

# Áramlási citometria

2011. / 4

**Immunológiai és Biotechnológiai Intézet**

**PTE KK**

# Az áramlási citometria elve

Az áramlási citometria („Flow cytometria”) sejtek **gyors, multiparaméteres** vizsgálatára alkalmas laboratóriumi módszer. Segítségével **kevert sejtpopulációkban** az egyes sejttípusok külön mérhetőek, analizálhatók és szeparálhatóak fenotípusuk, vagy funkcionális állapotuk szerint.

A rutinban használt áramlási citométerek segítségével egy mintában, egyidőben mérhető a sejtek nagysága, granuláltsága, és 4-6 fluoreszcens molekula jele. Így egy-egy sejttípusról 4-6 különböző **paramétert tudunk egyszerre meghatározni.**

# Direkt immunfluoreszcens jelölés

1. **50  $\mu$ l vért adni a már előkészített antitest-keverékekhez, inkubálás 30 percig.**
2. **1 ml RBC lízis puffert adni a mintákhoz, inkubálás 10 percig.**
3. **2 ml PBS-sel 1000 rpm-en centrifugálással mosás 5 percig.**
4. **Az üledék pelletet reszuszpendálása 500  $\mu$ l FACS-Fix-ben (0.5 % PFA - PBS).**
5. **Mérés FACSCalibur áramlási citométerrel, analízis a CellQuest programmal.**

# Minták

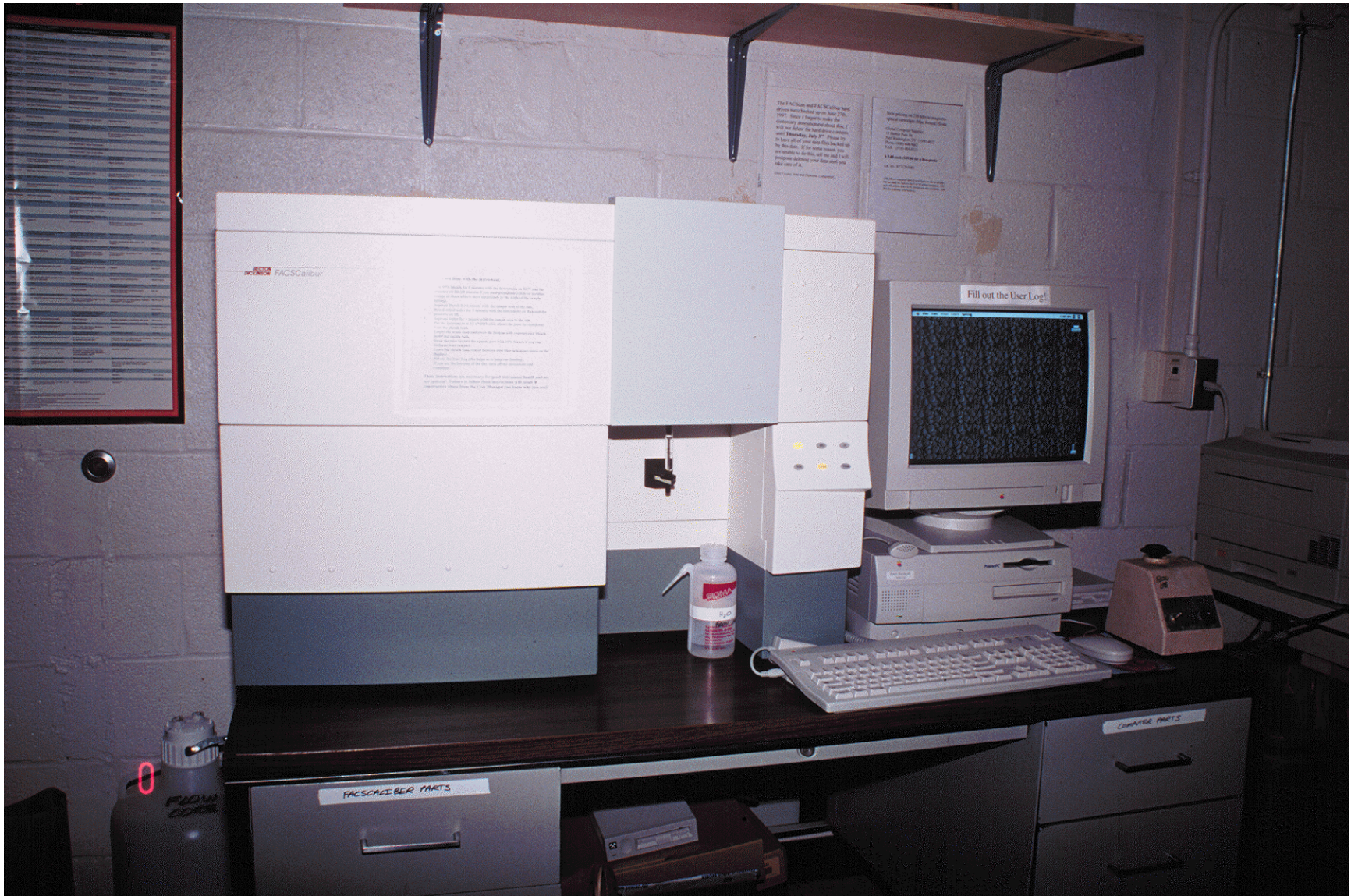
- 1. autofluorescens próba (v. izotípus ktrl.)**
- 2. anti-CD3-FITC + anti-CD4-PE**
- 3. anti-CD3-FITC + anti-CD8-PE**
- 4. anti-CD3-FITC + anti-CD56-CyC**
- 5. anti-CD19-FITC + anti-CD5-PE**
- 6. anti-CD3-FITC + anti-CD25-PE**

# CD-markerek (Cluster of Differentiation)

- **Sejtvonalmarkerek**: pl. CD3 T-sejtek; CD56 NK sejtek
- **Érés markerek**: CD1 thymocyták, CD10 (CALLa)
- **Aktivációs markerek**: CD25(IL-2R $\alpha$ ) T- B-sejtek, monociták; CD11a(LFA-1) monocyták, granulocyták



# FACS Calibur áramlási citométer







**FACS Vantage  
(sorter)**

**FACS Aria  
(digitális áramlási citométer)**

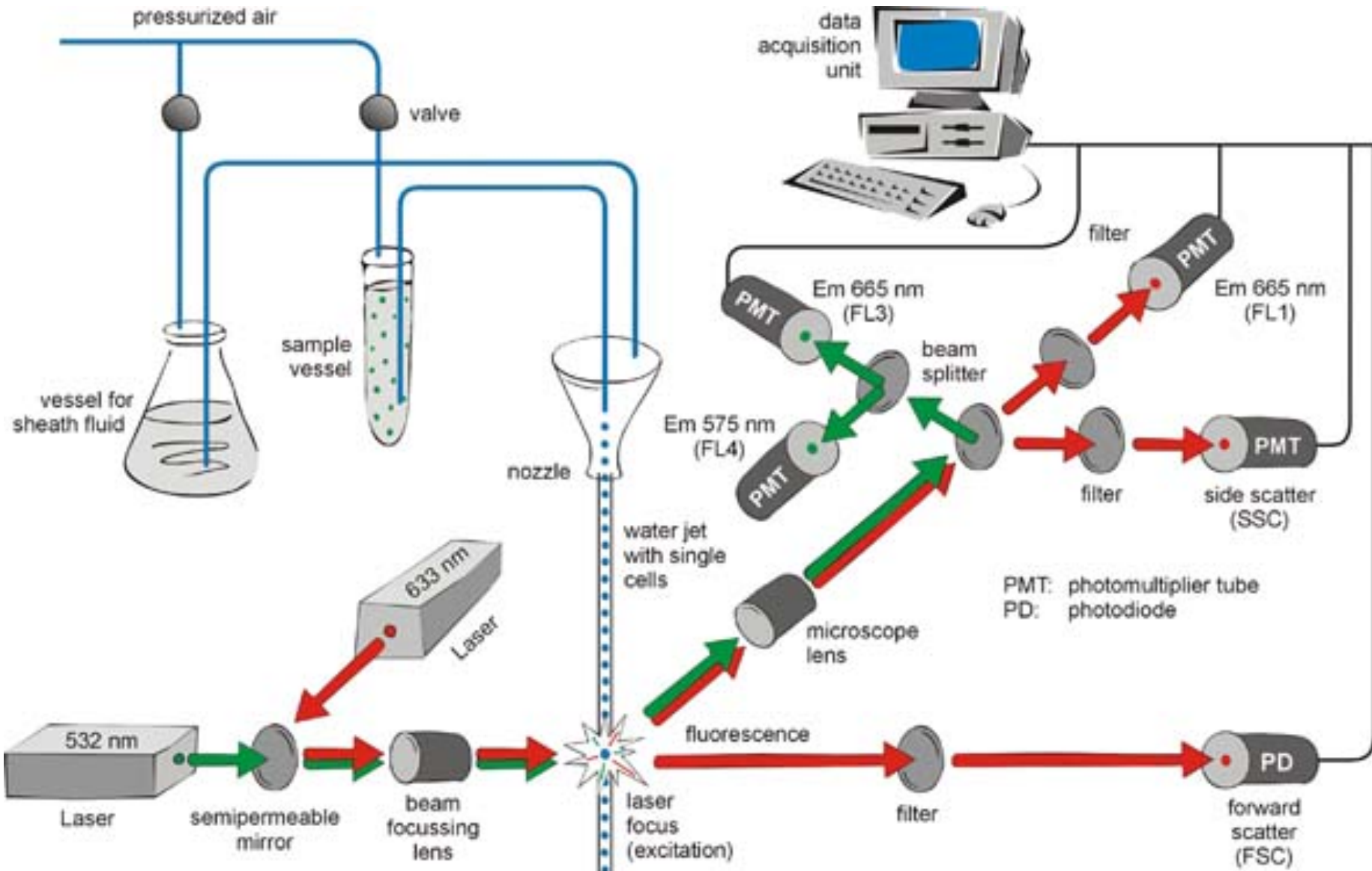


# **Az áramlási citométer fő komponensei**

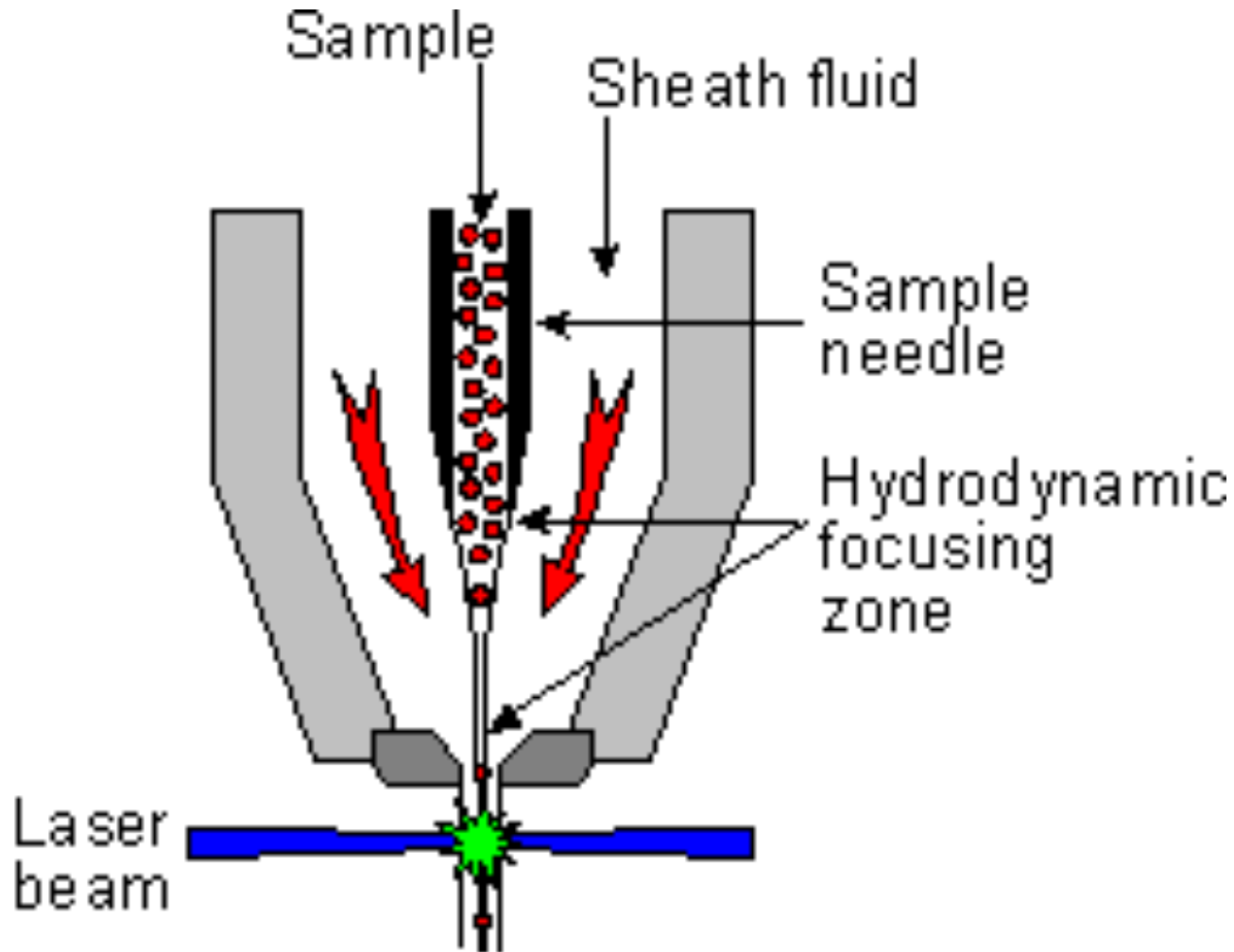
- **Folyadékok – köpenyfolyadék (sheath fluid); hidrodinamikus fókusztálás**
- **Optika – lézerek, lencsék, detektorok**
- **Komputer – kontroll és analízis**



# Az áramlási citométer felépítése

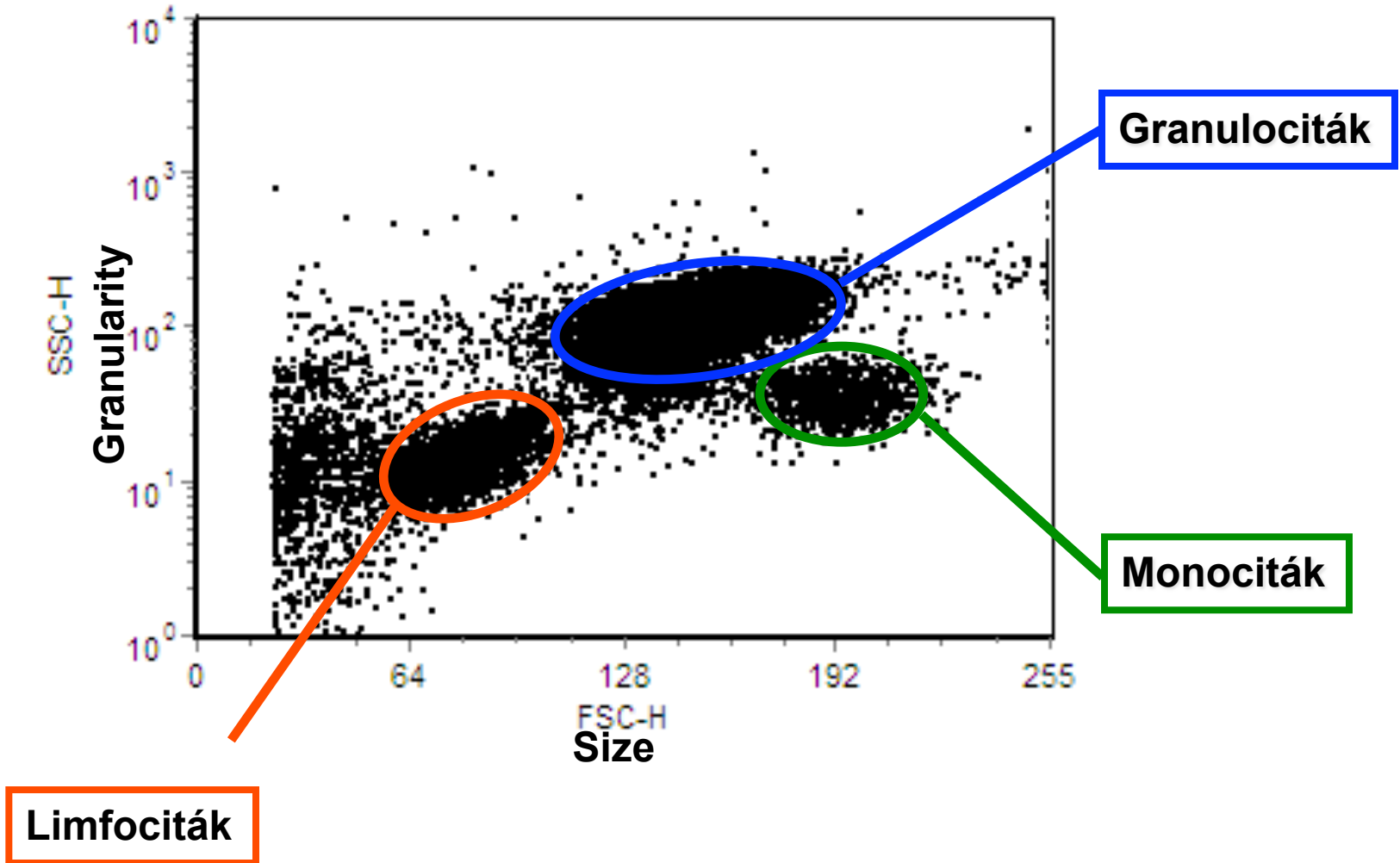


# Hidrodinamikai fókuszálas



# Méret és granularitás (FSC, SSC)

Humán perifériás vér



# Fluoreszcencia

## Gerjesztés (excitation) - Lézerek:

- Argon-ion (488 nm) - kék
- HeNe (633 nm) – piros
- UV
- Dye-lasers – pl. zöld

## Emisszió – Detektorok:

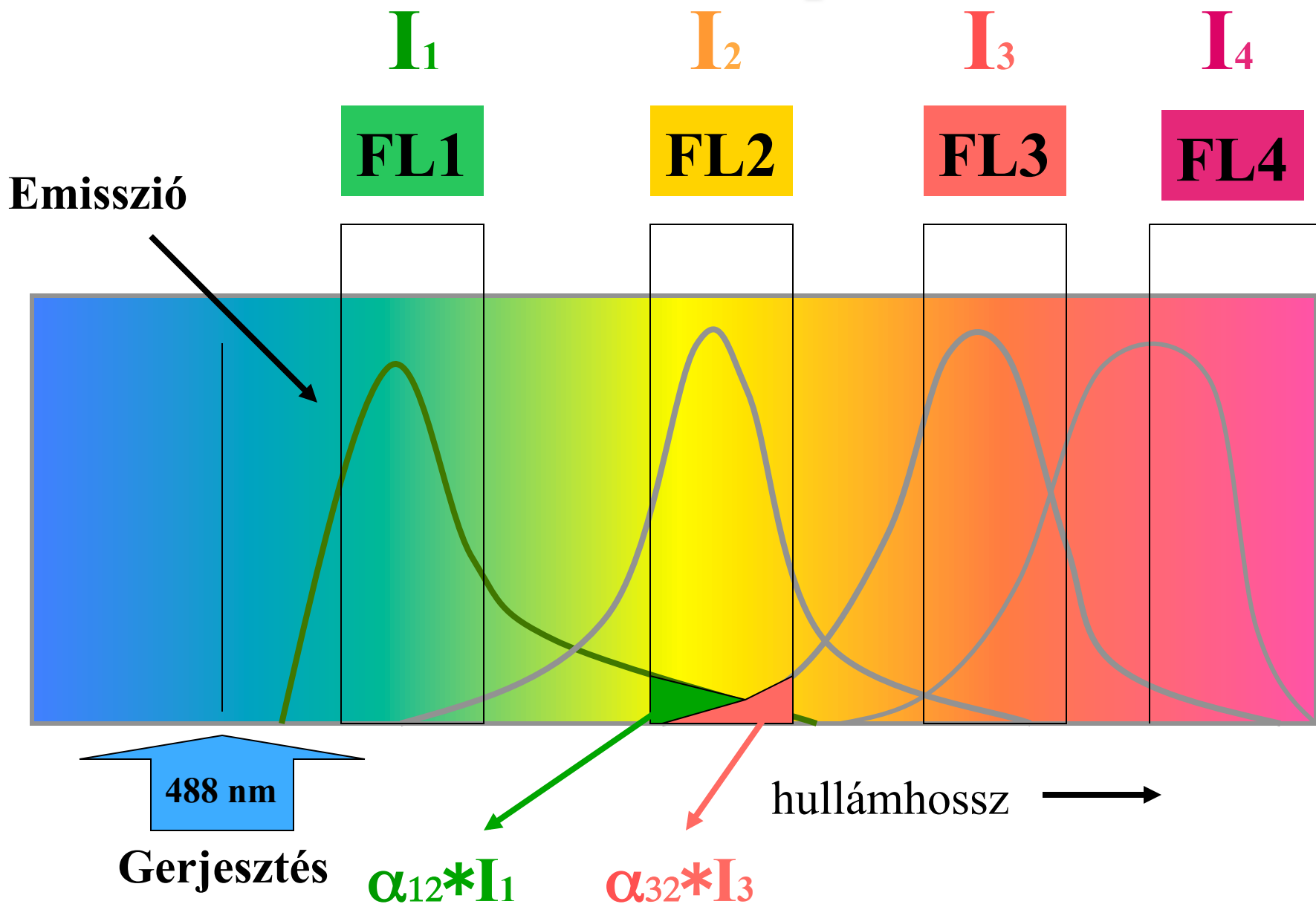
FL1: 515-545 nm

FL2: 560-600 nm

FL3: 610-660 nm

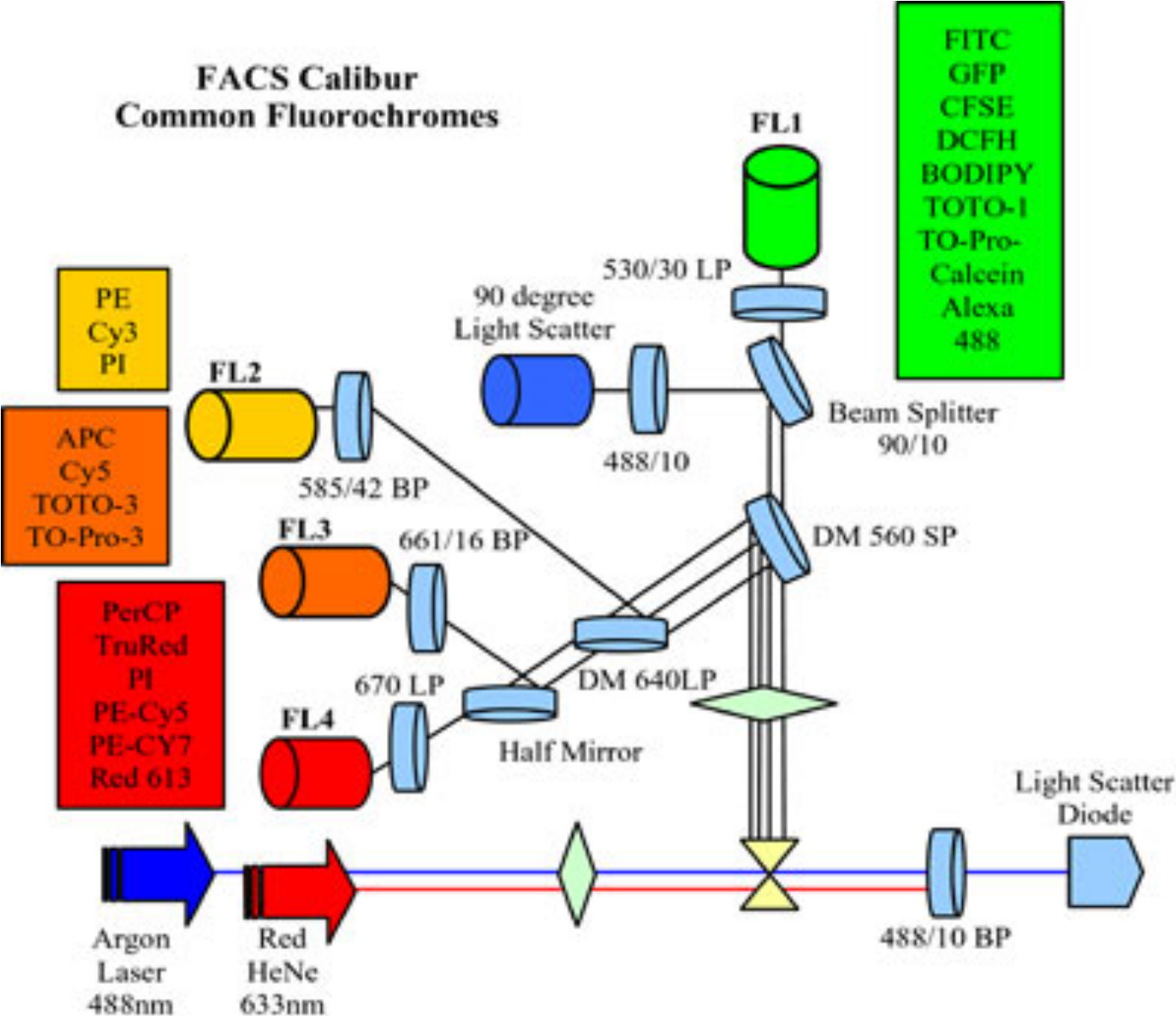
FL4: 670 nm <

# A fluoreszcens spektrum

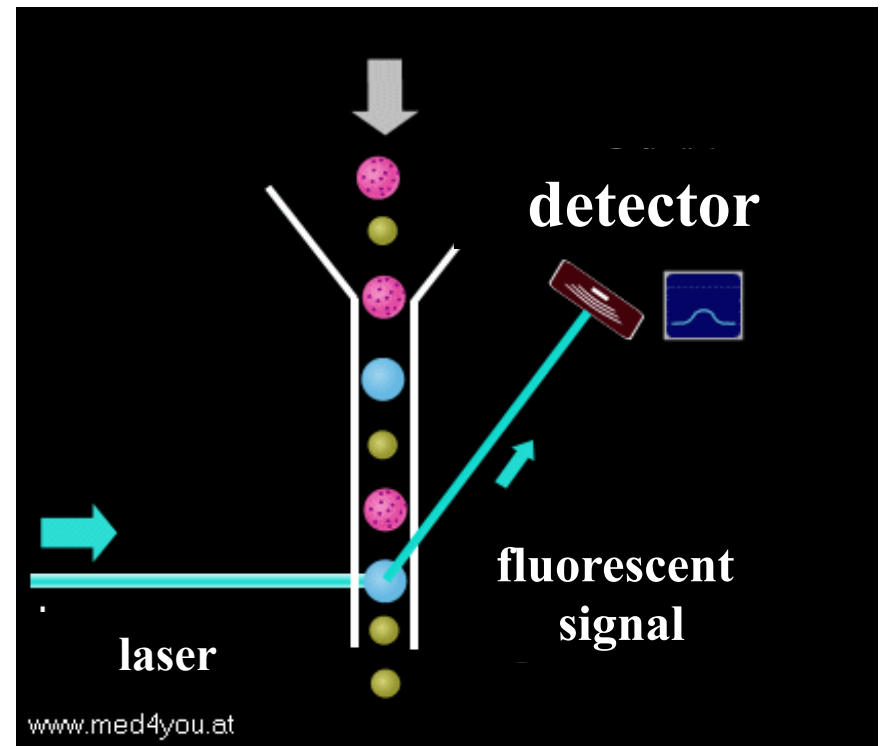
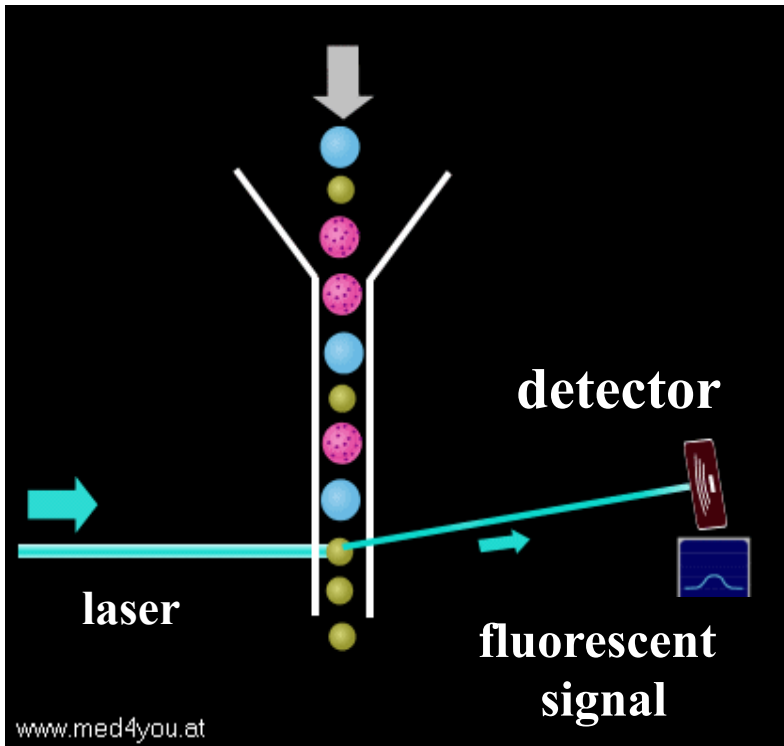




# FACS Calibur flow cytometer felépítése



# Fluoreszcens jelek detektálása



# Fluorokrómok

Fluorochrome	Fluorescence Emission Color	Ex-Max (nm)	Excitation Laser Line (nm)	Em-Max (nm)
Alexa Fluor® 405	Blue	401	360, 405, 407	421
Pacific Blue®	Blue	410	360, 405, 407	455
Alexa Fluor® 488	Green	495	488	519
FITC	Green	494	488	519
PE	Yellow	496, 546	488, 532	578
PE-Texas Red®	Orange	496, 546	488, 532	615
Texas Red®**	Orange	595	595	615
APC*	Red	650	595, 633, 635, 647	660
Alexa Fluor® 647	Red	650	595, 633, 635, 647	668
PE-Cy5*	Red	496, 546	488, 532	667
PerCP	Red	482	488, 532	678
PerCP-Cy5.5	Far Red	482	488, 532	695
PE-Cy7	InfraRed <sup>†</sup>	496, 546	488, 532	785
APC-Cy7	InfraRed <sup>†</sup>	650	595, 633, 635, 647	785

<sup>†</sup> *InfraRed* detection requires a Hamamatsu R3896 Photomultiplier Tube (comes with detector option).

\* APC and PE-Cy5 may be used together on instruments with cross-beam compensation.

\*\* Texas Red® detection requires a dye laser.

# Vizsgálati irányok, lehetőségek:

## 1. Immunfenotipizálás:

- Malignus **hematológiai** kórképek diagnosztikája és differenciál diagnosztikája
- **Immunhiányos állapotok** diagnosztikája és differenciál diagnosztikája
- **Autoimmun betegségek** aktivitásának nyomonkövetése
- Pre- és posttranszplantációs állapotok nyomonkövetése
- **HLA-haplotípus** vizsgálata
- **Tumorsejtek** vizsgálata:
  - Proliferációs antigének vizsgálata
  - Adhéziós molekula expresszió kimutatás
- **Fertőző betegségek** diagnosztikája és nyomon követése
- Sejtfelszíni fehérje (vagy egyéb) struktúrák távolságának meghatározása (**energia transzfer**)

## 2. Quantitativ mérési lehetőségek

- Vizsgált markert expresszáló sejtek mennyiségének quantitativ meghatározása
- Sejtfelszínen expresszálódó antigének quantitativ meghatározása

## 2. DNS és RNS tartalom mérése

- **Sejtciklus** analízis
- **Apoptózis** mérés
- **Reticulocyt**a szám meghatározás

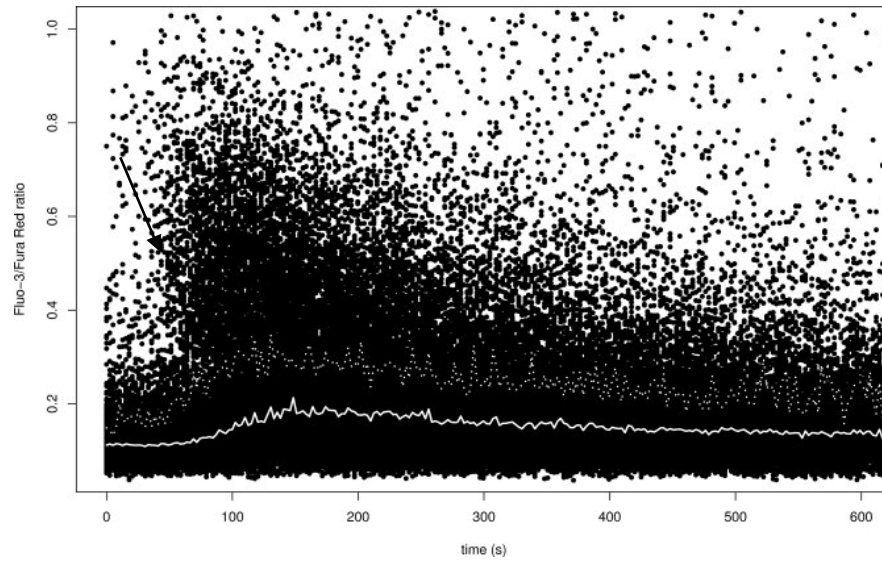
## 4. Funkcionális vizsgálatok

- **Phagocytáló képesség** vizsgálata
- Intracellularis **Ca<sup>++</sup> koncentráció** meghatározás
- Intracellularis **pH** meghatározás
- **Enzim** mennyiség, aktivitás ill. lokalizáció mérés
- **Reaktív oxigén intermedierek (ROI)** termelődésének detektálása (pl. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- **Kemotaxis** vizsgálat
- **Proliferációs** index meghatározása / nyomonkövetése
- Egyéb

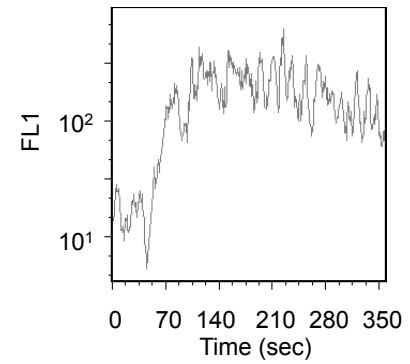
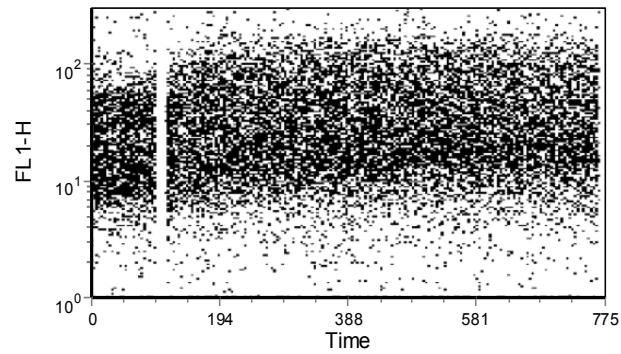
## 5. Sejtszeparálás



# Calcium influx

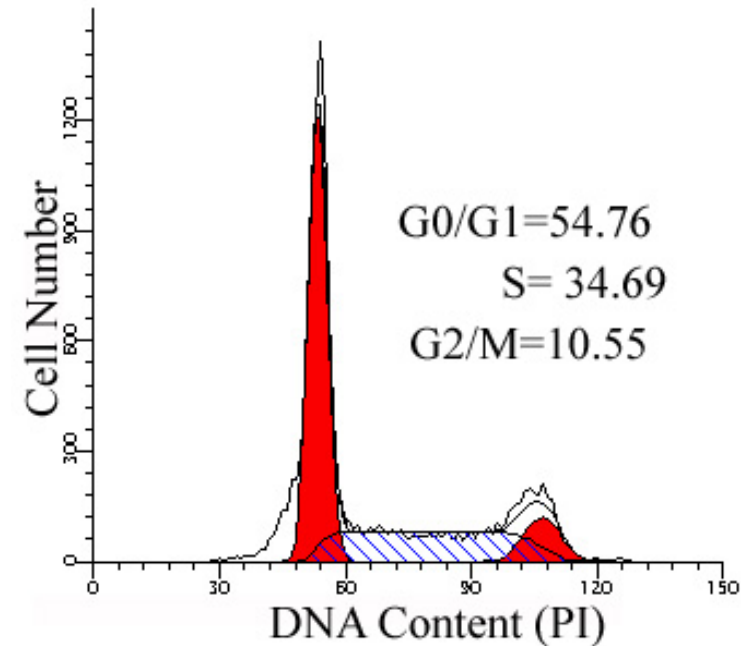
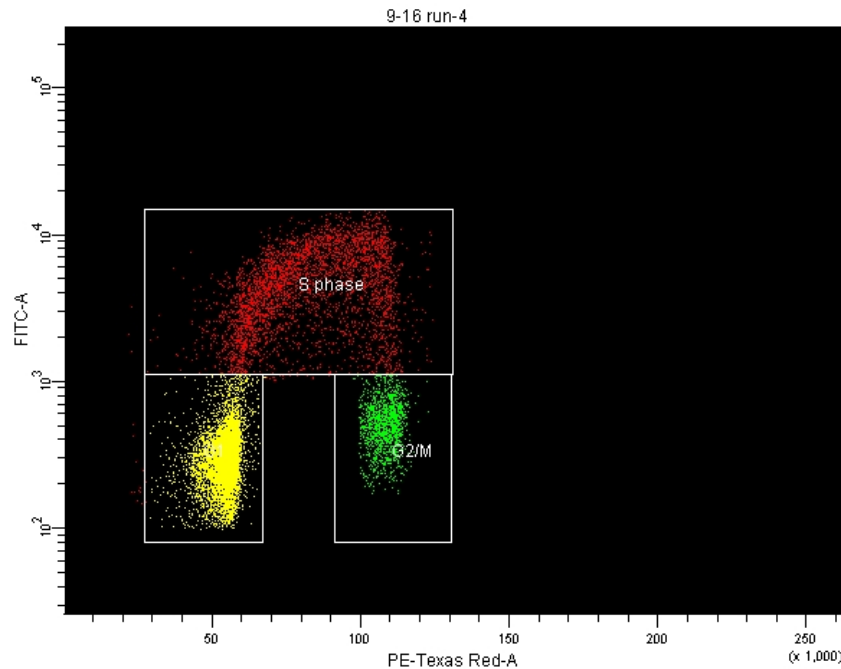
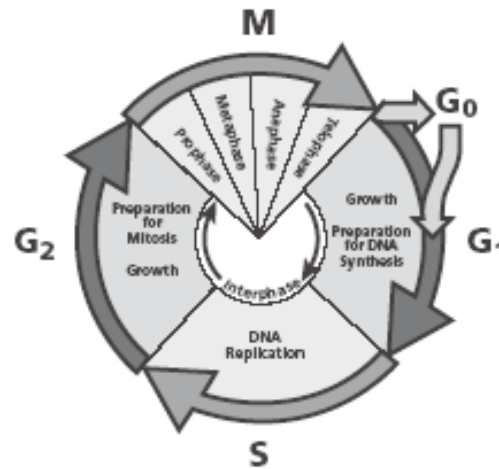


30  $\mu\text{g/ml}$  PHA kezelés



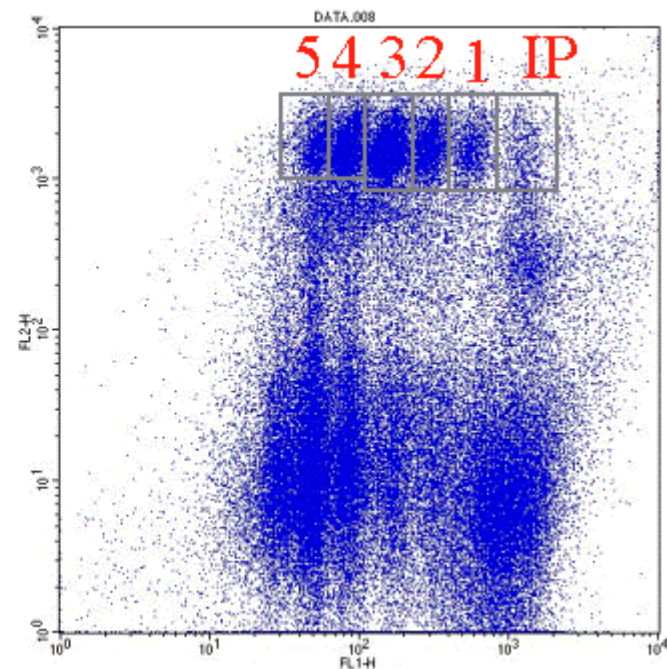
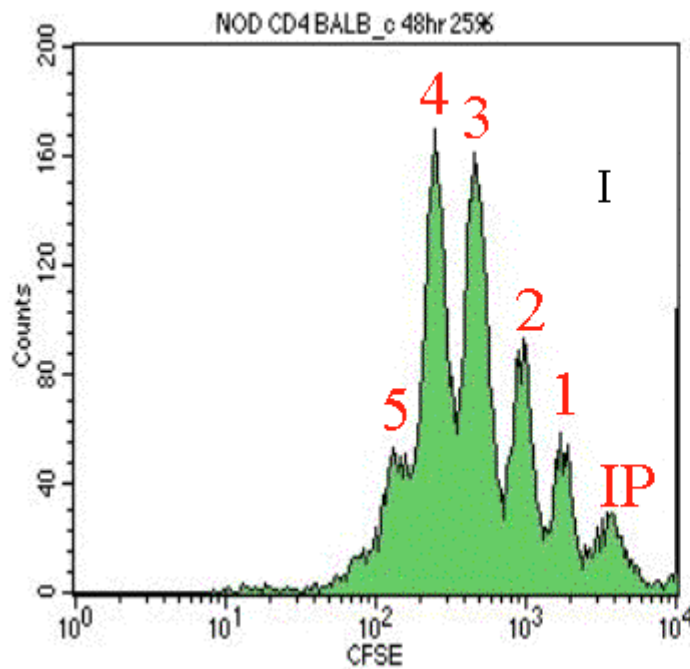
# Sejtproliferáció I

(BrdU incorporáció, propidium jodid)

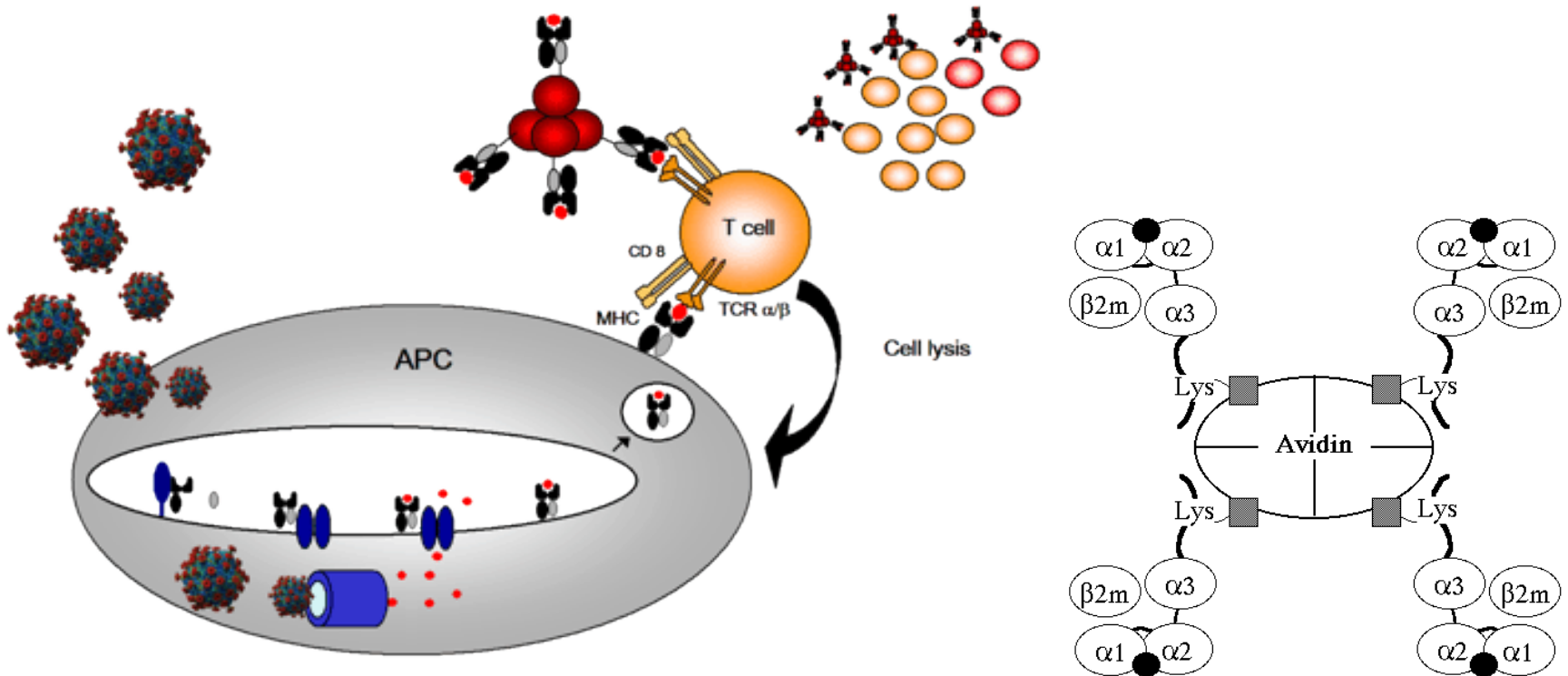


# Sejtproliferáció I - CFSE

(carboxi fluorescein succinimedyi ester)

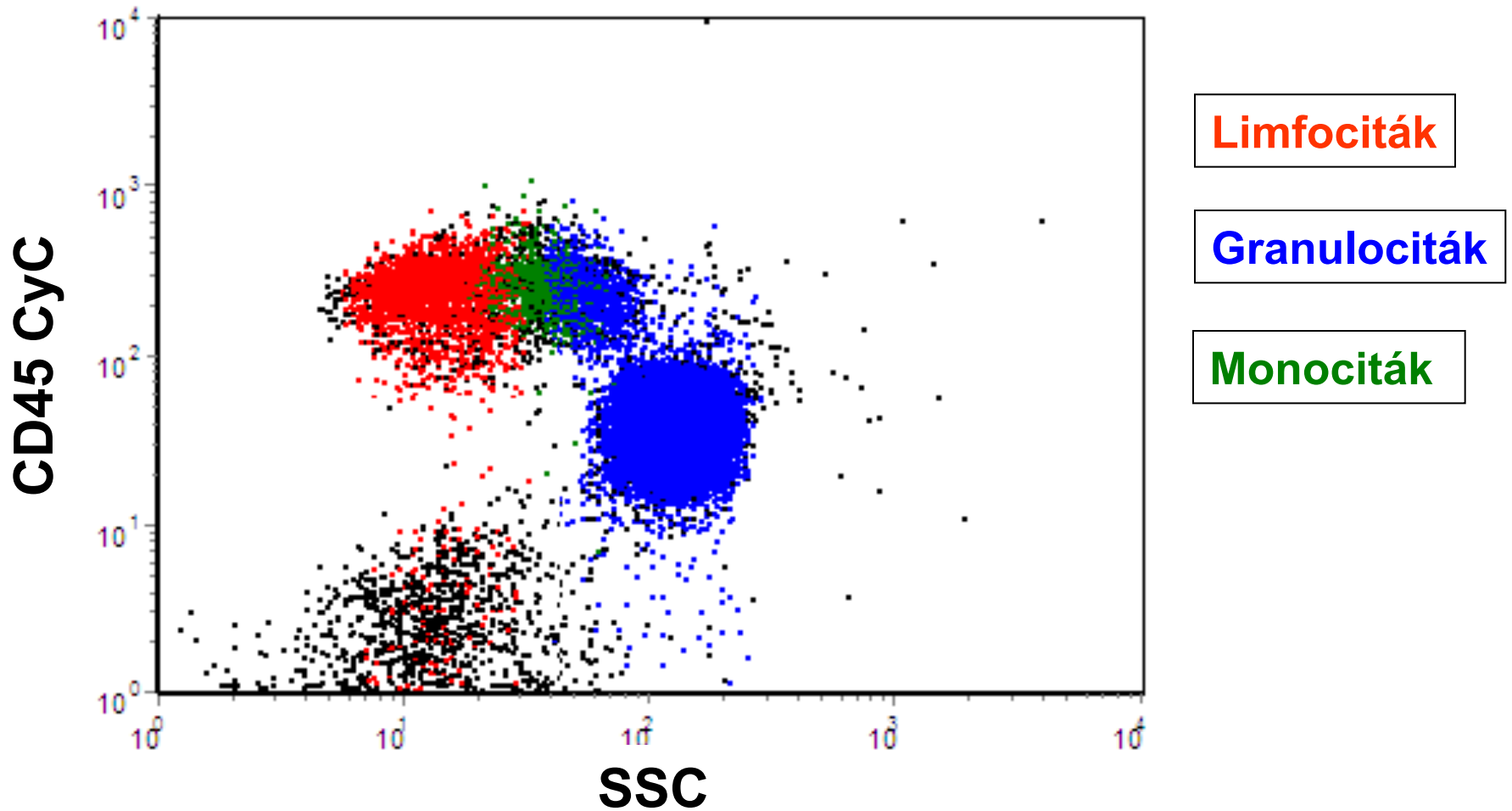


# Tetramer technology



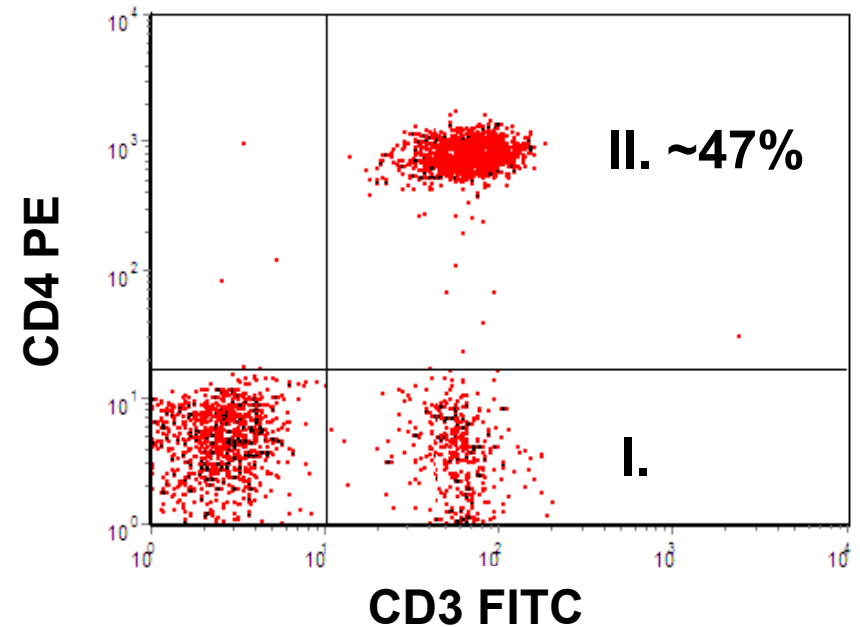
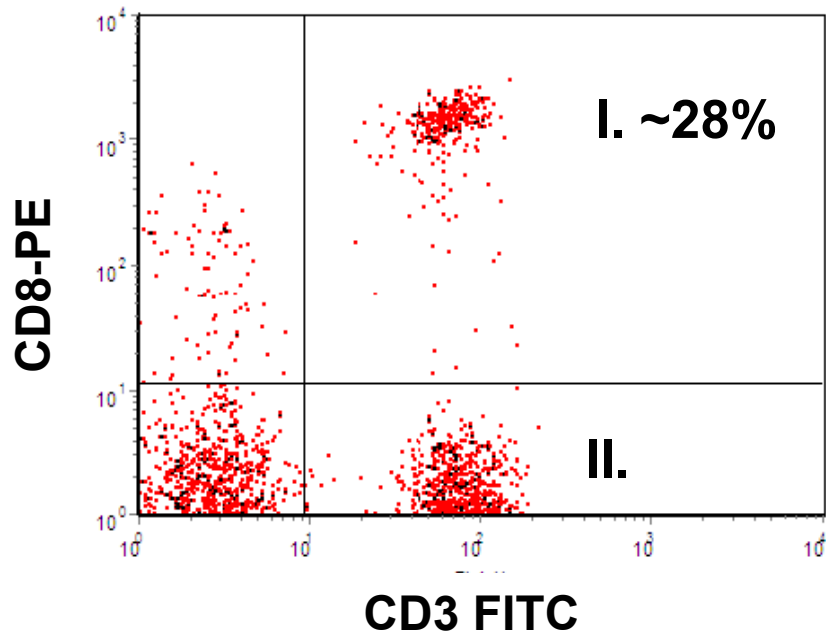
*MHC-peptide molecules elicit cytolytic T cell responses and stimulate the expansion of antigen-specific T cells. **Class I Tetramers** provide a powerful and general tool for the study of antigen-specific T cells.*

# CD45 expresszió (humán vér)





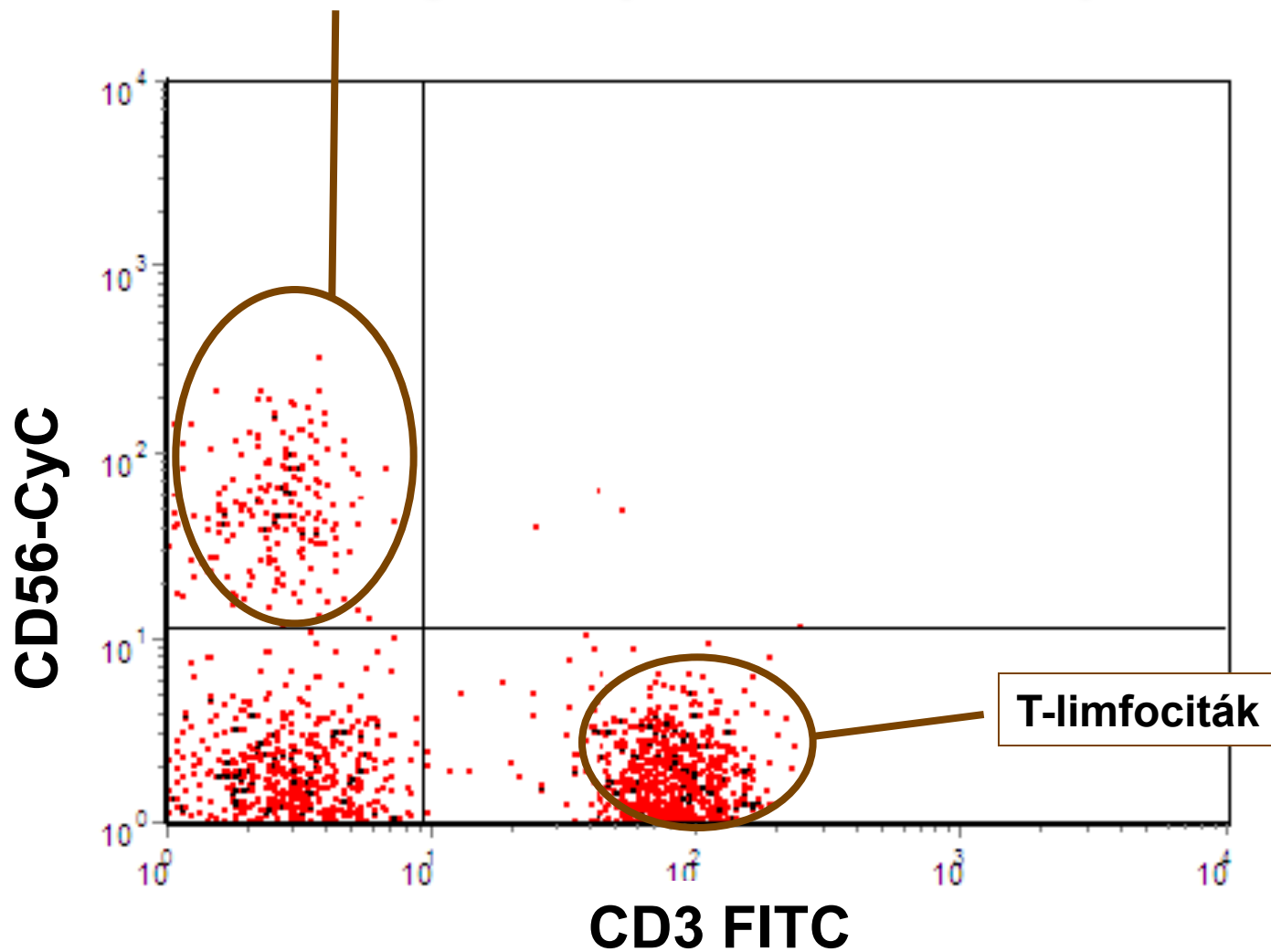
# Helper és citotoxikus T sejtek (humán vér)

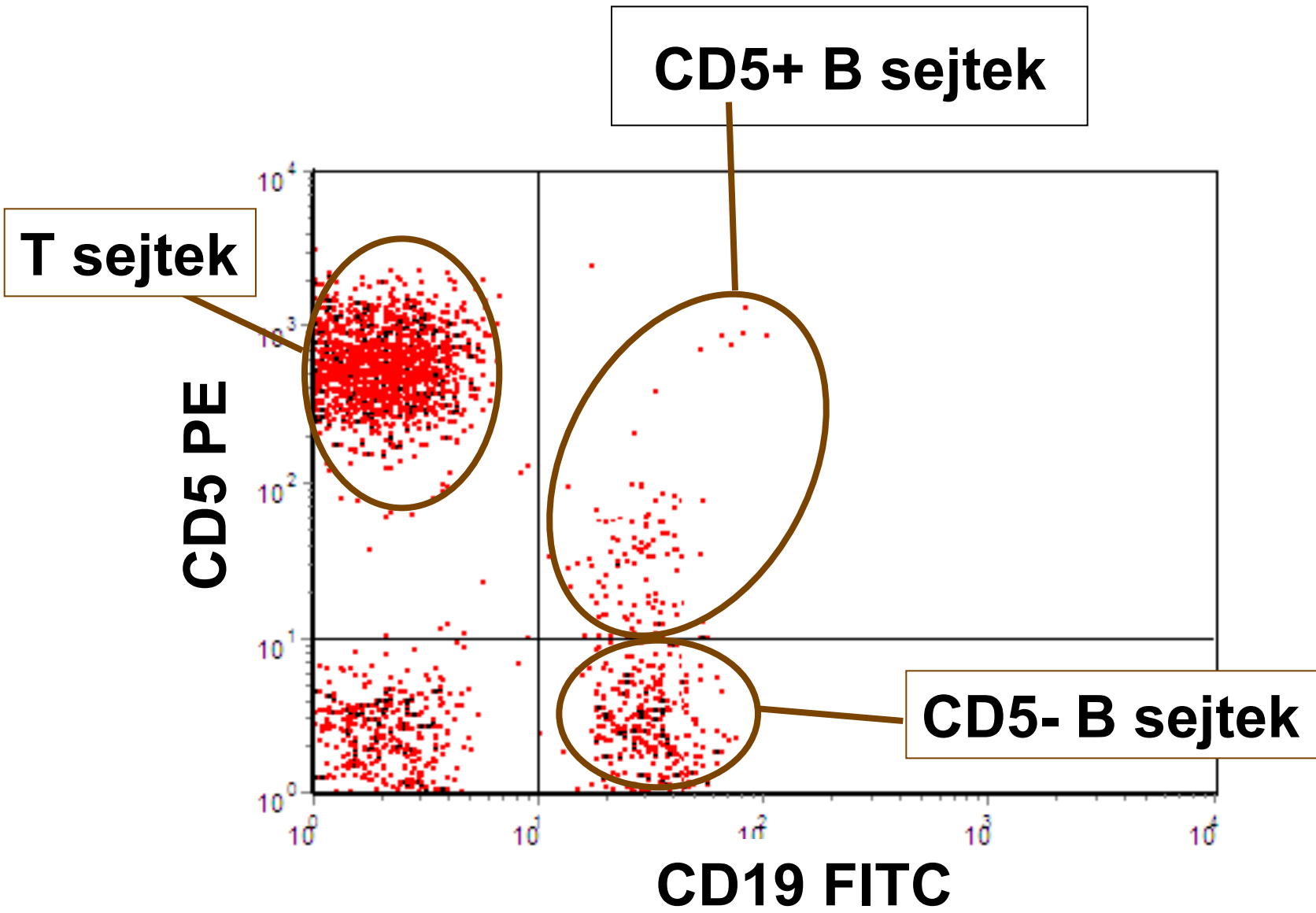


**I. - CD8+ (citotoxikus) T limfociták**

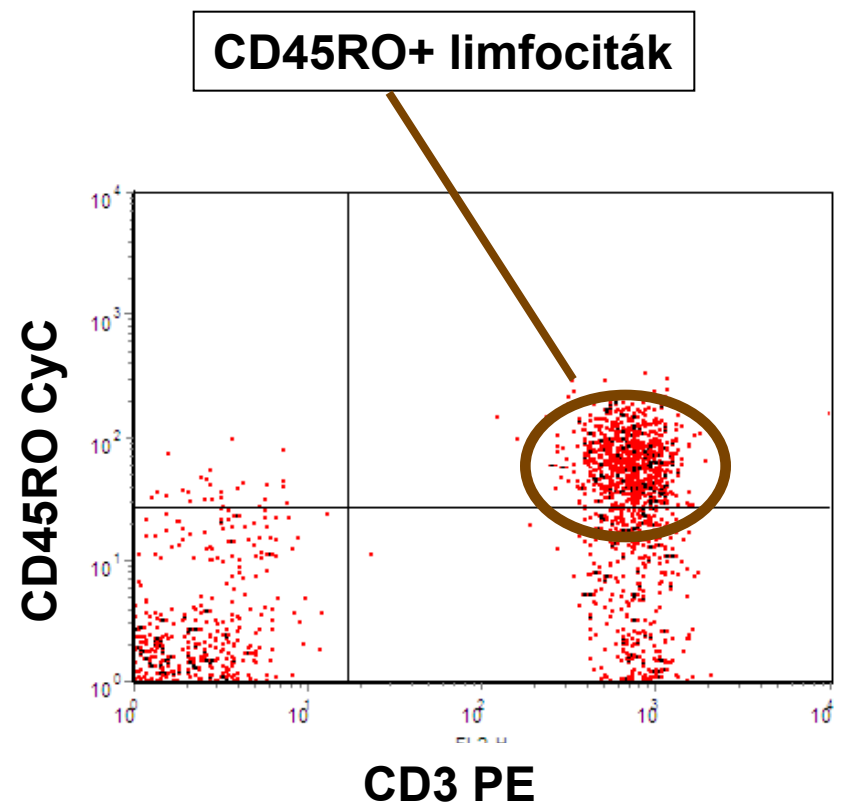
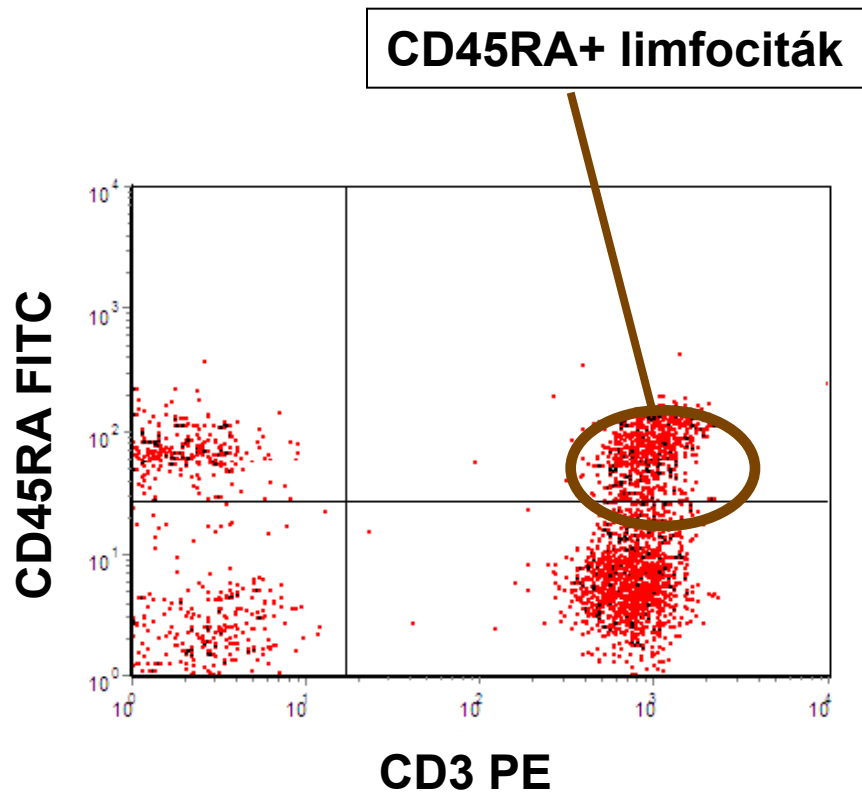
**II. - CD4+ (helper) T limfociták**

# NK sejtek (humán vér)

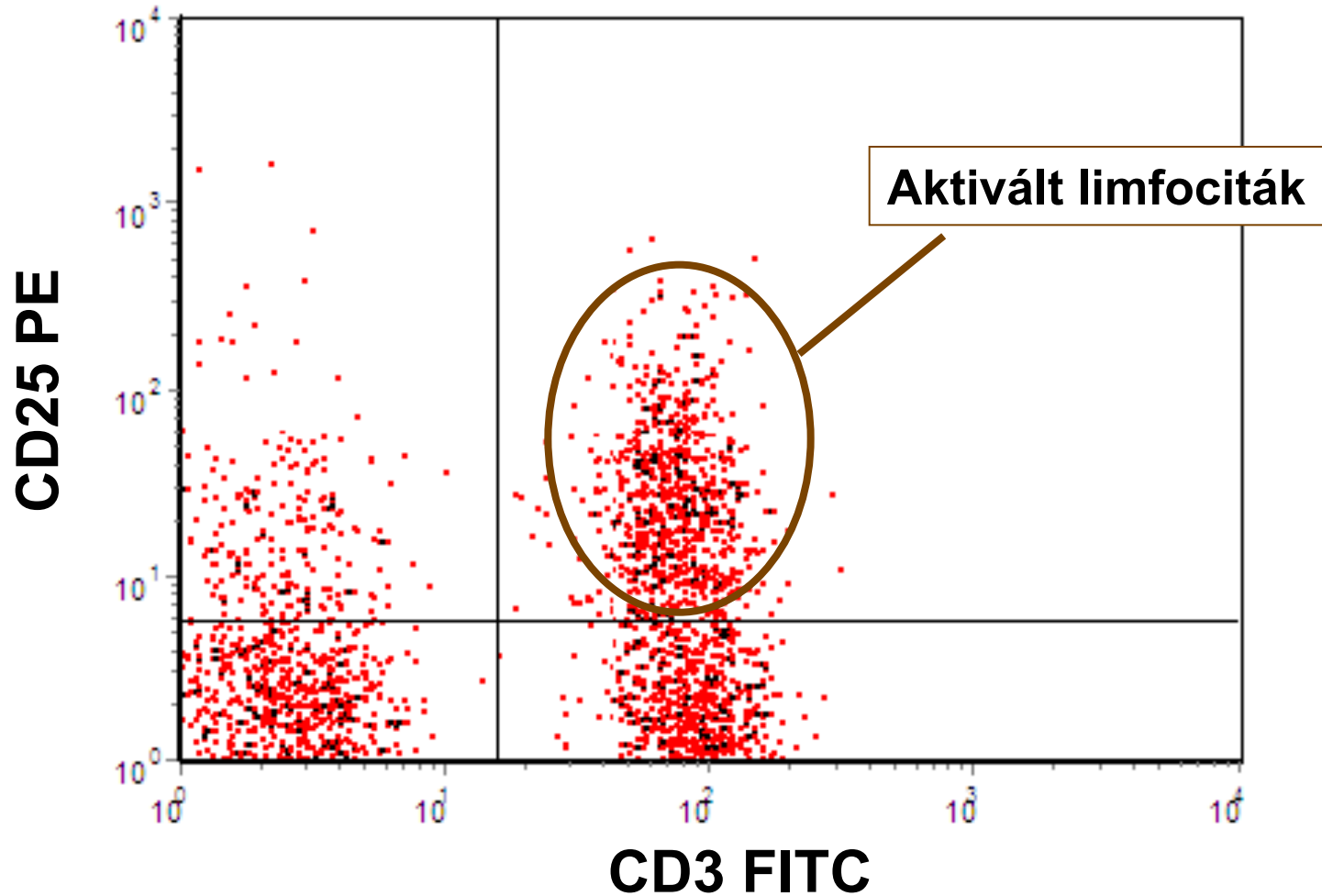




# CD45RA / RO (humán vér)

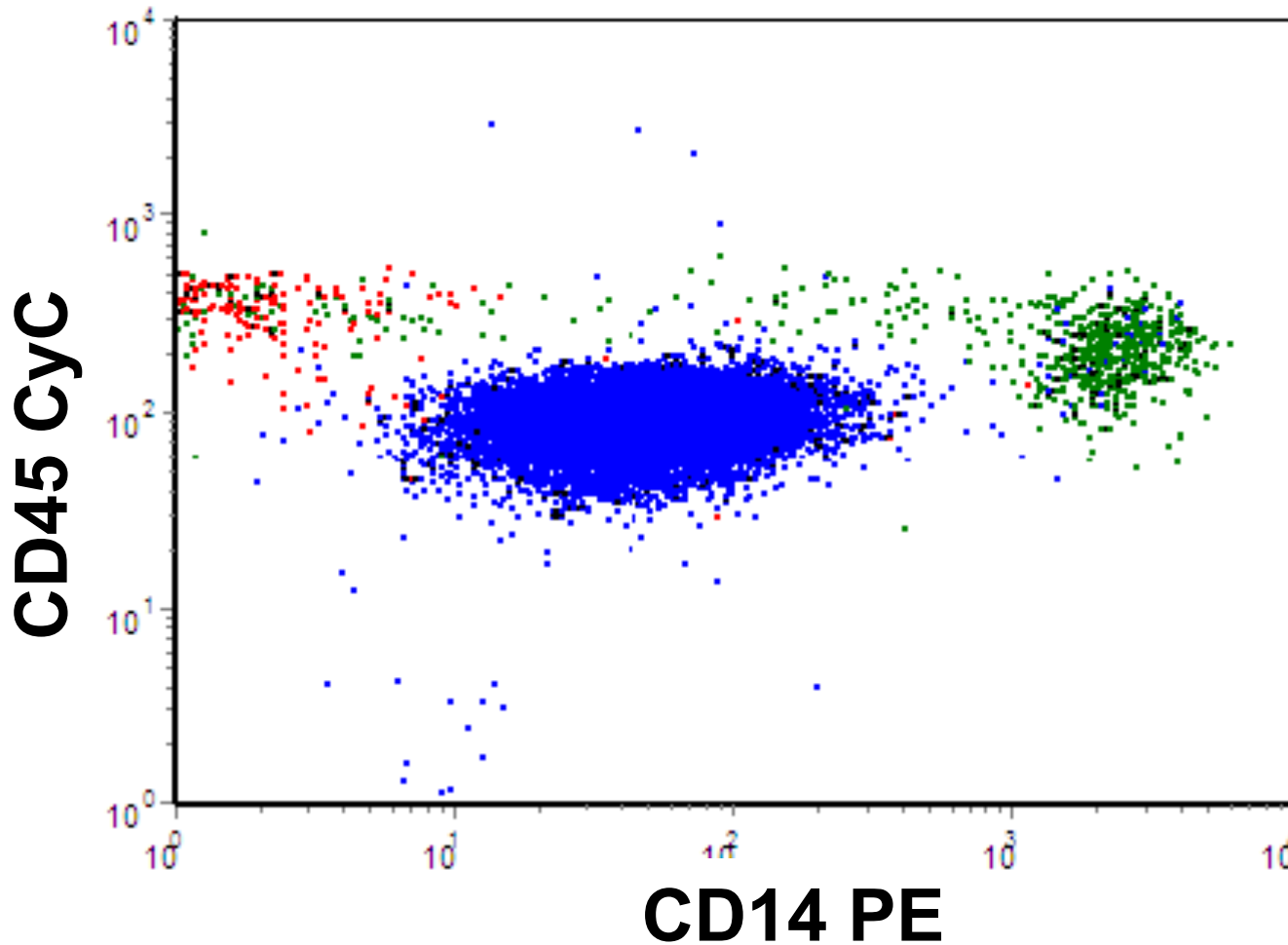


# IL2R $\alpha$ -lánc (CD25) expresszió (humán vér)





# CD14 expresszió (humán vér)



Limfociták

Granulociták

Monociták