

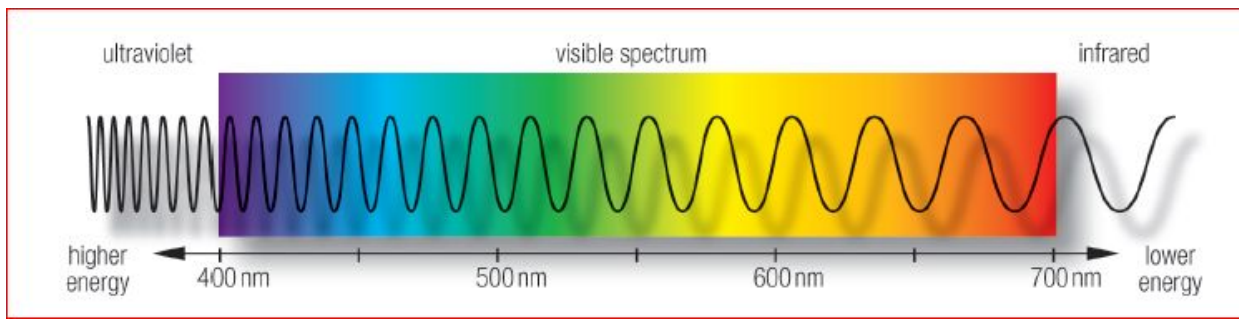
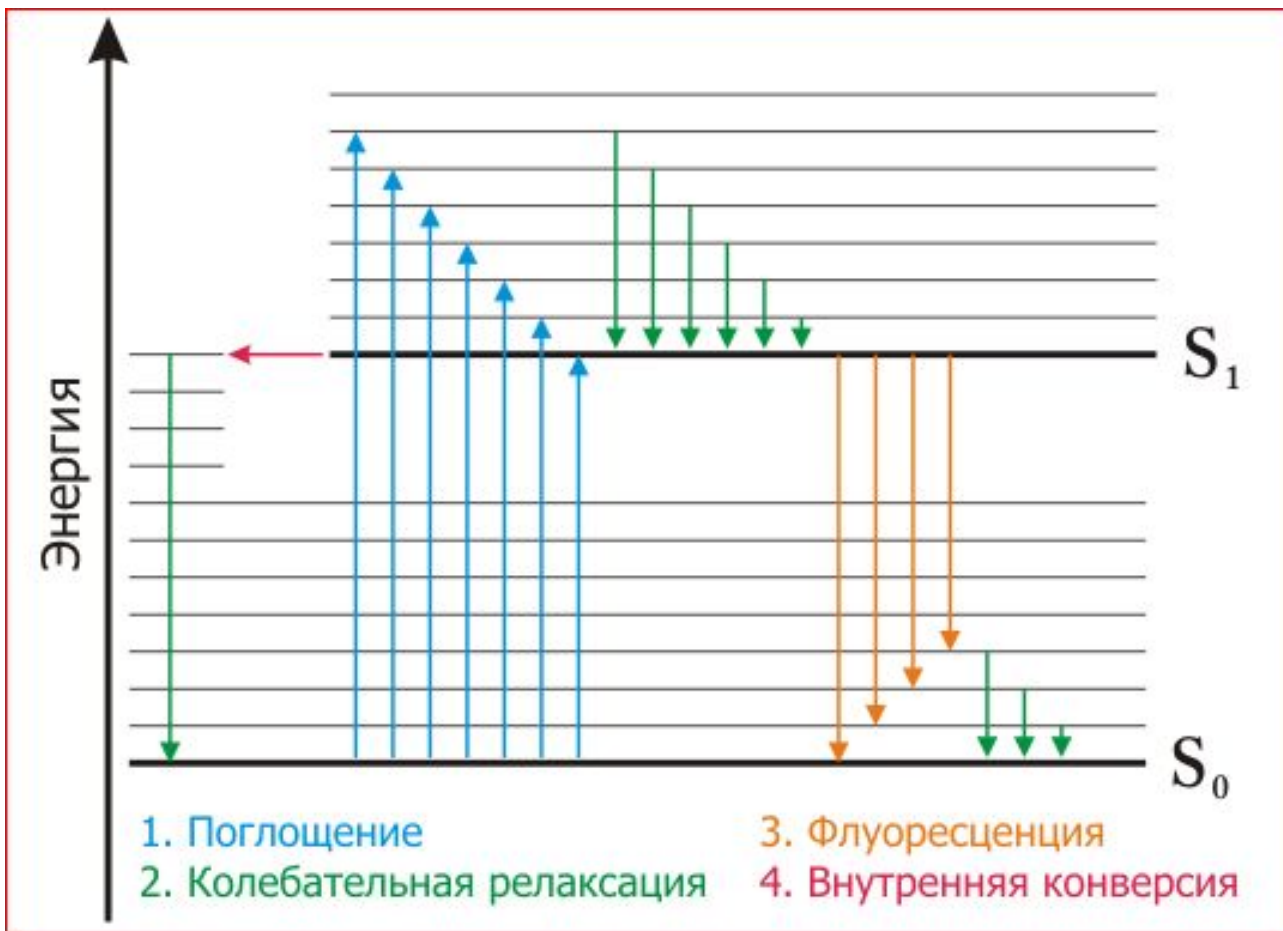
**Кафедра медицинских нанобиотехнологий МБФ**

**Методика проточной цитометрии и  
клеточной сортировки, их применение.**

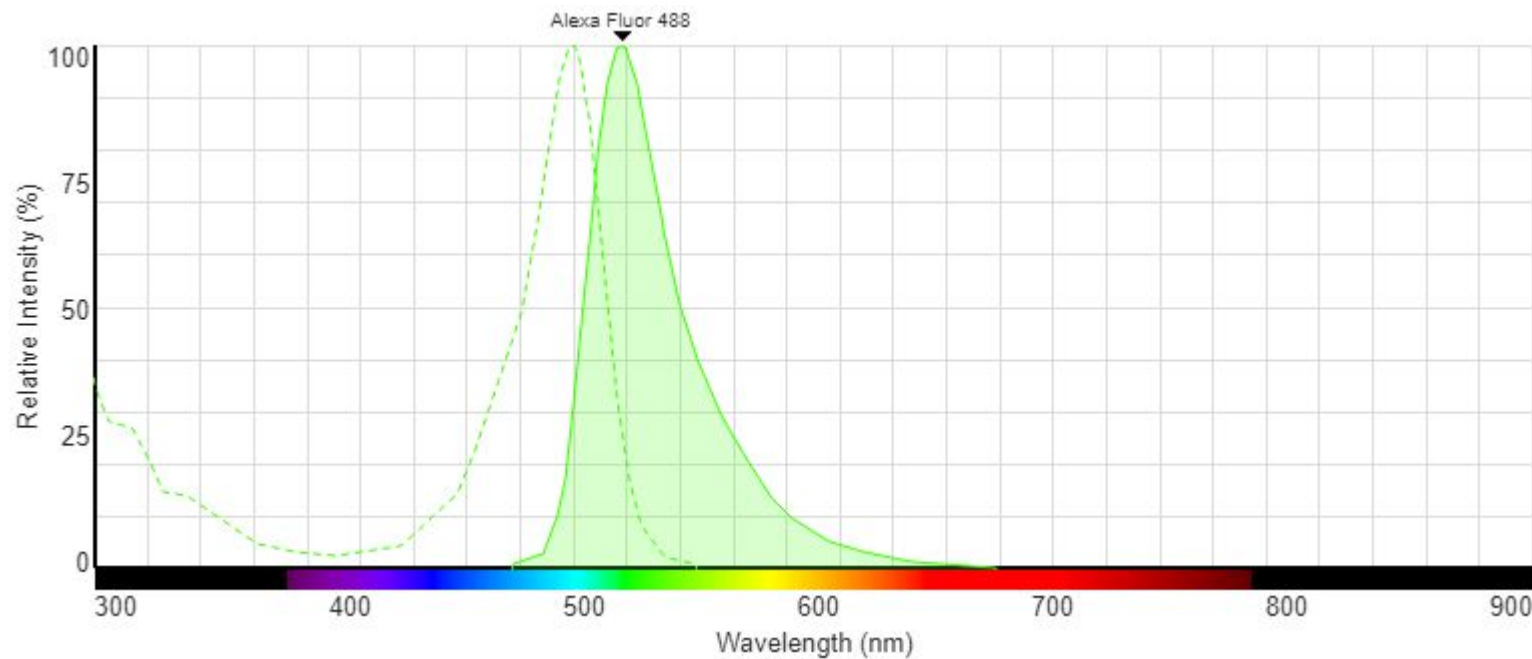
Автор:  
**Черепанов Сергей Александрович**

2019 г.

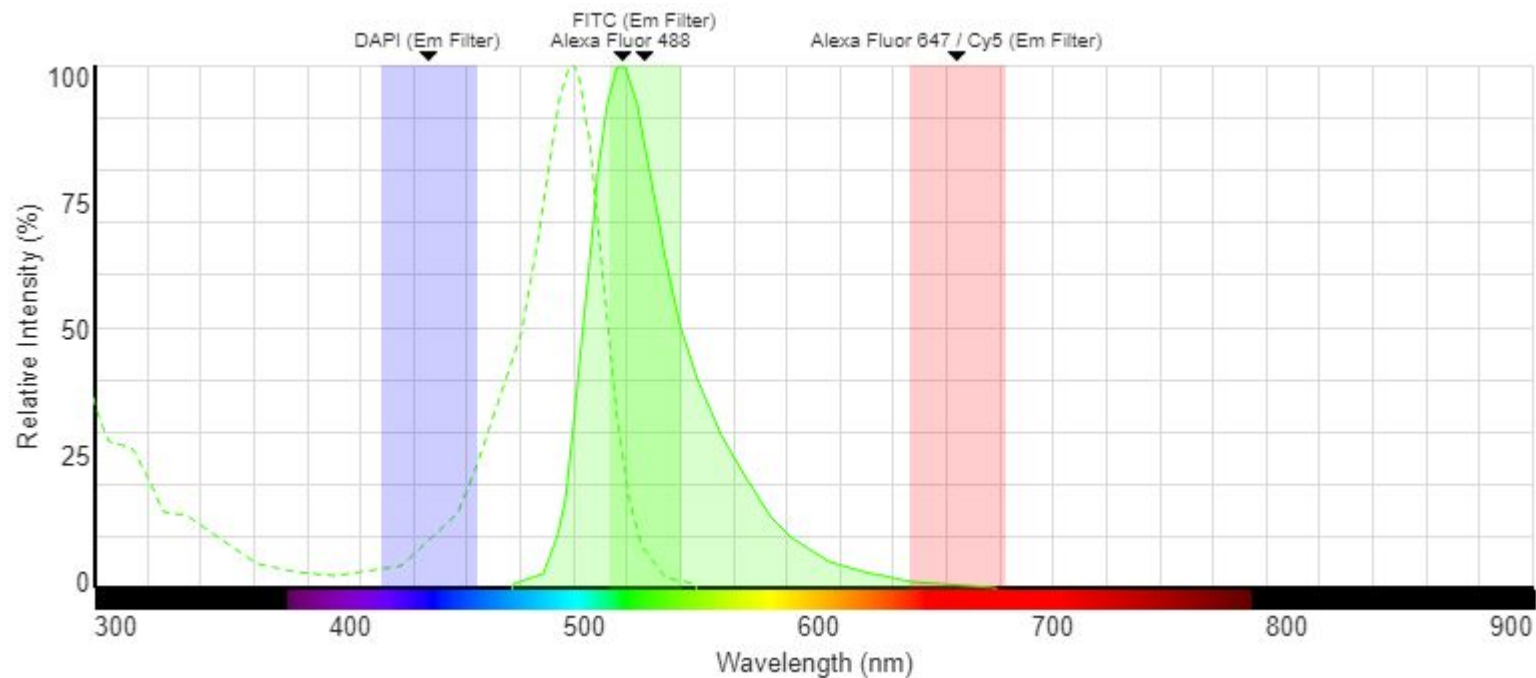
# Флуоресценция



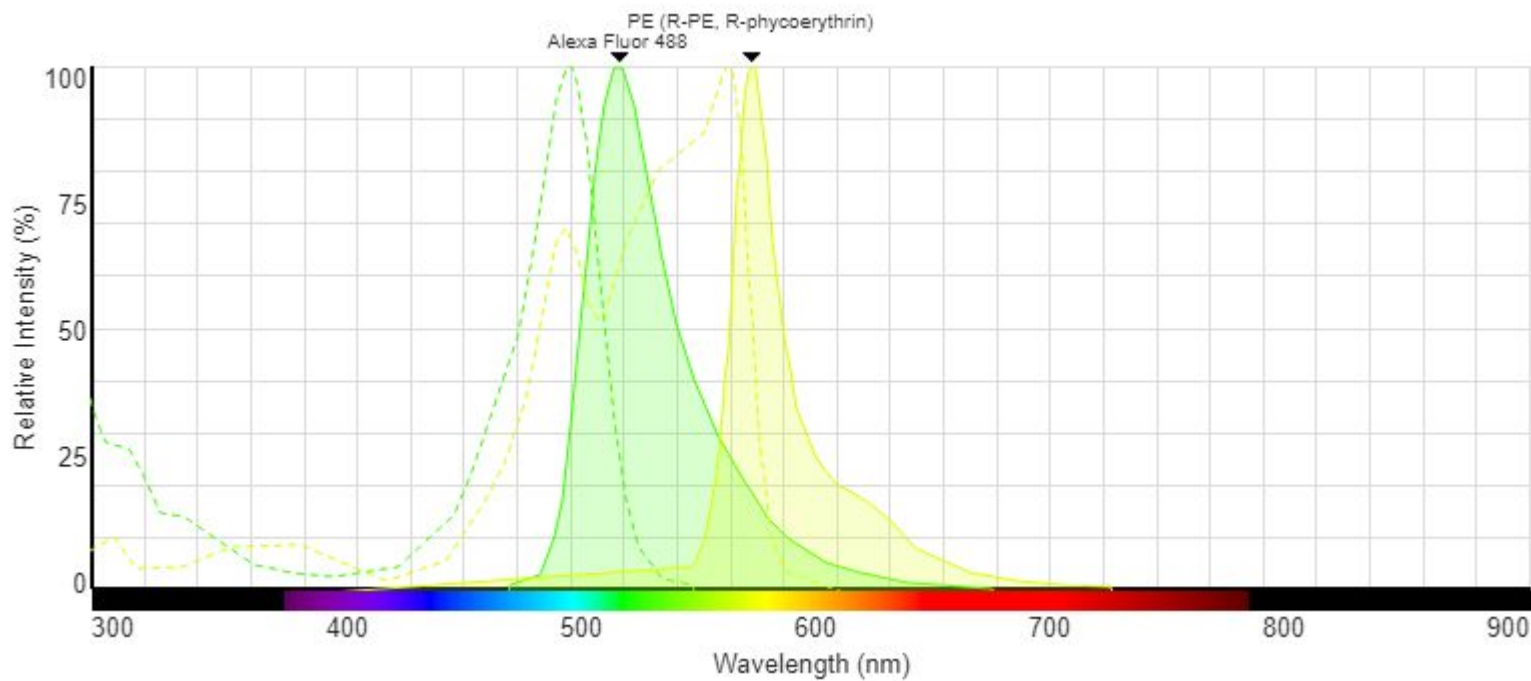
# Спектры возбуждения и испускания флуоресценции



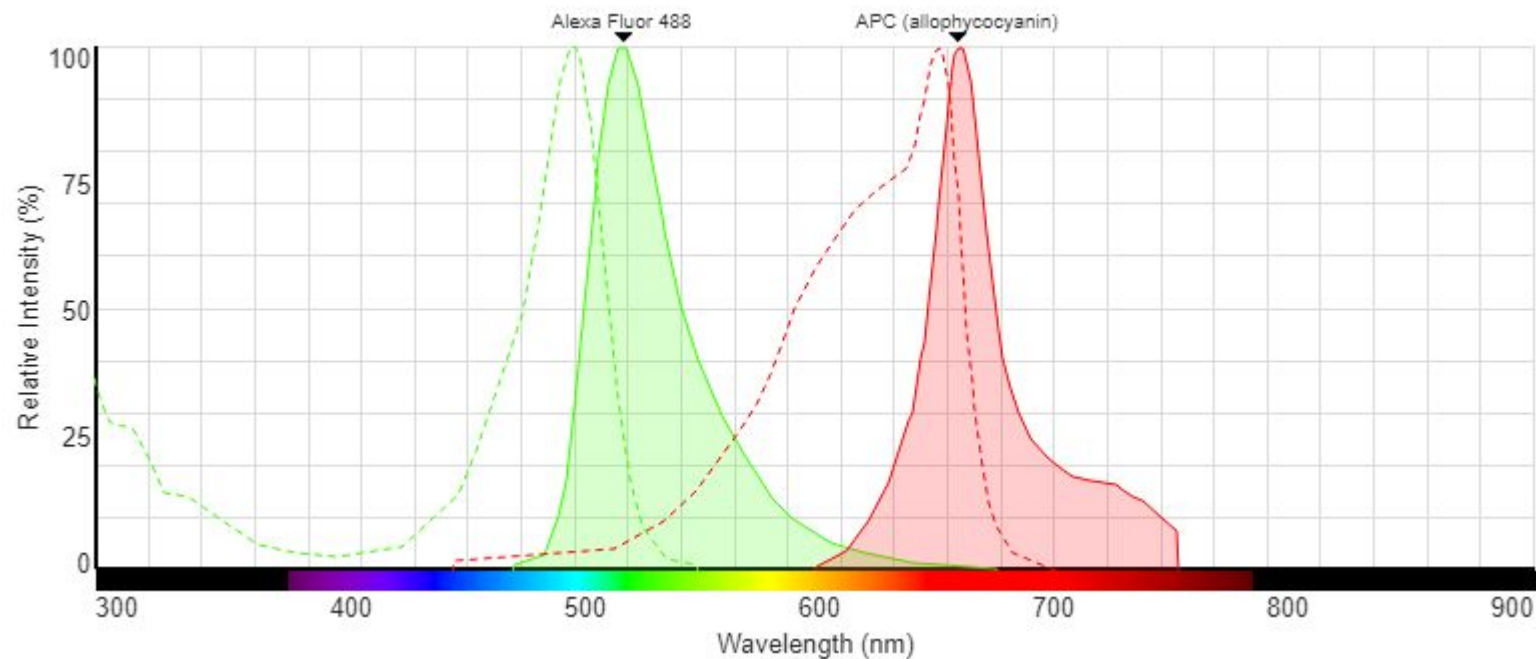
# Спектры возбуждения и испускания флуоресценции



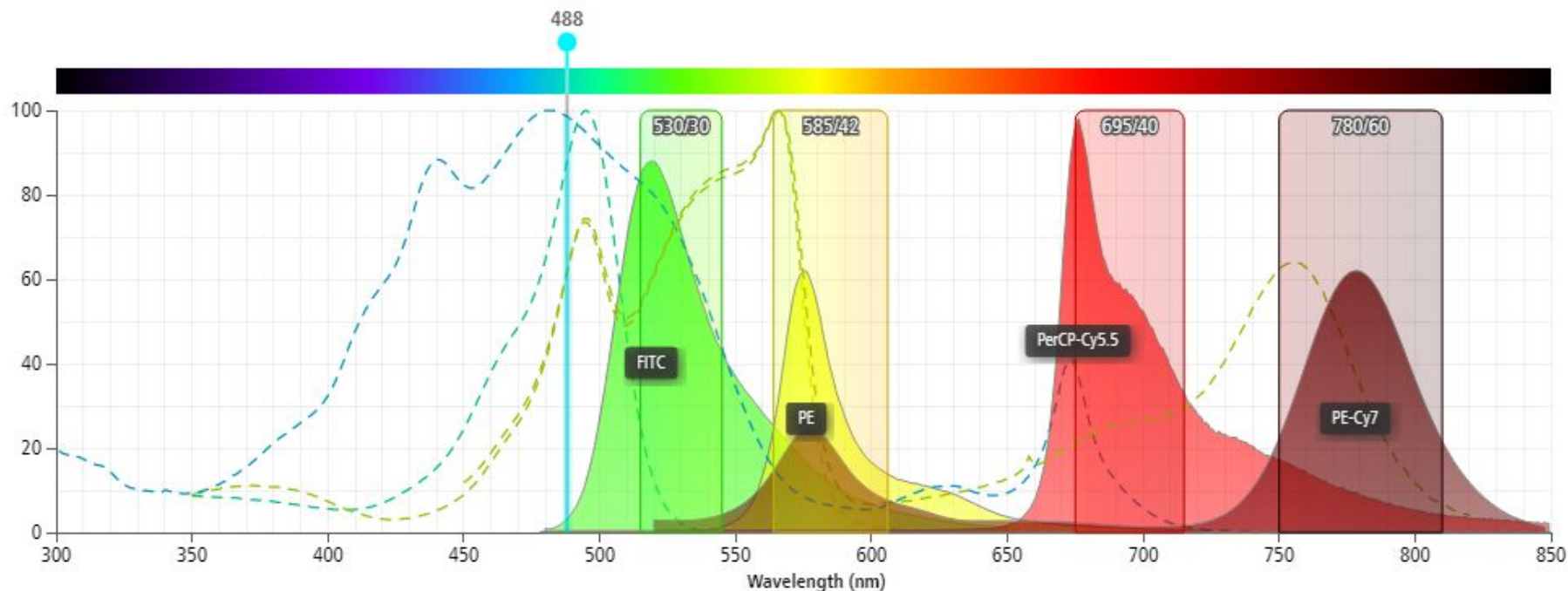
# Спектры возбуждения и испускания флуоресценции



# Спектры возбуждения и испускания флуоресценции

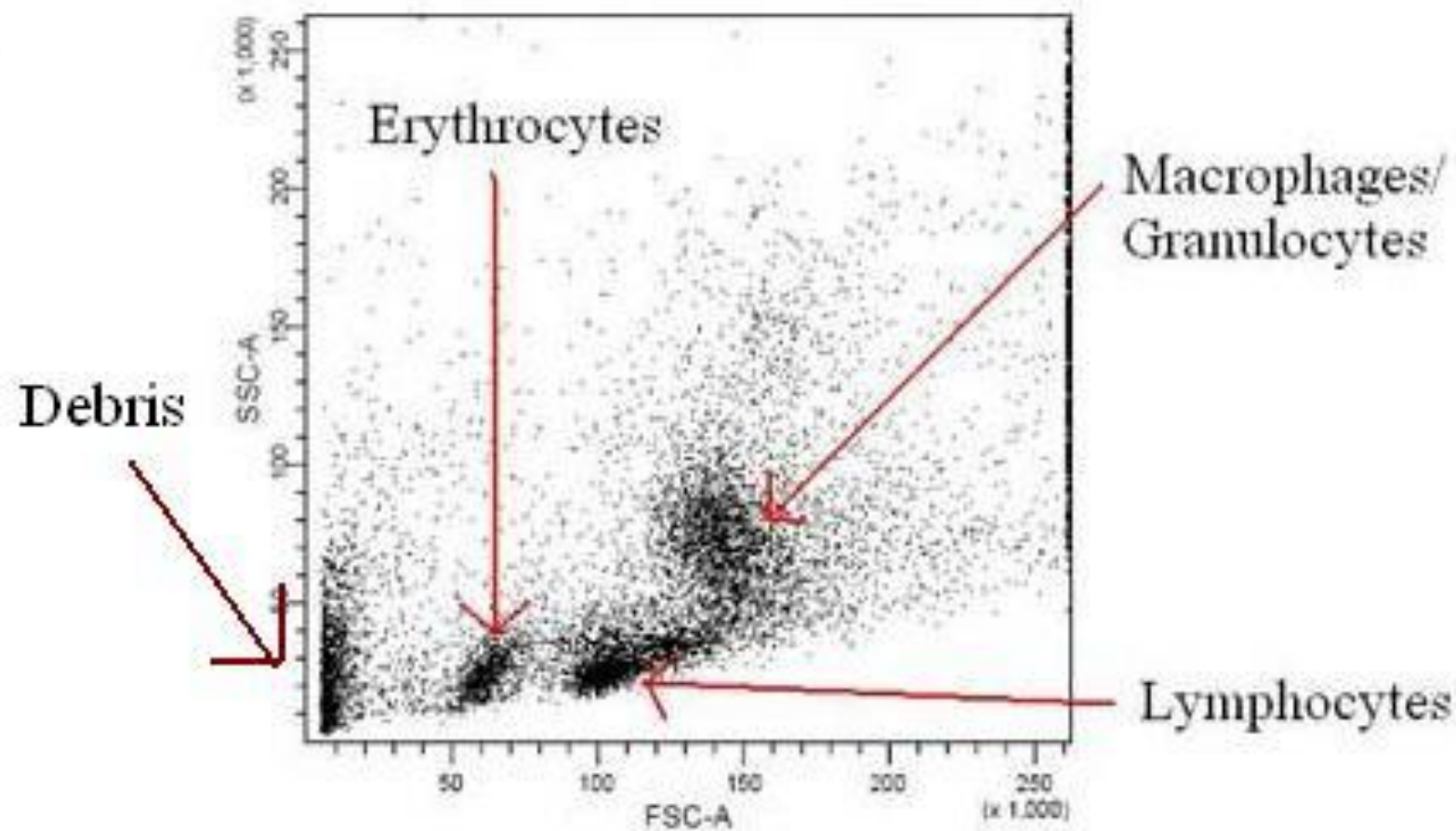


# Спектры возбуждения и испускания флуоресценции



Fluorochrome	%Max	<input checked="" type="checkbox"/> Ex	<input checked="" type="checkbox"/> Em	Filters	<input checked="" type="checkbox"/>	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>PerCP...</b>	<b>PE-Cy7</b>
FITC	88.0	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	530/30	<input checked="" type="checkbox"/>	47.4%	0.4%	0.3%	1.8%
PE	61.6	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	585/42	<input checked="" type="checkbox"/>	12.5%	70.4%	0.5%	16.4%
PerCP-Cy5.5	98.4	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	695/40	<input checked="" type="checkbox"/>	x	2.0%	48.4%	1.4%
PE-Cy7	61.8	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	780/60	<input checked="" type="checkbox"/>	x	x	11.9%	60.5%

Granularity ↑



Size →



# Клеточный сортер Beckman MoFLO XDP



Особенности прибора:

- Скорость анализа – до 100'000 событий в секунду
- Скорость сортировки – до 70'000 клеток в секунду
- 5 лазеров, 16 ФЭУ для регистрации флуоресценции

## **Технические характеристики:**

- Твердотельные лазеры с длинами волн 407, 488, 561, 592, 628 нм
- 14 каналов ФЭУ с фильтрами в диапазоне длин волн от 430 до 820 нм
- Возможность термостатирования образца и собранных популяций клеток
- Возможность одновременной сортировки до 4-х популяций
- Скорость сортировки до 70000 клеток в секунду
- Анализ сортировки до 100000 событий в секунду
- Множество режимов сортировки от обогащения популяции до высокоэффективной сортировки без примесей других клеток.

# Устройство клеточного сортера

Клеточный сортер состоит из нескольких блоков:

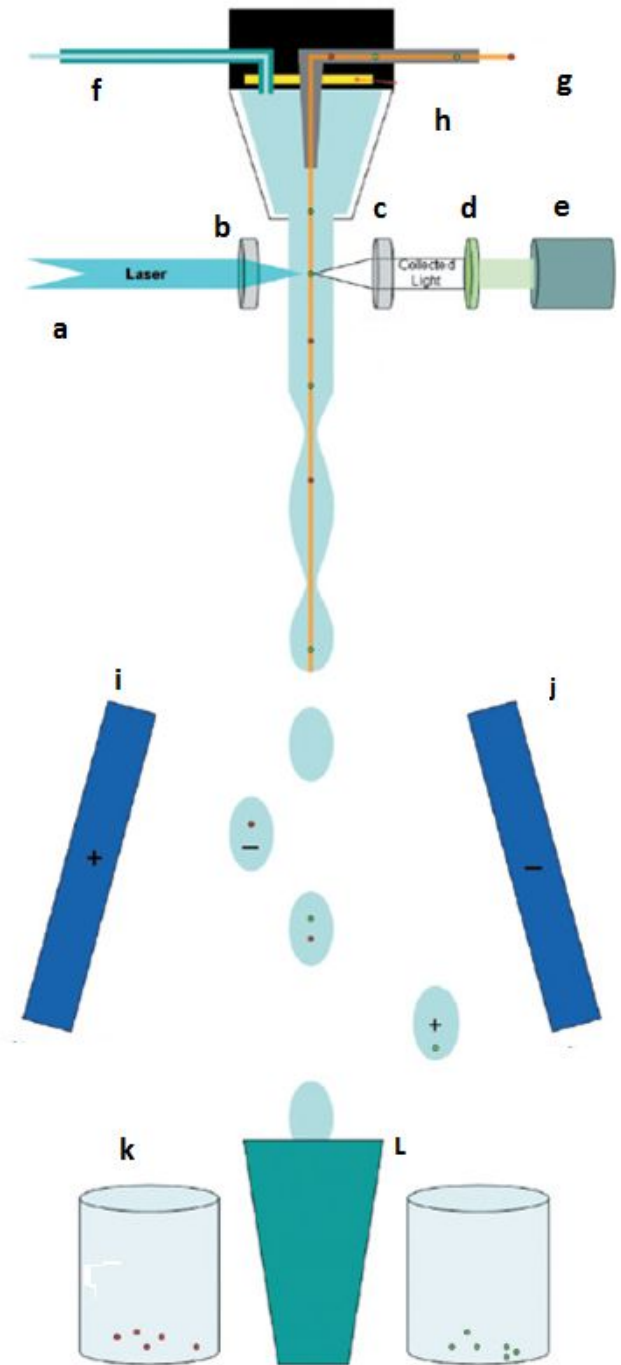
- Лазеры
- Оптическая система, обеспечивающая подведение лазерного излучения к клеткам
- Оптическая система, собирающая флуоресценцию
- Система светофильтров и ФЭУ, детектирующая флуоресценцию
- Система подачи обжимающей жидкости и образца

Все это есть у проточных цитофлуориметров.

Для сортировки клеток необходимы:

- Пьезокристалл, разбивающий струю на капли
- Система подачи заряда на капли
- Анод и катод, пролетая между которыми клетки отклоняются и попадают в одну из нескольких пробирок
- Вычислительный блок, координирующий работу прибора

Beckman Coulter Inc: **MoFlo XDP high-speed cell sorter**: Instructions for use. 2010. 239.



# Комплектация лазеров:

**488 нм**

**Flow-Check, Flow-Check Pro**

**407 нм**

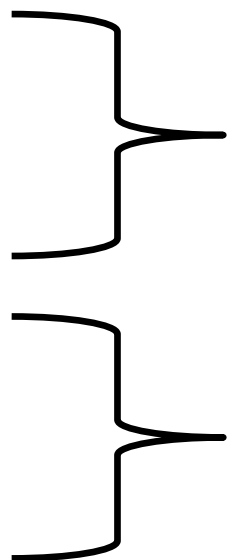
**Flow-Check Pro**

**628 нм**

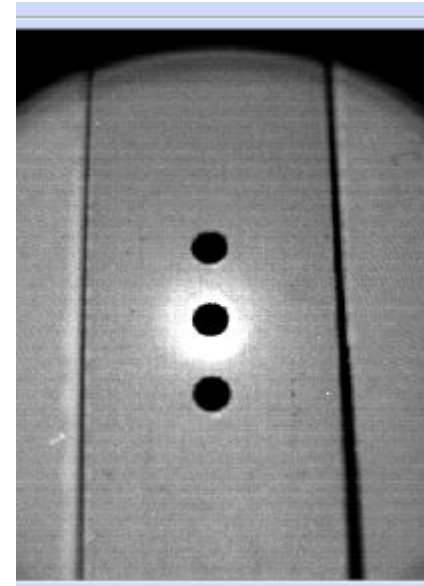
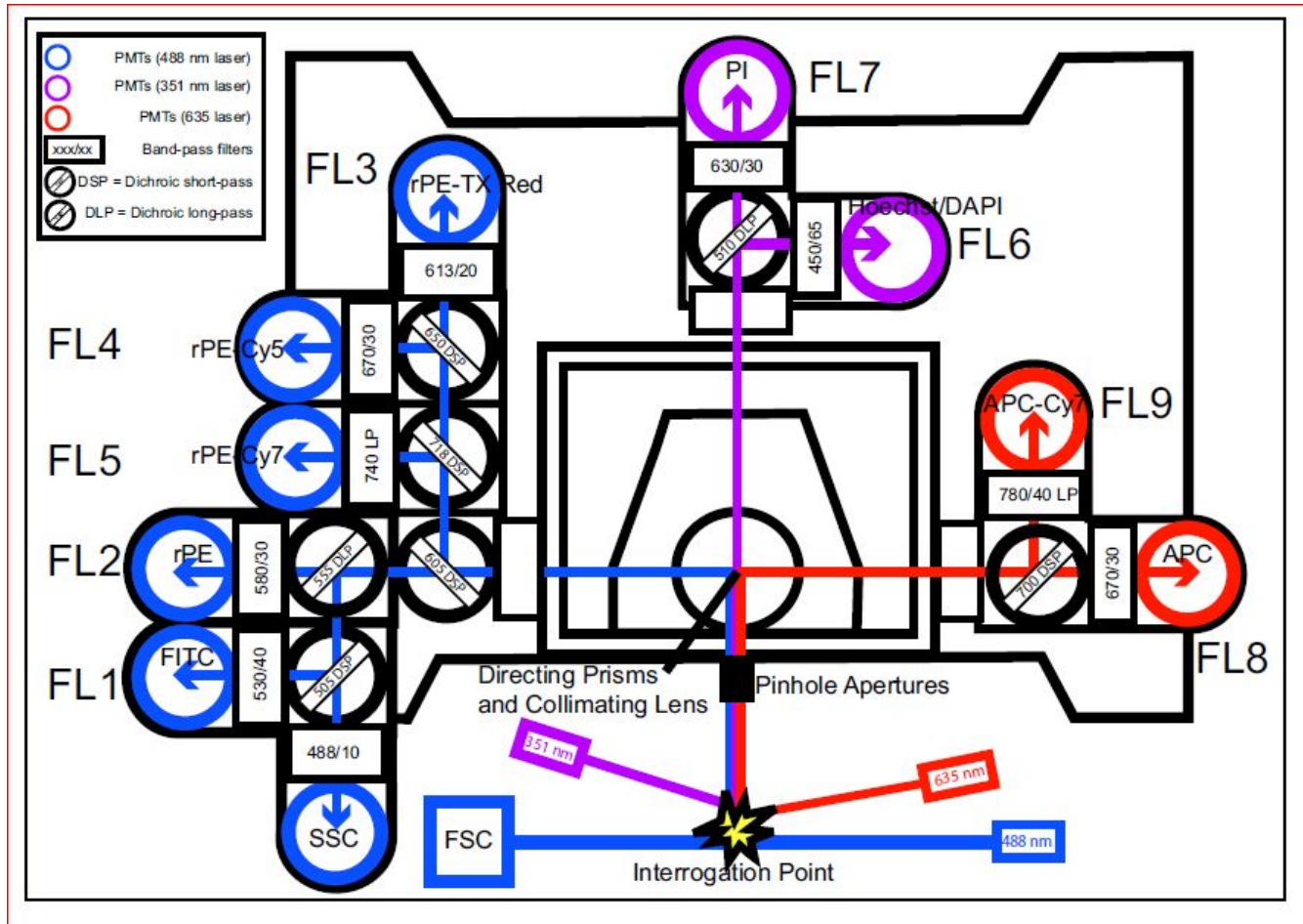
**561 нм**

**Rainbow Fluorescent Particles**

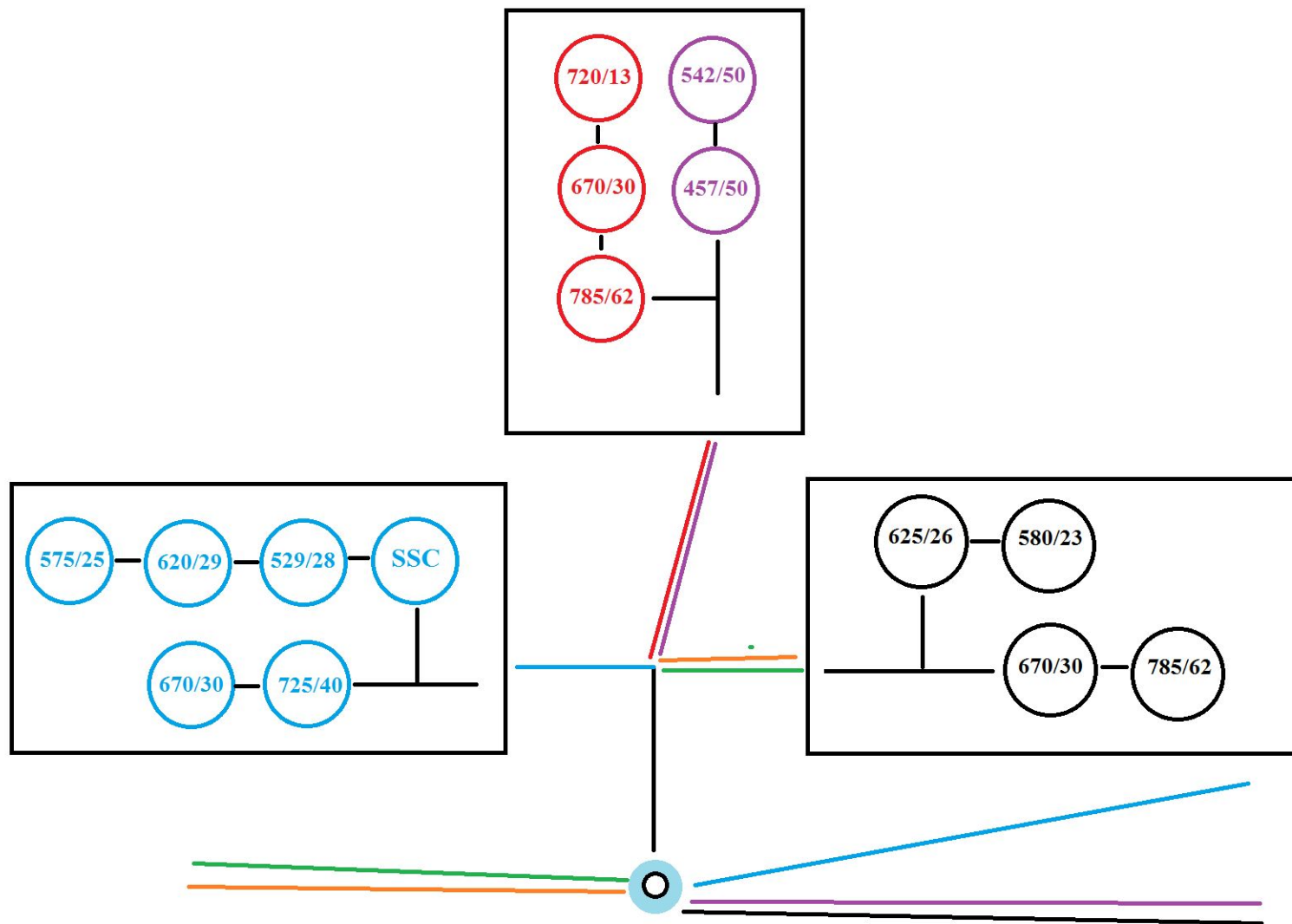
**592 нм**



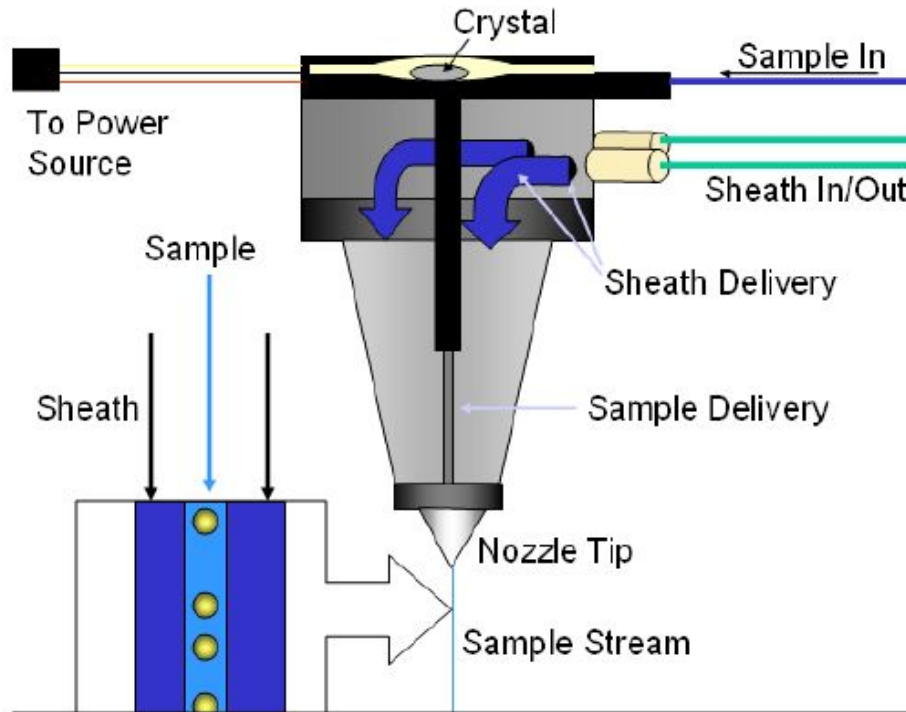
# Пример устройства оптических систем



# Комплектация каналов:



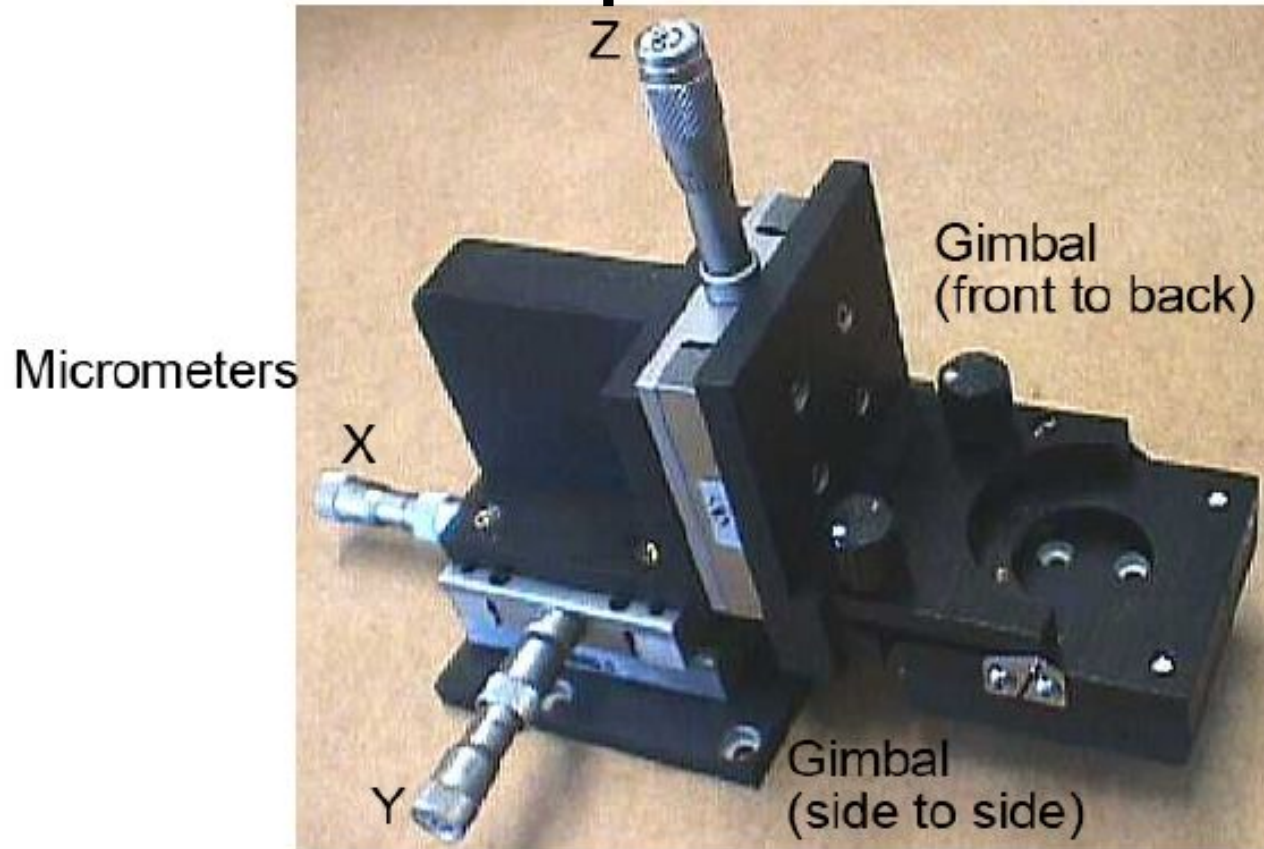
# Система гидрофокусировки



Диаметр наконечника (nozzle): 70, 100, 150, 200 мкм.

Необходимость системы гидрофокусировки: обеспечение положения клеток ровно в центре струи, что дает постоянное пятно контакта лазера с клеткой, что необходимо для точности регистрации флуоресценции.

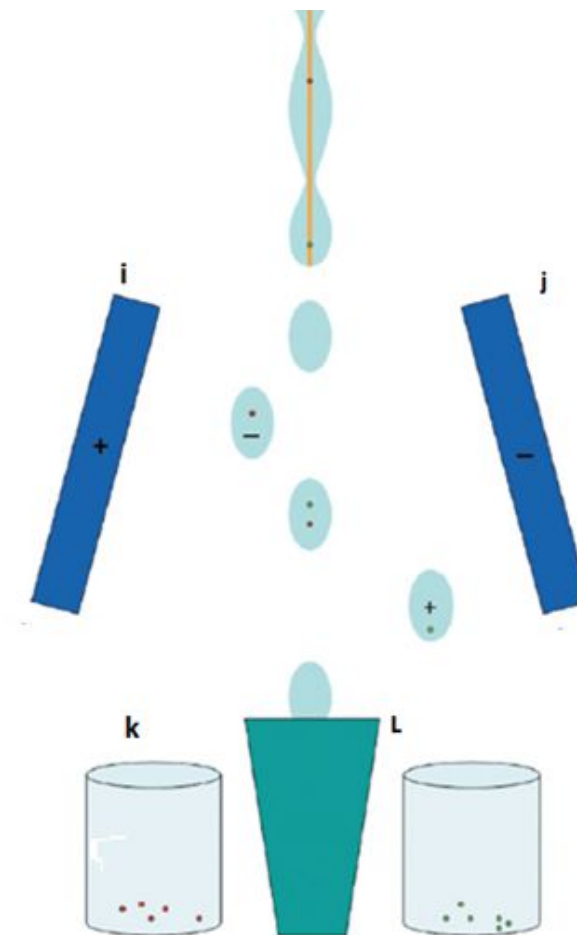
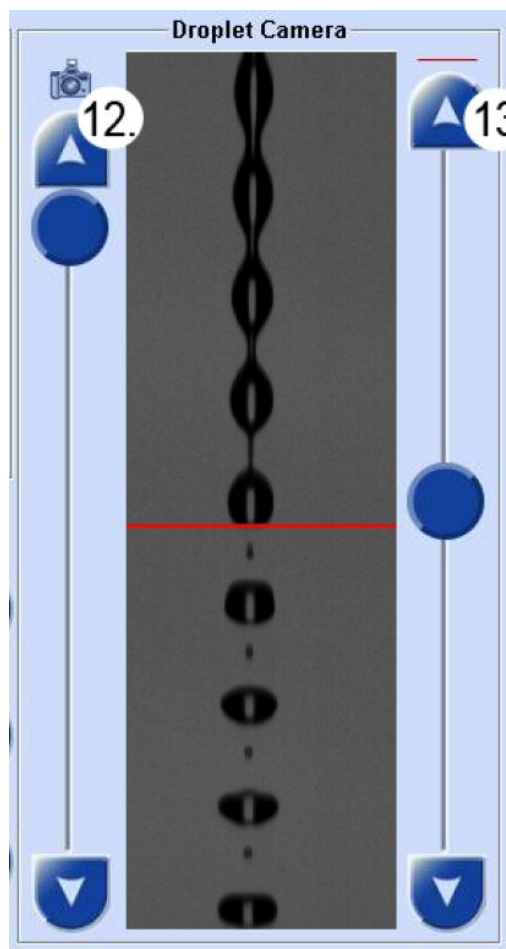
# Настройка подведения лазерного излучения к клеткам обеспечивается с помощью МИКРОВИНТОВ

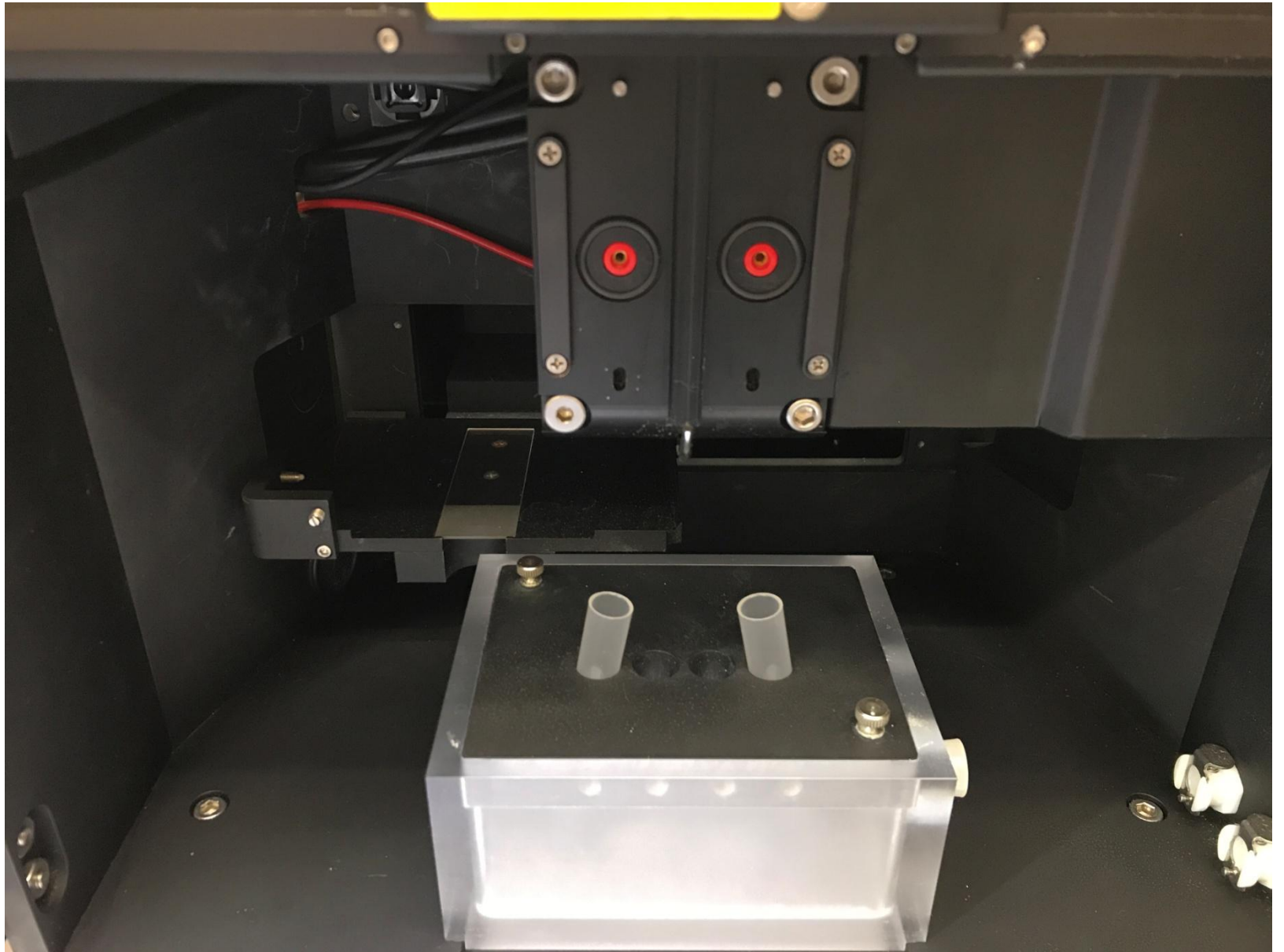




# Выбор “отрывающейся” капли

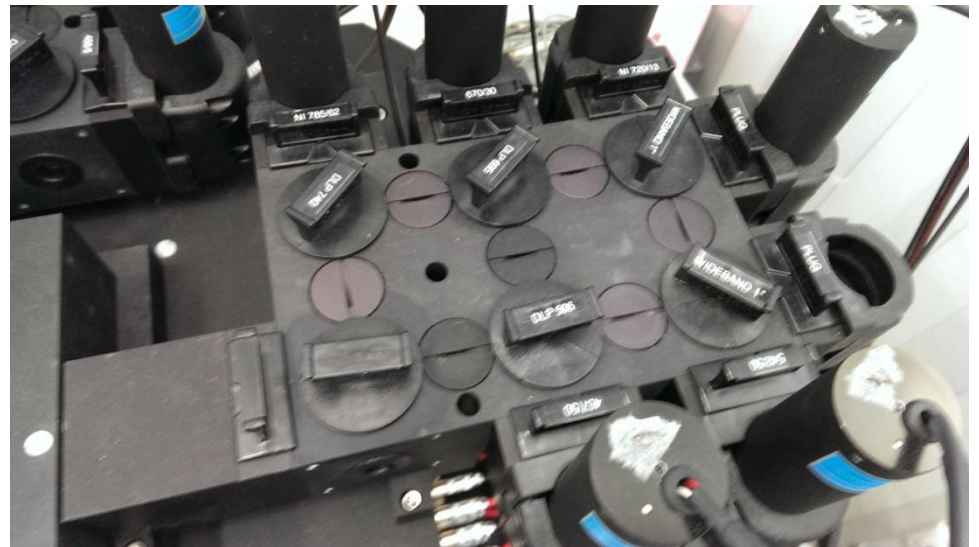
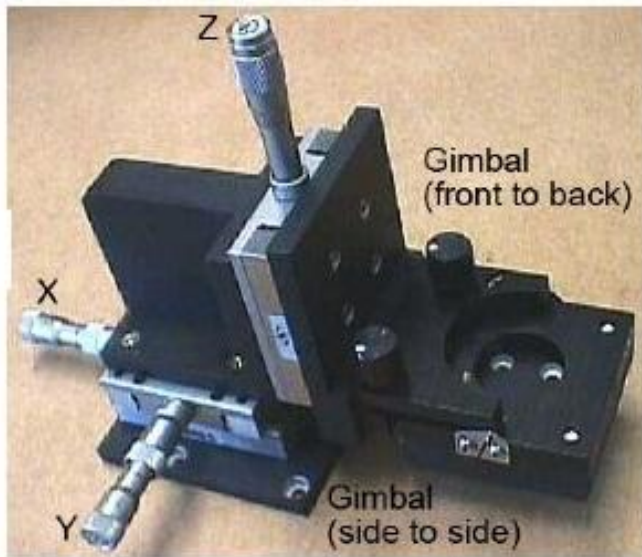
Регистрация флуоресценции – **клетка в струе**,  
Сортировка клеток – **клетка в капле**



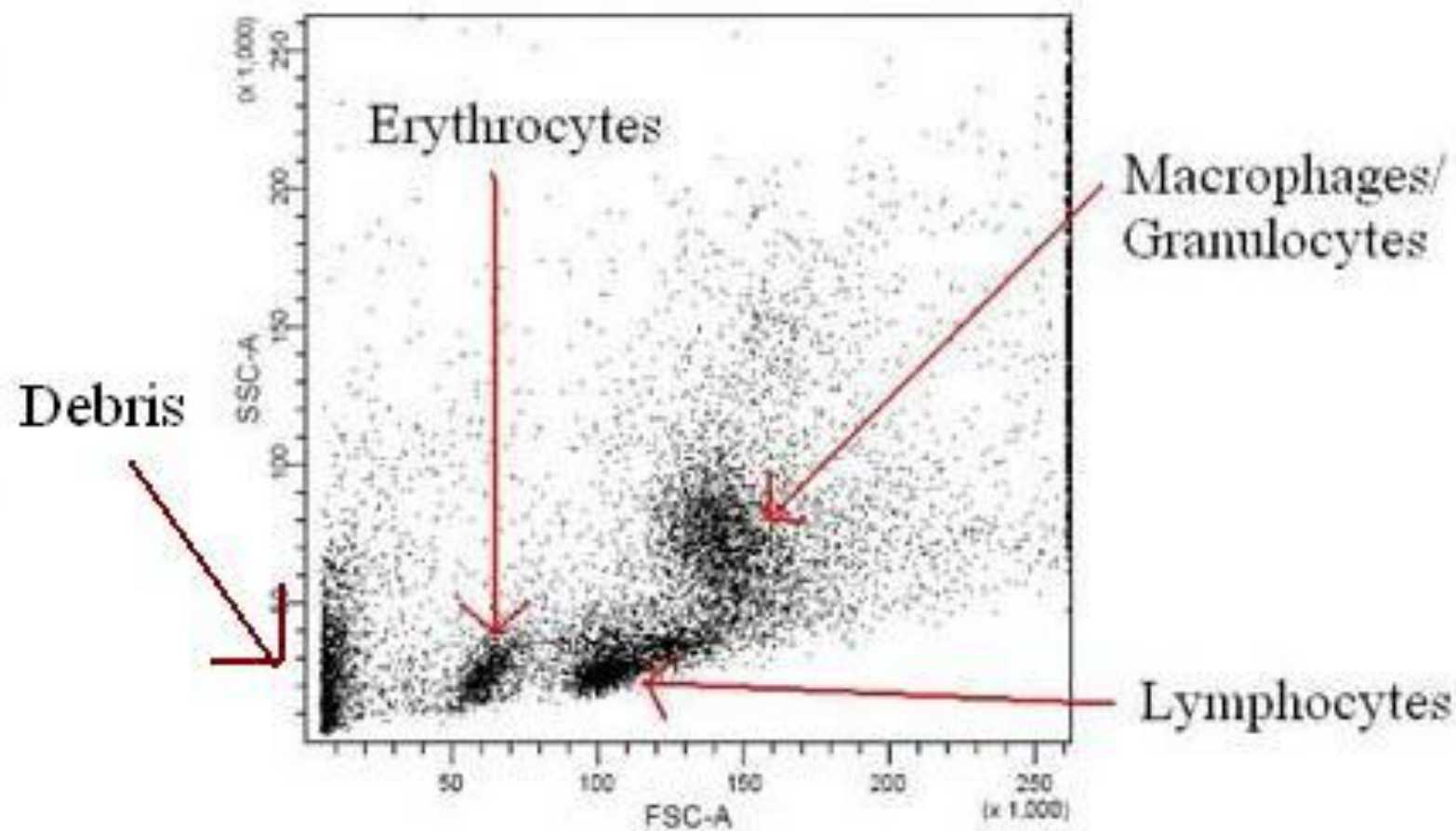


# Подготовка прибора к сортировке:

- **Разогрев лазеров – 10 минут**
- **Настройка струи – до 5 минут (во время разогрева лазеров)**
- **Настройка синего (488 нм) лазера – до 5 минут**
- **Настройка остальных пар лазеров – до 5 минут**
- **Настройка Drop delay time – до 10 минут (Flow-Check, Drop delay calibration particles)**



Granularity ↑



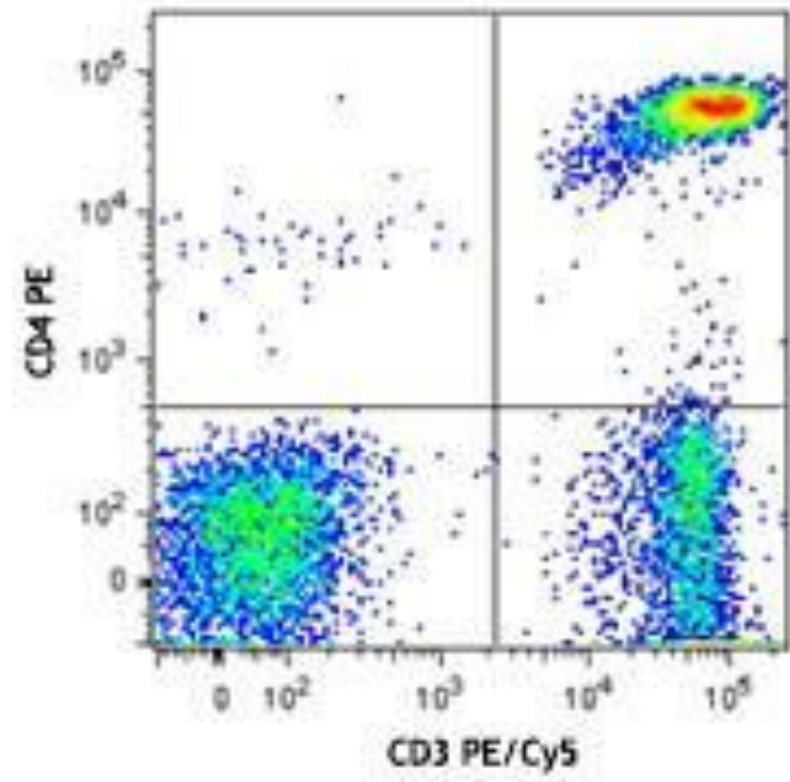
Size →

# Выявление Т-хелперов с помощью проточной цитометрии

CD3 – Т лимфоциты  
CD3 CD4 – Т хелперы  
CD3 CD8 – Т киллеры

PE/Cy5 (Ex – 488 nm, Em – 670 nm)

PE (Ex – 488 nm, Em – 578 nm)



# Выделение и характеристика химиорезистентных клеток боковой популяции низкодифференцированной глиомы С6

Мультиформная глиобластома – одна из самых злокачественных нейроэпителиальных опухолей головного мозга.

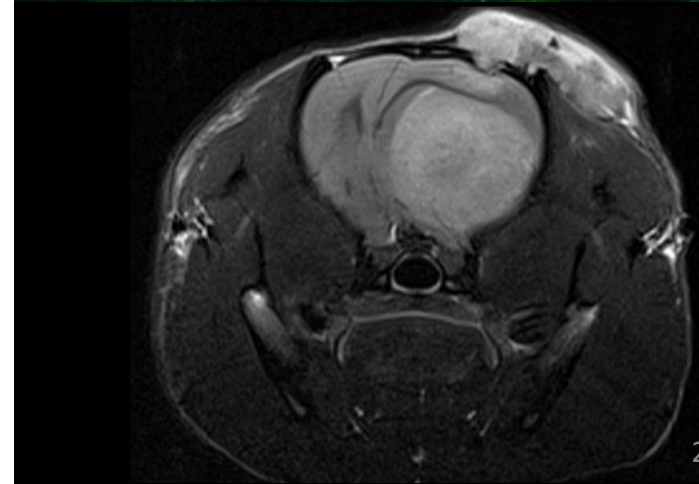
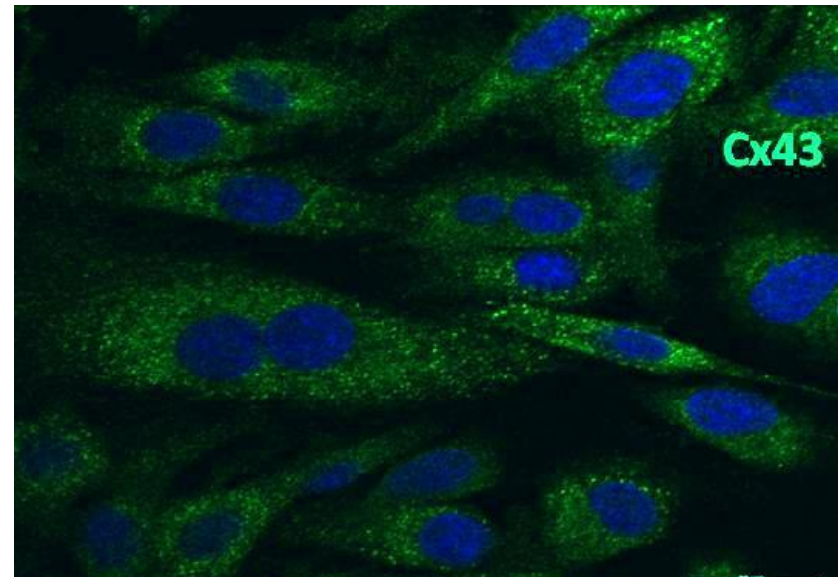
Средняя продолжительность жизни после постановки диагноза составляет 15 месяцев.

Существующие методы терапии малоэффективны.

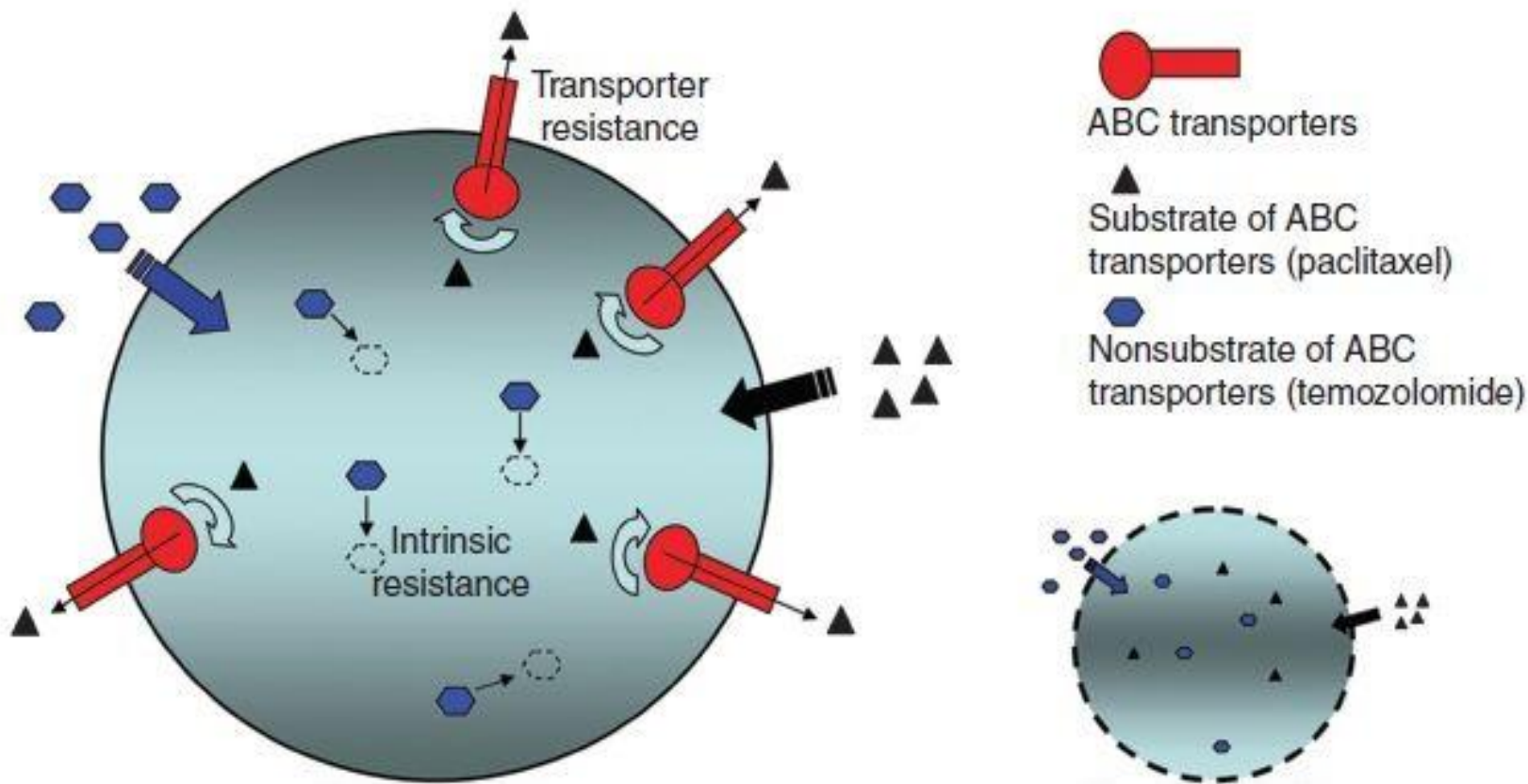
Причина – наличие субпопуляций химиорезистентных клеток.

Трудоемки в изучении, немногочисленны.

Необходимо обогащение субпопуляций.

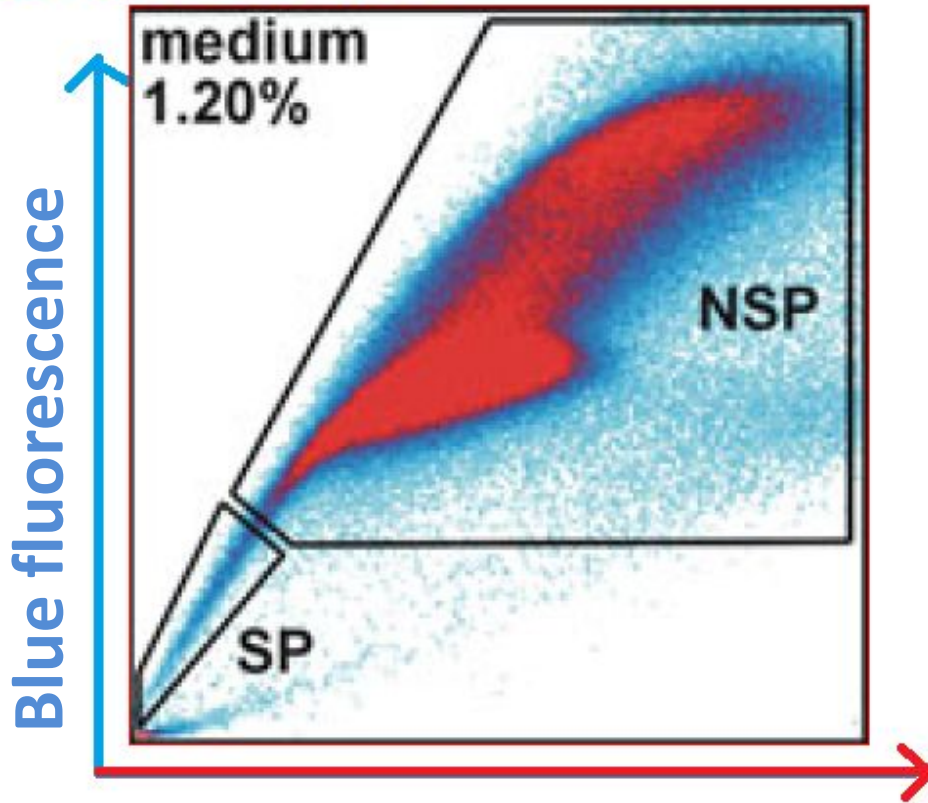


# Факторы трансporteвужаккератор- и радиорезистентности глиобластомы



Luo Y., Ellis L. Z., Dallaglio K., Takeda M., Robinson W. A., Robinson S. E., Liu W., Lewis K. D., McCarter M. D., Gonzalez R. *et al*: Side population cells from human melanoma tumors reveal diverse mechanisms for chemoresistance. // *The Journal of investigative dermatology* 2012, 132(10):2440-2450

# Химиорезистентные клетки боковой популяции



**Флуоресцентные красители:**

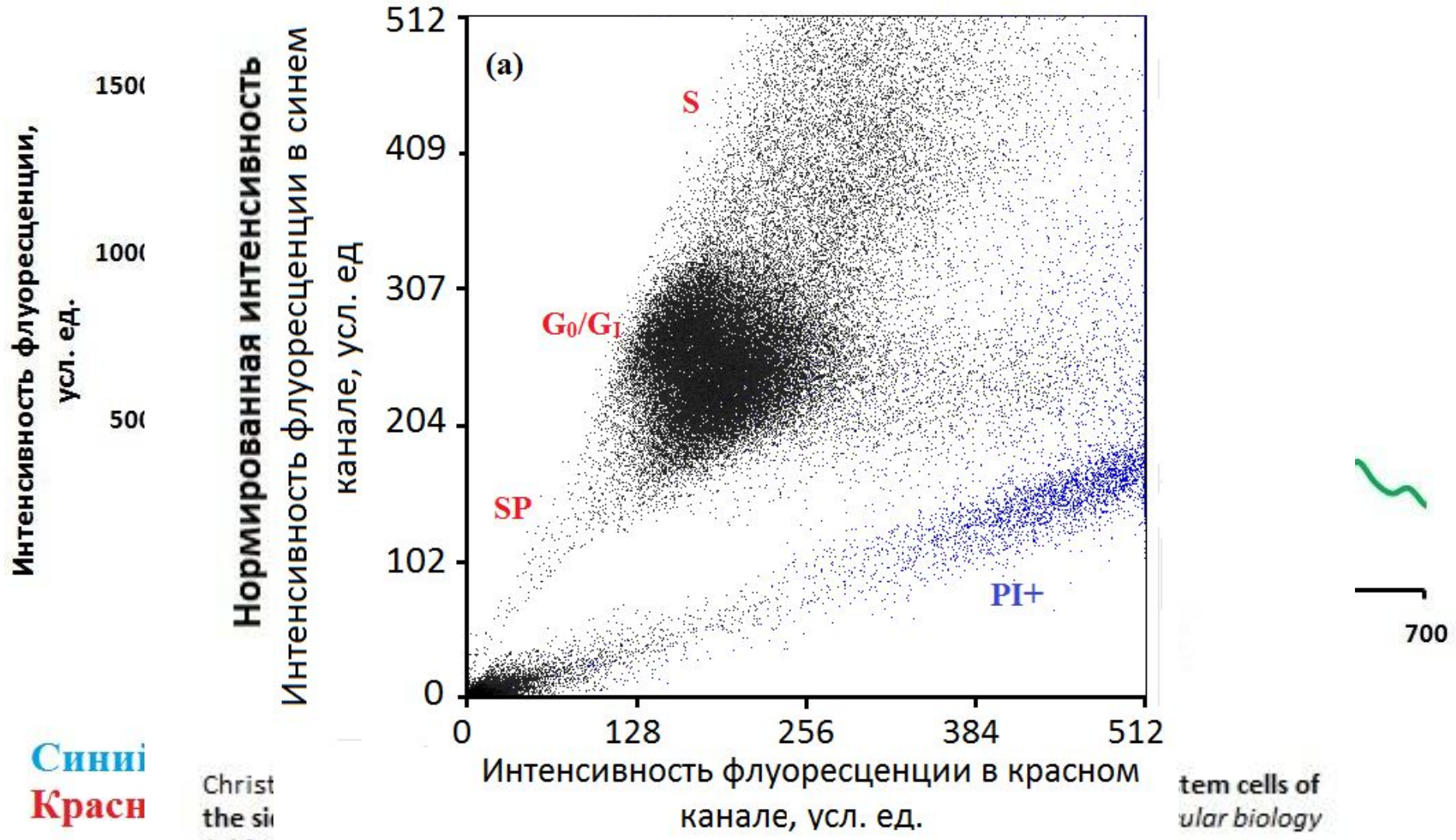
- Hoechst 33342
- Dye Cycle Violet





# Точечный анализ флуоресценции в каналах регистрации флуоресценции красителя Dye Cycle Violet

## Dye Cycle Violet 33342

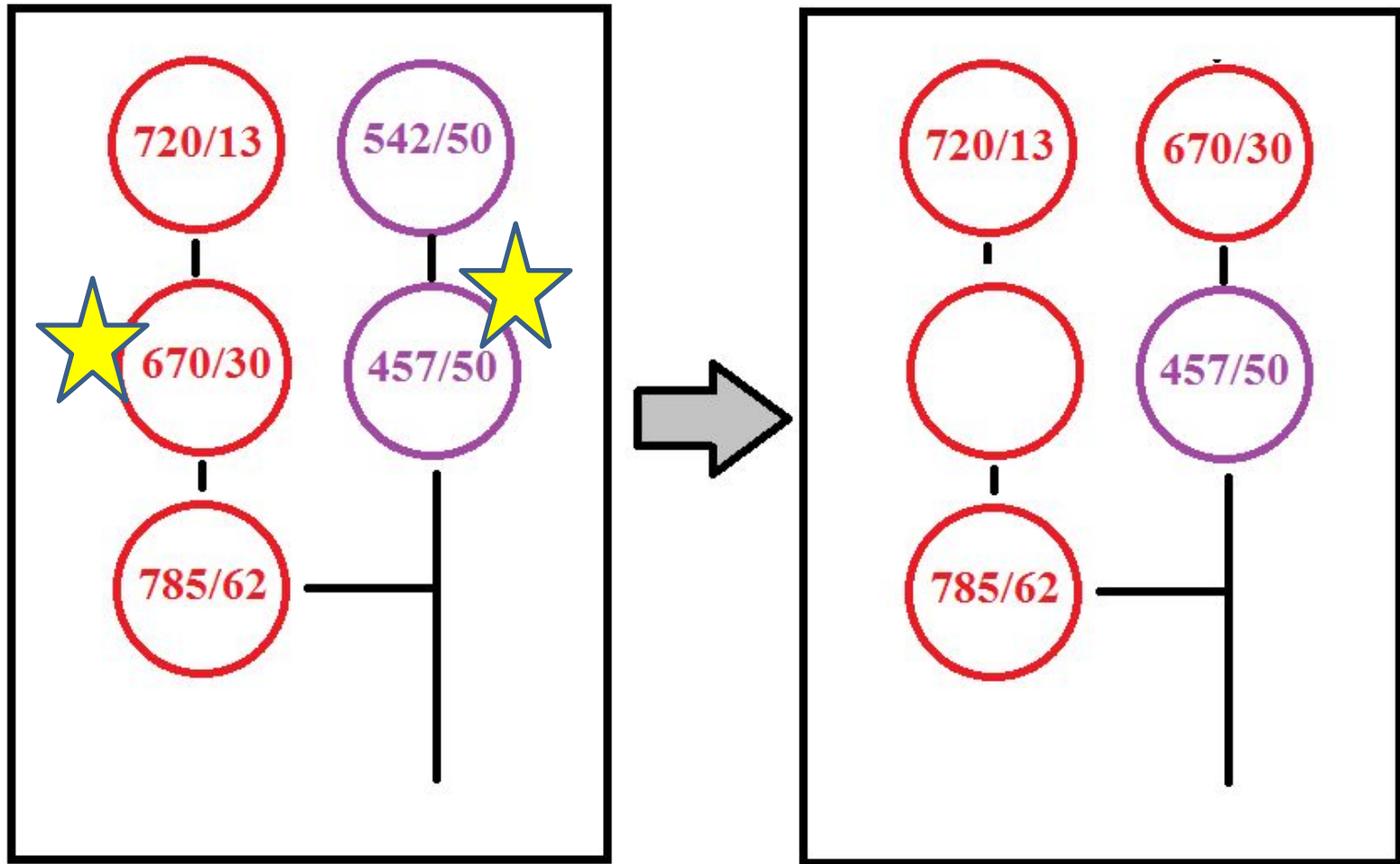


Синий  
Красный

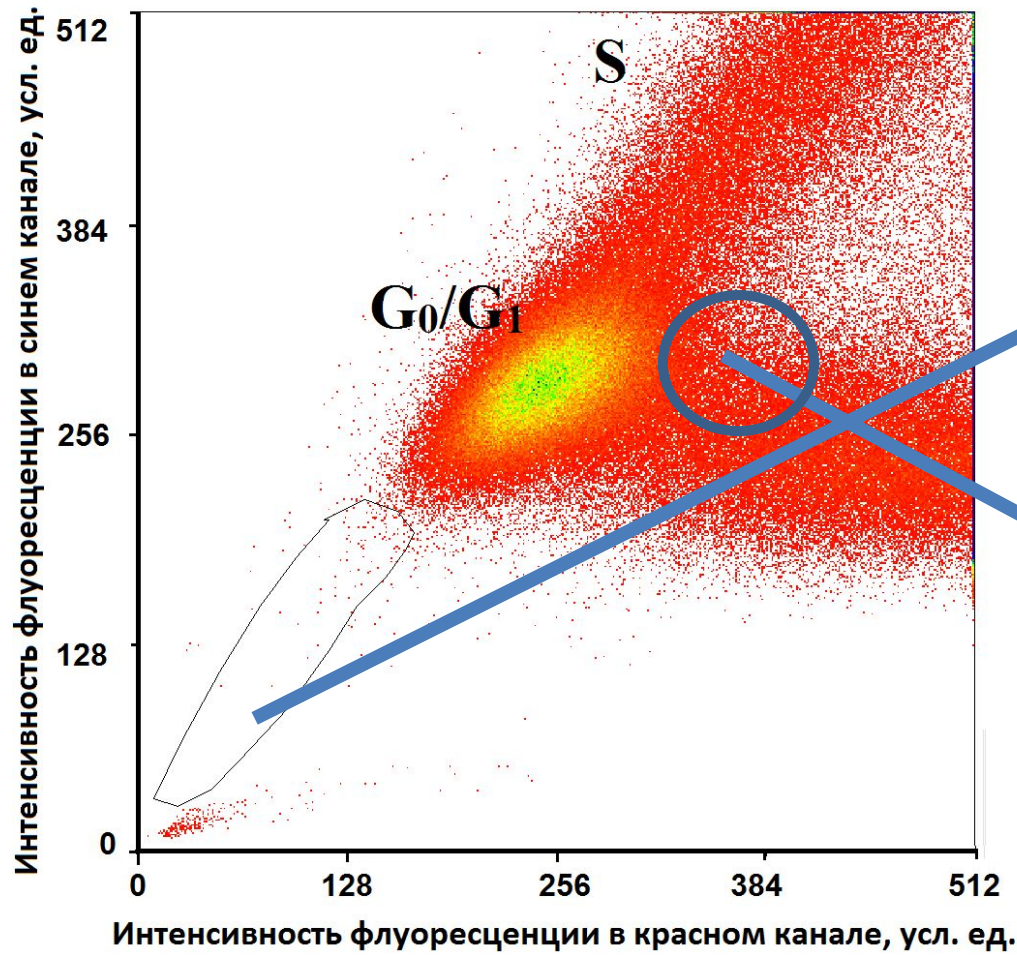
Christ the si  
(Clifto...

tem cells of  
ular biology

# Оптимизация расположения каналов для получения максимального сигнала



# Точеные диаграммы, позволяющие определить процент клеток боковой популяции



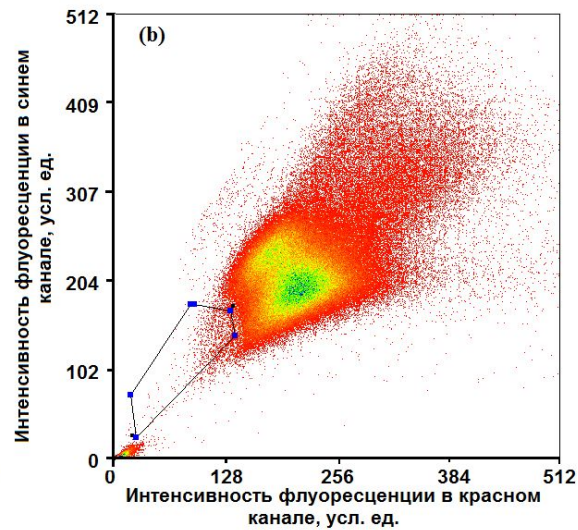
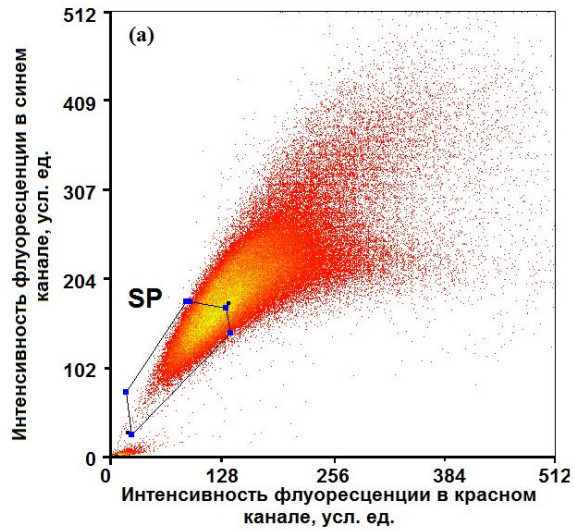
$$SP = (1,12 \pm 0,14)\%.$$



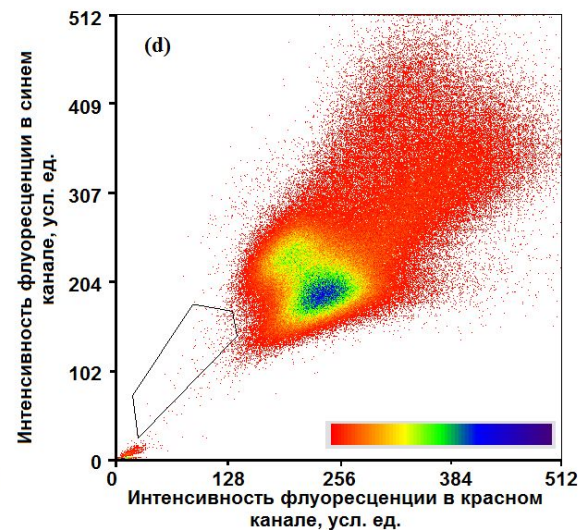
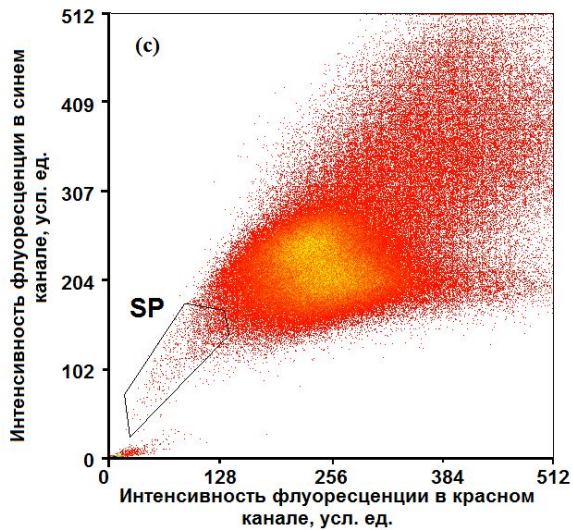
# Условия сортировки

- 1) Диаметр ноззла – 70 мкм
- 2) Давление – 60 psi
- 3) Разница давлений образца и обжимающей жидкости – 0,5 psi
- 4) Частота 92500 Гц
- 5) Амплитуда 15.5 В
- 6) IntelliSort – включен
- 7) Концентрация клеток –  $5 \cdot 10^6 / 1 \text{ мл}$
- 8) Объем образца – 2 мл
- 9) Количество отсортированных клеток –  $1 \cdot 10^5$
- 10) Режимы сортировки – Enrich (для клеток SP), Purify (для клеток nonSP)
- 11) Напряжение на синем канале FL6 – 450 В, напряжение на красном канале FI7 – 670 В
- 12) Температура пробирки во время сортировки – +4С

# Определение процента клеток боковой популяции в отсортированных образцах после



$$SP = (31,59 \pm 1,25)\%$$



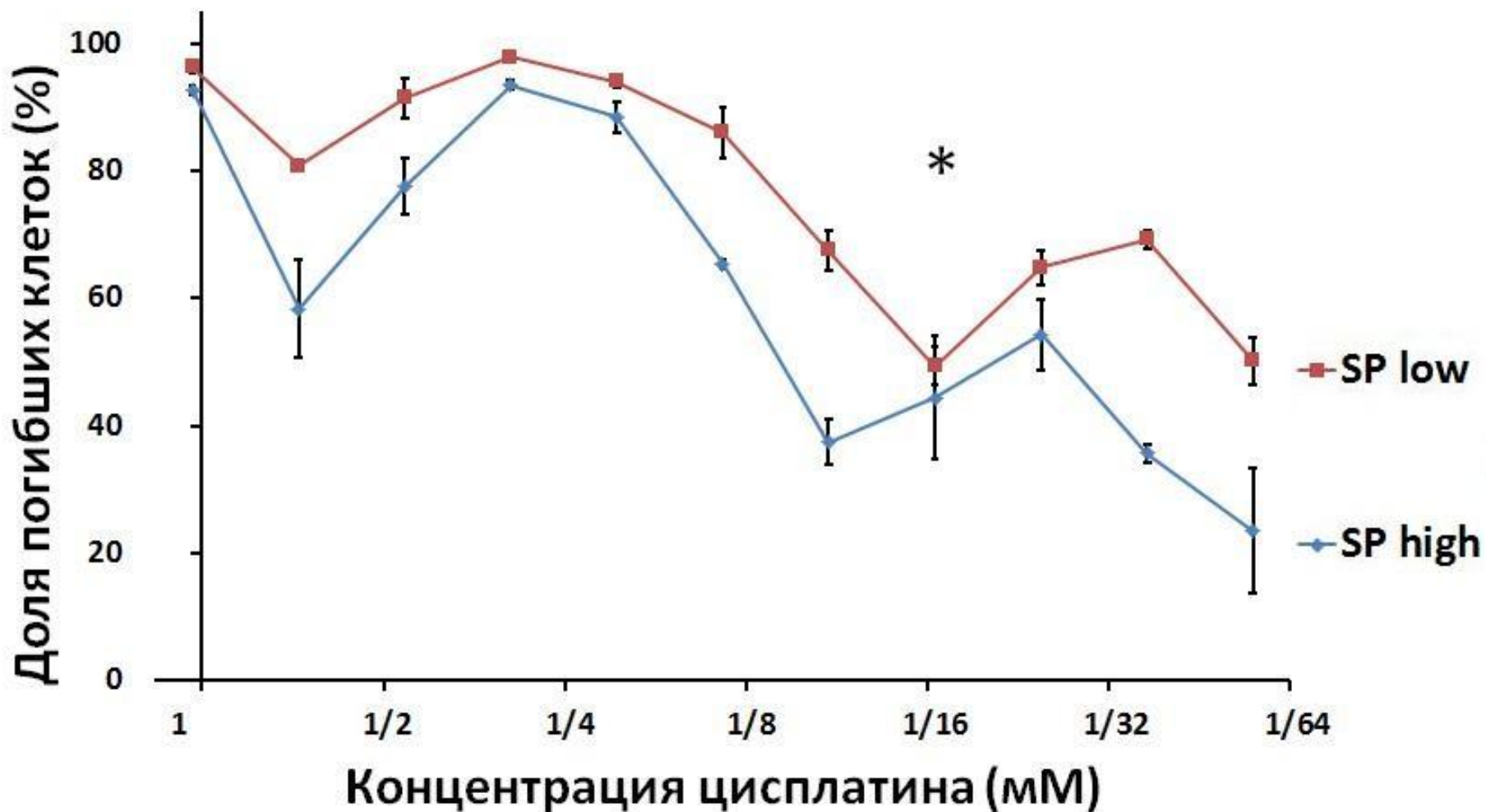
$$SP = (0,77 \pm 0,10)\%$$

# Динамика изменения процента клеток боковой популяции в образцах после сортировки

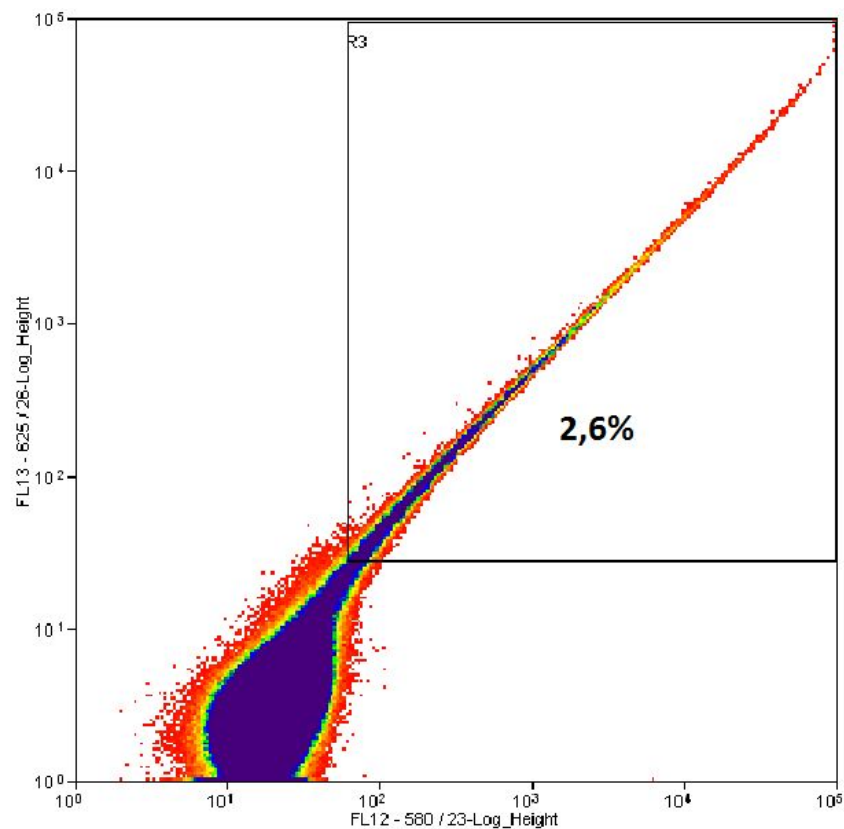
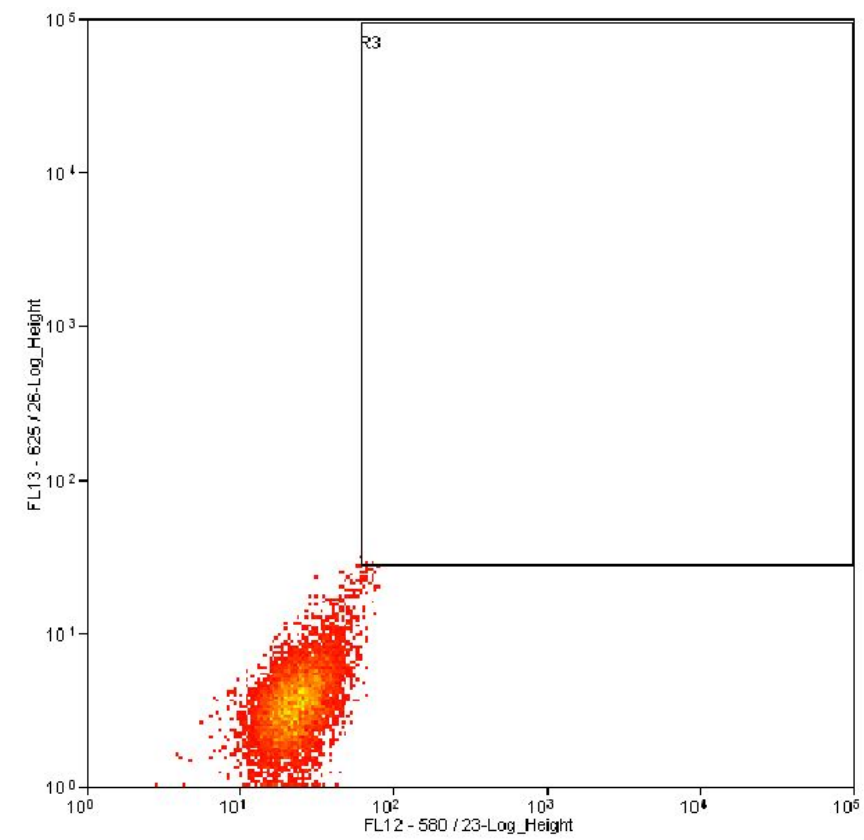
Процент клеток боковой популяции культуры С6	1,12 ± 0,14
--	-------------

Образец	№ пассажа (день после сортировки)				
	I пассаж (5)	II пассаж (9)	III пассаж (12)	IV пассаж (16)	V пассаж (20)
Образец после сортировки SP, процент клеток боковой популяции	31,59 ± 1,25	22,55 ± 1,14	5,23 ± 0,46	1,74 ± 0,58	1,12 ± 0,16
Образец после сортировки nonSP, процент клеток боковой популяции	0,77 ± 0,10	1,01 ± 0,12	1,09 ± 0,15		

# График зависимости доли погибших клеток от концентрации цисплатина для обогащенной и небогатенной культуры клеток

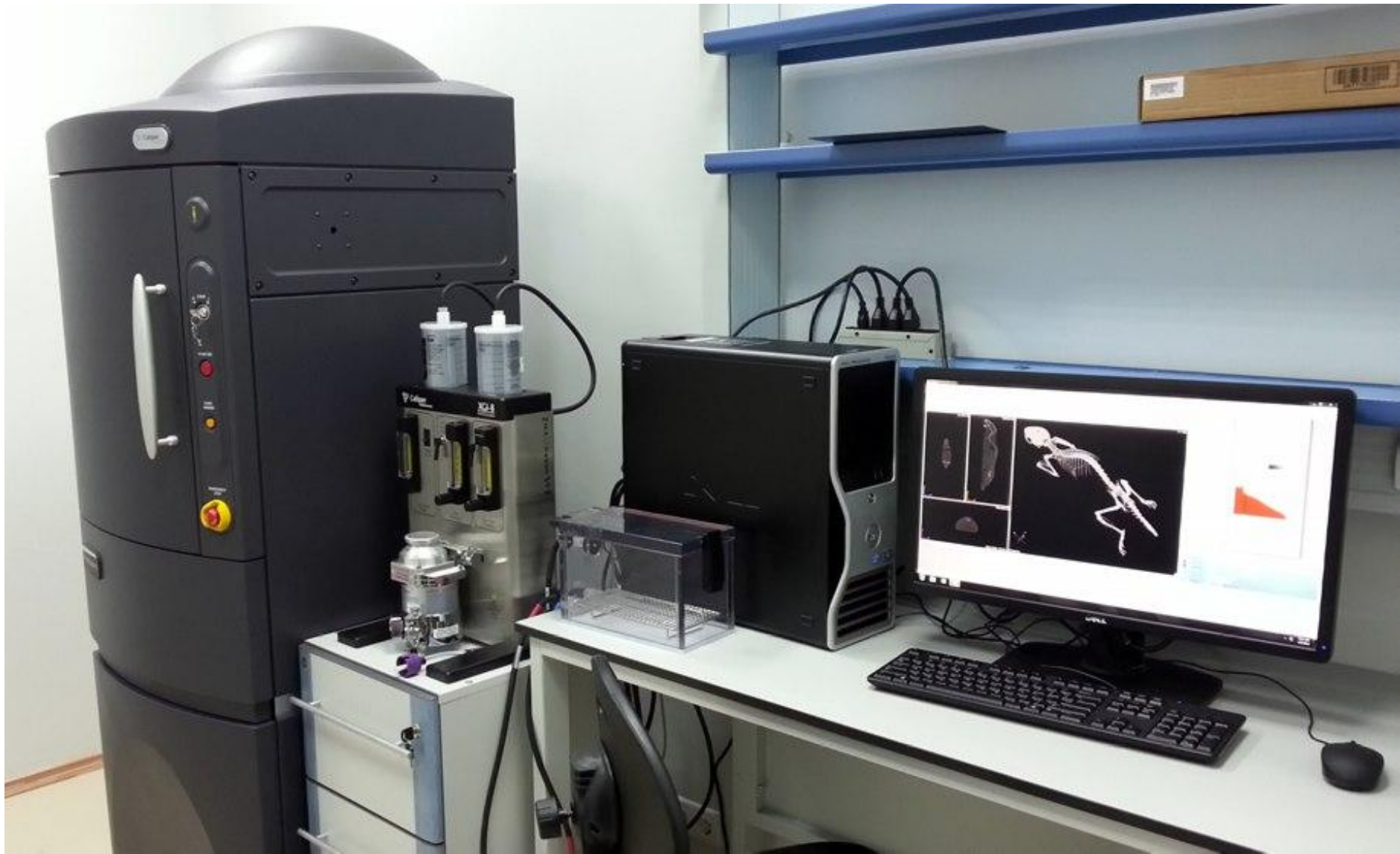


# Сортировка GFP+ клеток 4T1 карциномы МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

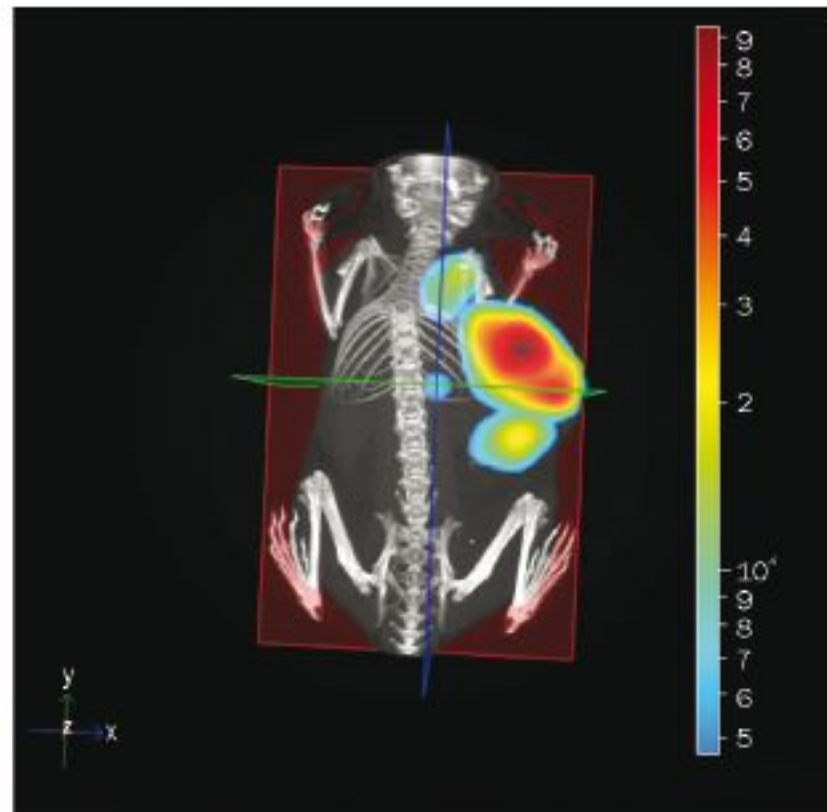
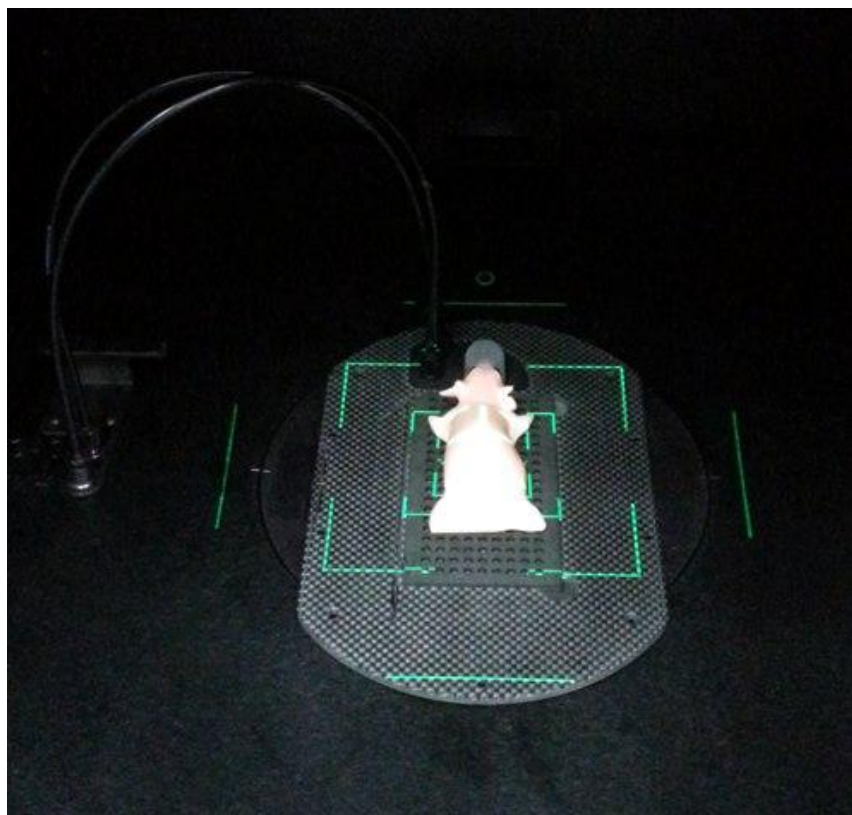




# IVIS Spectrum Pre-clinical In Vivo Imaging System



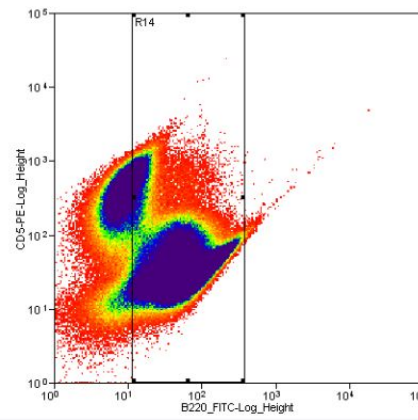
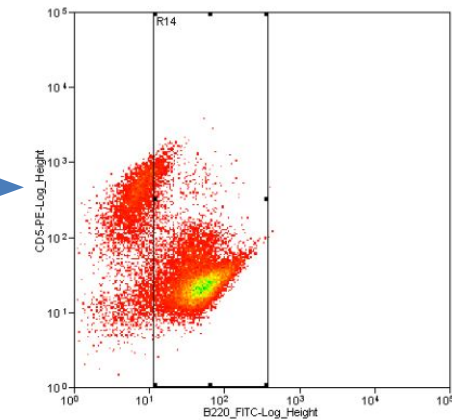
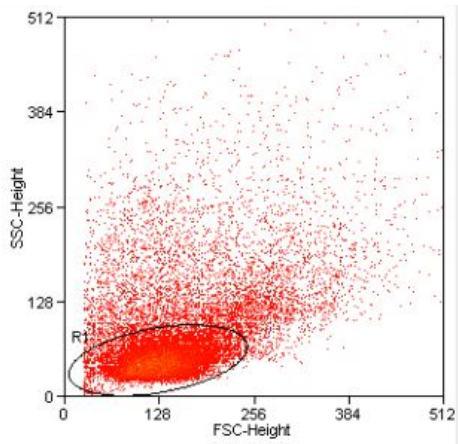
# МикроКТ и 3D-оптическая томография



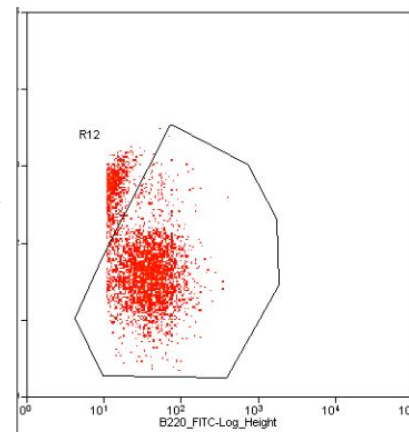
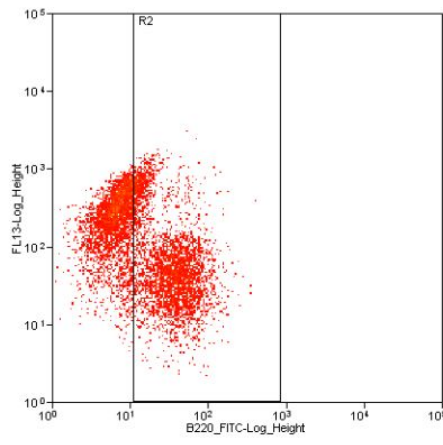
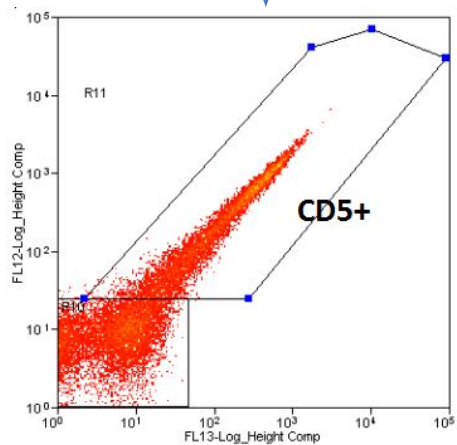
Снимки мыши с ортотопической карциномой 4T1-Luc2 на 35 сутки после имплантации

МОДЕЛИРОВАНИЕ И КОМПЛЕКСНАЯ РЕНТГЕНОВСКАЯ, ОПТИЧЕСКАЯ И МРТ-ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ПОЛИОРГАНЫХ МЕТАСТАЗОВ ОРТОТОПИЧЕСКОЙ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ 4T1 У МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/c.

# Сортировка B220+ CD5+ лимфоцитов

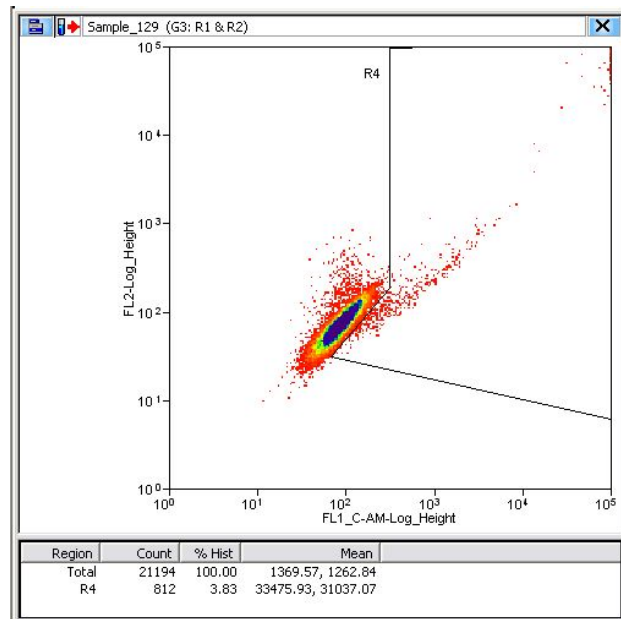
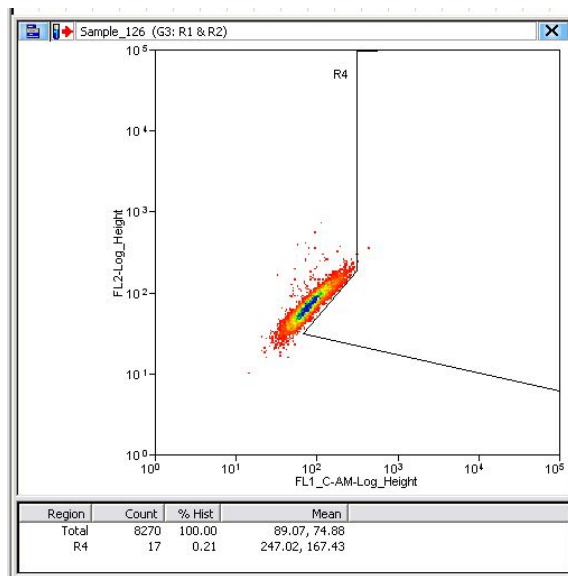
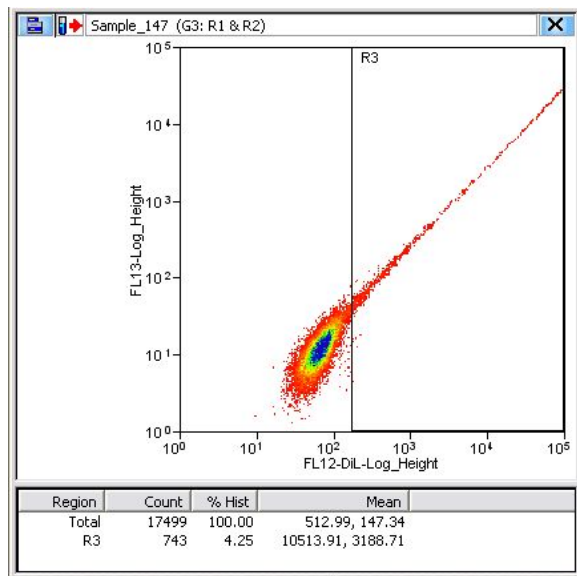
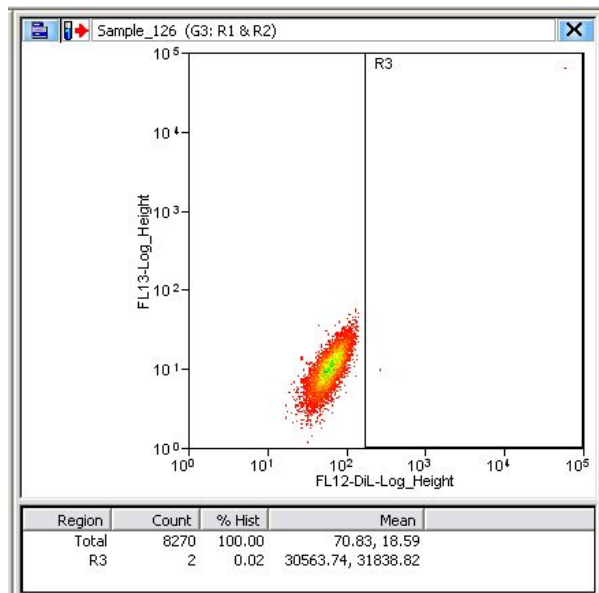


488 нм



488 нм  
561 нм

# Изучение процессов переноса красителя C-AM из клеток DiL+ C-AM+ в DiL- C-AM- клетки



# Спасибо за внимание

