

**CITOMETRIA  
A FLUSSO O  
CITOFUORIMETRIA**



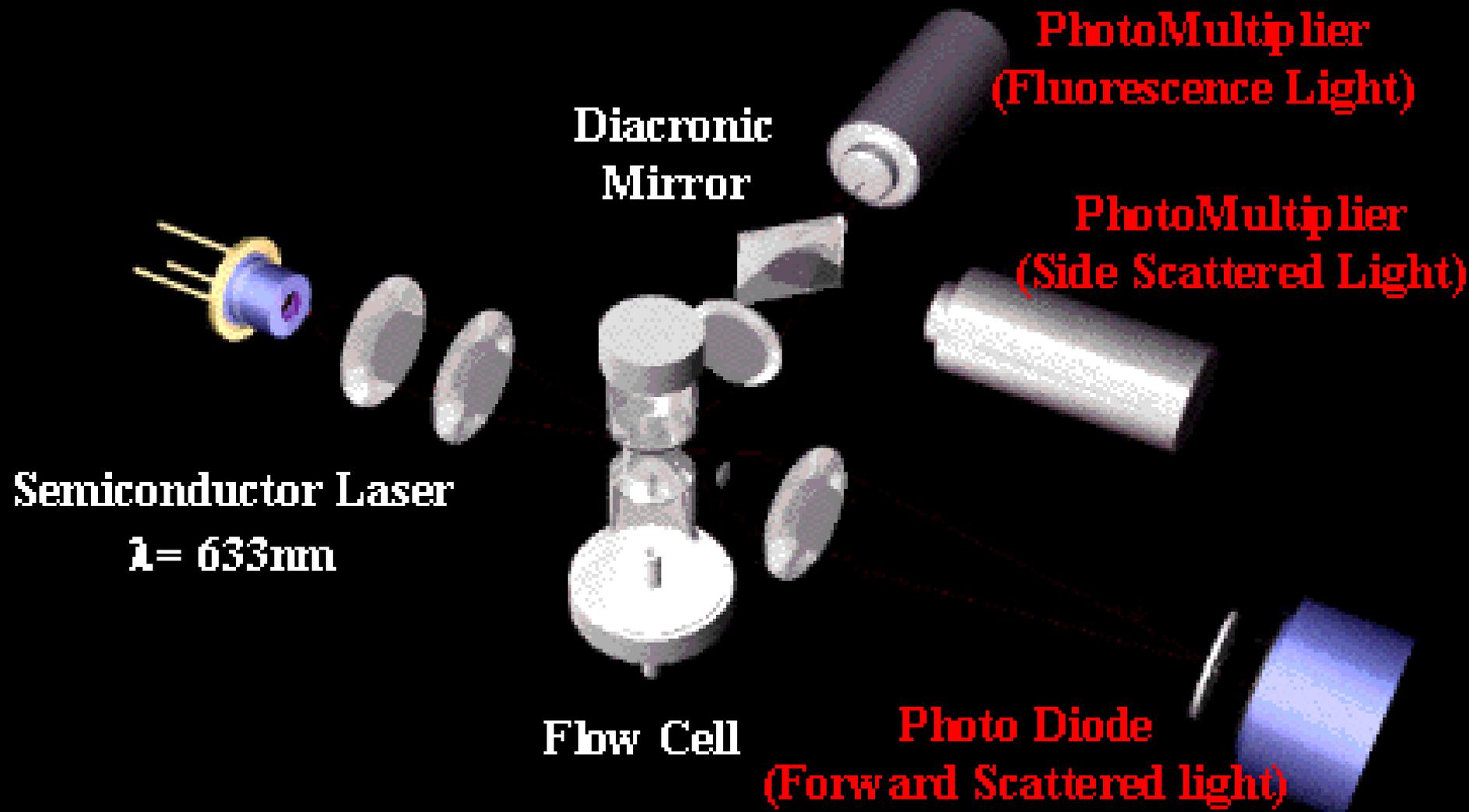
# CITOFUORIMETRIA CENNI STORICI

Tecnica nata alla fine degli anni 60, fortemente connessa alla microscopia ottica.

Semplificando, trattasi di microscopio con sistema automatico di **trasporto** delle cellule e di un **misuratore di luce** che sostituisce l'occhio umano.



# STRUMENTO: CITOFUORIMETRO o FACS



# CITOMETRIA A FLUSSO

## PRINCIPIO

Alla base di questa tecnica vi sono 2 fenomeni fisici:

### DIFFUSIONE

A piccolo ( $1^\circ \pm 0,1^\circ$ ) e grande ( $90^\circ \pm 12,5^\circ$ ) angolo.  
Selezione di popolazioni cellulari e discriminazione dai detriti.

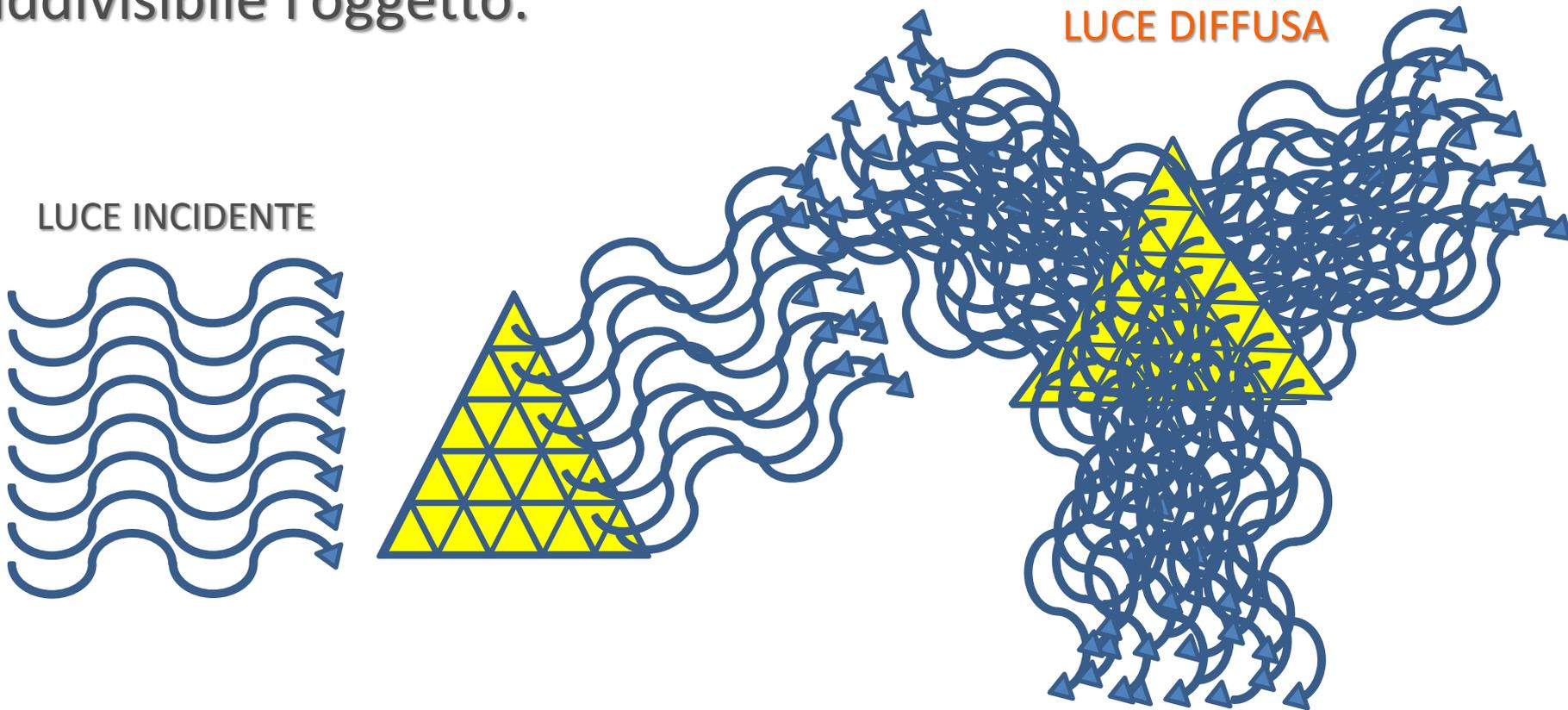
### FLUORESCENZA

Coniugazione di molecole fluorescenti a soggetti cellulari.  
Identificazione migliore delle popolazioni, riconoscimento di sostanze cellulari.

# CITOMETRIA A FLUSSO

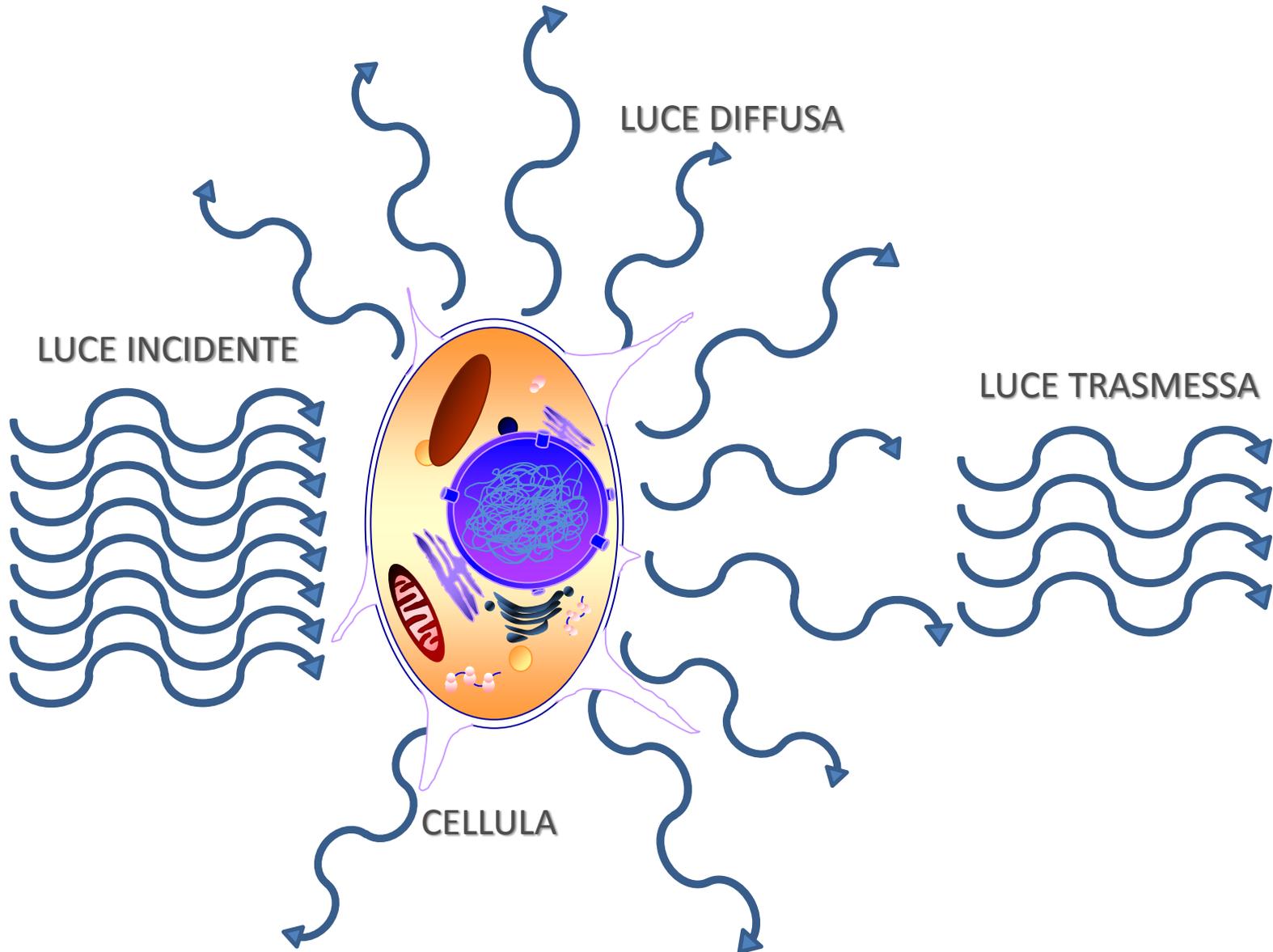
## DIFFUSIONE DELLA LUCE

La luce diffusa può essere considerata la **sommatoria** delle onde diffuse da **ogni componente elementare** in cui è suddivisibile l'oggetto.

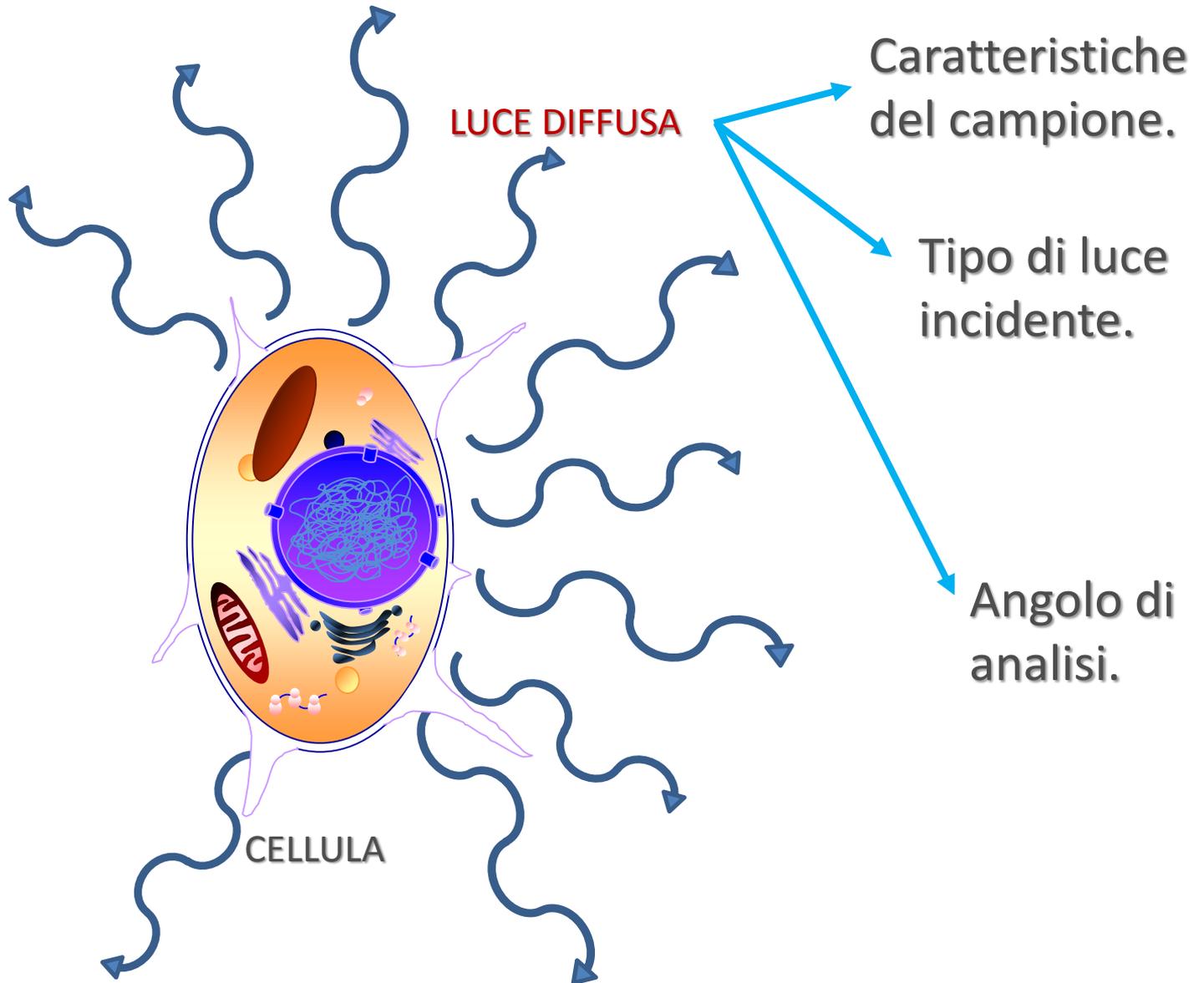


# CITOMETRIA A FLUSSO

## COMPORTAMENTO DELLA LUCE SULLE CELLULE



# CITOMETRIA A FLUSSO COMPORTAMENTO DELLA LUCE SULLE CELLULE



# CITOMETRIA A FLUSSO FLUORESCENZA



Potete «colorare» le cellule!

# FILMATI INDISPENSABILI

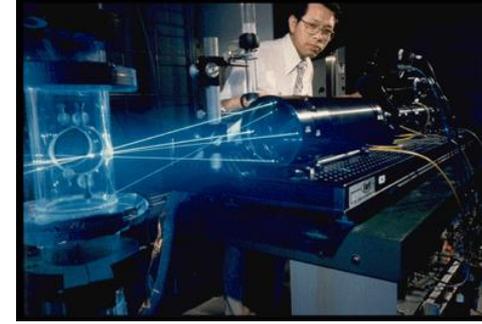
[http://media.invitrogen.com.edgesuite.net/tutorials/4Intro\\_Flow/player.html](http://media.invitrogen.com.edgesuite.net/tutorials/4Intro_Flow/player.html)

# SORGENTI DEL FACS

- **Lampade a Mercurio**, da UV a 600 nm.
- **Gas di Argon**, con emissione a 345 nm, **488 nm** e 514 nm.
- **Gas Argon Sintonizzabile**, da 350 a 529 nm.
- **Miscela di gas helio-neon**, a 544 nm oppure a 633 nm.
- **Miscela di gas argon-kriptone**, emissioni sintonizzabili dagli UV fino a 630 nm.
- **Dissoluzione di Rodamina (dye laser)**, da 580 a 650 nm circa. Eccitata con un laser ad argon, emette radiazione laser continua, selezionabili con un collimatore.



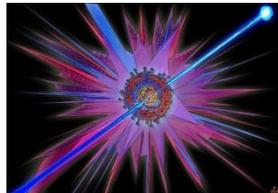
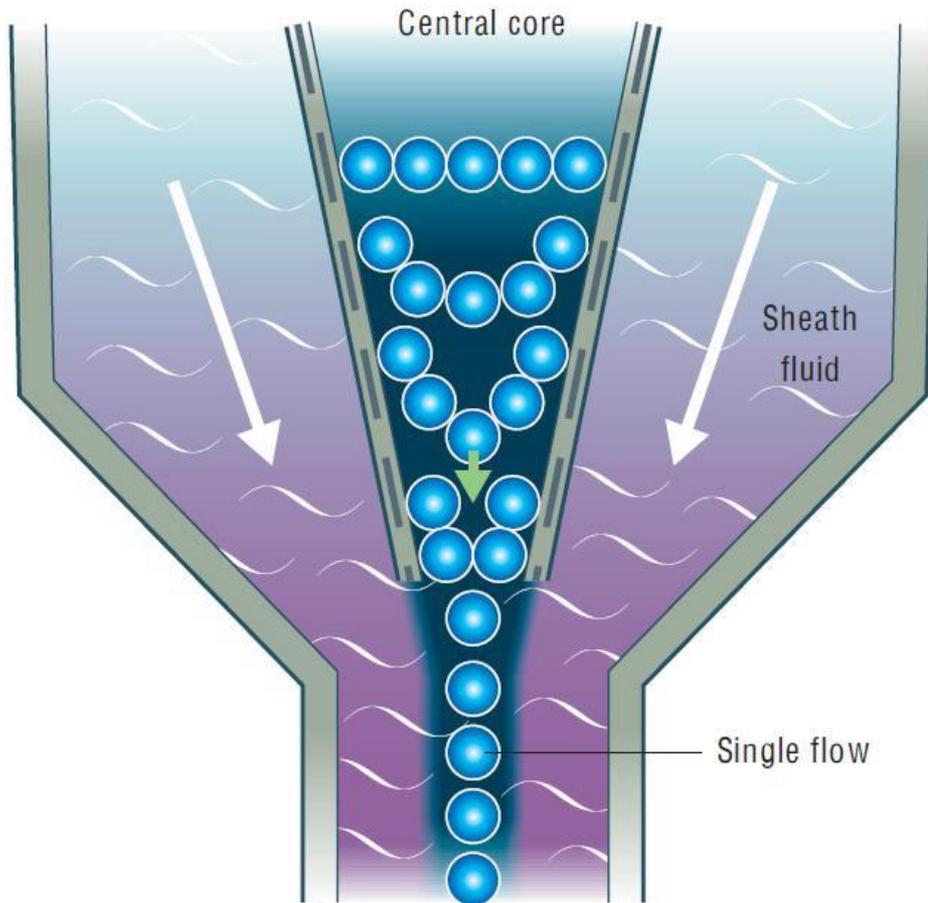
# CITOMETRIA A FLUSSO SORGENTI



- La sorgente più utilizzata è il **laser ad Argon**, di potenza tra i 15 mW e 5 W, costosa ed impiegabile a poche lunghezze d'onda, ovvero **488 nm (blu)**, 345 nm e 514 nm.
- La sorgente al laser Ar possiede una **elevata intensità**, permette la focalizzazione della radiazione su di una sezione molto ridotta (dimensioni cellulari) e l'**eccitazione di numerosi fluorofori**.

# CAMERA DI FLUSSO

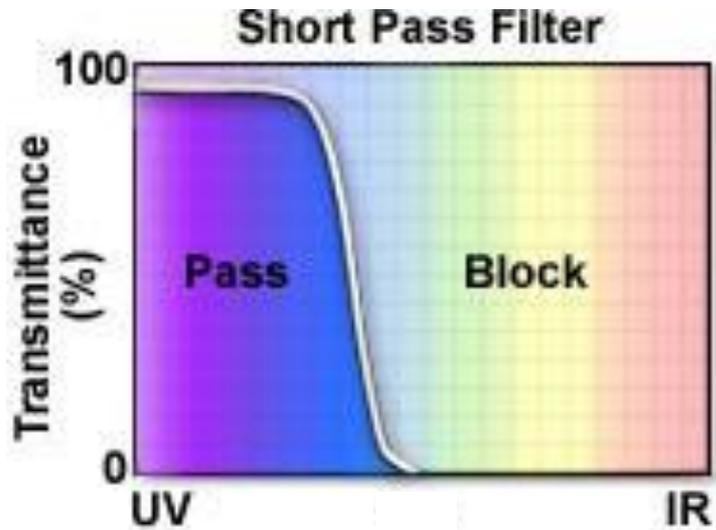
## Focalizzazione idrodinamica



Iniezione ad alta pressione: **n° di cellule analizzate alto.**

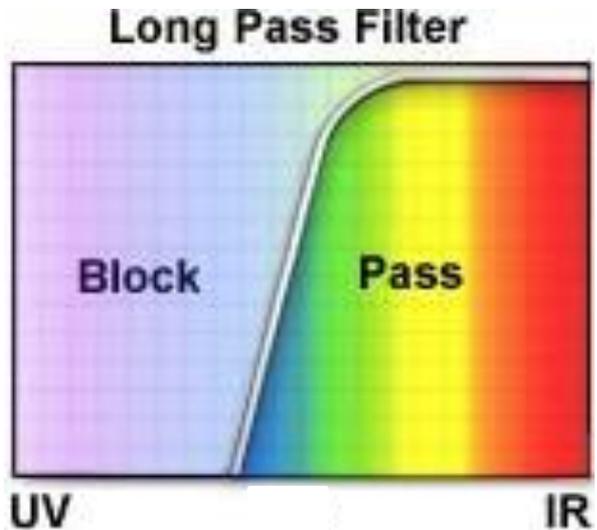
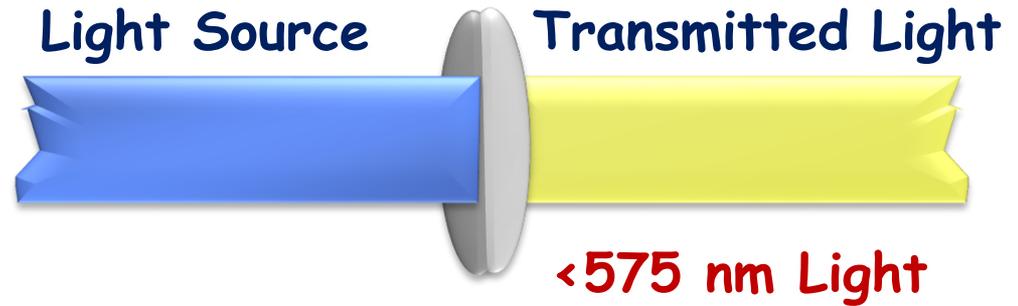
Iniezione a bassa pressione: **n° di cellule analizzate basso**, ma in colonna stretta, per un ottimale incontro col laser.

# FILTRI



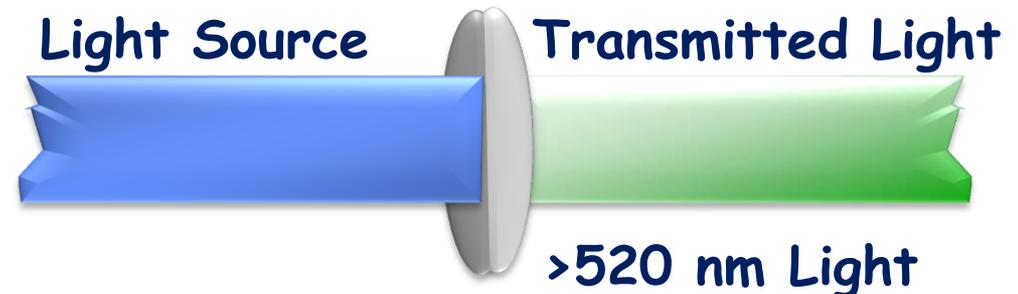
## Standard Short Pass Filters

575 nm Short Pass Filter



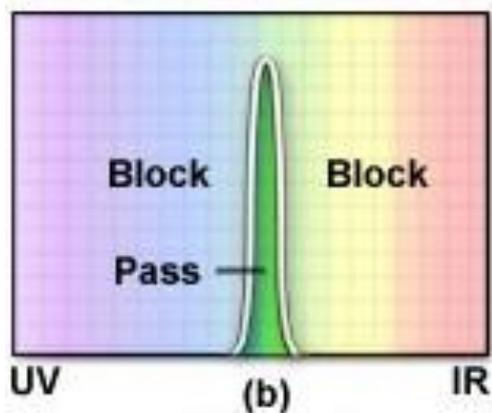
## Standard Long Pass Filters

520 nm Long Pass Filter



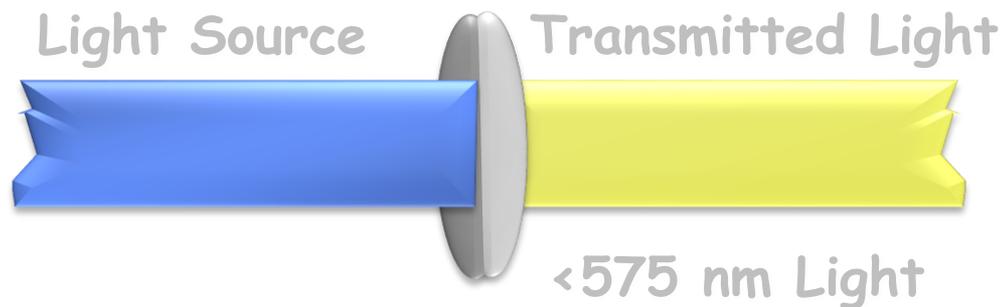
# FILTRI

## Band Pass Filter

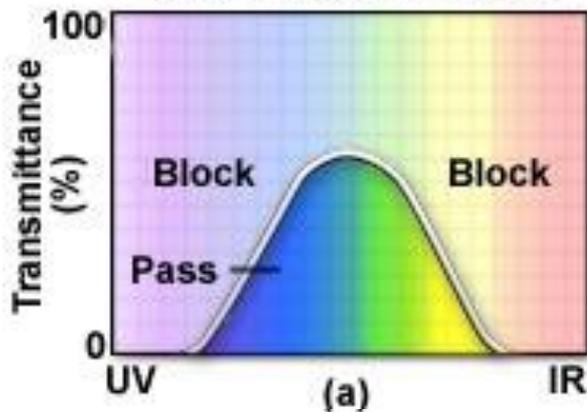


## Standard Short Pass Filters

575 nm Short Pass Filter

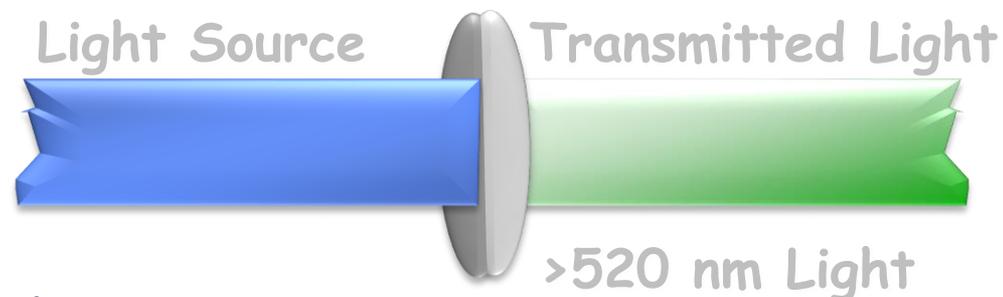


Wide Band Pass Filter



## Standard Long Pass Filters

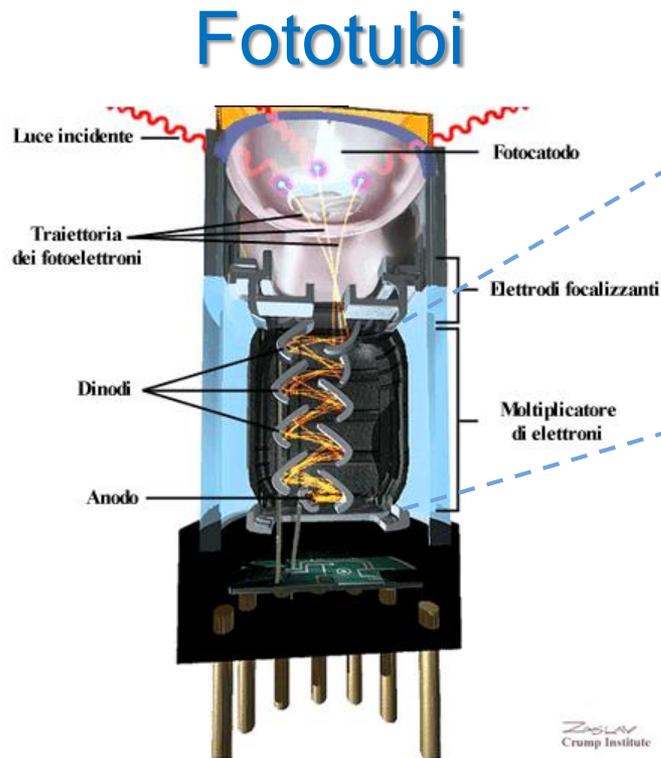
520 nm Long Pass Filter



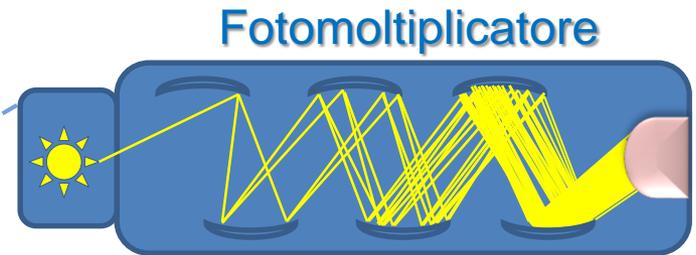
In genere descritti dalla  $\lambda$  centrale

# RIVELATORI

Converte l'intensità luminosa in un segnale elettrico.  
Possono essere:



Rilevazione della **fluorescenza**,  
segnale **più debole** rispetto alla luce  
diffusa frontalmente o lateralmente.

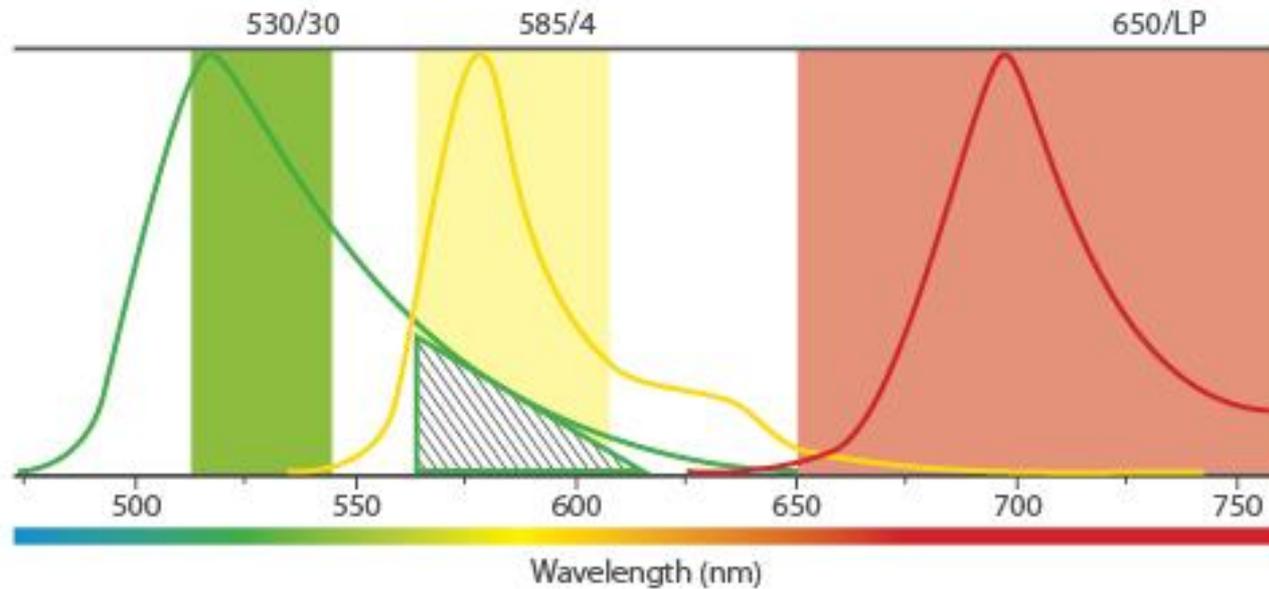


### Fotodiodi

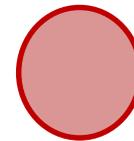
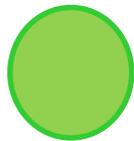


Rilevazione della luce **diffusa**  
**frontalmente** e **lateralmente**.

# LA SCELTA DEI FILTRI E DELLA RISPOSTA DEI RIVELATORI E' ESSENZIALE PER EVITARE «FALSI POSITIVI»



Su queste fluorescenze non vi sono dubbi.



Però se osservassimo una fluorescenza gialla?



# LA CITOMETRIA A FLUSSO PUO' ESSER IMPIEGATA PER «CERCARE» PROTEINE

Perché usarla al posto del Western Blot (WB)?



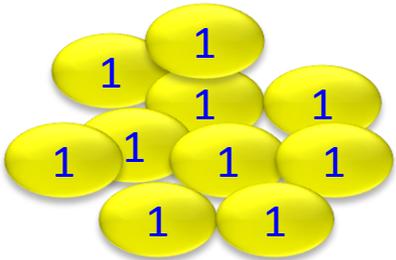
VS



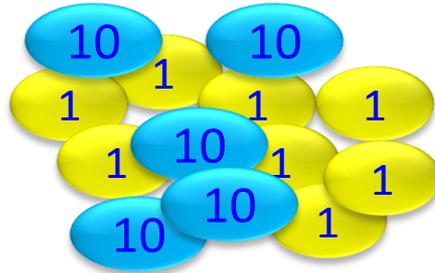
Analisi rapidissima di migliaia di campioni

Risultati validi da un punto di vista statistico

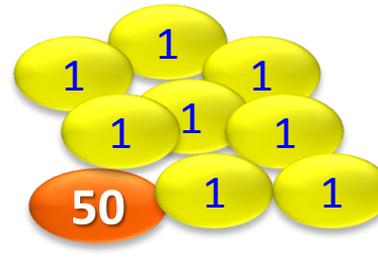
# CAPACITA' DESCRITTIVA DELLA CITOMETRIA A FLUSSO



1



5

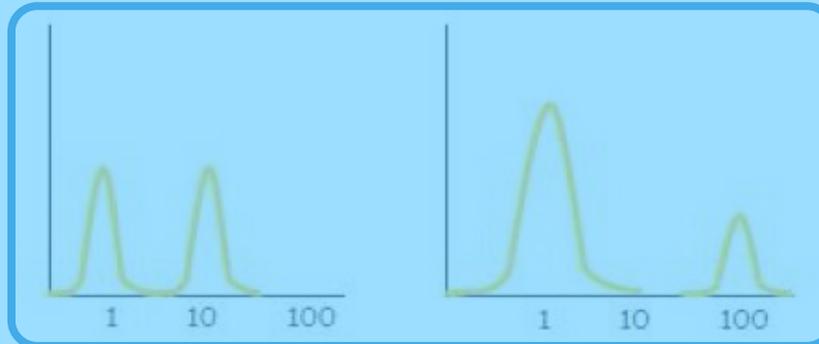
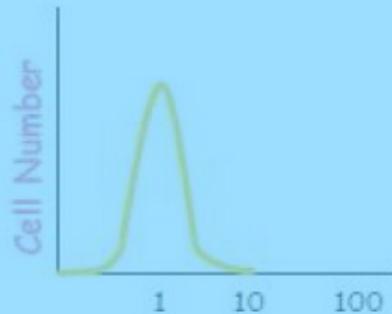


5

Valori medi



Western Blot  
(valore totale)



Citometria  
in flusso

Intensità della fluorescenza

(distribuzione dei valori)

# CARATTERISTICHE DELLA CITOFUORIMETRIA A FLUSSO

## VANTAGGI:

- Tecnica quantitativa, molto **sensibile**.
- Possibilità di misurare + caratteristiche di una cellula.
- Dipendenza **lineare** della misura dalla concentrazione della sostanza esaminata.
- Assenza di fotobleaching. 

## SVANTAGGI:

- Incapacità di descrizione di forme e struttura della cellula.

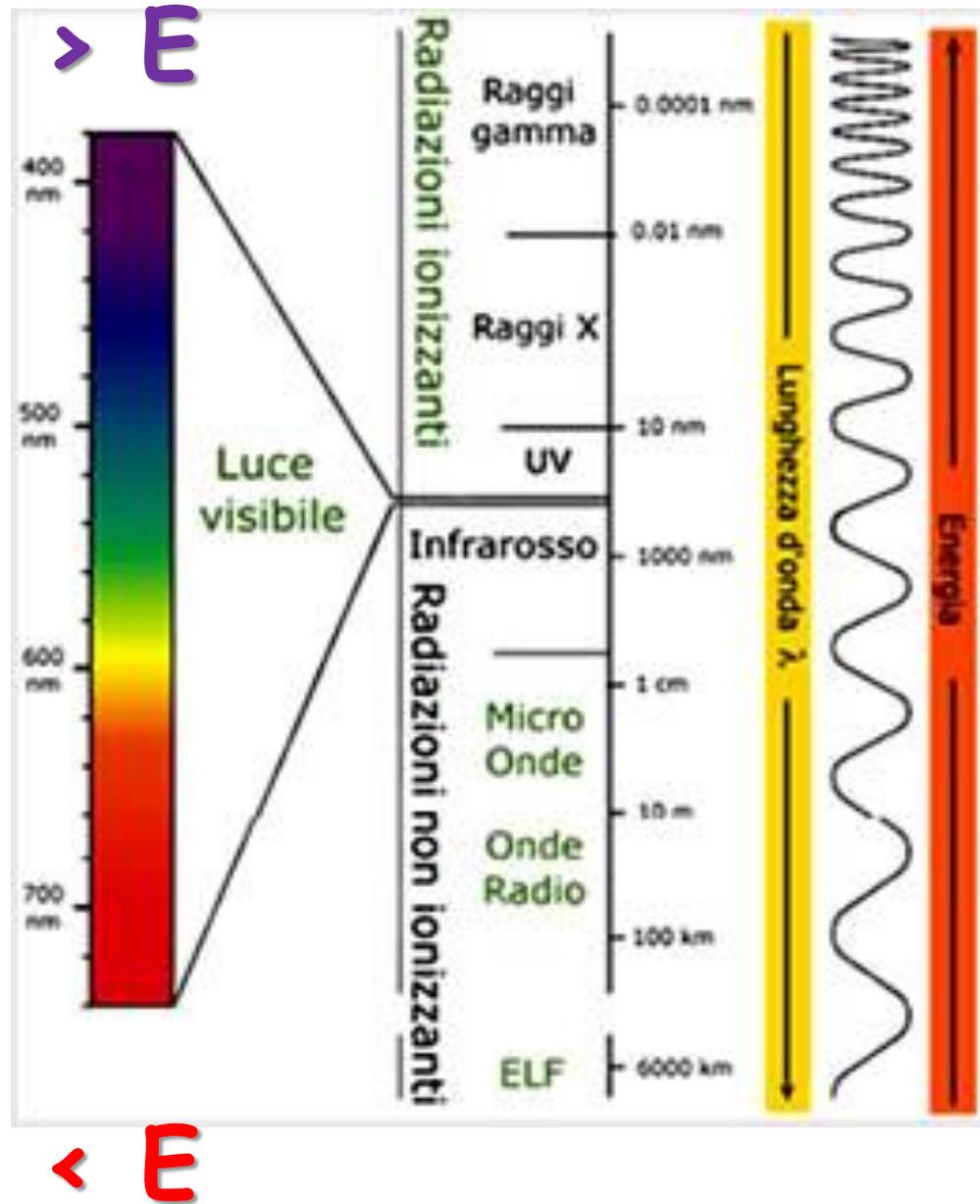
## NECESSITA':

Campo di luce per l'eccitazione uniforme nello spazio e nel tempo.

# SPETTRO ELETTRROMAGNETICO

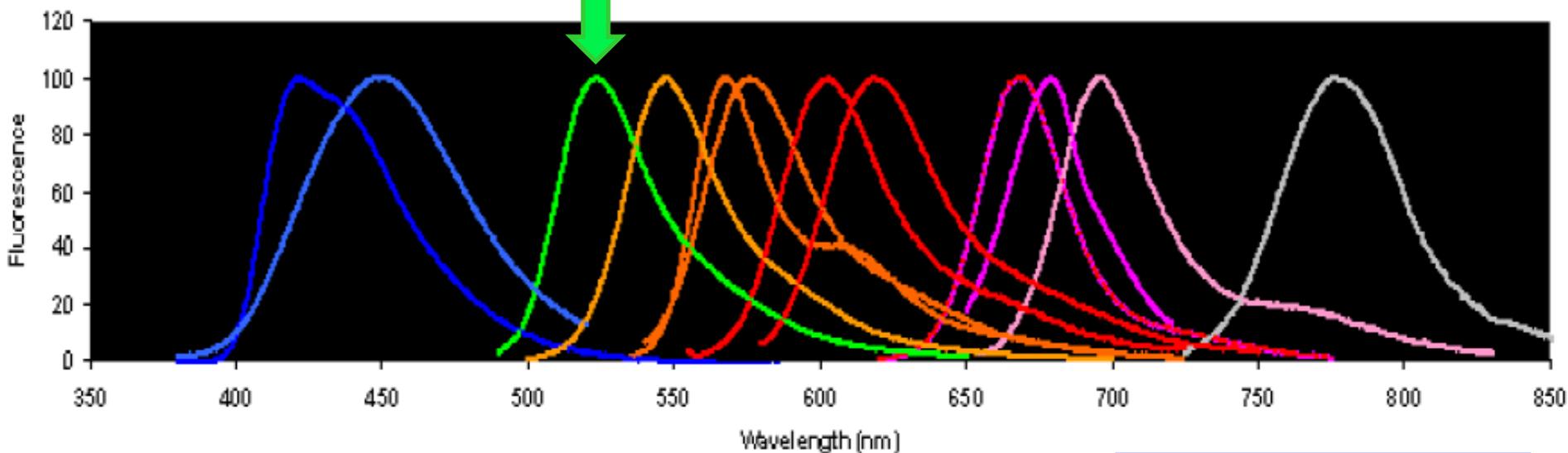
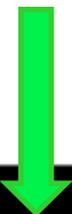
$$E = h \nu$$

$$\lambda = c / \nu$$



# NUOVI FLUOROFORI

FLUORESCEINA

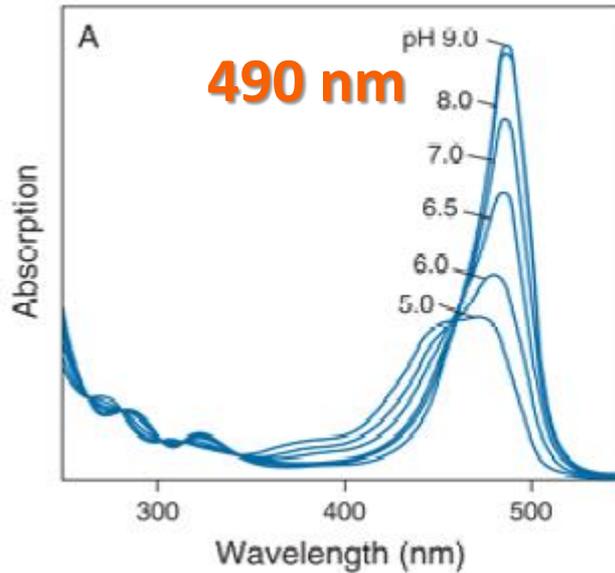


Interesse per l' IR

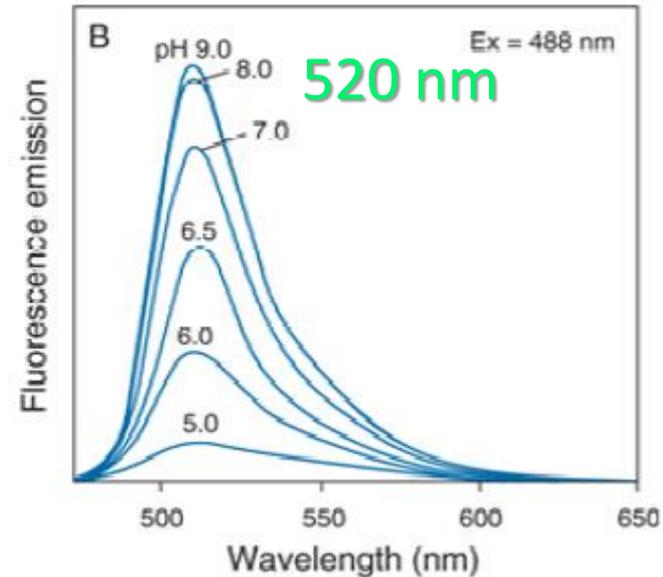
# FLUOROFORI LA FLUORESCEINA



## Assorbimento



## Emissione



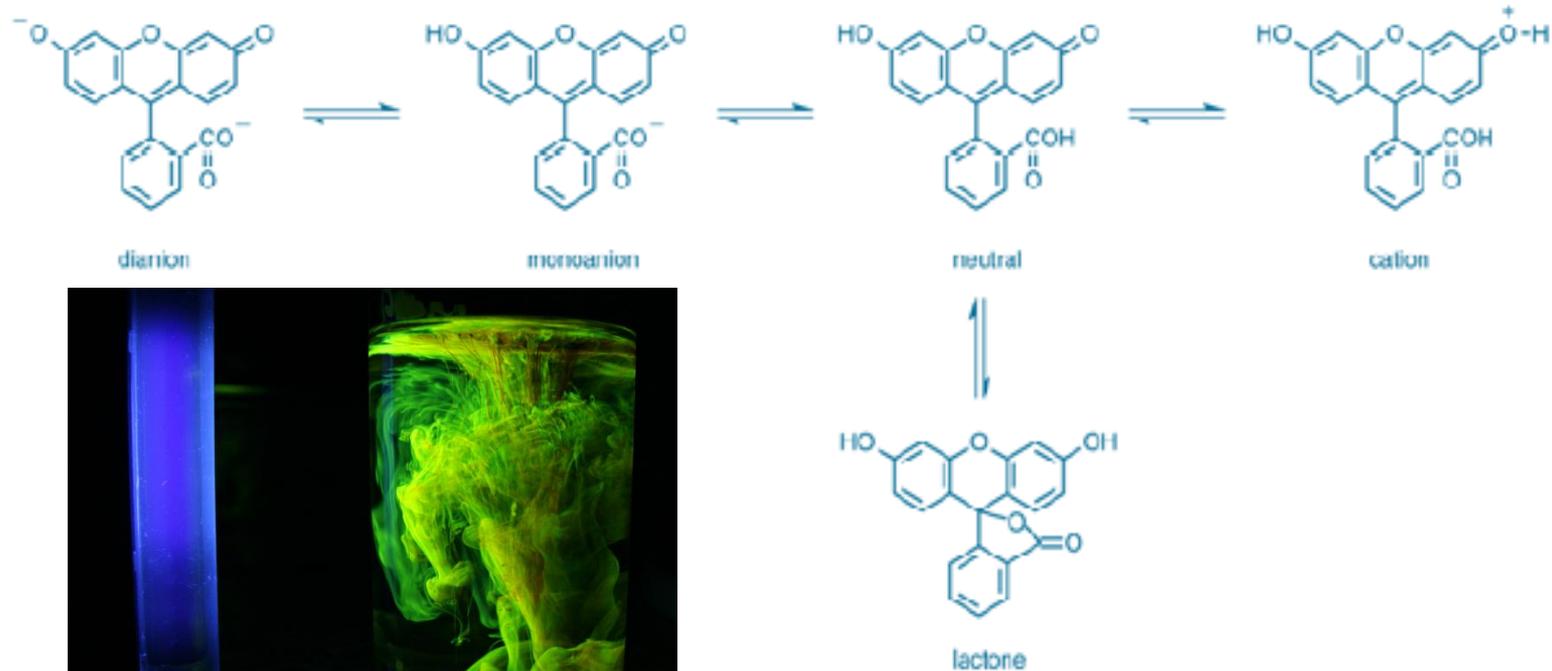
DIANIONE → MONOANIONE → NEUTRA → CATIONE



ACIDIFICAZIONE

# FLUOROFORI

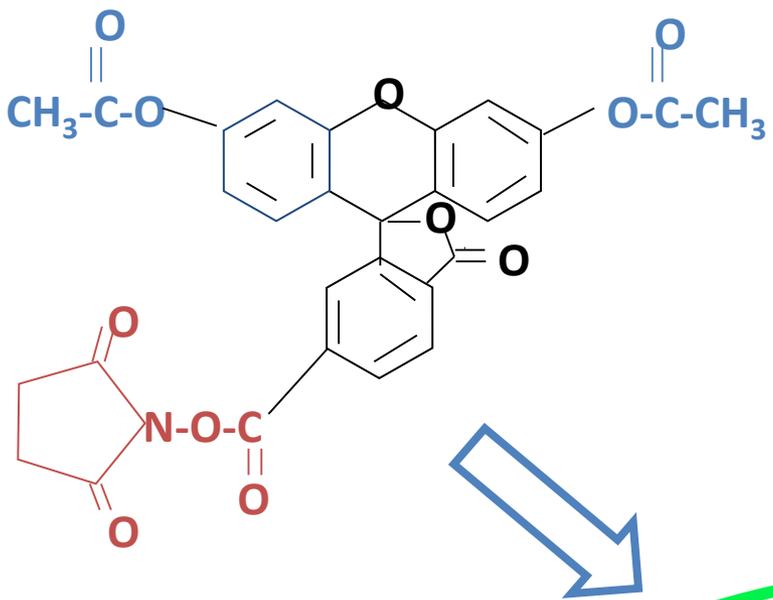
## LA FLUORESCEINA



La fluoresceina emette fluorescenza **solo** come **monoanione** e **dianione**.

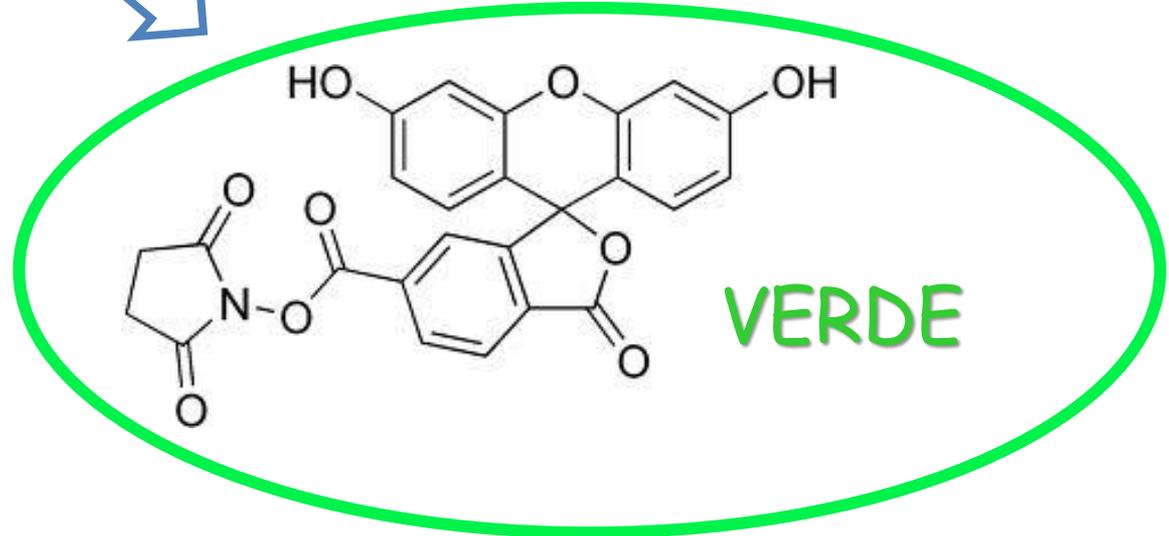
# PROLIFERAZIONE CELLULARE: CFSE STAINING

Carboxyfluorescein Succinimidyl ester

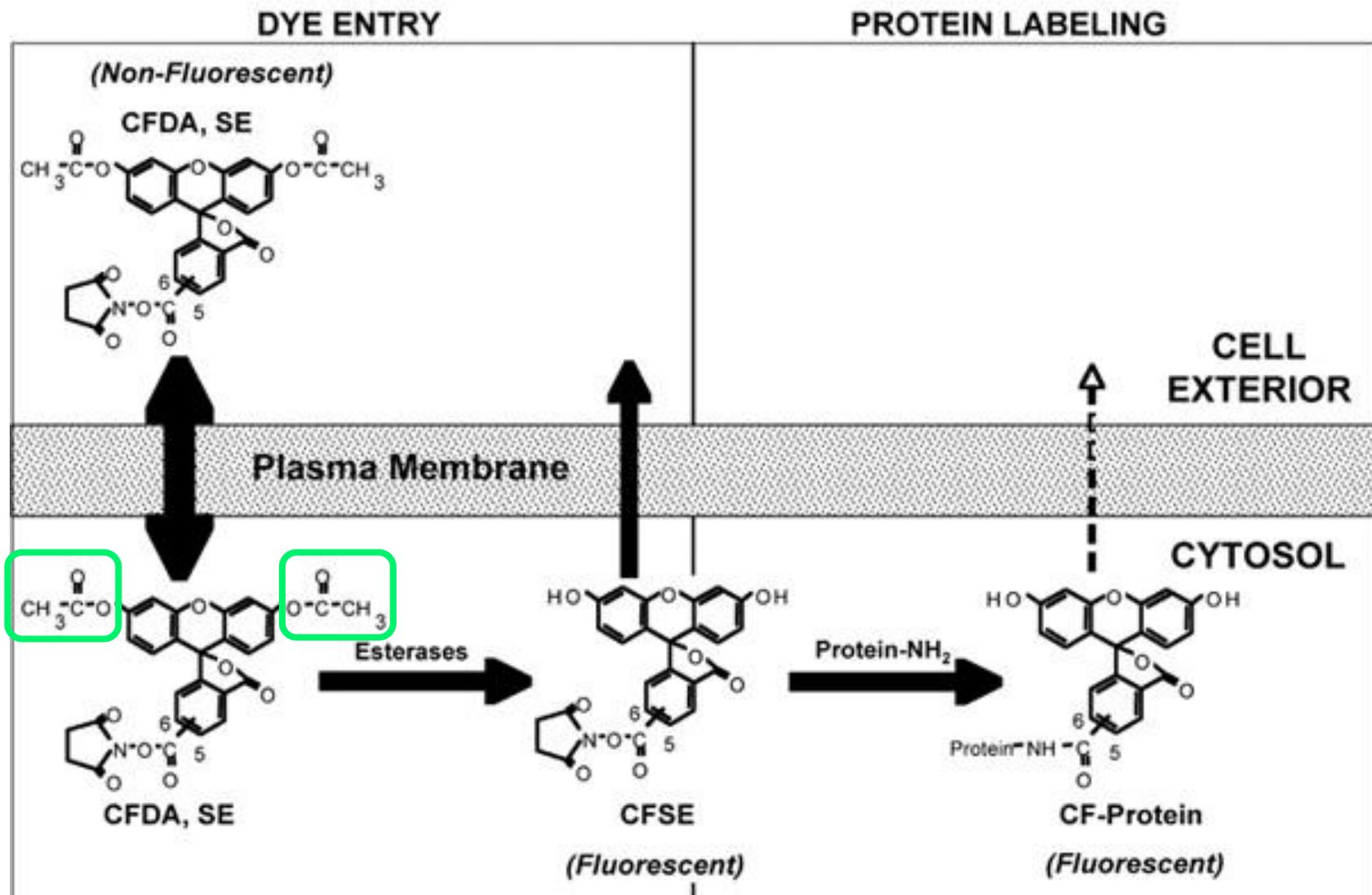


Composto fortemente lipofilo.

Passa facilmente la membrana cellulare, ma viene modificato nel citoplasma e diventa fluorescente.



# MECCANISMO DELLA CFSE



Stabile per settimane e non citotossica.

# CAMPI DI UTILIZZO DEL CFSE

Tramite citofluorimetro e CFSE si possono seguire fino a **8-10 divisioni** cellulari.

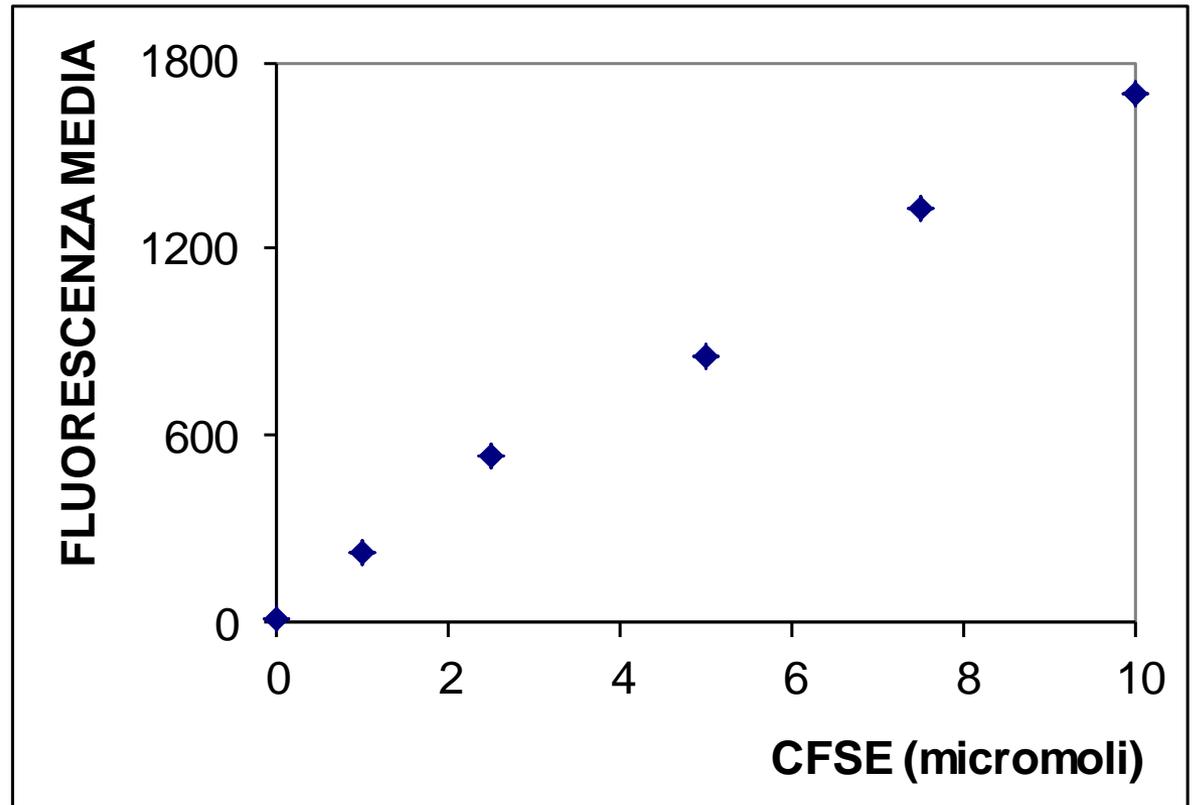
Utilizzabile **in vitro** e addirittura **in vivo** :

- marcatura di **cellule in coltura**,
- cellule prelevate da **animali**, trattate con CFSE e reinserte nel soggetto donatore.

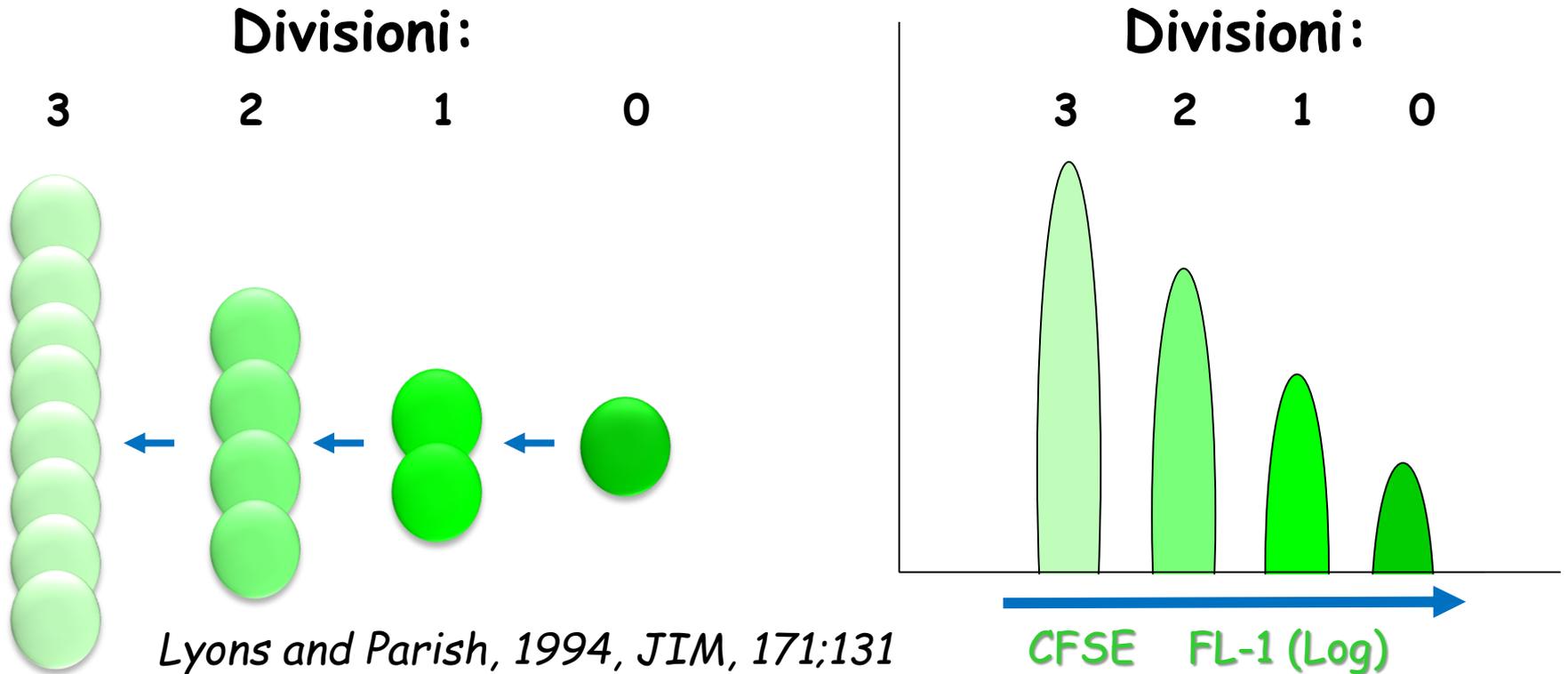
# CARATTERISTICHE DEL CFSE

## Risposta quantitativa

Grande linearità fra la intensità di fluorescenza e la concentrazione del CFSE.



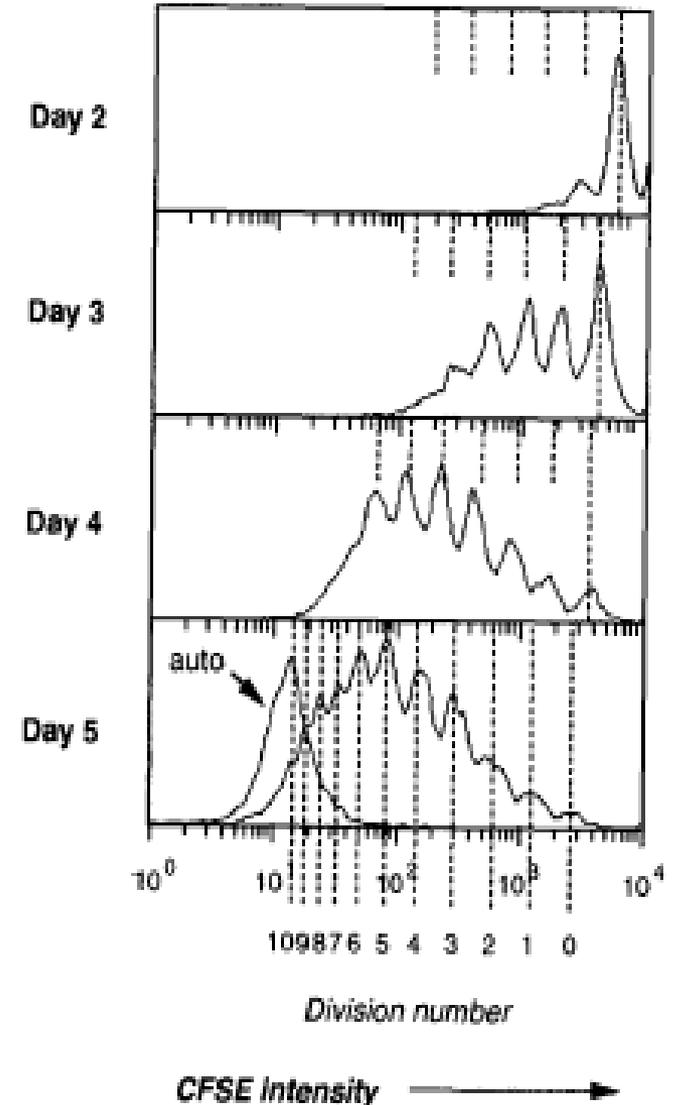
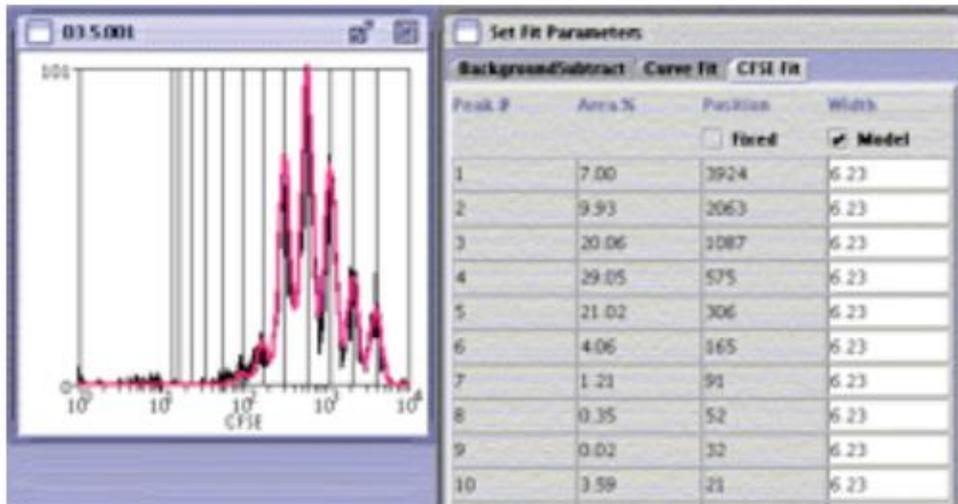
# STUDIO DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE MEDIANTE CFSE



Durante la mitosi, ogni cellula figlia erediterà una **quantità dimezzata di CFSE** e la fluorescenza di conseguenza **dimezzerà**.

# STUDIO DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE MEDIANTE CFSE

Uno specifico programma si incarica di determinare quante cellule appartengano ad ogni **generazione**.



# CFSE: CONCLUSIONI

## Vantaggi della tecnica basata sul CFSE:

☺ Non si utilizzano sostanze radioattive

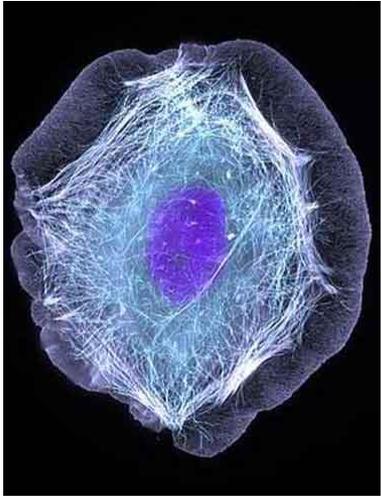
☺ ☺ Non necessita l'utilizzo di anticorpi

☺ ☺ ☺ **Permette di studiare i livelli di proliferazione in specifiche subpopolazioni cellulari**

☺ ☺ ☺ ☺ **Permette di determinare contemporaneamente l'espressione di altri markers (di attivazione, di funzionalità, apoptotici, ecc)**

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ **Utilizzando CFSE è possibile recuperare cellule vitali da utilizzare per successive analisi.**

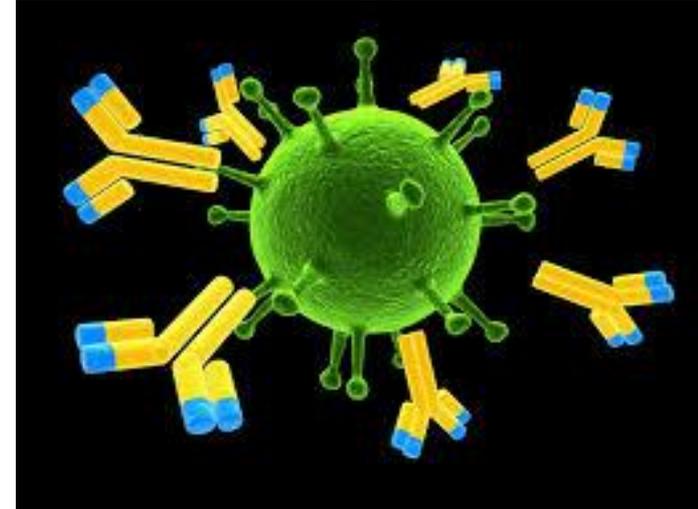
# RIASSUMENDO



Dimensione



Complessità

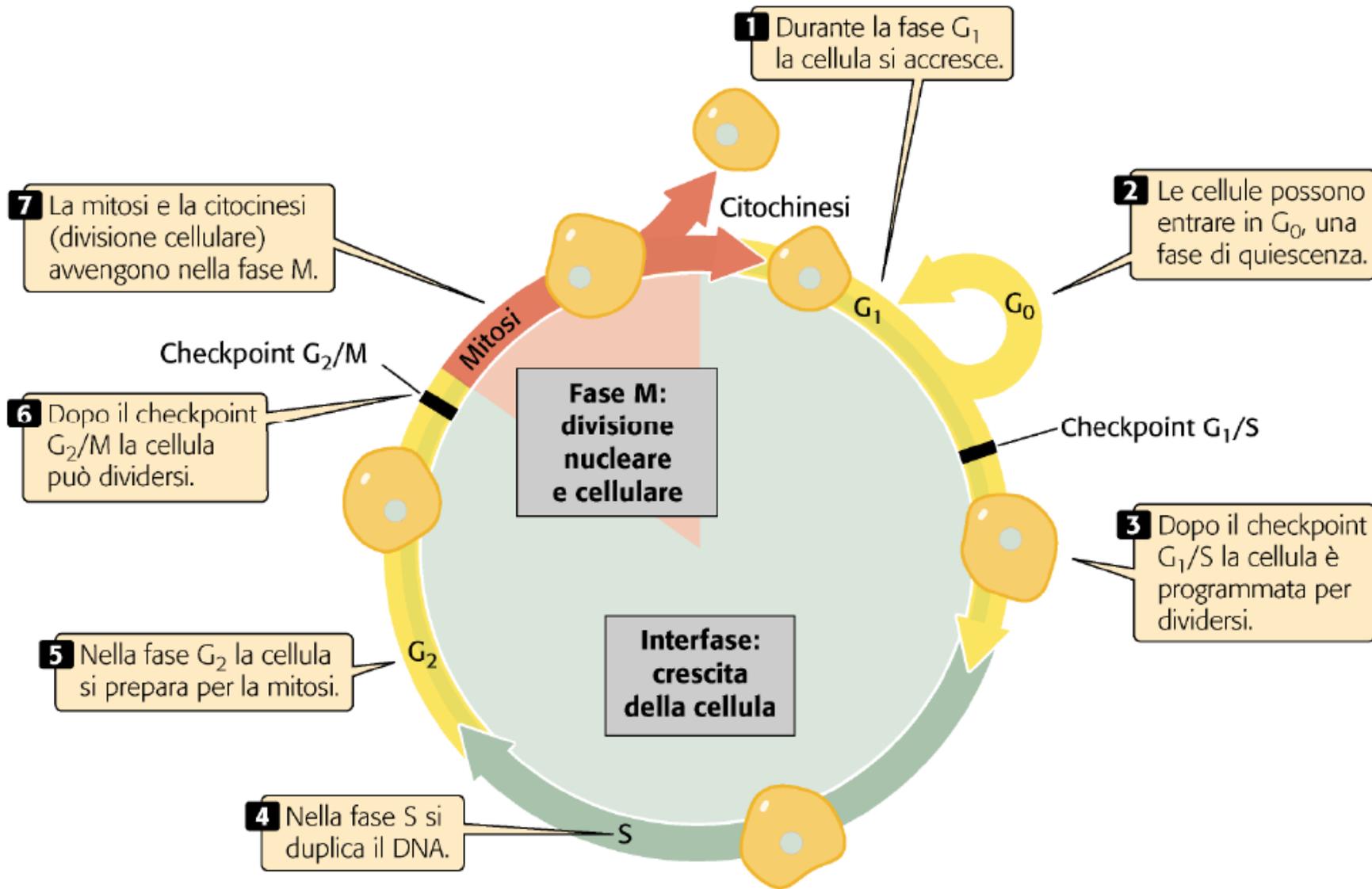


Fluorescenza

Il citofluorimetro può studiare caratteristiche proprie delle cellule in esame.

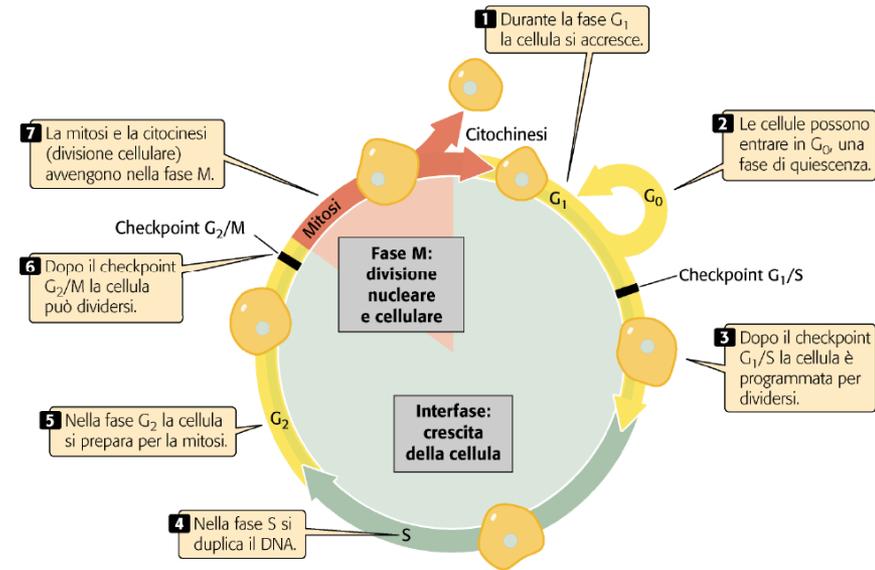
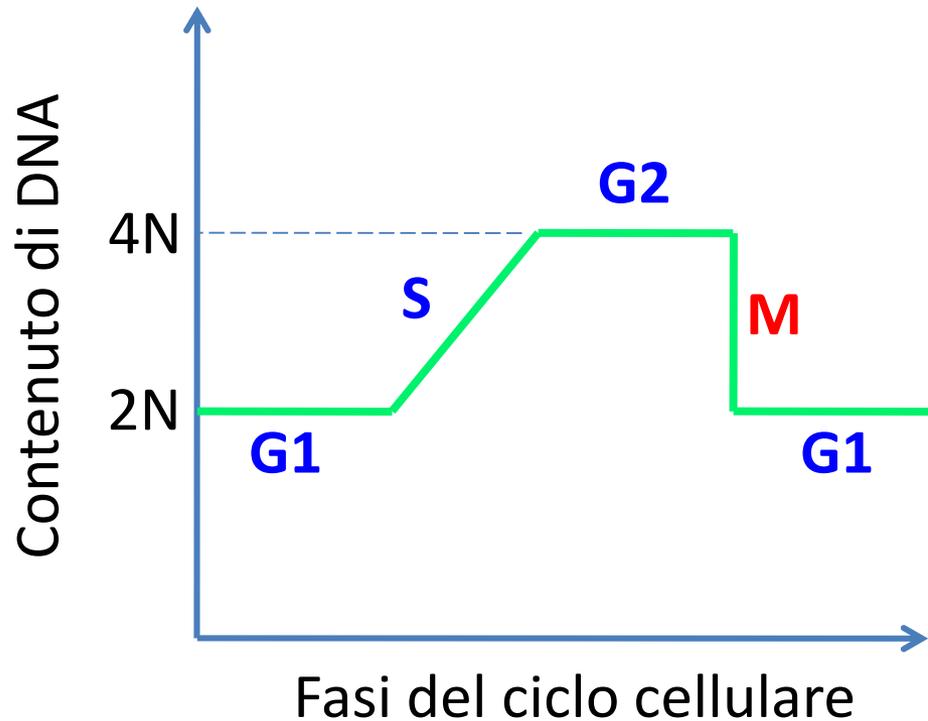
PROCESSI STUDIATI  
CON L'IMPIEGO DEL  
CITOFLOREMETRO

# CICLO CELLULARE



# CICLO CELLULARE

## IL CONTENUTO DI DNA



- **G<sub>1</sub>**: le cellule hanno un contenuto di DNA diploide (2N)
- **S**: le cellule hanno un contenuto di DNA variabile tra 2N e 4N
- **G<sub>2</sub>**: le cellule hanno un contenuto di DNA tetraploide (4N)
- **M**: mitosi, la cellula si divide e forma due cellule figlie con contenuto di DNA diploide (2N)

# CICLO CELLULARE

## ANALISI COL CITOFUORIMETRO

Fra le prime applicazioni di citofluorimetria; ciclo cellulare studiato tramite quantificazione del DNA.

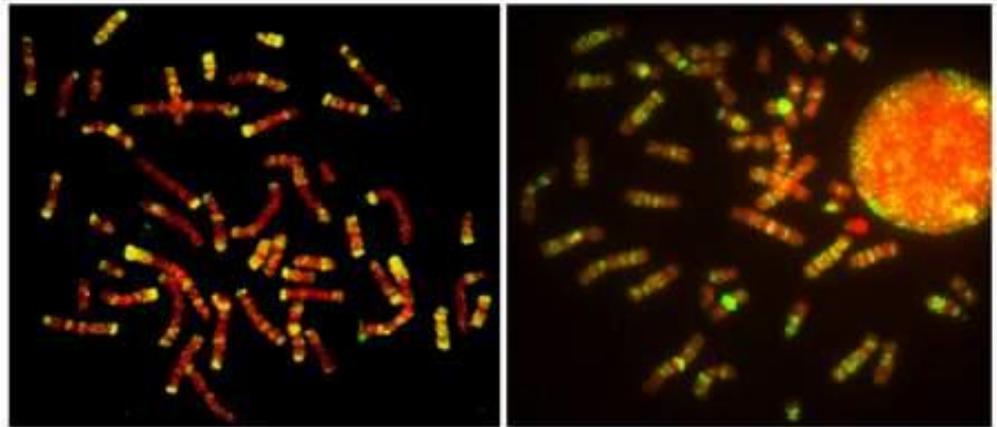
Marcatura con **Ioduro di propidio**.

Distribuzione delle cellule nelle varie fasi.

Quando è anomala (poliploidia, replicazione continua...), probabile trasformazione tumorale.

# IODURO DI PROPIDIO

- Lo ioduro di propidio (PI) non può penetrare le membrane cellulari, perciò entra esclusivamente nelle cellule **permeabilizzate** o **morte**.
- Intercalante fluorescente del DNA,
  - eccitabile a **488** nm,
  - emissione a **625** nm.

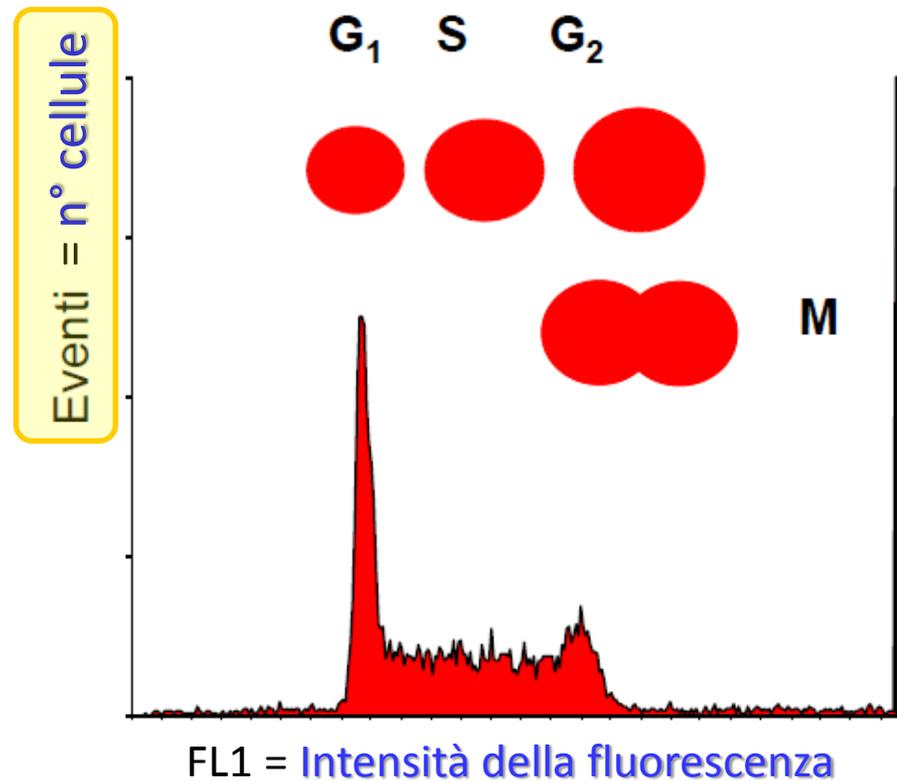


Permeabilizzazione delle cellule con soluzione di

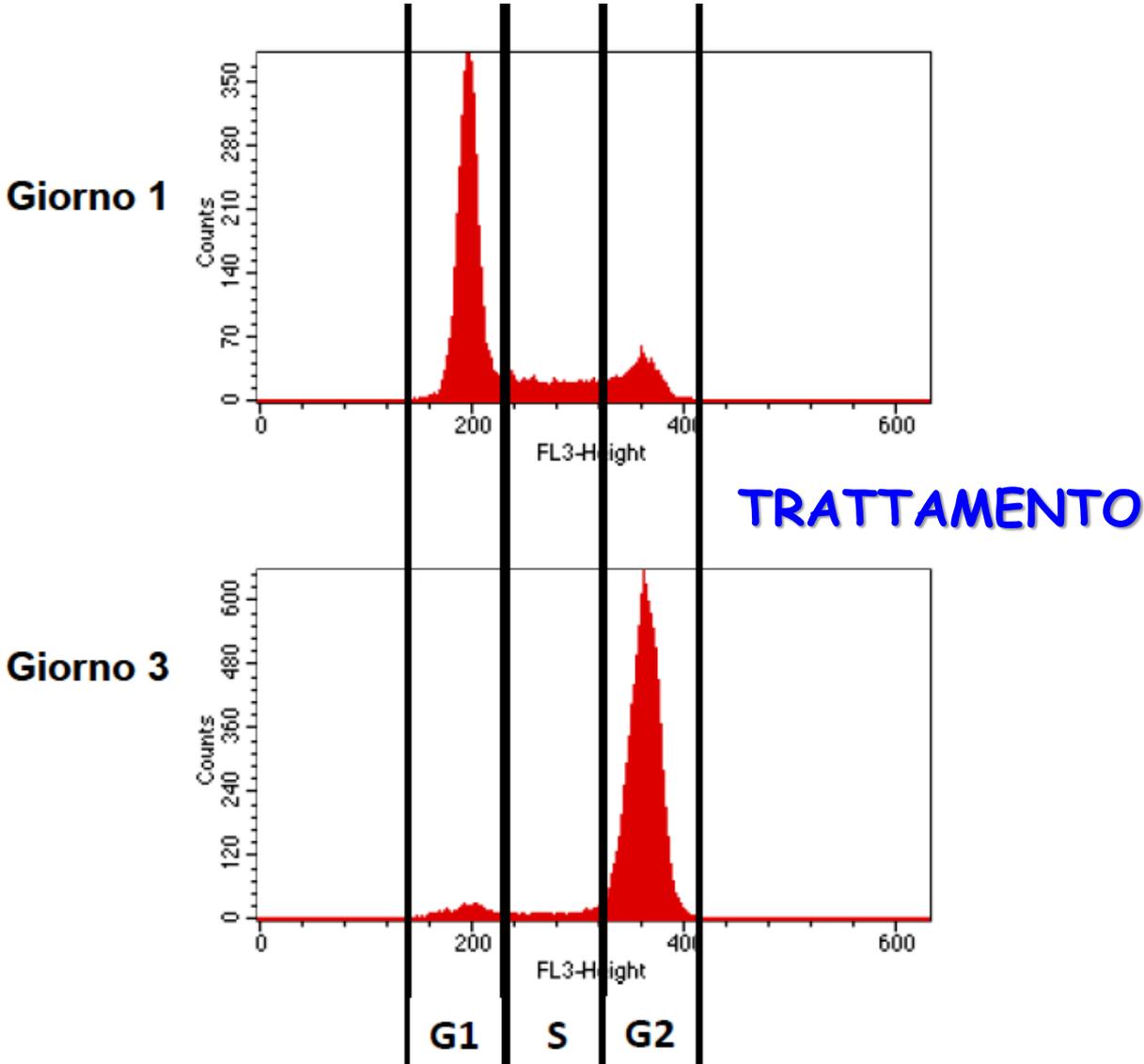
**Triton X-100** e **PI**

# ANALISI DEL CICLO CELLULARE CON IODURO DI PROPIDIO

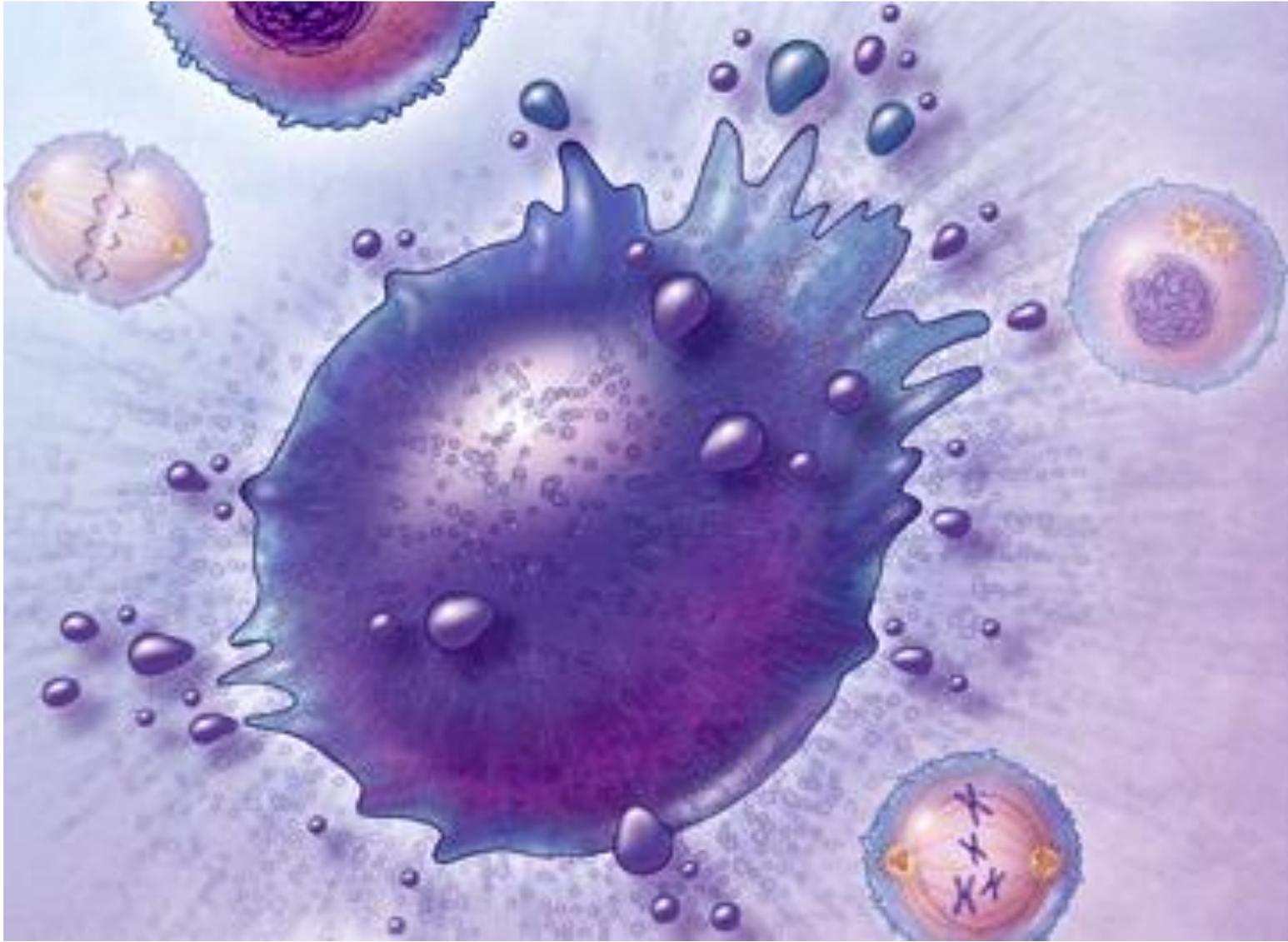
Le cellule devono  
essere  
perfettamente  
disaggragate.



# MODIFICAZIONE DEL CICLO CELLULARE: RILEVAZIONE CON IODURO DI PROPIDIO



# APOPTOSI



# APOPTOSI

## MODIFICAZIONI MORFOLOGICHE E FUNZIONALI

### ➤ Processi fisiologici:

- controllo dell'omeostasi tissutale
- sviluppo embrionale
- ricambio tissutale
- selezione negativa nel sistema immunitario

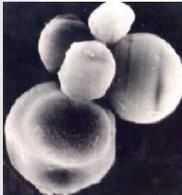
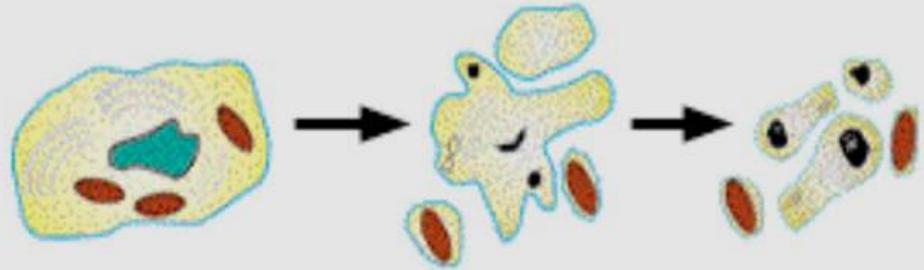
Membrane Changes

Mitochondrial Changes

Nuclear Changes

Cytoplasmic Changes

Apoptosis



Accidental Cell Death  
or Necrosis

### ➤ Processi patologici:

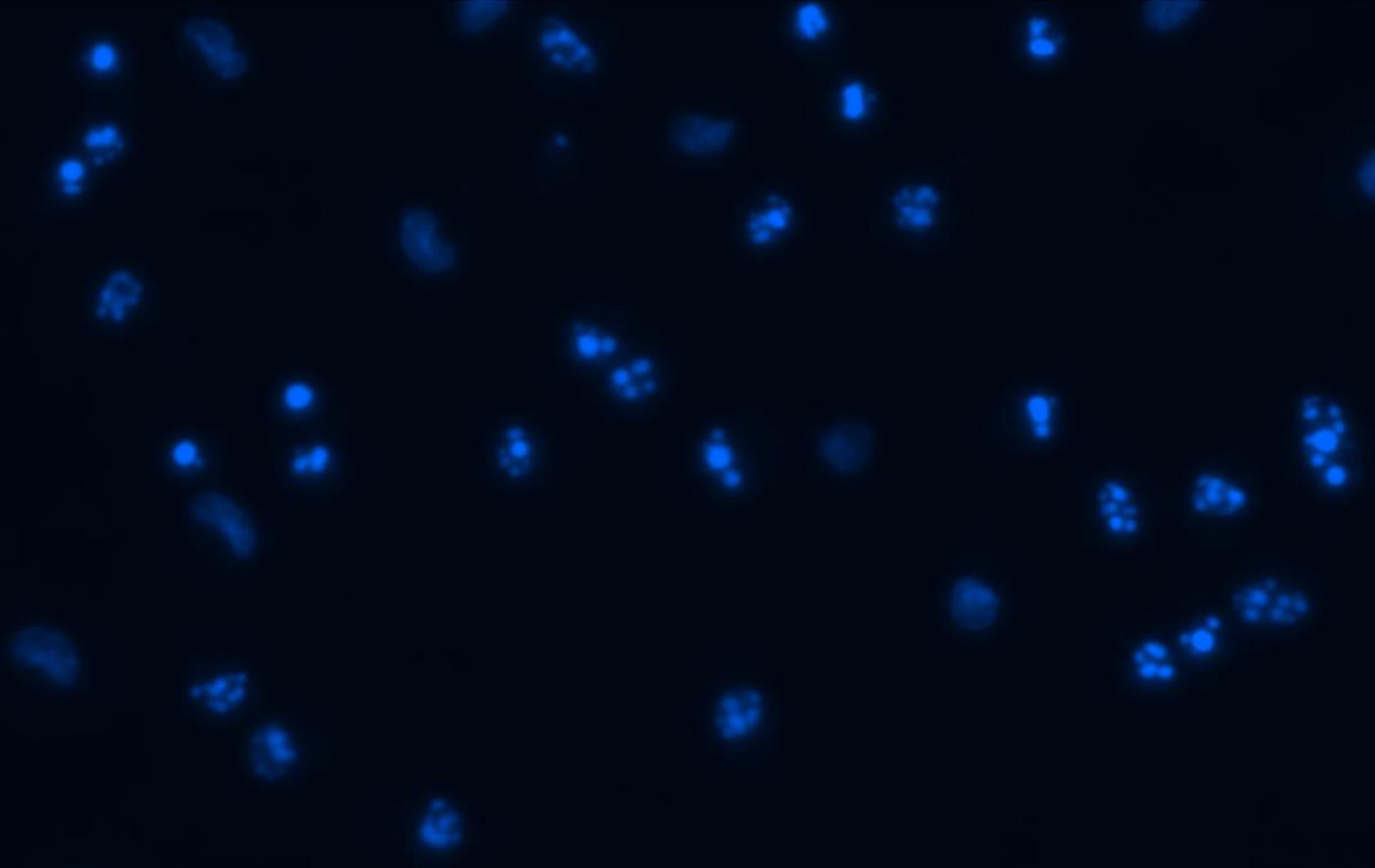
viene attivata nelle:

- infezioni virali (AIDS)
- malattie neurodegenerative (Alzheimer)
- malattie autoimmuni
- patologie ematiche (anemie)

viene disattivata nei:

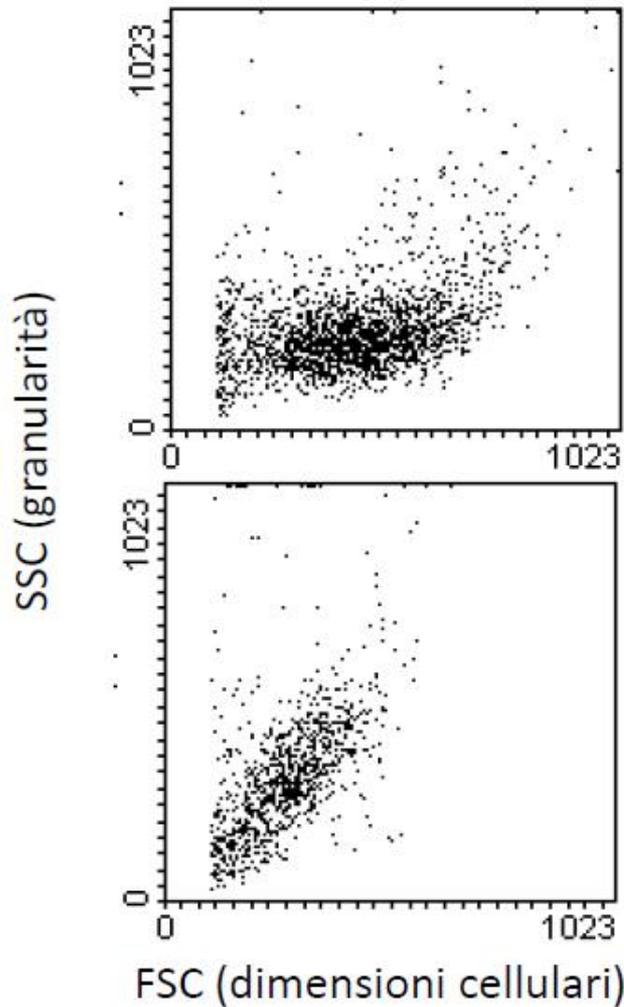
- processi di carcinogenesi
- resistenza a chemioterapici
- resistenza a risposta immune

LE CELLULE APOPTOTICHE AL MICROSCOPIO  
IL CITOFUORIMETRO NON PUO' VEDERLE!



# APOPTOSI E MODIFICAZIONI DELLE DIMENSIONI CELLULARI

## Condensazione citoplasmatica

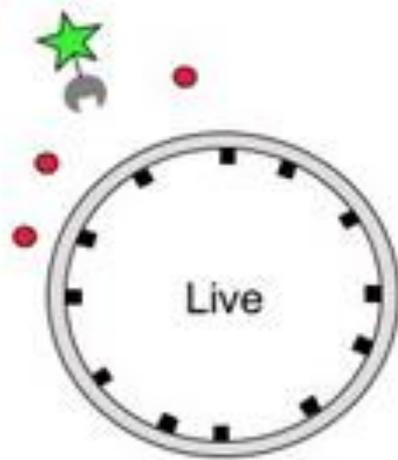


Cellule normali



Cellule sotto  
stimolo  
apoptotico

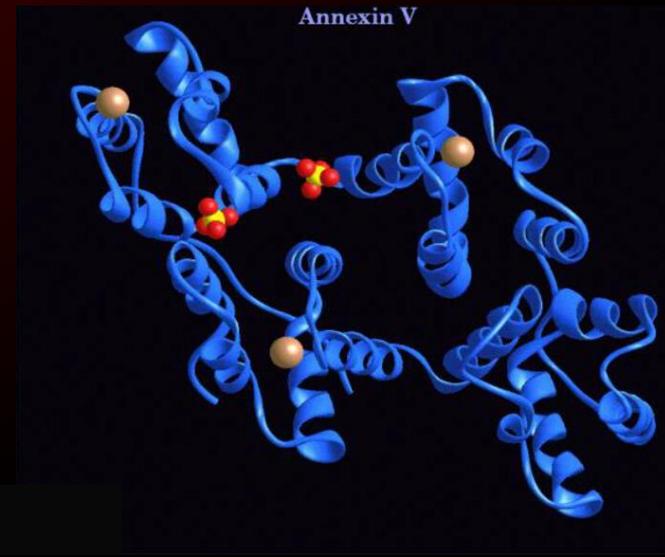
# APOPTOSI E MODIFICAZIONI DI MEMBRANA



Esposizione della **fosfatidilserina** nelle fasi precoci dell'apoptosi.

# ANNESSINA V

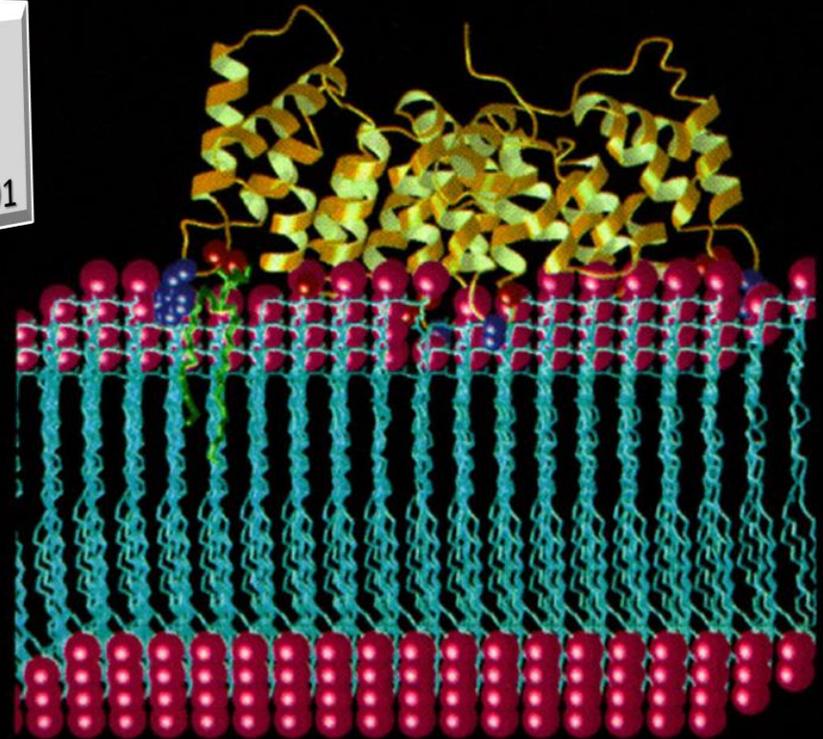
Proteina piccola in grado di interagire con alcune membrane in presenza di ioni calcio.



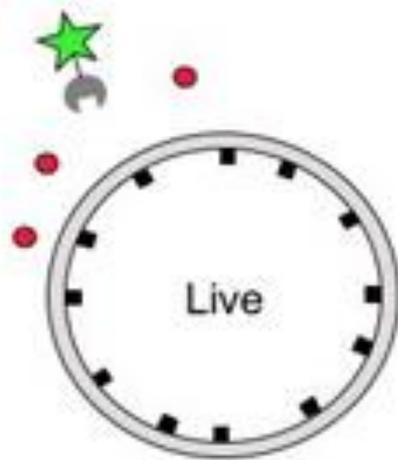
$$K_d = 0.036 \pm 0.011 \text{ nM}$$

[Archives of Biochemistry and Biophysics](#)  
Volume 298, Issue 1, October 1992, Pages 187-191

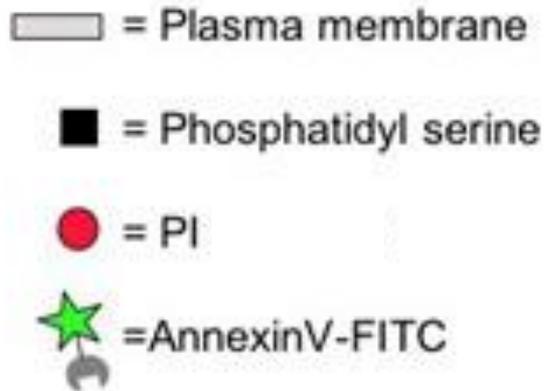
Facilmente  
coniugabile con  
un fluoroforo.



# APOPTOSI E MODIFICAZIONI DI MEMBRANA



Esposizione della fosfatidilserina nelle fasi precoci dell'apoptosi.

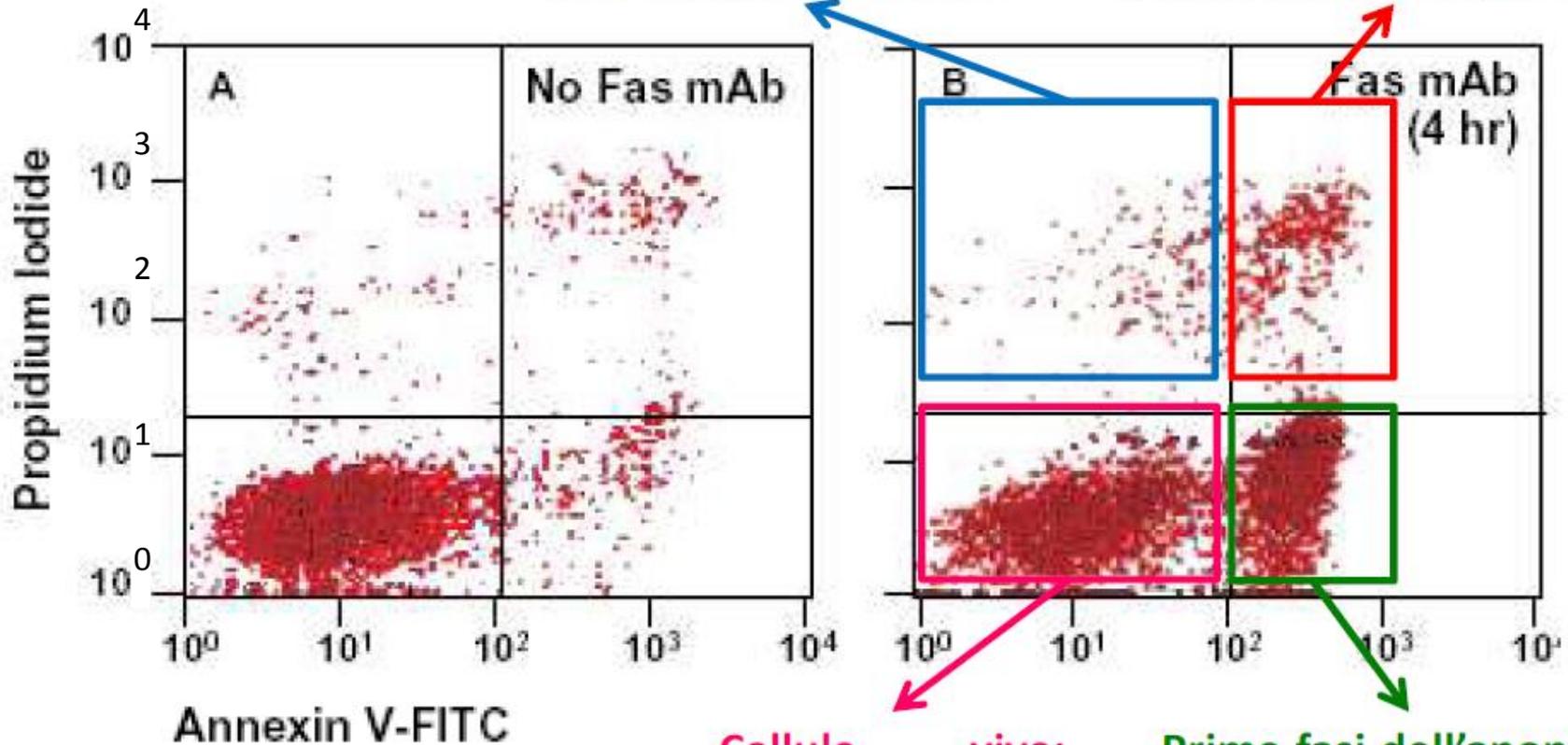


Perdita della integrità di membrana.

# ESEMPIO DI ANALISI DELL'APOPTOSI CON ANNESSINA V E IODURO DI PROPIDIO

Necrosi: positive per PI,  
negative per Annexin V

Apoptosi tardiva: positive  
per Annexin V e per PI

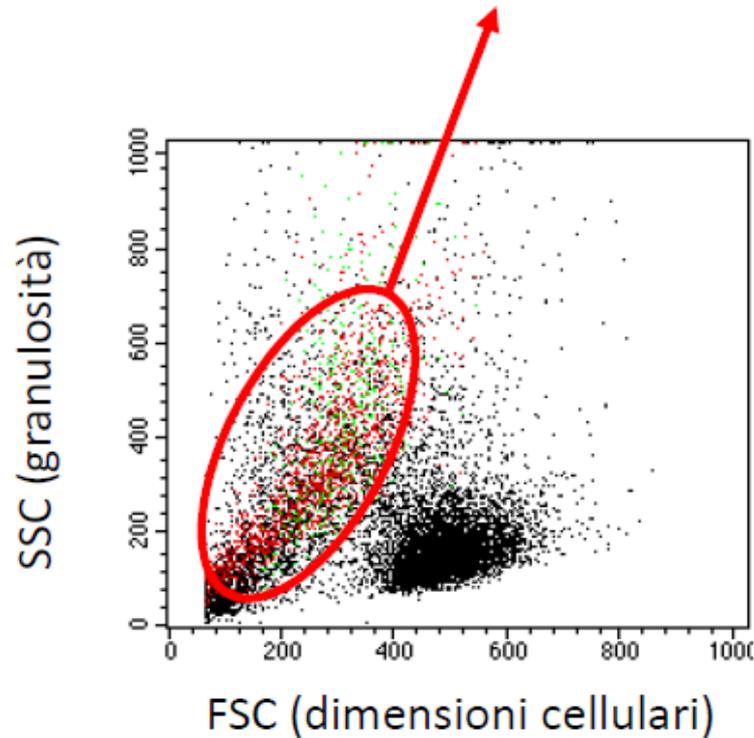


Cellule vive:  
negative per PI e  
Annexin V

Prime fasi dell'apoptosi:  
positive per Annexin V  
e negative per PI

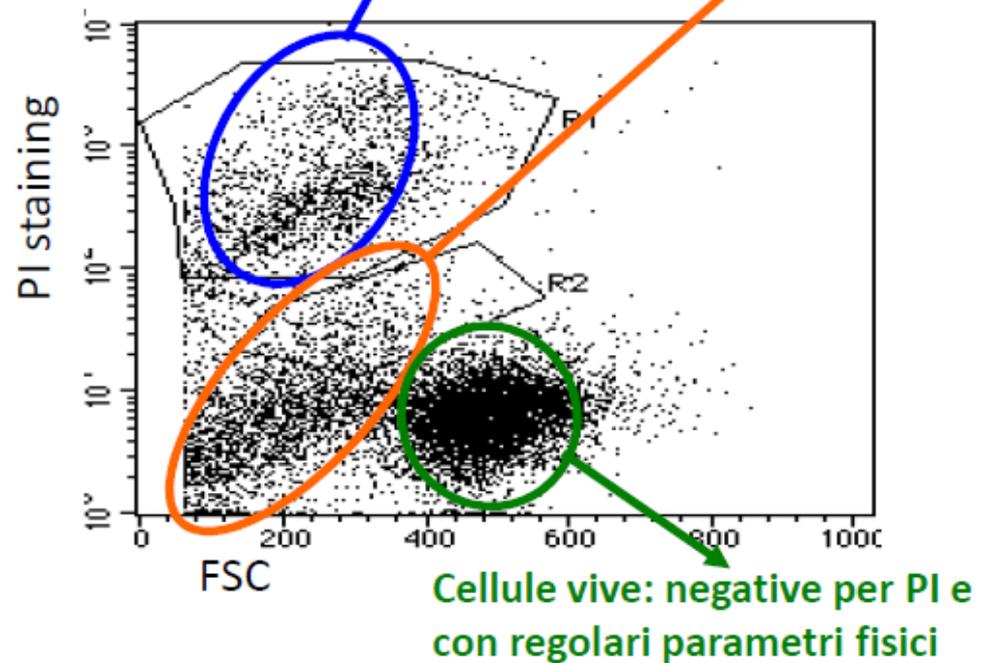
# APOPTOSI E MODIFICAZIONI DI MEMBRANA ANALISI COMPLESSIVA

Popolazione con parametri fisici modificati a causa della condensazione citoplasmatica



Popolazione positiva per PI: cellule morte

Popolazione negativa per PI: cellule apoptotiche



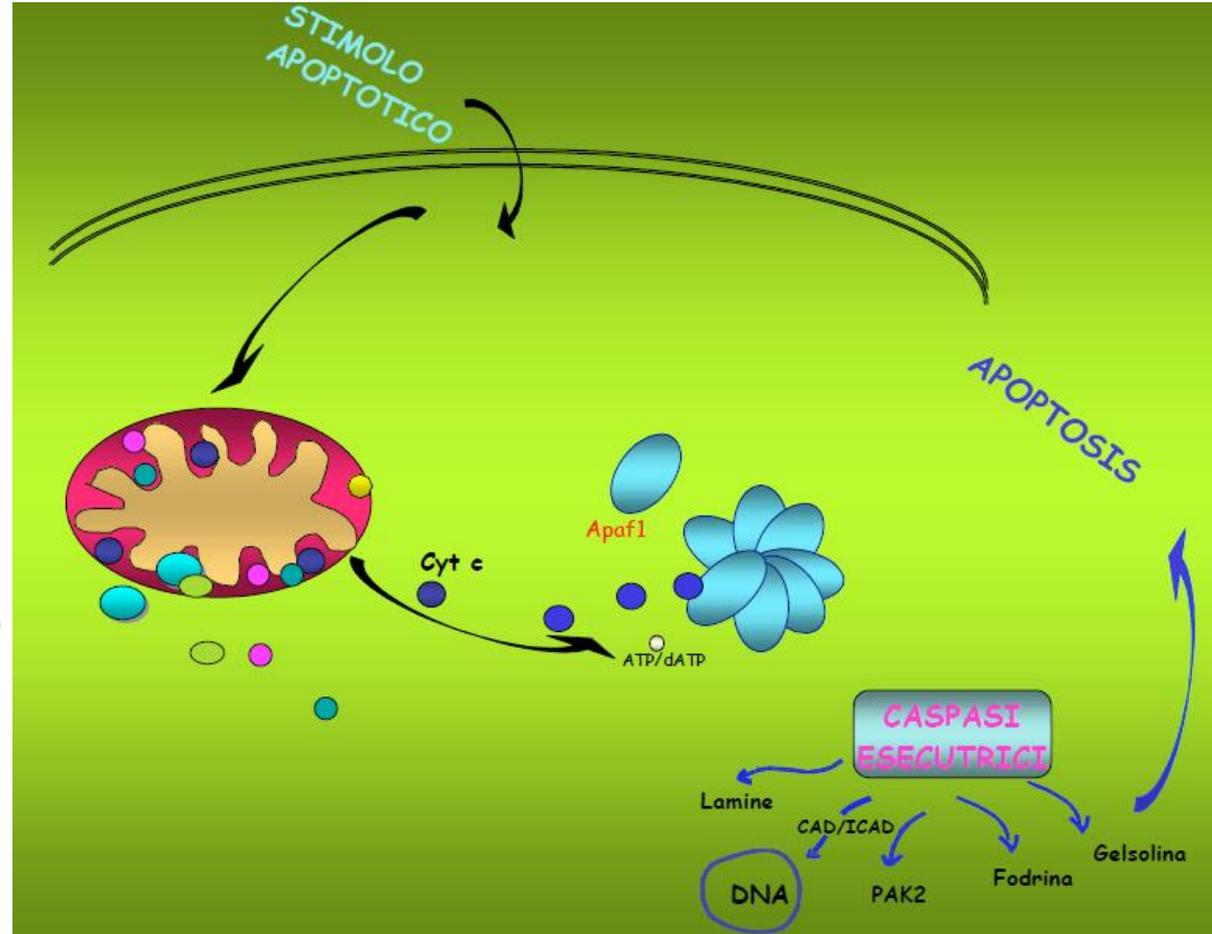
# APOPTOSI E MODIFICAZIONI MITOCONDRIALI

Caduta del potenziale di membrana.

Aumento della permeabilità della m.m.

Rilascio di **citocromo C**.

Attivazione delle **caspasi**.

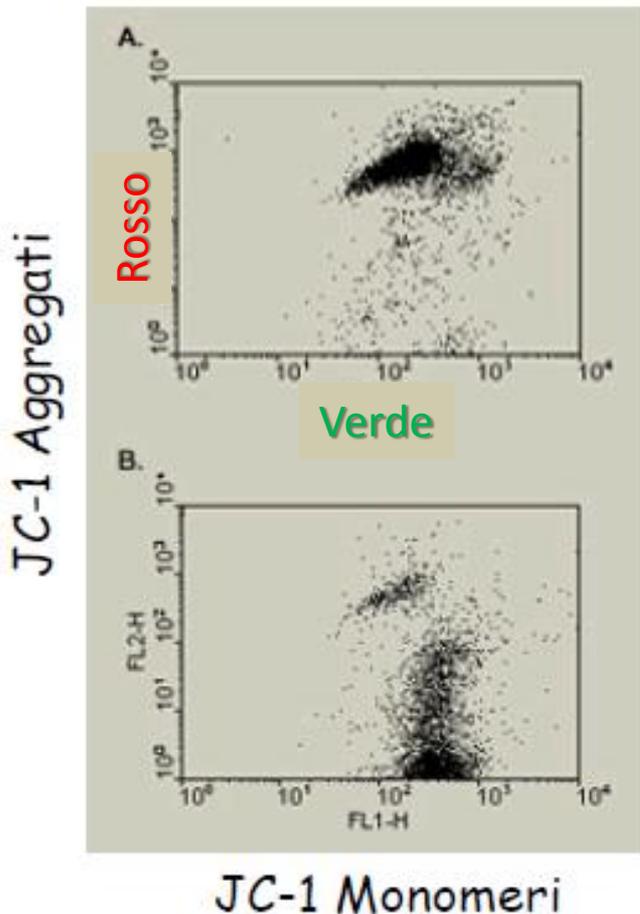


# APOPTOSI E MODIFICAZIONI MITOCONDRIALI

Colorante fluorescente lipofilo JC-1.

Si **aggrega** nella membrana mitocondriale (**rosso**) o rimane come **monomero** nel citoplasma (**verde**).

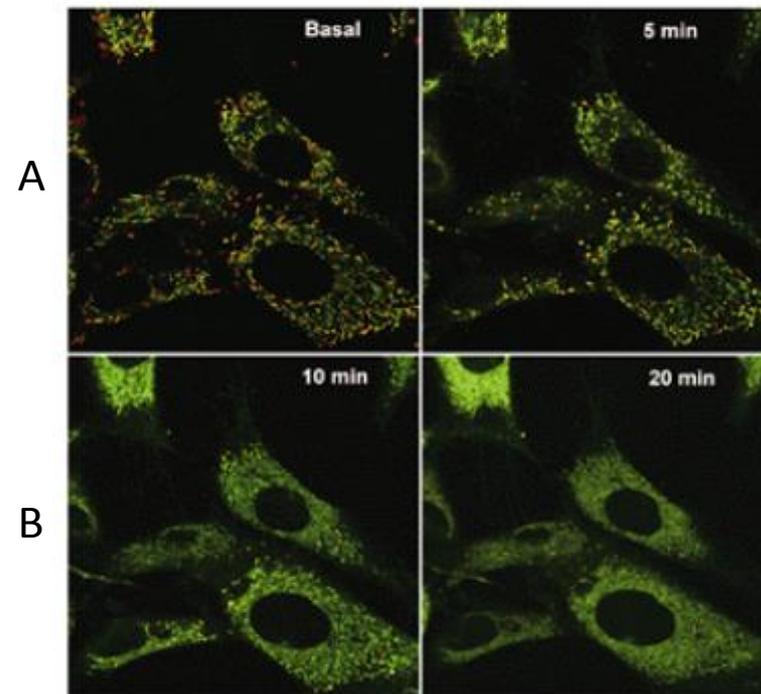
Valutazione citofluorimetrica



Cellule normali

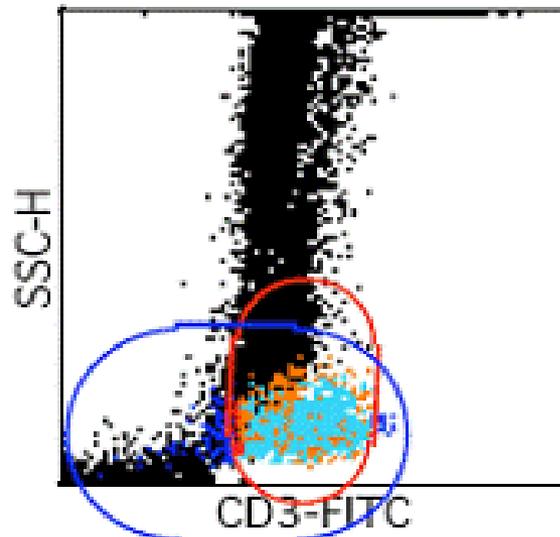
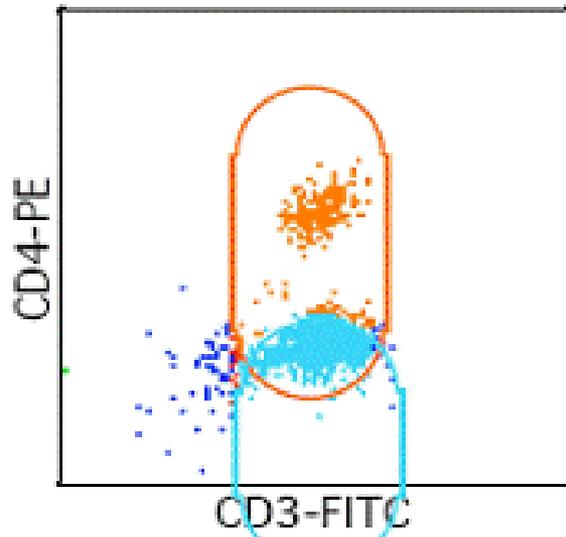
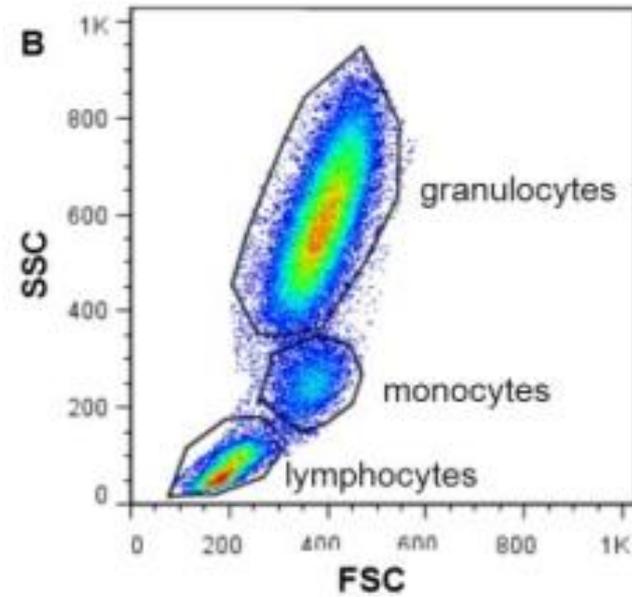
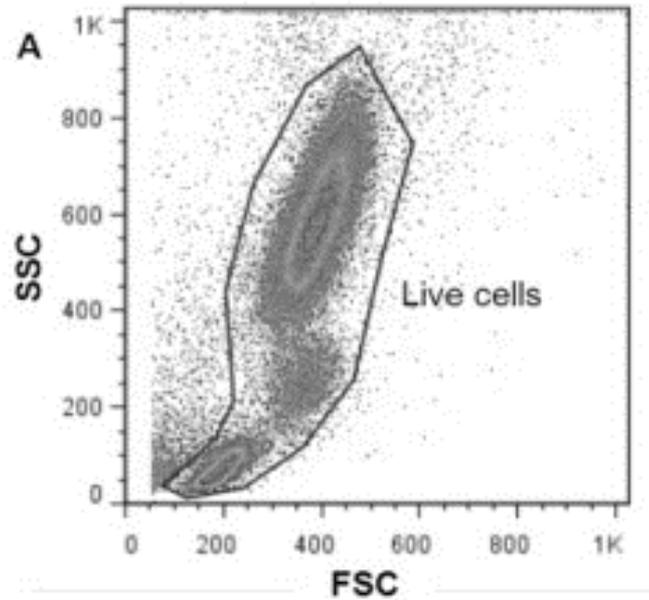
Cellule apoptotiche

Valutazione microscopica



# GATING

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	SD	CV	Median	Peak	Peak Ch
All	1, 9910	32147	100.00	64.29	28.00	4.53	151.36	540.65	3.05	511	1



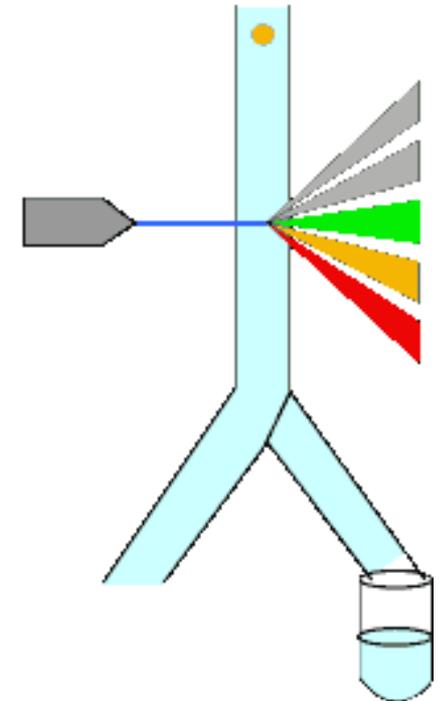
Possibilità di  
analizzare  
sottoinsiemi **comuni**  
a due popolazioni.

# IL SEPARATORE CELLUARE (SORTER)

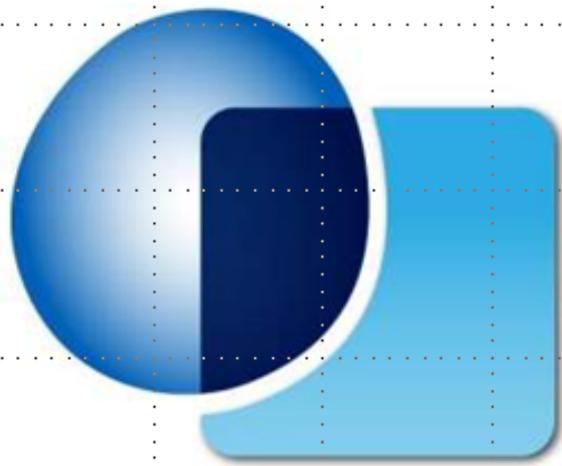
## FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting



Il fluido viene frammentato in minuscole goccioline, ognuna contenente **una sola cellula**.



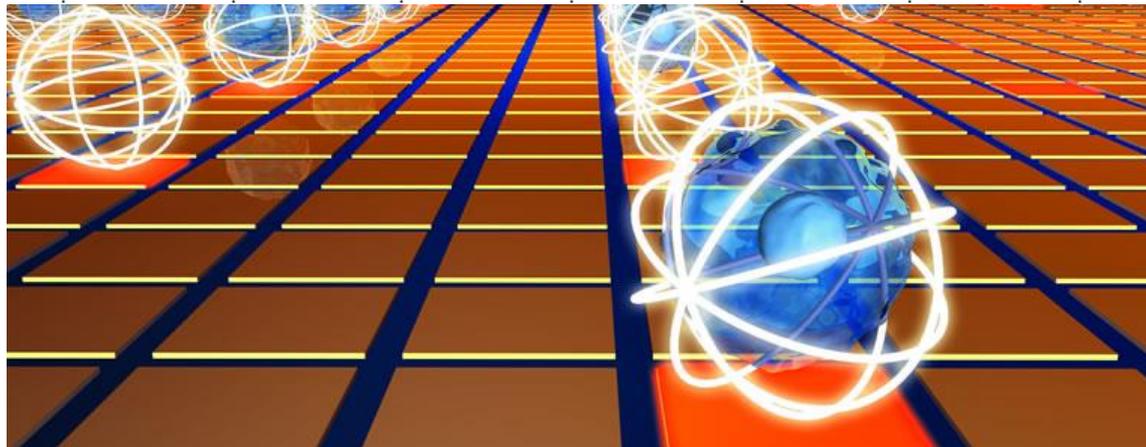
Le **placche di deflessione** caricano le gocce che contengono cellule positive ai parametri prefissati e le indirizzano in apposite provette.



silicon  
biosystems

THE LIVING-CELL COMPANY<sup>®</sup>

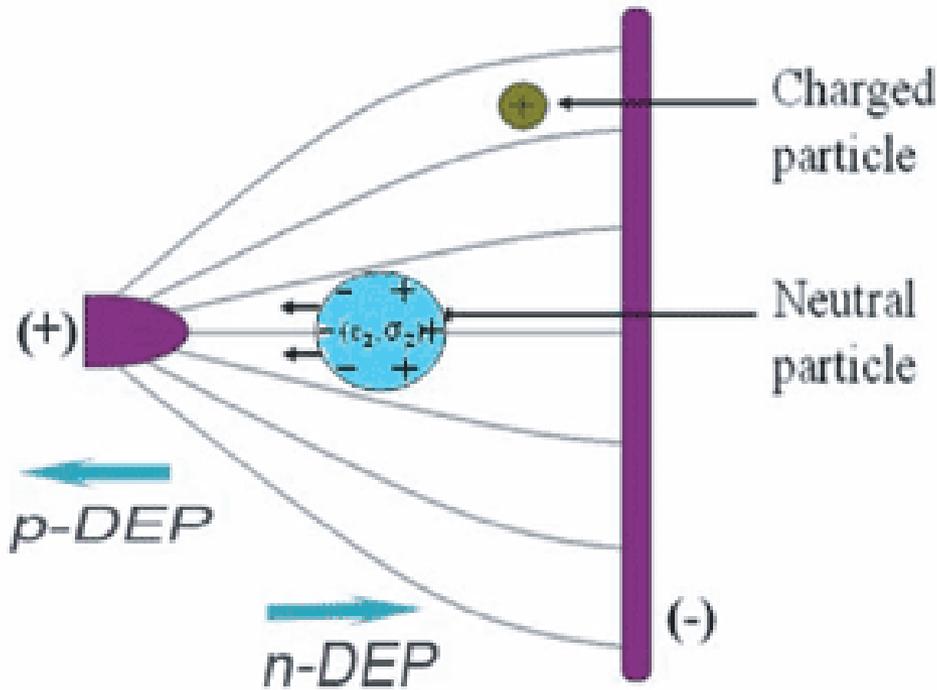
# DEPArray<sup>™</sup> Technology Primer



Silicon Biosystems Spa – Bologna ITALY

[www.siliconbiosystems.com](http://www.siliconbiosystems.com)

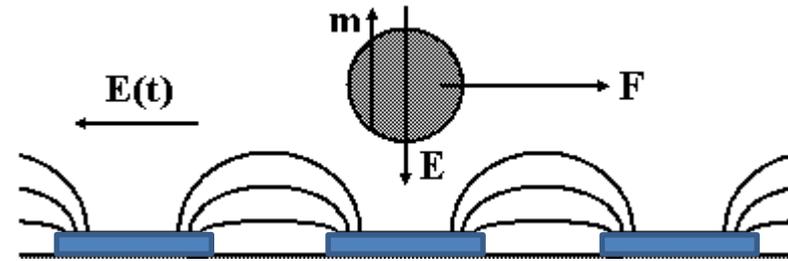
# DIELETTROFORESI (DEP)



## Dielectrophoresis of Biological Cells and Single-walled Carbon Nanotubes

Jaroslav (Jarek) Wosik, Divya Padmaraj,  
Chinmay Darne, Wanda Zagodzoon-Wosik

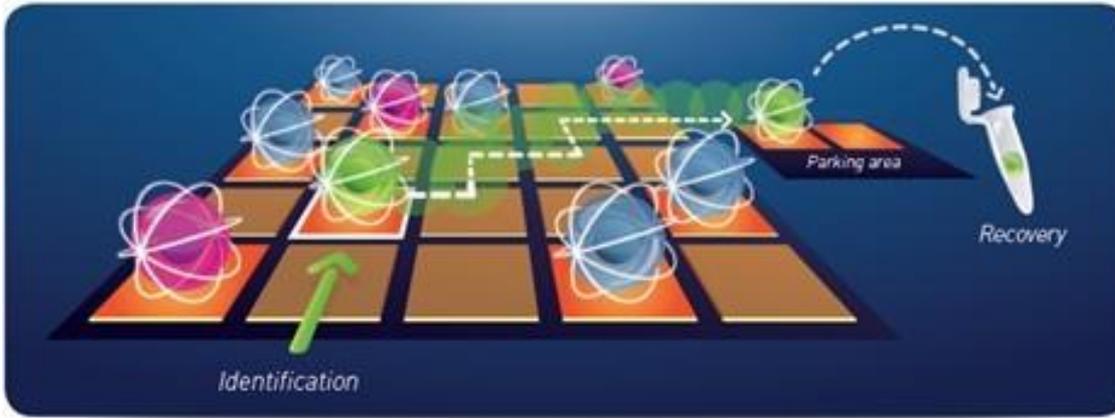
University of Houston • University of Houston-Clear  
Lake • ISSO Annual Report Y2006 • 108-109



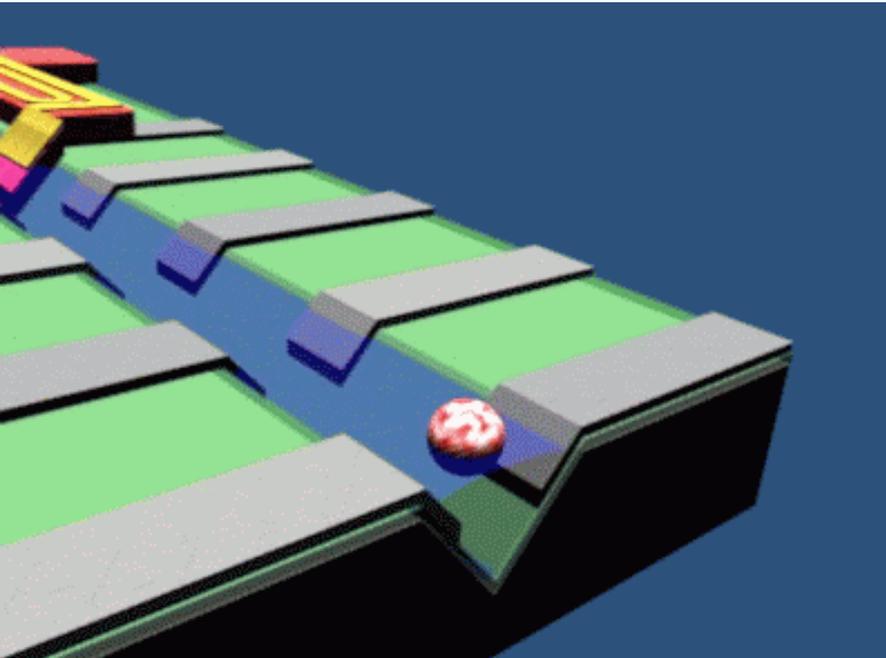
Formazione di **dipoli** in particelle dielettriche, se sottoposte a campi elettrici disomogenei.

Possibilità di **spostare le particelle senza toccarle!**

# STRUMENTO PER LA SELEZIONE DI CELLULE

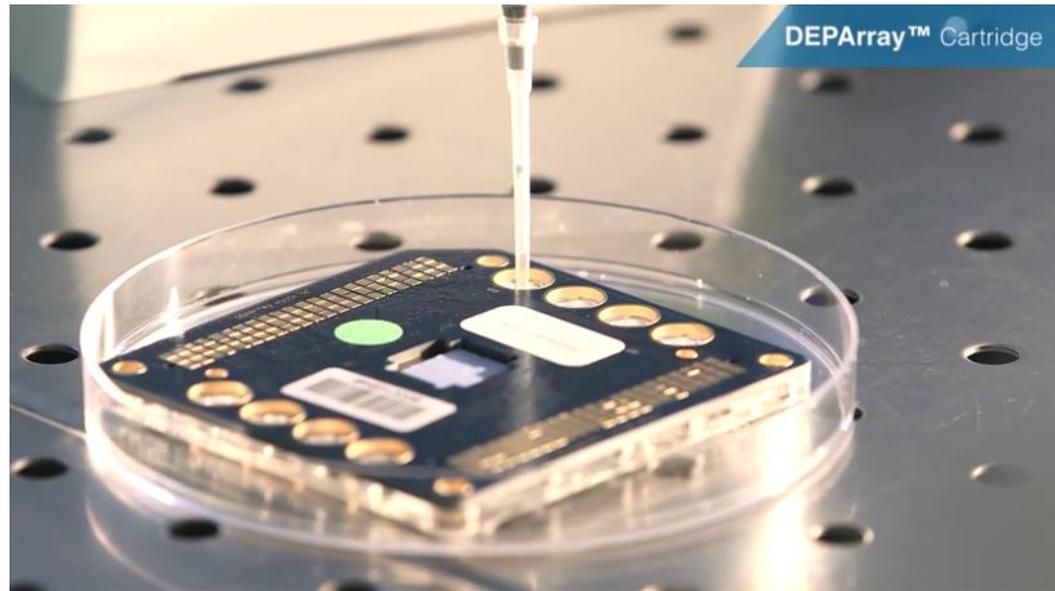
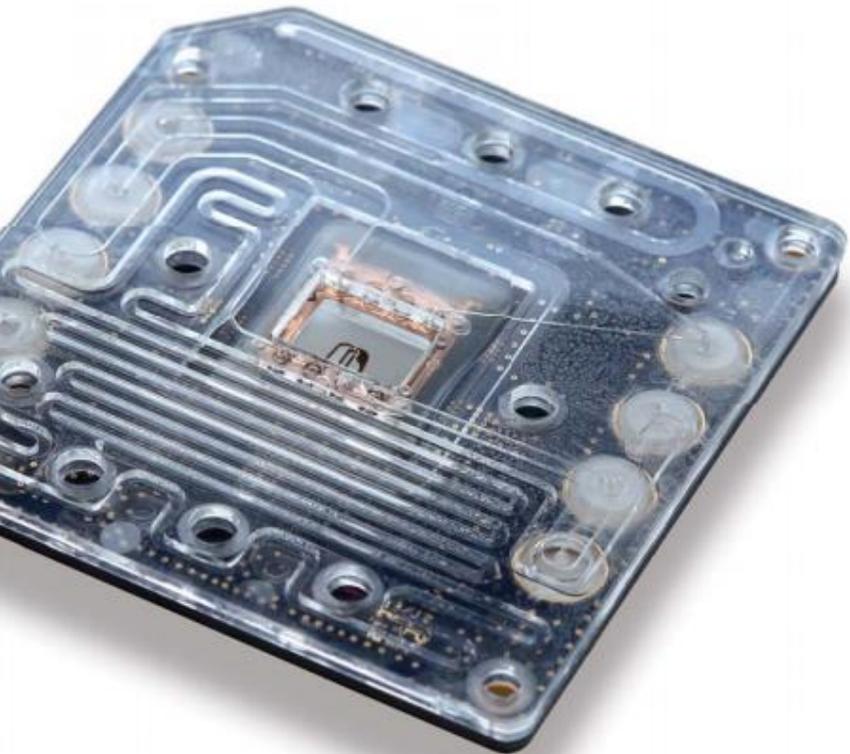


Le cellule sono sottoposte a dielettrodoresi.



# DEPArray - CHIP

Da 10000 a 200000 cellule possono essere iniettate nel chip.  
Per lo sperimentatore questa è l'**unica** fase manuale.

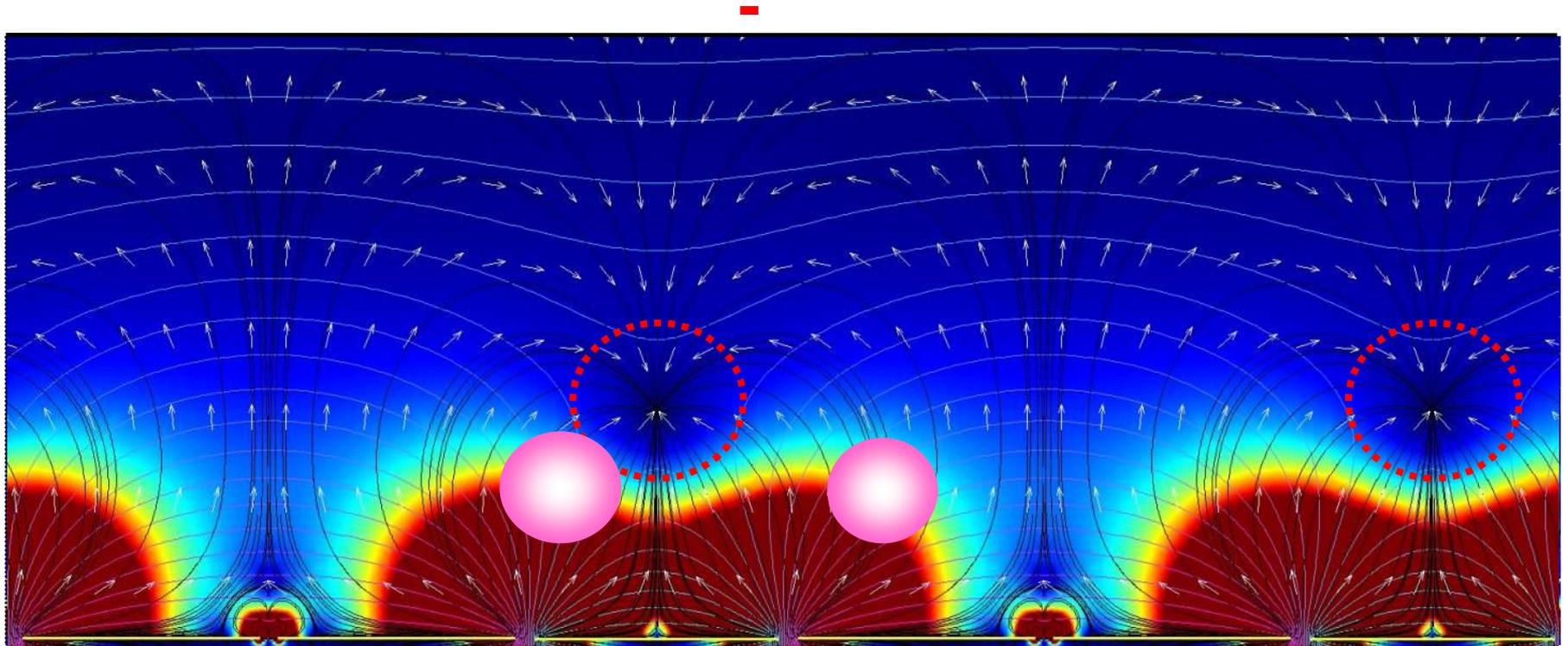


Nessun **contatto diretto** con le cellule significa:

**ASSENZA DI CONTAMINAZIONI**

# MOVIMENTO DELLE CELLULE NEL CHIP

Cell trapping by DEP cages generated by in-phase (+) and counter phase (-) AC voltages



+

+

-

+

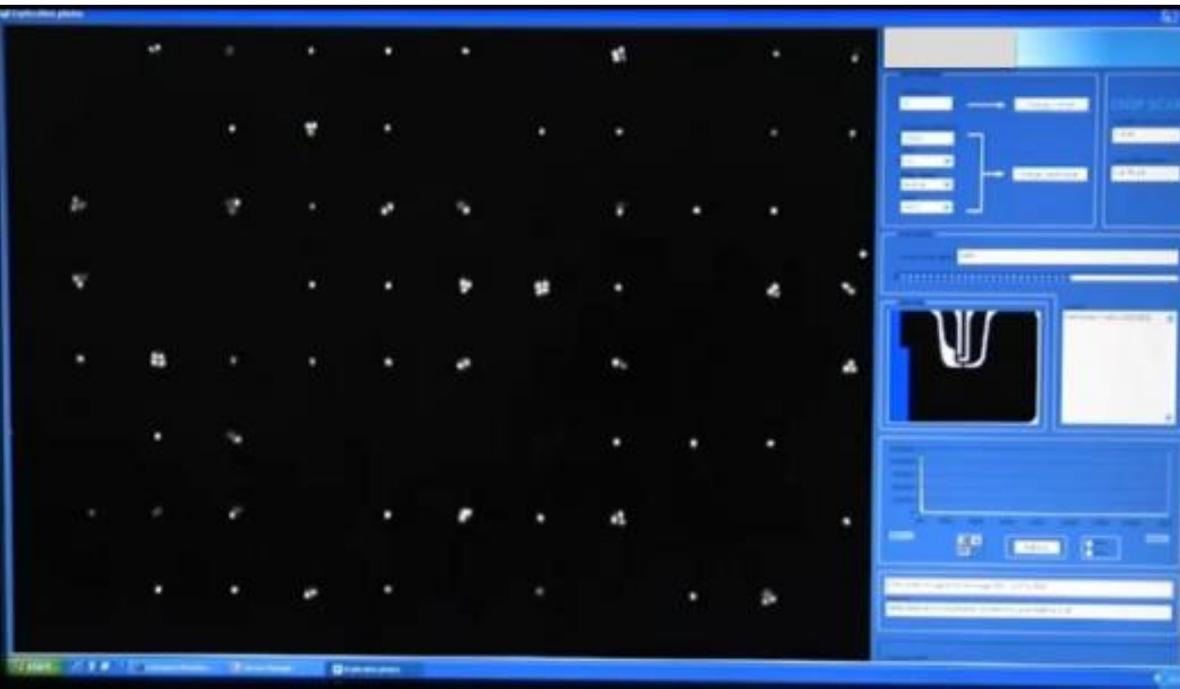
+

-

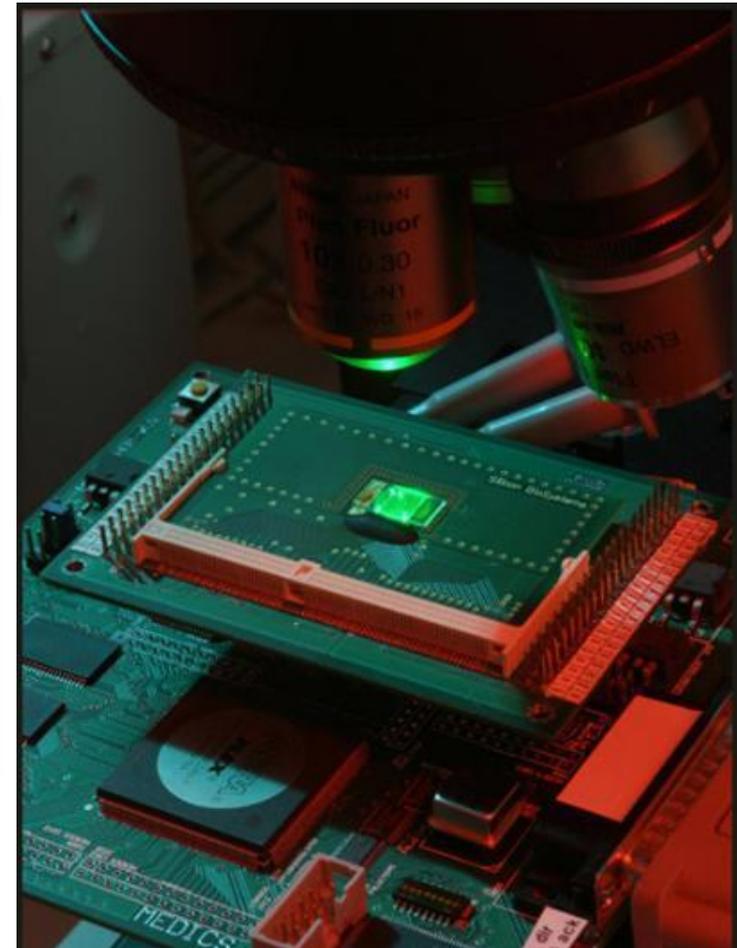
Cage motion drags along trapped cell

# COME SI SELEZIONANO LE CELLULE?

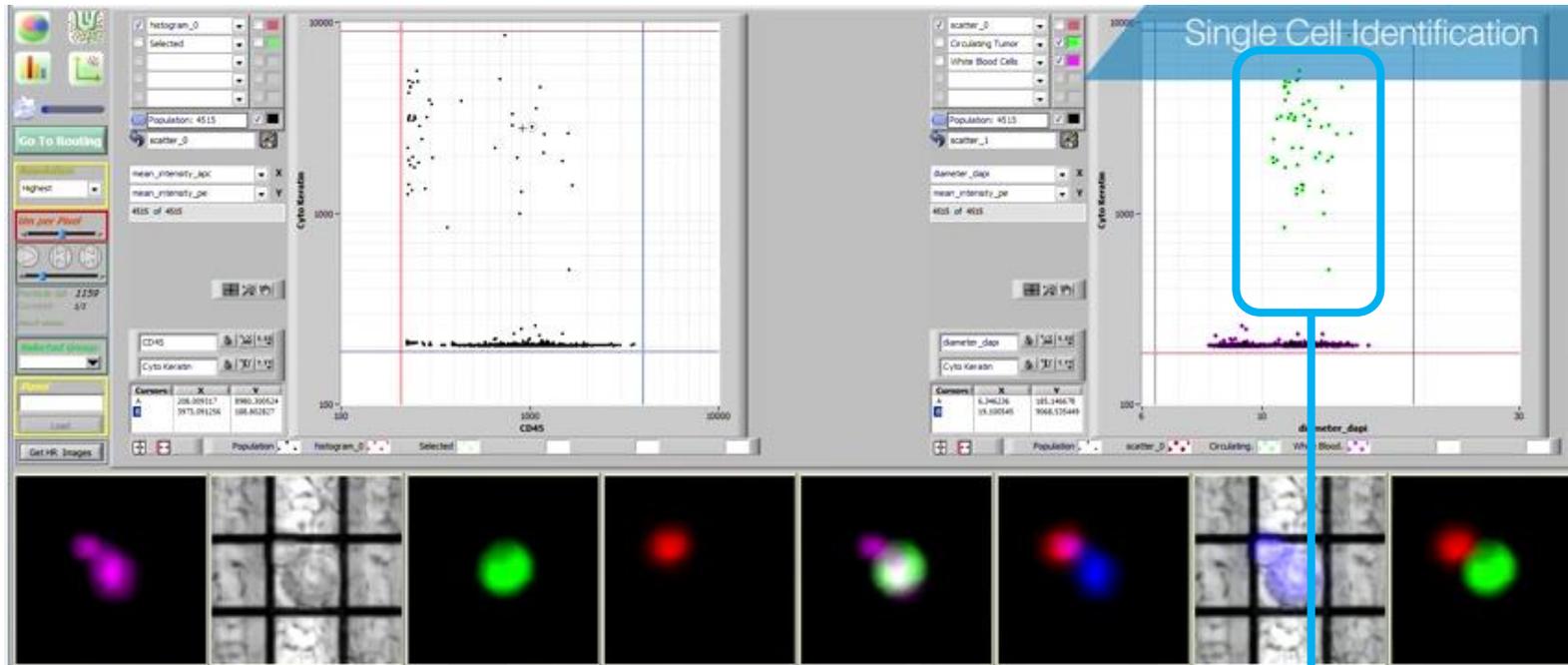
L'analisi delle **cellule in sospensione** in un tampone è affidata ad un **microscopio a fluorescenza** (6 canali) con un obiettivo a ingrandimento 10X.



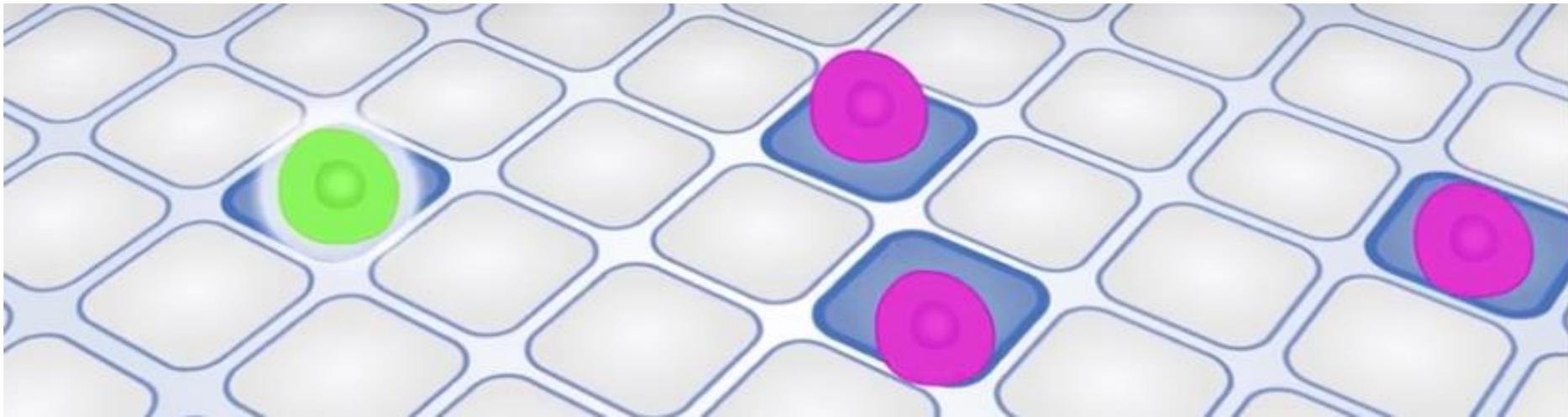
Ad ogni cellula è assegnato un **numero**.



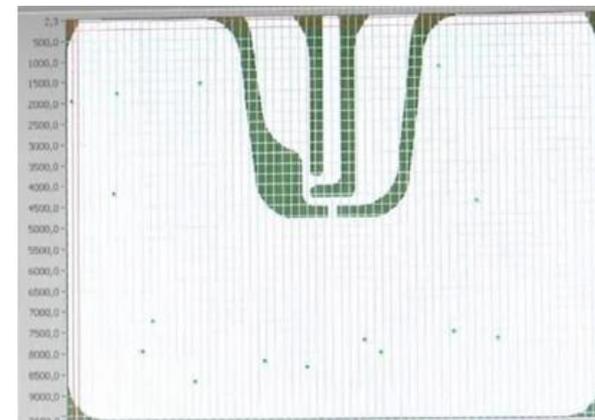
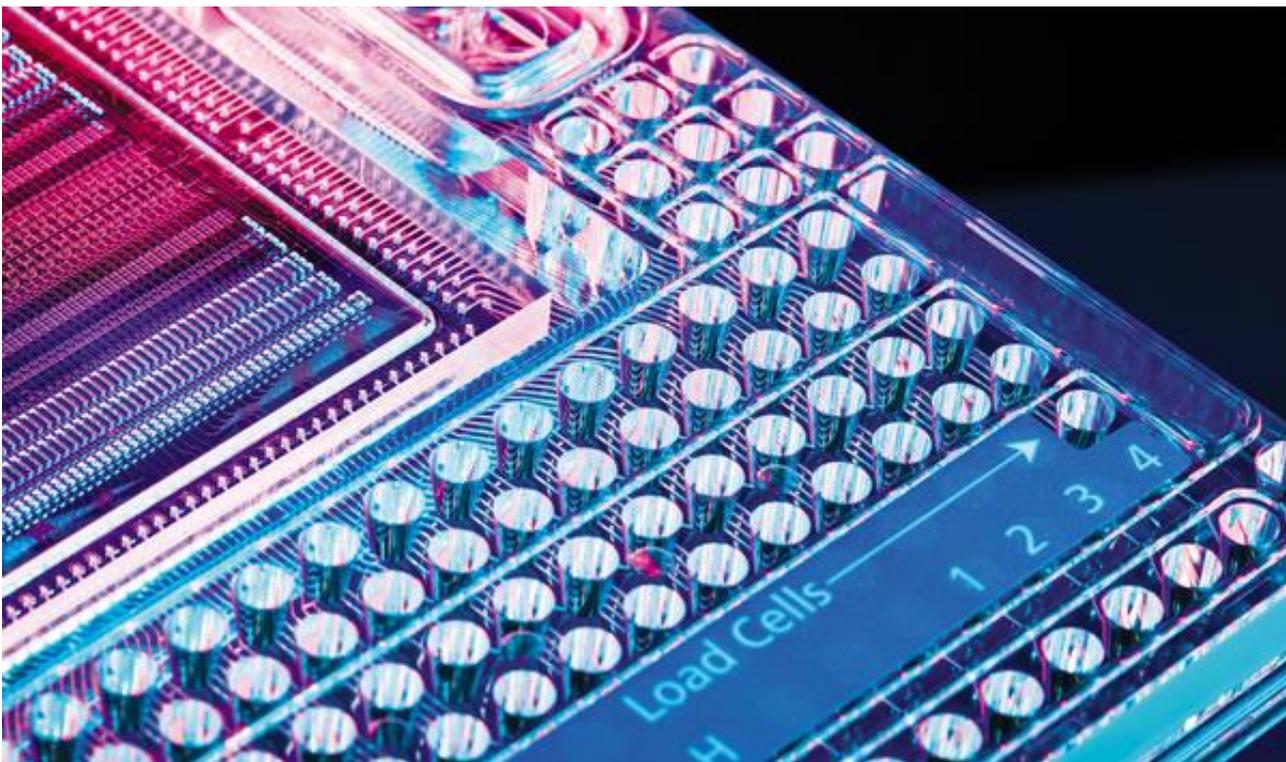
# STRUMENTO PER LA SELEZIONE DI CELLULE



Cellule positive per la grandezza valutata dall'operatore

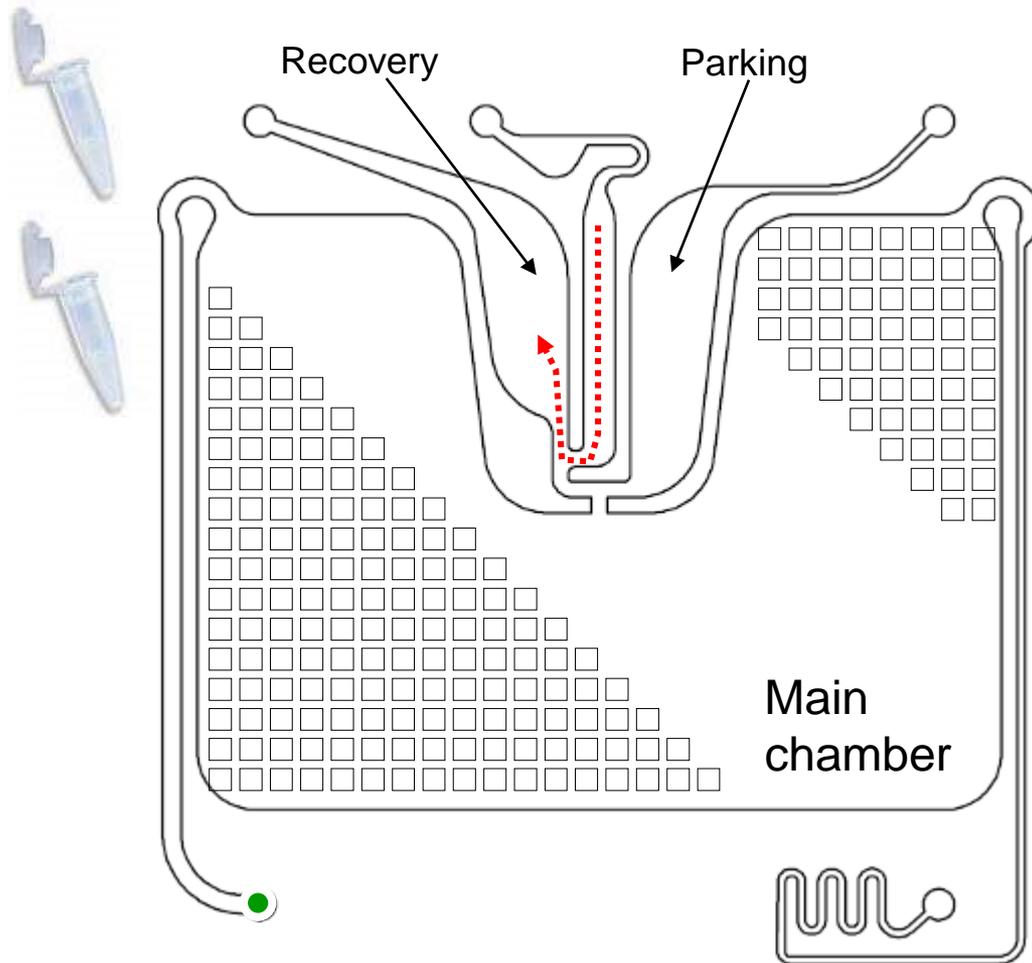


# LA DIELETTROFORESI E' SUCCESSIVA ALLA SELEZIONE DELLE CELLULE



# SELEZIONE ESTREMAMENTE EFFICIENTE

[https://www.youtube.com/watch?v=ANZKlsBpK\\_c](https://www.youtube.com/watch?v=ANZKlsBpK_c)



1. Inject, trap and image all cells.
2. Move all cells of interest into Parking chamber.
3. Move separately to Recovery chamber and flush.

## Features

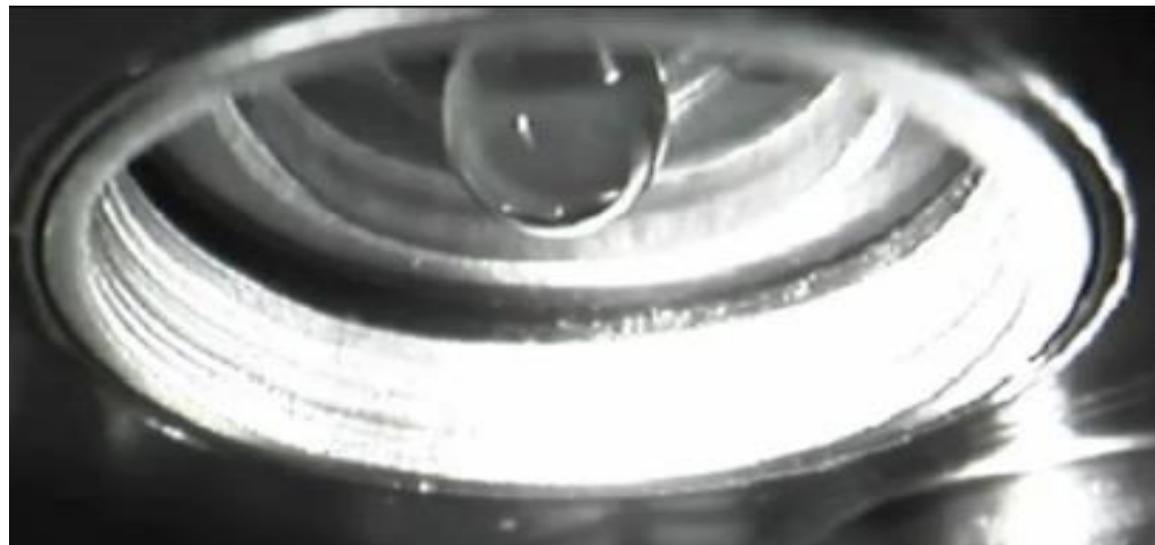
- Multiparametric image-based sorting.
- Single cell resolution.
- Small cell loads.
- Gentle on cells.
- No a priori thresholds → choose *best* cells.
- Sorting based on slow kinetics (10-100s minutes) possible.

# FINALITA' DELLO STRUMENTO

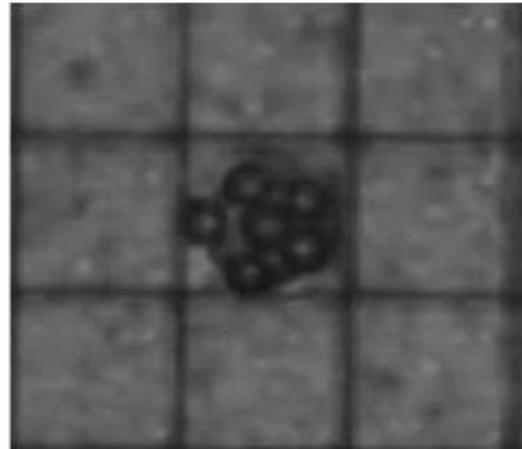
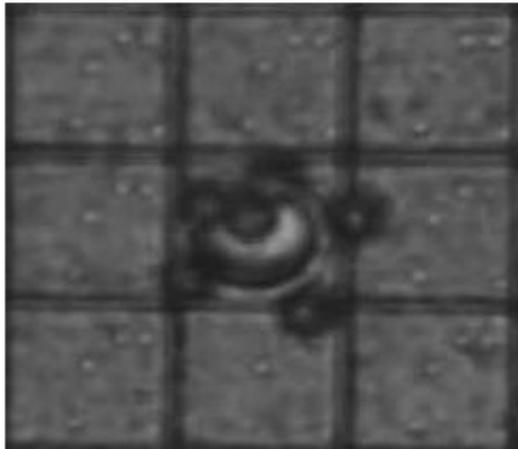
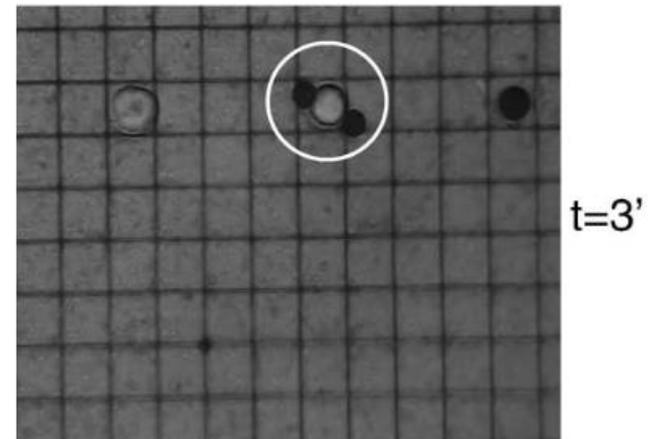
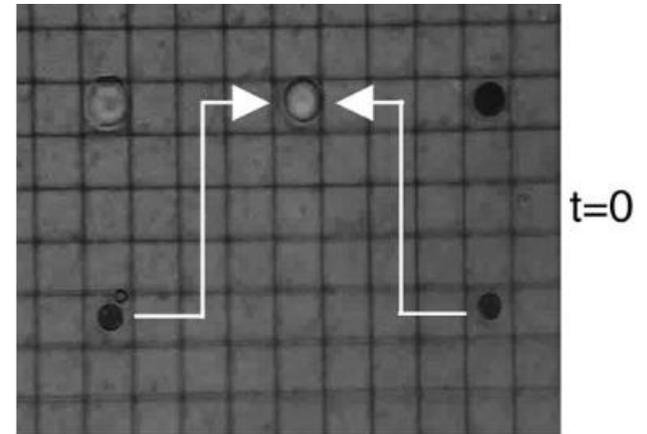
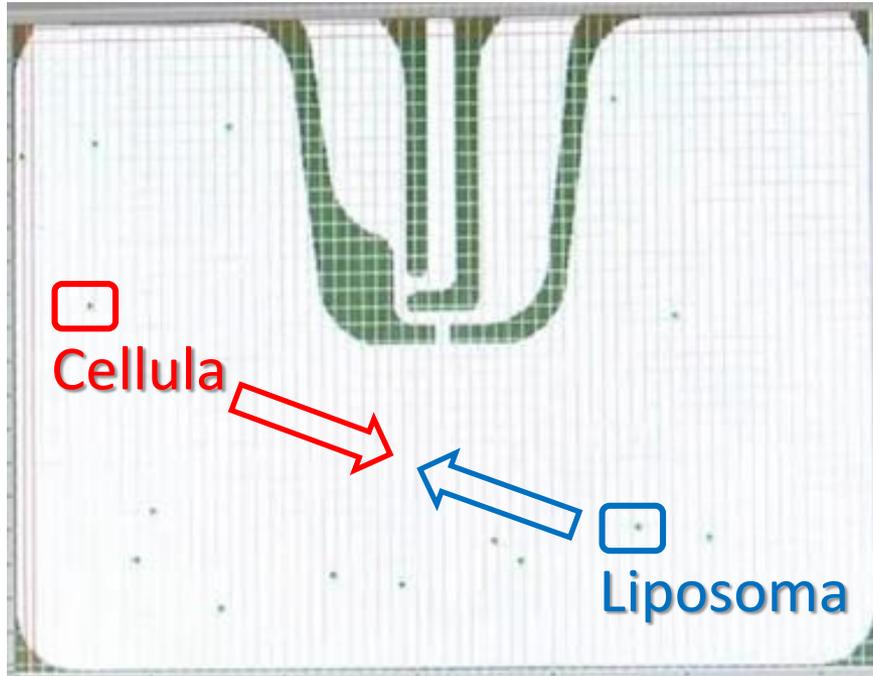
- Identificare
- Manipolare
- Recuperare **singole cellule** con purezza assoluta.



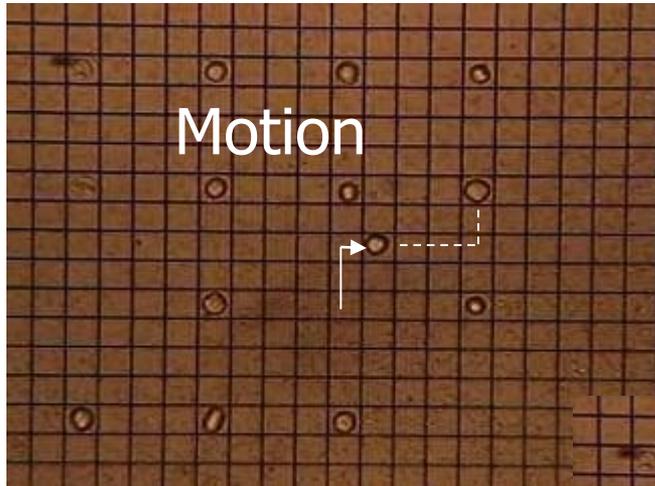
Le cellule estratte sono pronte per esperimenti successivi.



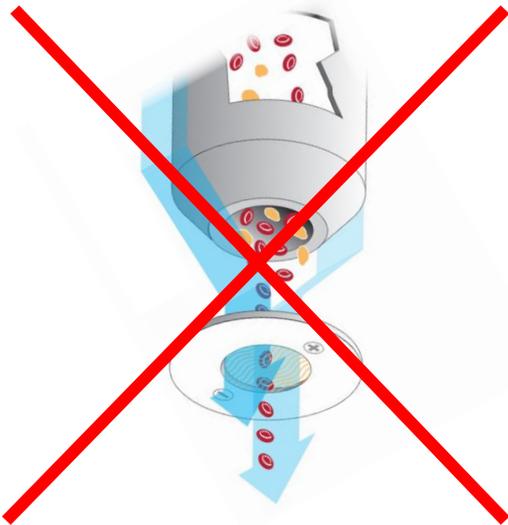
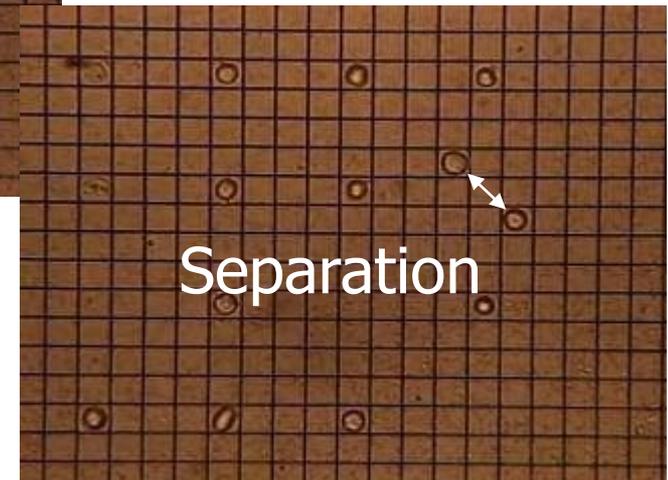
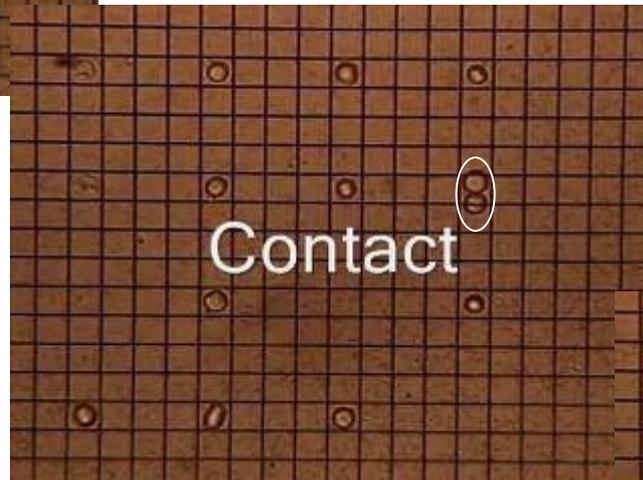
# VEICOLAZIONE DIRETTA E SPECIFICA DI FARMACI



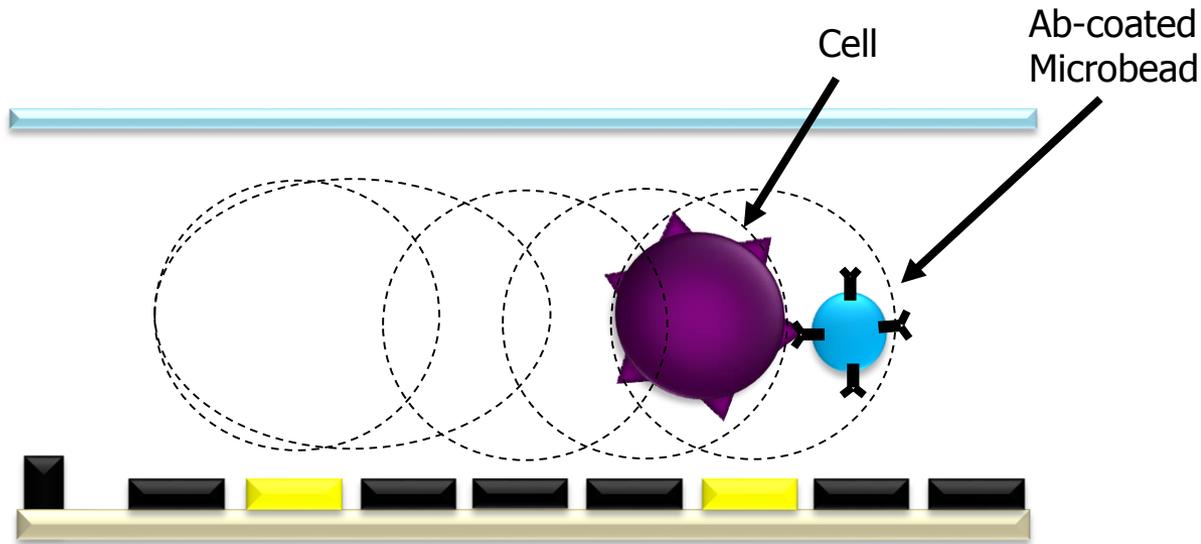
# INTERAZIONI CELLULA-CELLULA



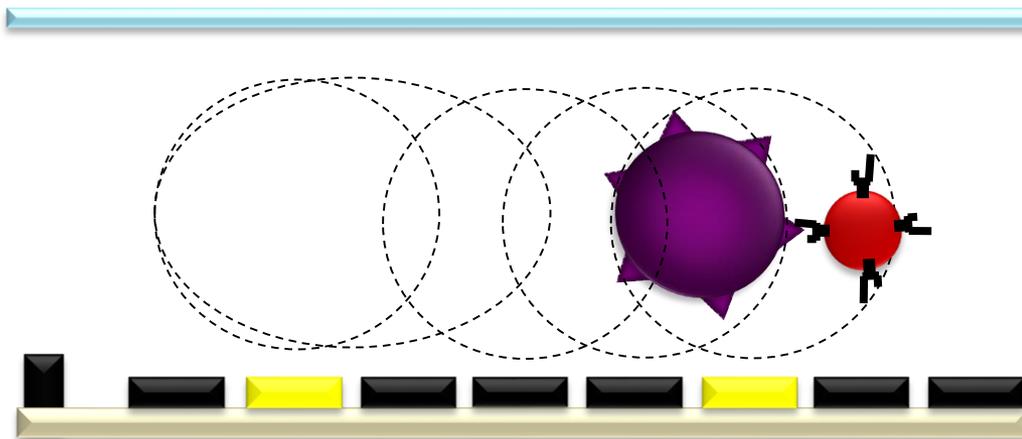
DEPArray™ Enables Individually Organized and Timed Cell-Cell Interactions



# RICONOSCIMENTI ALTAMENTE SPECIFICI



**SPECIFIC  
INTERACTION**



**NON-SPECIFIC  
INTERACTION**

A close-up photograph of a microscope slide with a grid pattern. A black pen nib is positioned diagonally across the slide, pointing towards the bottom right. The slide is illuminated with a green light, and there are some small, dark spots on the grid. The background is blurred.

SFRUTTARE LE CELLULE

IN COLTURA PER

PRODURRE

PROTEINE

# BOTTIGLIE ROTANTI

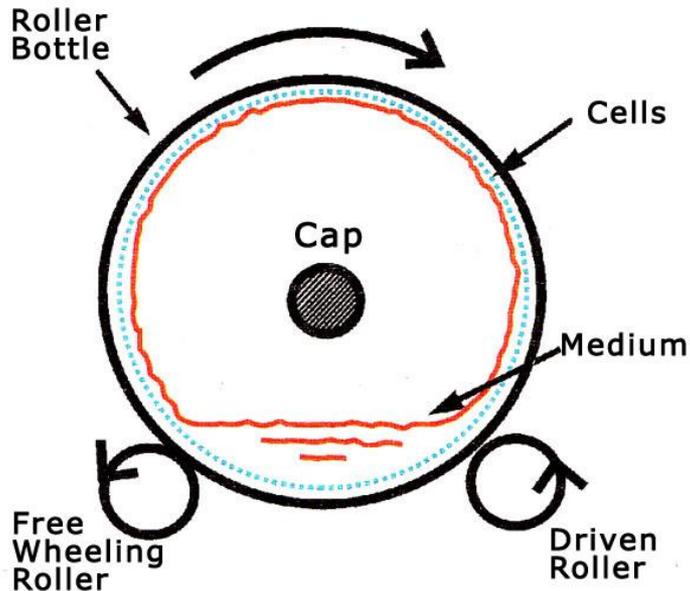


## PREGI

Fasi manuali poco frequenti...**ma numerose!**

## DIFETTI

**Sostegno specifico**

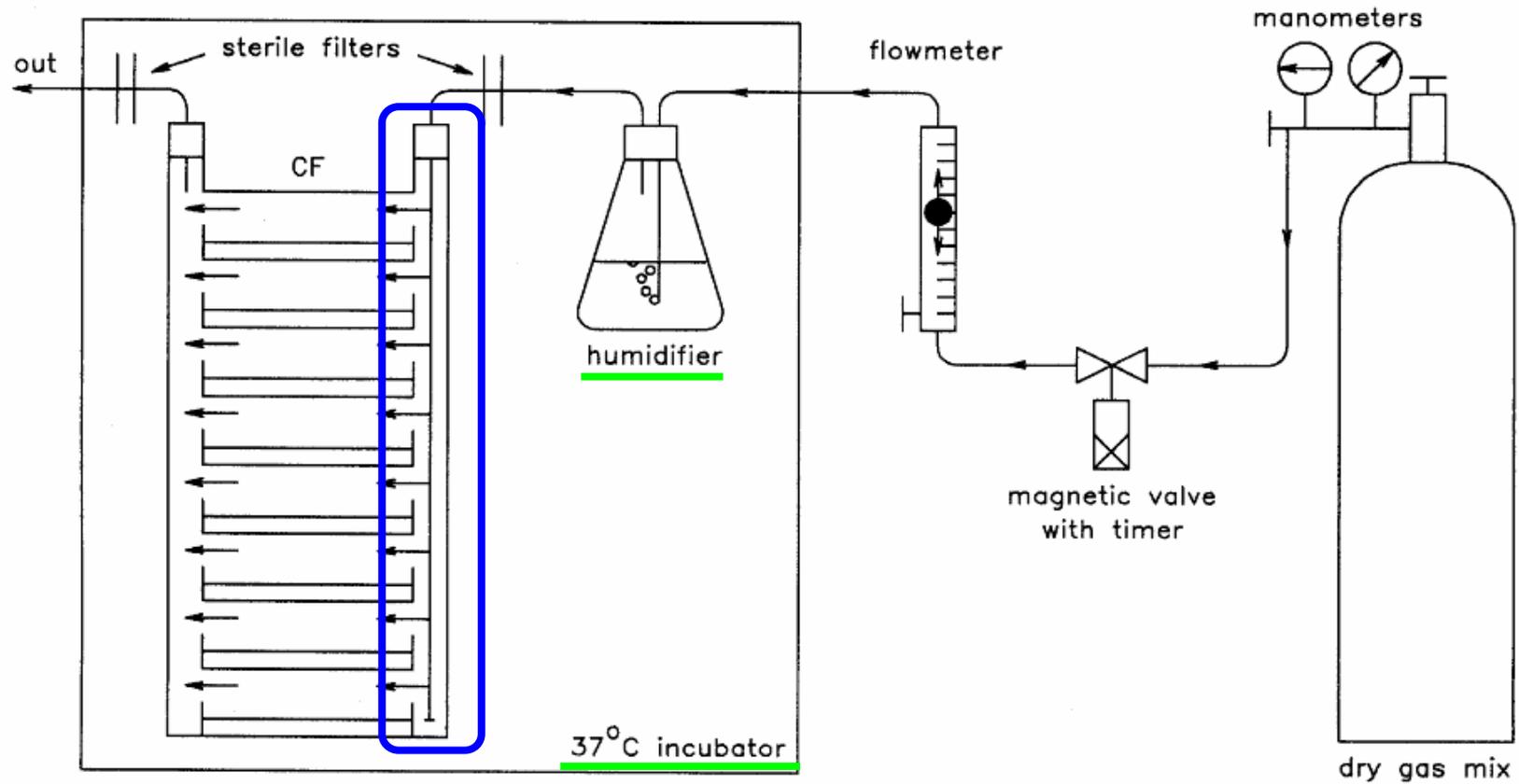


# CELL FACTORY



**Condominii** per cellule.  
Affitto pagato in proteine!

# SCHEMA DI UNA CELL FACTORY



Superfici di crescita isolate a liquidi e solidi,  
ma **non ai gas**.

# CONDIZIONI DI LAVORO

Preparare la sospensione di cellule in una bottiglia con connettore (sterili) e pinze.



**STERILITA'**  
**INDISPENSABILE**  
Si lavora solo sotto cappa

# FASI PRATICHE

Rimuovere il tappo

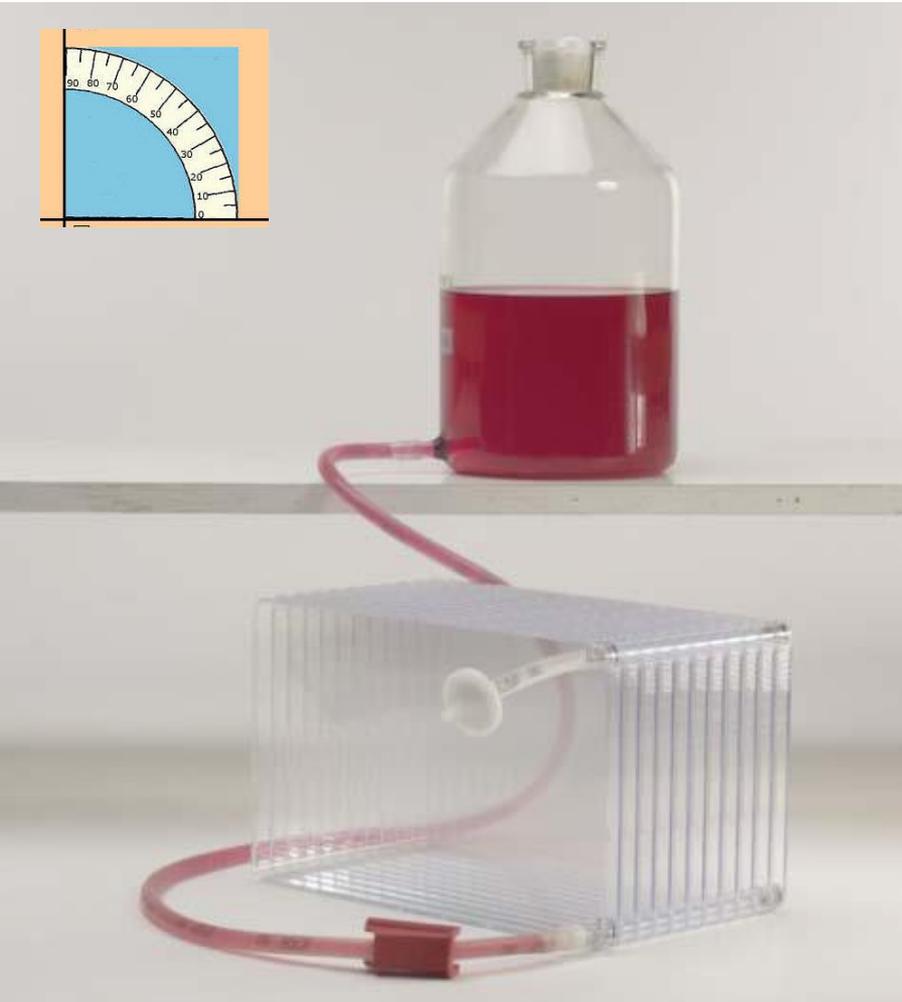
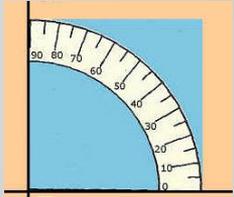


Inserire immediatamente  
il tubo di connessione



# FASI PRATICHE

Ruotare la cell factory  
sul lato “comunicante”

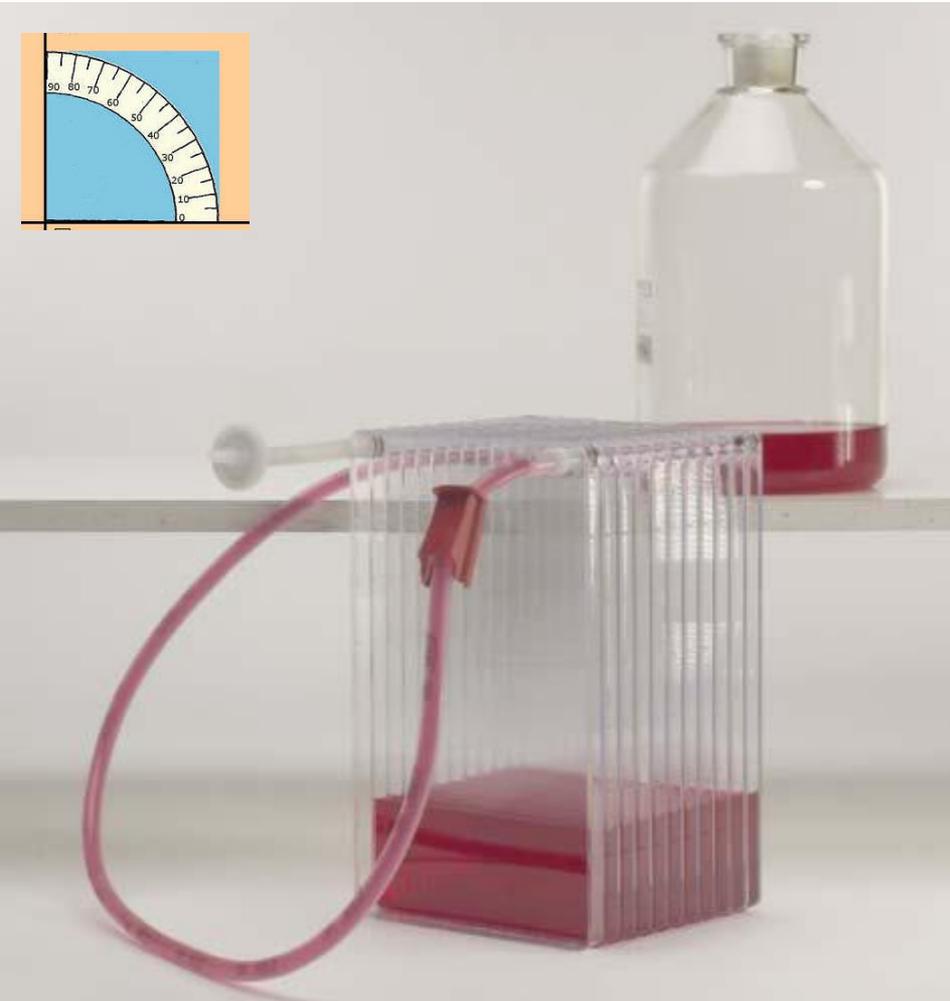
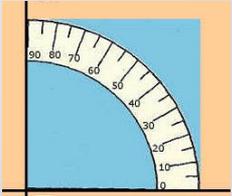


Attendere, prego!

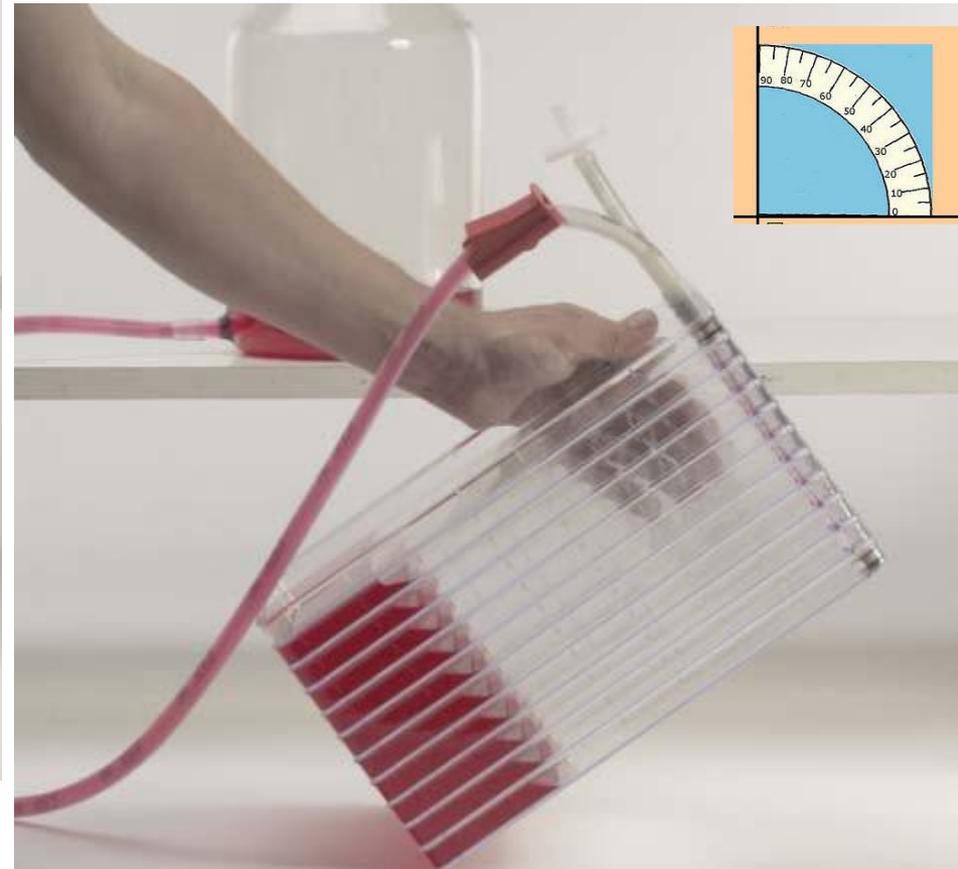
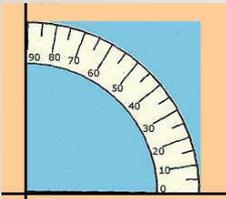


# FASI PRATICHE

Ruotare la cell factory sul lato non “comunicante”



Riporre...



# FASI PRATICHE

...e terminare.



# INCUBAZIONE

Chiudere con un filtro per  
l'aria ( $0,2 \mu\text{m}$ )



# ALTERNATIVA

Chiudere con uno  
scambiatore di gas



Se **non** serve il  
controllo della  
**temperatura**.

# SVUOTARE LA CELL FACTORY

Quando sostituire il medium?



Per recuperare il medium con la proteina di interesse prodotta e secreta dalle cellule.

# METABOLISMO CELLULARE

*8 min. Gasing*

*NUNC™  
Brand Products*



# FINE CARRIERA PER UNA CELL FACTORY



Terminato l'uso,  
per **decontaminare**  
la Cell Factory, si  
raccomanda  
l'impiego di un  
**autoclave:**

**> 60 min a 132°C**

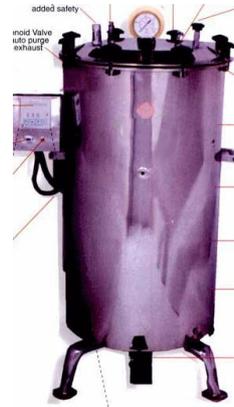
# STERILIZZAZIONE

Stufa a secco: 3 ore a 180°C



- per vetreria

Autoclave: 1 atm, 121°C  
2 atm, 134°C  
3 atm, 144°C



- per filtri e soluzioni

Filtrazione (0,22 μm)



- terreni di coltura,  
soluzioni organiche

Raggi γ



- Plasticheria

OK, le abbiám nutrite, cullate e coccolate.....

**MA SE VOLESSIMO UCCIDERLE?**

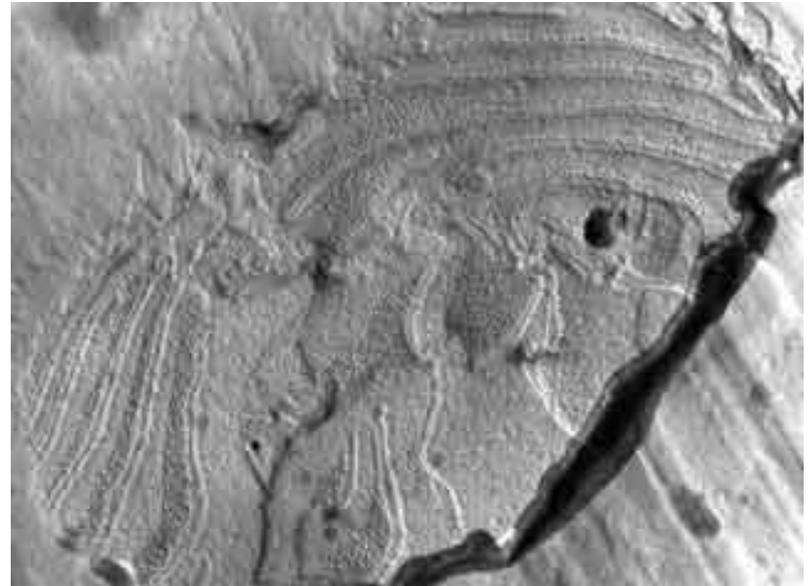
Od almeno render piú permeabile la membrana?

# LISI CELLULARE

## - DETERGENTI

Se **non** volessimo aggiungere sostanze chimiche:

## - CRIOFRATTURA



## - ULTRASUONI

Sonicazione (1959). Sfrutta il fenomeno della cavitazione.