

Einführung in die Durchflußzytometrie

BD Biosciences
Customer Education



BD Biosciences
Tullastr. 8-12
69126 Heidelberg
Tel. (06221) 305-0
Fax (06221) 305-216
www.bd.com

Modfit Lz™, QuantiCALC™ und WinList™ sind Markennamen der Verity Software House, Inc.,
BD, BD Logo und alle anderen Warenzeichen sind Eigentum von Becton, Dickinson and Company. © 2000

Was leistet ein Durchflußzytometer?

- ☛ Die Durchflußzytometrie quantifiziert im Vergleich zur Mikroskopie simultan mehrere optische Eigenschaften (Parameter) kompletter Zellen mit hoher Durchsatzrate. Die Mikroskopie mit der räumlichen Auflösung der Zellen wird jedoch nicht ersetzt.
- ☛ Die Meßgeschwindigkeit beträgt maximal 4000 Zellen pro Sekunde (BD FACSCalibur™).

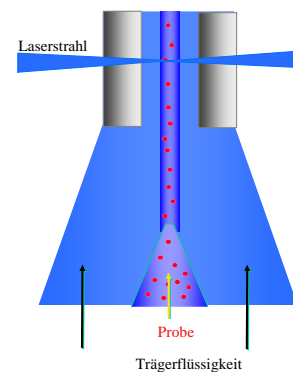
3

Was ist Durchflußzytometrie?

- ☛ Suspendierte Einzelzellen werden durch einen Lichtstrahl (Laser) geführt. Dabei senden die Zellen in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Probenvorbereitung charakteristische Lichtsignale aus, die mittels geeigneter Detektoren nachgewiesen werden.

2

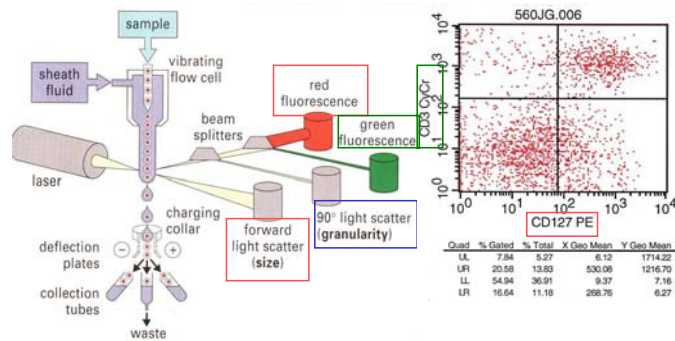
Wie funktioniert die Durchflußzytometrie?



- ☛ Durch die Trägerflüssigkeit wird eine laminare Strömung erzeugt (Hüllstrom).
- ☛ Durch die Querschnittsverengung in der Meßküvette wird sowohl der laminare Proben- als auch der Hüllstrom beschleunigt und dadurch verjüngt (**hydrodynamische Fokussierung**). Beide Strömungen vermischen sich dabei nicht!
- ☛ Der Abstand zwischen direkt aufeinanderfolgenden Zellen wird vergrößert, so daß die Zellen jeweils einzeln den Laserstrahl passieren und damit als einzelne Zelle gemessen werden. Verklebte Zellen werden nicht vereinzelt!

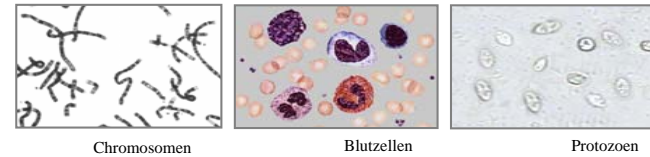
4

Fluorescence Activated Cell Sorter



5

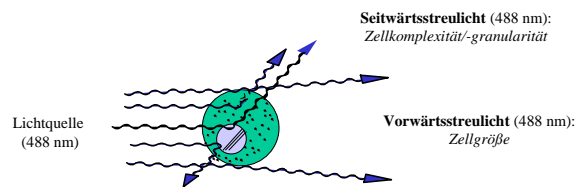
Welche Parameter lassen sich von diesen Partikeln messen ?



- Ihre relative Größe (Vorwärtsstreulicht - FSC)
- Ihre relative Granularität oder ihre interne Komplexität (Seitwärtsstreulicht - SSC)
- Ihre spezifische Fluoreszenz (FL1, FL2, FL3, FL4...) und die entsprechende relative Fluoreszenzintensität

7

Die Merkmale des FSC und des SSC



Vorwärtsstreulicht (FSC) - Lichtbeugung

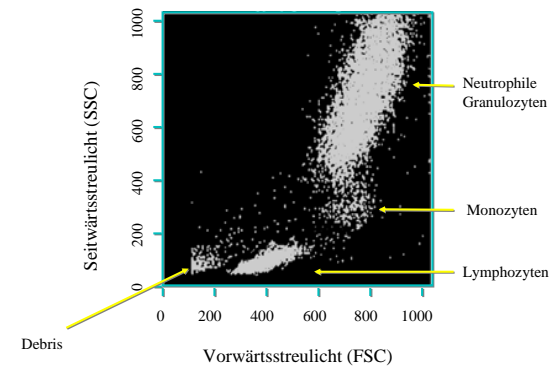
- proportional zur Zelloberfläche (Zellgröße)
- gemessen entlang der Achse des einfallenden Lichtes

Seitwärtsstreulicht (SSC) - Lichtbrechung und Reflexion

- proportional zur Zellkomplexität oder -granularität
- gemessen in einem 90° Winkel zum einfallenden Licht

6

Beispiel für FSC/SSC: Lysiertes Vollblut



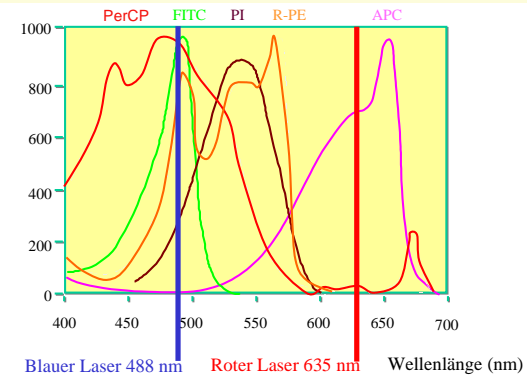
8

Wie werden die Fluoreszenzen gemessen?

- ↳ abhängig vom Gerätetyp
 - 3-4 Fluoreszenzen (1-2 Laser): BD FACSCalibur™
 - 3-6 Fluoreszenzen (1-3 Laser): BD LSR
- ↳ abhängig von der Probenvorbereitung
- ↳ die Wellenlänge ist vom jeweils eingesetzten Fluorochrom abhängig
- ↳ Fluoreszenzen werden im 90° Winkel zum einfallenden Licht gemessen

9

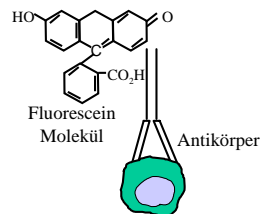
Absorptionsspektren gebräuchlicher Fluorochrome



11

Wie entsteht Fluoreszenzlicht?

$\lambda = 488 \text{ nm}$ (blau)
Energie des einfallenden Lichtes

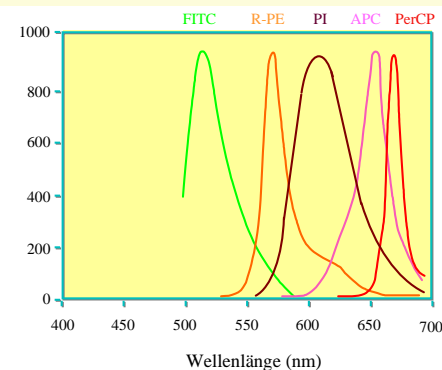


$\lambda \approx 519 \text{ nm}$ (grün)
Energie des emittierten Fluoreszenzlichtes

- ↳ Das Fluorochrom absorbiert die Energie des Laserlichtes
- ↳ Das Fluorochrom gibt die absorbierte Energie wieder frei:
 - ↳ Schwingungsenergie und Wärme
 - ↳ Emission eines Photons mit einer größeren Wellenlänge (= geringere Energie)
 - ↳ Die Wellenlängendifferenz zwischen Absorption und Emission wird **Stoke's-Shift** bezeichnet.

10

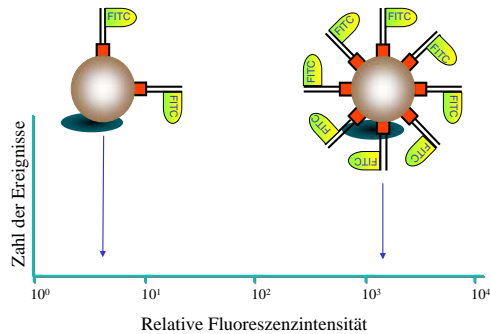
Emissionsspektren (= Fluoreszenzspektren) gebräuchlicher Fluorochrome



12

Fluoreszenzintensität

Das emittierte Fluoreszenzlicht ist proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrommoleküle



13

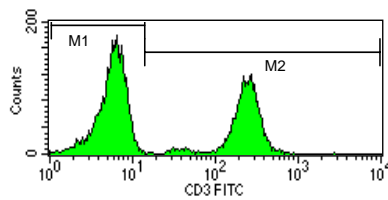
Anwendungen der Durchflußzytometrie im klinischen Labor

- ✦ HIV-Immunphänotypisierung (z.B. BD SimulSET™)
- ✦ CD4 Absolutzahlen (z.B. BD MultiSET™)
- ✦ Leukämien- und Lymphom- Immunphänotypisierung (BD CellQuest™, BD CellQuest Pro™)
- ✦ Zellzyklus und Analyse von Tumoren (Modfit LT™)
- ✦ Retikulozytenzählung (BD Retic-COUNT™)
- ✦ Cross-Match-Analytik (Organtransplantationen)
- ✦ Messung CD34-positiver hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen (BD ProCOUNT™)
- ✦ Bestimmung von Restleukozyten (rWBC) in Thrombozyten- oder Erythrozytenkonzentraten (BD LeucoCOUNT™)

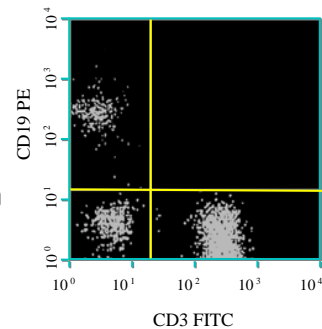
15

Darstellung von Zellanalysen

Häufigkeitsverteilung
Histogramm



Punktwolken-Darstellung
Dot Plot



14

Anwendungen der Durchflußzytometrie in Forschungslaboren

- ✦ Immunfunktions- Studien
- ✦ Hämatopoese der Stammzellen
- ✦ Multi-drug resistance Studien (Krebs)
- ✦ Kinetische Studien (Zellfunktion)
- ✦ Plättchenanalyse (Herzkranzgefäßverengung)
- ✦ Messung von Mikroorganismen (Bakterien, Protozoen, Hefen)
- ✦ Umweltanalysen z.B. des Wassers (Giardia, Cryptosporidium)
- ✦ FISH und Flow

16