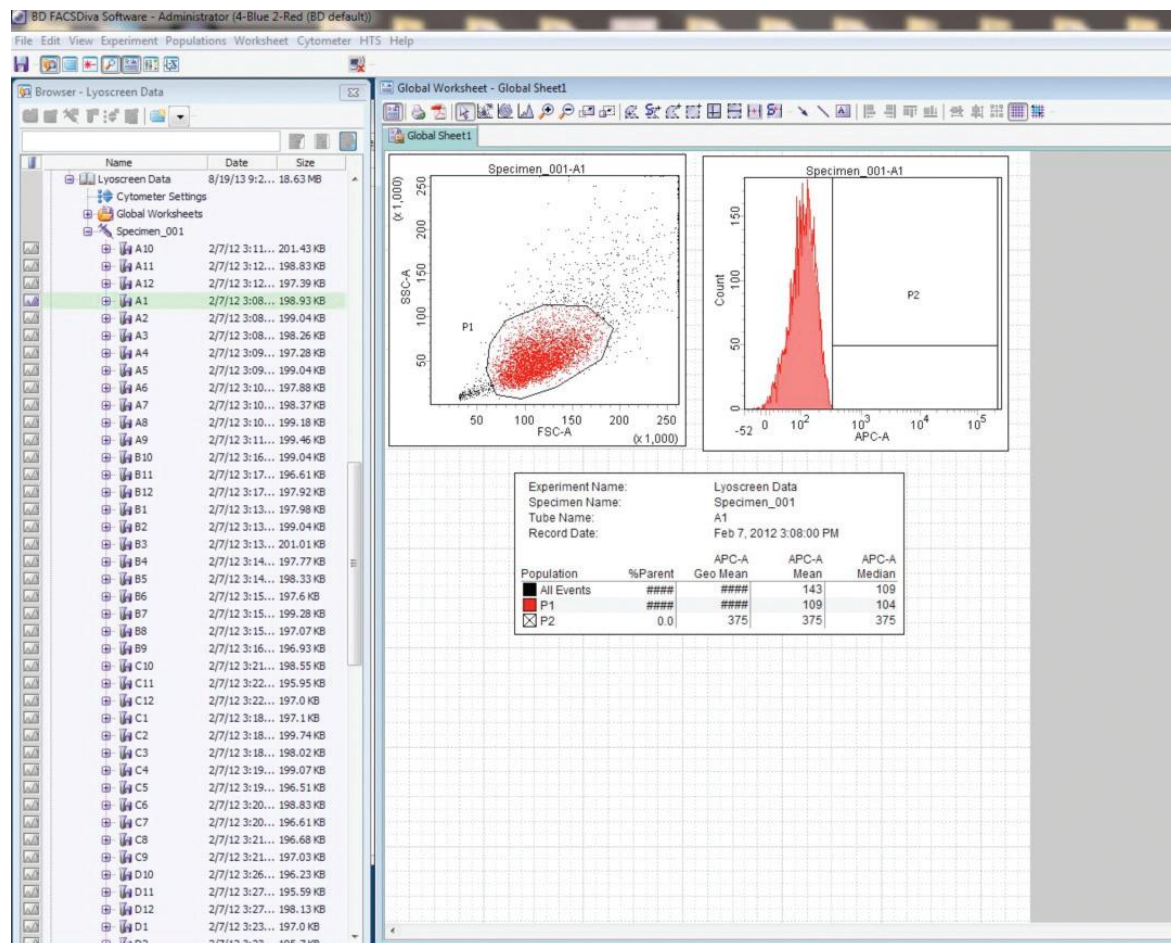


Plate 2



Plate 3



Gotowe procedury

<http://www.bdbiosciences.com/resources/flowcytometry/index.jsp>

<http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/index.jsp>

<http://www.ebioscience.com/media/pdf/best-protocols/cell-preparation-for-flow-cytometry.pdf>

<http://www.abdserotec.com/resources/flow-cytometry-ebook/common-protocols/methods.html>

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Analysis/Flow-Cytometry/Sample-Preparation-Assays-for-Flow-Cytometry.html>

<http://www.biolegend.com/isotype-controls-5327/>

FAQ

<http://www.ebioscience.com/resources/faq/flow-cytometry-faq.htm>

<http://www.flow-cytometry.us/index.php?page=stability>

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Tutorials.html>

<http://www.protocol-online.org/forums/forum/46-flow-cytometry/>

Użyteczne linki

Analiza fenotypowa komórek

- <http://www.abcam.com/protocols/flow-cytometry-immunophenotyping>
- http://www.biolegend.com/essential_markers
- [https://www.bdbiosciences.com/documents/BD Pharmingen CD4 Tcell phenotyping kits.pdf](https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_Pharmingen_CD4_Tcell_phenotyping_kits.pdf)
- https://www.bdbiosciences.com/documents/tcell_brochure.pdf
- https://www.bdbiosciences.com/documents/Bcell_Brochure.pdf

Analiza żywotności i śmierci komórek

- [https://www.bdbiosciences.com/documents/BD FACSVerse Apoptosis Detection AppNote.pdf](https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSVerse_Apoptosis_Detection_AppNote.pdf)
- https://www.bdbiosciences.com/documents/webinar_071812_apoptosis.pdf
- [http://flowbook.denovosoftware.com/Flow Book/Chapter 9%3A Cell Death, Including Apoptosis](http://flowbook.denovosoftware.com/Flow_Book/Chapter_9%3A_Cell_Death,_Including_Apoptosis)
- <http://cyto.mednet.ucla.edu/Protocols/detection.htm>
- http://www.crick.ac.uk/media/6866/viability_dyes_protocol_0.pdf

Użyteczne linki

Prolifercja komórek

- <http://flowbook.denovosoftware.com/Flow Book/Chapter 8%3a Cell Proliferation>
- <http://www.ebioscience.com/cell-proliferation-dye-efluor-450.htm>
- http://static.bdbiosciences.com/documents/BD_Violet_Prof_Dye450_TechBulletin.pdf?_ga=1.246280839.287098139.1447417642#search=BD%20Horizon%E2%84%A2%20Violet%20Proliferation%20Dye%20450
- https://www.ucl.ac.uk/ich/services/lab-services/FCCF/Flow_Cytometry_Applications/cell_analysis/CFSE

Wykrywanie białek wewnątrzkomórkowych (cytokin)

- <http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0138042&representation=PDF>
- <http://www.lifesciencesite.com/lcj/life0301/life-0301-06.pdf>
- <http://www.ebioscience.com/media/pdf/best-protocols/staining-intracellular-antigens-for-flow-cytometry.pdf>
- <http://www.ebioscience.com/media/pdf/best-protocols/staining-intracellular-antigens-for-flow-cytometry.pdf>

Użyteczne linki

Wykrywanie białek wydzielanych przez komórki

- http://www.bdbiosciences.com/sg/research/cytometricbeadarray/index.jsp?_ga=1.44487079.287098139.1447417642

Analiza DNA

- <http://flowbook.denovosoftware.com/Flow Book/Chapter 6%3a DNA Analysis>
- <http://passthrough.fw-notify.net/download/158995/http://www.dartmouth.edu/~dartlab/uploads/DNA.pdf>
- http://www.dako.com/08065_15dec05_guide_to_flow_cytometry_basic_dna_measurement_by_flow_cytometry_chapter16.pdf
- <http://www.abcam.com/protocols/flow-cytometric-analysis-of-cell-cycle-with-propidium-iodide-dna-staining>
- <https://www.tcd.ie/IMM/flow-cytometry-facility/assets/pdf/Analysis-of-Cell-Cycle-by-Flow-Cytometry.pdf>

Użyteczne linki

Inne zastosowania cytometrii przepływowej

- <http://flowbook.denovosoftware.com/Flow Book/Chapter 10 %3a Some Other Applications>
- <http://www.criver.com/files/pdfs/nonsource/researcher 224.aspx>

Podstawy cytometrii przepływowej

- <http://flowbook.denovosoftware.com/>
- https://books.google.pl/books?id=M_3rp2e-BWkC&pg=PA89&lpg=PA89&dq=flow+cytometry+phenotyping&source=bl&ots=S3H-dauxrr&sig=zLkAKAfWw0v9ken6hHG5VfiBbel&hl=pl&sa=X&ved=0CGQQ6AEwBjgKahUKewiSulPVq43JAhXhVHIKHby1D98#v=onepage&q=flow%20cytometry%20phenotyping&f=false
- <http://www.protocol-online.org/prot/Immunology/Immunofluorescence/>
- https://www.bdbiosciences.com/documents/tcell_brochure.pdf
- https://www.bdbiosciences.com/documents/Bcell_Brochure.pdf
- [https://www.ucl.ac.uk/ich/services/lab-services/FCCF/Introduction to flow cytometry](https://www.ucl.ac.uk/ich/services/lab-services/FCCF/Introduction_to_flow_cytometry)

Dziękuję za uwagę