

# **Проточная флюориметрия**

## **Лекция 1**

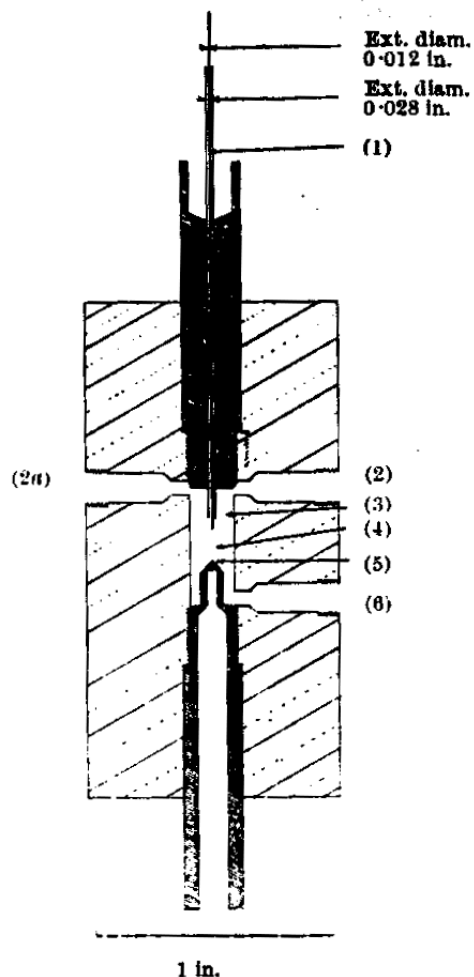
**И.А.Воробьев**

**История и базовые принципы  
метода**

# **Краткая история проточного цитометра**

## **Основные изобретения**

# Ламинарная струя для подсчета частиц



(1) Needle in holder; (2) and (2a) inflow tubes; (3) wide-bore tube; (4) observation area for (3); (5) vortex; (6) flushing tube

## A Device for Counting Small Particles Suspended in a Fluid through a Tube

P.J. Crosland-Taylor

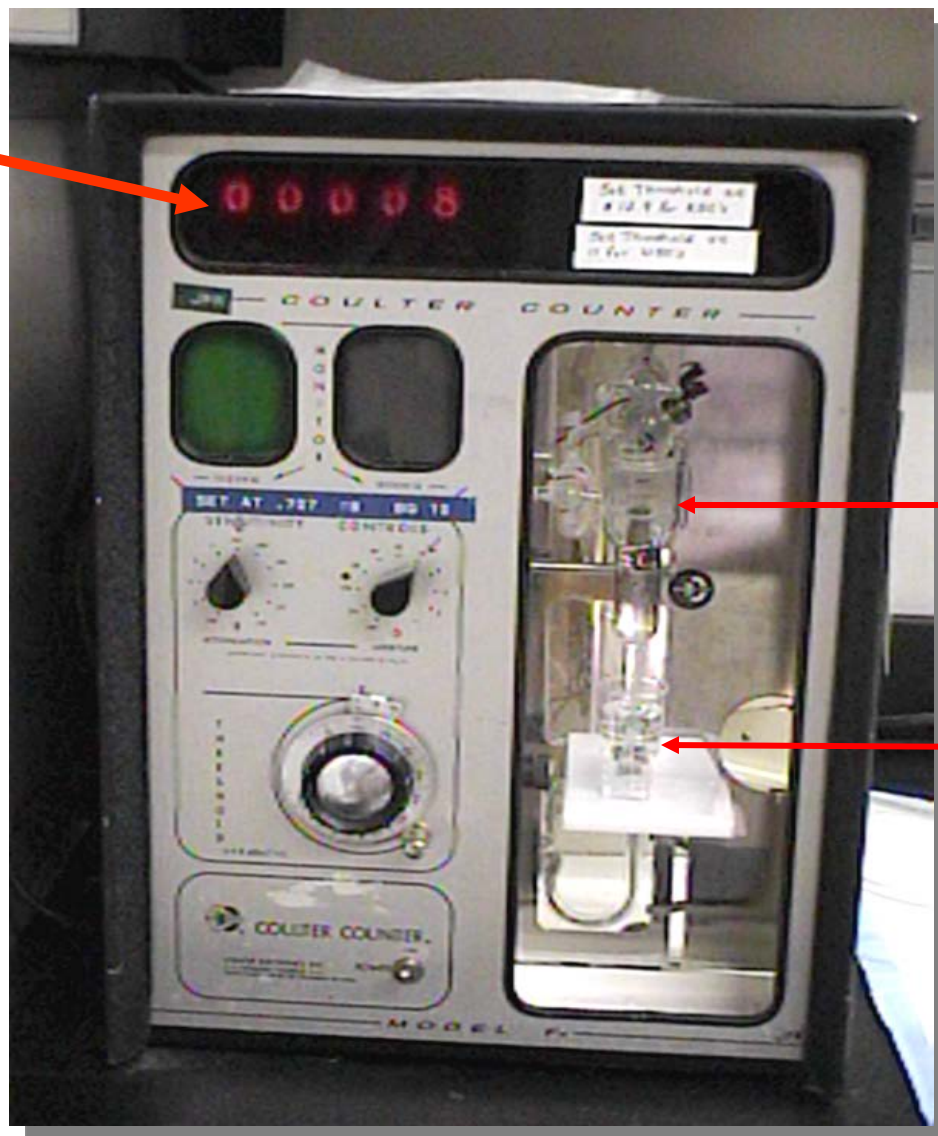
Bland-Sutton Institute of Pathology

Middlesex Hospital, London, W.1. June 17, 1952

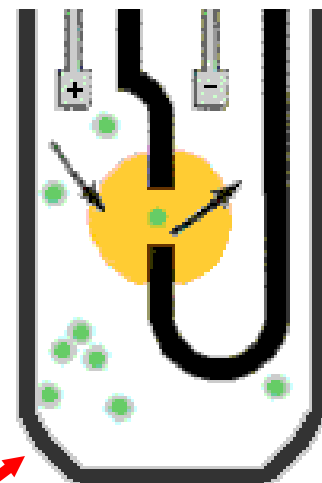
Nature 171: 37-38, 1953

# Первый счетчик - Coulter 1948-1956

дисплей



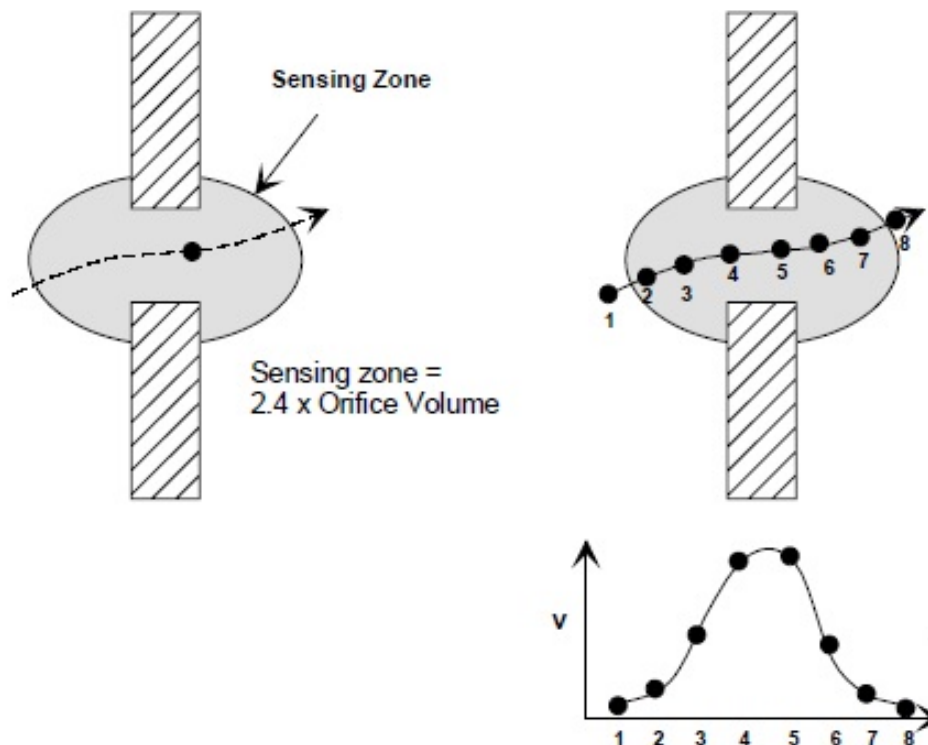
Измеряется электрическое сопротивление (импеданс)



отсос

ячейка

# Принцип Культера



**Измерение диаметра частиц по сопротивлению ячейки – скачок тока пропорционален изменению эффективного диаметра, который уменьшается проходящей частицей.**

**Метод позволяет измерять частицы размером от 0,4 мкм.**

# Первый цитометр

**Technicon - Hemalog D - 1974** – первый промышленный проточный цитометр. Он проводил измерения рассеивания и поглощения света при различных длинах волн (нейтрофилы и эозинофилы – по пероксидазной реакции; моноциты – реакция на эстеразу, и базофилы – окраска Альциановым синим). Возбуждение – от лампы накаливания.



Image from Shapiro  
“Practical Flow  
Cytometry”, Wiley-Liss,  
1995

# **Создание лазеров**

**1960 – рубиновый лазер (Т. Майман)**

**1960 (декабрь) – гелий-неоновый лазер (Али Джаван)**

**1964 – аргоновый лазер (В. Бриджес с соавт.)**

**1966 – лазер на красителях (П. Сорокин и Дж. Ланкард)**

# Первый проточный флюориметр

1977-78 Coulter Electronics создал серию Erics на основе 5 W аргонового лазера с полным анализом, флоппи-дискетом и принтером



Erics V (вид спереди) и стойка управления (справа)



# Современные проточные флуориметры и сортеры



LSR2 - до 7 лазеров



LSRFortessa – 5 лазеров



Stratedigm - 4 лазера

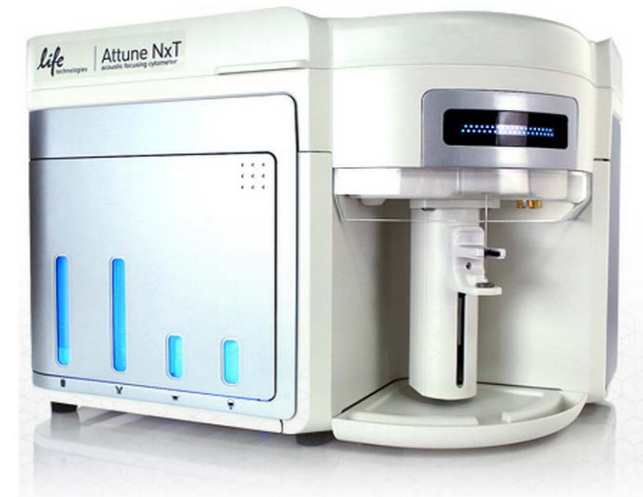


Influx – до 6 лазеров

# Современные проточные флюориметры



Аккури - до 2 лазеров



Attune – до 4 лазеров

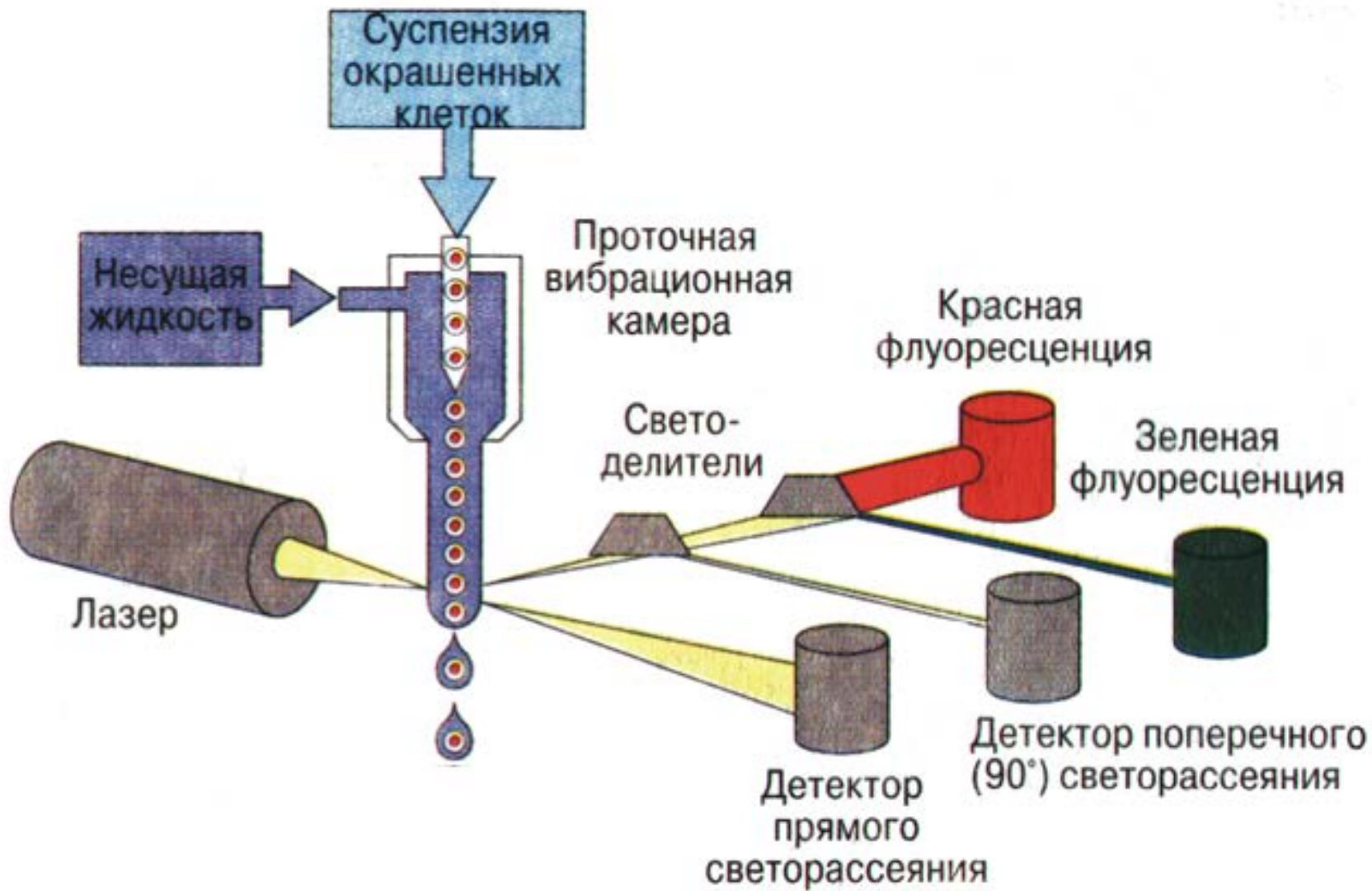


Millipore EasyCyte – до 3 лазеров



CytoFLEX – до 4 лазеров

# Блок-схема проточного флуориметра



# Основные компоненты проточного флюориметра

## Гидравлика

- Частицы в ламинарном потоке жидкости
- Последовательно проносятся

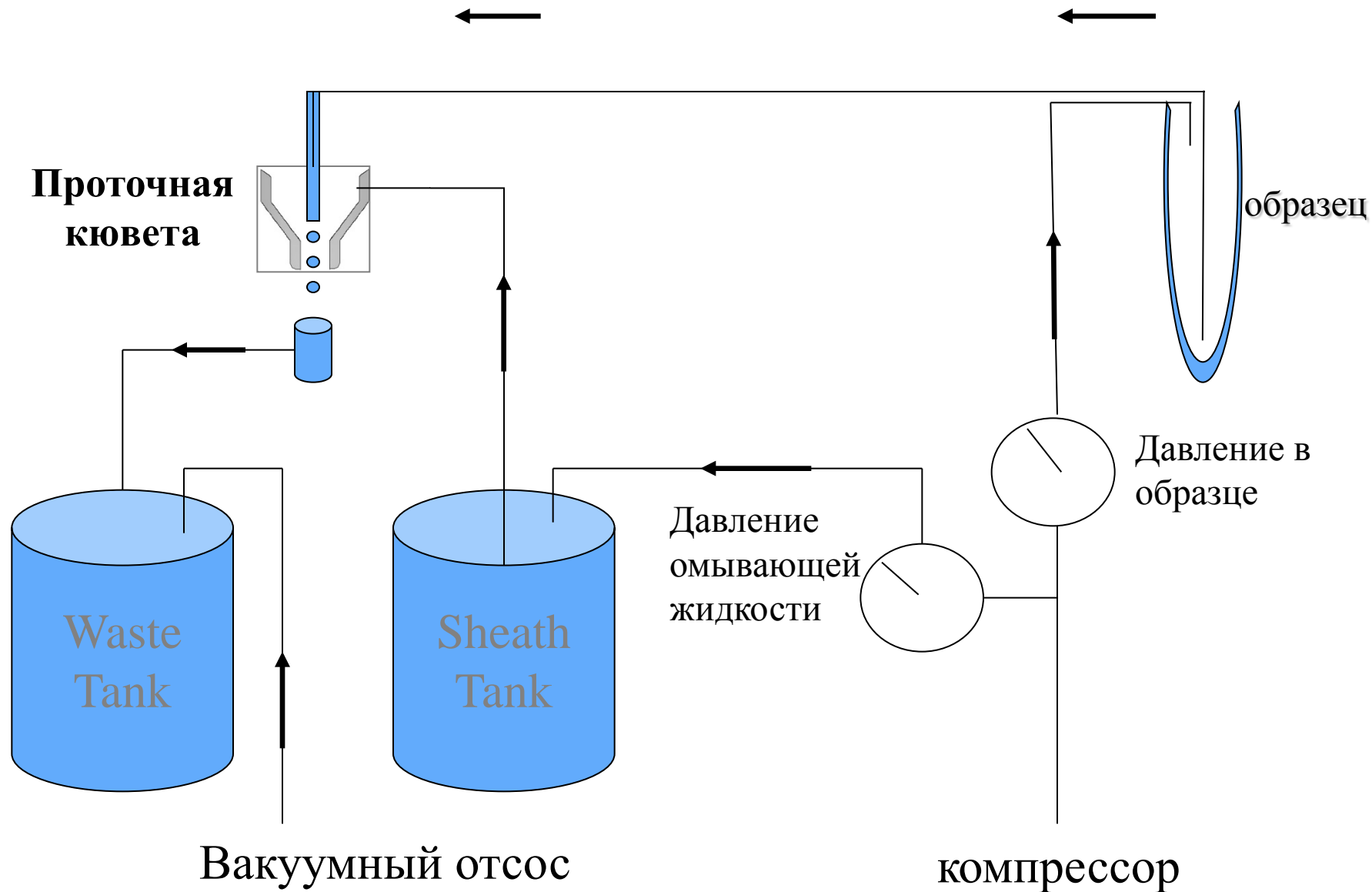
## Оптика

- Через эллиптический луч света от лазера.
- Рассеянный ими свет и свет флюоресценции
- Собирается объективом, разделяется светофильтрами и

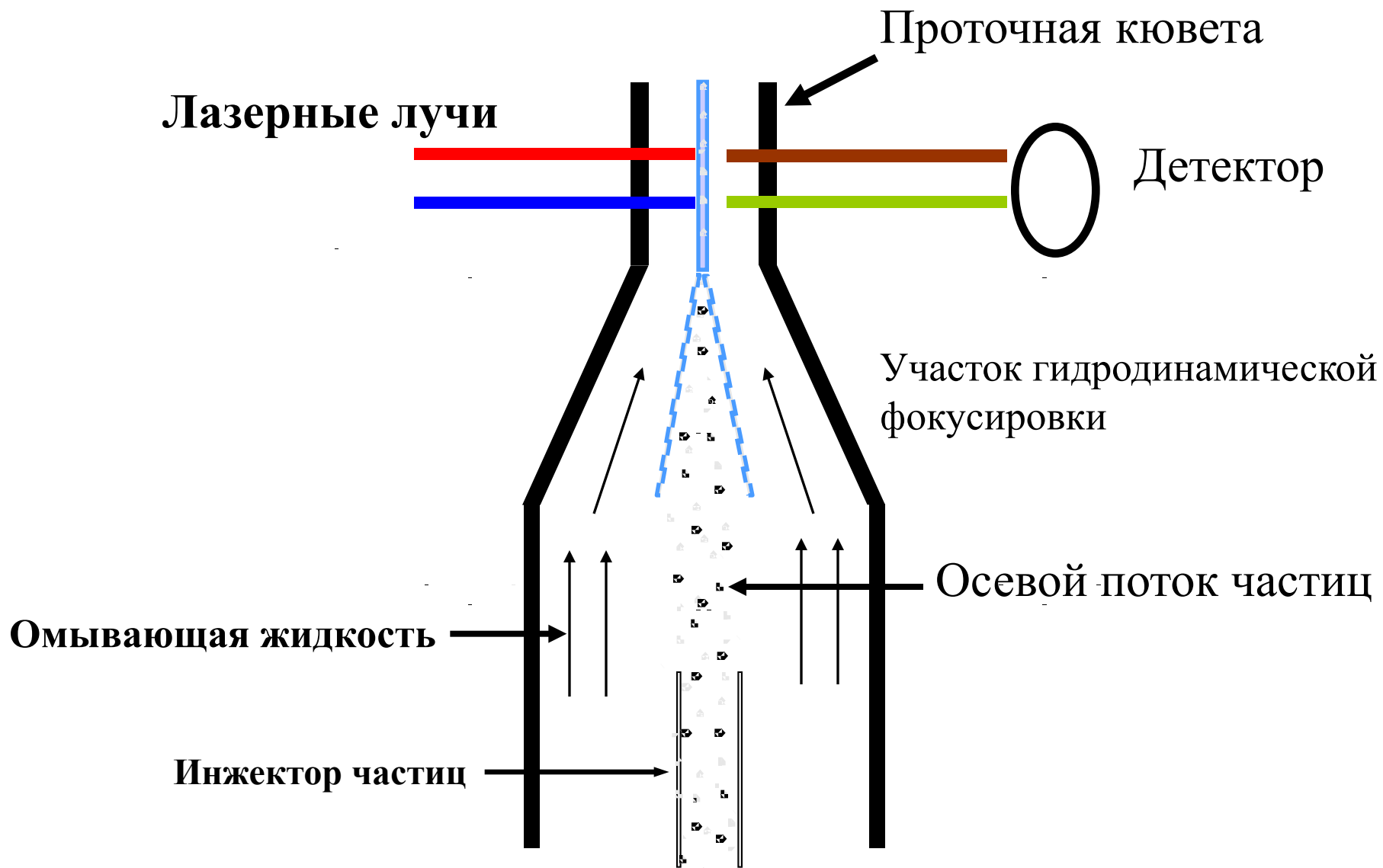
## Электроника

- Регистрируется ФЭУ.
- Электрический сигнал усиливается
- И превращается на АЦП в цифровые данные,
- Которые записываются компьютером в файл

# Гидравлическая система



# Формирование ламинарного потока



# Регуляция потока частиц

Струя с клетками обжимается внешним потоком жидкости (sheath fluid) в конической части кюветы.

Условие ламинарности потока в кювете – число Рейнольдса ( $Re$ ) не более 2300.

Конечная скорость потока регулируется давлением обжимающей жидкости.

Плотность частиц (клеток) в потоке регулируется разницей давлений (pressure difference).

Число Рейнольдса:

$$Re = d \times v \times \rho / \eta \leq 2300,$$

где

$d$  – диаметр струи

$v$  – скорость потока

$\rho$  – плотность жидкости

$\eta$  – вязкость жидкости

# Параметры струи

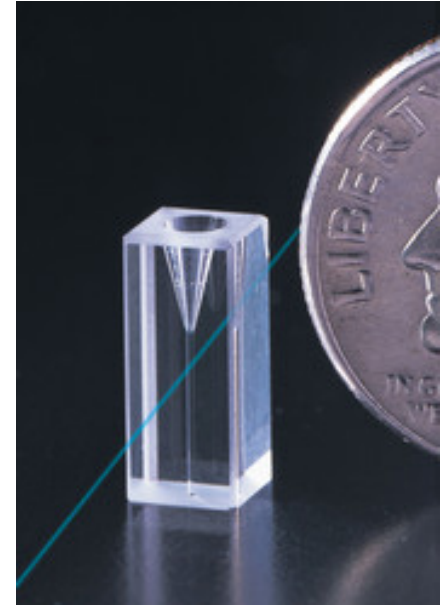
Диаметр струи (вместе с омывающей жидкостью) – в свободном сопле (jet-in-the-air) 70-130 мкм; в кювете – около 150х450 мкм.

Скорость потока через сопло (кювету) в области измерений – 2-30 м/сек.

Расход омывающей жидкости (PBS) – 10-50 мл в мин.

Расход пробы – 5-100 мкл/мин (регулируется оператором).

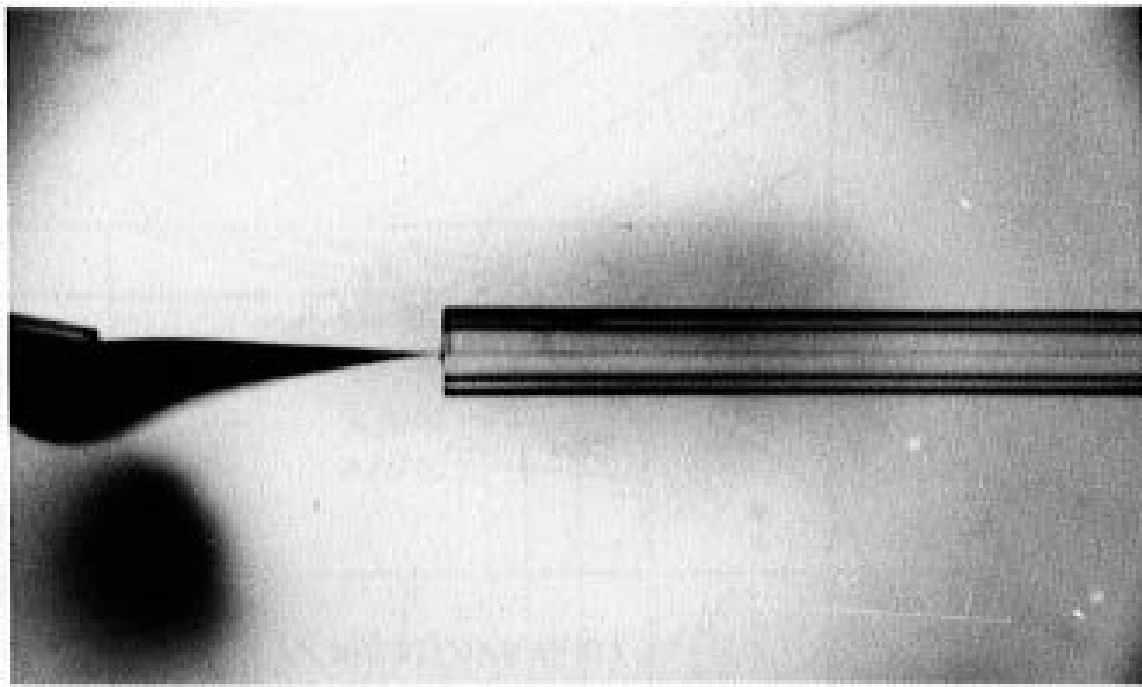
За счет гидродинамической фокусировки диаметр осевой струи составляет 10-20 мкм. Он должен слегка превышать диаметр клеток, которые анализируются. Увеличение диаметра осевой струи снижает точность измерений.



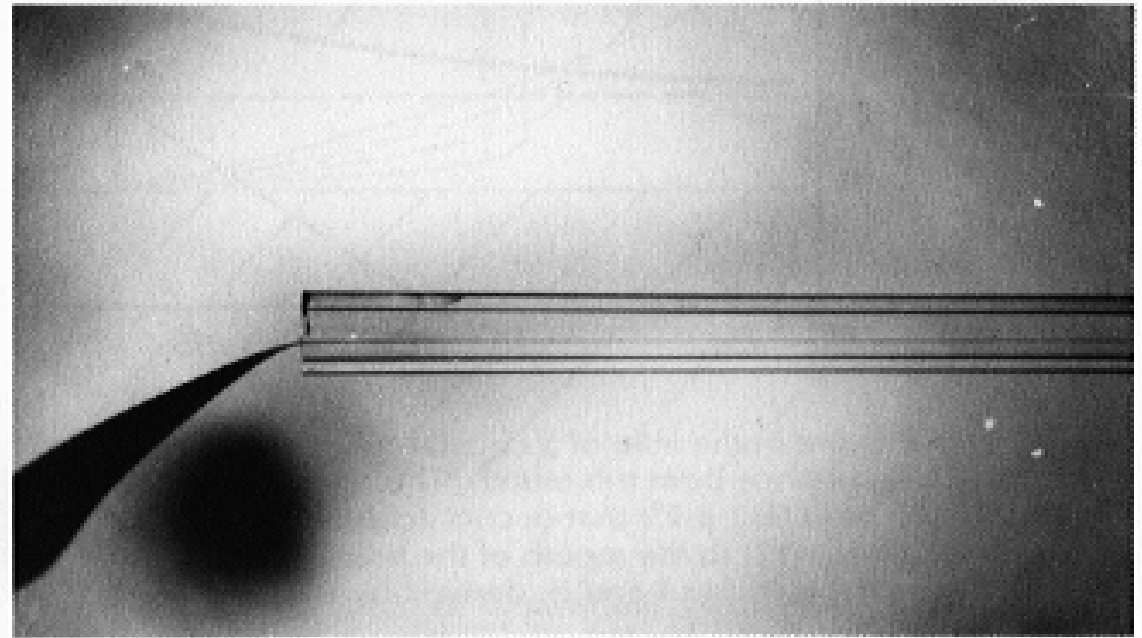


# Гидравлическая фокусировка

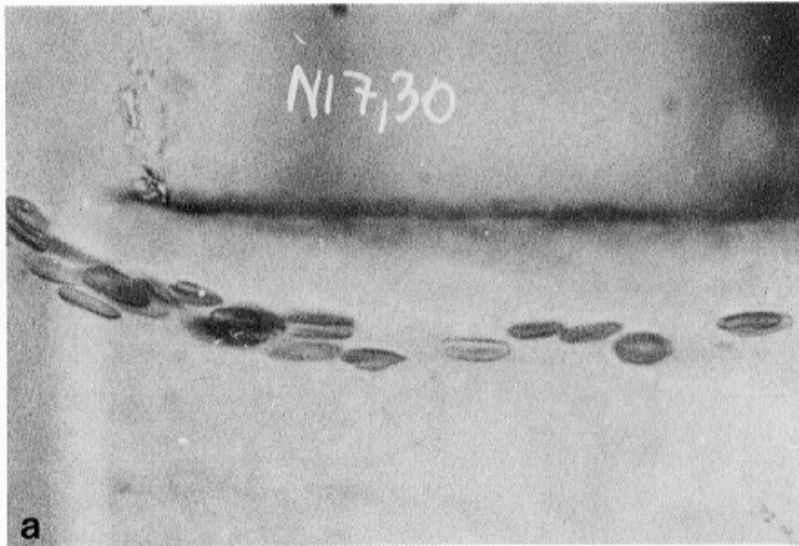
Струя чернил  
фокусируется в  
ускоряющемся потоке  
жидкости в трубке



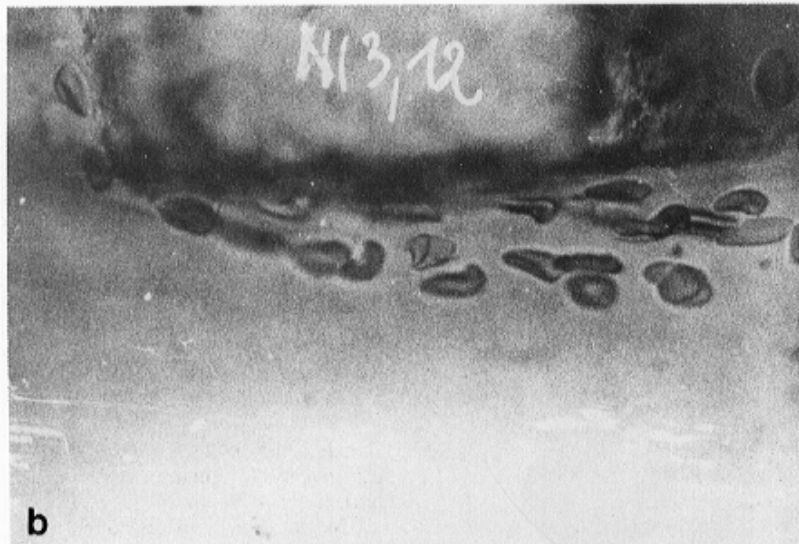
Положение струи  
чернил зависит от  
положения источника



# Ориентация и деформация клеток



а: Эритроциты в ламинарном потоке вытягиваются в центре потока вдоль оси



б: в турбулентном потоке клетки отбрасываются к краю и по разному деформируются

# Лазеры для проточной цитометрии

Лазеры – 488 нм; 640 нм; 407 нм; 561 нм; 594 нм;  
355-375 нм

Мощность – 15-200 мВт (как правило – 20-100 мВт).

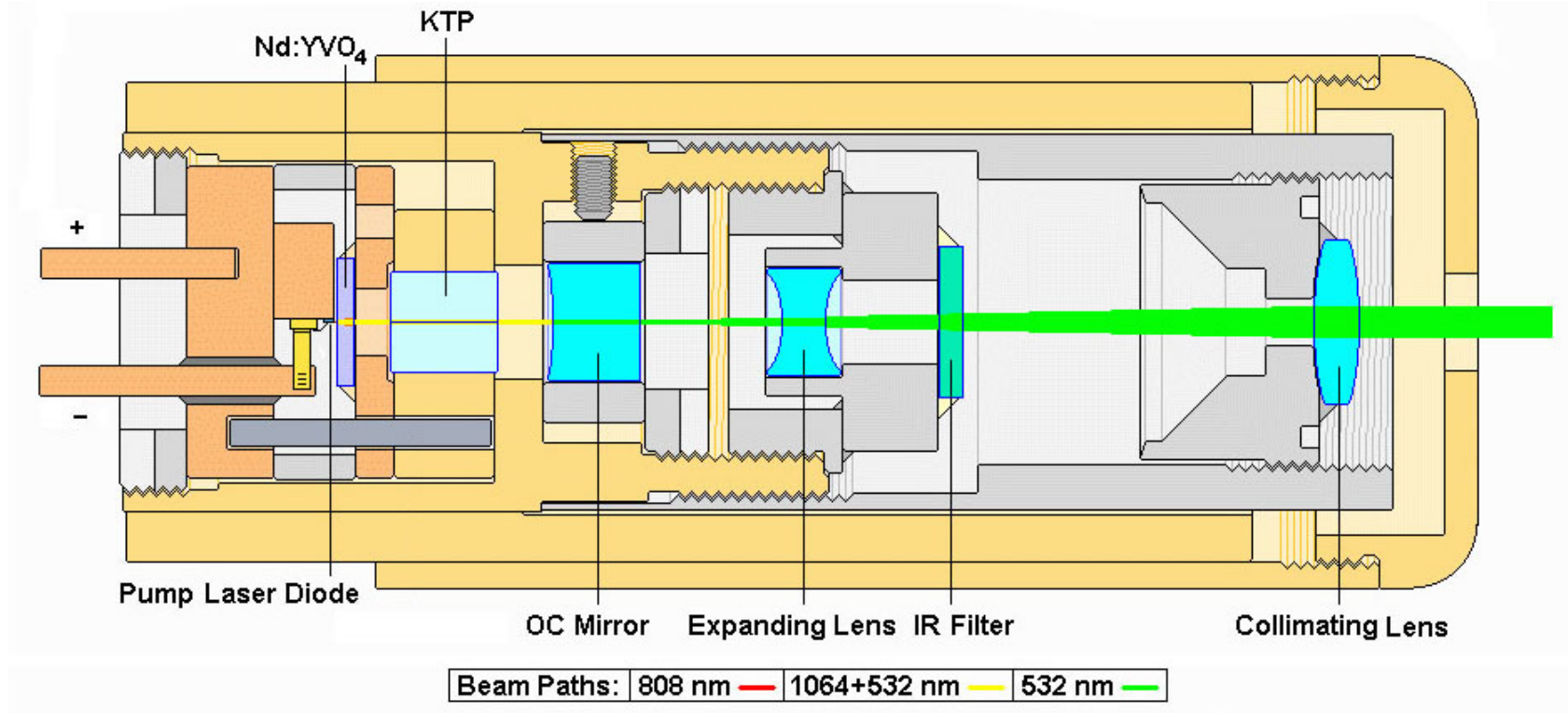
Стандартный набор – два или три лазера (488, 640 и 407 нм). Расширенный набор – 4 лазера (488, 640, 407 и 561 нм).

Свыше 4 лазеров устанавливается только на небольшое количество моделей цитометров и сортеров.

# Примеры твердотельных лазеров

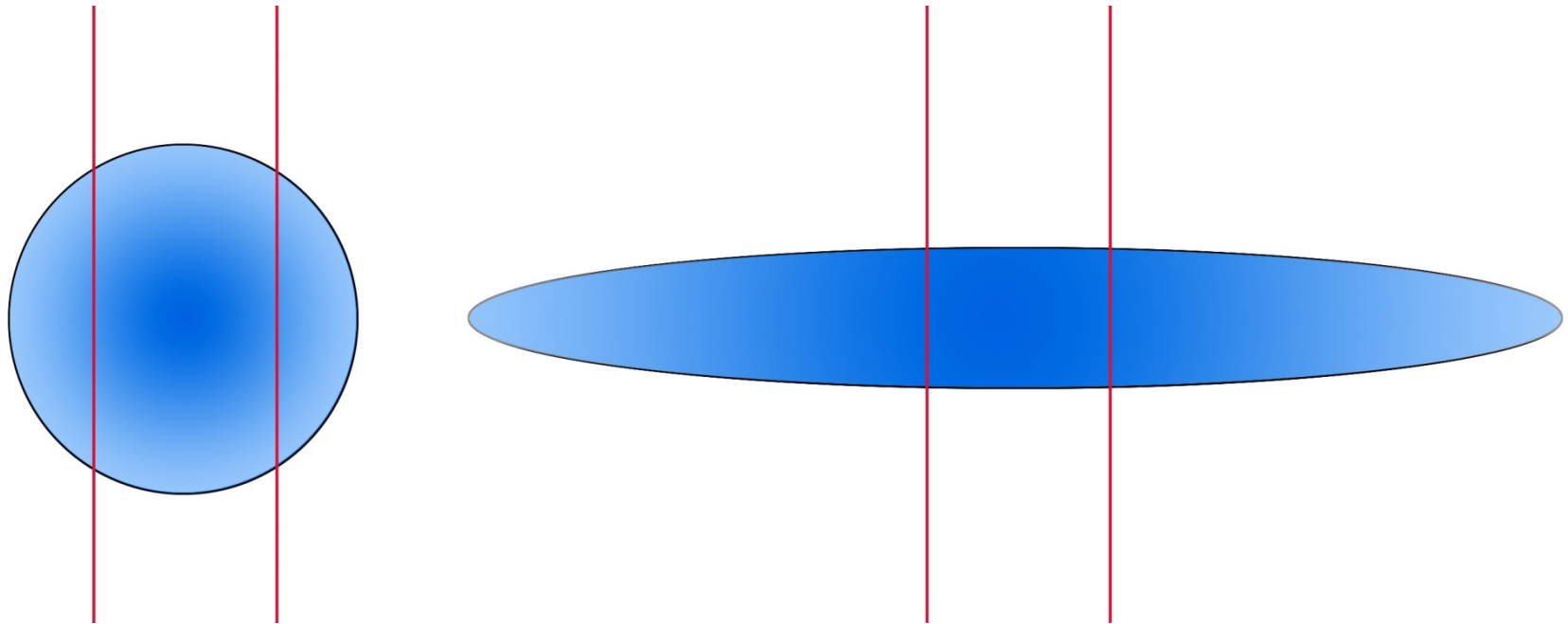


# Твердотельный лазер с диодной накачкой (DPSS)



Конструкция лазера зависит от длины волны. Общий принцип – накачка твердотельного резонатора с помощью светодиода. На выходе из резонатора – коллиматор пучка и ИК фильтр.

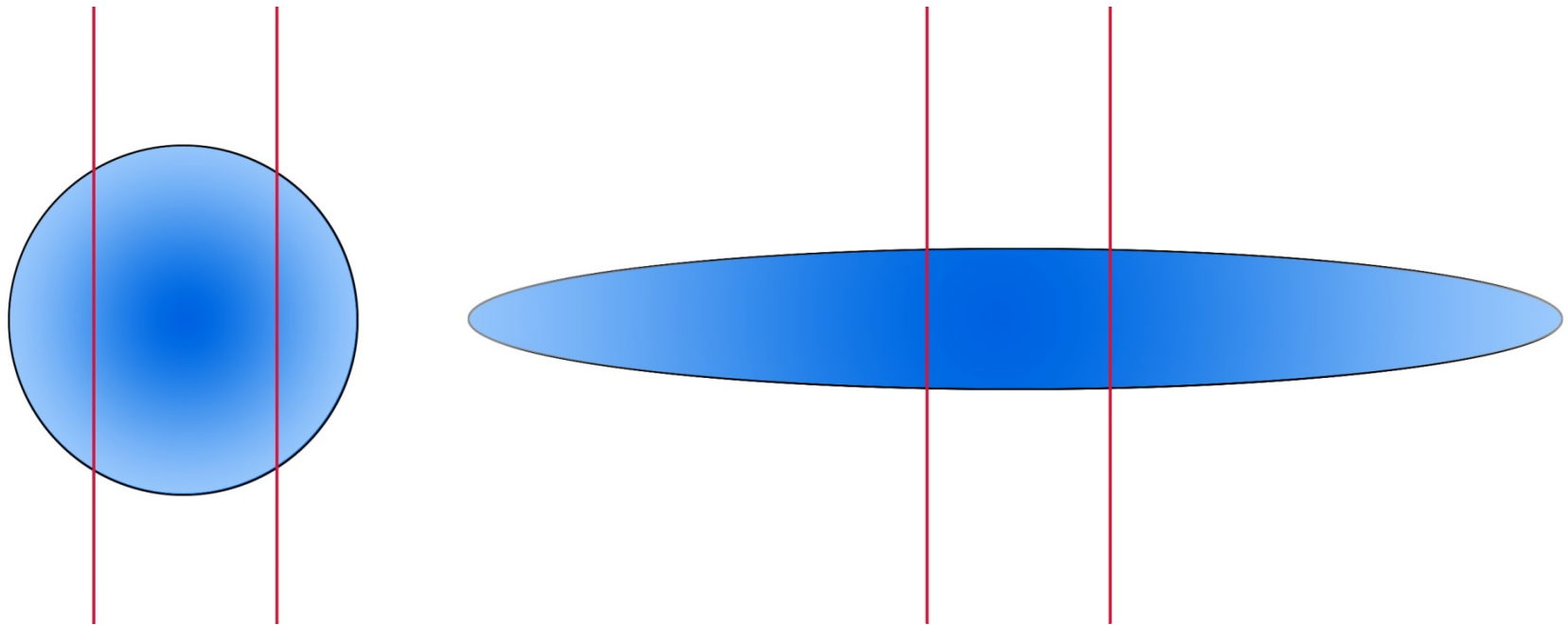
# Фокусировка лазера в кювете



**Лазерный пучок фокусируется в сильно вытянутое эллиптическое пятно (соотношение осей эллипса – от 4:1 до 8:1). Это позволяет уменьшить разброс в величине сигналов для частиц, пролетающих в стороне от продольной оси струи.**

**Размеры пятна: поперечный диаметр 9-20 мкм, продольный диаметр – 65-80 мкм. Высота пятна обратно пропорциональна максимальной производительности прибора.**

# Фокусировка лазера в кювете



**Эллиптическое пятно освещения ламинарной струи позволяет уменьшить разброс сигналов, вызванный случайным отклонением частицы в потоке жидкости от оси. Величина возможного отклонения растет с увеличением скорости подачи образца.**

Образец

Образец

Омывающая  
жидкость

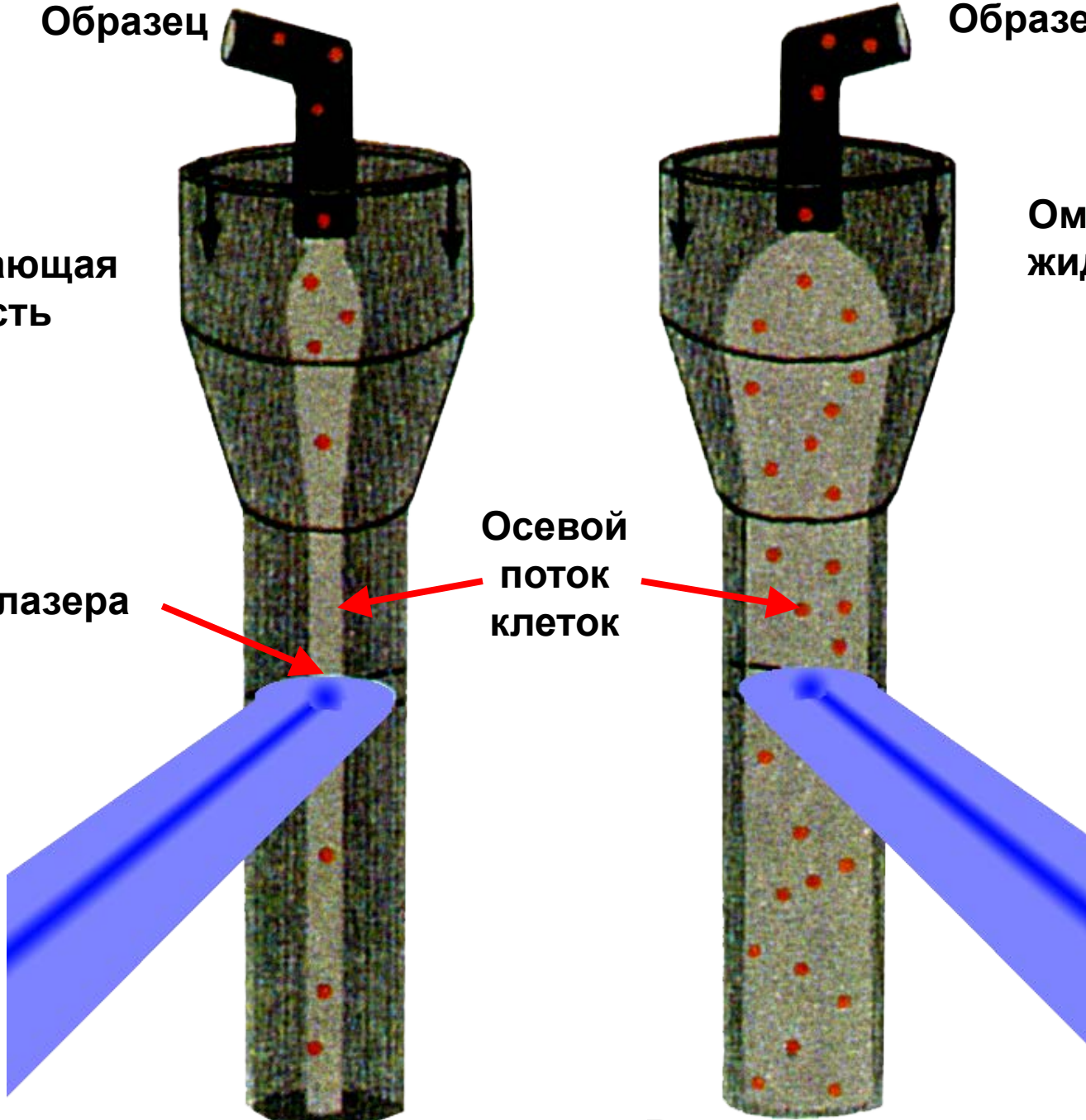
Омывающая  
жидкость

Пятно лазера

Осевой  
поток  
клеток

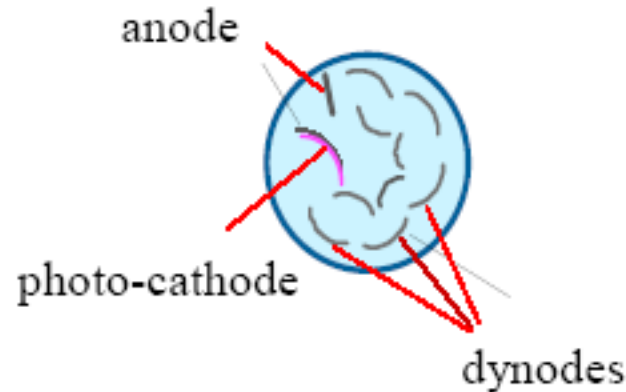
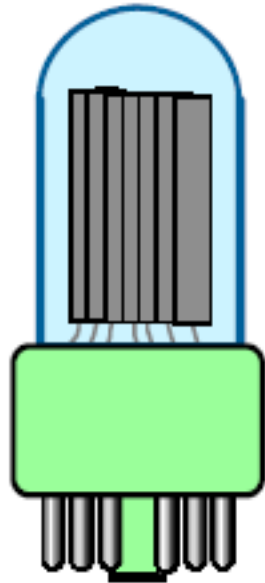
Низкая разность

Высокая разность





# Детектор сигналов – ФЭУ



**Фотоэлектронный умножитель (ФЭУ) – вакуумный прибор. Квантовый выход (фотокаатода) – не более 10-30%. Максимальная чувствительность – как правило, в синей области спектра (около 450 нм). ФЭУ с увеличенной полосой чувствительности в красной и ИК области имеют более низкий квантовый выход (менее 10%). Новейшие ФЭУ (арсенид галлия) имеют квантовый выход до 40%. но редко устанавливаются в приборы. Коэффициент усиления фототока – до  $10^6$ .**

# Работа ФЭУ

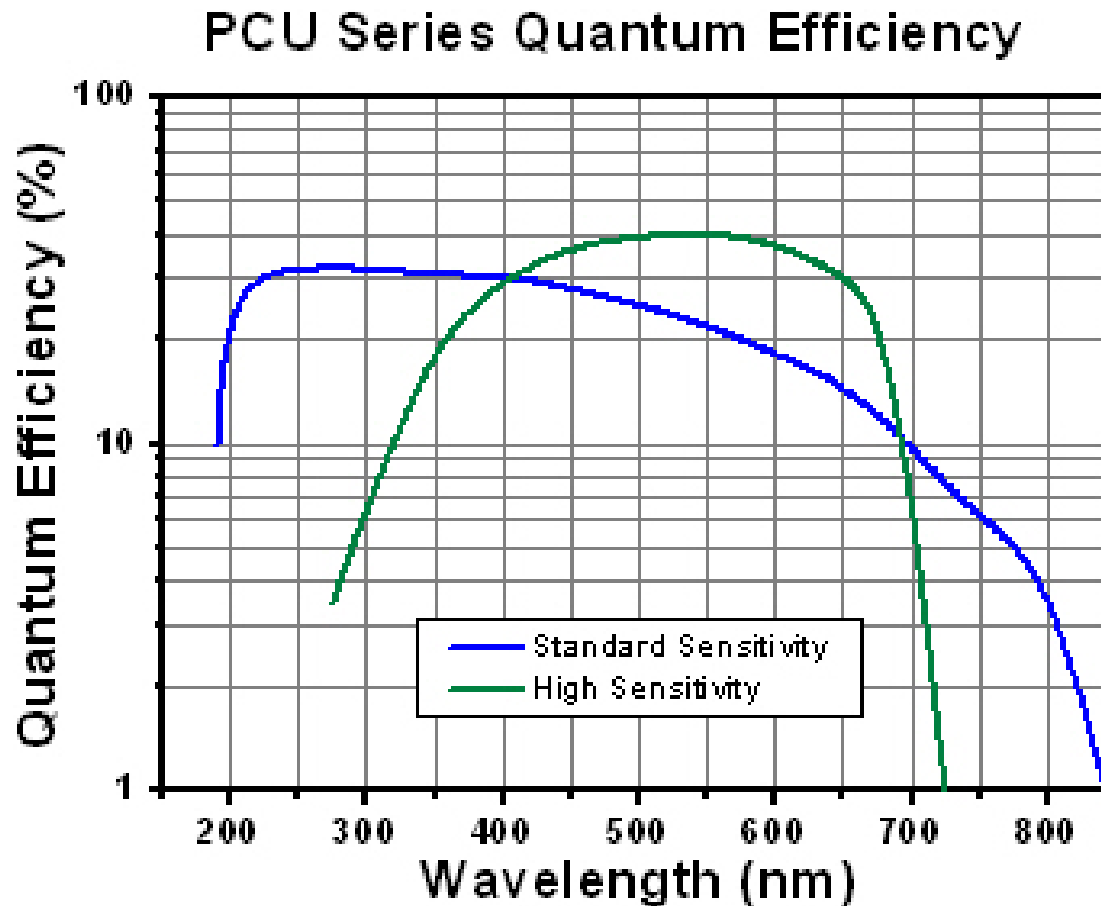
Фотоны, попадающие на входное окно, индуцируют заряд (от десятков до сотен тысяч электронов), который при считывании многократно усиливается диодами.

Величина усиления тока регулируется напряжением между диодами (100-1000 V). На выходе ФЭУ ток составляет миллиамперы.

Величина тока на выходе ФЭУ в широких пределах пропорциональна количеству фотонов на входе – динамический диапазон современных ФЭУ достигает 20 бит ( $2^{20}$ ).

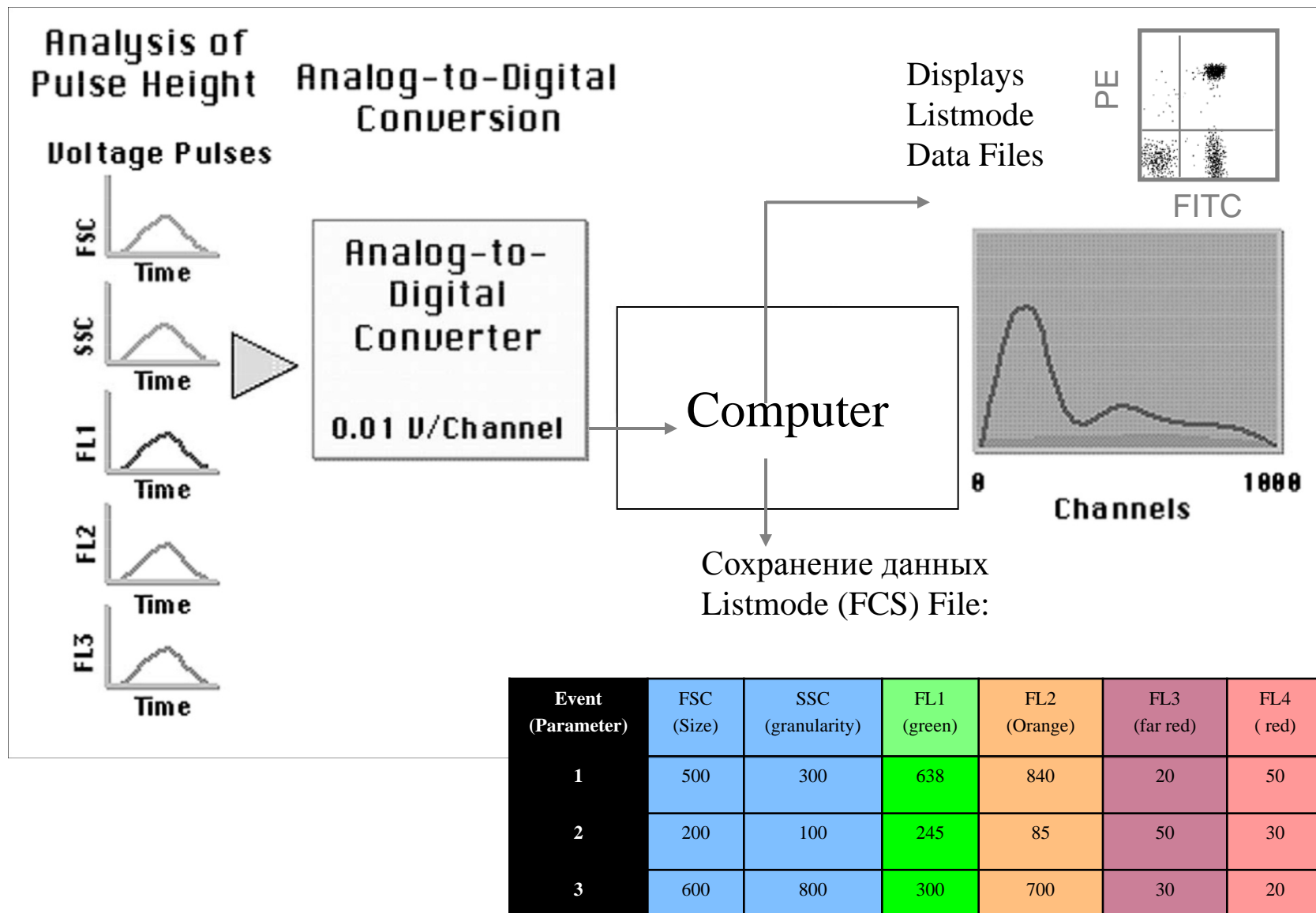
Максимальная тактовая частота ФЭУ составляет 1 ГГц, что позволяет детально измерить характеристики каждого события на проточном цитофлуориметре.

# Светочувствительность ФЭУ

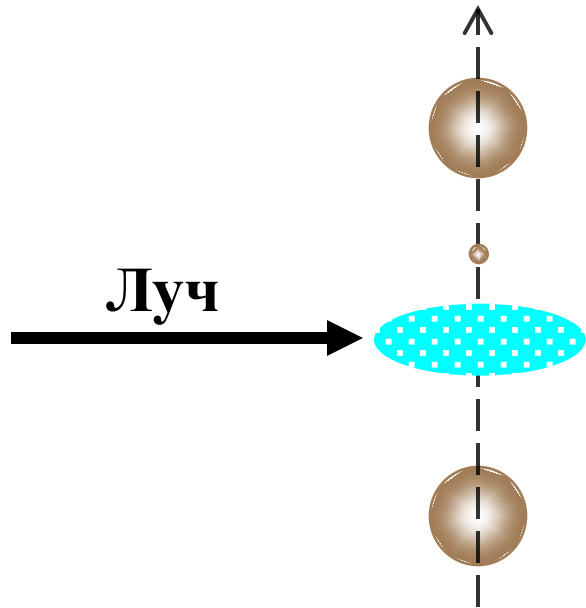


Современные ФЭУ имеют удовлетворительную чувствительность в диапазоне 500-650 нм, но быстро теряют ее в ближнем инфракрасном свете

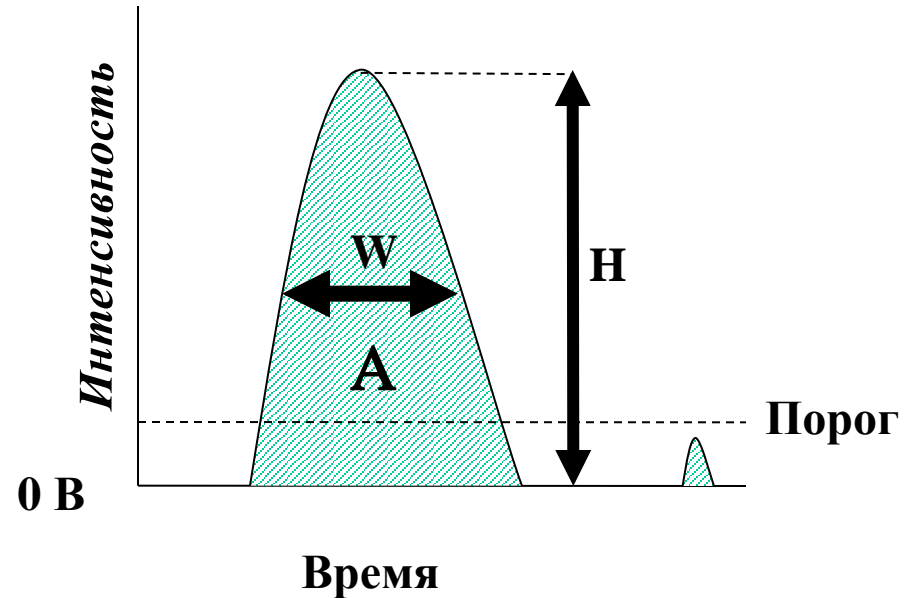
# Электроника: обработка сигнала



# Оцифровка сигнала (3 параметра)



частица в  
потоке

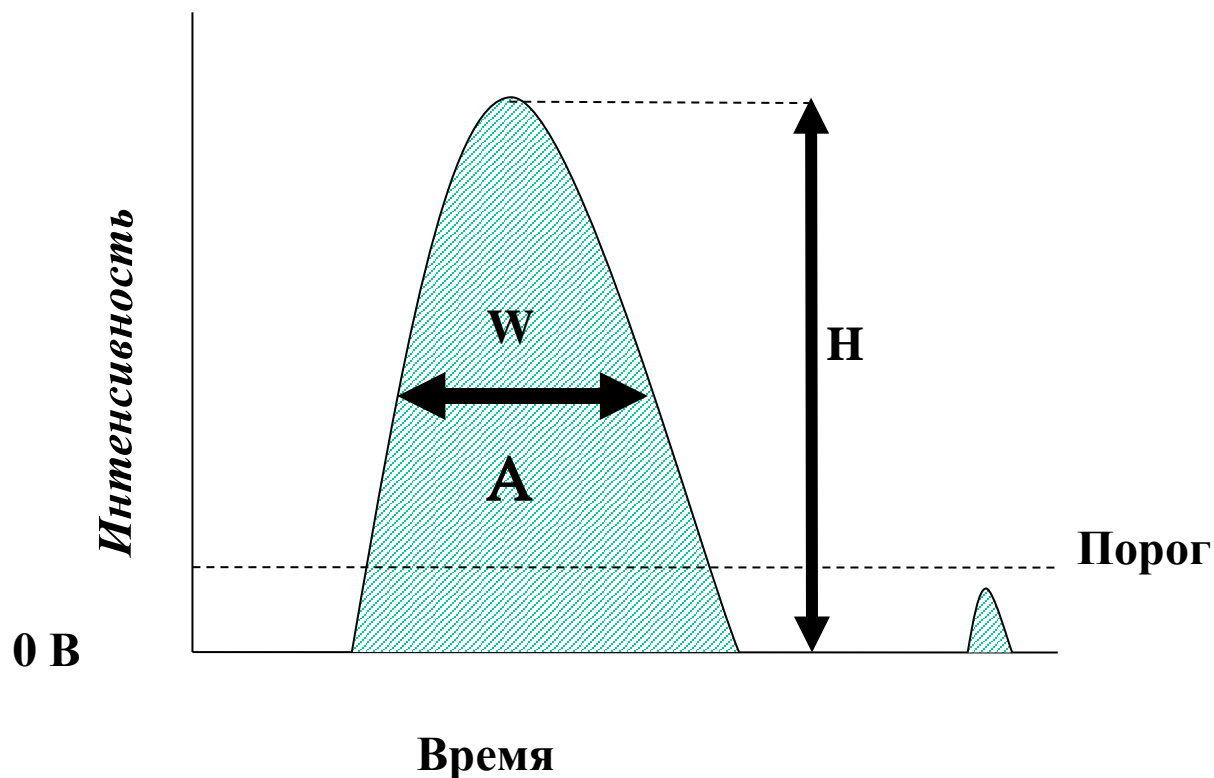


$H$  : высота

$A$  : площадь

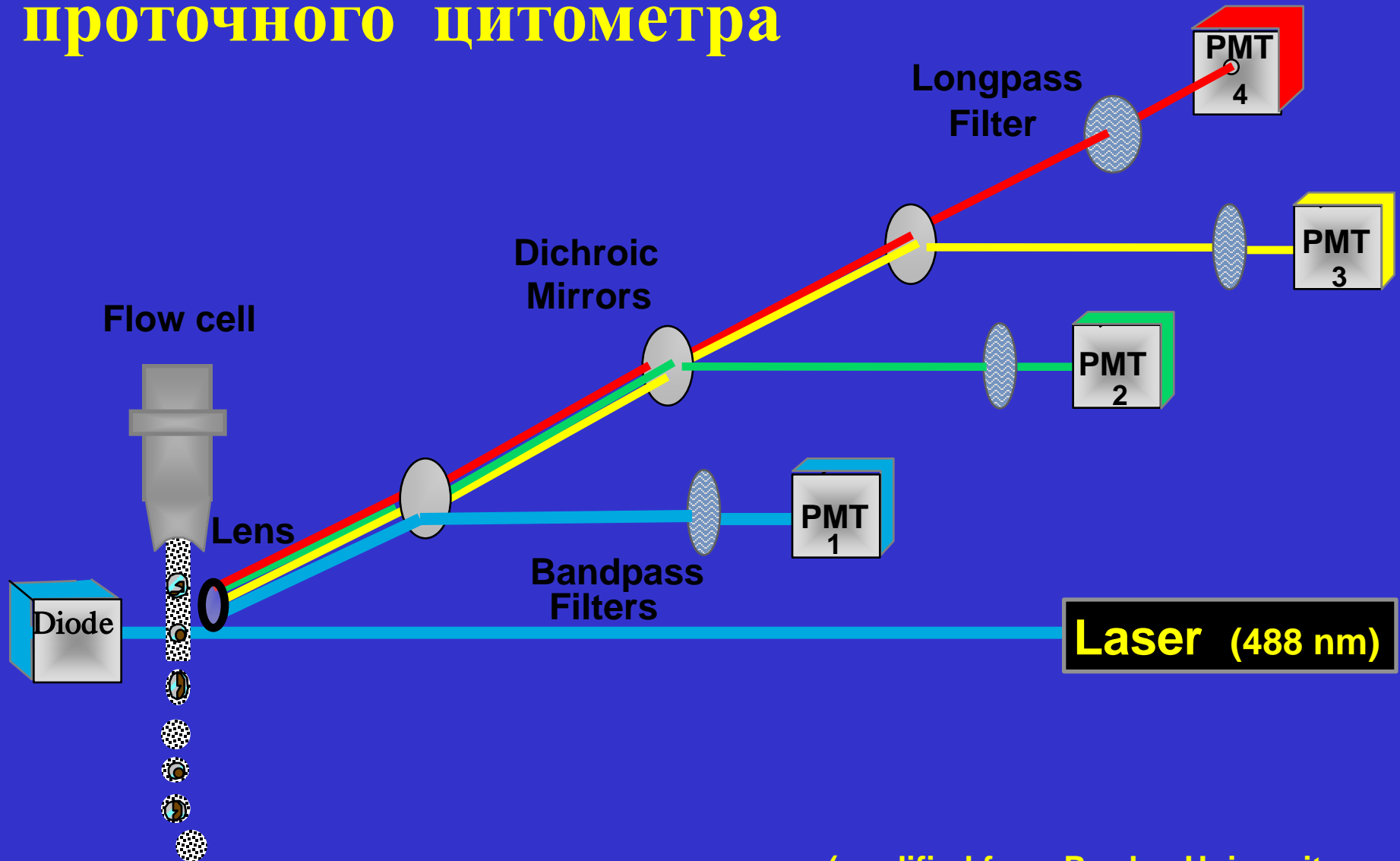
$W$  : ширина на полувысоте

# Особенности цифровых цитометров



Поскольку прибор позволяет измерить все три параметра, то наиболее точные результаты дает, как правило, площадь, а не высота. Так как измерения сигнала ведутся непрерывно (через буфер АЦП), для точного измерения площади вводится цифровая поправка, которая позволяет скомпенсировать задержку, вызванную детекцией порога по ведущему сигналу

# Оптическая схема простейшего проточного цитометра



(modified from Purdue University  
Cytometry Laboratories)

# Выделение сигналов (оптическое)

Прямое (малоугловое) рассеяние ( $\sim 3-5^\circ$ ) – шторка + фотодиод.

Боковое светорассеяние ( $\sim 45-90^\circ$ ) – объектив + светоделитель + запирающий светофильтр (band pass), затем ФЭУ.

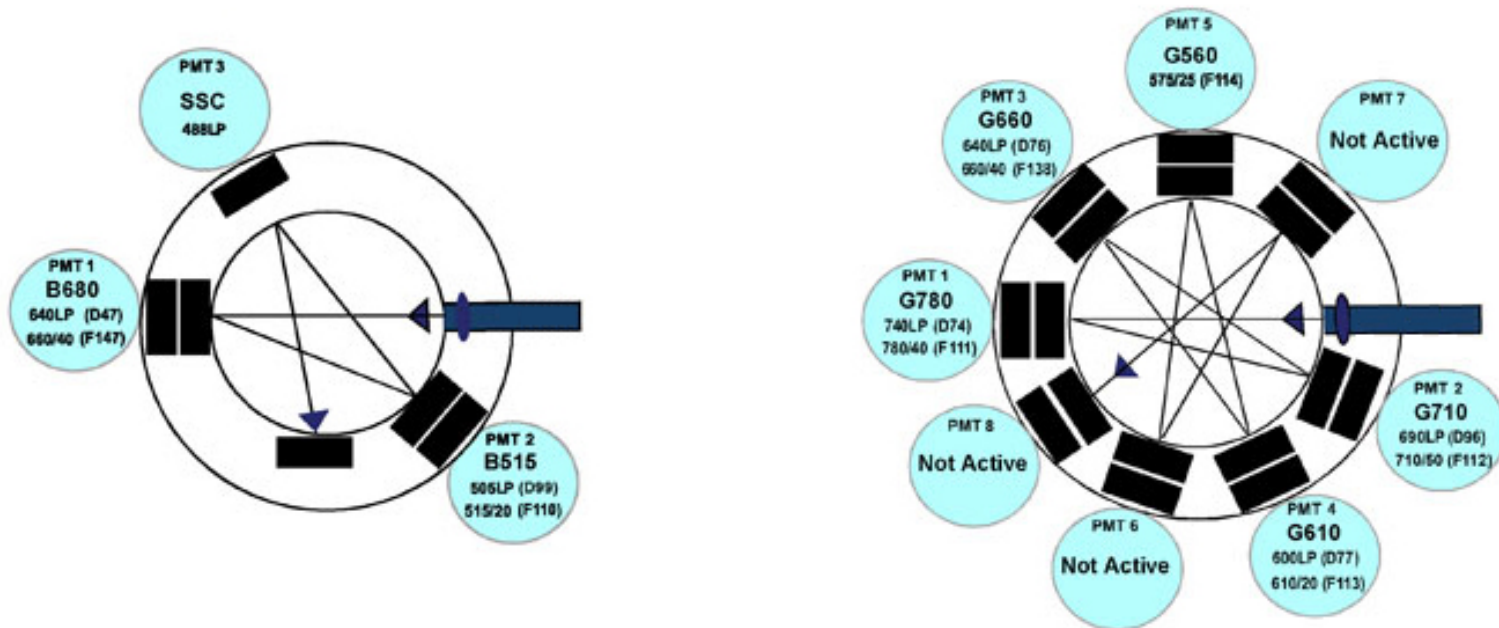
Каналы флюоресценции – тот же объектив + последовательные светоделители и запирающие светофильтры (band pass или long pass), затем ФЭУ.

Расположение светоделителей: либо под  $45^\circ$ , либо под  $11^\circ$  – полигон. В первом случае – пропускание, во втором – последовательное отражение.

Для каждого лазера устанавливается свой набор каналов флюоресценции (за исключением FSC/SSC).



# Зеркальная система светофильтров



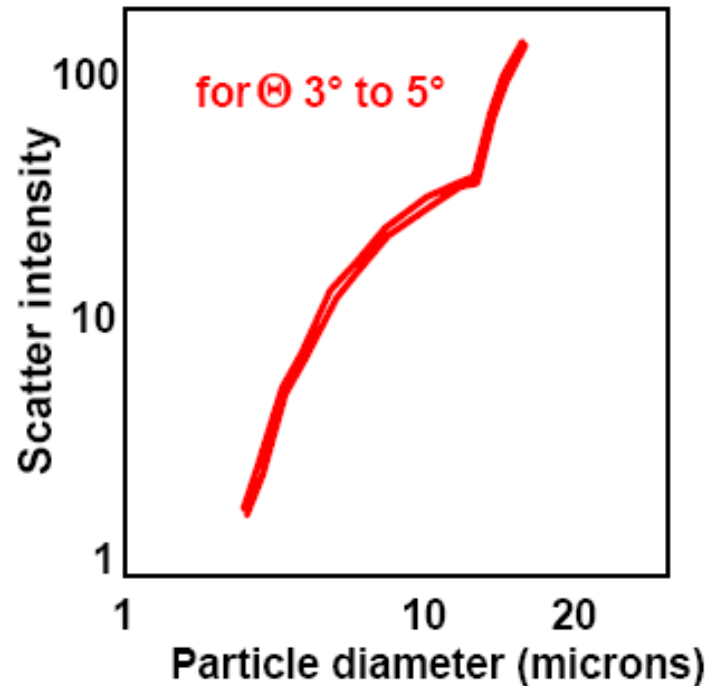
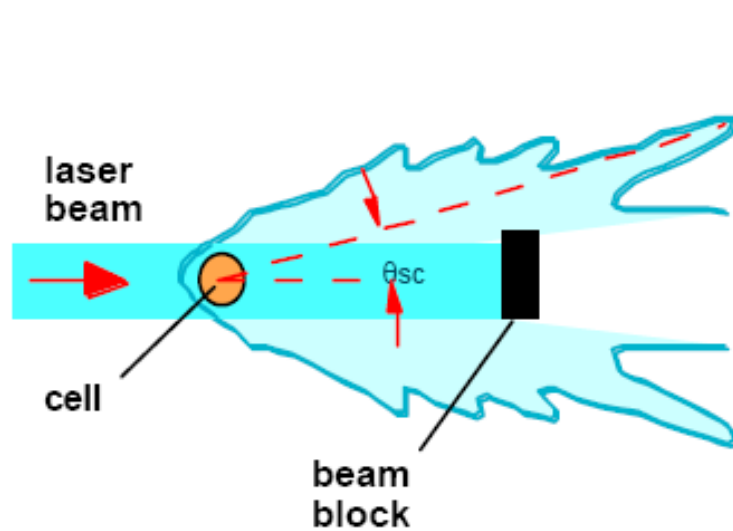
Система состоит из зеркал и фильтров с полосой пропускания (band pass filters). Она позволяет при последовательных отражениях разделять свет на несколько спектральных участков (практически – до 6 диапазонов в видимой и ближней ИК области)

# BD Biosciences – детекторы



Светоделители (тригоны и октагоны) отражают свет под углом около  $170^\circ$ , за счет чего потери света минимальны и возможна эффективная детекция до 7 флуоресцентных каналов от одного лазера.

# Прямое светорассеяние



Прямое (малоугловое) светорассеяние (FSC) – рассеяние под углом  $3-10^\circ$ . Оно описывается функцией Бесселя (рассеяние Ми – Gustav Mie, 1908), и в целом положительно (но нелинейно!) коррелирует с размером частицы. Интенсивность сигнала зависит от разности показателей преломления.

**Конкретные параметры зависят от прибора!**

# Размеры определяемых частиц

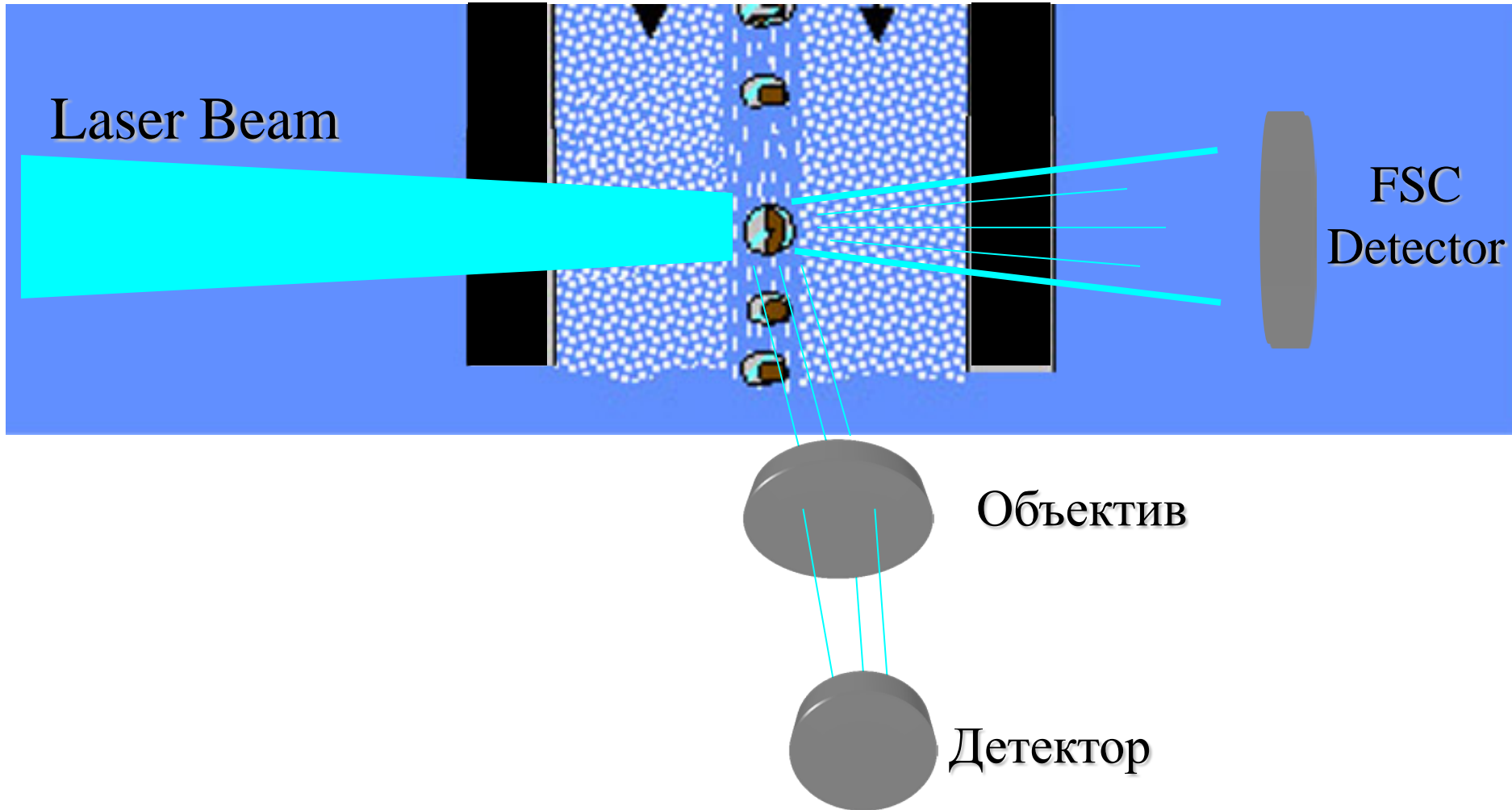
Минимальные размеры частиц определяются яркостью сфокусированного луча и чувствительностью детектора. При достаточной мощности и чувствительности предел определяется волновыми свойствами света и составляет около 60% длины волны. Стандартный прибор имеет предел разрешения около 0,5 мкм. Уверенное детектирование – от 0,8 мкм.

Прибор с хорошей фокусировкой луча и ФЭУ (вместо фотодиода) для детекции FSC позволяет выделять (от шума) частицы размером от 0,35-0,5 мкм.

Частицы размером 0,25-0,3 мкм можно отличить от шума только по их боковому светорассеянию (SSC) при использовании специально очищенной омывающей жидкости (фильтровать через 0,1 мкм поры).

Максимальный размер частиц определяется конструкцией прибора (его проточной кюветы). Стандартный вариант – до 20 мкм. Специальные приборы с большой кюветой позволяют определять размеры частиц вплоть до 80-100 мкм.

# Боковое светорассеяние (SSC)



# Боковое светорассеяние

Боковое светорассеяние (SSC) детектируется под условным углом  $90^\circ$ . Свет собирается с помощью высокоапертурного объектива ( $NA = 0,6-1,2$ ). Величина сигнала SSC от клеток в основном обусловлена их включениями, размер которых примерно равен или меньше длины волны возбуждающего света (488 нм).

Общая величина сигнала SSC определяется разностью показателей преломления, количеством включений в клетке и их размером. Максимальный сигнал в канале SSC дают частицы размером 0,3-0,5 мкм, но частицы размером более 1 мкм дают очень слабый сигнал.

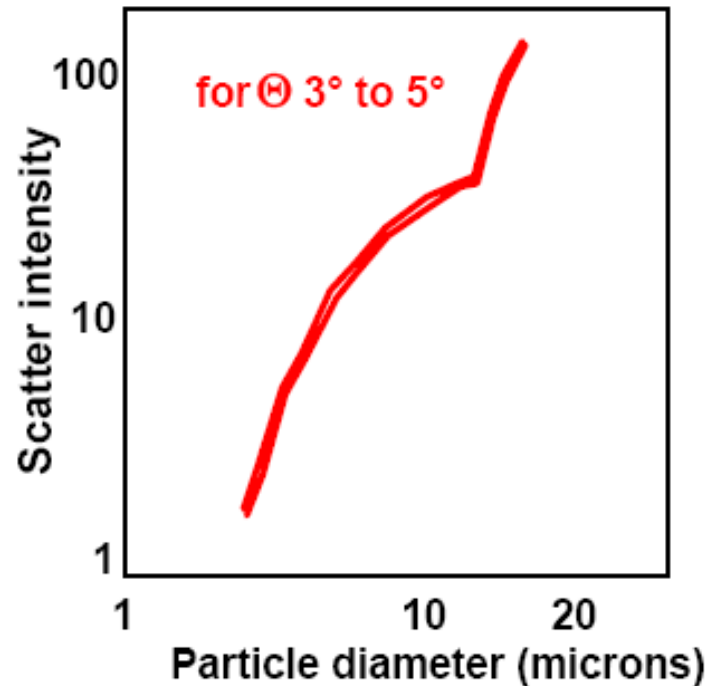
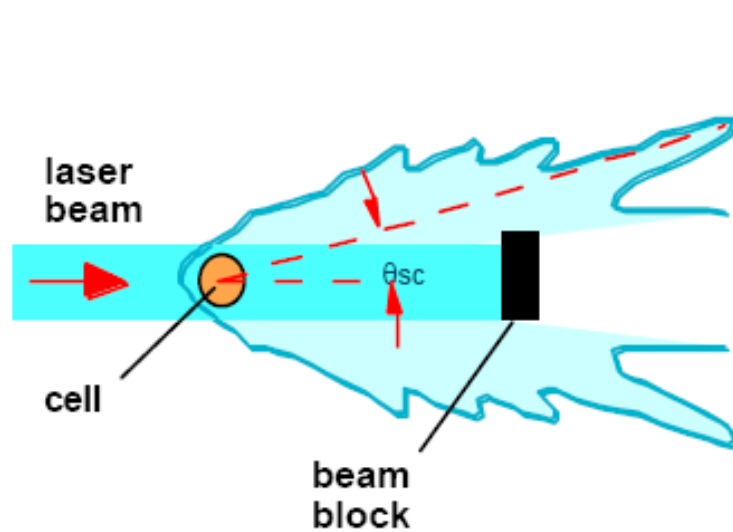
# **Проточная флюориметрия**

## **Лекция 2**

**И.А.Воробьев**

**Светорассеяние  
флуоресценция, красители**

# Прямое светорассеяние



Прямое (малоугловое) светорассеяние (FSC) – рассеяние под углом  $3-10^\circ$ . Оно описывается функцией Бесселя (рассеяние Ми – Gustav Mie, 1908), и в целом положительно (но нелинейно!) коррелирует с размером частицы. Интенсивность сигнала зависит от разности показателей преломления.

**Конкретные параметры зависят от прибора!**



# Размеры определяемых частиц

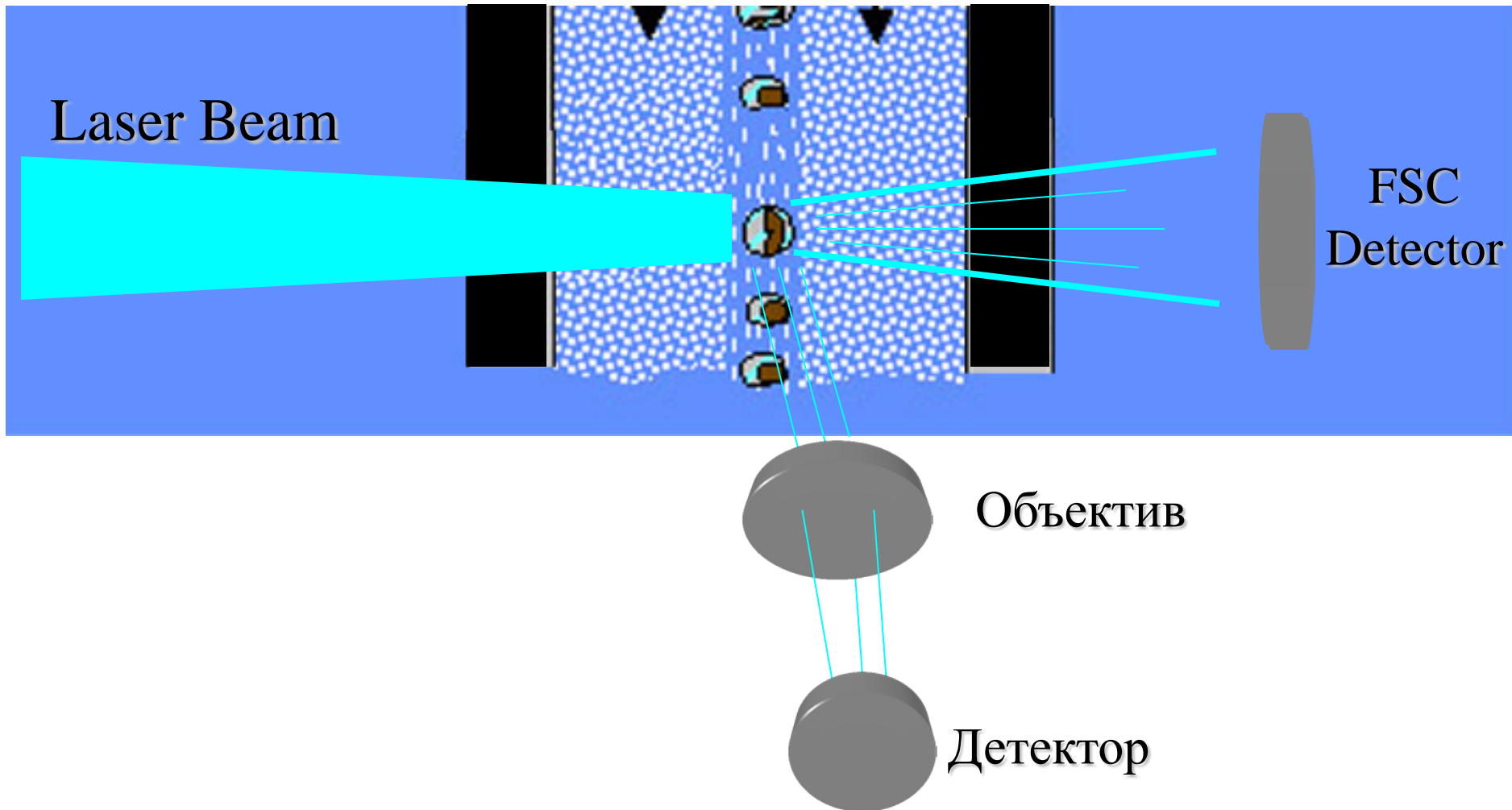
Минимальные размеры частиц определяются яркостью сфокусированного луча и чувствительностью детектора. При достаточной мощности и чувствительности предел определяется волновыми свойствами света и составляет около 60% длины волны. Стандартный прибор имеет предел разрешения около 0,5 мкм. Уверенное детектирование – от 0,8 мкм.

Прибор с хорошей фокусировкой луча и ФЭУ (вместо фотодиода) для детекции FSC позволяет выделять (от шума) частицы размером от 0,35-0,5 мкм.

Частицы размером 0,25-0,3 мкм можно отличить от шума только по их боковому светорассеянию (SSC) при использовании специально очищенной омывающей жидкости (фильтровать через 0,1 мкм поры).

Максимальный размер частиц определяется конструкцией прибора (его проточной кюветы). Стандартный вариант – до 20 мкм. Специальные приборы с большой кюветой позволяют определять размеры частиц вплоть до 80-100 мкм.

# Боковое светорассеяние (SSC)



# Боковое светорассеяние

Боковое светорассеяние (SSC) детектируется под условным углом  $90^\circ$ . Свет собирается с помощью высокоапертурного объектива ( $NA = 0,6-1,2$ ). Величина сигнала SSC от клеток в основном обусловлена их включениями, размер которых примерно равен или меньше длины волны возбуждающего света (488 нм).

Общая величина сигнала SSC определяется разностью показателей преломления, количеством включений в клетке и их размером. Максимальный сигнал в канале SSC дают частицы размером 0,3-0,5 мкм, но частицы размером более 1 мкм дают очень слабый сигнал.

# Запись результатов

**Сигналы с каждой клетки записываются в отдельную строку в файле (каждый ФЭУ – ячейка в строке). Размер файла определяется количеством записываемых сигналов и числом событий (клеток). Оба параметра устанавливаются оператором перед анализом пробы.**

**Один из каналов является ведущим (триггерным). Обычно это канал прямого светорассеяния, определяемого на лазере 488 нм, но может быть установлен любой другой (на том же лазере).**

**Запись сигналов в остальных каналах осуществляется при условии, что сигнал в триггерном канале превысил пороговое значение. Продолжительность записи также определяется ведущим каналом.**

**В аналоговых системах сигнал записывается в компьютер медленно (через АЦП), но с высокой точностью. В цифровых системах сигнал записывается сразу же, но выглядит ступенчатым. В то же время в цифровых системах можно регулировать момент начала и окончания записи сигнала по отношению к пороговому значению. В большинстве случаев цифровая запись производится с помощью скользящего буфера, что позволяет начинать ее до достижения порогового значения сигнала.**

# Хранение и анализ результатов

Listmode file – большая таблица (типа Excel) с данными. На его основе строятся различные графики (гистограммы, 2-х мерные и трехмерные графики) и проводятся статистические расчеты (среднее, медиана и проч.).

Файлы форматов FCS: 2.0 (аналоговые машины) и FCS 3.0 (цифровые машины). Они содержат кроме таблицы характеристики прибора (величины усиления на каждом ФЭУ, параметры компенсации и проч.). Файлы FCS позволяют обрабатывать данные в режиме off-line в графическом виде с помощью различных программ.

Стандартный анализ состоит в построении одномерных гистограмм и двумерных графиков и выделении интересующих вас событий, которые представляются графически или в виде статистических данных.

# Производительность проточного цитофлюориметра

Производительность определяется максимальным числом событий в единицу времени, которые могут быть зарегистрированы прибором.

Сигнал с каждой клетки может быть записан при условии, что расстояние между соседними клетками в потоке больше определенной величины. При этом клетки в потоке расположены на случайных расстояниях друг от друга. Расчеты показывают, что при диаметре струи с клетками в 10 мкм, отдельные клетки будут регистрироваться примерно в 99% случаев, если их концентрация в образце составляет не более  $5 \cdot 10^7$  клеток на мл. При большей концентрации заметное число клеток (несколько процентов) будут регистрироваться в виде дуплетов.

Меньшая концентрация клеток в образце приводит к замедлению подсчета, так как среднее расстояние между клетками в струе возрастает. Увеличение скорости подачи клеток, находящихся в исходной пробе в низкой концентрации, ускоряет подсчет, но приводит к расширению осевой струи и увеличению стандартного отклонения.

# Чувствительность прибора

1985 год – 1000-3000 молекул на клетку при мощности лазера 400 мВт

2012 год – 30-100 молекул на клетку при мощности лазера 50-100 мВт.

## Детектирование в дальнем красном свете

В 1985 году практическая граница была в районе 660 нм (APC)

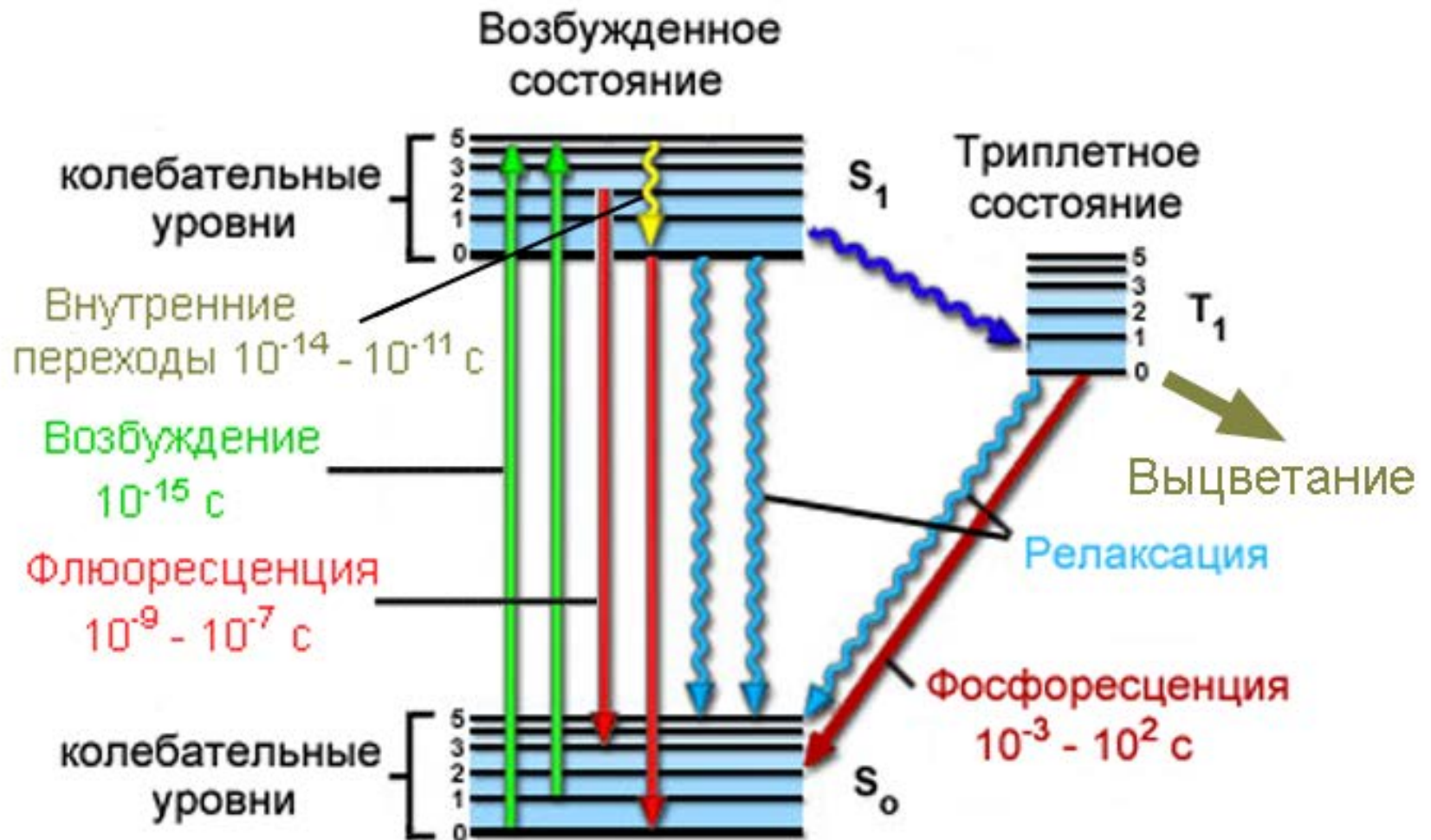
В 2010 году – до 850 нм (Qdot 800)

## Динамический диапазон ФЭУ:

В 1985 году – 3 логарифма ( $10^3$ )

Сейчас – до 6 логарифмов ( $10^6$ )

# Диаграмма Яблонского





# Явление флюоресценции

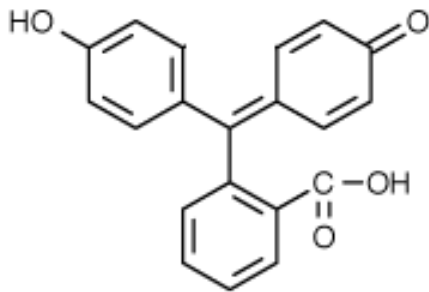
Квант света поглощается молекулой (возбуждение – характеристическое время  $10^{-15}$  секунды), затем электроны переходят на верхний разрешенный энергетический уровень (возбужденное состояние – характеристическое время  $10^{-9}$  секунды), после чего - высвечивается новый квант света, и молекула возвращается на исходный энергетический уровень. В альтернативе возбужденная молекула может претерпеть химическую модификацию (переход в триплетное состояние).

Сдвиг средней длины волны обусловлен внутренними колебаниями на разрешенных электронных уровнях поглощающей молекулы.

Высвечивание в результате эмиссии происходит равномерно по всем направлениям.

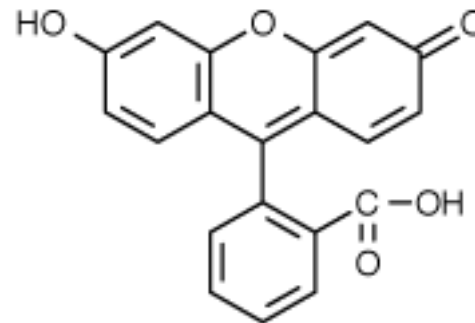
# Что такое хороший флуорофор?

Флуорофор: молекула с жесткой полиароматической (или гетероциклической) структурой



Фенолфталеин

Гибкий, не флуоресцирует



Флуоресцеин

Жесткий, флуоресцирует

1. Поглощенная энергия должна вызывать внутримолекулярный резонанс для эффективной эмиссии (синглетного возбужденного состояния) – коэффициент экстинкции.
2. Эффективная передача кванта энергии (фотона) при переходе из возбужденного в базовое состояние (квантовый выход)

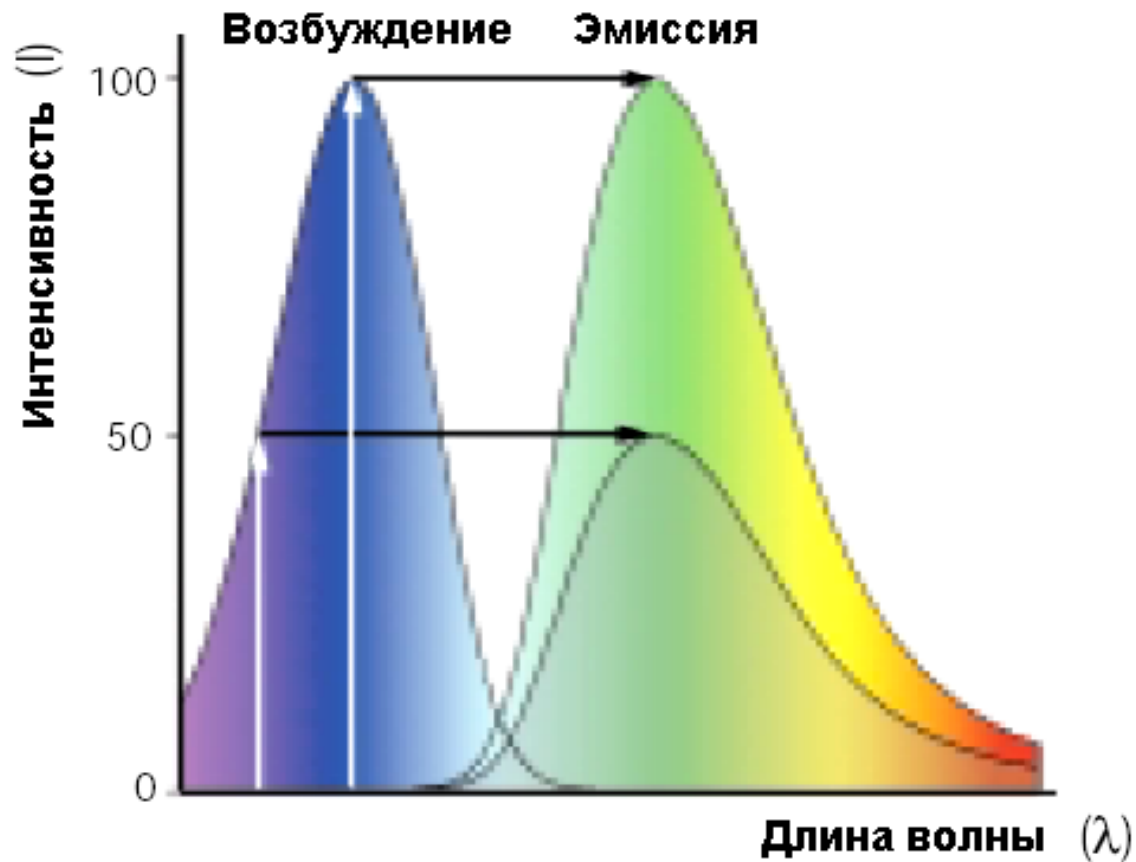
# Правило Стокса

**Спектры поглощения и испускания флуорохрома независимы. Эмиссия ненаправлена.**

**Спектр испускания и спектр поглощения красителя не совпадают, причем, как правило, максимум поглощения приходится на меньшую длину волны, чем максимум испускания.**

**Сдвиг между максимумами поглощения и эмиссии – сдвиг Стокса.**

# Сдвиг Стокса



# Детекция флуоресцентного сигнала

Сдвиг Стокса используется для эффективного выделения полос возбуждающего света и света эмиссии из общего спектра.

Интенсивность эмиссии составляет не более  $10^{-4}$  от интенсивности возбуждающего света.

Для наблюдения флуоресценции необходимо подавить возбуждающий свет с эффективностью не хуже, чем  $10^{10}$ .

Подавление рассеянного света осуществляется светоделителем и запирающим фильтром.

# Параметры флуоресценции

**Спектры возбуждения и эмиссии – необходимы для подбора светофильтров.**

**Коэффициент экстинкции ( $\epsilon$ ) – поглощение на грамм-моль для выбранной длины волны. Позволяет определить эффективный радиус хромофора молекулы.**

**Квантовый выход флуоресценции – соотношение числа поглощенных и испущенных молекулой фотонов (в %).**

**Время высвечивания или релаксации ( $\tau$ ) – среднее время эмиссии, то есть возвращения возбужденной молекулы в основное состояние.**

# **Параметры хороших флуоресцирующих молекул**

**Большой (по неперекрывающейся площади) сдвиг Стокса**

**Большой коэффициент экстинкции ( $100000 \text{ см}^{-1} * \text{М}^{-1}$  и более)**

**Высокий квантовый выход (>15%)**

**Оптимальная длина волны возбуждения близка к линии лазера (отличается от нее не более, чем на 15-25 нм)**

**Малое время релаксации**

**Минимальные изменения спектра в конъюгированной пробе (меченые антитела)**

# Виды красителей

Простые органические молекулы – DAPI; FITC, семейство Alexa и др.

Флуоресцентные белки фотосинтетических антенн – R-PE, APC, PerCP.

Флуоресцентные полимеры – BrilliantViolet-421; Brilliant UV – under development (BD Horizon Brilliant™ Ultraviolet 395)

Флуоресцентные белки животного происхождения (GFP, RFP, Katushka и др.)

Тандемные красители на основе белков и полимеров – PE-Cy5; APC-Cy7; BV-570; BV-711 и др.

Квантовые точки (Qdot 565, 605, 700 и др.)



# **FITC (флюоресцеин изотиоцианат)**

**FITC – наиболее часто употребляемый краситель.**

**Молекулярный вес – 389 Д. Изотиоцианат – наиболее распространенное производное флуоресцеина для конъюгации его с белковыми молекулами (антителами, авидином и проч.).**

**При получении конъюгатов обычно присоединяется 3-5 молекул FITC на молекулу белка.**

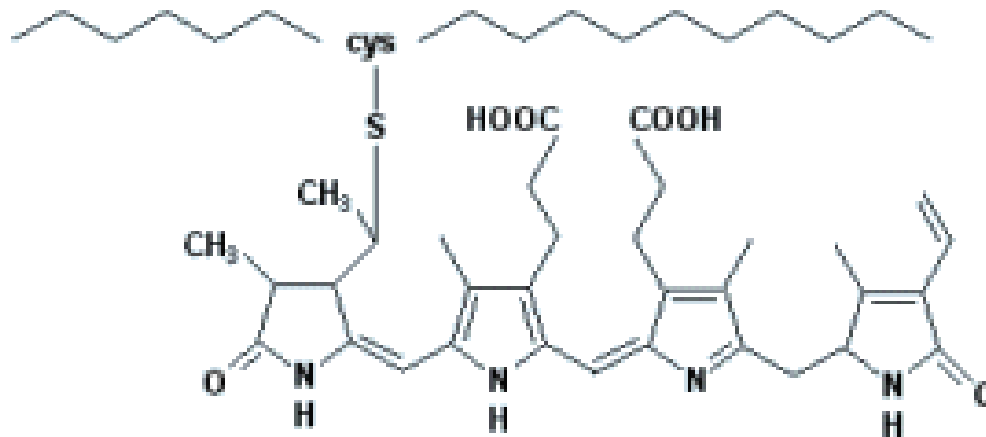
**Максимум поглощения – 494 нм, максимум эмиссии – 519 нм.**

**Обладает по сравнению с PE и APC более сильной флуоресценцией (время релаксации – 6 нс), но меньшей фотостабильностью. Имеет высокий квантовый выход.**

# Фикоэритрин

PE=RPE, phycoerythrin - белок из *Corralina officinalis*.

Вспомогательный компонент фотосинтетической антенны.



R-PE – (R символизирует происхождение из красной водоросли) – яркий оранжево-красный белок из группы фикобилинов с м.в. 240 kDa.

Содержит 34 хромофорных фикоэритробилиновые группы (на схеме) и имеет очень большой коэффициент экстинкции ( $1960000 \text{ см}^{-1} * \text{M}^{-1}$ ) и квантовый выход – 0,82. Время релаксации – 10-20 нс.

Максимумы поглощения – 492 и 565 нм. Эффективно возбуждается синим лазером (488 нм) и зеленым лазером (561 нм) имеет максимум эмиссии при 578 нм.

# PerCP (перединин-хлорофилловый белковый комплекс)

PerCP – компонент фотосинтетической антенны динофлагелляты *Glenodinium* sp. М.в. – 35 кД. Максимум возбуждения – 482 нм, эмиссии – 678 нм. Является природным тандемным красителем (перенос с каротина на хлорофилл). Обладает по сравнению с PE и APC более слабой флюоресценцией (коэффициент экстинкции – 300000) и значительно меньшей фотостабильностью. Нестабилен при хранении. Более эффективен в комплексе с цианиновым красителем Cy5.5. Основное преимущество – большой сдвиг Стокса.

# APC (аллофикоцианин)

APC – белок, компонент фикобилисомы цианобактерий. М.в. 105 кД, содержит 6 хромофорных групп. Максимум поглощения – 650 нм, эмиссии – 660 нм. Квантовый выход – 68%. Коэффициент экстинкции – 700000. По эффективности флуоресценции несколько уступает фикоэритрину.

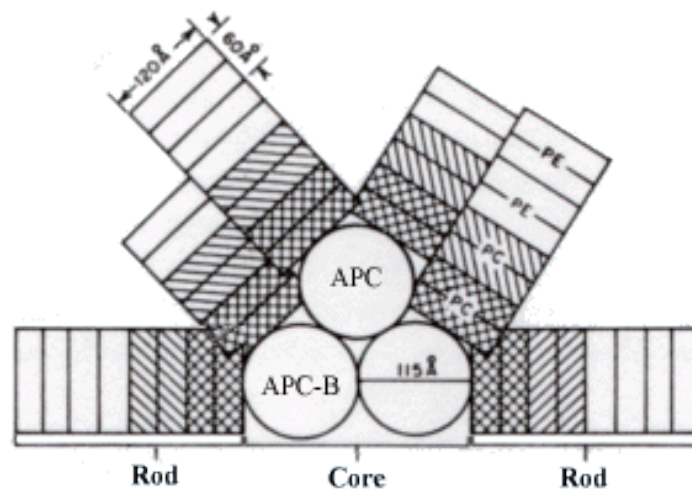


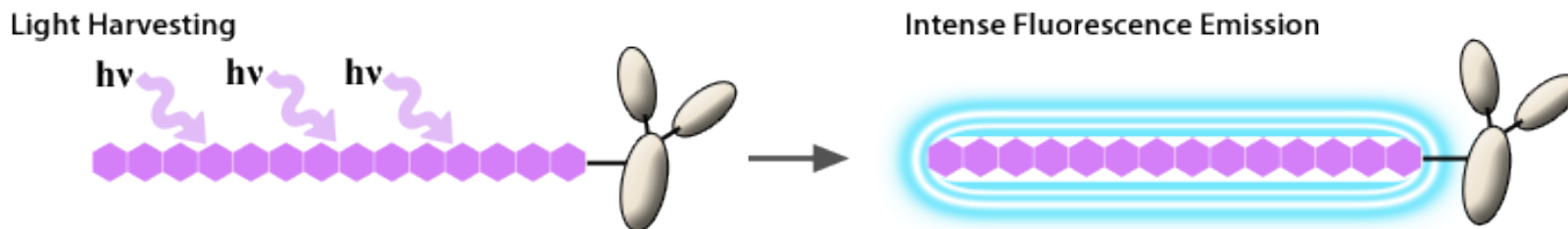
Схема фотосинтетической антенны: APC и APC-B составляют ядро фикобилисомы. Остальные фотосинтетические белки находятся на периферии в виде столбиков. Энергия фотонов переносится от столбиков в ядро, а затем на молекулу хлорофилла, вмонтированную в фотосинтетическую мембрану.

Обычная последовательность передачи энергии в антенне:  
phycoerythrin - phycocyanin - allophycocyanin - allophycocyanin B - chlorophyll a

# BV421 (Brilliant Violet)

BV421 – синтетический полимер, имеющий чередующиеся одинарные и двойные связи. М.в. не объявлен, но известно, что молекула содержит сплошную  $\pi$ -орбитальную группу электронов. Максимум поглощения – 407 нм, эмиссии – 421 нм. Время релаксации очень маленькое – менее 1 нс. Квантовый выход – 69%. Коэффициент экстинкции –  $2,6 \cdot 10^6 \text{ см}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ . По эффективности флюоресценции несколько превосходит фикоэритрин.

На его основе выпускается семейство тандемных красителей.

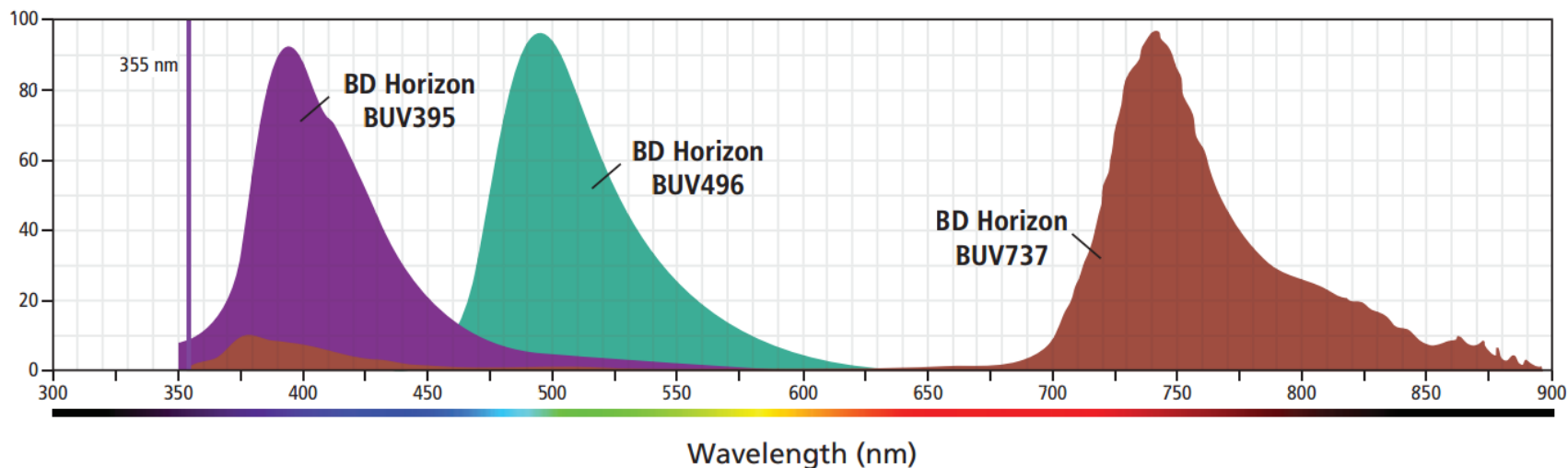


# BUV395 (Brilliant Ultraviolet)

BD Horizon Brilliant™ Ultraviolet 395 (BUV395) – новый синтетический полимер, имеющий чередующиеся одинарные и двойные связи. М.в. не объявлен. Максимум поглощения – 348 нм, эмиссии – 395 нм.

По эффективности флюоресценции близок к BV421.

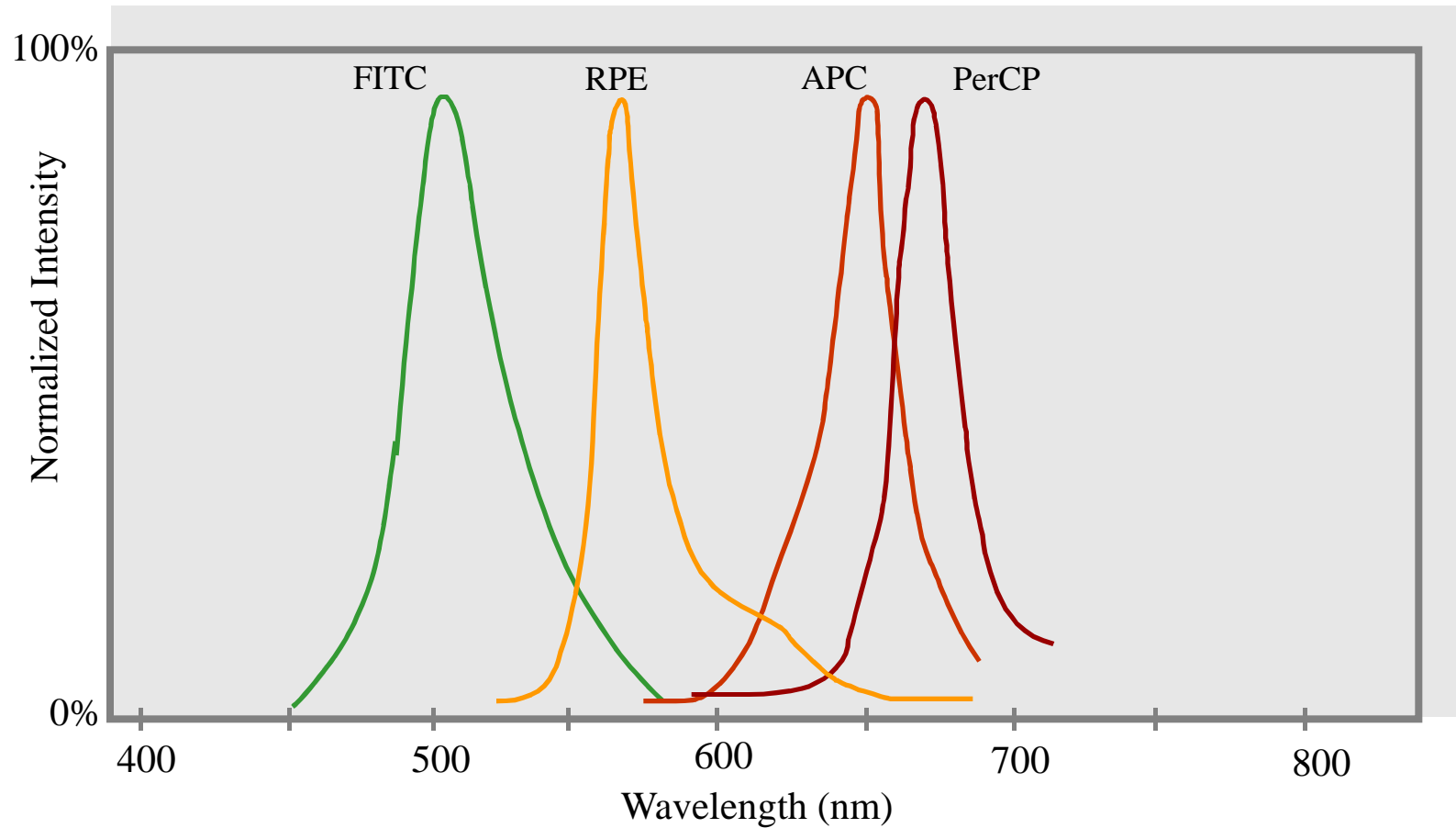
На его основе выпускается семейство тандемных красителей.



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.

# Спектры эмиссии классических флюорофоров



# Типы флюорофоров

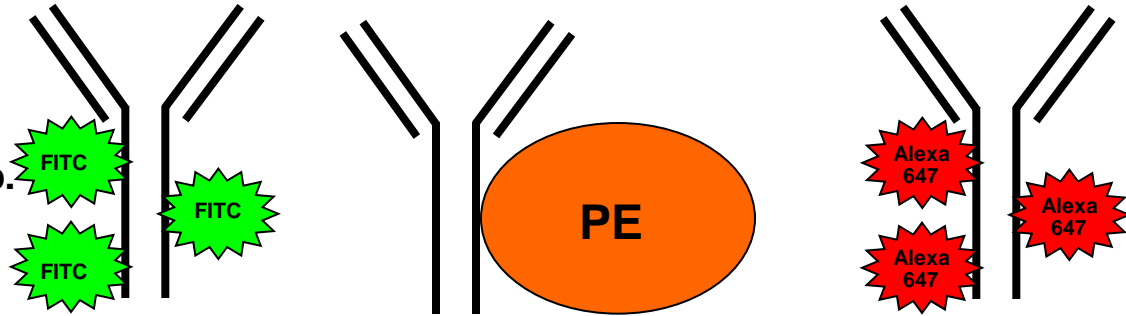
## Простые красители

Малый М.В.:

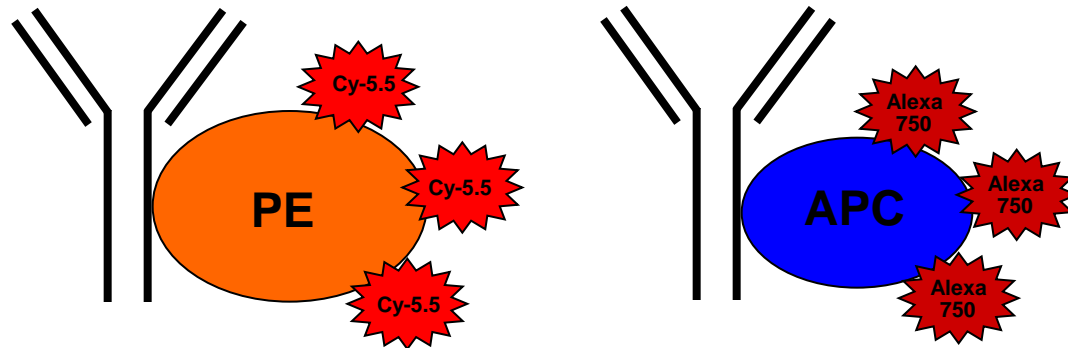
- Pacific Blue
- FITC
- AlexaFluor семейство и др.

Белки:

- Phycocerythrin(PE)
- Allophycocyanin(APC)
- GFP, etc.



## Тандемные красители (с ферстеровским переносом)



Эмиссия одного красителя (донор) перекрывается с абсорбцией другого (акцептор). Когда флуорохромные группы сближены и правильно ориентированы по отношению друг к другу, происходит перенос энергии кванта с одной группы на другую без излучения фотона.

Второй краситель испускает свет с большей длиной волны.

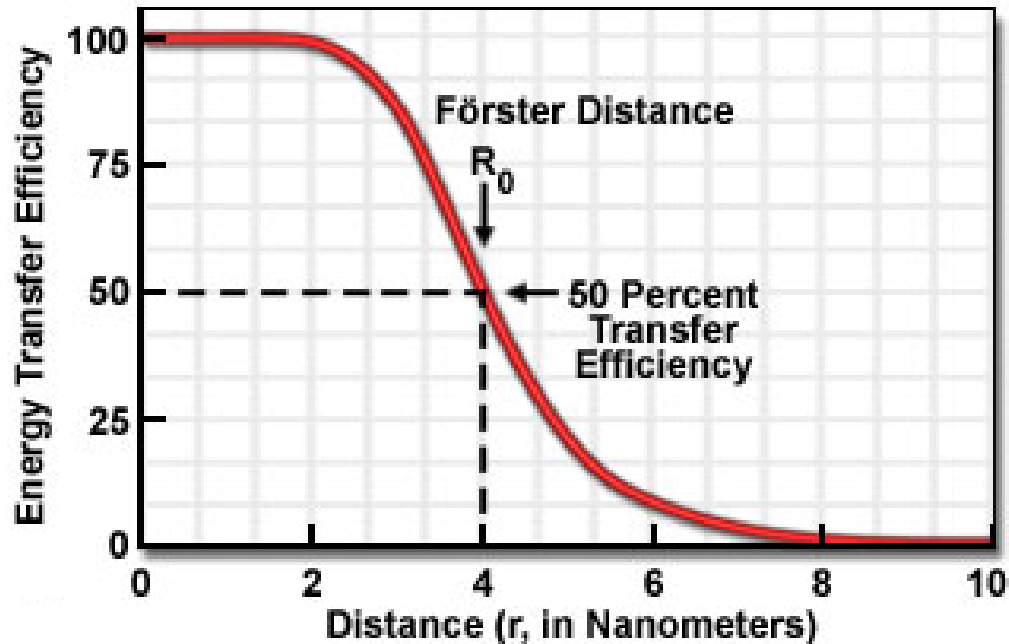


# **Явление ферстеровского переноса**

**Для близкорасположенных флуоресцирующих молекул возможен резонансный перенос энергии с одной молекулы на другую без излучения – ферстеровский безизлучательный перенос. Перенос эффективен в случае, если максимум эмиссии молекулы донора соответствует максимуму поглощения молекулы- акцептора, а расстояние между флуоресцирующими группами в составе молекул мало.**

**Эффективность переноса определяется расстоянием между молекулами и относительной ориентацией их флуоресцирующих групп.**

# Ферстеровский перенос



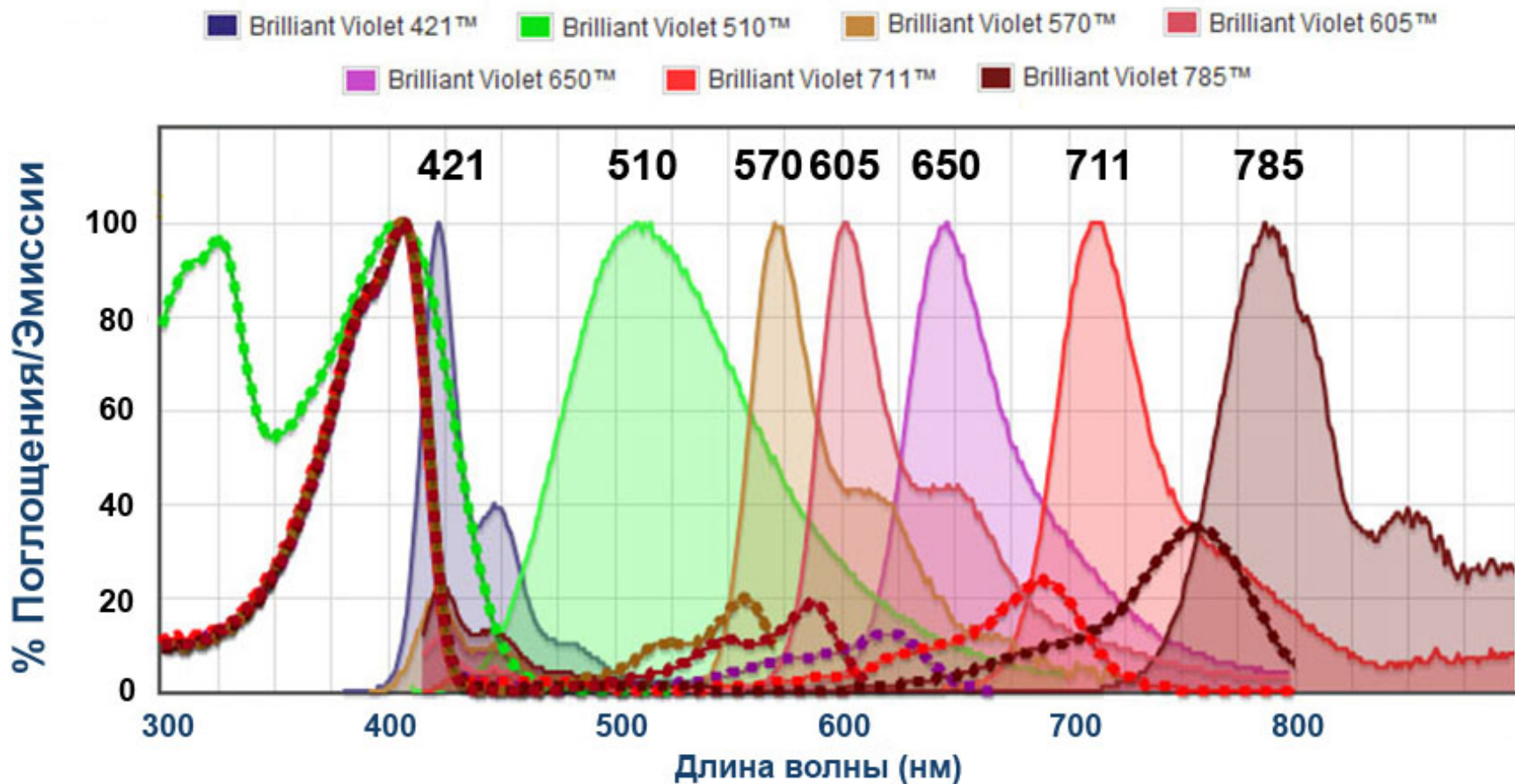
Эффективность переноса обратно пропорциональна шестой степени радиуса, поэтому быстро затухает с расстоянием.

FRET-sensors – пары молекул, расстояние между которыми может изменяться в эксперименте.

# Наборы тандемных красителей

1. На основе R-PE: PE-Texas Red; PE-Cy5; PE-Cy5.5; PE-Cy7
2. На основе APC – APC-Cy7; APC-Alexa700; APC-Alexa750
3. На основе PerCP – PerCP-Cy5.5
4. На основе Brilliant Violet – Brilliant Violet 510; 570; 605; 650; 711; 785.
5. На основе Brilliant UV – разрабатываются

# Семейство тандемных красителей на основе Brilliant Violet



# **Проточная флуориметрия**

## **Лекция 3**

**И.А.Воробьев**

**Представление данных проточной  
цитометрии**

**Основы многоцветного анализа**

# Каналы флюоресценции (1-3 лазера)

Для одного лазера (488 нм): FL-1 – FL-5

FL-1 – FITC (530/30 нм)

FL-2 – PE (RPE) (585/40 нм)

FL-3 – PE-TexasRed (610/20 нм)

FL-4 – PerCP-Cy5.5; PE-Cy5 или PE-Cy5.5 (>670 нм или 720/40 нм )

FL-5 – PE-Cy7 (780/60 нм)

Для второго лазера (при использовании пяти каналов для первого лазера):

FL-6 – APC (660/20 нм)

FL-7 – APC-Alexa-700 (712/20 нм)

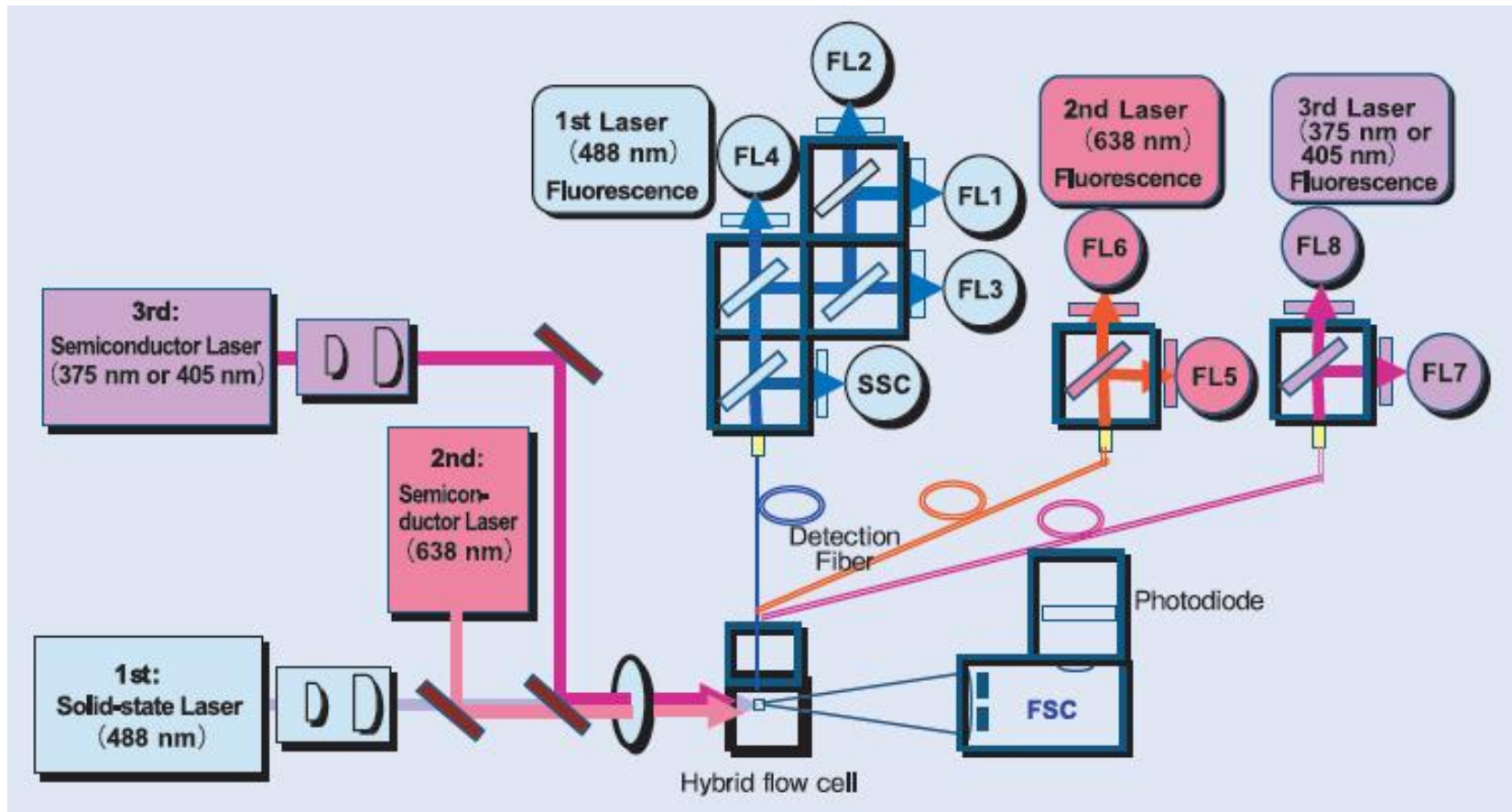
FL-8 – APC-Alexa-750 или APC-Cy-7 (>750 нм)

Для третьего лазера (405 нм): FL-9 – FL-10

FL-9 – Brilliant Violet (Pacific Blue) 450/50 (425/20)

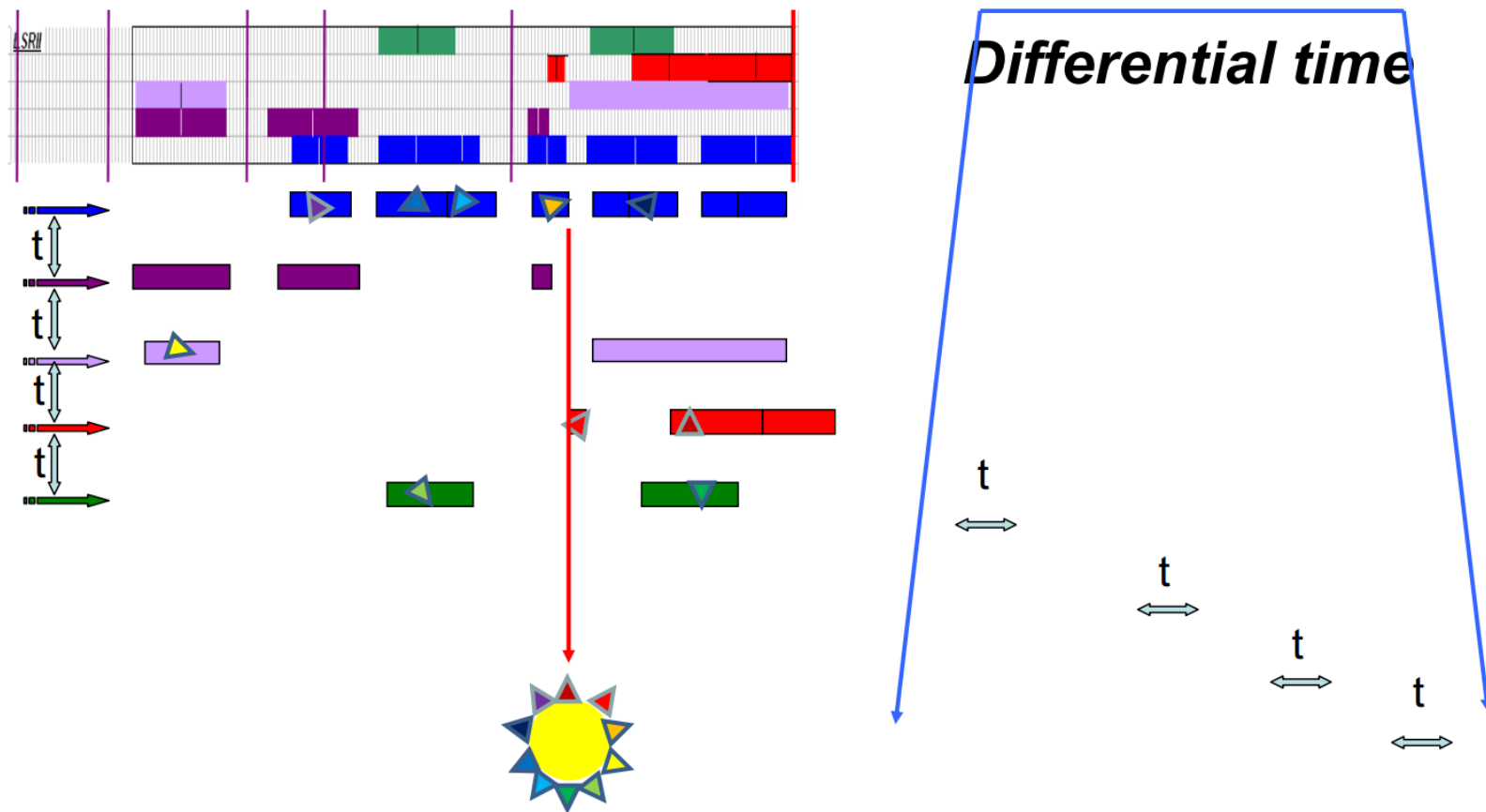
FL-10 – Krome Orange (Pacific Orange) 530/50

# Оптика многолазерного проточника



Боковое светорассеяние и сигналы флуоресценции собираются от объектива с помощью световодов и разделяются по каналам с помощью дихроичных зеркал.

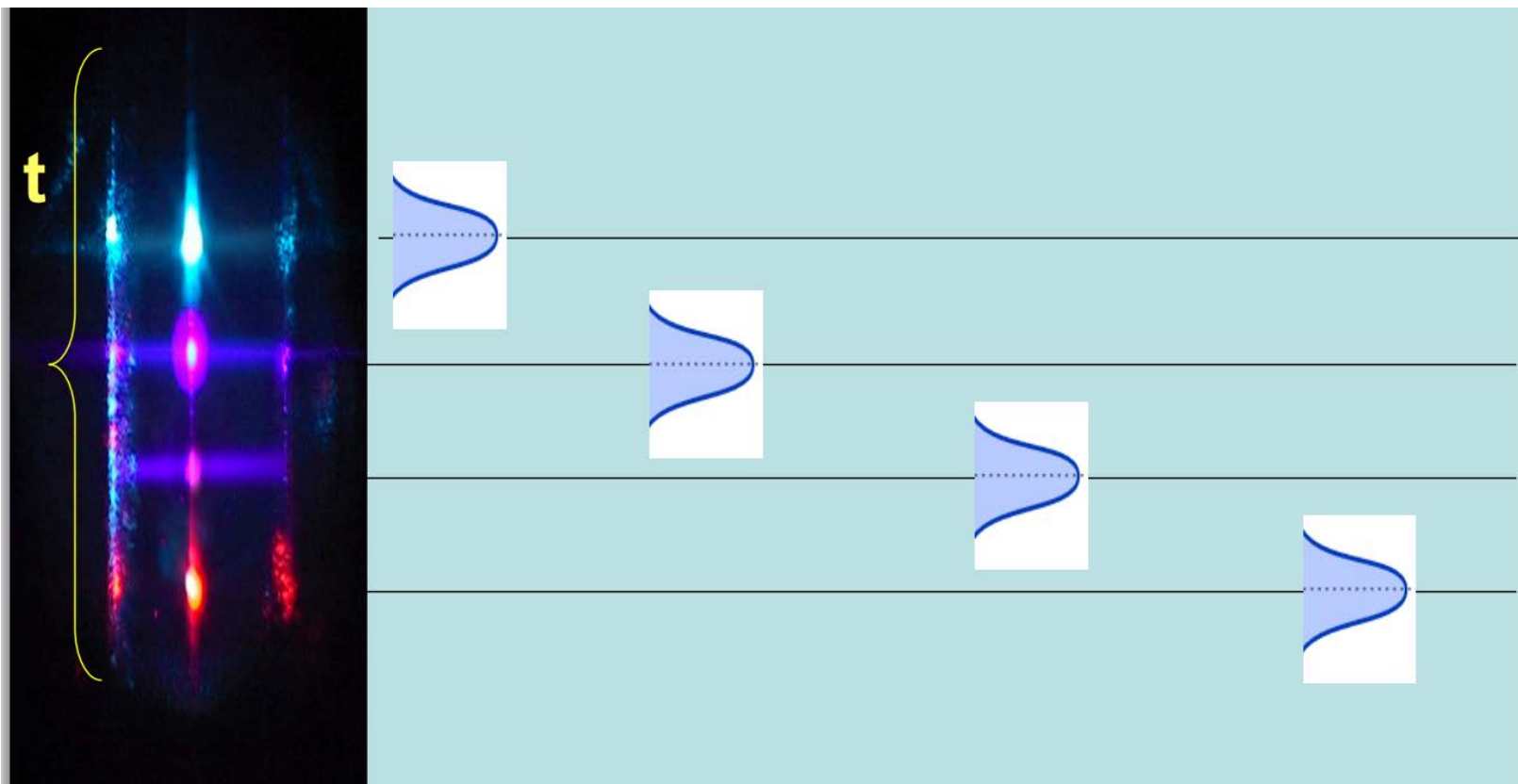
# Задержка лазеров



Лазерные пучки должны возбуждать молекулы не одновременно, а с задержкой более 100 нс – как правило, для этого они разделяются в пространстве (последовательное возбуждение)



# Настройка задержки лазеров



**Правильная настройка задержки обеспечивает минимальный разброс сигналов, возбуждаемых каждым лазером, и не позволяет собирать возбуждающий свет в каналах флуоресценции**

# **Каналы флюоресценции (4 лазера и более)**

**Для синего лазера (488 нм) остается всего два канала:**

**FL-1 – FITC (530/30 нм)**

**FL-2 – PerCP-Cy5.5; PE-Cy5 или PE-Cy5.5 (>670 нм или 720/40 нм )**

**Для четвертого (зеленого, 561 нм) лазера (при использовании двух каналов для первого лазера) – 4 канала:**

**PE (RPE) (585/40 нм)**

**PE-TexasRed (610/20 нм)**

**PE-Cy5.5 (720/40 нм)**

**PE-Cy7 (780/60 нм)**

**Фиолетовый лазер (405-407 нм): до 5 каналов (450/50; 530/50; 605/20; 710/40; 780/60 нм).**

**Лазеры УФ (355-375 нм): два канала (450/50 и 525/30 нм)**

**Лазер желтый (594 нм) – один канал (>620 нм)**

# Представление данных

**Listmode** (таблица данных) и **графики (Plots)**.

## Виды графиков.

Гистограмма – одномерное распределение. Демонстрируется число событий на канал.

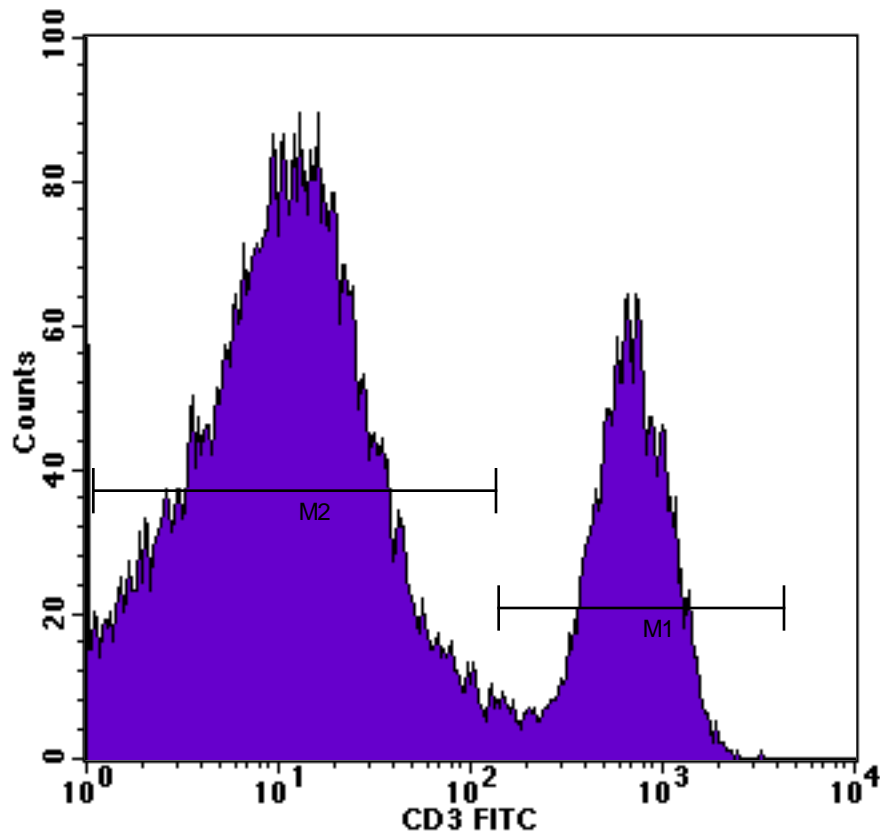
Двумерный график – поточечный (dot plot); по плотности событий (density plot) и др.

Трёхмерный график (поточечный) – пространственное распределение событий.

Шкала на графиках – линейная (1 - 1024) или логарифмическая ( $10^0$  -  $10^5$ ). Линейная шкала позволяет разделять небольшие различия в интенсивности сигнала. Логарифмическая шкала удобна тем, что позволяет видеть сигналы, различающиеся в 1000 и более раз.

Как правило, в линейной шкале представляется прямое светорассеяние, в логарифмической – сигналы флюоресценции (за исключением измерений ДНК).

# Гистограмма



Логарифмическая шкала –  
4 или 5 порядков ( $10^4$ - $10^5$ )

По оси абсцисс – интенсивность,  
по оси ординат – число событий.

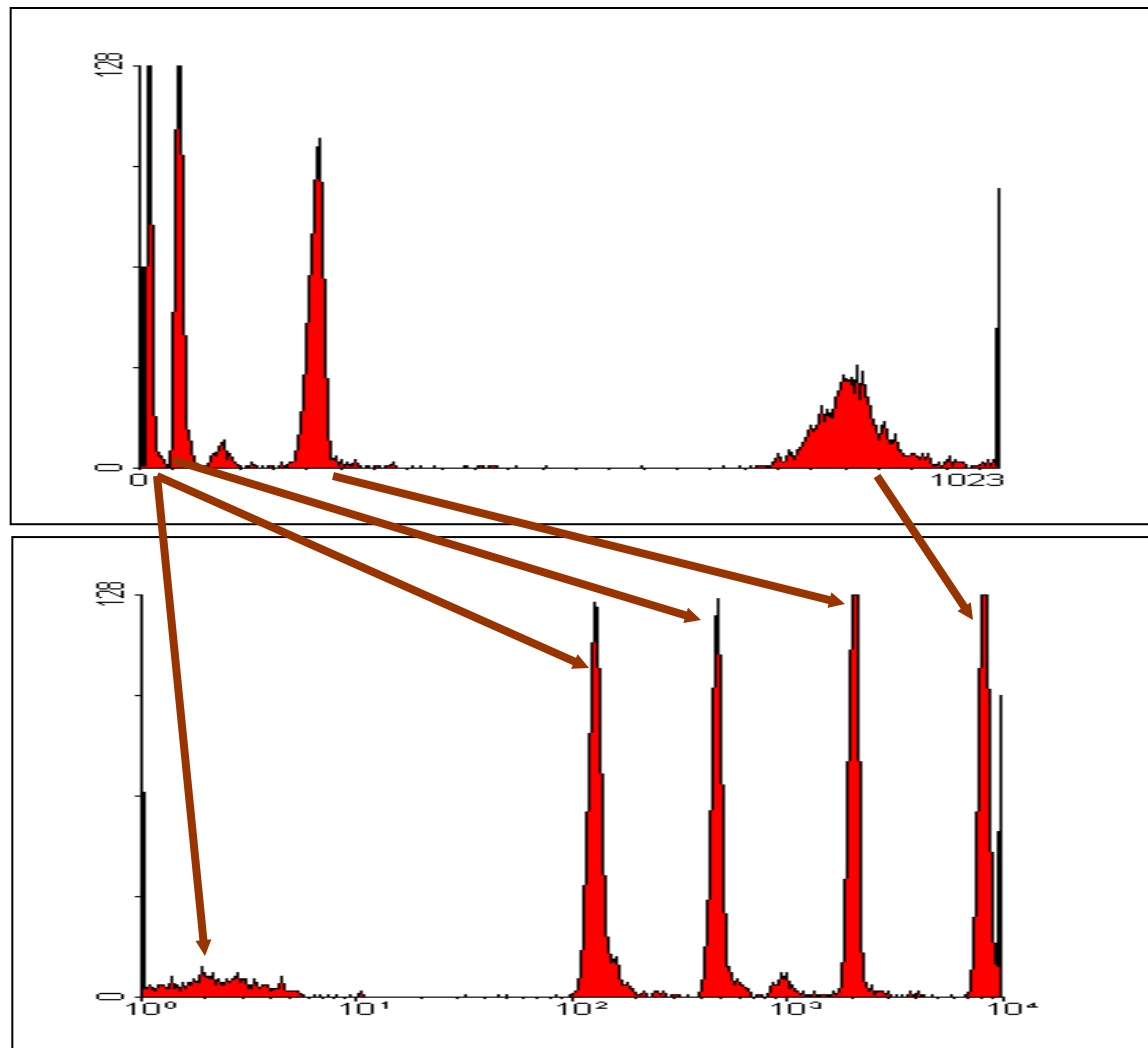
M1 – позитивная популяция;  
M2 – негативная популяция

File: AdigezalovaEA\_BLOOD.002

Acquisition Date: 10-Nov-05

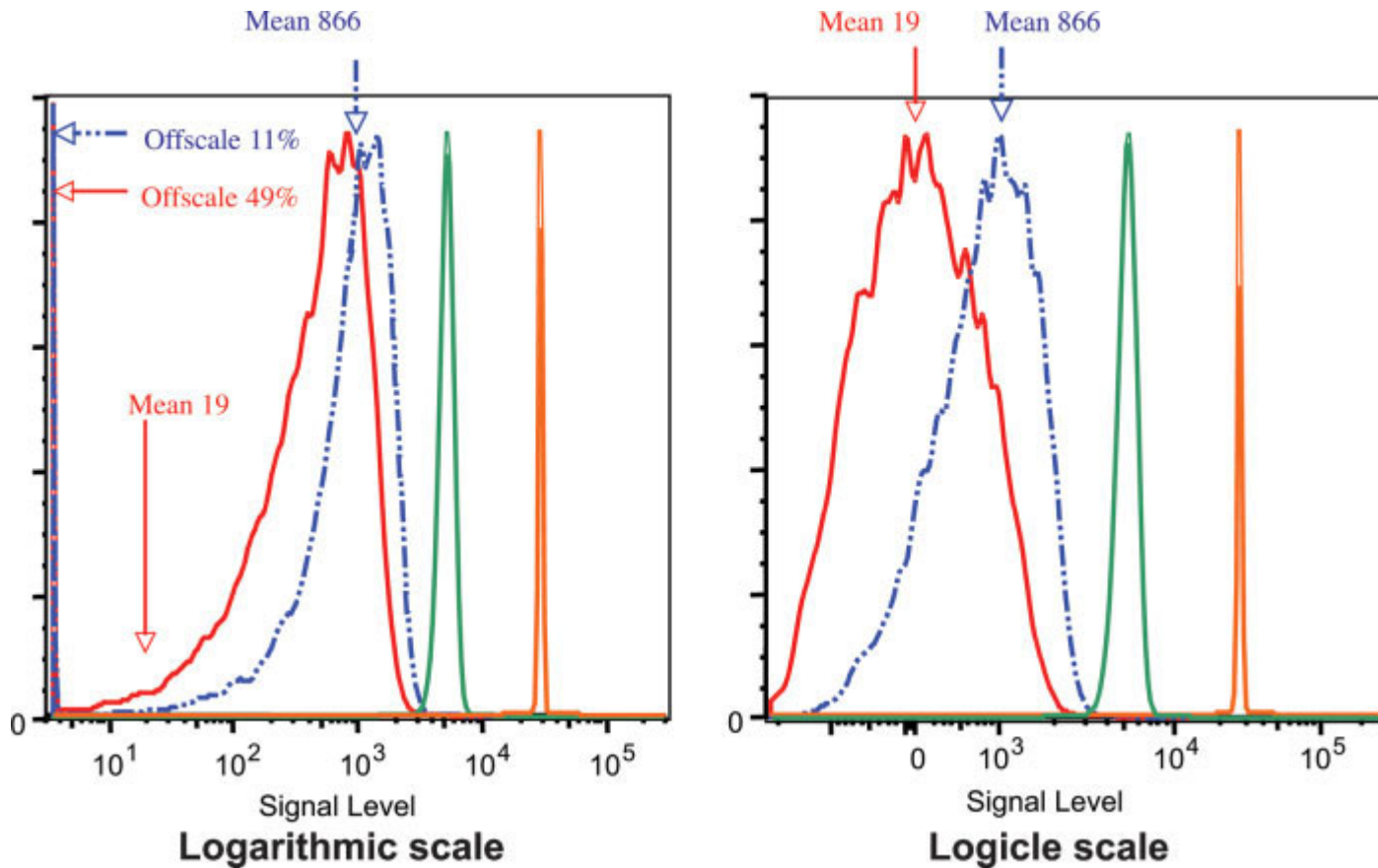
Marker	Left, Right	Events	% Gated	SD	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	28933	100.00	325.70	186.81	15.26	1
M1	142, 4294	6738	23.29	318.27	45.81	640.68	710
M2	1, 137	21200	73.27	19.33	113.80	10.94	15

# Логарифмическая и линейная шкалы



Линейная шкала, 1024 канала (наверху) и логарифмическая – 4 порядка (внизу). Исходные данные идентичны. Распределения в начале шкалы (слабые сигналы) выглядят более компактно при линейном представлении. Логарифмическая шкала передает отношение сигналов, линейная – их разность.

# Биэкспоненциальная шкала



Шкала описывается уравнением типа:  $\sinh(x) = (e^x - e^{-x})/2$

Биэкспоненциальная шкала позволяет выводить на экран отрицательные значения и представляет собой плавный переход от линейной шкалы в центре (примерно нулевое значение сигнала) к логарифмическим шкалам по краям (большие и малые значения сигнала)

# Характеристика распределений в проточной цитометрии

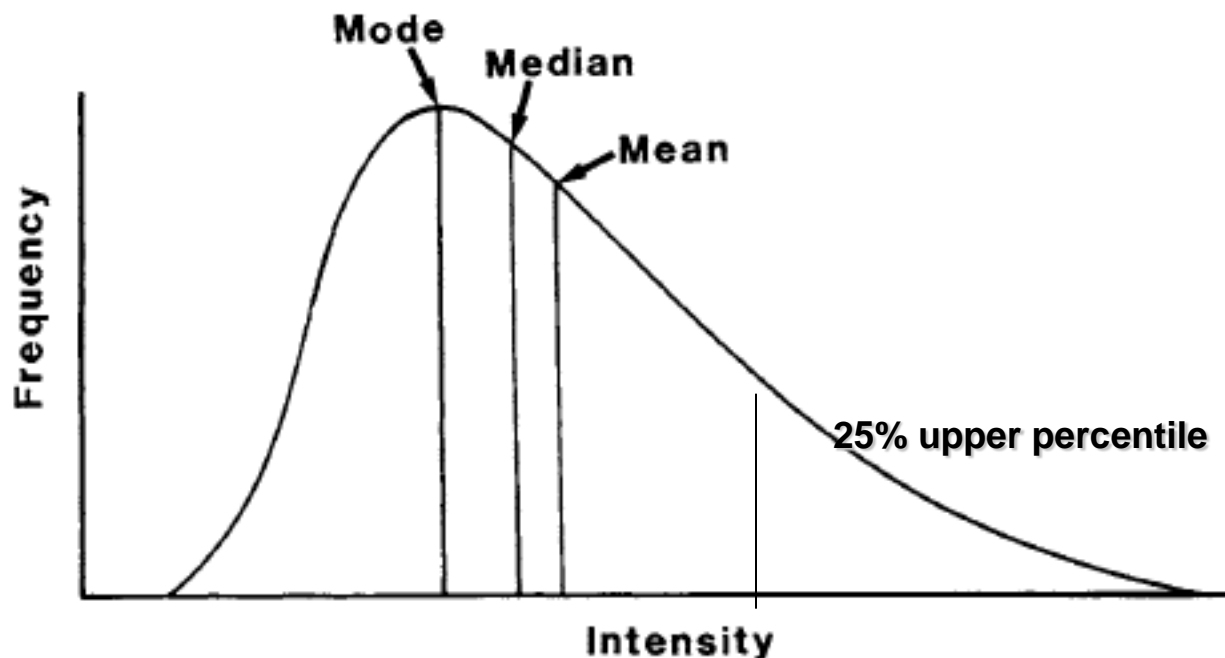
Любое распределение может быть охарактеризовано несколькими параметрами.

Для всех распределений можно указать медиану и процентиля. Неравномерное распределение может быть также охарактеризовано модальным значением.

Когда распределение имеет пик, обычно его характеризуют через среднее и стандартное отклонение (S.D.), однако эти характеристики имеют точный смысл только для нормального (Гауссовского) распределения.

Поскольку нормальные распределения встречаются редко, то сравнение данных часто проводится с использованием порогов (отсечек), то есть является полуколичественным.

# Характеристики распределения



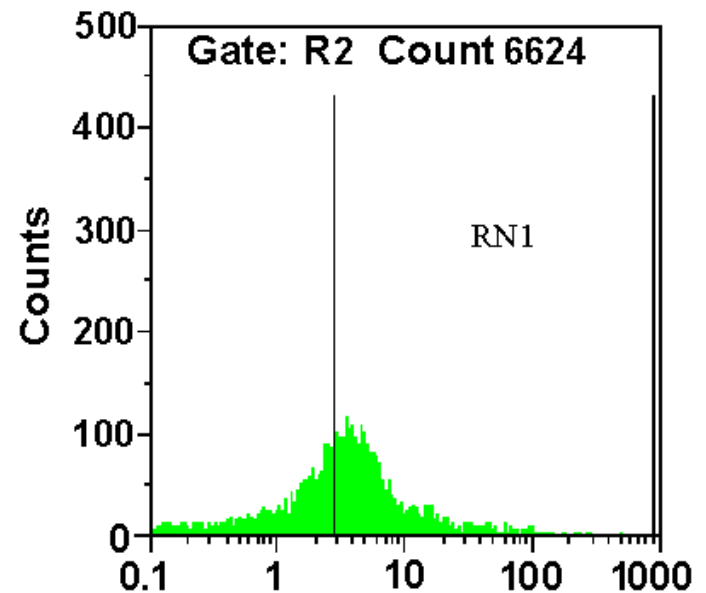
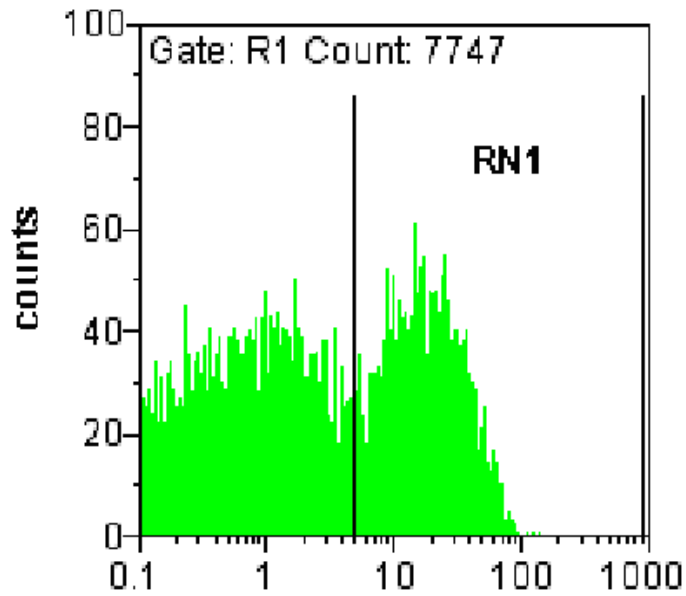
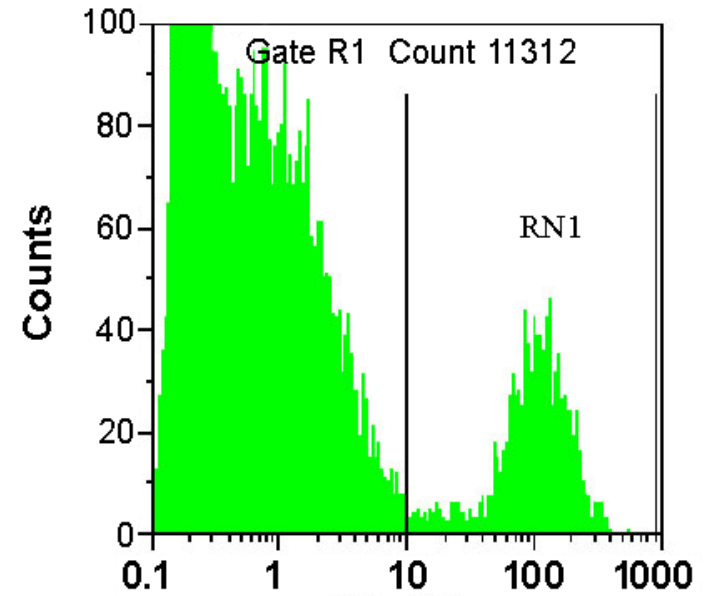
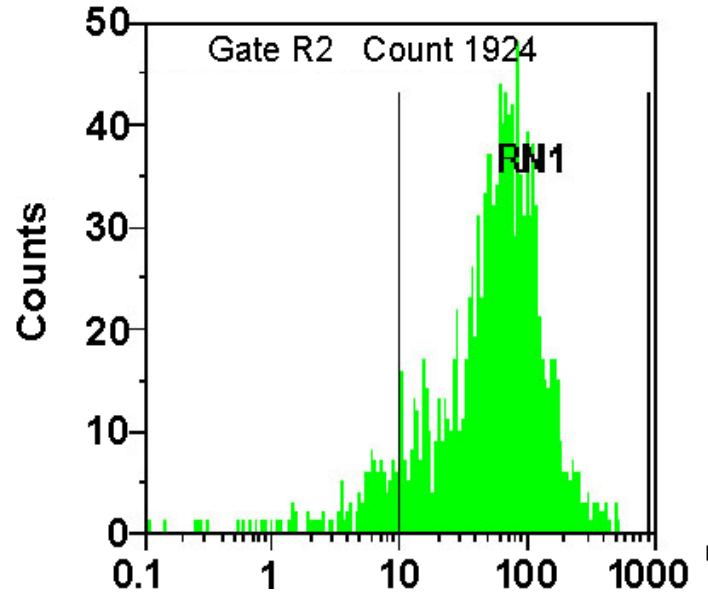
Первичной характеристикой любого распределения является его «центр». Центр распределения можно определить различными способами – как среднее, моду и медиану (mean, median and mode).

При использовании логарифмической шкалы «среднее» сильно зависит от небольшого числа ярких сигналов. «Мода» характеризует наиболее часто встречающиеся события, что также может быть несущественно. Поэтому для первичной характеристики распределения в проточной цитометрии чаще всего используется «медиана».

Для более детальной характеристики иногда используются процентиля. Однако использование медианы и процентилей ограничивает возможности количественного анализа распределений.



# Варианты гистограмм



# Двухпараметрический график

Single Positive  
Population  
(FITC-/PE+)

(FITC-/PE+)

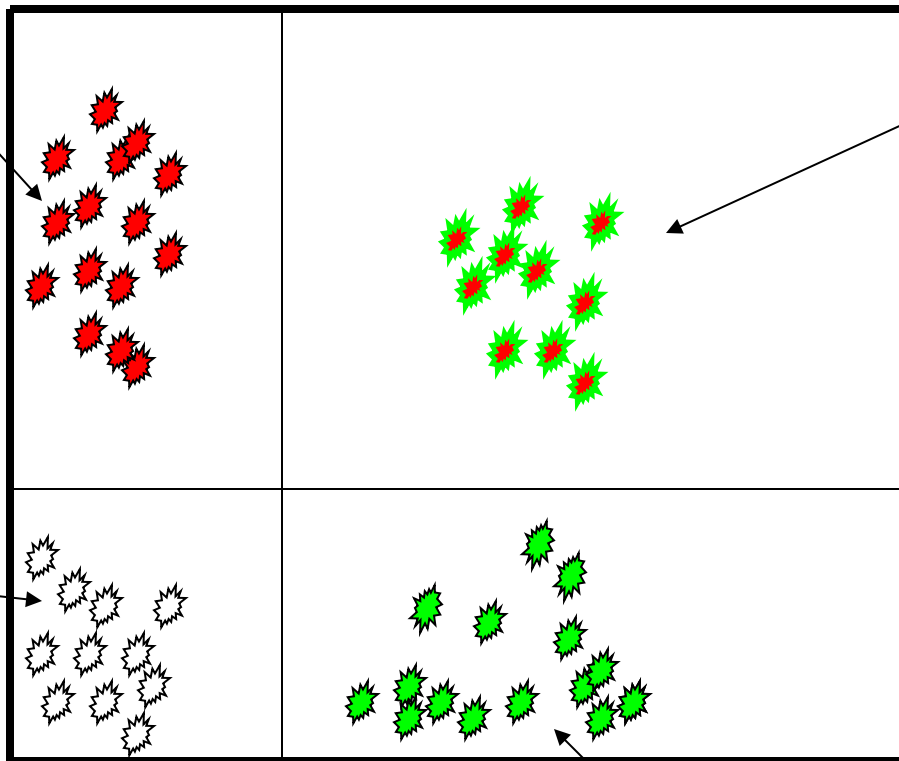
Double Positive  
Population (FITC+/PE+)

FL-2

Negative  
Population

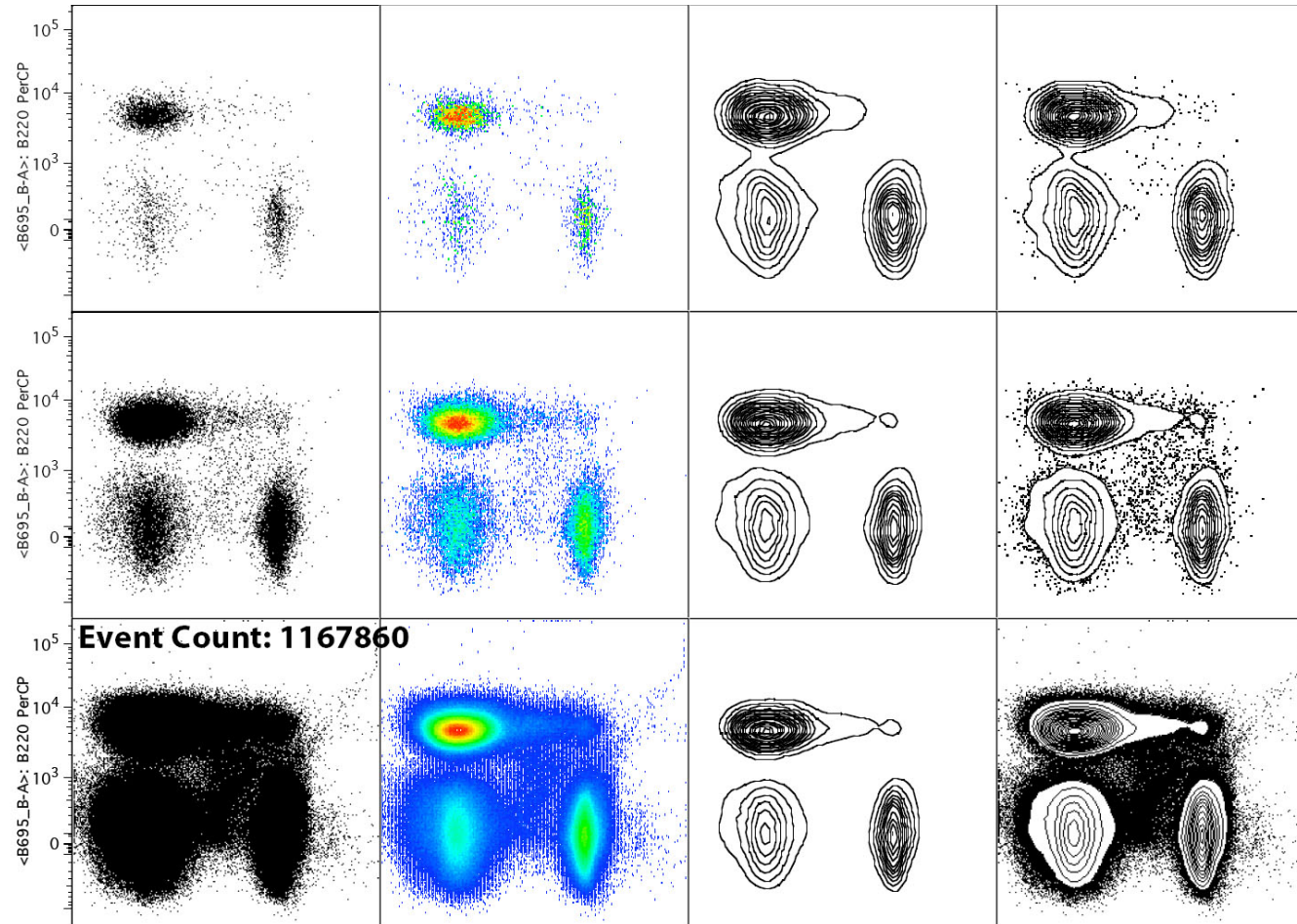
FL-1

Single Positive Population  
(FITC+/PE-)

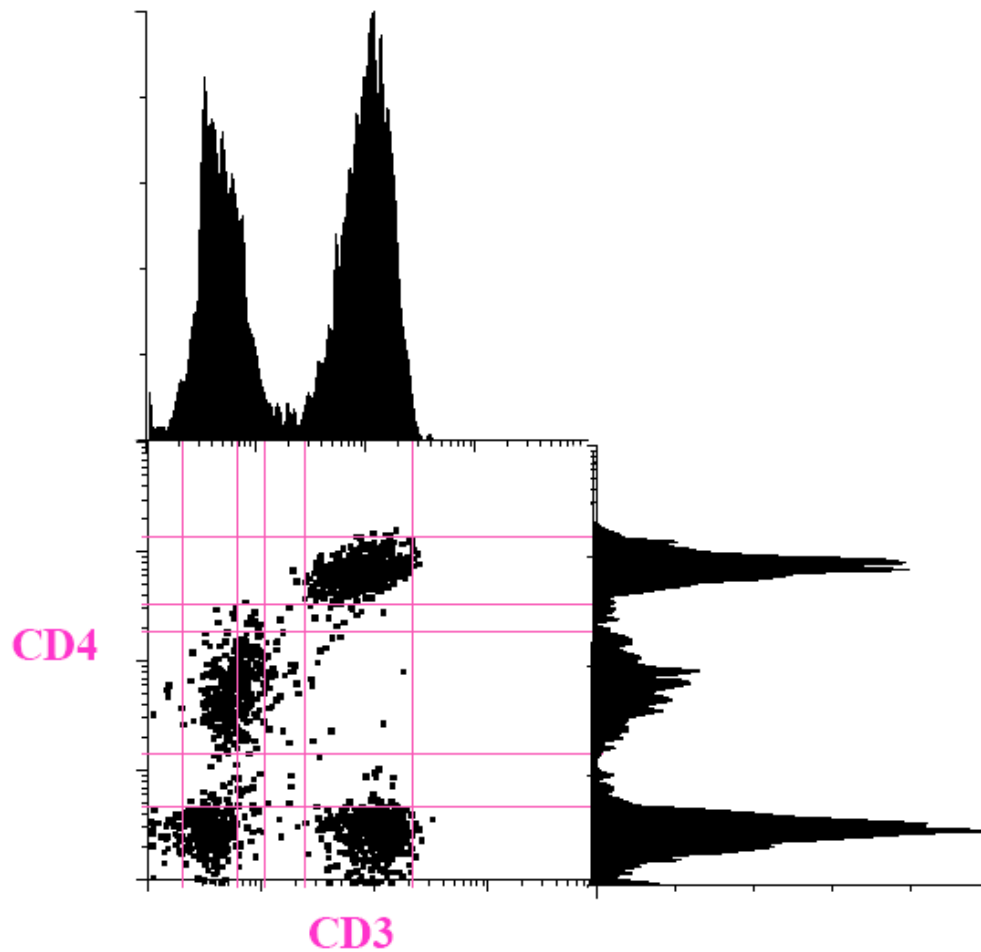


# Варианты двумерных графиков

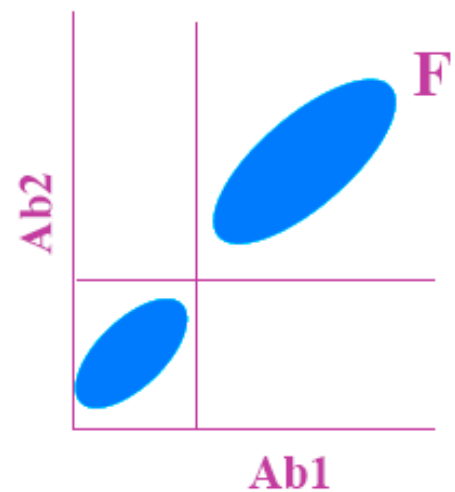
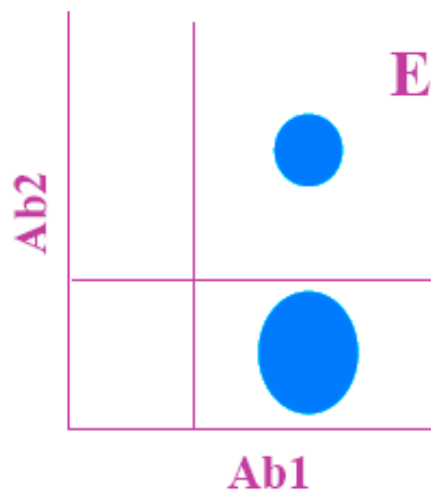
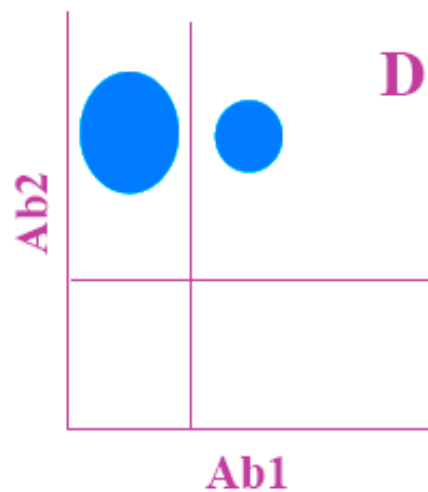
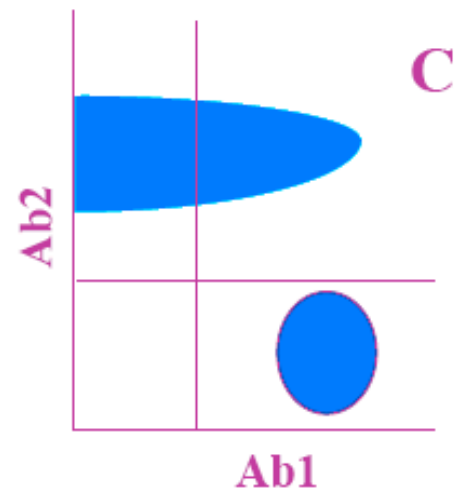
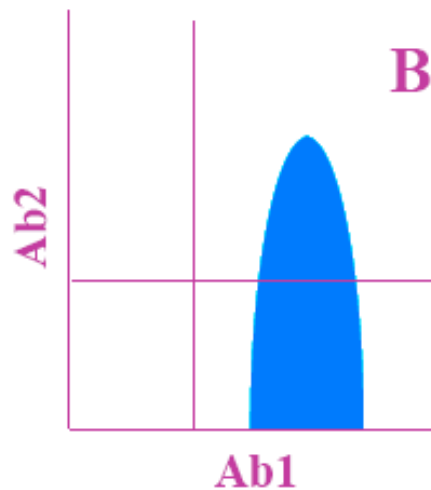
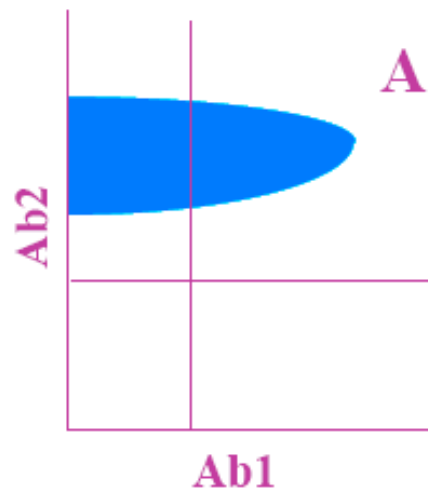
Используйте  
графики только  
одного типа –  
иначе люди вас  
не поймут!



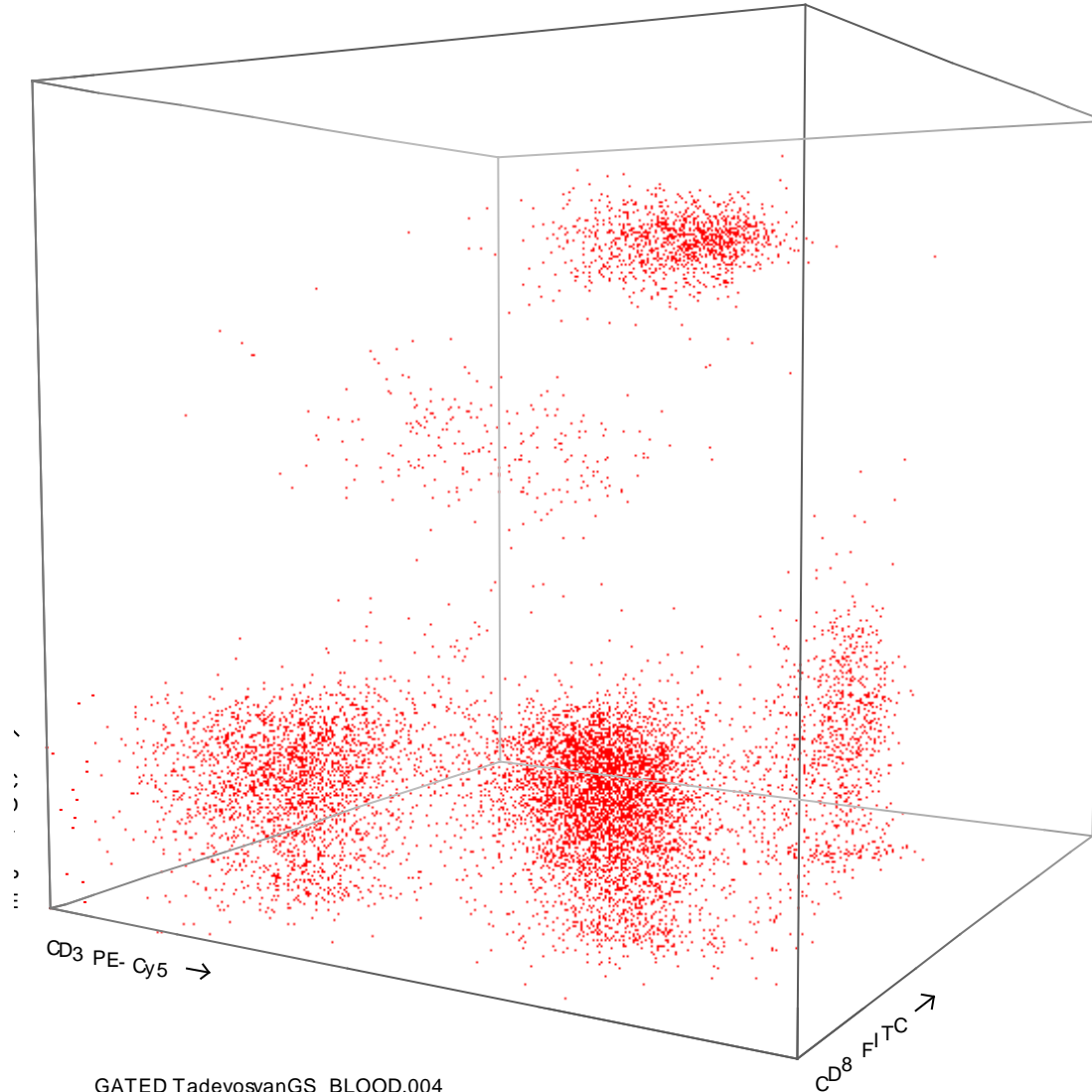
# Двумерный график и его гистограммы



# Варианты двумерных распределений

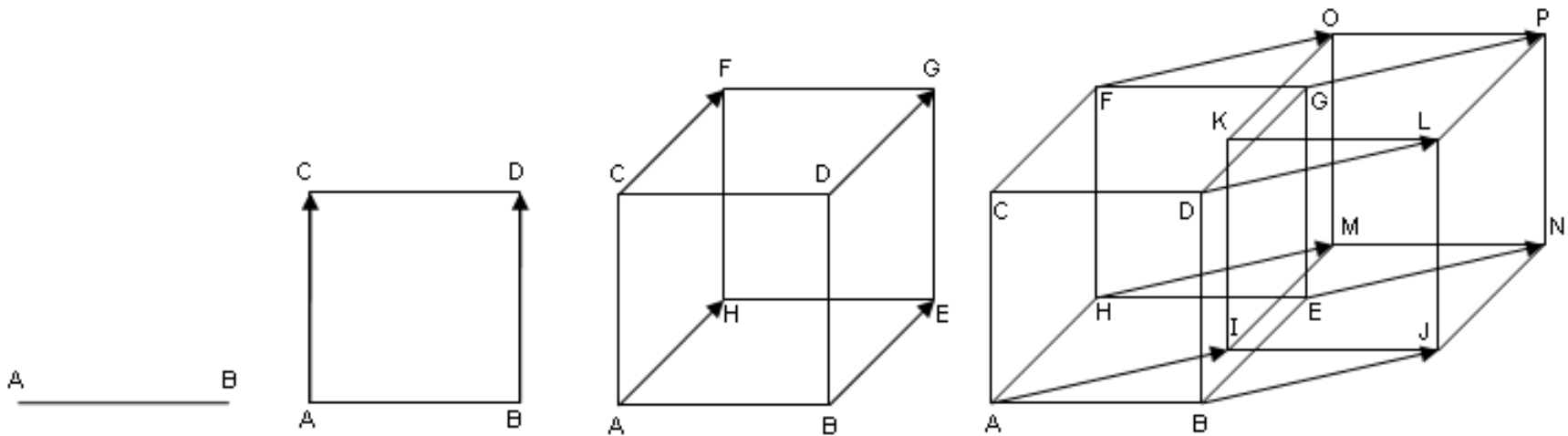


# Трёхмерный график (поточечный)



GATED TadevosyanGS\_BLOOD.004

# Проточная флюориметрия – анализ в многомерном пространстве признаков



## Построение четырехмерного куба (тессеракта)

В проточной флюориметрии мы имеем не менее 3 каналов флюоресценции в сочетании с двумя каналами светорассеяния – итого минимум пять измерений.

Для упрощения анализа применяется гейтинг – выделение популяции на двумерном графике (FSC/SSC, SSC/FL1).

# Основной вопрос

**Основной вопрос проточной цитометрии – как отличить «положительную» популяцию от отрицательной.**

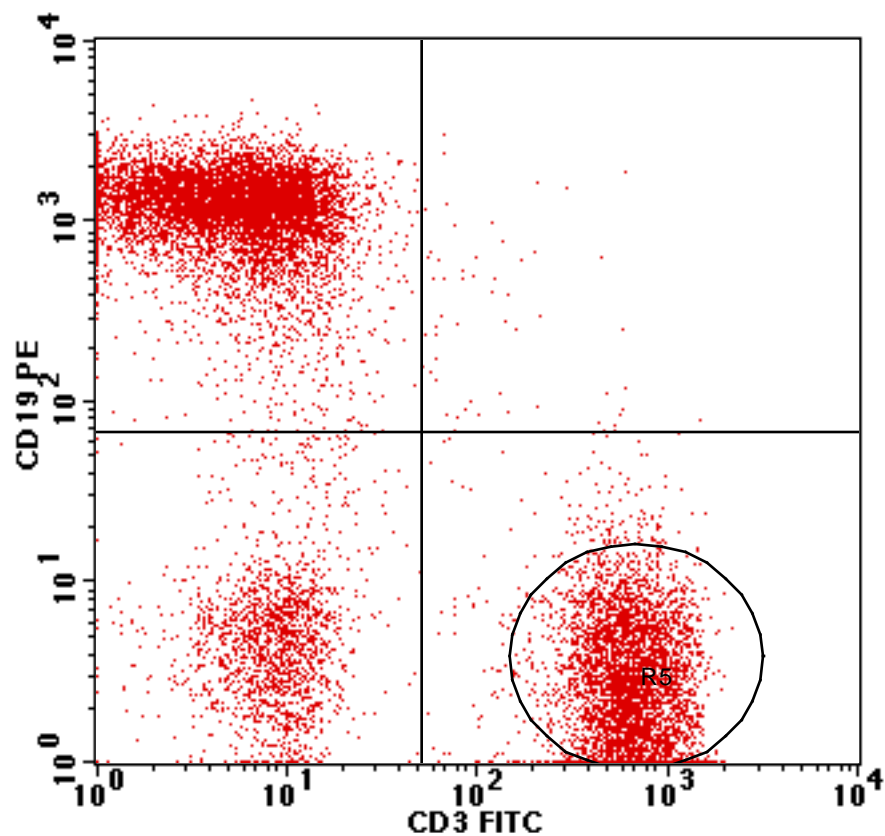
**Для математически строго ответа на данный вопрос необходимо использовать кластерный анализ (в многомерном признаковом пространстве). Однако такой подход находится далеко за пределами вычислительных возможностей современных компьютеров.**

**Поэтому для ответа на этот вопрос при использовании нескольких красителей приходится применять качественные методы графического анализа данных – выделение полигонов и гейтинг.**

**Кроме того, необходимо договориться о том, что является «положительной популяцией» и определить, в какой степени влияют сигналы от одного красителя на сигналы от других красителей.**



# Двумерный поточечный график (dot plot)



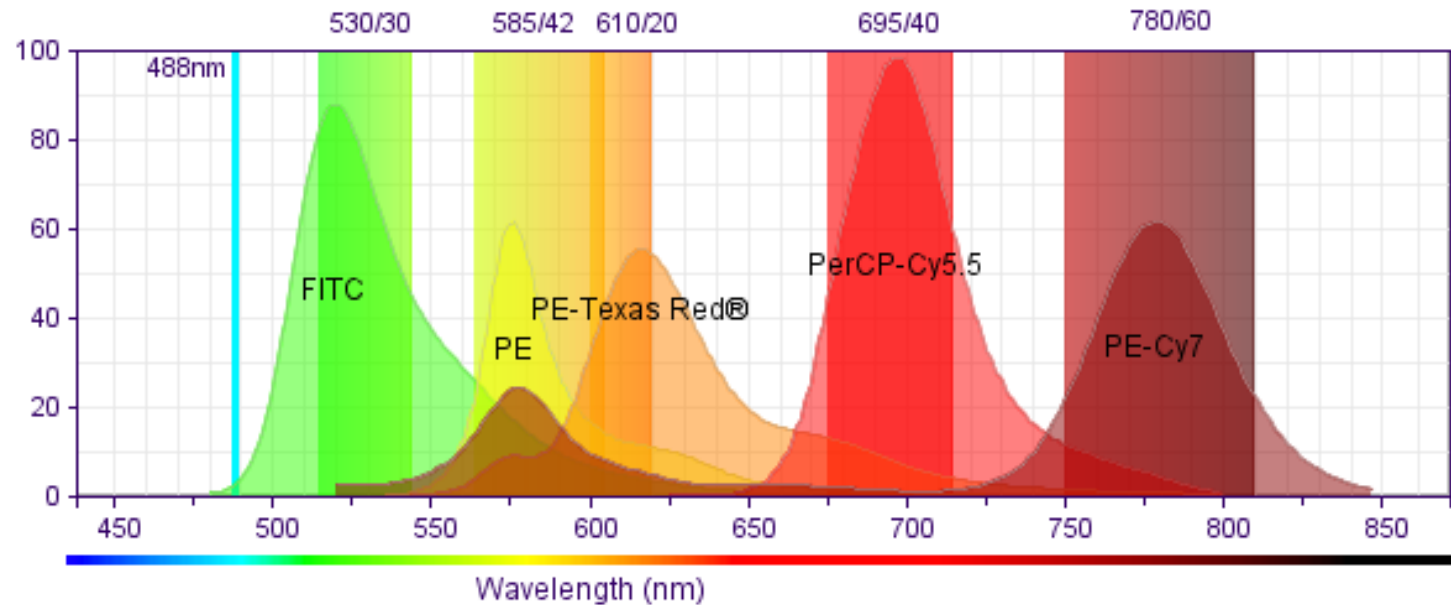
File: Adigezalov aEA\_BLOOD.002

Acquisition Date: 10-Nov-05

Gate: G1

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	7744	52.24	25.81	6.80	1264.33
UR	57	0.38	0.19	213.76	494.50
LL	1730	11.67	5.77	9.69	7.51
LR	5292	35.70	17.64	694.19	3.55

# Перекрывание спектров эмиссии



**Перекрывание спектров эмиссии неизбежно при использовании нескольких красителей, возбуждаемых от одного лазера. Оно приводит к тому, что при одновременной окраске клетки несколькими красителями измеремый каждым ФЭУ сигнал увеличивается за счет дополнительного сигнала от других красителей возбуждаемых тем же лазером.**

**Перекрывание для органических красителей асимметрично – коротковолновые красители дают большее «затекание» в следующий канал. Величина перекрывания возрастает по мере сближения максимумов флуоресценции.**

# Компенсация

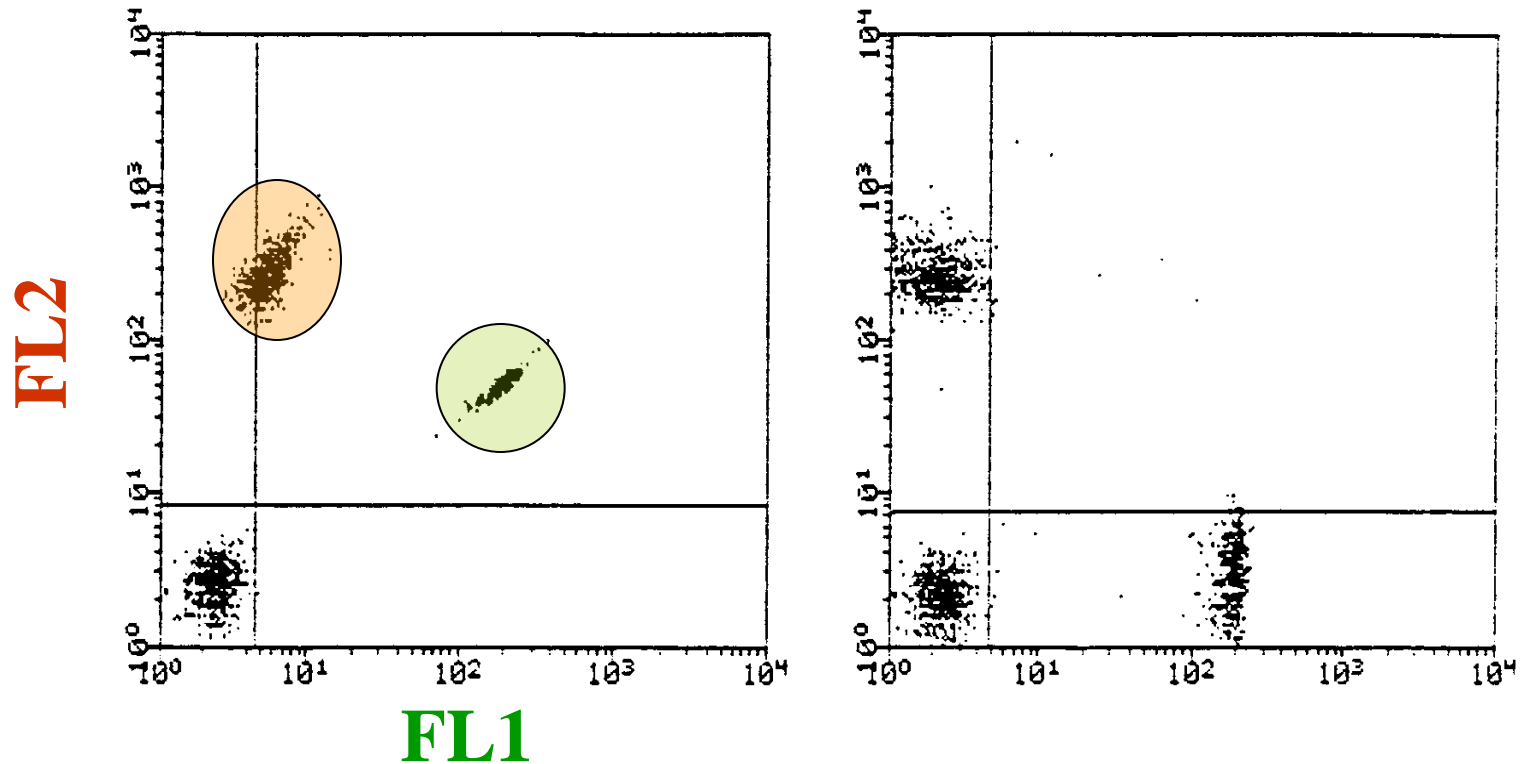
**При использовании нескольких красителей возникает проблема перекрывания спектров флюоресценции. Проблема усугубляется с ростом числа красителей.**

**Для того, чтобы определить, является ли сигнал истинным, или обусловлен затеканием из другого канала, применяется специальная процедура под названием «компенсация».**

**Компенсация в первом приближении означает вычитание одного сигнала, умноженного на некоторый коэффициент (как правило, от 1 до 100%) из другого.**

**Варианты компенсации: аналоговая (on-line) (непосредственно на приборе, неточная) и цифровая (более точная, в компьютере). Цифровая компенсация может производиться с помощью заранее подготовленной таблицы (т.н. автоматическая компенсация, для которой используются калибровочные частицы) или вручную, после сбора данных (off-line).**

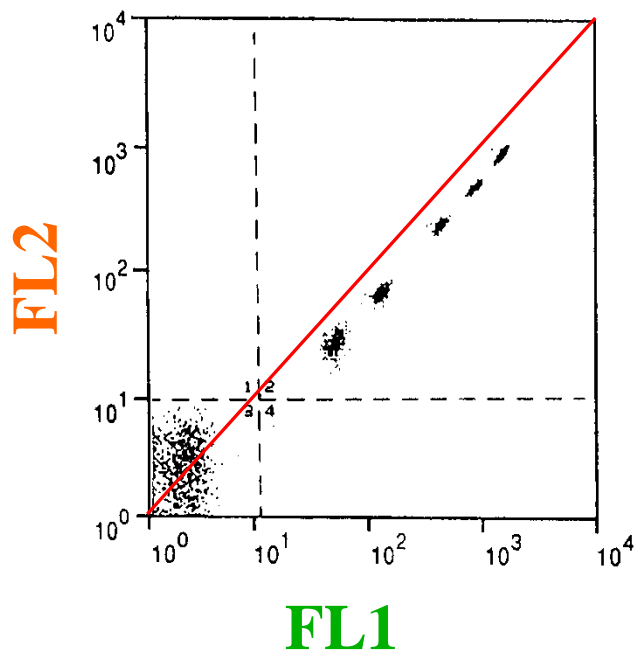
# Затекание сигналов и компенсация данных



Оригинальные данные (слева): флуоресценция FITC и PE детектируется первым и вторым детекторами одновременно. После компенсации (справа) популяции разделены лучше. Каждая группа исходно окрашена только одним красителем. Негативный контроль в левом нижнем углу.

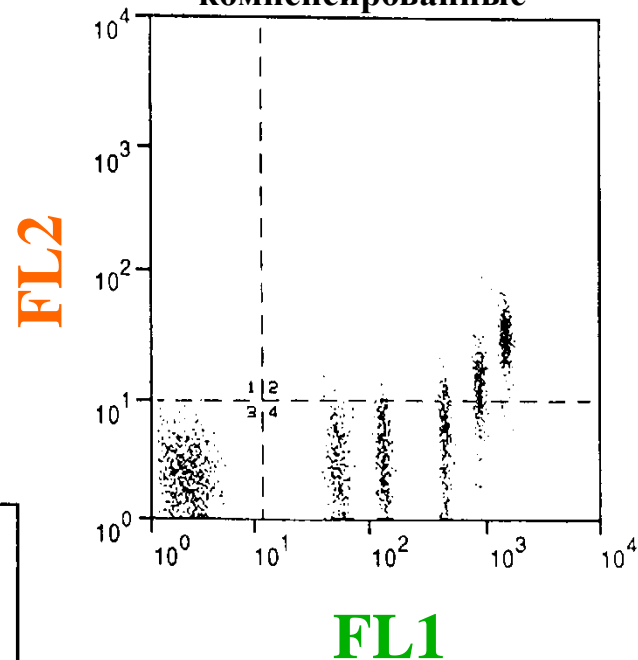
# Компенсация с помощью частиц

некомпенсированные

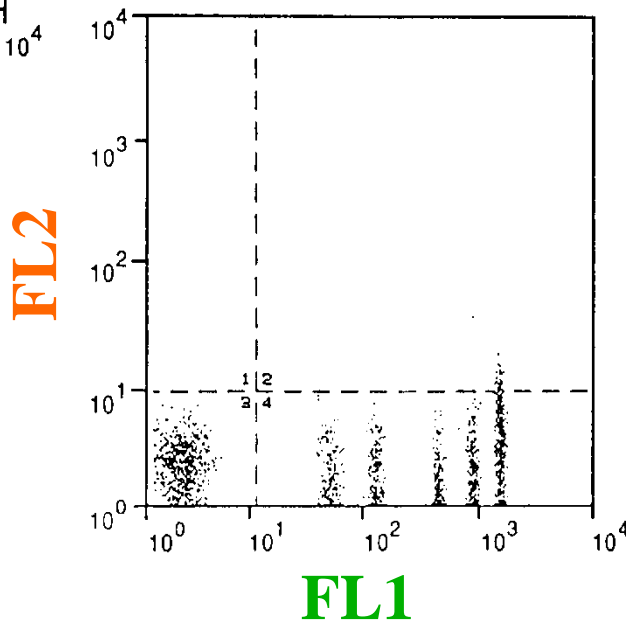


Частично

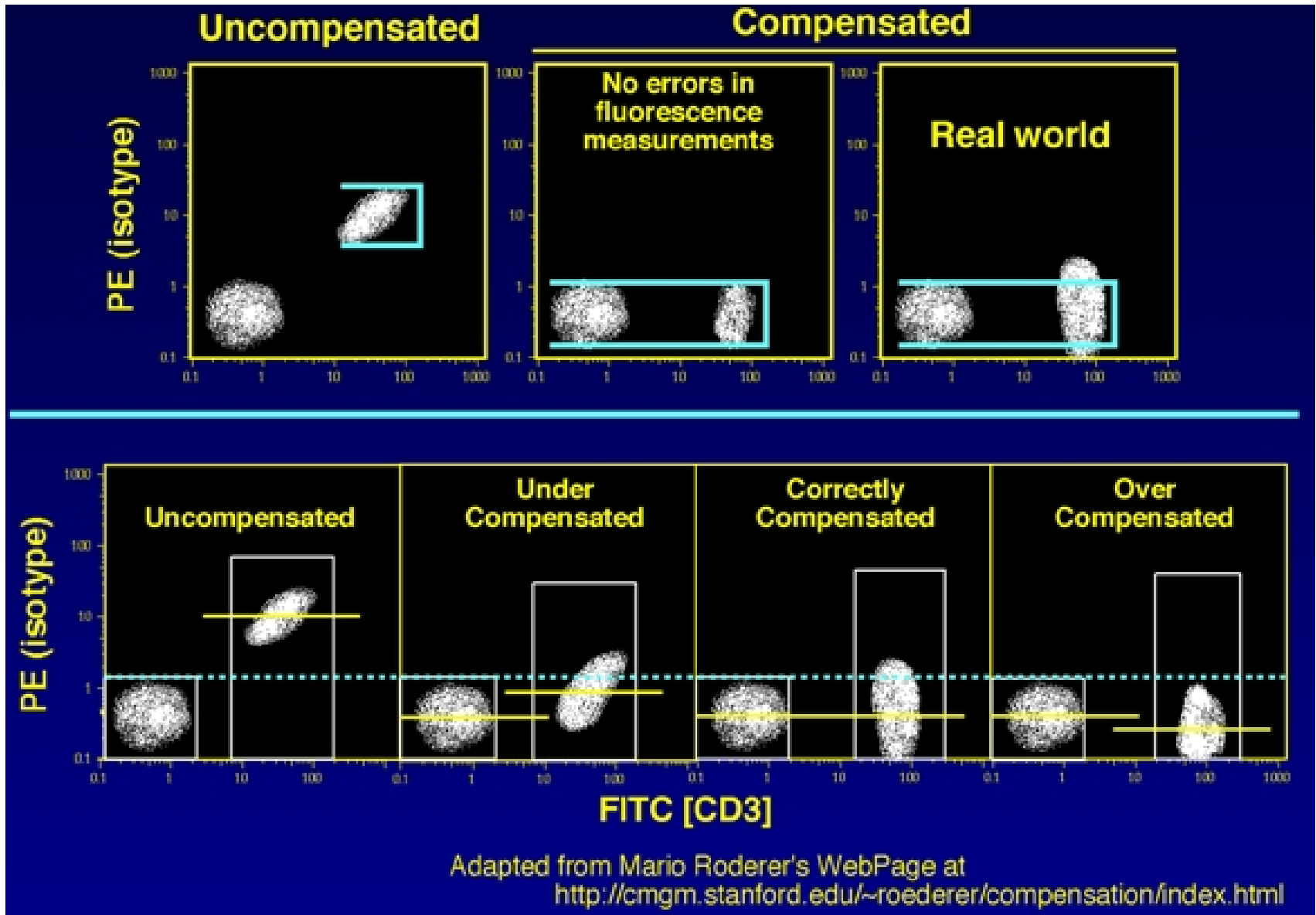
компенсированные



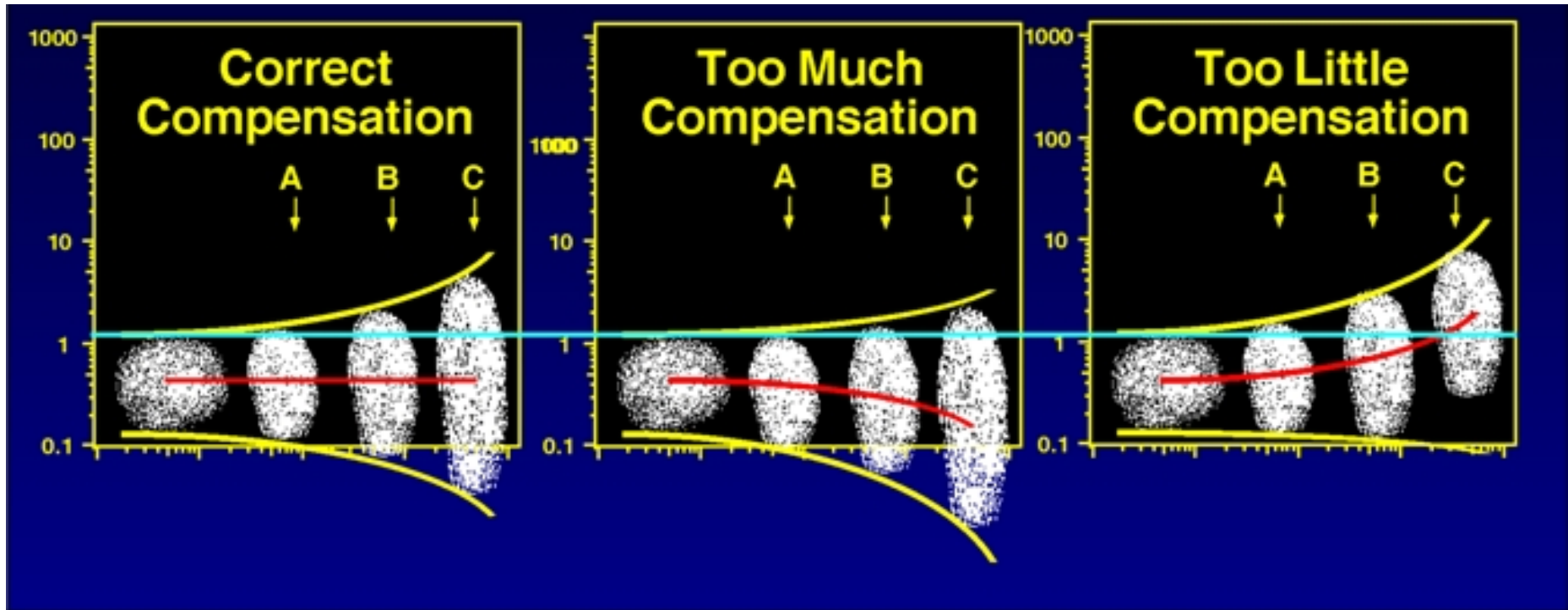
Полностью  
компенсированные



# Компенсация – недо- и пере-



# Компенсация в растянутой шкале



# Компенсация флюоресцентных сигналов – линейная

$$\text{Signal 1} = \text{FL1} - a * \text{FL2}$$

$$\text{Signal 2} = \text{FL2} - b * \text{FL1} - c * \text{FL3}$$

$$\text{Signal 3} = \text{FL3} - d * \text{FL2}$$

$$0 < a, b, c, d < 1; a \neq b \neq c \neq d;$$

Данная компенсация не является математически корректной, но для красителей FITC, R-PE, R-PE-Cy5 она дает приближение с точностью не хуже 1%.



# Компенсация флюоресцентных сигналов – полная (цифровая)

$$\text{Signal 1} = \frac{\text{FL1} - a \cdot \text{FL2}}{1 - a \cdot b}$$

$$\text{Signal 2} = \frac{\text{FL2} - b \cdot \text{FL1}}{1 - a \cdot b}$$

Для трех сигналов формулы становятся сложнее, поэтому компенсация для большего числа сигналов обычно записывается в виде матрицы.

Правильный расчет компенсации для трех и более сигналов может быть выполнен только в цифровой форме. Поскольку объем вычислений велик, то, как правило, компенсация выполняется после сбора данных.

Многие приборы (например, компании Beckton Dickenson) предполагают возможность «быстрой» цифровой компенсации по предварительно полученной матрице, рассчитанной с помощью тестовых частиц.

«Быстрая» компенсация является одним из источников ошибок в интерпретации данных, получаемых на клетках.

# Матрица компенсации

## Show Compensation AutoComp labkey-demo.xml

Compensation Matrix: Compensation

Compensation Comment:

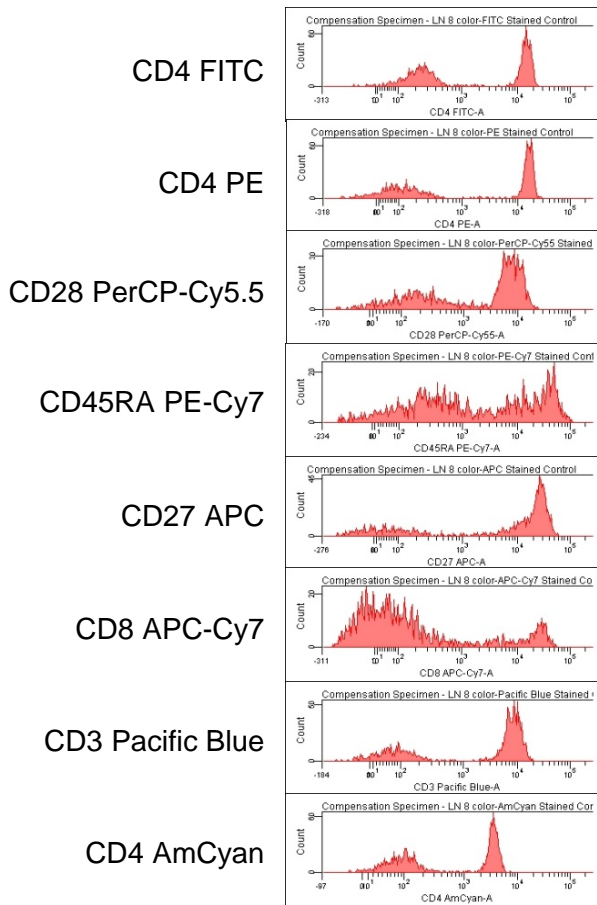
	APC-A	Alexa 680-A	FITC-A	PE Cy55-A	PE Cy7-A	PE Green laser-A	PE Tx RD-A	Pacific Blue-A
APC-A	1.000	0.065	-0.000	0.042	0.021	0.000	0.002	0.000
Alexa 680-A	0.039	1.000	0.005	0.330	0.350	0.018	0.027	-0.001
FITC-A	-0.001	0.000	1.000	-0.000	-0.000	0.018	0.006	-0.001
PE Cy55-A	0.042	0.089	-0.001	1.000	0.510	0.001	0.003	0.001
PE Cy7-A	0.000	0.000	0.000	0.004	1.000	0.130	0.044	-0.000
PE Green laser-A	0.000	-0.000	0.000	0.020	0.005	1.000	0.310	0.000
PE Tx RD-A	0.001	0.000	0.000	0.120	0.037	0.140	1.000	0.000
Pacific Blue-A	0.007	0.002	0.011	0.005	0.004	0.014	0.018	1.000

[Large Graphs] [[Medium Graphs](#)] [Small Graphs]

**Матрица позволяет автоматически проводить компенсацию сигналов. Она рассчитывается с помощью калибровочных частиц или по препаратам, окрашенным каждым из красителей. Для постройки матрицы компенсации необходимы т.н. «одиочные контроли».**

# 8-цветная матрица, 3 лазера (DiVa software, BD Biosciences)

Single-stained controls:



Auto-comp

	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7	Pacific Blue	Am Cyan
FITC	100.0	23.5	2.1	0.7	0.0	0.0	0.0	3.0
PE	1.6	100.0	12.3	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0
PerCP-Cy5.5	0.2	0.1	100.0	43.0	2.5	5.6	0.0	0.0
PE-Cy7	0.0	0.6	0.1	100.0	0.0	3.6	0.0	0.0
APC	0.1	0.0	0.3	0.2	100.0	2.7	0.0	0.0
APC-Cy7	0.0	0.0	0.1	3.9	19.9	100.0	0.0	0.1
Pacific Blue	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	100.0	18.1
Am Cyan	38.1	7.0	1.1	0.6	1.5	0.0	17.1	100.0

# Правильная настройка «быстрой» компенсации

**В идеале контроль компенсации должен проводиться для каждого красителя в каждом эксперименте. Компенсация с помощью частиц, как правило, не полностью приложима к клеткам, но она выполняется значительно быстрее, и многие приборы имеют возможность автоматического расчета матрицы компенсации.**

## Требования к контрольному образцу:

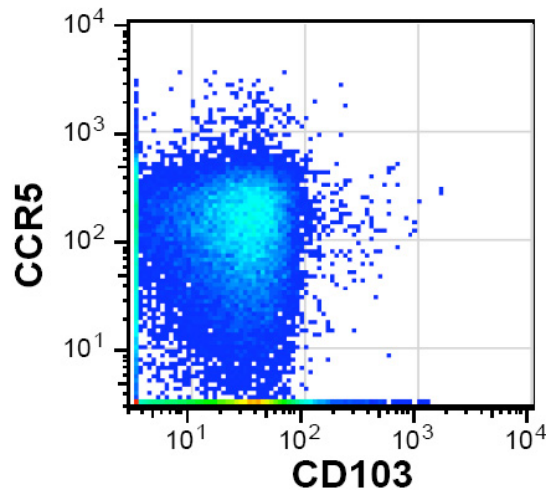
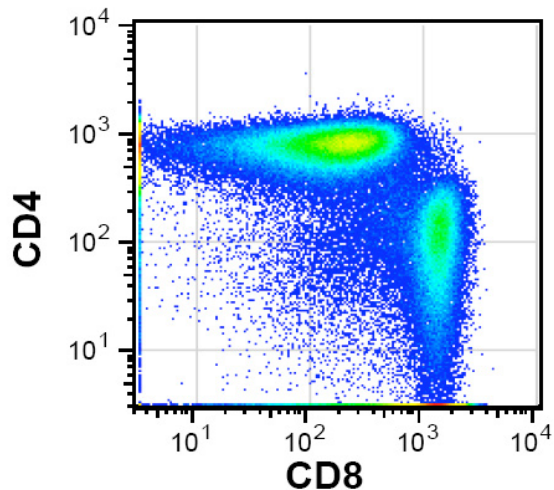
**Образец должен содержать позитивные и негативные популяции.**

**Каждая популяция должна составлять не менее 20% от общей.**

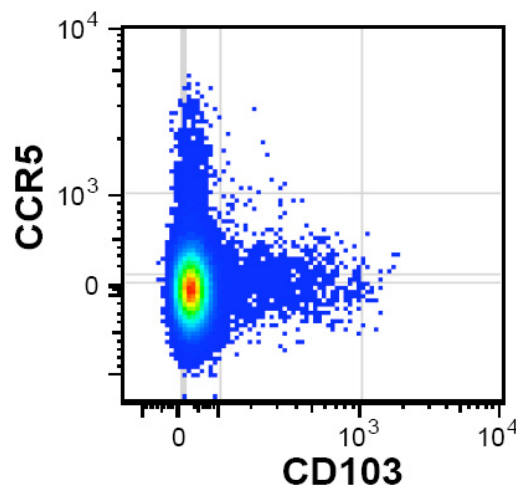
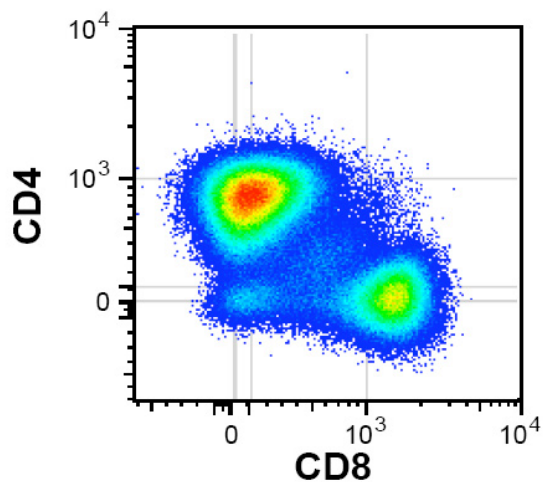
**Позитивная популяция должна иметь сильный сигнал – не менее, чем в конце 3-й- начале 4-й декады**

**Если используются клетки, то обе популяции должны обладать одинаковой автофлуоресценцией, например, можно применять CD3<sup>+</sup> лимфоциты и CD3<sup>-</sup> лимфоциты, но нельзя применять CD3<sup>+</sup> лимфоциты и CD3<sup>-</sup> моноциты**

# Представление компенсированных данных



Обычная шкала

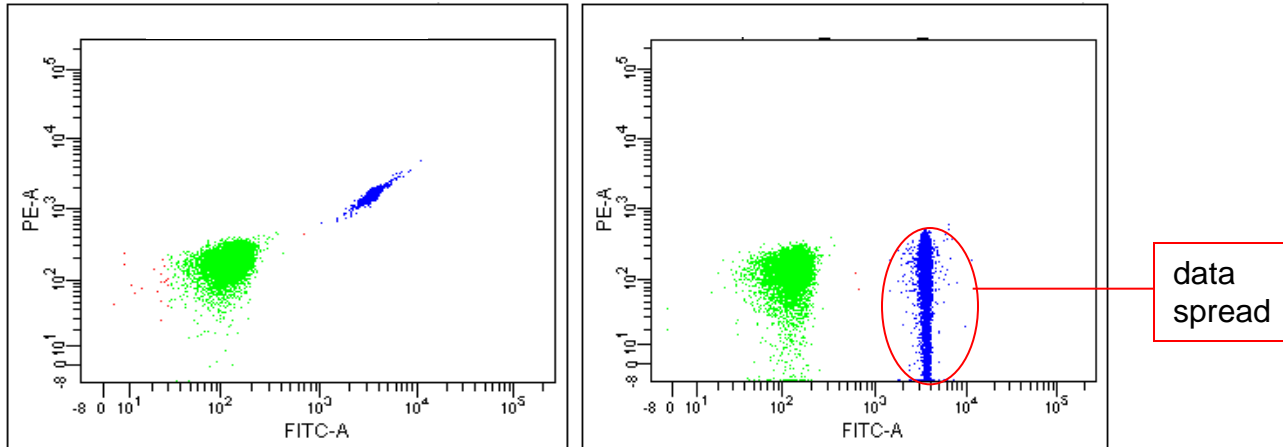


Биэкспоненциальная шкала

# Разброс (Spread)

uncompensated

compensated

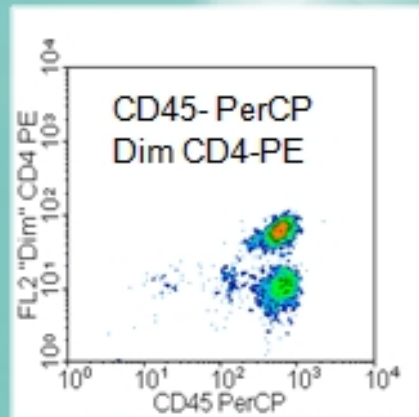
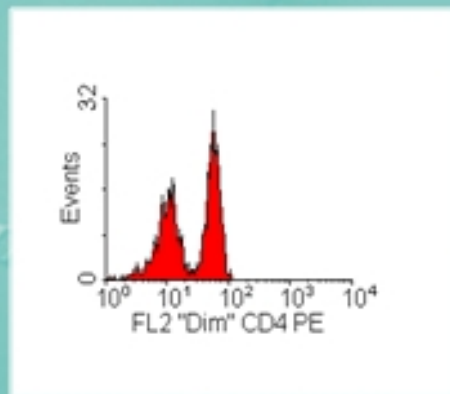
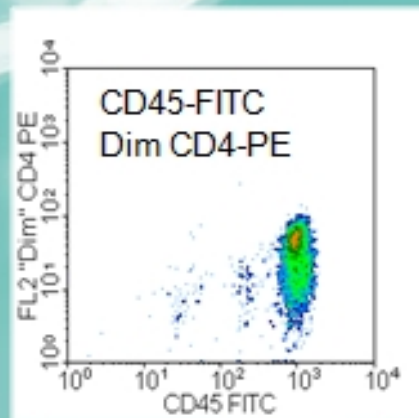
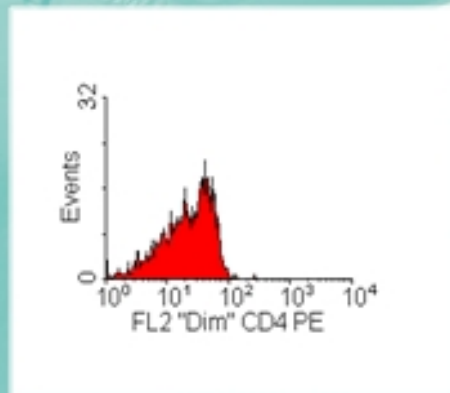


При компенсации разброс данных для популяции возрастает. Соответственно, различия между популяциями становятся менее выраженными. Причина – случайное распределение отклонений между одинаковыми клетками (вариация распределения, CV).

В логарифмической шкале слабые сигналы выглядят относительно растянутыми.

При вычитании данных величина разброса суммируется, так что итоговый разброс может быть значительно больше исходного. Это особенно важно при использовании большого числа меток

# Эффект компенсации при двойной окраске



Compensated analog data:  
CD45 FITC makes dim CD4 difficult to measure due to FITC spillover into PE and resultant "spread"

Compensated analog data:  
CD45 PerCP allows same dim CD4 cells to be separated from bkg. – little spillover into PE

# Основные факторы, влияющие на компенсацию

Относительное затекание флуорохромов – спектры

Тандемные красители имеют два пика флуоресценции, так как величина FRET всегда меньше 100%. Кроме того, они диссоциируют при длительном хранении.

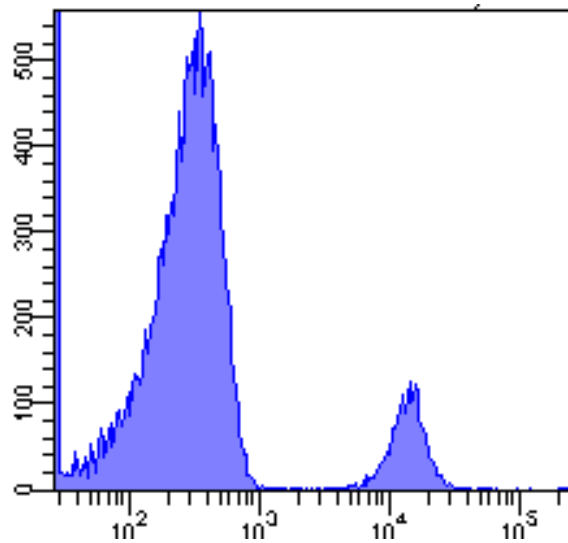
Относительная яркость флуоресценции.

Автофлуоресценция – ее величина и спектр различаются у разных типов клеток.

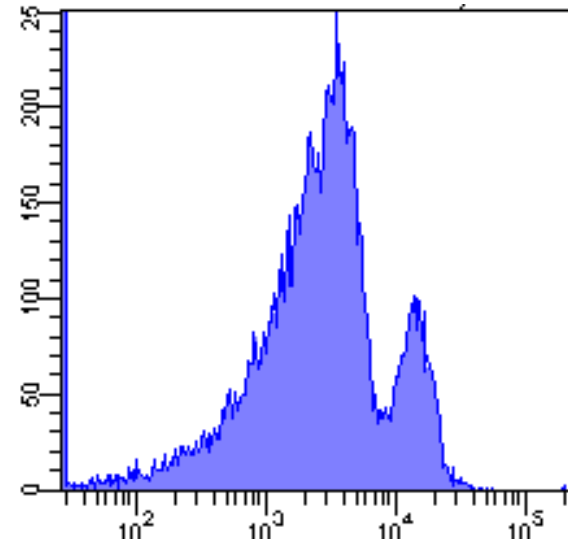


# Затекание сигналов уменьшает чувствительность

Без CD45 AmCyan:



С CD45 AmCyan:



CD19 FITC

Уменьшение чувствительности происходит, когда оба антигена (CD45 и CD19) коэкспрессируются на одних и тех же клетках.

# **Многоцветная проточная флуориметрия**

## **Лекция 4**

**И.А.Воробьев**

# Разделение популяций в проточной цитометрии

Основной вопрос проточной цитофлуориметрии:

*– Действительно ли интересующая нас популяция клеток специфически связывается с данными маркерами?*

В эксперименте «позитивные» клетки это те, которые могут быть надежно отделены от «негативных» или контрольных клеток.

*– Что надо сделать, чтобы их различить?*

На качественном уровне на данный вопрос отвечает последовательный гейтинг на двумерных графиках.

Более сложный вопрос:

*– насколько точно мы можем оценить размер популяции?*

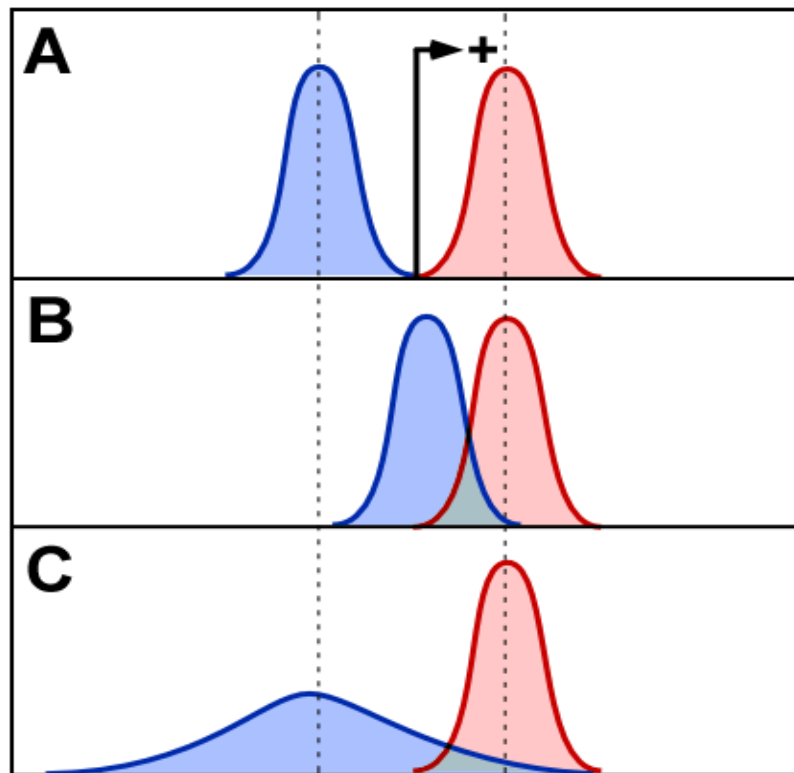
# Разрешающая способность метода

“Негативная”  
популяция      Позитивная  
популяция      популяция

Негативная популяция дает  
слабый сигнал.  
Популяции хорошо разделяются

Негативная популяция дает  
сильный сигнал.  
Популяции плохо разделяются

Негативная популяция дает  
слабый сигнал, но имеет  
широкое распределение (CV)  
Популяции не разделяются



**Возможность выделить позитивные популяции зависит от величины фонового сигнала и от ширины распределения негативной популяции**

# Отношение сигнал/шум

Максимальное отношение сигнал/шум (S/N) в проточной цитометрии определяется коэффициентом вариации (CV), который рассчитывается по формуле:

$$CV = S.D. / \text{mean} * 100$$

Коэффициент вариации устанавливается на минимальное значение при юстировке и настройке прибора. Для положительной популяции калибровочных частиц CV не превышает нескольких процентов (1-1,5% для синего лазера и не более 2-3% для красного лазера). Для меченых клеток он, как правило, существенно больше.

При правильной настройке прибора негативная популяция клеток (частиц) должна быть по крайней мере в 10 раз больше шума. При этом позитивная популяция должна помещаться на шкале.

Для настройки используются специальные частицы – CS@T beads. Смесь содержит частицы негативные, слабо окрашенные и очень яркие. Применяются для каждого флуорохрома.

# Индекс окраски (staining index – SI)

Индекс окраски определяется как:

$$SI = (MFI_{pos} - MFI_{neg}) / (2 * S.D._{neg}),$$

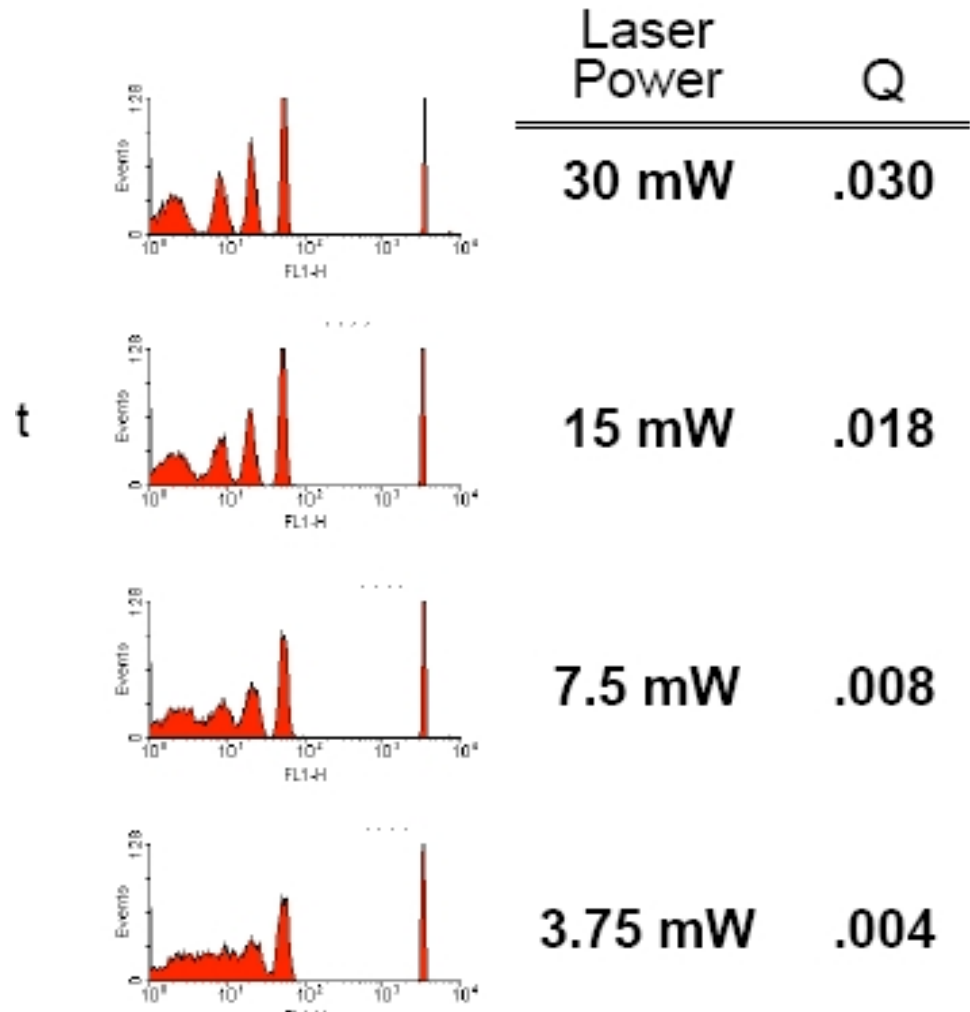
где MFI (mean fluorescent intensity) – средняя интенсивность флуоресценции, S.D. – стандартное отклонение.

Примерно индекс окраски может вычисляться как отношение интенсивности положительной популяции к удвоенному стандартному отклонению негативной популяции.

Усиление сигнала на ФЭУ на индекс окраски не влияет!

# Влияние мощности лазера на разрешение

Меньше мощность -  
меньше фотонов от  
каждой клетки и  
больше  
относительный шум  
считывания.



Образец

Образец

Омывающая  
жидкость

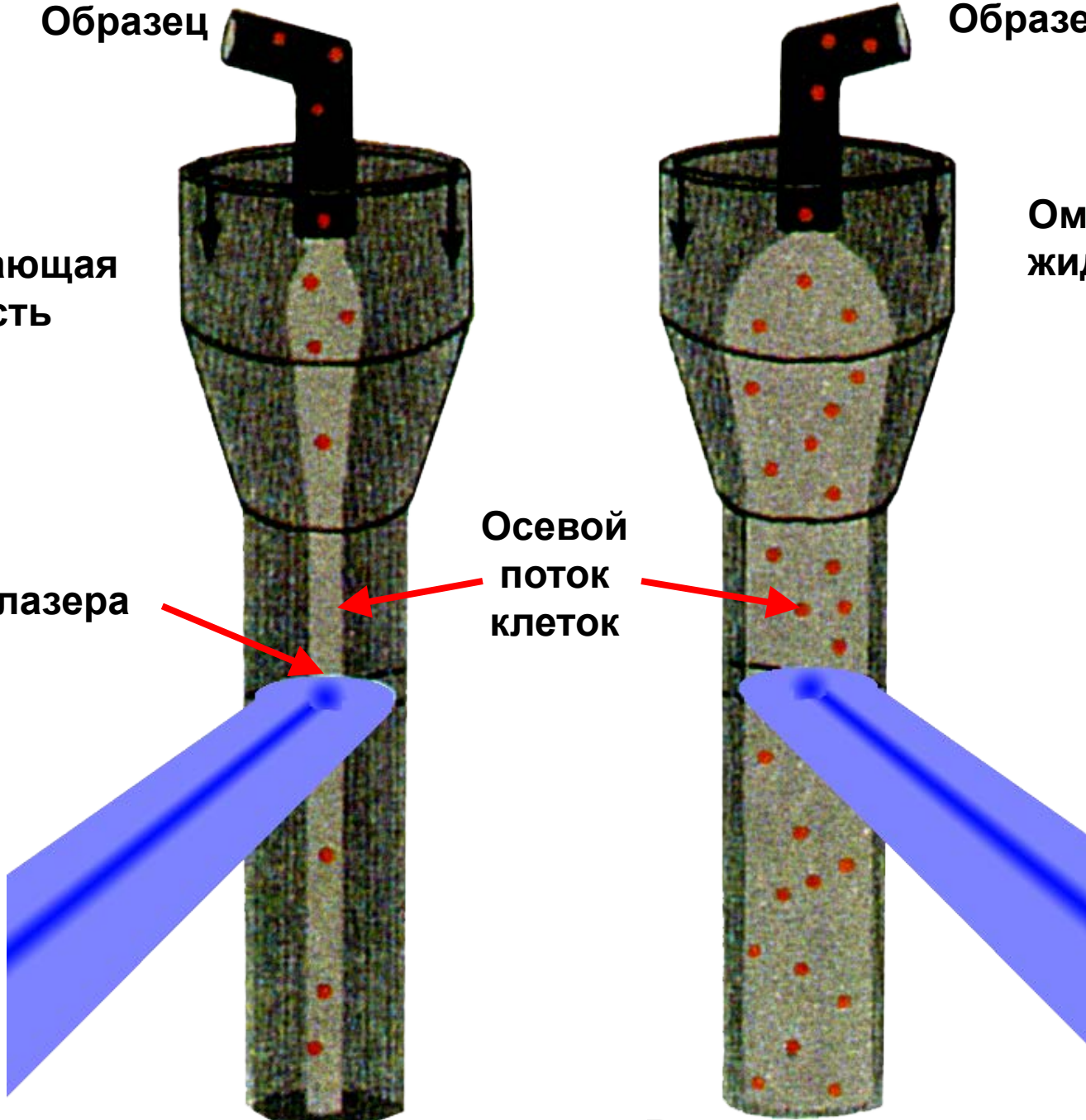
Омывающая  
жидкость

Пятно лазера

Осевой  
поток  
клеток

Низкая разность

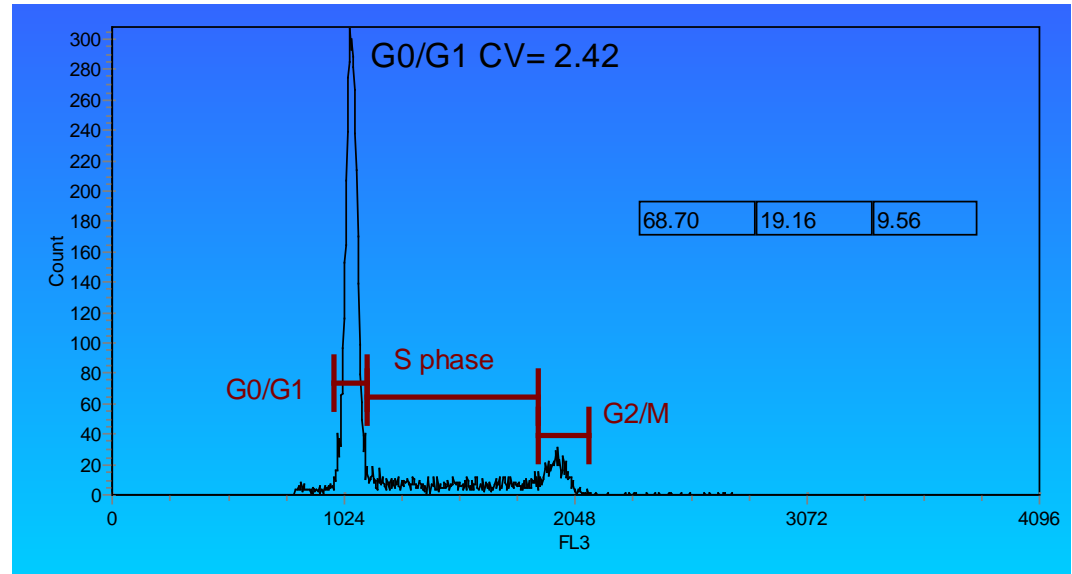
Высокая разность



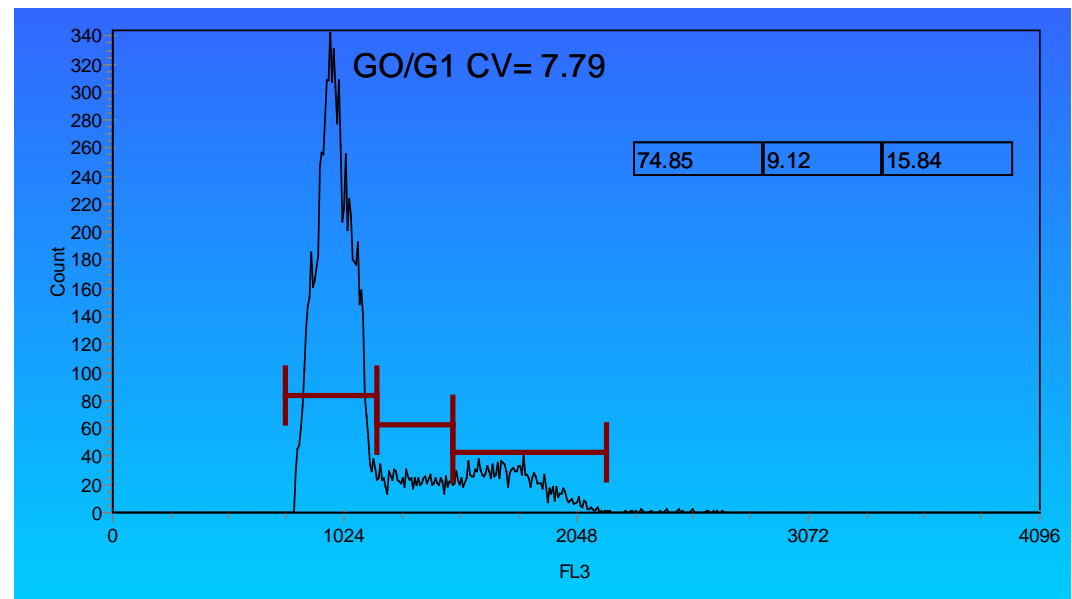


# Влияние скорости счета на CV

Низкая скорость  
подачи образца  
(sample difference)



Высокая скорость  
подачи образца



# Как считать события?

Если позитивная и негативная популяция отличаются по интенсивности в 10 раз и более – подсчет можно производить на максимальной скорости.

Если разделение позитивной и негативной популяций не очевидно – по крайней мере, пробный подсчет надо производить на минимальной скорости.

Наибольшие трудности возникают при выделении малых (1% и менее) популяций, когда интенсивности свечения положительных и отрицательных клеток близки. Основным препятствием для выделения малой популяции может быть автофлуоресценция.

# Параметры, влияющие на разрешение

Фон

Дисперсия

**\*Неспецифическое  
связывание и связывание  
с Fc-рецептором**  
**\*Автофлюорес-  
ценция клеток**  
**\*Свободный  
краситель**

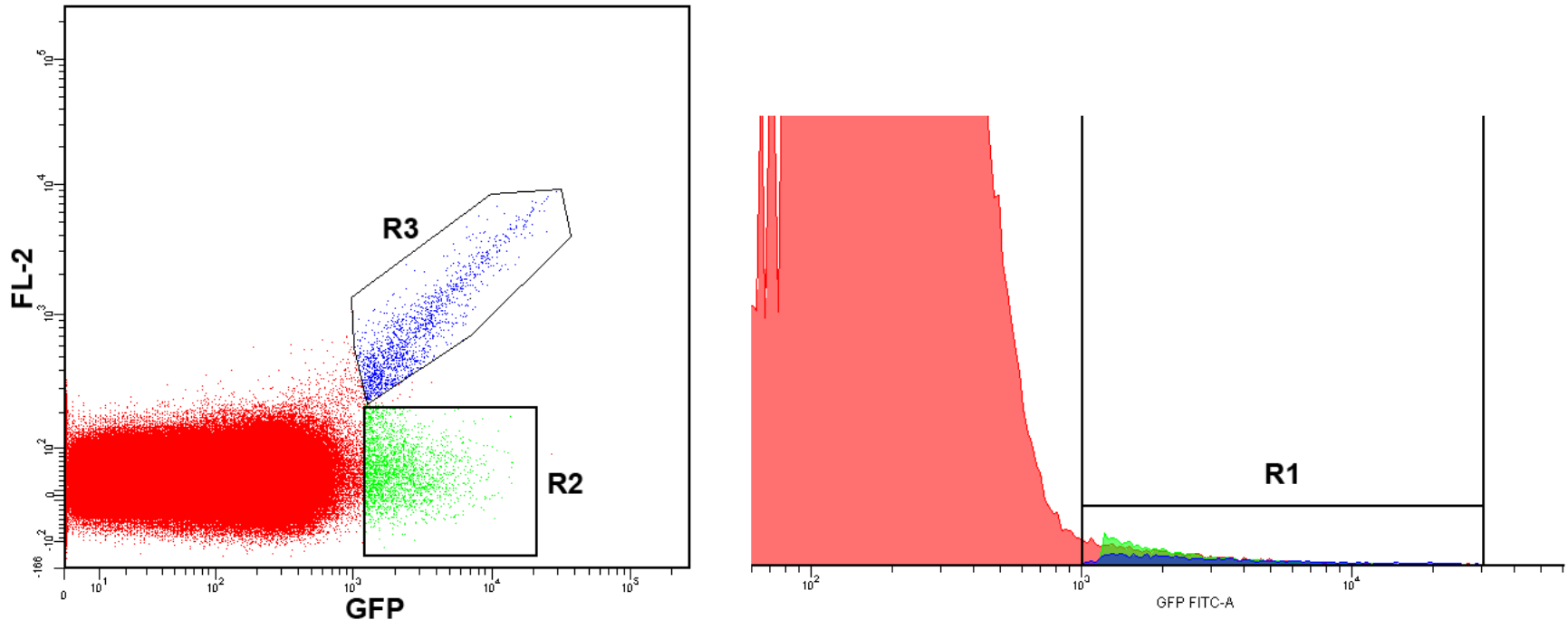
Перекрывание  
спектров  
красителей

Излишне большое  
усиление ФЭУ

Образец/Антитела

Прибор

# Выделение малой популяции



Выделение эффективно только на двумерном графике.

Расстояние между положительной и негативной популяциями должно быть достаточно велико – оно определяется относительной численностью положительной популяции.

# Автофлуоресценция

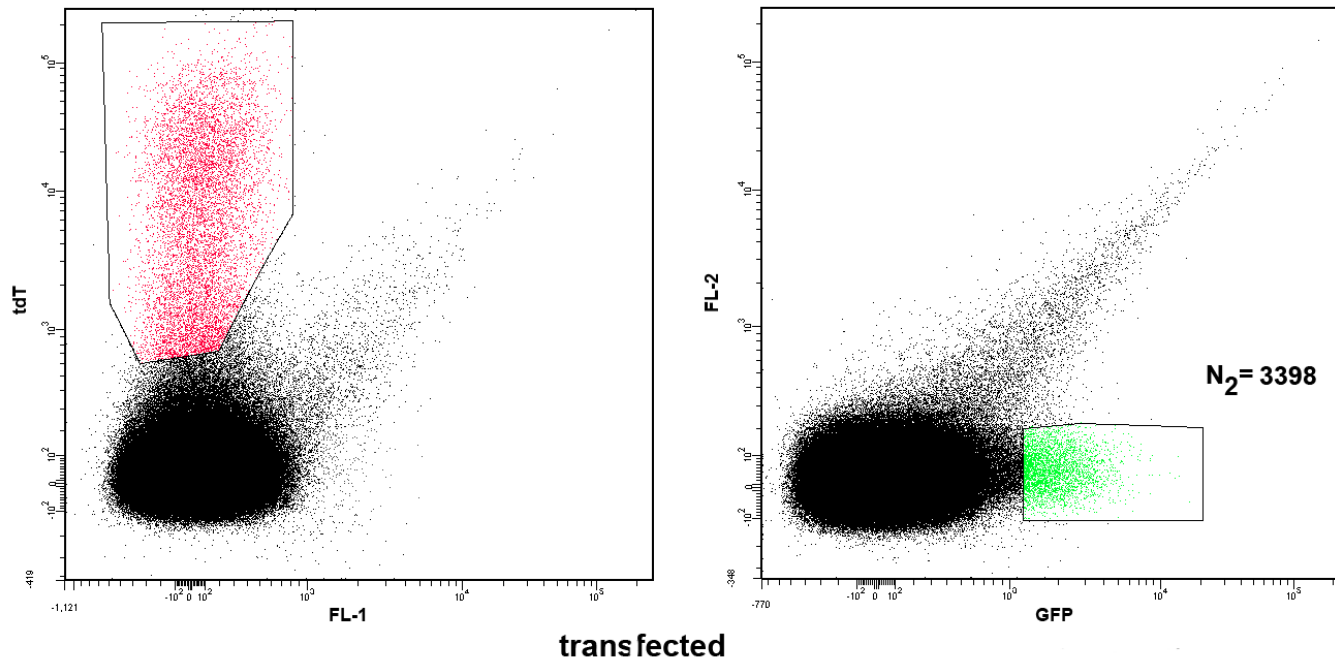
Наибольшая автофлуоресценция наблюдается при возбуждении УФ, затем фиолетовым (405 нм) и синим (488 нм) лазерами. Зеленый (561 нм) и красный (635 нм) лазеры автофлуоресценции практически не дают.

Автофлуоресценция возбуждается в широком диапазоне (355-500 нм), и клетки флуоресцируют в широком диапазоне (400-590 нм), создавая почти непрерывный спектр.

Автофлуоресцентный сигнал определяется цитоплазмой — он исчезающе мал у лимфоцитов, больше у моноцитов, и всегда велик у культивируемых клеток.

Для уменьшения автофлуоресценции культивируемых клеток можно использовать специальные среды (без витаминов и красителей).

# Роль автофлуоресценции



Выделение популяции трансфицированных клеток более эффективно в области меньшей автофлуоресценции – при возбуждении красным светом.

Слева – красный белок, справа – GFP.

# Анализ с помощью МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Анализ поверхностных маркеров может проводиться на живых клетках. Окрашенные препараты живых клеток нельзя хранить более 3-4 часов (их нужно фиксировать, но при этом снижается сигнал).

Анализ цитоплазматических (и ядерных) маркеров проводится только на фиксированных клетках после специальной обработки (пермеабиллизация). Окрашенные препараты (суспензия клеток) можно хранить в течение суток (максимум – до 36 часов).

Как правило, для окраски используются прямые конъюгаты антител с флуорохромами (например, CD3-FITC), но можно использовать и непрямую реакцию Кунса.

## **Проблемы:**

Подбор клона антител и определение правильного титра, подбор флуорохрома, постановка контролей.

Для цитоплазматического окрашивания – подбор условий фиксации и пермеабиллизации.

# Определение титра антител

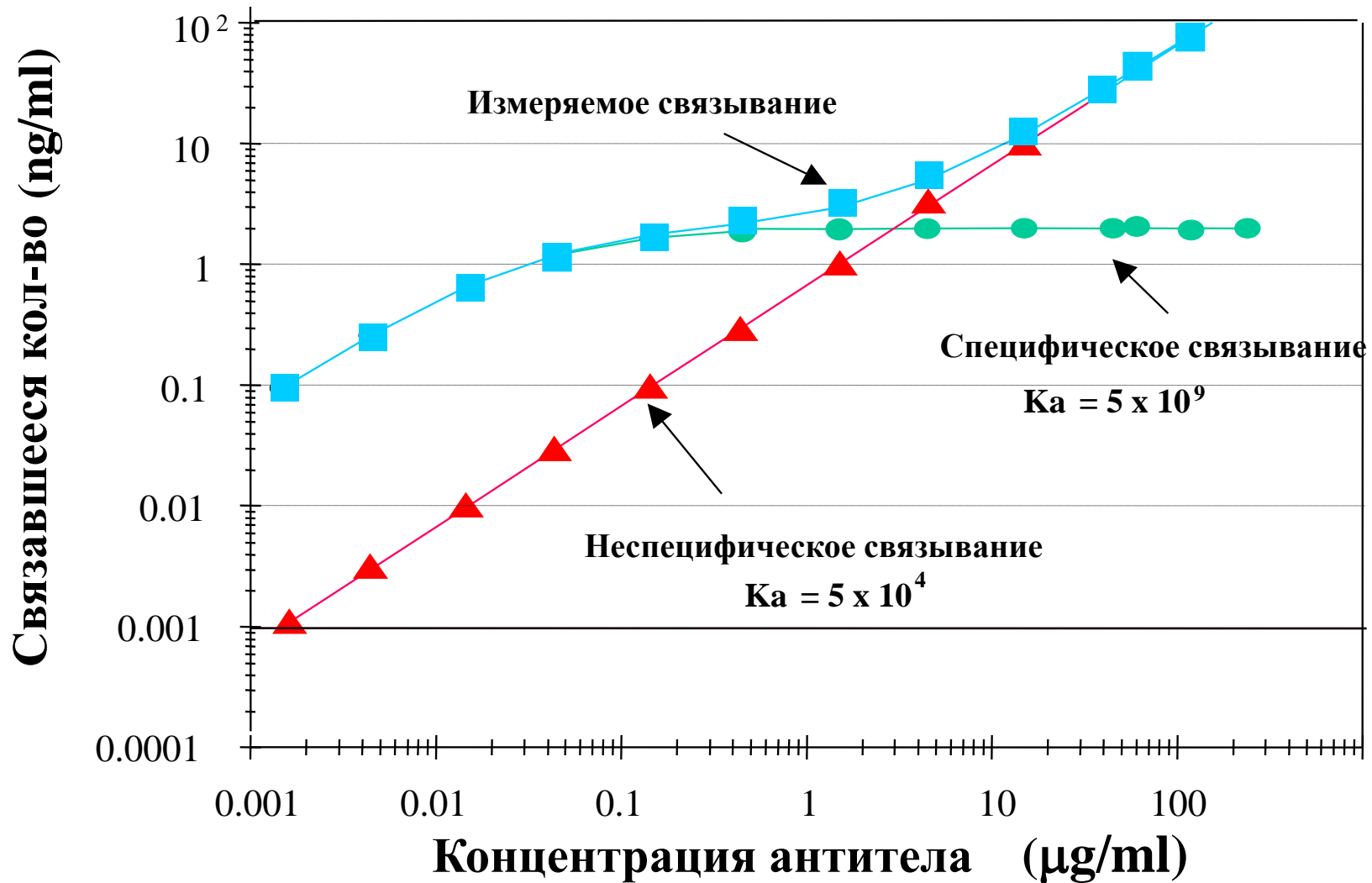
Определение оптимального титра антител необходимо для максимального разделения позитивной и негативной популяций, а также для выделения слабо позитивной популяции.

Как правило, оптимальный титр немного ниже, чем концентрация, рекомендуемая изготовителем.

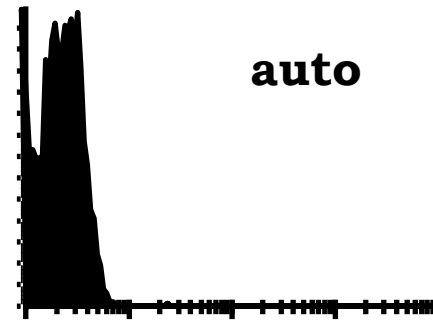
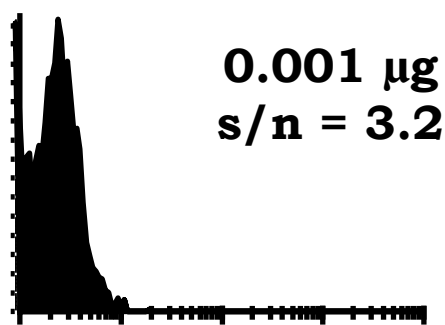
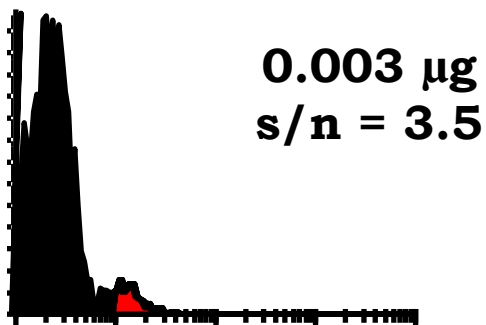
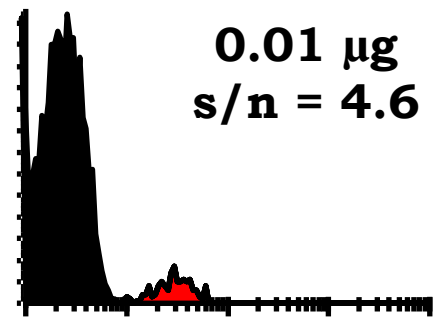
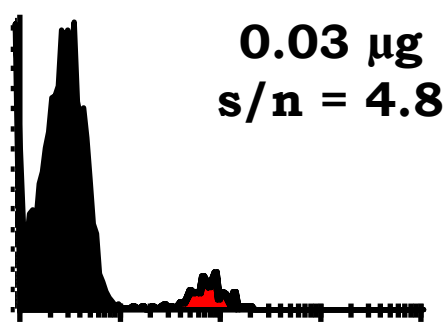
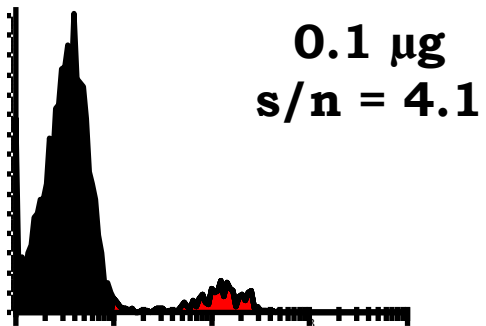
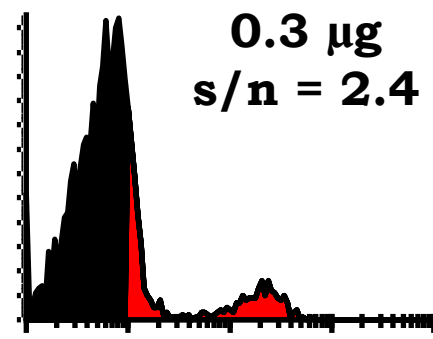
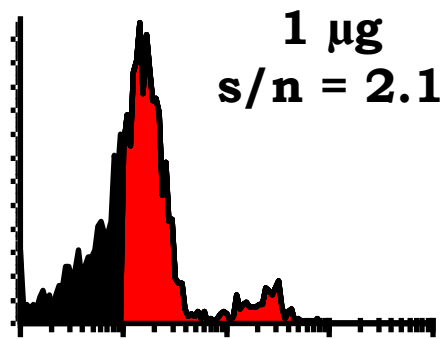
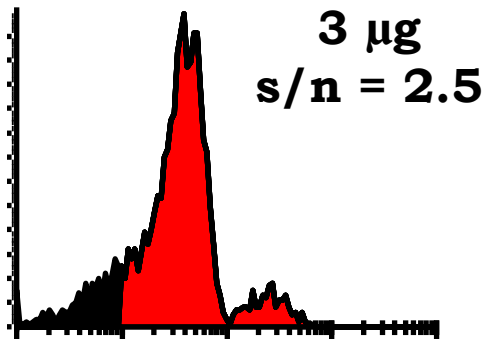
Подбор оптимального титра производится по кривой титрования.

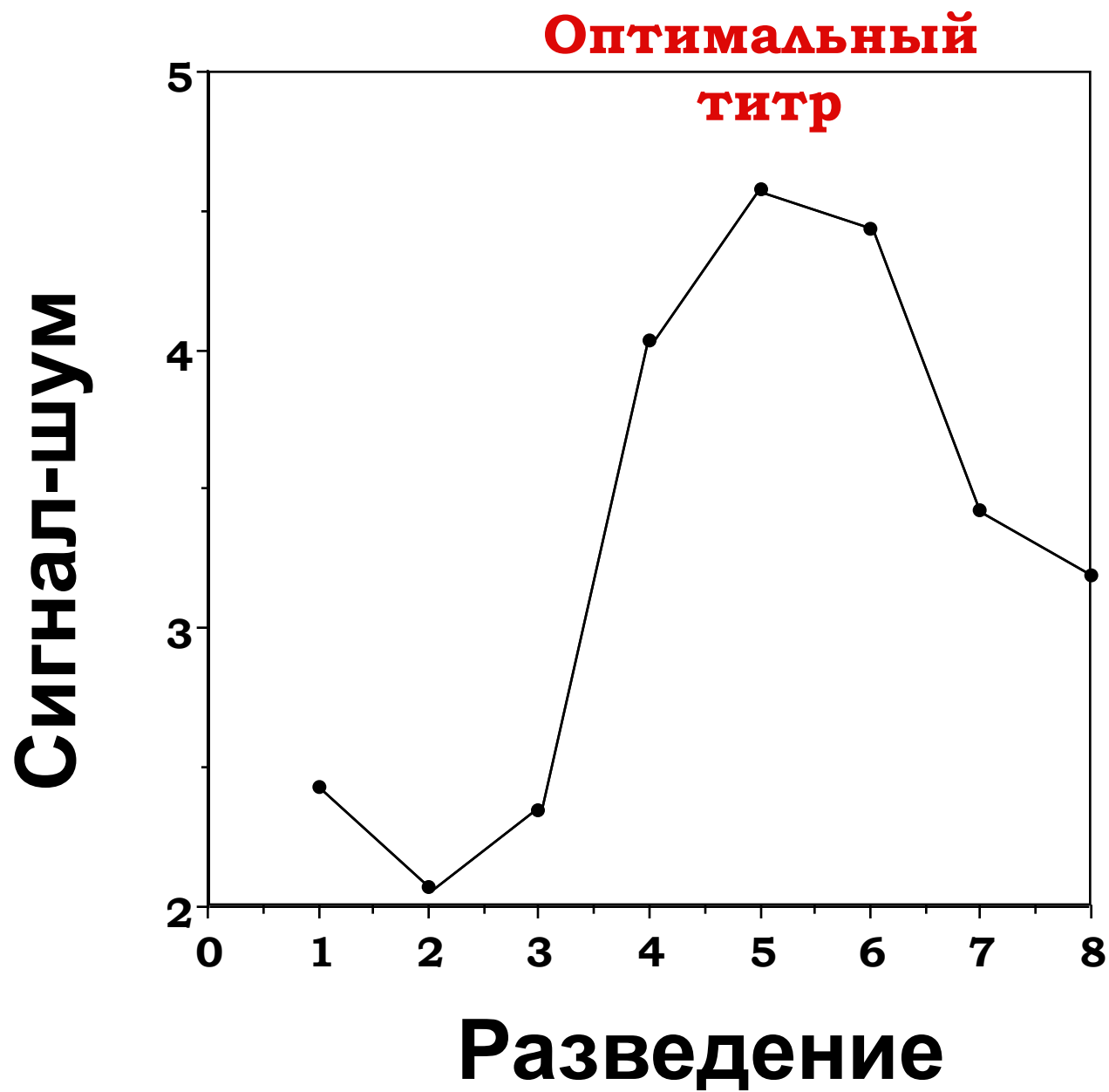


# Связывание антитела с антигеном

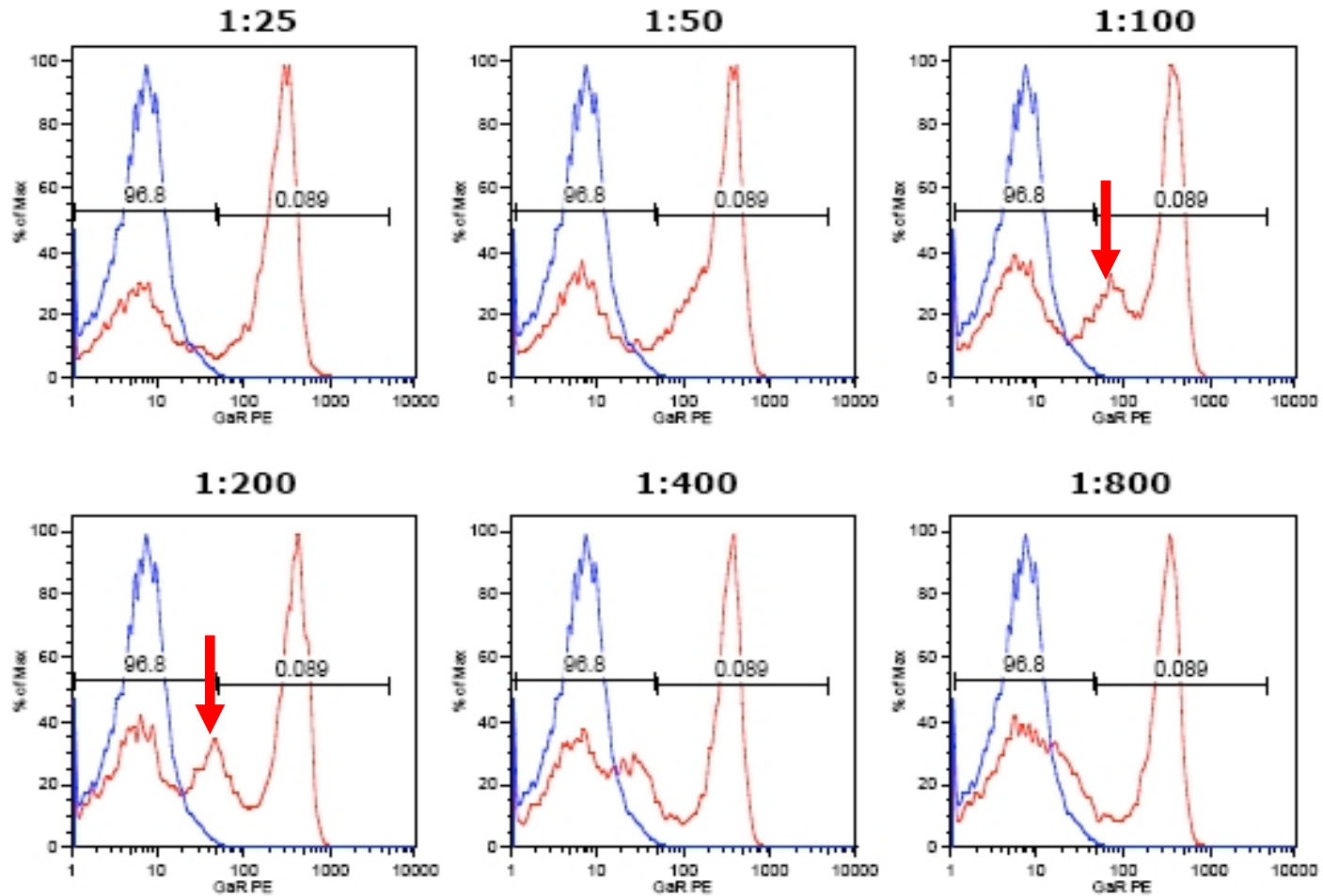


# Титрование антител





# Выделение слабоокрашенной популяции при титровании



Anti-Gr1

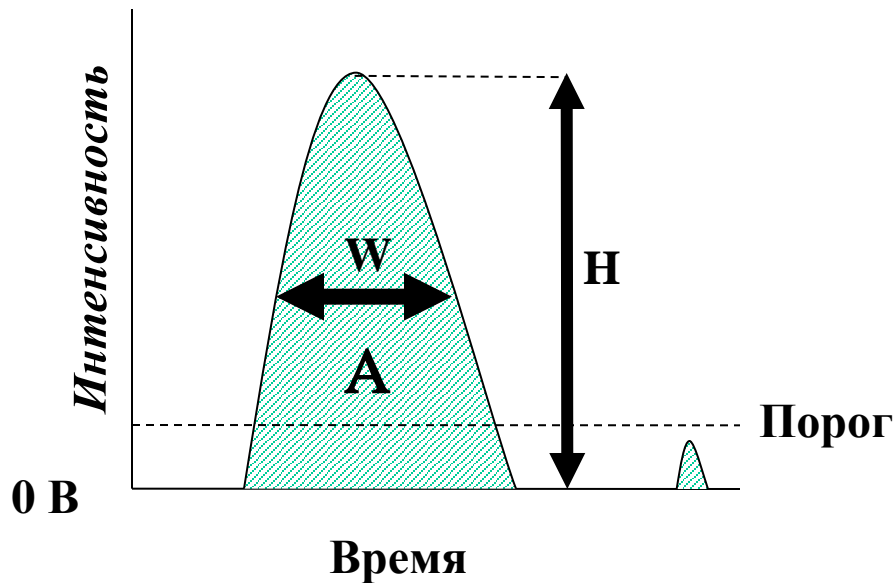
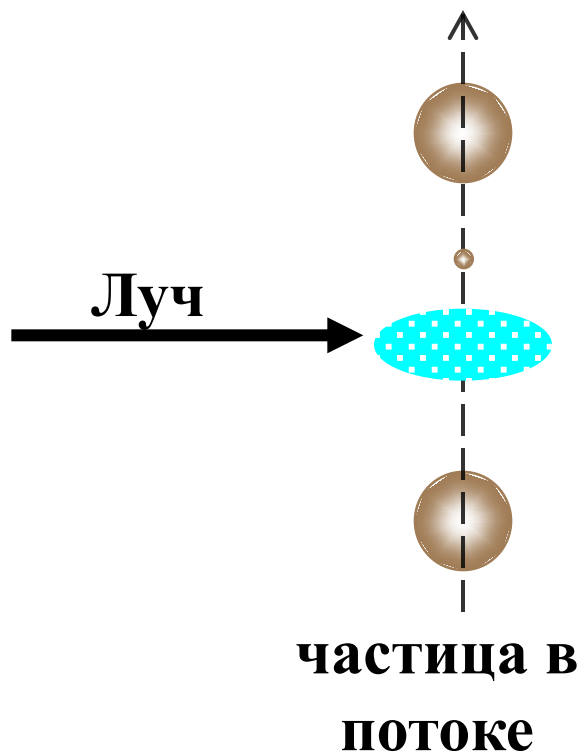
# Сравнение мышинных и кроличьих моноклональных антител

	МЫШЬ	кролик
Узнавание антигена	Лимитировано, слабое узнавание для белков грызунов	хорошее для пептидов и малых молекул
Количество эпитопов	Ограничено из-за иммунодоминантности	Узнается несколько эпитопов всегда
Аффинность	$K_d=10^{-9}$	$K_d=10^{-11}-10^{-12}$
специфичность	Средняя-высокая	Всегда высокая
применение	Проточная цитометрия, ИГХ (не всегда)	Проточная цитометрия, ИГХ (всегда)

# Ложно-позитивные результаты

1. Неспецифическое связывание антител – имеет низкую аффинность ( $K_d=10^{-4}$ ).
2. Связывание антител с Fc-рецептором (через тяжелые цепи) – высокоаффинное, видоспецифическое, характерно для моноцитов.
3. Связывание свободного флуорохрома. Чаще всего встречается для тандемных красителей.
4. Автофлуоресценция – имеет широкий спектр, может быть уменьшена при оптимизации светофильтра – узкая полоса, середина соответствует максимуму флуорохрома.
5. Мертвые клетки (клетки с нарушенной плазматической мембраной) – часто выглядят как отдельная популяция.
6. Слипание клеток (образование дуплетов).

# Выделение сдвоенных событий



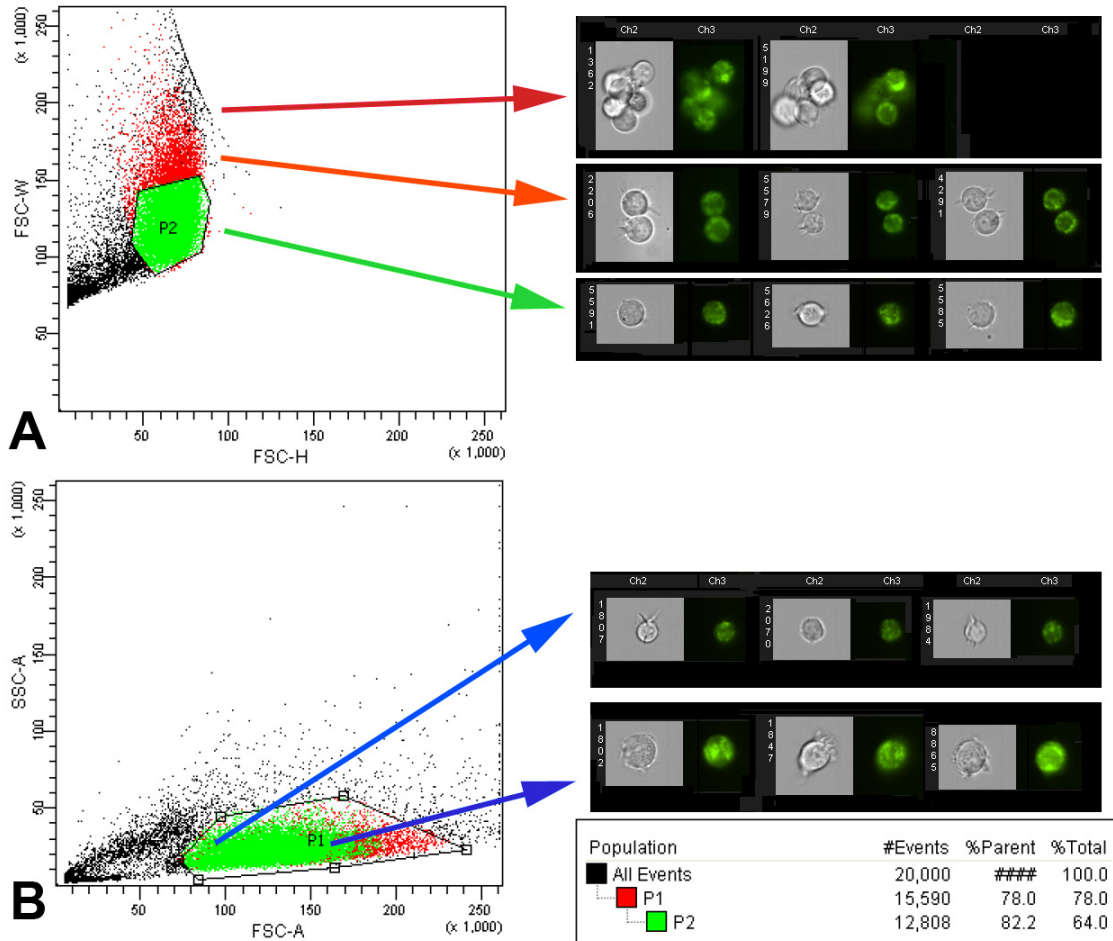
**H** : высота

**A** : площадь

**W**: ширина на полувысоте

Близко расположенные клетки дадут существенно большую ширину при той же высоте сигнала (график FSC-H/FSC-W)

# Отделение дуплетов

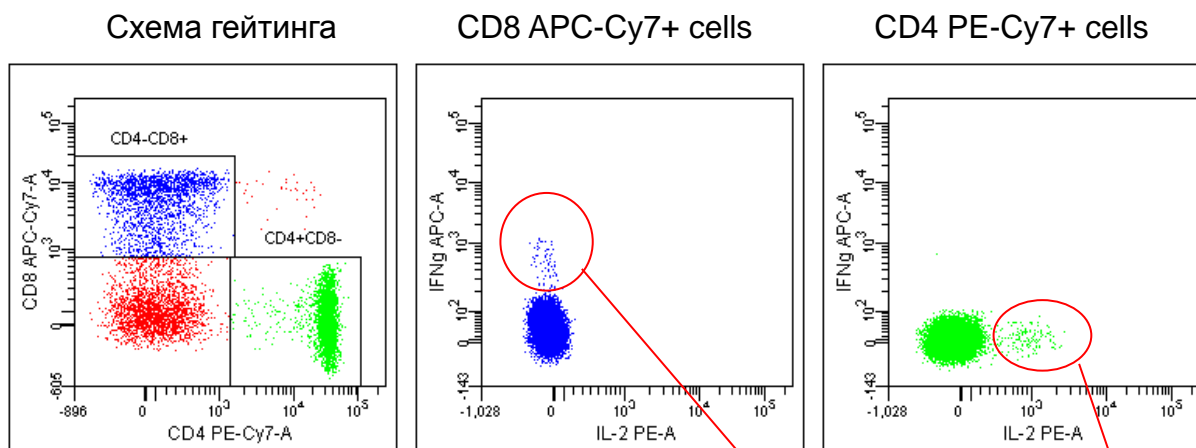


Отделение скоплений клеток проводится по отношению сигналов прямого светорассеяния



# Ложно-положительные данные как результат деградации тандемов

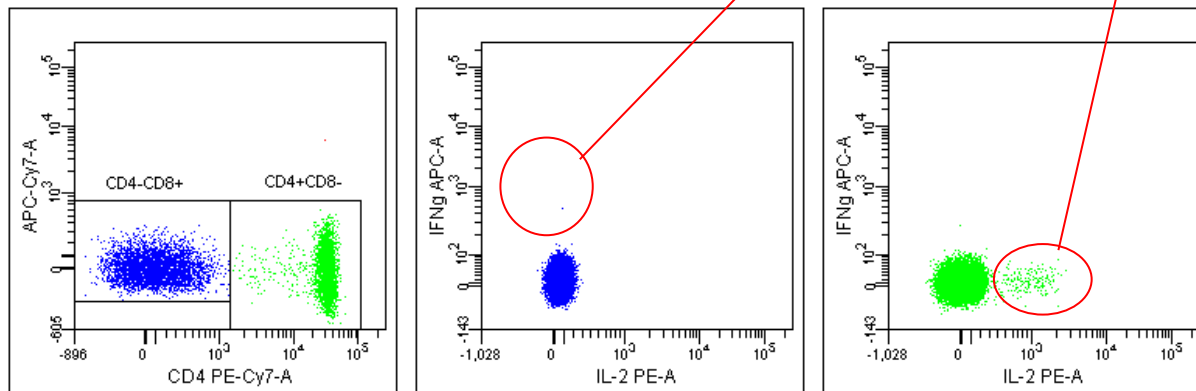
**A** CD8 APC-Cy7 и CD4 PE-Cy7:



Ложно-положительные события  
в канале APC исчезают в  
отсутствие APC-Cy7

Ложно-положительные  
события в канале PE  
сохраняются

**B** Только CD8 APC-Cy7:



# Подготовка культивируемых клеток к анализу

Удаление фенолового красного и предшественников флавинов (витамины) из культуральной среды (для уменьшения автофлуоресценции)

Замена сыворотки на БСА в культуральной среде

Стабильный pH среды на открытом воздухе (замена бикарбонатного буфера на 10-25 mM HEPES, pH 7.2)

Суспензию надо разбить на отдельные клетки с помощью пипетирования через тонкое отверстие

Для прикрепленных клеток:

Приготовление суспензии клеток с помощью аккутазы, а не трипсина (Accutase vs Trypsin) для лучшего сохранения поверхностных эпитопов.

Проверка жизнеспособности клеток при длительном пребывании в суспензии.

# Контроли

1. Позитивный контроль – для установки сигнала, настройки разрешения и компенсации.
2. Негативные контроли – для определения уровня автофлюоресценции и проч. Лучше всего – те же неокрашенные клетки, а также сходная негативная популяция (например, лимфоцитов).
3. Контроль «минус один краситель» – необходим при использовании многоцветной метки для определения компенсации.

# **Проблемы анализа некомпенсированных данных**

**При многоцветной цитометрии для первого опыта необходимо наличие всех контролей, построенных по принципу FMO (fluorescence minus one).**

**Основную трудность создает затекание из канала с высоким уровнем экспрессии в канал со слабым уровнем экспрессии (например, CD45 – CD10). Соответственно, яркие сигналы надо использовать со слабым красителем, или выводить их в канал, который дает минимальное затекание с другими. Но с тандемами надо соблюдать осторожность!**

**Расстояние между популяциями, лежащими вдоль диагонали, может быть небольшим – необходимо растягивать график на экране.**

# **Лекция 5**

**И.А.Воробьев**

**Многоцветная проточная  
флуориметрия.**

**Клеточный сортер и сортировка  
клеток (FACS)**

# Многоцветная проточная флуориметрия

начинается с того момента, когда анализ некомпенсированных данных приводит к появлению ложно-положительных результатов. Как правило, это происходит при использовании 4 и более красителей, но может быть и при трех красках, если их сигналы сильно «затекают» друг в друга.

Многоцветная проточная флуориметрия успешна только при выполнении нескольких условий, о которых и пойдет речь в дальнейшем.

# Многоцветная проточная флуориметрия – общие правила

## Подбор красителей:

1. Чем меньше молекул антигена, тем более яркой должна быть краска.
2. Минимальный спектральный перекрест для данного числа маркеров (FITC - PerCP-Cy5.5 – APC - BV)

## Анализ данных:

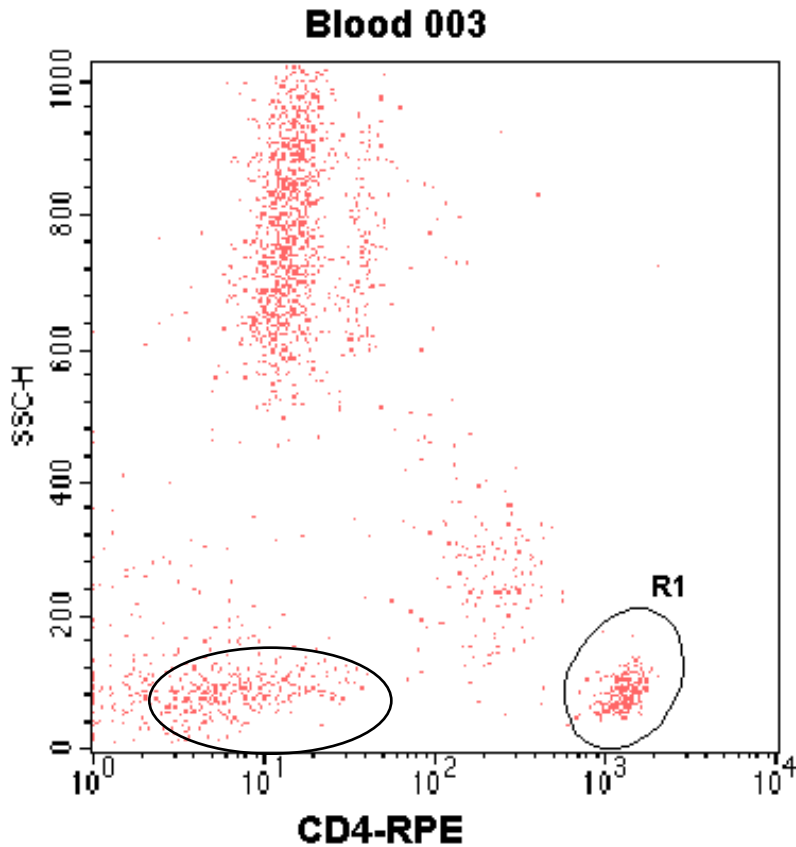
1. Выделение региона и его проекции на все графики.
2. Подсчет «абсолютного» числа клеток, положительных по выбранному маркеру, на графиках SSC/FL-i (после компенсации!).

# Таблица некоторых распространённых флуорохромов

Краситель	Лазер	Запирающий и Фильтр	Индекс окраски	Фото- стабильност ь	Возбуждение/ Эмиссия
PE	488/561	585/40	360	Высокая	496(546)/578
AlexaFluor 647	640	660/20	315	Высокая	650/668
APC	640	660/20	280	Высокая	650/660
PE-Cy7	488/561	780/60	280	Низкая	496(546)/785
PE-Cy5	488/561	695/40	220	Высокая	496(546)/667
PerCP-Cy5.5	488	695/40	93	Средняя	482/695
AlexaFluor 488	488	530/30	75	Высокая	495/519
FITC	488	530/30	69	Низкая	494/519
PerCP-Cy5.5	488	695/40	~100	Средняя	482/678
APC-Cy7 (H7)	640	780/60	42	Очень низкая	650/785
Brilliant Violet 421	407	450/50	~900	Высокая	407/421
Brilliant Violet 510	407	510/50	~300	Высокая	407/511
Brilliant Violet 570	407	575/30	~300	Высокая	407/570



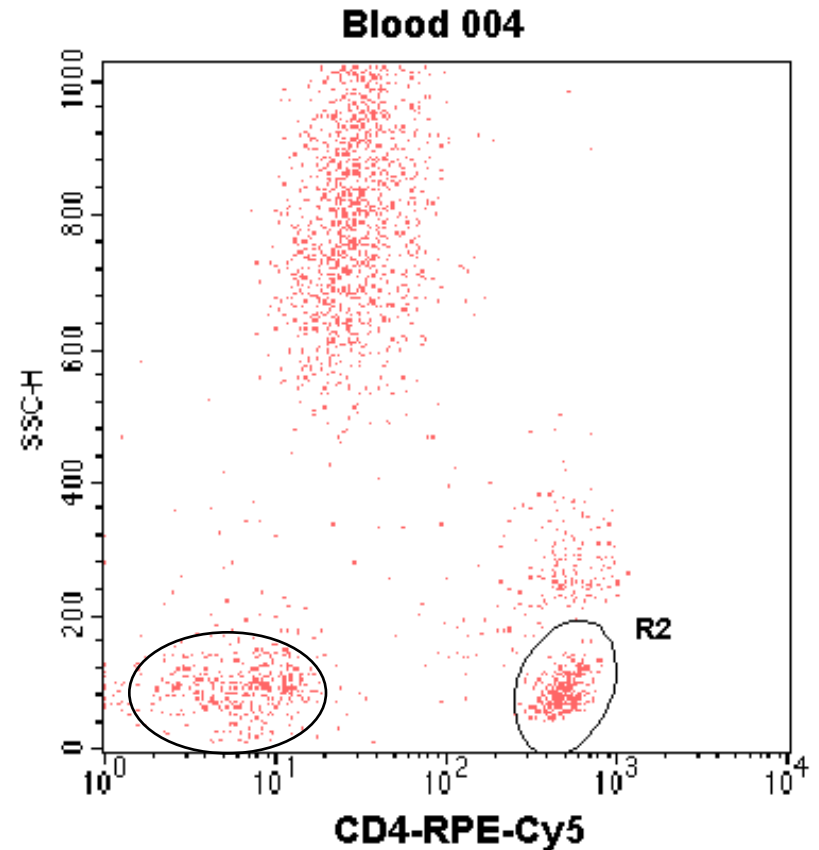
# Сравнение сигналов: PE/PE-Cy5



R1: 1264

Гранулоциты: 13,9

Отношение: 90,9



R2: 495

27,0

18,3

# Особенности многолазерной системы

Установка лазеров – последовательность и время задержки.

Расстояние между точками пересечения определяется временем затухания флуоресценции.

Время задержки (laser delay) устанавливается с помощью специальных частиц.

Для каждого лазера имеется собственный набор детекторов.

За счет этого можно использовать красители с одинаковой эмиссией, но разным возбуждением (PE-Cy7 и APC-Cy7).

Увеличение числа лазеров позволяет уменьшить число каналов для каждого из них, и, соответственно, облегчить проблемы компенсации.

Если число флуорохромов более 4, компенсация необходима, так как ее отсутствие может привести к ложно-положительным сигналам.

# Преимущества многолазерной системы

Разрешающая способность зависит от разброса.

Разброс увеличивается при компенсации (сигналы вычитаются, а разбросы складываются).

Увеличение числа лазеров и уменьшение числа каналов на каждом лазере позволяет свести к минимуму компенсацию.

Пример: FITC/PE на одном (488 нм) и двух (488/561 нм) лазерах

Сигнал возрастает незначительно, однако во втором случае по сравнению с первым уменьшается разброс в негативной популяции.

Таким образом возрастает SI, и, следовательно, разрешение.

Разрешение – способность отличить слабо окрашенную популяцию от негативной.

# **Подбор красителей**

**По уровню экспрессии антигена (для антител) - чем ниже уровень, тем ярче должен быть флуорохром**

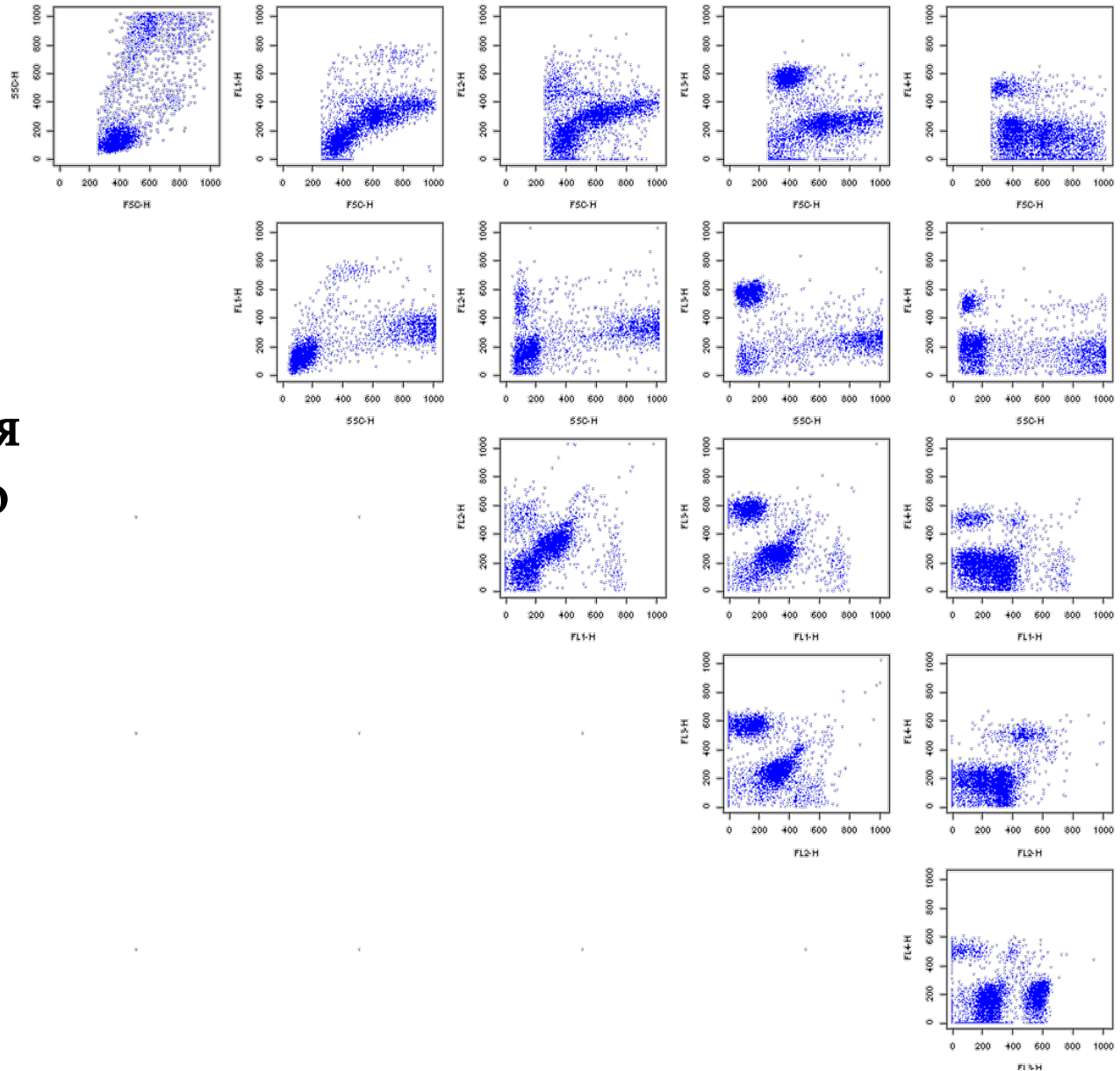
**По соображениям компенсации – красители, требующие большой компенсации, не должны одновременно характеризовать одну популяцию.**

**По соответствию спектров возбуждения/эмиссии красителей и имеющихся на приборе лазеров и каналов детекции.**

# Наборы флуорохромов для панели, содержащей 6 и более цветов

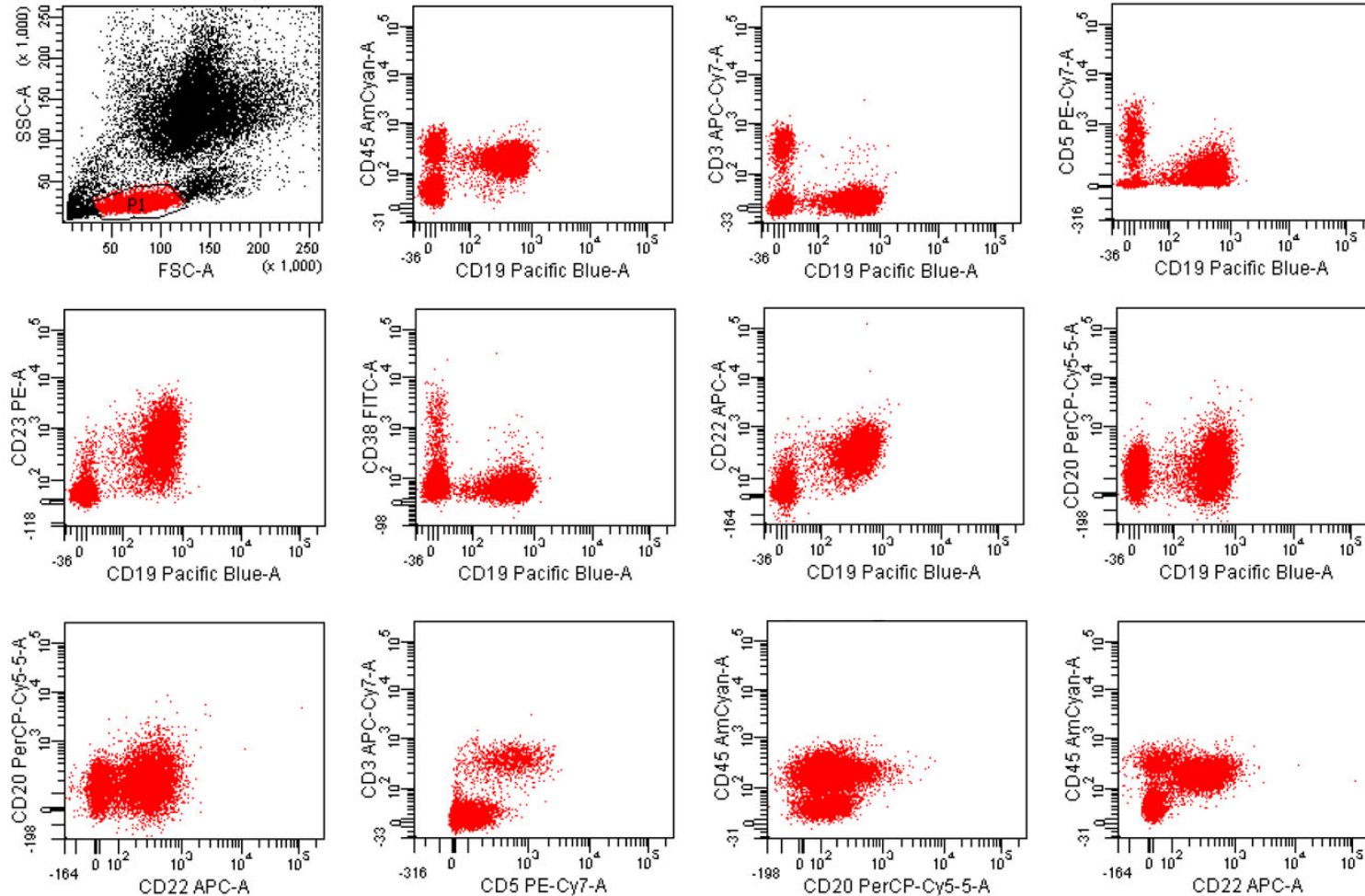
6 цветов, 2 лазера	8 цветов, 3 лазера	10 цветов, 4 лазера	Additional
FITC or Alexa 488	FITC or Alexa 488	FITC or Alexa 488	
PE	PE	PE	
		*PE-Texas Red or PE-Alexa 594	
PerCP-Cy5.5	PerCP-Cy5.5	PerCP-Cy5.5	
PE-Cy7	PE-Cy7	PE-Cy7	
APC or Alexa 647	APC or Alexa 647	APC or Alexa 647	
		*APC-Alexa 700	
APC-Cy7 (H7)	APC-Cy7 (H7)	APC-Cy7 (H7)	
	Brilliant Violet 421	Brilliant Violet 421	
	Brilliant Violet 510	Brilliant Violet 510	
		Brilliant Violet 711	
		Brilliant Violet 785	UBV, UBV tandems

# Полный набор графиков

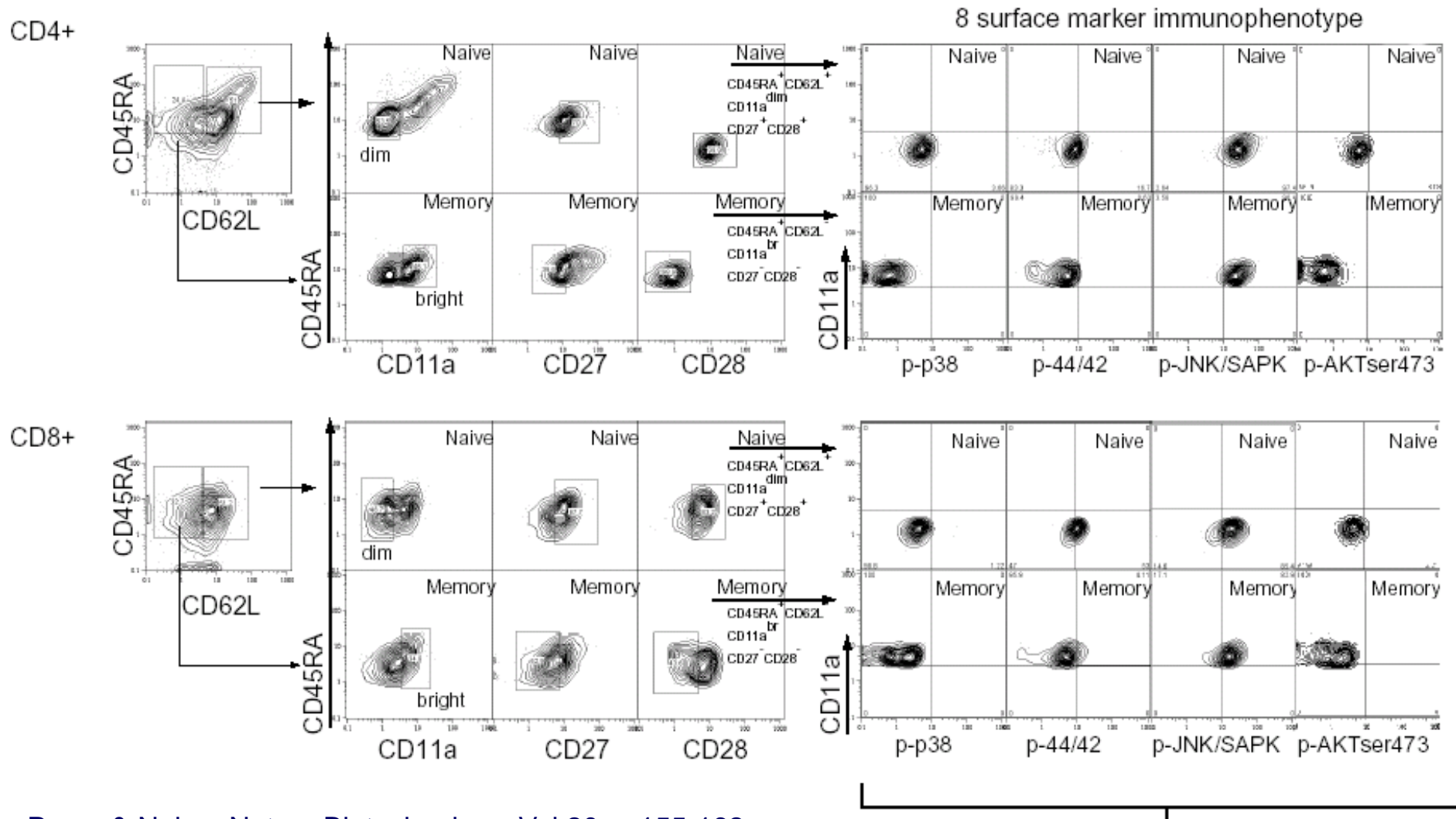


Графики для  
4-х цветного  
мечения

# Пример 8-и цветного окрашивания



# Выделение субпопуляций Т-клеток с помощью 11-и цветной метки





# Представление результатов в многоцветной флуориметрии

Построение всех двумерных графиков создает громоздкую картину: 4 цвета – 6 графиков, 6 цветов – 15 графиков, 8 цветов – 28 графиков и т.д.

Вместо этого применяется последовательный гейтинг – популяция, выделенная на одном графике, проецируется на следующие графики. Однако он может давать ошибки.

Интересующая нас популяция представляется для анализа на нескольких графиках с различными красителями

# Разработка многоцветного экспериментального протокола

Разработка 6-и цветного протокола

1. Случайный подбор красителей (что есть в лаборатории)
2. Подбор красителей, но без учета всех особенностей образца
3. Полная разработка протокола

Результаты стратегий 1 и 2: плохое выделение популяций с низким отношением сигнал-шум.

Правила:

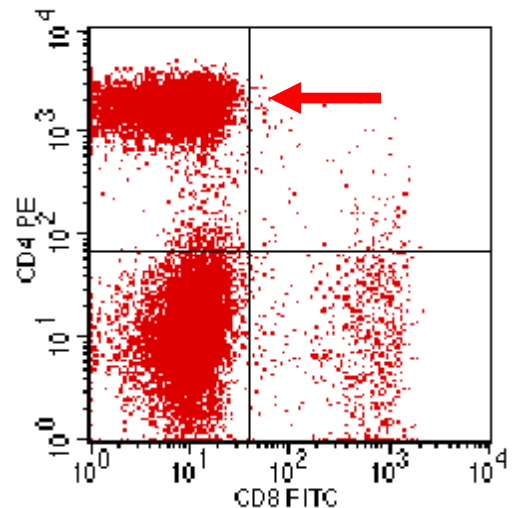
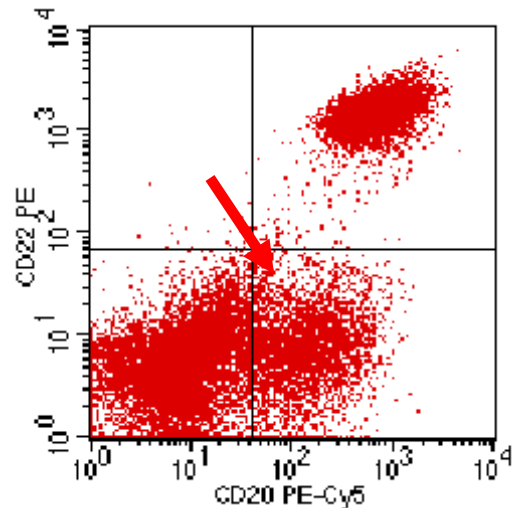
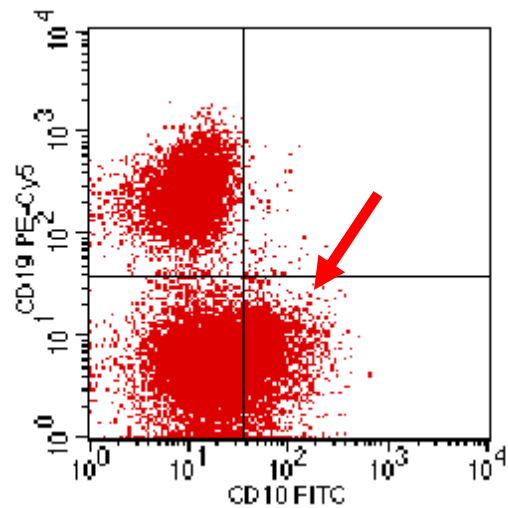
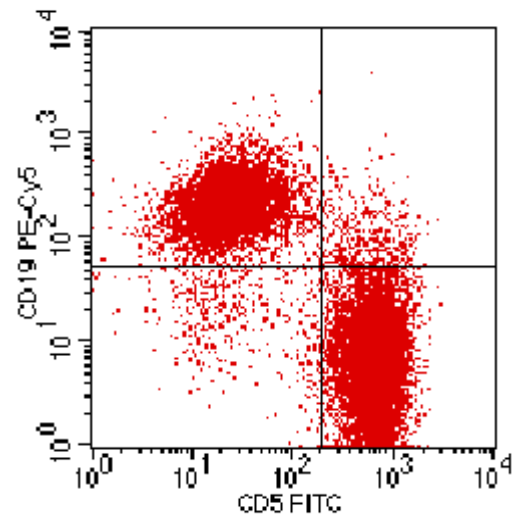
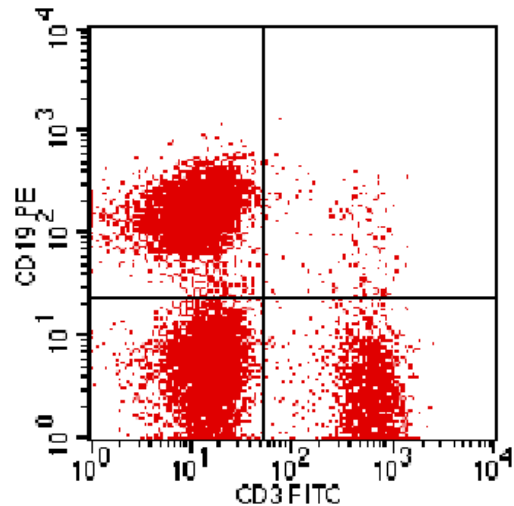
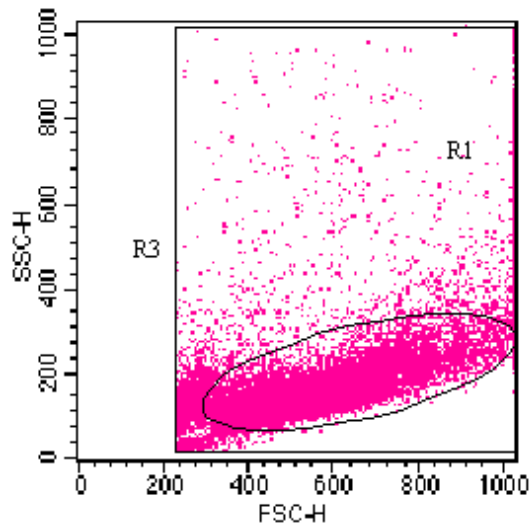
1. Яркие флуорохромы (BV, PE, APC) – малое число молекул антигена на клетку.
2. Флуорохромы, которые имеют сильное затекание (spillover), должны быть связаны с антителами, окрашивающими заведомо разные популяции клеток.
3. Нельзя использовать красители (тандемные), которые возбуждаются более, чем одним лазером (PE-Cy5, BV-570 и др.)

# Последовательный гейтинг

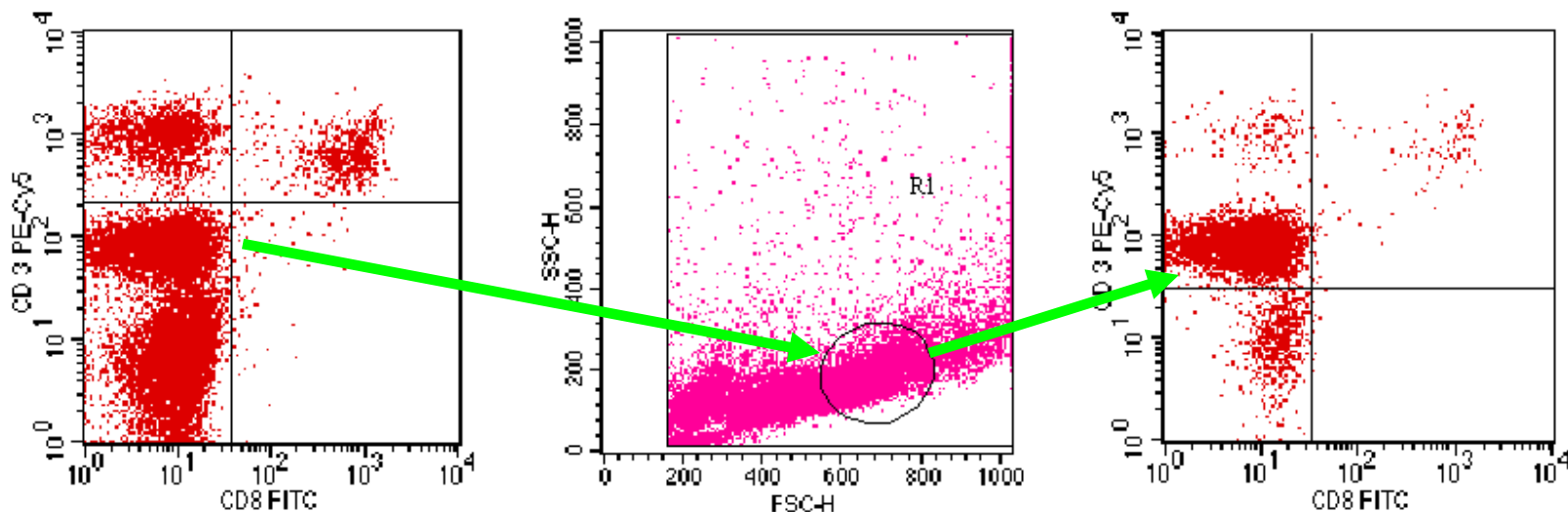
Прямая проекция – полигон выделяется, как правило, по прямому и боковому светорассеянию, а затем проецируется на графики флюоресценции

Обратная проекция – полигон выделяется, например, по светорассеянию, а затем верифицируется по флюоресценции. После чего полигон, выделенный по сочетанию признаков, отбрасывается назад на график светорассеяния

# T-клеточная лимфома



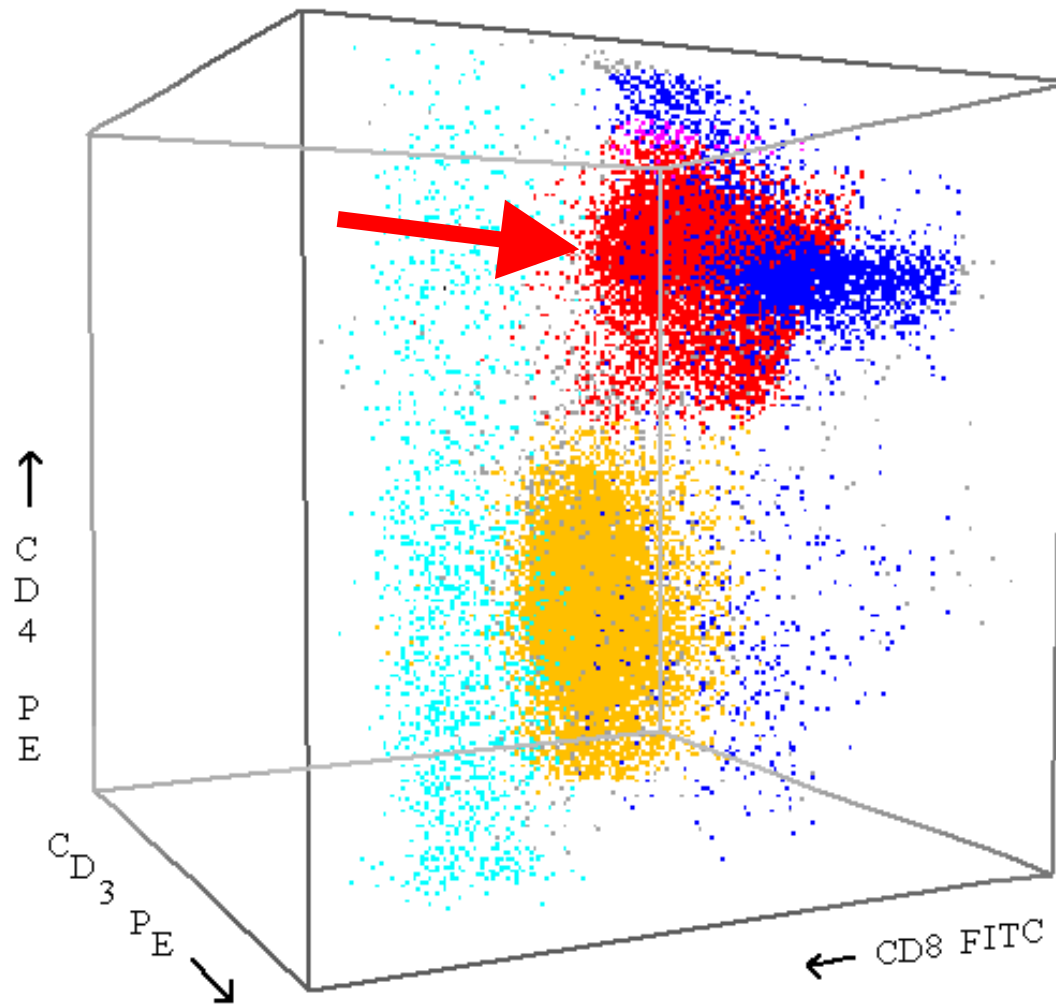
# Выделение полигона опухолевых клеток



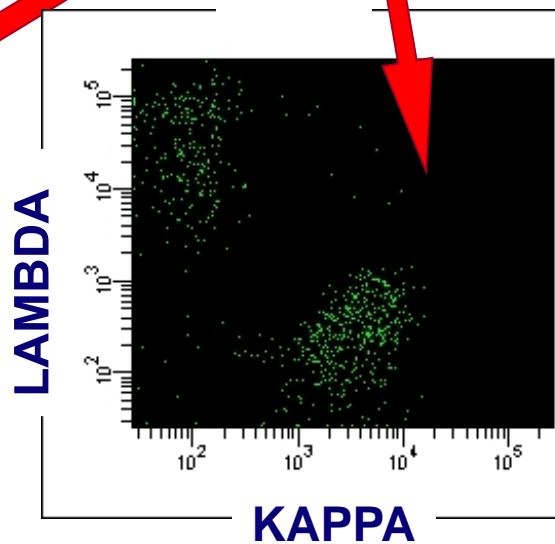
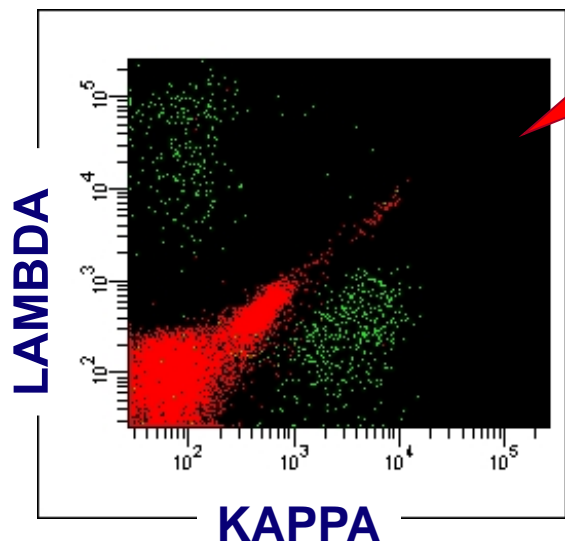
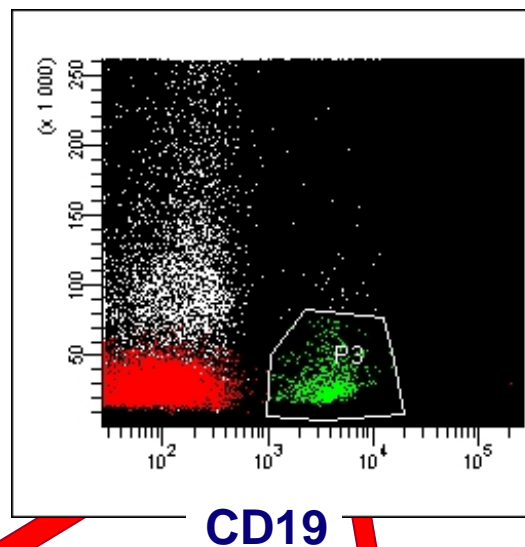
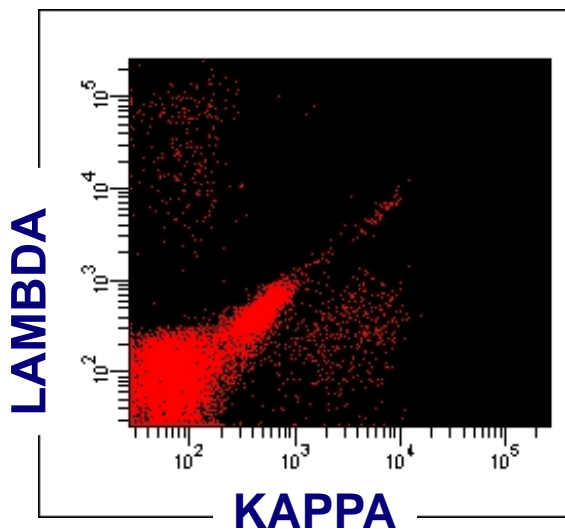
Фенотип опухолевых клеток:

CD10 / CD2 / CD5 / CD7 / **CD3low** / CD4 / **CD20low**

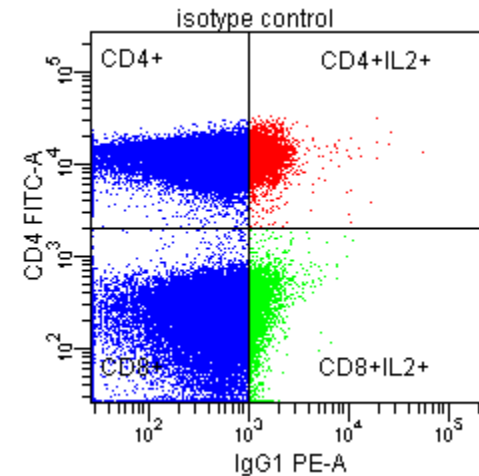
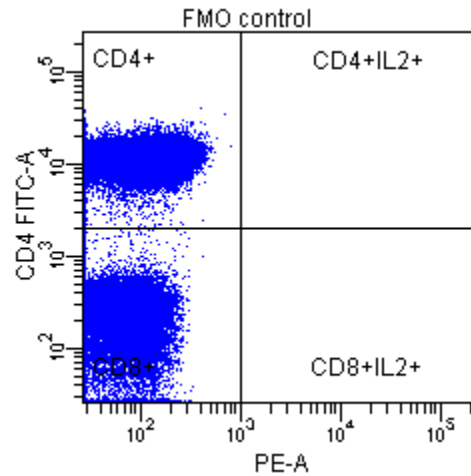
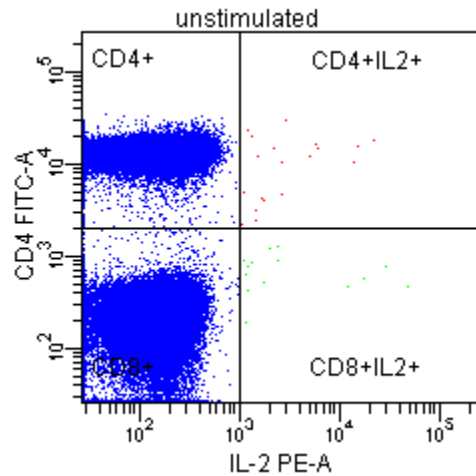
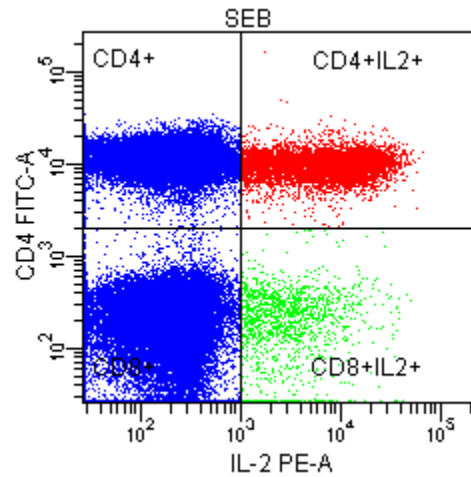
# Выделение опухолевой популяции



# Выделение субпопуляций лимфоцитов: Карра / Lambda / CD19



# Сравнение контролей для гейтинга



Контроль «минус один краситель» необходим и при использовании изотипического контроля.



# Виды контролей

- **Настройки инструмента**
  - напряжение на ФЭУ
  - матрица компенсаций (должна быть своя для каждого эксперимента)
- **Контроли гейтинга**
  - Изотипический контроль
  - Контроль ФМО
- **Биологические контроли**
  - Нестимулированные образцы
  - Материал от здоровых доноров

**Вам действительно нужно 12-18 цветов  
для решения научной проблемы???**



# **Основные компоненты проточного сортера**

**Проточный флуориметр +**

**Анализ данных в реальном времени**

**Разделение струи на капли с помощью вибрирующего сопла**

**Просмотр струи и настройка режима формирования капель**

**Заряд капель, содержащих частицы, их выделение и отклонение по результатам анализа**

**Емкости для сбора частиц**

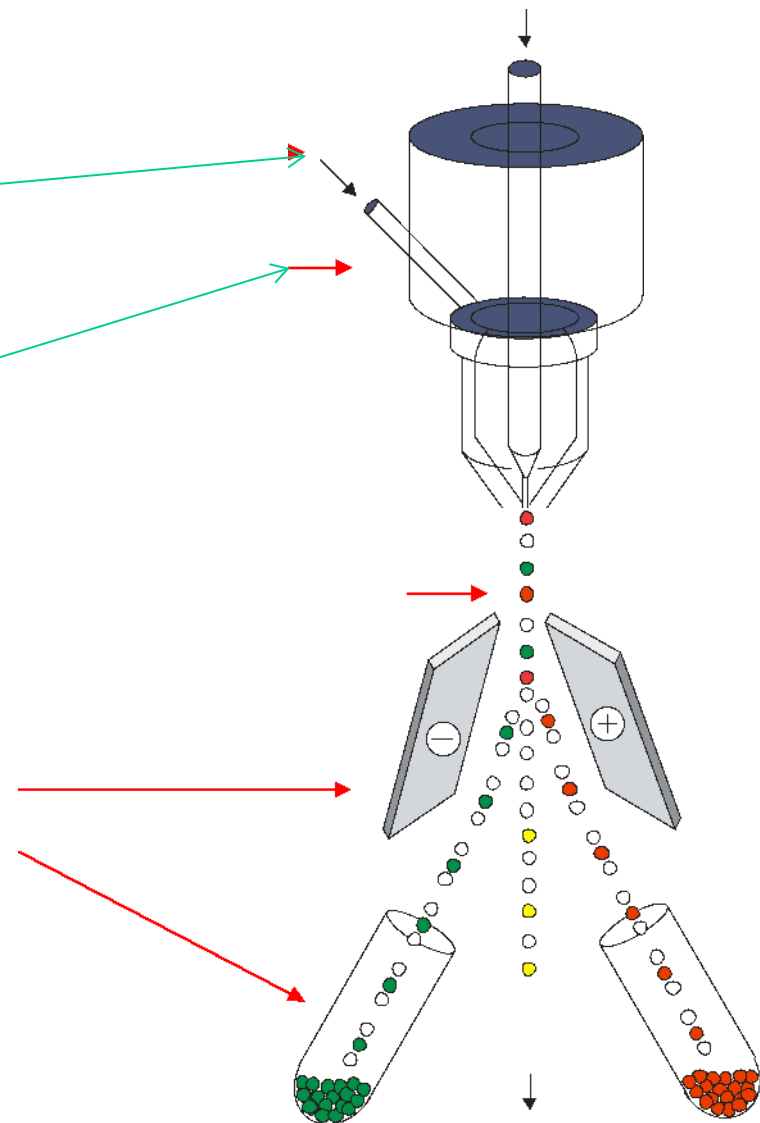
# Принцип сортировки клеток

Клетки в ламинарном потоке входят в форсунку (nozzle)

Форсунка осциллирует с высокой частотой (до 200 кГц), в результате чего струя разбивается на капли

Капли могут содержать клетки и заряжаются: + или –

Отклоняющими пластинами заряженные капли направляются в боковые пробирки. Незаряженные капли уходят в помойку.



# Современные сортеры: Aria, MoFlo и др.

Сортеры разделяются на два типа: струя в воздухе (jet in the air) и с проточной кюветой. Сортер с проточной кюветой имеет сложную систему настройки капель (анализ виртуальных капель).

В первом случае апертура объектива не превышает 0,55, во втором случае – 1,2.

Соответственно максимальная чувствительность (при аналогичных ФЭУ) различается не менее, чем в 4 раза. Поэтому в сортерах jet-in-the-air для повышения чувствительности, как правило, используют более мощные лазеры (200-1000 мВт)

Скорость сортировки определяется частотой формирования капель. Максимальная частота формирования капель (около 75 тыс. в секунду) определяется диаметром сопла (чем меньше сопло, тем больше частота).

# Классификация сортеров

**Сортеры разделяются на две категории:**

**- относительно простые машины с небольшим числом флуоресцентных каналов (4-5), жесткой архитектурой и возможностью сортировки в 2 пробирки.**

**- универсальные высокопроизводительные сортеры с числом лазеров 3 и более, числом каналов до 18-20, перестраиваемой архитектурой, и возможностью одновременной сортировки в 4-6 пробирок.**

**Основное различие – стоимость прибора (около 150 тыс. долл или 600-800 тыс. долл.) и сложность его эксплуатации.**

# Блок-схема клеточного сортировщика

Источник возбуждения и оптическая система

Проточный модуль - кювета или свободная струя

Детекторы сигналов и АЦП

Система прокачки жидкости – стабильное и высокое (5 атм и более) давление

Пробозаборник

Управляющая/отклоняющая система и пробосборник

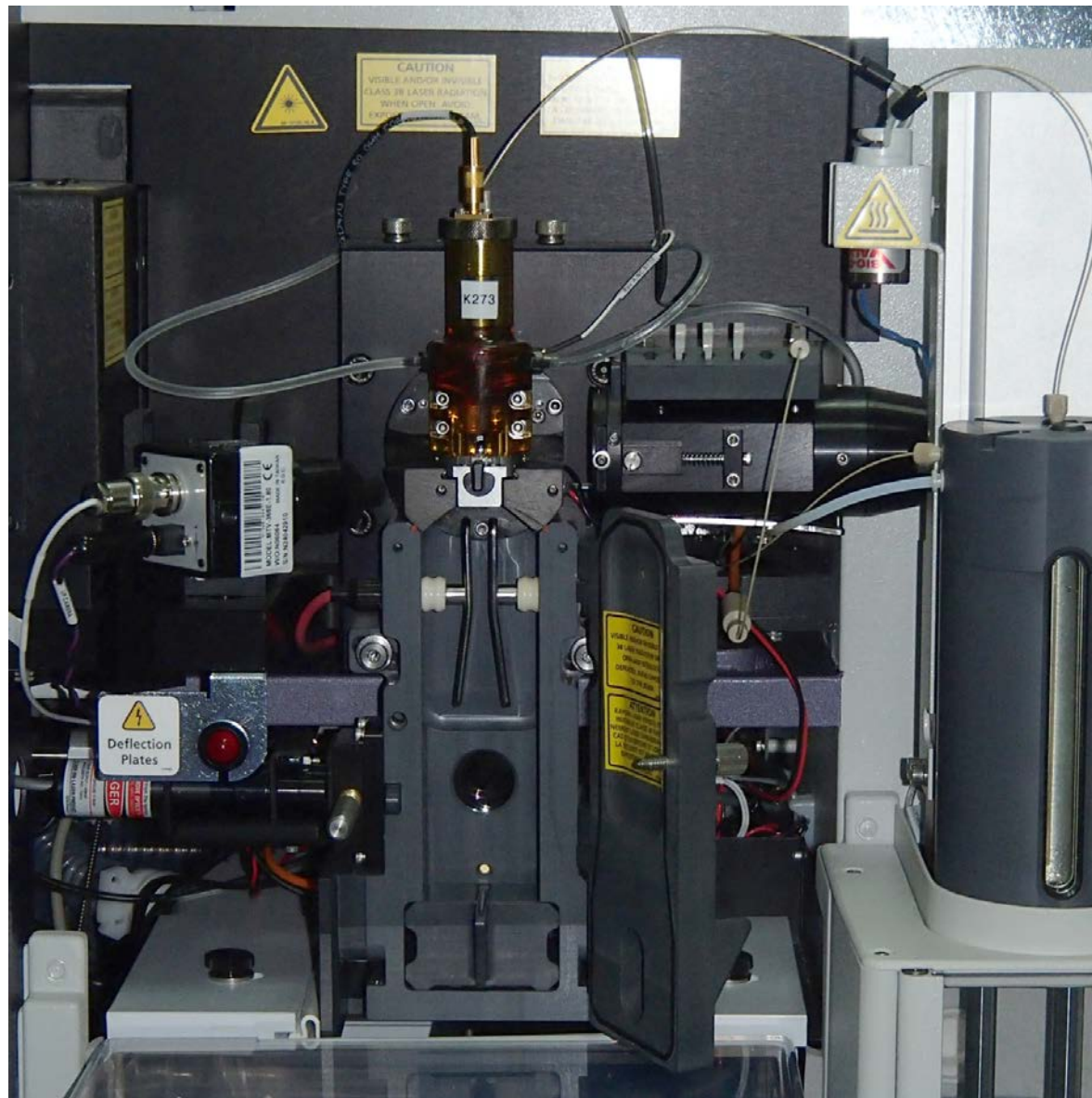
Программное обеспечение и компьютер

# FACS Aria - общий вид



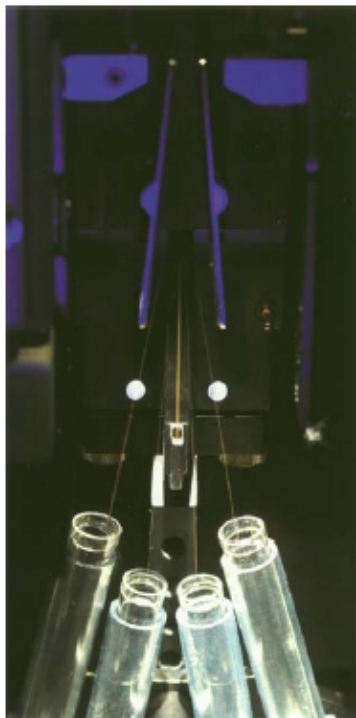


# Ячейка для анализа и сортировки клеток

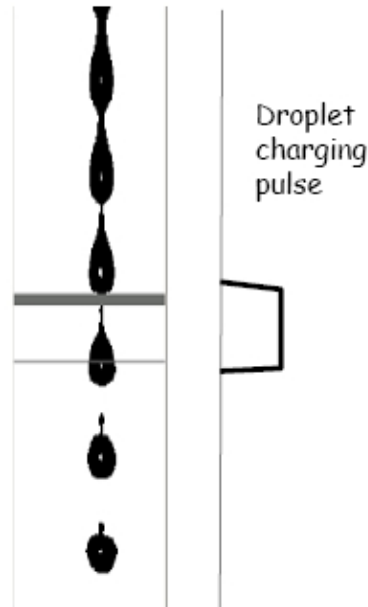


# Сортировка на BD FACSAria

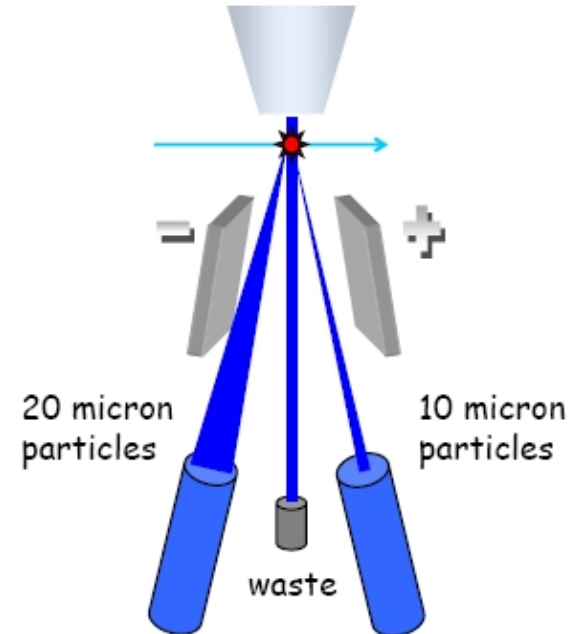
Sort stream trajectory need to be good to make sure the cells actually arrive safely at the tube. Stream can be affected by drop drive amplitude, phase, and size of the cells and nozzle.



Charging pulses need to be in phase with droplet generation"



Larger particles cause greater stream "fanning"



Joe Trotter,  
BD Biosciences

# Общий обзор сортировки

- Принцип сортировки
- Настройка сортера и организация рабочего процесса
  - Стабильная струя и формирование капель
  - Направление и фокусировка отклоняющихся капель
  - Установка правильной «задержки» капли
- Точность сортировки
- Сортировка в/на:
  - Пробирки
  - Многолуночные чашки (96 лунок)
  - Предметные стекла

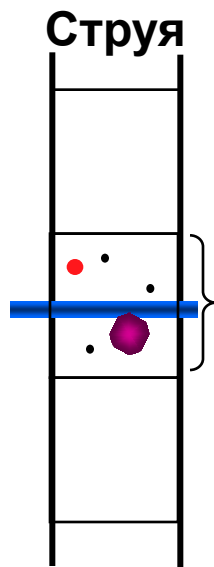
# Сортировка: общие принципы

Решение о сортировке вы принимаете на основе гейтинга.

Помните: вы сортируете не клетки, а капли!

Капля отправляется в пробирку если хотя бы один элемент в ней соответствует выбранным воротам!

Вы действительно сортируете Т-клетки ?  
Да, если все ворота должны быть последовательно выставлены.

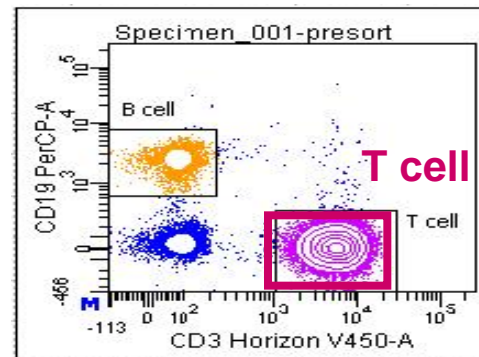
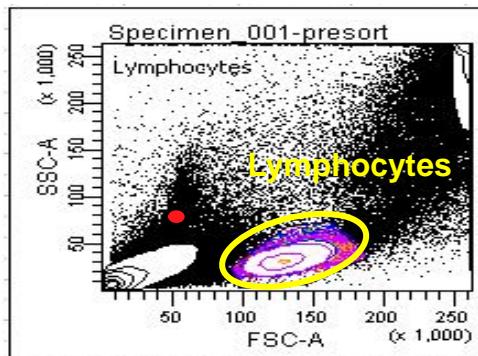


Виртуальная капля в точке принятия решения

- Мусор
- Тромбоцит
- Т-клетка

Tube: presort

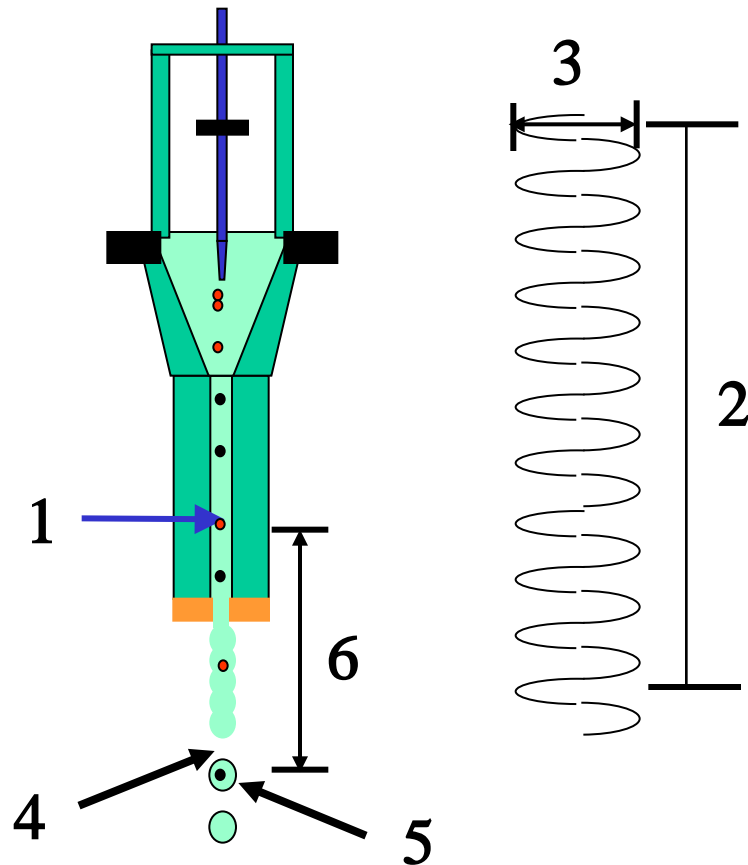
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	354,936	###	100.0
Lymphocytes	43,062	12.1	12.1
FSC-Exclusion	42,675	39.1	12.0
SSC-Exclusion	42,177	38.8	11.9
T cell	34,756	32.4	9.8
B cell	3,518	8.3	1.0



# Прогон (репетиция сортировки)

- Формирование и зарядание капель

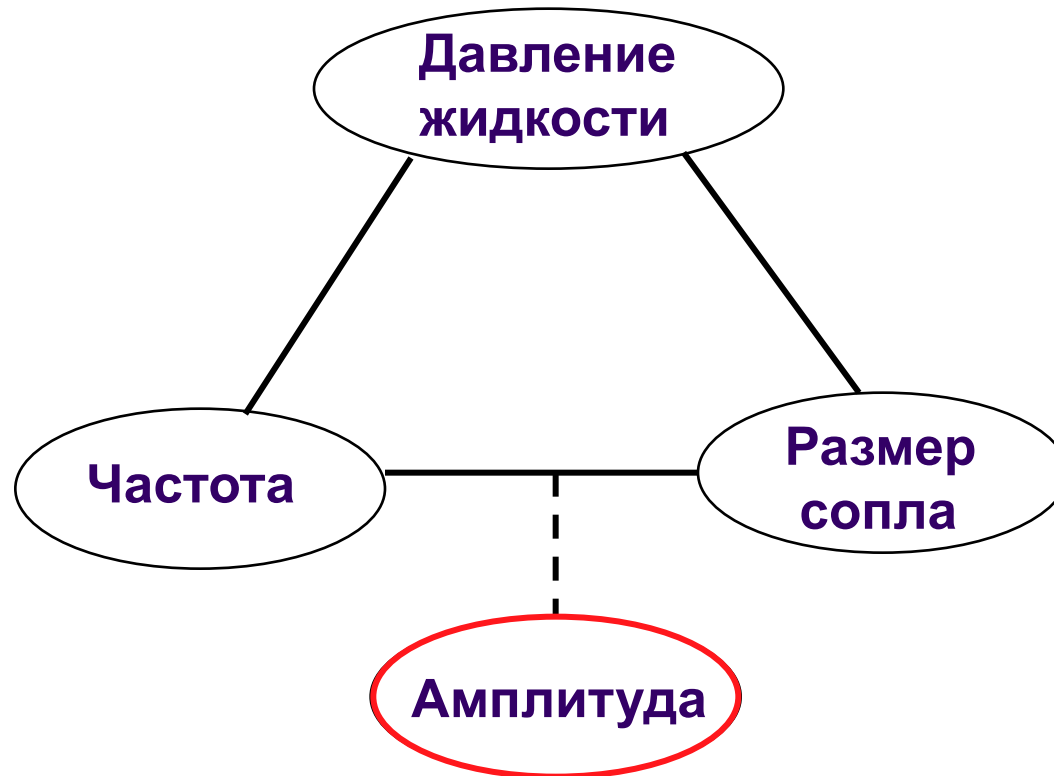
Критические параметры сортировки:



1. Точка пересечения
2. Частота вибрации
3. Амплитуда
4. Точка разрыва струи
5. Первая капля
6. «Задержка» капли (drop delay)

# Стабильность струи

Стабильность струи (при постоянной температуре помещения) зависит от правильного соотношения между 4 параметрами:



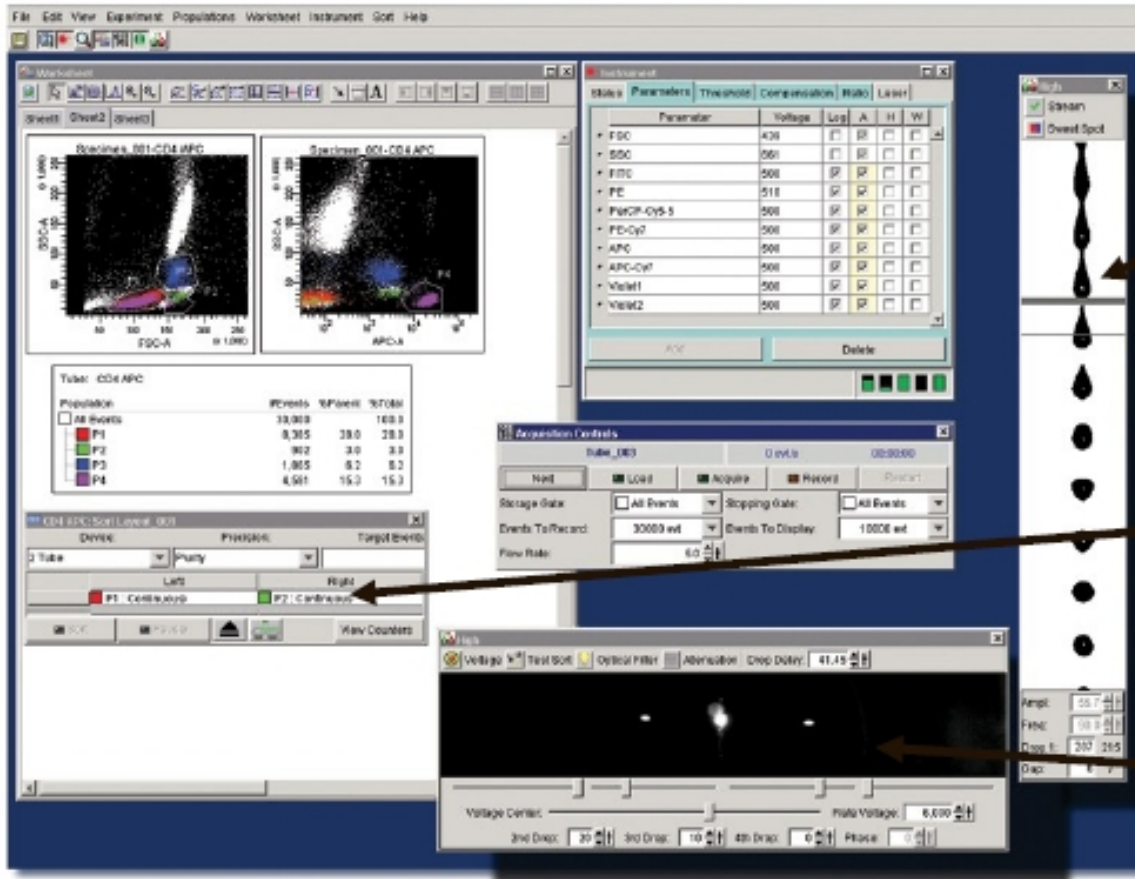
# Дисплей FACSAria

All displays are on  
Computer screen

Drop break off  
Display

Sort control

Real-time sort  
deflection display



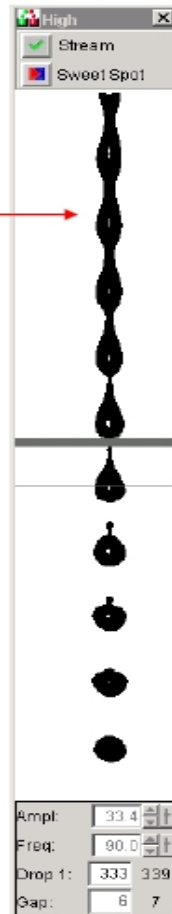
# FACSARIA - ВИД СТРУИ

BD FACSAria

Still-connected droplets

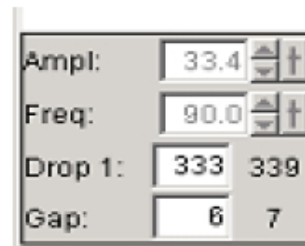
Last connected droplet (drop breakoff)

Drop drive frequency and amplitude should be optimized for every instrument, but should be quite stable over time once they are set up.



Gap between last and second-to-last connected droplet

Distance between drops



Drop drive amplitude

Drop drive frequency

Distance from laser intercept to last connected droplet

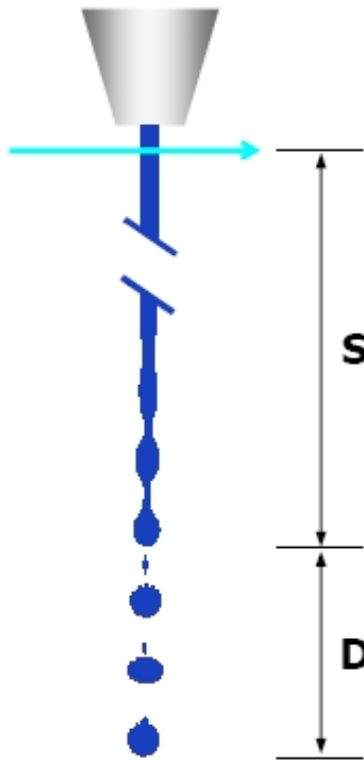
Joe Trotter,  
BD Biosciences



# Оптимизация процесса формирования капель

*Good long-term drop stability is essential*

- 1. Pick a “good” resonance frequency*
- 2. Adjust the jet velocity (pressure)*



break off distance =  $S$   
drop period =  $1 / f$   
delay =  $S / \lambda$

$$D \quad v = D / (n \text{ drops} * \text{period})$$

$v$  = jet velocity

$f$  = frequency (ddf)

$d$  = nozzle diameter

$$1) f_{\text{opt}} = v / \lambda_{\text{opt}} = v / 4.5d$$

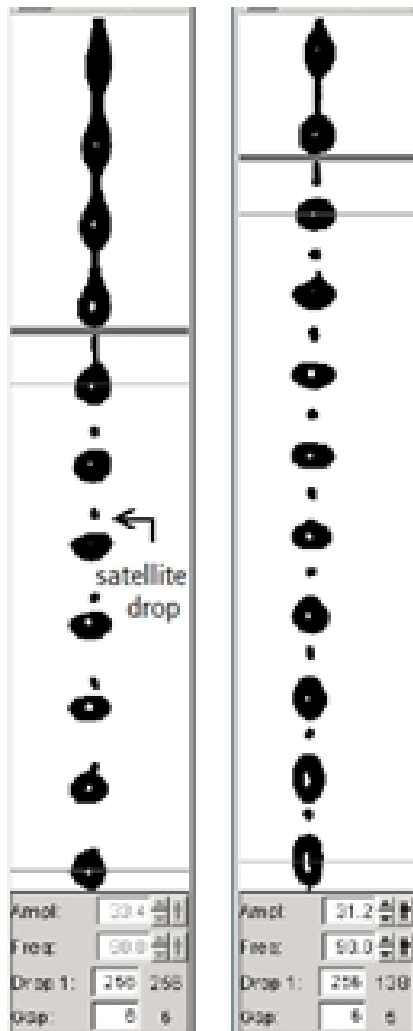
Optimal drop drive frequency may be calculated for any measured jet velocity based on  $\lambda_{\text{opt}}$ .

$$2) v = f_{\text{opt}} \cdot \lambda = f_{\text{opt}} \times 4.5d$$

Velocity may be optimized for any drop drive frequency .

# Вид капель в струе

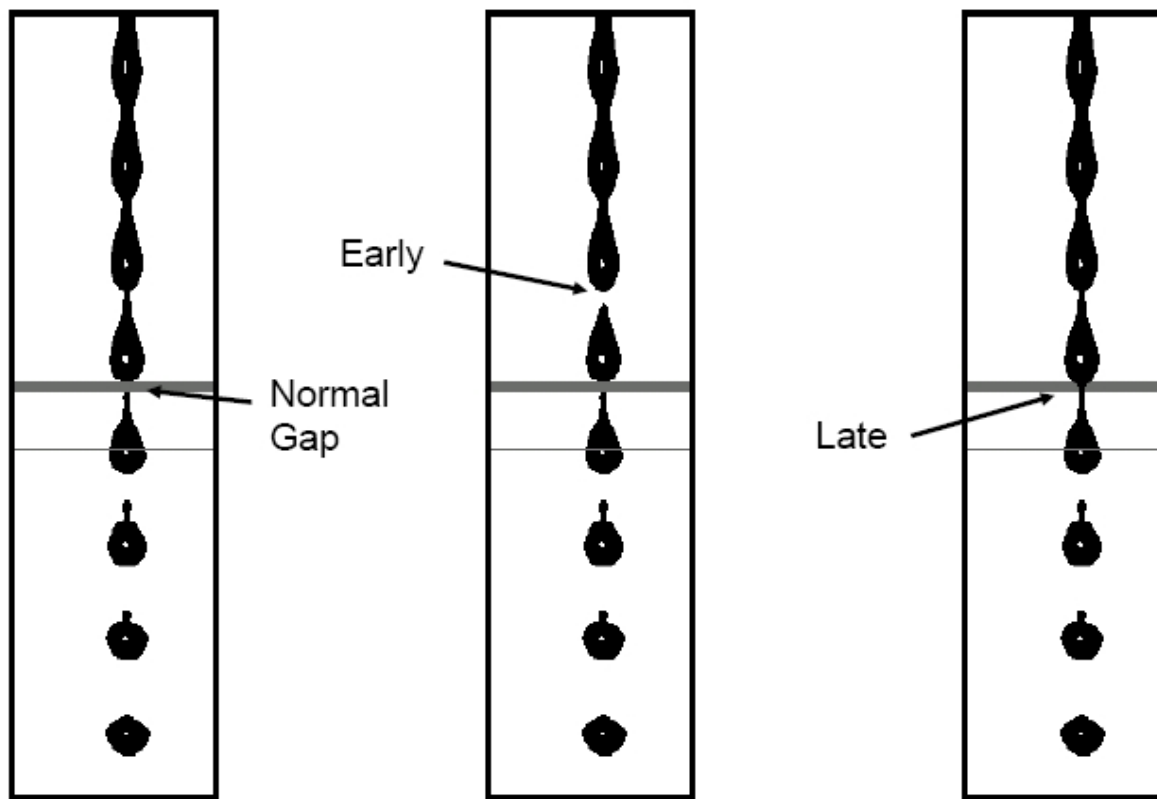
Remember to check the satellite drops.  
There should be only few of them, and they should be of the „fast“ type.



This is a bad example: Slow satellite drops will never merge and always give bad side streams.

It is of no use trying to sort with this kind of image!

# Настройка момента разрыва струи



# Какие сателлиты желательны?

## Drop formation & stability

Breakup of regularly distributed fluid jet.

$$\lambda_{\text{opt}} = 4.5d$$

$$\lambda_{\text{min}} = \pi d$$

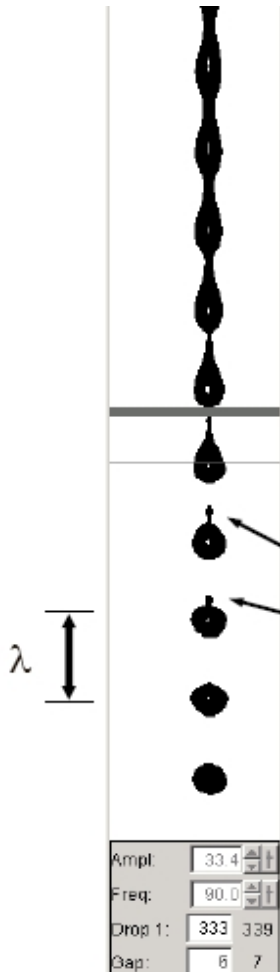
**Flow Cytometry: *Instrumentation and Data Analysis***, edited by Marvin A. Van Dilla, Phillip N. Dean, Ole D. Laerum, and Myron R. Melamed, pp 101-104, p 87, (Chapter by Pinkel and Stovel), Academic Press, 1985.

The wavelength of the drops is a major factor in sort stability.

The jet diameter contracts somewhat and is .88 to .98 the nozzle diameter depending on jet velocity

“Fast” satellite droplets (upper connection breaks off before lower one – usually more desirable than “slow” merging satellite droplets)

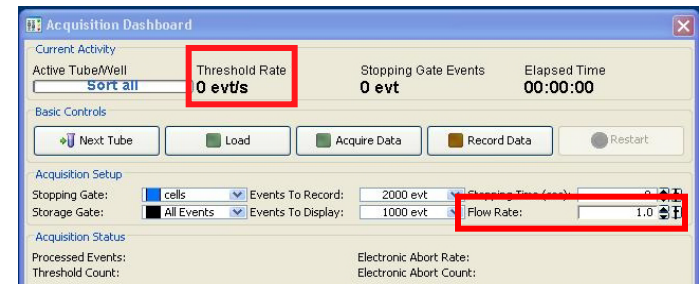
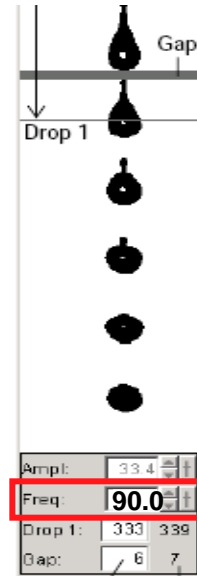
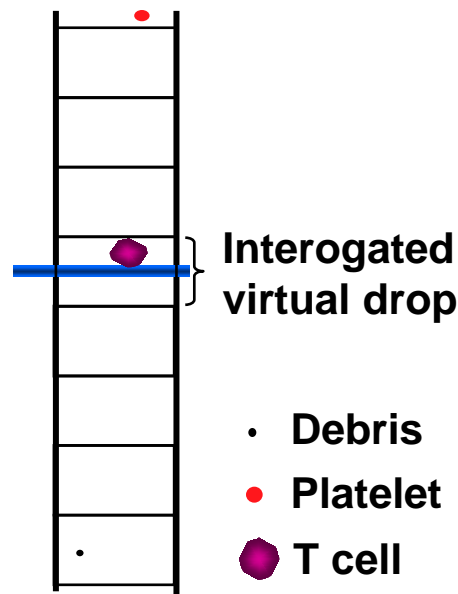
- Surface tension causes recently formed ellipsoidal drops to eventually become spherical downstream
- Buffers with different surface tensions can affect droplet break-off behavior



# Проблема накладывающихся событий

Чтобы уменьшить частоту совпадений, необходимо правильно подобрать частоту сортируемых событий.

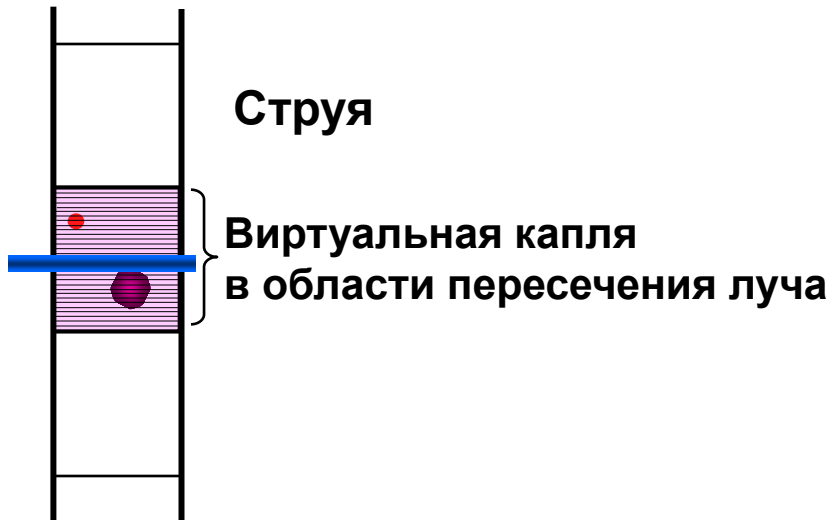
- максимальная скорость сортировки – не более  $\frac{1}{4}$  тактовой частоты
- скорость подачи образца – не более  $\frac{2}{3}$  максимальной



# Анализ виртуальной капли

Для настройки режима сортировки используется специальная маска - “Sort-Mask” которая позволяет локализовать клетку и проверить соответствие виртуальной капли выбранной стратегии гейтирования.

Маска разделяет каждую виртуальную каплю на 32 части (по высоте), и прибор анализирует каждую часть. Решение о «принятии» или «отклонении» всей капли принимается в соответствии с выбранным режимом сортировки.



# **Лекция 6**

**И.А.Воробьев**

**Флуоресцентно активируемая  
сортировка клеток (FACS)**

**Приложения проточной цитометрии**

# **Задержка капель**

**В тот момент, когда клетка анализируется (пересекает лучи лазеров), она находится далеко от точки зарядания капель.**

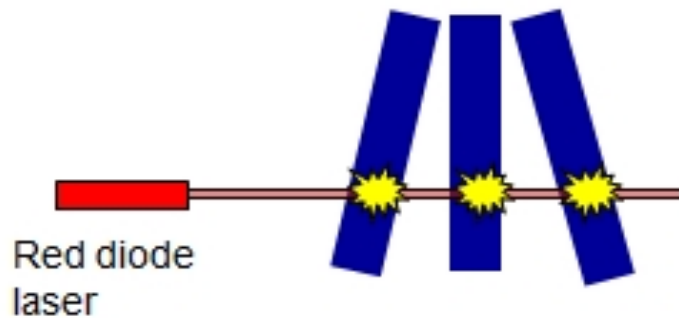
**Поэтому информация о заряде капли должна задерживаться до тех пор, пока проанализированная клетка не пройдет точку разрыва струи и не попадет в каплю, которая будет правильно заряжена.**

**Установка времени задержки является начальным этапом настройки сортера.**

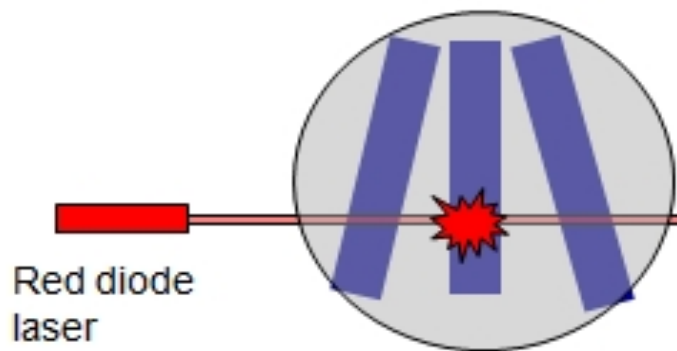
**Качество сортировки определяется в первую очередь точностью установки времени задержки.**



# Использование частиц Accudrop



Without filter, the AccuDrop camera shows a picture of the streams with the intercept points of the laser.

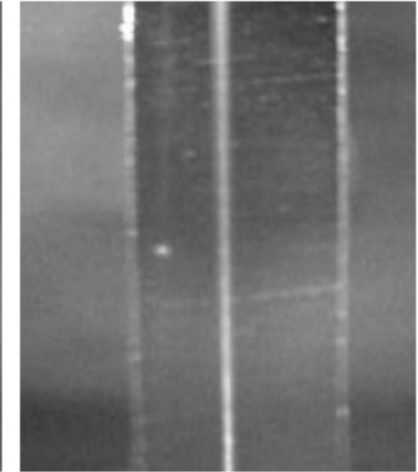
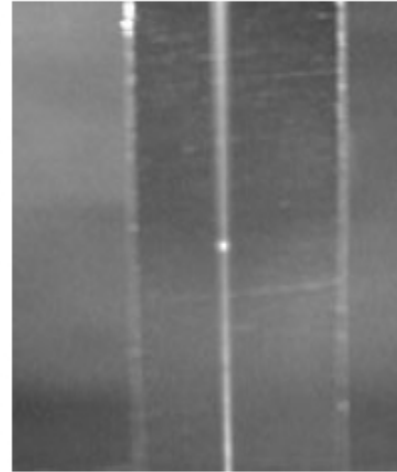
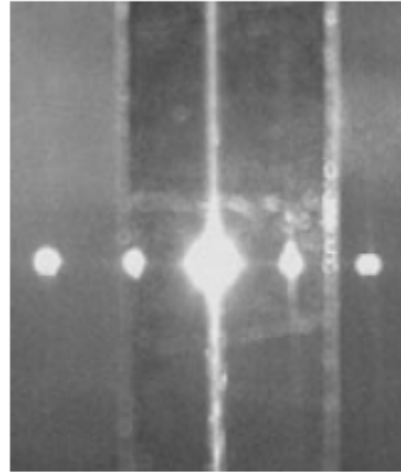
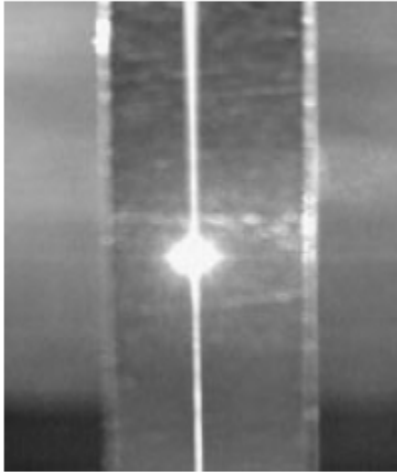


With the filter in place, only the fluorescence signals of the AccuDrop beads can be seen on the screen.

# Настройка задержки капель с помощью частиц Accudrop

Красный лазер без светофильтра

Красный лазер с введенным светофильтром



1) Illuminate stream with 670nm diode laser.

2) Optimize phasing using max. drops in deflection envelope, use 2.0 for 1.4 drops.

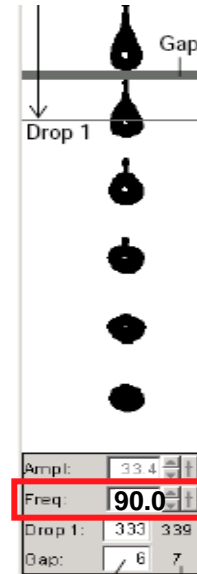
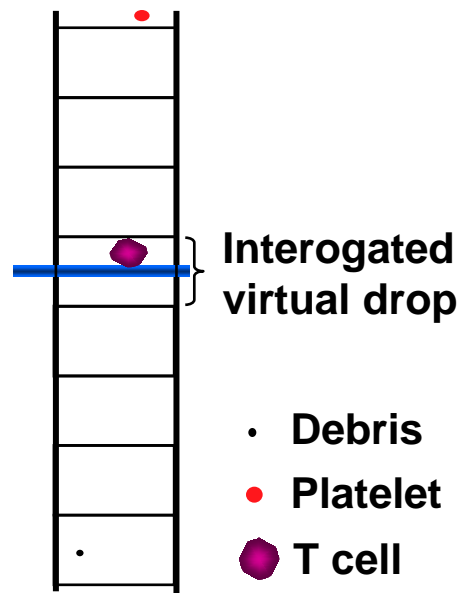
3) Run blue beads and set drop envelope to 1.0 drop.

4) Optimize drop delay to get beads into side stream and out of center stream.

# Проблема накладывающихся событий

Чтобы уменьшить частоту совпадений, необходимо правильно подобрать частоту сортируемых событий.

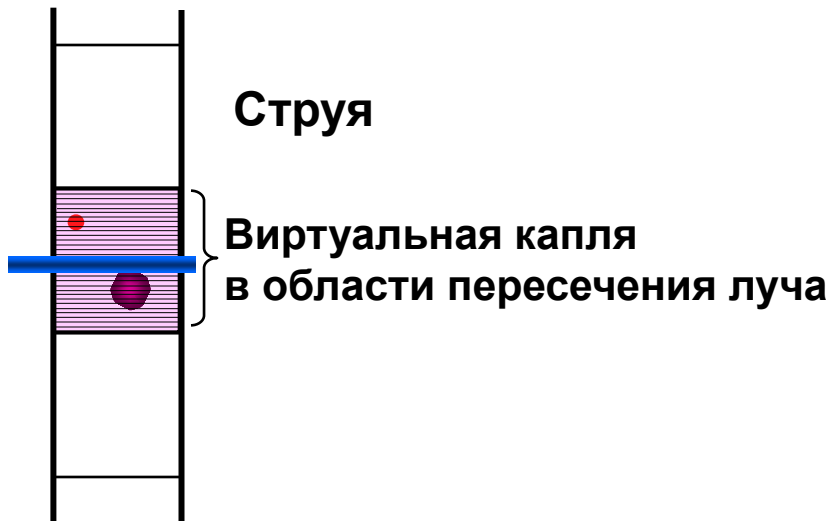
- максимальная скорость сортировки – не более  $\frac{1}{4}$  тактовой частоты
- скорость подачи образца – не более  $\frac{2}{3}$  максимальной



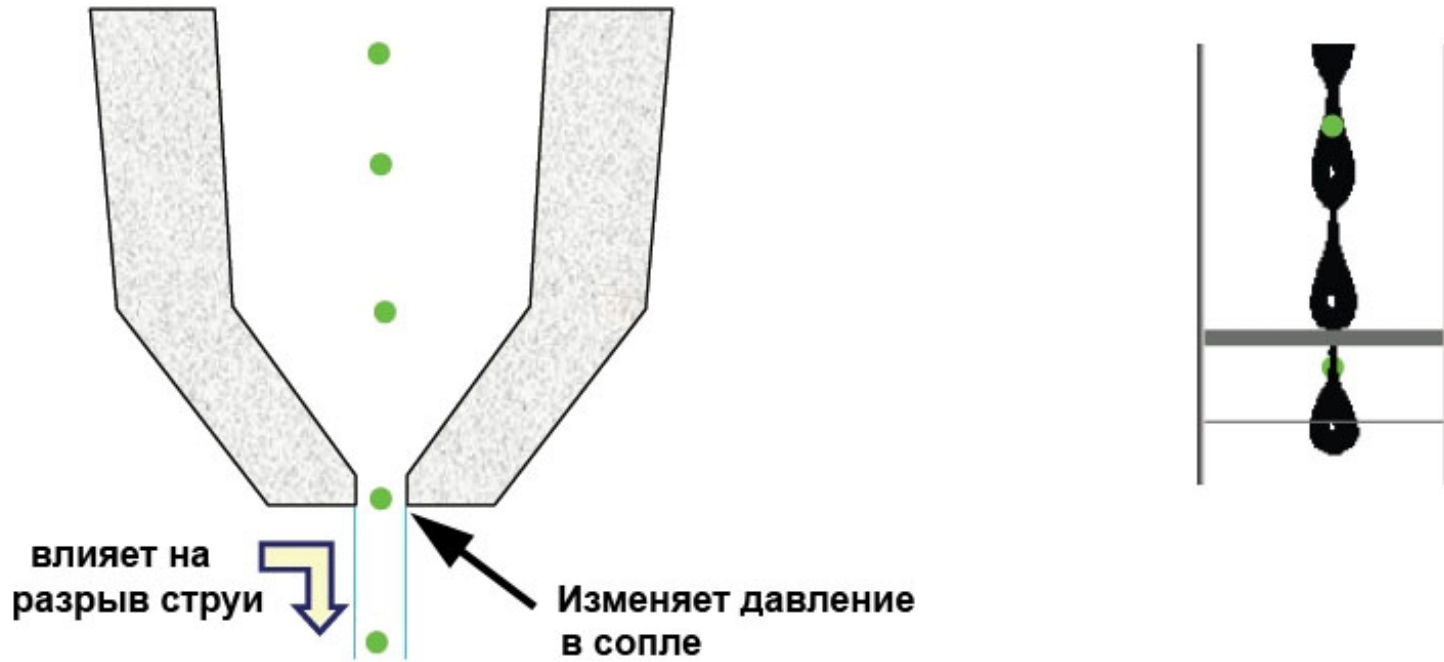
# Анализ виртуальной капли

Для настройки режима сортировки используется специальная маска - “Sort-Mask”, которая позволяет локализовать клетку и проверить соответствие виртуальной капли выбранной стратегии гейтирования.

Маска разделяет каждую виртуальную каплю на 32 части (по высоте), и прибор анализирует каждую часть отдельно. Решение о «принятии» или «отклонении» всей капли принимается в соответствии с выбранным режимом сортировки.



# Влияние клеток (частиц) на формирование капель



Клетка, проходя через сопло, меняет давление и скорость потока, влияя на работу осциллятора. Кроме того, клетка влияет на процесс формирования капли в области разрыва струи. Оба эффекта нелинейно зависят от соотношения размеров клетки и сопла. Все вместе может приводить к увеличению размеров капли и, в результате этого, ее непопаданию в пробирку. Допустимый диаметр клетки – не более  $1/5$  диаметра сопла.

# **Влияние частиц (клеток) на формирование капель**

**Клетки влияют на процесс формирования капель двояким образом:**

- 1. проходя через отверстие, они изменяют локальное давление и скорость, нарушая ламинарность потока**
- 2. сама клетка влияет на формирование капли, в составе которой она оказывается, в особенности когда она оказывается вблизи точки разрыва капель**

**В результате заряженные капли, содержащие клетки, могут отклоняться от основной траектории.**

**Поэтому для устойчивой сортировки размер отверстия сопла должен быть по крайней мере в 5 раз больше максимального размера сортируемых клеток (желательно – в 6 раз, недопустимо, когда соотношение менее 4).**

# Размер сопла

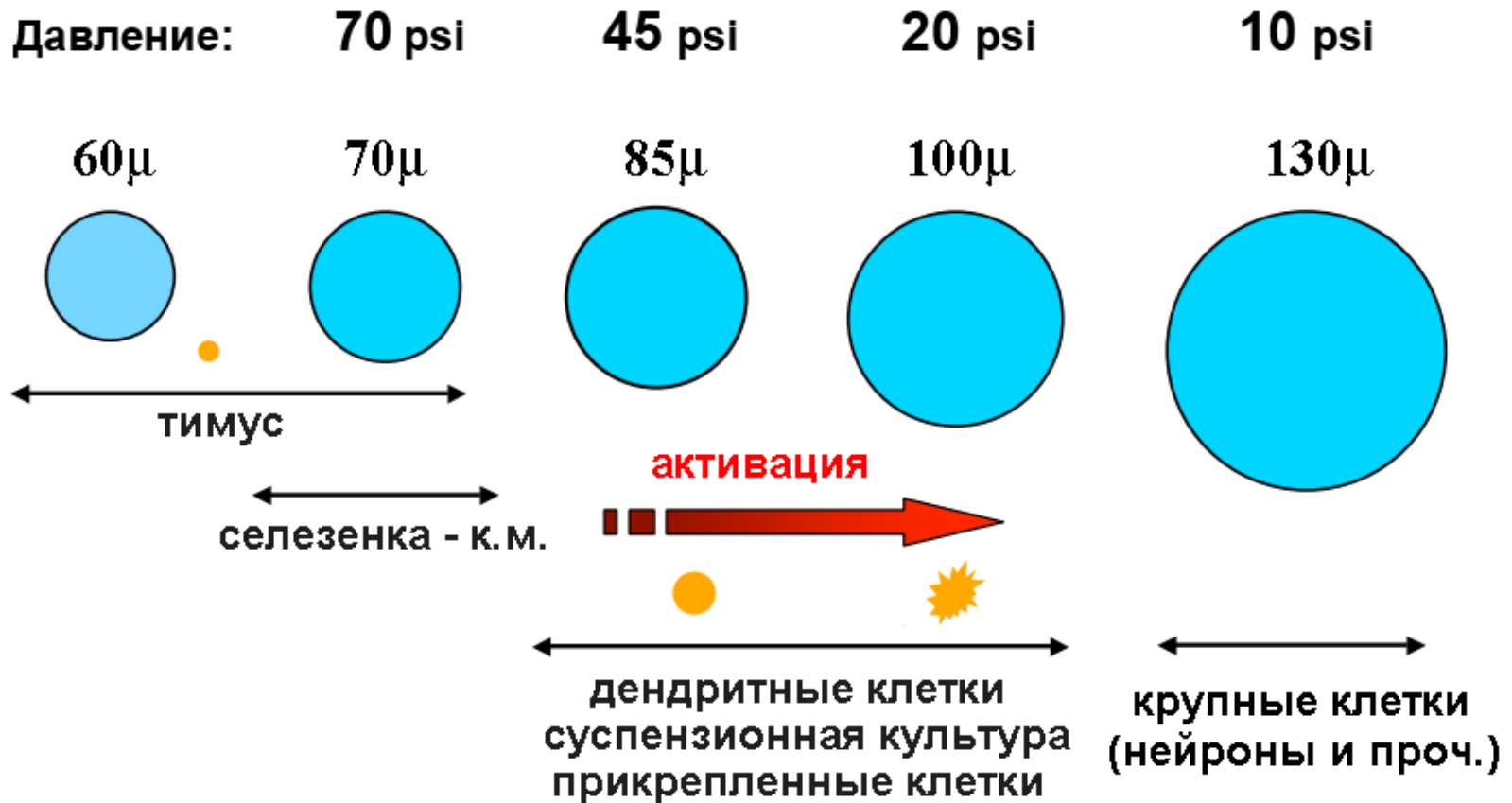
**Размер сопла определяется максимальным диаметром клеток – он должен быть примерно в 5 раз больше. Соответственно для лимфоцитов – 70 мкм. Для культивируемых клеток стандартным является 85 мкм (в старых приборах – 100 мкм). Максимальный размер клеток определяется тем, что они деформируют каплю. Поэтому предлагаемый в некоторых описаниях размер до 1/3 диаметра сопла является грубым преувеличением.**

**Переход от сопла диаметром 70 мкм к 85 мкм замедляет скорость сортировки примерно вдвое за счет снижения давления. Переход к 100 мкм дает еще двукратное замедление. На практике скоростные сортеры не могут работать с соплом более 130 мкм из-за возникающей нестабильности давления в струе омывающей жидкости.**

**Нестабильность давления является следствием того, что само давление необходимо снижать, чтобы избежать большого расхода омывающей жидкости и излишней скорости осевой части потока.**

**Альтернатива – большие клетки и низкое давление/скорость, или мелкие клетки и высокое давление/скорость.**

# Выбор размера сопла



Размер сопла определяется диаметром клеток, но он определяет давление в камере, а, следовательно, частоту образования капель и скорость сортировки.



# Выбор сопла

**Частота образования капель определяет скорость сортировки**

**Диаметр сопла и давление жидкости влияют на выживаемость клеток после сортировки**

**Чем более активны клетки функционально (пролиферация, фагоцитоз, продукция цитокинов и т.п.), тем более хрупкими они являются. Особенно хрупкими являются опухолевые клетки.**

**Примерное соотношение сопла, давления и частоты (FACSAria):**

<b>Диаметр сопла, мкм</b>	<b>Давление (psi)</b>	<b>Частота (КГц)</b>
<b>70</b>	<b>70</b>	<b>87</b>
<b>85</b>	<b>45</b>	<b>47</b>
<b>100</b>	<b>20</b>	<b>30</b>
<b>130</b>	<b>10</b>	<b>12</b>

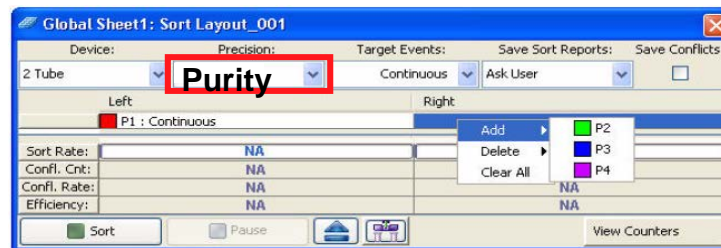
# Аккуратность сортировки

Статистическое снижение ошибок (максимальная частота:  $\text{Frequency} / 4 = \text{maximum Flow Rate}$ ) не может устранить их полностью.

Два типа ошибок:

1. Посторонние частицы попадают в каплю (недостаточная чистота)
2. Клетка не попадает в сортируемую каплю (недостаточный выход)

Единственной наилучшей стратегии нет, но есть выбор между различными вариантами. Для оптимизации сортировки необходимо максимально точно идентифицировать положение клетки по отношению к будущей капле и принять решение. Цифровые машины позволяют это сделать.



# **КПД сортировки**

**Не все клетки, потенциально попадающие в выделенное окно, собираются сортером.**

**Сортером всегда «отклоняются» близко расположенные (в струе) клетки, которые могут попасть в одну каплю.**

**Поэтому существуют несколько настроек сортера, из которых принципиальными являются две: максимальный выход (maximal yield) и максимальная чистота (maximal purity) фракции.**

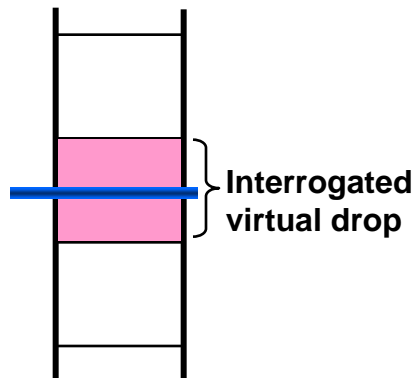
# Настройка варианта сортировки

BD FACSAria™ предлагает 6 вариантов настройки:

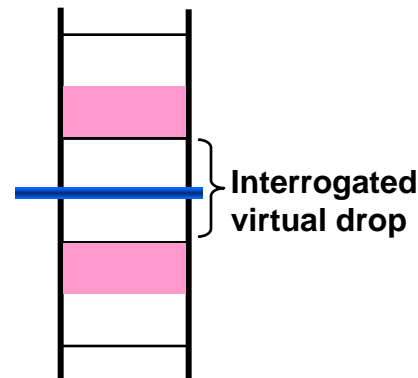
Наименование	Задачи	Возможные неудобства
<b>Initial</b>	Ручная или автоматическая настройка Drop Delay: 1 <sup>st</sup> adjustment	/
<b>Fine Tune</b>	Ручная или автоматическая настройка Drop Delay: Fine Tuning	/
<b>Purity</b>	Максимально возможная чистота фракции	Страдает эффективность (всегда менее <80%, как правило – не более 50%). Краевые струи часто плохо сфокусированы.
<b>Yield</b>	Эффективность приближается к 100%. Сортировка малых популяций – стволовые клетки, дендритные клетки и т.п.	Низкая чистота фракции (как правило, менее < 90-95%)
<b>4 Way Purity</b>	Режим аналогичен „Purity“, но крайние струи лучше сфокусированы.	Эффективность ниже, чем в режиме „Purity“
<b>Single Cell</b>	Сортировка в плашки. Удаляются все виртуальные капли, где клетки оказались близко к границе.	Значительные потери клеток! Краевые струи нестабильны!

# Как работают маски

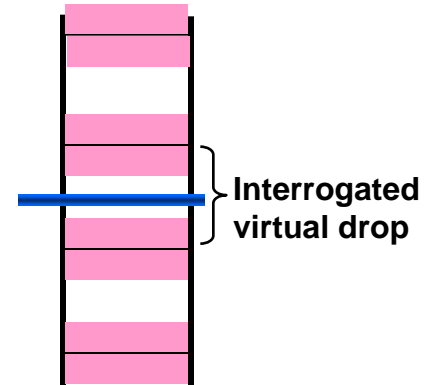
Yield-Mask



Purity-Mask



Phase-Mask



**Yield-Mask**: фокусируется только на самой виртуальной капле.

Обеспечивает сохранение клетки при сортировке, даже если она может выпасть из виртуальной капли.

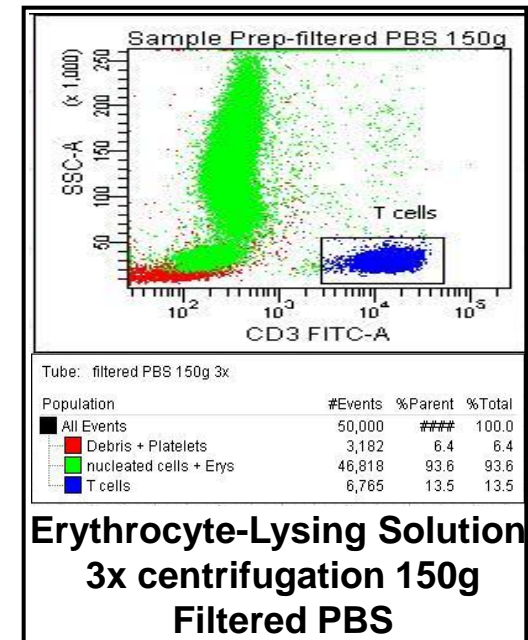
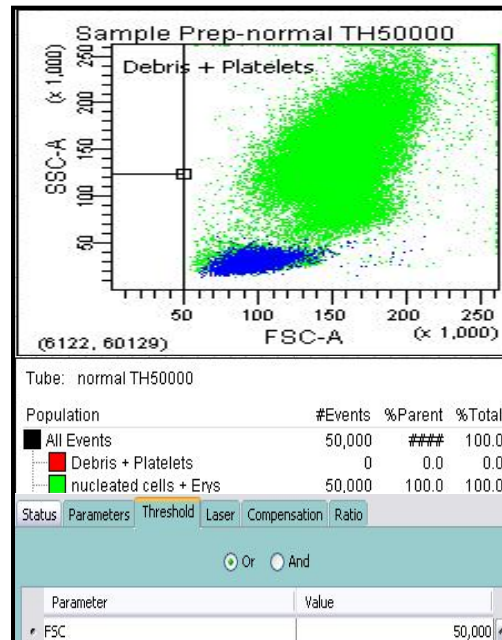
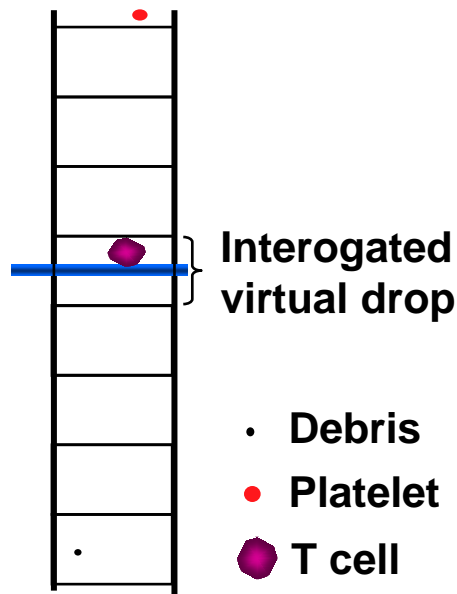
**Purity-Mask**: анализирует соседние виртуальные капли. Обеспечивает непопадание посторонних событий в каплю. Сомнительные капли всегда отклоняются.

**Phase-Mask**: анализирует соседние виртуальные капли. Отклоняются все виртуальные капли, где клетка располагается близко к границе.

# Настройка параметров для эффективной сортировки

Если частицы мусора являются «событиями», то они сильно замедляют сортировку. Чтобы уменьшить их влияние, можно:

- Увеличить порог FSC: все события под порогом становятся «невидимыми»
- оптимизировать подготовку образца: уменьшить содержание дебриса и мелких частиц (например, тромбоцитов), подобрать концентрацию клеток.



# Сортировка клеток

Скорость сортировки задается частотой образования капель – обычная (32 кГц, анализ до 10000 клеток в секунду) и высокоскоростная (95 кГц, до 30000 клеток в секунду)

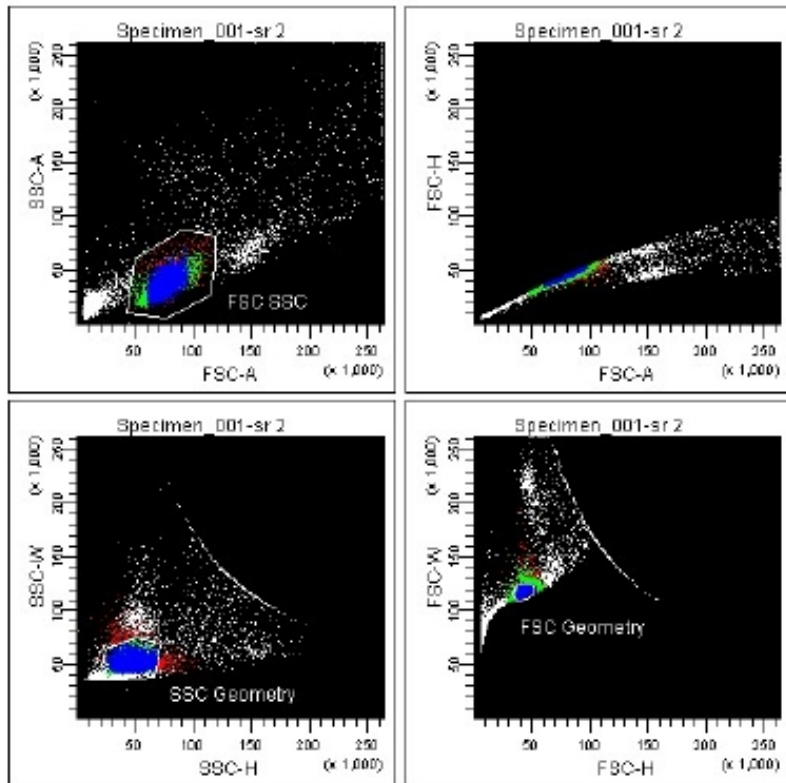
Эффективность сортировки определяется: скоростью; чистотой выделения клеток; временем, необходимым для сбора нужного числа клеток.

Скорость определяется потоком жидкости, чистота – способом выделения нужных капель и плотностью клеток в пробе; время – эффективностью сортировки.

Для эффективной сортировки подбирается оптимальная концентрация клеток в пробе (около 5-50 млн. на мл). Обычная продолжительность сортировки – от десяти минут до нескольких часов.

Подготовка сортера к работе – не менее 1 часа с момента запуска прибора (не менее 30 мин. на стабилизацию струи, настройка каналов сортировки – drop delay).

# Выделение одиночных событий



Одиночные события могут быть выделены за счет последовательного гейтирования:  
**FSC/SSC** для выделения живых клеток;  
затем **FSC-H/FSC-W** и **SSC-H/SSC-W** для отделения дуплетов

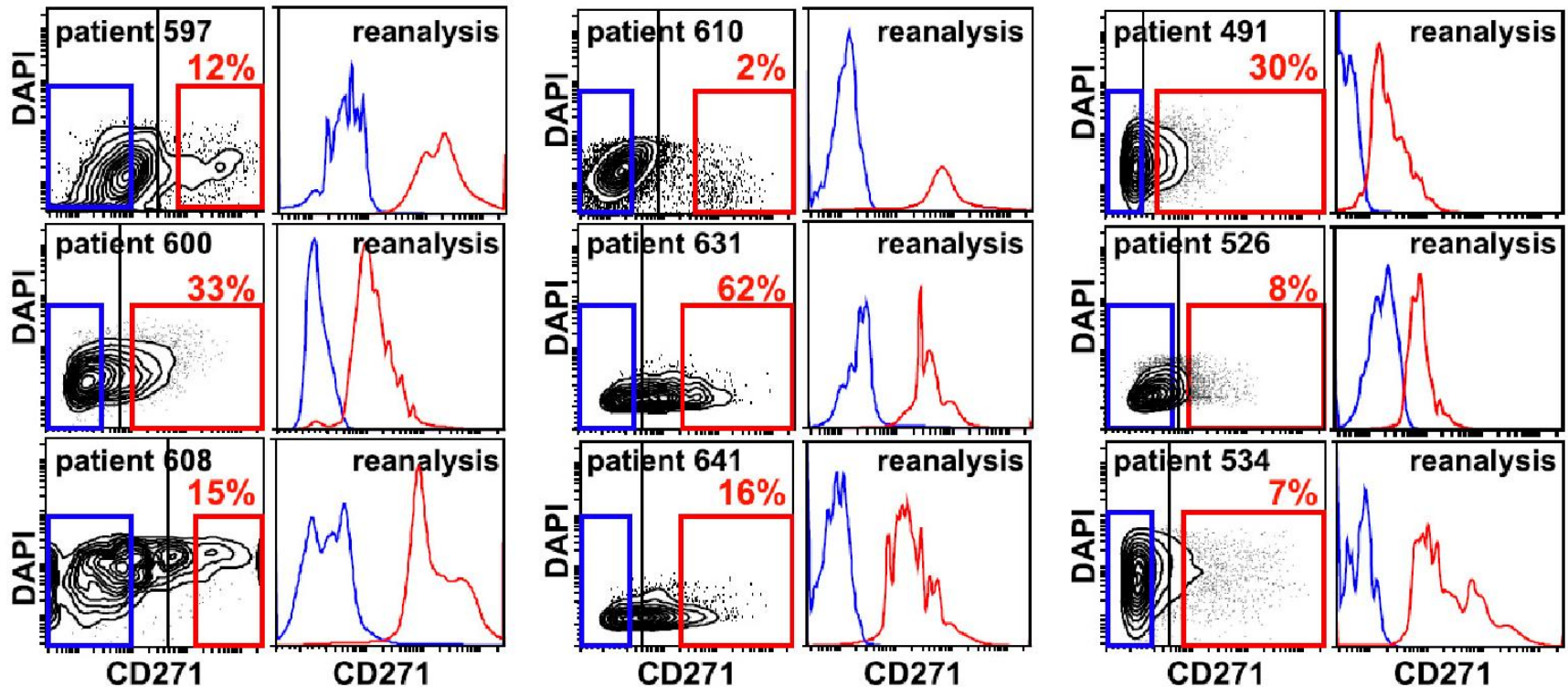
**Выделение по SSC-H/SSC-W** позволяет удалить повернувшиеся в потоке пары клеток.

Tube: sr 2

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	30,000		100.0
FSC SSC	22,025	73.4	73.4
SSC Geometry	21,350	96.8	71.2
FSC Geometry	19,950	93.4	66.5



# Анализ после сортировки



Образцы клеток меланомы. Расстояние между популяциями при анализе всегда меньше, чем между воротами для сортировки.

# Сортировка редких клеток

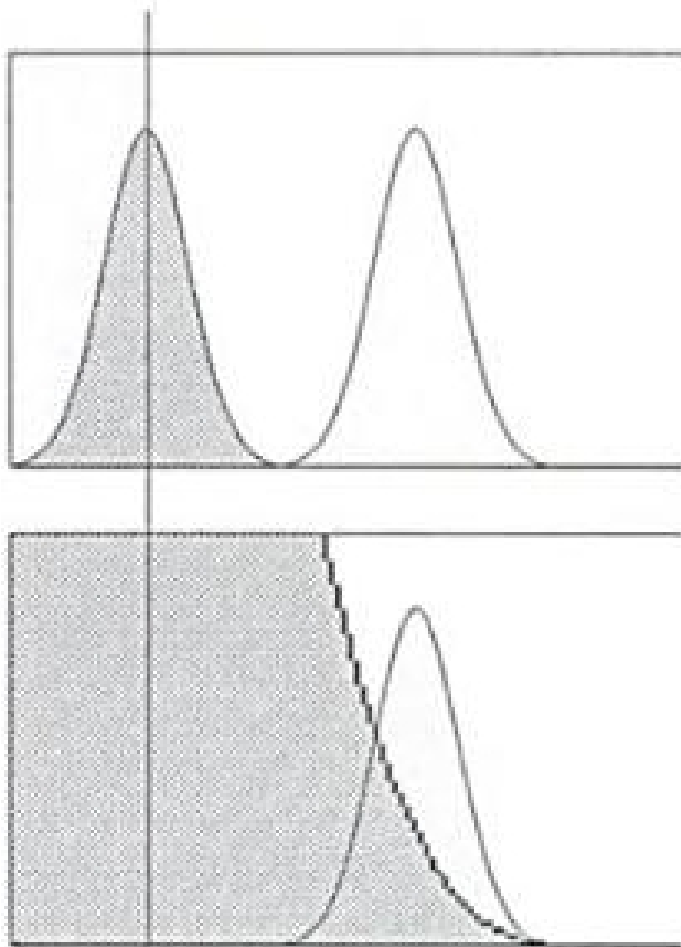
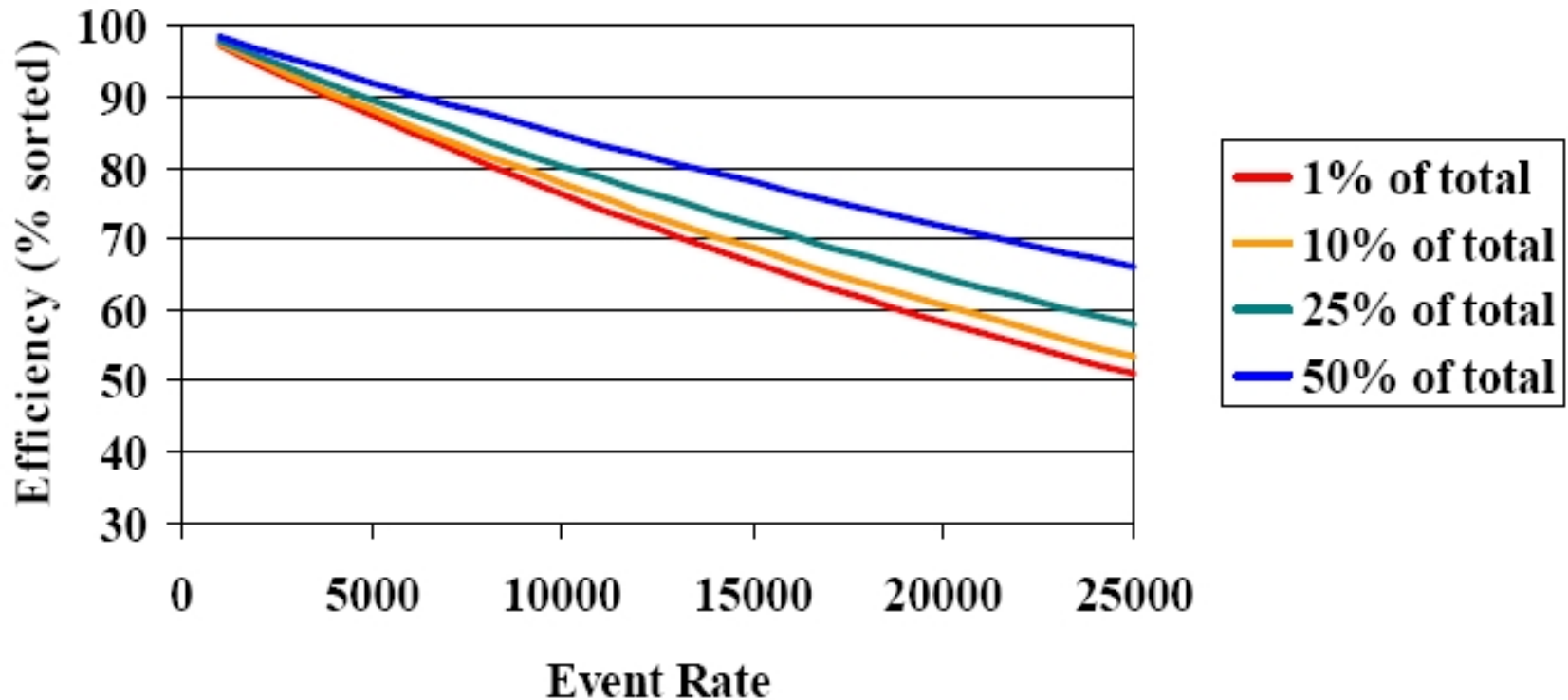


Fig. 1. Population overlap. This is one reason why rare cells are difficult to isolate. With regard to any parameter, discrimination between rare and the other cells depends not only on the difference in mean fluorescence but also on the CV of the major cell population, i.e. the shape of the fluorescence distribution (see → Kap. 03), as illustrated here. The broader the distribution of the major cell population, the more frequent are cells found in the area of the rare cell population, making it impossible to discriminate on the basis of that particular parameter. Defining a sort window must impair either purity or recovery of the selected cells. This overlap is minimized (a) by optimizing the staining conditions, i.e. maximizing the difference in mean fluorescence, (b) by preenriching the rare cells to increase their fraction in the sort window and (c) by using more than one discriminative parameter if possible (Fig. 3)

# Чистота сортировки зависит от скорости и величины фракции

Efficiency and Sorted Subset Frequency



# Rare population sorting – results

Table 1. Summary of sorting experiments with BT-20 cells

Parameter	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
Frequency of rare cells	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
Cells analyzed, no.	$1.3 \times 10^8$	$1.2 \times 10^8$	$1.2 \times 10^8$
Rare cells expected, no.	1300	120	12
Sort decisions, no.	154	27	23
Rare cells by UV microscopy, no.	127	17	5
Yield, %	10	14	40

At three different frequencies of rare cells, the number of recovered events are shown.

Gross *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995)

**Conclusion:** even using 4 colors the percentage of sorted cells and purity of their fraction comes down along with dilution (below 0.1%).

# **Редкие события труднее отсортировать**

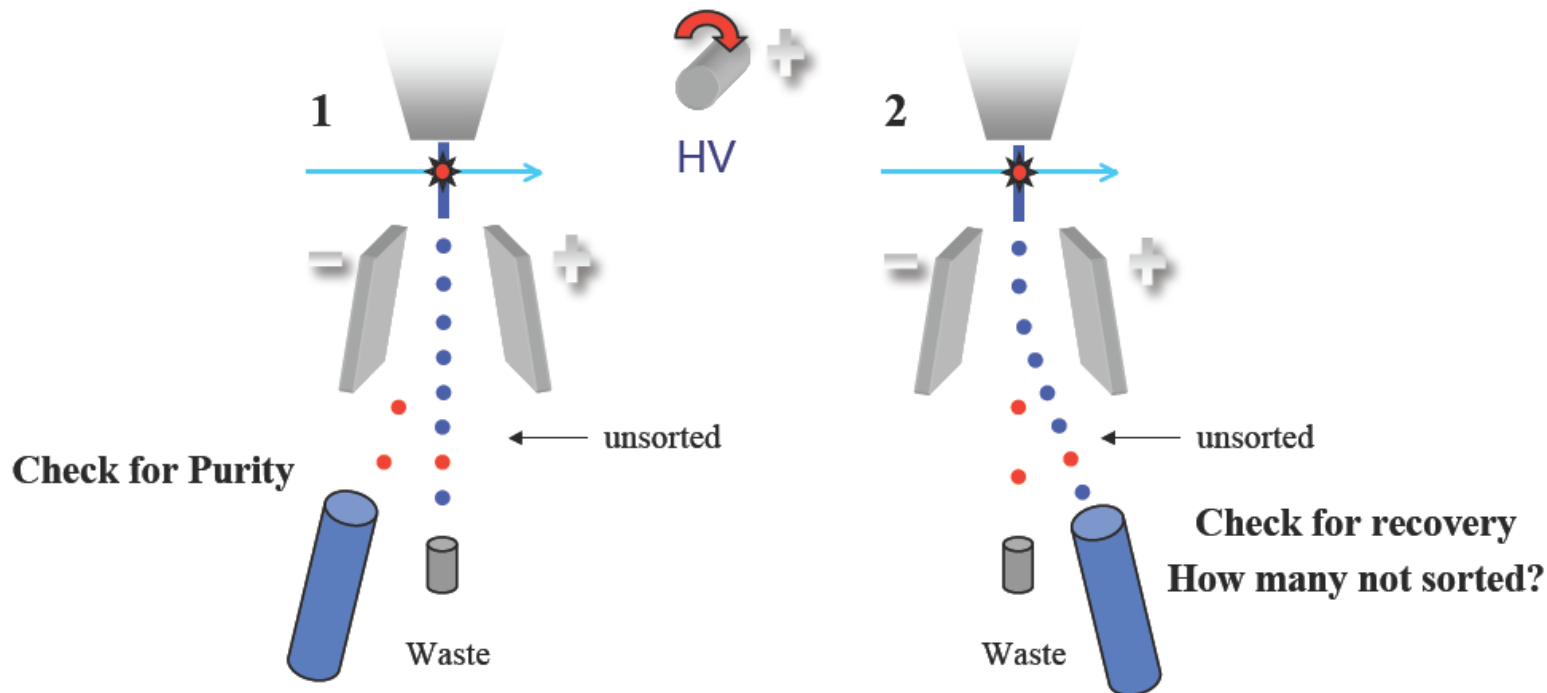
**Эффективность сортировки всегда уменьшается с увеличением скорости. Этот эффект проявляется в наибольшей степени при сортировке редких популяций.**

**При низком содержании клеток результаты мало предсказуемы – кроме низкого выхода, чистота фракции может очень сильно снижаться за счет ложных срабатываний.**

**Пороговым значением для сортировки с удовлетворительной чистотой считают содержание клеток в 0,01%.**

**На практике порог еще выше и составляет 0,02-0,03%.**

# Проверка результатов сортировки



Для оценки результатов сортировки проводят два сравнения: оценка чистоты фракции и оценка потерь при сортировке.

# Пробоподготовка для сортировки клеток

Клетки желательно перевести в среду с добавлением HEPES (10-25 mM) и использовать минимальные концентрации белка (сыворотки). В образец целесообразно добавить ДНКазу.

Из среды должен быть удален феноловый красный и, желательно, витамины для уменьшения автфлуоресценции.

В среде нежелателен кальций и магний, лучше – избыток ЭДТА.

Мертвые клетки следует, по возможности, удалить до начала сортировки.

Если их было много – препарат надо обработать ДНК-азой.

Образец обязательно надо профильтровать через сетчатый фильтр с диаметром пор 30-50 мкм.

Перед сортировкой мононуклеаров крови их следует очищать на градиенте фиколла/перколла после лизиса эритроцитов.

Если фракция невелика, желательно провести предварительное обогащение (магнитные частицы, градиент и проч.)

В пробирки для сбора клеток надо добавить полную культуральную среду, не зависящую от CO<sub>2</sub>.

# Возможности клеточного сортера

**Производительность** для лимфоцитов и др. малых клеток – до 10-15 тыс. событий в секунду (или 3-5 млн. клеток в час).

Для культивируемых клеток средних размеров (моноциты, фибробласты, клетки HeLa и им подобные) – до 2-3 тыс. событий в секунду.

**Продолжительность** сортировки составляет до 6-8 часов. Непрерывная работа сортера (в условиях термостатируемого помещения) может достигать 10 часов, но, как правило, она не превышает 3-4 часов.

**Количество** отсортированных клеток равно производительности прибора, умноженной на продолжительность сортировки, величину фракции и поправочный коэффициент (к.п.д. сортировки, в среднем составляет около 50%).

**Количество параметров**, по которым выделяют популяции клеток – до 18 (практически – без ограничений).

**Чистота отсортированной фракции** – зависит от точности выделения популяции и ее относительной величины. Для фракций объемом около 10% - 98% чистота достигается практически всегда, иногда выше (до 99,5%). Для фракций объемом менее 1% предельная чистота составляет 97-98%. Минимальный размер фракции, которую можно отсортировать с чистотой свыше 90%, составляет около 0,03%.

**Количество фракций**, которые можно одновременно отделять зависит от прибора. Для FACSAria – до 4 (с высокой степенью чистоты – не более 3).



# Форматы сортировки клеток

В пробирки (до 6 одновременно)

В планшет (96 луночный) – заданное число клеток в лунку.

На предметное стекло (заданное число клеток на точку).

Максимальное число сортируемых клеток, которые можно собрать, определяется размерами капель, в которых они находятся. В пробирку объемом 5 мл можно собрать около 1 млн. клеток при использовании сопла диаметром 85 мкм и около 2 млн. клеток при использовании сопла 70 мкм.

# Условия сортировки клеток

В описаниях рекомендуется сортировка клеток из ФФБ (PBS), иногда с добавлением 0,5% БСА. Это заведомо неоптимальные условия для жизни клеток, однако наиболее удобные условия для работы сортера. ФФБ можно использовать для сортировки лимфоцитов и аналогичных клеток, когда необходимо обеспечить максимальную скорость (на практике – около 15000 событий в секунду).

Для культивируемых клеток – сопло 85 мкм, среда – полная (но без сыворотки или с минимальной долей сыворотки), скорость – не более 6-8 тыс. событий (при хорошей гомогенизации суспензии). При наличии большой доли мертвых клеток скорость необходимо снижать.

Для предотвращения адгезии клеток пробу, где слипание клеток вероятно, целесообразно охлаждать (+4°C). Также охлаждаться может и приемник клеток.

# Условия успешной сортировки

## **Наша работа: наладка инструмента**

Юстировка лазеров

Проверка гидравлики и электроники (с помощью калибровочных и тестовых частиц)

Установка запаздывания между лазерами

Определение подходящего отверстия, соответствующего давления и частоты образования капель. Настройка струи.

## **Ваша работа (клиента) – все остальное:**

Подготовка образца

Получение суспензии клеток, удаление мертвых клеток и свободной ДНК, обогащение редкой популяции.

Раствор для работы с клетками (количество БСА, ФФБ или иной буфер и проч.)

Выбор красителей для минимального затекания между каналами и окраска препарата для получения максимального отношения сигнал/шум

Наличие всех необходимых контролей (ФМО) для правильной установки ворот

Контроли окрашивания

Стратегия гейтирования и сортировки (максимальная чистота или максимальный выход)

# Красители для КОНЪЮГАЦИИ

Краситель	Аналог 1	Аналог 2	Аналог 3
FITC	AlexaFluor 488		
PerCP	PerCP-Cy 5.5	PerCP-eFluor® 710 (eBio)	PE-Cy5.5
PE-TexasRed	Horizon PE-CF594 (BD)		
PE-Cy7	PE-H7 (BD)		
APC	AlexaFluor 647	eFluor®660 (eBio)	
AlexaFluor- 700	APC-AlexaFluor 700		
APC-Cy7	APC-H7 (BD)	APC-AlexaFluor 750	APC-eFluor®780 (eBio)
Pacific Blue	Horizon V450 (BD)	eFluor®450 (eBio)	BV421
AmCyan	Krome Orange (BC)	Horizon V500 (BD)	Pacific Orange

**Обозначения:** BD – BDBiosciences; BC – Beckman Coulter;  
eBio – eBioscience.

# Сортеры и проточные цитометры

## Проточные цитофлуоримеры:

- Приборы, позволяющие количественно и качественно различить клеточные популяции;
- Проанализированные клетки идут в слив;
- Наличие «карусели» для ввода образцов;
- В основном клинические приложения;
- Цена от 100 тыс. долларов;

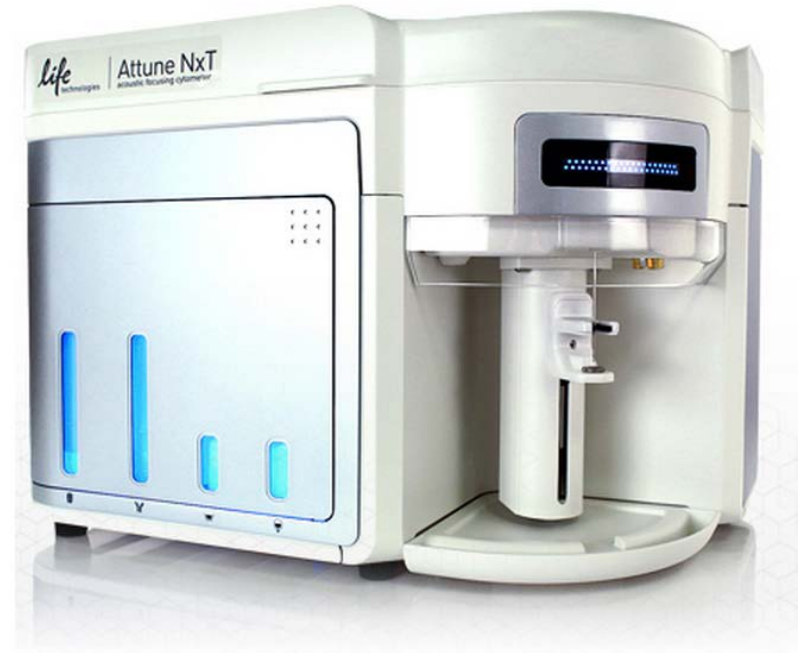
## Сортеры - анализаторы с модулем сортировки:

- Анализ, сортировка и сбор целевых образцов для дальнейших исследований;
- Один образец за один запуск;
- В основном научные приложения;
- Цена от 400 тыс. долларов.



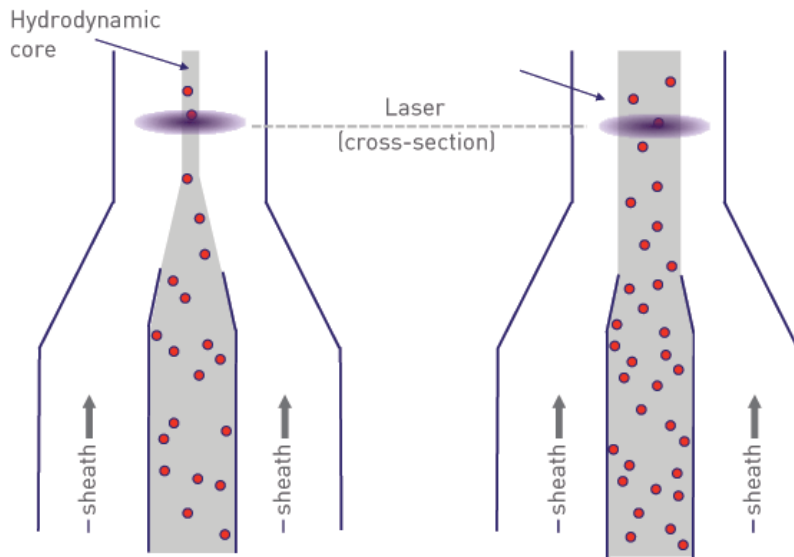
# Attune – акустическая фокусировка

**Акустическая фокусировка:**  
осевой поток создается звуковой волной (частота около 2 МГц), что позволяет создавать узкий поток с практически равномерными интервалами между клетками. В результате плотность клеток в потоке возрастает, и появляется возможность быстрого подсчета пробы (до 1 мл в минуту) без увеличения CV.  
До 4-х лазеров, до 14 каналов флуоресценции.

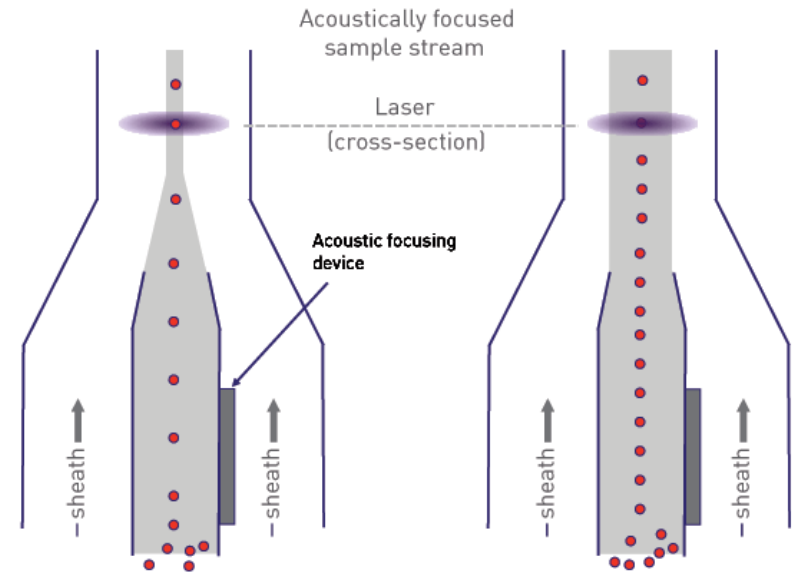


# Сравнение типов фокусировки

## Гидродинамическая фокусировка



## Акустическая фокусировка



# Accuri C6 – компактный цитометр



**Имеет 2 лазера (488 и 640 нм), FSC/SSC и 4 канала флуоресценции.**

**Достоинства: малые размеры и вес, быстрый запуск после установки, большой динамический диапазон ФЭУ, позволяющий не настраивать их напряжение, довольно высокая чувствительность (100 MESF for PE).**



# Guava EasyCyte™

**Компактный цитометр с капиллярной системой (без омывающей жидкости). Имеет до 3 лазеров (488, 642 и 405 нм) и до 10 каналов флуоресценции. Лазеры работают в импульсном режиме.**

**Производительность не указана.**

**Размер частиц – от 0,8 мкм**

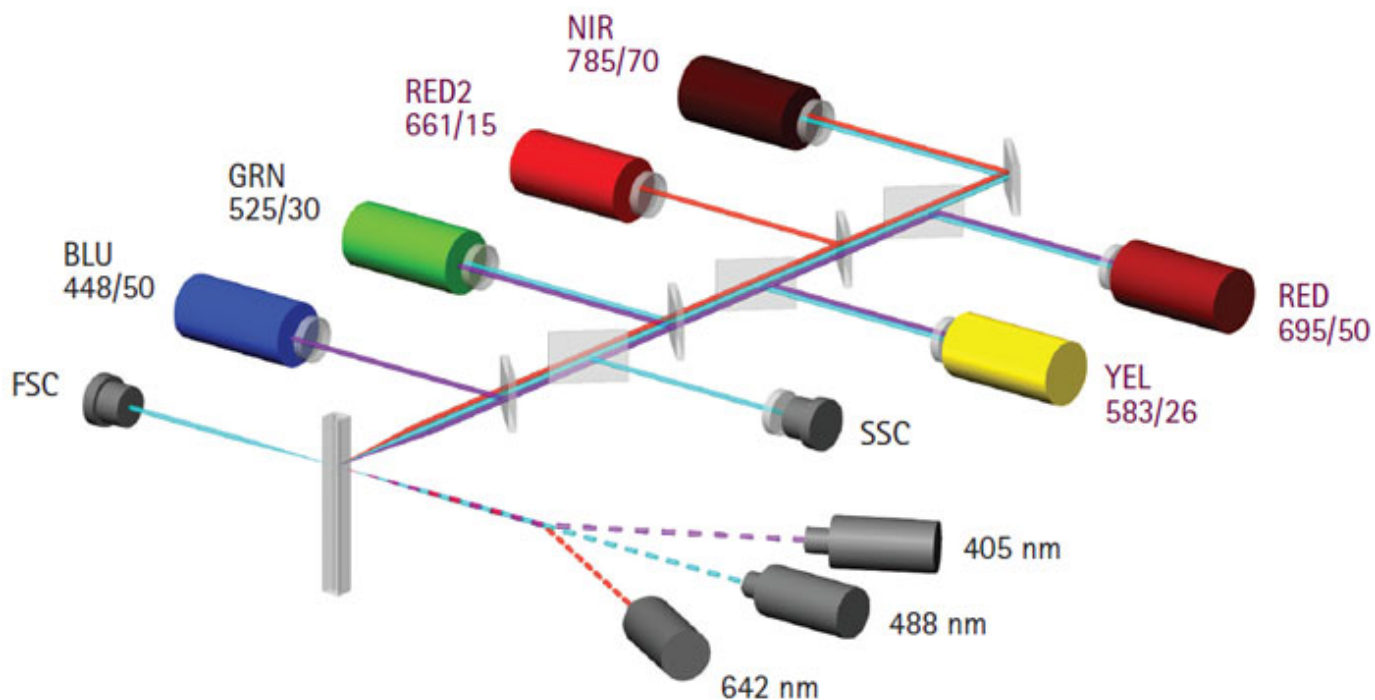
**Скорость – 7-72 мкл/мин.**

**Работа с планшетами и пробирками.**

**Компрессор для подачи жидкости внутри – забор пробы производится шприцем.**



# Оптическая схема easyCyte



Лазерные пучки сходятся в одном месте, сигналы регистрируются последовательно за счет перекрывания другого лазера. Упрощается настройка прибора, но требуется очень точная синхронизация работы лазеров и уменьшается чувствительность прибора.

Недостатки: частая промывка и замена капилляра, относительно низкая скорость счета, проблемы с использованием 96-луночных планшето́в.

# MACSQuant Analyzer

**3 лазера (488, 635 или 561, 405 нм); до 8 каналов флуоресценции.**

**Компрессор для подачи жидкости внутри – забор пробы производится шприцем.**

**Чувствительность – 100 MESF/PE**

**Размер частиц: 1-15 мкм.**

**Производительность – до 10000 событий в сек.**

**Скорости – 3 (25, 50 и 100 мкл/мин)**



# Partec CyFlow

**Сертифицированы для клиники**

**Семейство компактных приборов – до 4 лазеров (488, 638, 405, 561 нм) + UV LED; до 16 каналов флуоресценции. Забор пробы под давлением**

**Производительность – до 10000 событий в сек.**

**Скорости подачи образца меняются плавно (0-50 мкл/с)  
Есть подсчет абсолютного числа событий в пробе.**

**Переменная скорость обжимающей жидкости**

**Диапазон данных – 3-4 декады**



# Acea NovaCyte

**3 лазера (488, 640, 405 нм); до 12 каналов флуоресценции.**

**Забор пробы шприцем, без давления**

**Производительность – до 20000 событий в сек.**

**Скорости – 5-120 мкл/мин**

**Чувствительность (PE) - <50 MESF**

**Размер луча – 10x80 мкм**

**Диапазон 7 декад (24 бита), не нужна регулировка ФЭУ**



# Apogee A50 Micro

**До 3 лазеров (488, 635 или 532, 405 нм); до 12 каналов флуоресценции. Компрессор для подачи жидкости внутри – забор пробы производится шприцем с регулируемым объемом.**

**Есть возможность абсолютного подсчета клеток в каждой субпопуляции**

**Производительность – до 100 000 событий в сек.**

**Скорости подачи образца – от 0,7 до 200 мкл/мин**

**Представление данных – 5 декад (18 бит)**

**Анализ микрочастиц (от 140 нм)!**



# Fortessa X-20 (BD)

**4-5 лазеров (488, 635, 561, 405 нм); до 18 каналов флуоресценции.**

**Внешнее давление**

**Производительность – до 40000 событий в сек.**

**Забор проб – пробирки и планшеты (96 лунок)**

**Скорости – 3 ступени (25, 50 и 100 мкл/мин)**

**Представление данных – 4 декады**



# CytoFLEX (BC)

## Компактный прибор

До 4 лазеров (488, 561, 640 и 405 нм); до 13 каналов флуоресценции. Компрессор для подачи жидкости внутри – забор пробы производится шприцем.

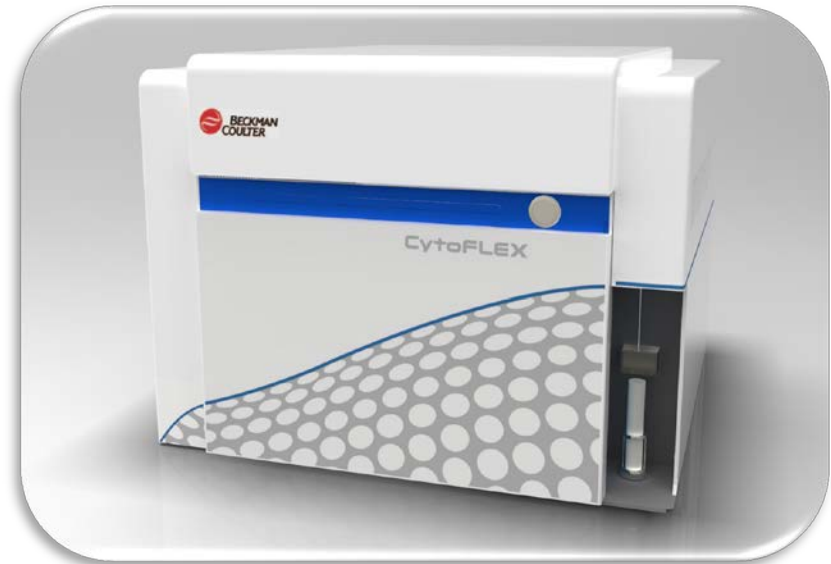
Чувствительность – 30 MESF/PE

Размер частиц: 0,2-15 мкм.

Производительность – до 5000 событий в сек.

Скорости – переменные, 10-240 мкл/мин

Представление данных – 7 декад





# Сортер S3: технические характеристики



Уровень чувствительности	До 100 000 событий/сек
Частота сортировки	До 30 000 событий/сек
Точность сортировки	>99%
Размер сопла	100 мкм
Направление сортировки	2 направления
Сбор отсортированного образца	до 5 пробирок 5 мл в каждом направлении
Предметные стекла	8-лучный стрип в каждом направлении
Лазеры	Основной: 488 нм 100 мВт Оptionальный: 561 нм 100 мВт
Детектирование	Прямое светорассеяние с ФЭУ Боковое светорассеяние с ФЭУ До 4 детекторов флуоресценции с ФЭУ Минимальное разрешение: 0,5 мкм
Рабочий диапазон температур	Система контроля температуры загрузочной платформы и зоны сбора отсортированного образца: 4 – 37°C
Струйная автоматика	Встроенная система струйной автоматки и восьмикратного разведения проточной жидкости деионизированной водой
Формат данных	FCS 3.1
Размеры (ШxГxВ)	2.3 x 2.1 x 2.1 футов (70 x 65 x 65 см)

**Применения проточной  
флуориметрии  
Лекция 7**

**И.А.Воробьев**

**Основные приложения метода**

# Области применения проточной флуориметрии

## Клеточная биология:

Определение ДНК для анализа фаз клеточного цикла

Поверхностные и цитоплазматические маркеры клеток

Кинетические исследования (определение фосфобелков и др. интермедиатов); анализ апоптоза.

Анализ внутриклеточных событий – поток  $Ca^{++}$ , митохондриальный потенциал

Экспрессия генов, эффективность трансфекции

## Диагностика:

Анализ популяций лейкоцитов, опухолевых и др. клеток

Анализ растворимых антигенов (с помощью специальных микросфер)

Микробиологический анализ

## Генетика:

Подсчет кариотипа - FISH

Сортировка хромосом

## Микробиология/ботаника:

Анализ микроорганизмов и водорослей

# Области применения сортировки (FACS)

## Клеточная биология:

Выведение стабильных клеточных линий с флуоресцентным маркером после трансфекции (трансдукции)

Сортировка клеток из гетерогенных популяций (исследование апоптоза, клетки на стадиях клеточного цикла, сортировка опухолевых клеток, стволовых клеток и проч.) для последующего клонирования и анализа (блоттинг, ПЦР, NGS, FISH, MALDI-TOF, анализ на микрочипах и др.).

## Генетика:

Сортировка хромосом

## Микробиология/ботаника:

Сортировка популяций микроорганизмов и водорослей

# **Анализ содержания ДНК**

**Анализ проводится на минимальной скорости. Желательно использовать прибор с большим размером лазерного пучка (например, FACSCalibur дает результаты лучше, чем FACSAria).**

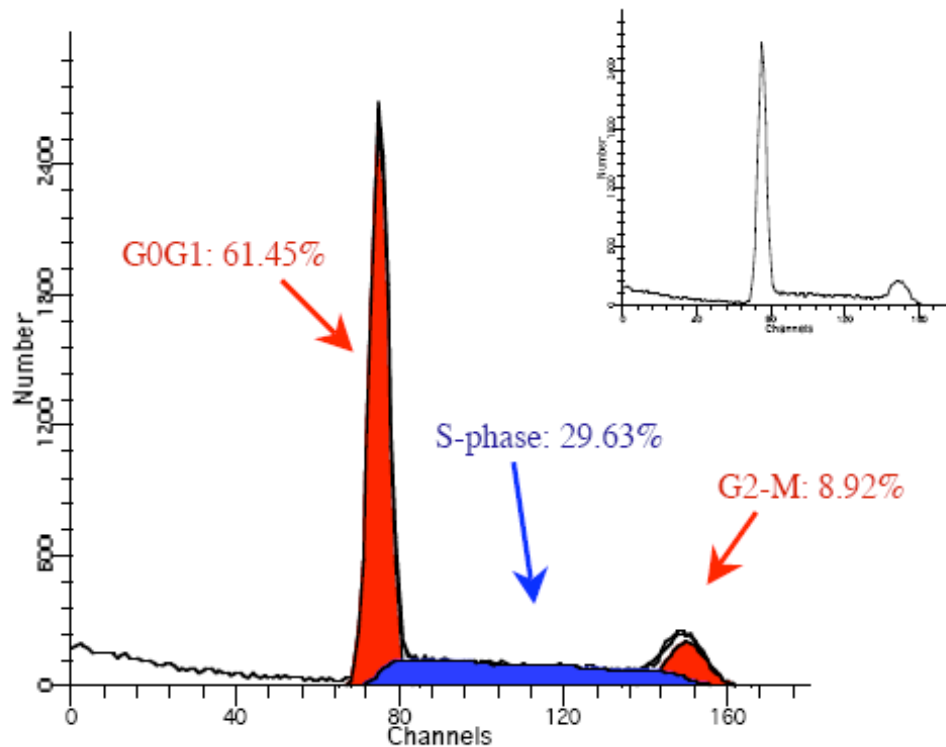
**Шкала для определения содержания ДНК – только линейная.**

**Фиксация образца – холодным 70% этанолом (требует определенного искусства).**

**Необходимо тщательно очистить клетки (или выделенные ядра) от примеси РНК. Лучше использовать выделенные ядра.**

**Анализ содержания ДНК на живых клетках (например, с помощью Hoechst 33342) часто дает недопустимо большие погрешности из-за наличия РНК, а также из-за работы мембранных насосов, откачивающих краску.**

# Определение фаз клеточного цикла

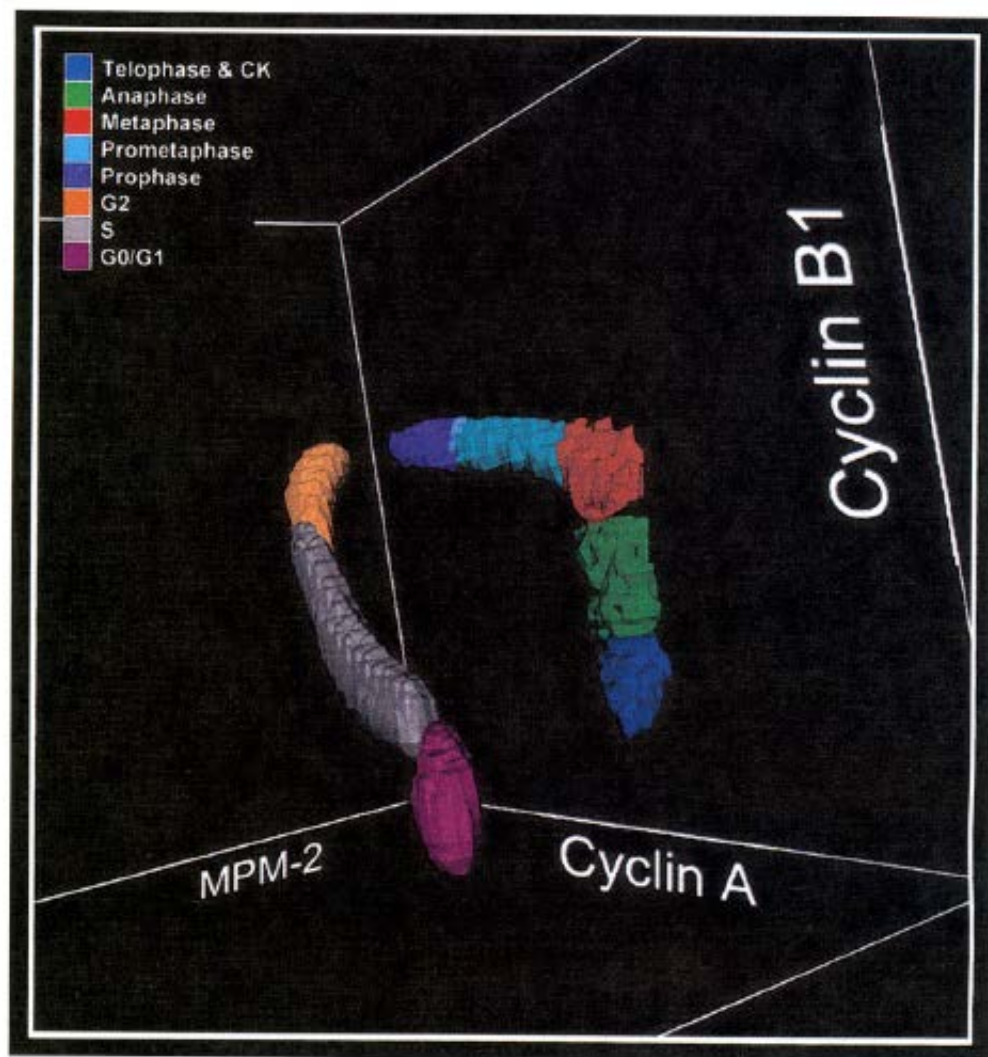


**Для приближенного анализа можно использовать отсечки.**

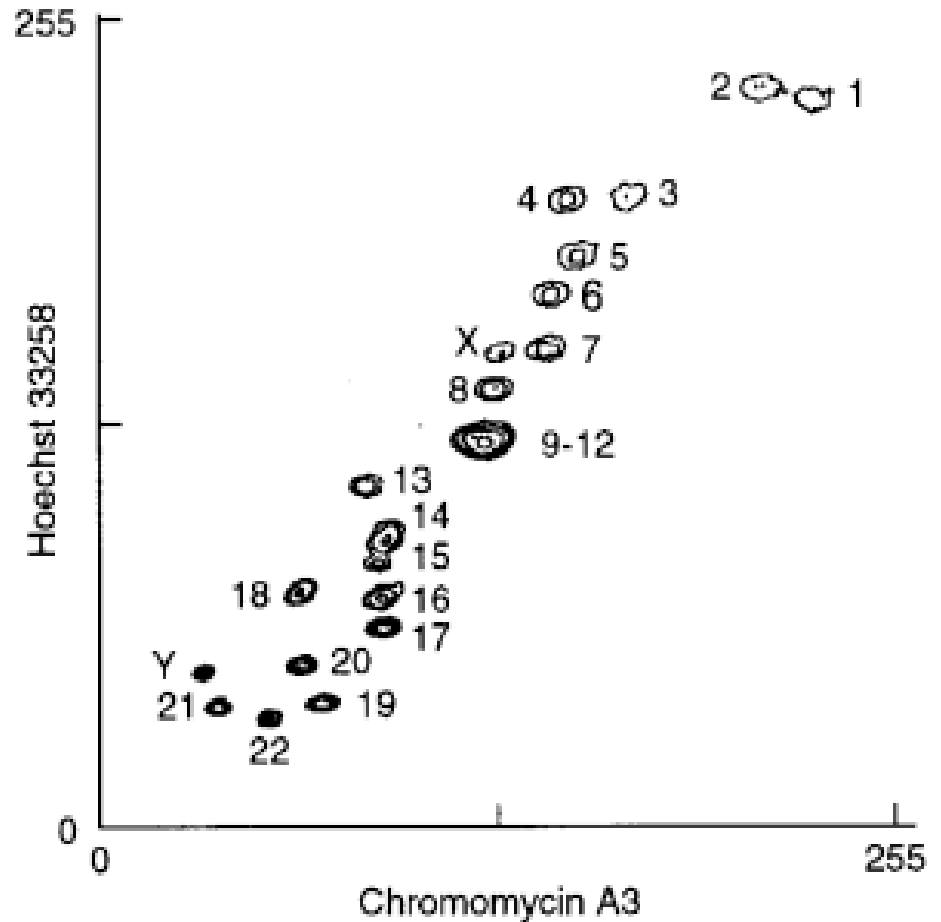
**Для точного анализа распределения по фазам цикла используется специальное программное обеспечение. Оно позволяет сгладить гистограмму и рассчитать доли клеток в G0/G1, S- и G2/M-периодах.**

**Анализ клеточного цикла в гетероплоидных культурах возможен только на качественном уровне!**

Трехпараметрическое  
окрашивание (MPM2 –  
Cyclin A – Cyclin B1) +  
анализ ДНК

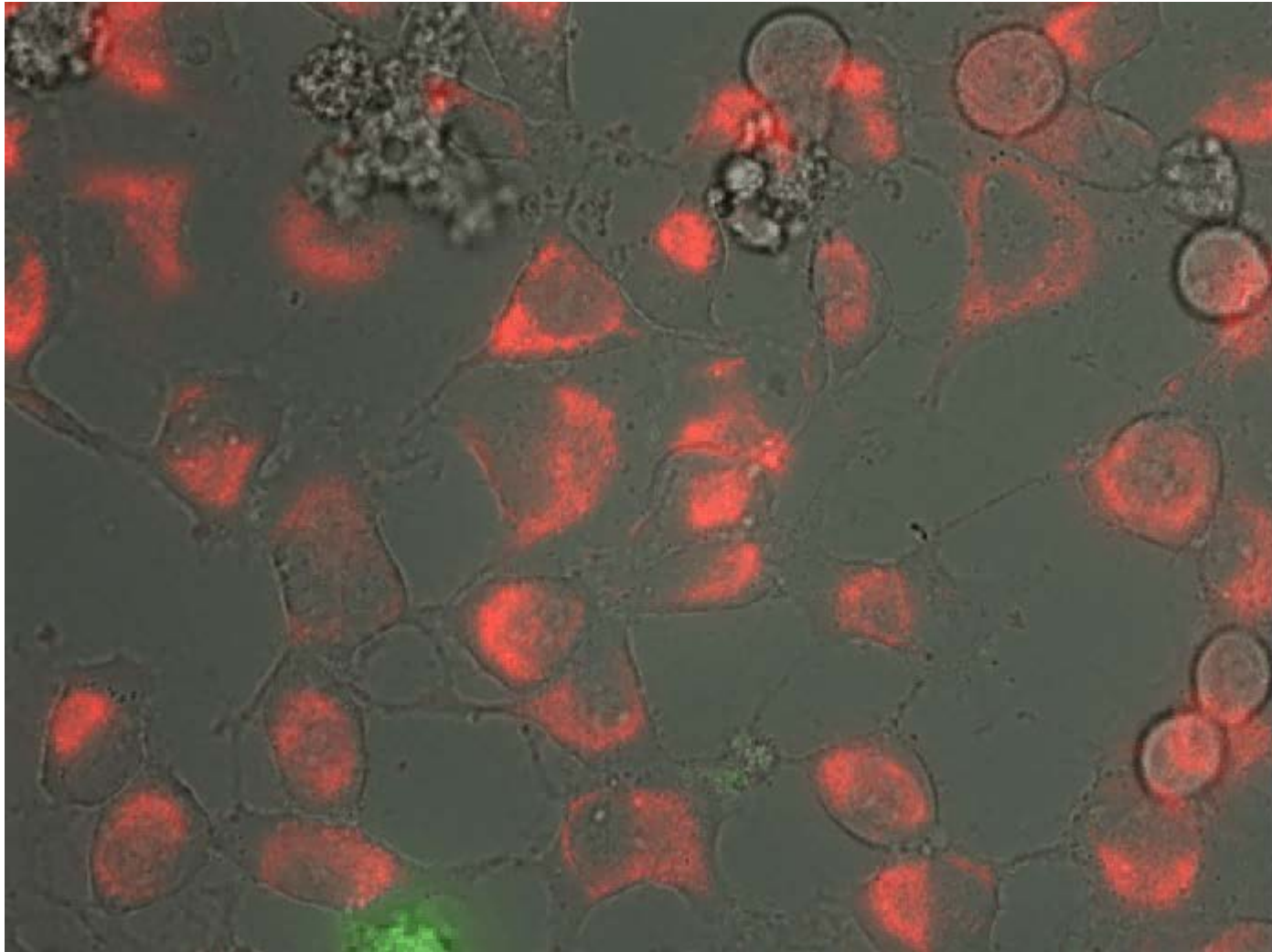


Хромосомы человека,  
двухцветная окраска  
(Gray and Cram, 1990)



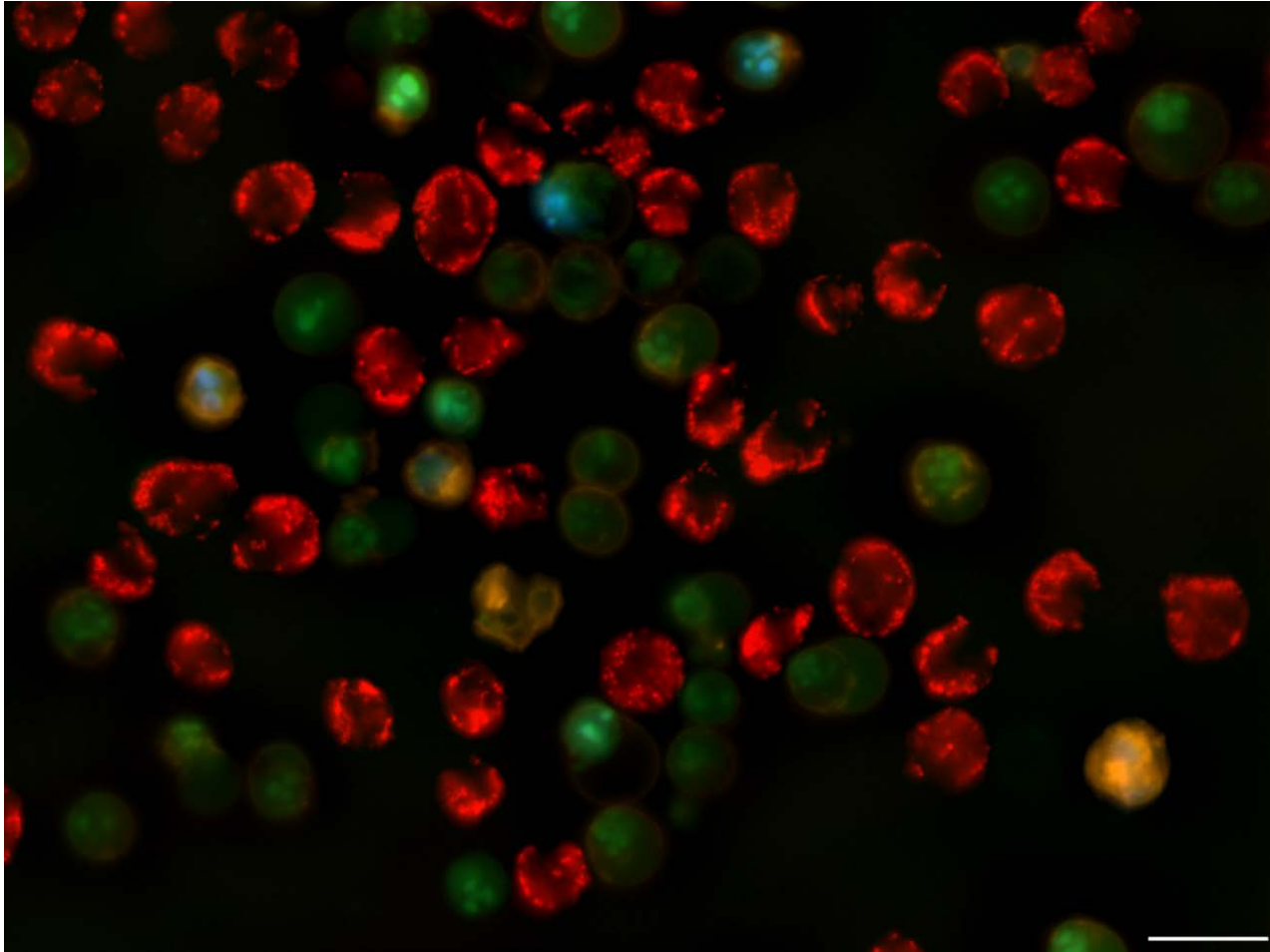


# Динамика апоптоза



**Клетки HeLa, стауроспорин (1 мкМ).  
Продолжительность съемки – 16 часов**

# Четырехцветное окрашивание



THP-1 cells treated with TRAIL, 100 ng/ml, 24 h. Red – TMRE staining, Green – caspase 3/7 staining; Yellow – Annexin V-Alexa 647 staining; Blue – Sytox Blue staining. Scale bar – 20  $\mu\text{m}$

# Апоптоз – последовательность событий

1. Начальный этап – индукция (внешний или внутренний пути).
  - 1а. Активация регуляторных каспаз 8/9 (предположительно).
2. Первые видимые события: митохондриальная «катастрофа» – пермеабиллизация наружной мембраны и сброс потенциала (MOMP); нарушение калий-натриевого баланса и съеживание клетки.
3. Промежуточные события: активация исполнительных каспаз 3/7 и экстернализация фосфатидилсерина; частичное нарушение проницаемости плазматической мембраны.
4. Поздние события: деградация ДНК, конденсация и затем фрагментация ядра, набухание клетки, затем – полная пермеабиллизация плазматической мембраны и распад клетки.

# Предварительные замечания

Апоптоз чрезвычайно вариабелен, и популяция клеток в процессе апоптоза гетерогенна – методы надо подбирать к вашей конкретной модели. Их нельзя брать случайным образом из литературы.

Одного теста никогда не бывает достаточно для описания полной картины. Используйте несколько проб (зондов), желательно в каждом исследуемом образце. Идеальным экспресс-методом является многоцветная проточная цитометрия (желательно – с использованием 4 лазеров – 488, 640, 405, 561 нм).

По возможности делайте фотографии клеток – увидеть апоптотические клетки очень полезно. Наилучшим методом является многоцветная флуоресцентная микроскопия, а также проточная цитометрия с визуализацией (Imaging flow cytometry).

# **Что можно определять методом проточной цитометрии?**

- 1. Параметры светорассеяния (FSC/SSC). На цифровых машинах – соотношение параметров FSC-W / FSC-H**
- 2. Флуоресцентные маркеры поверхностные (на плазматической мембране).**
- 3. Флуоресцентные маркеры внутренние (цитоплазматические и внутриядерные)**

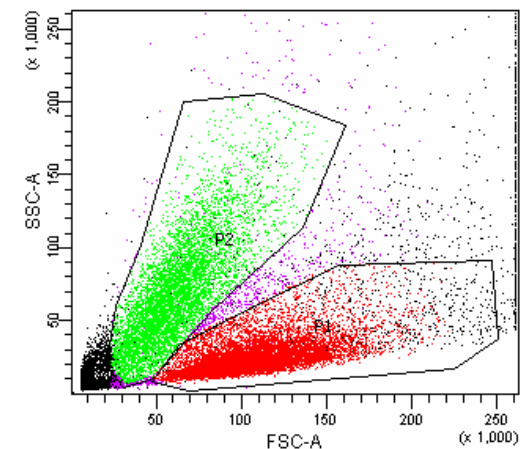
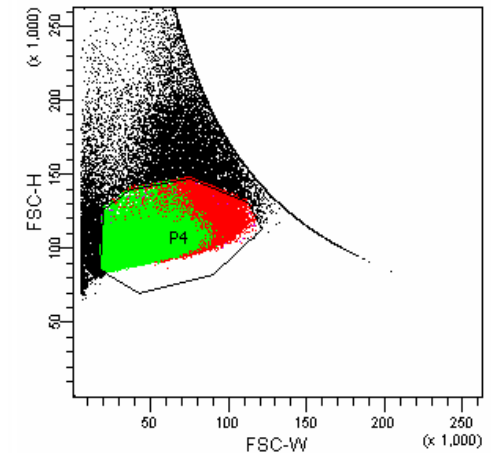
# С чего начать анализ апоптоза?

Отсечение сомнительных событий, затем оценка соотношения живых и мертвых клеток.

Для ориентира – определение клеток с aberrantным светорассеянием (увеличенное отношение SSC/FSC) и сильно поврежденной плазматической мембраной.

Это дает удобную оценку в начале изучения, а также оценку возможного уровня спонтанной гибели клеток.

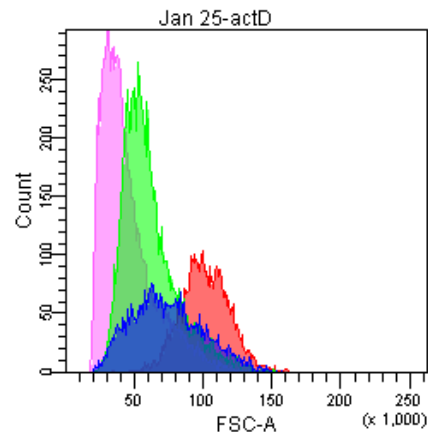
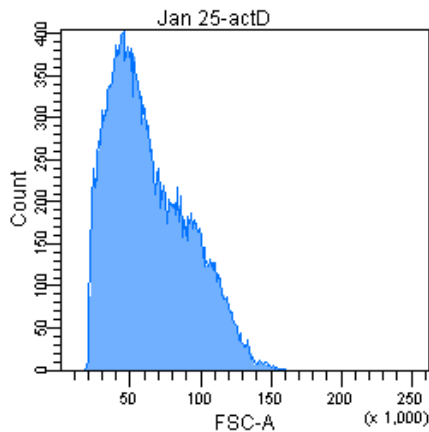
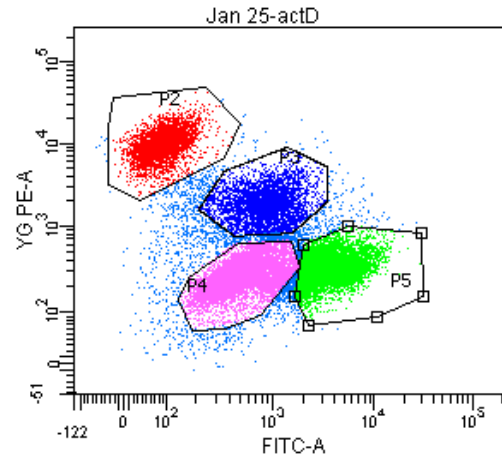
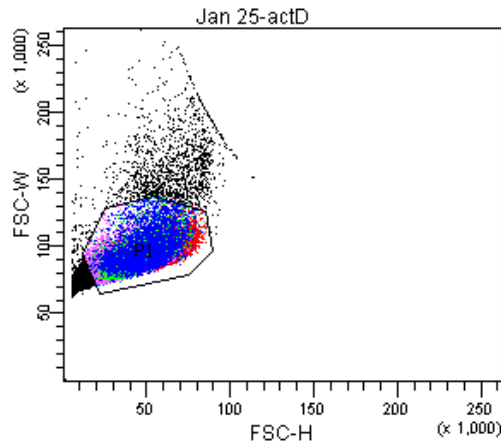
Прим. При неоптимальных условиях культивирования или приготовления образца уровень спонтанной гибели клеток может быть значительно больше 10%.



Tube: 3hours-40min

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	2,426,463	###	100.0
P4	1,930,602	79.6	79.6
P1	1,193,882	61.8	49.2
P2	658,791	34.1	27.2

# Анализ светорассеяния



Experiment Name: Jurkat-Ivan_started-Jan25							
Tube Name: actD							
Record Date: Jan 25, 2014 7:36:52 PM							
Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean	FSC-H Mean	FSC-W Mean	SSC-A Mean	
■ All Events	30,000	####	62,727	42,227	92,029	56,676	
■ P1	25,670	85.6	63,193	44,601	90,574	58,312	
■ P2	3,577	13.9	101,201	68,278	96,678	33,114	
■ P4	8,357	32.6	44,492	33,113	86,656	64,161	
■ P5	7,711	30.0	60,519	44,079	88,644	70,053	
■ P3	3,657	14.2	73,450	48,690	97,288	53,322	

**Четыре субпопуляции апоптотических клеток (P2-P5) значительно различаются по светорассеянию, наибольшие различия – по параметрам FSC-A/FSC-H (объем и диаметр клеток)**

# **Флуоресцентные пробы**

- 1. Плазматическая мембрана (Аннексин V)**
- 2. Активные каспазы (3, 7, 8?)**
- 3. Фрагментация ДНК (BrDU-TUNEL)**
- 4. Митохондриальные пробы (потенциал, АФК)**

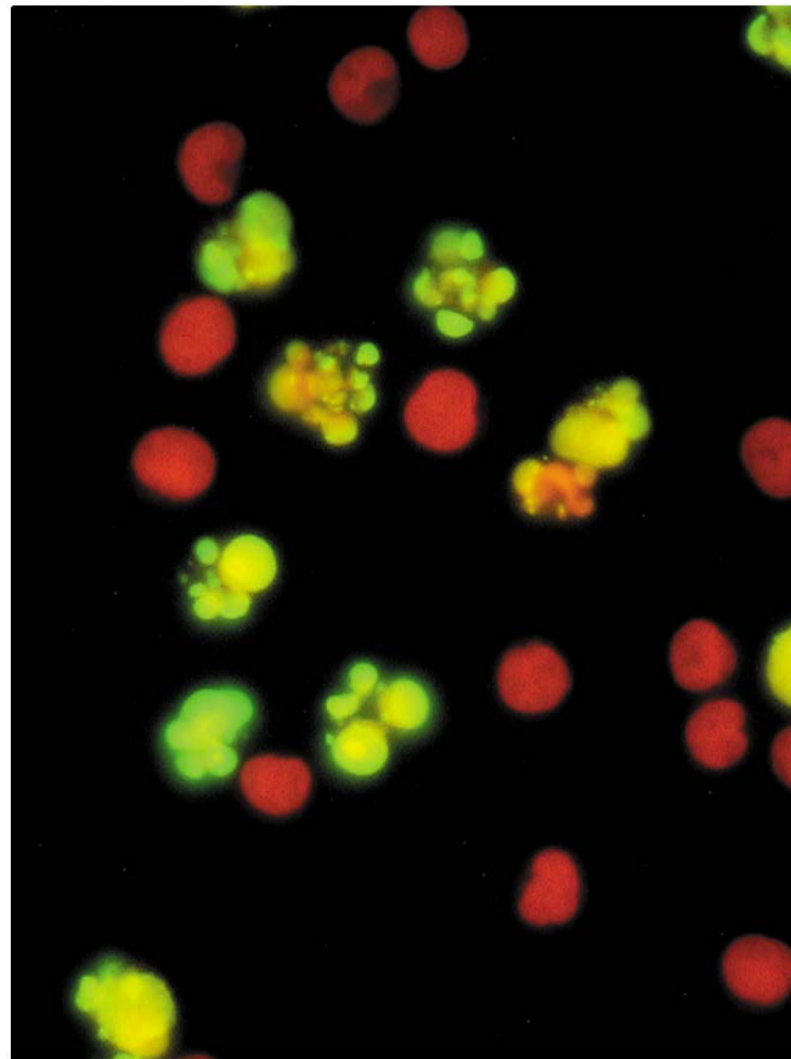


# Ядерные пробы

Двухцветная окраска клеток лимфомы:

APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit, with Alexa Fluor® 488 Anti-BrdU (from former Invitrogen, 2007):

апоптотические клетки – зеленые, "некротические" – красные (PI)



# Митохондриальные пробы

1. Потенциал-зависимая окраска митохондрий (суррогатное определение MOMP) – TMRE/TMRM, DiOC(6)3.

Родамин 123 годится для микроскопии, но не для цитометрии.

2. Mitotrackers – семейство красителей, но не все они потенциал-зависимые!
3. JC-1 (JC-10) – положительно заряженные красители, меняющие спектр флуоресценции в зависимости от концентрации – требуют титрования.
3. Определение активных форм кислорода – результаты могут зависеть от зонда.

# Каспазные пробы

**Флуоресцентные пробы для живых клеток:**

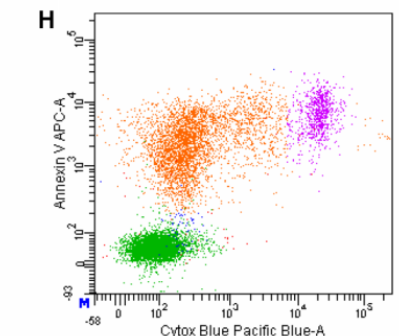
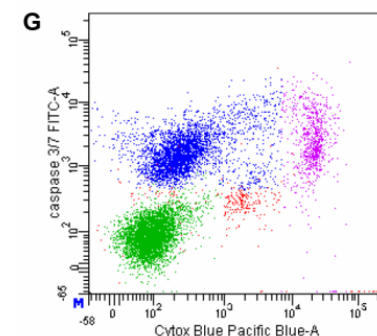
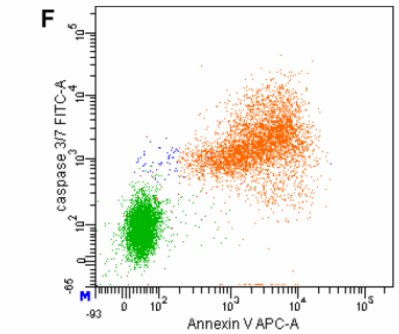
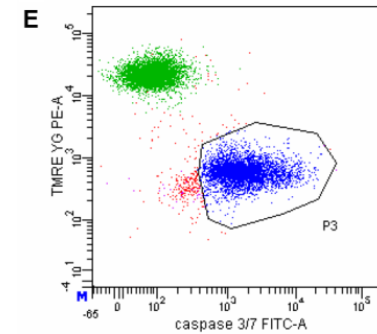
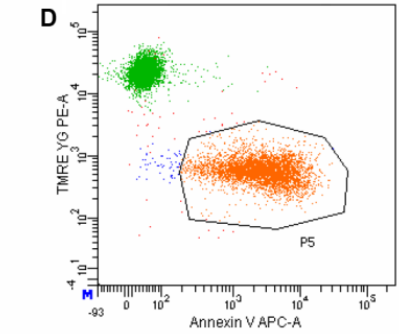
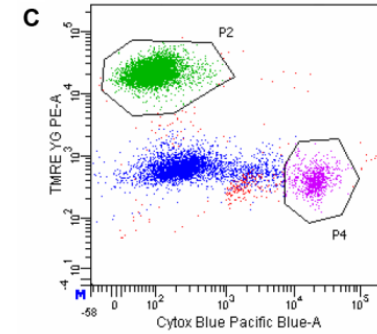
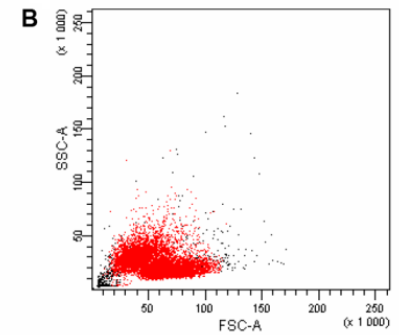
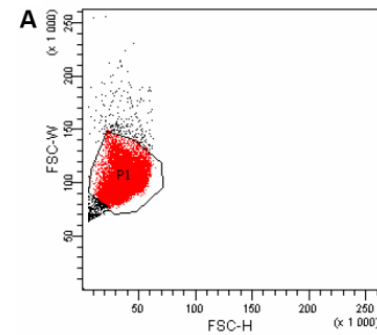
- 1. PhiPhiLux – не является ингибитором каспаз.**
- 2. FLICA – ингибитор каспазы. Требуется отмывки.**
- 3. CellEvent Green™ – сравнительно новая проба, которая не является ингибитором и не требует отмывки.**

**Флуоресцентные пробы для фиксированных клеток:**

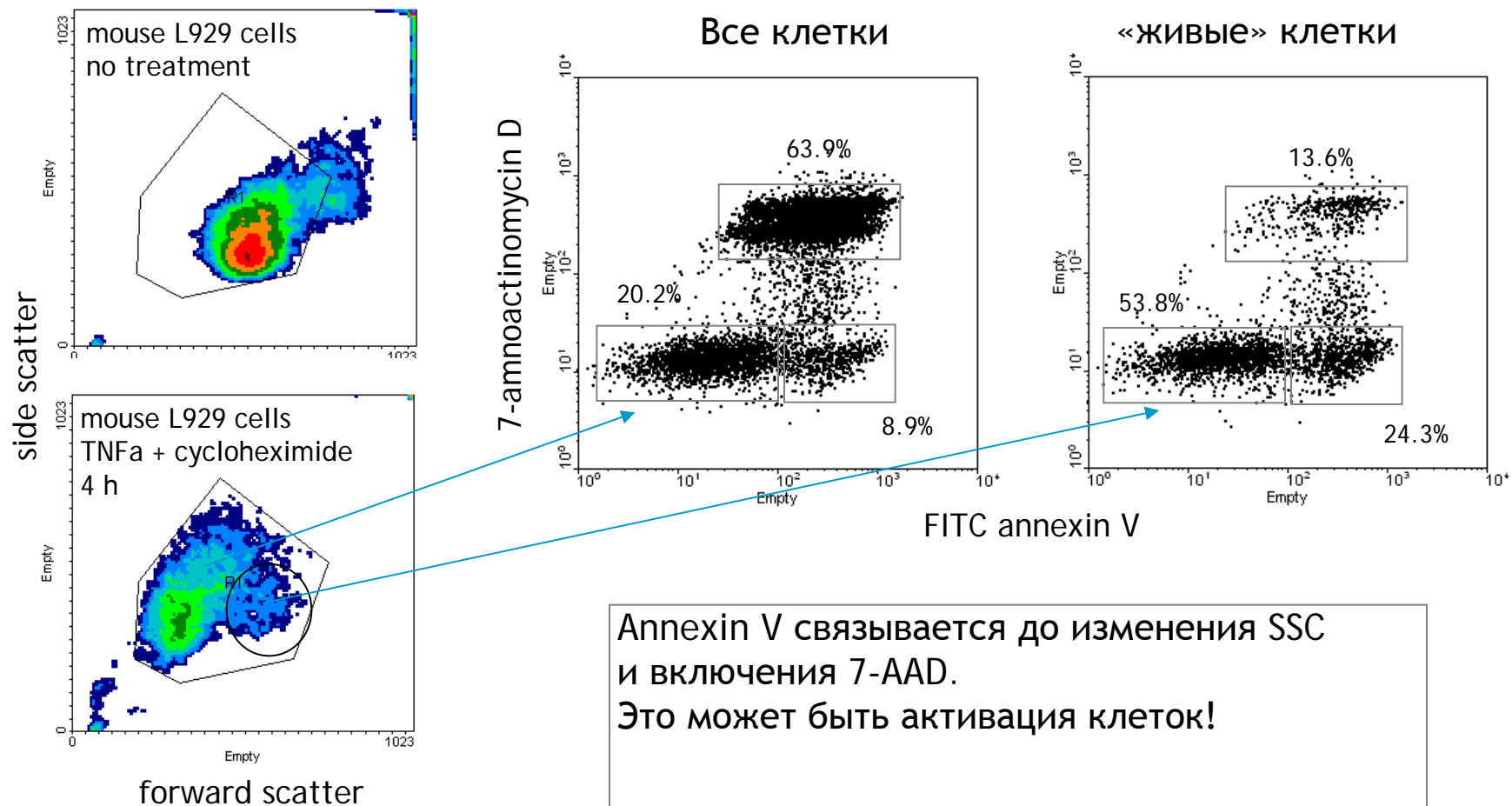
- 4. Антитела против активной каспазы 3 (разные производители, в том числе VDBiosciences, rabbit monoclonal Abs)**

# Клетки THP1, TRAIL, 100 нг/мл, 20 часов

- A – FSC-W / FSC-H, P1 – выделение одиночных клеток**
- B – светорассеяние, суммарный график (FSC/SSC)**
- C – TMRE/Sytox blue, P2 – TMRE positive cells, P4 – Sytox Blue bright (dead) cells**
- D – TMRE/Annexin V, P5 – Annexin V positive cells**
- E – TMRE/caspase 3/7, P3 – caspase positive cells**
- F – Annexin V/caspase 3/7**
- G – Sytox Blue/caspase 3/7**
- H – Sytox Blue/Annexin V**

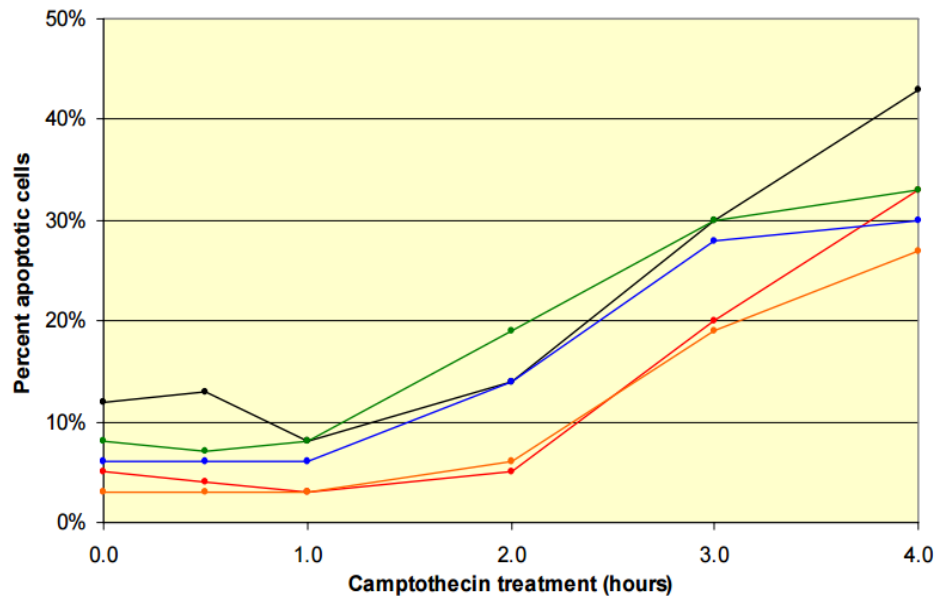


# Проба с аннексином V

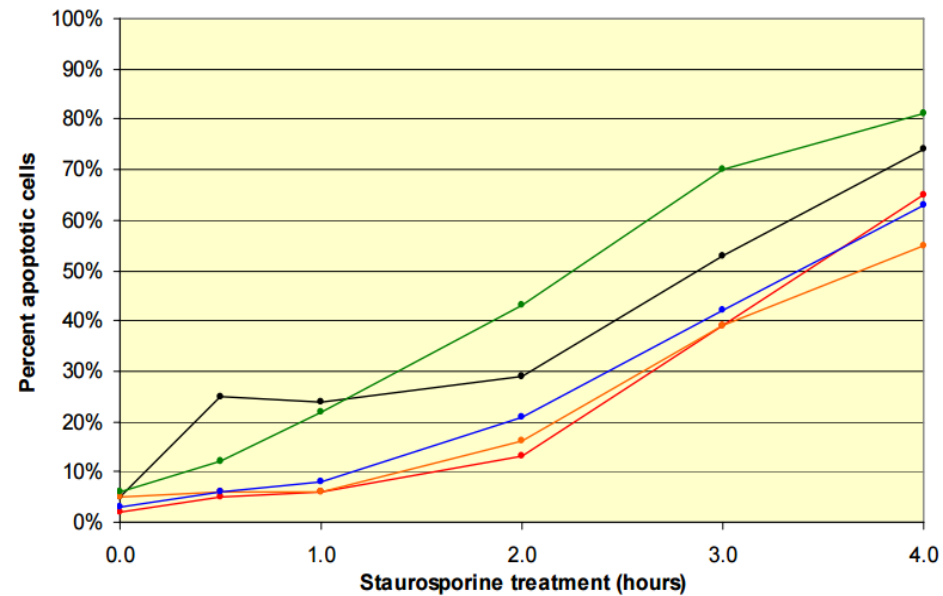


# Многоцветные пробы - корреляция

## Jurkat cells



## HeLa cells



F2N12S (●), annexin V (●), Vybrant® FAM Caspase-3 and 7 (●), MitoProbe™ DiIC<sub>1</sub>(5) (●), and MitoProbe™ JC-1 (●).

**Уровень корреляции многоцветных проб невелик, поскольку они характеризуют разные фазы апоптоза.**

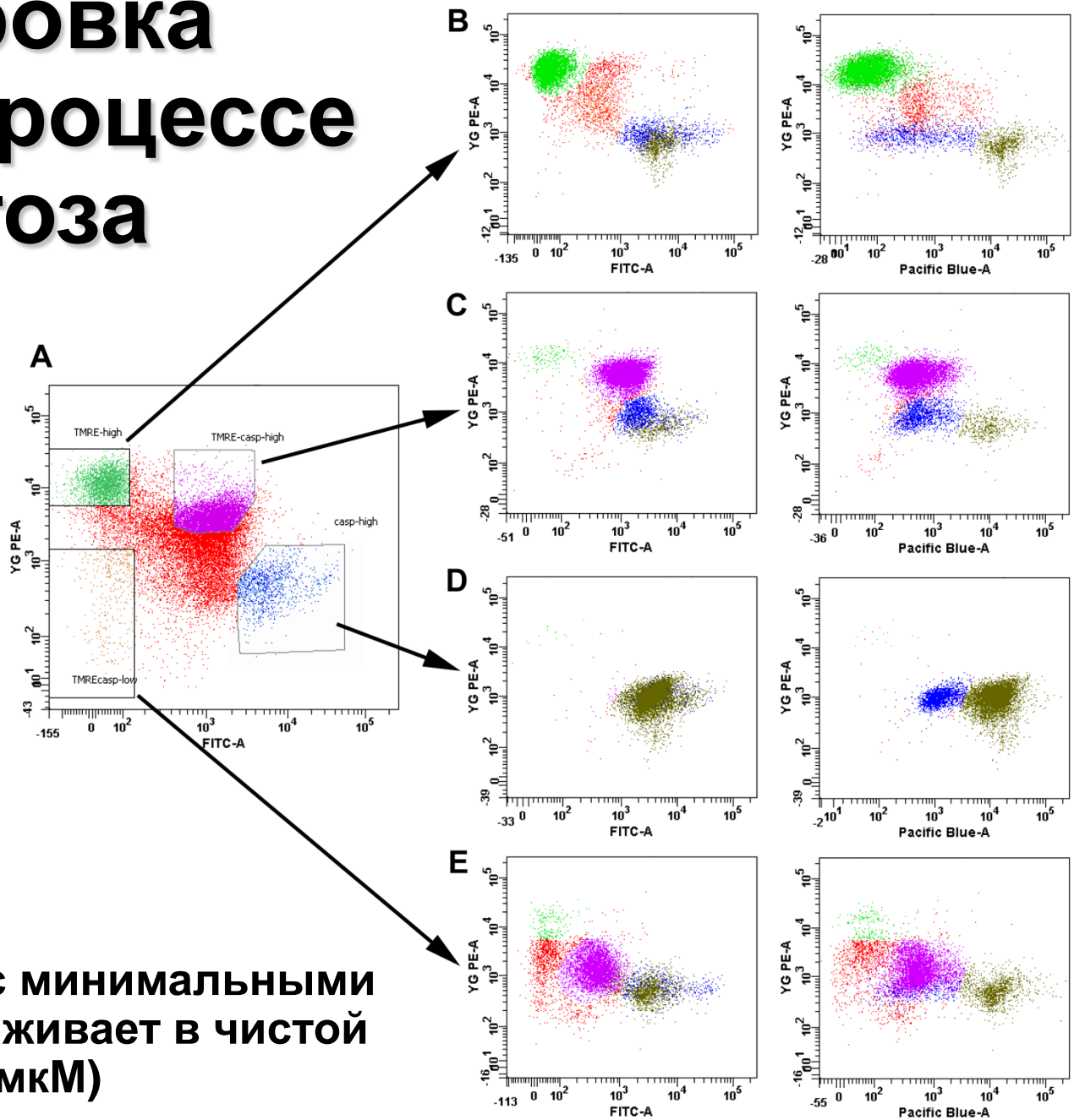
**(постер LifeTechnologies на Cyto2010)**

# **Исследование апоптоза с помощью многоцветной флуоресценции**

**Vorobjev I., Barteneva N. 2015. Temporal Heterogeneity Metrics in Apoptosis Induced by Anticancer Drugs. Journal Histochemistry and Cytochemistry. 63(7): 494-510. DOI: 10.1369/0022155415583534**

**Vorobjev I., Barteneva N. 2015. Temporal heterogeneity in apoptosis determined by imaging flow cytometry. Methods in Molecular Biology (in press)**

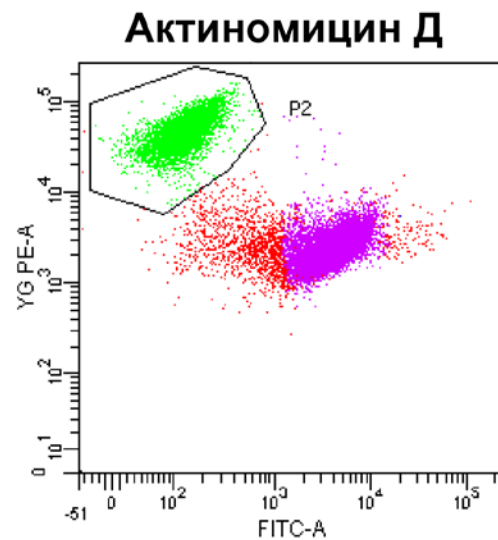
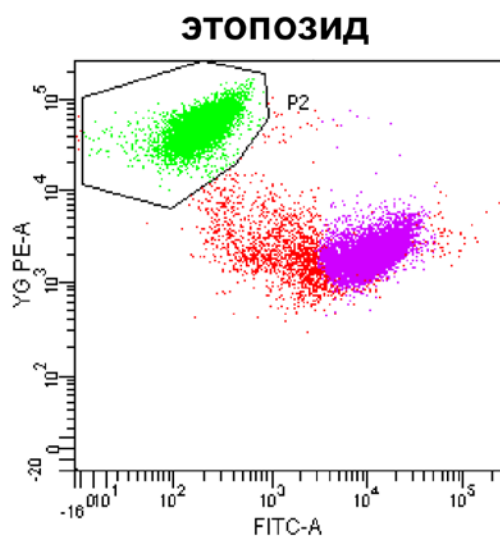
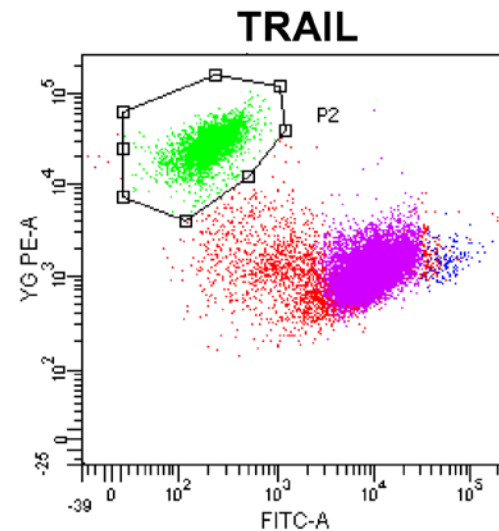
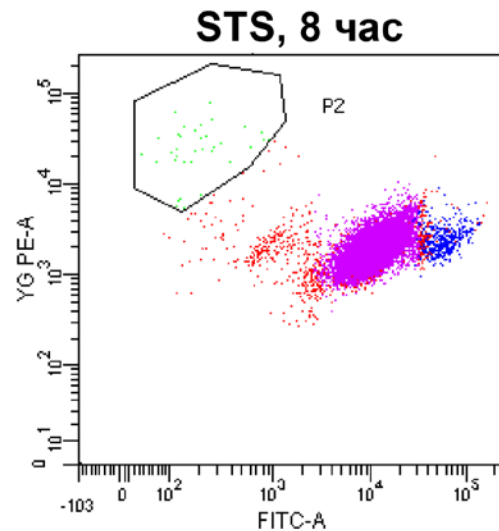
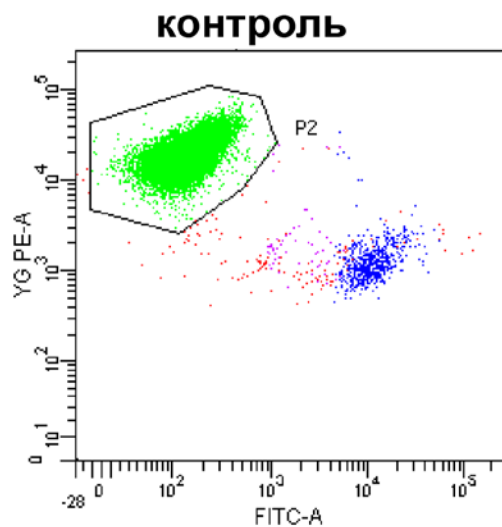
# Сортировка клеток в процессе апоптоза



Популяция клеток с минимальными повреждениями выживает в чистой среде (HeLa, STS 1 мкМ)



# Сравнение различных индукторов (8 час)



# Заключительные комментарии

## 1. Правильно подбирайте краситель для митохондрий.

Наиболее распространенные красители (возбуждаются синим лазером) - Rhodamine 123, DiOC6(3) (3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide) и JC-1 (JC-10).

Rhodamine 123 малоприспособлен для проточной цитометрии, так как сохраняется в клетках в значительной концентрации после деполяризации митохондрий.

DiOC6(3) лучше, чем родамин 123, но требует титрования.

JC-1 (JC10) меняют спектр флуоресценции, но это происходит только в узком диапазоне концентраций.

TMRE (TMRM) дают наилучшие результаты. Основной недостаток – слабое возбуждение данного красителя синим лазером (488 нм), значительно лучше – желто-зеленым лазером (561 нм).

# Заключительные комментарии

## **2. Окраска Аннексином V требует специальных подходов.**

Annexin V для прочного связывания с фосфатидилсеринем требует ионов кальция. Для полноценной окраски уровень кальция должен быть повышен (около 3 мМ). В отличие от антител, Аннексин V имеет относительно низкую константу связывания. Поэтому препарат надо анализировать сразу же после окраски (нельзя хранить больше 1-2 часов). Также окраска не выдерживает фиксации.

## **3. Интерпретируйте данные осторожно – лучше сделать дополнительное исследование.**

Деполяризация митохондрий и экстернализация фосфатидилсерина могут происходить не только при апоптозе, но и при других процессах, например, при активации клеток. Очень информативным является анализ каспаз, как наиболее специфических маркеров апоптоза.

# Заключительные комментарии

## 4. Подбор правильного теста.

Наличие небольшого числа клеток с содержанием ДНК меньше нормы (Sub-G1 peak) не обязательно означает апоптоз – это может происходить и при других процессах гибели. При появлении пика нужен дополнительный контроль на фрагментацию ДНК.

## 5. Будьте осторожны с фиксацией.

Формалин позволяет сохранить небольшие фрагменты ДНК в препарате, и уровень апоптоза, определяемый по содержанию ДНК после формалиновой фиксации, может быть занижен. Поэтому фиксировать суспензию клеток для определения содержания ДНК можно только холодным спиртом.

## 6. Используйте метод TUNEL.

При использовании данного метода выявляются новосинтезированные участки, и вам, наоборот, необходима фиксация формалином, но не спиртом, перед окраской антителами к бромдезоксисуридину.

# Анализ сигнальных путей

Соотношение клеток с различным уровнем экспрессии циклинов или фосфобелков.

Пробы только цитоплазматические – на фиксированных клетках.

Основные контроли – специфичность антител к фосфоэпитопам определяемых белков.

# Сортировка для анализа РНК

## Для различных вариантов ПЦР:

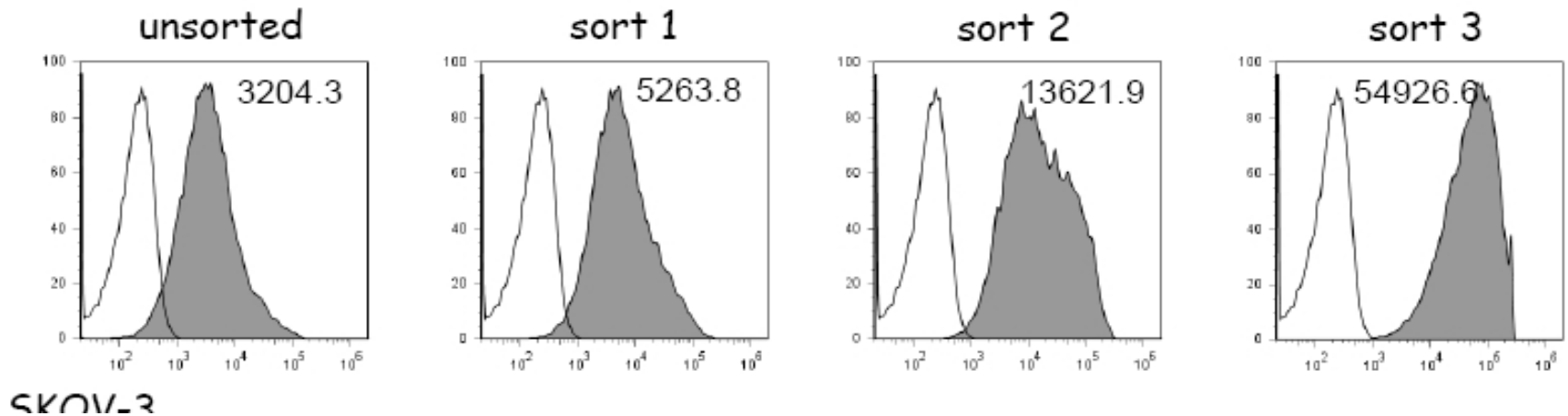
для real-time PCR – не менее  $10^4$ , лучше - от  $3 \cdot 10^4$  до  $10^5$ . Чем больше клеток, тем меньше разброс данных в повторях.

## Для анализа на микрочипах:

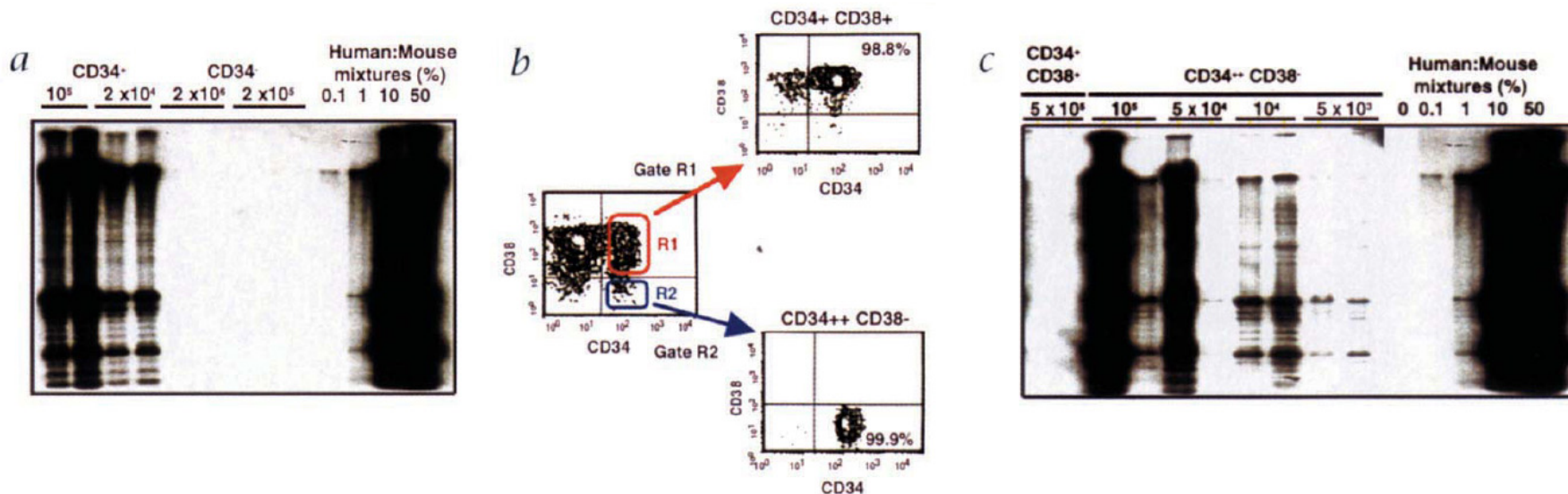
– не менее  $10^5$ , лучше - от  $3 \cdot 10^5$  до  $10^6$ . Поскольку чипы стоят дорого, лучше отсортировать больше клеток, чем повторять эксперимент.

# Отбор на экспрессию флуоресцентных белков в культуре

Multiple sorts and expansions were needed to get good enhanced expression of our fluorescent protein in these cells.



# СТВОЛОВЫЕ ЛЕЙКОЗНЫЕ КЛЕТКИ

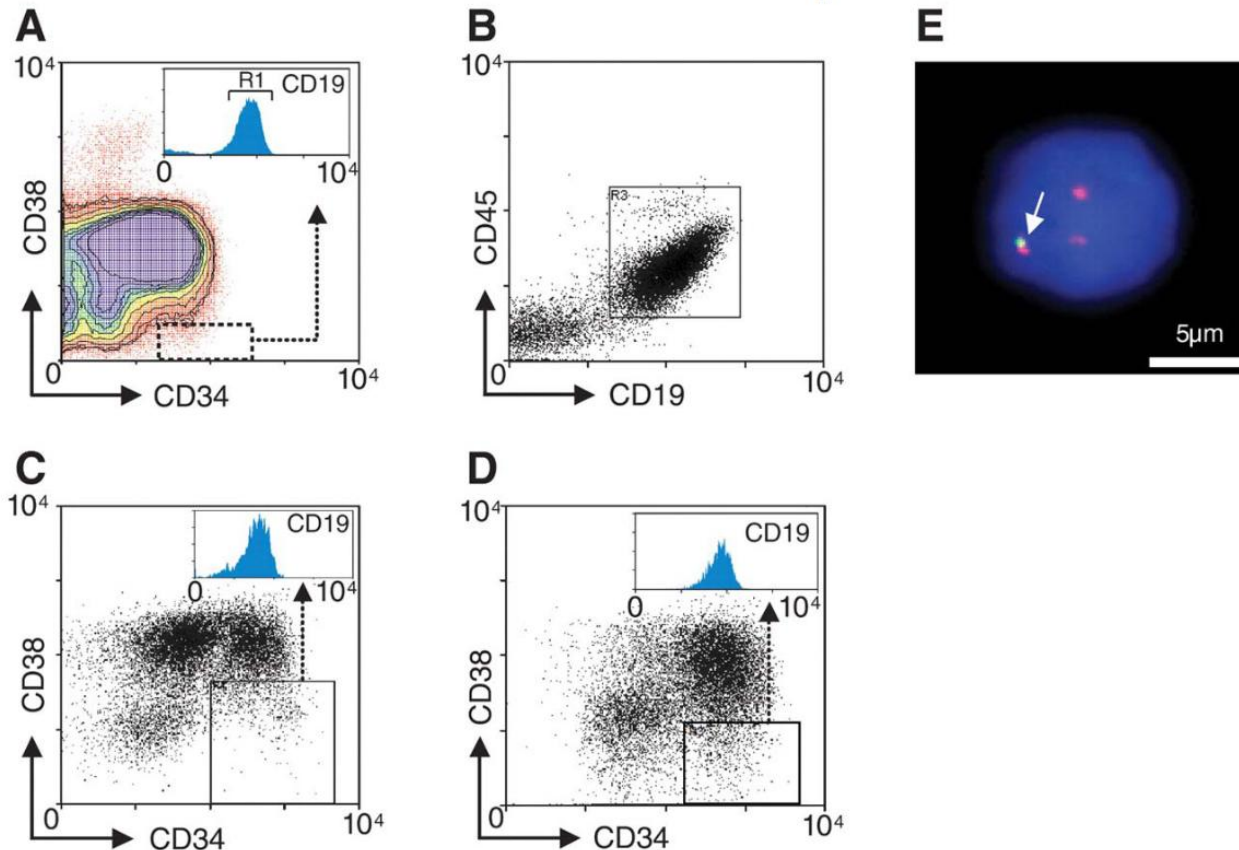


**D. Bonnet and J. E. Dick – 1997.**

Для возникновения опухоли у NOD-SCID мышей при трансплантации клеток ОМЛ человека достаточно  $5 \cdot 10^3$  клеток с фенотипом  $CD34^+CD38^-$ , тогда как другие фенотипы не дают опухоли даже в дозе  $5 \cdot 10^5$  клеток.

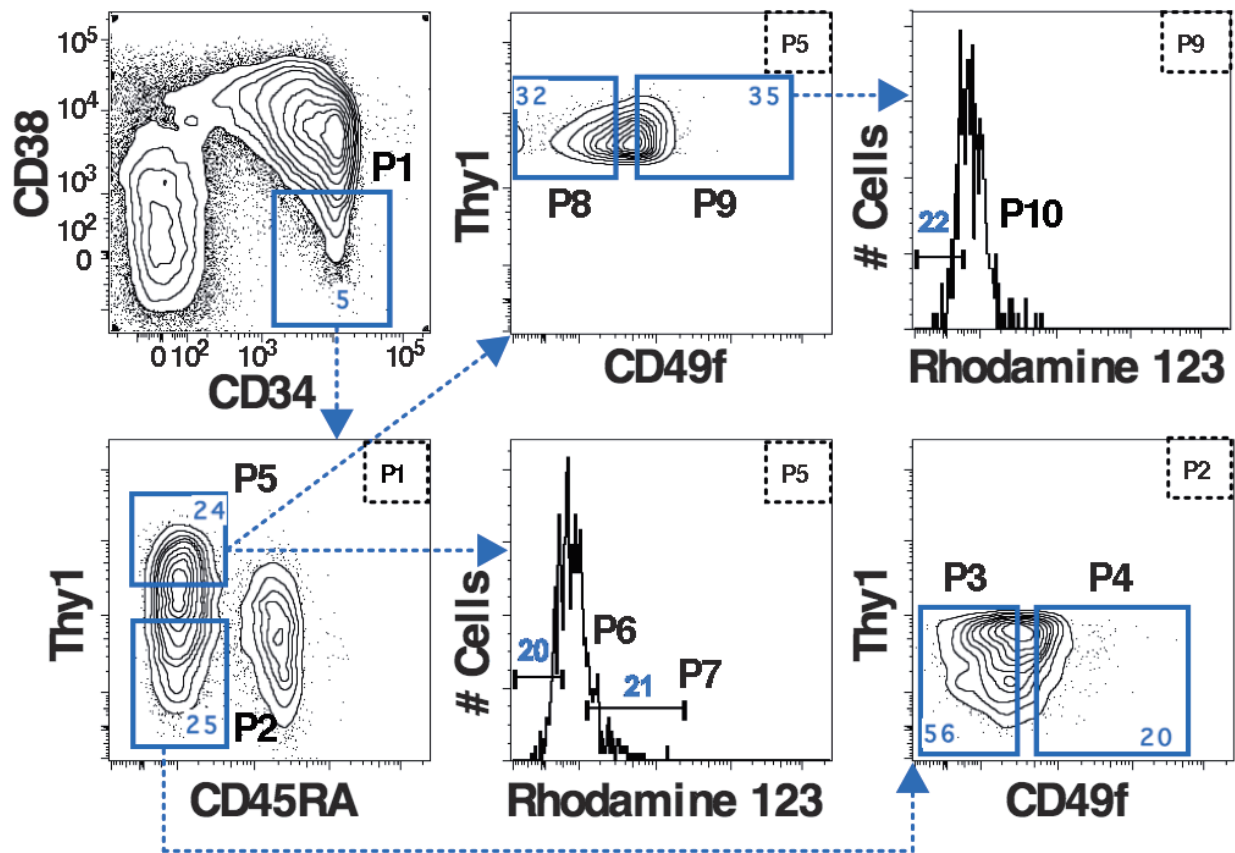


# Identification of tumorpropagating cells in cALL patients



A – selection for sorting ( $CD34^+CD38^{-/low}CD19^+$ ); B – after engraftment; C – analysis after engraftment; D – analysis after second (sequential) engraftment.

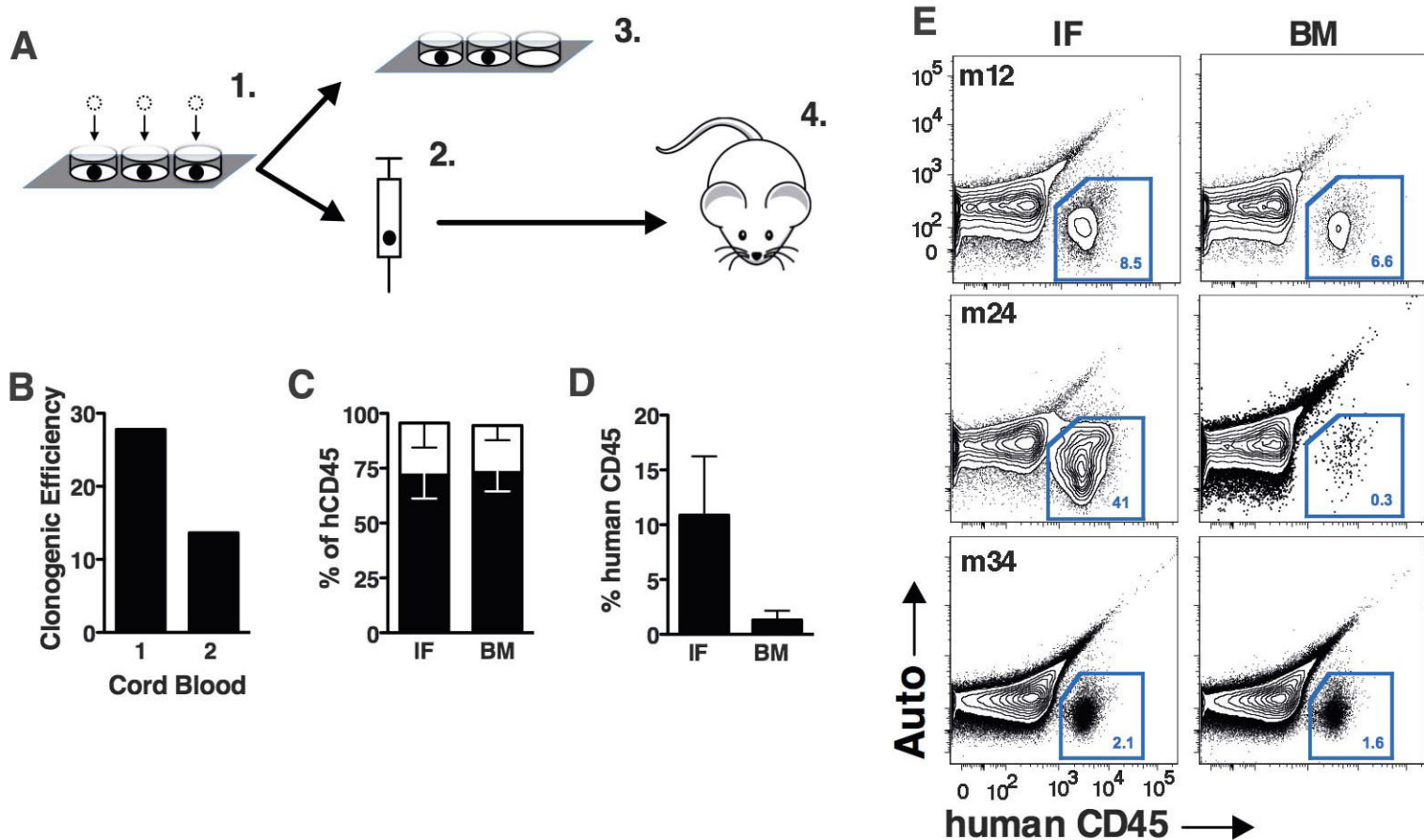
# СТВОЛОВЫЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ



Клетки окрашивали антителами против CD34, CD38, CD45RA, Thy1 (CD90) и CD49f, а также родамином 123. Сортировка позволила оценить эффективность репопуляции в 1/20 для Thy1<sup>+</sup> и 1/100 для Thy1<sup>-</sup> клеток.

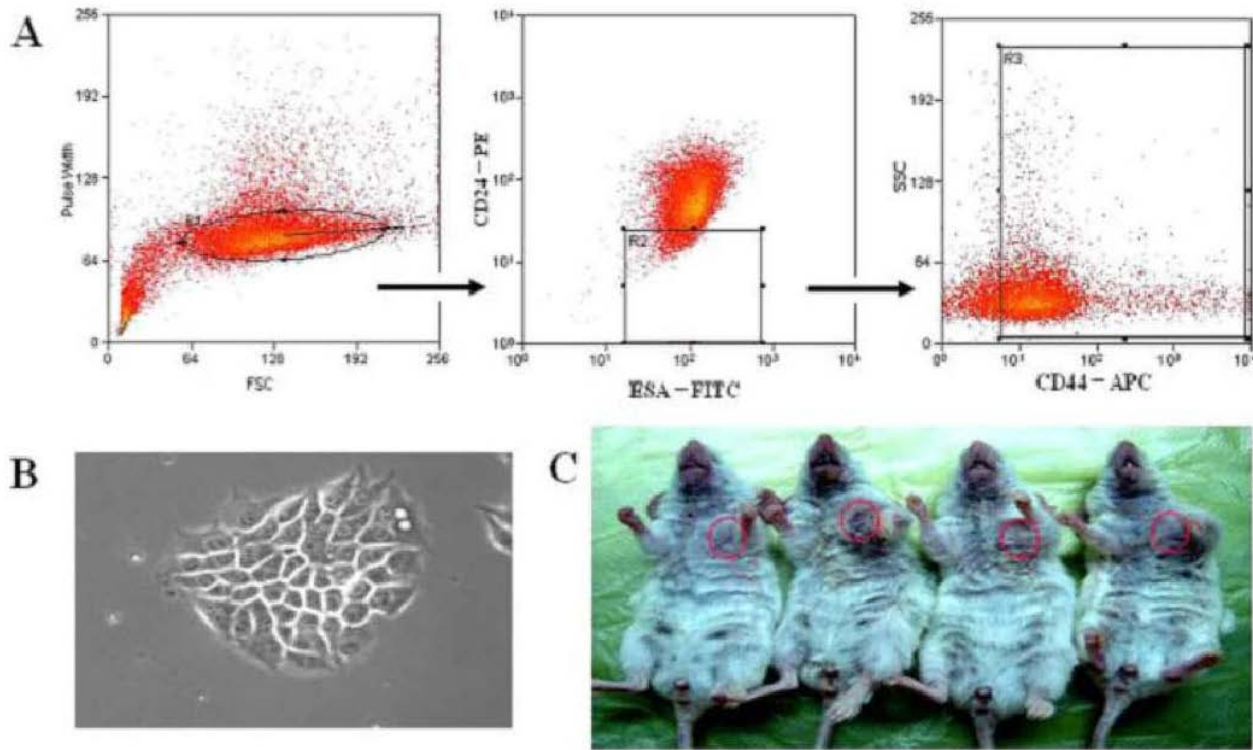
Для клеток Thy1<sup>+</sup>Rho123<sup>low</sup>CD49f<sup>+</sup> эффективность репопуляции составила 14-28%.

# Эффективность трансплантации



Результаты трансплантации NSG мышей единственной клеткой с фенотипом  $\text{Thy1}^+\text{Rho}^{\text{lo}}\text{CD49f}^+$

# Стволовые клетки РМЖ

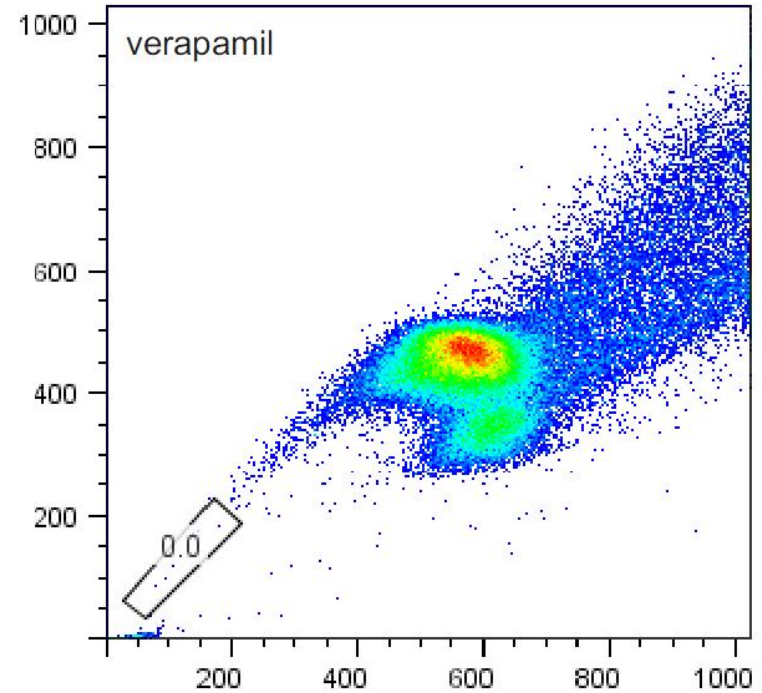
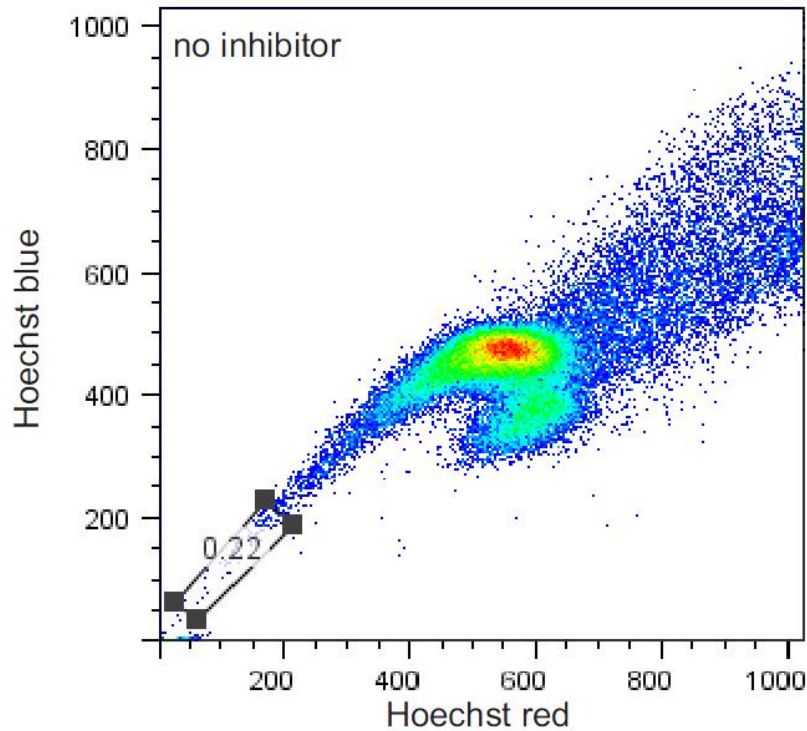


Стволовые свойства клеток с фенотипом  $ESA^+/CD44^+/CD24^{\text{low}}$ : опухоли в NOD/SCID мышах индуцировались в 100-1000 раз чаще, чем для неотсортированной популяции. Фракция выделенных клеток составляла около 1%.

Для выделенных клеток был получен специфический профиль микроРНК.

Sun, Liao, Qui et al., 2010

# Сортировка раковых клеток



## Основные подходы к выделению стволовых клеток

### опухоли:

выделение «боковой» популяции

Сортировка по активности альдегид-дегидрогеназы (ALDH)

Специфические сочетания поверхностных маркеров

# Сортировка боковой популяции

Клетки обрабатывают несколько минут проникающим красителем в культуральной среде (Hoechst 33342, Rhodamin 123 и др.), затем инкубируют в среде без красителя примерно 30 мин. Клетки, которые наиболее быстро выводят краситель, могут образовывать отдельную популяцию.

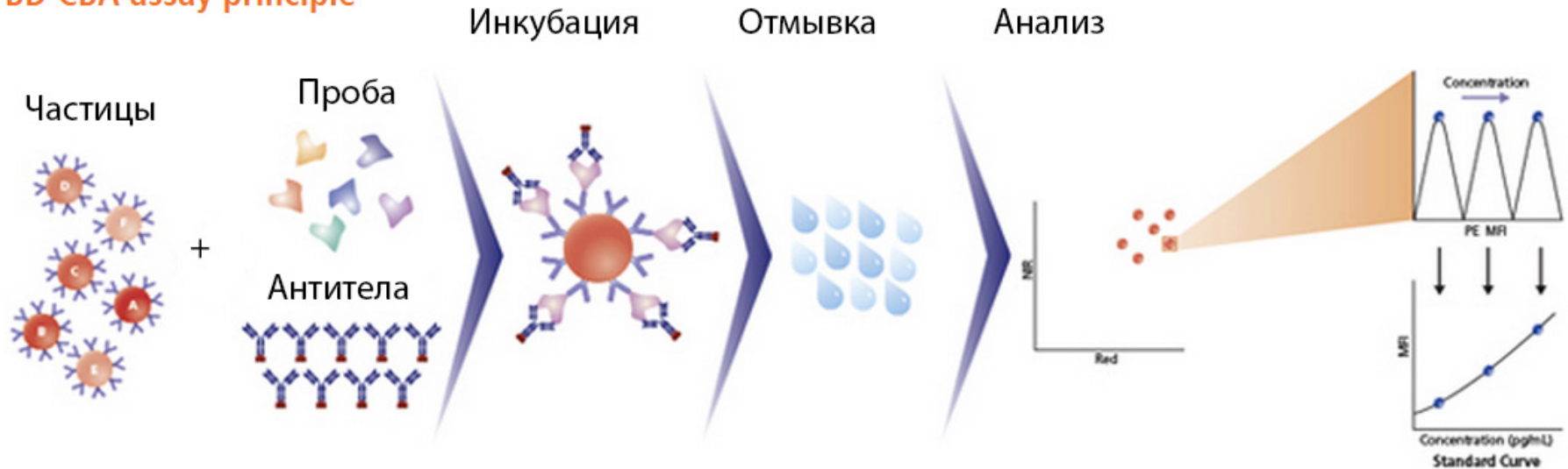
Контроль: активность белка MDR, ответственного за выведение красителя, подавляется верапамилом и некоторыми другими ингибиторами.

Боковые популяции выделяются не всегда!

# Bead-based immunoassay

## Принцип метода

### BD CBA assay principle

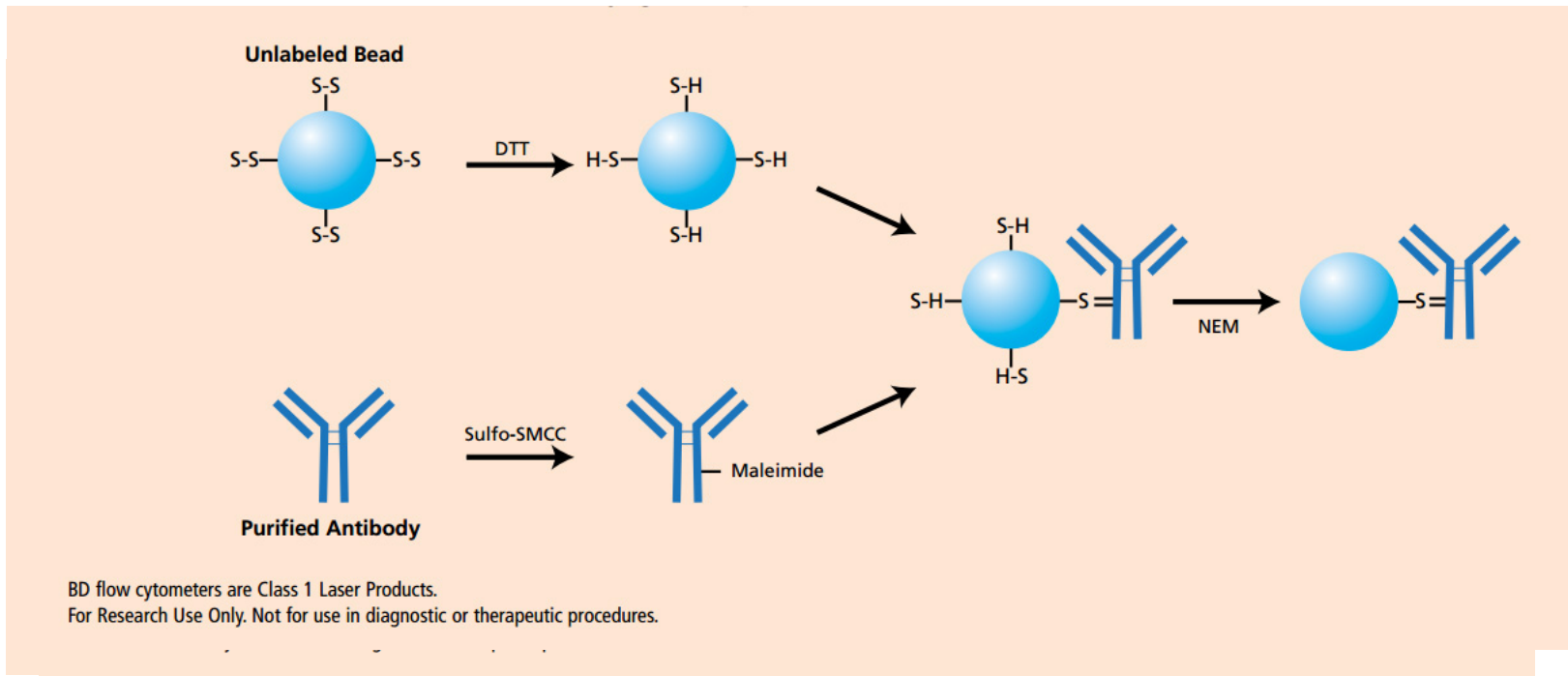


Растворенные белки выявляются с помощью частиц, несущих антитела (нефлуоресцирующие) к одной детерминанте и флуоресцентных антител против другой детерминанты белка.

Детекция – по наличию флуоресцентных частиц (FSC/SSC/FL1).

Метод позволяет определять до нескольких десятков белков одновременно (например, в плазме крови).

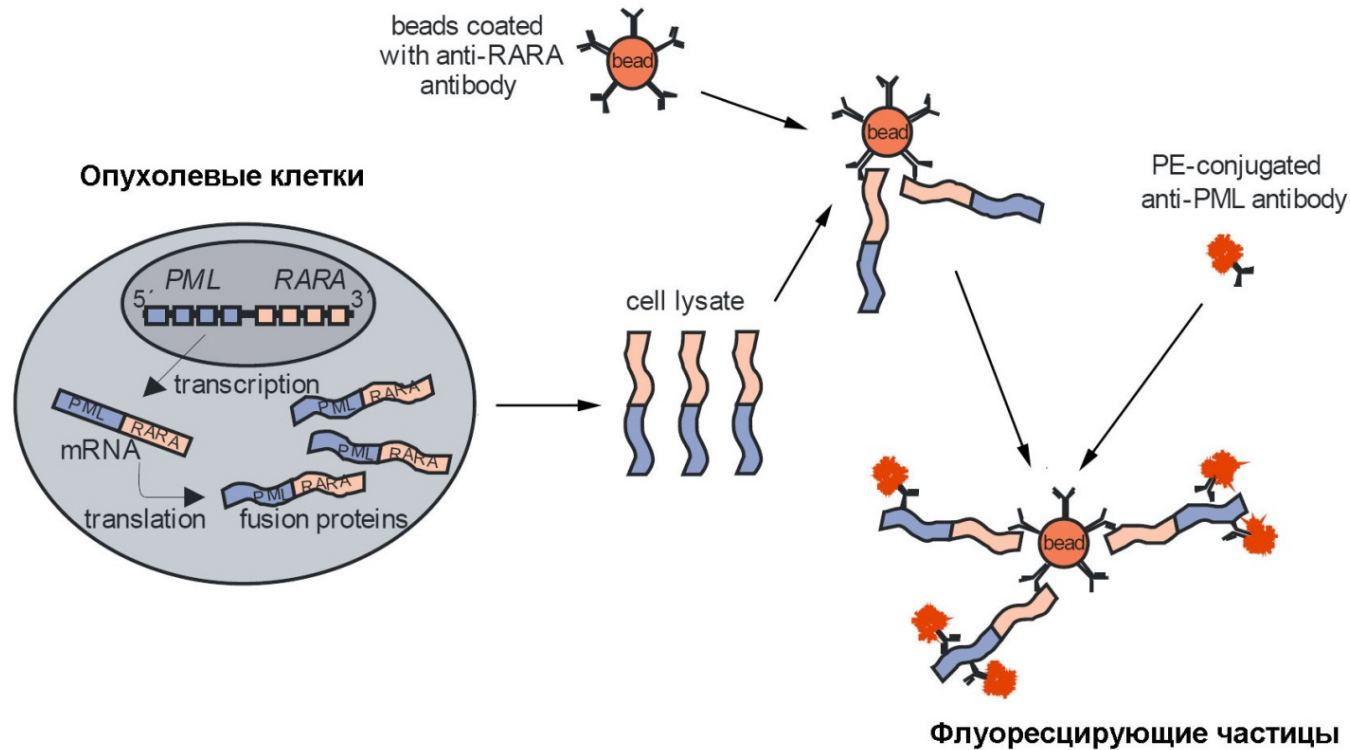
# Получение частиц



Частицы могут быть получены с любыми антителами



# Анализ опухолевых белков в плазме с помощью частиц



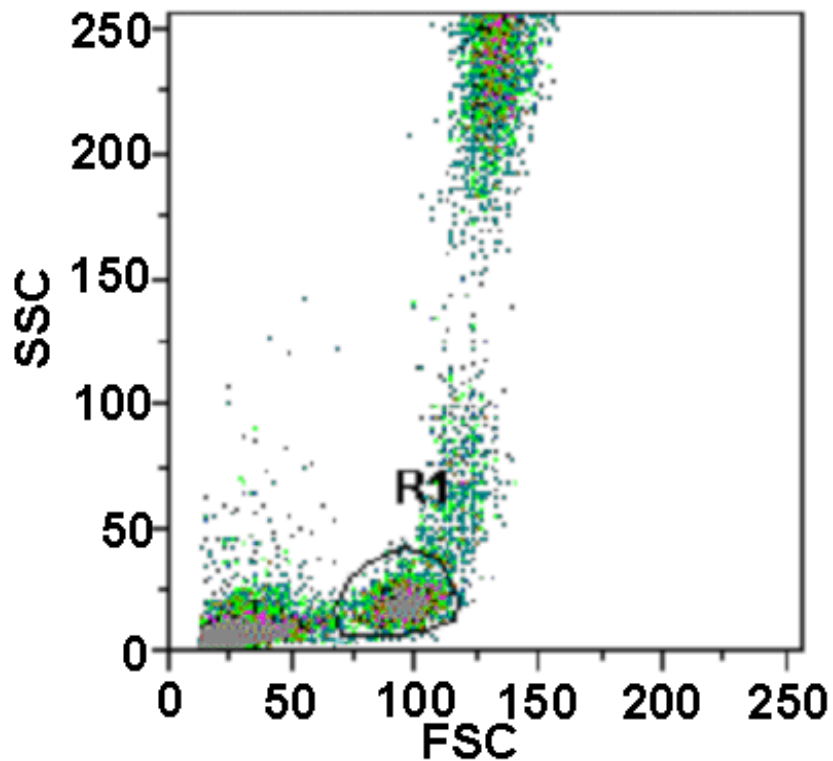
Опухолевые белки выявляются с помощью частиц, несущих антитела (нефлуоресцирующие) к одной детерминанте и флуоресцентных антител против другой детерминанты белка.

Детекция – по наличию флуоресцентных частиц (FSC/SSC/FL1).

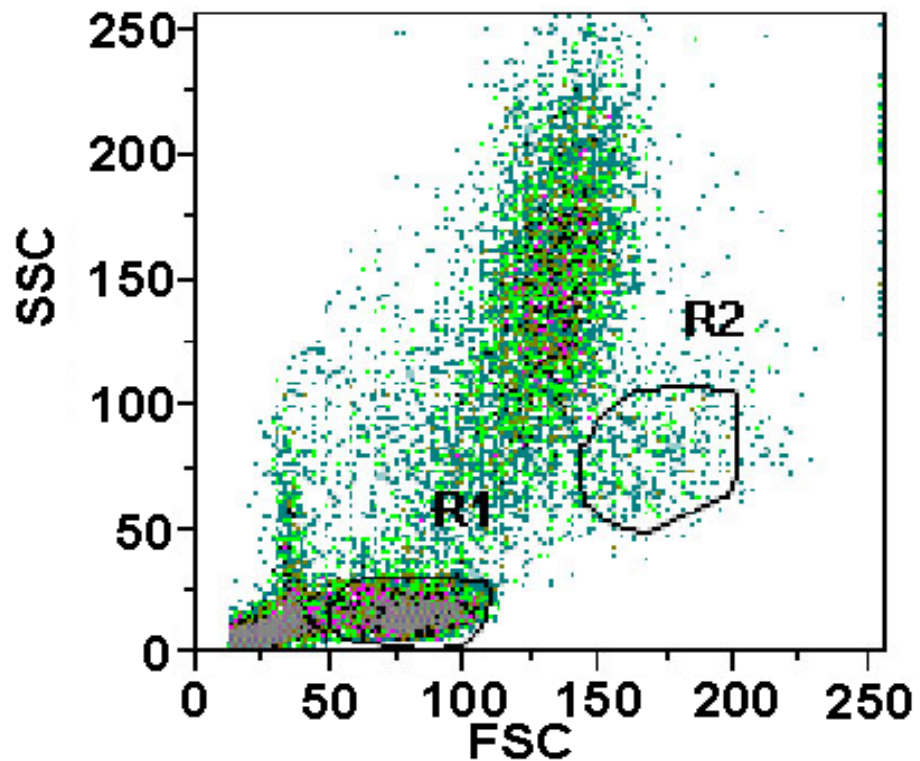
Метод обладает высокой чувствительностью к уникальным белкам.

# **Проточная флюориметрия в диагностике лейкозов и лимфом**

# Распределение клеток крови по светорассеянию



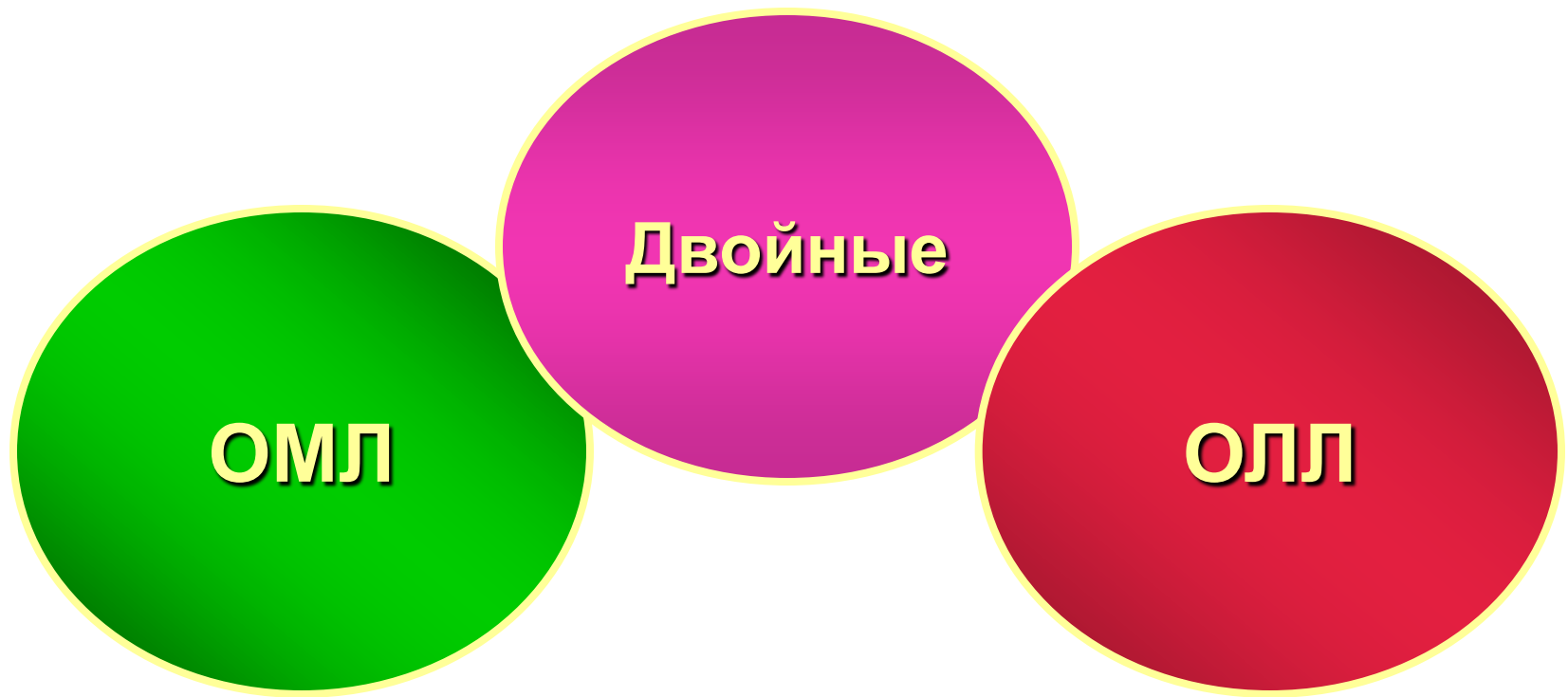
Норма



Патология

# Острые лейкозы – иммунологические группы

---



# Острые лейкозы (иммунологически)

---

1. Миелобластные (разной степени зрелости)
2. Промиелоцитарный
3. Миело-монобластные
4. Эритробластные
5. Мегакариоцитарный
6. В-лимфобластные (разной степени зрелости)
7. Т-лимфобластные (разной степени зрелости)
8. Плазмобластные
9. Из НК-клеток

# Острые лейкозы: общая характеристика

---

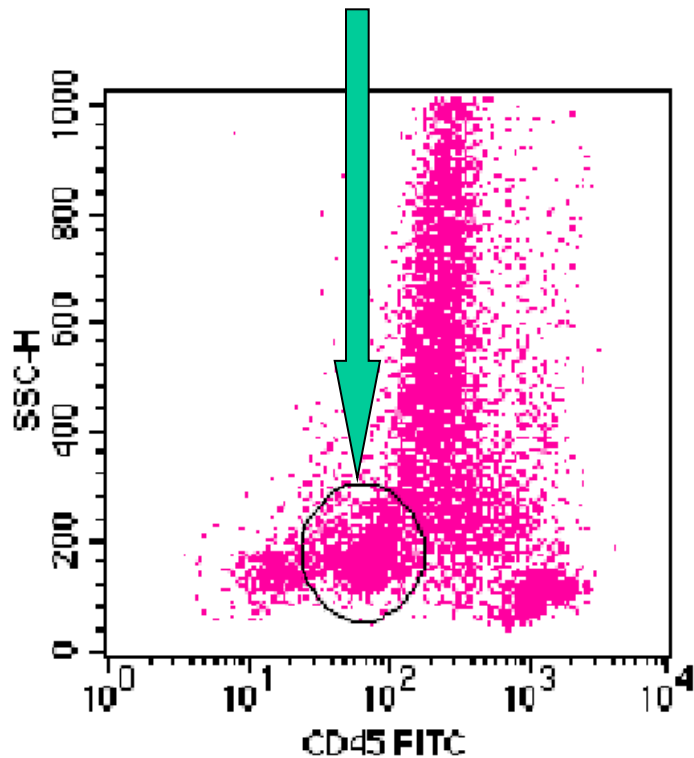
Большинство ОЛ характеризуются:

1. Сниженным уровнем CD45
2. Наличием специфических «ранних» маркеров

Исследование ведется в полигоне лимфоцитов и моноцитов, либо выделяется полигон бластных клеток.

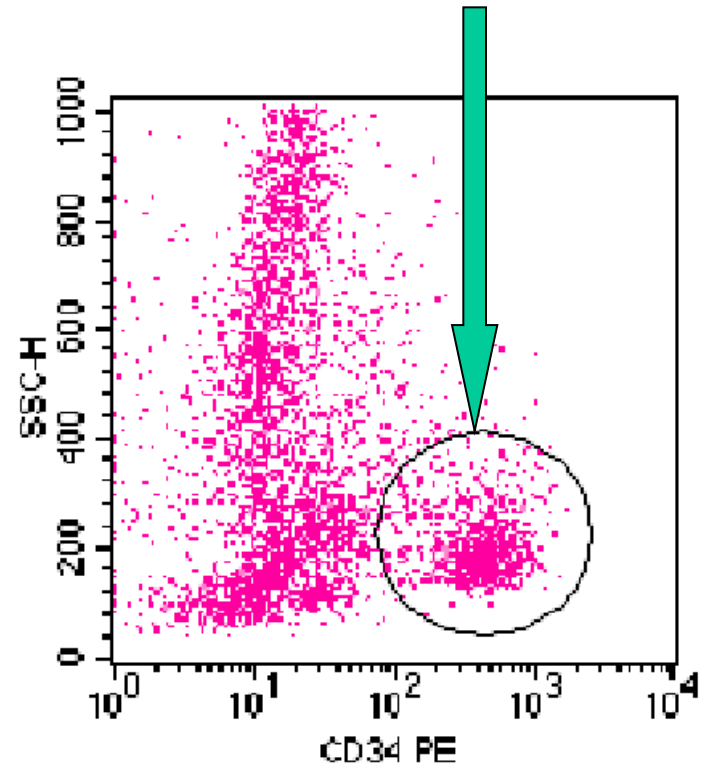
# Определение доли бластных клеток

## CD45 низкий



Region	Events	% Gated
R6	5022	21.36

## CD34+



Region	Events	% Gated
R5	4497	21.03

# Маркеры для острых лейкозов

---

Ранние: CD34; TdT; (CD7); CD117

Миелоидные:  
CD117; CD13; CD33; CD15; MPO; CD66

Моноцитарные: CD14; CD4 low

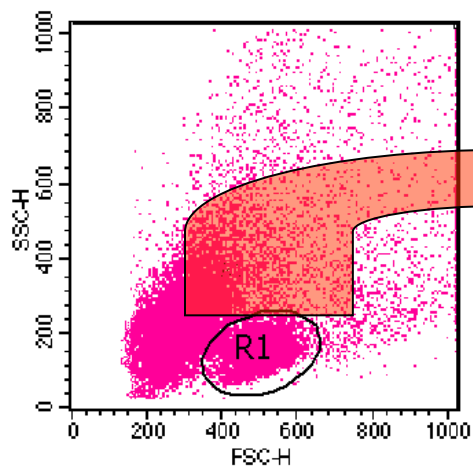
Лимфоидные:  
В-клеточные – CD10; CD19; CD79a; CD22  
Т-клеточные – CD2; CD7; CD3; CD5; CD4; CD8; CD1a  
НК-клеточные – CD16/CD3-; CD56/CD3-

Эритроидный: Gly-A

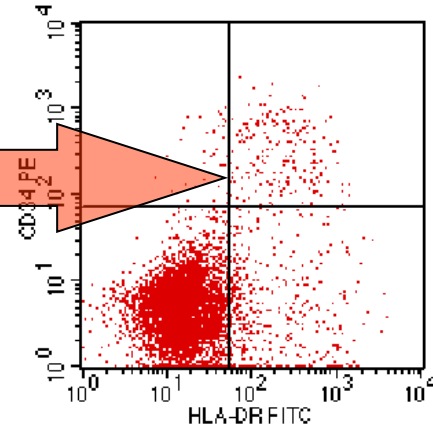
\*Мегакариоцитарные: CD41; CD61



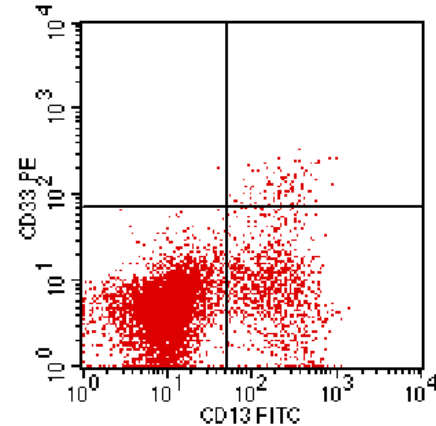
# Выделение полигона бластных клеток



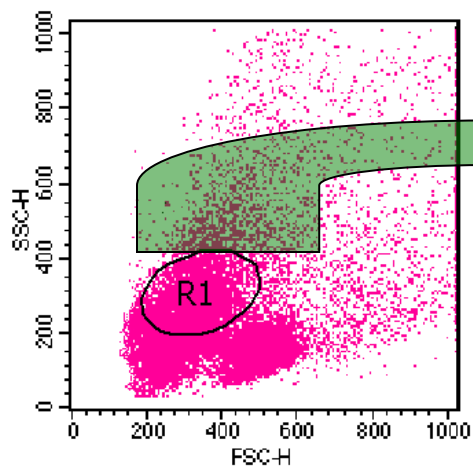
Region	Events	% Gated
R1	6244	25.11



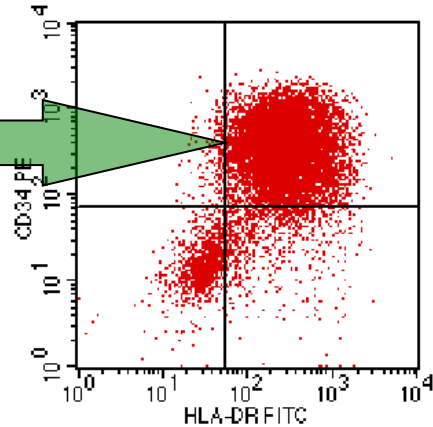
Quad	Events	% Gated
UL	40	0.64
UR	200	3.20
LL	5548	88.87
LR	455	7.29



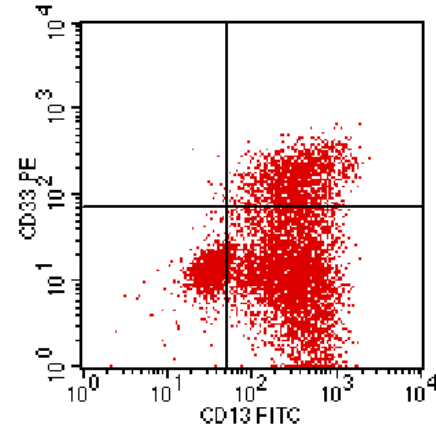
Quad	Events	% Gated
UL	1	0.02
UR	100	1.53
LL	5438	83.06
LR	1008	15.40



Region	Events	% Gated
R1	10293	41.40

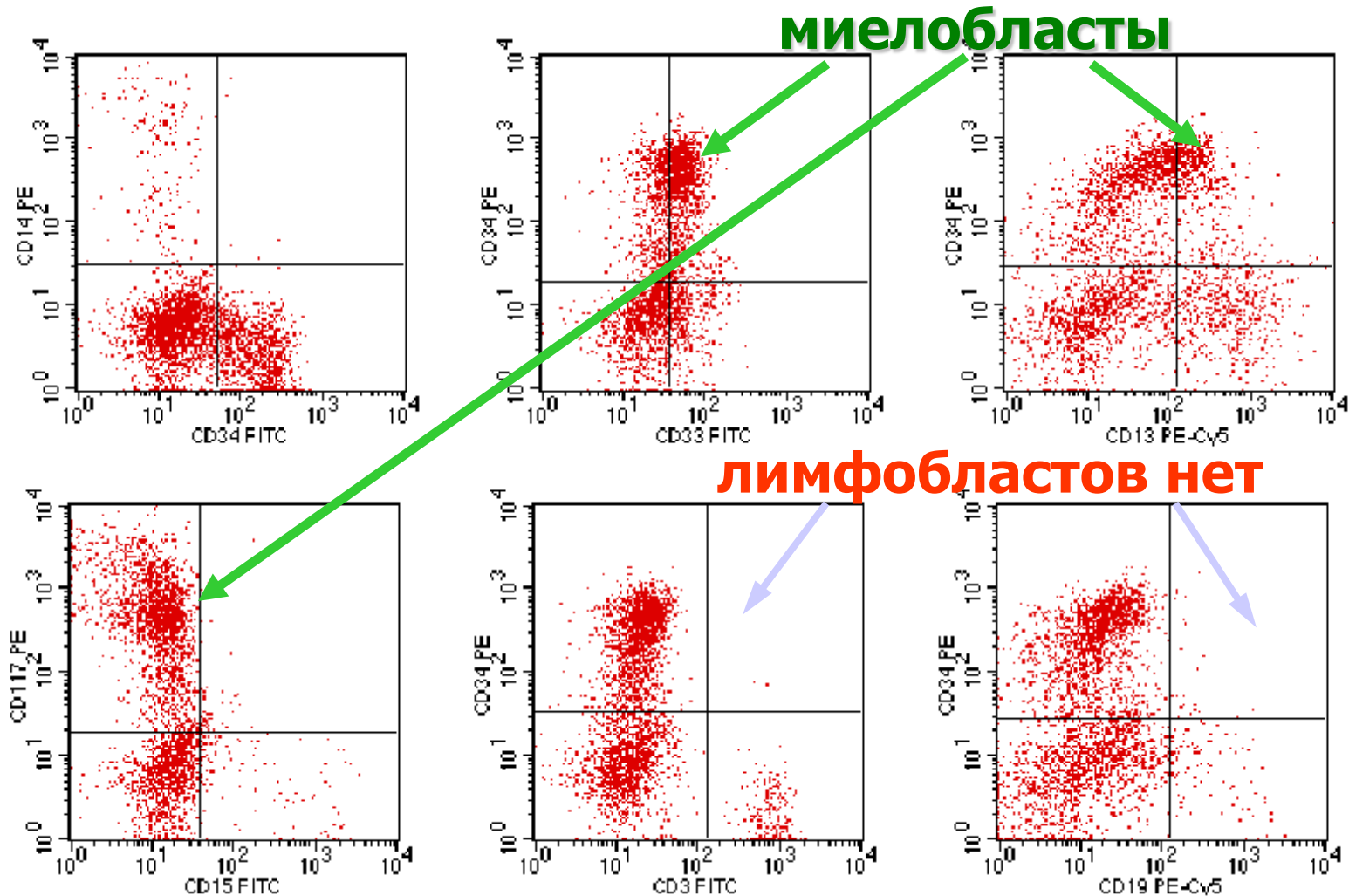


Quad	Events	% Gated
UL	210	2.04
UR	7967	77.40
LL	1287	12.50
LR	829	8.05

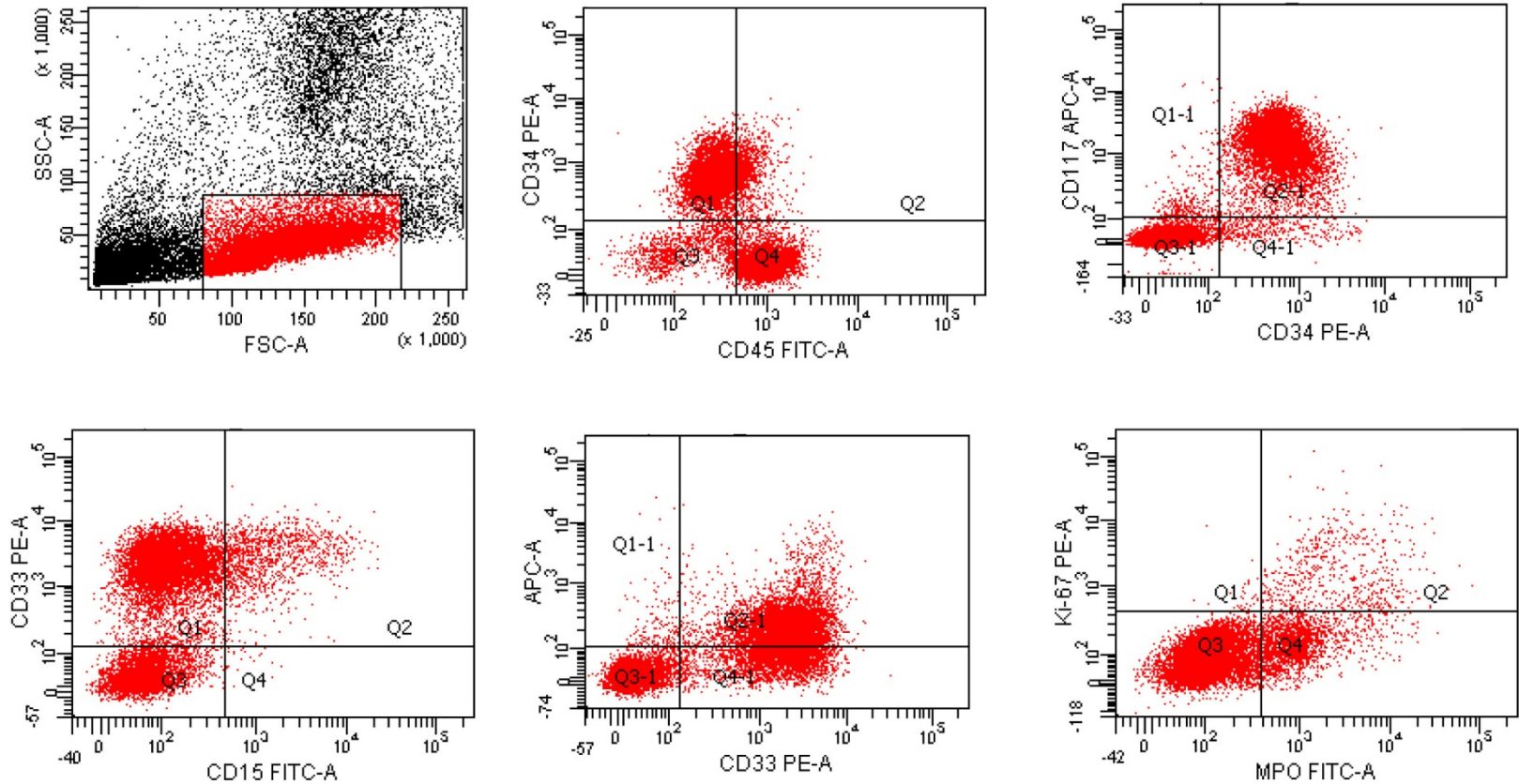


Quad	Events	% Gated
UL	11	0.15
UR	1529	20.27
LL	1350	17.89
LR	4655	61.70

# Определение линейной принадлежности бластов



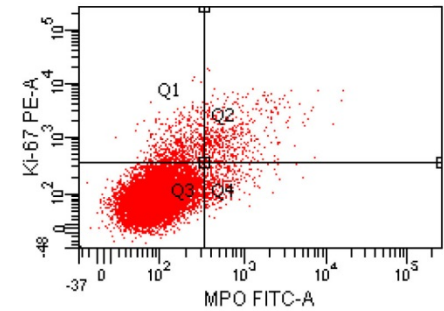
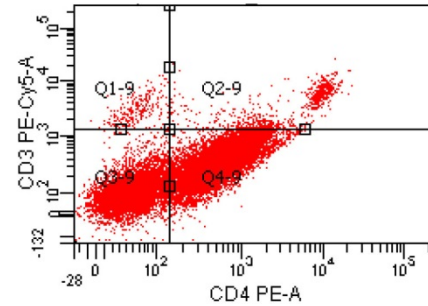
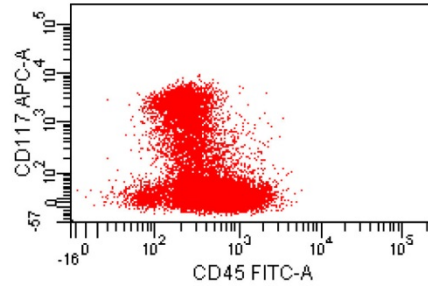
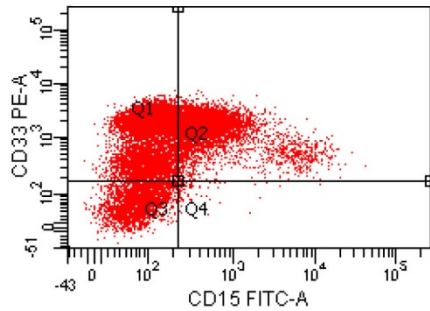
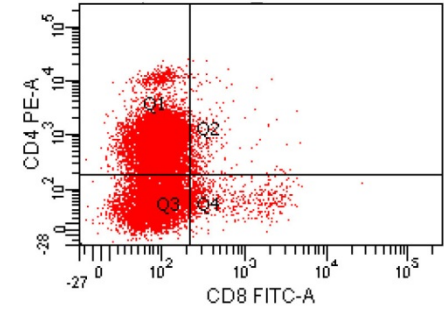
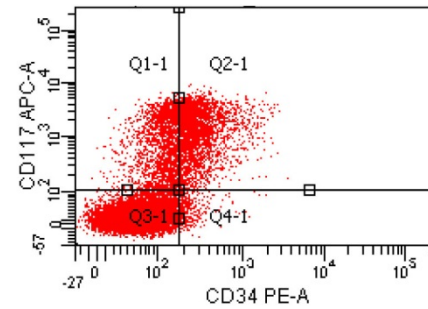
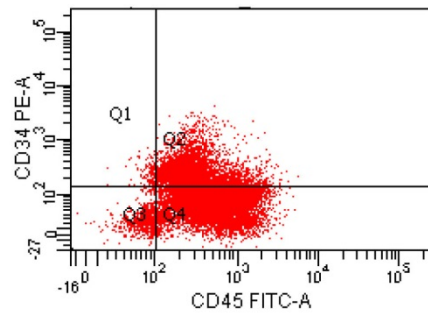
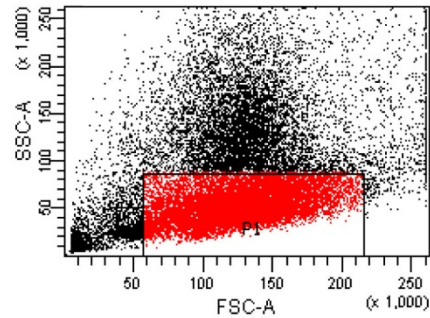
# Острый миелобластный лейкоз



Фенотип опухоли:

CD34+/HLA-DR+/CD117+/CD33+/CD13+/-/CD15-/MPO-; Ki-67 low

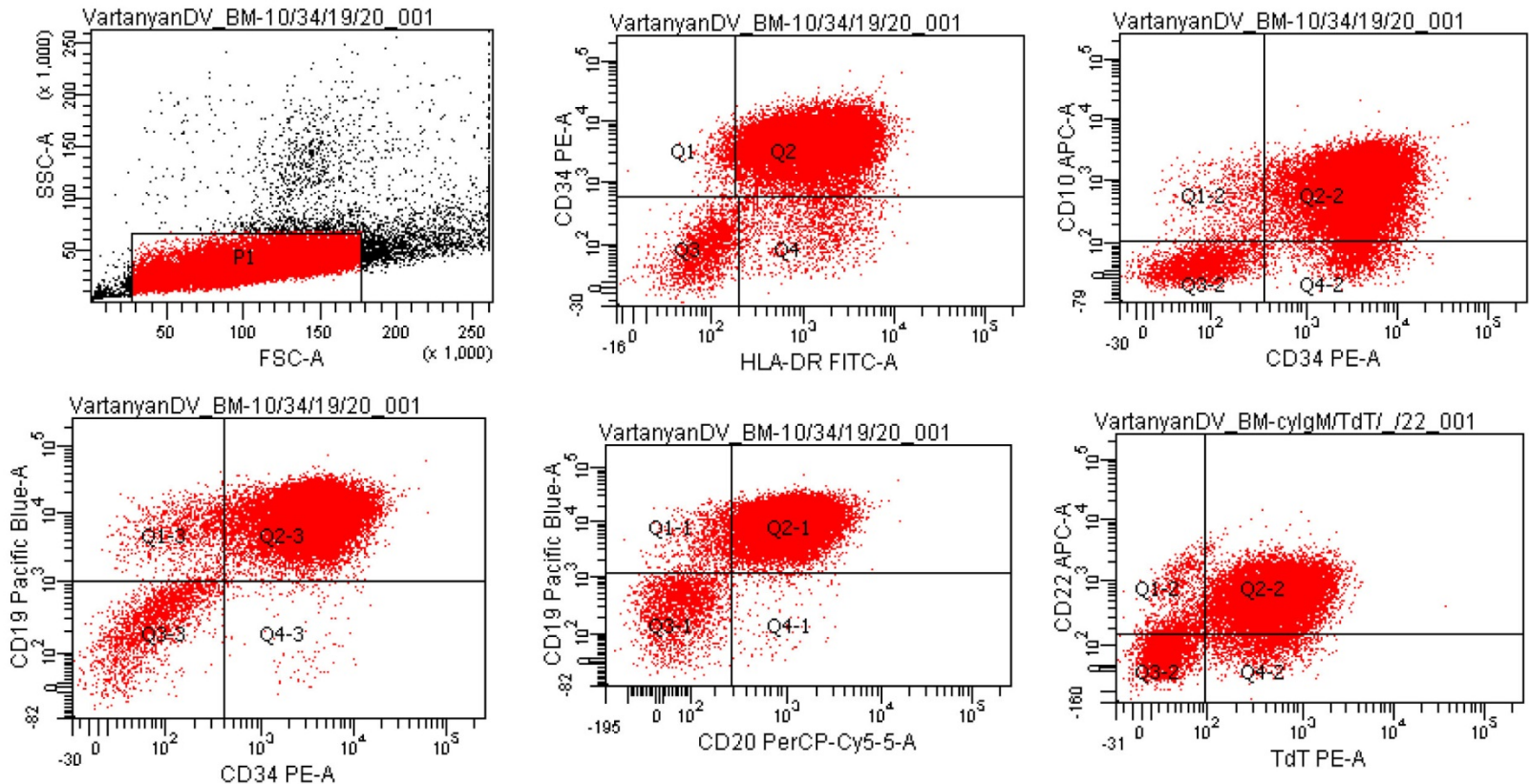
# Острый монобластный лейкоз



Фенотип опухоли:

CD34+/HLA-DR+/CD117+/-/CD33+/CD13+/-/CD15-/CD14+/CD4<sup>low</sup>/MPO-;  
Ki-67 low

# Острый В-лимфобластный лейкоз



Фенотип опухоли:

CD34+/HLA-DR+/CD10+/CD19+/CD22+/TdT+; Ki-67 low

# Иммунофенотипирование в диагностике лимфом

---

Диагностика проводится:

1. по экспрессии антигенов, которые редко встречаются в норме;
2. по коэкспрессии антигенов, которые в норме встречаются на разных клетках;
3. по дисбалансу между иммунологически различными клеточными популяциями

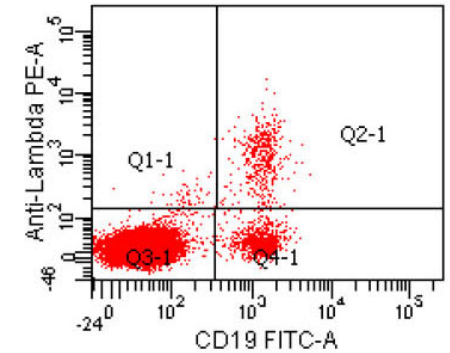
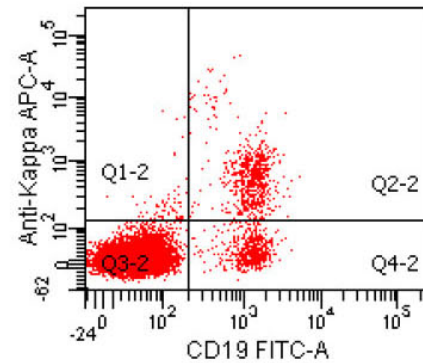
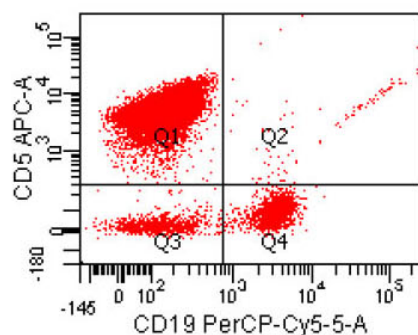
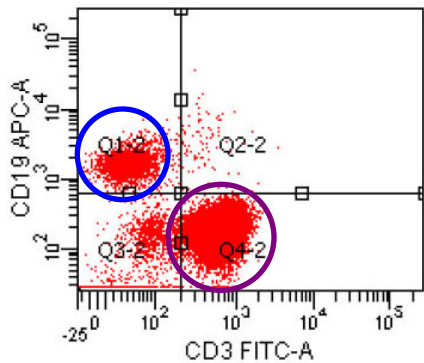
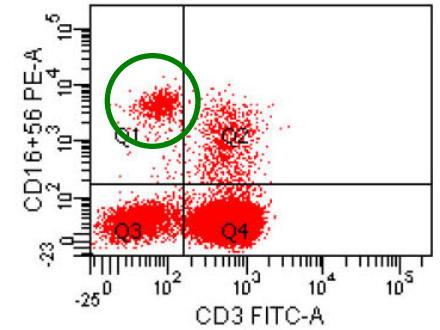
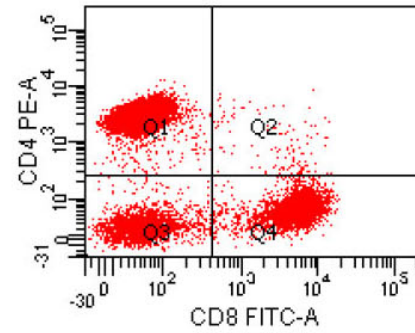
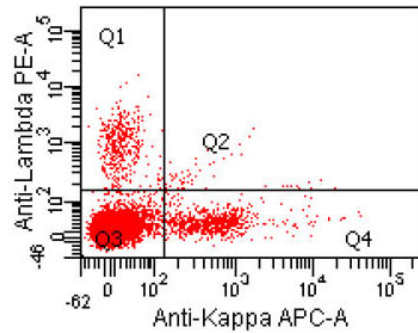
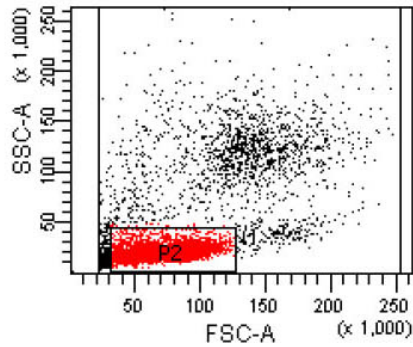
# **Иммунофенотипирование в диагностике лимфом**

**Минимальный набор антител:**

**В-клеточные лимфомы: CD19; CD20;  
CD22; CD5; CD10; CD23; CD79a; CD79b;  
каппа/lambda; CD38; Ki-67.**

**Т-клеточные лимфомы: CD1a; CD2;  
CD3; CD5; CD7; CD4; CD8; CD56; Ki-67**

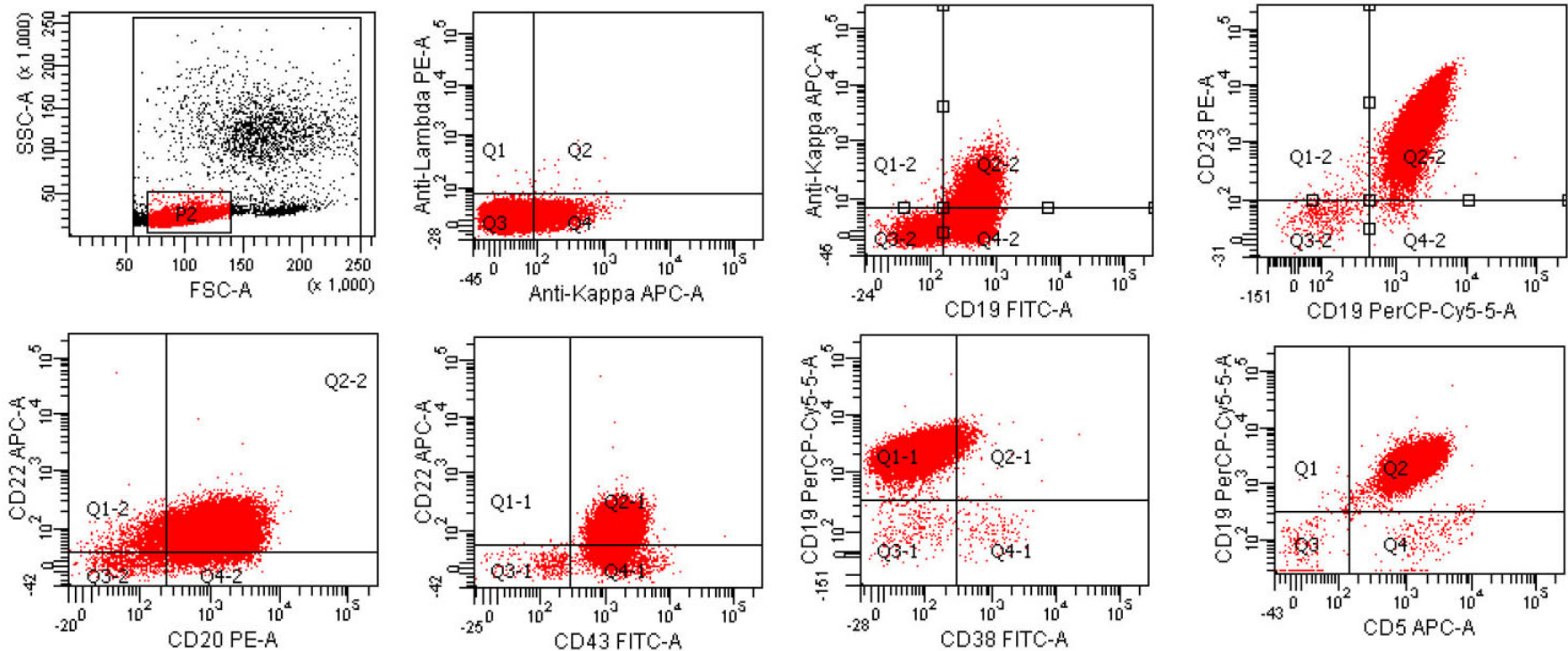
# Норма (кровь)



Соотношение Т-, НК и В-лимфоцитов;  
В-клетки поликлональны по легким цепям IgG;  
хелперно-супрессорное отношение в норме.



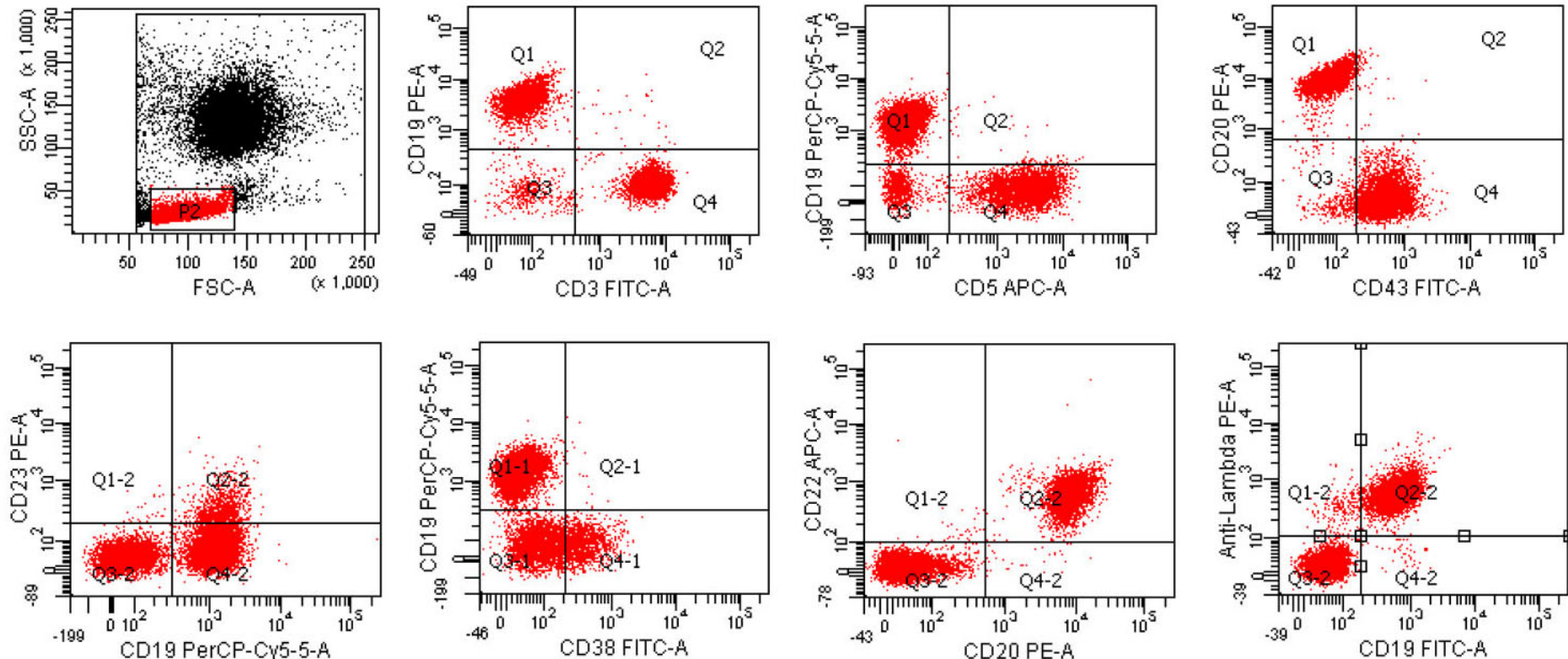
# Хронический В-клеточный лимфолейкоз



**Фенотип опухоли:**

**CD19<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup>/CD20<sup>low</sup>/CD22<sup>low</sup>/CD43<sup>+</sup>,  
клональность по легким цепям IgG.**

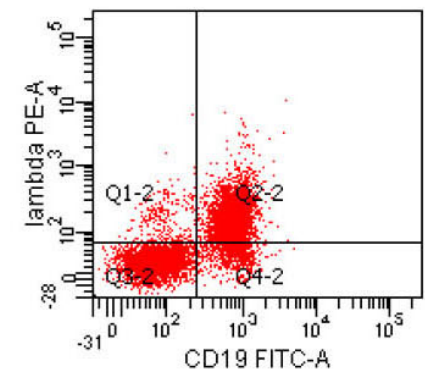
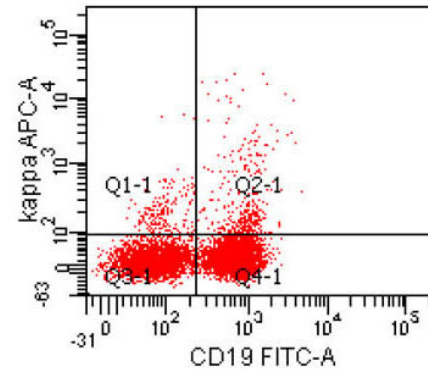
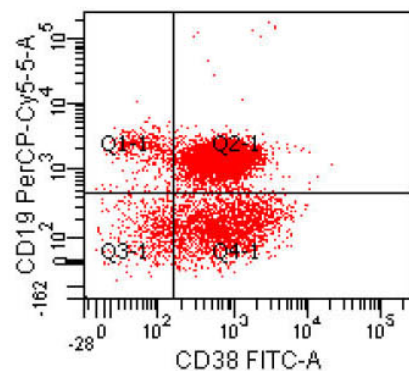
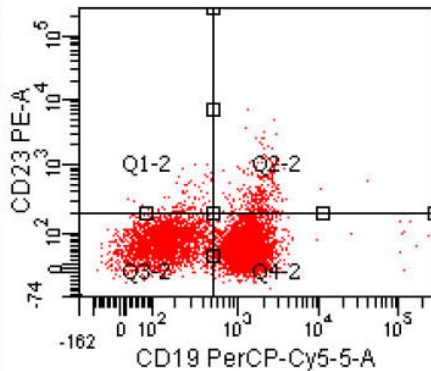
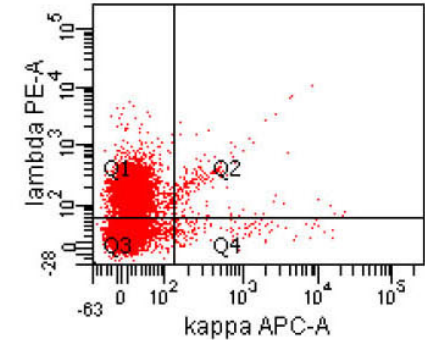
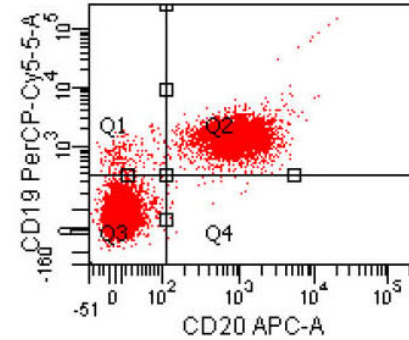
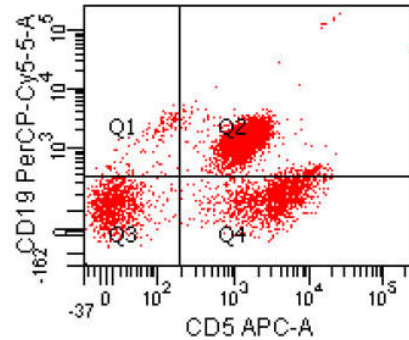
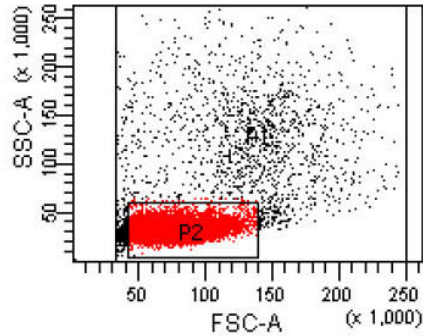
# Лимфома из клеток маргинальной зоны



**Фенотип опухоли:**

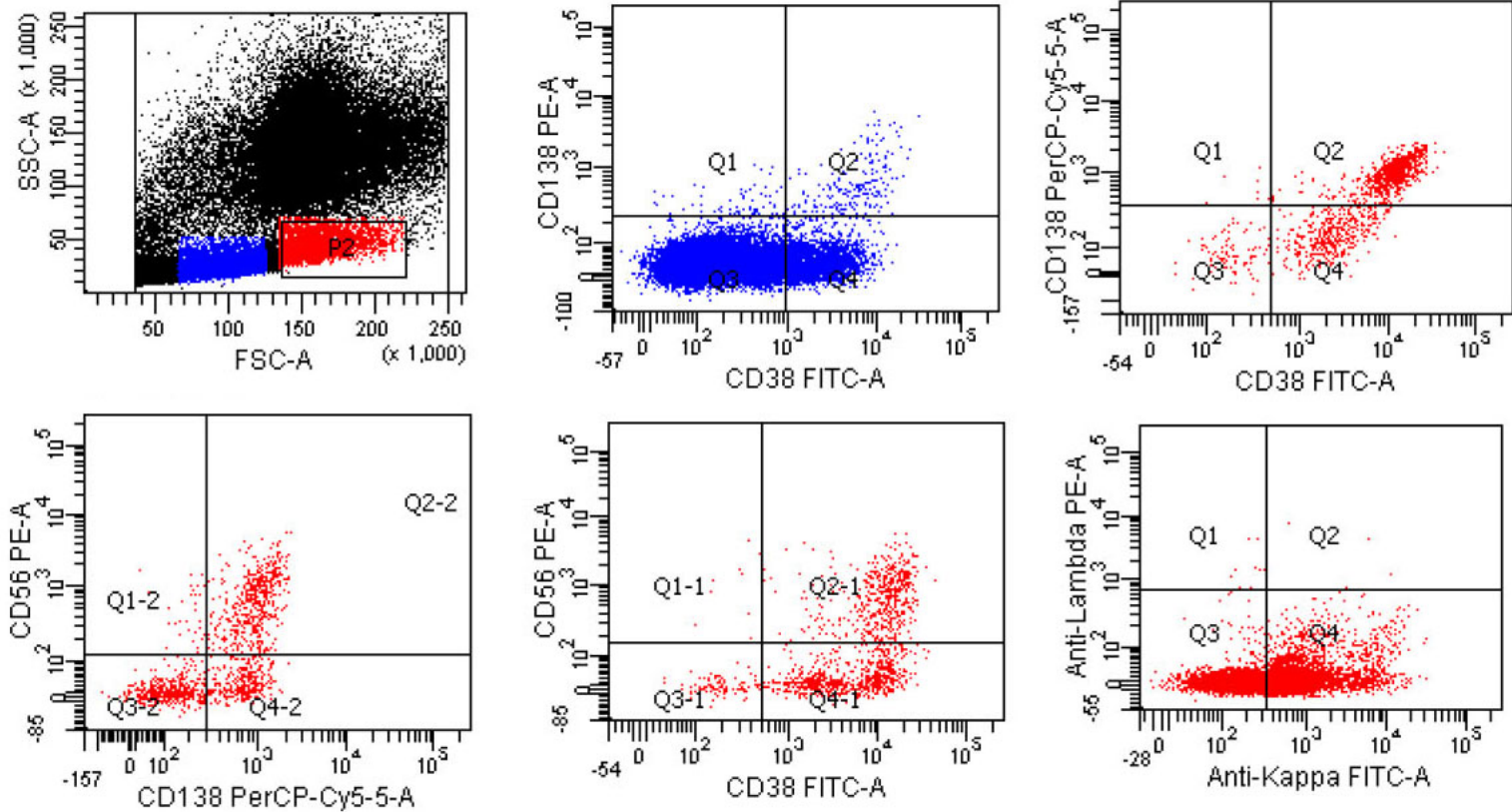
**CD19+/CD5-/CD23-/CD20+/CD22+/CD43-,  
клональность по легким цепям IgG.**

# ЛКМЗ



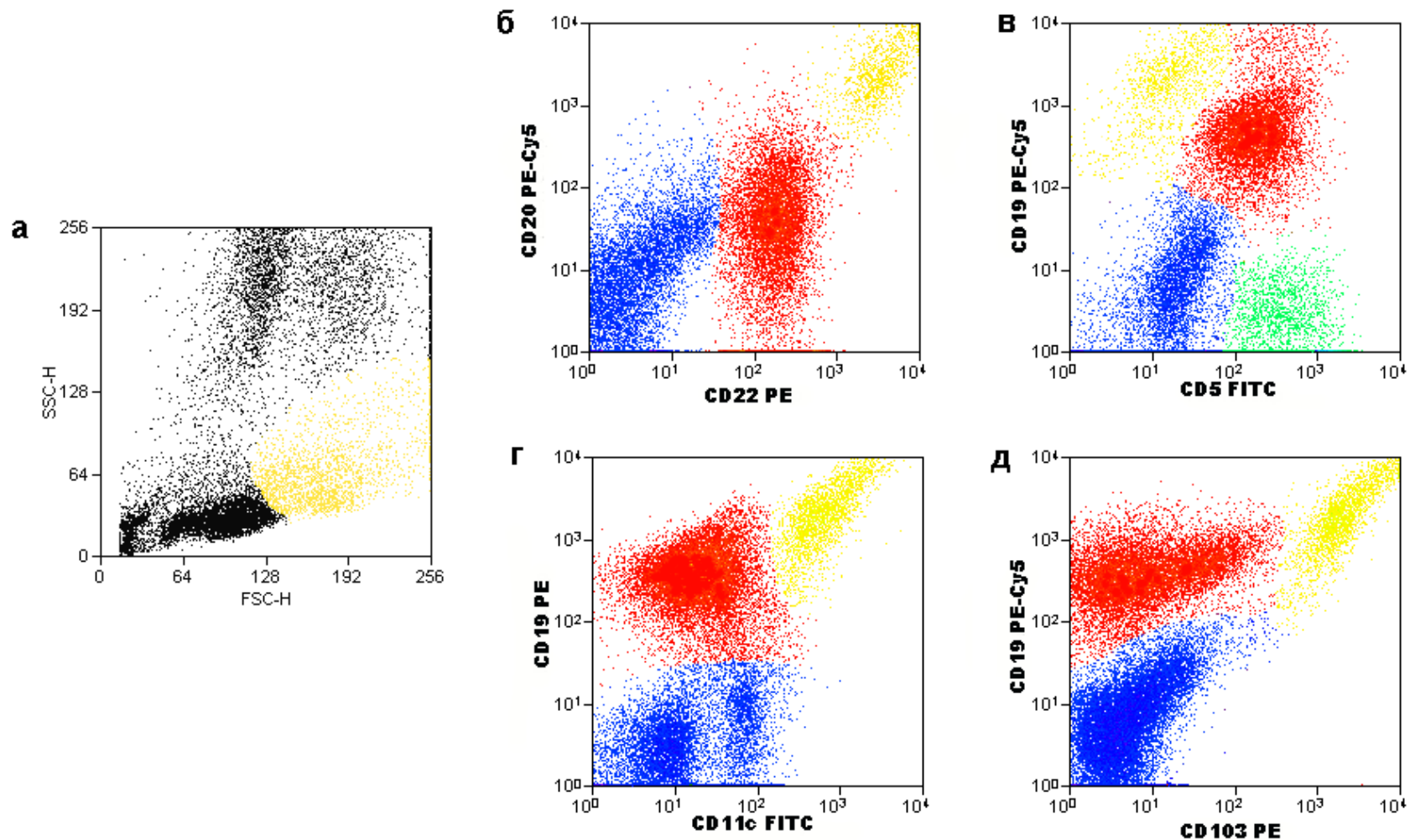
Фенотип опухоли: CD19<sup>+</sup>/CD20<sup>high</sup>/CD23<sup>-</sup>/CD5<sup>+</sup>,  
Клетки клональны по легкой цепи IgG.

# Миелома



**Фенотип опухоли: CD38<sup>high</sup>/CD138<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>/CD19<sup>-</sup>,  
клональность по легким цепям IgG.**

# Хронический лимфолейкоз + волосатоклеточный лейкоз



# **Современная диагностика гемобластозов**

**6 или 8 цветов, двух или трехлазерная машина.**

**Диагностика (кровь, костный мозг, реже – суспензия клеток лимфоузла): первичное заболевание, ответ на терапию, определение наличия остаточной болезни.**

**Возможности: чувствительность – до 0,01% (1 клетка на 10000).**

**Определение опухолевой популяции и ее фенотип (нозологическая форма или группа форм).**

# Пример 10-цветной диагностической панели

LASER	MAB	CLONE	FLUOROCHROME	SOURCE <sup>a</sup>
Blue (488 nm)	CD34	581	FITC	BC
	Ig-kappa	Polyclonal rabbit antihuman	FITC	DAKO
	CD7	8H8.1	PE	BC
	Ig-lambda	Polyclonal rabbit antihuman	PE	DAKO
	CD10	ALB1	ECD	BC
	CD4	T4	PECy5.5	BC
	CD56	NKH-1	PECy7	BC
	CD117	4G7	PECy7	BC
Violet (405 nm)	CD15	80H5	PB	BC
	CD20	HRC20	PB	BC
	CD45	J33	KO	BC
Red (638 nm)	CD3	UCHT1	APC	BC
	CD33	D3HL60.251	APC	BC
	CD8	T8	APC-Ax700	BC
	CD19	J4.119	APC-Ax750	BC

APC, allophycocyanin; Ax, Alexa; Cy, cyanin; ECD, energy coupled dye (PE coupled to Texas Red); FITC, fluorescein isothiocyanate; KO, Krome Orange; PB, Pacific blue; PE, R-phycoerythrin.

<sup>a</sup> BC, Beckman Coulter, Marseille, France; DAKO, DAKO Glostrup, Denmark.

**Дает возможность диагностики в одной пробирке – необходима для малоклеточных случаев (спинномозговая/плевральная жидкость; гипопластический к/м).**

**В один канал флуоресценции ставятся антитела, которые не могут экспрессироваться на одних и тех же клетках.**

(F.W.M.B. Preijers et al., 2012)