

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского

И.В. Балалаева

Проточная цитофлуориметрия

Учебно-методическое пособие

Рекомендовано методической комиссией биологического факультета для студентов ННГУ, обучающихся по направлению «Биология» (магистратура)

Нижний Новгород
2014

УДК 576.5
ББК Е.0,55
Б20

Б20 Балалаева И.В. Проточная цитофлуориметрия: Учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2014. – 75 с.

Рецензент: д.б.н., **В.В. Новиков**

В настоящем пособии представлены теоретические сведения об устройстве и принципе работы проточного цитофлуориметра, дано описание лабораторных работ практикума по использованию проточной цитофлуориметрии для решения исследовательских задач клеточной биологии и иммунологии.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов старших курсов биологического факультета ННГУ, обучающихся по направлению «Биология» (магистратура). Пособие также представляет интерес для студентов других естественнонаучных и медицинских специальностей при изучении оптических методов исследования биологических объектов.

Ответственный за выпуск:
председатель методической комиссии биологического факультета ННГУ
д.п.н., профессор И.М. Швец

УДК 576.5
ББК Е.0,55

© **И.В. Балалаева, 2014**
© **Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского, 2014**

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ПРИНЦИП РАБОТЫ ПРОТОЧНОГО ЦИТОФЛУОРИМЕТРА	5
1.1. Назначение проточного цитофлуориметра	5
1.2. Принципиальная схема устройства.....	5
1.3. Оптическая система и анализируемые параметры	8
1.4. Общие принципы анализа данных	13
2. ПРОТОЧНЫЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТР FACSCalibur	16
2.1. Особенности конструкции и управления	16
2.2. Процедура включения прибора	21
2.3. Процедура выключения прибора	22
2.4. Сбор данных в программе CellQuest Pro	23
2.5. Анализ данных в программе CellQuest Pro	29
3. ПРАКТИКУМ ПО ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ.....	38
3.1. Иммунофенотипирование лимфоцитов крови человека	38
3.2. Анализ механизма клеточной гибели	49
3.3. Анализ клеточного цикла методом ДНК-цитометрии.....	59
ЛИТЕРАТУРА	71
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	72
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	73

ВВЕДЕНИЕ

Проточная цитофлуориметрия как новый метод исследования клеток возникла и стала развиваться во второй половине XX века. Основная идея, послужившая толчком для создания этого метода – ускорение и автоматизация рутинного микроскопического исследования в лабораторной диагностике. Почти одновременно с появлением первого “проточного микроскопа” в 60-х гг были реализованы и подходы, которые позволяли анализировать клетки без получения их микроскопических изображений, а также проводить некоторые манипуляции с анализируемыми клетками.

К началу XXI века коммерческие проточные цитофлуориметры заняли прочное место в исследовательских лабораториях и медицинских учреждениях. Спектр областей их применения охватывает клеточную и молекулярную биологию, микробиологию, ботанику, иммунологию, эмбриологию, генетику и т.д. В практической медицине проточная цитофлуориметрия используется в гематологии, бактериологии, вирусологии, онкологии, медицинской иммунологии, причем данный список постоянно расширяется.

Современные проточные цитофлуориметры представляют собой довольно сложные устройства, требующие от оператора хорошего знания как биологии, так и ряда физических дисциплин, в первую очередь оптики и гидродинамики. Цитофлуориметры позволяют исследовать морфо-функциональное состояние индивидуальных клеток в потоке на основе измерения оптических, а в некоторых случаях и электрических свойств. Исключительно высокая производительность этих приборов позволяет собирать и анализировать большие массивы данных, объединяющие информацию о десятках и сотнях тысяч клеток.

В настоящее время существует также целый ряд приборов, позволяющих не только анализировать оптические свойства клеток, но и сортировать клетки с учетом этих свойств (так называемые “клеточные сортеры”). После сортировки собранные популяции клеток или выделенные индивидуальные клетки могут быть использованы исследователем для своих задач – последующего культивирования, введения экспериментальным животным, других методов анализа и т.п. Клеточные сортеры не являются предметом данного пособия и в дальнейшем не рассматриваются.

1. ПРИНЦИП РАБОТЫ ПРОТОЧНОГО ЦИТОФЛУОРИМЕТРА

1.1. Назначение проточного цитофлуориметра

Проточный цитофлуориметр – это прибор, позволяющий измерять оптические свойства индивидуальных клеток в суспензии.

Использование суспензии клеток является необходимым условием, поскольку измерение производится в токе жидкости. Большинство существующих в настоящее время приборов измеряют такие параметры клеток, как светорассеяние под разными углами и флуоресценция в различных диапазонах спектра.

В отличие от оптического микроскопа, проточная цитофлуориметрия не является методом визуализации, изображения клетки в процессе работы прибор не получает. Однако, необходимо отметить, что в последнее время на рынке появляются приборы, совмещающие функции цитофлуориметра и микроскопа.

Высокая производительность проточных цитофлуориметров обеспечивает измерение до нескольких десятков тысяч клеток в секунду, при этом для каждой клетки, в зависимости от конструкции прибора, может измеряться от 5 до 14 и более параметров. Анализ собранных данных позволяет выделить популяции клеток, обладающие теми или иными свойствами, определить их относительное и абсолютное содержание в образце.

Проточная цитофлуориметрия позволяет анализировать клетки (бактерии, одноклеточные водоросли, дрожжи, клетки животных и растений), а также другие частицы, такие как изолированные ядра, хромосомы и т.п. Кроме этого, развиваются специализированные методы анализа растворимых молекул с применением полимерных микросфер с конъюгированными антителами.

1.2. Принципиальная схема устройства

В упрощенном виде работу проточной системы прибора можно представить следующим образом (рис. 1):

- суспензия клеток из пробирки с образцом забирается специальной иглой (1);
- клетки узкой струей впрыскиваются в центр ламинарного потока проточной жидкости, представляющей собой буферный раствор, изотоничный по отношению к клеткам (2).

Забор образца из пробирки и проточной жидкости из соответствующего резервуара осуществляется за счет подачи избыточного давления (3);

- поток жидкости с клетками протекает через проточную ячейку (4), где происходит измерение оптических свойств клеток;
- после прохождения проточной ячейки поток жидкости собирается в слив (5).

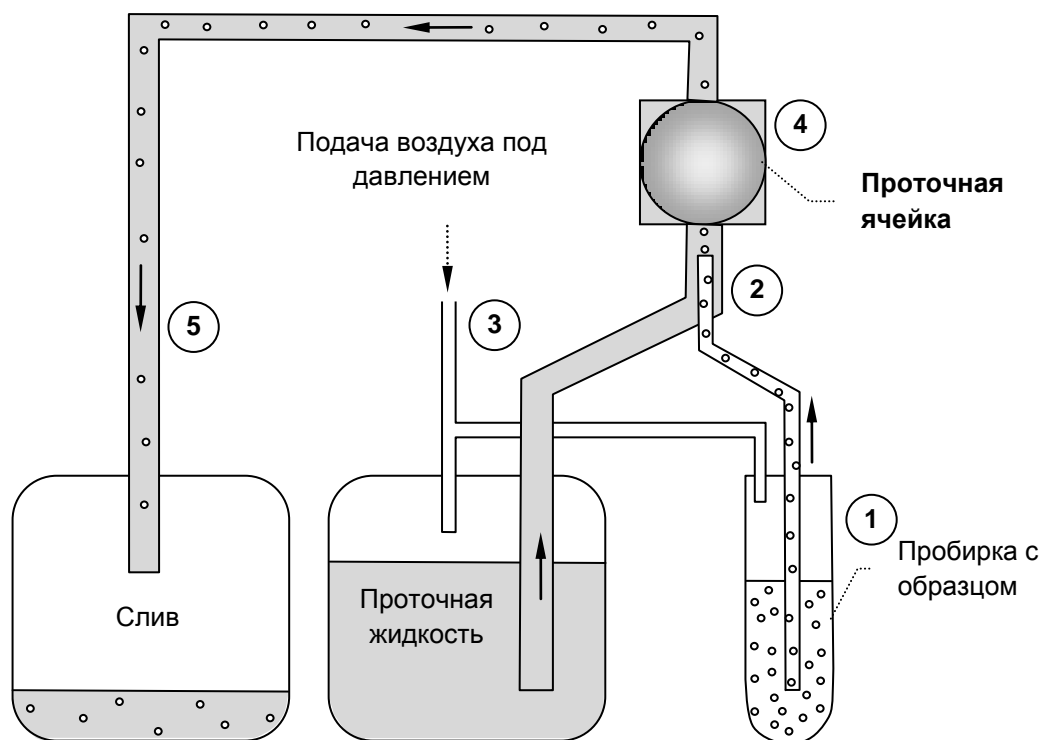


Рис. 1. Принципиальная схема проточной системы цитофлуориметра. Объяснения в тексте

Измерение оптических свойств клетки осуществляется в *проточной ячейке* – ключевом элементе цитофлуориметра.

Цитофлуориметры различных моделей могут существенно отличаться по конструкции проточной ячейки, однако в целом её принципиальная схема может быть представлена, как показано на рисунке 2. Ламинарный поток жидкости протекает по тонкому каналу в кювете из оптически прозрачного материала (кварц). В одном из участков канала в его центре сфокусирован лазерный луч, и клетки в потоке последовательно пересекают эту точку (рис. 2 Б). В момент пересечения клеткой этого участка рассеянный ею свет лазера, а также флуоресценция регистрируются оптической системой прибора.

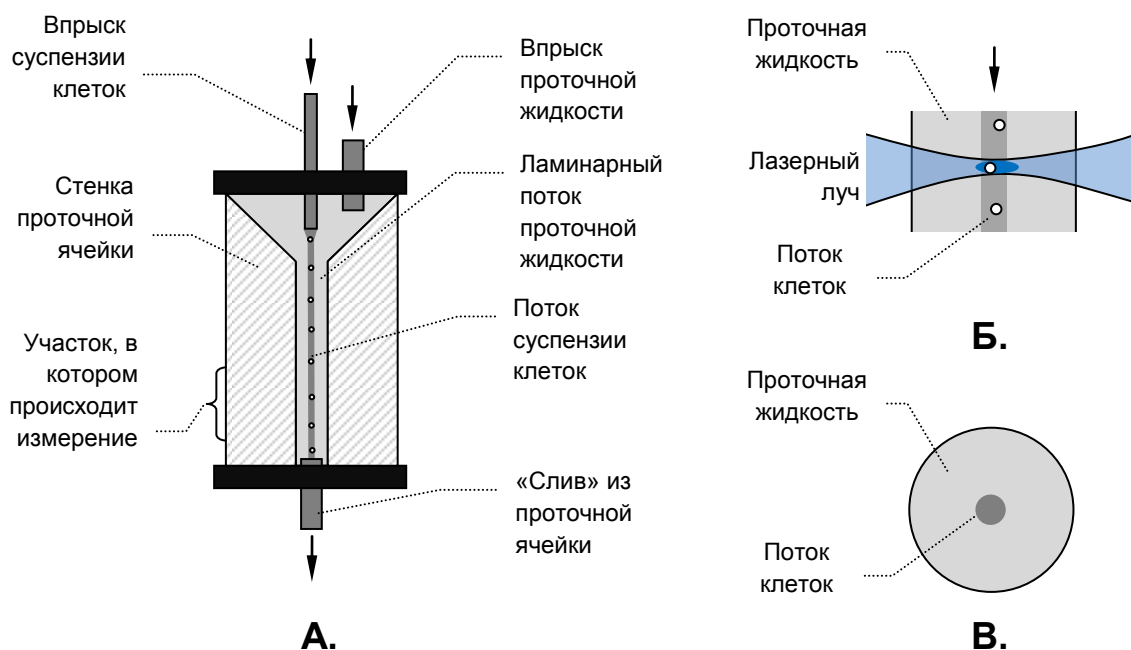


Рис. 2. Схема устройства типичной проточной ячейки (А); отдельно показаны участок, в котором клетка в потоке пересекает сфокусированный лазерный луч, (Б) и поперечный разрез ламинарного потока (В)

Диаметр лазерного луча в точке фокуса составляет около 20 мкм вдоль проточного канала и 60 мкм поперек него. Эти размеры обеспечивают быстрое пересечение клеткой пучка (при этом избегается ситуация, когда в пучке одновременно находятся несколько клеток) и достаточно равномерное освещение по всей ширине потока клеток. Однако, интенсивность света в луче неодинакова – в центре она выше, а к краям существенно уменьшается. Поперечный профиль интенсивности лазерного луча соответствует распределению Гаусса. Для примера, клетка, отклонившаяся от центра такого луча на 30 мкм, получит только 13,5% интенсивности света по сравнению с той, что окажется строго в центре. В связи с этим, для стабильности результатов очень важно, чтобы клетки пересекали лазерный луч строго определенным образом, одна за другой, без отклонения от потока.

Центрирование клеток в проточной ячейке осуществляется за счет строго организованного потока жидкости (*гидродинамическое фокусирование*). Именно для этой цели необходимо поддержание ламинарности потока, т.е. перемещение жидкости слоями/струями без их перемешивания (рис. 2 В). Поток клеток в центре не смешивается с окружающей его проточной жидкостью. Диаметр потока клеток регулируется за счет давления проточной жидкости – чем меньше это давление, тем шире поток клеток, и наоборот.

Ламинарность потока является важнейшим условием корректности измерения. Увеличение точности измерения можно достичь увеличением давления проточной жидкости. При этом сужается поток клеток; количество клеток, пересекающих лазерный луч в единицу времени, также снижается; фокусировка клеток относительно центра ламинарного потока улучшается; инструментальная погрешность измерения снижается. Напротив, уменьшение давления проточной жидкости и увеличение диаметра потока клеток приводит к увеличению количества клеток, пересекающих лазерный луч в единицу времени, это позволяет значительно ускорить анализ, однако точность измерения становится существенно ниже.

1.3. Оптическая система и анализируемые параметры

Оптическая система проточного цитофлуориметра включает один или несколько монохроматических лазерных источника света и систему детектирования сигнала.

При прохождении клеткой лазерного луча происходят следующие события:

- 1) часть света рассеивается клеткой;
- 2) часть энергии света поглощается и расходуется в тепло, на протекание фотохимических процессов, либо вновь высвечивается в виде света (флуоресценция), как правило, с меньшей энергией кванта;
- 3) часть света проходит без изменения, не взаимодействуя с клеткой.

Для анализа свойств клеток используются процессы 1) и 2), при этом в последнем случае анализируется флуоресценция.

Анализ прямого светорассеяния

Детектор прямого светорассеяния (*FSC*, от англ. “forward scatter”) располагается по ходу лазерного луча и собирает излучение, рассеянное в пределах малых углов (2-16°, значения зависят от модели прибора). Центральная часть *FSC*-детектора экранирована, поэтому нерассеянное лазерное излучение им не регистрируется.

В отсутствие клеток или других частиц лазерный луч попадает на экранированную часть детектора. При прохождении клетки через лазерный луч часть излучения рассеивается и попадает на боковые части детектора. Зарегистрированный сигнал преобразуется детектором в электрический

импульс, величина которого пропорциональна количеству попавшего на детектор света.

Появление сигнала FSC свидетельствует о прохождении какого-либо объекта через лазерный луч и используется для подсчета количества объектов*.

Объекты бóльшего размера, как правило, приводят к бóльшей величине малоуглового светорассеяния. В связи с этим, величина FSC-сигнала позволяет косвенно судить о величине объекта (рис. 3 А).

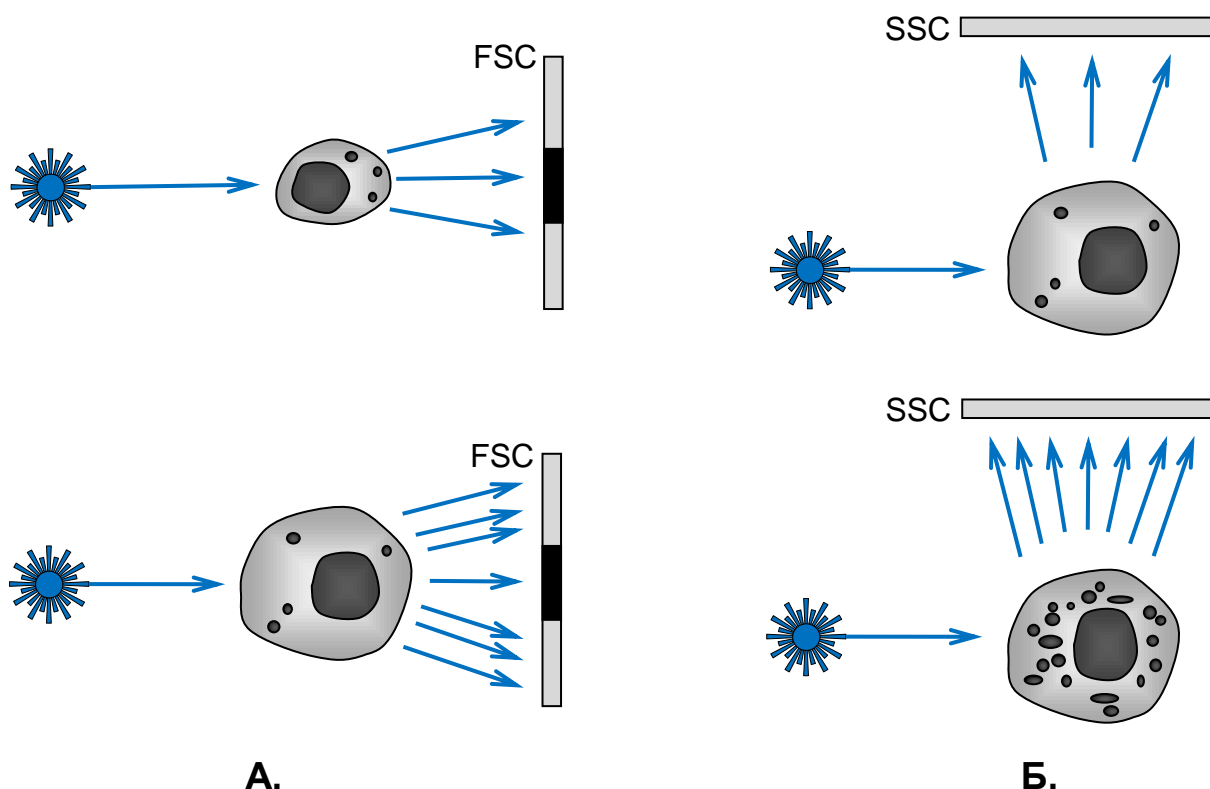


Рис. 3. Схема, иллюстрирующая принцип интерпретации данных о светорассеянии объектов:

А – сигнал прямого светорассеяния (FSC) выше от более крупных объектов;

Б – сигнал бокового светорассеяния (SSC) выше от объектов бóльшей гранулярности

* В терминологии специалистов по проточной цитофлуориметрии единичный сигнал от объекта принято называть “событием” (англ. “event”). Соответственно, речь идет о подсчете событий.

Анализ бокового светорассеяния

Детектор бокового светорассеяния (*SSC*, от англ. “side scatter”) располагается под углом в 90° относительно направления лазерного луча и собирает излучение, рассеянное в пределах больших углов ($75-105^\circ$, значения зависят от модели прибора).

Рассеяние света под большими углами является следствием многократного преломления и рассеяния луча лазера при прохождении через клетку. Регистрация этого излучения позволяет судить о сложности внутреннего строения клетки (наличие гранул, везикул, других внутриклеточных включений, соотношение ядро-цитоплазма и т.п.).

Объекты более сложной внутренней структуры, как правило, приводят к бóльшей величине светорассеяния на больших углах. В связи с этим, величина *SSC*-сигнала позволяет косвенно судить о гранулярности объекта (рис. 3 Б).

Комбинация *FSC* и *SSC* позволяет судить о морфологии клетки в целом и даже без анализа флуоресценции является довольно информативной при анализе популяций клеток в образце.

Анализ флуоресценции

Система для регистрации флуоресценции состоит из комплекса дихроичных зеркал, светофильтров и детекторы флуоресценции (*FL*, от англ. “fluorescence”), каждый из которых регистрирует излучение в строго определенном диапазоне длин волн.

Анализ флуоресценции клеток позволяет получить наибольшее количество информации об исследуемом образце, поскольку даже клетки с идентичной морфологией могут отличаться по составу белков и других макромолекул в зависимости от выполняемой функции, стадии клеточного цикла и т.д. Флуоресценция клетки может возникать как за счет собственных химических соединений (автофлуоресценция), так и за счет применения специальных красителей. Применяются красители, специфически связывающиеся с теми или иными структурами и компонентами клеток (например, пропиридиум йодид, связывающийся с ДНК) или конъюгаты красителей с моноклональными антителами, специфичными к определенным мембранным и цитоплазматическим антигенам клетки. Подход с использованием антител к мембранным антигенам является наиболее распространенным в проточной цитофлуориметрии.

В простейшем случае, при использовании только одного красителя, интенсивность флуоресценции свидетельствует о количестве сайтов связывания красителя с клеткой: в случае ДНК-специфичного красителя – о количестве ДНК в клетке, в случае антител – об экспрессии соответствующих антигенов на поверхности клетки и т.п. (рис. 4).

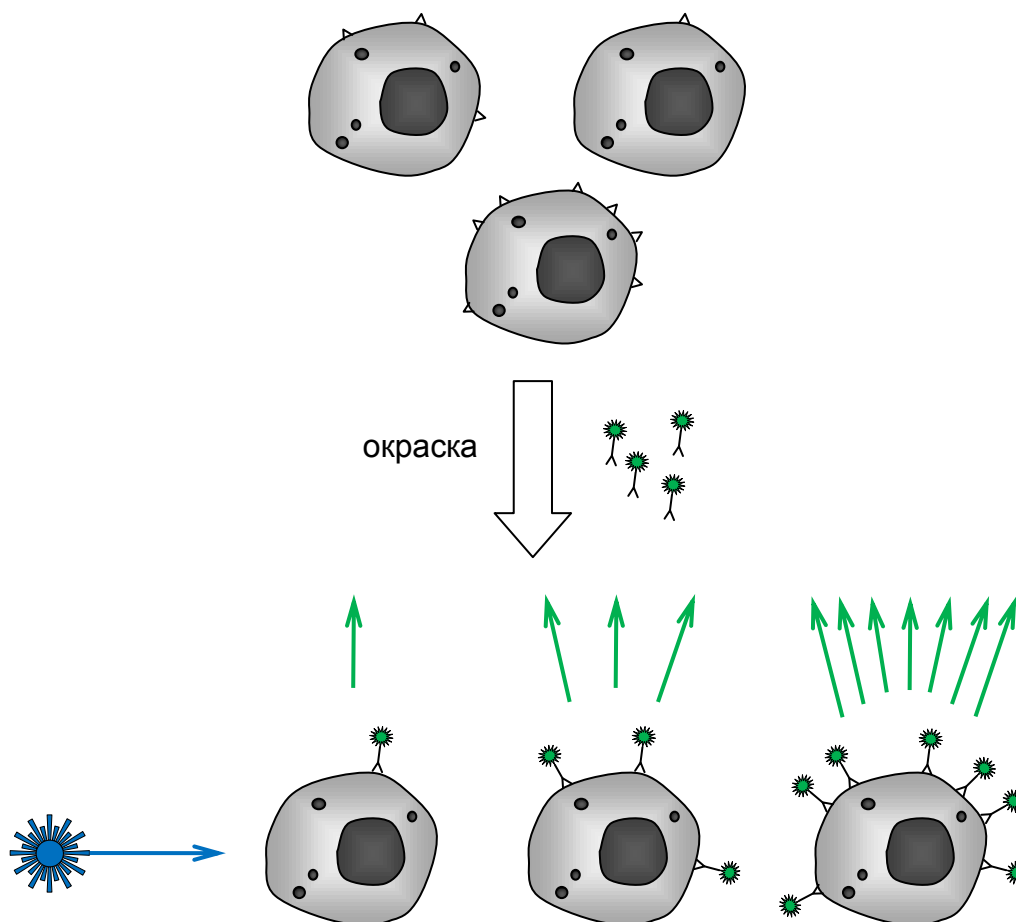


Рис. 4. Схема, иллюстрирующая принцип интерпретации данных о флуоресценции объектов при использовании одного красителя: интенсивность флуоресценции свидетельствует о количестве сайтов связывания красителя с клеткой

Одновременное использование нескольких красителей позволяет выделить популяции клеток с различным сочетанием исследуемых признаков (рис. 5). В частности, такой подход является очень важным при анализе содержания в крови различных фракций лейкоцитов, каждая из которых отличается уникальным сочетанием поверхностных белков – кластеров дифференциации. Все антитела с красителями при этом вносятся в суспензию клеток одновременно, но каждая клетка связывается только с антителами, специфичными к экспрессируемому ею антигенам.

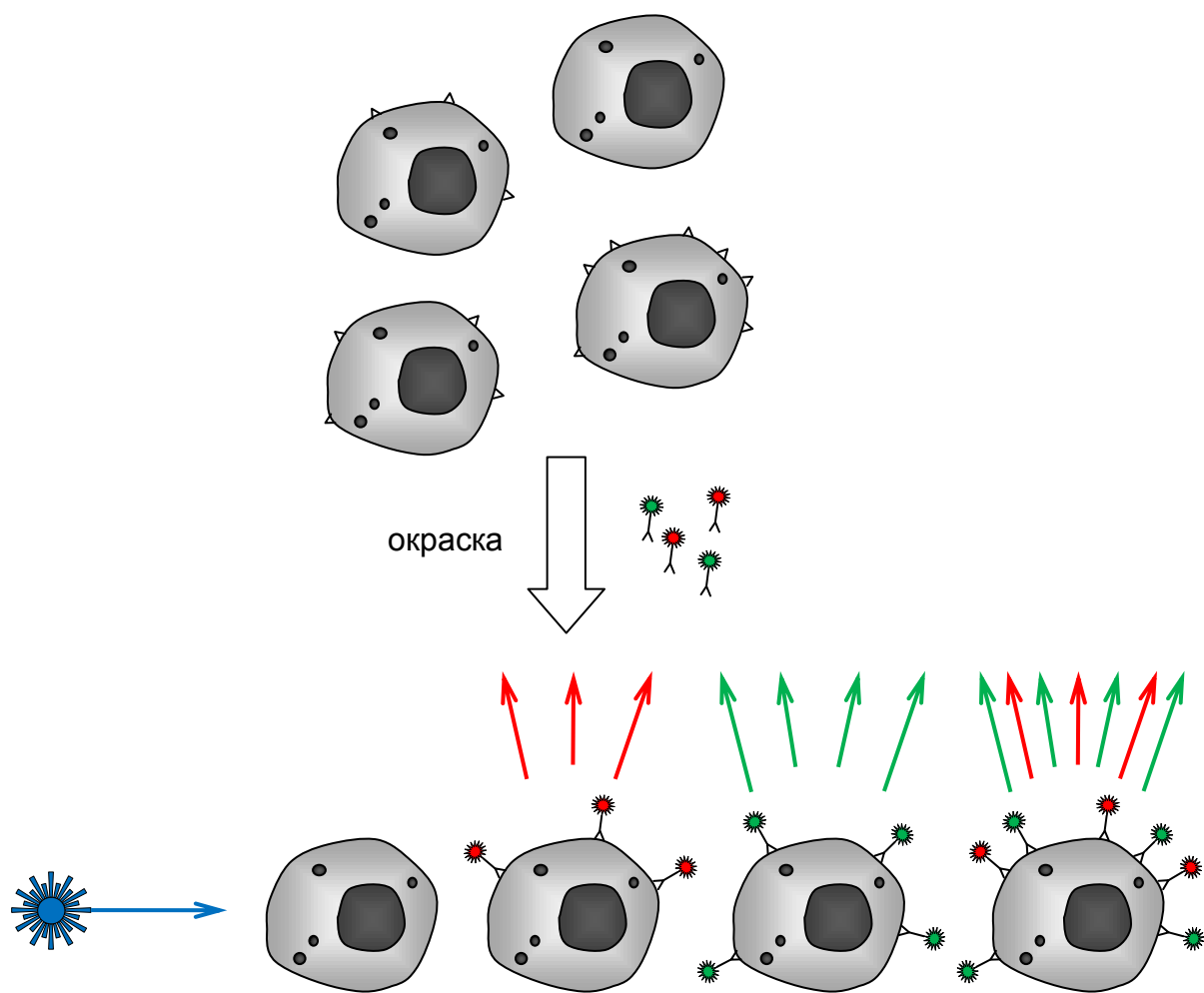


Рис. 5. Схема, иллюстрирующая принцип интерпретации данных о флуоресценции объектов при использовании нескольких красителей: сопоставление интенсивности сигнала на разных детекторах позволяет выделить в образце популяции клеток с различным сочетанием исследуемых признаков

При выборе красителя для проведения анализа необходимо учитывать, что его оптические свойства должны соответствовать возможностям прибора:

- длина волны хотя бы одного из лазерных источников должна попадать в спектр возбуждения красителя;
- в системе детектирования сигнала должен быть хотя бы один канал FL, позволяющий принять сигнал флуоресценции красителя.

Наиболее часто используемые в проточной цитофлуориметрии красители приведены в приложении 1.

Работа с двумя и более красителями требует учитывать, насколько широки и насколько перекрываются между собой их спектры флуоресценции. Широкий спектр флуоресценции красителя приводит к тому, что при его возбуждении сигнал регистрируется не только в основном FL-канале, но и в

соседних (рис. 6). Это может привести к неправильной интерпретации результатов. В частности, в приведенном на рисунке 6 примере сигнал от зелёного красителя флуоресцеина изотиоцианата (FITC) регистрируется как в канале FL1 (530/30*), так и в каналах FL2 (585/42) и FL3 (650 LP).

Для всех существующих в настоящее время проточных цитофлуориметров существуют алгоритмы *компенсации* перекрытия спектров флуорофоров.

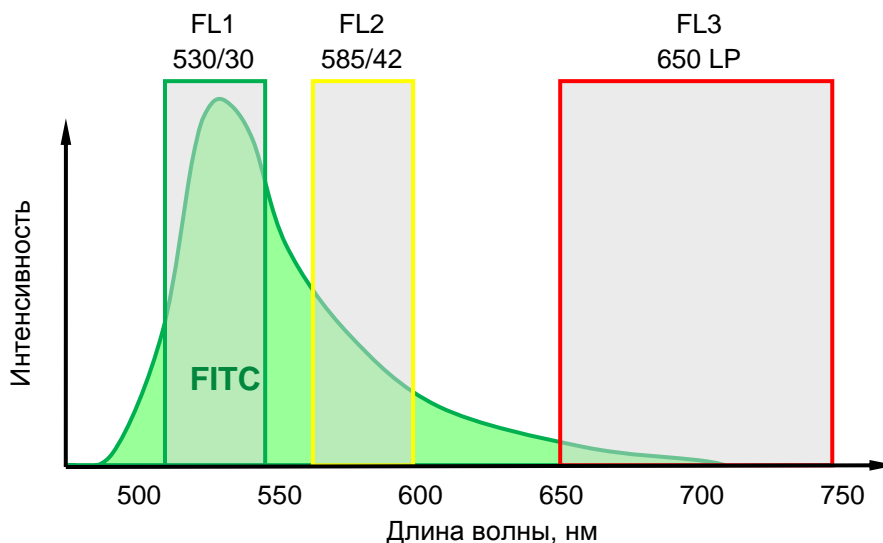


Рис. 6. Спектр флуоресценции красителя FITC и его сопоставление с каналами регистрации флуоресцентного сигнала

1.4. Общие принципы анализа данных

При попадании света на детектор светорассеяния или флуоресценции генерируется электрический ток, который в дальнейшем усиливается системой обработки сигнала, преобразуется в значения напряжения и оцифровывается для дальнейшего анализа.

* При описании спектральных характеристик оптических элементов используются следующие обозначения: 530/30 означает фильтр, пропускающий излучение с центральной длиной волны 530 нм и шириной полосы пропускания 30 нм. Аналогично расшифровывается 585/42. Обозначение LP указывает на фильтр, пропускающий излучение с длиной волны больше указанной, SP – с длиной волны короче указанной.

Схема формирования сигнала при прохождении клеткой лазерного луча показана на рисунке 7: сигнал постепенно нарастает при вхождении клетки в луч (1), достигает максимума, когда клетка достигает центра луча с максимальной интенсивностью излучения (2) и затем спадает (3). После оцифровки для электрического импульса рассчитывается его высота (H, от англ. “height”), ширина (W, от англ. “weight”) и площадь (A, от англ. “area”).

Незначительные колебания тока детектора в отсутствие образца, а также присутствие “мусора” в токе жидкости приводят к появлению небольших изменений напряжения. Для того чтобы прибор не учитывал их при подсчете и анализе событий, устанавливается некое пороговое значение напряжения, ниже которого изменения не учитываются.

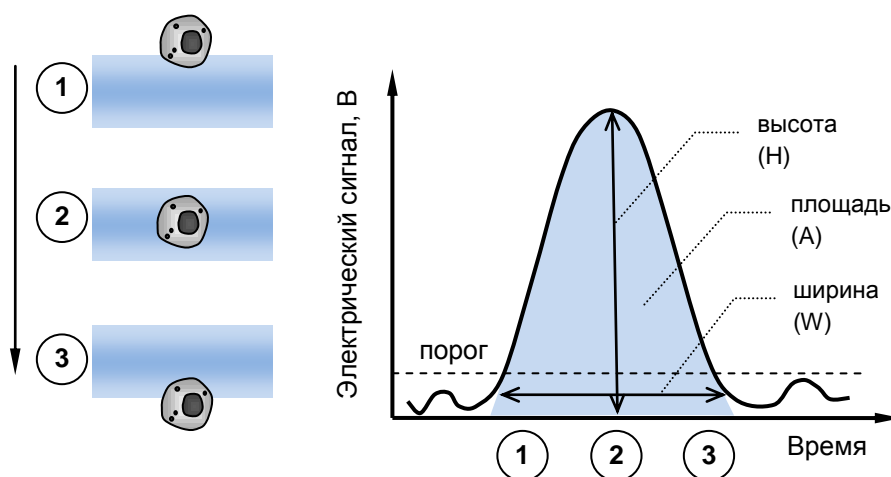


Рис. 7. Схема, формирования электрического сигнала при прохождении клеткой лазерного луча и основные параметры его анализа. Объяснения в тексте

Если прибор оснащен двумя и более лазерными источниками, то в нем предусмотрено совмещение данных, полученных при последовательном прохождении одной клеткой разных лазерных лучей. Это осуществляется за счет точного измерения времени, затрачиваемого клеткой на путь от одного лазера до другого и автоматического учета этого времени программой сбора данных.

Результатом измерения образца является сформированный файл, в котором в виде таблицы записаны данные со всех рабочих детекторов для каждого из зарегистрированных событий (объектов). Для облегчения обработки полученных данных они могут быть представлены в графическом виде (рис. 8).

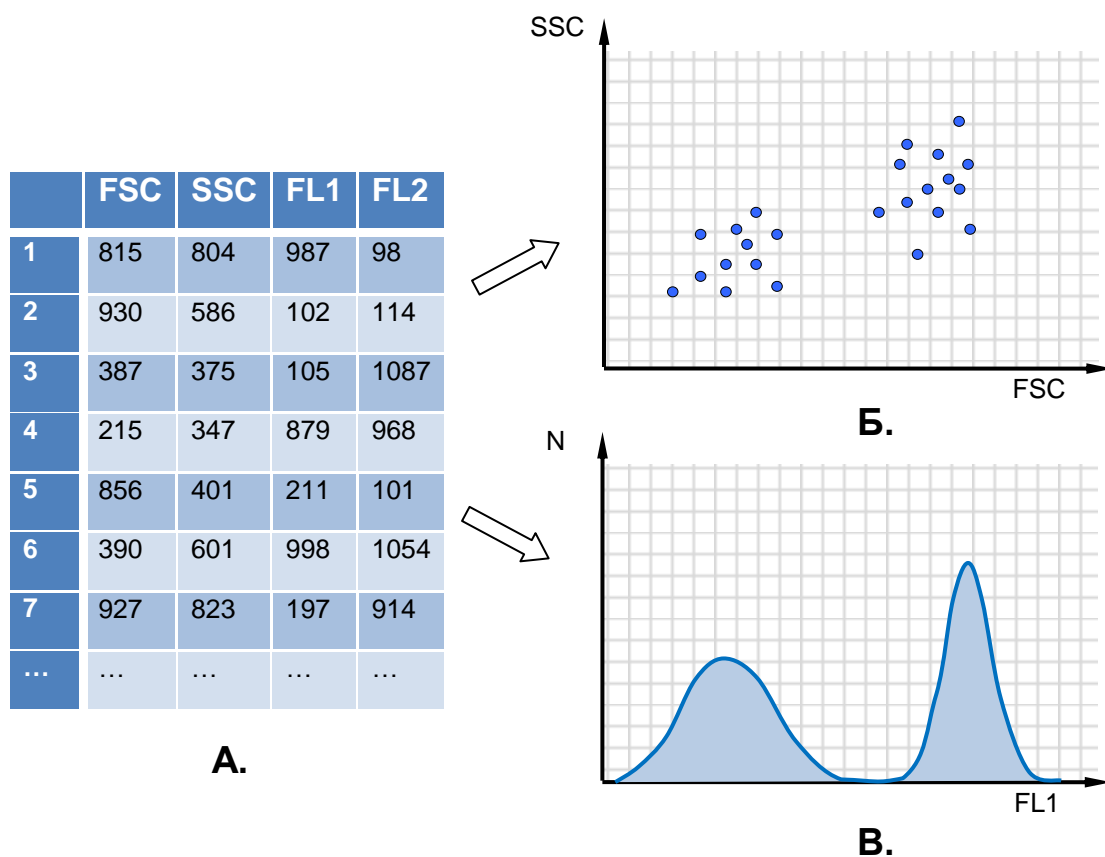


Рис. 8. Основные формы представления результатов проточной цитофлуориметрии: таблица данных (А), точечная диаграмма, на осях X и Y которой отложены любые два выбранные параметра (Б), гистограмма, на оси X которой отложен один из параметров, а на оси Y – количество событий, зарегистрированных для каждого из значений выбранного параметра (В)

Наиболее распространенными формами графического представления данных являются точечная диаграмма (рис. 8 Б) и гистограмма (рис. 8 В). В первом случае на осях диаграммы откладываются любые два из измеренных параметров. Каждое из событий отображается точкой, координаты X и Y которой соответствуют значениям сигнала для выбранных параметров. Во втором случае для отображения на гистограмме выбирается только один параметр, значения которого откладываются по оси X. По оси Y откладывается количество событий для каждого из значений X.

Программное обеспечение, используемое для получения и анализа данных проточной цитофлуориметрии, позволяет с помощью различных инструментов выделять на полученных графиках произвольные группы событий (клеток), определять их процентное соотношение, сравнивать степень выраженности исследуемого признака у разных популяций, проводить статистический анализ и т.д.

2. ПРОТОЧНЫЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТР FACSCalibur

2.1. Особенности конструкции и управления

Внешний вид проточного цитофлуориметра FACSCalibur (BD, США) показан на рисунке 9.

Питание цитофлуориметра осуществляется от сети переменного тока через трансформатор, подающий на прибор ток 117 В / 21 А. Кнопка включения электропитания цитофлуориметра находится справа внизу на боковой панели прибора (1).

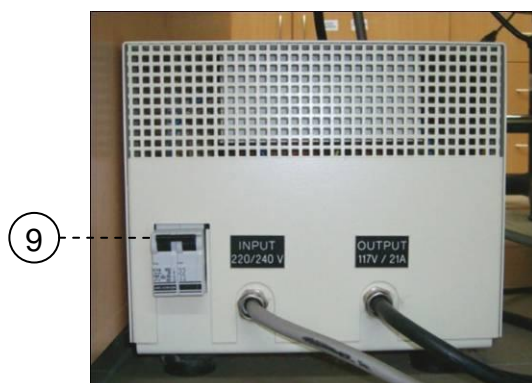
Загрузка образца осуществляется из стандартных полистирольных или полипропиленовых пробирок Falcon ёмкостью 5 мл (12×75 мм). При работе пробирка с образцом (4) устанавливается в порт подачи образца (2) над поворотным столиком (3). Забор образца осуществляется иглой из нержавеющей стали, оснащенной системой удержания капель (5). При центральном положении поворотного столика (под пробиркой с образцом) на образец подается давление и происходит его забор иглой. При повороте столика вправо или влево забор образца прекращается, оператор имеет возможность сменить пробирку, а система удержания капель предупреждает разбрызгивание остатков образца в игле и загрязнение рабочего места.

Использование стандартных пробирок является необходимым условием работы: для создания избыточного давления при заборе образца (подробнее см. п. 1.1) необходимо плотное прилегание горлышка пробирки к уплотнительному кольцу в верхней части забирающей пробу иглы.

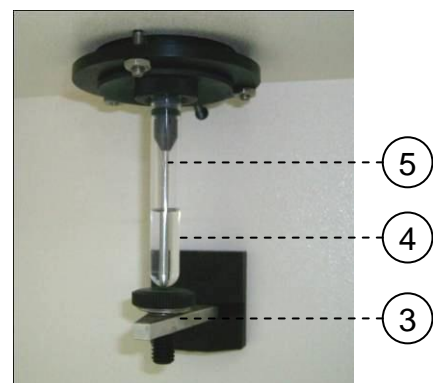
В выдвигающемся контейнере (6) размещены резервуар и фильтр для проточной жидкости, резервуар для слива отработанной жидкости, а также соединяющие трубки подачи жидкости и воздуха (рис. 10). Резервуары с проточной и отработанной жидкостью объемом 4 л снабжены датчиками уровня жидкости. При работе прибора в резервуаре с проточной жидкостью создается избыточное давление, в связи с этим для предохранения его от разрыва на резервуаре сверху закреплен металлический кожух. При необходимости, например для наполнения или смены резервуара, подачу давления можно отключить с помощью тумблера.



A.



Б.



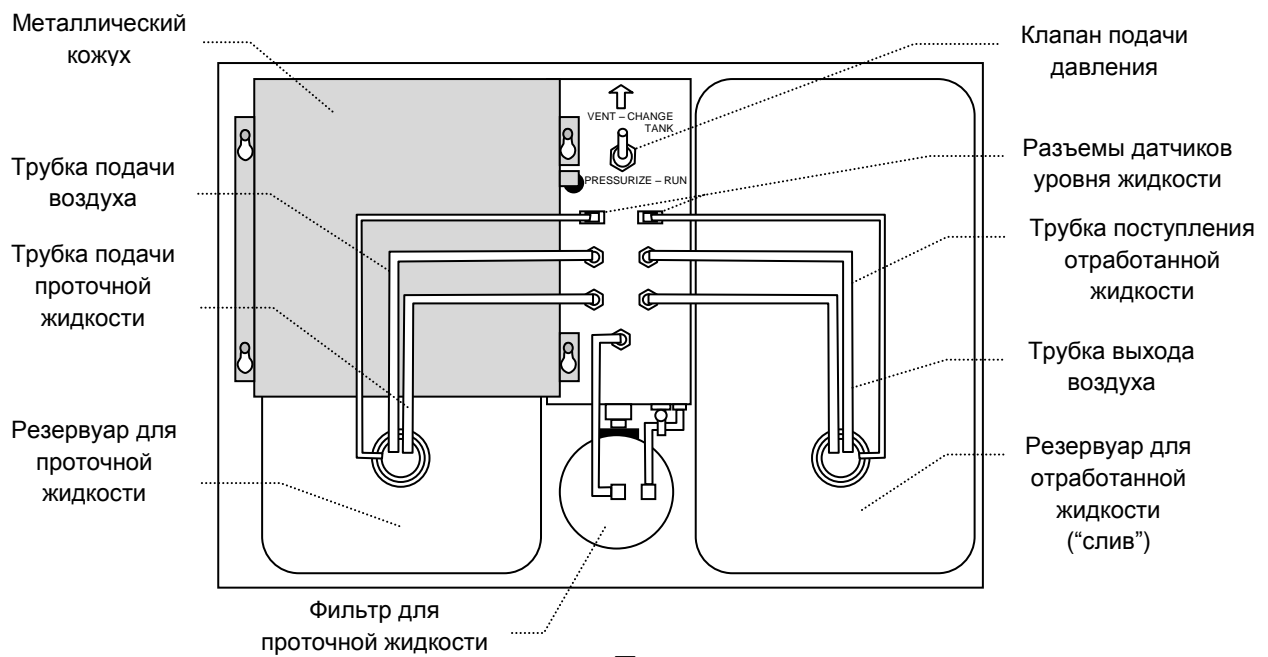
В.

Рис. 9. Внешний вид проточного цитофлуориметра FACSCalibur (А); отдельно показаны трансформатор (Б) и устройство порта подачи образца (В):

- 1 – кнопка включения электропитания,
- 2 – порт подачи образца,
- 3 – поворотный столик,
- 4 – пробирка с образцом,
- 5 – игла забора пробы,
- 6 – выдвигающийся контейнер для резервуаров с жидкостью,
- 7 – лицевая панель управления,
- 8 – крышка оптического и электронного отделения прибора,
- 9 – тумблер трансформатора



A.



Б.

Рис. 10. Внешний вид (А) и схема устройства (Б) выдвигающегося контейнера для резервуаров с жидкостями

Справа на передней панели расположены кнопки управления скоростью подачи образца и режимом работы прибора (7). Функции кнопок приведены в таблице 1.

Таблица 1
Функции кнопок на лицевой панели управления FACSCalibur

Обозначение	Функция
RUN	Подача образца в систему. При работе кнопка подсвечивается зеленым. Если поворотный столик отведен в сторону и подача образца не осуществляется, кнопка подсвечивается оранжевым
STNDBY (standby)	Режим ожидания: при нажатии останавливается поток жидкости и снижается мощность лазера
PRIME	Продувка проточной ячейки и удаление из неё пузырьков воздуха. По окончании процедуры прибор автоматически переходит в режим ожидания
Регуляция скорости подачи пробы	
LO	Медленная скорость подачи образца (12 ± 3 мкл/мин)
MED	Средняя скорость подачи образца (35 ± 5 мкл/мин)
HI	Медленная скорость подачи образца (60 ± 7 мкл/мин)

Под верхней откидывающейся крышкой прибора (8) размещена оптическая система прибора, включая проточную ячейку, и управляющая электроника.

Оптическая система FACSCalibur схематически показана на рисунке 11. Прибор оснащен двумя *лазерами*:

- аргоновым лазером 488 нм с мощностью 15 мВт;
- полупроводниковым лазером 635 нм с мощностью 10 мВт.

Излучение лазеров с помощью линз фокусируется в *кварцевой проточной ячейке*. Рассеянный клетками свет и флуоресценция с помощью системы линз, светоделителей и фильтров собирается и спектрально распределяется на несколько *детекторов*:

- FSC-детектор (фотодиод) – 488/10 нм;
- SSC-детектор (ФЭУ) – 488/10 нм;
- три FL-детектора (ФЭУ), FL1-FL3, регистрирующие флуоресценцию при возбуждении 488 нм лазером:
 - 530/30 нм,
 - 585/42 нм,
 - >650 нм;

- FL-детектор (ФЭУ), FL4, регистрирующий флуоресценцию при возбуждении 635 нм лазером:
 - 661/16 нм.

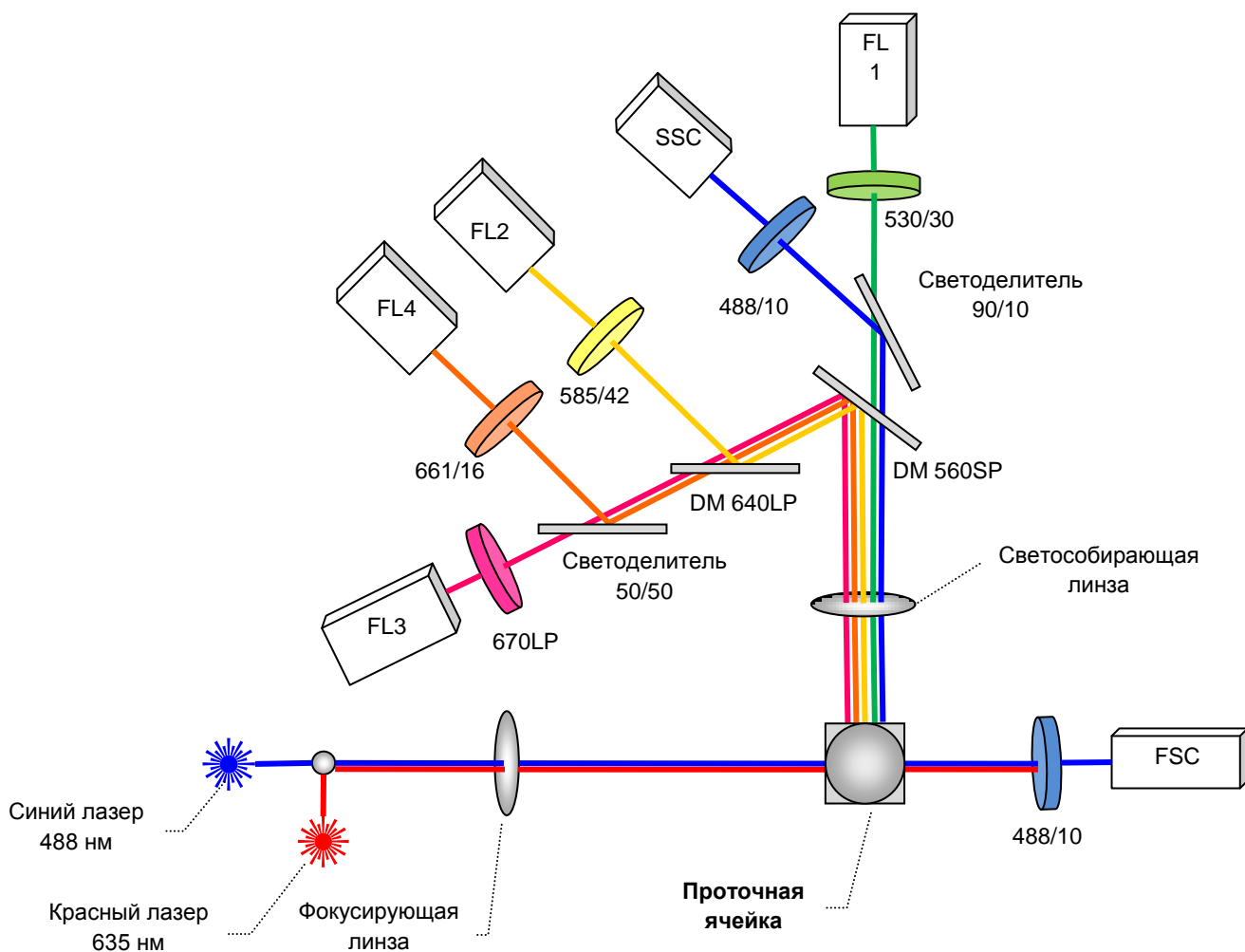


Рис. 11. Оптическая схема проточного цитофлуориметра FASCCalibur с двумя лазерами.

FSC – фотодетектор регистрирующий прямое светорассеяние;

SSC – ФЭУ, регистрирующий боковое светорассеяние;

FL1-FL4 – ФЭУ, регистрирующие флуоресценцию;

DM – дихроичное зеркало (“dichroic mirror”);

правила обозначения оптических фильтров описаны в примечании на стр. 13

Контроль работы прибора, сбор и анализ данных осуществляются с помощью управляющего компьютера. Прибор обеспечивает скорость счета до 2 000 событий в секунду.

2.2. Процедура включения прибора



Цитофлуориметр включается до включения управляющего компьютера, иначе прибор не будет распознан компьютером

1. Включите тумблер на трансформаторе. Включите питание цитофлуориметра;
2. Включите компьютер;
3. Заполните резервуар с проточной жидкостью (осуществляется в режиме STNDBY):
 - a. выдвиньте контейнер с резервуарами,
 - b. убедитесь, что тумблер подачи давления в резервуар с проточной жидкостью стоит в положении “vent – change tank” (“спуск давления – сменить резервуар”), при необходимости переключите его в данное положение. При данном положении тумблера давление в резервуар не подается,
 - c. отсоедините трубки подачи жидкости (белая) и воздуха (синяя), для этого необходимо нажать на металлические защелки клапанов,
 - d. отсоедините контакт датчика уровня жидкости,
 - e. снимите металлический кожух с резервуара,
 - f. выньте резервуар, открутите крышку с датчиком уровня жидкости,
 - g. заполните резервуар проточной жидкостью (не более чем на $\frac{3}{4}$, иначе при подаче давления жидкость может попасть в трубку подачи воздуха!). Можно использовать жидкость FACSTFlow или фосфатно-солевой буфер без Ca^{2+} и Mg^{2+} ,
 - h. закройте крышку резервуара, установите его в контейнер,
 - i. установите металлический кожух,
 - j. подключите датчик и трубки подачи жидкости и воздуха,
 - k. включите тумблер подачи давления в резервуар с проточной жидкостью, переключив его в положение “pressurize – run” (“подача давления – рабочий режим”), убедитесь, что в резервуар подано давление – резервуар не должен двигаться под кожухом;
4. Опорожните резервуар с отработанной жидкостью (“слив”):



С отработанной жидкостью необходимо обращаться как с потенциально инфекционным материалом

- a. отсоедините трубки подачи отработанной жидкости (оранжевая) и выхода воздуха (белая). Работа со сливом должна производиться только в перчатках!
 - b. отсоедините контакт датчика уровня жидкости,
 - c. выньте резервуар, открутите крышку с датчиком уровня жидкости,
 - d. опустошите резервуар,
 - e. налейте в резервуар для слива 400 мл неразбавленного раствора хлорамина. При заполнении резервуара его концентрация будет не менее 10%. Можно использовать жидкость FACSClean,
 - f. закройте крышку резервуара, установите его в контейнер,
 - g. подключите датчик и трубки подачи жидкости и воздуха,
5. Убедитесь в отсутствии пузырьков воздуха в фильтре для проточной жидкости. Если они есть, выполните следующие действия:
- a. осторожно постучите по фильтру для того чтобы пузырьки вышли на поверхность,
 - b. откройте трубку, опустив ролик зажима, для того, чтобы выпустить пузырьки с током проточной жидкости напрямую в резервуар для слива,
 - c. верните ролик в первоначальное положение.
6. Выполните продувку проточной ячейки:
- a. удалите пробирку из порта забора пробы,
 - b. нажмите кнопку PRIME на передней панели прибора,
 - c. после окончания процедуры установите пробирку;
7. Перед работой прогрейте лазеры в течение 5 минут после включения прибора.

2.3. Процедура выключения прибора

1. Выполните дезинфекцию порта подачи пробы:
 - a. переключите цитофлуориметр в режим RUN,
 - b. установите в порт подачи образца пробирку с 3 мл 10% раствора хлорамина. Можно использовать жидкость FACSClean,
 - c. отведите в сторону поворотный столик и оставьте пробирку в таком положении на 1 минуту,

- d. установите поворотный столик в центральное положение, переключите скорость потока в режим HI и промойте прибор в течение 5 минут;
2. Промойте порт подачи пробы:
 - a. установите в порт подачи образца пробирку с 3 мл дистиллированной воды,
 - b. отведите в сторону поворотный столик и оставьте пробирку в таком положении на 1 минуту,
 - c. установите поворотный столик в центральное положение, переключите скорость потока в режим HI и промойте прибор в течение 5 минут;
 3. Переключите прибор в режим STNDBY;
 4. Установите в порт подачи образца пробирку с дистиллированной водой. Объем воды не должен превышать 1 мл! В режиме STNDBY жидкость из резервуара подается в пробирку обратным током, переполнение пробирки может вывести из строя систему регулирования давления;
 5. Отключите соединение с прибором в программе, в которой осуществлялся сбор данных;
 6. Отключите подачу давления на резервуар с проточной жидкостью.
 7. Отключите питание цитофлуориметра кнопкой на корпусе прибора. Отключите тумблер на трансформаторе.

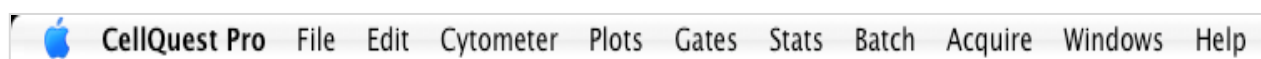
2.4. Сбор данных в программе CellQuest Pro

В данном разделе представлены минимальные сведения, необходимые для работы в программе CellQuest Pro. При необходимости более подробная информация может быть получена из поставляемых производителем инструкций к прибору (BD FACSCalibur Instruction For Use) и программе (BD CellQuest Pro Software User's Guide, BD CellQuest™ Pro Software Acquisition Tutorial). Инструкции размещены в свободном доступе на сайте производителя: <http://www.bdbiosciences.com>.

- I. **Запуск программы CellQuest Pro** осуществляется с помощью ярлыка на рабочем столе или на панели быстрого доступа.



При запуске программы в верхней части монитора отображается основное меню программы,



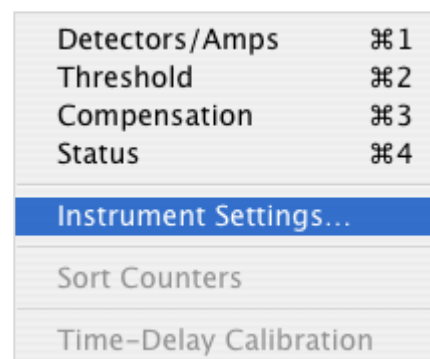
а также панель инструментов и новый бланк эксперимента.

II. **Подключение компьютера к цитофлуориметру.** В разделе меню Acquire (Сбор данных) выберите пункт Connect to Cytometer (Подключение к цитометру). При этом отобразятся новые окна – Acquisition Control (Управление сбором данных) и Browzer (Браузер).



III. **Загрузка калибровочных настроек.** Перед началом работы необходимо загрузить калибровочные настройки для параметров усиления на детекторах, порогового значения напряжения и компенсации перекрытия спектров флуорофоров.

Калибровка прибора и создание стандартных файлов настроек проводится квалифицированными специалистами. Опытные пользователи могут самостоятельно корректировать настройки с учетом особенностей исследуемого образца и используемых красителей и сохранять файлы пользовательских настроек. Пользователям без соответствующих навыков рекомендуется использовать заранее созданные файлы настроек.

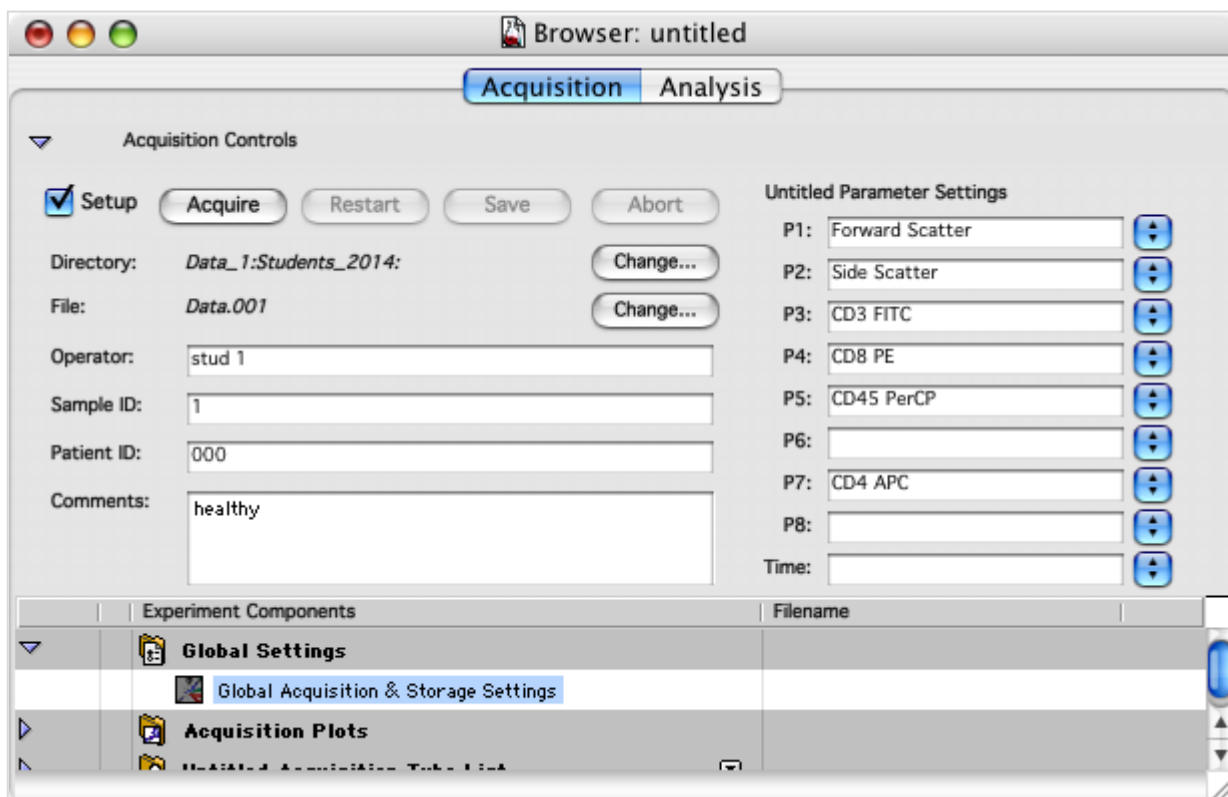


Для этого в меню Cytometer (Цитометр) выберите пункт Instrument Settings... (Настройки прибора...). В каталоге FACStation OSX4.9 / BD Files / Instrument Settings Files / выберите файл, указанный преподавателем.

Нажмите кнопку Set (Установить) для загрузки параметров из выбранного файла.

Для закрытия окна Instrument Settings нажмите кнопку Done (Готово).

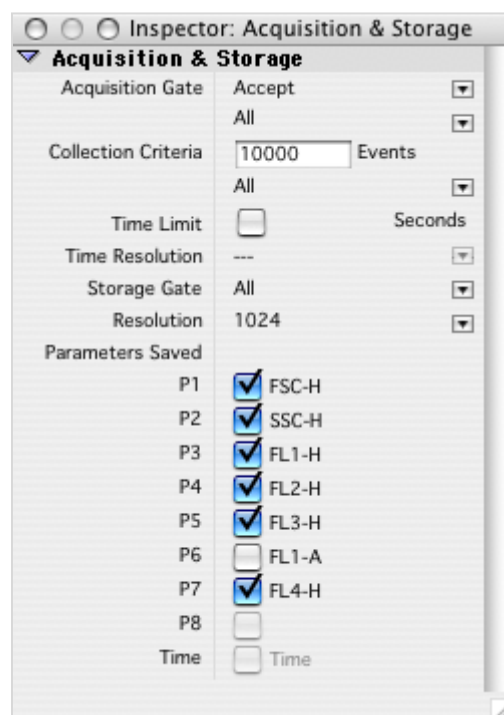
IV. **Индивидуальные настройки файла сбора данных.** В окне Browser (Браузер) в разделе Global Settings (Общие настройки) активируйте Global Acquisition & Storage Settings (Общие настройки сбора и сохранения данных). При этом отобразится новое окно – Inspector (Инспектор).



Функция окна Inspector (Инспектор) заключается в отображении параметров и настроек активного, выделенного в данный момент, элемента программы.

После описанных выше действий в этом окне отобразятся общие параметры сбора и сохранения данных.

В окне инспектора необходимо указать требуемое количество собираемых событий (или оставить 10 000 по умолчанию), а также выделить сохраняемые оптические параметры (в зависимости от поставленного эксперимента).



В окне браузера для выбранных оптических параметров рекомендуется указать (можно выбрать из выпадающего меню) информативное

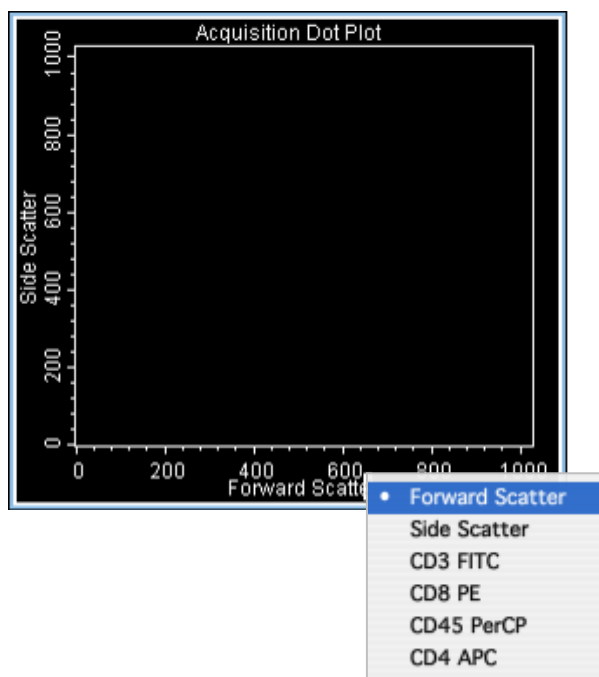
название. Именно оно будет отображаться на осях графиков впоследствии при анализе данных. В приведенном примере указано, антитела к каким молекулам на поверхности клеток (CD) использованы и с какими красителями они сконъюгированы.

В разделе Directory (Каталог) с помощью кнопки Change... (Изменить...) необходимо указать, в какую папку будут сохраняться данные, а в разделе File (Файл) ввести название файла.

При необходимости можно ввести имя оператора, комментарии и т.п.

- V. **Оптимизация окна эксперимента.** Рекомендуется в меню File (Файл) в пункте Document Size (Размер документа) выбрать размер документа 2×2 рабочих листа, это позволит удобно расположить все необходимые при анализе диаграммы и прочие элементы эксперимента.

Для контроля за ходом эксперимента создайте точечную диаграмму. Для этого в панели инструментов нажмите соответствующую кнопку и протягиванием мыши задайте в окне эксперимента положение и размер диаграммы.



При выделении созданной диаграммы (щелчком мыши в белый контур диаграммы) в окне инспектора отобразятся её параметры.

В инспекторе в разделе Basic Plot (Общие настройки диаграммы) укажите

Plot Type (Тип диаграммы): Acq->Analysis (Сбор данных с последующим анализом).

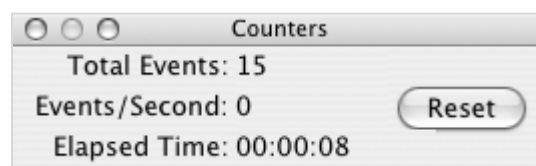
Какие именно параметры указывать на осях диаграммы – можно выбрать в меню, выпадающем при щелчке мыши на соответствующую ось или её название. Кроме этого, выбор возможен в пунктах X Parameter (X параметр) и Y Parameter (Y параметр) в инспекторе.

Создайте диаграмму FSC vs SSC.

Создайте и разместите в окне эксперимента другие необходимые диаграммы типа Acq->Analysis (Сбор данных с последующим анализом) в зависимости от проводимого эксперимента. Эти диаграммы позволят контролировать уровень регистрируемого сигнала флуоресценции клеток и при необходимости оптимизировать настройки прибора.

VI. Оптимизация настроек прибора. При начале работы в разделе Acquisition Controls (Управление сбором данных) браузера, а также в отдельном окне Acquisition Control должен быть отмечен пункт Setup (Режим настройки). Функции данных окон совпадают, поэтому при работе можно использовать одно из них, наиболее удобное. При необходимости, для оптимизации количества окон программы, скрыть окно Acquisition Control (Управление сбором данных) можно в меню Windows (Окна), выбрав пункт Hide Acquisition Control (Скрыть панель управления сбором данных).

В меню Acquire (Сбор данных) запустите окно Counters (Счетчики) для контроля числа подсчитанных прибором событий Total Events и времени эксперимента Elapsed Time.



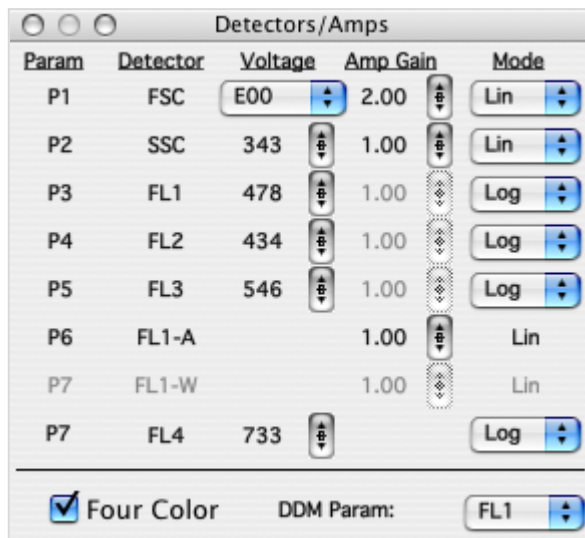
Установите пробирку с пробой в порт забора образца. Переведите цитофлуориметр в рабочий режим нажатием кнопки **RUN** на его лицевой панели, установите низкую скорость забора образца.

Запустите сбор данных нажатием кнопки Acquire (Сбор данных) в браузере. На диаграммах эксперимента начнут появляться точки, соответствующие регистрируемым прибором событиям.

Набрав не менее 1000 событий, покажите преподавателю получаемые данные. Дальнейшие действия по оптимизации настроек прибора выполняются только в его присутствии.

На диаграмме FSC vs SSC события должны располагаться таким образом, чтобы оптимально использовался весь диапазон шкал на обеих осях, при этом не должно быть значительного числа событий, которые “легли” на одну из осей, что возникает в случае слишком высокого или слишком низкого сигнала.

При необходимости, настройки прибора могут быть оптимизированы в окне, открывающемся в меню Cytometer (Цитометр) в пункте Detectors/Amps (Детекторы/Усилители).

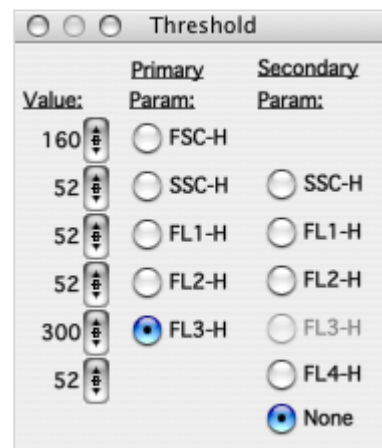


Используйте Amp Gain (Усилитель) для увеличения или уменьшения FCS-сигнала.

Используйте Voltage (Напряжение) для увеличения или уменьшения SSC-сигнала.

На диаграммах, отображающих флуоресценцию образца, значения сигнала от неокрашенных (негативных) клеток в оптимальном случае должны находиться в диапазоне 10^0-10^1 . Используйте Voltage (Напряжение) для увеличения или уменьшения FL-сигнала.

На получаемых диаграммах не должно быть большого количества мелкого дебриса (обломков клеток, мусора и т.п.). При необходимости его количество может быть снижено за счет оптимизации порога регистрации сигнала.



В меню Cytometer (Цитометр) в пункте Threshold (Порог) запустите соответствующее окно. Выберите параметр, по которому устанавливается порог, и выставьте значение таким образом, чтобы прибор по-прежнему сохранял все полезные данные, но “обрезал” дебрис.

Ручная настройка компенсации требует подготовки дополнительных образцов и в ходе выполнения описанных далее заданий не проводится. Описание данной процедуры приведено в перечисленных выше инструкциях.

При изменении настроек рекомендуется использовать кнопки в разделе Acquisition Controls (Управление сбором данных) браузера: Acquire (Сбор данных), Pause (Пауза) (кнопка появляется только при запущенном сборе данных), Resume (Возобновить) (кнопка появляется только в режиме паузы), Restart (Запуск заново).

После окончания процедуры оптимизации необходимо приостановить сбор данных и нажать кнопку Abort (Сброс).

VII. Сбор и сохранение данных. Снимите выделение с пункта Setup (Режим настройки) в разделе Acquisition Controls (Управление сбором данных) браузера. Запустите сбор данных кнопкой Acquire (Сбор данных).

Программа автоматически остановит сбор данных по достижении заданного числа необходимых событий.

Данные автоматически будут сохранены в указанном в браузере файле в формате *.fcs

Для остановки забора образца из пробирки необходимо перевести прибор в режим **STNDBY** кнопкой на лицевой панели и **убрать пробирку** из порта забора образца. Необходимо установить пустую пробирку или пробирку с дистиллированной водой для предупреждения обратного слива образца из иглы на рабочую поверхность стола.

Перед отключением прибора (после соответствующих процедур, описанных в п. 2.3) в разделе меню Acquire (Сбор данных) выберите пункт Disconnect from Cytometer (Отключение от цитометра).

2.5. Анализ данных в программе CellQuest Pro

В данном разделе представлены минимальные сведения, необходимые для анализа данных в программе CellQuest Pro. При необходимости более подробная информация может быть получена из поставляемых производителем инструкций к прибору (BD FACSCalibur Instruction For Use) и программе (BD CellQuest Pro Software User's Guide, BD CellQuest™ Pro Analysis Tutorial). Инструкции размещены в свободном доступе на сайте производителя:

<http://www.bdbiosciences.com>.

Анализ данных не требует работающего прибора. Если процедура анализа следует непосредственно за сбором данных, прибор можно отключить.

Анализ данных может быть продолжен в окне эксперимента, в котором осуществлялся контроль за сбором данных. Альтернативно, можно создать

новый эксперимент в меню File (Файл). В этом случае для отображения окна инспектора в меню Windows (Окна) нажмите Show Inspector (Показать инспектор).

Для создания и редактирования объектов в окне эксперимента используется панель инструментов. Функции основных кнопок этой панели будут рассмотрены ниже.

Графическое представление данных возможно в формате диаграмм или гистограмм. На осях диаграммы откладываются любые два из измеренных параметров. Каждое из событий отображается точкой, координаты X и Y которой соответствуют значениям сигнала для выбранных параметров. Во втором случае для отображения на гистограмме выбирается только один параметр, значения которого откладываются по оси X , по оси Y откладывается количество событий для каждого из значений X .



I. Отображение данных в виде диаграмм. Для отображения данных используются диаграммы различного типа:



– точечная диаграмма; каждое событие отображается точкой с соответствующими координатами, однако несколько событий с одинаковыми координатами будут отображаться только одной точкой;



– диаграмма плотности; количество событий в каждой точке (плотность) передается с помощью цветовой кодировки;



– контурная диаграмма; области с одинаковой плотностью событий оконтурены линиями;



– 3D-диаграмма; количество событий в каждой точке передается как третья координата (высота).

Для создания диаграммы выберите на панели инструментов необходимый тип диаграммы, протягиванием мыши задайте место расположения и размер диаграммы в окне эксперимента.

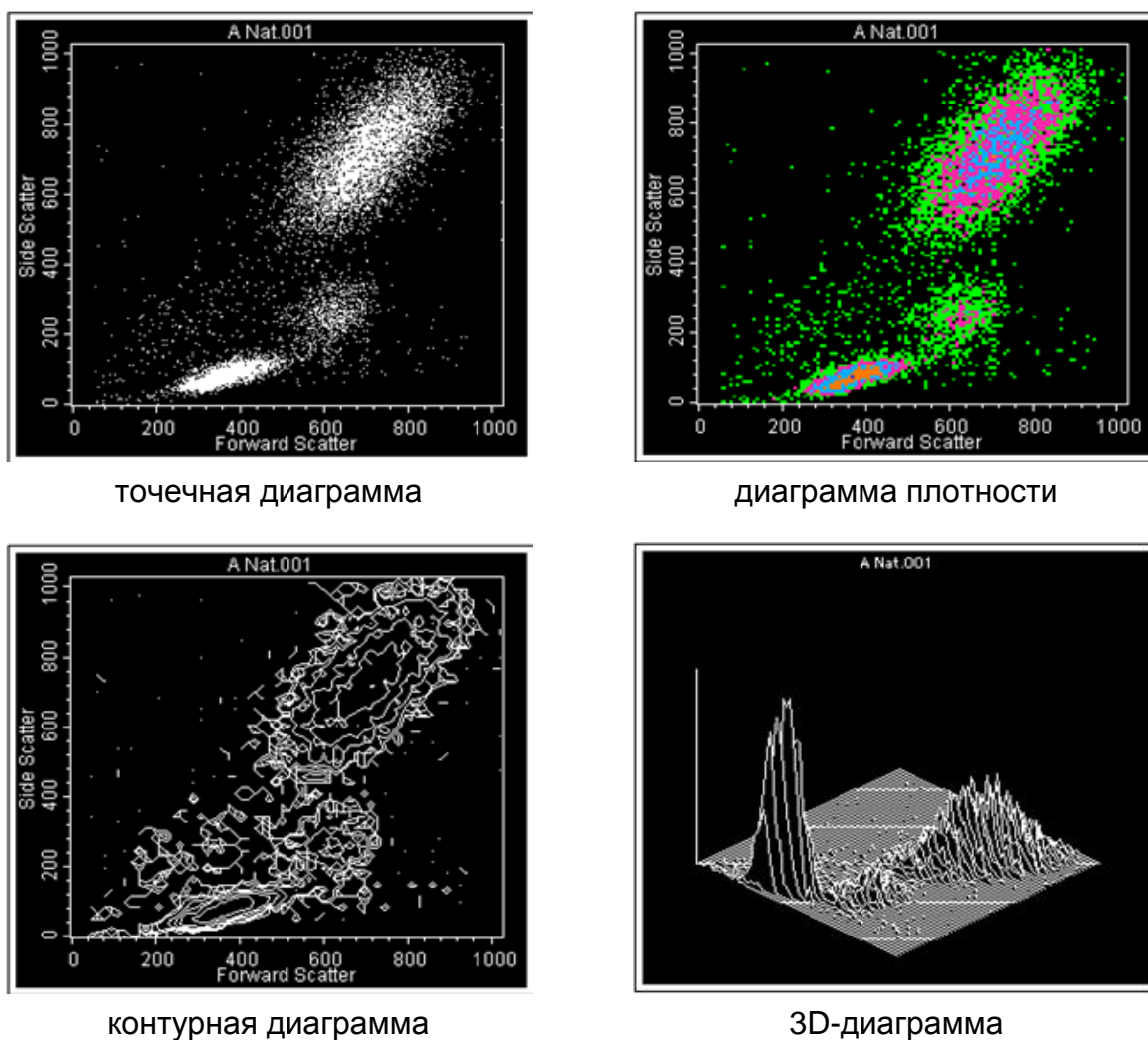
На панели инспектора в разделе Basic Plot (Общие настройки диаграммы) выберите Plot Type (Тип диаграммы): Analysis (Анализ) и укажите файл данных, которые необходимо отобразить на диаграмме.

Выберите на осях диаграммы, какие параметры из сохраненных в файле необходимо отобразить.

В одном эксперименте данные одного и того же файла могут быть представлены на нескольких различных диаграммах.

Разные диаграммы одного эксперимента могут отображать данные из разных файлов.

На рисунке 12 приведен пример графического представления данных о светорассеянии клеток (лейкоцитов периферической крови человека) на диаграммах описанных типов.



точечная диаграмма

диаграмма плотности

контурная диаграмма

3D-диаграмма

Рис. 12. Одни и те же данные о светорассеянии клеток, полученные методом проточной цитофлуориметрии и представленные на диаграммах различного типа

II. Использование гейтов на диаграммах. Гейт (от англ. “gate” – ворота) – это инструмент для выделения из всего массива полученных данных отдельных популяций клеток, удовлетворяющих определенным условиям, и последующего анализа этих популяций.

Для создания гейтов на диаграммах используются инструменты, позволяющие графически **выделять регионы**:



– выделение прямоугольного региона;



– выделение полигонального региона;

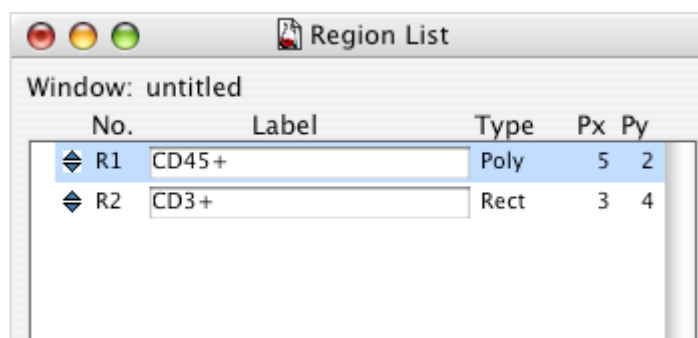
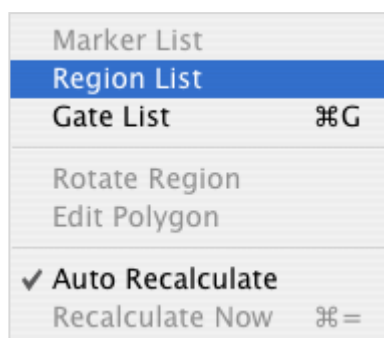


– выделение эллиптического региона;



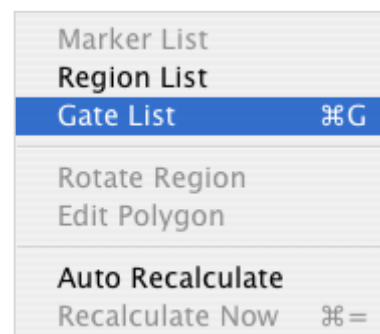
– выделение региона, автоматически очерчивающего популяцию событий.

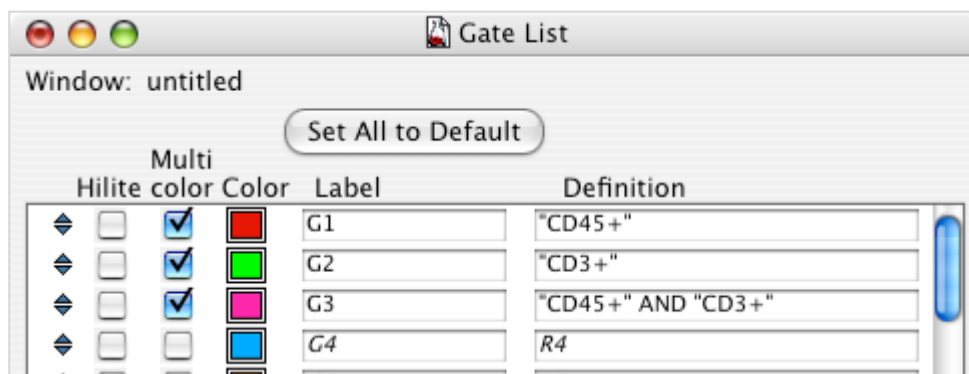
Для отображения списка регионов и их свойств выберите в меню Gates (Гейты) пункт Region List (Список регионов). Список позволяет добавить смысловые метки Label для каждого из заданных регионов.



Гейт, или условие выделения популяции, в простейшем случае может **совпадать с регионом**. В таком случае в гейт входят только события, которые попадают в указанный регион. Кроме этого, гейты могут создаваться путем **логической комбинации регионов**, например, гейт может учитывать вхождение события в два региона одновременно, или в хотя бы один из двух регионов. При создании гейтов используются логические операторы AND, OR, NOT.

Для отображения списка гейтов и их свойств выберите в меню Gates (Гейты) пункт Gate List (Список гейтов).

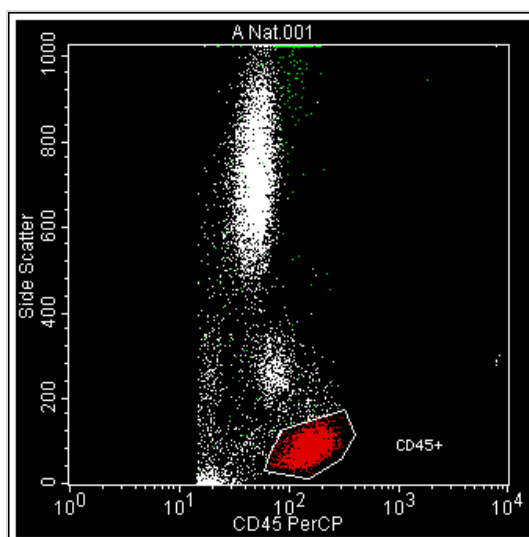




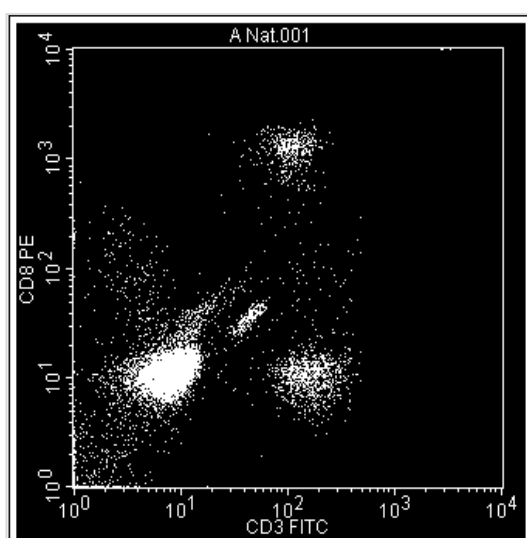
Для лучшего визуального восприятия на точечных диаграммах используется **цветовое маркирование** событий, соответствующих различным гейтам на диаграмме. При выделенной диаграмме в окне инспектора в разделе Dot Plot (Точечная диаграмма) активируйте опцию Multicolor Gating (Многоцветное отображение гейтов).

На диаграмме могут быть **отображены** не все сохраненные в файле события, а только **события, соответствующие определенному гейту**. Для этого в окне инспектора в разделе Basic Plot (Общие настройки диаграммы) в пункте Gate (Гейт) выберите, какие именно события должны быть отображены.

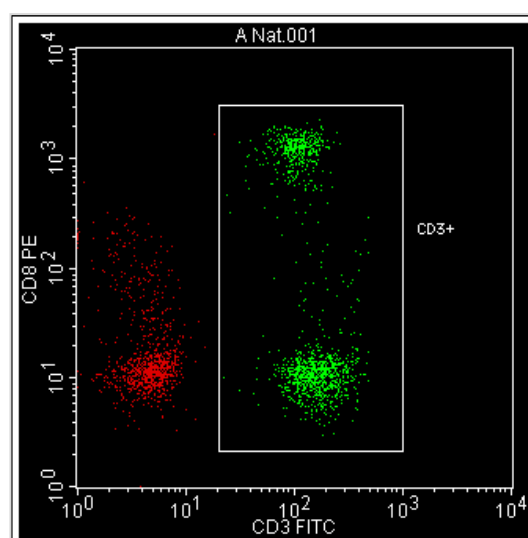
На рисунке 13 показано использование гейтов при анализе данных об экспрессии лейкоцитами периферической крови человека поверхностных белков (кластеров дифференциации CD). Представлены результаты того же эксперимента, что и на рисунке 12. На диаграмме **A** по оси X отложены значения относительной экспрессии CD45 и с помощью полигонального региона R1 обозначена популяция клеток "CD45+" с максимальной экспрессией данного белка, что характерно для лимфоцитов. Диаграммы **B** и **B** представляют распределение клеток по уровню экспрессии CD3 и CD8. Для того, чтобы проанализировать экспрессию данных белков только в популяции лимфоцитов, на диаграмме **B** для отображаемых данных применен гейт G1, соответствующий региону "CD45+". Среди всех лимфоцитов на данной диаграмме с помощью прямоугольного региона R2 "CD3+" выделены клетки с высокой экспрессией CD3, что является отличительной особенностью Т-лимфоцитов.



A.



Б.



В.

Рис. 13. Использование гейтов в анализе данных об экспрессии лейкоцитами периферической крови человека поверхностных белков (кластеров дифференциации CD). Каждый CD окрашен с помощью специфических антител, конъюгированных с различными флуоресцентными красителями:

А – полигональный регион R1 “CD45+” обозначает популяцию клеток с максимальной экспрессией данного CD;

Б, В – распределение клеток по уровню экспрессии CD3 и CD8; Б – отображены все события; В – отображены только события, вошедшие в гейт G1, совпадающий с регионом R1 “CD45+”; прямоугольный регион R2 “CD3+” соответствует клеткам, экспрессирующим данный CD

III. **Статистический анализ данных на диаграммах.** Программа CellQuest Pro позволяет провести статистический анализ данных с использованием заданных регионов и гейтов.

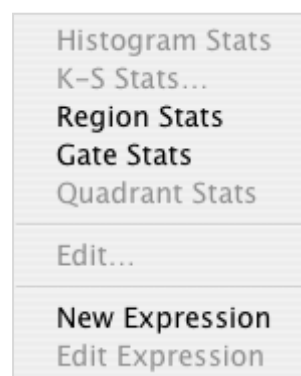
Кроме регионов и гейтов, для статистического анализа может использоваться разделение диаграммы на квадранты:



– инструмент, позволяющий разделить диаграмму на квадранты.

Для разграничения квадрантов с помощью мыши задайте положение точки перекрестья на диаграмме. Квадранты не могут использоваться при создании гейтов.

Для отображения результатов статистического анализа данных, представленных в виде диаграмм, в окне эксперимента выберите один из пунктов в меню Stats (Статистика):



- Region Stats – статистика по регионам;
- Gate Stats – статистика по гейтам;
- Quadrant Stats – статистика по квадрантам.

Программа рассчитывает количество событий в каждом заданном регионе, гейте, квадранте, их процентное соотношение, средние арифметические и геометрические значения измеренных параметров для каждой популяции, коэффициент вариации и стандартное отклонение и т.п. Для редактирования таблицы статистических данных используйте инспектор, в котором можно выбрать, какие из параметров необходимо выводить в итоговой таблице. При работе с квадрантами используются следующие обозначения: UL – верхний левый квадрант (“upper left”), LL – нижний левый (“low left”), UR – верхний правый (“upper right”), LR – нижний правый (“low right”).

Region Statistics			
File: A Nat.001			
Gate: G1			
Gated Events: 2295			
Total Events: 10000			
Region	Events	% Gated	% Total
CD45+	2295	100.00	22.95
CD3+	1351	58.87	13.51

Для примера, статистический анализ по регионам для данных, представленных на рисунке 13, показывает: общее количество событий Events составило 10 000, из них 2295 соответствуют региону R1 (клетки с экспрессией CD45), что составляет 22,95%; из них

1351 клетка экспрессирует CD3, это, в свою очередь, составляет 58,87% от гейта G1, или 13,51% от общего количества проанализированных событий.

IV. Отображение и анализ данных с помощью гистограмм. При анализе степени выраженности определенного признака удобно использовать гистограммы, на которых по оси X отображается один из измеренных параметров, а по оси Y откладывается количество событий для каждого из значений X.

При работе с гистограммами используются следующие кнопки панели инструментов:



–гистограмма;



– маркер, выделяющий регион на гистограмме, используемый для статистического анализа;



– выделение региона для создания гейтов.

На рисунке 14 приведен пример отображения и анализа данных с помощью гистограммы.

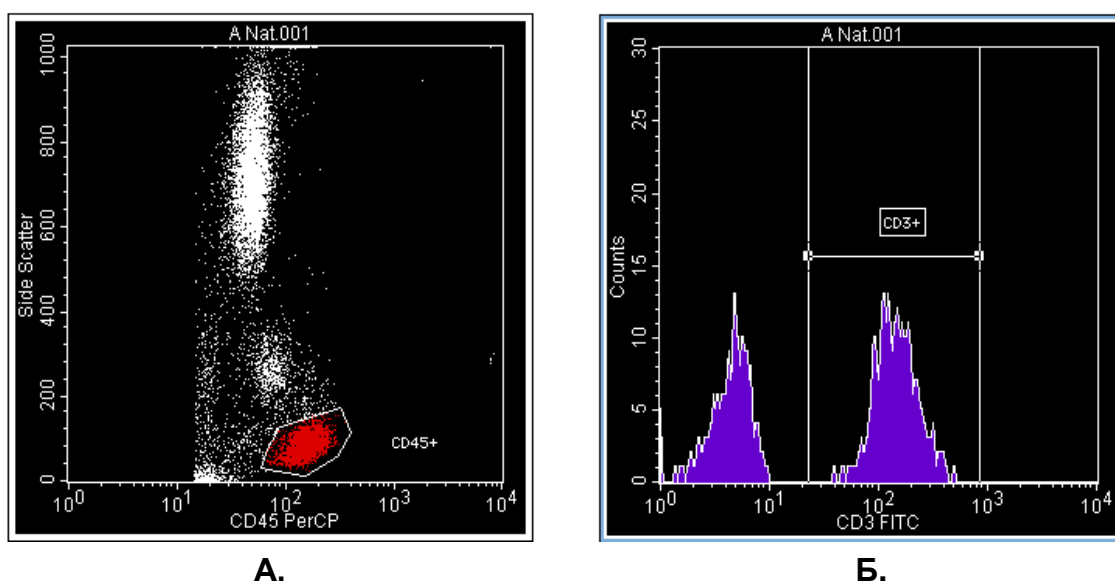


Рис. 14. Использование гистограммы в анализе данных об экспрессии лейкоцитами периферической крови человека CD3.:

А – полигональный регион R1 “CD45+” обозначает популяцию клеток с максимальной экспрессией этого белка;

Б – распределение клеток по уровню экспрессии CD3; отображены только клетки из региона R1 “CD45+”; маркер M1 “CD3+” выделяет популяцию клеток, экспрессирующих данный CD

На диаграмме **A** выделен регион **R1**, соответствующий клеткам с максимальной экспрессией **CD45**. Гейт **G1** соответствует этому региону. На гистограмме **Б** отображены только клетки, вошедшие в гейт **G1**, и показано их распределение по уровню экспрессии **CD3**. Для клеток, экспрессирующих этот белок, задан маркер **M1** “**CD3+**”.

Для отображения статистики по гистограмме выберите в меню **Stats** (Статистика) пункт **Histogram Stats** (Статистика по гистограмме).

В эксперименте, данные которого, представлены на рисунке 14, количество экспрессирующих **CD3** Т-лимфоцитов составило 58,87% от общего числа лимфоцитов (экспрессирующие **CD45** клетки из гейта **G1**), что согласуется с данными, полученными при использовании для анализа точечной диаграммы.

Histogram Statistics			
File:	A Nat.001		
Gate:	G1		
Gated Events:	2295		
Total Events:	10000		
Marker	Events	% Gated	% Total
All	2295	100.00	22.95
CD3+	1350	58.82	13.50

- V. **Сохранение и экспорт данных.** Для экспорта изображения (диаграммы, гистограммы) выберите в меню **File** (Файл) пункт **Export Graphic...** (Экспортировать графический объект...) и задайте параметры экспорта. Файл может быть сохранен в формате *.jpeg, *.bmp, *.png, *.pict.

Для экспорта статистических данных в меню **File** (Файл) выберите пункт **Export Statistics...** (Экспортировать статистику...) и задайте параметры экспорта. Файл может быть сохранен в формате *.txt.

Возможно копирование объекта и перенос его в другую программу через буфер обмена.

Полученные данные (измеренные параметры) для каждого образца сохраняются в процессе сбора данных в отдельные файлы формата *.fcs. В этом же файле сохраняются сведения о настройках прибора, при которых они были получены. Изменение настроек и параметров в файле эксперимента не влияет на первичные сохраненные данные в файле *.fcs.

Можно сохранить файл самого эксперимента со всей информацией о диаграммах и гистограммах, регионах, гейтах, настройках отображения, статистике и т.п. в собственном формате программы **CellQuest Pro** в меню **File** (Файл), пункт **Save** (Сохранить) или **Save as...** (Сохранить как...). Документ эксперимента может быть также сохранен в формате *.pdf.

3. ПРАКТИКУМ ПО ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ

3.1. Иммунофенотипирование лимфоцитов крови человека

Термин “лимфоциты” объединяет незернистые лейкоциты крови (агранулоциты), образующиеся из единого предшественника (лимфобласта), развивающиеся в лимфоидной ткани и циркулирующие в крови и лимфе.

Выделяют три основных типа лимфоцитов: Т-клетки (Т-лимфоциты), В-клетки (В-лимфоциты) и НК-клетки (естественные киллеры). В совокупности они составляют 25–30% всех лейкоцитов (1500–2200 в 1 мм³ крови).

Функции Т-, В- и НК-клеток существенно различаются.

НК-клетки, или *естественные киллеры* (от англ. “natural killer”), обеспечивают врожденный противовирусный и противоопухолевый иммунитет. Эти же клетки ответственны за трансплантационный иммунитет, осуществляя контроль экспрессии комплексов гистосовместимости I класса.

В-лимфоциты (от лат. “bursa Fabricius” – сумка Фабрициуса, орган у птиц, в котором созревает данный тип клеток) играют важнейшую роль в обеспечении гуморального иммунитета. После активации В-лимфоциты трансформируются в плазматические клетки, продуцирующие антитела.

Т-лимфоциты получили своё название от слова “тимус”, органа, где они созревают из предшественников. Существует несколько субпопуляций Т лимфоцитов: $\alpha\beta$ Т-клетки, в том числе Т-хелперы, Т-киллеры, НКТ-лимфоциты и естественные регуляторные Т-клетки, а также $\gamma\delta$ Т-клетки.

Т-хелперы (от англ. “helper” – помощник) после активации (после взаимодействия с антиген-презентирующей клеткой) вырабатывают широкий спектр цитокинов и ростовых факторов, регулирующих работу других клеток, участвующих в реализации иммунного ответа. От активности Т-хелперов зависит формирование как клеточного, так и гуморального иммунитета.

Т-киллеры (от англ. “killer” – убийца) обеспечивают адаптивный клеточный иммунитет, участвуя в лизисе вирус-инфицированных клеток, а также клеток, подвергшихся злокачественному перерождению.

Естественные регуляторные Т-клетки предотвращают реакцию других Т-клеток на аутоантигены, а также ограничивают развитие всех форм иммунного ответа.

НКТ-лимфоциты совмещают функции НК-клеток и некоторые функции Т-лимфоцитов.

γδT лимфоциты отличаются от остальных Т-клеток антиген-распознающими рецепторами. Дифференцируются они не в тимусе, а в основном в слизистых оболочках пищеварительного тракта. Функция этой относительно небольшой по количеству субпопуляции клеток заключается в обеспечении врожденного иммунитета.

Все перечисленные типы лимфоцитов очень похожи по своим морфологическим характеристикам – небольшие округлые клетки диаметром около 7-10 мкм, с крупным ядром, занимающим почти весь объем клетки. Это делает невозможным их различение с помощью микроскопа и стандартных цитологических окрасок. В то же время, относительное и абсолютное содержание различных типов лимфоцитов является важнейшим диагностическим признаком в случае воспалительных, инфекционных, аллергических, онкологических заболеваний и т.д.

Различение типов лимфоцитов осуществляется на основании анализа **фенотипа** – набора белков (*маркеров*), экспрессируемых на поверхности клетки и участвующих в выполнении функций, специфических для каждой субпопуляции лимфоцитов.

С целью систематизации известных поверхностных молекул лейкоцитов введена *номенклатура CD* (от англ. “cluster of differentiation” – кластер дифференцировки), в соответствии с которой каждой молекуле, независимо от её химической структуры, присвоен определенный номер. Наличие молекулы на поверхности обозначается как “+”, отсутствие “-”. Некоторые CD молекулы, используемые для идентификации основных групп лимфоцитов, приведены в таблице 2:

- CD45 – тирозиновая протеинфосфатаза, участвующая в работе сигнальных путей клетки;
- CD3 – белок-корцептор антиген-распознающего Т-клеточного рецептора;
- CD4 – трансмембранный гликопротеин, участвующий в распознавании молекул антигена, связанных с антиген-презентирующим комплексом II класса. Данный белок, кроме Т-лимфоцитов, экспрессируется на моноцитах, макрофагах, дендритных клетках и т.д.;
- CD8 – трансмембранный гликопротеин, участвующий в распознавании молекул антигена, связанных с антиген-презентирующим комплексом I класса;

- CD19 – белок в составе корцепторного комплекса антиген-распознающего В-клеточного рецептора. Присутствует на В-лимфоцитах с самых ранних этапов развития и теряется на этапе их созревания в плазматические клетки;
- CD56 – гликопротеин, участвующий в клеточной адгезии и экспрессирующийся на поверхности нейронов, глиальных клеток, клеток скелетной мускулатуры и НК-клеток;
- CD16 – рецептор для Fc-фрагмента иммуноглобулинов G, присутствующий на поверхности части НК-клеток, полиморфноядерных нейтрофильных лейкоцитов, моноцитов и макрофагов.

Таблица 2

CD молекулы, используемые для идентификации основных групп лимфоцитов

Группа	CD маркеры
Лейкоциты	CD45+
Т-лимфоциты	CD45+, CD3+
Т-хелперы	CD45+, CD3+, CD4+
Т-киллеры	CD45+, CD3+, CD8+
В-лимфоциты	CD45+, CD3-, CD19+
НК-клетки	CD45+, CD3-, CD56+, CD16+/-

Так как большинство CD присутствуют на нескольких типах клеток, определение только одного CD не позволяет точно определить тип клетки. Для точной идентификации типа клетки необходимо определение сочетания, или комбинации, маркеров.

Для определения фенотипа клеток используется метод **иммунофенотипирования**: клетки окрашиваются специфичными к CD антителами, конъюгированными с флуоресцентными красителями. Связывание маркированных антител с клеткой определяется тем, какие именно CD она экспрессирует. После такой окраски проводится анализ флуоресценции клеток с помощью проточной цитофлуориметрии.

Экспериментальная часть

Цель работы:

Анализ относительного содержания различных популяций лимфоцитов в крови человека методом иммунофенотипирования.

Оборудование и материалы:

- *проточный цитофлуориметр FACSCalibur, оснащенный двумя лазерами;*
- *образец крови человека, стабилизированной антикоагулянтом (К₃ЭДТА);*
- *набор реактивов MultiTEST IMK Kit Reagent, включающий:*

1) *раствор антител:*

антитела к CD3, конъюгированные с красителем FITC,
антитела к CD8, конъюгированные с красителем PE,
антитела к CD45, конъюгированные с красителем PerCP,
антитела к CD4, конъюгированные с красителем APC;*

2) *раствор антител:*

*антитела к CD3, конъюгированные с красителем FITC,
антитела к CD16 и CD56, конъюгированные с красителем PE,
антитела к CD45, конъюгированные с красителем PerCP,
антитела к CD19, конъюгированные с красителем APC;*

3) *раствор для лизиса эритроцитов MultiTEST IMK Kit Lysing Solution в 10-кратной концентрации.*

- пробирки Falcon 12×75 мм с крышками, полипропиленовые пробирки объемом 15 мл с крышками, автоматические дозаторы переменного объема на 10-100 мкл и 100-1000 мкл со сменными одноразовыми наконечниками, деионизированная вода, проточная жидкость FACSFlow, емкость для сбора отработанных реактивов и использованных наконечников.



С образцом крови необходимо обращаться как с потенциально инфекционным материалом.
Работать только в перчатках.

* Полные названия и оптические характеристики красителей приведены в приложении 1.



Растворы в составе *MultiTEST IMK Kit Reagent* содержат опасные вещества: азид натрия, диэтиленгликоль, формальдегид. При работе необходимо избегать их попадания на кожу и слизистые.

Цитофлуориметр FACSCalibur позволяет одновременно проанализировать до четырех параметров флуоресценции. В то же время, для разделения основных типов лимфоцитов, представленных в таблице 2, необходимо определение шести CD маркеров (т.к. CD16 и CD56 маркируют один и тот же тип клеток, антитела к ним конъюгируют с одним и тем же красителем). Это обуславливает разделение эксперимента на две задачи: определение отношения фракций Т-лимфоцитов в одной пробирке (пробирка А) и определение В-лимфоцитов и НК-клеток в другой пробирке (пробирка Б).

Разведение лизирующего раствора:

Перед началом работы приготовьте лизирующий раствор (из расчета 450 мкл на пробирку), разведя его в 10 раз деионизированной водой. Оставьте раствор при комнатной температуре. Данный раствор обеспечивает гипотоничный лизис эритроцитов, при этом условия среды остаются достаточно мягкими, чтобы сохранить жизнеспособными ~92% лейкоцитов.

Окраска клеток:

Приготовьте пробирки Falcon 12×75 мм и подпишите А и Б. Проведите процедуру окраски в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3
Окраска пробирок А и Б

Пробирка А	Пробирка Б
Внесите 20 мкл раствора антител к CD3/CD8/CD45/CD4	Внесите 20 мкл раствора антител к CD3/CD16, CD56/CD45/CD19
Добавьте 50мкл крови, избегая её попадания на стенки пробирки	
Закройте пробирку крышкой, бережно перемешайте и оставьте в темноте при комнатной температуре на 15 минут	
Добавьте 450 мкл лизирующего раствора	
Закройте пробирку крышкой, бережно перемешайте и оставьте в темноте при комнатной температуре на 15 минут	

Попадание крови на стенки пробирки или плохое перемешивание могут привести к некачественному окрашиванию клеток, яркое освещение пробирки в ходе инкубации может привести к выгоранию красителей.

Образцы необходимо проанализировать на проточном цитофлуориметре в течение 24 часов после окрашивания.

Анализ образца на проточном цитофлуориметре:

1. Включите цитофлуориметр и компьютер, подготовьте прибор к работе как описано в п. 2.2.
2. Руководствуясь п. 2.4 настройте прибор для работы. Подключитесь к прибору. Загрузите файл настроек, указанный преподавателем. Задайте количество собираемых событий 20 000. Выберите для сохранения данные FSC, SSC, FL1-H, FL2-H, FL3-H, FL4-H. Задайте папку и название файла для сохранения данных.

Для анализа пробирки А задайте следующие названия каналов:

FSC – Forward Scatter,	FL2-H – CD8 PE,
SSC – Side Scatter,	FL3-H – CD45 PerCP
FL1-H – CD3 FITC,	FL4-H – CD4 APC.

3. В окне эксперимента создайте следующие диаграммы:

FSC vs SSC,	CD3 FITC vs CD8 PE,
CD45 PerCP vs SSC,	CD8 PE vs CD4 APC.

4. Установите пробирку А в порт забора образца, запустите сбор данных. В присутствии преподавателя выполните оптимизацию настроек прибора.
5. Соберите и сохраните данные для пробирки А.
6. Промойте канал подачи образца деионизированной водой. Для этого оставьте пробирку с водой в порту забора пробы в режиме RUN на 1-2 минуты.
7. Для анализа пробирки Б задайте новый файл для сохранения данных и следующие названия каналов:

FSC – Forward Scatter,	FL2-H – CD16,56 PE,
SSC – Side Scatter,	FL3-H – CD45 PerCP
FL1-H – CD3 FITC,	FL4-H – CD19 APC.

8. В окне эксперимента должны отображаться следующие диаграммы (используйте ранее созданные):

FSC vs SSC,

CD3 FITC vs CD16,56 PE,

CD45 PerCP vs SSC,

CD16,56 PE vs CD19 APC.

9. Установите пробирку Б в порт забора образца, запустите сбор данных. При необходимости в присутствии преподавателя повторите оптимизацию настроек прибора.

10. Соберите и сохраните данные для пробирки Б.

11. После окончания работы с образцами выключите прибор как описано в п. 2.3.

Анализ и интерпретация полученных данных:

Логические схемы анализа данных для пробирок А и Б показаны на рисунке 15.

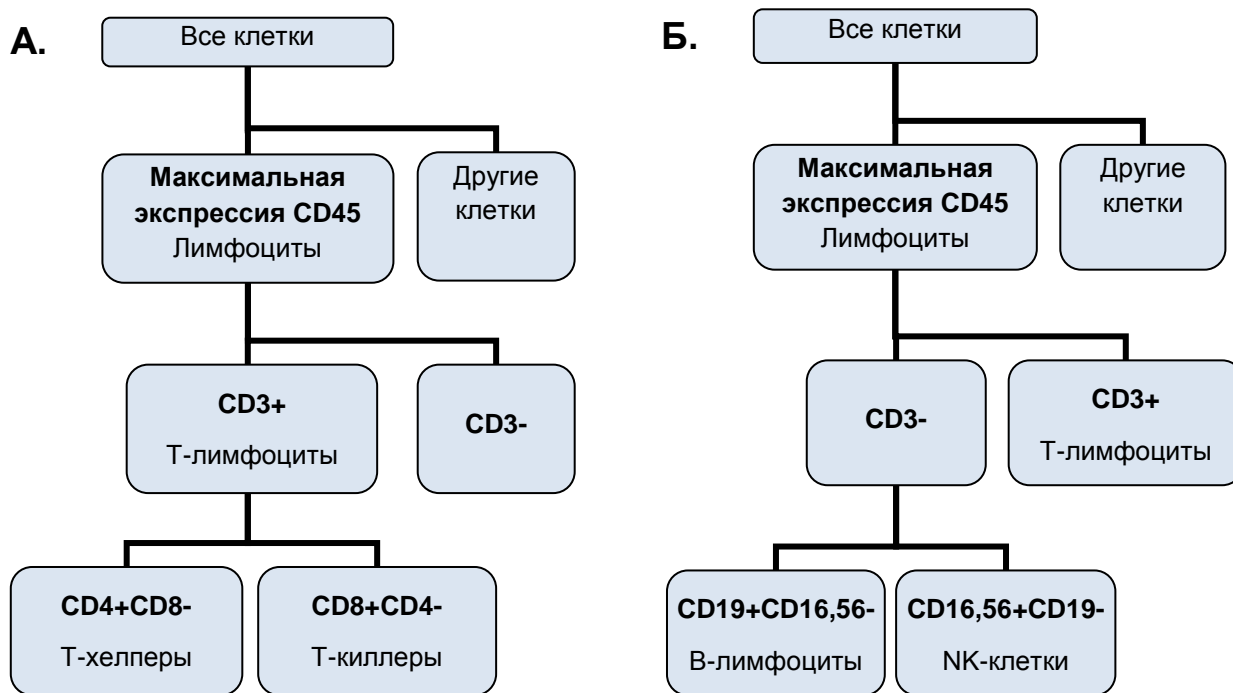


Рис. 15. Схема анализа данных для пробирок А и Б

Среди всех лейкоцитов лимфоциты можно отличить по небольшим размерам, низкой гранулярности и максимальной экспрессии CD45. Среди лимфоцитов Т-клетки отличаются от прочих видов клеток экспрессией CD3. Т-хелперы и Т-киллеры характеризуются CD4 и CD8, соответственно. Все эти CD окрашены антителами с различными красителями в пробирке А.

Среди CD3- клеток только В-лимфоциты экспрессируют CD19, а NK-клетки – CD16 и CD56. Окраска данных CD проведена в пробирке Б.

Пример анализа данных для обеих пробирок в программе CellQuest Pro приведен на рисунках 16, 17.

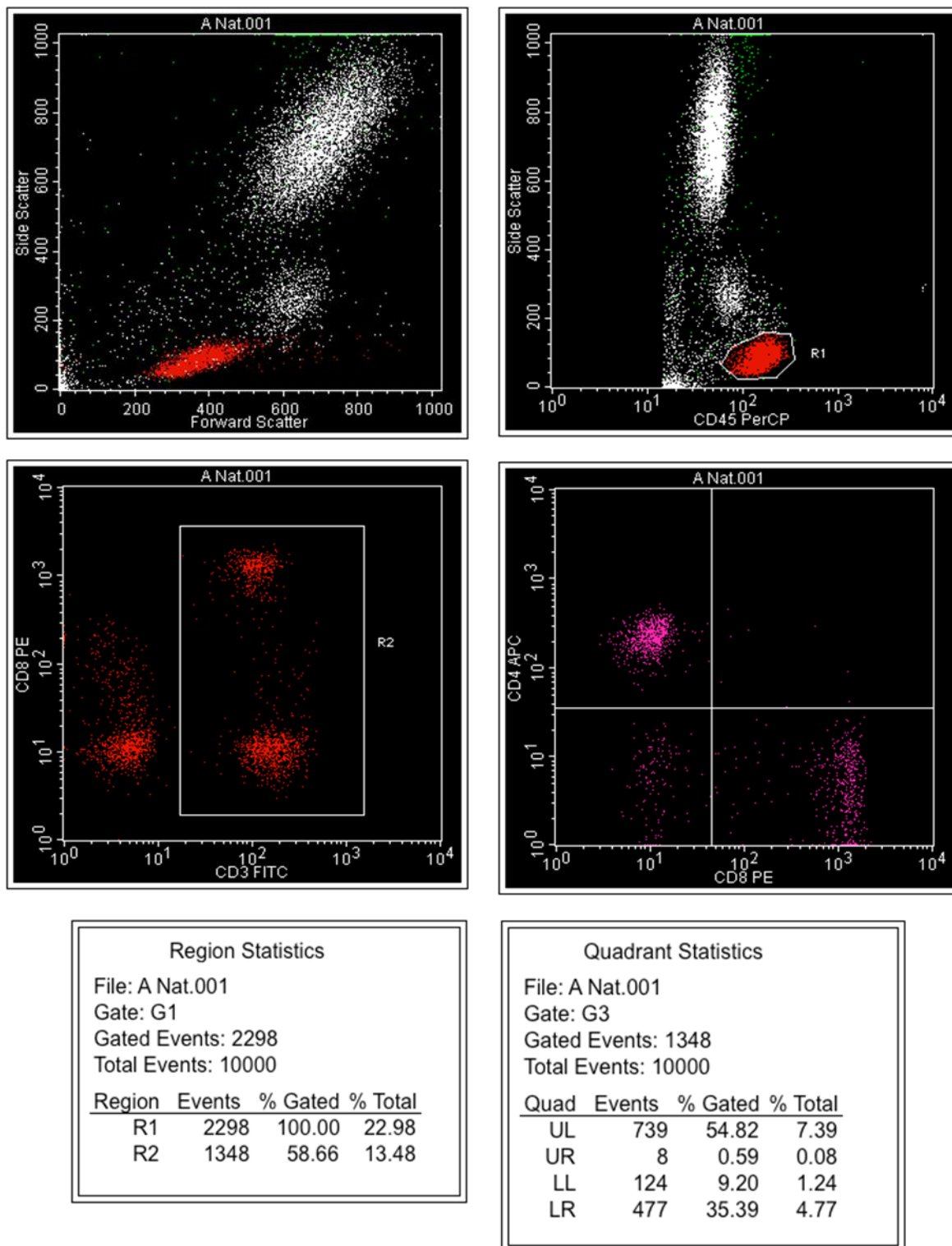


Рис. 16. Пример анализа данных в эксперименте по иммунофенотипированию лимфоцитов. **Пробирка А**

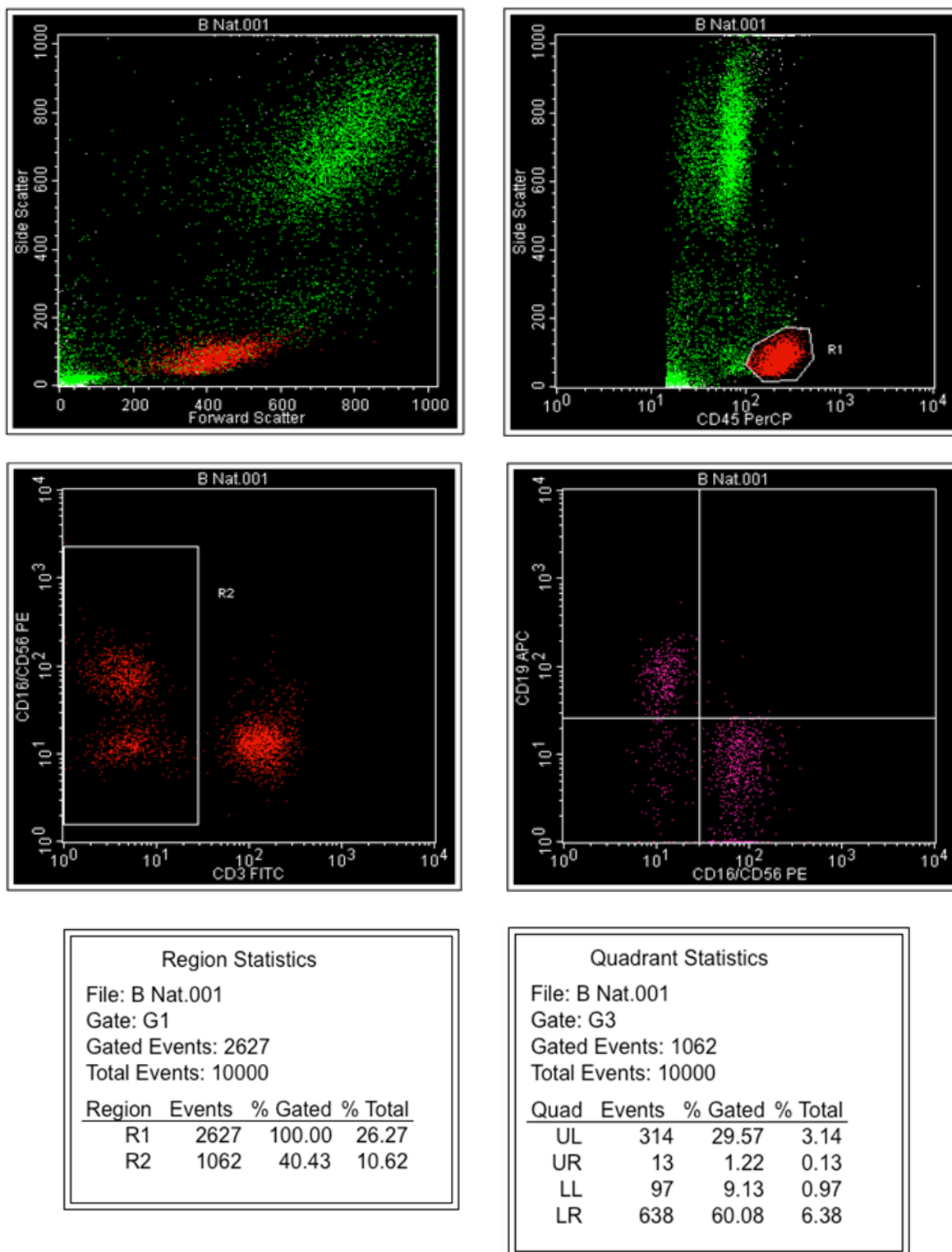


Рис. 17. Пример анализа данных в эксперименте по иммунофенотипированию лимфоцитов. **Пробирка Б**

1. Используйте диаграммы, созданные при сборе данных. Откройте на всех диаграммах файл, соответствующий пробирке А. При работе руководствуйтесь п. 2.5. Используйте многоцветное отображение гейтов на диаграммах.

2. На диаграмме CD45 PerCP vs SSC задайте полигональный регион 1, соответствующий клеткам с максимальной экспрессией CD45.
3. На диаграмме CD3 FITC vs CD8 PE отобразите только события, попадающие в гейт 1, соответствующий созданному региону. Задайте прямоугольный регион 2, соответствующий клеткам, экспрессирующим CD3.
4. В окне гейтов создайте гейт 3, соответствующий событиям, попадающим одновременно в регион 1 и регион 2, используйте оператор AND.
5. На диаграмме CD8 PE vs CD4 APC отобразите только события, попадающие в созданный гейт 3.
6. Разбейте диаграмму CD8 PE vs CD4 APC на квадранты, так чтобы CD8+CD4- клетки находились в правом нижнем, а CD8-CD4+ в левом верхнем углу.
7. Используя инструменты статистики, определите относительное содержание Т-лимфоцитов, Т-хелперов и Т-киллеров среди всех лимфоцитов.
Занесите данные в таблицу 4.
Обратите внимание, что проценты рассчитываются относительно общего количества лимфоцитов (гейт 1).
8. Повторите процедуру для данных пробирки Б. Откройте соответствующий файл. На диаграмме CD45 PerCP vs SSC. Задайте полигональный регион 1, соответствующий клеткам с максимальной экспрессией CD45.
9. На диаграмме CD3 FITC vs CD16,56 PE отобразите только события, попадающие в гейт 1, соответствующий созданному региону. Задайте прямоугольный регион 2, соответствующий клеткам, НЕэкспрессирующим CD3.
10. В окне гейтов создайте гейт 3, соответствующий событиям, попадающим одновременно в регион 1 и регион 2, используйте оператор AND.
11. На диаграмме CD16,56 PE vs CD19 APC отобразите только события, попадающие в созданный гейт 3.
12. Разбейте диаграмму CD16,56 PE vs CD19 APC на квадранты, так чтобы CD16,56+CD19- клетки находились в правом нижнем, а CD16,56-CD19+ в левом верхнем углу.

13.Используя инструменты статистики, определите относительное содержание В-лимфоцитов и НК-клеток среди всех лимфоцитов. Занесите данные в таблицу 4.

Обратите внимание, что проценты рассчитываются относительно общего количества лимфоцитов (гейт 1).

Таблица 4

Относительное содержание лимфоцитов различных типов в крови человека

Группа	Среднее значение, %	95%-доверительный интервал, %	Полученное значение, %
Т-лимфоциты	72	56-86	
Т-хелперы	45	33-58	
Т-киллеры	24	13-39	
В-лимфоциты	14	5-22	
НК-клетки	13	5-26	

Задание:

Определить относительное содержание основных популяций лимфоцитов в образце крови и по результатам экспериментальной работы сделать вывод о соответствии полученных данных 95%-му доверительному интервалу для здорового взрослого человека.

3.2. Анализ механизма клеточной гибели

Гибель отдельных клеток многоклеточного организма является необходимым условием нормального онтогенетического развития, а также лежит в основе подавляющего большинства патофизиологических процессов. В настоящее время выделяют не менее трех основных типов клеточной гибели: некроз, апоптоз и аутофагию.

Некроз, как правило, имеет место в тех случаях, когда клетка повреждена настолько сильно, что более не может существовать, однако существует и вариант контролируемого рецептор-зависимого некроза. Некротические клетки набухают, наблюдается денатурация и коагуляция цитоплазматических белков, разрушение клеточных органелл, нарушение целостности плазматической мембраны и выход вовне клеточного содержимого.

Апоптоз представляет собой строго контролируемый процесс гибели клетки, осуществляемый с участием регуляторных и эффекторных белков. Апоптотические клетки характеризуются конденсацией хроматина, фрагментацией ДНК, уплотнением цитоплазмы и, в конечном итоге, образованием окруженных мембраной фрагментов клетки – апоптотических телец. Апоптоз может являться частью запрограммированного онтогенетического процесса, а также может быть вызван различными стимулами: повреждением ДНК под действием ионизирующего излучения или химических агентов, тепловым и холодным шоком, взаимодействием клетки с цитотоксическими лимфоцитами и т.д.

Аутофагия (или автофагия) также строго контролируется и сопровождается “перевариванием” клеткой собственных белков, органелл, вплоть до крупных участков цитоплазмы с участием собственных лизосомальных ферментов.

Нарушение механизмов контролируемой клеточной гибели напрямую связано с развитием онкологических, аутоиммунных, нейродегенеративных и других заболеваний. В случае онкологических заболеваний такие нарушения становятся причиной устойчивости опухолей к действию цитотоксических химиотерапевтических препаратов и других видов лечения.

Определить механизм, по которому погибает клетка при действии определенного фактора, можно с помощью микроскопического исследования, либо при анализе специфических молекулярных процессов, сопровождающих каждый вид гибели.

Простейшим способом определить некротическую гибель с помощью проточной цитофлуориметрии является использование связывающихся с ДНК красителей, не проникающих через нативную клеточную мембрану (рис. 18). В этом случае будут окрашиваться только клетки с нарушенной целостностью мембраны, что наблюдается в случае некроза. Наиболее часто для данной задачи используются:

- 7-AAD – 7-аминоактиномицин D*;
- PI – пропидиум йодид.

Оба соединения являются интеркалирующими красителями, с высокой аффинностью взаимодействующими с двойной спиралью ДНК, но не проникающими через клеточную мембрану.

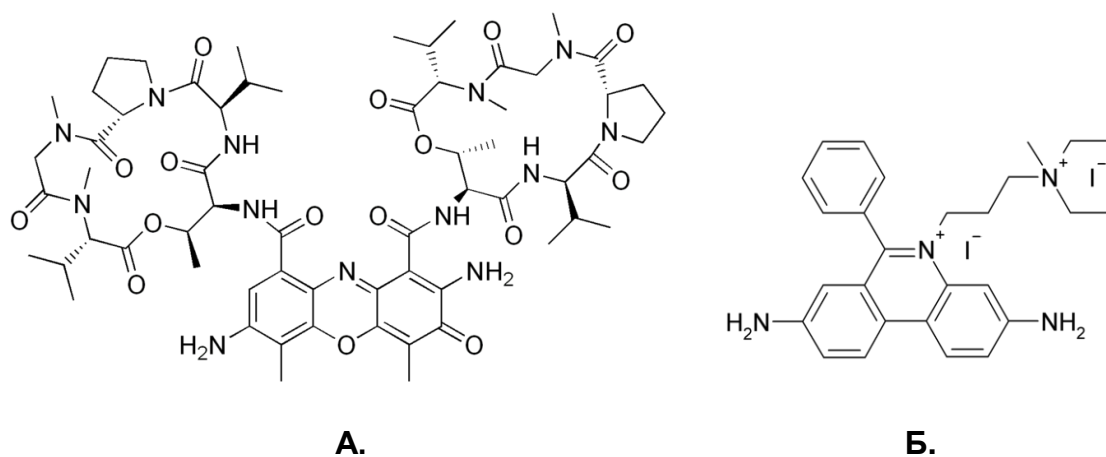


Рис. 18. Флуоресцентные ДНК-красители, используемые для идентификации клеток с нарушенной целостностью плазматической мембраны: А – 7-AAD; Б – PI

Для апоптоза наиболее характерными признаками являются выход на внешнюю сторону плазматической мембраны фосфатидилсерина, активация ферментов из группы каспаз, нарушение функционирования митохондрий и исчезновение потенциала на их мембране, выход в цитоплазму митохондриальных белков, активация или, наоборот, деградация белков-маркеров, фрагментация ДНК.

Изменения в плазматической мембране – одна из наиболее ранних характеристик развития апоптоза, детектируемая в живых клетках. В норме

* Оптические характеристики красителей приведены в приложении 1.

наружный и внутренний слои мембраны существенно отличаются по своему липидному составу, в частности, в наружном слое мембраны отсутствует фосфатидилсерин. Экстернализация фосфатидилсерина необходима – это своеобразный сигнал “ешь меня” для макрофагов, участвующих в поглощении апоптотических телец.

Появление фосфатидилсерина в наружном слое мембраны может быть выявлено с помощью *аннексина V*, связанного с красителями. Аннексин V (рис. 19) – белок размером 35-36 кДа, относящийся к обширной группе белков, характеризующихся способностью связываться с отрицательно заряженными фосфолипидами при участии ионов Ca^{2+} . В организме его функция предположительно заключается в регуляции свертывания крови. При наличии на поверхности клеток фосфатидилсерина аннексин V специфически связывается с ними и обеспечивает их детектирование за счет регистрации флуоресценции красителя.

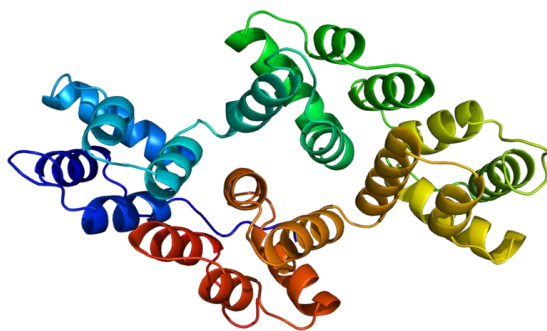


Рис. 19. Структура аннексина V

Необходимо учитывать, что при нарушении целостности клеточной мембраны аннексин V может проникать внутрь клетки, при этом окраска будет наблюдаться независимо от локализации фосфатидилсерина. В связи с этим необходимо использовать сочетание красителей на апоптоз и некроз, чтобы точно идентифицировать состояние клетки.

Экспериментальная часть

Цель работы:

Определение механизма гибели клеток при действии цитотоксических агентов

Оборудование и материалы:

- проточный цитофлуориметр *FACSCalibur*, оснащенный двумя лазерами;
- 6-луночный планшет с культивируемыми клетками яичника китайского хомячка *CHO* (за 24 часа до занятия в лунки планшета внесены цитотоксические соединения);
- раствор для снятия клеток с подложки (*трипсин-версен*),
- охлажденный фосфатный буфер (*PBS*),
- центрифуга для осаждения клеток,
- набор реактивов для окраски погибших и апоптотических клеток. При работе используется **один из следующих вариантов:**

1) *BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit*, включающий:

- a. *FITC Annexin V* – аннексин V, конъюгированный с красителем *FITC*;
- b. *PI* – пропидиум йодид, 50 мкг/мл;
- c. буфер для окрашивания (*Annexin V Binding Buffer*) в 10-кратной концентрации (0.1M *HEPES* (pH 7.4), 1.4M *NaCl*, 25мM *CaCl₂*);

2) *BD Pharmingen™ PE Annexin V Apoptosis Detection Kit*, включающий:

- a. *PE Annexin V* – аннексин V, конъюгированный с красителем *PE*;
- b. *7-AAD* – 7-аминоактиномицин D;
- c. буфер для окрашивания (*Annexin V Binding Buffer*) в 10-кратной концентрации (0.1M *HEPES* (pH 7.4), 1.4M *NaCl*, 25мM *CaCl₂*);

- пробирки *Falcon* 12×75 мм с крышками, полипропиленовые пробирки объемом 15 мл с крышками, автоматические дозаторы переменного объема на 1-10 мкл и 100-1000 мкл со сменными одноразовыми наконечниками, деионизированная вода, проточная жидкость *FACSFlow*, емкость для сбора отработанных реактивов и использованных наконечников.



Компоненты в составе *Annexin V Apoptosis Detection Kit*, а также исследуемые в работе цитотоксические соединения являются опасными для человека и могут обладать мутагенным действием. При работе необходимо избегать их попадания на кожу и слизистые.

В качестве цитотоксических агентов в данной работе используются (рис. 20):

- цисплатин – производное платины (цис-диаминдихлорплатина(II)), взаимодействующее с ДНК с образованием внутри- и межнитевых сшивок;
- циклофосфамид – (RS)-N,N-бис(2-хлорэтил)-1,3,2-оксазафосфоринан-2-амин-2-оксид, трансформирующийся под действием фосфатаз клетки в ряд метаболитов, образующих алкильные сшивки ДНК и белков;
- актиномицин D – полипептидный антибиотик, связывающийся с комплексом инициации транскрипции и препятствующий работе РНК-полимеразы.

Все перечисленные соединения в настоящее время применяются для лечения онкологических заболеваний.

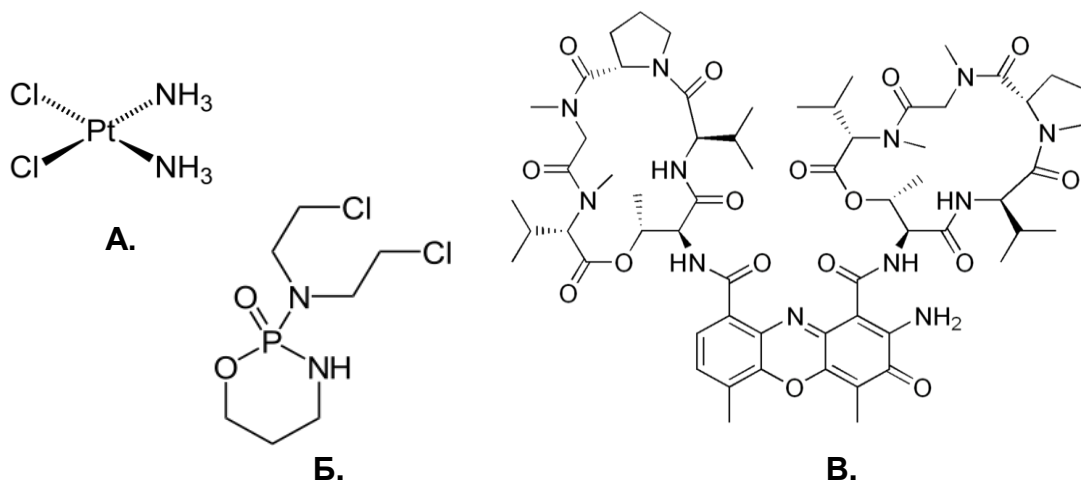


Рис. 20. Цитотоксические соединения: А. – цисплатин; Б. – циклофосфамид; В. – актиномицин D

Для корректной интерпретации данных необходимо сравнение окрашивания обработанных клеток с клетками, неподвергавшимися воздействию (“контроль”).

Разведение лизирующего раствора:

Перед началом работы приготовьте буфер для окрашивания (из расчета не менее 5 мл на лунку планшета), разведя его в 10 раз деионизированной водой. Оставьте раствор при комнатной температуре.

Получение суспензии клеток:

Для исследования клеток методом проточной цитофлуориметрии необходимо снять адгезионную культуру клеток с подложки (лунок планшета).

1. С использованием автоматического дозатора соберите из лунки планшета культуральную среду в 15 мл пробирку.
2. Промойте лунку 2 раза по 1,5 мл PBS, соберите его в ту же пробирку.
3. Промойте лунку раствором для снятия клеток с подложки (1,5 мл).
4. Залейте лунку раствором для снятия клеток с подложки (200 мл), обеспечивающим диссоциацию клеток со дна лунок. Клетки линии СНО в нормальных условиях роста находятся на дне сосуда в прикрепленном состоянии.
5. После инкубации в течение 5-10 минут добавьте 2 мл холодного PBS, дозатором распипетируйте содержимое лунки для диссоциации клеточного слоя и тщательно соберите суспензию в пробирку.
6. Дважды промойте лунку PBS для количественного сбора клеток в ту же пробирку.
7. Осадите клетки на центрифуге (5 мин при 200g). **Работа с центрифугой осуществляется только в присутствии инженера или преподавателя.**
8. Ресуспендируйте клетки в 3 мл холодного PBS.
9. С помощью камеры Горяева рассчитайте количество клеток в собранном образце*.
10. Повторно осадите клетки на центрифуге, ресуспендируйте разведенным (1×) буфером для окрашивания до концентрации 1 млн клеток на 1 мл

* Процедура работы с камерой Горяева описана в приложении 2.

Окраска клеток:

1. В пробирку Falcon 12×75 мм внесите 100 мкл суспензии клеток в буфере для окрашивания.
2. Добавьте **5 мкл** растворе аннексина V, конъюгированного с красителем.
3. Добавьте **5 мкл** 7-AAD или **5 мкл** PI, в зависимости от состава набора.
4. Бережно перемешайте и оставьте при комнатной температуре в темноте на **15 минут**.
5. Добавьте **400 мкл** буфера для окрашивания (1×).

Образцы необходимо проанализировать на проточном цитофлуориметре в течение 1 часа после окрашивания.

Анализ образца на проточном цитофлуориметре:

1. Включите цитофлуориметр и компьютер, подготовьте прибор к работе как описано в п. 2.2.
2. Руководствуясь п. 2.4 настройте прибор для работы. Подключитесь к прибору. Загрузите файл настроек, указанный преподавателем. Задайте количество собираемых событий 20 000. Задайте папку и название файла для сохранения данных.

Красители в составе разных наборов отличаются по своим оптическим свойствам. В связи с этим их флуоресценция будут регистрироваться в разных каналах.

<i>FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit</i>	<i>PE Annexin V Apoptosis Detection Kit</i>
выберите для сохранения данные FSC, SSC, FL1-H, FL2-H	выберите для сохранения данные FSC, SSC, FL2-H, FL3-H

3. Задайте следующие названия каналов:

<i>FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit</i>	<i>PE Annexin V Apoptosis Detection Kit</i>
FSC – Forward Scatter, SSC – Side Scatter, FL1-H – FITC Annexin V, FL2-H – PI	FSC – Forward Scatter, SSC – Side Scatter, FL2-H – PE Annexin V, FL3-H – 7-AAD

4. В окне эксперимента создайте следующие диаграммы:

<i>FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit</i>	<i>PE Annexin V Apoptosis Detection Kit</i>
FSC vs SSC FITC Annexin V vs PI	FSC vs SSC PE Annexin V vs 7-AAD

5. Установите пробирку с необработанными клетками (“контроль”) в порт забора образца, запустите сбор данных. В присутствии преподавателя выполните оптимизацию настроек прибора.
6. Соберите и сохраните данные для “контрольной” пробирки.
7. Соберите и сохраните данные для “опытной” пробирки/пробирок.
8. После окончания работы с образцами выключите прибор как описано в п. 2.3.

Анализ и интерпретация полученных данных:

Пример анализа данных в программе CellQuest Pro приведен на рисунке 21.

1. Используйте диаграммы, созданные при сборе данных. Откройте на всех диаграммах файл, соответствующий “контрольной” пробирке. При работе руководствуйтесь п. 2.5. Используйте многоцветное отображение гейтов на диаграммах.
2. На диаграмме FSC vs SSC задайте регион, ограничивающий типичные по размеру клетки. Гибель клеток при действии цитотоксических агентов может сопровождаться образованием большого количества дебриса – фрагментов клеток, апоптотических телец, обрывков мембран и т.п.
3. На диаграмме FITC Annexin V vs PI (или PE Annexin V vs 7-AAD) отобразите только события, попадающие в гейт 1, соответствующий созданному региону.
4. Разбейте диаграмму FITC Annexin V vs PI (или PE Annexin V vs 7-AAD) на квадранты:
 - Нативные клетки не окрашиваются ни конъюгированным с красителем Annexin V, ни PI/7-AAD.

- Клетки на ранних стадиях апоптоза сохраняют целостность мембраны, но на внешней стороне их плазматической мембраны появляется фосфатидилсерин. Эти клетки окрашиваются только конъюгированным с красителем Annexin V.
- Клетки на поздней стадии апоптоза или погибшие путем некроза теряют целостность мембраны и окрашиваются всеми красителями.

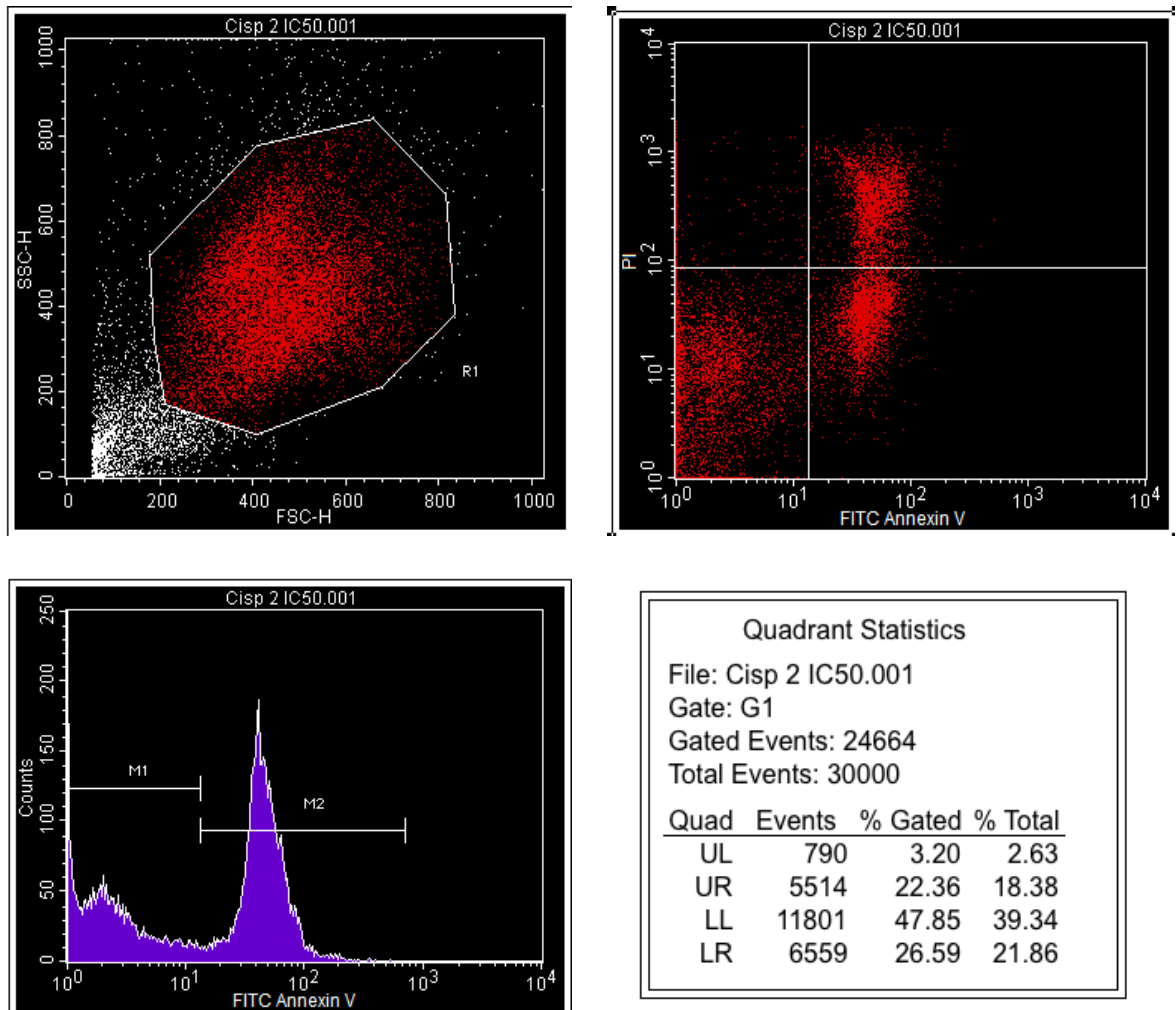


Рис. 21. Пример анализа данных в эксперименте по определению механизма гибели клеток. Приведены данные для клеток, обработанных цитотоксическим агентом

- Окраску клеток Annexin V, конъюгированным с красителем, можно представить в виде гистограммы, по оси X которой отложен уровень сигнала в соответствующем канале.
- Используя инструменты статистики, определите относительное содержание клеток каждой группы. Занесите данные в таблицу 5.

7. Повторите процедуру для пробирок с клетками, обработанными цитостатическими соединениями.

Обратите внимание, что в любой популяции клеток даже в отсутствие сильных внешних воздействий присутствует некоторое количество погибающих/погибших клеток.

Нарушение условий получения клеточной суспензии может привести к повреждению клеток. Если в “контрольной” пробирке значительная часть клеток окрасилась PI/7-AAD, результаты эксперимента являются некорректными.

Таблица 5

Относительное содержание жизнеспособных и погибающих клеток

Вариант обработки	Нативные, %	Ранний апоптоз, %	Поздний апоптоз/некроз, %
Контроль			
Цитотоксическое соединение 1, концентрация X			
Цитотоксическое соединение 2, концентрация X			
Цитотоксическое соединение 3, концентрация X			

Задание:

Определить относительное содержание жизнеспособных и погибающих клеток СНО при действии различных цитотоксических агентов и сделать вывод о преимущественном механизме гибели клеток.

3.3. Анализ клеточного цикла методом ДНК-цитометрии

Ряд стадий, или состояний, через которые проходит клетка от момента образования из материнской клетки до деления с образованием дочерних клеток, получил название *клеточного цикла*.

Для активно делящихся эукариотических клеток продолжительность цикла в среднем составляет около суток. В течение этого времени клетка последовательно проходит через следующие фазы (рис. 22):

- **G1** (от англ. “gap” – промежуток, интервал) – фаза роста новообразованной клетки, активного образования белков и клеточных структур;
- **S** (от англ. “synthesis” – синтез) – фаза синтеза ДНК, или репликации;
- **G2** – фаза, во время которой происходит контроль завершенности репликации ДНК перед началом деления;
- **M** (от англ. “mitosis” – митоз) – фаза митотического деления клетки.

Дифференцировавшиеся клетки, “вышедшие” из цикла последовательных делений, находятся в фазе покоя **G0**.

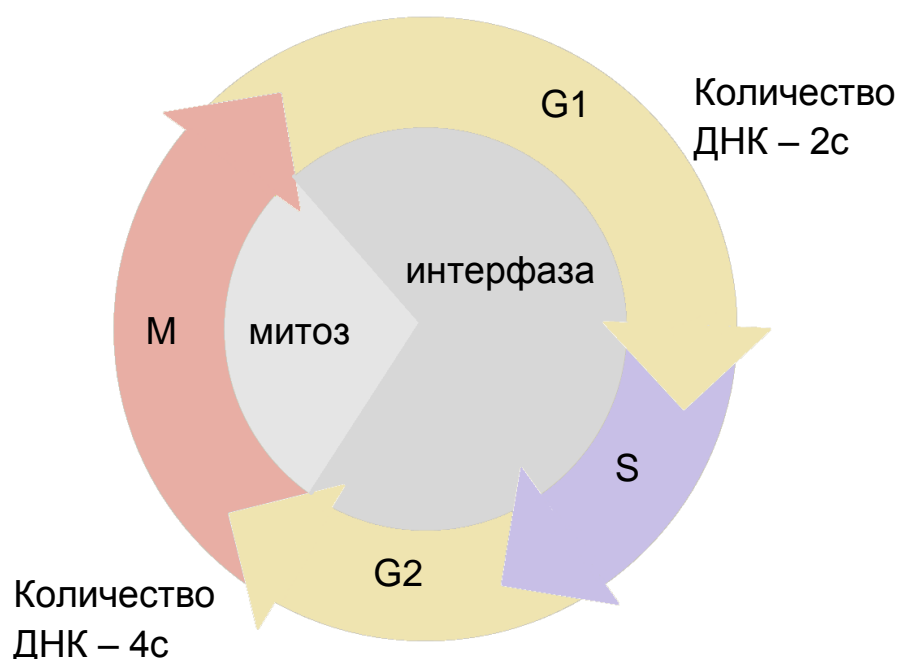


Рис. 22. Схематичное представление клеточного цикла

Существует многоуровневый контроль прохождения клеткой фаз клеточного цикла. Ключевым компонентом системы контроля является небольшое семейство протеинкиназ (*циклин-зависимые киназы*) и их белков-

регуляторов (*циклины*), кроме этого важная роль принадлежит многочисленным *регуляторным белкам*, способным блокировать прохождение клеткой цикла в случае нарушения целостности ДНК, появления сшивок ДНК-белок или ДНК-ДНК, неполной репликации, нарушения связывания хромосом с микротрубочками при начале митоза и т.п. Если в течение определенного времени клетке не удастся исправить нарушения, то происходит индукция апоптоза. Это механизм позволяет поддерживать генетическую идентичность клеток многоклеточного организма.

Нарушения в системе контроля клеточного цикла – одна из основных причин образования злокачественных опухолей. Мутации в генах регуляторных белков клеточного цикла приводят к бесконтрольному делению клеток, дальнейшему накоплению мутаций в клетках, появлению и размножению анеуплоидных клеток с ненормальным содержанием хромосом и т.д. В свою очередь, действие многих противоопухолевых препаратов сопровождается замедлением или блокадой клеточного цикла.

Определить фазу цикла можно по анализу количества ДНК в клетке. В фазе **G1/G0** количество ДНК строго соответствует **2c**. В ходе **S**-фазы количество ДНК постепенно увеличивается и достигает **4c** к **G2**-фазе. После разделения дочерних клеток в митозе количество ДНК возвращается к **2c**.

Для анализа количества ДНК методом проточной цитофлуориметрии проводится выделение из клеток ядер и их окрашивание с помощью красителя пропидиум йодида PI (рис. 18), флуоресценция которого является количественным показателем содержания ДНК.

Экспериментальная часть

Цель работы:

Анализ влияния цитотоксических соединений на клеточный цикл

Оборудование и материалы:

- проточный цитофлуориметр FACSCalibur, оснащенный двумя лазерами;
- 6-луночный планшет с культивируемыми клетками яичника китайского хомячка СНО (за 24 часа до занятия в лунки планшета внесены цитотоксические соединения);
- раствор для снятия клеток с подложки (трипсин-версен),
- охлажденный фосфатный буфер (PBS),

- центрифуга для осаждения клеток,

- набор реактивов *Cycle TEST™ PLUS DNA Reagent Kit*, включающий:

- 1) *Solution A* (реактив А) – раствор трипсина в буфере, содержащем детергенты и тетрагидрохлорид спермина;
- 2) *Solution B* (реактив В) – раствор ингибитора трипсина и рибонуклеазы А в цитратном буфере, содержащем тетрагидрохлорид спермина;
- 3) *Solution C* (реактив С) – раствор PI и тетрагидрохлорида спермина в цитратном буфере;
- 4) Цитратный буфер, содержащий сахарозу и диметилсульфоксид.

- пробирки *Falcon* 12×75 мм с крышками, полипропиленовые пробирки объемом 15 мл с крышками, автоматические дозаторы переменного объема на 100-1000 мкл со сменными одноразовыми наконечниками, деионизированная вода, проточная жидкость *FACSFlow*, фильтровальная бумага, емкость для сбора отработанных реактивов и использованных наконечников.



Компоненты в составе *DNA Reagent Kit*, а также исследуемые в работе цитотоксические соединения являются опасными для человека и могут обладать мутагенным действием. При работе необходимо избегать их попадания на кожу и слизистые.

В качестве агентов, влияющих на клеточный цикл в данной работе используются цитотоксические соединения цисплатин, циклофосфамид, актиномицин D, описанные подробно на странице 53 и представленные на рисунке 20.

Для корректной интерпретации данных необходимо сравнение обработанных клеток с клетками, неподвергавшимися воздействию (“контроль”).

Подготовка реактивов:

Перед началом работы реактивы А и В необходимо нагреть до комнатной температуры. Реактив С должен сохраняться при 2-8°C в темноте.

Получение суспензии клеток:

Для исследования клеток методом проточной цитофлуориметрии необходимо снять адгезионную культуру клеток с подложки (лунок планшета).

1. С использованием автоматического дозатора соберите из лунки планшета культуральную среду в 15 мл пробирку.
2. Промойте лунку 2 раза по 1,5 мл PBS, соберите его в ту же пробирку.
3. Промойте лунку раствором для снятия клеток с подложки (1,5 мл).
4. Залейте лунку раствором для снятия клеток с подложки (200 мл), обеспечивающим диссоциацию клеток со дна лунок. Клетки линии СНО в нормальных условиях роста находятся на дне сосуда в прикрепленном состоянии.
5. После инкубации в течение 5-10 минут добавьте 2 мл холодного PBS, дозатором распипетируйте содержимое лунки для диссоциации клеточного слоя и тщательно соберите суспензию в пробирку.
6. Дважды промойте лунку PBS для количественного сбора клеток в ту же пробирку.
7. С помощью камеры Горяева рассчитайте количество клеток в собранном образце*.
8. Осадите клетки на центрифуге (5 мин при 300g). **Работа с центрифугой осуществляется только в присутствии инженера или преподавателя.**
9. Залейте осадок клеток цитратным буфером с сахарозой и диметилсульфоксидом из расчета ~1 мл на 1 млн клеток, ресуспендируйте клетки и повторно осадите. Выполните эту процедуру дважды.
10. Ресуспендируйте осадок клеток цитратным буфером с сахарозой и диметилсульфоксидом до концентрации 1 млн клеток на 1 мл. Для последующей окраски необходимо отобрать в отдельную пробирку 5×10^5 клеток (0,5 мл суспензии).

Получение и окраска ядер клеток:

1. Осадите клетки (5×10^5) на центрифуге (5 мин при 400g).
2. Осторожно отберите из пробирки весь супернатант, последнюю каплю слейте на фильтровальную бумагу.

* Процедура работы с камерой Горяева описана в приложении 2.

3. Добавьте **250 мкл** реактива А и осторожно перемешайте постукиванием по пробирке.

4. Оставьте при комнатной температуре на **10 минут**.

Под действием неионных детергентов происходит растворение мембранных липидов, трипсин разрушает цитоскелет клетки и ядерные белки. Спермин ассоциирует с нуклеиновыми кислотами и стабилизирует их.

5. Добавьте **200 мкл** реактива В и осторожно перемешайте постукиванием по пробирке.

6. Оставьте при комнатной температуре на **10 минут**.

Под действием РНК-азы происходит расщепление РНК. Активность трипсина на этой стадии ингибируется. Присутствие спермина позволяет сохранить ядра клеток с частично расщепленными белками.

7. Добавьте **200 мкл** холодного реактива С, осторожно перемешайте постукиванием по пробирке.

8. Оставьте на **10 минут** в темноте в холодильнике при 2-8°C.

Присутствующий в реактиве С пропидиум йодид окрашивает ДНК.

9. Перенесите окрашенный образец в пробирку Falcon 12×75 мм.

Образцы необходимо проанализировать на проточном цитофлуориметре в течение 3 часов после окрашивания. До анализа окрашенные образцы должны храниться при 2-8°C. Наличие агрегатов ядер существенно сказывается на результатах анализа, в связи с этим осторожно ресуспендируйте образец перед анализом постукиванием по пробирке.

Анализ образца на проточном цитофлуориметре:

1. Включите цитофлуориметр и подготовьте прибор к работе как описано в п. 2.2.

2. Руководствуясь п. 2.4 настройте прибор для работы. Подключитесь к прибору. Загрузите файл настроек, указанный преподавателем. Задайте количество собираемых событий 30 000. Задайте папку и название файла для сохранения данных.

В окне, открывающемся при выборе в меню Cytometer (Цитометр) пункта Detectors/Amps (Детекторы/Усилители) укажите для FL2 Mode (Режим работы) – **Lin** (Линейное усиление). Это позволит повысить

чувствительность прибора по отношению к небольшим изменениям уровня сигнала (не более 2-х раз между клетками в G1 и G2/M фазах).

В этом же окне в качестве **DDM-param** (DDM-параметр) укажите FL2. Для данного параметра будет регистрироваться не только высота сигнала, но и его ширина и площадь (рис. 7). Подробнее характеристики сигнала описаны в п. 1.4. Данная опция позволит различать между собой компактные ядра с удвоенным количеством ДНК и дублеты – прошедшие почти одновременно пары ядер с обычным количеством нуклеиновой кислоты.

3. Выберите для сохранения данные FSC, SSC, FL2-H, FL2-A.

4. В окне эксперимента создайте диаграммы:

FSC vs SSC,

FL2-W vs FL2-A,

и гистограмму для FL2-A.

5. Установите пробирку с необработанными клетками (“контроль”) в порт забора образца, запустите сбор данных при скорости потока **LO**. В присутствии преподавателя выполните оптимизацию настроек прибора.

6. Соберите и сохраните данные для “контрольной” пробирки.

7. Соберите и сохраните данные для “опытной” пробирки/пробирок.

8. После окончания работы с образцами выключите прибор как описано в п. 2.3.

Анализ полученных данных в программе CellQuest Pro:

Пример анализа данных в программе CellQuest Pro приведен на рисунке 23.

1. Используйте диаграммы, созданные при сборе данных. Откройте на всех диаграммах файл, соответствующий “контрольной” пробирке. При работе руководствуйтесь п. 2.5. Используйте многоцветное отображение гейтов на диаграммах.

2. На диаграмме FSC vs SSC задайте регион, ограничивающий типичные по размеру клетки. Гибель клеток при действии цитотоксических агентов может сопровождаться образованием большого количества дебриса – фрагментов клеток, апоптотических телец, обрывков мембран и т.п.

3. На диаграмме FL2-W vs FL2-A отобразите только события, попадающие в гейт 1, соответствующий созданному региону.

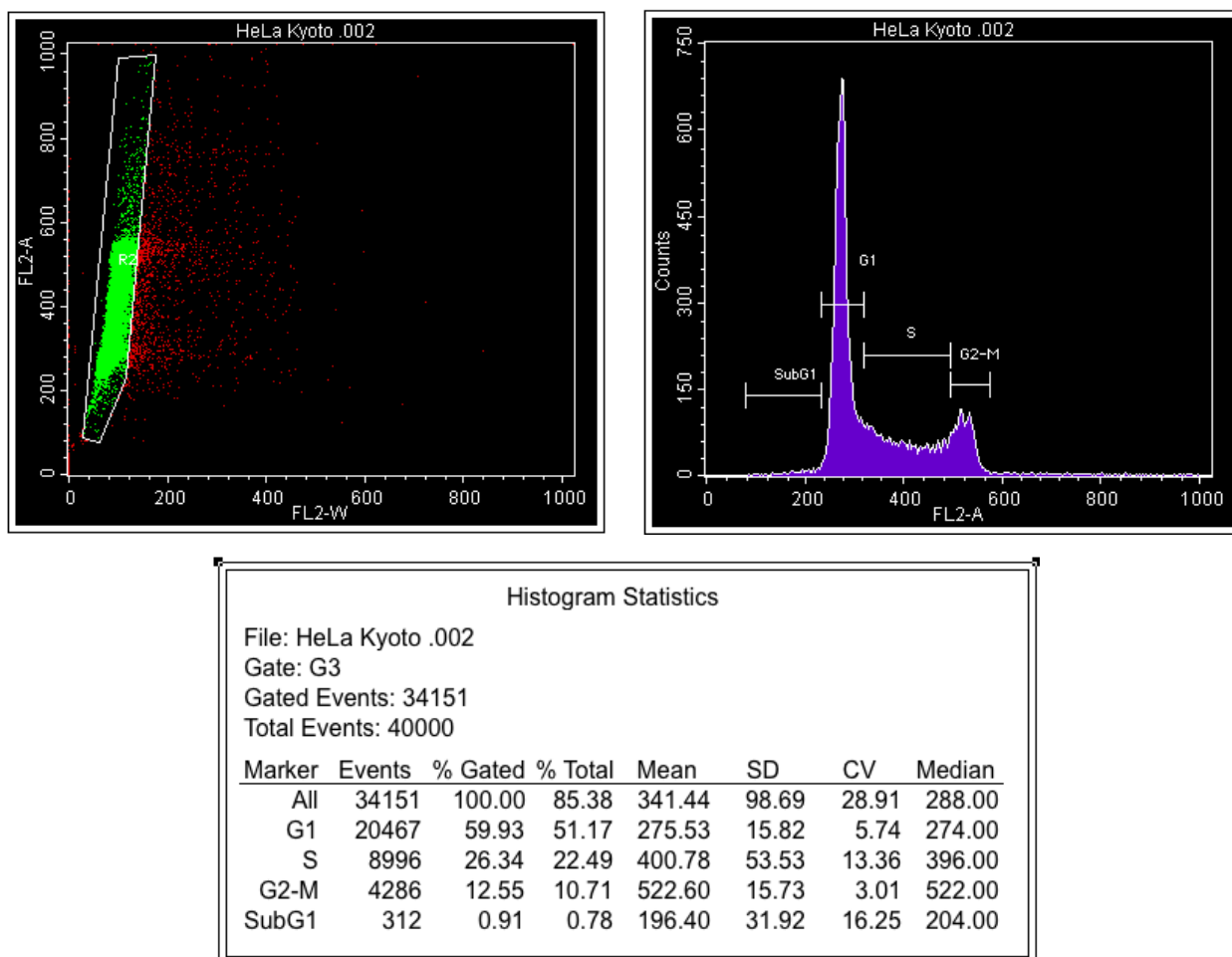


Рис. 23. Пример анализа данных в эксперименте по исследованию клеточного цикла в программе CellQuest Pro

4. На диаграмме FL2-W vs FL2-A задайте регион, ограничивающий события с очень небольшими значениями ширины сигнала FL2-W. Увеличение ширины сигнала является следствием слипания ядер или почти одновременного прохождения через луч лазера нескольких ядер.
5. В окне гейтов создайте гейт 3, соответствующий событиям, попадающим одновременно в регион 1 и регион 2, используйте оператор AND.
6. На гистограмме FL2-A отобразите только события, попадающие в гейт 3.
7. Задайте на гистограмме FL2-A маркеры, ограничивающие клетки с определенным количеством ДНК:

Область	Местоположение
G1	В подавляющем большинстве случаев – максимальный пик на гистограмме
G2/M	Как правило, второй по величине пик; величина сигнала в ~2 раза больше, чем для G1
S	Между G1 и G2/M
subG1	События с уровнем сигнала меньше, чем от ядер G1; фрагменты ядер, образовавшиеся в результате апоптоза или некроза клеток

В некоторых случаях на гистограмме могут присутствовать пики, соответствующие тетраплоидным клеткам (наличие таковых выявляется по тетраплоидам в G2/M фазе, сигнал от которых в два раза превышает G2/M диплоидных клеток) и анеуплоидным клеткам (наличие выявляется по присутствию дополнительных пиков с уровнем сигнала, не кратным диплоидам).

- С помощью выставления маркеров в программе CellQuest Pro приблизительно оцените относительное содержание клеток на каждой фазе клеточного цикла и относительную величину событий в subG1.

Обратите внимание, что проведение вертикальных границ между отдельными фазами является очень грубым и субъективным.

Анализ полученных данных в программе ModFit LT:

Более точное разделение данных на фазы клеточного цикла и их анализ могут быть проведены с помощью специализированных программ, в частности, ModFit LT. В данном разделе представлены минимальные сведения, необходимые для работы в программе ModFit LT. При необходимости более подробная информация может быть получена из поставляемого производителем руководства к программе (ModFit LT User Guide). Руководство размещено в свободном доступе на сайте производителя: <http://www.vsh.com>.

- Запуск программы ModFit LT** осуществляется с помощью ярлыка на рабочем столе или на панели быстрого доступа.

При запуске программы в верхней части монитора отображается основное меню программы, а также панель



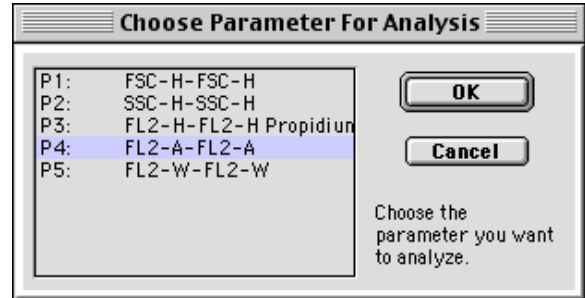
ModFit LT

инструментов.

2. В диалоговом окне, отображающемся при нажатии на соответствующую кнопку панели управления программы, **выберите файл** для анализа.



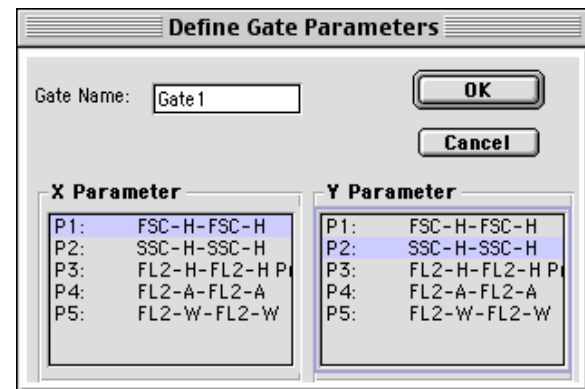
3. При открытии файла в окне Choose Parameter For Analysis (**Выберите параметр** для анализа) укажите FL2-A.



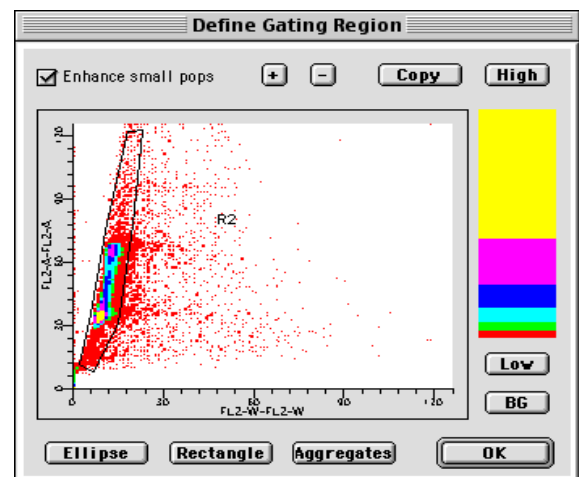
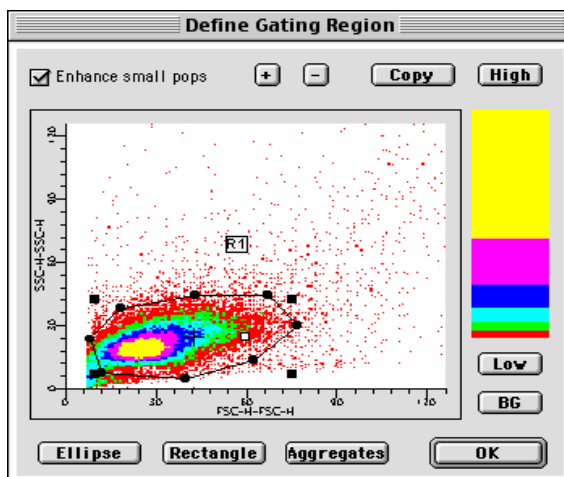
4. В появившемся окне Define Gates (Задать гейты) отметьте Gate 1 (Гейт 1) и Gate 2 (Гейт 2) для задания условий включения данных в анализ.



5. При нажатии в этом же окне кнопки Define Gate 1... (Задать гейт 1...) отобразится окно Define Gate Parameters (Задать параметры гейта). Выберите в качестве X-параметра (X Parameter) FSC-H, а в качестве Y-параметра (Y Parameter) SSC-H



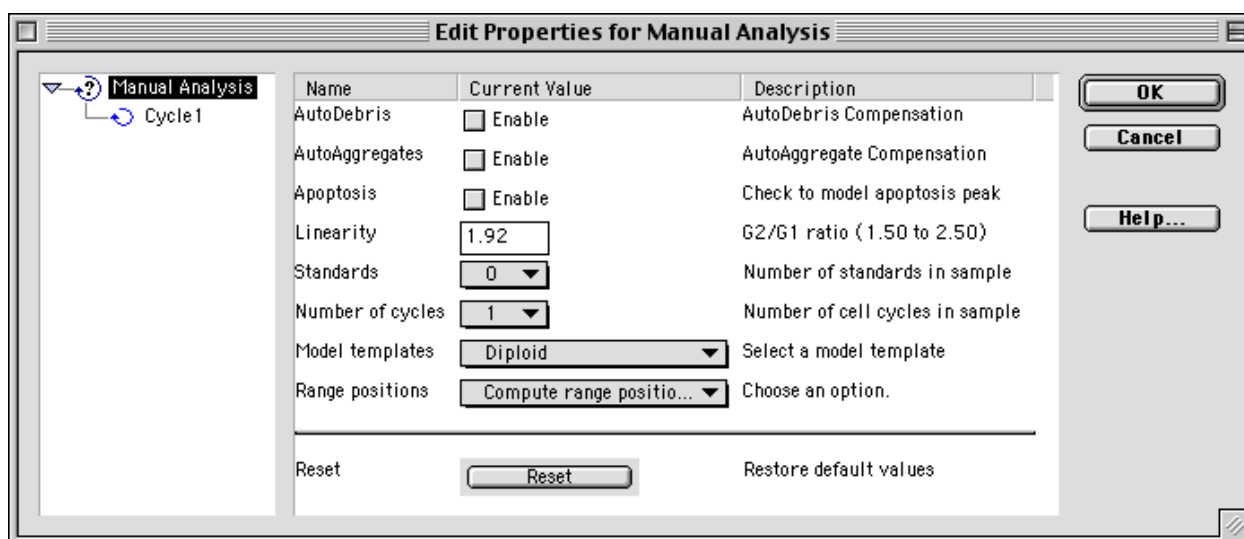
6. После нажатия кнопки ОК в появившемся окне Define Gate Region (Задать регион для гейта) выделите область, соответствующую анализируемым клеткам и подтвердите свой выбор гейта кнопкой ОК.



7. Аналогичным образом выберите для второго гейта параметры FL2-W и FL2-A и выделите область, исключаящую из анализа дуплеты.

После задания гейтов на листе нового эксперимента отобразится гистограмма, построенная с учетом гейтирования данных, и, внизу листа, заданные гейты на определенных пользователем диаграммах

8. В диалоговом окне, отображающемся при нажатии на кнопку Mod (Модель) панели управления программы, задайте параметры модели, в соответствии с которыми необходимо обработать данные.



Пункты AutoDebris (Автоопределение дебриса), AutoAggregates (Автоопределение агрегатов) и Apoptosis (Апоптоз) позволяют задать или отменить автоматический поиск на гистограмме соответствующих событий.

Linearity (Линейность) – параметр, зависящий от технического состояния прибора и показывающий соотношение в уровне сигнала между G2/M и G1 популяциями. Точно задание данной величины имеет важное значение для корректности анализа данных.

9. При нажатии на кнопку Range (Диапазон) на анализируемой гистограмме отобразятся маркеры регионов в соответствии с заданной моделью. Установите маркер, соответствующий G1 диплоидных клеток (Dip G1) на соответствующий пик гистограммы. Положение этого пика позволит программе



автоматически рассчитать положение остальных популяций. Возможно задание вручную приблизительных позиций и других маркеров.

10. После нажатия кнопки Fit (Рассчитать/аппроксимировать) на листе эксперимента отображается результат анализа.



Пример анализа данных в программе ModFit LT показан на рисунке 24.

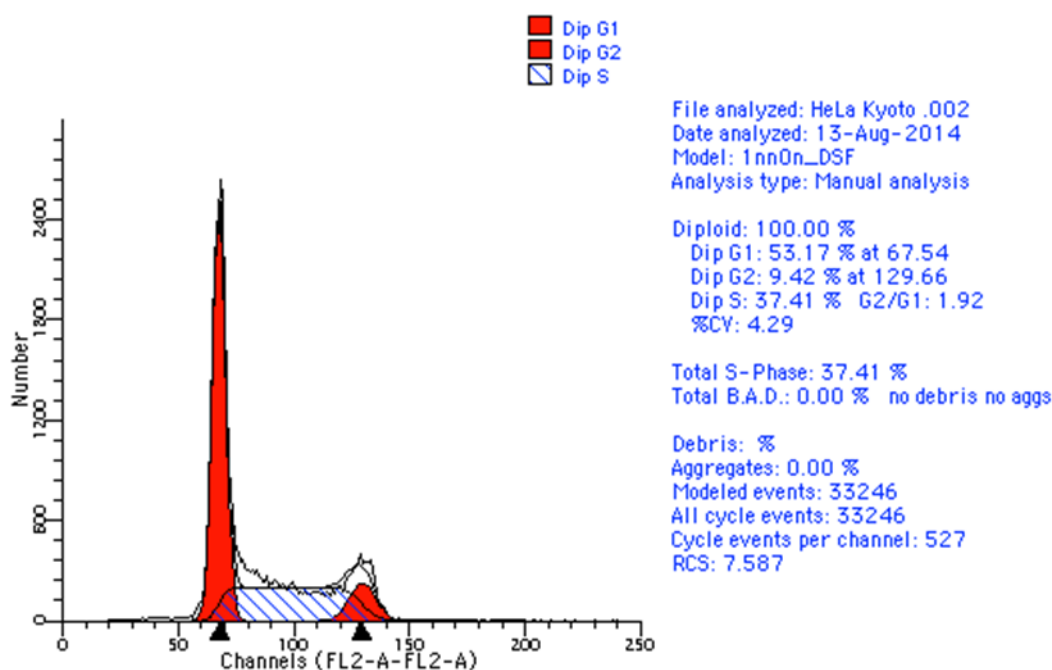


Рис. 24. Пример анализа данных в эксперименте по исследованию клеточного цикла в программе ModFit LT

Среди 33246 проанализированных клеток доля клеток в фазе G1 – 53.17%, в фазе G2/M – 9.42%, автоматически определенный коэффициент линейности составил 1.92. 37.41% клеток находится в фазе S.

11. Выполните анализ для контрольной и опытных проборок. При наличии значимого количества событий в subG1 добавьте в анализ популяцию Apoptosis (Апоптоз). Определите относительное содержание клеток на каждой фазе клеточного цикла и относительную величину subG1 событий. Занесите данные в таблицу 6, сравнив с результатами предварительного анализа в программе CellQuest Pro.

12. При необходимости, экспортировать данные эксперимента можно в меню Export (Экспорт) в пунктах Histogram graphic... (Гистограмма...) и Report graphic... (Графический файл отчета...).

Возможно копирование объекта и перенос его в другую программу через буфер обмена.

13. Сохранение файла эксперимента осуществляется в меню File (Файл) в пунктах Save (Сохранить) или Save as... (Сохранить как...).

Таблица 6
Распределение клеток по фазам клеточного цикла

Вариант обработки	G1-фаза, %	S-фаза, %	G2/M-фаза, %	subG1, %
Контроль				
Цитотоксическое соединение 1, концентрация X				
Цитотоксическое соединение 2, концентрация X				
Цитотоксическое соединение 3, концентрация X				

Задание:

Определить относительное содержание клеток СНО на каждой фазе клеточного цикла и сделать вывод о возможном влиянии цитотоксических агентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клетки/ под ред. Б. Льюина и др.; пер. с англ. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 951 с.
2. Ярилин А.А. Иммунология. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
3. Introduction to Flow Cytometry [Электронный ресурс]. – Электрон. текстовые дан. – Becton, Dickinson and Company, 2014 – Режим доступа: http://www.bdbiosciences.com/eu/services/training/itf_launch.jsp, свободный.
4. Learn about the principles of flow cytometry [Электронный ресурс]. – Электрон. текстовые дан. – Life Technologies Corporation, 2014 – Режим доступа: <http://www.lifetechnologies.com/ru/ru/home/support/tutorials.html>, свободный.
5. Ormerod M.G. Flow Cytometry - A Basic Introduction [Электронный ресурс]. – Электрон. текстовые дан. – De Novo Software, 2008 – Режим доступа: <http://flowbook.denovosoftware.com/index.php?title=&bc=3>, свободный.
6. Shapiro H.M. Practical Flow Cytometry. – Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2003. – 736 p.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Таблица П1-1

Оптические свойства основных флуорофоров, используемых в
проточной цитофлуориметрии

Флуорофор	Поглощение λ_{em} , нм	Флуоресценция λ_{ex} , нм	Лазер для возбуждения, нм	Канал регистрации сигнала *
FITC (флуоресцеин)	495	519	488	FL1
Alexa Fluor 488	499	519	488	FL1
SYTOX Green	504	523	488	FL1
Fiuo-3	506	526	488	FL1
DCF (2'7'- дихлордигидрофлу оресцеин)	505	535	488	FL1
EGFP (зелёный флуоресцентный белок)	488	507	488	FL1
HuPer (белок- сенсор H ₂ O ₂)	(420); 500	516	488	FL1
PE (фикоэритрин)	480;565	578	488	FL2
PI (пропидиум йодид)	536	617	488	FL2
Sy3	(512);550	570;(615)	488	FL2
PerCP (перидин- хлорофилл протеин)	490	675	488	FL3
7-AAD (7-амино- актиномицин D)	546	647	488	FL3
PE-Cy5 (конъюгат PE и Cy5)	480;565;650	670	488	FL3
PE-Cy7 (конъюгат PE и Cy5)	480;565;743	767	488	FL3
APC (аллофикоцианин)	650	660	635	FL4
Cy5	(625);650	670	635	FL4
Alexa Fluor 647	652	668	635	FL4
Cy5	(625);650	670	635	FL4

* Канал регистрации сигнала указан для проточного цитофлуориметра FACSCalibur

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Для подсчета количества клеток используется двухсеточная камера Горяева (рис. П2-1). Камера представляет собой толстое предметное стекло, разделенное бороздками. Центральная часть стекла содержит выемку глубиной 0,1 мм, на дно которой нанесена сетка. Глубина камеры (0,1 мм) и площадь больших и малых квадратов сетки ($1/25$ и $1/400$ мм², соответственно) указаны на предметном стекле. Объем жидкости над квадратом, образованным большими делениями сетки Горяева, составляет 0,004 мкл.

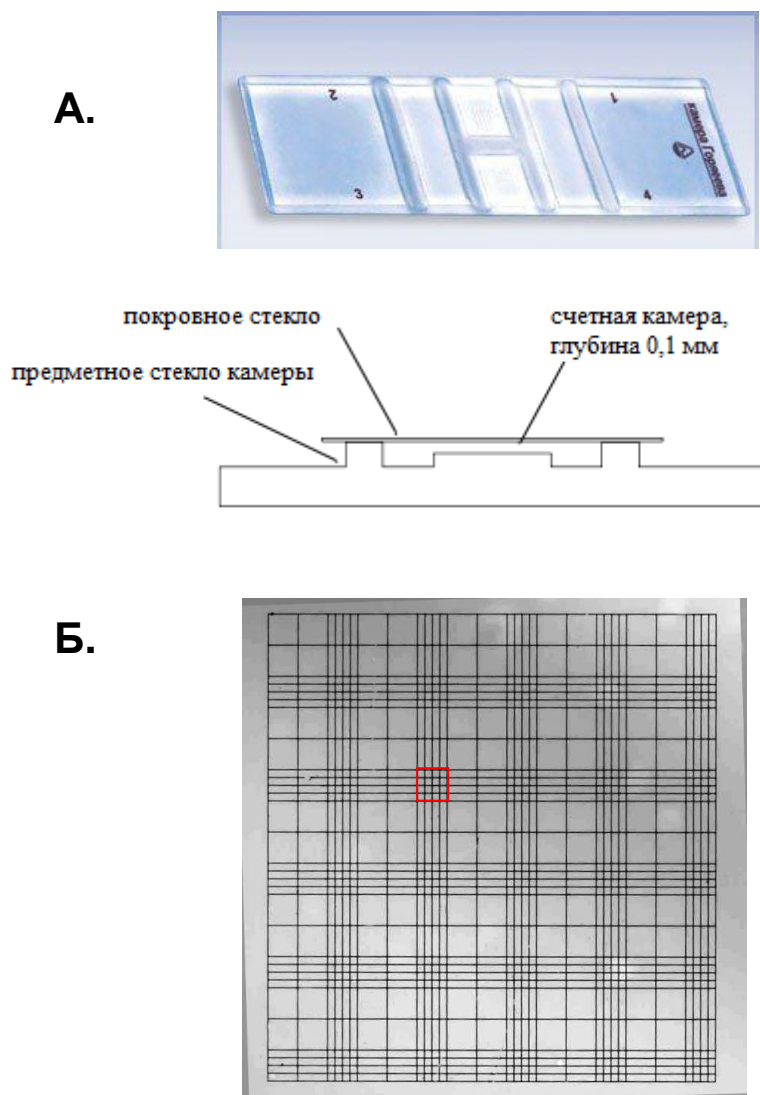


Рис. П2-1. Двухсеточная камера Горяева. А. – внешний вид камеры и схема камеры (вид сбоку), иллюстрирующая расположение счетной камеры; Б. – сетка счетной камеры, границы одного из больших квадратов выделены цветом

Перед началом работы необходимо подготовить камеру. Для этого покровное стекло необходимо поместить на камеру, плотно прижать пальцем и притереть его круговыми движениями до появления интерференционных радужных полос. Только при соблюдении этого условия покровное стекло хорошо удерживается на камере при её наклоне, а глубина и рабочий объем счетной камеры соответствуют указанным в паспорте.

Тщательно распипетированная суспензия клеток (30 мкл) с помощью дозатора переносится в счетную камеру, которая помещается на предметный столик микроскопа. Подсчет клеток проводят в режиме фазового контраста, сфокусировавшись на линиях одной из двух сеток, нанесенных на дно счетной камеры. Начинают подсчет через 2-3 минуты после заполнения, чтобы клетки осели и находились в одной плоскости.

Подсчитывается количество клеток в 20 больших квадратах. При подсчете учитываются все клетки, лежащие в квадрате, а также пересекающие верхнюю и правую сторону квадрата. Количество клеток в 1 мл исследуемой суспензии вычисляется по формуле:

$$M = (a \cdot 10^3) / (h \cdot S) \cdot n,$$

где M – количество клеток в 1 мл суспензии,

a – среднее количество клеток в квадрате сетки,

h – глубина камеры,

S – площадь квадрата сетки, мм^2 , при подсчете в больших квадратах
 $S = 1/25 \text{ мм}^2$,

10^3 – коэффициент перевода $[\text{см}^3]$ в $[\text{мм}^3]$,

n – коэффициент разведения суспензии.

Ирина Владимировна Балалаева

ПРОТОЧНАЯ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЯ

Учебно-методическое пособие

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Нижегородский государственный университет им. Н.И.
Лобачевского».

603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.

Подписано в печать Формат 60x84 1/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Гарнитура Таймс.

Усл. печ. л. . Уч.-изд. л. .

Заказ № . Тираж экз.

Отпечатано в типографии Нижегородского госуниверситета
им. Н.И. Лобачевского

603600, г. Нижний Новгород, ул. Большая Покровская, 37

Лицензия ПД № 18-0099 от 14.05.01