

Cytometria Przepływowa BD

BD Biosciences, San Jose, CA

Spis Treści

Analiza Komórkowa

Cytometria Przepływowa

Jak Działa Cytometria Przepływowa

Sortowanie

Pomiary Cech Komórek

Przeciwciała Monoklonalne

Fluorescencja jako Marker Komórek
i Aktywności Komórkowej

Wielokolorowa Cytometria
Przepływowa

Podsumowanie

Analiza Komórek

Najnowsze postępy w biologii molekularnej i komórkowej – w badaniu komórek obejmującym ich funkcję, struktury jakie zawierają, oddziaływania z otoczeniem oraz cykl życia, podział i śmierć – pomogły naukowcom zyskać głębsze zrozumienie chorób człowieka. Coraz lepsze poznawanie różnych rodzajów populacji komórek, sposobów działania komórek i różnic pomiędzy rodzajami komórek ma fundamentalne znaczenie z punktu widzenia badania biologii komórkowej i chorób oraz stanowi podstawowe zastosowanie aparatów i odczynników opracowywanych przez BD Biosciences.

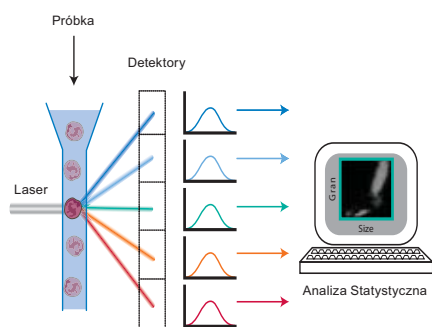
Technologia wzmacniająca nasze oferty produktowe – cytometria przepływowa – odgrywa kluczową rolę w pogłębianiu tego zrozumienia. Cytometria przepływowa – pierwsza technika stworzona do analizy pojedynczych komórek – stanowi zaawansowaną technologię liczenia, badania i sortowania pojedynczych komórek. Z punktu widzenia tego postępu równie ważne było równoległe odkrycie i rozwój przeciwciał monoklonalnych, co umożliwiło badaczom wykrywanie i oznaczanie specyficznych populacji komórek.

Połączenie tych dwóch technologii – skomercjalizowanych mniej więcej w tym samym czasie – wywołało gwałtowny rozwój rynku cytometrii przepływowej.



Cytometria Przepływowa

Cytometria przepływowa oferuje badaczom i klinicyście trzy istotne możliwości. Po pierwsze, cytometria przepływowa analizuje populację komórek na zasadzie „komórka po komórce” (ang. *cell-by-cell*) – zdolność o decydującym znaczeniu z punktu widzenia dzisiejszych badaczy i klinicyście, którzy szukają bardzo niewielu komórek wśród wielu komórek w próbce (często jak igieł w stogu siana), co umożliwia im zdiagnozowanie, monitorowanie lub badanie choroby bądź procesu biologicznego. Po drugie, cytometria przepływowa jest nadzwyczaj szybka. Tempo rutynowej analizy próbek może sięgać 10 000 komórek na sekundę – jest to niewiarygodny postęp względem historycznych metod wzrokowego badania i zliczania komórek. W końcu, cytometria przepływowa posiada zdolność jednoczesnego mierzenia wielu parametrów (tzw. multipleksing) pojedynczych komórek. Multipleksing pozwala badaczom i klinicyście zebrać więcej informacji z jednej próbki szybciej, niż kiedykolwiek wcześniej. Możliwości te uczyniły z cytometrii przepływowej potężne narzędzie o wielu zastosowaniach, zarówno dla badaczy, jak i klinicyście.



Rycina 1. Zasada cytometrii przepływowej

Jak działa cytometria przepływowa?

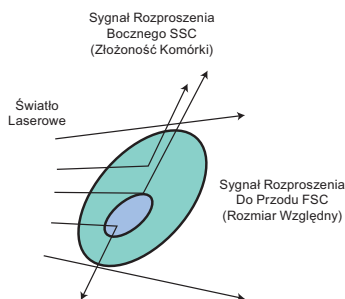
Cytometry przepływowe zawierają trzy główne układy – płynowy, optyczny i elektroniczny.

Układ płynowy przepuszcza próbkę komórek (na przykład próbkę krwi człowieka) przez komorę przepływową w taki sposób, że komórki przechodzą pojedynczo przez wiązkę laserową. Każda komórka przechodzi przez wiązkę, rozprasza światło i może emitować światło fluorescencyjne. Te sygnały świetlne są zbierane przez układ optyczny i kierowane do rozmaitych detektorów. Sygnały otrzymywane przez detektory są następnie przekształcane w wartości numeryczne przez układ elektroniczny. Wyniki mogą być wyświetlane na ekranie lub zapisane dla celów przyszłej analizy przy użyciu specjalnie zaprojektowanego oprogramowania.

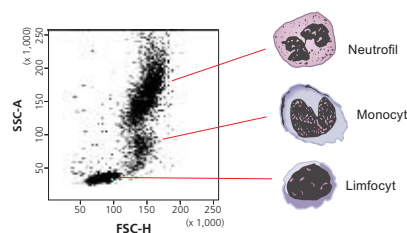
Gdy każda komórka przechodzi przez wiązkę, jej parametry (cechy) są mierzone i zapisywane wraz z czasem przejścia przez wiązkę. Zwykle dane zbierane są co najmniej dla 10 000 komórek na próbkę. Podstawowe zasady działania cytometrów przepływowych są przedstawione na rycinie 1.

Sortowanie

System BD FACSAria™ II może zarówno sortować, jak i analizować populacje komórek. Jest to cenne, gdy badacz musi zbadać konkretny rodzaj komórki. Najpierw parametry ustawiane są w taki sposób, aby cytometr przepływowy mógł identyfikować komórki interesujące badacza. Gdy tylko zidentyfikowana zostanie populacja komórek, które mają być poddane sortowaniu, strumień cieczy zawierający próbkę jest przekierowywany przy wysokim ciśnieniu przez układ płynowy w jeden strumień w taki sposób, że komórki przechodzą pojedynczo przez wiązkę laserową, gdzie wykrywane są informacje o komórkach. Jeśli komórka odpowiada określonym parametrom, cytometr generuje ładunek elektryczny. W efekcie naładowana komórka jest odchylana do probówki do zbierania. Badacz może wziąć interesujące go komórki i poddać je hodowli lub zbadać przy użyciu innych testów. Nienaładowane kropelki kierowane są wraz ze strumieniem do pojemnika na odpady. Proces ten przebiega szybko i może zostać zrealizowany w tempie 20 000 komórek na sekundę. System BD FACSAria™ II może sortować jednocześnie do czterech populacji.



Rycina 2. Rozproszenie światła



Rycina 3. Wykres kropkowy różnych rodzajów komórek krwi

Fluorochrom	Kolor Emisji Fluorescencyjnej
BD Horizon™ V450	Niebieski
Pacific Blue™	Niebieski
AmCyan	Zielony
Alexa Fluor® 488	Zielony
FITC	Zielony
PE	Żółty
PE-Texas Red®	Pomarańczowy
Texas Red®	Pomarańczowy
APC	Czerwony
Alexa Fluor® 647	Czerwony
PE-Cy™5	Czerwony
PerCP	Czerwony
PerCP-Cy™5.5	Daleka Czerwień
Alexa Fluor® 700	Daleka Czerwień
PE-Cy™7	Podczerwień
APC-Cy7	Podczerwień

Rycina 4. Popularne fluorochromy

Pomiary cech komórek

W momencie przechodzenia komórki przez wiązkę laserową, światło ulega rozproszeniu w różnych kierunkach, co ilustruje rycina 2. Ilość światła i kierunek, w jakim światło to jest rozpraszane pomagają badaczom określić zarówno rozmiar, jak i wewnętrzną złożoność komórki. Informacje te wyświetlane są w formie wizualnej na pewnego rodzaju wykresie, zwanym wykresem kropkowym, gdzie każda kropka reprezentuje pojedynczą komórkę. Na wykresie kropkowym, przedstawionym na rycinie 3, różne rodzaje komórek krwi – neutrofile, monocyty i limfocyty – można odróżnić poprzez sposób przedniego i bocznego rozpraszania światła. Obecnie cytometria przepływowa umożliwia badaczom jednoczesne badanie więcej niż jednej populacji komórek i uzyskanie informacji wykraczających znacznie poza jeden parametr.

Przeciwciała monoklonalne

W momencie pojawienia się cytometrii przepływowej przypadkowo wytyczono również sposoby wytwarzania przeciwciał monoklonalnych. Późniejsze połączenie przeciwciał monoklonalnych z cytometrią przepływową ujawniło rzeczywistą siłę technologii przepływowej i pobudziło szybki postęp w zakresie zastosowań cytometrii przepływowej.

Przeciwciała monoklonalne pozwalają badaczom wykrywać i oznaczać – „znakować” – określone populacje komórek. Technologia obejmuje tworzenie odczynnika przeciwciała, który będzie wiązać się do określonej struktury (antygeny), o której wiadomo, że jest obecna na danym rodzaju komórki interesującej badacza. Technologia ta stanowi klucz do opracowywania odczynników biologicznych, które można stosować nie tylko w celu identyfikowania komórek, ale również oznaczania zmian związanych z funkcją tej komórki.

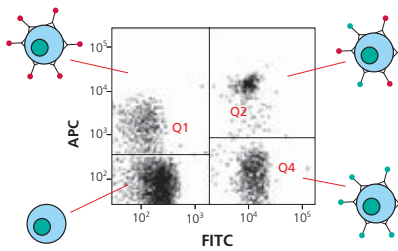
Wraz z możliwością przyglądania się wielu komórkom i parametrom, badacze potrzebowali sposobu identyfikowania i grupowania komórek. Aby osiągnąć ten cel, do bazowej technologii cytometrii przepływowej włączono użycie fluorescencji i wielokolorowego barwienia. Efektem tego mariażu technologii jest zrewolucjonizowanie współczesnych badań biologicznych.

Fluorescencja jako marker komórek i aktywności komórkowej

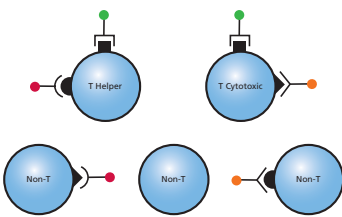
Przeciwciała monoklonalne są często łączone z barwnikiem fluorescencyjnym (fluorochromem), który po pobudzeniu przez laser będzie emitować światło fluorescencyjne. Fluorochrom umożliwia badaczowi śledzenie, które komórki wiążą się do przeciwciała lub znacznika.

Większość komórek naturalnie nie emituje światła fluorescencyjnego. Jednakże jeśli przeciwciało monoklonalne oznaczone fluorochromem wiąże się z antygenem prezentowanym na powierzchni komórki, w momencie przechodzenia tej komórki przez wiązkę laserową cytometru przepływowego odebrany zostanie sygnał światła fluorescencyjnego.

Fluorochromy różnią się między sobą pod względem koloru emitowanego światła. Na przykład FITC, jeden z fluorochromów oferowanych przez BD, po ekspozycji na działanie lasera stosowanego w naszych cytometrach przepływowych będzie emitować zielone światło, zaś PE, inny spośród oferowanych przez BD odczynników znakowanych fluorochromami, będzie emitować światło pomarańczowe. Te różnice pomiędzy fluorochromami są istotne, ponieważ pomagają badaczom odróżniać populacje komórek lub różne aktywności komórkowe.



Rycina 5. Wykres kropkowy fluorescencji



Rycina 6. Trójkolorowe barwienie limfocytów

Wielokolorowa cytometria przepływowa

Komórki różnych rodzajów posiadają różne kombinacje antygenów i będą wiązać się z różnymi kombinacjami przeciwciał. Jeśli każde przeciwciało monoklonalne stosowane w badaniu próbki komórek jest związane z innym fluorochromem, to poszczególne rodzaje komórek można odróżnić od siebie na podstawie kombinacji kolorów emitowanych w momencie przechodzenia przez wiązkę laserową. Rycina 5 przedstawia wykres kropkowy komórek zabarwionych dwoma różnymi odczynnikami przeciwciał monoklonalnych, z których każdy związany jest z innym kolorem fluorochromu. Na podstawie ilości emitowanego światła każdego koloru (FITC - zielone lub APC - czerwone), zidentyfikowano cztery różne populacje.

Równoczesne zastosowanie kombinacji wielu kolorów jeszcze bardziej zwiększa zdolność rozróżniania różnych (heterogennych) populacji komórek. Rycina 6 ilustruje przykład, w którym w badaniu próbki komórek użyto trzech różnych przeciwciał monoklonalnych — każde znakowane innym fluorochromem — celem szukania limfocytów T. Widocznych było pięć różnych rodzajów komórek. Użycie wielu kolorów nie tylko umożliwiło zidentyfikowanie komórek T, ale również pozwoliło wykryć dwa różne rodzaje komórek T: limfocytów T pomocniczych i limfocytów T cytotoksycznych. Znajomość liczby i proporcji tych dwóch rodzajów limfocytów T jest bardzo ważne w badaniu niedoboru odporności i w opiece nad pacjentami z chorobami niedoboru odporności, np. HIV.

Podsumowanie

Cytometria przepływowa, pierwsza technika stworzona do analizy pojedynczych komórek, łączy w sobie elastyczność i czułość technologii fluorescencyjnej z szybkością i możliwościami integracji danych. Stała się ona złotym standardem w analizie komórkowej i jest obecnie stosowana jako narzędzie analityczne w wielu sektorach nauk biologicznych.

W miarę rozwoju badań w dziedzinie biologii komórkowej cytometria przepływowa w coraz szerszym zakresie wspiera te badania. Aby sprostać temu wyzwaniu, zespół ds. Analizy Komórkowej w BD Biosciences kontynuuje wprowadzanie innowacji — rozwijając bardziej niż kiedykolwiek skomplikowane testy i aparaty, które są bardziej zaawansowane i łatwiejsze w użyciu.



BD Biosciences
 ul. Królowej Marysieńki 90
 02-954 Warszawa
 tel.: + 48 22 651 62 52
 faks: + 48 22 651 75 89
www.bdbiosciences.com