

Bi9393 Analytická cytometrie



Biofyzikální ústav AVČR
Královopolská 135
612 65 Brno

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

Karel Souček, Ph.D.

Lukáš Kubala, Ph.D.

Pavla Gajdušková, Ph.D.

Eva Bártová, Ph.D.

Eva Slabáková, Ph.D.

Alena Hyršlová Vaculová, Ph.D.



Struktura kurzu

■ Přednášky

- 8 lekcí o průtokové cytometrii a aplikacích
- 1 lekce o mikroskopii
- 2 lekce zaměřené na „microarrays“

■ Cvičení

Součástí kurzu je praktické cvičení. Navíc bude jedna přednáška věnována praktické demonstraci. Vybraná zařízení budou demonstrována přímo v laboratořích BFÚ

■ Test

Kurz bude zakončen zkouškou ve formě testu shrnujícího látku za celý semestr. Výsledek testu bude tvořit 75% celkového hodnocení.

■ Seminář

Každý student bude prezentovat krátký seminář jehož téma bude konzultováno s přednášejícím a bude se týkat zaměření kurzu. Téma semináře bude shrnuto v krátkém textu ve stylu hesla pro [CZ Wikipedii](#). Na základě této prezentace a odevzdaného textu bude udělen zápočet a hodnocení vlastního semináře se bude také z 25-ti % odrážet v celkové známce.



Seminář studentů

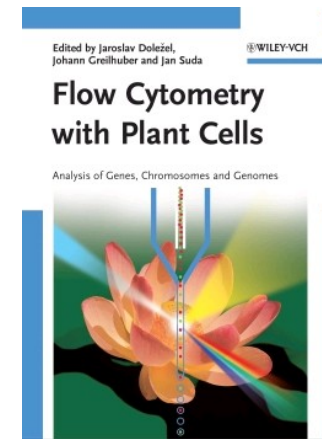
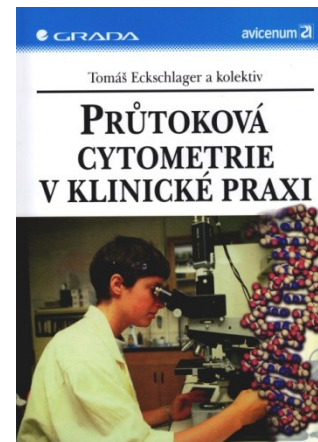
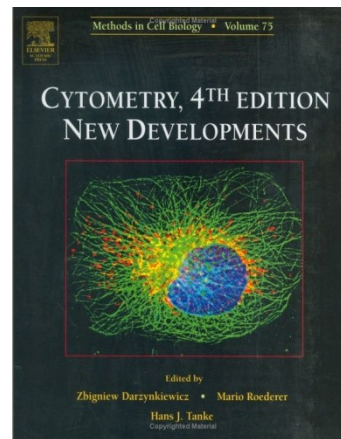
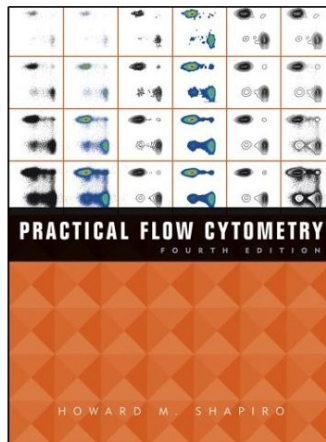
- Téma semináře musí vycházet z probírané technologie a musí být schváleno přednášejícím.
- Cílem je demonstrovat pochopení principů ze kterých vychází a jejich uplatnění v biologii.
- Prezentace musí být připravena např. v PowerPoint(u). Prezentaci je nutné předložit v předstihu přednášejícímu ke konzultaci a posouzení.
- Délka prezentace je 10 minut.
- Obsah prezentace shrnout v krátkém „Wiki“ textu.

Seminář studentů – příklady témat

- Základní principy průtokové cytometrie
- Analýza dat z průtokového cytometru
- Základní principy separace pomocí průtokové cytometrie
- Principy fluorescence a fluorescenční značky
- Základy detekce fluorescence a zpracování signálu.
- Aplikace průtokové cytometrie
 - Imunofenotypová analýza krevních destiček.
 - Využití průtokové cytometrie v diagnostice alergických onemocnění.
 - Analýza DNA pomocí průtokové cytometrie.
 - Aplikace průtokové cytometrie při studiu imunologie bezobratlých.
 - Chromozómová analýza pomocí fluorescenční mikroskopie a průtokové cytometrie.
 - Extracelulární detekce cytokinů.
 - Monoklonální protilátky v průtokové cytometrii.
 - Imunofenotypová analýza periferních lymfocytů.
 - Využití průtokové cytometrie v cytogenetice.
 - Stanovení buněčné viability.
 - Metody detekce apoptózy.
 - Měření enzymatických aktivit pomocí průtokové cytometrie.
 - Zdroje excitace a optické systémy v průtokové cytometrii.
 - Detekce CD4+ T buněk u HIV pozitivních pacientů.
 - Aplikace FRET a FRAP.
 - Víceparametrové analýzy v průtokové cytometrii.
 - Průtoková cytometrie v diagnostice nádorových onemocnění.
 - Intracelulární detekce cytokinů.
 - Imunofenotypová analýza krevních destiček.
 - Využití průtokové cytometrie v diagnostice alergických onemocnění.

Informační zdroje – průtoková cytometrie

- Practical Flow Cytometry, Howard M. Shapiro, Wiley-Liss; 4th edition
- Cytometry: New Developments, Volume 75, Fourth Edition (Methods in Cell Biology), Zbigniew Darzynkiewicz, Academic Press; 4th edition
- Průtoková cytometrie v klinické praxi, T. Eckschlager a kol., Grada 1999
- Flow Cytometry with Plant Cells: Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes; Jaroslav Dolezel (Editor), Johann Greilhuber (Editor), Jan Suda (Editor), February 2007



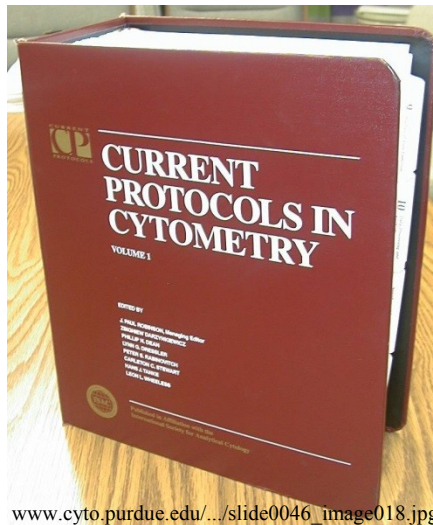
Tyto knihy je možné zapůjčit po domluvě ke studiu do knihovny BFÚ.

Více informací o knihách o průtokové cytometrii najdete na:

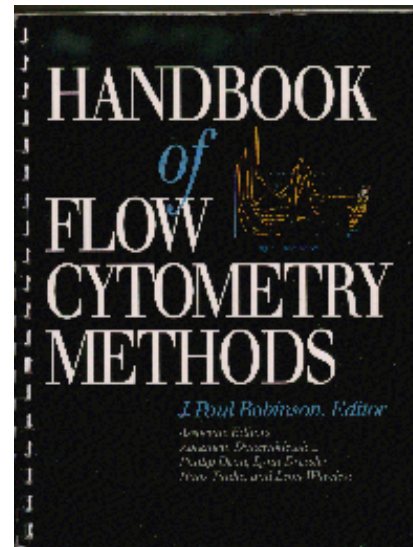
<http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/books/bookindx.htm>

Informační zdroje – průtoková cytometrie (metody a protokoly)

- The Handbook of Flow Cytometry Methods
- Current Protocols in Cytometry



www.cyto.purdue.edu/.../slide0046_image018.jpg



Tyto knihy je možné zapůjčit po domluvě ke studiu do knihovny BFÚ.

Více informací o knihách o průtokové cytometrii najdete na:

<http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/books/bookindx.htm>

Informační zdroje – cytometrie (časopisy)

■ Cytometry Part A

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/jhome/33945>



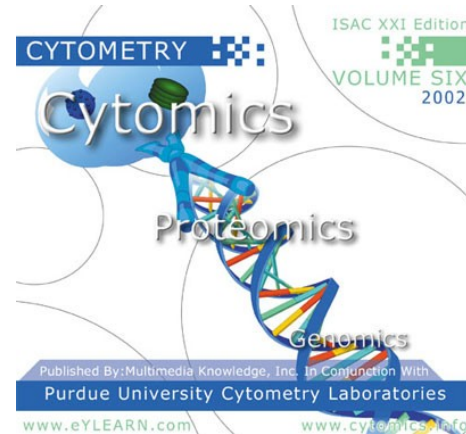
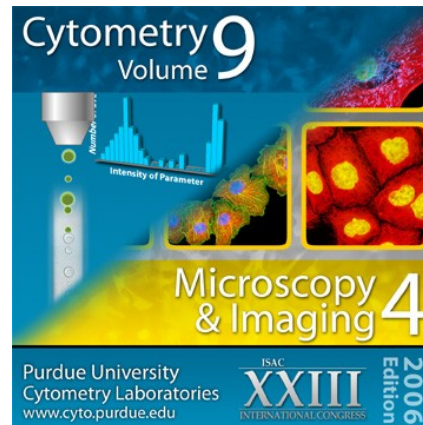
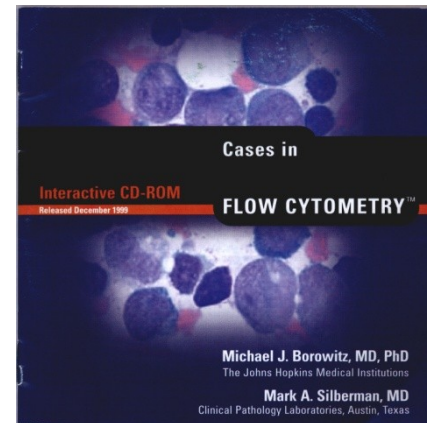
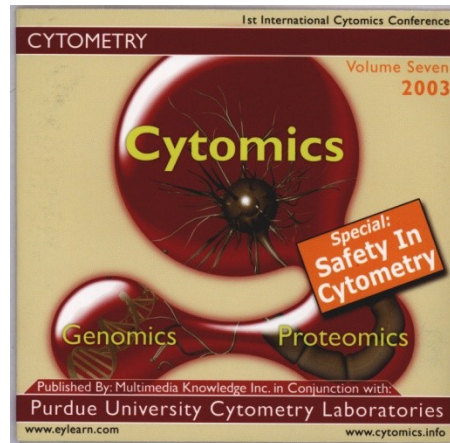
■ Cytometry Part B: Clinical Cytometry

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/jhome/102019902>



Jednotlivá čísla Cytometry Part A (od roku je možné zapůjčit po domluvě ke studiu do knihovny BFÚ).

Informační zdroje – cytometrie (CD-ROM)



Je možné zapůjčit po domluvě.



Informační zdroje – (Internet)

- Purdue University, Cytometry Labs

<http://www.cyto.purdue.edu/>

- International Society for Analytical Cytology

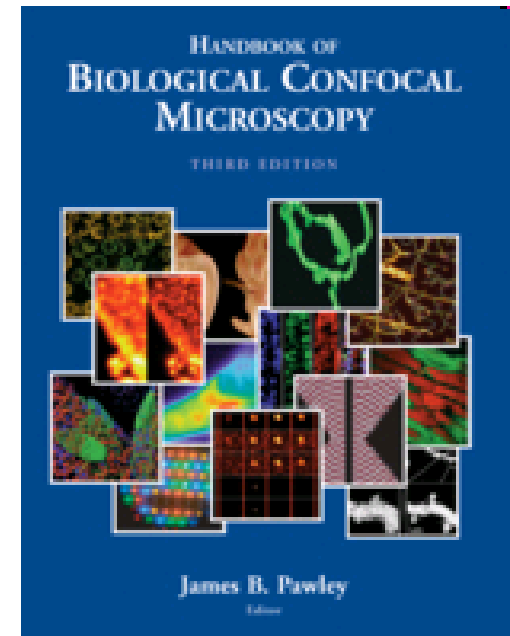
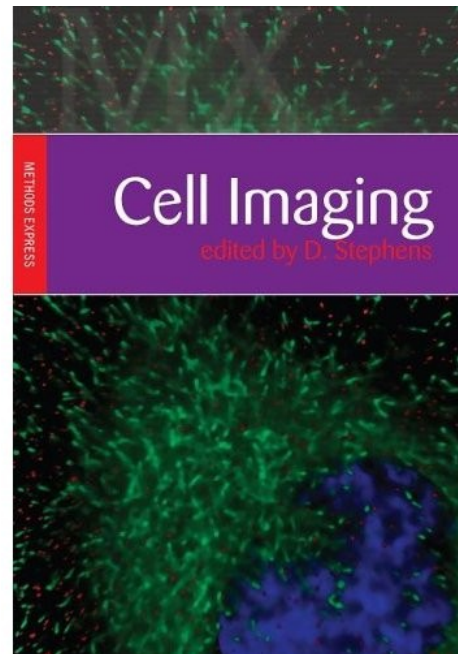
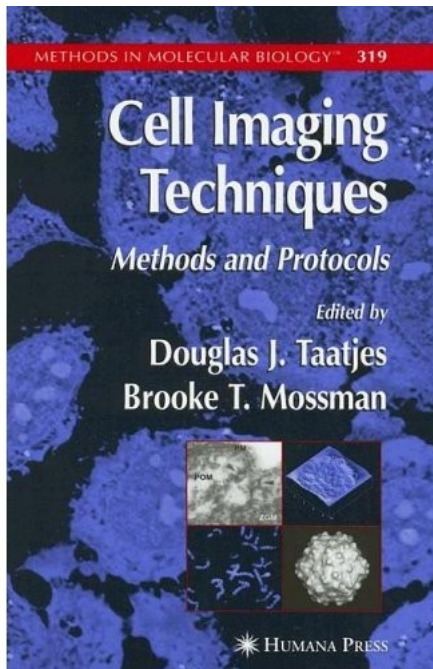
<http://www.isac-net.org/>

- Molecular Probes (Invitrogen)

<http://probes.invitrogen.com/handbook/>

Informační zdroje - mikroskopie

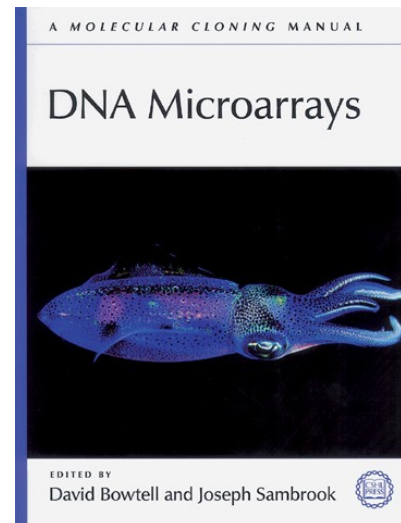
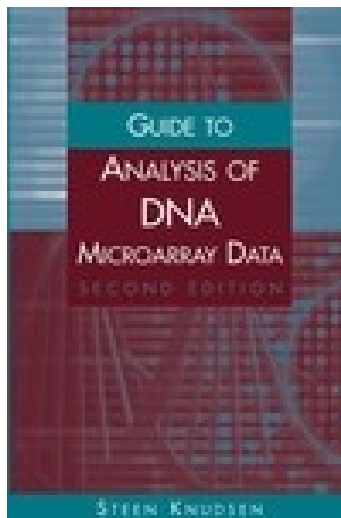
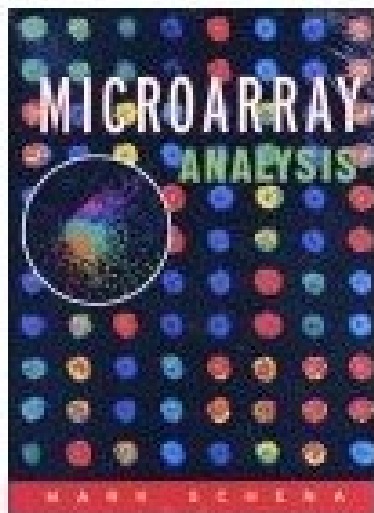
- Taatjes D. J. Cell Imaging Techniques, Methods and Protocols, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2005
- Stephens D. Cell Imaging, Scion Publishing Ltd., 2006.
- Pawley, J. (Ed.), Handbook of Biological Confocal Microscopy, 3rd ed., 2006



Tyto knihy je možné zapůjčit ke studiu do knihovny BFÚ.

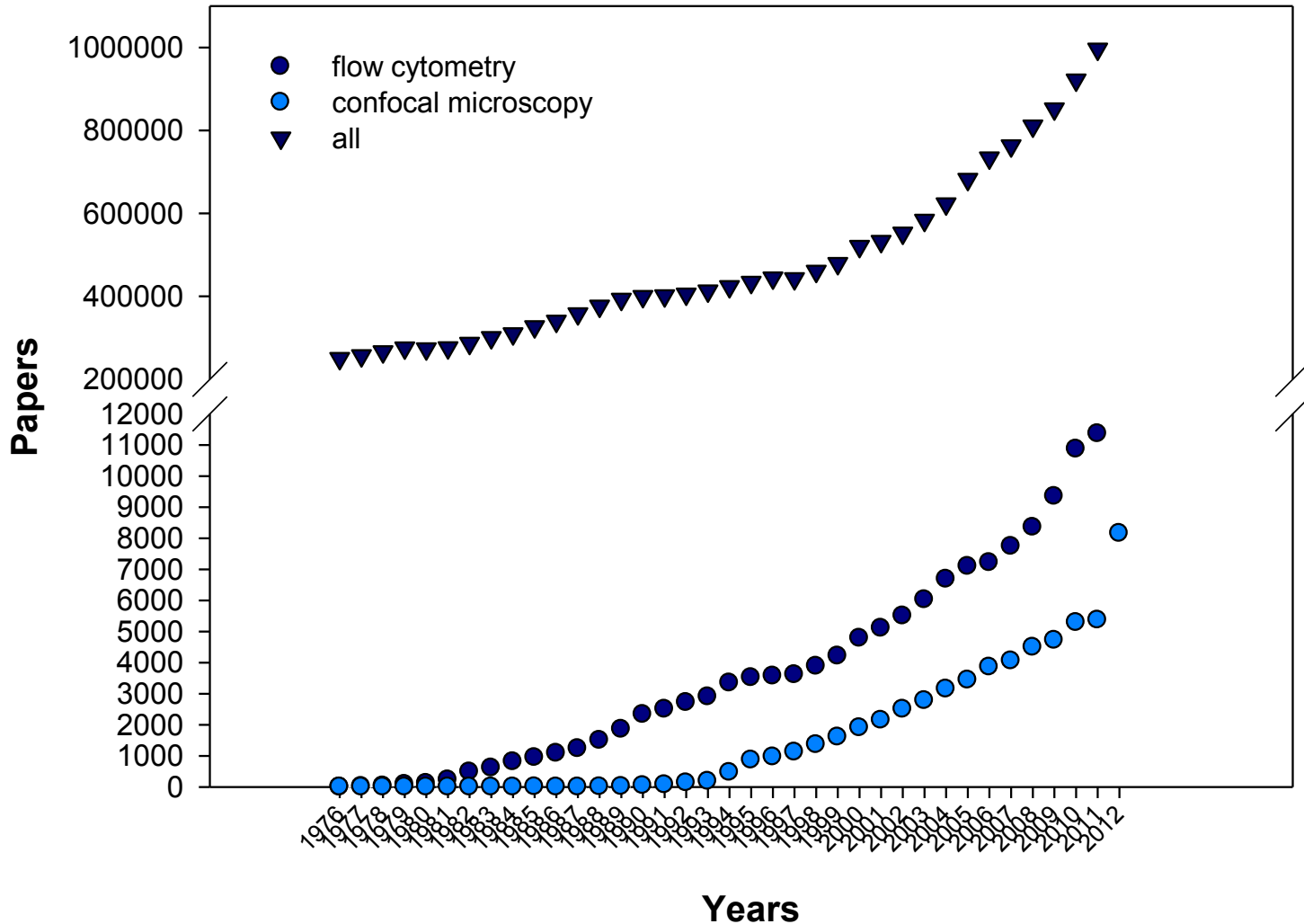
Informační zdroje - microarrays

- Microarray Analysis, Mark Schena, Wiley-Liss 2003
- Guide to Analysis of DNA Microarray Data, Second Edition, Steen Knudsen, Wiley-Liss 2004
- DNA microarrays: a molecular cloning manual. Bowtell D, Sambrook J., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2003.



Tyto knihy je možné zapůjčit po domluvě ke studiu do knihovny BFÚ.

Cytometry Publications/Year

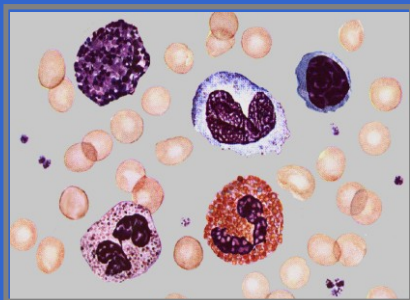




Obecný úvod do průtokové cytometrie

- Základní principy, možnosti průtokové cytometrie a její aplikace
- Historie

Tyto částice mají něco společného ...



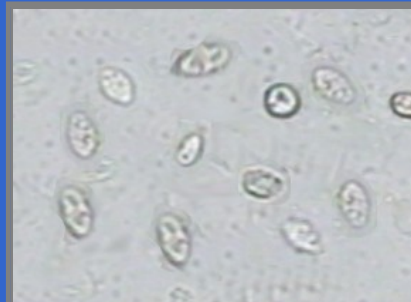
Blood cells



Chromosomes



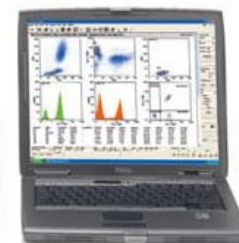
Algae



Protozoa

... určité parametry těchto částic mohou být měřeny pomocí průtokové cytometrie.

Komerční zařízení





Co můžeme analyzovat pomocí průtokové cytometrie?

- Počítat částice v suspenzi
- Oddělit živé částice od neživých
- Hodnotit 10^5 až 10^6 částic za méně než 1 minutu
- Kvantifikovat rozptyl světla, ale i intenzitu fluorescence
- Fyzicky separovat jednotlivé částice (populace) pro další analýzu



Jaké jsou principy?

- **Rozptyl světla (Light scatter)** pomocí laseru nebo UV lampy
- Detekce specifické fluorescence
- **Hydrodynamicky** zaostřený proud částic
- **Elektrostatická** separace částic
- Možnost **multivariační** analýzy dat



Definice

- **Průtoková cytometrie (flow cytometry)**
 - Meření vlastností proudících částic (buněk)
- **Průtokový sorting (flow sorting)**
 - Separace částic (buněk) na základě parametrů měřených průtokovou cytometrií
 - také známo jako **Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)**



Technické součásti

- Zdroje světla
- Detekční systémy
- Fluidní systém
- Separace
- Sběr dat
- Analýza dat



Technické součásti

■ Detekční systémy

Fotonásobiče (Photomultiplier Tubes (PMTs))

dříve 1-2

nyní 3-8

Diody

detekce rozptylu světla (light scatters)

■ Zdroje světla

Lasery (350-363, 420, 457, 488, 514, 532, 600, 633 nm)

Argon ion, Krypton ion, HeNe, HeCd, Yag

UV (Arc) Lampy

Mercury, Mercury-Xenon



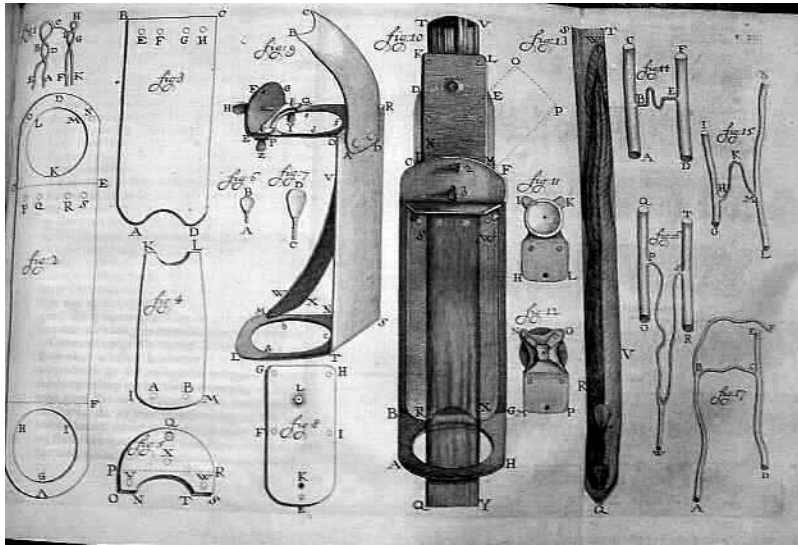
Stain Your Own Cell

life
technologies™

Historie barvení biologických materiálů

Až do poloviny 19. století – *byly používány pouze přírodní barviva*

Anton van Leeuwenhoek použil v roce 1719 šafrán na obarvení svalových buněk

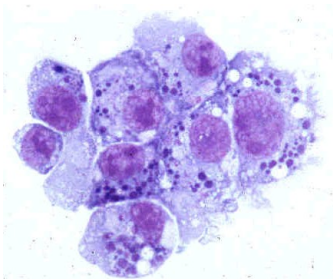


Leeuwenhoek
Microscope
(circa late 1600s)



Historie barvení biologických materiálů

Paul Ehrlich - 1879 použil kyselá a zásaditá barviva pro odlišení acidofilních, eosinofilních a neutrofilních leukocytů



Clin Lab Med. 1993 Dec;13(4):759-71.

The Ehrlich-Chenzinsky-Plehn-Malachowski-Romanowsky-Nocht-Jenner-May-Grunwald-Leishman-Reuter-Wright-Giemsa-Lillie-Roe-Wilcox stain. The mystery unfolds.

Woronzoff-Dashkoff KP.

Historie barvení biologických materiálů

Princip fluorescenčního Mikroskopu - August Köhler - 1904



August Köhler
(1866-1948)

Köhler's Original Woodcut

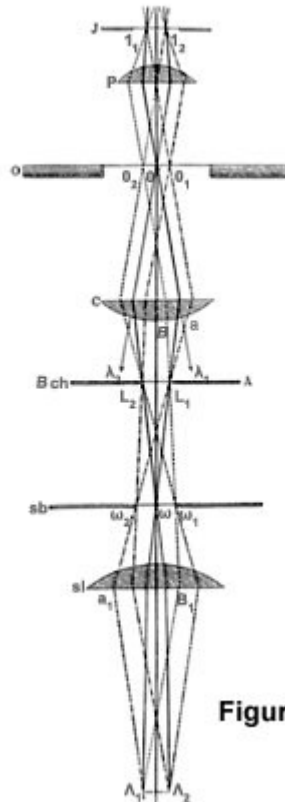
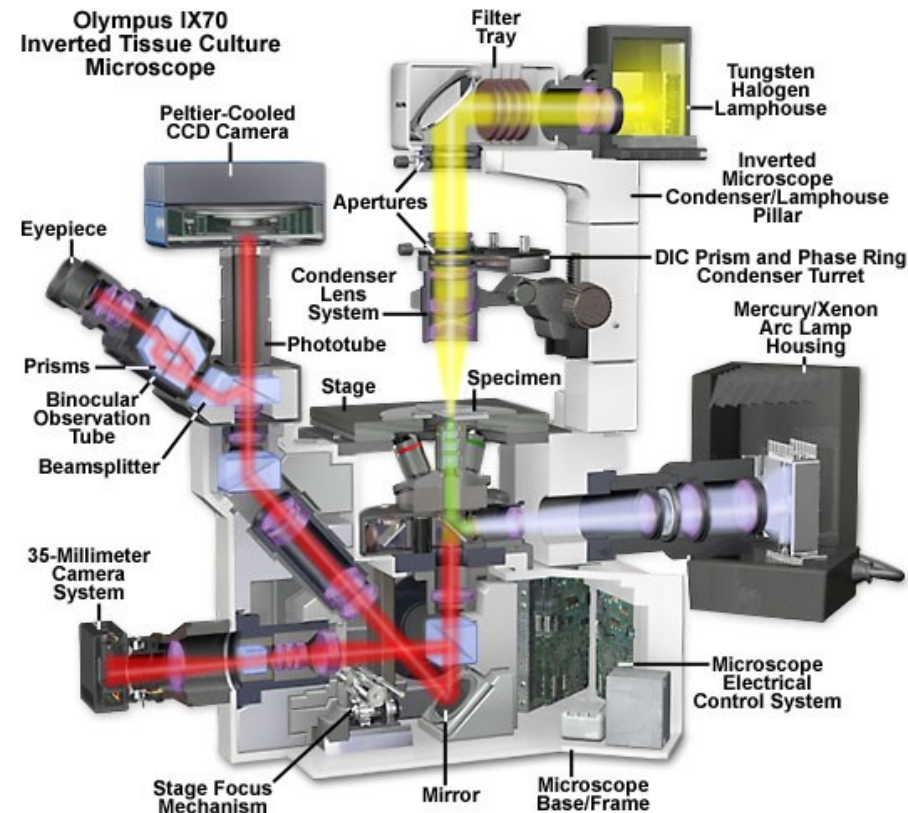


Figure 1



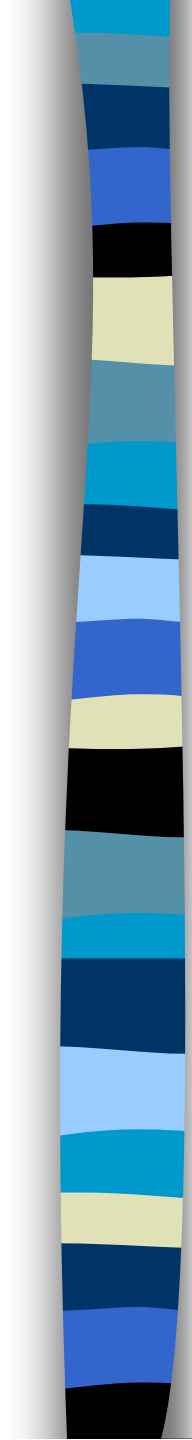
Andrew Moldavan

Není jasné zda
Moldavan vůbec svůj
„počítač buněk“ sestrojil.
Ve svém, článku popisuje
mnoho problémů, ale
žádné výsledky.

“The purpose of the experiment is to have each microscopical cell passing through the capillary tube, register itself automatically on the photoelectric apparatus, thus creating a micro-current which can be amplified and recorded.”

Photo-Electric Technique for the Counting of Microscopical Cells

Andrew Moldavan
Montreal, Canada
Science 80:188-189, 1934



Coons et al 1941 – vyvinuli techniku fluorescenčního značení protilátek - označili anti-pneumokokové protilátky pomocí antracénu. To jim umožnilo detekovat protilátky i patogeny v tkáni pomocí UV fluorescence.

“Moreover, when Type II and III organisms were dried on different parts of the same slide, exposed to the conjugate for 30 minutes, washed in saline and distilled water, and mounted in glycerol, individual Type III organisms could be seen with the fluorescence microscope.....”

Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group

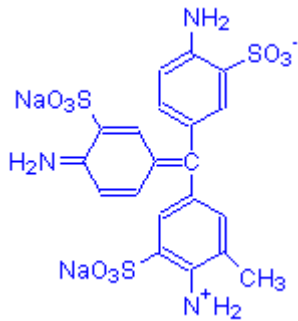
Albert H. Coons, Hugh J. Creech and R. Norman Jones

Department of Bacteriology and Immunology, Harvard Medical School, and the Chemical Laboratory, Harvard University
Proc. Soc. Exp.Biol.Med. 47:200-202, 1941

Coons a Kaplan (1950) - konjugovali fluorescein s isokyanátem (FITC) – získali lepší signál – dále od autofluorescence.

Friedman

Friedman (1950) – kombinoval kyselý fuchsin, akridinovou žlutá a berberin pro detekci buněk nádorů dělohy pomocí fluorescenčního mikroskopu



Acid Fuchsin

Acid magenta

Acid rubin

Acid roseine

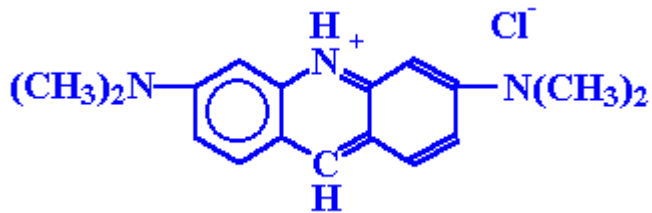
Absorption Max 540-545

von Bertalanffy & Bickis

Ludwig von Bertalanffy (1901-1972)

von Bertalanffy & Bickis (1956)

- metachromatic fluorescence Akridinové oranže byla použita pro detekci RNA v tkáni
- použili ji také pro rozlišení normálních a nádorových buněk



Absorption Max 467 nm

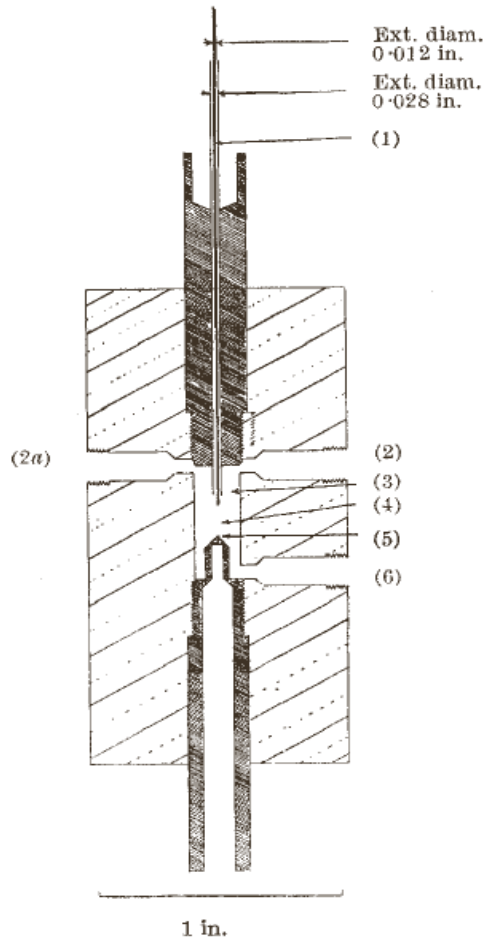
Gucker - 1947

- Vyvinul průtokový cytometr pro detekci bakterií v aerosolu.
- Utajená práce vynikala během Druhé světové války a byla publikována v roce 1947.
- Cílem byla rychlá detekce vzdušných spór a bakterií během válečného konfliktu.
- Instrument: Proudí vzduch procházel skrz osvětlenou komůrku. Jako zdroj světla sloužila lampa ze světlometu a pro detekci byl použit fotonásobič.

P.J. Crossland-Taylor

„Sheath Flow“ princip

“Provided there is no turbulence, the wide column of particles will then be accelerated to form a narrow column surrounded by fluid of the same refractive index which in turn is enclosed in a tube which will not interfere with observation of its axial content.”



(1) Needle in holder; (2) and (2a) inflow tubes; (3) wide-bore tube; (4) observation area for (3); (5) vortex; (6) flushing tube

A Device for Counting Small Particles suspended in a Fluid through a Tube

ATTEMPTS to count small particles suspended in fluid flowing through a tube have not hitherto been very successful. With particles such as red blood cells the experimenter must choose between a wide tube which allows particles to pass two or more abreast across a particular section, or a narrow tube

P. J. CROSLAND-TAYLOR*

Bland-Sutton Institute of Pathology,
Middlesex Hospital,
London, W.1.
June 17.

No. 4340 January 3, 1953

NATURE

Wallace Coulter



- Wallace Coulter - Coulter orifice - 1956 -
- (patent 1953) – měření změny vodivosti během průchodu buněk v suspenzi malým otvorem

Originální
patentová
aplikace
W.Coultera 1953

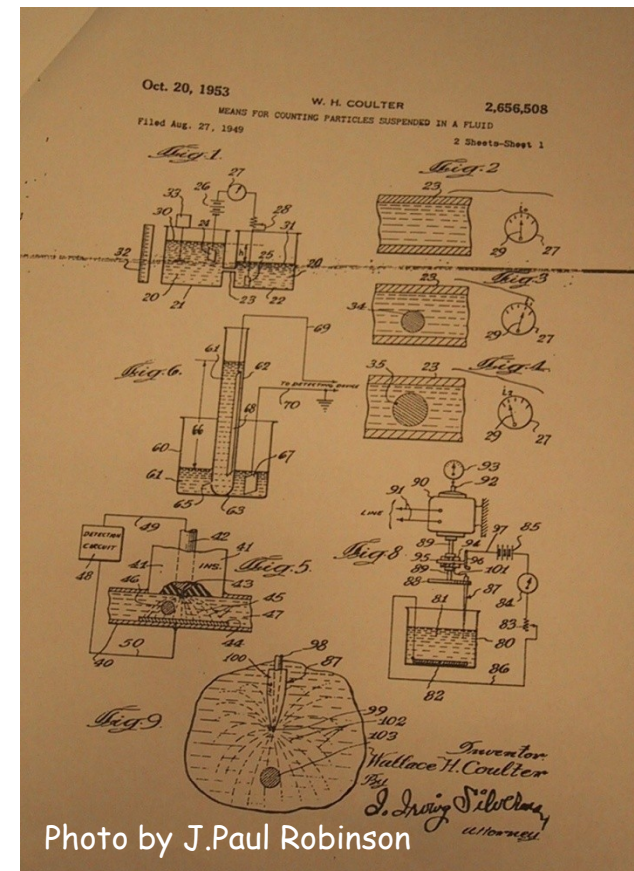
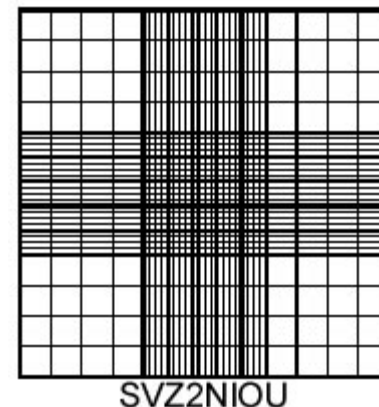
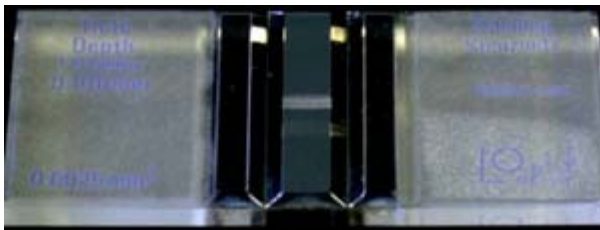


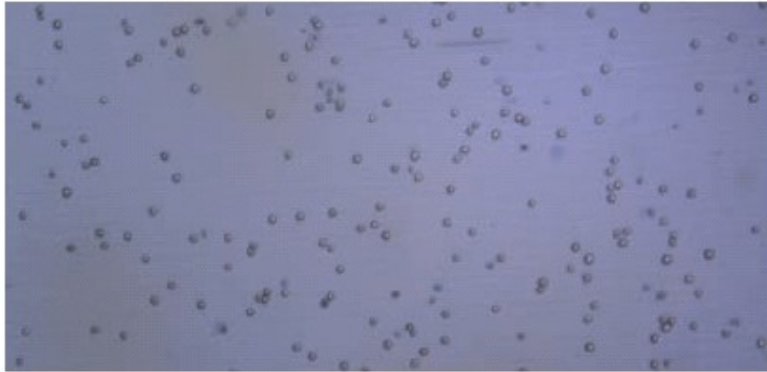
Photo by J.Paul Robinson

Jak počítat buňky?

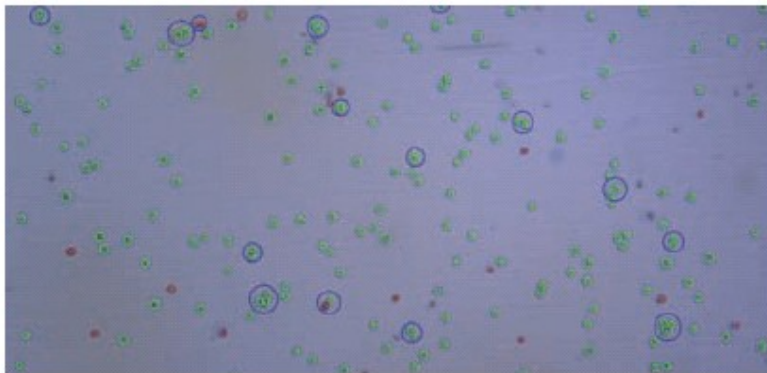
- Hemocytometer (Bürkerova komůrka) byla standardem pro počítání buněk do ~ 1950
- Rozměry jsou 3x3x0.1 mm. Obvykle jsou červené krvinky ($1 \times 10^6/\text{mm}^3$) počítány po naředění 1:200
- Leukocyty ($5 \times 10^3/\text{mm}^3$) jsou ředěny 1:10 v roztoku lyzujícím červené krvinky
- Statistická chyba:
 - koeficient variance (CV) je při 500 spočítaných buňkách 4.4%
 - chyba pipetování a ředění je ~ 10%



Roche Innovatis Cedex



High Resolution Color Image



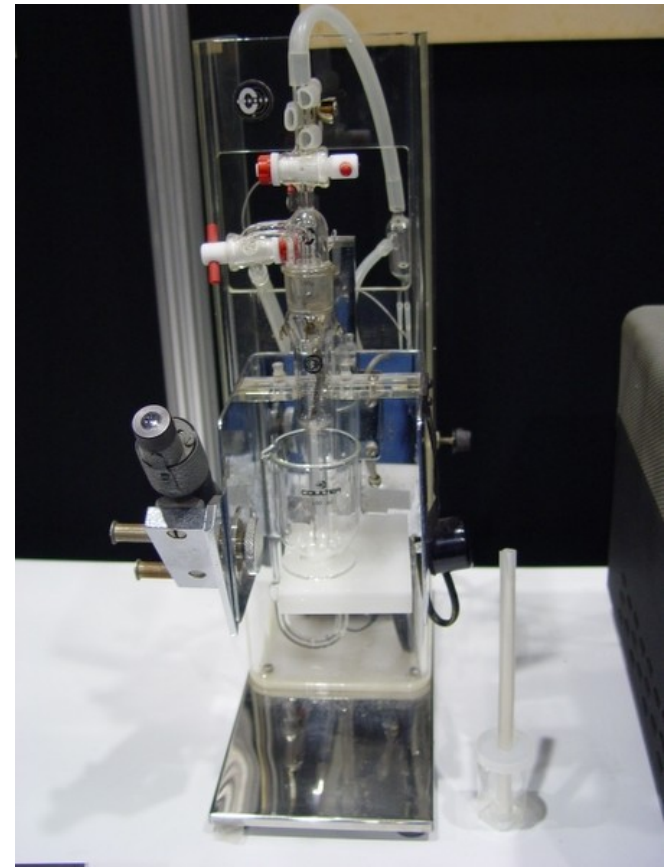
Visual Labeling



Coulter Counter



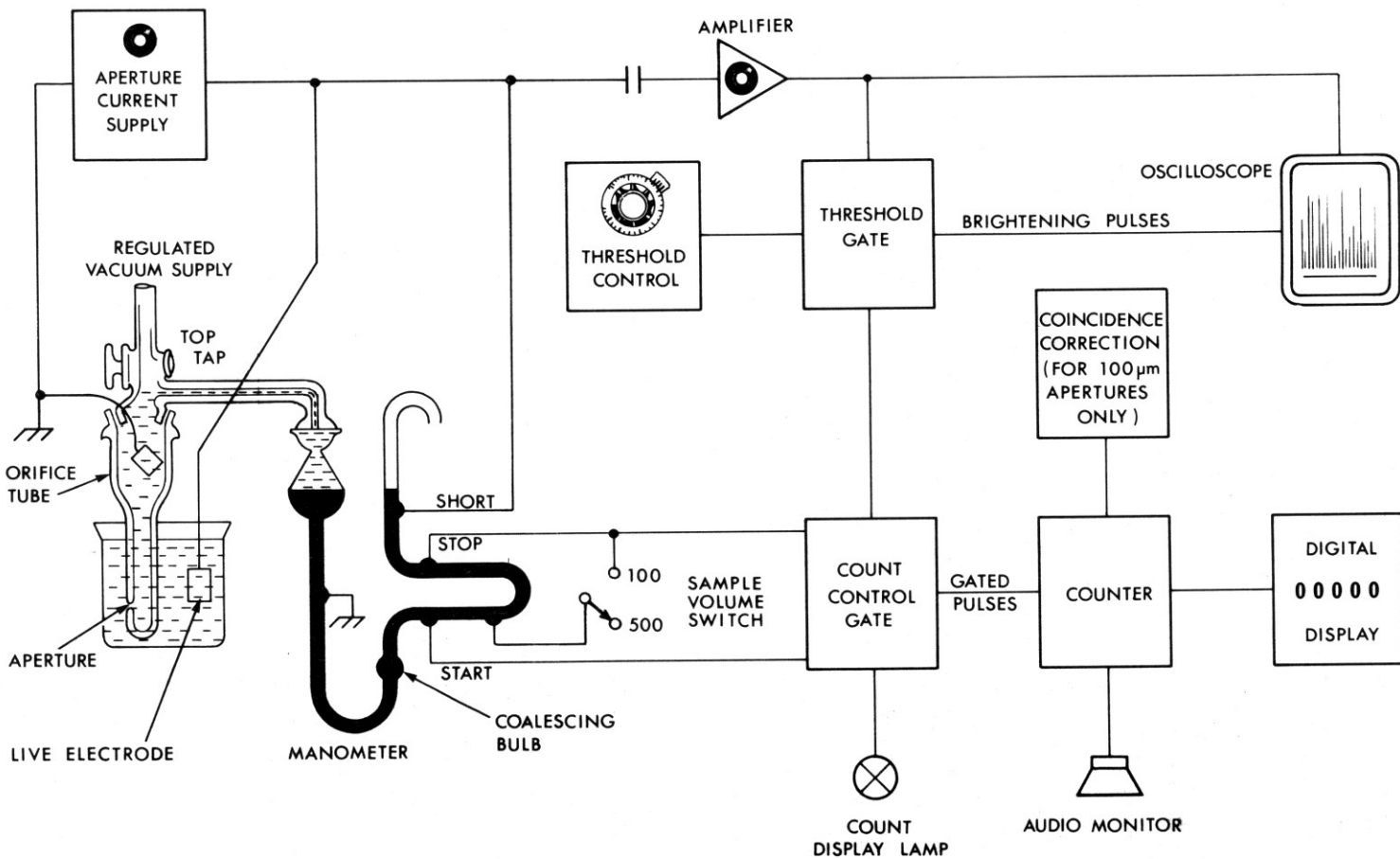
První komerční verze CC



Coulter Counter

1-2

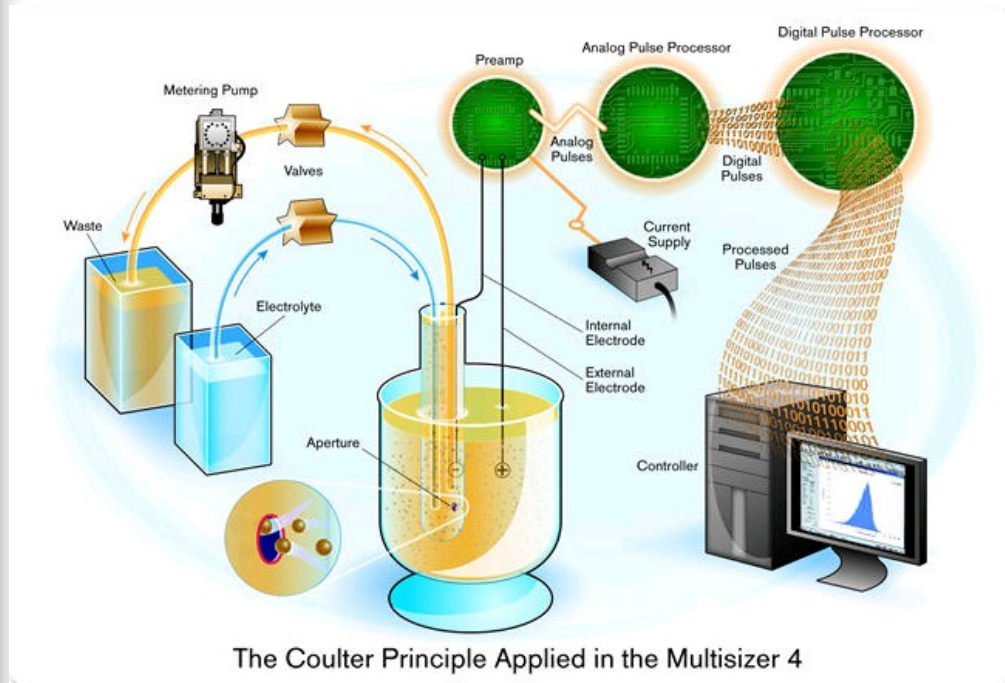
FIG.1-1 FUNCTIONAL BLOCK DIAGRAM FOR MODEL ZF COUNTER



July '80

Beckman Coulter

■ Multisizer™ 3&4 COULTER COUNTER®



Roche Innovatis

CASY TT

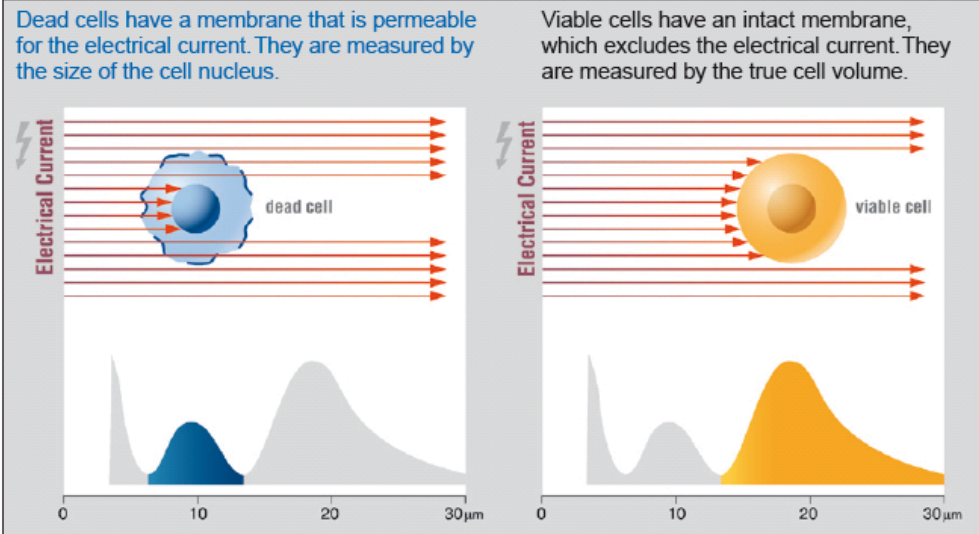


Figure 1: Viability Measurement by Electrical Current Exclusion. The status of the cell membrane distinctly affects the electrical signal generated when a cell is passing the measuring pore.

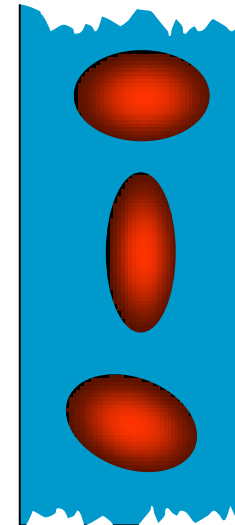
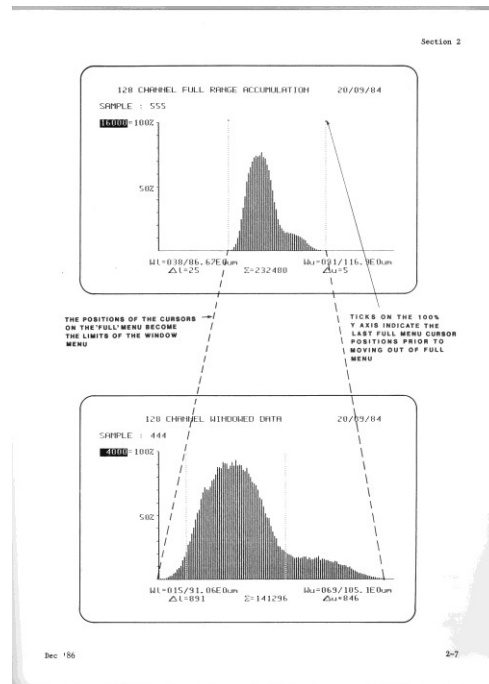


Cytograph. Stolní přístroj schopný měřit rozptyl světla **He-Ne laseru** (1970).

Mack Fulwyler- sorter

Mack Fulwyler - sorter 1965 - Los Alamos National Labs – jeho sorter separoval částice na základě elektronicky měřeného objemu (stejný princip jako Coulter counter) a separoval pomocí elektrostatického vychýlení.

Cílem bylo sortovat červené krvinky, protože u nich byla naměřena bimodální distribuce buněčného objemu. Princip separace byl založen na principu inkoustové tiskárny Richarda Sweeta ze Stanfordu (1965)



Po té co bylo objasněno, že bimodalita červených krvinek je artefakt byla tato skupina schopna separovat **neutrofilů a lymfocytů** z krve.

Richard Sweet

Richard Sweet vyvinul elektrostatickou inkoustovou tiskárnu jejíž princip využil Mack Fulwyler pro svůj buněčný sorter.

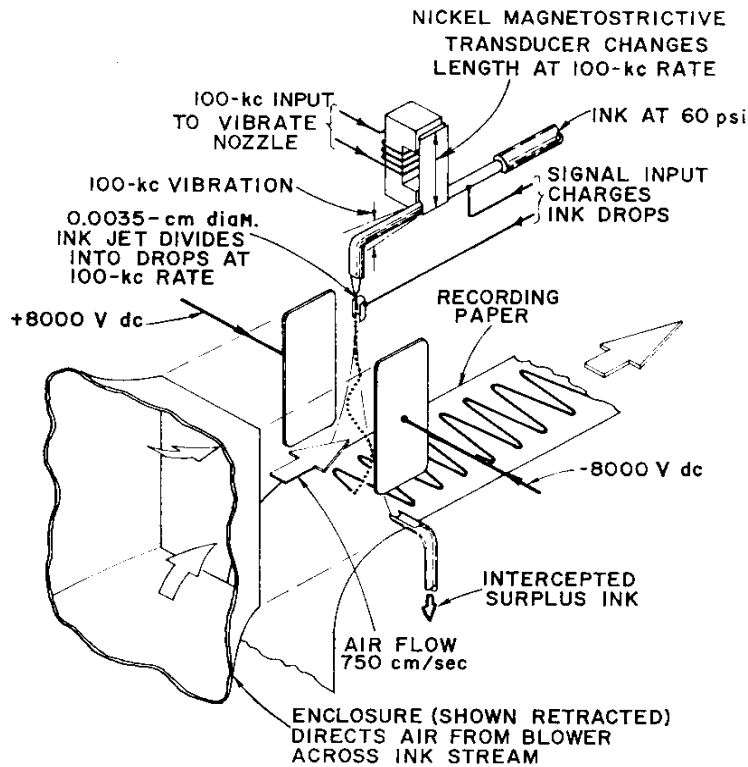


FIG. 1. Ink-jet oscillograph.

THE REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS

VOLUME 36, NUMBER 2

FEBRUARY 1965

High Frequency Recording with Electrostatically Deflected Ink Jets*

RICHARD G. SWEET
Systems Techniques Laboratory, Stanford Electronics Laboratories, Stanford University, Stanford, California
(Received 28 September 1964)

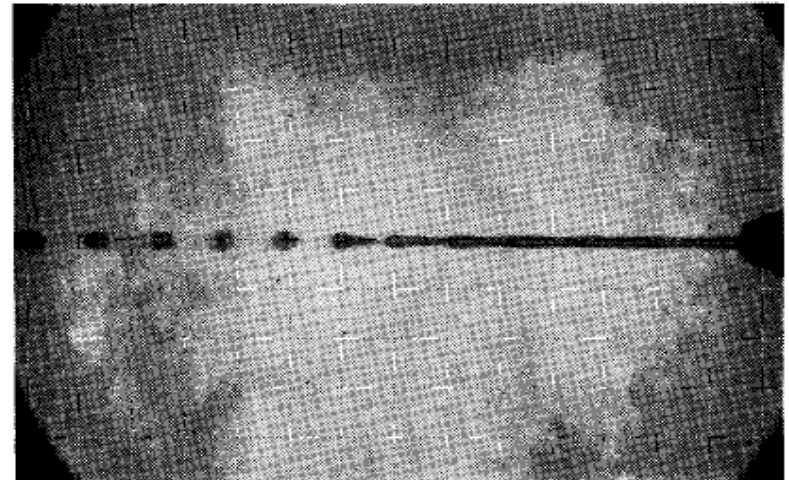
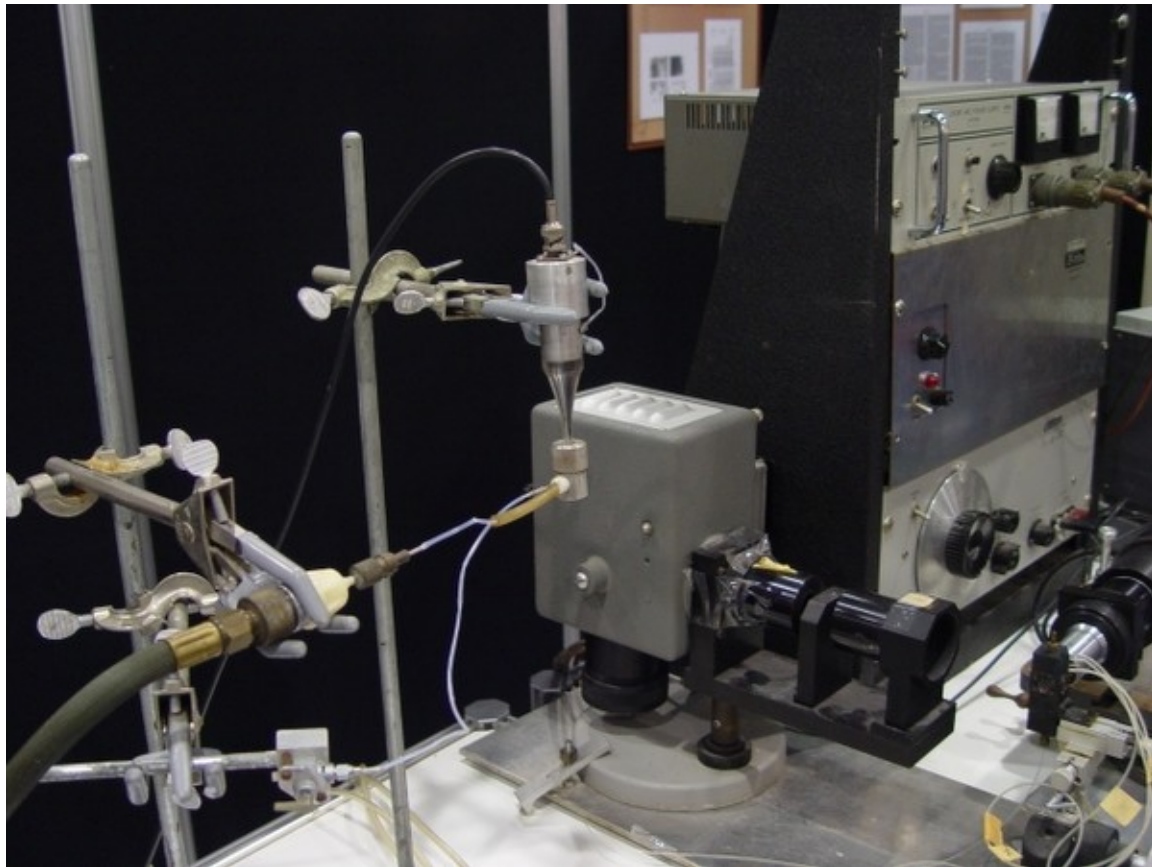
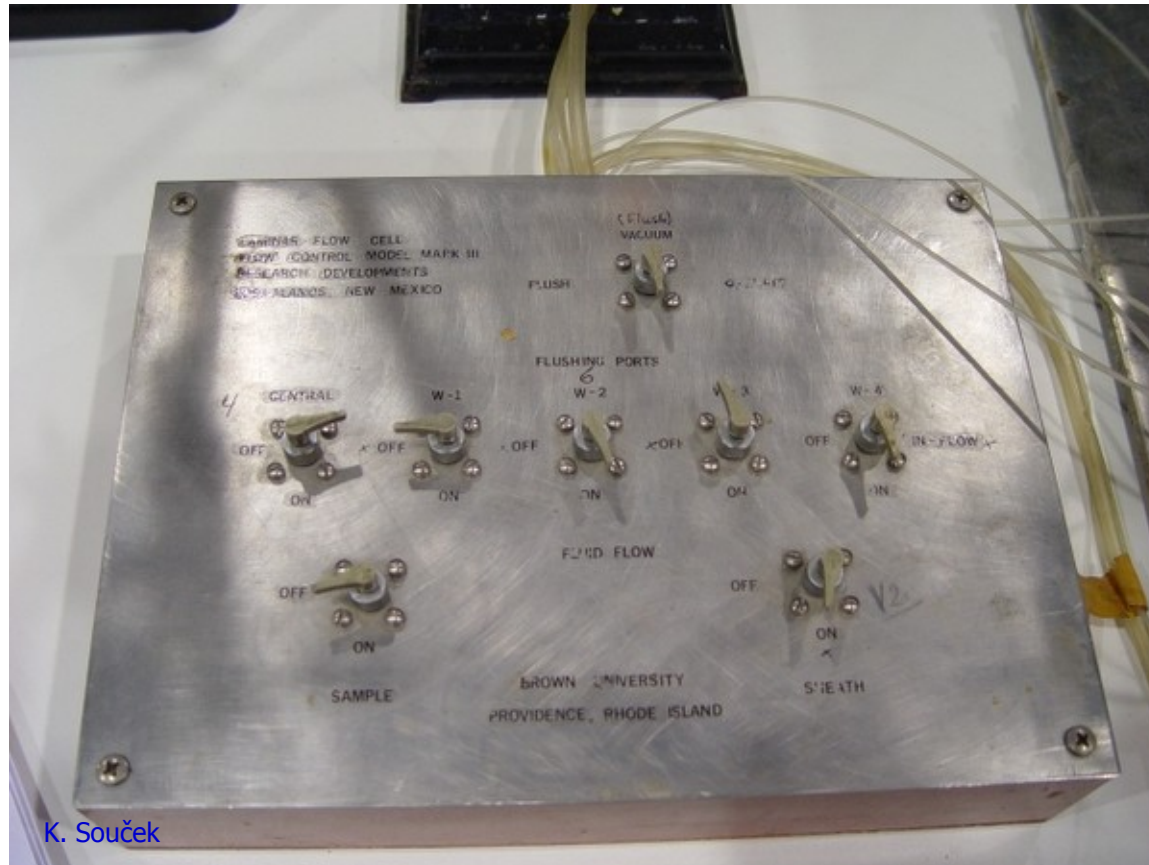


FIG. 3. Ink-drop formation.

Mack Fulwyler- sorter



Mack Fulwyler- sorter



K. Souček

Mack Fulwyler in His Own Words

J. Paul Robinson

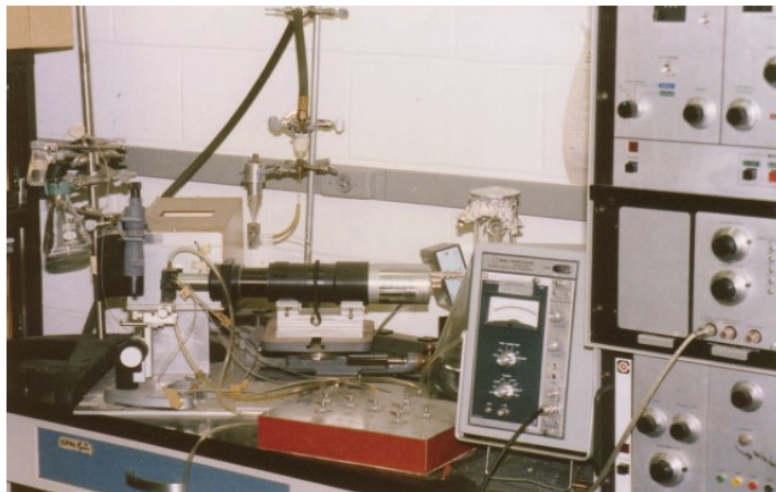
Purdue University Cytometry Laboratories, Bindley Biosciences Center, Purdue University, West Lafayette, Indiana

Received 12 July 2005; Revision 15 July 2005; Accepted 15 July 2005

MACK FULWYLER IN HIS OWN WORDS

65

FIG. 1. The Fulwyler instrument as installed in Dr. Boris Rotman's Laboratory in Brown University, immediately prior to disassembly in March 2005. The instrument had not been altered or moved since installation in 1967, except for the addition of a laser instead of the UV lamp.



April 30, 1968

M. J. FULWYLER
PARTICLE SEPARATOR

3,380,584

Filed June 4, 1965

5 Sheets-Sheet 1

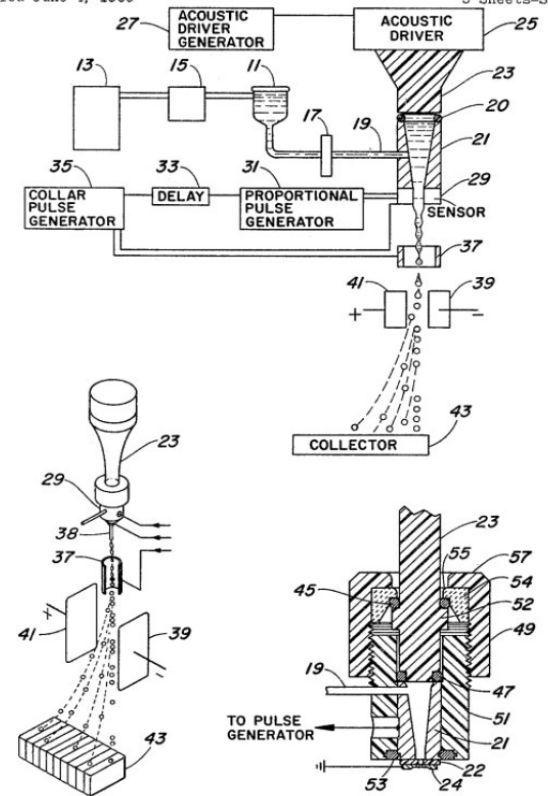


FIG. 4. A page from Fulwyler's patent on the cell separation technology patent #3,380,584 showing the fundamental components of the invention of the cell sorter.

INVENTOR.
Mack J. Fulwyler
BY
Richard A. Robinson
Attorney

Leonard Arthur "Len" Herzenberg

From Hulett, HR, Bonner, WA, Barrett, J, and Herzenberg, LA. Cell Sorting: Automated Separation of Mammalian Cells as a Function of Intracellular Fluorescence. Science 1969; 166: 747-749. Reprinted with permission from AAAS.

Cell Sorting: Automated Separation of Mammalian Cells as a Function of Intracellular Fluorescence

Abstract. A system for high-speed sorting of fluorescent cells was able to sort mouse spleen cells from Chinese hamster ovarian cells after development of fluorochromasia. Highly fluorescent fractions separated after similar treatment from mouse spleen cells immunized to sheep erythrocytes were enriched in antibody-producing cells by factors of 4 to 10.



Klíčové „cytometrické“ publikace

- 1934: Moldovan – Fotoelektrické měření buněk v kapiláře
- 1947: Gucker – fotoelektrické počítání buněk
- 1949: Coultrův počítač částic
- 1961: Rotman poprvé používá fluorescenci pro kvantifikaci enzymatické reakce
- 1964: Sweet – elektrostatická inkoustová tiskárna
- 1965: Fulwyler – květen 1965 - patent elektrostatického sorteru
- 1965: Kanetsky – spektrofotometrické měření buněk
- 1965: Fulwyler – listopad 1965 – publikace o buněčné separaci v časopise Science
- 1968: Gohde – první článek o fluorescenční průtokové cytometrii (v němčině)
- 1969: Gohde – patent
- 1969: Van Dilla – druhý článek o fluorescenční průtokové cytometrii
- 1969: Mullaney – první článek věnující se popisu rozptylu světla jako cytometrického parametru
- 1969: Heryenberg – třetí článek o fluorescenční průtokové cytometrii
- 1973: Gohde – patent dvojího značení
- 1977: Gohde – popis kompenzací signálu při dvojtém značení
- 1978: Kachel – flow imaging – kombinace průtokové cytometrie a analýzy obrazu
- 1983: izolace a detekce jader (DNA) z tkání zalitých v parafínu
- 1984: kongres o nomenklatuře cytometrie DNA
- 1987: Graz - vysokorychlostní sortování chromozómů
- 1991: Robinson – automatizace klinických systémů – průtokový cytometr a čtečka čárkových kódů

K čemu to všechno je... například...

Position Available

FLOW CYTOMETRY TECHNICIAN

Oceanography, MIT



The Chisholm Laboratory at MIT (<http://web.mit.edu/chisholm/www/>) is seeking a full-time flow cytometry technician to participate in research involving oceanic cyanobacteria. The position requires a Bachelors degree in science or engineering and two years experience. Applicants must have a solid background in and experience with flow cytometry, including extensive knowledge of hardware, data analysis, and experimentation. Duties include maintenance of flow cytometry instruments, experimentation, and assisting other lab members with flow cytometry as needed. Must be able to work as a member of a multidisciplinary team.

Please send a resume and 3 letters of recommendation to Dr. Marcia Osburne (mosburne@mit.edu), or Dr. Marcia Osburne, MIT, 15 Vassar St. rm 48-336B, Cambridge, MA 02139

K čemu to všechno je... například...

- 43 miliónů lidí na světě je infikováno virem HIV (WHO)
- ročně zemře ~ 2 miliónu lidí na HIV/AIDS (v Africe je ~ 11 miliónu AIDS sirotků)
- kvantifikace CD4 T lymfocytů je klíčový parametr při monitorování léčby
- Průtoková cytometrie je „zlatý standard“
- Optimalizované postupy a zařízení pro levné (< 3 EUR / vzorek) a rychlé detekce (250 vzorků / den)

Quick and easy preparation
for CD4 absolute and CD4%

Step 01

Add 20µl EDTA whole blood

After adding EDTA blood
10 min incubation

Partec CD4/CD45
dry mAb tube



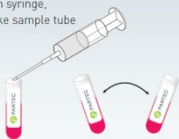
Step 02

Add pre-filled buffer 1 from
tube, shake sample tube



Step 03

Add pre-filled buffer 2
from syringe,
shake sample tube



Step 04

Refill volume from sample
tube into syringe



Step 05

Attach syringe to
CyFlow® miniPOC



CyFlow® miniPOC

True Point-of-Care Device
for CD4 & CD4% Testing

Compact
& Portable



routine mode



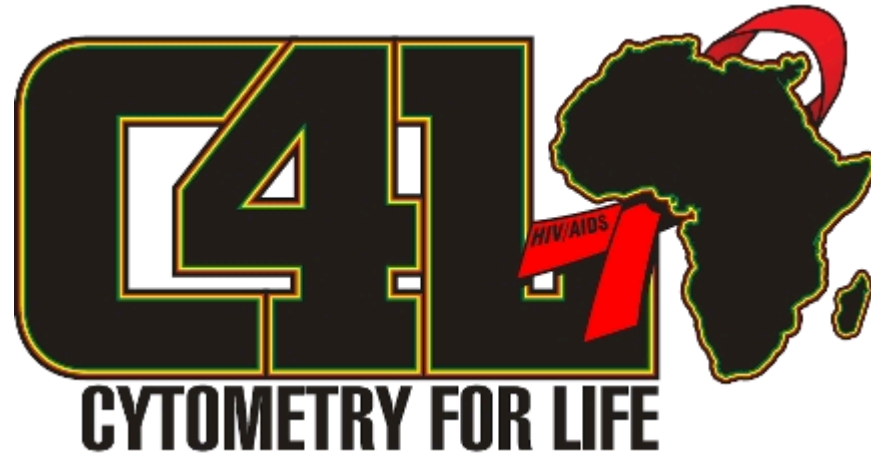
routine mode



expert mode with cell distribution display



 PARTEC



- <http://www.cytometryforlife.org/>



Co tomu předcházelo...

- Rozvoj techniky umožňující rychlou a reprodukovatelnou detekci cytometrických parametrů.
- Nové vědecké poznatky vedoucí k definici vhodných diagnostických markerů.

ISAC presents: Mack Fulwyler - Innovator, Inventor & Pioneer

<http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/gh/HTML/start.htm?loc=http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/gh/HTML/video/video.html?v=Flowtheinvention.wmv>

<http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/cyto10a/seminalcontributions/fulwyler.html>





Shrnutí přednášky

- Úvod do kurzu
- Zdroje literatury
- Historie průtokové cytometrie
- Základní principy

Na konci dnešní přednášky byste měli:

1. vědět jaké jsou požadavky pro tento kurz
2. znát základní zdroje informací
3. mít stručný přehled o historii průtokové cytometrie
4. orientovat se v některých základních principech průtokové cytometrie