

Введение в проточную цитометрию

Иван Андреевич Воробьев

Лекция прочитана на ББС МГУ летом 2022 года

Краткая история проточного цитометра

Основные изобретения:

**Ламинарный поток жидкости
ФЭУ**

Светодиод и лазер

Первый цитометр

Technicon - Hemalog D - 1974 – первый промышленный проточный цитометр. Он проводил измерения рассеивания и поглощения света при различных длинах волн (нейтрофилы и эозинофилы – по пероксидазной реакции; моноциты – реакция на эстеразу, и базофилы – окраска Альциановым синим). Возбуждение – от лампы накаливания.



Image from Shapiro
“Practical Flow
Cytometry”, Wiley-Liss,
1995

Первый проточный флюориметр

1977-78 Coulter Electronics создал серию Erics на основе 5 W аргонового лазера с полным анализом данных, флоппи-дискетом и принтером



Eric's V (вид спереди) и стойка управления (справа)

CytoFLEX (BeckmanCoulter)

Компактный прибор

До 6 лазеров (488, 638, 405, 561 и 375 и 808 нм); до 13 каналов флуоресценции.

Компрессор для подачи жидкости находится внутри – забор пробы производится шприцем.

Чувствительность – 30 MESF/PE. SSC от лазера 405 нм.

Размер частиц: 0,2-15 мкм.

Производительность – до 10000 событий в сек.

Скорости подачи образца переменные – 10-240 мкл/мин

Представление данных – 7 декад (10^7)



Attune – акустическая фокусировка

Акустическая фокусировка:
осевой поток создается звуковой волной (частота около 2 МГц), что позволяет создавать узкий поток с практически равномерными интервалами между клетками. В результате плотность клеток в потоке возрастает, и появляется возможность быстрого подсчета пробы (до 1 мл в минуту) без увеличения CV.
До 4-х лазеров, до 14 каналов флуоресценции.



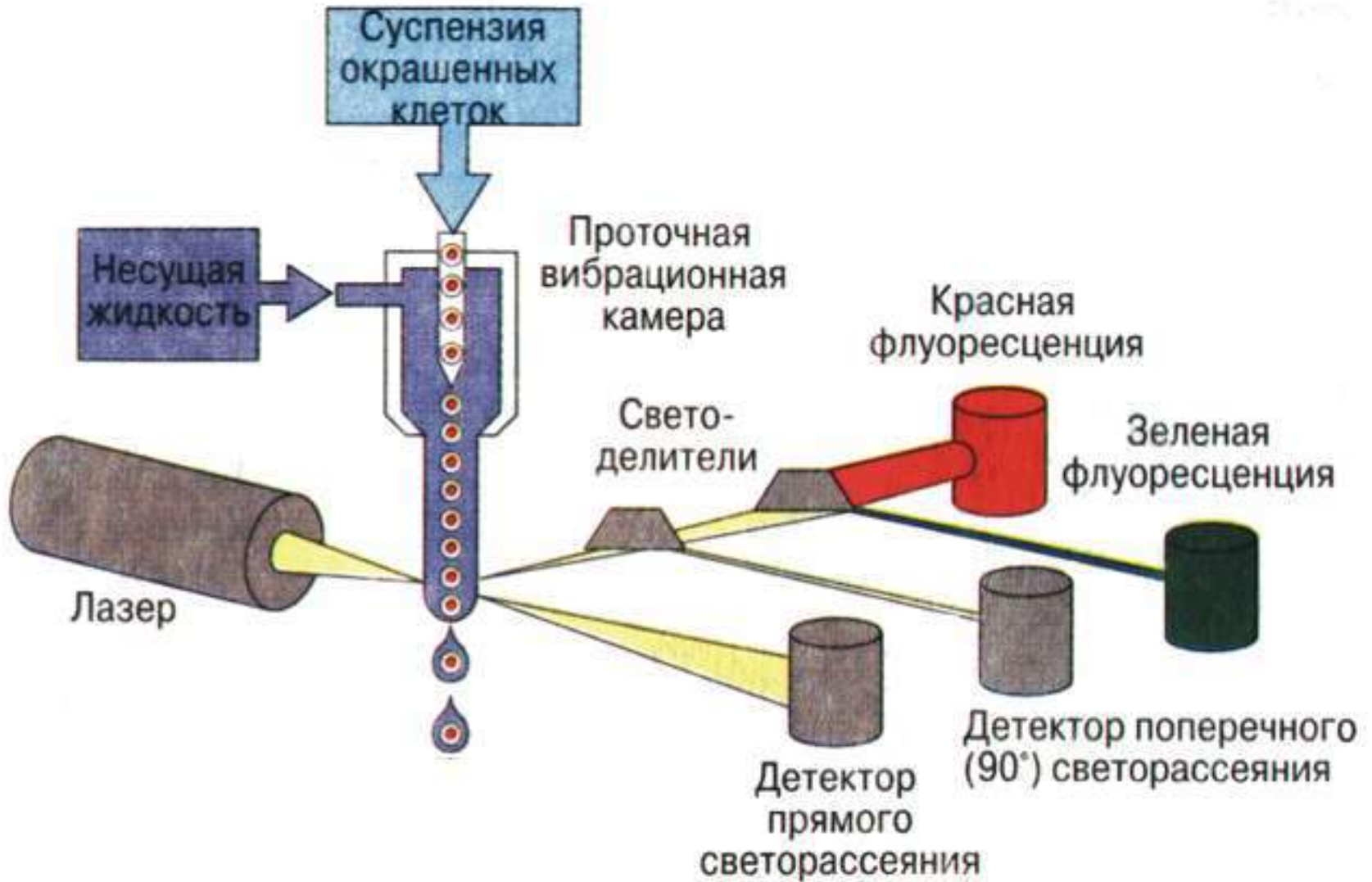
Accuri C6 – компактный цитометр



Имеет 2 лазера (488 и 640 нм), FSC/SSC и 4 канала флуоресценции.

Достоинства: малые размеры и вес, быстрый запуск после установки, большой динамический диапазон ФЭУ, позволяющий не настраивать их напряжение, довольно высокая чувствительность (100 MESF for PE).

Блок-схема проточного флуориметра-сортера



Основные компоненты проточного флюориметра

Гидравлика

- Частицы в ламинарном узком потоке жидкости
- Последовательно с большой скоростью проносятся

Оптика

- Через эллиптический луч света от лазера.
- Рассеянный ими свет и свет флуоресценции
- Собирается объективом, разделяется светофильтрами и

Электроника

- Регистрируется ФЭУ.
- Электрический сигнал с ФЭУ усиливается
- и превращается на АЦП в цифровые данные,
- Которые записываются компьютером в файл

Гидравлика проточного флуориметра

Гидравлика – система для создания ламинарного потока жидкости с регулируемой скоростью подачи частиц.

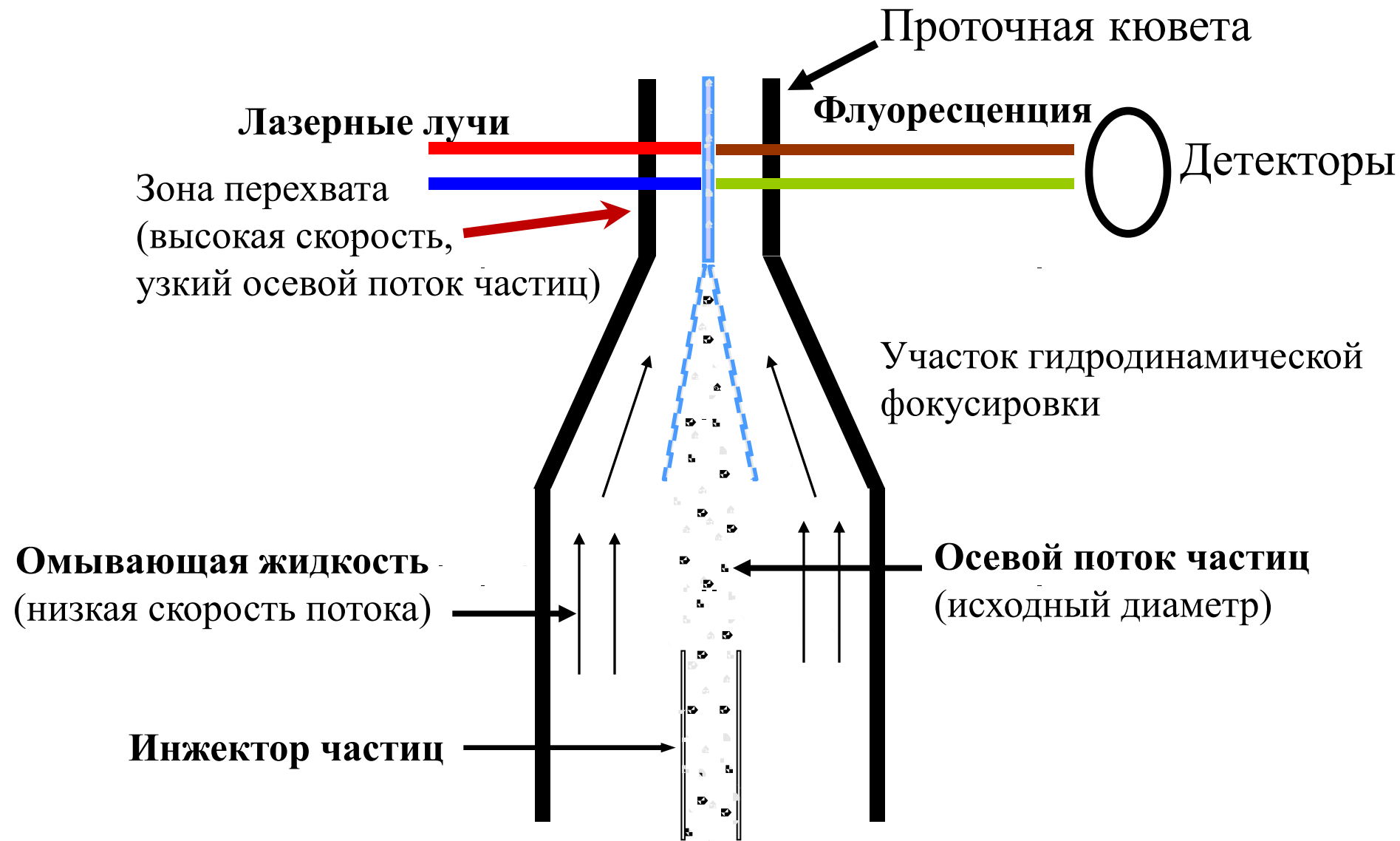
Два основных варианта – система с избыточным давлением и система забора пробы.

Система с избыточным давлением позволяет регулировать скорость подачи пробы в широких пределах.

Система забора пробы позволяет убрать громоздкую систему регулировки давления в пробирке с образцом.

Гибридная схема – объем образца сначала забирается внутрь прибора, а затем подается в проточную кювету под регулируемым давлением.

Формирование потока частиц в зоне «перехвата»



Параметры струи

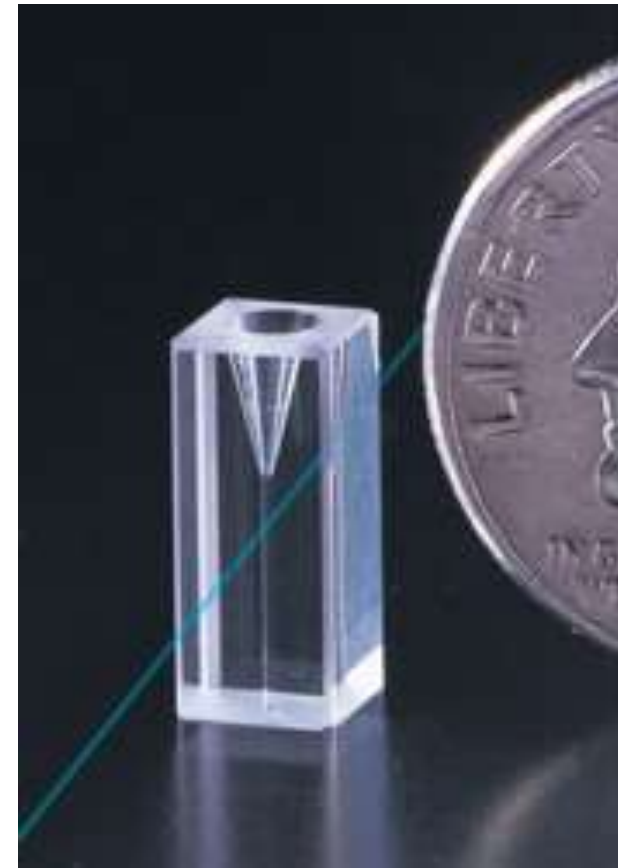
Диаметр струи (вместе с омывающей жидкостью) – в свободном сопле (jet-in-the-air) составляет 70-130 мкм; в кювете – около 150х450 мкм.

Скорость потока через сопло (кювету) в области измерений – 2-30 м/сек.

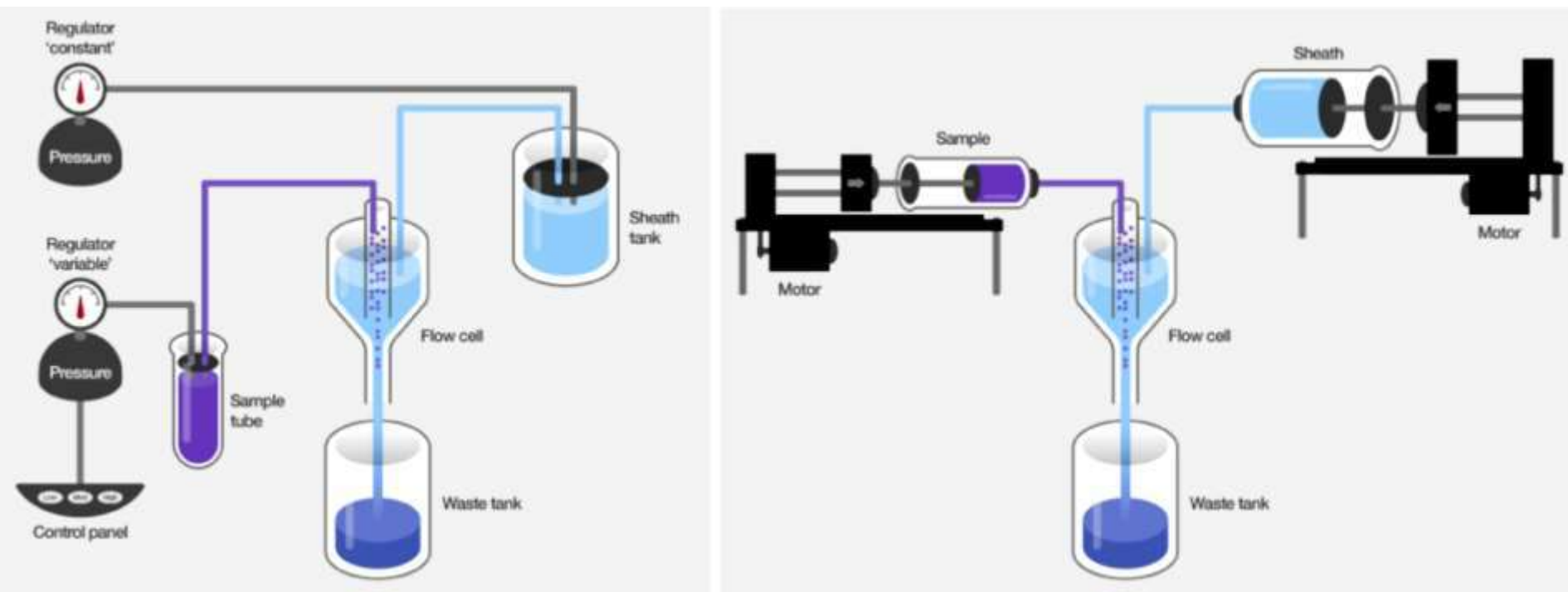
Расход омывающей жидкости (PBS) – 10-50 мл в мин.

Расход пробы – 5-100 мкл/мин (регулируется оператором).

За счет гидродинамической фокусировки диаметр струи, содержащей клетки, составляет 10-20 мкм. Он должен слегка превышать диаметр клеток, которые анализируются. Увеличение диаметра осевой струи снижает точность измерений.



Жидкостные системы



Слева – основанная на разности давлений. Проба постоянно забирается из пробирки, находящейся под давлением.

Справа – инъекционная (шприцевая). Проба сначала набирается из пробирки или планшета в шприц (заданный объем), из которого затем поступает в кювету.

Лазеры для цитометрии

Полупроводниковые лазеры. Полупроводниковые лазеры, подобно другим лазерам, испускают излучение, когерентное в пространстве и во времени.

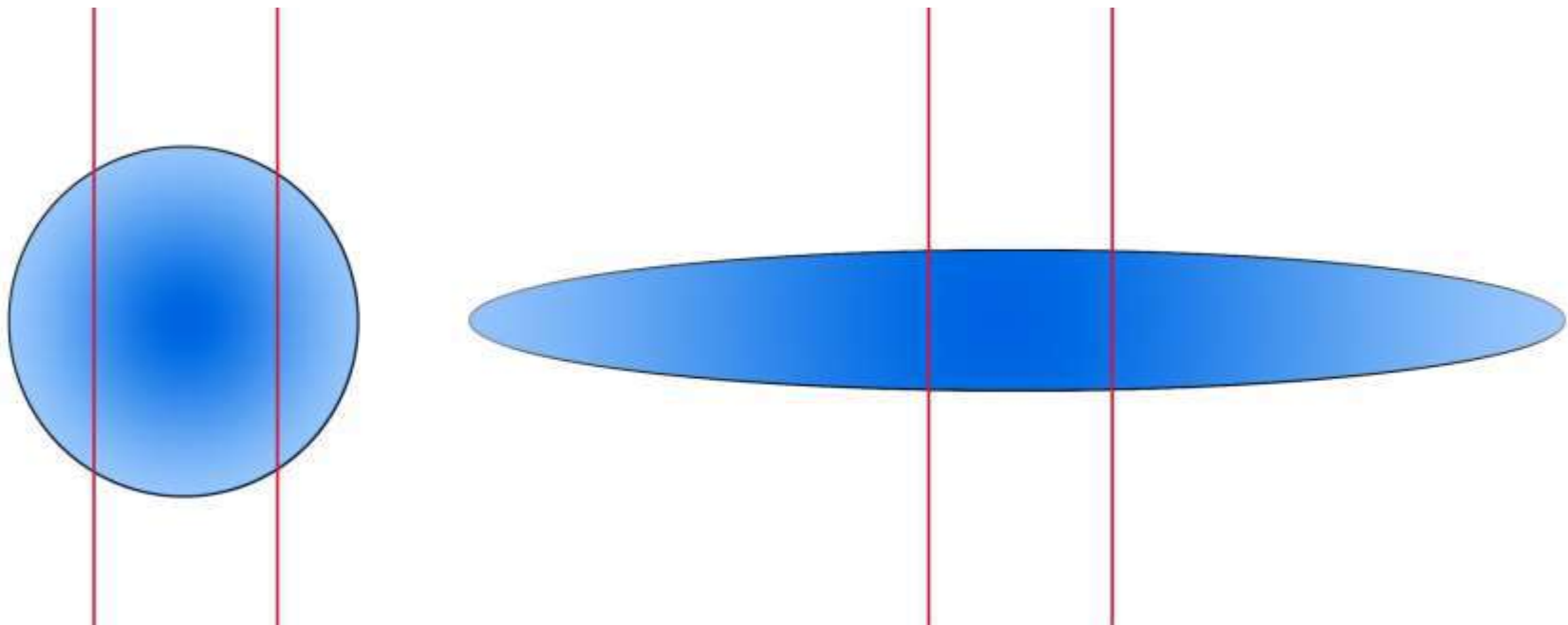
Полупроводниковые лазеры имеют очень малые размеры ($\sim 0,1$ мм в длину), и, так как активная область в них очень узкая (~ 1 мкм и меньше), и расхождение лазерного луча значительно больше, чем у обычного лазера.

Стандартные лазеры – 405, 488, 561 и 638-642 нм.

Дополнительные – УФ (355 или 375 нм), 445 нм, 594 нм, ближний ИК.

Мощность лазеров – 20-150 мВт. Чем больше мощность, тем долговечнее лазер.

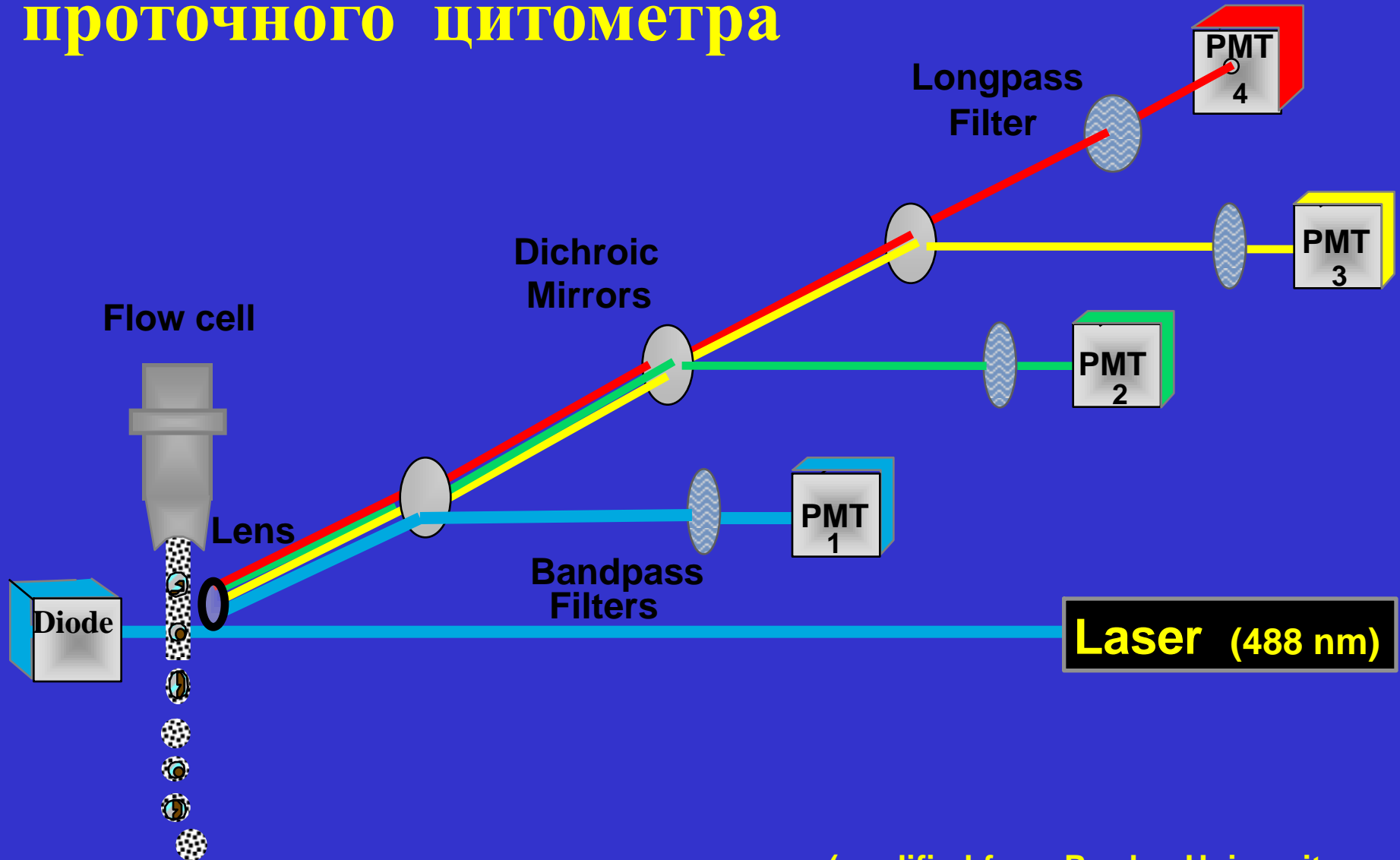
Фокусировка лазера в кювете



Лазерный пучок фокусируется в сильно вытянутое эллиптическое пятно (соотношение осей эллипса – от 4:1 до 8:1). Это позволяет уменьшить разброс в величине сигналов для частиц, пролетающих в стороне от продольной оси струи.

Размеры пятна (FACS Aria): поперечный диаметр 9-20 мкм, продольный диаметр – 65-80 мкм. Высота пятна определяет максимальную производительность прибора (чем меньше – тем больше).

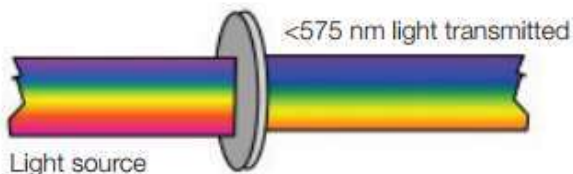
Оптическая схема простейшего проточного цитометра



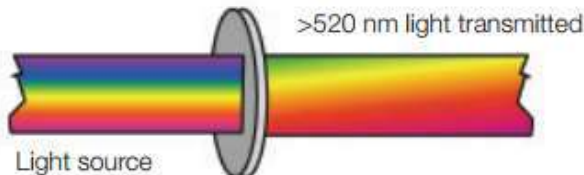
(modified from Purdue University
Cytometry Laboratories)

Основные типы светофильтров и дихроичных зеркал

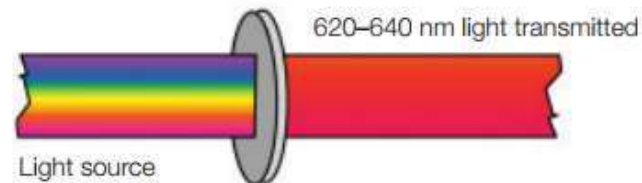
575 nm Short Pass Filter



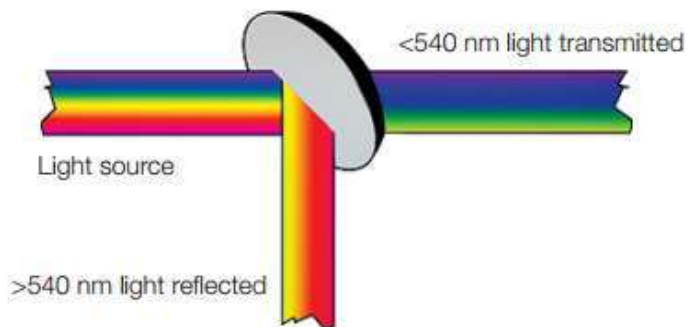
520 nm Long Pass Filter



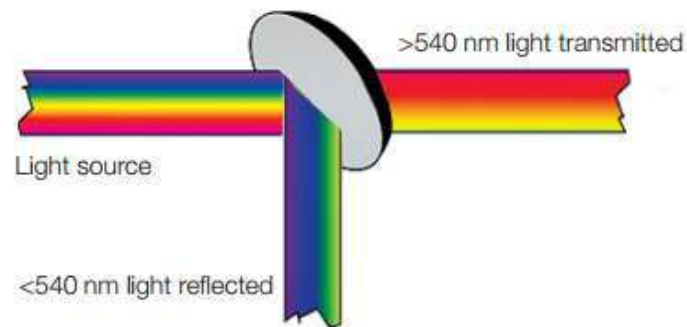
630/20 nm Band Pass Filter



540 nm Dichroic Short Pass Mirror

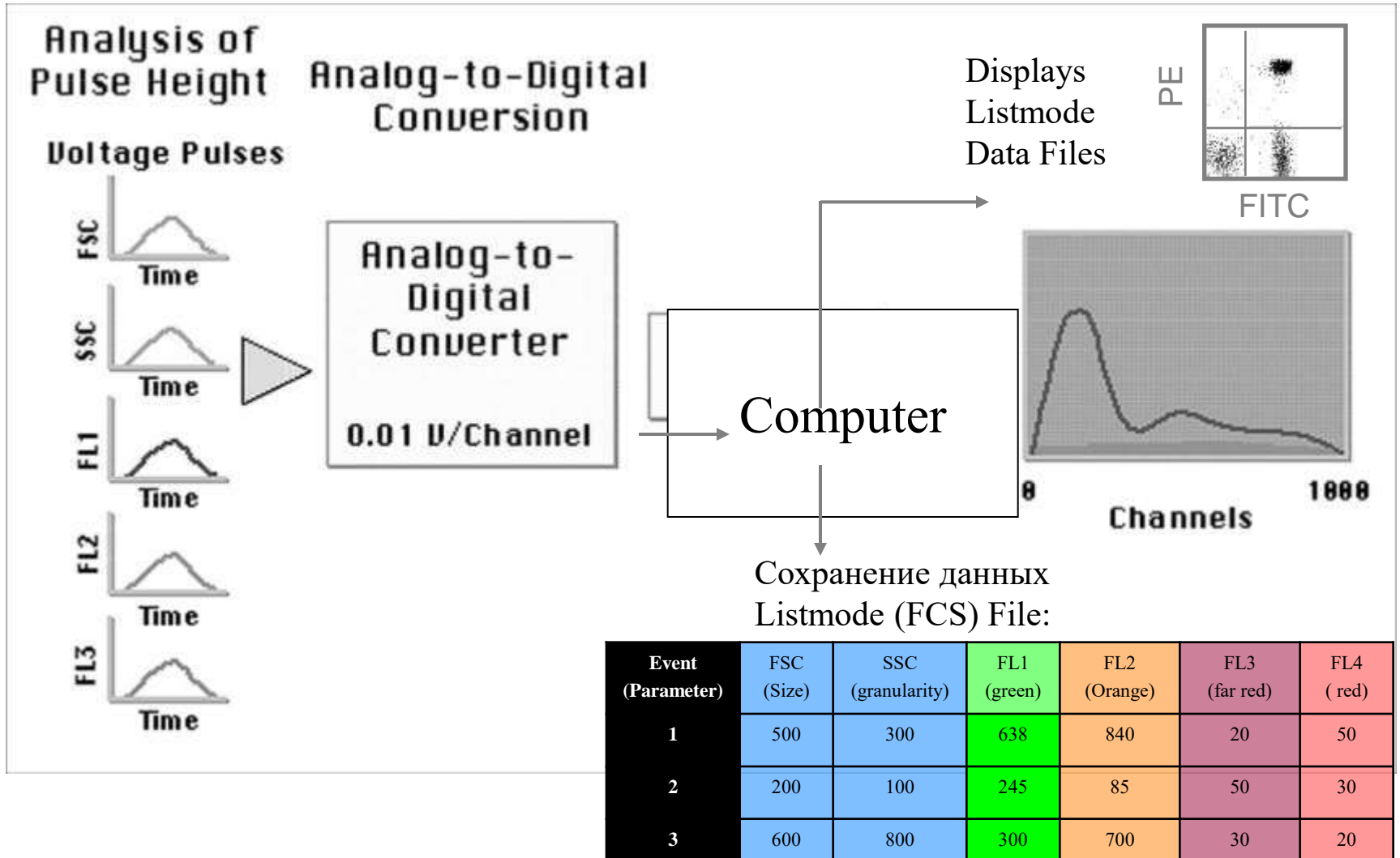


540 nm Dichroic Long Pass Mirror

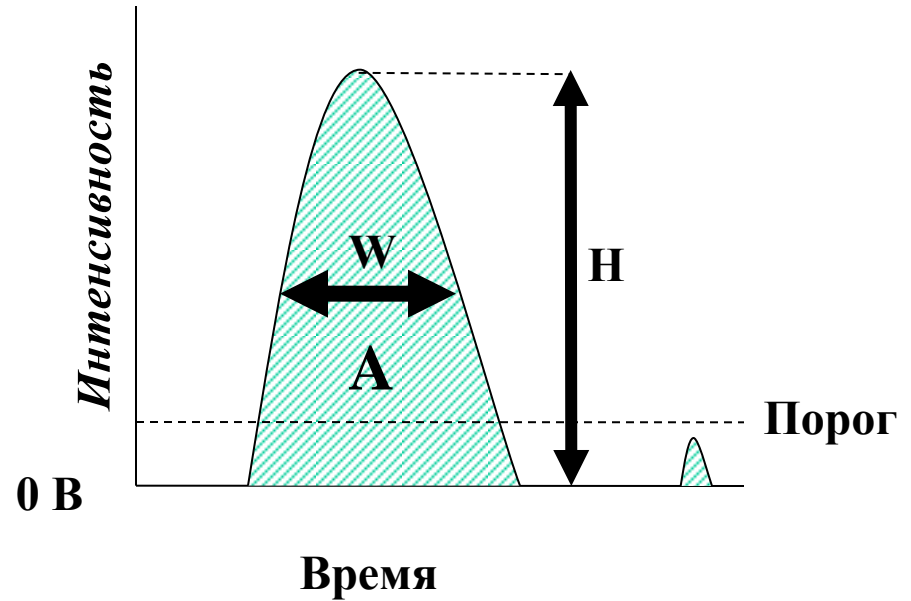
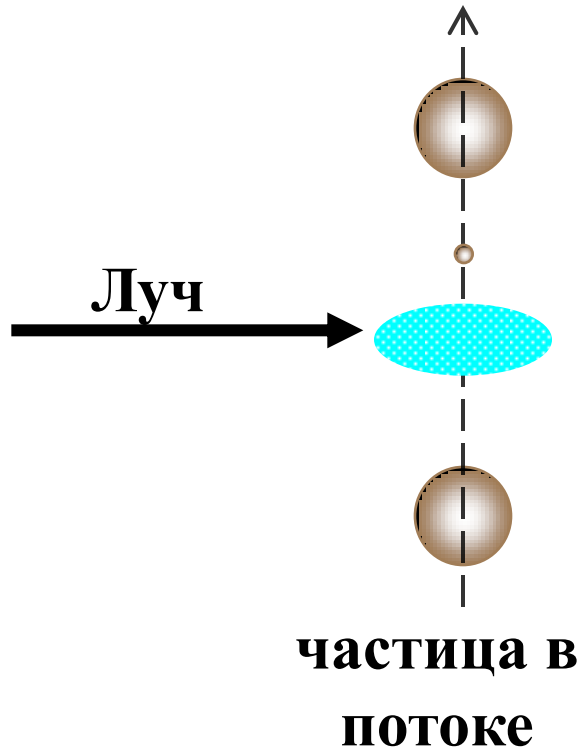


В проточной цитометрии используются главным образом дихроические зеркала обоих типов и фильтры с полосой пропускания (band-pass filters)

Электроника: обработка сигнала



Оцифровка сигнала (3 параметра)



H : высота

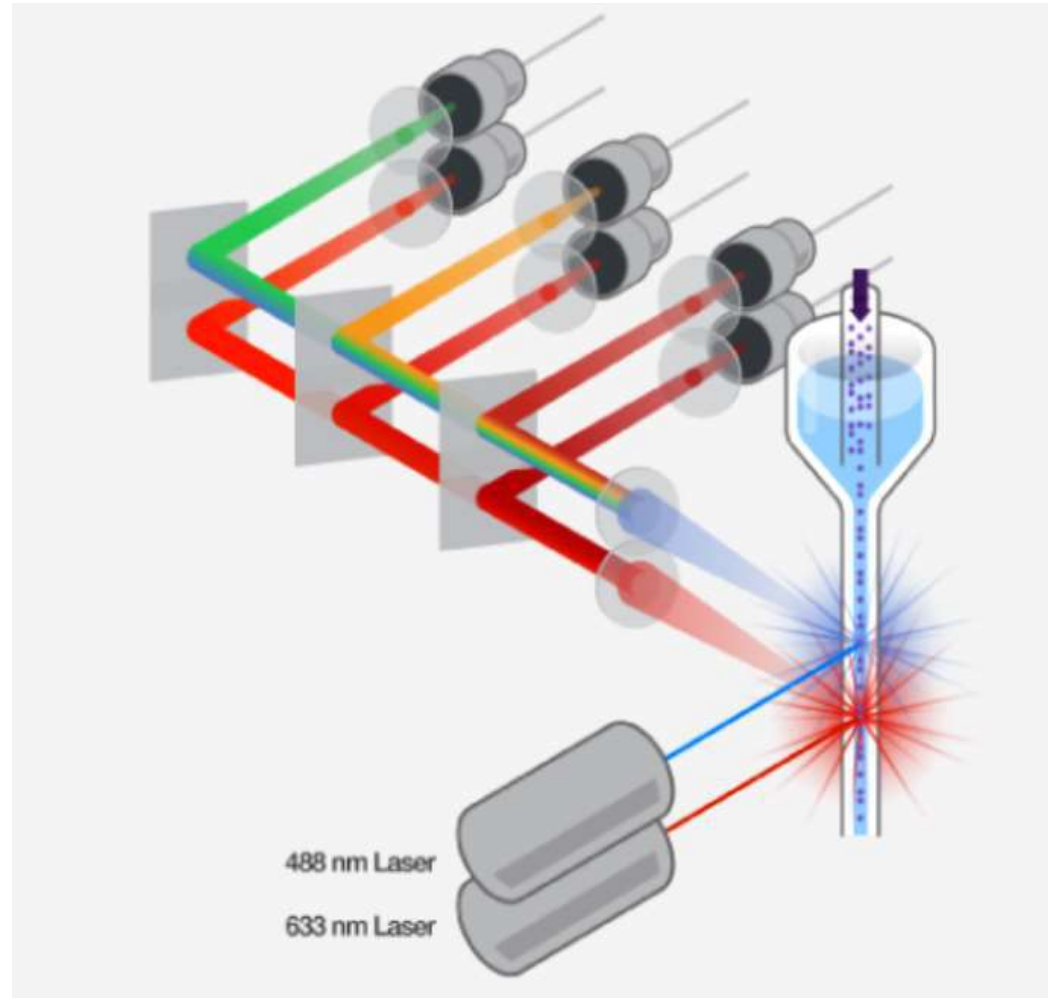
A : площадь

W : ширина на полувысоте

Параллельное расположение лазеров

Два лазерных луча располагаются параллельно друг другу и частицы в струе пересекают их последовательно (друг за другом), соответственно наборы светофильтров для каждого лазера работают независимо.

Для правильной работы прибора сдвиг лазеров (время задержки для АЦП) должен быть точно отрегулирован.



Триггерный сигнал

Для синхронной записи сигналов со всех каналов в цитометре имеется система управляющего или триггерного сигнала.

Триггером является сигнал с одного из ФЭУ, который при превышении порогового значения передает команду для других АЦП записывать (сохранять) сигналы со всех остальных ФЭУ в этот же отрезок времени.

По умолчанию в качестве триггерного используется сигнал с диода прямого светорассеяния (FSC), но оператор может установить и любой другой сигнал.

Выделение сигналов (оптическое)

Прямое (малоугловое) рассеяние ($\sim 3-5^\circ$) – шторка + фотодиод.

Боковое светорассеяние (90°) – объектив + светоделитель + запирающий светофильтр (band pass), затем ФЭУ.

Каналы флюоресценции – тот же объектив + последовательные светоделители и запирающие фильтры (band pass или long pass), затем ФЭУ.

Расположение светоделителей: либо под 45° , либо под 11° – полигон. В первом случае – пропускание, во втором – последовательное отражение.

Для каждого лазера устанавливается свой набор каналов флюоресценции (за исключением FSC/SSC).

Размеры определяемых частиц

Минимальные размеры частиц определяются яркостью сфокусированного луча и чувствительностью детектора. Стандартный прибор имеет предел разрешения около 0,5 мкм. Уверенное детектирование, как правило, начинается от 1 мкм.

Прибор со специальной фокусировкой луча и ФЭУ (вместо фотодиода) для детекции FSC позволяет выделять (от шума) частицы размером от 0,3-0,5 мкм.

Более мелкие объекты выделяются только на основании бокового (высокоуглового) светорассеяния – SSC.

Максимальный размер частиц определяется конструкцией прибора (его проточной кюветы). Типичный вариант – до 25-30 мкм. Специальные приборы с большим диаметром кюветы позволяют определять размеры частиц вплоть до 80-100 мкм.

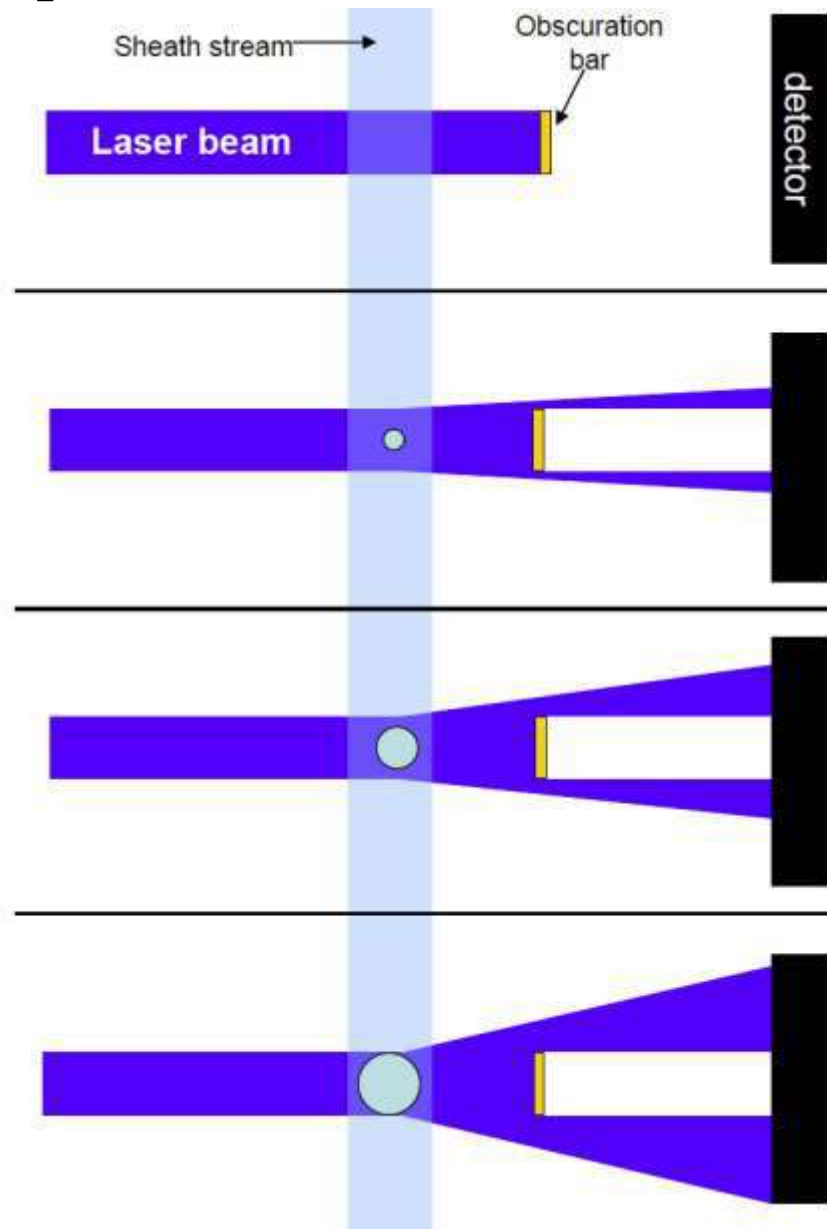
Прямое светорассеяние

Прямое (малоугловое) светорассеяние (FSC) – рассеяние под углом $0,5^\circ$ - 5° (иногда – до 10°). Угол определяется шторкой, которая может регулироваться.

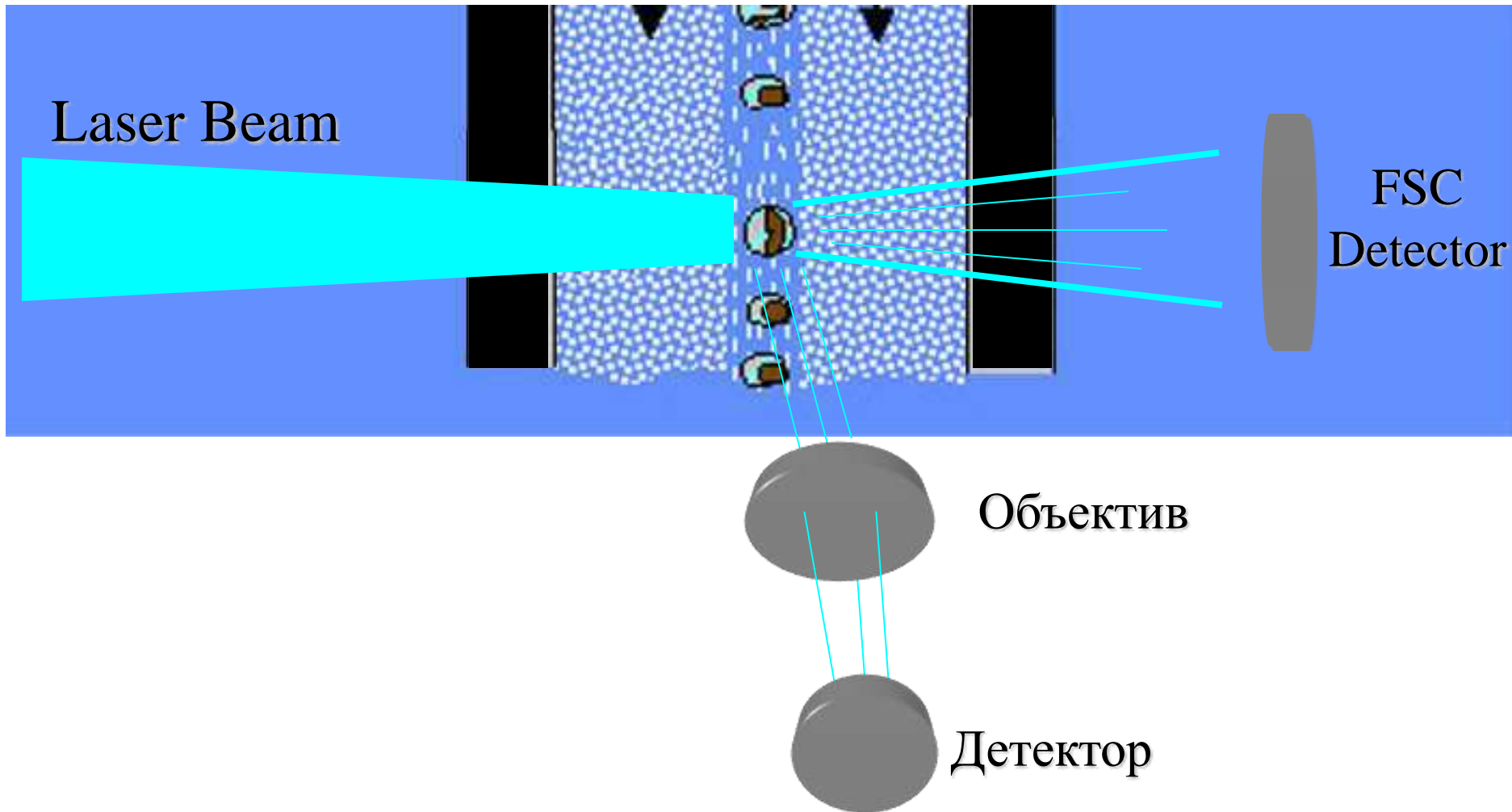
Величина FSC определяется размерами объекта, проходящего в струе жидкости, когда его диаметр превышает длину волны света.

Интенсивность сигнала также зависит от разности показателей преломления.

Поскольку величина сигнала FSC довольно велика, в качестве детектора устанавливается фотодиод, а не ФЭУ, как для всех остальных параметров.



Боковое светорассеяние (SSC)



Боковое светорассеяние

Боковое светорассеяние (SSC) детектируется под условным углом 90° . Свет собирается с помощью высокоапертурного объектива ($NA = 0,6-1,2$). Величина сигнала SSC от клеток в основном обусловлена их включениями, размер которых примерно равен или меньше длины волны возбуждающего света (488 нм).

Интенсивность сигнала SSC определяется разностью показателей преломления частицы и среды, количеством включений в клетке и их размером. Максимальный сигнал в канале SSC дают частицы размером около 0,3-0,5 мкм.

Типы флуорофоров

Простые красители, специфичные для некоторых органелл:

TMRM/TMRE – окраска митохондрий

Ядерные красители (окраска ДНК)

Флуоресцентные белки животного происхождения (GFP, RFP, etc.)

Типы флуорофоров

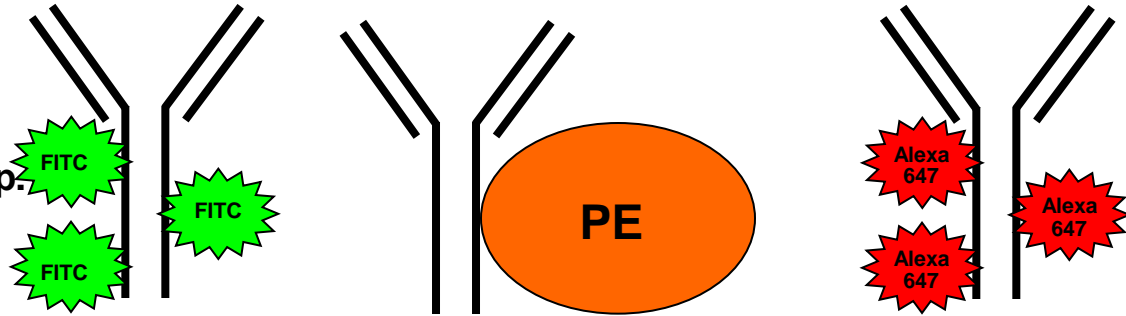
Простые красители

Малый М.В.:

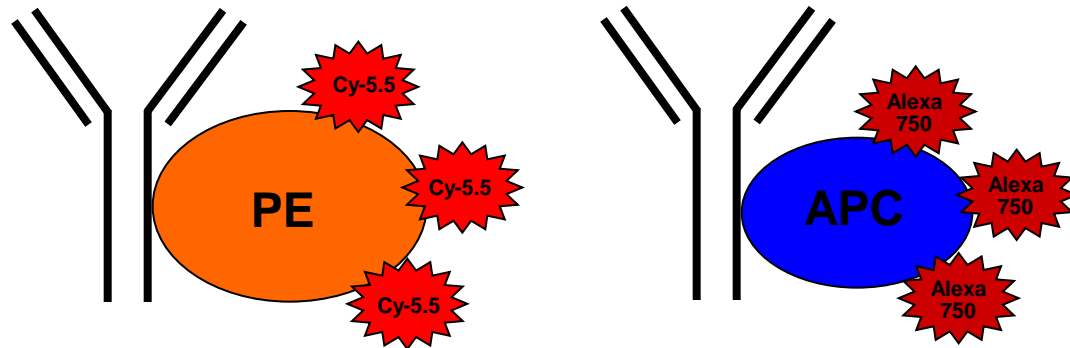
- Pacific Blue
- FITC
- AlexaFluor семейство и др.

Белки:

- Phycoerythrin(PE)
- Allophycocyanin(APC)
- GFP, etc.



Тандемные красители (с ферстеровским переносом)



Эмиссия одного красителя (донор) перекрывается с абсорбцией другого (акцептор). Когда флуорохромные группы сближены и правильно ориентированы по отношению друг к другу, происходит перенос энергии кванта с одной группы на другую без излучения фотона.

Второй краситель испускает свет с большей длиной волны.

Производительность проточного цитофлуориметра

Производительность определяется максимальным числом событий в единицу времени, которые могут быть зарегистрированы прибором.

Сигнал с каждой клетки может быть записан при условии, что расстояние между соседними клетками в потоке больше **определенной величины**. При этом клетки в потоке расположены на случайных расстояниях друг от друга. Расчеты показывают, что при диаметре струи с клетками в 10 мкм, отдельные клетки будут регистрироваться примерно в 99% случаев, если их концентрация в образце составляет не более $5 \cdot 10^7$ клеток на мл. При большей концентрации заметное число клеток (несколько процентов) будут регистрироваться в виде дуплетов. Эти сигналы в основном можно отделить при анализе данных.

Меньшая концентрация клеток в образце приводит к замедлению подсчета, так как среднее расстояние между клетками в струе возрастает. Увеличение скорости подачи клеток, находящихся в исходной пробе в низкой концентрации, ускоряет подсчет, но приводит к расширению осевой струи в которой идут клетки и, соответственно, к увеличению случайного разброса данных (определяется по стандартному отклонению – CV).

Представление данных

Listmode (таблица данных) и **графики (Plots)**.

Виды графиков.

Гистограмма – одномерное распределение. Демонстрируется число событий на канал.

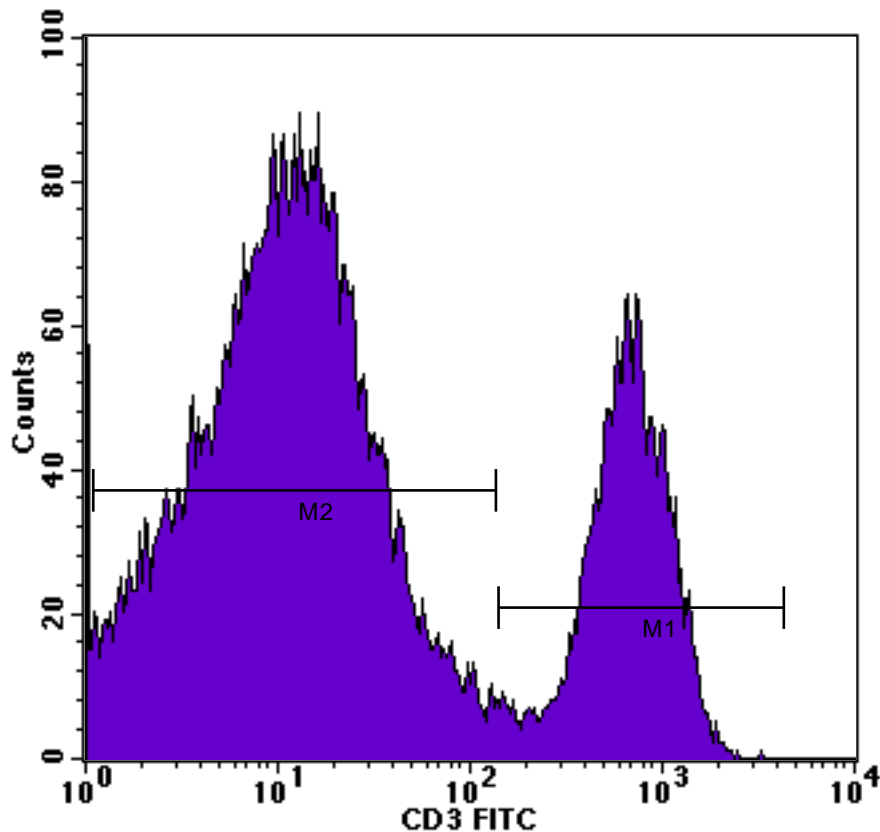
Двумерный график – поточечный (dot plot); по плотности событий (density plot) и др.

Трёхмерный график (поточечный) – пространственное распределение событий.

Шкала на графиках – линейная (1 - 256) или логарифмическая (10^0 - 10^7).
Линейная шкала позволяет разделять небольшие различия в интенсивности сигнала. Логарифмическая шкала удобна тем, что позволяет видеть сигналы, различающиеся в 1000 и более раз.

Как правило, в линейной шкале представляется прямое светорассеяние, в логарифмической – сигналы флюоресценции (за исключением измерений ДНК).

Гистограмма



**Логарифмическая шкала –
4 или 5 порядков (10⁴-10⁵)**

**По оси абсцисс – интенсивность,
по оси ординат – число событий.**

**M1 – позитивная популяция;
M2 – негативная популяция**

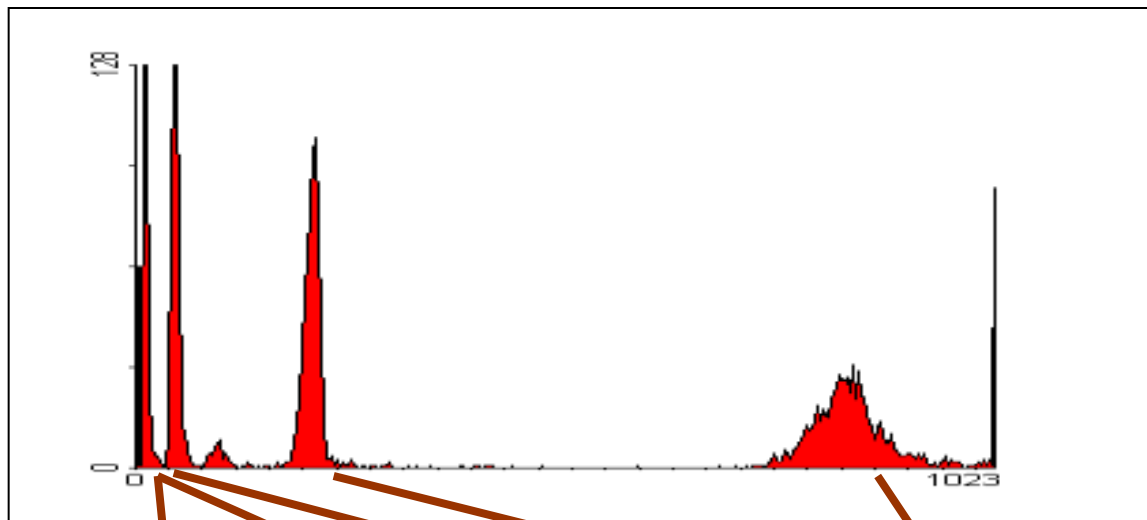
File: AdigezalovaEA_BLOOD.002

Acquisition Date: 10-Nov-05

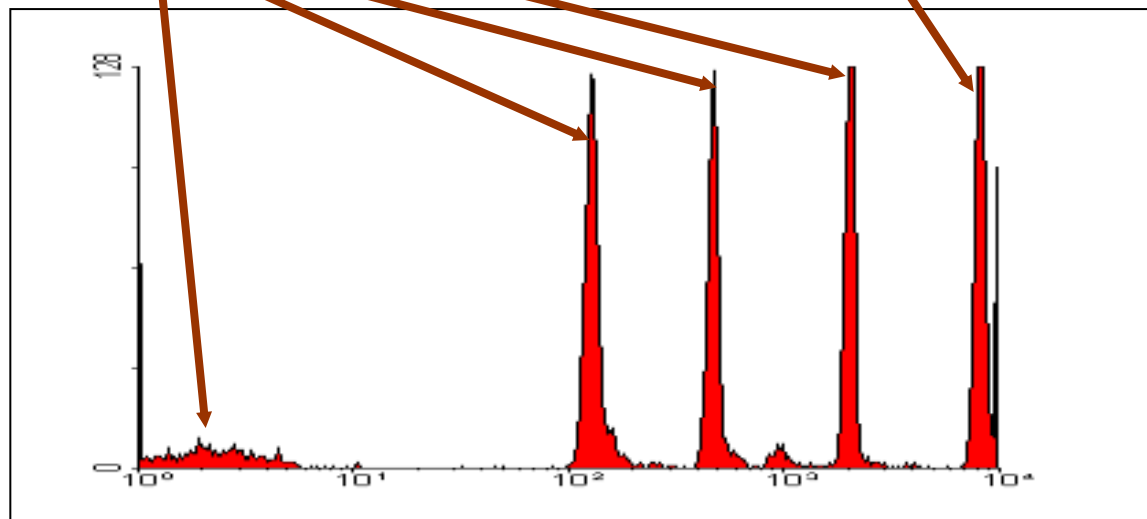
Marker	Left, Right	Events	% Gated	SD	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	28933	100.00	325.70	186.81	15.26	1
M1	142, 4294	6738	23.29	318.27	45.81	640.68	710
M2	1, 137	21200	73.27	19.33	113.80	10.94	15

Логарифмическая и линейная шкалы

Линейная шкала,
1024 канала
(наверху)



Логарифмическая
шкала – 4 порядка
или 10000 каналов
(внизу).



Исходные данные идентичны. Распределения в начале шкалы (слабые сигналы) выглядят более компактно при линейном представлении. Логарифмическая шкала передает отношение сигналов, линейная – их разность.

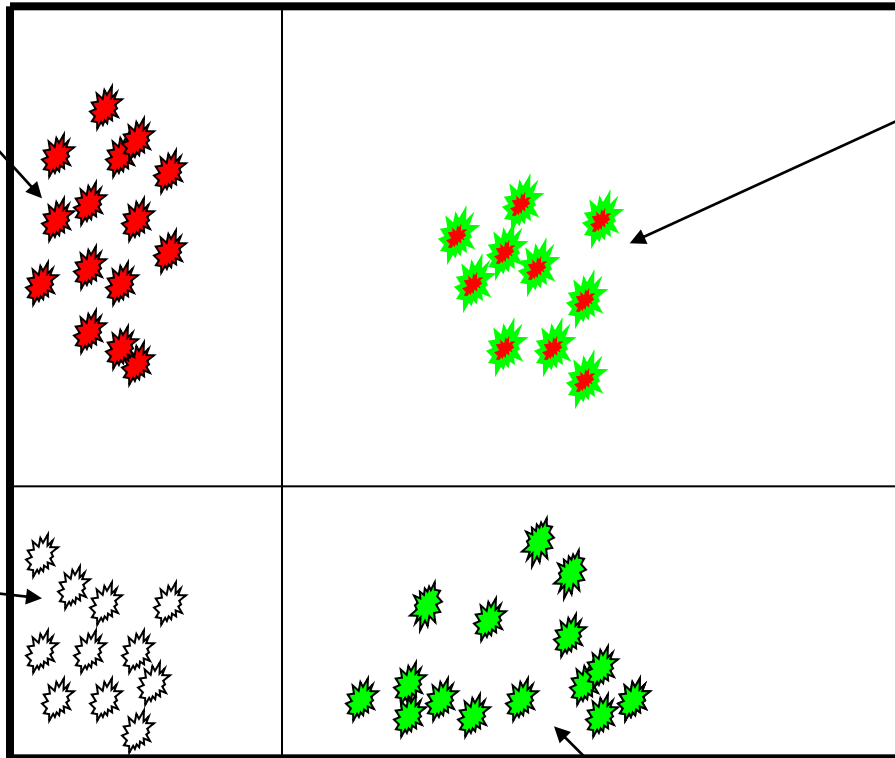
Двухпараметрический график

Single Positive
Population
(FITC-/PE+)

Double Positive
Population
(FITC+/PE+)

FL-2

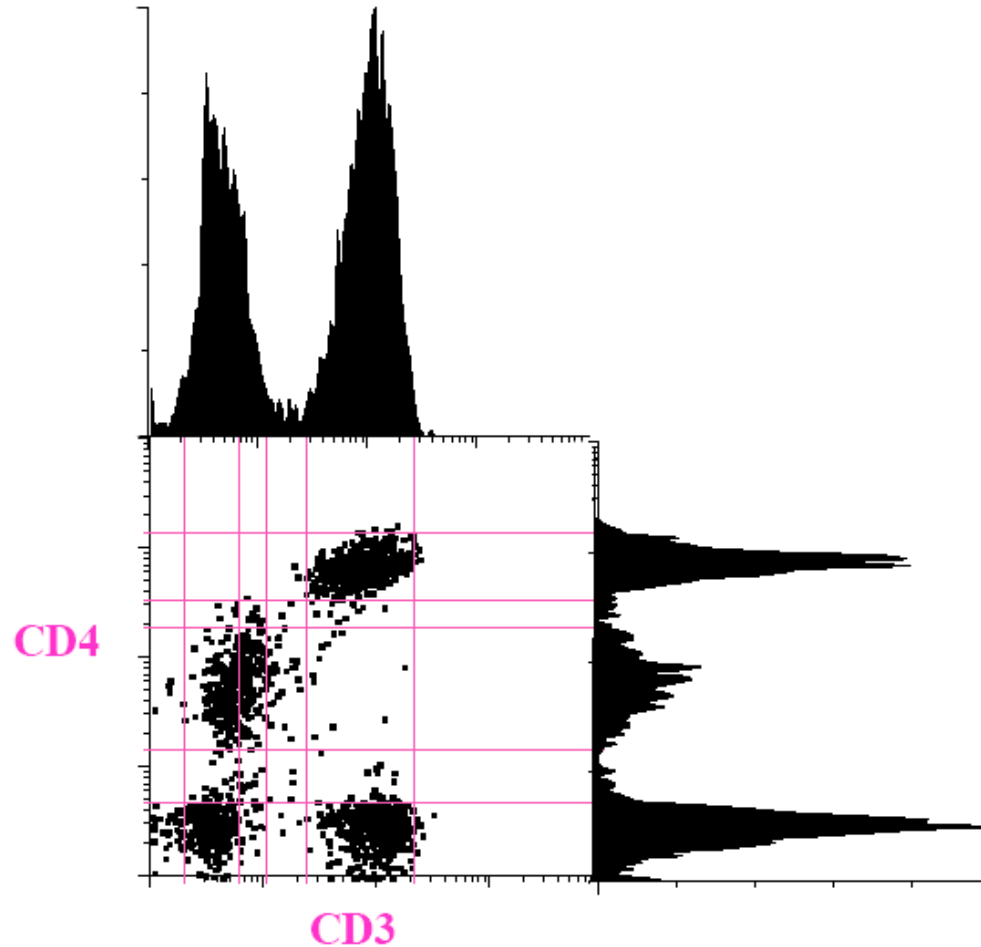
Negative
Population



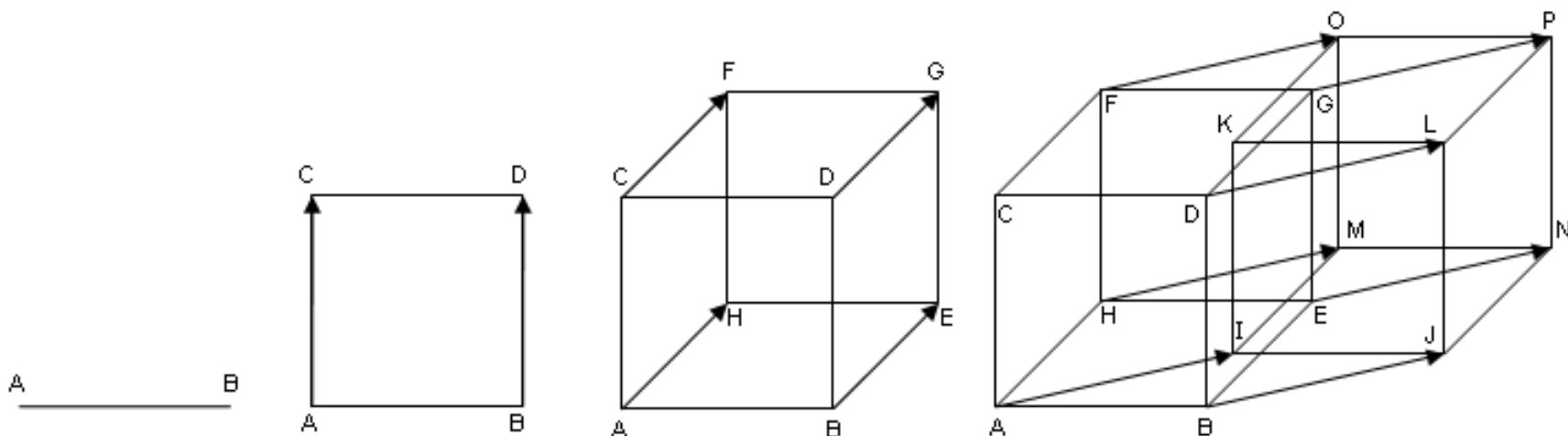
FL-1

Single Positive Population
(FITC+/PE-)

Двумерный график и его гистограммы



Проточная флуориметрия – анализ в многомерном пространстве признаков



Построение четырехмерного куба (тессеракта)

В проточной флуориметрии мы имеем не менее 3 каналов флюоресценции в сочетании с двумя каналами светорассеяния – итого минимум пять измерений.

Для упрощения анализа применяется гейтинг – выделение популяции на двумерном графике (FSC/SSC, SSC/FL1).

Основной вопрос

Основной вопрос проточной цитометрии – как отличить «положительную» популяцию от отрицательной.

Для математически строгого ответа на данный вопрос необходимо использовать кластерный анализ (в многомерном признаковом пространстве). Однако такой подход находится **пока** за пределами вычислительных возможностей современных ПК.

Поэтому для ответа на этот вопрос при использовании нескольких красителей приходится применять качественные методы графического анализа данных – выделение полигонов и гейтинг.

Кроме того, необходимо договориться о том, что является «положительной популяцией» и определить, в какой степени сигналы от одного красителя влияют на сигналы от других красителей («затекание сигналов»).

Разделение популяций в проточной цитометрии

Основной вопрос проточной цитофлуориметрии (продвинутая версия):

– Действительно ли интересующая нас популяция клеток специфически связывается с данными маркерами?

В эксперименте «позитивные» клетки это те, которые могут быть надежно отделены от «негативных» или контрольных клеток.

– Что надо сделать, чтобы их различить?

На качественном уровне на данный вопрос отвечает последовательный гейтинг (установка порогов) на двумерных графиках.

Еще более сложный вопрос:

– насколько точно мы можем оценить размер популяции?

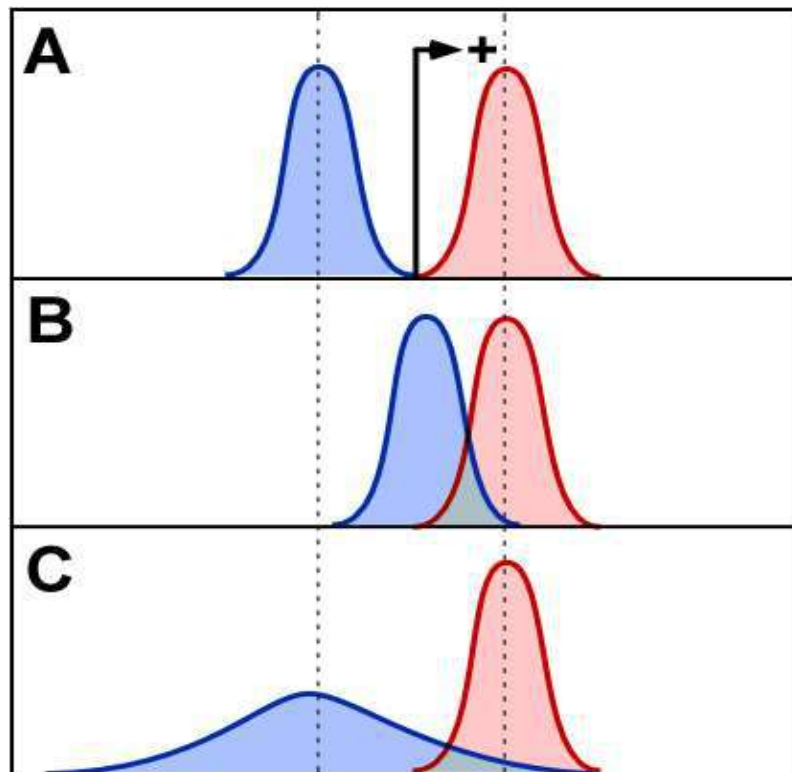
Разрешающая способность метода

“Негативная”
популяция Позитивная
популяция популяция

Негативная популяция дает
слабый сигнал.
Популяции хорошо разделяются

Негативная популяция дает
сильный сигнал.
Популяции плохо разделяются

Негативная популяция дает
слабый сигнал, но имеет
широкое распределение (CV)
Популяции не разделяются



Возможность выделить позитивные популяции зависит от величины фонового сигнала и от ширины распределения негативной популяции

Настройка ФЭУ

Негативная популяция должна давать сигнал по крайней мере в 10 раз больше шума. При этом позитивная популяция должна помещаться на шкале.

Разрешение – способность отличить слабо окрашенную популяцию от негативной.

Калибровочные частицы CS@T beads – негативные, слабо окрашенные и очень яркие. Применяются для настройки каналов для каждого флуорохрома.

Автофлуоресценция

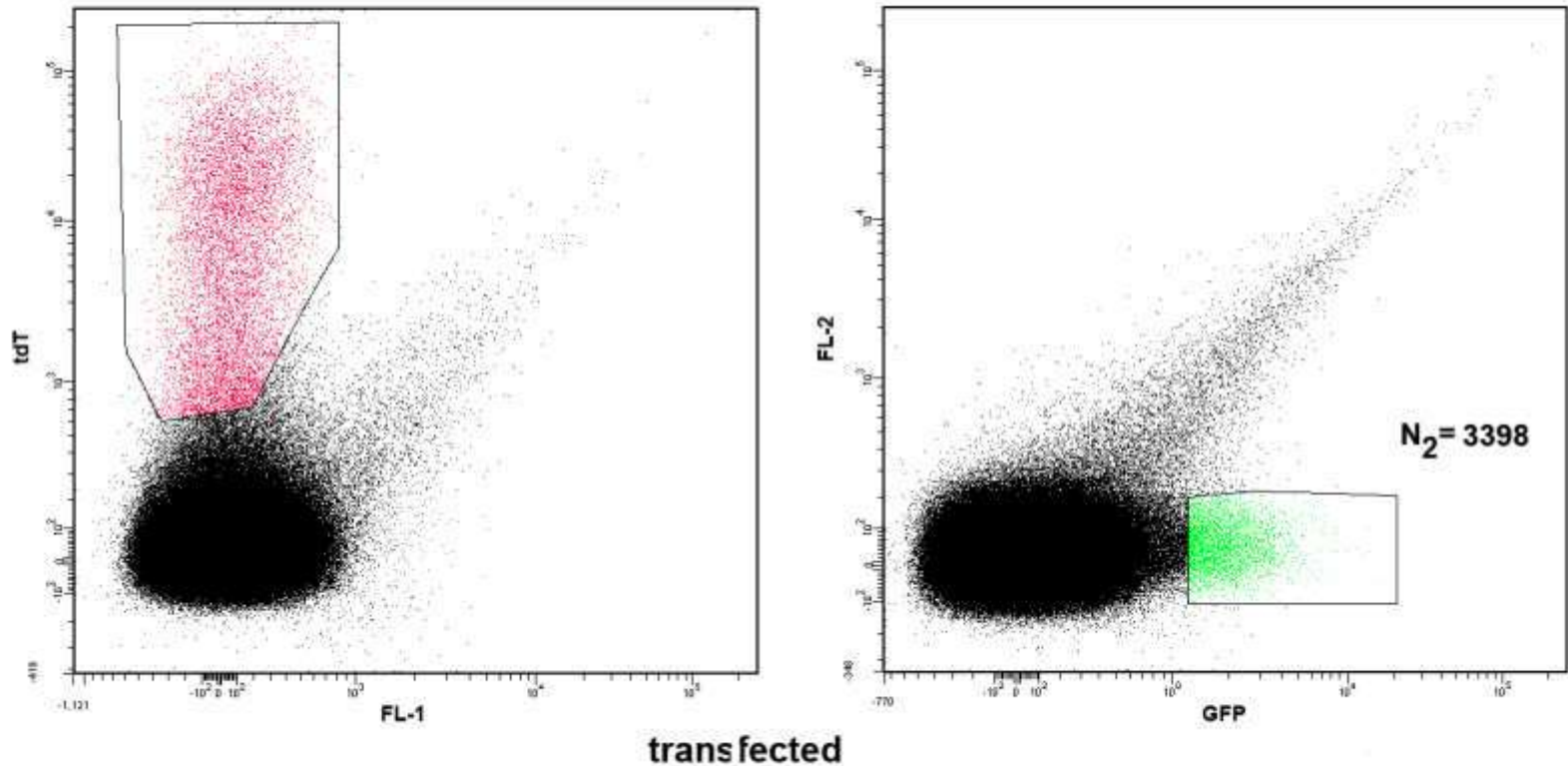
Наибольшая автофлуоресценция наблюдается при возбуждении УФ, затем фиолетовым (405 нм) и синим (488 нм) лазерами. Зеленый (561 нм) и красный (635 нм) лазеры автофлуоресценции практически не дают.

Автофлуоресценция возбуждается в широком диапазоне (355-500 нм), и клетки флуоресцируют в широком диапазоне (400-590 нм), создавая почти непрерывный спектр.

Автофлуоресцентный сигнал определяется цитоплазмой — он исчезающе мал у лимфоцитов, больше у моноцитов, еще больше у макрофагов, и всегда велик у культивируемых клеток.

Для уменьшения автофлуоресценции культивируемых клеток можно использовать специальные среды (без витаминов и красителей).

Роль автофлуоресценции



Выделение популяции трансфицированных клеток более эффективно в области меньшей автофлуоресценции – при возбуждении красным светом.

Слева – красный белок, справа – GFP.

Параметры, влияющие на разрешение

Фон

Дисперсия

***Неспецифическое
связывание и связывание
с Fc-рецептором**
***Автофлуорес-
ценция клеток**
***Свободный
краситель**

Перекрывание
спектров
красителей

Излишне большое
усиление ФЭУ,
или
неправильная
настройка лазера

Образец/Антитела

Прибор

Анализ с помощью моноклональных антител

Анализ поверхностных маркеров может проводиться на живых клетках. При этом окрашенные препараты нельзя хранить более 3-4 часов (тогда их нужно фиксировать).

Анализ цитоплазматических (и ядерных) маркеров проводится только на фиксированных клетках после специальной обработки (пермеабиллизация). Окрашенные препараты (суспензия клеток) можно хранить в течение суток (максимум – до 36 часов).

Как правило, для окраски используются прямые конъюгаты антител с флуорохромами (например, CD3-FITC).

Проблемы:

подбор клона антител и их титра, подбор комбинаций флуорохромов, постановка контролей.

Для цитоплазматического окрашивания – подбор условий фиксации.

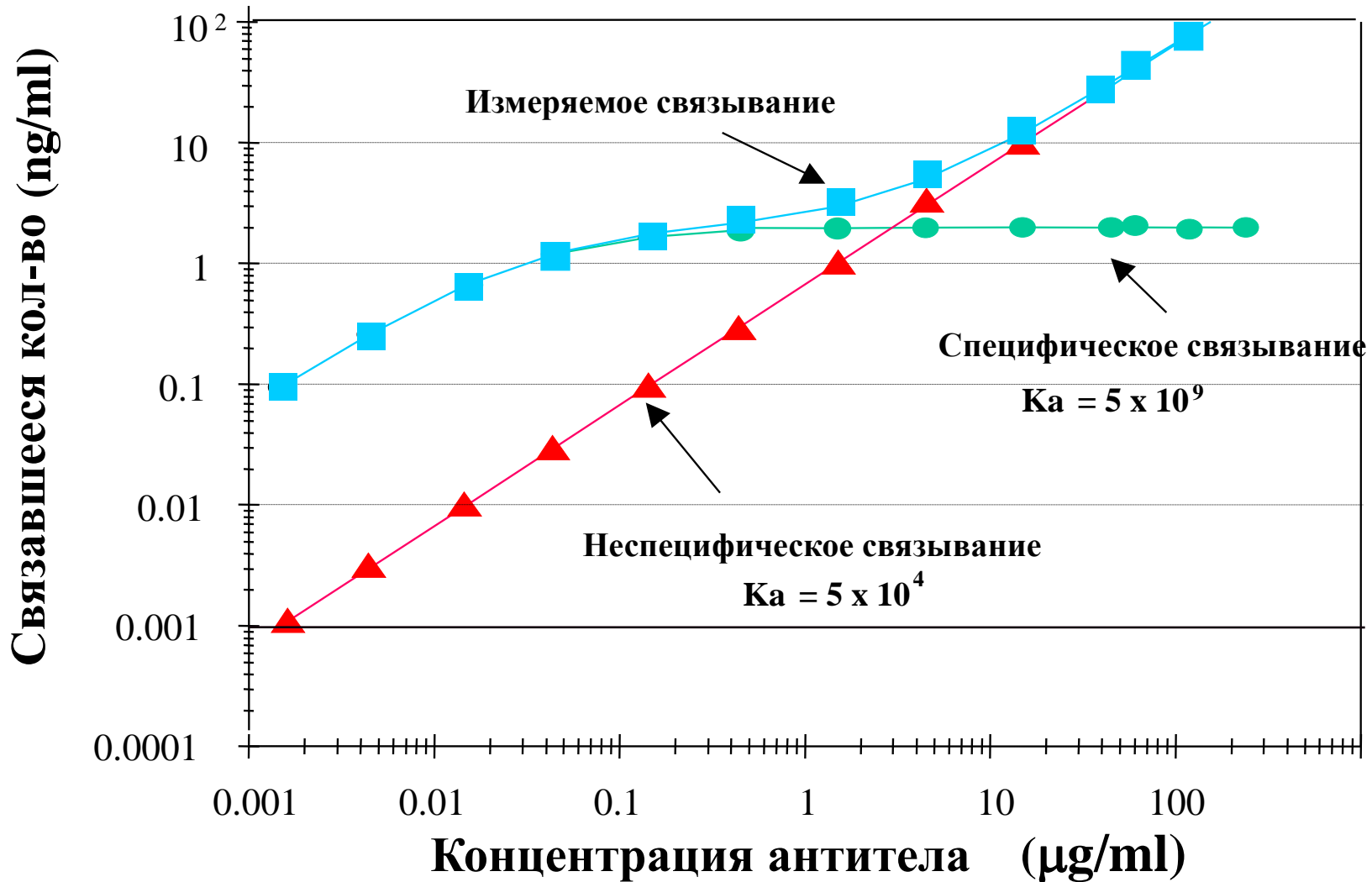
Определение титра антител

Определение оптимального титра антител необходимо для максимального разделения позитивной и негативной популяций, а также для выделения слабо позитивной популяции, если она есть.

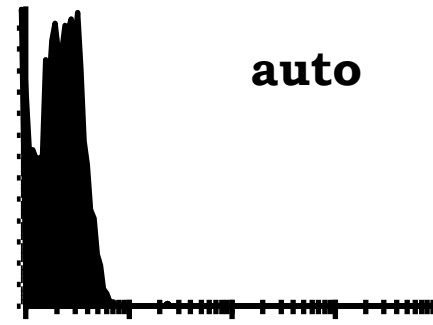
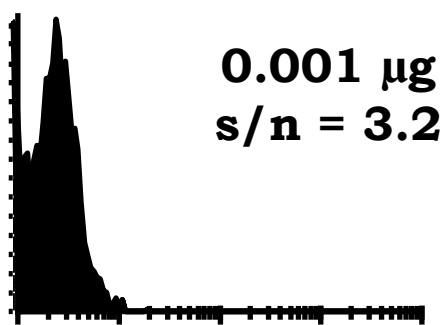
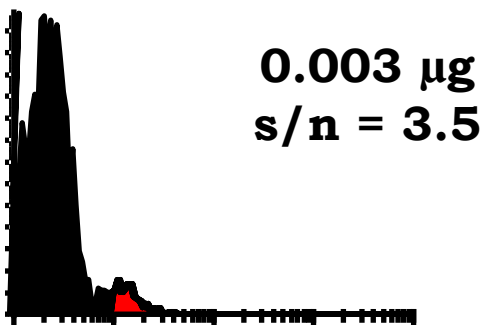
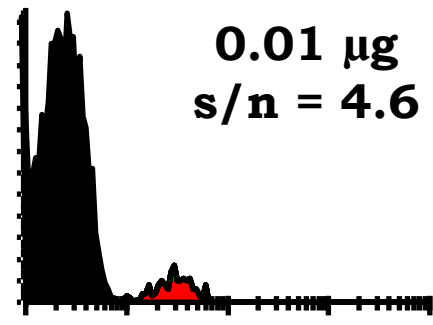
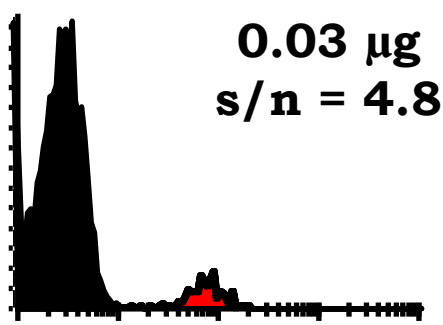
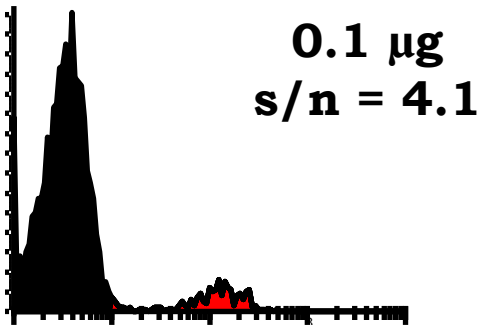
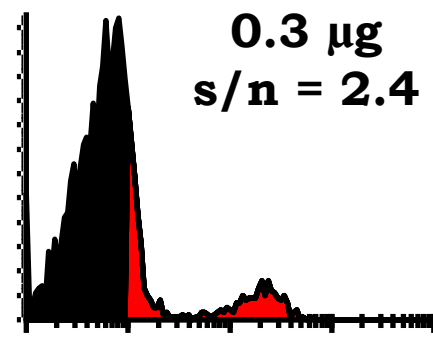
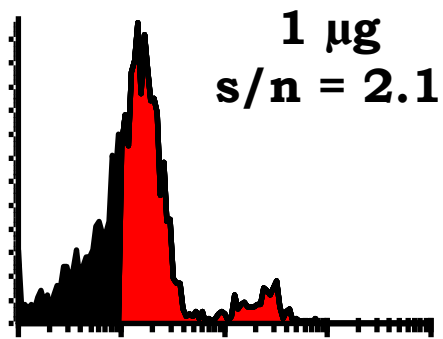
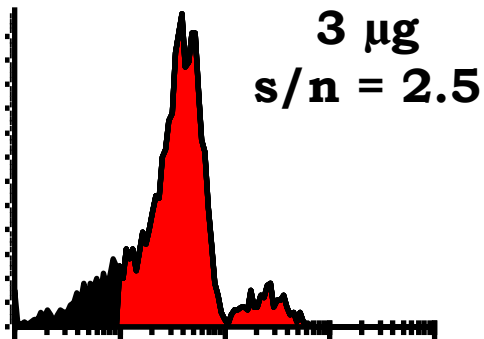
Как правило, оптимальный титр коммерческих антител немного ниже, чем концентрация, рекомендуемая изготовителем.

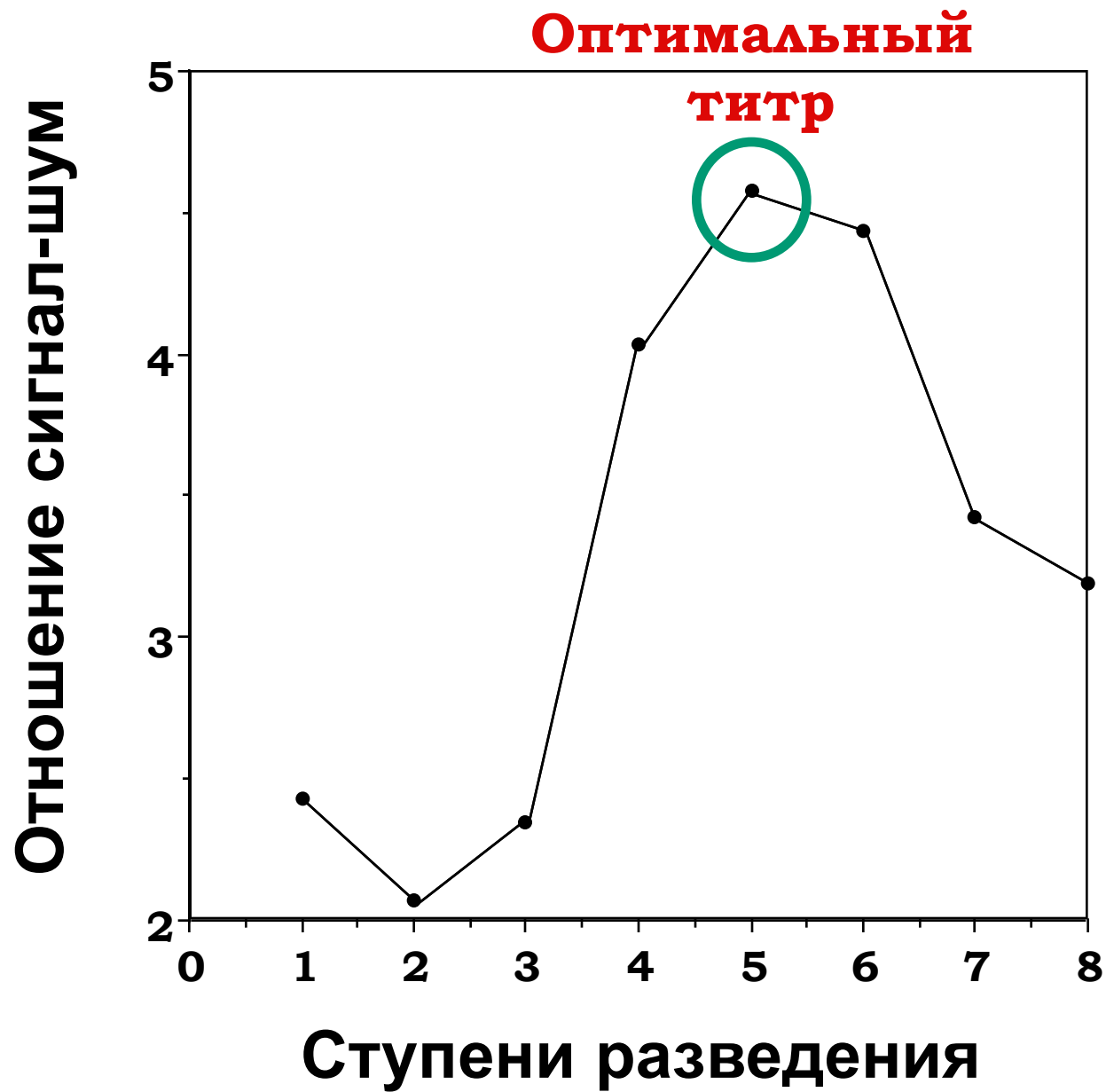
Подбор оптимального титра производится по кривой титрования.

Связывание антитела с антигеном



Титрование антител





Как считать события на практике?

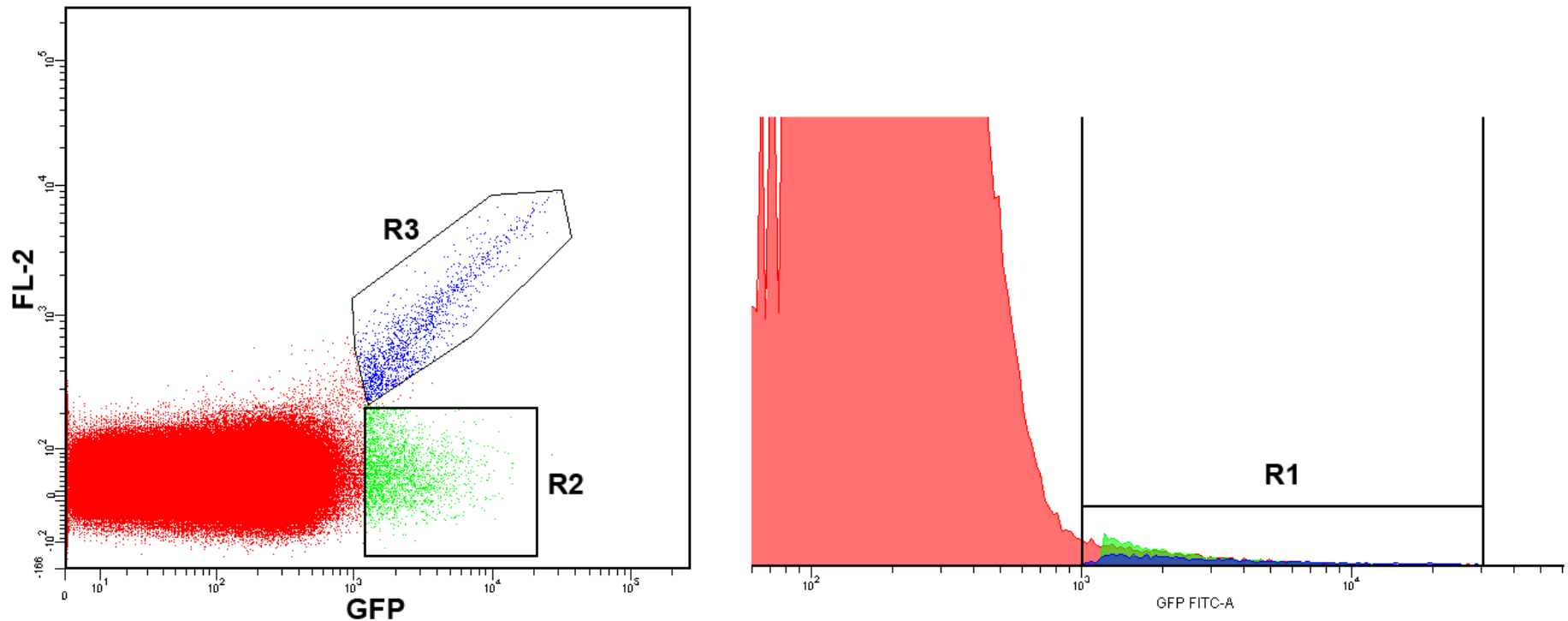
Если позитивная и негативная популяция отличаются по интенсивности в 10 раз и более – подсчет можно производить на максимальной скорости прибора.

Если разделение позитивной и негативной популяций не очевидно – по крайней мере, пробный подсчет надо производить на минимальной скорости.

Наибольшие трудности возникают при выделении малых популяций (1% и менее от исходной), а также, когда средние интенсивности свечения положительных и отрицательных клеток близки.

Нередко основным препятствием для выделения малой популяции становится автофлуоресценция клеток.

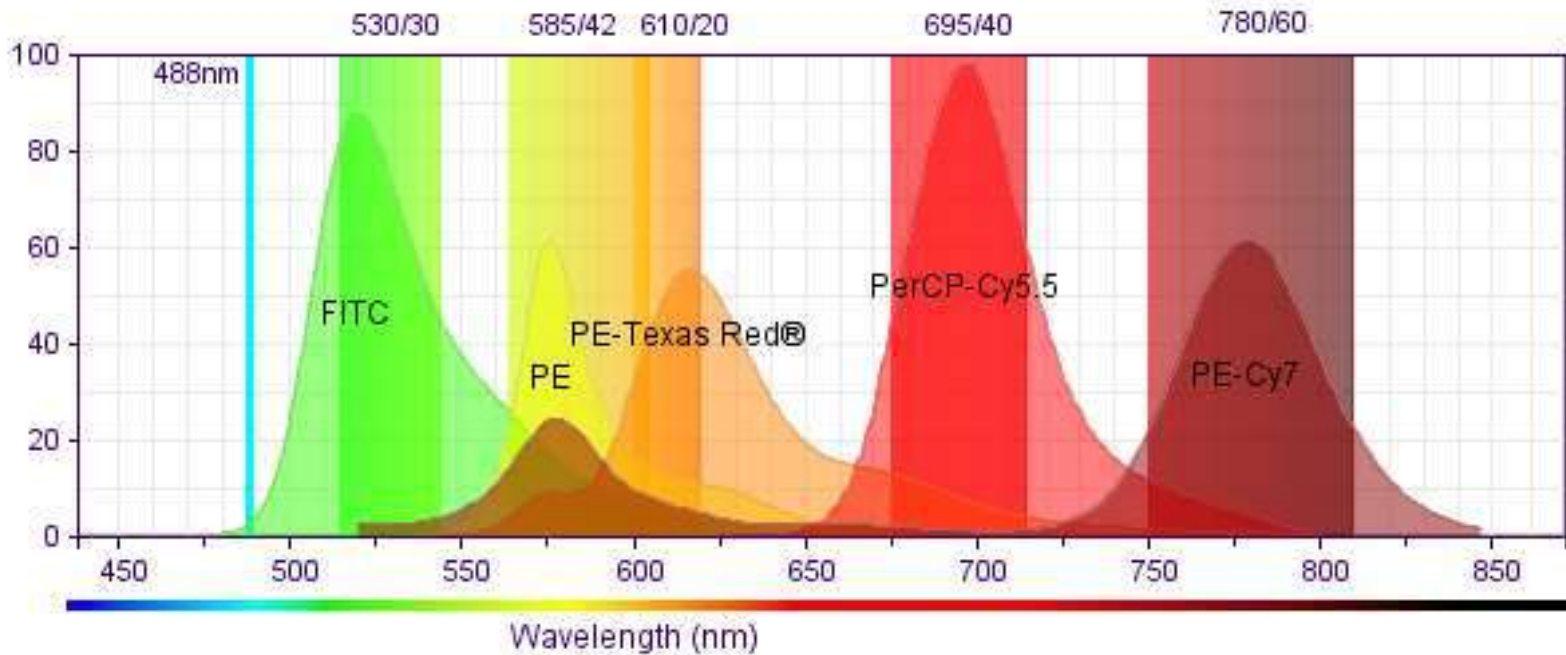
Выделение малой популяции



Выделение малой популяции эффективно только на двумерном графике.

Расстояние между позитивной и негативной популяциями должно быть достаточно велико – оно определяется относительной численностью (долей) позитивной популяции.

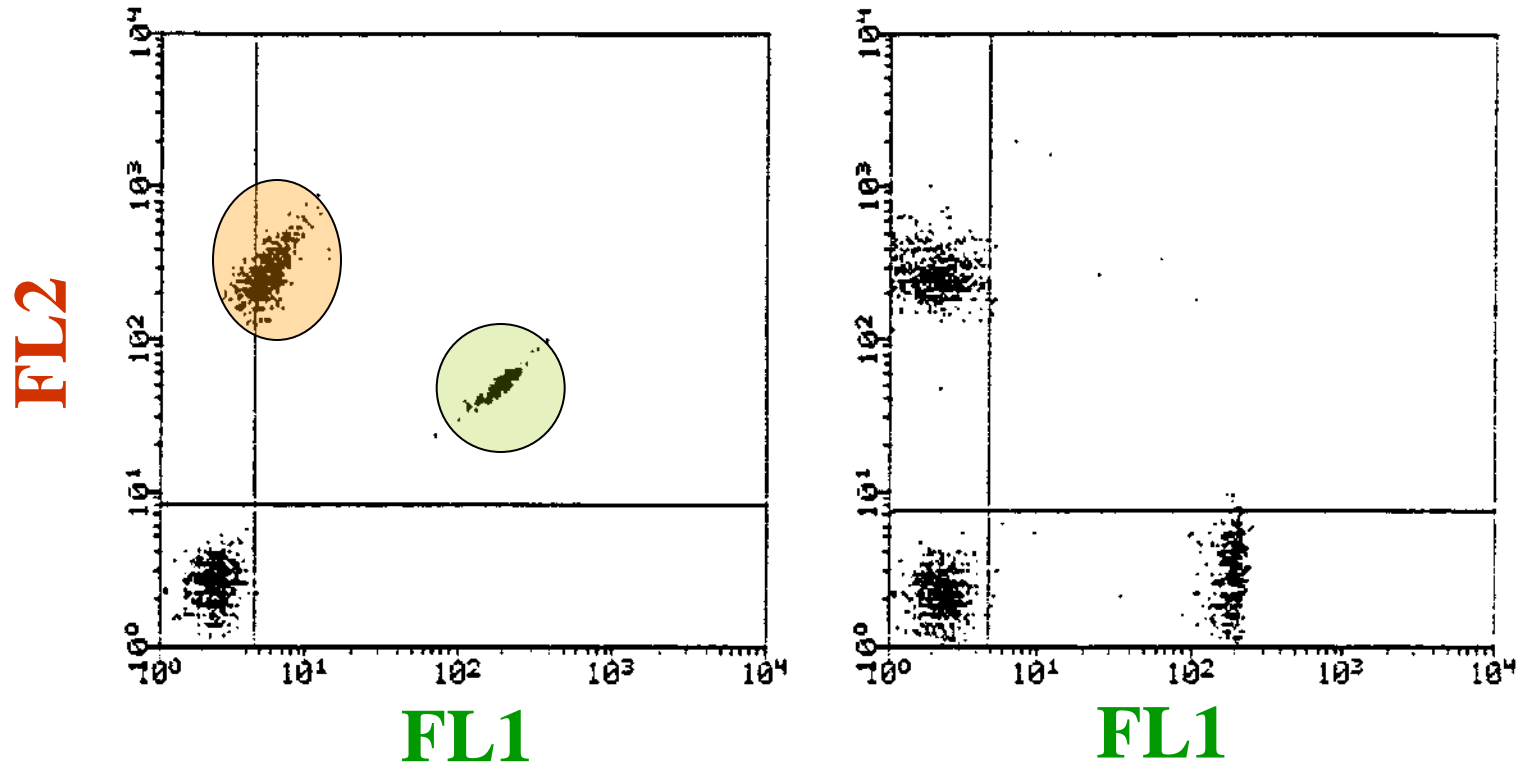
Перекрытие спектров эмиссии



Перекрытие спектров эмиссии неизбежно при использовании нескольких красителей, возбуждаемых от одного лазера. Оно приводит к тому, что при одновременной окраске клетки несколькими красителями измеряемый каждым ФЭУ сигнал увеличивается за счет дополнительного сигнала от других красителей возбуждаемых тем же лазером.

Перекрытие спектров для органических красителей асимметрично – коротковолновые красители дают большее «затекание» в следующий канал. Величина перекрытия возрастает по мере сближения максимумов флуоресценции.

Затекание сигналов и компенсация данных



Оригинальные данные (слева): флуоресценция FITC и PE детектируется первым и вторым детекторами одновременно. После компенсации (справа) популяции разделены лучше. Каждая группа исходно окрашена только одним красителем. Негативный контроль в левом нижнем углу.

Компенсация

При использовании нескольких красителей возникает проблема перекрывания спектров флуоресценции. Проблема усугубляется с ростом числа красителей.

Для того, чтобы определить, является ли сигнал истинным, или обусловлен затеканием из другого канала, применяется специальная процедура под названием «компенсация».

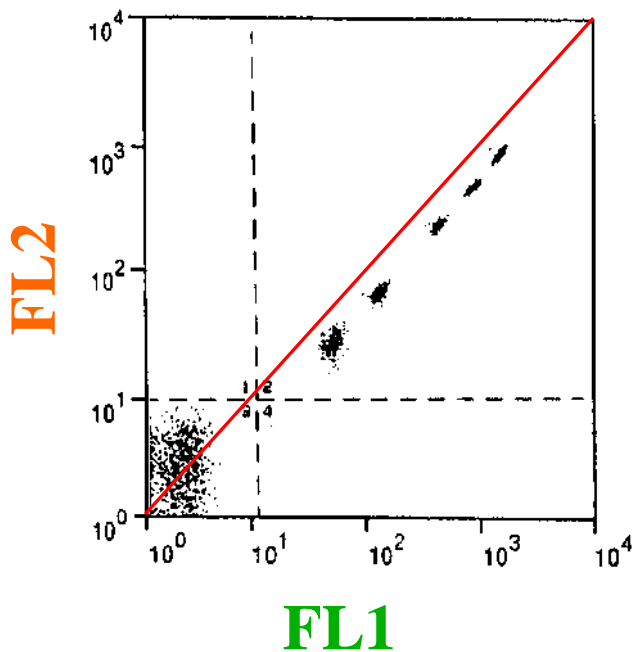
Компенсация в первом приближении означает вычитание одного сигнала, умноженного на некоторый коэффициент (как правило, от 1 до 100%) из другого.

Варианты компенсации: аналоговая (on-line) (непосредственно на приборе, неточная) и цифровая (более точная, в компьютере). Цифровая компенсация может производиться с помощью заранее подготовленной таблицы (т.н. автоматическая компенсация, для которой используются калибровочные частицы) или вручную, после сбора данных (off-line).

Автоматическая компенсация применяется как обязательная в клинических исследованиях (диагностика).

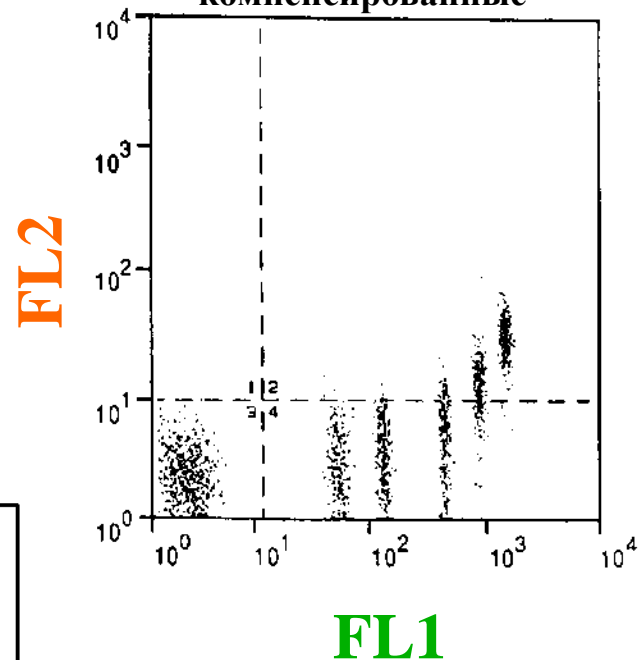
Компенсация с помощью частиц

некомпенсированные

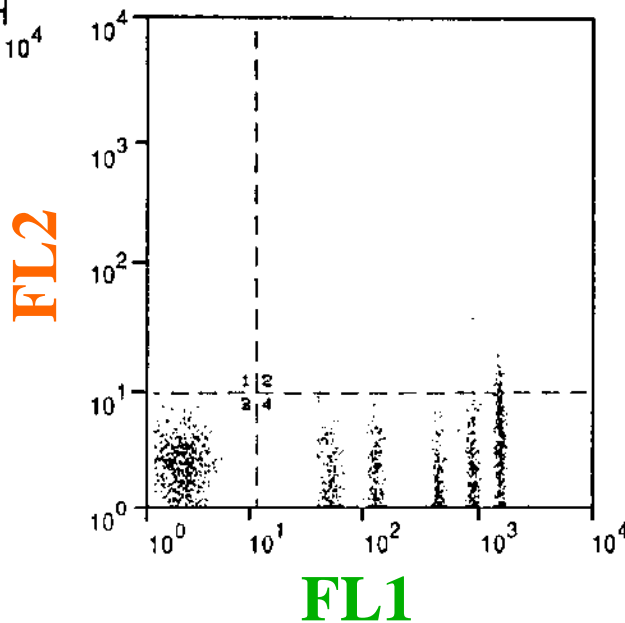


Частично

компенсированные



Полностью
компенсированные



Компенсация в растянутой шкале

