

Применение методов проточной цитофлуорометрии для научных исследований

Павел Вавилов,
Beckman Coulter, Новосибирск



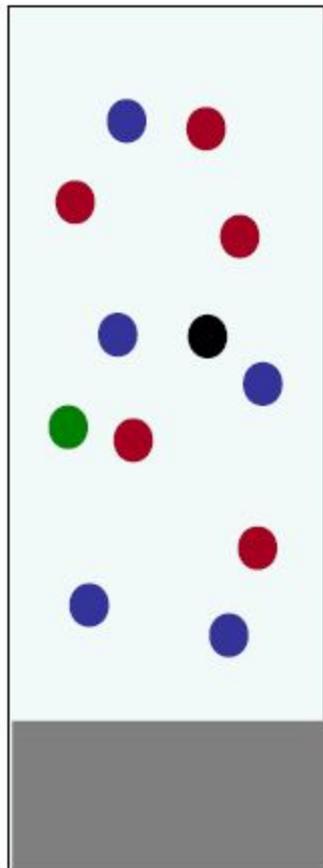
Проточная цитометрия

Современная технология быстрого измерения параметров клетки, ее органелл и происходящих в ней процессов

Клеточный анализ: статистика и достоверность результатов

Таблицы Rumke:

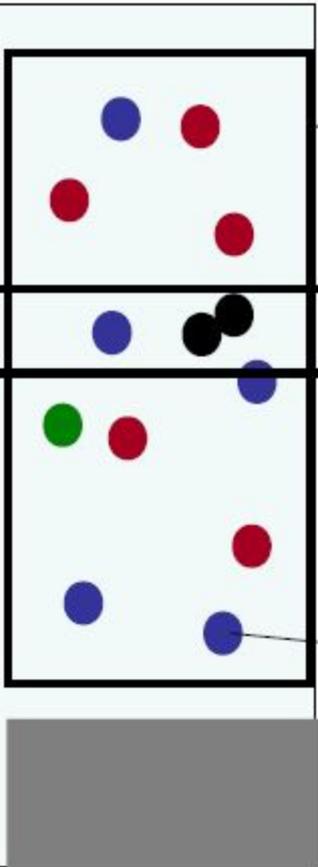
статистические отклонения при визуальном анализе -
поиск бластов при помощи световой микроскопии



a	n = 100	n = 200	n = 500	n = 1.000	n = 10.000
0	0 - 3.6	0 - 1.8	0 - 0.7	0 - 0.4	0 - 0.1
1	0.0 - 5.4	0.1 - 3.6	0.3 - 2.3	0.5 - 1.8	0.8 - 1.3
2	0.2 - 7.0	0.6 - 5.0	1.0 - 3.6	1.2 - 3.1	1.7 - 2.3
3	0.6 - 8.5	1.1 - 6.4	1.7 - 4.9	2.0 - 4.3	2.6 - 3.4
4	1.1 - 9.9	1.7 - 7.7	2.5 - 6.1	2.9 - 5.4	3.6 - 4.5
5	1.6 - 11.3	2.4 - 9.0	3.3 - 7.3	3.7 - 6.5	4.5 - 5.5
6	2.2 - 12.6	3.1 - 10.2	4.1 - 8.5	4.6 - 7.7	5.5 - 6.5
7	2.9 - 13.9	3.9 - 11.5	4.9 - 9.6	5.5 - 8.8	6.5 - 7.6
8	3.5 - 15.2	4.6 - 12.7	5.8 - 10.7	6.4 - 9.9	7.4 - 8.6
9	4.2 - 16.4	5.4 - 13.9	6.6 - 11.9	7.3 - 10.9	8.4 - 9.6
10	4.9 - 17.6	6.2 - 15.0	7.5 - 13.0	8.2 - 12.0	9.4 - 10.7
15	8.6 - 23.5	10.4 - 20.7	12.0 - 18.4	12.8 - 17.4	14.3 - 15.8
20	12.7 - 29.2	14.7 - 26.2	16.6 - 23.8	17.6 - 22.6	19.2 - 20.8
25	16.9 - 34.7	19.2 - 31.6	21.3 - 29.0	22.3 - 27.8	24.1 - 25.9
30	21.2 - 40.0	23.7 - 36.9	26.0 - 34.2	27.2 - 32.9	29.1 - 31.0
35	25.7 - 45.2	28.4 - 42.0	30.8 - 39.4	32.0 - 38.0	34.0 - 36.0
40	30.3 - 50.3	33.2 - 47.1	35.7 - 44.4	36.9 - 43.1	39.0 - 41.0
45	35.0 - 55.3	38.0 - 52.2	40.6 - 49.5	41.9 - 48.1	44.0 - 46.0
50	39.8 - 60.2	42.9 - 57.1	45.5 - 54.5	46.9 - 53.1	49.0 - 51.0

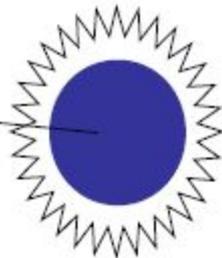
Сколько «атипичных» клеток – 1, 5 или 8???

Проблемы, связанные с автоматическим подсчетом



**Анализ всех клеток на одной картинке:
медленно!!!**

**Анализ по секторам:
дуплеты и «половины» клеток!!!**

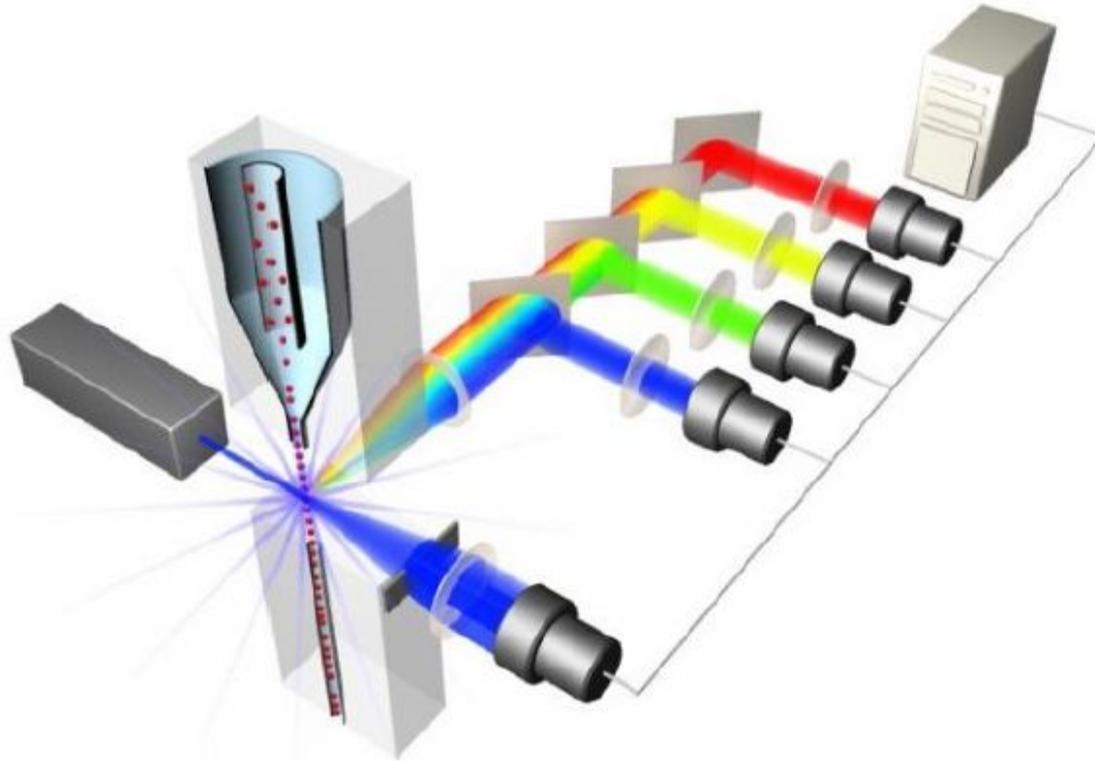


**Анализ каждой клетки отдельно:
очень медленно!!!**

Преимущества проточной цитометрии

- Измерение большого количества клеток за короткий промежуток времени
- Детекция редких событий, небольших субпопуляций с превосходной статистической точностью
- Одновременное определение морфологических параметров и параметров флуоресценции клеток
- Применим для различных типов клеток, включая клетки млекопитающих, растений, бактерии

Основные компоненты проточного цитофлуориметра: гидравлика, оптическая система и электроника.

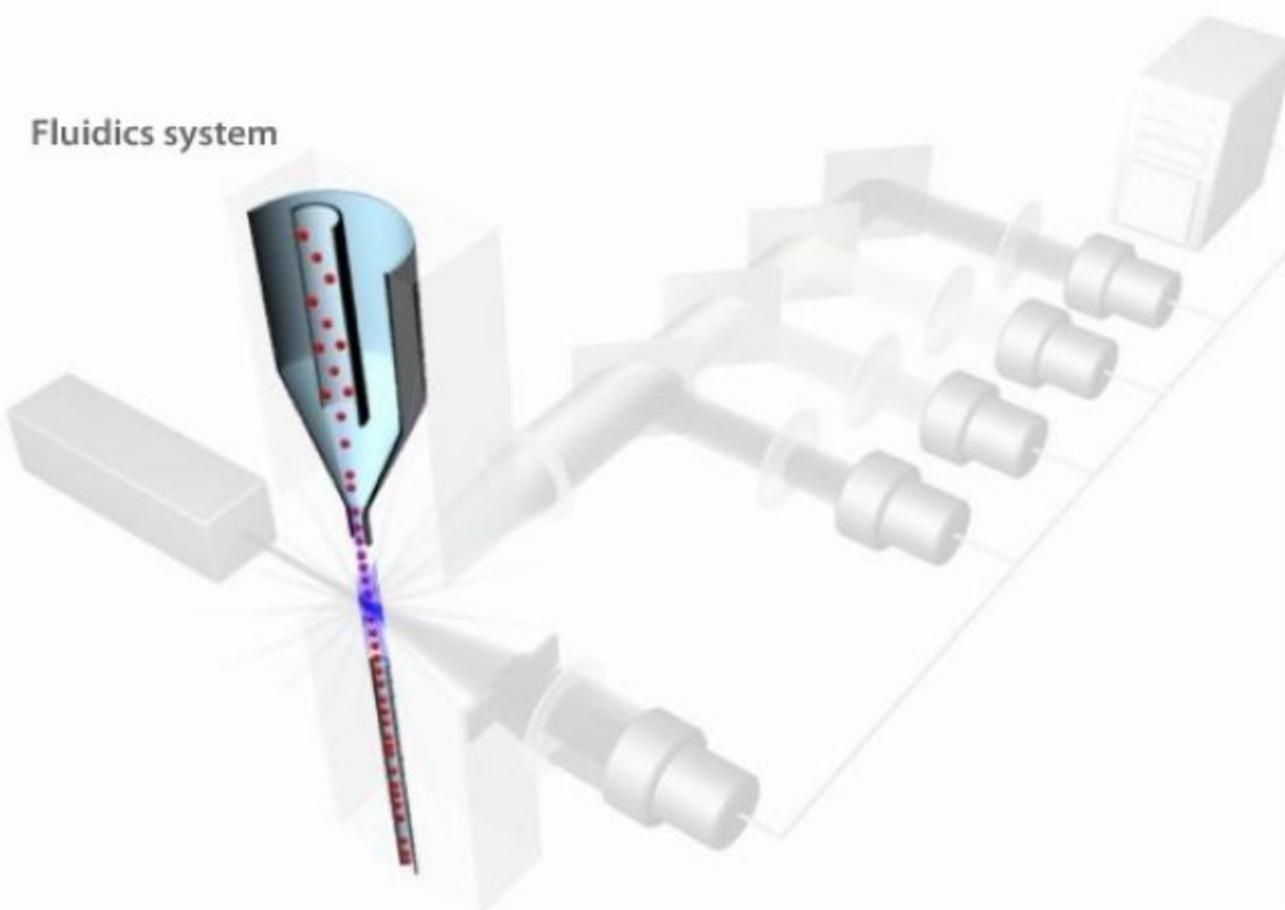


Задачи компонентов:

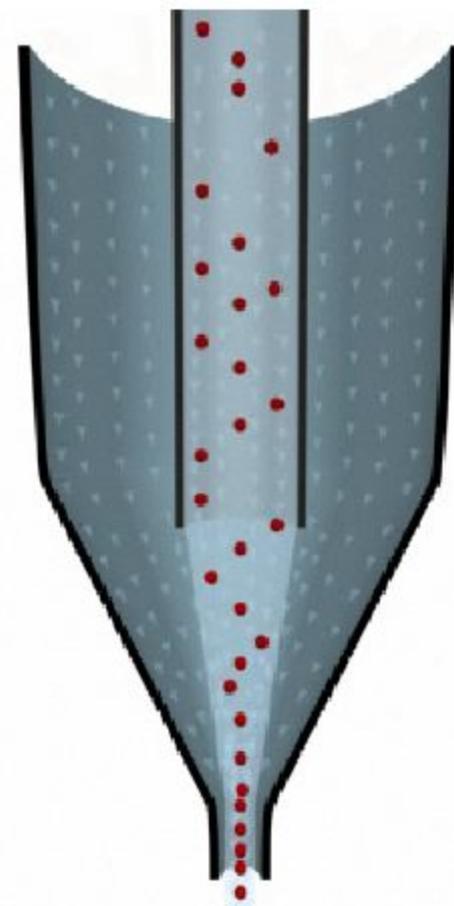
- гидравлика – доставка образца для измерения;
- оптическая система: источники света – облучение образца, система оптических фильтров – сбор излучения;
- электроника – перевод светового сигнала в цифровой сигнал, который может быть проанализированным при помощи программного обеспечения

Гидравлика – «fluidics system»: доставка и подготовка образца для измерения

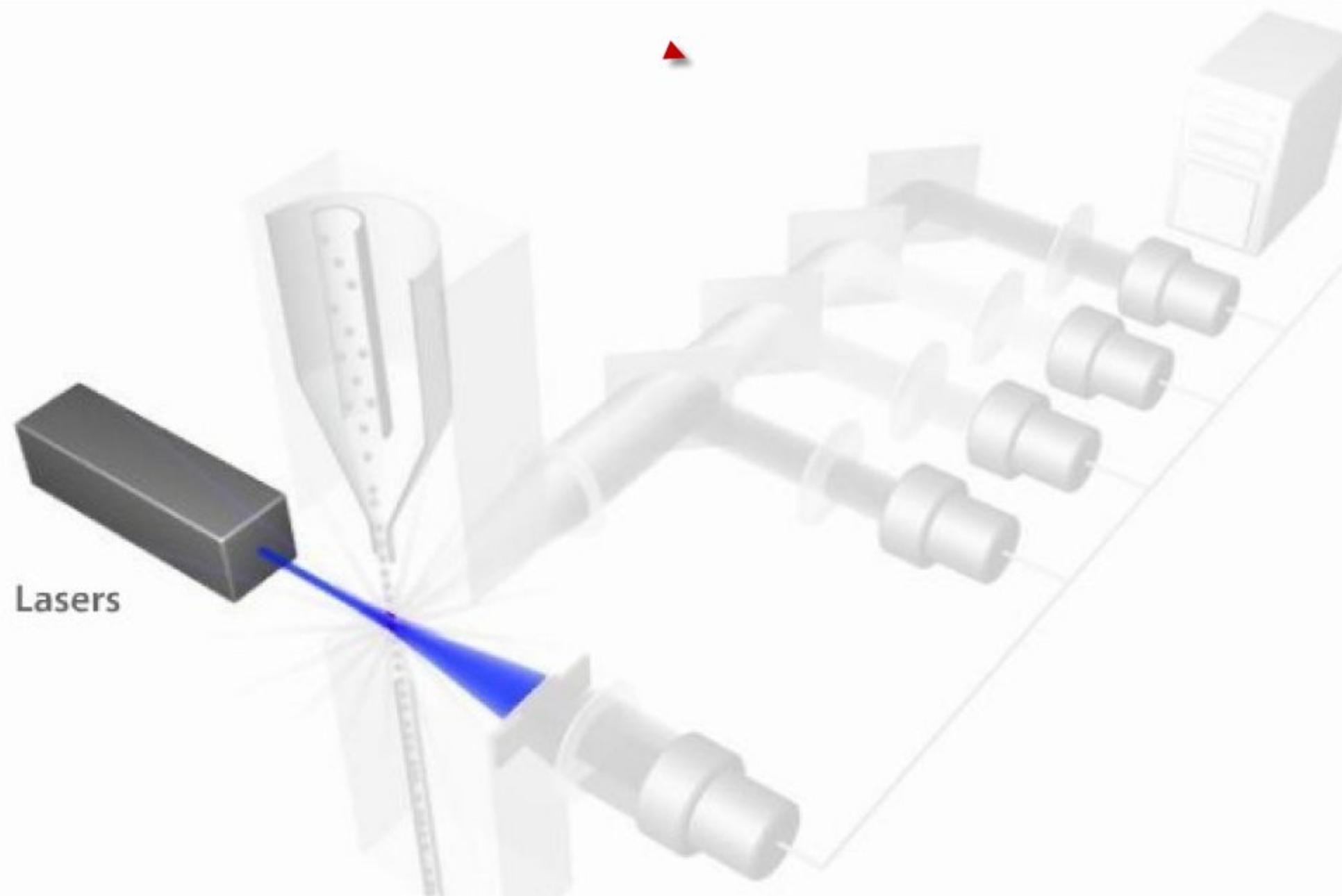
Fluidics system



Hydrodynamic Focusing

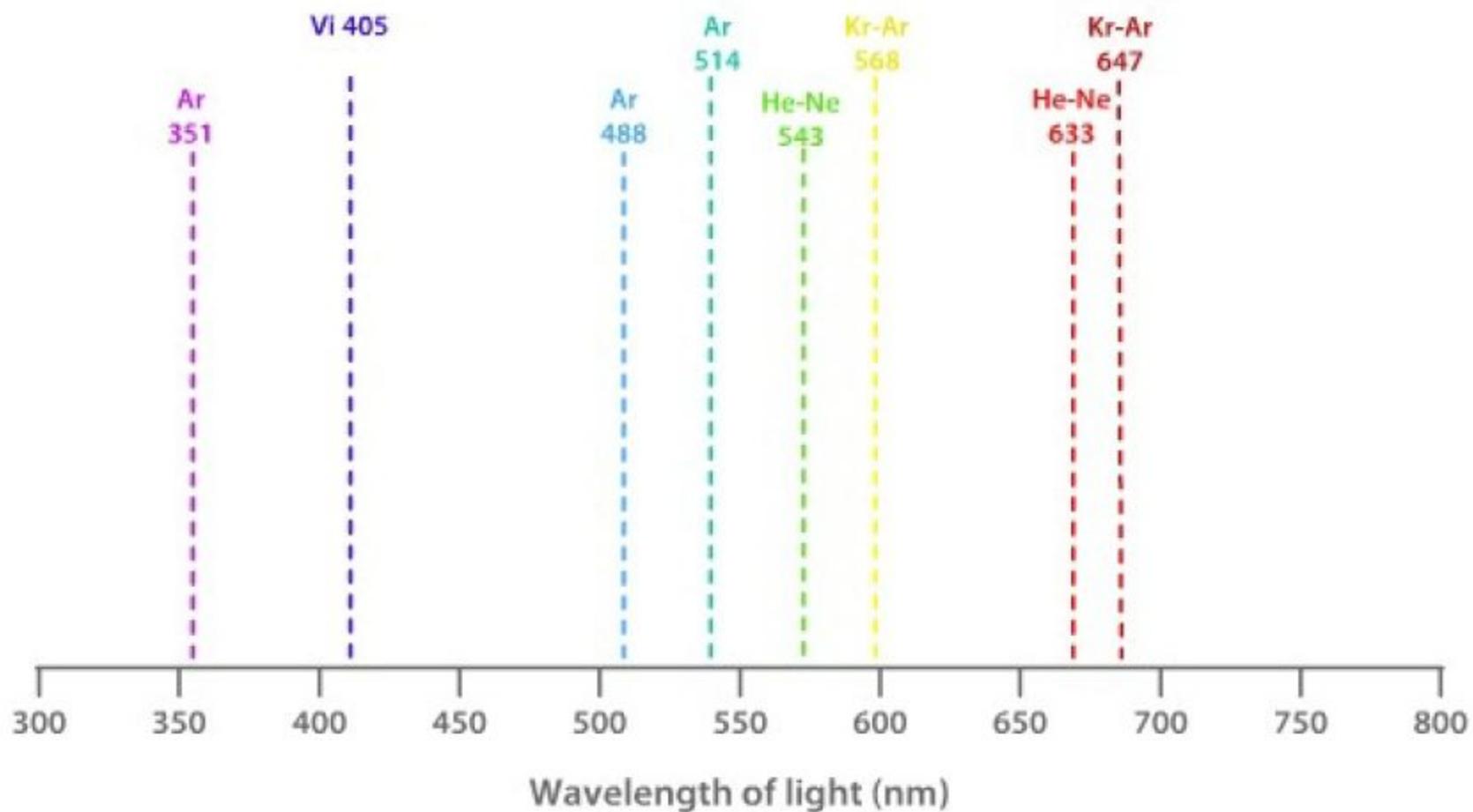


Оптическая система - источники света

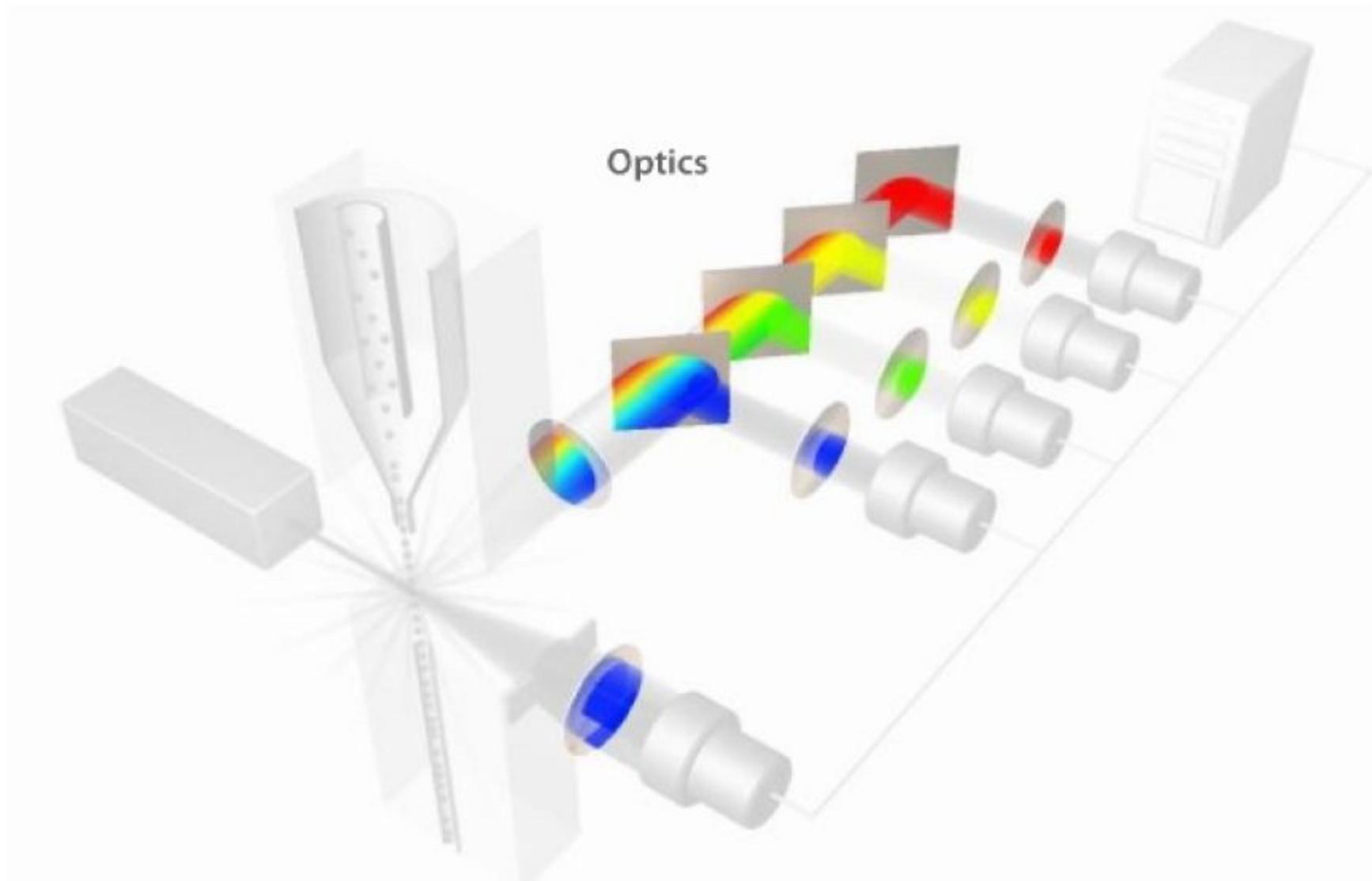


Оптическая система - источники света

- UV или 355nm
- Violet или 407nm
- Blue или 488nm
- Yellow или 561nm
- Red или 637nm

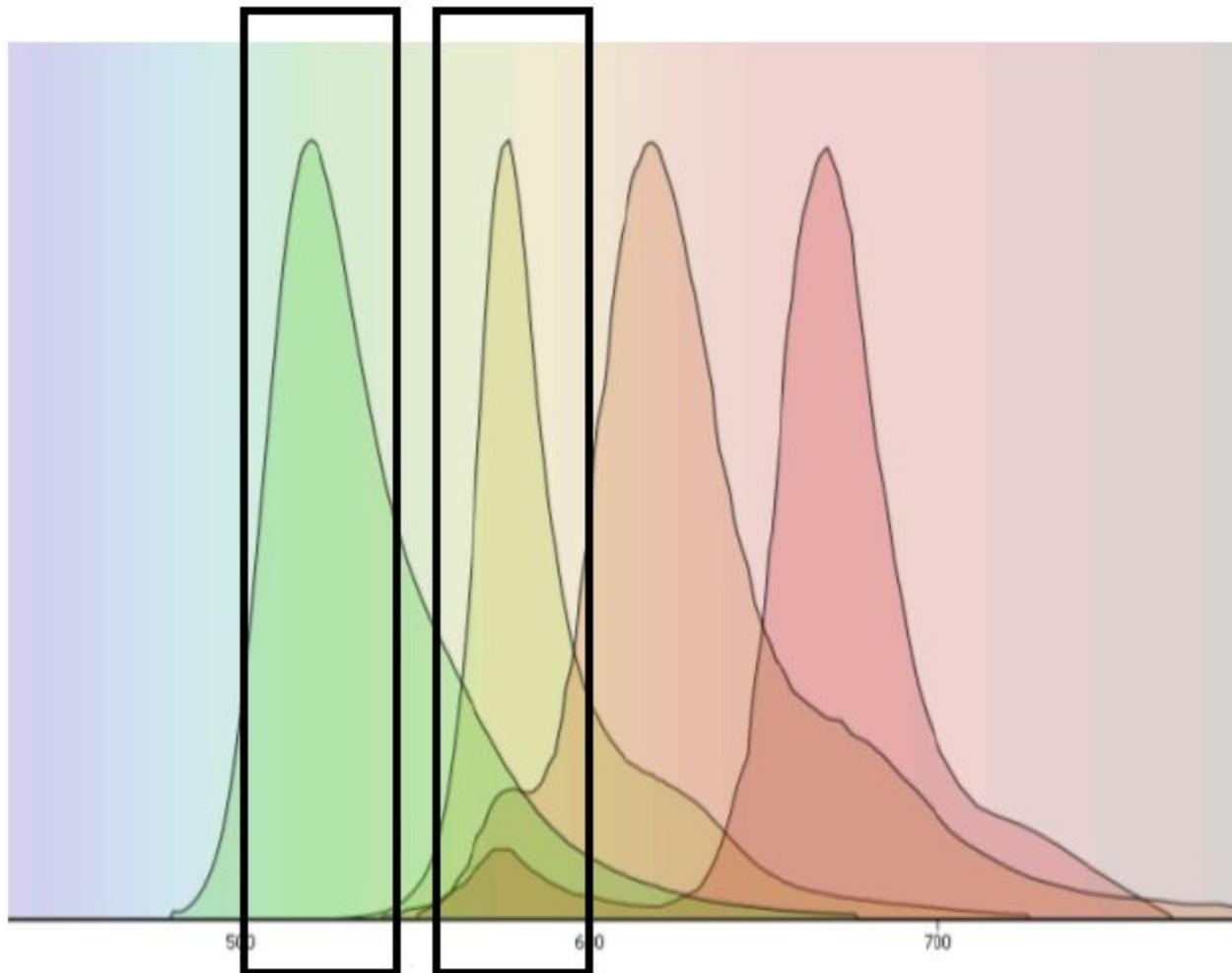


Оптическая система - источники света



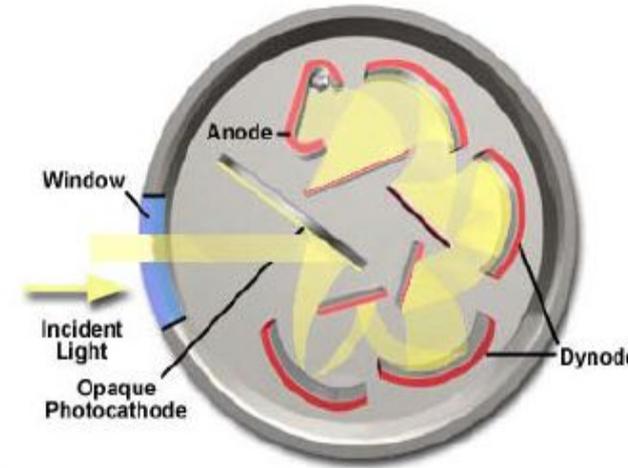
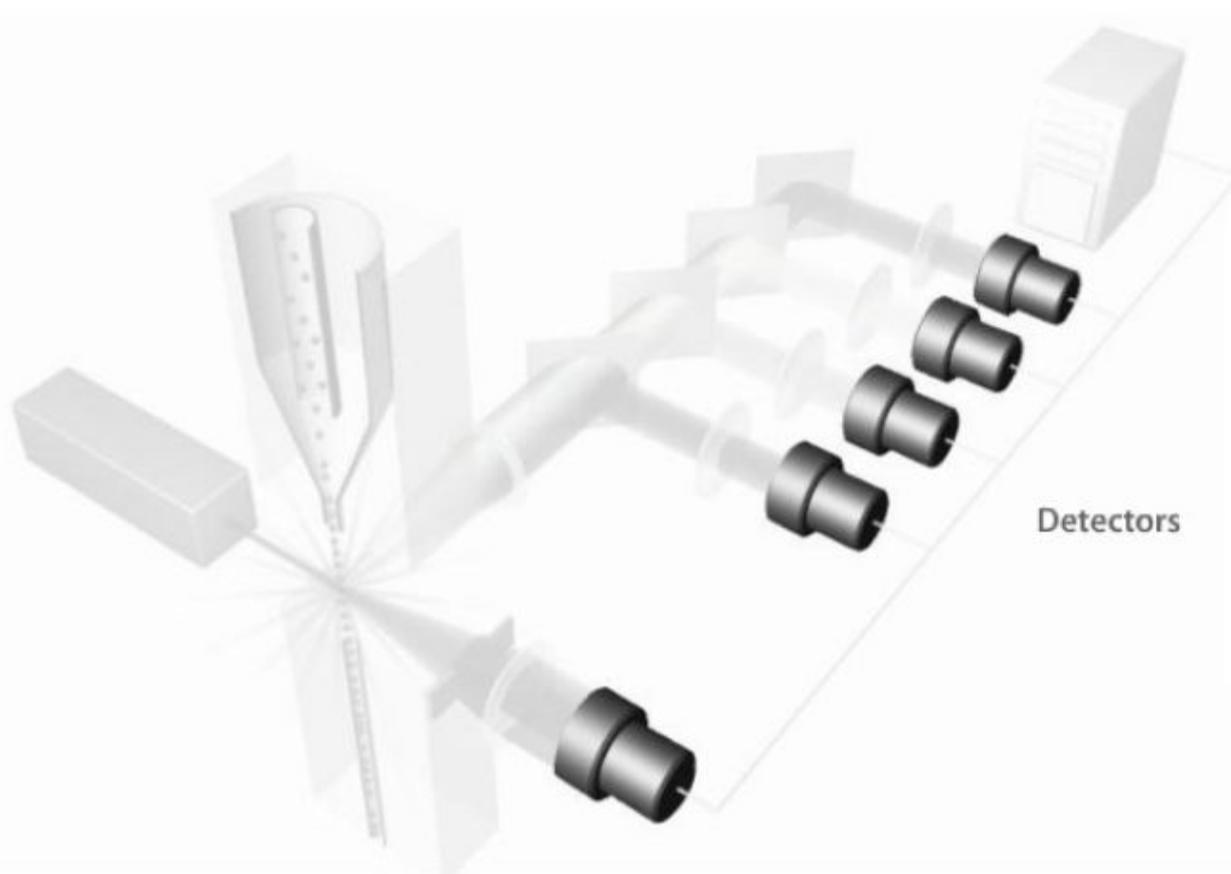
Оптическая система – система фильтров

фильтры позволяют анализировать только строго определенную часть спектра на строго определенном ФЭУ



525 BP 575 BP

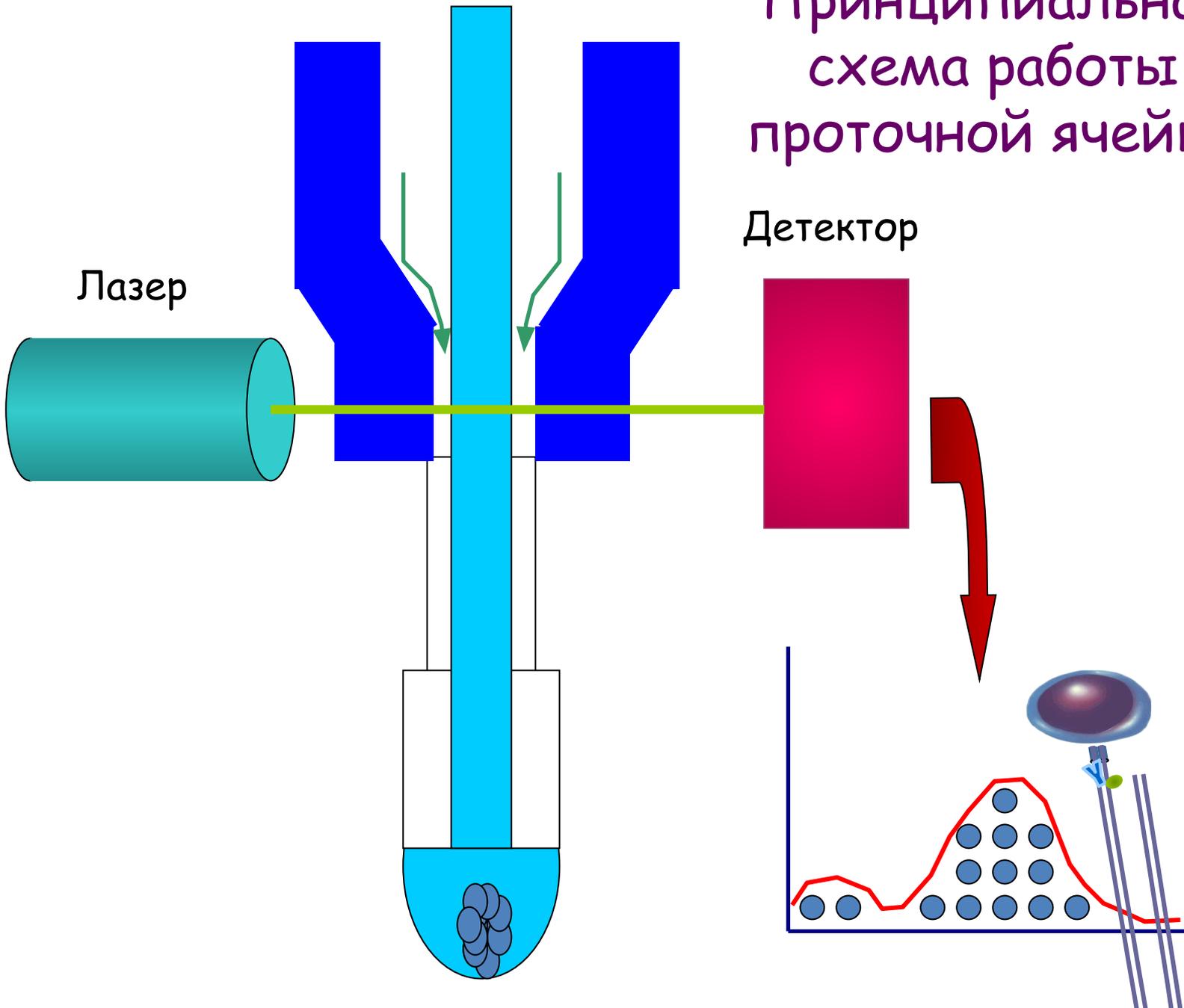
Электроника – детекторы



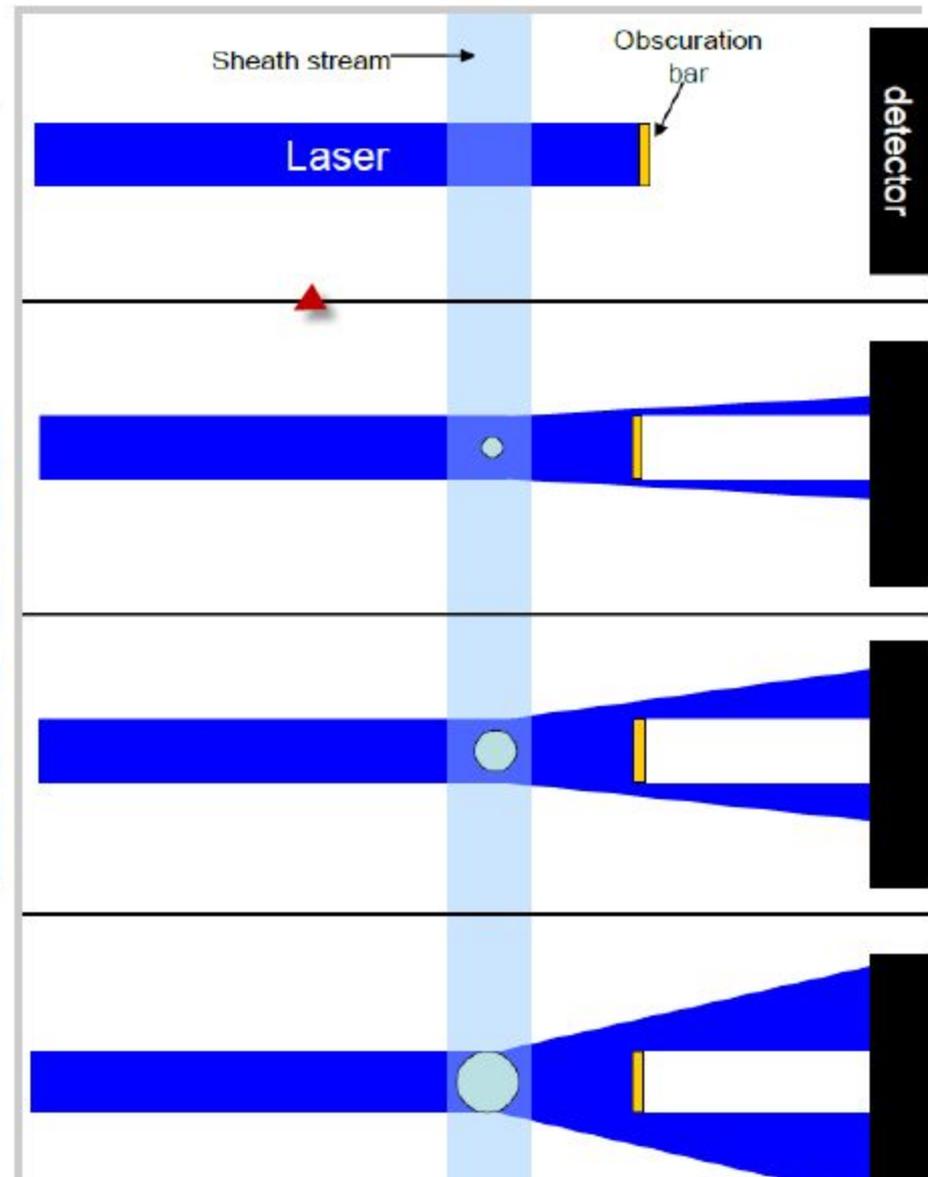
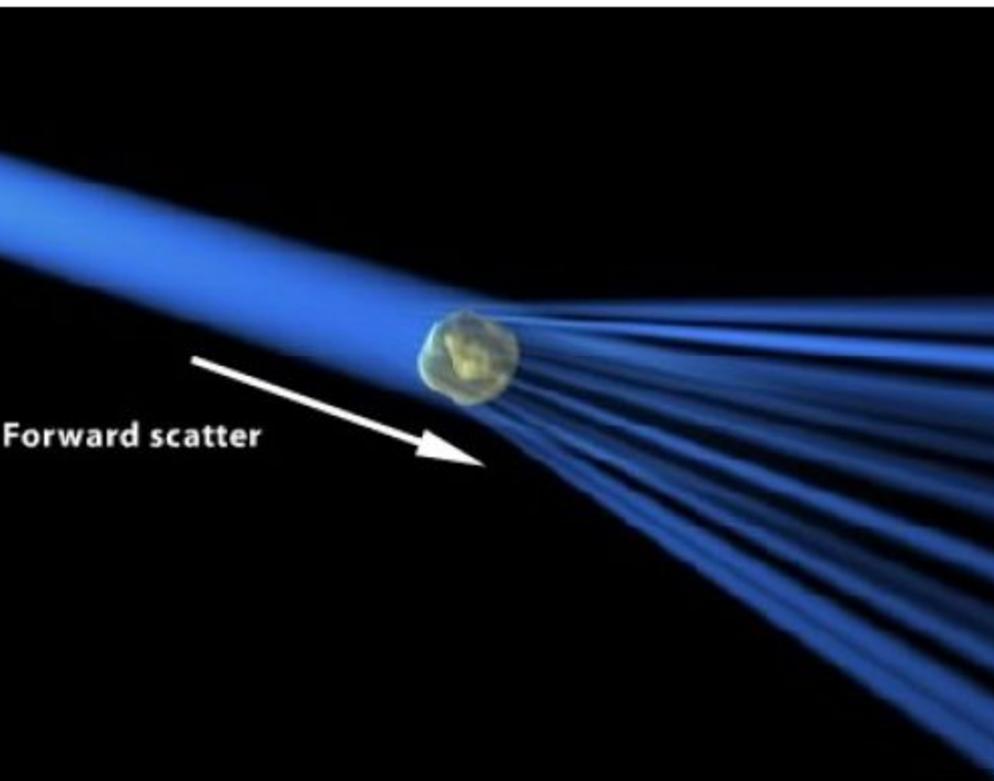
2 типа детекторов – **РМТ (фотоэлектронные умножители)** и **фотодиоды** – способны генерировать напряжение при попадании фотонов. **Фотодиоды** – используются для регистрации прямого светорассеяния (сильный сигнал). **РМТ** используются для усиления амплификации слабых сигналов – боковое светорассеяние и флуоресценция.

!!! НО детекторам важна только одна характеристика – сила сигнала, они не различают ни цвета, ни размера – это задача для оптических фильтров !!!

Принципиальная схема работы проточной ячейки



Регистрация светорассеяния в прямом направлении – анализ относительного размера или диаметра частиц



Предмет анализа – суспензия одиночных частиц, которыми являются ...

→ ... обычно, частицы размера 0,5 – 50 мкм



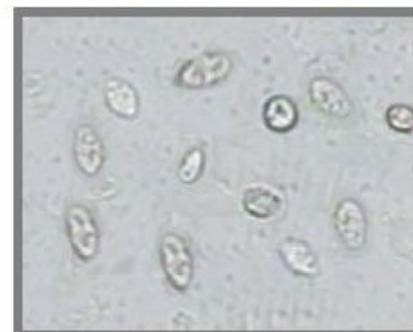
Клетки крови



Хромосомы



Водоросли



Простейшие

Bacteria
0.5 μm

Phytoplankton
2 μm

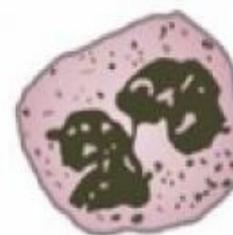
Red Blood Cell
6 μm

BD CBA Bead
7.5 μm

Lymphocyte
8 μm

Neutrophil
12 μm

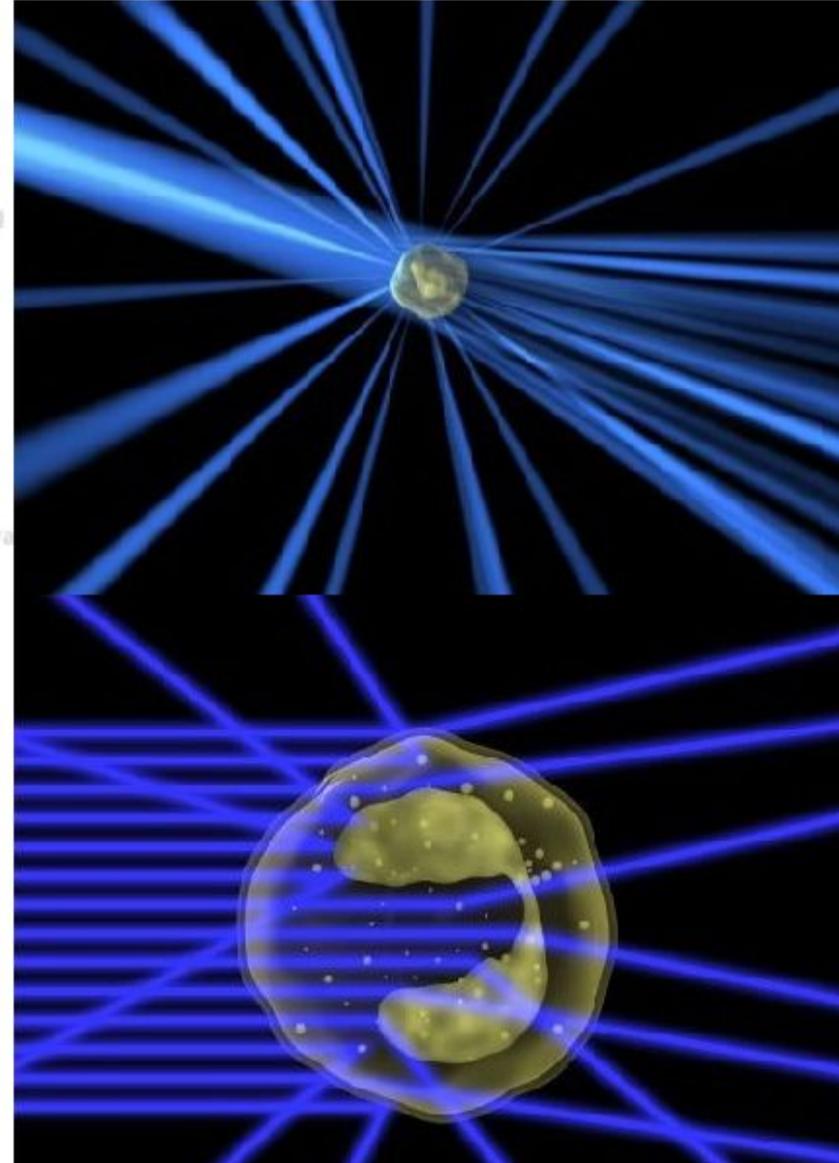
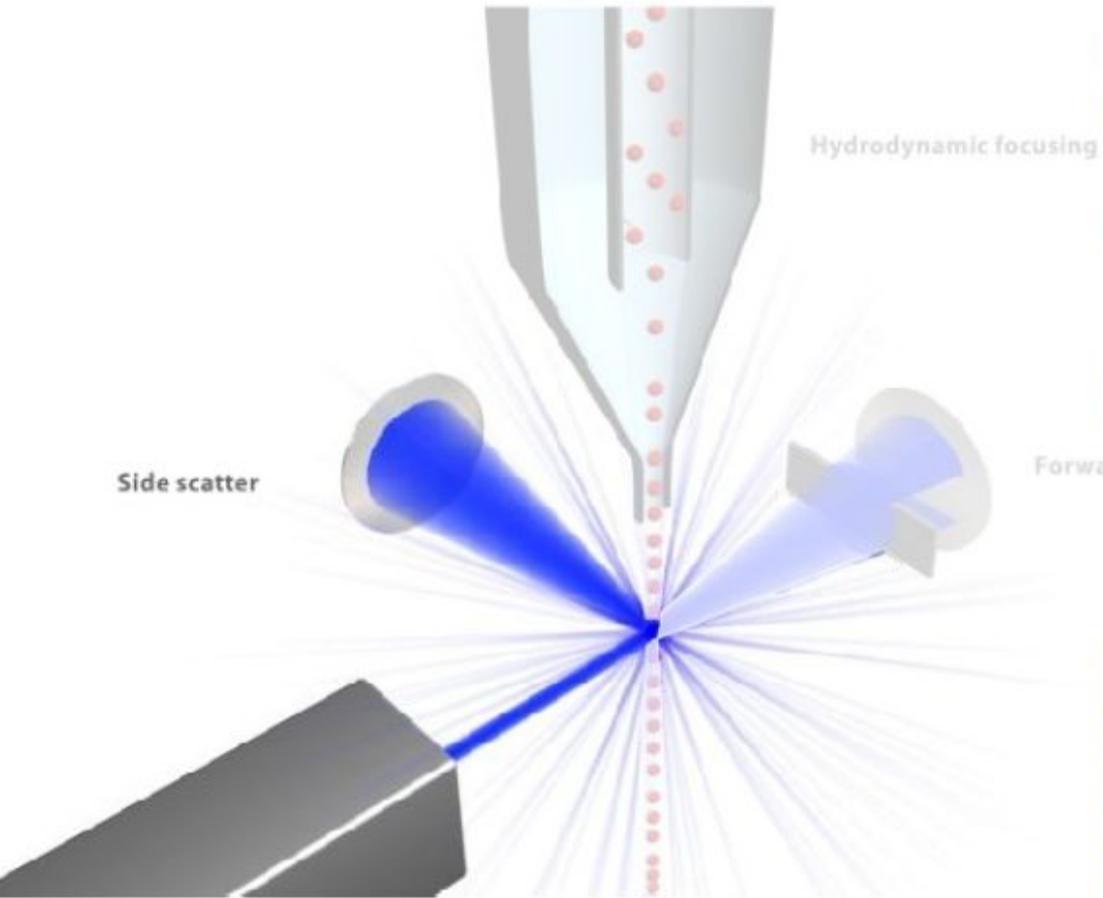
Monocyte
14 μm



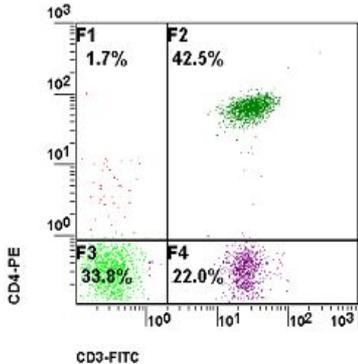
←
Smaller

→
Larger

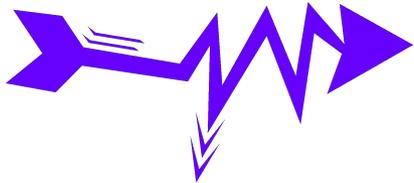
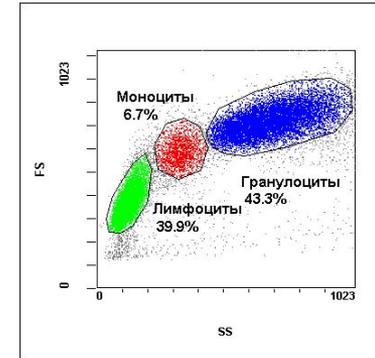
Регистрация светорассеяния в боковом направлении – анализ «структуры» частиц



Параметры прибора



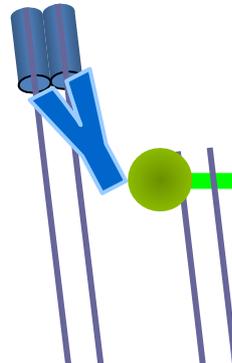
Боковое светорассеяние (SS) под углом 90°
~ Структура клеток



Луч лазера



Малоугловое светорассеяние (FS) под углом $< 10^\circ$
~ Размеры клеток



Интенсивность флуоресценции.
~ Плотность антигенов

Проточная цитометрия и клеточный анализ

Преимущества метода:

Короткое время анализа (сек) за счет высокой скорости (до 100000 частиц/сек);

Анализ большого количества клеток (до 10^8 и более клеток);

Логические ограничения допускают детектирование отдельных популяций клеток;

Измерение параметров редко встречающихся клеток;

Объективное измерение интенсивности флуоресценции;



TNF

IFN- γ

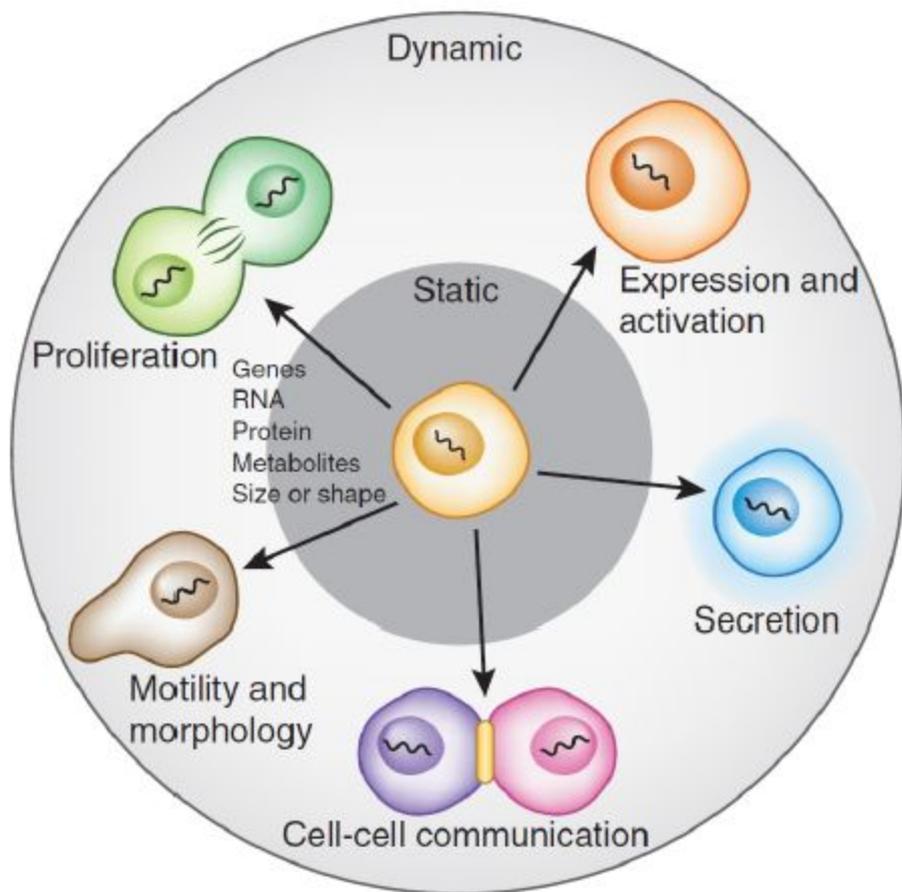
IL-2

Function

Phenotype



Параметры клеток, изучаемые при помощи проточной цитометрии



Chattopadhyay et al., 2014

С применением специальных реактивов.

- Структурные компоненты
 - Содержание РНК/ДНК
 - Содержание и активность митохондрий
 - Содержание лизосом и т.п.
- Функциональная активность
 - Поверхностные и внутриклеточные антигенные детерминанты;
 - Синтез ДНК
 - Деградация ДНК
 - Концентрация ионов
 - Экспрессия генов
 - Фосфорилирование белков
 - Синтез белков
 - и много-много другое...

... с использованием различных флуоресцентных молекул!!!

Проточная цитометрия – основные приложения:

Анализ функциональной активности клеток различного происхождения – пролиферация, апоптоз, фаго- и пиноцитоз, продукция активных форм кислорода и азота, секреторная дегрануляция и т.д.



Анализ основ функционирования отдельных органелл и процессов в них происходящих – ядро клетки, митохондрии, лизосомы и т.д.

Анализ поверхностных и внутриклеточных молекул, экспрессируемых клетками различного генеза, в норме и в ответ на стимуляцию.

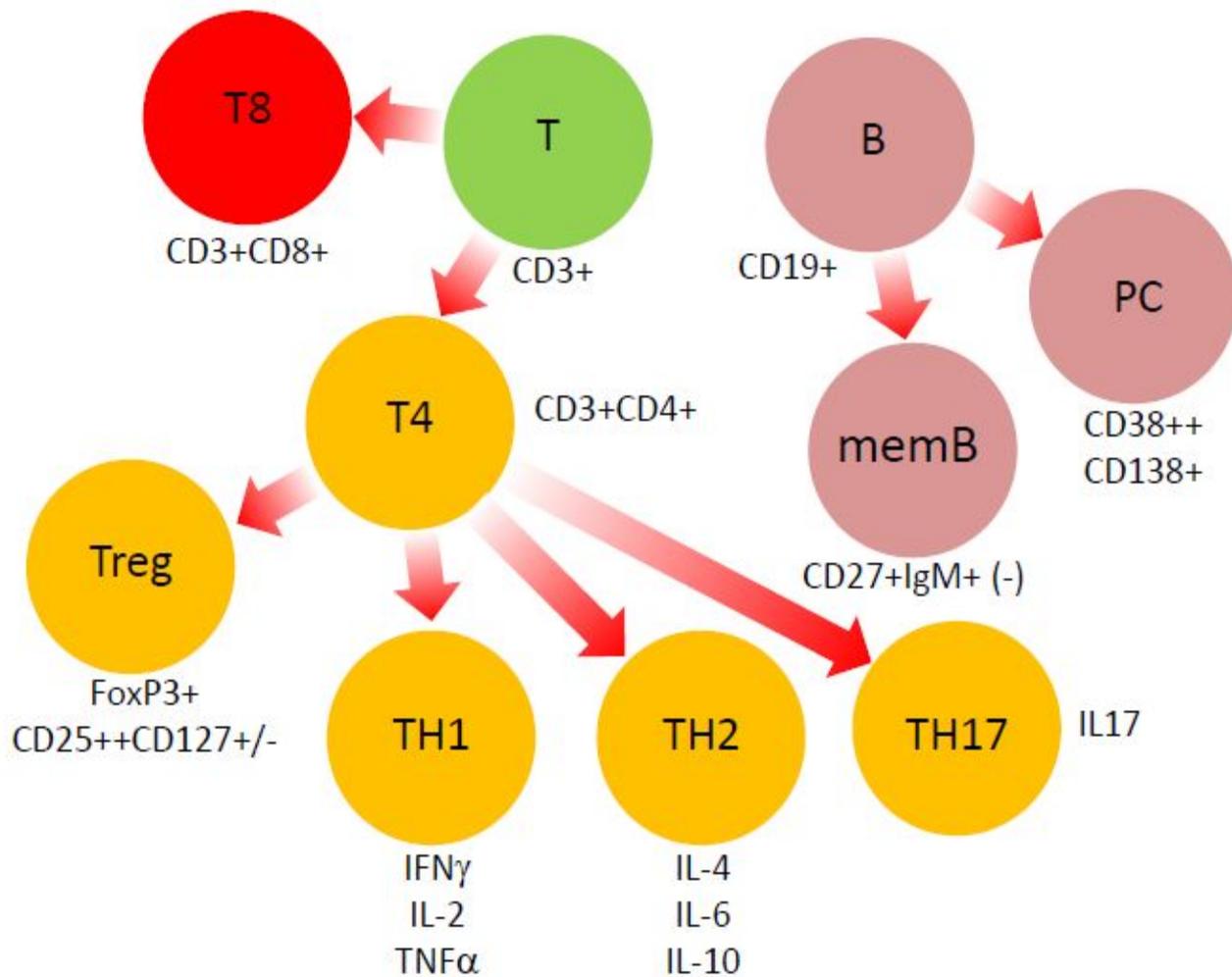
Качественное и количественное определение уровня основных и «редких» клеточных популяций в образцах различного происхождения – периферическая кровь и костный мозг человека, клетки лимфоидных органов животных, циркулирующие клетки морских беспозвоночных

Мониторинг иммунитета – субпопуляции лимфоцитов

В р о ж д е н н ы й
и м м у н н ы й
о т в е т



П р и о б р е т е н н ы й
и м м у н н ы й
о т в е т



Анализ поверхностных и внутриклеточных молекул при помощи антител, конъюгированных с флуорохромами

T/B/NK, популяции цитотоксических T-клеток и T-хелперов, уровень экспрессии маркера «поздней активации» HLA-DR - 6 флуорохромов для 8 антител



Цель исследования:

- Выделить популяции T- и B-лимфоцитов, NK- и NKT-клетки.
- Выявление цитотоксических T-клеток и T-хелперов.
- Определить уровень активации клеток по экспрессии HLA-DR

Расположение антител по каналам:

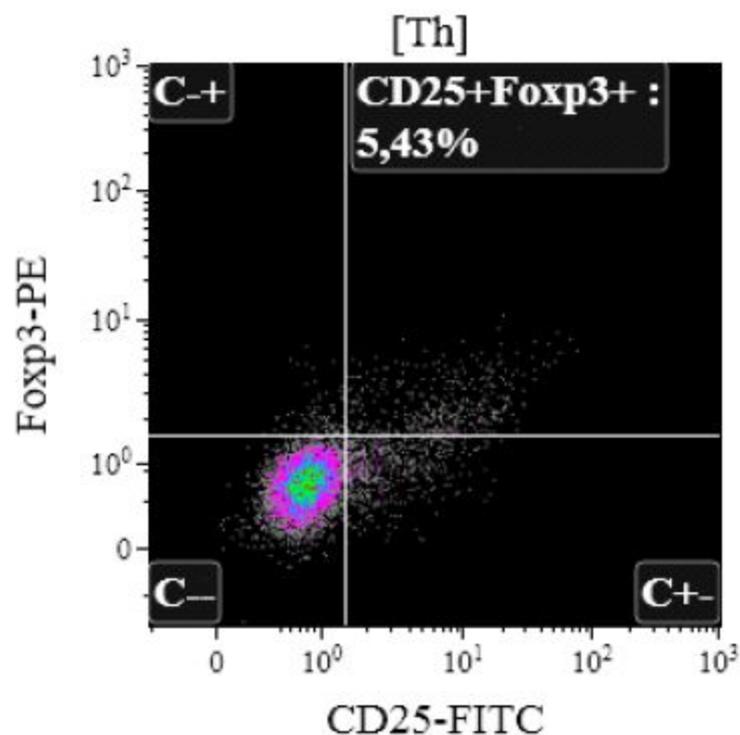
488 Excitation			633 Excitation		
FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC
HLA-DR	CD16+CD56	CD4+CD19	CD8	CD3	CD45
IM1638U	A07766+A07788	6604727+A07748	A99019	737657	IM2473

Материал: _____ - Периферическая кровь

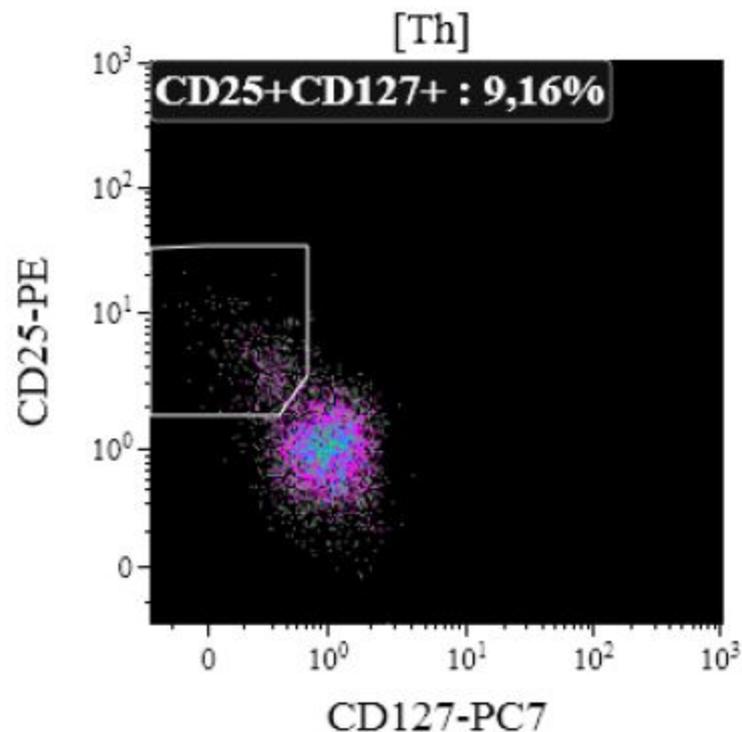
Пробоподготовка: - Лизис эритроцитов при помощи VersaLyse (A09777) + IOTest 3 Fixative (A07799), без отмывки, внесение по завершении лизиса эритроцитов частиц Flow-Count (7547053) для абсолютного счета.

Анализ поверхностных и внутриклеточных молекул при помощи антител, конъюгированных с флуорохромами

окраска клеток на поверхностные и внутриядерные антигены - анализ регуляторных Т-клеток



Периферическая кровь
«лабораторной крысы» крысы линии
Wistar (*Rattus norvegicus*)



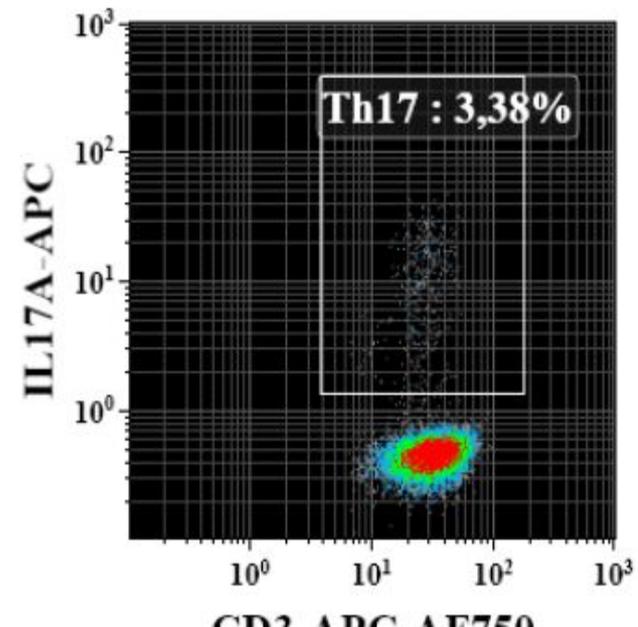
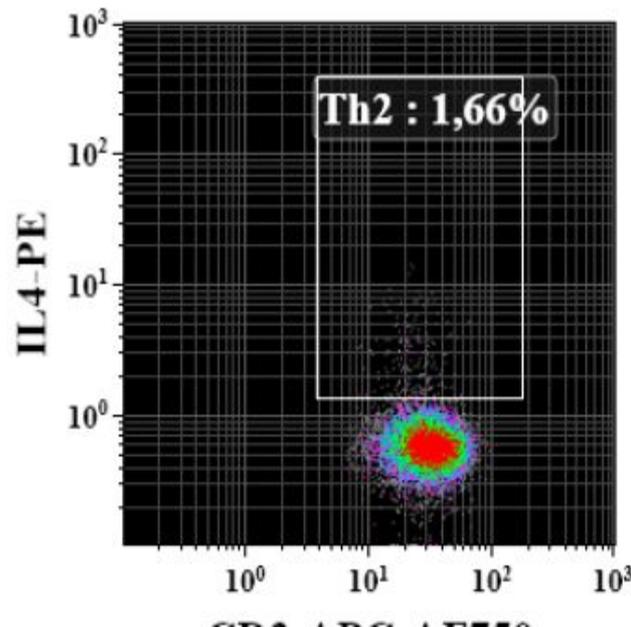
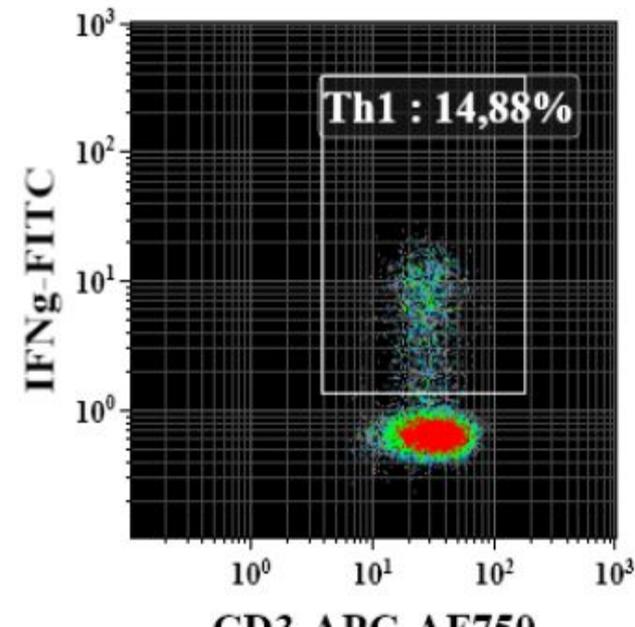
Периферическая кровь
условно здорового донора
(*Homo sapiens*)

Анализ поверхностных и внутриклеточных молекул при помощи антител, конъюгированных с флуорохромами

определение субпопуляций Т-хелперов по уровню продукции цитокинов – анализ фенотипа и функций клеток

Подготовка образцов:

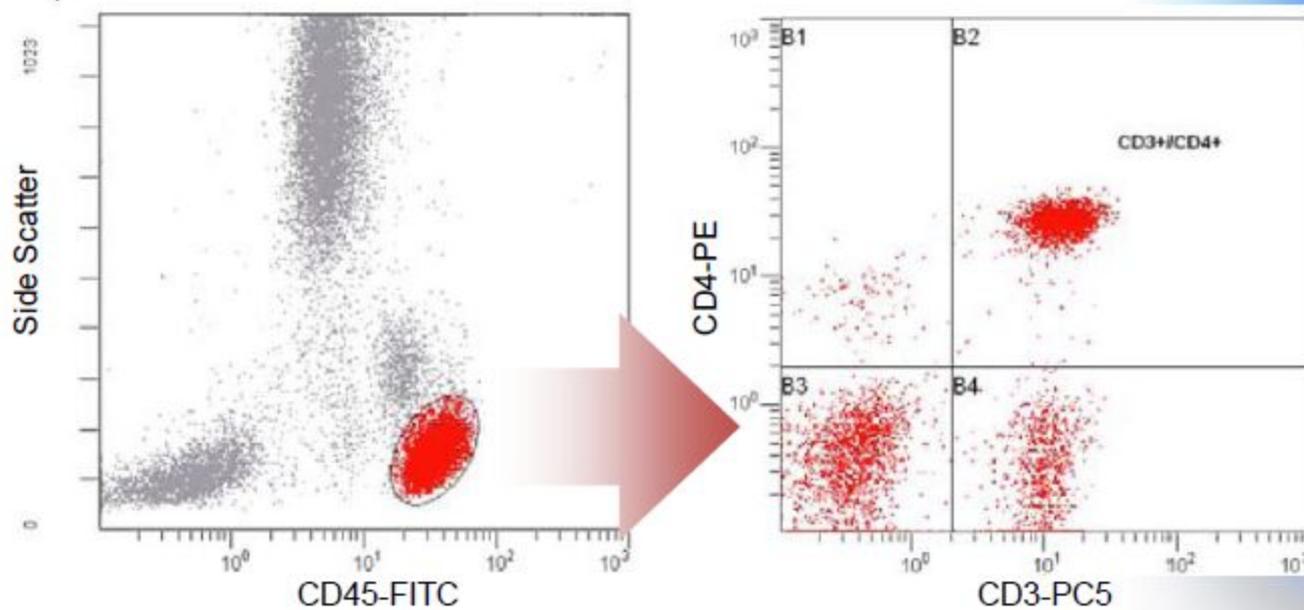
1. развести цельную гепаринизированную кровь в соотношении 1:2 средой RPMI-1640 (кровь должна быть не «старше» 4-6 часов после забора)
2. стимулировать клетки PMA (50 ng/ml) и иономицином (1 мкМ)
3. внести момензим в концентрации 2 мкМ или брефельдин А (1 мкг/мл)
4. инкубировать при 37°C в атмосфере 5% CO₂ не менее 6 часов.
5. отмыть от среды и окрашивать на поверхностные и внутриклеточные антигены.



Содержание основных популяций лимфоцитов

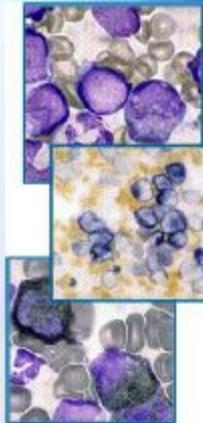


TetraCHROME™ CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5, периферическая кровь



Лейкозы и лимфомы

- Лейкоз, рак крови
 - Острый или хронический
 - Арест или нарушение созревания в костном мозге
- Лимфома, рак лимфатической системы
 - Образование солидных опухолей в лимфатических тканях.
 - Лимфома Ходжкина
 - Неходжкинские лимфомы
- Миелома
 - Пролиферация плазматических клеток



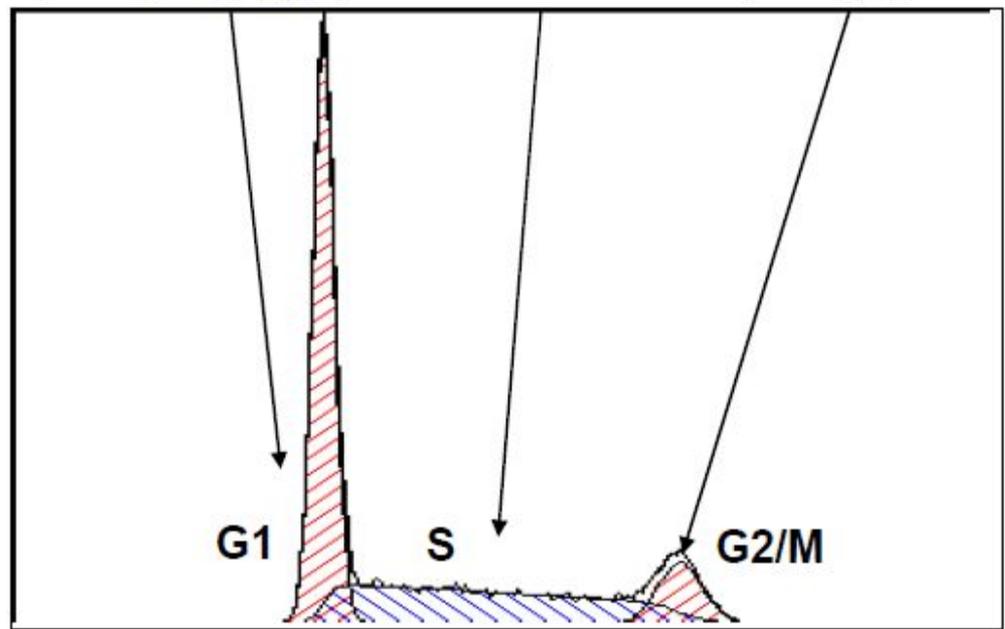
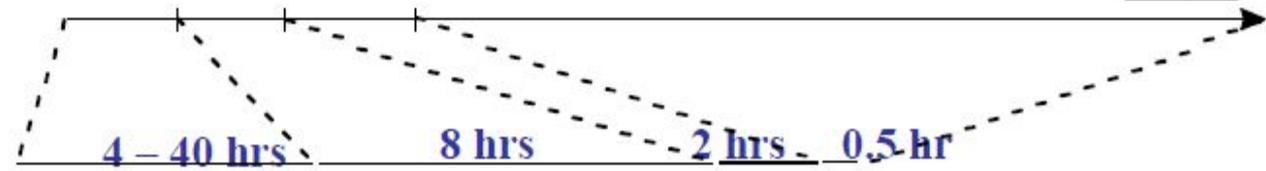
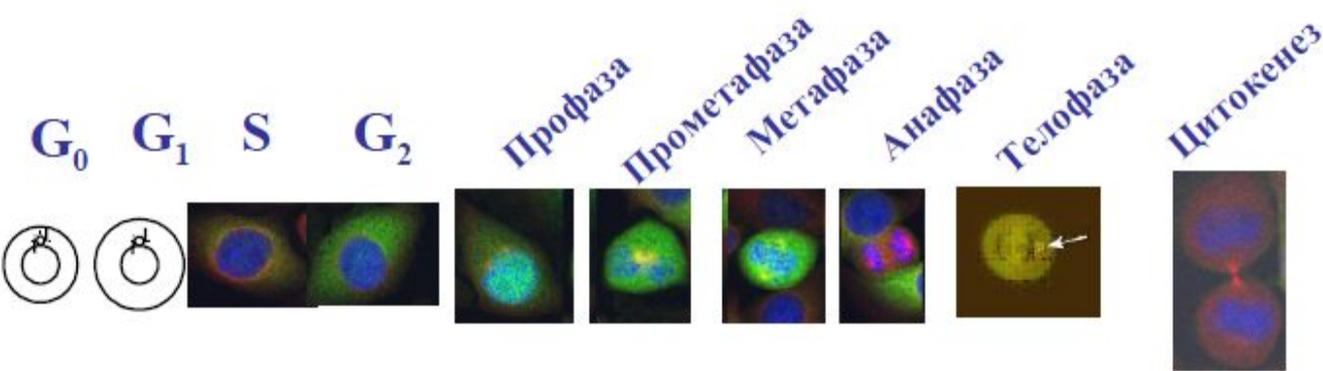
Развитие знаний о заболевании



Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, Mariotto A, Feuer EJ, Edwards BK (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2002*, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2002/, based on Nov 2004 SEER data, posted to the SEER web site 2005.

содержание ДНК в клетках при помощи ДНК-связывающих флуоресцентных красителей

МИТОЗ

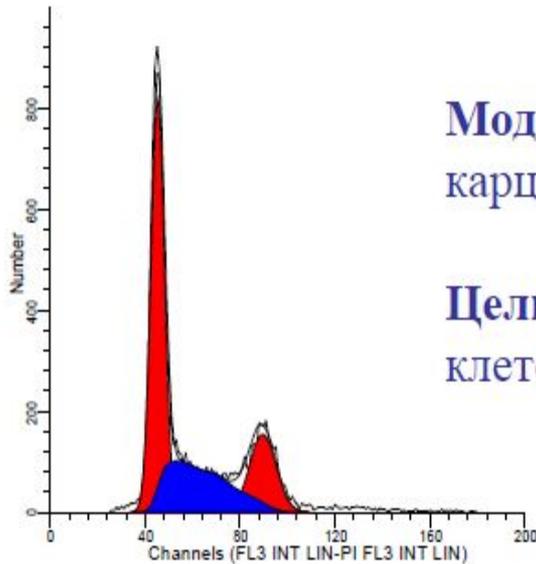


Первая публикация с описанием принципов метода:
Van Dilla MA, Trujillo TT, Mullaney PF, Coulter JR (14 March 1969). "Cell Microfluorometry: A Method for Rapid Fluorescence Measurement". *Science* 163 (3872): 1213-1214.

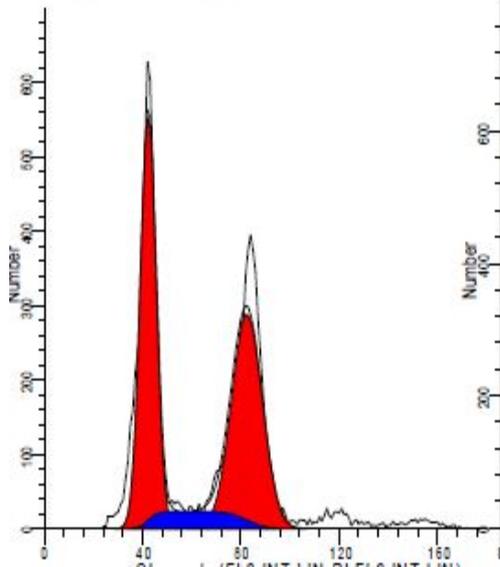
Клеточный цикл в научных исследованиях... например, поиск новых цитостатиков.

Модельный объект: клетки линии A549 (происхождение: человек, карцинома легкого);

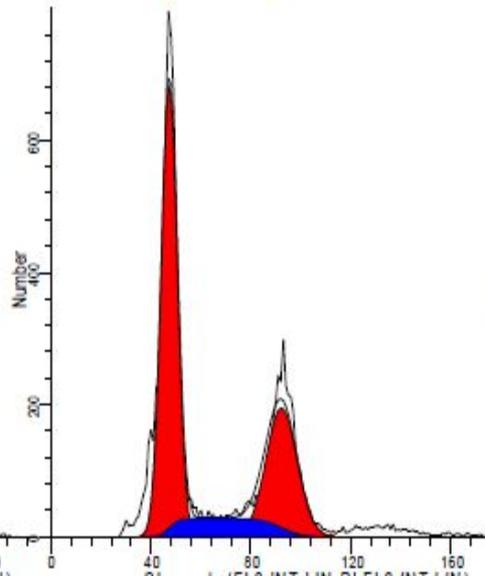
Цель исследования: оценка влияния препаратов на распределение клеток по фазам клеточного цикла



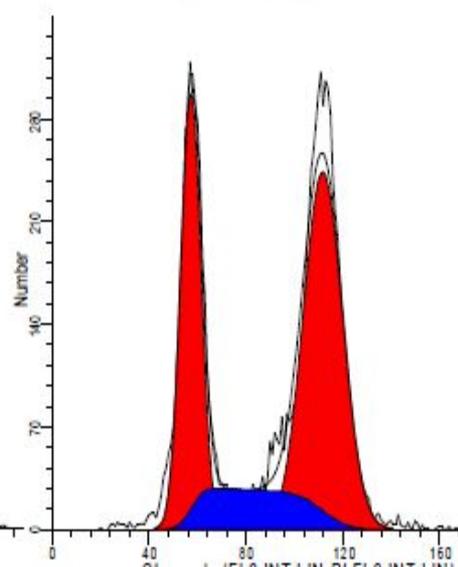
Доксирубицин



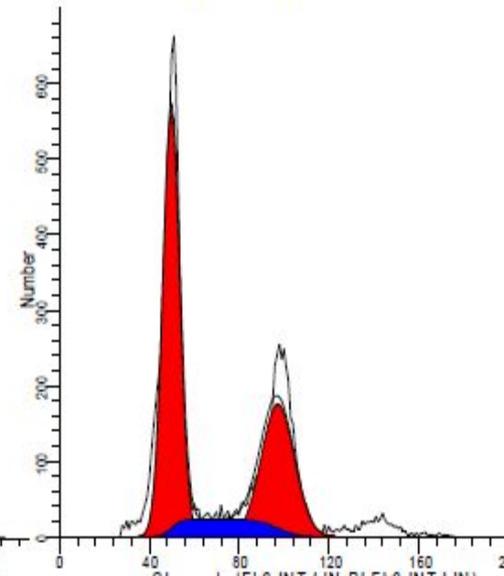
Препарат №1



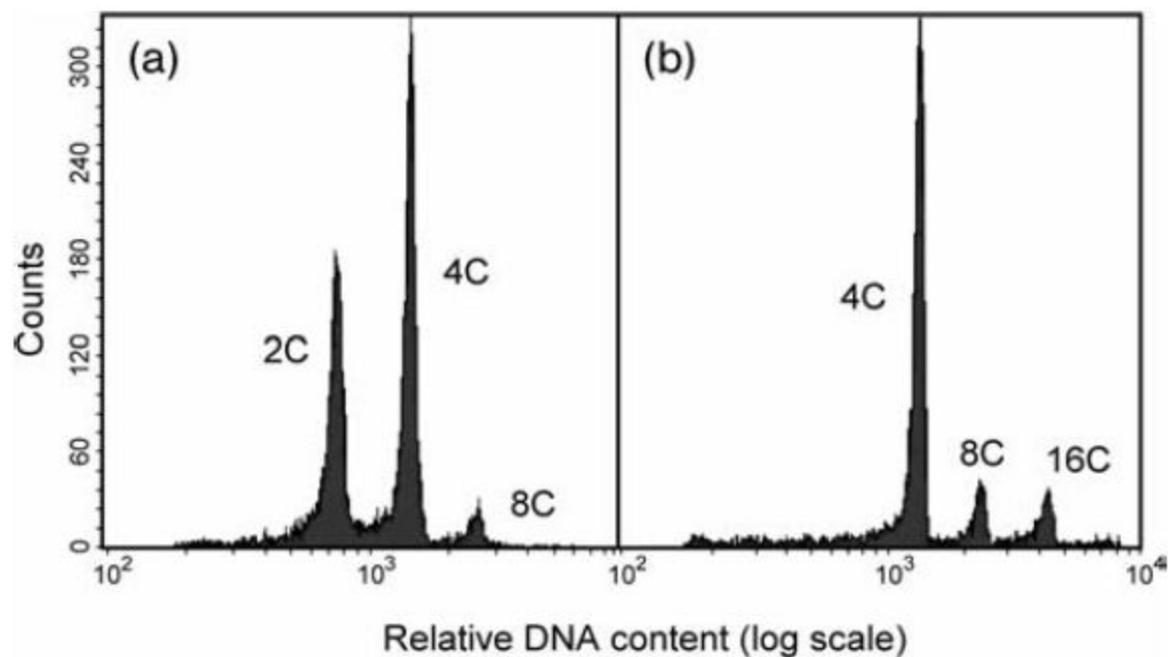
Препарат №2



Препарат №3



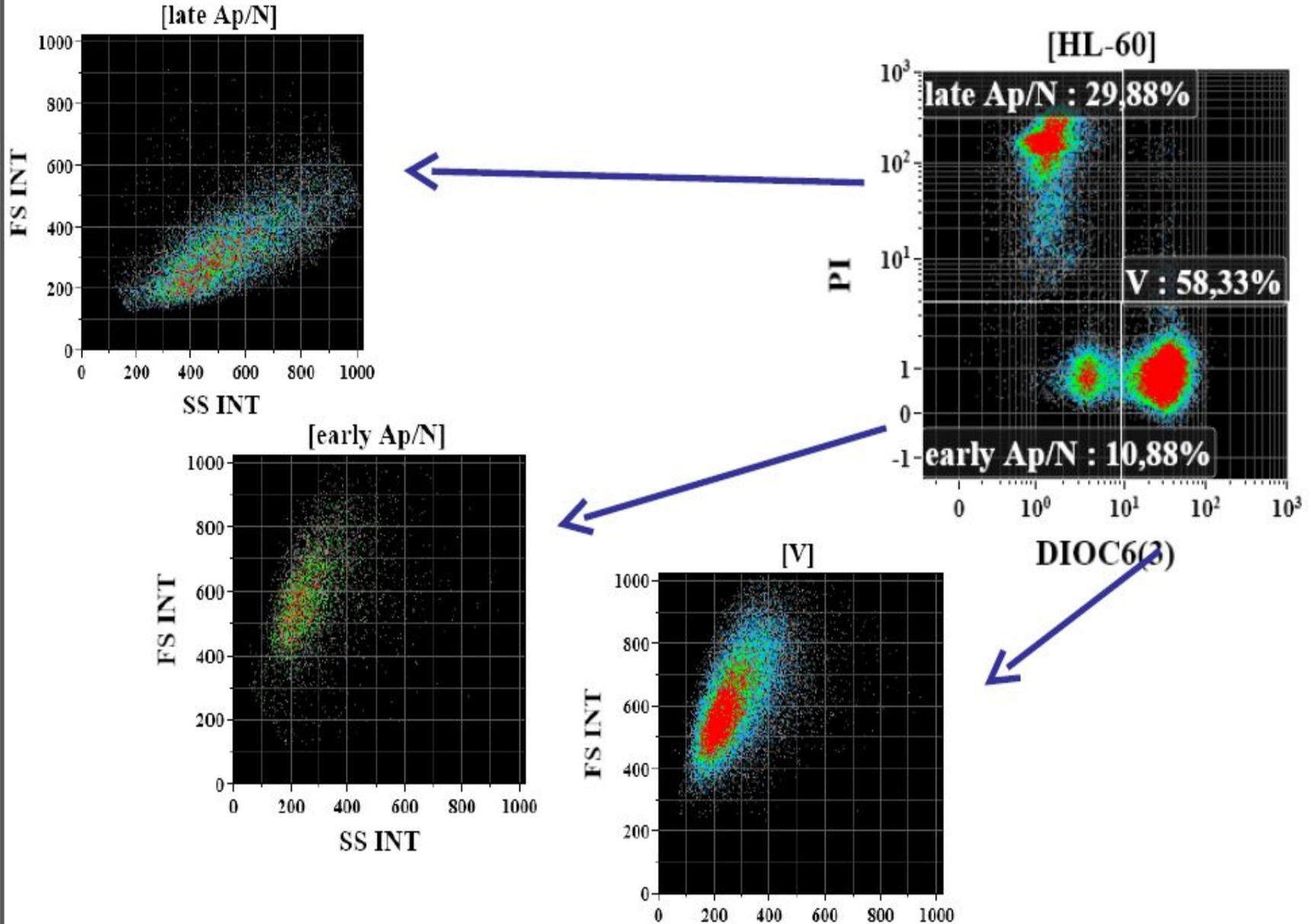
Изменение ploидности клеток (*Pisum sativum*)



(a) контрольный образец

(b) образец под действием бактериальной инфекции

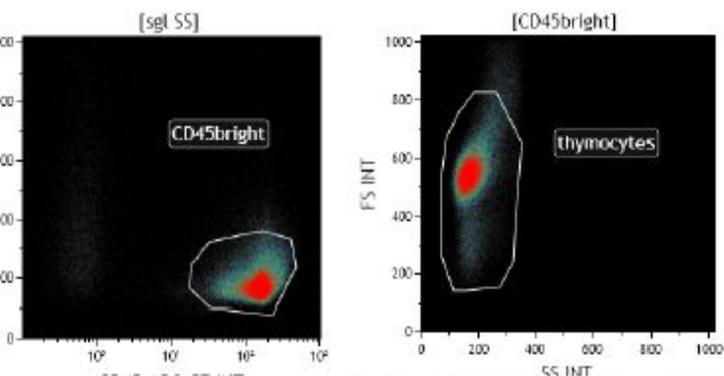
Анализ функциональной активности клеток – клеточная гибель



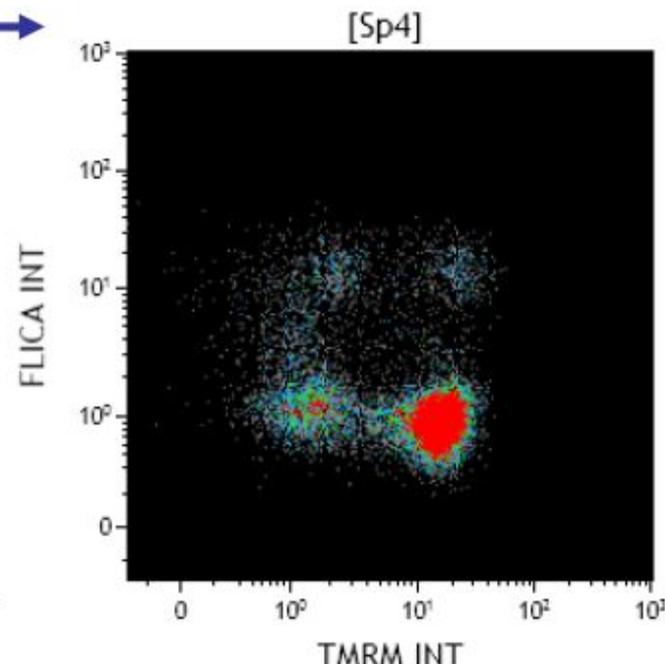
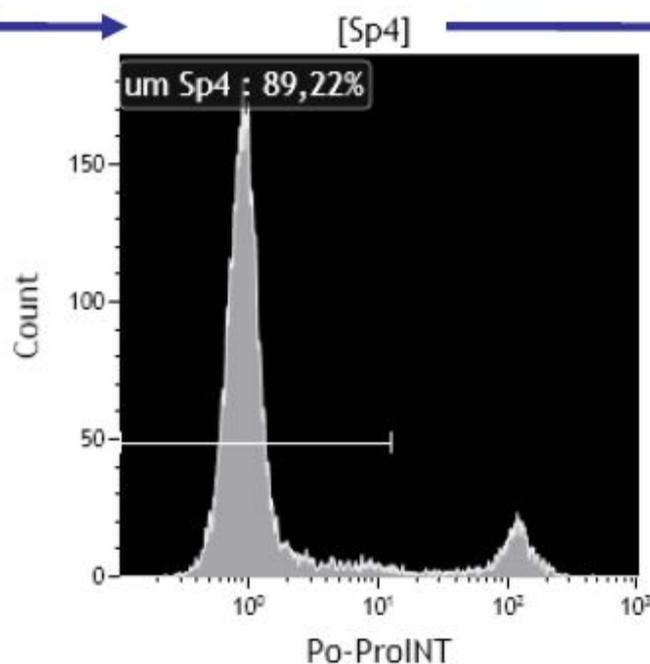
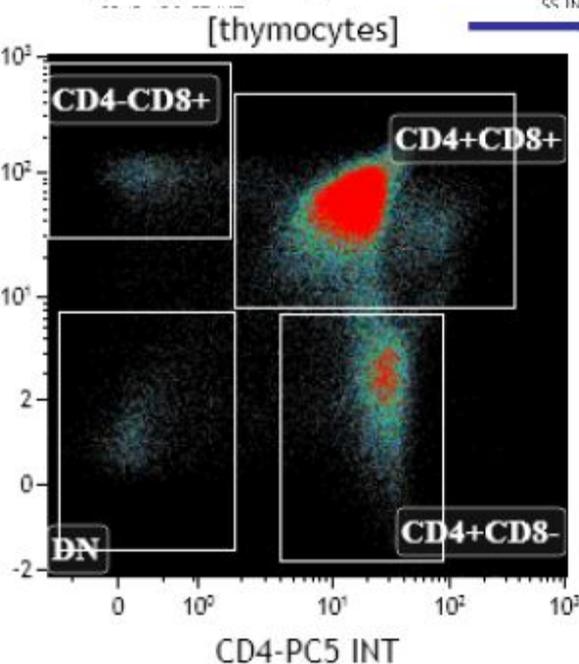
Одновременный анализ функций и фенотипа клеток



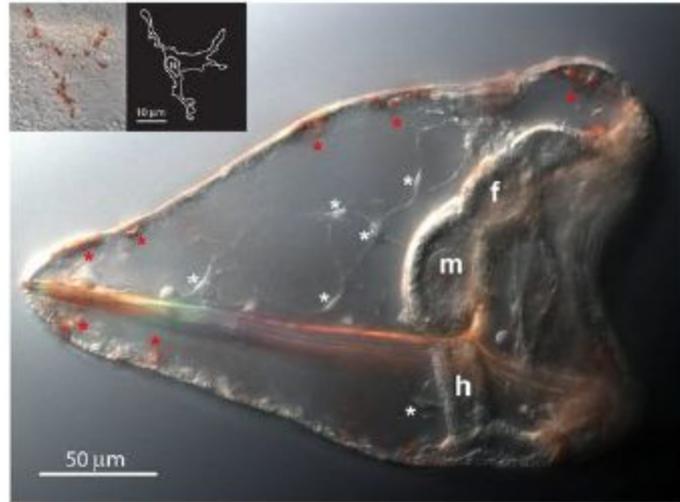
анализ уровня апоптоза в основных популяциях тимоцитов мыши



- окраска антителами – CD45, CD4 и CD8;
- уровень активности каспаз – FAM FLICA;
- эффективность функционирования митохондрий – TMRM;
- исследование проницаемости клеточной мембраны – PO-PRO-1.



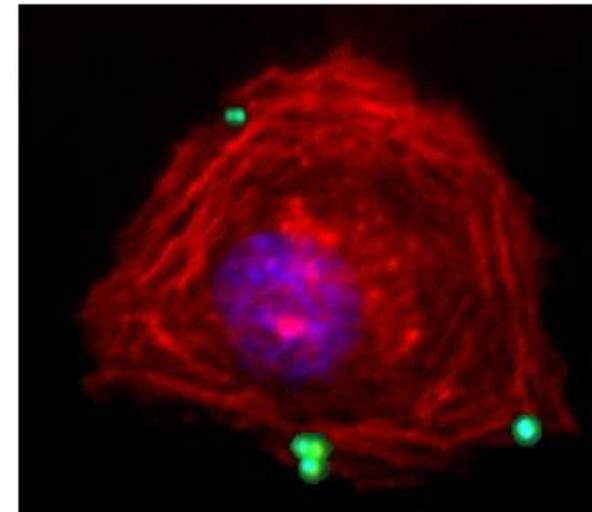
Анализ функциональной активности клеток - фагоцитоз



1883 год, Одесса, И.И. Мечников
доклад «О целебных силах
организма»

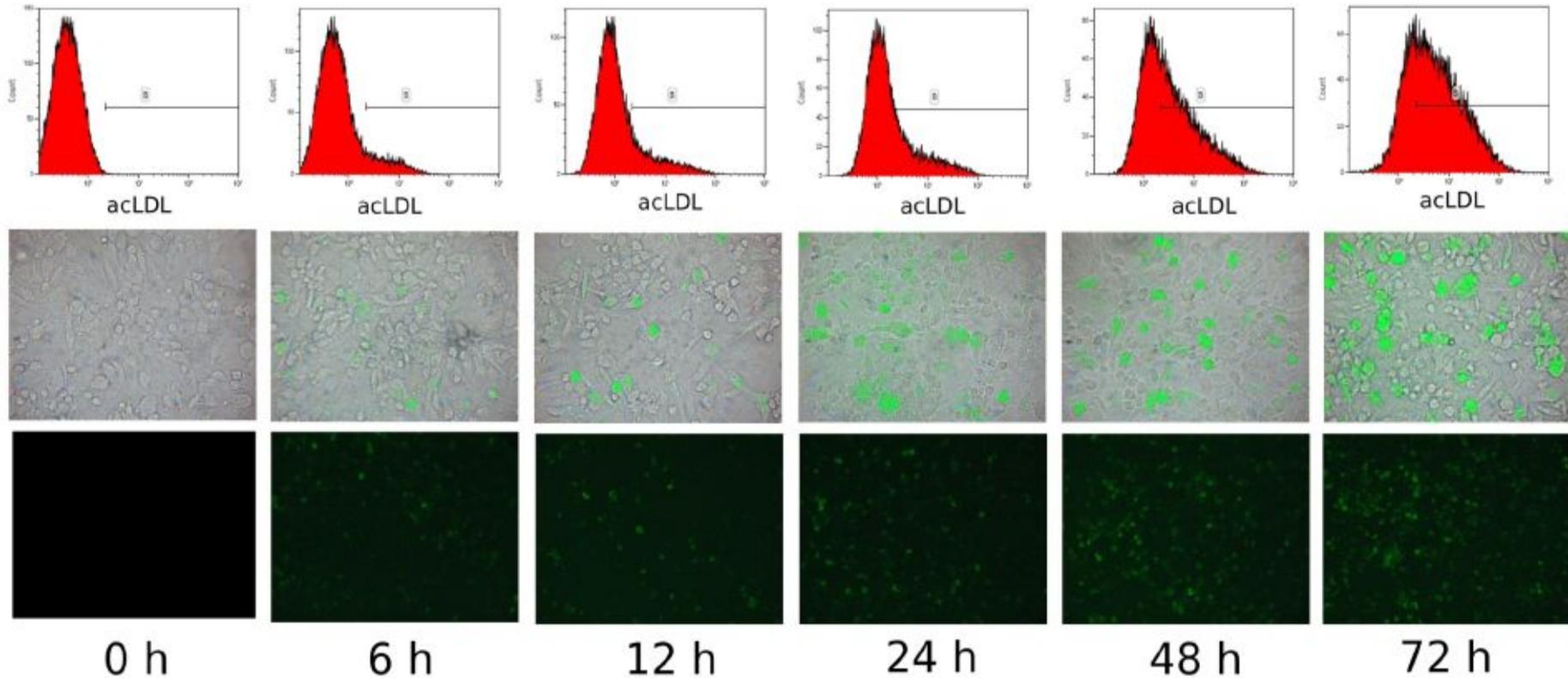
В настоящее время выделяют 8 стадий фагоцитоза (Ярилин А.А, 2010), каждую из которых можно исследовать при помощи методов проточной цитометрии:

- приближение к объекту фагоцитоза в результате хемотаксиса;
- адгезия;
- активация мембраны;
- погружение;
- образование фагосомы;
- слияние фагосомы и лизосомы;
- киллинг и расщепление объектов фагоцитоза;
- выброс продуктов деградации.

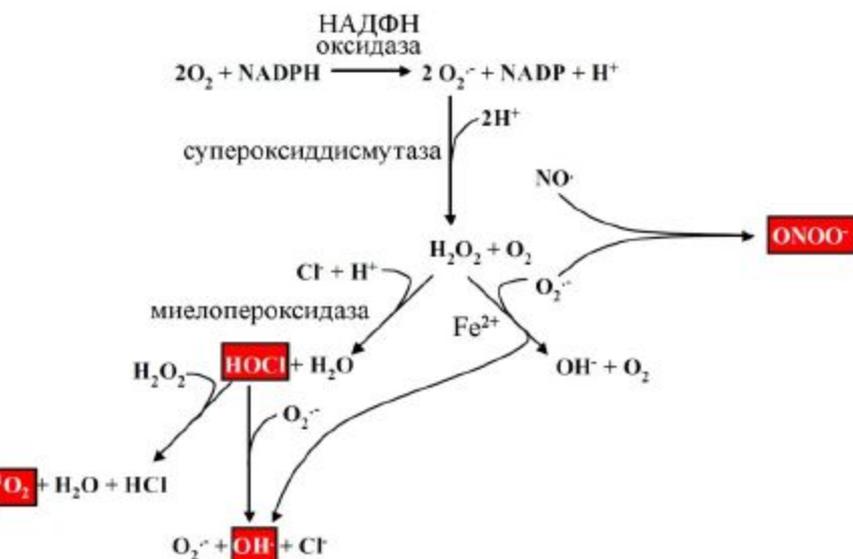


Анализ функциональной активности клеток – фагоцитоз, пиноцитоз и макропиноцитоз

поглощение acLDL-ФИТЦ дифференцированными в присутствии РМА клетками линии THP-1



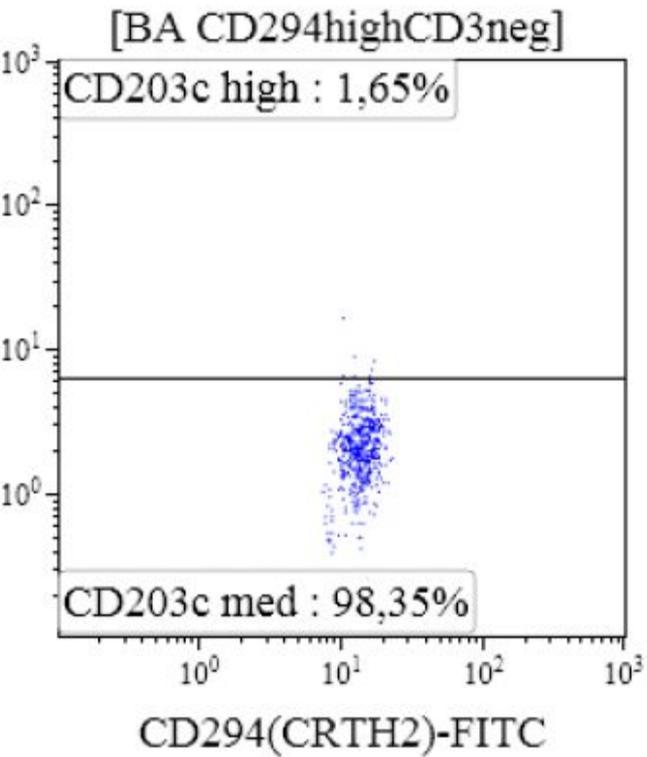
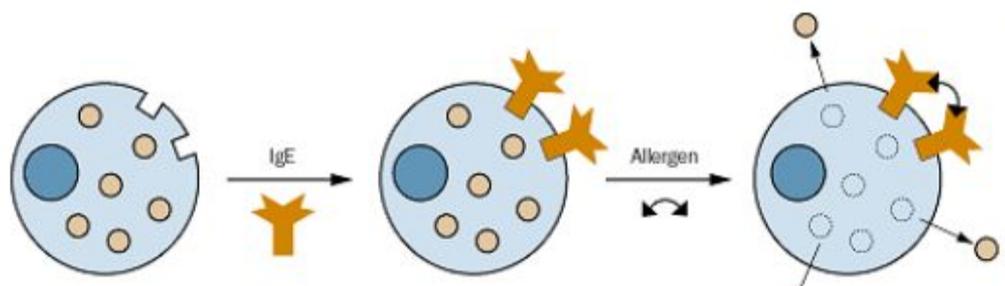
Анализ функциональной активности клеток – продукция активных форм кислорода



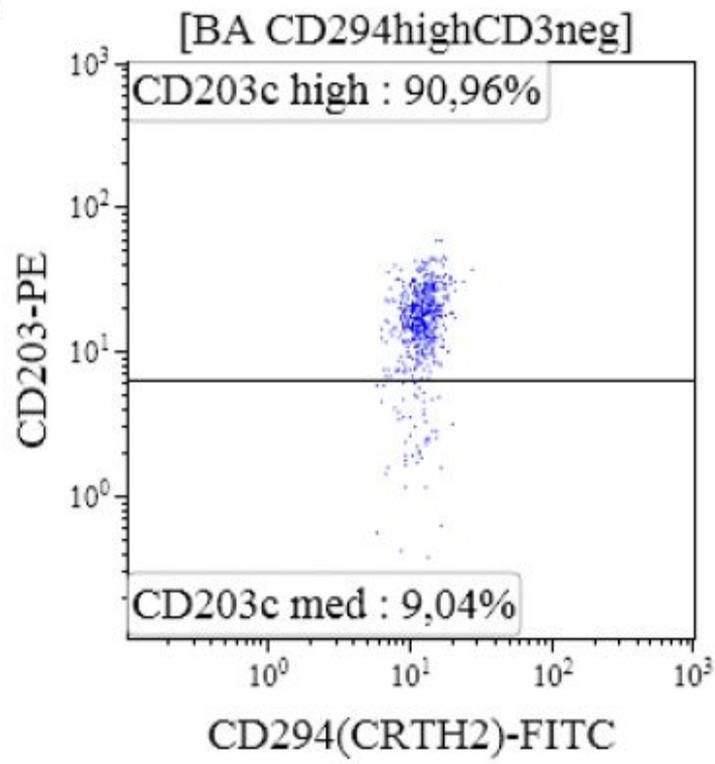
Некоторые флуоресцентные красители, применяемые в проточной цитометрии

Краситель	Ex/Em, нм	Лиганд
HE (дигидроэтидин)	520/610	$\text{O}_2^{\bullet-}$
DCFH-DA (дихлоро-дигидрофлуоресцеин)	498/522	H_2O_2 , HO^{\bullet} , ROO^{\bullet}
Amplex Red	360/460	H_2O_2
DHR123 (дигидрородамин 123)	505/529	H_2O_2 , HOCl , ONOO^-
DMA, 9,10-диметилантроцин	375/436	$^1\text{O}_2$
CHD, 1,3-cyclohexanedione	400/452	HO^{\bullet}
APF, аминофенилфлуоресцеин	500/520	HOCl , HO^{\bullet}

Анализ функциональной активности клеток – секреторная дегрануляция базофилов периферической крови



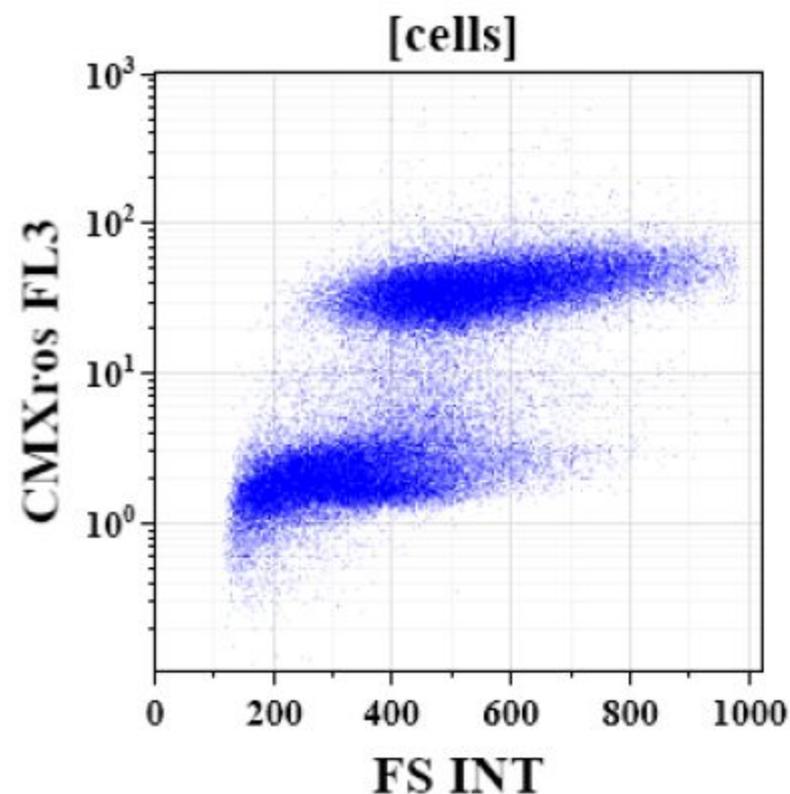
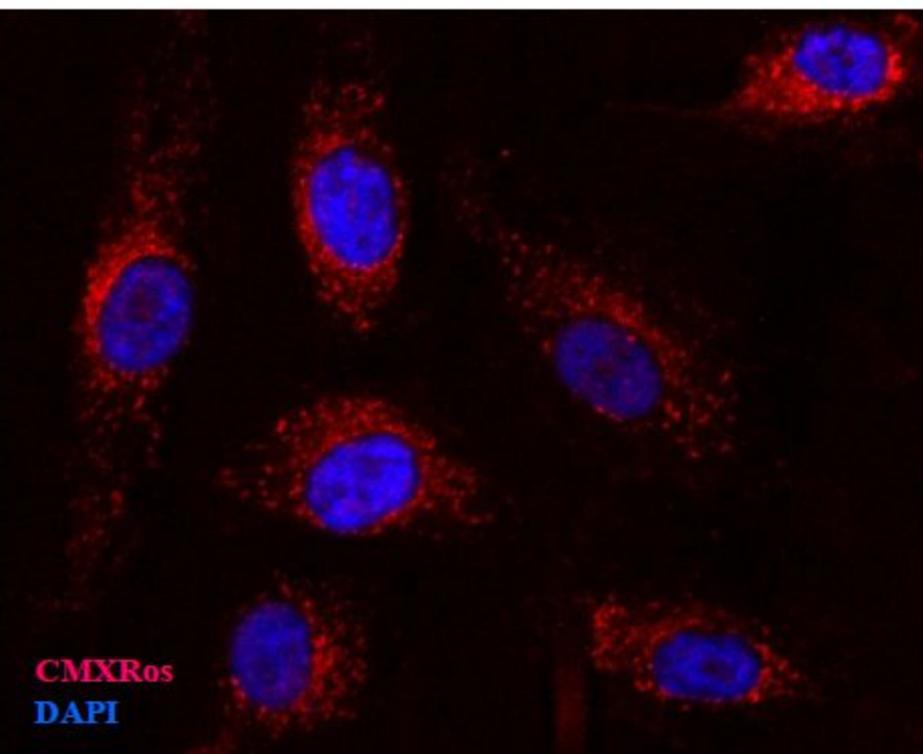
спонтанная дегрануляция



+анти-IgE антитела

Анализ основ функционирования отдельных органелл и процессов в них происходящих:

- функционирование митохондрий, исследование мембранного потенциала митохондрий

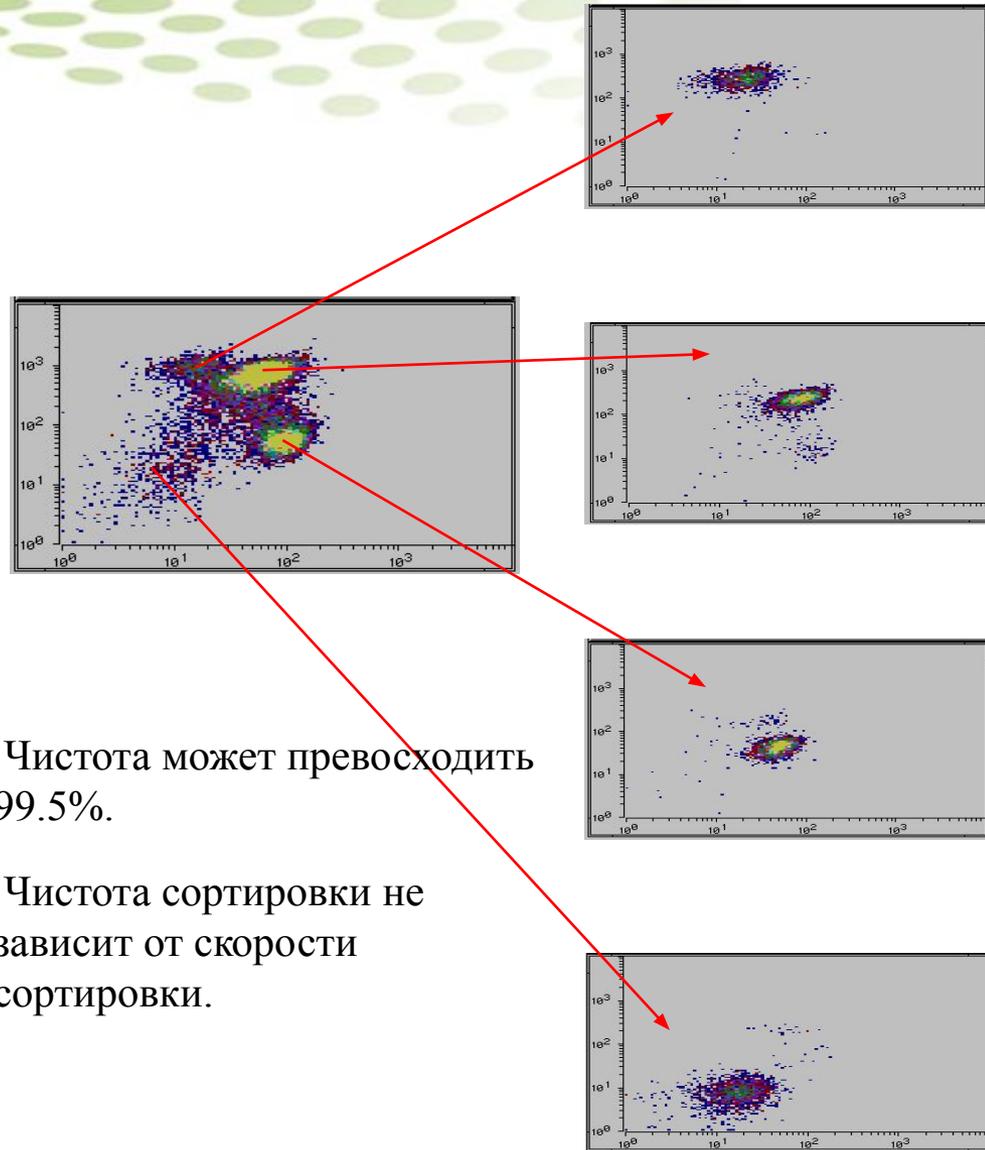
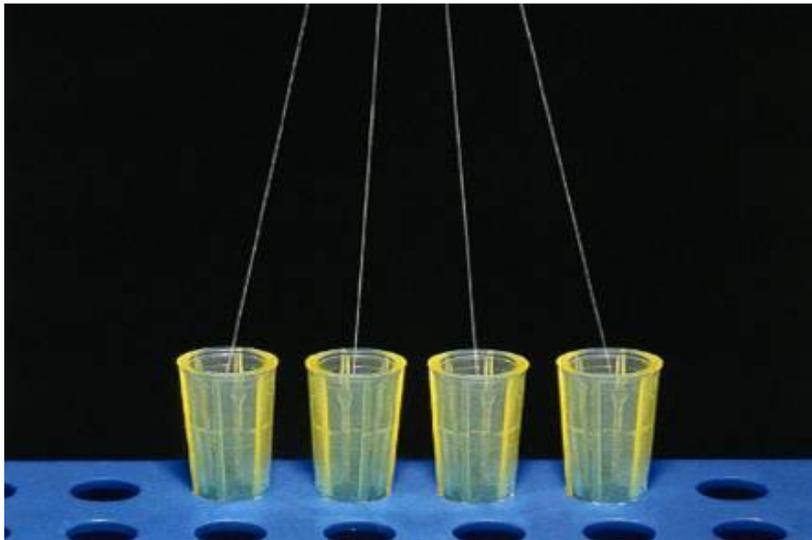
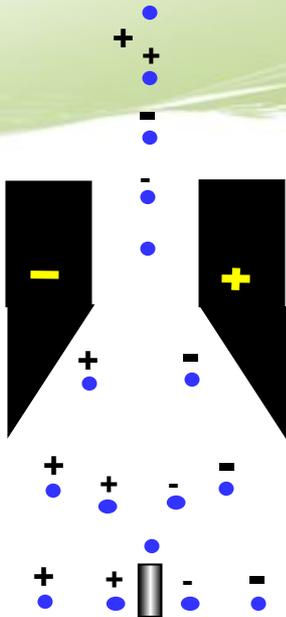


Эндотелиальные клетки линии EA.hy 926, окрашенные MitoTracker Red CMXRos

флуоресцентная микроскопия

проточная цитометрия

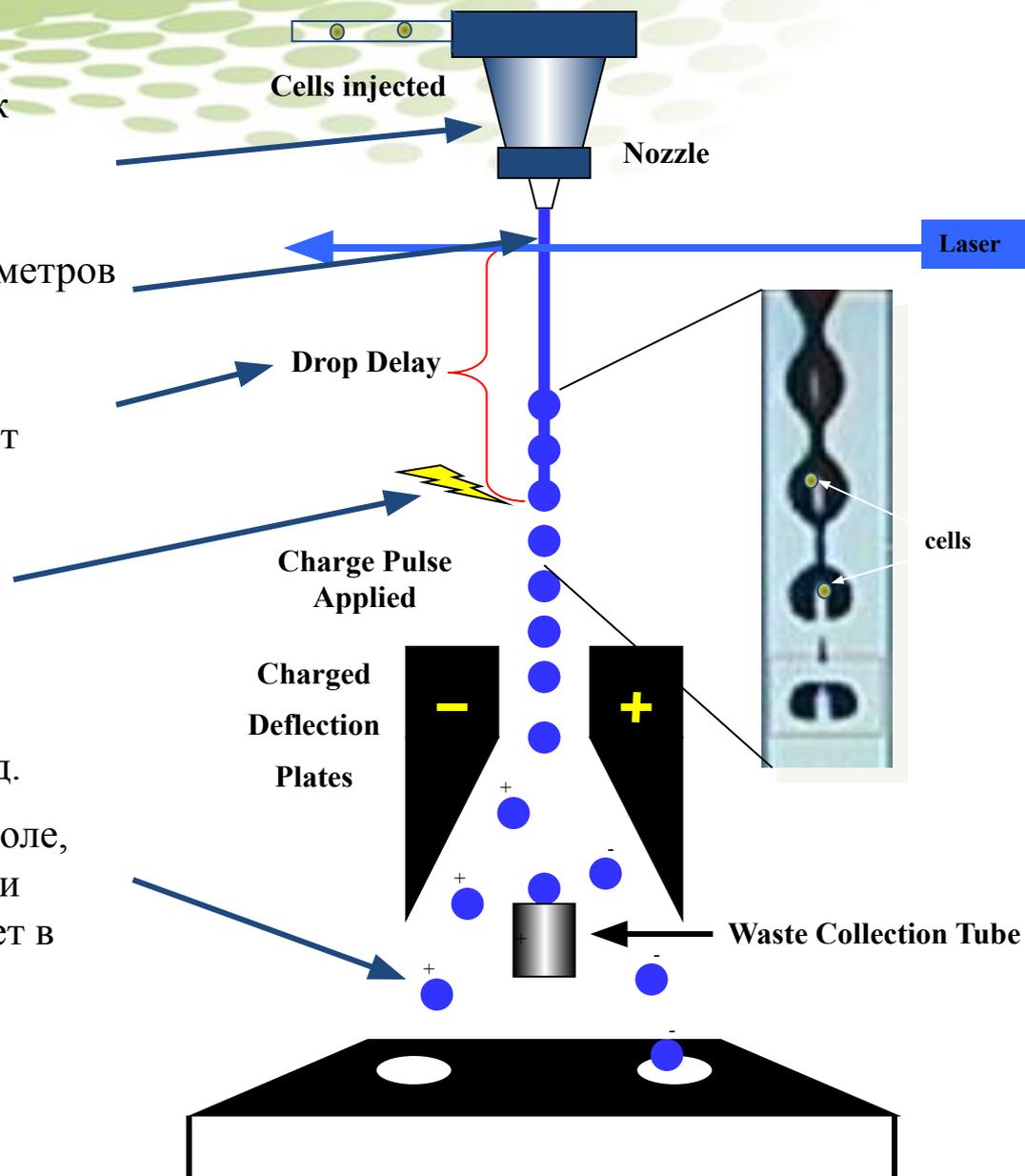
Клеточные сортеры



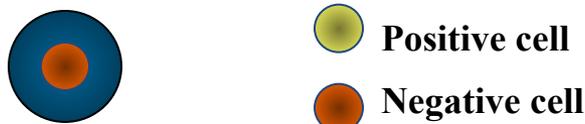
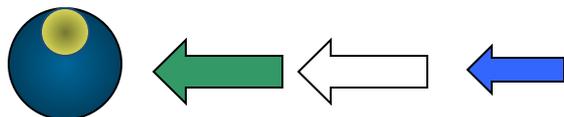
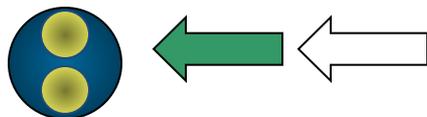
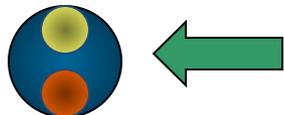
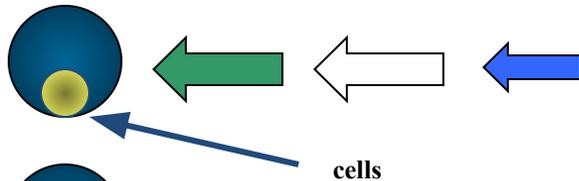
- Чистота может превосходить 99.5%.
- Чистота сортировки не зависит от скорости сортировки.

MoFlo™ XDP: Сортировка. Может быть использована во всех приложениях

- Формирование капель контролируется амплитудой и чистотой вибрации насадок (CytoNozzle).
- Решение о сортировке каждой клетки принимается на основе измеренных параметров флуоресценции и светорассеяния.
- Если клетку надо отсортировать, то электроника контролирует точный момент времени, когда клетка будет находиться в последней отрывающейся капле – "Drop Delay".
- Электроника заряжает струю.
- Последняя капля отрывается, неся положительный или отрицательный заряд.
- При прохождении через электрическое поле, создаваемое заряженными отклоняющими пластинами, капля отклоняется и попадает в нужную пробирку.



MoFlo™ XDP: Режимы сортировки возможно смешение режимов: Mixed Sort Modes (!)



Режим насыщения (Enrich mode)



Сортируются ВСЕ положительные клетки за исключением сильных совмещений клеток (клетки слишком близко друг к другу, чтобы их разделить).

Чистый режим (Purify mode)



Негативные не сортируются, т.е. сортируются только положительные клетки в отсутствие негативных.

Избирательный режим (Single mode)



Сортируется только положительная клетка, причем, если она одна находится в капле. Это очень важный режим, он используется при сортировке в 96-луночные планшеты.

Клеточные сортеры MoFlo™ XDP И MoFlo™ Astrios



MoFlo™ XDP: Сортировка. Чистота, выход и жизнеспособность

Чистота

Чистота сортировки больше 99%

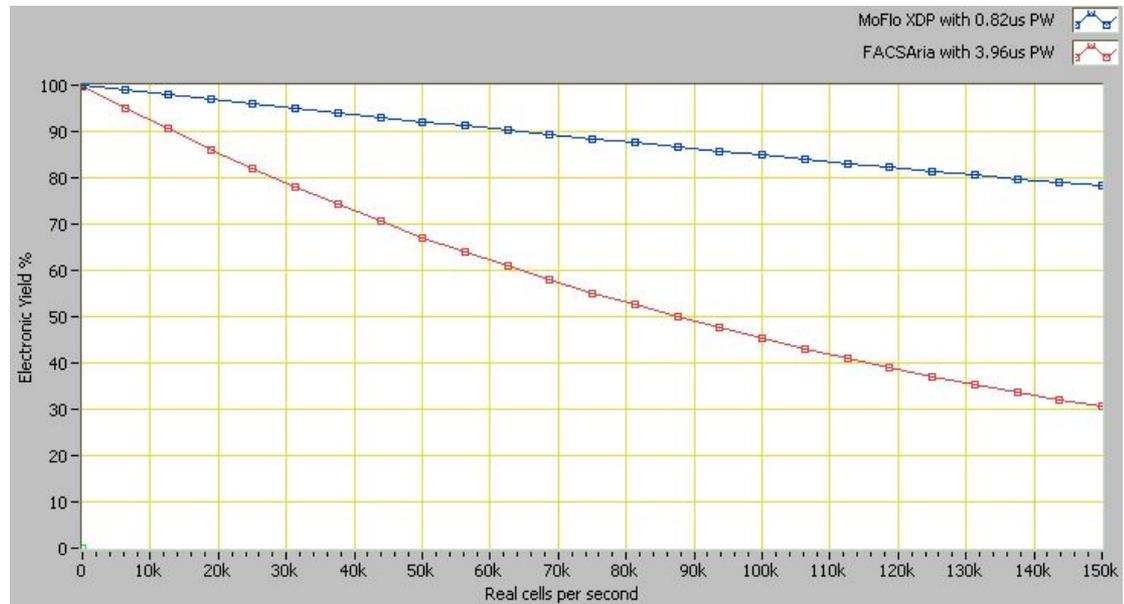
Жизнеспособность

- MoFlo™ XDP используется для идентификации большого разнообразия клеток включая: Т-клетки, В-клетки, НК-клетки, dendritic cells, гемопоэтические и нервные стволовые клетки.
- После сортировки клетки нормально функционируют и способны производить цитокины, представлять антигены, производить антитела, активироваться, связываться с клетками мишенями, пригодны для трансплантации и долгоживущих культур.

Выход

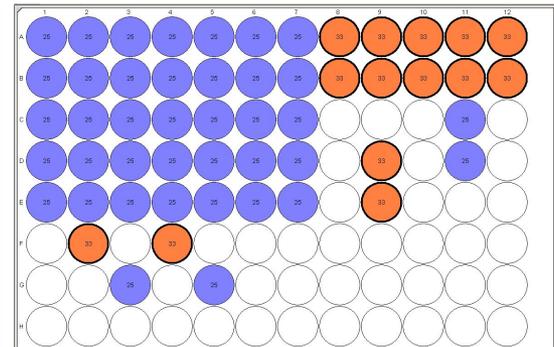
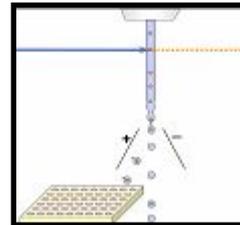
На большой скорости работы MoFlo™ XDP имеет выход сортировки в два раза больший чем у конкурентов. Даже на сравнительно медленных скоростях сортировки MoFlo™ XDP сохраняет свое преимущество.

На графике показан выход сортировки (electronic yield, %) в зависимости от скорости сортировки (клеток в секунду).



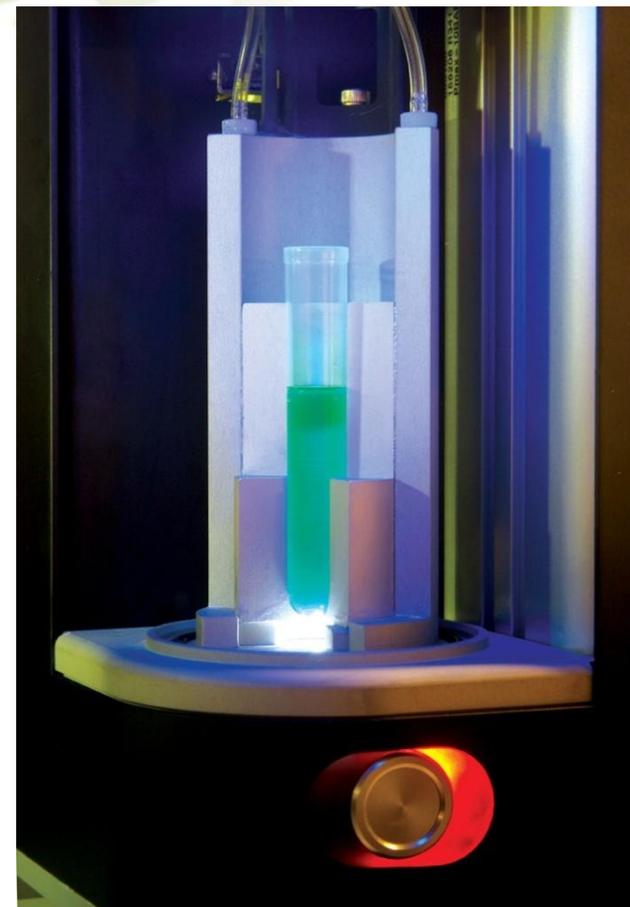
MoFlo™ XDP: Модуль CyCLONE™

- CyCLONE™ – это управляемый компьютером роботизированный модуль, который осуществляет точное и быстрое распределение отсортированных капель по заданным пользователем микропланшетам.
- Используемые планшеты: на 6, 24, 96, 384 и 1536 ячейки, планшеты заданные пользователем и предметные стекла.
- Распределение капель на предметные стекла легко задается для разного количества рядов и колонок.
- Модуль CyCLONE™ также используется для контроля задержки отрыва капель.



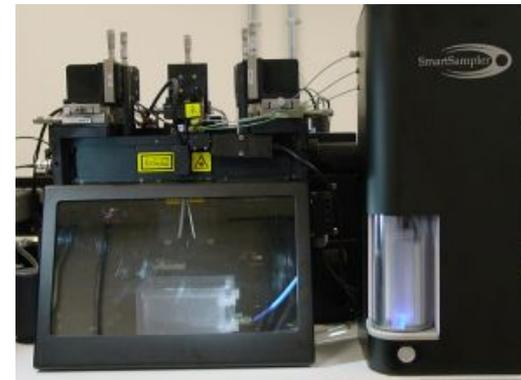
MoFlo™ XDP: Модуль SmartSampler. Особенности.

- Герметичный модуль SmartSampler позволяет производить сортировку из пробирок, предназначенных для разных целей.
- Широкий выбор типов пробирок: 0,5, 1,5, 5, 14, 15 и 50 мл.
- Возможна установка параметров автоматического взбалтывания и позиционирования образца.
- Детектор воздуха предупреждает пользователя о низком уровне образца, позволяет использовать весь объем образца и предотвращает попадание воздуха в систему.
- Конфигурация модуля, оснащенная водяной баней, позволяет поддерживать температуру образца в пределах от -4 до 40°C.
- Возможны автоматическая очистка и выключение.



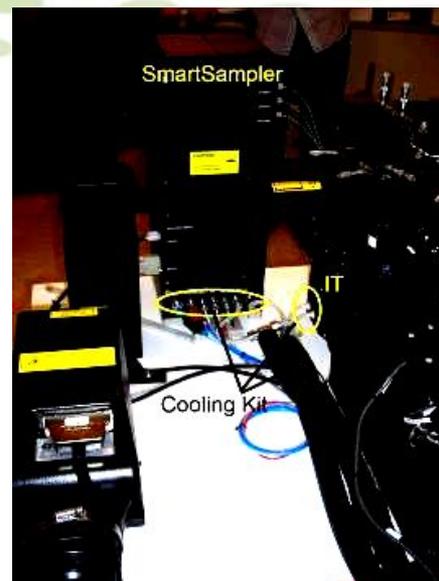
MoFlo™ XDP: Модуль SmartSampler. Биобезопасность.

- Используемый в системе воздух очищается системой двойной фильтрации ULPA.
- Рабочая камера сделана из материала Lexan™, который препятствует вытеканию жидкости, герметично изолируя пробирку с образцом.
- Герметичная камера защищает оператора в случае повреждения пробирки.



MoFlo™ XDP: Термостабилизация

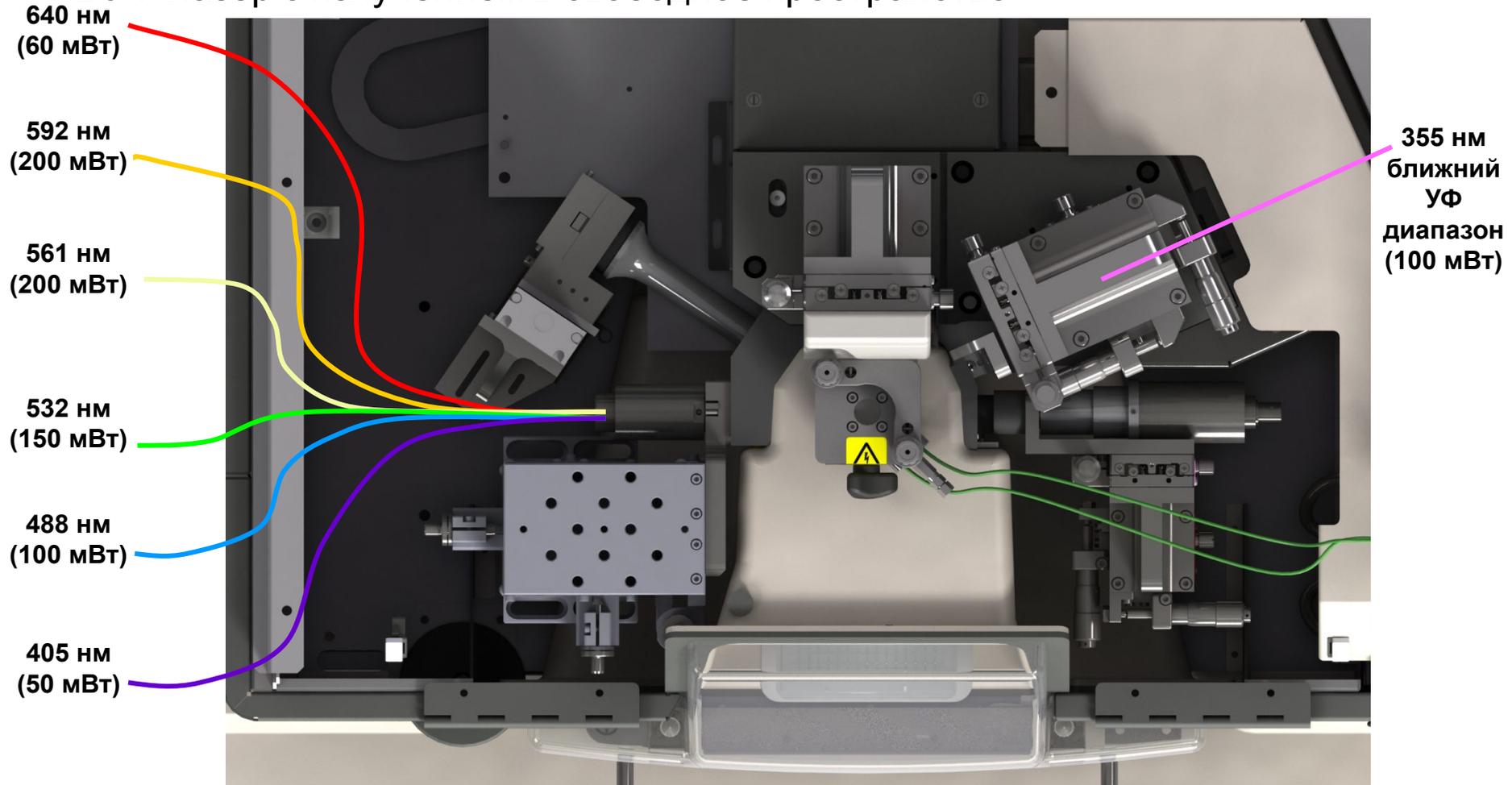
- Водяная баня поддерживает образцы в постоянной температуре
- Поддерживает отсортированные клетки в постоянной температуре
- Отдельно стоящее оборудование от MoFlo™ XDP
- Температура определяется оператором: -4 - 40°C



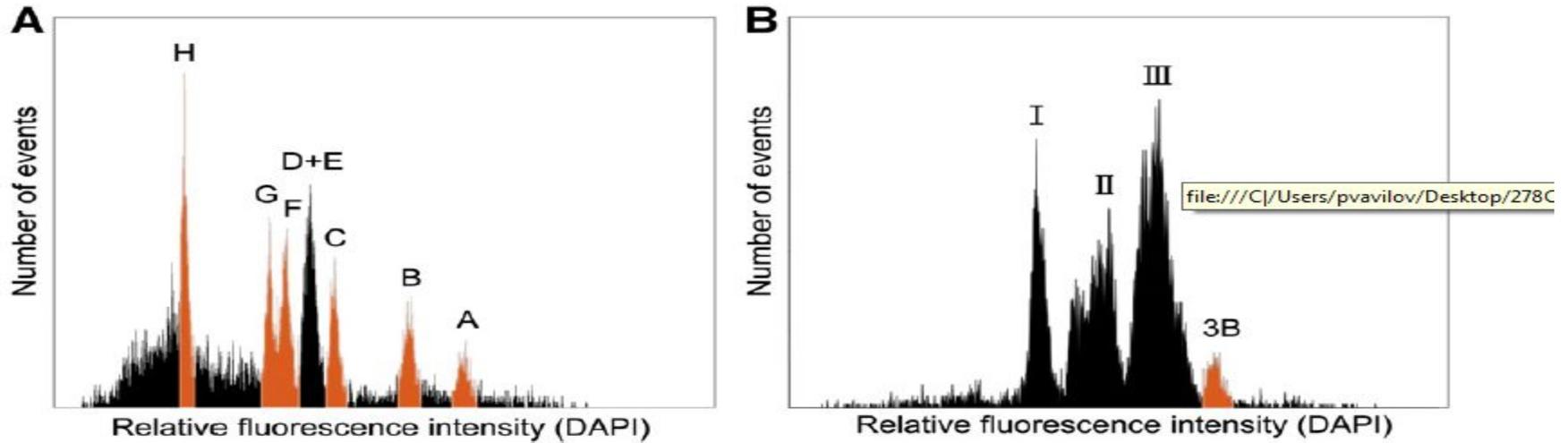
Модульная система - возможность выбора лазеров

До 6 лазеров с волоконными каналами передачи излучения +

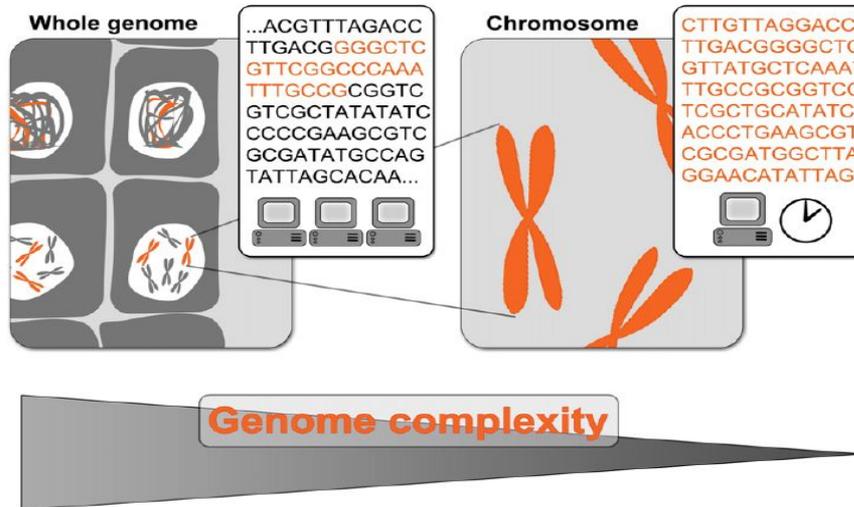
1 УФ-лазер с излучением в свободное пространство



Первый в мире сортировщик с семью апертурами!



Flow karyotyping in chickpea and bread wheat. The fluorescence intensity histograms (flow karyotypes) were obtained from DAPI-stained suspensions of mitotic chromosomes. (A) Chickpea cv. Frontier (2n = 2x = 16) forms seven peaks, six of which each represent a single chromosome (A–C and F–H). The seventh peak harbors both chromosomes D and E. (B) In the wheat cv. Chinese Spring (2n = 6x = 42) flow karyotype, only chromosome 3B forms a discrete peak. The remaining 20 chromosomes are dispersed into the composite peaks I–III.



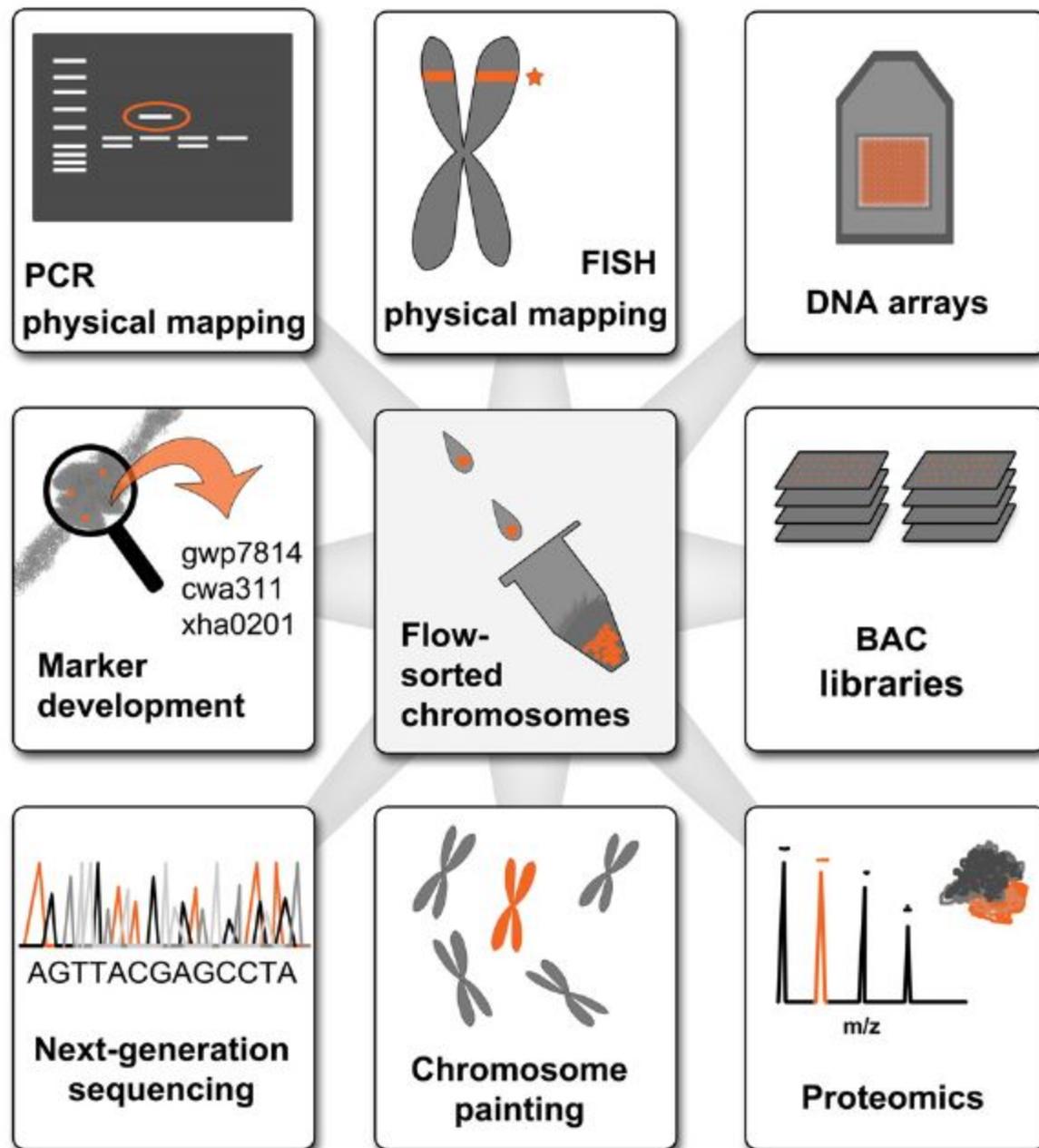


Fig. 6. Major current and potential uses of flow-sorted chromosomes.

Спасибо за внимание!

www.beckmancoulter.com
www.beckmancoulterreagents.com