



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

Ειδικές μέθοδοι ανάλυσης κυτταρικών διεργασιών Κυτταρομετρία Ροής

Έλενα Κουιμτζόγλου
Τμήμα Βιολογίας



<http://www.exetasis.gr/kittarometritis>

Κυτταρομετρία ροής είναι μια διαδικασία μέτρησης κυττάρων σε ένα δείγμα που «ρέει».

Αποτελεί μια αυτοματοποιημένη τεχνική.

Συνδυάζοντας τη σκέδαση και το φθορισμό μπορεί να κάνει

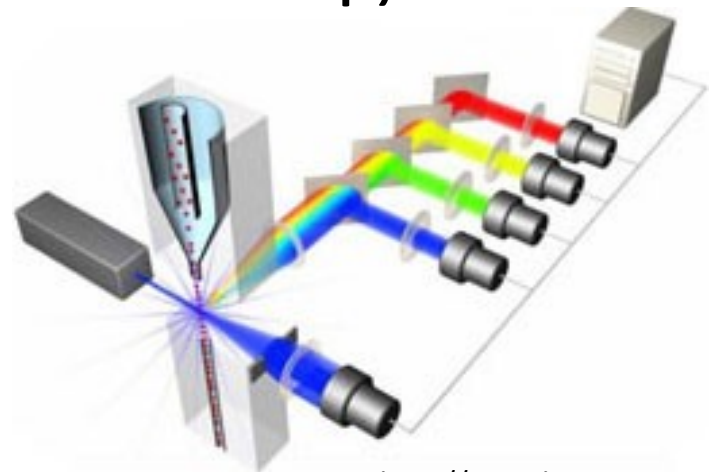
- ποσοτικοποίηση κυτταρικών πληθυσμών
- ανάλυση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των κυττάρων
- ανάλυση κυτταρικών λειτουργιών και αλληλεπιδράσεων

! Το δείγμα πρέπει να είναι σε μορφή εναιωρήματος.

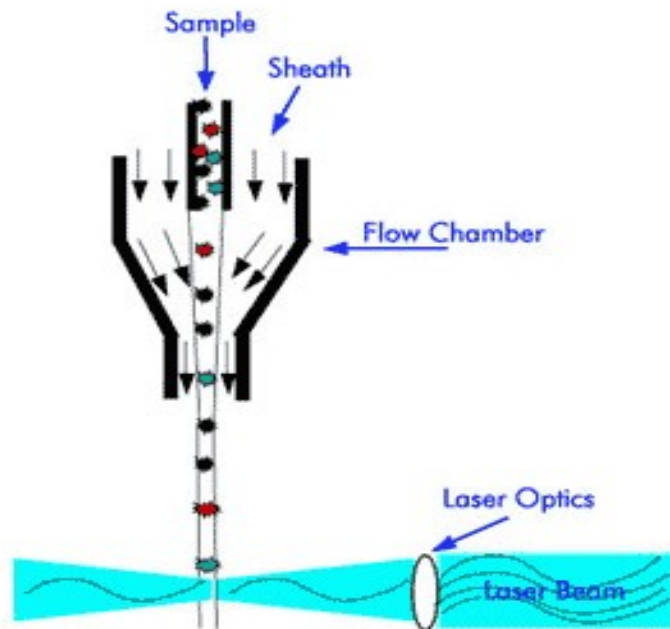
Ο κυτταρομετρητής ροής μπορεί να κάνει:
ανάλυση μεγάλου αριθμού κυττάρων
να ανιχνεύσει πολύ μικρό αριθμό κυττάρων, καθώς
και να ανιχνεύσει κυτταρικούς υποπληθυσμούς σε
μικρό χρόνο.

Αποτελείται από:

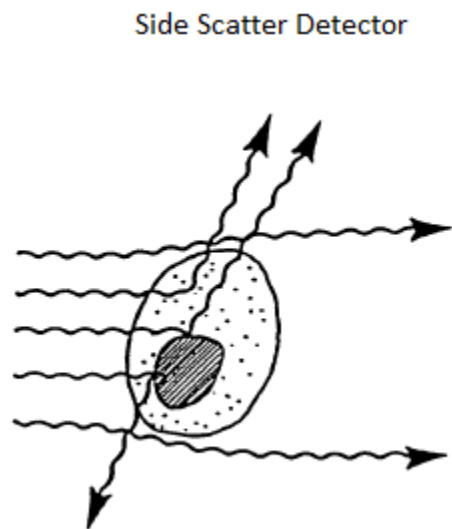
- i. Το υδροδυναμικό σύστημα ροής
- ii. Το οπτικό σύστημα
- iii. Το ηλεκτρονικό σύστημα ανάλυσης δεδομένων



Το υδροδυναμικό σύστημα αποτελείται από την κυψελίδα ροής, μέσα από την οποία περνάει το κυτταρικό εναιώρημα περιβαλλόμενο από ένα αδρανές ρυθμιστικό διάλυμα (sheath fluid). Έτσι, επιτυγχάνεται η ροή των κυττάρων σε **μονήρη διάταξη**.



Το οπτικό σύστημα αποτελείται από ακτινοβολία laser, από φίλτρα που διαχωρίζουν το φάσμα της ακτινοβολίας, και φωτοπολλαπλασιαστές που συλλέγουν τα φωτεινά σήματα.



πρόσθια σκέδαση

(forward scatter) σκέδαση ανάλογα με το μέγεθος των κυττάρων

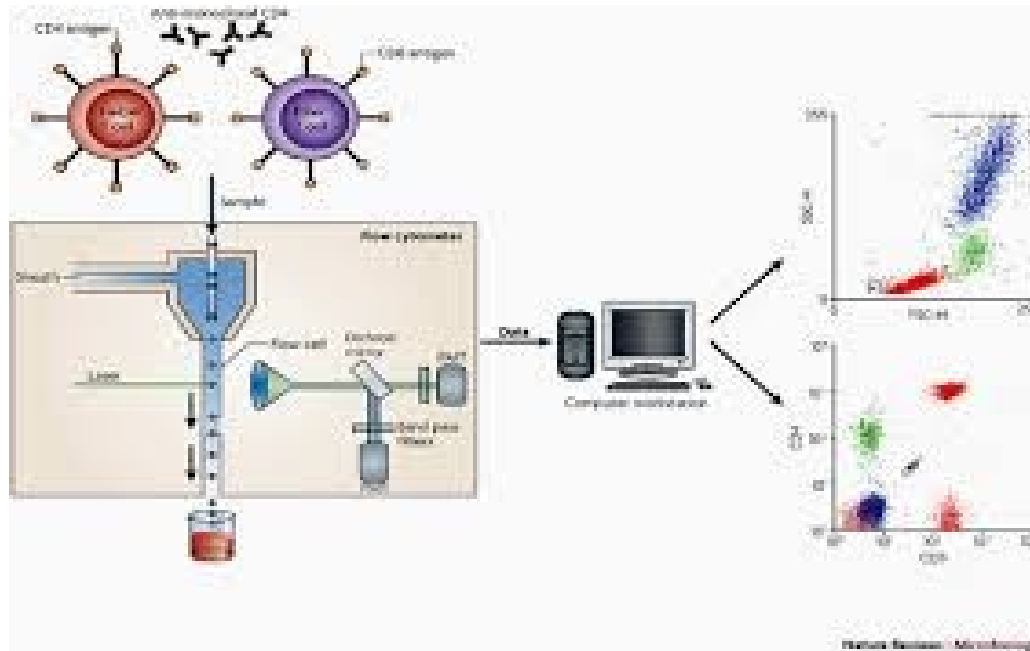
πλάγια σκέδαση (side scatter)

σκέδαση ανάλογα με την ενδοκυττάρια πολυπλοκότητα, π.χ. κοκκιότητα

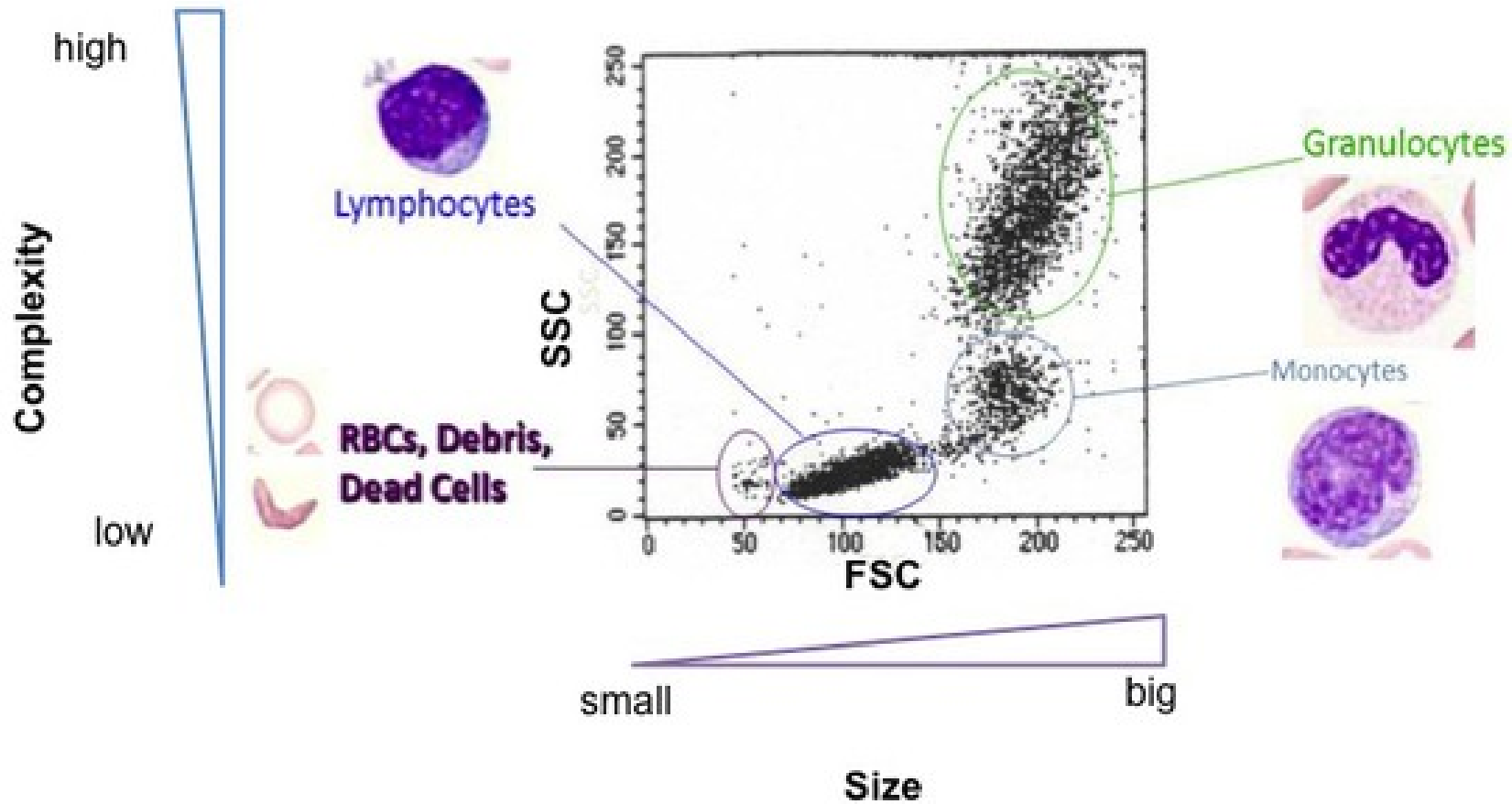
<http://www.labome.com/method/Flow-Cytometry-A-Survey-and-the-Basics.html>

Χρησιμοποιούνται **φθορίζουσες ουσίες** που επιλέγονται ανάλογα με το είδος του κυτταρικού πληθυσμού που εξετάζεται. Ο συνδυασμός **σκεδαζόμενου φωτός** και **φθορισμού** συλλέγεται από τους φωτοανιχνευτές.

Το **ηλεκτρονικό σύστημα** ανάλυσης δεδομένων περιλαμβάνει τη μετατροπή των φωτεινών σημάτων σε δεδομένα, τα οποία στη συνέχεια αναλύονται από τον ηλεκτρονικό υπολογιστή του οργάνου.



<http://www.aids.org.gr/pdfs/26aids/tsalimalma.pdf>



<http://www.backbonebiology.com/flow-cytometry>

Εξωτερικός ανοσοφθορισμός

Επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός κυττάρων σε υποπληθυσμούς σύμφωνα με την παρουσία συγκεκριμένων μεμβρανικών επιφανειακών πρωτεϊνών που φέρει ο καθένας

Η διάκριση επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικού μονοκλωνικού αντισώματος που προσδένεται/αναγνωρίζει σε μια συγκεκριμένη επιφανειακή πρωτεΐνη το οποίο είναι άμεσα ή μη συνδεδεμένο με μια φθορίζουσα ουσία όπως φλοουρεσκίνη (FITC) ή φυκοερυθρίνη (PE).

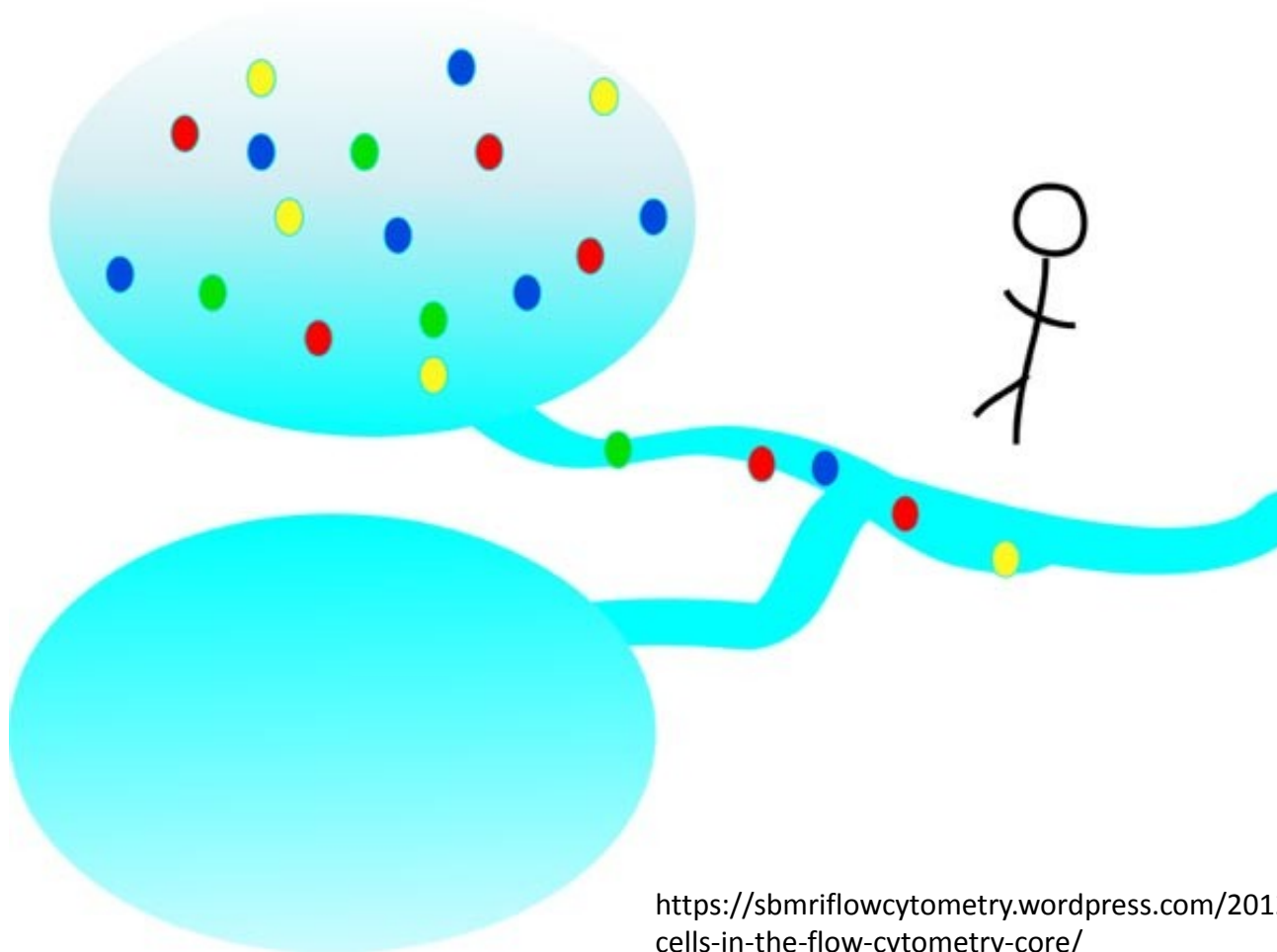
Αν το αρχικό αντίσωμα δεν είναι άμεσα συνδεδεμένο με τη φθορίζουσα ουσία, μια άλλη ανοσοσφαιρίνη (δεύτερο αντίσωμα) σημασμένη με FITC ή PE αναγνωρίζει το πρώτο αντίσωμα και συνεπώς τη μεμβρανική πρωτεΐνη.

Το πλεονέκτημα της χρήσης διαφορετικών
αντισωμάτων άμεσα συνδεδεμένων με διαφορετικές
φθορίζουσες ουσίες είναι η **ταυτόχρονη χρώση για**
δυο (διπλός φθορισμός) ή και περισσότερες
μεμβρανικές πρωτεΐνες στον ίδιο κυτταρικό
πληθυσμό.

Σκοπός του πειράματος

- Υπολογισμός του ποσοστού των μακροφάγων, Τ λεμφοκυττάρων, Β λεμφοκυττάρων και τάξης ΙΙ θετικών κυττάρων στην σπλήνα.

Σας ευχαριστώ!



<https://sbmriflowcytometry.wordpress.com/2012/08/30/counting-cells-in-the-flow-cytometry-core/>

Τέλος Ενότητας



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο Πανεπιστήμιο Κρήτης**» έχει χρηματοδοτήσει μόνο τη αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.



Σημειώματα

Σημείωμα αδειοδότησης

- Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά, Μη Εμπορική Χρήση, Όχι Παράγωγο Έργο 4.0 [1] ή μεταγενέστερη, Διεθνής Έκδοση. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων π.χ. φωτογραφίες, διαγράμματα κ.λ.π., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό και τα οποία αναφέρονται μαζί με τους όρους χρήσης τους στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».



[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

- Ως **Μη Εμπορική** ορίζεται η χρήση:
 - που δεν περιλαμβάνει άμεσο ή έμμεσο οικονομικό όφελος από την χρήση του έργου, για το διανομέα του έργου και αδειοδόχο
 - που δεν περιλαμβάνει οικονομική συναλλαγή ως προϋπόθεση για τη χρήση ή πρόσβαση στο έργο
 - που δεν προσπορίζει στο διανομέα του έργου και αδειοδόχο έμμεσο οικονομικό όφελος (π.χ. διαφημίσεις) από την προβολή του έργου σε διαδικτυακό τόπο
- Ο δικαιούχος μπορεί να παρέχει στον αδειοδόχο ξεχωριστή άδεια να χρησιμοποιεί το έργο για εμπορική χρήση, εφόσον αυτό του ζητηθεί.

Σημείωμα Αναφοράς

Copyright Πανεπιστήμιο Κρήτης, Έλενα Κουιμτζόγλου 2015. «Ειδικές μέθοδοι ανάλυσης κυτταρικών διεργασιών. Κυτταρομετρία Ροής».
Έκδοση: 1.0. Ηράκλειο 2015. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση:
<https://opencourses.uoc.gr/courses/course/view.php?id=366>

Διατήρηση Σημειωμάτων

Οποιαδήποτε αναπαραγωγή ή διασκευή του υλικού θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει:

- το Σημείωμα Αναφοράς
- το Σημείωμα Αδειοδότησης
- τη δήλωση Διατήρησης Σημειωμάτων
- το Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (εφόσον υπάρχει)

μαζί με τους συνοδευόμενους υπερσυνδέσμους.