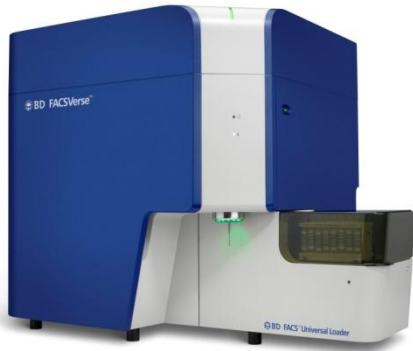




**Fakultet: Cytometria – zastosowanie
w badaniach biologicznych**

Wprowadzenie do cytometrii przepływowej: metody znakowania komórek

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

Przygotowanie komórek do znakowania

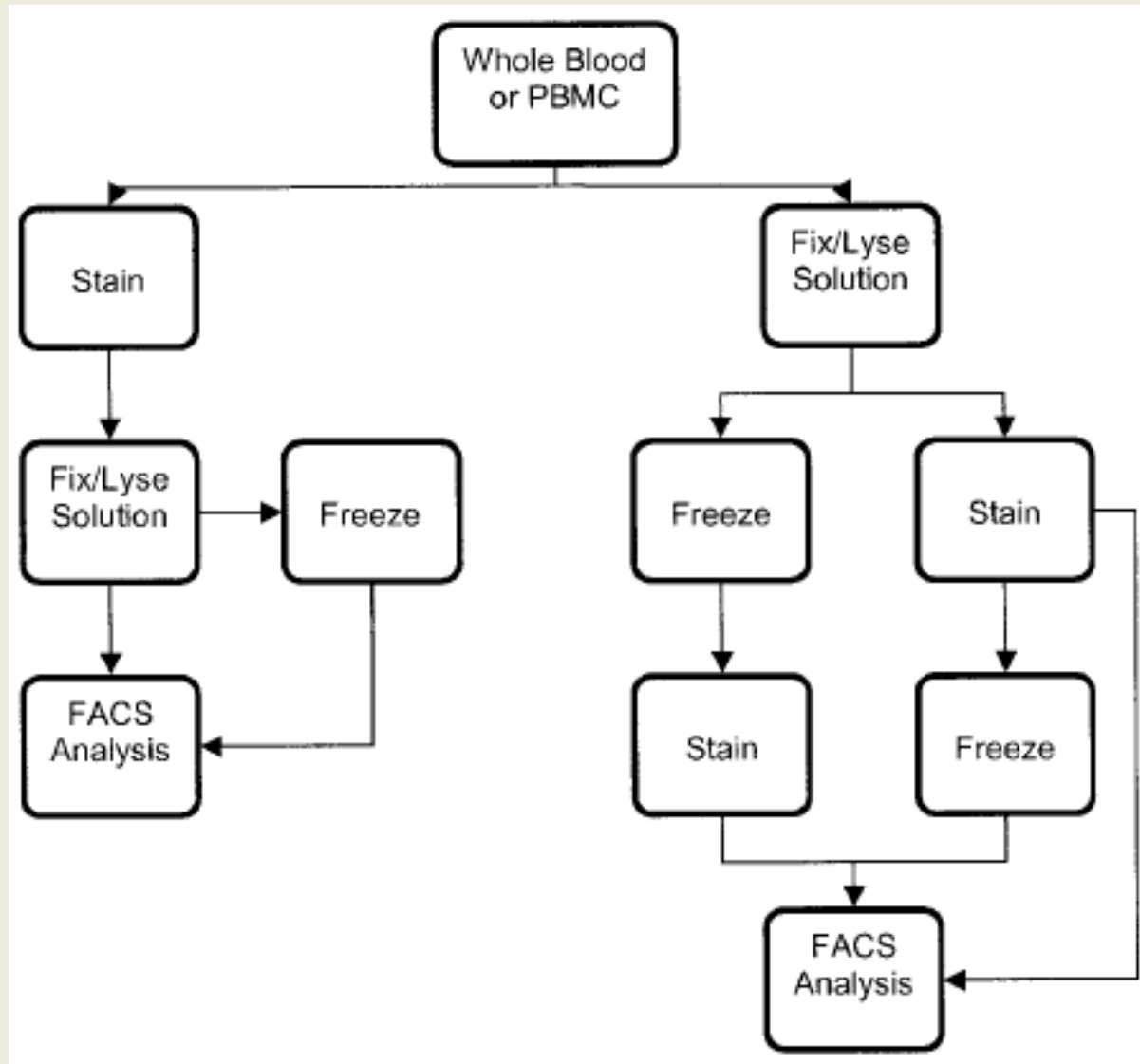
- 1. Zawiesina komórek (bez fragmentów tkanek, błon komórkowych, zlepionych komórek). Komórki z hodowli nieadherentnych i krwi obwodowej stwarzają najmniej problemów**
- 2. Komórki z hodowli adherentnych (trawienie enzymatyczne). Trawienie receptorów, zmniejszenie ich ekspresji, zmniejszenie dostępności do epitopów**
- 3. Izolowanie komórek z narządów metodami mechanicznymi, enzymatycznymi lub oboma jednocześnie**

1. **Próbki kliniczne – zwykle krew obwodowa, wymaga lizy erytrocytów (wodą, chlorkiem amonu, detergentem)**
2. **Antygeny powierzchniowe znakowane są na komórkach nieutrwalonych – standardowe procedury**
3. **Znakowanie wewnątrzkomórkowe wymaga utrwalania i permeabilizacji komórek. Brak jest standardowej procedury: a/ utrwalanie 70% etanolem w 4 st. C; b/ utrwalanie absolutnym metanolem w -80 st.C; c/ 1% formaldehyd w 4 st.C, następnie metanol w -20 st.C; d/ 1% formaldehyd w obecności detergentu (saponina) w 0-4 st.C, następnie metanol w -20 st.C (lub bez tego etapu)**

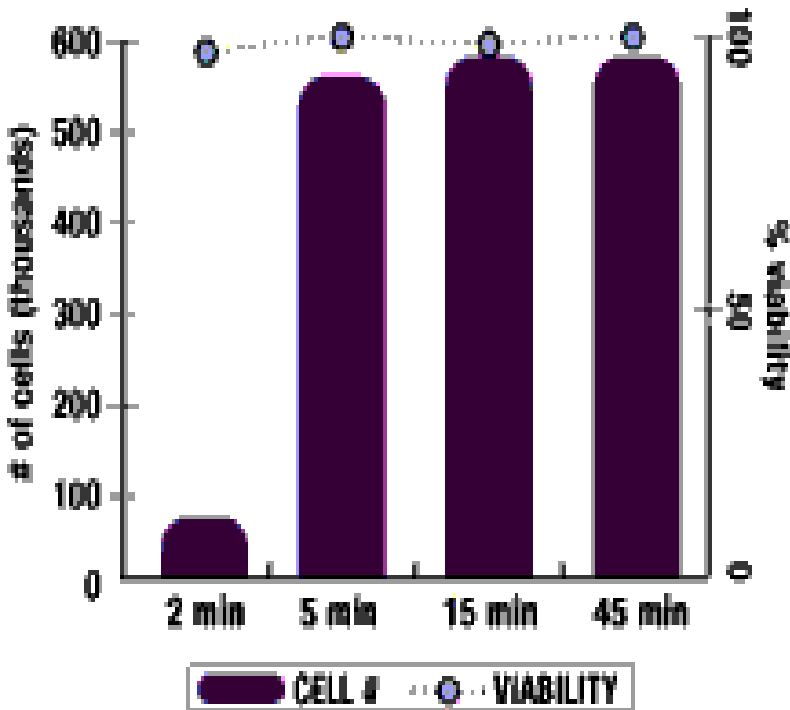
Przygotowanie prób do analizy w cytometrze przepływowym

- 1. Komórki z hodowli in vitro**
- 2. Komórki izolowane z tkanek limfoidalnych**
- 3. Komórki z innych tkanek niż limfoidalne**
- 4. Izolowanie komórek z krwi obwodowej**

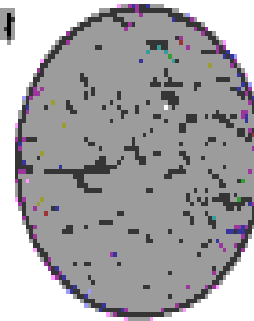
Wybór procedury



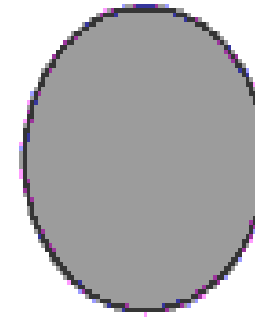
Wpływ trawienia enzymatycznego na żywotność komórek



BEFORE: cell monolayer, 100X mag.



AFTER: same plate, following Accutase treatment, 100X mag.



Zasady barwienia komórek

Barwienie z użyciem przeciwciał sprzężonych z fluorochromami

Barwienie z użyciem cząsteczek innych niż przeciwciała sprzężonych z fluorochromami

Barwienie wolnymi barwnikami fluorescencyjnymi

Przechowywanie wyznakowanych komórek

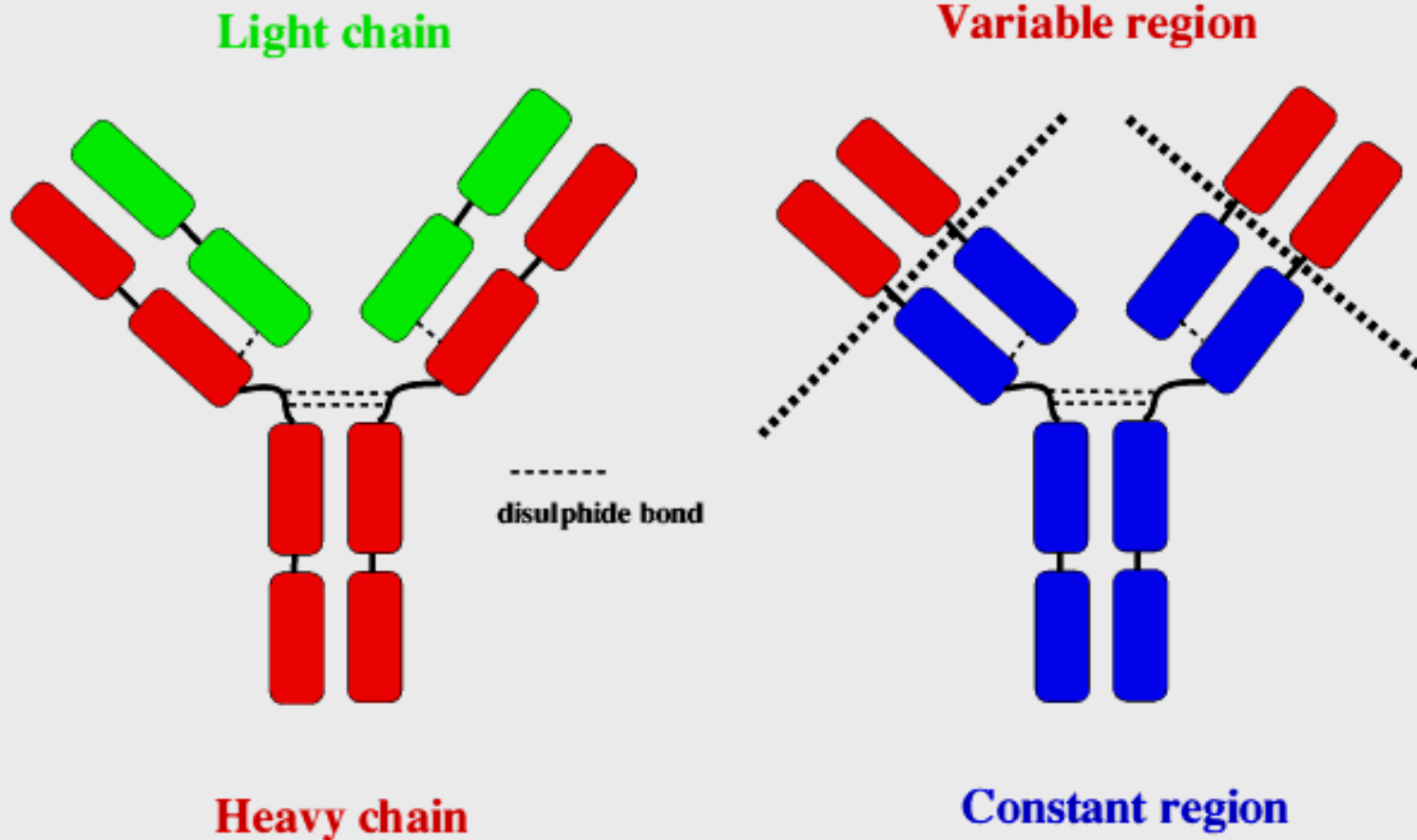
Podstawowe zasady przechowywania prób

1. W lodówce: 4 stopnie C, w ciemności (pamiętać o biologicznej aktywności komórek np. fagocytozie)
2. Utrwalone do 3 dni
3. Zasady zależne od rodzaju komórek, ich traktowania (permeabilizacja), fluorochromów, badanego procesu (apoptoza, zmiany potencjału błonowego)
4. O ile to możliwe: analiza tuż po wyznakowaniu komórek

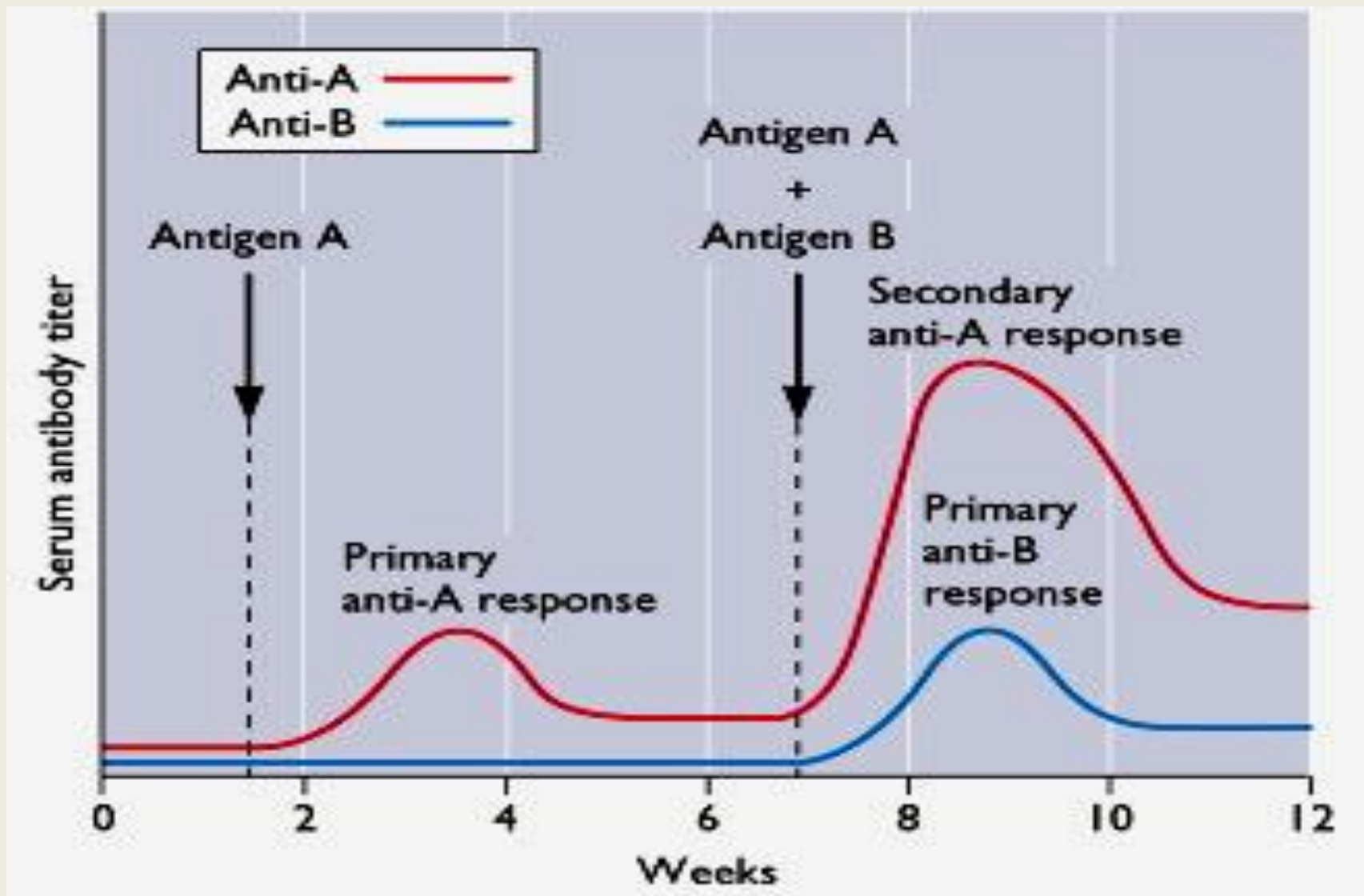
Zastosowanie przeciwciał w cytometrii przepływowej

Schematyczna budowa przeciwciał

Basic structure of an Antibody



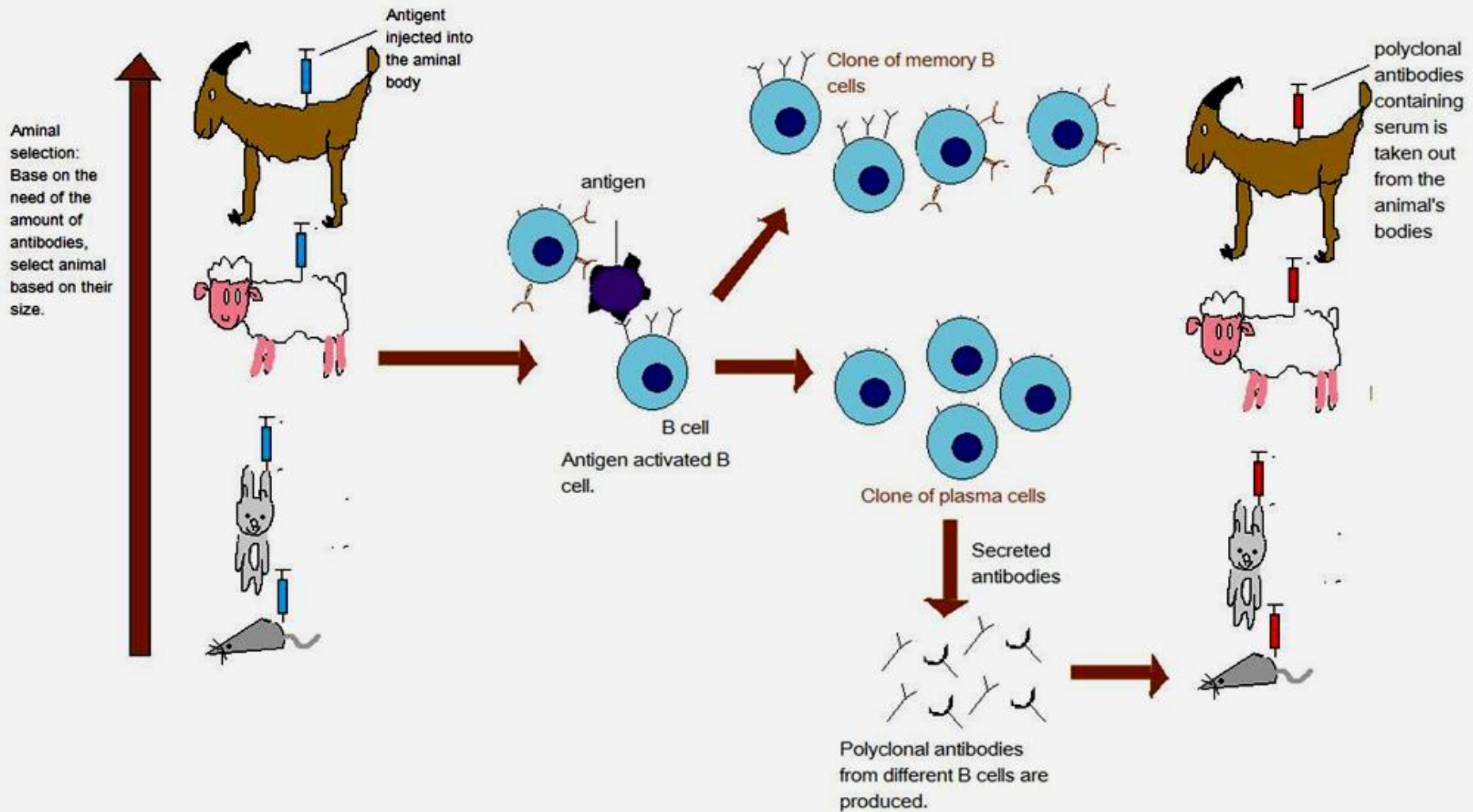
Odpowiedź pierwotna i wtórna



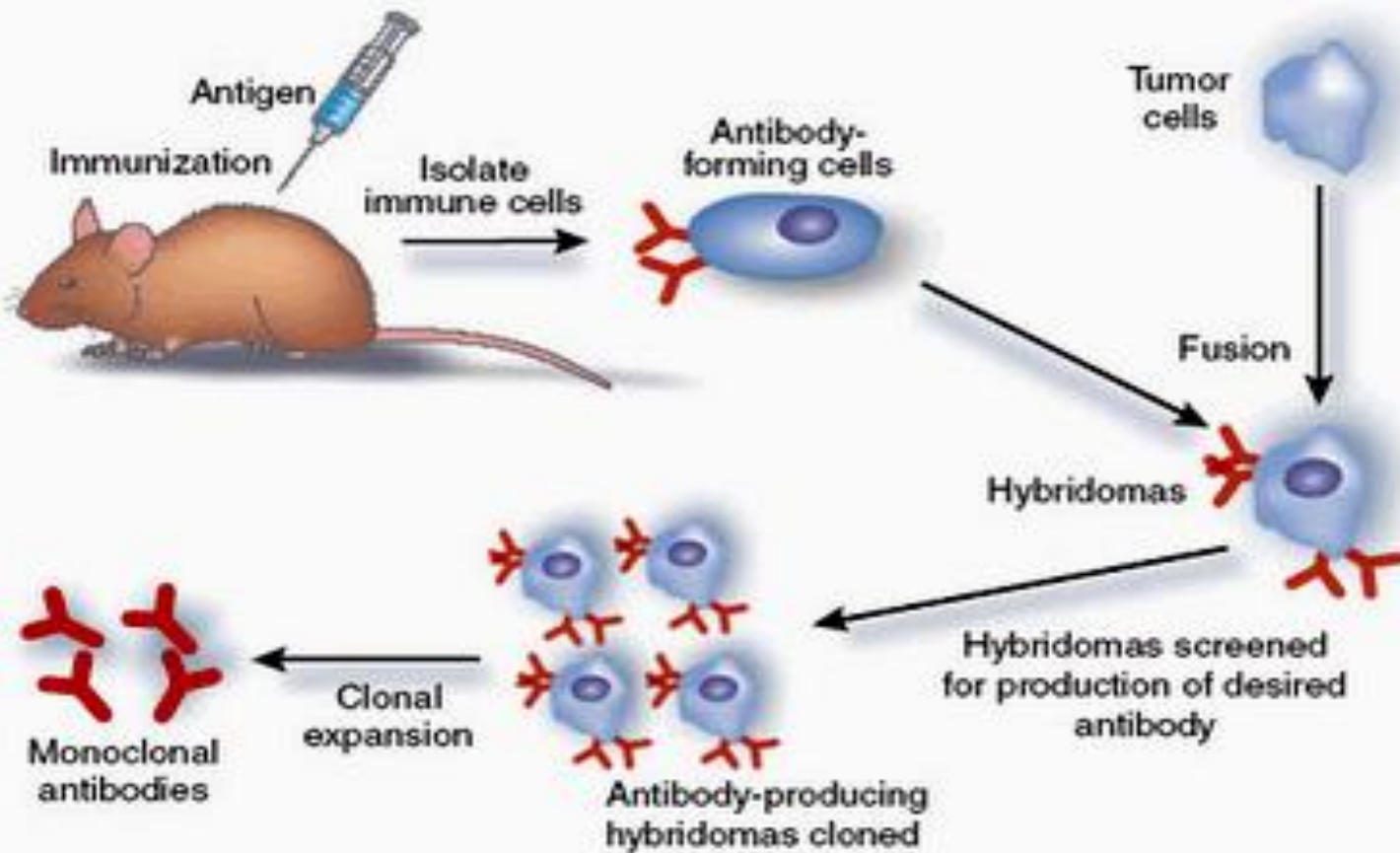
**Zastosowanie przeciwciał wykorzystuje
ich zdolność do wiązania antygenów:
Podstawą jest reakcja Ag:Ab**

**Antygeny występują w organizmach
żywych powszechnie i służą do
specyficznego identyfikacji komórek**

Przeciwciała poliklonalne



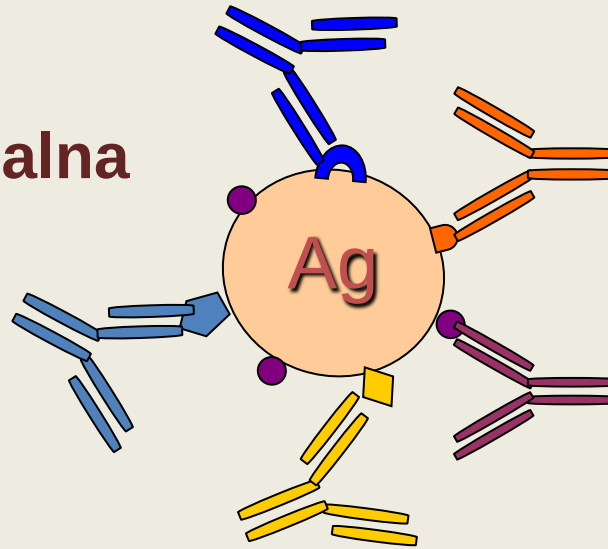
Przeciwciała monoklonalne



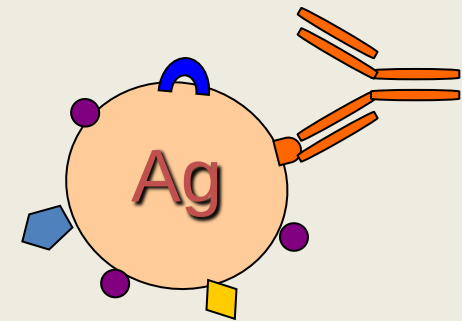
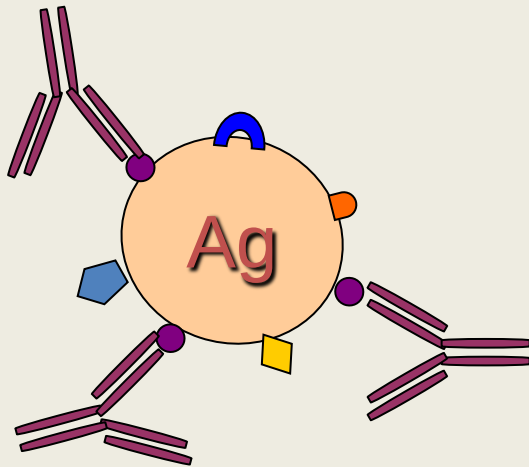
Production Of Monoclonal Antibodies

Porównanie surowicy poliklonalnej i przeciwciał monoklonalnych

Surowica poliklonalna



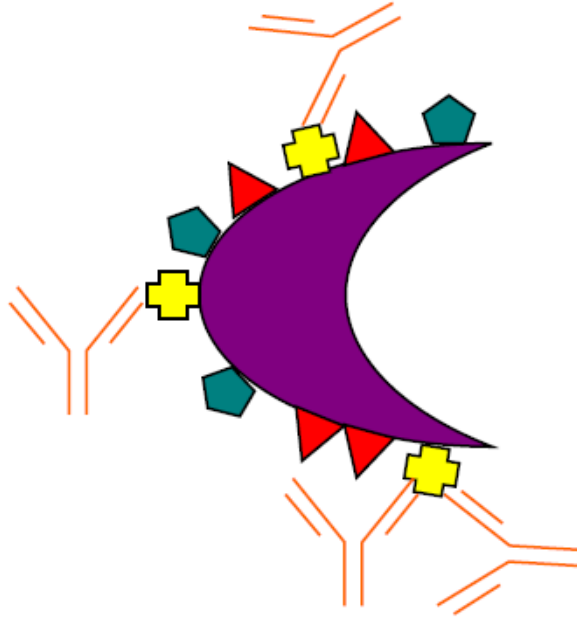
Przeciwciała monoklonalne



Porównanie surowicy poliklonalnej i przeciwciał monoklonalnych

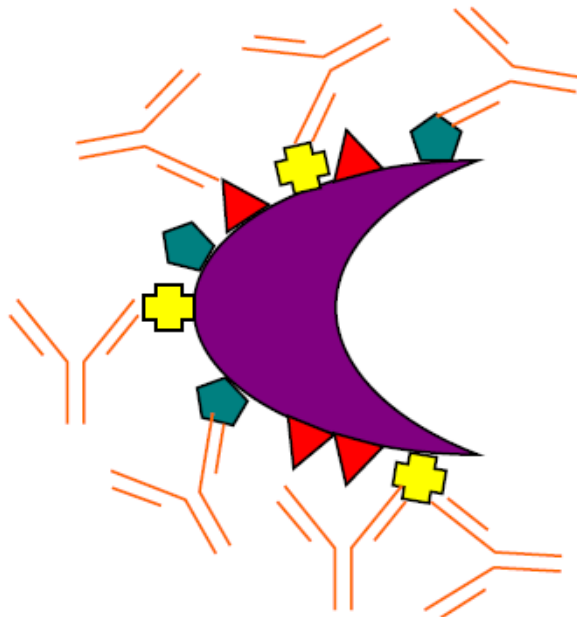
Surowica poliklonalna zawiera przeciwciała specyficzne dla różnych epitopów tego samego antygeny, zatem jest heterogenna i utrudnia standaryzację znakowania i analizy

Przeciwciała monoklonalne wiążą takie same epitopy, zatem można uzyskać powtarzalność znakowania



Abs monoklonalne:

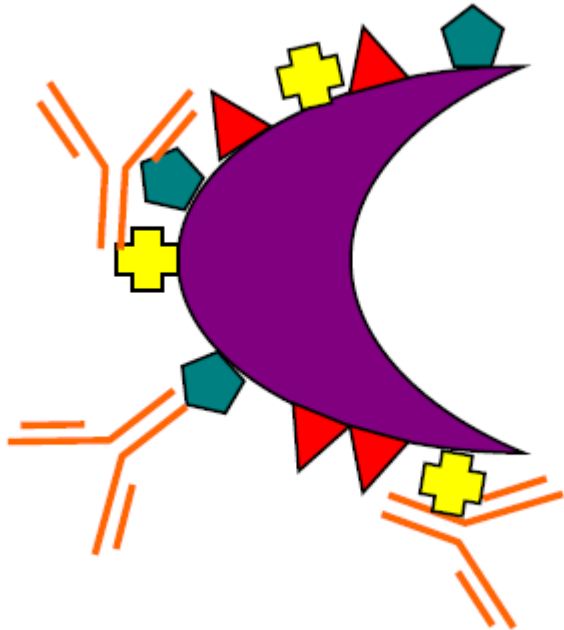
- jednorodne, wiążą ten sam epitop
- duża swoistość, nie wykazują różnic w powinowactwie do epitopu
- mogą być nieskuteczne dla prób utrwalonych



Abs (surowica) poliklonalne:

- niejednorodne, wiążą różne epitopy antygeny
- skutecznie „saturują” antygen, powstaje silniejszy sygnał
- mogą wykazywać wiązanie nieswoiste, mogą różnić się powinowactwem

Czy przeciwciała wiążą tylko epitopy?



Wiązanie niespecyficzne:

- inne regiony przeciwciała mogą łączyć się z epitopem
- mogą być wiązane przez receptory dla fragmentu Fc
- Zastosowanie kontroli izotypowej służy do określenia poziomu wiązania niespecyficznego

Blokowanie FcR

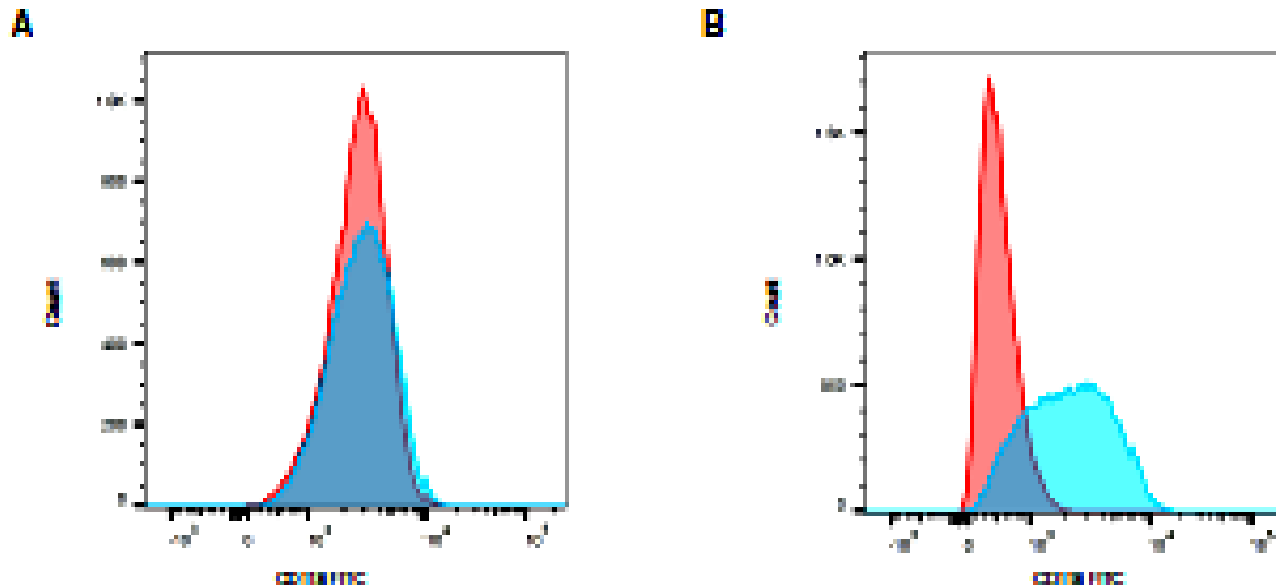


Fig 21. Fc blocking. THP-1 cells stained with mouse anti human CD11a (blue) or mouse IgG2a isotype control (red) in the absence (A) and presence (B) of human Seroblock (BUF070A).

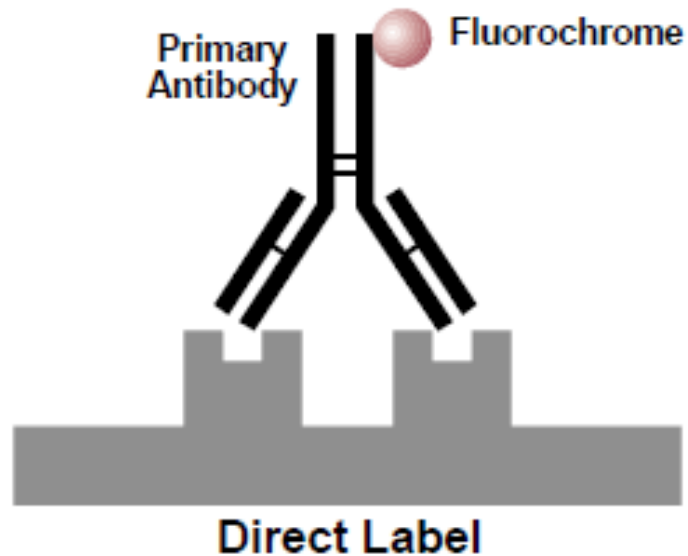
Określanie fenotypu komórek - immunofenotypowanie

Identyfikacja komórek na podstawie
znaczników/markerów powierzchniowych

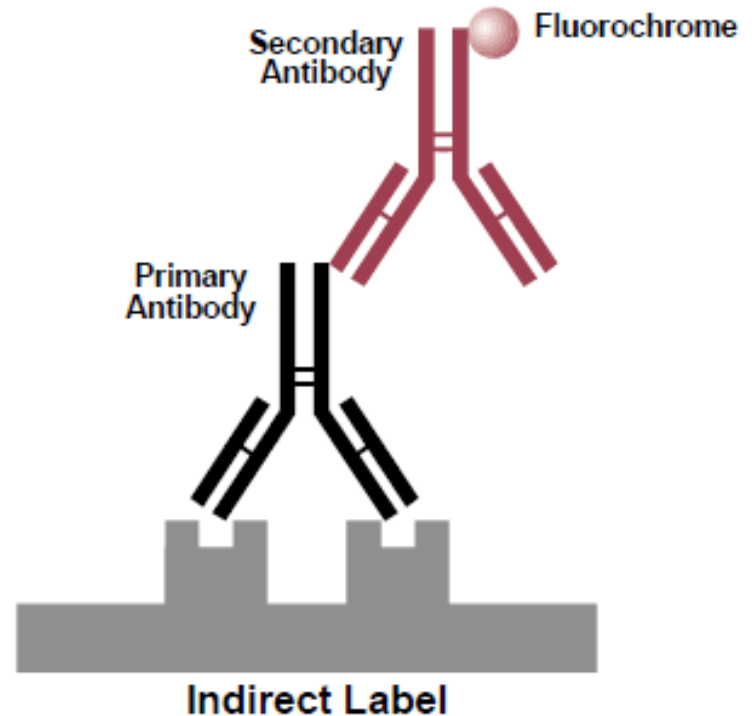
Do tego celu używamy Ab monoklonalnych
przeciwno markerom różnicującym komórki



Znakowanie bezpośrednie

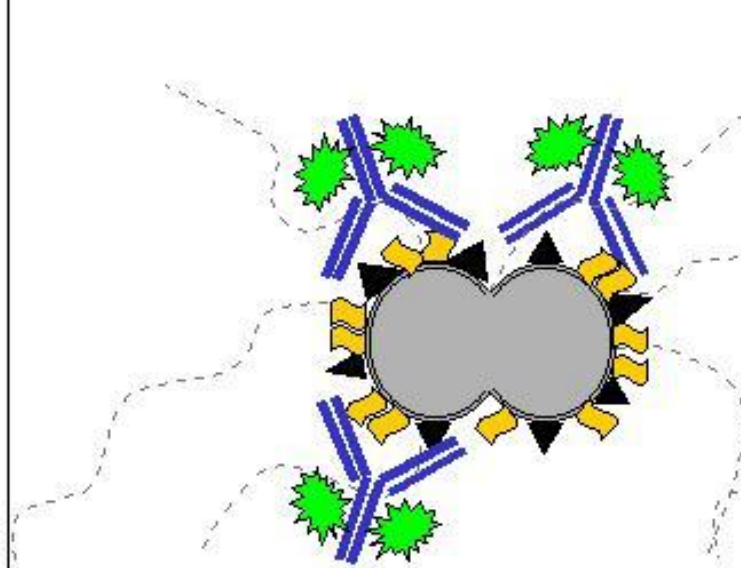


Znakowanie pośrednie

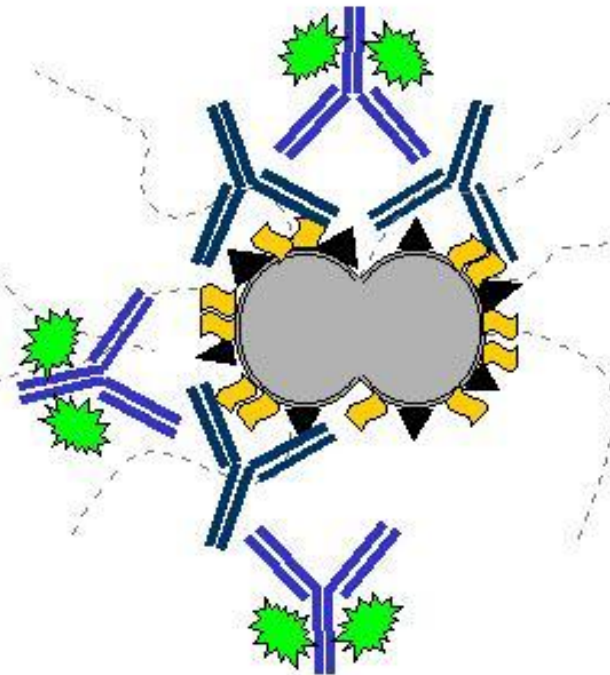


Który sygnał jest silniejszy?

Direct
Immunofluorescence
Staining

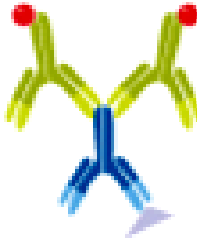


Indirect
Immunofluorescence
Staining



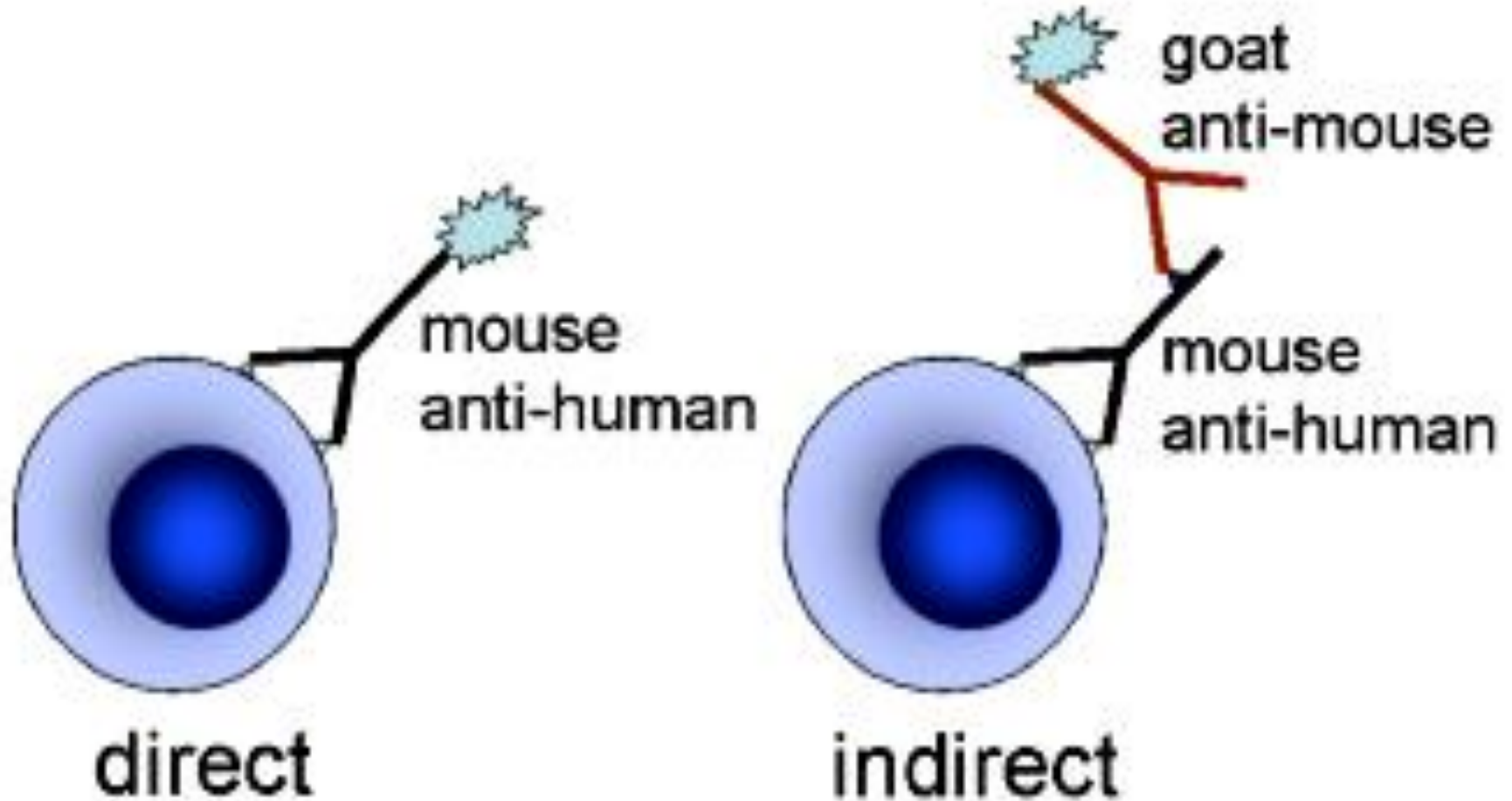
Który sygnał jest silniejszy?

Direct	
	
Advantage	Limitation
Good for multicolor labeling	Lower sensitivity

Indirect	
	
Advantage	Limitation
Higher sensitivity	Potential non-specific binding of secondary antibodies

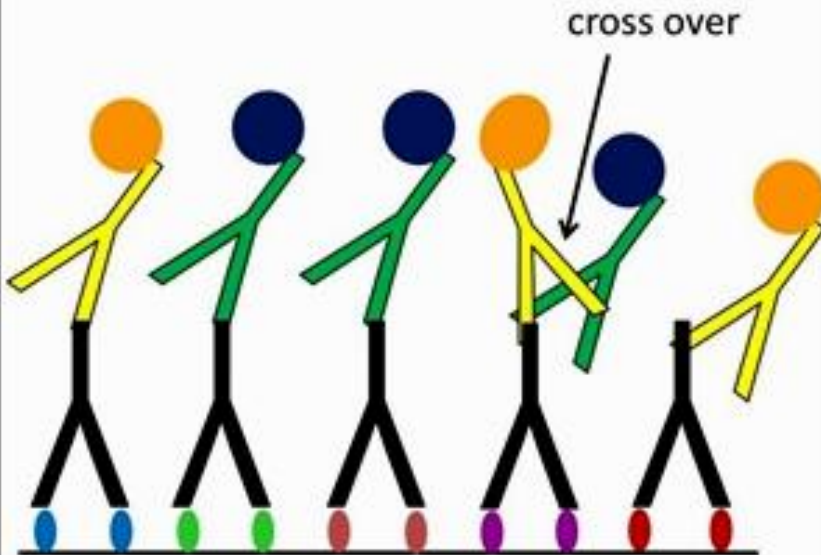
KEY:  Antigen  Label  Secondary Antibody
 Primary Antibody

Jak wybieramy przeciwciała

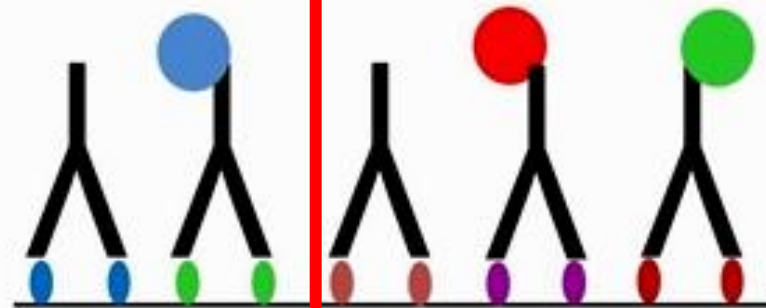


Która metoda jest lepsza?

With secondary antibodies

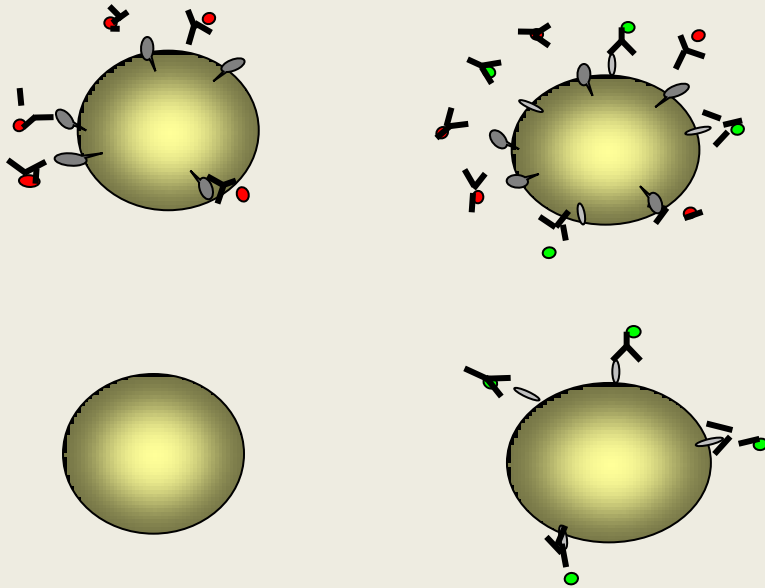


Without secondary antibodies

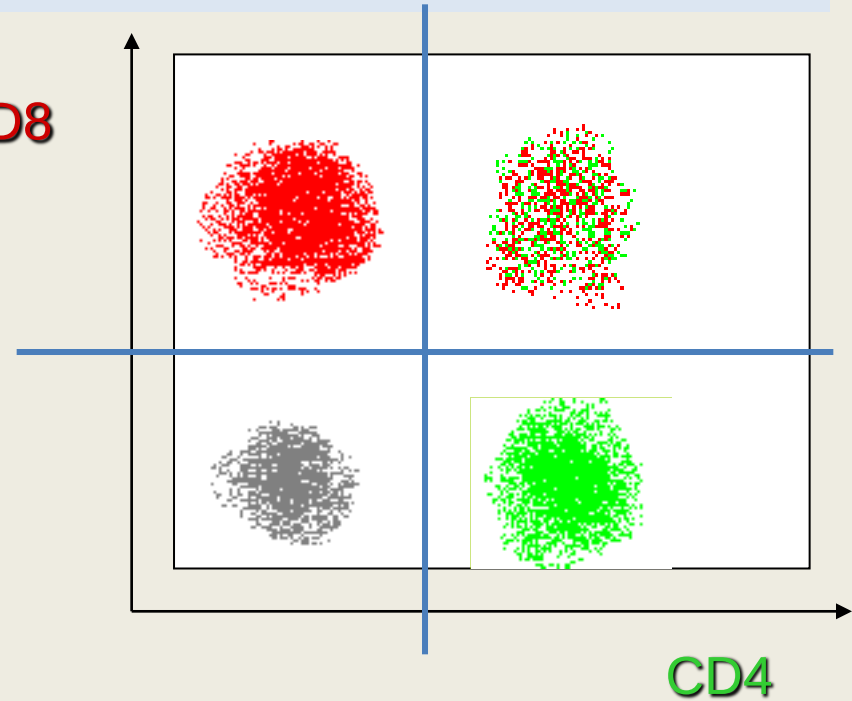


- No secondary antibodies
- No cross over
- No additional wash steps

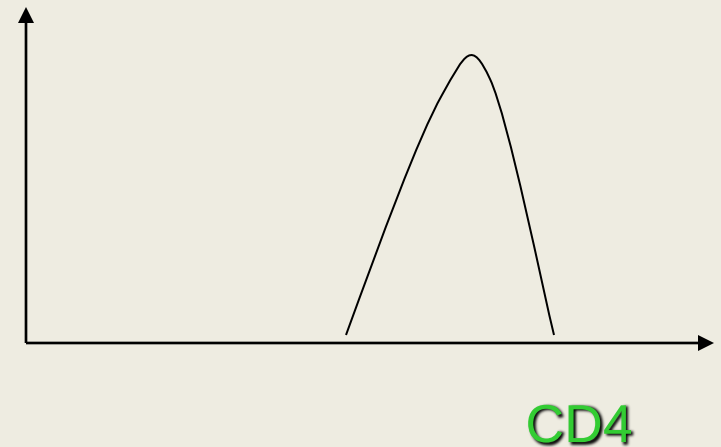
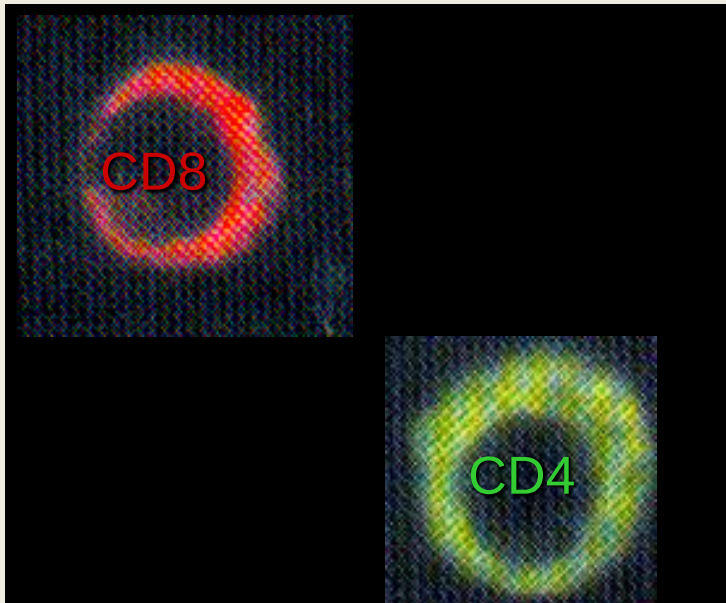
Znakowanie markerów powierzchniowych



CD8

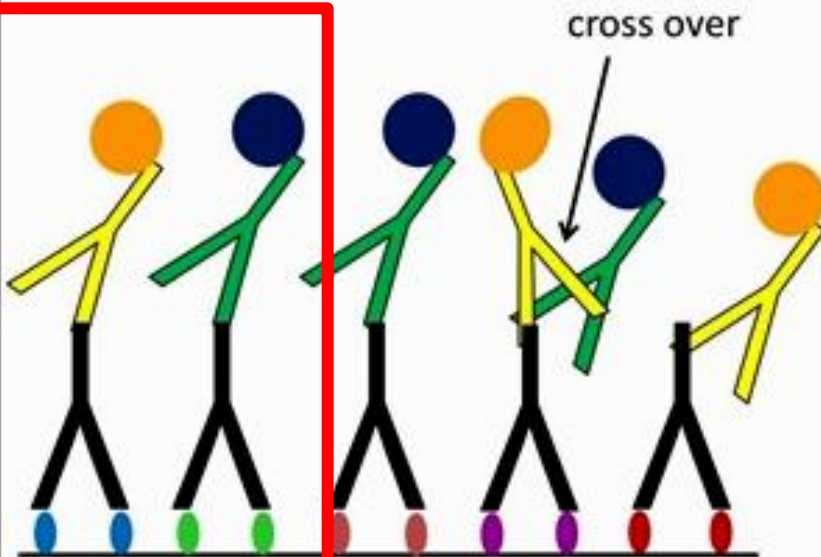


CD4

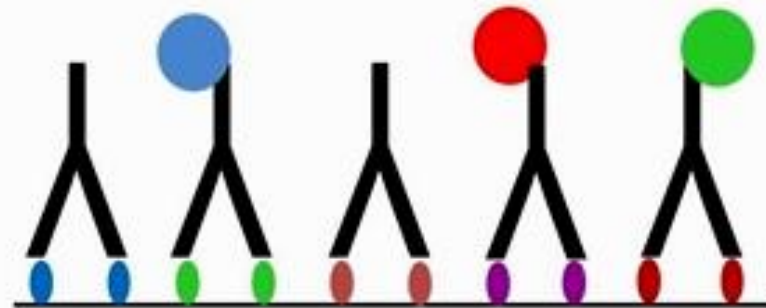


Która metoda jest lepsza?

With secondary antibodies

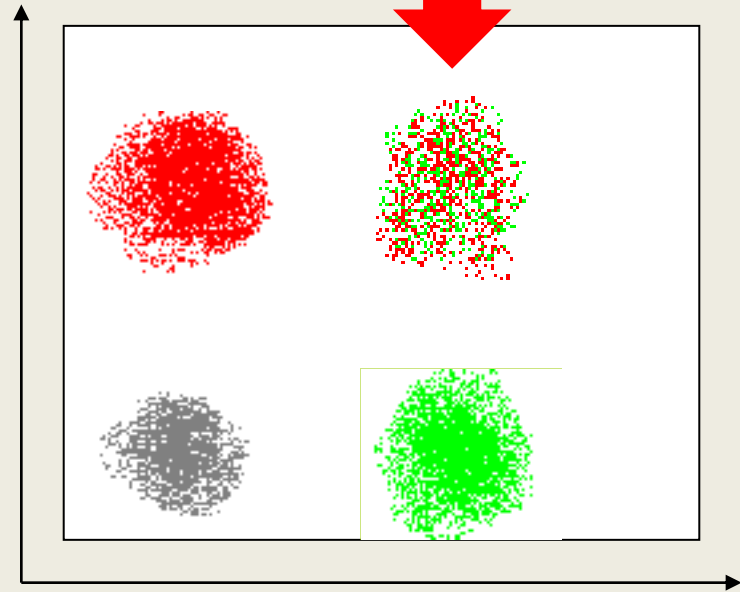
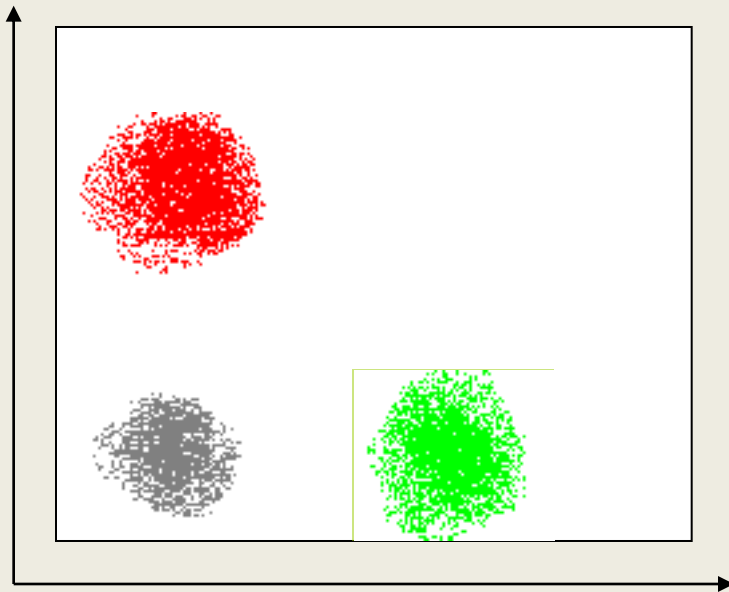


Without secondary antibodies



- No secondary antibodies
- No cross over
- No additional wash steps

Fałszywe pozytywne wyniki



Czy można stosować obie metody jednocześnie?

1. Inkubacja z nieznakowanym I rz. przeciwciałem. Płukanie
2. Inkubacja ze znakowanym II rz. Ab. Płukanie
3. Inkubacja ze znakowanym I rz. Ab. Płukanie
4. Analiza
5. Procedury zależą od rodzaju komórek.
Nierekomendowane utrwalanie. Utrwalanie przed dodaniem II rz. przeciwciał.

Przeciwciało/biotyna/awidyna

1. Biotyna, wit. H, wit. B7
2. Awidyna, białko obecne w jajach, wykazuje powinowactwo do biotyny, 1 cz. awidyny wiąże 4 cz. biotyny
3. Streptoawidyna, białko bakteryjne (*Streptomyces avidinii*), wiąże niekowalencyjnie biotyne

Reakcja biotyna-awidyna; biotyna-streptoawidyna – specyficzna, nieodwracalna

1. Nieznakowane Ab I-rzędowe + Ab II-rzędowe sprzężone z fluorochromem
2. Ab I rz. + Ab II rz. Biotyna + streptawidyna/fluorochrom
3. Amplifikacja systemu 2

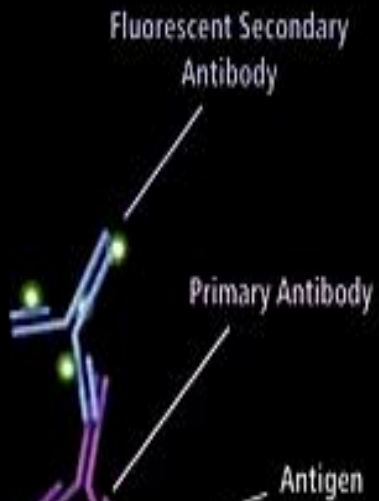


Figure 1

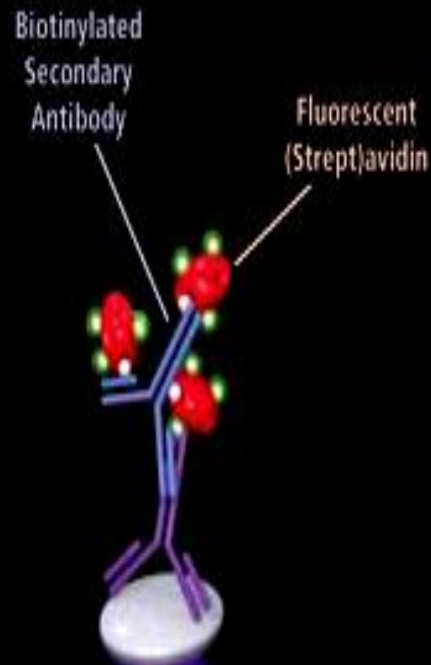


Figure 2

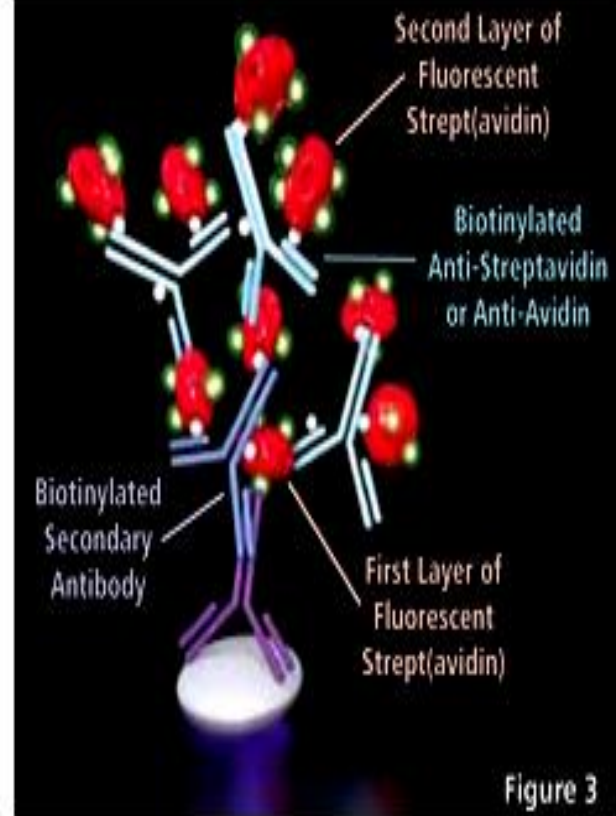
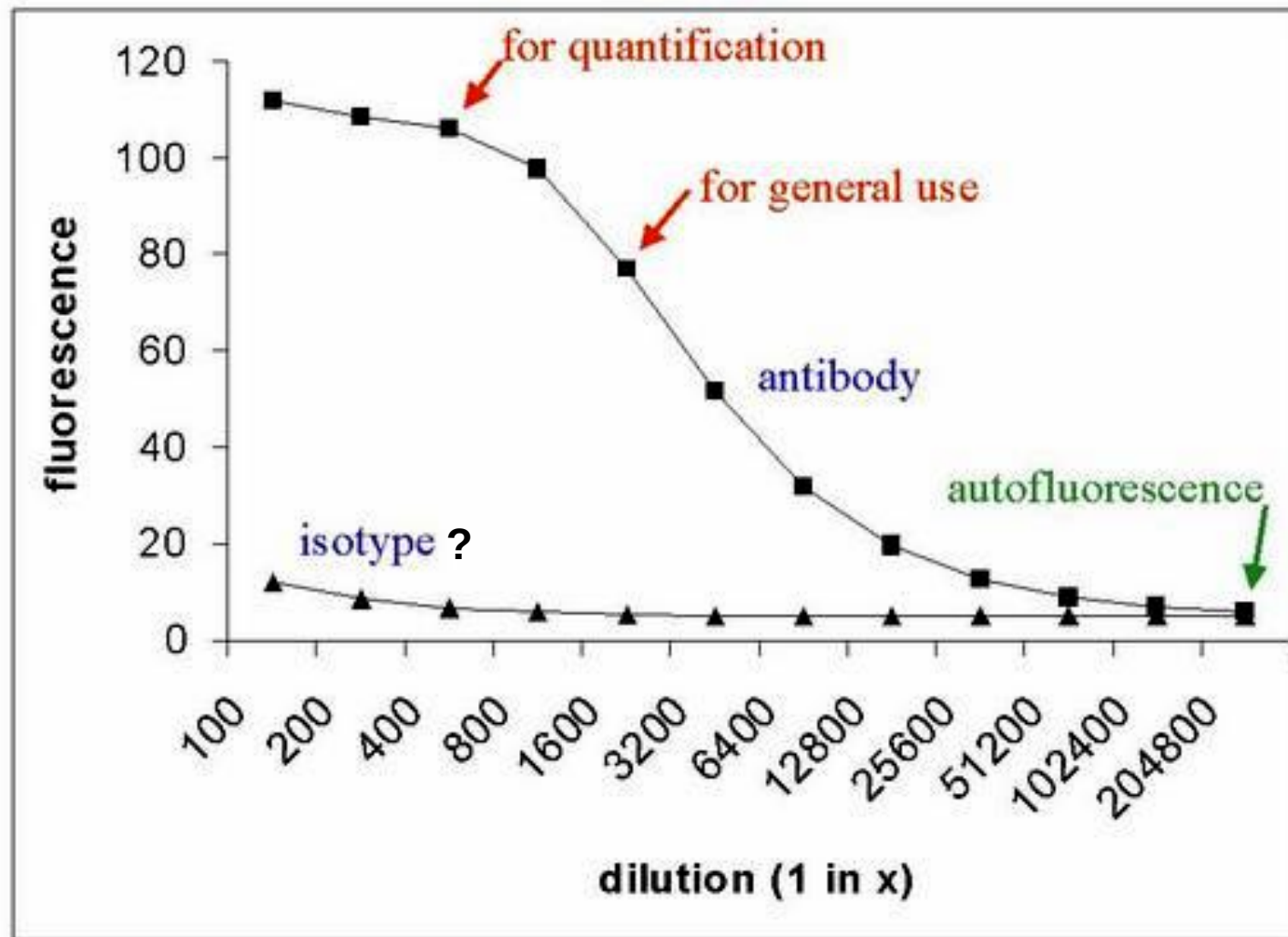


Figure 3

Wybór odpowiedniego stężenia przeciwciała



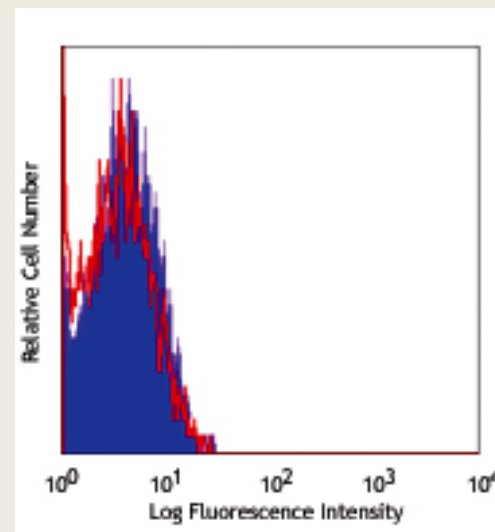
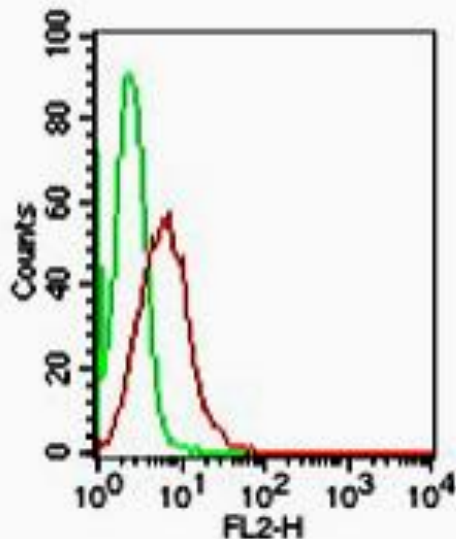
- 1. Zwykle rozcieńczamy Ab: szereg dwukrotnych rozcieńczeń np. 1:50, 1:100, 1:200 itd.**
- 2. Inkubujemy komórki z takimi samymi rozcieńczeniami kontroli izotypowej**
- 3. Chcemy oceniać ekspresję badanego markera – używamy stężenie saturujące**
- 4. Chcemy ocenić obecność pozytywnych i negatywnych komórek – używamy mniejszego stężenia**

Kontrola izotypowa

Rodzaj kontroli negatywnej wykluczający niespecyficzne wiązanie przeciwciał wynikające głównie z wiązania z receptorami Fc.

Przykład: mysie przeciwciała IgG2a silnie wiązane są przez leukocyty człowieka.

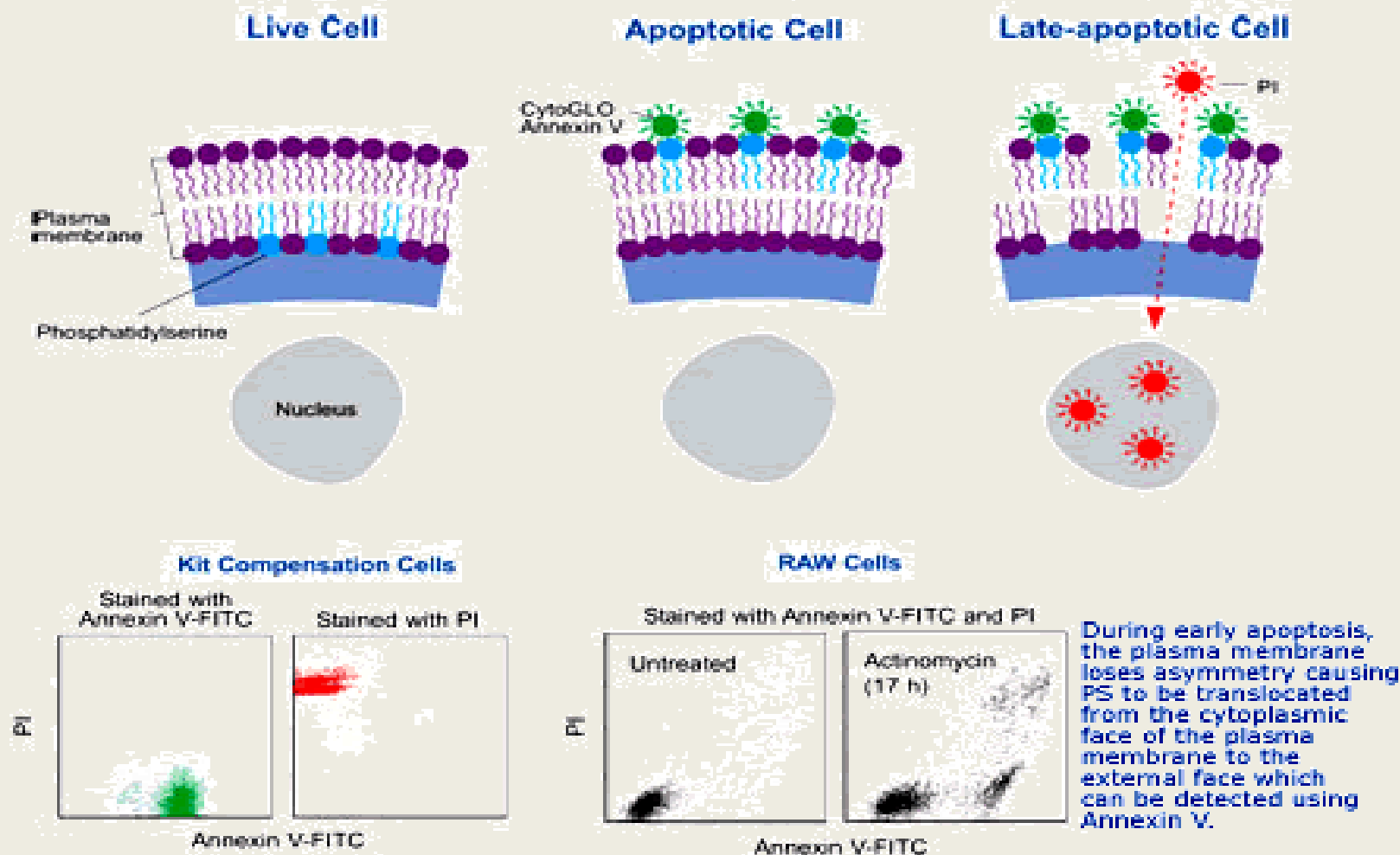
Wykorzystanie i stosowanie kontroli izotypowej (dlaczego jej przydatność jest kwestionowana)



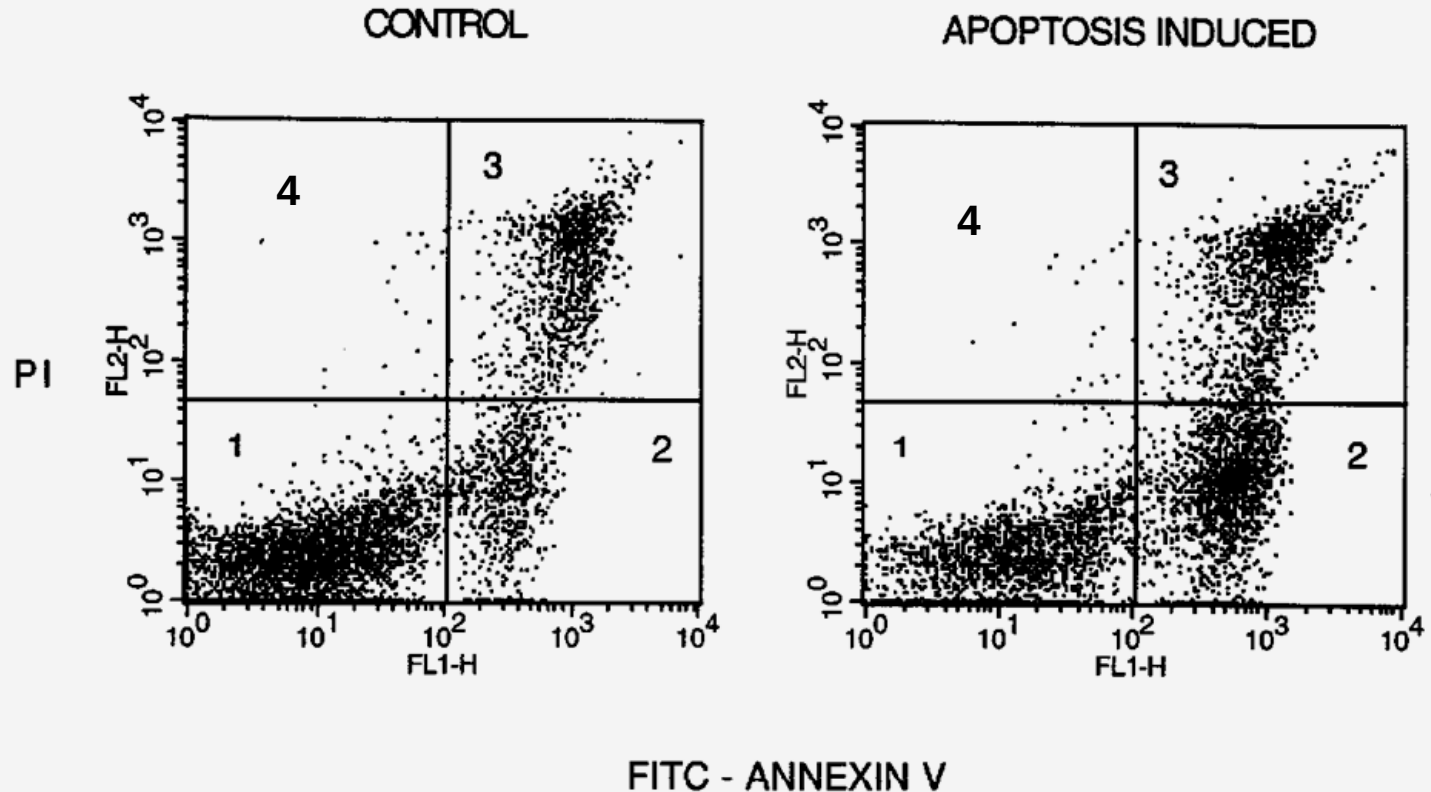
**Znakowanie komórek z
zastosowaniem cząsteczek innych
niż Ab sprzężonych z
fluorochromami**

Aneksyna V

Białko komórkowe o słabo poznanej funkcji. Wykazuje powinowactwo do fosfatydyloseryny.

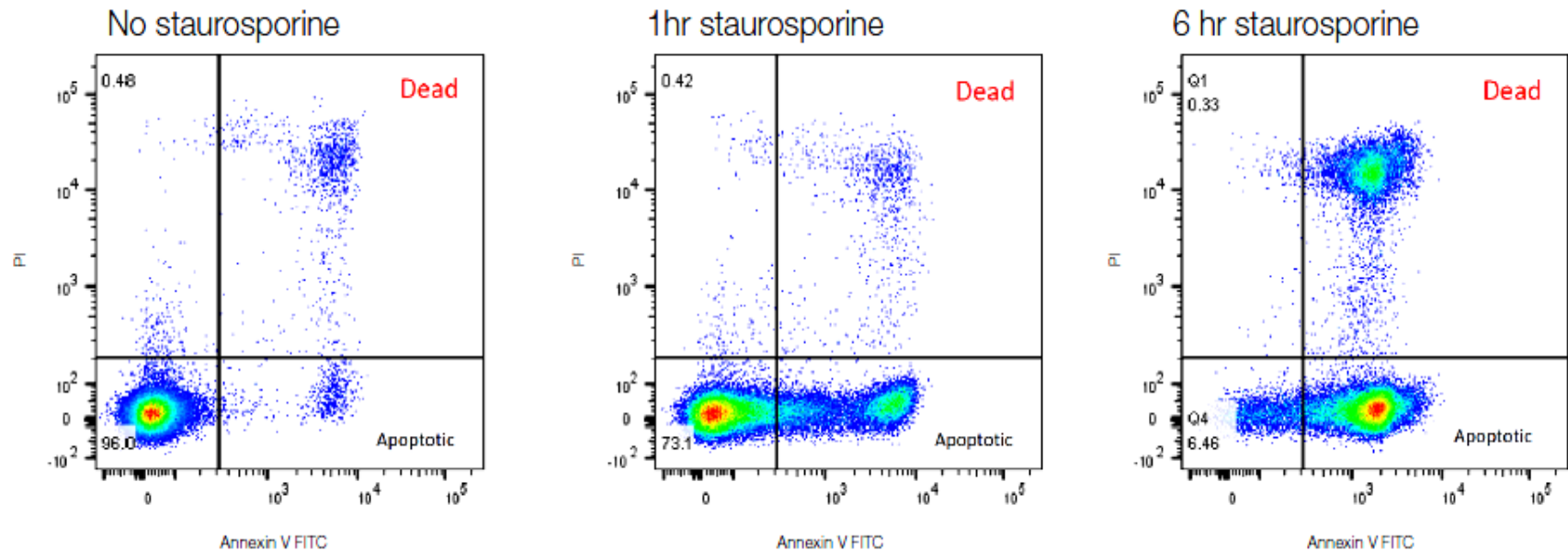


Oznaczenie komórek apoptotycznych



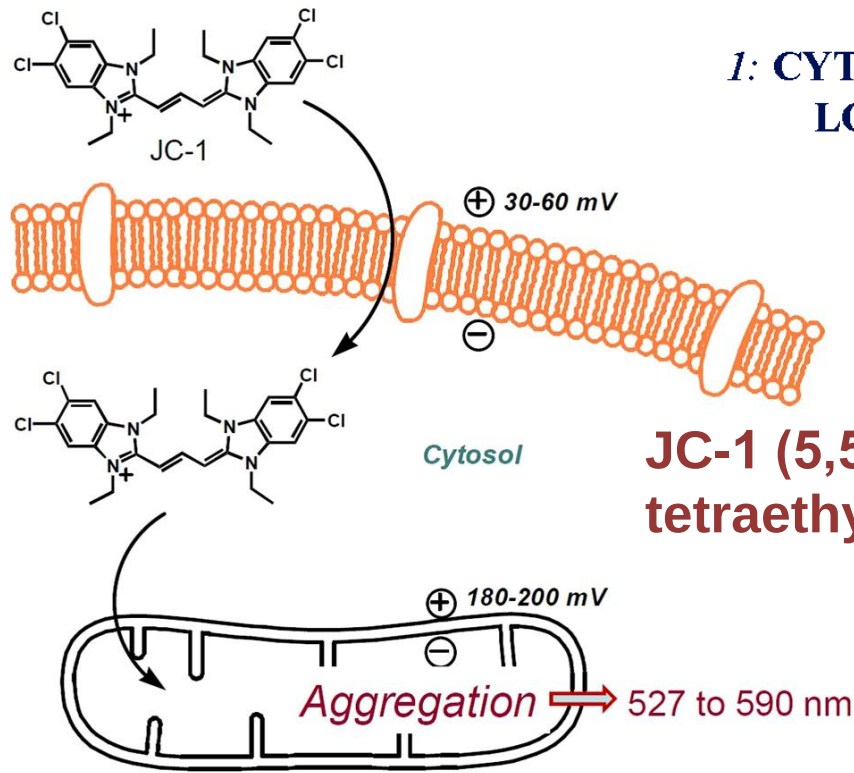
1. Live cells
2. Early apoptotic cells
3. Late apoptotic cells
4. Necrotic cells

Oznaczanie komórek apoptotycznych



Analiza potencjału błonowego

- Utrata potencjału błonowego mitochondriów oznaką apoptozy
- JC-1 monomery-zielona fluorescencja
- JC-1 dimery-czerwona fluorescencja



1: CYTOPLASMIC
LOADING

3: E.R.
LOADING

JC-1

(1)

JC-1

(2)

VAL.

≈ - 60 mV

≈ - 180 mV

≈ 0 mV

2: MITOCHONDRIAL
LOADING

JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'
tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide)

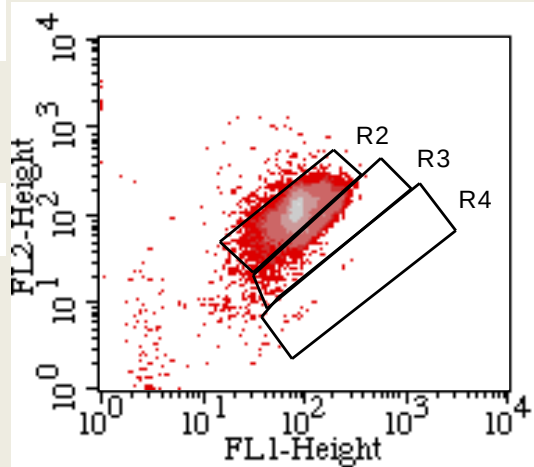
Analiza potencjału błonowego

A

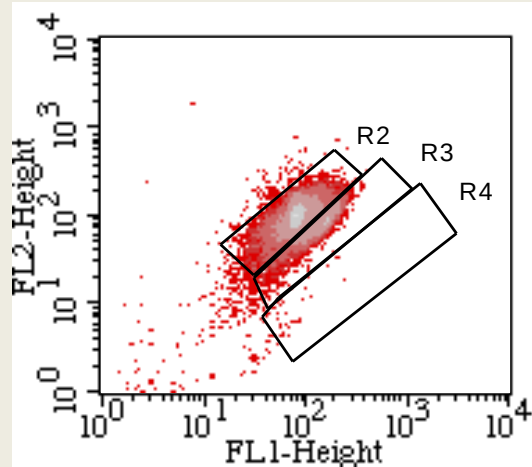
Ctrl

ASM

-Hc



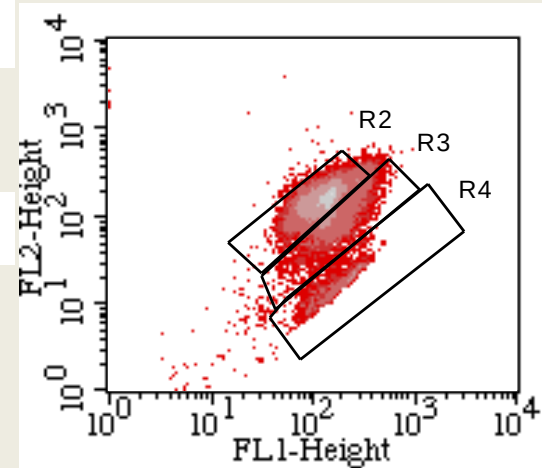
R2 - 88.30%
R3 - 7.51%
R4 - 0.06%



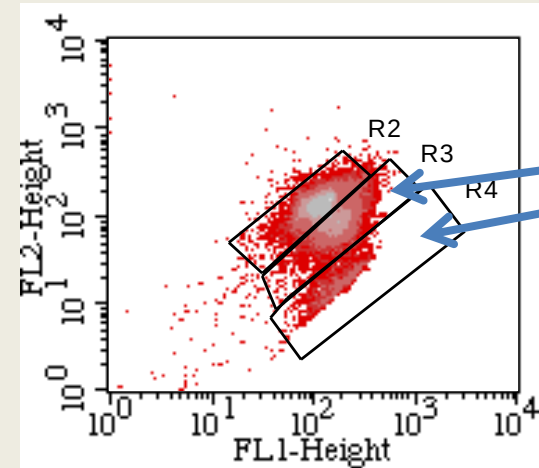
R2 - 77.65% *
R3 - 17.60% *
R4 - 0.07%

B

+Hc



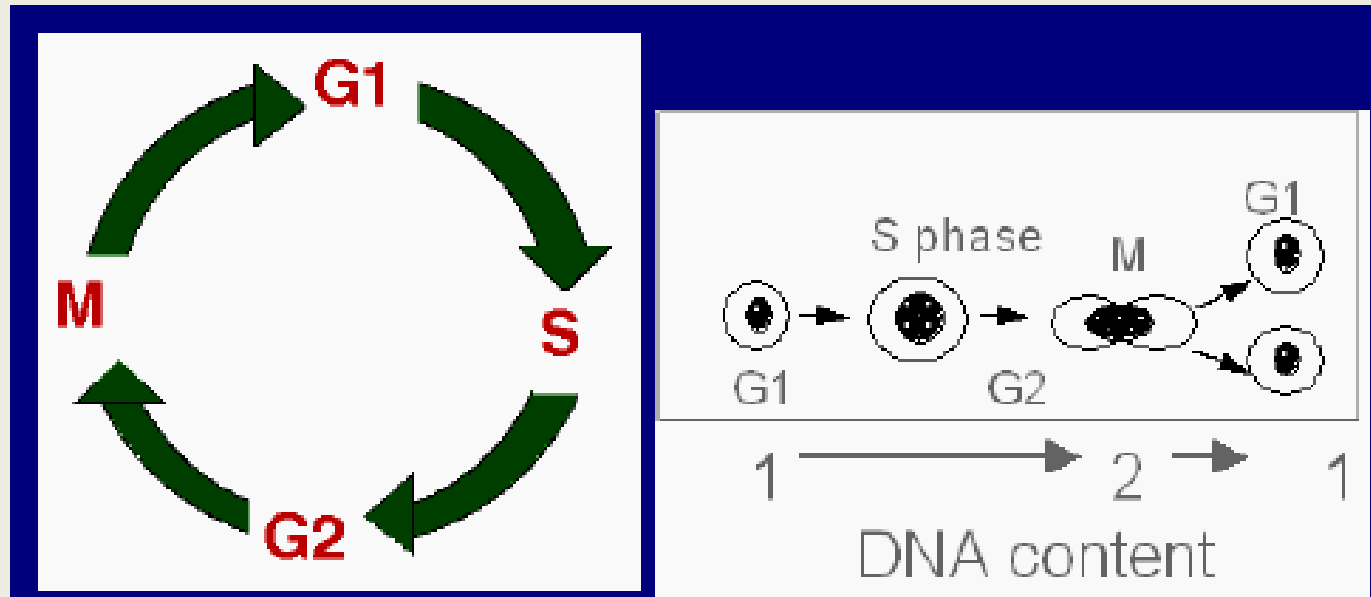
R2 - 76.16% #
R3 - 13.81% #
R4 - 6.21% #



R2 - 60.27% * # ^
R3 - 29.18% * # ^
R4 - 7.19% # ^

Znakowanie wolnymi barwnikami fluorescencyjnymi

Oznaczanie zawartości DNA



DAPI, PI, 7-AAD bezpośrednio łączą się z DNA

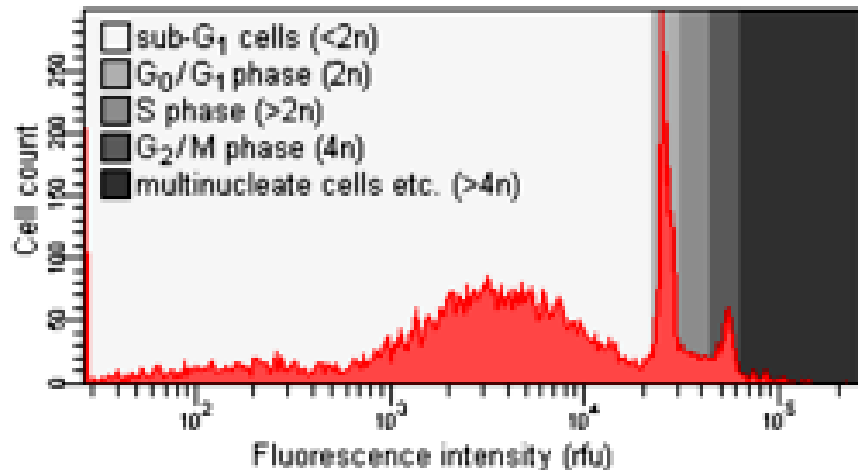
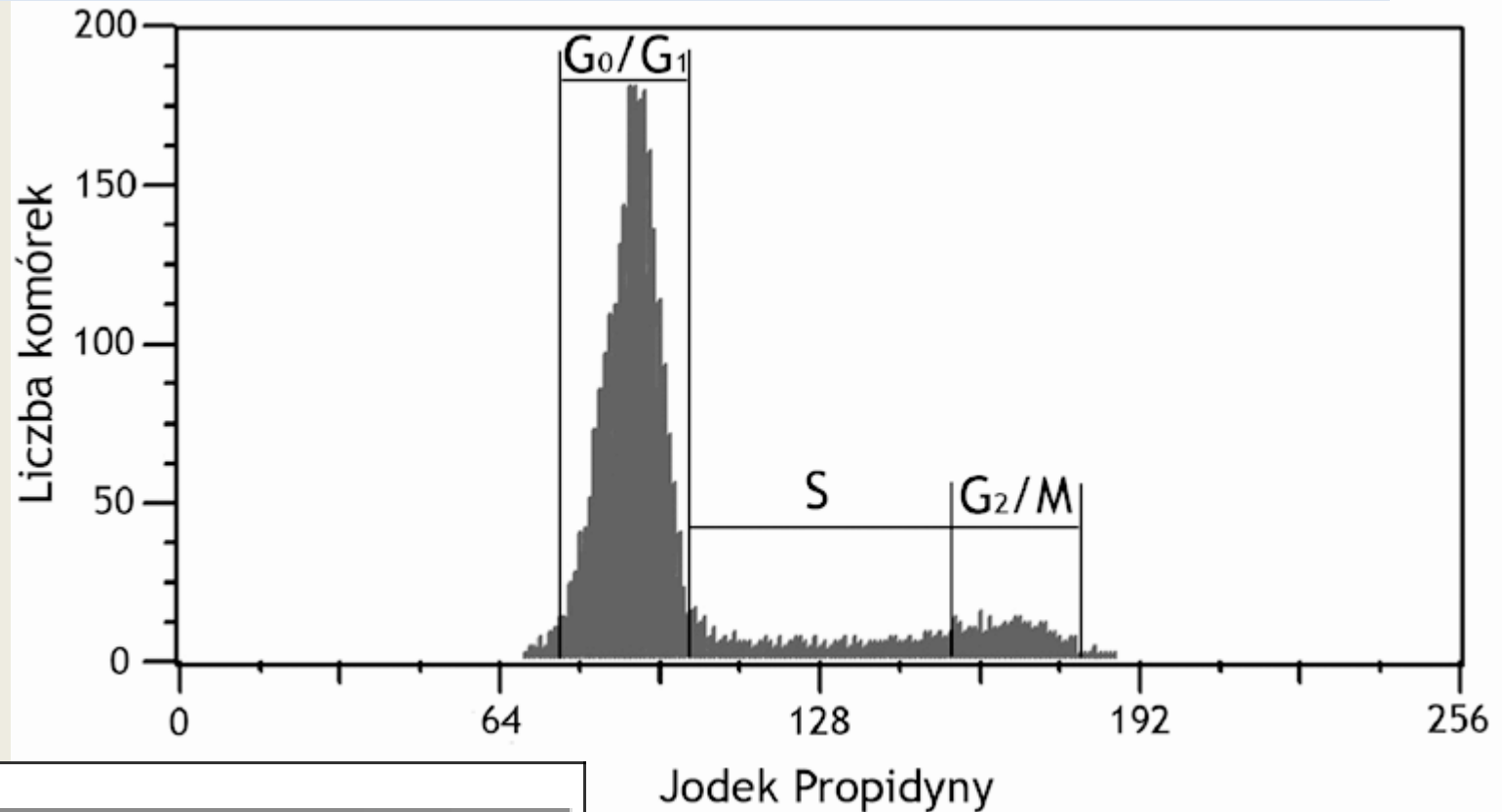
DAPI (4',6-diamidyno-2-fenyloindol) – UV, przenika przez błony żywych i utrwalonych komórek, 358 nm/461 nm

PI – 535 nm/617 nm, nieprzepuszczalny dla błon żywych komórek (w komórkach roślinnych znakuje ścianę komórkową)

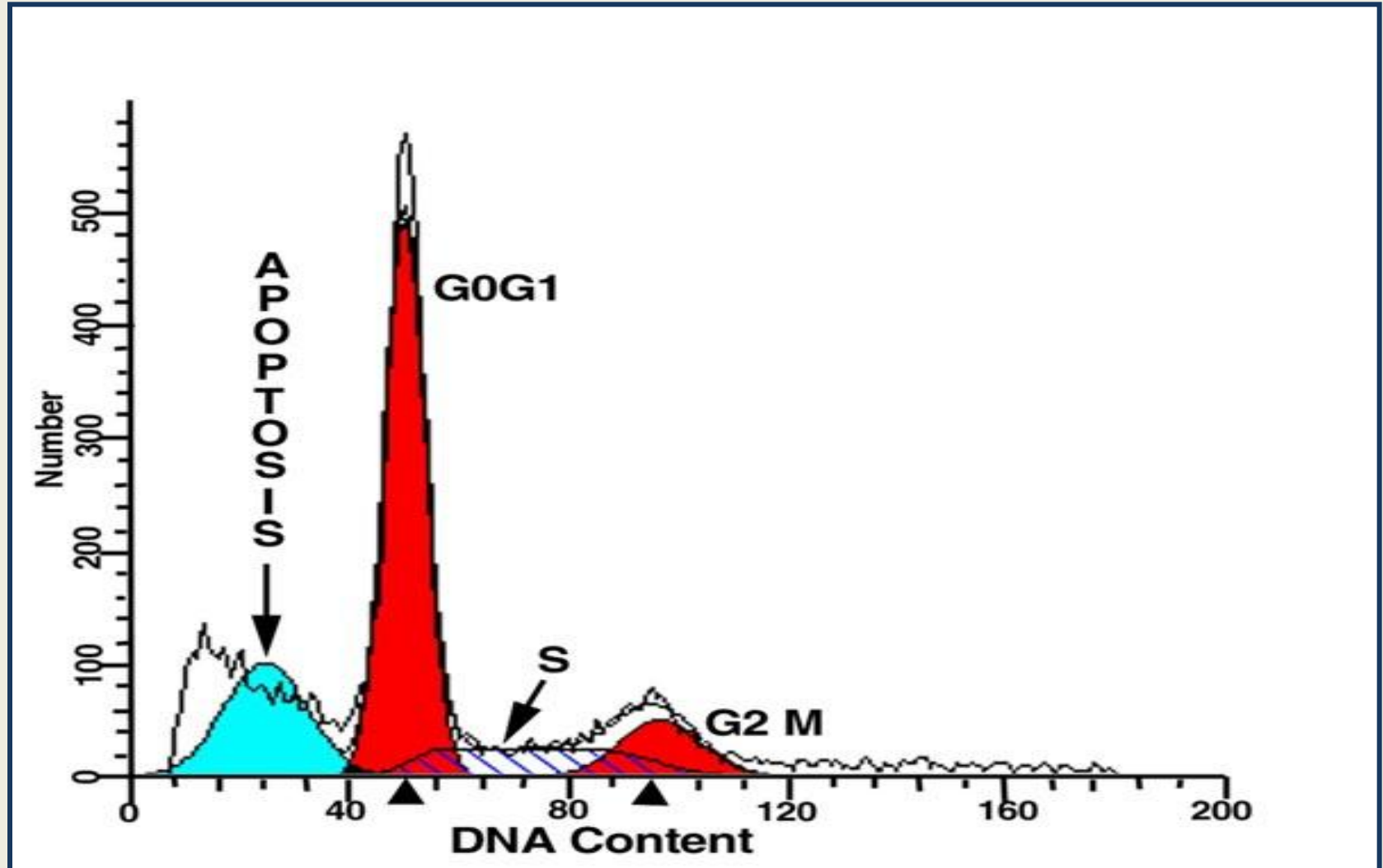
7-AAD, (7-aminoactinomycin D), duże powinowactwo do regionów GC, nie przenika przez błony żywych komórek, 546 nm/647 nm

Hoechst – bis-benzimidazole, przenika przez nienaruszone błony komórek, UV, 345 nm/ 485 nm

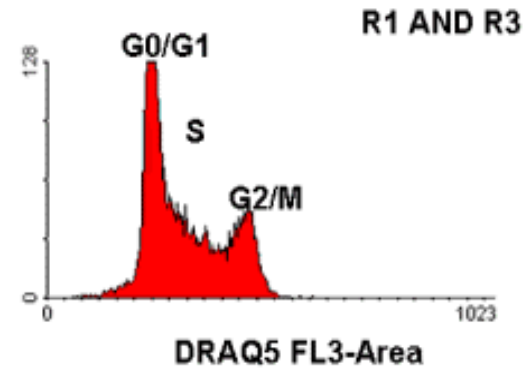
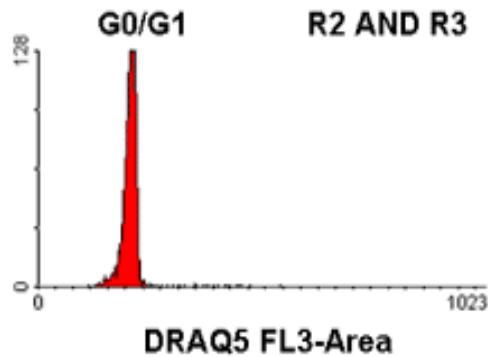
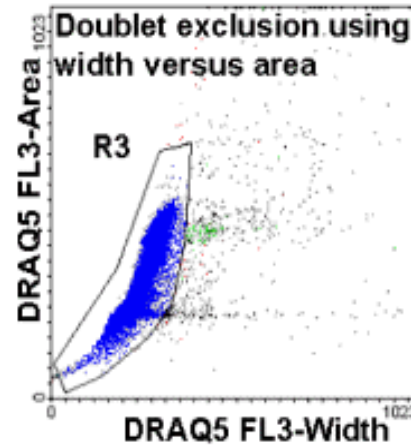
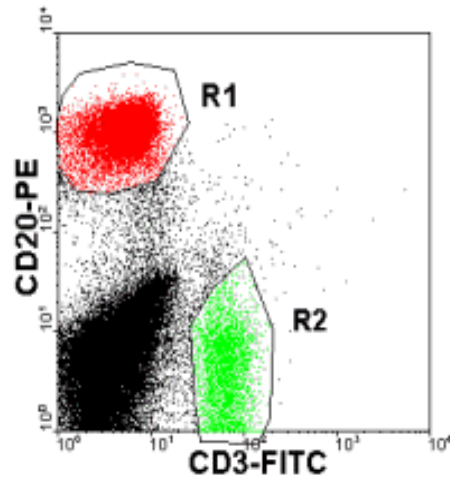
Analiza cyklu komórkowego



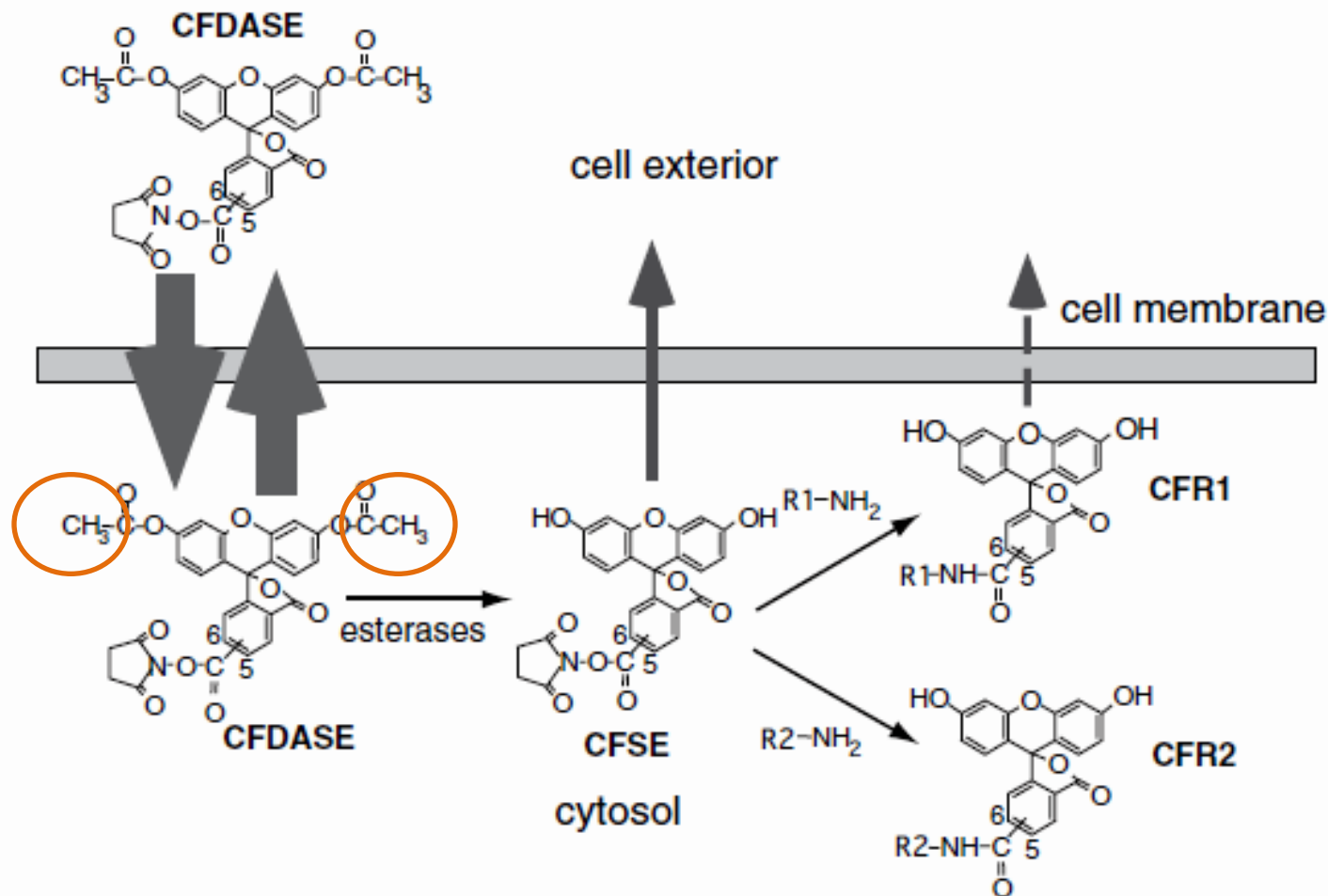
Analiza cyklu komórkowego



Analiza cyklu komórkowego

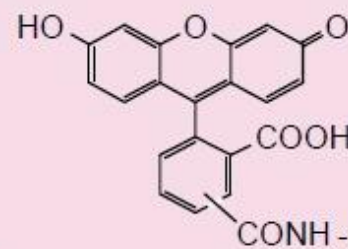
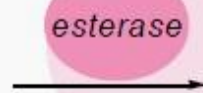
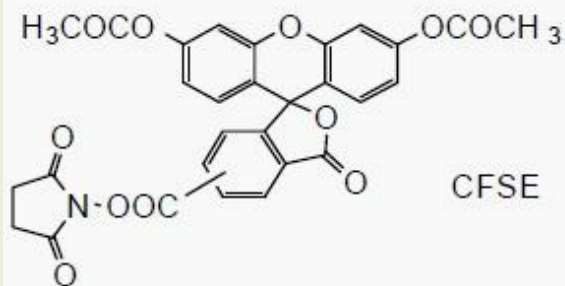
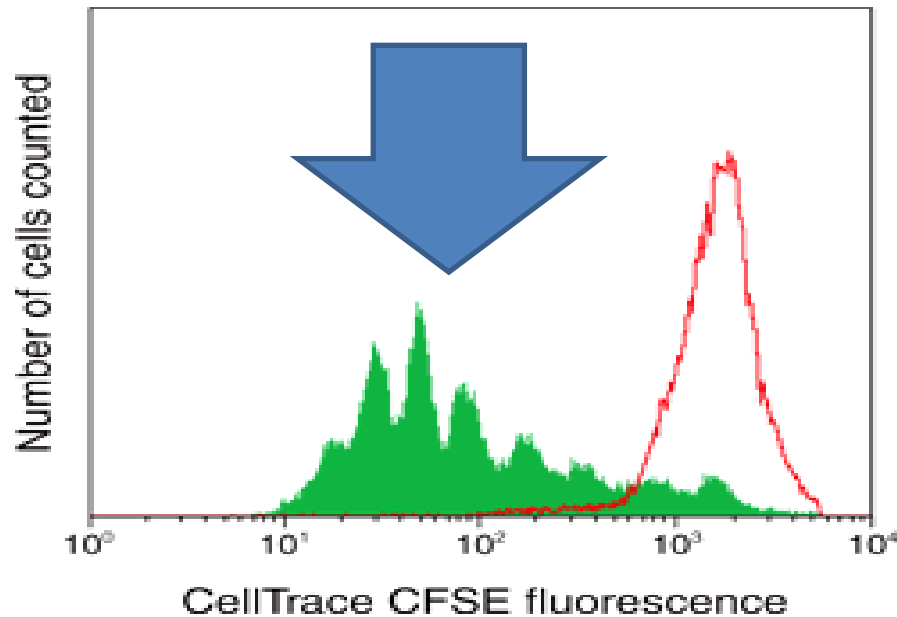


Zastosowanie CFDA-SE do znakowania komórek



- CFDA-SE carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (lipofilowy o słabej fluorescencji)
- CFSE carboxyfluorescein succinimidyl ester (emituje silną fluorescencję)

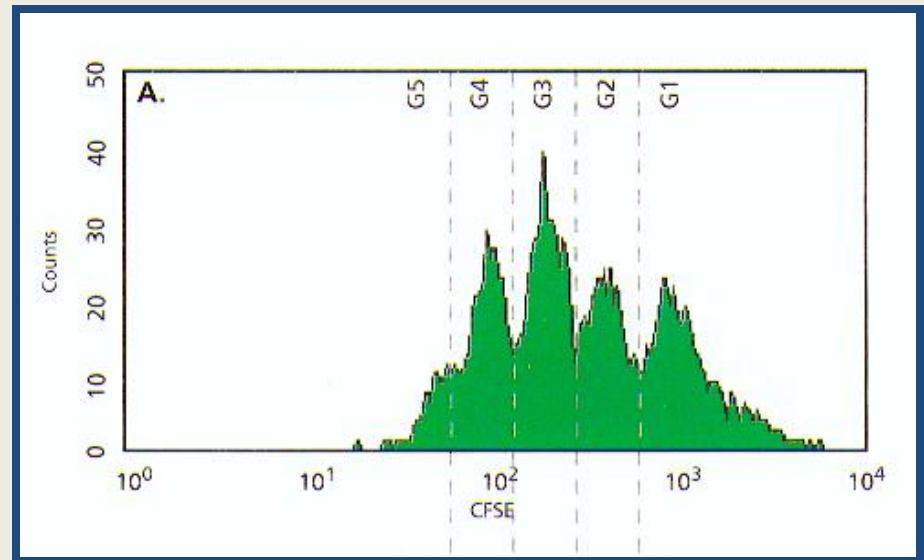
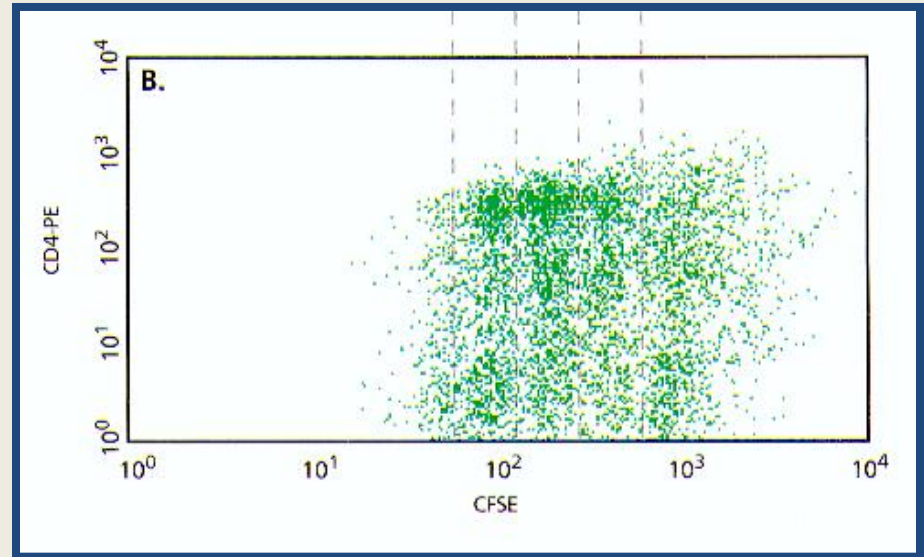
Analiza proliferacj



viable cell

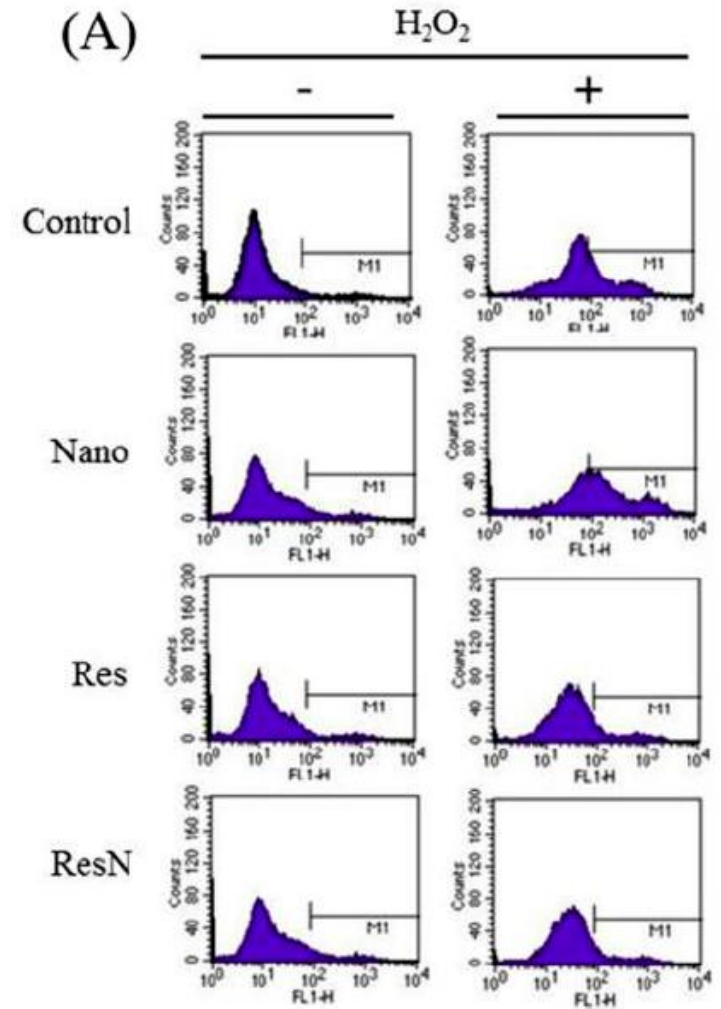
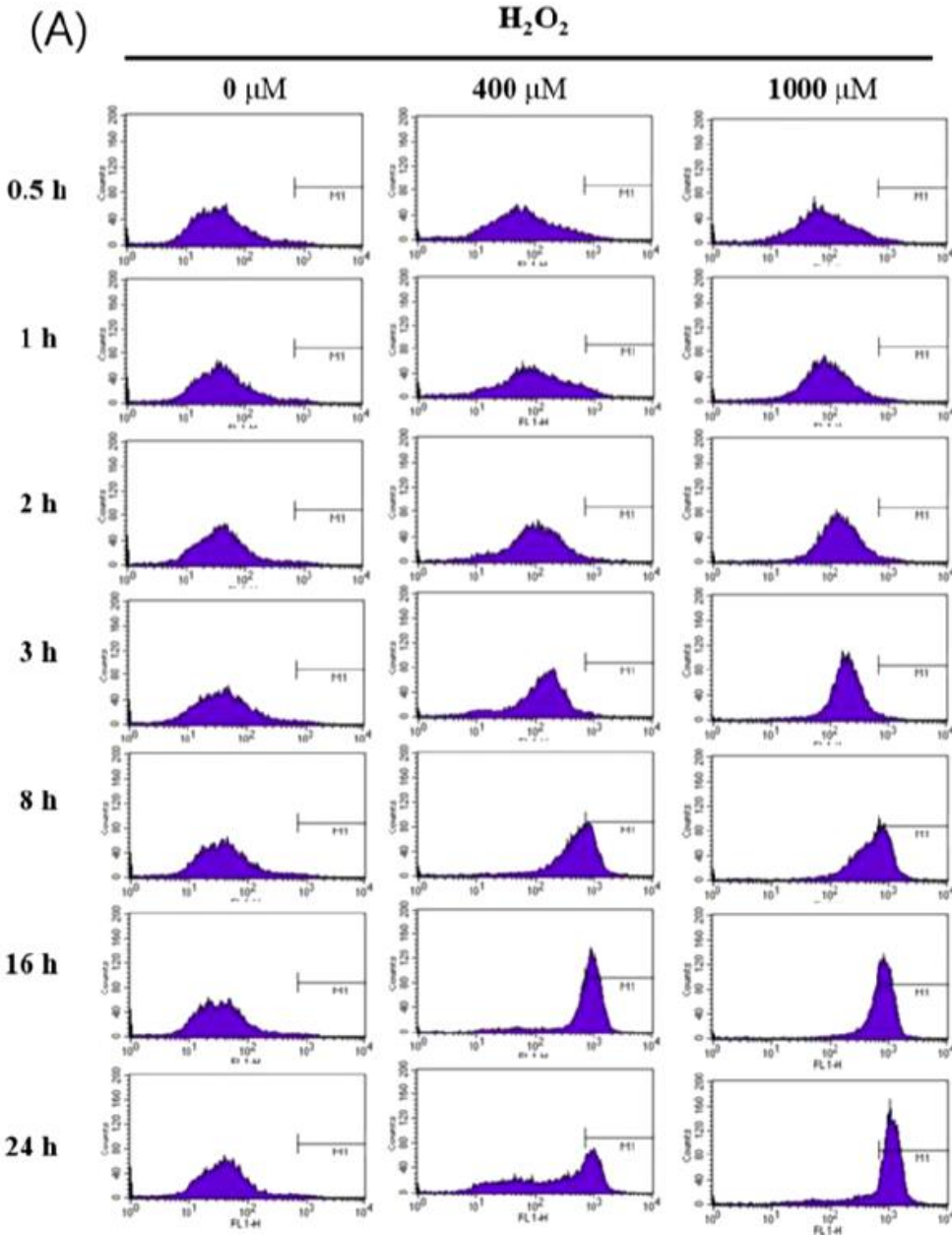
protein-conjugated
fluorescein
green fluorescence

Analiza proliferacjii



Detekcja ROS

H2DCFDA (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate) is a useful fluorogenic reagent to detect reactive oxygen intermediates in cells. On oxidation, H2DCFDA becomes the highly green fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein.



Detekcja ROS

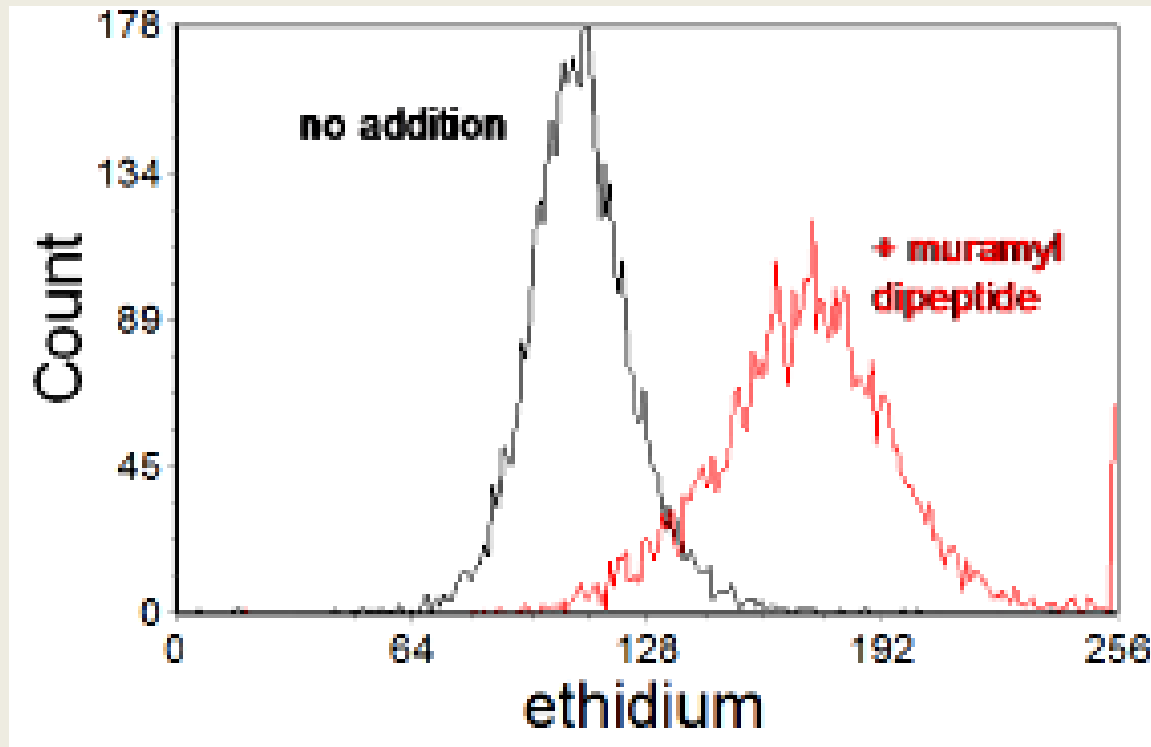
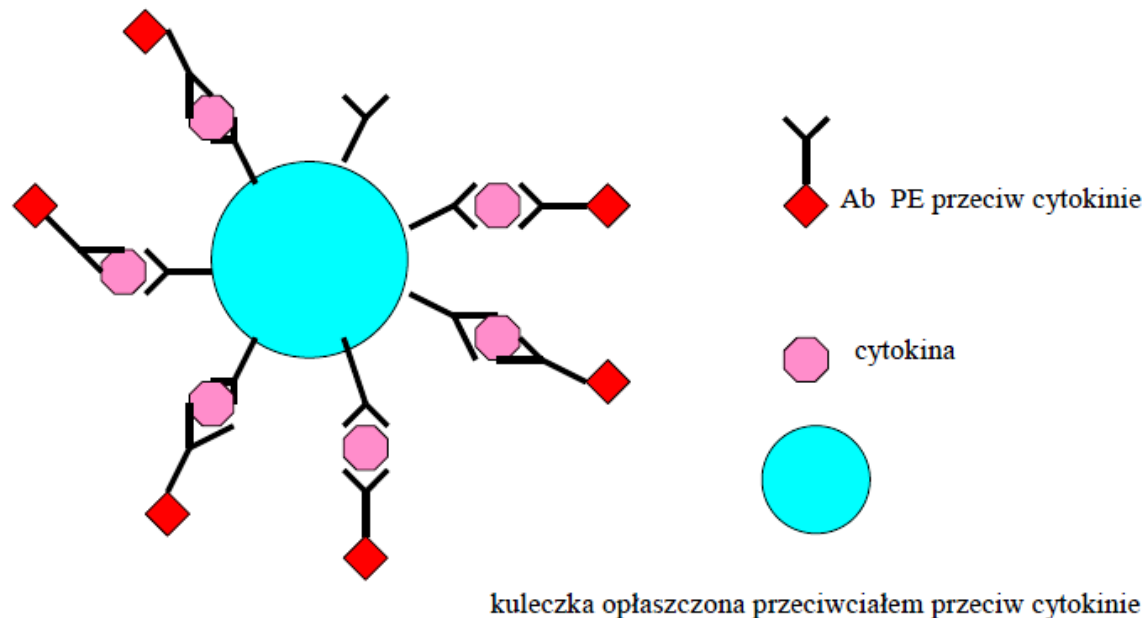
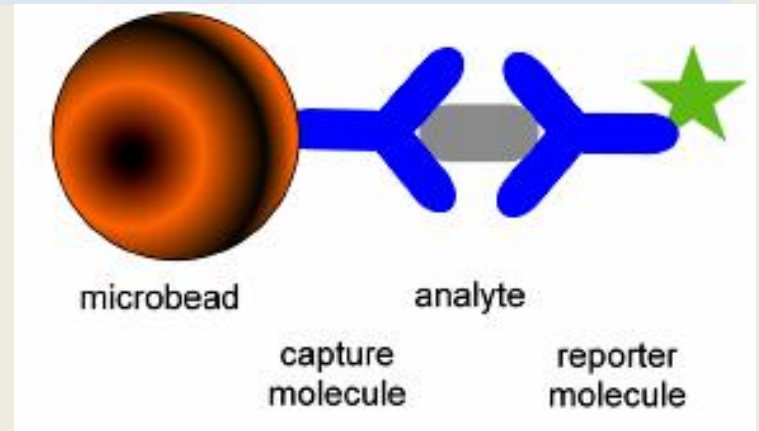
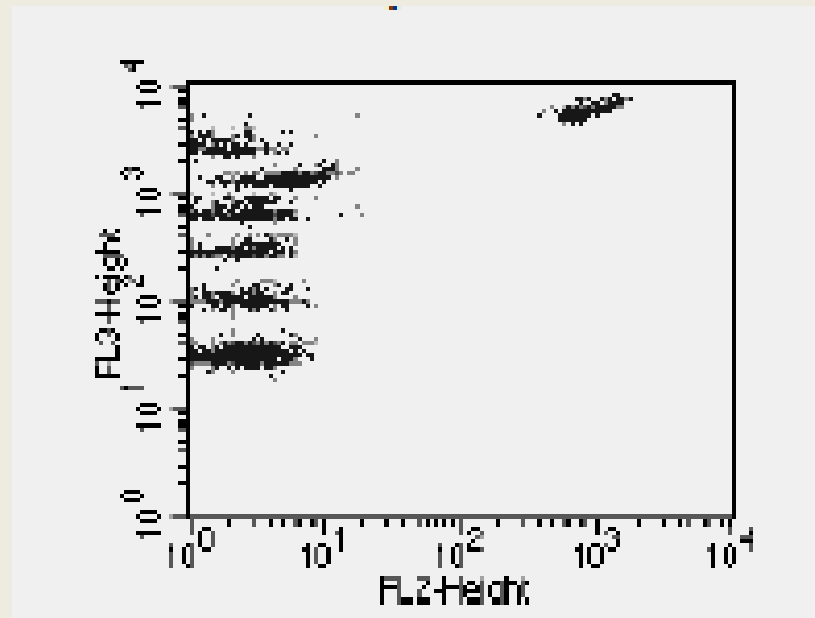
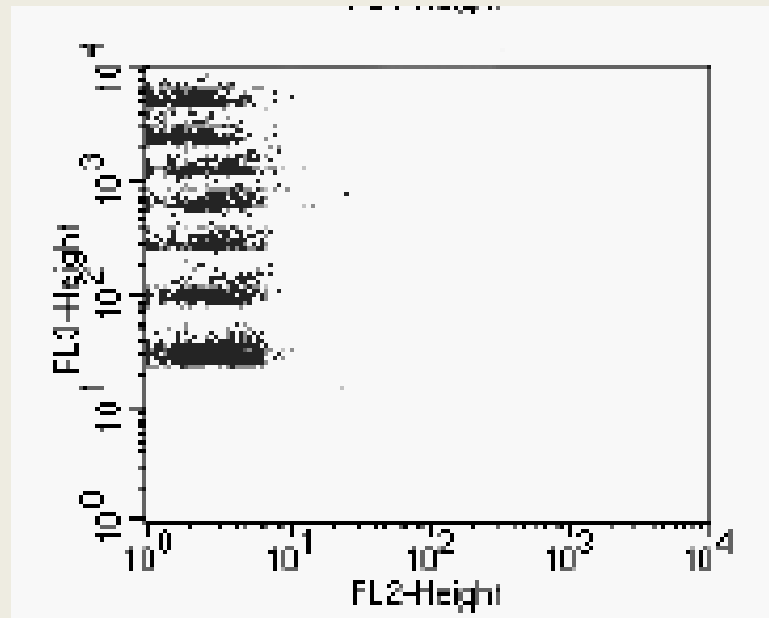
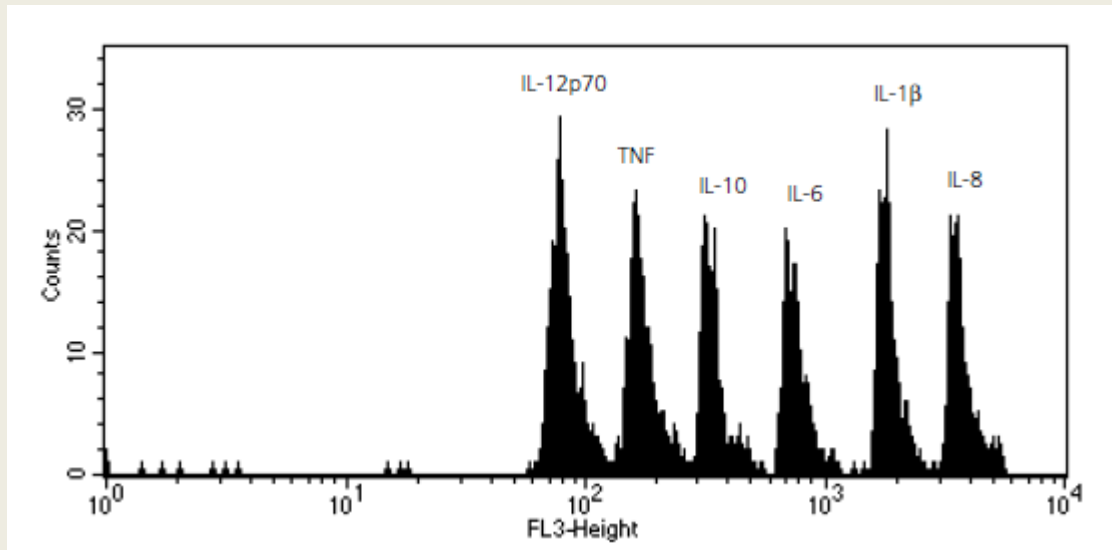


Figure 10.1. Measurement of oxidative burst in human peripheral blood granulocytes using dihydroethidium (hydroethydyna). On oxidation, ethidium is produced which binds to DNA and fluoresces red. The histogram shows the red fluorescence before and after incubation with 10 mM muramyl dipeptide for 15 min. The granulocytes were displayed by gating an a scatter plot. Data supplied by Richard Allman & Amanda J. Taylor, then at the Velindre Hospital, Cardiff, Wales.

Jeszcze raz zastosowanie przeciwciał.....ale na nośniku



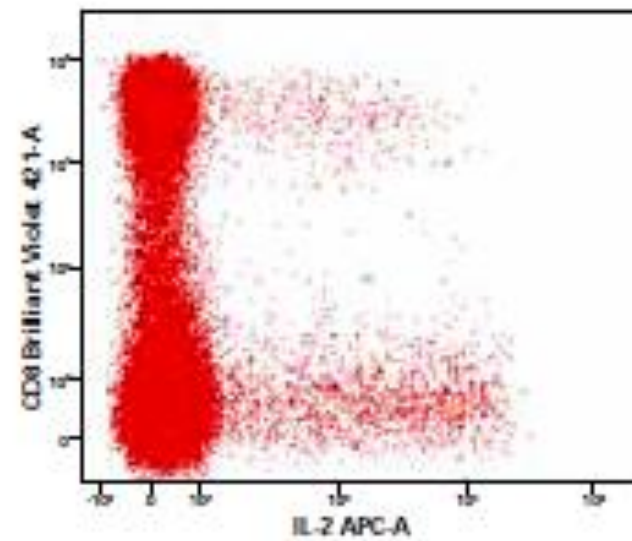
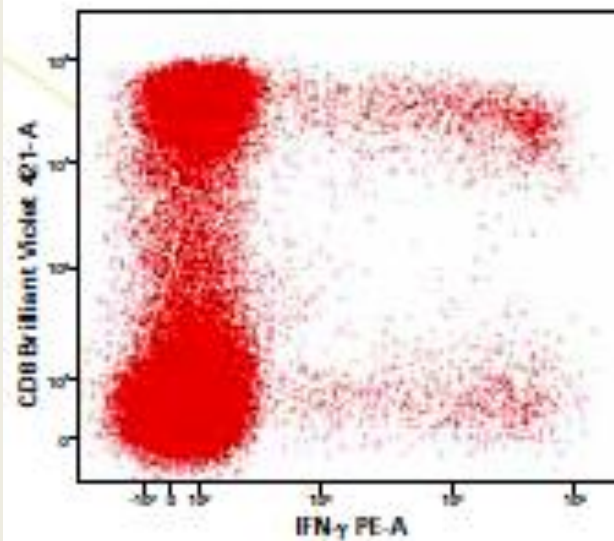
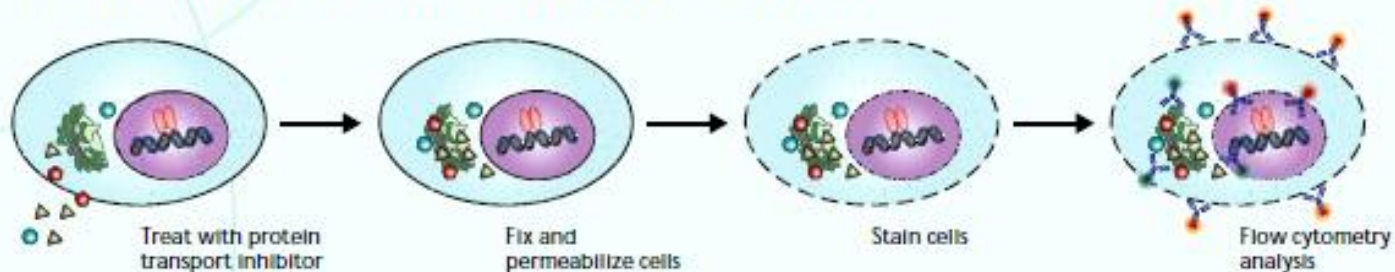
Oznaczanie stężenia cytokin



Wykrywanie wewnątrzkomórkowych markerów

Basic principles of intracellular staining.

Cells are fixed and permeabilized (symbolized by dashed line membrane), stained, and then analyzed by flow cytometry. For studies of secreted proteins, cells are first treated with a protein transport inhibitor to allow accumulation of the target protein inside the cell.



Wykrywanie wewnątrzkomórkowych cytokin

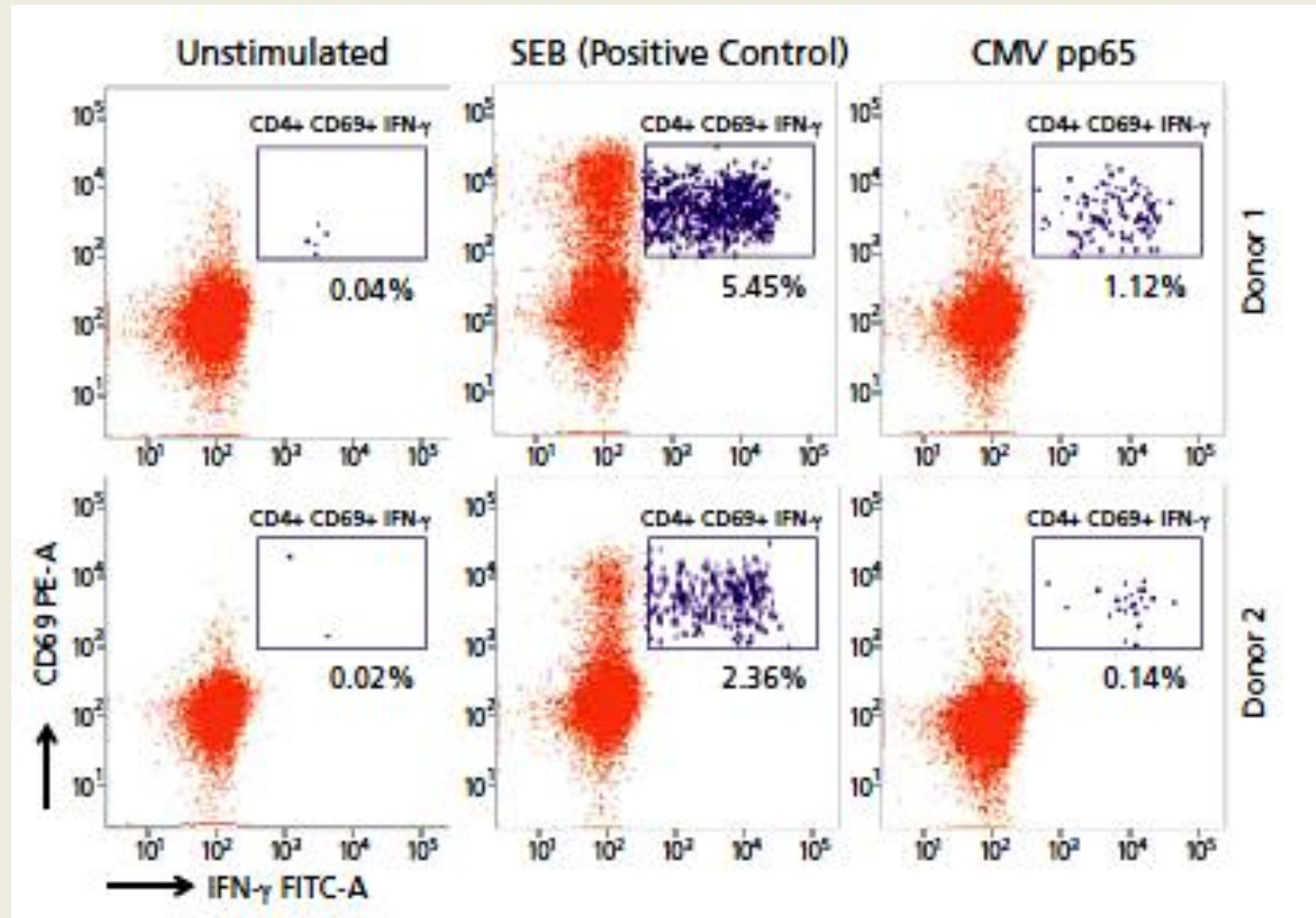
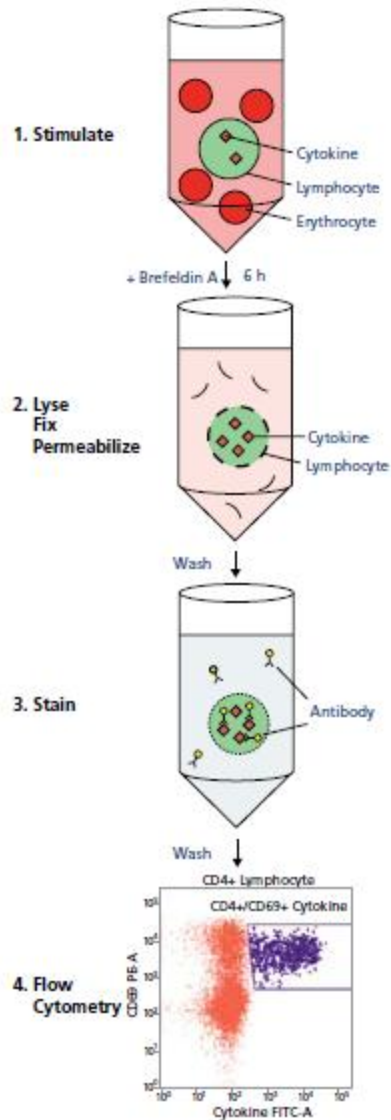
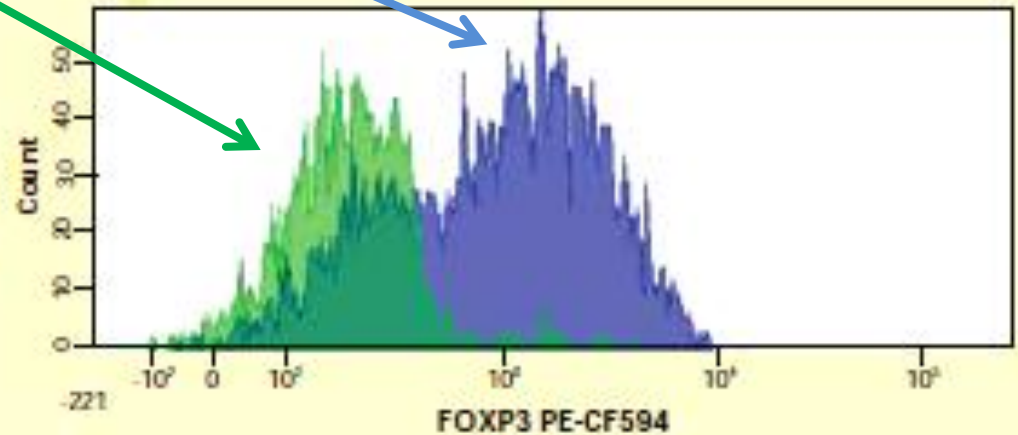
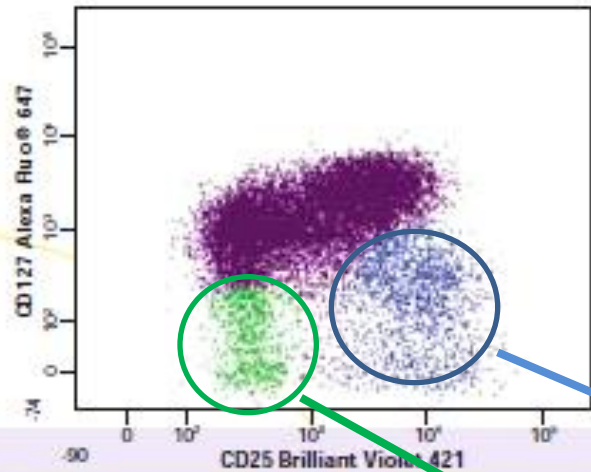
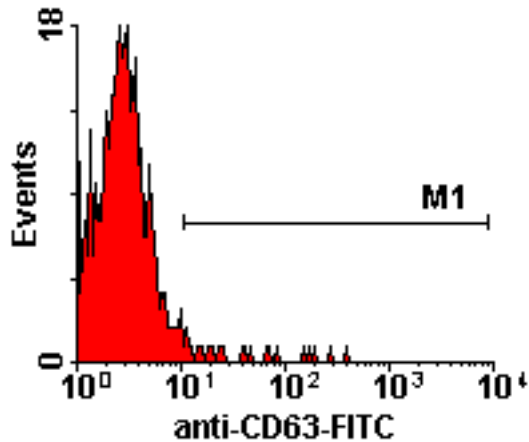
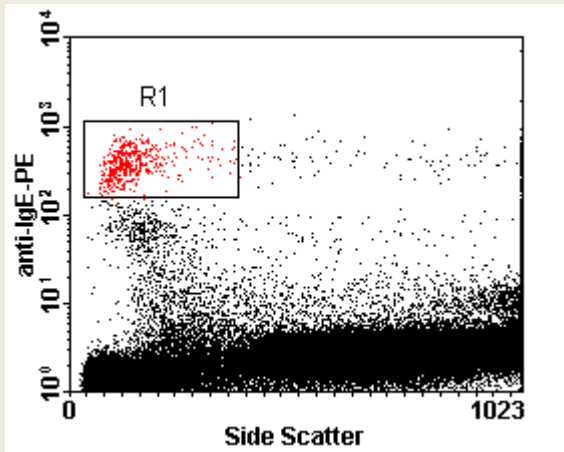


Figure 1. Overview of the BD FastImmune Intracellular Cytokine assay.

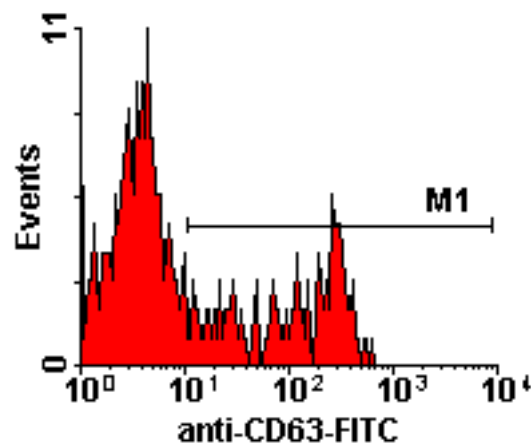
Wykrywanie czynników transkrypcyjnych



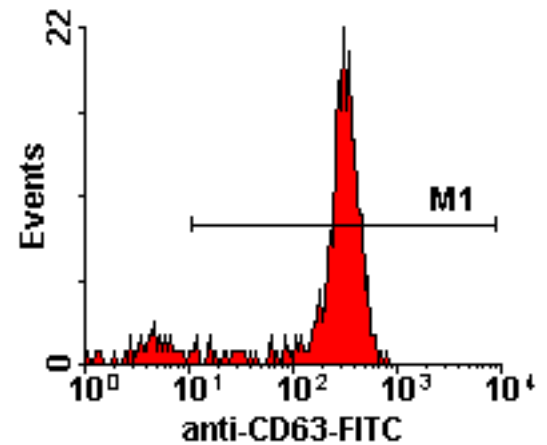
Testy diagnostyczne: aktywacja bazofili



Kontrola negatywna

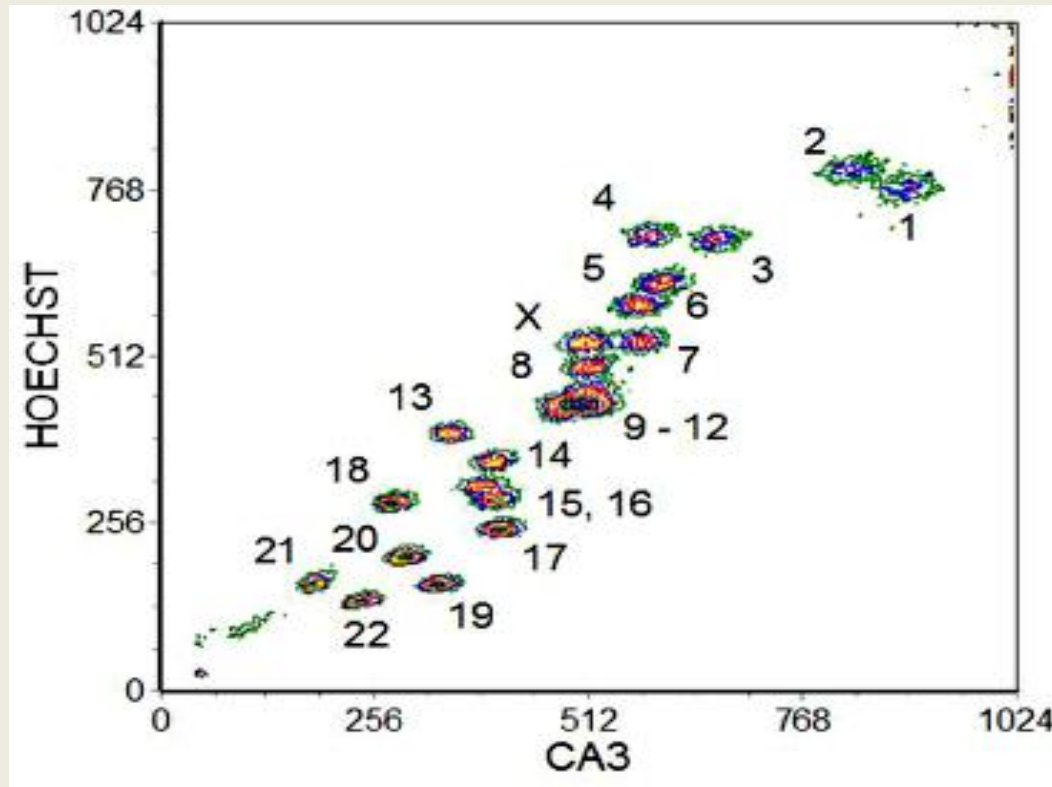


Kontrola pozytywna



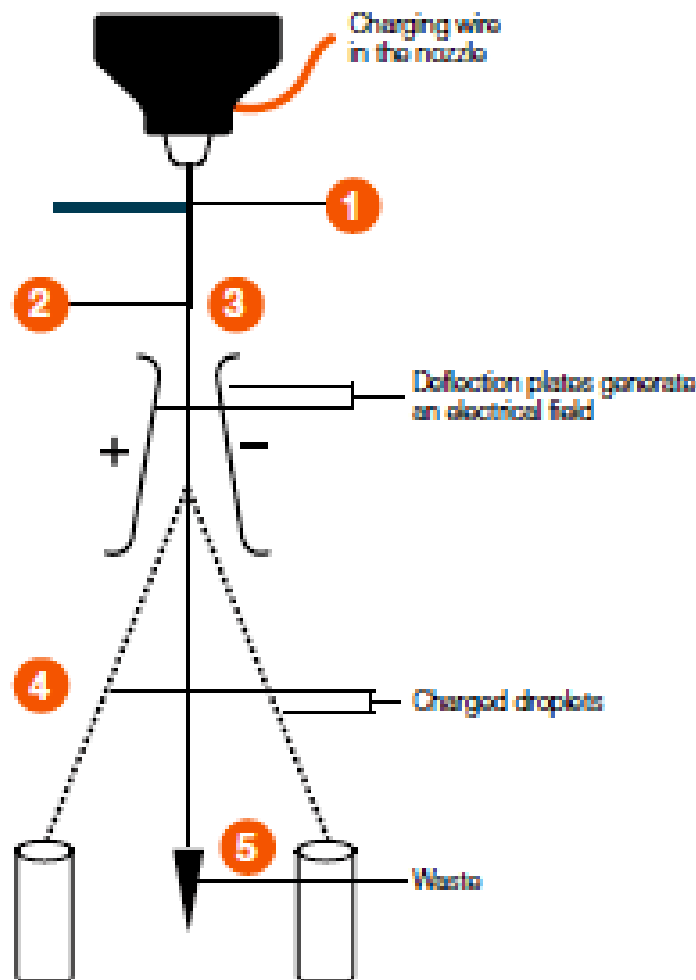
Próba

Analiza chromosomów



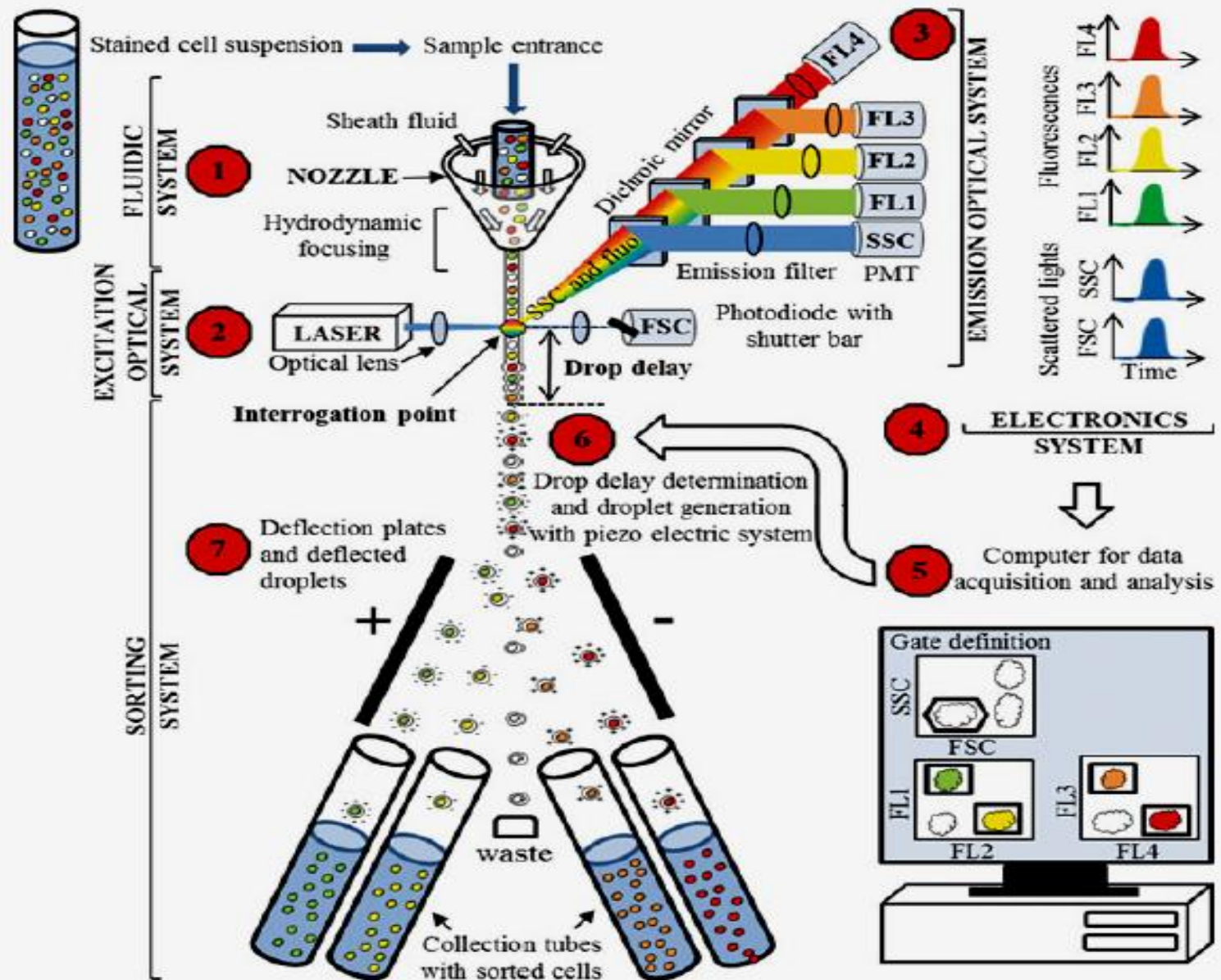
The dyes usually selected are Hoechst 33258, which shows a preference for AT-rich regions, and chromomycin A3, which binds to GC-rich regions. A cytometer with two high-powered argon-ion lasers is required; one laser is tuned to give UV to excite the Hoechst dye (blue fluorescence) and the other to 458 nm to excite the chromomycin A3 (green fluorescence). A typical result is shown in *Figure 10.5*.

Podstawy sortowania komórek (a)



- 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

Podstawy sortowania komórek (b)



Dziękuję za uwagę