

Bi9393 Analytická cytometrie

Lekce 3

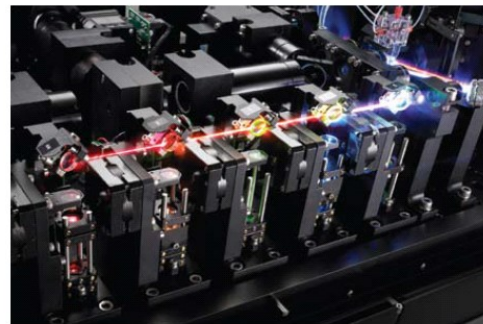


Karel Souček, Ph.D.

Oddělení cytokinety
Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i.
Královopolská 135
612 65 Brno

e-mail: ksoucek@ibp.cz
tel.: 541 517 166

Image Stream & Flowsight Amnis – kombinace průtokové cytometrie a analýzy obrazu

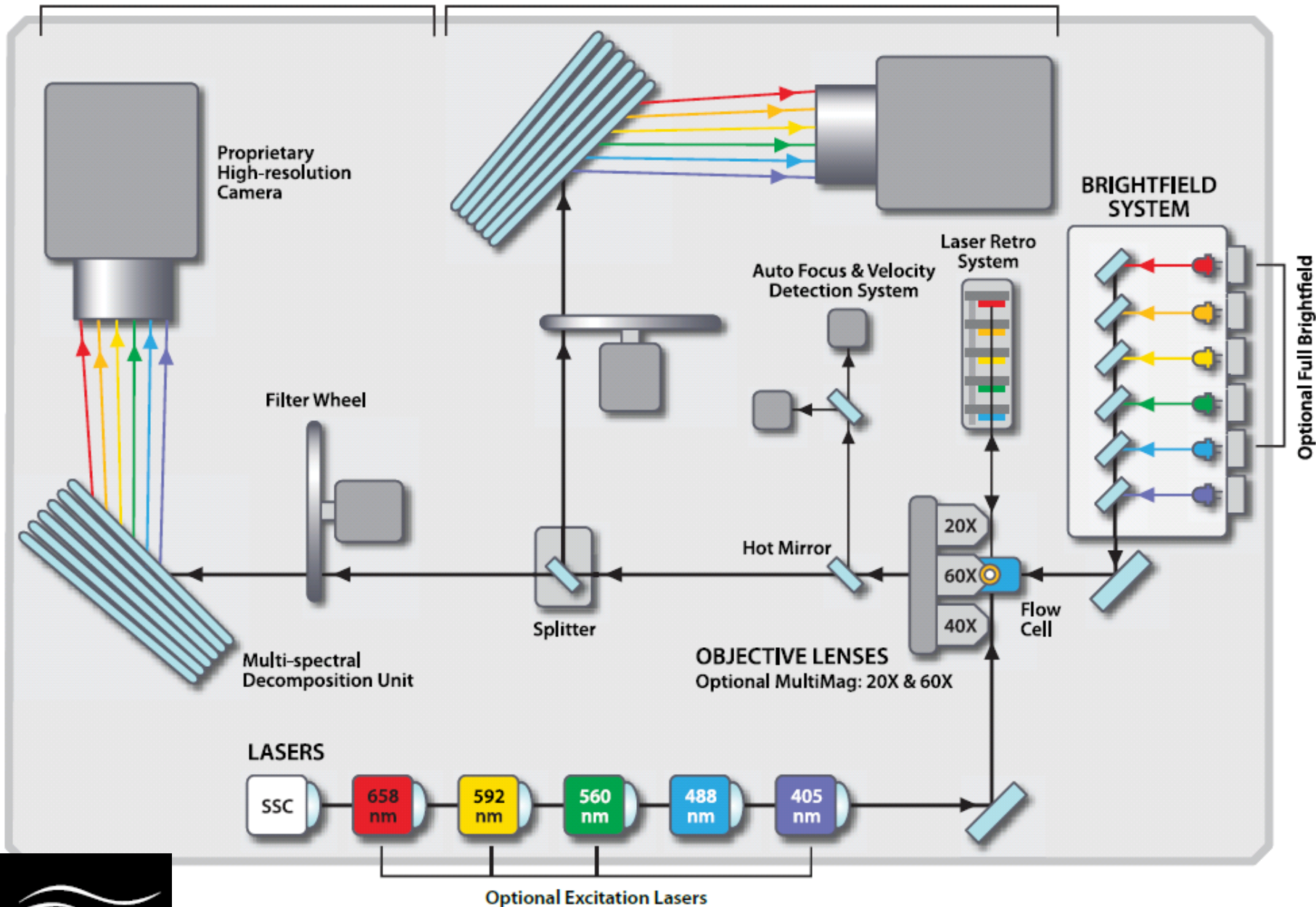


STANDARD COLLECTION SYSTEM

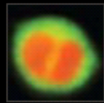
Image Channels: 1-6

OPTIONAL COLLECTION SYSTEM

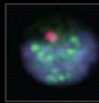
Image Channels: 7-12



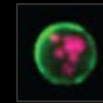
Amnis - aplikace



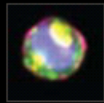
Cell Signaling



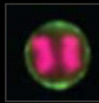
DNA Damage and Repair



Cell Death



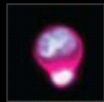
Co-localization



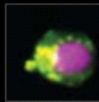
Cell Cycle and Mitosis



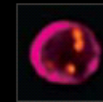
Parasitology



Cell-Cell Interactions



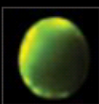
Autophagy



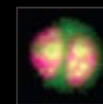
Microbiology



Morphology



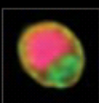
Targeted Immunotherapy



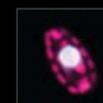
Oncology



Internalization



Stem Cell Differentiation



Oceanography

The logo for Amnis, featuring a stylized white wave above the word "amnis" in a white, lowercase, sans-serif font, all set against a black rectangular background.



Principy průtokové cytometrie a sortování

- sorting
- zpracování signálu
- analýza dat
- kompenzace signálu



Doležel (1999)

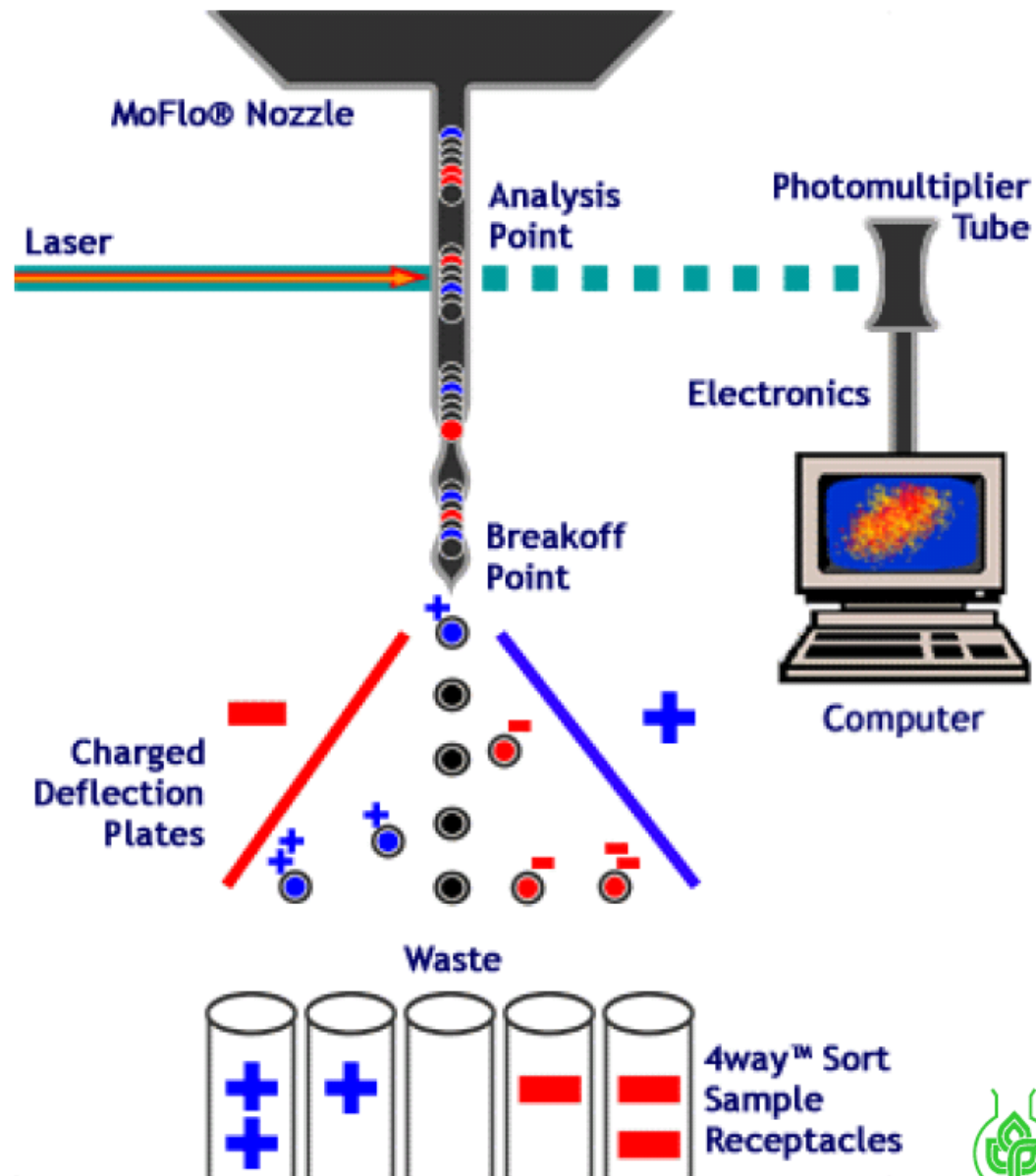


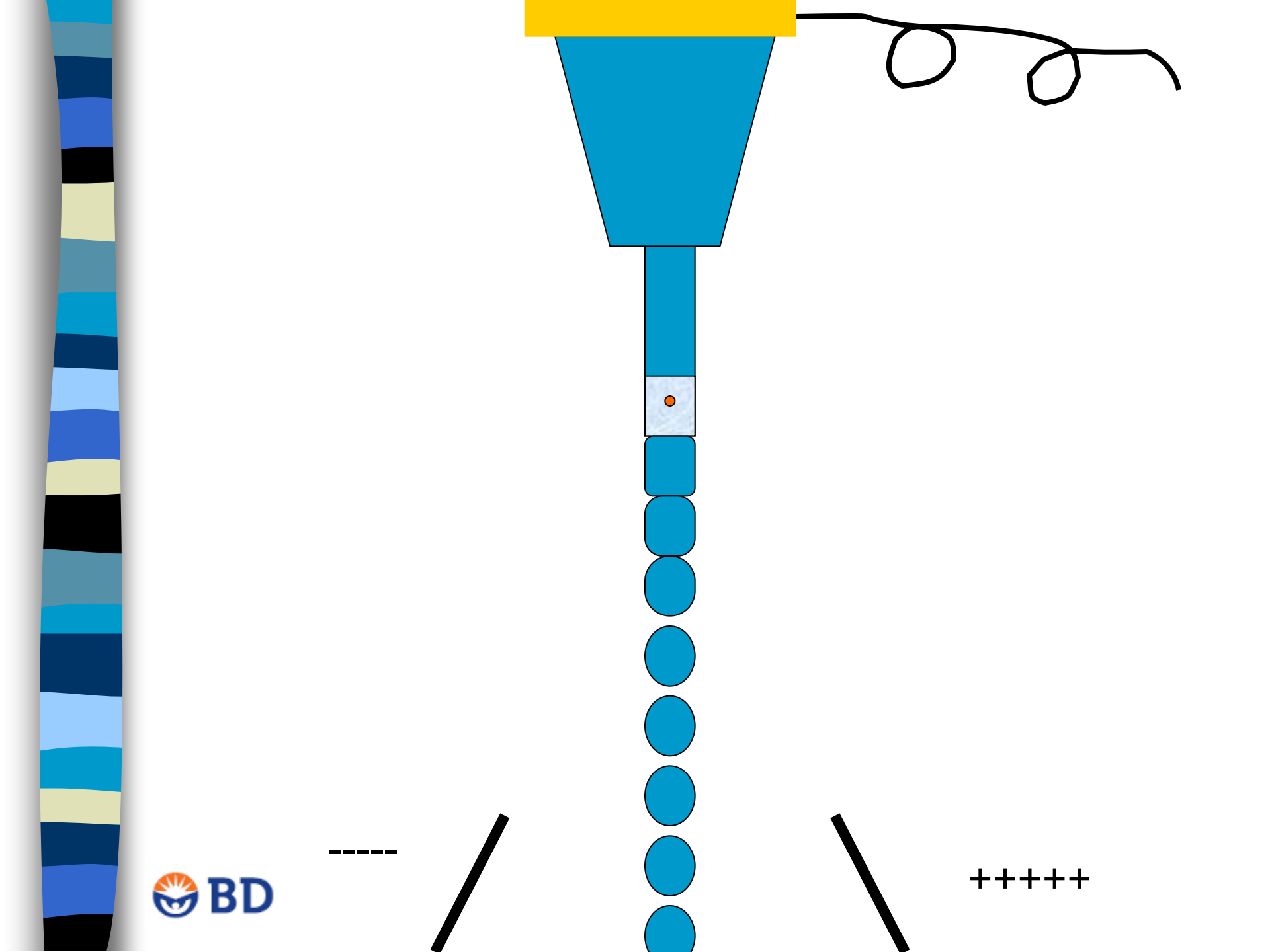
ELECTROSTATIC DROPLET SORTER

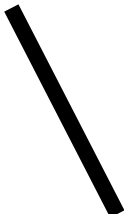
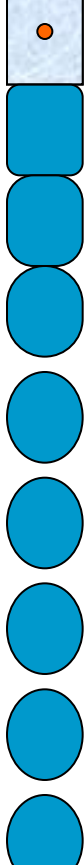
- High speed ($\sim 10^4/\text{sec}$)
 - Concentrated sorted fraction
 - Biosafety hazard
 - Mechanical shearing
- Problems to sort large particles

Used by:
Becton Dickinson
Beckman Coulter
Cytomation

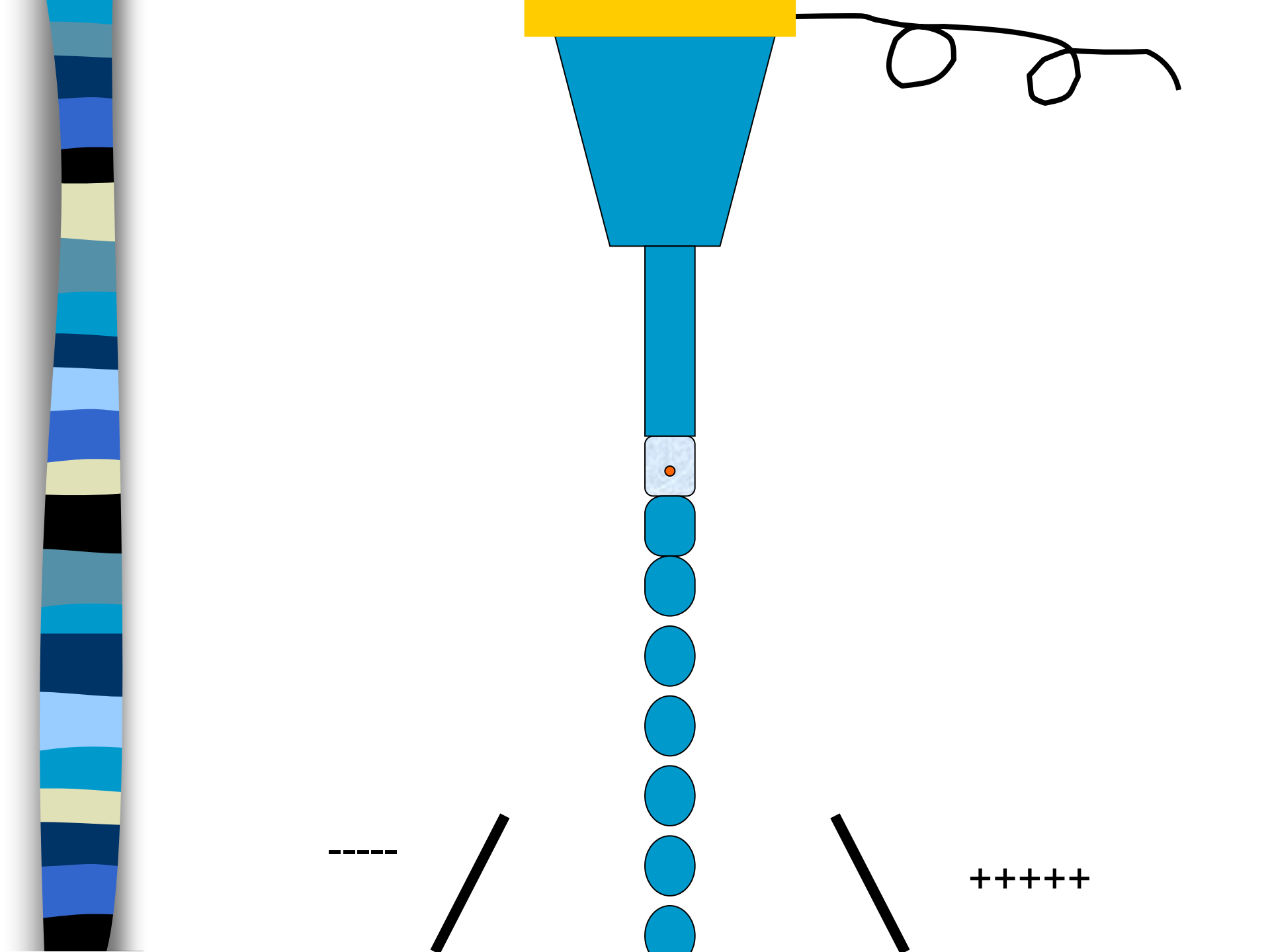
Doležel (1999)

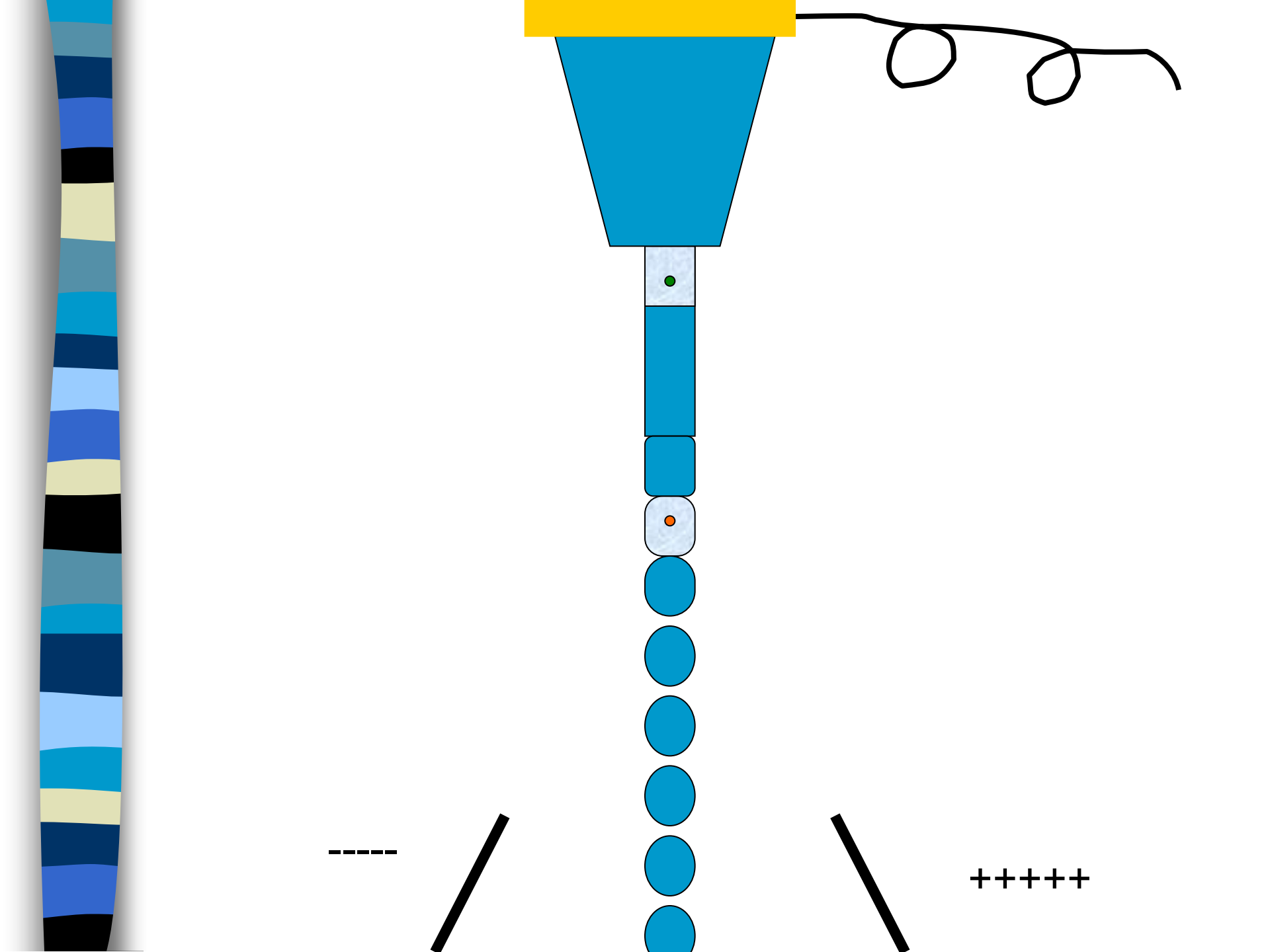


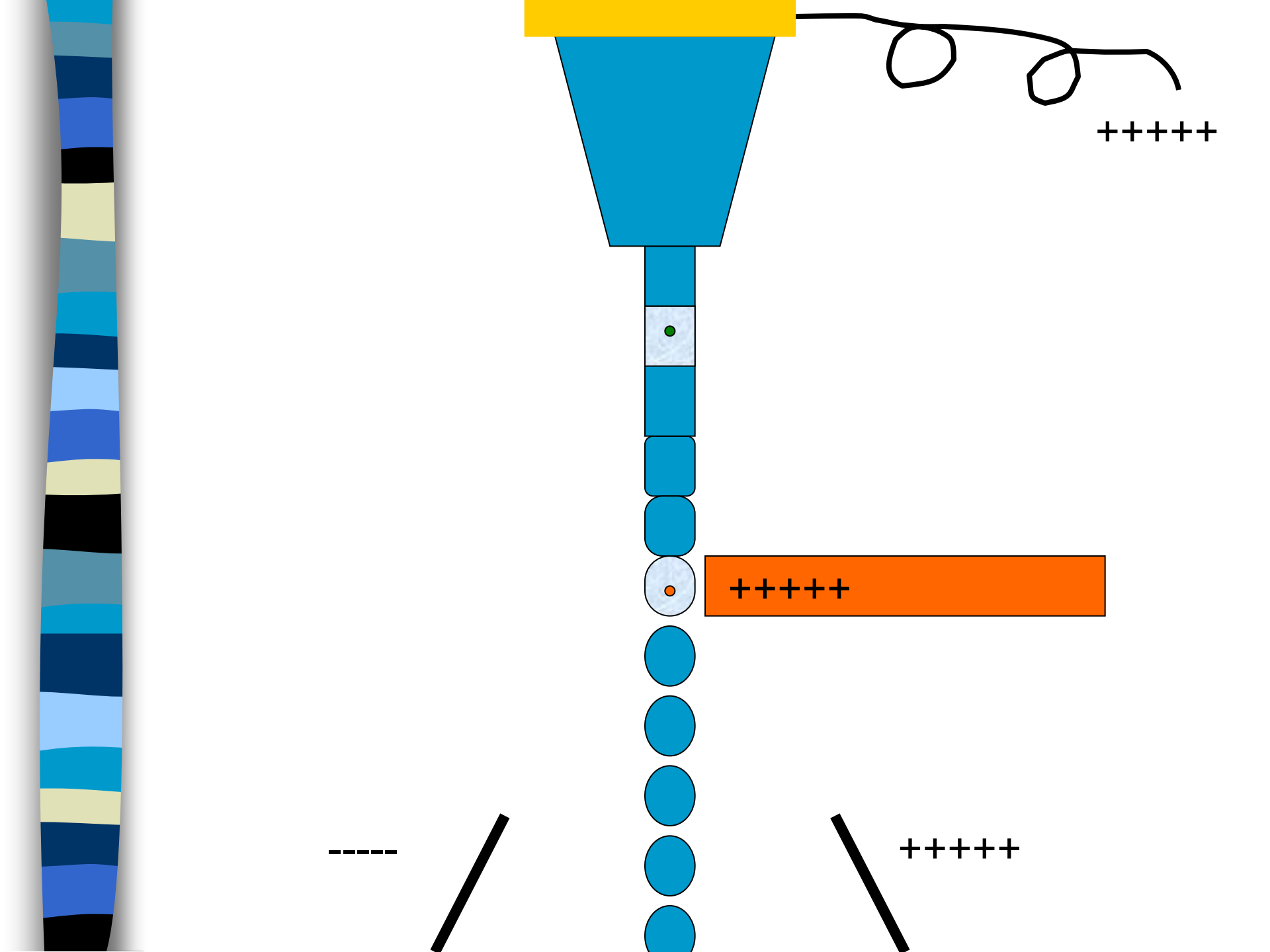


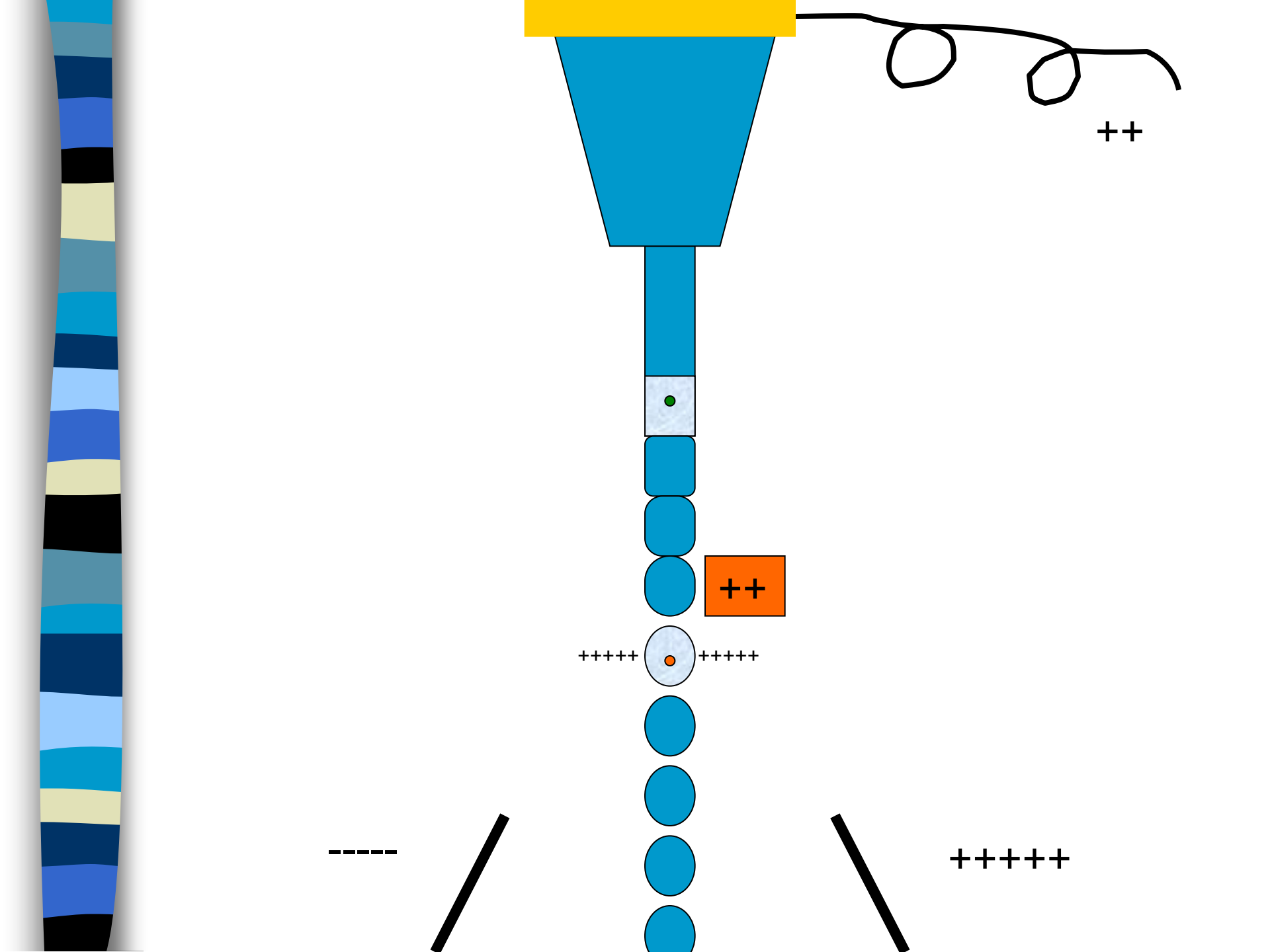


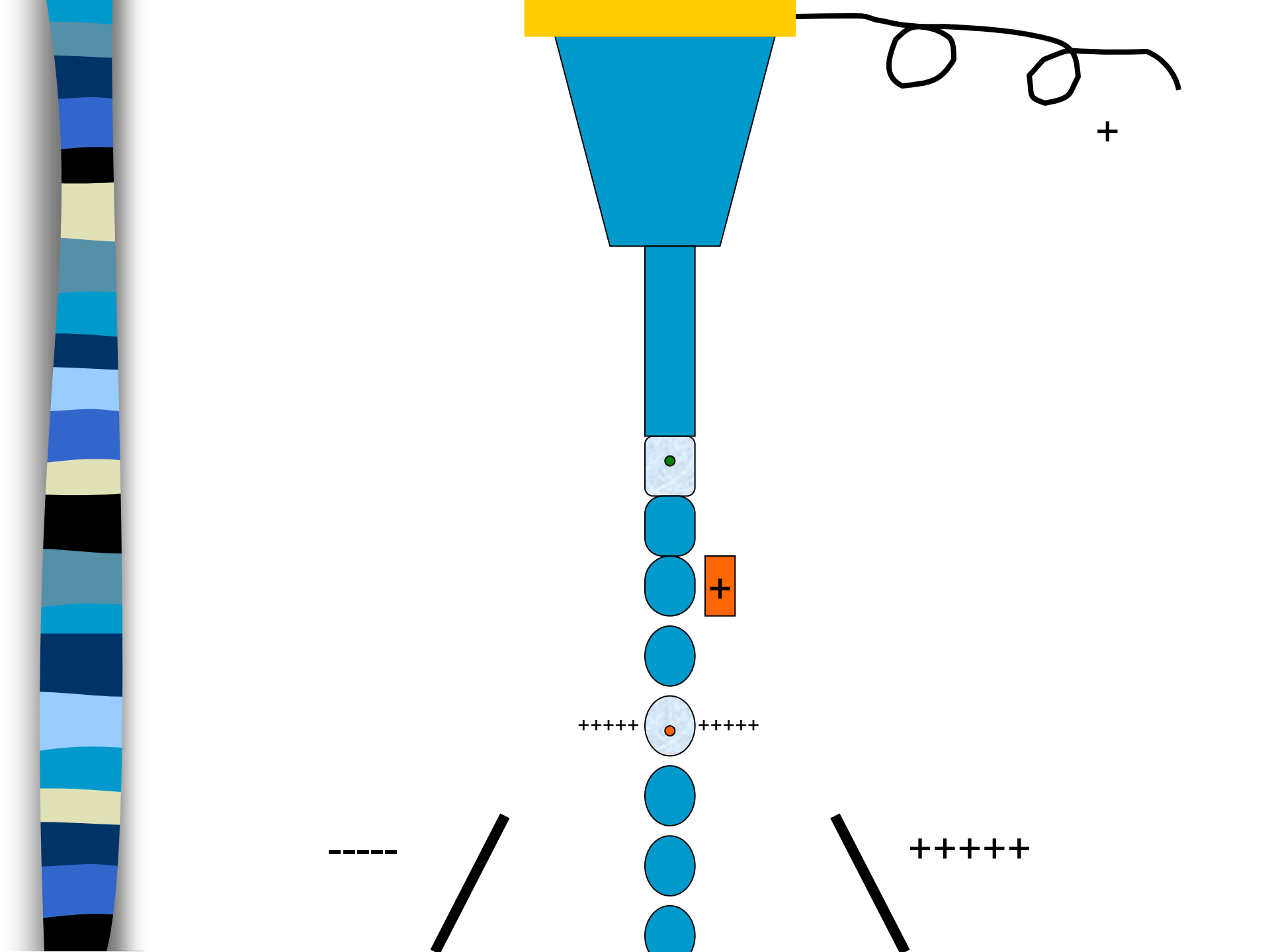
+++++

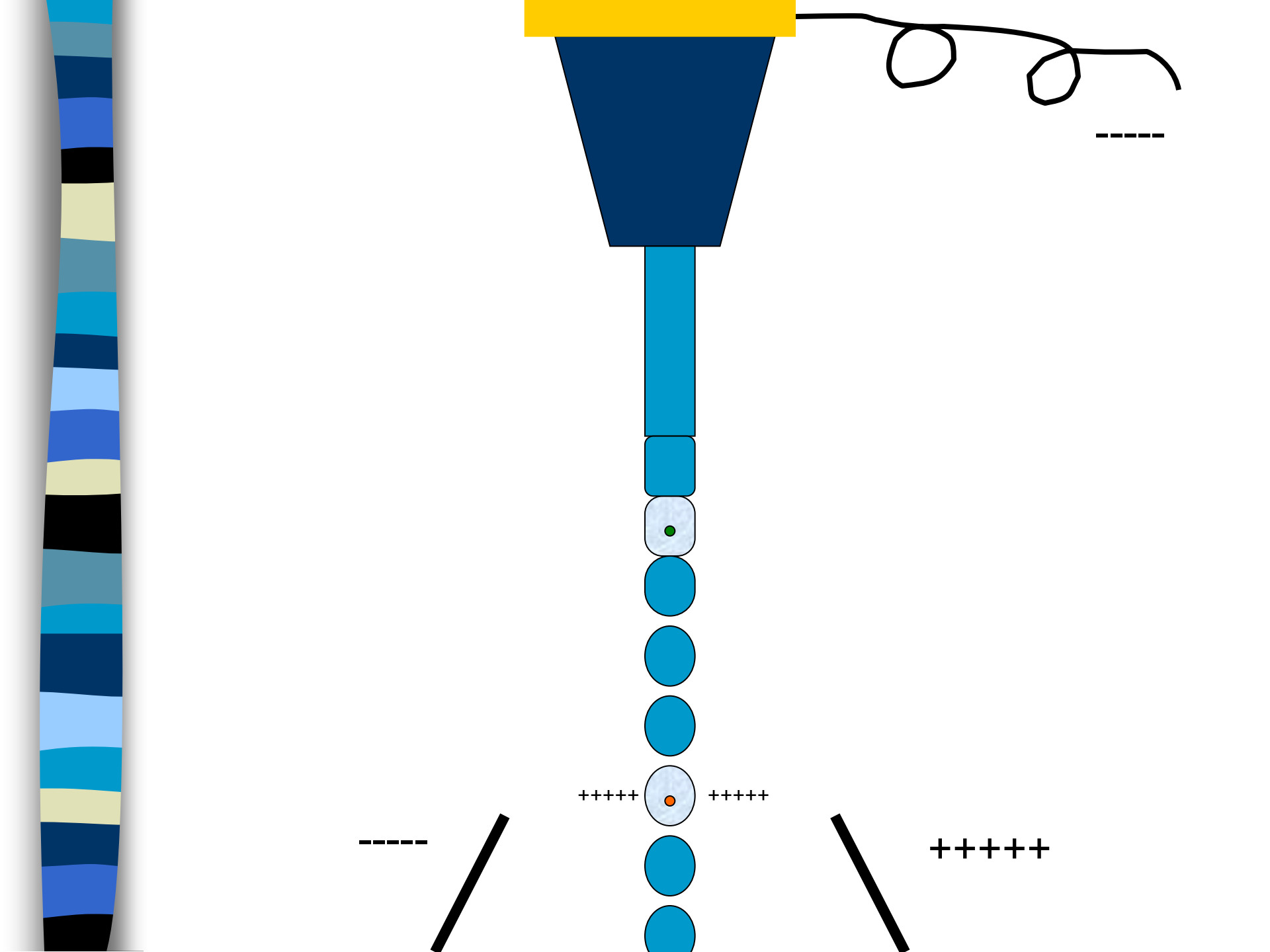


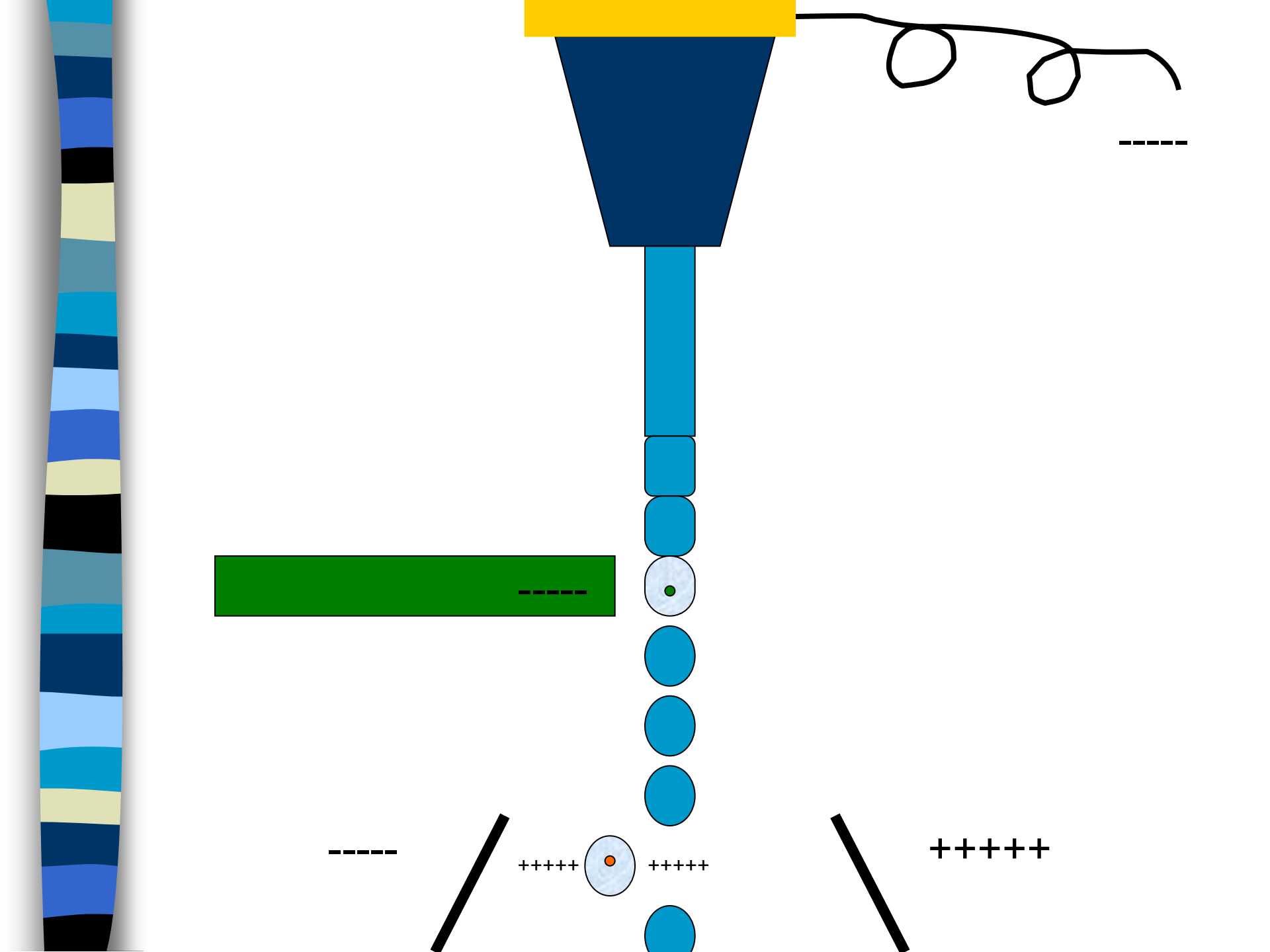


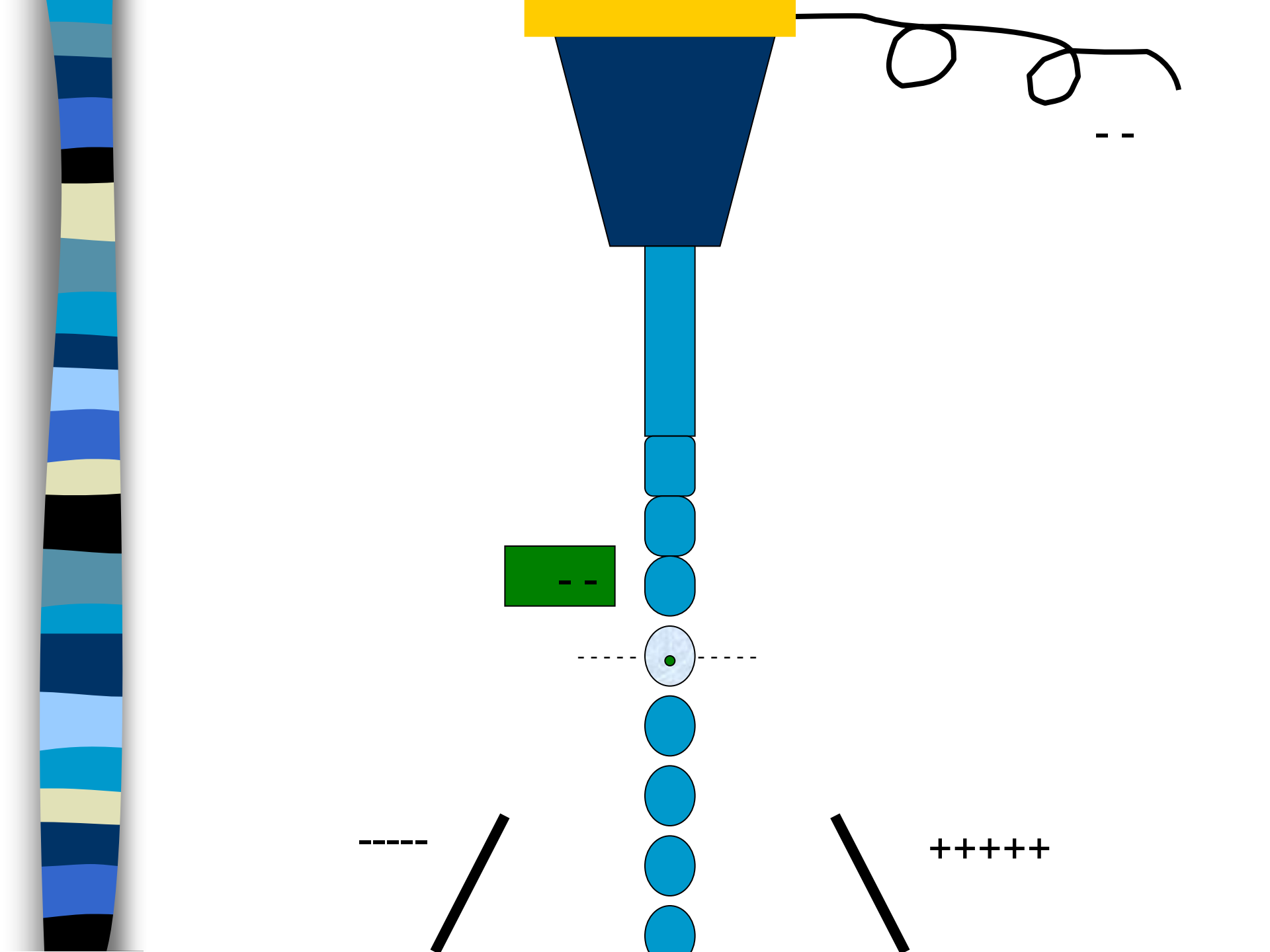


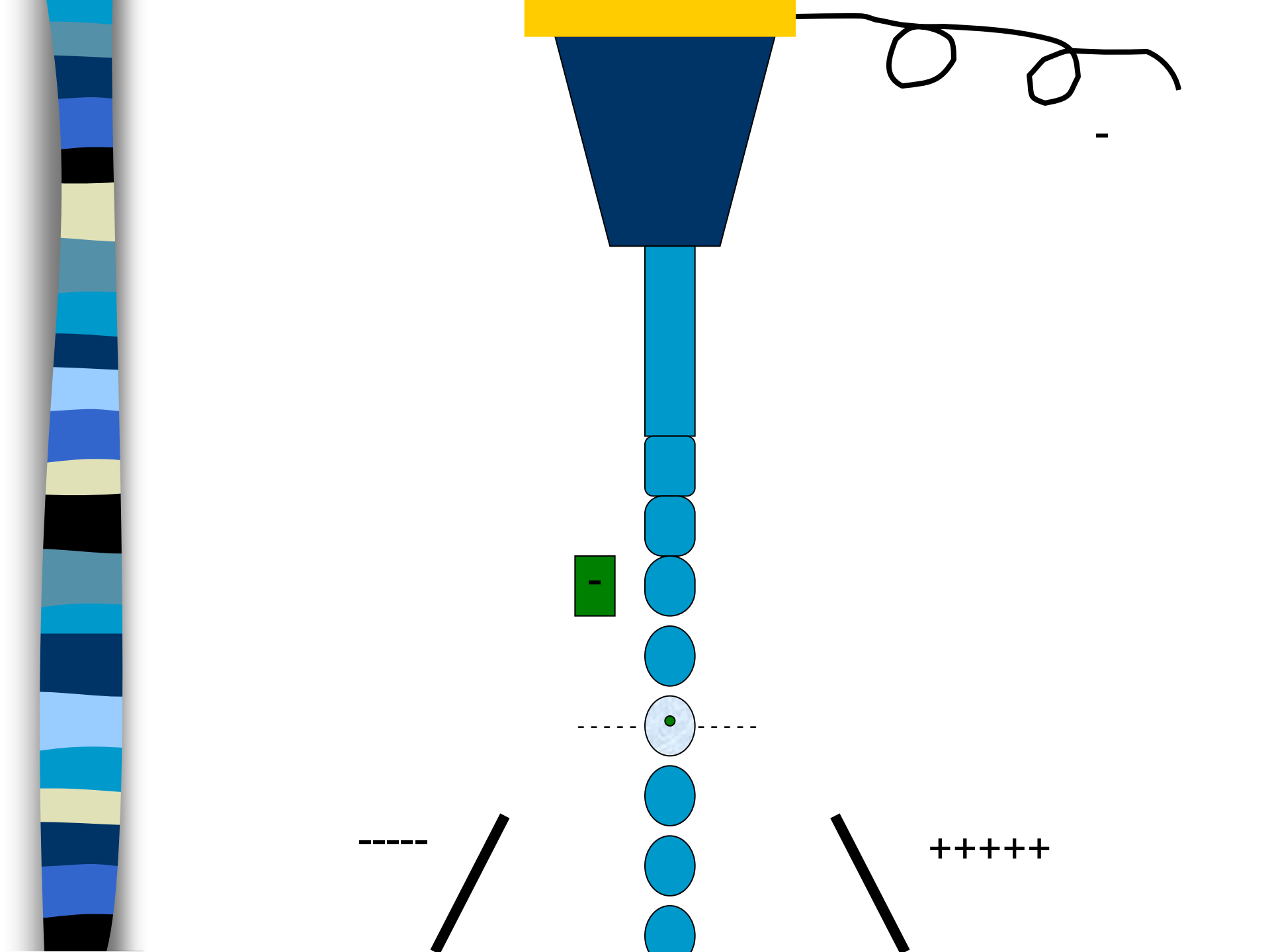


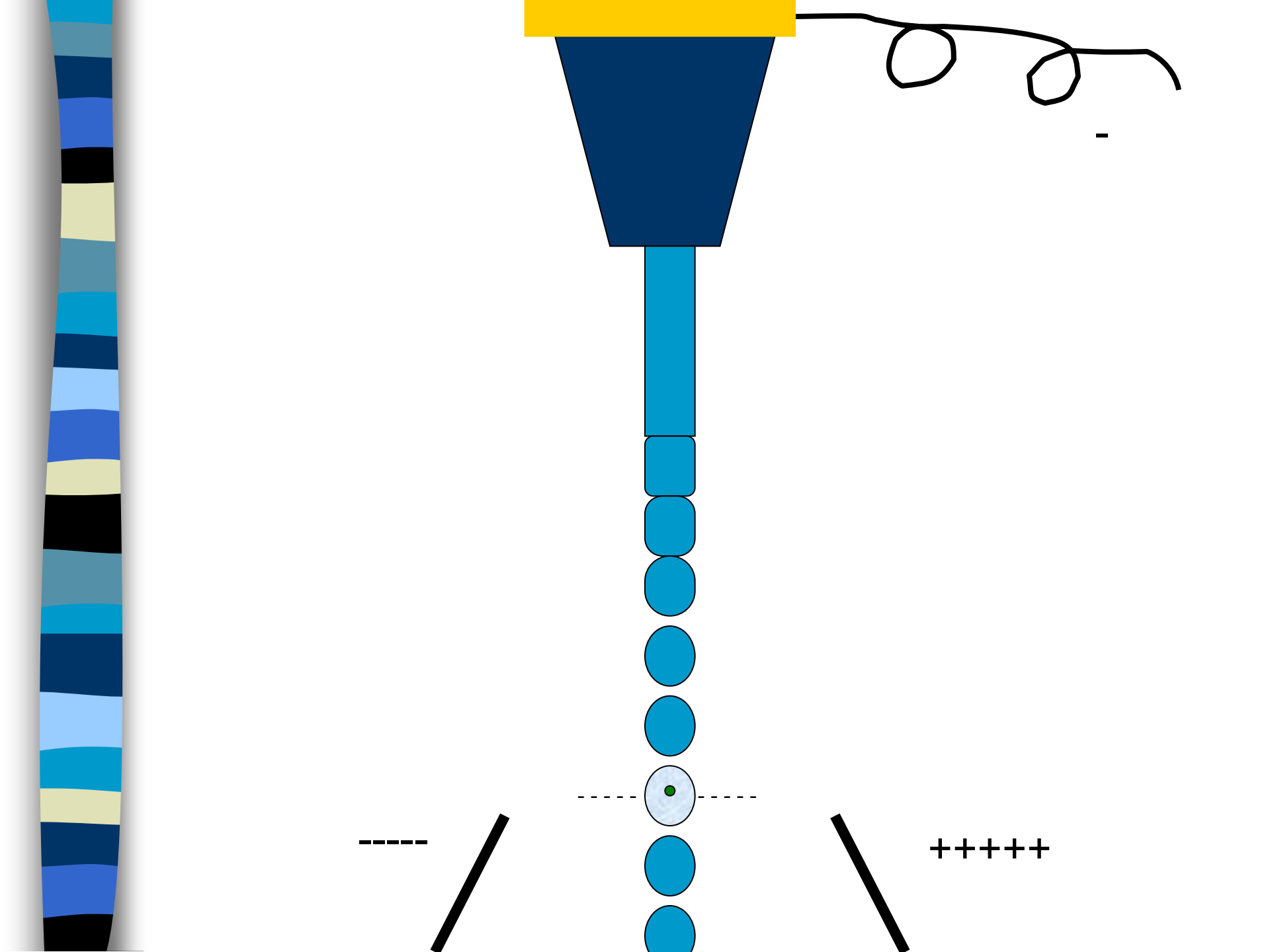


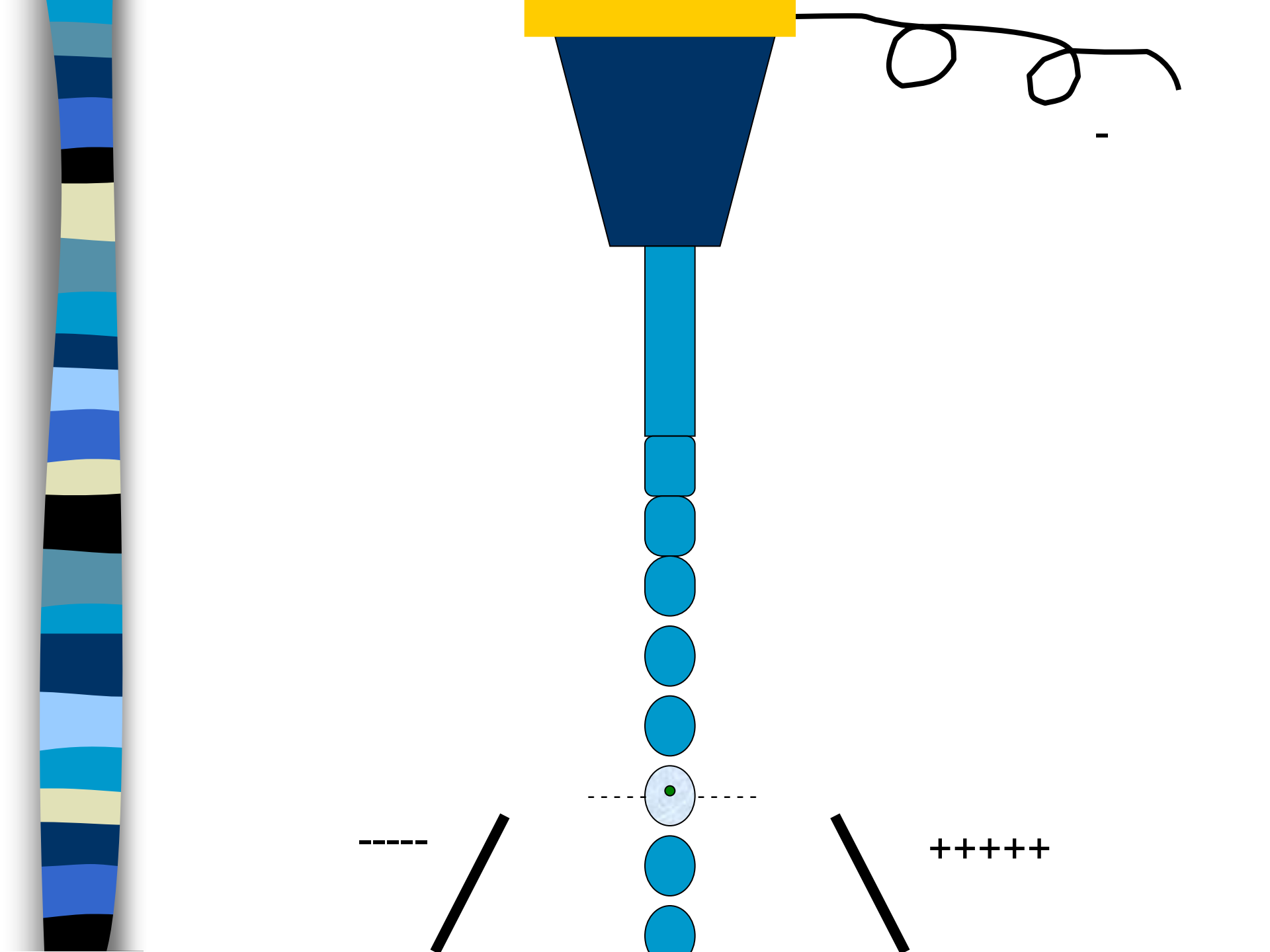


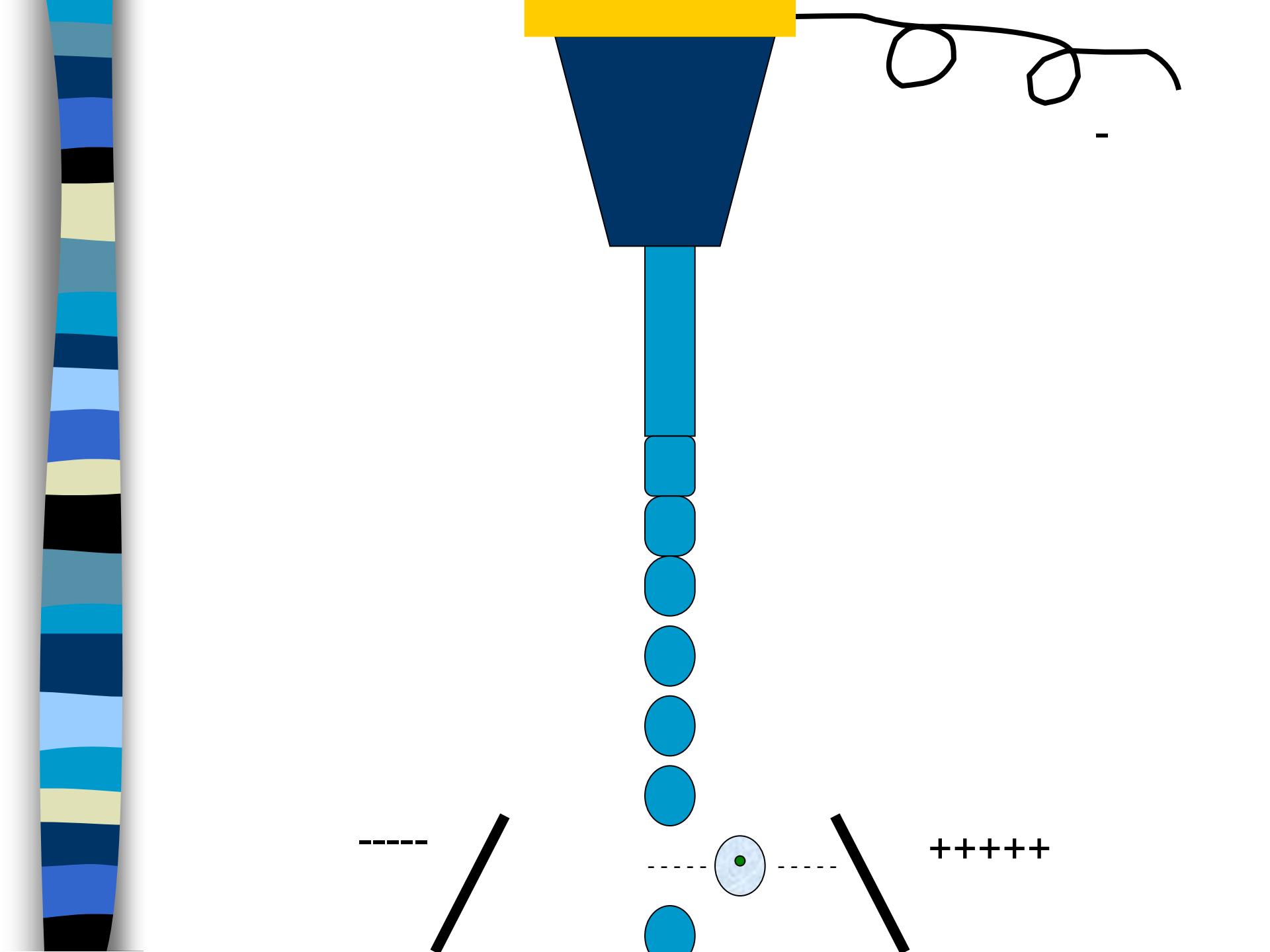










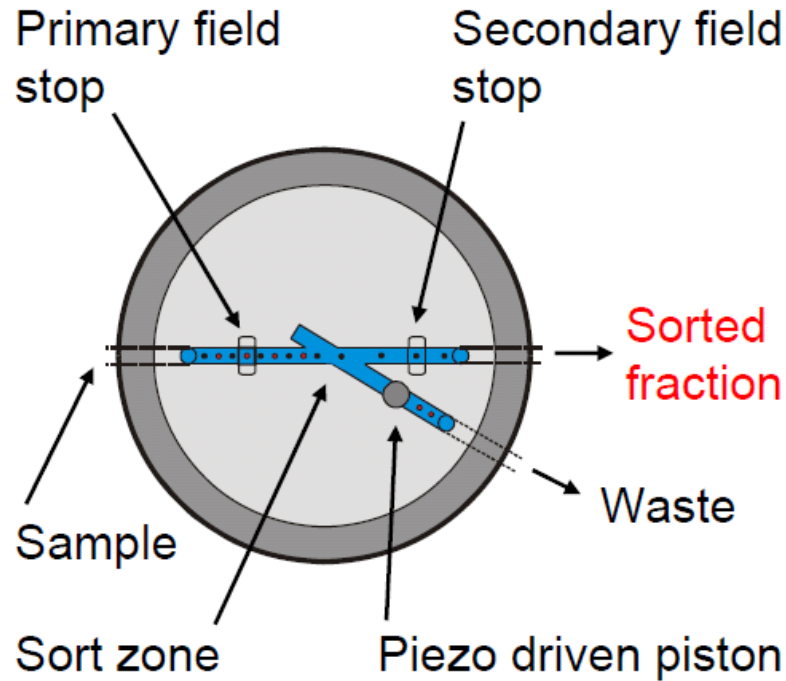


ISAC presents: Mack Fulwyler - Innovator, Inventor & Pioneer

<http://www.isac-net.org/index.php?option=content&task=view&id=498>



FLUIDIC SWITCH SORTER

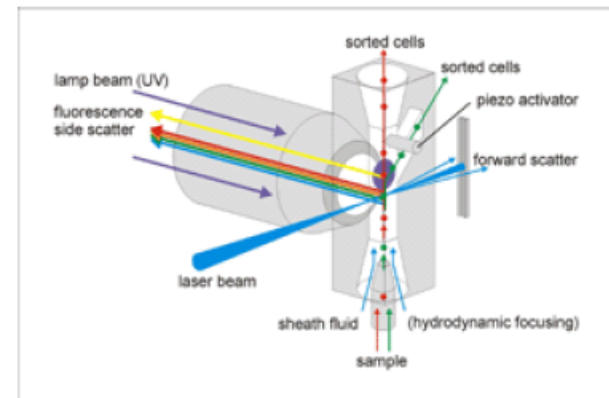
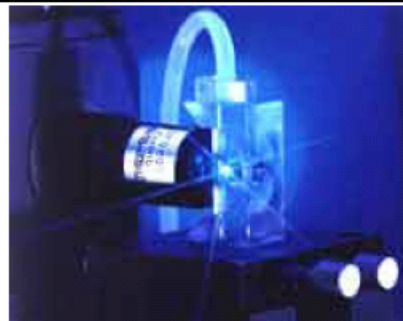


- Safety (enclosed stream)
- Gentle to cells
- Sorting of large particles ($>100 \mu\text{m}$)

Low speed ($\sim 100/\text{sec}$)

- Dilute sorted fraction
- Noisy

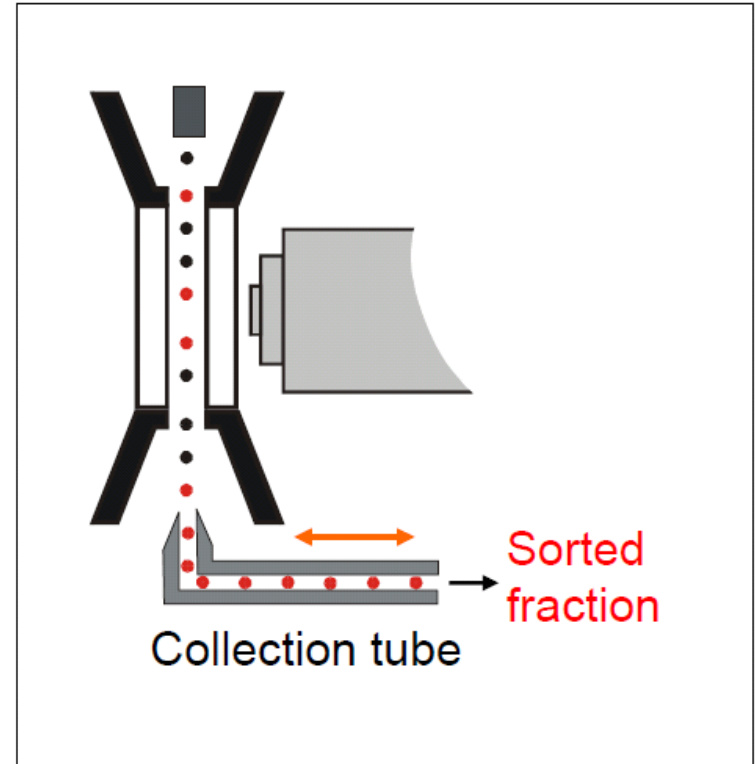
Used by: Partec



FLUIDIC SWITCH SORTER

- Safety (enclosed stream)
- Gentle to cells
- Low speed (~ 100 / sec)
- Dilute sorted fraction
- Noisy

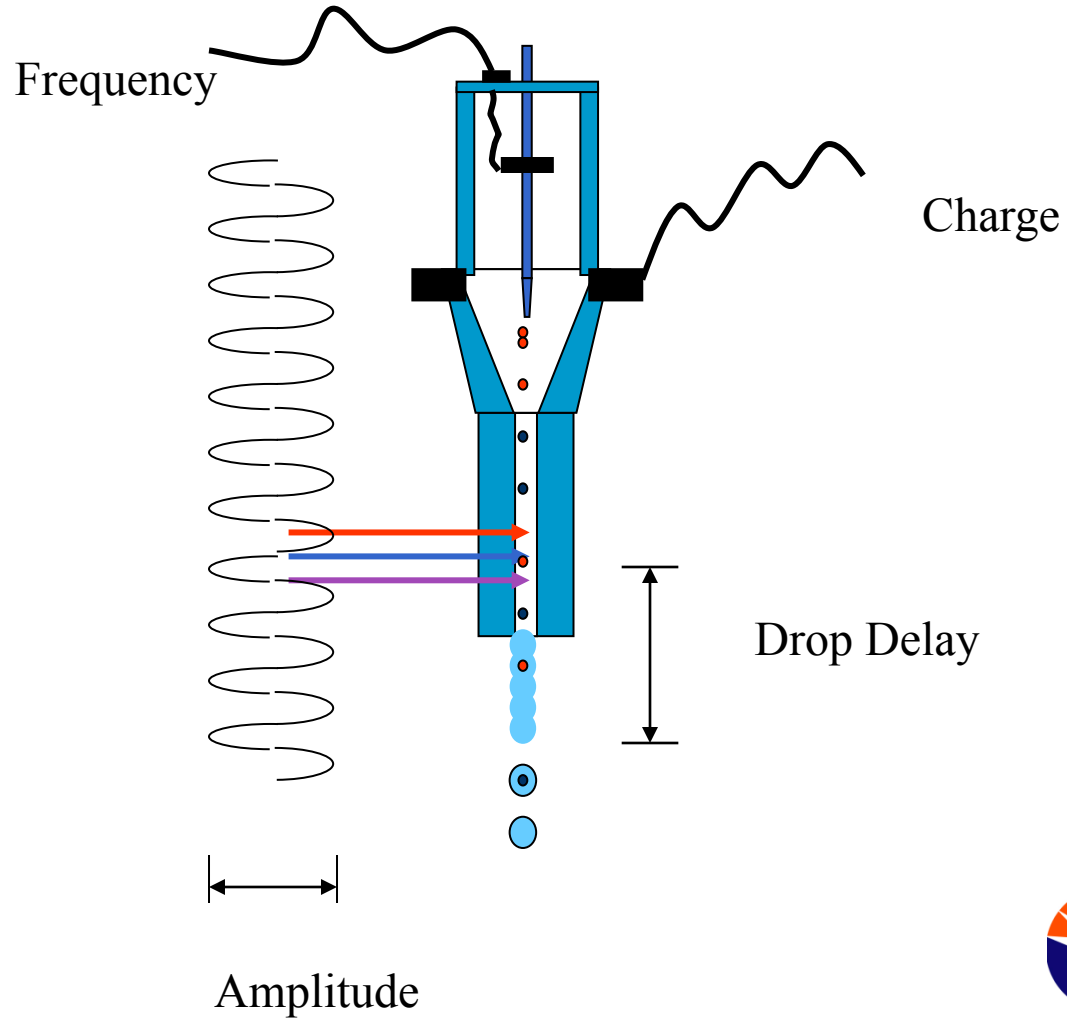
Used by: Becton Dickinson



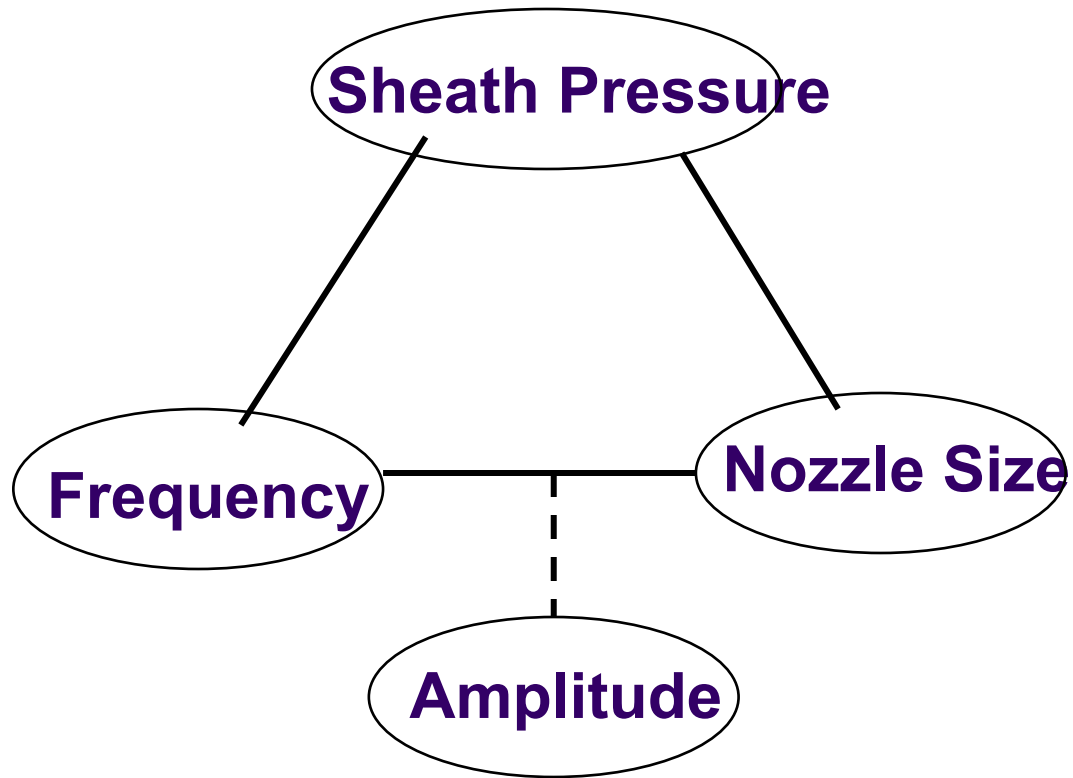
SORTING



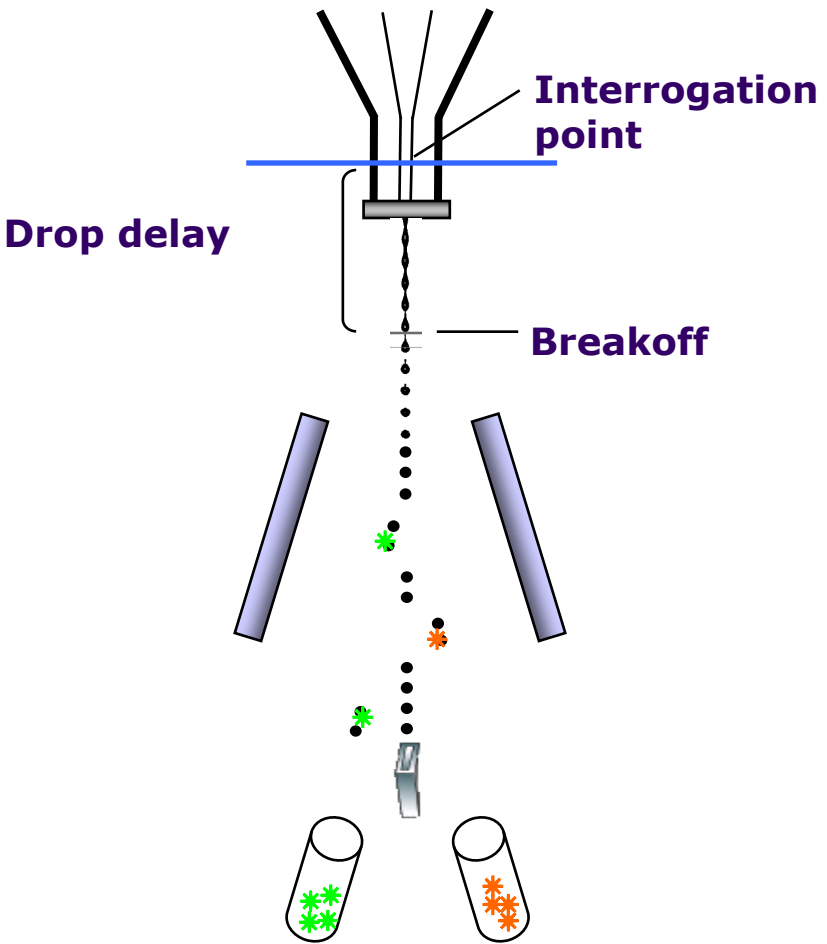
SORTING



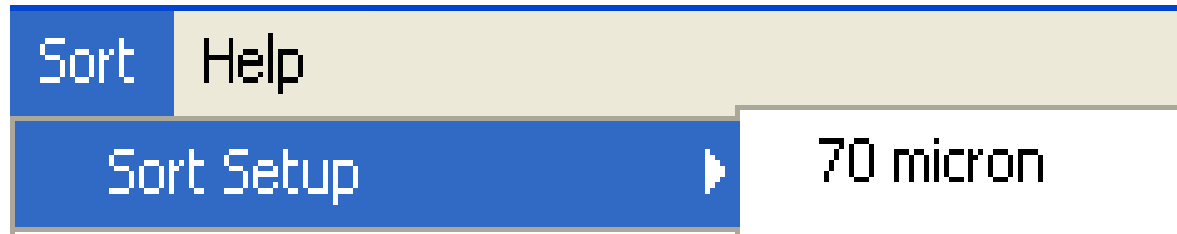
SORTING



SORTING



SORTING



Sort Setup mode	Default Sheath Pressure
70 micron 70 custom	70 psi
85 micron 85 custom	45 psi
100 micron 100 custom	20 psi
130 micron 130 custom	10 psi

- 70 micron
- 85 micron
- 100 micron
- 130 micron
- 70 custom
- 85 custom
- ◆ 100 custom
- 130 custom

SORTING

Each sort setup includes:

Sheath pressure

Breakoff window values

Side Stream window

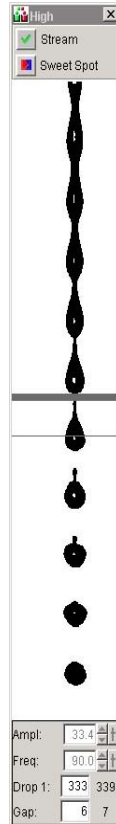
values

Table 3-2 Default Sort Setup values

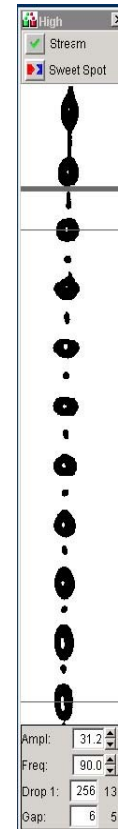
Setting	70 micron	85 micron	100 micron	130 micron
Sheath Pressure	70	45	20	10
Amplitude	60	32	12	24
Frequency	87	47	30	12
Drop 1	150	150	150	150
Gap (upper limit)	6 (14)	7 (17)	10 (21)	12 (21)
Attenuation	Off	Off	Off	Off
Drop Delay	47.00	30.00	27.00	16.00
Far left voltage	100	100	80	60



SORTING - Streams

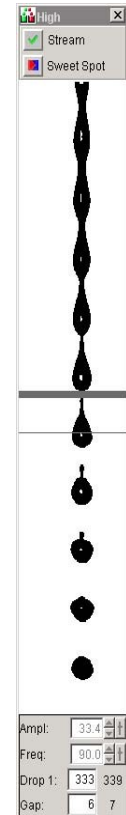
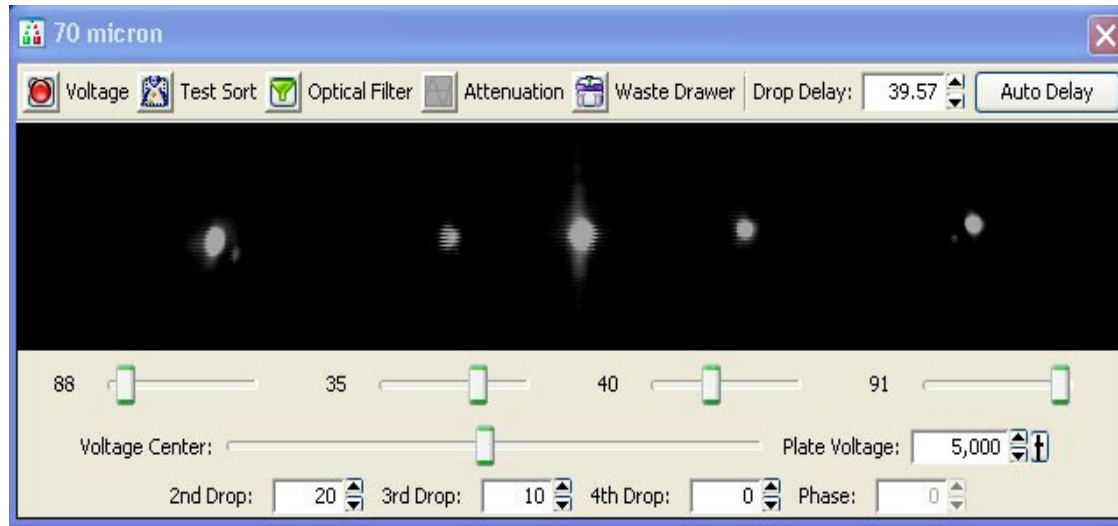


Good



Bad

SORTING – Setup Side Streams

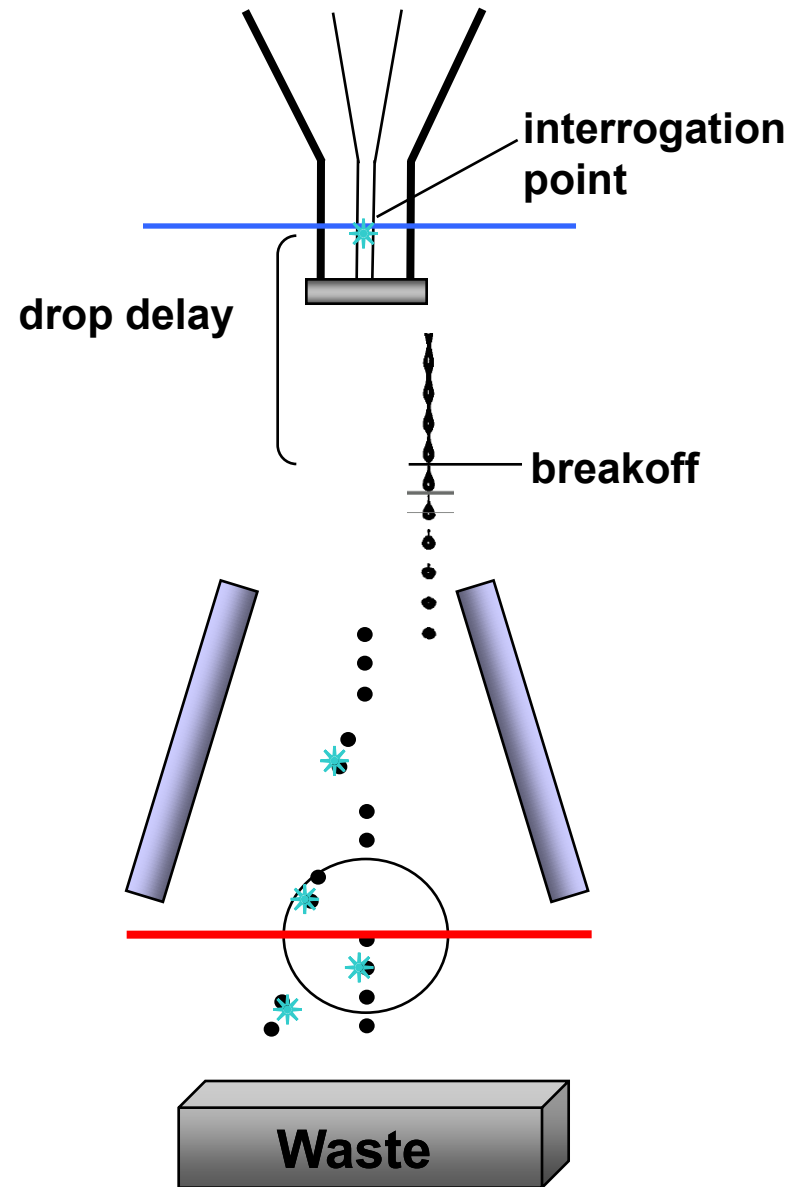


Drop Delay

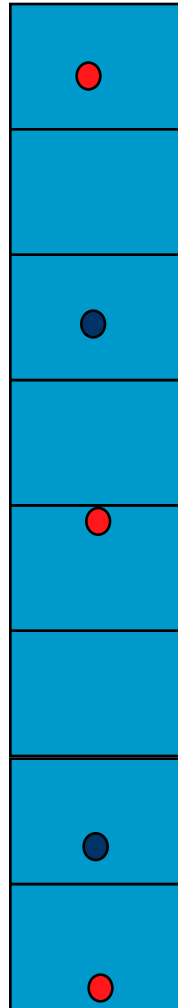
BD FACS™

Accudrop
technology

- Accudrop beads
- Diode laser
- Camera
- Optical filter

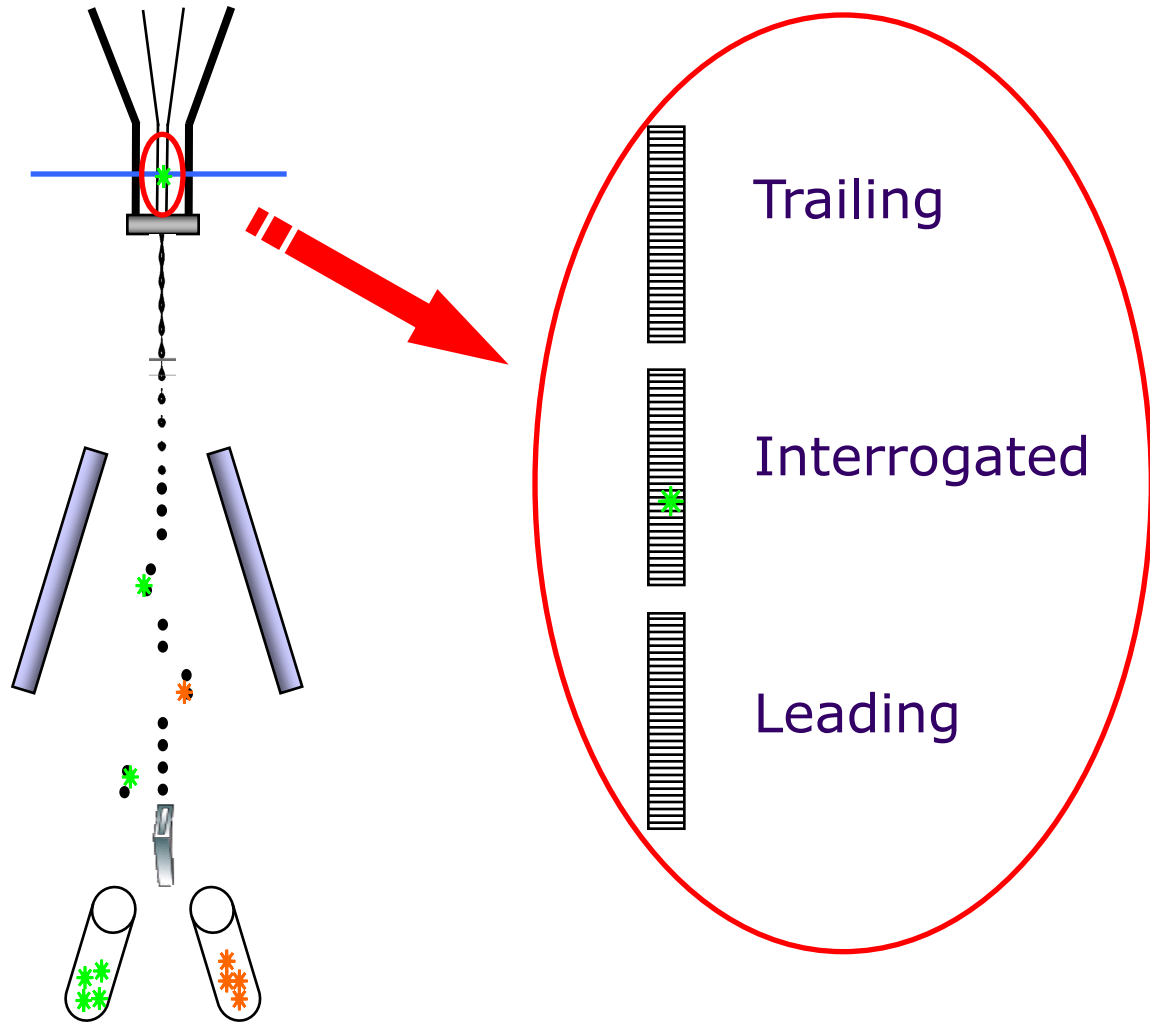


Sorting - Sort Masks



Cells are randomized
distributed over the stream

Sorting - Sort Masks

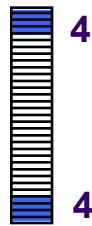


Mask

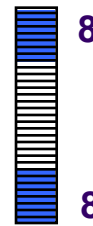
- A region of the stream monitored for the presence of cells
- Determines how drops will be deflected if a sorting conflict occurs
- Measured in 1/32 drop increments



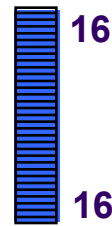
Mask = 0



Mask = 8



Mask = 16



Mask = 32

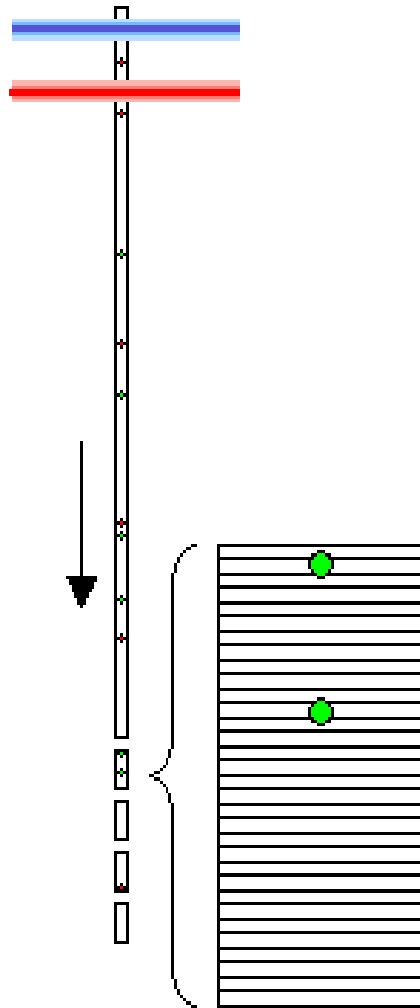
Conflict Resolution

- Precision modes include three types of masks
 - Yield
 - Purity
 - Phase

	Precision Mode				
	Purity	Yield	Single Cell	Initial	Fine Tune
Yield Mask:	32	32	0	32	0
Purity Mask:	32	0	32	0	0
Phase Mask:	0	0	16	0	0
Single Cell:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Sorting - Sort Masks

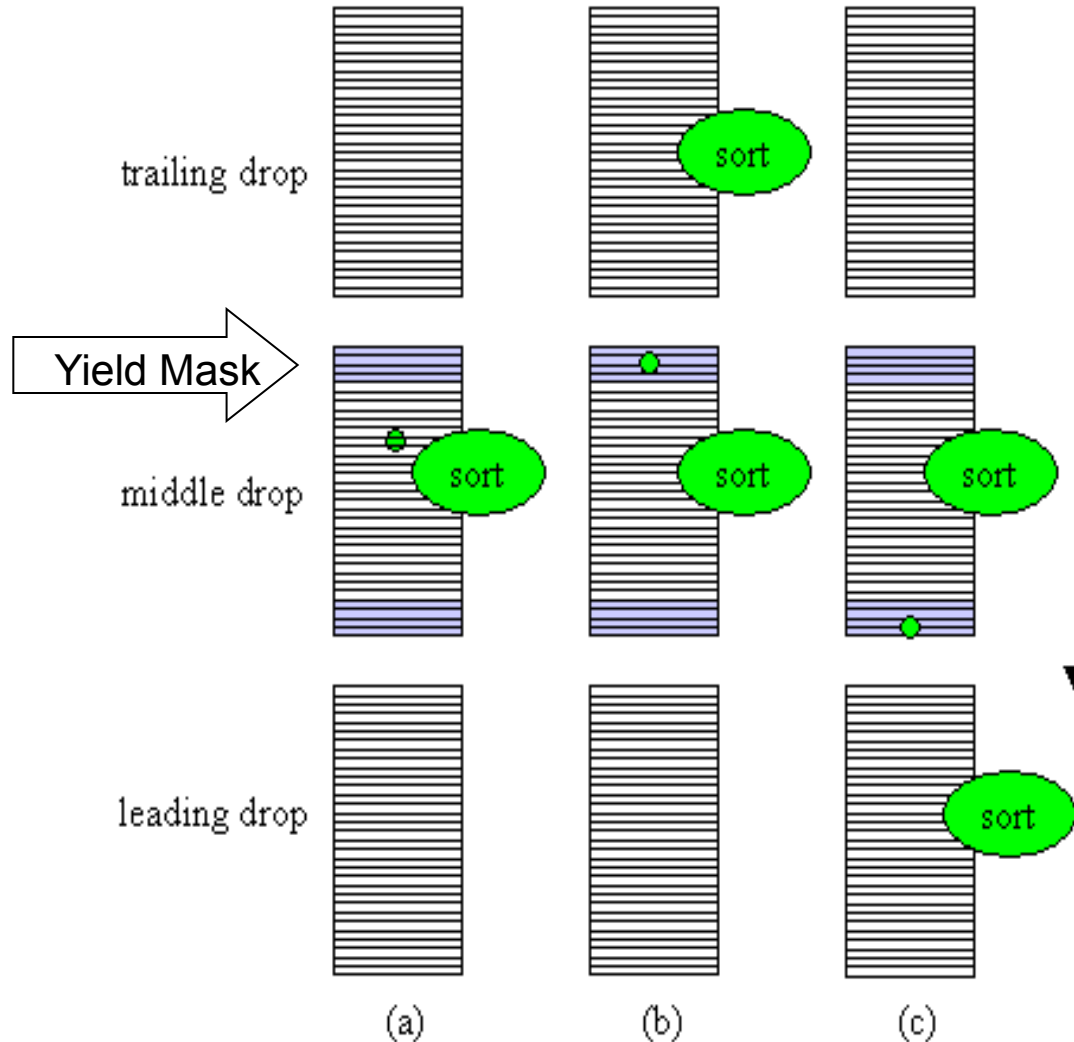
Sort decisions are determined by sort masks



Target particles in a drop with
1/32-drop resolution

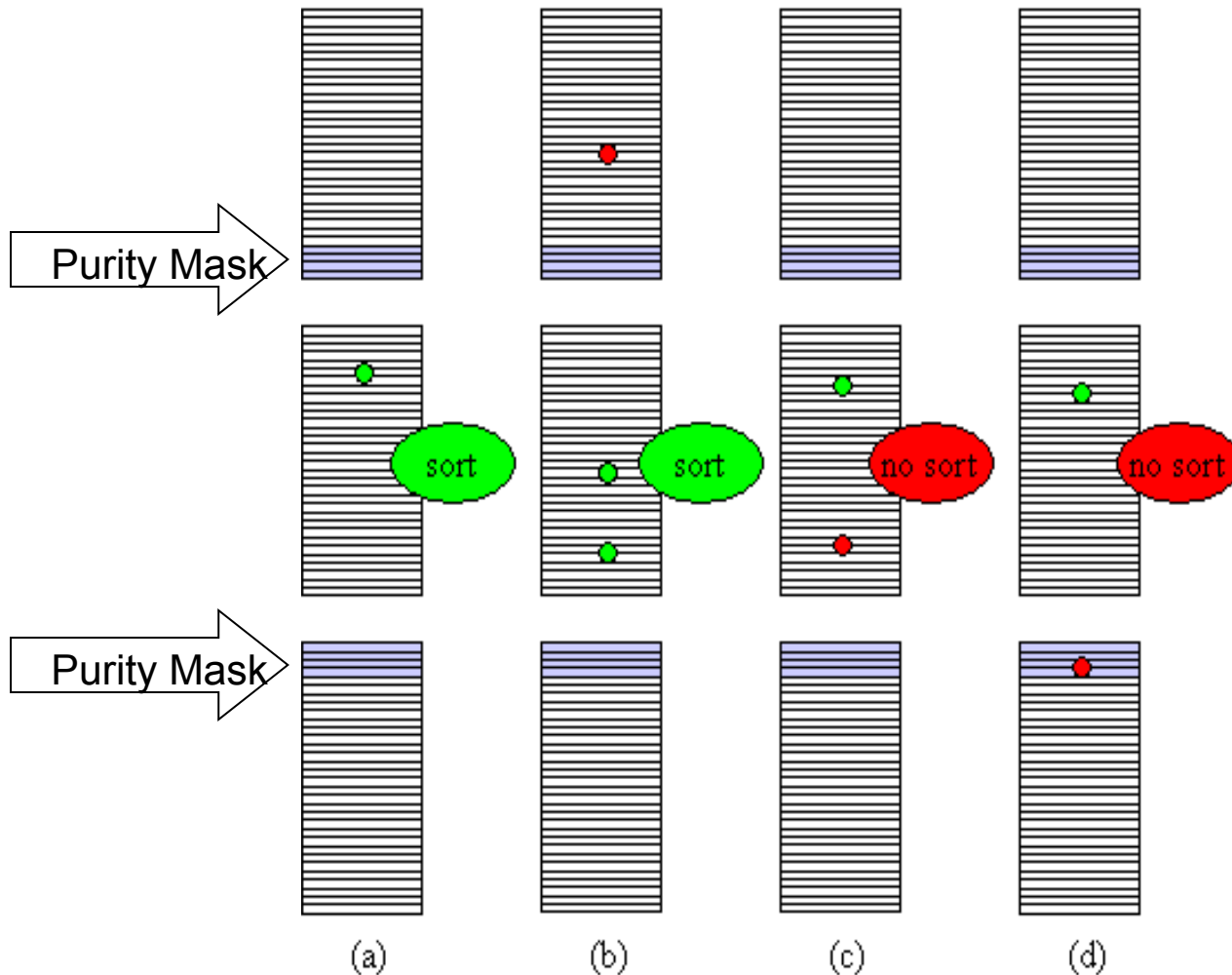
Sorting - Yield Mask

The yield mask defines how many drops will be sorted. Yield mask of 8/32 indicated in blue; target particle shown in green



Sorting - Purity Mask

Purity mask of 8/32 in blue, 4/32 in each adjacent drop;
target particles in green, non-target particles in red





Elektronika

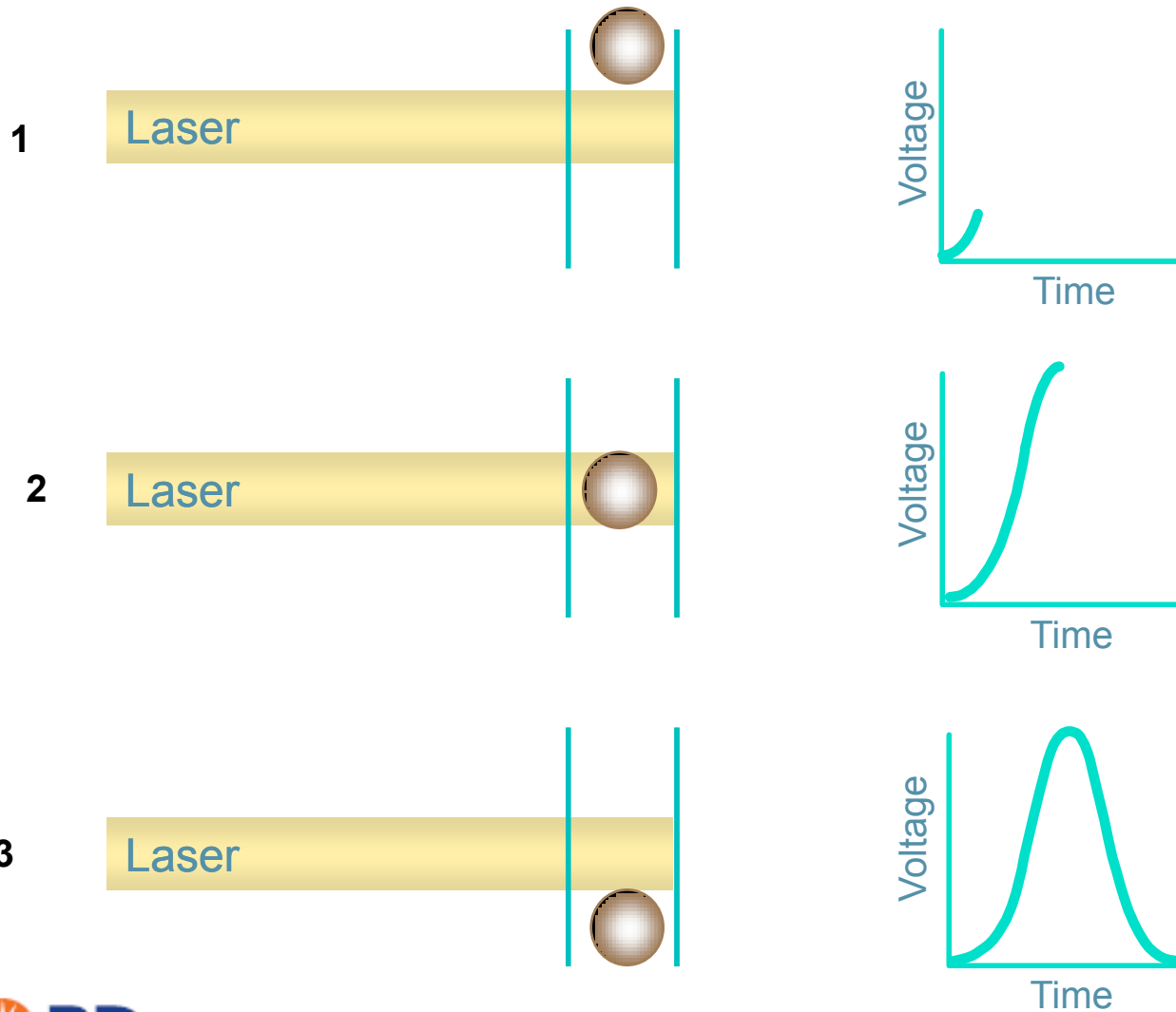
- Zpracování signálu z detektorů
 - Předzesílení
 - zesiluje signál pro přenos z detektorů do centralní elektronické části
 - Zesílení
 - úprava intensity signálu
 - lineární nebo logaritmické
 - Generování integrálu a šířky pulsu
 - Analog-digital konverze



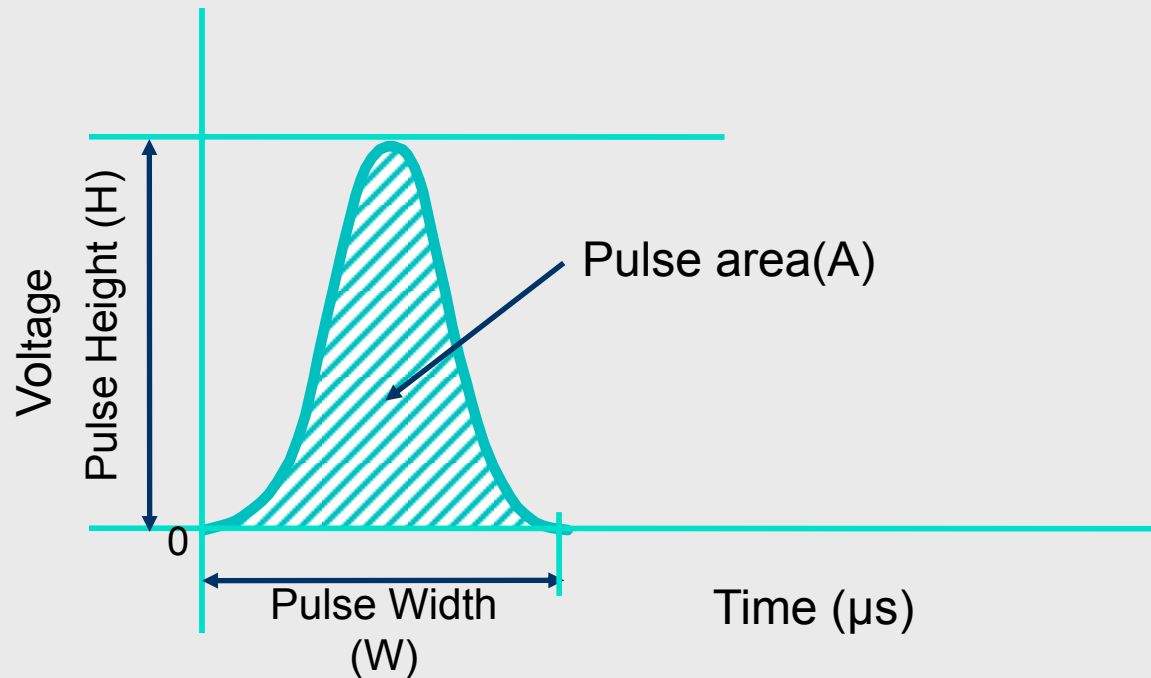
Sběr dat

- Data jsou sbírána jako “list” hodnot, pro každý “parametr” a pro každou “event” (buňku)
- každé měření z každého detektoru je označeno jako “parameter”

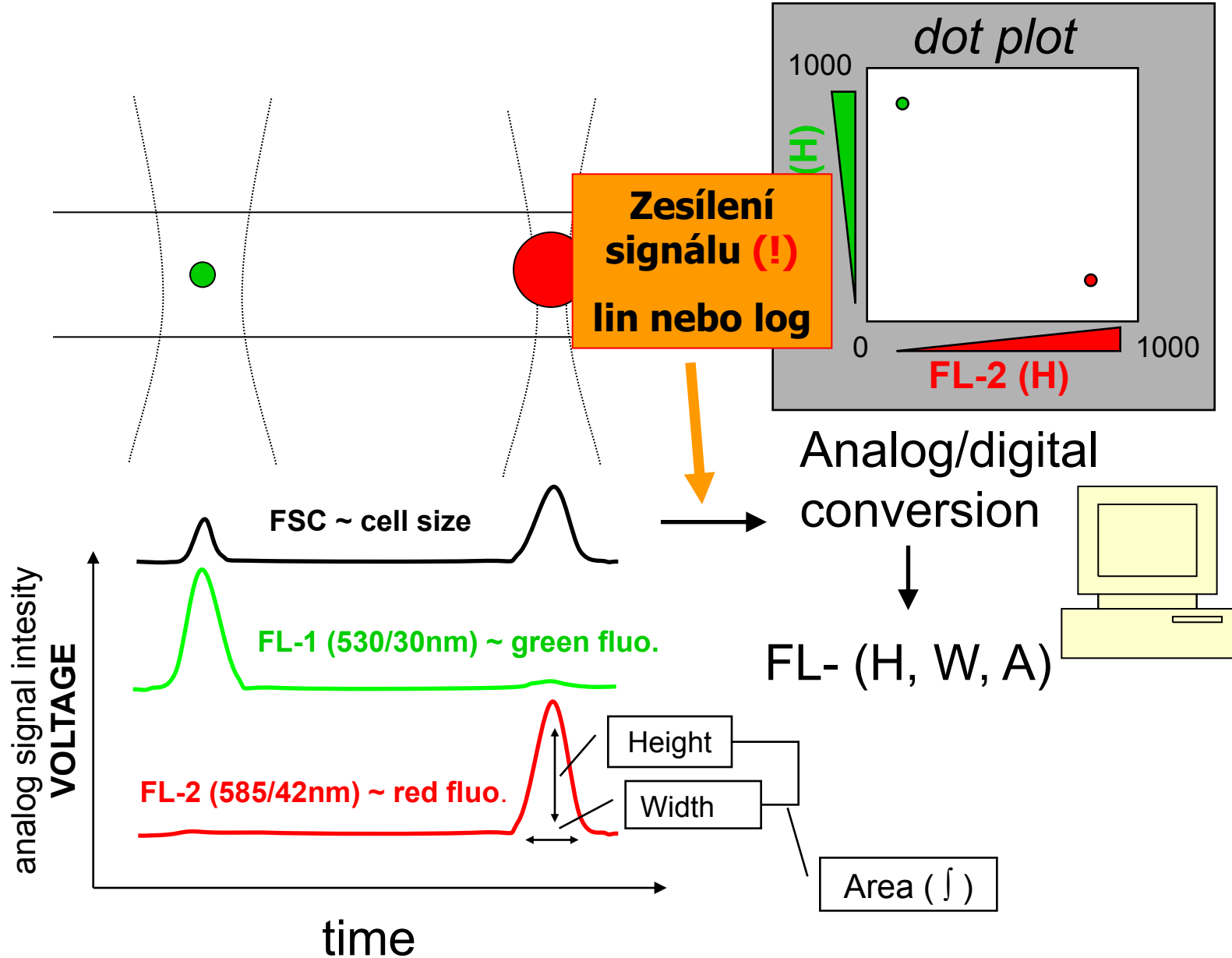
Creation of a Voltage Pulse



Height, Area, and Width



Signal processing



Data Acquisition - Listmode

<i>Event</i>	<i>Param1</i> <i>FS</i>	<i>Param2</i> <i>SS</i>	<i>Param3</i> <i>FITC</i>	<i>Param4</i> <i>PE</i>
1	50	100	80	90
2	55	110	150	95
3	110	60	80	30



Charakteristiky pulsu

- Pulsy detekované na průtokovém cytometru jsou analogové jevy detekované pomocí analogových zařízení
- Tyto pulsy trvají několik mikrosekund
- Pokud nemůžeme digitalizovat tento puls v reálném čase musíme kombinovat analog-digitalní zpracování pulsu
- běžně trvalo několik mikrosekund digitalizovat puls – to nebylo dostatečně průchodné pro vysokorychlostní sběr dat
- Nové – plně digitální systémy mohou digitalizovat puls přímo pomocí MHz frekvence



Zpracování signálu: detekce píku

- Protože analogový puls je velice krátký (μs) je nabití kondenzátoru jediným způsobem jak zadržet.
- Kondenzátor je paměť pro puls.
- Pro detekci píku (maxima) jsou kondenzátory nabíjeny v obvodu umožňujícím detekci zesilujícího signálu.



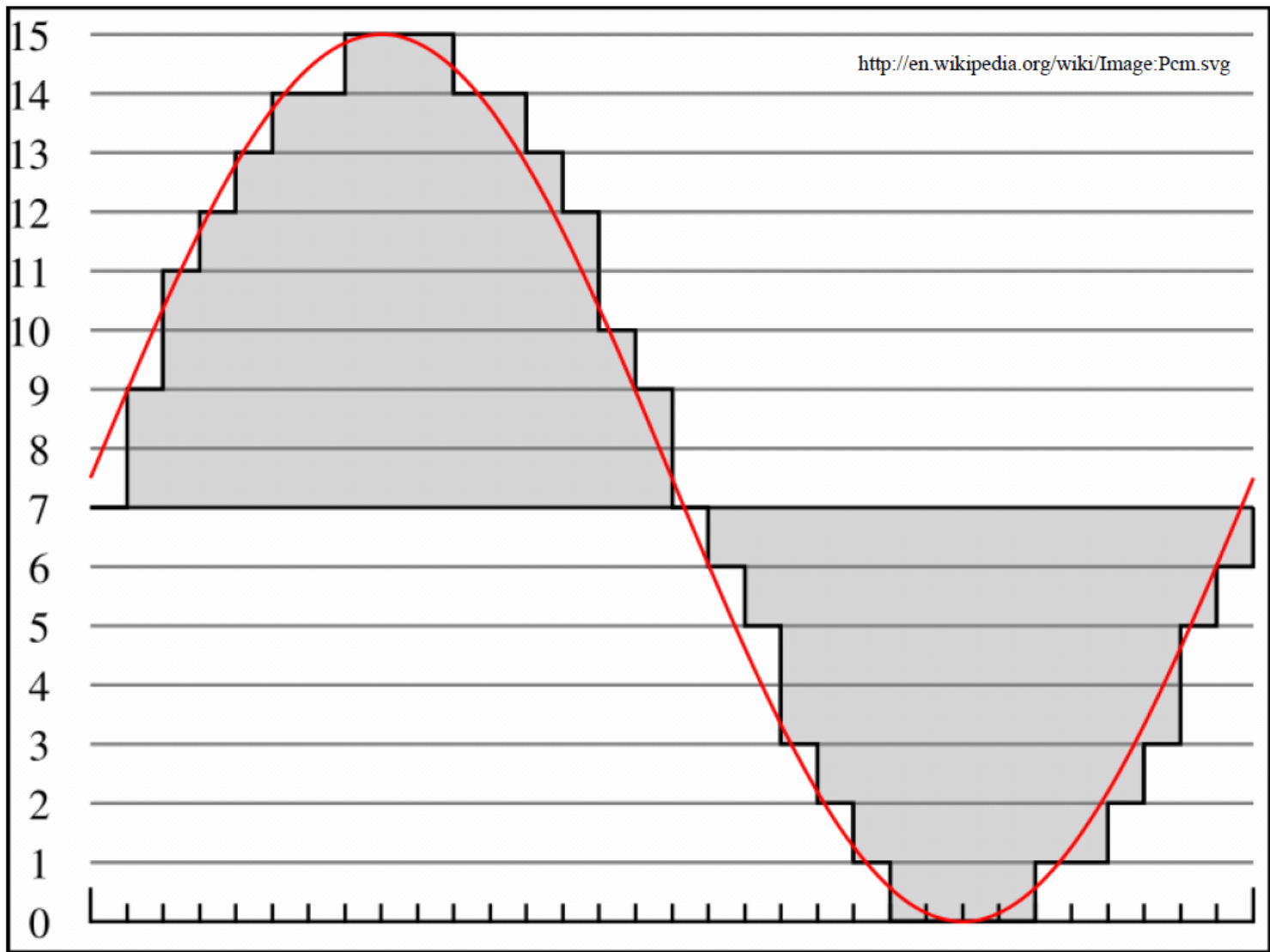
Měření integrálu a šířky (width) píku

- V obvodu integrátoru odpovídá nabití kondenzátorů integrálu signálu mezi resetem a držením signálu.
- Šířka píku je detekována nabitím kondenzátoru připojeného k lineárnímu generátoru který spíná na začátku pulsu a vypíná při dosažení minima. Napětí na kondenzátoru pak odpovídá době trvání pulsu.



Analogově-digitální převod

- Analogový signál musí být konvertován na digitální puls, aby bylo umožněno jeho další zpracování
- Pomocí analog-digitální konverze (ADC) – analogový vstup/digitální výstup
- Obvod rozděljuje signál do předvolených kanálů
- 8 bitů = 256 kanálů
- 10 bitů = 1024 kanálů



4 bitová pulzně kódová modulace analogového signálu

$$2^4=16$$



Lineární a logaritmický obvod

- lineární
- logaritmický
- dynamický rozsah
- kompenzace fluorescenčního signálu

Lineární obvody

- výstupní signál odpovídá (poměrově) vstupnímu signálu
- detekce signálu založeného na kvantitativním vztahu (DNA značení) vyžaduje 10 bitové rozlišení
- vyšší přesnost vyžaduje vyšší množství bitů
- současná zařízení mají rozlišení 4 řádů v logaritmické škále - ADC musí mít schopnost rozlišení nejméně 1/10,000 což odpovídá 1 mV v 0-10 V škále.
- pro dosažení této přesnosti je nutné 14ti bitové rozlišení

$$2^8 = 256$$

$$2^{10} = 1024$$

AD převodníky

Počet bitů	# kanálů	rozlišení
8	256	39.1 mV
10	1024	9.77 mV
12	4096	2.44 mV
14	16384	610 μ V
16	65536	153 μ V
18	262144	38.1 μV
20	1048576	9.54 μ V
22	4194304	2.38 μ V
24	16777216	596 nV

Full scale measurement range = 0 to 10 volts

ADC resolution is 12 bits: $2^{12} = 4096$ quantization levels

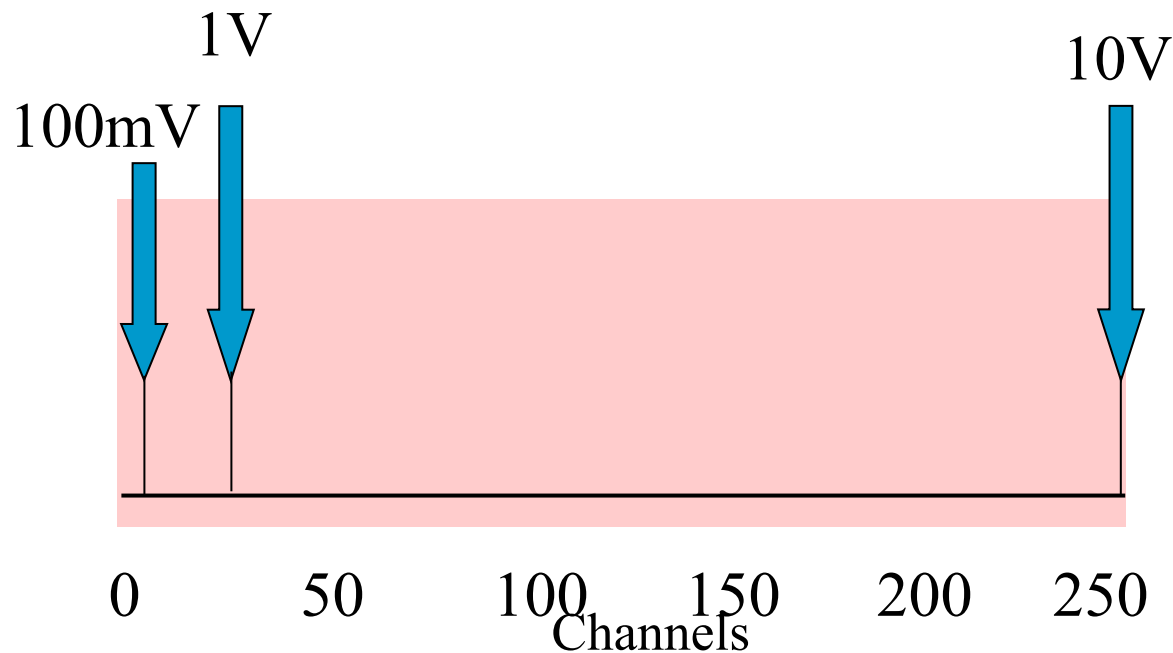
ADC voltage resolution is: $(10-0)/4096 = 0.00244$ volts = 2.44 mV

Proč používat lineární obvody?

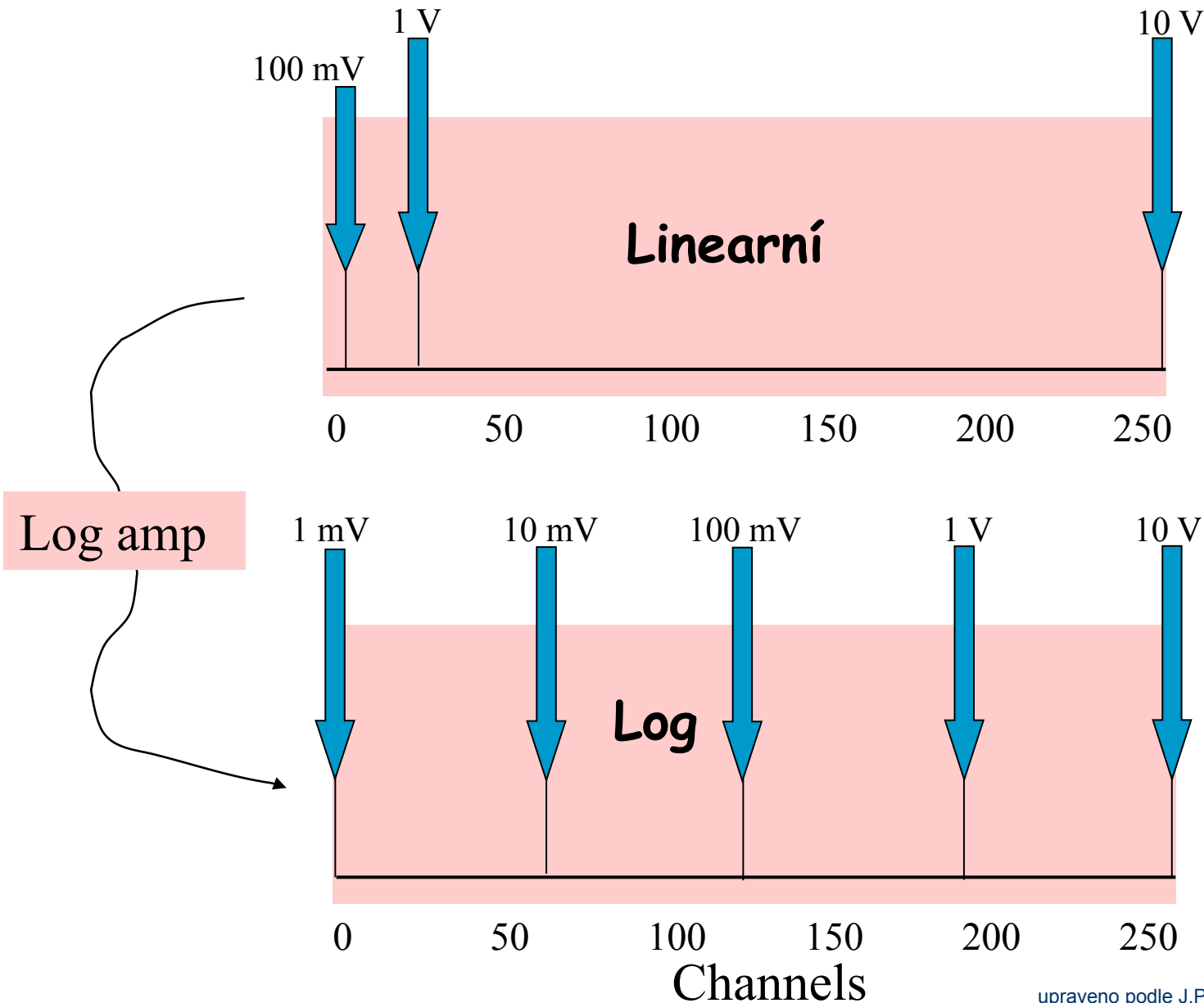
- Kompenzace signálu musí být prováděny na lineárních datech. Tzn. že celá elektronika musí být lineární (> 14-ti bit ADC) nebo musí být doplněn speciální obvod mezi předzesilovač a display.
- Pro imunologické fenotypizace potřebujeme velký dynamický rozsah.
- průtokový cytometr zesiluje signál na hodnoty mezi 0-10 V před ADC.

Kolik bitů?

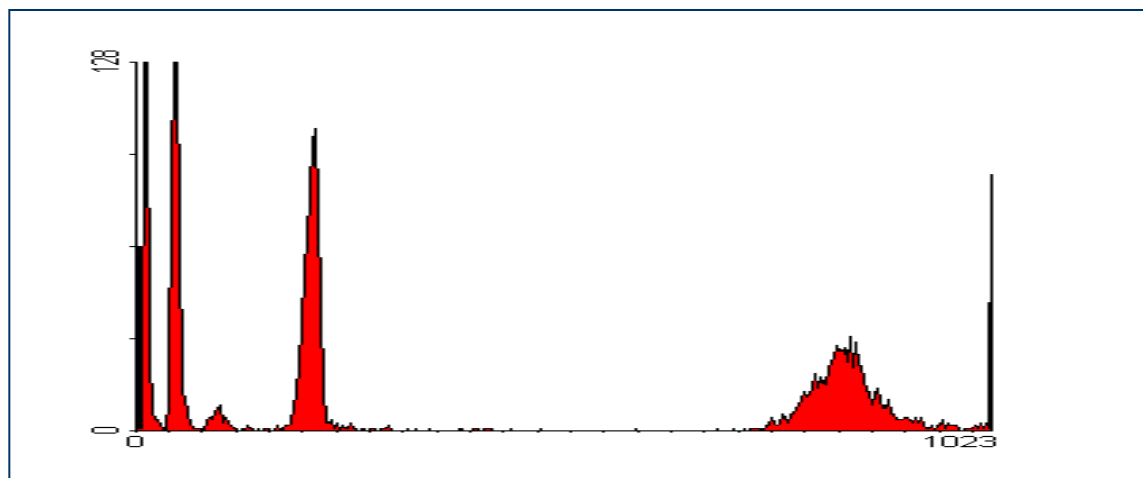
- Pokud konvertujeme analogový signál pomocí 8 bitového ADC – máme 256 kanálů ($2^8=256$) odpovídajících rozsahu 0-10 V
- Rozdíl mezi kanály je $10/256 \approx 40\text{mV}$



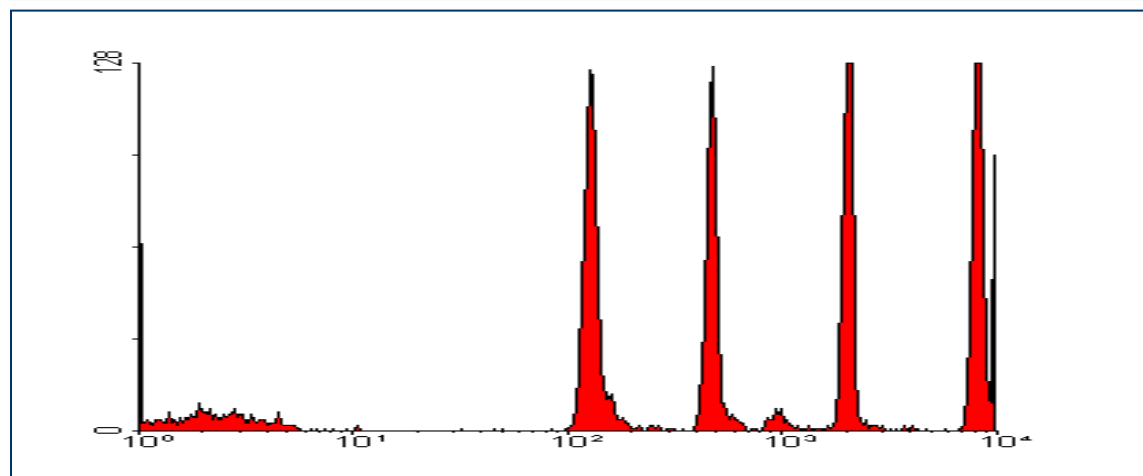
Ideální logaritmický zesilovač



Logaritmické zesílení & dynamický rozsah



lin



log

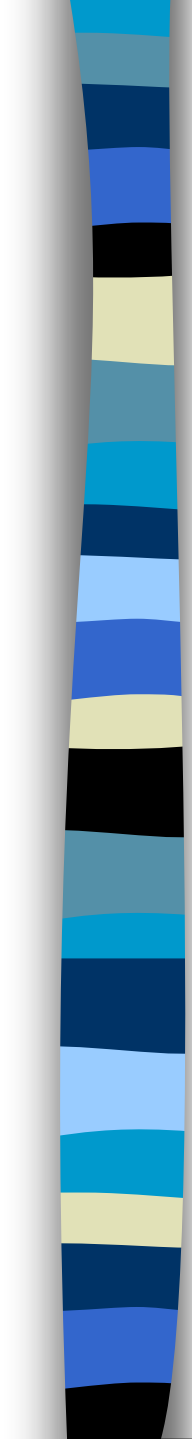
„Ratio circuits“

- jsou analogové obvody generující výstupní signál odpovídající poměru ze dvou vstupních signálu (dvou detektorů)
- Tvořeno speciálními moduly tzv. analogové násobiče.
- např. pro výpočet povrchové denzity navázaných antigenů dělíme počet navázaných molekul velikostí povrchu buněk (není běžné)
- **Detekce intracelulárního pH**
- **Detekce intracelulárních Ca^{2+}** (Indo-1)
- lze také kalkulovat pomocí speciálních softwarových nástrojů



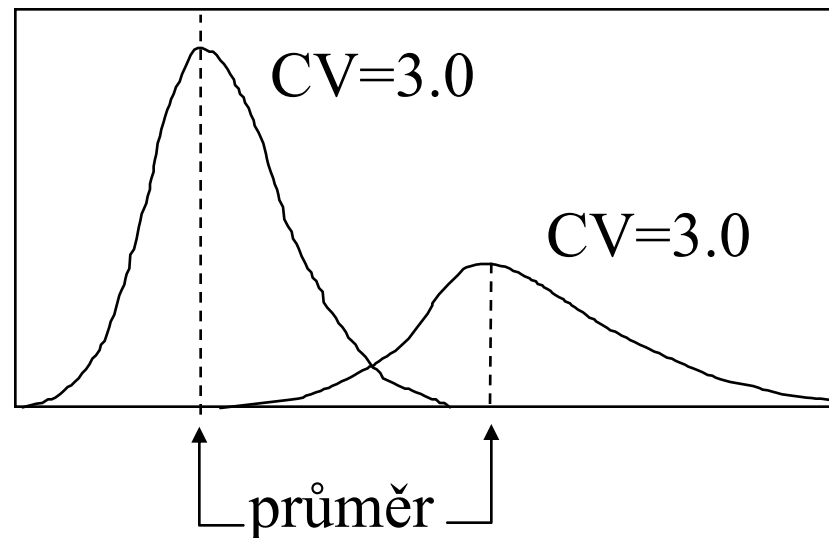
Kompenzace fluorescenčního signálu

...později

- 
- přesnost – koeficient variance (CV)
 - citlivost, šum, pozadí
 - MESF jednotky
 - Přesnost a linearita

Koeficient variance

$$\%CV \text{ definice} = \frac{\text{St.chyba} \times 100}{\text{průměr}}$$



Klíčové pro jeho hodnotu je:

- stabilita fluidního systému
- obarvení (označení) buněk

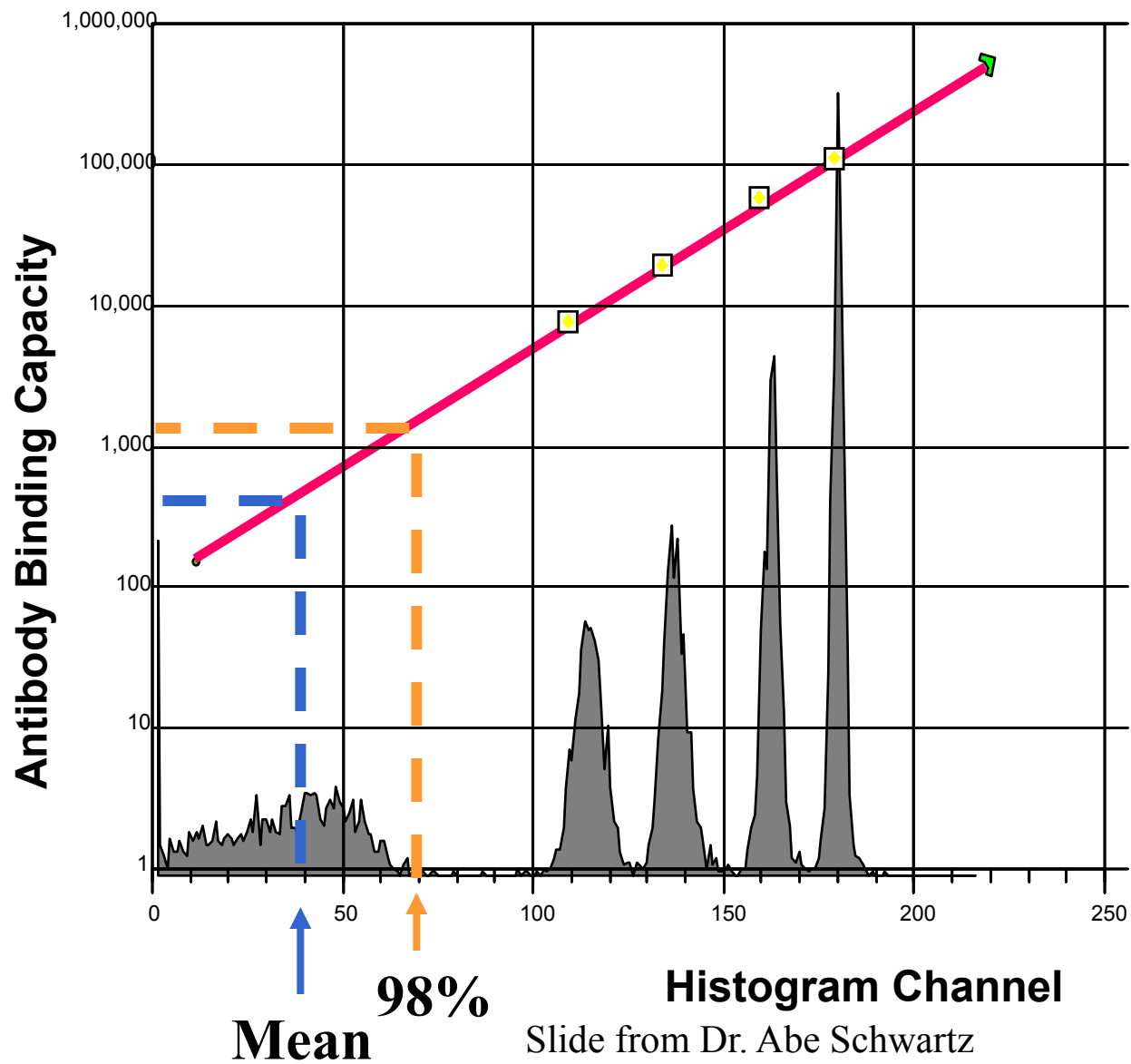


Kvantitativní jednotky - ABC

Antibody Binding Capacity

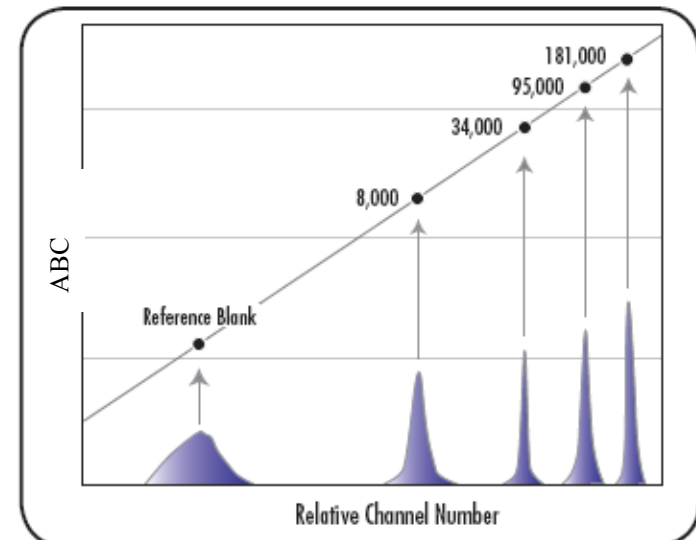
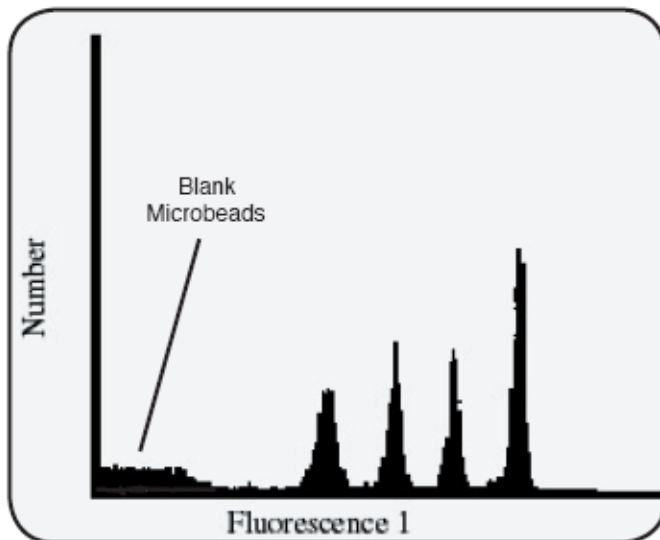
- množství protilátky, které se specificky váže na populaci buněk (nebo mikročástic)
- pozn.: Hodnota ABC nemusí odpovídat skutečnému množství antigenů na povrchu buněk nebo částic

Detekce prahu (šumu)



Určení ABC

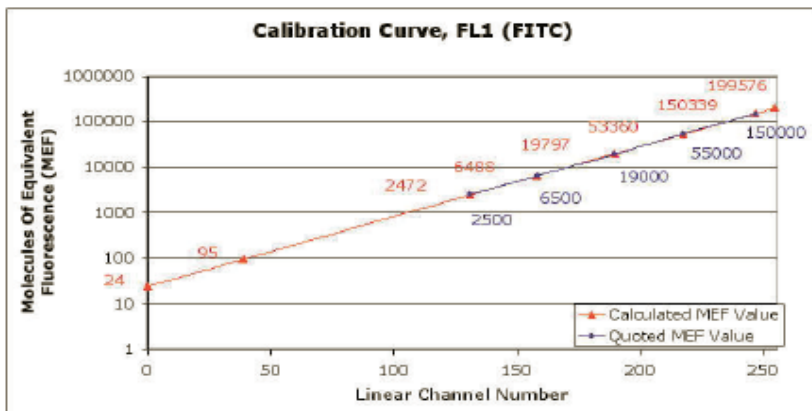
Quantum™
Simply Cellular®
Mouse Antibody-Binding Standards





Proč je důležité určit práh?

- určuje nejnižší množství značky (protilátky) detekovatelné přístrojem
- určí, zda pozadí (šum) interferuje s analýzou



Performance Parameter	Value
r^2	0.9997
Coefficient of Response	65
Detection Threshold	95
Zero Channel	24
Maximum Fluorescence	199576
Log Decades	3.94
Average Residual %	1.73

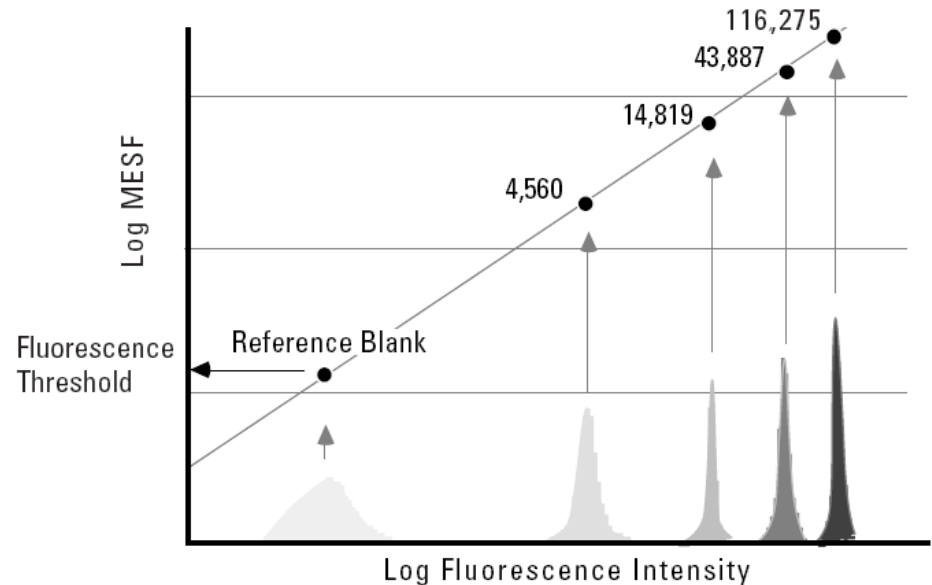
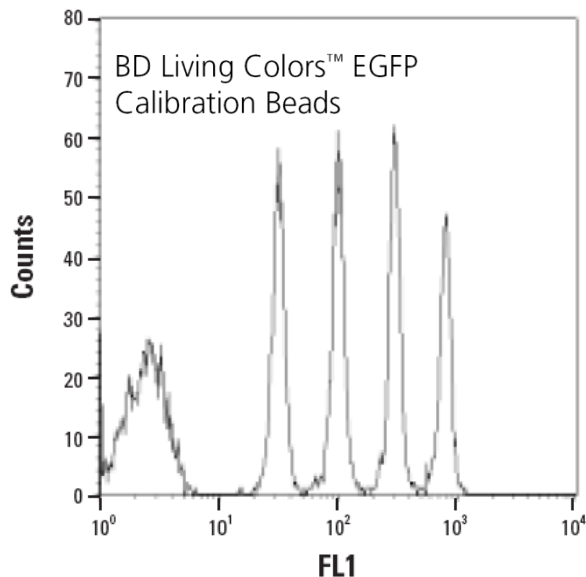
Figure 1. Calibration Curve and Calculations for FL1 Channel (FITC)

Table 1. Performance Parameters

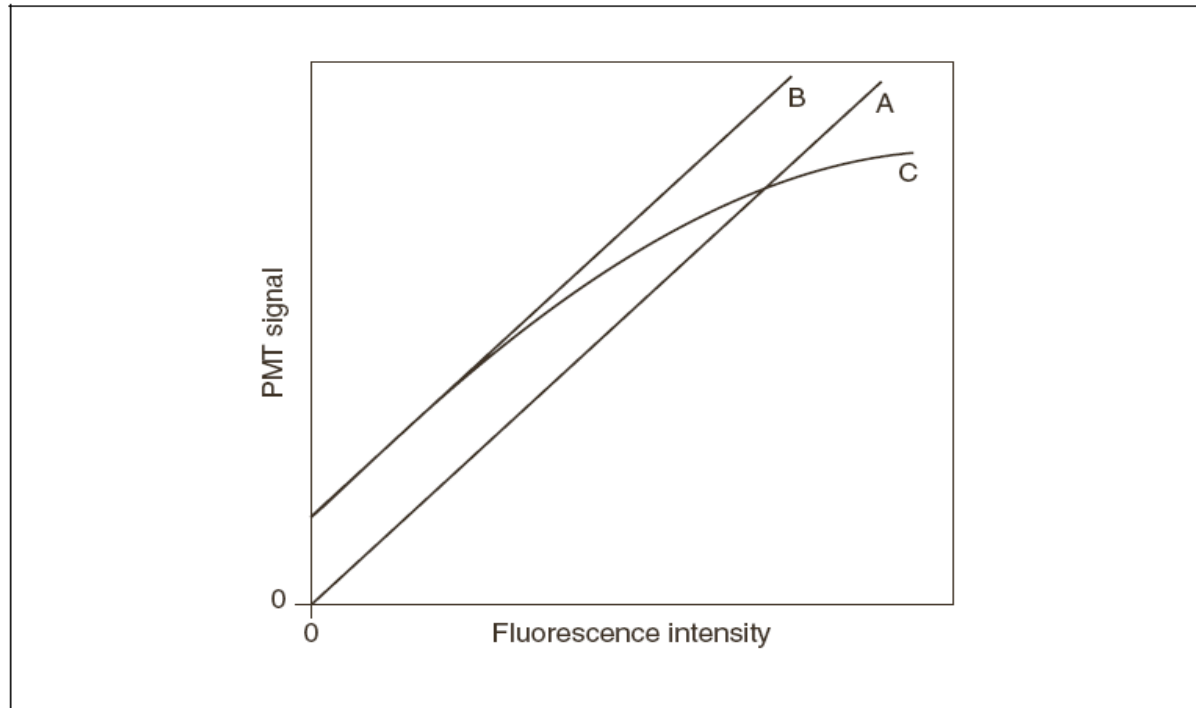
Average Residual %	The absolute average % that the calculated regression line varies from the actual data points. Indication: The fit of the calibration line and the confidence of the instrument's response across the fluorescence range.
Detection Threshold	The value of the blank bead in units of fluorescence intensity. Indication: The lowest level of fluorochrome that can be detected by the instrument.
Coefficient of Response	The slope of the calculated regression line, determined using a 256-channel scale. Indication: The range of sample space covered by the instrument. For a four-log- decade instrument, the coefficient of response should theoretically be 64. ($256/4 = 64$).
Zero Channel	The value in units of fluorescence intensity where the calculated regression line intercepts the fluorescence intensity axis in channel zero. Indication: The left-hand boundary of the instrument's sample space.
Maximum Fluorescence	The value in units of fluorescence intensity where the calculated regression line intercepts the fluorescence intensity axis in channel 255. Indication: The right-hand boundary of the instrument's sample space.
Log Decades	Calibrated full-scale or dynamic range of the detector being examined.

MEFS Units

- Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome (MESF) Units
 - metoda pro určení citlivosti přístroje (Abraham Schwartz)
 - směs částic označených známým množstvím molekul fluorescenční značky
 - práh určený pomocí MESF znamená nejmenší detekovatelné množství fluorochromu (BD FACS Aria II 85 MEFS – FITC)



Linearita detekce



- praktický příklad nelinearity může být během měření množství DNA v buňkách v G0/G1 a G2/M fázi buněčného cyklu
- lze použít mikročástice nebo jiné vnitřní standardy pro kalibraci



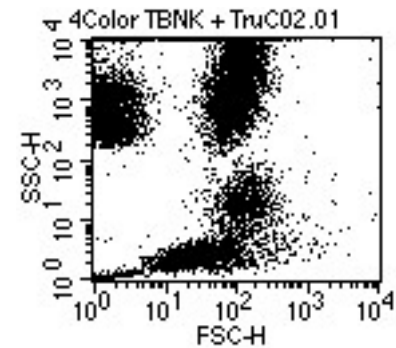
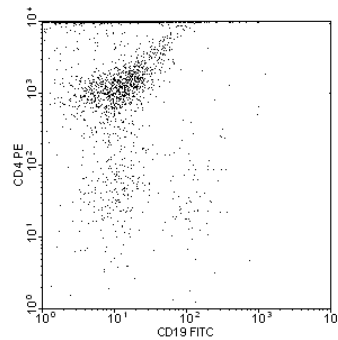
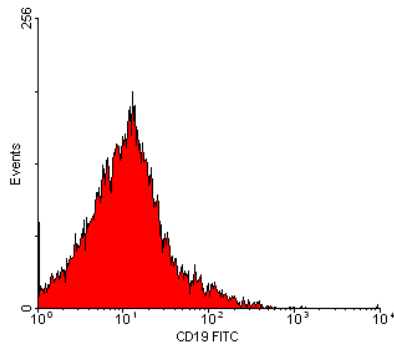
Analýza dat

■ Zobrazení dat

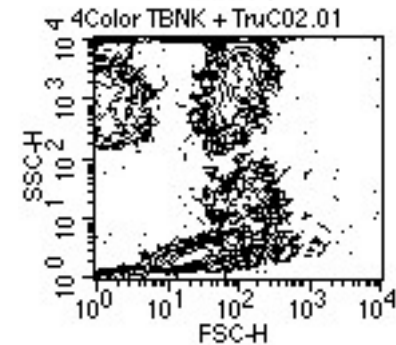
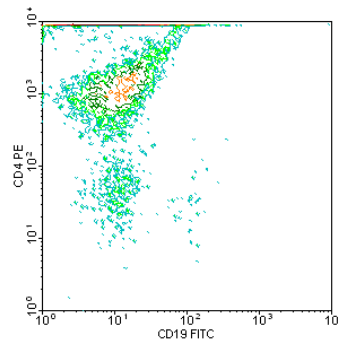
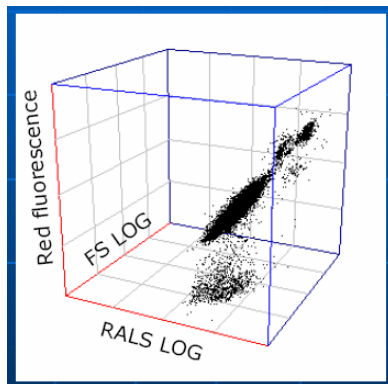
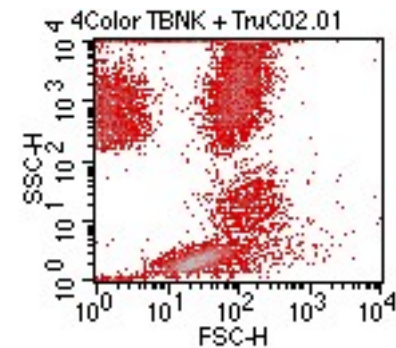
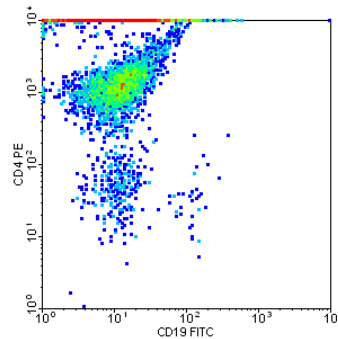
- histogram
- dot plot
- isometric display
- contour plot
- chromatic (color) plots
- 3 D projection

■ Gating

Způsoby pro zobrazení dat

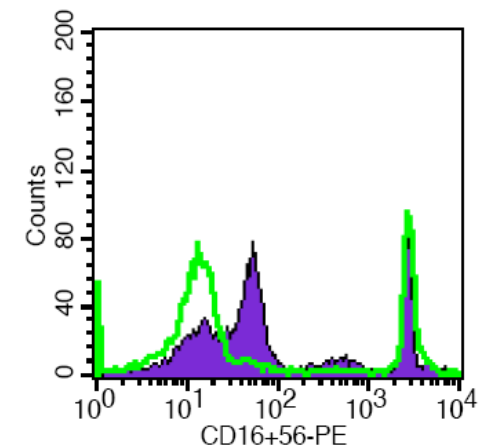
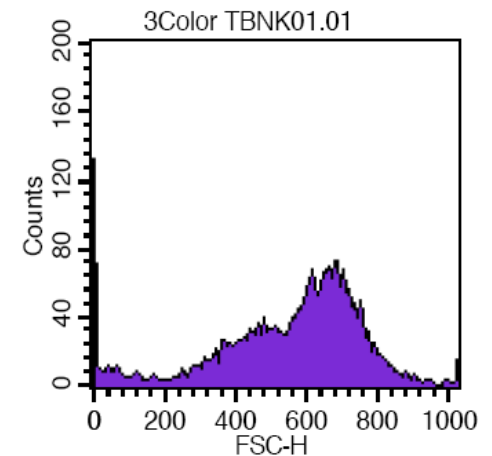


4Color TBNK + TruC02.01



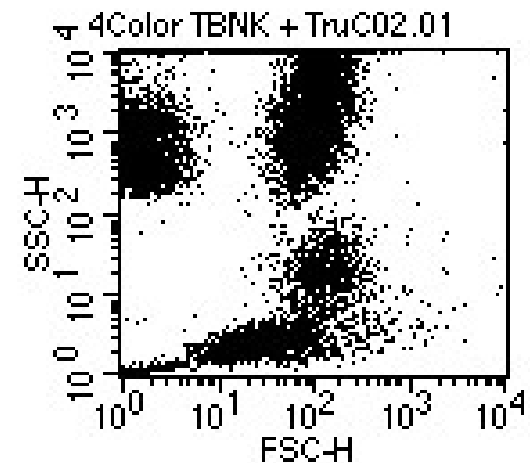
Histogram distribuce četnosti

- Histogram zobrazuje četnost částic pro jeden parametr
- Jednoduchý výstup
- Nekoreluje s dalším parametrem
- Problém s identifikací populací



Dot plot

- Zobrazuje korelaci dvou libovolných parametrů
- Jednotlivé tečky představují konkrétní změřené buňky (částice)
- Hodnoty pro řadu částic mohou ležet ve stejném místě
- Nemáme informaci o relativní denzitě částic
- Problémy s vykreslením v případě velkých objemů dat



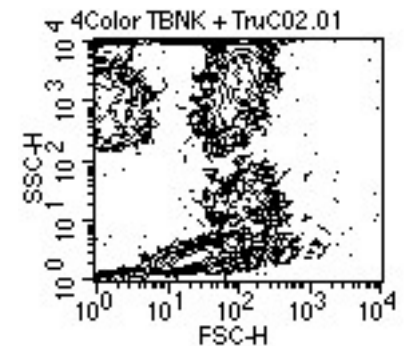
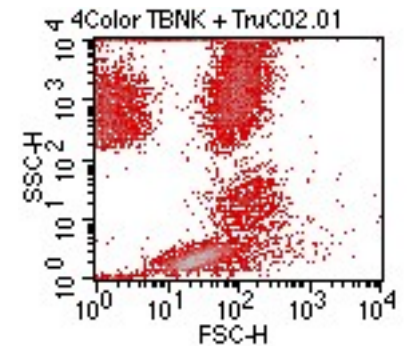
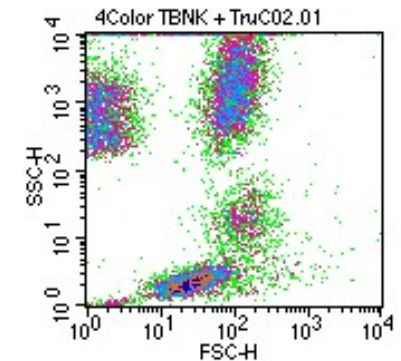
Density & contour plot

Density plot:

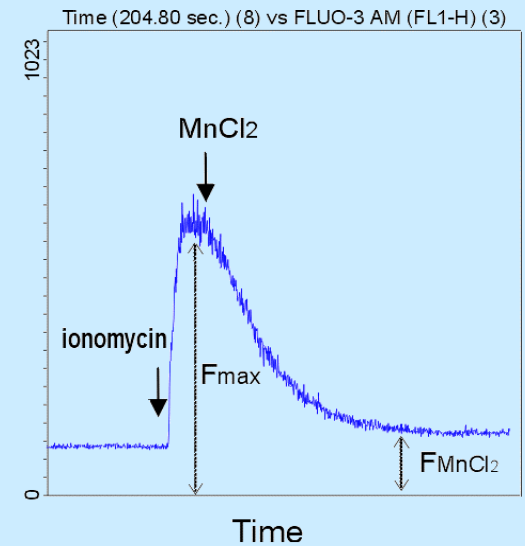
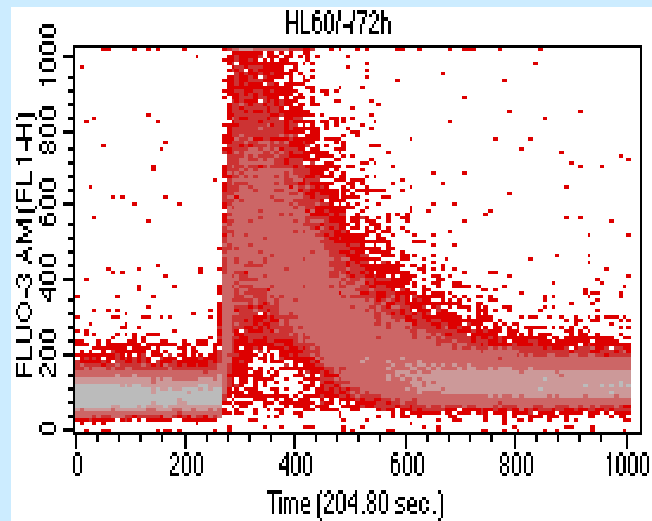
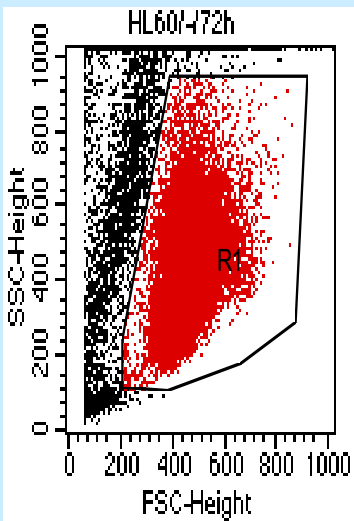
- Zobrazuje dva parametry jako frekvenci četnosti
- barva a nebo její odstín odpovídá četnosti částic

Contour plot:

- spojnice spojuje body (částice) se stejnou hodnotou signálu
- V podstatě simulujeme 3D graf – třetí rozměr je frekvence



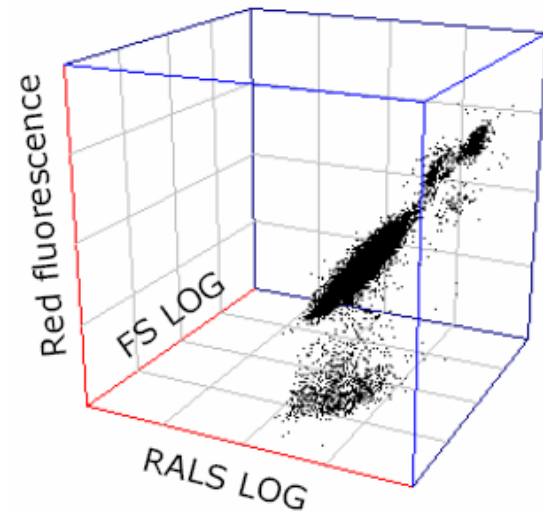
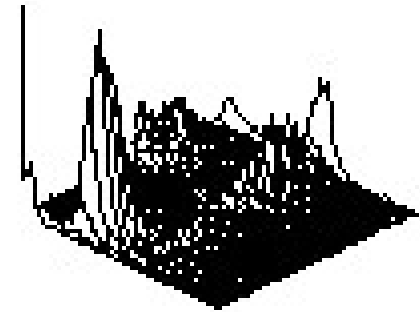
Čas jako jeden z parametrů



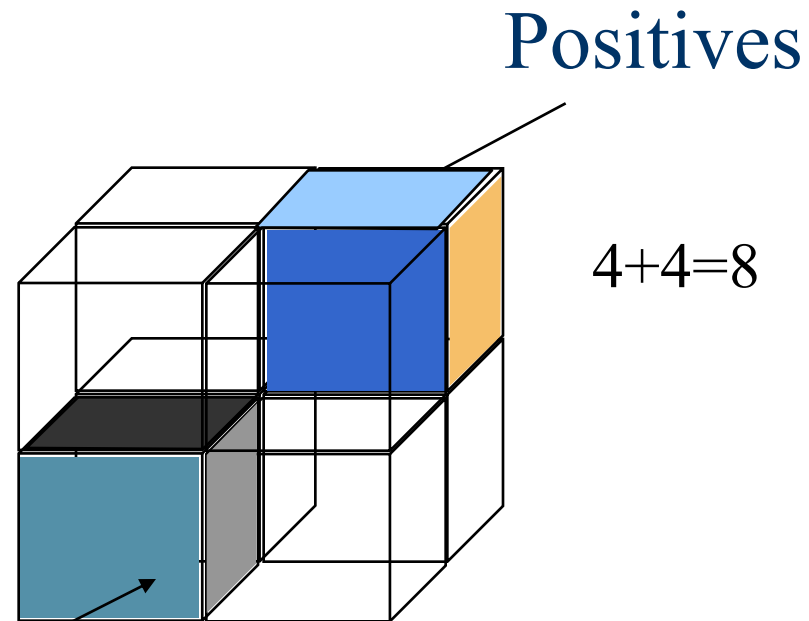
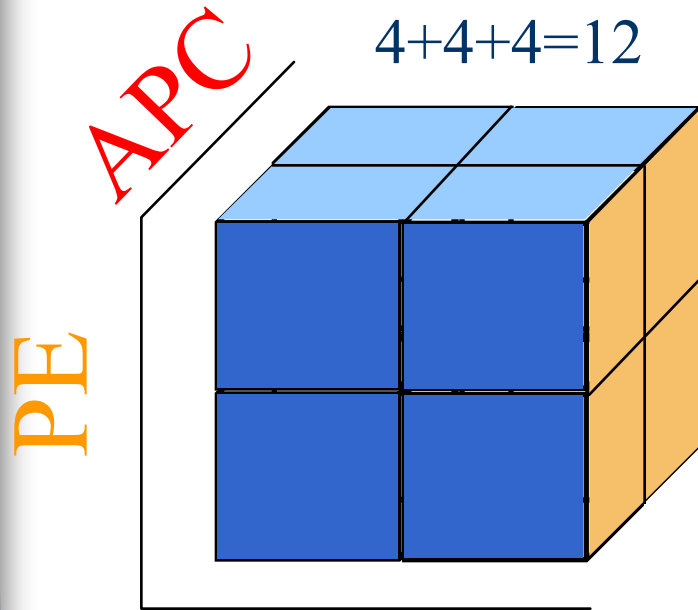
3D zobrazení

- 2 parametry + četnost
- 3 parametry společně

4Color TBNK + TruCO2.01

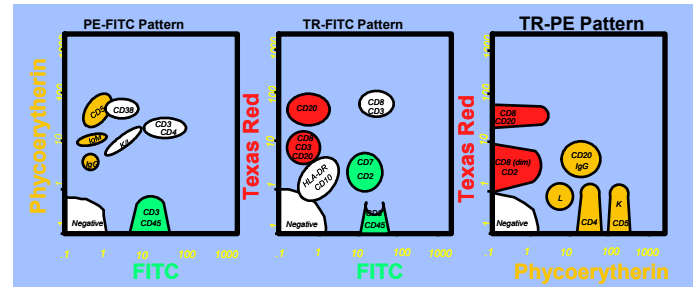
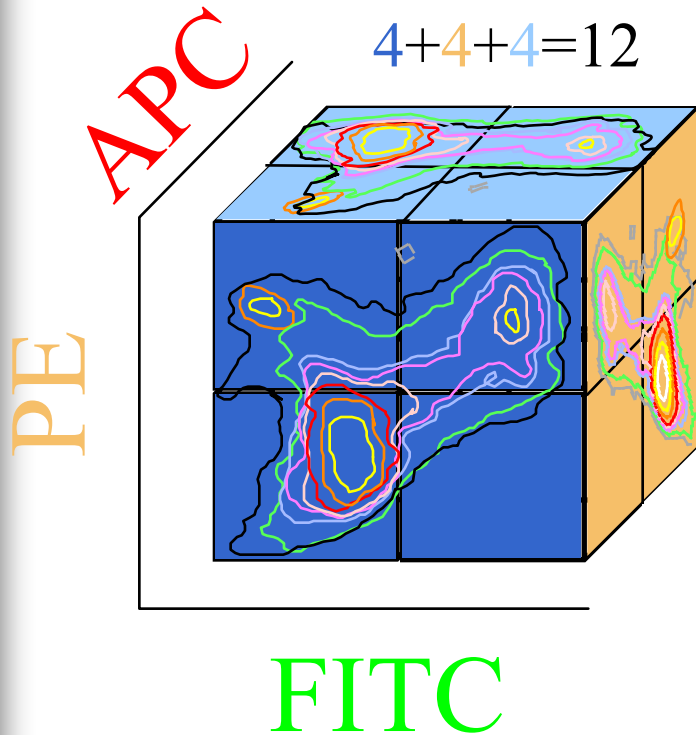


3 Color Combinations



Negatives

3 Color Combinations





„Gating“

- Real-time gating vs. softwarový „gating“
- Určení regionů
- Strategie „gatingu“
- Analýza kvadrantů
- Boolean „gating“
- zpětný „gating“

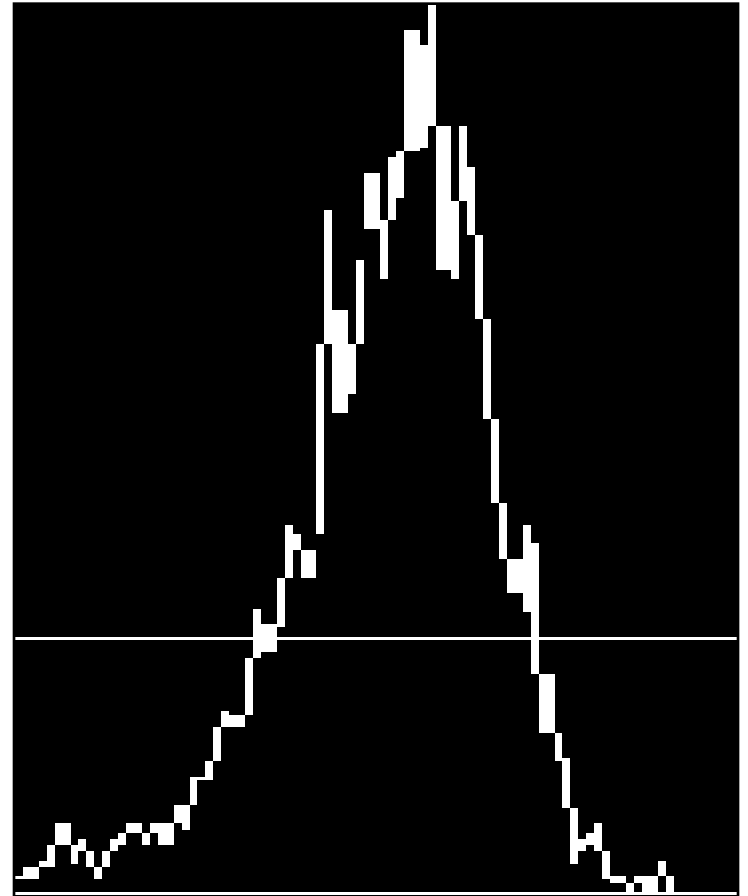


Real-Time vs. Software Gating

- Real-time (live) gating:
 - omezuje akceptovaná data během měření
- Software (analysis) gating:
 - vyřazuje určitá data během následné analýzy

Určení regionů

- Objektivní nebo subjektivní?
 - školení/schopnosti/trénink
- Možné tvary:
 - obdelník
 - elipsa
 - “free-hand” (polygon)
 - kvadrant
- Statistika
 - počet
 - podíl (%)
 - průměr, medián, S.D., CV,



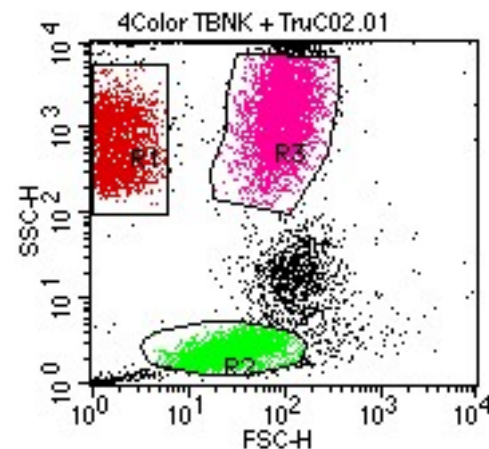
Region vs. gate

Region

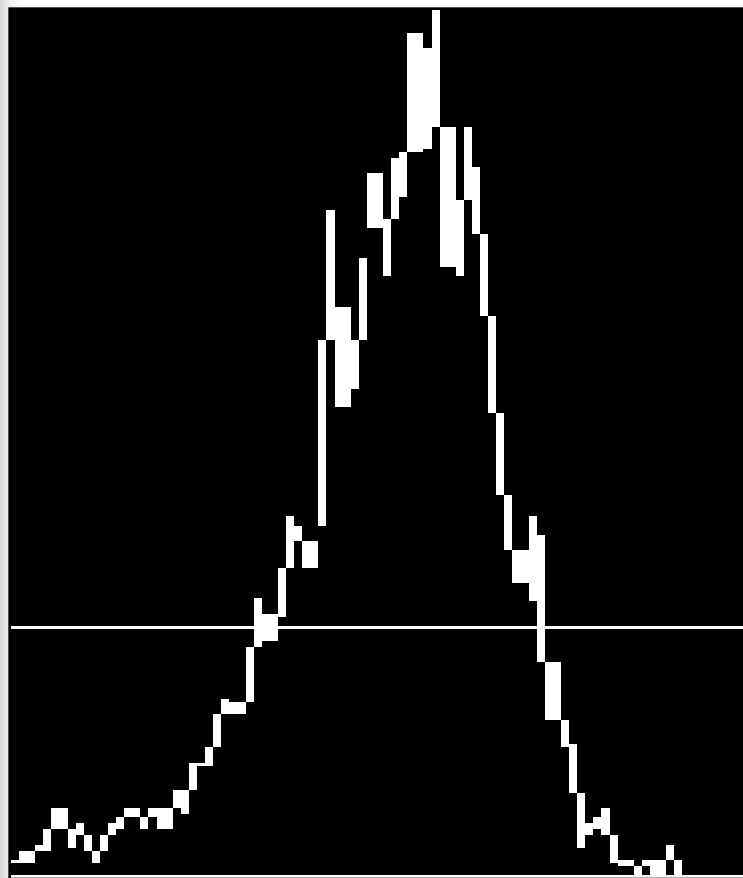
- oblast (plocha) v grafu definovaná uživatelem
- mnoho regionů v jedné grafu
- ohraničujeme pomocí nich populace našeho zájmu
- je možné je barevně odlišit
- je definován stejně pro všechny vzorky v analýze

Gate

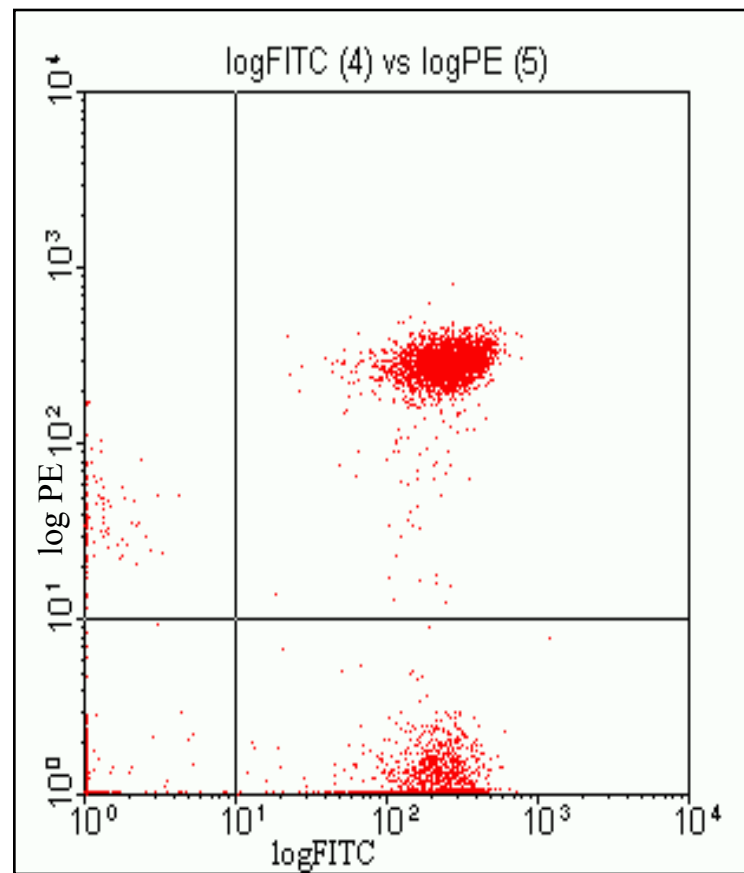
- je definován jako jeden a nebo více regionů zkombinovaných pomocí logických operátorů (AND, OR, NOT; Booleova logika)



Using Gates



Region 1 established



Gated on Region 1

Statistika

- Aritmerický průměr
- Geometrický průměr
- Medián
 - odhad střední hodnoty
 - není ovlivněn extrémními hodnotami
- Směrodatná odchylka
- Koeficient variance
- Modus – nejčastější hodnota

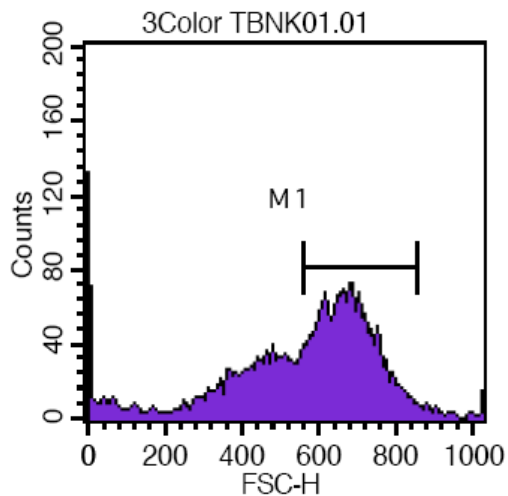
$$\bar{x} = \frac{1}{n} (x_1 + x_2 + \dots + x_n) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$$(a_1 \cdot a_2 \cdot \dots \cdot a_n)^{\frac{1}{n}} = \sqrt[n]{a_1 \cdot a_2 \cdot \dots \cdot a_n} = \left(\prod_{i=1}^n a_i \right)^{\frac{1}{n}}$$

$$\int_{-\infty}^m f(x) dx = 0,5$$

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

Statistika pro histogram



Histogram Statistics

File: 3Color TBNK01.01

Sample ID:

Tube: CD3/CD4/CD45

Acquisition Date: 21-Apr-98

Gated Events: 15000

X Parameter: FSC-H (Linear)

Log Data Units: Linear Values

Patient ID:

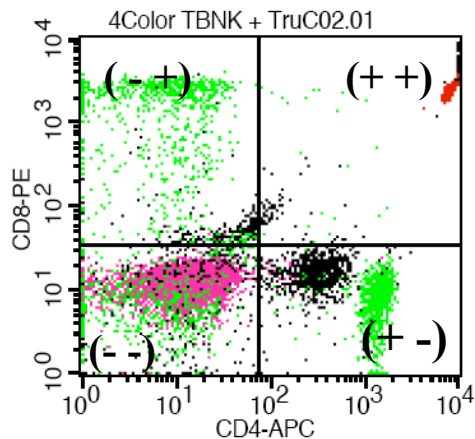
Panel: 3 Color TBNK

Gate: No Gate

Total Events: 15000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	0, 1023	15000	100.00	100.00	570.49	500.40	29.98	612.00	0
M1	559, 855	9306	62.04	62.04	670.83	667.81	9.56	667.00	672

Analýza kvadrantů



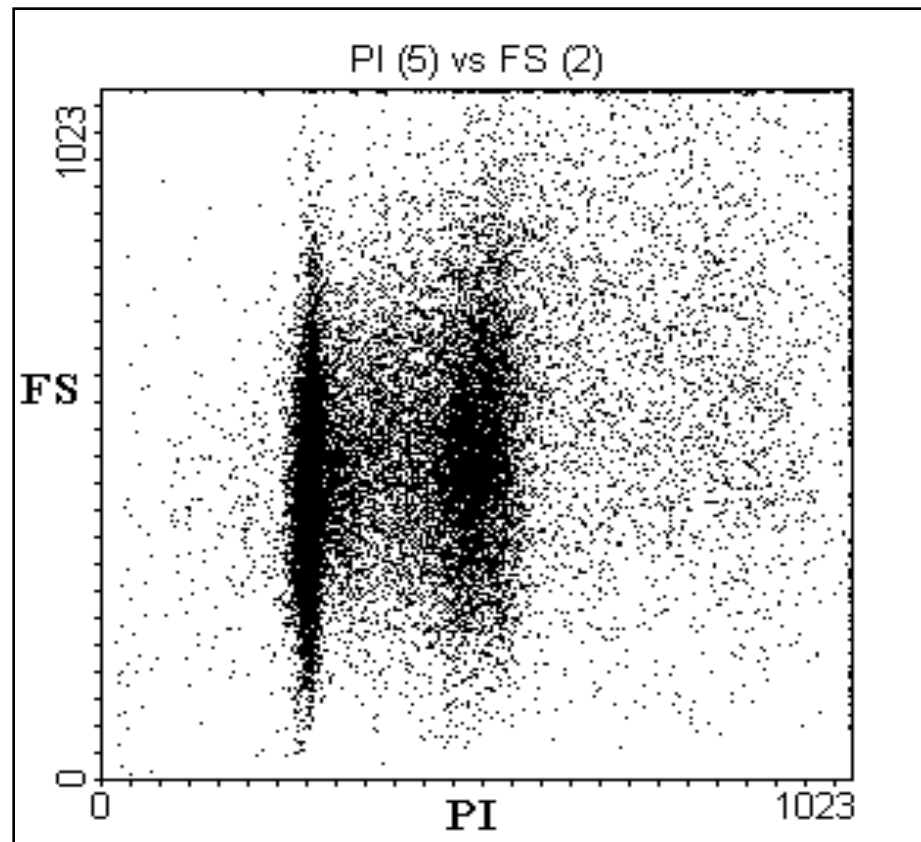
Quadrant Statistics

File: 4Color TBNK + TruC02.01 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: Patient ID:
 Tube: CD8/CD8/CD45/CD4 TruC Panel: 4 Color TBNK + TruC
 Acquisition Date: 08-Oct-98 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: CD4-APC (Log) Y Parameter: CD8-PE (Log)
 Quad Location: 74, 35

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	1149	11.49	11.49	16.67	9.14	1474.42	618.99
UR	2222	22.22	22.22	7621.69	6806.34	2386.22	2160.04
LL	4783	47.83	47.83	15.00	10.87	12.01	10.64
LR	1846	18.46	18.46	879.87	646.31	12.24	10.28

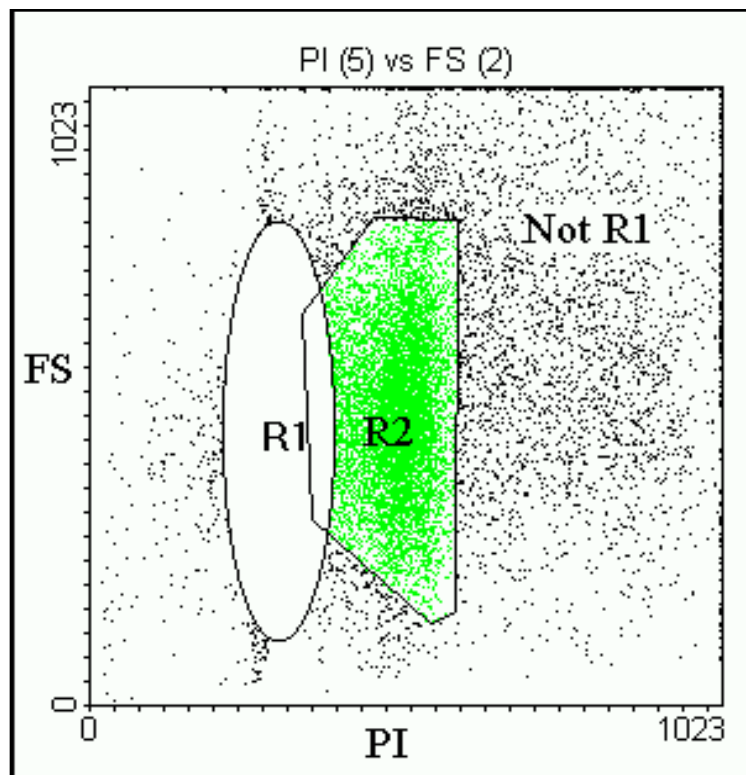
Logický „Gating“ (Booleova logika)

S překrývajícími se oblastmi máme mnoho možností:



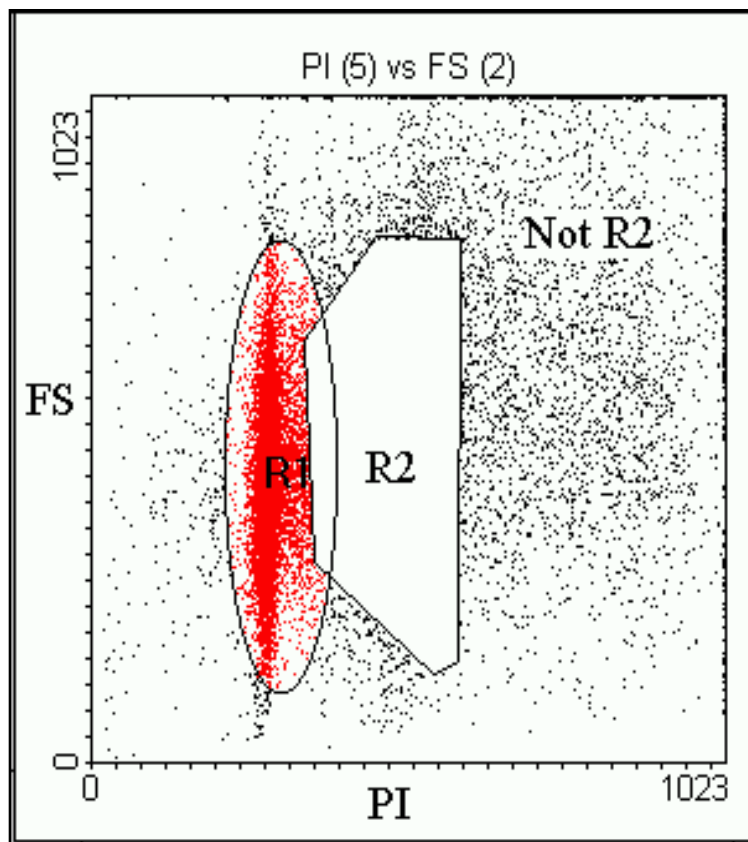
Boolean Gating

Not Region 1:



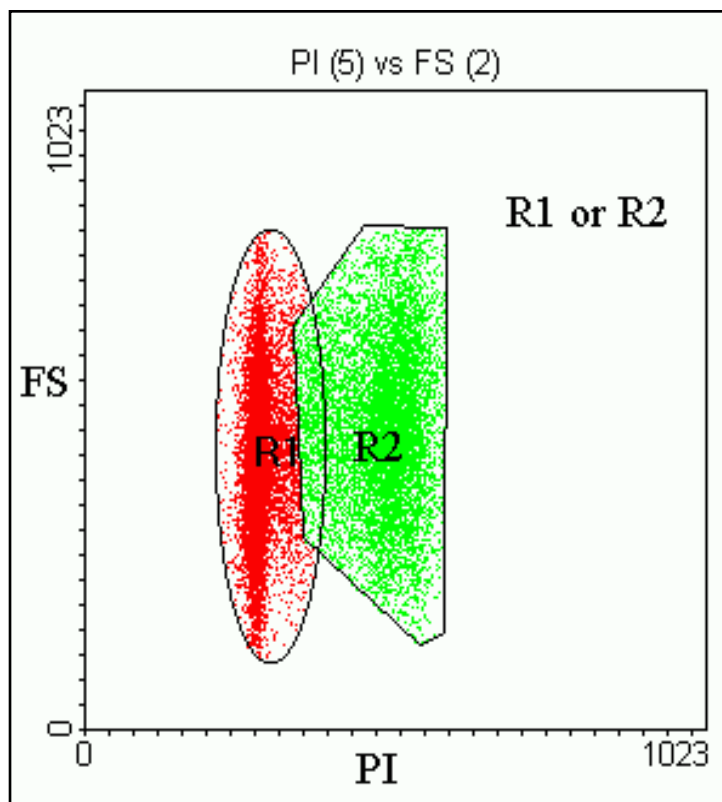
Boolean Gating

Not Region 2:



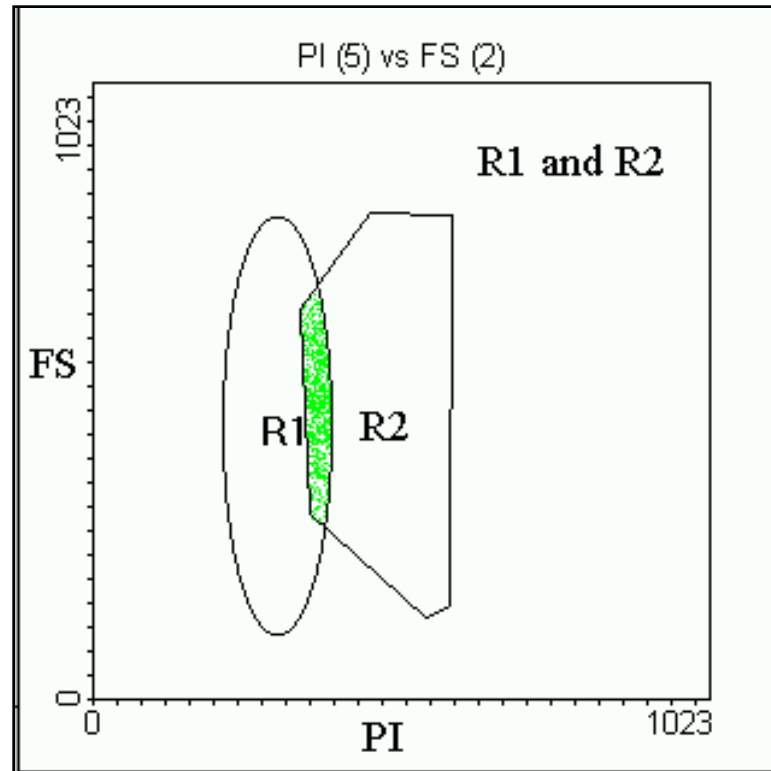
Boolean Gating

Region 1 or Region 2:



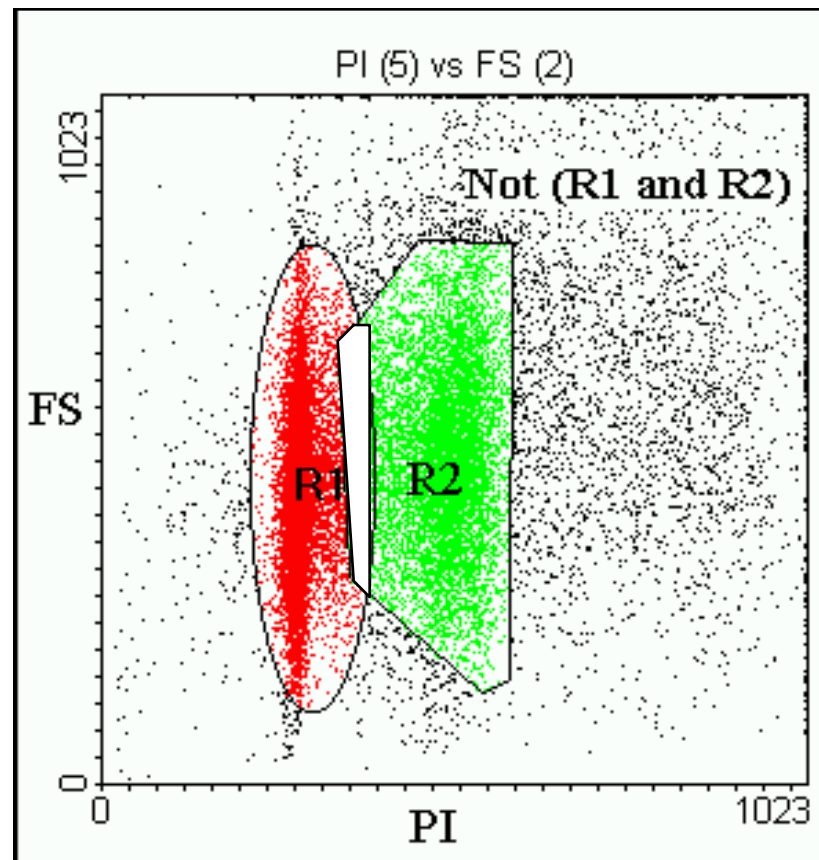
Boolean Gating

Region 1 and Region 2:

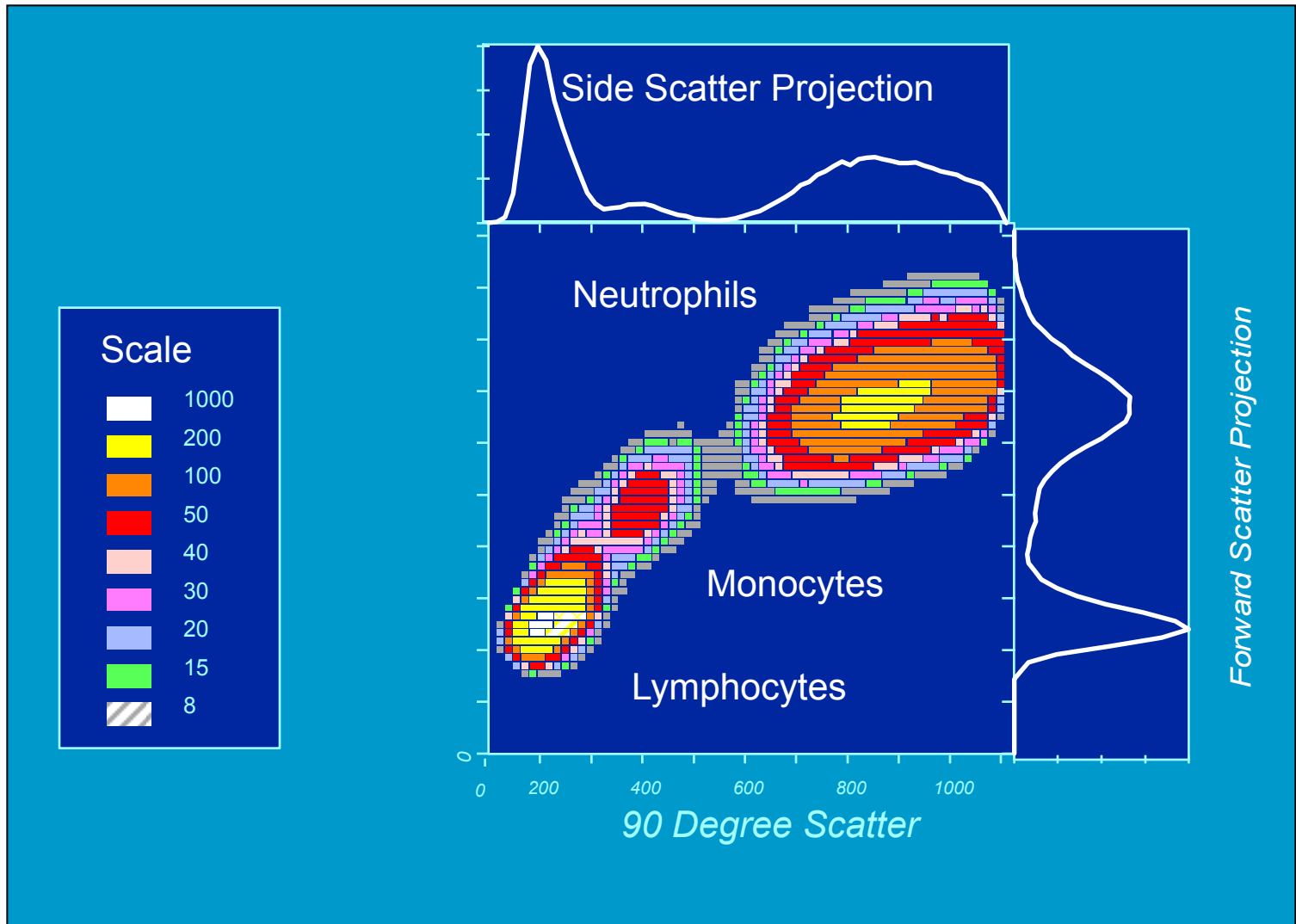


Boolean Gating

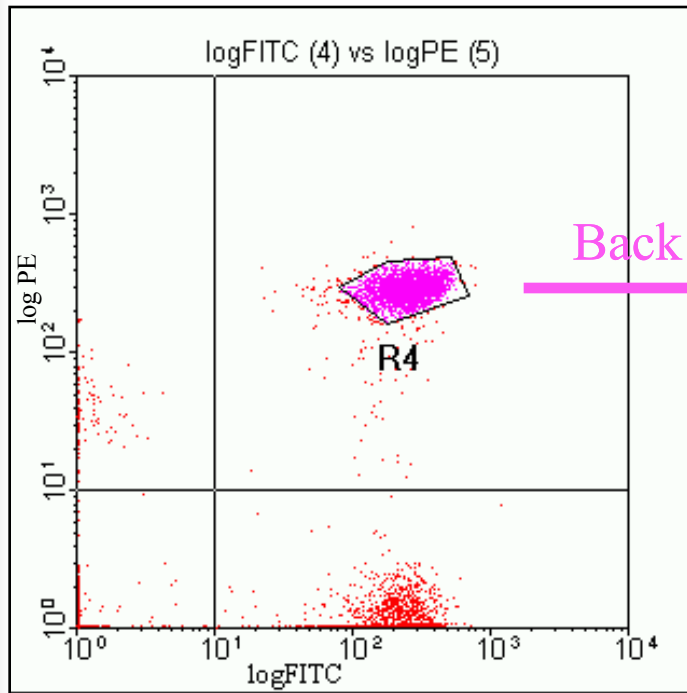
Not (Region1 and Region 2):



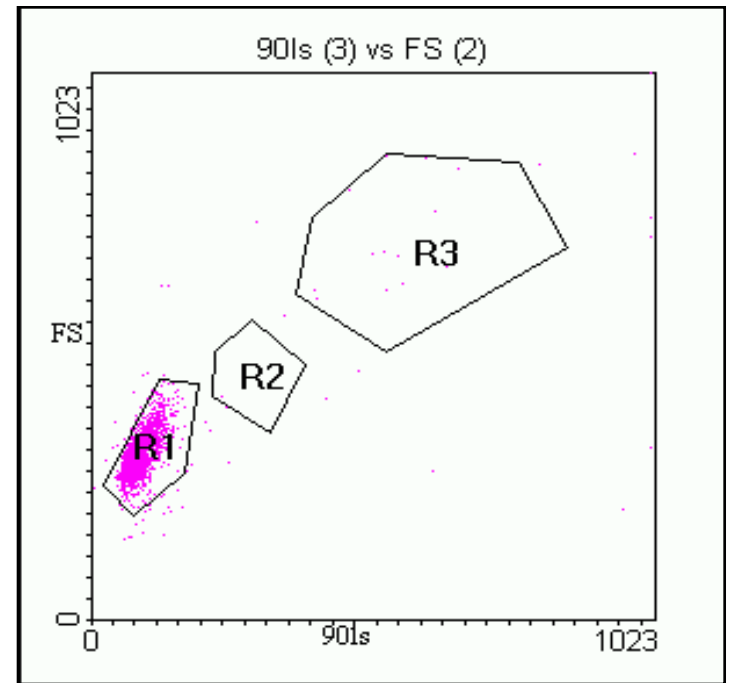
Light Scatter Gating



Back Gating

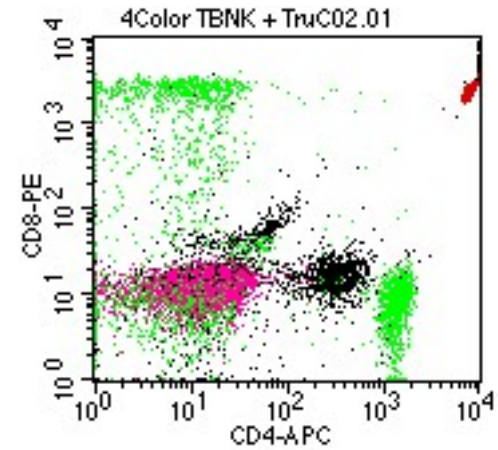
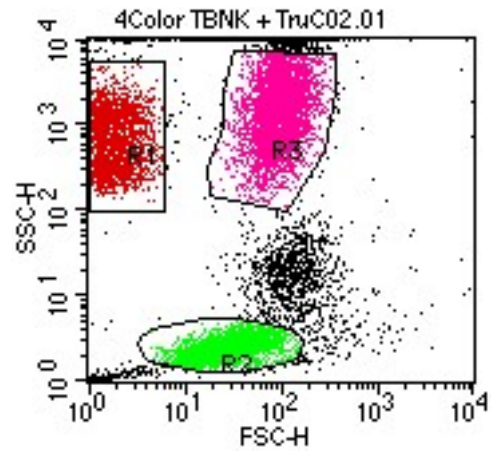


Region 4 established

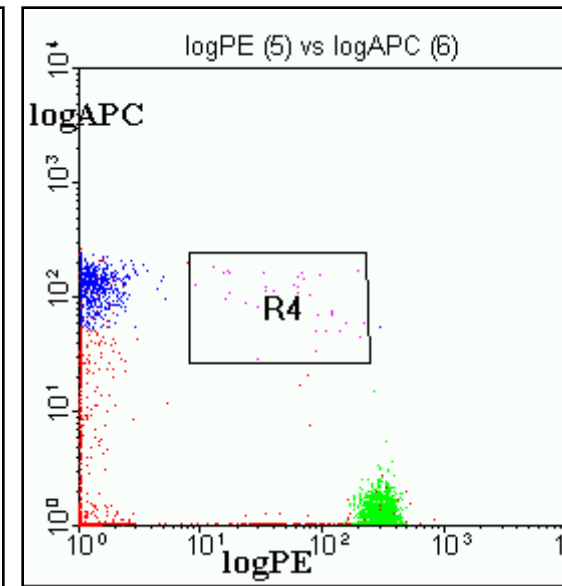
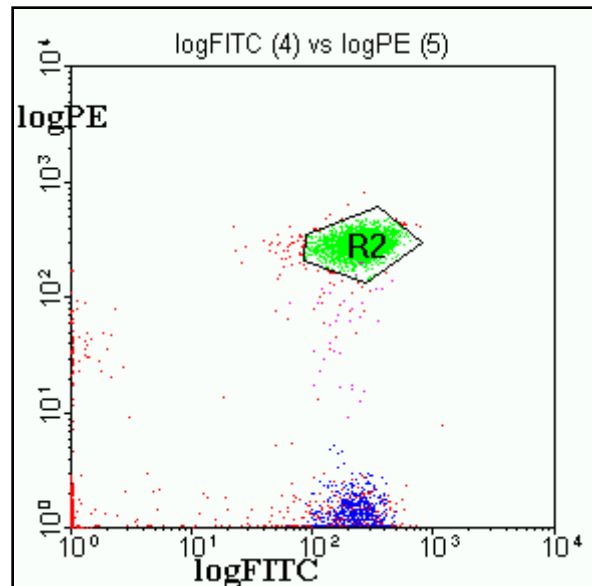
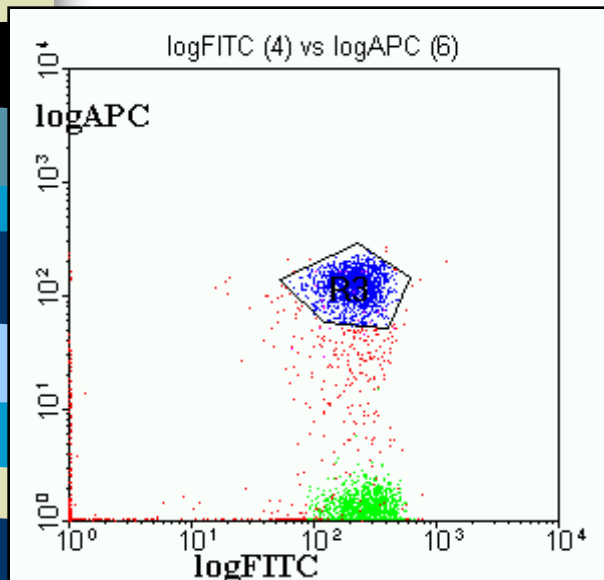
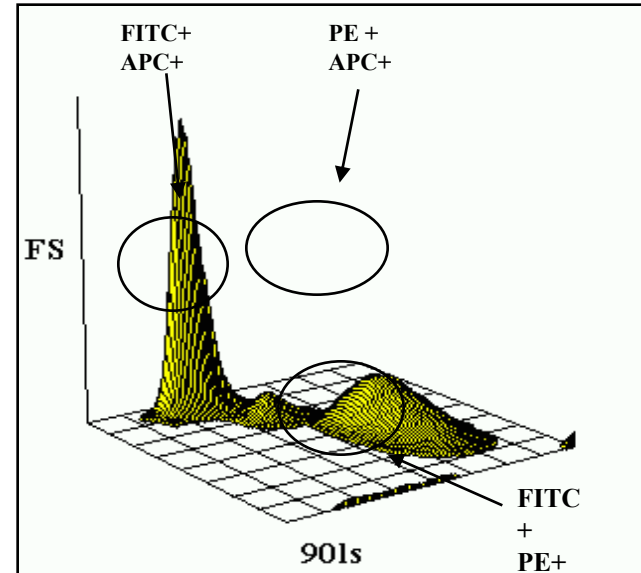
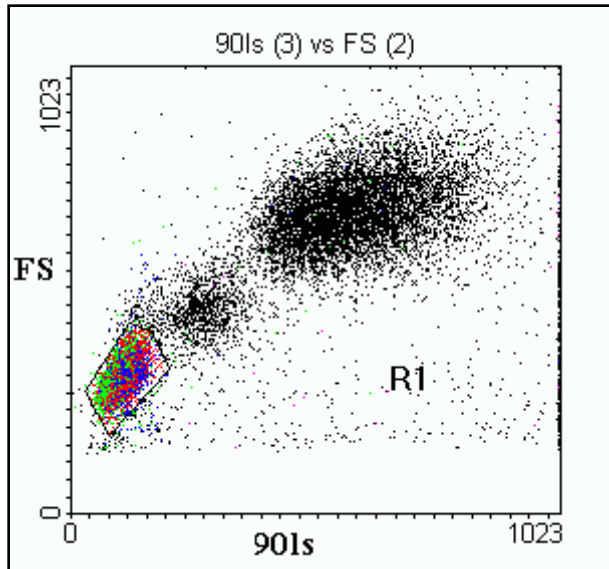


Back-gating using Region 4

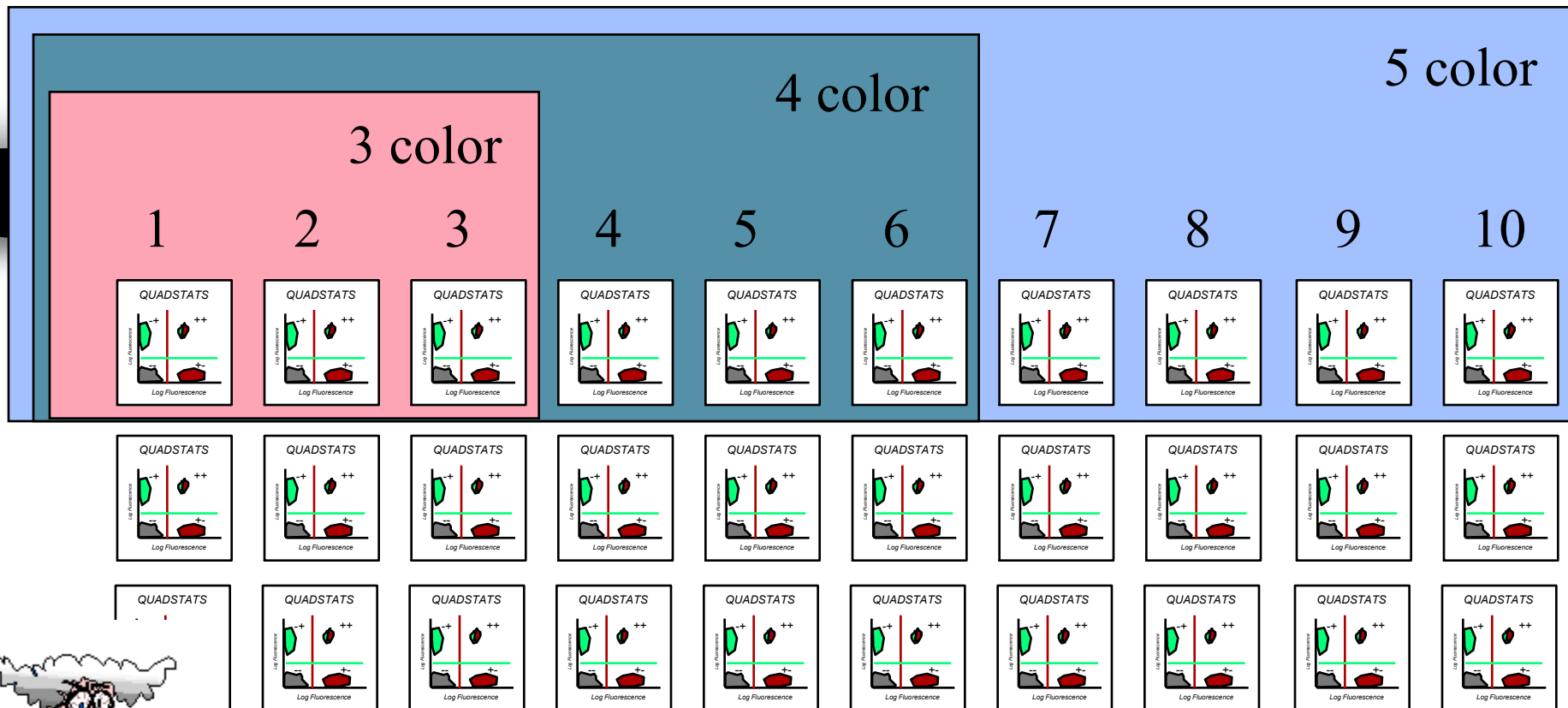
Back Gating

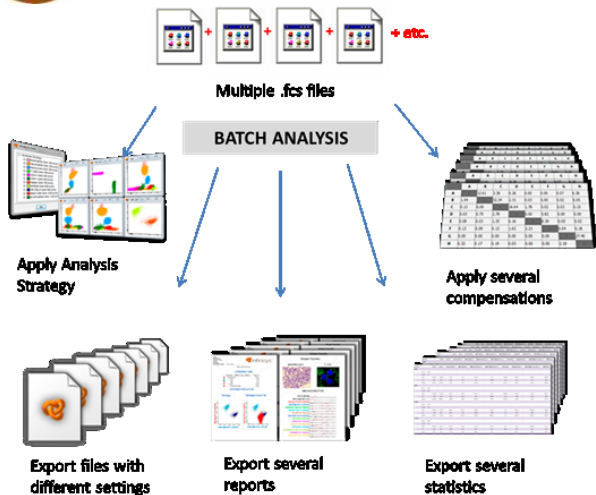


3 Parameter Data Display

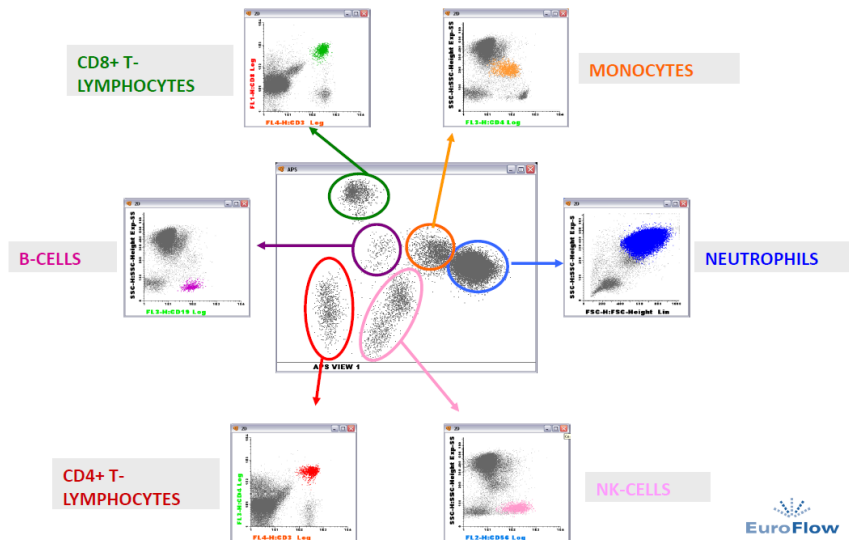


Vícebarevné analýzy generují mnoho dat...





Automatic Population Separator





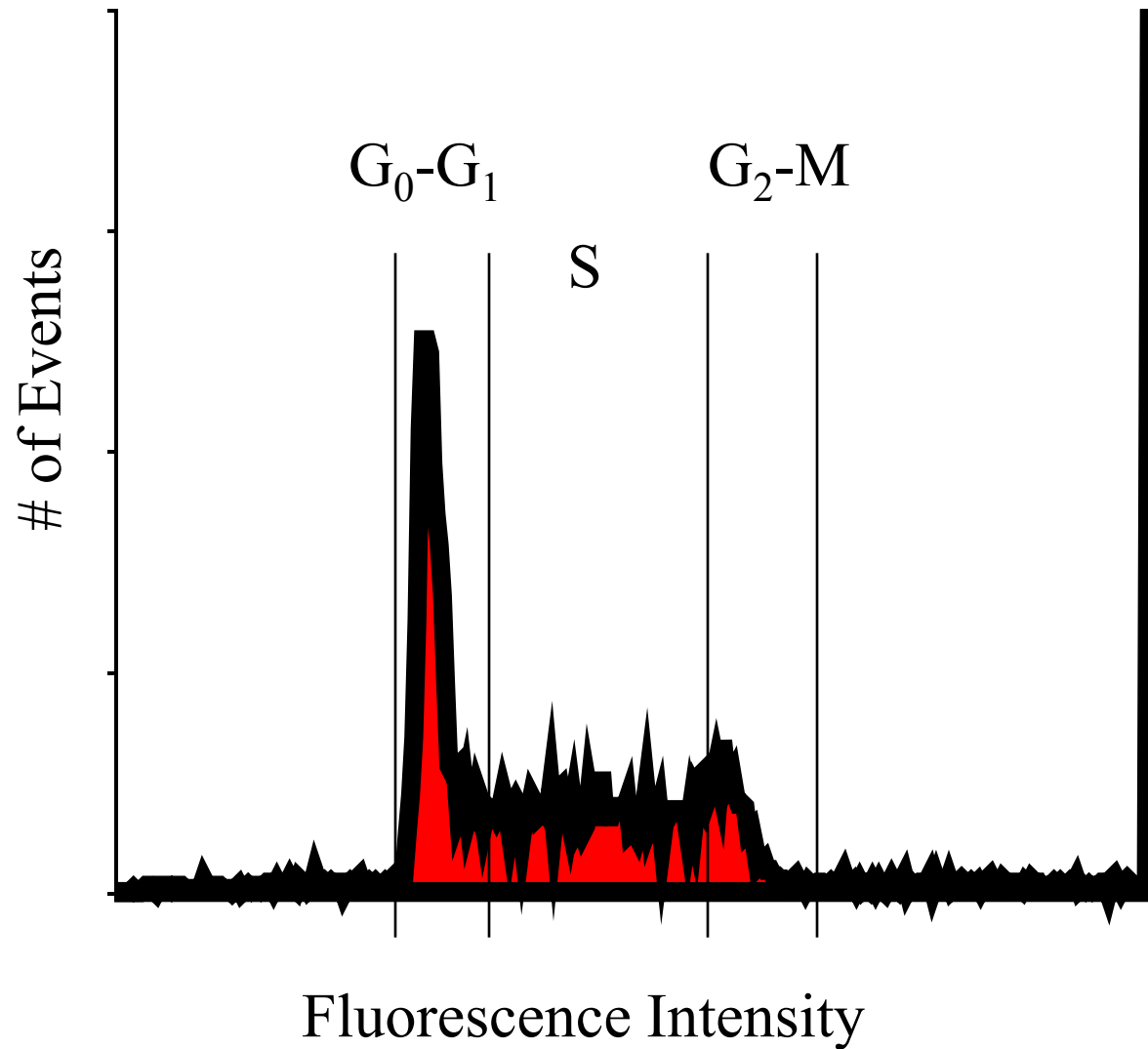
Způsoby pomocí kterých lze upravit výsledky:

1. Odstranění „doublets“
2. Čas jako parametr pro kontrolu kvality

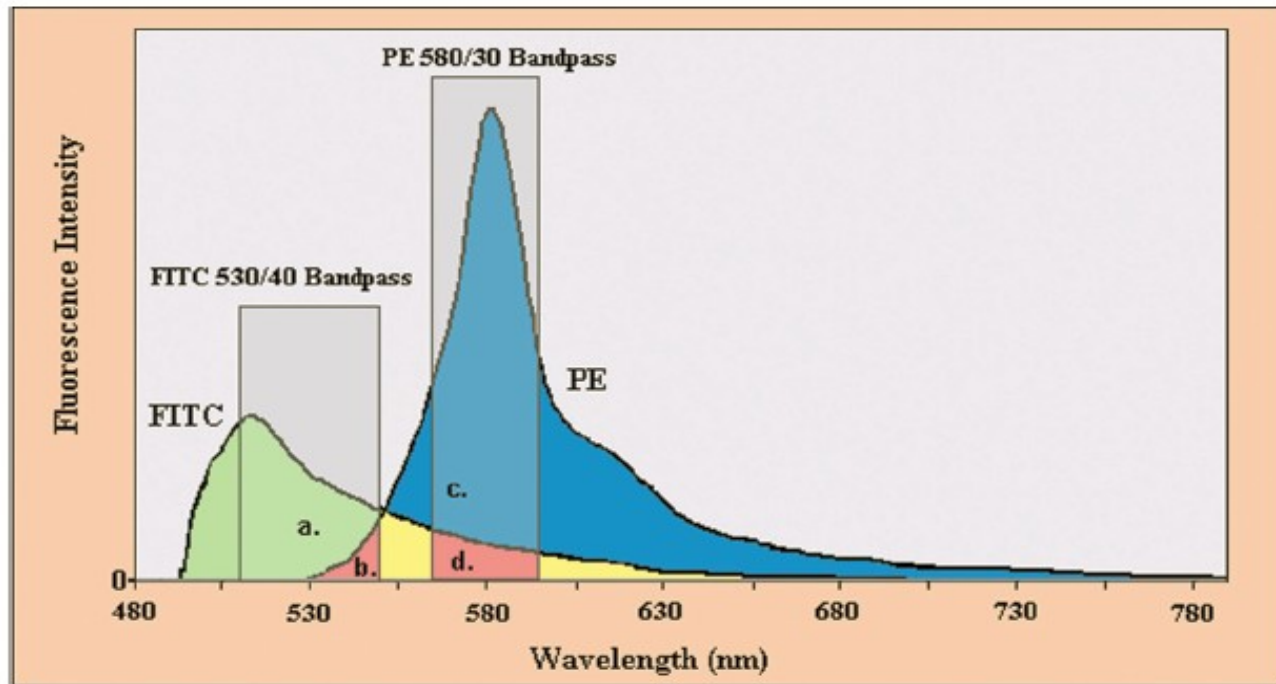
Příklad - pro DNA analýzu je třeba:

- odstranit „debris“ a shluky
- odstranit „doublets“
- udržovat konstantní průtok

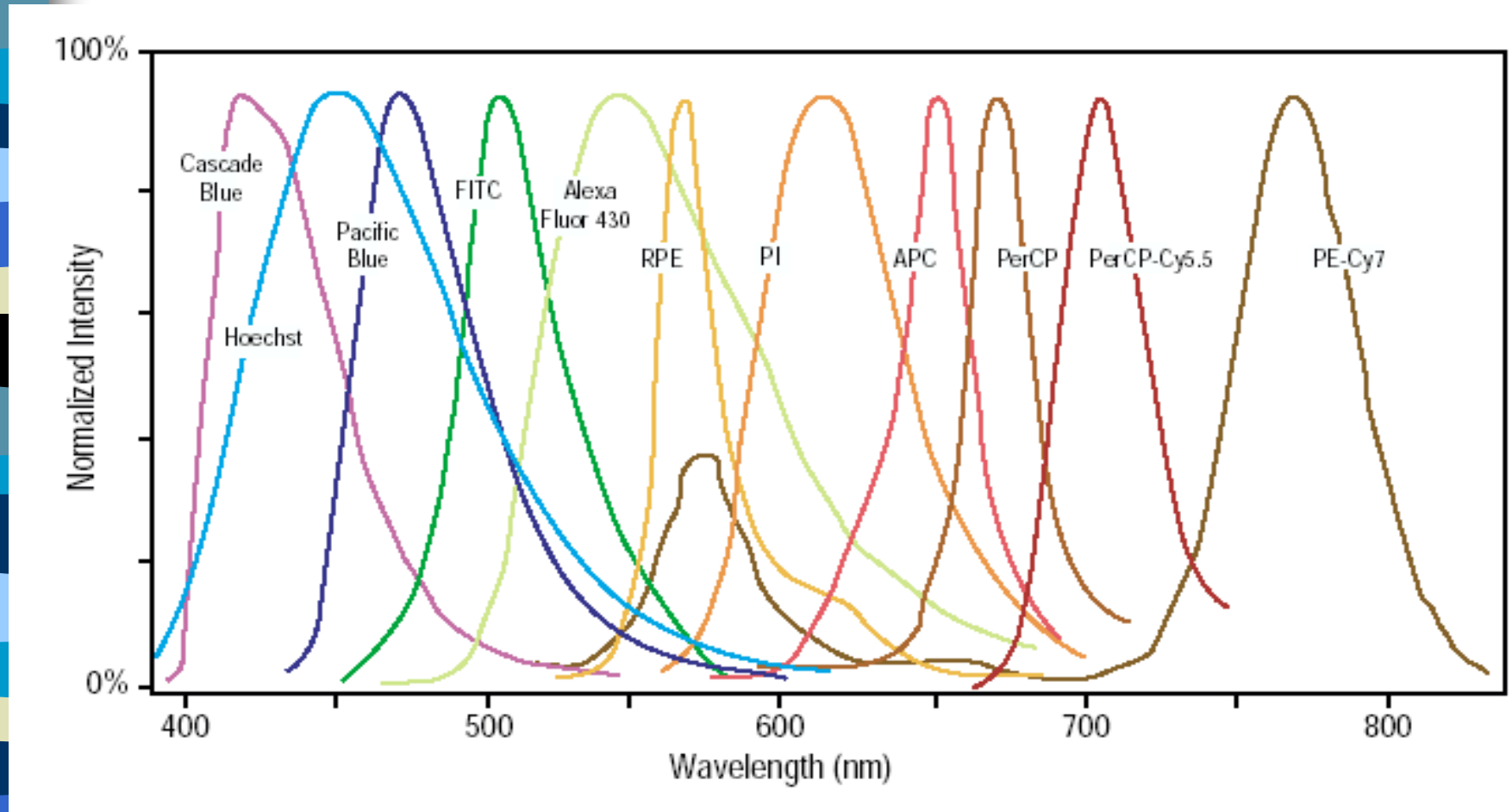
DNA Histogram



Co je problém při vícebarevné detekci?



Emission Spectra–Spectral Overlap

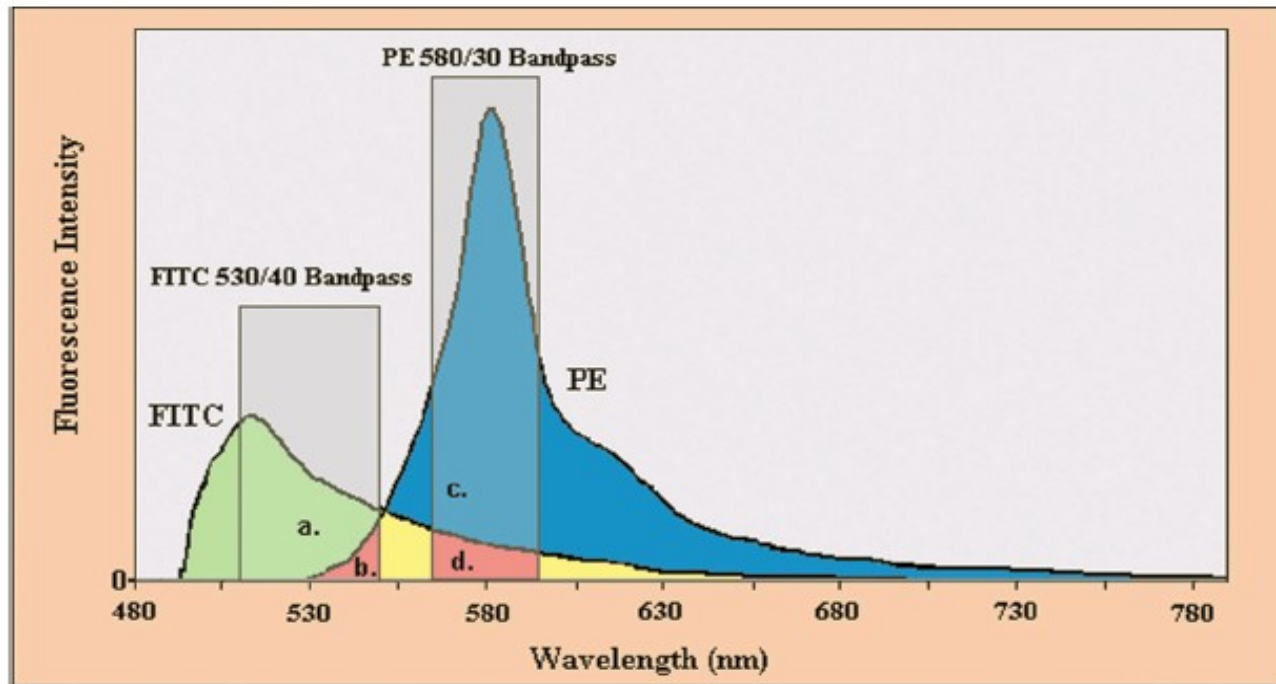




Kompenzace fluorescenčního signálu při vícebarevné detekci

- Proces při kterém dochází k eliminaci všech fluorescenčních signálů kromě signálu z fluorochromu který má být na příslušném detektoru detekován
- Nastavení pomocí mixu mikročástic či buněk označených/neoznačených příslušnými fluorochromy.

Co je problém při vícebarevné detekci?



Kompenzace fluorescenčního signálu při vícebarevné detekci

Table 1.14.1 Typical Spillover Matrix for a Three-Color Compensation^a

Fluorophore	Detector		
	Green	Orange	Red
FITC	1.000	0.180	0.040
PE	0.009	1.000	0.213
PE-Cy5	0.005	0.029	1.000

^aNote: The diagonal elements are 1, since the contribution of each fluorophore to its cognate detector is defined to be 100%. In this table, the FITC into PE spillover is 18%; the PE into FITC spillover is 0.9%.

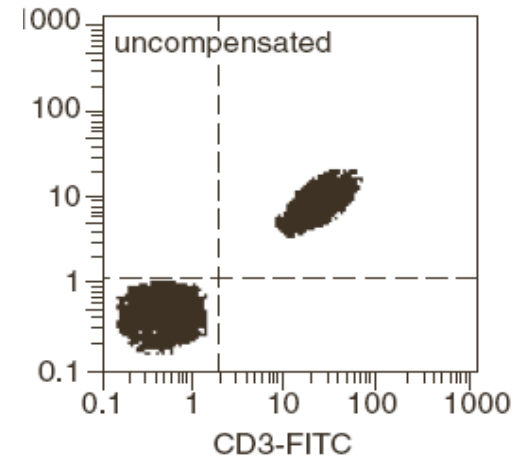
Current Protocols in Cytometry

Kompenzace fluorescenčního signálu

#2

FITC positive & negative

PE negative beads



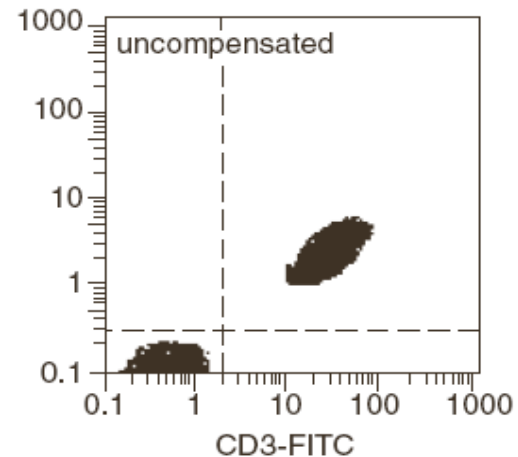
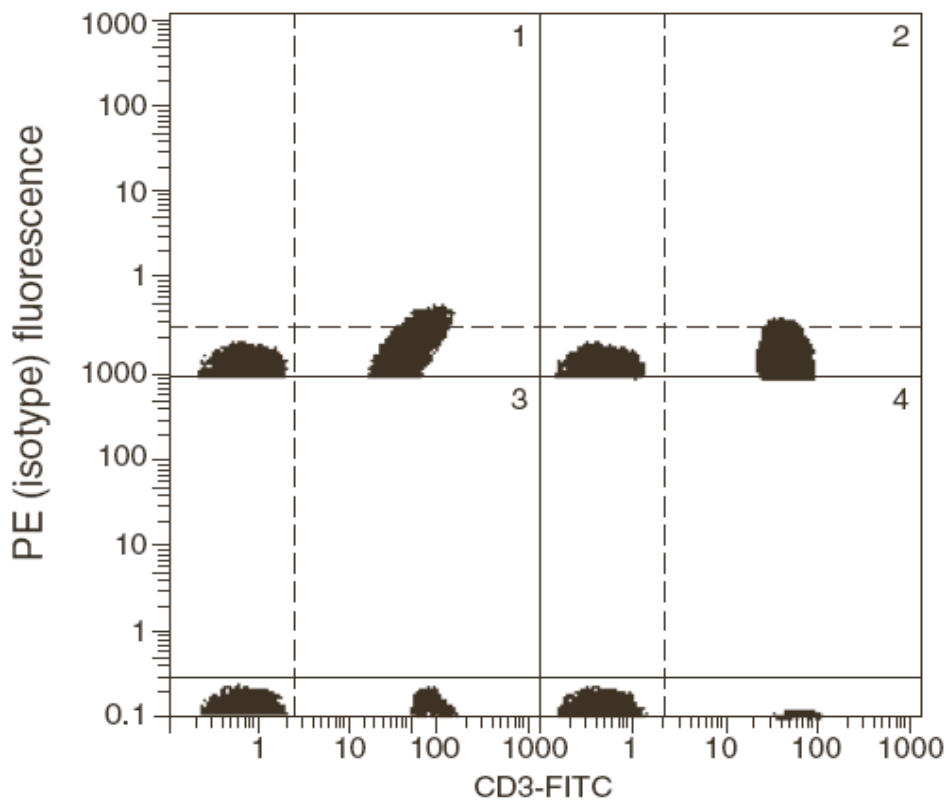
Current Protocols in Cytometry

Kompenzace fluorescenčního signálu

FITC positive & negative

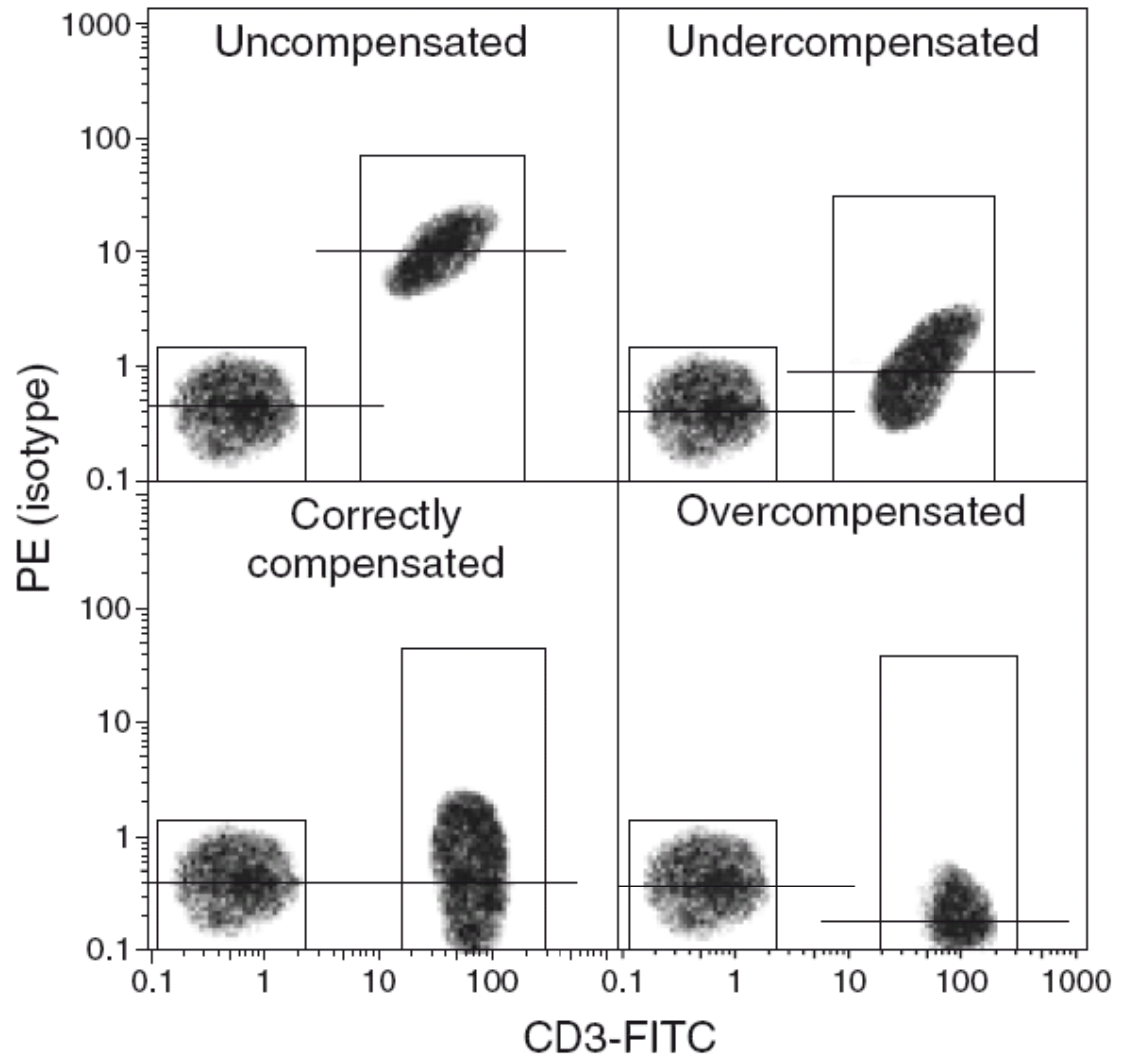
PE negative beads

NONE!



Current Protocols in Cytometry

Kompenzace fluorescenčního signálu



Nastavení kompenzací

- značené mikročástice – pro běžně konjugované fluorochromy



CaliBRITE Beads

CaliBRITE 3 three-color kit–Catalog No. 340486

CaliBRITE two-color kit–Catalog No. 349502

CaliBRITE PerCP Beads–Catalog No. 340497

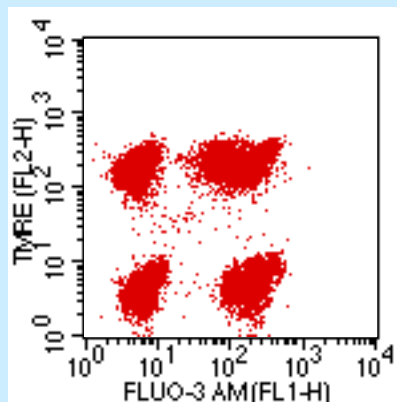
CaliBRITE APC Beads–Catalog No. 340487

CaliBRITE PerCP-Cy5.5 Beads with Bead Dilution Buffer–Catalog No. 345036

For In Vitro Diagnostic Use with FACS brand flow cytometers

Setup	Tube ^a	Unlabeled	FITC	PE	PerCP or PerCP-Cy5.5 ^b	APC
two-color	A	1 drop				
	B	1 drop	1 drop	1 drop		
three-color	A	1 drop				
	B	1 drop	1 drop	1 drop	1 drop	
four-color	A	1 drop				1 drop
	B	1 drop	1 drop	1 drop	1 drop	1 drop

- značené buňky – pro vitální značení



parametr - detektor amp.

FL1 - 544

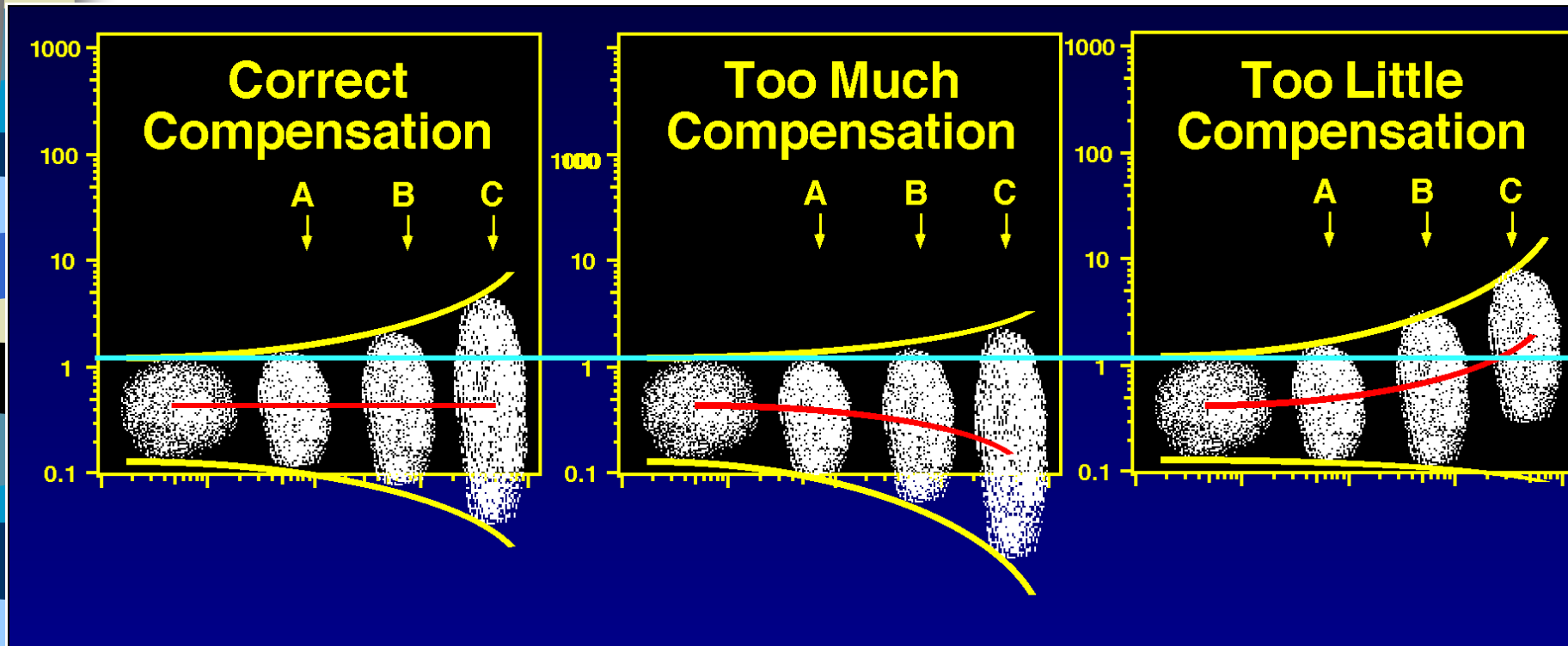
FL2 - 434

kompenzace

FL1 - 1.1%FL2

FL2 - 17.5%FL1

Which marker for compensation?



Small errors in compensation of a dim control (A) can result in large compensation errors with bright reagents (B & C).

Use bright markers to setup proper compensation.



Kompenzace - literatura

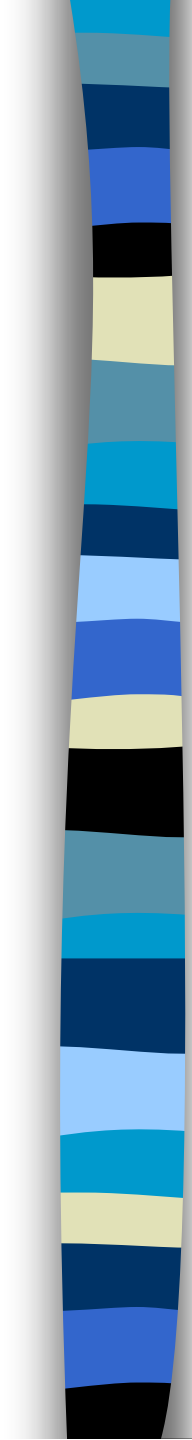
Mario Roederer - Compensation in Flow Cytometry
Current Protocols in Cytometry (2002) 1.14.1-1.14.20 John Wiley & Sons, Inc.

M. Loken, D. R. Parks, & L. A. Herzenberg (1977). Two-color immunofluorescence using a fluorescence-activated cell sorter. *J. Histochem. Cytochem.* **25**:899-907.

M. Roederer & R. F. Murphy (1986). Cell-by-cell autofluorescence correction for low signal-to-noise systems: application to EGF endocytosis by 3T3 fibroblasts. *Cytometry* **7**:558-565.

S. Alberti, D. R. Parks, & L. A. Herzenberg (1987). A single laser method for subtraction of cell autofluorescence in flow cytometry. *Cytometry* **8**:114-119.

C. B. Bagwell & E. G. Adams (1993). Fluorescence spectral overlap compensation for any number of flow cytometry parameters. *in: Annals of the New York Academy of Sciences*, **677**:167-184.



*No Data Analysis
Technique Can Make
Good Data Out of
Bad Data!*

Shapiro's 7th Law of Flow Cytometry



Shrnutí přednášky

- sorting
- zpracování signálu
- vizualizace dat a „gating“
- kompenzace

Na konci dnešní přednášky by jste měli:

1. Znat základní principu sortování,
2. popsat způsob zpracování signálu,
3. rozumět lin / log zesílení signálu,
4. rozeznat jednotlivé způsoby vizualizace dat,
5. chápat základní principy „gatingu“,
6. znát princip kompenzace signálu při vícebarevné detekci.