

# Wybór Odczynników do Wielokolorowej Cytometrii Przepływowej

Holden Maecker i Joe Trotter  
BD Biosciences, San Jose

***Cytometry przepływowe wykrywające sześć, osiem i więcej kolorów pobudziły rozwój nowych fluorochromów i koniugatów przeciwciał wykorzystujących te możliwości. Jednakże wybór kombinacji fluorochromów optymalnej dla specyficzności konkretnego przeciwciała jest procesem złożonym. Niniejsza notatka dot. stosowania dostarcza pewnych prostych wytycznych, mających pomóc w wyborze zestawu odczynników do wielokolorowej cytometrii przepływowej, uniknięciu cykli prób i błędów oraz zwiększeniu szans na przeprowadzenie udanego eksperymentu.***

Spis treści

Podstawy: Znać swój aparat

Fluorochromy: Zdecyduj się na jasne

Kolory i specyficzność: Zdefiniuj właściwe kombinacje

Barwniki tandemowe: Uwaga na degradację

Dobór kontroli do weryfikacji zestawu odczynników

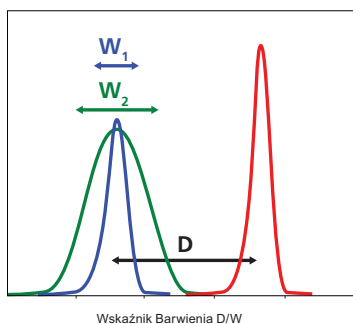
Odczynniki do wielokolorowej cytometrii przepływowej

## Podstawy: Znać swój aparat

Dobór odczynników rozpoczyna się od konfiguracji aparatu. Rodzaj i liczba laserów oraz detektorów decyduje o tym, czy układ optyczny może wzbudzić dany fluorochrom i właściwie wykryć daną kombinację fluorochromów. Na skuteczność wykrywania poszczególnych barwników wpływa również projekt układu optycznego, podobnie jak ustawienia aparatu, w tym napięcia PMT. (Patrz nowa funkcja BD Cytometer Setup and Tracking [CS&T] oprogramowania BD FACSDiva™ 6.x na stronie [bdbiosciences.com/facsdiva](http://bdbiosciences.com/facsdiva)). I wreszcie, na faktyczną jasność jednego fluorochromu względem innego w dużym stopniu wpływa wybór filtrów optycznych, stosowanych z każdym detektorem. Wybór filtra to proces wzajemnych ustępstw: stosowanie szerszego filtra pasmowoprzepustowego może zwiększyć zdolność wykrywania danego fluorochromu, ale może również zwiększyć wielkość rozlanego tła, na jakie wpłynęły w tym detektorze sąsiadujące fluorochromy. Dobrym sposobem wizualizacji tych efektów jest wirtualne testowanie kombinacji filtrów przy użyciu narzędzia internetowego, takiego jak przeglądarka na stronie [bdbiosciences.com/spectra](http://bdbiosciences.com/spectra). Narzędzie to ilustruje przewidywane rozlanie (ang. *spillover*)\* w przypadku poszczególnych kombinacji fluorochromów i filtrów.

\* Przewidywany „wyciek” stanowi znormalizowany procent emitowanej fluorescencji, który może niekoniecznie odpowiadać procentowi stosowanemu do kompensacji z uwagi na skutki różnych współczynników wzmocnienia detektorów.





**Rycina 1.** Rzeczywisty stopień jasności odczynnika zależy od różnicy pomiędzy populacją pozytywną i negatywną (D) i rozproszenia populacji negatywnej (W). Wskaźnik barwienia stanowi użyteczny miernik znormalizowanego sygnału ponad tło.

### Fluorochromy: Zdecyduj się na jasne...

Biorąc pod uwagę wiele różnic w konfiguracji aparatów, niemożliwe jest uniwersalne określenie „najlepszych” fluorochromów do stosowania w kombinacjach 6, 8 lub większej liczby kolorów. Jednakże w przypadku konkretnego cytometru, jak aparat BD™ LSR II, możliwe jest uszeregowanie dostępnych barwników według stopnia ich jasności na tym aparacie (gdy jest konfigurowany za pomocą określonego zestawu laserów i filtrów). Ale jak właściwie definiujemy i mierzymy jasność? Dobra funkcjonalna definicja stopnia jasności odczynnika powinna zawierać określenie skutków wpływu tła lub tego, w jaki sposób sygnał rozkłada się nad niezabarwionymi populacjami komórek. Na tło w konkretnych detektorach wpływają poziomy sygnał, autofluorescencja komórek, barwienie niespecyficzne, szum elektryczny i tło optyczne z innych fluorochromów (rozlanie). Zwiększają one szerokość (wariancję lub  $OS^2$ ) populacji negatywnej w takim stopniu, w jakim każdy z tych czynników wpływa na zakłócenia i/lub sygnał (patrz **Ryc. 1**). W tym sensie dobrym znormalizowanym miernikiem funkcjonalnym stopnia jasności odczynnika jest wskaźnik barwienia (ang. *stain index*)<sup>1</sup>, definiowany jako  $D/W$ , gdzie D jest różnicą pomiędzy populacją pozytywną a negatywną, a W jest równe 2 OS populacji negatywnej.

Gdy to samo przeciwciało jest sprzężone z różnymi barwnikami, aby wyrobić sobie opinię na temat względnego stopnia jasności barwników na danym aparacie można porównać ich wskaźniki barwienia. Opiera się to na założeniu, że właściwości chemiczne koniugacji w przypadku wszystkich odczynników zostały zoptymalizowane. Wykorzystując to założenie, **Tabela 1** przedstawia wskaźnik barwienia dla kilku różnych koniugatów CD4 przy użyciu określonych filtrów na standardowym cytometrze przepływowym BD LSR II.

Informacje w tej tabeli dają wyobrażenie o względnym stopniu jasności różnych fluorochromów na tej platformie. Prowadzi to do określenia pierwszej zasady wyboru odczynników: należy wybierać najjaśniejsze fluorochromy spośród dostępnych. Załóżmy, że posiadasz czterokolorowy panel składający się z odczynników sprzężonych z FITC, PE, PerCP-Cy™5,5 oraz APC i chcesz dodać piąty kolor. Oczywistym wyborem jest PE-Cy™7, ponieważ jest to najjaśniejszy fluorochrom, którego nie ma jeszcze w twoim panelu.

Fluorochrom	Klon	Wskaźnik barwienia
<sup>1</sup> PE-Cy5	RPA-T4	353
PE	RPA-T4	302
<sup>2</sup> APC	RPA-T4	278
<sup>2</sup> Alexa Fluor® 647	RPA-T4	214
PE-Cy7	RPA-T4	139
<sup>1</sup> PerCP-Cy5.5	RPA-T4	107
<sup>3</sup> BD Horizon™ V450	RPA-T4	85
<sup>3</sup> Pacific Blue™	RPA-T4	80
<sup>4</sup> Alexa Fluor® 488	RPA-T4	73
Alexa Fluor® 700	RPA-T4	61
<sup>4</sup> FITC	RPA-T4	56
<sup>5</sup> APC-Cy7	RPA-T4	37
<sup>1</sup> PerCP	RPA-T4	37
AmCyan	RPA-T4	25
<sup>5</sup> APC-H7	RPA-T4	24

**Tabela 1.** Przeciętny wskaźnik barwienia różnych koniugatów fluorochromów obsługiwanych zarówno na cytometrze przepływowym BD LSR II, jak i BD FACSCanto II

<sup>1,2,3,4,5</sup> Fluorochromy wymienione z tą samą liczbą w indeksie górnym są rejestrowane w tym samym detektorze, toteż normalnie nie byłoby stosowane w skojarzeniu.

### ...ale minimalizuj wzajemne nakładanie się widm

Tylko sam stopień jasności idzie tak daleko. Indeksy barwienia wymienione w **Tabela 1** są obliczane z odczynnikami uruchamianymi pojedynczo, a nie w ramach koktajlu. Gdy tylko dodane zostaną inne odczynniki, problemem staje się nakładanie widm. Im więcej kolorów próbuje się zastosować, z tym większym nakładaniem tych kolorów będzie trzeba sobie poradzić. Ze zjawiskiem tym radzimy sobie poprzez zastosowanie kompensacji, która wprowadza korektę wszystkich sygnałów w taki sposób, że na przykład populacja komórek emitujących jedynie fluorescencję PE nie wykaże żadnej fluorescencji FITC. Choć jest to w ogólności prawdziwe dla populacji, pojedyncze komórki będą wpadać powyżej lub poniżej średniej, i to poszerzenie danych jest większe, gdy nakładanie widm wprowadza dodatkowe zakłócenie.<sup>1</sup> Kompensacja nie usuwa niestety tego szumu, choć korygowana jest mediana, ponieważ pozostaje rozproszenie danych (wariancja) wynikające z rejestracji (statystyki) fotoelektronów. Skutkiem rozproszenia danych jest więc zmniejszenie czułości rozdzielczości, i stąd też indeksu barwienia w detektorze fluorescencji, na który wpływają sygnały z innych detektorów. Tak więc druga zasada wyboru odczynników brzmi: wybierając kombinację odczynników należy minimalizować potencjalne nakładania widm. Może to kolidować z zasadą pierwszą, czyli wybieraniem najjaśniejszych fluorochromów. Na przykład, PE-Cy5 jest bardzo jasny jeśli chodzi o indeks barwienia (**Tabela 1**), ale charakteryzuje się znaczącym udziałem (tj. dodaje tła) do detektora APC. Choć te dwa fluorochromy można stosować łącznie, czułość rozdzielczości w przypadku APC zostanie zredukowana na przykład w porównaniu z kombinacją PerCP-Cy5.5 i APC. Dzieje się tak w sytuacji, gdy zechcesz poświęcić pewien poziom jasności w jednym detektorze w celu uniknięcia rozmycia (i utraty czułości rozdzielczości) w innym.

### Kolory i specyficzność: Zdefiniuj właściwe kombinacje

Biorąc pod uwagę te dwie zasady, wygenerowaliśmy zestaw fluorochromów, które stanowią uzasadnione opcje wyboru do stosowania w eksperymentach wymagających 6, 8 lub większej liczby kolorów (**Tabela 2**). Należy zwrócić uwagę, że te opcje wyboru opierają się na aparatach BD (BD LSR II, sorterze komórek BD FACSAria™ II lub cytometrze przepływowym BD FACSCanto™ II) i na odczynnikach, które zwykle można nabyć z katalogu jako koniugaty przeciwciał.

Po zdefiniowaniu fluorochromów, które mają być zastosowane, można zacząć dopasowywanie specyficzności przeciwciał do poszczególnych fluorochromów, aby wybrać faktyczne koniugaty, które mają zostać zastosowane. W tym celu kwestiami kluczowymi pozostają stopień jasności i nakładanie, co ilustruje następujący przykład.

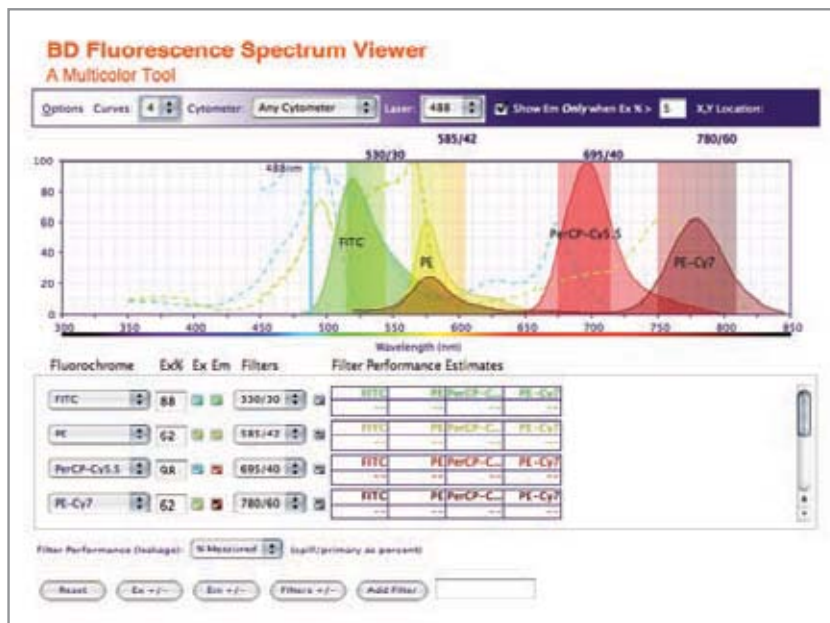
6-kolorowy	8-kolorowy	10-kolorowy
FITC or Alexa Fluor® 488	FITC or Alexa Fluor® 488	FITC or Alexa Fluor® 488
PE	PE	PE
		PE-Texas Red® or PE-Alexa Fluor® 610
PerCP-Cy5.5	PerCP-Cy5.5	PerCP-Cy5.5
PE-Cy7	PE-Cy7	PE-Cy7
APC or Alexa Fluor® 647	APC or Alexa Fluor® 647	APC or Alexa Fluor® 647
		Alexa Fluor® 680 or 700
APC-Cy7 or APC-H7	APC-Cy7 or APC-H7	APC-Cy7 or APC-H7
	AmCyan	AmCyan
	BD Horizon V450	BD Horizon V450

**Tabela 2.** Popularne opcje wyboru dla 6-, 8- i 10-kolorowych eksperymentów

Załóżmy, że chcesz przyjrzeć się barwieniu CD62L na komórkach T CD8+. Podczas, gdy białko CD8 obecne jest w dużej ilości i przeciwciała przeciw niemu barwią komórki bardzo jasno, CD62L jest względnie „ciemne” (białko nie występuje zbyt licznie na powierzchni komórki, i/lub dostępne przeciwciała wykazują małe powinowactwo). Początkowo należy rozważyć zastosowanie najjaśniejszego fluorochromu spośród dostępnych, PE, w przypadku CD62L, stosując jednocześnie ciemniejszy fluorochrom, jak FITC w przypadku CD8. FITC daje jednak znaczący udział do detektora PE (patrz **Ryc. 2**). W efekcie, w przypadku komórek CD8+, które są mocno zabarwione w detektorze FITC, wpływ na czułość rozdzielczości w przypadku PE jest negatywny w tym sensie, że rozdzielczość CD62L może być poniżej optymalnej. Istnieje wiele potencjalnych rozwiązań tego problemu, na przykład:

- 1) Przesunięcie CD8 do fluorochromu, który wykazuje mniejsze nakładanie widma z PE (jak PerCP-Cy5.5 lub APC).
- 2) Przesunięcie CD62L do detektora, który jest nadal relatywnie jasny, ale nakłada się z FITC (jak APC lub PE-Cy5). Należy zwrócić uwagę, że w tym przykładzie w detektorze FITC mocno zabarwione są tylko komórki CD8+, więc tylko komórki CD8+ przyczyniają się do rozproszenia danych w detektorze PE. Jeśli interesuje cię barwienie CD62L tylko na komórkach CD4+ (CD8-), pierwotna kombinacja odczynników (CD8 FITC, CD62L PE) będzie odpowiednia.

Przykład ten ilustruje dwie dodatkowe zasady wyboru odczynników: należy zachować najjaśniejsze fluorochromy dla ciemnych przeciwciał i odwrotnie, ale unikać wpływu sygnału z populacji jasnych komórek do detektorów wymagających wysokiej czułości w przypadku tych populacji.



Rycina 2. Zachodzenie spektralne FITC na detektor PE. Pobrane ze strony [bdbiosciences.com/spectra](http://bdbiosciences.com/spectra)

### Barwniki tandemowe: Uwaga na degradację

Ostatnim tematem, jaki należy rozważyć, jest możliwość degradacji barwników tandemowych. W obecności światła, utrwalacza i podwyższonych temperatur, APC-Cy7 i w mniejszym stopniu PE-Cy7 mogą ulegać degradacji, a więc mogą one świecić w detektorze macierzystego barwnika (APC lub PE). Proces ten rozpoczyna się często od małej subpopulacji komórek, prowadząc do zdarzeń fałszywie pozytywnych w APC lub PE.<sup>1</sup>

Problemu tego można w dużym stopniu uniknąć minimalizując ekspozycję próbek na światło, ciepło i utrwalacze na bazie formaldehydu. Dodatkowo, BD Biosciences stworzyło APC-H7, analog APC-Cy7 o zwiększonej trwałości przy ekspozycji na światło, ciepło i utrwalacze na bazie formaldehydu. Mimo to w przypadku pewnych zastosowań, istnieje dodatkowa zasada: należy wziąć pod uwagę konsekwencje degradacji barwników tandemowych oraz to, czy wpłynie to negatywnie na odczyty w detektorach APC lub PE. Jeśli tak, można zastosować różne inne konfiguracje odczynników. W sytuacjach, w których konieczne jest ostateczne utrwalanie próbek (np. próbki niosące zagrożenie biologiczne), dostępny jest stabilizujący utrwalacz, który pomaga zapobiegać degradacji APC-Cy7, utrwalający jednocześnie komórki (BD Biosciences Nr Kat. 338036). Jeśli chodzi o bardziej trwałe barwniki tandemowe, BD oferuje obecnie skoniugowane przeciwciała APC-H7.

### **Dobór kontroli do weryfikacji zestawu odczynników**

Po uwzględnieniu tych wszystkich czynników jesteś gotów, aby przetestować wielokolorowy koktajl odczynników. Aby to zrobić, istnieją dwa rodzaje kontroli, które możesz zechcieć włączyć do wstępnego testowania: kontrole dokładności i kontrole fluorescencji minus jeden (fluorescence-minus-one - FMO).<sup>2</sup> Kontrole dokładności wykorzystują dane przeciwciała samo (lub z minimum dodatkowych odczynników bramkujących) i porównują wyniki w przypadku wykorzystania tego przeciwciała w kompletnym koktajlu. Na podstawie tego można zaobserwować wpływ dodatkowych odczynników na interesujący nas odczyt, aby uzyskać pewność, że inne odczynniki nie wpływają negatywnie na ten odczyt. Kontrole FMO łączą wszystkie odczynniki w danym koktajlu, z wyjątkiem jednego interesującego nas odczynnika. Są one przydatne do mierzenia czułości poszczególnych detektorów w kontekście innych odczynników. Można je również wykorzystywać do rutynowego bramkowania tych detektorów, w przypadku których zastosowanie innych sposobów ustawiania bramek nie jest możliwe lub praktyczne. Ogólnie rzecz biorąc, po właściwym zweryfikowaniu zestawu odczynników nie ma konieczności codziennego przeprowadzania wszystkich tych kontroli.

Podsumowując, w niniejszym artykule określono zasady wyboru odczynników do wielokolorowej cytometrii przepływową. W celu uzyskania możliwie najlepszych wyników należy zrównoważyć te zasady:

---

**Zasada 1:** Należy wybrać najjaśniejszy zestaw fluorochromów dla konkretnej konfiguracji aparatu.

---

**Zasada 2:** Należy wybierać fluorochromy w taki sposób, aby zminimalizować potencjalne nakładanie widm.

---

**Zasada 3:** Należy zachowywać najjaśniejsze fluorochromy dla słabych przeciwciał i odwrotnie.

---

**Zasada 4:** Należy unikać wpływu sygnału z populacji jasnych komórek do detektorów wymagających wysokiej czułości w przypadku tych populacji.

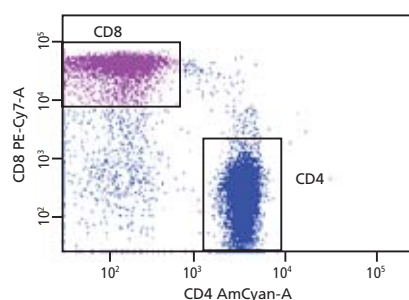
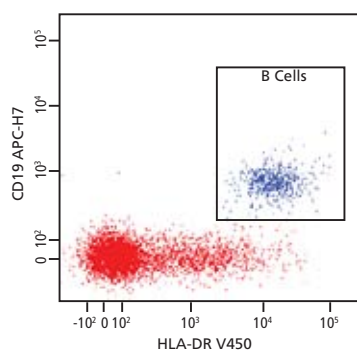
---

**Zasada 5:** Należy podjąć kroki, aby uniknąć degradacji barwników tandemowych i uwzględnić ich wpływ na wyniki.

---

Z czasem dostępne staną się sprawdzone panele odczynników wielokolorowych, zarówno w oparciu o źródła w literaturze, jak i od producentów. Projektując panele odczynników, wielu użytkowników nie będzie musiało zaczynać od zera. Niemniej jednak, biorąc pod uwagę ogromną różnorodność zastosowań wielokolorowej cytometrii przepływową, większość badaczy znajdzie się czasem w sytuacji, w której będą musieli samodzielnie wybrać wielokolorowe odczynniki. Mamy nadzieję, że te zasady okażą się pomocne.

W celu uzyskania szerszych informacji na temat odczynników do wielokolorowej cytometrii przepływową, prosimy odwiedzić stronę [bdbiosciences.com/colors](http://bdbiosciences.com/colors).



**Rycina 3.** Przykład wykorzystania odczynników bramkujących (CD4, CD8, CD19) przy użyciu niekonwencjonalnych koniugatów z fluorochromami wzbudzonymi przez laser niebieski, czerwony i fioletowy.

### Odczynniki do wielokolorowej cytometrii przepływowej

Rozszerz swoją cytometrię wielokolorową o opcje wykraczające poza pięć typowych kolorów.

- BD Biosciences nadal rozszerza ofertę wielokolorowych odczynników, aby pomóc w wytyczających nowe drogi badaniach przy wykorzystaniu rozszerzonych możliwości detekcji fluorescencji w naszych cytometrach przepływowych.
- Oferujemy przeciwciała sprzężone bezpośrednio z fluorochromami, które wykraczają poza naszych pięć typowych kolorów, dostarczając kolorów do laserów fioletowych, czerwonych i niebieskich. Obejmują one koniugaty AmCyan, BD Horizon V450, Alexa Fluor® 700 i PE-Cy7, mające wspomóc barwienie 9-kolorowe gotowymi odczynnikami.
- Program BD Biosciences Custom Conjugation\* oferuje więcej opcji wyboru do projektowania wielokolorowych eksperymentów. Program oferuje wiele kolorów, co przedstawiono w **Tabeli 3**.

\* W celu uzyskania szerszych informacji na temat programu Custom Conjugation Program, prosimy skontaktować się z przedstawicielem BD ds. sprzedaży

Fluorochrom	Ex Max (nm)
Alexa Fluor® 488	495
Alexa Fluor® 594	590
Alexa Fluor® 647	650
Alexa Fluor® 680	679
Alexa Fluor® 700	696
AmCyan	457
APC	650
APC-Cy7	650
BD APC-H7	650
BD Horizon V450	404
FITC	494
Pacific Blue™	401
PE-Cy5	496, 564
PE-Cy7	496, 564
PerCP	482
PerCP-Cy5.5	482
PE-Texas Red®	496, 564
Texas Red®	595

**Tabela 3.** Koniugaty dostępne w BD Biosciences w programie Custom

### Piśmiennictwo

1. Maecker HT, Frey T, Nomura LE, Trotter J (2004) Selecting fluorochrome conjugates for maximum sensitivity. *Cytometry A* 62:169-173

2. Baumgarth N, Roederer M (2000) A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods* 243:77-97

Tabela 4. Specyfikacje fluorochromów BD Biosciences

Fluorochrom	Kolor Emisji Fluorescencji	Ex-Max (nm)	Linia Lasera Wzbudzającego (nm)	Em-Max (nm)	BD FACScan™	BD FACScalibur™	BD FACSCanto™	BD FACSCanto™ II	BD FACSVantage™ SE	BD™ LSR	BD™ LSR II	BD FACSAria™ family	BD FACSArray™	BD Influx™
BD Horizon V450	Niebieski	404	405, 407	448				•	•		•	•		•
Pacific Blue™	Niebieski	401	405, 407	452				•	•		•	•		•
AmCyan	Zielony	457	405, 407	491				•	•		•	•		•
Alexa Fluor® 488	Zielony	495	488	519	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
FITC	Zielony	494	488	519	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
PE	Żółty	496, 564	488, 532	578	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
PE-Texas Red®	Pomarańczowy	496, 564	488, 532	615	•			•	•	•	•	•		•
Texas Red®†	Pomarańczowy	595	595	615					•					
APC*	Czerwony	650	595, 633, 635, 647	660		•	•	•	•	•	•	•	•	•
Alexa Fluor® 647	Czerwony	650	595, 633, 635, 647	668		•	•	•	•	•	•	•	•	•
PE-Cy5*	Czerwony	496, 564	488, 532	667	•	•			•	•	•	•		•
PerCP	Czerwony	482	488, 532	678	•	•	•	•		•	•	•		•
PerCP-Cy5.5	Daleka Czerwień	482	488, 532	695	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Alexa Fluor® 700	Daleka Czerwień	696	633, 635	719				•	•		•	•		•
PE-Cy7	Podczerwień	496, 564	488, 532	785	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
APC-Cy7	Podczerwień	650	595, 633, 635, 647	785			•	•	•	•	•	•	•	•
BD APC-H7	Podczerwień	650	595, 633, 635, 647	785			•	•	•	•	•	•	•	•

\* APC i PE-Cy5 mogą być stosowane łącznie na aparatach z kompensacją międzylaserową.  
 † Detekcja Texas Red® wymaga lasera barwnikowego w przypadku wzbudzenia 595-600 nm.



**BD Biosciences**  
 ul. Królowej Marysieńki 90  
 02-954 Warszawa  
 tel.: + 48 22 651 62 52  
 faks: + 48 22 651 75 89  
[www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com)