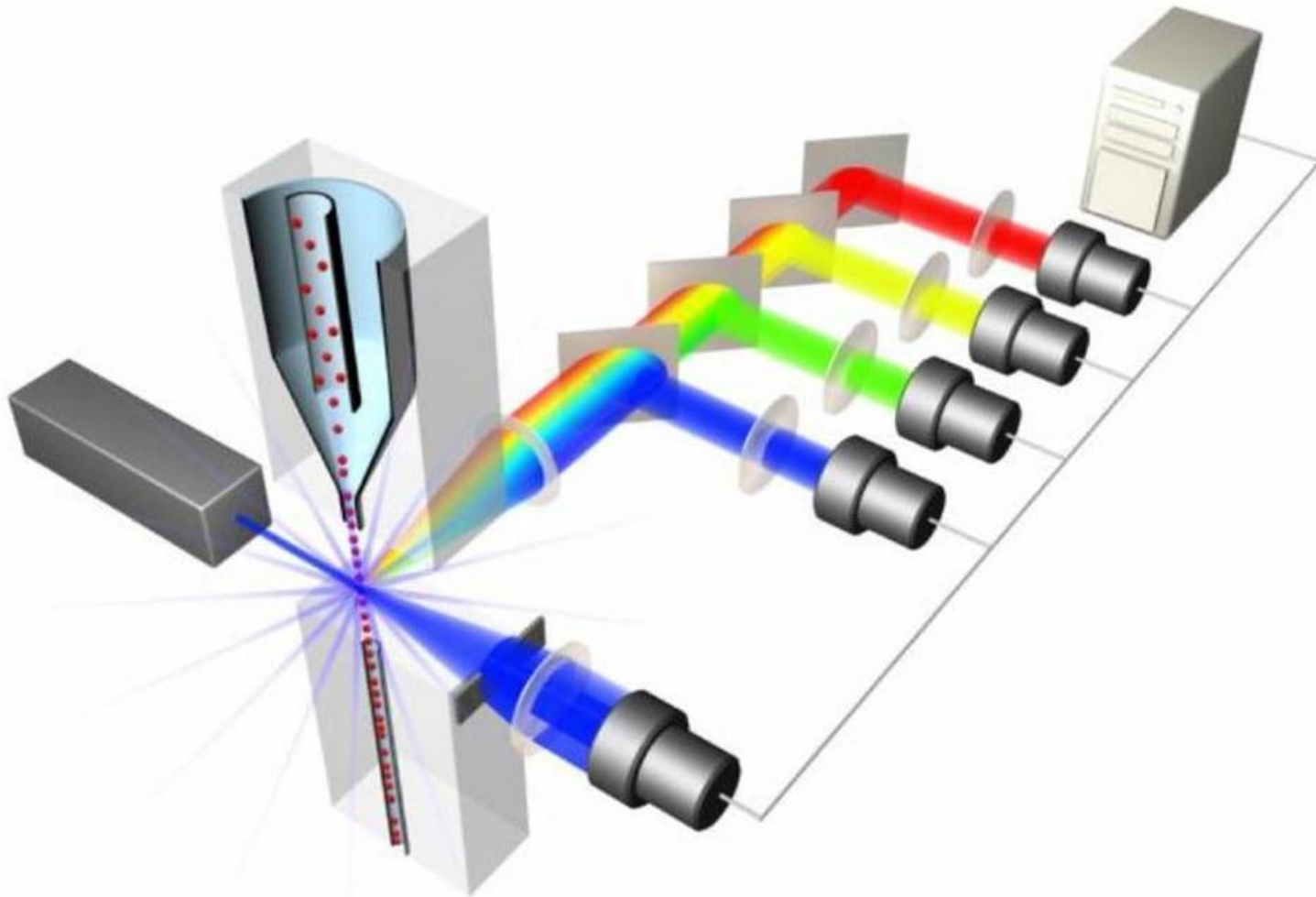


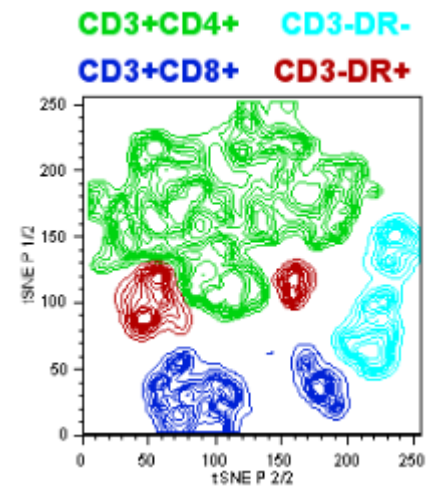
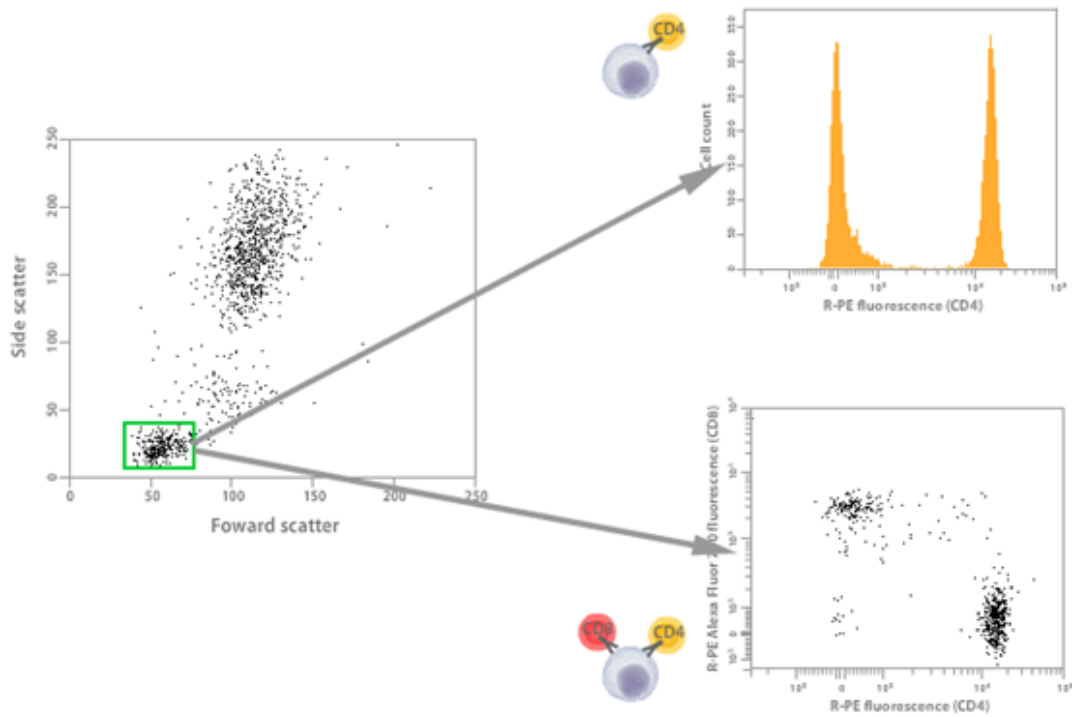


CYTOMETRIE

MVDr. Jozef JANDA, PhD.

PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE





MOŽNOSTI CYTOMETRIE

- Vstupní materiál - suspenze jednotlivých buněk (nebo jiných objektů)
- Rychlost – $10^4/s$
- Počet parametrů – až 20
- Velikosti objektů – 5-10um (0.2-40um)
- Automatizace – měření z 96-jamkových destiček
- Analýza mnohoparametrických dat



VYUŽITÍ CYTOMETRIE

- Počítání buněk
- Imunofenotypizace – hematologie, onkologie, imunologie
- Funkční testy – fagocytóza, degranulace, produkce cytokinů, metabolická aktivita, fosforylace signálních molekul, exprese transkripčních faktorů
- Životnost, buněčná smrt, apoptóza
- Buněčný cyklus, proliferace
- Exprese fluorescenčních proteinů
- Fluorescenční sondy – pH, ionty, redox potenciál, fluorescenční substráty enzymatických reakcí
- Mikrobiologie
- Multiplex bead assays
- Sortování buněk, příp. organel



CYTOMETRIE NA PŘF UK

- Viničná 7 – S007
 - BD LSRII, BC CytoFlex, AutoMACS
 - Jozef Janda, Galina Kislik
- BIOCEV - IMCF
 - BD LSRFortessa, BD FACSAria Fusion
 - Galina Kislik, Petra Prokšová, Markéta Dalecká
- Katedra botaniky - Benátská





BD LSR II
Ondra
4-laser, 18-color



AutoMACS
Adela
Magnetic sorter

Viničná



BC CytoFlex S
Oliver
4-laser, 13-color

Biocev



BD LSRFortessa
5-laser, 18-color



BD FACSaria Fusion
Cell sorter
5-laser, 18-color



<u>Cytoflex optical configuration</u>							
Violet 405nm				Yellow-Green 561nm			
V1	450/45		BV421, <u>PacBlue</u> , DAPI	G1	585/42		PE
V2	525/40		BV510, <u>KromeOrange</u>	G2	610/20		PE-TR, ECD, PI
V3	610/20		BV605	G4	690/50		PE-Cy5.5
V4	660/20		BV650	G5	780/60		PE-Cy7
Blue 488nm				Red 638nm			
B1	525/40		FITC	R1	660/20		APC
B4	690/50		<u>PerCP</u>	R2	712/25		Alexa700
SSC	488/10		SSC	R3	780/60		APC-Cy7



PROVOZ LABORATOŘE

- Samostatné používání přístrojů – po proškolení
- Laboratoř zabezpečuje údržbu, kalibraci, školení uživatelů, podporu při plánování experimentů, nastavení cytometrů, vlastním měření, analýze dat, interpretaci výsledků
- Přístup k licencím cytometrického software (FlowJo, Kaluza, CytExpert, FACSDiva)
- Pracovníci laboratoře
 - Jozef Janda (Po, St, Pá) jozef.janda@natur.cuni.cz
 - Galina Kislik (Út, Čt) galina.kislik@natur.cuni.cz



NOVÍ UŽIVATELÉ

- První kontakt: cytometrie@natur.cuni.cz
- Schůzka ohledně projektu (cíle, druh materiálu, příprava vzorku, výběr reagensí)
- Školení
- Přístup do rezervačního systému
- Samostatné měření



CENY A ÚČTOVÁNÍ

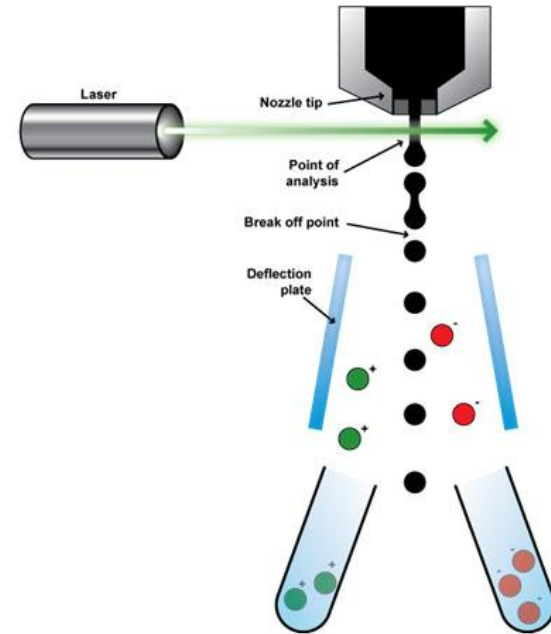
- Uživatelé platí za využitý strojový čas – fakturace 1x ročně na základě rezervací v kalendáři
- Interní ceny
 - LSRII 300Kč/h
 - CytoFlex 200Kč/h

 - Fortessa 350Kč/h
 - Aria 550Kč/h



FACS SORTING

- FACS Aria Fusion v Biocevu
- 5-laser, 18+2 parameter
- 4-way sorting,
- index sorting into 96-well plates
 - Connection to downstream OMICs or functional assays
- temperature control



MAGNETICKÁ SEPARACE (MACS)

- AutoMACS
- Magneticky značené protilátky
 - Převážně lidské a myší markery
 - Sekundární protilátky – anti-Ig, anti-FITC, streptavidin
- Kolóny v magnetickém poli
- Pozitivní/negativní selekce
- Programy pro vyšší čistotu nebo výtěžek



FUTURE OUTLOOK

- Mass cytometry
- Image mass cytometry
- Spectral cytometry
- Tissue cytometry
- Large particle analysis/sorting – up to mm range
- Single cell sorting for OMICs
 - Immunophenotyping using nucleotide-tagged Ab



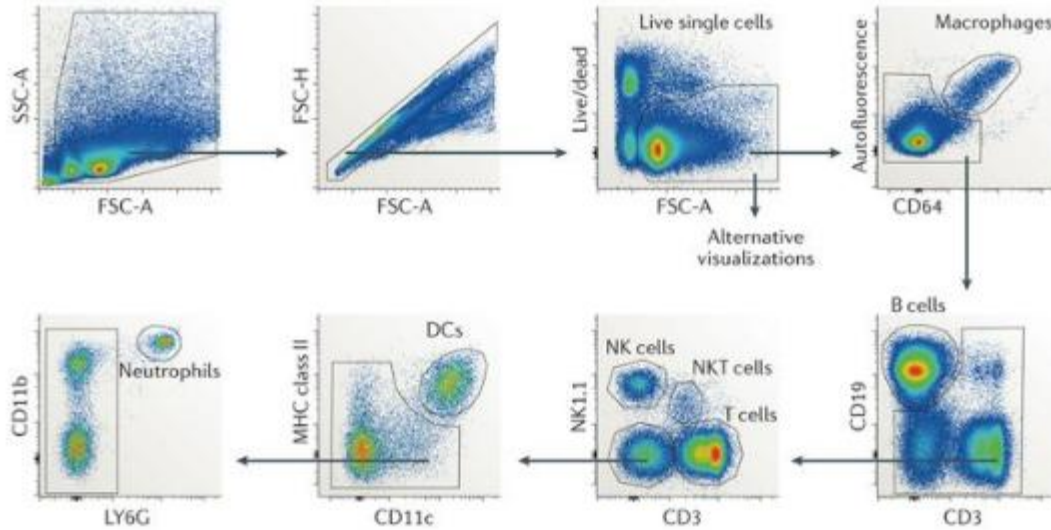
VYUŽITÍ CYTOMETRIE

- Počítání buněk
- Imunofenotypizace – hematologie, onkologie, imunologie
- Funkční testy – fagocytóza, degranulace, produkce cytokinů, metabolická aktivita, fosforylace signálních molekul, exprese transkripčních faktorů
- Životnost, buněčná smrt, apoptóza
- Buněčný cyklus, proliferace
- Exprese fluorescenčních proteinů
- Fluorescenční sondy – pH, ionty, redox potenciál, fluorescenční substráty enzymatických reakcí
- Mikrobiologie
- Multiplex bead assays
- Sortování buněk, příp. organel

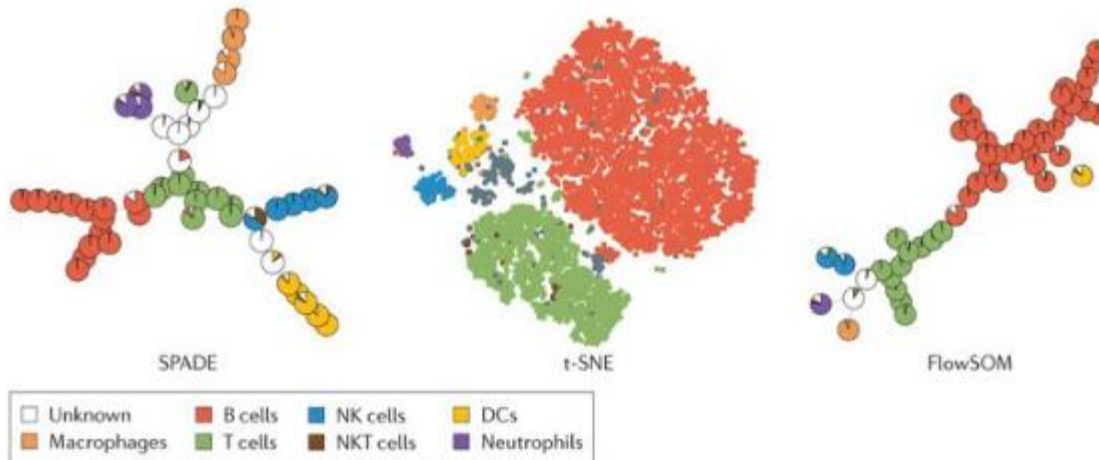


MNOHOBAREVNÁ CYTOMETRIE

a Manual gating

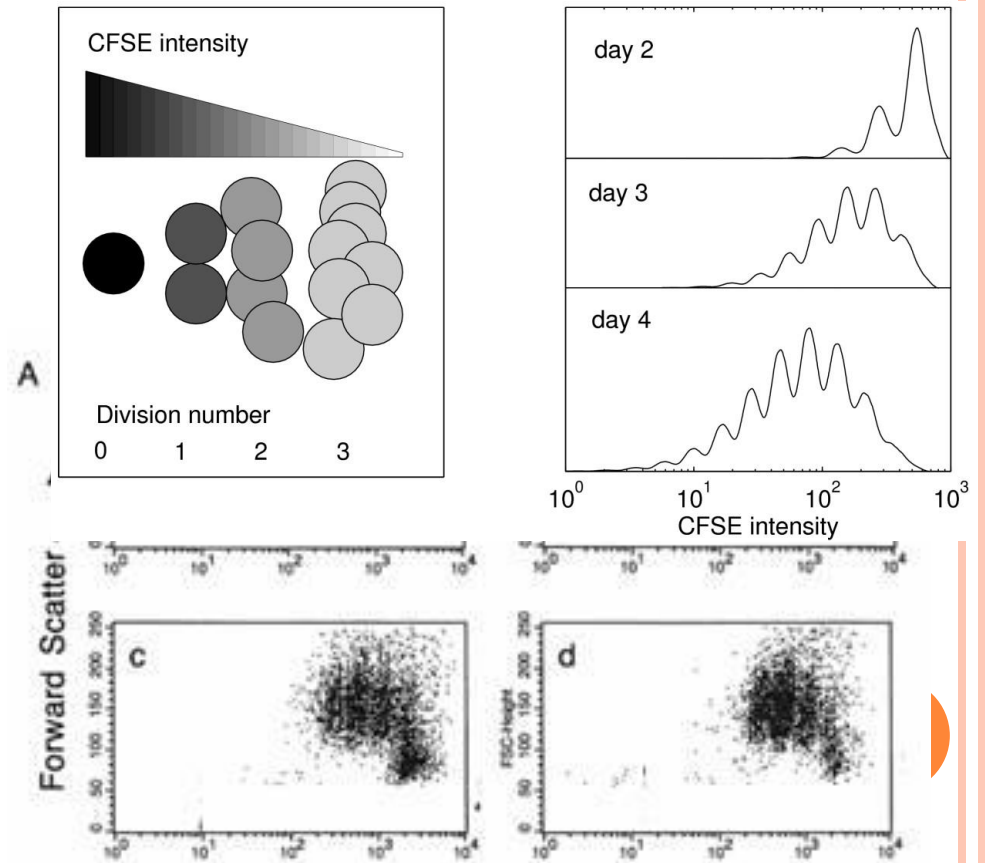


b Mapping of the manual gating



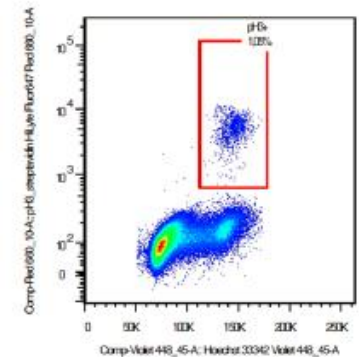
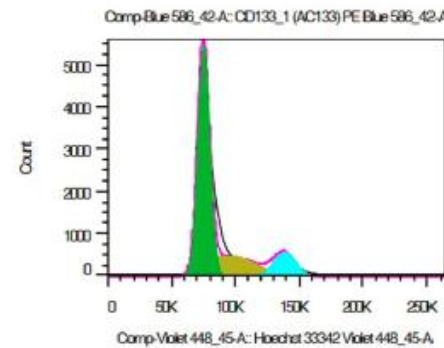
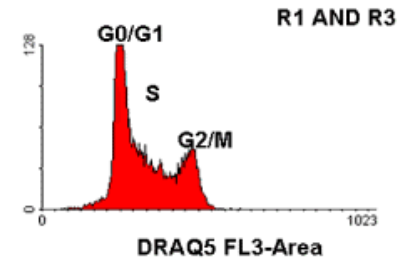
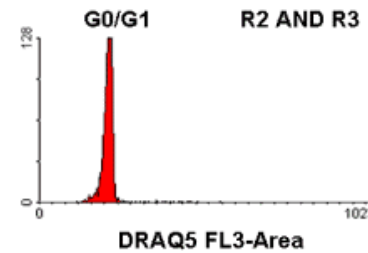
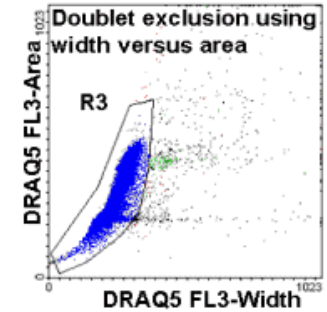
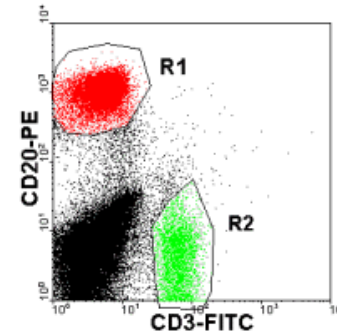
PROLIFERACE

- Ředění barvičky (např. CFDA-SE)
- Inkorporace BrdU
- Ki67



BUNĚČNÝ CYKLUS

- Obsah DNA
- Expresce cyklinů
- Fosforylace H3
- Fucci



APOPTÓZA

- Fosfatidylserin - AnnexinV
- Fragmentace DNA – Tunel assay
- Mitochondriální potenciál
- Aktivita kaspáz

