

Separazione dell'eterogeneità cellulare in Citofluorimetria a Flusso:

principi e sue applicazioni

28 Novembre 2018

Fabio Casciano PhD

Livelli di organizzazione della materia vivente

Particelle subatomiche

Atomo

Molecola

Organulo

Cellula

Tessuto

Organo

Apparato

Organismo

Popolazione

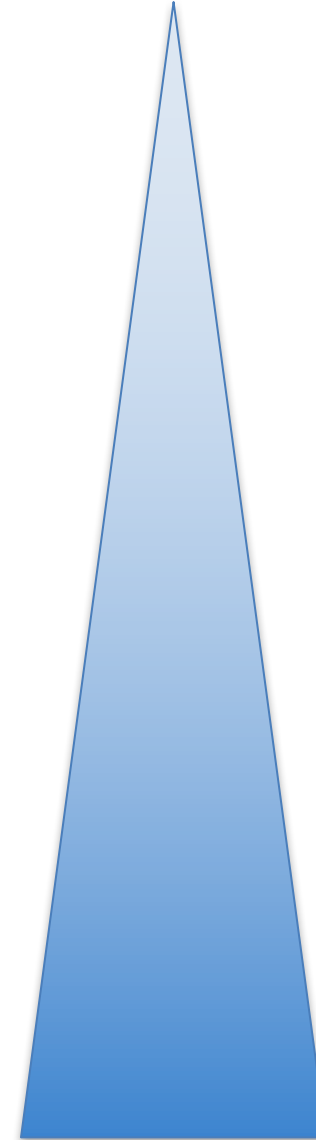
Specie

Comunità

Ecosistema

Biosfera

COMPLESSITÀ



Livelli di organizzazione della materia vivente

Particelle subatomiche

Atomo

Molecola

Organulo

Cellula

Tessuto

Organo

Apparato

Organismo

Popolazione

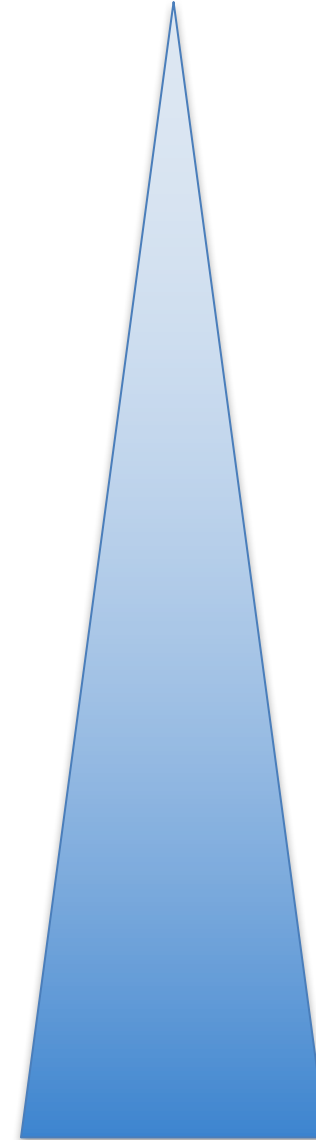
Specie

Comunità

Ecosistema

Biosfera

COMPLESSITÀ



Esame citometrico

Citometria Statica o per immagine

Cellula visualizzata da operatore e poi analizzata

Vantaggi:

- Distinguere provenienza segnale

Svantaggi:

- Tempi di lavoro lunghi
- Limitato numero di cellule analizzate

Citometria a Flusso

Sospensione cellulare trasportata fino a punto di analisi dove il segnale è raccolto da computer e poi è analizzato

Vantaggi:

- Analisi multiparametrica
- Elevato numero di cellule analizzate
- Rapidità di analisi
- Semplicità preparazione dei campioni (vitali)
- Riproducibilità

Svantaggi:

- Campioni devono essere monodispersi
- Non si localizza sede provenienza segnale

- 1. *Cos'è la Citofluorimetria?***
- 2. *Come funziona un citofluorimetro?***
- 3. *Ottica e fluidica***
- 4. *Fluorocromi***
- 5. *Applicazioni***

- 1. Cos'è la Citofluorimetria?**
- 2. Come funziona un citofluorimetro?*
- 3. Ottica e fluidica*
- 4. Fluorocromi*
- 5. Applicazioni*

Cos'è la Citofluorimetria?

Misura delle caratteristiche fisico/chimiche di cellule o altre particelle biologiche, all'interno di una sospensione eterogenea.

PRINCIPIO BASE

1. Sangue intero, colture cellulari, tessuti dissociati, nuclei, batteri/lieviti/parassiti, alghe e plancton
2. Segnale delle singole particelle è registrato nel momento in cui sono colpite da un laser
3. I dati sono mostrati come eventi su un istogramma/dot plots

La citofluorimetria è multiparametrica



FCS: Grandezza

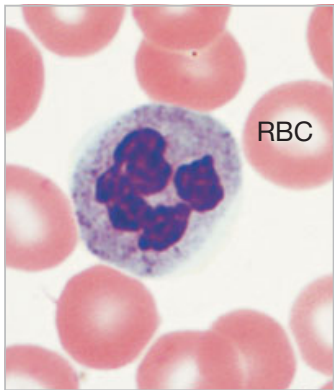
SSC: Complessità

FL: Intensità Fluorescenza

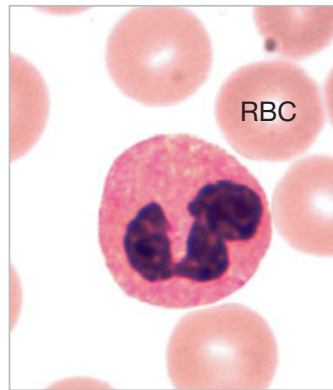
Diversi tipi di leucociti

Granulociti

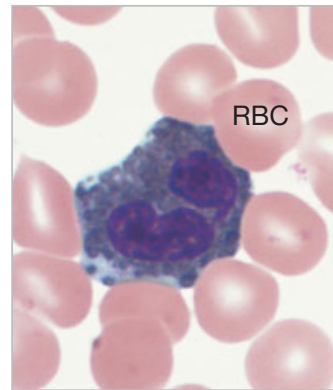
Agranulociti



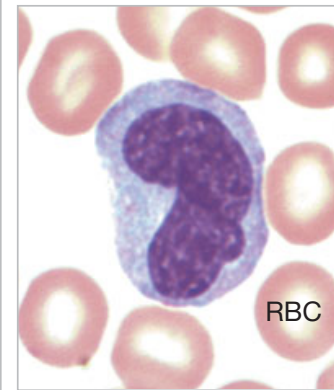
a Neutrophil LM × 1500



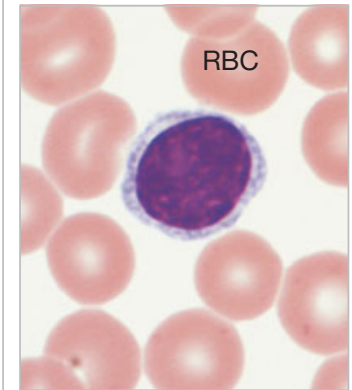
b Eosinophil LM × 1500
Acidofilo



c Basophil LM × 1500



d Monocyte LM × 1500



e Lymphocyte LM × 1500

Fundamentals of Anatomy & Physiology, Martini Nath

Strisci ematici colorati secondo la metodica di Wright

- I globuli rossi appaiono colorati dal rosa al salmone
- Nuclei sono di colore blu scuro/porpora
- Citoplasma blu chiaro
- Granuli dei Neutrofili appaiono color lilla
- Granuli dei Basofili appaiono blue scuro/nero, amano colorante basico (ematossilina)
- Granuli degli Eosinofili appaiono rosso/arancio, amano colorante acido (eosina)

Blu di metilene (basico) colora in blu, l'eosina (acida) colora in rosso/rosato

La citofluorimetria è multiparametrica

Tecnologia che permette di misurare simultaneamente, ad alta velocità, multipli parametri di singole cellule.

Dimensione relativa: Forward Scatter – FSC

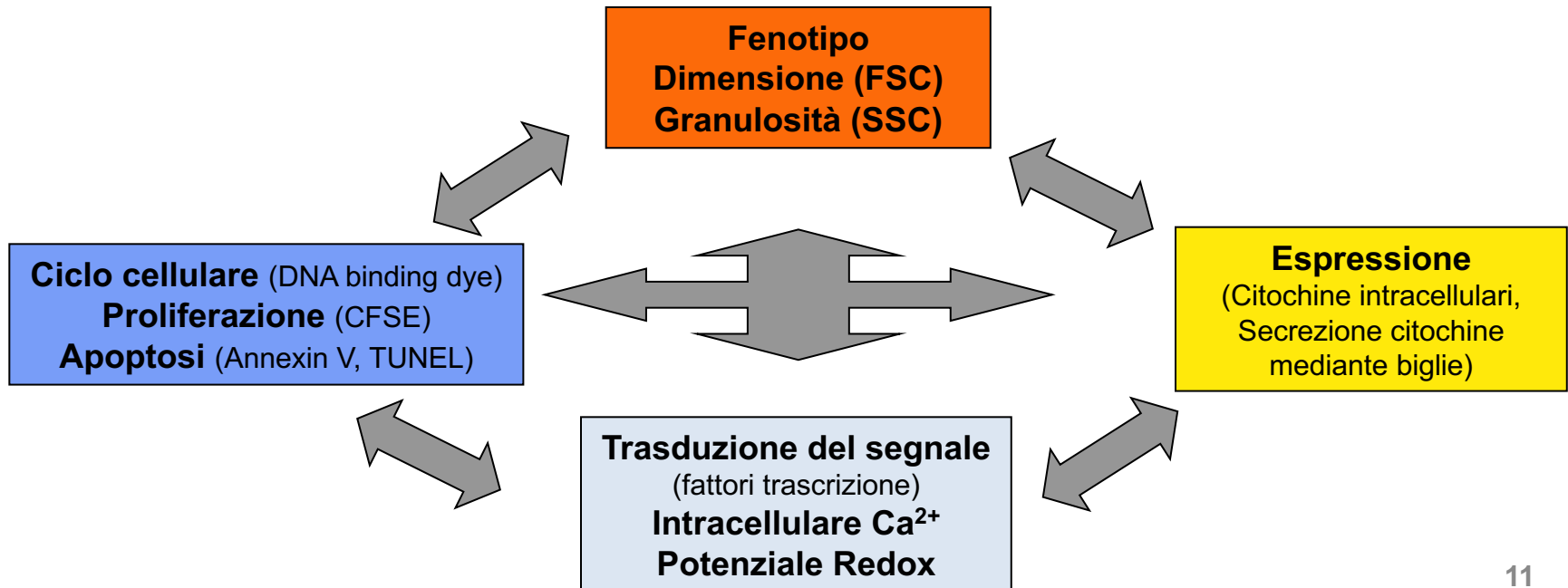
Granulosità o Complessità interna: Side Scatter – SSC

Intensità di fluorescenza: FL1, FL2, FL3 ... avvalendosi di molecole fluorescenti utilizzate come sonde

Citofluorimetria multiparametrica

È possibile:

1. **Analisi dettagliata dei marker di differenziamento cellulare:**
in sistemi in sviluppo e in seguito a stimolazione antigenica
2. Valutare *simultaneamente* il fenotipo e la funzione
3. **Cell Sorting** (separare e recuperare le singole cellule)



1. *Cos'è la Citofluorimetria?*
2. **Come funziona un citofluorimetro?**
3. **Ottica e fluidica**
4. *Fluorocromi*
5. *Applicazioni*

Citofluorimetri comuni

BD FACS Calibur



2 laser
4 colori

Beckman Coulter Epics Altra

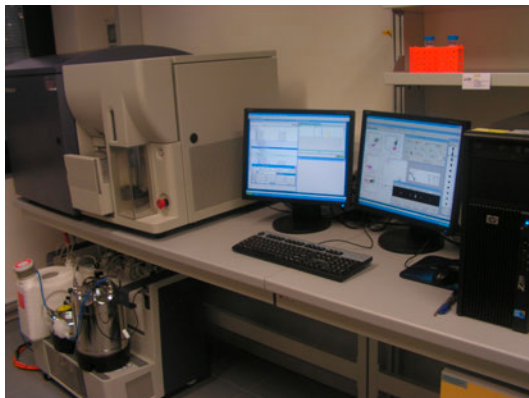


BD FACS Canto II

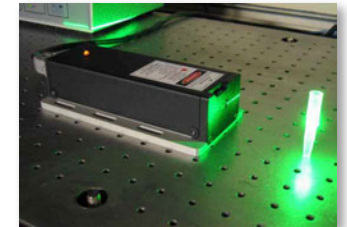


> 2 laser
> 6-7 colori

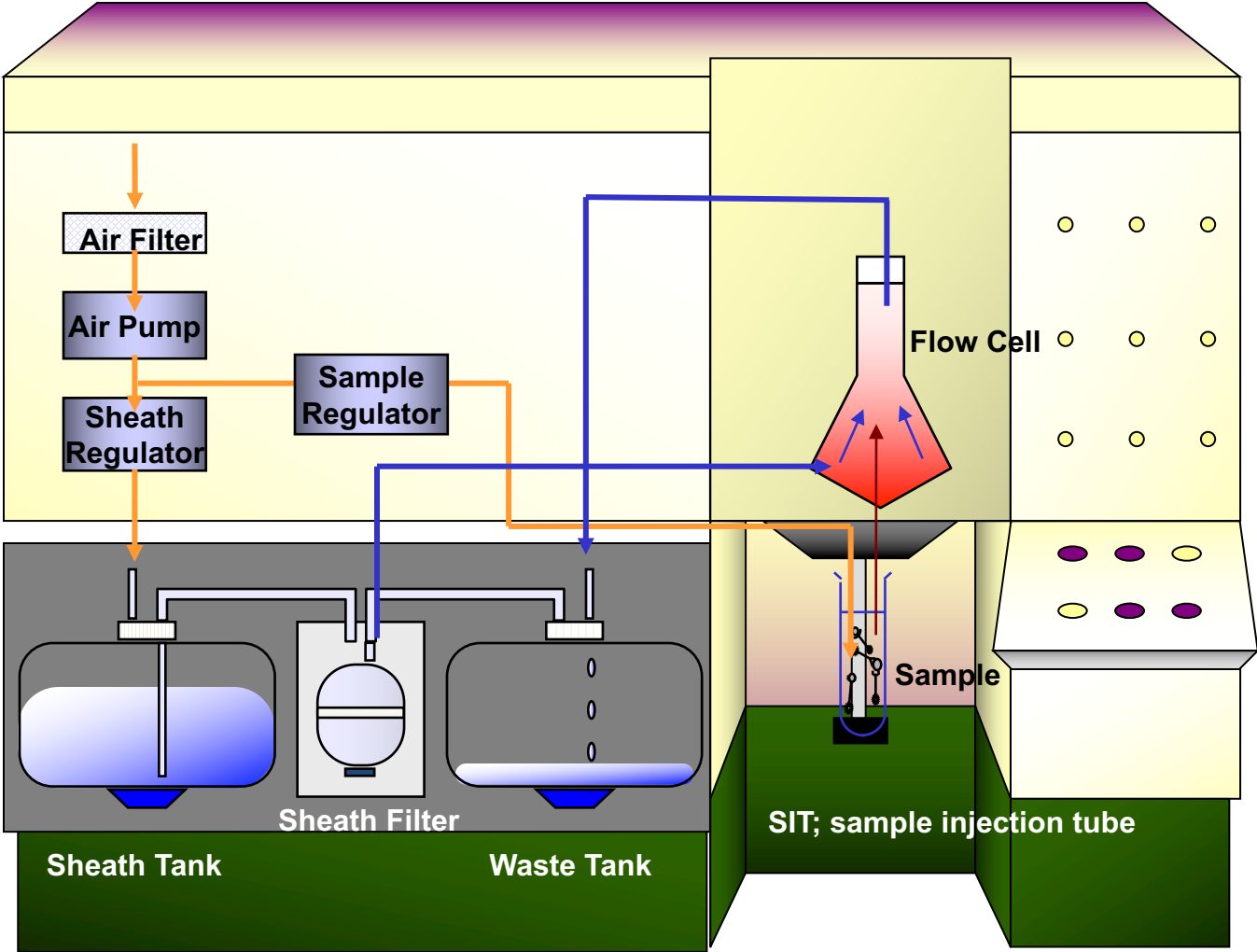
BD FACS Arial



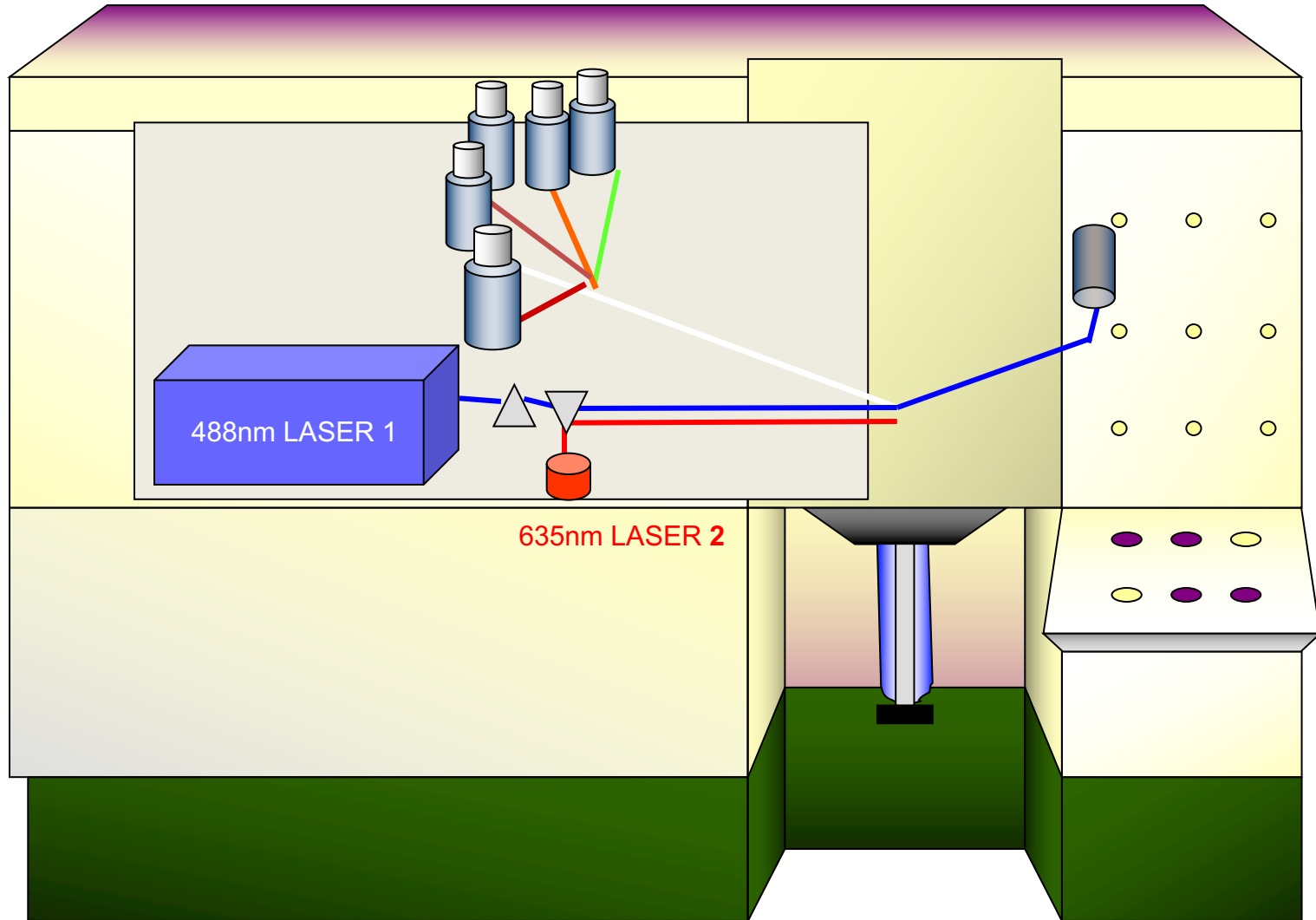
4 laser: 488nm, 633nm, 405nm, 375nm
9 colori
Sorting



Fluidica



Ottica



Funzionamento di un Citofluorimetro

- Le particelle in sospensione sono portate in singola fila per essere intercettate

Fluidica

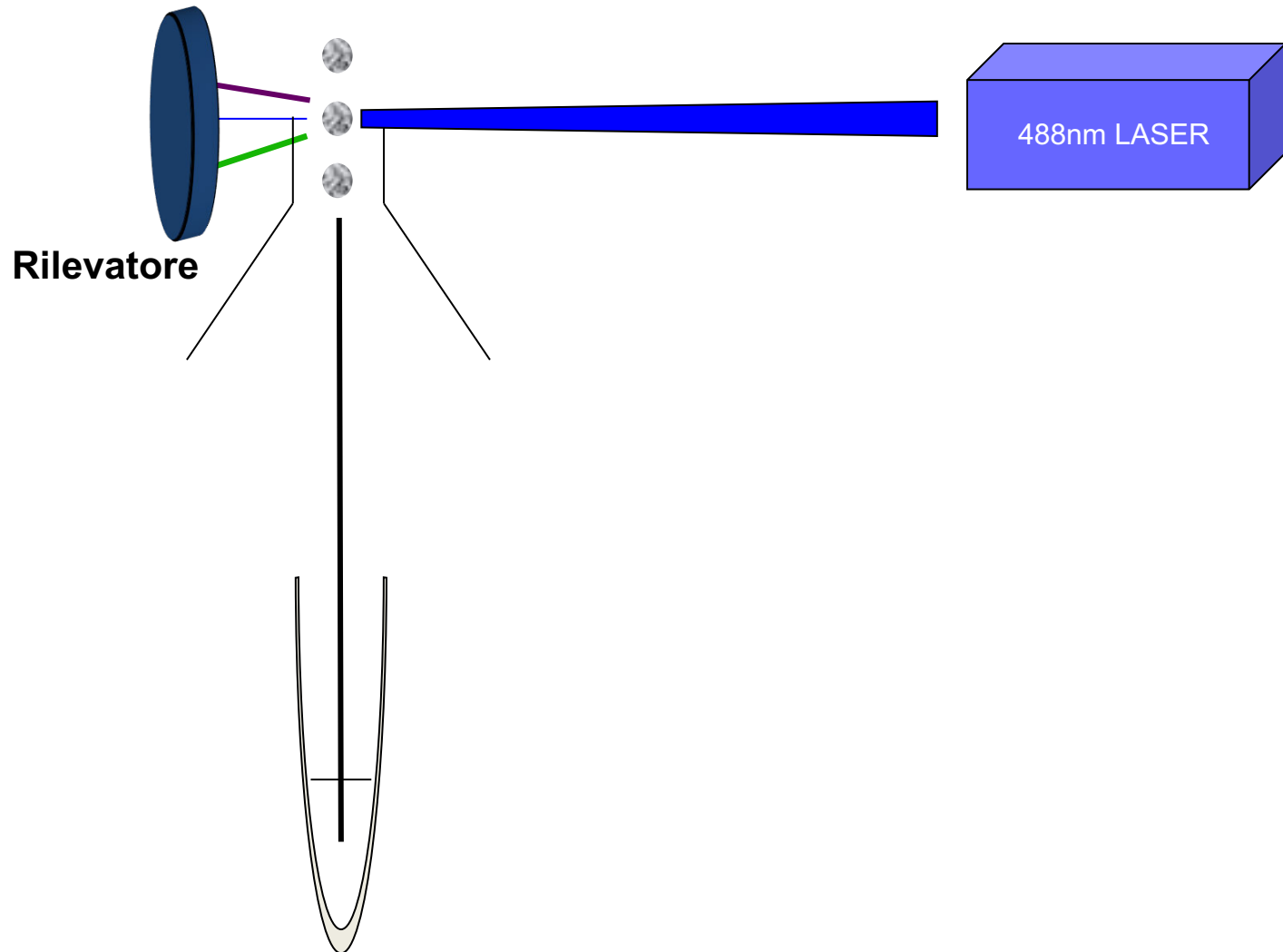
- da un laser il quale farà emettere un segnale di luce diffusa e fluorescenza che sarà filtrato e collezionato

Ottica

- per poi essere digitalizzato e registrato in un file per la successiva analisi.

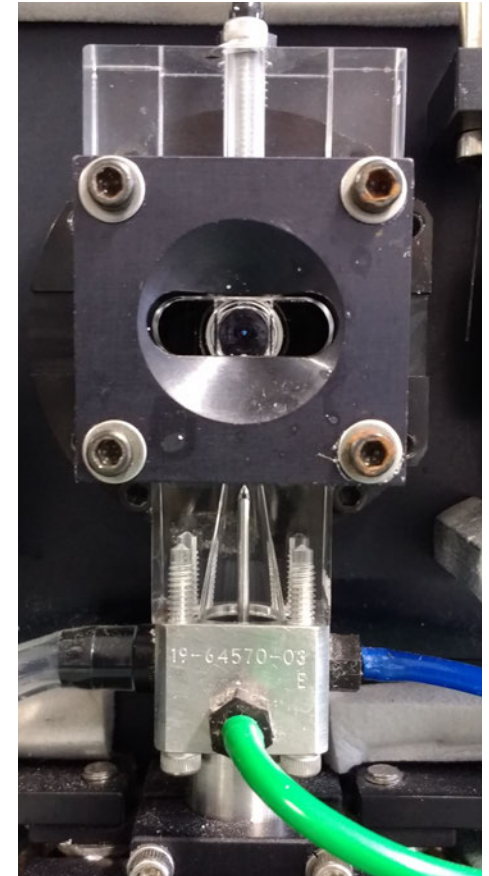
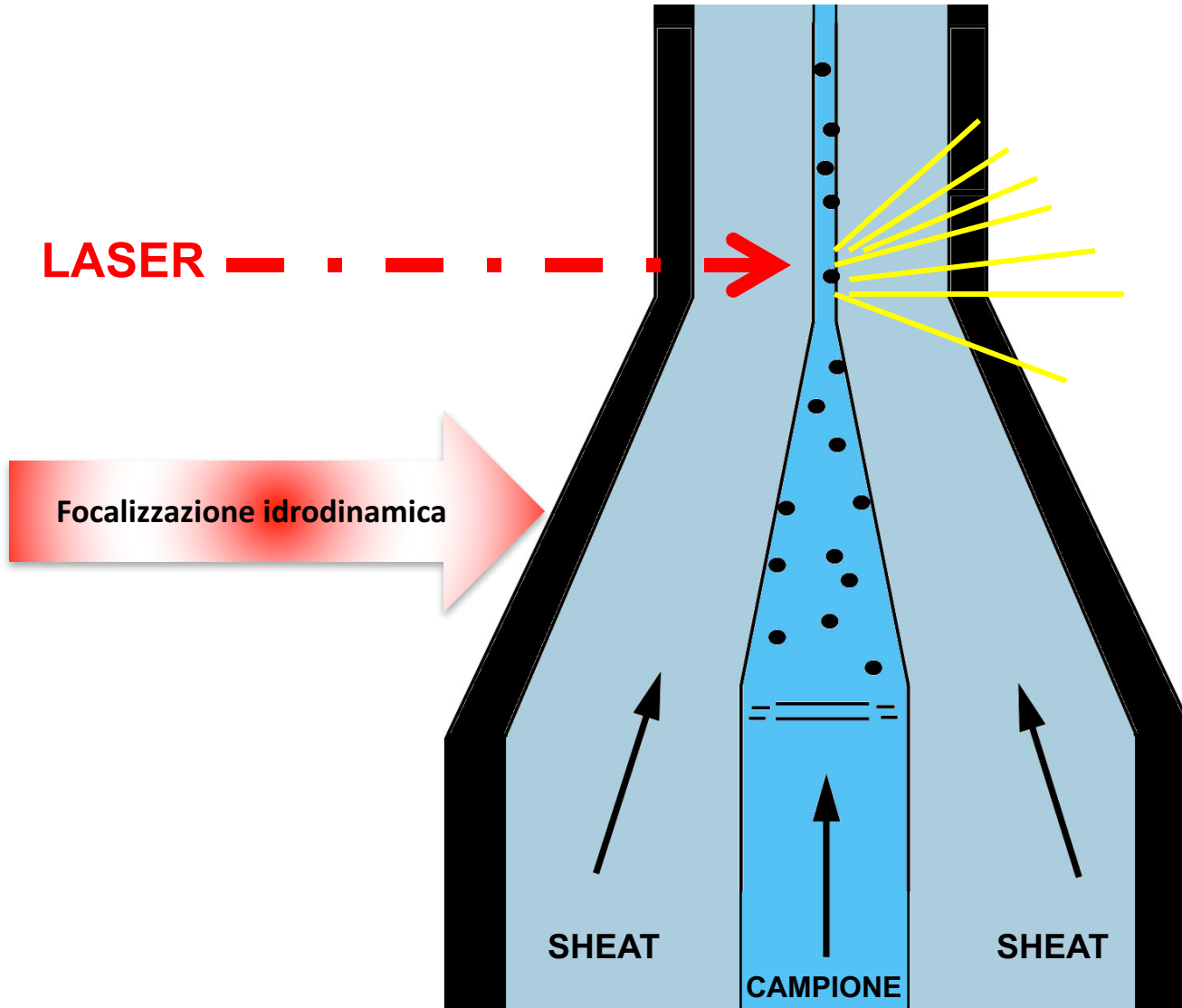
Elettronica

Meccanismo di funzionamento di un Citofluorimetro (Semplificato)



Camera di conta e Focusing Idrodinamico

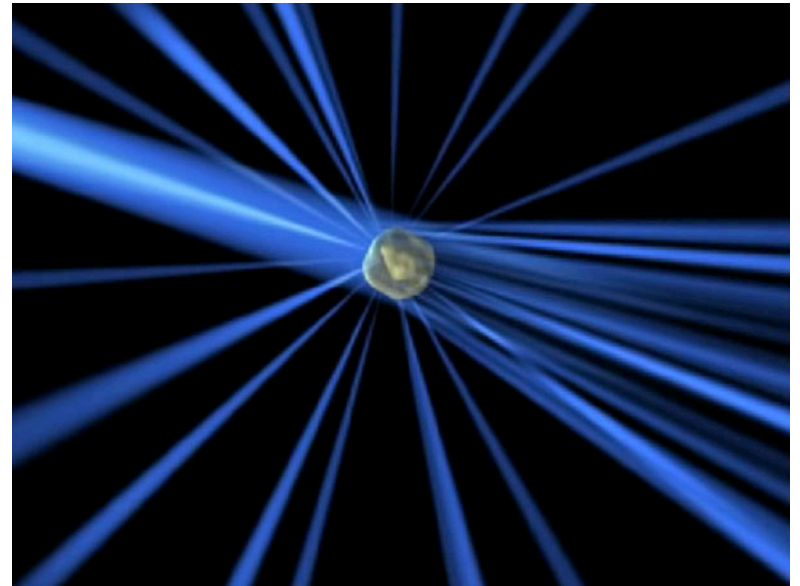
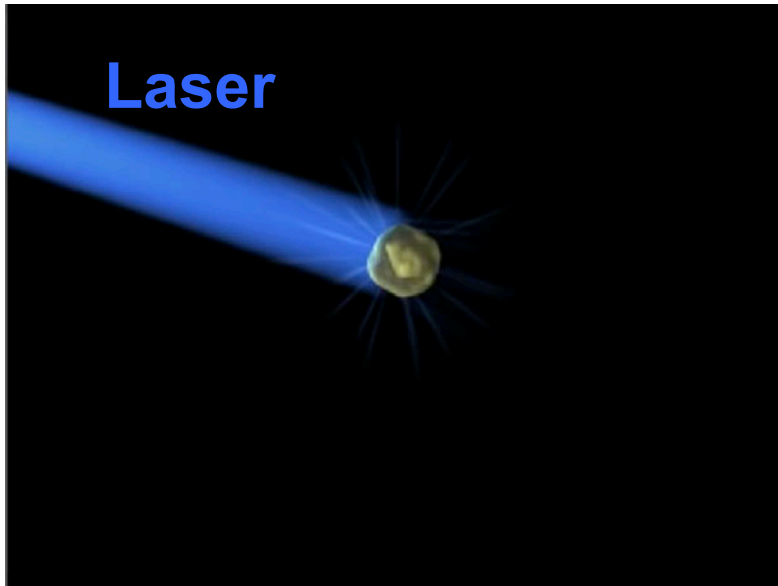
Tramite la focalizzazione idrodinamica è possibile mettere le cellule in fila per poi essere intercettate dal laser



Diffusione della Luce

Light Scattering

- Quando la luce di un laser incide su una cellula, la cellula diffonderà la luce in tutte le direzioni.
- La luce diffusa sarà rilevata dal corrispondente detector.

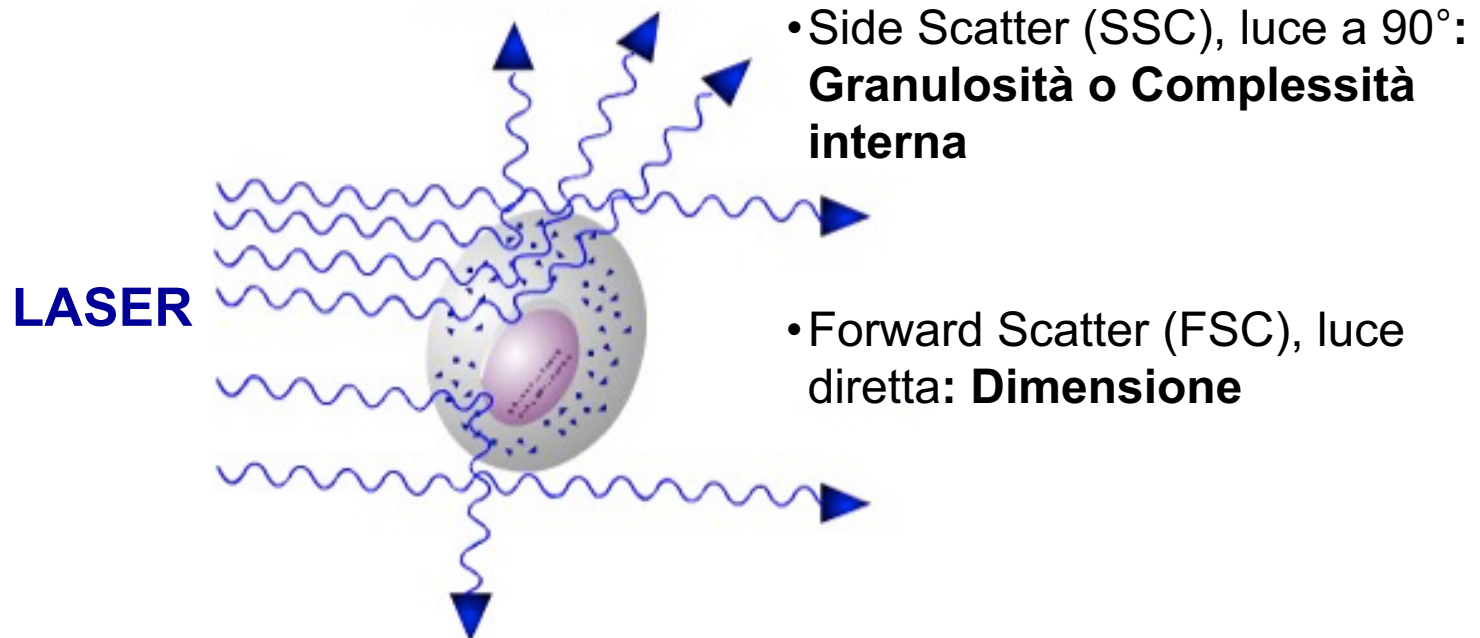


Diffusione della Luce

Light Scattering

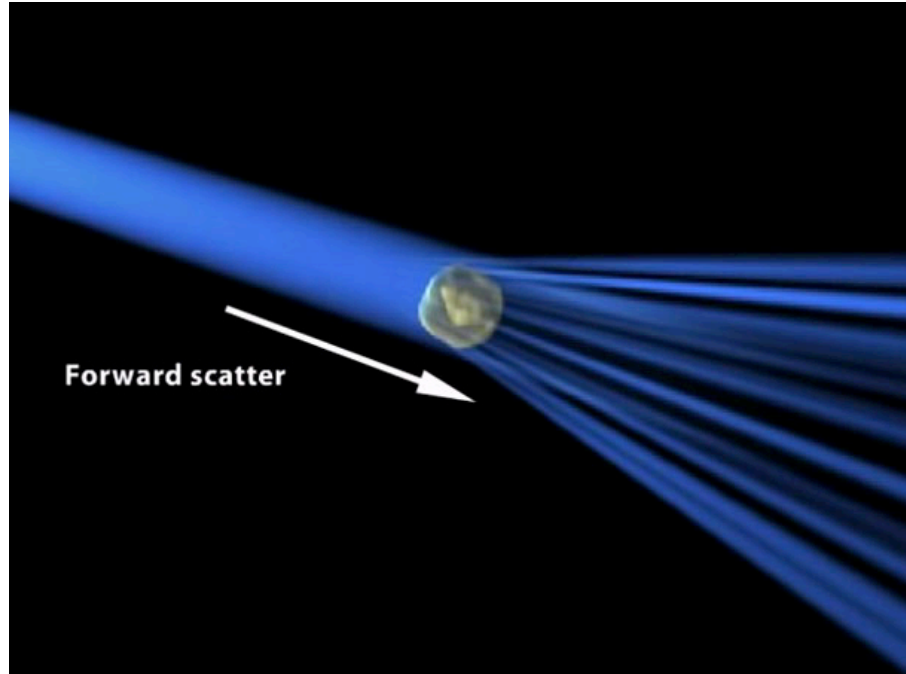
La luce diffusa rilevata sarà quella:

- diretta (**Forward Scatter**)
- ortogonale (**Side Scatter**)



Scatter Frontale

(Forward Angle Light Scatter, **FSC**)



Il passaggio delle cellule attraverso il raggio laser origina un segnale che viene rilevato dal sensore che raccoglie la luce che è diffusa in direzione lineare.

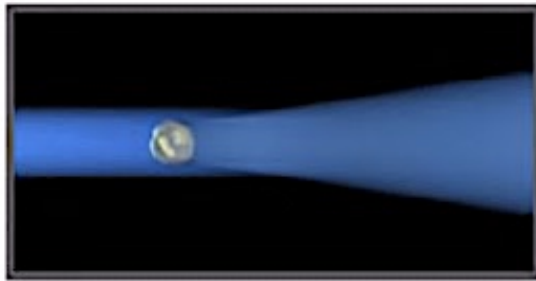
Darà informazioni sulla grandezza cellulare.

Scatter Frontale

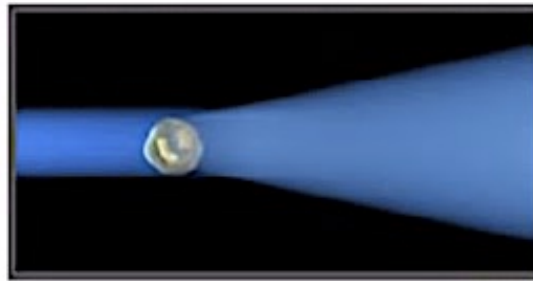
(Forward Angle Light Scatter, **FSC**)

Dimensione

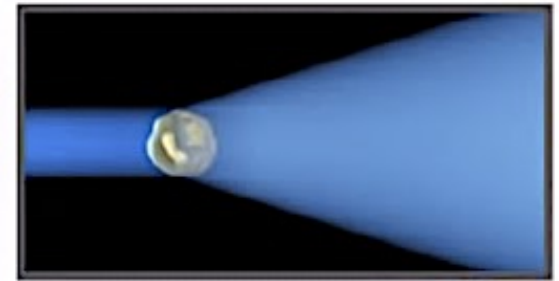
Piccola



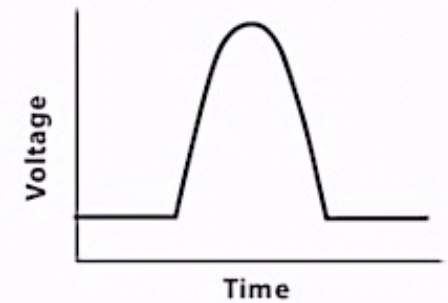
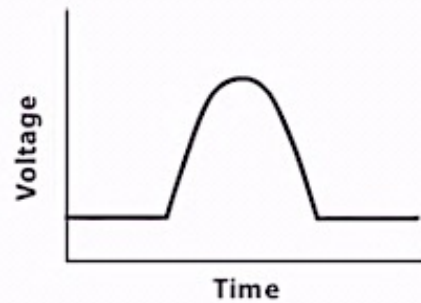
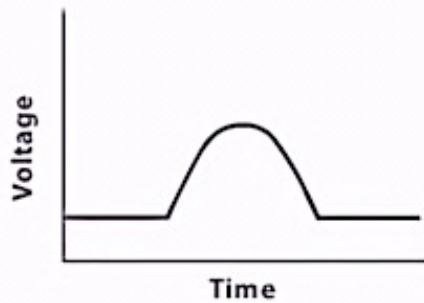
Media



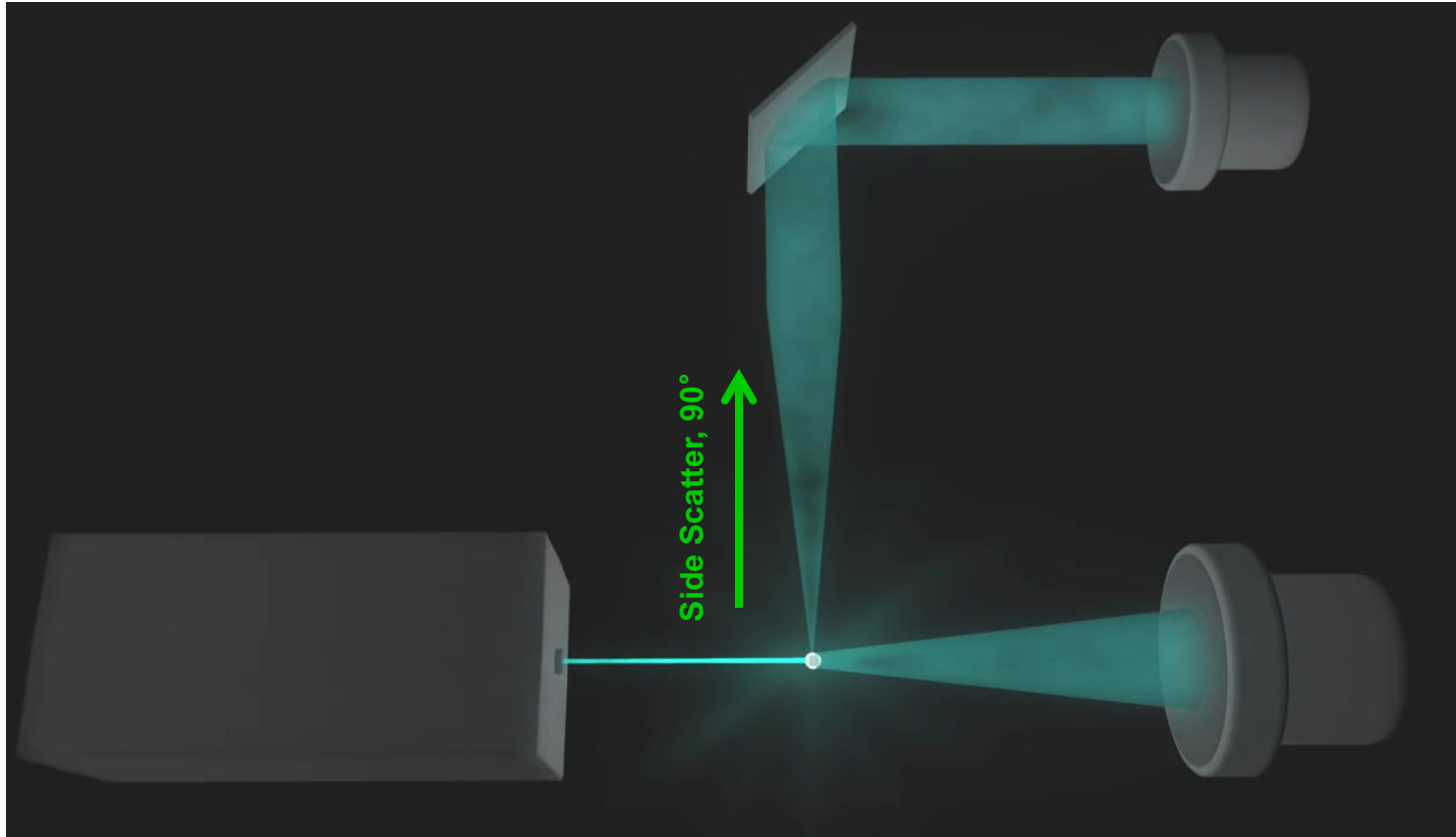
Grande



Segnale risultante



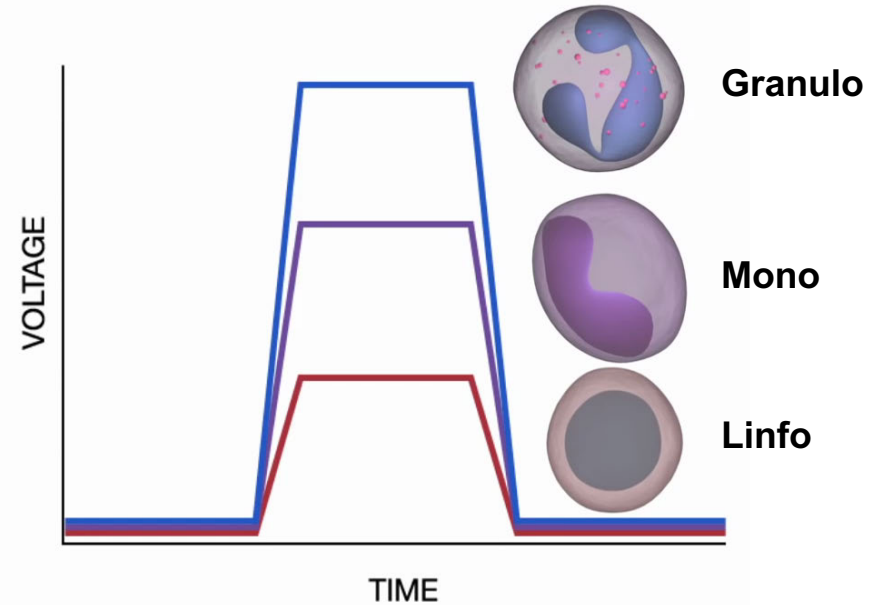
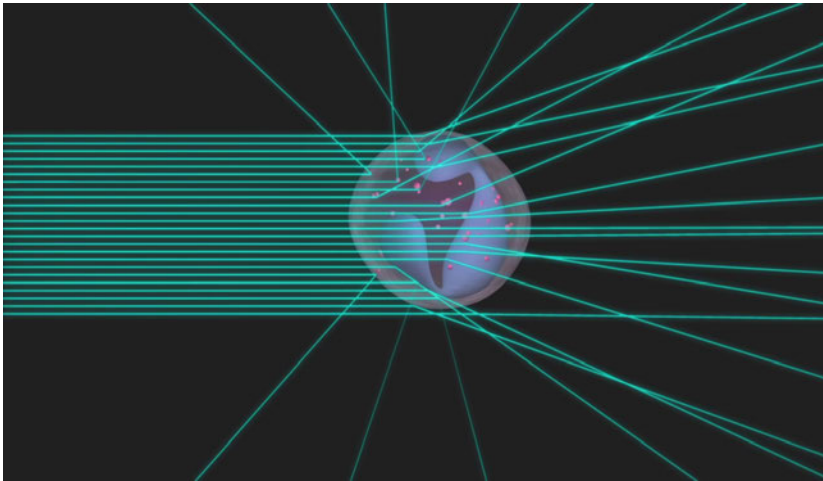
Scatter Laterale (Side Scatter, SSC)



Il passaggio delle cellule origina anche secondo segnale captato dal sensore che raccoglie la luce a 90 gradi.

Darà informazioni densità/granularità (proporzionale alla quantità di strutture citosoliche) **delle cellule.**

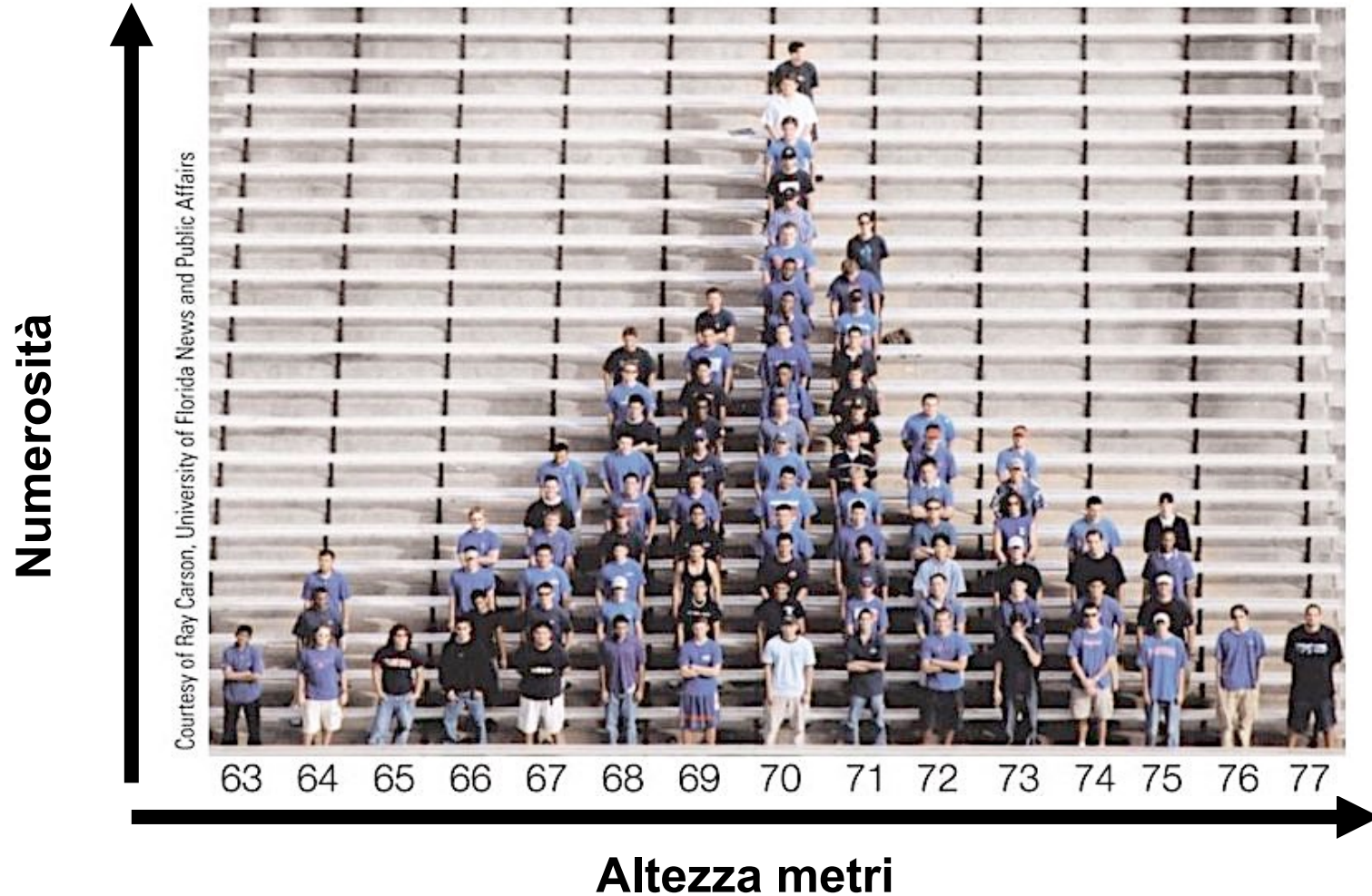
Scatter Laterale (Side Scatter, SSC)



La diffusione SSC risulta dalle inclusioni presenti all'interno della cellula e pertanto può essere **usato per distinguere** cellule **granulate** da quelle **non-granulate**.

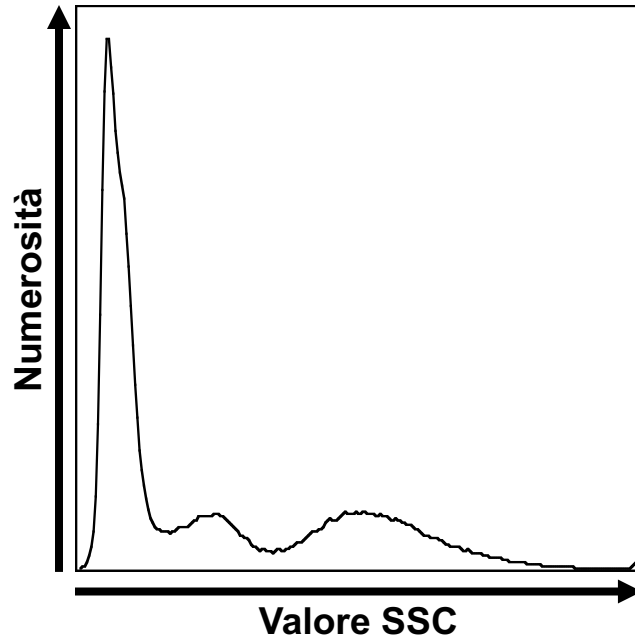
Istogramma

È la rappresentazione grafica (diagramma) della distribuzione di una variabile continua suddivisa in classi.

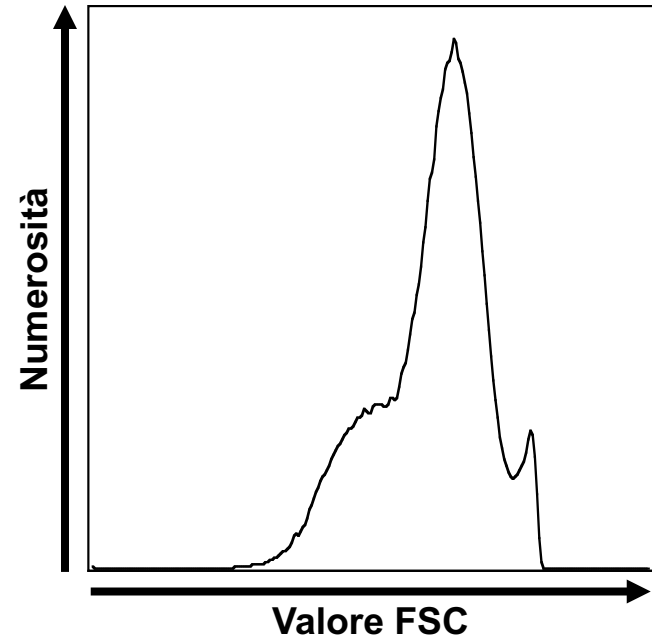


Istogramma di FSC, SSC di una popolazione eterogenea

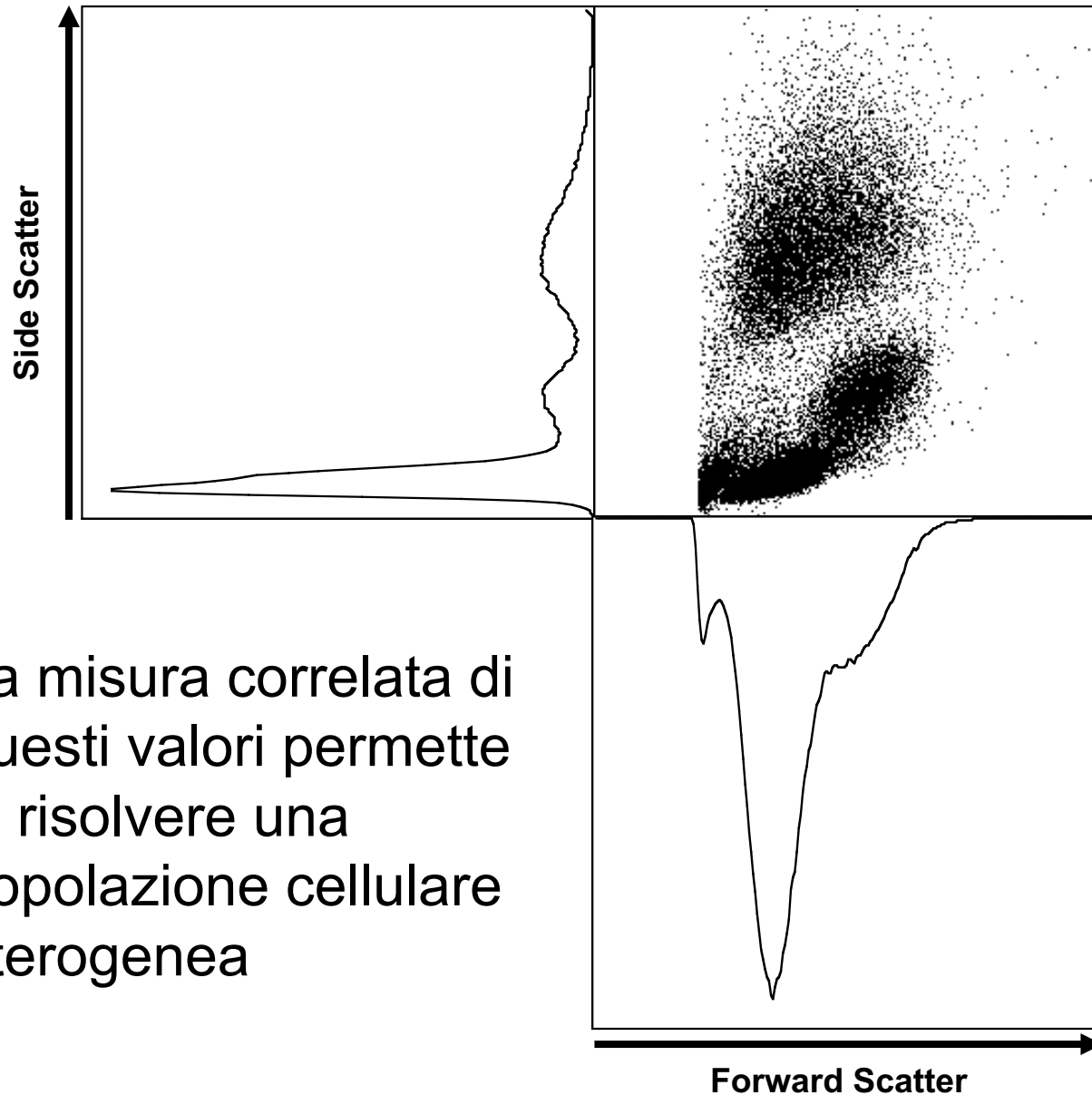
SSC



FSC

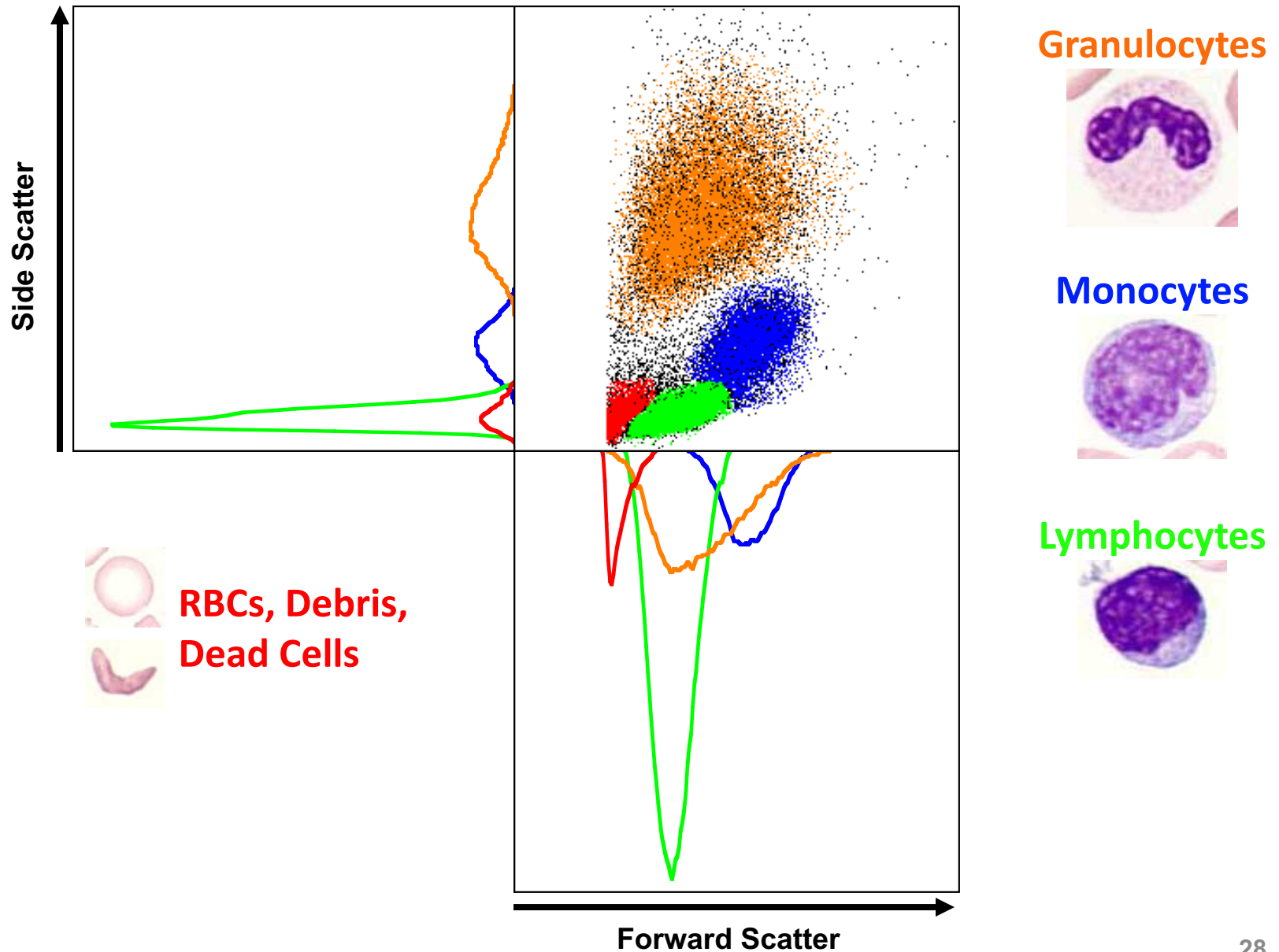


Citogramma: trasposizione cartesiana di due istogrammi



La misura correlata di questi valori permette di risolvere una popolazione cellulare eterogenea

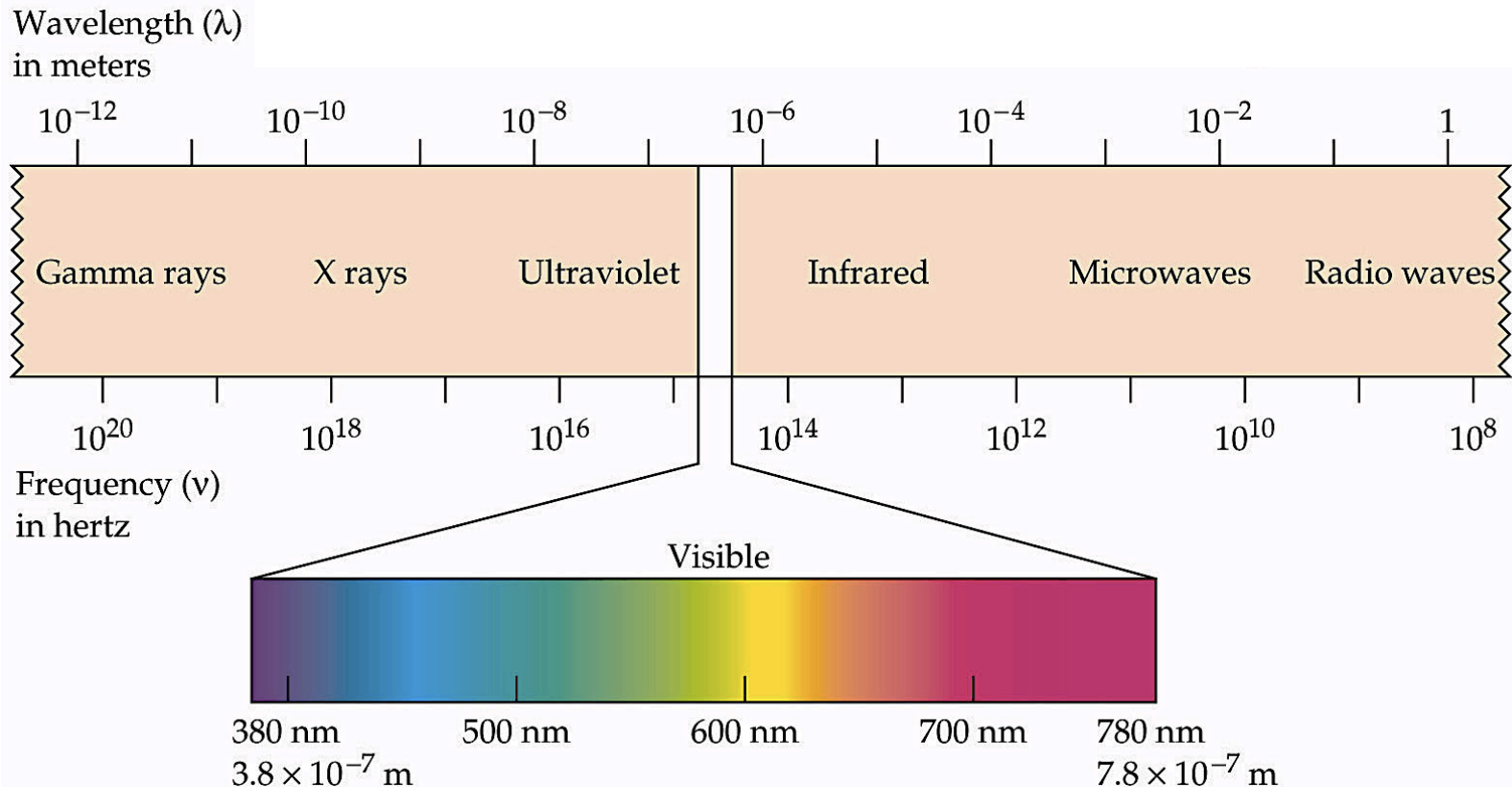
Citogramma: trasposizione cartesiana di due istogrammi



1. *Cos'è la Citofluorimetria?*
2. *Come funziona un citofluorimetro?*
3. *Ottica e fluidica*
4. ***Fluorocromi***
5. *Applicazioni*

Lo spettro della radiazione elettromagnetica

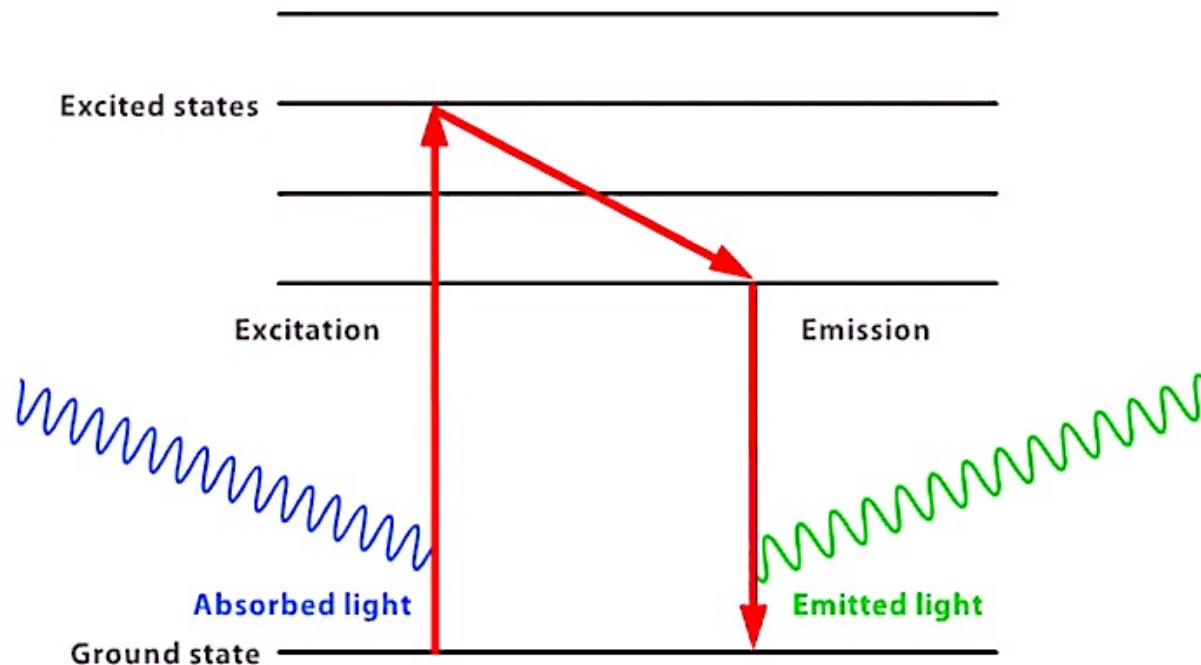
Per radiazione elettromagnetica si intende la propagazione di energia tramite onde e/o corpuscoli nel campo elettromagnetico



La luce visibile è la porzione dello spettro elettromagnetico visibile dall'occhio umano, compresa circa tra 400 e 700 nanometri di lunghezza d'onda

Fluorocromi

- I fluorocromi sono sostanze che possono essere eccitate da una sorgente luminosa ed emettono un segnale di fluorescenza (STOKE SHIFT).
- I fluorocromi sono utilizzati da soli o in coniugazione con anticorpi monoclonali per individuare specificamente antigeni, marcatori e proprietà biochimiche cellulari.



Perché usare molecole fluorescenti

MOLECOLE FLUORESCENTI

Misura di proprietà biologiche e biochimiche

- ***Immunofenotipo: Identificare e quantificare popolazioni cellulari; recettori o molecole intracellulari***
- ***Valutare flussi di calcio***
- ***Misurare il contenuto di acidi nucleici***
- ***Misurare l'attività enzimatica***
- ***Valutare l'apoptosi***
- ***Valutare l'attività mitocondriale***
- ***Valutare l'attività delle caspasi***
- ***Valutare la proliferazione cellulare***

Fluorocromi comunemente utilizzati

semplificato

Fluorocromi singoli:

Fluoresceina FITC

Derivati delle ficobiliproteine:

Ficoeritrina PE

Complesso proteico Peridina-
Clorofilla **PerCP**

Allofococianina **APC**

Fluorocromi in Tandem:

due fluorofori coniugati dove
il primo trasferisce energia al
secondo (FRET)

PE-Cy5.5

PE-Cy7

APC-Cy7






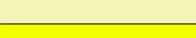






Proteine fluorescenti:

GFP

mCherry

YFP





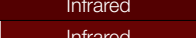
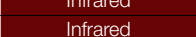

Table 1. Fluorophores for flow cytometry.

Fluorophores	Fluorescence Color	Maximal Absorbance, nm	Maximal Emission, nm	Relative Brightness
DyLight 405		400	420	3
Alexa Fluor 405		401	421	3
Pacific Blue		410	455	1
Alexa Fluor 488		495	519	3
FITC		490	525	3
DyLight 549		562	576	4
PE*		496, 546	578	5
APC		650	661	4
Alexa Fluor 647		650	665	4
DyLight 650		654	673	4
PerCP		490	675	2
Alexa Fluor 700		702	723	2

* PE is the same as R-phycoerythrin.

APC, allophycocyanin; FITC, fluorescein isothiocyanate; PE, phycoerythrin; PerCP, peridinin chlorophyll protein.







Table 2. Tandem dyes for flow cytometry.

Fluorophores	Fluorescence Color	Maximal Absorbance, nm	Maximal Emission, nm	Relative Brightness
PE–Alexa Fluor 647		496, 546	667	4
PE–Cy5		496, 546	667	5
PerCP–Cy5.5		490	695	3
PE–Cy5.5		496, 546	695	4
PE–Alexa Fluor 750		496, 546	779	4
PE–Cy7		496, 546	785	4
APC–Cy7		650	785	2

* PE is the same as R-phycoerythrin.

APC, allophycocyanin; PE, phycoerythrin; PerCP, peridinin chlorophyll protein.

Table 3. Fluorescent proteins in flow cytometry.

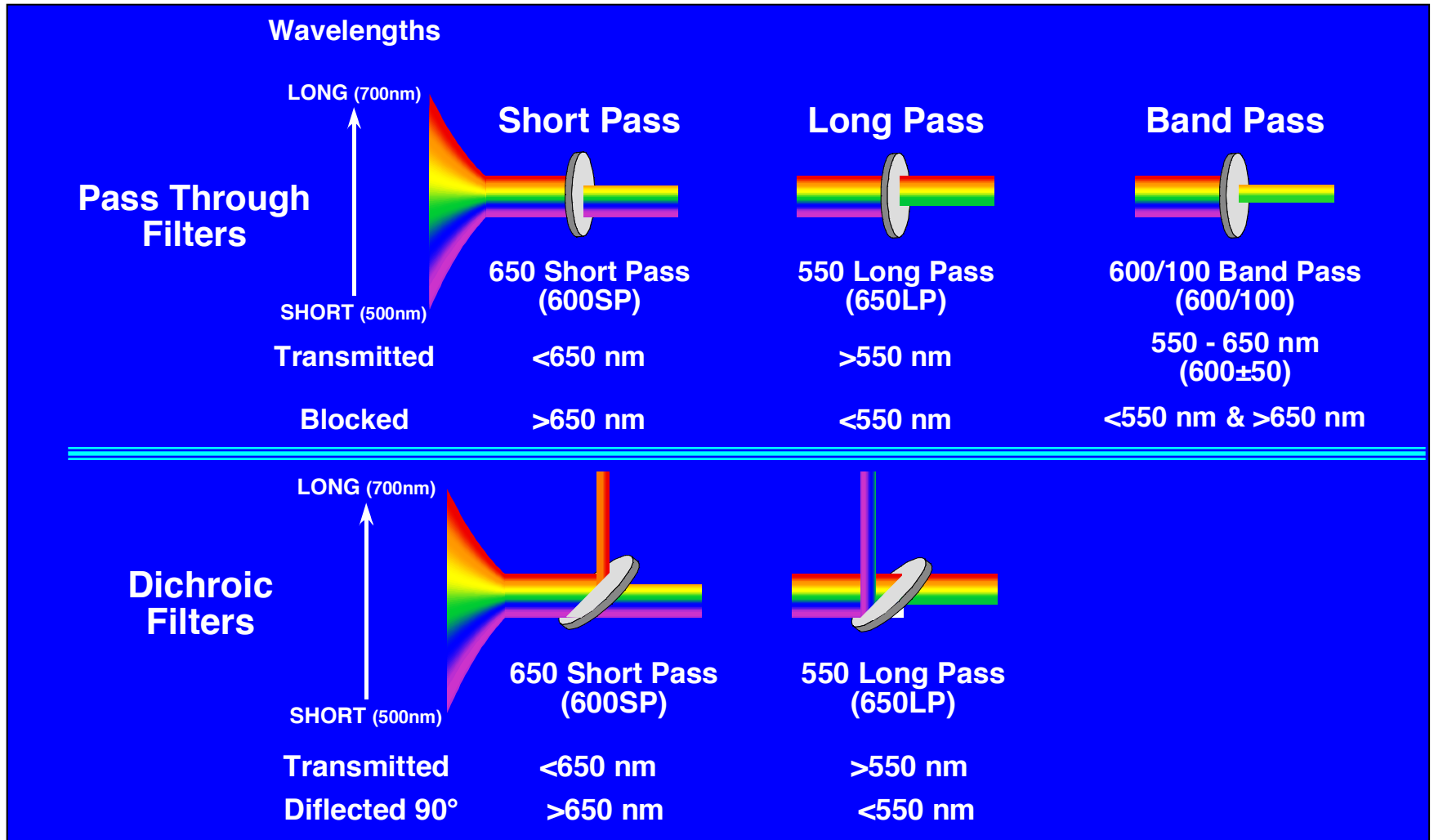
Fluorophores	Fluorescence Color	Maximal Absorbance, nm	Maximal Emission, nm	Relative Brightness
EBFP		383	445	2
CFP		439	476	2
EGFP		484	509	4
YFP		514	527	5
RFP		558	583	4
mCHERRY		587	610	3

Caratteristiche dei fluorocromi comunemente utilizzati

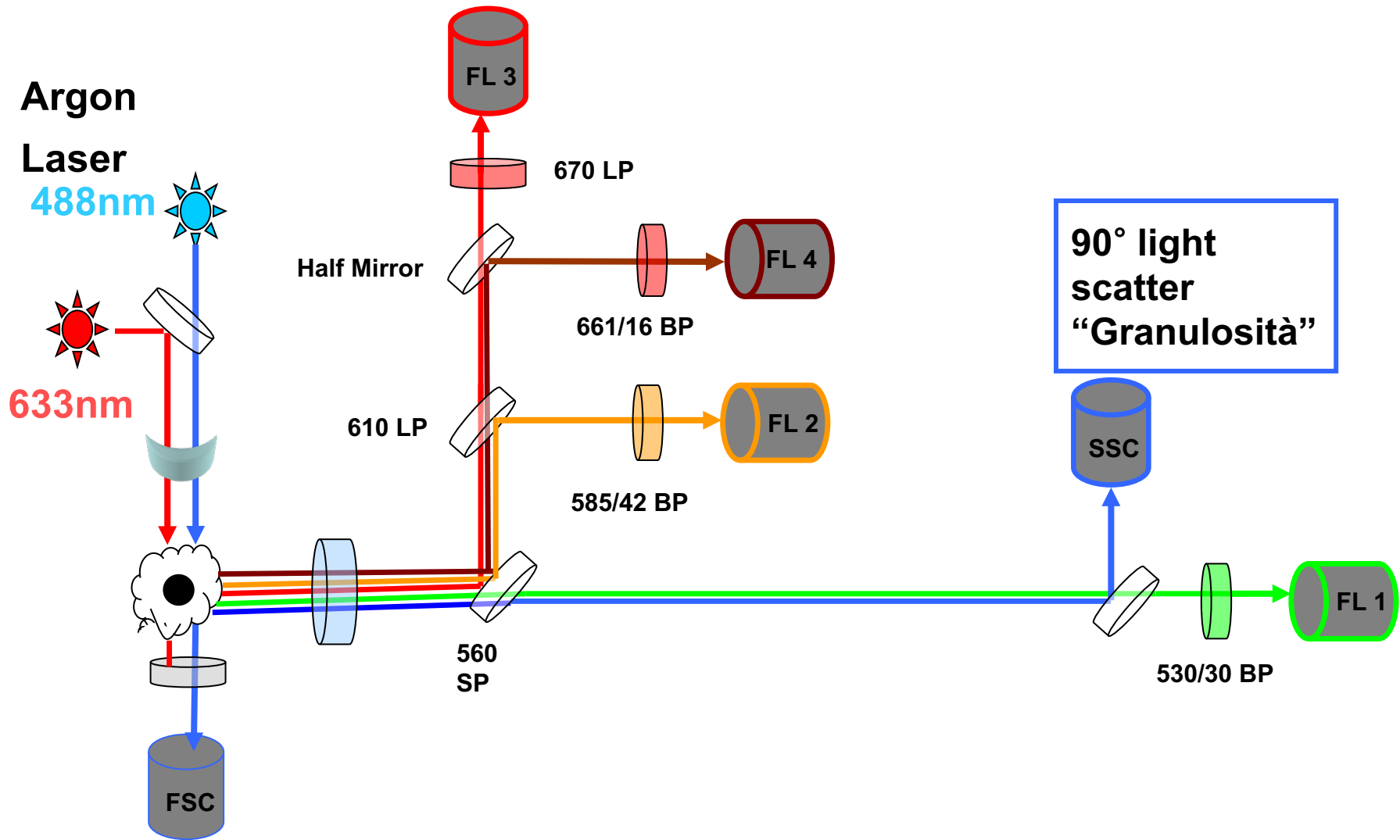
Fluorocromi coniugati	Laser Eccitazione (nm)	Emissione (nm)
Fluoresceina FITC	488	530
Ficoeritrina PE	488	580
PE-Texas Red	488	615
PE-Cy5	488	670
PerCP	488	670
Allofococianina APC	633	670
APC-Cy7	633	767

Sebbene alcuni di loro possono essere eccitati dalla stessa sorgente luminosa, emettono un differente colore. In questo modo possono essere utilizzati simultaneamente.

Tipi di filtri ottici



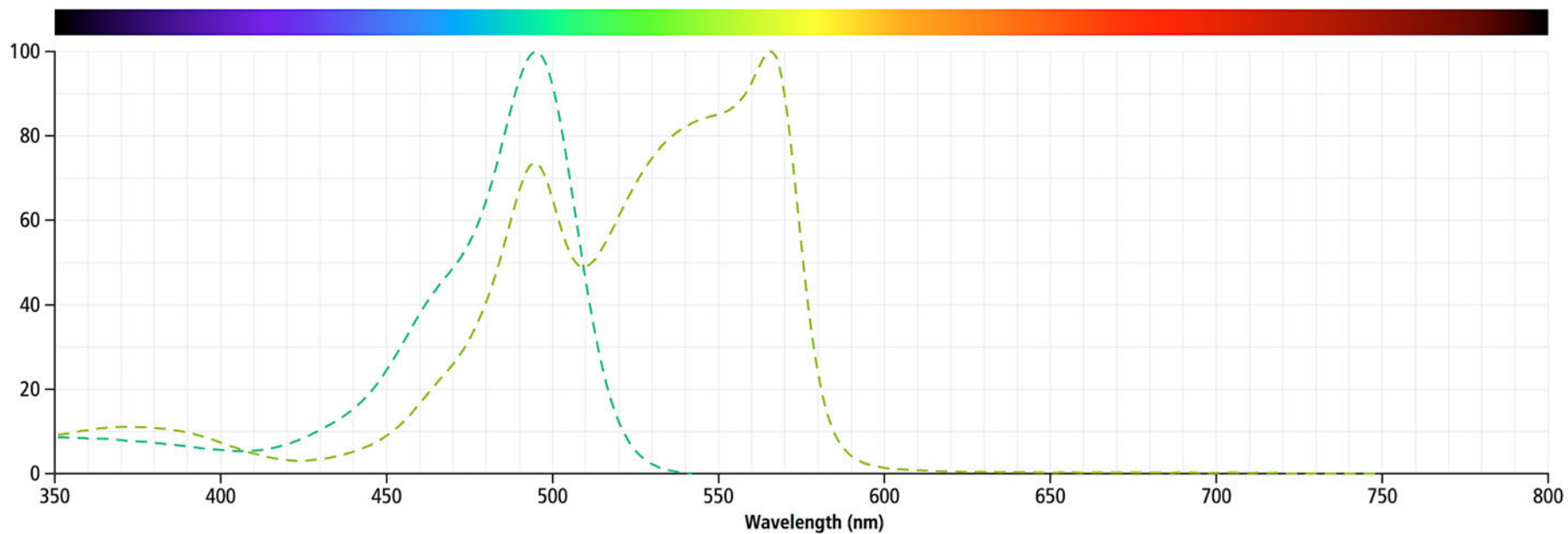
Raccolta del segnale



2° - 16° light scatter "Dimensione",
indice rifrattivo

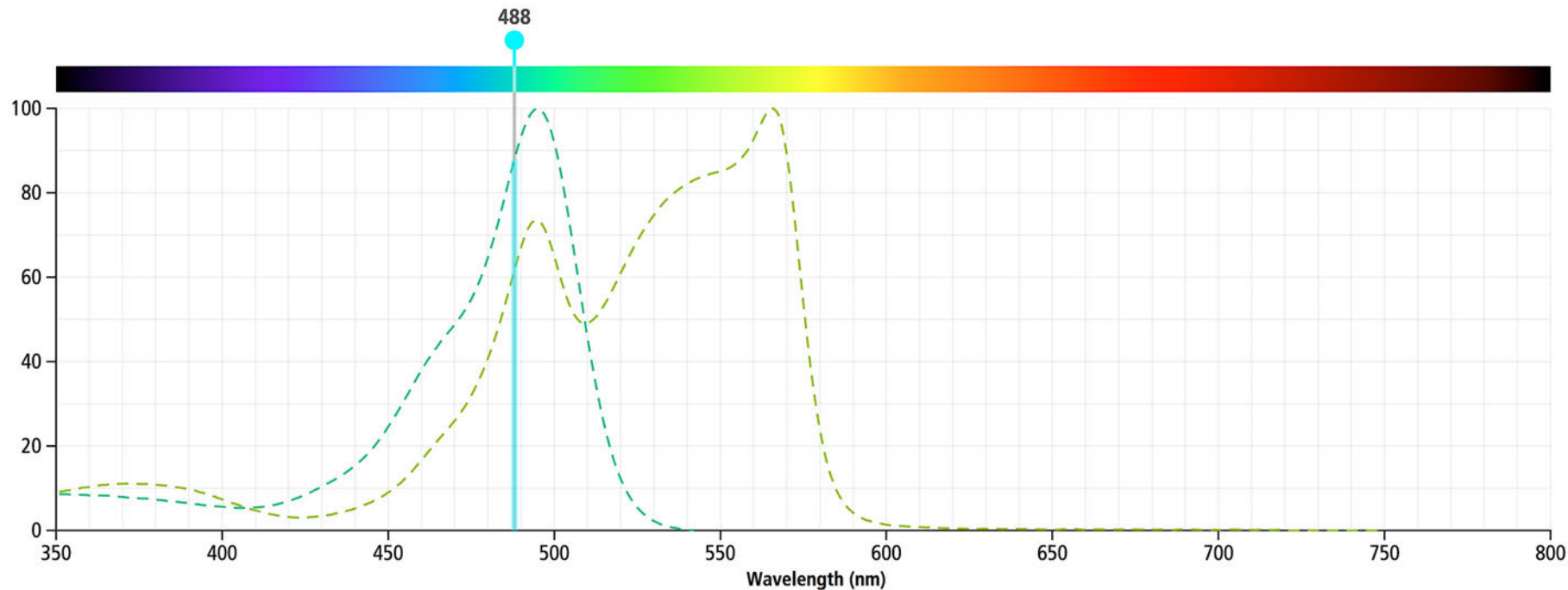
Esempio spettri assorbimento/emissione

FITC
PE



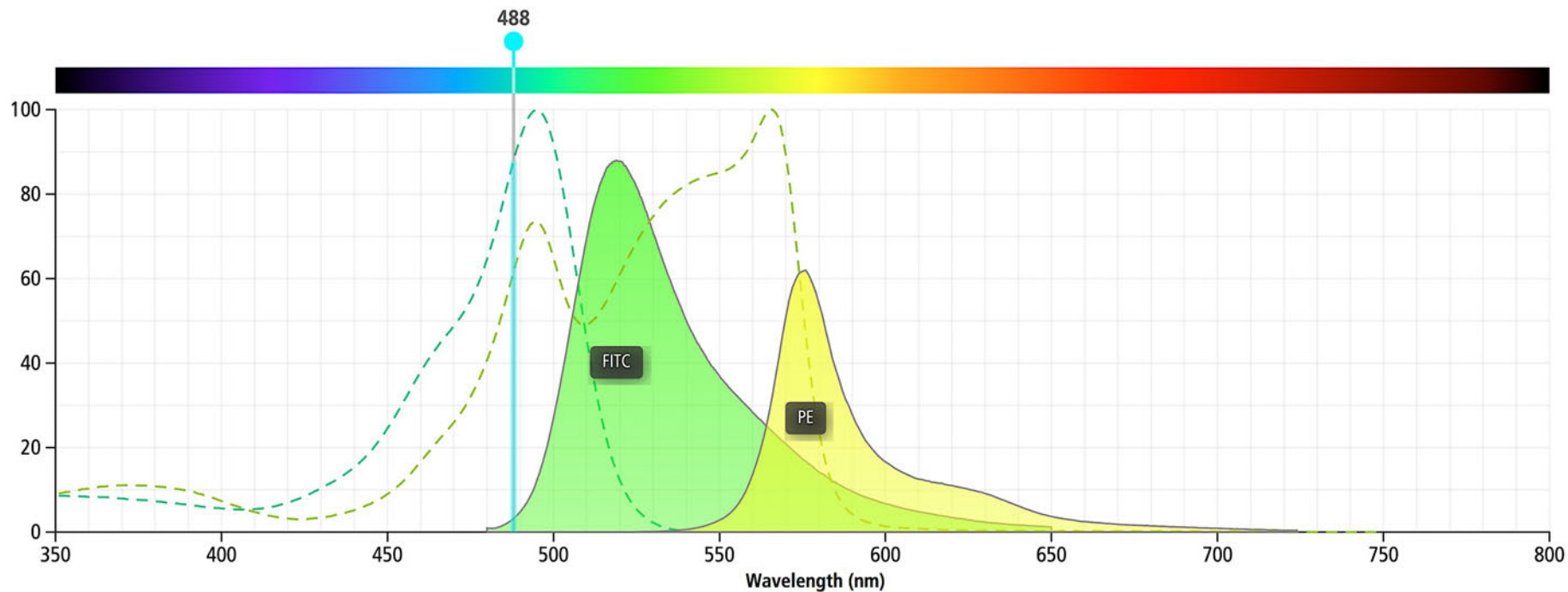
Esempio spettri assorbimento/emissione

FITC
PE



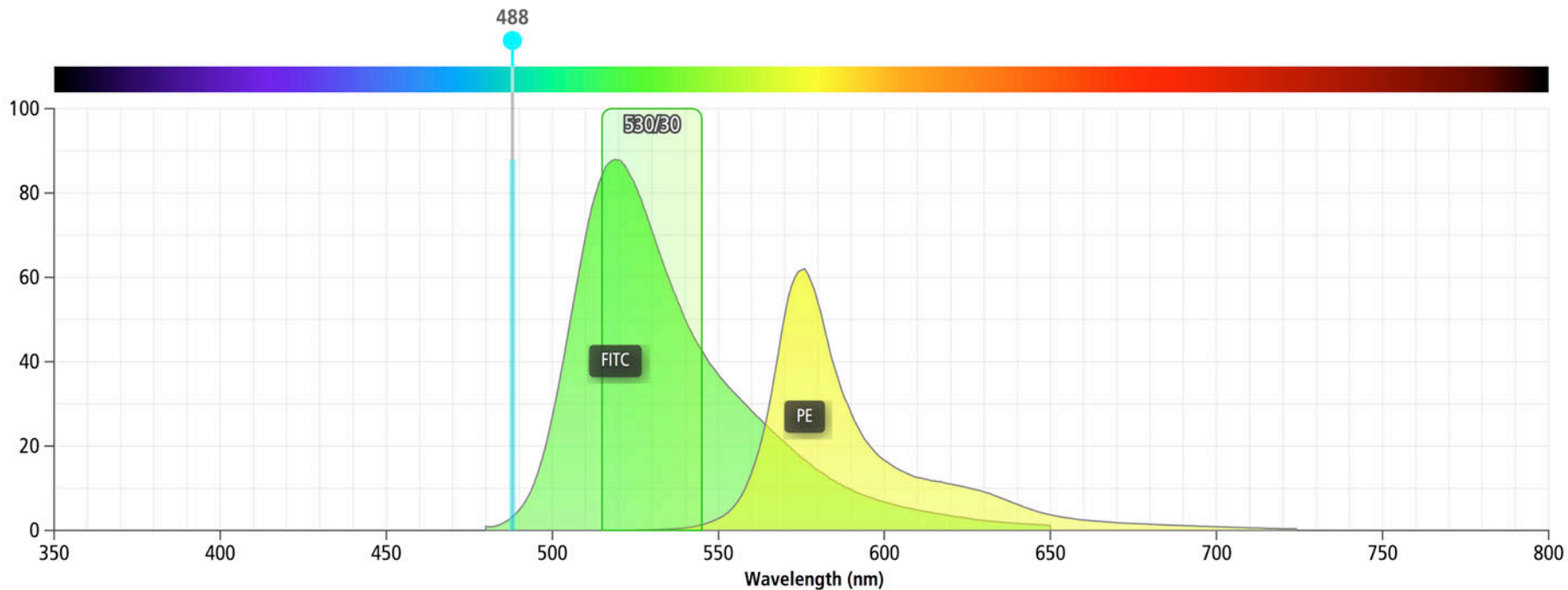
Esempio spettri assorbimento/emissione

FITC
PE



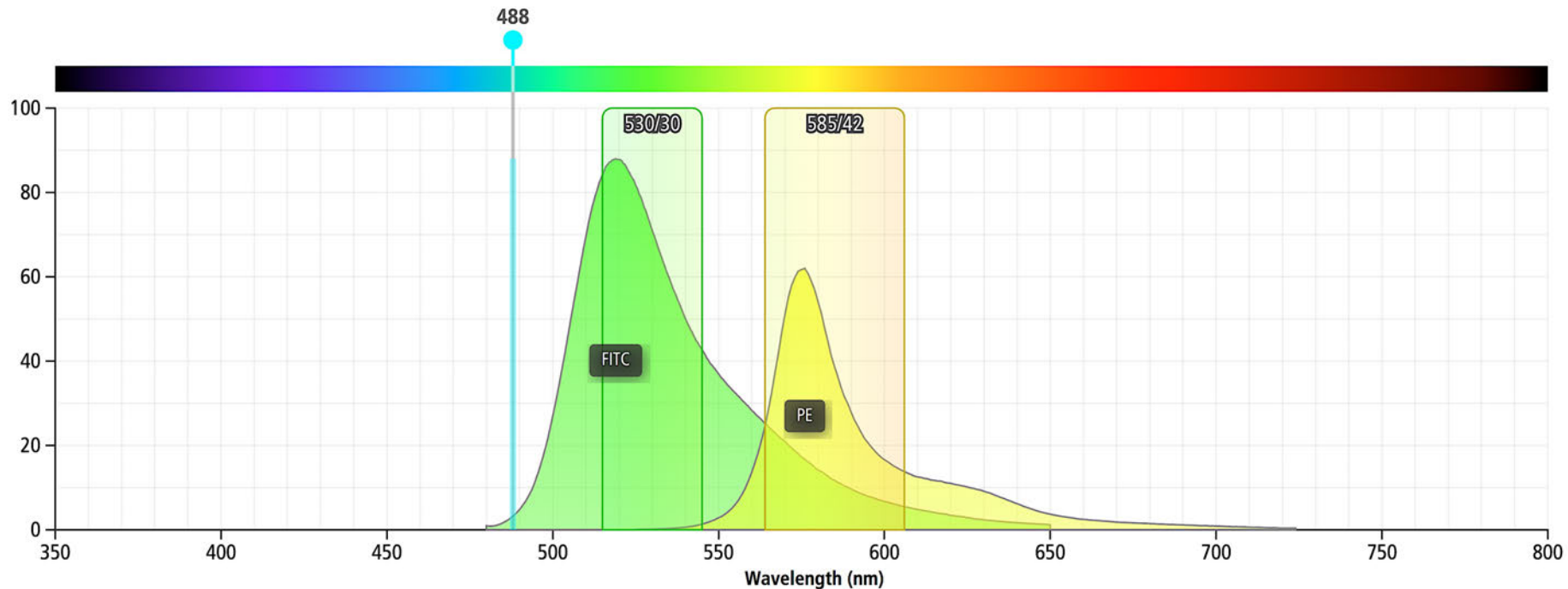
Esempio spettri assorbimento/emissione

FITC
PE



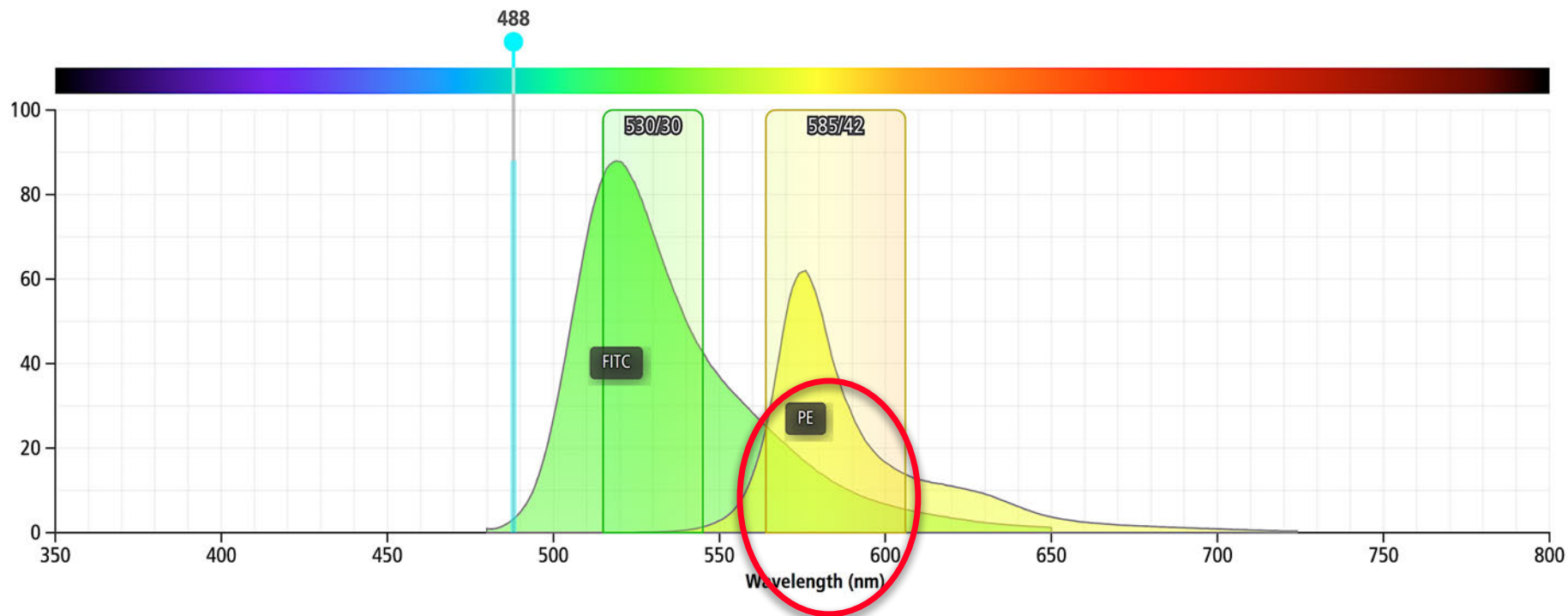
Esempio spettri assorbimento/emissione

FITC
PE



Esempio spettri assorbimento/emissione

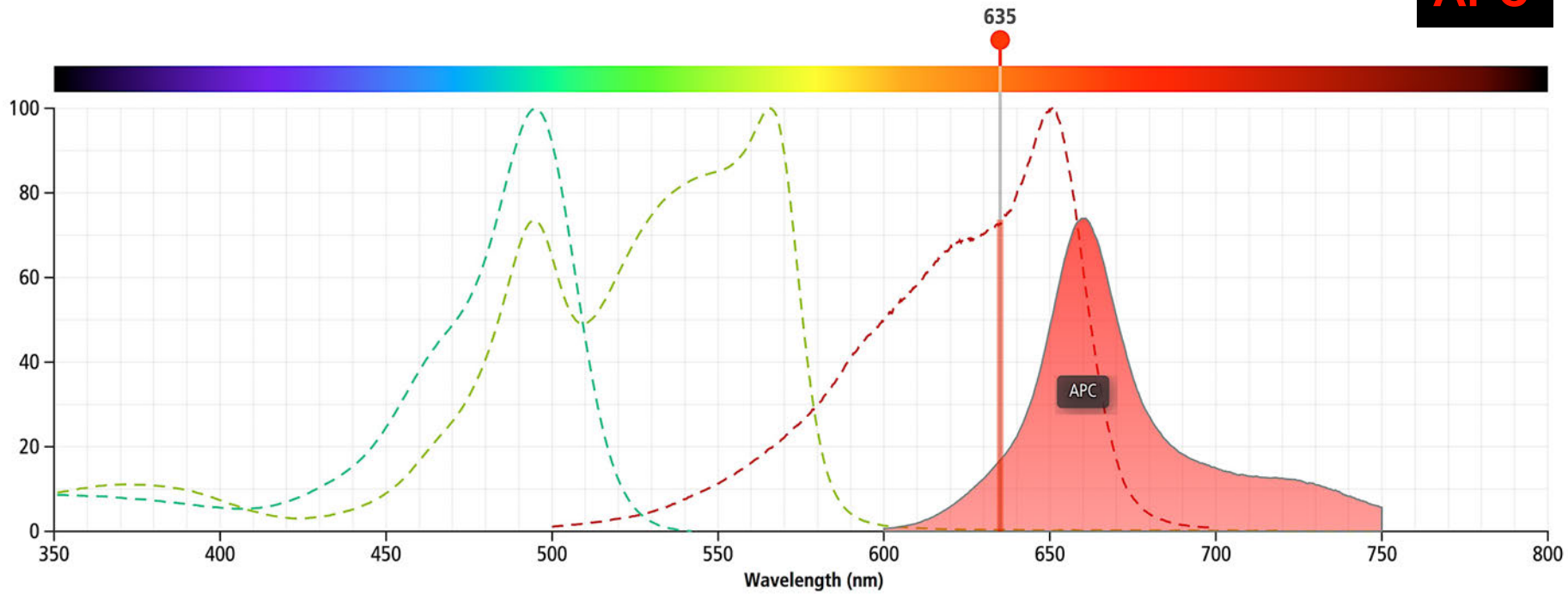
FITC
PE



**Sovrapposizione Spettrale (Spectral Overlap) di FITC
nel detector di PE
Da correggere tramite setup strumentale detto
COMPENSAZIONE**

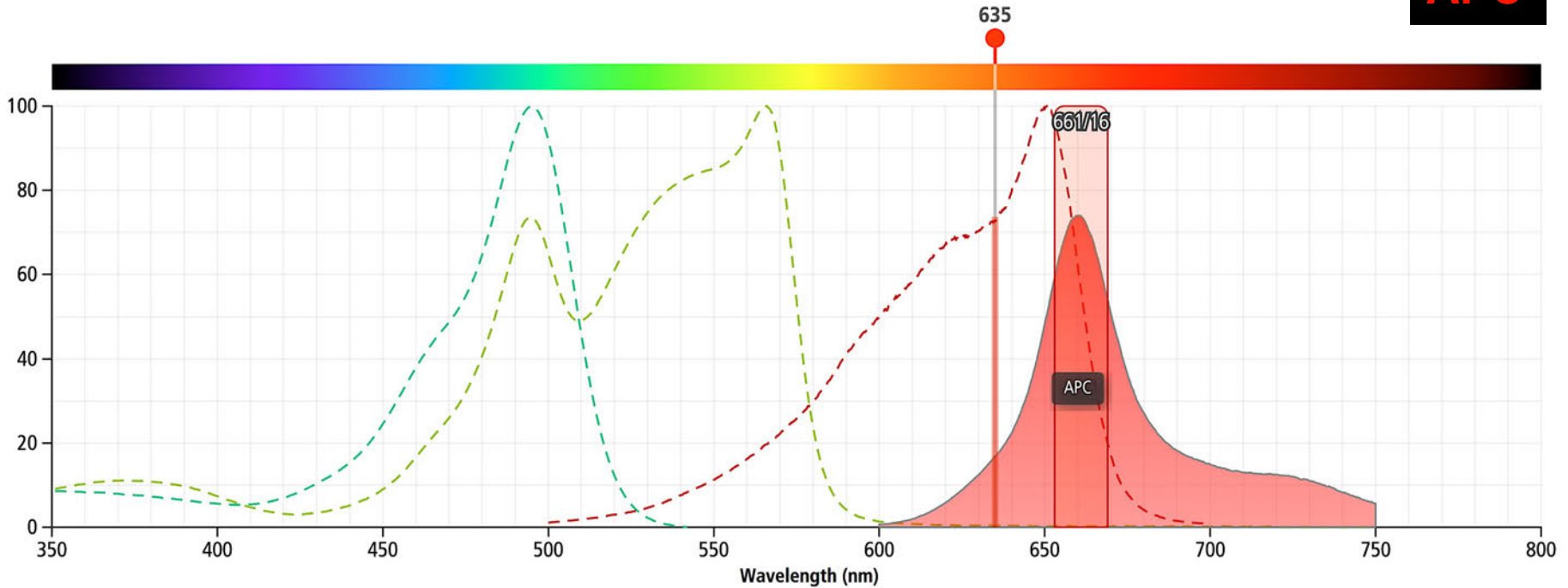
Esempio spettri assorbimento/emissione

FITC
PE
APC



Esempio spettri assorbimento/emissione

FITC
PE
APC



1. *Cos'è la Citofluorimetria?*
2. *Come funziona un citofluorimetro?*
3. *Ottica e fluidica*
4. *Fluorocromi*
5. ***Applicazioni***

Applicazioni della citofluorimetria

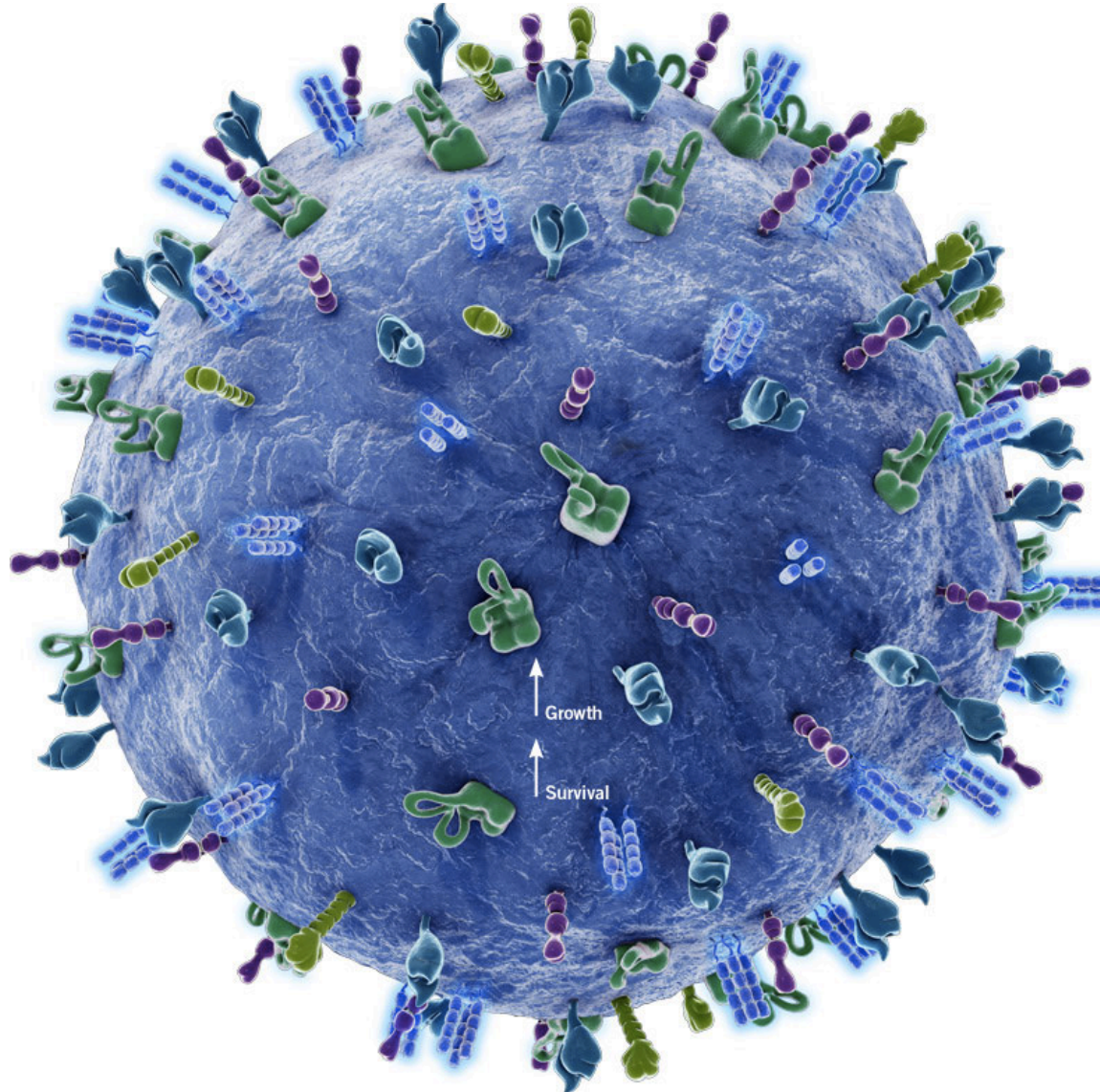
- Analisi Multicolore:
 - Immunofenotipo (es: CD, recettori, molecole di adesione)
 - Intracellular staining: espressione citochine, phospo flow
- Ciclo cellulare
- Proliferazione
- Apoptosi
- Cell Sorting

Applicazioni della citofluorimetria

- **Analisi Multicolore:**
 - Immunofenotipo (es: CD, recettori, molecole di adesione)
 - Intracellular staining: espressione citochine, phospo flow
- Ciclo cellulare
- Proliferazione
- Apoptosi
- Cell Sorting












Molecole di membrana

Le cellule sono ricoperte di molecole che permettono la comunicazione delle une con le altre



Utilizzati Anticorpi Coniugati

- Sono sempre anticorpi coniugati ovvero legati a molecole fluorescenti.
- Anticorpi specifici e monoclonali.
- Specifici per le **molecole CD** (cluster di differenziazione) espresse sulla superficie cellulare.
- Tramite il sistema di classificazione CD possiamo identificare le cellule in base alla presenza o assenza di questi marcatori sulla superficie.

		Key Markers - Human	Key Markers - Mouse
T Cell		CD3 CD4 CD8	CD3 CD4 CD8
B Cell		CD19 CD20	CD45R/B220 CD19 CD22 (B cell activation marker)
Dendritic Cell		CD11c CD123	CD11c CD123
NK Cell		CD56	CD335 (NKp46)
Stem Cell/ Precursor		CD34 <i>hematopoietic stem cell only</i>	CD34 <i>hematopoietic stem cell only</i>
Macrophage/ Monocyte		CD14 CD33	CD11b/ Mac-1 Ly-71 (F4/80)
Granulocyte		CD66b	CD66b Gr-1/Ly6G Ly6C
Platelet		CD41 CD61 CD62	CD41 CD61 (Integrin β 3) CD9 CD62P (activated platelets)
Erythrocyte		CD235a	CD235a Ter-119
Endothelial Cell		CD146	CD146 MECA-32 CD106 CD31 CD62E (activated endothelial cells)
Epithelial Cell		CD326	CD326 (EPCAM1)

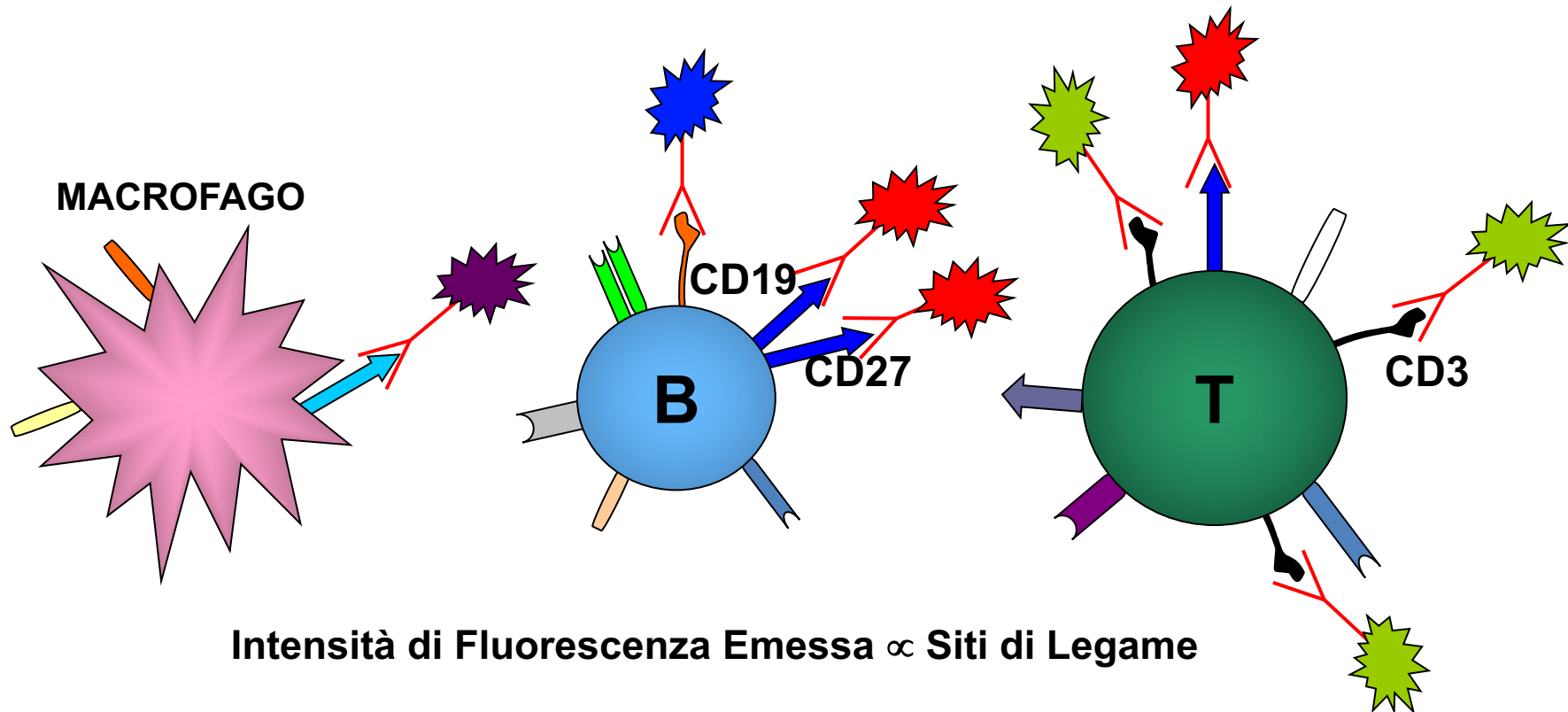
CD (cluster of differentiation) molecules are cell surface markers useful for the identification and characterization of leukocytes. The CD nomenclature was developed and is maintained through the HLDA (Human Leukocyte Differentiation Antigens) workshop started in 1982. The goal is to provide standardization of monoclonal antibodies to human antigens across laboratories. To characterize or “workshop” the antibodies, multiple laboratories carry out blind analyses of antibodies. These results independently validate antibody specificity.

While the CD nomenclature has been developed for use with human antigens, it is applied to corresponding mouse antigens as well as antigens from other species. However, the mouse and other species antibodies are not tested by HLDA.

Human CD markers were reviewed by the HLDA. New CD markers were established at the HLDA9 meeting held in Barcelona in 2010. For additional information and CD markers please visit www.hcdm.org.

Analisi Immunofenotipica

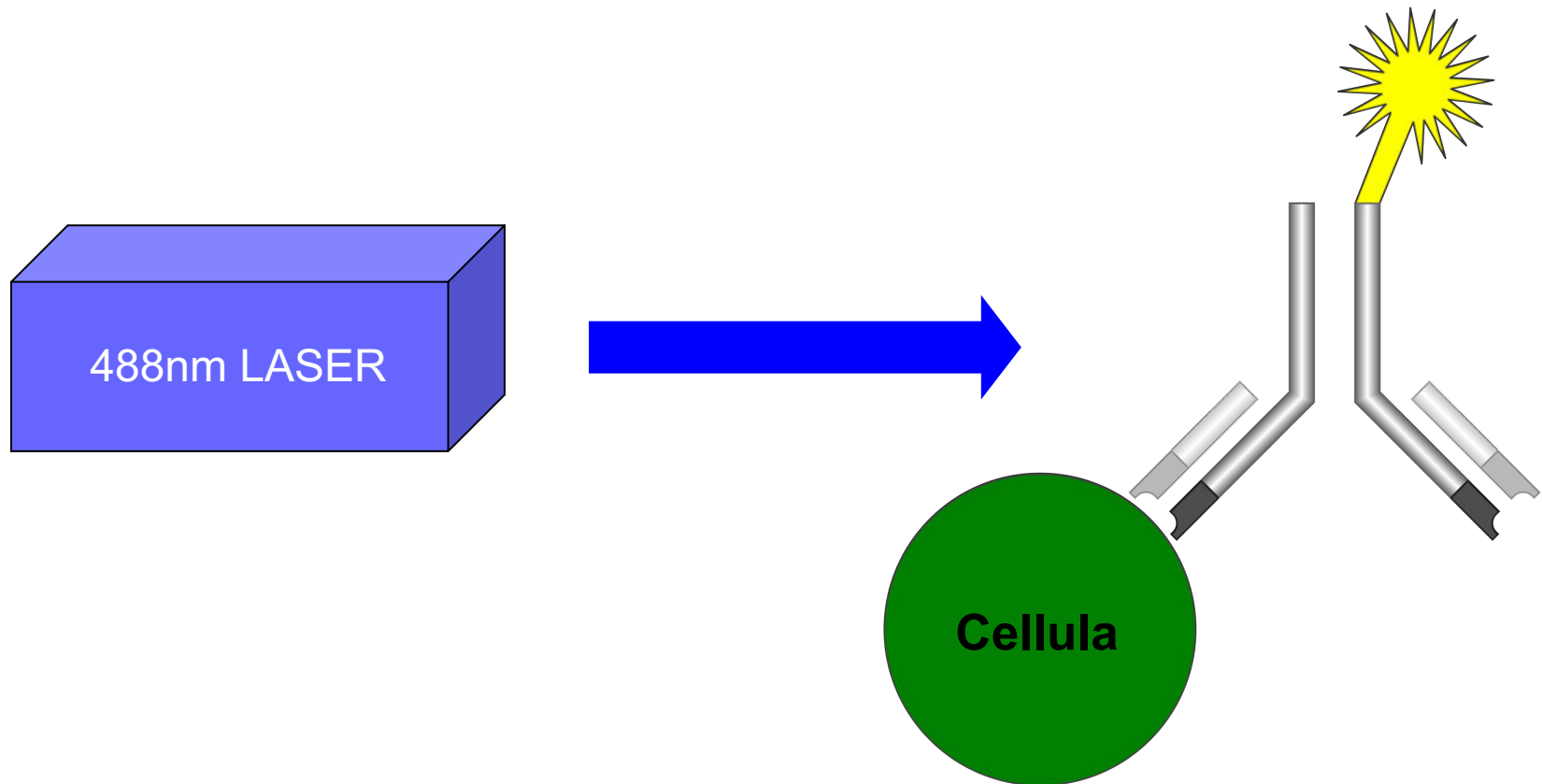
Ogni cellula può essere “marcata” con diversi anticorpi coniugati



L'uso di multipli fluorocromi, ciascuno con simile lunghezza d'onda d'eccitazione e differenti lunghezze d'onda d'emissione (“colori”), permette di misurare diverse caratteristiche cellulari contemporaneamente.

Segnali di fluorescenza

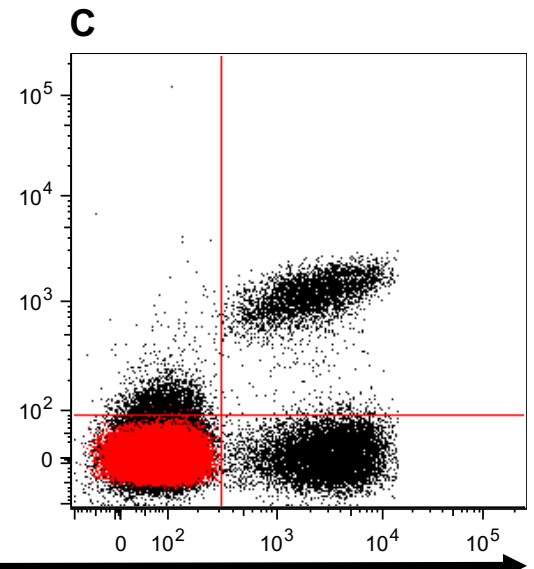
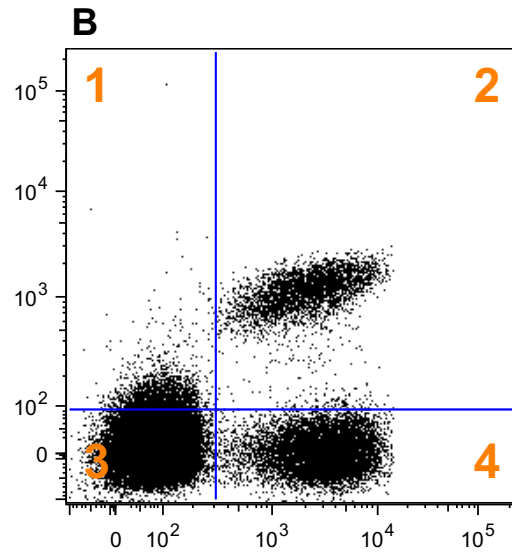
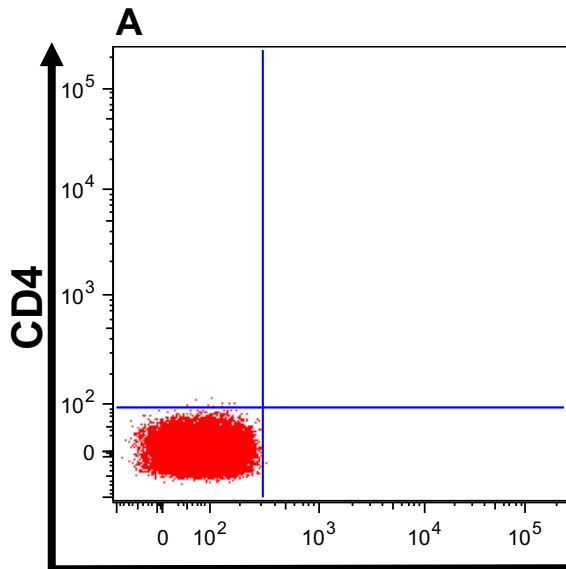
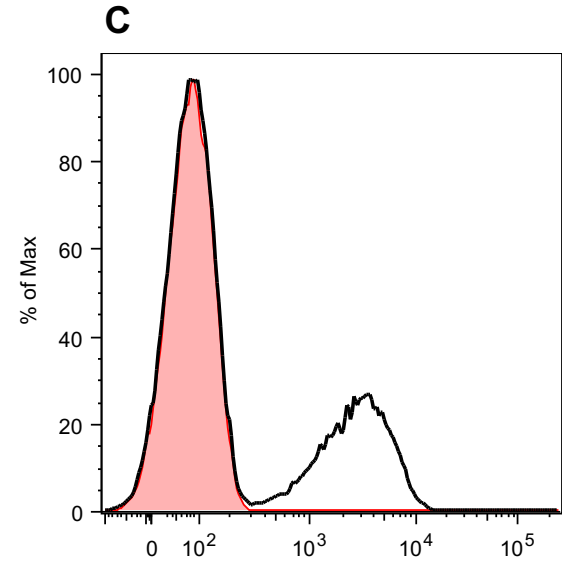
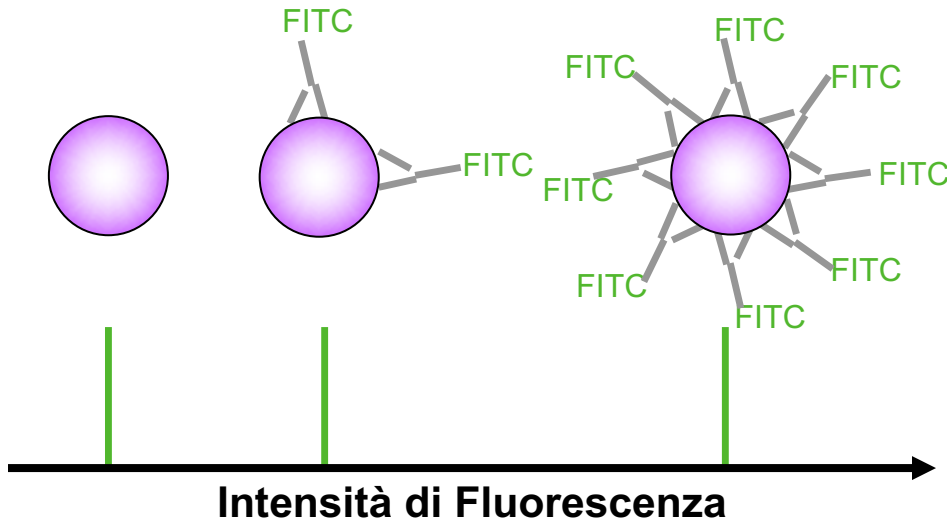
Anticorpi coniugati a molecole fluorescenti legano specifiche proteine della cellula.



By Gringer (Own work) [CC0], via Wikimedia Commons

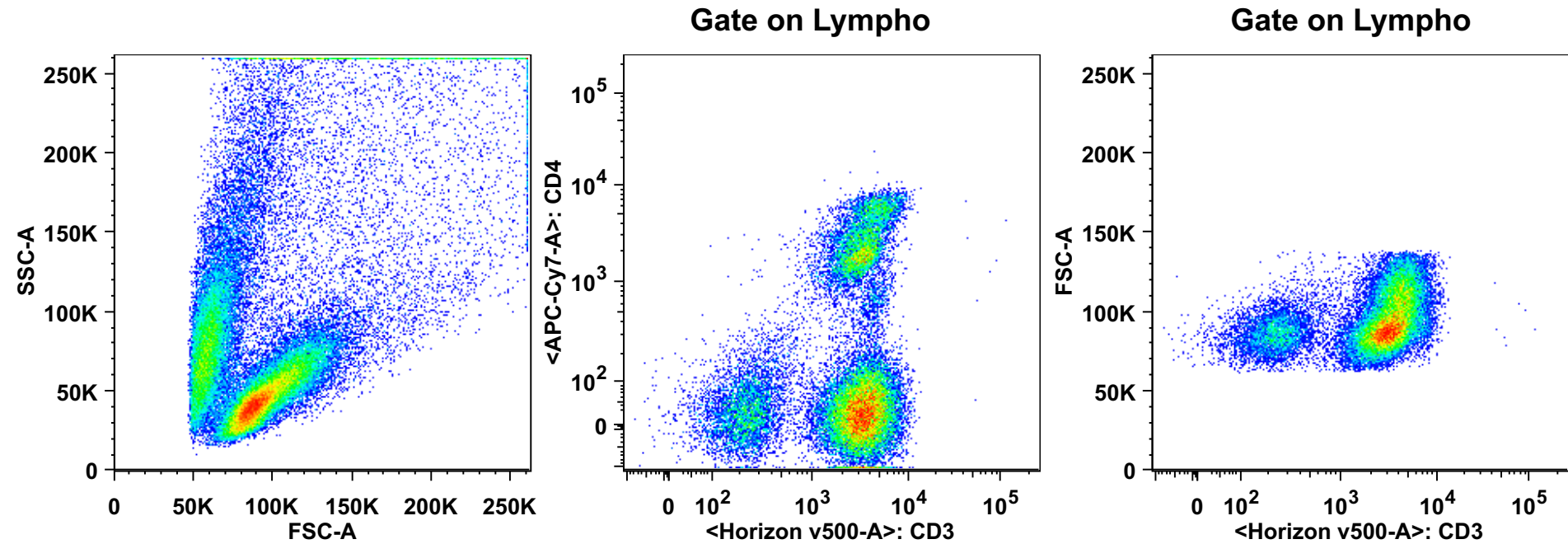
Quando le cellule sono colpite dal laser, la molecola fluorescente è eccitata ad uno stato energetico superiore. Nel ritorno al loro stato basale, il fluorocromo emette energia luminosa.

Segnali di Fluorescenza



CD3

Occhio agli assi!



La citofluorimetria è multiparametrica



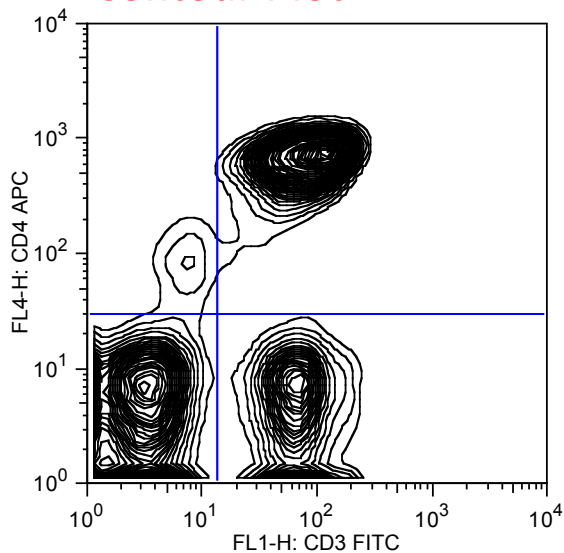
FCS: Grandezza

SSC: Complessità

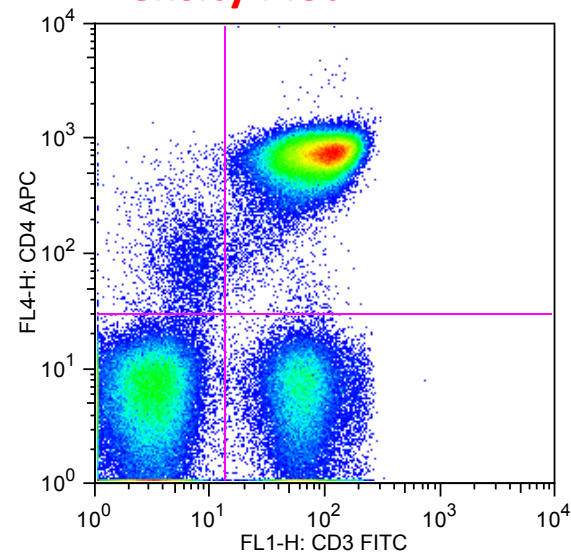
FL: Intensità Fluorescenza

Plot Types

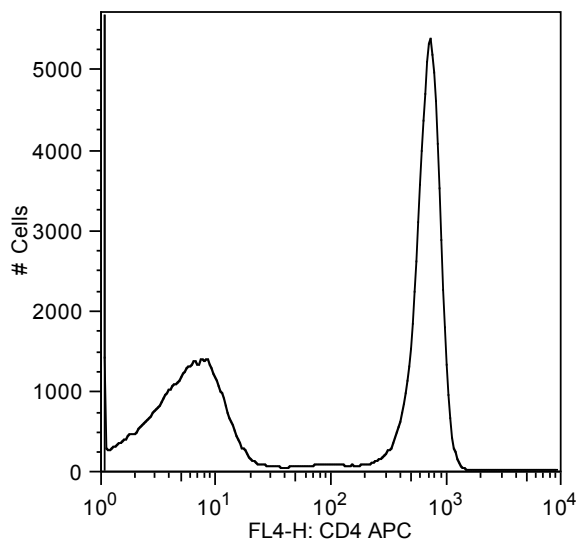
Contour Plot



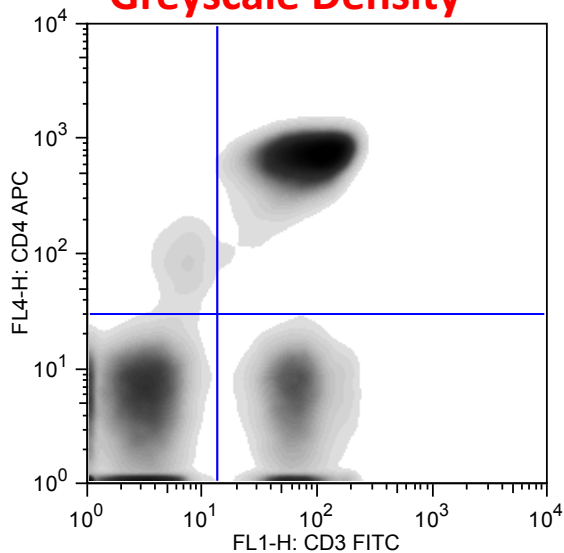
Density Plot



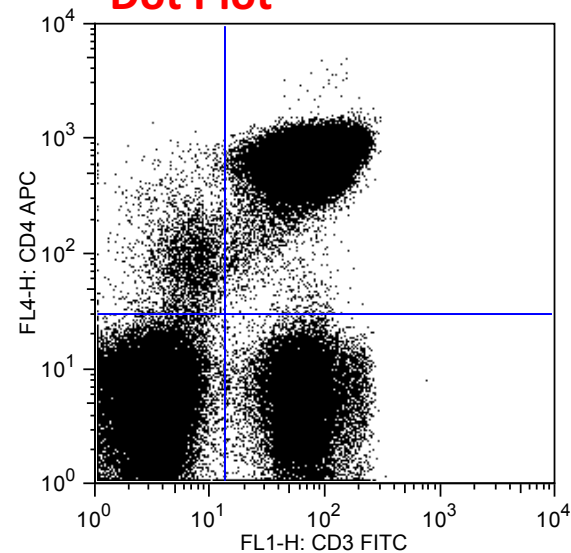
Histogram



Greyscale Density



Dot Plot



Workflow Immunofenotipo

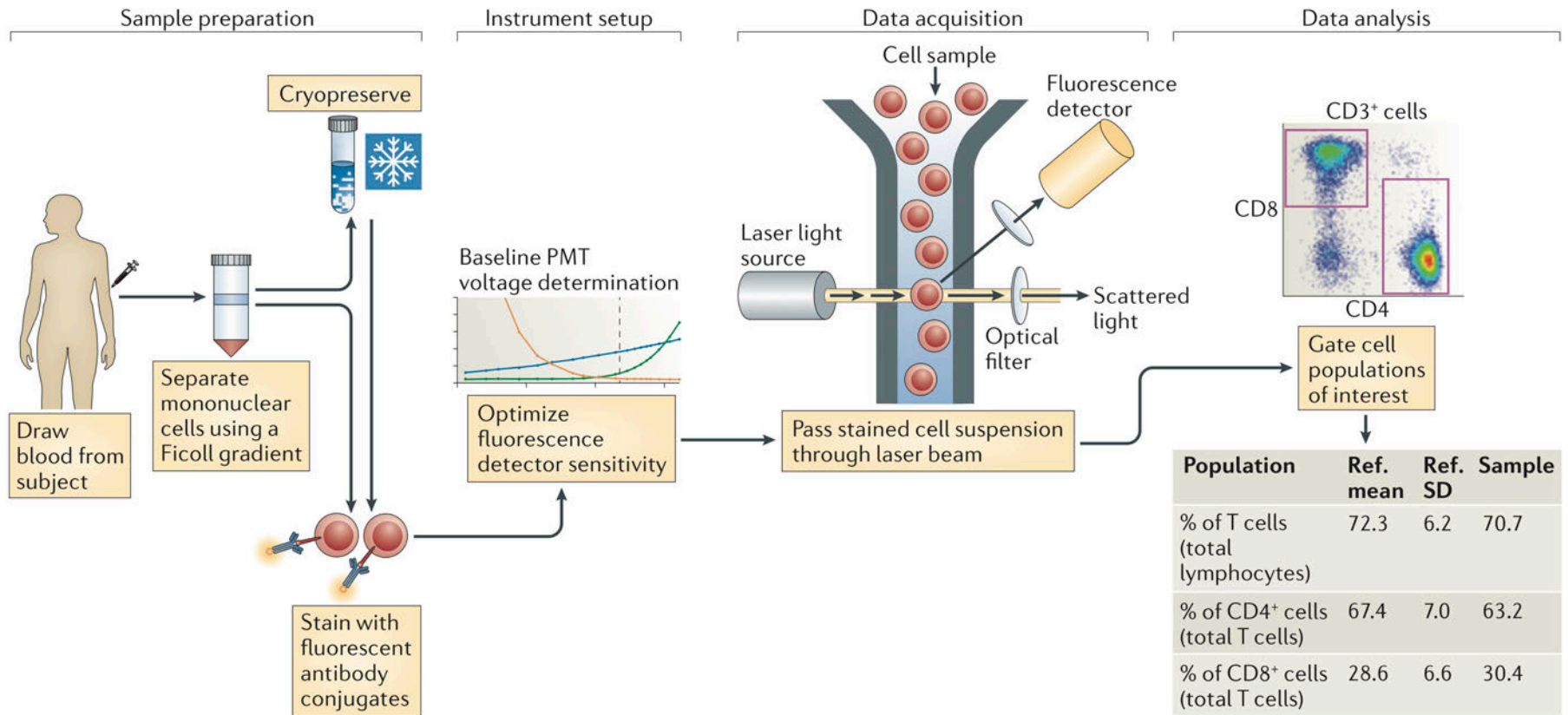


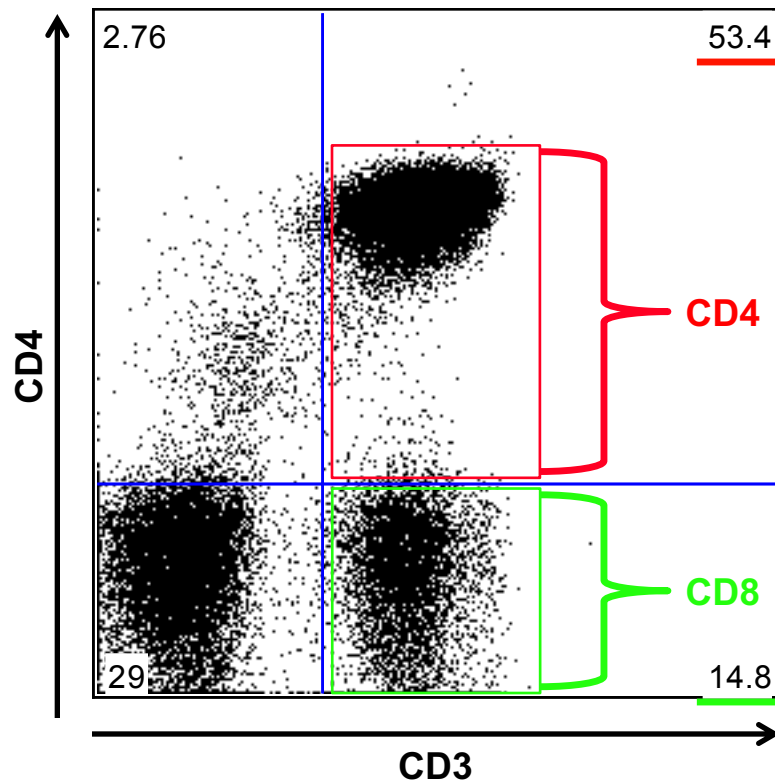
Figure 1 | **A typical flow cytometry experiment.** Sample preparation from blood often involves Ficoll gradient separation of mononuclear cells, and sometimes cryopreservation, before staining with fluorescent antibody conjugates. Each of these steps can introduce variability in the assay results. Instrument setup involves setting voltage gains for the photomultiplier tubes (PMTs) so as to achieve optimal sensitivity. To the extent that this is not standardized, it becomes a source of variability as well. Data acquisition involves passing the stained cells through a laser beam and recording the fluorescence emission from all of the bound antibody conjugates. Here, the main variable is the type of instrument, including the lasers and optical filters used. This is followed by data analysis, in which cell populations of interest are defined and reported on, which is another significant source of variation. Ref., reference; SD, standard deviation.

Esempi di analisi

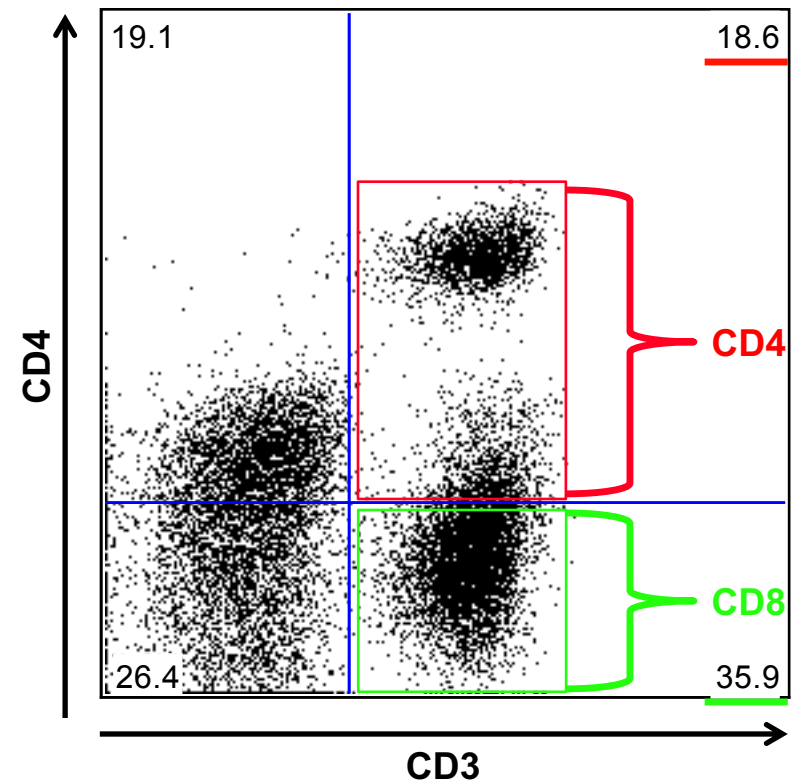
DIAGNOSI PAZIENTI CON HIV

Le cellule che esprimono la molecola CD4 sono infettate dal virus e muoiono. Quindi nei pazienti con infezione in corso le cellule CD4 saranno diminuite in percentuale.

DONATORE SANO
Rapporto CD4/CD8=3,6



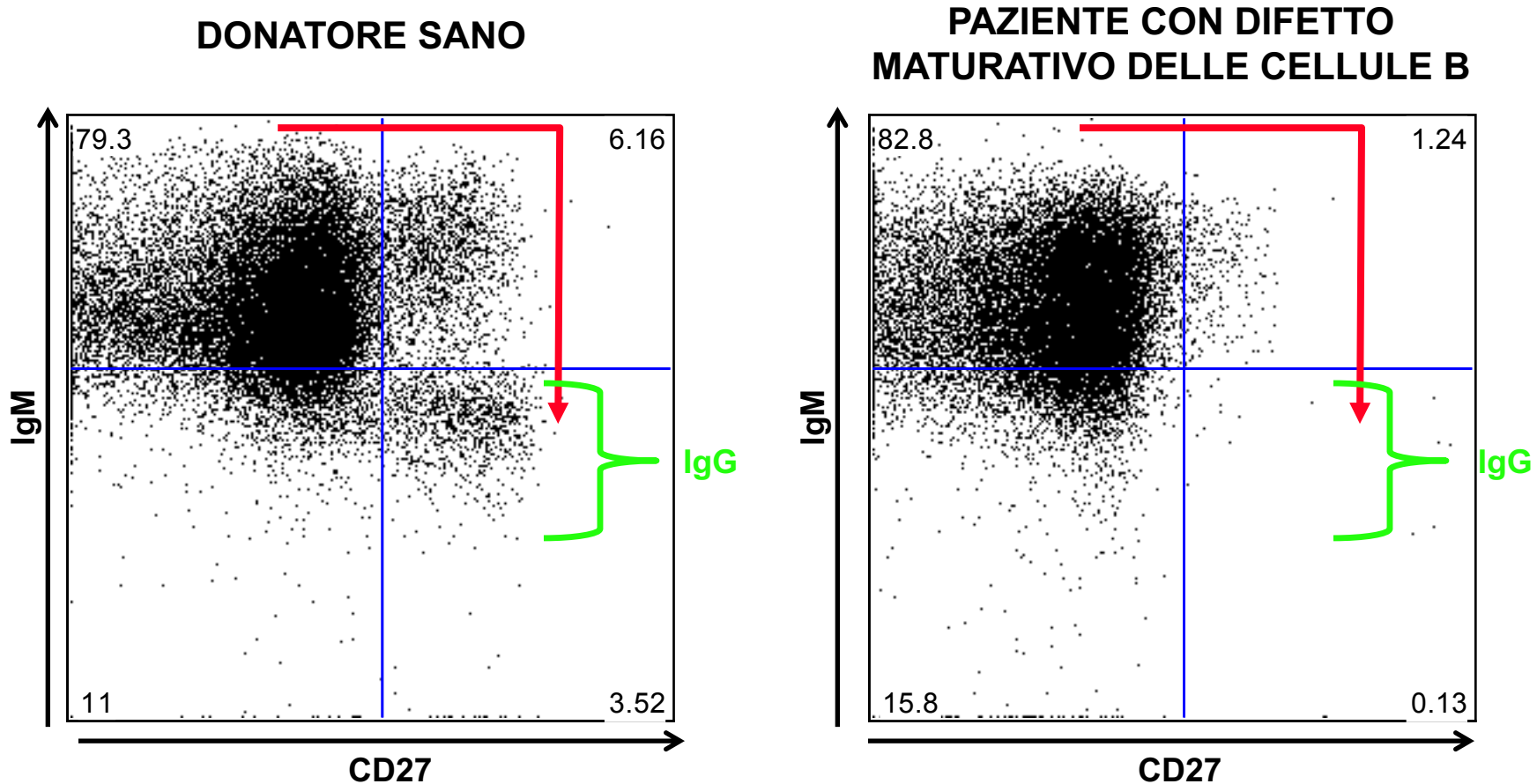
PAZIENTE HIV
Rapporto CD4/CD8=0,5



Esempi di analisi

Indagine in paziente con infezioni ricorrenti con sospetto difetto anticorpale

Dopo l'incontro con l'antigene le cellule B acquisiscono il marcatore CD27 e perdono dalla superficie l'IgM.

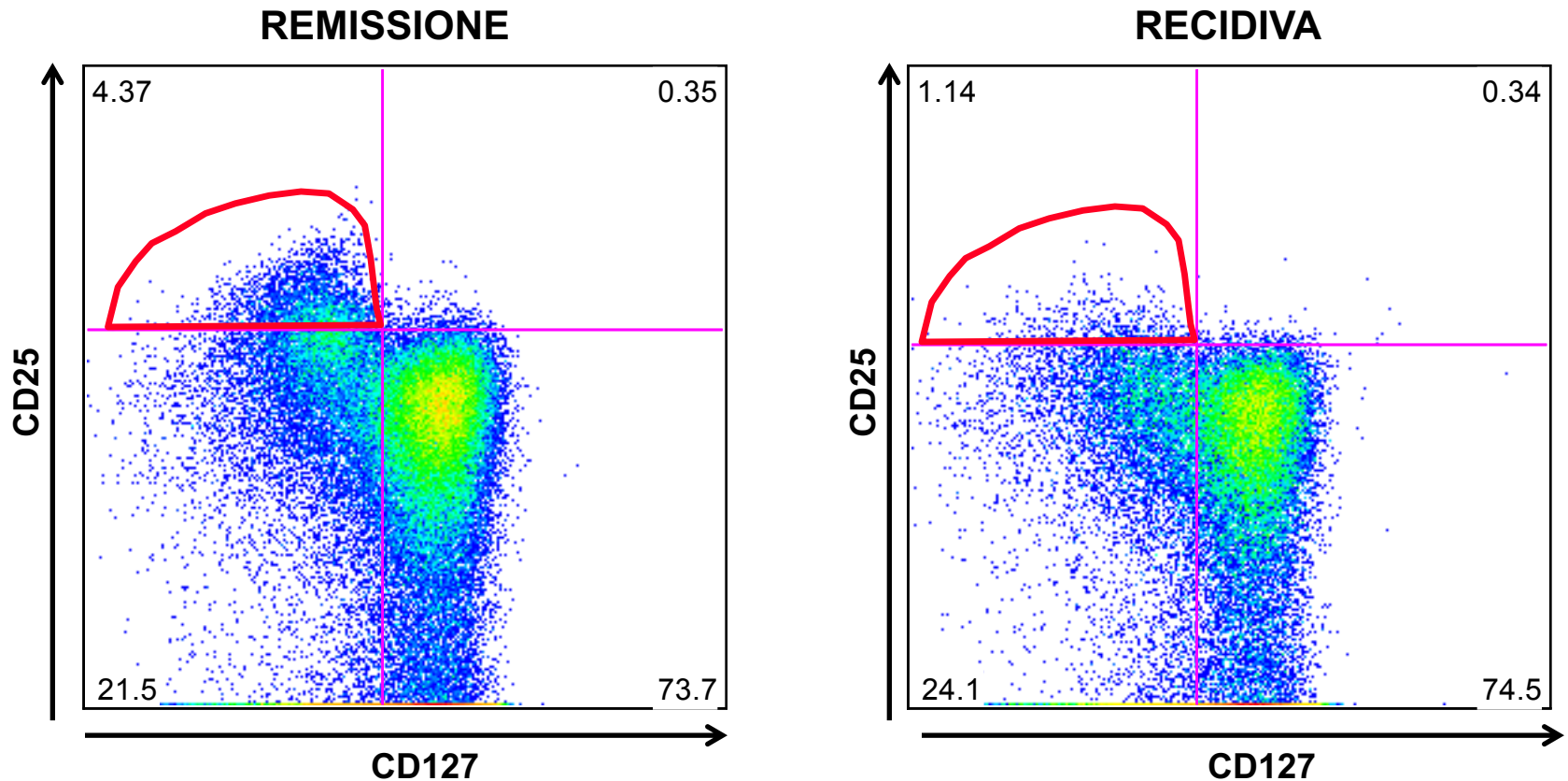


Esempi di analisi

Indagine in pazienti con malattie autoimmuni per indagare le cellule regolatorie

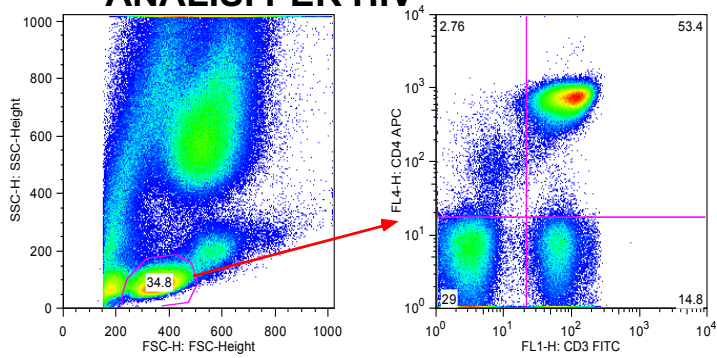
Le cellule T regolatorie mantengono l'omeostasi del sistema immunitario

Esempio Paziente con Sclerosi Multipla

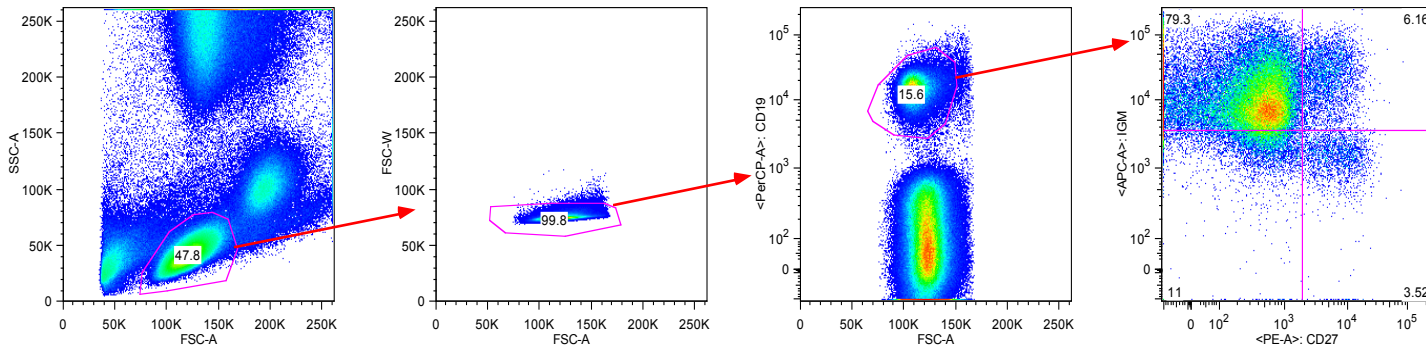


Esempi di analisi progressive in citofluorimetria

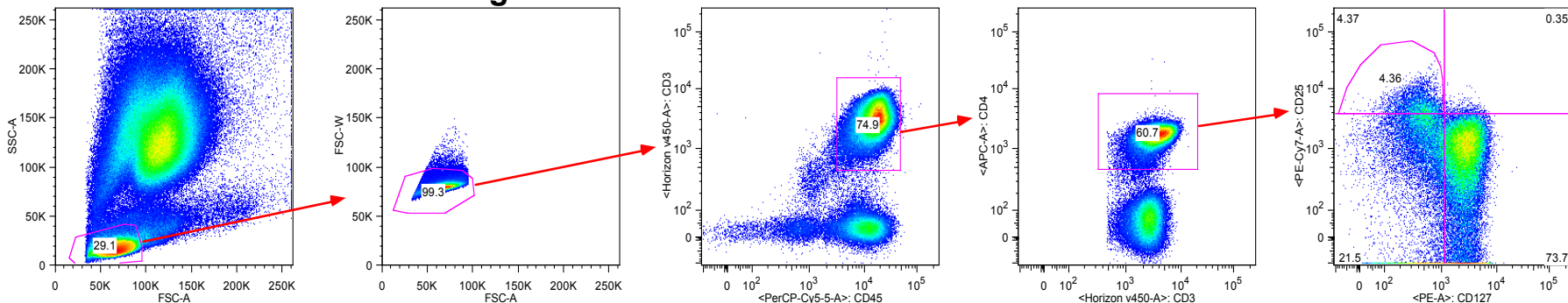
* ANALISI PER HIV



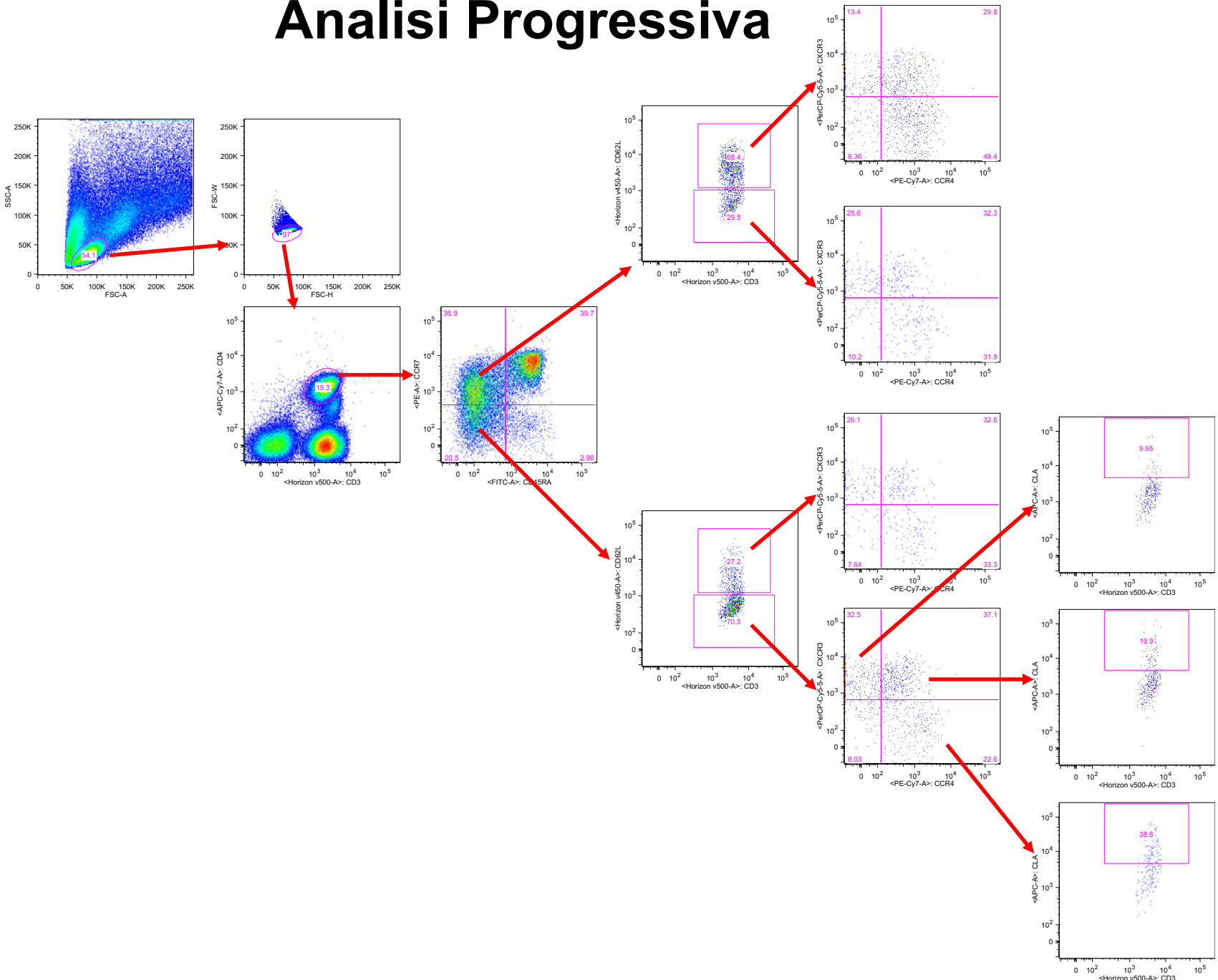
* ANALISI PER CONFERMA DI IMMUNODEFICIENZA B



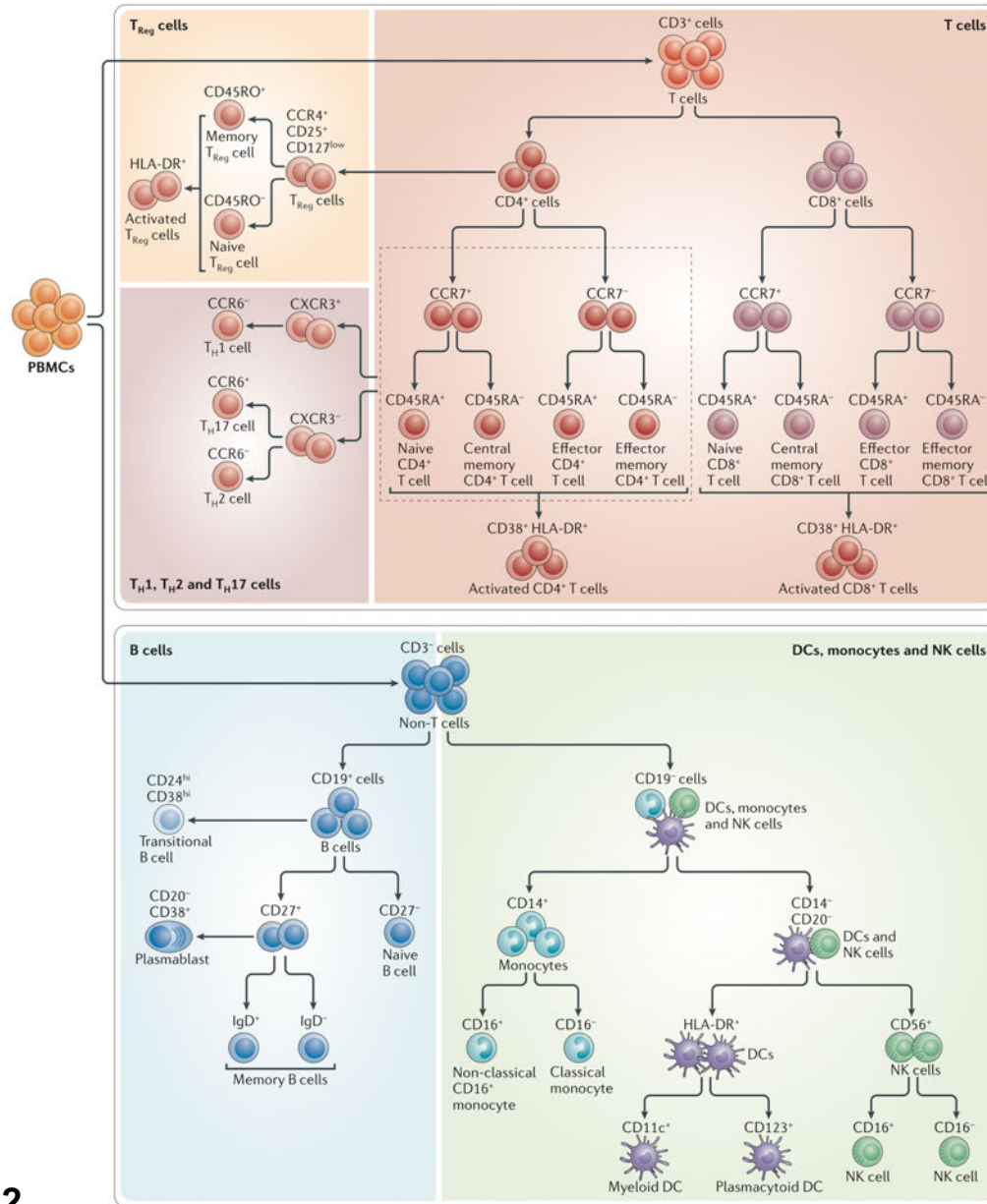
* ANALISI PER STUDIO Treg



Analisi Progressiva



Identificazione di subsets cellulari



Maecker et al. 2012,
Nature Reviews Immunology 12, pages 191–200

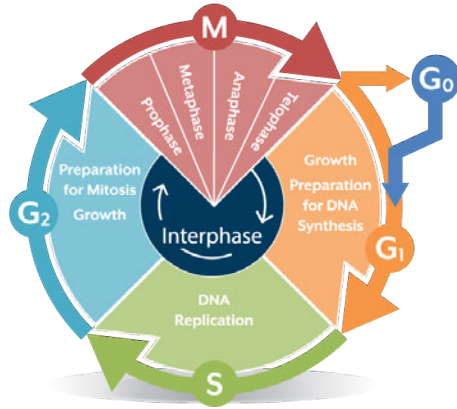
Applicazioni della citofluorimetria

- Analisi Multicolore:
 - Immunofenotipo (es: CD, recettori, molecole di adesione)
 - Intracellular staining: espressione citochine, phospo flow
- **Ciclo cellulare**
- Proliferazione
- Apoptosi
- Cell Sorting

Analisi Ciclo Cellulare

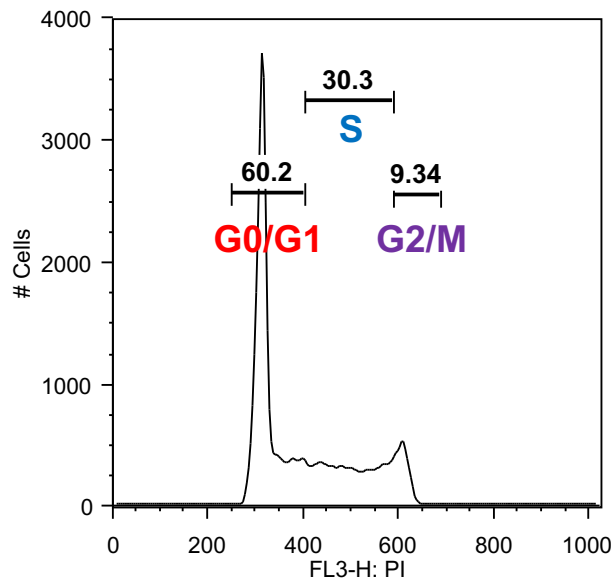
L'analisi del ciclo cellulare tramite la quantificazione del DNA è stata una delle prime applicazioni della citofluorimetria a flusso.

Utilizzato colorante che lega stechiometricamente il DNA: Ioduro di Propidio (PI).

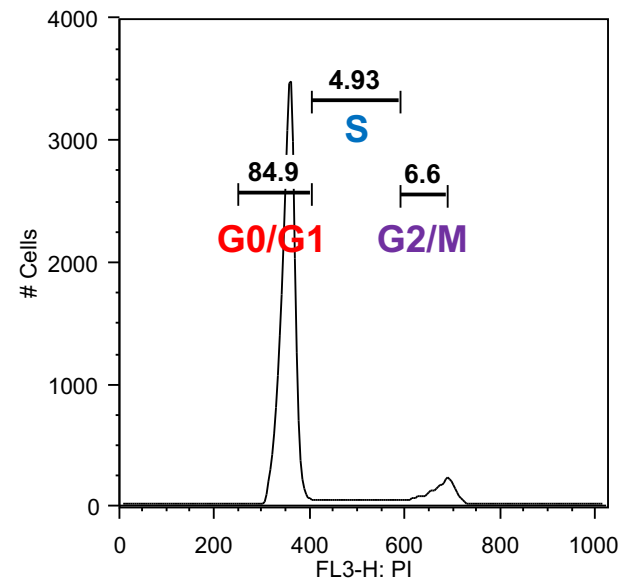


- Il contenuto di DNA aumenta con il procedere delle fasi da G1 a M.
- Cellule in fase S hanno più DNA di quelle in G1. Prenderanno proporzionalmente più colorante.
- Le cellule in fase G2 saranno il doppio più brillanti rispetto quelle in G1.

EHEB 24h non trattate



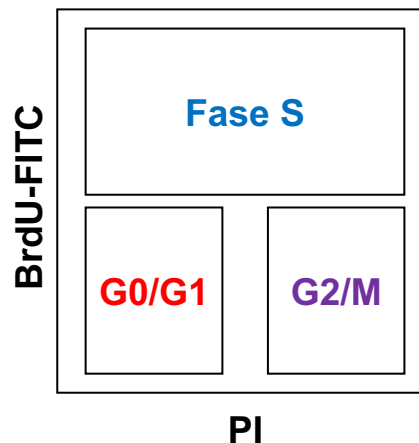
EHEB 24h + Nutlin 10uM



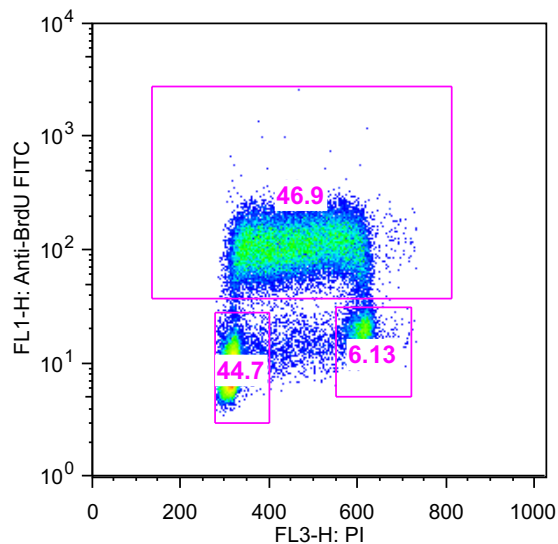
Analisi Ciclo Cellulare: Incorporazione della BrdU

Le cellule sono pulsate con Bromodeossiuridina (BrdU).
La BrdU sarà rilevata con anticorpi anti-BrdU.

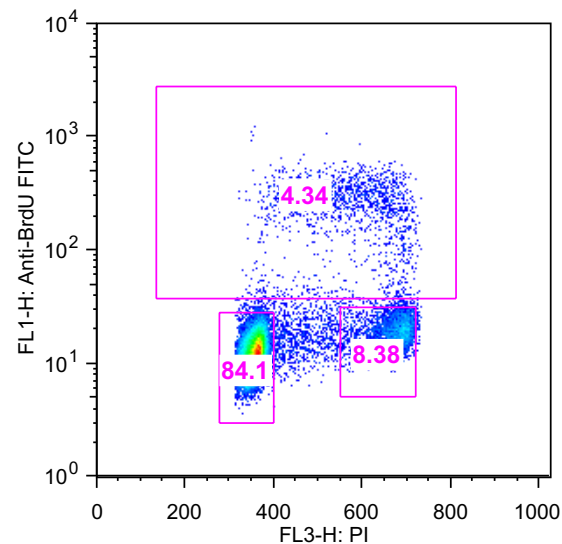
- Una limitazione della colorazione in singola del DNA è l'impossibilità di determinare se le cellule stanno ciclando o meno
- Le cellule in fase S incorporano BrdU, al contrario di quelle in fase G1 e G2



EHEB 24h non trattate



EHEB 24h + Nutlin 10uM

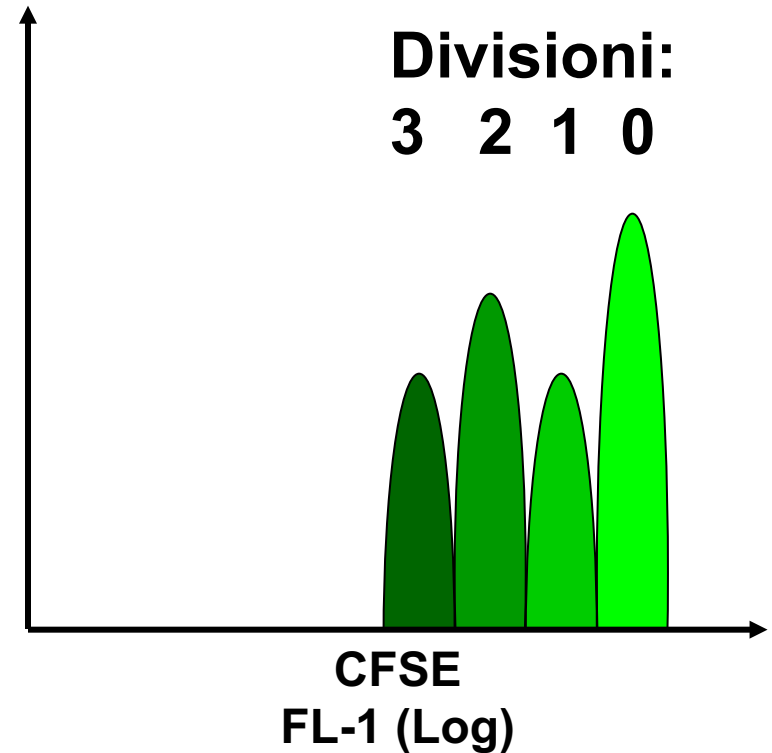
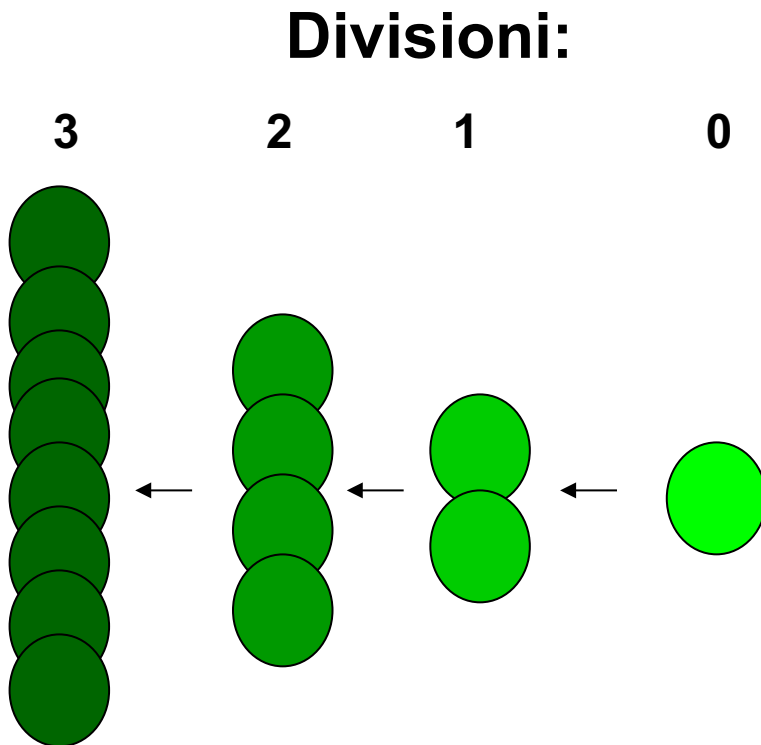


Applicazioni della citofluorimetria

- Analisi Multicolore:
 - Immunofenotipo (es: CD, recettori, molecole di adesione)
 - Intracellular staining: espressione citochine, phospo flow
- Ciclo cellulare
- **Proliferazione**
- Apoptosi
- Cell Sorting

Proliferazione cellulare

- Estere succinimmidico della carbossifluoresceina (CFSE) è reso fluorescente dalle esterasi all'interno della cellula.
- Si diluisce con le divisioni cellulari

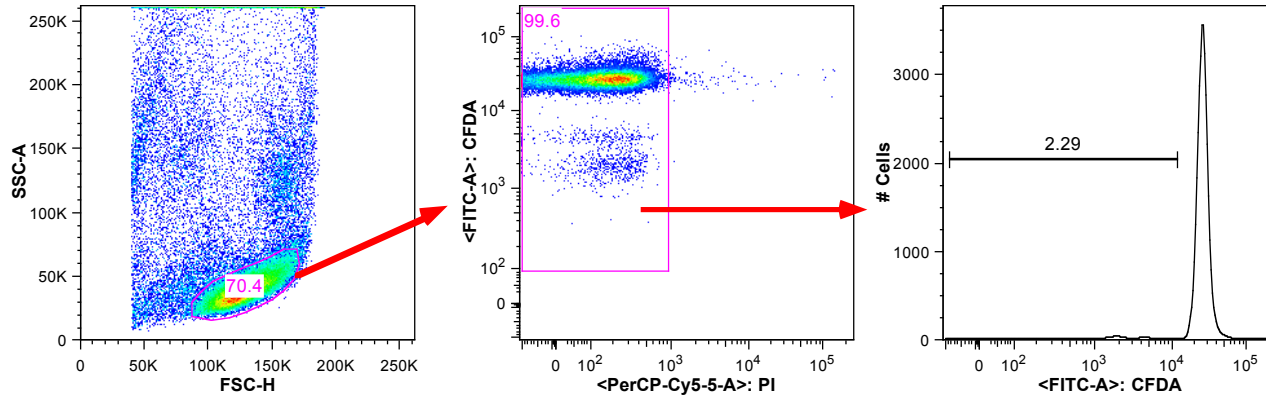


Lyons and Parish, 1994
JIM, 171;131

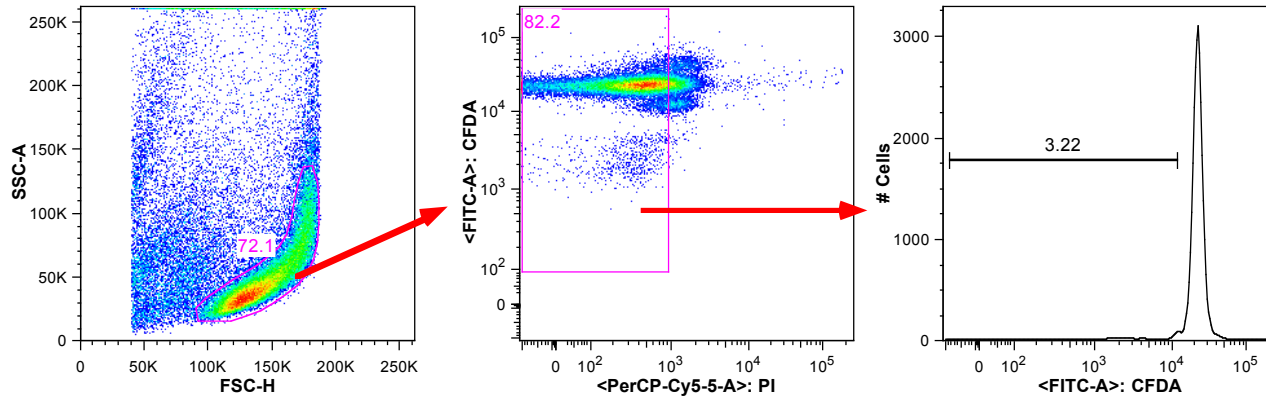
Proliferazione cellulare

PBMC + PHA 5ug/ml

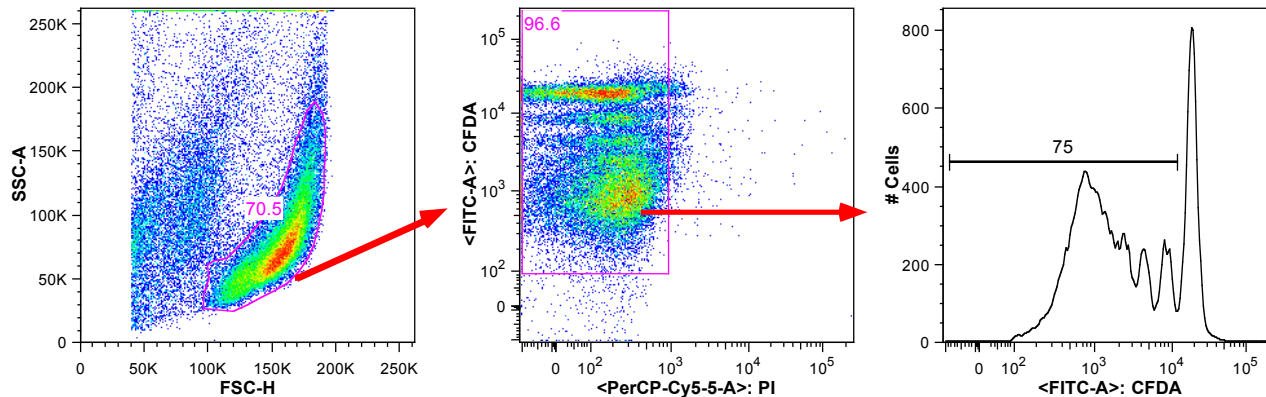
Giorno 1



Giorno 2



Giorno 5



Applicazioni della citofluorimetria

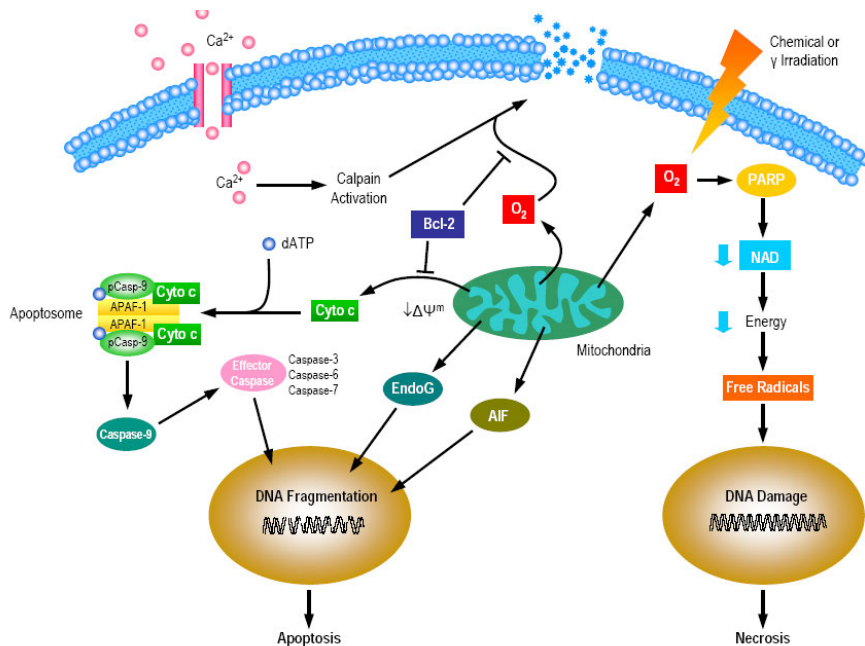
- Analisi Multicolore:
 - Immunofenotipo (es: CD, recettori, molecole di adesione)
 - Intracellular staining: espressione citochine, phospo flow
- Ciclo cellulare
- Proliferazione
- **Apoptosi**
- Cell Sorting

Analisi Apoptosi/Necrosi

Processo apoptotico è processo di morte cellulare programmato.

Avviene fisiologicamente durante la crescita tissutale e in risposta ad un trauma.

Cellule tumorali evadono l'apoptosi.



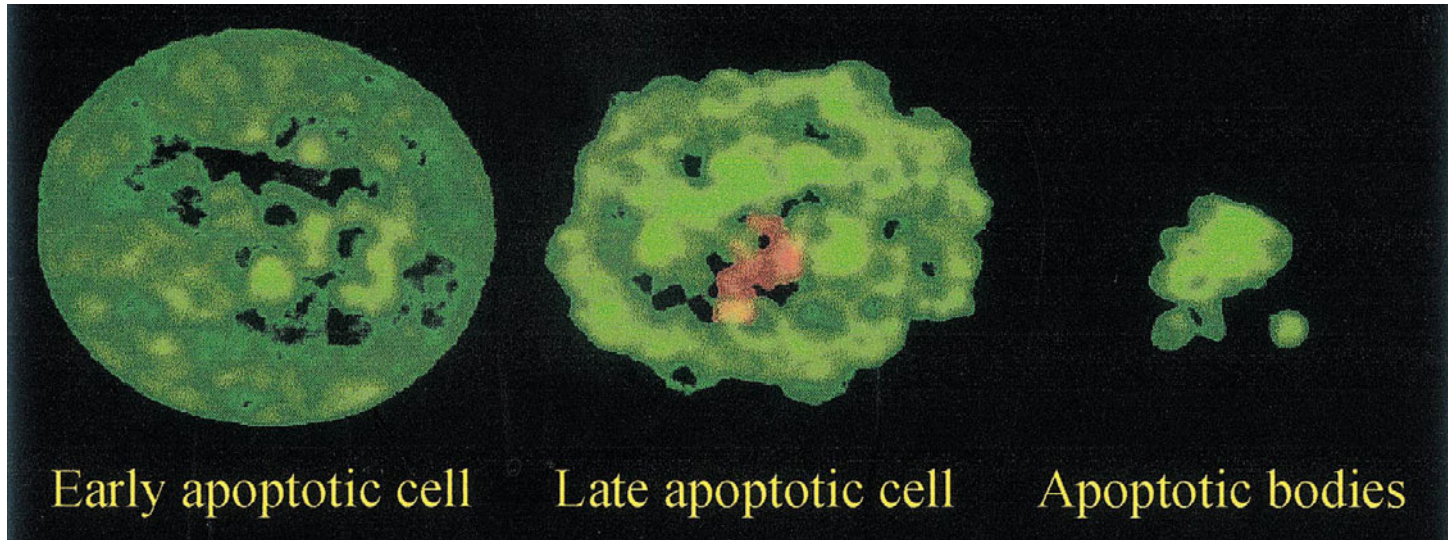
Apoptosi risulta in differenti eventi cellulari visualizzabili tramite FACS:

- Alterazione delle funzioni mitocondriali (Mitotracker Red, JC1)
- Attivazione delle caspasi
- Fragmentazione del DNA (analisi del picco subG1)
- Alterazione della continuità di membrana (AnnexinV/PI)

Apoptosi: modifica della morfologia cellulare

L'apoptosi comporta una diminuzione della grandezza cellulare e un aumento delle inclusioni interne.

Vista in microscopia confocale. Cellule Jurkat trattate con anti-Fas.

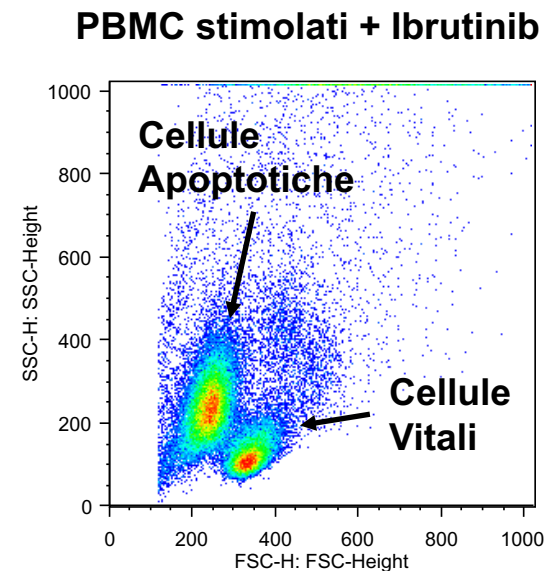
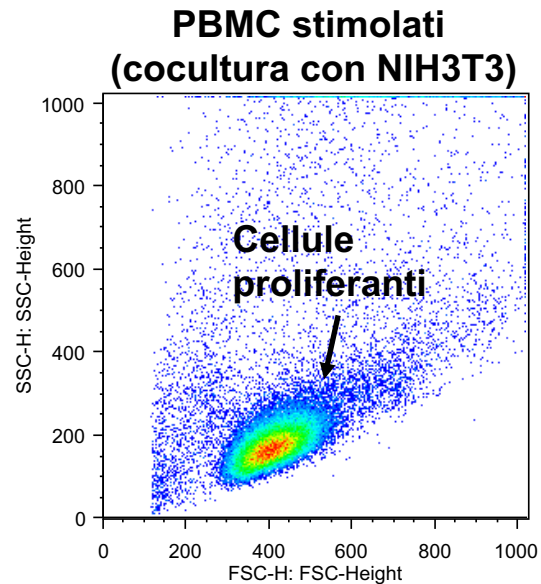
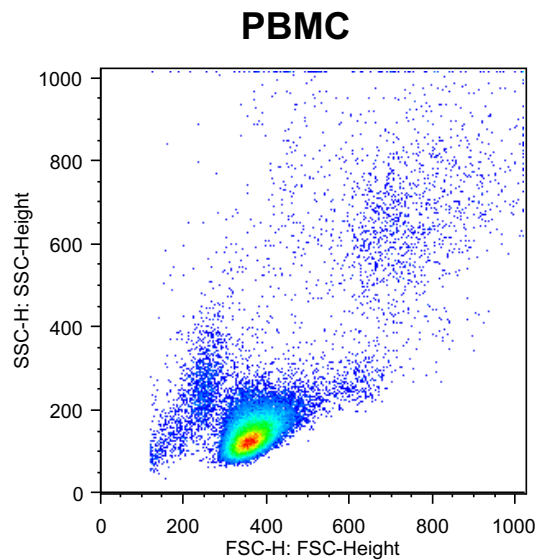


Vermes et al., 2000
JIM, 243 (2000) 167–190

Apoptosi: modifica della morfologia cellulare

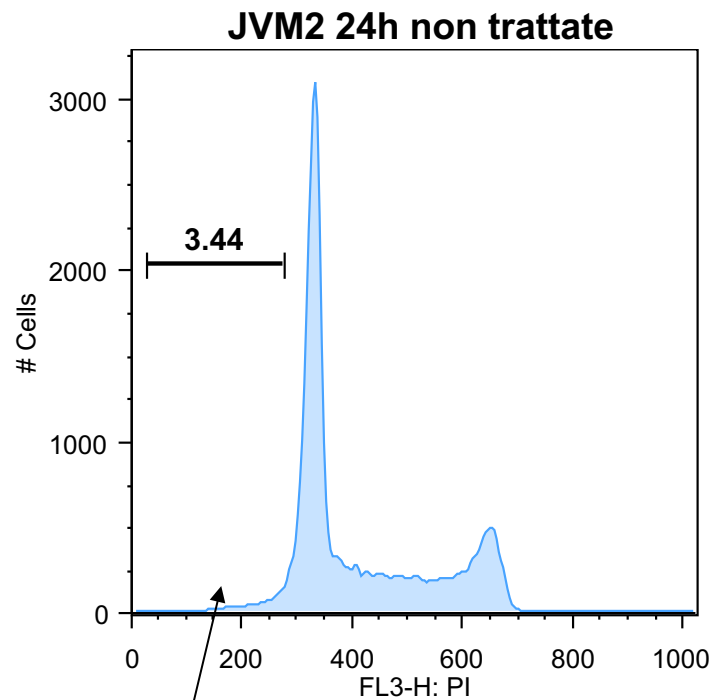
L'apoptosi comporta una diminuzione della grandezza cellulare e un aumento delle inclusioni interne.

Esempio: cellule di paziente con leucemia

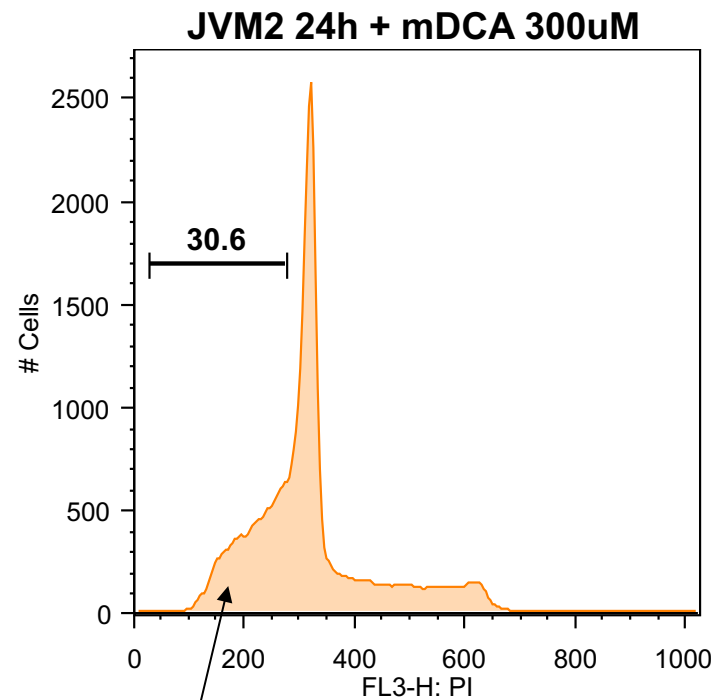


Apoptosi: analisi del picco Sub G1

La frammentazione del DNA può essere rilevata tramite il PI.
Si nota una popolazione a sinistra del picco G1.



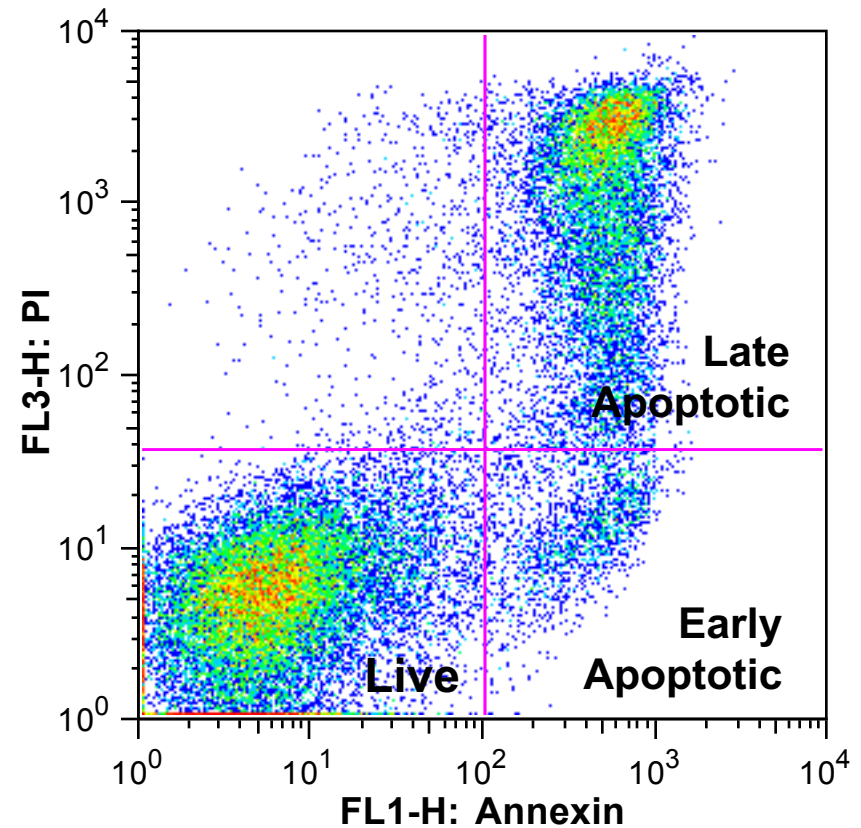
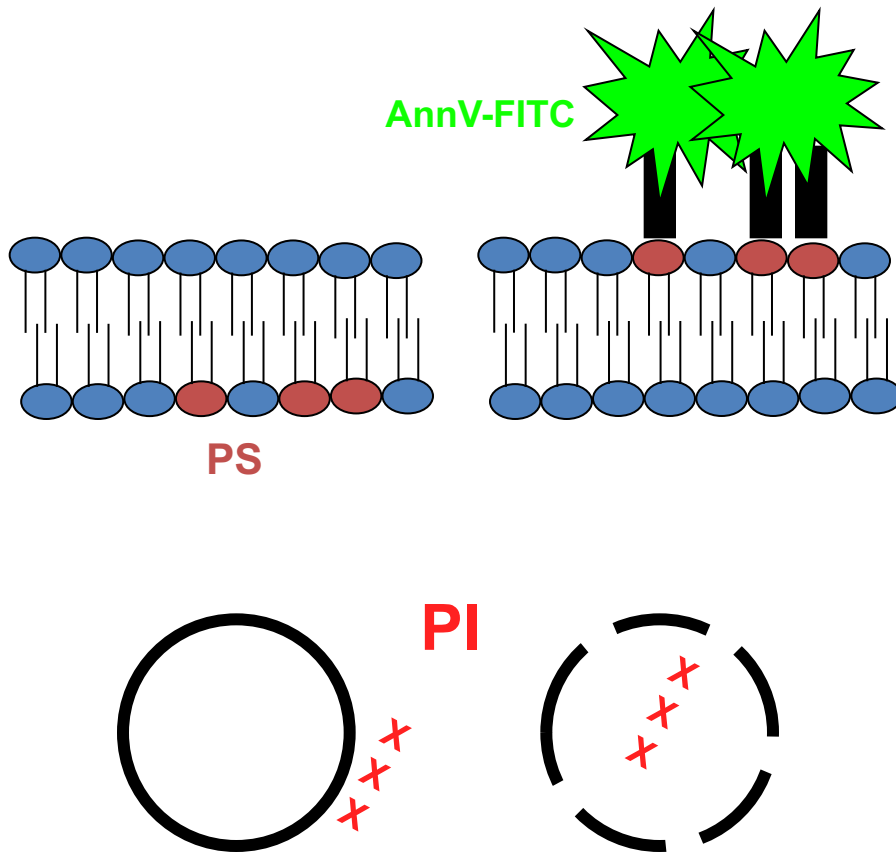
Picco Sub-G1



Picco Sub-G1

Apoptosi: saggio Annessina V/PI

- Fosfatidilserina (PS) è nel foglietto interno della membrana citoplasmatica
- AnnV può legare la PS esternalizzata dalle cellule apoptotiche
- PI entrerà nelle cellule con membrana compromessa (apoptotiche o necrotiche)



Apoptosi: Analisi degli organelli ed enzimi

Il potenziale di membrana mitocondriale e le attività enzimatiche si modificano parallelamente agli eventi cellulari

Si possono utilizzare molecole affini ai mitocondri per valutarne la depolarizzazione durante l'apoptosi:

- Mitotracker Red CMXRos
- JC1

Molecole reattive con gli enzimi intracellulari:

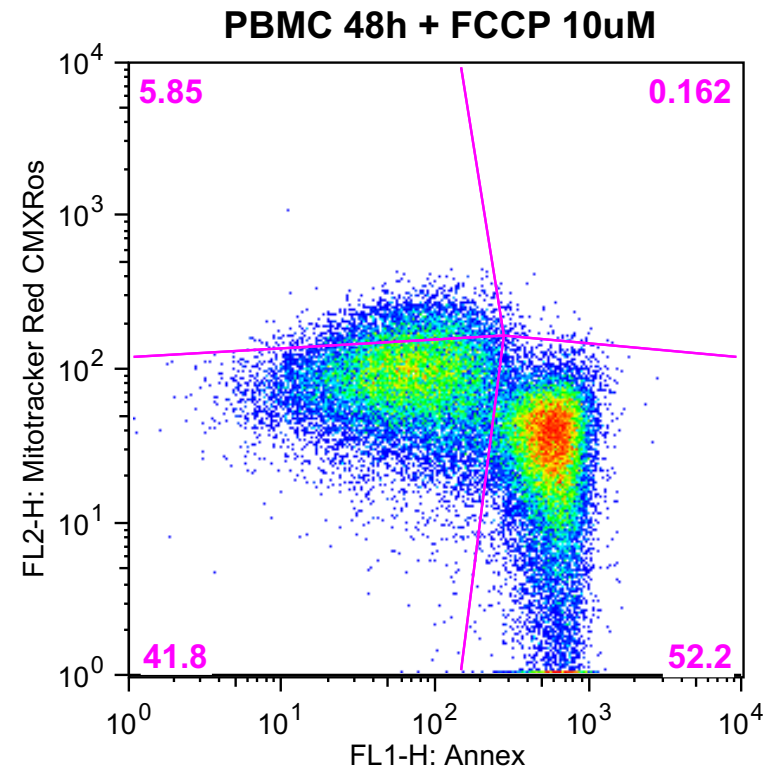
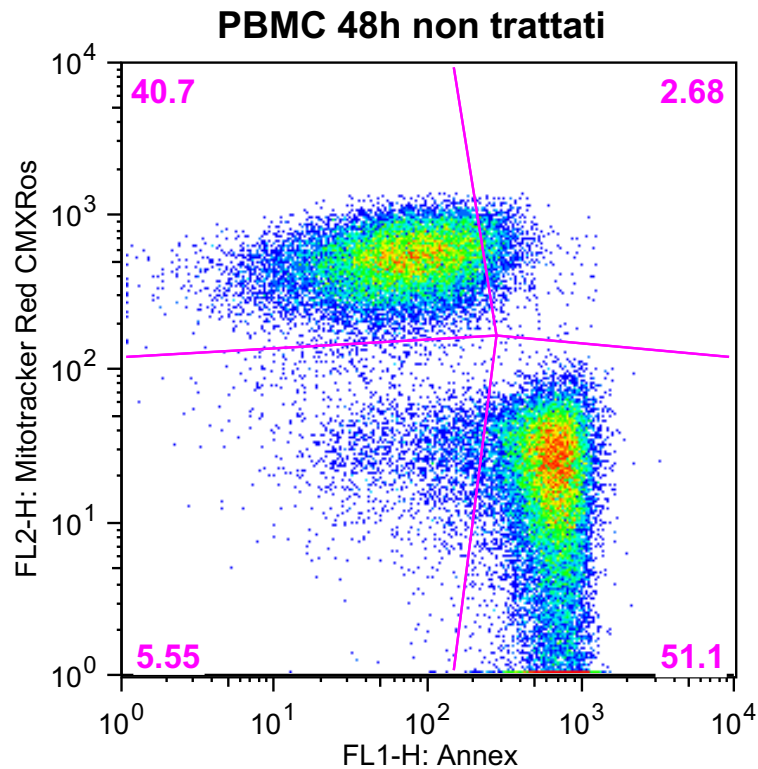
- Calcein-AM convertita in molecola fluorescente dalle esterasi
- Z-VAD FITC lega le caspasi attive

La combinazione di queste molecole permette una maggiore definizione dei processi intracellulari, durante l'apoptosi, rispetto l'utilizzo di annessinaV/PI

Apoptosi: Mitotracker

Mitotracker Red, molecola lipofila, colora i mitocondri in funzione del loro potenziale.

La diminuzione dell'intensità di fluorescenza indica una riduzione dell'attività mitocondriale.



(FCCP) carbonil cianuro-p-trifluorometossifenil idrazone

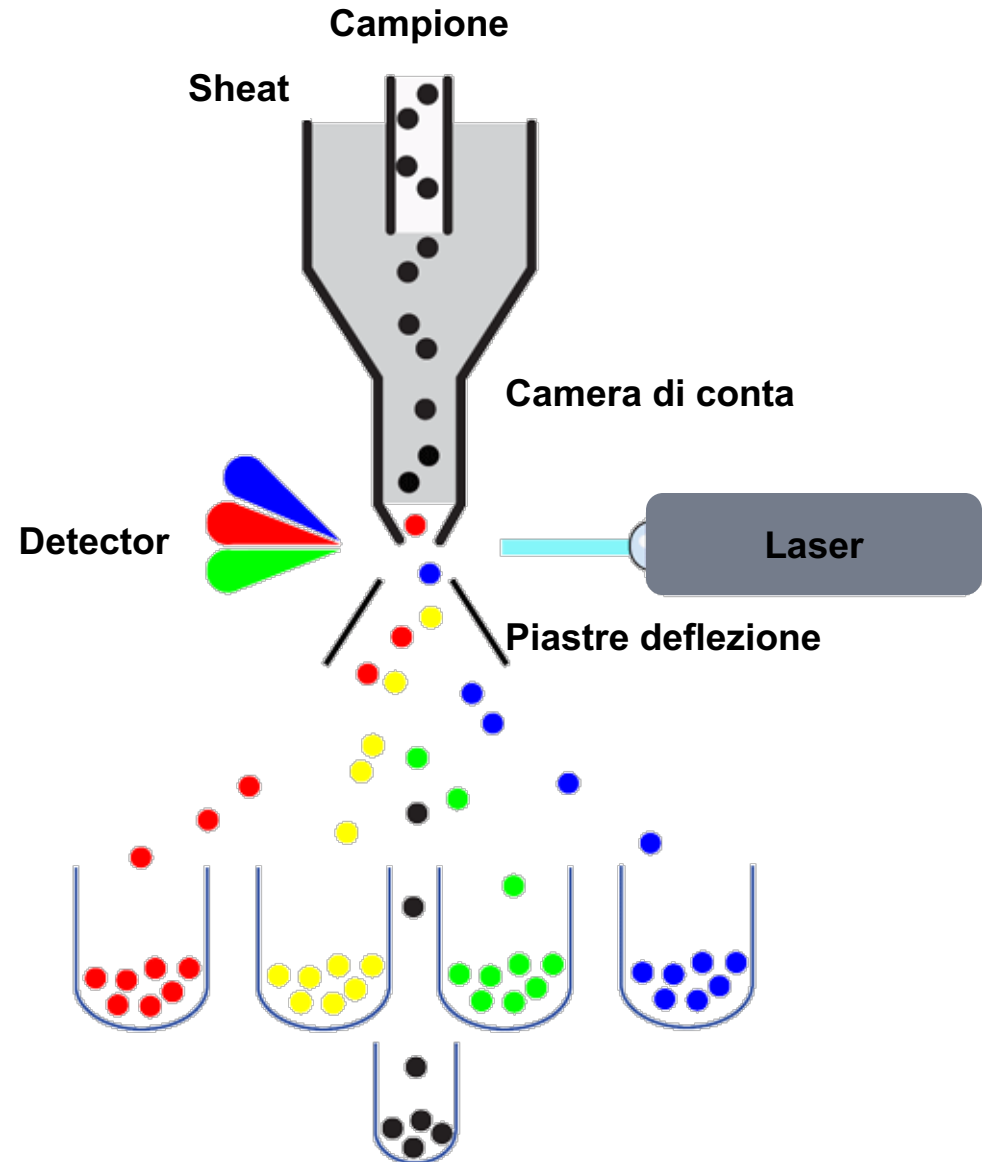
Alternativa: JC1

Applicazioni della citofluorimetria

- Analisi Multicolore:
 - Immunofenotipo (es: CD, recettori, molecole di adesione)
 - Intracellular staining: espressione citochine, phospo flow
- Ciclo cellulare
- Proliferazione
- Apoptosi
- **Cell Sorting**

Cell Sorting

- Recupero di cellule vitali da popolazioni eterogenee (sangue, colture cellulari...)
- Permette di recuperare singoli cloni da esperimenti di trasfezione
- Avere una purezza >95%



Cell Sorting

