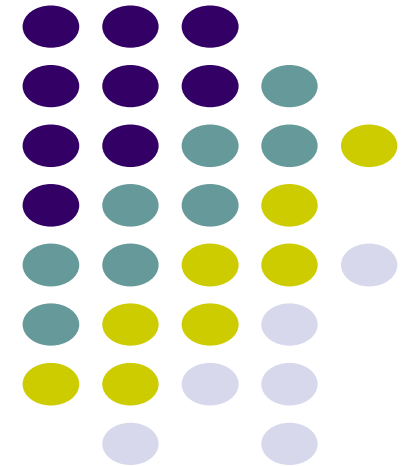
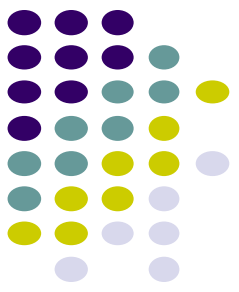


# 9. Citofluorimetria

## Principi di funzionamento

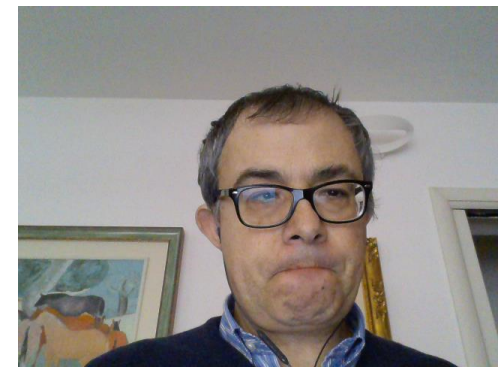
**Prof. Gian Matteo Rigolin**  
**Ematologia**  
**Azienda Ospedaliero Universitaria**  
**Arcispedale S. Anna Ferrara**



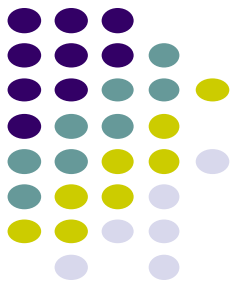


# Un citofluorimetro ha 5 componenti principali

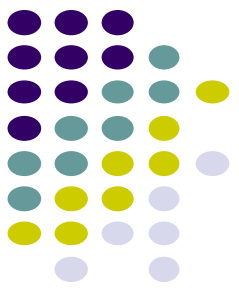
1. Un laser che fornisce una luce monocromatica
2. Una cella a flusso con un flusso di liquido, che trasporta e allinea le cellule in modo che passino in un'unica fila attraverso il raggio laser
3. Sistemi ottici e filtri che regolano i segnali luminosi
4. I fotomoltiplicatori che generano dati relativamente al FSC (approssimazione della dimensione delle cellule) e sul SSC (che si riferisce alla complessità delle cellule), oltre a convertire i segnali di fluorescenza dalla luce in segnali elettrici che vengono elaborati da un computer
5. Un computer per l'analisi dei segnali.



# Principi di FCM

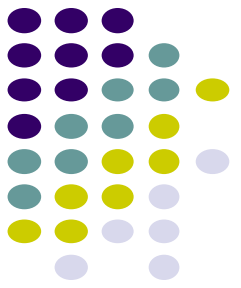
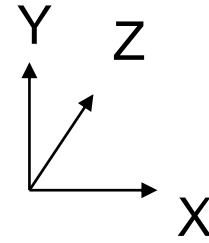
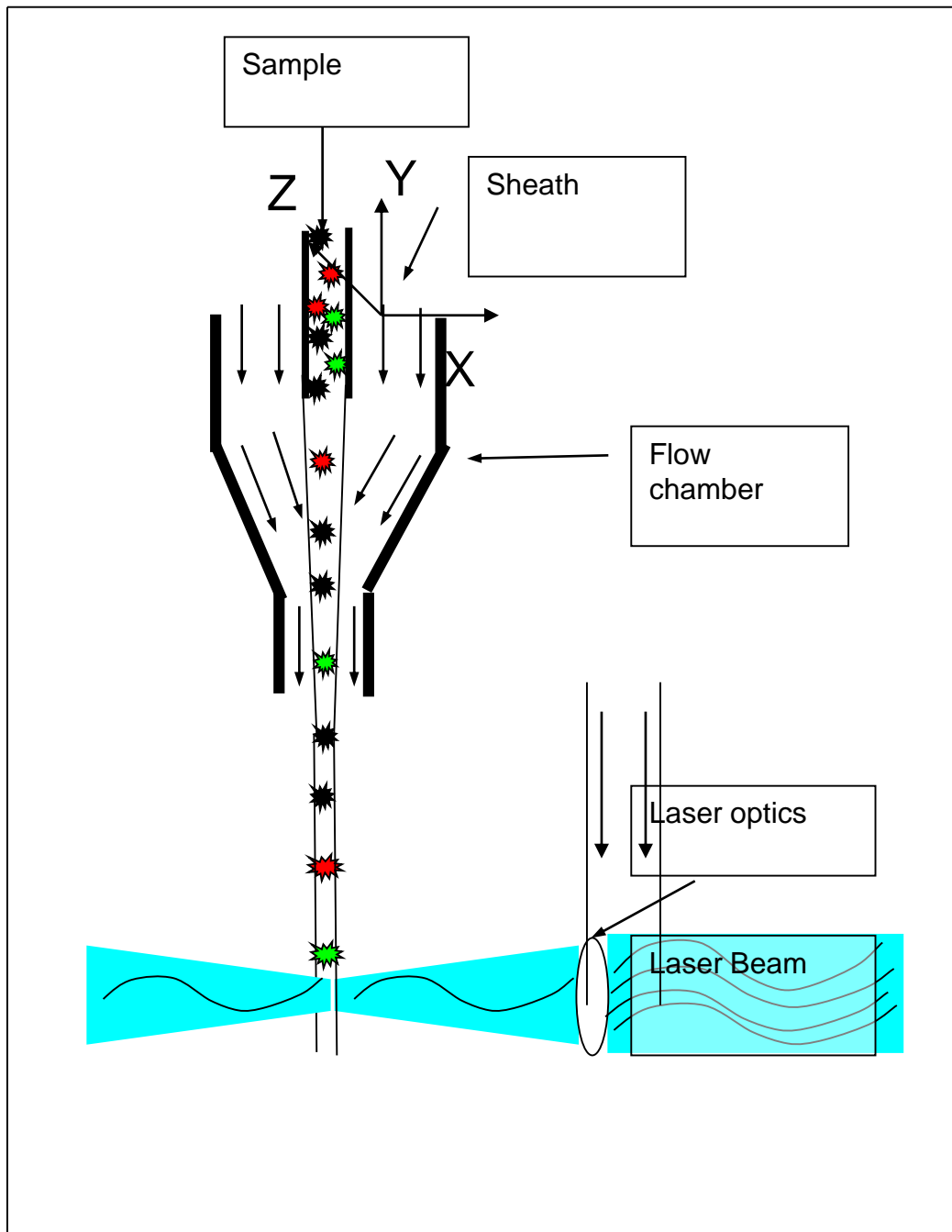


- Per un'analisi affidabile, il campione deve essere in sospensione monodispersa.
- In un citometro a flusso, il fluido isotonico viene forzato sotto pressione in un tubo che lo porta alla cella di flusso, dove viene generata una colonna di fluido con **flusso laminare** e una portata elevata (il cosiddetto **sheath fluid** o fluido di guaina)



# Principi di FCM

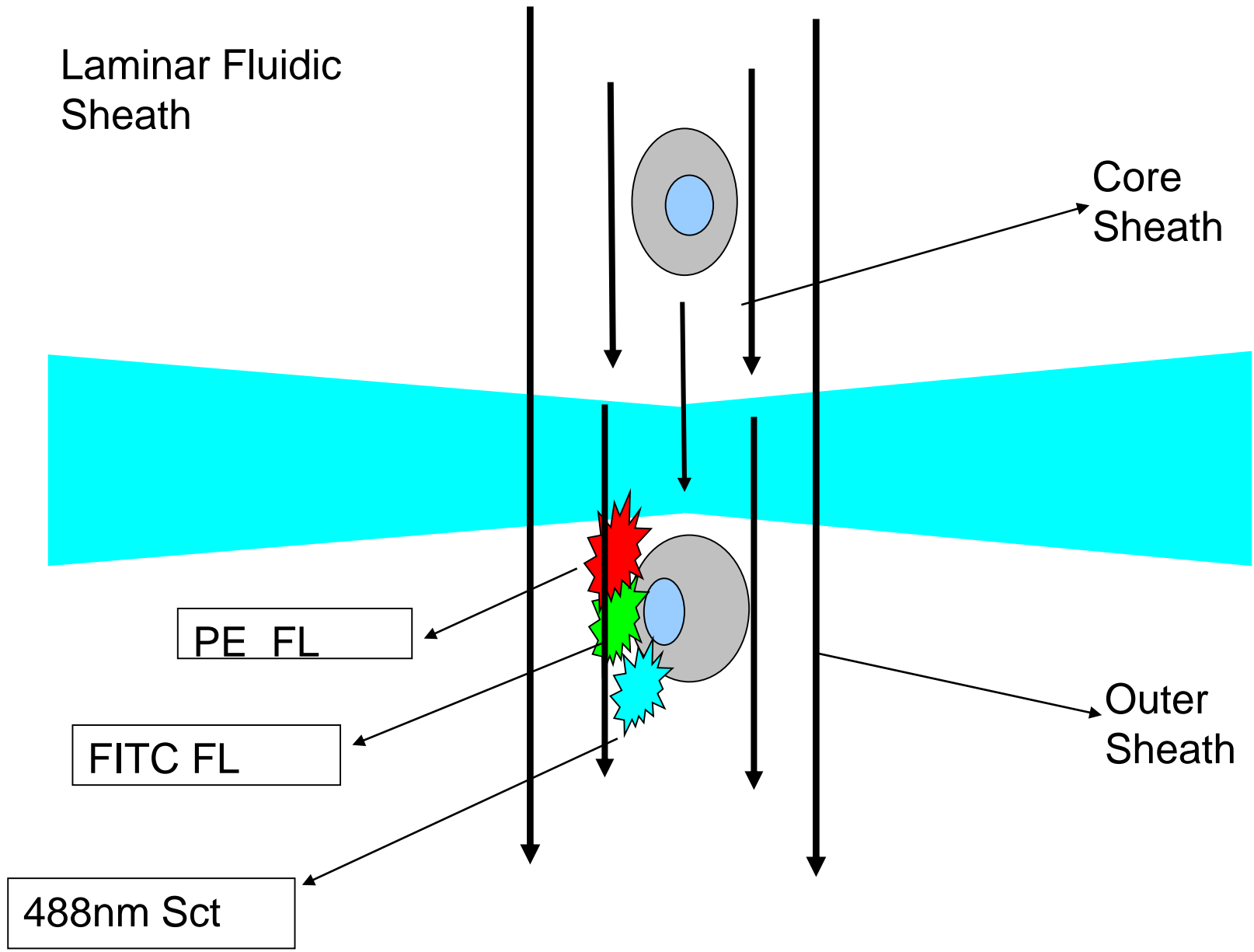
- Il campione viene introdotto nella cella di flusso da una siringa computerizzata al centro del sheath fluid, creando un flusso coassiale all'interno di un flusso (**sample core stream**).
- La pressione del sheath fluid allinea idrodinamicamente le cellule o le particelle in modo che vengano presentate al raggio di luce una alla volta.



**Una sospensione a singola cellula è idrodinamicamente focalizzato generando un flusso laminare che interseca i laser**

**Le cellule vengono presentate al laser mediante i principi della messa a fuoco idrodinamica**

Laminar Fluidic Sheath



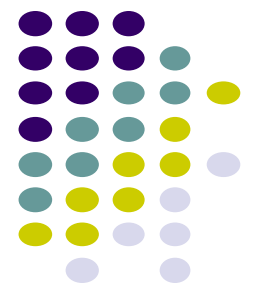
Core Sheath

Outer Sheath

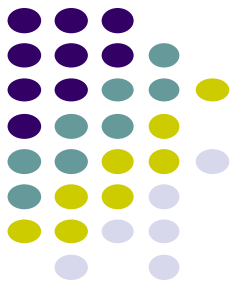
PE FL

FITC FL

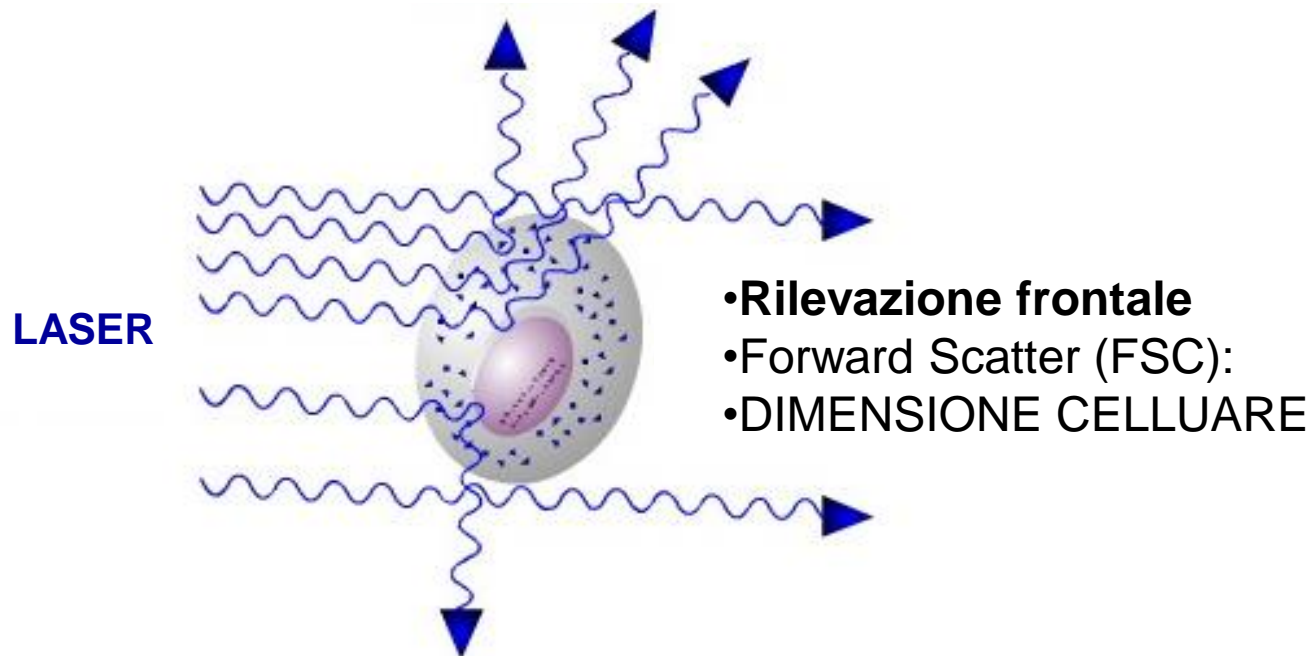
488nm Sct



# FSC e SSC



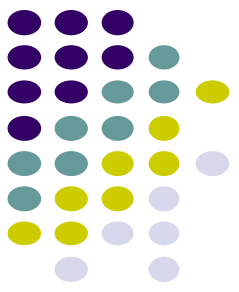
- Rilevazione laterale
- Side Scatter (SSC)
- COMPLESSITA' CELLULARE



L'interazione delle cellule con il fascio di luce dà luogo a fenomeni di diffrazione (scattering).

Il FSC è determinato dalla diffrazione in relazione al diametro cellulare

Il SSC è determinato dalla riflessione e rifrazione del raggio raccolta a 90°.

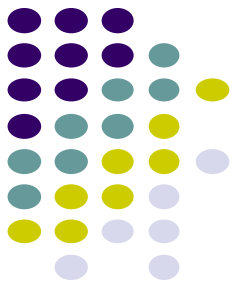


# Principi di FCM

- La diffusione della luce fornisce una misura approssimativa delle dimensioni delle cellule (FSC) e granularità (SSC).
- Il SSC viene raccolta come luce fluorescente ad angolo retto rispetto al raggio ed è dovuta alla luce riflessa dalle strutture interne della cellula.
  - Le cellule con granularità elevata o vacuoli come granulociti o monociti hanno SSC maggiore di quelle senza granuli come linfociti
- FSC e SSC vengono utilizzati per impostare la soglia per la separazione di detriti, eritrociti e piastrine da cellule nucleari vitali.
  - Le cellule vive diffondono più luce delle cellule morte e apoptotiche e quindi hanno FSC più alti.



# Principi di FCM

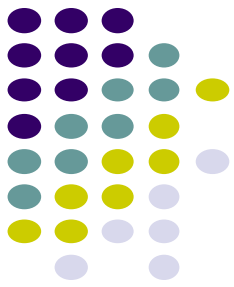


- Per l'applicazione in FCM, gli anticorpi sono coniugati con **fluorocromi**, coloranti che assorbono la luce dal laser ed emettono luce a lunghezze d'onda più lunghe.

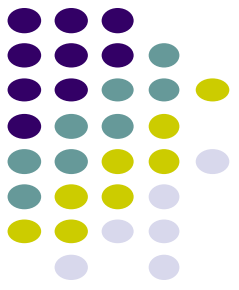
TABLE OF FLUOROCHROMES COMMONLY USED IN CLINICAL FLOW CYTOMETRY

Probe	Ex (nm)	Em (nm)	MW	Acronym/Comments
<b>Reactive and Conjugated Probes</b>				
R-Phycoerythrin	480;565	578	240 k	PE
Red 613	480;565	613		PE-Texas Red
Fluorescein isothiocyanate	495	519	389	FITC
Rhodamine isothiocyanate	547	572	444	TRITC
X-Rhodamine	570	576	548	XRITC
Peridinin chlorophyll protein	490	675		PerCP
Texas Red	589	615	625	TR
Allophycocyanin	650	660	104 k	APC
TruRed	490,675	695		PerCP-Cy5.5
Alexa Fluor 647	650	668	1250	
Alexa Fluor 700	696	719		
Alexa Fluor 750	752	779		
Cyanine 5	(625);650	670	792	Cy5
Cyanine 5.5	675	694	1128	Cy5.5
Cyanine 7	743	767	818	Cy7
PE-TR-X	595	620	625	ECD
PE-Cy5 conjugates	480;565;650	670		Cychrome, Tri-Color, Quantum Red
PE-Cy7 conjugates	480;565;743	767		PE-Cy7
APC-Cy7 conjugates	650;755	767		APC-CY7
<b>Nucleic Acid Probes</b>				
4',6-Diamidino-2-phenylindole	345	455		DAPI ,AT-selective
SYTOX Blue	431	480	~400	DNA
SYTOX Green	504	523	~600	DNA
Ethidium bromide	493	620	394	
7-Aminoactinomycin D	546	647		7-AAD, CG-selective
Acridine Orange	503	530/640		DNA/RNA
Thiazole Orange	510	530		TO (RNA)
Propidium iodide	536	617	668.4	PI

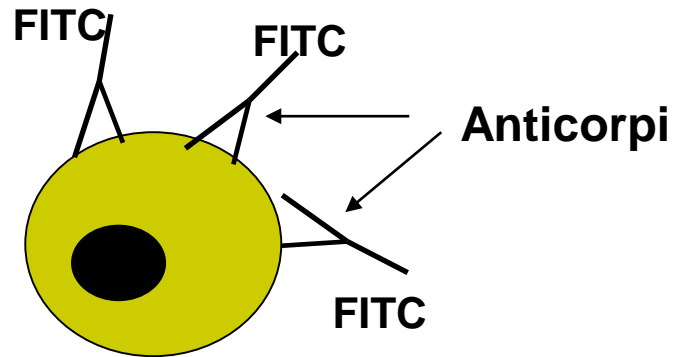
Em, peak emission wavelength (nm); Ex, peak excitation wavelength (nm); MW, molecular weight.



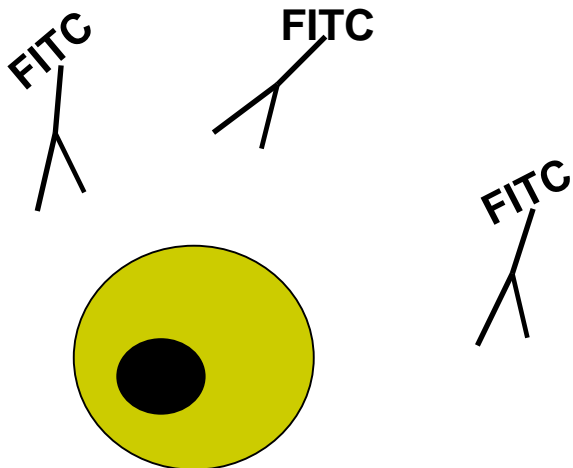
# Immunofluorescenza



**Gli anticorpi sono coniugati artificialmente ai fluorocromi (FITC, PE etc)**



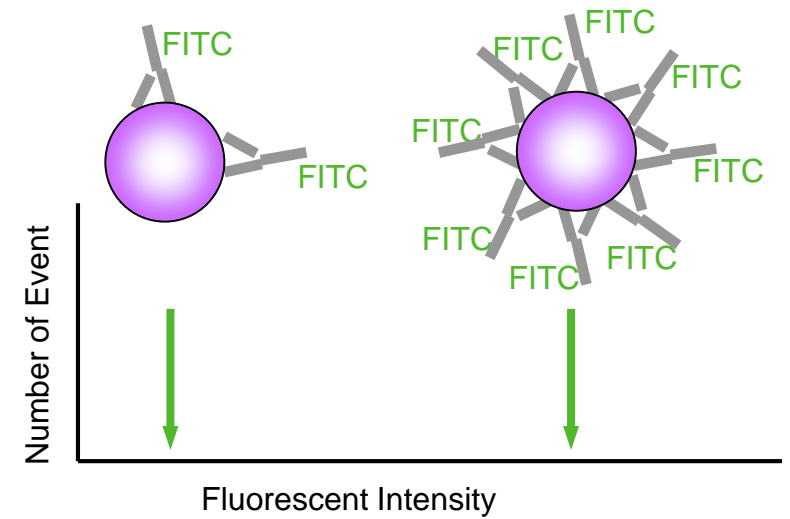
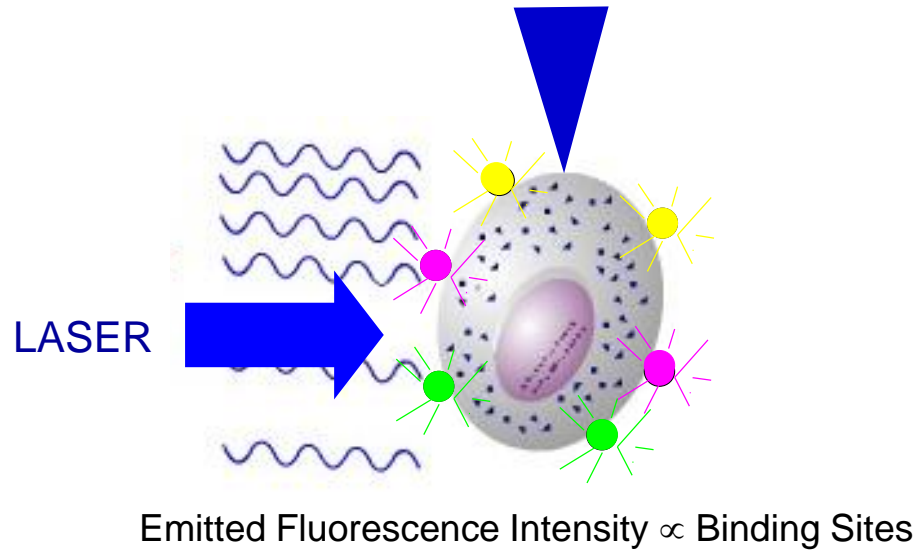
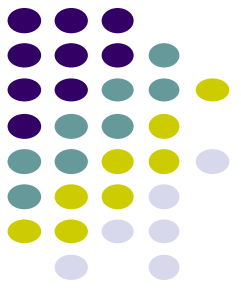
**Gli anticorpi riconoscono molecole (antigeni) specifiche nella superficie cellulare**

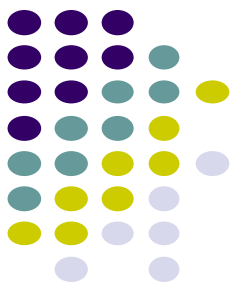


**Quando vengono analizzate, le cellule che esprimono l'antigene per cui l'anticorpo è specifico manifesteranno fluorescenza.**

**Le cellule prive dell'antigene non manifesteranno fluorescenza**

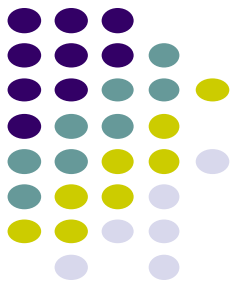
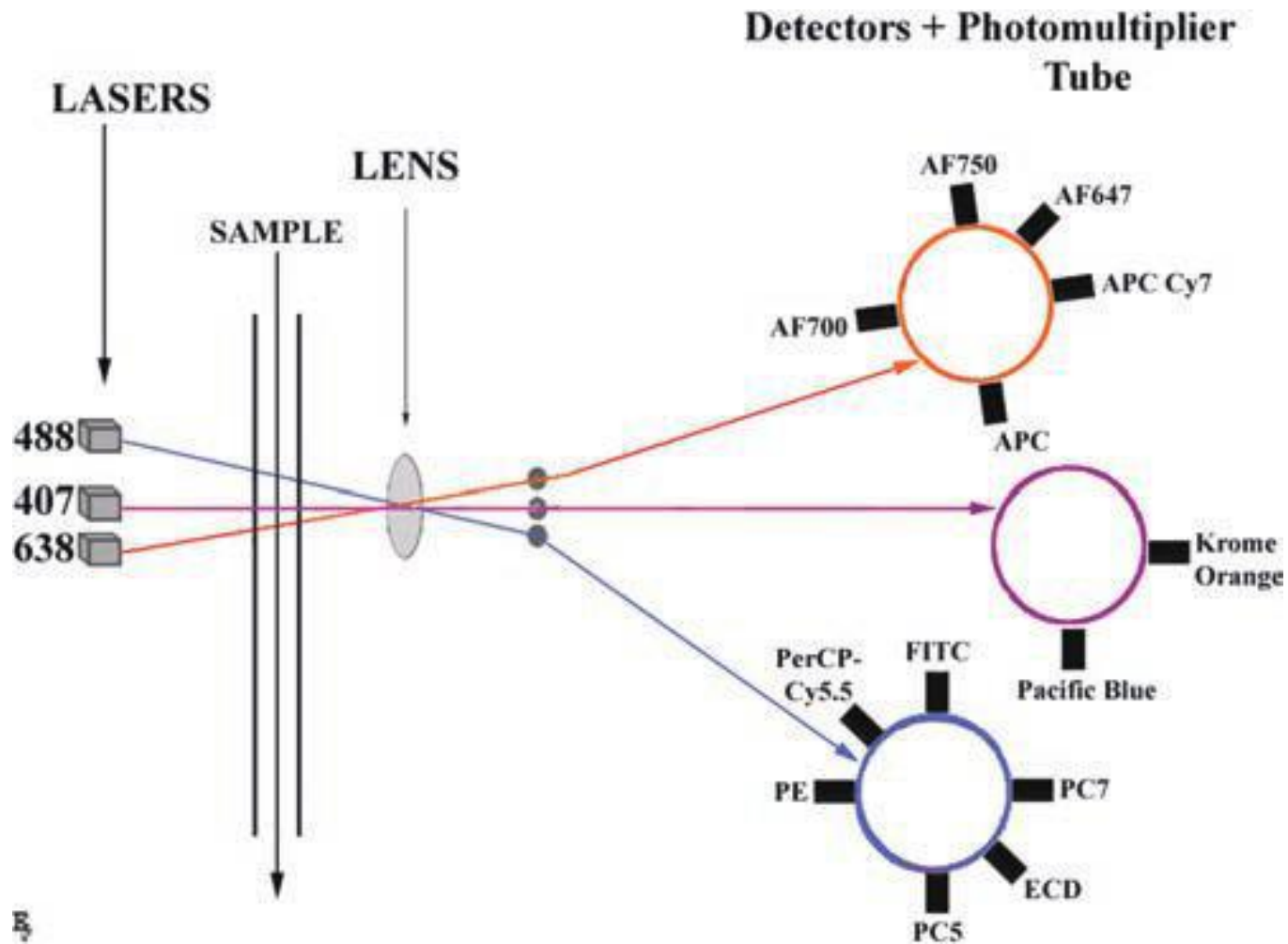
# Segnali di fluorescenza





# Principi di FCM

- La luce emessa viene focalizzata da una lente su cavi a fibre ottiche e trasmessa a **sensori**
- I **filtri** davanti a ciascuno di una serie di rivelatori limitano la luce che raggiunge il sensore solo a una piccola gamma particolare di lunghezze d'onda (denominate canali).
- I **sensori** convertono i fotoni in impulsi elettrici proporzionali al numero di fotoni ricevuti e al numero di molecole di fluorocromo legate alla cellula.

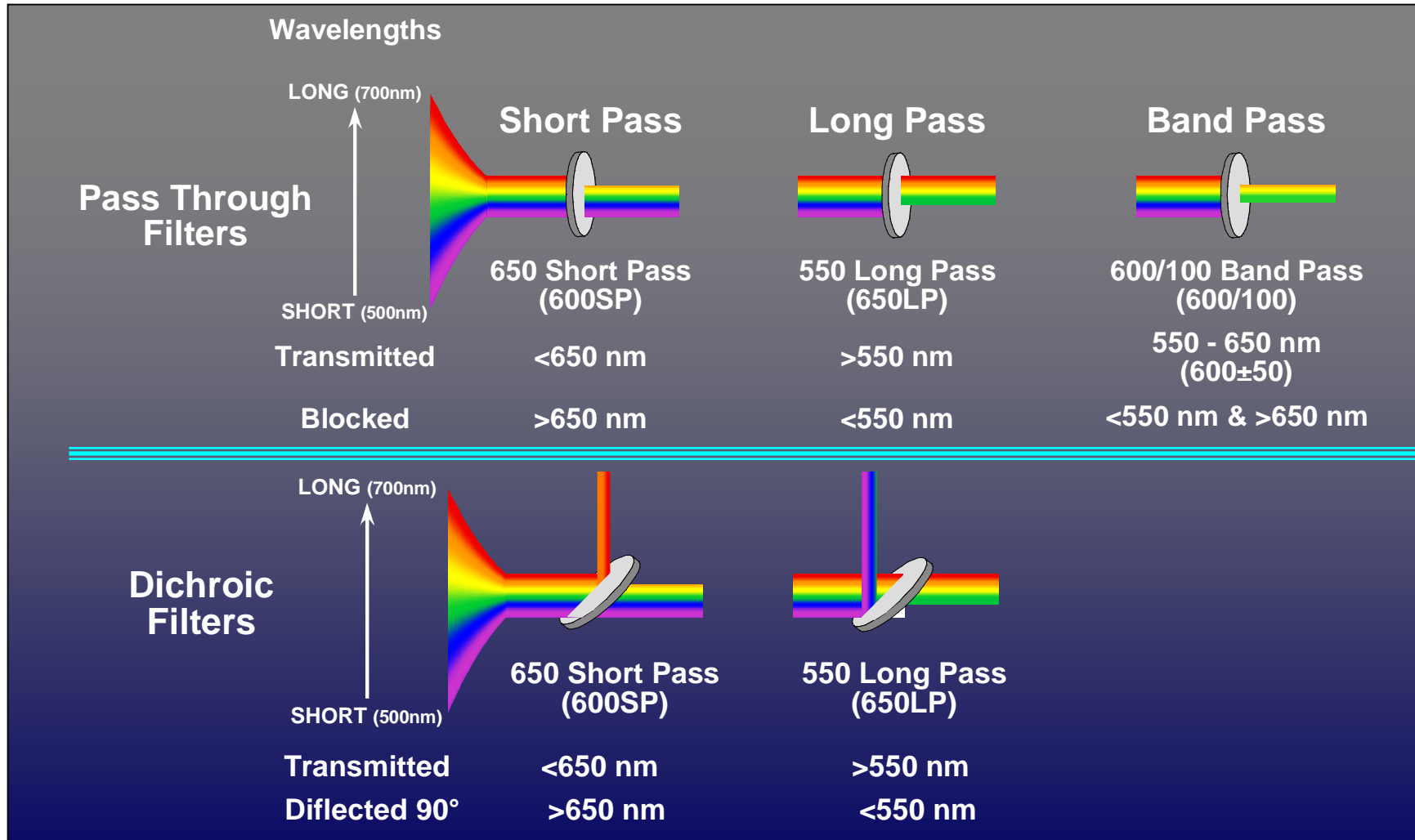
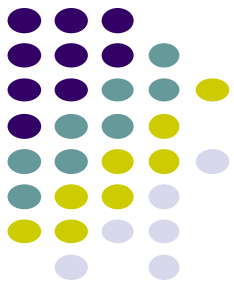


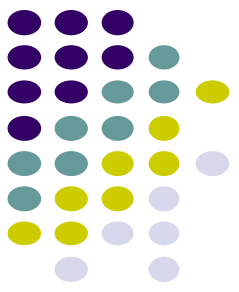
la sospensione a cella singola è focalizzata idrodinamicamente con fluido guaina per intersecare i laser (è mostrato un sistema a tre laser).

I segnali di fluorescenza sono raccolti da più sensori di emissione di fluorescenza, separati per ogni laser.

I segnali rilevati sono amplificati da tubi fotomoltiplicatori e convertiti in forma digitale per l'analisi

# Types of Optical Filters



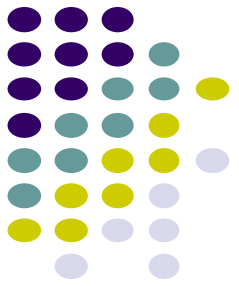


# Principi di FCM

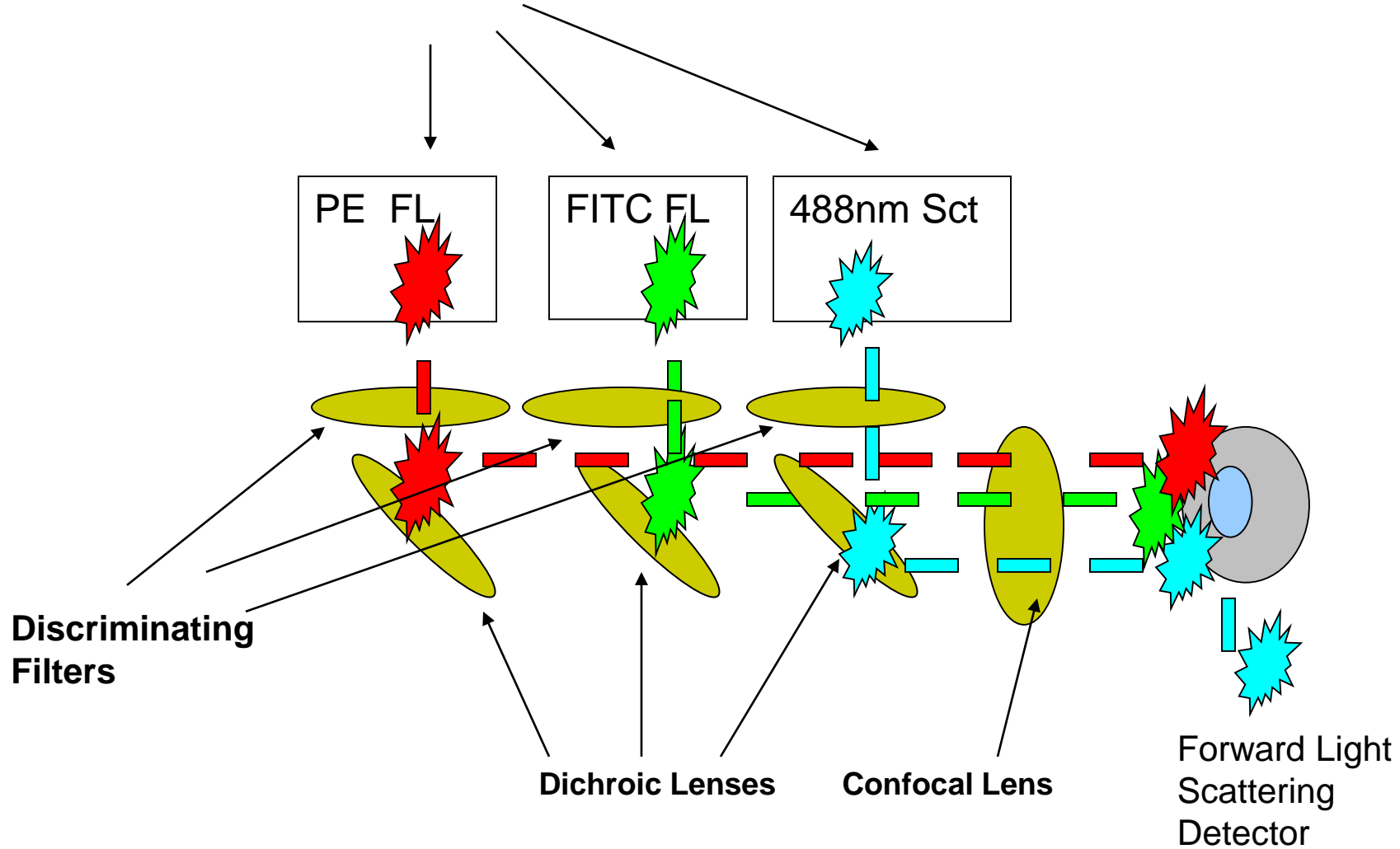
- Le emissioni fluorescenti sono di bassa intensità e devono essere amplificate da tubi fotomoltiplicatori (PMT).
- Gli impulsi elettrici dei fotoelettroni raccolti dai PMT vengono convertiti in segnali digitali.
- I dati FCM acquisiti vengono archiviati elettronicamente nei cosiddetti file in modalità list-mode che fanno parte della cartella clinica del paziente



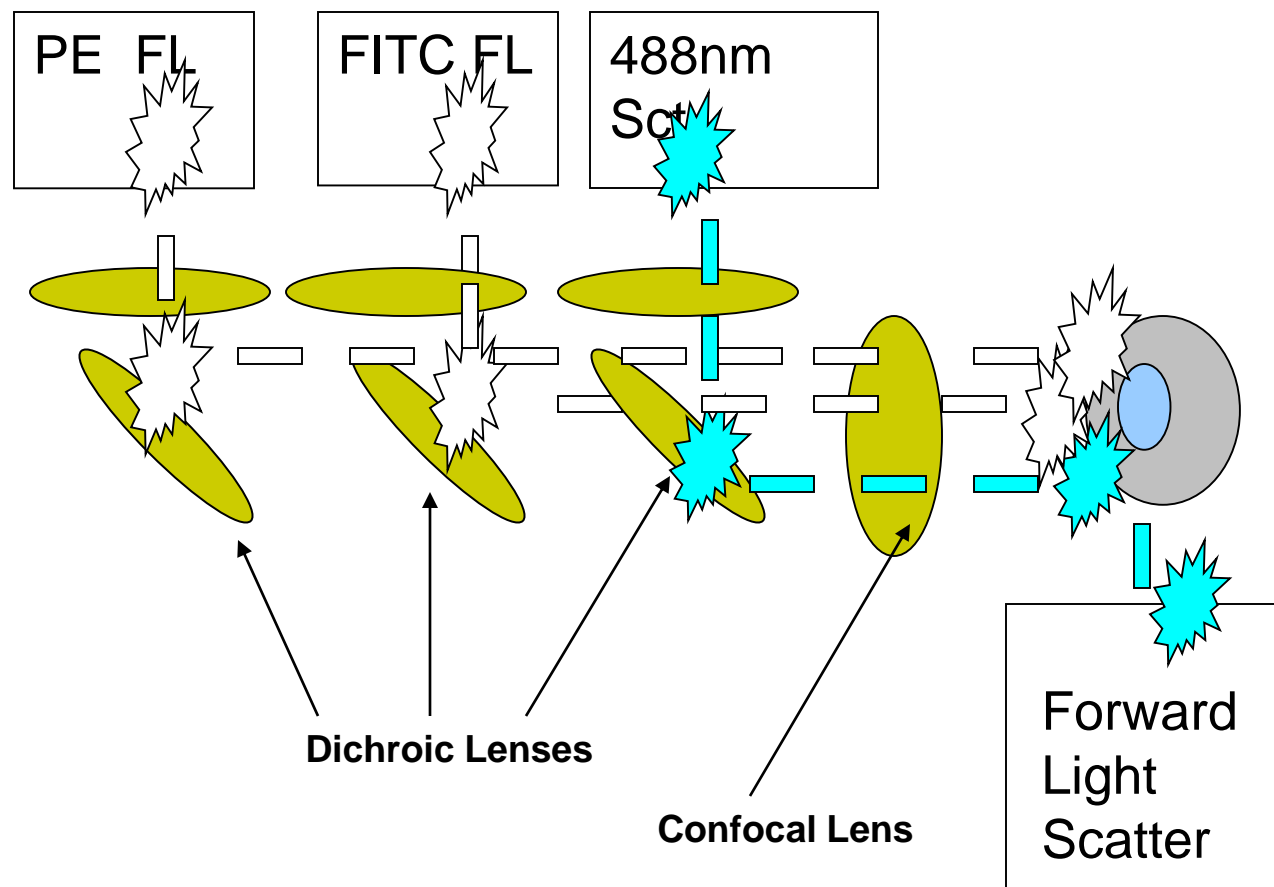
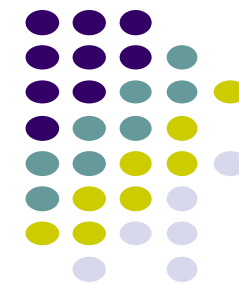
# Each cell generates a quanta of fluorescence



Photomultiplier Tubes (PMT's)

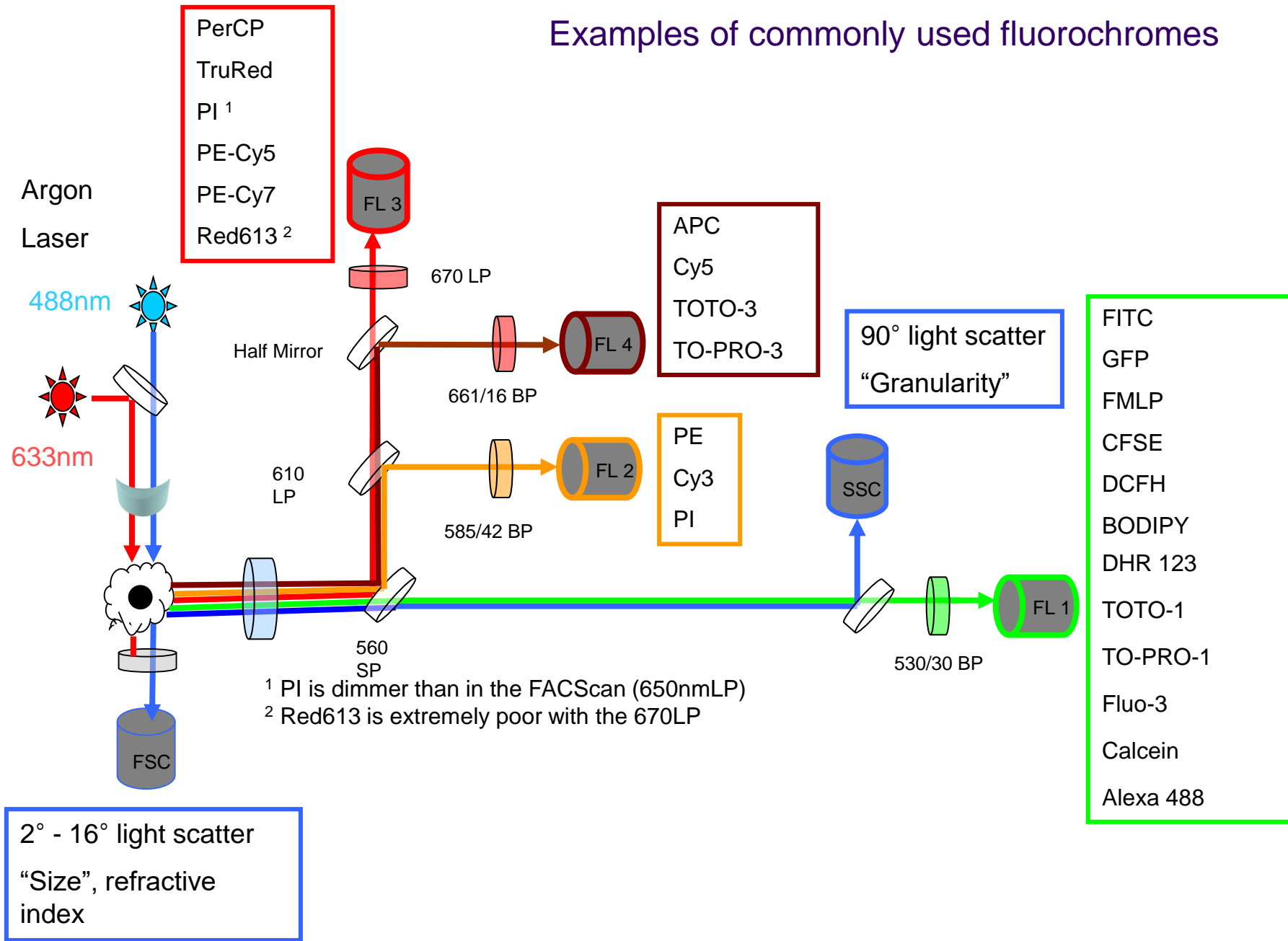
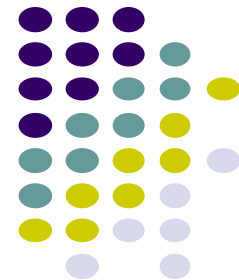


## Negative cells are also detected



# FACScan - FACS Calibur

## Examples of commonly used fluorochromes



# Fluidic System

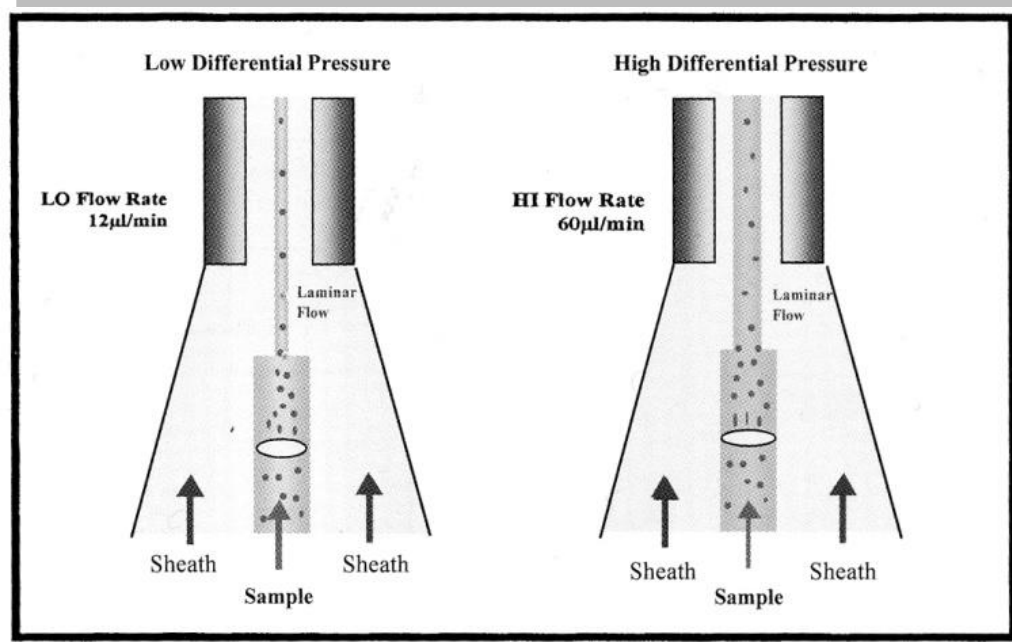
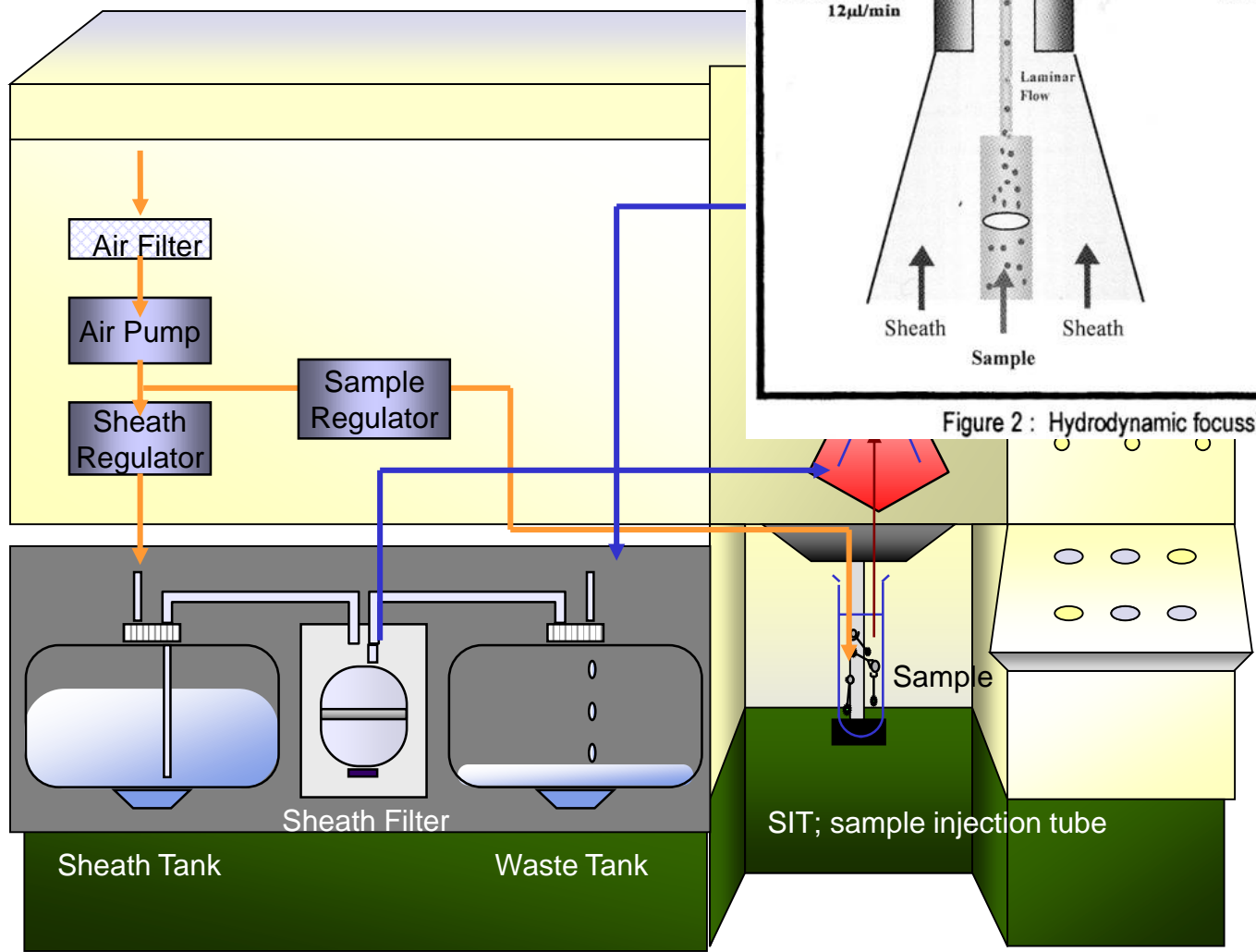
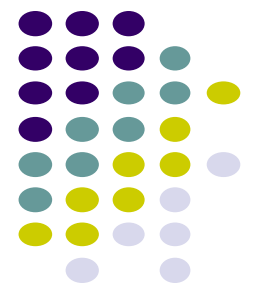
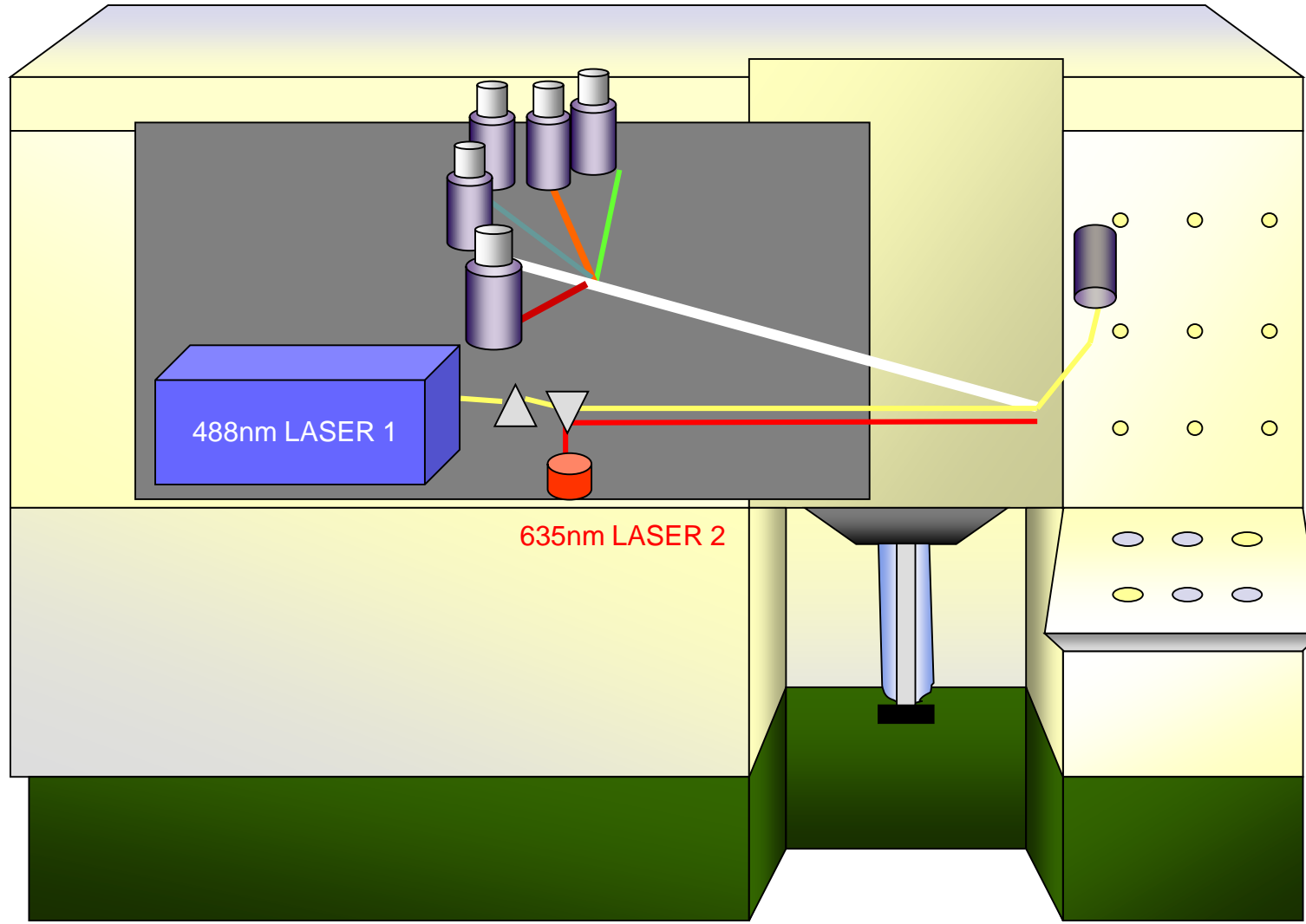
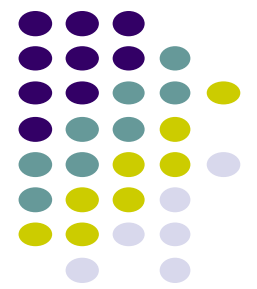
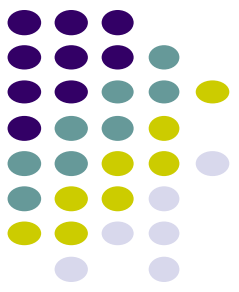


Figure 2 : Hydrodynamic focussing and FACSCalibur flow area



# Optics System

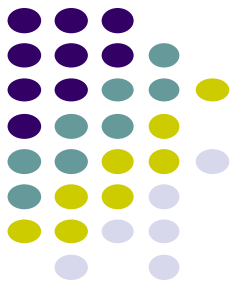




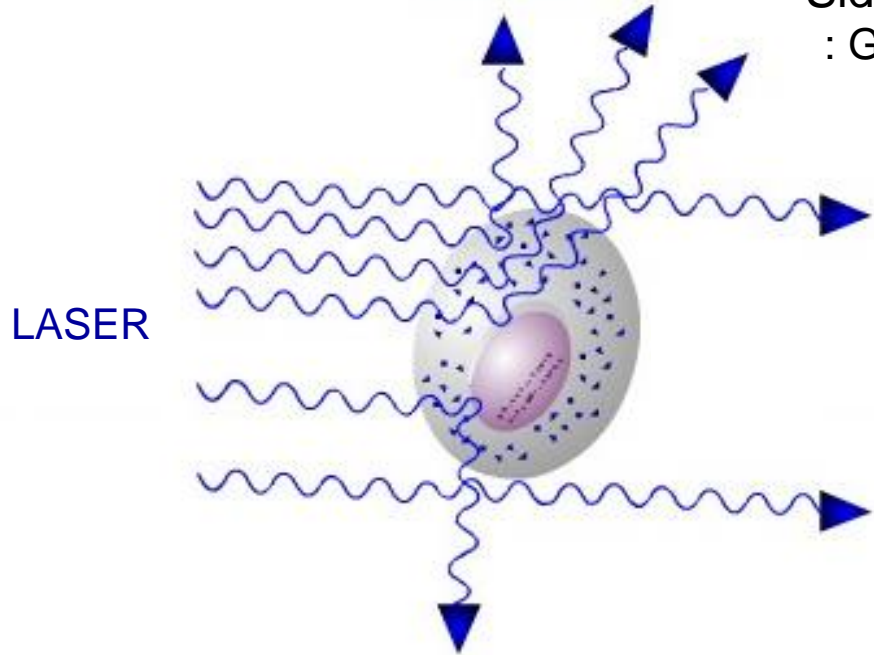
# Dalla Fluorescenza allo schermo del Computer

- I quanti di fluorescenza delle singole cellule vengono rilevati dai vari sensori (PMT).
- I PMT convertono la luce in impulsi elettrici.
- Questi segnali elettrici sono amplificati e digitalizzati utilizzando i convertitori da analogico a digitale (ADC).
- Ogni evento è designato un numero di canale (basato sull'intensità di fluorescenza rilevata originariamente dai PMT)

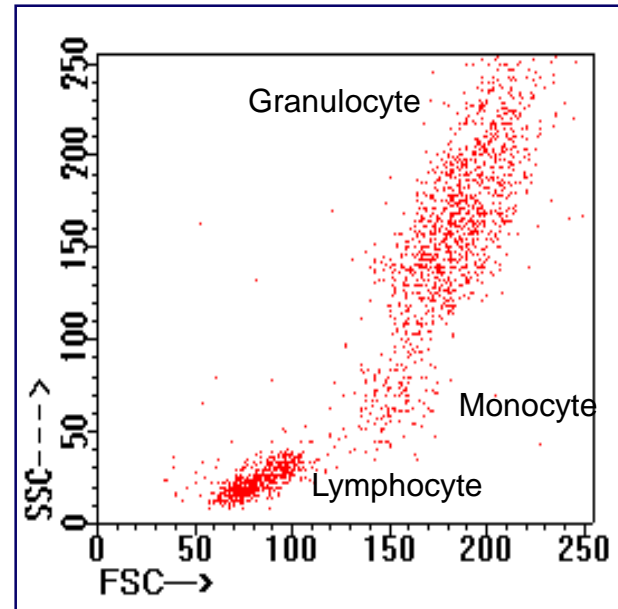
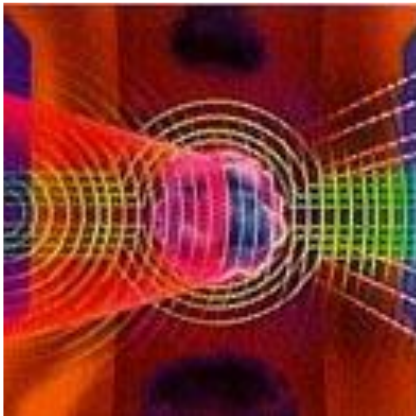
# Properties of FSC and SSC

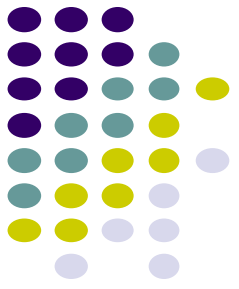


- Side Scatter (SSC)  
: Granularity or Internal Complexity

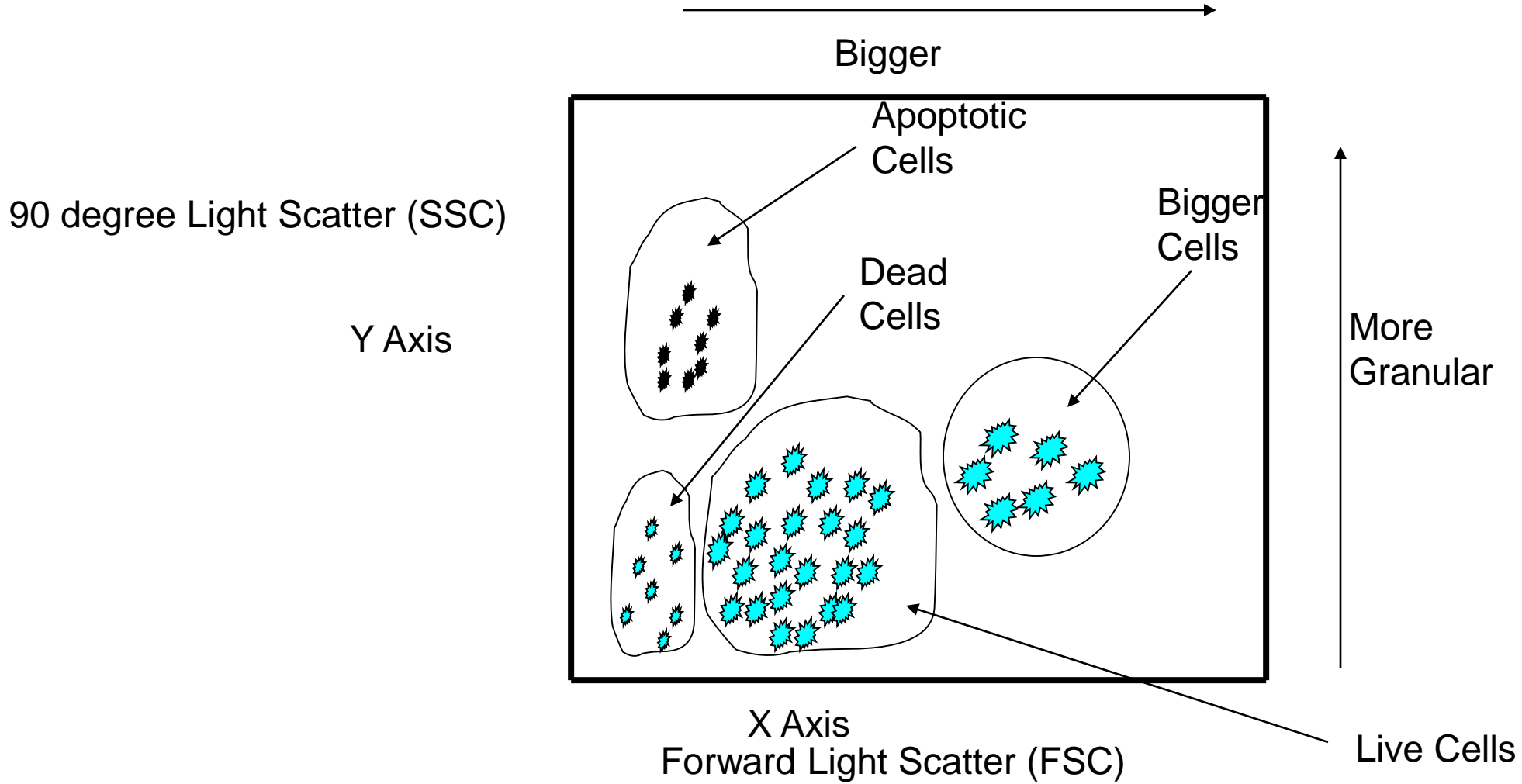


- Forward Scatter (FSC)  
(FSC) : Cell Size



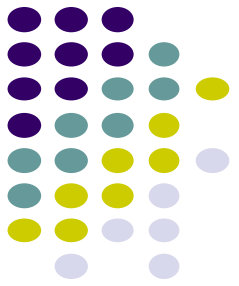
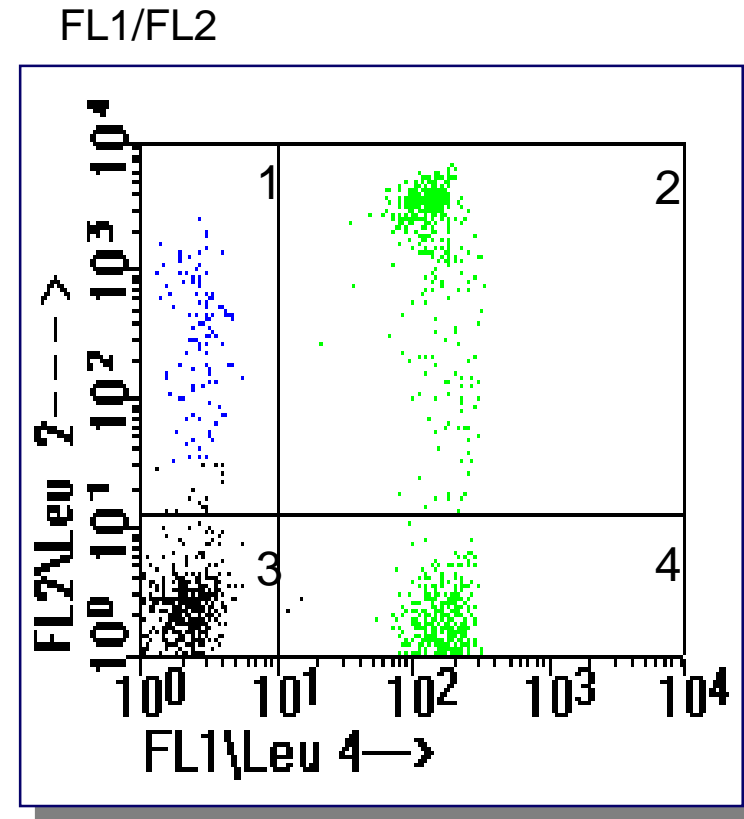
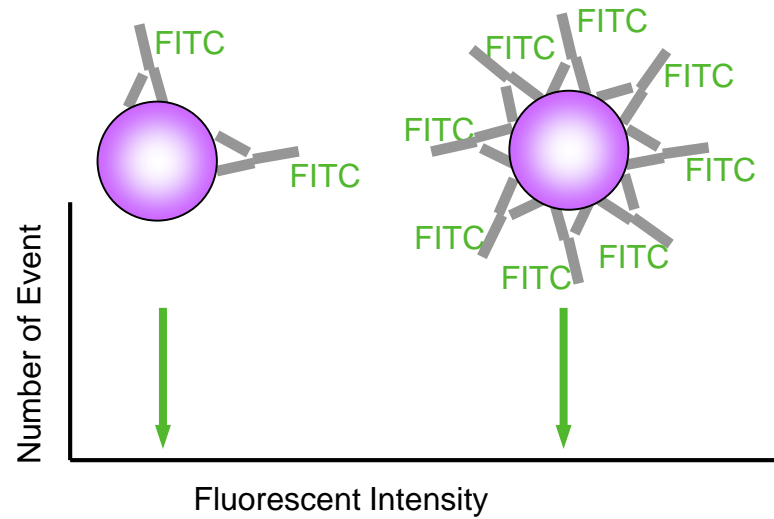
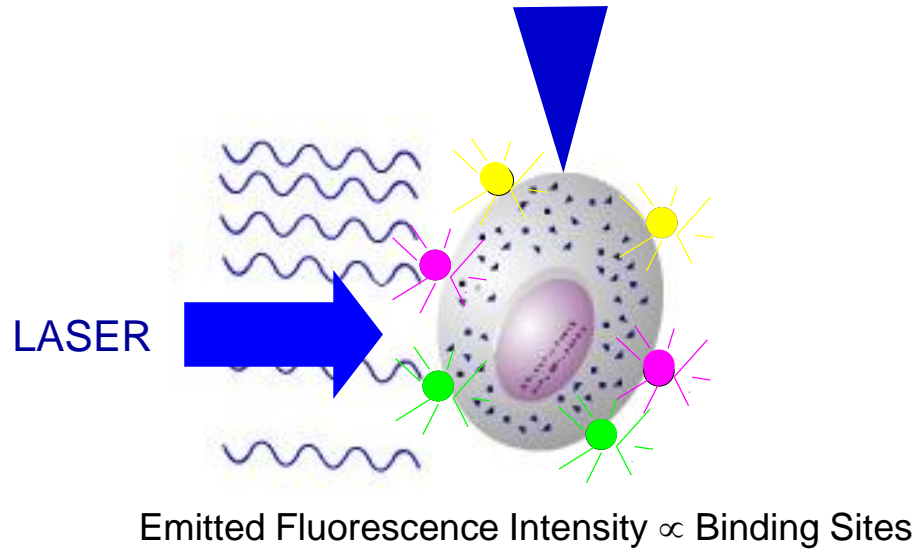


# Light Scattering, 2 Parameter Histogram

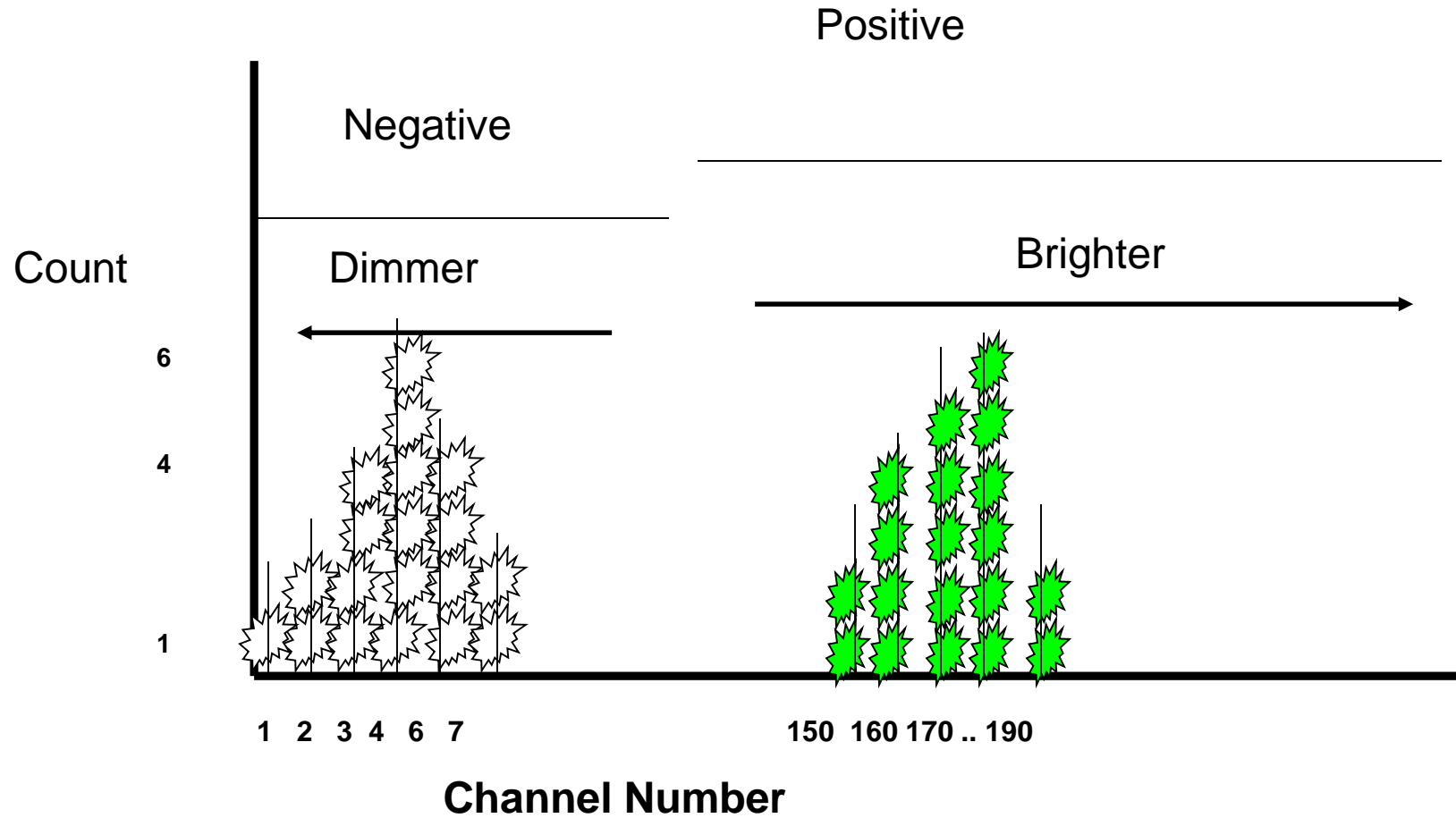
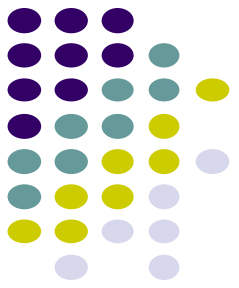




# Fluorescence Signals

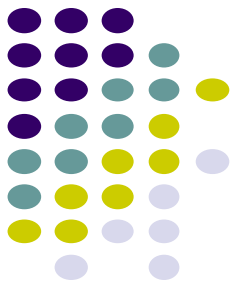
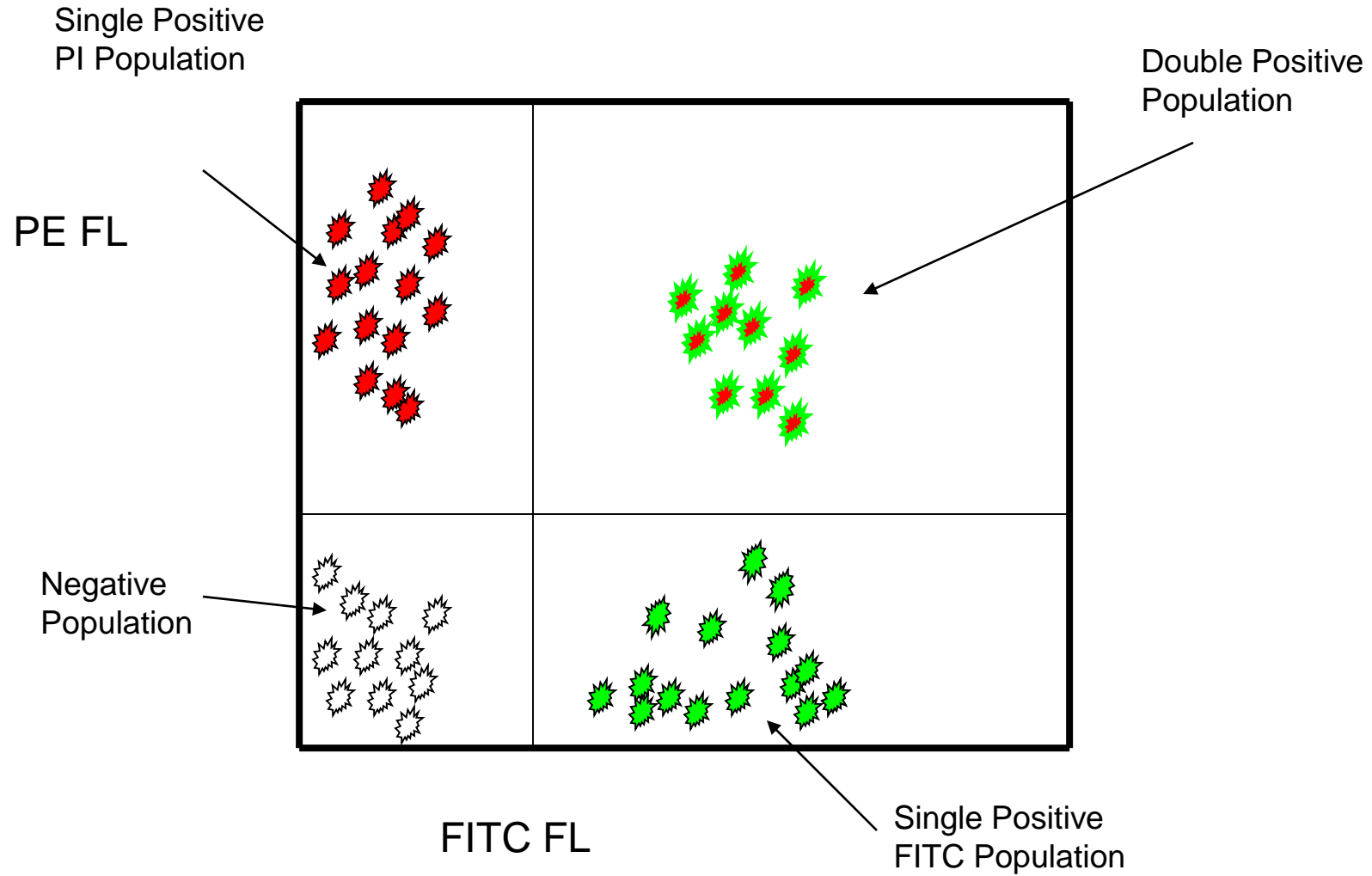


# 1 Parameter Histogram



Fluorescence picked up from the FITC  
PMT

# 2 Parameter Histogram

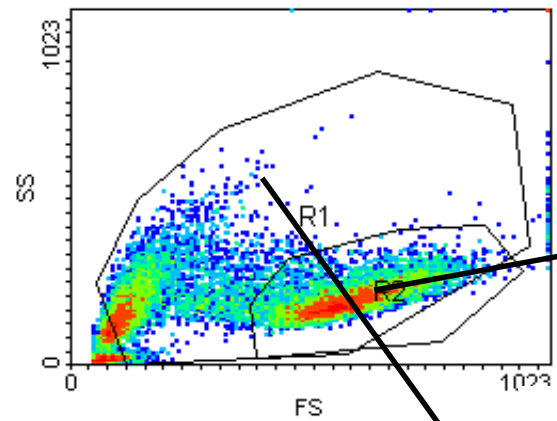
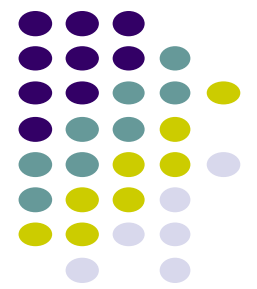


# Gating e Statistica



- I dati generati vengono visualizzati utilizzando piattaforme software di acquisizione e visualizzazione multiparamateriche.
- Gli istogrammi corrispondenti a ciascuno dei parametri di interesse possono essere analizzati utilizzando strumenti statistici per calcolare la percentuale di cellule che manifestano fluorescenza specifica e l'intensità della fluorescenza.
- Queste informazioni possono essere utilizzate per esaminare l'espressione di fluorescenza all'interno di sottopopolazioni di cellule in un campione (**gating**).

# Flow Cytometry Data



Larger Region includes all cells

Smaller Region, Live cells mostly

