

FlowCytometry

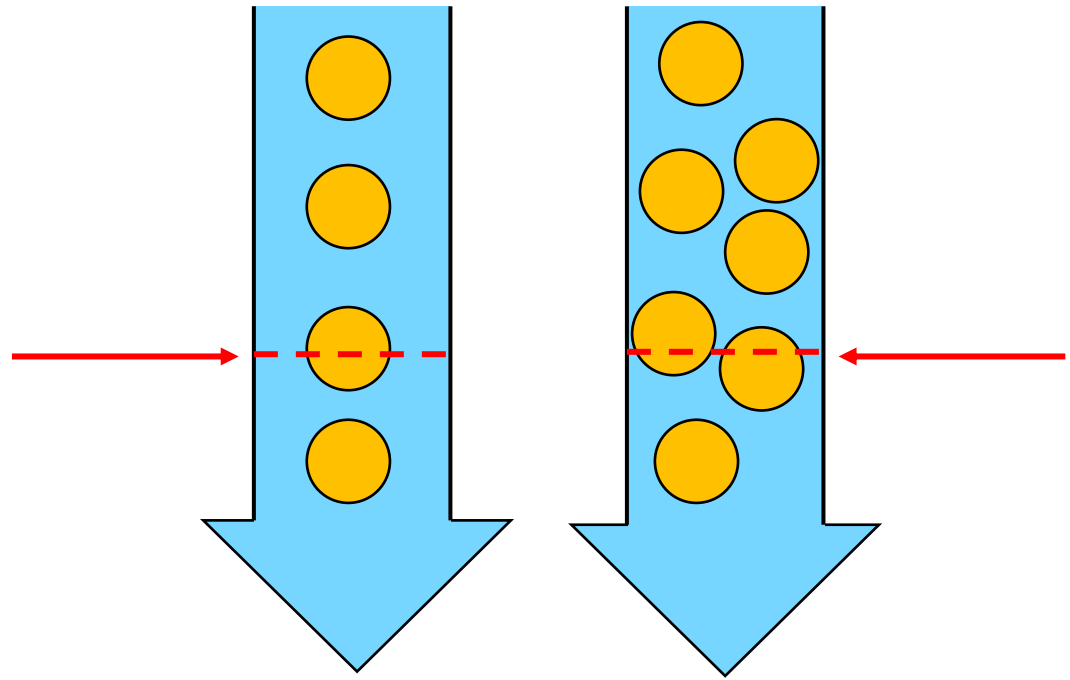
Metry
Measurement

Cyto
Cells

Flow
Flusso

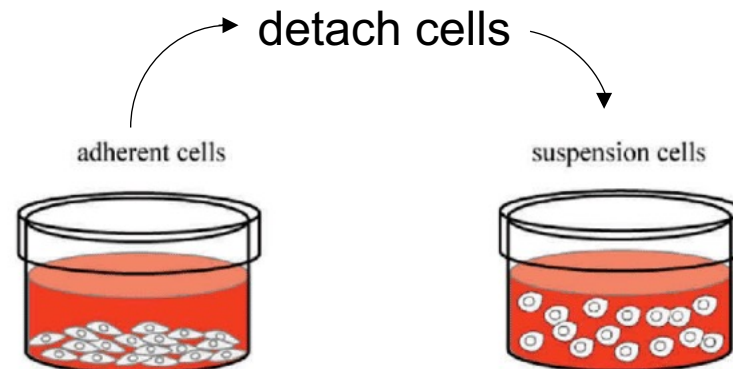
FlowCytometry

- Flusso di cellule in “**fila indiana**”



FlowCytometry

- Flusso di cellule in “**fila indiana**”
- Cellule in **sospensione**



FlowCytoMetry

- Flusso di cellule in “fila indiana”
- Cellule in sospensione
- Attraverso un volume illuminato dove le cellule **disperdono la luce ed emettono fluorescenza**
- segnale convertito in **valori digitali** immagazzinati in un computer

VANTAGGI DELLA CITOFUORIMETRIA

- **multiparametricità**

possibilità di mettere in relazione più caratteristiche della stessa cellula (anche fino a 20 parametri contemporaneamente)

- analisi di grandi **quantità** di cellule
- relazione lineare tra segnale misurato e concentrazione dell'analita in esame
- riproducibilità ed affidabilità **statistica** delle acquisizioni
- grande sensibilità
- rapidità di analisi
- possibilità di ulteriori analisi a posteriori
DIVA, CELL QUEST, FLOW JO
 - FACS: purificazione di una popolazione cellulare

IL CITOFUORIMETRO

E' uno strumento di laboratorio che permette un'analisi veloce ed automatica di **popolazioni cellulari in sospensione**

misurandone le caratteristiche **fisiche** e/o **biochimiche** (volume, granulosità, fluorescenza).

Consente di:

- **quantificare e memorizzare** contemporaneamente più parametri per ogni cellula che compone la popolazione
- **analizzare** i dati ottenuti anche dopo l'acquisizione

ELEMENTI DEL CITOFLUORIMETRO

Sistema fluidico

trasporto del campione nella cella di analisi
FLUSSO UNICELLULARE e
UNIDIREZIONALE

Sistema di eccitazione

una o più sorgenti
luminose

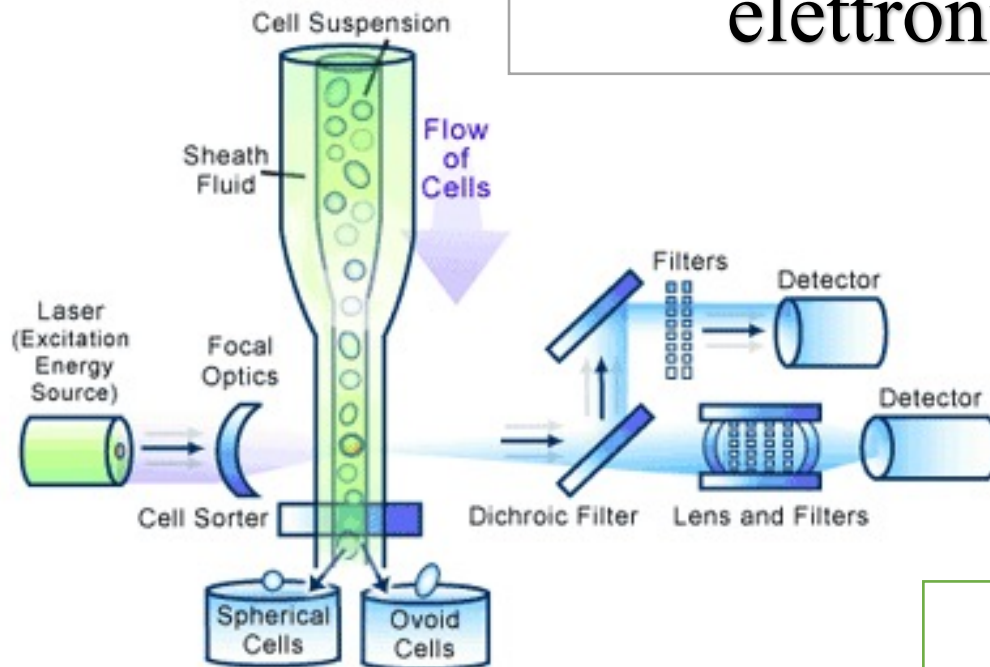
Sistema ottico elettronico

raccoglie ed elabora i segnali
lenti, specchi e filtri che
inviano i segnali ai
fotomoltiplicatori che ne
permettono l'acquisizione sotto
forma di dati digitali.

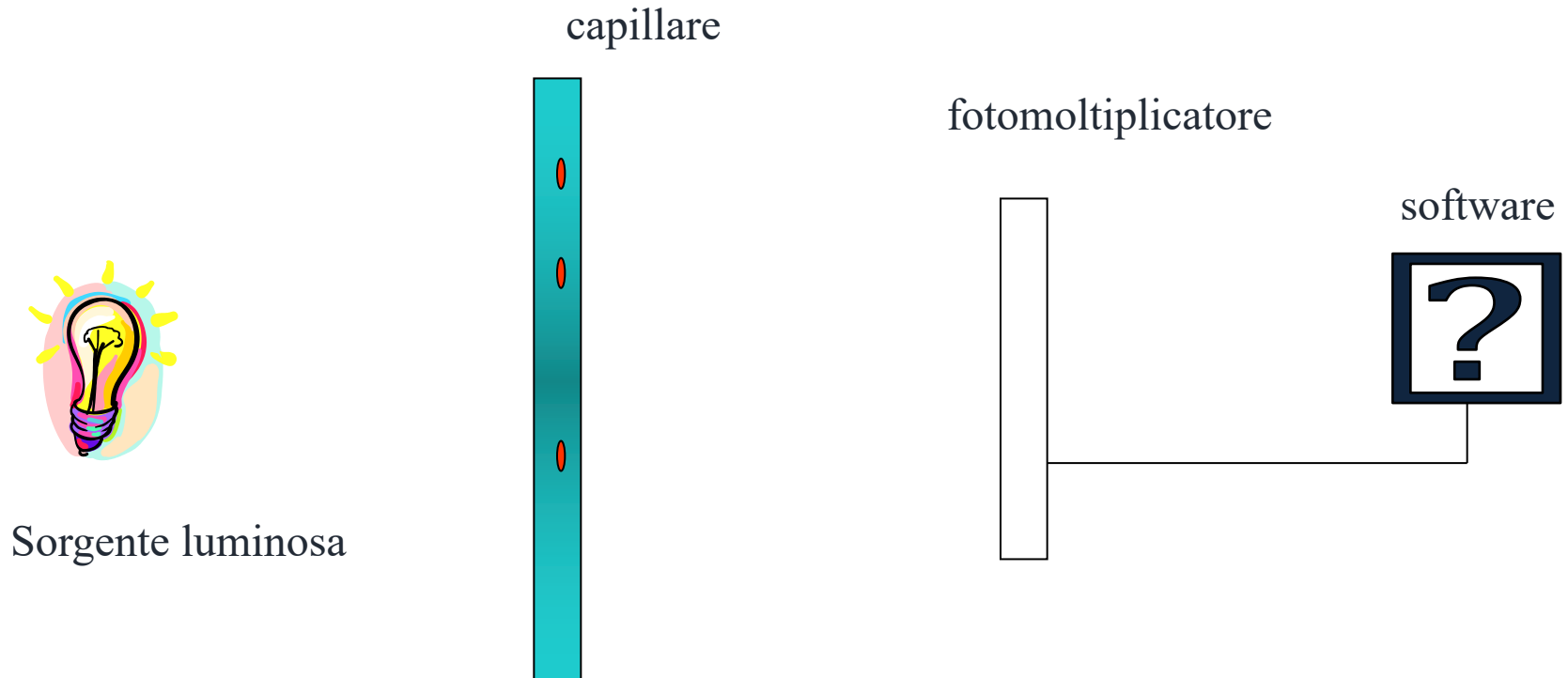
computer

tramite specifici programmi, permette (il controllo dello strumento) e l'analisi dei dati da parte di un operatore mediante una rappresentazione grafica (DIVA, FLOW JO, CELL QUEST)

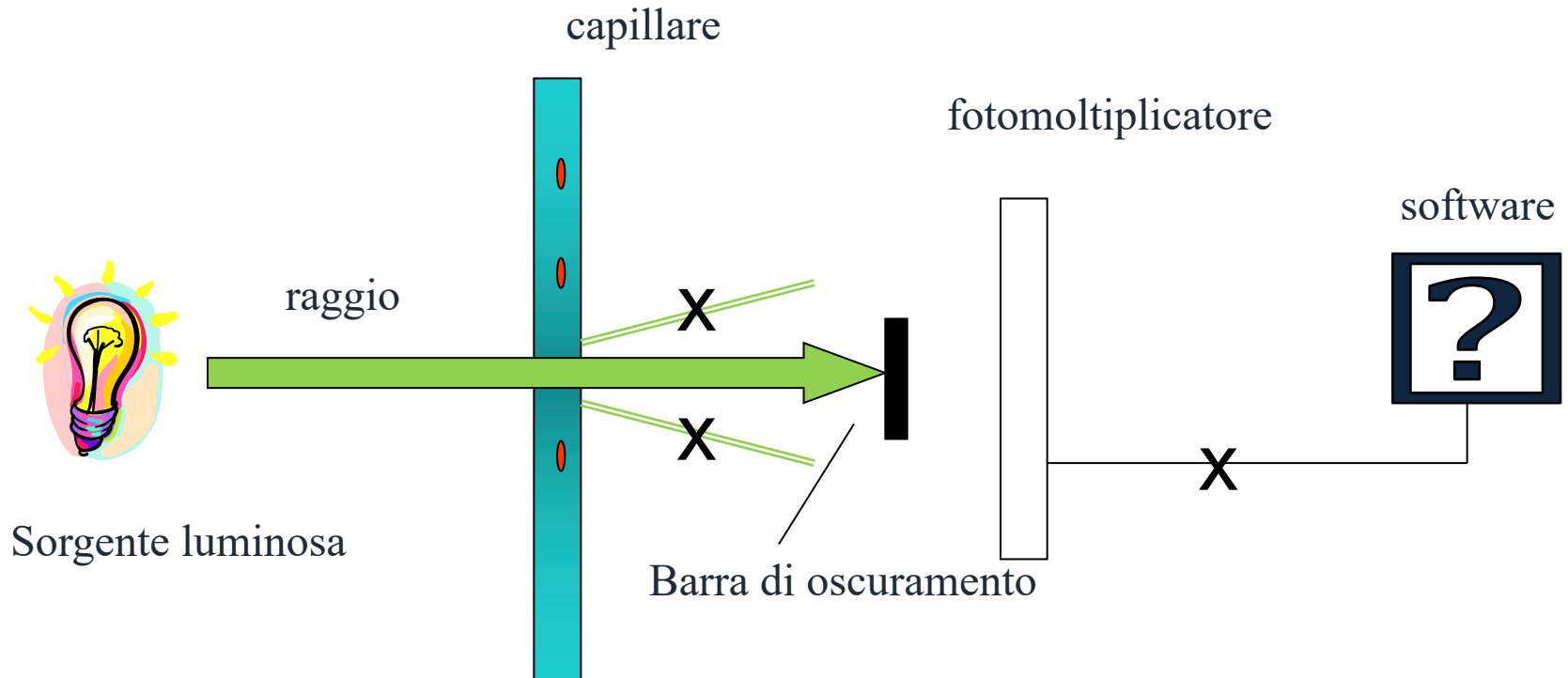
SORTER



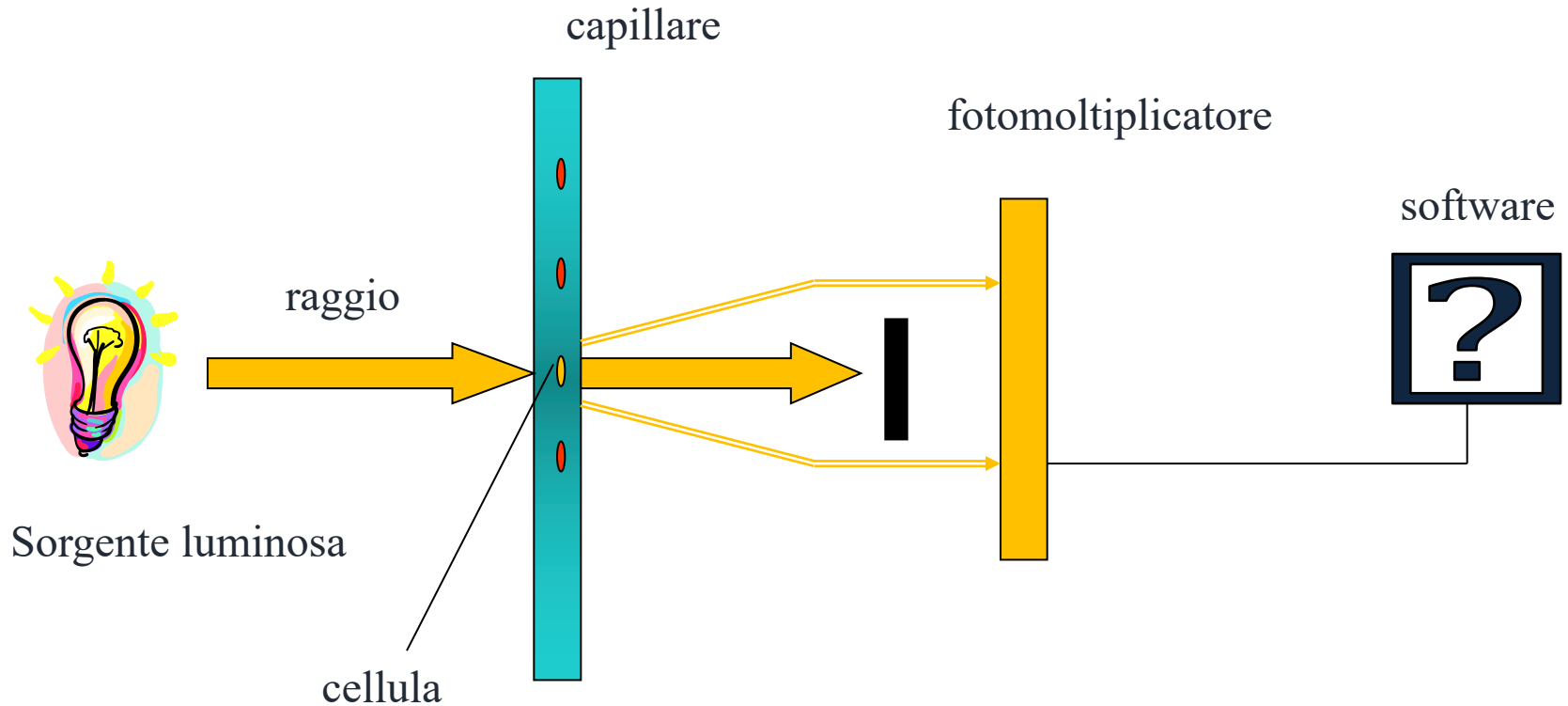
SCHEMA DI UN CITOFLUORIMETRO



SCHEMA DI UN CITOFLUORIMETRO



SCHEMA DI UN CITOFLUORIMETRO

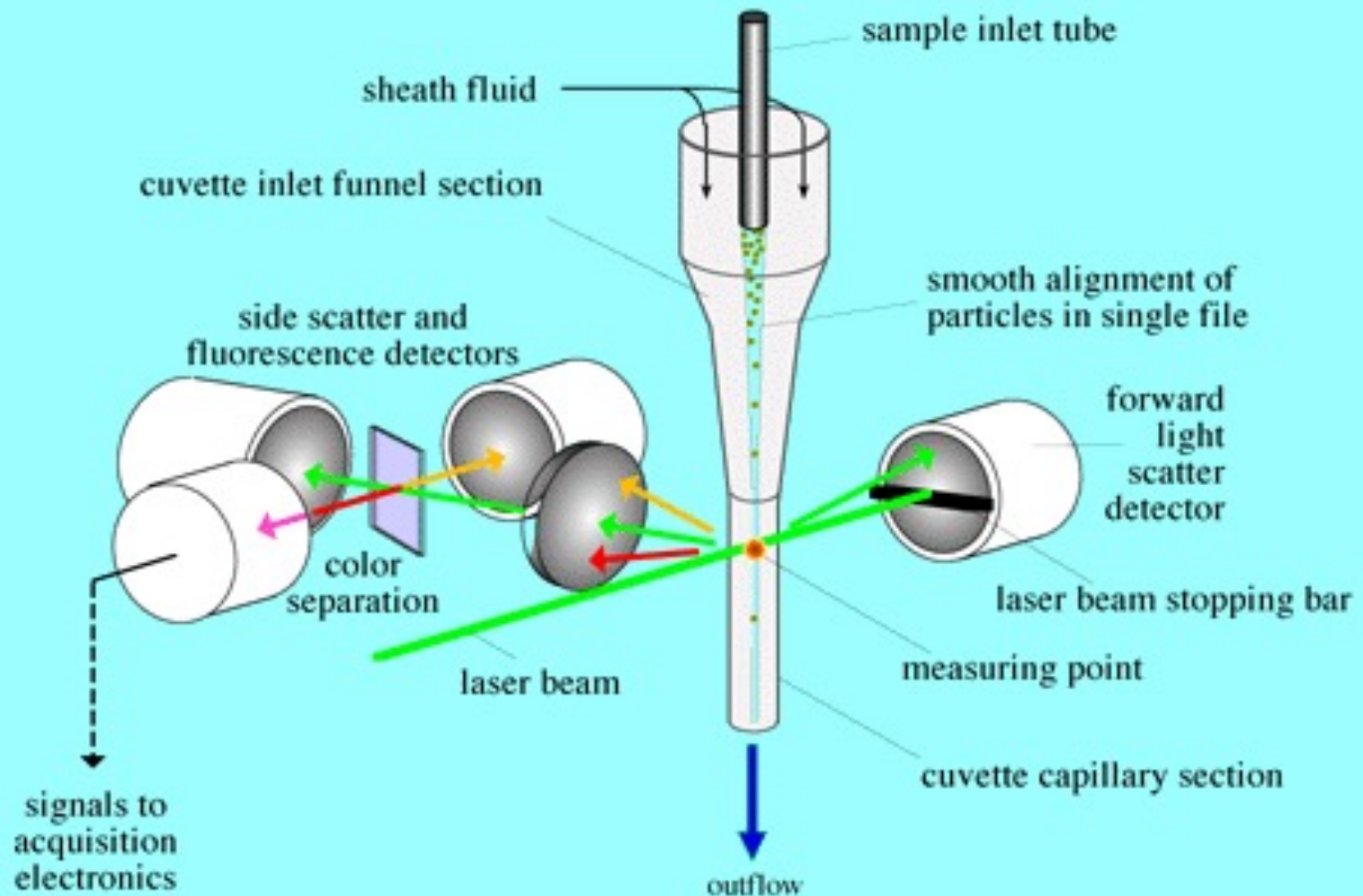


Camera a flusso → singole cellule in fila indiana → colpite dalla luce di un raggio laser → riflettono/rifrattono la luce ed emettono fluorescenza.

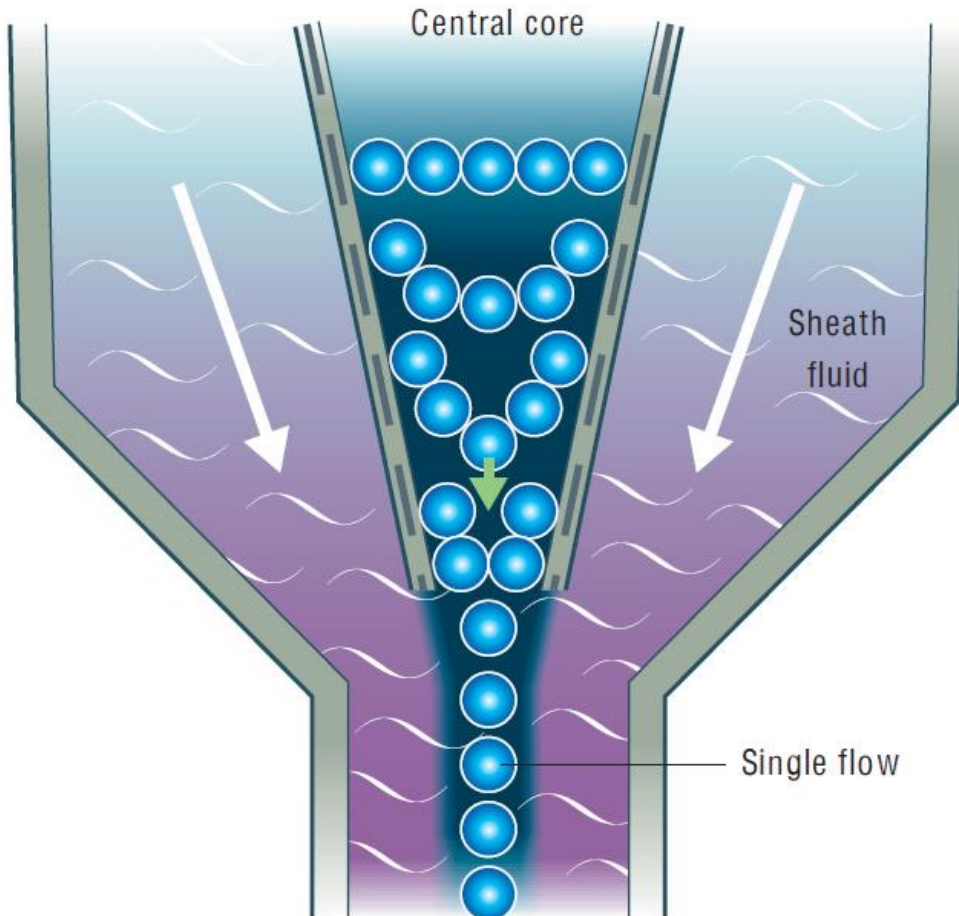
Si generano così dei segnali che vengono raccolti e trasformati in segnali digitali e inviati ad un computer.

CITOMETRO A FLUSSO

Flow cytometer operating principle



Sistema fluidico per il trasporto del campione nella cella di analisi



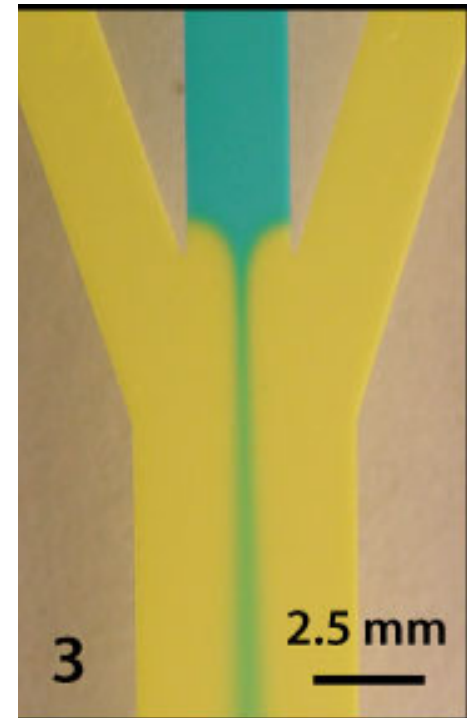
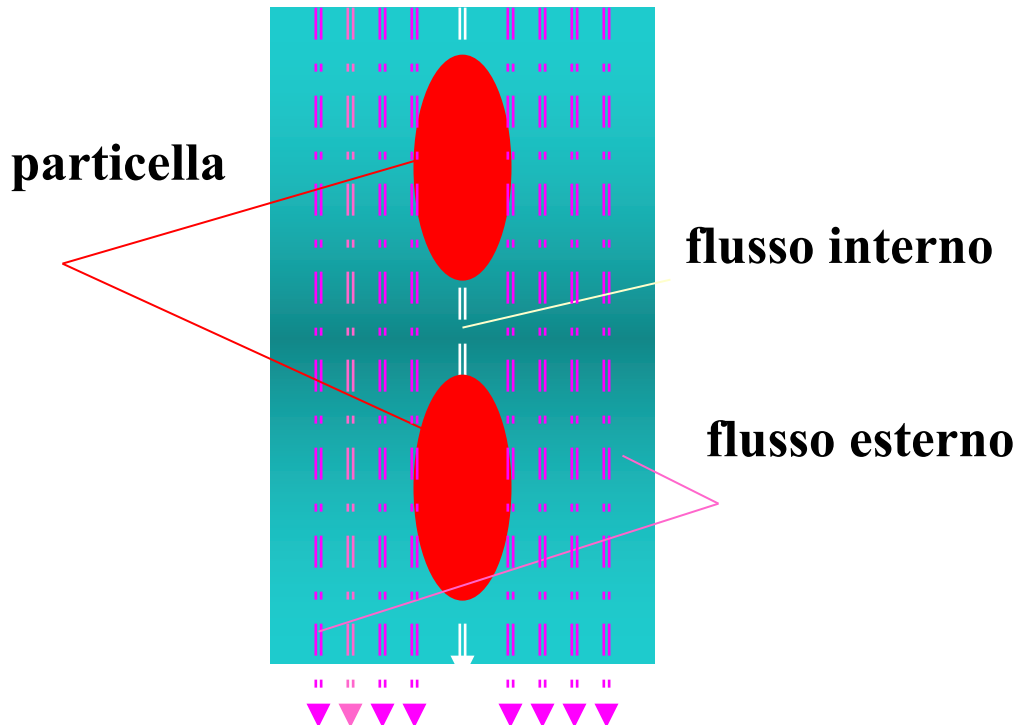
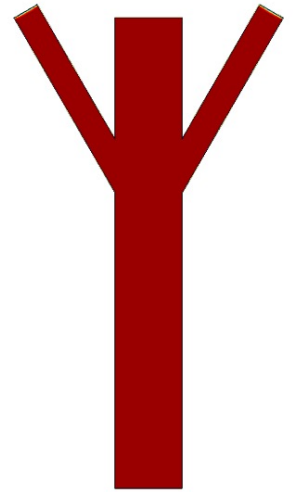
Hydrodynamic Focusing

Il campione viene spinto con pressione verso il punto di misura situato all'interno della camera a flusso, in cui avviene l'allineamento in **singola fila delle cellule**.

La pressione di spinta consente di contare centinaia di cellule al secondo

Flusso laminare

In tali condizioni di flusso si possono considerare due regimi fluidici coassiali: quello interno (*core flow*) contiene le particelle, quello esterno (*sheath flow*) mantiene queste ultime lungo l'asse ideale di flusso.

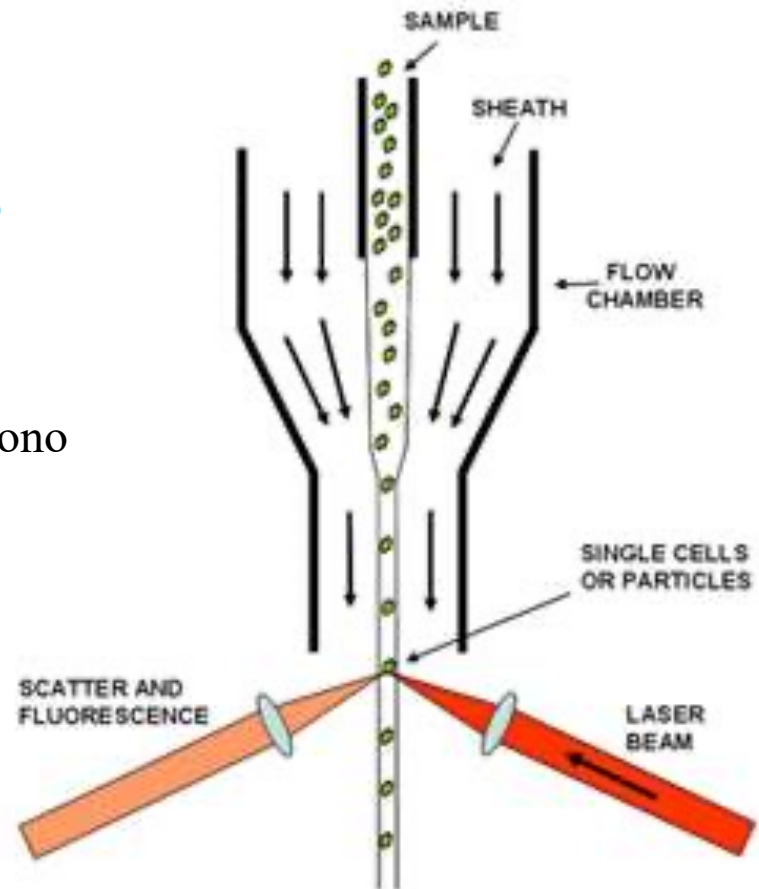


Il **sistema fluidico** è di fondamentale importanza in quanto può influenzare il segnale letto dal rilevatore.

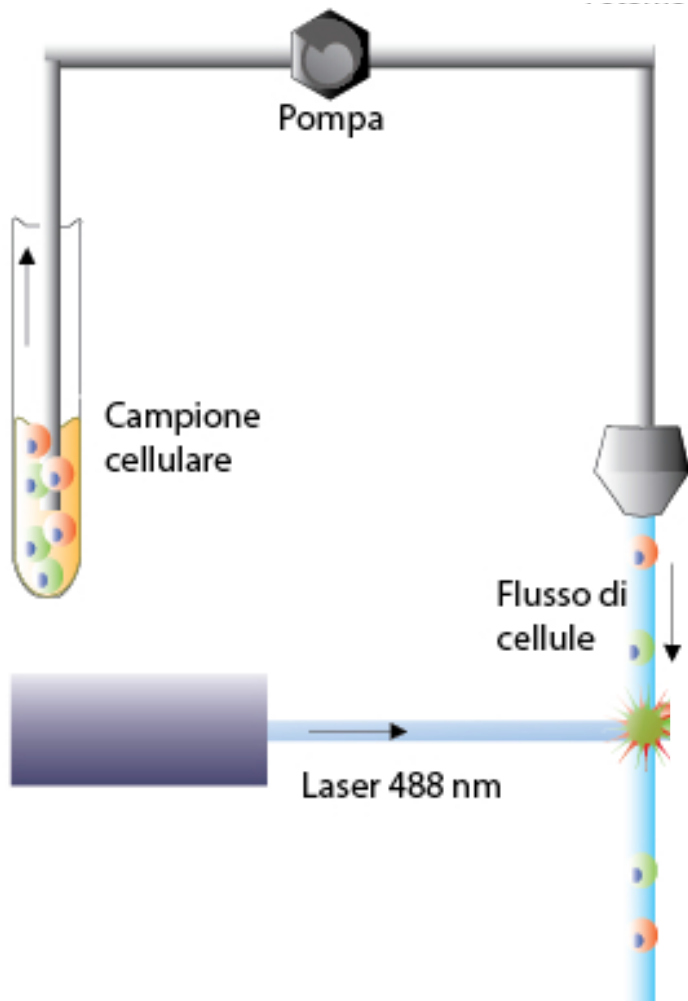
Poiché il citofluorimetro rilevi una ad una le particelle presenti nel campione di partenza in maniera omogenea è necessario che lo strumento sia dotato di un sistema che immetta nel capillare **ogni singola particella nello stesso punto**.

E' necessario che nel capillare si instauri un **flusso laminare** (non turbolento).

In condizioni di flusso laminare le forze di inerzia idrodinamica esercitate sulle particelle le mantengono durante il loro moto al centro del capillare (*idrofocalizzazione del flusso*).



Schema di un citofluorimetro a flusso



Sistema di eccitazione

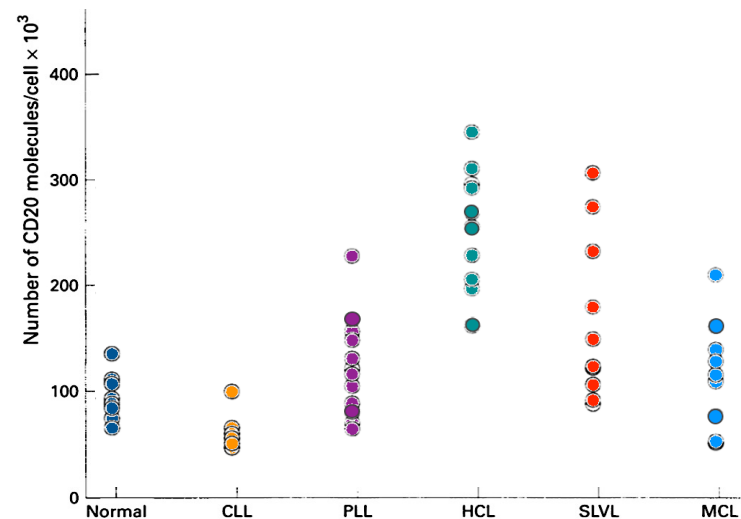
costituito da una o più sorgenti luminose che generano segnali monocromatici e unidirezionali che intercettano le cellule nella cella di analisi.

- I citometri con sorgente a **lampada ad arco** (più economici perché le lampade a vapori di Mercurio e Xenon non richiedono raffreddamento).
- I citometri con sorgente a **luce laser**
 - sono usati in immunologia ed ematologia, settori in cui vengono utilizzati maggiormente i fluorocromi.
 - Il laser consente di misurare minime quantità di fluorocromo.

J Clin Pathol 1998;51:364-369

Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias

Lia Ginaldi, Massimo De Martinis, Estella Matutes, Nahla Farahat, Ricardo Morilla, Daniel Catovsky



Sistema di eccitazione

costituito da una o più sorgenti luminose che generano segnali monocromatici e unidirezionali che intercettano le cellule nella cella di analisi.

- I citometri con sorgente a **lampada ad arco** (più economici perché le lampade a vapori di Mercurio e Xenon non richiedono raffreddamento).
- I citometri con sorgente a **luce laser**
 - sono usati in immunologia ed ematologia, settori in cui vengono utilizzati maggiormente i fluorocromi.
 - Il laser consente di misurare minime quantità di fluorocromo.
 - Nella maggior parte degli strumenti è impiegato un **laser a ioni Argon**, di potenza variabile, centrato su una lunghezza di **488nm (blu)**.
Questa lunghezza d'onda consente un'efficiente misura dei parametri fisici e può eccitare contemporaneamente diversi fluorocromi.

Per altre lunghezze d'onda si usano laser al Krypton (350nm), Elio neon (630nm), ecc...

Sistema di eccitazione

BD FACS ARIA IIIu optical configuration

FACS
ARIA IIIu

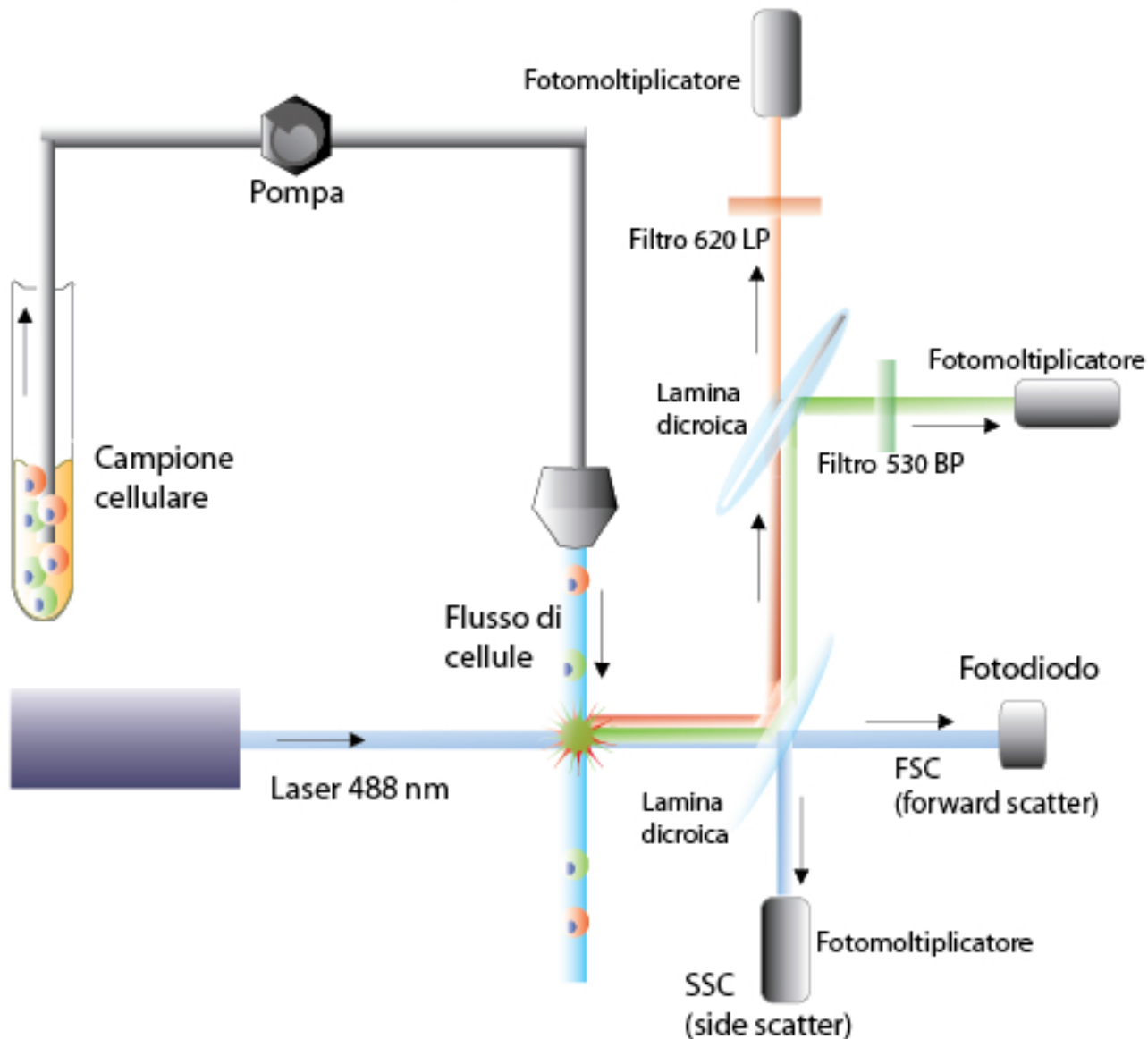
Laser (Excitation)	PMTs	BP Filters (Emission)	LP mirrors	Fluorochromes (examples)
Blue 488 nm	A FL1	695/40	655	PerCP, PerCP-Cy5.5, PerCP-eFluor 710
	B FL 2	530/30	505	FITC, Alexa 488, GFP, SYTOX Green, YFP
	C SSC	488/10		SSC
Red 633 nm	A FL 3	780/60	735	APC-Cy7, APC-H7, DRAQ5, Alexa 750, eFluor780
	B FL 4	710/50	690	Alexa 680, Alexa 700
	C FL 5	670/30		APC, Cy5, Alexa 633, Alexa 647, SYTOX Red
Violet 405 nm	A FL 6	780/60	735	BV 785, Qdot 800
	B FL 7	710/50	685	BV 711, Qdot 705
	C FL 8	670/30	630	BV 650, eFluor 650 NC
	D FL 9	610/20	570	7-AAD, PI, BV 605
	E FL 10	530/30	505	Alexa 430, Zombie Aqua, BV 510, Krome Orange
	F FL 11	450/40		Pacific Blue, DAPI*, CFP, Hoechst*, Alexa 405, BD HorizonV450, SYTOX Blue, BV421
Yellow/Green 561 nm	A FL 12	780/60	735	PE-Cy7
	B FL 13	710/50	685	PE-Alexa 700, PE-Cy5.5
	C FL 14	670/30	630	PE-Cy5, 7-AAD
	D FL 15	610/20	600	PE-Texas Red, mCherry, PI, Alexa 610, mRaspberry, mStrawberry, Alexa 594, mRFP
	E FL 16	586/15	570	PE, DsRed, dTomato, Alexa 546

* possible but not optimal with this laser and filter

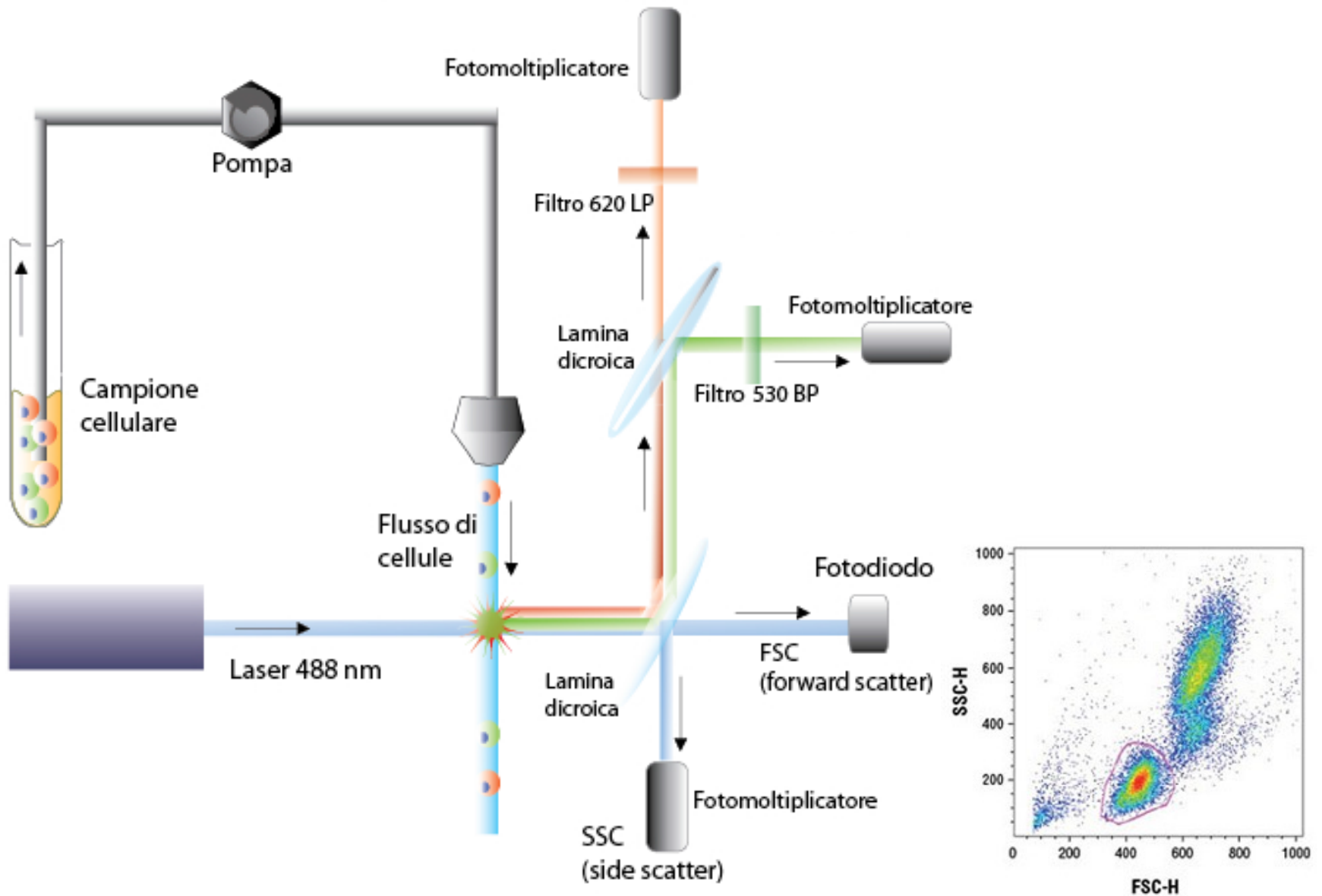
CytoFLEX

808nm FL21

Schema di un citofluorimetro a flusso



Schema di un citofluorimetro a flusso



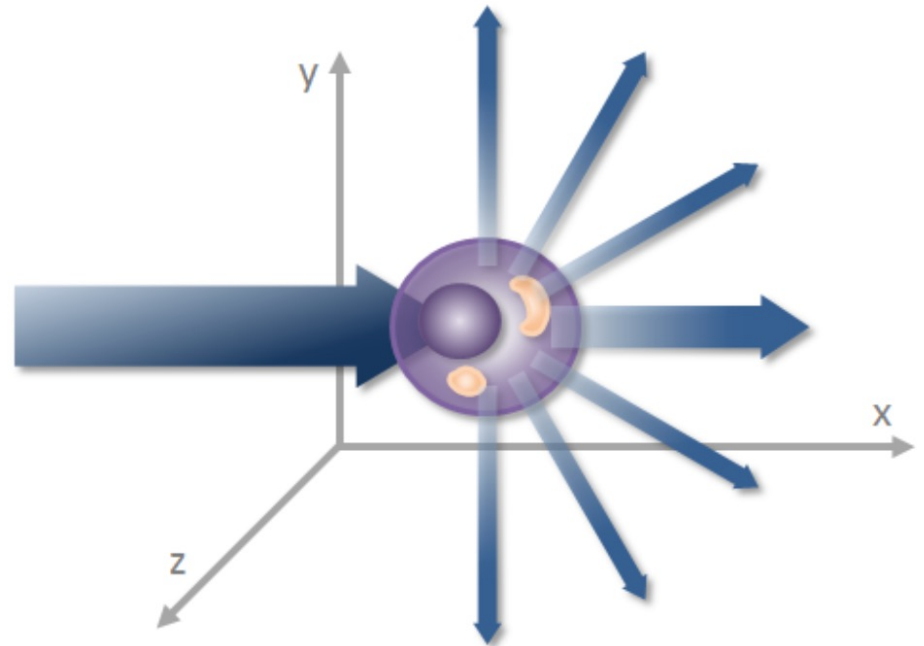
L'interazione di un fascio di luce con una cellula dà luogo a fenomeni di:

1) Light scattering

legati alle caratteristiche fisiche della particella

2) Fluorescenza

Legati alla presenza di molecole fluorescenti

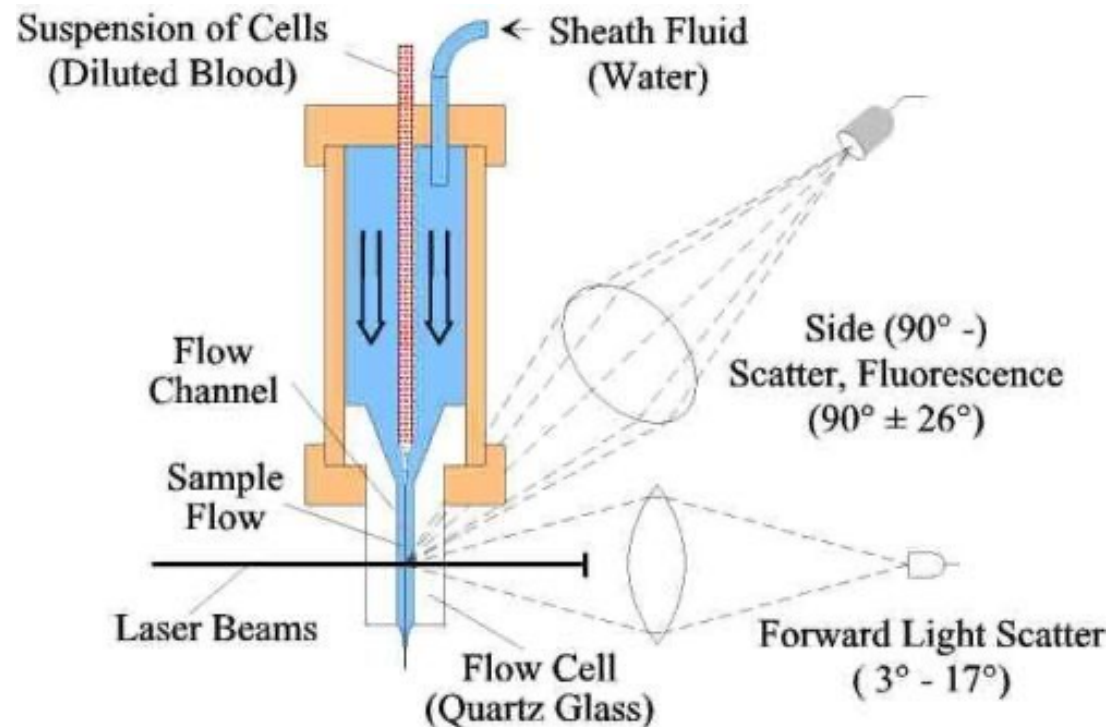
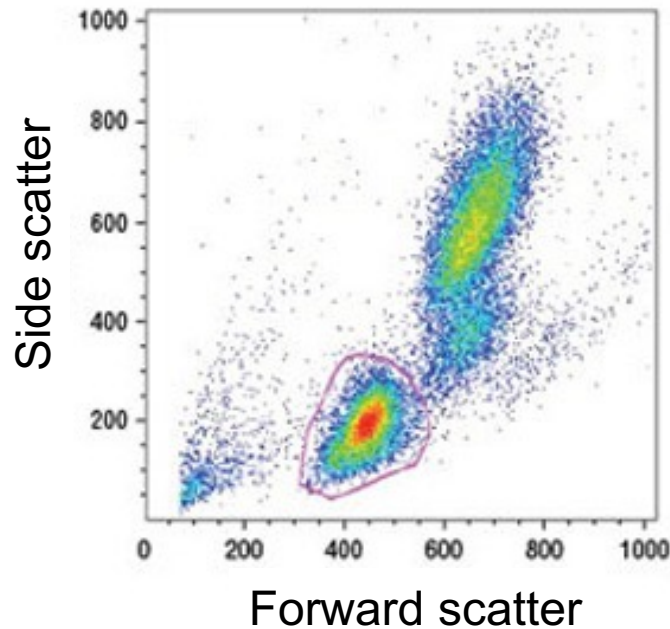
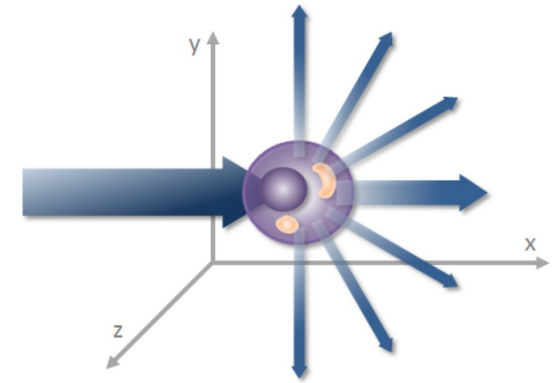


L'interazione di un fascio di luce con una cellula dà luogo a fenomeni di:

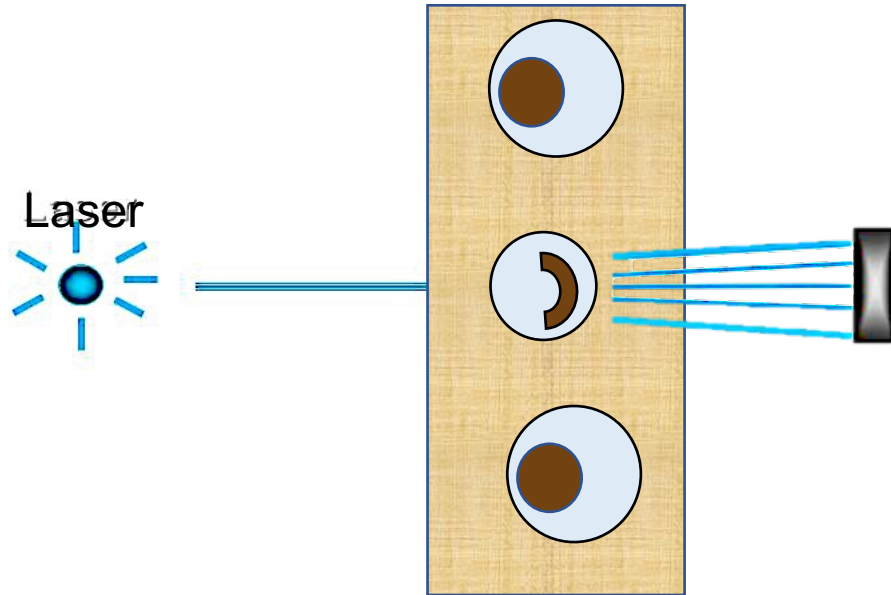
1) Light scattering

legati alle caratteristiche fisiche della particella

- a. Diffusione a basso angolo (**Forward scatter**)
- b. Diffusione a 90° (**Side scatter**)

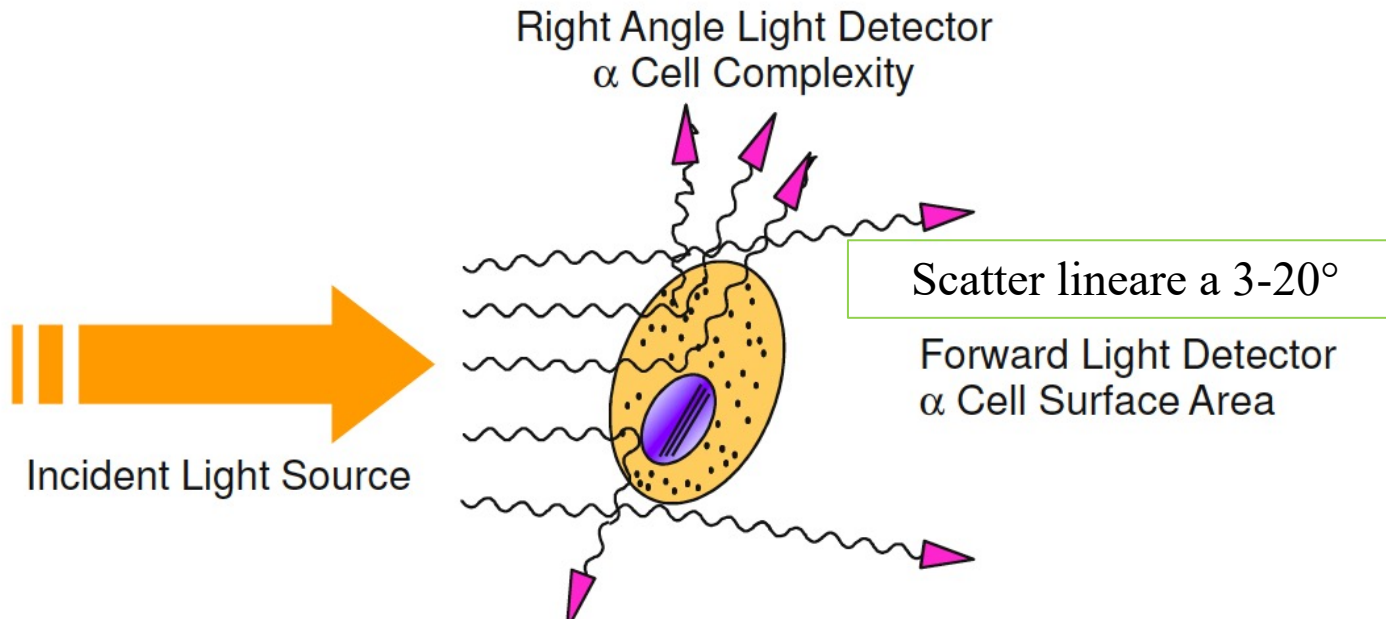


Scatter Frontale - Forward Scatter (FSC)

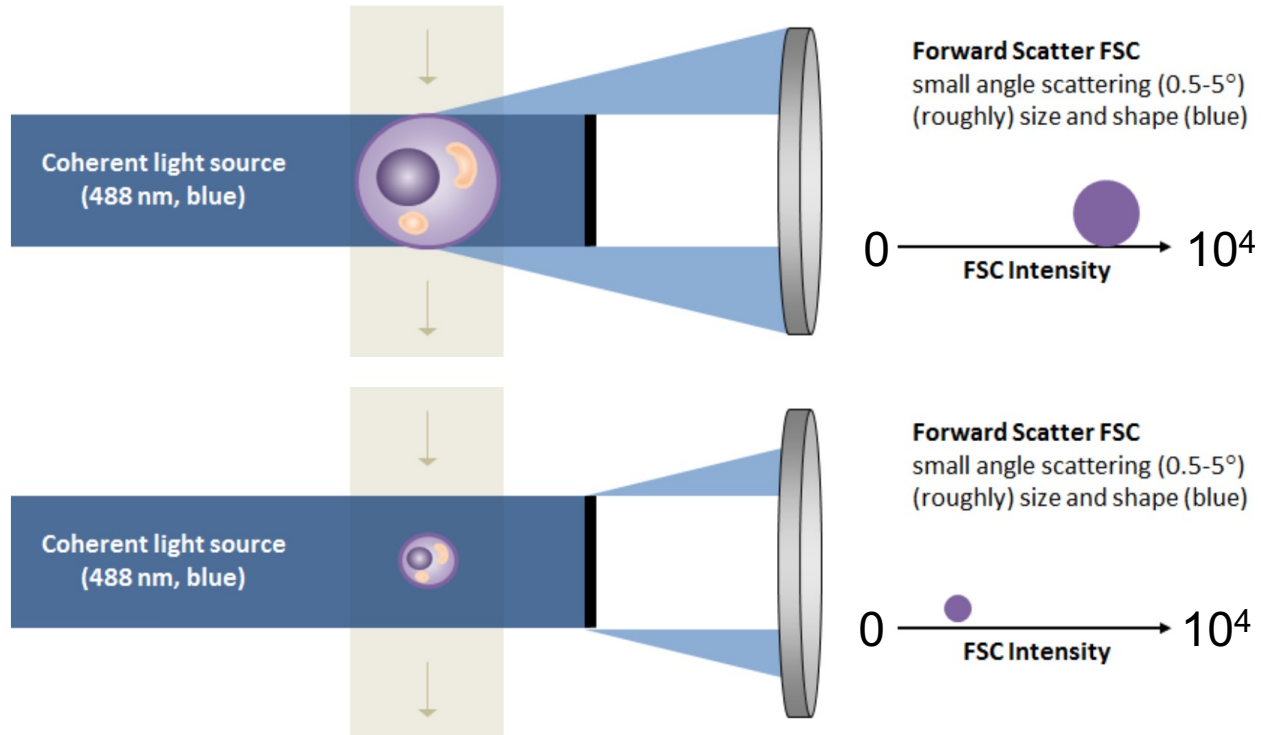


Il passaggio delle cellule attraverso il laser, dà origine ad un segnale di diffrazione che viene captato dal sensore che raccoglie la luce nel canale dello **scatter frontale (forward)**, e che dà informazioni sul **volume cellulare**.

L'intensità del Forward Scatter (FSC) è proporzionale alla **dimensione** e alla **forma** delle cellule.

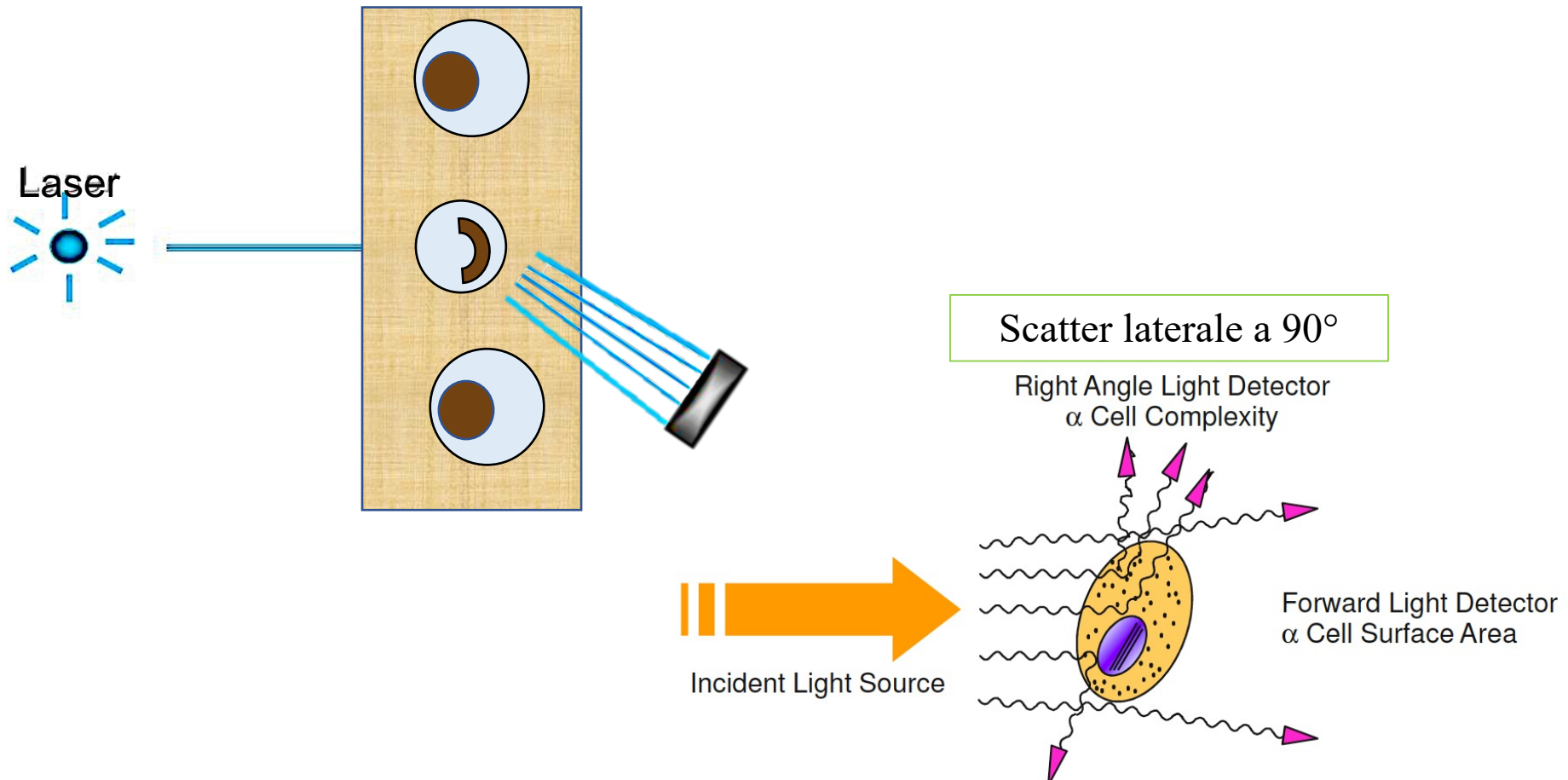


Forward Angle Light Scatter



L'angolo di dispersione dipende dalle **dimensioni**

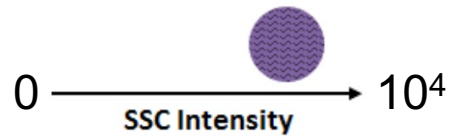
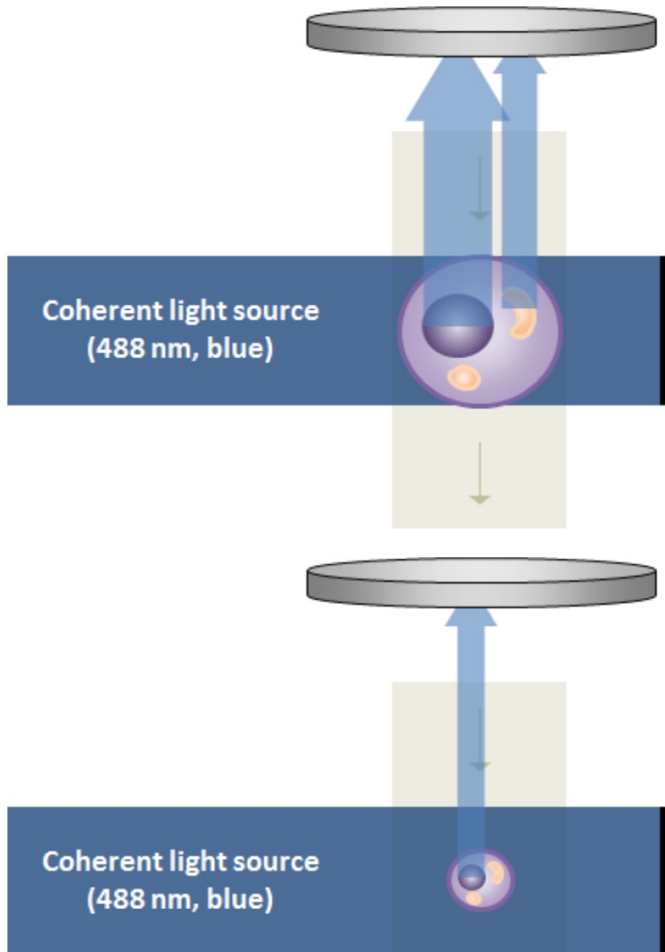
Scatter Laterale - Side Scatter (SSC)



Il passaggio delle cellule dà anche origine ad segnale di rifrazione/riflessione, che viene captato dal sensore che raccoglie la luce dello **Scatter Laterale**

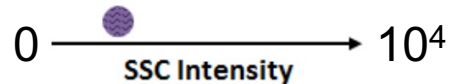
dà informazioni sulla **densità/granularità** (compreso il rapporto nucleo/citoplasma) delle cellule che passano attraverso il laser

Scatter Laterale - Side Scatter (SSC)



Side Scatter SSC

large angle scattering (15-150°),
darkfield, complexity and
granularity (blue)



Side Scatter SSC

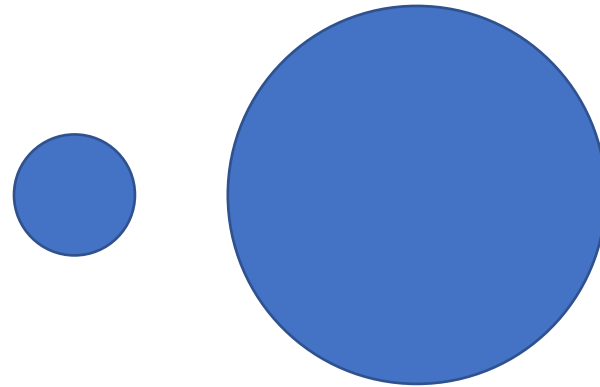
large angle scattering (15-150°),
darkfield, complexity and
granularity (blue)

La **dispersione laterale**
dipende dalla “**granulosità**”
delle cellule

Segnali legati alle
caratteristiche
fisiche della
cellula:

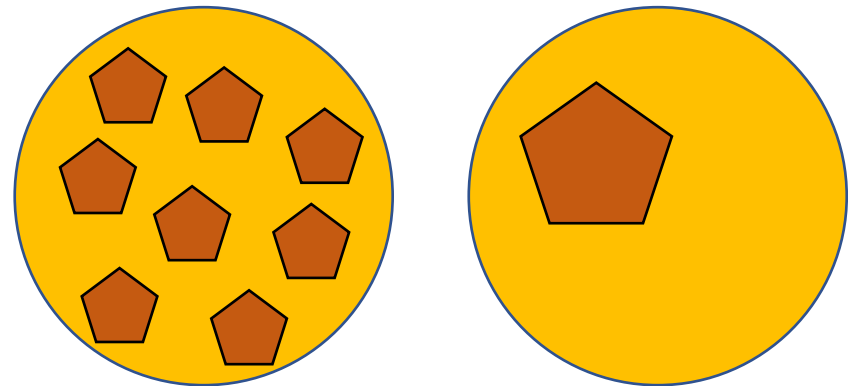
FORWARD SCATTER

- Diametro o grandezza

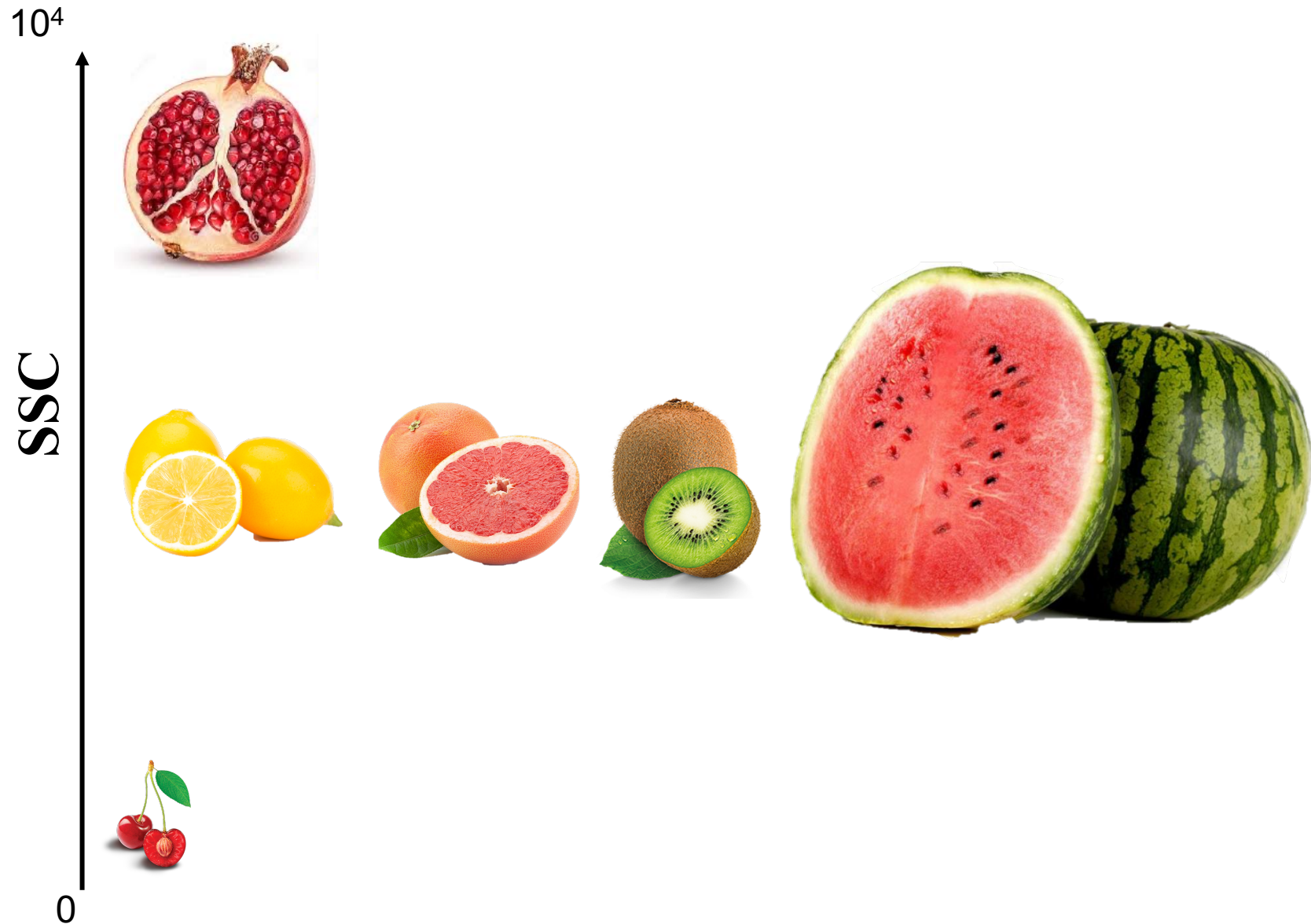


SIDE SCATTER

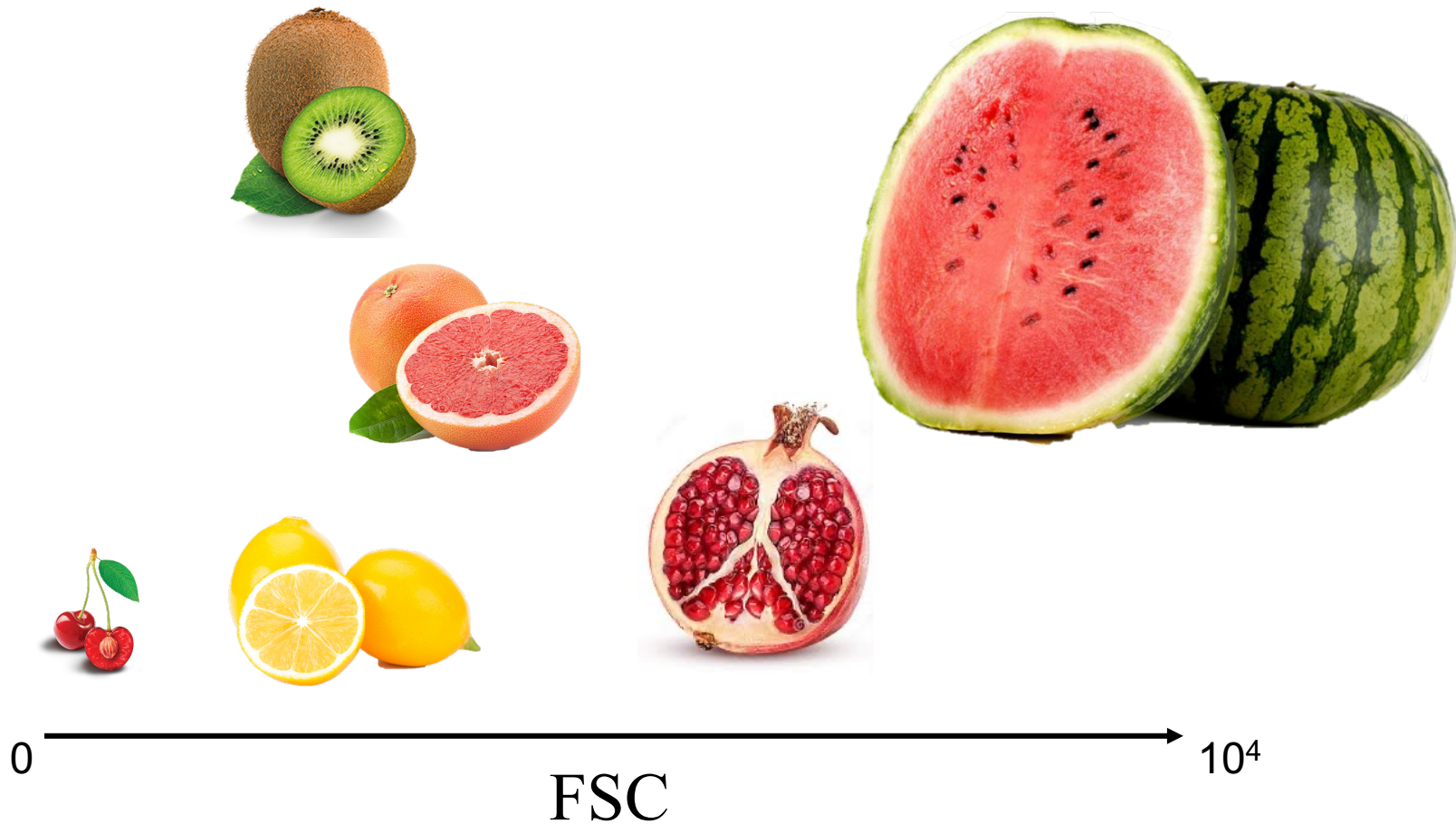
- Rapporto nucleo/citoplasma
- Granulosità interna
- Rugosità di membrana



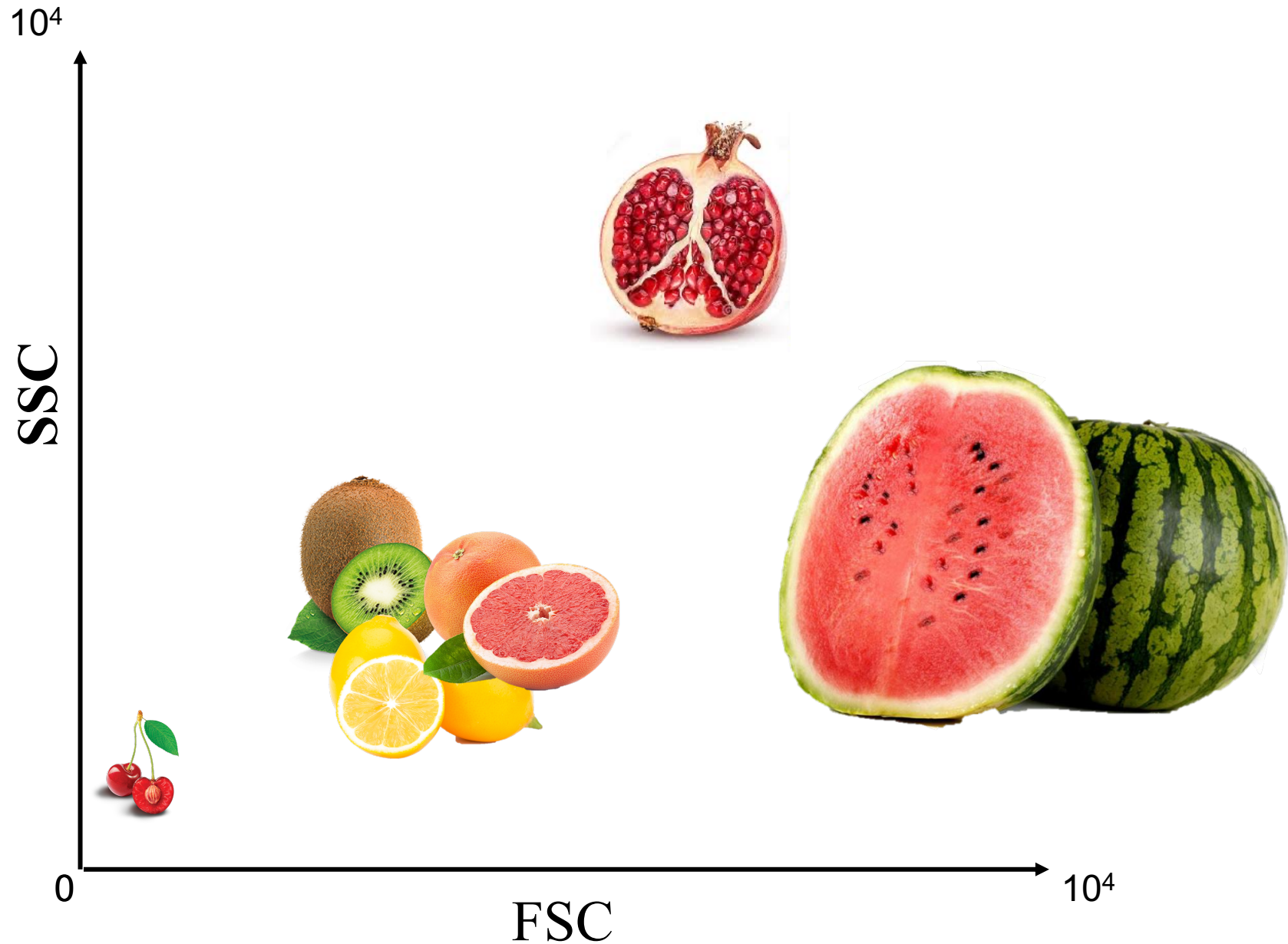
Forward (FSC) and Side Scatter (SSC)



Forward (FSC) and Side Scatter (SSC)



Forward (FSC) and Side Scatter (SSC)



Analisi dei dati

Dalla combinazione dei due tipi di segnali (“*Side Scatter*” e “*Forward Scatter*”) si ottiene:

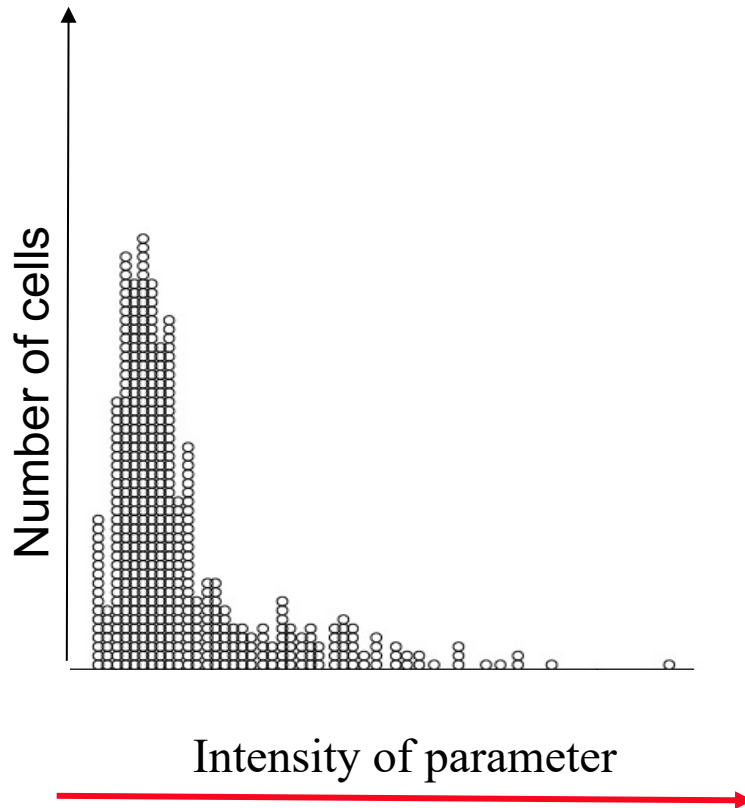
1. «**citogramma**» (monodimensionale)
2. «**dot plot**» (bidimensionale)

È possibile rilevare diverse popolazioni cellulari, in base alle sole caratteristiche **fisiche**.

Ogni punto rappresenta un evento contato

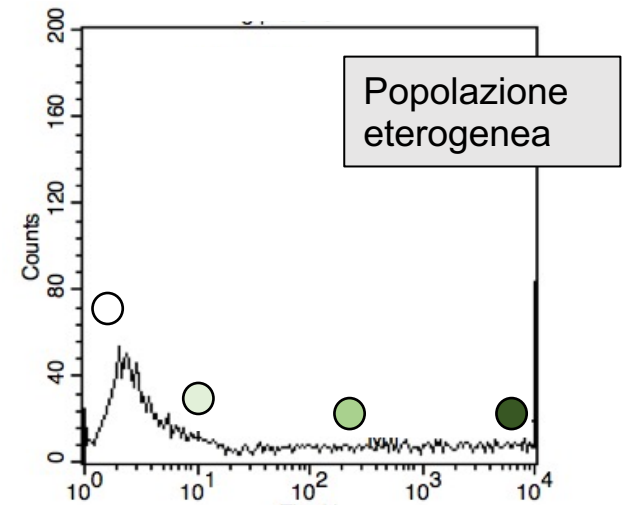
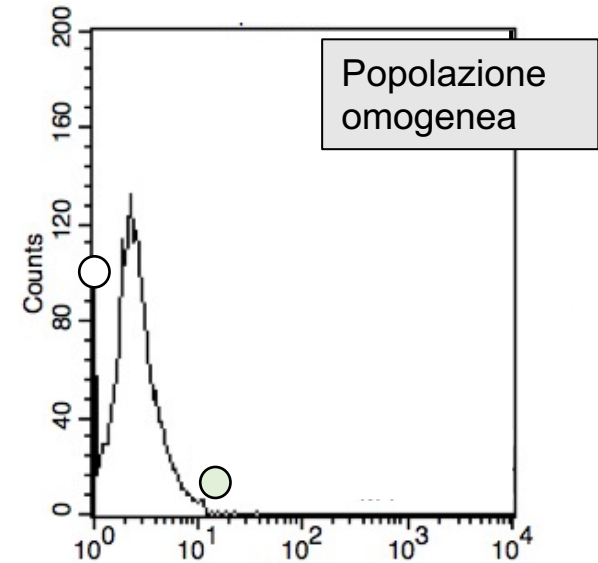
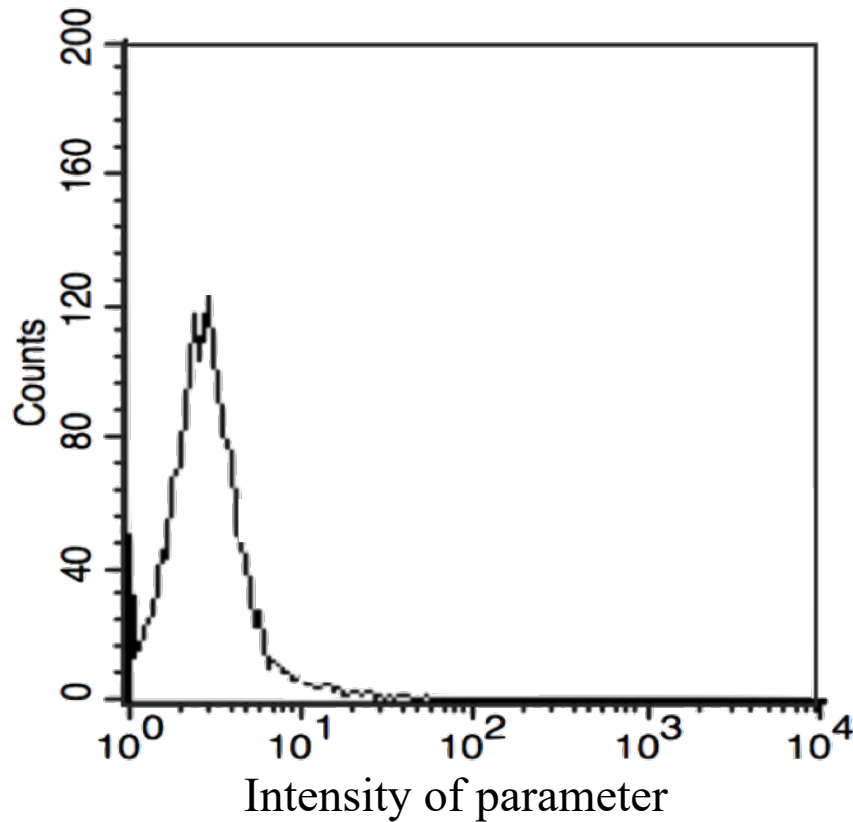
Citogramma monodimensionale

Analisi di 1 parametro fisico o 1
fluorescenza alla volta



Citogramma monodimensionale

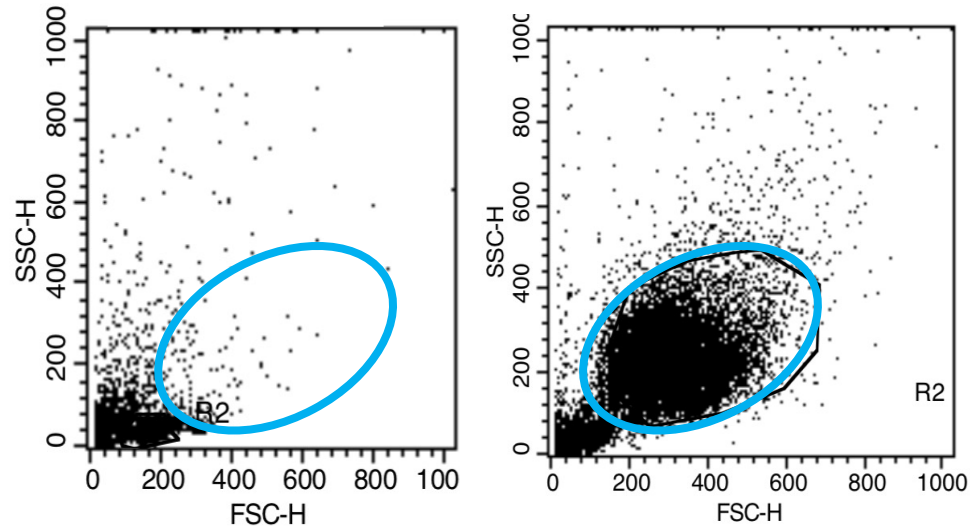
Analisi di 1 parametro fisico o 1
fluorescenza alla volta



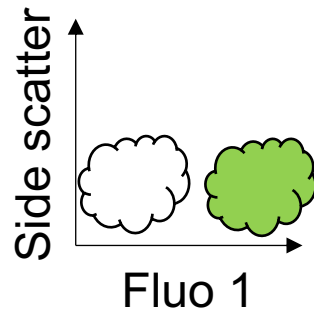
Intensità della fluorescenza verde

Dot plot bidimensionale

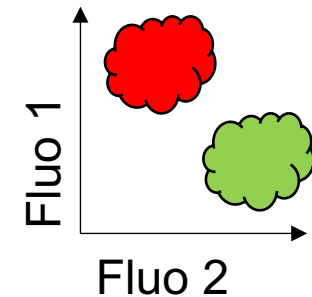
Analisi di 2 parametri fisici alla volta



Analisi di 1 parametro fisico + 1
fluorescenza alla volta

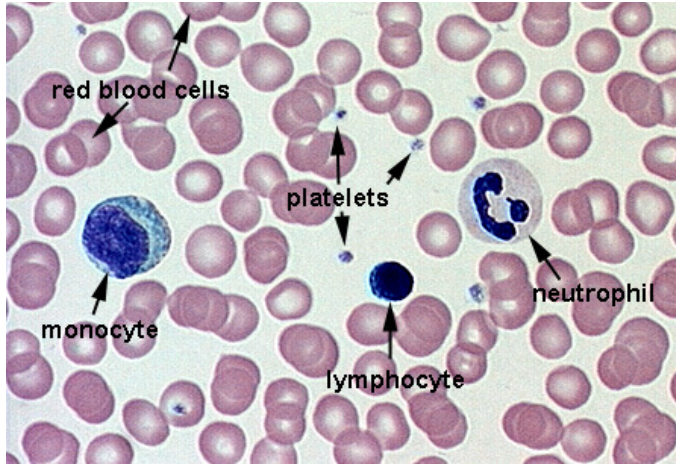


Analisi di 2 fluorescenze alla volta



Light Scatter Gating

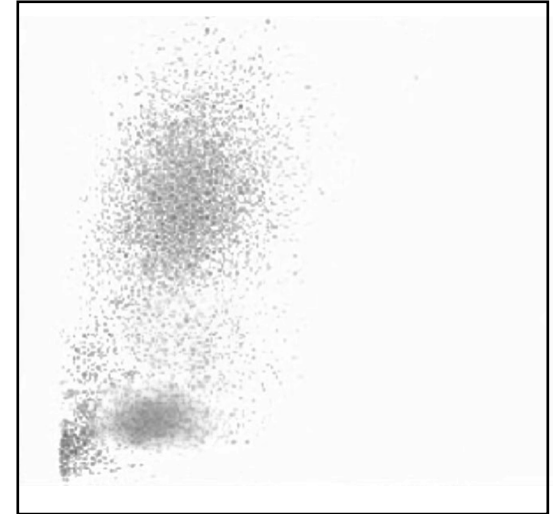
Human white
blood cells



Dot plot

Bidimensionale

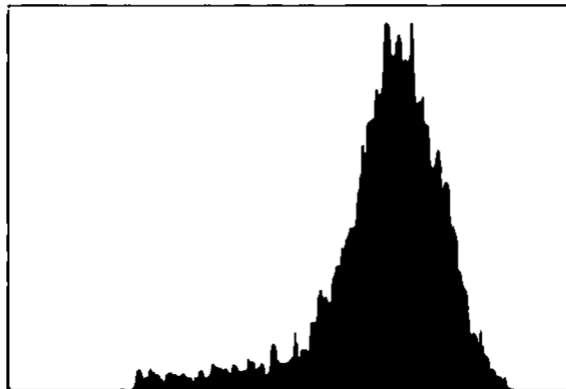
Side Scatter Projection
Scatter laterale (90°)



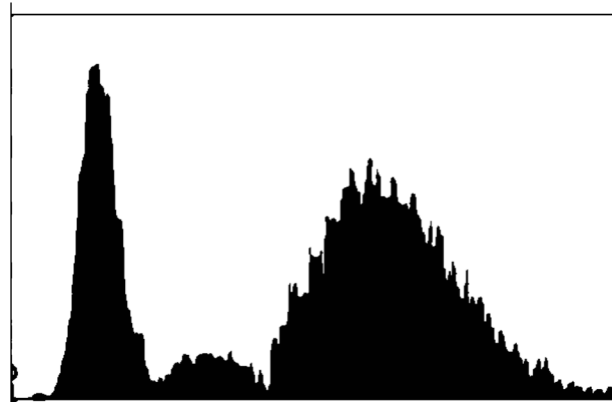
Forward Scatter Projection
Scatter frontale (0-20°)

Citogramma monodimensionale

Number of events



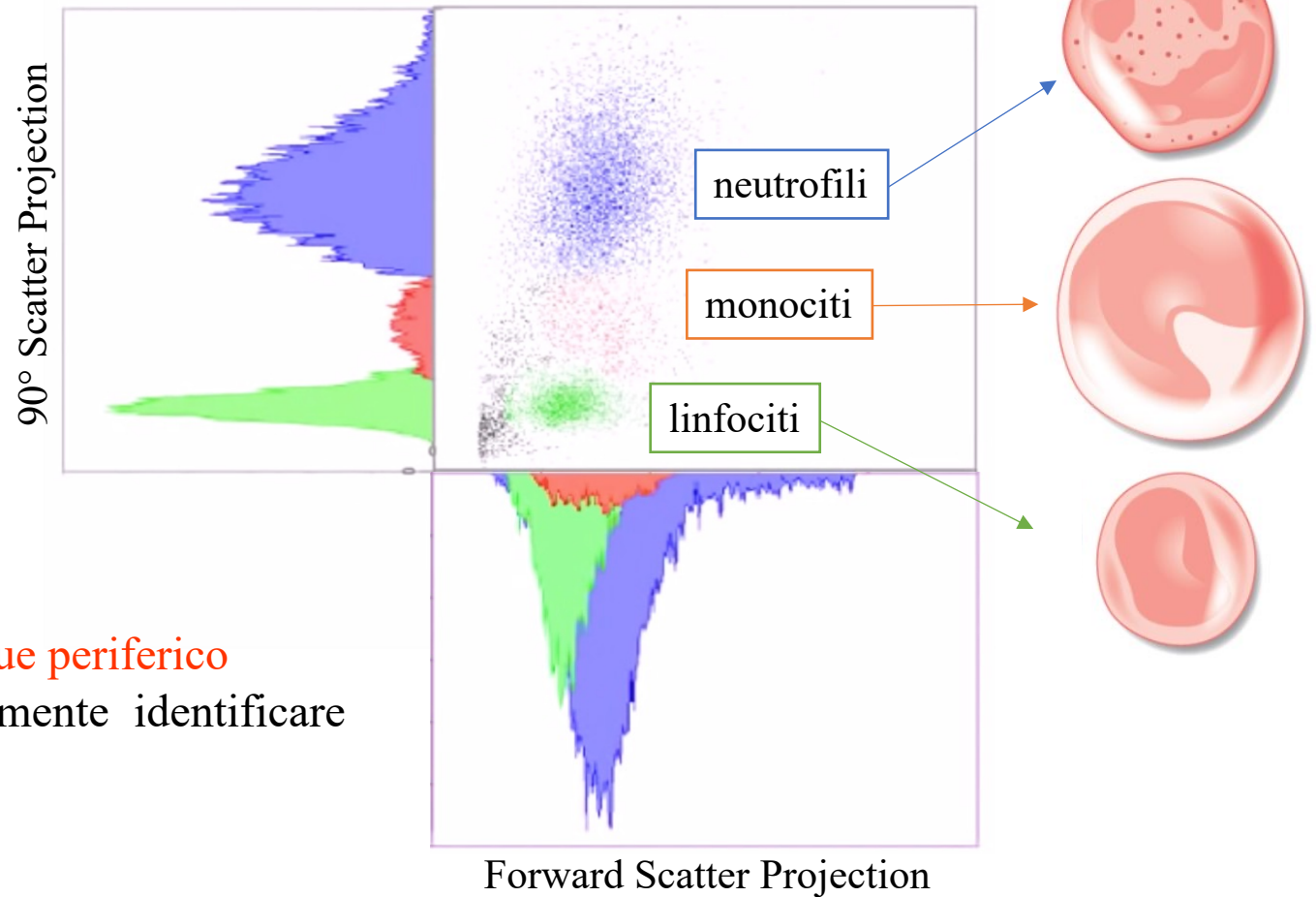
Forward Scatter Projection
Scatter frontale (3-20°)



Side Scatter Projection
Scatter laterale (90°)

Human white blood cells

Light Scatter Gating



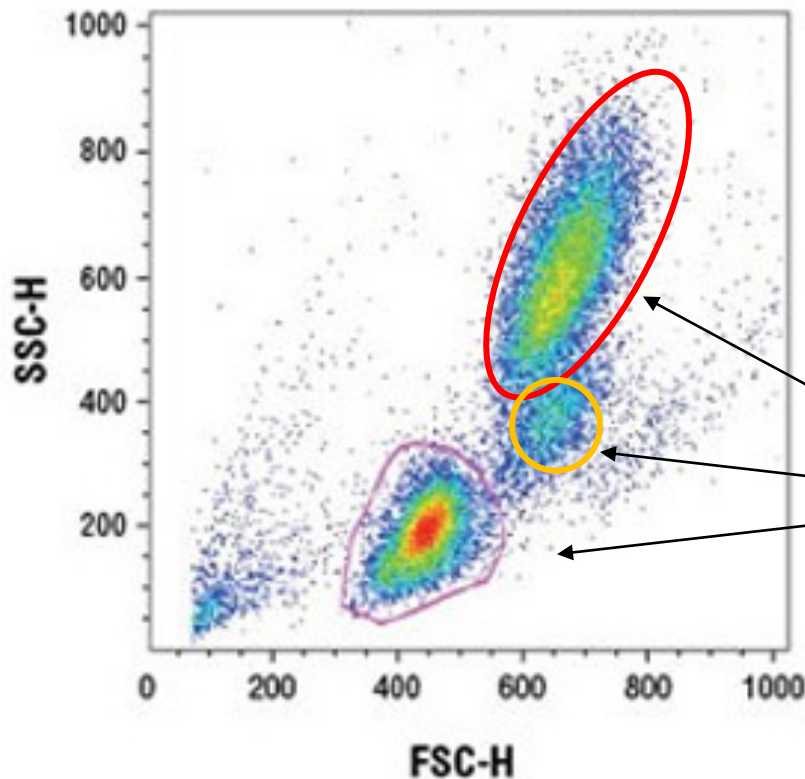
Leucociti del sangue periferico

si possono facilmente identificare
tre popolazioni:

- linfociti
- monociti
- granulociti

Light Scatter of white blood cells

Light scatter può essere utilizzato per identificare popolazioni di cellule



Si può disegnare un “**gate**” elettronico (x) che permetterà in seguito l’analisi del segnale di fluorescenza proveniente soltanto dalla popolazione scelta

Sistema ottico elettronico

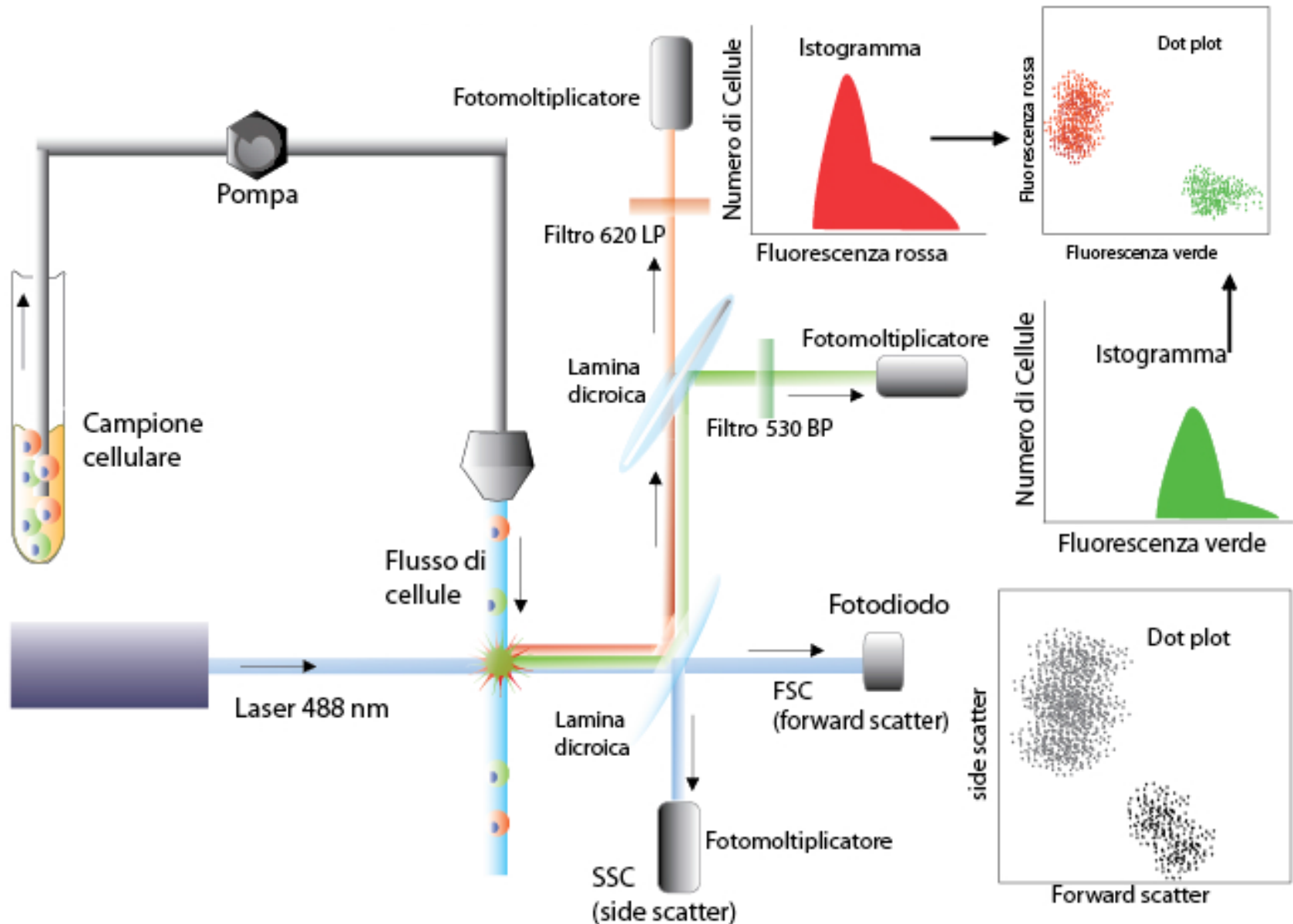
L'ottica di eccitazione consiste di:

- Uno o più **laser** come sorgente luminosa
- **Lenti** di focalizzazione per collimare il fascio luminoso prima del punto di interrogazione

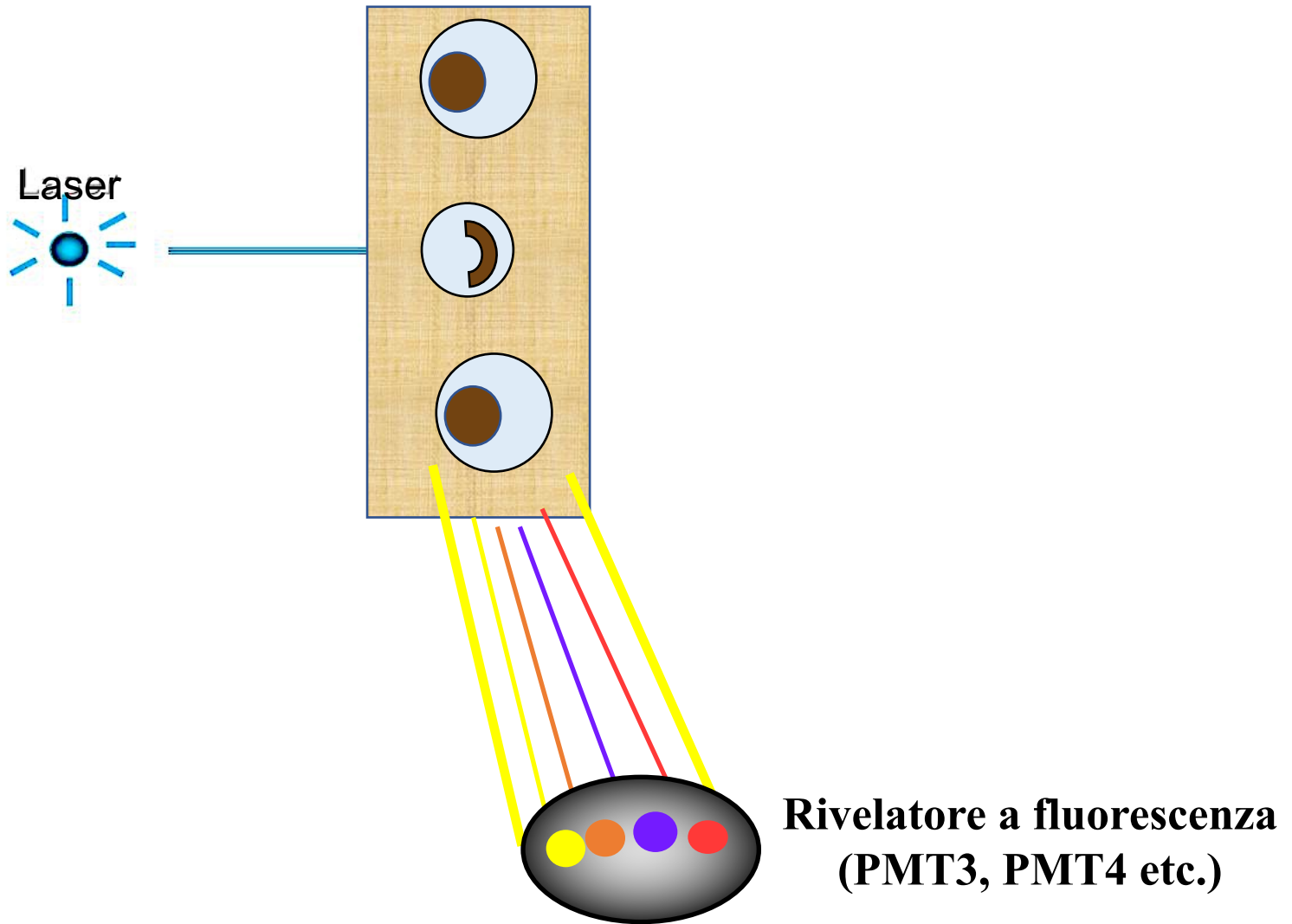
L'ottica di rilevazione comprende:

- una lente di collezione che raccoglie tutti i segnali generati dall'interazione del fascio luminoso con la singola cellula
- Un sistema di specchi e filtri ottici in grado di separare le specifiche lunghezze d'onda che devono essere raccolte dai differenti rilevatori

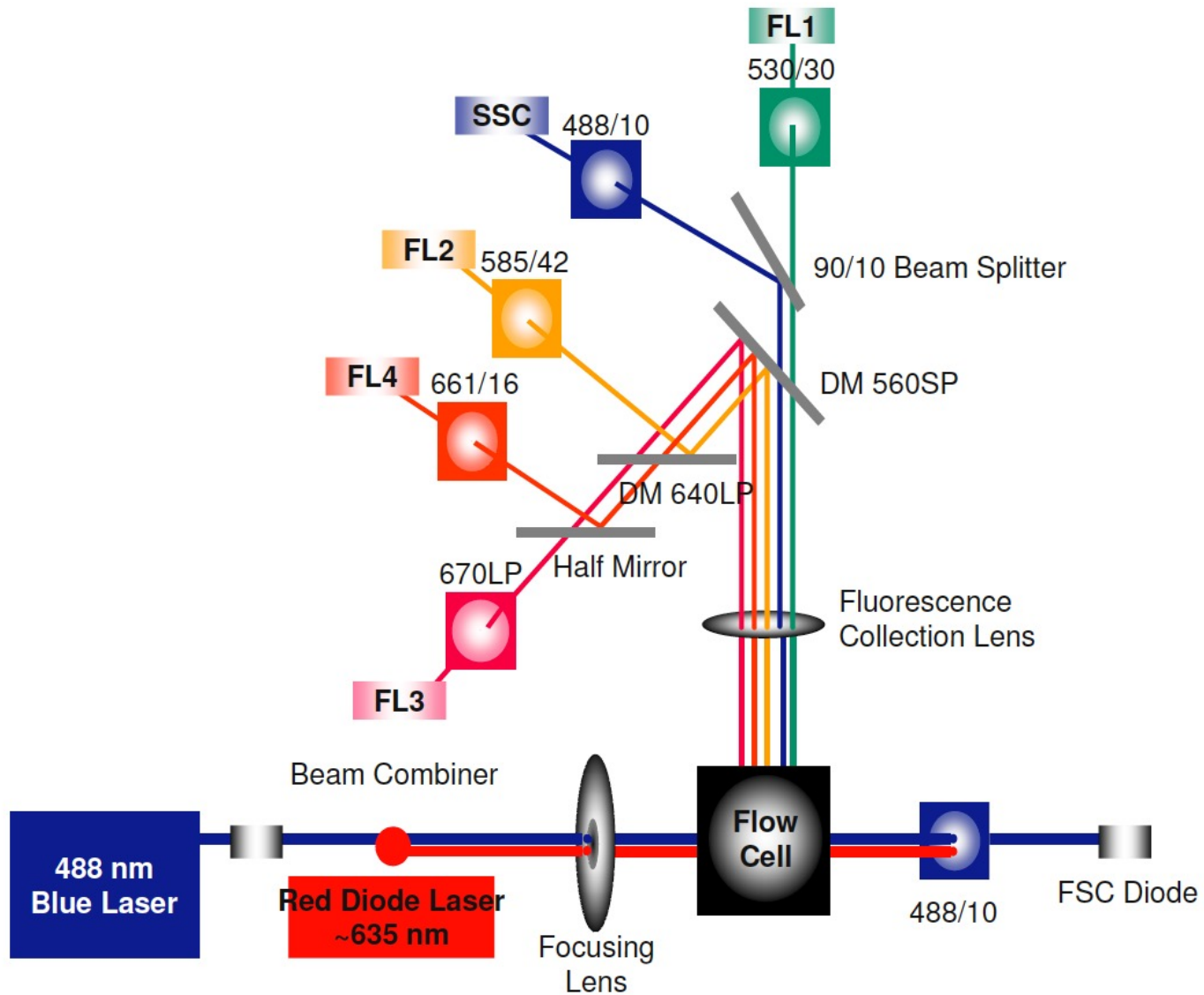
Schema di un citofluorimetro a flusso



Rivelatori per Fluorescenza

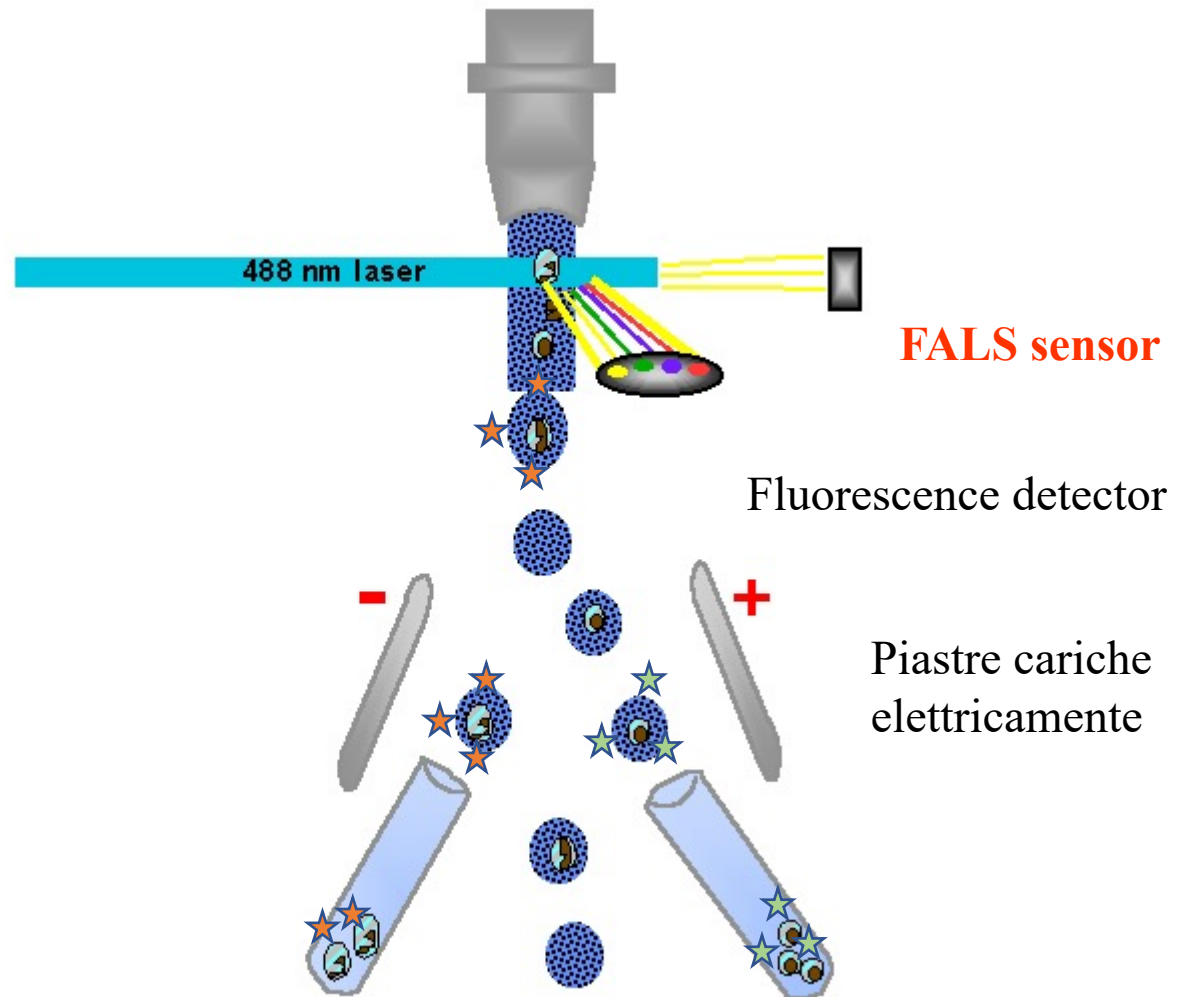


Ottica FACSCalibur - 4 colori



Il “Sorting cellulare”

FACS
Fluorescence
Activated
Cell
Sorting

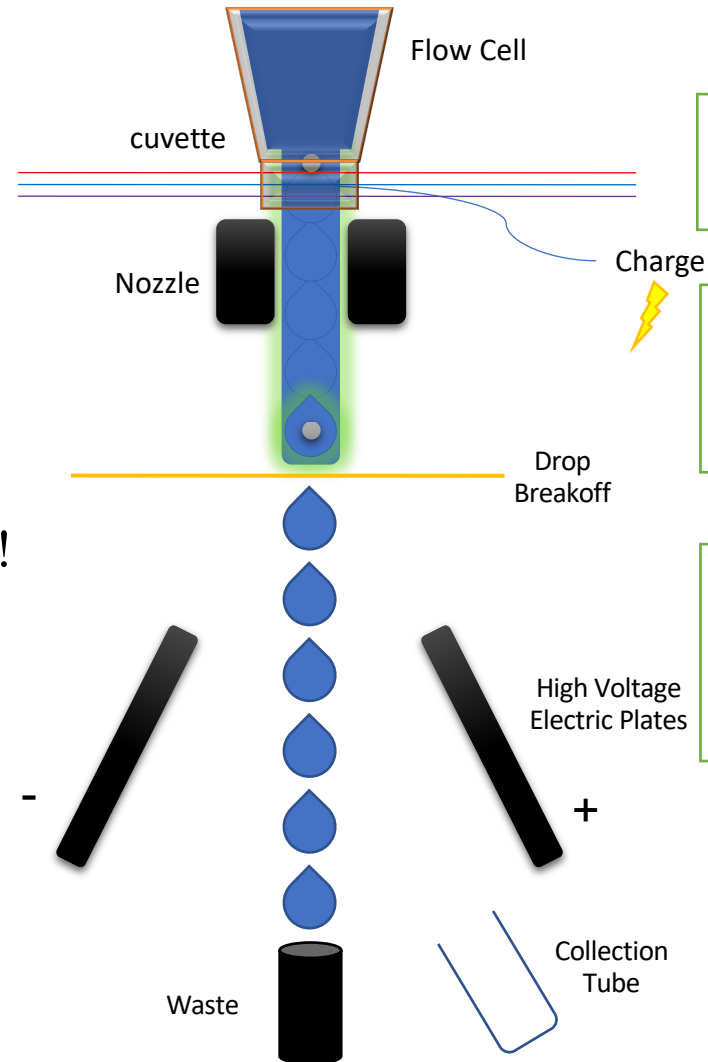


Cellule singole separate dentro diverse
provette

II “Sorting cellulare”

Physical separation
of a cell or particle of interest
from a **heterogeneous** suspension
of cells or particles.

A cell sorter sorts **drops**, not cells!



**Interrogation
point**

Charge Drop

With particle of interest
Through application of a
voltage

Drop Generation

Break Stream into Droplets
(30-100,000 drops/sec)

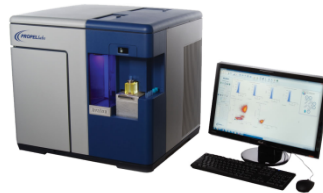
Deflect Charged Drop

Cell Sorters

MoFlo
(Beckman Coulter)



Avalon
(Propel Labs)



Astrios
(Beckman Coulter)



SH800
(Sony)



FACSVantage
(BD Biosciences)



FACSJazz
(BD Biosciences)



Influx
(BD Biosciences)



Synergy3200
(i-Cyt)



FACSAria
(BD Biosciences)



JSAN
(Bay Bioscience)

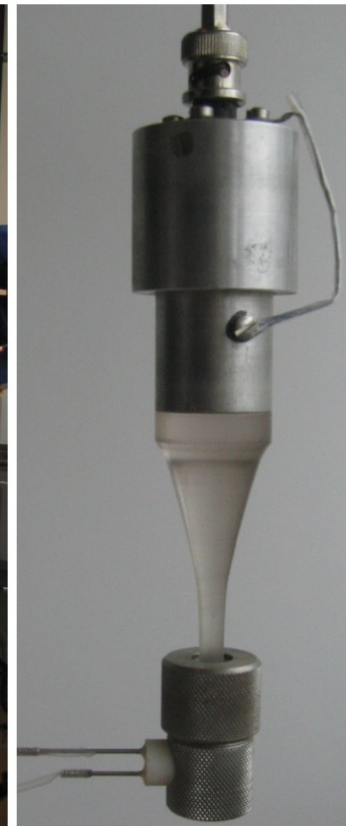


DAL 1970 AD OGGI

Comparsa della citofluorimetria a flusso avviene attorno agli anni 70, determinando un veloce e intenso sviluppo delle tecniche istologiche e citochimiche.

Inizialmente

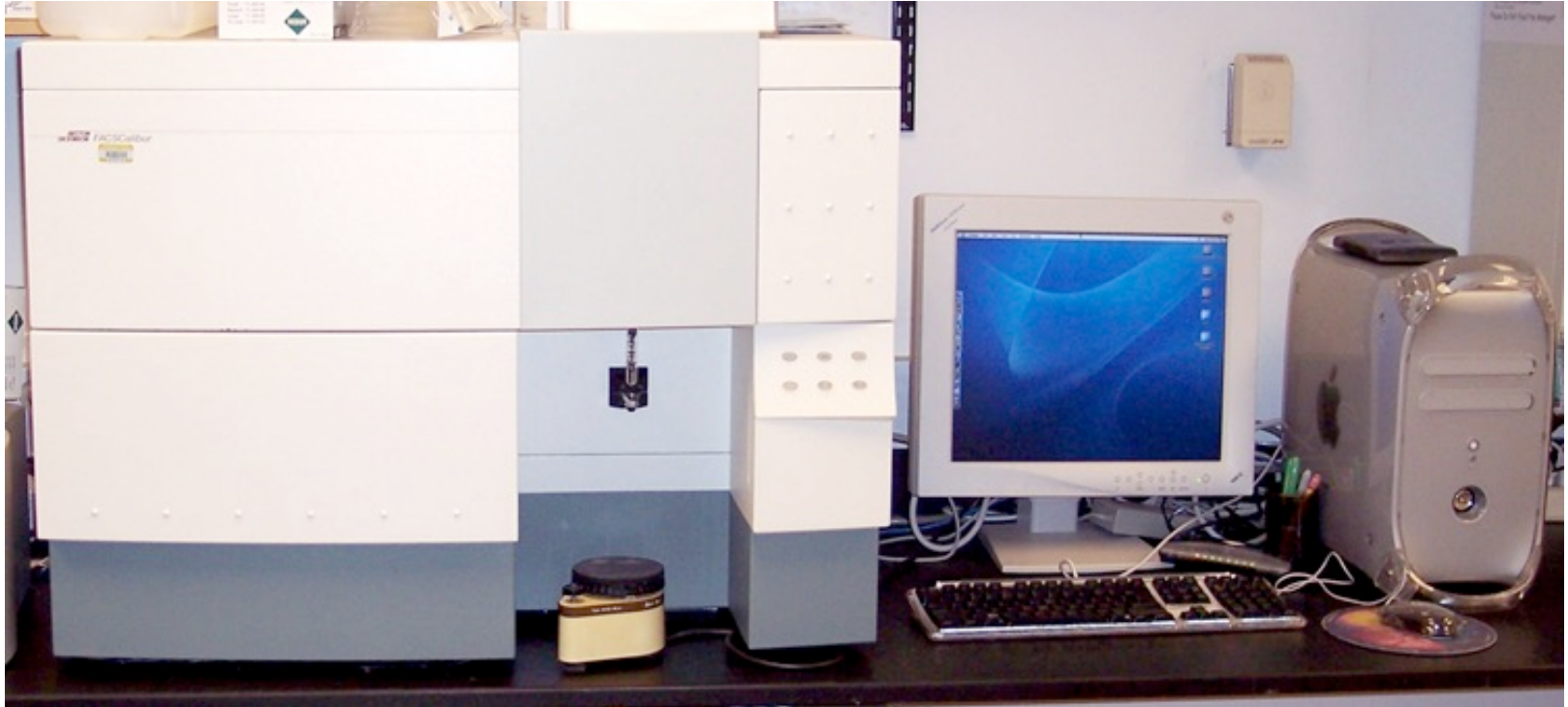
misura di 1-2 parametri: uno per le misure fisiche e 1 per la fluorescenza



Fulwyler's original cell sorter – a 1967 model

DAL 1970 AD OGGI

FACScalibur



- 1 laser 488nm
- 3 parametri (fluorescenza) simultaneamente

DAL 1970 AD OGGI

FACScanto



- 3 laser
- 6/8 parametri simultaneamente

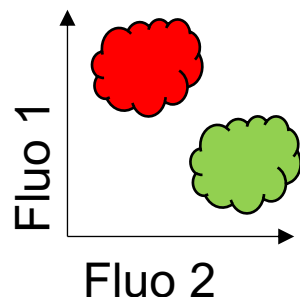
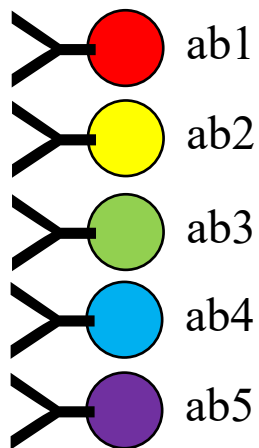
DAL 1970 AD OGGI

2017: BD LSRFORTESSA X-20.

5 laser e possibilità di analizzare 20 parametri simultaneamente (18 colori)

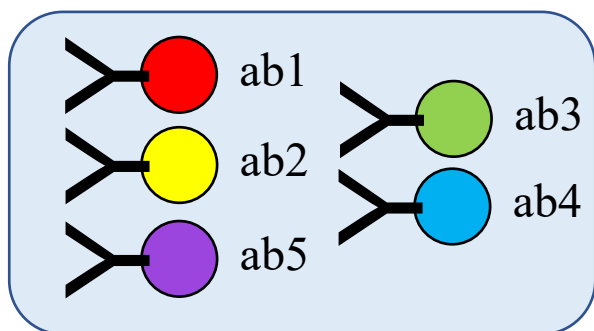


DAL 1970 AD OGGI



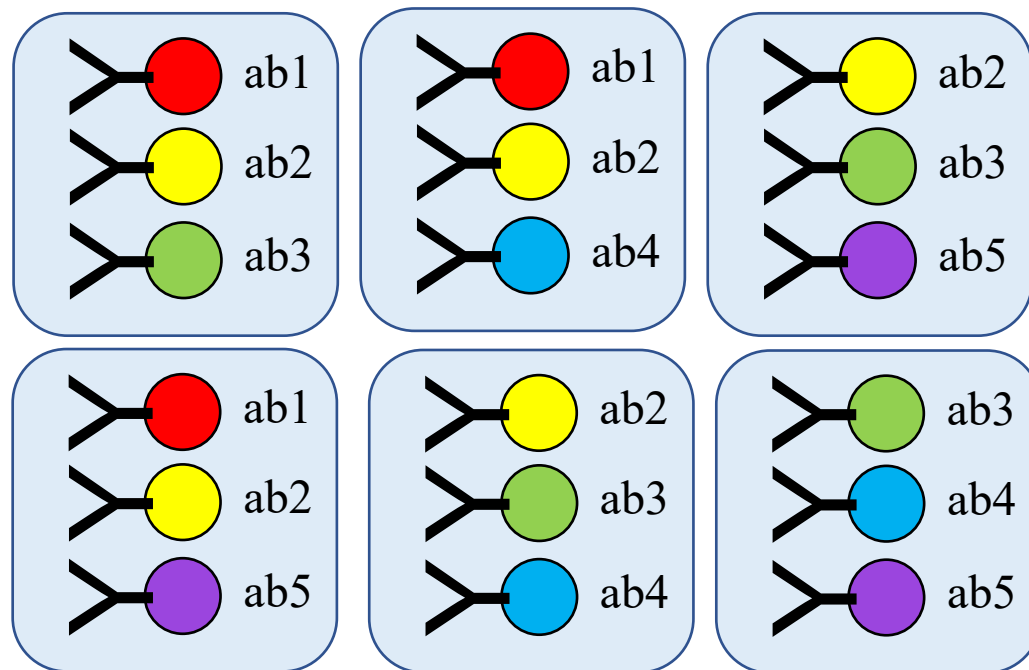
LSRFORTESSA X-20

(20 colori contemporaneamente)



FACScalibur

(3 colori contemporaneamente)

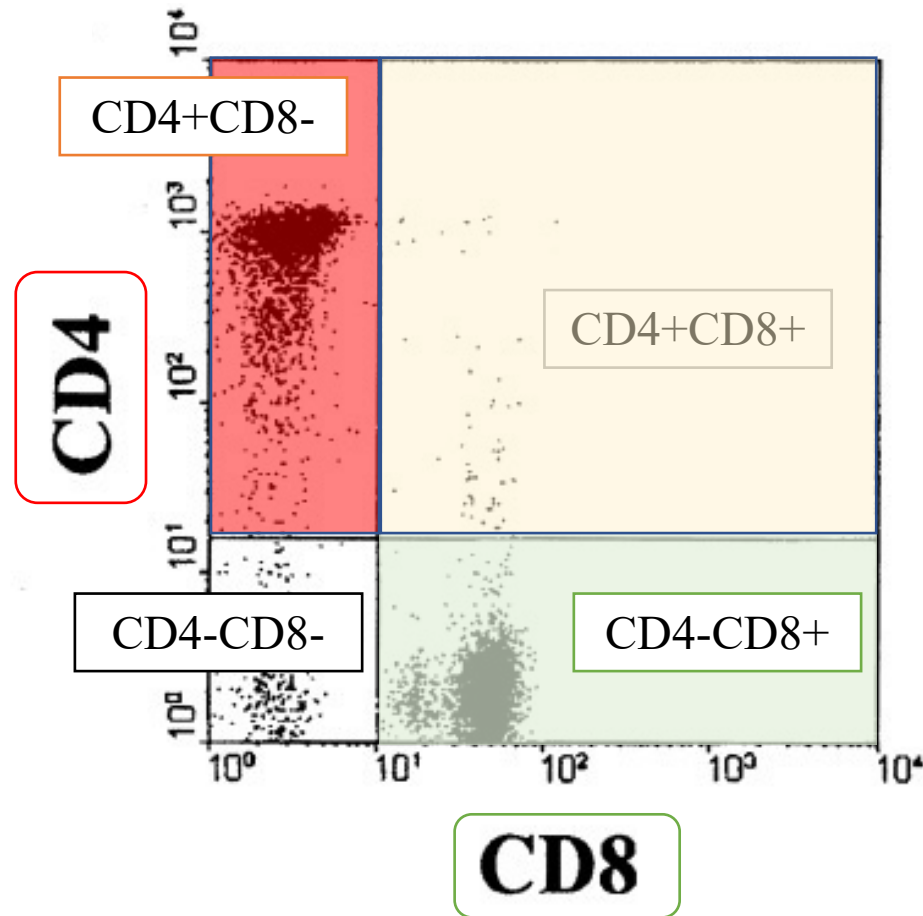


APPLICAZIONI

- Determinazione dei marcatori di differenziamento cellulare, **di superficie**, intracitoplasmatici e **intranucleari**
- Valutazione del **contenuto cellulare di DNA**
- Discriminazione tra cellule vive, cellule **apoptotiche** e **necrotiche**
- Predisposizione per la **separazione cellulare**

APPLICAZIONI

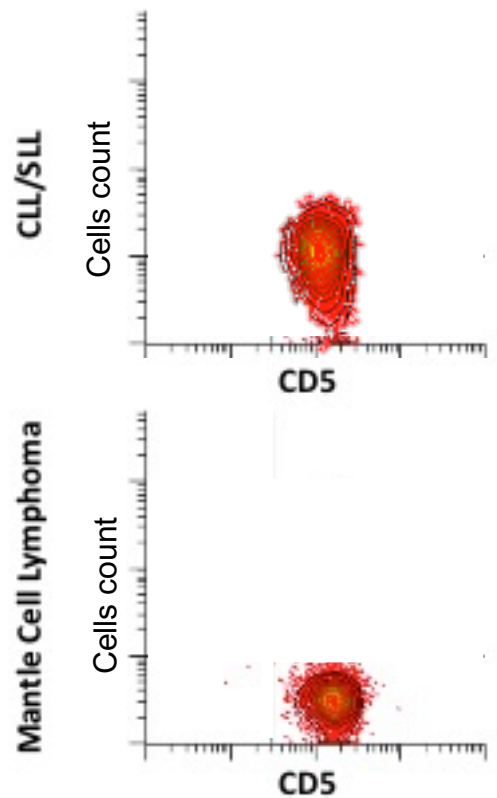
1a. Ricerca di antigeni CD presenti sui linfociti con anticorpi marcati (“*Dot-Plot*”)



rappresentazione bidimensionale della doppia fluorescenza di una popolazione linfocitaria (CD4 e CD8)

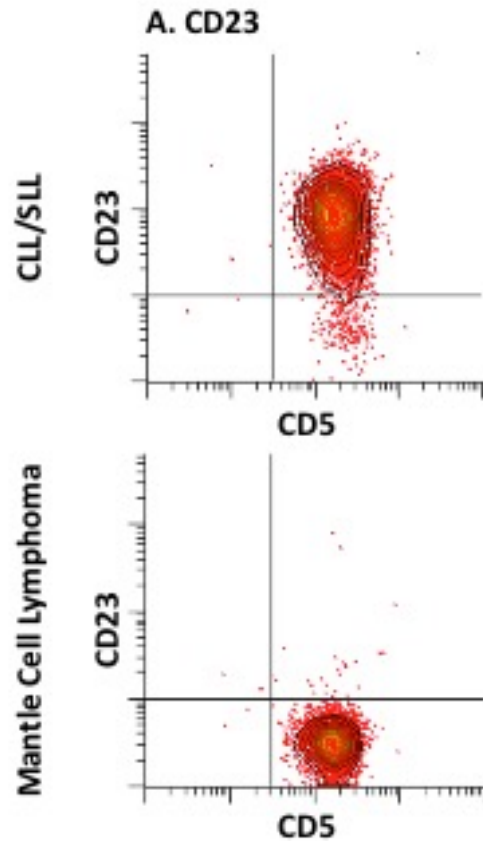
APPLICAZIONI

1b. Ricerca di antigeni CD presenti sui linfociti con anticorpi marcati (applicazione clinica)



APPLICAZIONI

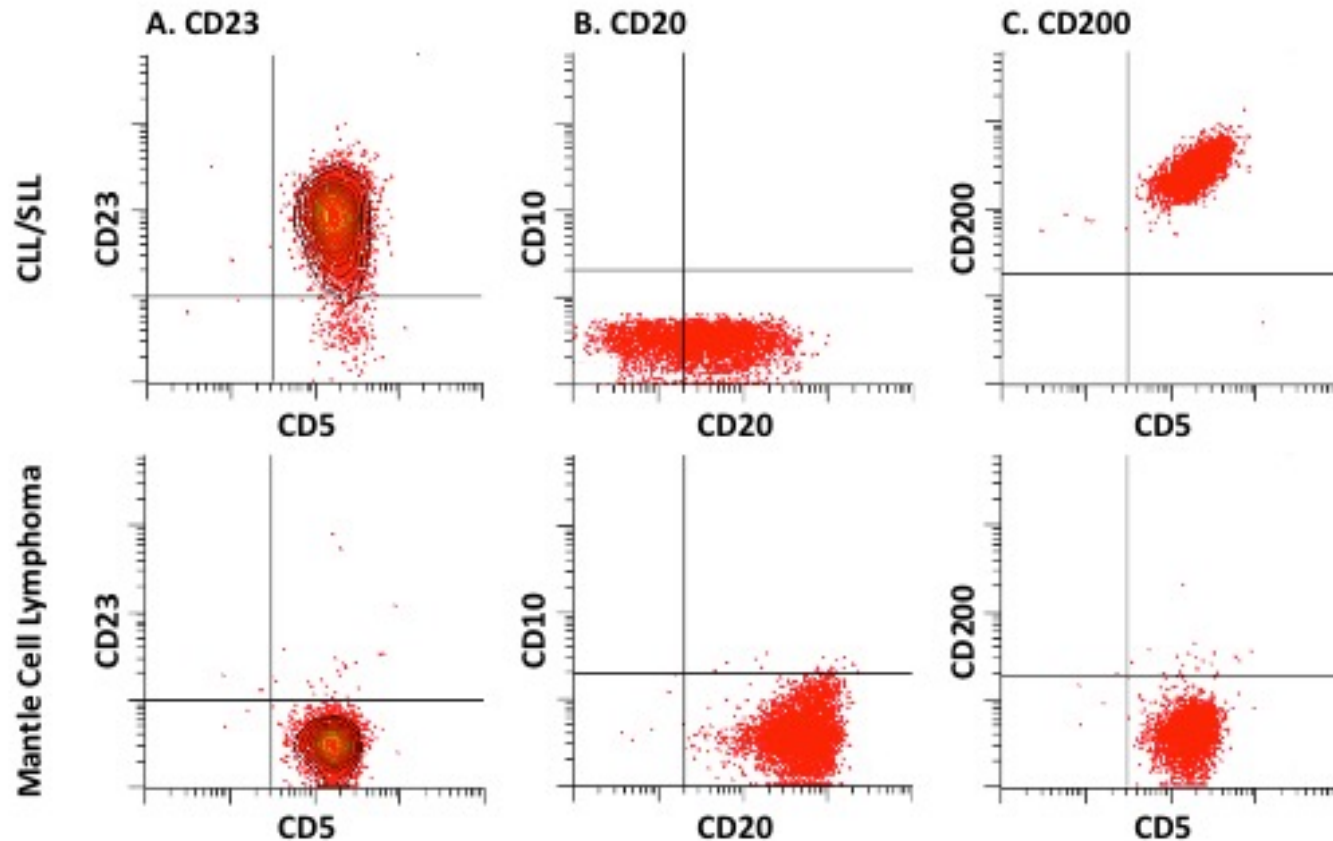
1b. Ricerca di antigeni CD presenti sui linfociti con anticorpi marcati (applicazione clinica)



APPLICAZIONI

1b. Ricerca di antigeni CD presenti sui linfociti con anticorpi marcati (applicazione clinica)

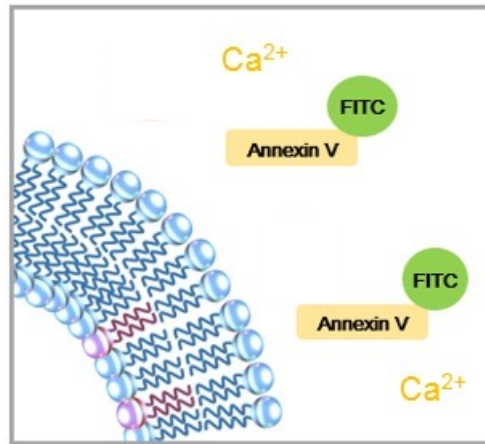
CLL immunofenotipo: CD5+CD10-CD20+**CD23+CD200+**



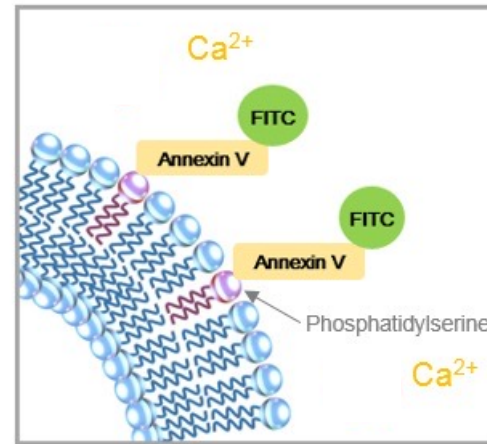
MCL immunofenotipo: CD5+CD10-CD20+**CD23-CD200-**

APPLICAZIONI

2. Valutazione di apoptosi (efficacia di un trattamento)

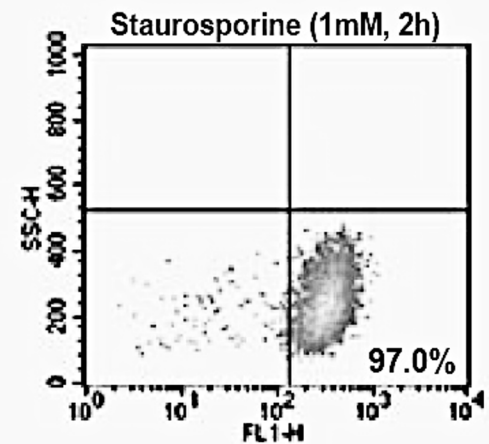
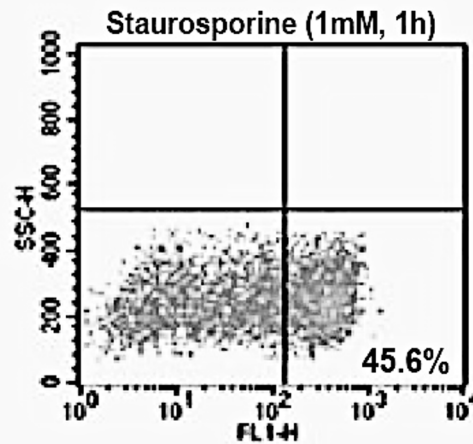
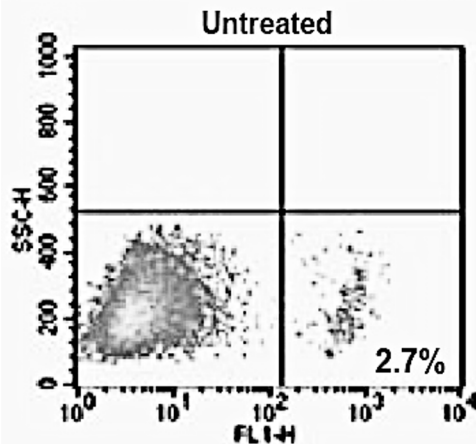


Normal cell



Early and Late stages of apoptosis

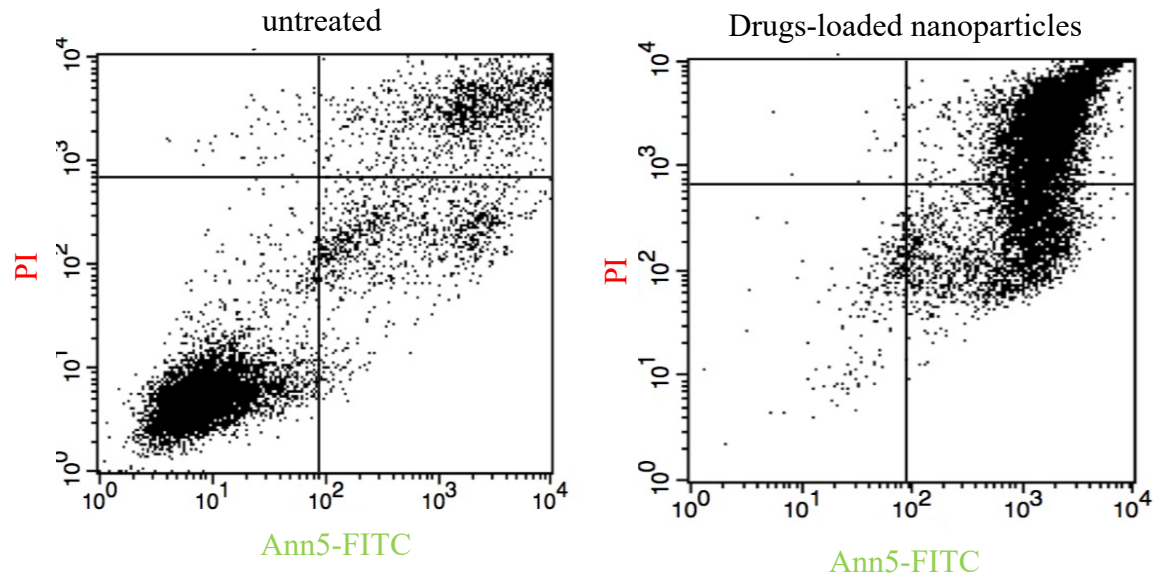
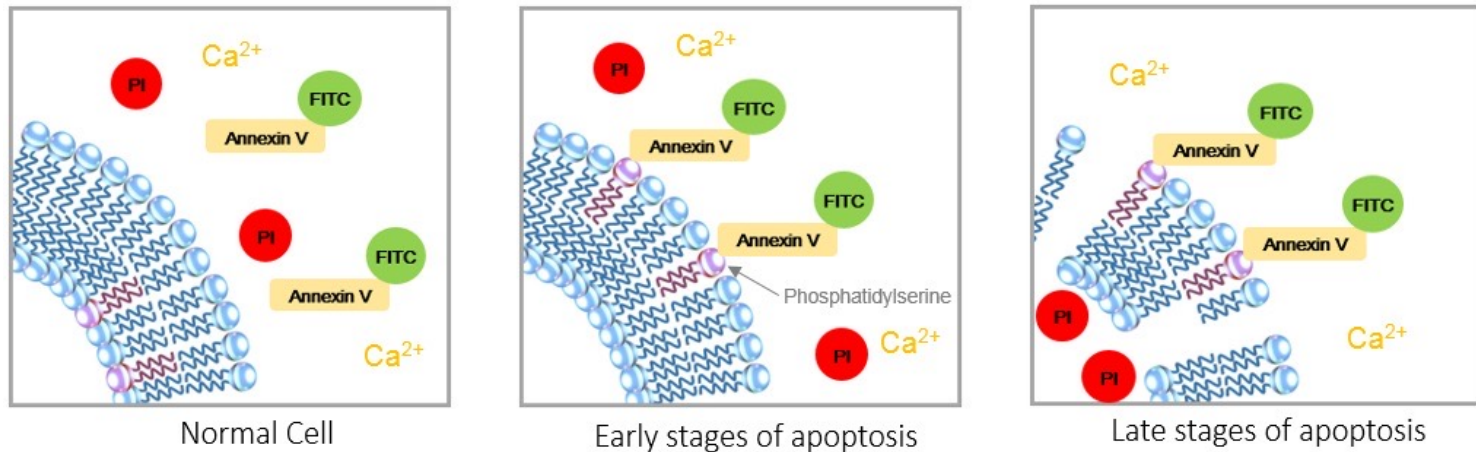
Jurkat



Ann5-FITC

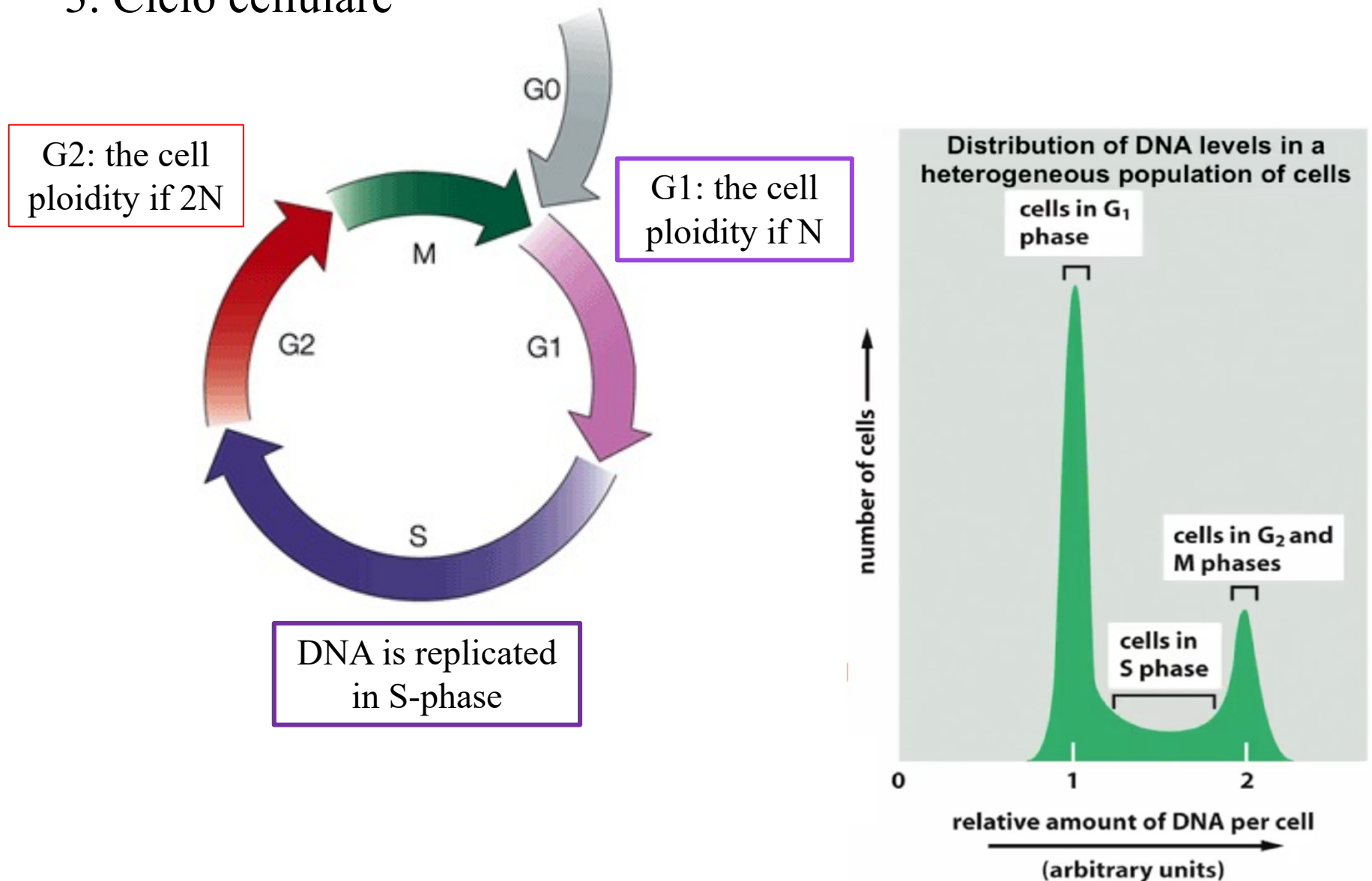
APPLICAZIONI

2. Valutazione di apoptosi (efficacia di un trattamento)



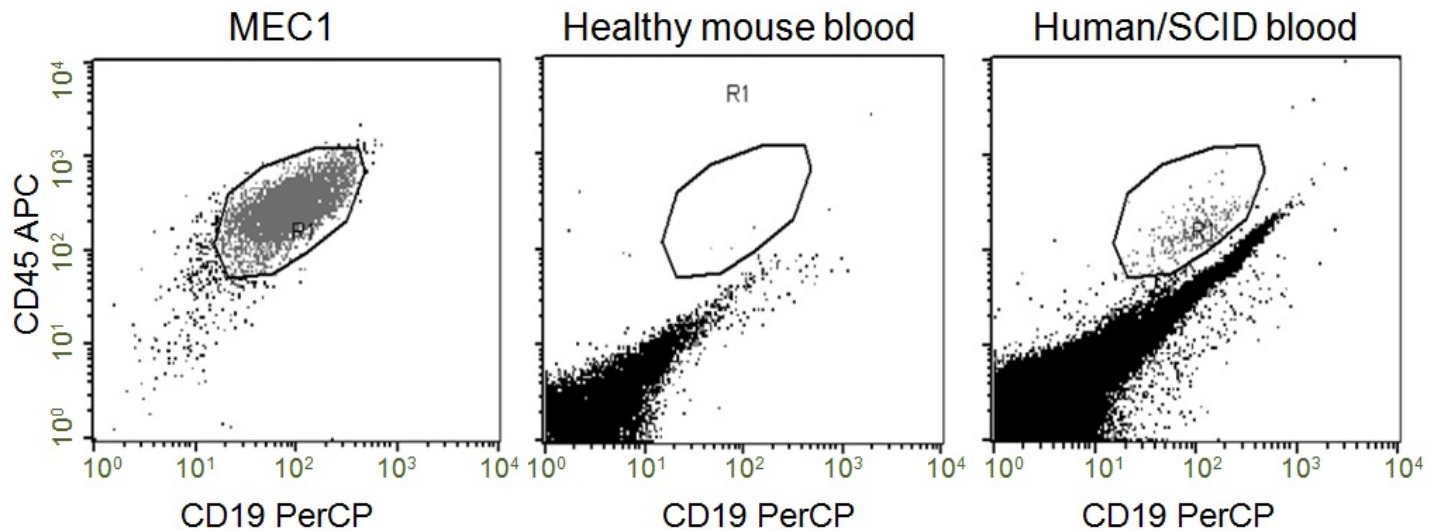
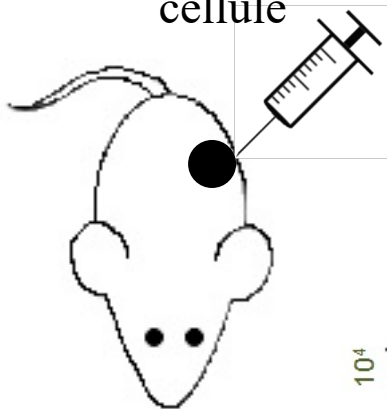
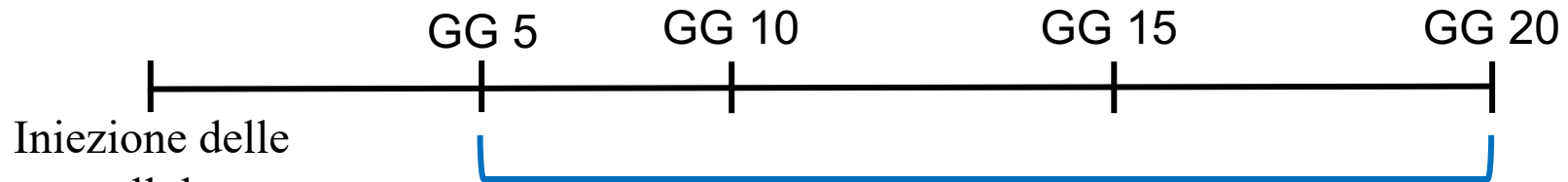
APPLICAZIONI

3. Ciclo cellulare



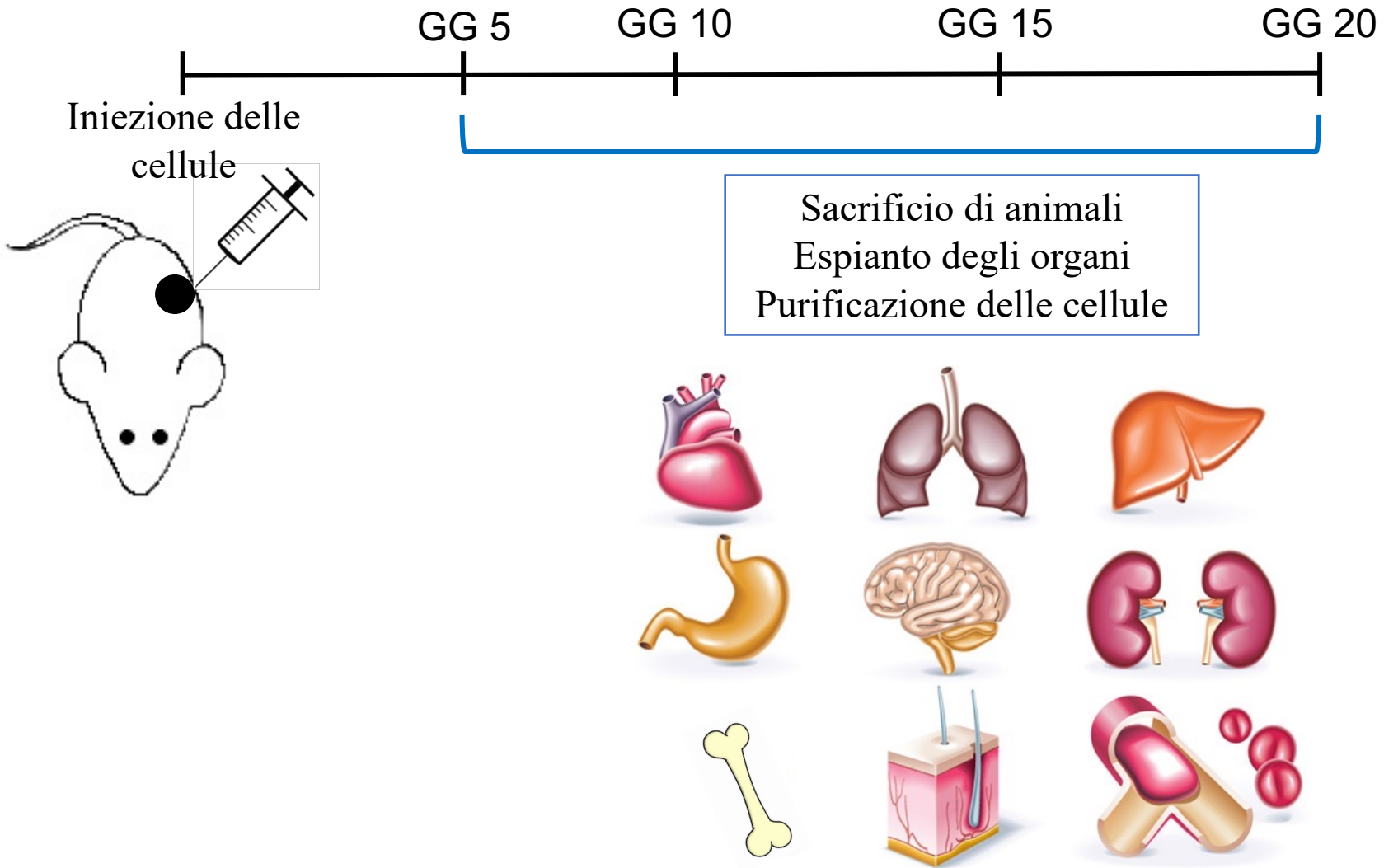
APPLICAZIONI

4a. Caratterizzazione di un modello animale



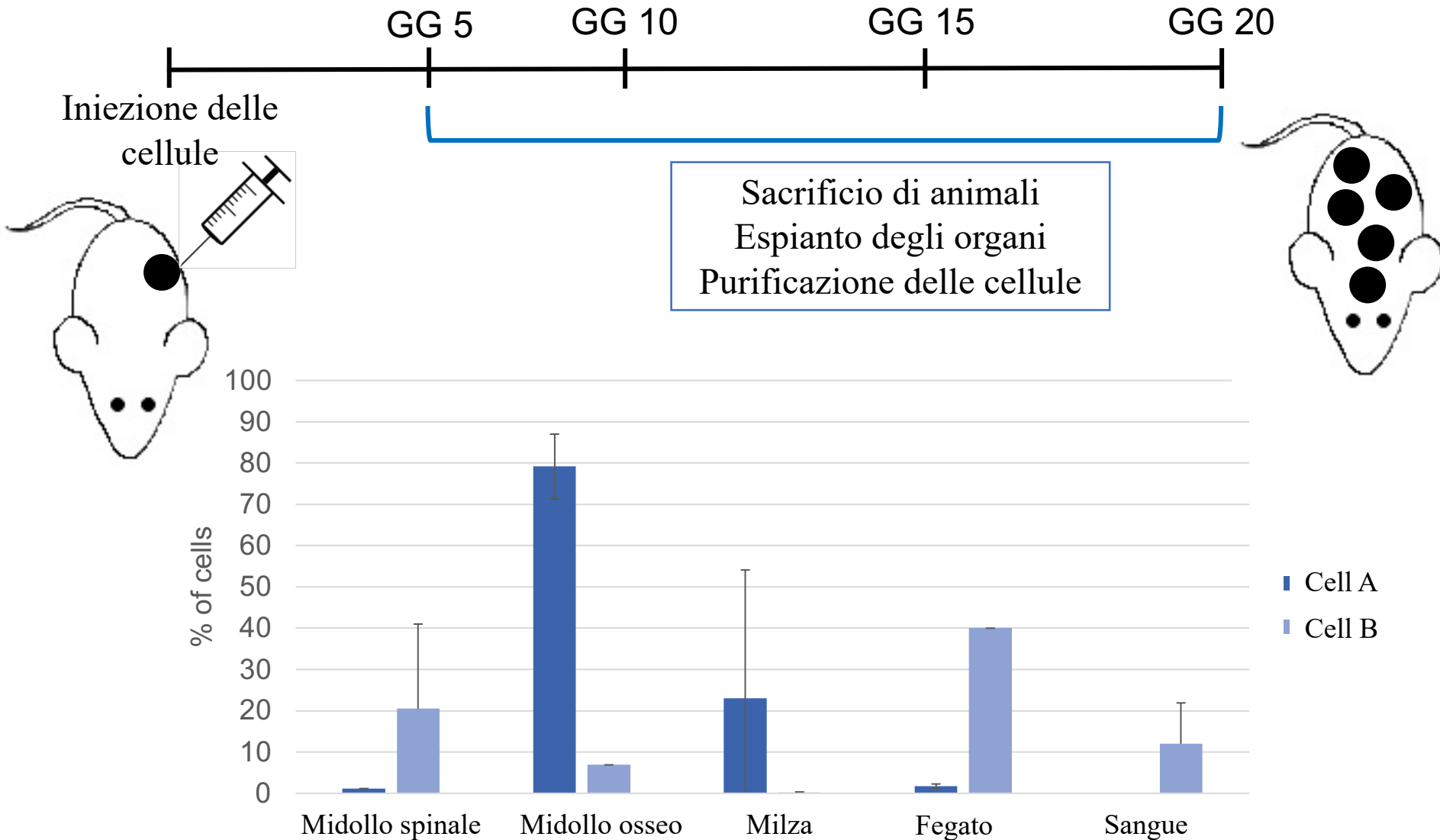
APPLICAZIONI

4b. Caratterizzazione di un modello animale



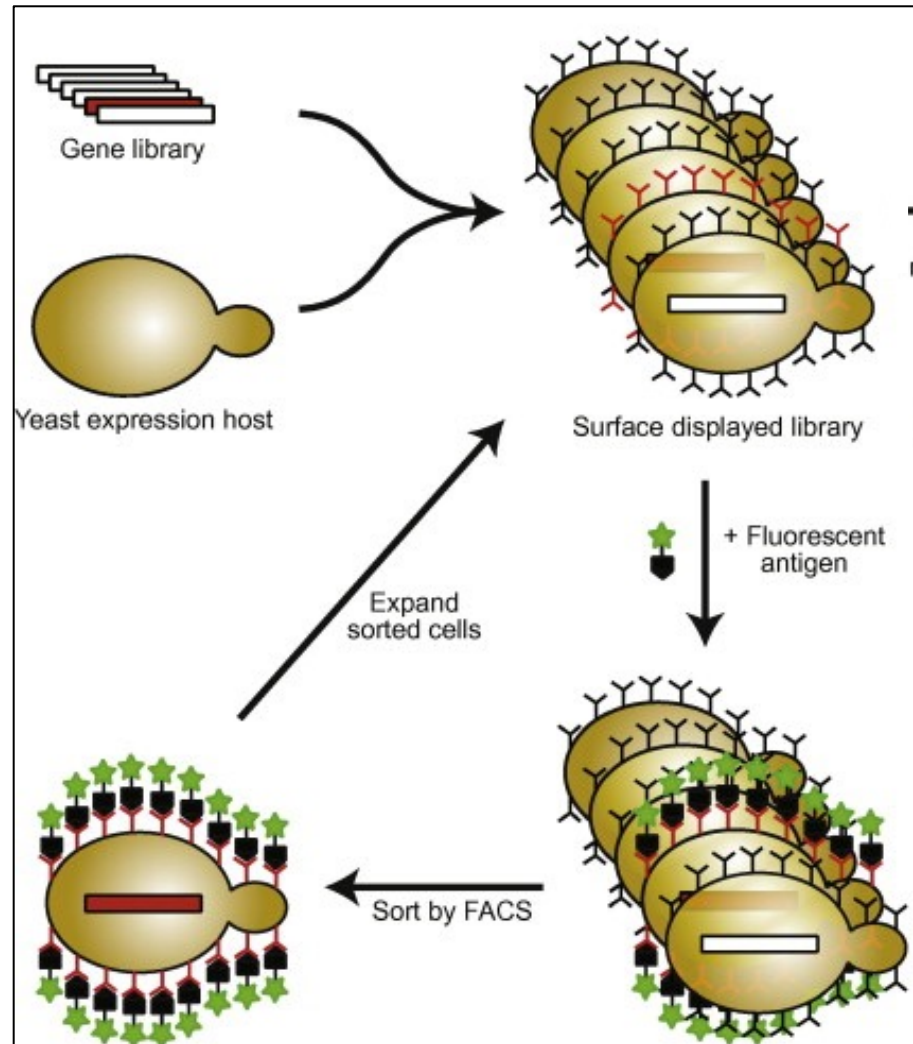
APPLICAZIONI

4b. Caratterizzazione di un modello animale



APPLICAZIONI

5. Yeast Display



APPLICAZIONI

5. Batteri

