

*Průtoková cytometrie*

# Principy a instrumentace

Ing. Antonín Hlaváček



## Úvod

- Průtoková cytometrie je moderní laboratorní metoda
- měření a analýza fyzikálních -chemických vlastností buňky během průchodu laserovým paprskem
- Identifikace různých buněčných typů uvnitř smíšené populace, analýza jednotlivých subpopulací v rámci jedné populace
- Rychlá, přesná a reprodukovatelná metoda, umožňuje současné měření několika parametrů až na 100 000 buněk za 1 sekundu



# *Složky průtokového cytometru*

**Fluidika:** vzorek – buněčná suspenze.

Nasátí vzorku do přístroje. Průtok vzorku přístrojem. Vytvoření proudu buněk pro měření. Sortování. Regulace rychlosti měření.

**Optika:** Zdroj excitačního záření. Optické zařízení pro sběr emitovaného záření a odraženého světla. Zdroje světla (lasery, detektory, filtry)

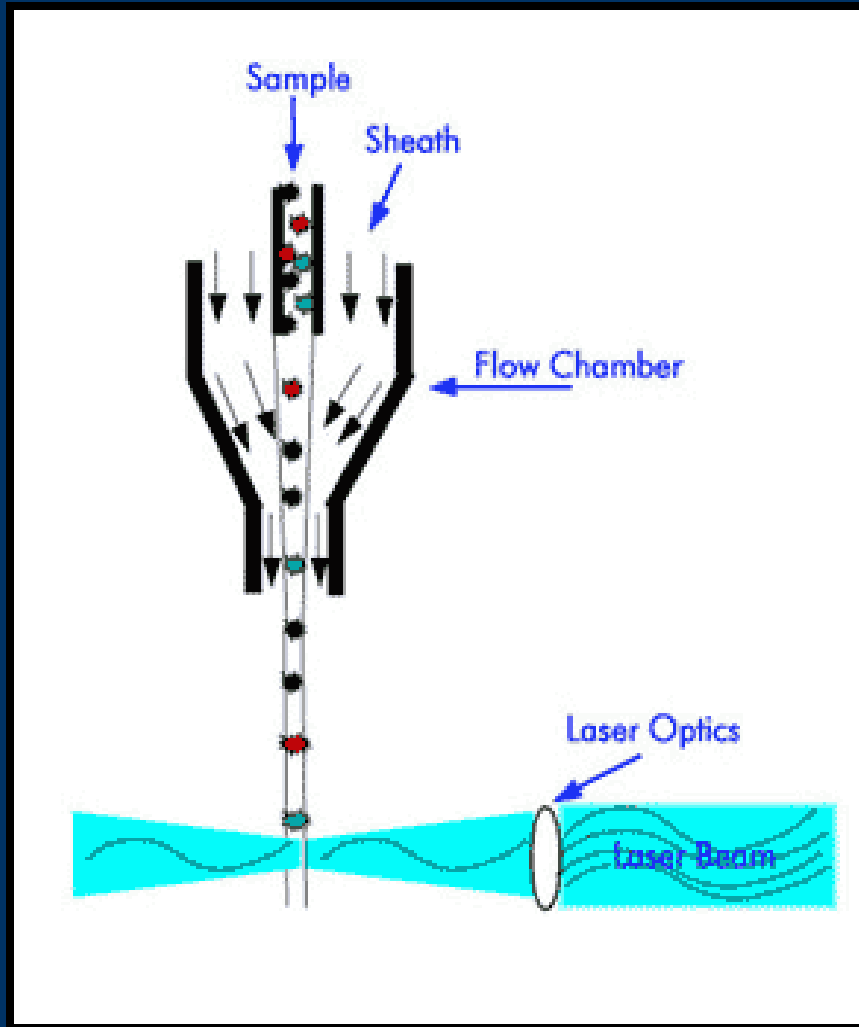
**Elektronika:** Převod optického signálu na elektronický signál. Digitalizace pro počítačovou analýzu.

**Analýza dat:** Zobrazení dat & analýza  
identifikace populací  
kvantifikace intenzity značení  
kvantifikace zastoupení buněk v dané populaci

---

---

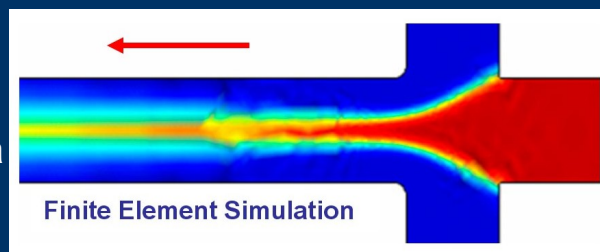
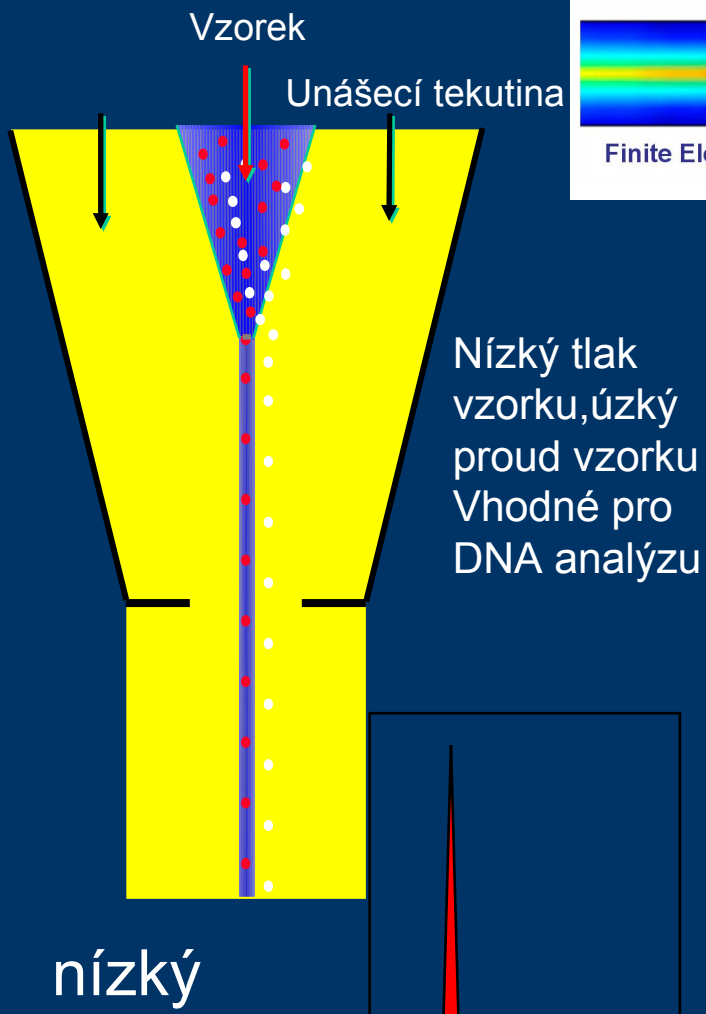
# Základní komponenty průtokového cytometru:



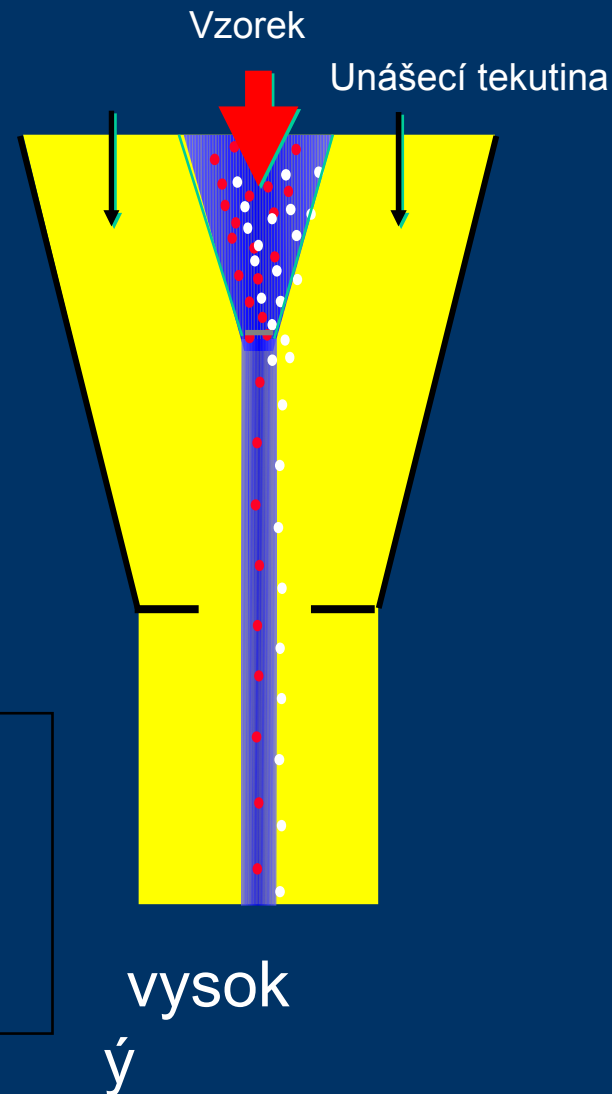
- 1. Fluidika
  - Flow cell (průtoková komůrka)
  - Sheath fluid (nosná kapalina)
  - Hydrodynamická fokusace

# Hydrodynamická fokusace v kyvetě

Dobré rozlišení



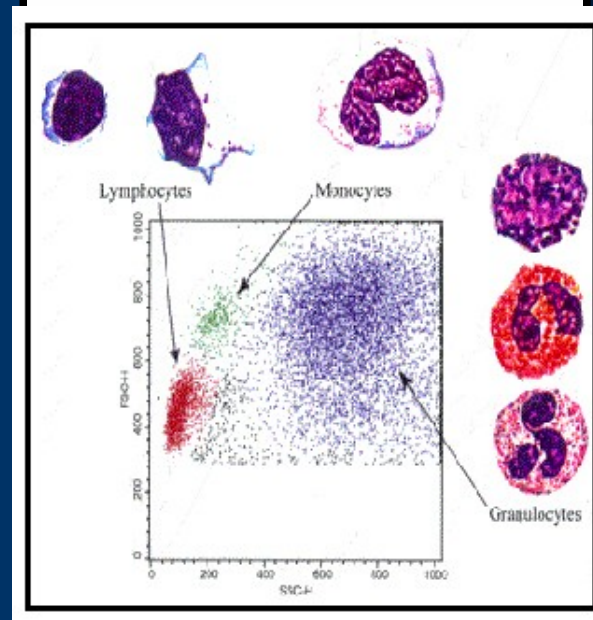
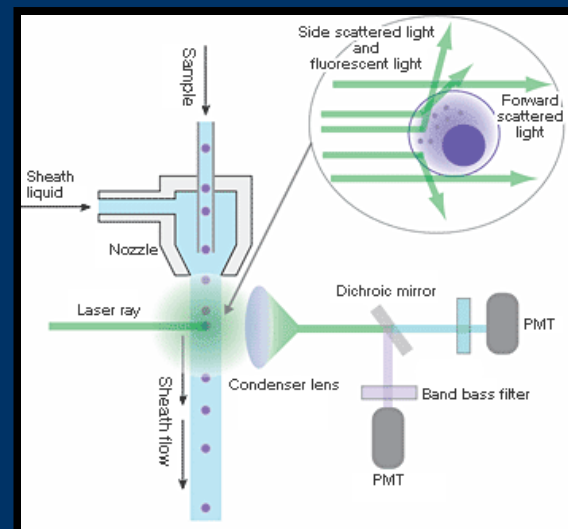
Horší rozlišení



ý

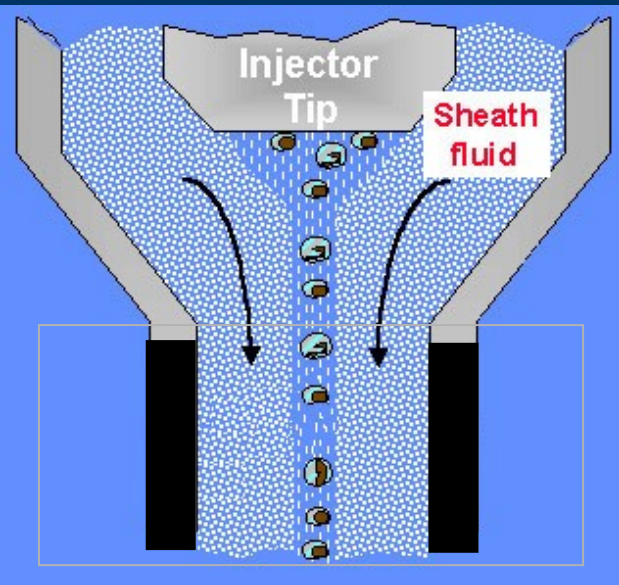
# Základní komponenty průtokového cytometru:

- 2. Optický systém
- Laserový paprsek
- Forward scatter (FSC)
- Side scatter (SSC)
- emitované fluorescenční signály

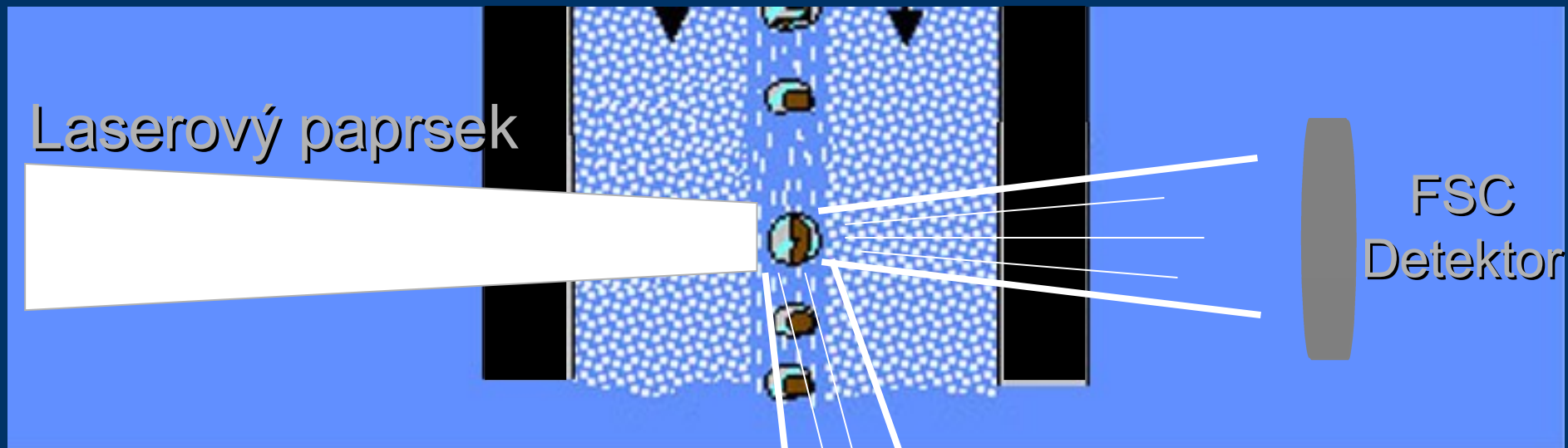


# Rozptyl světla buňkou: Forward Scatter (FSC)

Čím větší buňka, tím větší rozptyl světla



# Rozptyl světla buňkou: Side Scatter (SSC)



Intenzita SSC je proporcionální množství cytosolických struktur v buňce (granula, buněčné inkluze, atd.)

**SSC závisí na granularitě buňky**

Sběrné čočky

SSC  
Detektor

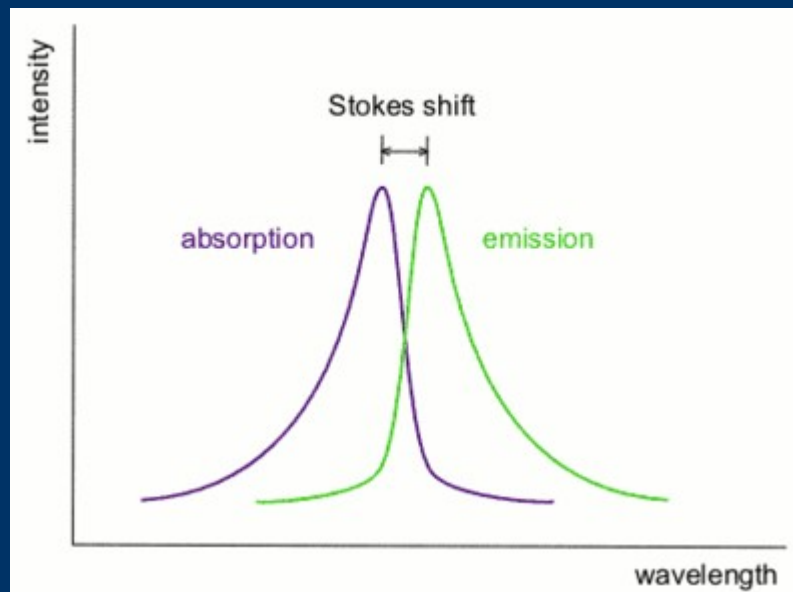
FSC  
Detektor



## Fluorescenční kanály

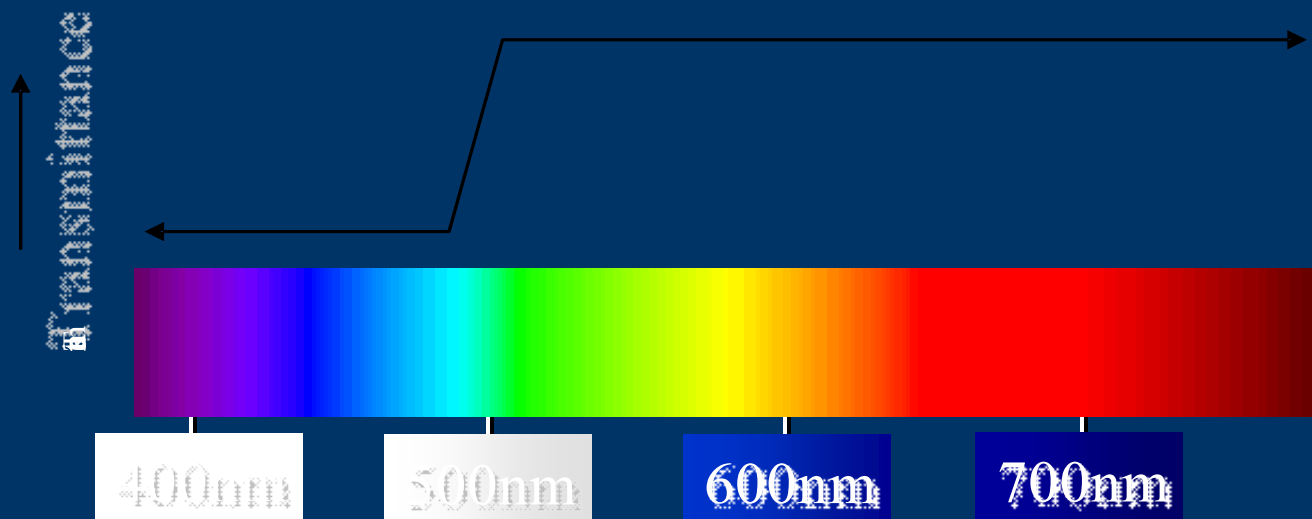
- Fluorochromy (buňce vlastní nebo navázané, např. pomocí protilátek) na buňkách absorbují část světla a excitují se
- Emise světla o nižší energii, tj. o delší vlnové délce než byla excitační.
- Emitované fotony prochází přes sběrné čočky a jsou pomocí soustavy filtrů a zrcadel rozděleny do **kanálů** dle svojí vlnové délky

### Stokesův posun



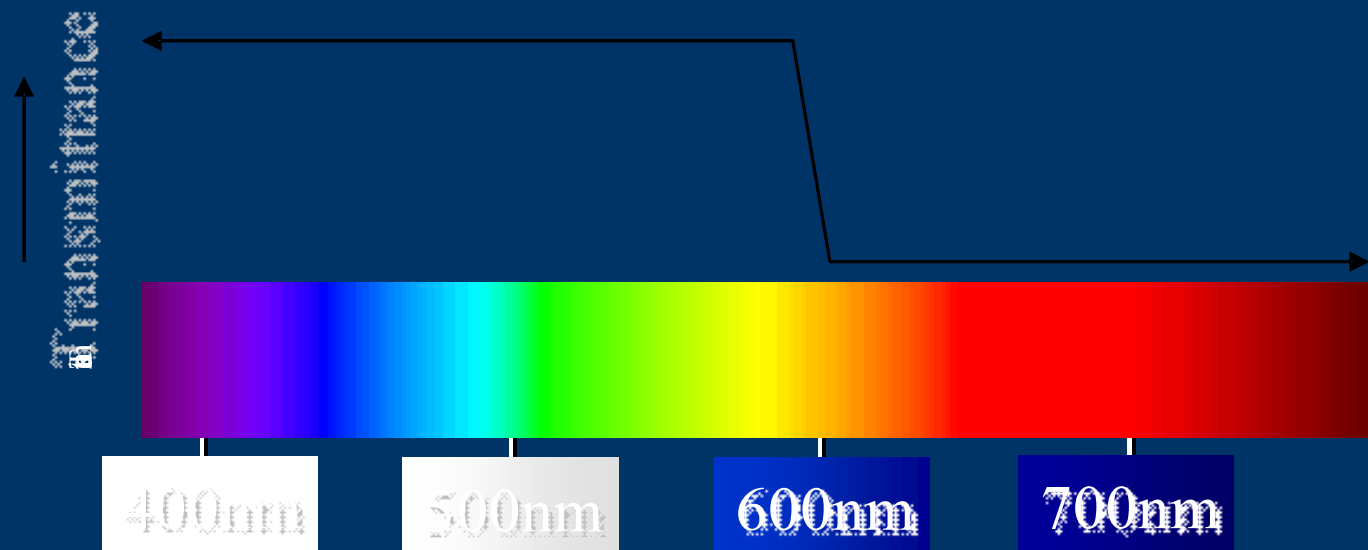
# Long Pass Filtry (LP)

- Propouští všechny vlnové délky vyšší než specifikovaná vlnová délka
- Example: 500LP bude propouštět všechny vlnové délky větší než 500nm



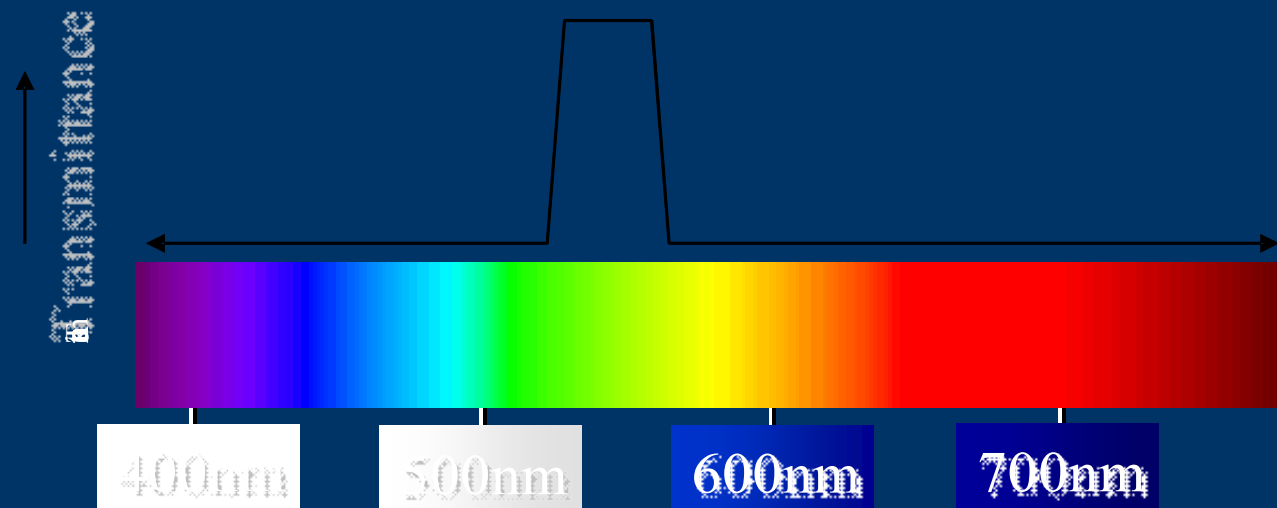
# Short Pass Filtry (SP)

- Propouští všechny vlnové délky kratší než specifikovaná vlnová délka
- Příklad: 600SP bude propouštět všechny vlnové délky kratší než 500nm.



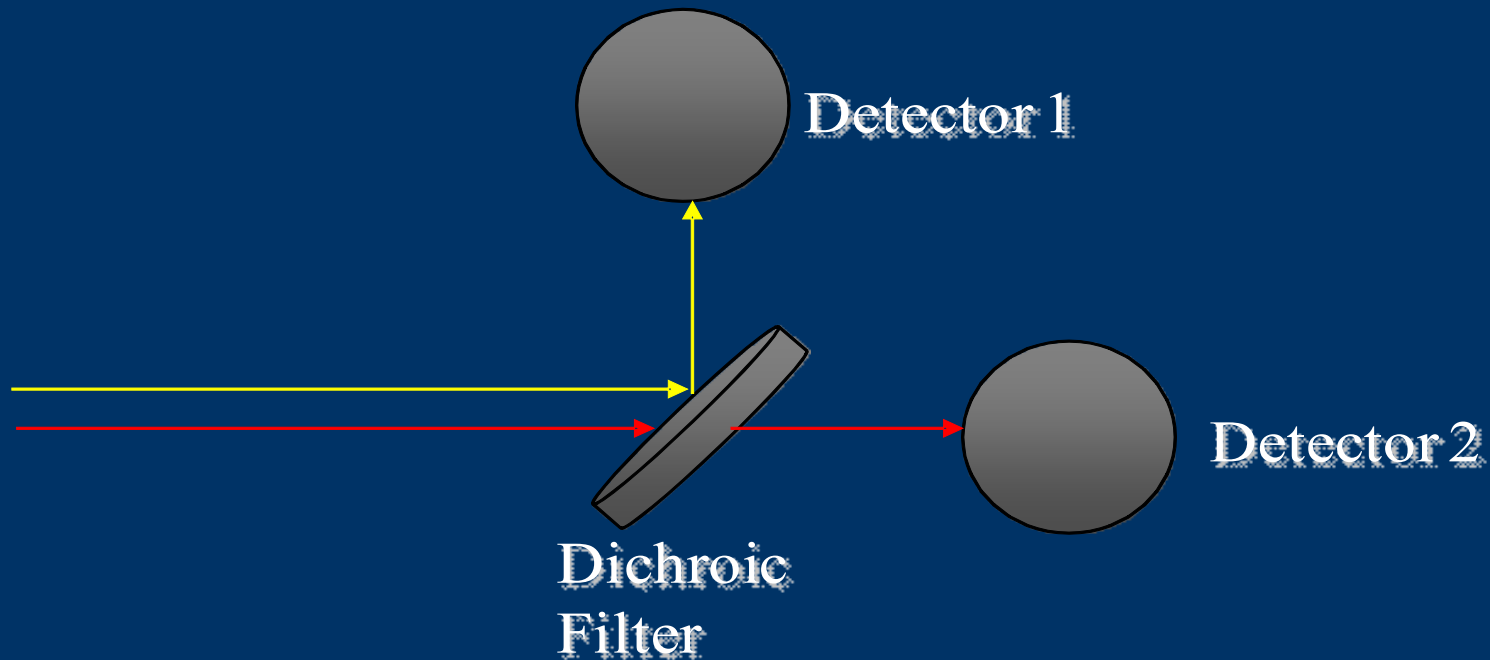
# Pásmové filtry

- Propouší specifické rozmezí vlnových délek
- Příklad: 550/20BP Filter bude propouštět vlnové délky mezi 540nm a 560nm ( $550/20 = 550 \pm 10$ , ne  $550 \pm 20$ )

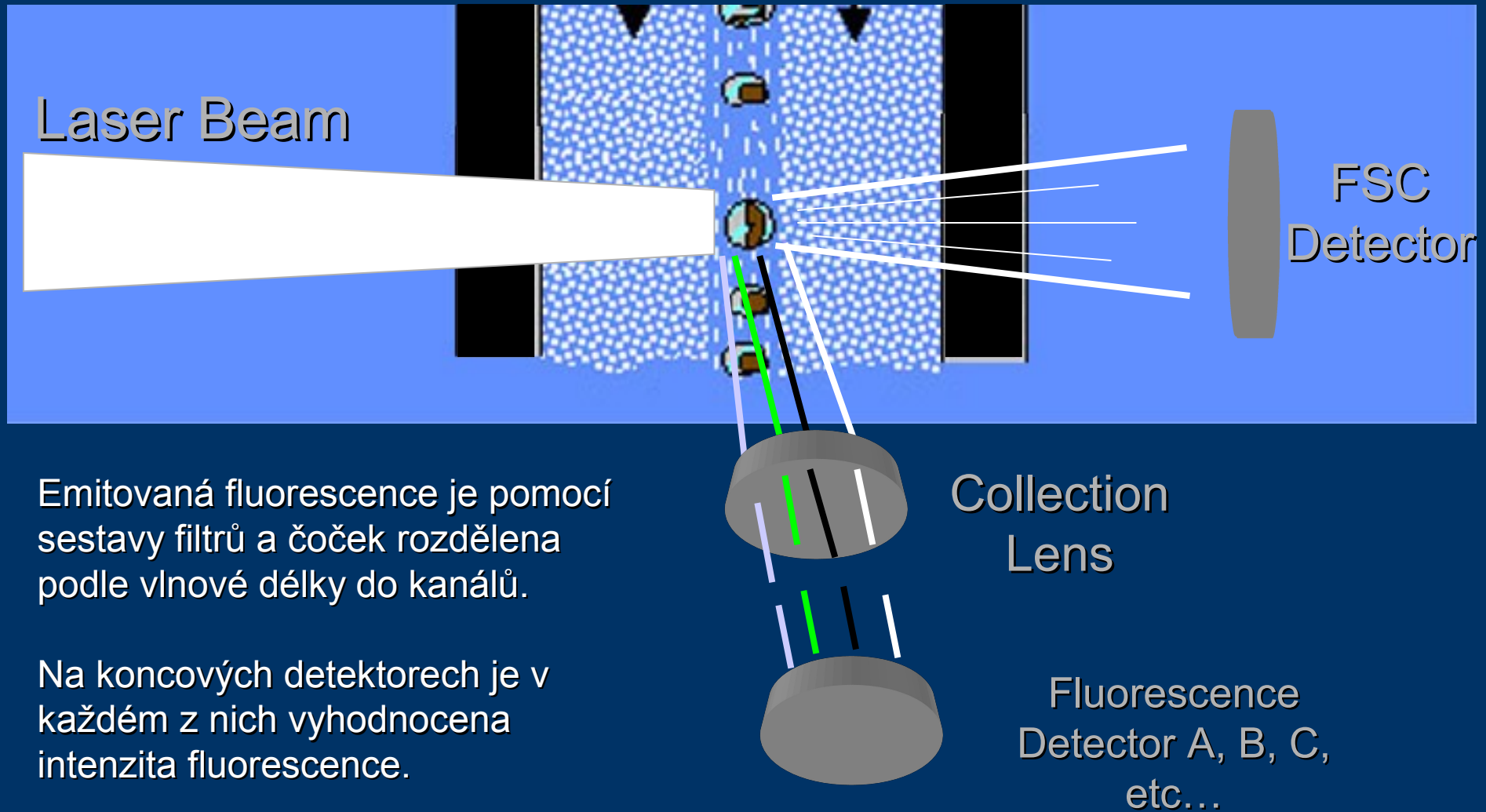


# Dichroické filtry

- Mohou být long pass (LP) nebo short pass (SP)
- Filtr je umístěn v úhlu  $45^\circ$
- Část světla je odražena v úhlu  $90^\circ$  k příchozímu paprsku, část světla je propuštěna.



## Detekce Fluorescence



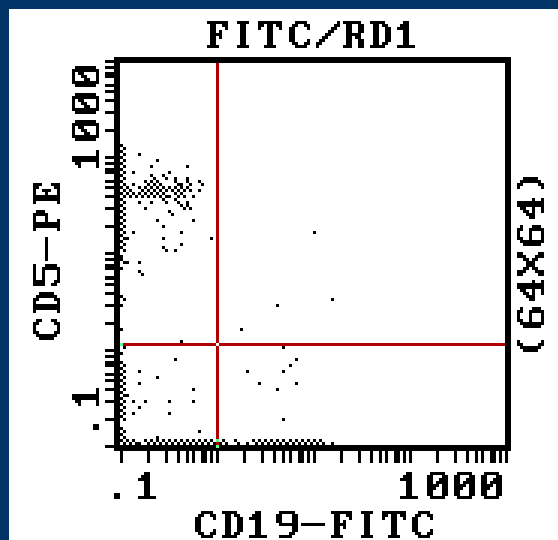
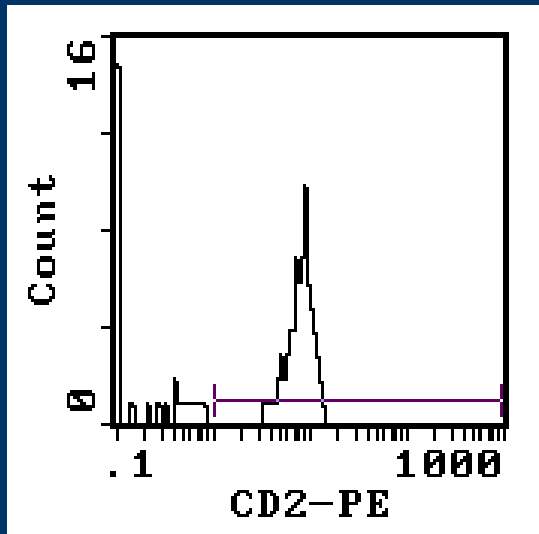
Emitovaná fluorescence je pomocí sestavy filtrů a čoček rozdělena podle vlnové délky do kanálů.

Na koncových detektorech je v každém z nich vyhodnocena intenzita fluorescence.

Collection  
Lens

Fluorescence  
Detector A, B, C,  
etc...

# Základní komponenty průtokového cytometru

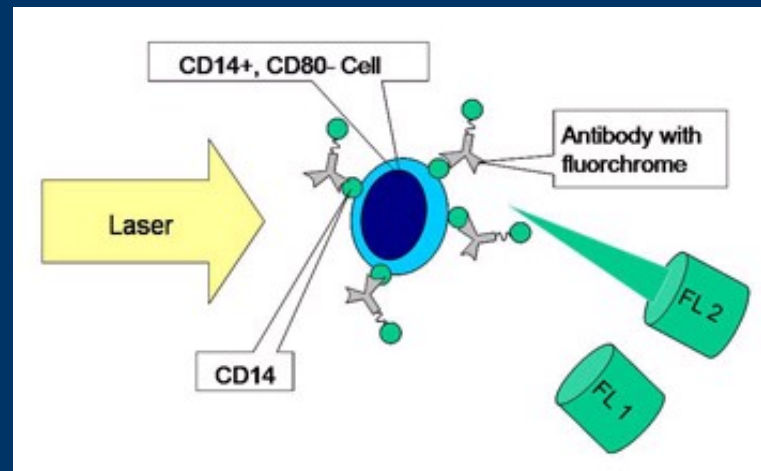


## 3. Počítačový systém (workstation)

- Výstupem měření jsou pak výsledky v grafické a číselné formě:
  - jednoparametrové histogramy
  - dvouparametrové histogramy
  - zastoupení buněk nesoucí daný antigen v procentech

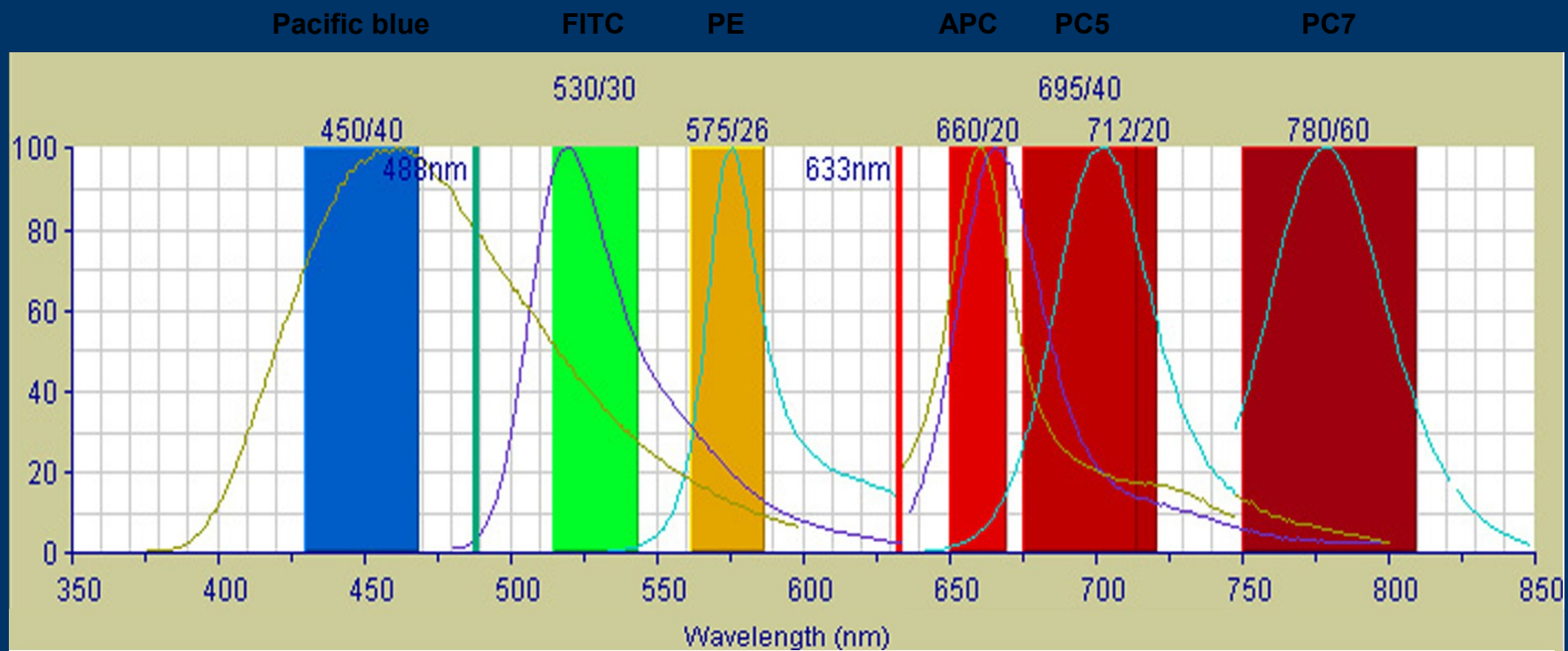
# Fluorescenční vlastnosti buněk

- Detekována fluorescence procházejících buněk. Fluorescenční barviva (fluorochromy) navázané na analyzované buňky nebo částice absorbují světlo určité vlnové délky vyzařované laserem a následně emitují část takto absorbovaného světla avšak již o odlišné vlnové délce.





# Vícebarevná průtoková cytometrie



# Kompenzace pomocí softwaru

---

- Je potřeba připravit jednobarevně značené kontrolní vzorky
- Software vypočítá hodnoty kompenzací
- Snadné, přesné a rychlé
- Umožňuje to mnohobarevnou analýzu

Možné na cytometrech nové generace

Kompenzační matrix

|             | FL1   | FL2   | FL3  |
|-------------|-------|-------|------|
| FL1<br>Comp |       | 3.96  | 0    |
| FL2<br>Comp | 27.35 |       | 5.15 |
| FL3<br>Comp | 0     | 11.18 |      |

# Průtokový cytometer Accuri C6



## *Technické specifikace:*

- 2 lasery modrý – 488 nm – 50 mW  
červený – 640 nm – 30 mW
- FCS, SSC, 4 fluorescenční detektory
- Optické filtry v základní výbavě:

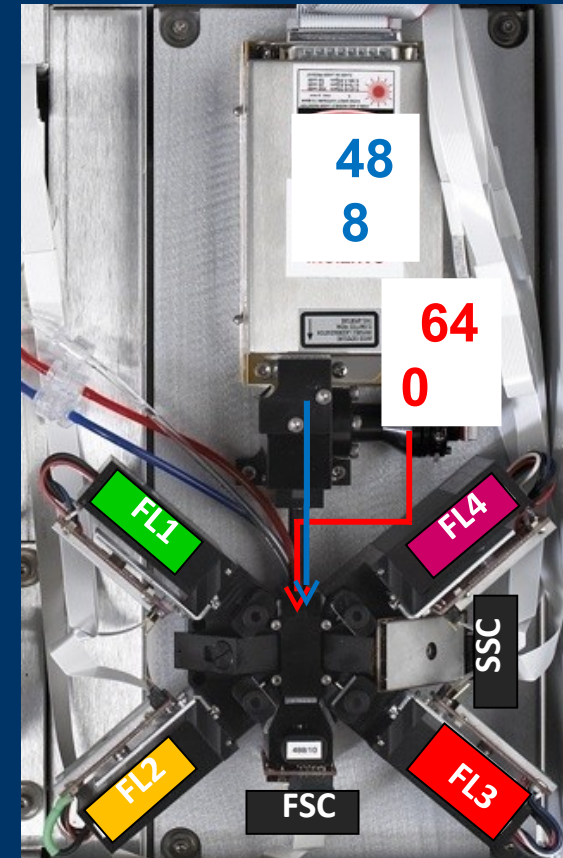


FL1 530/30

FL2 585/40

FL3 670

FL4 675/25



- Optické filtry volitelné
- 
-

- Minimální množství vzorku 30  $\mu$ l
  - Nosná kapalina  $\rightarrow$  deionizovaná voda
  - Automatický dekontaminační a čistící cyklus
  - Maximální rychlost sběru dat 10 000 událostí/sec
  - Jednoduchý export dat do MS Office
  - Export dat do FCS 3.0 souborů pro další analýzu ve sofistikovanějších analytických programech (př. FlowJo)
- 
-

# Ovládací software

CFlow® Plus
accuri®

Collect
Analyze
Statistics

**A4** HPB CD3-F CD4, CD45, CD8

|          |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |
|----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|
|          | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10  | 11  | 12  |
| <b>A</b> | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | A6 | A7 | A8 | A9 | A10 | A11 | A12 |
| <b>B</b> | B1 | B2 | B3 | B4 | B5 | B6 | B7 | B8 | B9 | B10 | B11 | B12 |
| <b>C</b> | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | C9 | C10 | C11 | C12 |
| <b>D</b> | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 | D7 | D8 | D9 | D10 | D11 | D12 |
| <b>E</b> | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | E6 | E7 | E8 | E9 | E10 | E11 | E12 |
| <b>F</b> | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 | F7 | F8 | F9 | F10 | F11 | F12 |
| <b>G</b> | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | G7 | G8 | G9 | G10 | G11 | G12 |
| <b>H</b> | H1 | H2 | H3 | H4 | H5 | H6 | H7 | H8 | H9 | H10 | H11 | H12 |

C6 and CFlow are connected and ready.

**Run Limits**

Run Unlimited

125000 events

in Ungated Sample

0 Min 0 Sec

0.0 µL

Backflush Unclog

**Fluidics**

Slow  Medium  Fast

Flow Rate 14 µL/min

Core Size 10 µm

Custom

Flow Rate 11 µL/min

Set Core Size

Core Size 5 µm

**Threshold**

Set Threshold

None

80,000 on FSC-H

**ADD to A4**

Set Color Compensation

**Last Run** Cumulative Delete Sample Data

0 Events 229,303  Warn before deleting

0:00 Time 0:00

0.0 Microliters 0.0

0.0 Events / Sec 0

0.0 Events / µL 0.0  Data Capacity Used

8% of 10,000,000 Events

| Plot 2: Sample HPB CD3-F CD4, CD45, CD8 |  | Count | Volume (µL) | % of This Plot | % of All | Mean CD3 FITC-A | Mean CD4 PE-A | CV CD3 FITC-A | CV CD4 PE-A |
|---|--|-------|-------------|----------------|----------|-----------------|---------------|---------------|-------------|
| Gated on (R1 in (P1 in all))            |  |       |             |                |          |                 |               |               |             |
| This Plot 99,183 0.0 100.0% 43.3%       |  |       |             |                |          |                 |               |               |             |
| Q3-UL 147 0.0 0.1% 0.1%                 |  |       |             |                |          |                 |               |               |             |
| Q3-UR 59,194 0.0 59.7% 25.8%            |  |       |             |                |          |                 |               |               |             |
| Q3-LL 21,455 0.0 21.6% 9.4%             |  |       |             |                |          |                 |               |               |             |
| Q3-LR 18,387 0.0 18.5% 8.0%             |  |       |             |                |          |                 |               |               |             |

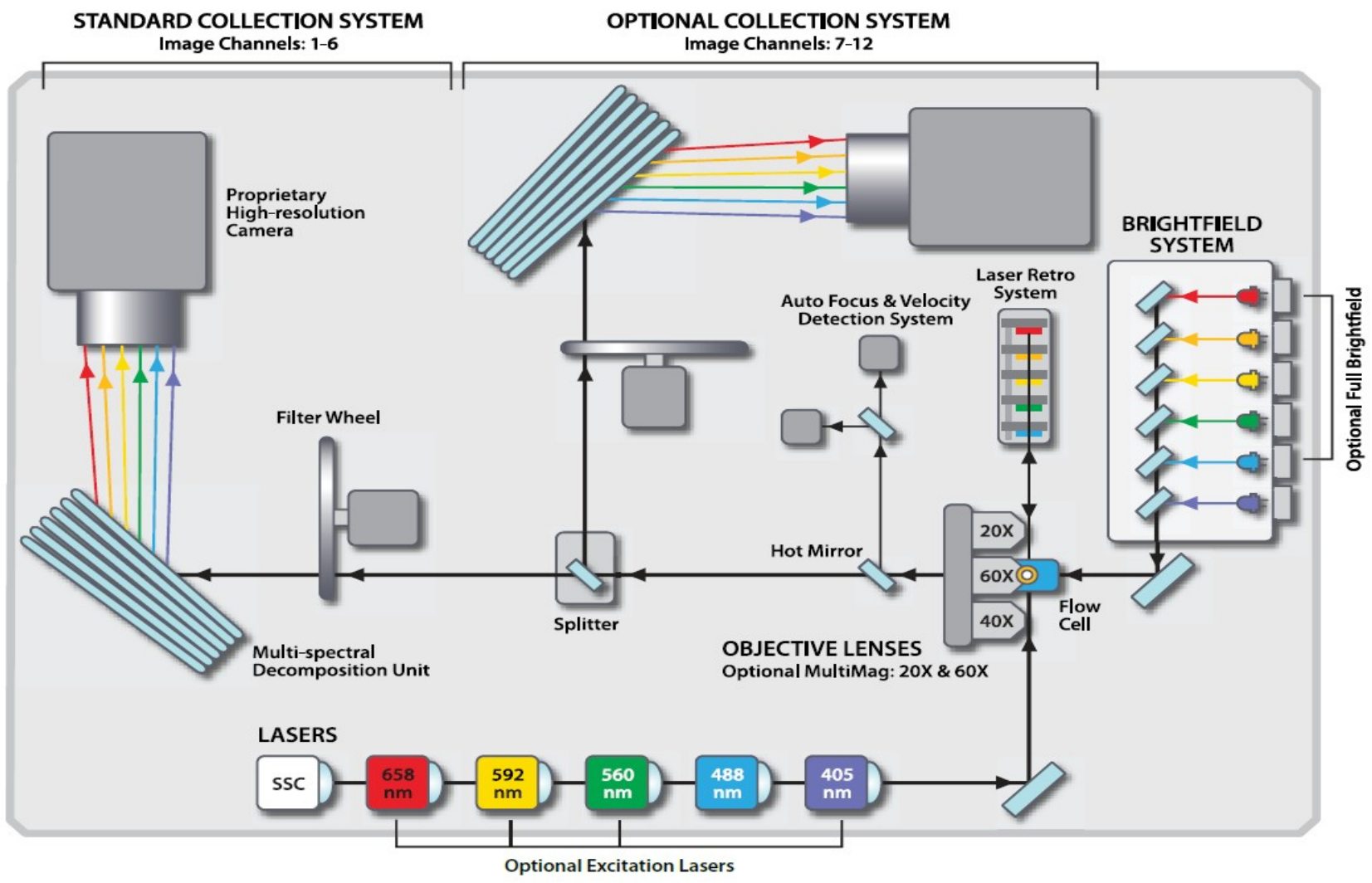
  

| Plot 3: Sample HPB CD3-F CD4, CD45, CD8 |  | Count | Volume (µL) | % of This Plot | % of All | Mean CD3 FITC-A | Mean CD45 PE-CY7-A | CV CD3 FITC-A | CV CD45 PE-CY7-A |
|---|--|-------|-------------|----------------|----------|-----------------|--------------------|---------------|------------------|
| Gated on (P1 in all)                    |  |       |             |                |          |                 |                    |               |                  |
| This Plot 102,719 0.0 100.0% 44.8%      |  |       |             |                |          |                 |                    |               |                  |
| R1 99,183 0.0 96.6% 43.3%               |  |       |             |                |          |                 |                    |               |                  |
| Q1-UL 21,694 0.0 21.1% 9.5%             |  |       |             |                |          |                 |                    |               |                  |
| Q1-UR 77,625 0.0 75.6% 33.9%            |  |       |             |                |          |                 |                    |               |                  |
| Q1-LL 3,380 0.0 3.3% 1.5%               |  |       |             |                |          |                 |                    |               |                  |
| Q1-LR 20 0.0 0.0% 0.0%                  |  |       |             |                |          |                 |                    |               |                  |

## *Image Stream ISX & Flow Sight*



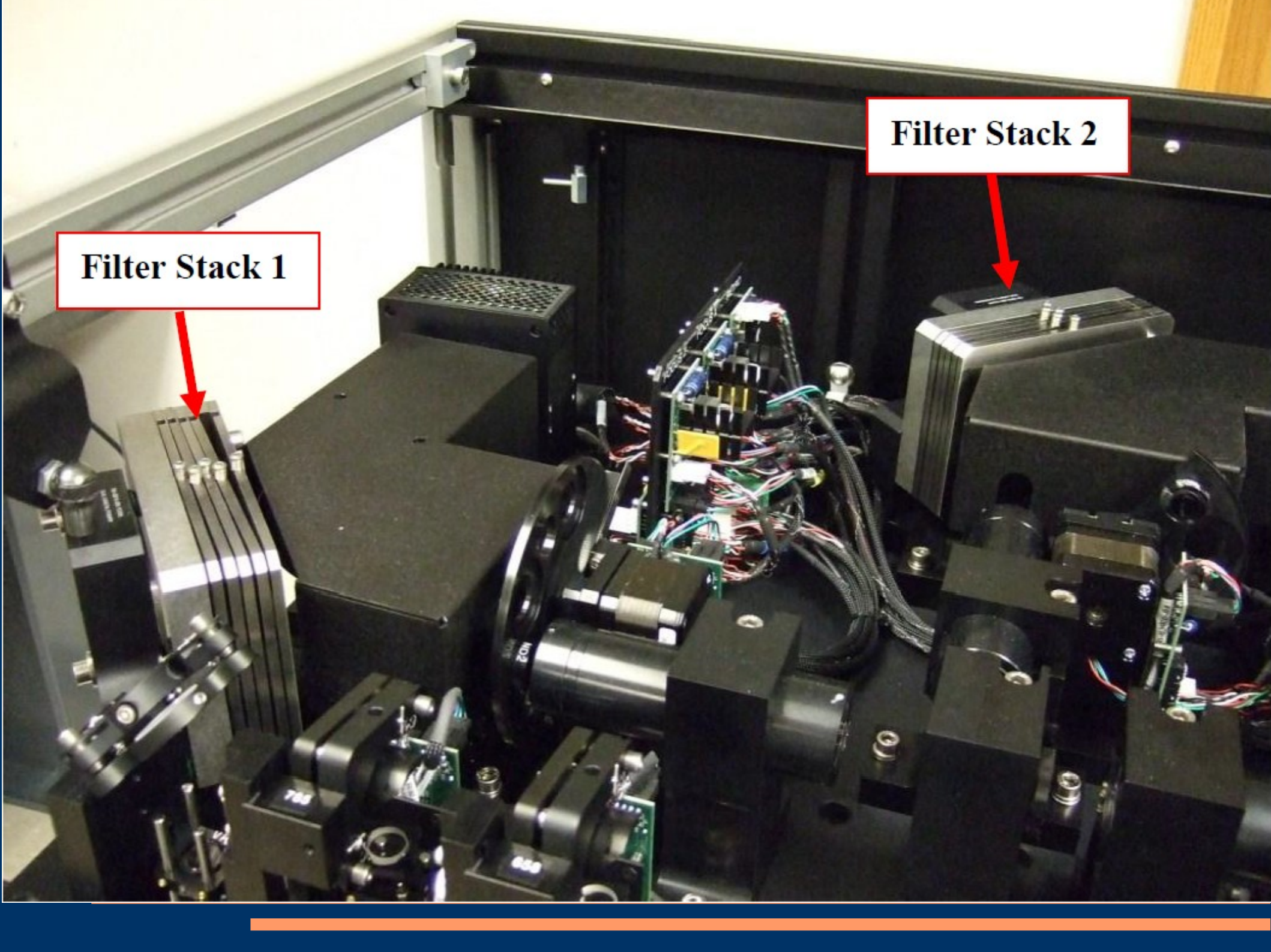




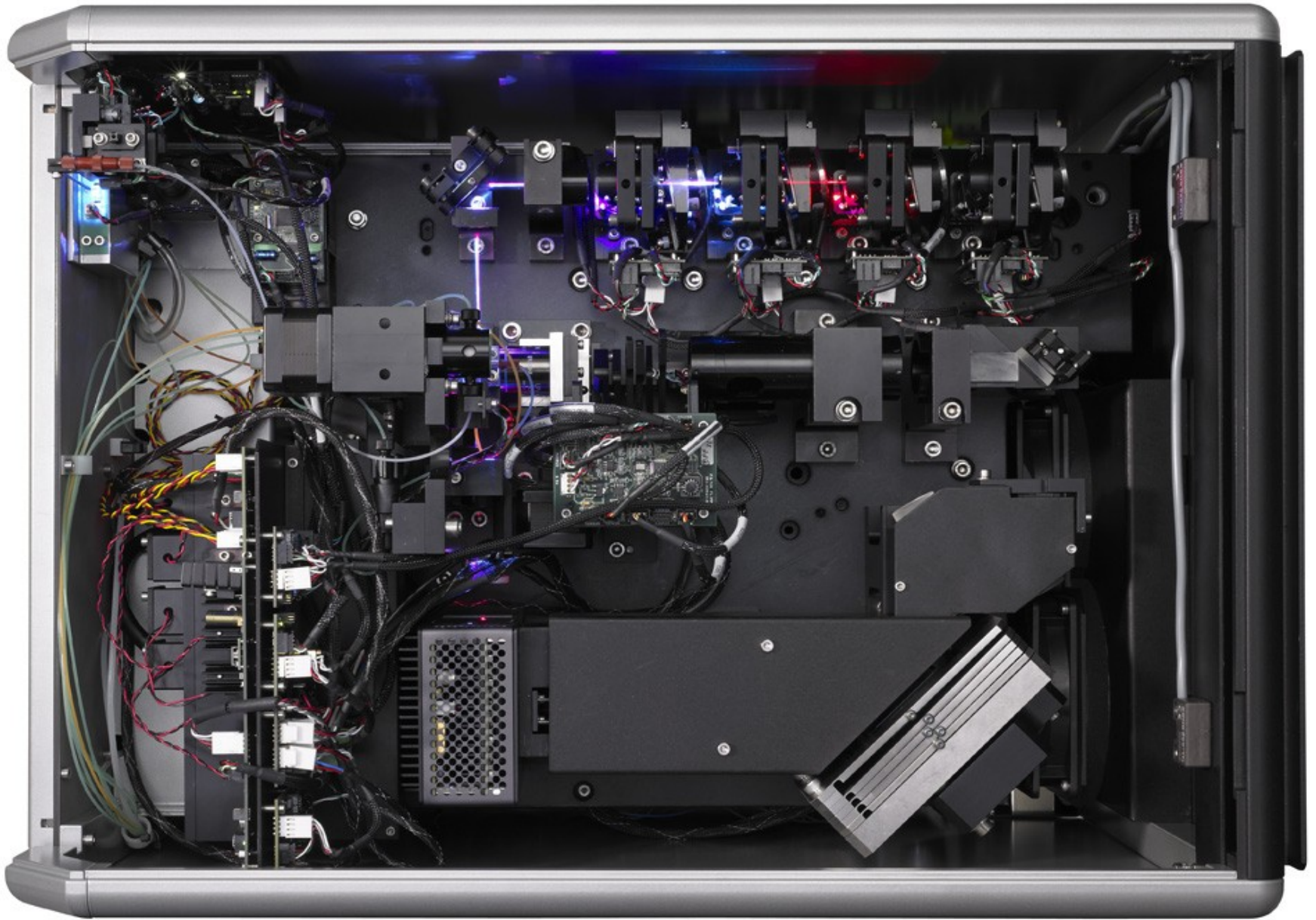


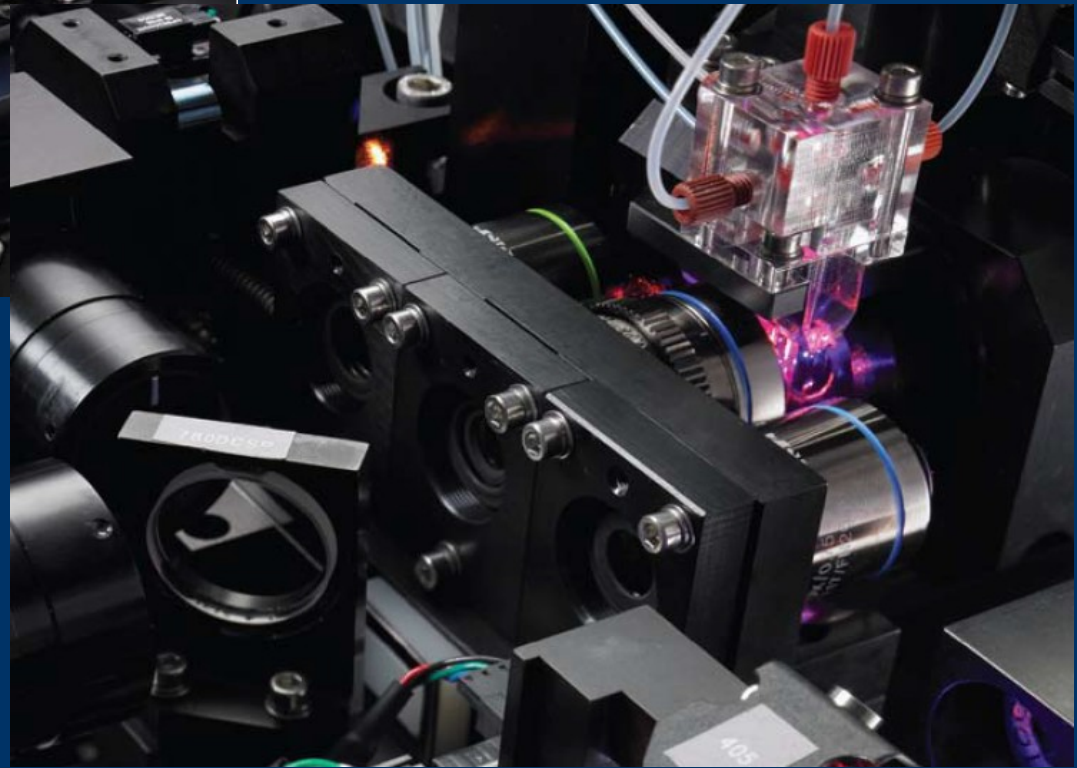
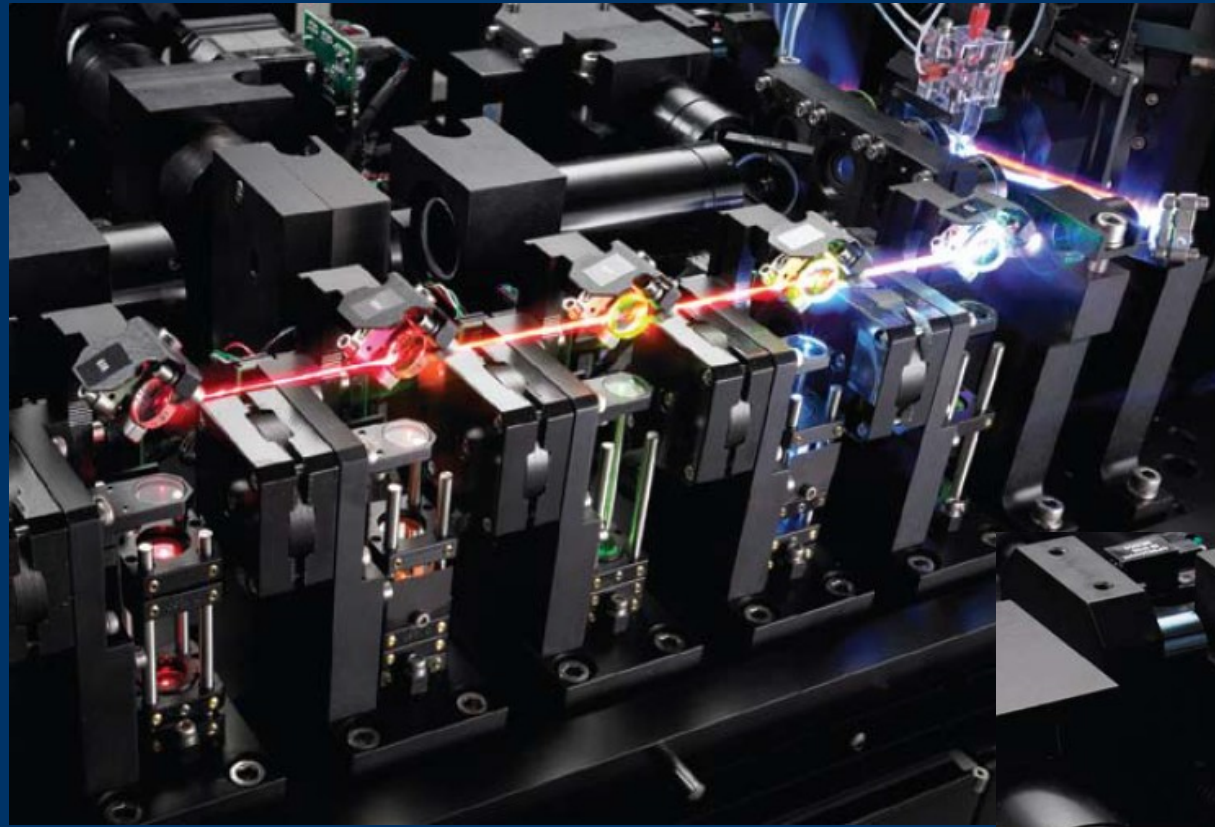
**Filter Stack 1**

**Filter Stack 2**



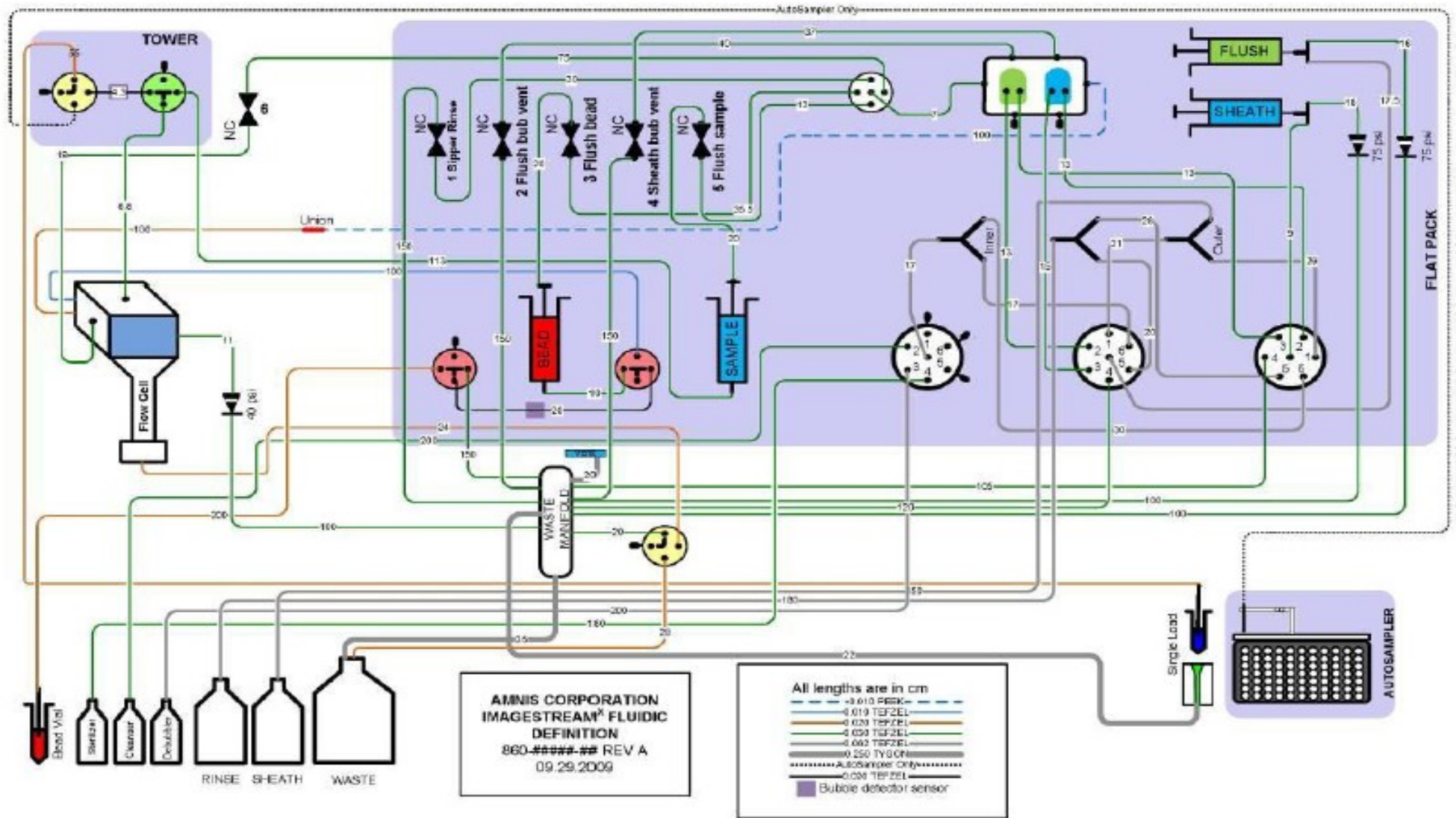




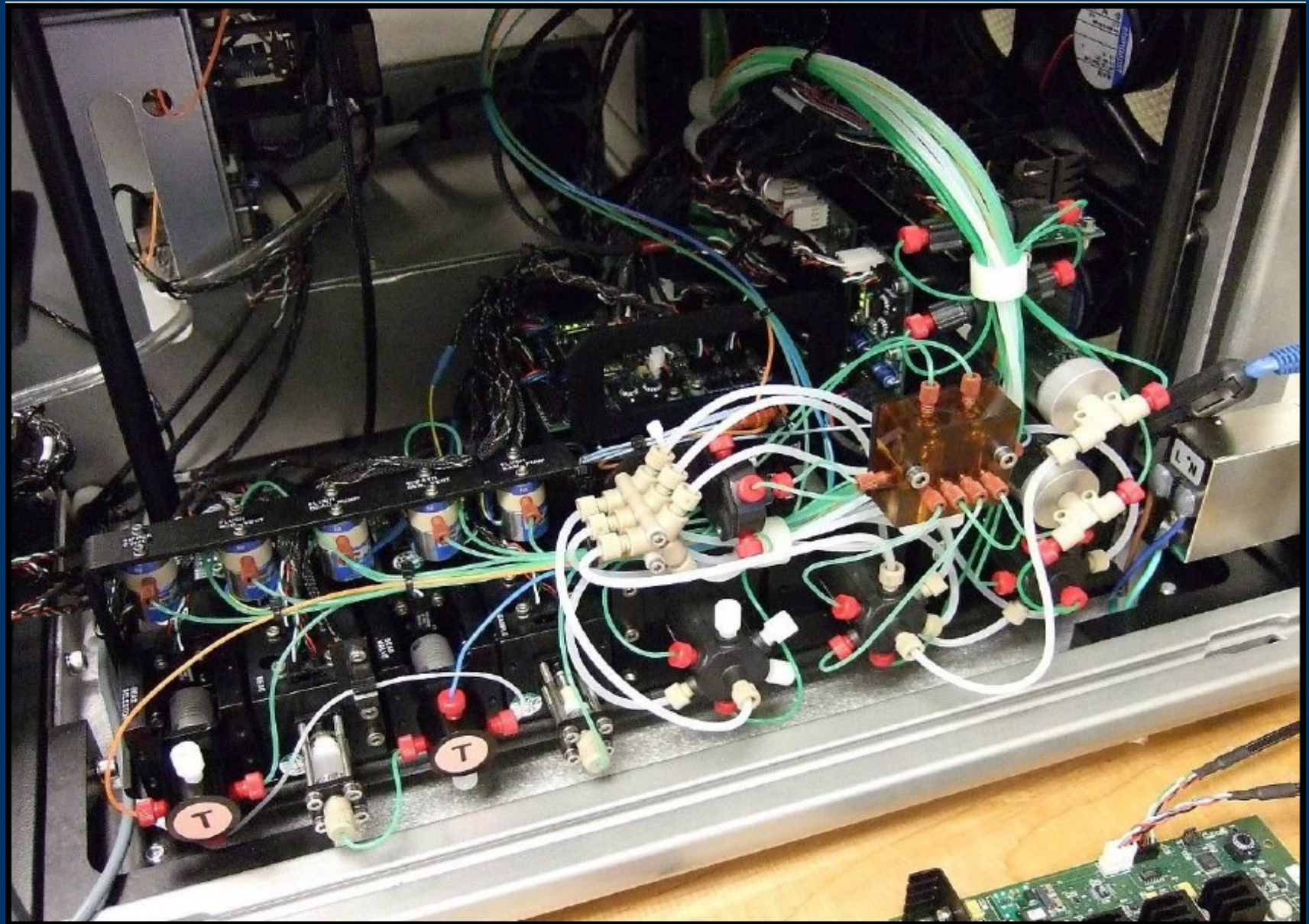




# Fludika...schéma



## *Fluidika...realita*





## Servis

- Elektronika – všechny moduly propojeny přes průmyslovou sběrnici
- Každý modul má svou adresu
- Vestavěný linuxový počítač, připojení přes terminál na ovládací PC
- Možnost kontrolovat každou část přístroje individuálně
- Self – test
- V případě výpadku linuxového počítače možnost ovládní přes externí zařízení připojené do sběrnice

### Graphical Population Definitions

Define populations using familiar graphical tools and combine them with logical functions.

### Comprehensive Population Statistics

Characterize your cell populations with a wide range of statistical metrics to reveal differences in cell morphology, phenotype, and function.

### Inspect Your Populations

The Image Gallery allows you to see every image of every cell or perform a "virtual cell sort" to inspect and validate the cells within a specific population.

### Images for Every Dot

Every dot in every scatter plot is linked to the corresponding cell imagery. Simply click on a dot to see the associated cell images or vice-versa.

### Wizards Simplify Analysis

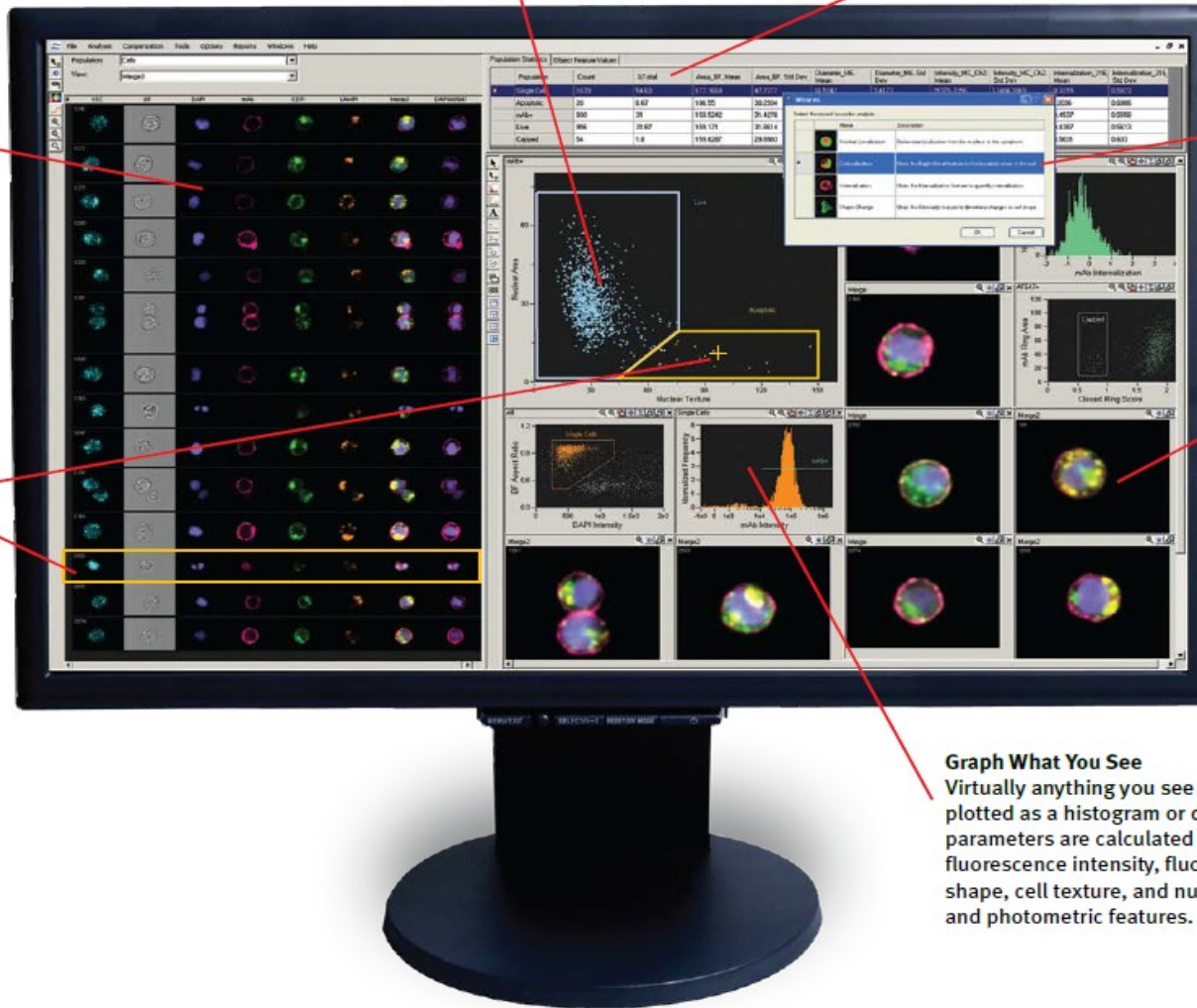
Pre-configured and optimized analysis wizards are provided for many common applications.

### Flexible Image Display Tools

Create composite images, pseudo-color representations and a host of other image transformations for reporting and publication.

### Graph What You See

Virtually anything you see in the imagery can be plotted as a histogram or dot plot. Hundreds of parameters are calculated for every cell, including fluorescence intensity, fluorescence location, cell shape, cell texture, and numerous other morphologic and photometric features.



# ImageStream<sup>x</sup> Specifications

Advanced engineering creates exceptional performance

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

|                  | Magnification   |               |                 |
|------------------|-----------------|---------------|-----------------|
|                  | 40X             | 60X           | 20X             |
| Numeric Aperture | 0.75            | 0.9           | 0.5             |
| Pixel Size       | 0.5 x 0.5 μm    | 0.3 x 0.3 μm  | 1.0 x 1.0 μm    |
| Field of View    | 60 x 128 μm     | 40 x 170 μm   | 120 x 256 μm    |
| Imaging Rate     | 1,000 cells/sec | 600 cells/sec | 2,000 cells/sec |

## SAMPLE CHARACTERISTICS

Volume: 50 μl

Utilization Efficiency: > 50% of sample

Throughput: 1 sample/min nominal

## SPECTRAL IMAGING BANDS AND APPLICABLE DYES

| CHANNEL 1<br>420-480 nm | CHANNEL 2<br>480-560 nm  | CHANNEL 3<br>560-595 nm  | CHANNEL 4<br>595-660 nm  | CHANNEL 5<br>660-740 nm  | CHANNEL 6<br>740-800 nm                         | CHANNEL 7<br>420-505 nm  | CHANNEL 8<br>505-570 nm   | CHANNEL 9<br>570-595 nm | CHANNEL 10<br>595-660 nm  | CHANNEL 11<br>660-740 nm   | CHANNEL 12<br>740-800 nm   |
|-------------------------|--|--|--|--|---|--|---|-------------------------|---|--|--|
| Brightfield             | FITC<br>GFP<br>YFP<br>Acridine Orange<br>Alexa Fluor 488<br>Alexa Fluor 500<br>Alexa Fluor 514<br>SYTO<br>Spectrum Green<br>LysoTracker Green<br>DyeCycle Green<br>Calcium Green-1<br>MitoTracker Green<br>DyLight 488 | DsRed<br>Dil<br>Cy3<br>R-phycoerythrin<br>OPF<br>Alexa Fluor 546<br>Alexa Fluor 555<br>DyLight 549<br>Calcium Orange | 7-AAD<br>PE-Texas Red (ECD)<br>PE-Alexa Fluor 610<br>Propidium Iodide<br>Spectrum Orange<br>MitoTracker Red<br>LysoTracker Red<br>RFP<br>mCherry<br>Alexa Fluor 568<br>Alexa Fluor 594<br>Alex Fluor 610<br>DyLight 594<br>Texas Red | PerCP<br>PerCP-Cy5.5<br>PE-Alexa Fluor 647<br>PE-Alexa Fluor 680<br>PE-Cy5<br>PE-Cy5.5<br>DRAQ5<br>Nile Blue | PE-Cy7<br>PE-Alexa Fluor 750<br>Darkfield (SSC) | DAPI<br>Hoechst 33258<br>CFP<br>Alexa Fluor 405<br>Marina Blue<br>Pacific Blue<br>Cascade Blue<br>LIVE/DEAD Violet<br>DyLight 405<br>eFluor 450<br>Spectrum Aqua | Alexa Fluor 430<br>Pacific Orange<br>Cascade Yellow<br>Lucifer Yellow<br>Qdot 525<br>Qdot 545 | Qdot 565<br>Qdot 585    | Qdot 605<br>Qdot 625<br>eFluor 605<br>mCherry<br>Alexa Fluor 568<br>Alexa Fluor 594<br>Alexa Fluor 610<br>DyLight 594<br>Texas Red<br>Spectrum Red<br>Calcium Crimson | Qdot 705<br>eFluor 650<br>Nile Blue<br>APC<br>APC-Cy5.5<br>DyLight 649<br>MitoTracker Deep Red<br>Alexa Fluor 647<br>Alexa Fluor 660<br>Alexa Fluor 680<br>DRAQ5<br>Cy5<br>Cy5.5 | Qdot 800<br>APC-Cy7<br>APC-Alexa Fluor 750<br>APC-eFluor780<br>DyLight 750 |

Excitation Lasers: 405 nm diode laser 488 nm solid state laser 561 nm solid state laser 592 nm solid state laser 658 nm diode laser

Note: Twelve image channel configuration shown. Multiple lasers can be used in six image channel configuration. Other laser lines are available. Please contact Amnis for more information.

## AUTOMATED INSTRUMENT OPERATIONS

Start up and shut down

Sample load and acquisition

Laser alignment, focus adjustment, calibration and self test

## OPERATIONAL REQUIREMENTS

350 W, 90-240 VAC, 50-60 Hz

100 Mbps ethernet, minimum

No external air or water necessary

## PHYSICAL CHARACTERISTICS

36" W x 26" H x 24" D (91 cm x 66 cm x 61 cm)

350 lbs (159 Kg)



*To je vše...*

Děkuji za pozornost

