

ΠΡΟΣ ΤΟ ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΒΑΣΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ Β΄

III ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

ΓΙΑΝΝΑΚΗ ΕΥΘΑΛΙΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ PhD

ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

**ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
«ΘΕΑΓΕΝΕΙΟ»**

Επιλογή αντιδραστηρίων και αξιολόγηση

- Θέματα φθοριζουσών ουσιών
- Compensation
- Είδη φθοριζόντων ανιχνευτών
- Τιτλοποίηση αντισώματος
- Αποφυγή και έλεγχος background
- Έλεγχος χρώσεων, αξιολόγηση δείγματος
- Εσωτερικός έλεγχος ποιότητας

Φθορίζουσες ουσίες

- Είναι χρωστικές που όταν δέχονται φωτεινή ενέργεια (πχ από Laser) ενός συγκεκριμένου μήκους κύματος το εκπέμπουν σε μεγαλύτερο μήκος. Οι δύο αυτές διεργασίες ονομάζονται διέγερση (excitation) και εκπομπή (emission). Η διαδικασία εκπομπής φωτός γίνεται πολύ γρήγορα (σε nanosec) και είναι γνωστή ως **φθορισμός**. Το να «**φθορίζεις**» σημαίνει να εκπέμπεις φώς μέσω αυτής της διαδικασίας.
- Οι πιο σημαντικές ιδιότητες μιας φθορίζουσας ουσίας είναι το **φάσμα διέγερσης και εκπομπής** (absorption & emission spectrum), ο **συντελεστής απόσβεσης** (extinction coefficient), η **κβαντική απόσβεση** (quantum efficiency) και η **κβαντική απόδοση** (quantum yield) .

Φθορισμός (Fluorescence)

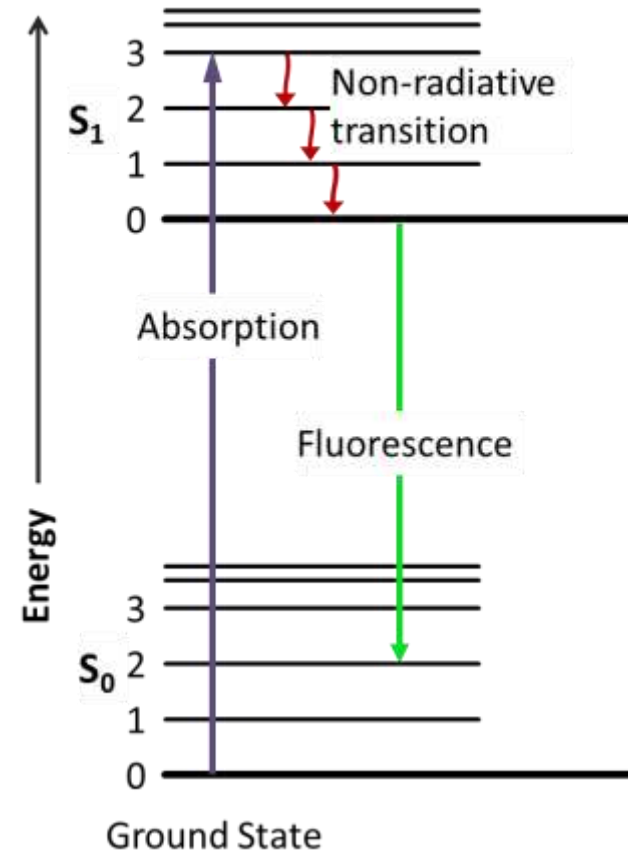
Ο φθορισμός πραγματώνεται όταν ένα ηλεκτρόνιο ενός μορίου, ή ατόμου, ή νανοδομής αναπαύεται στην φάση που απαιτεί την χαμηλότερη ενεργειακά κατάσταση του (**ground state**) μετά από εκπομπή (**emission**) ενός φωτονίου εφόσον αυτό είχε διεγερθεί (**excitation**) προηγουμένως σε μια ανώτερη ενεργειακή κατάσταση από κάποιας μορφής ηλεκτρομαγνητική ενέργεια:

Excitation: $So+h\nu_{ex} \rightarrow S1$

Fluorescence emission: $S1 \rightarrow So+h\nu_{em}+heat$

Όπου $h\nu$ είναι ένας γενικός όρος της φωτεινής ενέργειας, h = σταθερά (**Planck's constant**) και ν = συχνότητα φωτός (**frequency**). So ονομάζεται η βασική κατάσταση (ground state) του φθορίζοντος μορίου (**fluorophore**) και $S1$ είναι η πρώτη διεγερμένη (ηλεκτρονικά) ενεργειακή κατάσταση (excited state).

Το να «**φθορίζεις**» σημαίνει να εκπέμπεις φως μέσω αυτής της διαδικασίας.



Φθορισμός (Fluorescence) II

- Το εκπεμπόμενο φως είναι χαμηλότερης ενέργειας και μεγαλύτερου μήκους κύματος από το απορροφούμενο φως. Αυτό σημαίνει ότι το χρώμα του φωτός που εκπέμπεται είναι διαφορετικό από το χρώμα του φωτός που απορροφήθηκε.
- Μετά την εκπομπή του φωτός το φθορίζον μόριο επανέρχεται στην χαμηλή αρχική ενεργειακή του κατάσταση (ground state). Το μόριο μπορεί να απορροφήσει φωτόνιο ξανά και να περάσει από την διαδικασία του φθορισμού πολλαπλές φορές. Το γεγονός αυτό καθιστά τον φθορισμό μια πολύ ευαίσθητη τεχνική ανίχνευσης ακόμη και μικροσκοπικών ποσοτήτων χρώσεων.
- Στην πραγματικότητα όμως το φθορίζον μόριο λόγω της αστάθειάς του στο στάδιο διέγερσης, αποδομείται και διασπάται έτσι ώστε να μη μπορεί να φθορίσει ξανά, αυτό ονομάζεται φωτολεύκανση (**photobleaching**).

Κβαντική απόδοση (quantum yield)

- Ως κβαντική απόδοση **quantum yield** φθορίζουσας ουσίας ορίζεται ο λόγος του αριθμού των φωτονίων που παράγονται, εκπέμπονται προς τον λόγο των φωτονίων που απορροφώνται.

$$\Phi = \frac{\text{Number of photons emitted}}{\text{Number of photons absorbed}}$$

- Η μέγιστη κβαντική απόδοση μιας φθορίζουσας χρωστικής είναι το 1.0 (100%): κάθε φωτόνιο που απορροφάται καταλήγει στην εκπομπή ενός φωτονίου. Ουσίες με quantum yields ακόμη και 0.10 θεωρούνται αρκετά φθορίζουσες.

- Ένας ακόμη τρόπος να υπολογίσουμε την κβαντική απόδοση είναι με τον υπολογισμό του ρυθμού αποδόμησης της διεγερμένης κατάστασης (**rate of excited state decay**): $\Phi = \frac{k_f}{\sum_i k_i}$

- Όπου k_f είναι ο ρυθμός αυθόρμητης εκπομπής ακτινοβολίας (**rate of spontaneous emission of radiation**) και $\sum_i k_i$ είναι το άθροισμα όλων των αιτιών που προκαλούν αποδόμηση της διεγερμένης κατάστασης.

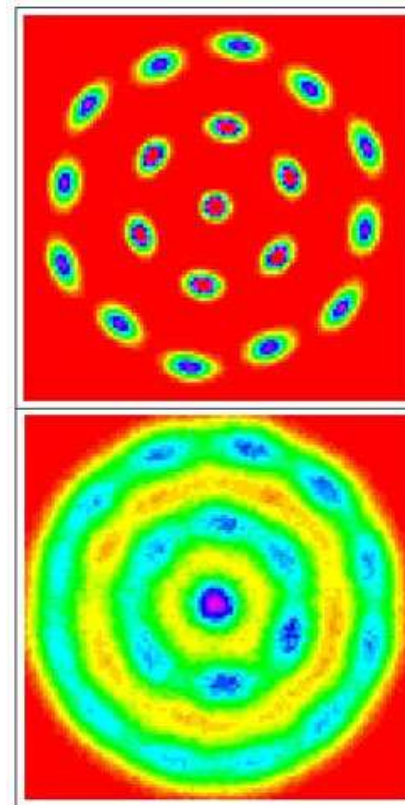
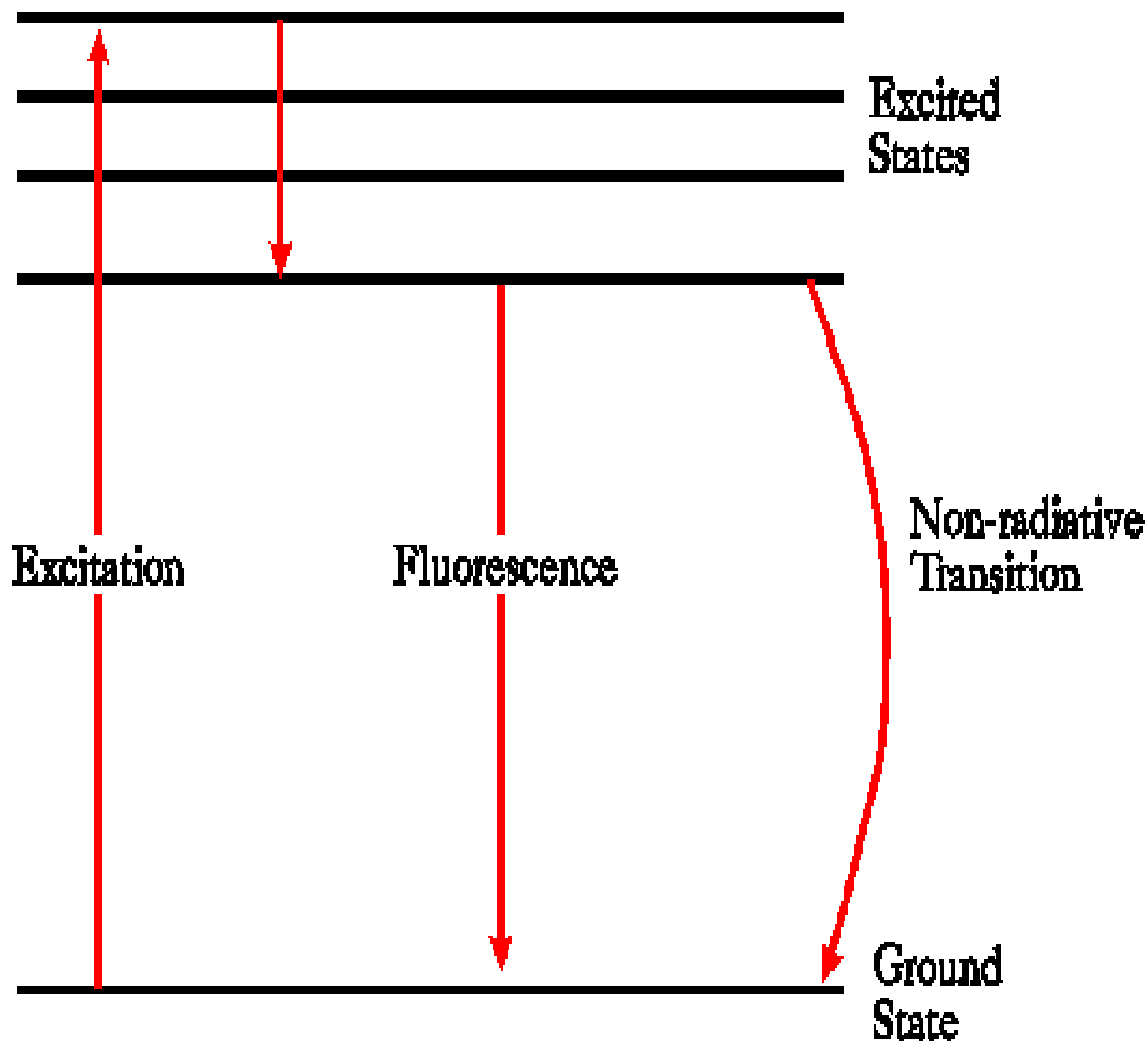
Κβαντική απόδοση (quantum yield) II

Παράγοντες που επηρεάζουν την κβαντική απόδοση εκπομπής ενέργειας με την μορφή φωτονίων σε άλλους τρόπους απόδοσης "non-radiative rates", είναι:

- dynamic collisional quenching (δυναμική απόσβεση)
- near-field dipole-dipole interaction (resonance energy transfer FRET)
- internal conversion (εσωτερική μετατροπή)
- intersystem crossing (the spin of the excited electron is reversed)

Κβαντική απόσβεση (Quenching)

- Ως απόσβεση ορίζουμε κάθε διαδικασία που μειώνει την ένταση του φθορισμού μιας ουσίας (**fluorescence intensity**).
- Προκαλείται από παράγοντες όπως: **excited state reactions, energy transfer, complex-formation and collisional quenching**.
- Επηρεάζεται από την πίεση και την θερμοκρασία (περιβαλλοντικές συνθήκες) καθώς και από την παρουσία μορίων οξυγόνου, ιόντων ιωδίου και ακρυλαμίδης.



Jablonski Energy Diagram

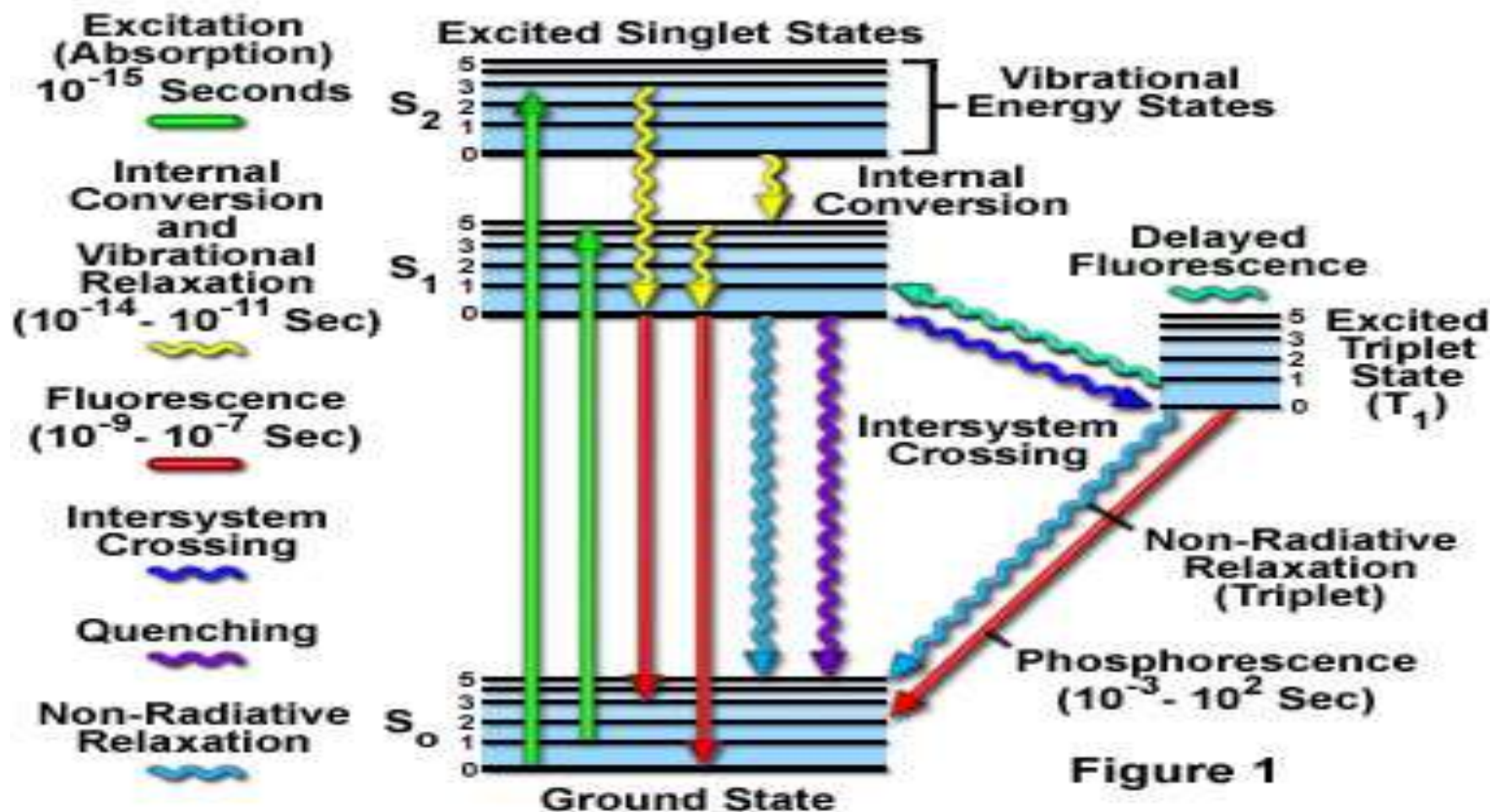
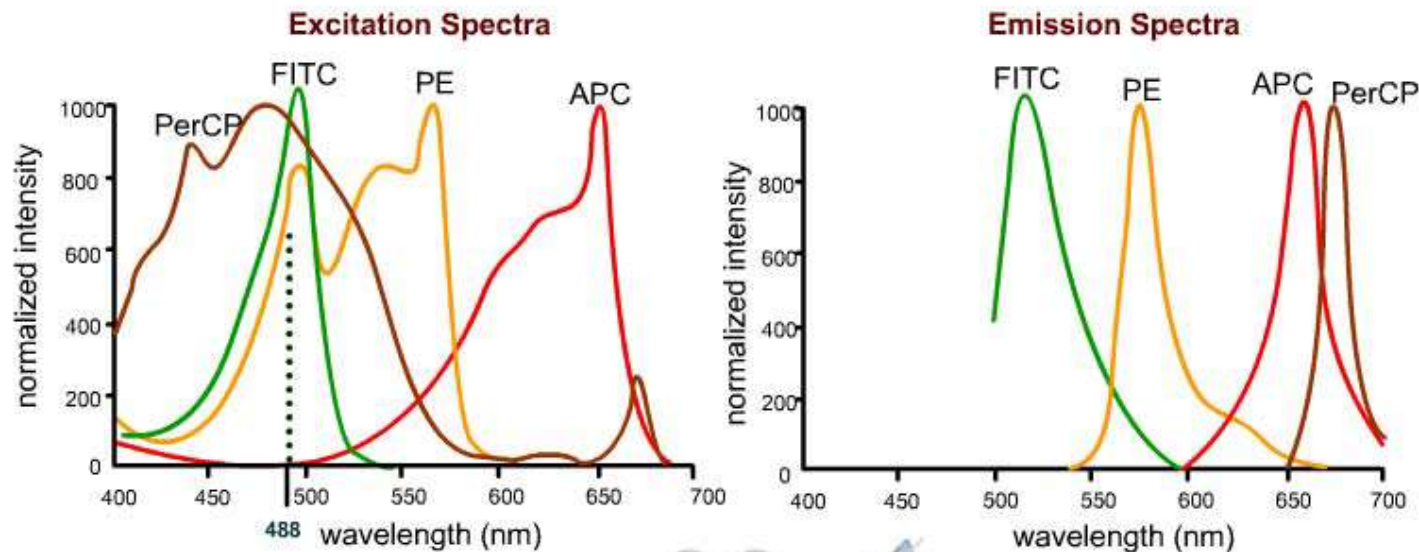


Figure 1

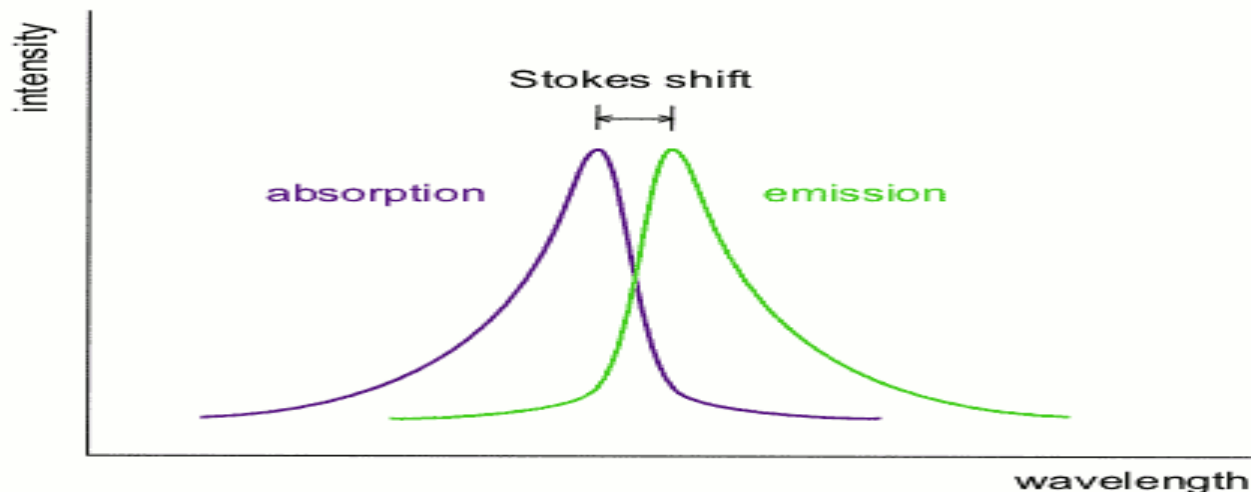
Φάσματα απορρόφησης και εκπομπής

Το εύρος κατανομής του φωτός που μπορεί να διεγείρει μια ουσία ονομάζεται **φάσμα απορρόφησης**. Ενώ το εύρος κατανομής του φωτός (φθορισμός) που εκπέμπεται ονομάζεται **φάσμα εκπομπής**. Κάθε κυτταρόμετρο έχει συγκεκριμένα lasers και οπτικά φίλτρα, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τα φάσματα ενεργοποίησης και εκπομπής όταν διαλέγουμε φθορίζουσες ουσίες για τα πρωτόκολλά μας.

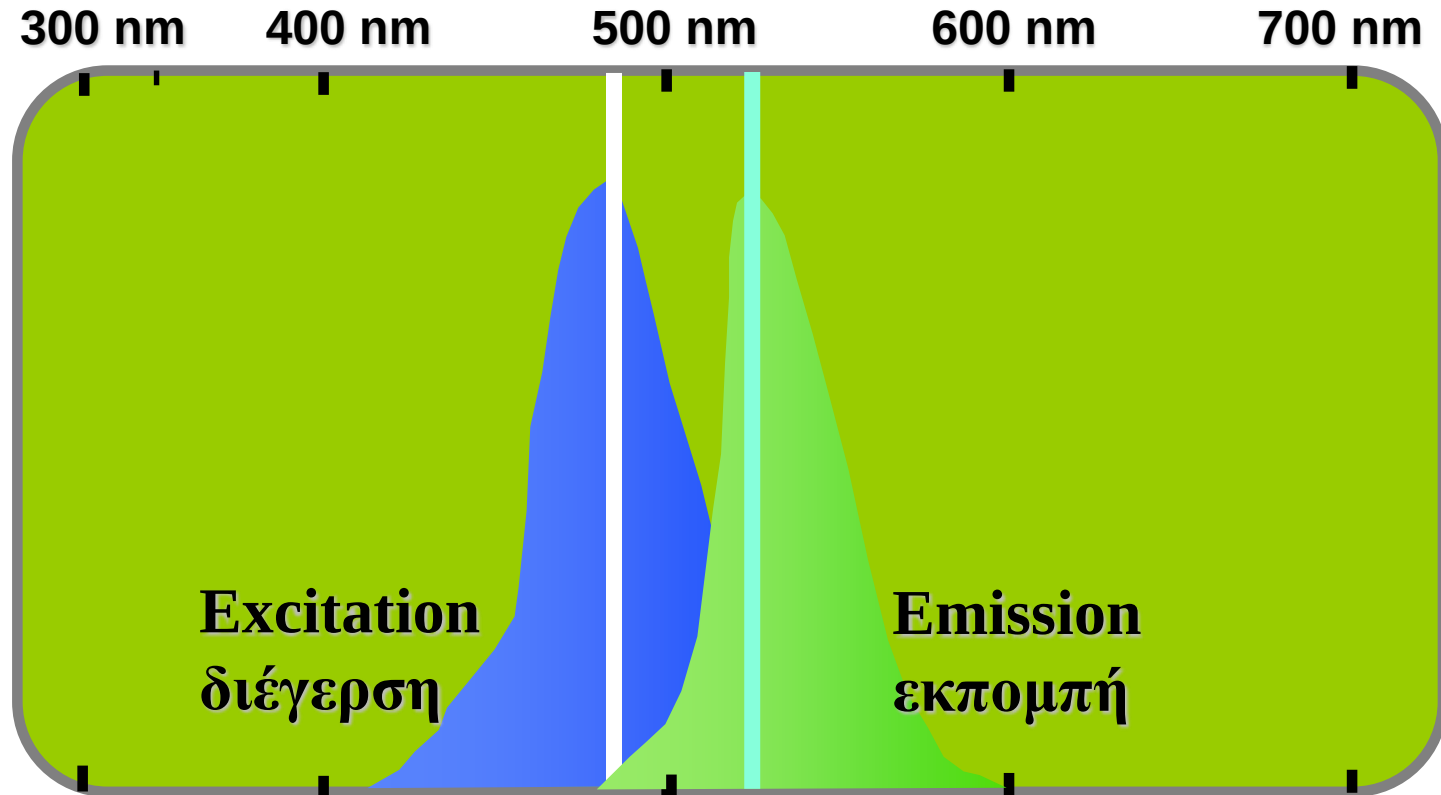


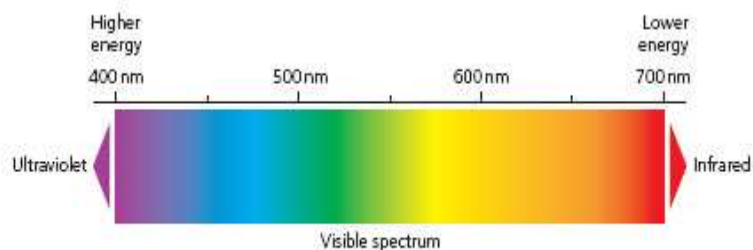
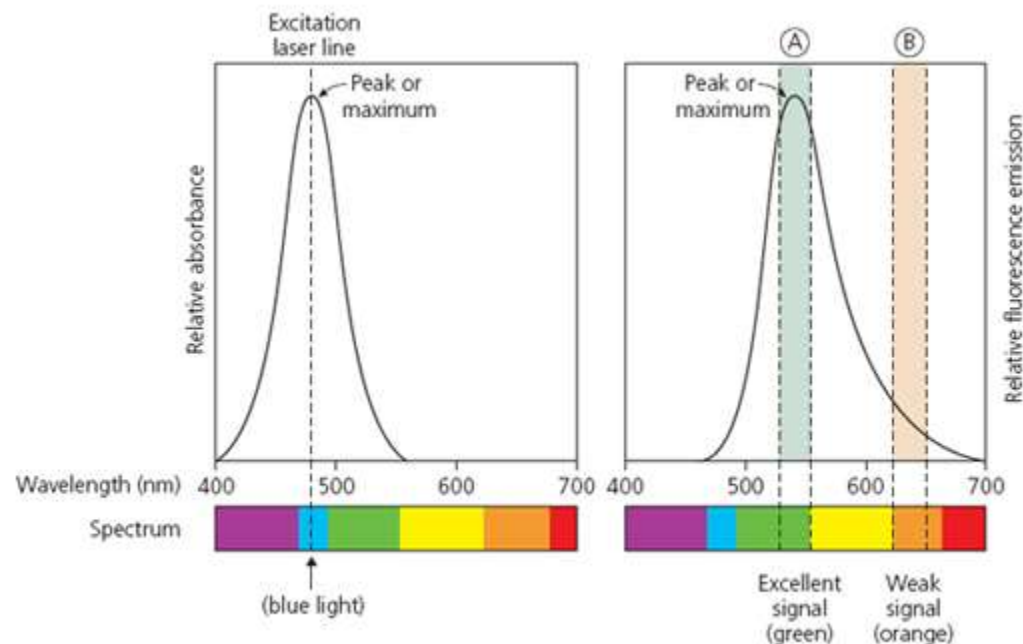
Φάσμα απορρόφησης & φάσμα εκπομπής

- Εντός του φάσματος απορρόφησης βρίσκεται το μήκος κύματος που διεγείρει πιο έντονα την φθορίζουσα ουσία (**excitation maximum**). Ανάλογα βρίσκεται το μήκος κύματος στο οποίο εκπέμπει (φθορίζει) πιο έντονα η φθορίζουσα ουσία (**emission maximum**).
- Το emission maximum είναι πάντοτε σε μεγαλύτερο μήκος κύματος (μικρότερη ενέργεια) από το excitation maximum. Αυτή η διαφορά ονομάζεται **Stoke's shift**. Είναι χαρακτηριστικό της στερεοδομής κάθε φθορίζουσας ουσίας.



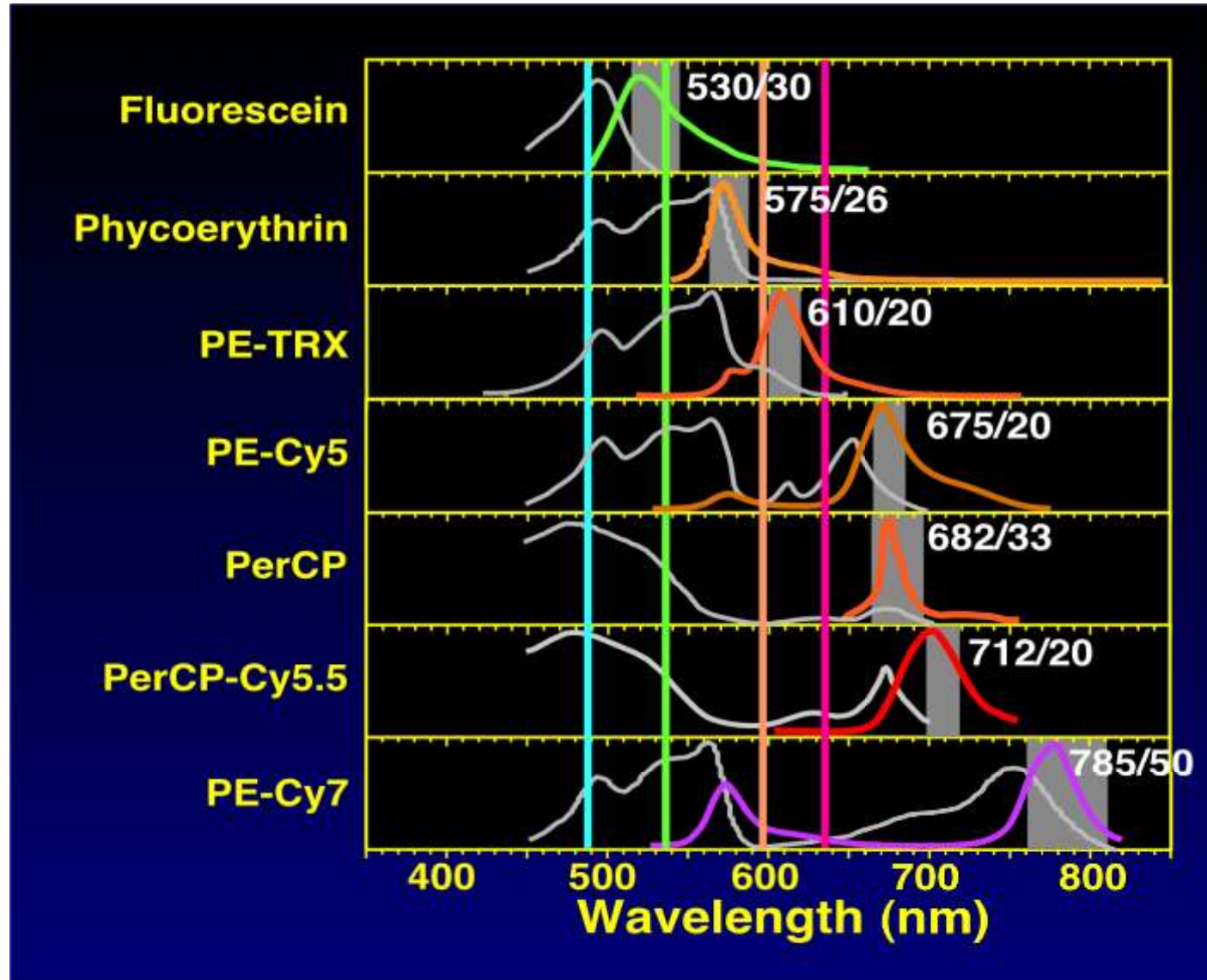
Fluorescein (FITC)





Το μήκος κύματος διέγερσης είναι σημαντικό για το συνολικό αριθμό φωτονίων που θα απορροφήσει κάθε φθορίζουσα ουσία. Το φάσμα απορρόφησης του FITC (fluorescein isothiocyanate), για παράδειγμα είναι από 400–550 nm όμως όσο πιο κοντά στα 490 nm (peak or maximum) είναι το μήκος κύματος που το διεγείρει, τόσο μεγαλύτερος θα είναι και ο αριθμός των φωτονίων που θα απορροφηθούν. Κατ' επέκταση όσο περισσότερα φωτόνια απορροφώνται, τόσο πιο έντονος ο φθορισμός που εκπέμπεται, δηλ. πιο έντονο το φάσμα εκπομπής.

Excitation- and Emission spectra of dyes for the blue laser



Είδη φθοριζόντων ανιχνευτών

● Απλές οργανικές φθορίζουσες ουσίες

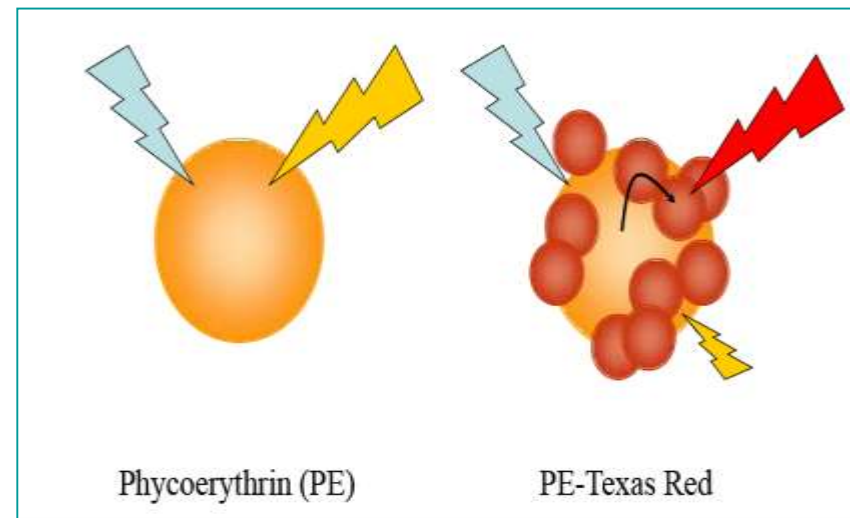
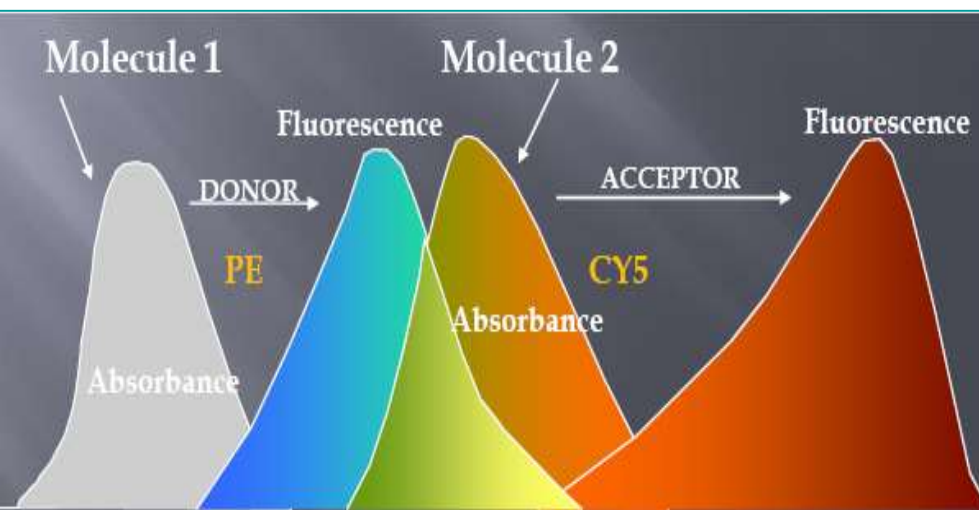
Single dyes

Dye	Laser excitation line (nm)	Maximal absorbance (nm)	Maximal emission (nm)	Fluorescence color
Alexa Fluor [®] 405	405, 407	401	421	
Alexa Fluor [®] 430	405, 407	433	541	
Alexa Fluor [®] 488	488	495	519	
Alexa Fluor [®] 633	633, 635, 647	632	647	
Alexa Fluor [®] 647	633, 635, 647	650	665	
Alexa Fluor [®] 660	633, 635, 647	663	690	
Alexa Fluor [®] 680	633, 635, 647	679	702	
Alexa Fluor [®] 700	633, 635, 647	702	723	Infrared
APC	633, 635, 647	650	661	
FITC	488	490	525	
Pacific Blue [™]	405, 407	410	455	
PerCP	488	490	675	
Phycoerythrin	488	490, 565	578	

Οργανικές διδύναμες χρωστικές

TANDEM Dyes

- Είναι σύνθετες φθορίζουσες ουσίες, αποτέλεσμα ένωσης δύο χρωστικών. Η διέγερση της πρώτης προκαλεί εκπομπή ενέργειας που διεγείρει τη δεύτερη. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η εκπομπή ενέργειας και φθορισμού σε μήκος κύματος μεγαλύτερο από ότι θα μπορούσε να επιτύχει η πηγή laser των 488nm με μια φθορίζουσα ουσία
- Για τη μεταφορά της ενέργειας, το σωματίδιο το οποίο δέχεται την ενέργεια αυτή θα πρέπει να έχει ένα φάσμα απορρόφησης το οποίο **επικαλύπτει το φάσμα εκπομπής** του σωματιδίου που την παρέχει.



Είδη φθοριζόντων ανιχνευτών

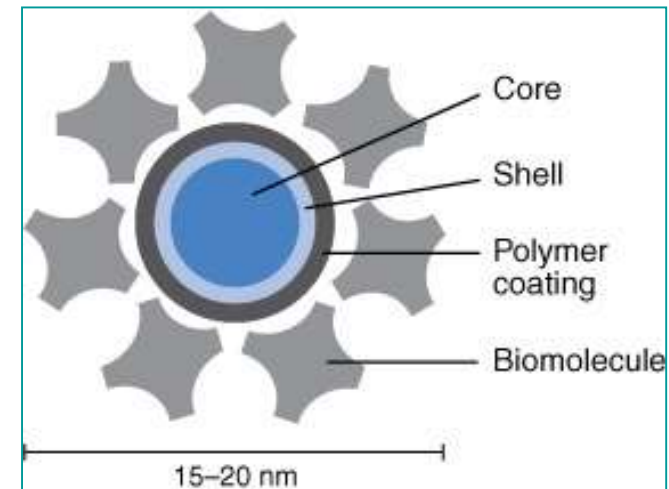
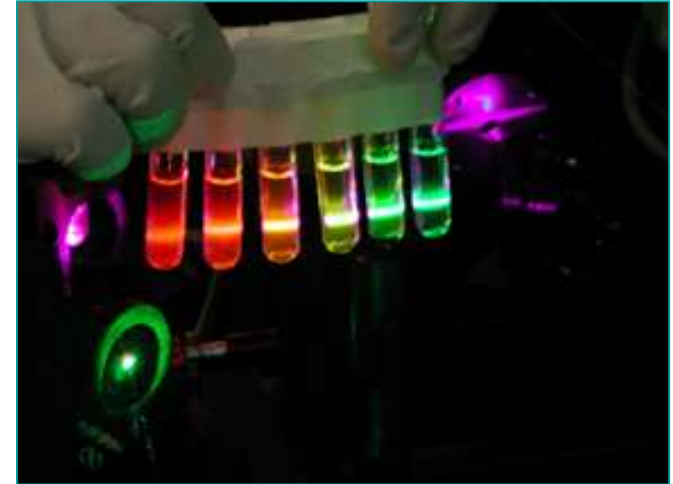
🌐 Οργανικές διδύναμες χρωστικές TANDEM

Tandem dyes				
Dye	Laser excitation line (nm)	Maximal absorbance (nm)	Maximal emission (nm)	Fluorescence color
APC-Alexa Fluor® 750	633, 635, 647	650	779	Infrared
APC-Cy5.5	633, 635, 647	650	695	
APC-Cy7	633, 635, 647	650	785	Infrared
PerCP-Cy5.5	488	496, 546	695	
PE-Alexa Fluor® 610	488	496, 546	627	
PE-Alexa Fluor® 647	488	496, 546	667	
PE-Alexa Fluor® 680	488	496, 546	702	
PE-Alexa Fluor® 700	488	496, 546	723	Infrared
PE-Alexa Fluor® 750	488	496, 546	779	Infrared
PE-Cy5.5	488	496, 546	695	
PE-Cy5	488	496, 546	667	
PE-Cy7	488	496, 546	785	Infrared
PE-Texas Red®	488	496, 546	615	

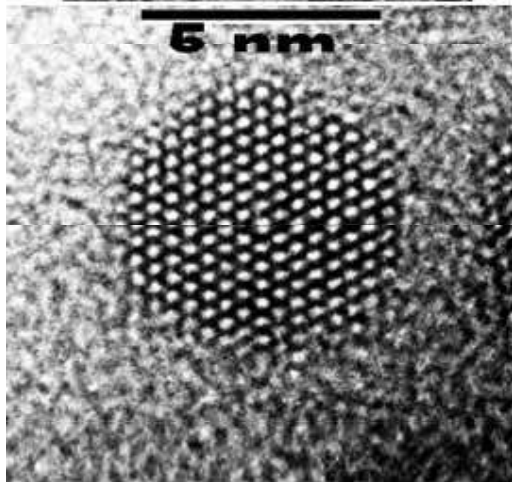
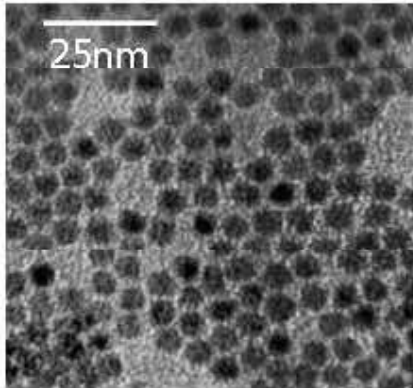
QUANTUM DOTS

ΚΒΑΝΤΙΚΑ ΣΗΜΕΙΑ

- Ανόργανες φθορίζουσες χρωστικές
- Βασίζονται στη νανοτεχνολογία, είναι ημιαγωγοί.
- Η εκπομπή του μήκους κύματος εξαρτάται από το μέγεθος τους και κυμαίνεται από μπλε έως και βαθύ κόκκινο.
- Ευρύτερα φάσματα διέγερσης και στενότερα φάσματα εκπομπής (διευκόλυνση στο compensation)
- Διεγείρονται από 405nm και 488nm Lasers, ή οποιοδήποτε μήκος κύματος μικρότερο από το φάσμα εκπομπής τους.



QUANTUM DOTS



655 605 585 565 525 nm

Size of the nanocrystal determines the color

Size is tunable from $\sim 2\text{-}10\text{ nm}$ ($\pm 3\%$)

Size distribution determines the spectral width

QUANTUM DOTS

408 nm excitation

• Pacific Blue dye	450/50
• Pacific Orange dye or Qdot 565 nanocrystal	575/26 565/20
• Qdot 605 nanocrystal	605/20
• Qdot 655 nanocrystal	655/20
• Qdot 705 nanocrystal	710/50 or 720/20
• Qdot 800 nanocrystal	780/60

488 nm Excitation

• Alexa Fluor 488 dye	525/50
• RPE	575/26
• Qdot 605 nanocrystal	605/20
• Qdot 655 nanocrystal	655/20
• Qdot 705 nanocrystal	710/50
• Qdot 800 nanocrystal	780/60

Κλασικές φθορίζουσες ουσίες που χρησιμοποιούνται για τη σήμανση των νουκλεϊνικών οξέων

Προσκολλώνται στοιχειομετρικά στα νουκλεϊκά οξέα, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ποσοτικές μετρήσεις. Αυτό βοηθά στη μέτρηση του κυτταρικού κύκλου, της πλοειδίας και της βιωσιμότητας

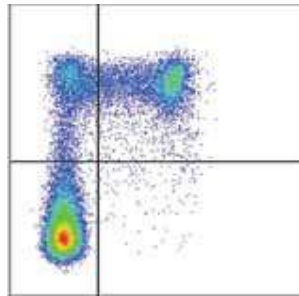
- Το **PI** είναι η χρωστική η οποία χρησιμοποιείται συχνότερα για χρώση του DNA. Συνδέεται μεταξύ των βάσεων των δίκλωνων νουκλεϊκών οξέων. Όταν διεγείρεται δίνει κόκκινο φθορισμό, από μπλε φως.
- Η χρήση της φθορίζουσας χρωστικής **DAPI** είναι η πιο συνήθης πρακτική για τη σήμανση του DNA με υπεριώδη διέγερση (UV excitation).
- Οι φθορίζουσες χρωστικές **DRAQ5** και **Hoechst 33342**, έχουν την ικανότητα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να διακρίνουμε τα ζωντανά κύτταρα μέσα στον κυτταρικό κύκλο. Για τη χρήση των υπολοίπων φθοριζόντων ανιχνευτών, τα κύτταρα θα πρέπει πρώτα να είναι μονιμοποιημένα ή διαπερατά.

Κλασικές χρωστικές νουκλεϊκών οξέων

Dye Name	Ex/Em	Fluorescence EmissionColor
Acridine homodimer	431/498	Green
Acridine orange	500/526 (DNA) 460/650 (RNA)	Green/Red
7-AAD (7-aminoactinomycinD)	546/647	Red
ACMA	419/483	Blue
DAPI	358/461	Blue
Ethidium bromide	518/605	Red
Hoechst 33258 (bis-benzimide)	352/461	Blue
Hoechst 34580	392/498	Blue
Nuclear yellow	355/495	Yellow
Propidium iodide (PI)	535/617	Red
acridine orangeAO	503/530	Red
DRAQ 5	646/697	Violet

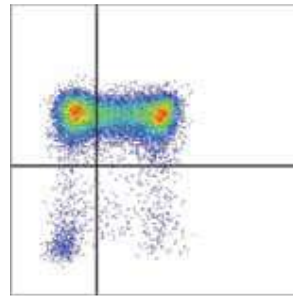
Σήμανση των νουκλεϊκών οξέων για έλεγχο απόπτωσης / νέκρωσης.

Annexin V-eFluor® 450

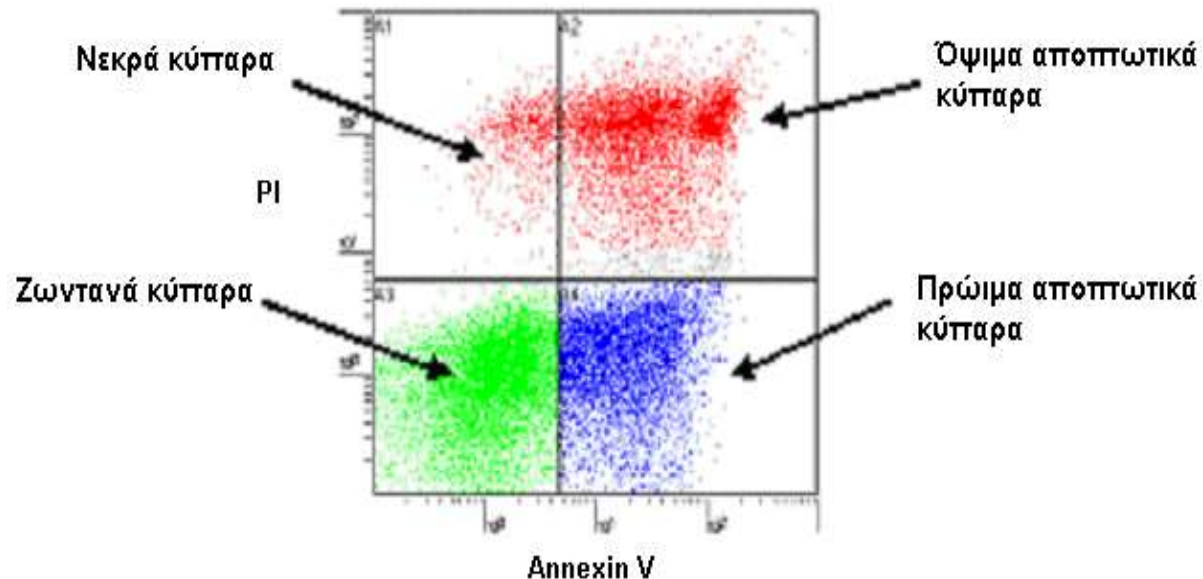
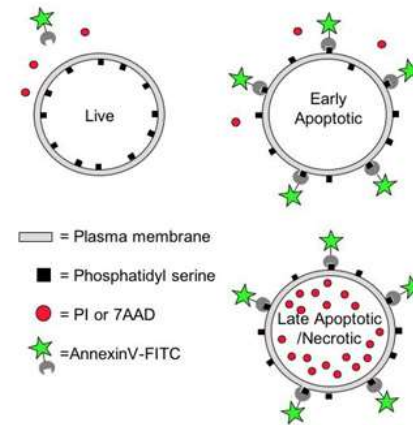


Propidium Iodide

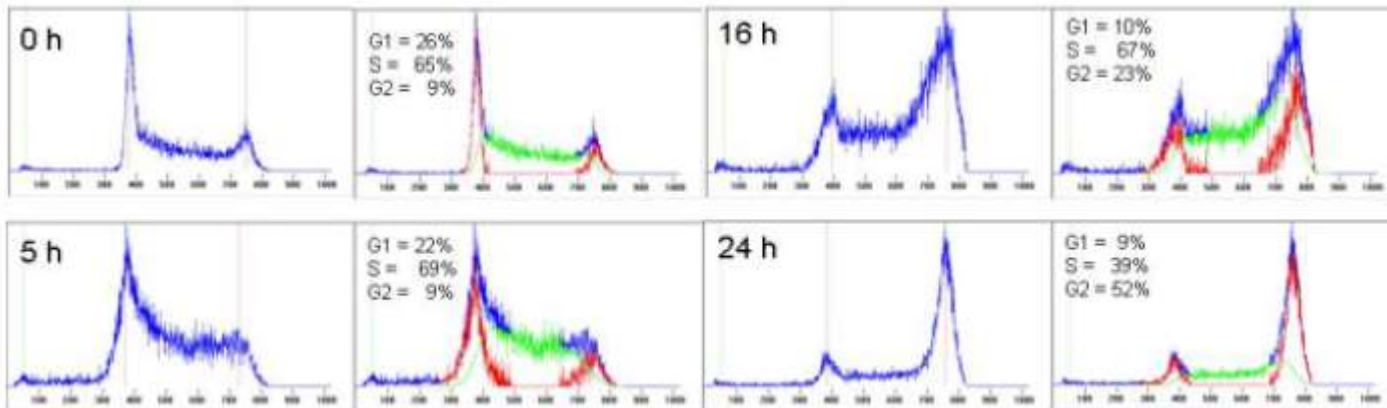
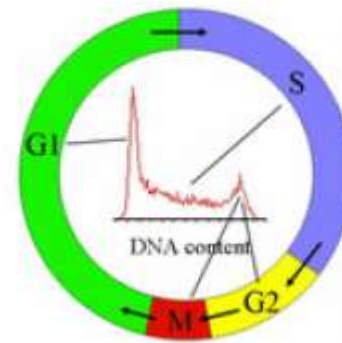
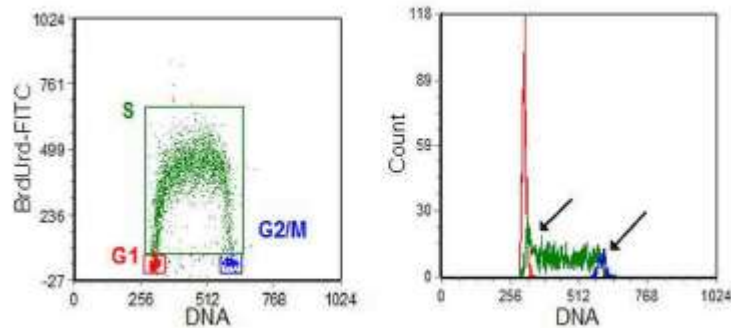
Annexin V-eFluor® 450



Propidium Iodide

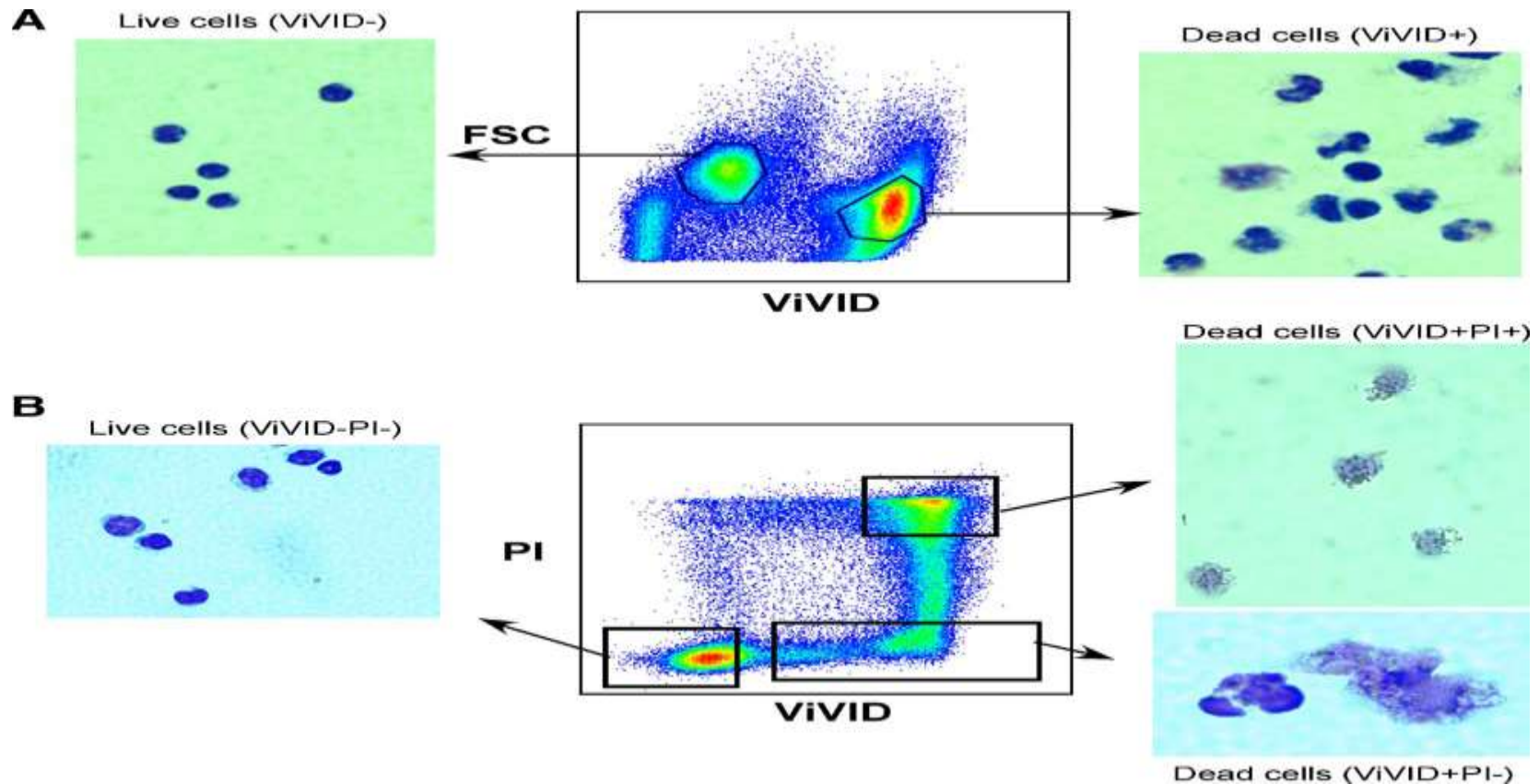


Χρώση DNA για έλεγχο κυτταρικού κύκλου (PI, Brdu, CFSE)

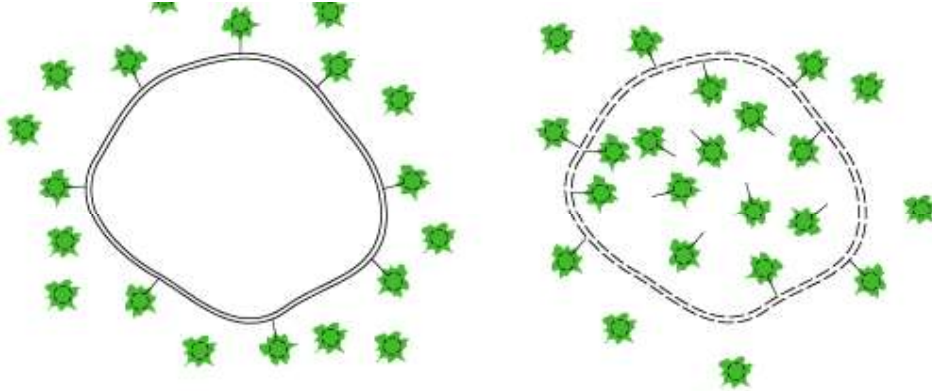


Χρώσεις βιωσιμότητας νέα γενεά. Amine reactive dyes: An effective tool to discriminate live and dead cells in polychromatic flow cytometry

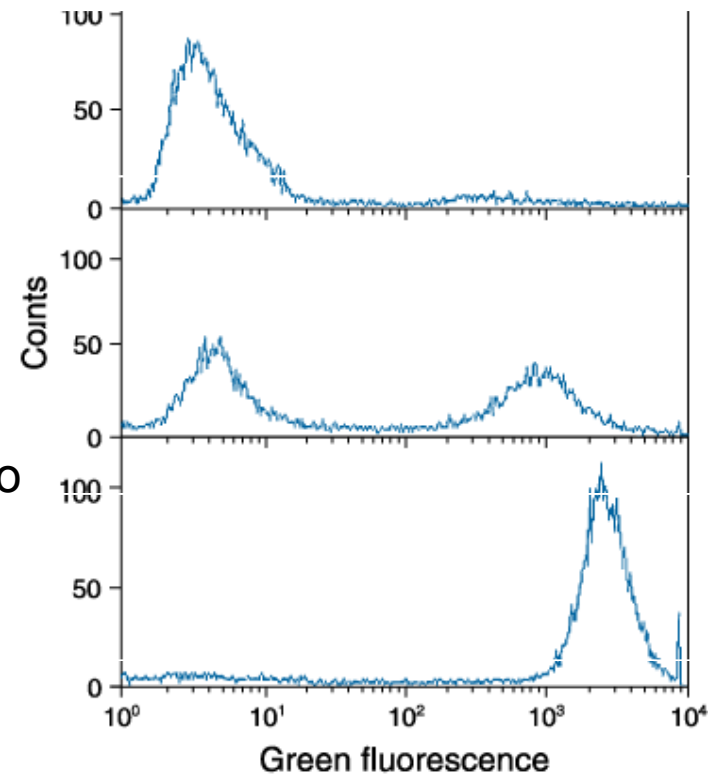
Stephen P. Perfetto, Pratip K. Chattopadhyay, Laurie Lamoreaux, Richard Nguyen,
David Ambrozak, Richard A. Koup, Mario Roederer
Journal of Immunological Methods 313 (2006) 199–208



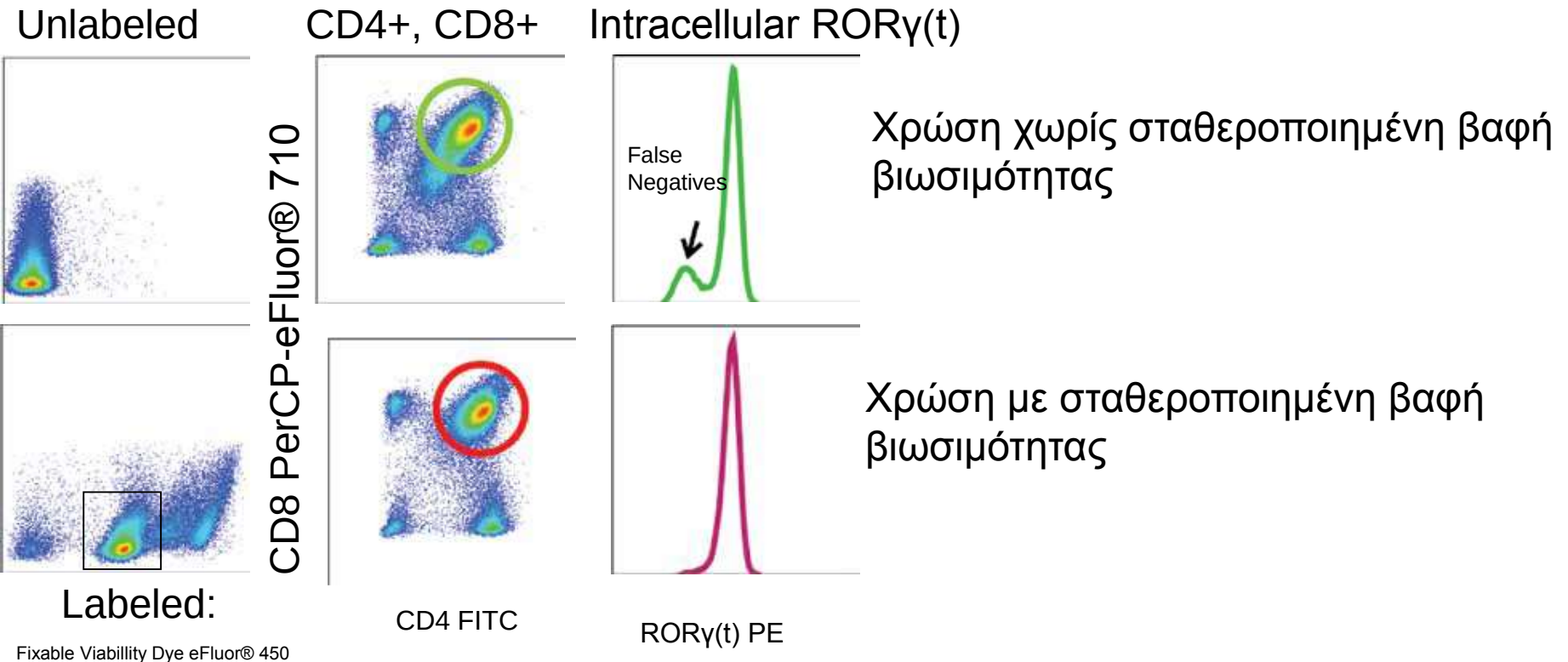
Χρωστικές βιωσιμότητας αμινοσυνδεόμενες



- Αντιδρούν **ομοιοπολικά** με ελεύθερες αμίνες
- **Διαπερνούν** κατεστραμμένες κυτταρικές μεμβράνες νεκρών κυττάρων
- Αντιδρούν μόνο με τις αμίνες της κυτταρικής μεμβράνης των ζωντανών κυττάρων με μειωμένο φθορισμό. Η διαφορά έντασης φθορισμού είναι 50 φορές μεγαλύτερη στα νεκρά κύτταρα
- Ο **φθορισμός διατηρείται** και μετά από μονιμοποίηση των κυττάρων
- Οι χρωστικές χρησιμοποιούν μόνο **ένα κανάλι** φθορισμού
- Σε αντίθεση με το 7-AAD και το Propidium Iodide, οι χρωστικές **διατηρούνται εντός του κυττάρου** μετά από επεξεργασία για ενδοκυττάρια χρώση ή κρυοσυντήρηση.

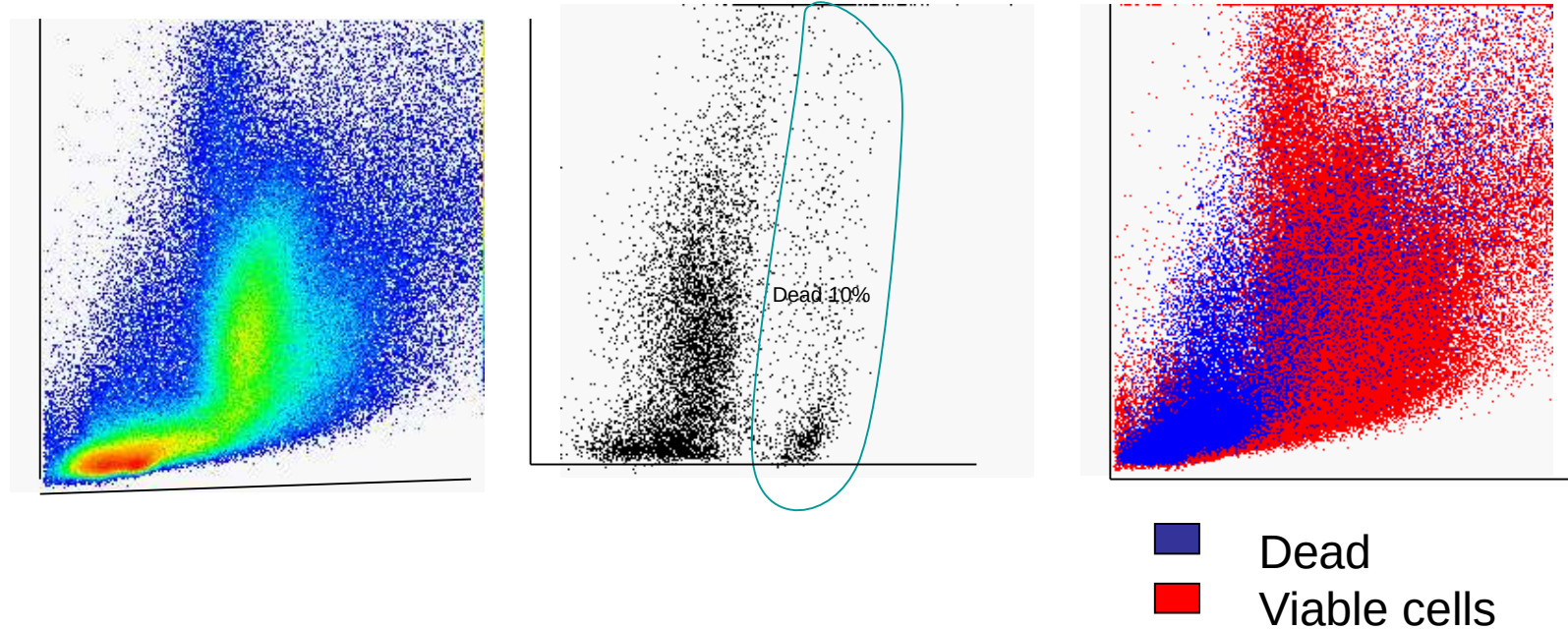


Γιατί οι χρώσεις βιωσιμότητας;



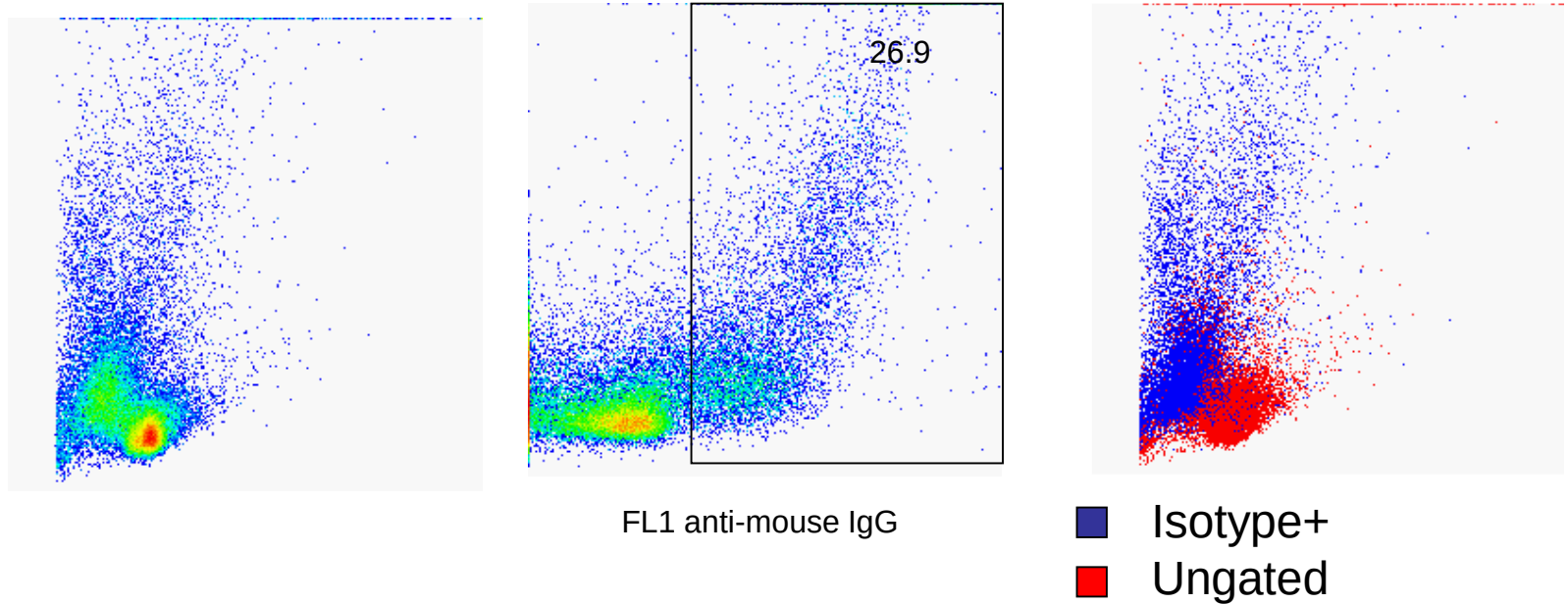
- Νεκρά κύτταρα αυξάνουν το Background, συνδέονται μη ειδικά με χρωστικές και αυτοφθορίζουν έντονα
- Απαραίτητες σε ενδοκυττάρειες χρώσεις

Γιατί οι χρώσεις βιωσιμότητας;



Τα νεκρά κύτταρα δεν ξεχωρίζουν στο παράθυρο μορφολογίας (FSc / SSc) και δεν επιτρέπουν οριοθέτηση στον ζώντα πληθυσμό.

Γιατί οι χρώσεις βιωσιμότητας;



Τα νεκρά κύτταρα συνδέονται μη ειδικά με τα αντισώματα. Εάν θέλετε να ποσοτικοποιήσετε έναν σπάνιο πληθυσμό και συνυπολογίσετε τον ψευδώς θετικό πληθυσμό, θα έχετε ανακριβή αποτελέσματα.

Φθορίζουσες πρωτεΐνες

- Η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP), αρχικά απομονώθηκε από την τσούχτρα (jellyfish / *Aequorea victoria*). Μπορεί να διεγερθεί στα 488 nm και παράγει φθορισμό χρώματος πράσινου. Χρησιμοποιείται για τη μελέτη της γονιδιακής μεταγραφής. Συνδέεται το γονίδιο GFP με το γονίδιο της υπό μελέτη πρωτεΐνης, το ανασυνδυασμένο γονίδιο εισάγεται στο κύτταρο εκφράζοντας πρωτεΐνη που φθορίζει.
- Η GFP παράγει δυνατό φθορισμό μέσω του p-hydroxybenzylidene-imidazolidinone χρωμοφόρου, που παράγεται από κυκλοποίηση και οξείδωση της πρωτεΐνης στην αλληλουχία Ser-Tyr-Gly των θέσεων 65-67.

Άλλοι φθορίζοντες ανιχνευτές

Μέτρηση βιωσιμότητας μέσω κυτταρικών λειτουργιών

Χρωστικές που απαιτούν δράση εστεράσης:

Εισέρχονται εύκολα σε υγιή κύτταρα, όπου διασπώνται από ενδοκυττάρια εστεράσες ελευθερώνοντας χρωμοφόρα μόρια, τα οποία παραμένουν εντός του κυττάρου εφόσον η μεμβράνη του είναι άθικτη, ή διαφεύγουν αν το κύτταρο χάσει την ακεραιότητα της μεμβράνης του (**Calcein AM, Calcein Violet AM, Calcein Blue AM, Calcein red-Orange**)

Χρωστικές που συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια:

Τα υγιή κύτταρα έχουν λειτουργικά μιτοχόνδρια με ενεργό δυναμικό μεμβράνης που μπορεί να διατηρήσει εντός κάποιες χρωστικές συγκρινόμενα με μη λειτουργικά μιτοχόνδρια (**JC-1, Rhodamine 123, TMRM-TMRE, MitoTrackers**)

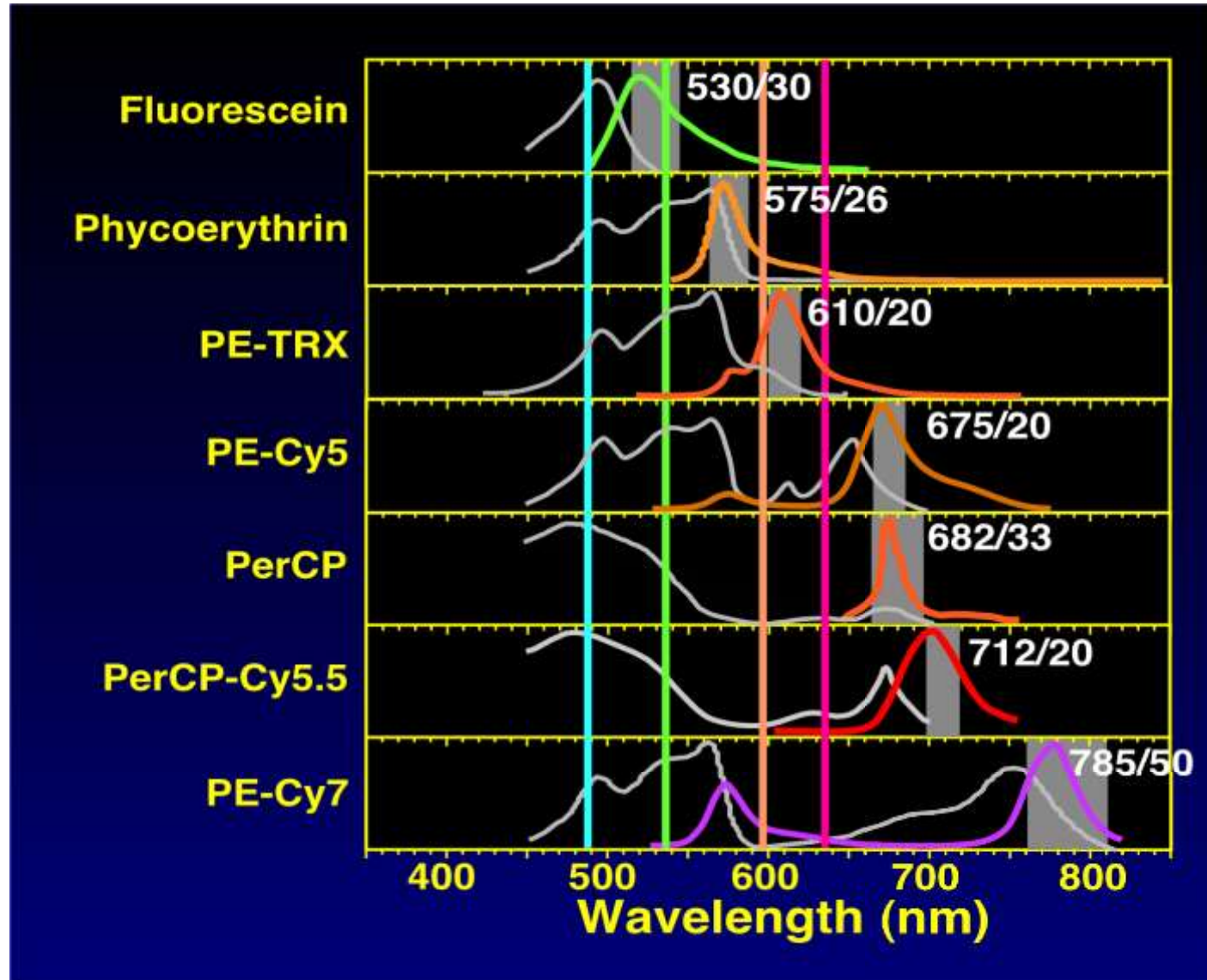
Ένζυμα:

Αποένζυμα συζευγμένα με φθορίζουσες χρωστικές χρησιμοποιούνται για να συνδεθούν με υποστρώματα χωρίς να τα διασπάσουν.

Ιχνηθέτες (Probes)

- Ιχνηθέτες RNA συνθέτονται με νουκλεοτίδια συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες (FITC) και εισέρχονται στα κύτταρα προκειμένου να ενωθούν με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες τους (π.χ. **E6/E7 mRNA HPV**)

Excitation- and Emission spectra of dyes for the blue laser



Ρύθμιση χρωματικής αλληλοεπικάλυψης φθορίζουσων χρωστικών

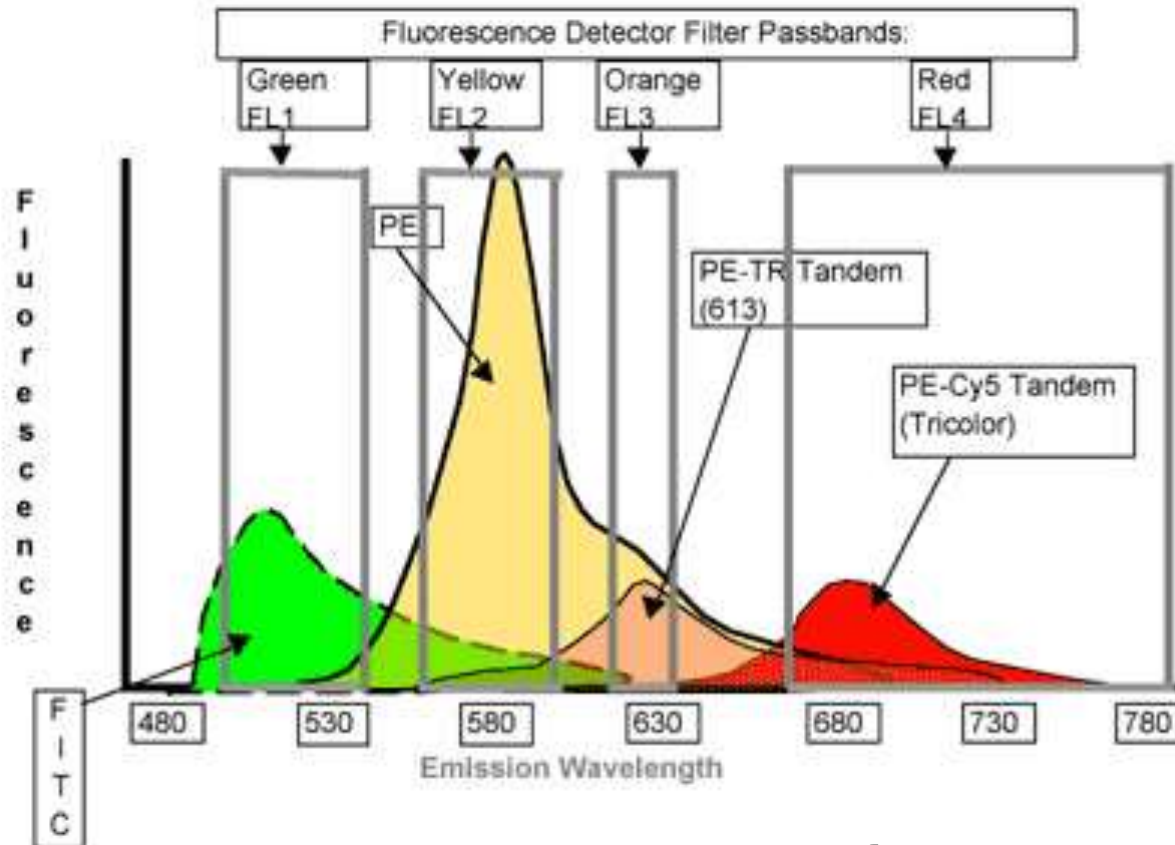
Compensation



Compensation

- Τα φθοριοχρώματα τυπικά φθορίζουν σε ένα ευρύ φάσμα φωτός (100nm ή και περισσότερο)
- Ανάλογα με την διάταξη των φίλτρων, ένας ανιχνευτής μπορεί να «δει» φθορισμό προερχόμενο από περισσότερα του ενός φθοριοχρώματα. **(bleed over ή spillover)**
- Είναι απαραίτητη **η αντιστάθμιση των φθοριοχρωμάτων “compensation”** προκειμένου κάθε φωτοανιχνευτής να δίνει πληροφορίες μόνο από ένα φθοριόχρωμα

Compensation



- Μία πολύ σημαντική λειτουργία του ηλεκτρονικού συστήματος είναι η λειτουργία compensation

- Υπάρχει χρωματική αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των χρωμάτων που εκπέμπονται από διάφορες φθορίζουσες ουσίες, γι'αυτό μαθηματική αντιστάθμιση (compensation) εφαρμόζεται προκειμένου να μειώσει το ποσοστό αλληλοεπικάλυψης προκειμένου να προκύπτει πραγματικός φθορισμός και όχι αθροιστικός.

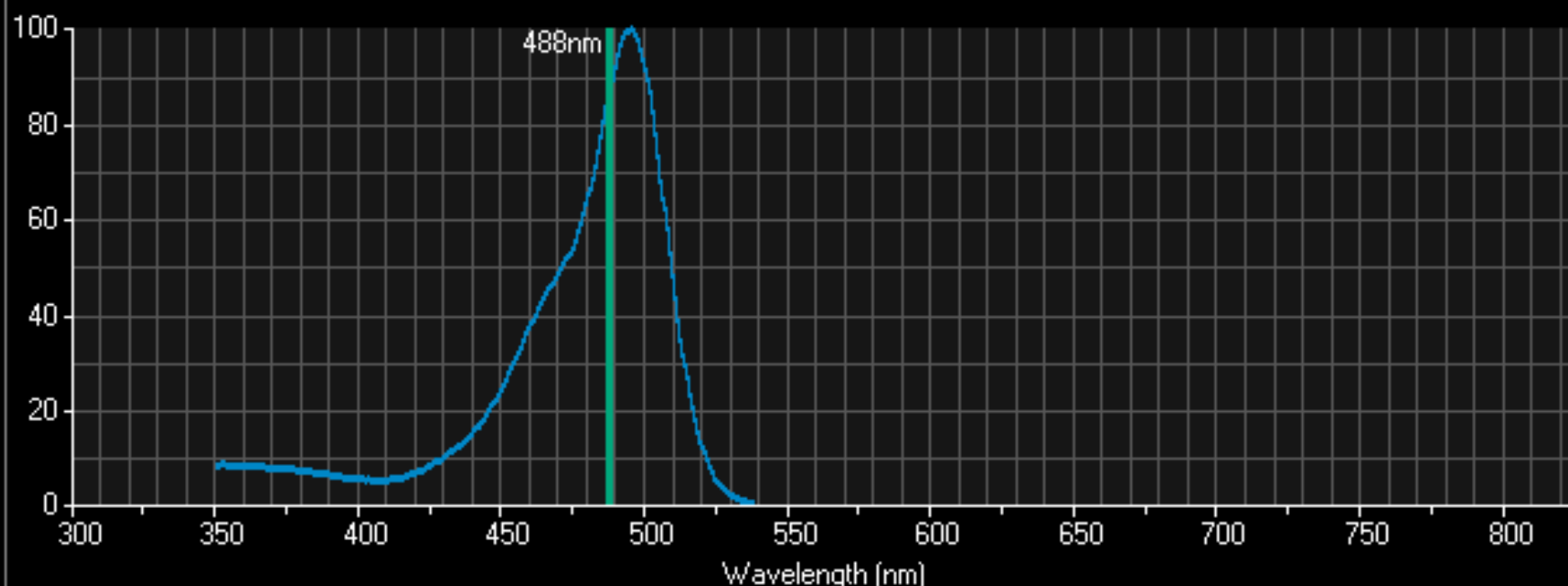
File Edit View Favorites Tools Help



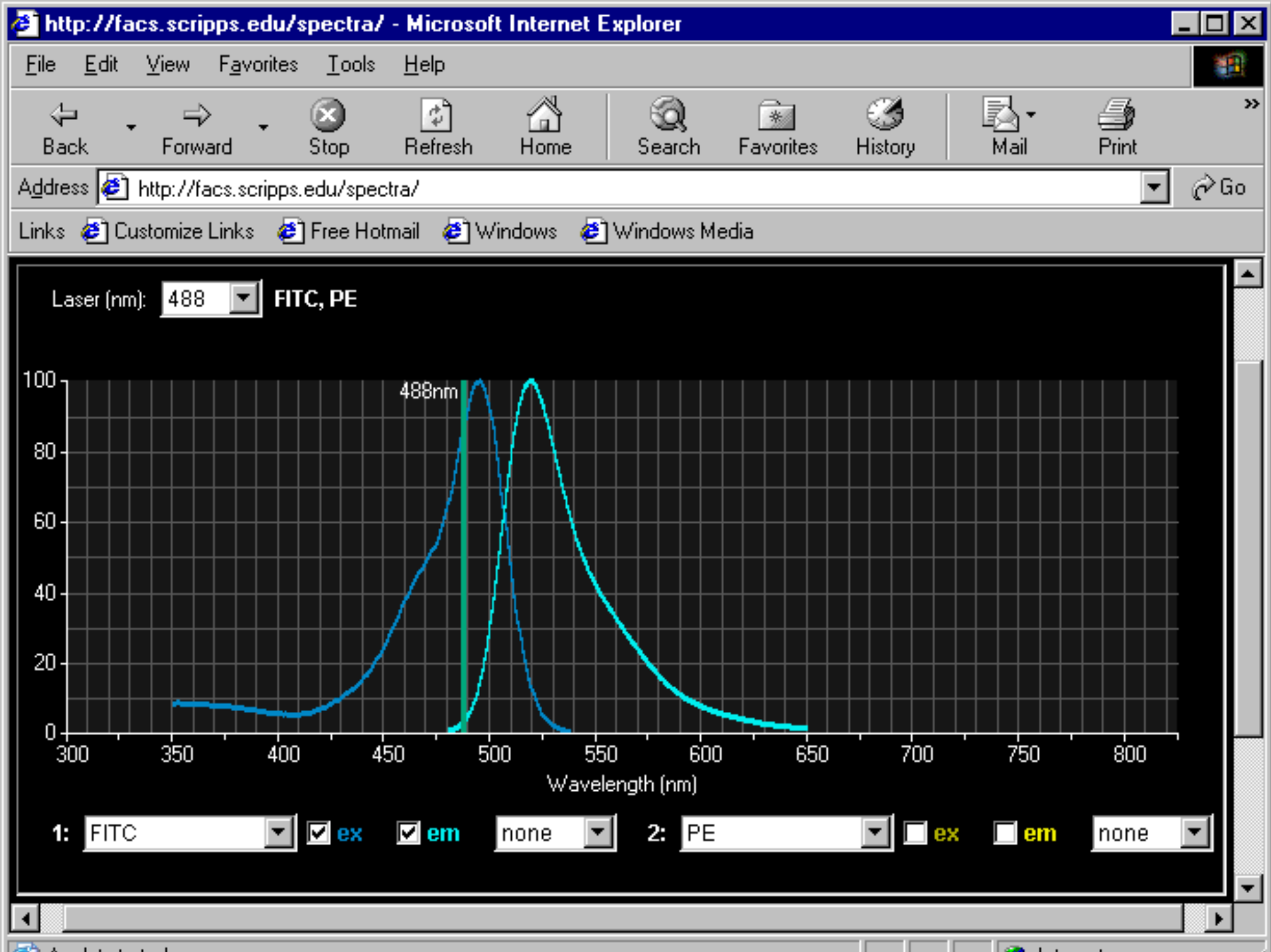
Address http://facs.scripps.edu/spectra/

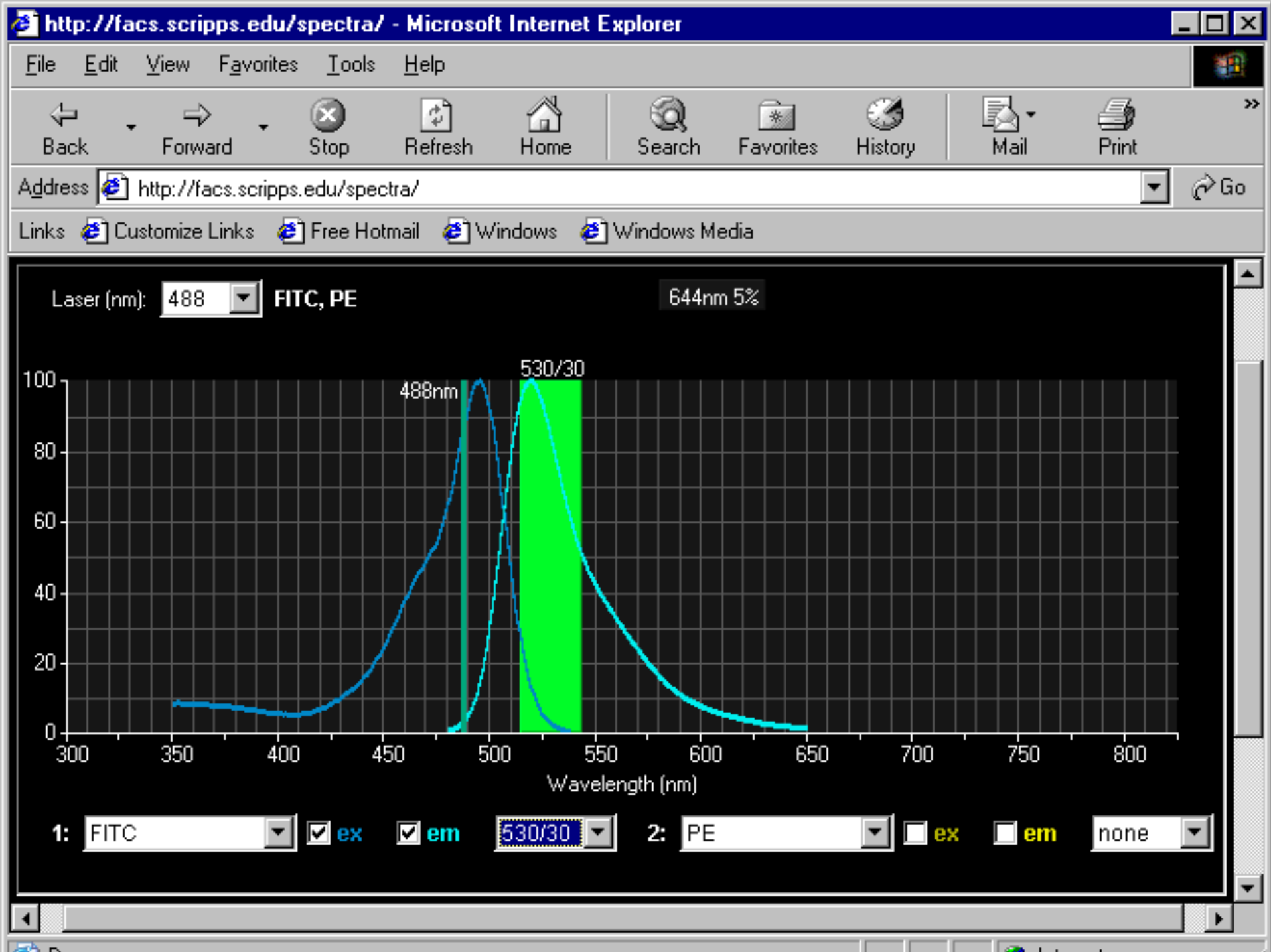
Links Customize Links Free Hotmail Windows Windows Media

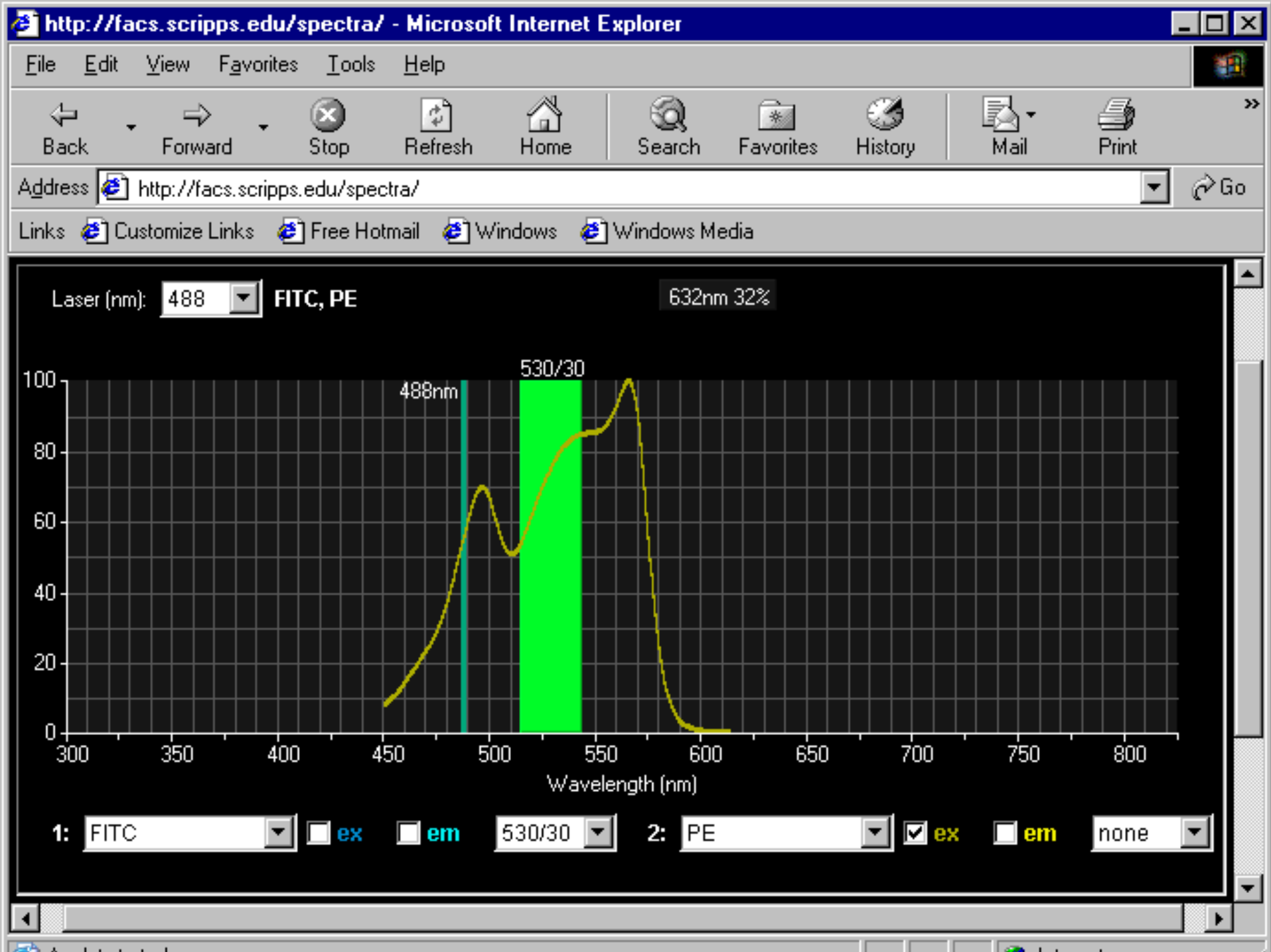
Laser (nm): 488 FITC, PE



1: FITC ☒ ex ☐ em none 2: PE ☐ ex ☐ em none







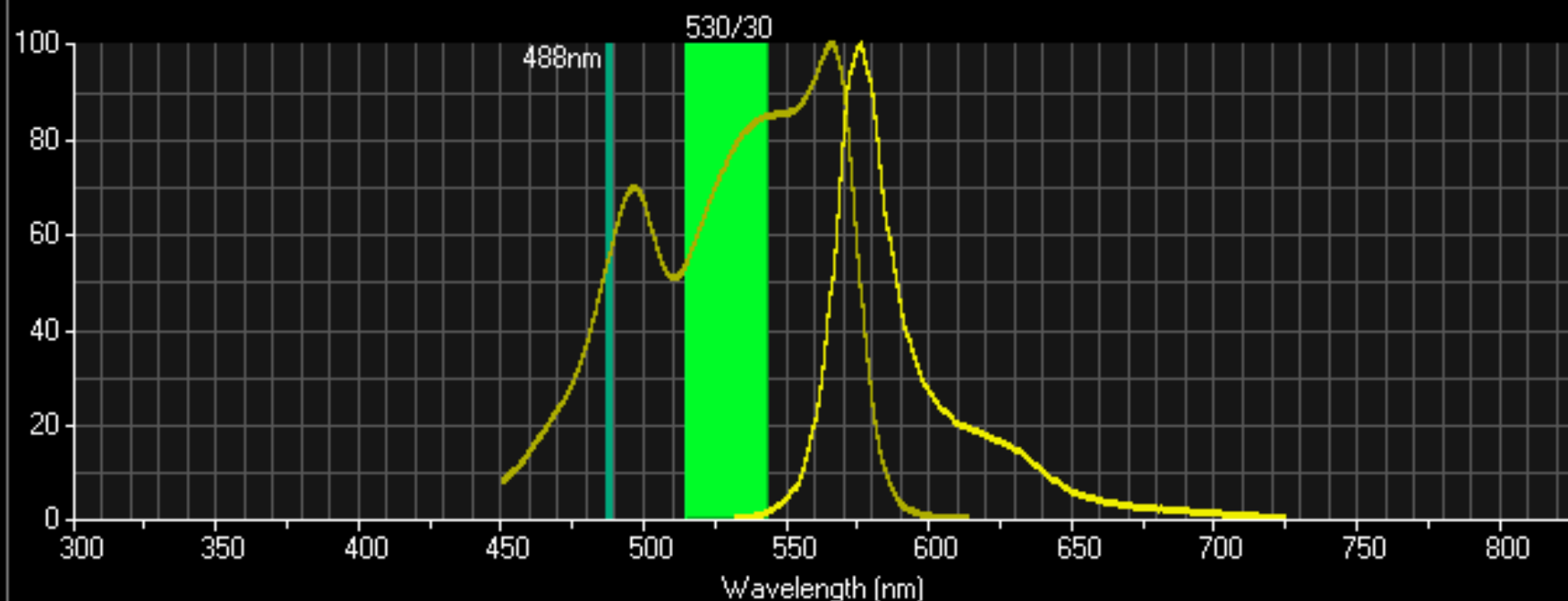
File Edit View Favorites Tools Help



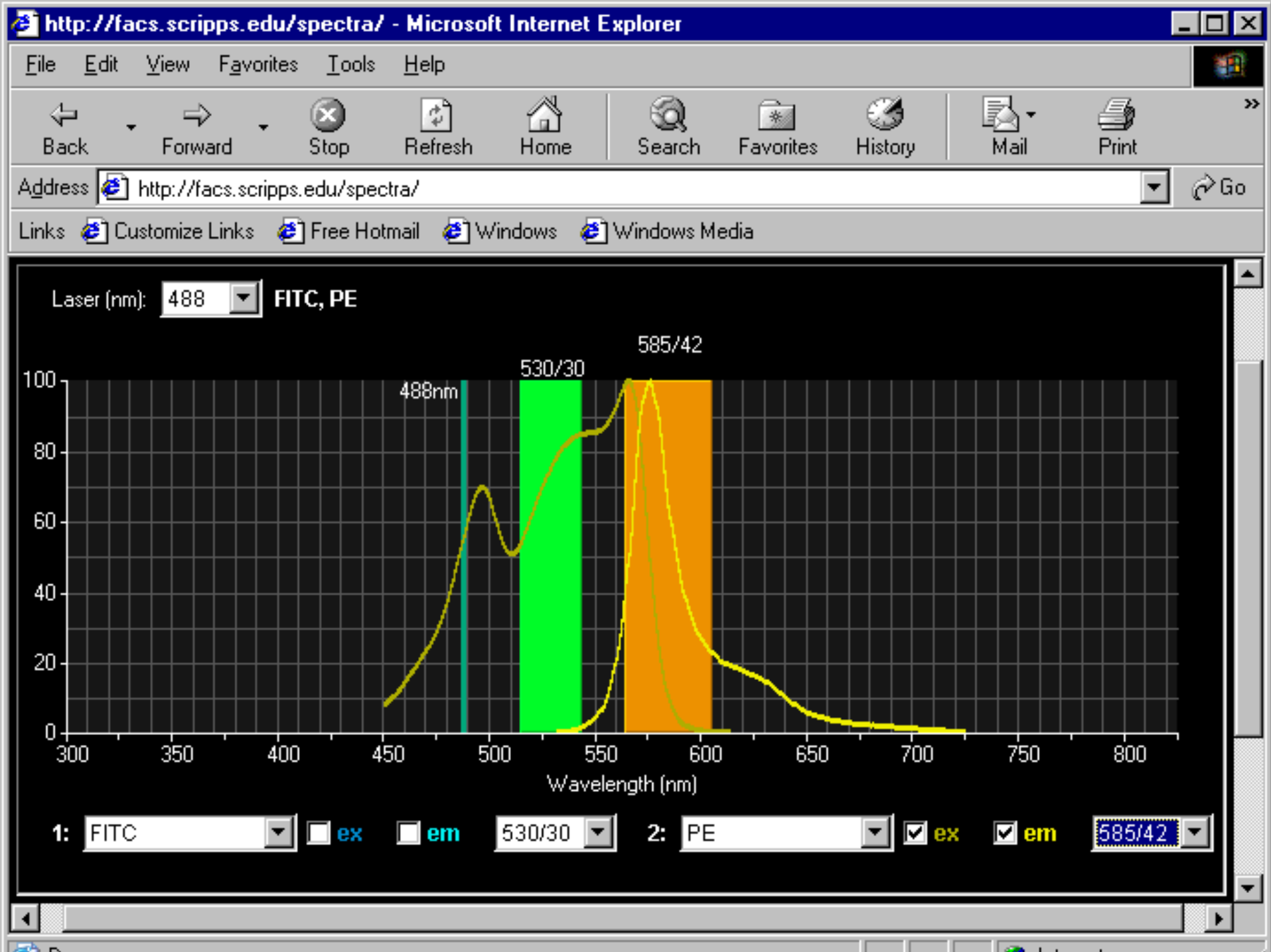
Address http://facs.scripps.edu/spectra/

Links Customize Links Free Hotmail Windows Windows Media

Laser (nm): 488 FITC, PE



1: FITC ☐ ex ☐ em 530/30 2: PE ☒ ex ☒ em none



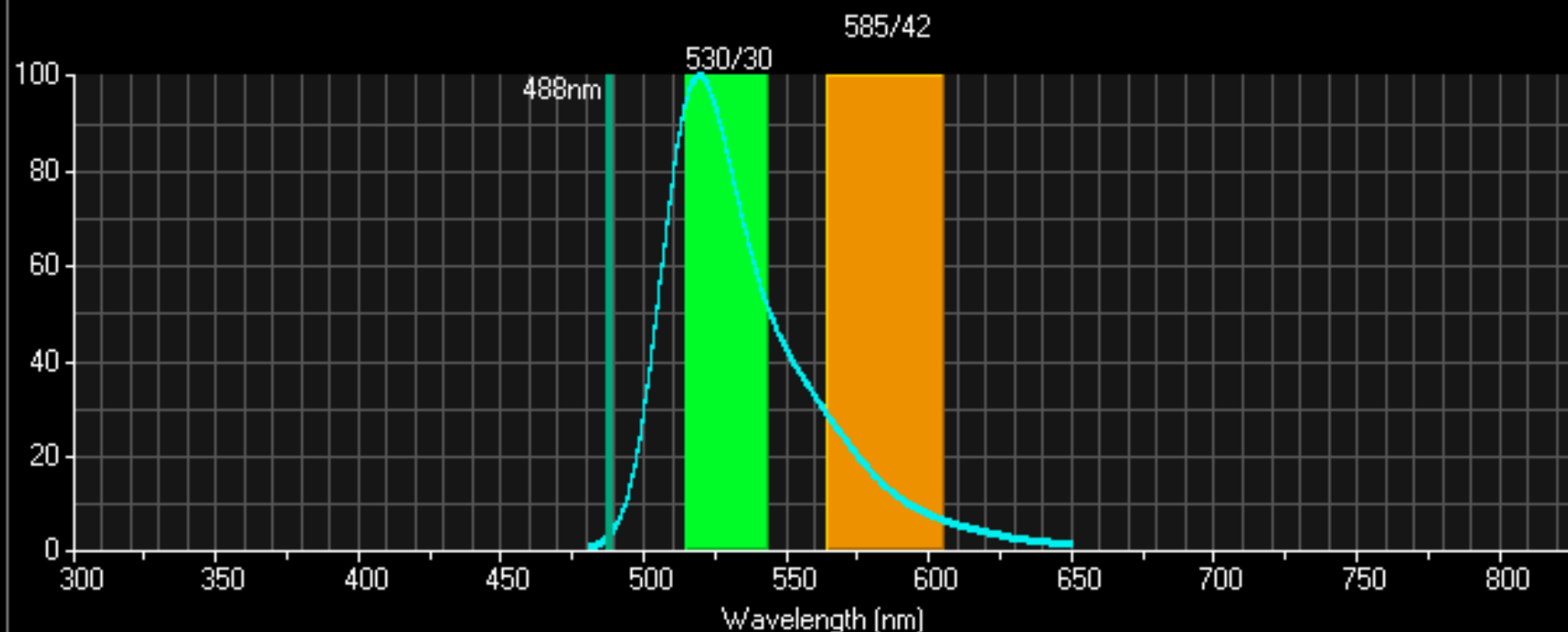
File Edit View Favorites Tools Help



Address http://facs.scripps.edu/spectra/

Links Customize Links Free Hotmail Windows Windows Media

Laser (nm): 488 FITC, PE



1: FITC ☐ ex ☒ em 530/30 2: PE ☐ ex ☐ em 585/42

File Edit View Favorites Tools Help



Back



Forward



Stop



Refresh



Home



Search



Favorites



History



Mail



Print



>>

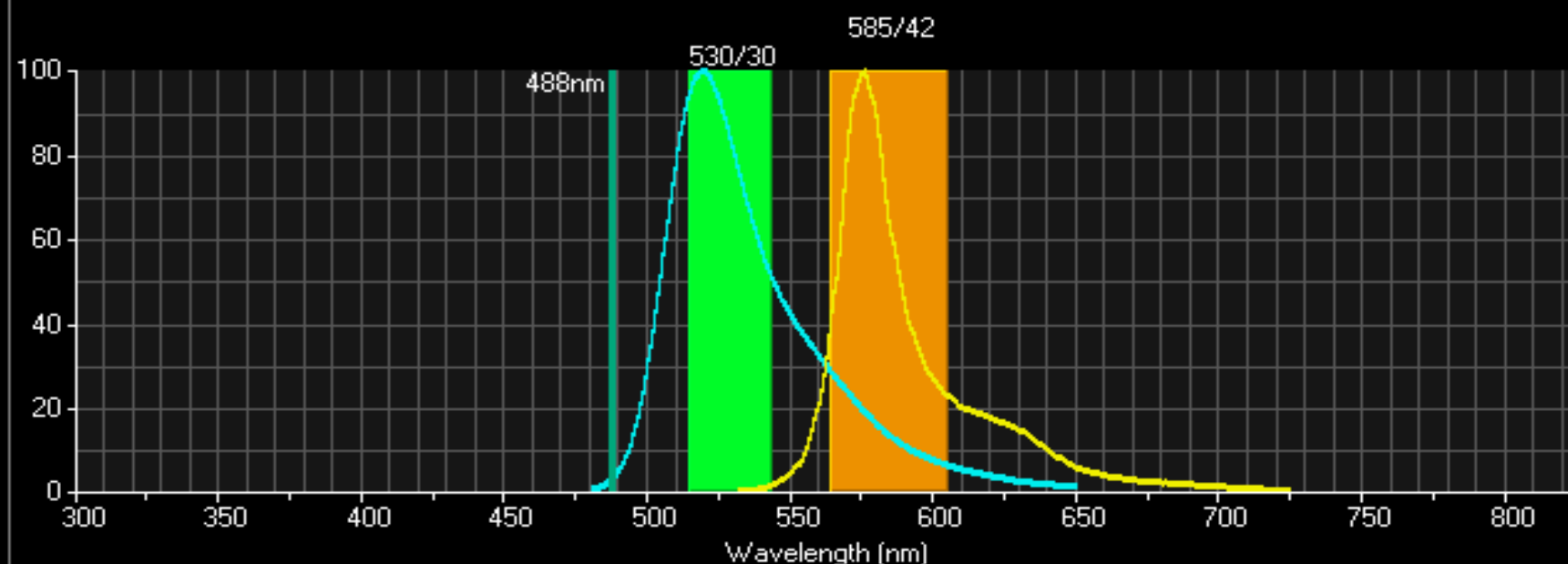
Address  http://facs.scripps.edu/spectra/ 

 Go

Links  Customize Links  Free Hotmail  Windows  Windows Media

TSRI Fluorescence Spectrum Viewer Java 2

Laser (nm): 488  FITC, PE



1: FITC  ☐ ex ☒ em 530/30  2: PE  ☐ ex ☒ em 585/42 

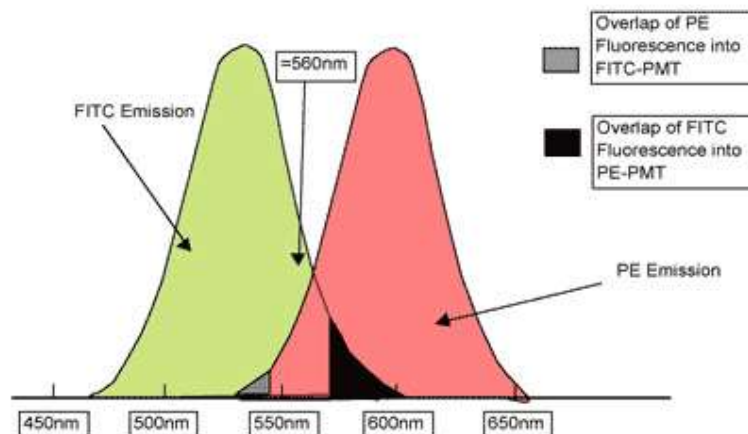
Υπολογισμός

$$\mathbf{FL1}(\text{measured}) = \mathbf{FTTC}(\text{true}) + 0.01 \times \mathbf{PE}(\text{true})$$

$$\mathbf{FL2}(\text{measured}) = 0.15 \times \mathbf{FTTC}(\text{true}) + \mathbf{PE}(\text{true})$$

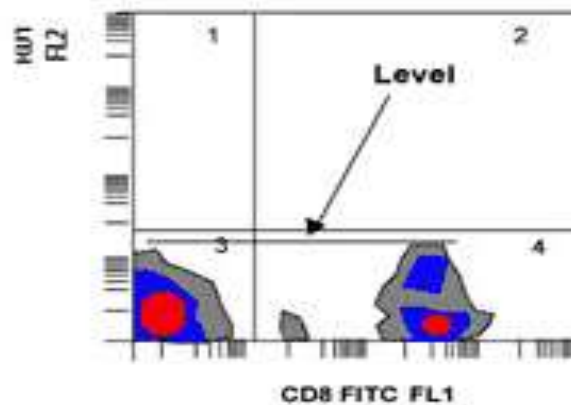
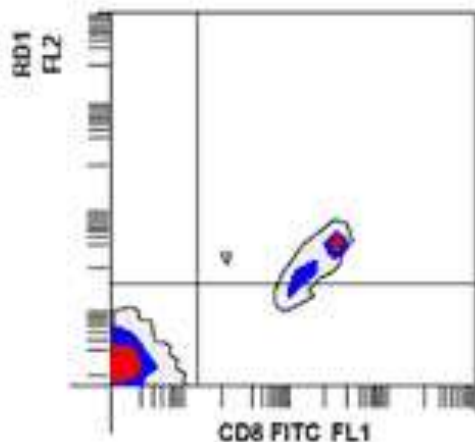
$$\mathbf{FTTC}(\text{true}) = \mathbf{FL1}(\text{measured}) - 0.01 \times \mathbf{PE}(\text{true})$$

$$\mathbf{PE}(\text{true}) = \frac{\mathbf{FL2}(\text{measured}) - 0.15 \times \mathbf{FL1}(\text{measured})}{1 - 0.15 \times 0.01}$$



FLa-%FLb	Spectral Overlap	Dye being Interfered with	Dye Where Interference Originates
FL1-FL2	<5%	FITC	PE
FL2-FL1	20-40%	PE	FITC
FL2-FL3	20-40%	PE	PE\Texas Red
FL3-FL2	20-50%	PE\Texas Red	PE
FL3-FL4	<20%	PE\Texas Red	PE\Cy5
FL4-FL1	<5%	PE\Cy5	FITC
FL4-FL2	<20%	PE\Cy5	PE
FL4-FL3	<20%	PE\Cy5	PE\Texas Red

RD1-%FITC
or
FL2-FL1
= 0.00%



RD1-%FITC
or
FL2-FL1
= 12.00%

Same

ID	Percent	Count	MeanX	MeanY
1	0	0	*****	*****
2	0	0	*****	*****
3	60.0	3000	0.3	0.24
4	40.0	2000	31	0.23

Σωστό compensation Πότε;



- 4 βήματα πρέπει να ακολουθούνται προκειμένου να πραγματοποιηθεί σωστά η αντιστάθμιση φθορισμού. Αυτά τα βήματα πρέπει να ακολουθούνται σε κάθε πείραμα:
- όπου ο κυτταρικός πληθυσμός διαφέρει,
 - όταν αλλάζουν τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια,
 - ή όταν κάποιο από τα settings του κυτταρομέτρου αλλάξει.
- Επομένως απαιτείται **καθημερινά** compensation!

Σωστό compensation Πώς;

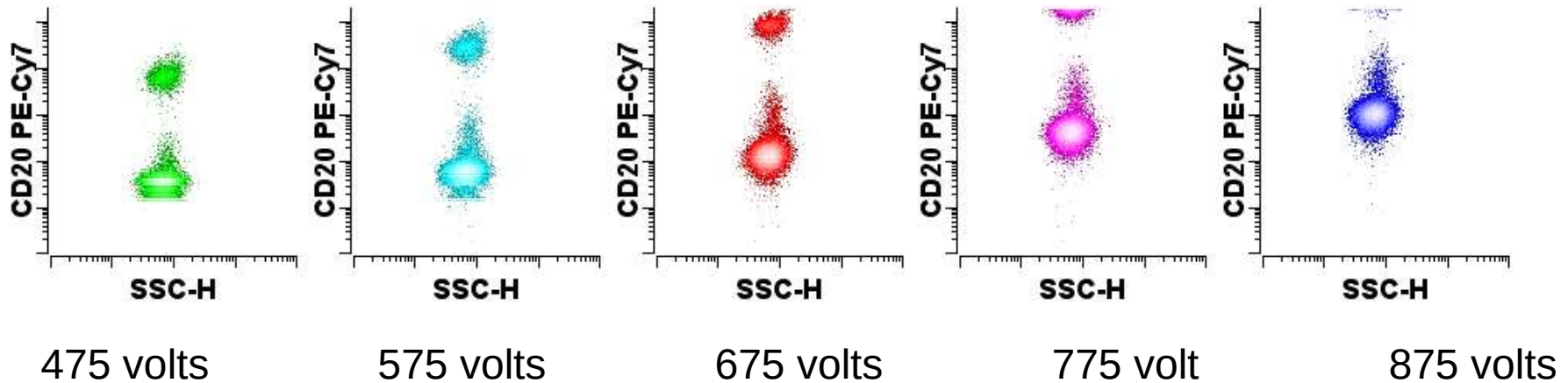


- Το σωληνάριο compensation πρέπει να περιέχει μη σεσημασμένα κύτταρα (**unstained**) όπως και κύτταρα σεσημασμένα με μία χρωστική (**singly-stained with the fluorescent probes**). Τα θετικά σεσημασμένα κύτταρα πρέπει να έχουν τον ίδιο αυτοφθορισμό με τα αρνητικά μη σεσημασμένα κύτταρα (π.χ. λεμφοκύτταρα).
- Τα **PMT voltages** πρέπει να τεθούν αρκετά ψηλά ώστε να εγγυώνται ότι ο αρνητικός πληθυσμός είναι εκτός του άξονα σε κάθε κανάλι ανίχνευσης φθορισμού.
- Οριοθέτηση (**analysis gate**) καθορίζεται σε πληθυσμό κυττάρων που έχει τον ίδιο αυτοφθορισμό. Εν συνεχεία νέα οριοθέτηση γίνεται στον θετικά σεσημασμένο πληθυσμό και στον αρνητικό επίσης.
- Τα κέντρα των θετικών και αρνητικών πληθυσμών ευθυγραμμίζονται έτσι ώστε οι διάμεσες τιμές φθορισμών των να έχουν την ίδια τιμή (**median fluorescences**).

Μάρτυρες compensation

- Σωληνάρια με μονό φθορισμό (single stain), θα πρέπει να είναι τουλάχιστον τόσο έντονος ο φθορισμός τους όσο των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται στο πείραμα.
- Χρησιμοποιούνται βιολογικοί μάρτυρες [κύτταρα σεσημασμένα και μη, υποπληθυσμοί CD8 στα T κύτταρα] ή σφαιρίδια συνδεδέμενα με αντίσωμα, αρκεί οι θετικοί και αρνητικοί πληθυσμοί να έχουν τον ίδιο φθορισμό όταν είναι μη σεσημασμένοι. Να ταιριάζουν με τα δείγματα του πειράματος.
- Ένας μάρτυρας για κάθε χρώμα και ένας για κάθε διαφορετικό lot number κάθε tandem χρωστικής που χρησιμοποιείται (Cy5PE, Cy7PE, Cy7APC, TRPE)

Detector Voltage



- Πολύ χαμηλό μειώνει την ευαισθησία
 - Πολύ υψηλό ωθεί τα φωτεινά σήματα εκτός κλίμακας
- Αραιώστε με μη σεσημασμένο αντίσωμα

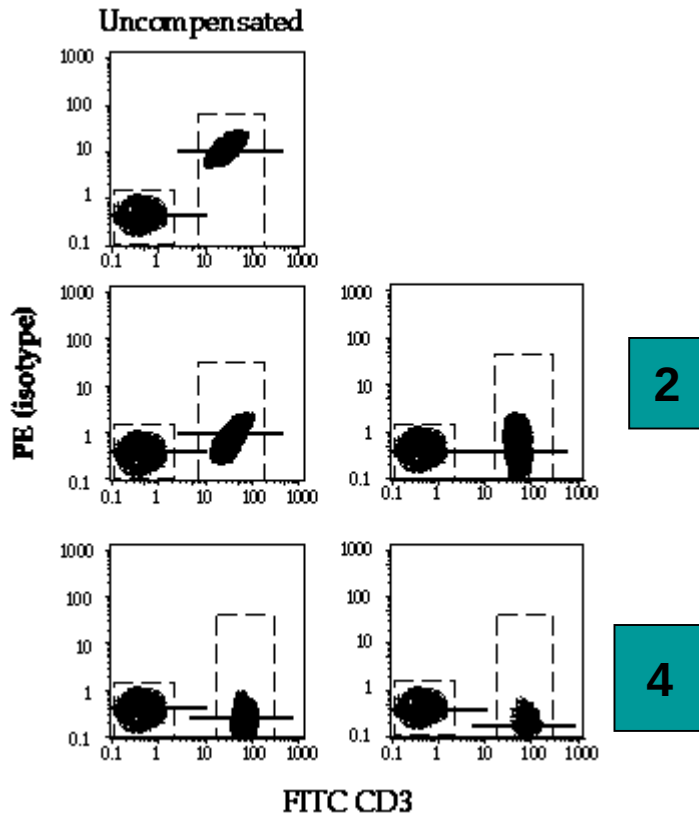
Ίσως χρειαστεί συμβιβασμός

Σωστό compensation

Κατάλληλη αντιστάθμιση υπάρχει όταν ο FITC-θετικός πληθυσμός έχει την ίδια μέση ή διάμεση τιμή PE φθορισμού όπως ο FITC-αρνητικός πληθυσμός.

Ποιο διάγραμμα;

2

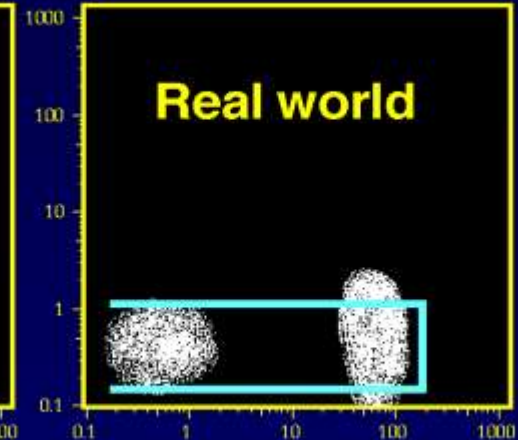
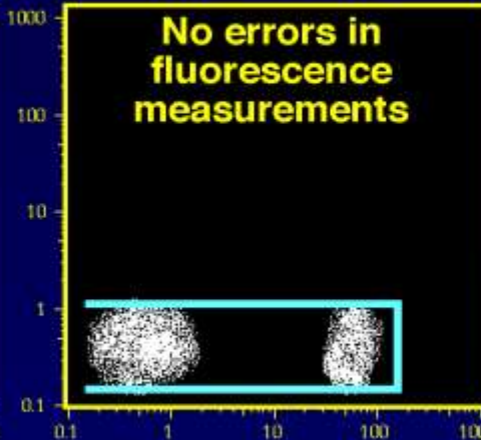
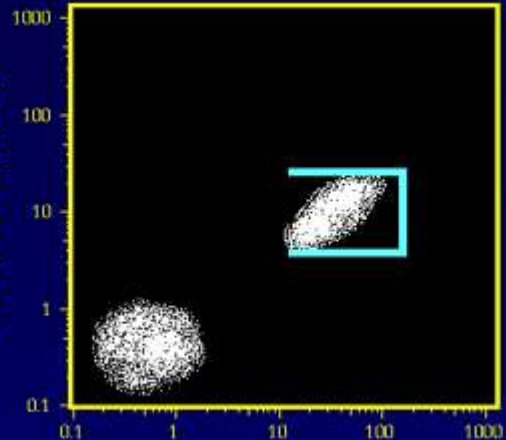


Πόσο compensation είναι σωστό;

Uncompensated

Compensated

PE
PE (isotype)



PE (isotype)
PE

PE

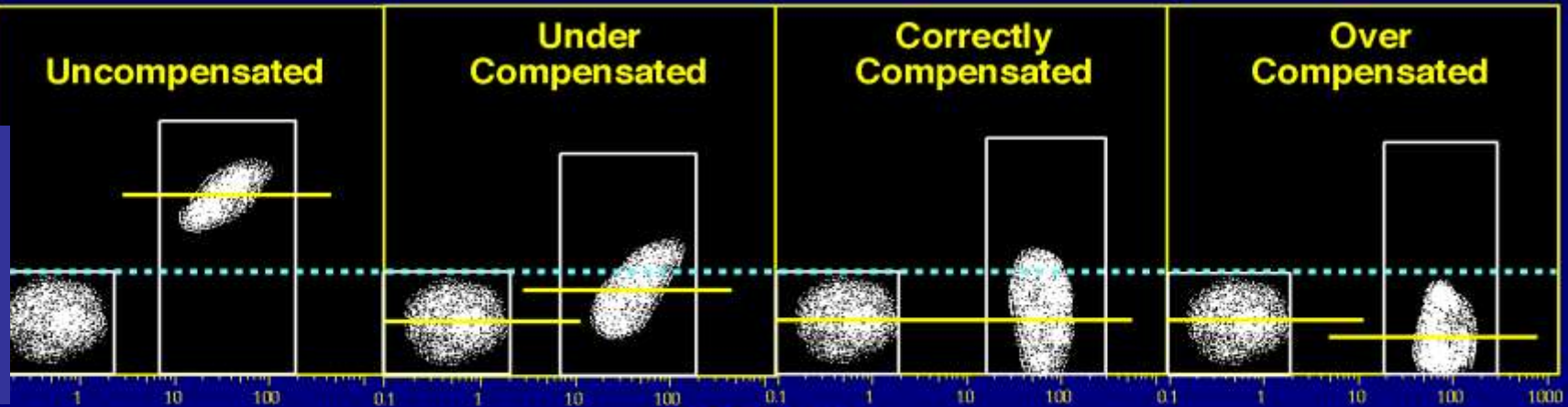
Uncompensated

Under Compensated

Correctly Compensated

Over Compensated

FITC [CD3]



Adapted from Mario Roderer's WebPage at
<http://cmgm.stanford.edu/~roederer/compensation/index.html>

Compensation σε πολυχρωματική ανάλυση

Είναι αδύνατον να πραγματοποιηθεί σωστό compensation «με το μάτι» (dot plots, histograms).

- Χρησιμοποιούμε στατιστική (διάμεση τιμή οριοθετημένων κυττάρων)
- Χρησιμοποιούμε εργαλεία για compensation, όπως σφαιρίδια που δεσμεύουν αντισώματα

Παράγοντες που επηρεάζουν την ευαισθησία, απόδοση στην κυτταρομετρία

- Πυκνότητα αντιγόνου
- Σταθερότητα χρωστικών
- F/P λόγος
- Συγκέντρωση αντισώματος (stain index)
- Τιτλοποίηση αντισώματος

Πυκνότητα αντιγόνου (Antigen Density)

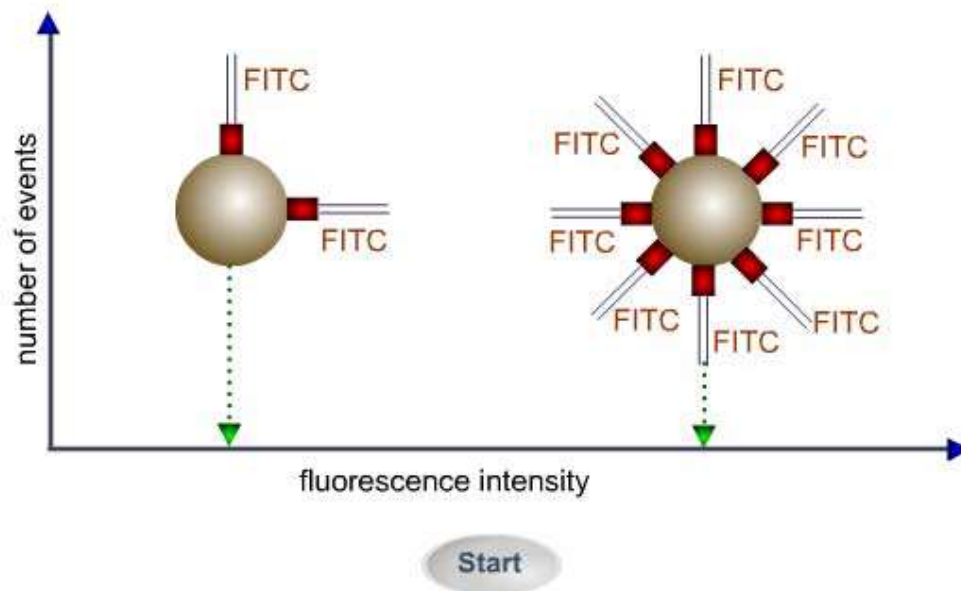
Επίπεδα αντιγονικής
έκφρασης στο κύτταρο:

- Μπορεί να ποικίλει
εξαιτίας διέγερσης
κυττάρου και διαφορές
στην λειτουργία του.
- Μπορεί να είναι
διαβαθμιζόμενη (π.χ.
smeared population)
- Απαραίτητη σε ποσοτική
ανάλυση QFCM

Cell	Antigen	Molecules per Cell
T cell	TCR	100,000
	CD2	55,000
	CD3	124,000
	CD5	90,000
	CD7	20,000
	CD45	>200,000
CD4+ T cell	CD4	100,000
	CD28	20,000
	CCR5	4,000-24,000
CD8+ T cell	CD8	90,000
	CD28	15,000
B cell	CD19	18,000
	CD20	109,000
	CD21	210,000
	CD22	14,000
	HLA-DR	85,000
	CD11a	10,000
	CD40	2,000
	CD86	16,000
	CD80	2,000
Dendritic cell	CD11a	27,000
	CD40	17,000
	CD80	132,000
	CD86	208,000
Monocyte	CD14	110,000
	CD32	21,000
	CD64	13,000
Neutrophil	CD14	3,500
	CD16	225,000
NK cell	CD56	10,000
Red Blood Cell	Glycophorin A	340,000
Basophil	CD23	15,000

Ένταση φθορισμού ανάλογη της πυκνότητας του αντιγόνου

Η ένταση φθορισμού που εκπέμπεται από ένα κύτταρο ή σωματίδιο είναι ανάλογη της ποσότητας των συνδεδεμένων θέσεων του φθορίζοντα ιχνηθέτη. Όσο περισσότερες είναι οι θέσεις δέσμευσης τόσο περισσότερο φθορισμός παράγεται, και τόσο μεγαλύτερη η κλίμακα της έντασης του φθορισμού.

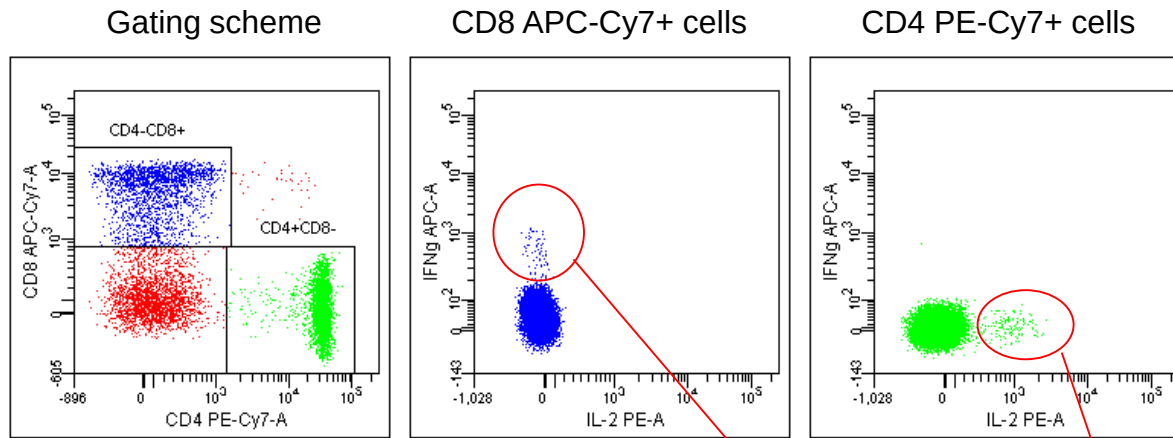


Σταθερότητα χρωστικών

- Οι φθορίζουσες χρωστικές με την πάροδο του χρόνου, την έκθεση στο φως, την αυξανόμενη θερμοκρασία, και με την παρουσία αντιδραστηρίων μονιμοποίησης διασπώνται και ξεθωριάζουν.
- Παραμονή στο σκοτάδι και σε χαμηλή θερμοκρασία 4°C μειώνει το φαινόμενο αυτό.
- Οι χρωστικές Tandem είναι πιο ασταθείς (APC-Cy7, PE-Cy7), ωστόσο υπάρχουν αντιδραστήρια σταθεροποιητές (Stabilizing Fixative) που εμποδίζουν την ραγδαία διάσπασή τους. Νέες χρωστικές tandem όπως APC-H7 είναι πιο σταθερές.

Ψευδώς θετικό αποτέλεσμα εξαιτίας της διάσπασης των διδύναμων χρωστικών

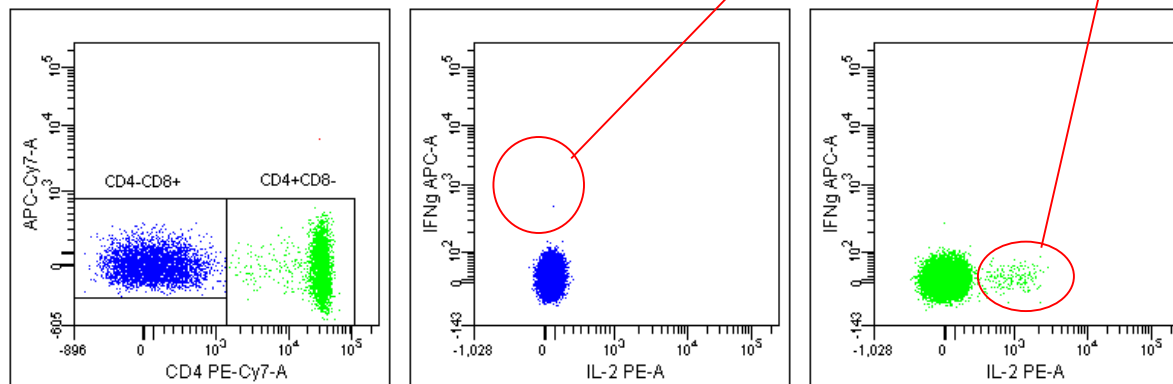
A. With CD8 APC-Cy7 and CD4 PE-Cy7:



False positives in
APC channel reduced
in absence of APC-Cy7

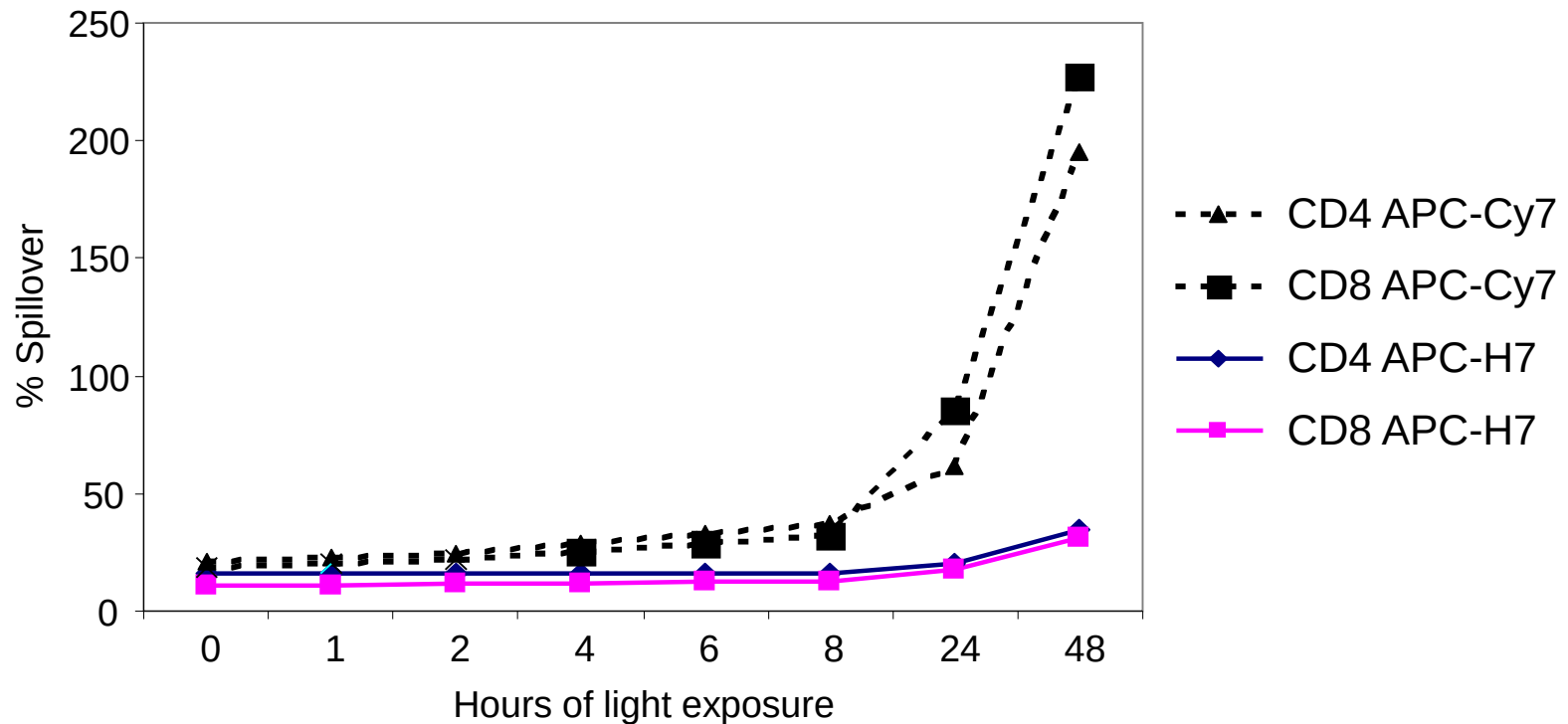
False positives in
PE channel
remain

B. Without CD8 APC-Cy7:



Νέα γενεά tandem είναι πιο σταθερή

- APC-H7 as a replacement for APC-Cy7:
Comparison of Sample Stability



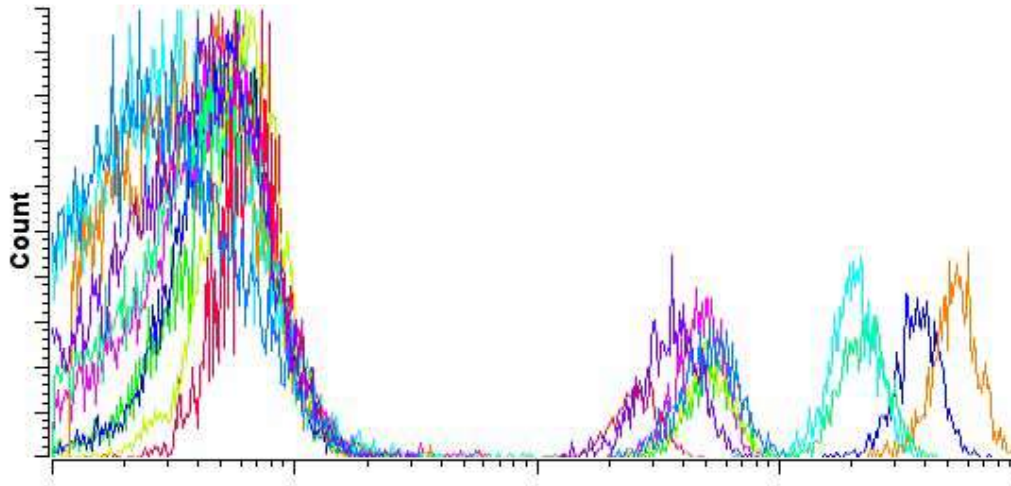
F/P λόγος (dye-protein ratio)

- Είναι η αναλογία κατά τη σήμανση αντισώματος ή άλλου ιχνηθέτη με φθορίζουσα ουσία. Βέλτιστη αναλογία οδηγεί στη βέλτιστη σήμανση των κυττάρων προς αποφυγή στερεοδιατακτικών προβλημάτων.
- Μεγάλη αναλογία F/P : απώλεια φθορισμού (quenching) σε γειτονικά μόρια φθορίζόντων ουσιών
- Μεγάλη αναλογία F/P : απώλεια βιολογικής δραστηριότητας μορίων ή μειωμένη διαλυτότητα.
- Μικρή αναλογία F/P : χαμηλός φθορισμός αναποτελεσματικός ιχνηθέτης.

F/P λόγος (Dye-protein ratio)

- Ποσοτικοποίηση συζευγμένης πρωτεΐνης: χρωστικής (dye: protein or F/P molar ratio) είναι σημαντική για την πρόβλεψη της ποσότητας του ιχνηθέτη σε ένα πείραμα και για έλεγχο της έντασης φθορισμού μεταξύ πειραμάτων.
- Η αναλογία αντιπροσωπεύει το μέσο αριθμό μορίων χρωστικής συζευγμένων σε κάθε μόριο πρωτεΐνης.
- Υψηλή αναλογία επιτρέπει υψηλή ευαισθησία.
- Ακριβής καθορισμός του λόγου είναι απαραίτητος στην **κυτταρομετρία ποσοτικού φθορισμού (QFCM)**. Επηρεάζεται από μοριακή αναλογία F, P, σκουπίδια και την δραστικότητα των αντιδραστηρίων σύζευξης.

Fluorochrome Intensity



FITC = Green

PE-TR = Light blue

PE-Cy7 = Orange

A594 = Yellow green

A700 = Blue

PE = Dark Blue

PerCP-Cy5.5 = Magenta

Pacific Blue = Red

APC = Light green

APC-Cy7 = Purple

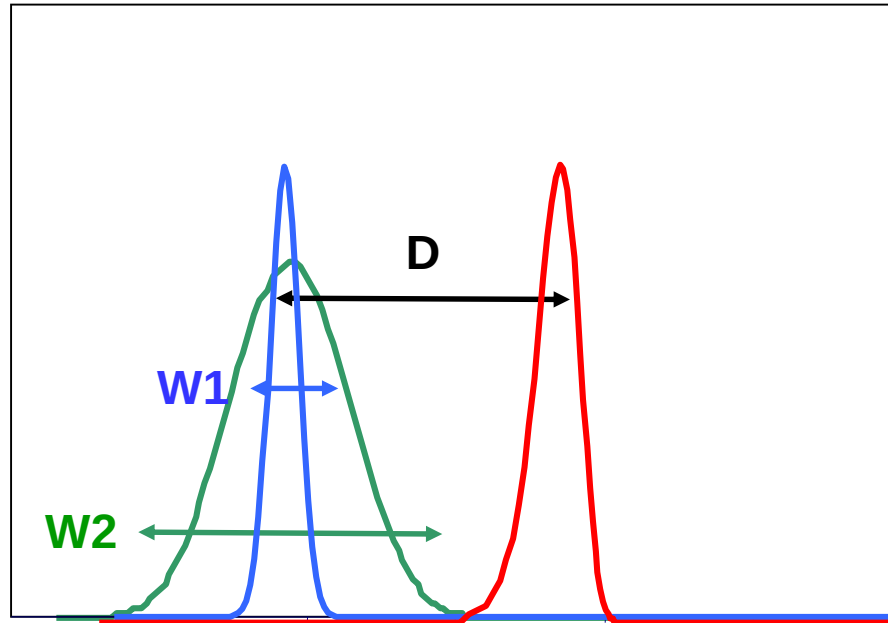
Fluorochrome Brightness Index

Fluorochrome	Ex (nm)	Em (nm)	Filter	Brightness
PE	496, 565	575	585/40	5
Alexa Fluor® 647	650	668	660/20	5
APC	645	660	660/20	5
PE/Cy7	496	774	780/60	4
PE/Cy5	496	670	695/40	4
PE/Cy5.5	496	695	695/40	3
PerCP/Cy5.5	482	690	695/40	3
Alexa Fluor® 488	495	519	530/30	3
FITC	493	519	530/30	3
APC/Cy5.5	650	690	695/40	3
PerCP	482	675	695/40	2
APC/Cy7	650	774	780/60	2
APC/Alexa Fluor® 750	650	775	780/60	2
Alexa Fluor® 700	696	719	720/45	2
Pacific Blue	410	455	440/40	1

The Fluorochrome Brightness Index Score is a relative indication of fluorescence intensity above the background for each fluorochrome conjugation (1=dim, 5=brightest). These values can differ depending upon the flow cytometer, the instrument filters and settings, the antibody clone and the antigen target, f/p ratios, the buffer conditions, etc.

For questions or assistance contact Technical Service at techserv@biolegend.com or 877-246-5343.

“Bright” = good resolution sensitivity

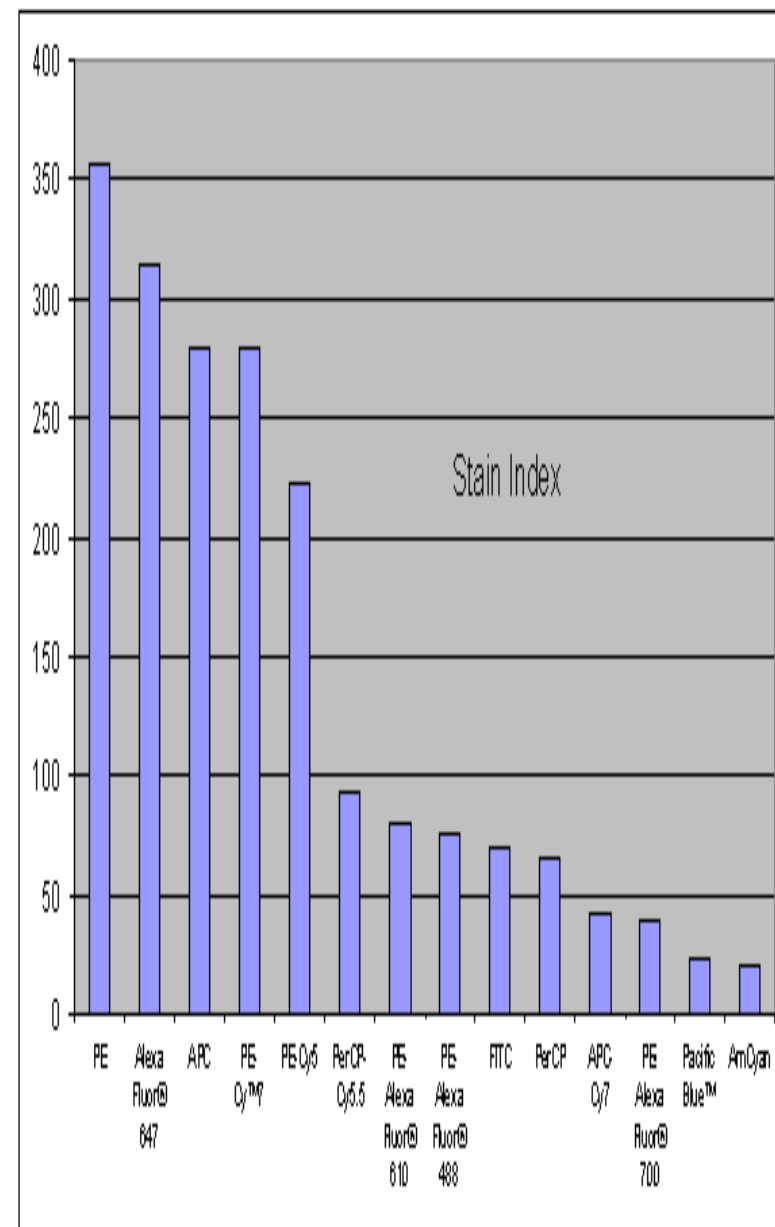


$$\text{Stain Index (SI)} = D/W$$

D = difference between positive and negative peak medians, and
W = 2 x rSD (robust standard deviation) spread of the negative population

The stain index is a useful metric for normalized signal over background.

Relative Brightness		Reagent	Filter
BRIGHTTEST		Brilliant Violet™ 421	450/50
		PE	575/26
		BD Horizon PE-CF594	610/20
		PE-Cy5	670/14
		APC	660/20
BRIGHT		PE-Cy7	780/60
		Alexa Fluor® 647	660/20
		PerCP-Cy5.5	695/40
MODERATE		Alexa Fluor® 488	530/30
		FITC	530/30
		BD Horizon V450	450/50
		Pacific Blue™	450/50
DIM		Alexa Fluor® 700	730/45
		PerCP	695/40
		APC-Cy7	780/60
		AmCyan	525/20
		BD Horizon V500	525/20
		BD APC-H7	780/60



Resolution / staining index

- Από τους σημαντικότερους παράγοντες στην κυτταρομετρία είναι η αξιόπιστη **διάκριση μεταξύ θετικού και αρνητικού** κυτταρικού πληθυσμού, καθώς και η με ακρίβεια μέτρηση του θετικού πληθυσμού.
- Οι παράμετροι του resolution index και staining index (4) είναι σημαντικά εργαλεία για να **περιγραφεί ποσοτικά ο βαθμός διάκρισης / διαχωρισμού μεταξύ δύο πληθυσμών**. Απαιτούν τον προσδιορισμό της διάμεσης τιμής (median) και της τυπικής απόκλισης [standard deviation (SD)] της έντασης του φθορισμού των κυτταρικών πληθυσμών. Όταν η διάκριση μεταξύ θετικού και αρνητικού είναι ελάχιστη, τότε στατιστικοί έλεγχοι μπορούν να προσδιορίσουν την πιθανότητα ένας πληθυσμός να είναι σημαντικά διαφορετικός από τον άλλο.
- Απαραίτητη προϋπόθεση για την αξιοποίηση τους, είναι η χρήση κατάλληλων **μαρτύρων** που εξασφαλίζουν ότι τα δείγματα έχουν προετοιμαστεί σωστά και ο **προσδιορισμός του επιπέδου του μη ειδικού σήματος / θορύβου (background)**.

Πώς καθορίζεται το επίπεδο του μη ειδικού σήματος (background)

Αγνοώντας τον θόρυβο του μηχανήματος (noise), τα αίτια του background στον φθορισμό μπορούν να ομαδοποιηθούν ως εξής:

- (I) αυτοφθορισμός (autofluorescence)
- (II) επικάλυψη φάσματος εκπομπής (spectral overlap)
- (III) ανεπιθύμητη μη ειδική σύνδεση αντισώματος

(I) Αυτοφθορισμός

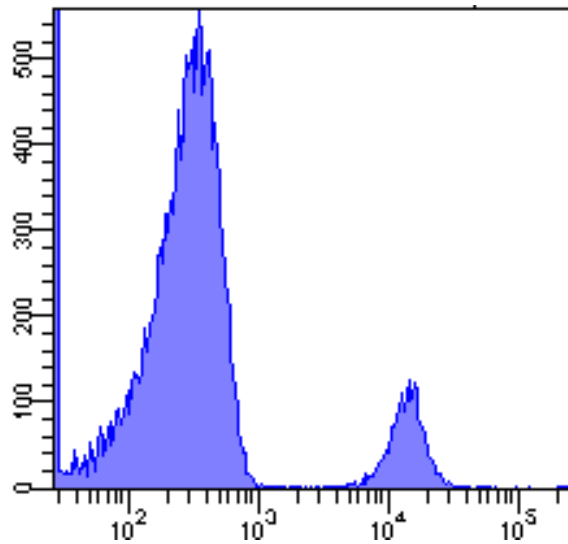
- Φυσικά κυτταρικά συστατικά (πχ, NADPH και φλαβίνες)
- Συνθήκες βιολογικές και φυσιολογικές καθώς ο τύπος του κυττάρου
- Η μονιμοποίηση των κυττάρων επάγει αυτοφθορισμό
 - Μονιμοποιητικά αλδεϋδης αντιδρούν με αμίνες και πρωτεΐνες δίνοντας φθορίζοντα προϊόντα.

(II) Επικάλυψη φάσματος εκπομπής (Spectral overlap)

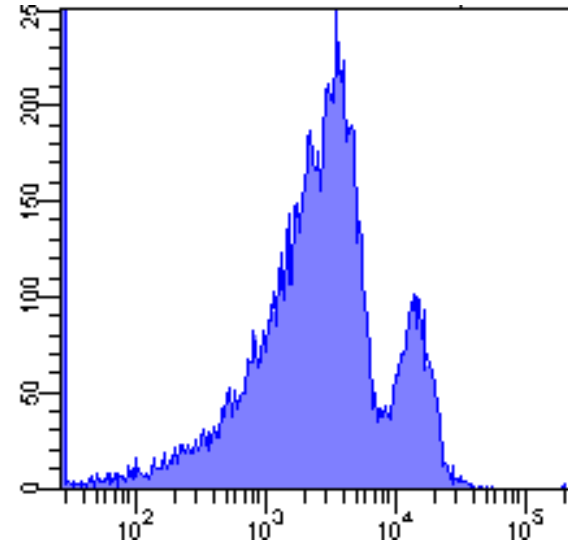
- Μειώνεται με την επιλογή κατάλληλων συνδυασμών φθοριζόντων ανιχνευτών με μικρή ή καθόλου χρωματική επικάλυψη μεταξύ τους.
- (Κινδυνεύοντας να μειωθεί η ευαισθησία), μειώνεται επιλέγοντας οπτικά φίλτρα με στενότερα διακριτικά χαρακτηριστικά
- Με compensation

Spillover affects resolution sensitivity

Without CD45 AmCyan:



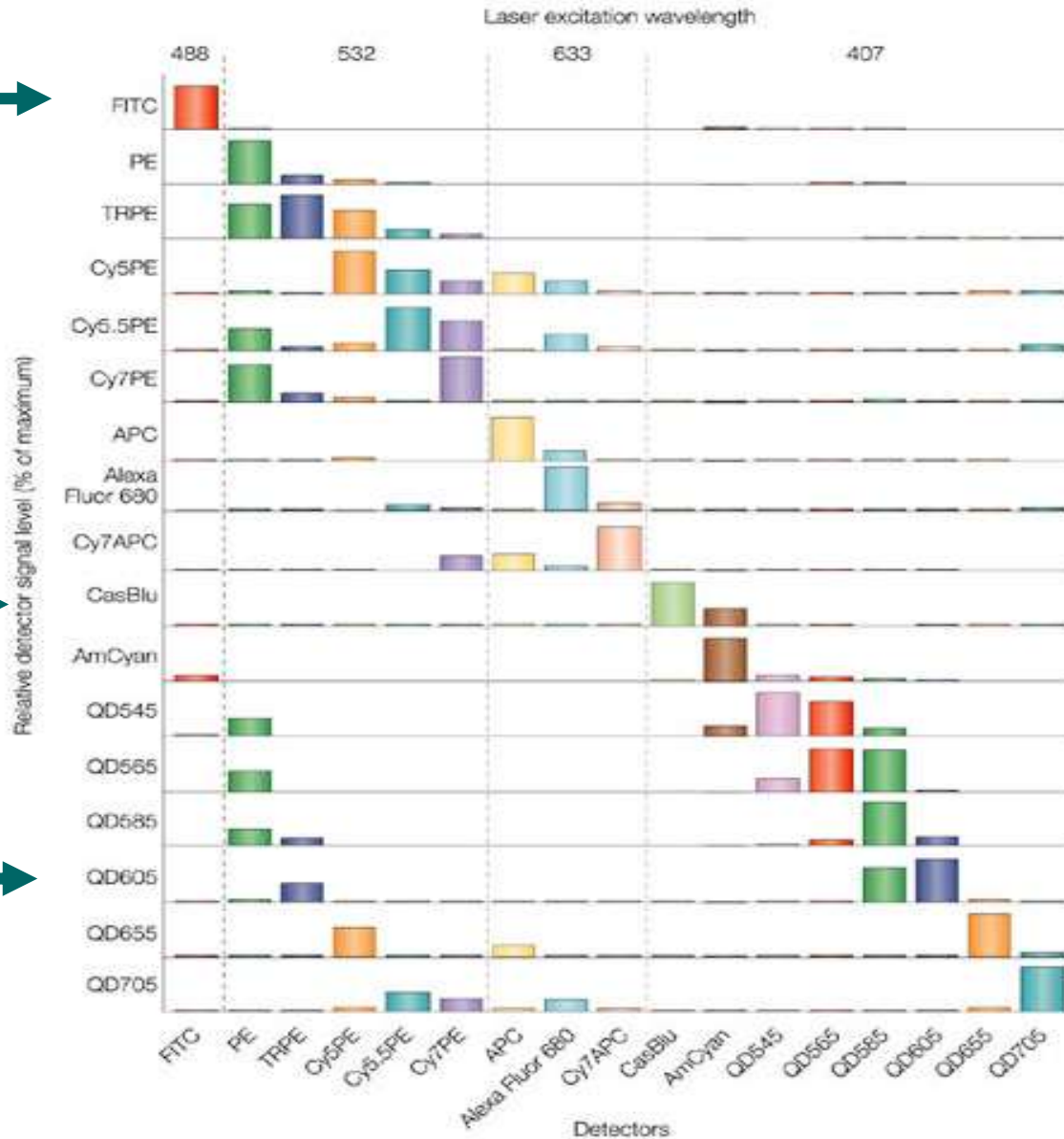
With CD45 AmCyan:



CD19 FITC

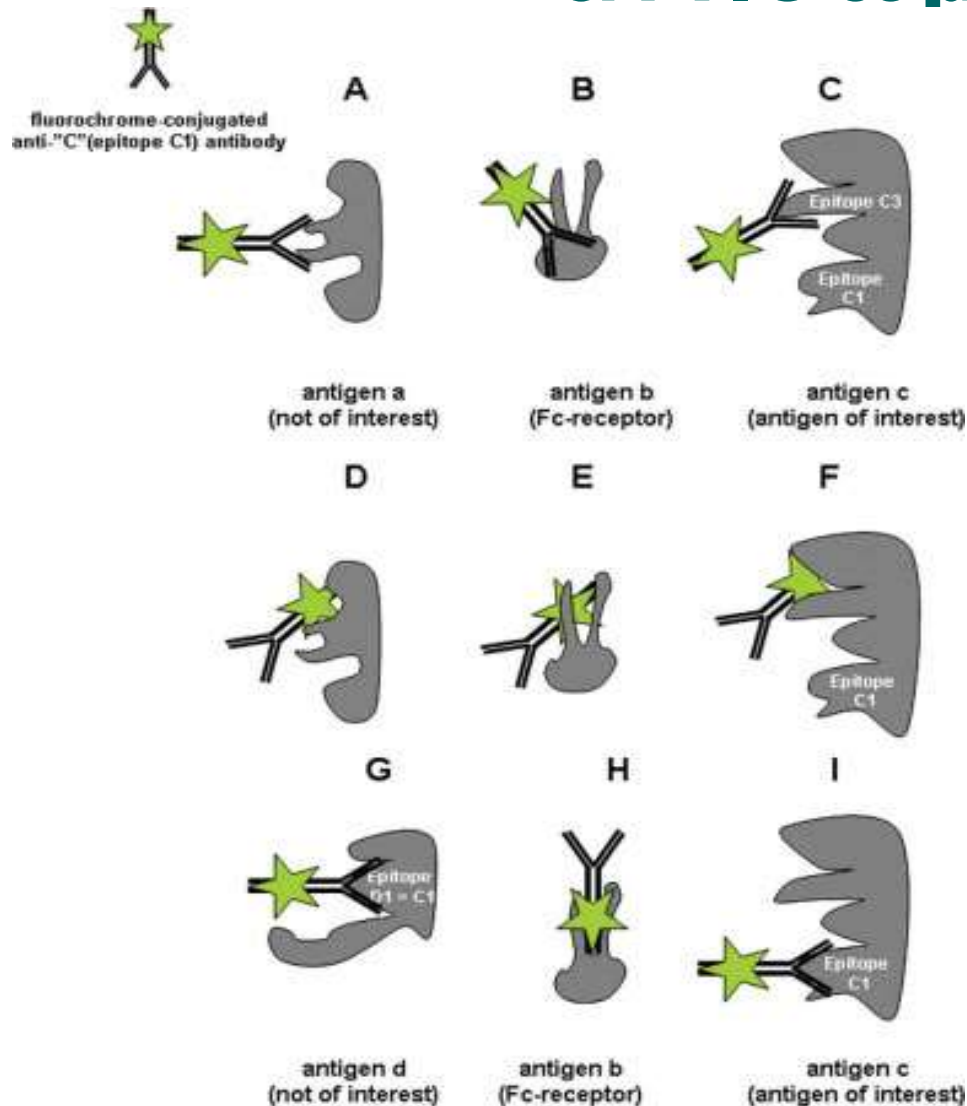
Note that this is only an issue when the two markers (CD45 and CD19) are co-expressed on the same cell population.

(II) Χρωματική επικάλυψη



Καλές φθορίζουσες ουσίες είναι αυτές που έχουν την μικρότερη χρωματική επικάλυψη και διεγείρονται από διαφορετικά lasers, πχ. FITC, Cascade Blue, QDots605

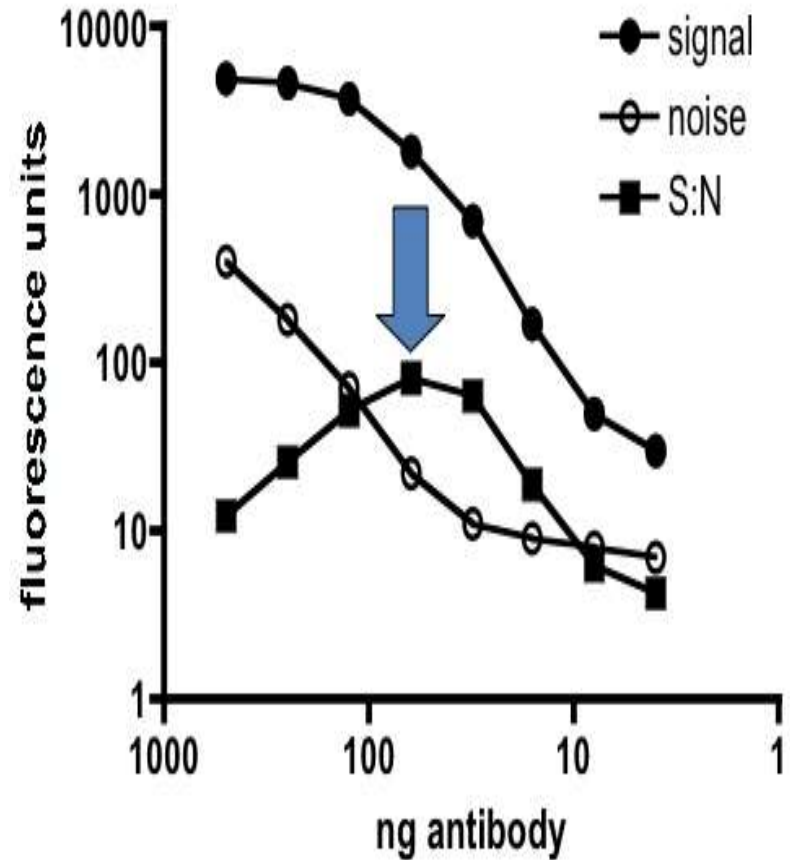
(III) Ανεπιθύμητη μη ειδική σύνδεση αντισώματος



- (A-C) Non-specific antibody binding
 - Binding of an antibody to a different epitope than the one it was generated against
- (G-I) Specific antibody binding
 - Binding to an epitope that is shared by a different antigen
- Fc mediated binding
 - Can be either specific or non-specific
- (D-F) Fluorochrome mediated binding
 - Some fluorochrome molecules are highly charged

Τιτλοποίηση αντισώματος

- Τα αντισώματα έχουν ένα εύρος τιμών συγκεντρώσεως με το οποίο συνδέονται στα αντιγόνα. Εάν χρησιμοποιηθεί πολύ λίγο αντίσωμα πιθανά να υπάρχει μειωμένη ένταση φθορισμού. Εάν χρησιμοποιηθεί πολύ αντίσωμα, κορεσμός θα επέλθει, καλύπτοντας τον πραγματικό αριθμό των αντιγόνων στόχων στο δείγμα.
- Στόχος η εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης αντισώματος που προσεγγίζει την τιμή κορεσμού αλλά να είναι ελαφρά κατώτερή της.
- Αυτό εξασφαλίζει ότι η εκπομπή φθορισμού είναι γραμμικά ανάλογη με την ποσότητα του αντιγόνου που υπάρχει στο δείγμα

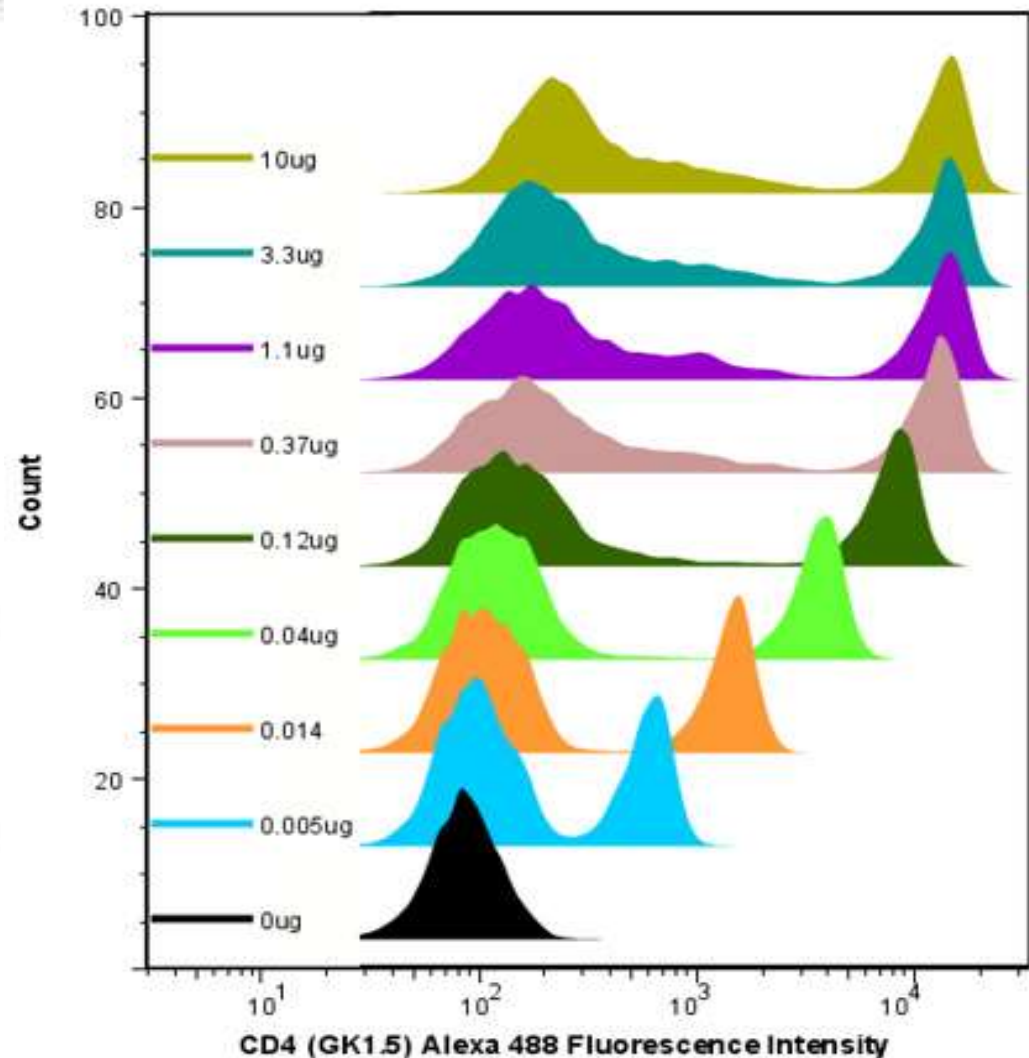
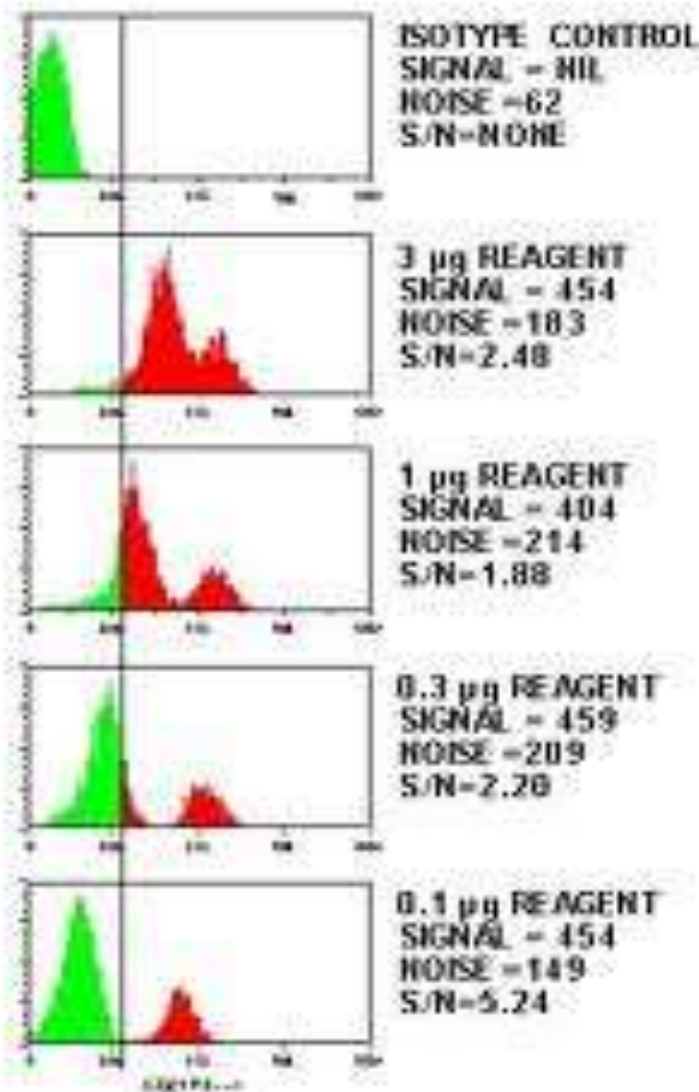


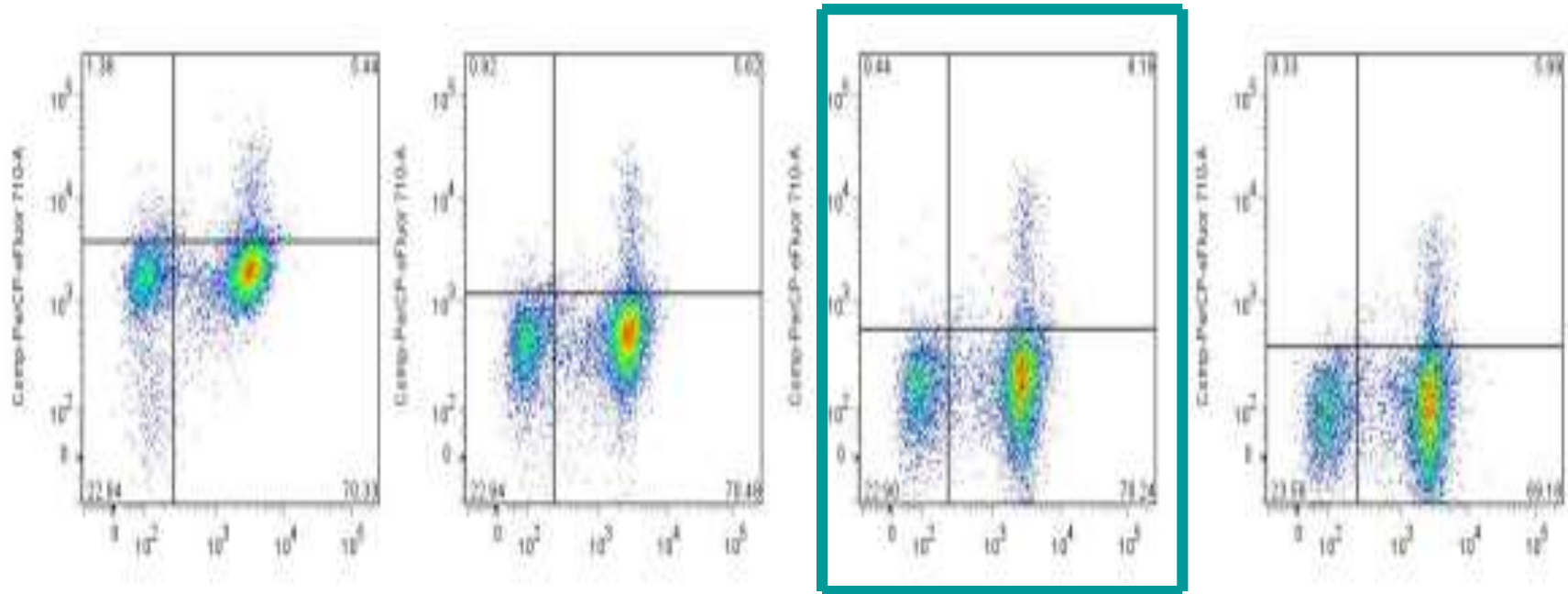
Γιατί τιτλοποίηση;



- Βελτιστοποίηση σήματος φθορισμού & διαχωρισμού αρνητικού από θετικό πληθυσμό
- Εύρεση συγκέντρωσης κορεσμού (saturation)
- Ελαχιστοποίηση background
- Εξοικονόμηση αντισωμάτων

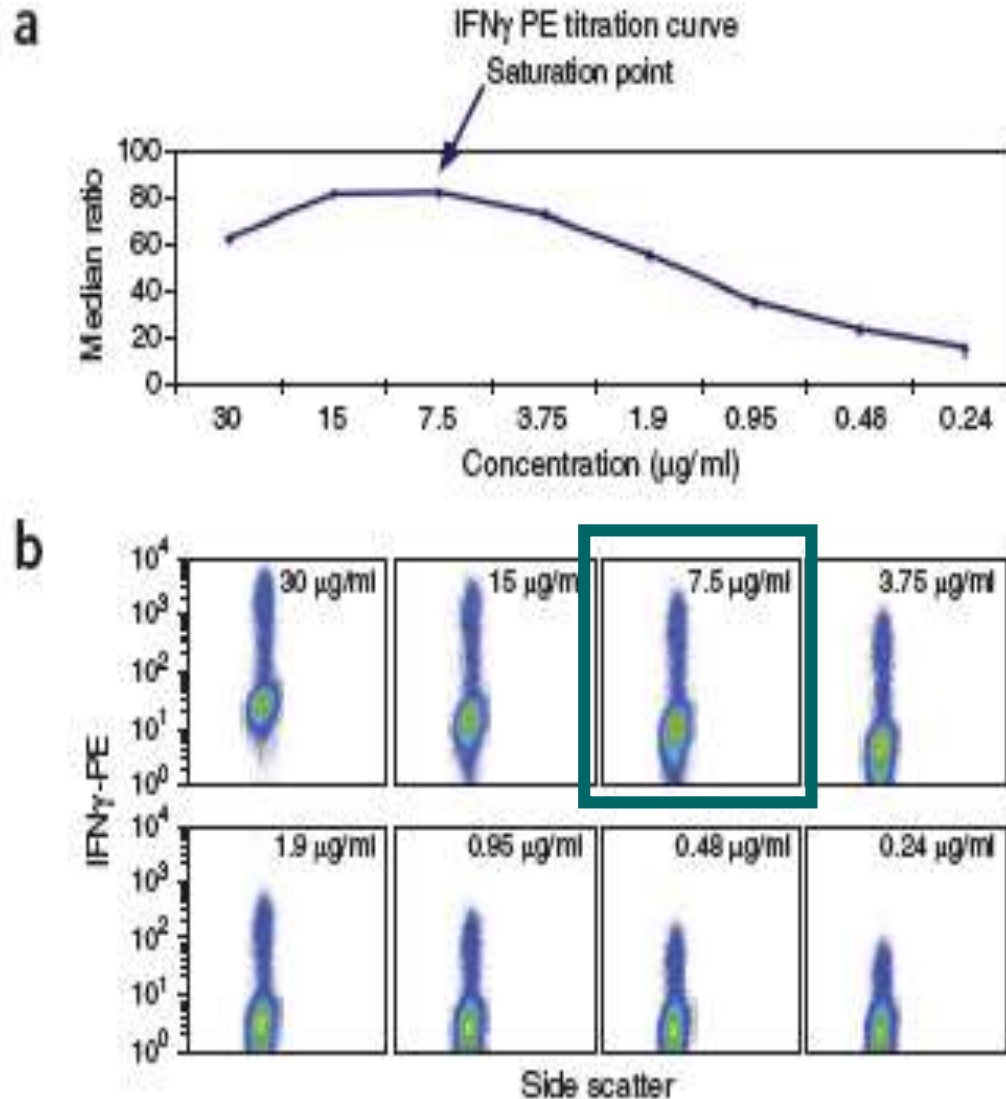
Τιτλοποίηση Αντισώματος





- Εύρεση βέλτιστης τιμής συγκέντρωσης Ab κάνει την ανάλυση αισθητά πιο ευαίσθητη και ακριβή.
- Υπερβολικά υψηλή συγκέντρωση αυξάνει τον θόρυβο και μειώνει την ικανότητα να διαχωρίζεται ο θετικός πληθυσμός (1 $\mu\text{g}/\text{δείγμα}$)
- Καθώς το Ab αραιώνεται ο θόρυβος υποχωρεί και ο θετικός πληθυσμός είναι καλά διακριτός.
- Συνεχίζοντας την αραιώση, αρχίζει να μειώνεται το ποσοστό του θετικού πληθυσμού. (0.015 $\mu\text{g}/\text{δείγμα}$)
- Βέλτιστος τίτλος 0.06 $\mu\text{g}/\text{δείγμα}$, καλύτερη αναλογία signal to noise

Τιτλοποίηση αντισώματος



Κάνουμε τιτλοποίηση Ab όταν:

- δεν γνωρίζουμε το % των θετικών κυττάρων
- δεν έχουμε αρνητικό πληθυσμό με τον οποίο θα μπορούσαμε να συγκρίνουμε τη θετική τιμή MFI μαζί του.

Σε κάθε περίπτωση συστήνεται να αρχίζουμε από την συγκέντρωση που προτείνει ο κατασκευαστής και διαδοχικά να αυξάνουμε την αραίωση με σταθερό αριθμό κυττάρων, συνήθως $1\mu\text{g}/10^6$ για επιφανειακή χρώση.

Είδη μαρτύρων

Instrument setup controls

- PMT voltage settings

- Compensation (per experiment)

Staining/Gating controls

- Isotype controls

- Fluorescence-minus-one (FMO) controls

- Viability

Biological controls

- Unstimulated samples

- Healthy donors

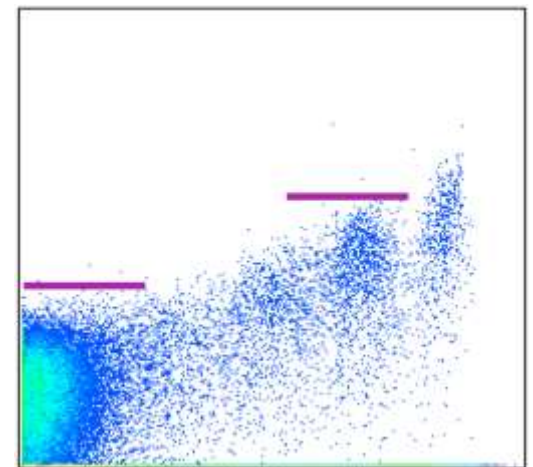
Recommended controls for Flow Cytometry/Facs

Control	Sample type	Primary Ab	Secondary	Reason
Cells only Use treated and untreated cells	Neg control cells	No	No	Negative Control/Background Autofluorescence control
Primary Ab control	Neg control cells	Yes	No	Check for non specific binding of primary
Treated primary Ab control	Treated cells	No	Yes	Check for non specific binding of secondary Ab on treated cells
Isotype control	Neg control cells	Use Isotype control antibody. This should be the same antibody isotype as primary antibody. *	Yes	To confirm that the primary antibody binding is specific and not a results of non-specific Fc receptor binding or other protein interactions.
Compensation controls for each fluorochrome	Positive population of labeled beads or positive control cell sample	Yes	Yes	Positive control to set up cytometer alignment and to remove spectral overlap.
Cell viability control	Cell sample (identical to other samples) stained with both antibody and PI nuclear stain	Yes	Yes	Non-viable cells can be discriminated from live cells on the basis of light scatter (FSC=forward scatter). This discrimination is often lost in fixed or permeabilized cells. In these cases dead cells can be distinguished from live cells by their uptake of fluorescent DNA dyes due to loss of membrane integrity e.g. PI (propidium iodide) is used for dead-cell discrimination in unfixed and non permeabilized cells. 7-AAD (7-aminoactinomycin D, fluorescent) + AD (actinomycin D, nonfluorescent) for fixed or permeabilized cells.
Specificity control	Cell samples	Yes. With excess non-labeled primary.	For direct staining only	Add excess unlabelled primary antibody with normal amount of labeled primary. If staining is specific, the non-labeled primary should compete with labeled primary and reduce the fluorescence observed.
Treated secondary Ab control	Treated cells	No	Yes	Check for non-specific binding of secondary Ab on treated cells

*Isotype controls can also be raised against an antigen known not to be present in the sample, eg KLH.

Έλεγχος χρώσεων (staining ctrls)

- Ο έλεγχος χρώσεων γίνεται για να καθοριστούν ποιά κύτταρα εκφράζουν και ποιά όχι το υπό διερεύνηση αντιγόνο.
- Το όριο θετικότητας μπορεί να εξαρτάται και από ποσότητες φθορισμού σε άλλα κανάλια, παρόλο που το compensation έγινε σωστά.



Μάρτυρες απαραίτητοι για κάθε πείραμα για αποφυγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων

- Κύτταρα χωρίς σήμανση (**unstained ctrl**) . Καθορίζει το επίπεδο voltage, την κατανομή και τα κανάλια φθορισμού.
- Θετικοί μάρτυρες χρωματισμένοι με ένα χρώμα, τόσοι όσες και οι φθορίζουσες ουσίες που θα χρησιμοποιηθούν. (**Compentation ctrls**)
- Ο ιδανικός μάρτυρας, κύτταρα ανάλογα αυτών του πειράματος αρνητικά ως προς το διερευνώμενο αντιγόνο (**Cell line ctrl**).
- Μάρτυρες που επεξεργαστήκαν χωρίς το πρώτο αντίσωμα (primary Ab) "**secondary only**" **ctrls** για χρώσεις έμμεσου φθορισμού.
- **Ισοτυπικοί μάρτυρες** για αποκλεισμό ψευδώς θετικού φθορισμού λόγω ισοτύπου του αντισώματος. Απαραίτητοι για χρώσεις αντισωμάτων απευθείας συζευγμένων με φθορίζουσα ουσία.
- **Ισοκλωνικοί μάρτυρες** για αποκάλυψη της μη ειδικής πρόσδεσης των αντισωμάτων μέσω του φθορίζοντος μορίου
- Για περισσότερες από τρεις φθορίζουσες χρωστικές χρειάζονται μάρτυρες που έχουν χρωματιστεί για όλα τα χρώματα του πειράματος εκτός ενός. Οριοθετούν μεταξύ θετικά και αρνητικά χρωματισμένων πληθυσμών. **Fluorescence minus one (FMO) ctrls**.

Ισοτυπικός μάρτυρας

Ιδανικά, να ταιριάζει σε όσο το δυνατό περισσότερα χαρακτηριστικά με το ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα Ab

- Συγκέντρωση
- Βαριά αλυσίδα (IgA, IgG, IgD, IgE ή IgM)
- Ελαφριά αλυσίδα (kappa, lambda)
- Υποτάξεις (IgG2a, IgG2b, etc.)
- Φθορίζουσα χρωστική (μοριακά και F/P λόγο)
- Κατασκευαστής

Ρόλος

- 📖 Ορισμός αρνητικού φθορισμού στον υπό μελέτη πληθυσμό (cut off)
- 📖 Αποκλεισμό ψευδώς θετικού φθορισμού λόγω ισοτύπου του αντισώματος.
- 📖 Απαραίτητο για χρώσεις αντισωμάτων απευθείας συζευγμένων με φθορίζουσα ουσία.
- 📖 Αναγκαία συνθήκη στην ύπαρξη νεκρών κυττάρων

Ισοκλωνικός μάρτυρας

- Μίγμα μονοκλωνικών αντισωμάτων σεσημασμένων και μη. Τα δεύτερα σε μεγαλύτερη αναλογία.
- Ειδικά κατασκευασμένα να αποκαλύπτουν τη μη ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων μέσω του φθορίζοντος μορίου.
- Ο ειδικός και μη ειδικός φθορισμός αναστέλλεται από την περίσσεια του σεσημασμένου αντισώματος.

Εσωτερικός αρνητικός μάρτυρας

Ο ιδανικός μάρτυρας, κύτταρα ανάλογα αυτών του πειράματος αρνητικά ως προς το διερευνώμενο αντιγόνο

- Πανομοιότυπες συνθήκες επεξεργασίας και χρώσης συμπεριλαμβανομένου και της έκθεσης στο υπό μελέτη αντίσωμα.
- Ιδανικό για προσδιορισμό αυτοφθορισμού και μη ειδικής πρόσδεσης που προκαλείται από αυξημένη συγκέντρωση αντισώματος.

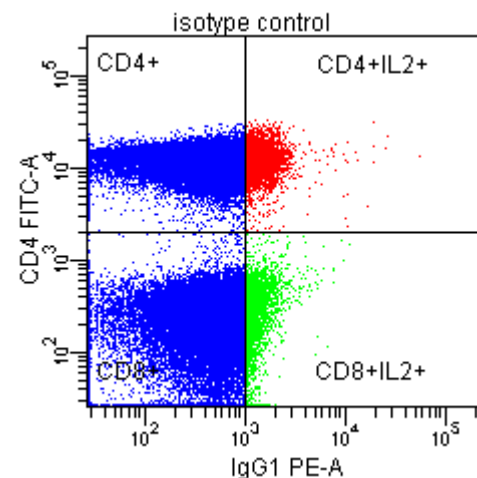
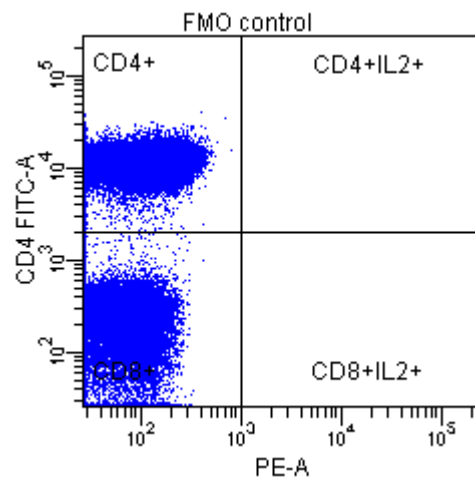
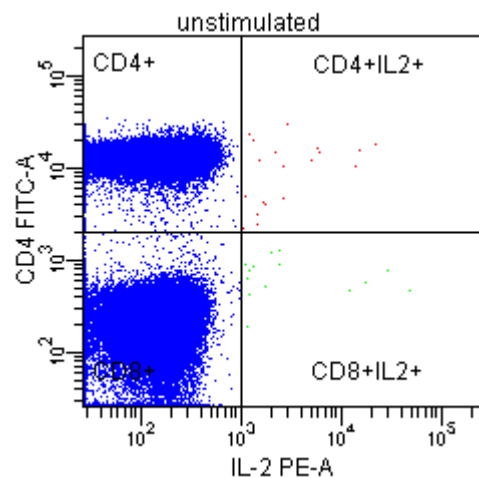
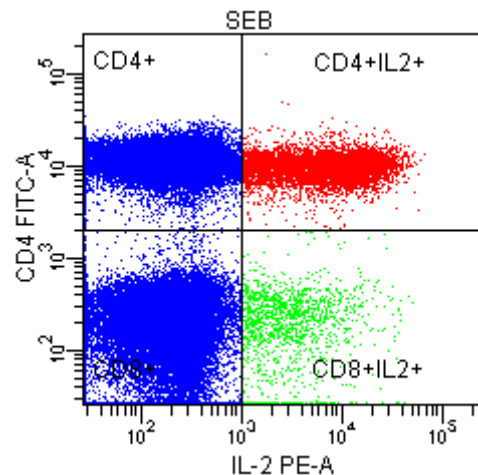
FMO μάρτυρας

Fluorescence Minus One

Δείγματα σεσημασμένα με όλα τα αντισώματα του πειράματος **εκτός από ένα**

- FMO μάρτυρες: οριοθετούν μεταξύ θετικά και αρνητικά χρωματισμένων πληθυσμών σε πολυπαραμετρικές αναλύσεις.
- Προσδιορίζουν τόσο τα επίπεδα θορύβου από μη ειδική πρόσδεση αντισωμάτων καθώς και στον εντοπισμό ατελειών του compensation. Χρησιμεύουν στον προσδιορισμό θετικών κυττάρων όταν συγκριθούν με το υπό ανάλυση δείγμα.

Σύγκριση μαρτύρων



Staining Controls

- Unstained cells or complete isotype control stains are *improper* controls for determining positive vs. negative expression in multi-color experiments.
- The **best control** is to stain cells with all reagents *except* the one of interest.

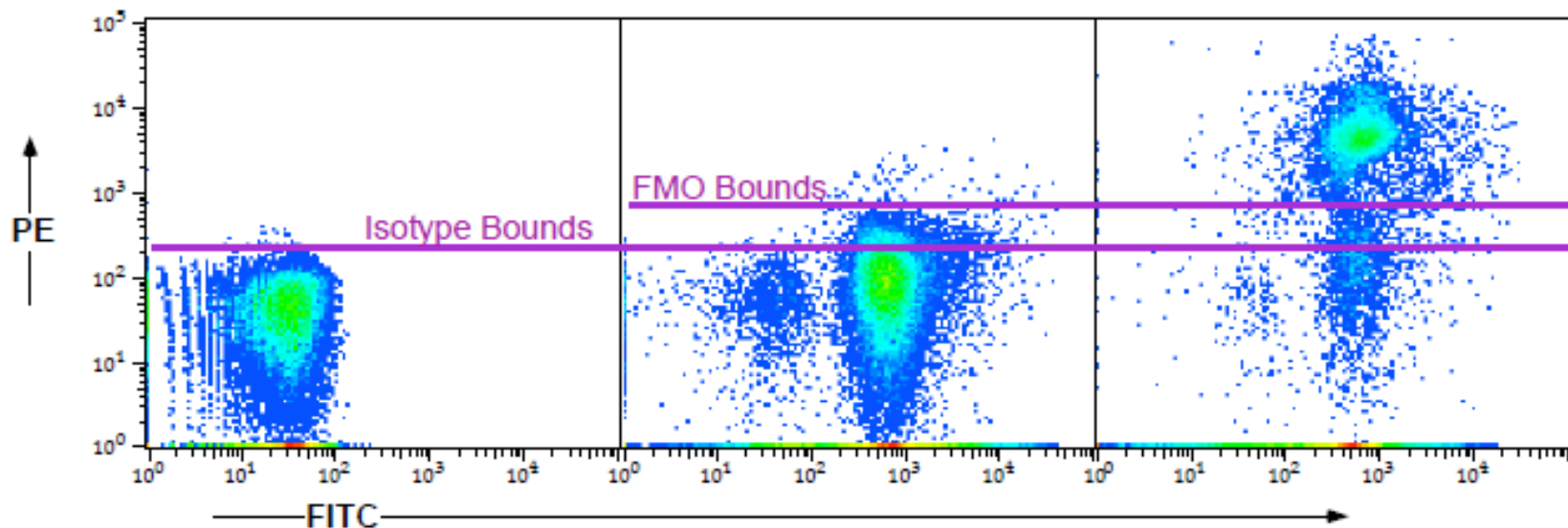
FMO Control

“Fluorescence Minus One”

Identifying CD4 cells with 4 colors

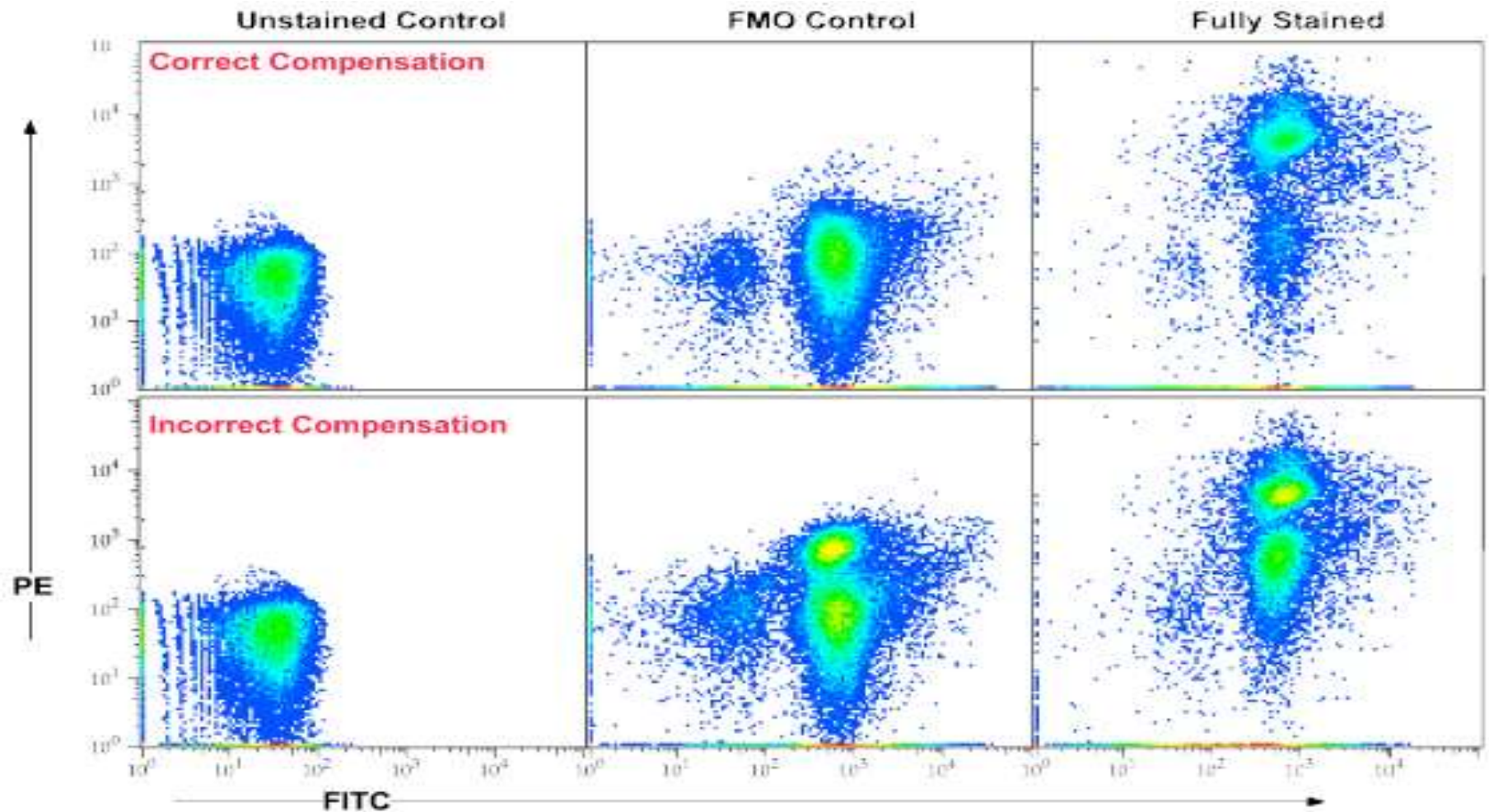
PBMC were stained as shown in a 4-color experiment.
Compensation was properly set for all spillovers

	Unstained Control	FMO Control	Fully Stained
FITC	—	CD3	CD3
PE	—	—	CD4
Cy5PE	—	CD8	CD8
Cy7PE	—	CD45RO	CD45RO



Complex Interactions in Compensation

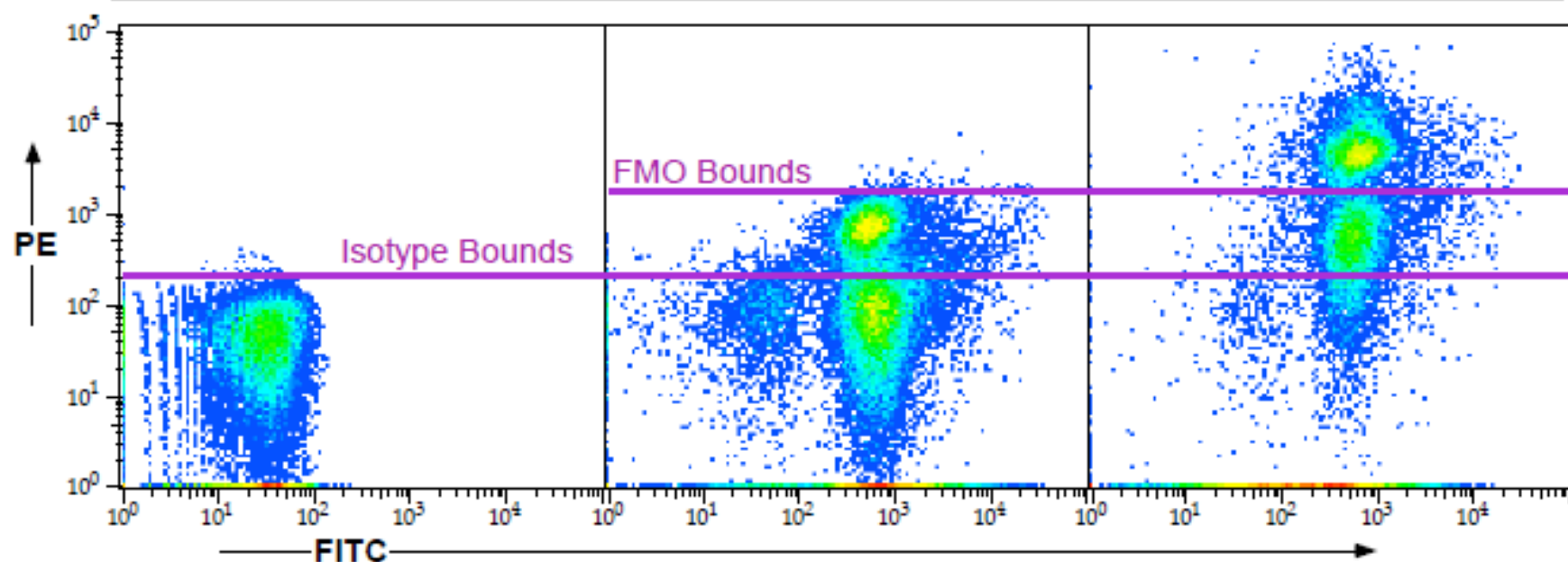
The same data is shown with correct or wrong Cy5PE->Cy7PE comp setting. Note that neither of these channels is shown here!



FMO controls aid even when compensation is improper

Incorrect Cy5PE into Cy7PE compensation

	Unstained Control	FMO Control	Fully Stained
FITC	-	CD3	CD3
PE	-	-	CD4
Cy5PE	-	CD8	CD8
Cy7PE	-	CD45RO	CD45RO



FMΟ μάρτυρες

- Αναγνωρίζουν καλύτερα τους θετικά από τους αρνητικά σεσημασμένους πληθυσμούς
- Βοηθούν στην ανάδειξη προβλημάτων compensation όταν αυτά δεν είναι άμεσα ορατά
- Πρέπει να χρησιμοποιούνται όποτε απαιτείται ανάλυση ακριβείας ή όταν ανιχνεύονται αντιγόνα με χαμηλή έκφραση

Συστάσεις

- Αποφύγετε ή διορθώστε τον υψηλό αυτοφθορισμό
- Καθιερώστε την ειδικότητα των αντισωμάτων
- Ελαχιστοποιήστε το background με κατάλληλη τιτλοποίηση
- Αναγνωρίστε τις ανεπιθύμητες συνδέσεις των αντισωμάτων
- Ελαχιστοποιείτε την ανάγκη για compensation
- Αναγνωρίστε και αναδείξτε τον υπό διερεύνηση πληθυσμό σας

Επιλέγοντας κατάλληλα αντιδραστήρια για πολυχρωματική ανάλυση

- Επιλέξτε τις εντονότερες φθορίζουσες ουσίες (stain index) για το δικό σας κυτταρόμετρο βάση των οπτικών φίλτρων του
- Επιλέξτε φθορίζουσες ουσίες που μειώνουν την πιθανότητα χρωματικής αλληλοεπικάλυψης
- Κρατείστε για τα ασθενώς συνδεόμενα αντισώματα τους εντονότερους φθορίζοντες ανιχνευτές και το αντίστροφο (λάβετε υπ' όψιν την πυκνότητα του αντιγόνου)
- Αποφύγετε την επέκταση φθορισμού (spillover) από έντονους πληθυσμούς σε ανιχνευτές που απαιτούν υψηλή ευαισθησία για αυτούς τους πληθυσμούς
- Πάρτε μέτρα για αποφυγή διάσπασης των tandem χρωστικών και να έχετε στο μυαλό σας επιπτώσεις που μπορεί να έχει αυτό στα αποτελέσματά σας
- Intralaser compensation is always higher than interlaser compensation
- Οργανώστε το πείραμά σας συμπεριλαμβάνοντας τους κατάλληλους μάρτυρες

Everything's Relative!!!

- The relative bin numbers are just that...relative.
- Saying your cells have a mean fluorescence intensity of 100 means absolutely nothing until you compare it to a negative.
- The fact that everything is relative allows you to compare 2, 3, or 20 samples using the same instrument settings.
- You may need to compromise!!!

Εσωτερικός έλεγχος ποιότητας (Internal Quality Control)

- Έλεγχος που πραγματοποιείται 1 ή 2 φορές το χρόνο από εξειδικευμένο προσωπικό που ελέγχει την επίδοση στοιχείων όπως lasers, φωτοπολλαπλασιαστές (PMTs), οπτικά φίλτρα, και λογαριθμικούς και γραμμικούς πολλαπλασιαστές.
- Έλεγχος σωστής λειτουργίας του KP (start-up). Γίνεται με την χρήση κατάλληλων σφαιριδίων αναφοράς σε ειδικά διαγράμματα και με ειδικά settings του KP, παράμετροι όπως CVs, μέση και διάμεση τιμή καναλιών καταγράφονται. Χρησιμοποιώντας διαγράμματα Levey-Jenning, οι τιμές μπορούν να καταγραφούν και να επεξεργαστούν για απόκλιση από το επιθυμητό.
- Αντιστάθμιση των καναλιών φθορισμού.

Έλεγχος ποιότητας κυτταρομετρητή ροής

- Σφαιρίδια οπτικής ευθυγράμμισης (Τύπος I):
ευθυγράμμιση των οπτικών συστημάτων
- Σφαιρίδια αναφοράς (Τύπος II) : καθορισμένης
έντασης φθορισμού, ρύθμιση φίλτρων και
φωτοπολλαπλασιαστών
- Σφαιρίδια βαθμονόμησης (Τύπος III) :
Διαφορετικά επίπεδα έντασης φθορισμού,
ρύθμιση της ποσοτικοποίησης των σημάτων
φθορισμού

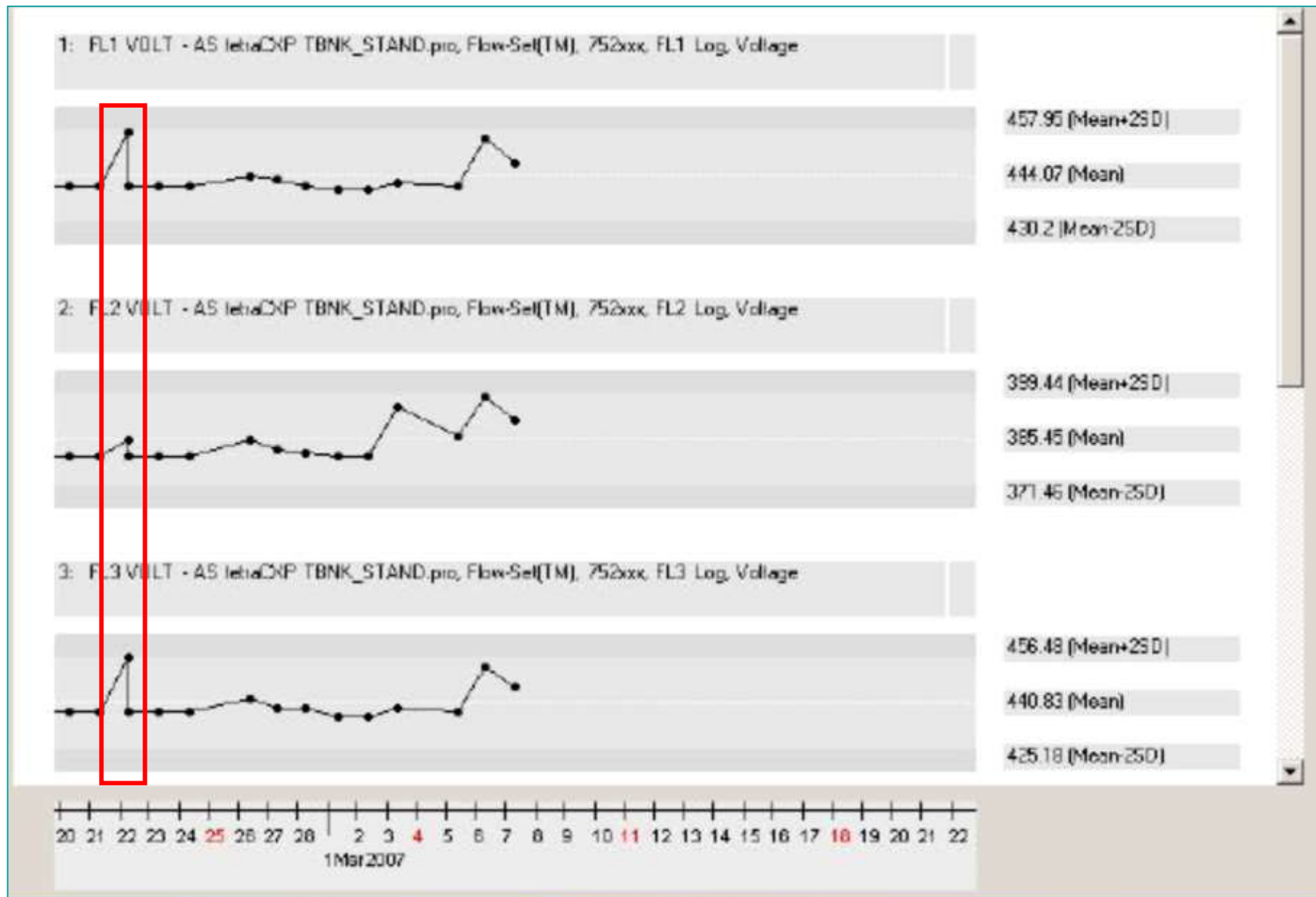
Ρύθμιση & βαθμονόμηση ΚΡ

Πίνακας 1.1: Φυσικά χαρακτηριστικά σφαιριδίων που χρησιμοποιούνται για τη ρύθμιση και βαθμονόμηση των κυτταρομετρητών ροής.

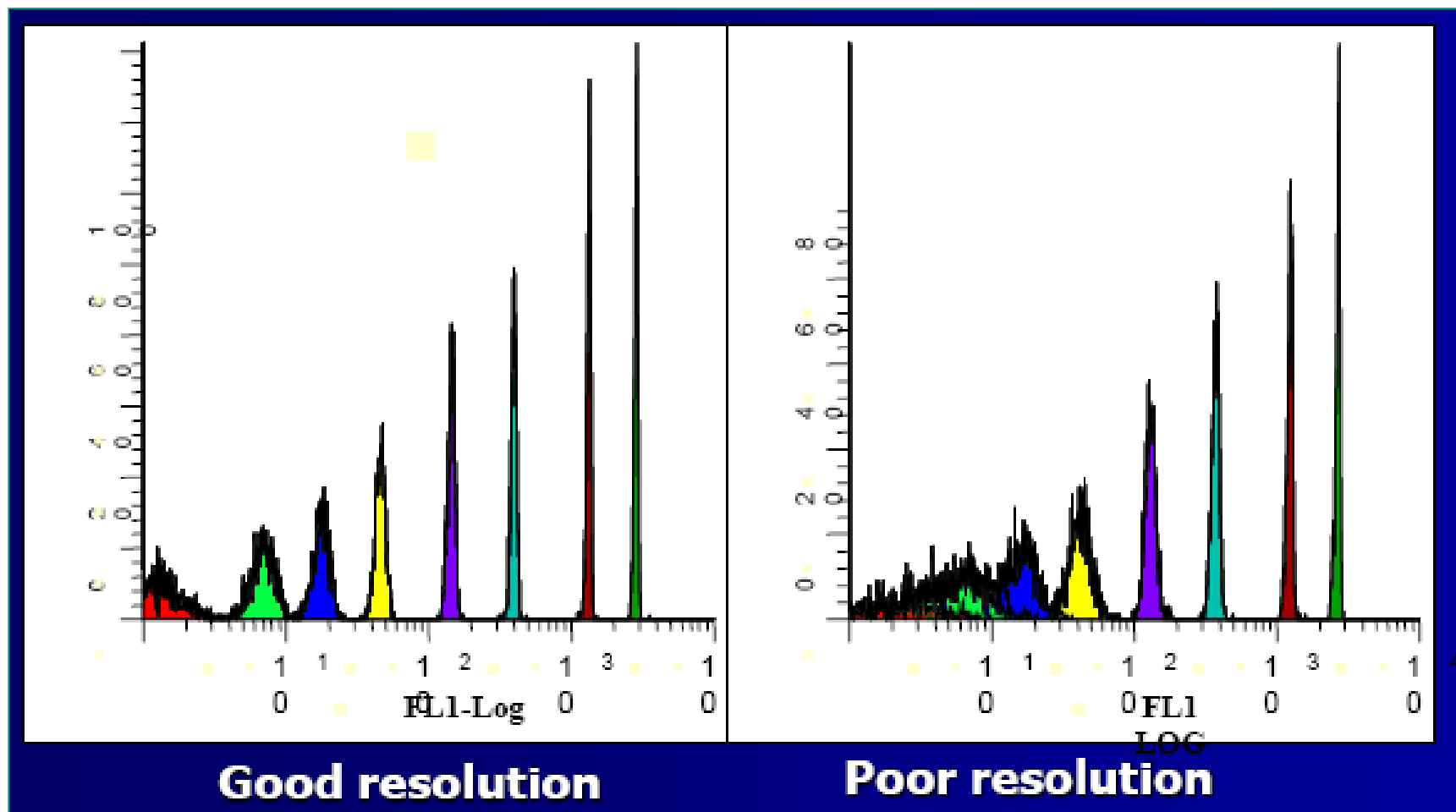
Χαρακτηριστικά Ιδιότητες	Τύπος 0 τυφλά	Τύπος I ευθυγράμμισης		Τύπος II αναφοράς			Τύπος III βαθμονόμησης		
		Ia	Ib	IIA	IIB	IIC	IIIA	IIIB	IIIC
<u>Μέγεθος παρόμοιο</u> με των λεμφοκυττάρων	= ¹	< ²	=	=	=	=	=	=	=
Ομοιομορφία μεγέθους (CV<2,3%)	Όχι	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
Επίπεδο έντασης φθορισμού	-/- ³	+/ ⁴	+/+	+ ⁵	+	+	(-/+) ⁶	(-/+)	(-/+)
Αριθμός επιπέδων εντάσεως φθορισμού	Ένα	Ένα	Ένα	Ένα	Ένα	Ένα	Πολλά	Πολλά	Πολλά
<u>Ισοδύναμα φάσματα</u> εκπομπής και διέγερσης με τα δείγματα	—	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι	Ναι	Όχι	Ναι	Ναι
Επίδραση περιβάλλοντος	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι	Ναι	Όχι	Ναι	Ναι
<u>Ικανότητα δέσμευσης</u> <u>αντισώματος</u>	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι	Όχι	Όχι	Ναι

Σημείωση: 1: ισοδύναμο, 2: μικρότερο, 3: πολύ ασθενής, 4: πολύ έντονη, 5: έντονη, 6: ασθενής προς έντονη

Σφαιρίδια οπτικής ευθυγράμμισης Τύπου Ι



Σφαιρίδια βαθμονόμησης Τύπου III



Καλές πηγές πληροφόρησης

- <http://www.youtube.com/watch?v=nAfL4FXju1s>
- <http://www.abdserotec.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf>
- http://www.bdbiosciences.com/immunocytometry_systems/support/training/online/ITF/
- <http://www.scq.ubc.ca/flow-cytometry-a-technology-to-count-and-sort-cells/>
- http://www.unsolvedmysteries.oregonstate.edu/flow_04
- http://www.unsolvedmysteries.oregonstate.edu/flow_06
- Wikipedia.org

Βιβλιογραφία

- Ruud Hulspas et al., Considerations for the Control of Background Fluorescence in Clinical Flow Cytometry. Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 76B:355-364 (2009)
- Holden T. Maecker et al., Selecting Fluorochrome Conjugates for Maximum Sensitivity. Cytometry Part A 62A:169-173 (2004)
- Zsolt Sebestyen et al., Long Wavelength Fluorophores and Cell-by-Cell Correction for Autofluorescence Significantly Improves the Accuracy of Flow Cytometric Energy Transfer Measurements on a Dual-Laser Benchtop Flow Cytometer. Cytometry 48:124-135 (2002)
- Mario Roederer et al., Cell-by-Cell Autofluorescence Correction for Low Signal-to- Noise Systems: Application to Epidermal Growth factor Endocytosis by 3T3 Fibroblasts. Cytometry 7:558-565 (1986)
- Autofluorescence: Causes and Cures, Wright Cell Imaging Facility, Toronto Western Research Institute, www.uhnresearch.ca/wcif