

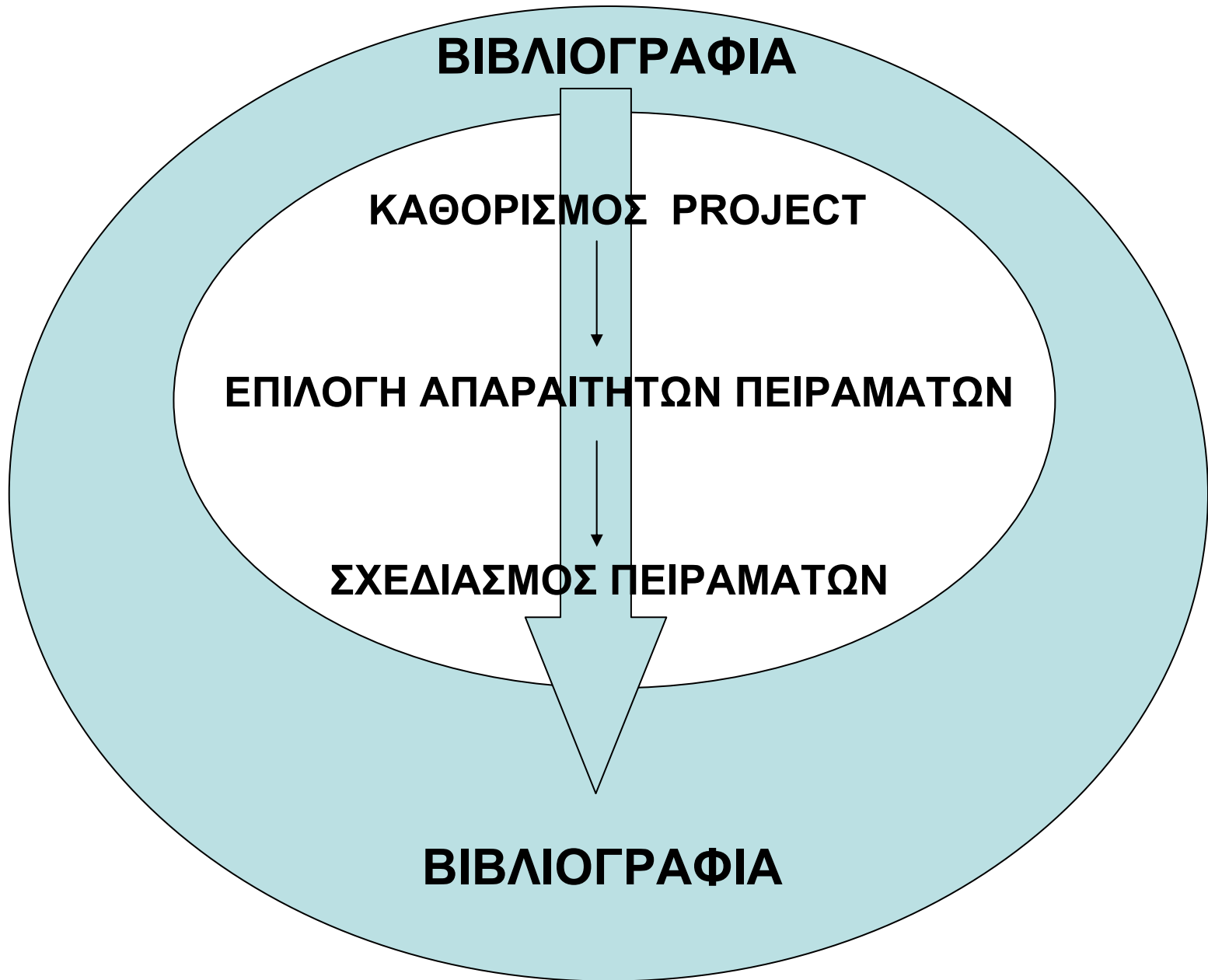


"ALEXANDER FLEMING"
Biomedical Sciences Research Center

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΝΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ I

FLOW CYTOMETRY UNIT
Operational Scientist:
Dr. Sofia Grammenoudi
grammenoudi@fleming.gr

Scientist in Charge: **Dr. D.L. Kontoyiannis**



ΒΑΣΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΗΝ ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΙ ΤΟΝ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

- ΔΙΑΘΕΣΙΜΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ
- ΧΡΗΣΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΗΔΗ ΔΙΑΘΕΤΩ
- ΕΠΙΛΟΓΗ/ΑΓΟΡΑ ΚΑΙΝΟΥΡΙΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΜΠΟΡΟΥΝ ΝΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΟΥΝ

ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΗΔΗ ΔΙΑΘΕΤΩ
ΣΕ ΠΑΡΑΠΑΝΩ ΑΠΟ ΕΝΑ ΠΕΙΡΑΜΑ

- ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΚΟΣΤΟΥΣ
- ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ/ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ



ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ - ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

- Ποιότητα δείγματος: μονοκύτταρο εναιώρημα υψηλής βιωσιμότητας
- Η κατάσταση του δείγματος εξαρτάται από τον στόχο/τύπο της ανάλυσης

Φαινοτυπική ανάλυση/ποσοτικοποίηση κυτταρικών τύπων

ή

Λειτουργική ανάλυση



ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ - ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

- Φαινοτυπική ανάλυση/ποσοτικοποίηση κυτταρικών τύπων
 - κύτταρα σε κατάσταση ηρεμίας
- Λειτουργική ανάλυση
 - κύτταρα σε κατάσταση **ενεργοποίησης** π.χ.
 - διέγερση T λεμφοκυττάρων με anti-CD3 και χρώση Fluo-3/Fura Red για μέτρηση επιπέδων ασβεστίου
 - ενεργοποίηση T λεμφοκυττάρων με ConA (2-3d) και επαναδιέγερση με anti-CD3/anti-CD28 (5hr) για μέτρηση IFN- γ



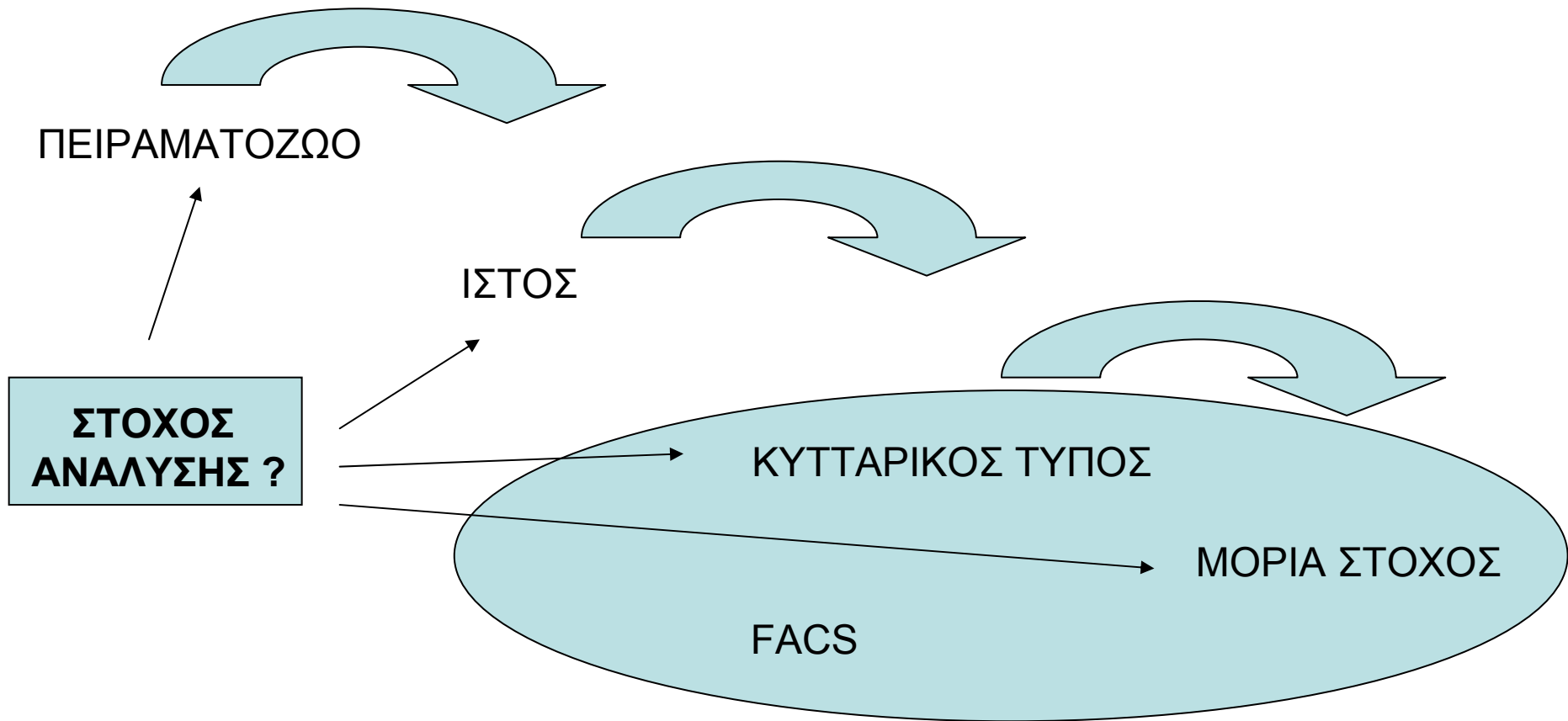
ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ - ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

• Λειτουργική ανάλυση

- κύτταρα σε κατάσταση **πολλαπλασιασμού** π.χ.
 - συν-καλλιέργεια T λεμφοκυττάρων με δενδριτικά κύτταρα και ανάλυση με χρώση CFSE
- κύτταρα σε κατάσταση **απόπτωσης** π.χ.
 - διέγερση T λεμφοκυττάρων με anti-CD3/CD28 και χρώση Annexin/PI



ΣΤΟΧΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

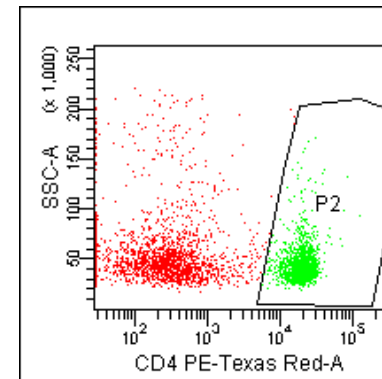
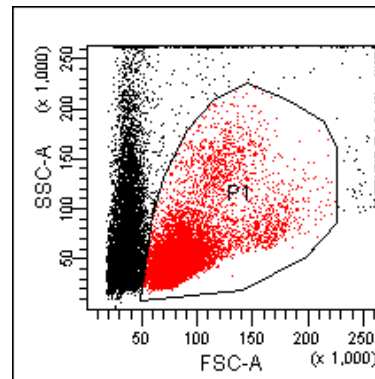


ΣΤΟΧΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ - ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ

- Η Κυτταρομετρία Ροής βασίζεται στην καταχώρηση κάθε κύτταρου που αναλύεται σε μια **ομάδα κυττάρων με παρόμοια χαρακτηριστικά**.
- Η καταχώρηση αυτή διευκολύνεται όταν οι ομάδες κυττάρων σε ένα δείγμα που αναλύεται είναι απομονωμένες η μία από την άλλη και αποτελούν **διακριτούς πληθυσμούς**.
- Το αντίσωμα ή το πάνελ αντισωμάτων κάθε ανάλυσης θα πρέπει να επιλέγεται με σκοπό να παρέχει το πιο ακριβή και σαφή ορισμό του πληθυσμού / υποπληθυσμού στόχου.

ΣΤΟΧΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ

CD4 T CELLS

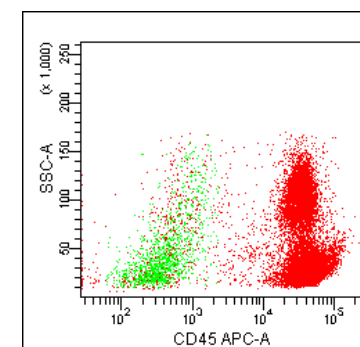
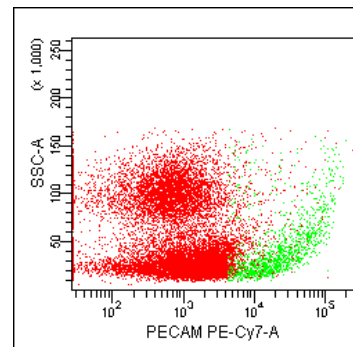
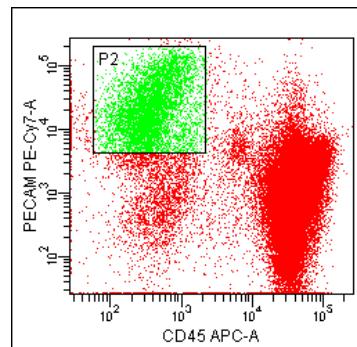
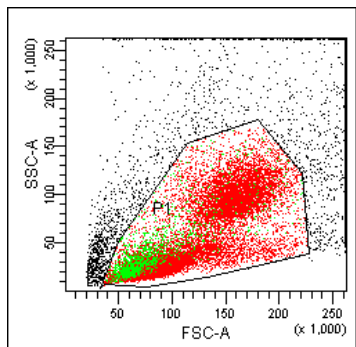


ΣΤΟΧΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ - ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ

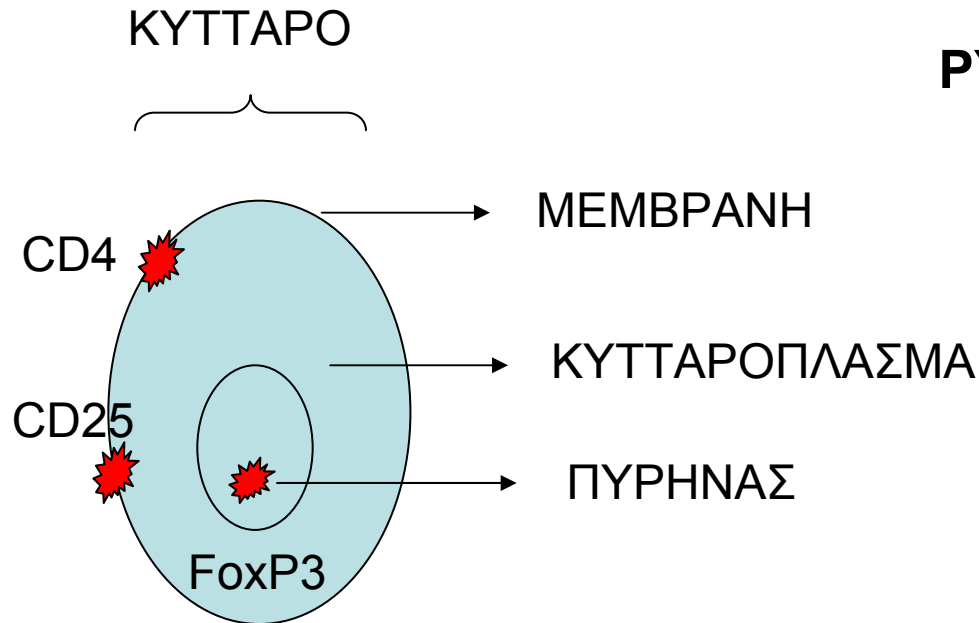
ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ PECAM +ve/CD45 -ve

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ/ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

- ΠΕΡΙΠΛΟΚΟΣ ΙΣΤΟΣ/ΙΔΙΑΙΤΕΡΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΟΣ
- ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΘΕΤΙΚΗ ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΟΣ
- ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟ ΑΛΛΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΤΥΠΩΝ ΤΟΥ ΙΣΤΟΥ



ΣΤΟΧΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ - ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ



ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ CD4+/CD25+/FoxP3+

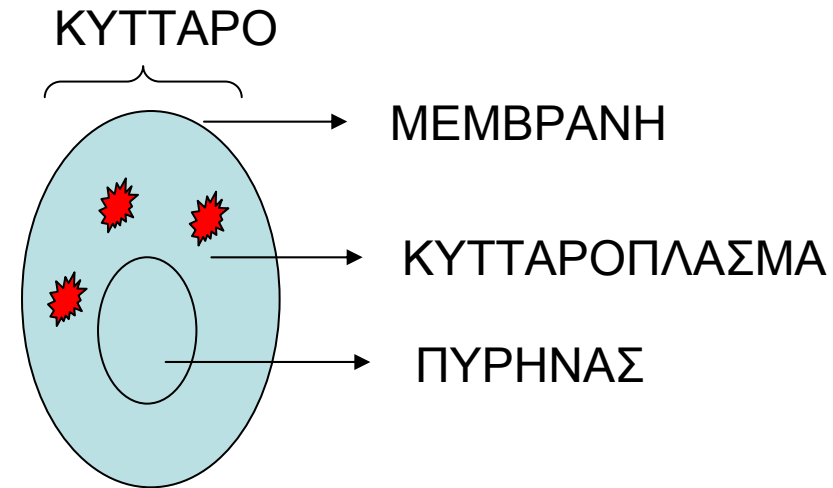
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ/ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

- ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΧΡΩΣΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΚΑΙ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΧΡΩΣΗΣ
- ΠΡΩΤΟΚΟΛΟ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ
- ΠΡΩΤΟΚΟΛΟ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ (το FoxP3 είναι πυρηνικό αντιγόνο)
- ΕΠΙΛΟΓΗ ΦΘΟΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΣ



ΣΤΟΧΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ – ΜΟΡΙΑ ΣΤΟΧΟΙ

ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ



ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ/ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

- ΕΠΙΛΟΓΗ ΠΑΝΕΛ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΣΑΦΗ ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΟΣ
- ΕΚΦΡΑΣΗ ΣΕ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ – ΠΡΩΤΟΚΟΛΟ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ
- ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ – ΠΡΩΤΟΚΟΛΟ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ
- ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ – ΠΡΩΤΟΚΟΛΟ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ ΕΚΚΡΙΣΗΣ

Monensin και Brefeldin A είναι **αναστολείς της μεταφοράς πρωτεϊνών** που παρεμποδίζουν την έκκριση πρωτεϊνών από τα κύτταρα μέσω του συστήματος Golgi, προκαλώντας έτσι **συσσώρευση των κυτοκίνων** στο ενδοπλασματικό δίκτυο ή το Golgi

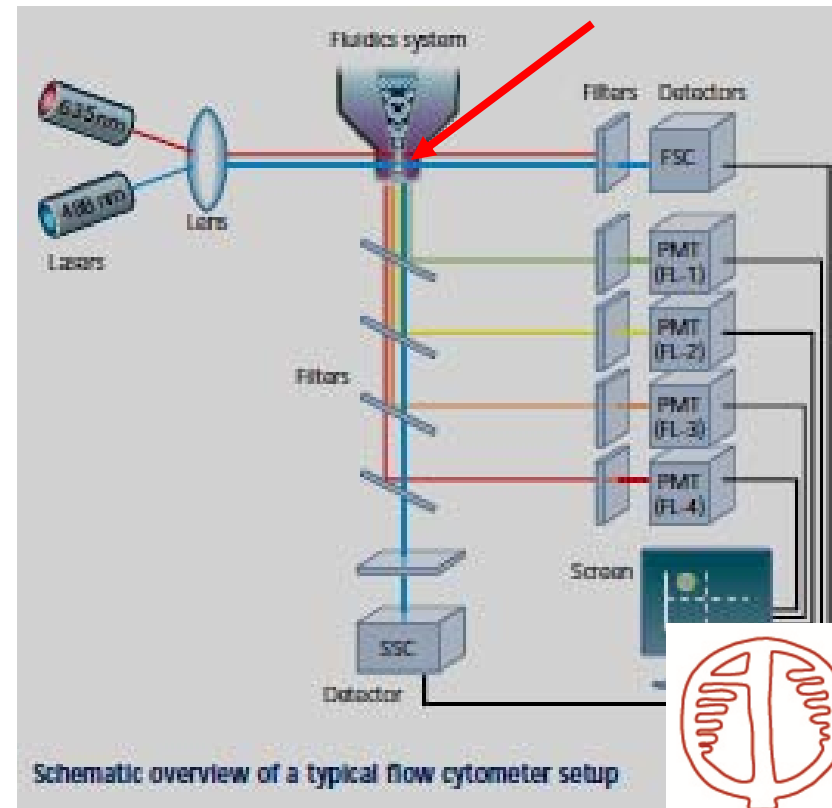
ΟΠΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ – ΣΚΕΔΑΣΗ

Η σκέδαση συμβαίνει όταν ένα κύτταρο εκτρέπει την δέσμη φωτός του laser.

Ο βαθμός στον οποίο συμβαίνει αυτό εξαρτάται από τις φυσικές ιδιότητες του κυττάρου, δηλαδή το **μέγεθος** και την **εσωτερική πολυπλοκότητα**.

Παράγοντες που επηρεάζουν την σκέδαση του φωτός είναι:

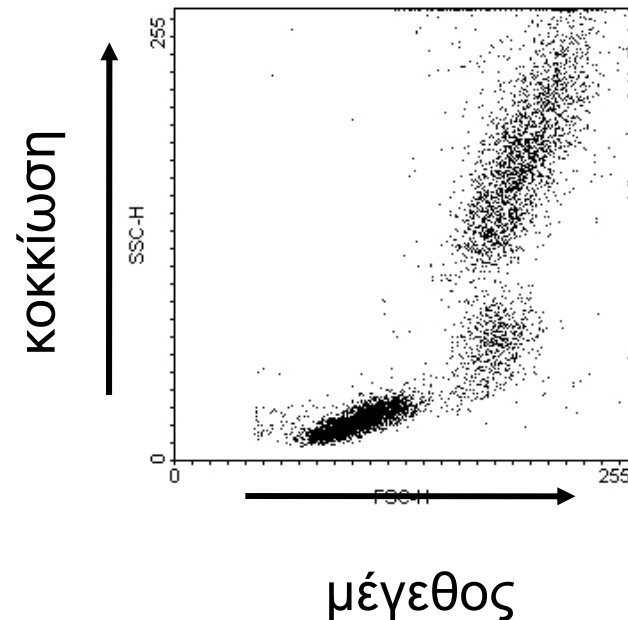
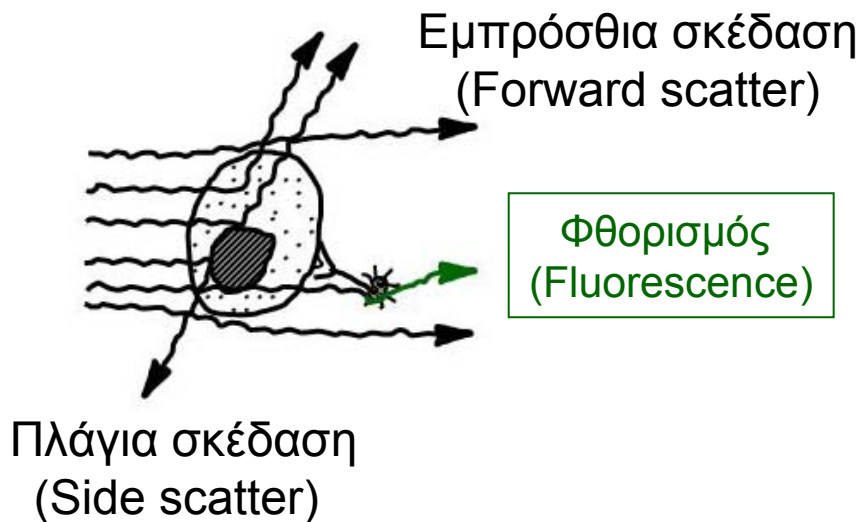
- η μεμβράνη
- ο πυρήνας και κάθε κοκκώδες υλικό στο εσωτερικό του κυττάρου
- το σχήμα του κυττάρου και
- η τοπογραφία επιφάνειας



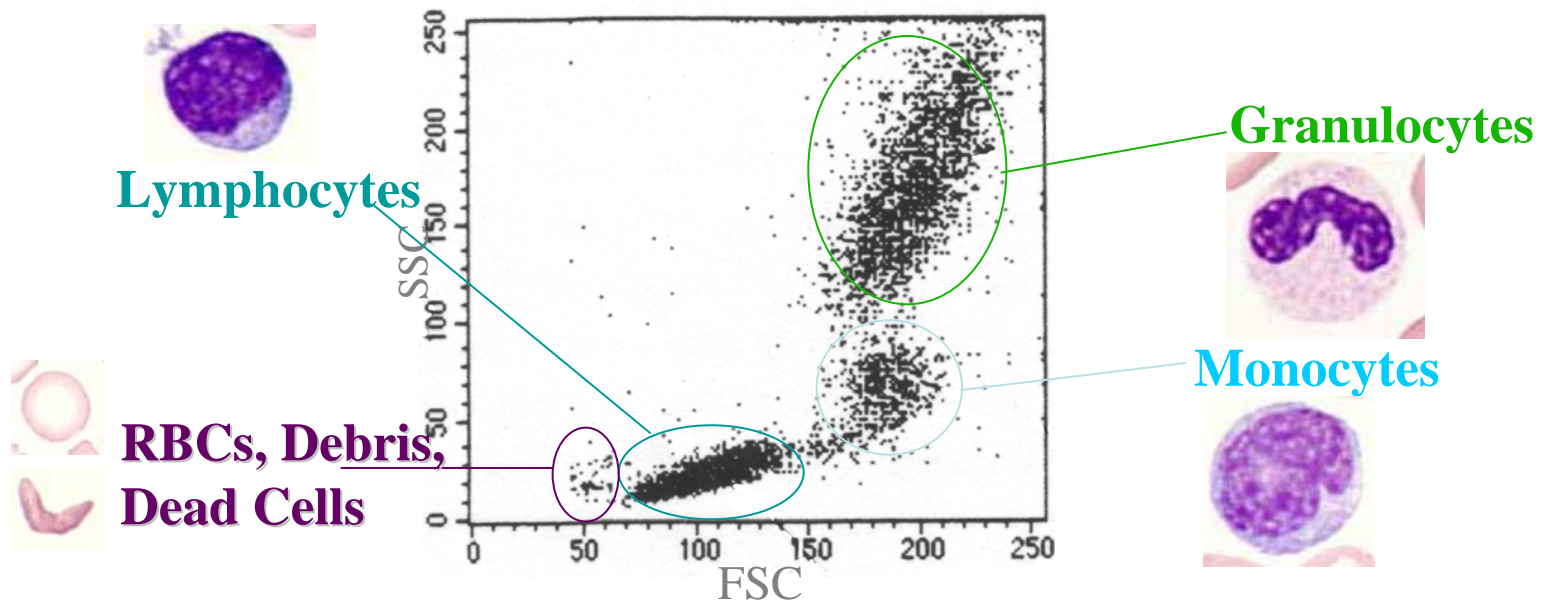
ΟΠΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ – ΣΚΕΔΑΣΗ

Η σκέδαση γίνεται σε δύο κατευθύνσεις:

- **Εμπρόσθια** (Forward Scatter; FS) και σχετίζεται με τον όγκο/**μέγεθος** του κυττάρου
- **Πλάγια** (Side Scatter; SS) και σχετίζεται με την εσωτερική πολυπλοκότητα/**κοκκίωση** του κυττάρου



Εφαρμογές: Κατηγοριοποίηση των κυτταρικών τύπων ενός ετερογενούς δείγματος π.χ. αίμα

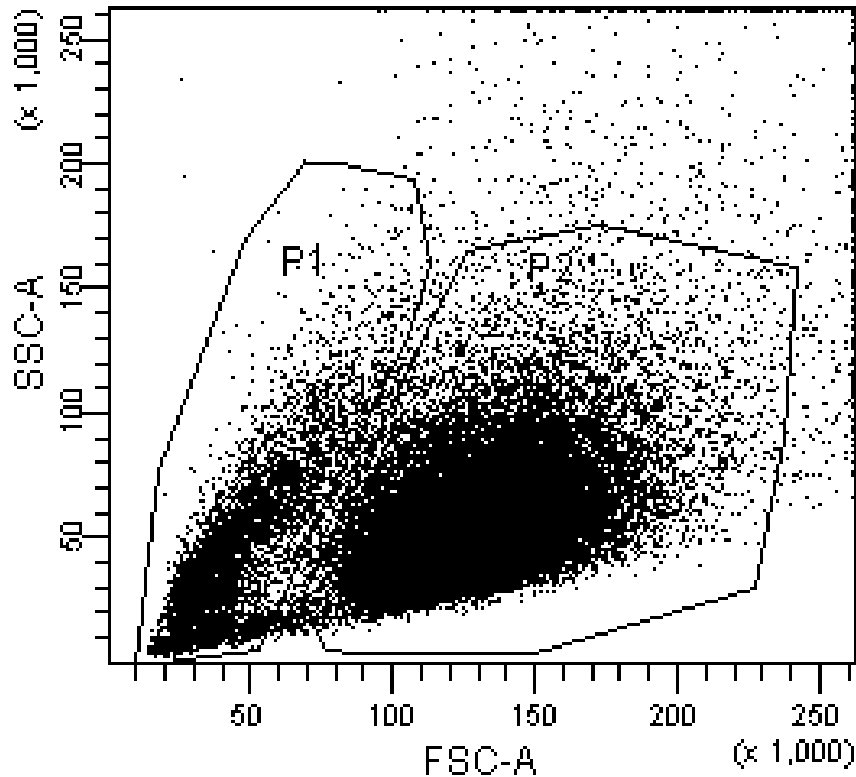


Συγκρίνοντας τους κυτταρικούς τύπους του αίματος

- Κοκκιοκύτταρα: μεγάλα κύτταρα με αυξημένη κοκκίωση
υψηλός εμπρόσθιος και πλάγιος σκεδασμός
- Μονοκύτταρα: μεγάλα κύτταρα με μέτρια κοκκίωση
υψηλός εμπρόσθιος και χαμηλότερος πλάγιος σκεδασμός
- Λεμφοκύτταρα: μικρά κύτταρα χωρίς κοκκίωση
χαμηλός εμπρόσθιος και πλάγιος σκεδασμός



Εφαρμογές: Διαχωρισμός νεκρών/ζωντανών κυττάρων



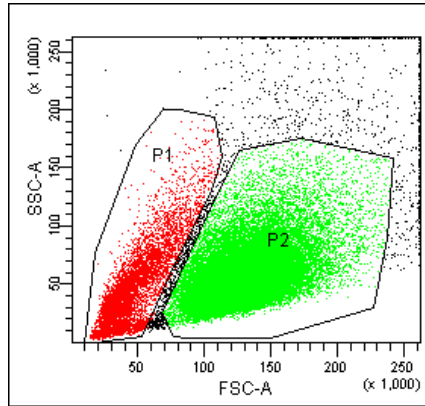
Τα νεκρά κύτταρα έχουν συνήθως μικρότερο εμπρόσθιο σκεδασμό από τα ζωντανά και παρόμοιο ή υψηλότερο πλάγιο σκεδασμό

Η χρήση του εμπρόσθιου και πλάγιου σκεδασμού από μόνη της δεν μπορεί να διαχωρίσει πλήρως τα νεκρά από τα ζωντανά κύτταρα, μπορεί μόνο να εμπλουτίσει τον πληθυσμό των ζώντανων κυττάρων

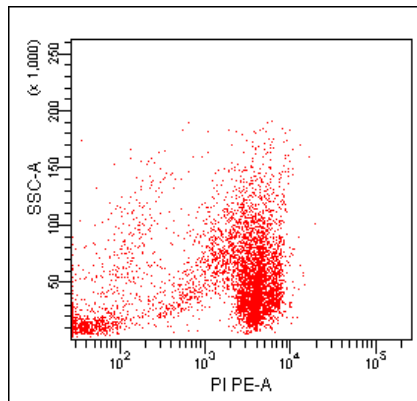
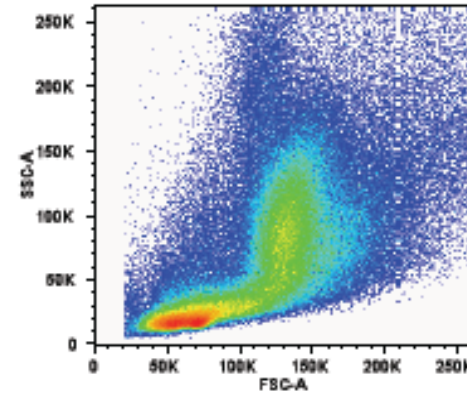


Εφαρμογές: Διαχωρισμός νεκρών/ζωντανών κυττάρων

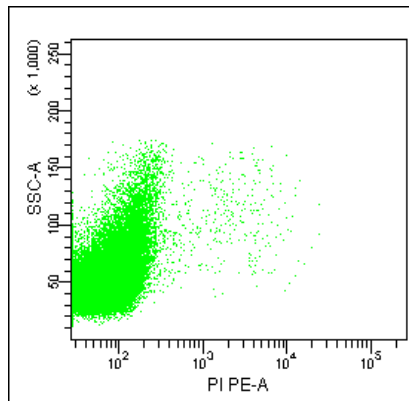
Κυτταρική σειρά



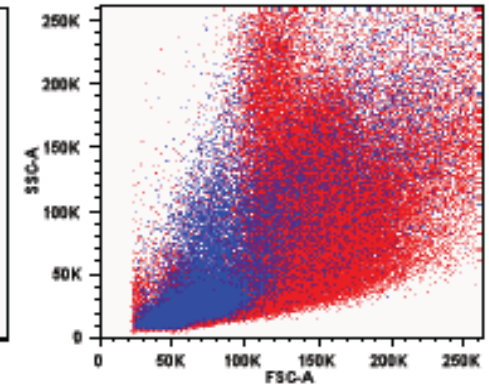
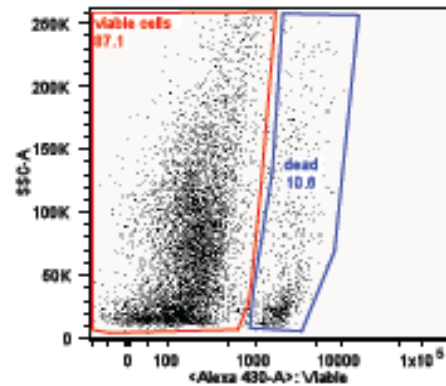
Δείγμα Ιστού (Bone Marrow)



Dead cells



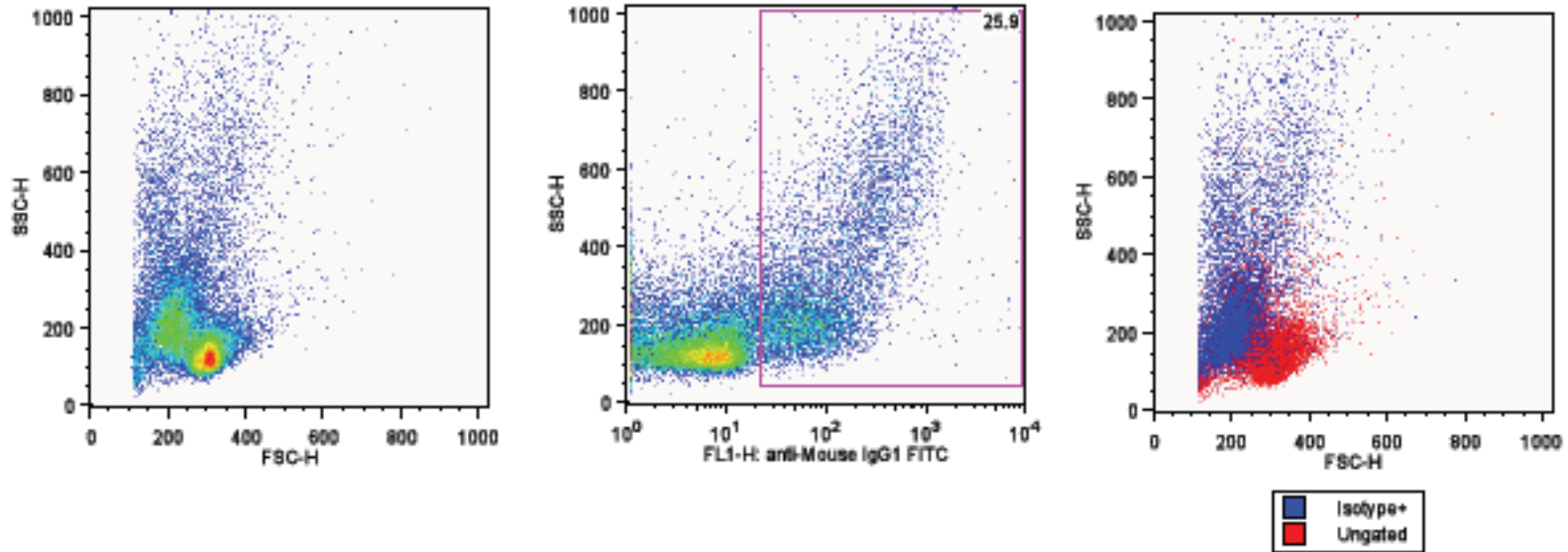
Viable cells



Legend:
■ dead
■ viable c



Γιατί και πότε είναι απαραίτητη η χρήση χρώσης διαχωρισμού νεκρών/ζωντανών



- Η μη-ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων στα νεκρά κύτταρα οδηγεί στην ανίχνευση ψευδώς θετικών (false positive) κυττάρων
- Ιδανικά, η χρήση χρώσης διαχωρισμού νεκρών/ζωντανών θα πρέπει να εφαρμόζεται σε κάθε πείραμα
- Απαραίτητα στην ποσοτικοποίηση σπάνιων πλυθησμών



ΧΡΩΣΕΙΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΖΩΝΤΑΝΩΝ/ΝΕΚΡΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Κοινές χρωστικές (non fixable)

- Εισχωρούν σε νεκρά κύτταρα με διαπερατές μεμβράνες και προσδένονται σε νουκλεϊκά οξέα.
- Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε μη μονιμοποιημένα δείγματα ακριβώς πριν την λήψη δεδομένων
- Το δείγμα δεν πρέπει να εκτίθεται σε αυτές για μεγάλο χρονικό διάστημα γιατί τελικά θα εισέλθουν και στα ζωντανά κύτταρα

Dye	Working Concentration	Flow Cytometric Detection
DAPI	>200 ng/ml	440 nm channel from UV laser or Violet diode
PI	5 mg/ml	575 nm, 610 nm or 670 nm channels from Argon laser.
7-AAD	2.5 mg/ml	670 nm channel from Argon laser.
ToPro-3	50 nM	660 nm channel from Red HeNe (633 nm line)

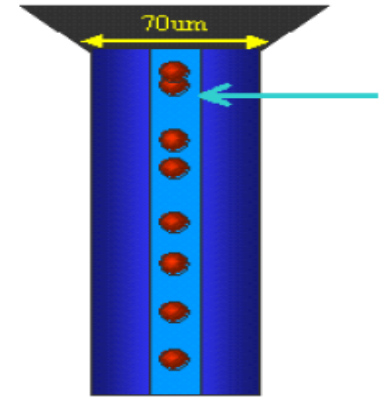
ΧΡΩΣΕΙΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΖΩΝΤΑΝΩΝ/ΝΕΚΡΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

	Excitation (nm)	Emission Max (nm)
Live/Dead Fixable Dead Cell Stains (Invitrogen)		
Blue	350	450
Violet	405	451
Aqua	405	526
Green	488	520
Yellow	405	575
Red	488	615
Far Red	633	655
Near Infra Red	633	750
Fixable Viability Dye (eBioscience)		
eFluor450	405	450
eFluor660	633	660
eFluor780	633	780
BD Horizon VD450 (BD)		
BD Horizon VD450	405	450

Εαν η μονιμοποίηση του δείγματος είναι απαραίτητη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές χρωστικές οι οποίες προστίθενται στα δείγματα πριν την μονιμοποίηση και διατηρούνται μέσα στα κύτταρα και μετά από αυτή.



Εφαρμογές: Doublet discrimination



Η πιθανότητα δημιουργίας κυτταρικών συστάδων από δύο ή και περισσότερα κύτταρα (cell doublets/clusters) αυξάνεται όταν αναλύουμε:

- εναιωρήματα που περιέχουν συσσωματώματα κυττάρων
- εναιωρήματα που περιέχουν μεγάλο αριθμό νεκρών κυττάρων
- σε υψηλές ταχύτητες (high event rate)
- με υψηλή πίεση (high pressure differential)

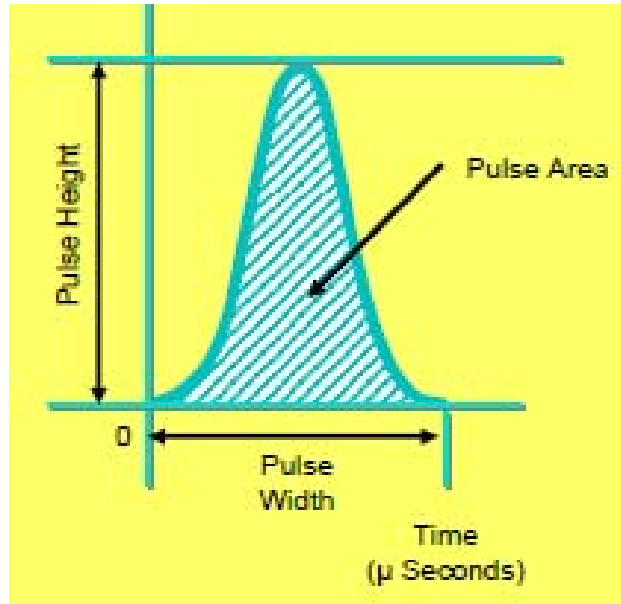
Για να ελαχιστοποιηθεί η δημιουργία κυτταρικών συστάδων χρειάζεται:

- σωστή προετοιμασία δείγματος
- κατάλληλο φιλτράρισμα των εναιωρημάτων
- **χρήση διαγράμματος “doublet discrimination”**



DOUBLET DISCRIMINATION PLOTS

Διαγράμματα που συνδυάζουν



FSC-A vs. FSC-H

FSC-H vs. FSC-W

FSC-A vs FSC-W

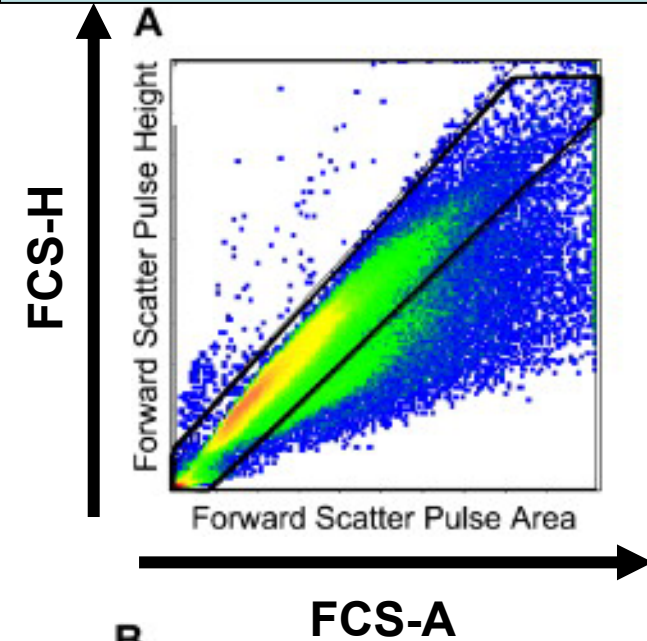
SSC-A vs. SSC-H

SSC-A vs. SSC-W

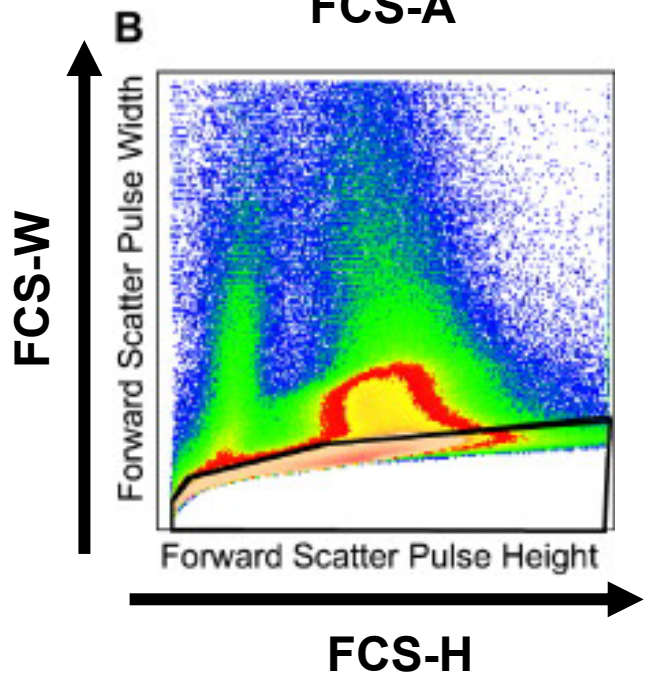
Για σωματίδια στην κλίμακα μεγέθους και σχήματος των αιμοποιητικών κυττάρων, υπάρχει γενικά μια **γραμμική σχέση** μεταξύ του ύψους (H-Height), του πλάτους (W-Width) και της περιοχής (A-Area) του παλμού της εμπρόσθιας ή/και της πλάγιας σκέδασης.



DOUBLET DISCRIMINATION PLOTS



- Τα μονά κύτταρα βρίσκονται στην διαγώνιο
- Σε ένα διπλό κύτταρο η μέτρηση του **ύψους (H)** του παλμού είναι **πολύ μικρή** σε αντιστοιχία με την **περιοχή (A)** του παλμού



- Τα μονά κύτταρα βρίσκονται στην διαγώνιο
- Σε ένα διπλό κύτταρο η μέτρηση του **πλάτους (W)** του παλμού είναι **πολύ μεγάλη** σε αντιστοιχία με το **ύψος (H)** του παλμού



Εφαρμογές: Ανάλυση μικρών σωματιδίων

- βακτήρια (1-5 μm)
- αιμοπετάλια (2-3 μm)
- υδρόβιοι μικροοργανισμοί (0,02-200 μm)
- μαγιά (1 μm)
- χρωμοσώματα (flow karyotypes)
- Microbeads ($\geq 5 \mu\text{m}$) (carriers for biological relevant material e.g. peptides and cDNA)

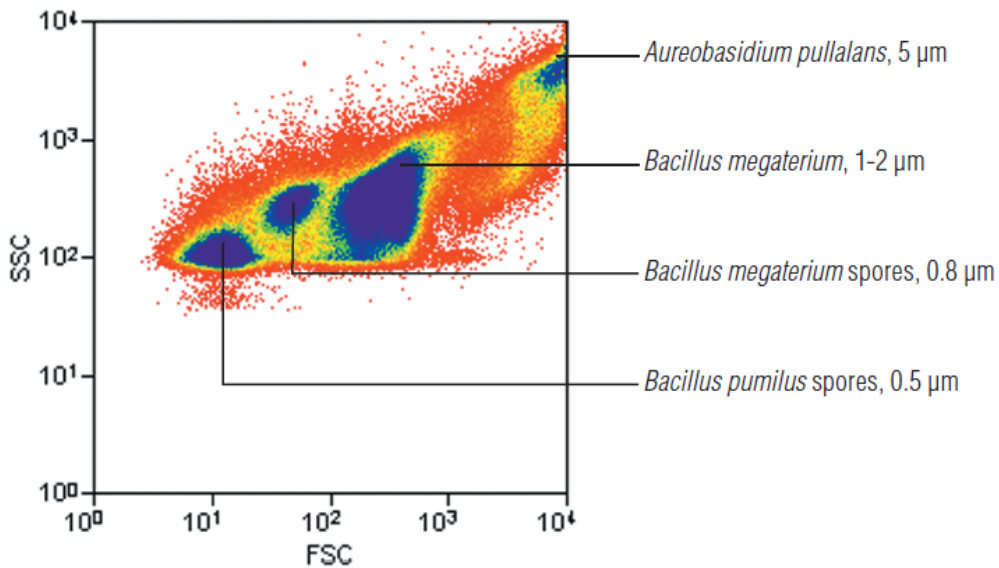


Figure 1. This histogram demonstrates resolution of multiple small species by forward and side scatter.



Βιβλιογραφία

- **Practical Flow Cytometry**, Howard Maurice Shapiro - Wiley-Liss (2003)
ISBN 0471411256
- **Flow Cytometry, 3rd edition**, Michael G. Ormerod, Oxford Uni Press (2000)
ISBN 0199638241
- Donnenberg A.D and Donnenberg V.S. Rare-Event Analysis in Flow Cytometry. 2007. Clinics in Laboratory Medicine: 27:3, p627-652