EVERY
event matters.

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНАЯ СОРТИРОВКА КЛЕТОК И ДРУГИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ



Содержание

Введение

Методы выделения клеток

Что такое клеточный сортер

Принцип проточной цитофлуориметрии

Преимущество клеточных сортеров

Объекты для сортировки

Принцип сортировки

Сортеры MoFlo™

Немного истории

Ключевые особенности

Общие характеристики

Характеристики MoFlo™ XDP

Характеристики MoFlo™ Astrios EQ

Приложения

Поддержка

Методы выделения клеток

Сортировка клеток по принципу проточной цитофлуориметрии

сбор клеток по параметрам светорассеяния и флуоресценции

Избирательный лизис

разрушение клеток под влиянием различных агентов

Выделение клеток на градиенте плотности

центрифугирование в градиентном растворе, при этом клетки перемещаются до тех пор, пока не достигнут области градиента, где их плавучая плотность равна плотности среды

Мембранная фильтрация

сепарация, при которой разделяется жидкость на два потока при помощи полупроницаемой мембраны

Магнитная сепарация

магнитная маркировка клеток, магнитная сепарация в штативе или колонке, вымывание немеченой клеточной фракции, вымывание меченой клеточной фракции

Лазерная микродиссекция

процесс вырезания фрагментов из гистологических препаратов с помощью лазера

Что такое клеточный сортер

Это одновременно проточный цитофлуориметр (анализатор) и сортировщик клеток.

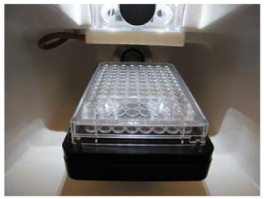
Позволяет собирать клетки по определенной совокупности признаков по флуоресцентному сигналу и сигналу светорассеяния.



Исходный материал для сортировки:
суспензия клеток, клеточных органелл, частиц

Результат сортировки:
популяции клеток, клеточных органелл или частиц с возможностью заданного их количества от одной





Что такое клеточный сортер

Современные сортеры - приборы, способные одновременно выделять несколько популяций клеток или частиц



максимально быстро

без потери клеток образца

сохраняя высокую выживаемость клеток

асептично или без контаминации

с заданным одновременно большим количеством параметров

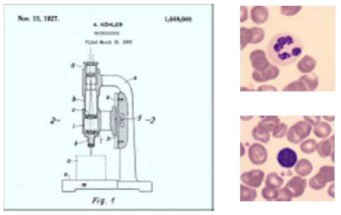
в широком диапазоне размеров

с высоким уровнем биобезопасности

Принцип проточной цитофлуориметрии

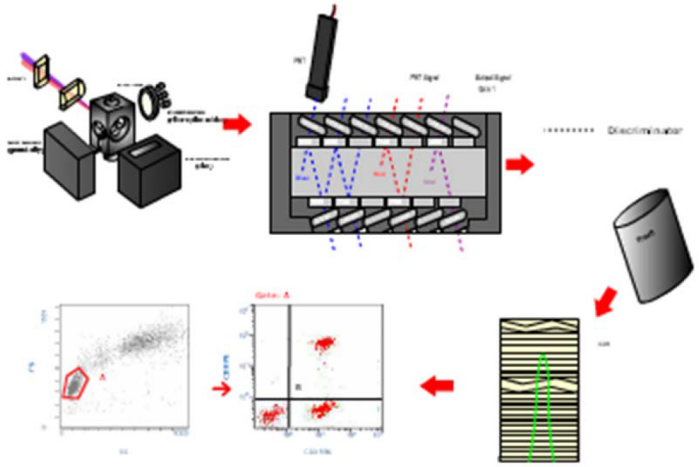
Цитометрия (цитометрические исследования)

совокупность методов измерения клеток. Обычно выполняются с помощью микроскопа (микроскопия, имидж-цитометрия, морфометрия и т.д.)



Проточная цитометрия

измерения происходят при прохождении клеток в потоке жидкости через детектирующее устройство.



Проточные цитофлуориметры

возможность детектирования флуоресцентных красителей проточными цитометрами. Это позволило существенно расширить спектр применения этих приборов.

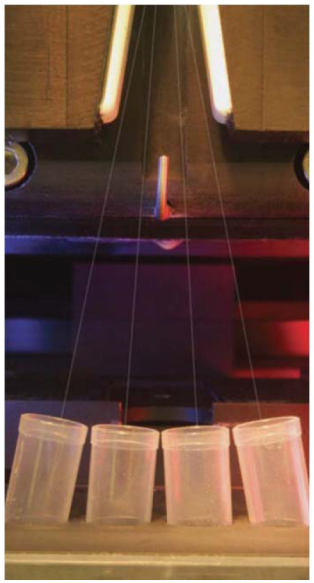
Принцип проточной цитофлуориметрии

Проточная цитометрия позволяет измерять те же параметры клеток, что и микроскопия:

- размеры клеток или частиц
- гранулярность клеток
- количество клеток
- автофлуоресценцию
- флуоресценцию, испускаемую флуорохромами - маркерами компонентов клеток
- флуоресценцию, испускаемую флуорохромами, конъюгированными с маркерами поверхностных или внутриклеточных компонентов клеток.

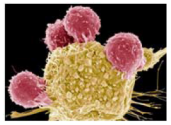
Существенным преимуществом использования проточной цитометрии является скорость анализа одиночных клеток.

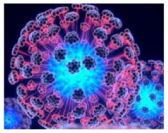
Преимущества клеточных сортеров

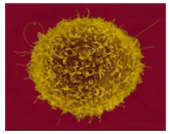


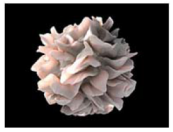
- Исследование характеристик клеток разной природы (морфологические параметры, экспрессия генов, характеристика цитоплазмы и т.д.)
- Одновременное использование большого количества параметров для выбора целевой популяции (многоцветный анализ)
- Выделение клеток с разным уровнем экспрессии генов, разным уровнем внутриклеточного кальция и т.д.
- Высокая чистота отсортированных популяций
- Выделение редких клеток («одна на миллион»)

Объекты для сортировки

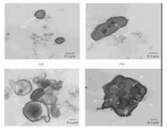

Опухолевые клетки


Стволовые клетки

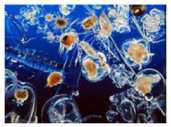

Клетки крови


Дендритные клетки


Бактерии,
дрожжевые грибы


Микрочастицы

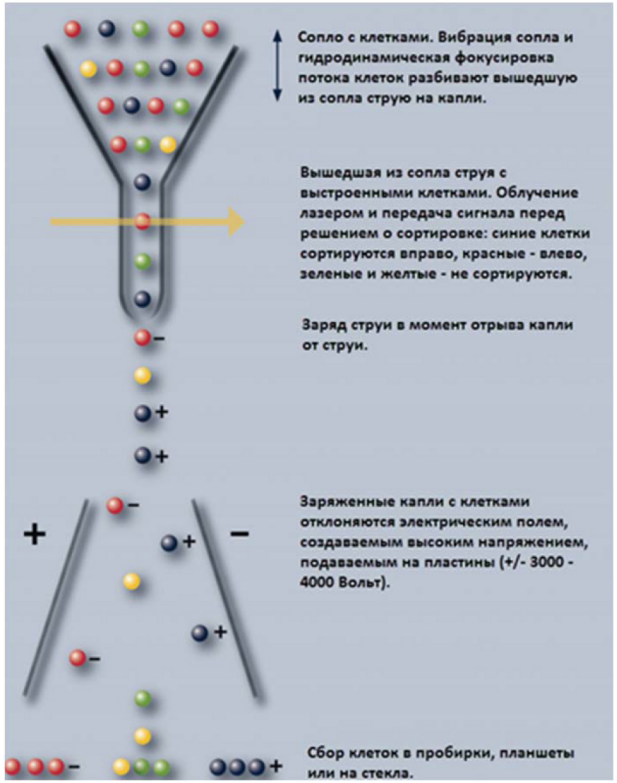

Хромосомы


Водные микроорганизмы

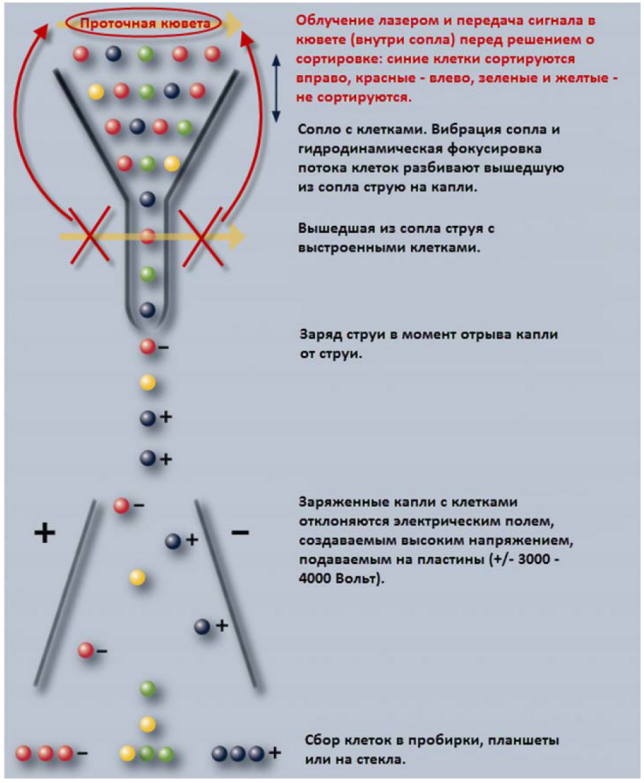
...

Принцип сортировки

Технология Jet-in-Air



Кюветная технология



Принцип сортировки

На примере технологии Jet-in-Air



1 шаг. Отрыв капли

2 шаг. Детектирование параметров одиночной клетки

3 шаг. Принятие решения («сортируем/не сортируем»)

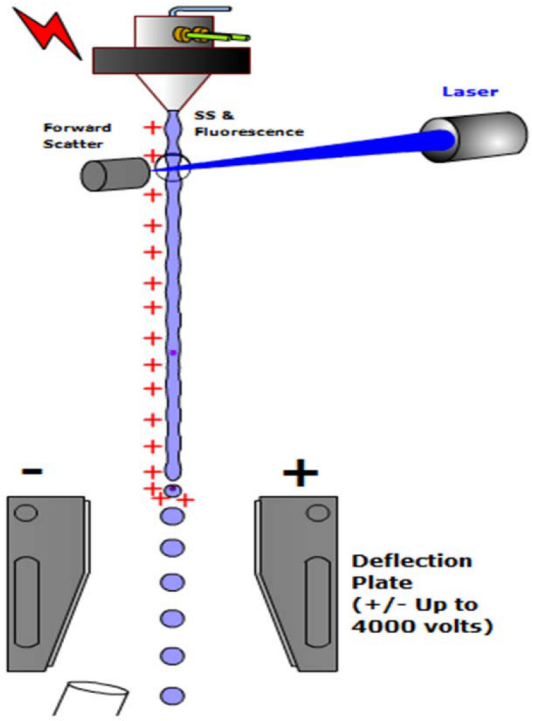
4 шаг. Время отрыва капли

5 шаг. Заряд капли в точке отрыва

6 шаг. Отклонение капли по заряду

Принцип сортировки

На примере технологии Jet-in-Air



1 шаг. Отрыв капли

2 шаг. Детектирование параметров одиночной клетки

3 шаг. Принятие решения («сортируем/не сортируем»)

4 шаг. Время отрыва капли

5 шаг. Заряд капли в точке отрыва

6 шаг. Отклонение капли по заряду

Сортеры MoFlo™. Немного истории

1980-е. Lawrence Livermore Laboratory. Cicero. 25 000 соб/сек

1994. Cytomation. MoFlo. 70 000 соб/сек

2007. Dako. MoFlo XDP. Электроника.

2009. Beckman Coulter. MoFlo Astrios. Автоматизация.

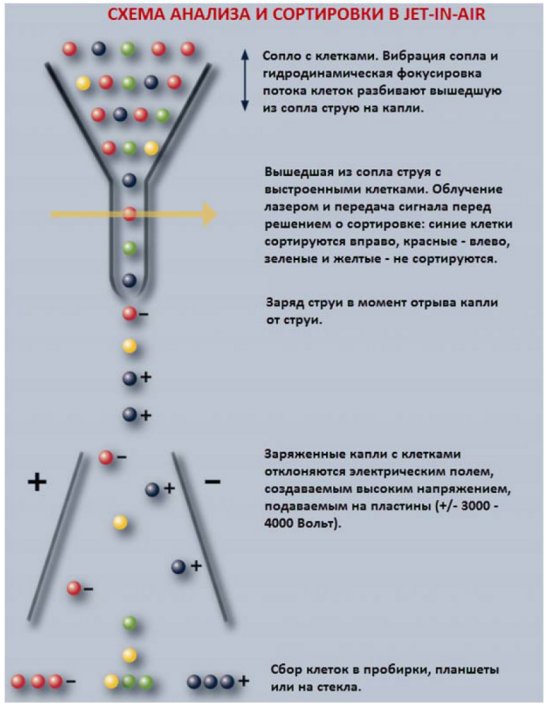
Сортеры MoFlo™. Ключевые особенности.

- Технология сортировки Jet-in-Air
- Высокая выживаемость клеток
- Комбинированные режимы сортировки
- Автоматическое определение параметра DropDelay без калибровочных частиц
- Высокие выход и чистота сортировки

Сортеры MoFlo™. Ключевые особенности.

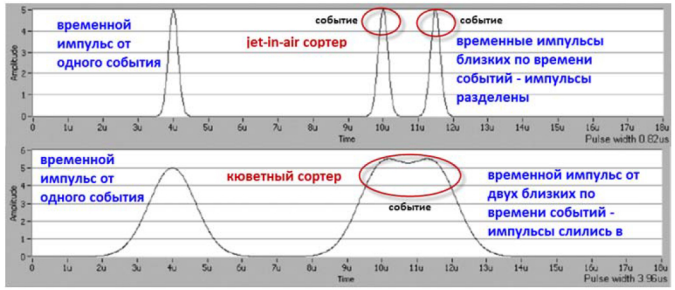
Технология сортировки Jet-in-Air





Регистрация клетки на высокой скорости

Как следствие, одновременно достигаются
- высокая точность
- высокая скорость
- высокая выживаемость



Сортеры MoFlo™. Ключевые особенности.

Высокая выживаемость клеток

90% выживают при максимальной скорости сортировки 70 000 событий в секунду
(в кюветных сортерах выживает только 50% при максимальной скорости)

Благодаря:

1. Высокие скорости анализа/сортировки (jet-in-air).
Невысокий риск повреждения клетки т.к. клетка мало времени находится в системе.

2. Запатентованные конструкции сопла и насадки на сопло.
Снижают механическое повреждение клеток.

3. Термостатирование линии образца.
От -4^0 до $+40^0$C

4. Автоопределение DropDelay без калибровочных частиц (см. далее).
Нет контаминации образца при добавлении реагента.



Особенно важно для редких клеток, клеток чувствительных к влиянию внешней среды: протопласты, стволовые клетки, циркулирующие опухолевые клетки, клетки нейрального происхождения.

Сортеры MoFlo™. Ключевые особенности.

Комбинированные режимы сортировки

При сортировке в несколько пробирок одновременно для каждой популяции можно задать свой оптимальный режим, в зависимости от вида объекта сортировки.



Sort Mode (3 режима + Abort). Решения о сортировке принимаются в зависимости от числа нужных клеток и наличия ненужных клеток в капле.

Режим Abort в пробирку при сортировке популяций в пробирки позволяет собрать неотсортированные клетки для повторной сортировки! ОБРАЗЕЦ НЕ ТЕРЯЕТСЯ

Сортеры MoFlo™. Ключевые особенности.

Комбинированные режимы сортировки

Stream	L3	L2	L1	R1	R2	R3
Sort Mode	Purify 1-2	Purify 1-2	Purify 1-2	Purify 1-2	Purify 1-2	Collect Soft Aborts L3-R2
Population	A	B	C	D	E	Aborts A-E
Occurence	1%	5%	1%	1%	1%	
Effcicency	48%	50%	48%	48%	48%	
Target cells (2min 20 second)	100000	50000	100000	100000	100000	
Soft Aborts	48000	250000	48000	48000	48000	442000 клеток, «спасенных» для ресортировки
Sorted cells (3 min 20 sec)	52000	250000	52000	52000	52000	



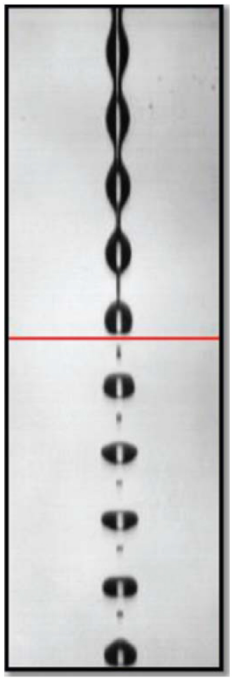
MoFlo Astrios EQ :
сбор 442000 нужных потерянных клеток (R3), которые бы потерялись на других системах.

Насадка: 70 мкм
Частота: 100 000 Гц
(100 000 капель/сек)
Скорость:
50 000 событий/сек.
Продолжительность сортировки:
3 мин 20 сек.

Сортеры MoFlo™. Ключевые особенности.

Автоматическое определение параметра DropDelay <u>без калибровочных частиц</u>

Определение DropDelay требуется перед каждой сортировкой всегда на любом сортере.



Программа Intellisort II

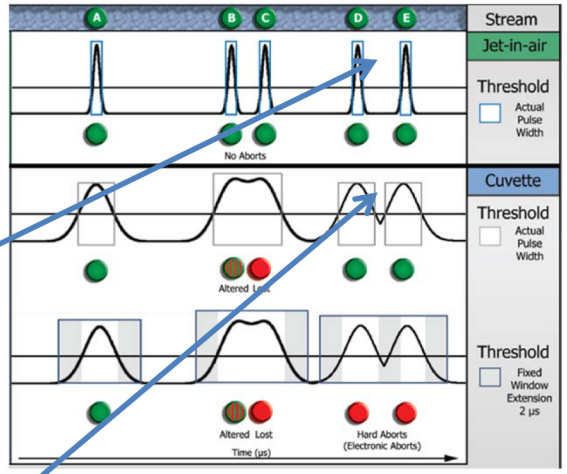
- Экономия времени и трудозатрат
- Экономия рагентов
- Нет риска контаминации при добавлении реагента

Сортеры MoFlo™. Ключевые особенности.

Высокие выход и чистота сортировки

! в том числе на высоких скоростях

Электроника «видит» каждое событие



MoFlo: временные импульсы регистрации каждой клетки

Кюветный сортер со слабой электроникой: временные импульсы регистрации от близких по времени клеток либо совпадают, либо не воспринимаются как события, незарегистрированное событие – Hard Abort.

Важно при сортировке редких образцов.

Сортеры MoFlo™. Ключевые особенности.

Высокие выход и чистота сортировки

! в том числе на высоких скоростях

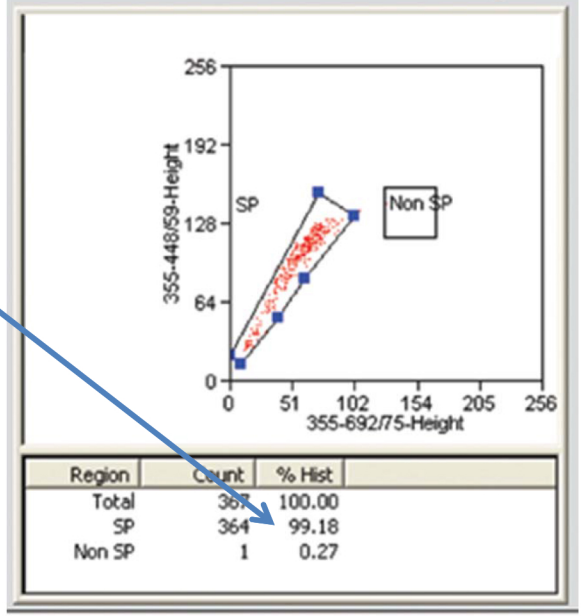
Чистота сортировки достигает более 99%

Пример

Популяция	Чистота	% от общего количества	Скорость
Mouse SP	99.18%	0.04%	46795

Важно при сортировке редких образцов.

Боковая популяция



Сортеры MoFlo™. Общие характеристики.

Стабильные

- проточная система,
- оптика,
- электроника.

! Успешная история



MoFlo -
Modular **Flo**w
Cytometry



Модульная конструкция:

прибор адаптируется под меняющиеся задачи

Высокая производительность:

скорость анализа - до **100 000** событий/сек.

Скорость сортировки - до **70 000** событий/сек.

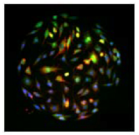


Высокие скорости
без потерь образца

Неограниченные оптические возможности:

любые лазеры -> любые красители.

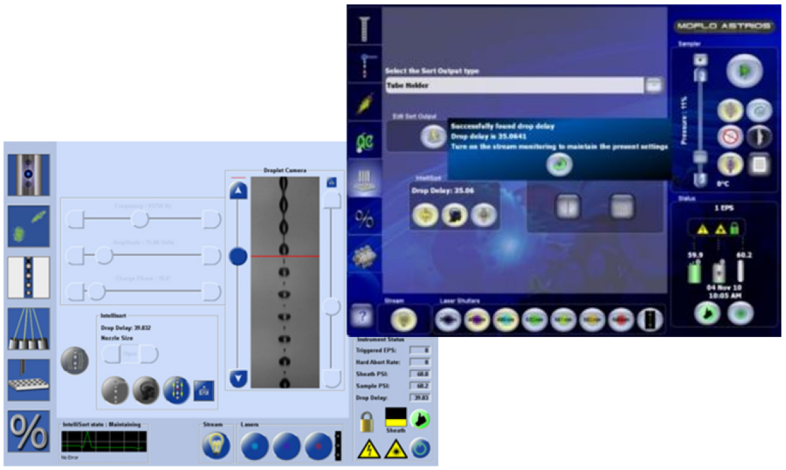
Многоцветный анализ.



Сортеры MoFlo™. Общие характеристики.

Биобезопасность

- установка в ламинарный шкаф
- сенсорный экран
- автоматическое определение DropDelay
- автоклавируемые насадки на сопло, емкости для слива и проточной жидкости
- полностью заменяемая линия образца
- удаление аэрозолей





! Возможна асептическая сортировка

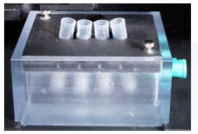
Сортеры MoFlo™. Общие характеристики.

Широкий выбор приспособлений

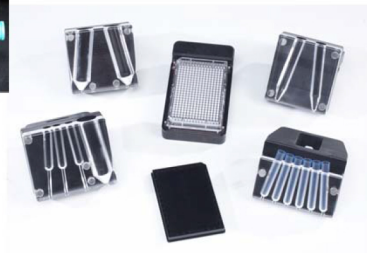
оптимальные условия для различных объектов сортировки в зависимости от размера клеток, их концентрации, флуорохромов, их чувствительности



- держатели для пробирок для подачи образца, 0,5 – 50 мл



- держатели для пробирок для сбора отсортированных фракций



- держатель для различных планшетов и слайдов, 6-1536-луночные



- насадки на сопло 40-200 мкм



- оптические фильтры, любые

Характеристики сортера MoFlo™ XDP

СТАБИЛЬНАЯ МАШИНА ДЛЯ НАУКИ

Открытость и гибкость ➡ *тонкая настройка под специфические задачи*



! Максимальное число лазеров 6, УФ – реальный 355 нм

! Максимальное число оптических параметров
18 флуоресцентных и 2 по рассеянию

! 4-струйная сортировка (одновременно в 4 пробирки)

! Возможности:
- автоматическое определение DropDelay при заказе IntelliSort II
- минимальный размер частиц от 200 нм при заказе NanoView
- любые лазеры, в том числе и газовые лазеры (сортировка хромосом)

Характеристики сортера MoFlo™ Astrios EQ

АВТОМАТИЗАЦИЯ. РАБОТА С СУБМИКРОННЫМИ ЧАСТИЦАМИ И ГЕТЕРОГЕННЫМИ СРЕДАМИ

высокий уровень автоматизации ➡ *для стандартизированных задач*



! Максимальное число лазеров 7, УФ – реальный 355 нм

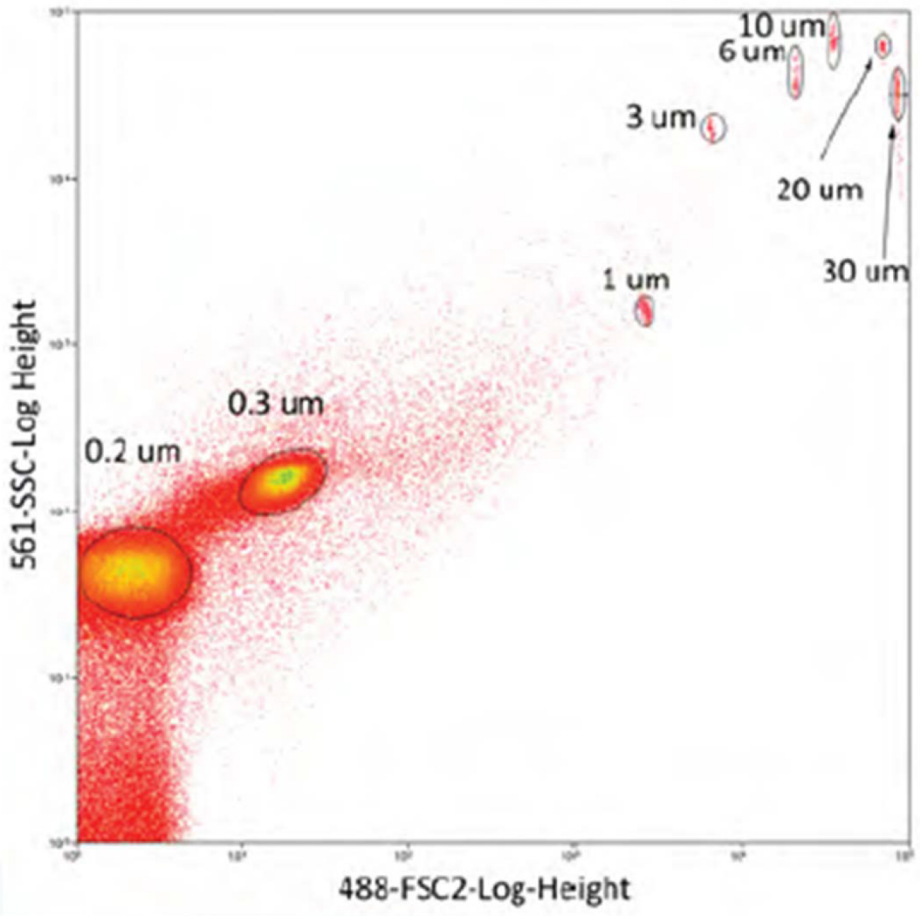
! Максимальное число оптических параметров
41 флуоресцентных и 3 по рассеянию

! 6-струйная сортировка (одновременно в 6 пробирок)

! Автоматическое определение DropDelay без калибровочных частиц (IntelliSort II)

Характеристики сортера MoFlo™ Astrios EQ

Высокая чувствительность по размерам диаметр клеток от 200 нм



Хорошо различимы одновременно субмикронные и микронные частицы; субмикронные частицы между собой

Характеристики сортера MoFlo™ Astrios EQ

Приспособления для образца и продукта сортировки

- сортировка из пробирок 0,5; 1,0; 1,5; 5; 7; 14; 15; 50 мл

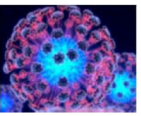
- сортируется в
  1,5 или 5 мл пробирки при 6-струйной сортировке,
  1,5; 5; 7 мл или 3 х 5 мл + 1 х 50 мл пробирки при 4-струйной сортировке
  5, 15 мл и 50 мл пробирки, чашки Петри при 2-струйной сортировке
  планшеты от 6 до 1536 лунок, предметные стекла, слайды.



Приложения для MoFlo™. Примеры.

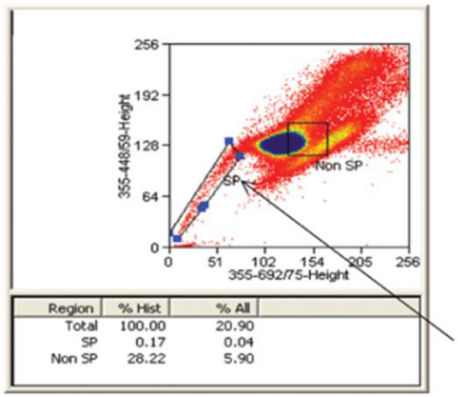
- сортировка и исследование клеток крови и их субпопуляций
- разработка перспективного иммунофенотирования с более 13 флуорохромами в 1 пробирке
- сортировка и исследование стволовых клеток и их субпопуляций для последующего культивирования и молекулярно-генетического анализа
- сортировка клеток с применением флуоресцентных белков
- сортировка клеточных линий для получения сублиний клеток
- сортировка клеток после трансфекции
- сортировка и исследование микрочастиц
- сортировка и исследование бактерий и дрожжевых грибов для клонирования и анализа видового и подвидового состава
- сортировка и исследование водных организмов (планктона, водорослей) для анализа видового состава в исследованиях экологии воды

Приложения. Стволовые клетки



! Высокие скорость, чувствительность

- малое количество клеток боковой популяции (SP) (0,08%, в зависимости от объекта) делает проблематичным их выделение с помощью проточной цитофлуориметрии.

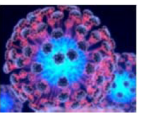


! Реальный УФ-лазер
Окрашивание костного мозга мыши красителем Hoechst 33342

App. Note: «Flow Cytometry of the Side Population (SP)», July 2007

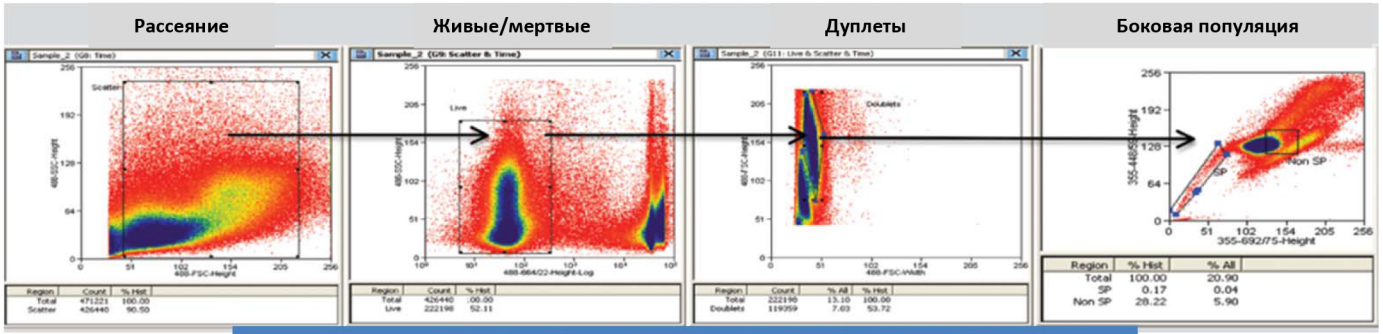
Сортировка клеток SP и дальнейшие исследования показали, что они имеют свойства, схожие со стволовыми, и способствуют регенерации скелетной и мышечной ткани. Это тип мезенхимальных стволовых клеток.

Приложения. Стволовые клетки

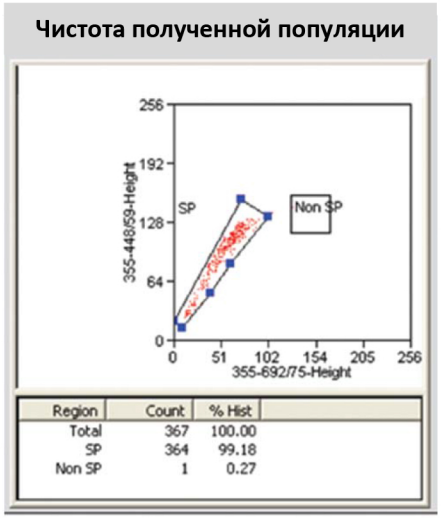


! Смешанные режимы сортировки (ресортировка)

Пример.
Стандартная конфигурация фильтров MoFlo™ Astrios, УФ-лазер.
Отсортированы: клетки боковой популяции мыши с высокой скоростью 45 000 событий/сек. и чистотой более 99 %.

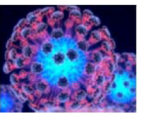


Популяция	Чистота	%, от общего к-ва	Скорость
Mouse SP	99.18%	0.04%	46795



Альтернативный метод магнитной сепарации неэффективен из-за малой концентрации выделяемых стволовых клеток.

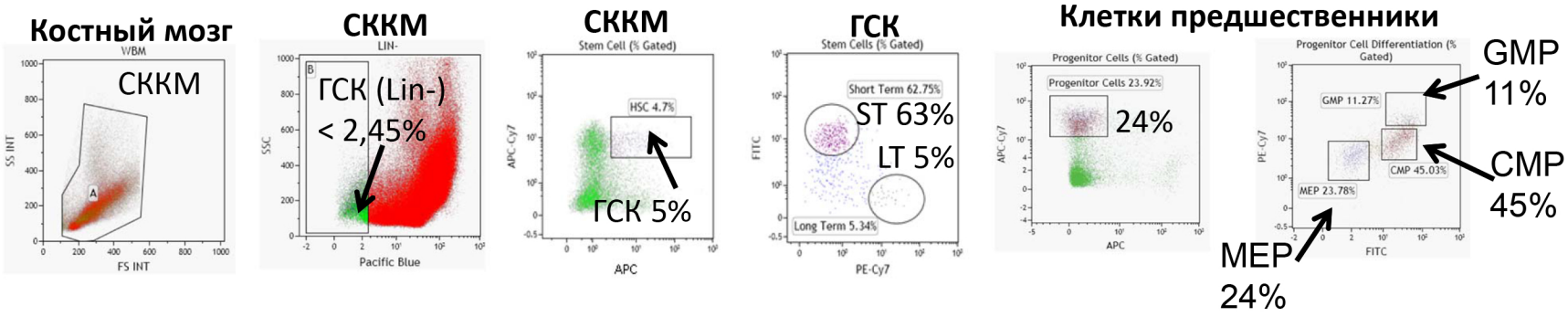
Приложения. Стволовые клетки



Пример. 7 лазеров MoFlo™ Astrios

Сортировка: 6 субпопуляций стволовых клеток костного мозга мыши (концентрация 1-2x10^6 клеток): гемопоэтических долговременных (LT) и недолговременных (ST), а так же клеток-предшественников CMP (common myeloid progenitors), GMP (granulocyte-macrophage p.), MEP (megakaryocyte-erythroid p.) и CLP (common lymphoid p.). С помощью красителя DAPI исключали мертвые клетки.

Гемопоэтические стволовые клетки - клетки, из которых в процессе пролиферации и дифференцировки формируются все прочие клетки крови.



Приложения. Бактерии и дрожжевые грибы



! Усиленный детектор прямого светорассеяния MoFlo™ Astrios EQ

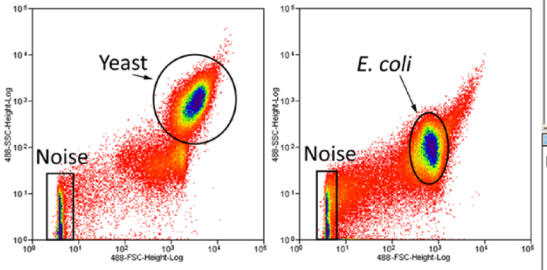
- можно детектировать и отсортировать популяции дрожжевых грибов и бактерий.

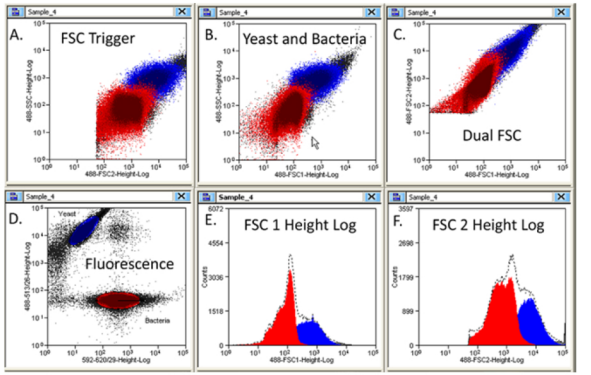


Бактерия *E. Coli,*
1-3 мкм



Дрожжевые грибы *S. Cerevisiae,*
3-4 мкм





10мг образца с 3x10^8/мг *E. Coli*, коньюгированными с Red Texas и с 2x10^7/мг *S. Cerevisiae,* коньюгированными с FITC, отсортированы со скоростью 15 000 событий в секунду.

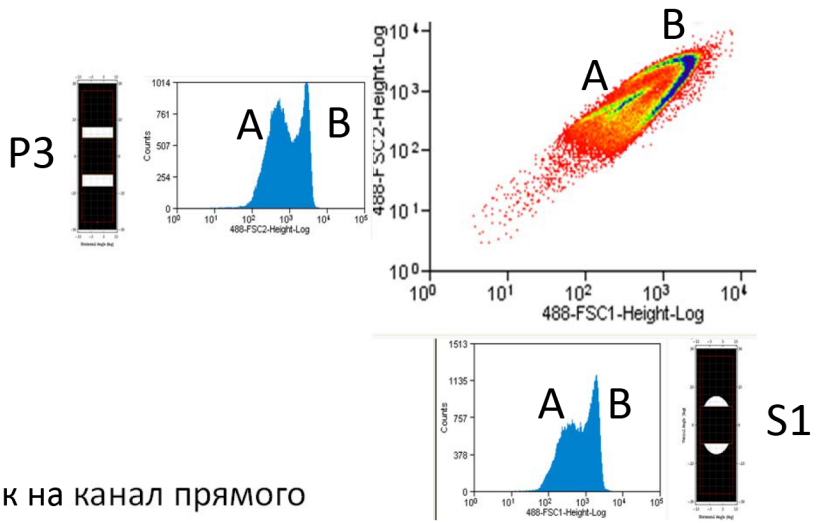
Appl. notes: "MoFlo™ Astrios Enhanced Forward Scatter Module: "Small Particle Applications"*

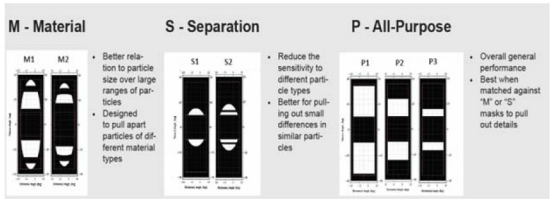
Приложения. Бактерии и дрожжевые грибы



! 2 ФЭУ усиленного канала прямого светорассеяния MoFlo™ Astrios EQ
- морфологически различимы и отсортированы субпопуляции, которые ранее невозможно было разделить при сортировке.

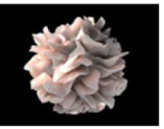
Разделение бактерий *Streptoccus thermophilus* и *Lactobacillus bulgaricus* из йогурта





7 масок на канал прямого светорассеяния, входят в поставку MoFlo™ Astrios EQ

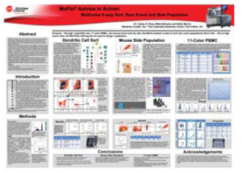
Приложения. Дендритные клетки



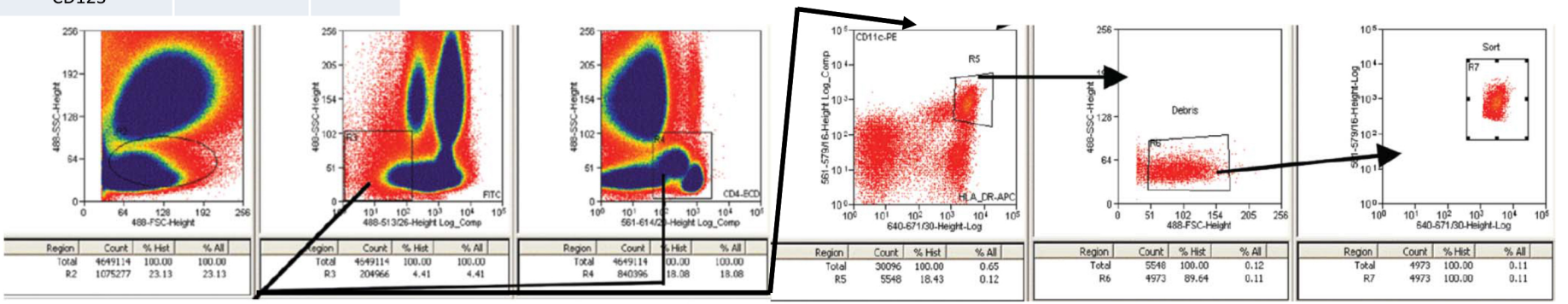
Клетки иммунной системы играют важную роль в иммуномодуляции, презентируют антигены Т-клеткам, контролируют дифференцировку Т-лимфоцитов, регулируют активацию и супрессию иммунного ответа.
Выделение дендритных клеток разного происхождения (миелоидные $CD11c^{hi}CD123^{lo}$, лимфоидные $CD11c^{-}CD123^{hi}$) из периферической крови с помощью клеточных сортеров расширяет возможности их изучения.

Маркер	Флуорохром	Лазер
CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD57	FITC	488
CD4	ECD	561
HLA-DR	APC	640
CD11c, CD123	PE	561

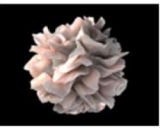
- Образец периферической крови взрослого донора был покрашен линейными маркерами CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD57, конъюгированными с FITC и маркерами CD4-ECD, HLR-DR – APC, CD11c-PE или CD123-PE, в зависимости задачи.
- Популяция дендритных клеток первоначально была определена как CD4+ и CD3-, CD14-, CD16-, CD19-, CD20-, CD57-.
- На следующем этапе популяции дендритных клеток были отсортированы как HLR-DR+, CD11c+ или CD123+, предварительно исключив дебрис.



Poster: MoFlo Astrios in Action: Multicolour 6 way Sort Rare Events and Side Population



Приложения. Дендритные клетки

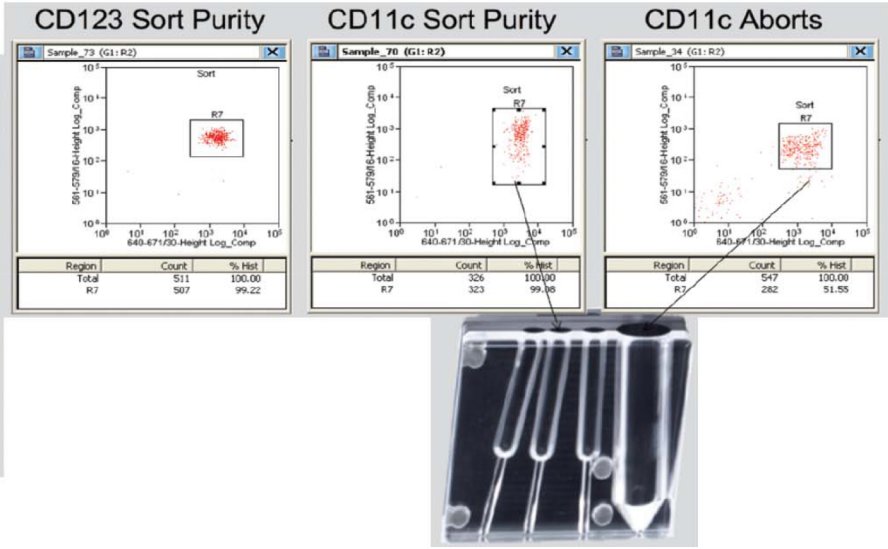


!Комбинированный режим сортировки

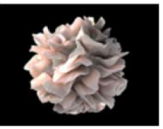
- сохранили клетки, не удовлетворяющие критериям сортировки, с возможностью их дальнейшего исследования.

MoFlo™ Astrios EQ : чистота больше 99% при сортировке на скорости 10 000 соб/сек.

Струя	Режим	Популяция	%, клеток	Чистота
L1 (5 ml tube)	Purify 1	CD4+HLA-DR+CD11C+	0.11%	99.08%
R2 (50 ml conical tube)	Aborts from L1	Aborts of CD4+HLA-DR+CD11C+	N/A	N/A
L1 (5 ml tube)	Purify 1	CD4+HLA-DR+CD123+	0.11%	99.22%
R2 (50 ml conical tube)	Aborts from L1	Aborts of CD4+HLA-DR+CD123	N/A	N/A



Приложения. Дендритные клетки



Epub ahead of print February 11, 2013 - doi:10.1189/jlb.1011525

JLB

Article

Preterm neonates display altered plasmacytoid dendritic cell function and morphology

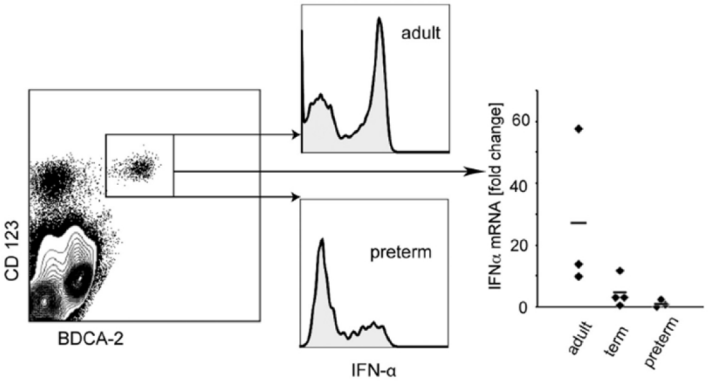
S. S. Schüller,[*,1] K. Sadeghi,*[*,1,2] Lukas Wisgrill,* A. Dangl,* S. C. Diesner,* A. R. Prusa,* K. Klebermasz-Schrehof,* S. Greber-Platzer,* J. Neumüller,[†] H. Helmer,[‡] P. Husslein,[‡] A. Pollak,* A. Spittler,[§,‖] and E. Förster-Waldl**

*Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Division of Neonatology, Pediatric Intensive Care and Neuropediatrics, Departments of [‡]Obstetrics and Gynecology and [§]Surgery, and [‖]Core Facility Flow Cytometry, Medical University of Vienna, Vienna, Austria; and [†]Department of Cell Biology and Ultrastructure Research, University of Vienna, Vienna, Austria

RECEIVED OCTOBER 26, 2011; REVISED DECEMBER 14, 2012; ACCEPTED JANUARY 20, 2013. DOI: 10.1189/jlb.1011525

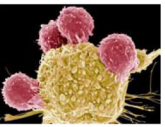
MoFlo™ Astrios EQ

Исследование уровня интерферона у недоношенных младенцев. Отсортировано 300 клеток из образца – периферической крови с концентрацией $2x10^6$ периферических клеток крови на мл, меченых антителами CD123++, HLA-DR++, BDCA-2++ с флуорохромами FITC, PE, APC соответственно.



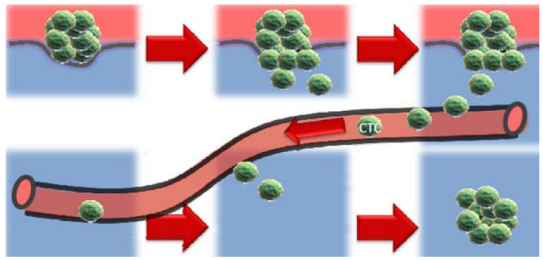
После сортировки проводился подсчет IFN-α mRNA. Результаты сравнивались между недоношенными, доношенными младенцами и взрослыми пациентами.

Приложения. Опухолевые клетки



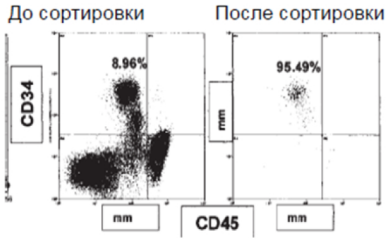
! Высокая скорость сортировки и при этом ее высокая чистота

- клетки низкой концентрации, таких как циркулирующие опухолевые клетки, резидуальные лейкемические клетки.

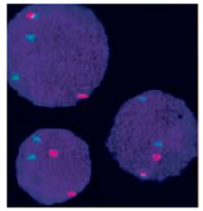


Сортировка циркулирующих опухолевых клеток, число которых обычно от 1 до 500 в 1 мл, производится в целью их выявления для дальнейших исследования прогноза заболевания.

К примеру, анализ образца на наличие резидуальных лейкемических клеток и их последующая сортировка при минимальной остаточной болезни (МОБ) производится с целью дальнейшего генетического анализа для исследования ответа на терапию.



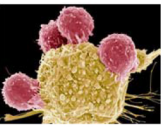
Сортировка лекемических клеток на основании иммунофенотипического анализа



Генетический анализ отсортированных лейкемических клеток - FISH t(8;21)

M. Varella-Garcia Minimal residual disease (MRD) in remission t(8;21) AML and in vivo differentiation detected by FISH and CD34+ cell sorting// Leukemia (2001) 15, 1408-1414

Приложения. Опухолевые клетки



[CANCER RESEARCH 64, 4180–4189, June 15, 2004]

Hypoxia Enhances Metastatic Efficiency by Up-Regulating Mdm2 in KHT Cells and Increasing Resistance to Apoptosis

Li Zhang[1,2] and Richard P. Hill[1,2,3]

[1]Research Division, Ontario Cancer Institute/Princess Margaret Hospital, [2]Department of Medical Biophysics, and [3]Department of Radiation Oncology, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

! Чистота сортировки

- сортировка трансфецированных клеток

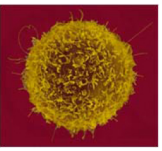
Например, для дальнейшего исследования интересующего белка-показателя метастатического потенциала, на основании чего оценивается прогноз заболевания и вектор терапии.

На сортере MoFlo проведена сортировка клеток фибросаркомы и карциномы легкого мыши (их содержание в образце - 10^7кл/мл) с трансфецированным кДНК интересующего белка по экспрессии зеленого флуоресцентного белка EGFP.

Некоторые клетки содержат белок, отвечающий за гипоксию, которая, в свою очередь дает информацию о метастатической эффективности, возникающей вследствие повышения устойчивости клеток к апоптозу.

После сортировки проводится исследование метастатического потенциала в аэробных условиях с использованием ПЦР и при инъекциях в животных (10^5клеток).

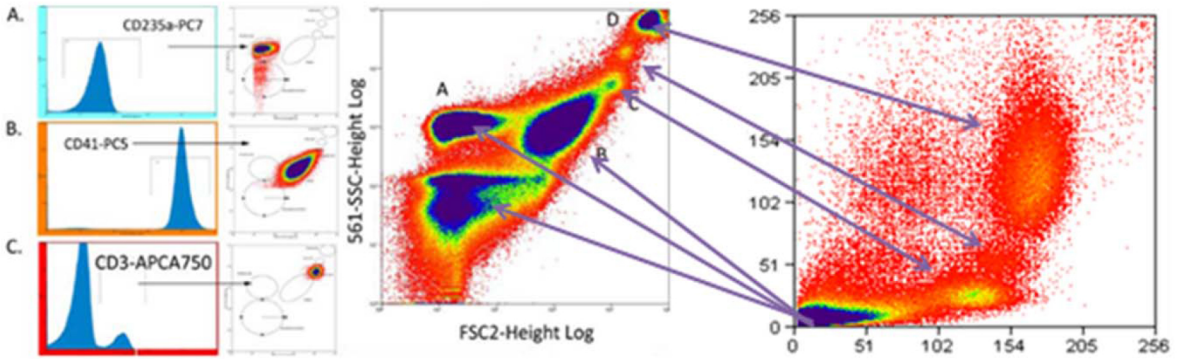
Приложения. Клетки крови



! Широкий динамический диапазон
- сортируются и малые и большие частицы ОДНОВРЕМЕННО с превосходным разрешением.

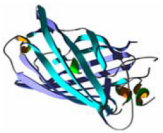
В проточной цитофлуориметрии - множество приложений по исследованию клеток крови, возможности которых еще больше расширяются с использованием сортировки.

Appl.Note: MoFlo™ Astrios Enhanced Forward Scatter+ - 0.2 µm to 30 µm Dynamic FSC Detection.



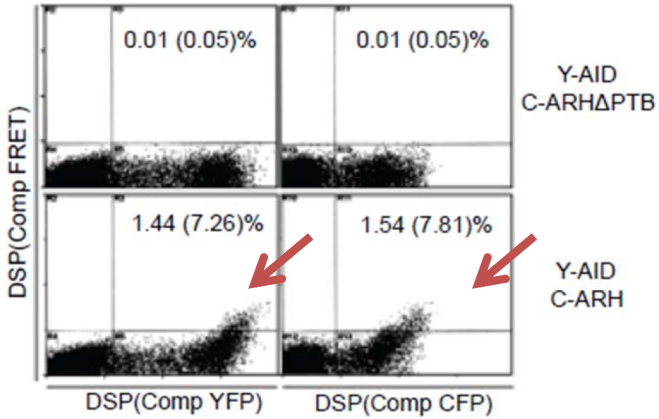
Популяции крови человека на гистограммах MoFlo™ Astrios EQ:
A. Эритроциты,
B. Тромбоциты,
C. Лимфоциты,
D. Гранулоциты

Приложения. Применение флуоресцентных белков



! Высокая скорость
! Высокая эффективность (нет Hard Aborts) и высокая чистота сортировки
! Высокая выживаемость клеток
- анализ и сортировка клеток по генной экспрессии.

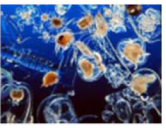
Клетки линии эмбриональных клеток почек человека (HEK-293) с определенными белками по экспрессии генов отсортированы с использованием метода резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET). HEK-293 трансфецировались и ко-трансфецировались исследуемыми белками (ARHΔPTB, ARH и AID) с флуоресцентными белками YFP и CFP.



На двух верхних рисунках видно отсутствие FRET у клеток, трансфецированных с CFP- или YFP- белками (слева на рисунке) и клеток, ко-трансфецированных с CFP-ARHΔPTB- и YFP-AID-связанными белками (справа на рисунке). На нижних двух рисунках видно присутствие сдвига флуоресцентной эмиссии у клеток, ко-трансфецированных с CFP-ARH- и YFP-AID-связанными белками.
Сдвиг флуоресцентной эмиссии показывает близкое расположение белков ARH и AID во время патогенеза болезни Альцгеймера.

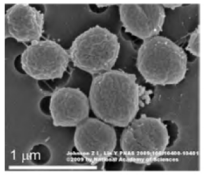
Appl.Note: FRET

Приложения. Водные микроорганизмы

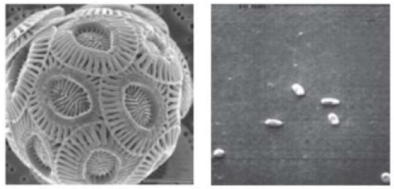


Оценка качества воды, изучения жизнеспособности клеток и их разнообразия, изучения популяций планктона с помощью молекулярных и генетических методов, оценка количества фитопланктона, исследований фотосинтезирующего планктона...

Изучение и сортировка бактерий и других микрочастиц с помощью стандартной проточной цитофлуориметрии затруднены по причине малого размера клеток. Их выделение по морфологическим характеристикам невозможно, поскольку сигнал неотделим от шума, а узкий динамический диапазон приборов ограничивает исследования разных популяций клеток одновременно.

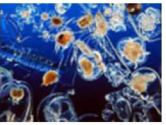


Фотосинтезирующая цианобактерия сферической формы *Prochlorococcus marinus,* размер ~ 200 нм. Важный компонент пищевой цепи.



Одноклеточная панцирная водоросль кокколитофорида *Emiliania huxleyi*, имеет внешний панцирь из известковых пластинок (кокколиты), размер ~ 5мкм. При заражении вирусом *EhV* способна сбрасывать внешнюю оболочку и превращаться свободноживущую гаплоидную форму. Играет важнейшую роль в глобальном биогеохимическом равновесии на Земле.

Приложения. Водные микроорганизмы



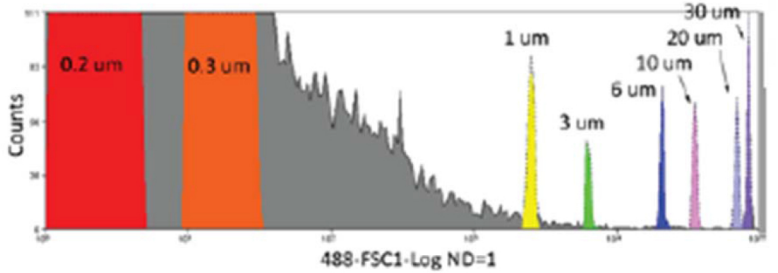
! 2 ФЭУ для детектирования малоуглового светорассеяния

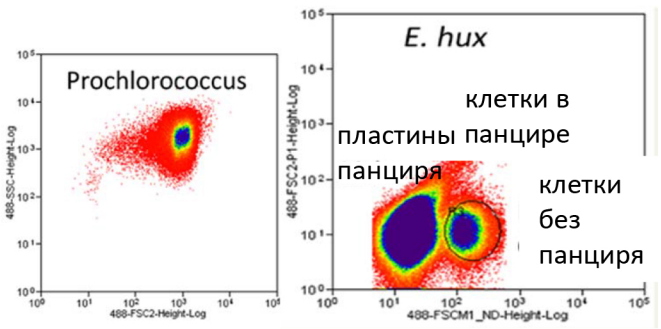
! Высокая скорость сортировки

! Высокий выход сортировки

- детектирование и малых и крупных организмов одновременно. Например, разные формы существования водоросли *Emiliania huxleyi* и малую цианобактерию *Prochlococcus*.

Детектирование клеток планктона по морфологическим параметрам по их автофлуоресценции, исключая использование специальных меток.

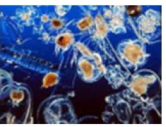




Комплексное решение:

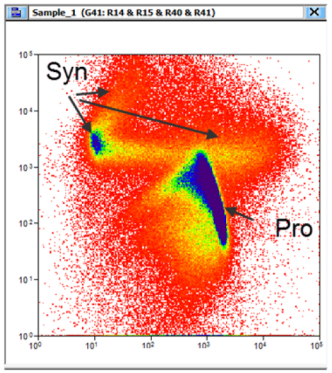
- анализатор жизнеспособности клеток **Beckman Coulter Vi-Cell** – отбор живых клеток,
- **центрифугирование** на 300 x *g*;
- клеток 1x10^6 кл/мл;
- окрашивание CYTOX Green,
- анализ на ПО **Kaluza** для определения оптимального лазера и полосы пропускания.

Приложения. Водные микроорганизмы

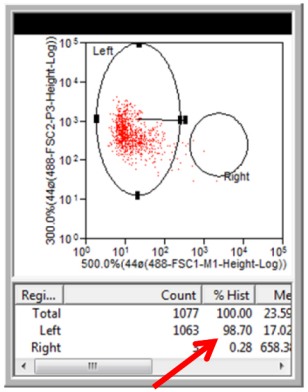


Отсортированные mitochondria используются для анализа ДНК и для важных исследований субклеточного состава. *E. huxleyi* и *P. marinus* – организмы, изучаемые в биологии моря и играющие важную роль в углеродном цикле, в экологии моря.
Скорость сортировки 25 000 событий в секунду, сортировка 100 000 событий при режиме сортировки Purity 1-2, насадка на сопло 100мкм.

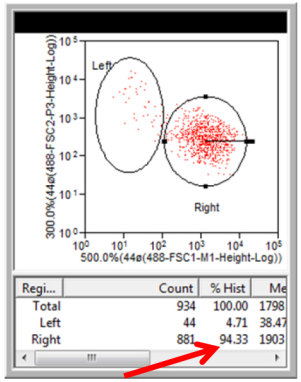
Отсортированы одновременно пять популяций: *Rhodosaurus*, *Cryptomonas, Prochlorococcus* и 2 популяции *Synechococcus.*
Скорость сортировки 50 000 событий в секунду, при режиме сортировки Purity 1-2.



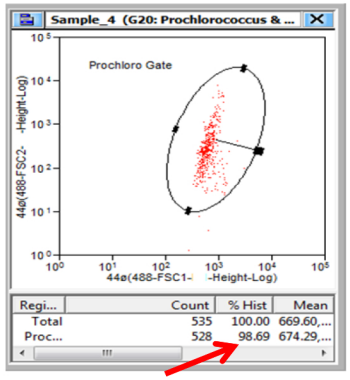
Synechococcus 1



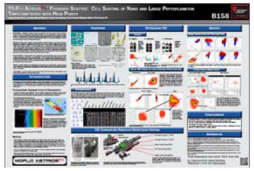
Synechococcus 2



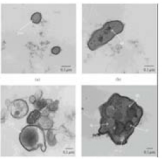
Prochlorococcus



Poster "Sorting of small and large Phytoplankton simultaneously with high Purity"



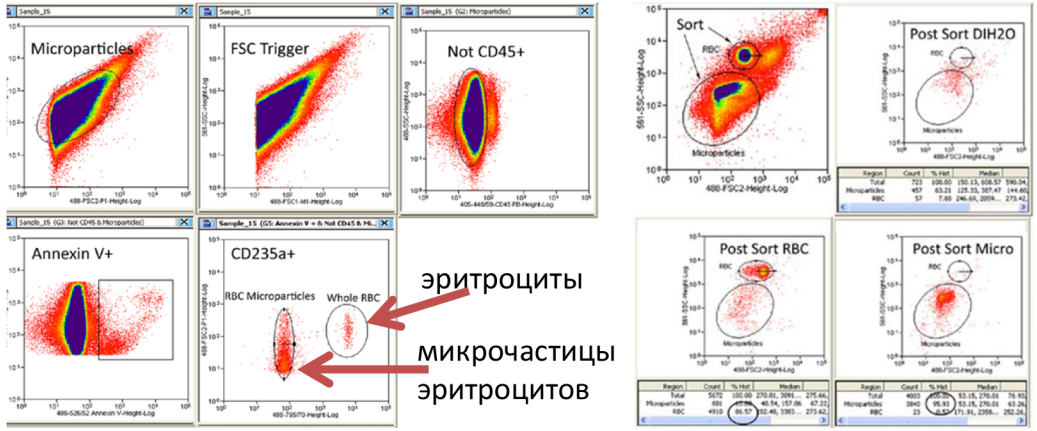
Приложения. Микрочастицы



Микрочастицы – фрагменты плазматической мембраны клеток. Образование микрочастиц связано с такими важными процессами как активация, стрессовые условия клеток и апоптоз. Кроме того, они могут использоваться как носители маркированных биообъектов и прицельной терапии.

! 2 ФЭУ усиленного канала прямого светорассеяния MoFlo™ Astrios EQ
- с высокой точностью регистрация малых частиц размером от 0,2 мкм в диаметре

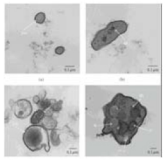
Сортировка микрочастиц крови: эндотелиальных (CD45-PB-/ Annexin-V-FITC/ CD106+/ CD146+) с маской M2, тромбоцитных (Annexin-V+/ CD41+CD42b+/ CD61+) с маской M1, эритроцитных микрочастиц (на рисунке) (CD45+/ Annexin-V/ CD235a+) с масками M1 и P1.



Высокая скорость сортировки
~ 60 000 соб.\сек с чистотой 96%,

Appl.Note: MoFlo™ Astrios Enhanced Forward Scatter+ - 0.2 µm to 30 µm Dynamic FSC Detection.

Приложения. Микрочастицы

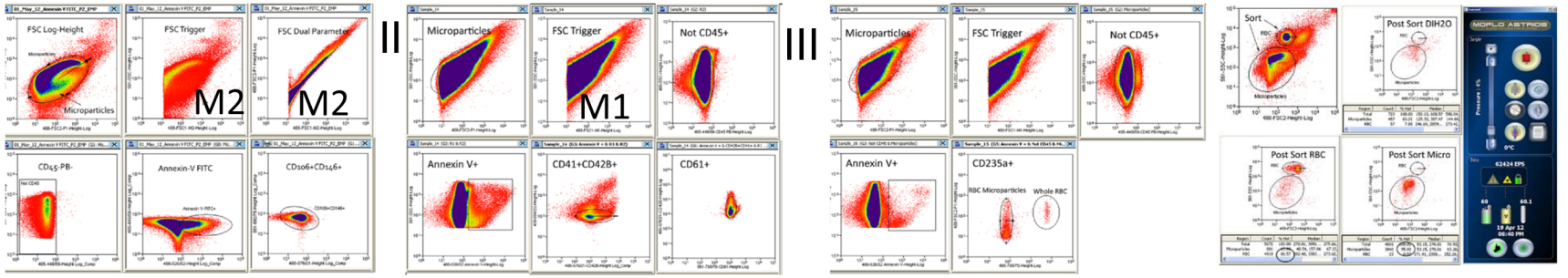


Микрочастицы – фрагменты плазматической мембраны клеток. Образование микрочастиц связано с такими важными процессами как активация и стрессовые условия клеток, включая апоптоз. Кроме того, они могут использоваться как носители маркированных биообъектов и прицельной терапии.

MoFlo Astrios EQ благодаря усиленному каналу прямого светорассеяния, способному с высокой точностью регистрировать малые частицы размером от 200 нм в диаметре, демонстрирует успешные анализ и сортировку микрочастиц.

Показана сортировка микрочастиц крови на **скорости 50 000 событий в секунду**: I - эндотелиальных (мечены CD45-PB-/ Annexin-V-FITC/ CD106+/ CD146+) с маской M2, II - тромбоцитных (Annexin-V+/ CD41+CD42b+/ CD61+) с маской M1, III – на скорости **60 000 событий в секунду** эритроцитных микрочастиц (мечены CD45+/ Annexin-V/ CD235a+) с масками M1 и P1.
Сортировка эритроцитных микрочастиц и эритроцитов крови человека, 62 000 событий в секунду. Чистота: 86% для эритроцитов и 96% для микрочастиц эритроцитов (SSC – FSC 2)

I II III



Appl.Note: MoFlo™ Astrios Enhanced Forward Scatter+ - 0.2 µm to 30 µm Dynamic FSC Detection.

Приложения. Хромосомы

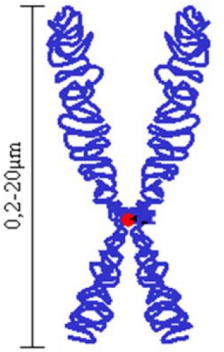


! мощный газовый лазер MoFlo XDP
! высокая чистота и скорость

Выделение фракций хромосом с использованием УФ-лазера при режиме чистой сортировки (Purify 1) с 4-мя струями.

Кариотипирование изолированных хромосом в цитометрии можно проводить путем маркировки одним (PI или Ethidium Bromide) или двумя ДНК-специфическими флуоресцентными метками (Hoechst 33258; Chromomycin A3).

Скорость анализа 1000 хромосом в секунду. Число событий для анализа – 100 000. Скорость сортировки 8 000 – 12 000 хромосом в секунду. Насадка на сопло 70 мкм.



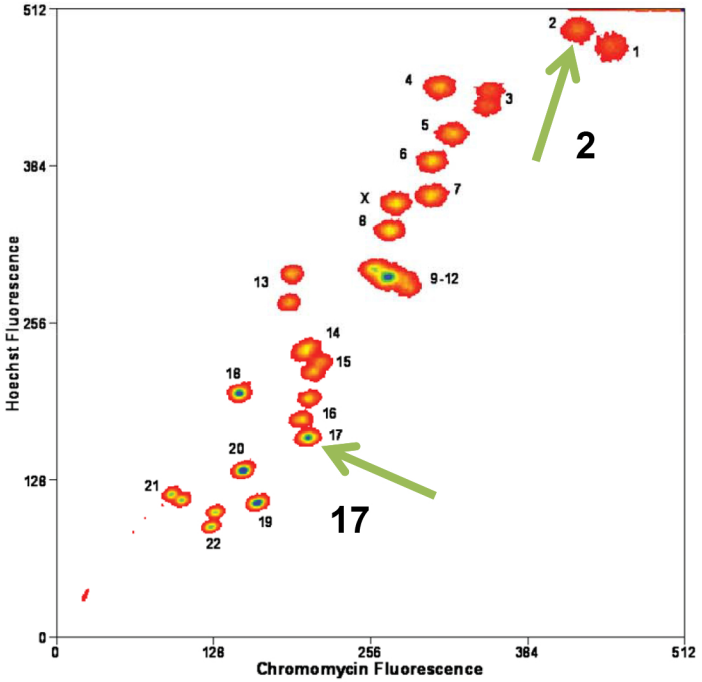
После сортировки проводится выделение белков или ДНК для геномных или протеомных исследований.

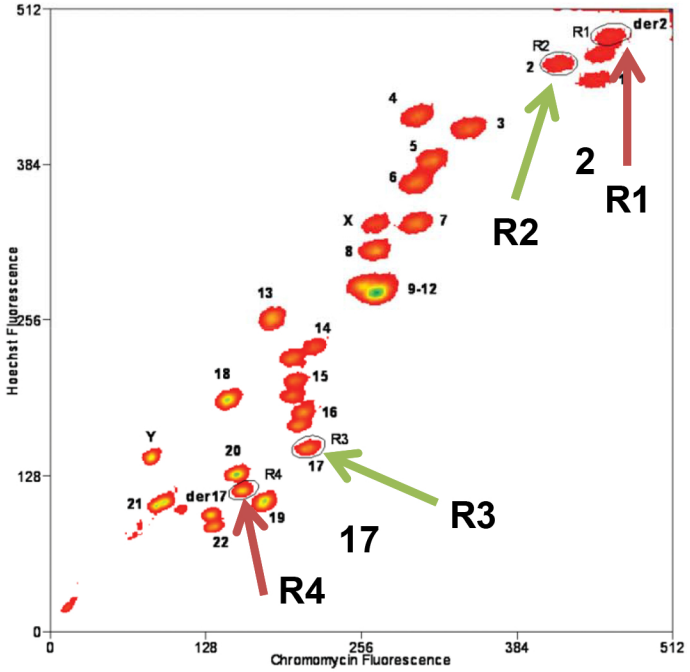
Appl. Note: Chromosome Sorting

Приложения. Хромосомы



На левом рисунке показан кариотип нормальной клеточной линии человека. Показана позиция каждого типа хромосом.
На правом рисунке можно наблюдать транслокацию между хромосомами 2 и 17: показано гейтирование производных 2 (R1) и 17 (R4) и их нормальных аналогов 2 (R2) и 17 (R3).





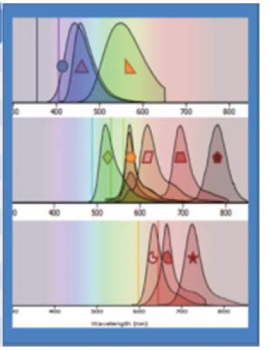
Приложения. Многоцветный / полихромный анализ

Повышенная информативность исследований:

- большее число антигенов определяется на одной клетке
- детальная характеристика фенотипа отдельных клеточных популяций
- анализ как основных, так и малых популяций по широкому спектру маркеров

Меньше пробирок в панели – экономия времени, трудозатрат и сопутствующих реагентов

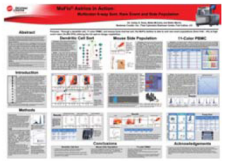
Маркер	Флуорохром	Лазер	Обозначение
CD8	Alexa 350	355	
Live/Dead	Violet	405	
CD45	Krome Orange	405	
CD5	FITC	488	
CD34	PE	561	
CD3	ECD	561	
CD14	PC5.5	532	
CD4	PC7	561	
CD16	Alexa 594	592	
CD19	APC	640	
CD10	APCA700	640	



Исследование периферической крови с использованием 11 маркеров.

Сортировка 6 популяций клеток с одновременным использованием разных режимов сортировки при скорости 45 000 событий в секунду.

Poster: MoFlo Astrios in Action: Multicolour 6 way Sort Rare Events and Side Population



Большое количество детектируемых событий требует высокой производительности приборов.

Приложения. Многоцветный / полихромный анализ

! Сортировка в 6 пробирок

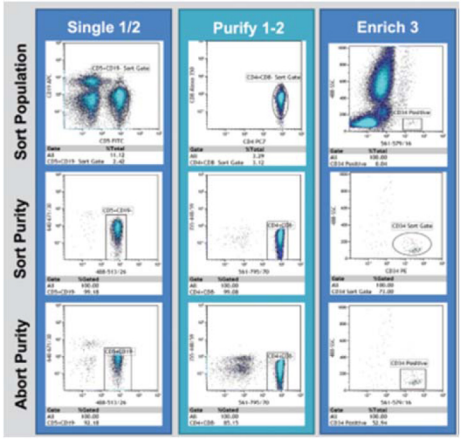
- широкие возможности для сортировки большого числа популяций клеток.

! Комбинированный режим сортировки

- выделение специфических популяций клеток.

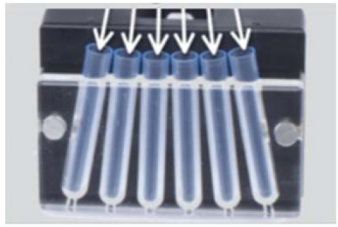
! 7 пространственно разделенных лазеров

- практически отказ от необходимости компенсации.

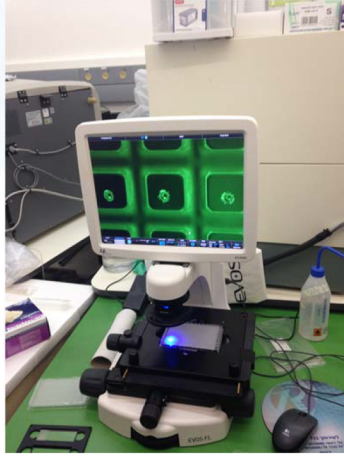


Шестиструйная сортировка

Струя	Режим	Популяция	Чистота	Эффективность
L3	Single ½	CD5+CD19-	99.18%	25%
L2	L3 Abort	CD5+CD19-	N/A	N/A
L1	Purify 1-2	CD4+CD8-	99.08%	70%
R1	L1 Aborts	CD4+CD8-	N/A	N/A
R2	R3 Aborts	CD34+	N/A	N/A
R3	Enrich 3	CD34+	52.04%	100%



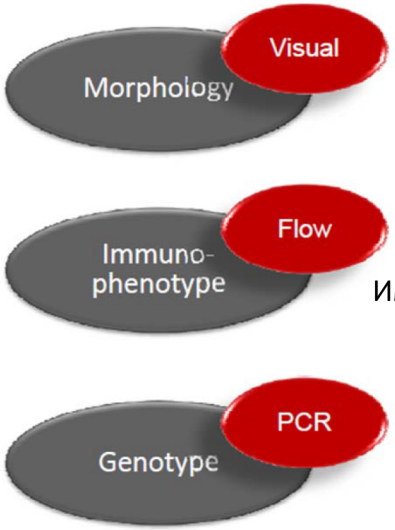
Приложения. Сортировка единичных клеток

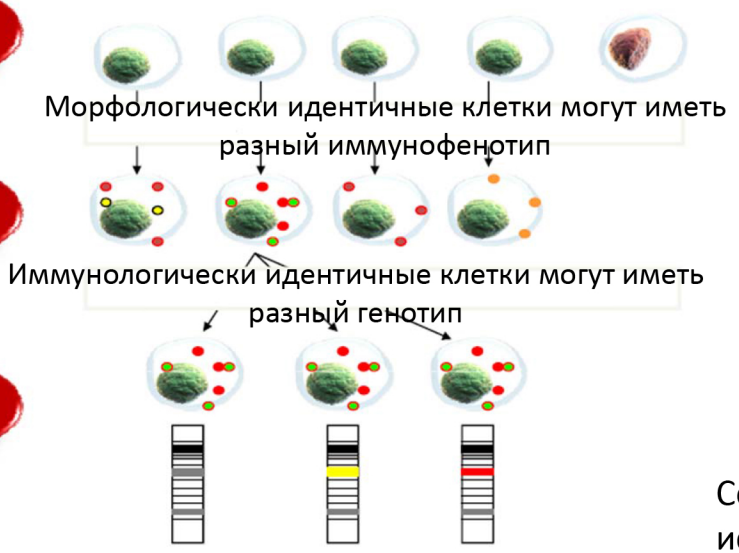


Сортировка по одной клетке в лунку планшета или на слайд / стекло с высокой точностью.

После такой сортировки проводится дальнейшая ПЦР единичной клетки (на рынке предлагаются такие решения).







Сортировка единичных клеток во весь 96-луночный планшет при концентрации популяции 1% совершается:
- в течение 75 секунд
- с точностью 99%

Сортировка единичной клетки используется в клонировании, анализе генной экспрессии.

Поддержка. Материалы. Демонстрация.

- Микросайт MoFlo Astrios EQ (англ.): www.astrioseq.com



Содержатся все материалы, включая статьи и постеры по приложениям!

- Микросайт реагентов (англ.): www.beckmancoulterreagents.com



- Статьи по jet-in-air, электронике, выживаемости, сравнение с другими сортерами на www.molbiol.ru, www.biohub.ru

- Обмен опытом и мнениями пользователей
http://www.olig.ru/forums/index.php?showtopic=539905

- Демонстрация.
  MoFlo XDP: Медицинский университет им. Пирогова, Москва.
  MoFlo Astrios: Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург;
  Институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск.
  +Европа

Поддержка. Обучение. Сервис.

1. Базовый курс обучения от специалиста ООО «Бекмен Культер», 5 дней

2. Обучение на базе производителя, 5 дней
   Тренинг-центр: Ньон (Швейцария)
   MoFlo XDP: Майами (Флорида, США)
   MoFlo Astrios: Форт Коллинз (Колорадо, США)

3. Консультационная и методическая поддержка специалистами ООО «Бекмен Культер» и специалистами компании-дистрибьютора, на протяжении всего времени.

4. Сервисная поддержка обученными российскими инженерами (4 человека на настоящее время), обучение инженеров компании-дистрибьютора.

5. Тематические семинары, школы и конференции, проводимые ООО «Бекмен Культер» и компаниями-дистрибьюторами по России.

Сортеры клеток серии MoFlo™ производства Beckman Coulter

- **Высокопроизводительные**
- **Для сортировки всевозможных популяций клеток и частиц**
- **С высокой эффективностью и выживаемостью клеток**
- **С качественной сервисной и методической поддержкой**