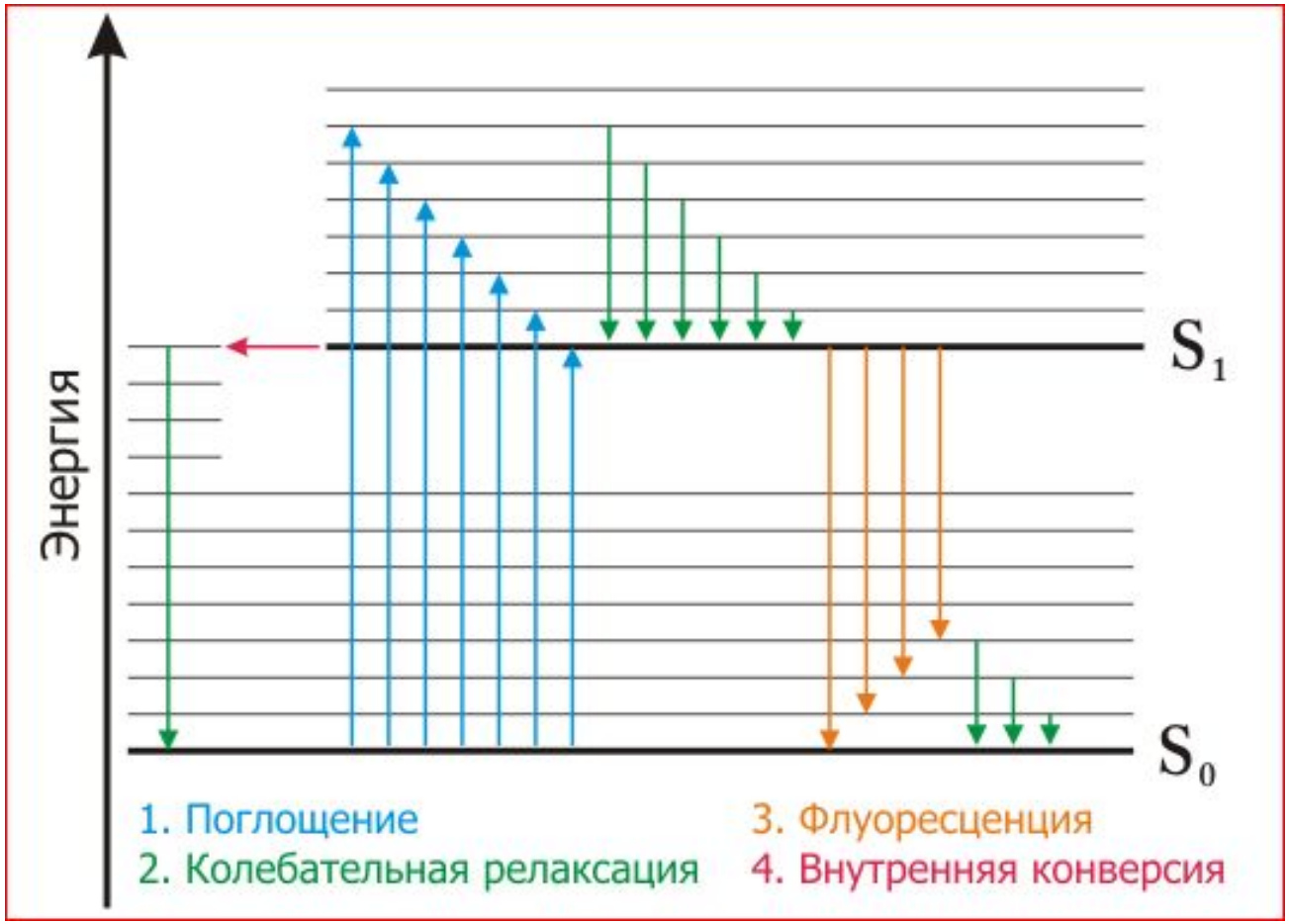
Кафедра медицинских нанобиотехнологий МБФ

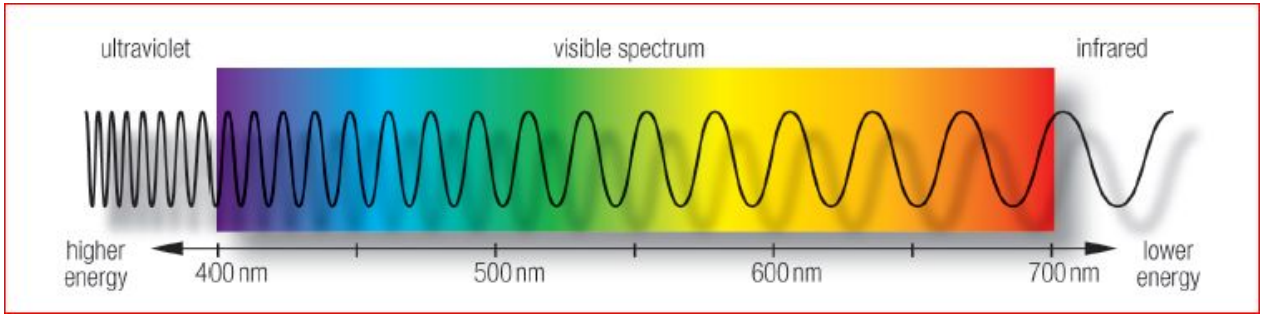
Методика проточной цитометрии и клеточной сортировки, их применение.

Автор:
Черепанов Сергей Александрович

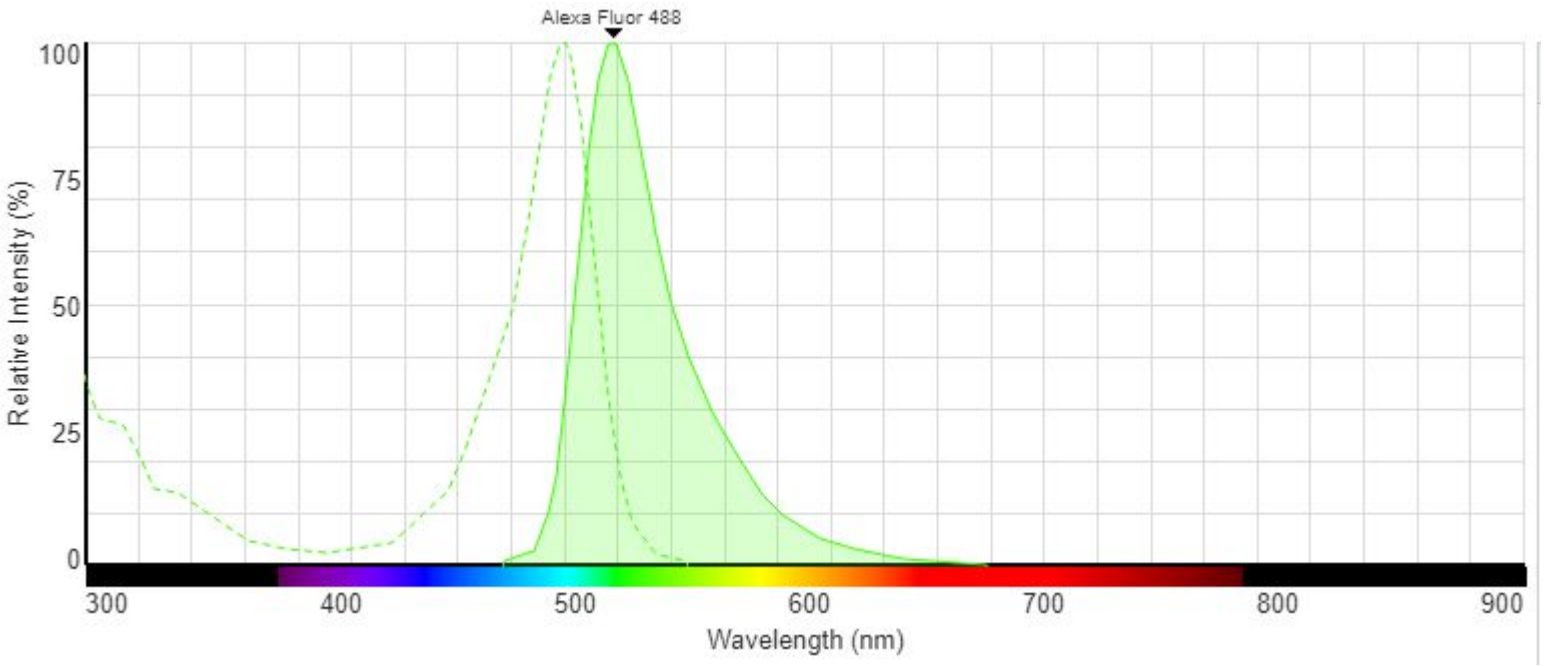
2019 г.

Флуоресценция





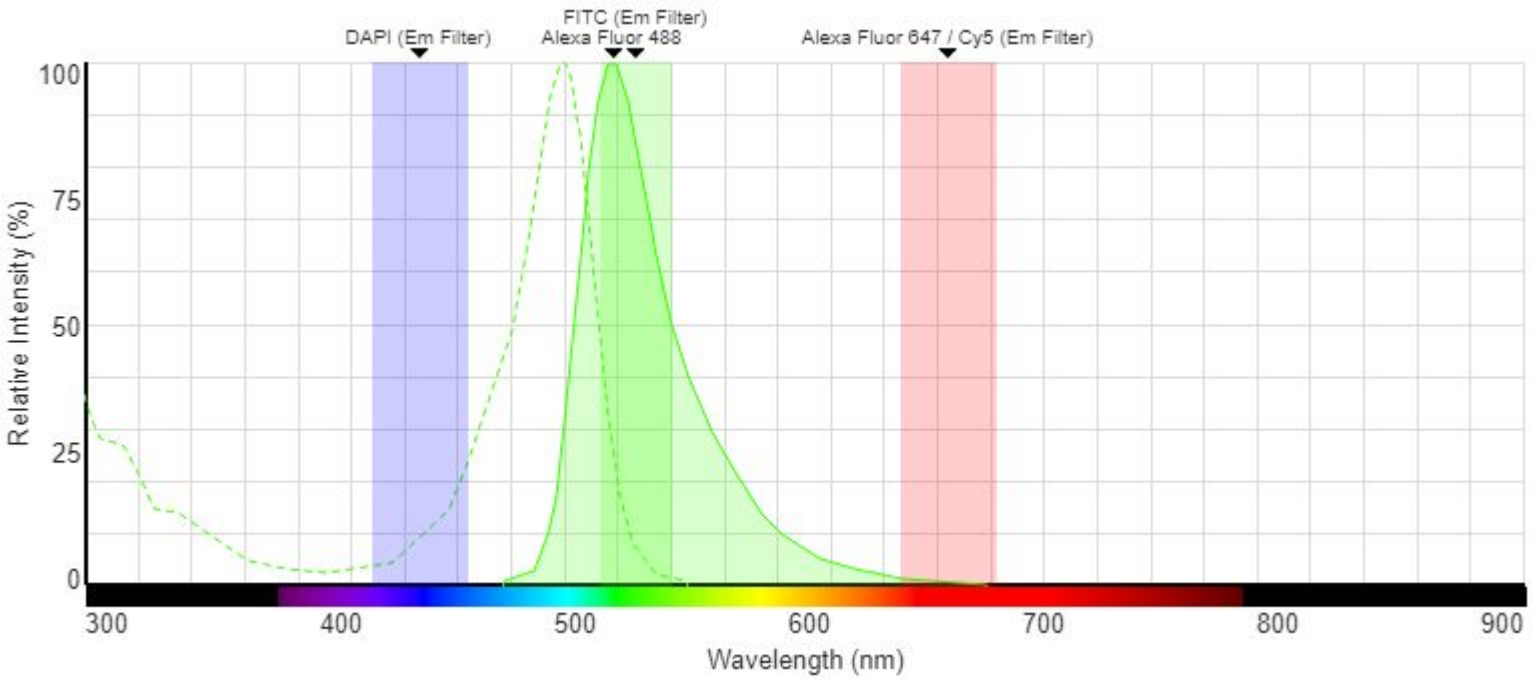
Спектры возбуждения и испускания флуоресценции



ThermoFisher SCIENTIFIC

Spectra Viewer

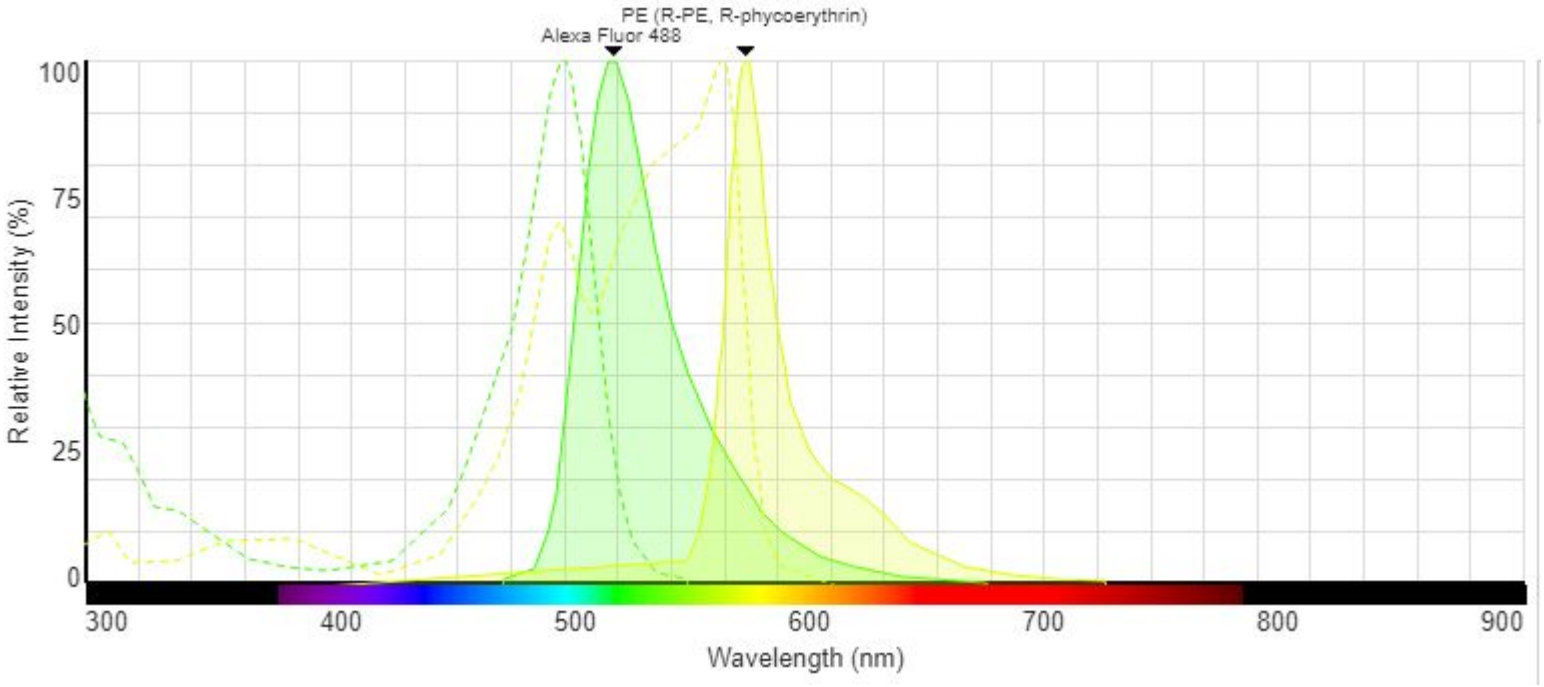
Спектры возбуждения и испускания флуоресценции



ThermoFisher SCIENTIFIC

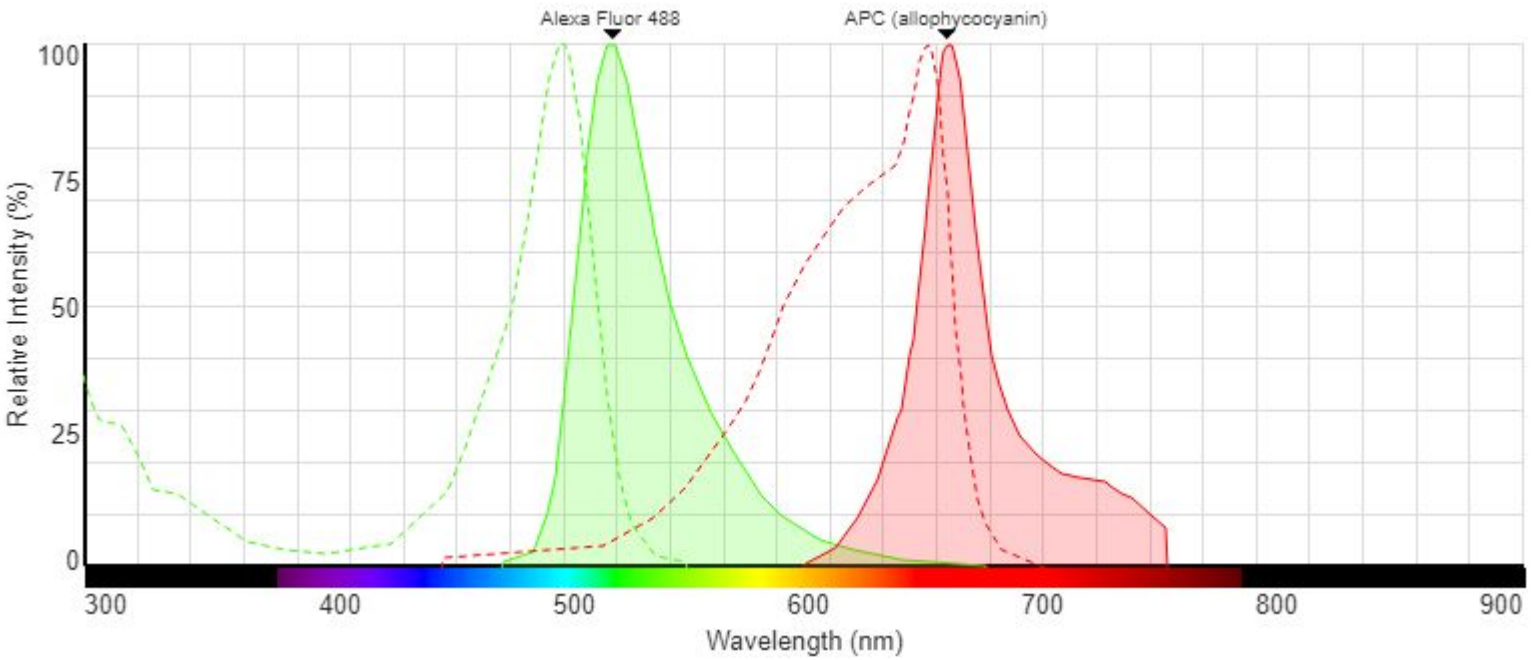
Spectra Viewer

Спектры возбуждения и испускания флуоресценции



ThermoFisher SCIENTIFIC Spectra Viewer

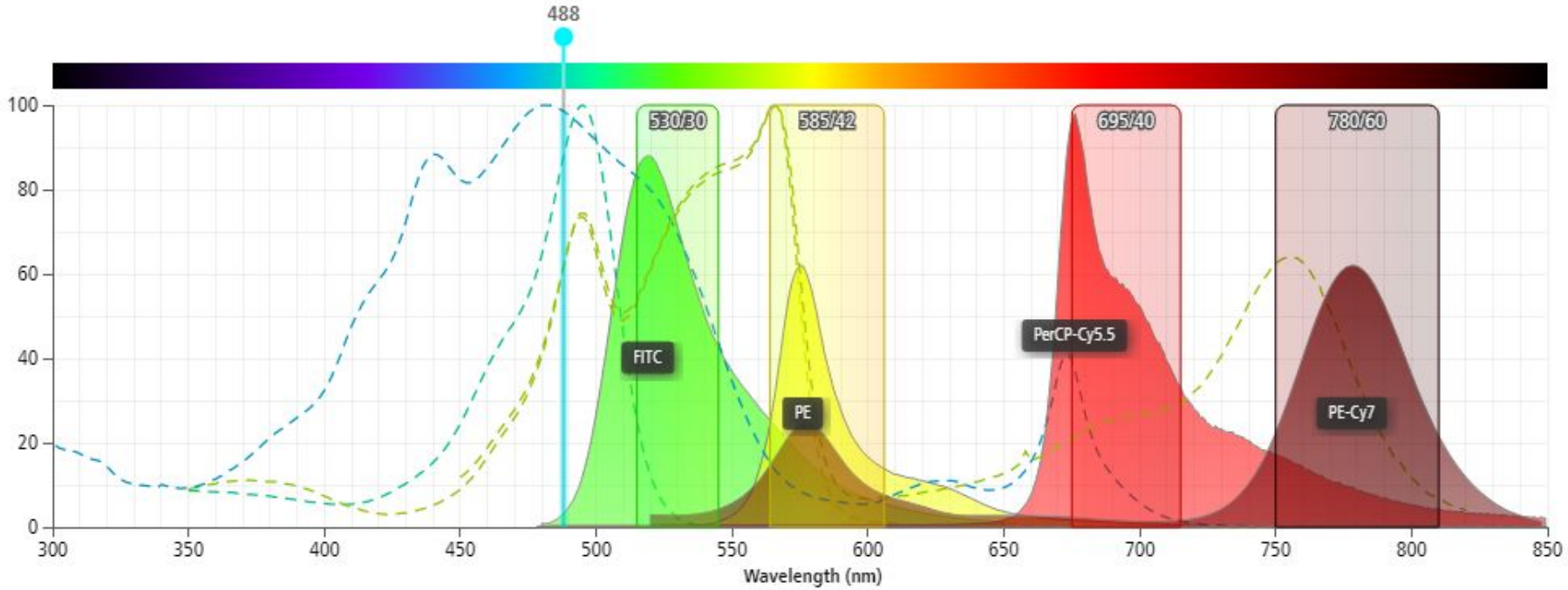
Спектры возбуждения и испускания флуоресценции



ThermoFisher SCIENTIFIC

Spectra Viewer

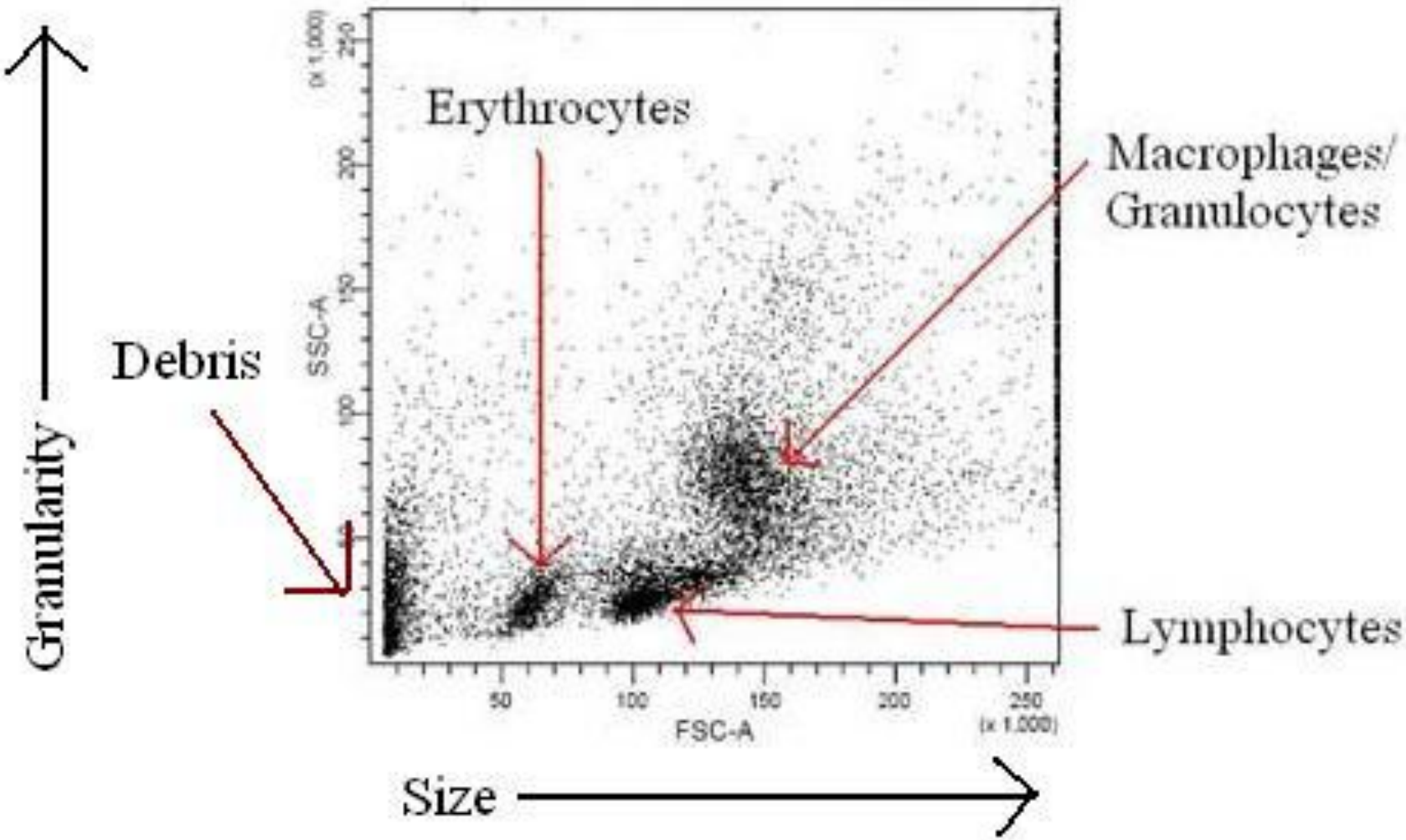
Спектры возбуждения и испускания флуоресценции



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

BD Biosciences

BD FLUORESCENCE SPECTRUM VIEWER A MULTICOLOR TOOL


Erythrocytes
Macrophages/
Granulocytes
Debris
Lymphocytes
Granularity
Size
SSC-A
FSC-A
(x 1,000)
50
100
150
200
250

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

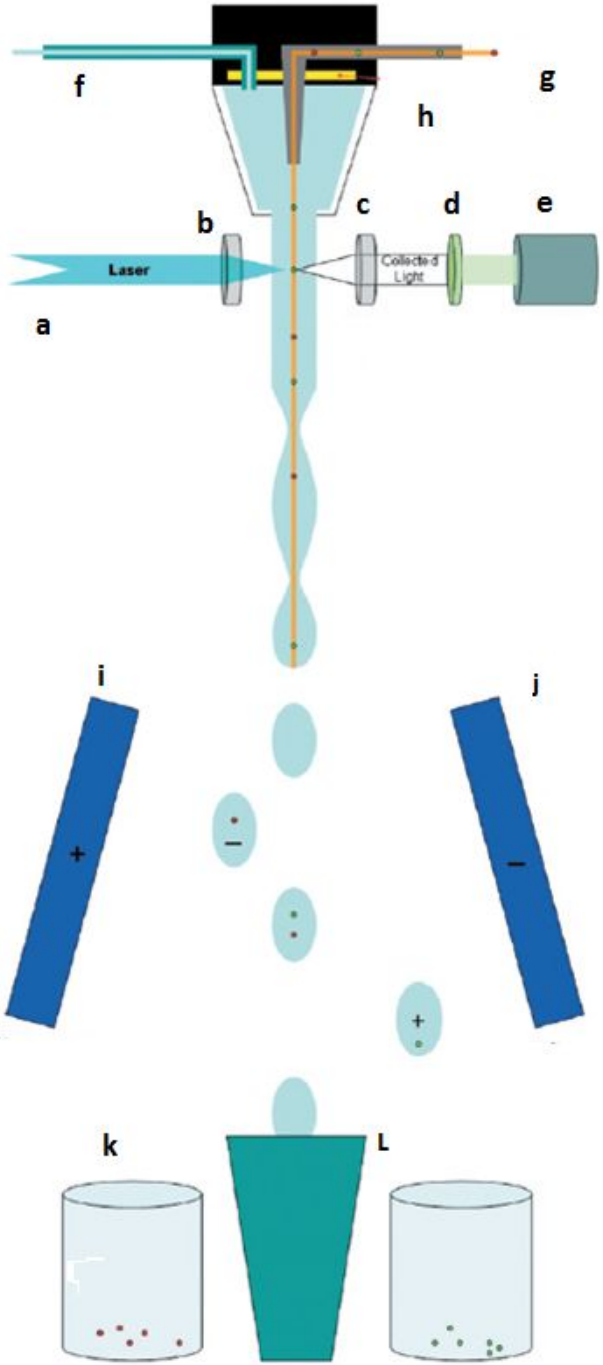
Клеточный сортер состоит из нескольких блоков:

- 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.

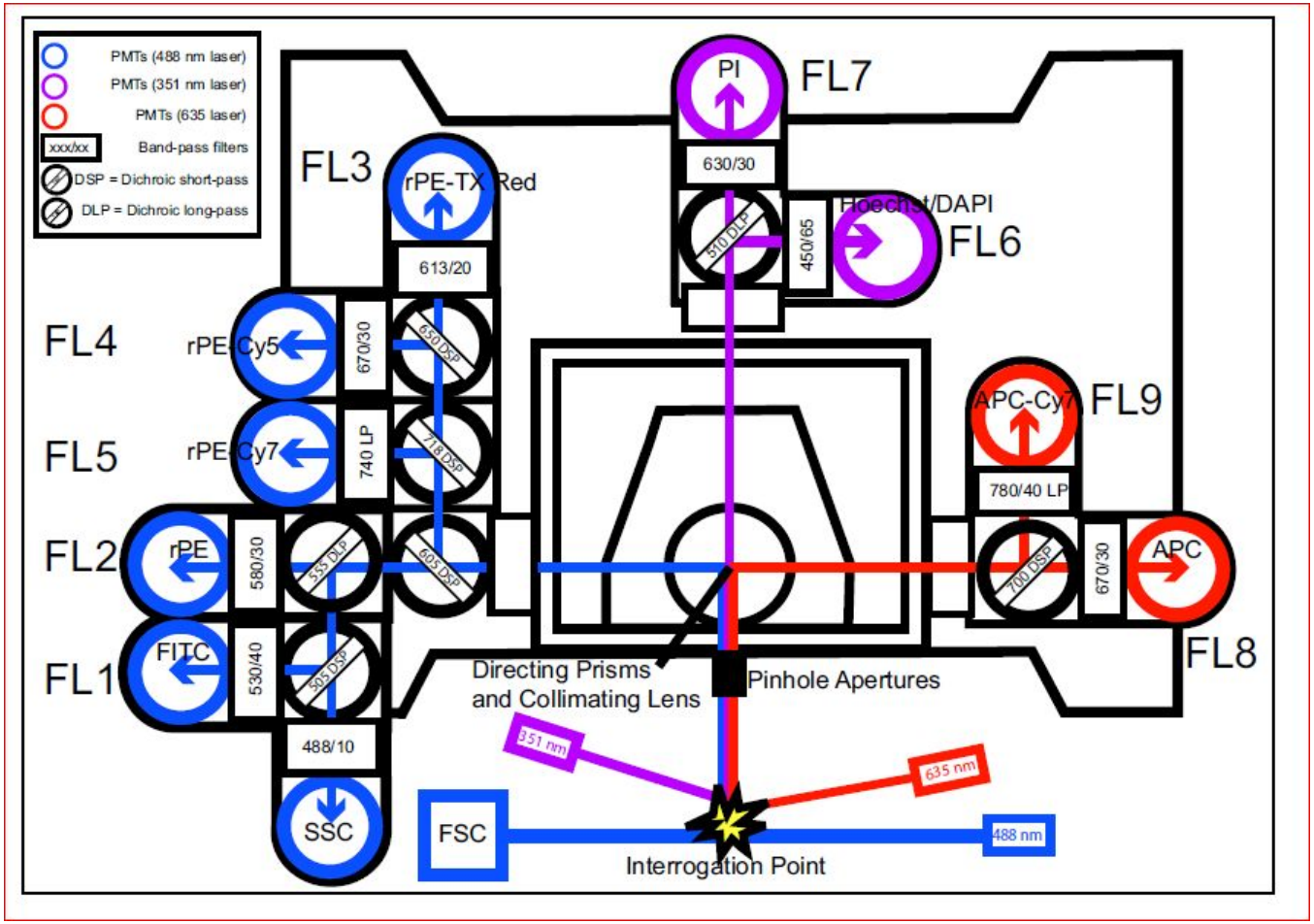
Комплектация лазеров:

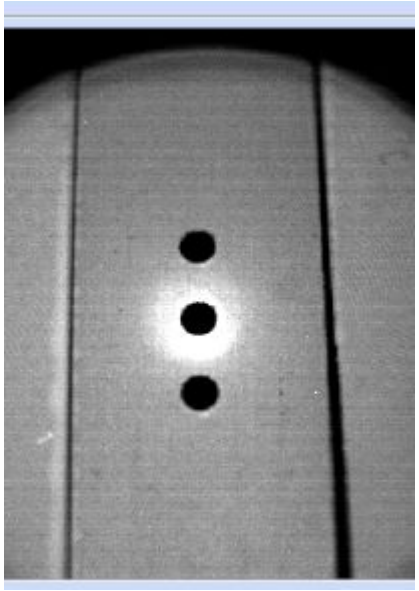
488 нм — **Flow-Check, Flow-Check Pro**

407 нм
628 нм — **Flow-Check Pro**

561 нм
592 нм — **Rainbow Fluorescent Particles**

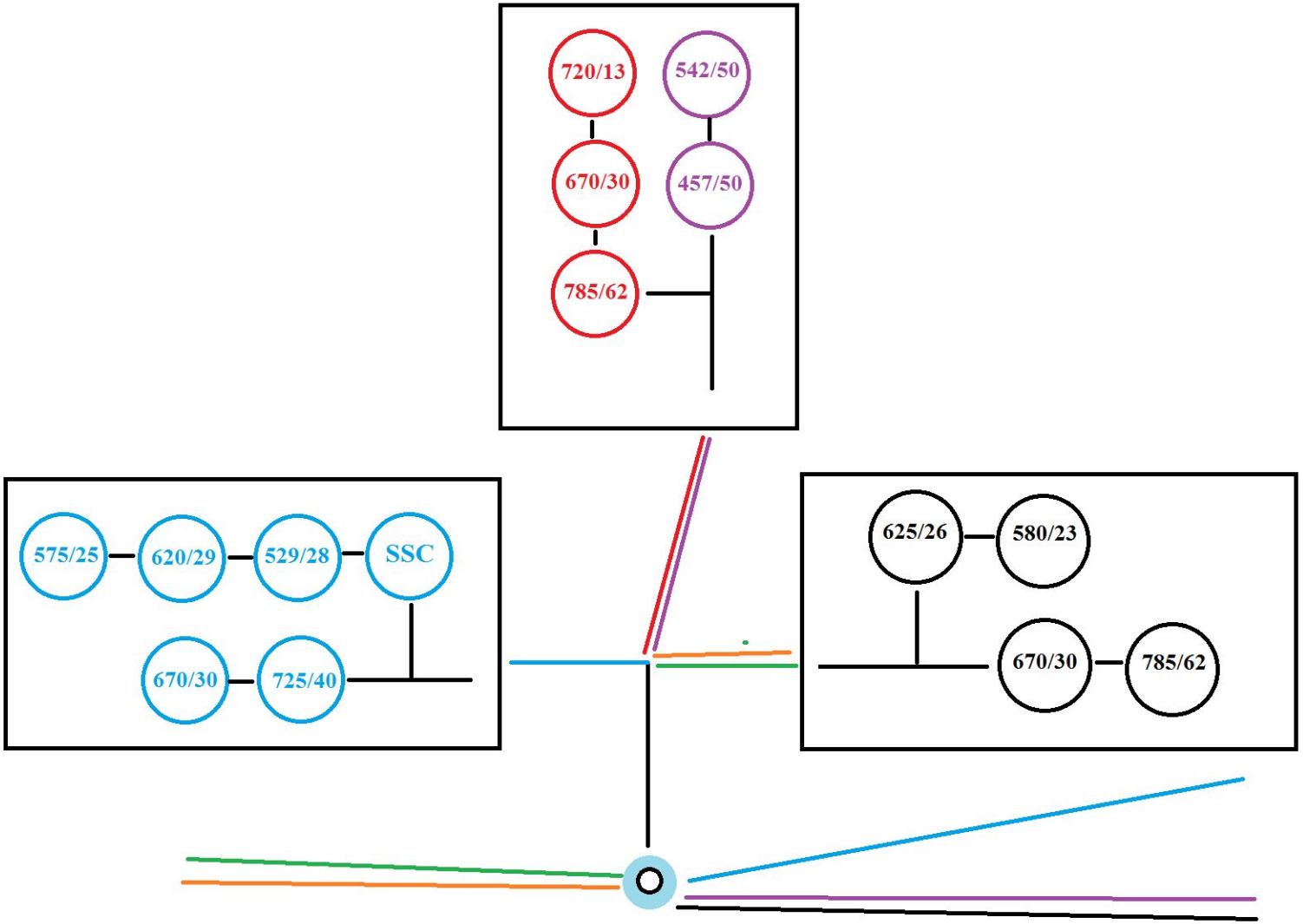
Пример устройства оптических систем



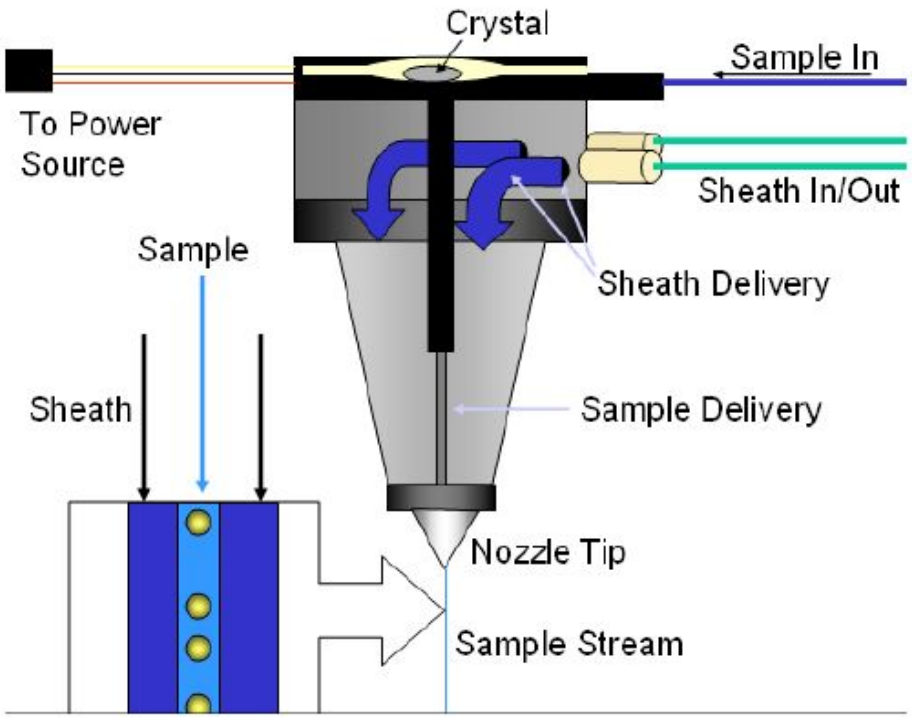


Beckman Coulter Inc: **MoFlo XDP high-speed cell sorter**: Instructions for use. 2010. 75.

Комплектация каналов:



Система гидрофокусировки

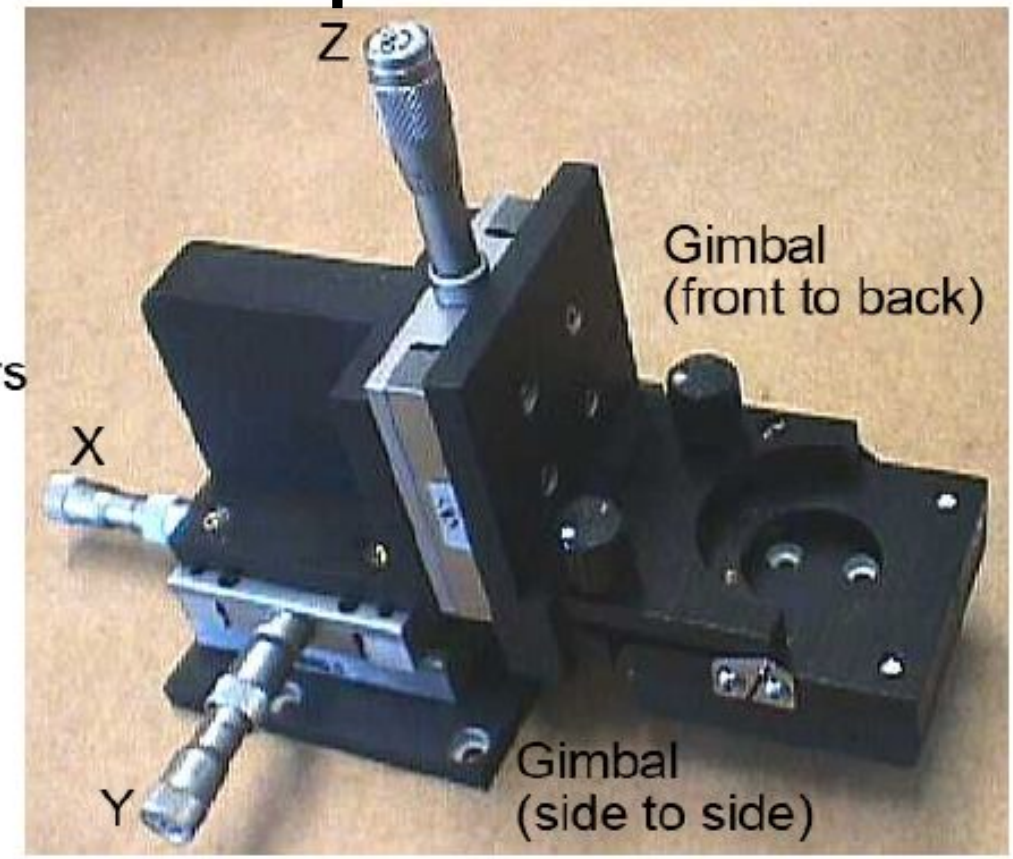


Диаметр наконечника (nozzle): 70, 100, 150, 200 мкм.

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

Beckman Coulter Inc: **MoFlo XDP high-speed cell sorter**: Instructions for use. 2010. 84.

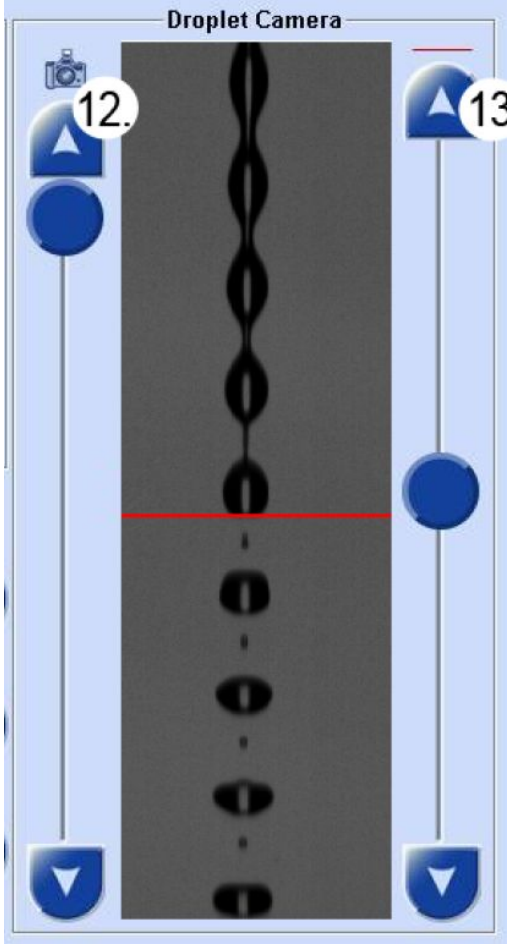
Настройка подведения лазерного излучения к клеткам обеспечивается с помощью микровинтов

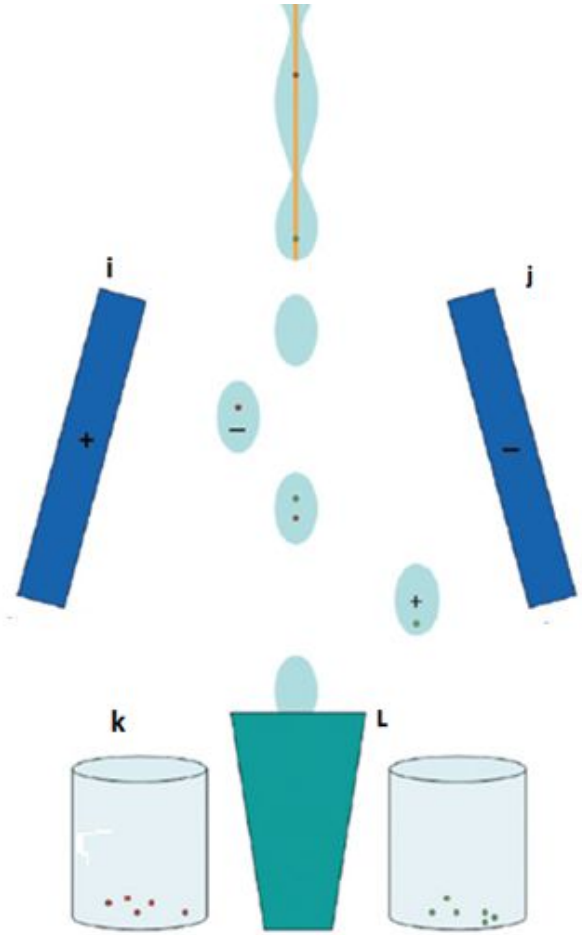


Beckman Coulter Inc: **MoFlo XDP high-speed cell sorter**: Instructions for use. 2010. 93.

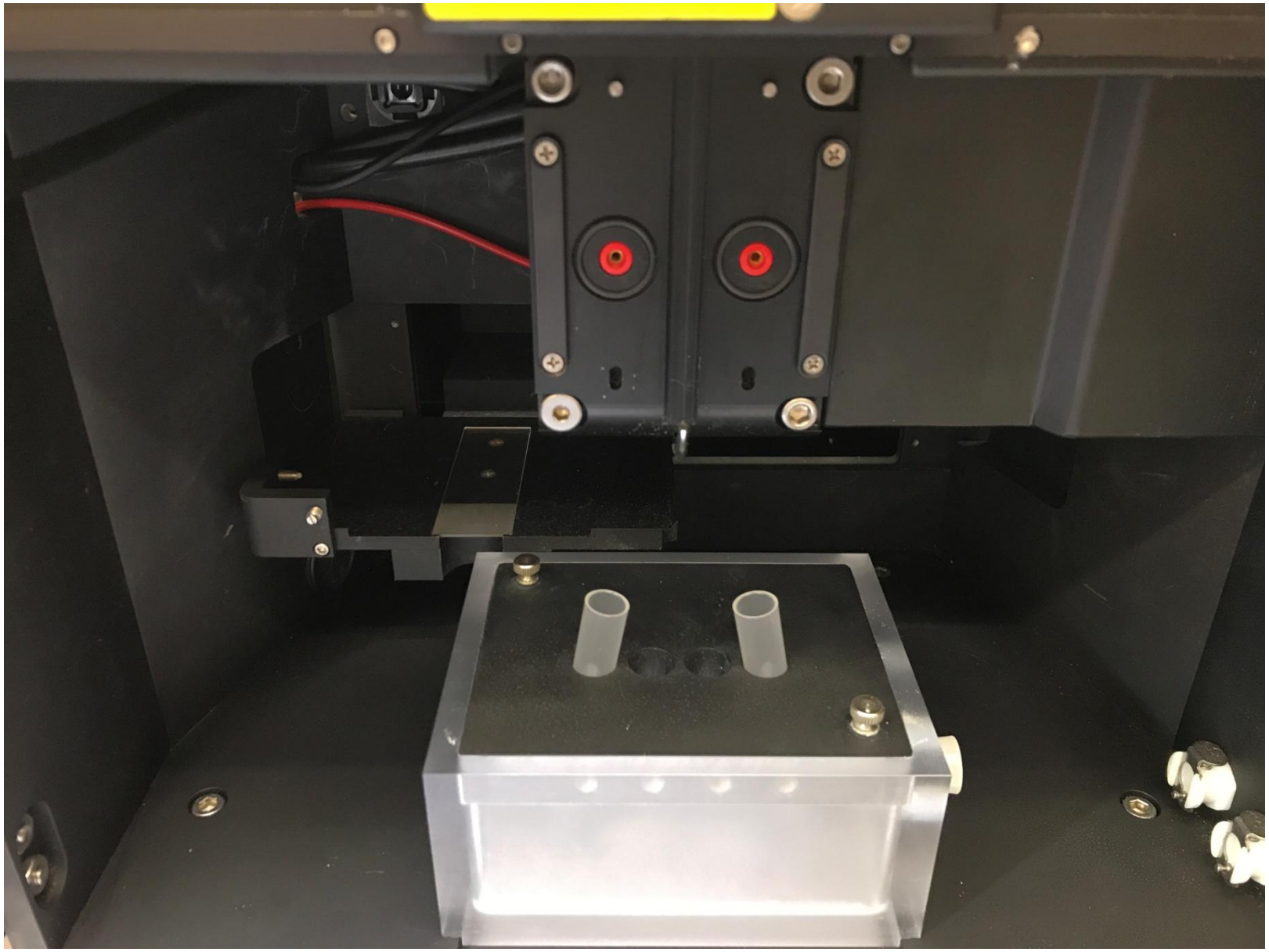
Выбор “отрывающейся” капли

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



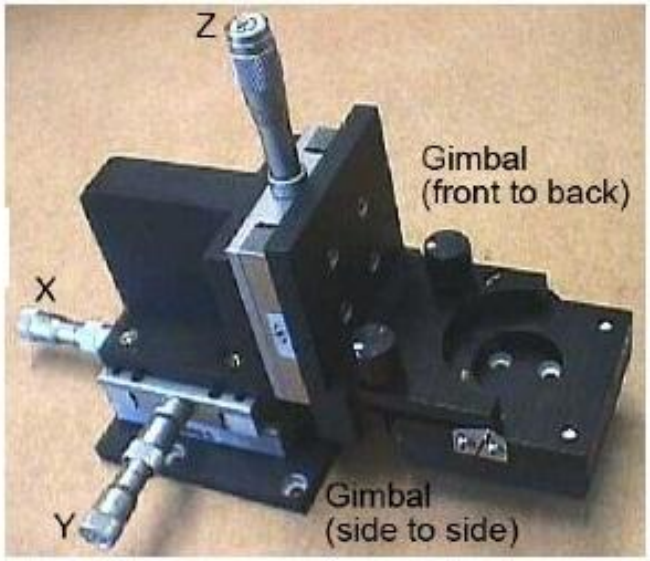


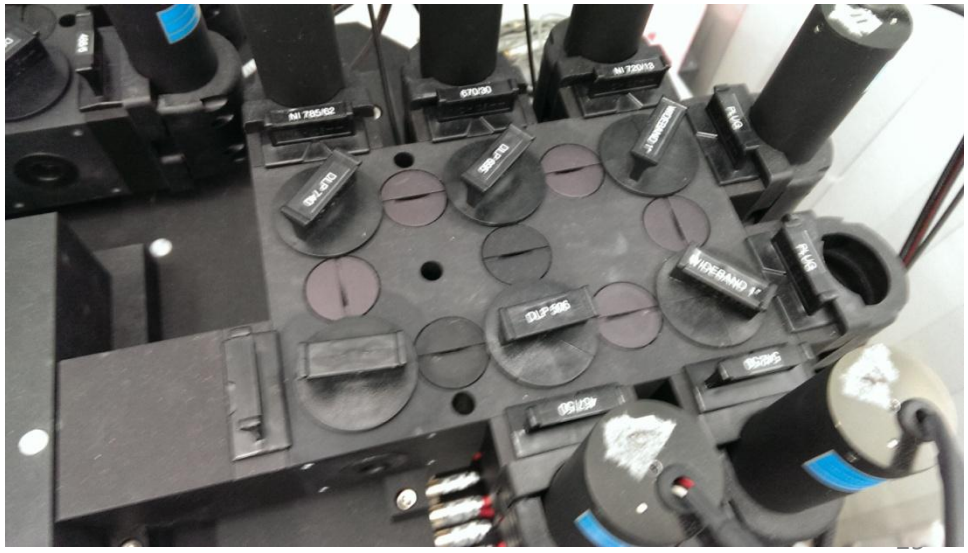
Beckman Coulter Inc: **MoFlo XDP high-speed cell sorter**: Instructions for use. 2010. 239.

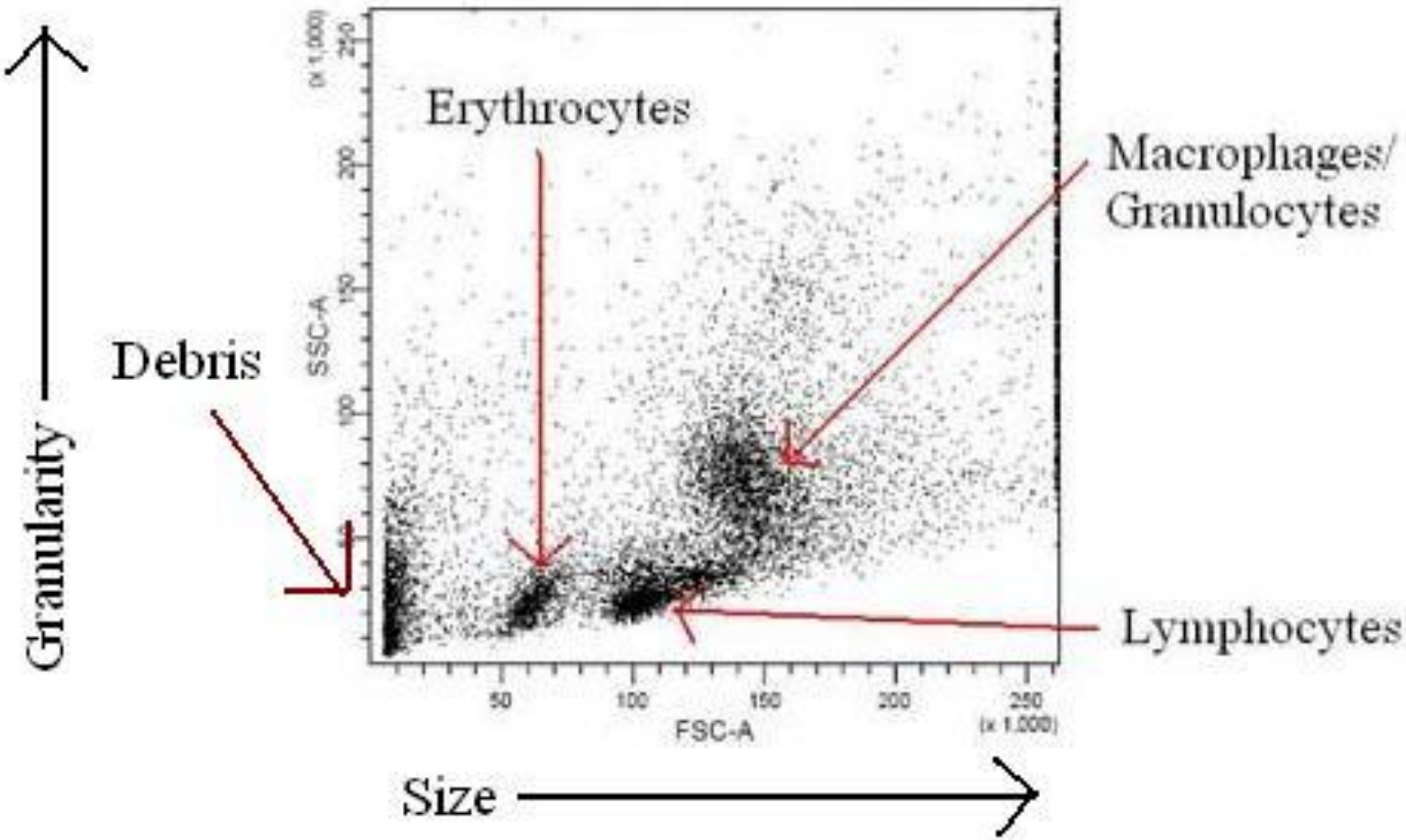


Подготовка прибора к сортировке:

- **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)



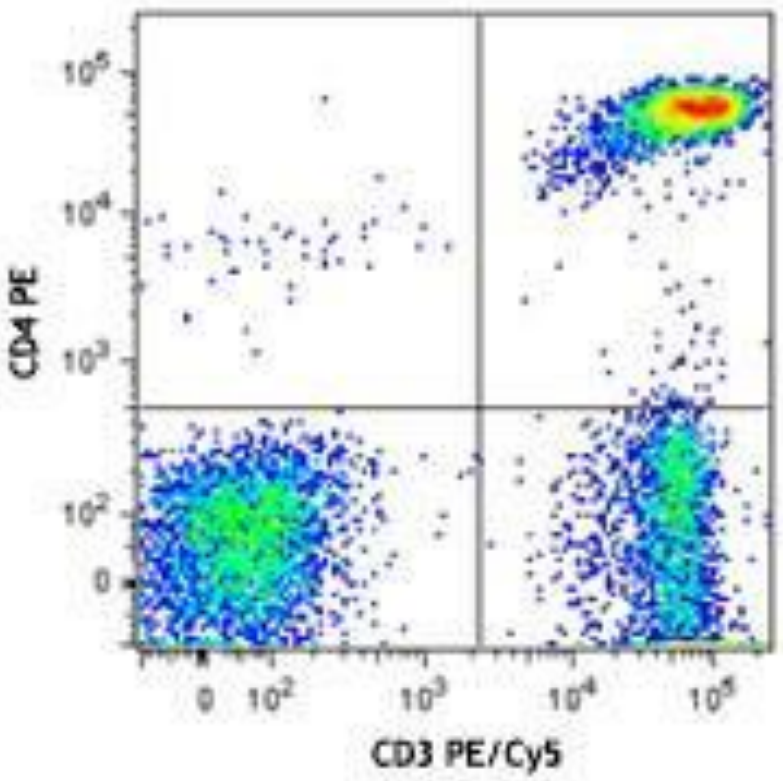



Erythrocytes
Macrophages/
Granulocytes
Debris
Lymphocytes
Granularity
Size
SSC-A
FSC-A
(x 1,000)
50
100
150
200
250

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.

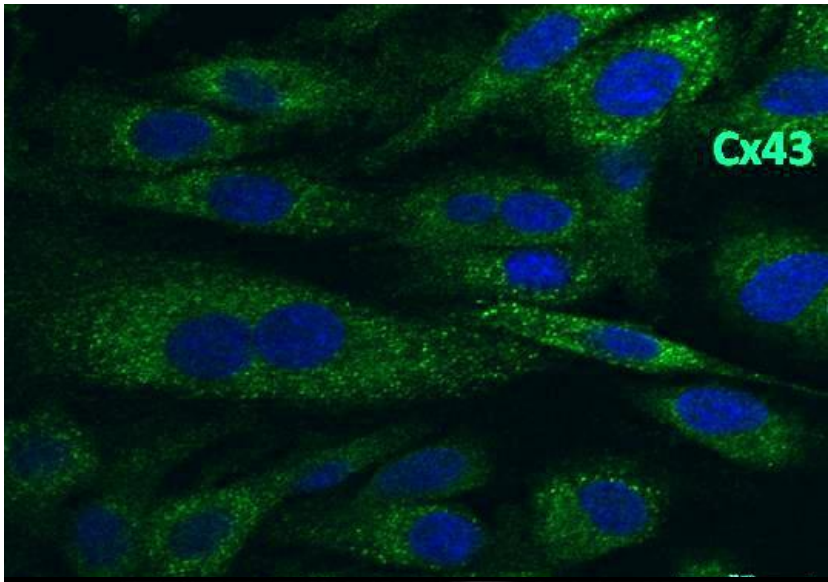
Средняя продолжительность жизни после постановки диагноза составляет 15 месяцев.

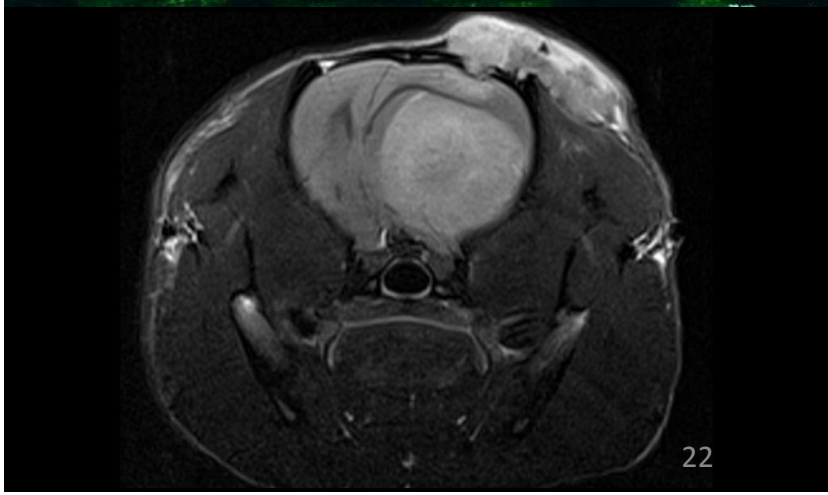
Существующие методы терапии малоэффективны.

Причина – наличие субпопуляций химиорезистентных клеток.

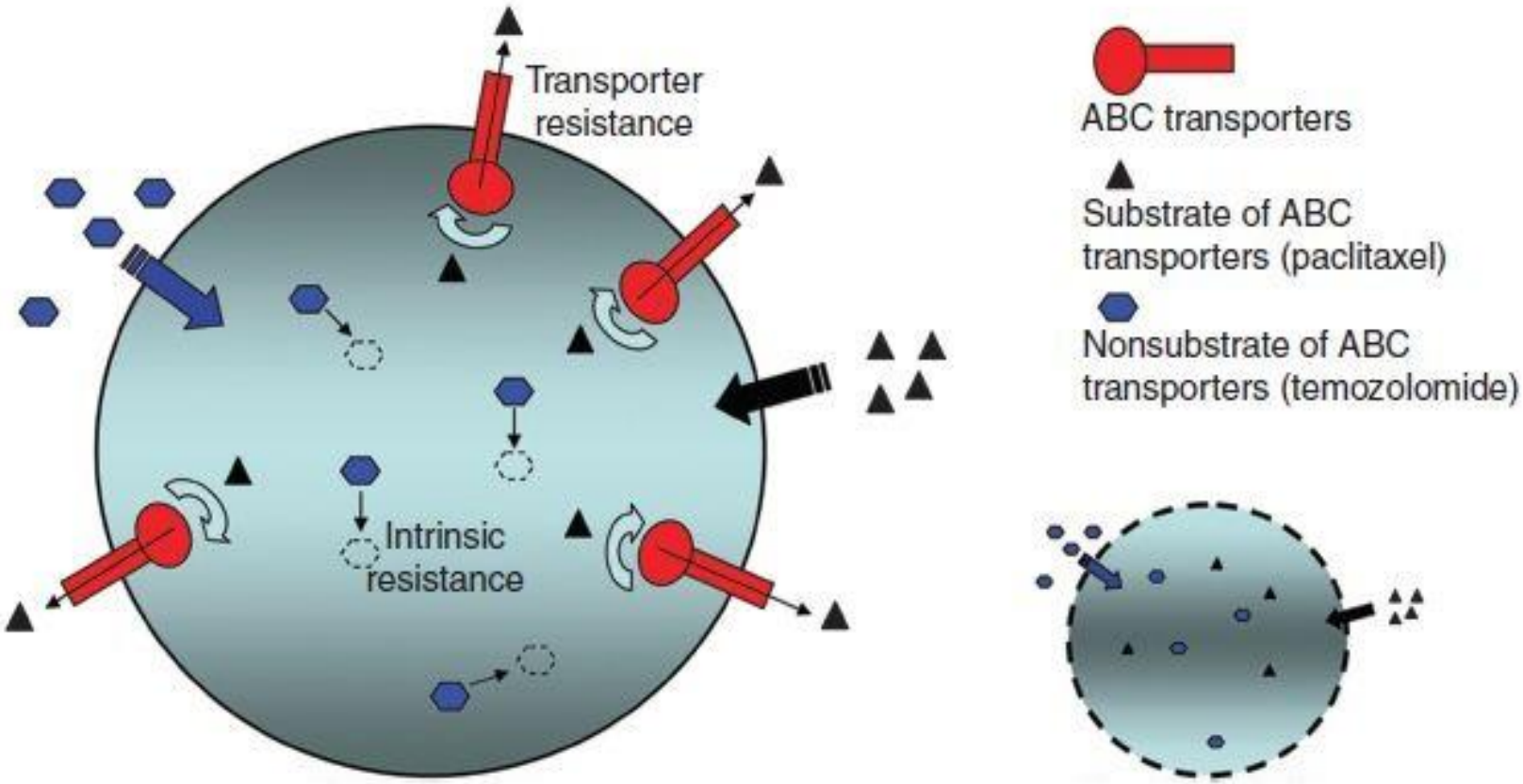
Трудоемки в изучении, немногочисленны.

Необходимо обогащение субпопуляций.



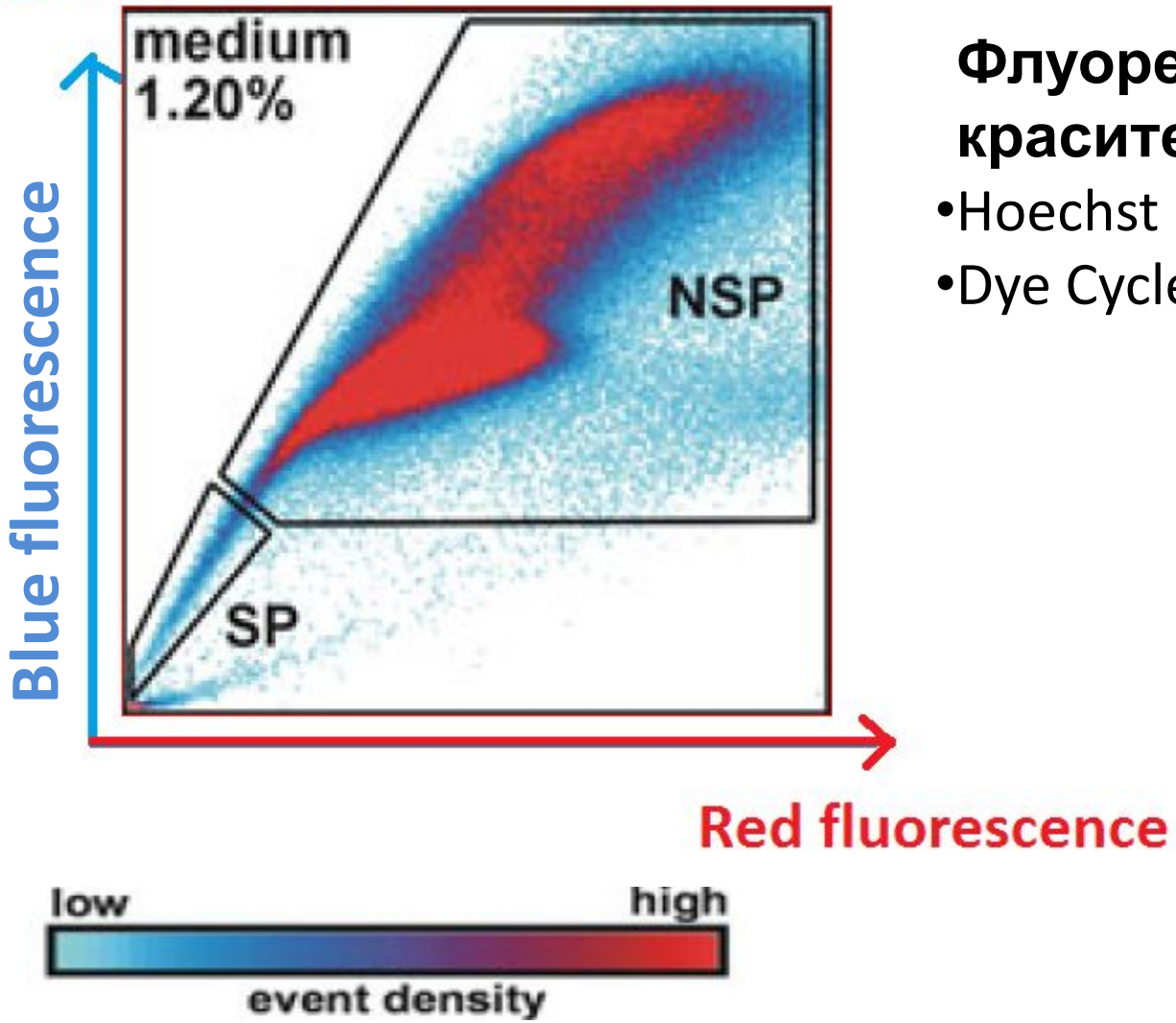


Факторы способствующие хемио- и радиорезистентности злокачественных опухолей



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

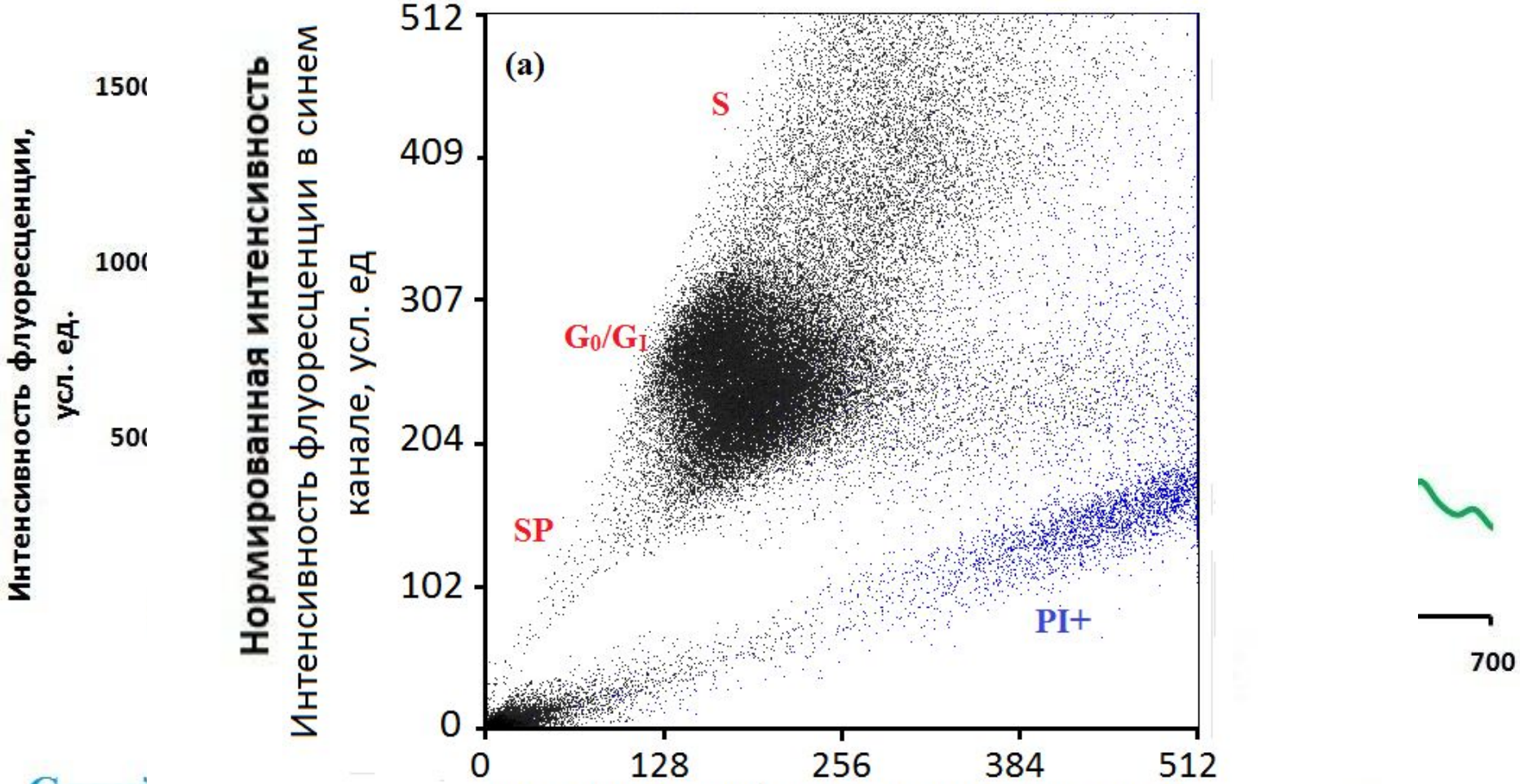
Химиорезистентные клетки боковой популяции



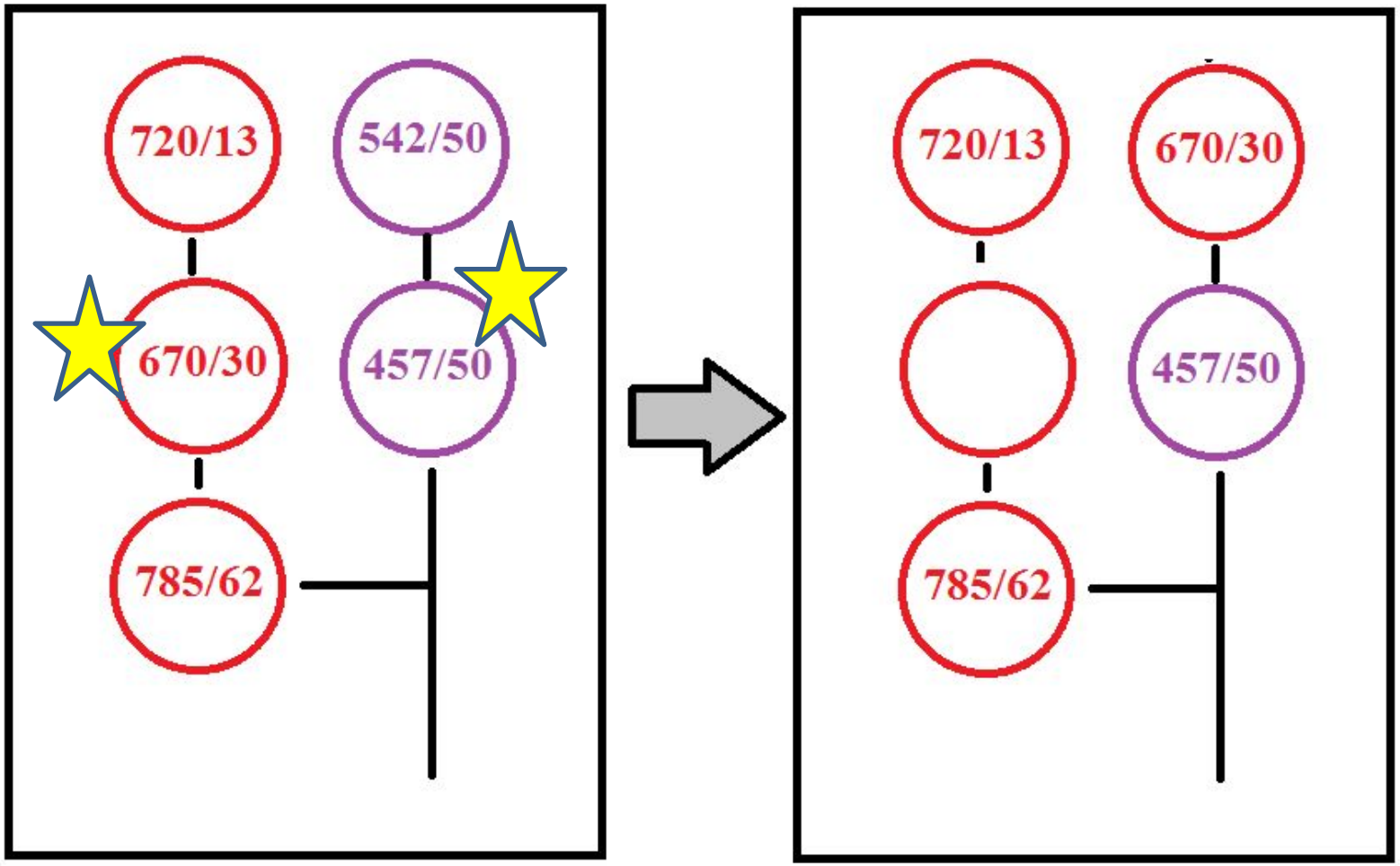
Флуоресцентные красители:

- Hoechst 33342
- Dye Cycle Violet

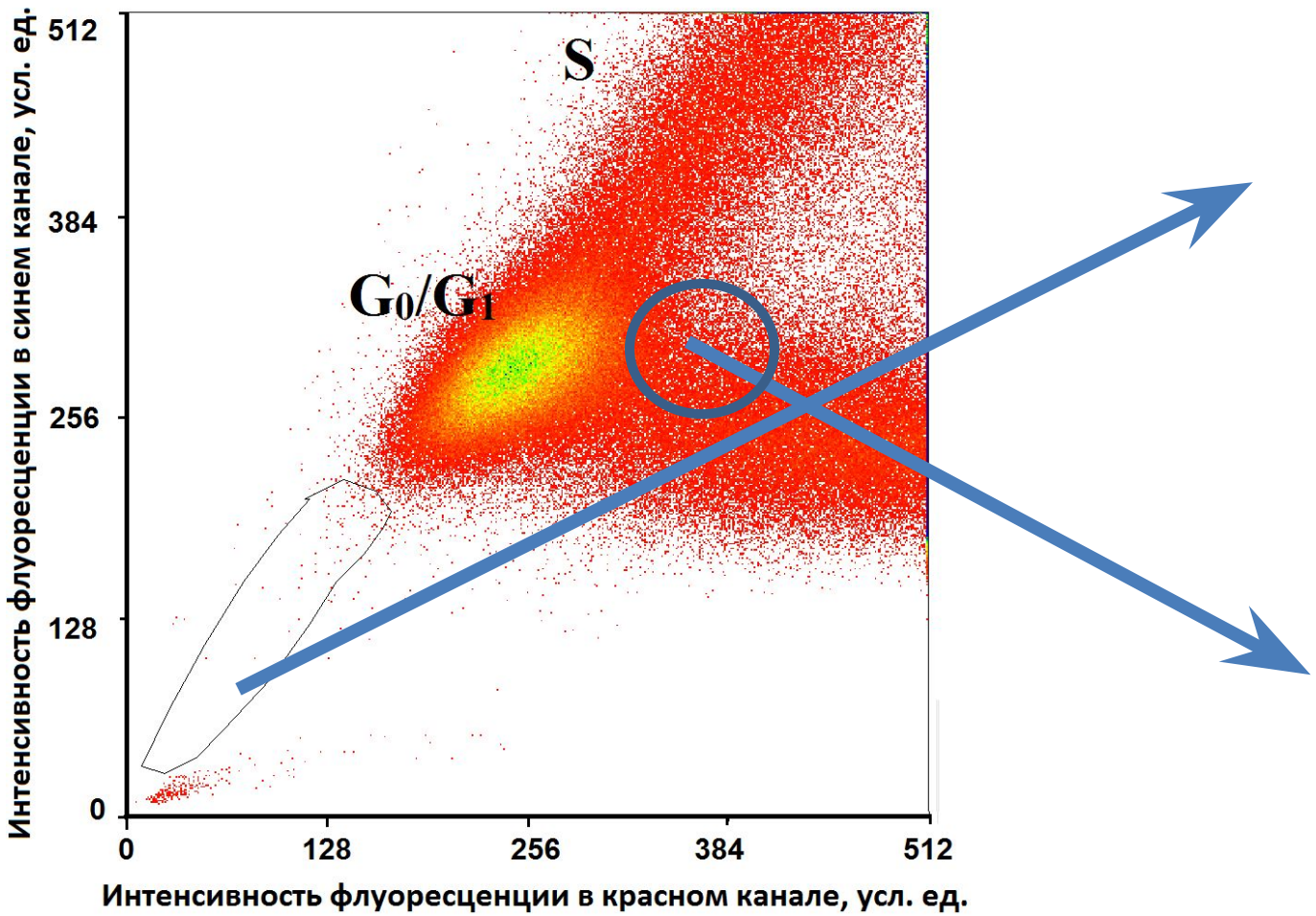
Спектры распределения клеток по интенсивности регистрации флуоресценции красителя Dye Cycle Violet



Оптимизация расположения каналов для получения максимального сигнала



Точеные диаграммы, позволяющие определить процент клеток боковой популяции

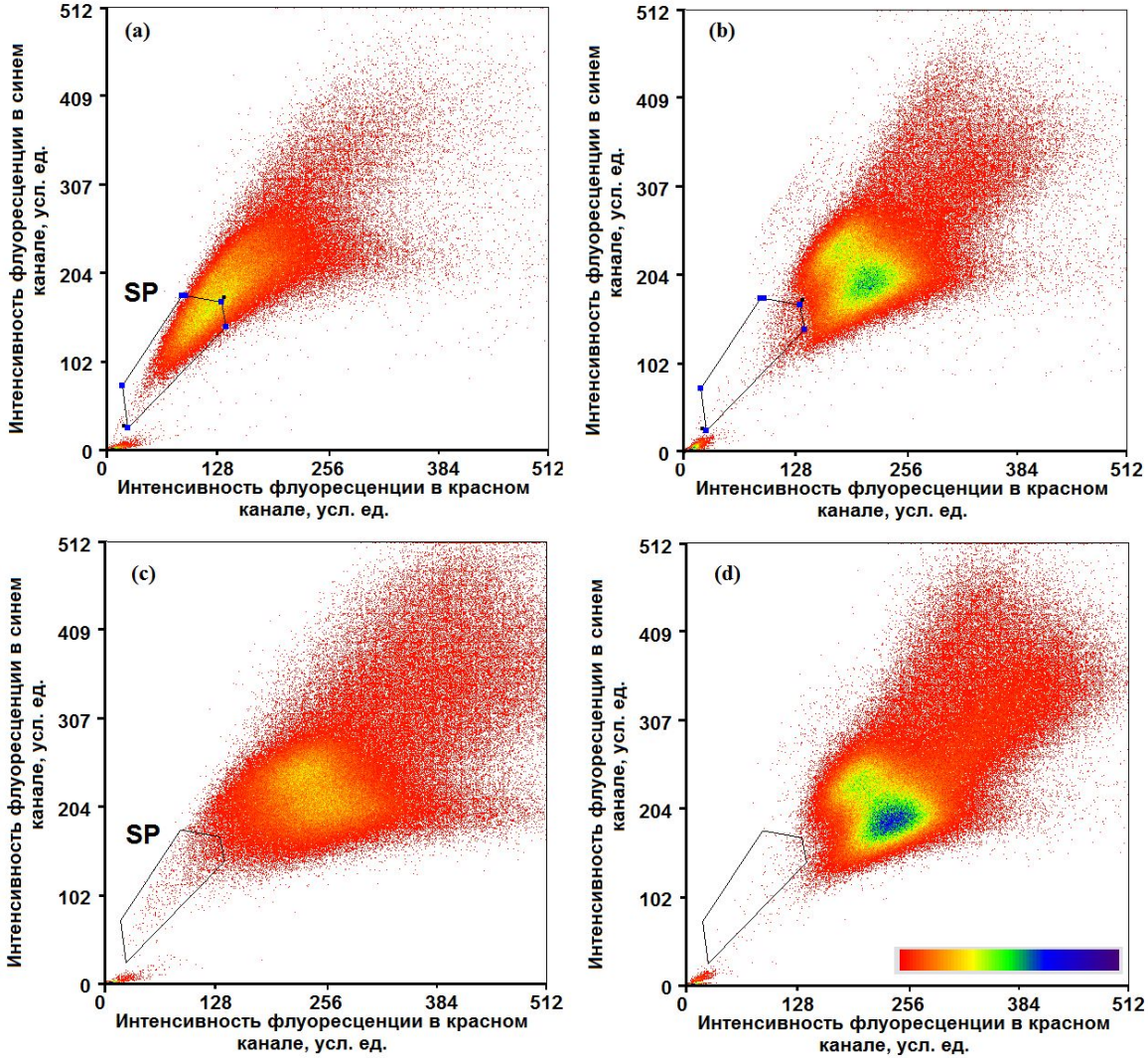


SP = (1,12 ± 0,14)%.

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*10^6/ 1 мл
8) Объем образца – 2 мл
9) Количество отсортированных клеток – 1* 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 Fl7 – 670 В
12) Температура пробирки во время сортировки – +4С

Определение процента клеток боковой популяции в отсортированных образцах после



SP=(31,59 ± 1,25)%,

SP= (0,77 ± 0,10)%

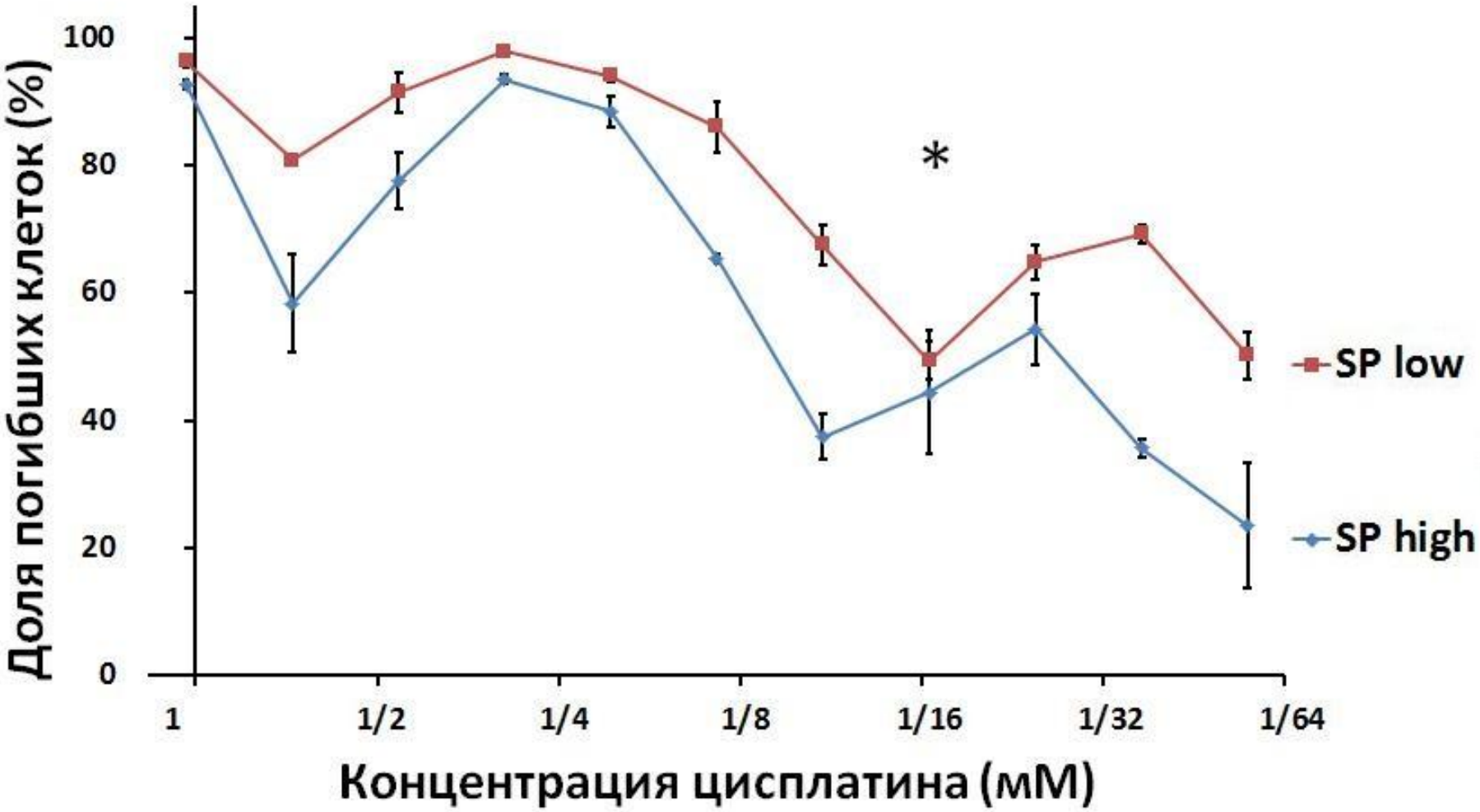
Динамика изменения процента клеток боковой популяции в образцах после сортировки

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

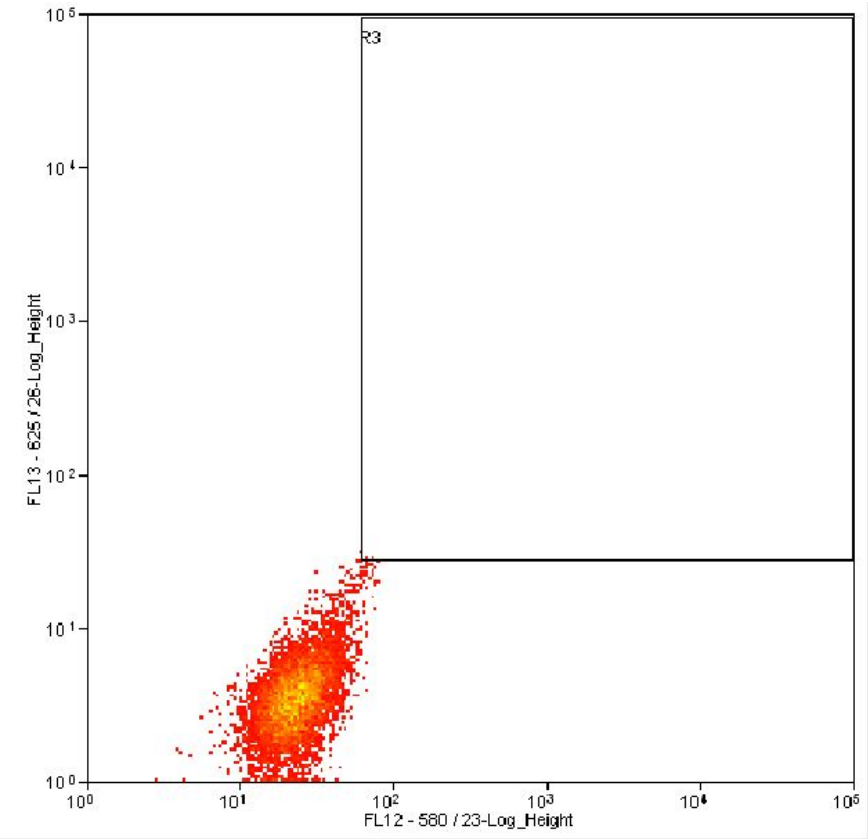
№ пассажа (день после сортировки) / Образец	I пассаж (5)	II пассаж (9)	III пассаж (12)	IV пассаж (16)	V пассаж (20)
Образец после сортировки SP, процент клеток боковой популяциии	31,59 ± 1,25	22,55 ± 1,14	5,23 ± 0,46	1,74 ± 0,58	1,12 ± 0,16
Образец после сортировки nonSP, процент клеток боковой популяциии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

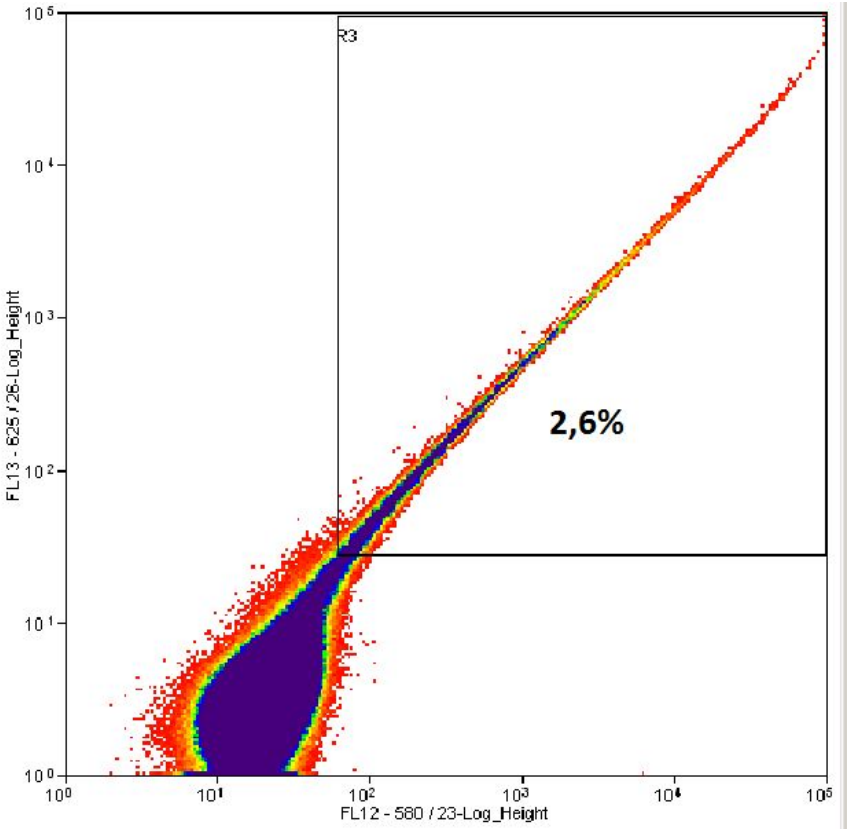
Схема эксперимента по изучению цитотоксичности цисплатина

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

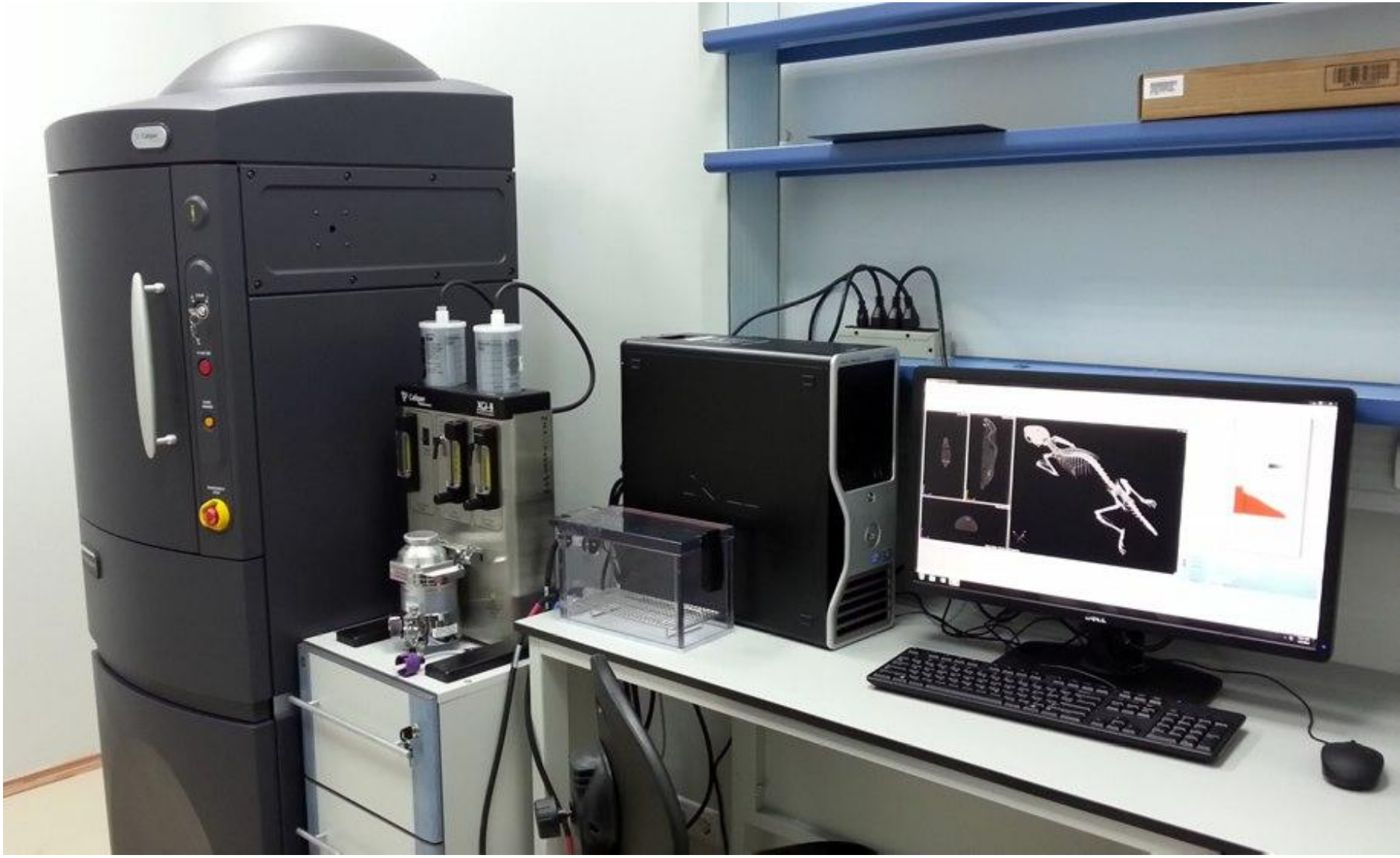


Сортировка GFP+ клеток 4T1 карциномы молочной железы

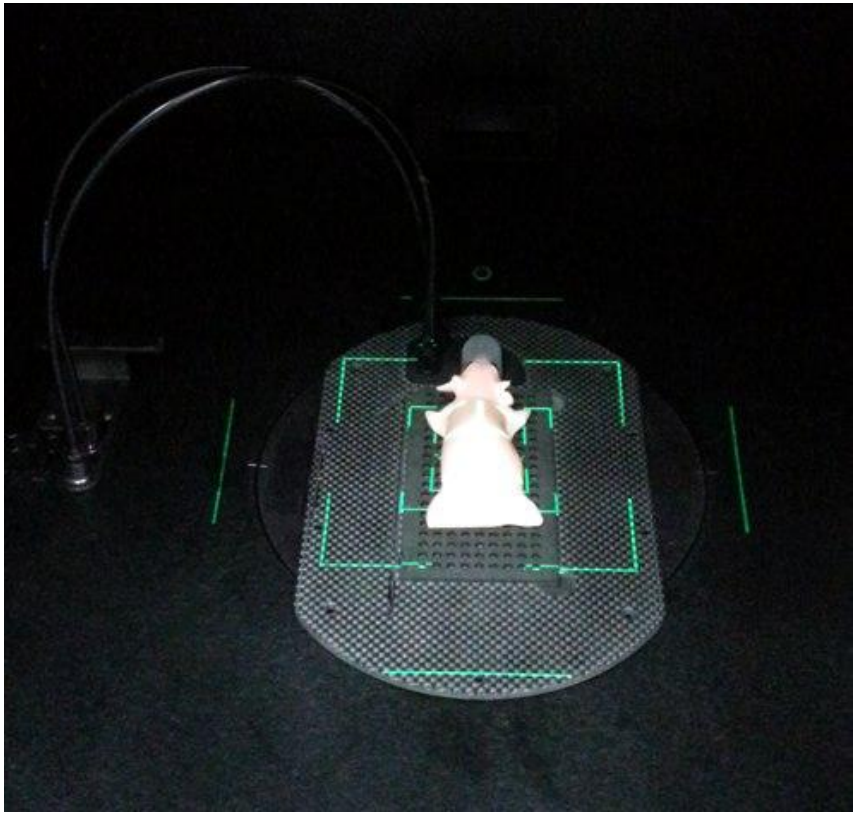


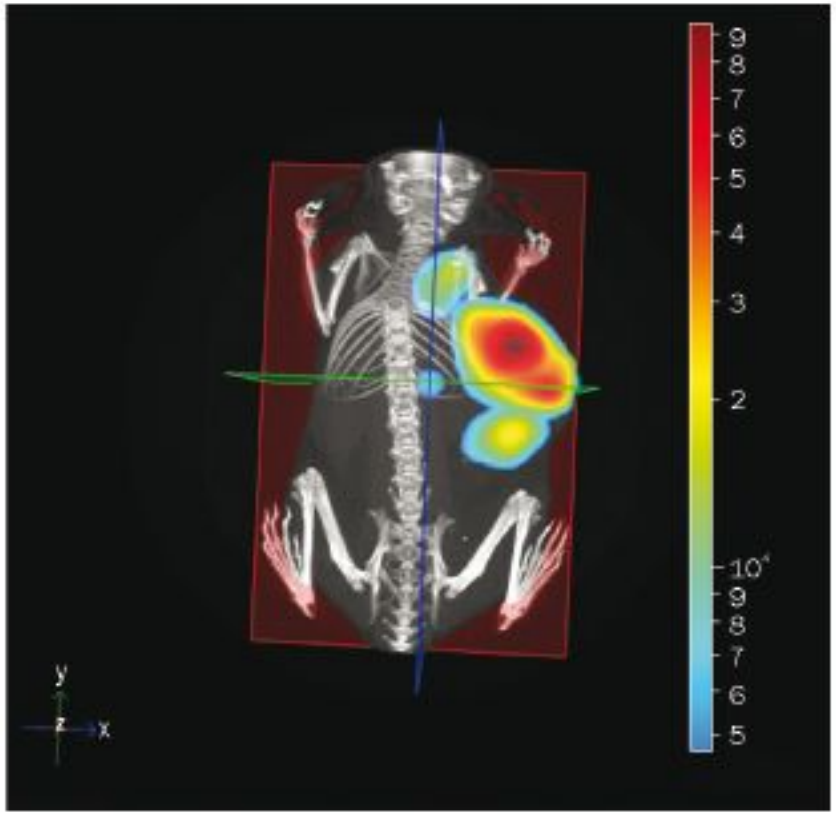


IVIS Spectrum Pre-clinical In Vivo Imaging **System**



МикроКТ и 3D-оптическая томография

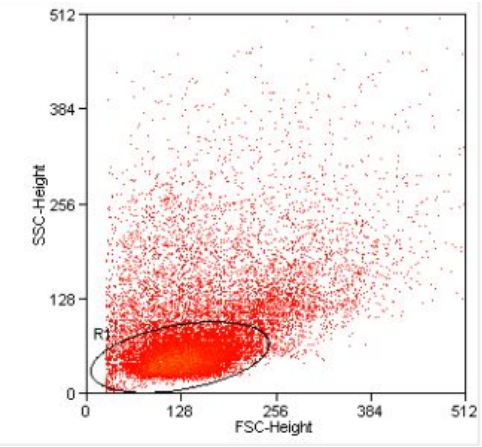


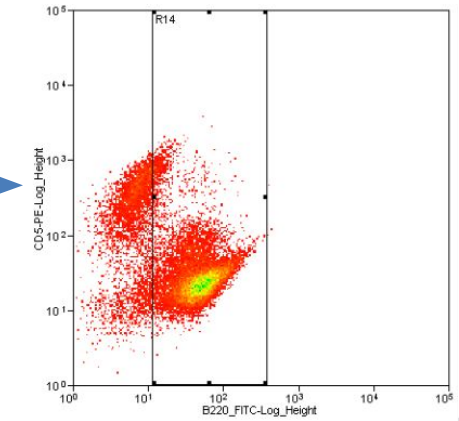


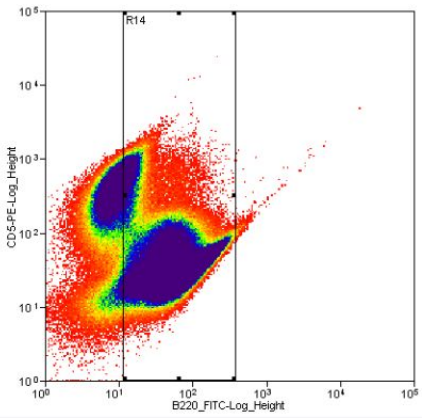
Снимки мыши с ортопической карциномой 4T1-Luc2 на 35 сутки после имплантации

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

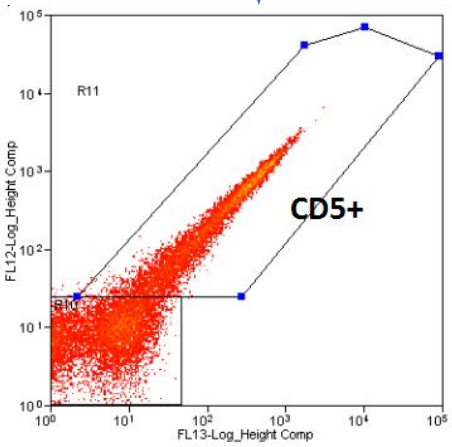
Сортировка B220+ CD5+ лимфоцитов

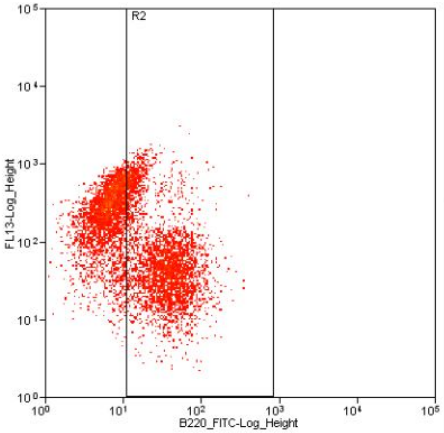


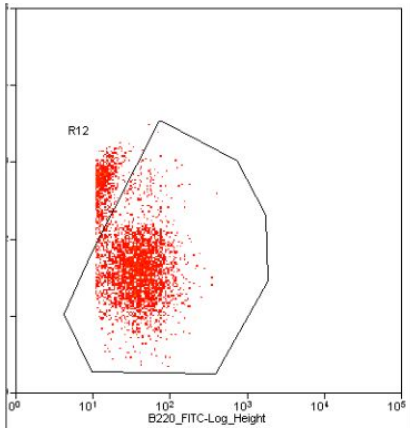




488 нм

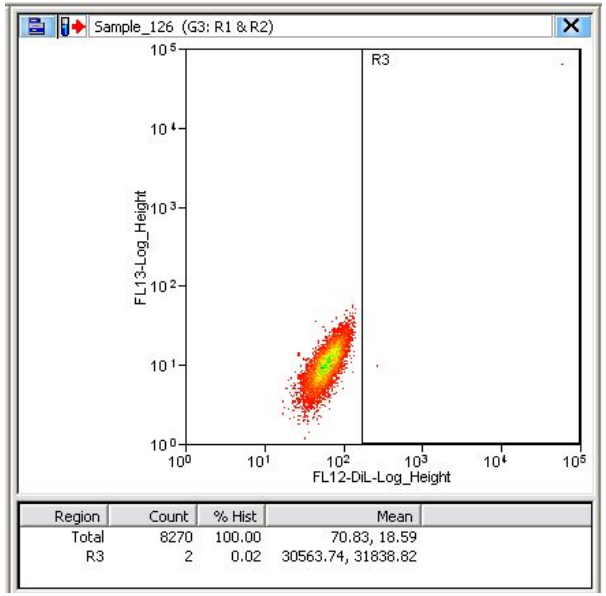


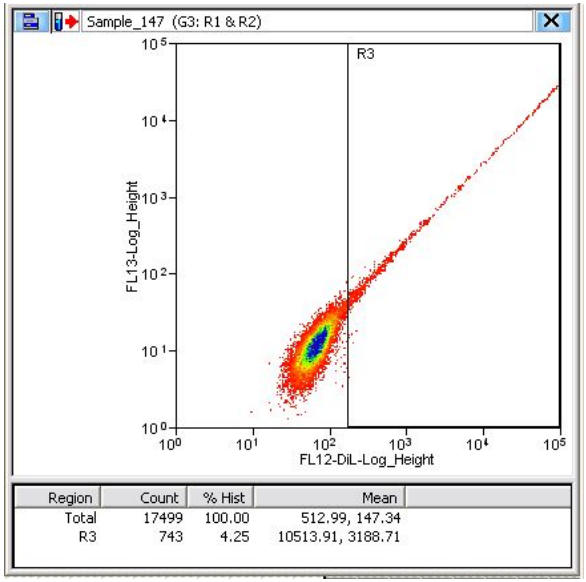


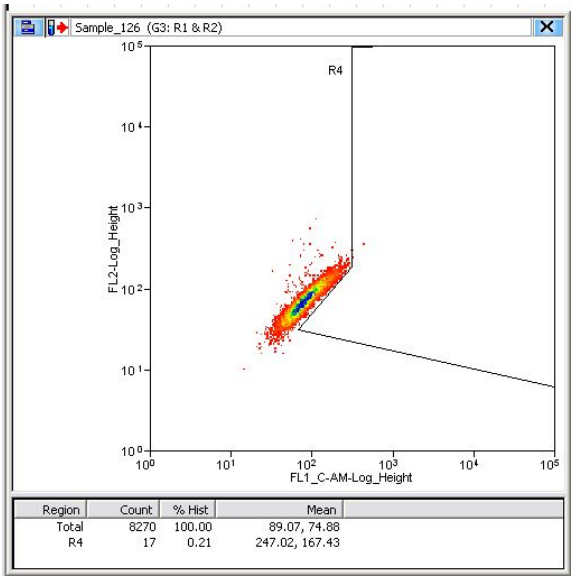


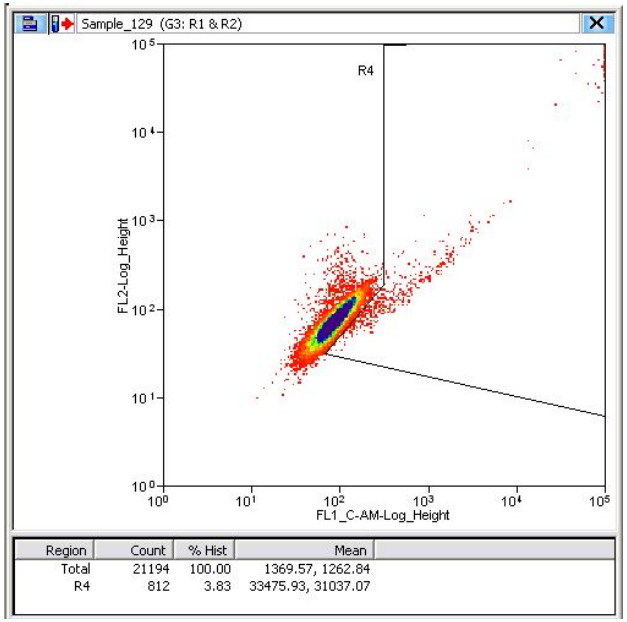
488 нм
561 нм

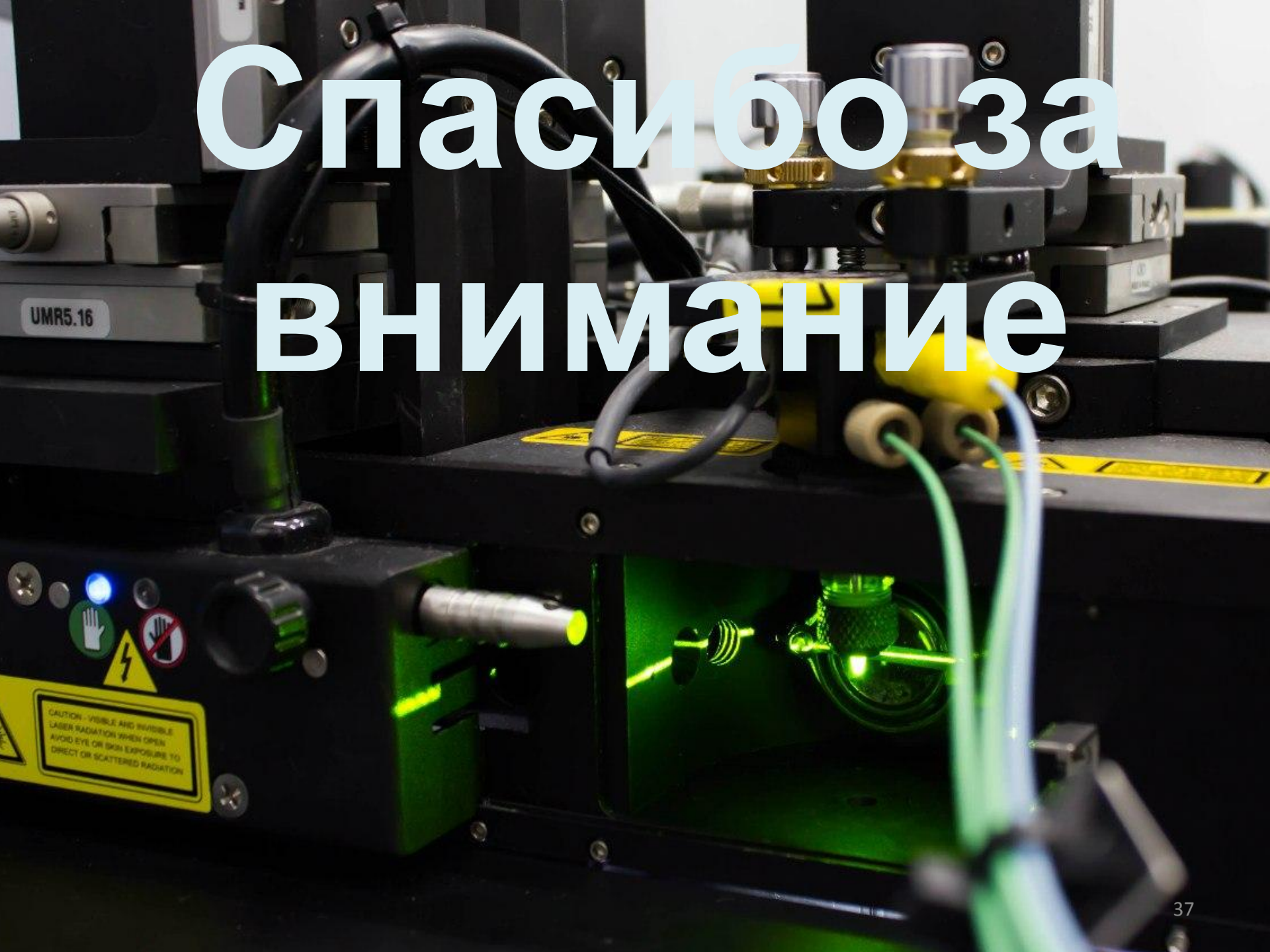
Изучение процессов переноса красителя C-AM из клеток DiL+ C-AM+ в DiL- C-AM- клетки











Спасибо за внимание