

Evoluzione della citofluorimetria

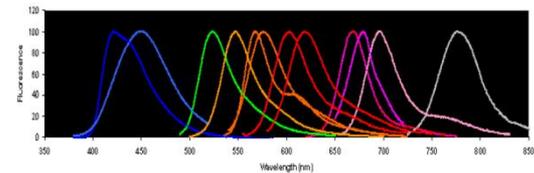
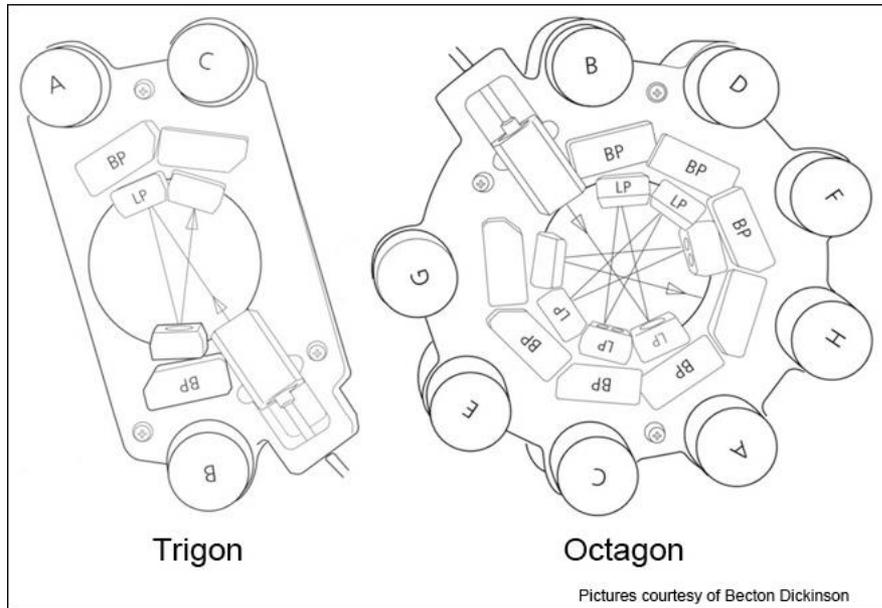
Aumentano di efficienza e numero:

I laser

I filtri ottici

I rivelatori

I fluorocromi

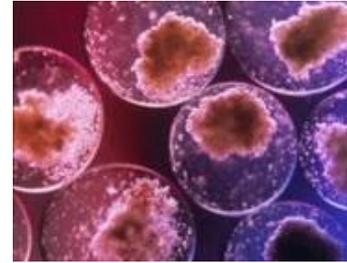


Tutto ciò **non** permette comunque allo strumento di esser **descrittivo** quanto altre macchine:

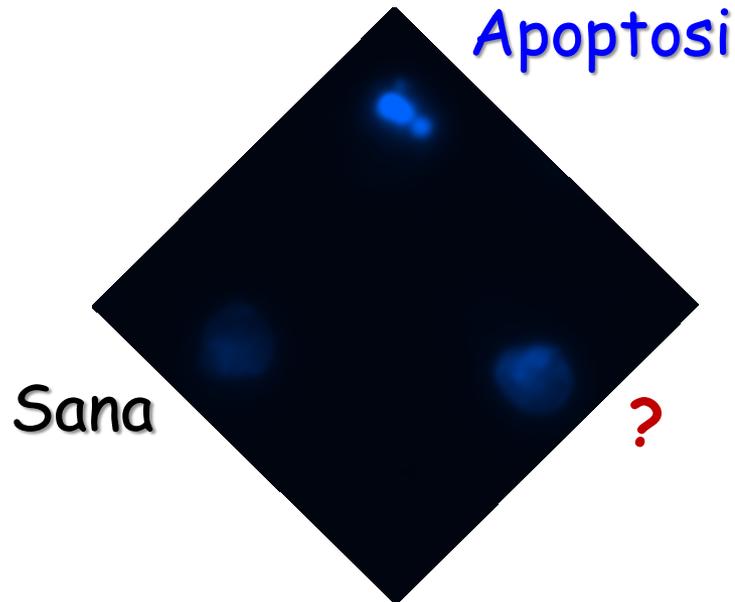


Imaging quantitativa - non solo osservazioni

La microscopia offre **immagini dettagliate** di cellule e informazioni morfologiche, utili strumenti scientifici per lo studio della funzione delle cellule.

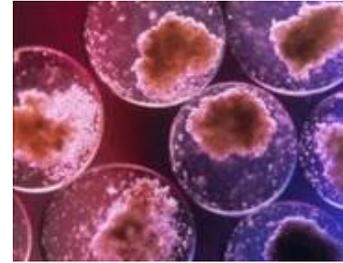


Tuttavia, l'interpretazione di immagini può essere **soggettiva, qualitativa e laboriosa**.



Imaging quantitativa - non solo osservazioni

La microscopia offre immagini dettagliate di cellule e informazioni morfologiche, utili strumenti scientifici per lo studio della funzione delle cellule.



Tuttavia, l'interpretazione di immagini può essere soggettiva, qualitativa e laboriosa.

La Citometria a flusso, studiando un gran numero di cellule, risulta eccellente per fenotipizzazioni **quantitative** e produrre **risultati statisticamente solidi**. Manca però di qualsiasi capacità di fornire immagini; localizzazione subcellulare e funzioni delle cellule sono misurati **indirettamente**.

ImageStream[®]X

Microscopio a flusso



ImageStreamX[®] è la seconda generazione di questa nuova tipologia di citofluorimetri, risultato di 10 anni di sviluppo!

Le informazioni che
fornisce erano ritenute

IMPOSSIBILI

fino a pochissimi anni fa.

ImageStream®X

- Produce fino a **12 immagini ad alta risoluzione di ogni cellula in sospensione.**
- Analizza fino a **1000 cellule/s.**
- Risoluzione di un microscopio 60 X.
- Sensibilità di fluorescenza del migliore citometro a flusso convenzionale.
- Grande versatilità grazie ai numerosi laser (fino a **5**).



Citofluorimetro



ImageStreamX

vs

ImageStreamX

- Produce fino a 12 immagini ad alta risoluzione di ogni cella in sospensione.
- Analizza fino a 1000 cellule/s.
- Risoluzione di un microscopio 60 X.
- Sensibilità di fluorescenza del migliore citometro a flusso convenzionale.
- Grande versatilità grazie ai numerosi laser (fino a 5).

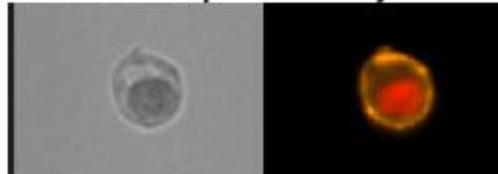
Permette di:

- **quantificare** la morfologia cellulare, l'intensità e posizione delle sonde fluorescenti nelle (o tra le) cellule;
- analisi di sottopopolazioni **rare** e anche di campioni altamente eterogenei;
- eseguire **studi morfologici e funzionali allo stesso tempo** utilizzando le 12 immagini per cellula.

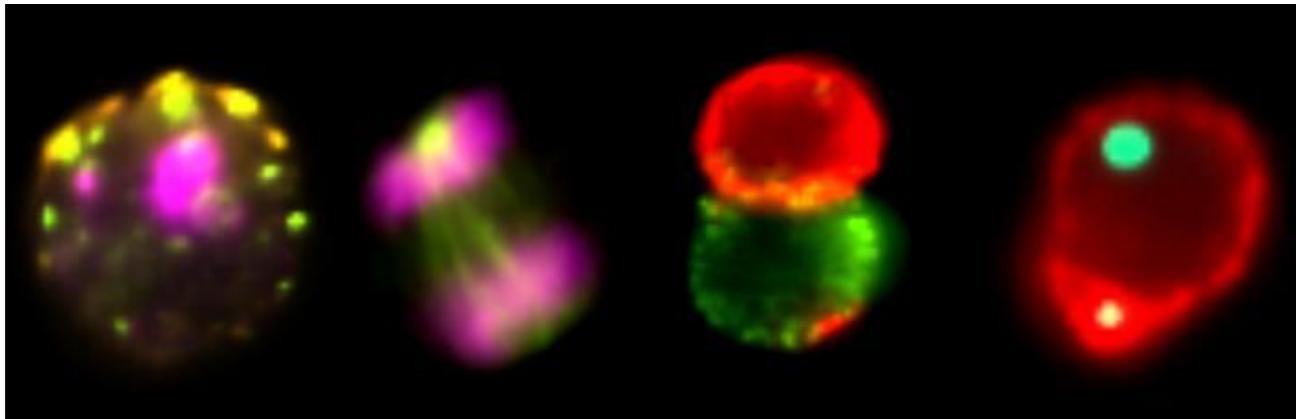
Imaging quantitativa - non solo osservazioni

L' ImageStreamX combina la **velocità, sensibilità** e abilità di fenotipizzare della citometria a flusso con le immagini dettagliate e la **comprensione funzionale** della microscopia.

HuPB CD14+ Monocyte



HuPB CD45+ Lymphocyte



**COMBINA
SOLO I
PREGI (?)**

Ogni applicazione che potete immaginare!

Utilizza gli **stessi coloranti** e marcatori impiegati in microscopia e citometria a flusso.

Laser	Detector Name	Equivalent Bandpass Filter	Sample Parameters / Fluorochromes
Blue - Yellow	Channel 1	450/60	Brightfield
	Channel 2	520/80	FITC; Alexa 488; GFP; YFP; CFSE; SYTOX Green; LIVE/DEAD Fixable Green; DyeCycle Green; Azami Green (FUCCI)
	Channel 3	578/35	PE; DSRed FP
	Channel 4	628/65	PE-Alexa610; PE-TxRd; PI; 7AAD; mCherry; TagRFP; Kusabira Orange (FUCCI)
	Channel 5	700/80	PerCP; PE-Cy5.5; PerCP-Cy5.5; PE-Alexa700; DRAQ5
	Channel 6	770/60	Darkfield (SSC); PE-Cy7; PE-Alexa750; PE-eFluor780
Violet - Red	Channel 7	463/85	Pacific Blue; Alexa405; Marina Blue; Cascade Blue; DyeCycle Violet; SYTOX Blue; CellTrace calcein Violet AM; LIVE/DEAD Fixable Violet, DAPI
	Channel 8	538/65	LIVE/DEAD Aqua; Qdot 525; Qdot 545; Pacific Orange
	Channel 9	583/25	Brightfield sync; Qdot 565; Qdot 585
	Channel 10	628/65	Q-dot 605; Qdot 625
	Channel 11	700/80	Alexa647; APC; Cy5; Alexa680; Alexa700; SYTOX Red
	Channel 12	770/60	APC-Cy7; APC-Alexa750; APC-eFluor780

E' perciò in grado di eseguire virtualmente qualsiasi analisi standard con il valore aggiunto della **conferma visiva**.

LASERS AND EXAMPLE DYES

Laser (nm)	405	488	560	592	658
Max. Power (mW)	100	500	200	300	120
Example Dyes	DAPI Hoechst CFP Alexa Fluor 405 Marina Blue Pacific Blue Cascade Blue LIVE/DEAD Violet DyLight 405 eFluor 450 Spectrum Aqua Alexa Fluor 430 Pacific Orange Cascade Yellow Lucifer Yellow Qdot 525 Qdot 545 Qdot 565 Qdot 585 Qdot 605 Qdot 625 eFluor 605 Qdot 705 eFluor 650 Qdot 800	FITC GFP YFP Acridine Orange Alexa Fluor 488 Alexa Fluor 500 Alexa Fluor 514 SYTO Spectrum Green LysoTracker Green DyeCycle Green Calcium Green-1 MitoTracker Green DyLight 488 DsRed Dil Cy3 R-phycoerythrin OFP 7-AAD PE-Texas Red (ECD) PE-Alexa Fluor 610 Propidium Iodide PerCP PerCP-Cy5.5 PE-Alexa Fluor 647 PE-Alexa Fluor 680 PE-Cy5 PE-Cy5.5 DRAQ5 PE-Cy7 PE-Alexa Fluor 750	DsRed Dil Cy3 R-phycoerythrin OFP Alexa Fluor 546 Alexa Fluor 555 DyLight 549 Calcium Orange PE-Texas Red (ECD) PE-Alexa Fluor 610 Propidium Iodide Spectrum Orange MitoTracker Red LysoTracker Red RFP mCherry Alexa Fluor 568 Alexa Fluor 594 Alex Fluor 610 DyLight 594 Texas Red PE-Alexa Fluor 647 PE-Alexa Fluor 680 PE-Cy5 PE-Cy5.5 DRAQ5 Nile Blue PE-Cy7 PE-Alexa Fluor 750	mCherry Alexa Fluor 568 Alexa Fluor 594 Alexa Fluor 610 DyLight 594 Texas Red Spectrum Red Calcium Crimson Nile Blue APC APC-Cy5.5 DyLight 649 MitoTracker Deep Red APC-Alexa Fluor 750 APC-eFluor780	APC APC-Cy5.5 DyLight 649 MitoTracker Deep Red Alexa Fluor 647 Alexa Fluor 660 Alexa Fluor 680 DRAQ5 Cy5 Cy5.5 APC-Cy7 APC-Alexa Fluor 750 APC-eFluor780

Alcune analisi possibili



Internalization



Co-localization



Cell signalling



Shape change



T cell - APC interaction



Cell Cycle and Mitosis



DNA damage and repair

FISH



Cell death & Apoptosis



Phagocytosis & Autophagy



Stem cells & Hematopoiesis



Oceanography



Microbiology



Parasitology



L'interazione fra cellule diventa oggetto di studio!

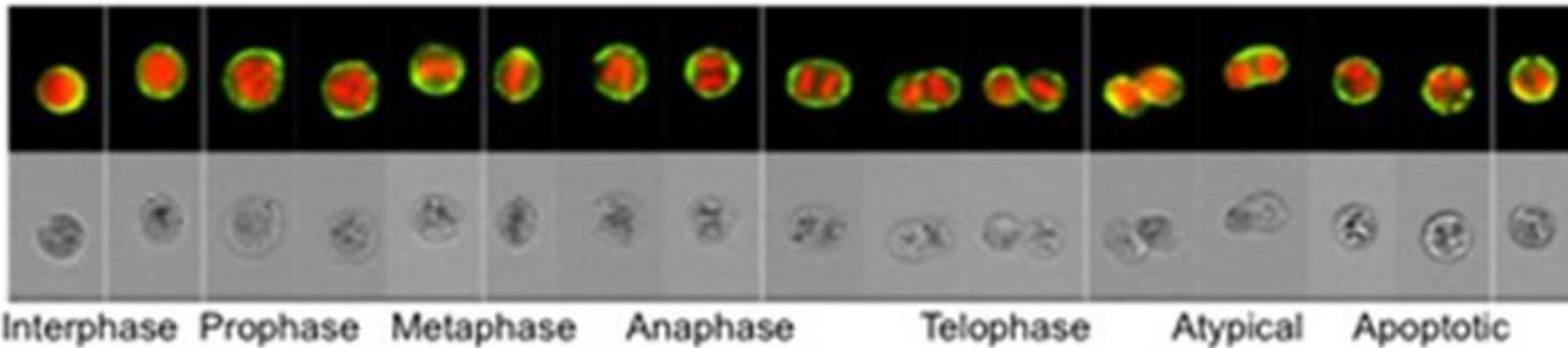
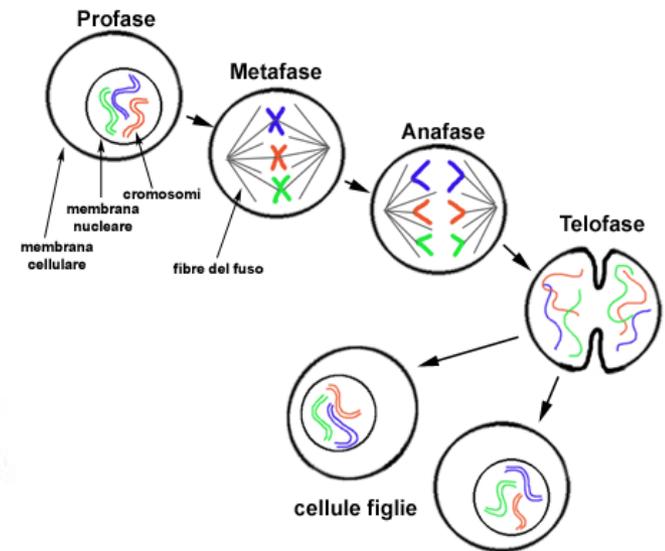
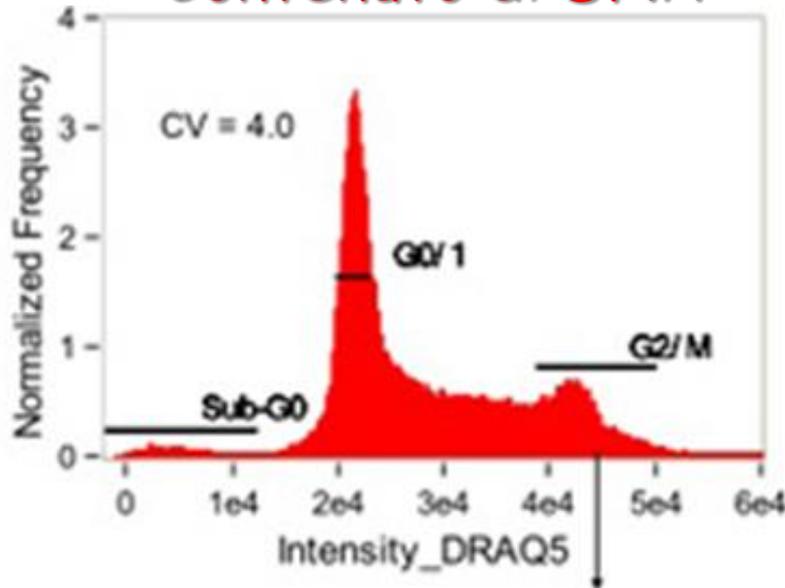
ANALISI

POSSIBILI

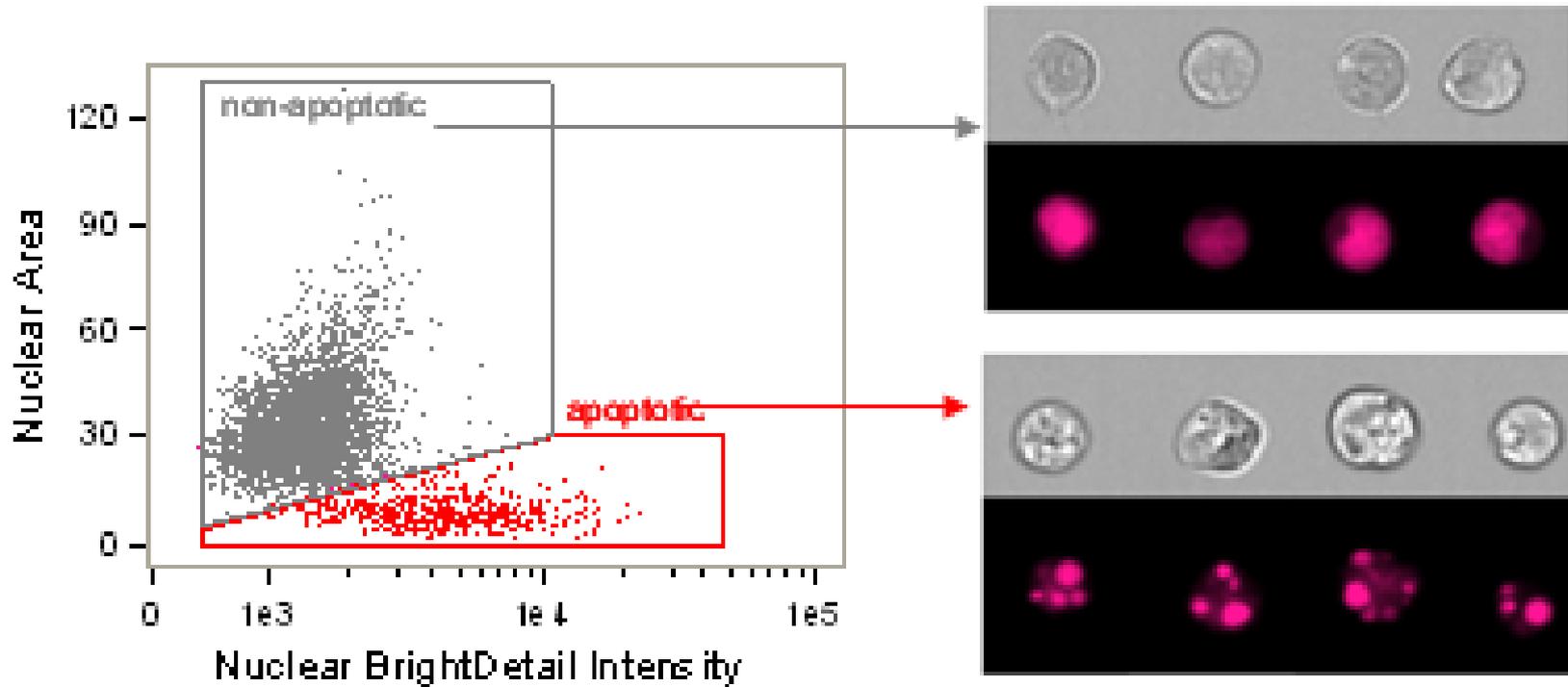
Studio del ciclo cellulare

Similmente a un normale citofluorimetro:

Contenuto di DNA



Studio della apoptosi



Viene misurata la condensazione e frammentazione del DNA.

Concetto

Tutto ciò che si fa al citofluorimetro si può fare anche al microscopio a flusso.

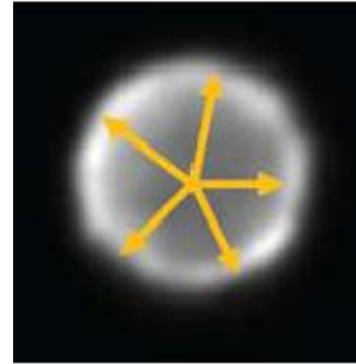
Le informazioni che
fornisce erano ritenute

IMPOSSIBILI

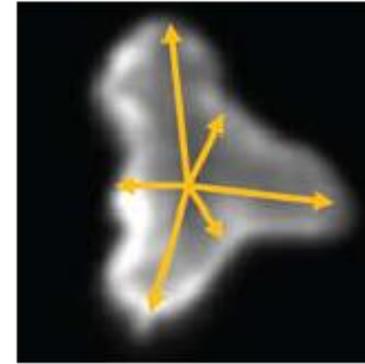
fino a pochissimi anni fa.

Studi di morfologia

Modificazioni nella forma delle cellule sono correlate a cambiamenti di funzione.



23.8



4.6

Es attivazione dei macrofagi, differenziazione delle cellule staminali, risposta cellulare ai **farmaci**...

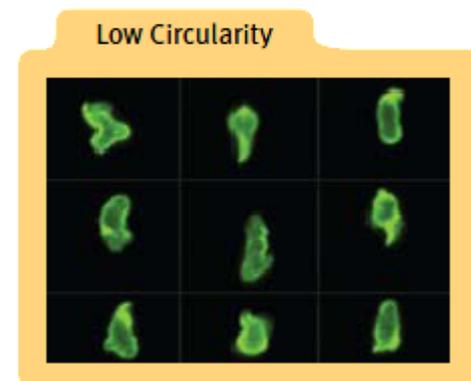
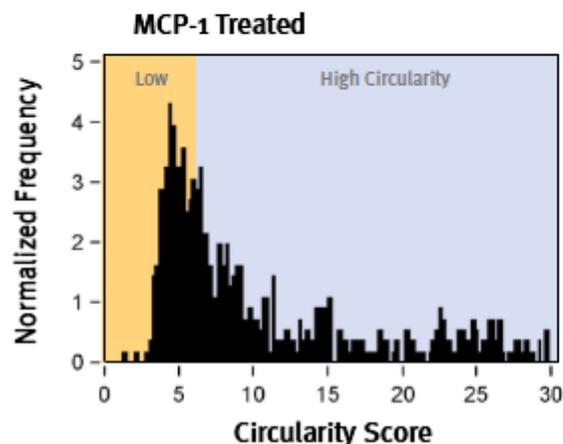
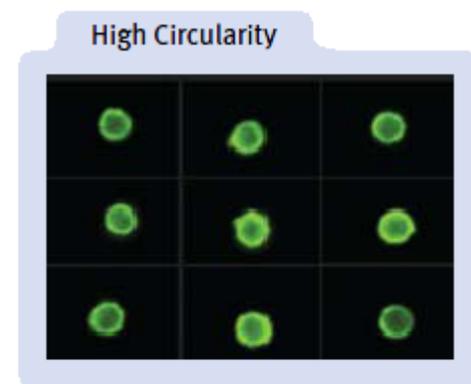
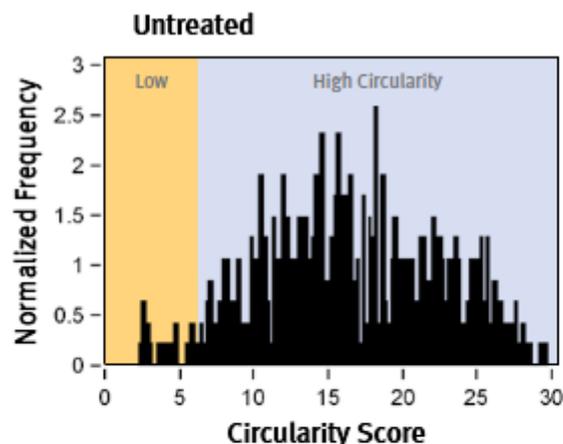
Il software dello strumento ci fornisce il **punteggio di circolarità (CS)**.

CS: Misura della circolarità di una cellula.
Tanto > tanto più le cellule sono circolari.

Esempi di studi di morfologia

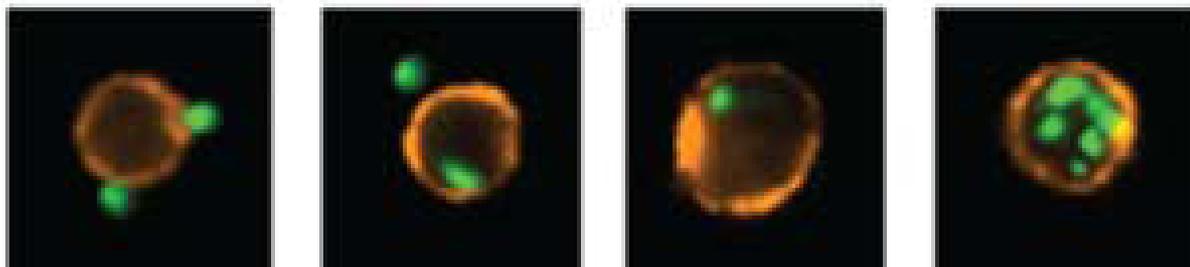
MCP-1 induce il cambiamento di forma dei **monociti** e la migrazione verso siti di infiammazione, come dimostra il **calo significativo il punteggio di circolarità**.

Al contrario, trattamenti che riducano la risposta infiammatoria - come i **farmaci** per disturbi autoimmuni - provocano un aumento dell'**CS**.



Studi di internalizzazione

E' possibile **misurare** l'**assorbimento** cellulare di ligandi specifici e fornire un valore di questa internalizzazione.

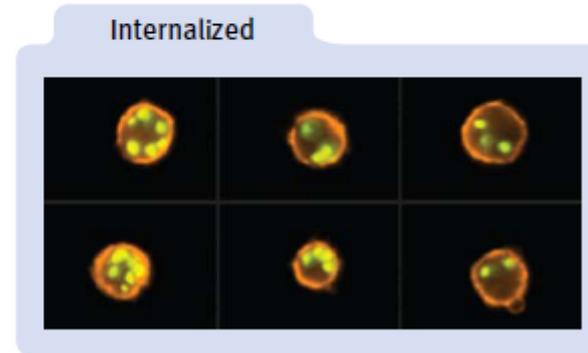
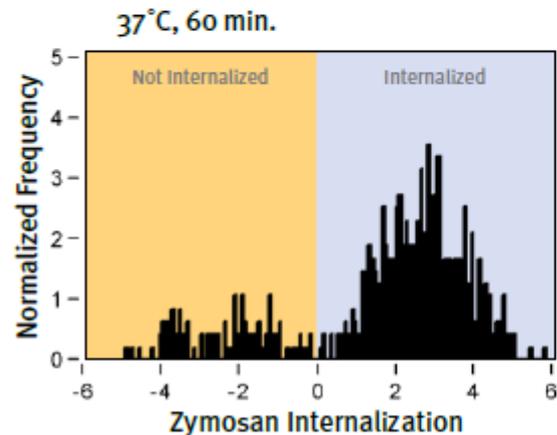
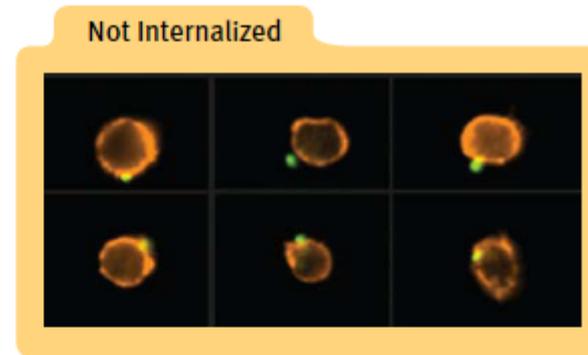
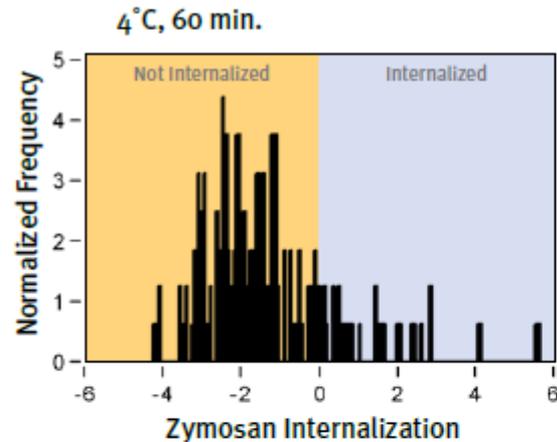


Le cellule con **Zymosan** (**verde**) associate alla **membrana** (**arancione**) hanno punteggi negativi di internalizzazione; le cellule che invece lo hanno fagocitato, hanno punteggi positivi.

Importante nello studio del metabolismo di droghe, interazioni ospite-patogeno, presentazione dell'antigene...

Il **punteggio di internalizzazione** è una misura della quantità relativa del segnale all'interno rispetto all'esterno della cellula.

Esempio di studio di internalizzazione

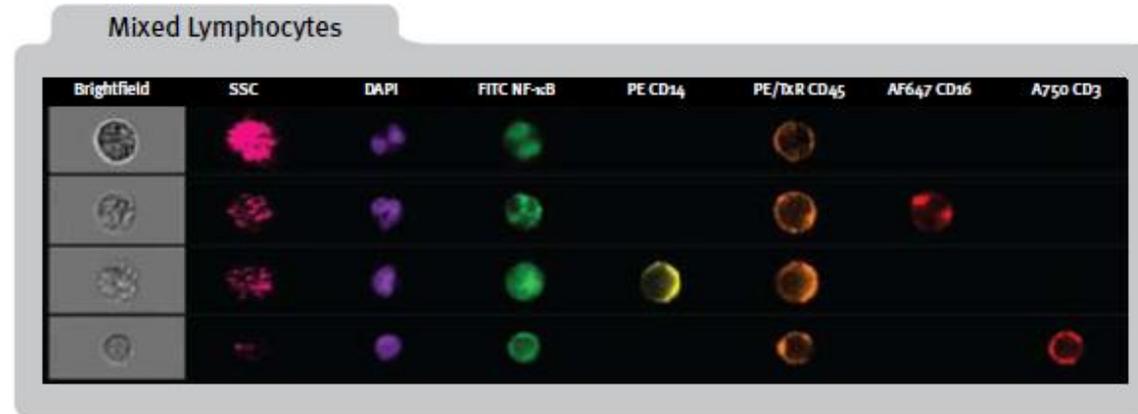
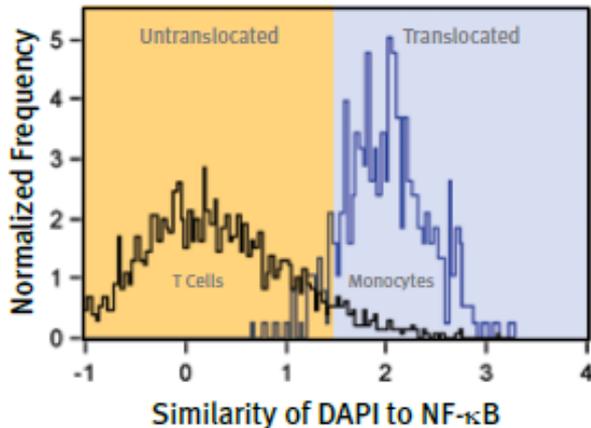


Fagocitosi delle particelle marcate con FITC Zymosan (verde) da parte di cellule RAW (arancione); incubazione a 4° C (in alto) e a 37° C (in basso).

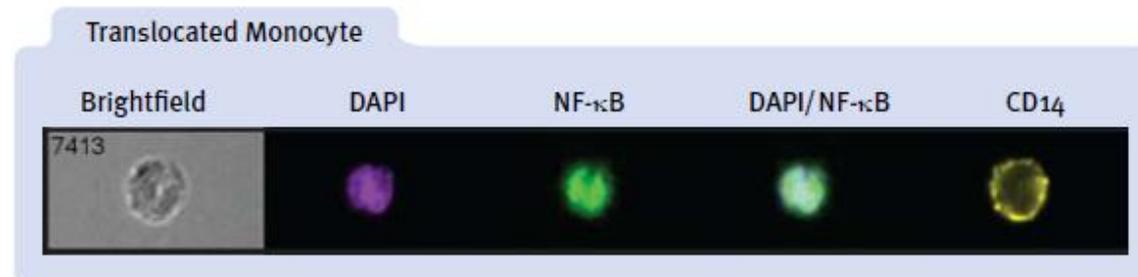
Studi di cell signaling

Traslocazione di fattori di trascrizione dal citoplasma al nucleo.

Evento cardine in molti processi critici per l'attivazione cellulare, la differenziazione e la difesa da ospiti.



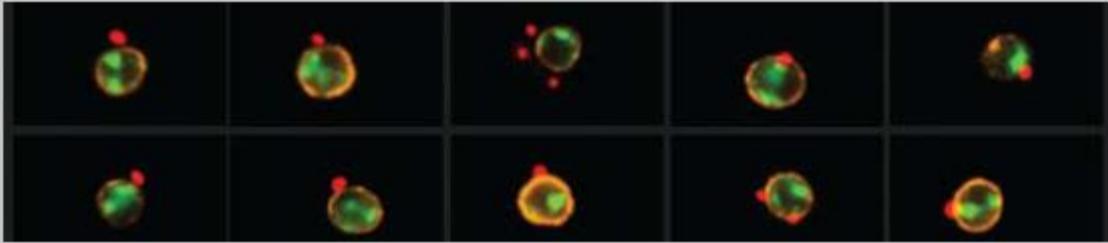
Traslocazione di NF-κB nei leucociti dal sangue



Esempio di internalizzazione

Internalizzazione e traffico lisosomiale di CpGB in cellule dendritiche

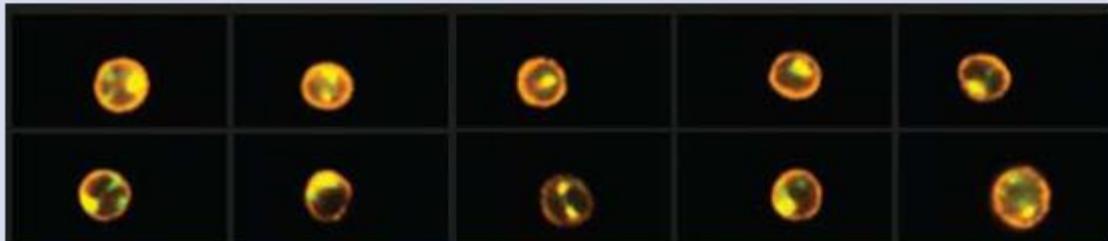
External CpGB



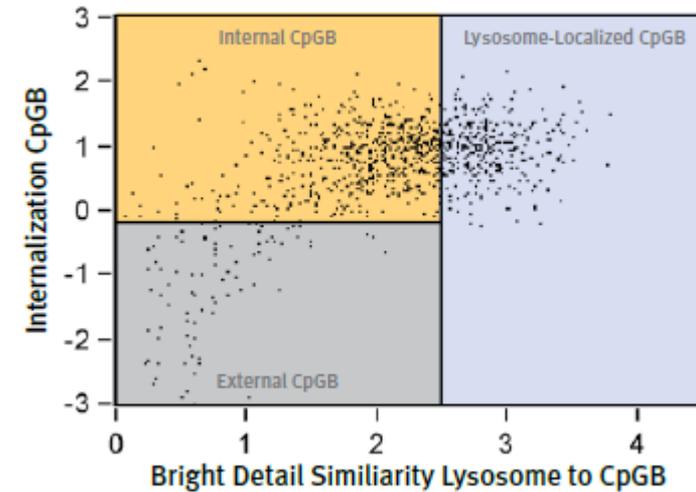
Internal CpGB



Lysosome-Localized CpGB



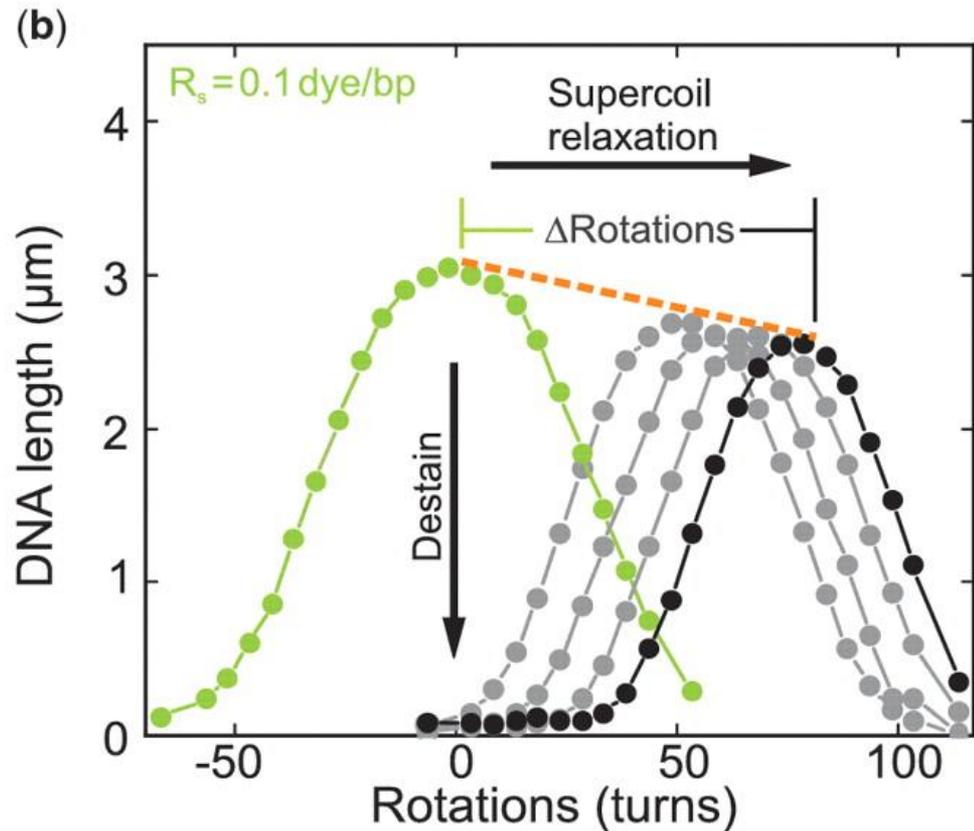
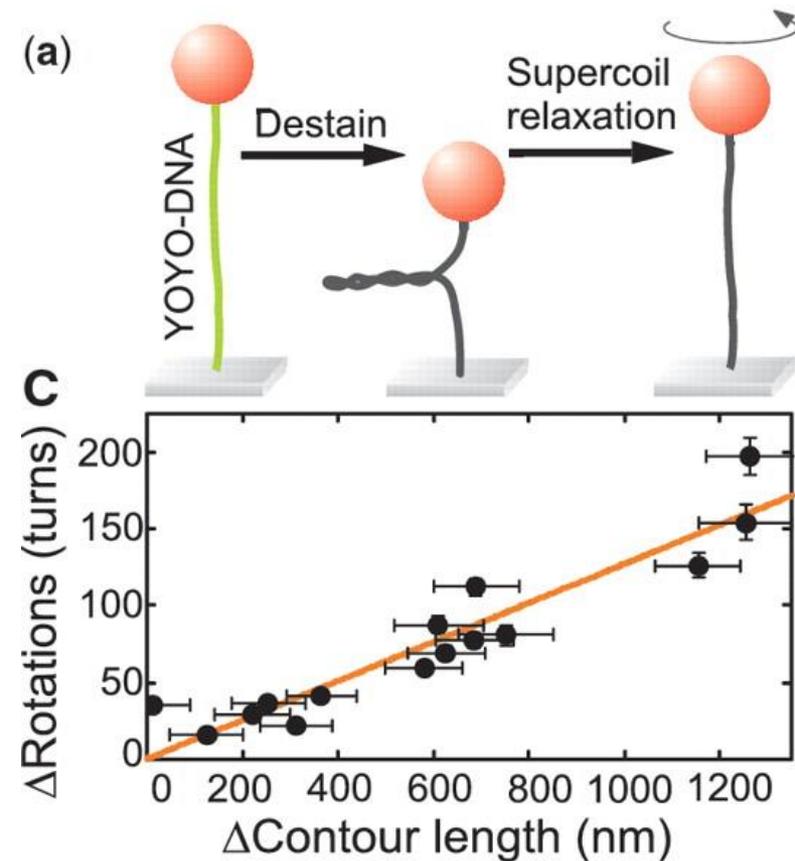
Time: 30 min



DC (arancione)
CpGB (rosso)
lisosomi (verde)

Colorante utilizzabile nella rilevazione di infezioni

YOYO-1 è un intercalante del DNA, con proprietà di emissione in fluorescenza (**verde**).

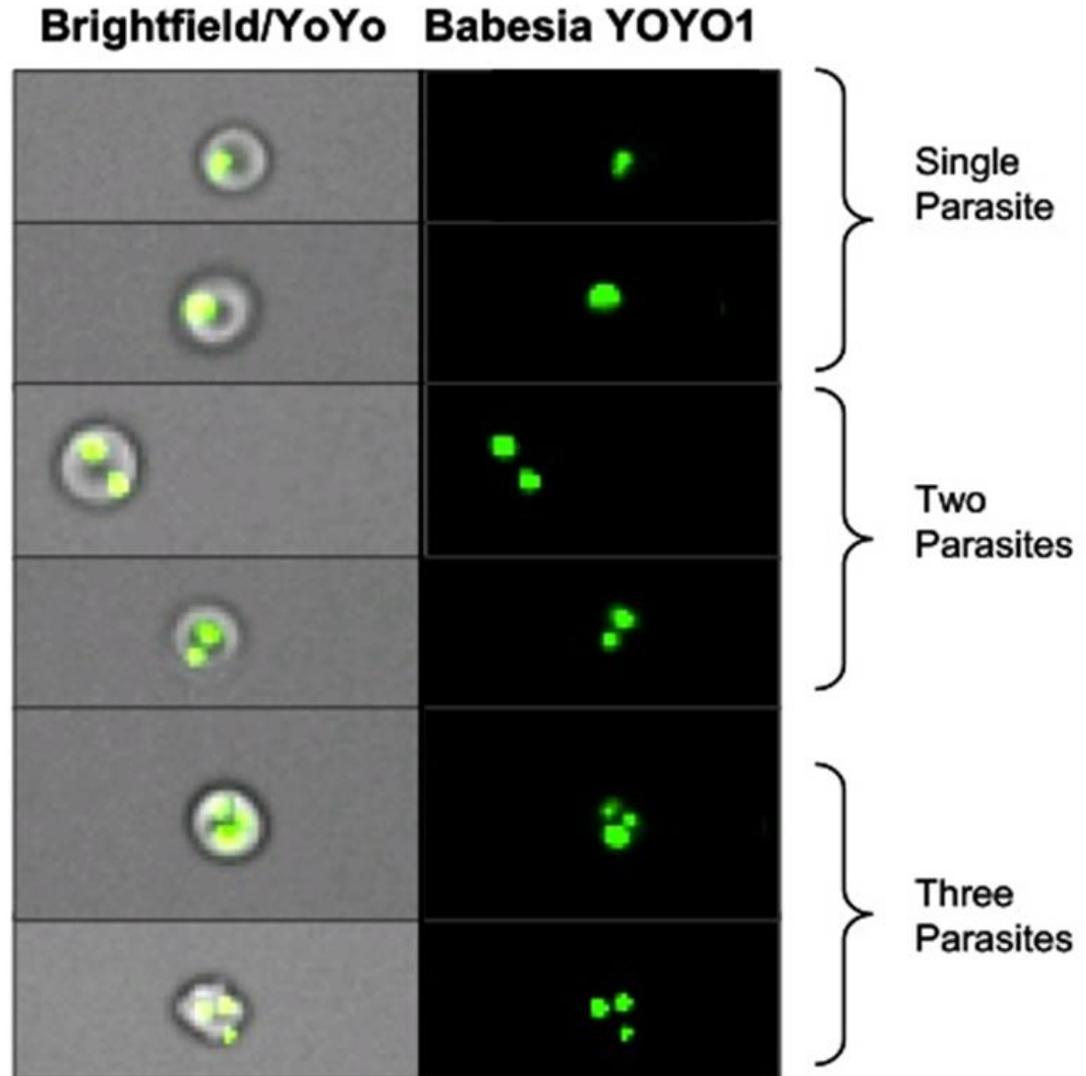


[Katrin Günther¹](#), [Michael Mertig^{1,*}](#) and [Ralf Seidel²](#) Mechanical and structural properties of YOYO-1 complexed DNA. *Nucl. Acids Res.* (2010) 38 (19): 6526-6532.

Rilevazione di infezioni

La Babesia
infetta i
globuli rossi.

Non rileva solo
l'infezione, ma
quantifica i
parassiti.



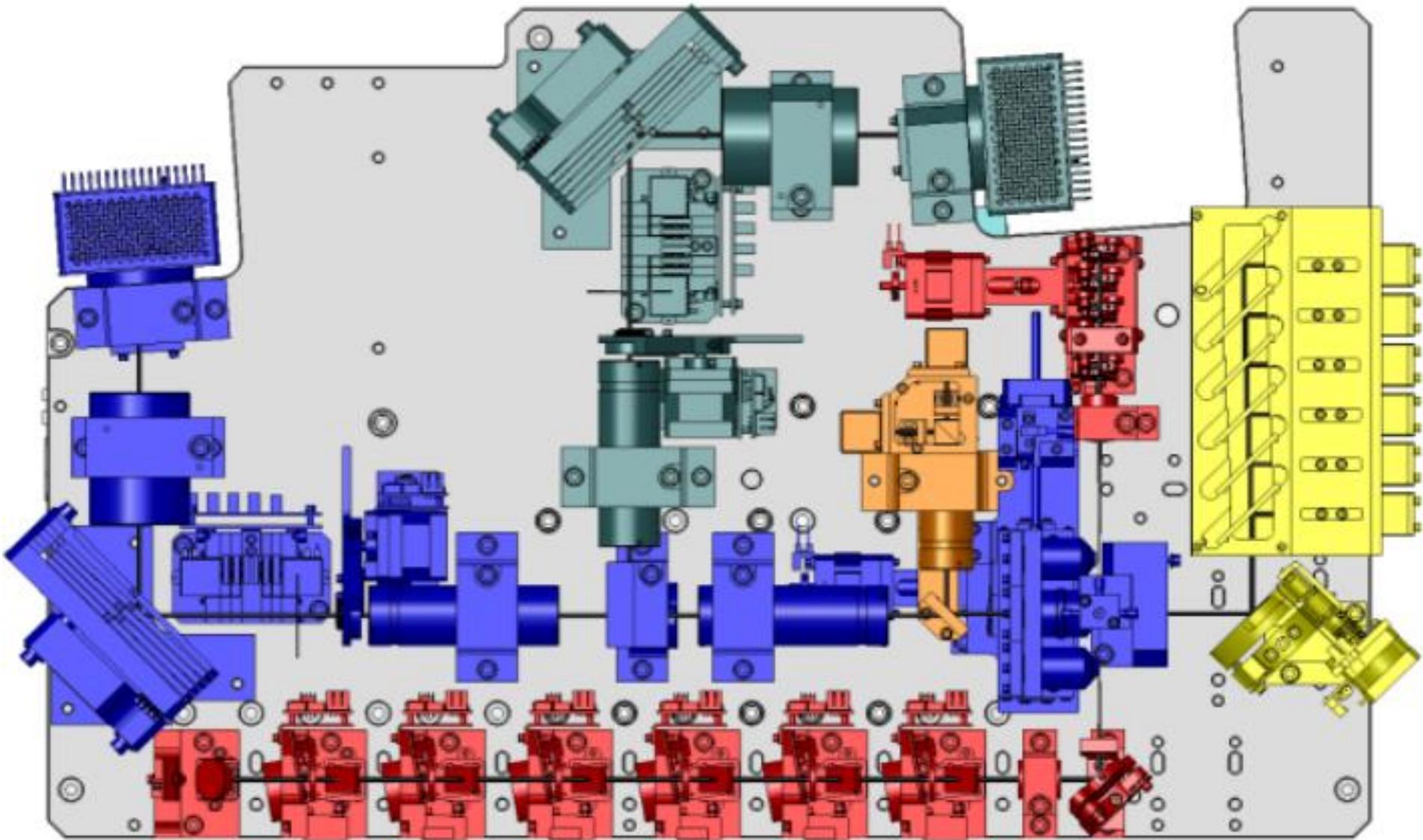
Strumento



Edizione 2016



Struttura dell'ImageStream®X



Schema dello strumento

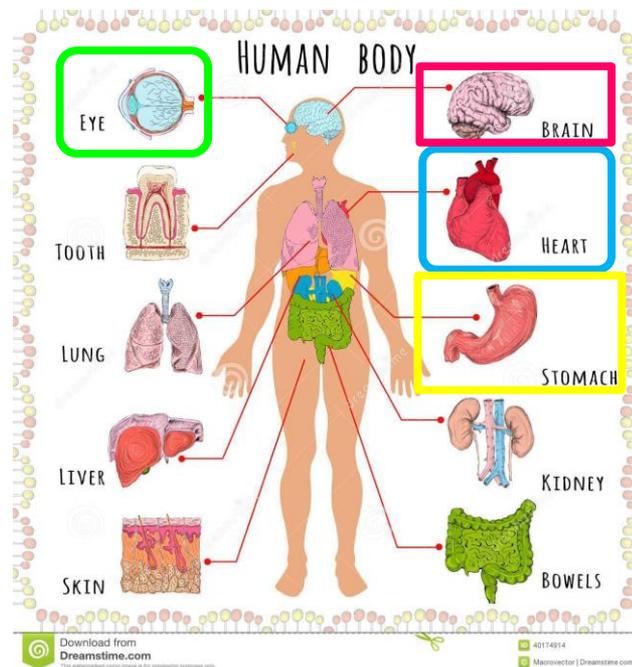
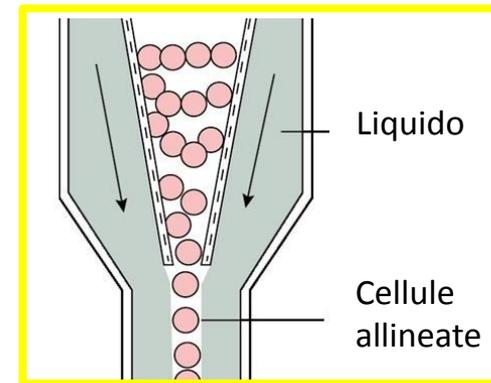
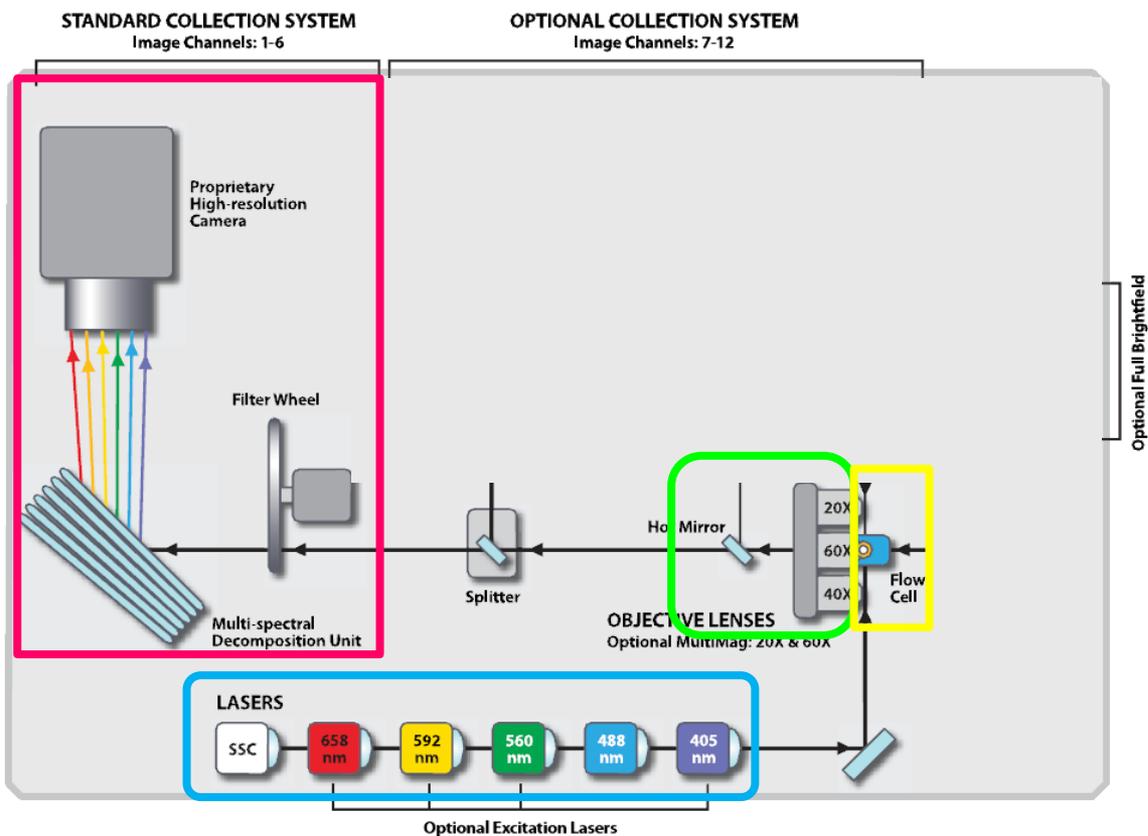


Image Stream X confrontato con altri strumenti

CITOFUORIMETRO

MICROSCOPIO

SORGENTI A LASER

CAMERA DI FLUSSO

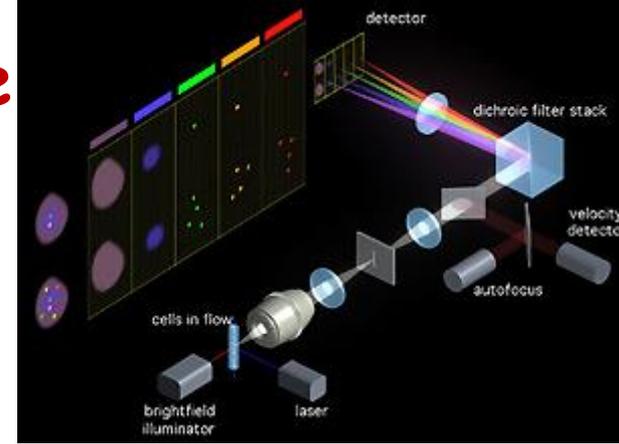
OBIETTIVO

FILTRI (a ruota)

SCOMPOSITORE DELLA LUCE

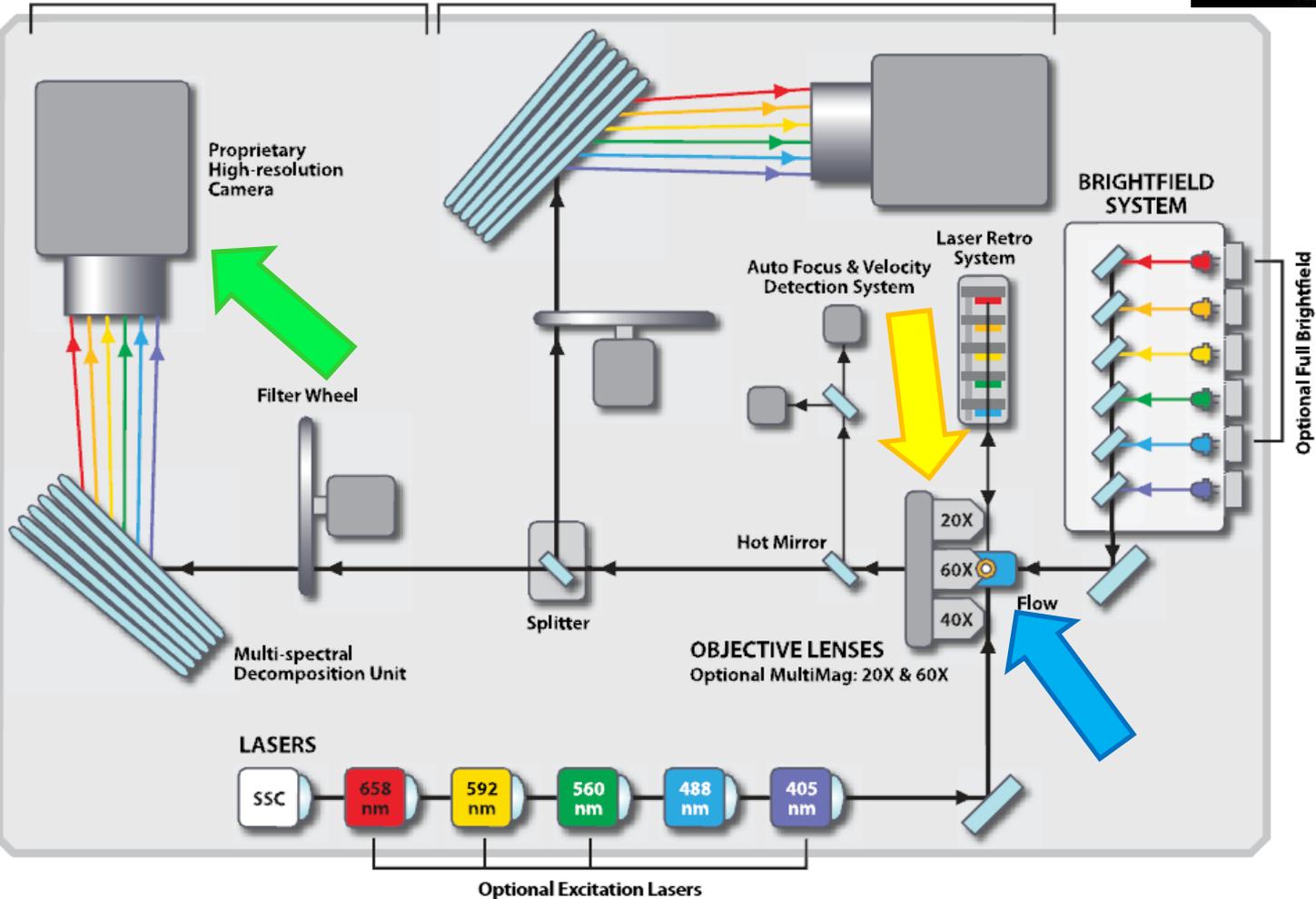
RIVELATORE A CAMERA

Schema strutturale



STANDARD COLLECTION SYSTEM
Image Channels: 1-6

OPTIONAL COLLECTION SYSTEM
Image Channels: 7-12



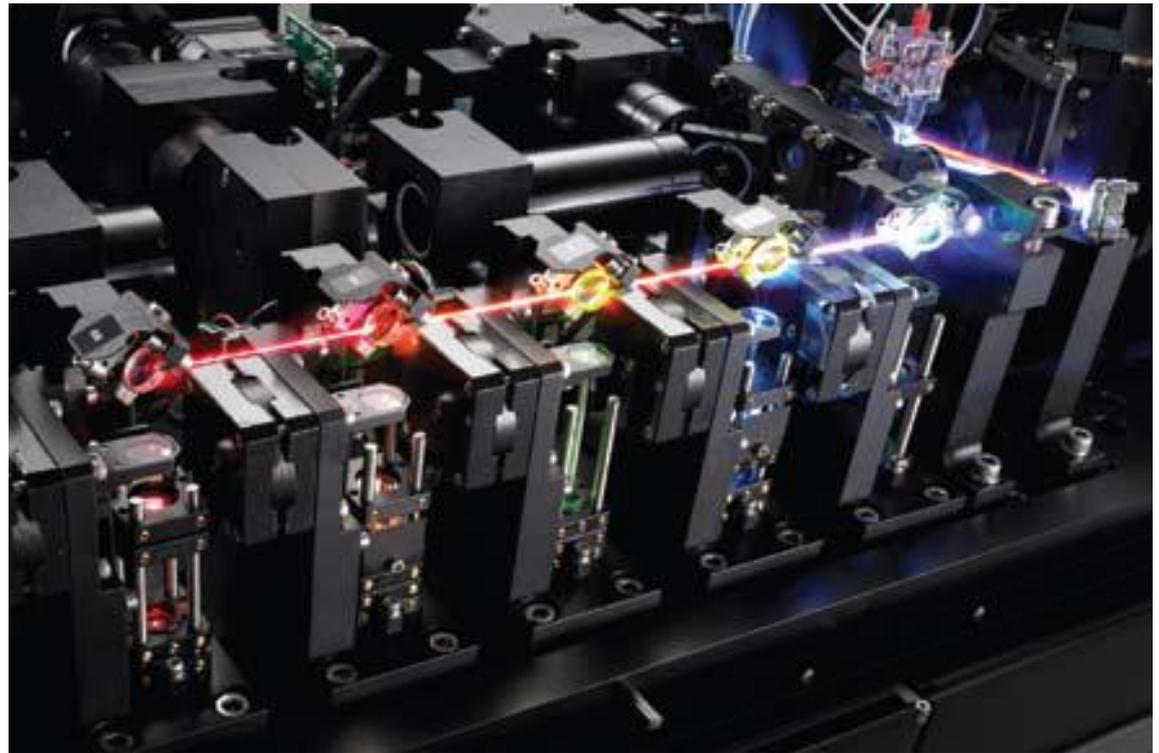
Laser



Sorgente luminosa: **laser**.

Quello inserito di base nello strumento è a **488 nm**.

Fino a
cinque
distinti
laser.



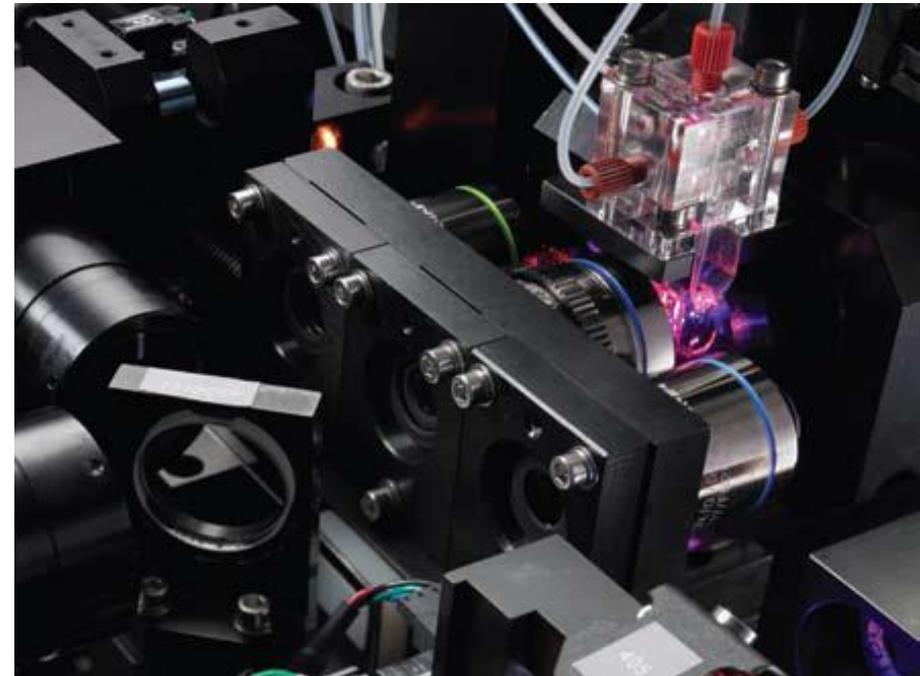
La potenza dello strumento può essere aumentata con laser supplementari: 405, 561, 592 e 658 nm.

Obiettivi

Oltre alla **lente 40 x** di ingrandimento standard, per maggiori flessibilità e **risoluzione**, sono disponibili le **20 X** e **60 X**.

Objective	Field of view	Pixel size	Depth of field	NA
40X	60 μm	0.5 μm	4 μm	0.75
20X	120 μm	1 μm	8 μm	0.5
60X	40 μm	0.33	2.5 μm	0.9

L'obiettivo di 60 X è adatto a piccoli corpuscoli come **lieviti** e **batteri** e offre un maggiore dettaglio con cellule provenienti da mammiferi e vegetali.



La luce in fotografia è come

Diaframma di un obiettivo



.....l'acqua di una vasca da bagno!

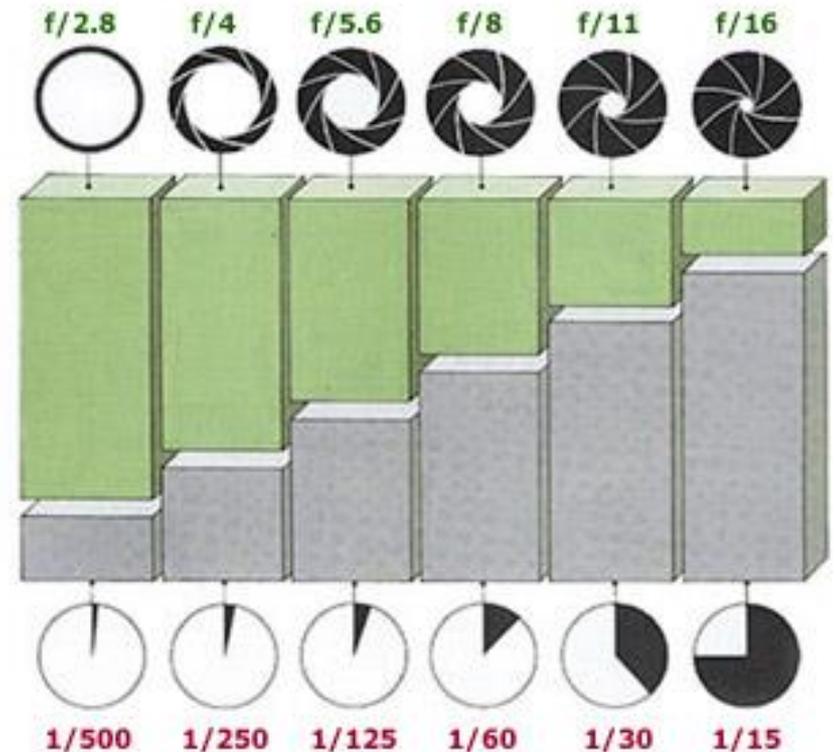


PRINCIPI DI OTTICA

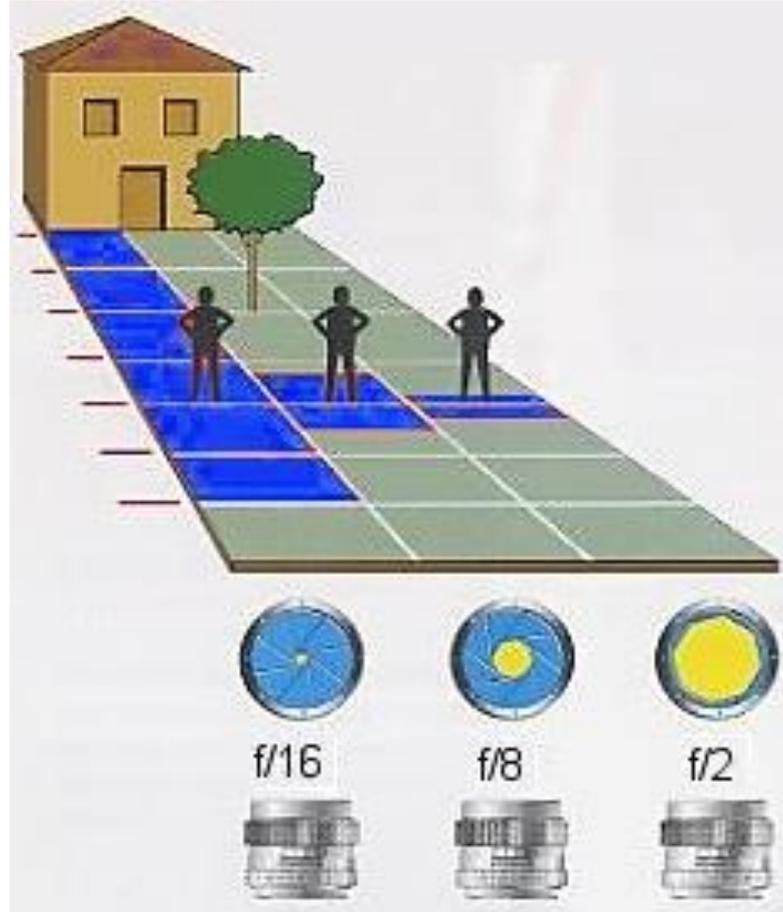
- Profondità di campo -

Intervallo attorno al piano focale in cui l'immagine rimane definita.

Diaframma di un obiettivo



Profondità di campo in funzione del diaframma

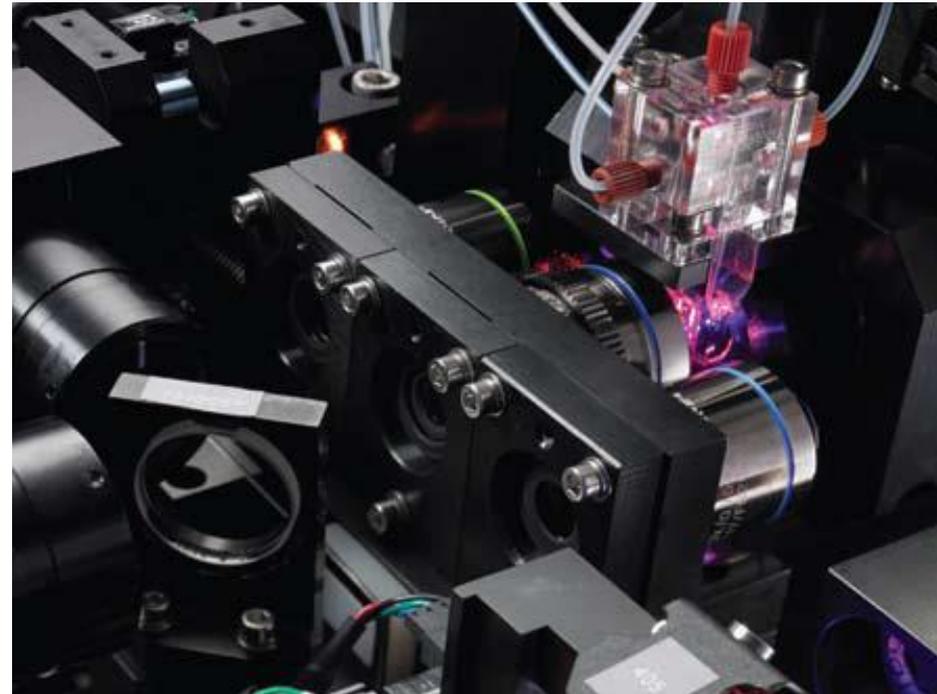


Obiettivo ImageStreamX

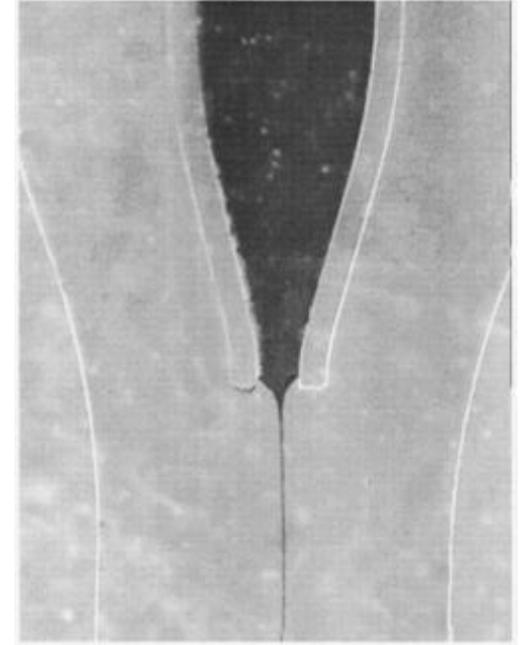
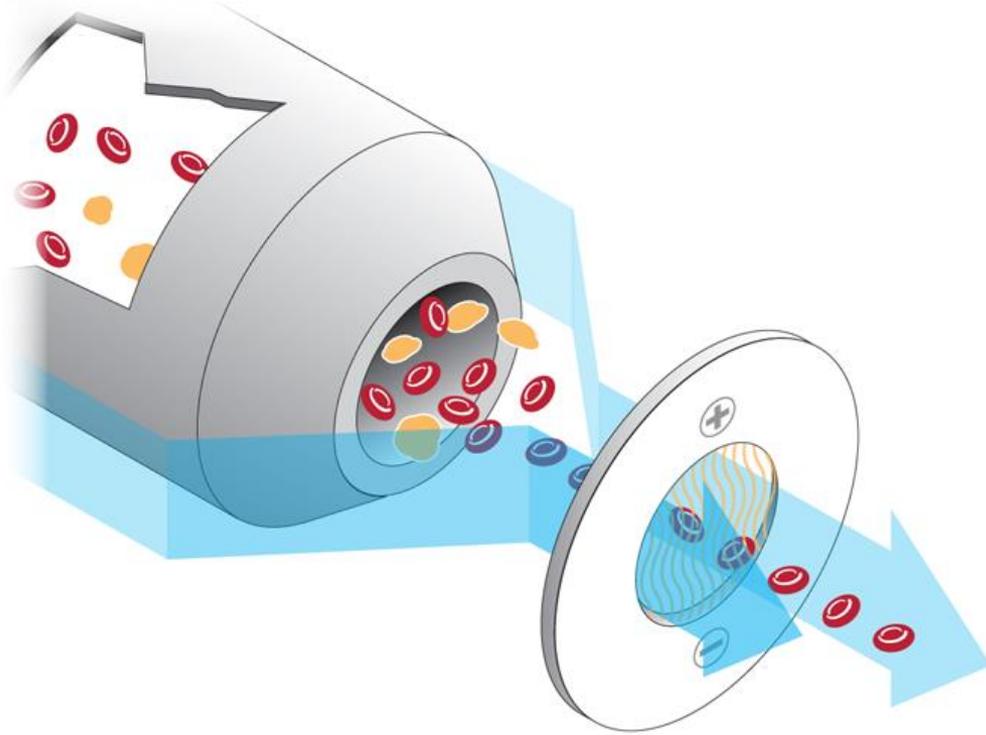


Necessità: raccogliere la > quantità di luce per analizzare il campione in 1/1000 s.

SCOPO: proiettare tutte le strutture all'interno della cellula in un unico piano di messa a fuoco.



Come si ottengono immagini a fuoco?



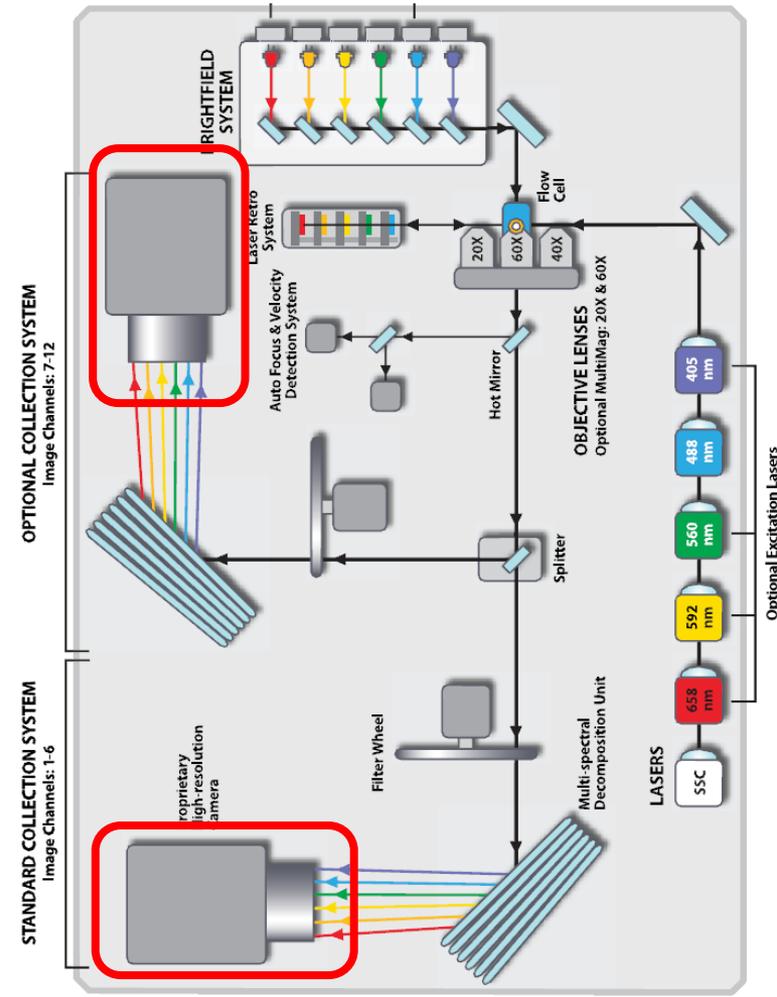
Estensione della profondità di campo

Combinazione di ottica specializzata e algoritmi di elaborazione delle immagini unici.

Rivelatori a camera

Fino a **12 canali** di rilevazione totali.

6 di base + altri 6 sono disponibili con l'aggiunta di una seconda camera opzionale.



Automatizzabilità

Autocampionatore: caricamento automatico da micropiastre.

Classiche provette da citofluorimetro



Visualizzazione dei risultati

Popolazioni cellulari

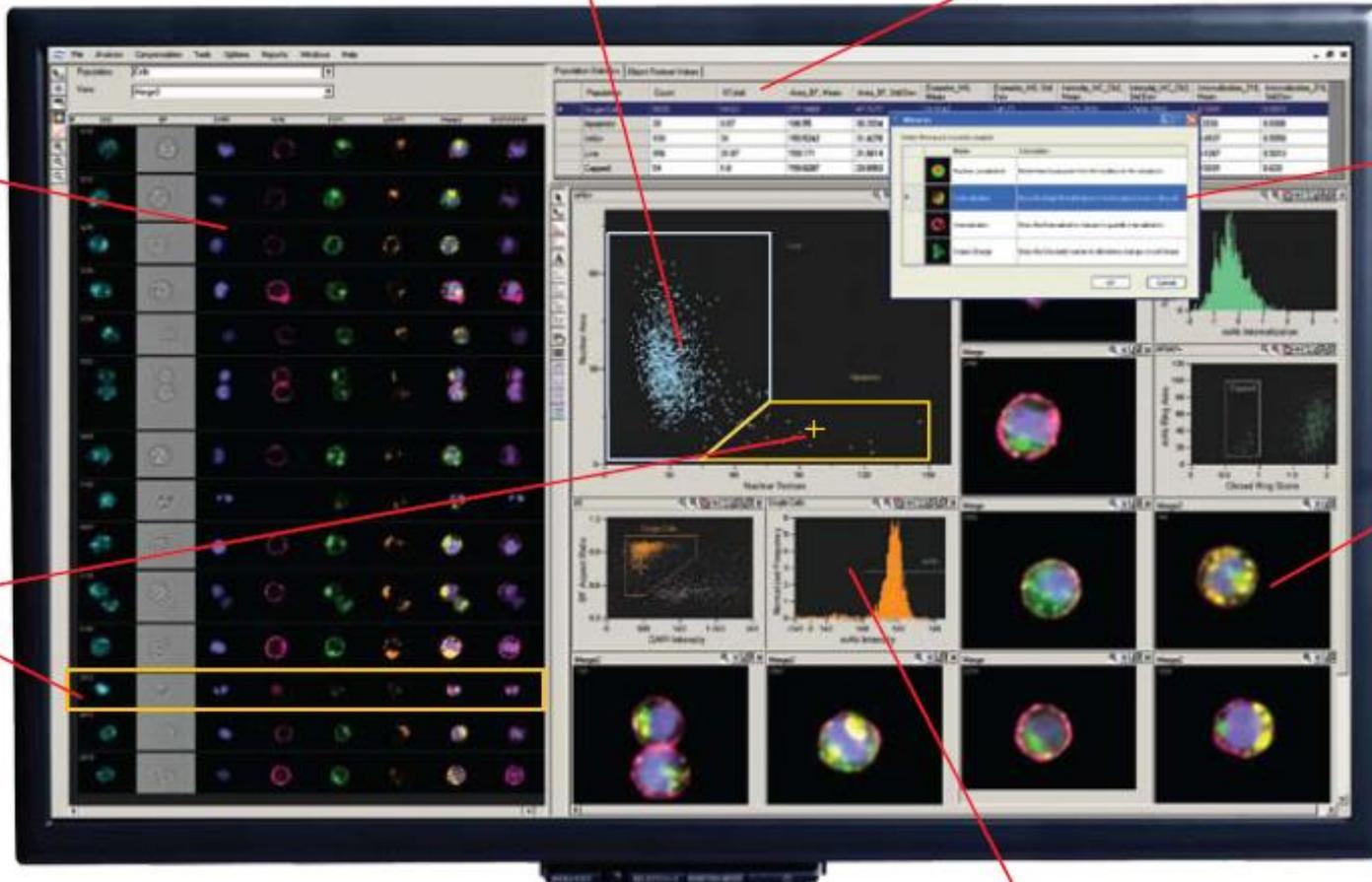
Statistiche globali delle popolazioni

Popolazioni cellulari in dettaglio

Analisi ottimizzata e pre-configurata.

A ogni puntino corrisponde l'immagine della cellula.

Creazione di composizioni di immagini

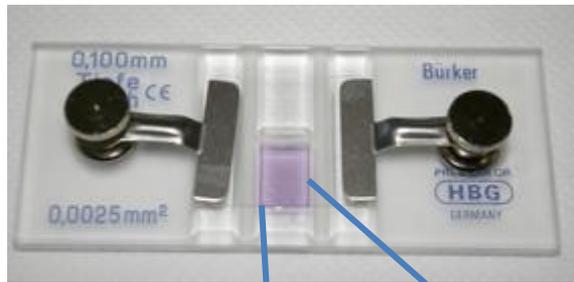


Centinaia di parametri vengono misurati/calcolati per ogni cellula: forma delle cellule, consistenza delle cellule, intensità e localizzazione della fluorescenza, oltre a numerose altre caratteristiche morfologiche e fotometriche.

CONTA

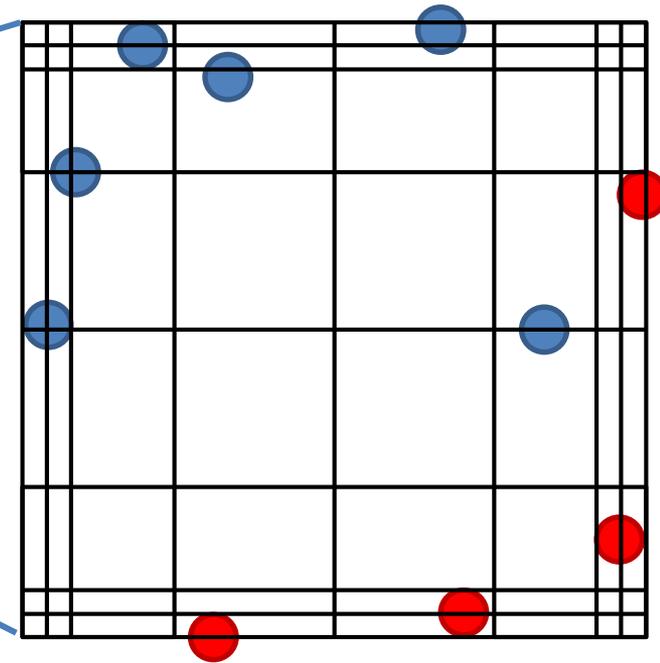
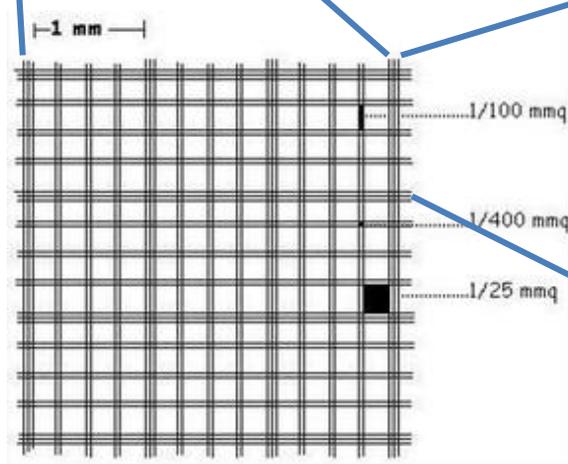
CELLULARE

CONTA MANUALE DELLE CELLULE



Camera di BURKER

9 quadrati grandi delimitati da 3 linee, ognuno suddiviso in 16 quadratini



Si contano le cellule in alto e sulla sinistra che tocchino la linea centrale; non si contano le cellule sulla linea centrale in basso e a destra.

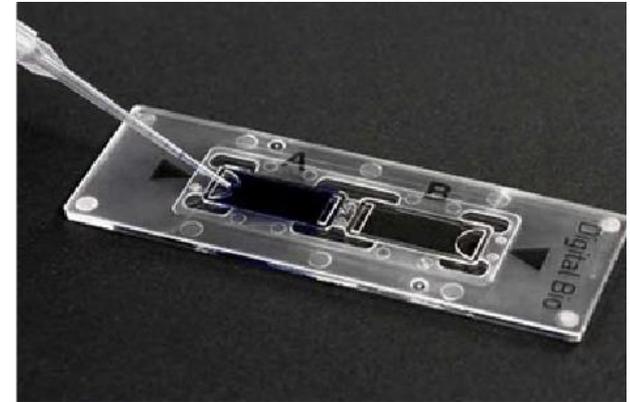
CONTACELLULE

AUTOMATICI

CONTACELLULE INVITROGEN

Conta cellule con diametro da 5-60 μm

Tempo di analisi: 1 minuto



Equipaggiato con **capillare** da 45, 60, 160 μm ,
permette analisi su cellule con
diametro da 0,7 a 160 μm .

Parametri misurabili sulle cellule:

- n° e concentrazione
- volume
- vitalità
- aggregazione
- presenza di detriti

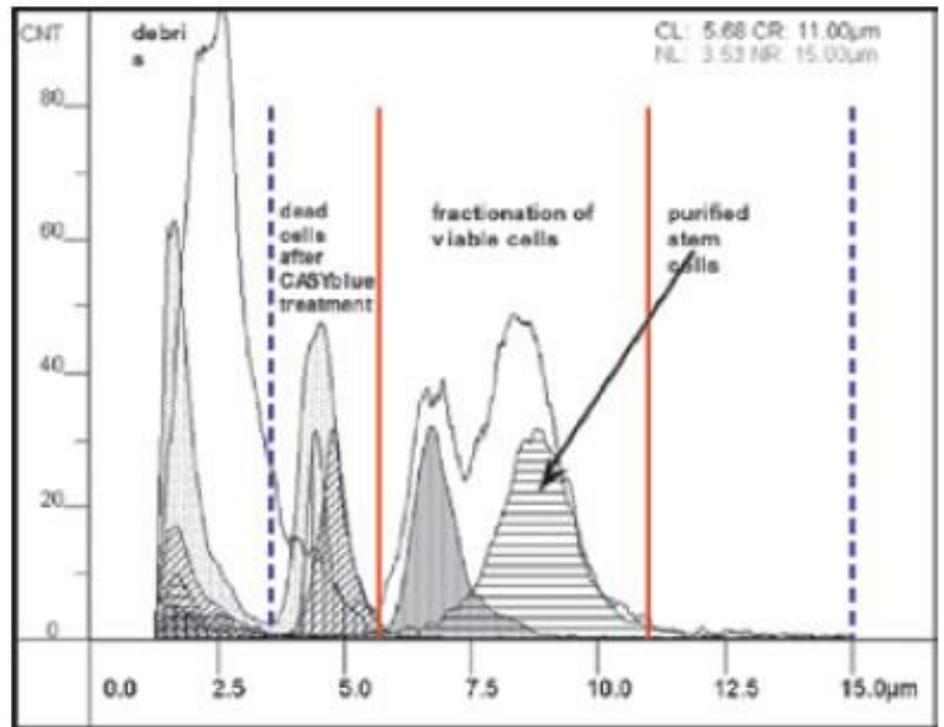


CONTACELLULE CASY TTC

Vengono misurati tramite **elettrodi** fino a 1000000 segnali/s creati dal passaggio di cellule attraverso un poro, in campo elettrico a basso voltaggio.

Analisi in 10 s.

n°



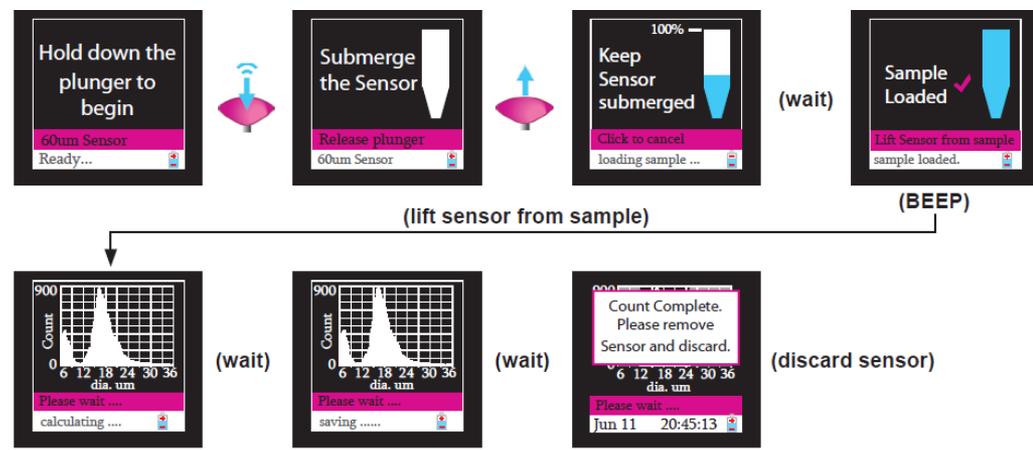
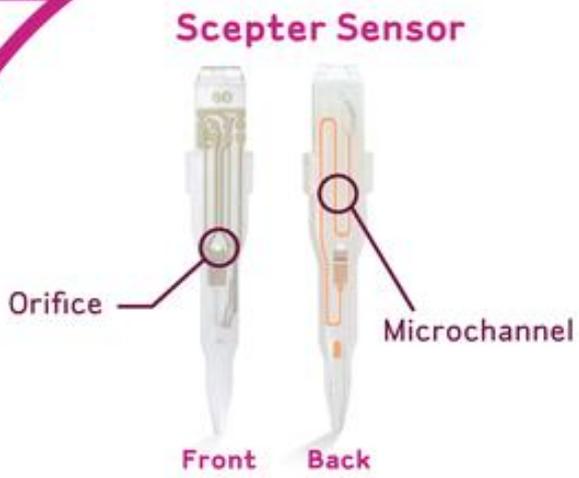
Dimensioni

CONTACELLULE A PIPETTA!



Conta fino a 1500000 cellule/mL con diametro da 6 um a 36 um

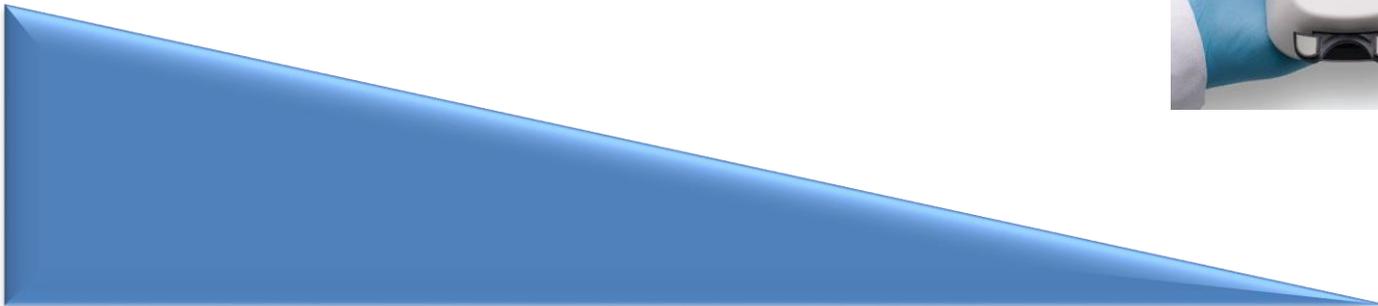
PUNTALI Davanti Dietro



DIMENSIONI DEI CONTACELLULE



Dimensioni



BIO-RAD

CONTACELLULE TC10



<http://www.bio-rad.com/prd/en/US/adirect/biorad?catID=KW3FRJ15&cmd=BRCatgProductDetail&country=US&javascriptDisabled=true&lang=en&ts=1&vertical=LSR>

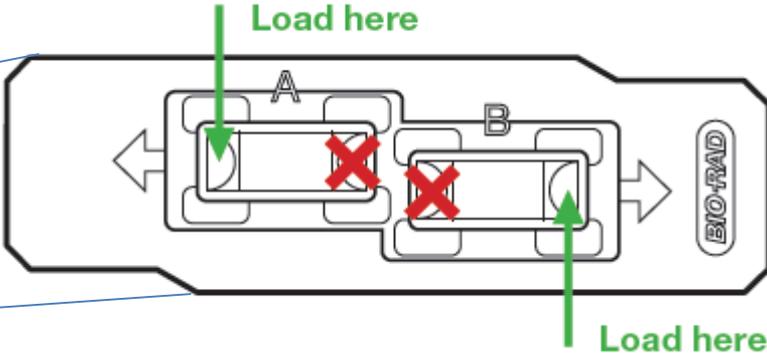
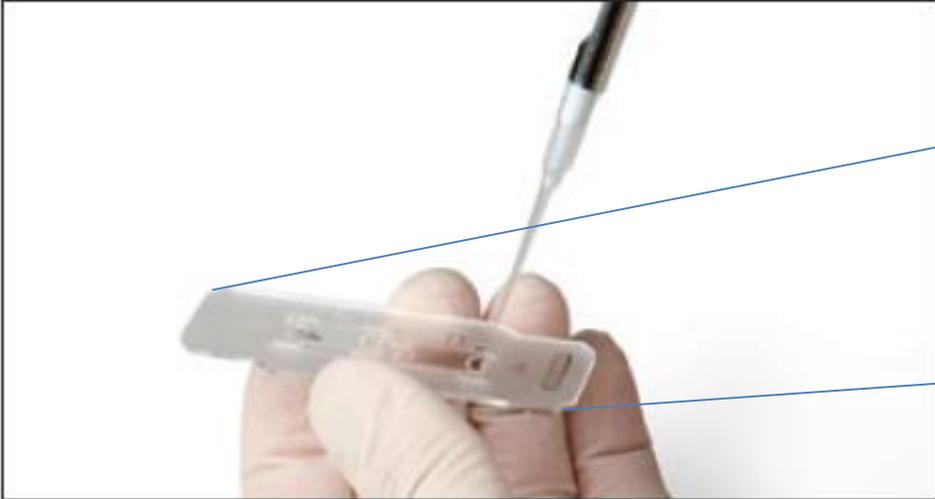
VANTAGGI DI UN CONTACELLULE

Sistema quasi privo di fasi manuali.

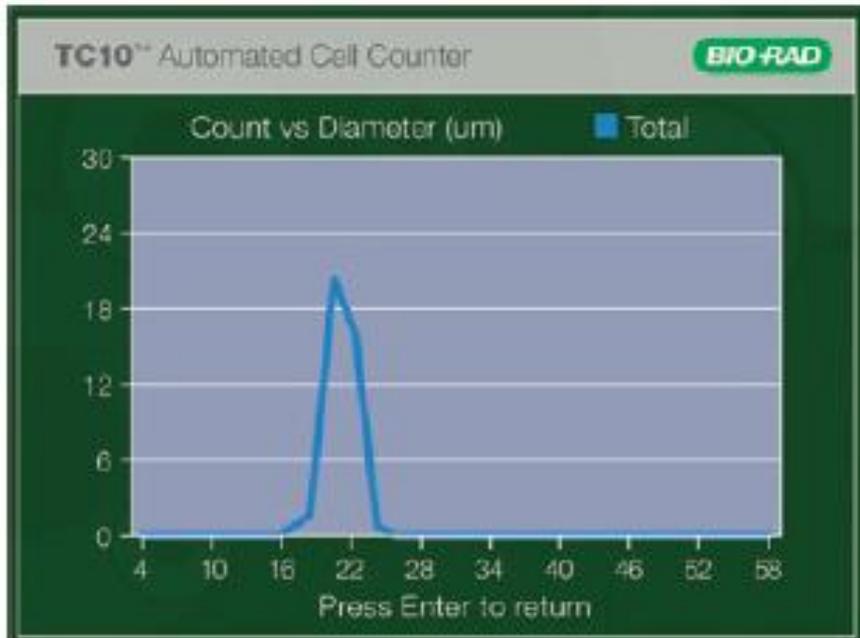


Estrema riproducibilità e tempi ridotti per la conta.

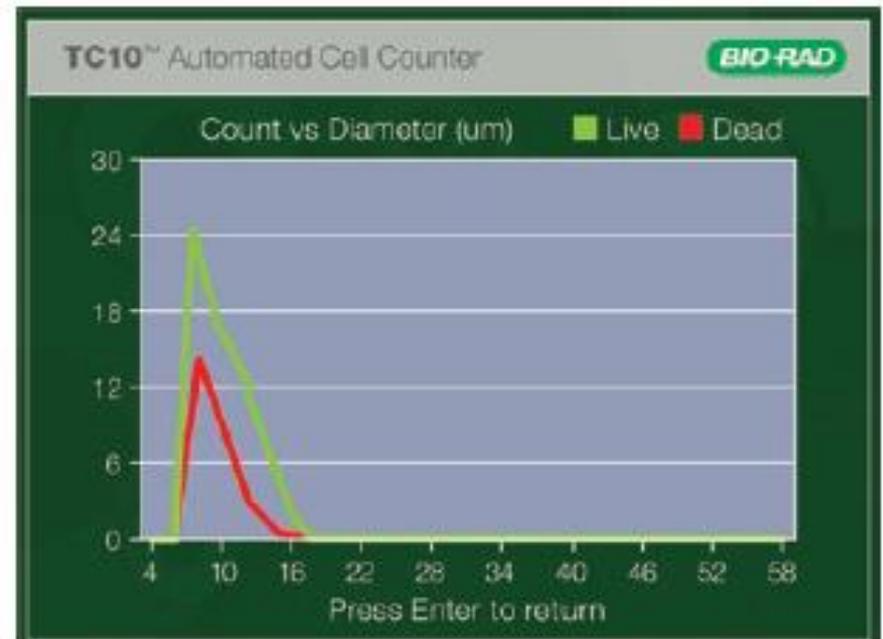
CARICAMENTO DEL CONTACELLULE BIORAD



VISUALIZZAZIONE DEI RISULTATI

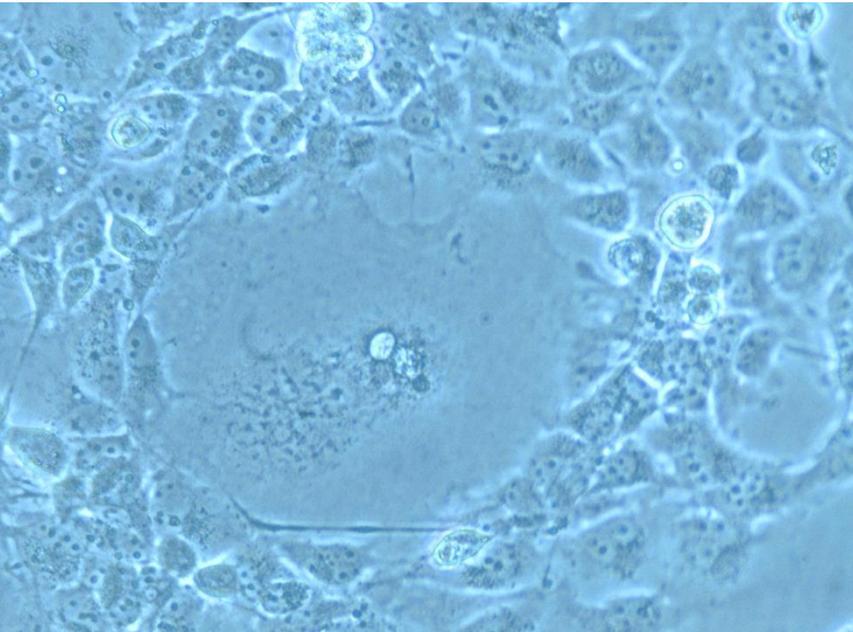


Distribuzione delle dimensioni

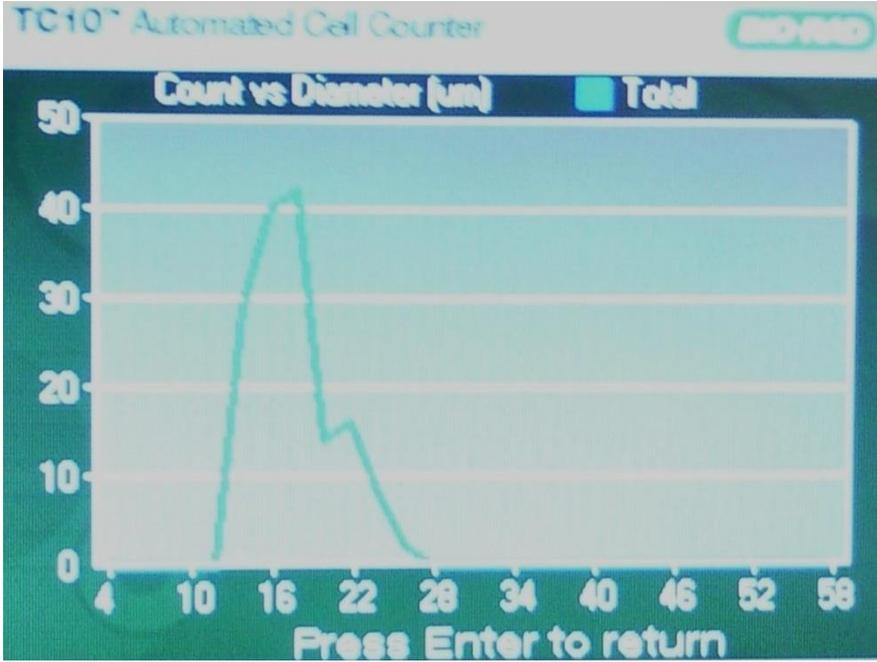


Vitalità cellulare

ESEMPIO REALE

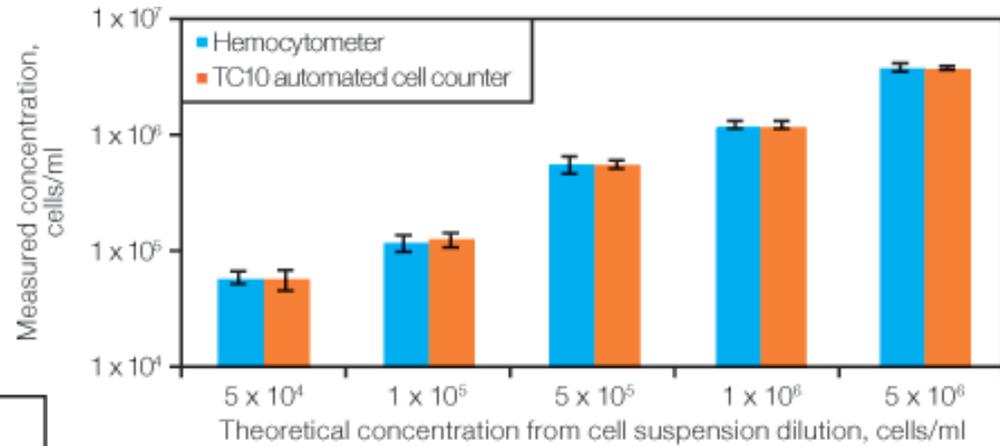


Contaminazioni cellulari

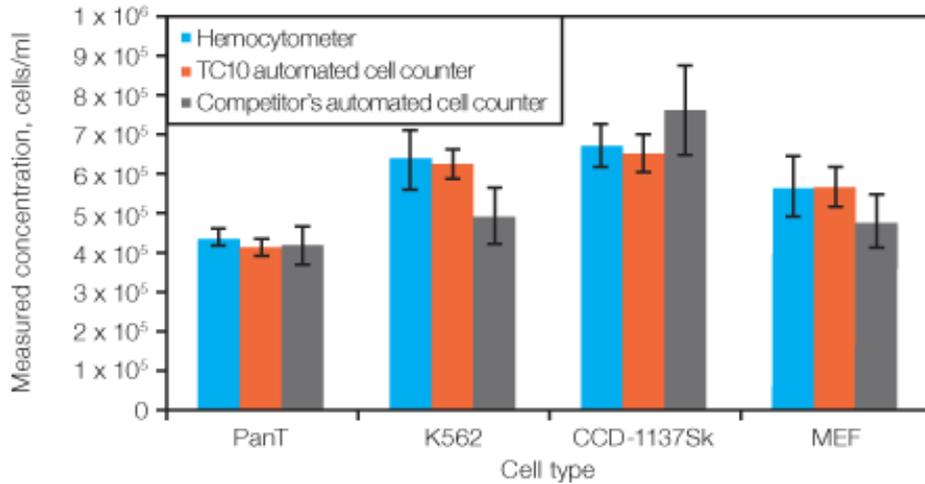


CONFRONTO CON I CONCORRENTI

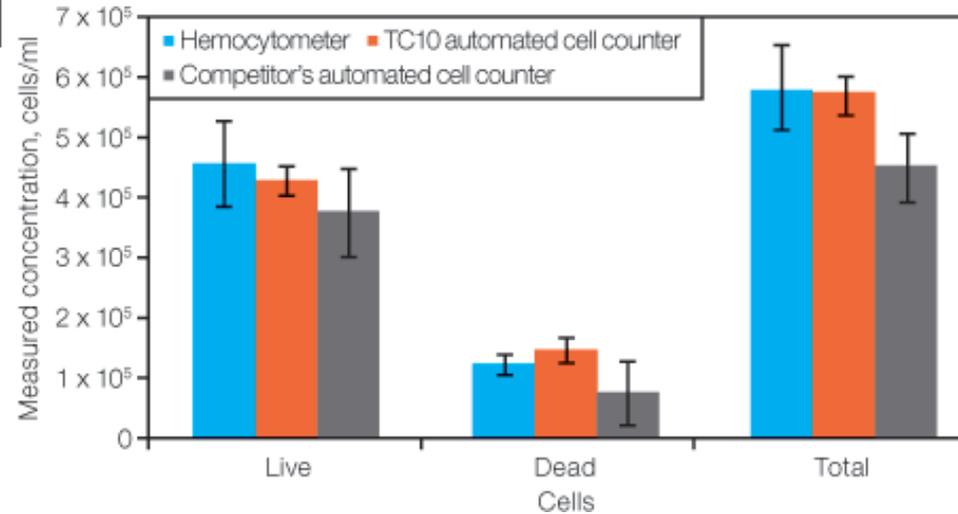
A



B



C



RIEPILOGO



**STUDI SU
CELLULE**

