

Průtokový cytometr se sortrem

Ústav Biotechnologie (319)

Michaela Rumlová: michaela.rumlova@vscht.cz, linka 4177, 5004

Ivana Křížová: ivana.krizova@vscht.cz, linka 4127, 5004



Průtoková cytometrie

Flow cytometry (FC) = flow+cyto+metry: měření buněk v pohybu

FC umožňuje:

- analyzovat mnoho vlastností a charakteristik na úrovni jedné buňky/částice (FC rekord: 26 parametrů)
- ve vzorku o velkém množství částic (10^4 - 10^5)
- ve velmi krátké době (minuty)



Hlavní 3 komponenty FC

fluidika

optika

elektronika



- fluidika – unášecí tekutina do které se vstříkne vzorek
- optika – zdroje záření a optické hranoly, filtry a detektory
- elektronika – digitalizace snímaného optického signálu a zpracování dat software



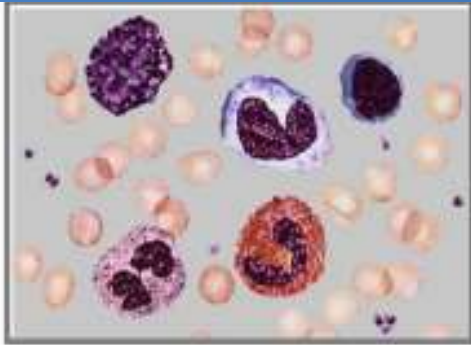


Průtokový cytometr se sortrem Becton Dickinson BD FACS Aria III SORP

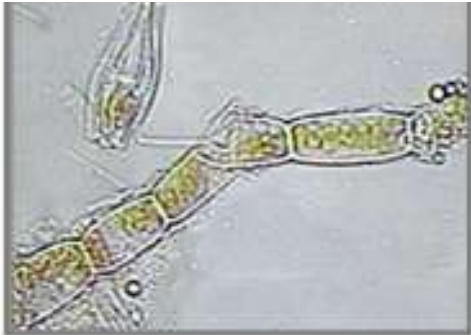
Co umí?

- analyzovat a třídit jakékoliv částice nebo buňky o velikostech od 250 nm do 150 mikrometrů
- analýza a třídění (sortování) částic/buněk pomocí dvou základních parametrů:
 - 1) rozptyl světla
 - 2) emitovaná fluorescence

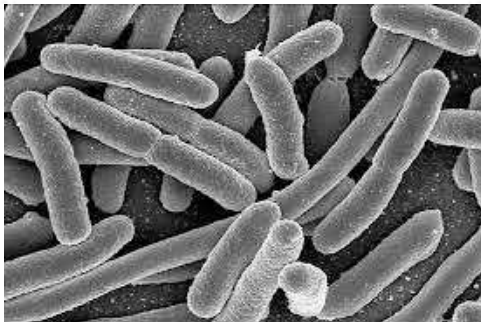




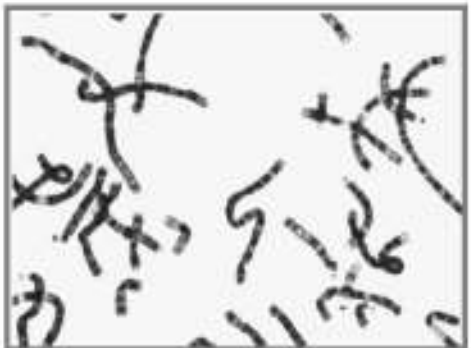
tkáňové buňky



řasy a kvasinky



bakteriální buňky



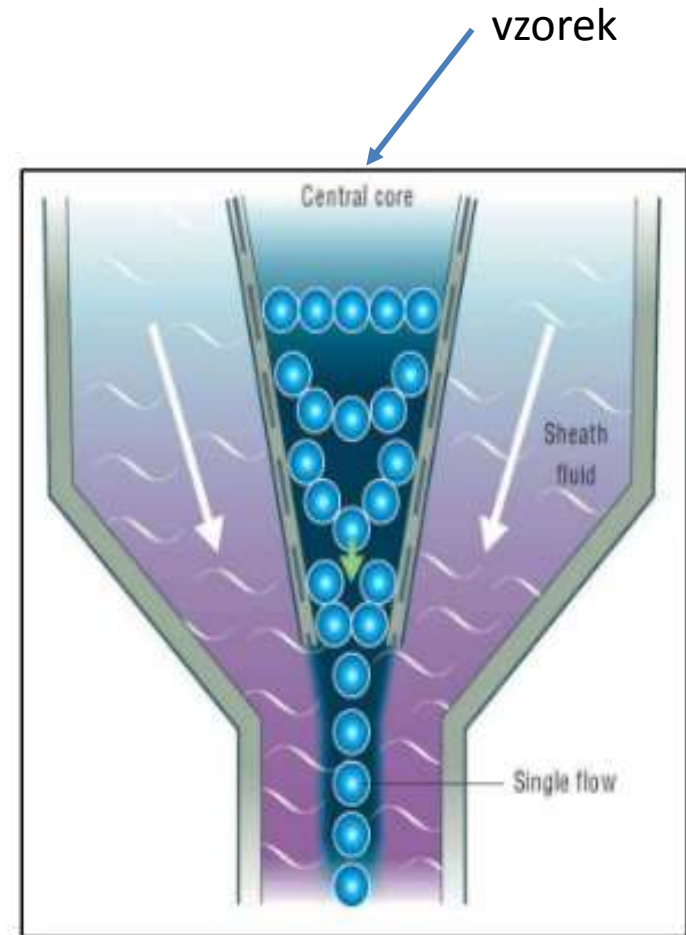
chromosomy

polymerní kuličky

různá velikost
různá denzita vnitřního obsahu
(komplexita/granularita)
buněk/částic
Ize měřit pomocí FC

princip průtokové cytometrie:

- suspenze částic/buněk je vnesena a vyředěna do proudu tzv. nosné kapaliny (PBS, voda, pufr)
- částice jsou tlačeny do středu proudu kde se „řadí“ jedna za druhou: hydrodynamická fokusace
- částice vstupují do měřící cely/kyvety – srdce celého přístroje - kde prochází světelným paprskem (nebo několika)

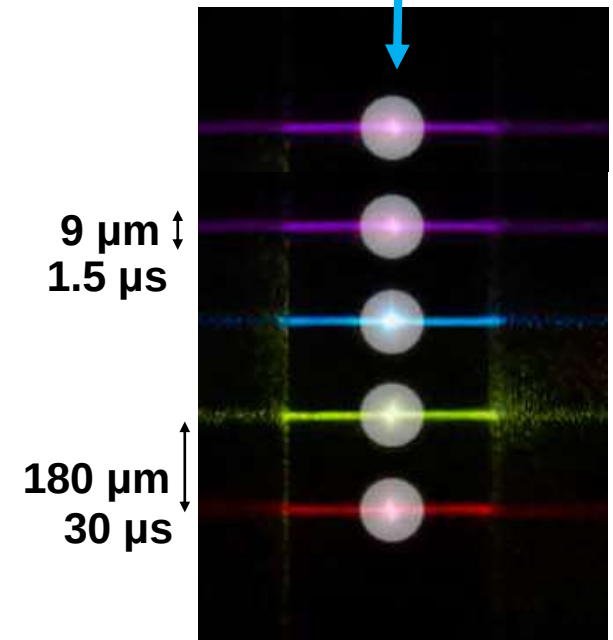
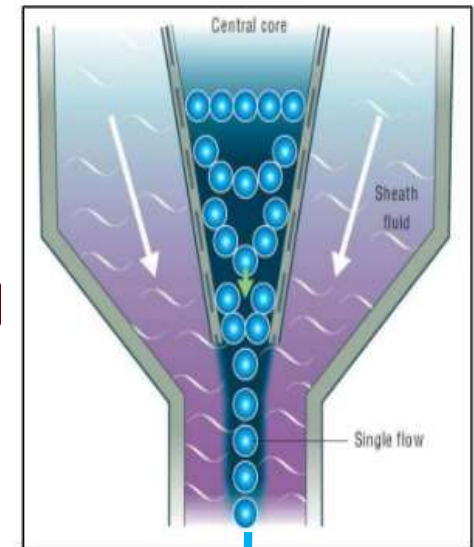




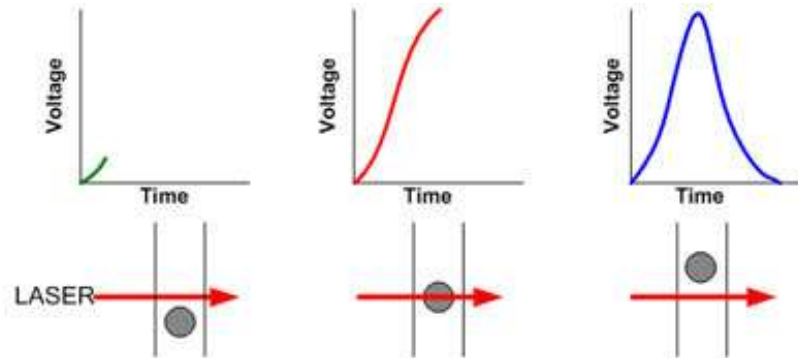
UV Fialový Modrý YG Červený
355nm 405nm 488 nm 561 640 nm



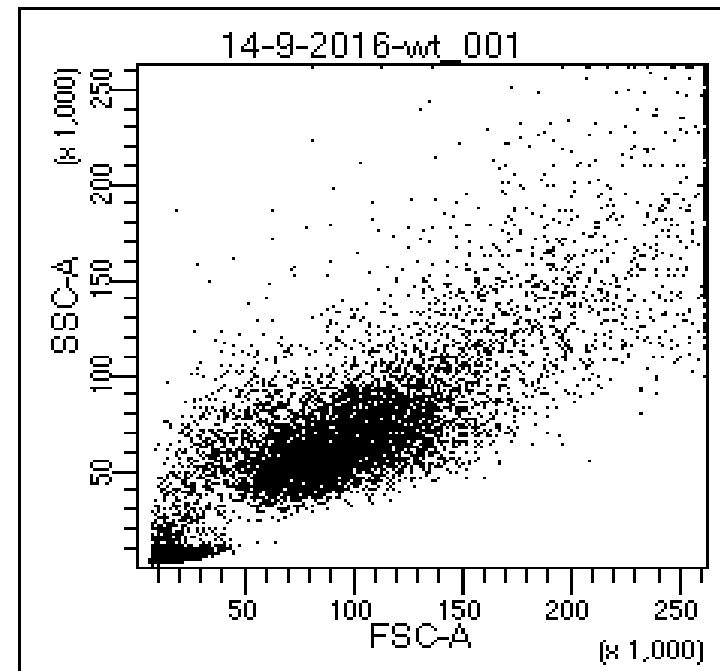
- zdroj záření – monochromatické lasery
- kalibrace: 1 částice /světelný paprsek
- Rozptyl světla, excitace a emise: přenos optickými vlákny– filtry (LP) a detekce pomocí detektorů:
1x fotodioda (FSC) a 15 x fotonásobičů



záznam intenzity světelného signálu v podobě napěťového pulsu
potlačení podprahového signálu - treshold

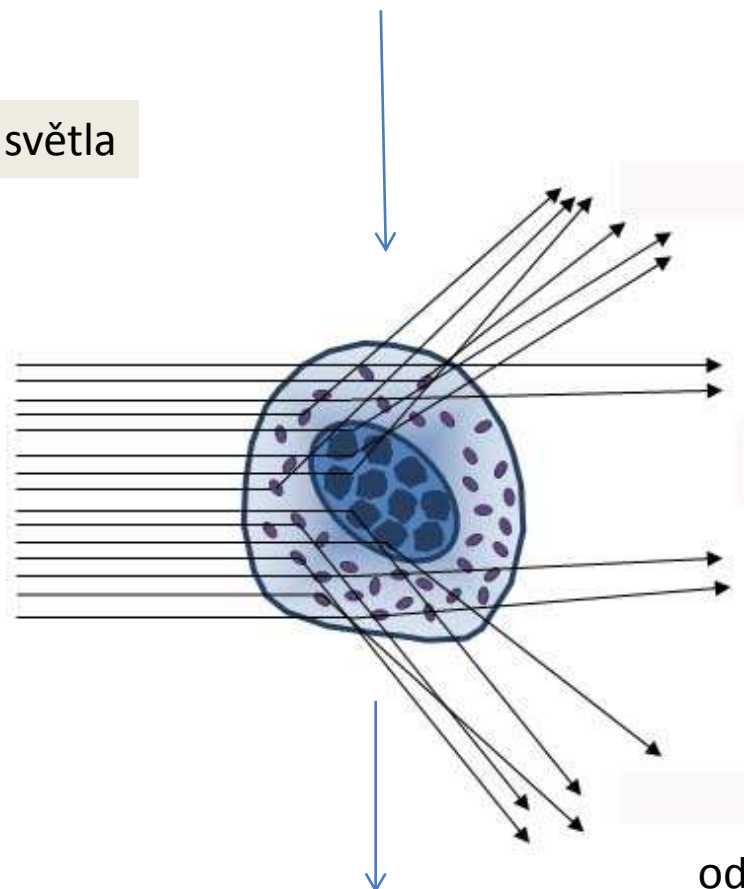


Pro každou událost se ukládají
získaná data v příslušných
naměřených kanálech,
vyhodnocení softwarem: **dot blot**





Rozptyl světla

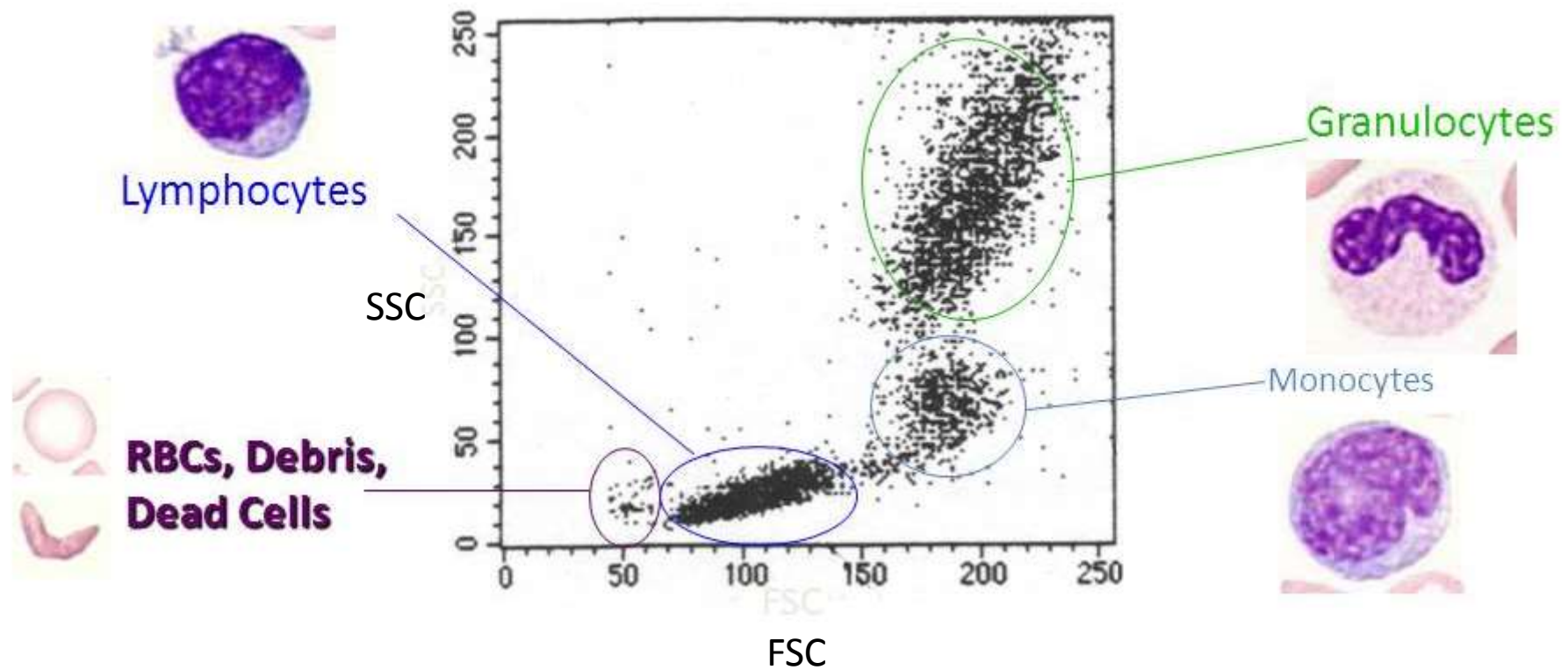


procházející světlo:
forward scatter FCS (488 nm)
velikost částice/buňky

odražené světlo side
scatter SSC
granularita/komplexita
částice/buňky



měření přímého a bočního rozptylu světla: FSC a SSC

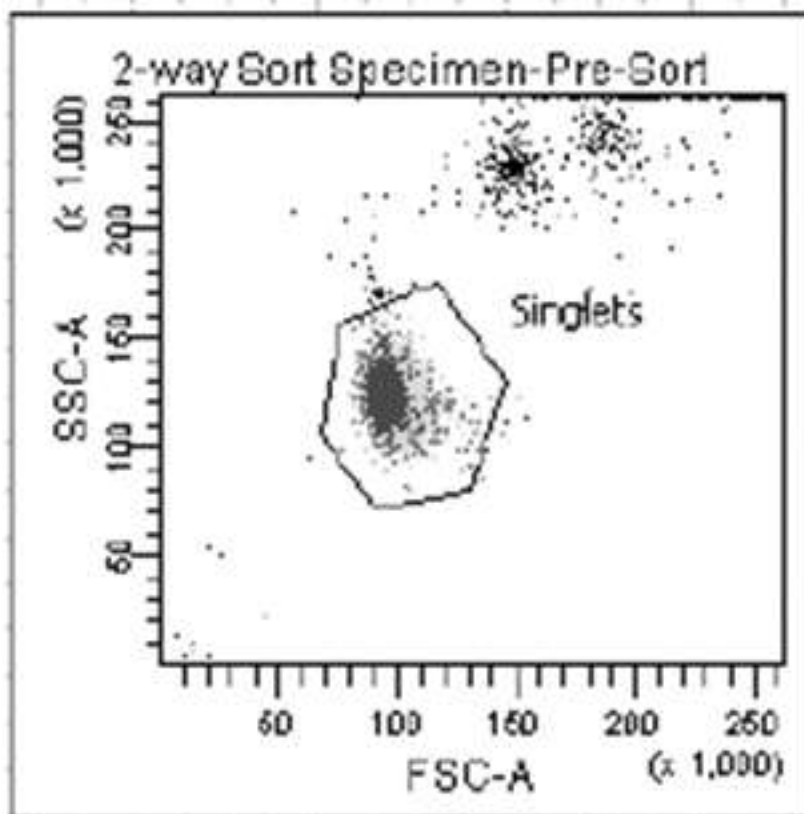




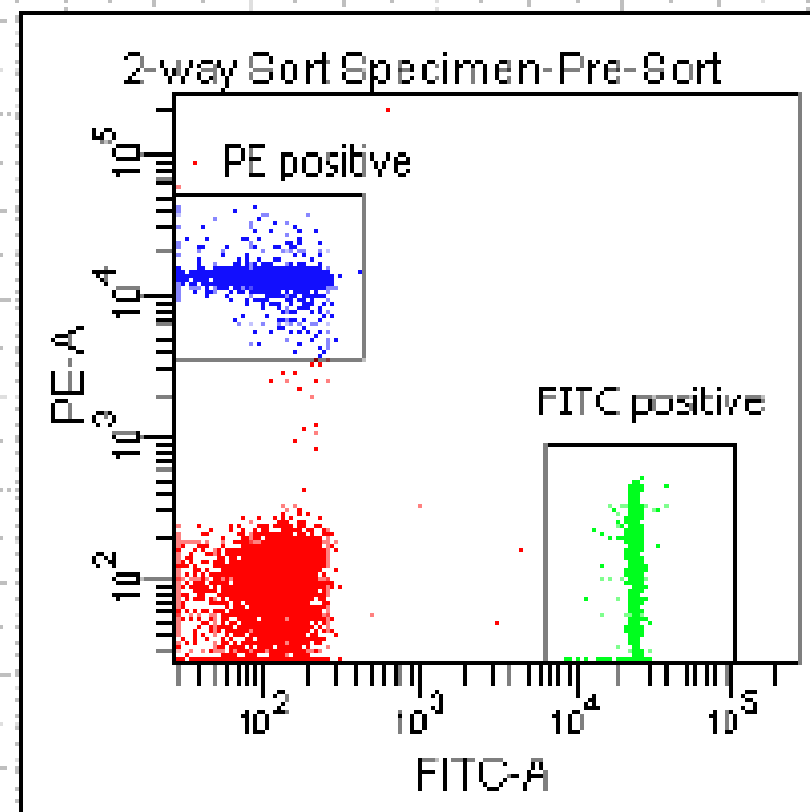
fluorescence

- Analyzovaná částice obsahuje fluorescenčně značené molekuly: protilátku, inkorporované nanočástice, GFP.....
- lokalizace na povrchu nebo uvnitř
- fluorescenčně značená částice/buňka prochází laserem – excitace fluoroforu – emise – detekce - vyhodnocení

Rozptyl světla



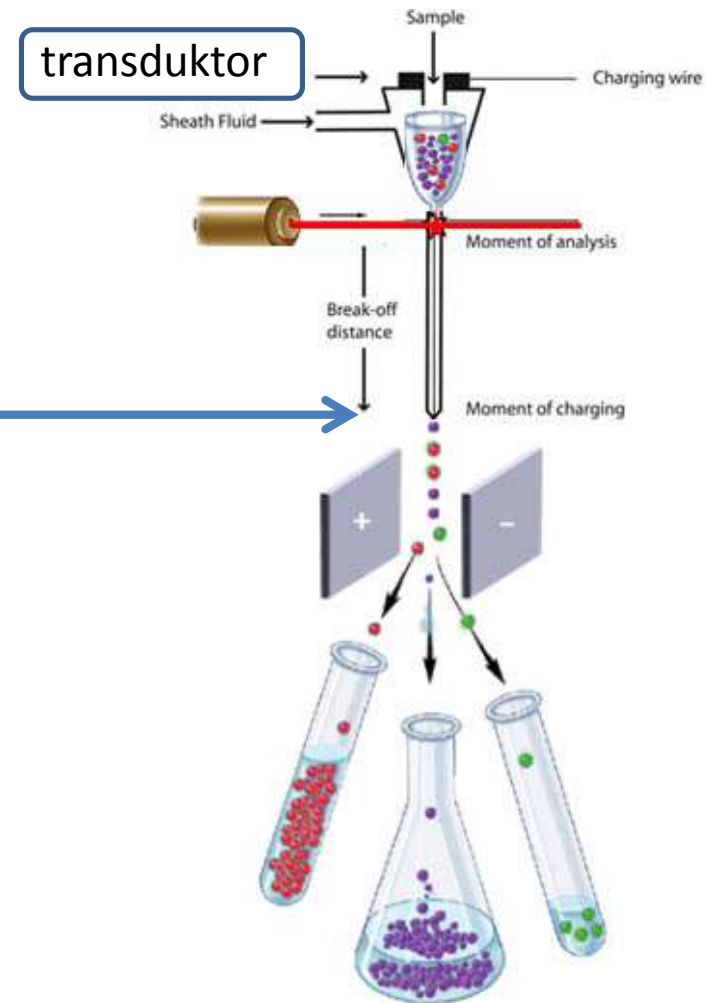
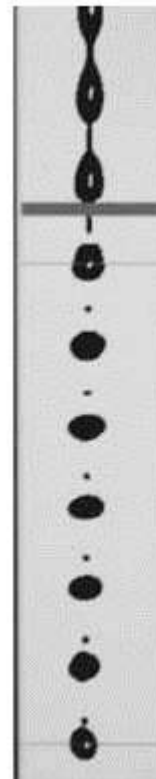
fluorescence



Třídění/sortování částic

metoda elektrostatického sortování

- částice, obsahující sledovaný fluorescenční/morfologický znak, je pozitivně nebo negativně nabitá
- roztříštění proudu částic na uniformní kapičky – ideálně 1 kapička 1 částice
- pomocí deflekčních desek dochází u kapiček obsahujících nabité částice k vyklonění z proudu
- zachycení pozitivních buněk do testovacích zkumavek





sortovací módy

1. čistota >99%
2. Výtěžek 95-99%
3. 4-cestné sortování
4. „single-cell“

Aplikace po třídění/sortování buněk

- pro oddělení /vyčištění příslušných populací částic
- pro další analýzu (mikroskopie)
- pro kultivaci „pozitivních“ buněk
- v „single-cell“ módu pro klonování (editace genomu CRISPR/Cas9)

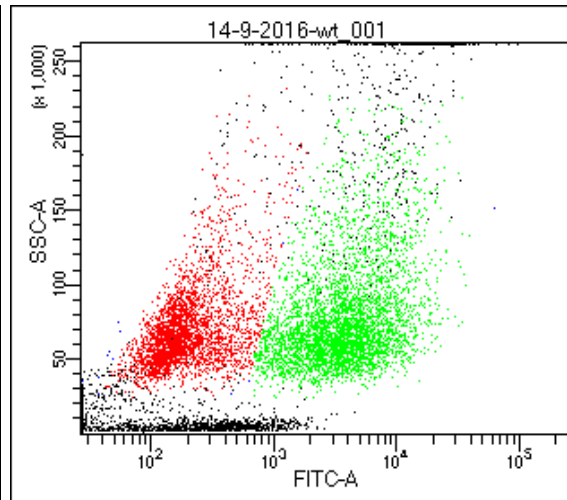
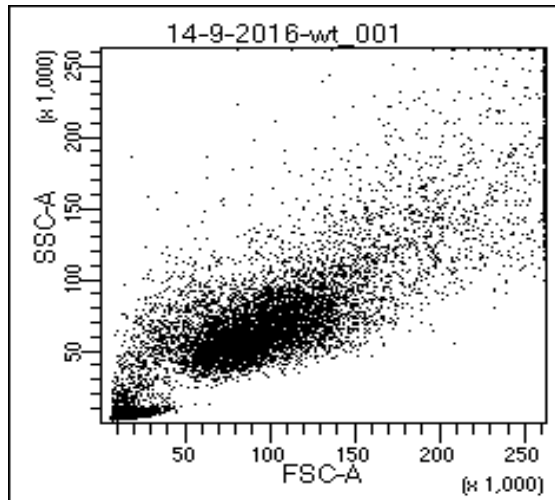
Aplikace:

Přímá kvantifikace částic/buněk nesoucích fluorofor(y)

- uvnitř či na povrchu
- fixované i nativní preparáty

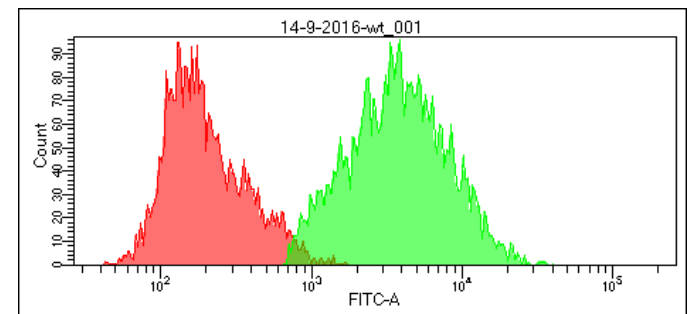
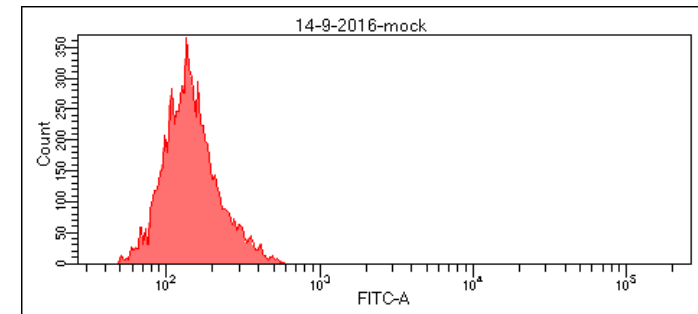
Barvení:

- Přímé: fluorescenčně značené primární protilátky
- Nepřímé: fluorescenčně značené konjugáty
- biochemická reakce – značený substrát

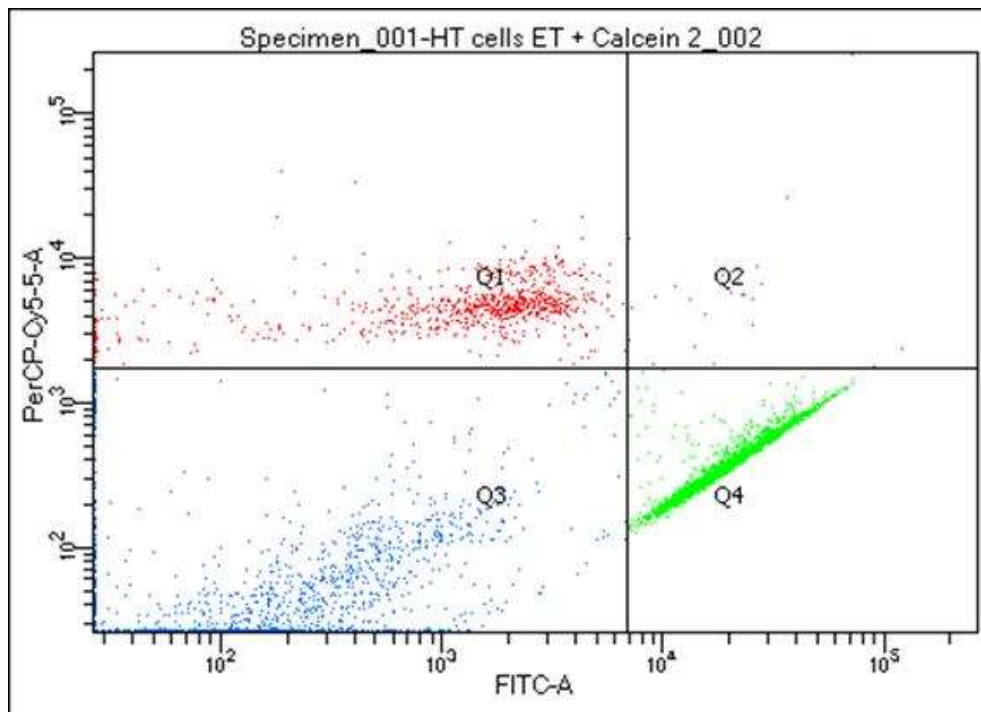


Tube: wt_001

Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	10,000	####	100.0
■ P1	3,201	32.0	32.0
■ P2	4,487	44.9	44.9



viabilita buněk

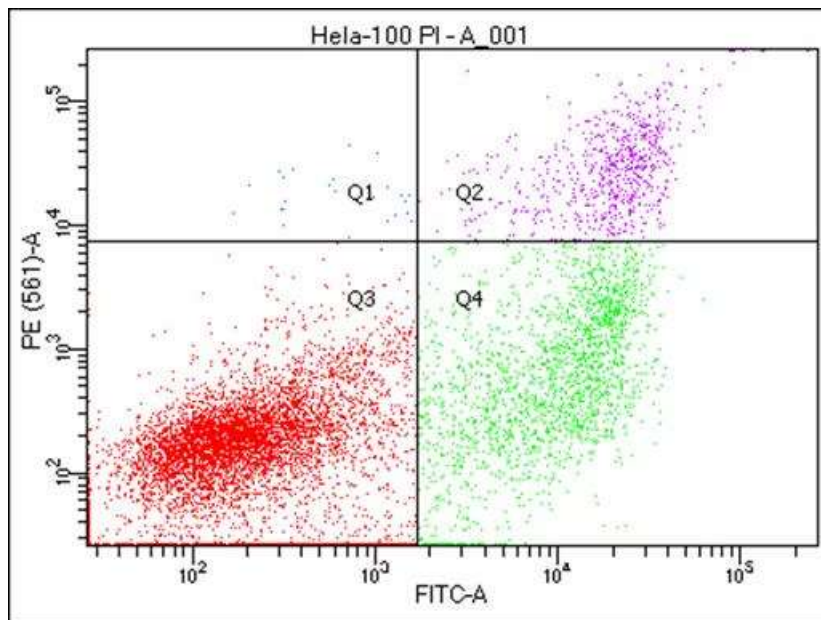


Tube: HT cells ET + Calcein 2_002

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
Q1	786	7.9	7.9
Q2	23	0.2	0.2
Q3	1,564	15.6	15.6
Q4	7,627	76.3	76.3

typ buněčné smrti

apoptosa: FITC konjugovaná protilátka proti PS
nekroza: prostup PI do mrtvých buněk

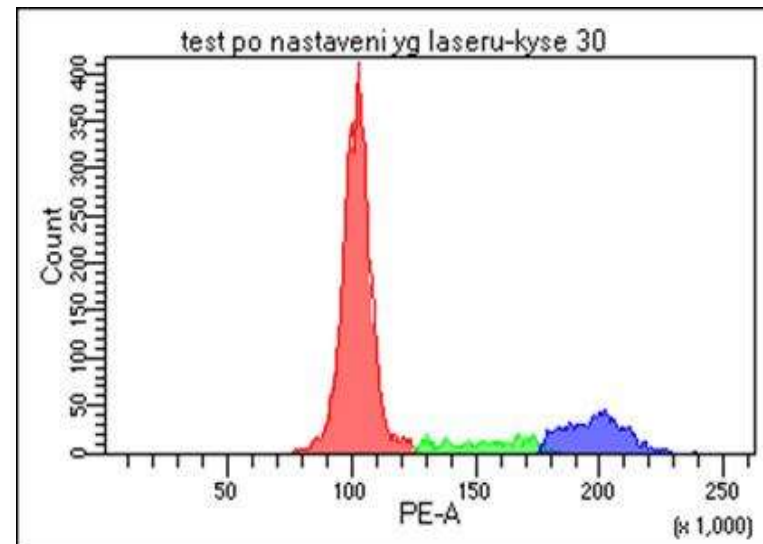
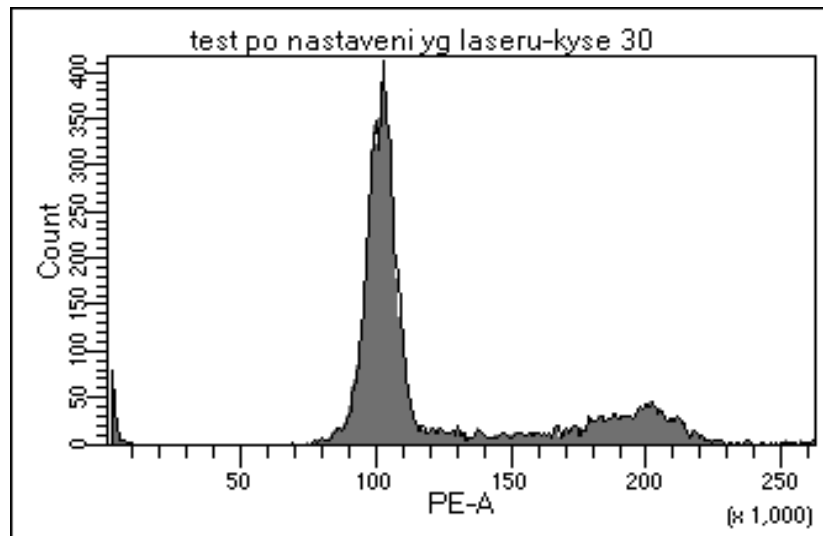


Tube: 100 PI-A_001

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
Q1	25	0.2	0.2
Q2	679	6.8	6.8
Q3	7,387	73.9	73.9
Q4	1,909	19.1	19.1

Buněčná proliferace

přímé měření obsahu DNA v buňkách: stanovení buněk v jednotlivých fázích BC



Tube: kyse 30

Population	#Events	%Parent
All Events	10,000	####
☒ P1	7,217	72.2
G1	5,052	70.0
S	701	9.7
G2/M	1,414	19.6



**Těšíme se na Vaše vzorky!!!
(i na Vás)**

Ústav Biotechnologie (319)

Michaela Rumlová: michaela.rumlova@vscht.cz, linka 4177, 5004

Ivana Křížová: ivana.krizova@vscht.cz, linka 4127, 5004