Проточная цитометрия: обзор

Проточная цитометрия – это технология, обеспечивающая быстрый многопараметрический анализ отдельных клеток в растворе. Проточные цитометры используют лазеры в качестве источников света для получения как рассеянных, так и флуоресцентных световых сигналов, которые считываются детекторами, такими как фотодиоды или фотоумножительные трубки. Эти сигналы преобразуются в электронные сигналы, которые анализируются компьютером и записываются в файл данных стандартизированного формата (.fcs). Клеточные популяции могут быть проанализированы и/или очищены на основе их флуоресцентных или светорассеивающих характеристик.

Различные флуоресцентные реагенты используются в проточной цитометрии. К ним относятся флуоресцентно конъюгированные антитела, ДНК-связывающие красители, красители жизнеспособности, ионные индикаторные красители и флуоресцентные экспрессионные белки.

Проточная цитометрия является мощным инструментом, который имеет применение в иммунологии, молекулярной биологии, бактериологии, вирусологии, биологии рака и мониторинге инфекционных заболеваний. За последние 30 лет он добился значительных успехов, что позволило получить беспрецедентные детали в исследованиях иммунной системы и других областей клеточной биологии.

Ключевые слова: проточная цитометрия, флуоресценция, реагенты

Ознакомление

Проточная цитометрия - это технология, которая быстро анализирует отдельные клетки или частицы, когда они проходят мимо одного или нескольких лазеров, будучи взвешенными в буферном растворе на основе соли. Каждая частица анализируется на предмет рассеяния видимого света и одного или нескольких параметров флуоресценции. Рассеяние видимого света измеряется в двух разных направлениях: прямое направление (прямое рассеяние или FSC), которое может указывать на относительный размер ячейки, и при 90° (боковое рассеяние или SSC), которое указывает на внутреннюю сложность или гранулярность ячейки. Рассеяние света не зависит от флуоресценции. Образцы готовят для измерения флуоресценции путем трансфекции и экспрессии флуоресцентных белков (например, зеленого флуоресцентного белка, GFP), окрашивания флуоресцентными красителями (например, йодида пропидия, ДНК) или окрашивания флуоресцентно конъюгированными антителами (например, CD3 FITC).

Проточная цитометрия является мощным инструментом, который имеет применение в нескольких дисциплинах, таких как иммунология, вирусология, молекулярная биология, биология рака и мониторинг инфекционных заболеваний. Например, он очень эффективен для изучения иммунной системы и ее реакции на инфекционные заболевания и рак. Он позволяет одновременно характеризовать смешанные популяции клеток из крови и костного мозга, а также твердые ткани, которые могут быть диссоциированы на отдельные клетки, такие как лимфатические узлы, селезенка, ткани слизистой оболочки, солидные опухоли и т. Д. В дополнение к анализу популяций клеток, основным применением проточной цитометрии является сортировка клеток для дальнейшего анализа. Более подробный обзор приложений будет обсуждаться далее в этом разделе.

Приборы, используемые для проточной цитометрии, развивались в течение последних нескольких десятилетий. Распространены несколько лазерных систем, а также инструменты, предназначенные для конкретных целей, такие как системы с 96-скважинными погрузчиками, предназначенными для анализа шариков, системы, которые сочетают в себе микроскопию и проточную цитометрию, и системы, которые сочетают масс-спектрометрию и проточную цитометрию. Обзор существующих инструментальных платформ будет обсуждаться в этом блоке.

Увеличение доступных реагентов за последние несколько лет привело к взрывному росту числа параметров, используемых в экспериментах по проточной цитометрии. Наблюдается резкое увеличение фторхромов, используемых для конъюгирования моноклональных антител, таких как тандемные красители и полимерные красители. Кроме того, наблюдается увеличение доступных флуоресцентных белков, используемых для трансфекции за пределами GFP, таких как mCherry, mBanana, mOrange, mNeptune и т. Д. Эти достижения в области фторхромов и приборов привели к экспериментам с возможностью более 30 параметров.

Заключительной частью эксперимента по проточной цитометрии является анализ данных. Традиционная двухпараметрическая гистограмма (точечный график) по-прежнему часто используется. Однако увеличение количества параметров и сложности экспериментов приводит к использованию новых алгоритмов кластерного анализа данных, таких как PCA, SPADE и tSNE. Эти улучшенные методы интеллектуального анализа данных позволяют извлекать полезную информацию из многомерных данных, доступных в настоящее время из проточной цитометрии.

Традиционные проточные цитометры

Традиционные проточные цитометры состоят из трех систем: флюидики, оптики и электроники. Система флюидики состоит из оболочки жидкости (обычно буферного солевого раствора), которая находится под давлением для доставки и фокусировки образца к точке лазерного перехвата или опроса, где анализируется образец. Оптическая система состоит из оптики возбуждения (лазеры) и коллекционной оптики (фотоумножительные трубки или PMT и фотодиоды), которые генерируют видимые и флуоресцентные световые сигналы, используемые для анализа образца. Серия дихроичных фильтров направляет флуоресцентный свет к определенным детекторам, а полосовые фильтры определяют длины волн света, которые считываются, чтобы каждый отдельный фторхром можно было обнаружить и измерить. Более конкретно, дихроичные фильтры - это фильтры, которые пропускают свет, который либо короче, либо длиннее по длине волны и отражает оставшийся свет под углом. Например, фильтр 450 Dichroic Long Pass (DLP) пропускает свет, который имеет длину волны более 450 нм, через фильтр и отскакивает от более коротких длин волн света под углом для отправки на другой детектор. Полосовые фильтры обнаруживают небольшое окно определенной длины волны света. Например, полосовой фильтр 450/50 пропускает через фильтр флуоресцентный свет с длиной волны 450 нм +/− 25 нм, который считывает детектор. Электронная система преобразует сигналы от детекторов в цифровые сигналы, которые могут быть прочитаны компьютером.

Несколько лазерных систем являются общими для приборов, часто имеющих 20 параметров (FSC, SSC и 18 флуоресцентных детекторов). Внедряются новые инструментальные платформы с пятью и более лазерами и 30–50 параметрами, но они встречаются реже. Наиболее распространенными лазерами, используемыми в традиционных проточных цитометрах, являются 488 нм (синий), 405 нм (фиолетовый), 532 нм (зеленый), 552 нм (зеленый), 561 нм (зелено-желтый), 640 нм (красный) и 355 нм (ультрафиолетовый). Дополнительные длины волн лазера доступны для специализированных применений. Кроме того, существуют приборы, которые заменили PMT на лавинные фотодиоды (APD) для обнаружения флуоресценции с целью повышения чувствительности.

Акустические фокусирующие цитометры

Этот цитометр использует ультразвуковые волны для лучшей фокусировки ячеек для лазерного опроса. Этот тип акустической фокусировки обеспечивает более высокий ввод образца и меньшее засорение образца. Этот цитометр может использовать до 4 лазеров и 14 флуоресцентных каналов.

Специфическим типом традиционного проточного цитометра является сортировщик клеток, который может очищать и собирать образцы для дальнейшего анализа. Сортировщик ячеек позволяет пользователю выбрать (затвор) на популяции клеток или частиц, которая является положительной (или отрицательной) для желаемых параметров, а затем направить эти ячейки в сосуд для сбора. Сортировщик ячеек разделяет ячейки, колеблясь потоком образца жидкости на высокой частоте для генерации капель. Затем капли получают либо положительный, либо отрицательный заряд и пропускаются через металлические прогибные пластины, где они направляются в конкретный сосуд для сбора на основе их заряда. Сосуды для сбора могут быть трубами, горками или пластинами (распространены 96-луночные или 384-луночные).

Существует два типа клеточных сортировщиков, кварцевая кювета и «струя в воздухе», которые отличаются тем, где находится точка лазерного опроса. Сортировщики кварцевых кюветных ячеек имеют фиксированное лазерное выравнивание и их легче подготовить к сортировке. Сортировщики ячеек «струя в воздухе» должны ежедневно выравнивать лазеры и их сложнее настроить, но они более адаптируемы для обнаружения мелких частиц.

Визуализационные цитометры

Визуализационные проточные цитометры (IFC) сочетают традиционную проточную цитометрию с флуоресцентной микроскопией. Это позволяет проводить быстрый анализ образца на предмет морфологии и многопараметрической флуоресценции как на уровне одной клетки, так и на уровне популяции (Barteneva, Fasler-Kan, & Vorobjev, 2012). IFC может отслеживать распределение белка в отдельных клетках, как конфокальный или флуоресцентный микроскоп, а также обрабатывать большое количество клеток, как проточный цитометр. Они особенно полезны в нескольких приложениях, таких как клеточная сигнализация, исследования колокализации, взаимодействия между клетками, повреждение и восстановление ДНК и любое приложение, которое должно быть в состоянии координировать клеточное местоположение с экспрессией флуоресценции на больших популяциях клеток.

Массовые цитометры

Массовые цитометры сочетают в себе масс-спектрометрию времени пролета и проточную цитометрию. Клетки маркируются антителами, помеченными ионами тяжелых металлов (обычно из серии лантаноидов) вместо флуоресцентно помеченных антител и обнаруживаются с помощью масс-спектрометрии времени пролета. Массовые цитометры не имеют обнаружения света FSC или SSC, что не позволяет использовать традиционный метод обнаружения клеточных агрегатов. Однако для этой цели могут быть использованы другие методы, такие как штрих-кодирование клеток (Leipold, Newell, & Maecker, 2015). Кроме того, массовая цитометрия не имеет клеточных автофлуоресцентных сигналов, а реагенты не имеют спектрального перекрытия излучения, связанного с флуоресцентными метками, поэтому компенсация не требуется. Однако образец разрушается во время анализа, поэтому сортировка клеток невозможна, а скорость сбора намного ниже, чем у стандартного проточного цитометра (1000 клеток в секунду вместо 10 000 клеток в секунду). В настоящее время существуют коммерчески доступные реагенты для 40 каналов, но это число будет увеличиваться с введением других ионов металлов, таких как платина, для конъюгации с антителами (Mei, Leipold, & Maecker, 2016).

Цитометры для мультиплексных шариковых массивов Bead Array Analysis стали популярными для анализа больших объемов аналитов в небольших объемах выборки. Вкратце, эти анализы используют захватные шарики с известным количеством флуоресценции в определенном канале и молекулу-репортер, обнаруженную отдельным лазером, для количественной оценки количества захваченного аналита, связанного с конкретной бусиной. По сути, это эквивалентно 100 анализам ИФА.

Для анализа этих анализов были разработаны небольшие проточные цитометры с обычно 2 лазерами и 96-луночными погрузчиками. Эти приборы имеют небольшие размеры и оптические стендовые конструкции, которые оптимизированы для обнаружения и распознавания бусин с различным количеством флуоресценции вдоль двух каналов. Разработаны приборы, способные обнаруживать 100–500 различных комбинаций бусин.

Одной из проблем многопараметрической проточной цитометрии является компенсация (или стирание спектрального перекрытия) между флурохромами. Новый тип проточного цитометра, спектральный анализатор специально разработан для решения этой проблемы. Спектральный анализатор измеряет все спектры флуоресцентного излучения для каждого фторхрома в многоцветном образце для создания спектрального отпечатка. Затем во время анализа каждый спектр не смешивается, чтобы обеспечить чистый сигнал для каждого фторхрома (Sony, 2017). Спектральный анализ начинает заменять традиционные PMT в качестве метода обнаружения для многомерной проточной цитометрии.

Новые детекторные технологии Фотоумножительные трубки (PMT) остаются стандартной детекторной технологией для проточной цитометрии. Их высокая чувствительность и низкий фон делают их полезными для флуоресцентной технологии. Тем не менее, твердотельные детекторы начинают появляться в некоторых цитометрах. Лавинные фотодиоды (APD) недороги, чувствительны и очень линейны и более спектрально чувствительны в длинной красной области. Кремниевые фотодиоды (SiPD) также являются перспективным вариантом для твердотельных детекторов.

Небольшие органические молекулы, такие как фторсцеин (MW = 389 D), Alexa Fluor 488 (аналог флуоресцеина), Texas Red (325 D), Alexa Fluor 647 (1464 D), Pacific Blue и Cy5 (762 D), обычно используются для конъюгации антител. Они имеют последовательные спектры излучения, но небольшой сдвиг Стокса (разница между длиной волны возбуждения и длиной волны излучения, примерно 50-100 нм). Они также стабильны и достаточно легко конъюгируются с антителами. Красители Alexa Fluor (Thermo Fisher) были разработаны, чтобы быть более устойчивыми к фотоотбеливанию и лучшим выбором реагентов для образцов, которые также будут использоваться для визуализации.

Фикобилипротеины

Фикобилипротеины представляют собой крупные белковые молекулы, полученные из цианобактерий, динофлагеллятов и водорослей. Это большие молекулы, например, фикоэритрин (ПЭ) имеет молекулярную массу 240 000 D. Эти белки имеют большие сдвиги Стокса (75-200 нм), очень стабильны с последовательными спектрами излучения. Из-за своего большого размера фикобилипротеины отлично подходят для количественной проточной цитометрии, поскольку они обычно имеют соотношение белка к фторхрому 1: 1 во время конъюгации. Однако фикобилипротеины подвержены фотоотбеливанию и не рекомендуются для применения при длительном или повторном воздействии источников возбуждения. Примерами фикобилибротеинов являются фикоэритрин (ПЭ), аллофикоцианин (APC) и перидинин хлорофилловый белок (PerCP).

Квантовые точки

Квантовые точки (Qdots) являются полупроводниковыми нанокристаллами, которые имеют плотные флуоресцентные спектры излучения, связанные с размером нанокристалла. Они оптимально возбуждаются С помощью ультрафиолетовых или фиолетовых лазеров, но могут быть минимально возбуждены несколькими лазерами. Это минимальное возбуждение усложняет флуоресцентную компенсацию, когда Qdots используются в многопараметрических экспериментах. Из-за проблем с компенсацией и трудностей в сопряжении Qdots с антителами эти реагенты в значительной степени были заменены полимерными красителями в многопараметрических окрашивающих панелях.

Полимерные красители

Полимерные красители состоят из полимерных цепей, которые собирают световые сигналы и могут быть «настроены» на поглощение и испускание света на определенных длинах волн в зависимости от длины полимерной цепи и прикрепленных молекулярных субъединиц. Эти красители очень стабильны и имеют схожую квантовую эффективность с фикобилипротеинами со значительно повышенной фотостабильностью. Поскольку полимерные красители могут поглощать свет только на определенных длинах волн, они избегают проблем с множественным лазерным возбуждением, которые затрудняют использование реагентов Qdot в многопараметрических экспериментах. Примерами этих реагентов являются реагенты Brilliant Violet (BV), Brilliant Ultraviolet (BUV) и Brilliant Blue (BB).

Тандемные красители

Тандемные красители химически связывают фикобилипротеины (PE, APC, PerCP) или полимерные красители (BV421, BUV395) с небольшими органическими фторхромами (Cy3, Cy5, Cy7) для создания красителя, который использует перенос энергии флуоресценции (FRET) для увеличения доступных фторхромов, которые могут быть возбуждены одним лазерным источником. Например, Texas Red имеет максимальное возбуждение 589 нм, а PE имеет излучение 585 нм, поэтому, связывая PE с Texas Red, излучение от PE используется для возбуждения Texas Red с использованием FRET, позволяющего PE-TxRed возбуждаться лазером 488 нм или 532 нм. Антитела полимерной цепи используют тот же метод для увеличения доступных фторхромов, которые могут возбуждаться одним лазером. Тандемные красители чрезвычайно яркие с большими значениями сдвига Стокса (150-300 нм), что полезно при работе с низкой плотностью антигена. Однако тандемные красители менее стабильны, чем донорские фторхромы, и могут отличаться от партии к партии по эффективности передачи энергии, что усложняет компенсацию. Большинство более длинных полимерных красителей Brilliant также являются тандемами и разделяют эти проблемы.

Металлические конъюгаты для массовой цитометрии Антитела для использования в массовой цитометрии конъюгируются с одноизотопными ионами тяжелых металлов в лантаноидном ряду элементов. В настоящее время существует 35 изотопов лантаноидных серий, коммерчески доступных для конъюгации антител. Эти зонды не являются флуоресцентными и применимы только для массовой цитометрии. Дополнительные конъюгаты антител станут доступны, как только другие металлические элементы будут оценены на пригодность для этой платформы.

Флуоресцентные белки

Флуоресцентные белки часто используются в качестве репортерных систем для экспрессии генов. Наиболее часто используется зеленый флуоресцентный белок (GFP), полученный из медузы Aequorea victoria (Tsien, 1998). GFP был клонирован для генерации голубого флуоресцентного белка (CFP) и желтого флуоресцентного белка (YFP). Красный флуоресцентный белок (DsRed) был обнаружен из грибного анемона (Михаил В. Мац, 1999), а затем клонирован для использования в системах экспрессии белка. Мономерные флуоресцентные белки следующего поколения (mCherry, mBanana) были клонированы из DsRed и имеют более широкие спектры возбуждения и излучения. Фиолетовые и зелено-желтые возбужденные флуоресцентные белки особенно интенсивно используются в проточной цитометрии. Новые флуоресцентные белки постоянно открываются и генерируются; В настоящее время существует несколько сотен, с спектрами возбуждения и излучения в диапазоне от ультрафиолетового до ближнего инфракрасного диапазона. Наличие многих лазерных длин волн на современных проточных цитометрах резко расширило использование флуоресцентных белков в проточной цитометрии.

Красители нуклеиновых кислот

Красители нуклеиновых кислот связывают ДНК, РНК или и то, и другое. Они используются для количественного определения ДНК для анализа клеточного цикла (Propidium Iodide, 7AAD, DyeCycle Violet, DAPI), дискриминации хромосом для сортировки (Hoescht 33342, Chromomycin A3), сортировки стволовых клеток с использованием анализа боковой популяции (Hoescht 33342), жизнеспособности клеток и для сортировки бактерий. Их можно комбинировать с другим маркером, таким как фторхромный конъюгированный анти-BrdU для определения пролиферации.

Пролиферация красителей

Пролиферация клеток может быть измерена пульсацией клеток BrdU (бромодеоксиуридином), а затем окрашиванием антителом против BrdU и красителем ДНК. Однако этот метод не позволяет проводить долгосрочные исследования пролиферации. Карбоксифторсцеин сукцинимидально сложный эфир (CFSE) и другие подобные красители могут быть использованы для наблюдения за множественными делениями пролиферирующих клеток. Красный и фиолетовый возбужденные варианты этих красителей также теперь доступны. Каждая клетка постоянно маркируется красителем, и последующие поколения клеток наследуют меньшее количество красителя из-за разбавления красителя. Эти красители не влияют на рост или морфологию клеток и подходят для долгосрочных исследований пролиферации.

Жизнеспособность красителей

Жизнеспособность клеток может быть измерена путем исключения красителей (Propidium iodide, DAPI) или путем связывания красителя с аминами в клетке, чтобы определить, является ли клеточная мембрана неповрежденной. Красители исключения не могут быть зафиксированы, подходят только для клеток, которые не являются инфекционными и будут проанализированы немедленно. Аминосвязывающие красители, такие как живые / мертвые реагенты (ThermoFisher), красители зомби (biolegend) или поправимые красители Viablity (BD Biosciences), могут быть зафиксированы и использованы для клеток, которые являются инфекционными, клеток, которые необходимо окрашивать для внутренних антигенов, и клеток, которые необходимо хранить до приобретения.

Индикаторные красители кальция

Индикаторные красители кальция подвергаются изменению цвета при связывании с кальцием. Они используются для индикации активации и передачи сигналов клетками. Данные выражаются в виде соотношения двух длин волн, связанных со связанным и несвязанным кальцием и красителем. Наиболее часто используемым красителем остается indo-1, ультрафиолетовый двухфазный кальциевый зонд. Также доступны сине-зеленые кальциевые зонды, включая флуо-3.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Проточная цитометрия имеет множество методов и приложений, которые подходят для нескольких областей исследований. В этом разделе приложения широко сгруппированы по конкретным дисциплинам, однако любой из этих методов может быть использован во всех областях обучения.

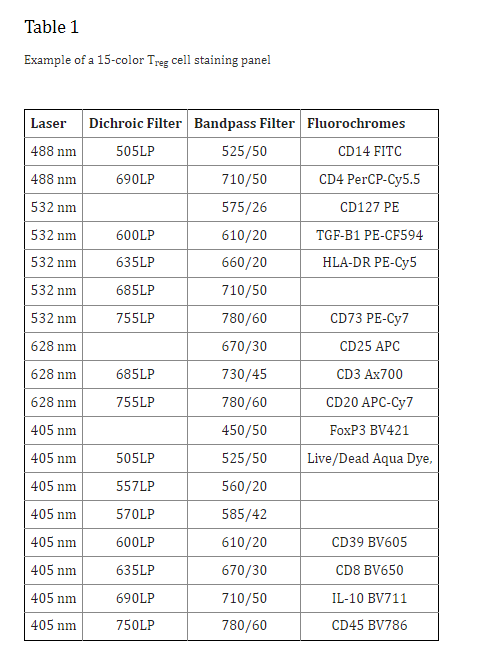
ИММУНОЛОГИЯ

Иммунофенотипирование

Иммунофенотипирование является наиболее используемым применением в проточной цитометрии. Он использует уникальную способность проточной цитометрии одновременно анализировать смешанные популяции клеток по нескольким параметрам. В своей простейшей форме эксперимент по иммунофенотипированию состоит из клеток, окрашенных фторхром-конъюгированными антителами, которые нацелены против антигенов на поверхности клетки. Большинству из этих антигенов присваиваются номера «кластер дифференцировки» или номера CD мастерскими по дифференцировке лейкоцитов человека, так что общая номенклатура используется для определения моноклональных антител, направленных против специфических клеточных антигенов. Например, CD3 является «кластером дифференцировки No 3» и используется для определения Т-клеточного корецептора, который присутствует на всех Т-клетках.

Большинство иммунных клеток имеют специфические МАРКЕРЫ CD, которые определяют их как популяцию клеток. Эти клеточные маркеры называются маркерами линии и используются для определения конкретных клеточных популяций для дополнительного анализа в каждом эксперименте по иммунофенотипированию. Примерами являются маркеры Т-клеток (CD3, CD4, CD8), маркеры В-клеток (CD19, CD20), моноцитарные маркеры (CD14, CD11b) и маркеры NK-клеток (CD56, CD161).

В дополнение к маркерам линии, которые определяют популяции клеток, другие маркеры используются для характеристики каждой клеточной популяции. Эти маркеры могут включать маркеры активации (CD69, CD25, CD62L), маркеры памяти (CD45RO, CD27), маркеры самонаведения тканей (α4/β7) и маркеры хемокиновых рецепторов (CCR7, CCR5, CXCR4, CCR6). Часто эксперименты по иммунофенотипированию также включают внутриклеточные маркеры, такие как FoxP3 (определяет T).рег клетки), цитокины (IFN-γ, TNF-α, IL-2 определяют TH1 клетка), маркеры пролиферации (Ki67, CFSE) и антиген-специфические маркеры (основная гистосовместимость или тетрамеры MHC). Современные приборы и реагенты способны к 28 экспериментам по иммунофенотипированию цвета, однако чаще проводятся эксперименты в цветовом диапазоне 12–15. Образец 15-цветного Трег панель клеточного иммунофенотипирования показана в Таблица 1



Специфические реакции антигена

Специфические реакции антигена могут быть измерены путем стимуляции клеток специфическим антигеном, а затем поиска производства цитокинов, пролиферации, активации, памяти или распознавания антигена через мультимеры MHC. Мультимеры MHC представляют собой мономеры MHC (MHC-I или MHC-II), которые обычно биотинилируются, а затем связываются с флуоресцентной основой стрептавидина в группах 4 (тетрамер), 5 (пентамер) или 10 (декстрамер). Эти мультимеры MHC «нагружены» антигеном выбора, а затем используются для связывания с Т-клетками, которые распознают антиген, тем самым указывая на уровень ответа на конкретный антиген. Это приложение обычно используется в исследованиях вакцин.

Внутриклеточный анализ цитокинов

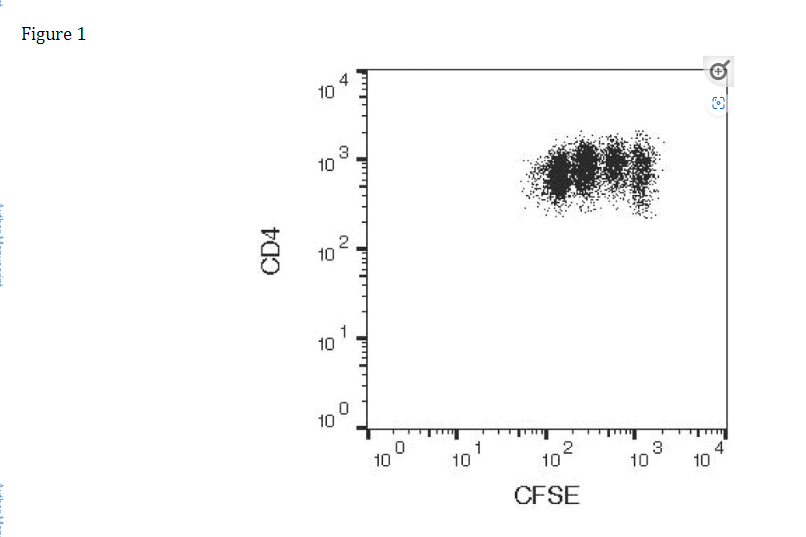
Внутриклеточный анализ цитокинов выполняется путем обработки клеток ингибитором транспорта белка (Брефельдин А или Моненсин) в течение 2-12 часов, чтобы любые цитокины, продуцируемые клетками, могли накапливаться в клетке, что позволяет лучше обнаруживать. Клетки могут быть стимулированы различными антигенами во время этой инкубации, такими как пептиды из вакцины для измерения иммунного ответа.

После лечения ингибитором транспорта белка клетки окрашивают для маркеров жизнеспособности и маркеров клеточной поверхности, затем фиксируют и пермеабилизируют для внутриклеточного окрашивания антицитокиновыми антителами.

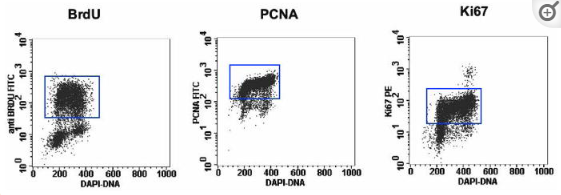
Анализ пролиферации

Пролиферация клеток может быть измерена с помощью проточной цитометрии с использованием нескольких различных анализов и маркеров. Эти анализы используют различные методы для выявления событий, связанных с пролиферацией, таких как включение аналогов тимидина (BrdU) в репликацию ДНК, отслеживание поколений наследуемых постоянных красителей (CFSE) и экспрессия антигенов, связанных с пролиферацией (Ki67, PCNA).

Проточная цитометрия эквивалента 3Пролиферационный анализ H тимидина использует аналоги тимидина BrdU или EdU (этинилдеоксиуридин) для пульсирующих растущих клеток в течение 2-6 часов. После этой инкубации клетки окрашивают для поверхностных маркеров (необязательно), а затем фиксируют и пермеабилизируют для окрашивания встроенных BrdU или EdU. Процедура BrdU использует ДНКазу для воздействия BrdU на окрашивание антител, но процедура EdU использует катализируемую медью химию щелчка для обнаружения EdU. Оба метода обычно противопоставляют окрашиванию ДНК-связывающим красителем, таким как йодид пропидия. Кроме того, как метод BrdU, так и метод EdU совместимы с окрашиванием дополнительных внутриклеточных маркеров антигена.

CFSE и другие подобные красители (CellTrace Violet, FarRed и др.) пересекают клеточную мембрану в живых клетках и связываются ковалентно и постоянно с внутриклеточными структурами (обычно лизином или другими аминами). Дочерние клетки каждого последующего поколения наследуют краситель, что позволяет проводить долгосрочный анализ пролиферации. Этот метод очень полезен при пролиферации в результате долгосрочной стимуляции антигена. Пример окрашивания CFSE находится в Рисунок 1. 

Экспрессия антигенов, связанных с пролиферацией, также может быть использована в качестве маркера пролиферации. Ki67 экспрессируется во время пролитерации клеток (все фазы), но не во время покоя клеток. PCNA (пролиферирующий клеточный ядерный антиген) необходим для репликации ДНК. Наличие Ki67 или PCNA является показателем пролиферации клеток. Окрашивание Ki67, PCNA и BrdU на одних и тех же клетках показано в Рисунок 2.



Анализ апоптоза Апоптоз, или запрограммированная гибель клеток, является явлением, которое часто исследуется в иммунологии и других областях исследований. Он используется для поддержания гомеостаза иммунной системы путем удаления клеток без запуска воспалительной реакции (некроза). Это механизм смерти для клонально расширенных Т-клеток после иммунного ответа, для самонацеливающихся Т-клеток, для аутореактивных В-клеток и нескольких других клеток в иммунной системе.

Обнаружение апоптоза с помощью проточной цитометрии использует несколько мишеней вдоль каскада событий, связанных с апоптозом. Транслокация плазматической мембраны нацелена на окрашивание Annexin V, на переваривание эндонуклеазы ДНК нацелено на анализ TUNEL (TdT dUTP Nick End Labeling), активация каспаз может быть нацелена на антитела и красители, митохондриальный апоптоз нацелен на красители, которые определяют потенциал митохондриальной мембраны и конденсацию хроматина в ядре, обнаруженную при окрашивании Hoescht 33342.

Аннексин V представляет собой фосфолипидсвязывающий белок, который связывается с фосфатидилсерином при его перемещении во внешний слой клеточной мембраны во время апоптоза. Краситель исключения жизнеспособности (например, йодид пропидия) следует использовать при окрашивании Приложением V, чтобы подтвердить, что связывание происходит на внешней поверхности клеточной мембраны.

TUNEL - это метод, который использует способность терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы (TdT) маркировать концы разрывов ДНК, связанных с апоптозом, dUTP (дезоксиуридинтрифосфат) или BrdU. DUTP или BrdU маркируются флуохромом для обнаружения, а клетки окрашиваются красителем ДНК перед получением данных.

Сигнальный путь каспазы активируется в большинстве случаев апоптоза. На это нацелено использование внутриклеточного окрашивания и антител, специфичных для активной формы каспазы 3. Существуют дополнительные анализы, в которых используются флуорогенные субстраты, которые при воздействии активности каспазы расщепляются, а затем излучают флуоресценцию.

Митохондриальный апоптоз не всегда использует путь каспазы, поэтому для обнаружения используются различные методы. Большинство из этих методов исследуют мембранный потенциал митохондрий, например, с использованием красителя JC-1. Однако существует антитело против APO2.7, которое локализуется на митохондриальной мембране и экспрессируется только во время апоптоза.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Флуоресцентный анализ белка Флуоресцентные белки (GFP, mCherry, YFP, mRuby и т. Д.) Используются в качестве маркеров для экспрессии белка. Как правило, клетки трансфектируются плазмидой, которая содержит промоторную последовательность и кодирует интересующий ген вместе с флуоресцентным белком. Экспрессия флуоресцентного белка используется в качестве индикатора экспрессии интересующего гена. В последнее время экспрессия расщепленного двух- или трехпарсионного флуоресцентного комплементирования, связанного с другими белками, позволяет обнаруживать РНК-белковые и белково-белковые взаимодействия. Эти методологии произвели революцию в обнаружении и изоляции клеток, где флуоресценция обнаруживается только в ответ на суррогатное материнство (Han et al., 2014). Эта технология используется для нескольких применений, например, для отслеживания in vivo трансплантированных клеток, бактериальных или вирусных инфекций и нокаута генов в клетках для дальнейшего выяснения функции гена.

Анализ клеточного цикла

Анализ клеточного цикла состоит из окрашивания ДНК насыщенным количеством ДНК-связывающего красителя. В большинстве случаев клетки фиксируют 70% раствором этанола, который проникает в клетки, а затем окрашивают красителем (PI, 7AAD, DAPI). Однако существуют красители, которые могут проникать в живые клетки и окрашивать ДНК без вреда для клеток, таких как Hoescht 33342. В этом типе анализа образцы приобретаются с низкой скоростью потока с линейным усилением, а затем анализируются с использованием программного обеспечения для моделирования плоидности для определения фаз клеточного цикла.

Цитометрия потока сигнальной трансдукции Это приложение использует антитела, полученные против покоящихся и фосфорилированных сигнальных молекул. Использование этих реагентов и специализированных буферов в окрашивающих панелях позволяет изучать сигнальные пути в смешанных популяциях клеток.

Проточная цитометрия РНК-цитометрия РНК сочетает в себе проточную цитометрию с флуоресцентной гибридизацией in situ (FISH) для обнаружения экспрессии РНК наряду с экспрессией белка. Этот метод требует оптимизации окрашивания панели, поскольку не все фторхромные конъюгированные антитела выдержат обработку при 40 ° C в течение нескольких 1-часовых инкубаций. Это полезный метод, когда антитела недоступны для мишени, и вместо этого можно использовать экспрессию РНК.

СОРТИРОВКА ЯЧЕЕК

При сортировке клеток используется проточный цитометр с возможностями сортировки ячеек для разделения и очистки клеток или частиц для дальнейшего анализа. По сути, любая ячейка или частица, которые могут быть сделаны флуоресцентными, могут быть разделены сортировщиком ячеек. Ячейки могут быть отсортированы на 96 или 384 плиты скважины, трубки и слайды. Несколькими распространенными типами образцов являются трансфектированные клетки, экспрессирующие флуоресцентный белок, стволовые клетки, инфильтрирующие опухолевые лимфоциты, опухолевые клетки и популяции лейкоцитов. Основным соображением для любого сорта клеток является увеличение количества антител, необходимых для окрашивания большого количества клеток.

ДРУГИЕ ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

Абсолютный подсчет клеток Абсолютный подсчет клеток может быть добавлен к любому эксперименту по иммунофенотипированию. В процедуре используются флуоресцентные шарики известной концентрации, которые приобретаются вместе с образцом. Образец анализируется и закрытое количество клеток для интересующей популяции сравнивается с количеством бусин, полученных в том же образце, для получения количества клеток на миллилитр.

Количественная проточная цитометрия Количественная проточная цитометрия использует стандарт на основе шариков для создания кривой окрашивания известных количеств флуоресценции. Затем клетки приобретаются с теми же настройками прибора, и линейный регрессионный анализ используется для расчета количества флуоресценции на клетках. В зависимости от используемой системы шариков это может быть выражено в виде антител, связанных на клетку (ABC), способности связывания антител (ABC) или молекул эквивалентных растворимых фторхромов (MESF). Лучшим фторхромом для этого применения является ПЭ, который из-за своего размера почти всегда связывается с антителом с соотношением фторхрома к белку 1: 1. Молекулярный эквивалент стандартов растворимой флуоресценции (MESF) может быть использован для преобразования произвольных измерений интенсивности флуоресценции в число флуоресцентных молекул путем создания стандартной кривой и регрессии из данных MESF-шарика в любом конкретном эксперименте для количественного определения приблизительного числа флуоресцентных меток на клетке.

Мультиплексированные бисерные массивы

Мультиплексированные бисерные массивы представляют собой наборы бусин, покрытых антителами против специфических растворимых белков или нуклеиновых кислот. Каждая бусина имеет известное количество флуоресценции и конкретную мишень, которая дает местоположение для шарика в матрице. Сбор до 100 бусин инкубируют с интересующим образцом, обрабатывают флуоресцентным репортером, а затем приобретают на проточном цитометре с помощью по меньшей мере 2 лазеров для обнаружения 2 различных фторхромов. Специальное программное обеспечение используется для расчета количества анализируемого вещества на основе флуоресценции.

Анализы фагоцитоза Используя флуоресцентно помеченные биочастицы или бактерии, можно обнаружить фагоцитоз с помощью проточной цитометрии. Бактерии помечены чувствительным к рН красителем, который флуоресцирует только при воздействии более низкого рН фагосомы, что указывает на то, что бактерии фагоцитозированы.

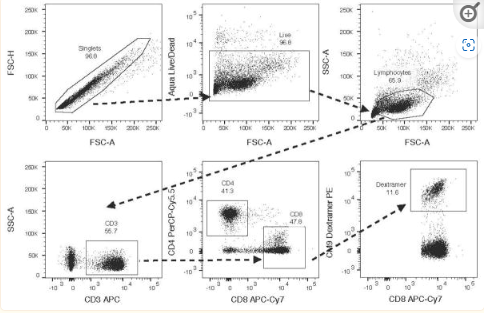
Анализ и сортировка мелких частиц С помощью проточных цитометров с повышенной чувствительностью можно обнаруживать и сортировать экзосомы и другие субмикронные частицы. Анализ клеточных экзосом, вирусов и других субклеточных частиц создает новые приложения во многих областях, включая биологию рака, терапию рака и разработку вакцин. Эта технология все еще находится на стадии разработки, но методы и приборы быстро совершенствуются, чтобы сделать это приложение более доступным в ближайшем будущем.

АНАЛИЗ ДАННЫХ

FCS 3.1 File Standard Формат файла FCS был создан в 1984 году для стандартизации файлов данных режима списка проточной цитометрии. Все файлы данных проточной цитометрии имеют расширение файла «.fcs», которое позволяет считывать файлы любой программой анализа проточной цитометрии. Текущим стандартом файла fcs является FCS 3.1.

Обычный анализ проточной цитометрии

Обычный анализ проточной цитометрии состоит из рисования области вокруг популяции клеток (гатинг) и применения этой области к другим параметрам в рамках эксперимента. Это позволяет отбирать конкретные группы клеток для дальнейшего анализа других маркеров. Например, хелперные Т-клетки могут быть сначала определены экспрессией CD3+, CD4+, а затем проанализированы для активации, глядя на эту популяцию для экспрессии маркера активации, такого как CD25 (IL-2Rα), а затем IFN-γ продукции цитокинов. Пример гатинга находится в Рисунок 3.



Для анализа данных проточной цитометрии доступны многочисленные коммерческие компьютерные программы в дополнение к программному обеспечению, предоставляемому прибором. Наиболее популярными являются FlowJo, FCS Express, WinList, Kaluza и WinMDI.

Программное обеспечение для анализа клеточного цикла Использует моделирование плоидности для определения фазы клеточного цикла, представленной гистограммой ДНК. ModFit LT - это программа, предназначенная для этого типа анализа. Кроме того, модуль анализа клеточного цикла доступен на FlowJo.

Анализ многомерных данных

Анализ многомерных данных, содержащих более 14 параметров, с использованием традиционных стратегий измерения потока является громоздким и трудоемким. Кроме того, можно пропустить интересные популяции клеток, потому что отношения между маркерами нелегко определить с помощью традиционных методов гейтинга. Существует множество новых аналитических инструментов, которые используются для визуализации и анализа этого типа данных. Примерами являются SPADE (анализ прогрессирования событий, нормализованных по плотности), tSNE (t-распределенное стохастическое соседское встраивание), PCA (анализ главных компонентов) и FLOCK (кластеризация FLOw без K).

Математически t-SNE похож на PCA, но он может идентифицировать больше сегрегирующих признаков, чем PCA, поскольку t-SNE оптимизирует только кластеризацию похожих объектов друг с другом, в то время как PCA оптимизирует как близость похожих событий, так и разделение разнородных событий. Большинство из этих алгоритмов требуют методов сокращения или уменьшения выборки данных, чтобы уменьшить сложность данных перед анализом.

Cytobank является еще одним источником облачного анализа многомерных данных, где пользователи загружают данные и подписываются на веб-платформу. tSNE доступен в виде подключаемого модуля для программного обеспечения FlowJo и FCSExpress.