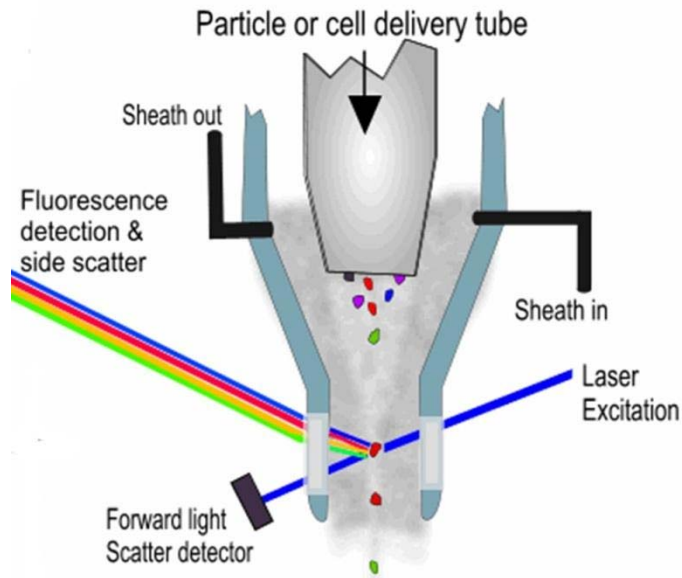


## Az áramlási citometria elve

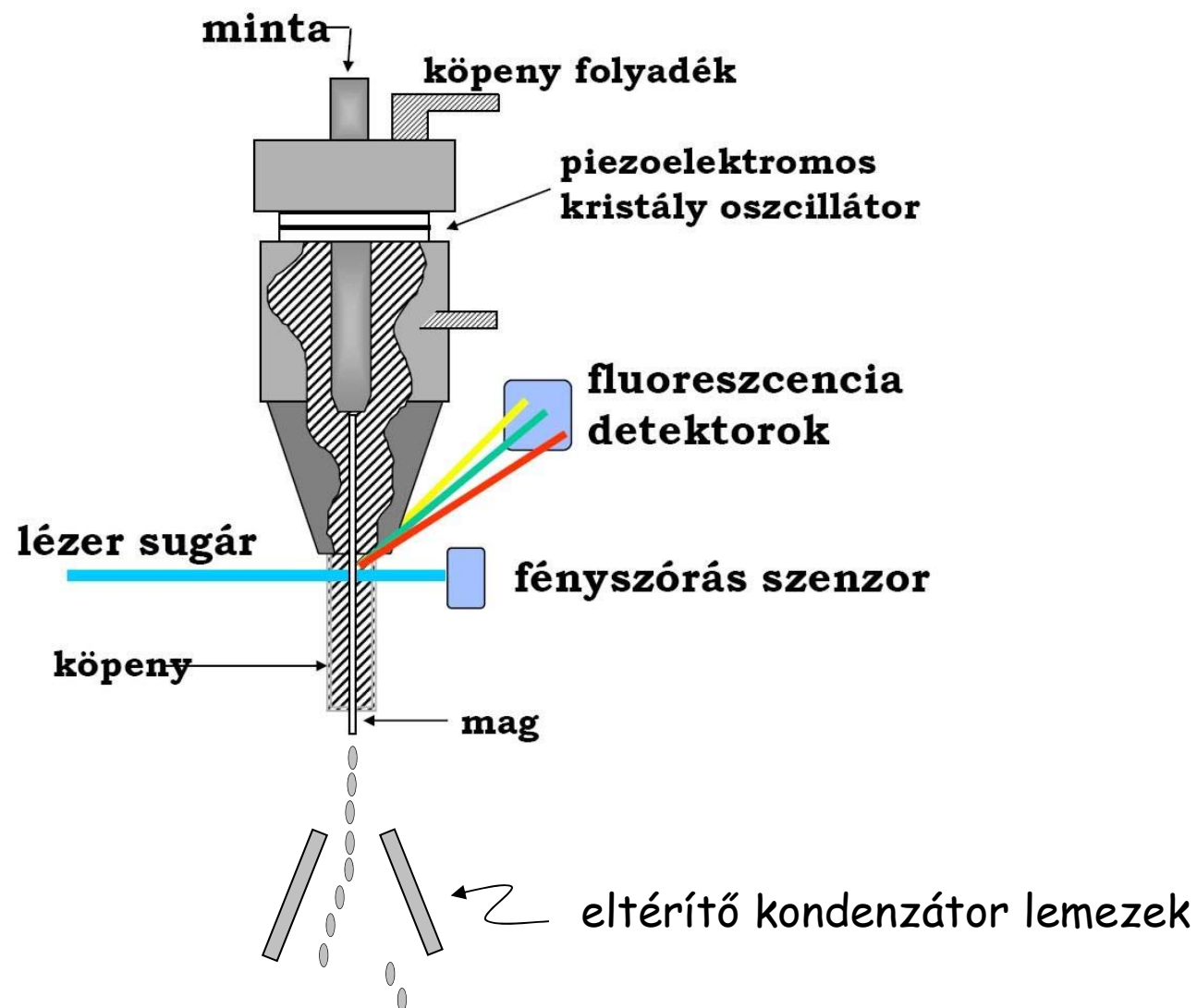


Olyan műszer, amely

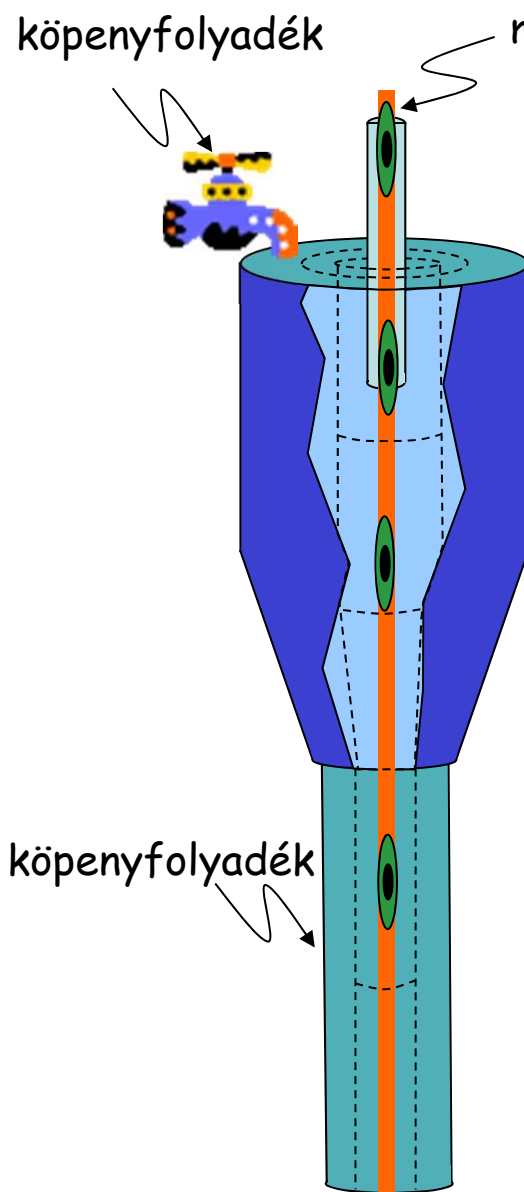
- szuszpendált
- egyedi sejtek
- fluoreszcens és fényszórási paramétereit méri
- nagy sebességgel (akár több ezer sejt/sec)

|                     | Áramlási citometria                        | Fluoreszcens mikroszkópia          | Fluorimetria               |
|---------------------|--------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| Sejtek típusa       | szuszpendált                               | szuszpendált és kitapadt           | szuszpendált (v. kitapadt) |
| Sejtszintű feloldás | egyedi sejtek (nincs szubcelluláris info.) | egyedi sejtek szubcelluláris info. | populáció                  |
| Mért paraméter      | fluoreszcens és fényszórás                 | elsősorban fluoreszcens            | elsősorban fluoreszcens    |
| Sebesség            | több ezer sejt/sec                         | néhány sejt/perc                   | -                          |
| Manipuláció         | szortírozás                                | egyedi sejtek manipulációja        | -                          |

## Az áramlási citometria működési elve



## Áramlási rendszer



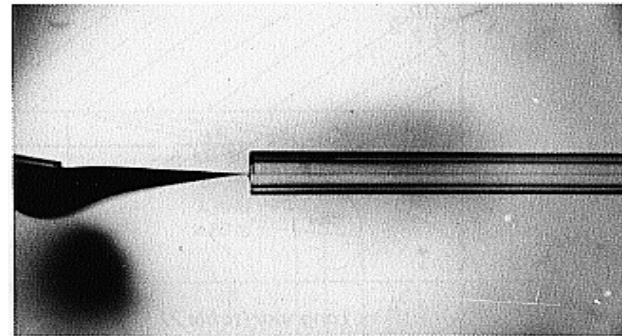
A köpeny folyadék koncentrikus körökben veszi körül a mintafolyadékot (lamináris áramlás).

Ezáltal a mintafolyadékot az áramlási fej közepére fókuszálja (hidrodinamikai fókuszálás).

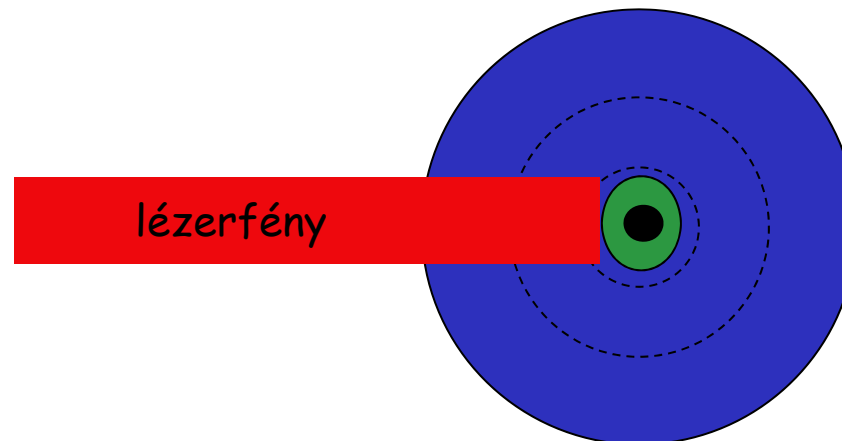
A hidrodinamikai fókuszálás célja:

a sejtek ott haladjanak, ahol a lézer megvilágítja őket.

Tintasugár  
hidrodinamikai  
fókuszálása

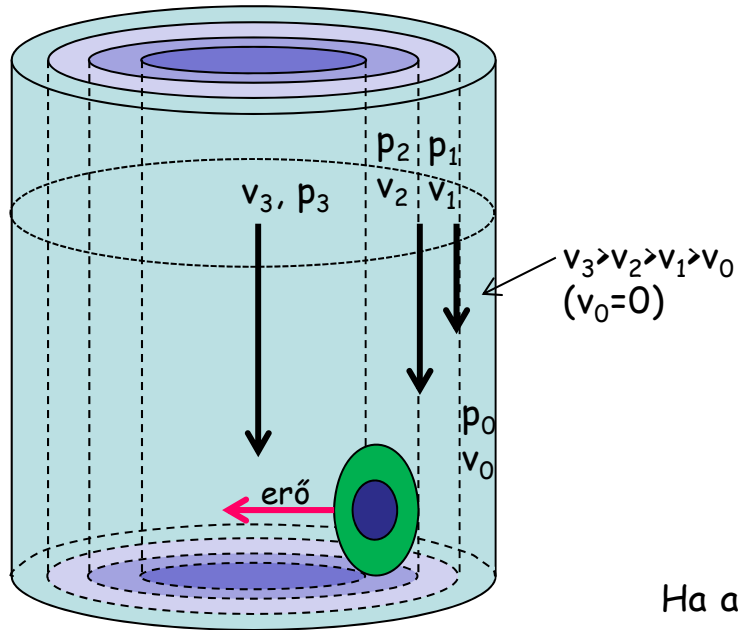


lézerfény



Az áramlási cella  
felülnézete

# Hidrodinamikai fókuszálás



**Lamináris áramlás:** koncentrikus folyadék rétegek, melyek egyre nagyobb sebességgel mozognak az áramlás közepe felé.

Bernoulli egyenlet:

$$p + \frac{1}{2}\rho v^2 + \rho gh = \text{állandó}$$

Ha egy adott magasságban ( $h$ ) vizsgáljuk:

$$p + \frac{1}{2}\rho v^2 = \text{állandó}$$



Ha a sebesség ( $v$ ) nő, a nyomásnak ( $p$ ) csökkennie kell.

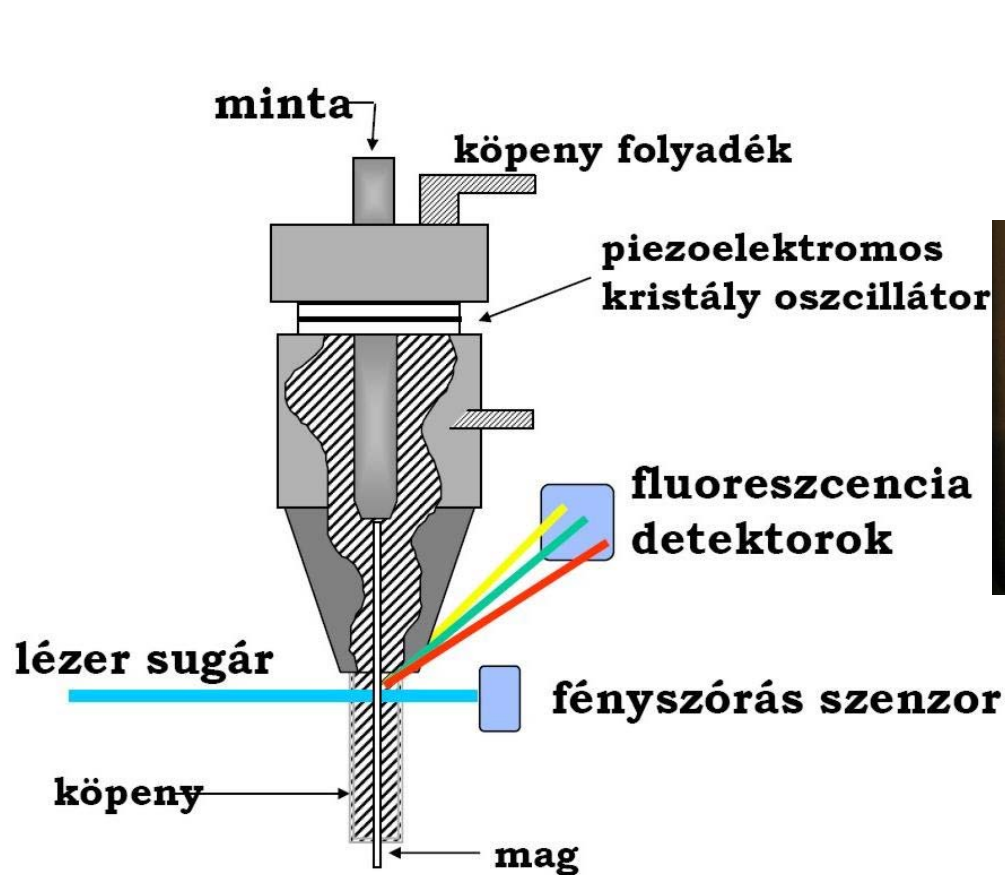


$$p_0 > p_1 > p_2 > p_3$$

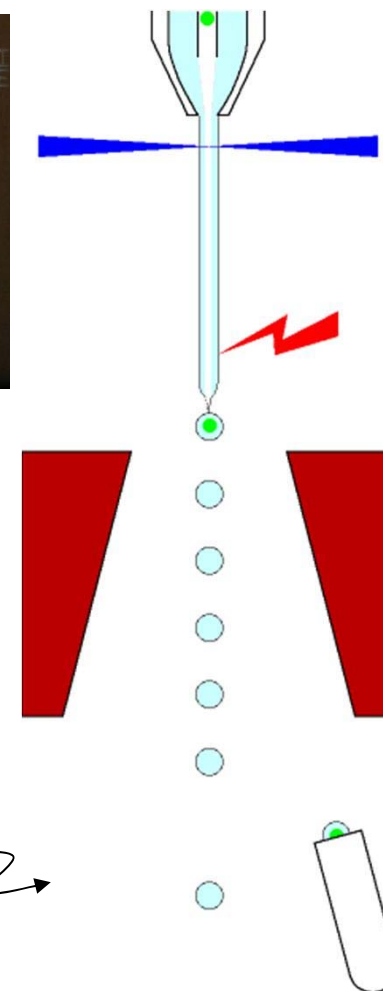
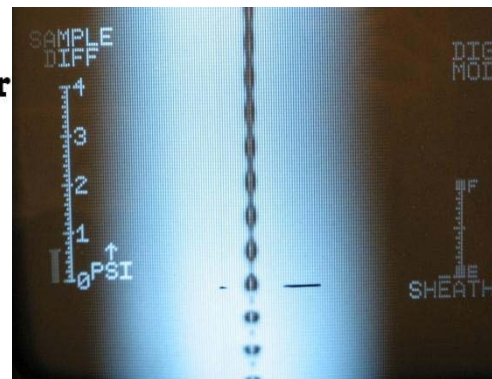


Egy sejt a rá ható nyomásgradiens miatt az áramlás közepe felé kényszerül mozogni.

# Sejtszeparálás



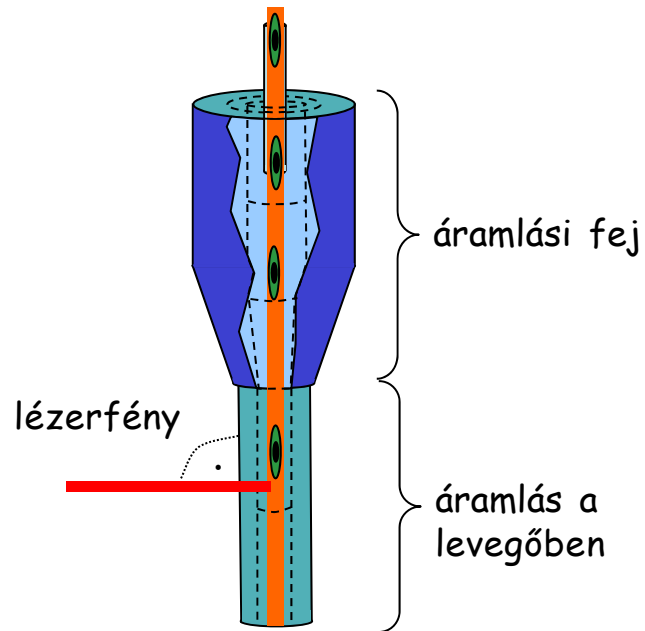
A piezoelektromos kristály rezgése cseppekre bontja a folyadékoszlopot.



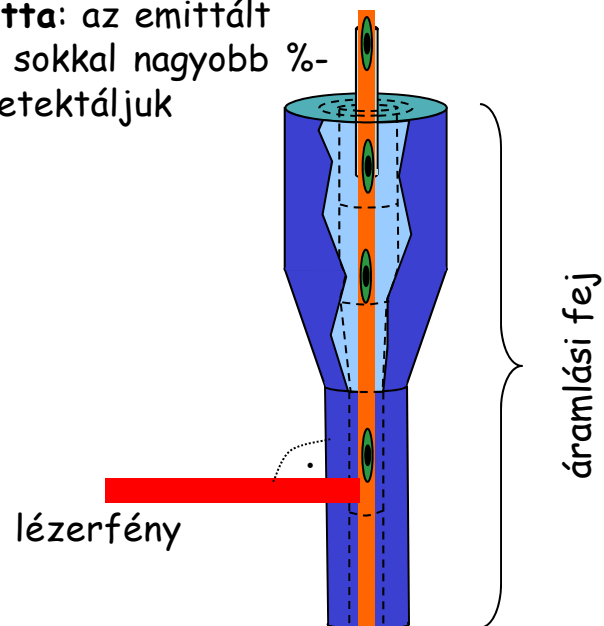
A cseppeket a mért fényszórás és fluoreszcens jelek alapján töltik fel pozitív vagy negatív töltéssel.

eltérítő kondenzátor lemezek: állandó feszültség van rajtuk.

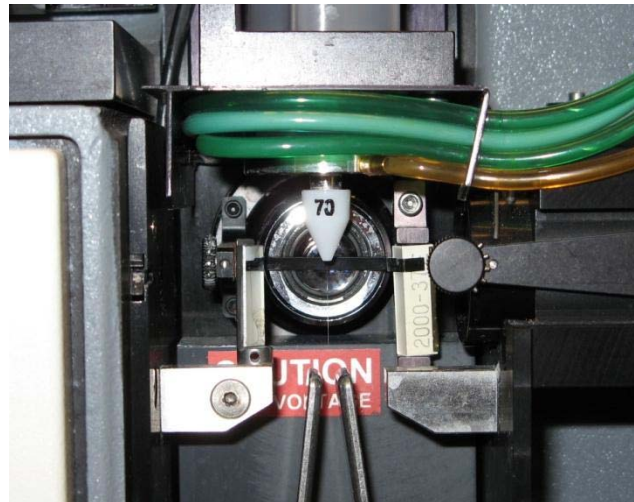
jet-in-air (áramlás a levegőben):



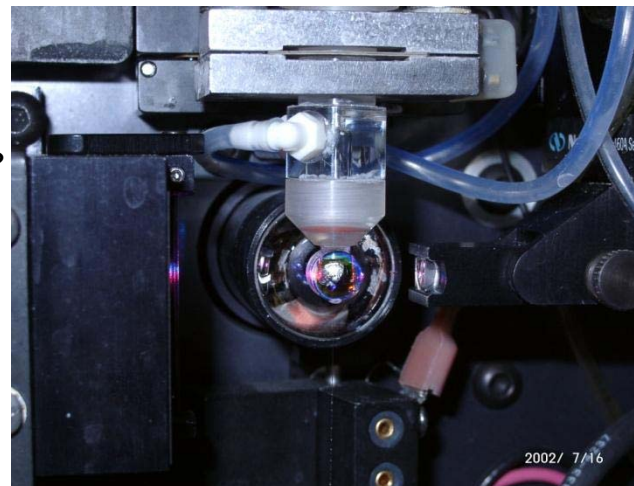
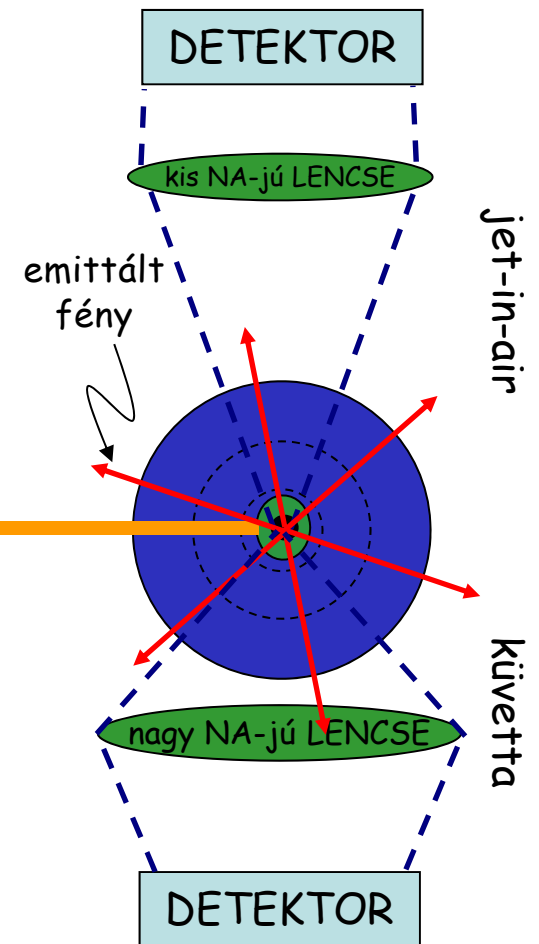
**küvetta:** az emittált fény sokkal nagyobb %-át detektáljuk



## Megvilágítás



Az áramlási cella felülnézete

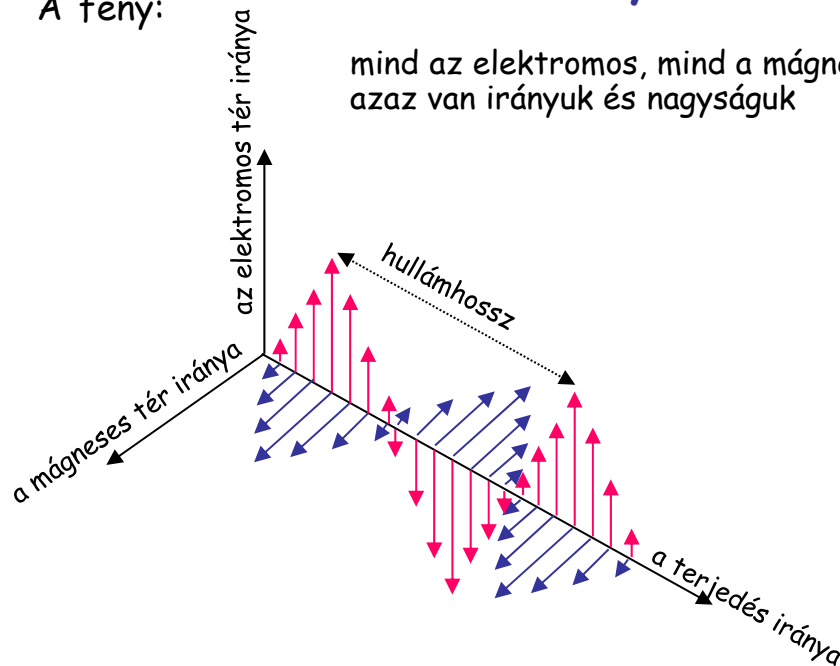




# A fény és a fluoreszcencia tulajdonságai

A fény:

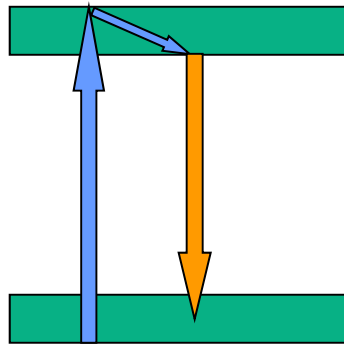
mind az elektromos, mind a mágneses tér vektor,  
azaz van irányuk és nagyságuk



Fluoreszcencia:

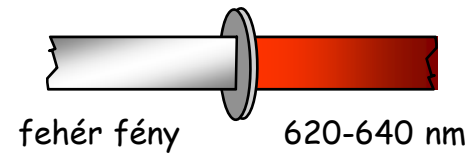
gerjesztett állapot

alapállapot

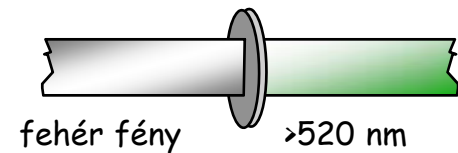


- A gerjesztést követően a molekula visszajut az első gerjesztett szint legalsó (ún. vibrációs) alszintjére. Minden további folyamat ebből a helyzetből indul.
- A fluoreszcencia hosszabb hullámhosszú, mint a gerjesztő fény.

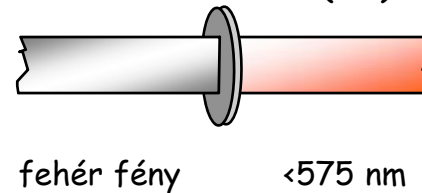
630 nm-es sávszűrő:



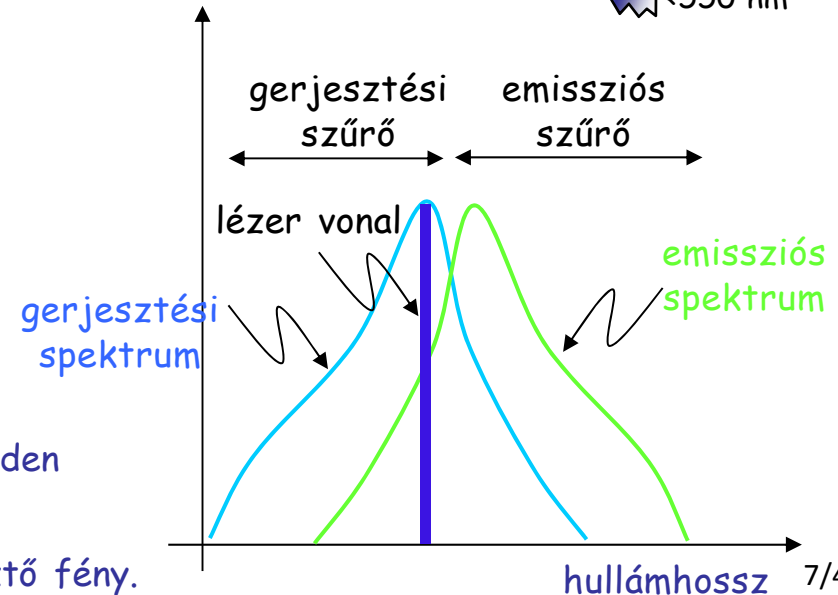
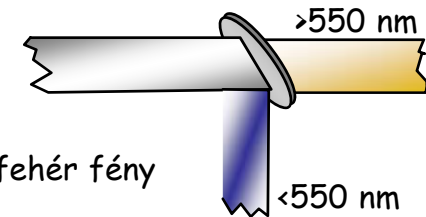
520 nm-es felüáteresztő (LP):



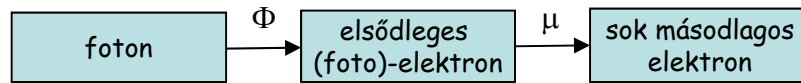
575 nm-es aluláteresztő (SP):



550 nm-es dikroikus tükrő:



# Detektorok

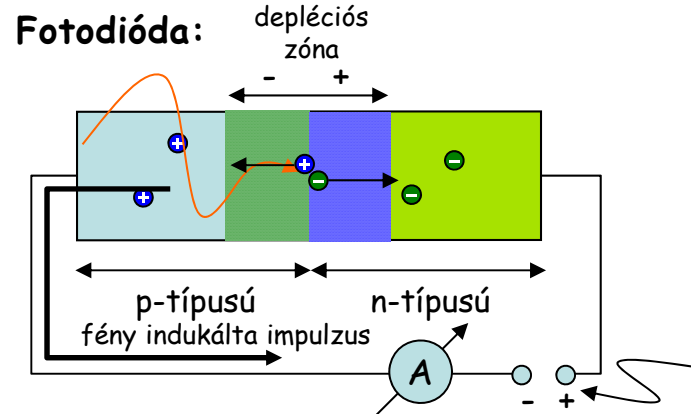


- kvantumhatásfok ( $\Phi$ ):  $\Phi = \frac{\text{elektronok száma}}{\text{fotonok száma}} \times 100$

- erősítés ( $\mu$ ):  $\mu = \frac{\text{elektronok végső száma}}{\text{fotoelektronok száma}} \times 100$

pl. ha minden dinóda 10 másodlagos elektront bocsát ki, és 8 dinóda van:

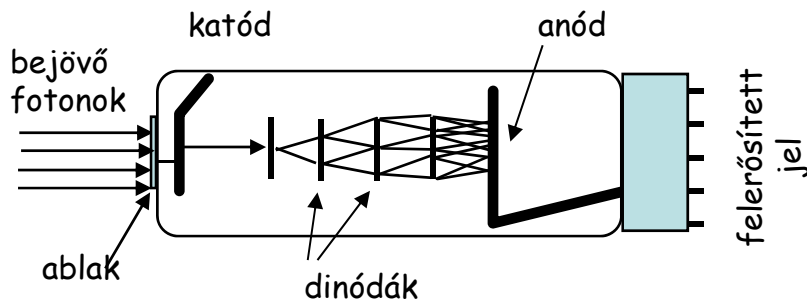
$$\mu = 10^8$$



- magas kvantumhatásfok
- nulla erősítés

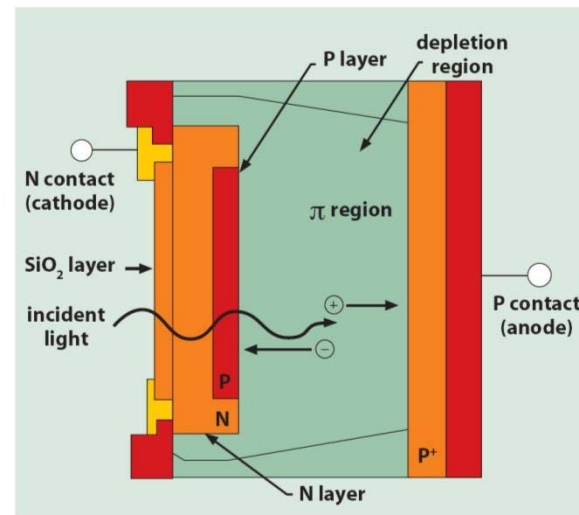
kétféle üzemmód: 1. nincs feszültség, 2. záró irányú feszültség

**Fotoelektronsokszorozó (photomultiplier, PMT):**



- a dinódák egyre pozitívabb feszültségen vannak, és a gyorsuló elektronok a dinódákba ütközve másodlagos elektronokat váltanak ki
- alacsony kvantumhatásfok
- magas erősítés

**Lavina fotodióda (avalanche photodiode):**



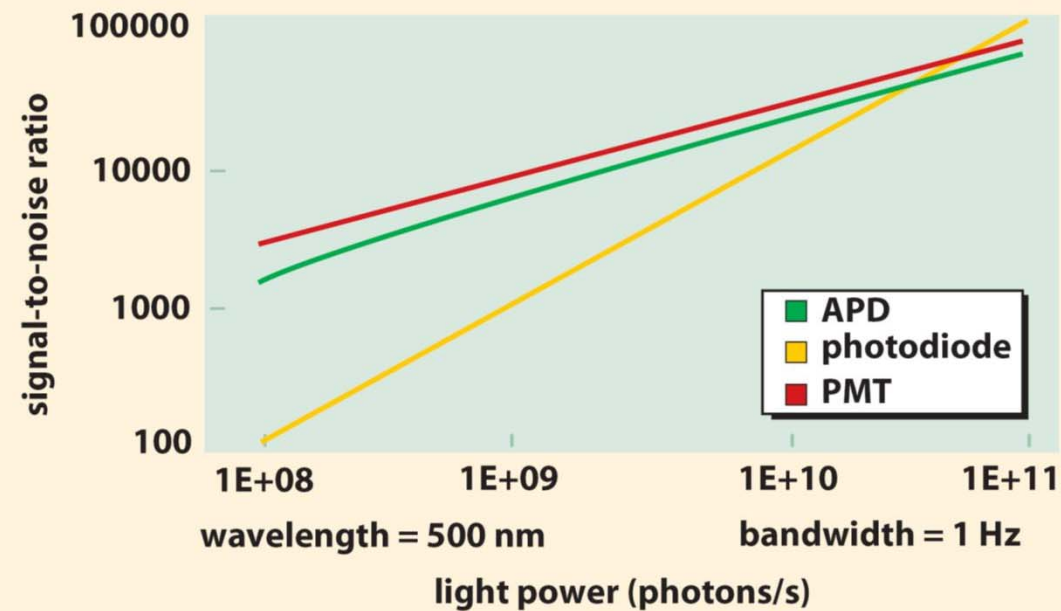
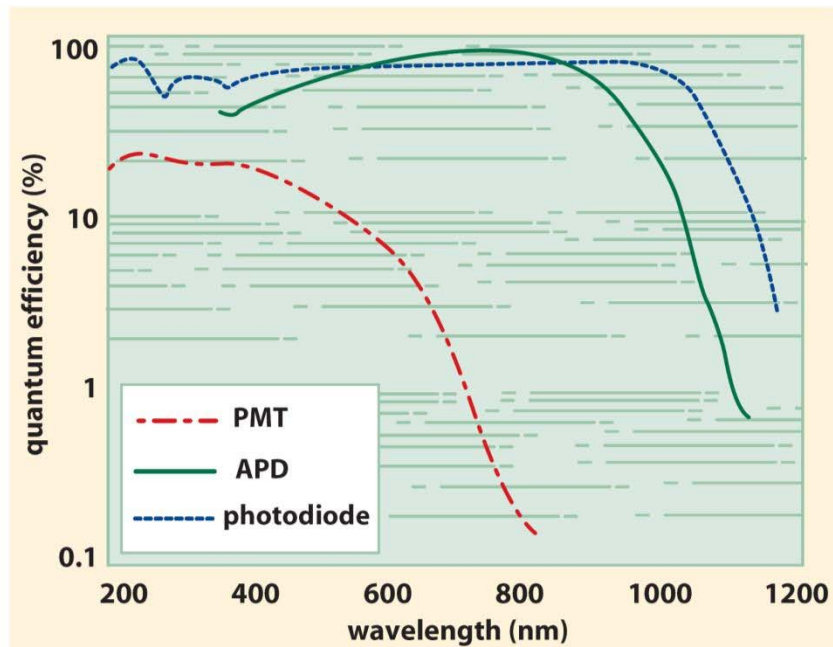
- a diódára magas záró irányú feszültséget kapcsolnak, és a fotoelektronok annyira felgyorsulnak, hogy másodlagos elektronokat váltanak ki ( $\mu \neq 0$ )

• a fotodióda és a PMT előnyös tulajdonságait kombinálja

- magas kvantumhatásfok
- magas erősítés
- hátrány: magas sötétáram



## Detektorok összehasonlítása



## Jel-zaj arány áramlási citometriában

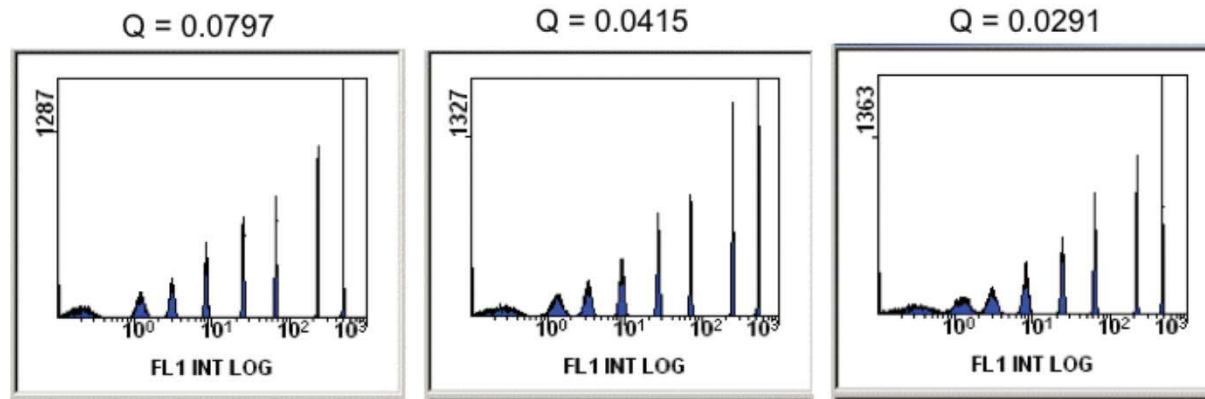
- Az áramlási citometriás adatok minősége a jel-zaj arány függvénye
- A jel-zaj arányt két faktor határozza meg:
  - detektálási hatásfok (Q), más néven kvantumhatásfok ( $\Phi$ ): egy fluorofór által kiváltott fotoelektronok száma
  - háttér fényerősség (B)

a fotonszámlálás Poisson  
jellege miatt

$$zaj \sim \sqrt{n}$$

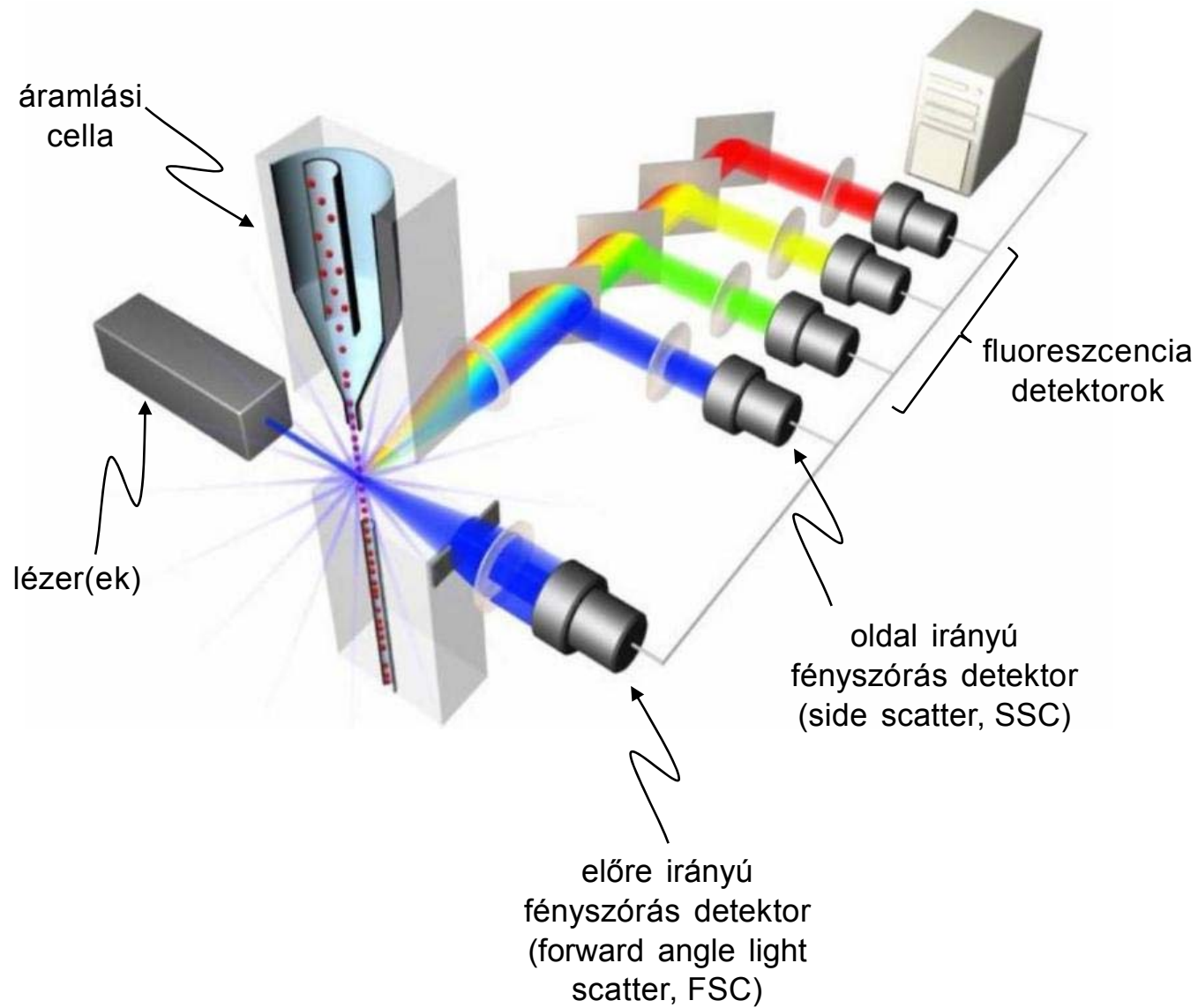
$$relatív\ zaj \sim \frac{\sqrt{n}}{n} = \frac{1}{\sqrt{n}}$$

A relatív zaj fordítottan arányos a  
fotonszám négyzetgyökével.



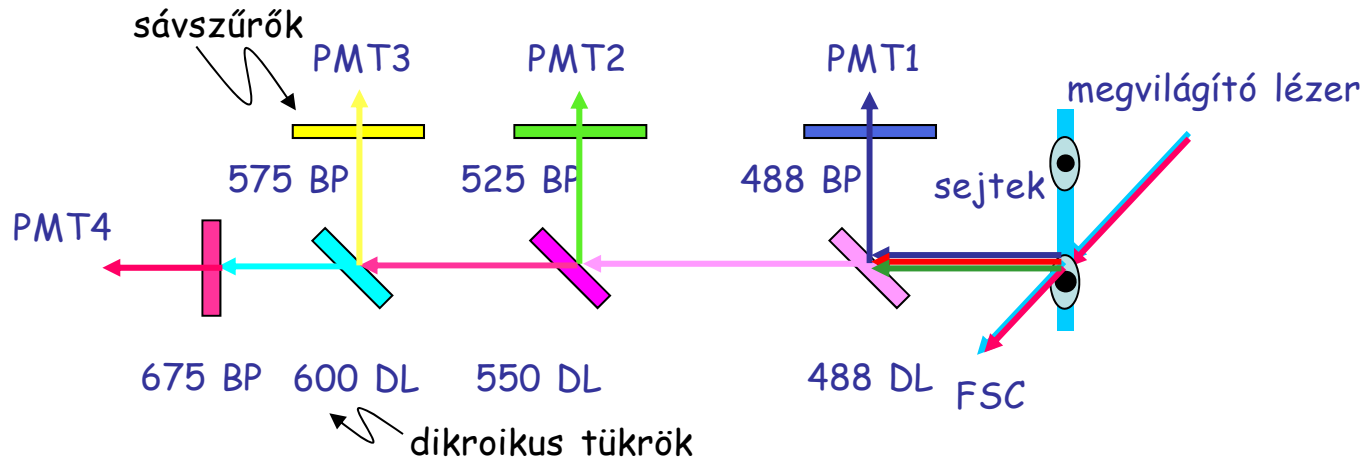
A Q faktort a lézer intenzitás csökkentésével fokozatosan kisebbre állították (miközben a legfényesebb populációt ugyanabban a csatornában tartották a detektorfeszültség növelésével) → csökkent a feloldóképesség.

## Detektorok elrendezése I.



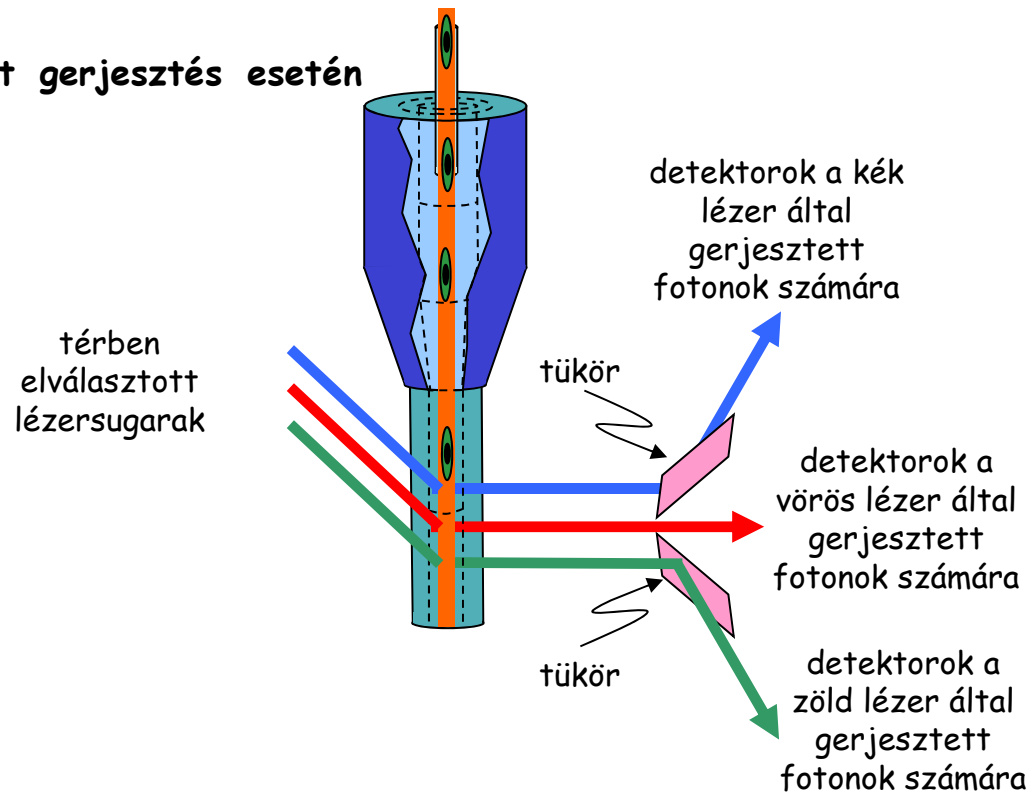
## Detektorok elrendezése II.

Azonos helyen történő gerjesztés esetén

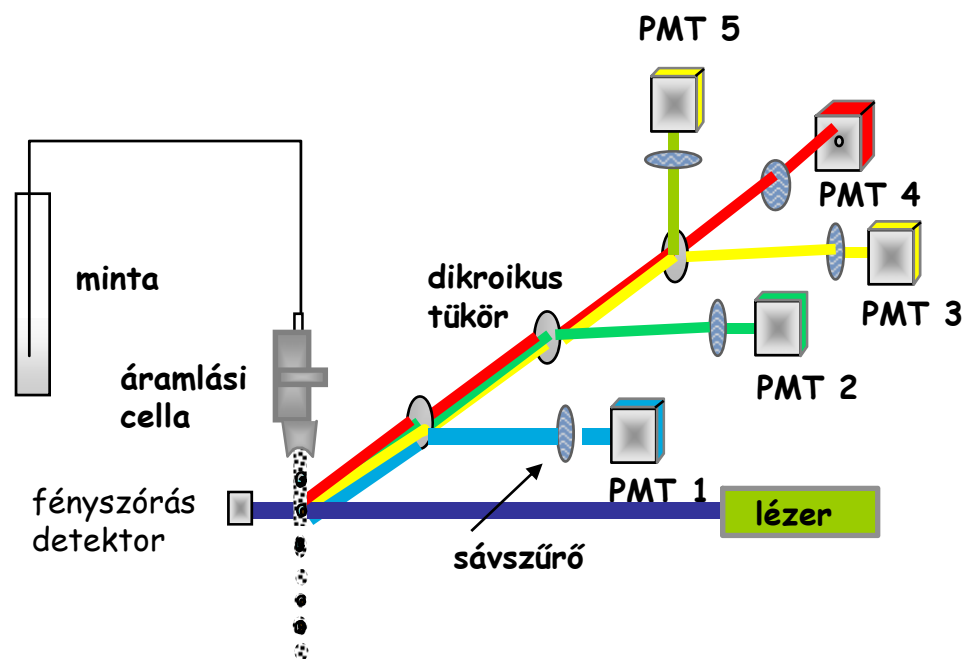


A dikroikus tükrökkel a közös sugárból leválasztanak egyet-egyet, amit még egy optikai filterrel tovább szűrnek.

Térben szétválasztott gerjesztés esetén



### Detektorok elrendezése III.

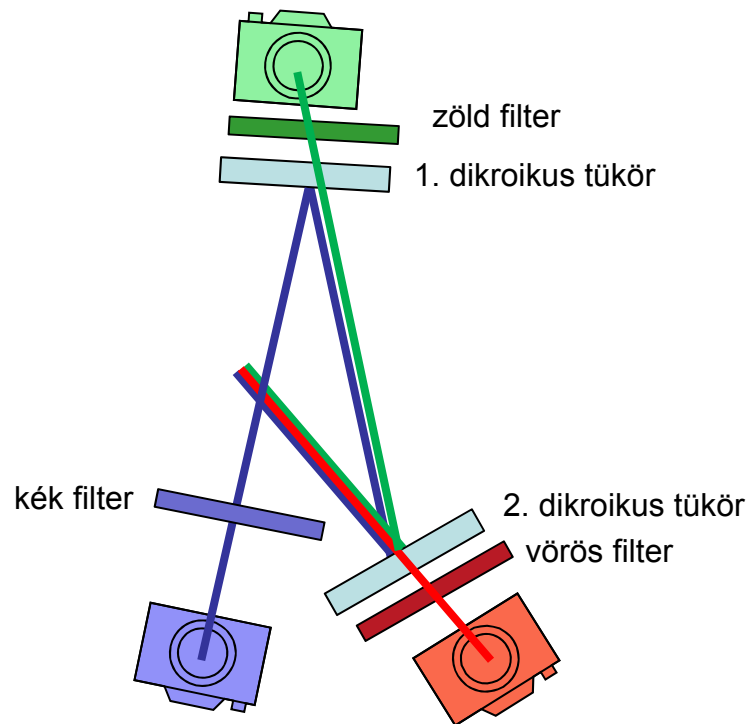


## Detektorok elrendezése IV.

Új fejlesztések: „oktagon” és „trigon” detektor-elrendezés

**Előnyök és elvek:**

- Az emisszió helyéhez legközelebbi detektor detektálja a leghosszabb hullámhosszú fluoreszcenciát, amiben általában a legkevesebb foton van.
- Az alacsonyabb hullámhosszú fotonokat (felüláteresztő) dikroikus tükrökkel verik vissza a többi detektorba.
- A fény visszaverés általában hatékonyabb, mint az áteresztés (transzmisszió).



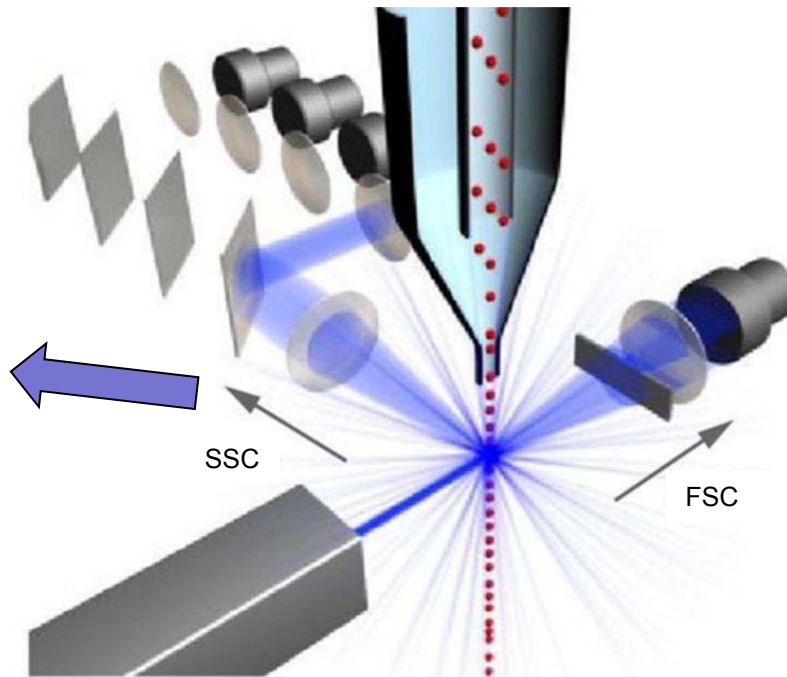
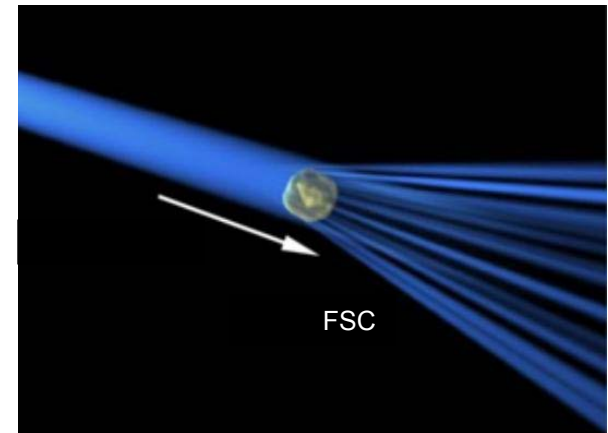
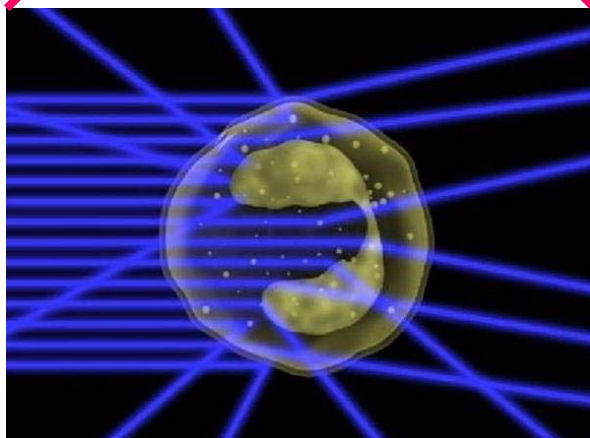
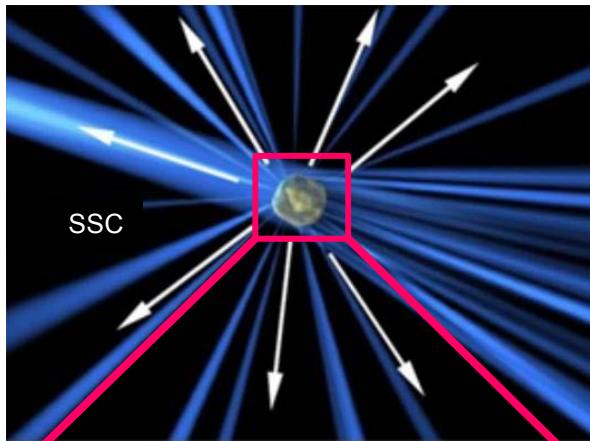


## Fényszórás szignálok

A fényszórás jelek intenzitása (FSC és SSC) függ

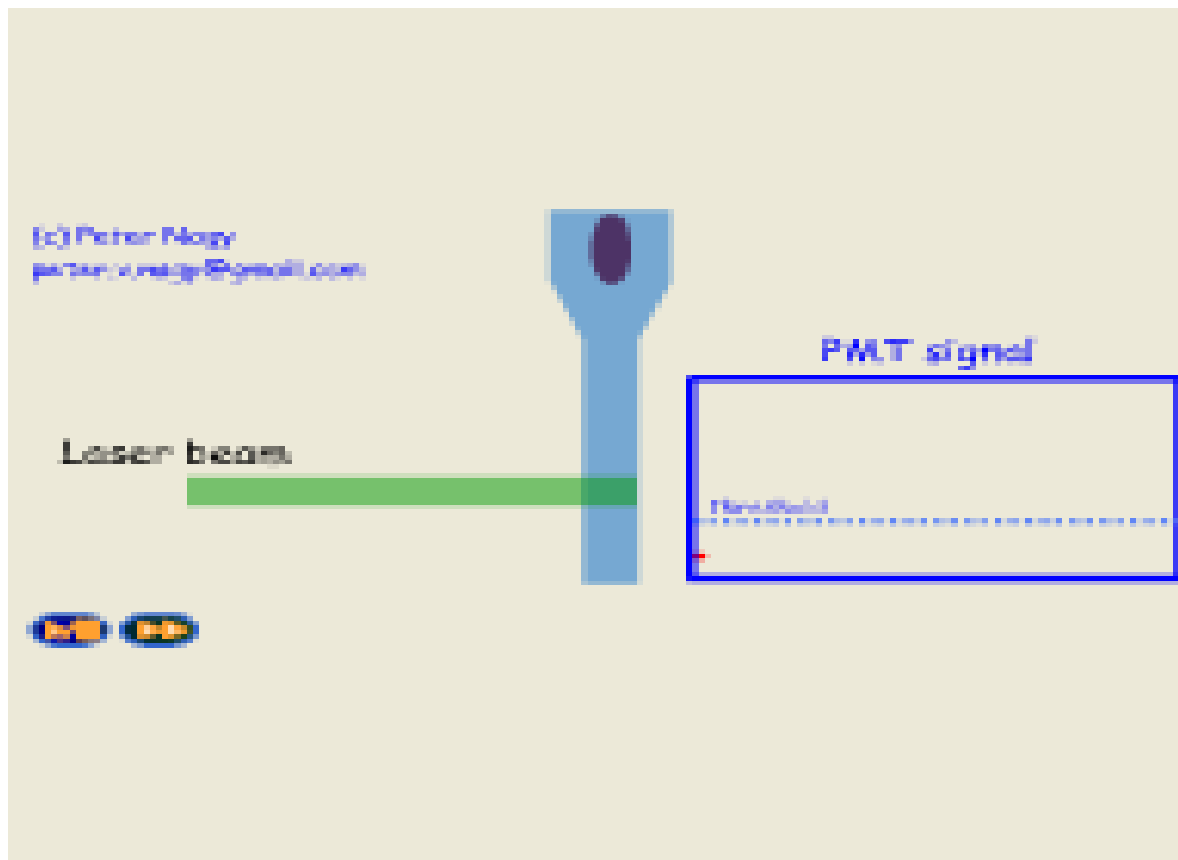
- a sejtek törésmutatójától (mennyivel különbözik a sejt törésmutatója a környezetétől)
- a sejt lézer nyalábhoz viszonyított relatív orientációjától
- az FSC-re és az SSC-re specifikus faktoroktól

SSC jel: a sejt belső  
granuláltságával arányos

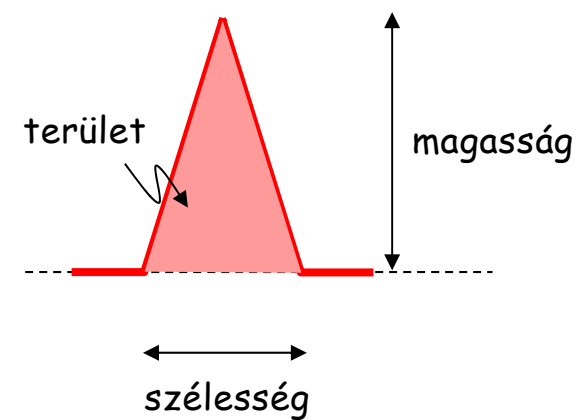


FSC jel: a sejtmérettel  
arányos

## A jel detektálása

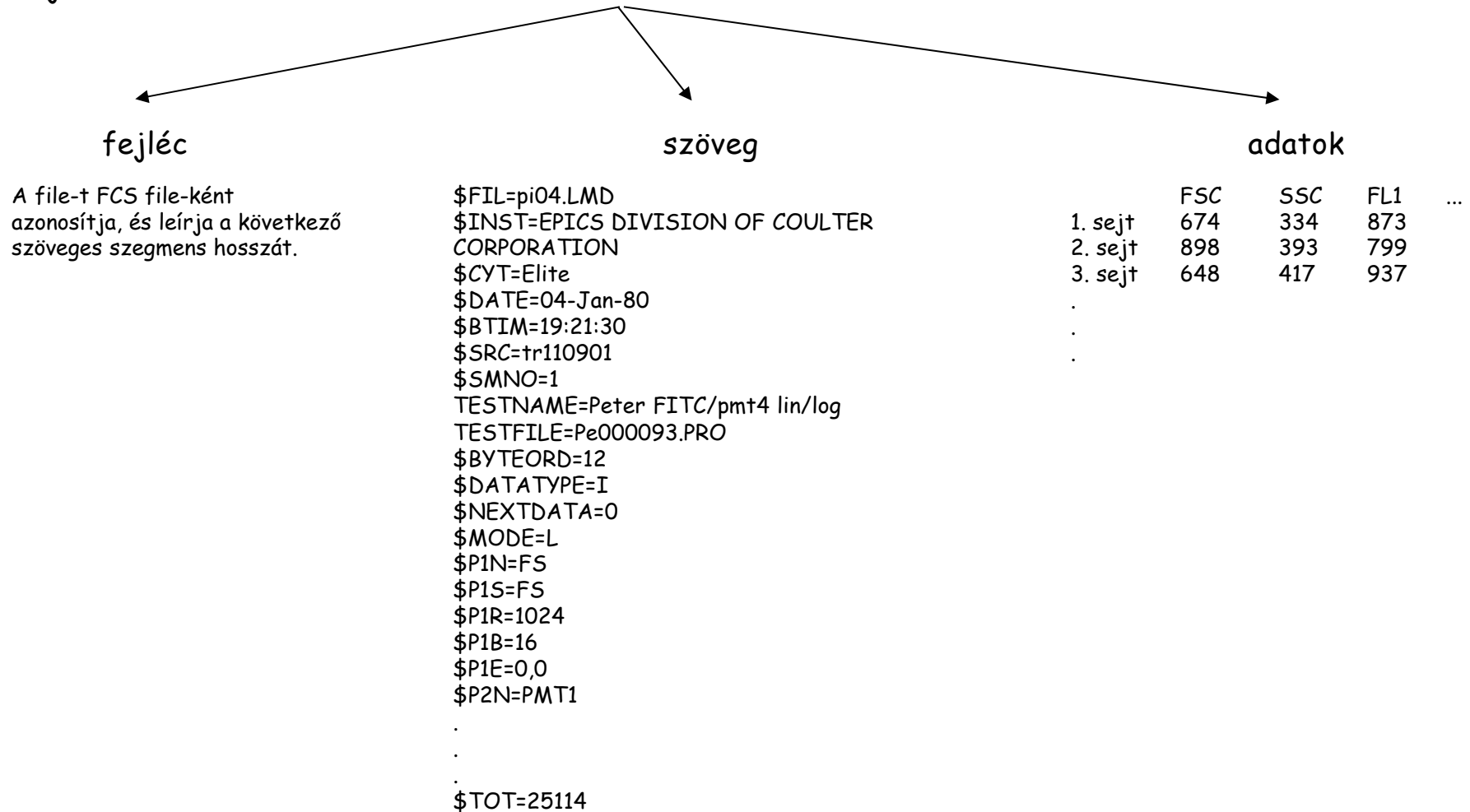


A detektoron mért jel:



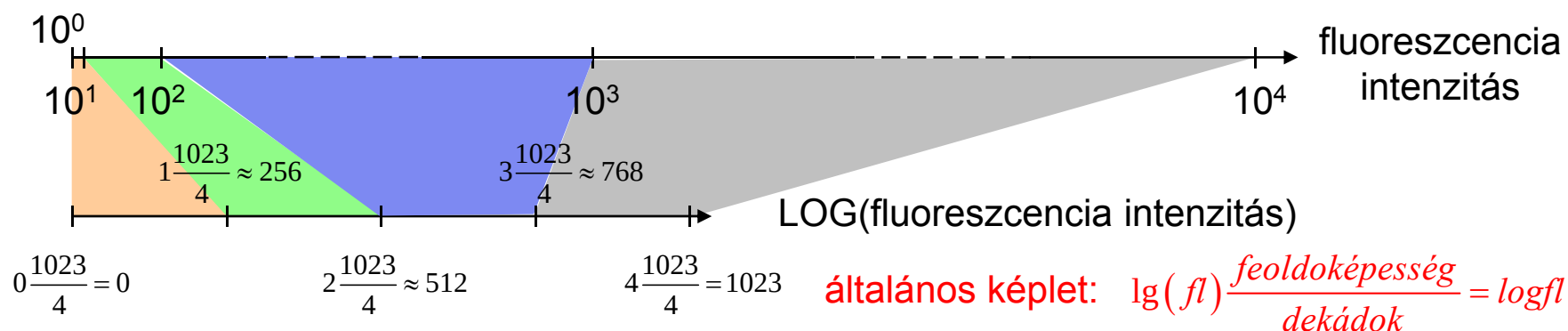
## Az adatok tárolása

Az adatok elmentése általában ún. FCS (flow cytometry standard) file-ban történik, ahol minden sejtről elmentik az összes mért adatot = list mode file



## Feloldóképesség az adatok mérése során

- A legtöbb biológiai paraméter több (3-4) nagyságrendre terjed ki.
- Korábban a legtöbb áramlási citométernek 10 bites feloldóképessége volt (mert a nagyobb feloldóképességű detektorok túl drágák voltak), azaz a fluoreszcencia intenzitásokat 10 bites feloldóképességgel mérték ( $2^{10}=1024$ ).
- A fluoreszcencia intenzitás 3 nagyságrendjének mérése nem elégséges, ezért logaritmikus erősítőket használtak, amik a skála felső részét összenyomják.



- A modern detektorok 16-bites ( $2^{16}=65536$ ) vagy hasonló feloldóképességgel mérik a fluoreszcenciát → nincs szükség logaritmikus erősítőkre.

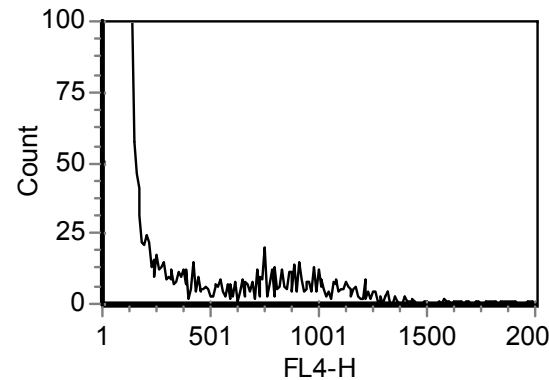
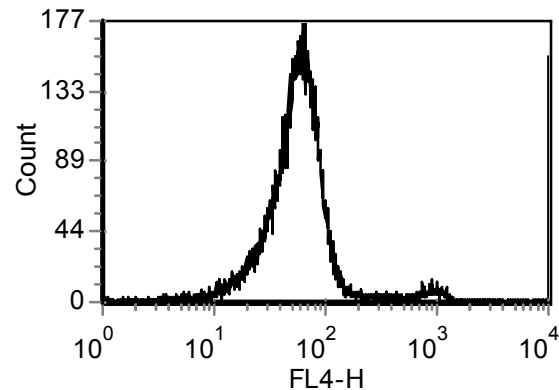
# Az adatok megjelenítése I.

Egydimenziós (egy paraméteres) ábrázolási mód: hisztogram

ugyanazon adatok

logaritmikus skálán

lineáris skálán

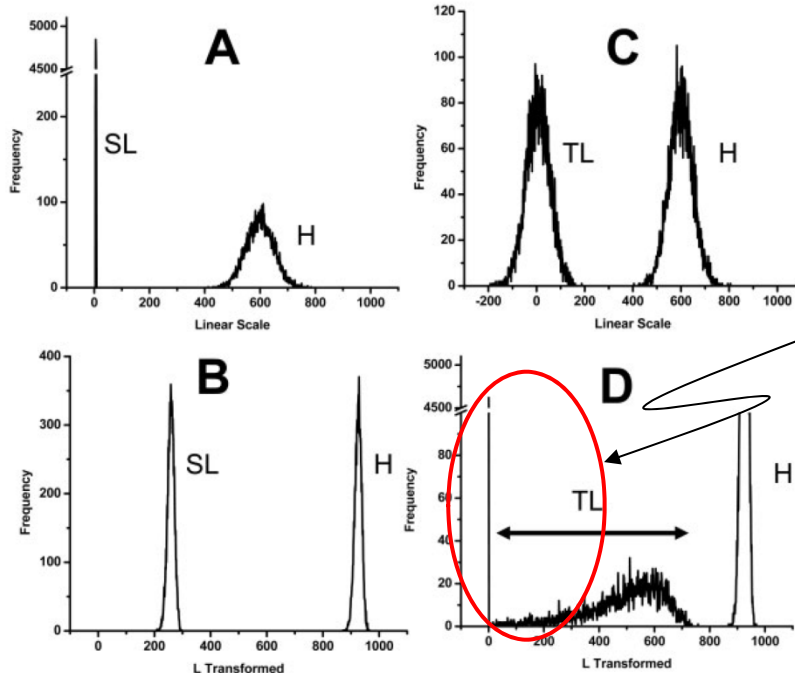


A logaritmikus skála előnye:

- összenyomja a skálát a magas értékeknél
- sok biológiai paraméter log-normális eloszlást mutat, ez log skálán haranggörbének látszik.

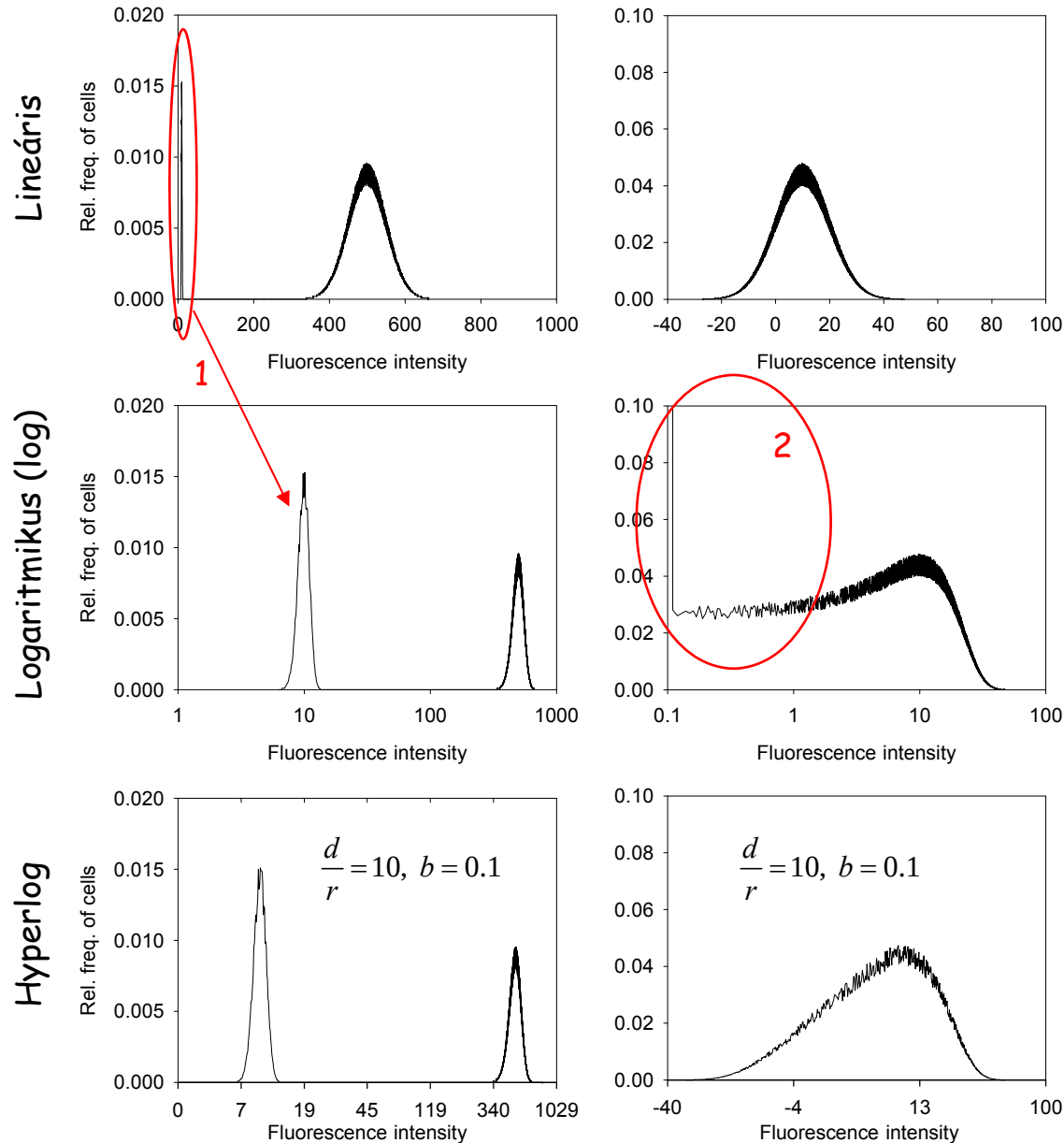
Hátránya:

- nulla és negatív számokat nem tud ábrázolni
- ún. binning artefaktum



Binning artefaktum: úgy tűnik, hogy az alacsony intenzitású populáció elnyúlik balra, és az első csatornában sok sejt halmozódik fel.

## Skála típusok

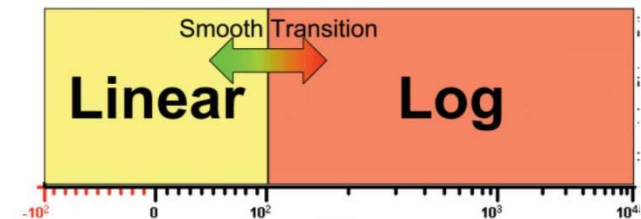


1. Az alacsony intenzitású populáció nem vehető ki jól lineáris skálán, csak log skálán, DE

2. a log skálán binning artefaktum figyelhető meg.

Megoldás:

egy olyan skála, amely lineáris alacsony intenzitásoknál és logaritmus magas intenzitásoknál: hyperlog (HL) skála (Cytometry, 64A, 34)



$$LIN = 10^{\frac{d}{r}x_{HL}} + b \frac{d}{r} x_{HL} - 1, \text{ if } x_{HL} \geq 0$$

$$LIN = -10^{-\frac{d}{r}x_{HL}} + b \frac{d}{r} x_{HL} + 1, \text{ if } x_{HL} < 0$$

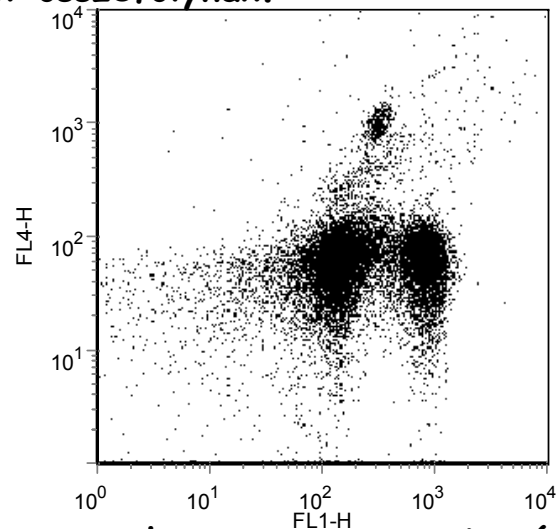
Keressük  $x_{HL}$ , hogy az egyenlet helyes legyen.

1-2. A HL skálán mindkét populáció jól látszik, és nincs binning artefaktum.

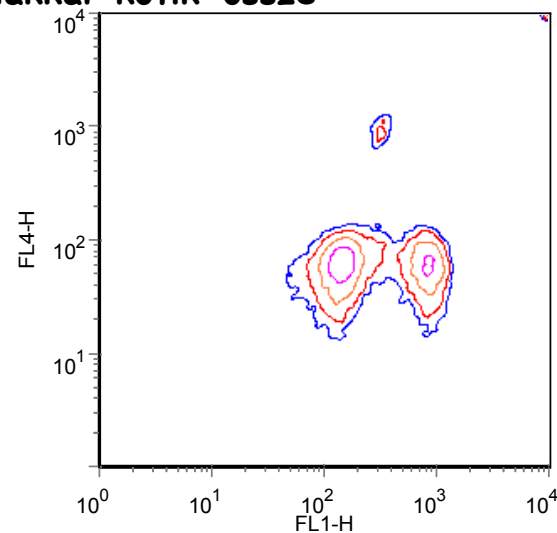


## Kétdimenziós (két paraméteres) ábrázolási módok: **Az adatok megjelenítése II.**

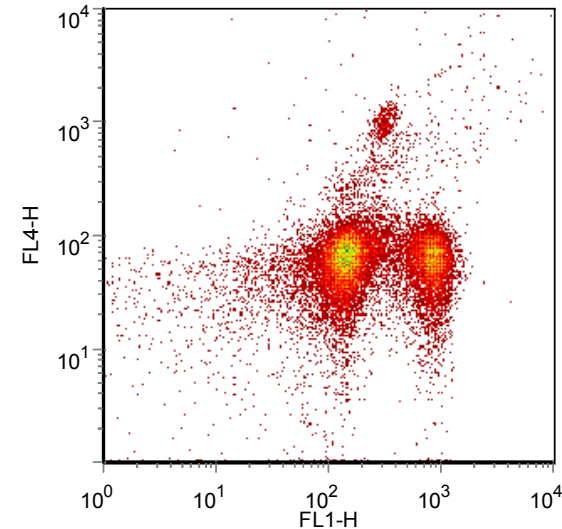
1. dotplot: a két tengelyen egy-egy mért paramétert tüntetünk fel, az ábrán minden pont egy sejtnek felel meg. Hátrány: sok sejt esetén a pontok összefolynak.



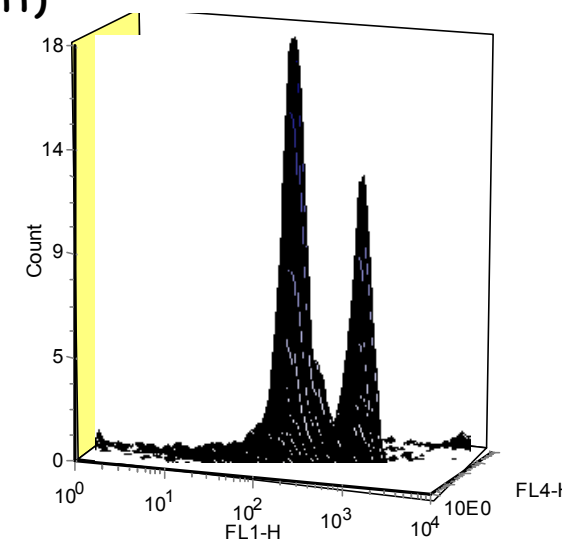
3. contour plot: az azonos sejtszámú pontokat vonalakkal kötik össze



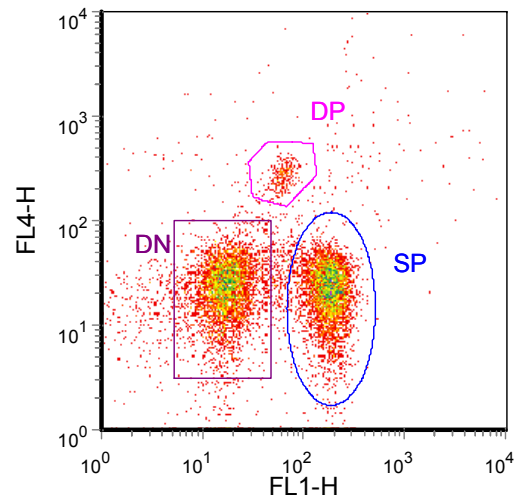
2. density plot: az ábrán minden pont színe a sejtek számát jelenti



4. 3D (surface, felszín) ábra: a sejtek számát a z tengelyen ábrázolják (ritkán alkalmazott)



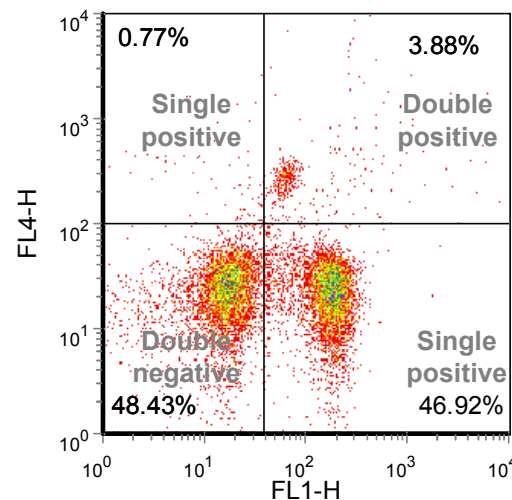
# Régiók, kvadránsok, markerek: szubpopulációk megjelölésére szolgáló eszközök



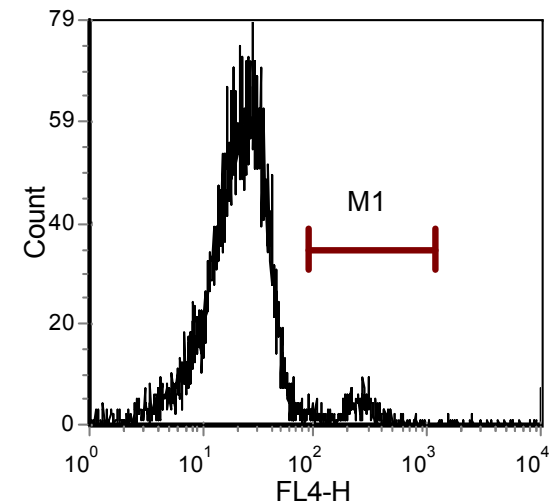
**Régió:** egy a felhasználó által definiált terület, amely a sejtek egy bizonyos részét kijelöli.

Több régiót definiálhatunk ugyanazon ábrán is.

A régióknak különféle alakjuk lehet (téglalap (DN), sokszög (DP) és ovális (SP)).

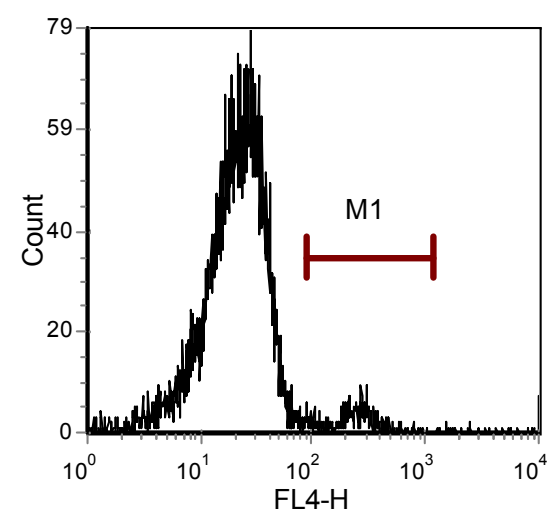
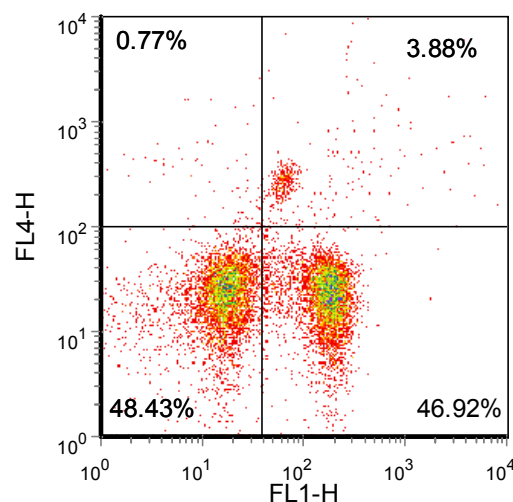
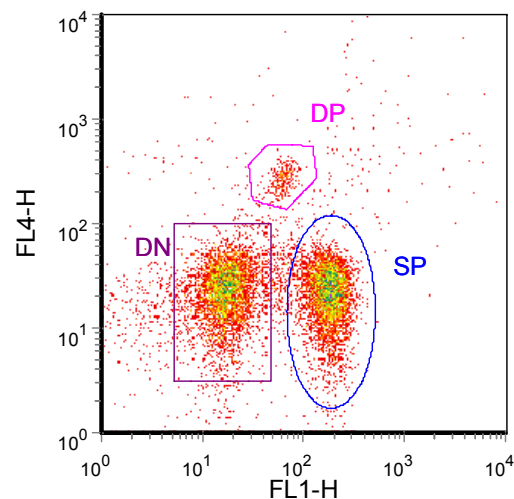


**Kvadráns:** egymásra merőleges vonalakkal 4 terület kijelölése a 2D ábrán, amely mindkét tengelyen azonosítja a pozitív és negatív sejteket.



**Marker:** sejtek kiválasztása egy hisztogramon

# Mit lehet a régiókkal, kvadránsokkal és a markerekkel csinálni?



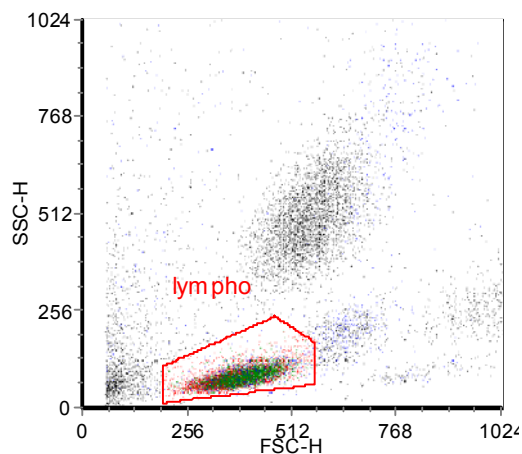
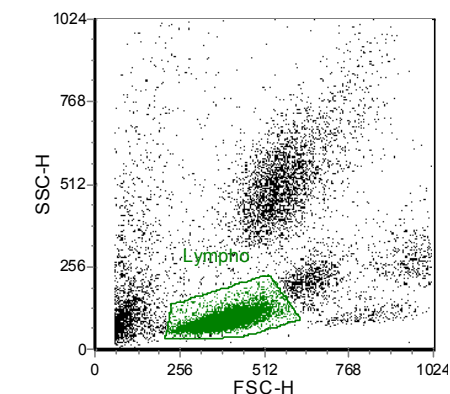
| Gate | X Geometric Mean | Y Geometric Mean | % of All Cells |
|------|------------------|------------------|----------------|
| None | 48.09            | 21.7             | 100.0          |
| SP   | 171.29           | 19.51            | 42.91          |
| DP   | 61.56            | 253.34           | 2.62           |
| DN   | 16.86            | 21.08            | 45.19          |

| Gate | X Geometric Mean | Y Geometric Mean | % of All Cells |
|------|------------------|------------------|----------------|
| UL   | 13.55            | 286.44           | 0.77           |
| UR   | 108.74           | 317.44           | 3.88           |
| LL   | 14.45            | 18.95            | 48.43          |
| LR   | 158.77           | 19.17            | 46.92          |

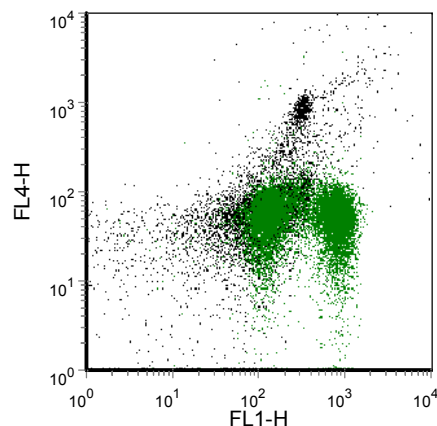
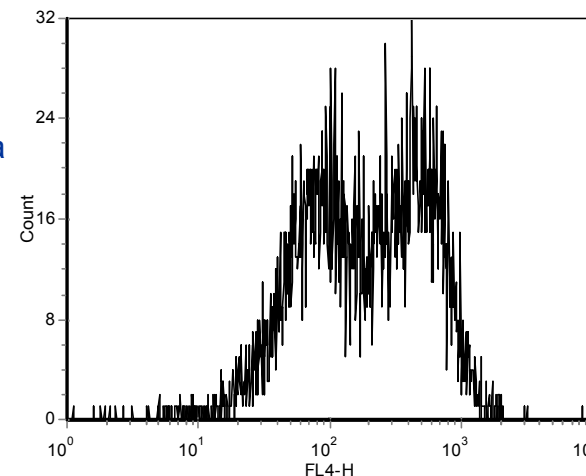
| Marker | % of all cells | Geometric Mean | CV     |
|--------|----------------|----------------|--------|
| None   | 100.0          | 21.7           | 677.57 |
| M1     | 4.49           | 240.38         | 54.55  |

- az azonosított szubpopulációkat szeparáltan lehet analízálni
- a statisztikákat vagy a teljes populációra vagy csak a régióra/kvadránsokra/markerre számítjuk ki

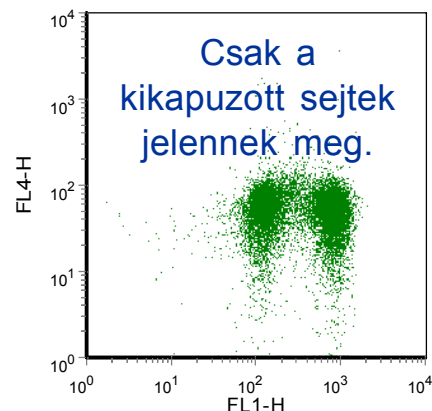
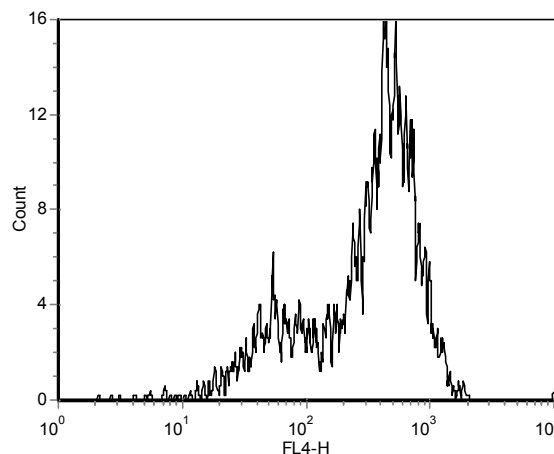
# Kapuzás (gating)



minden sejt  
FL4 eloszlása



A piros (limfocita)  
kapuban levő  
sejtek FL4  
eloszlása

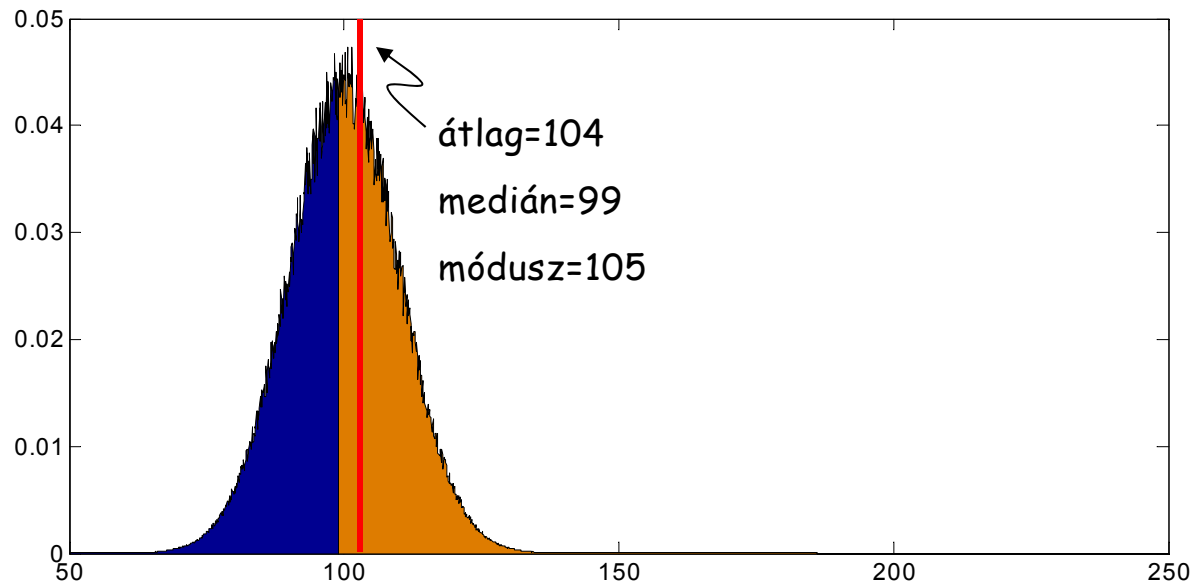


**Kapunak** nevezzük az egy vagy több régió/kvadráns/marker logikai operátorok (AND, OR, NOT) segítségével definiált kombinációját.

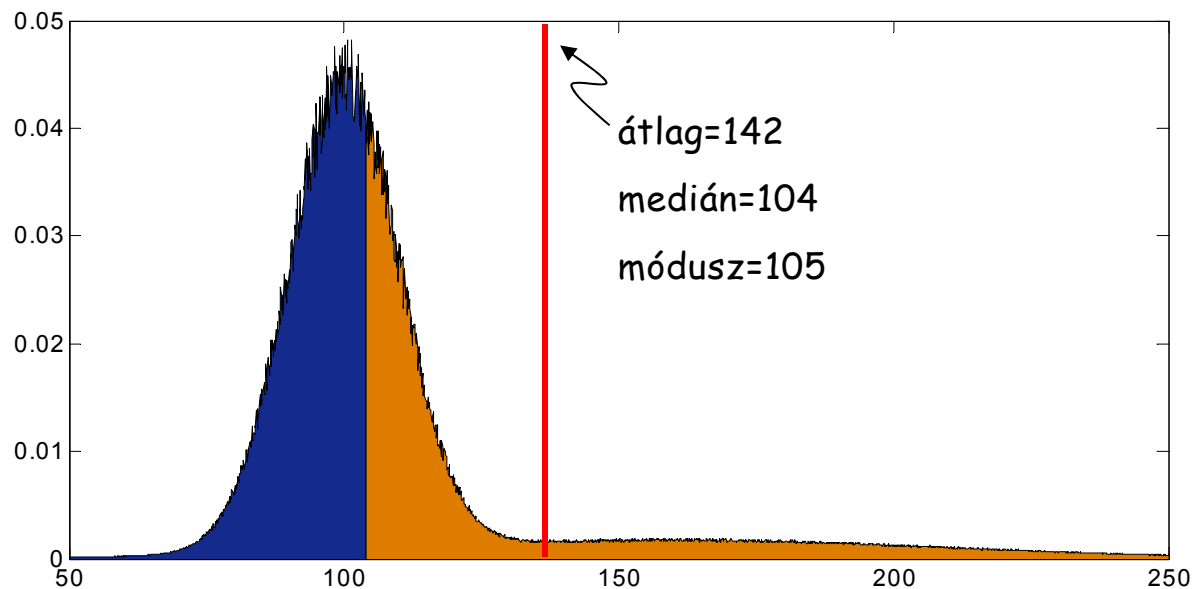
Az adattömeg egy halmazát definiálja, amelyet szeparáltan kell feltüntetni vagy analizálni.

- statisztikák kiszámolására és a kiválasztott sejtek karakterizálására használják
- meg lehet szabadulni a nem kívánt adatoktól (pl. sejtörmelék)

# Statisztikák



Az eloszlás egy magas intenzitású szubpopuláció által szennyezett:



A centrális tendencia jellemzése:

**Átlag:**

$$\text{átlag} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

**Medián:**

A középső érték, amely két egyenlő részre osztja az eloszlást (a vonal a kék és a narancssárga területek között)

**Módusz:**

a legnagyobb gyakorisággal előforduló érték

Az átlag jelentős mértékben módosul a szennyező populáció hatására, míg a medián a centrális tendencia sokkal robosztusabb jellemzője.

A diszperzió jellemzése:

**SD:** az értékek szórása az átlag körül

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

**Variációs koefficiens (CV):**

$$CV = \frac{SD}{\text{átlag}} 100$$

az eloszlás relatív szélességét jellemzi

## Áramlási citométerek



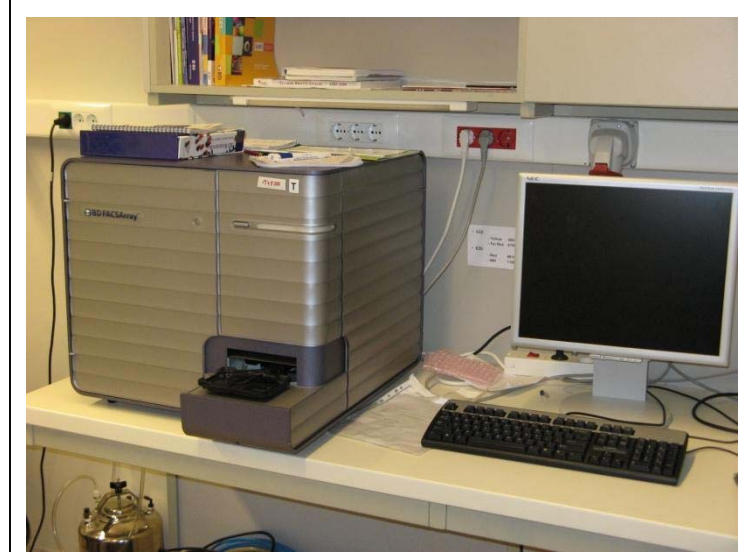
Coulter Epics Elite



Becton Dickinson FACS Vantage DiVa

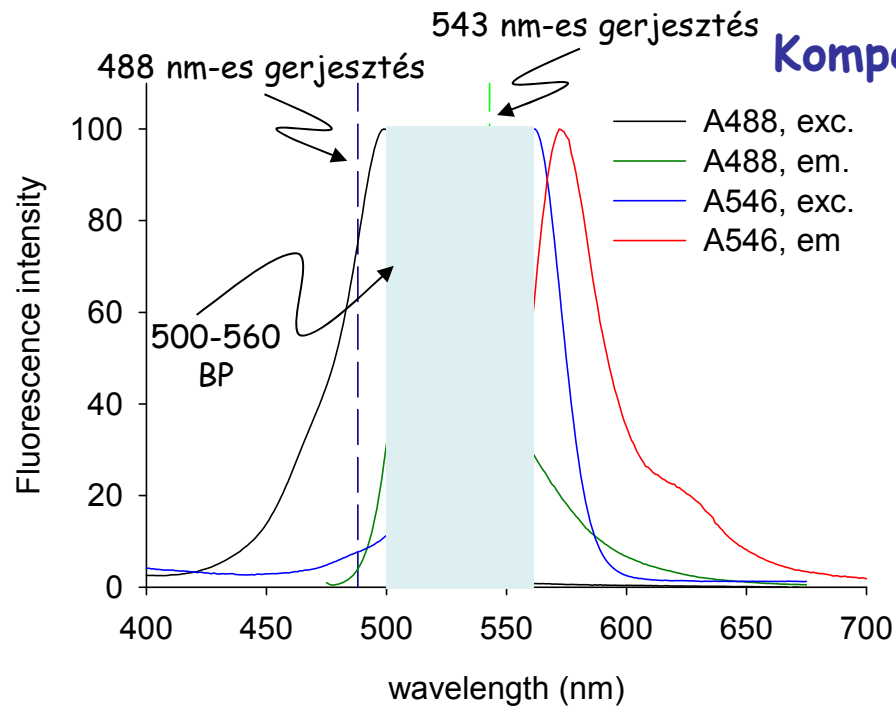


Becton Dickinson FACScan



Becton Dickinson FACSArray





Ha egyszerre két fluoreszcens festéket (Alexa488, Alexa546) vizsgálunk, a legtöbb esetben a mért fluoreszcencia intenzitás mindkét festék hozzájárulását tartalmazza.

$$A488channel = I_{A488} + I_{A546} \times S_{A546 \rightarrow A488}$$

A488channel - mért fl. int. az A488 csatornában

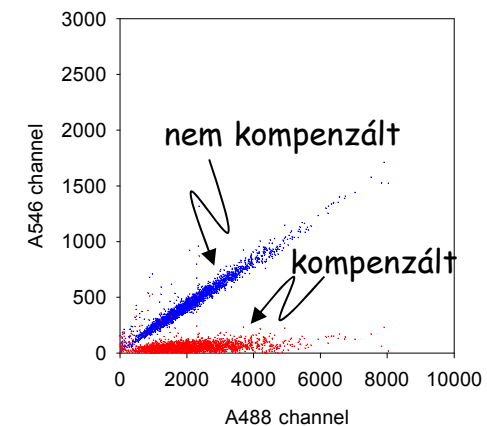
$I_{A488}$ ,  $I_{A546}$  - az A488 és A546 festékek „tisztá” fluoreszcencia intenzitása

$S_{A546 \rightarrow A488}$  - spektroszkópai állandó, ami meghatározza, hogy az A546 festék mennyire világít át az A488 csatornába

Hasonló egyenlet írható fel az A546 csatornára is:

$$A546channel = I_{A546} + I_{A488} \times S_{A488 \rightarrow A546}$$

Az  $S$  faktorokat egyszeresen (pl. csak A488) jelölt mintákkal határozzuk meg, melyek a kompenzáció után vagy vízszintesen vagy függőlegesen helyezkednek el az ábrán.





## Kompenzáció II.

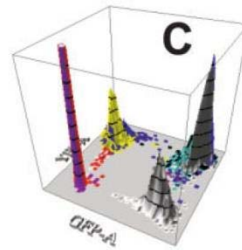
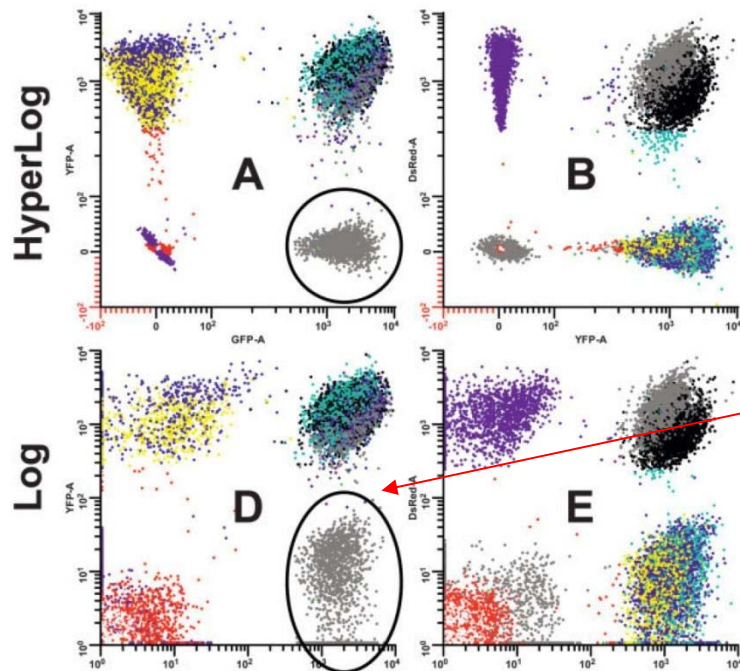
Kompenzáció során tiszta, átvilágítástól mentes intenzitásokat számítunk ki.

Egyszerű eset: egyirányú átvilágítás, tehát pl.  $S_{A546 \rightarrow A488} \neq 0$ ,  $S_{A488 \rightarrow A546} = 0$

$$\left. \begin{aligned} A488channel &= I_{A488} + I_{A546} \times S_{A546 \rightarrow A488} \\ A546channel &= I_{A546} \end{aligned} \right\} I_{A488} = A488channel - A546channel \times S_{A546 \rightarrow A488}$$

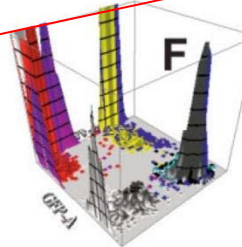
Bonyolultabb eset: kétirányú átvilágítás, tehát pl.  $S_{A546 \rightarrow A488} \neq 0$ ,  $S_{A488 \rightarrow A546} \neq 0$

$$\left. \begin{aligned} A488channel &= I_{A488} + I_{A546} \times S_{A546 \rightarrow A488} \\ A546channel &= I_{A546} + I_{A488} \times S_{A488 \rightarrow A546} \end{aligned} \right\} \begin{aligned} I_{A488} &= \frac{A488channel - A546channel \times S_{A546 \rightarrow A488}}{1 - S_{A546 \rightarrow A488} \times S_{A488 \rightarrow A546}} \\ I_{A546} &= \frac{A546channel - A488channel \times S_{A488 \rightarrow A546}}{1 - S_{A546 \rightarrow A488} \times S_{A488 \rightarrow A546}} \end{aligned}$$

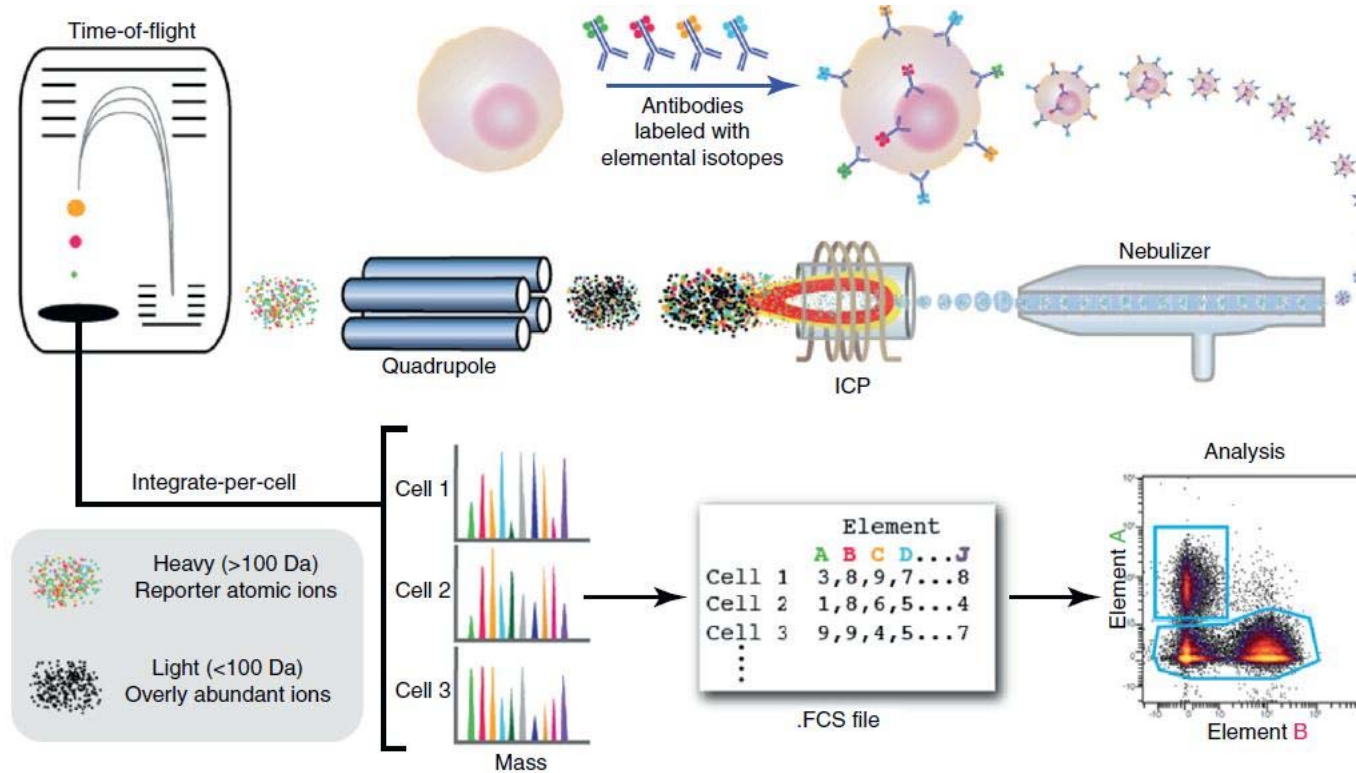


A logaritmikus skála gyakran félrevezető képet mutat a kompenzációról:

úgy tűnik, mintha alulkompenzált lenne.



# Tömeg citometria (mass cytometry)

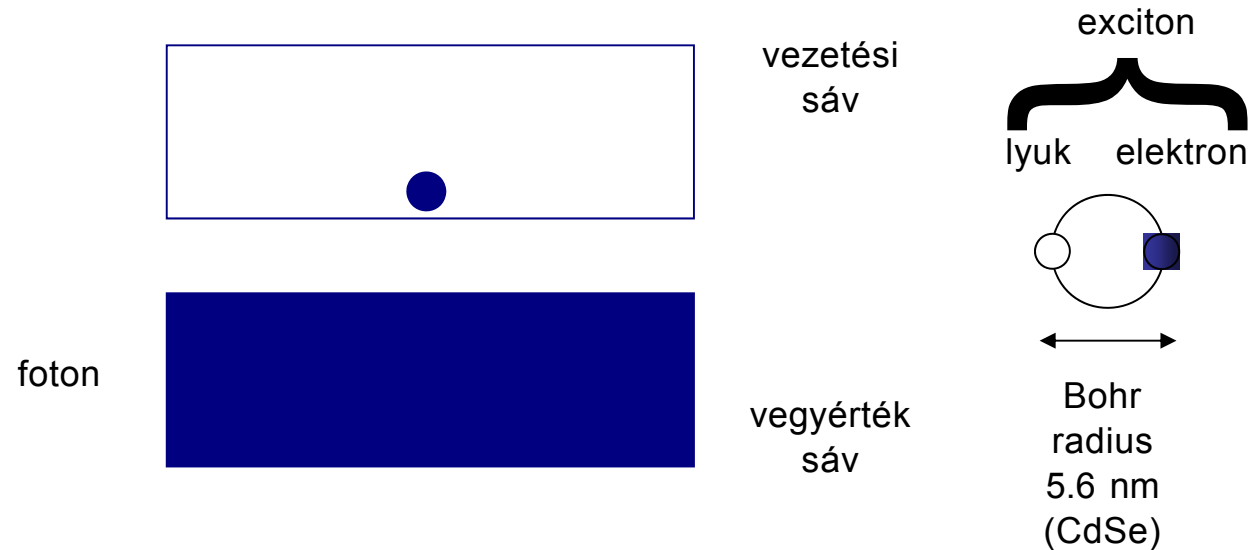


- A spektrális átfedés miatt a szelektíven egyszerre detektálható fluorofórok száma limitált.
- Az antitesteket stabil fémizotópokkal (leggyakrabban lantanidákkal) meg lehet jelölni.
- A sejteket ICP-ben ionizálják (ICP=inductively coupled plasma), melyet TOF-MS (time-of-flight mass spectrometry) analízis követ.
- Minden izotóp mennyisége sejtenként kvantitálható.
- Az adatokat az áramlási citométerben megszokott módon prezentálják és analizálják.

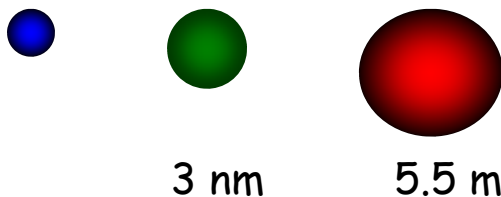
- Bendall, S. C., G. P. Nolan, M. Roederer, and P. K. Chattopadhyay. 2012. A deep profiler's guide to cytometry. Trends Immunol 33:323-332.
- Bandura, D. R., V. I. Baranov, O. I. Ornatsky, A. Antonov, R. Kinach, X. Lou, S. Pavlov, S. Vorobiev, J. E. Dick, and S. D. Tanner. 2009. Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry. Anal Chem 81:6813-6822.
- [www.dvsscience.com/](http://www.dvsscience.com/)

## Quantum dot-ok (qdot, QD) optikai tulajdonságai

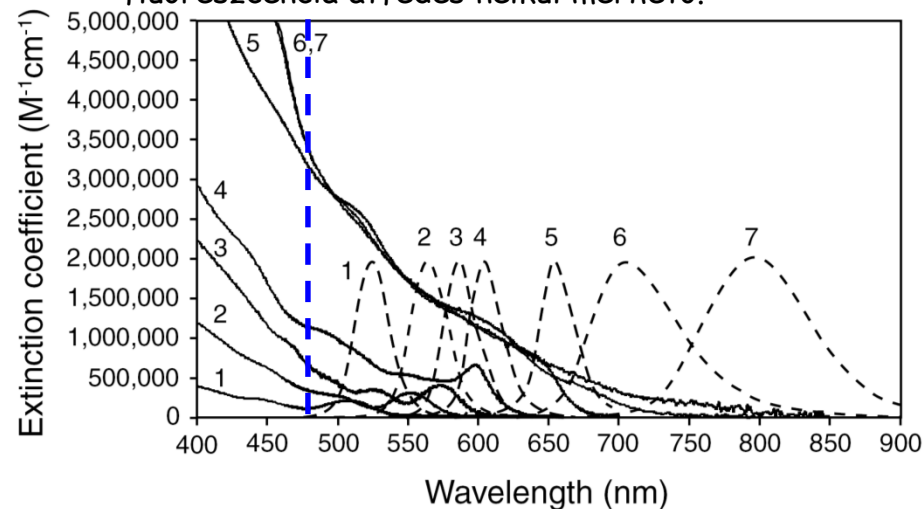
A kompenzáció elkerülhető, ha olyan fluoreszcens festékeket használunk, melyeknek keskeny az emissziós spektrumuk, ezért csak egy fluoreszcens detektor detektálja őket. Ilyenek pl. a quantum dot-ok.



- Széles gerjesztési spektrum
- Keskeny emissziós csúcs
- Nagy fotostabilitás (nincs photobleaching)

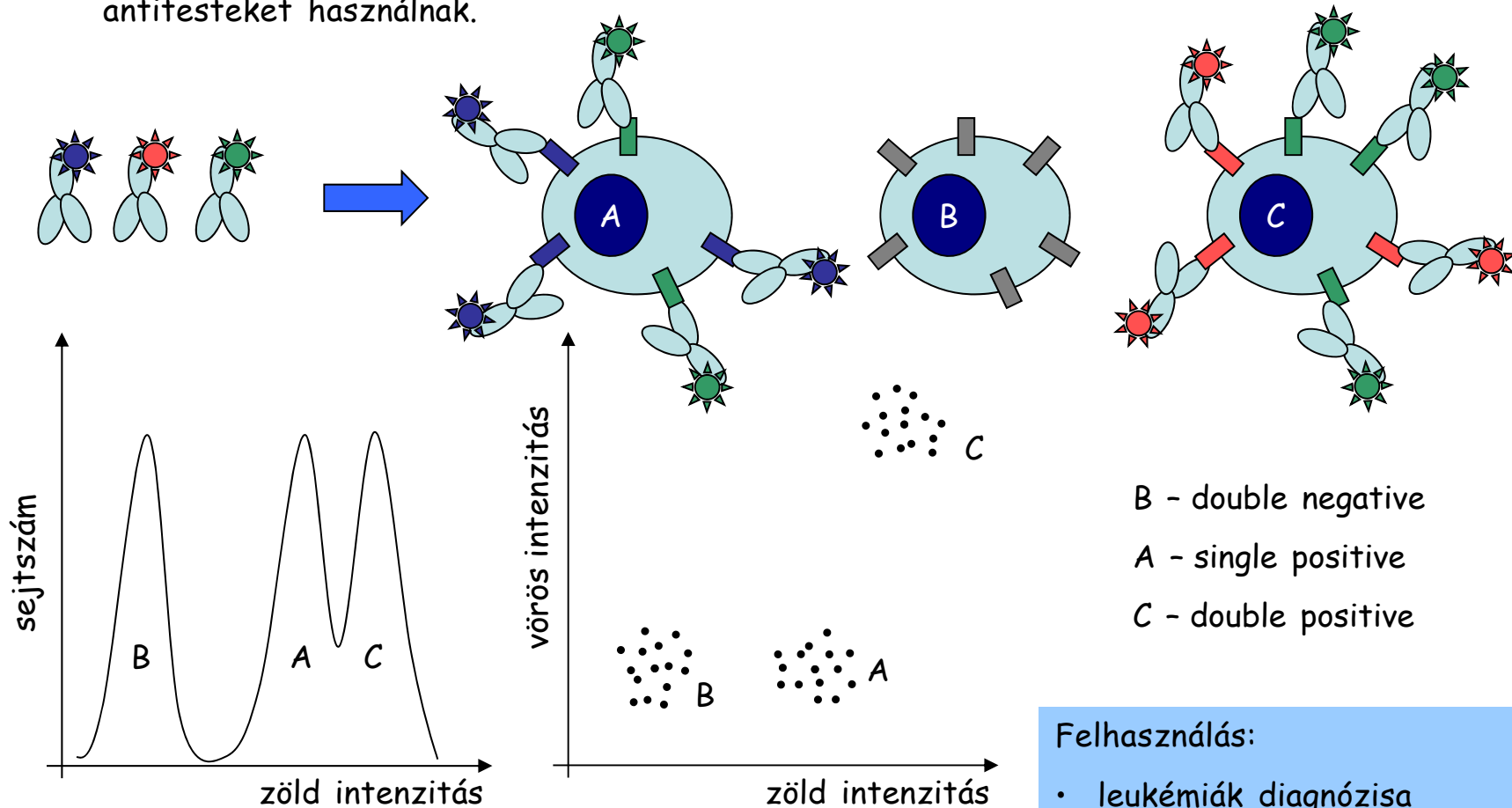


A széles gerjesztési spektrum miatt egy, pl. 488 nm-es lézerrel több quantum dot gerjeszthető, és a keskeny emissziós spektrumok miatt a fluoreszcencia átfedés nélkül mérhető.



## Immunfenotipizálás áramlási citometriával

- szuszpenziós ill. könnyen szuszpendálható sejtek vizsgálatára alkalmas
- sejtfelszíni antigéneket (ill. fixált és permeabilizált sejtek intracelluláris antigénjeit) monoklonális antitestekkel megjelöljük. Klinikai alkalmazásokban általában elsődlegesen jelölt antitesteket használnak.



### Felhasználás:

- leukémiák diagnózisa
- AIDS diagnosztika (CD4<sup>+</sup> limfocita szám)

# CD4<sup>+</sup> limfociták számának meghatározása AIDS betegekben Afrikában

([www.cytometryforlife.org](http://www.cytometryforlife.org))

## Probléma:

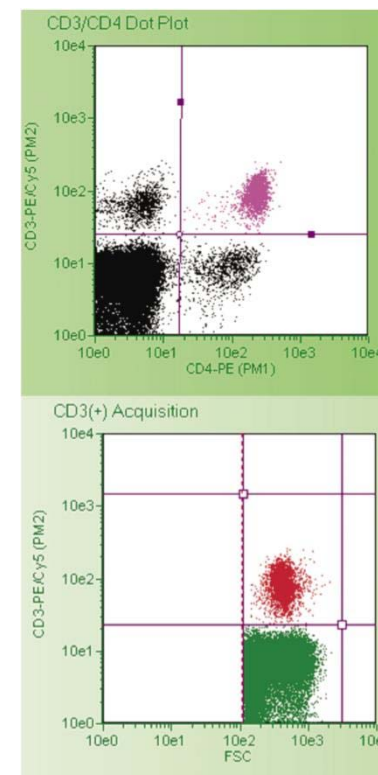
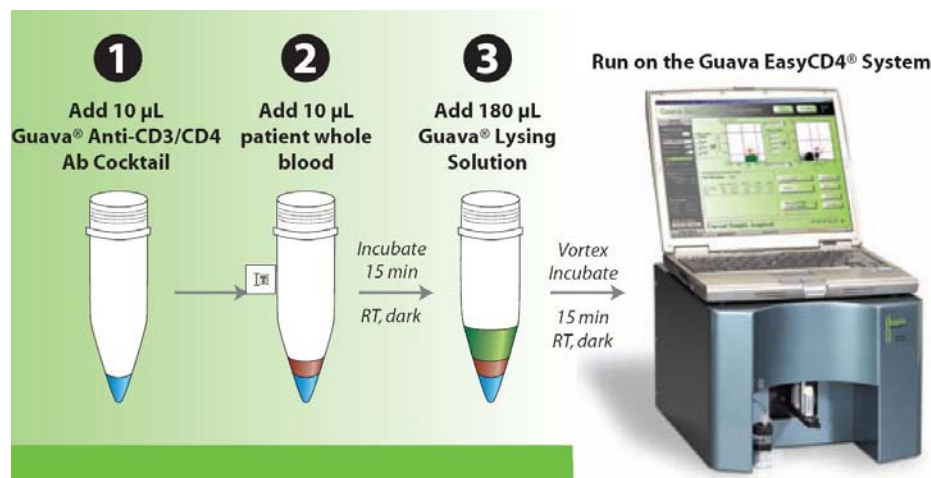
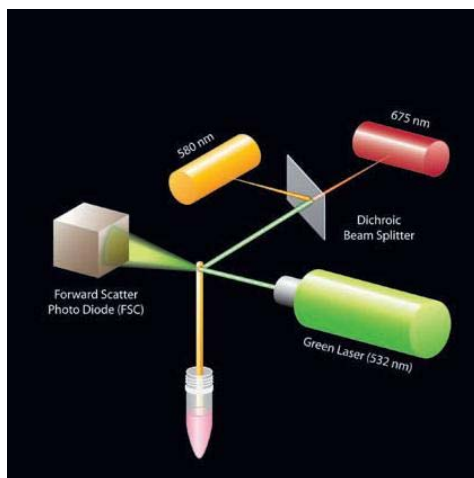
- az új HIV fertőzések 65%-a fejlődő országokban (pl. Afrika) történik
- az AIDS progresszióját a CD4<sup>+</sup> limfociták számának meghatározásával lehet nyomon követni
- a CD4<sup>+</sup> limfocita számot általában áramlási citométerrel határozzák meg a fejlett országokban
- az áramlási citométerek túl drágák a fejlődő országok számára

## Megoldás:

- olyan specializált műszer kifejlesztése, ami egyszerű, olcsó, karbantartást nem igényel
- az ilyen műszerek praktikusán csak a CD4<sup>+</sup> limfocita számot tudják meghatározni, de azt olcsón

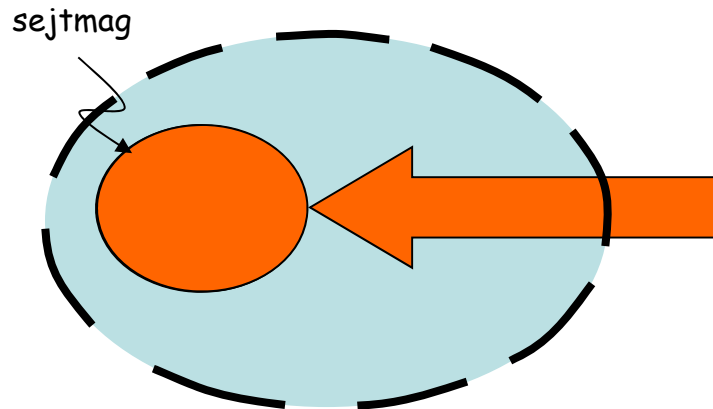
Pl.: **Guava EasyCD4** ([www.guavatechnologies.com](http://www.guavatechnologies.com))

- mikropapilláris alapú áramlási citométer
- beállítást nem igényel, nehéz körülmények között is használható





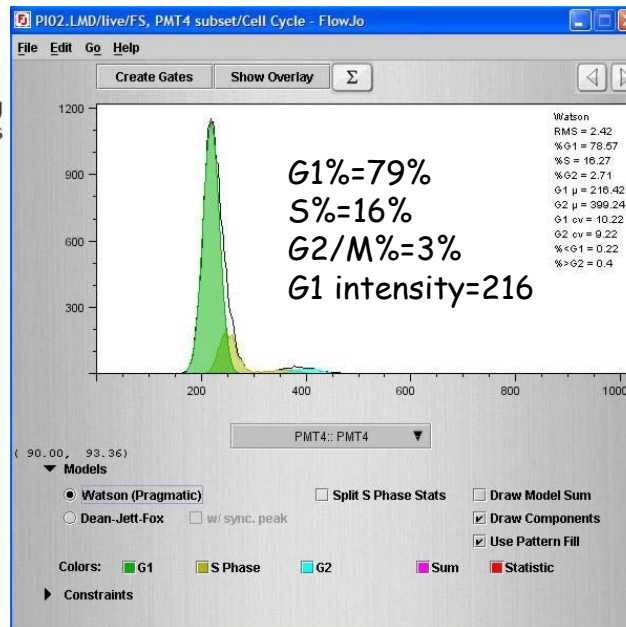
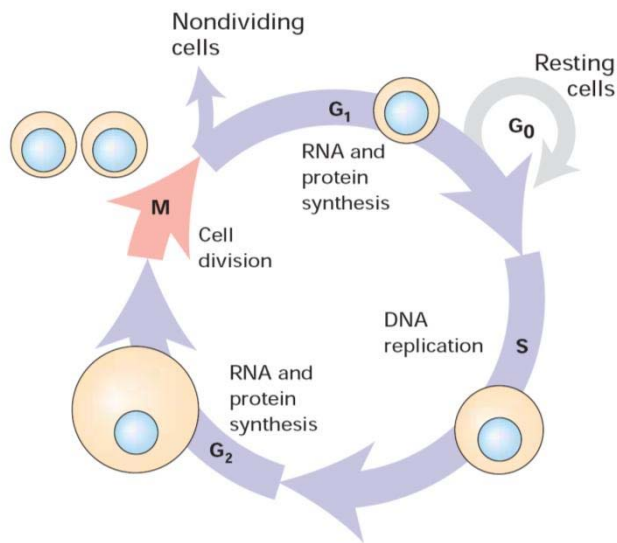
# Sejtciklus és DNS tartalom analízis



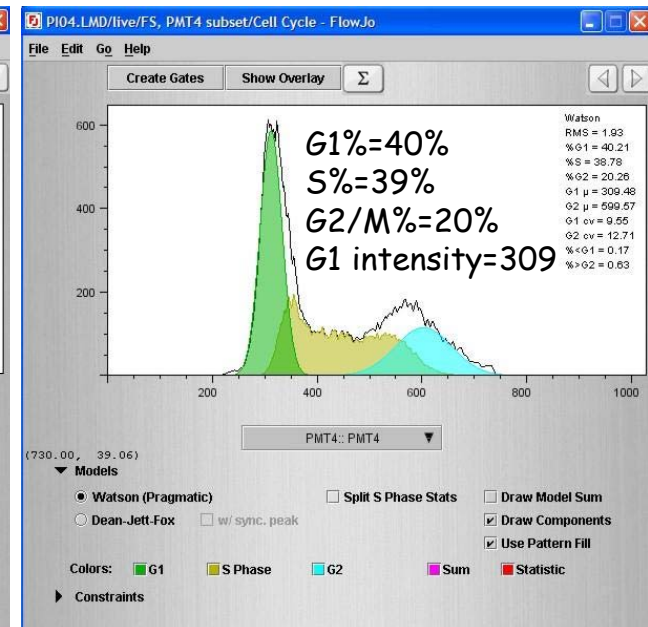
1. a sejteket fixáljuk és permeabilizáljuk, hogy a DNS festék hozzáférjen a DNS-hez
2. a DNS festék (pl. propidium jodid) eljut a sejtmagba, és ott sztöchiometrikusan kötődik a DNS-hez
3. a mért fluoreszcencia intenzitás arányos a sejt DNS tartalmával

Alkalmazási terület:

- daganatos sejtek
  - a normálisnál magasabb DNS tartalommal rendelkeznek
  - magasabb S és G2/M aránnyal rendelkeznek
- apoptotikus sejtek sub-G1 DNS tartalommal rendelkeznek



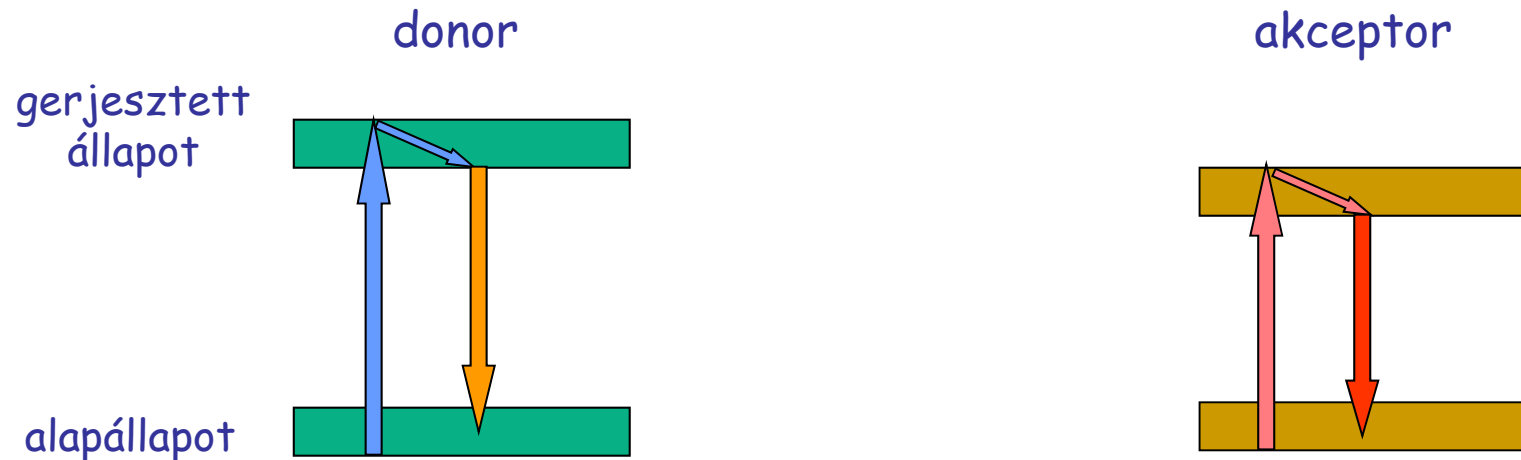
humán diploid sejt



JIMT-1 (humán emlőtumor sejtvonala)



# FRET



- A gerjesztést követően a molekula visszajut az első gerjesztett szint legalsó (ún. vibrációs) alszintjére. Minden további folyamat ebből a helyzetből indul.
- FRET esetében a donor molekula közelében található egy akceptor molekula, amely sugárzás nélküli energiaátadással átveszi a donor energiáját.
- a FRET abban nyilvánul meg, hogy a donor gerjesztését követően az akceptor emittálja a fotont

A FRET sebességi állandóját a következő egyenlet írja le:

$$k_{FRET} = konst \cdot J n^{-4} k_f \kappa^2$$

A FRET hatásfok (E) meredeken függ a donor-akceptor távolságtól (R):

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}$$

$R_0$  - az a távolság, ahol  $E=50\%$   
 $E$  - a FRET-tel relaxálódó gerjesztett donorok aránya

## A FRET mérése áramlási citometriával I.

Szenzitizált emisszió: az akceptor gerjesztése a donoron keresztül (az akceptor fluoreszkál a donor gerjesztését követően,  $F_{AD}$  - akceptor fluoreszcencia intenzitás donor jelenlétében;  $F_A$  - akceptor fluoreszcencia intenzitás donor nélkül)

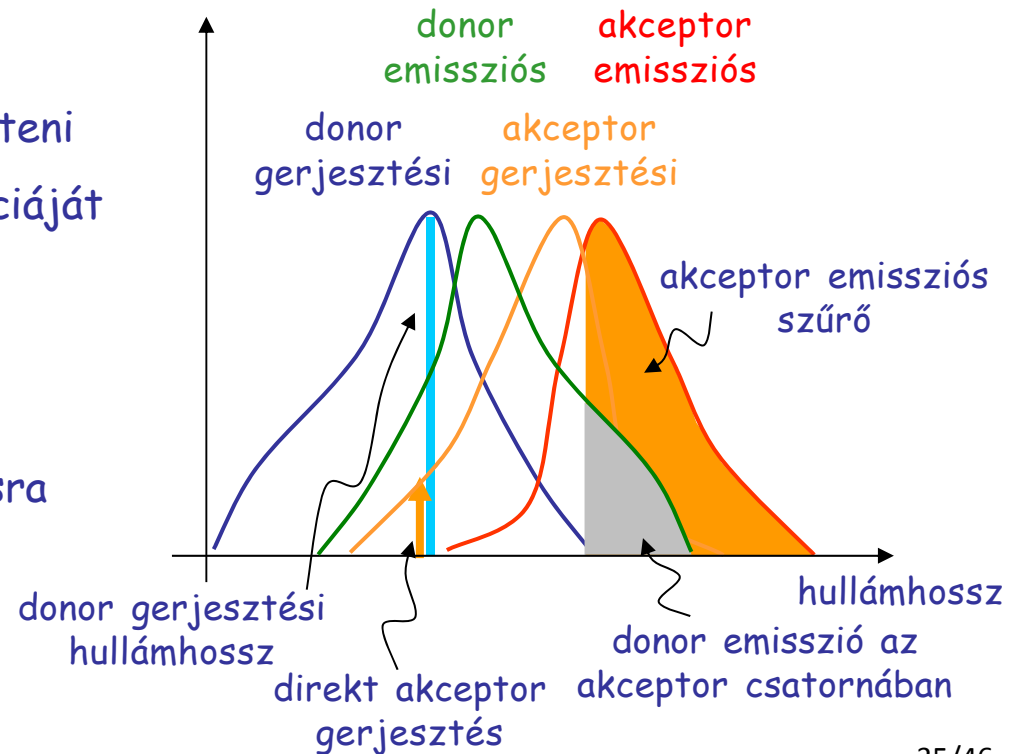
$$E = \left( \frac{F_{AD}}{F_A} - 1 \right) \frac{\varepsilon_A C_A}{\varepsilon_D C_D}$$

Probléma:

- nem lehet specifikusan a donort gerjeszteni
- nem lehet csak az akceptor fluoreszcenciáját detektálni



Az egyes csatornák közötti átvilágításra korrigálni kell.



## A FRET mérése áramlási citometriával II.

$$I_1(\lambda_{ex,D}, \lambda_{em,D}) = I_D(1-E) + \text{donor jel} + \text{akceptor jel} + \text{FRET jel} \frac{S_4}{S_2} \quad \text{donor csatorna}$$

$$I_2(\lambda_{ex,D}, \lambda_{em,A}) = I_D(1-E)S_1 + \text{donor jel} + \text{akceptor jel} + \text{FRET jel} \quad \text{FRET csatorna}$$

$$I_3(\lambda_{ex,A}, \lambda_{em,A}) = I_D(1-E)S_3 + \text{donor jel} + \text{akceptor jel} + \text{FRET jel} \frac{S_3}{S_1} \quad \text{akceptor csatorna}$$

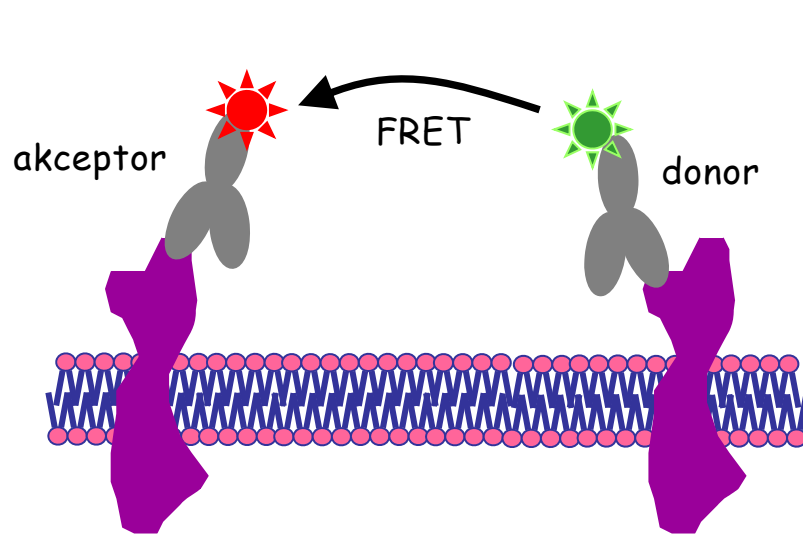
donor jel   akceptor jel   FRET jel

$$S_1 = \frac{I_{2,D}}{I_{1,D}} \quad S_3 = \frac{I_{3,D}}{I_{1,D}} \quad S_2 = \frac{I_{2,A}}{I_{3,A}} \quad S_4 = \frac{I_{1,A}}{I_{3,A}} \quad \alpha = \frac{I_2}{I_1} \frac{\varepsilon_D L_D}{\varepsilon_A L_A}$$

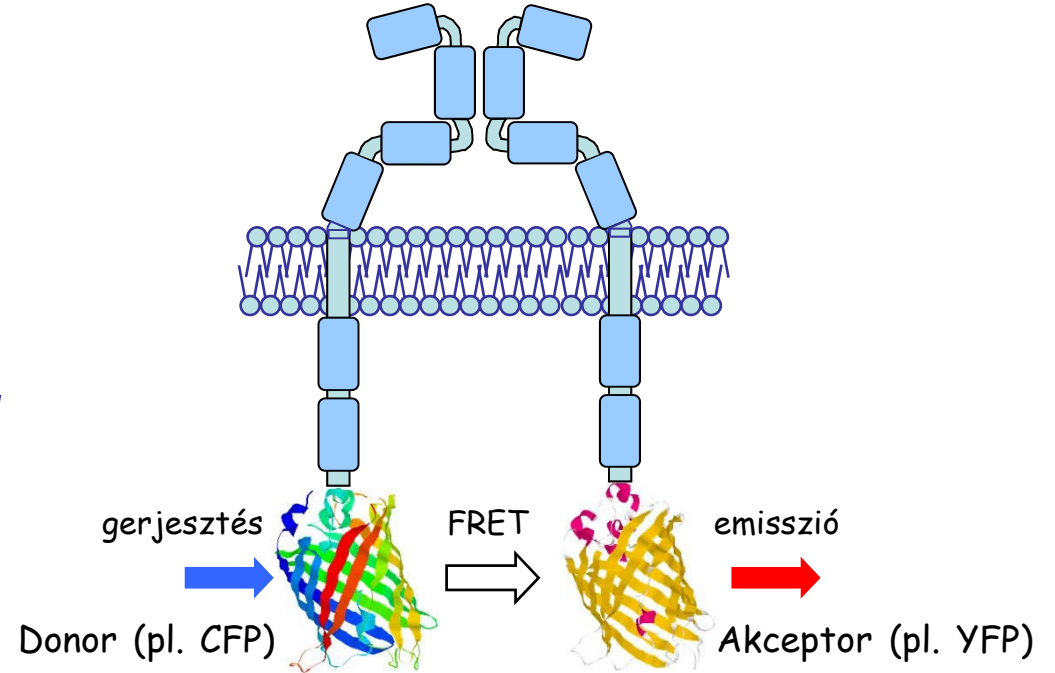
$$\frac{E}{1-E} = A = \frac{1}{\alpha} \left[ \frac{I_1(S_1 - S_2 S_3) + I_2(S_3 S_4 - 1) + I_3(S_2 - S_1 S_4)}{I_1(S_2 S_3 / S_1 - 1) + I_2(S_4 / S_2 - S_3 S_4 / S_1)} \right]$$

# A FRET mérése áramlási citometriával III.

A sejtek fluoreszcens jelzése



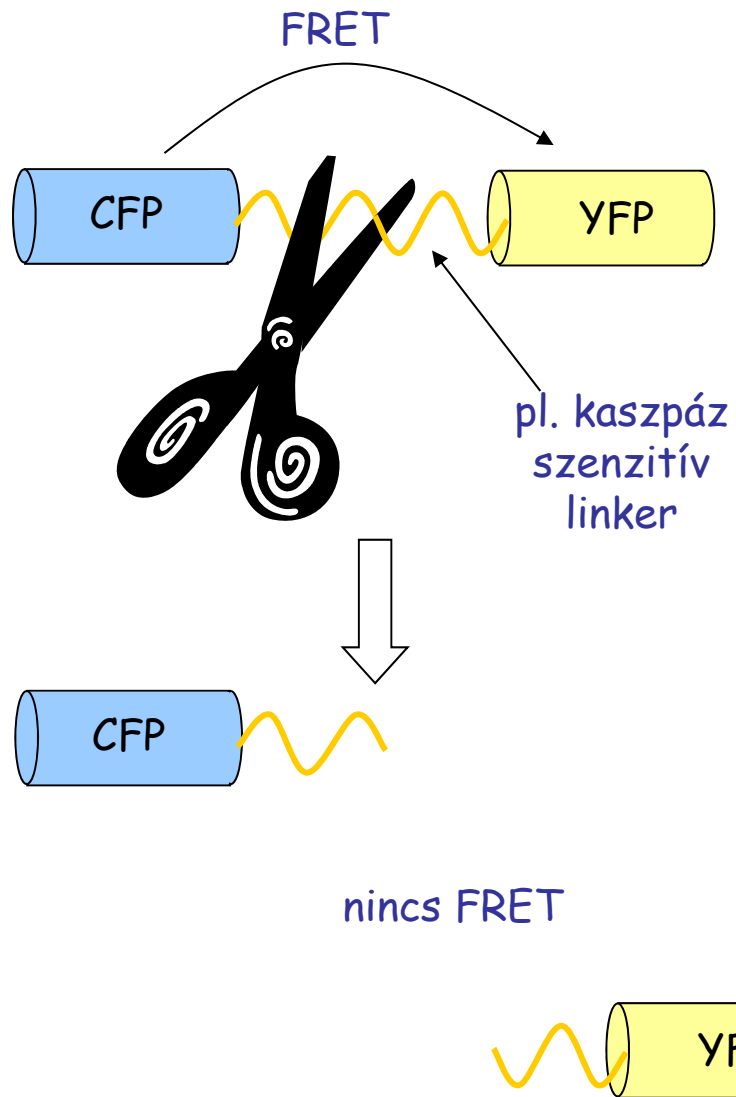
antitesttel vagy Fab-vel



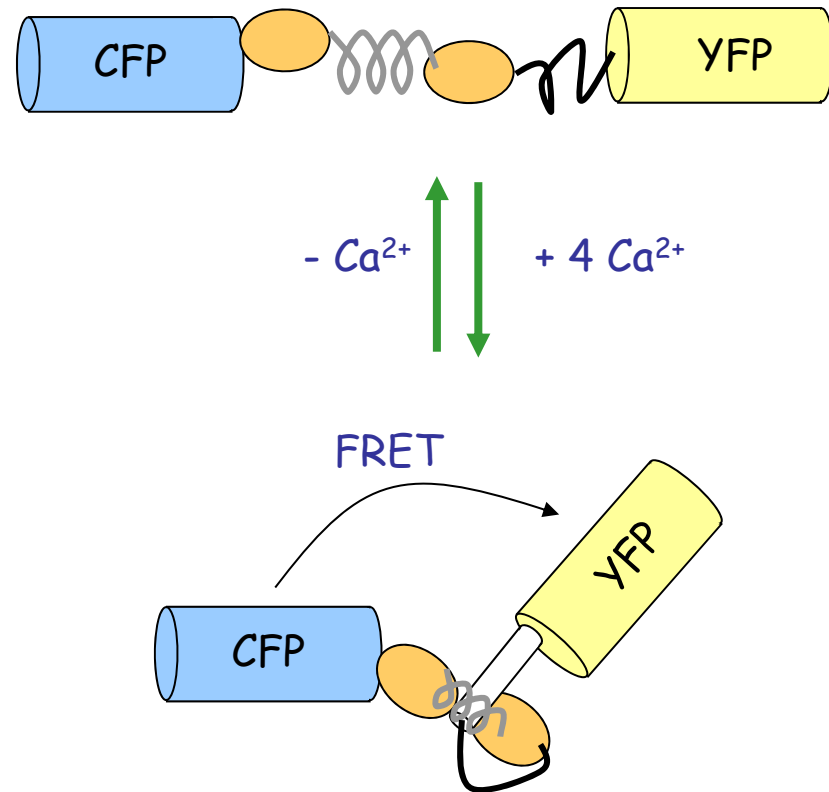
GFP-vel és spektrális  
variánsaival jelölt fúziós  
fehérjékkel

## A FRET alkalmazása intracelluláris enzimaktivitás és ionkoncentráció mérésére

Proteáz szenzorok:



Kalcium szenzorok:



Nature, 388, 882.

# FRET-en alapuló szortírozás

Cytometry, 67A, 86.

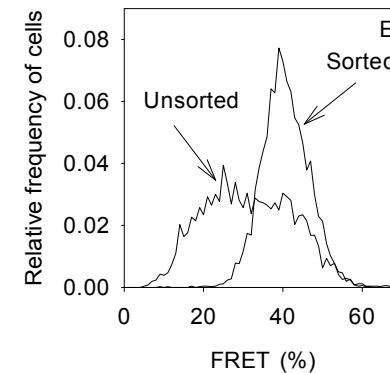
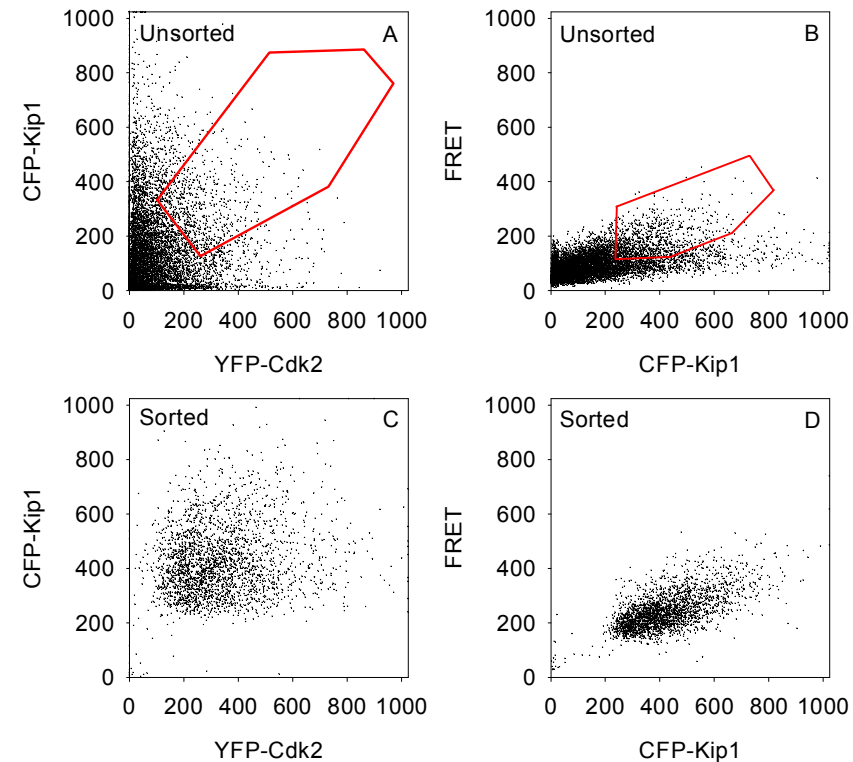
Gomba sejteket YFP-CDK2-vel és CFP-Kip1-gyel transzfektálunk.

Nem szortírozott gombasejtek populációja, melyben FRET-et mutató és nem mutató sejtek keverednek egymással.

A sejteket az A és B részben feltüntetett kapuknak megfelelően szortíroztuk, és a szortírozást ellenőriztük. Olyan sejteket választottunk ki, ahol

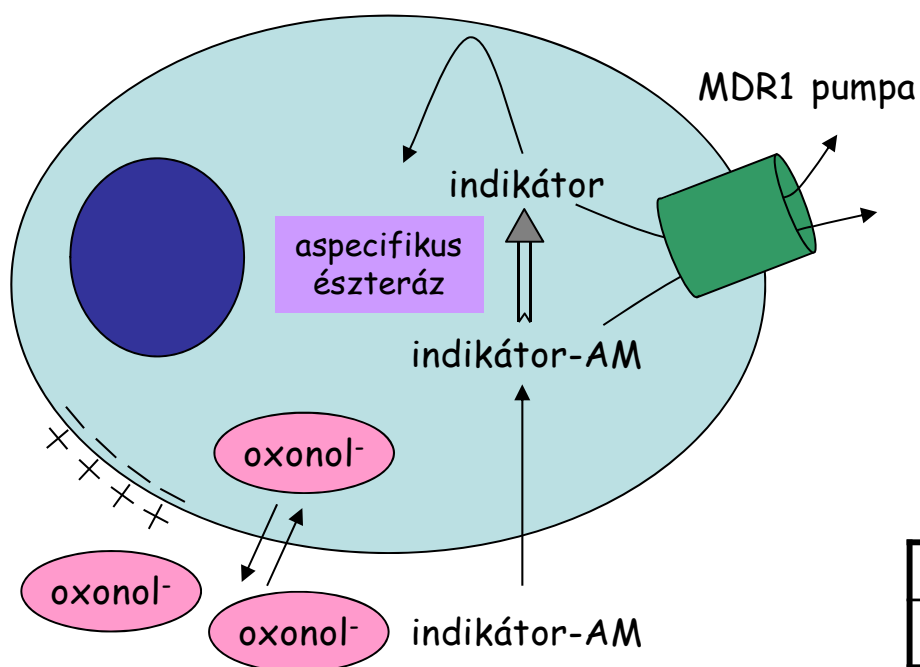
- volt donor és akceptor
- nagy volt a FRET csatornában az intenzitás

A szortírozott sejtekben csak FRET-et mutató sejtek voltak.





## Ionkoncentrációk, membránpotenciál és intracelluláris enzimaktivitás mérése

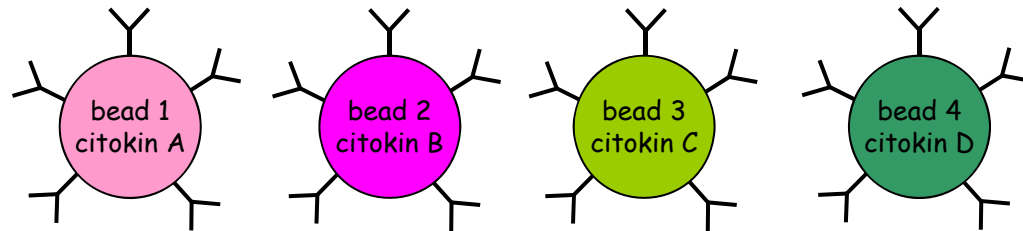


1. Az indikátor hidrofób, acetoxi-metilészter (AM) formája átjut a sejtmembránon.
2. Intracellulárisan aspecifikus észterázok hidrolizálják.
3. A felszabaduló, hidrofil indikátor nem képes az elő sejtek membránján átjutni, ezért intracellulárisan felhalmozódik.
4. Az indikátorok egy részének fluoreszcenciája a környezet ionkoncentrációjától függ.

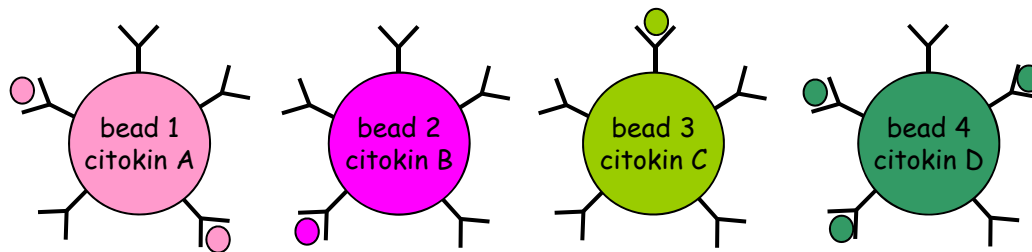
5. multidrog rezisztencia mérése: az MDR pumpák kipumpálják a sejtekből az indikátort és/vagy annak AM formáját. A calcein olyan indikátor, amely nem indikál semmit, tehát csak a felhalmozódását mérjük, ill. annak hiányát MDR-t mutató sejtekben.
6. A negatív töltésű oxonol a membránpotenciálnak (Nernst egyenlet) megfelelően oszlik meg a membrán két oldalán. Depolarizáció esetén nő a sejtben levő oxonol mennyisége, így nő a sejtek fluoreszcencia intenzitása.

| Indikátor neve              | Mért paraméter                                                                                               |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BCECF                       | pH                                                                                                           |
| FURA-2, INDO-1, Fluo-3      | Ca <sup>2+</sup>                                                                                             |
| SBFI                        | Na <sup>+</sup>                                                                                              |
| PBFI                        | K <sup>+</sup>                                                                                               |
| fluoreszcein-diacetát (FDA) | életképesség, mivel a festék nem (nagyon) érzékeny semmire, csak a felhalmozódását mérjük elő sejteken belül |
| calcein                     | multidrog rezisztencia                                                                                       |
| oxonol                      | membránpotenciál                                                                                             |

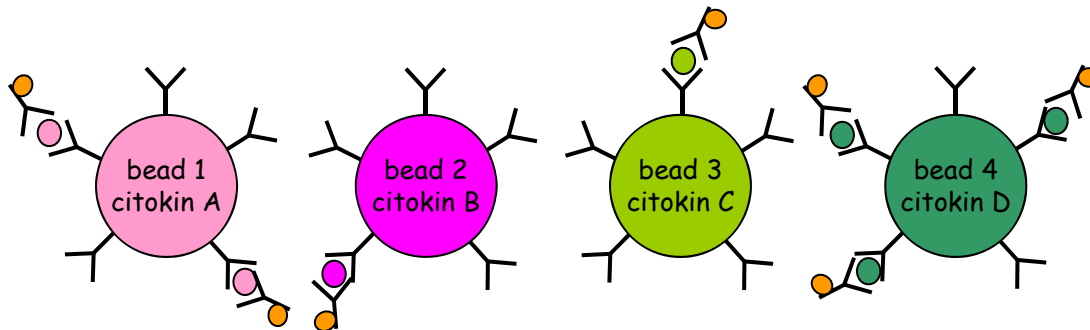
## Multiplex bead analízis



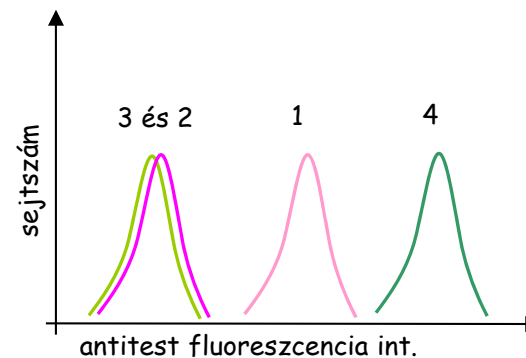
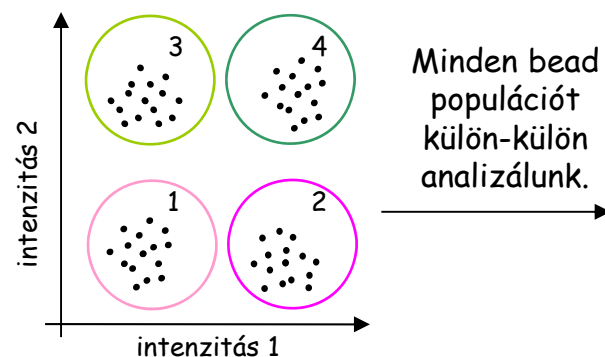
Különböző színű bead-ek, melyekhez különböző citokinekre specifikus antitest van kötve.



A beadek keverékéhez egy sejt lizátumát adják. A beadekhez a lizátumban levő mennyiséggel arányos mennyiségű citokin kötődik.



A mintához a bead-ek színétől eltérő színű fluoreszcens festékekkel jelölt, citokin ellenes detektáló antitesteket adnak, amelyek kötődnek a bead-hez már kikötött citokinhez.

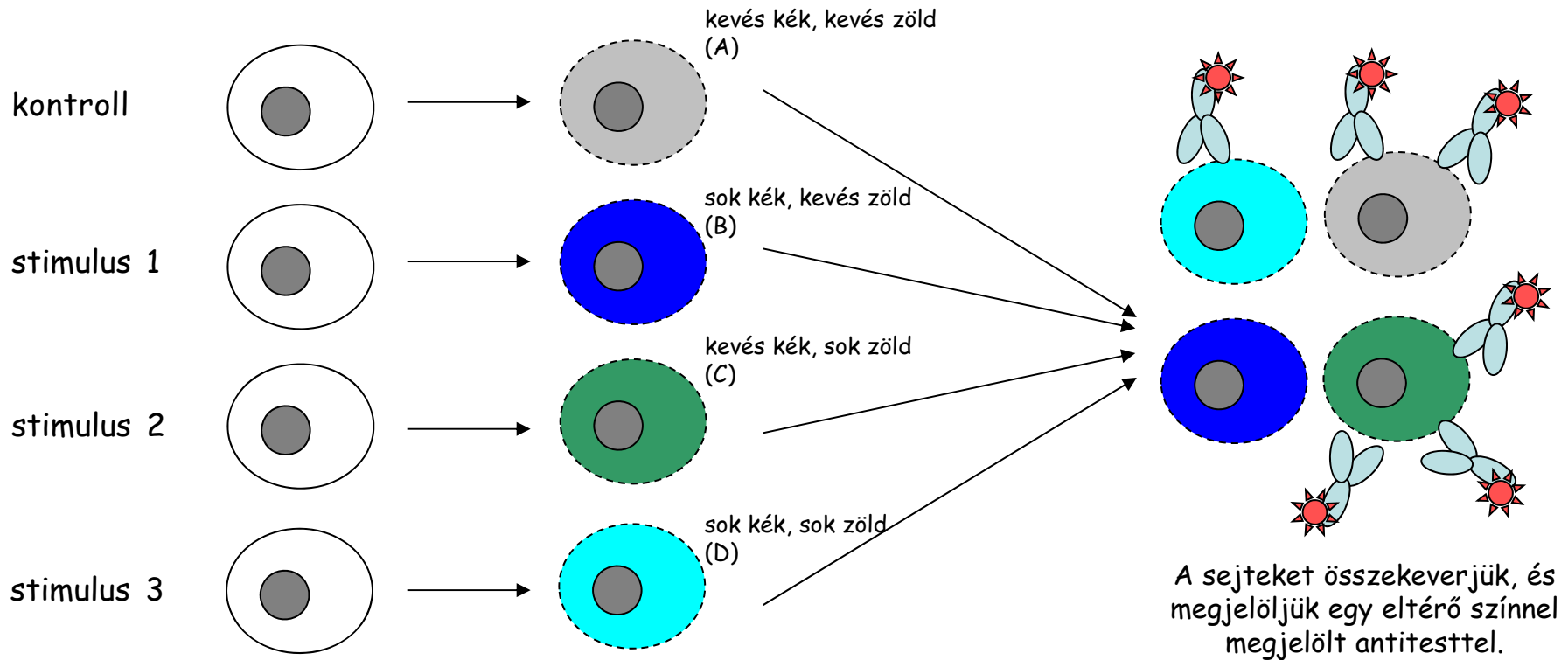


A bead-eket egyszerre lehet az áramlási citométeren futtatni.

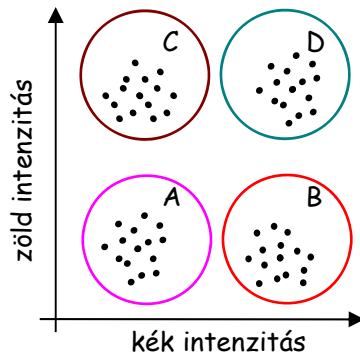
Előny: egy sejten belül egyszerre sok citokin (vagy más fehérje) szintje mérhető.

# FCB: fluorescent cell barcoding (fluoreszcens sejt vonalkódolás)

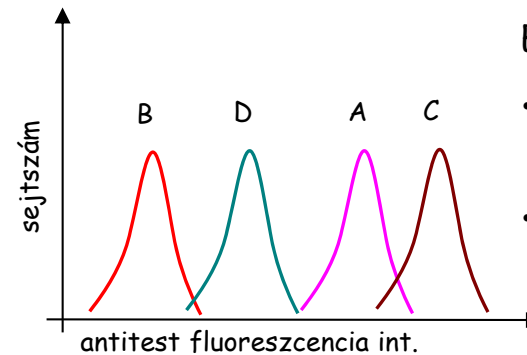
Nat. Methods, 3, 361



A sejteket fixáljuk, permeabilizáljuk, és megjelöljük különböző színű és koncentrációjú festékekkel.



Minden populációt külön-külön analizálunk.

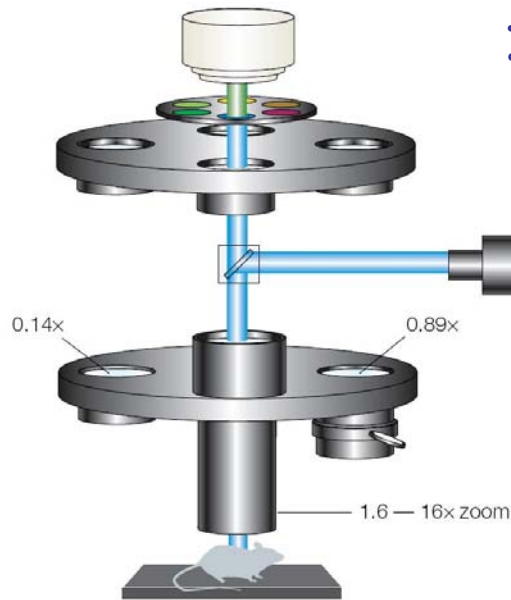


Előny:

- alacsonyabb antitest felhasználás
- egyszerre sok minta vizsgálható

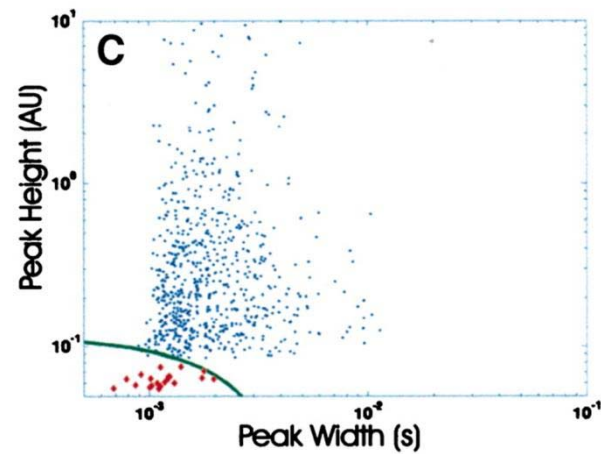
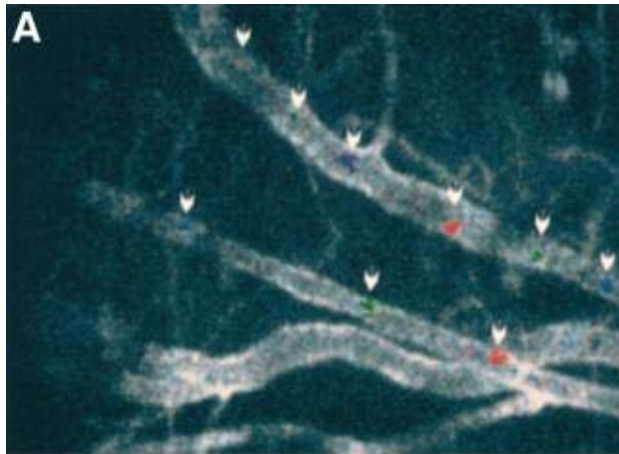
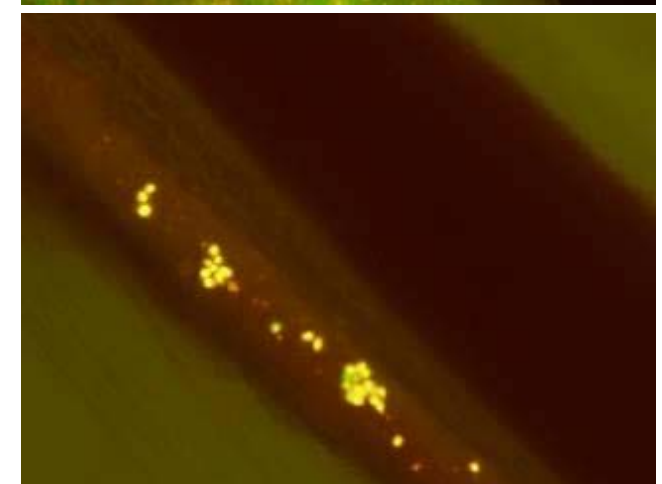
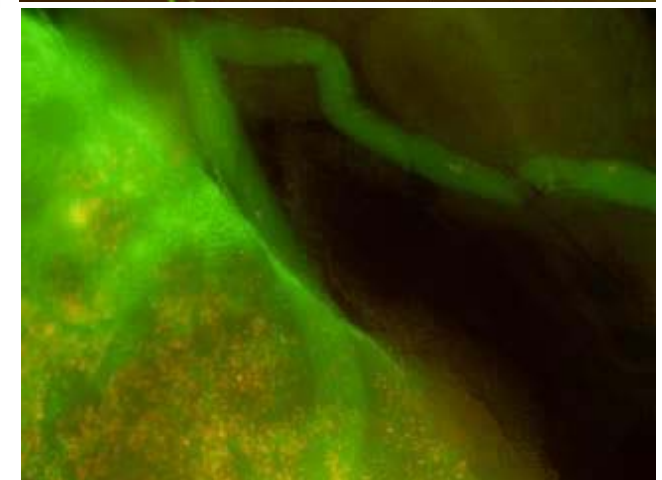
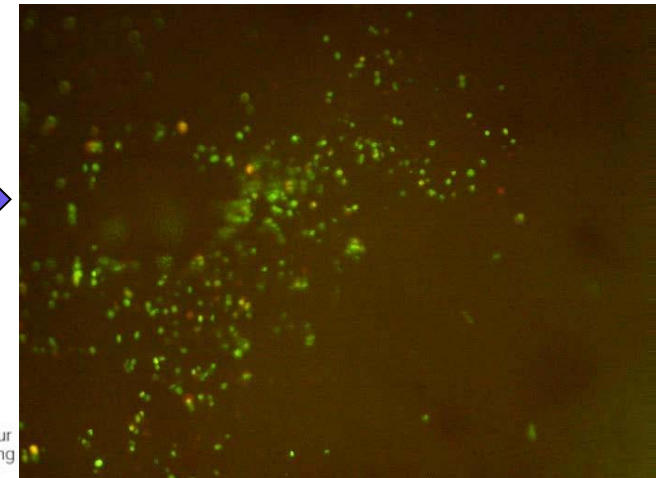
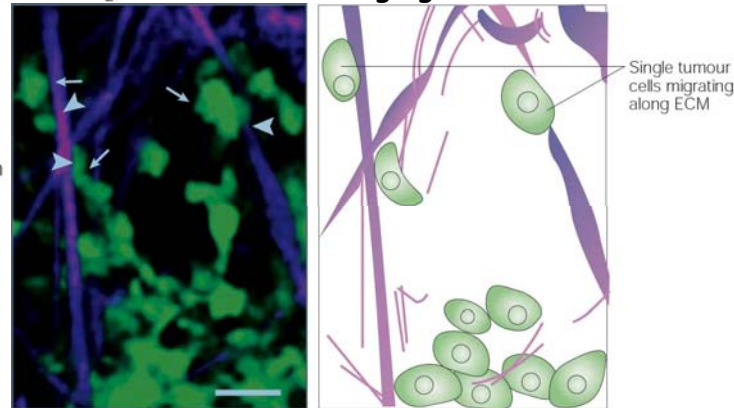
## In vivo áramlási citometria

Daganatsejtek követhetők  
nyomon nyirokerekben *in vivo*.  
Cancer Res 67:8223 (2007)



Olympus OV100

### In vivo imaging



Fluoreszcensen jelzett sejtek vizsgálhatók élő állatban, és az áramlási  
citometriához hasonló ábrák készíthetők.  
Cancer Res 64:5044 (2004), Nat. Rev. Canc. 3: 921 (2003)



# Átmenet a mikroszkópia és az áramlási citometria között

## Áramlási citometria:

- sok szuszpenziós sejt analízise gyorsan, automatikusan
- szubcelluláris felbontóképesség nélkül

## Mikroszkópia:

- kevés kitapadt sejt analízise jelentős felhasználói munka árán
- szubcelluláris információ

## Képalkotó áramlási citometria:

- áramló sejtekről képeket készít
- a sejtek fluoreszcencia intenzitását az áramlási citométerhez hasonlóan megméri, áramlási citométerhez hasonló hisztogram és dot plot formájában megjeleníti
- az egy és kétdimenziós hisztogramon kiválasztott sejtek képeit vissza lehet keresni
- a sejteken kolokalizációs és morfológiai analízist is lehet végezni



## Lézer scanning citométer (LSC):

- tárgylemezen levő sejteket vizsgál
- az egész tárgylemezt (tehát nemcsak egy mikroszkóp látóteret) beszkenel alacsony NA-jú objektívvel
- a sejteket automatikusan azonosítja
- a sejteken morfológiai és kolokalizációs vizsgálatokat is lehet végezni
- a sejtek fluoreszcencia intenzitás adatait az áramlási citométeren megszokott egy- és kétdimenziós hisztogram formájában is meg lehet jeleníteni

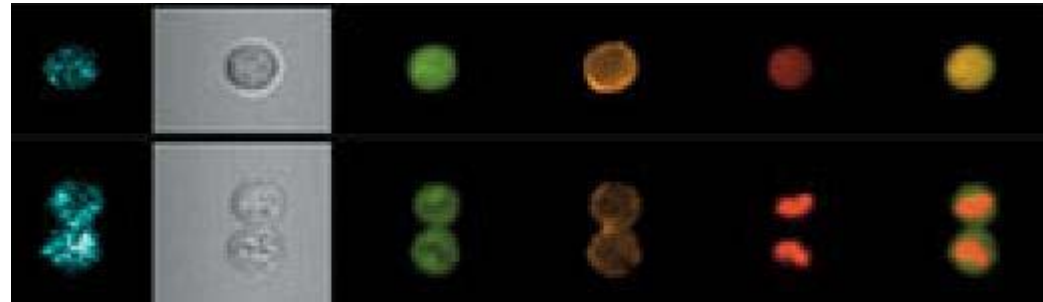


sok sejt mérése automatikusan szubcelluláris felbontóképességgel

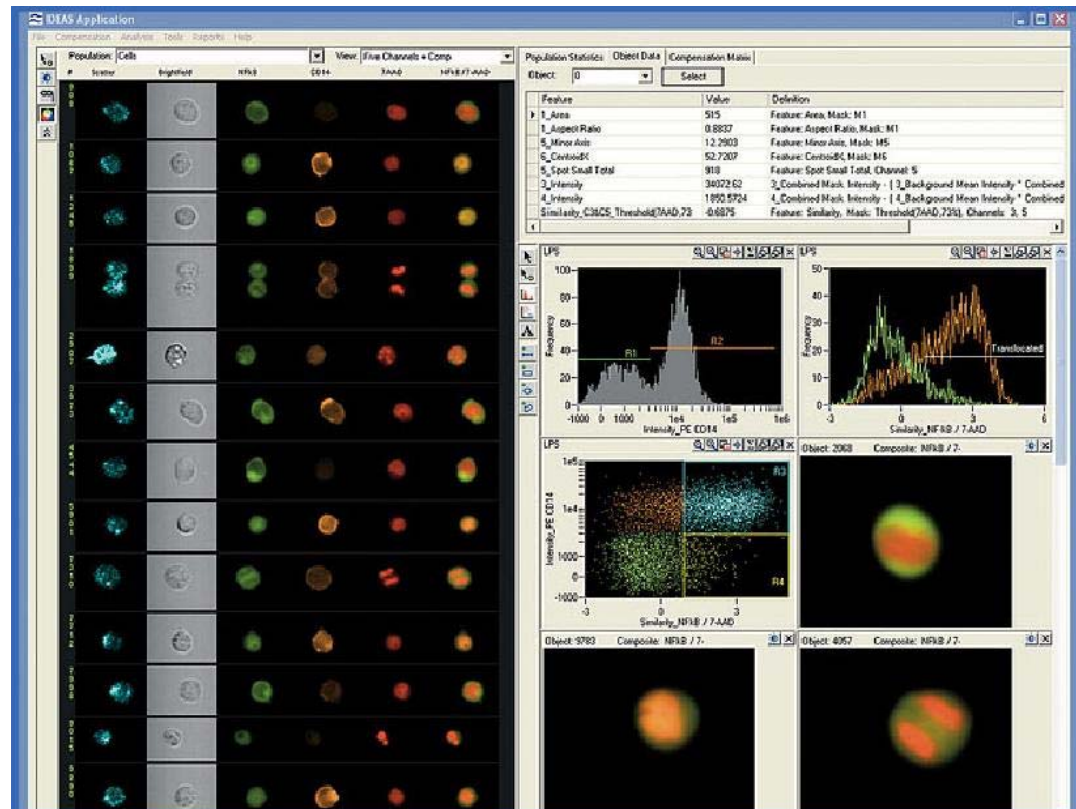
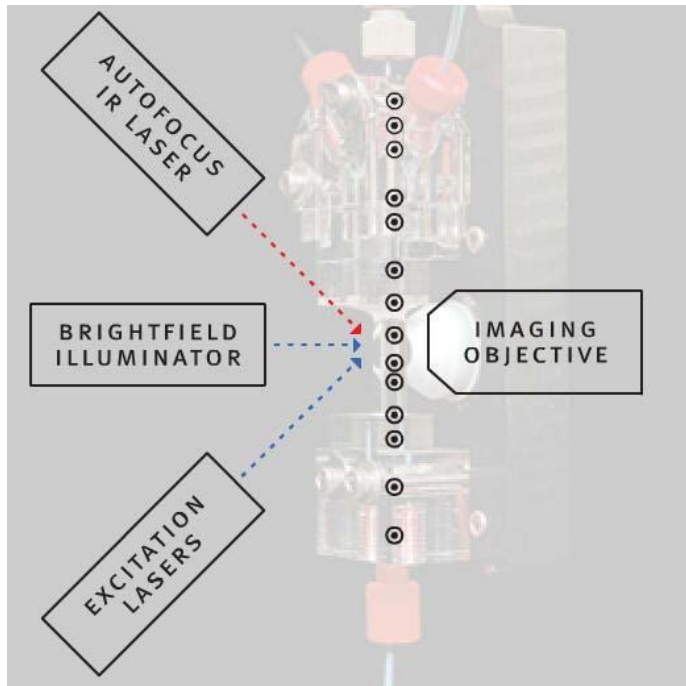
# Képkotó áramlási citometria (imaging flow cytometry)

1. A sejtek az áramlási citometriában megszokotthoz hasonló áramlási cellában áramlanak.
2. Az áramlási cellában a sejteknek nemcsak az összes (vagy maximális) fluoreszcencia intenzitását mérjük meg, hanem róluk kép is készül.

3. A sejtek képeit a készülék elmenti...



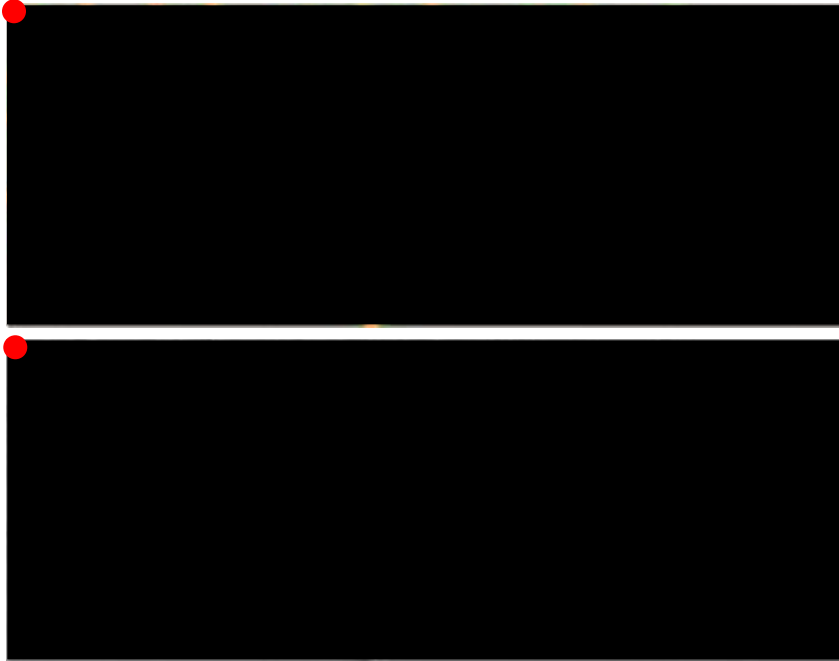
4. ... és a sejtek fluoreszcencia adatait az áramlási citométerhez hasonlóan elemezhetjük.



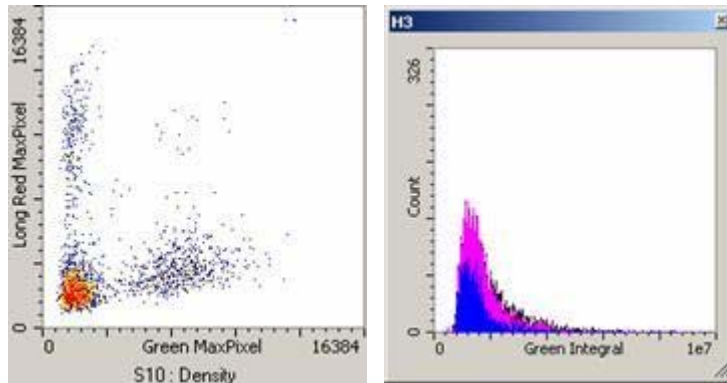
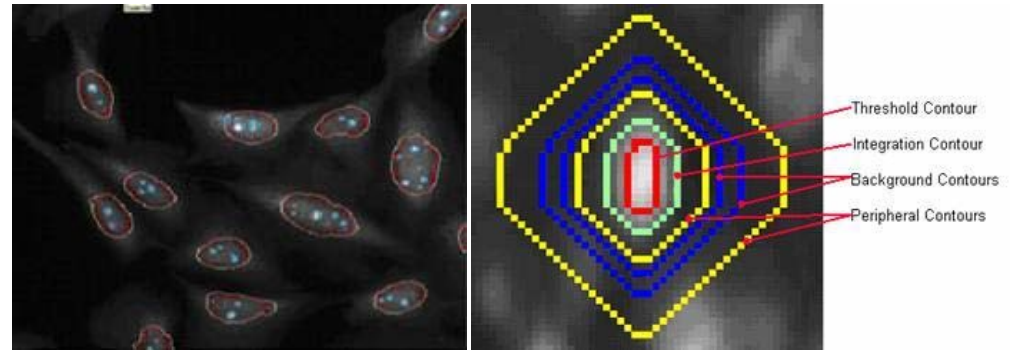


## Laser scanning cytometry (LSC)

1. A mikroszkóp tárgylemezt a lézersugár végigpásztázza.



2. Magfestés alapján a sejtmagokat a szoftver azonosítja, és a magot, ill. a körülötte levő citoplazmát körülrajzolja (szegmentálás).



3. A sejtek fluoreszcencia intenzitás értékeit a gép kiszámolja, és az áramlási citométeren megszokotthoz hasonlóan elemzi.