Curso: Aspectos teóricos y aplicaciones de la citometría de flujo

Introducción teórica a la citometría de flujo.

Dra Irene Sales

Responsable Plataforma Citómica, Unitat d'Alta Tecnolgía (UAT), VHIR

Organitza: Vall d'Hebron Institut de Recerca VHIR

Participa: Vall d'Hebron Hospital, CRG, upf, Universitat de Barcelona, BD, PRBB Barcelona Biomedical Research Park, CCiTUB Centres Científics i Tecnològics Universitat de Barcelona

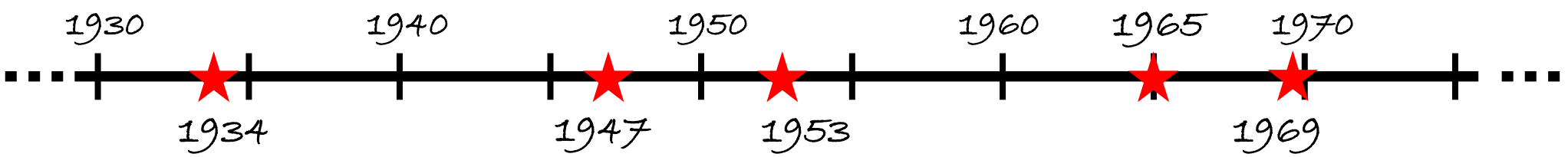
Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Qué es la Citometría de flujo?

La citometría es una técnica que permite medir simultáneamente múltiples características físicas y químicas de células o partículas en suspensión que atraviesan un haz de luz (laser), y ofrece la posibilidad de separar las células (sorting) en función de sus características.

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Historia de la citometría de flujo



Moldavan, Primer contador celular automatizado.

Gucker, Citómetro de flujo para detectar bacterias en aerosoles.

Crosland-Taylor, diseñó la cámara de flujo. Aplica el principio de Reynolds (1883) al flujo laminar.

Fulwyler, describe el proceso de separación electrostática.

Van Dilla, primer citómetro de flujo a partir de la cámara de flujo con ejes ortogonales, en el National Laboratory de Los Alamos.

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Historia de la citometría de flujo

- 1970 Se construyen los primeros citómetros de flujo.

- 1980- Actualidad se han producido muchos adelantos en las aplicaciones de la citometría de flujo en el campo de la investigación clínica-biológica, sobretodo a partir del desarrollo de los anticuerpos.

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Componentes de un citómetro de flujo

Fluídica

- Flujo laminar (sistema presurizado).
- cámara de flujo (enfoque hidrodinámico).

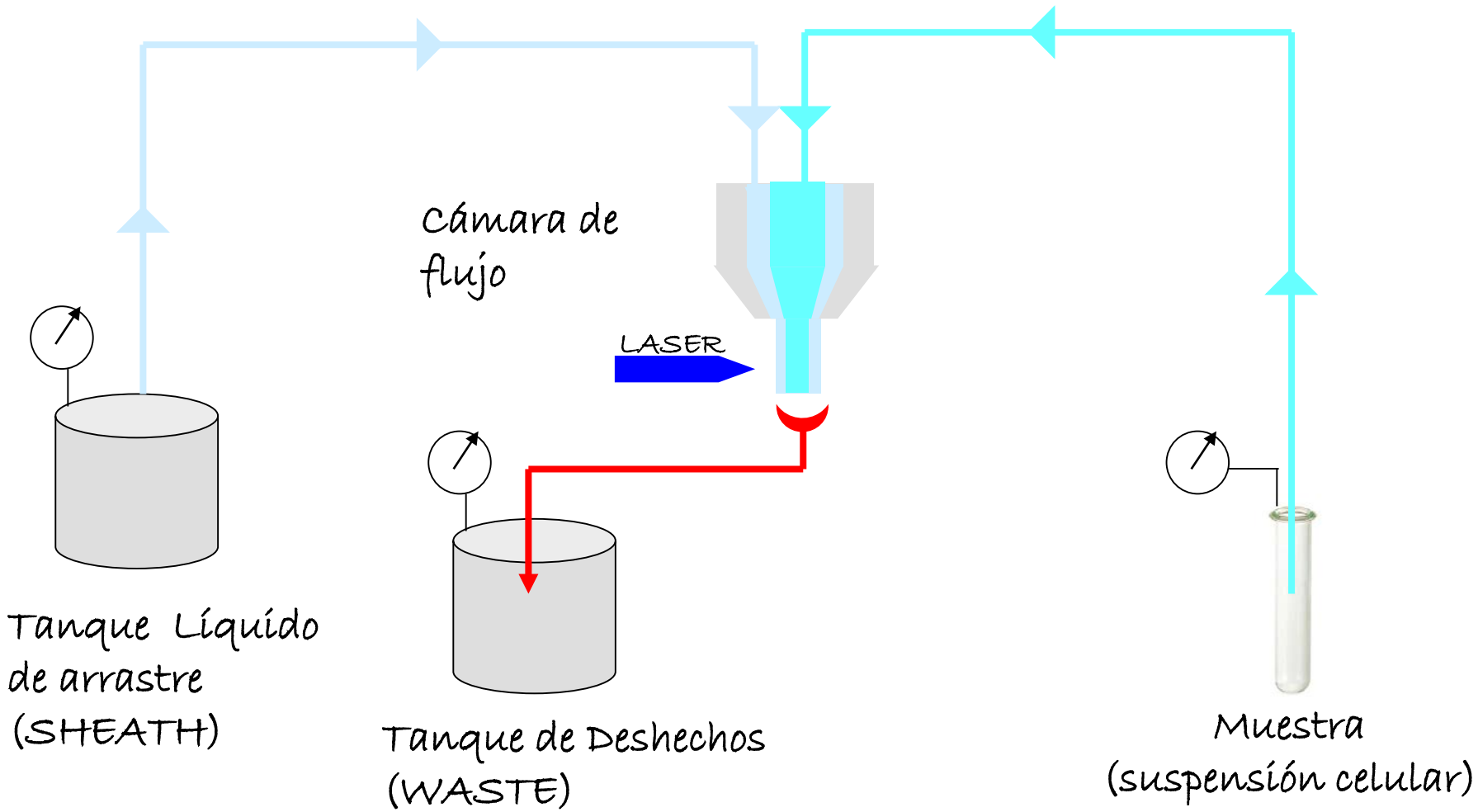
Óptica

Electrónica

Informática

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Fluídica (I)

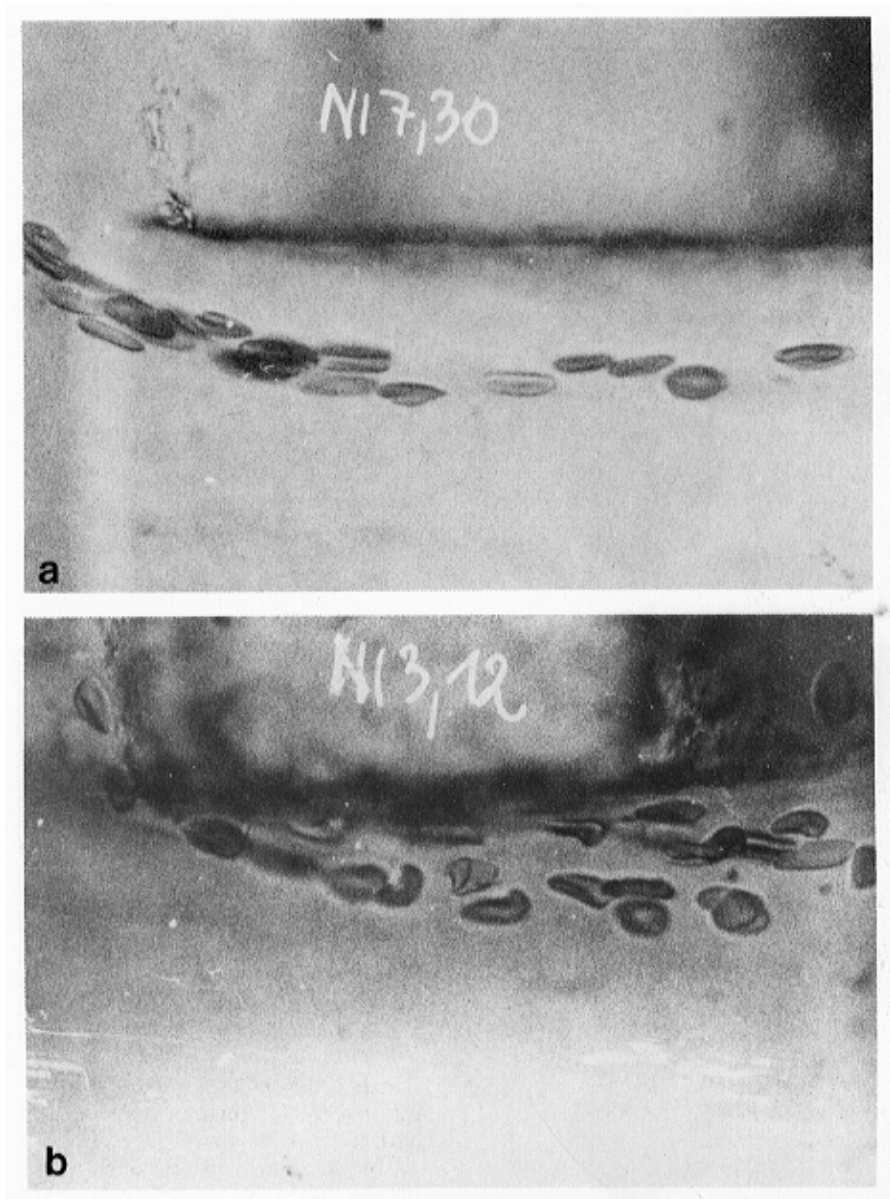


Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Fluídica (II)

Flujo laminar

Flujo turbulento

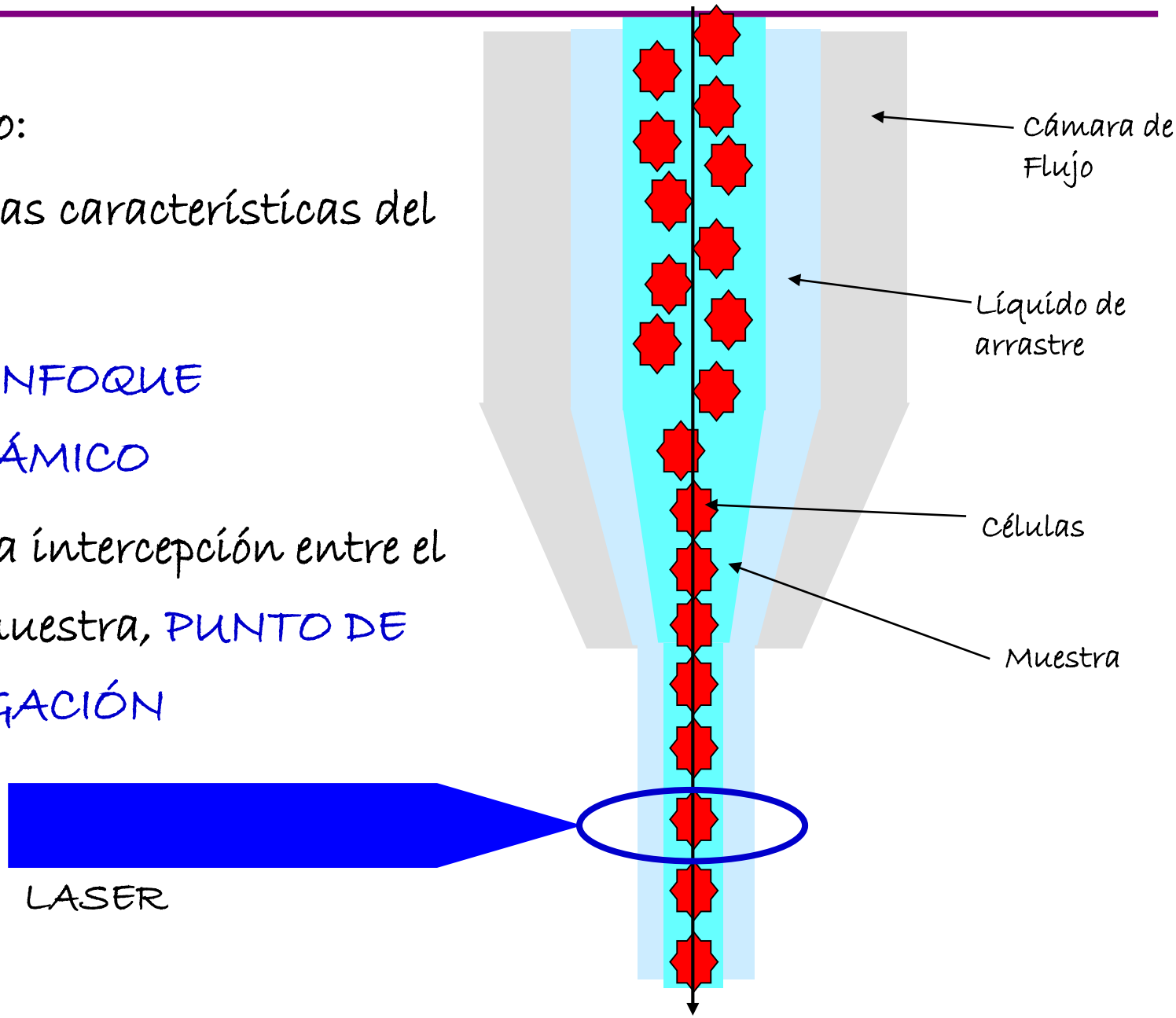


Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Fluídica (III)

La cámara de flujo:

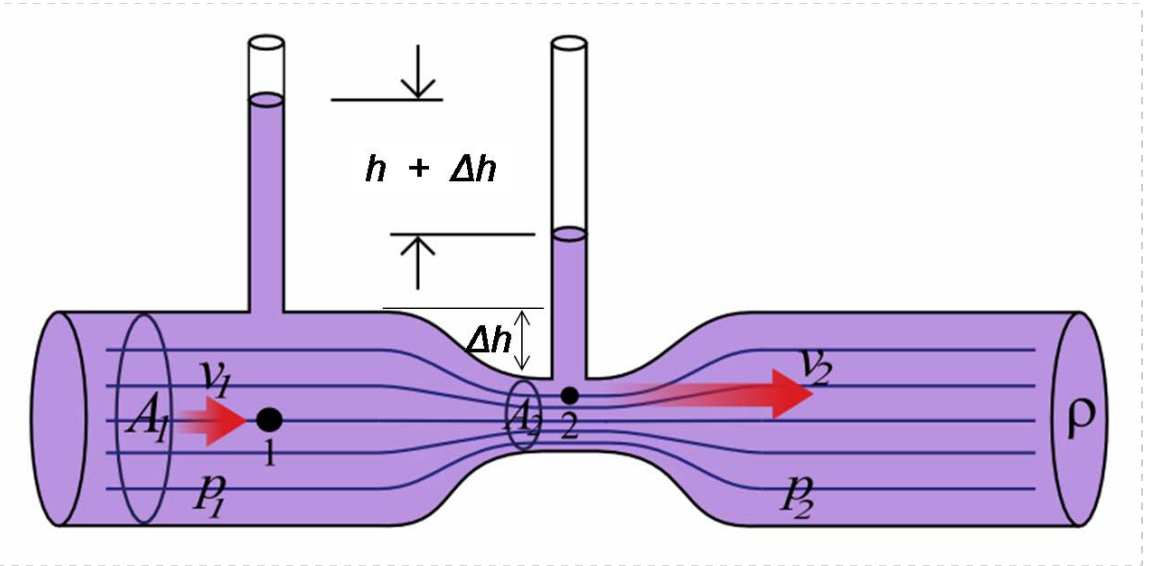
- determina las características del flujo
- permite el ENFOQUE HIDRODINÁMICO
- se produce la intercepción entre el láser y la muestra, PUNTO DE INTERROGACIÓN



Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Fluídica (IV)

- Enfoque hidrodinámico permite el paso individualizado de las células a través de la cámara de flujo.
- La disminución de la presión y el aumento de la velocidad en el centro del flujo provoca la focalización (Efecto Venturi 1797, explicado por el principio de Bernoulli, 1738).



Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Fluídica (V)

- La velocidad del líquido de arrastre viene determinada por la presión a la que está sometido, no modificable en la mayoría de citómetros analizadores.

- La diferencia de presiones entre el líquido de arrastre y la muestra, determina la velocidad del paso de células por la cámara de flujo (low/med/high).

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Componentes de un citómetro de flujo

Fluídica

- Flujo laminar (sistema presurizado).
- Cámara de flujo (enfoque hidrodinámico).

Óptica

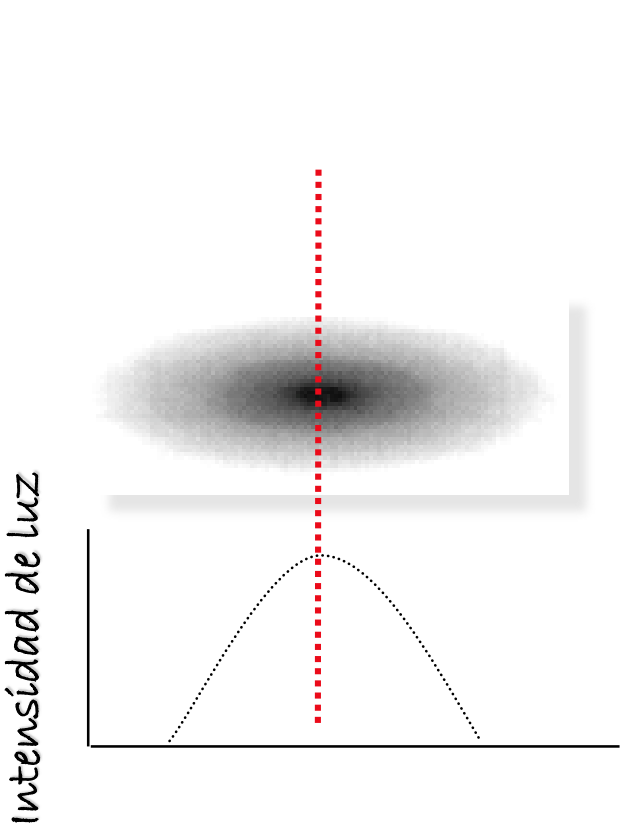
- LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation).
- Luz dispersada y fluorescencia.
- Sistema de filtros para la recolección de la señal.

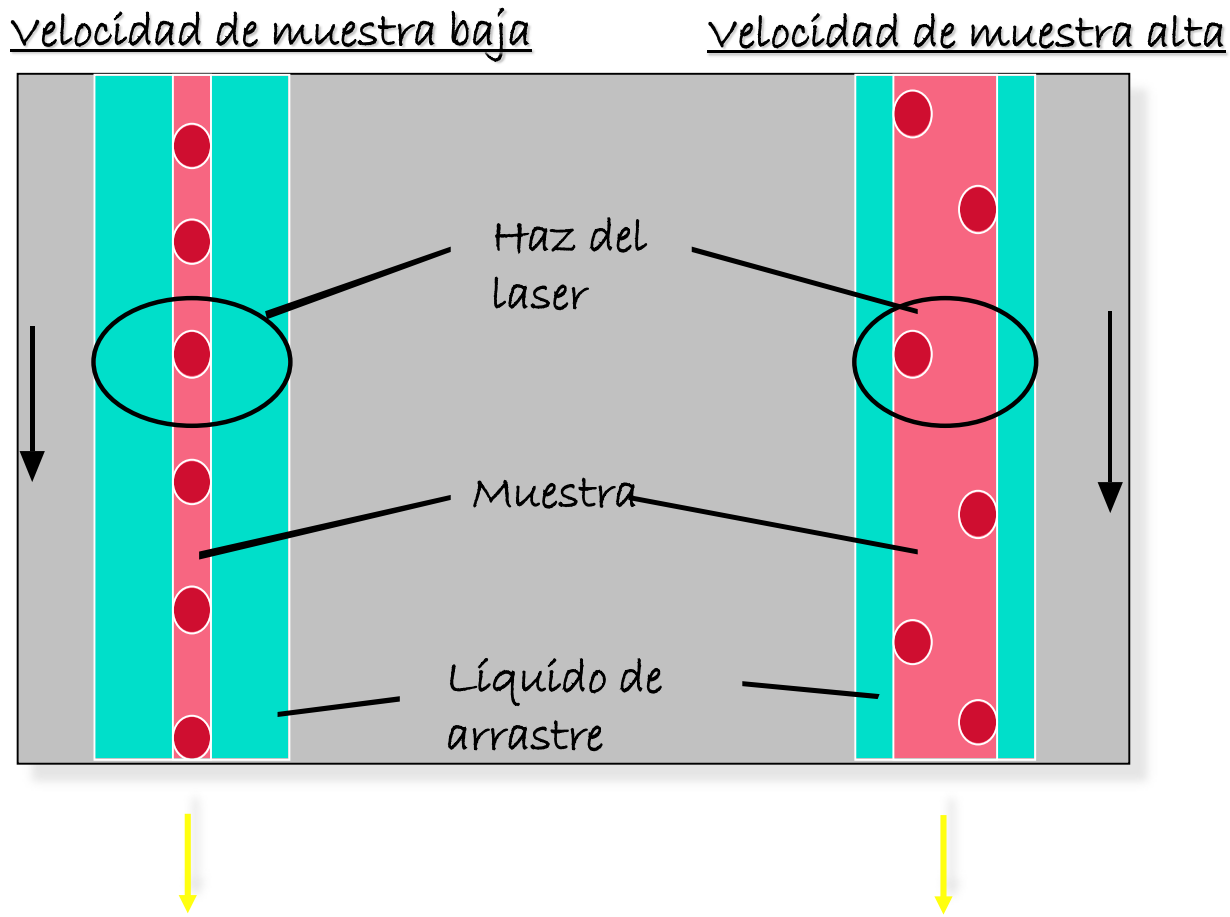
Electrónica

Informática

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Óptica (1)



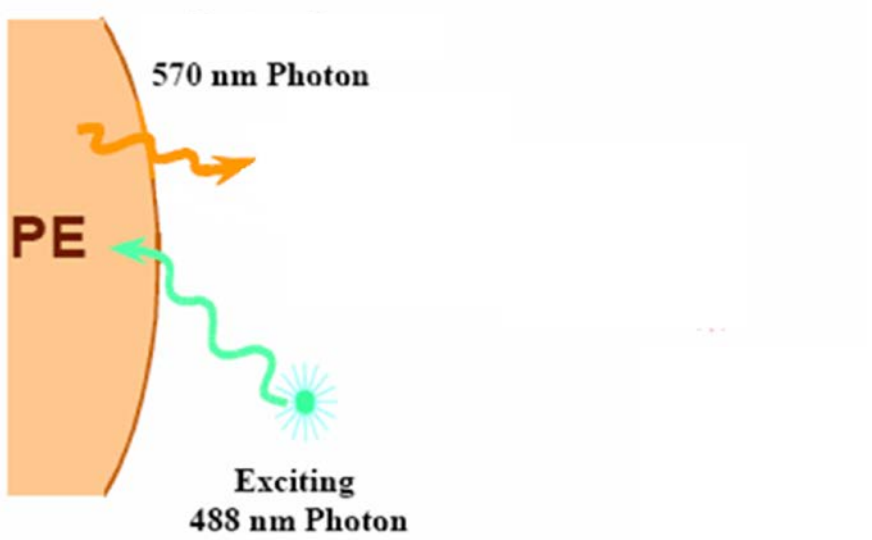


Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Óptica (II)

· Cada célula (evento) que atraviesa la fuente de luz (láser) genera una señal (dispersión de la luz, fluorescencia) que es recogida por espejos y filtros ópticos.

· La especificidad de la detección está controlada por la selección de longitudes de onda por parte de espejos y filtros ópticos.



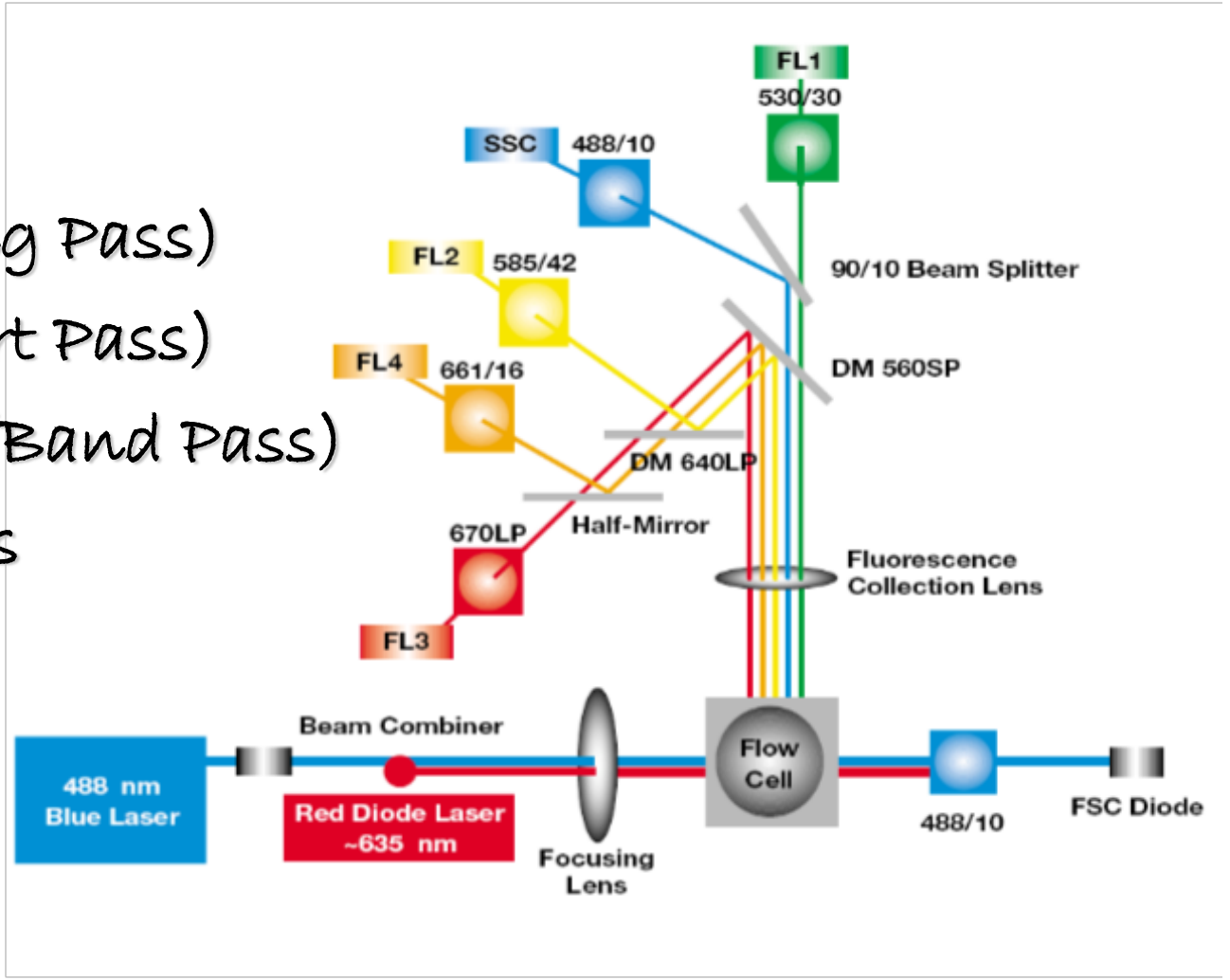
Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Óptica (III)

· Los filtros ópticos absorben o reflejan determinadas longitudes de onda.

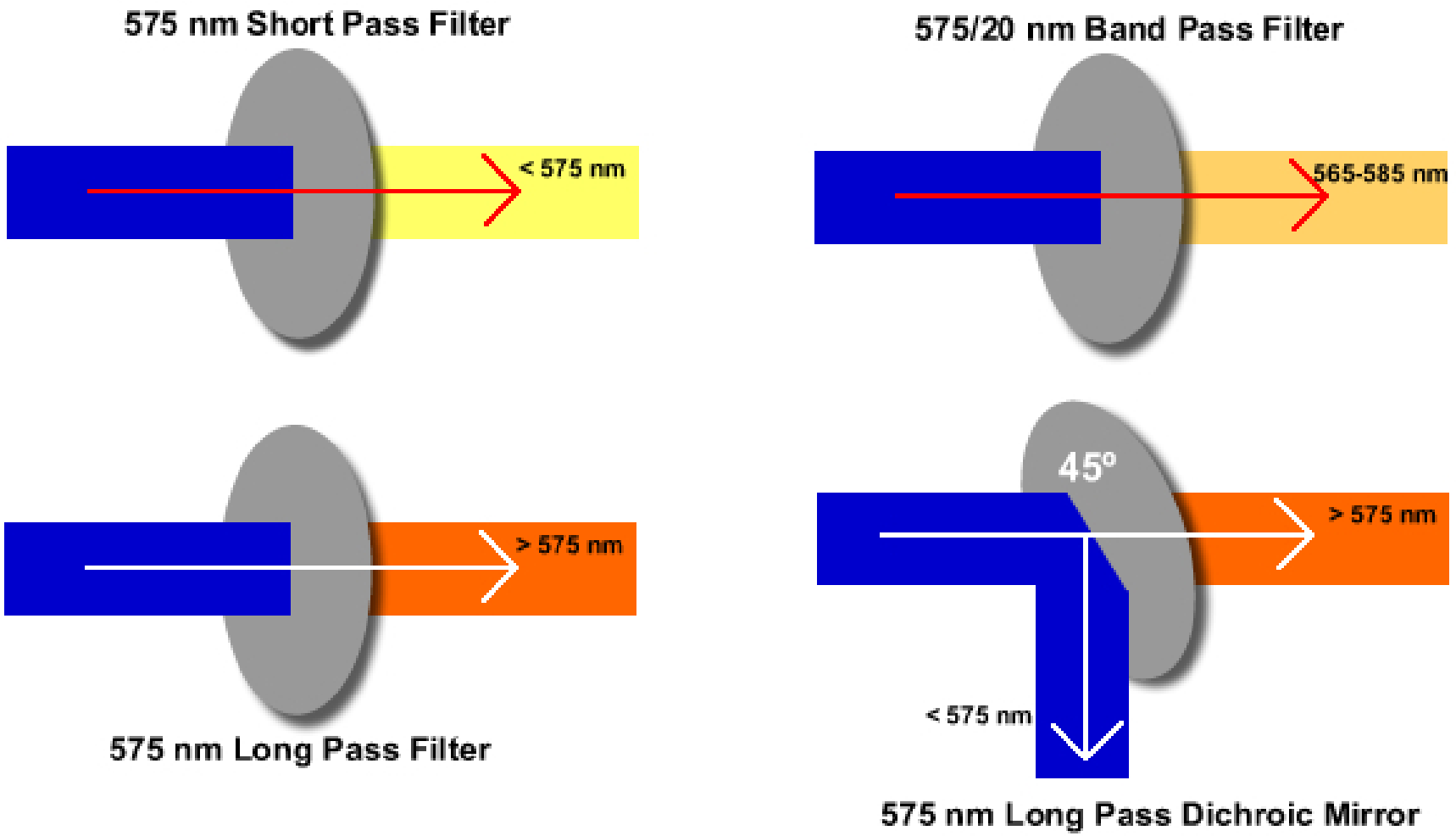
· Tipos de filtros:

- Paso largo (Long Pass)
- Paso corto (Short Pass)
- Paso de banda (Band Pass)
- Espejos Dicroicos
- Neutros



Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Óptica (IV)



Combinando los distintos filtros podemos detectar los distintos fluorocromos que presente la muestra simultáneamente.

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Qué información da un citómetro de flujo sobre una célula

1. Tamaño celular (Forward Scatter, FSC).
2. Complejidad o granulosidad celular (Side Scatter, SSC).
3. Fluorescencia (FL).

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Qué información da un citómetro de flujo sobre una célula

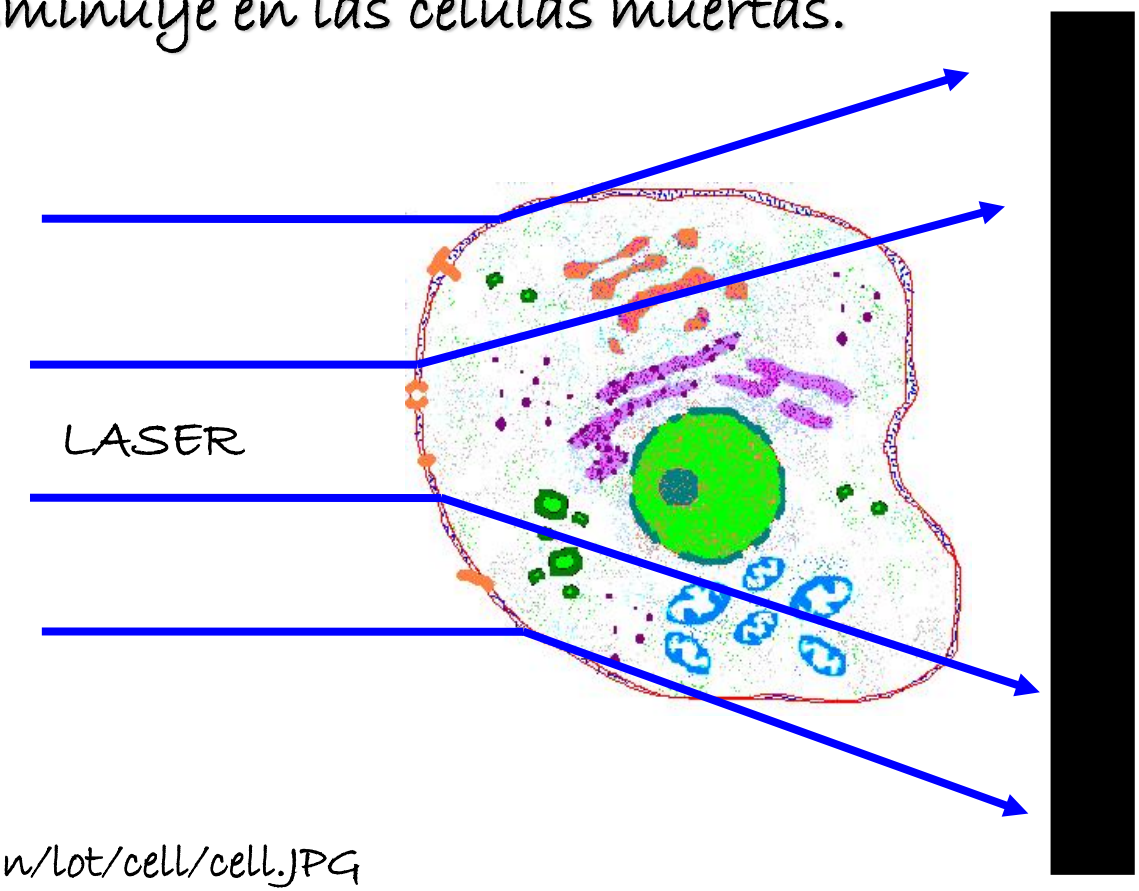
1. Tamaño celular (FSC).
2. Complejidad o granulosidad celular (SSC).
3. Fluorescencia (FL).

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

1. Tamaño celular (FSC)

Difracción. Recogida entre 0.5 y 2 º. Proporcional al tamaño celular.

Refracción. Entre 2-15º. Información sobre la estructura celular externa. Depende del *índice de refracción* entre el medio y las células. Disminuye en las células muertas.



www.the-aps.org/education/lot/cell/cell.JPG

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Qué información da un citómetro de flujo sobre una célula

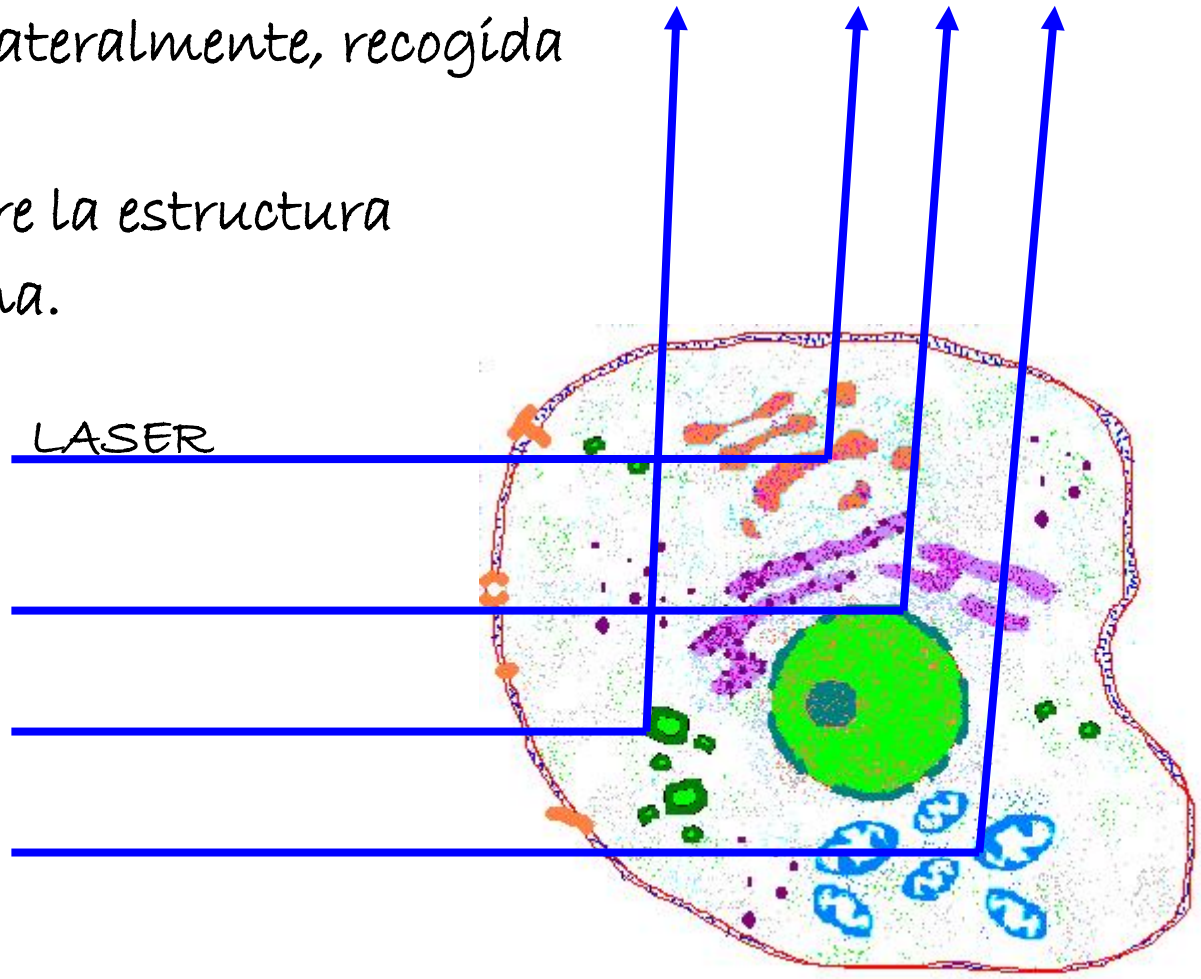
1. Tamaño celular (Forward Scatter, FSC).
2. Complejidad o granulosidad celular (SSC).
3. Fluorescencia (FL).

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

2. Complejidad o granulosidad celular (SSC)

Luz dispersada lateralmente, recogida a 90º.

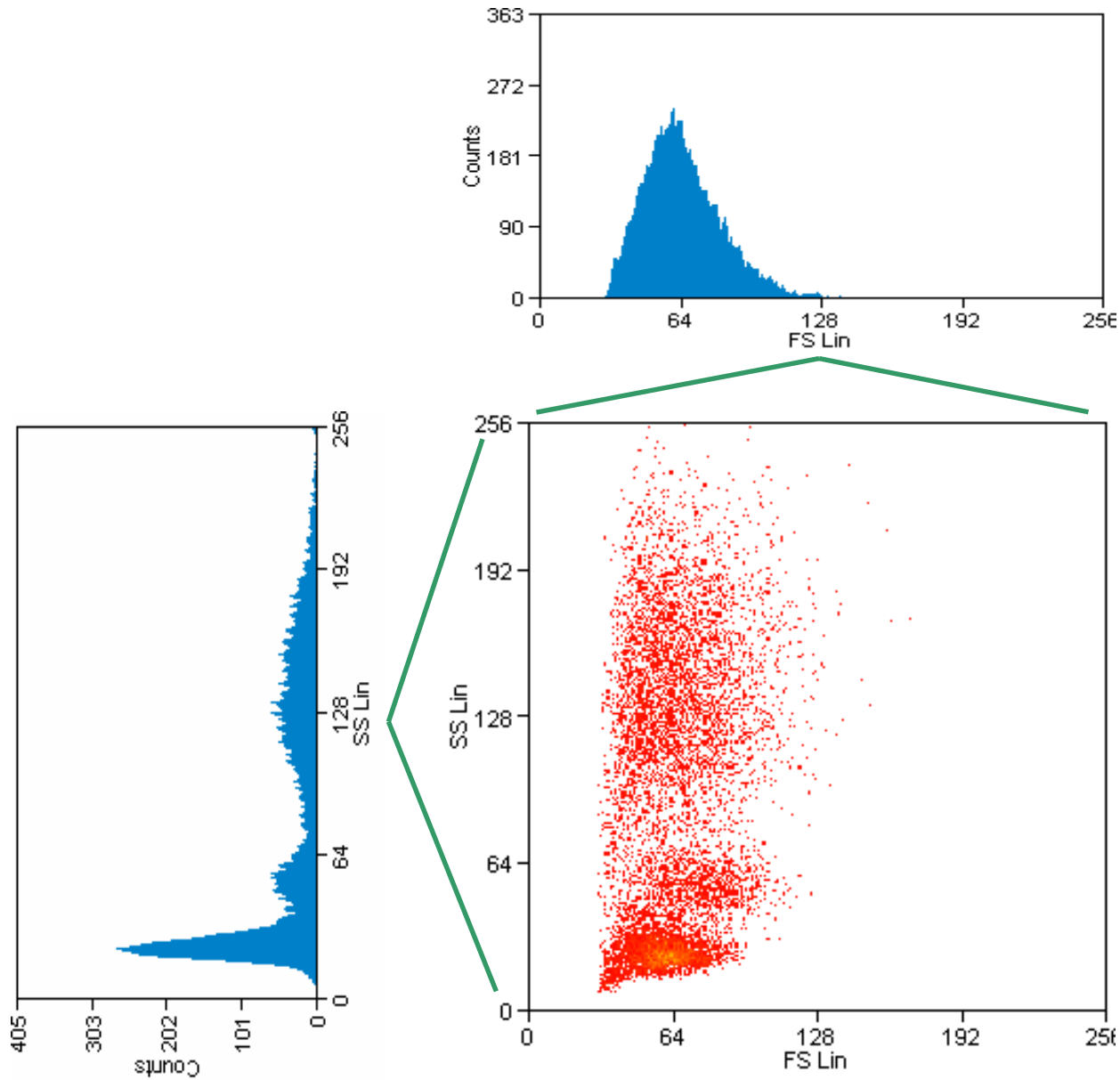
Nos informa sobre la estructura celular interna.



www.the-aps.org/education/lot/cell/cell.JPG

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

2. Complejidad o granulosidad celular (SSC)



Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Qué información da un citómetro de flujo sobre una célula

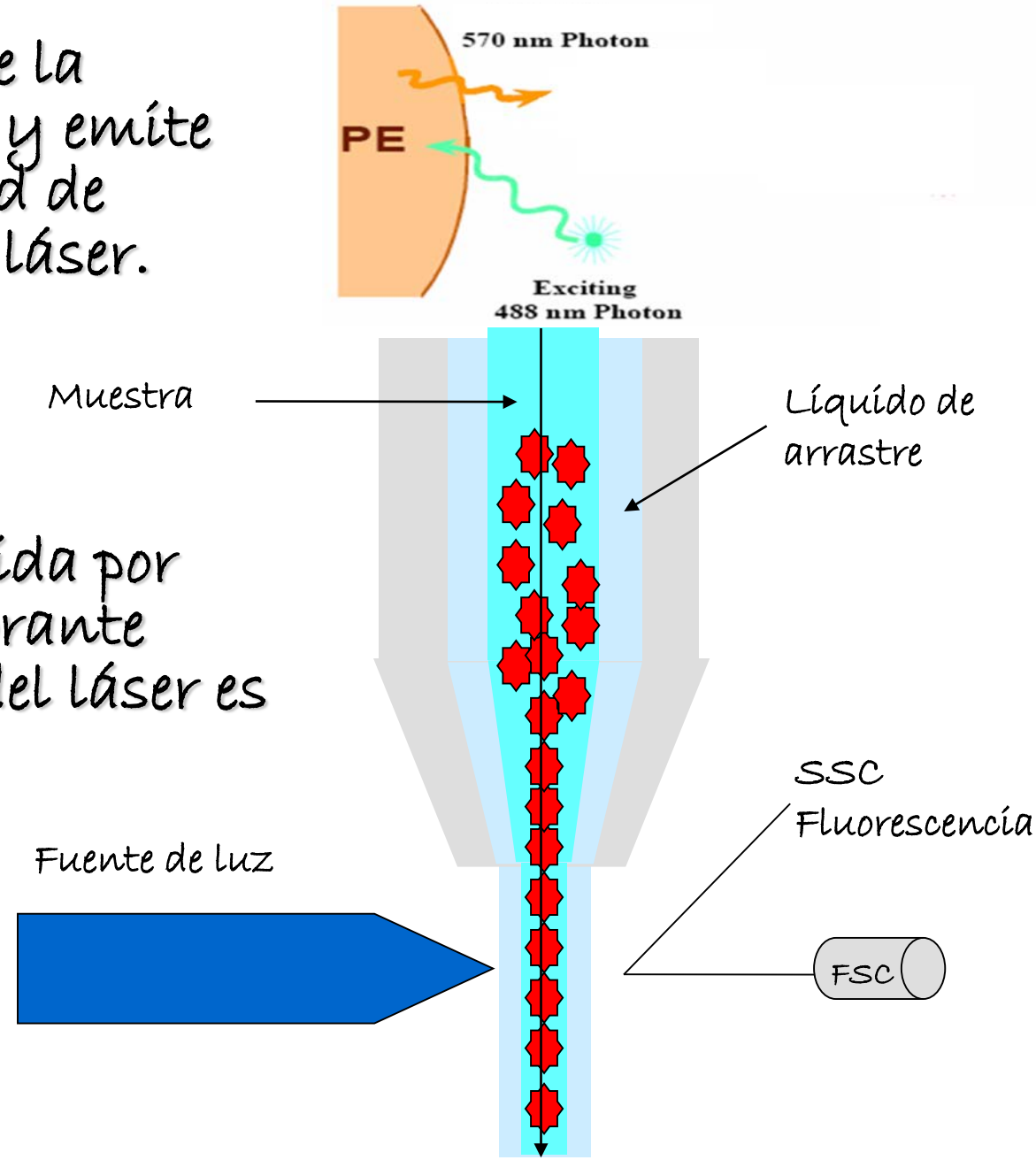
1. Tamaño celular (FSC).
2. Complejidad o granulosidad celular (SSC).
3. Fluorescencia (FL).

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

3. Fluorescencia (FL).

· El fluorocromo absorbe la energía del láser, vibra y emite fotones de una longitud de onda mayor que la del láser.

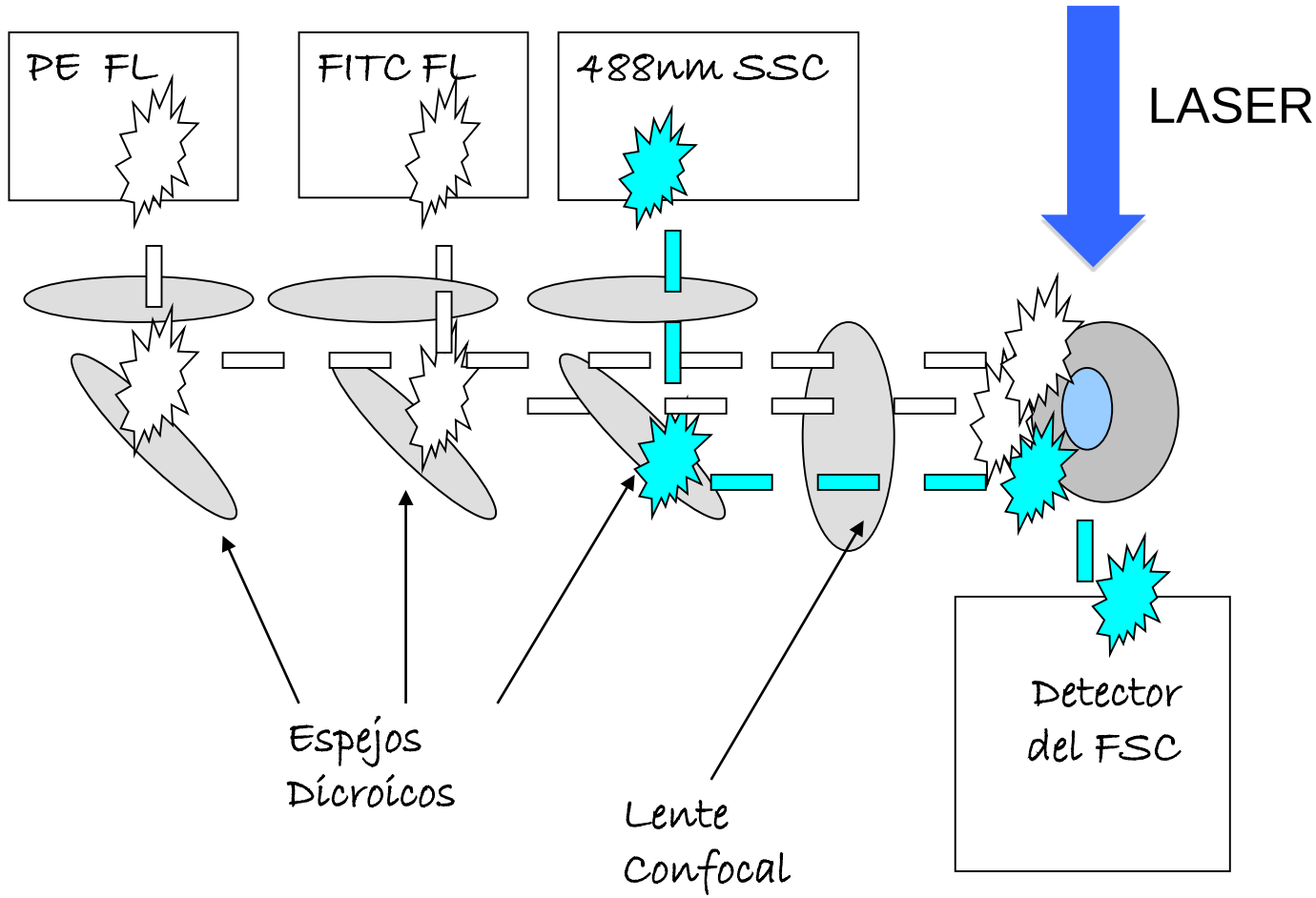
· La fluorescencia emitida por cada fluorocromo o colorante debida a la excitación del láser es recogida a 90º.



Vall d'Hebron
Institut de Recerca

3. Fluorescencia (FL).

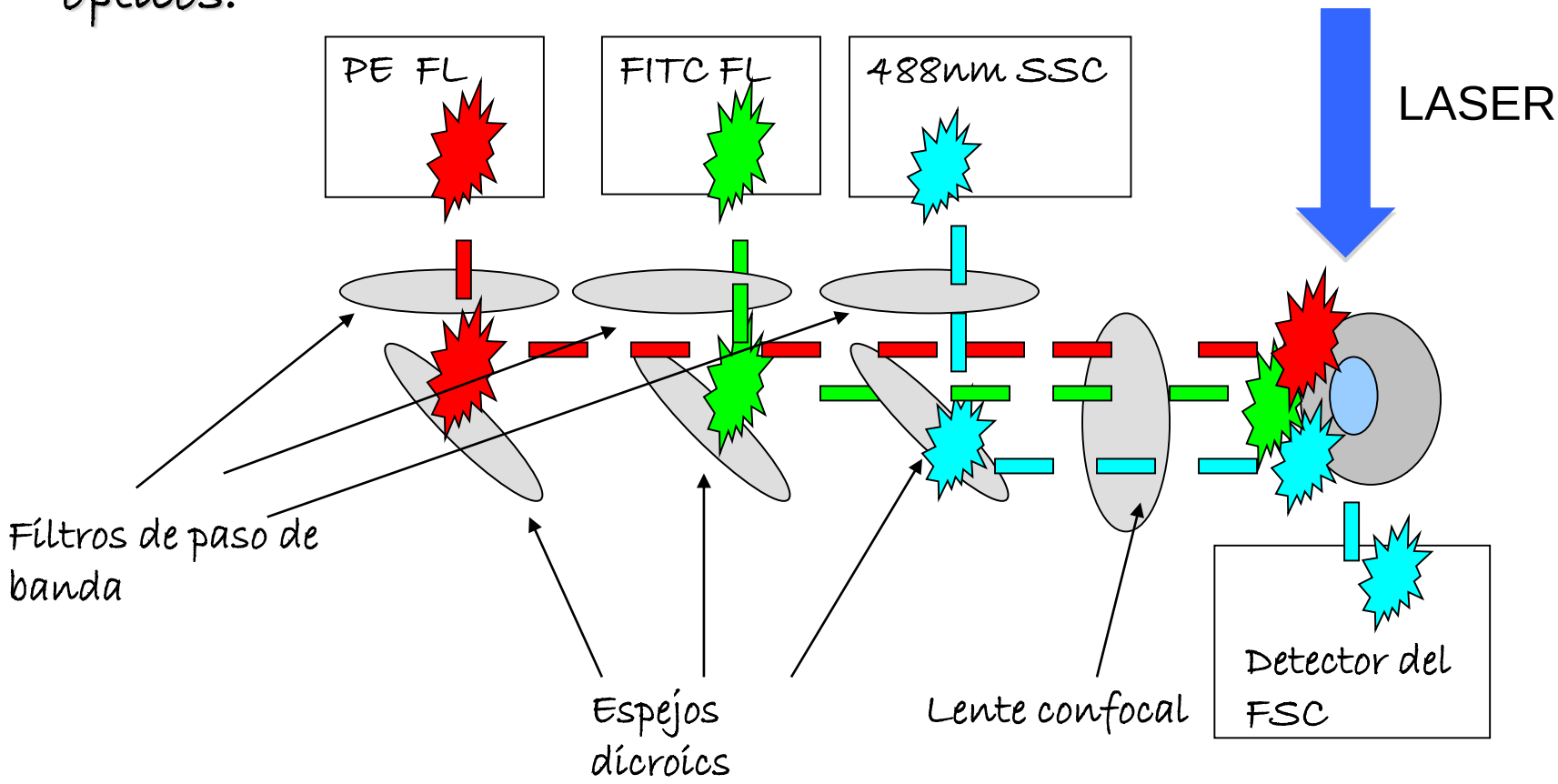
Las células negativas también son detectadas.



Vall d'Hebron
Institut de Recerca

3. Fluorescencia (FL).

La especificidad de la detección está controlada por la selección de las longitudes de onda mediante espejos y filtros ópticos.



Vall d'Hebron
Institut de Recerca

3. Fluorescencia (FL).

EXITACIÓN		EMISIÓN
488 nm	Fluoresceína (FITC)	519 nm
	Ficoeritrina (PE)	578 nm
	Ficoeritrina-Cianina5 (PECy5)	670 nm
	Peridinin-clorofil·la (PerCP)	675 nm
561 nm	Ficoeritrina (PE)	578 nm
	Ficoeritrina-Cianina5 (PECy5)	670 nm
633 nm	Aloficocianina (APC)	660 nm
	Aloficocianina H7 (APC-H7)	785 nm
	Aloficocianina-Cianina7 (APC-Cy7)	767 nm
405 nm	Alexa405	421 nm
	Alexa430	540 nm
	Pacific Blue	455 nm
365 nm	Hoechst33342	460 nm
	DAPI	461 nm
	Indo1	401 nm

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

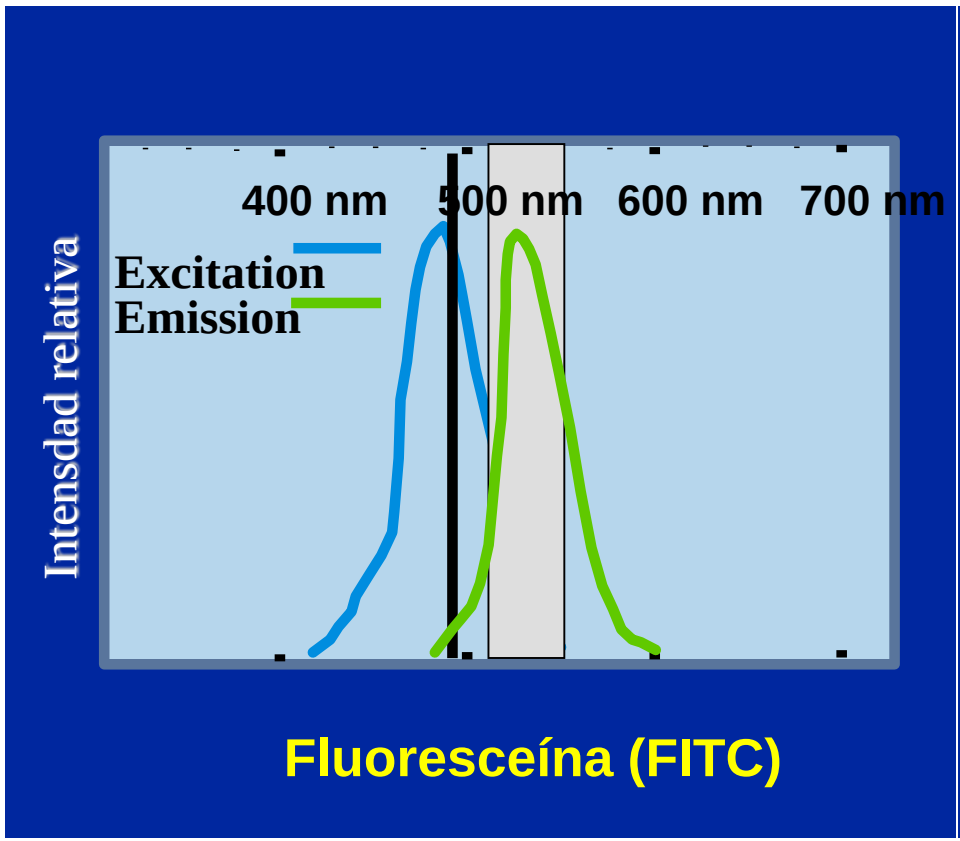
3. Fluorescencia (FL).

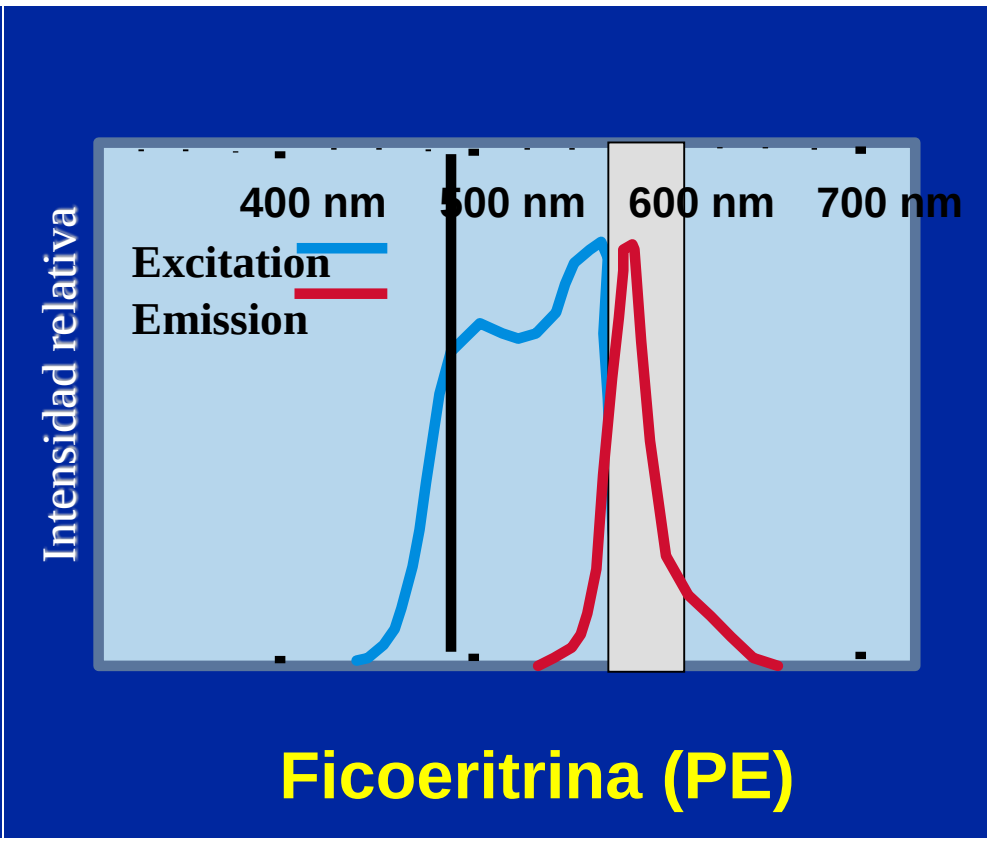
EXITACIÓN		EMISIÓN
488 nm	Fluoresceína (FITC)	519 nm
	Ficoeritrina (PE)	578 nm
	Ficoeritrina-Cianina5 (PECy5)	670 nm
	Peridinin-clorofil·la (PerCP)	675 nm
561 nm	Ficoeritrina (PE)	578 nm
	Ficoeritrina-Cianina5 (PECy5)	670 nm
633 nm	Aloficocianina (APC)	660 nm
	Aloficocianina H7 (APC-H7)	785 nm
	Aloficocianina-Cianina7 (APC-Cy7)	767 nm
405 nm	Alexa405	421 nm
	Alexa430	540 nm
	Pacific Blue	455 nm
365 nm	Hoechst33342	460 nm
	DAPI	461 nm
	Indo1	401 nm

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

3. Fluorescencia (FL).

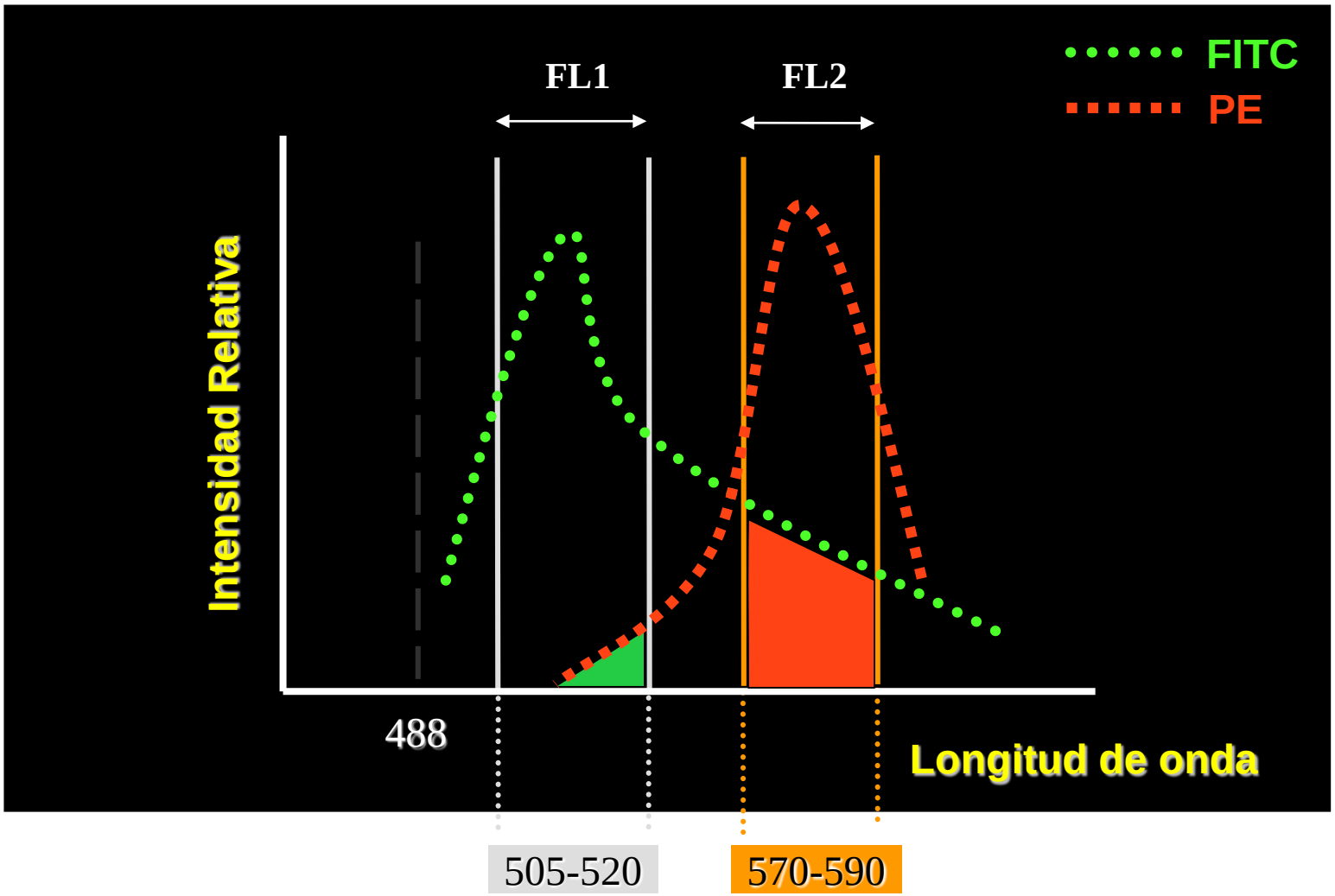
Ensayo multicolor: combinación de 2 o más fluorocromos





3. Fluorescencia (FL).

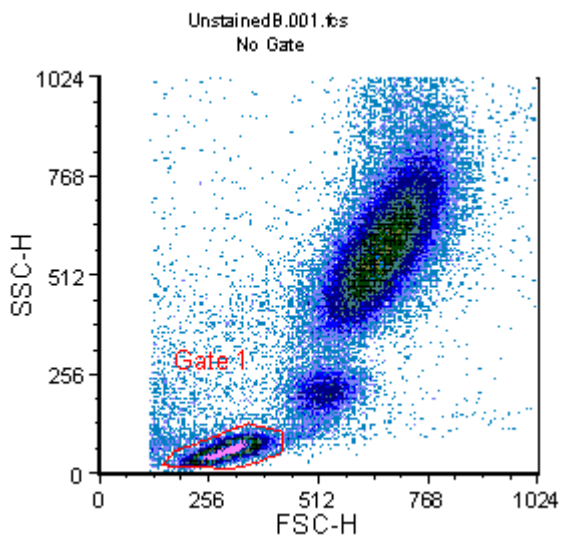
Solapamiento y Compensación



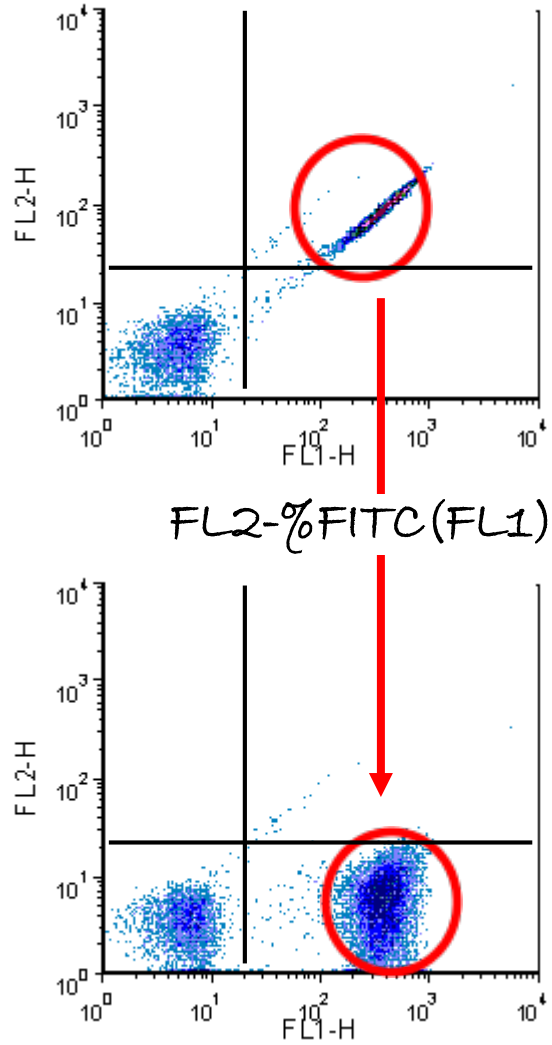
Vall d'Hebron
Institut de Recerca

3. Fluorescencia (FL).

Ejemplo



Seleccionamos la población de interés



FCS Filename	Gate	Y Arithmetic Mean
CD3 FITC.002	UL	32,01
CD3 FITC.002	UR	87,85
CD3 FITC.002	LL	3,42
CD3 FITC.002	LR	21,19

Solamente deberíamos detectar fluorescencia en el canal del FITC (FL1).

FCS Filename	Gate	Y Arithmetic Mean
CD3 FITC.002	UL	0,0
CD3 FITC.002	UR	75,61
CD3 FITC.002	LL	3,31
CD3 FITC.002	LR	3,44

Una vez compensada solamente tenemos fluorescencia en el detector que nos interesa.

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

3. Fluorescencia (FL).

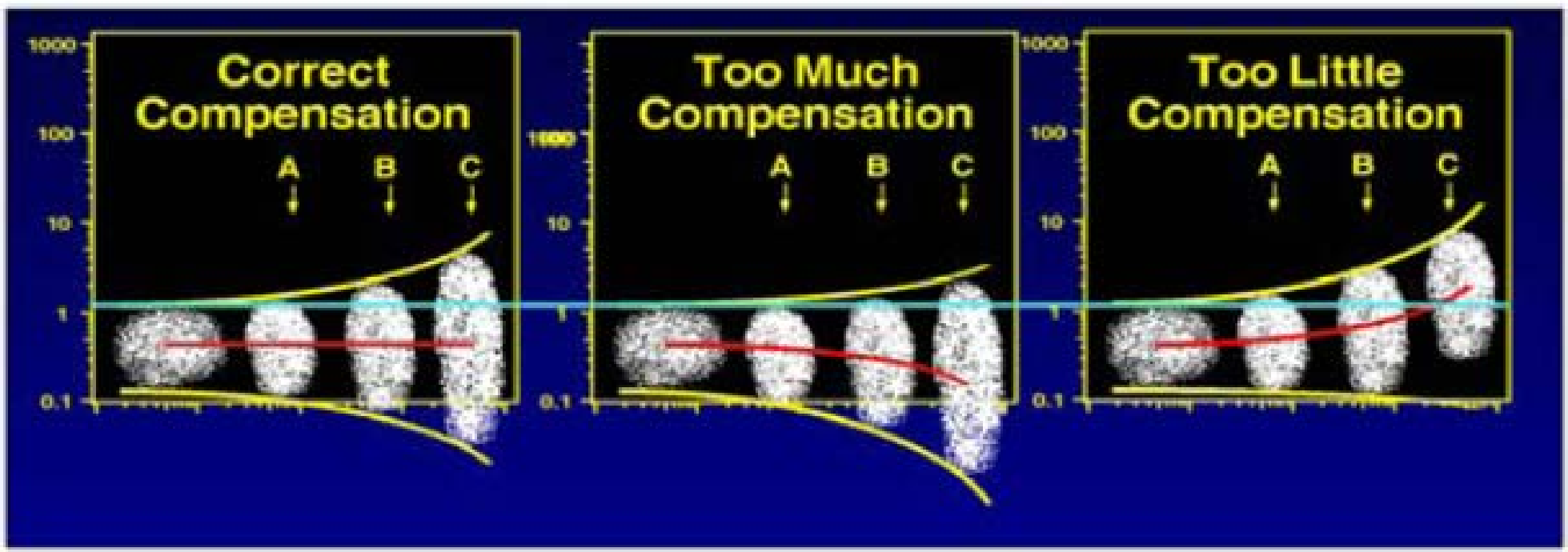
Cómo compensamos?

- Para compensar lo que hacemos es restar señal de un detector a otro.
- Se necesitan controles positivos con una sola fluorescencia conocida.
- Los equipos analógicos restan la señal antes de procesarla y por lo tanto, no se puede recuperar.
- Los equipos digitales procesan la señal entera y después aplican matrices.

$$\%FL2\ compensación = \frac{Median\ FL2pos - Median\ FL2neg \times 100}{Median\ FL1pos - Median\ FL1neg}$$

3. Fluorescencia (FL).

Comprovación de la compensación



Vall d'Hebron
Institut de Recerca

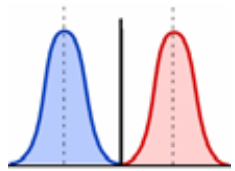
3. Fluorescencia (FL).

Qué fluorocromos escogemos y porqué?

Fluorocromos más brillantes para los marcajes "dim" EVITANDO el solapamiento de los espectros con la población brillante!

Com se define y se mide el brillo de un fluorocromo?

Por su capacidad de discriminar Células DIM de les Negativas así como las Células Negativas del Background.



Esta capacidad está influenciada por el CV, el ruido electrónico, background, autofluorescencia celular....

Por lo tanto, una medida de Sensibilidad de resolución de un fluorocromo es el ÍNDICE DE TINCIÓN.

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

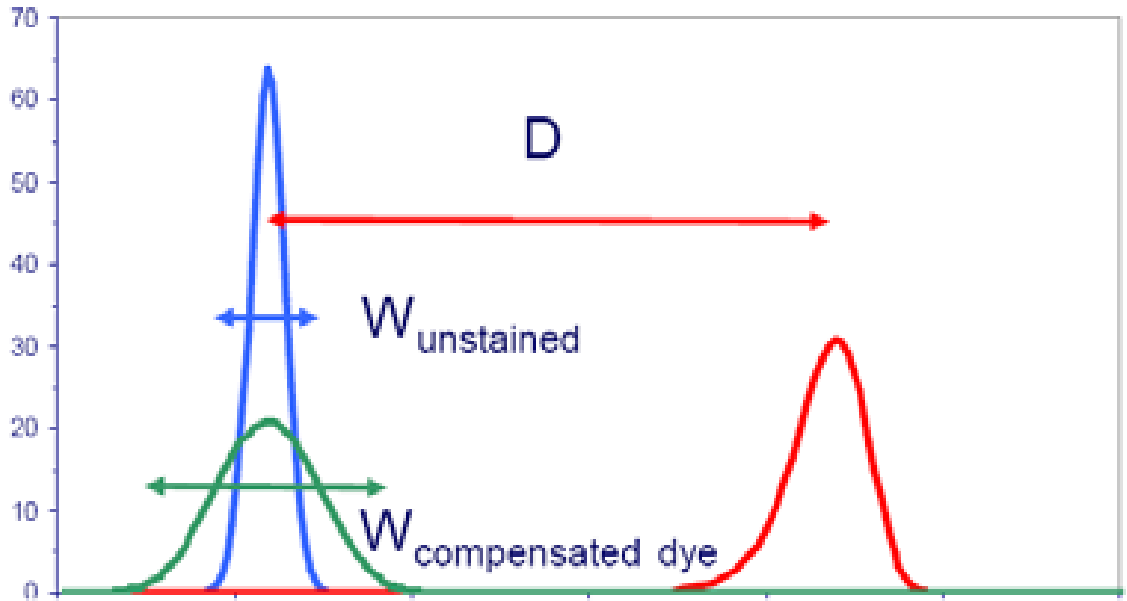
3. Fluorescencia (FL).

Índice de Tinción (Stain Index)

Es una medida del brillo

D= Distancia de la población positiva de la negativa

W= Anchura de la población negativa



$$SI_{parametric} = \frac{mean_{positive} - mean_{negative}}{2 \times SD_{negative}}$$

1. Interesan fluorocromos con elevados índices de Tinción.
2. Interesa MINIMIZAR las compensaciones.

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

3. Fluorescencia (FL).

Table 1. Stain index of various anti-CD4 fluorochrome conjugates on a BD LSR II flow cytometer.

Reagent	Filter	Stain Index
PE	585/40	356.3
[1]Alexa Fluor® 647	660/20	313.1
[1]APC	660/20	279.2
PE-Cy7	780/60	278.5
[2]PE-Cy5	695/40	222.1
[2]PerCP-Cy5.5	695/40	92.7
[3]Alexa Fluor® 488	530/30	75.4
[3]FITC	530/30	68.9
[2]PerCP	695/40	64.4
APC-Cy7	7801/60	42.2
Alexa Fluor® 700	720/45	39.9
Pacific Blue™	440/40	22.5
AmCyan	525/50	20.2

[1,2,3] Fluorochromes listed with the same superscript number are read in the same detector, and thus would not normally be used in combination.

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

3. Fluorescencia (FL).

Ejemplo: Estudiamos la expresión de CD62L (débil) en la población CD8 (alta).

→ CD8 FITC/CD62L PE

- El FITC tiene un elevado grado de solapamiento con el PE.
- Compromete la resolución en el canal del PE.
- Menor Sensibilidad de resolución en la población problema (CD62L).

↓

1. Escoger otro fluorocromo para el CD8 con menos solapamiento en PE (ex. PerCP-Cy5.5 ó APC).
2. Escoger otro fluorocromo para el CD62L igual de brillante, que no se solape con el FITC (ex. APC)

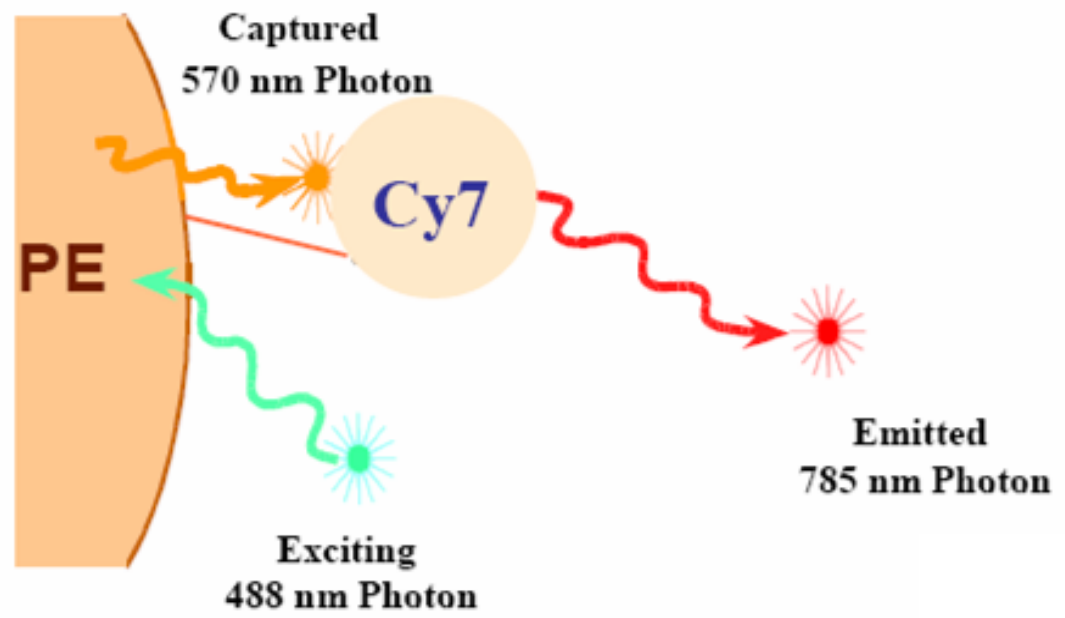
Vall d'Hebron
Institut de Recerca

3. Fluorescencia (FL).

Tándems

• 2 fluorocromos unidos químicamente:

PE-Cy5
PE-Cy7
APC-Cy5
APC-Cy7
PerCP-Cy5.5...



Inconvenientes:

• Pueden degradarse a consecuencia de: luz, fijación, elevadas temperaturas...
• Emitiendo en el detector del fluorocromo parental:
Ej. APC-Cy7 al degradarse emitirá en APC y PE-Cy7 en PE dando Falsos positivos

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

3. Fluorescencia (FL).

Tándems

Prevención:

- Minimizar la exposición a la luz, calor y evitar fijaciones con formaldehído.
- Si no se pueden evitar las fijaciones: usar soluciones estabilizantes.

Alternativa: APC-H7

- Más estable a la luz y temperatura.
- Más estable a la fijación con formaldehído.
- Bajo solapamiento en otros detectores.

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

3. Fluorescencia (FL).

Controles para un experimento de citometría:

- control de autofluorescencia: células sin marcar.
- control isotípico
- Controles compensación: Single color, FMOs

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

3. Fluorescencia (FL).

Controles para un experimento de citometría:

- control de autofluorescencia: células sin marcar.
- control isotípico
- Controles compensación: Single color, FMOs

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

3. Fluorescencia (FL).

Controles para un experimento de citometría:

- control de autofluorescencia: células sin marcar.
- control isotípico
- Controles compensación: Single color, FMOs

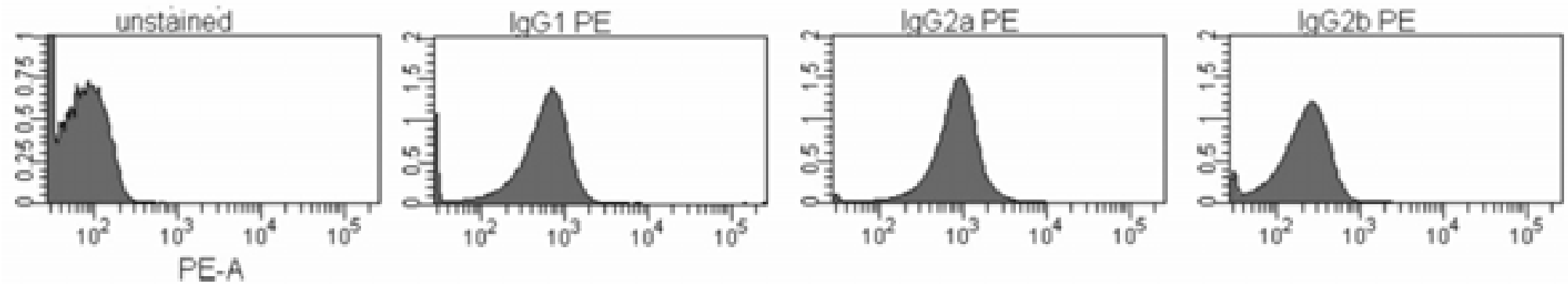
Vall d'Hebron
Institut de Recerca

3. Fluorescencia (FL).

Controles Isotípicos:

- Tenemos en cuenta la tinción inespecífica de un anticuerpo con un ISOTIP determinado conjugado a un fluorocromo en concreto. Ex. Mouse IgG1 FITC

- Distintos isotipos presentan distinto background:



Vall d'Hebron
Institut de Recerca

3. Fluorescencia (FL).

Controles para un experimento de citometría:

- control de autofluorescencia: células sin marcar.
- control isotípico
- Controles compensación: Single color, FMOs

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

3. Fluorescencia (FL).

Controles de compensación: se realizan para aquellos experimentos en los que se combinan 2 o más fluorescencias.

- Single Color: cada fluorocromo por separado.

- FMOs

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

3. Fluorescencia (FL).

FMO: "Fluorescence Minus One"

• Los controles FMO contienen todos los anticuerpos de la muestra menos 1.

• El detector en el cual no hay anticuerpo es el que el FMO proporciona el control negativo:

Ejemplo.

CD3 CD4 CD8 CD25 CD127 CD45.

El FMO para situar la región de positividad para el CD25 sería:

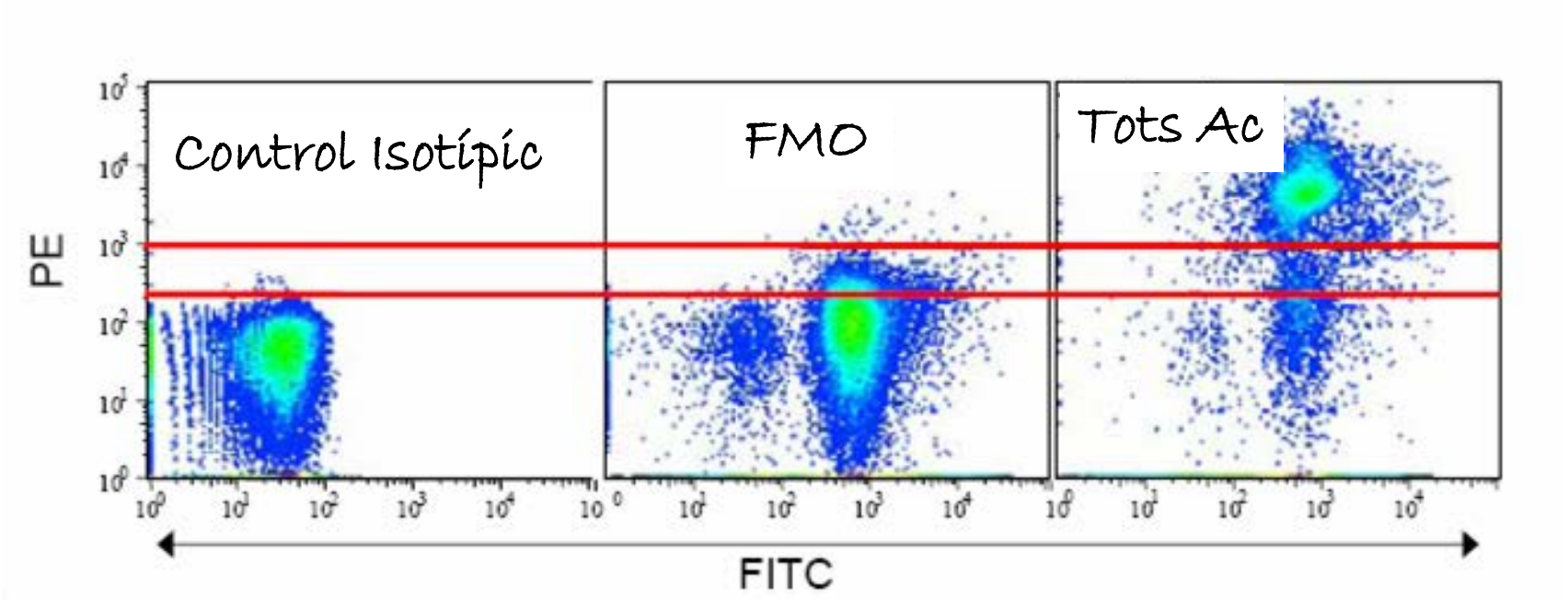
- CD3 CD4 CD8 --- CD127 CD45

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

3. Fluorescencia (FL).

FMO: "Fluorescence Minus One"

Ejemplo: CD3 FITC / CD4 PE / CD8 PE-Cy5 / CD45RO PE-Cy7.

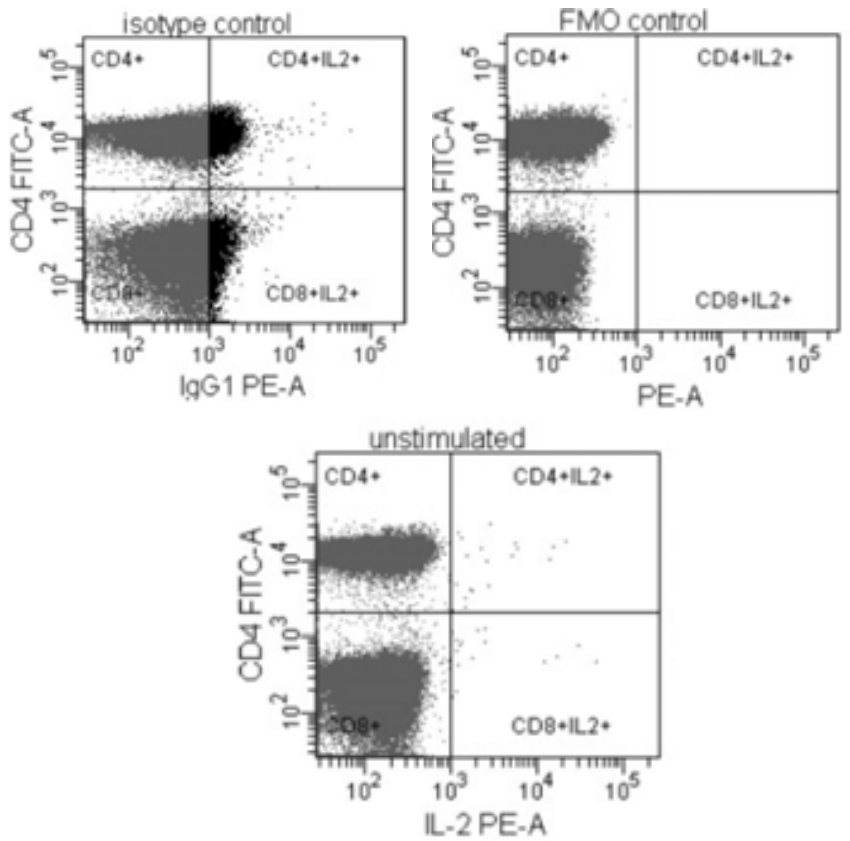


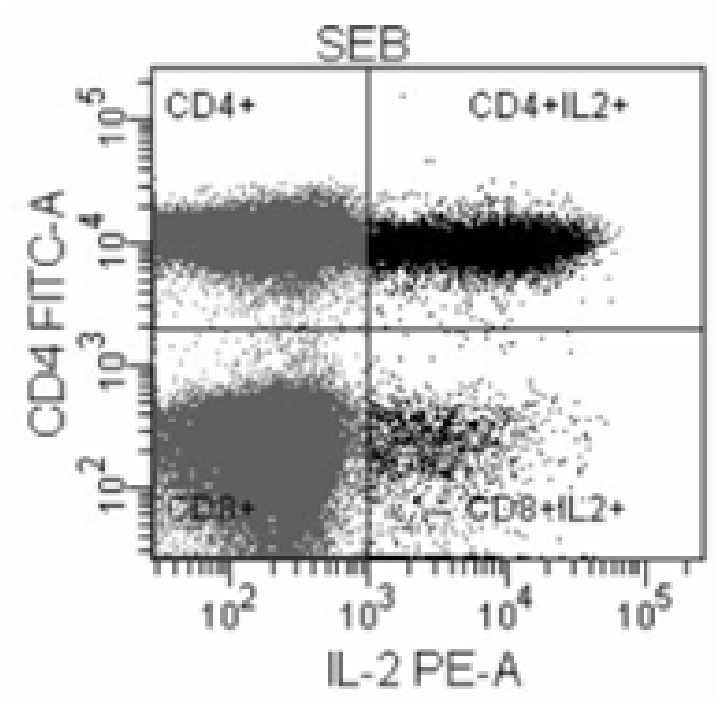
Vall d'Hebron
Institut de Recerca

3. Fluorescencia (FL).

Ejemplo. CD4 FITC / IL-2 PE

¿Dónde situamos el cuadrante de positividad para la IL-2 PE?





Dades procedents Joseph Trotter,
Cytometry Part A 69A:1037–1042 (2006)

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

3. Fluorescencia (FL).

Otros aspectos a considerar:

- Unión inespecífica:

ex. PE-Cy5 se pueden unir inespecíficamente a las Fc expresadas en linfocitos B, monocitos y células dendríticas.

Solución:

- Células de Rata o Ratón: usar bloqueo de FC comerciales.
- Células humanas: Cocktails de IgGs, suero humano.
- Usar otros tándems de baja o nula afinidad por los receptores Fc: PE-TexasRed y PE-Cy7.

- Efecto del tamaño del fluorocromo en marcajes intracelulares: No influye! Recomendación usar fluorocromos brillantes.

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

3. Fluorescencia (FL).

Creación de paneles multicolor

1. Seleccionar los florocromos de acuerdo al instrumento que vamos a usar.

2. Adecuar el brillo de los florocromos al nivel de expresión del antígeno.
- Florocromos Brillantes - Antígenos poco expresados
- Florocromos débiles - Antígenos muy expresados

3. Minimizar el solapamiento de espectros de emisión en marcadores que se expresan en la misma célula.

4. Evitar combinaciones que generen falsos positivos en caso de degradación del florocromo.

5. Intentar, dentro de lo posible, usar florocromos excitados por el LASER rojo en antígenos que se expresen en células con alta autoflorescencia.

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Componentes de un citómetro de flujo

Fluídica
- Flujo laminar (sistema presurizado).
- Cámara de flujo (enfoque hidrodinámico).

Óptica
- LASER.
- Luz dispersada y fluorescencia.
- Sistema de filtros para la recolección de la señal.

Electrónica
- Amplificación mediante PMTs.
- Conversión a valores digitales.

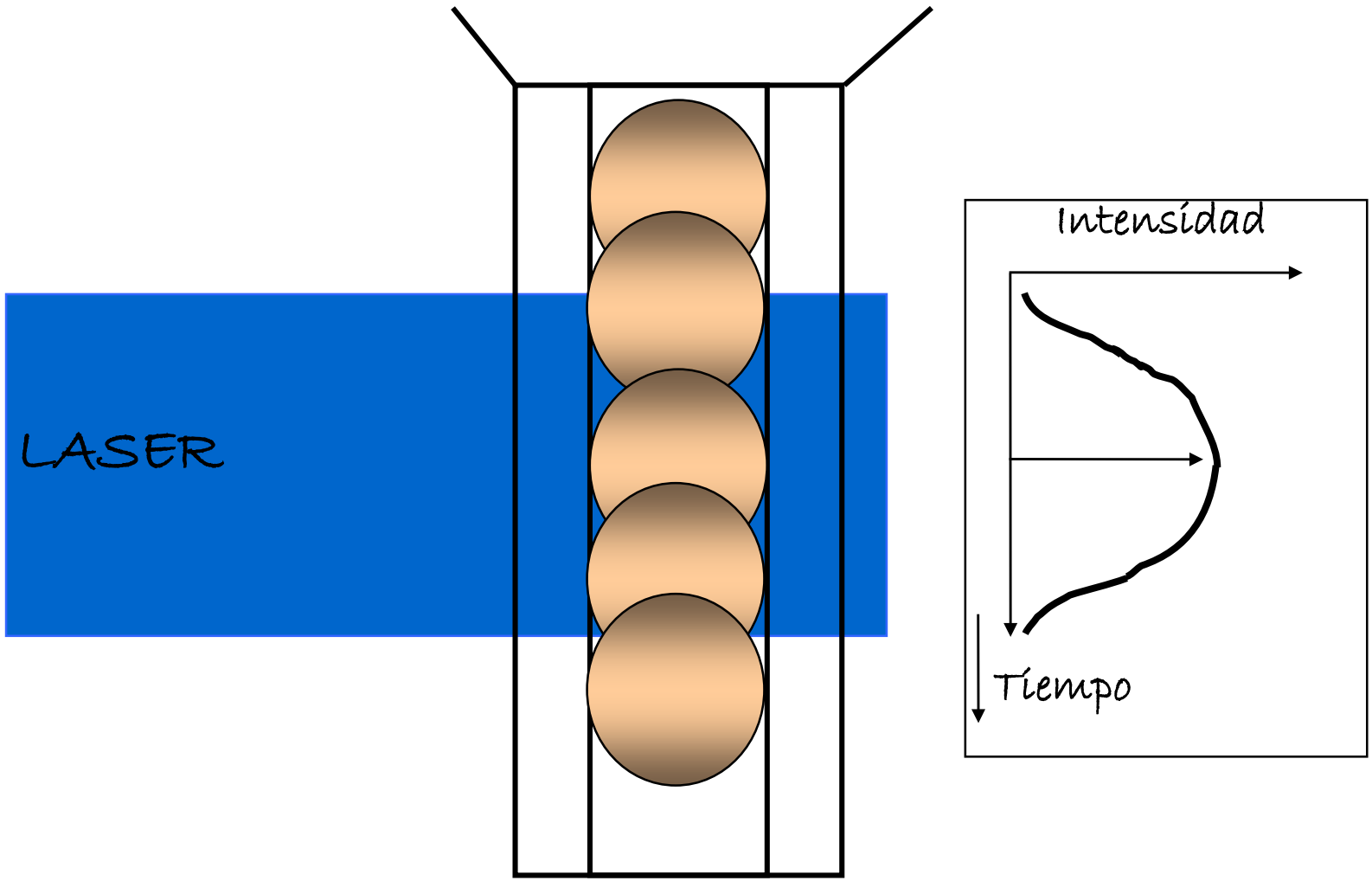
Informática

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Electrónica (I)

La fluorescencia generada por cada célula es recogida por diversos detectores fotomultiplicadores de la señal (PMTs).

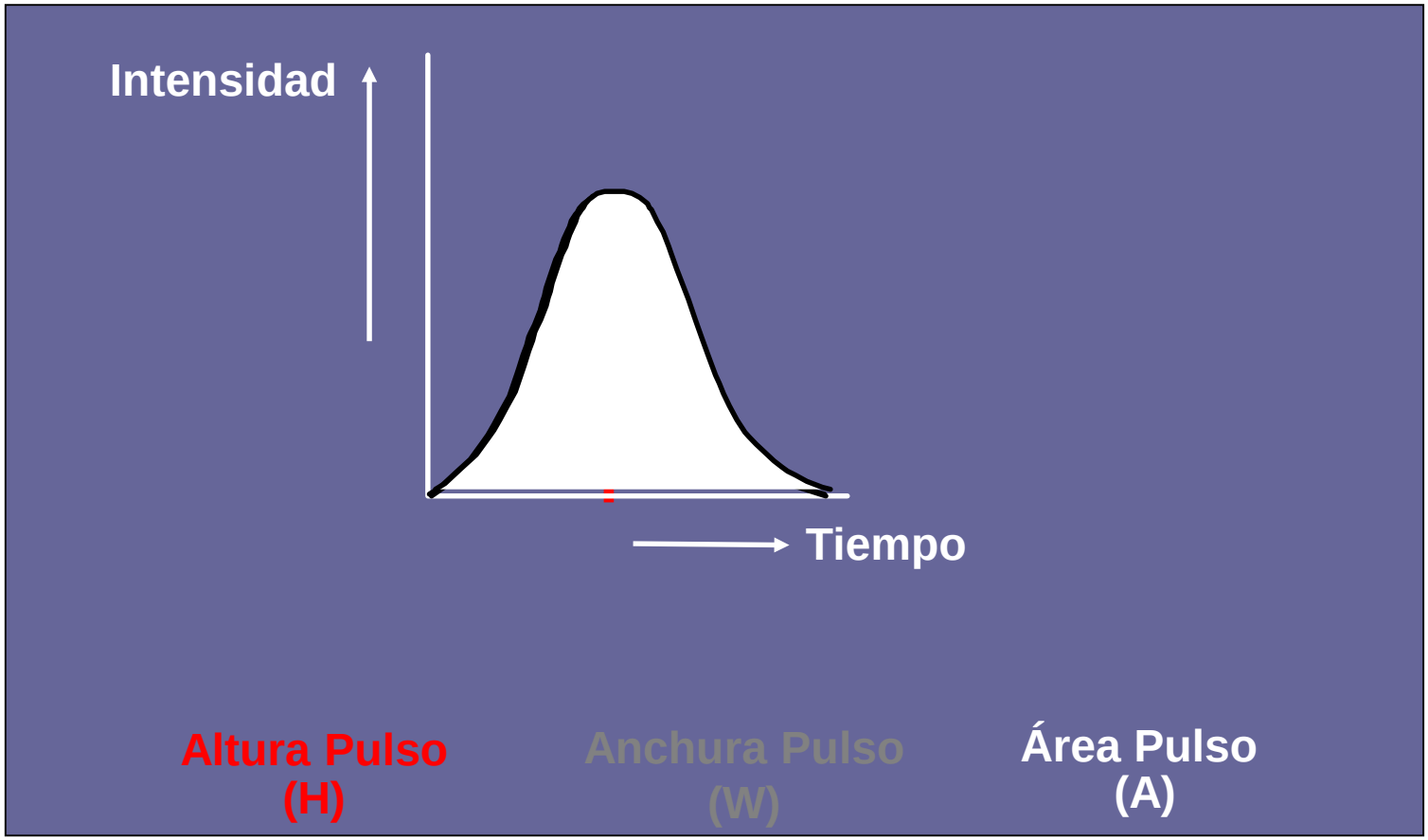
PMTs convierten la señal luminosa recibida en pulsos eléctricos.



Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Electrónica (II)

De cada señal podemos obtener la altura, anchura y área.

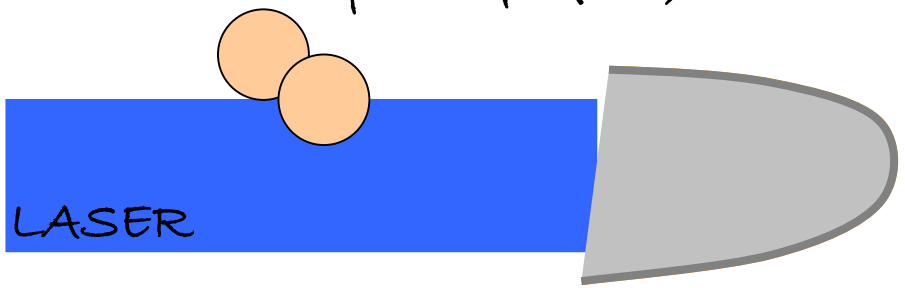


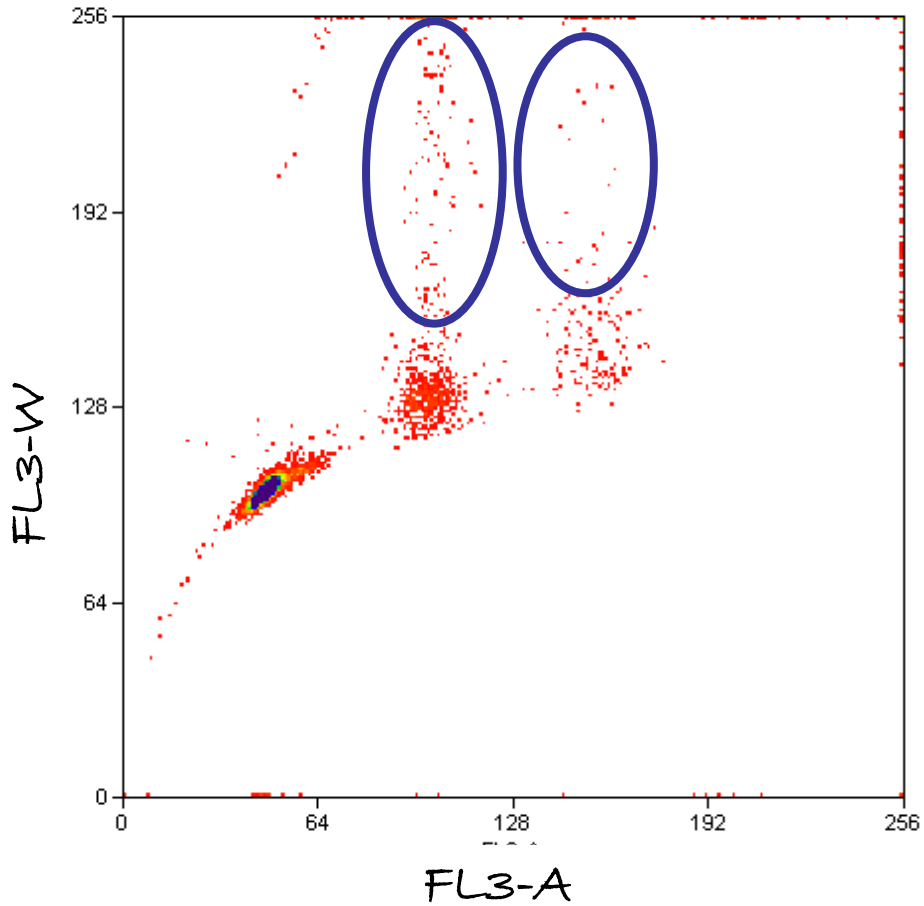
Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Electrónica (III)

1 Células en fase G2/M (4n)

2 Células en fase G1 (2n)





Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Electrónica (IV)

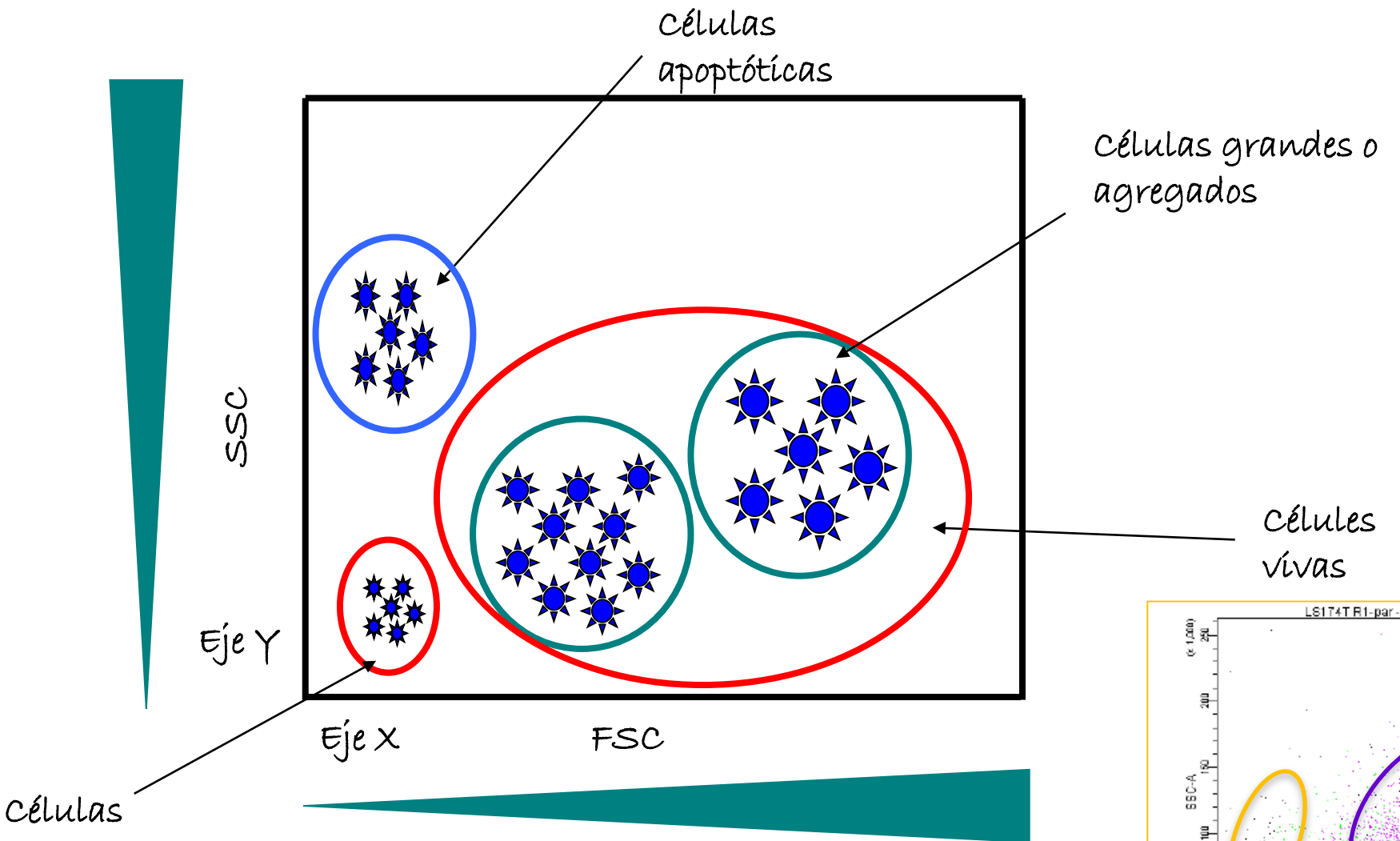
- Estas señales eléctricas son amplificadas y digitalizadas mediante los ADCs (Analog to Digital Converters).

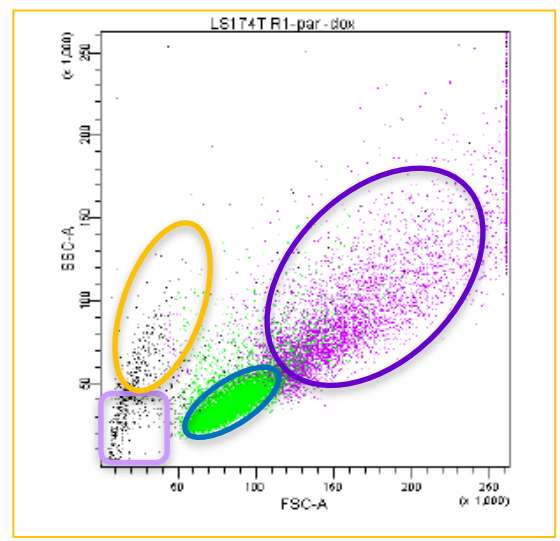
- A cada señal de fluorescencia generada por cada evento se le asigna un canal de intensidad de fluorescencia, en función de la señal detectada por los PMTs, en un histograma de 1 o 2 parámetros.

- Cada evento está correlacionado de manera individual con todos los parámetros analizados (FSC, SSC, y fluorescencias).

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Electrónica (V)

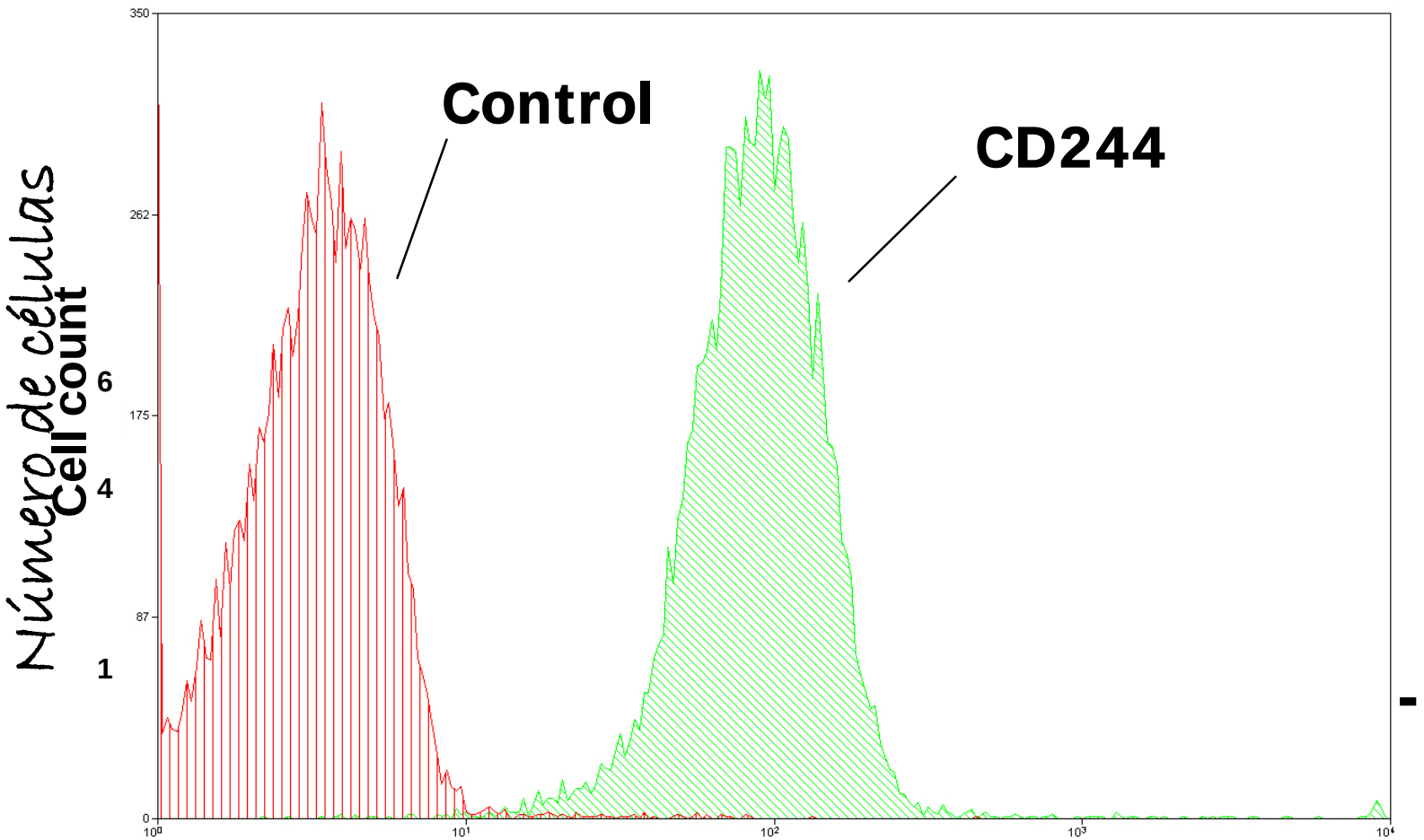




Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Electrónica (VI)

- Histograma uniparamétrico.



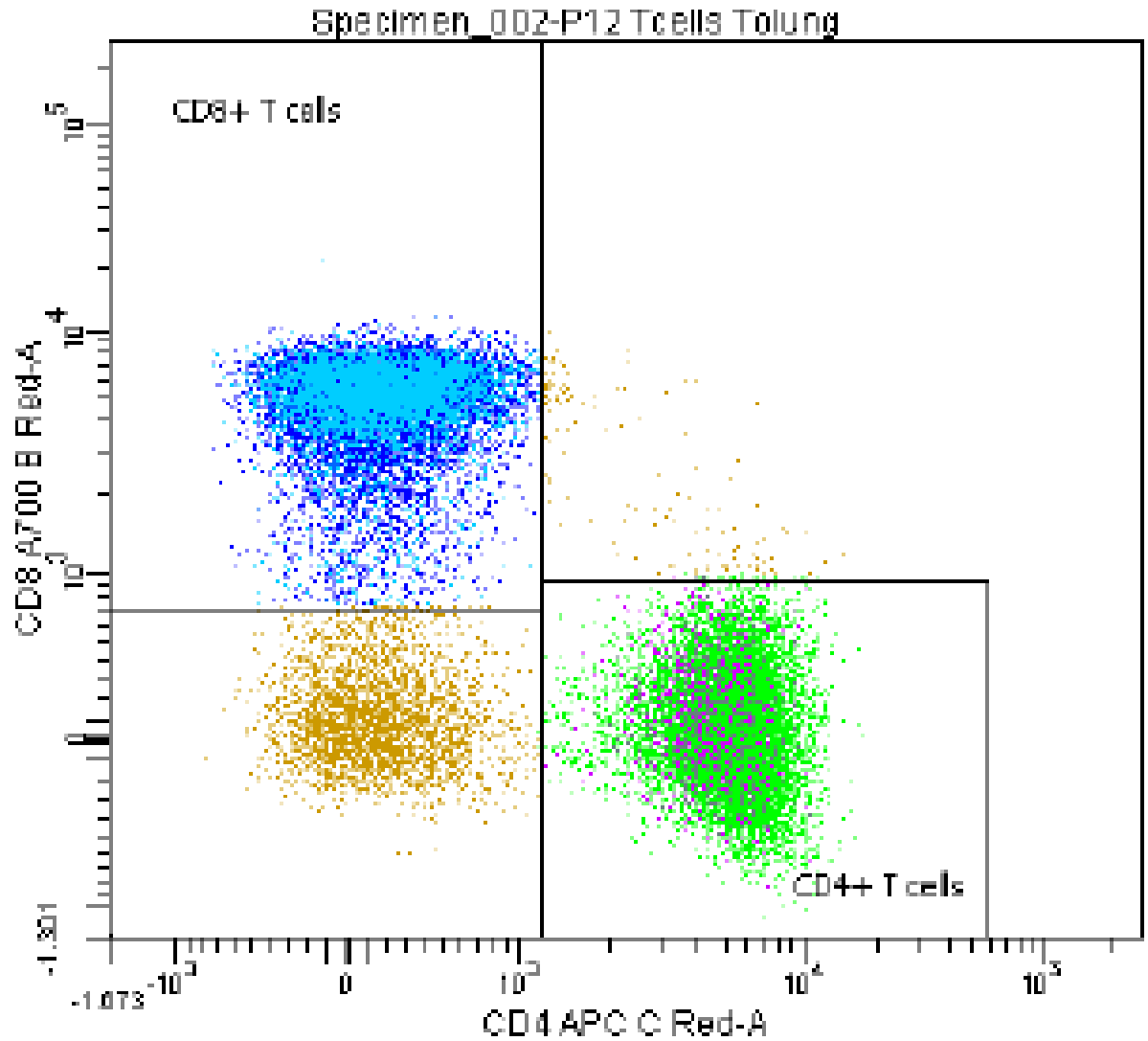
Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Electrónica (VII)

- Histograma biparamétrico.

Pobl
posit
para

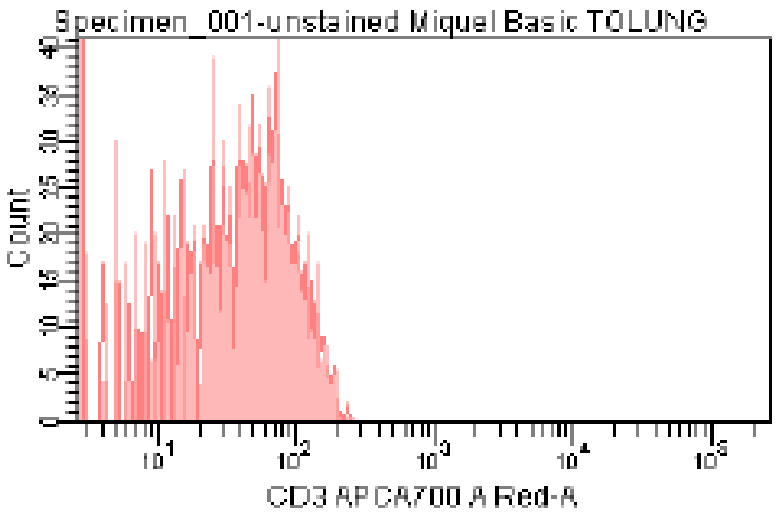
doble

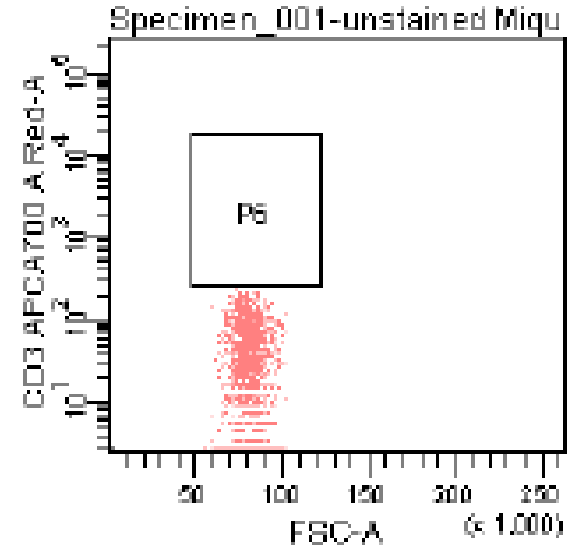


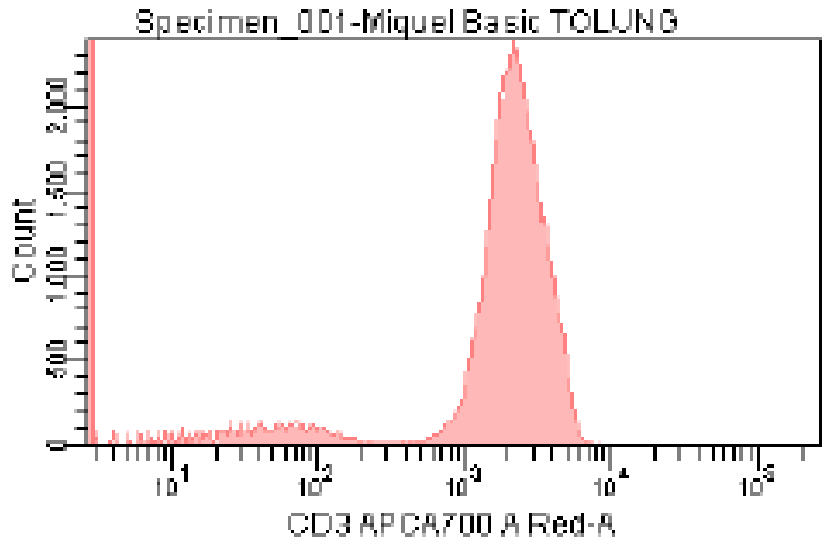
Poblaci
negati

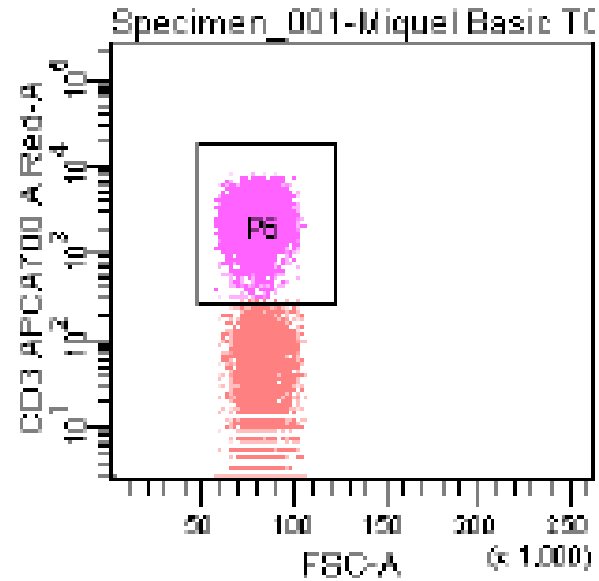
Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Electrónica (VII)







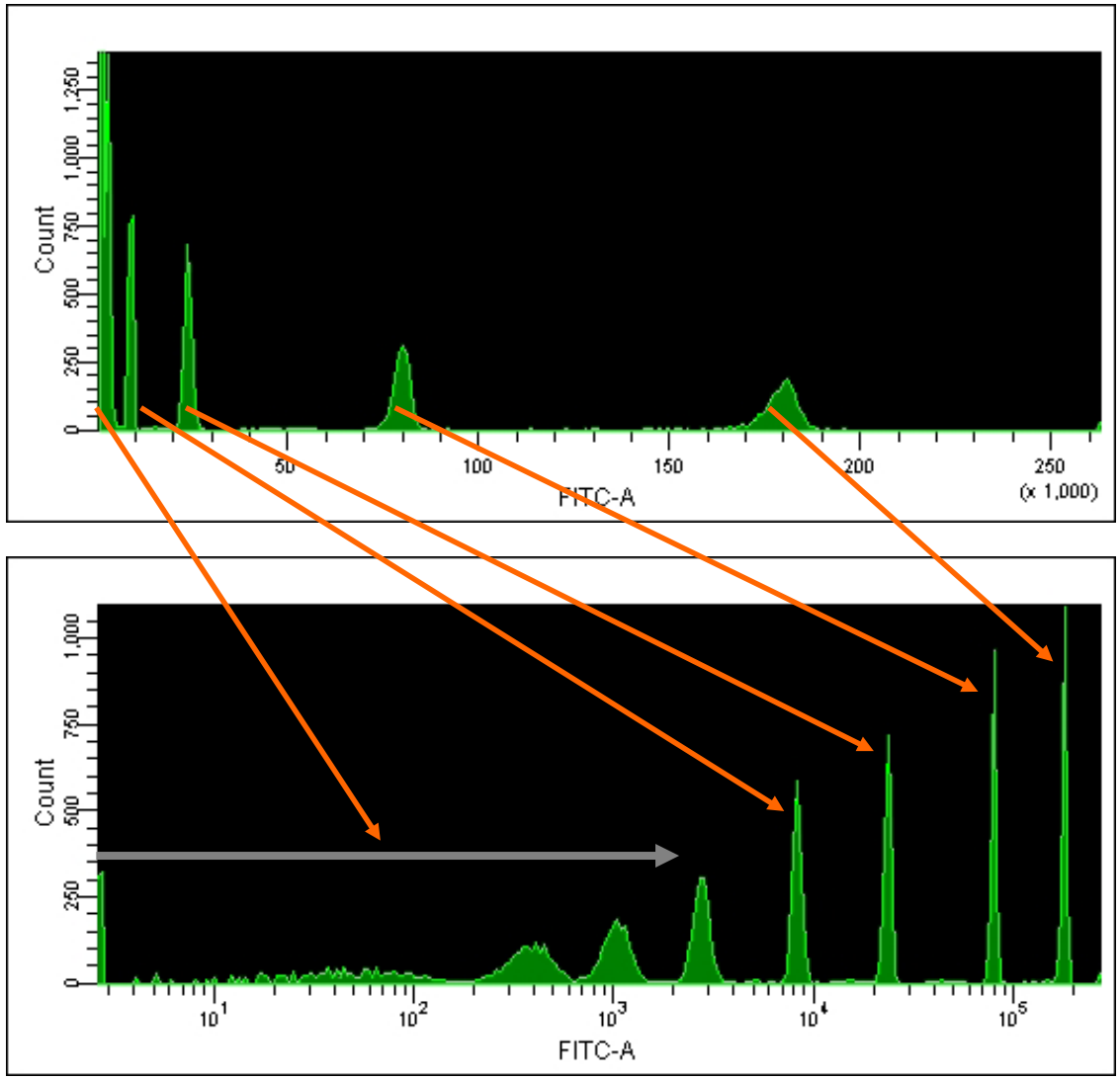


Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Electrónica (VIII)

Escala lineal

Escala logarítmica



Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Componentes de un citómetro de flujo

Fluídica
- Flujo laminar (sistema presurizado).
- Cámaro de flujo (enfoque hidrodinámico).

Óptica
- LASER.
- Luz dispersada y fluorescencia.
- Sistema de filtros para la recolección de la señal.

Electrónica
- Amplificación mediante PMTs.
- Conversión a valores digitales.

Informática
- Análisis en un sistema informático.

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Análisis de datos

El citómetro nos da datos de la muestra que adquirimos:

- Formato Estándar (FCS 2.0, FCS 3.0).
- Archivo de Texto.
- Información de cada célula.
- Necesidad de compartir y comparar datos entre diferentes laboratorios y equipos.

Cell #	FSC-A	SSC-A	FITC-A	PE-A	PerCP-Cy5-5	APC-A
1	91825	117731	3260	1064	95	96
2	91261	125190	115	136	3214	1018
3	93022	112909	70	116	114	17308
4	93433	128917	95	110	150	11776
5	100540	115243	84	7888	890	92
6	88810	151105	62	136	2957	590
7	96170	126448	3260	1141	67	3
8	93497	124832	89	85	43	58
9	91282	100535	31	50	98	12314
10	93755	120241	152	184	113	119
11	95665	102580	96	86	156	151
12	84486	124264	97	163	3198	812
13	99302	134495	142	8425	757	99
14	97278	110935	28	47	80	12283

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

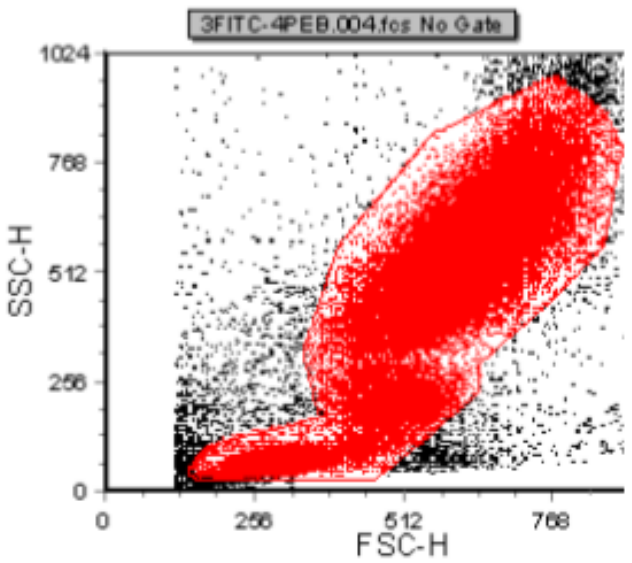
Software (I)

- Distinguimos 3 tipos de archivos:
  - Documento o Protocolo o Plantilla: es exclusivo del software. Nos permite visualizar los datos y escoger la información que deseamos guardar.
  - Instrument Settings: es un archivo de la configuración de los detectores. Nos permite guardar las condiciones de adquisición para poder adquirir muestras en las mismas condiciones.
  - Data: archivo FCS. Contiene la información sobre la muestra y es estándar. Eso nos permite analizar estos datos con otros softwares distintos al de adquisición.

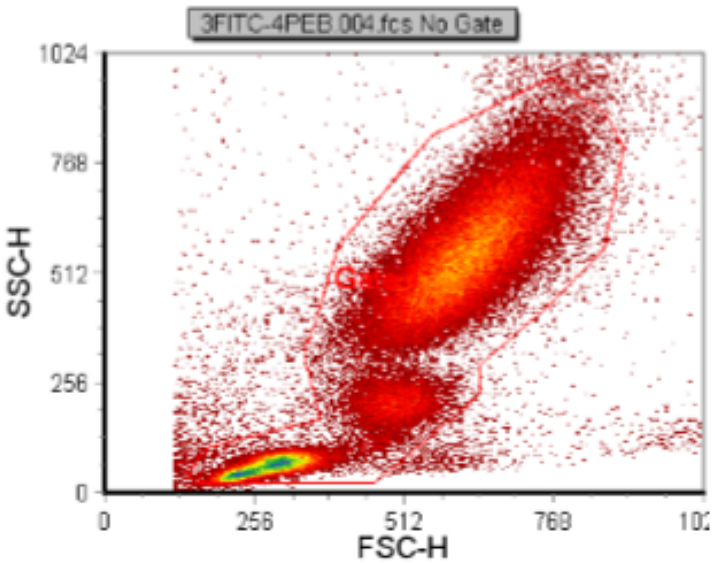
Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Software (II)

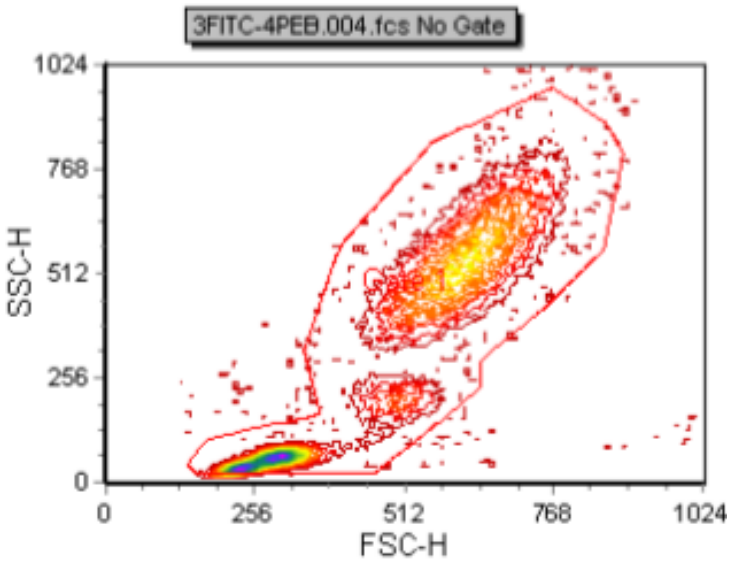
- Las diferentes formas de representar los datos en el software son, en general:
  - Gráficos de puntos biparamétricos:



Dispersión



Densidad

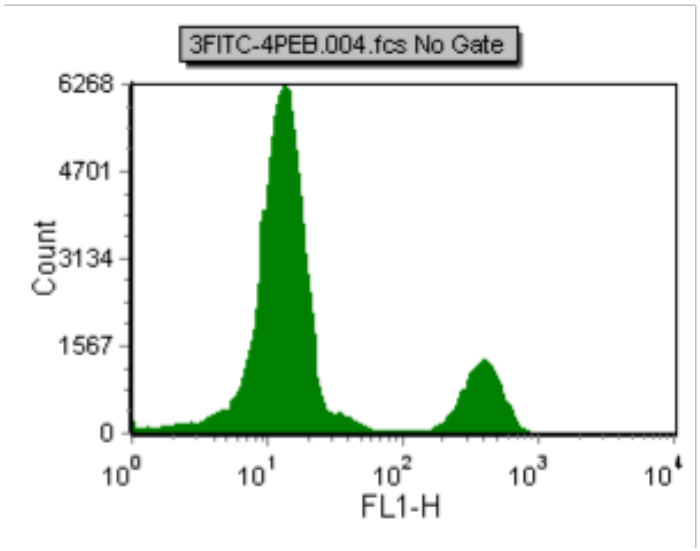


Contorno

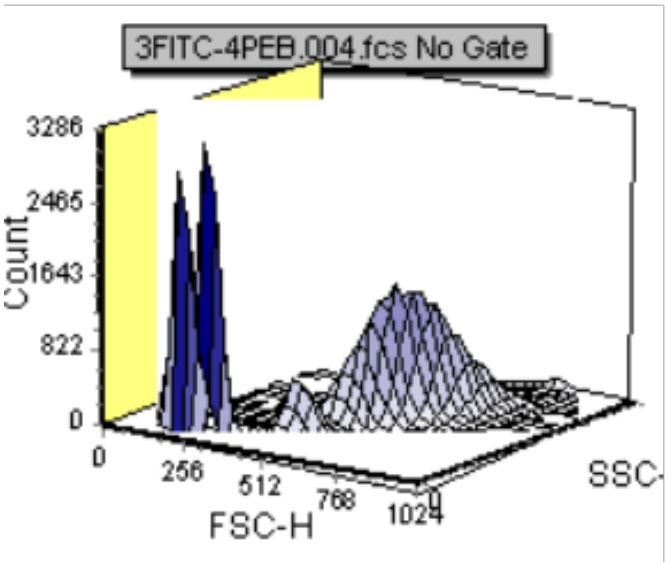
Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Software (III)

Gráficos monoparamétricos:



Gráficos especiales:

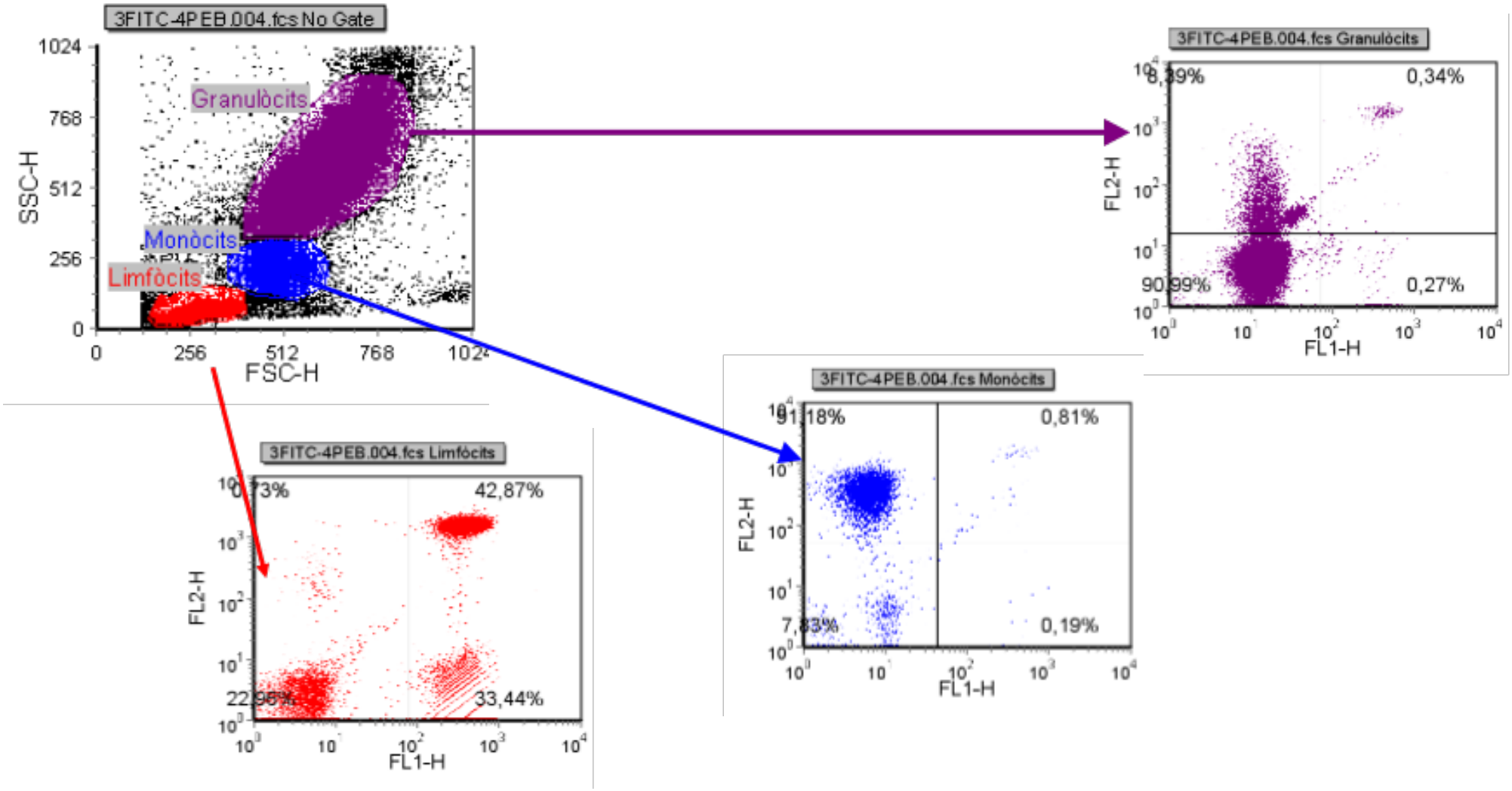


Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Software (IV)

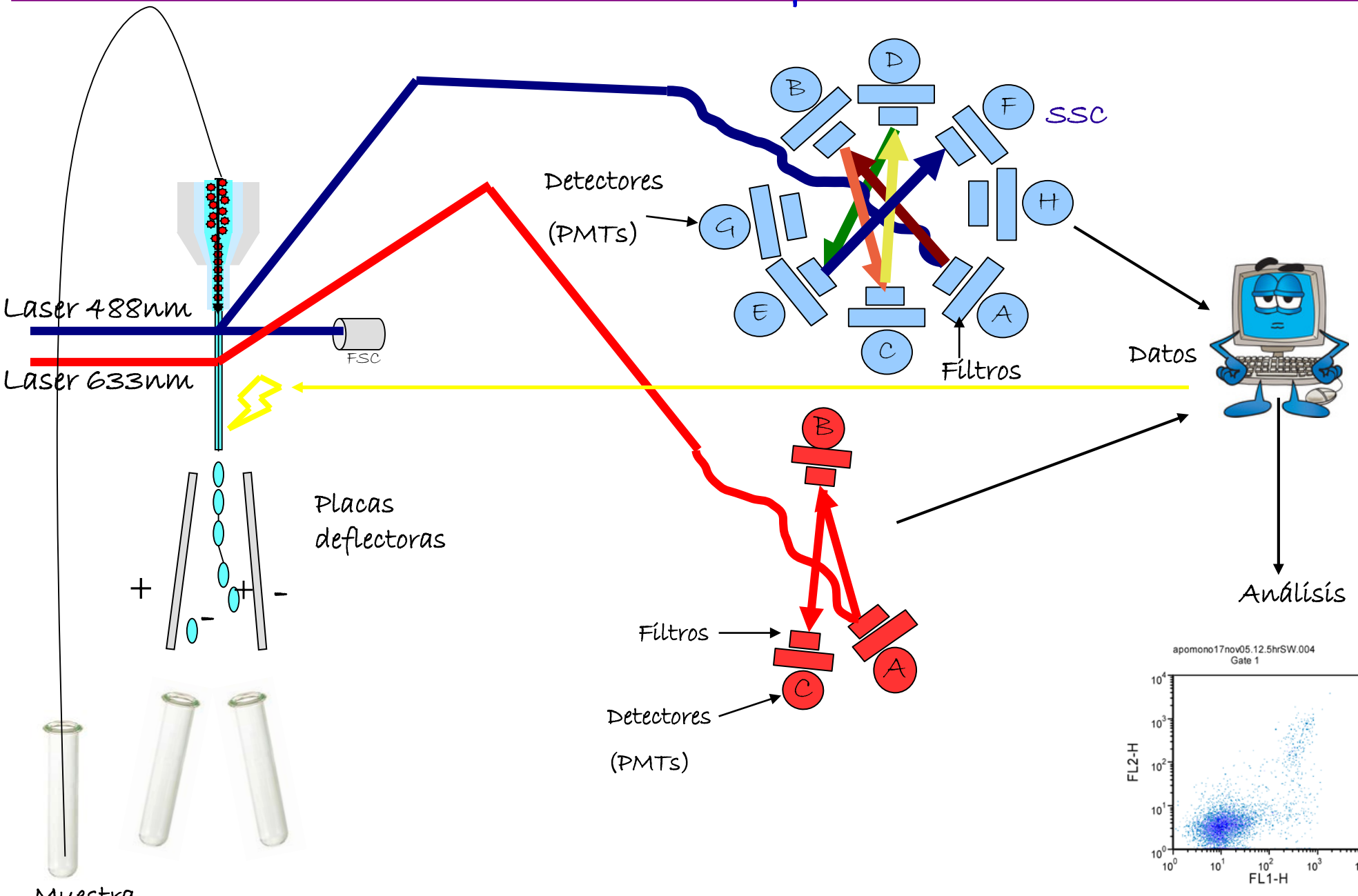
¿Cómo estudiamos la población que nos interesa?

- Utilizamos Regiones y "Gates". Eso nos permite estudiar poblaciones concretas.



Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Esquema de un citómetro-Separador



Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Aplicaciones de la citometría de flujo

- Inmunofenotipaje
- Proliferación celular
- Ciclo celular (ploidías)
- Apoptosis
- Esayos funcionales (potencial de membrana mitocondrial, extrusión sondas fluorescentes, metabolismo oxidativo...)
- Análisis de marcadores de superficie
- Análisis de proteínas intracelulars
- Comprobación eficiencia de transfección, análisis de proteínas fluorescentes.
- Estudio de microorganismos
- Fosforilación de proteínas
- Sorting de poblaciones puras con características específicas de interés.

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Aspectos a tener en cuenta en el planteamiento de un experimento de citometría de flujo

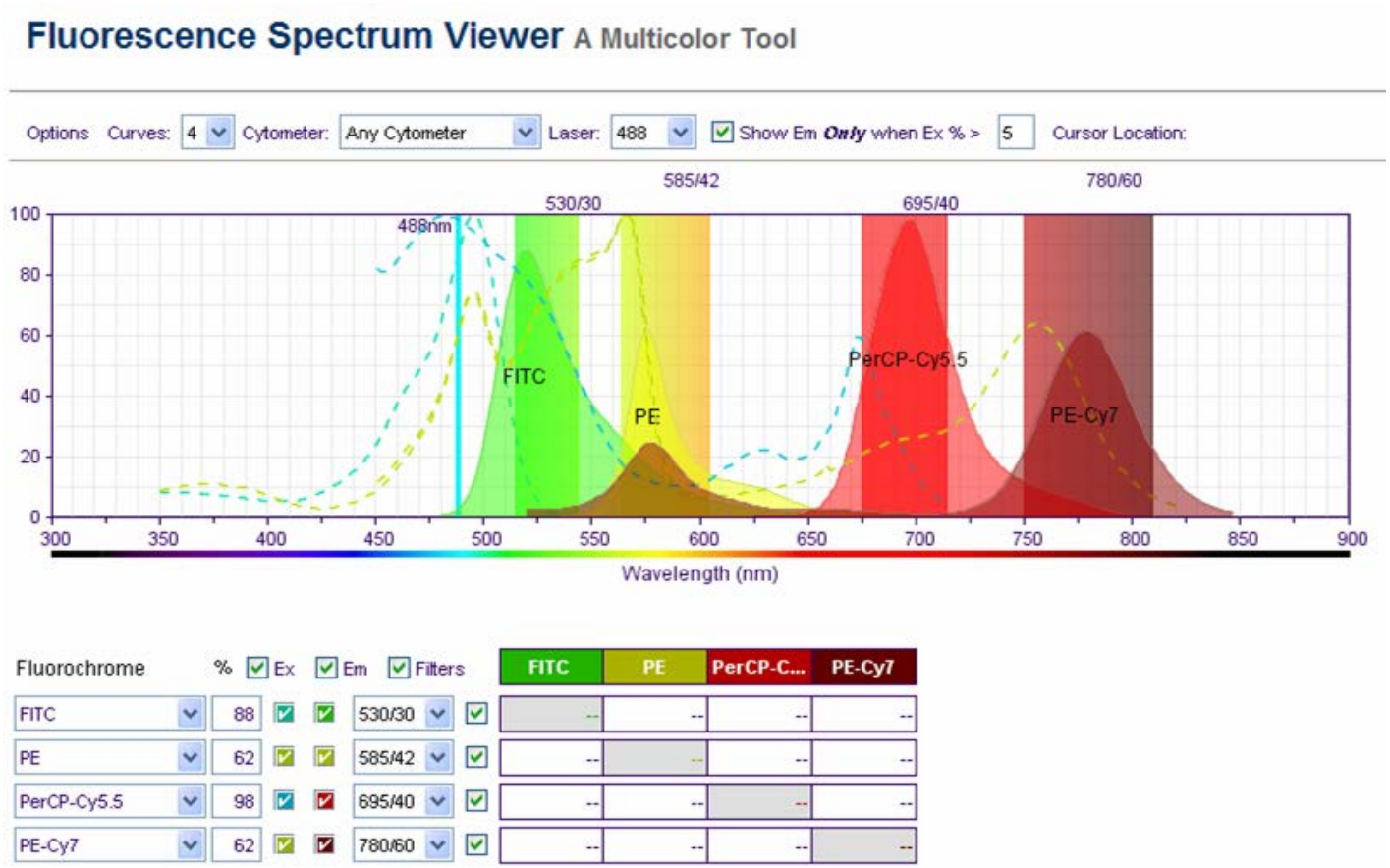
- Qué fluorocromos podemos medir?
- Qué fluorocromos queremos medir?
- Cuántos queremos medir simultáneamente?
- Cómo interaccionan entre ellos?

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Aspectos a tener en cuenta en el planteamiento de un experimento de citometría de flujo

http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html

http://www.bdbiosciences.com/us/s/spectrumviewer



Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Aspectos a considerar

- El equipo da valores absolutos.....pero no sabe si una muestra presenta fluorescencia o no. Es necesario referenciarla a un control.
- Aumentar la velocidad de paso de la muestra (aumentando el diferencial de presiones) dificulta la resolución de las poblaciones.
- El software nos permite ver los datos de una forma estadística. Nos muestra los datos de manera que los podamos interpretar.
- Antes de diseñar un experimento preguntad al personal de la UAT.

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

UAT – Plataforma de Citómica

En la UAT, disponemos de 2 citómetros FacsCalibur de BD. Los citómetros disponen de 2 LASERS.

- LASER Azul que emite luz a 488nm de longitud de onda.
- LASER Rojo que emite luz a 633nm.

Detección de 4 fluorescencias simultáneamente. 3 en el LASER Azul y 1 en el LASER Rojo.

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

UAT – Plataforma de Citómica

Disponemos de 1 citómetro Fortessa de BD. Equipado con 4 LASERes.

- LASER Azul que emite luz a 488nm de longitud de onda.
- LASER Rojo que emite luz a 633nm de longitud de onda.
- LASER Violeta que emite luz a 405nm de longitud de onda.
- LASER Amarillo-verde que emite luz a 561nm de longitud de onda.

Detección de 16 fluorescencias simultáneamente. 2 en el azul, 5 en el Amarillo-verde, 3 en el Rojo y 6 en el Violeta.

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

UCTS – Plataforma de Citómica

- También disponemos de 1 separador celular que disponen de 4 LASERES (488 nm, 633 nm , 405 nm , 561 nm) y 13 detectores de fluorescencia.

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

Prácticas

- Se realizarán unas prácticas para aprender a usar el citómetro en sus aspectos más básicos:
  - Encender el citómetro
  - Crear un documento de trabajo
  - Pasar muestras
  - Compensar
  - Obtener datos
  - Apagar el citómetro
  - Análisis de datos básico FCSExpress

Vall d'Hebron
Institut de Recerca

UAT – Plataforma de Citómica

Responsable UAT:

Dra Rosa Prieto email: rosa.prieto@vhir.org

Responsable Plataforma de Citómica:

Dra Irene Sales email: irene.sales@vhir.org

Email plataforma: citom@vhir.org

Telf: 934894179 (ext.4179)

REVEALING A NEW
HORIZON

Multicolor Flow Cytometry

Alberto Crespo Guardo, PhD.
Application Specialist
BD Biosciences
Master of Immunology
March 25th, 2019

BD

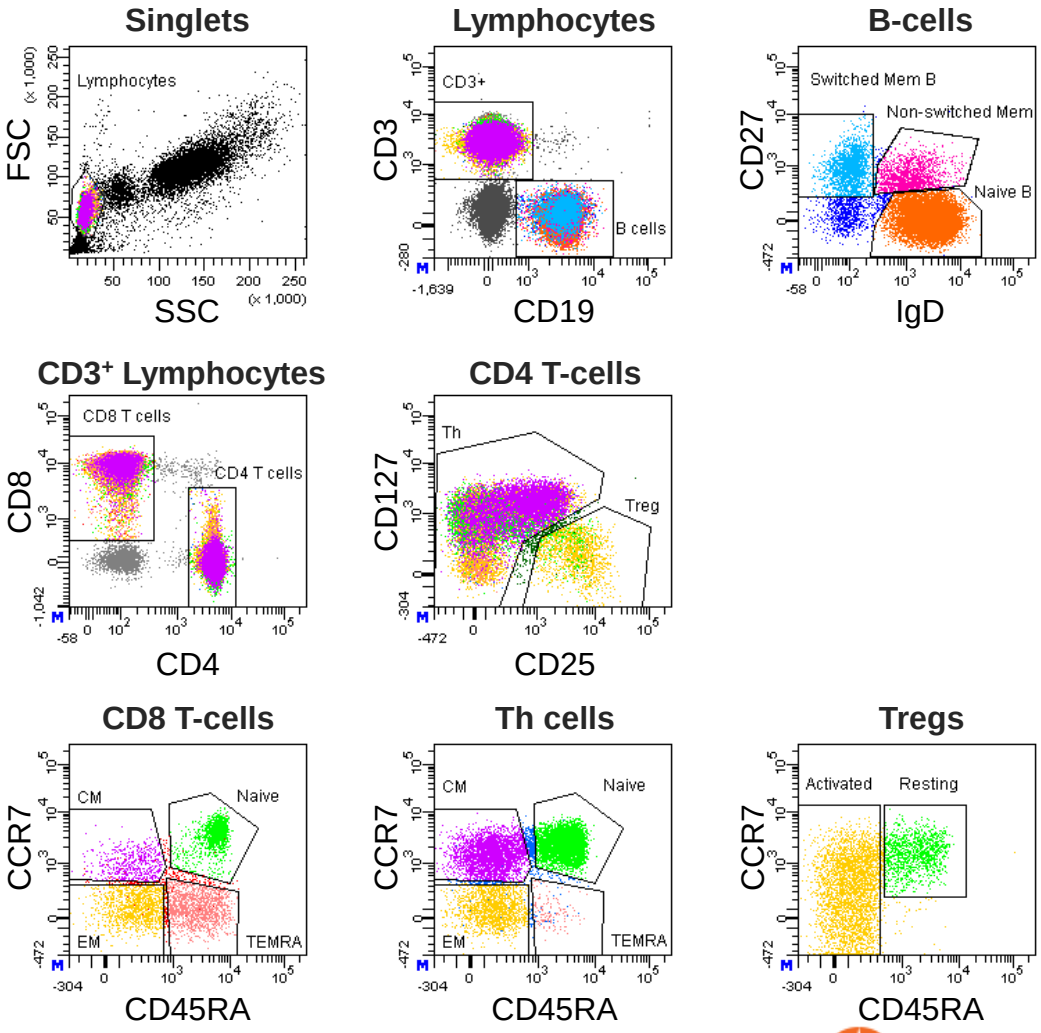
Agenda

- Normas básicas para el diseño de paneles (60 min)
- Ejercicio práctico: diseño de un panel (45 min)
- Uso del la herramienta GPS (Guided Panel Solution) (15 min)

Previous considerations
e.g. Defining T- and B-cell populations

Marker
CD45RA
CD3
CD4 + IgD
CD19
CD25
CD127
CCR7
CD27
CD8

Menganito et al., 2019



BD

Previous considerations
e.g. Defining T- and B-cell populations

Menganito et al., 2019

Fluorochrome	Marker
BD Horizon™ V450	CD45RA
BD Horizon™ V500	CD3
FITC	CD4 + IgD
PerCP-Cy™5.5	CD19
PE-Cy™5	CD25
PE-Cy™7	CD127
Alexa Fluor® 647	CCR7
Alexa Fluor® 700	CD27
APC-H7	CD8

Scenario 1: Have you checked your instrument and its configuration?

Marker	Fluorochrome
CCR7	BD Horizon™ V450
CD4 + IgD	BD Horizon™ V500
CD3	FITC
	???
CD25	PE-Cy™5
CD27	PE-Cy™7
	???
CD127	Alexa Fluor® 700
CD45RA	APC-H7

Scenario 2: You will save ab_s but… have you checked how it works?

BD

Elements of multicolor flow cytometry

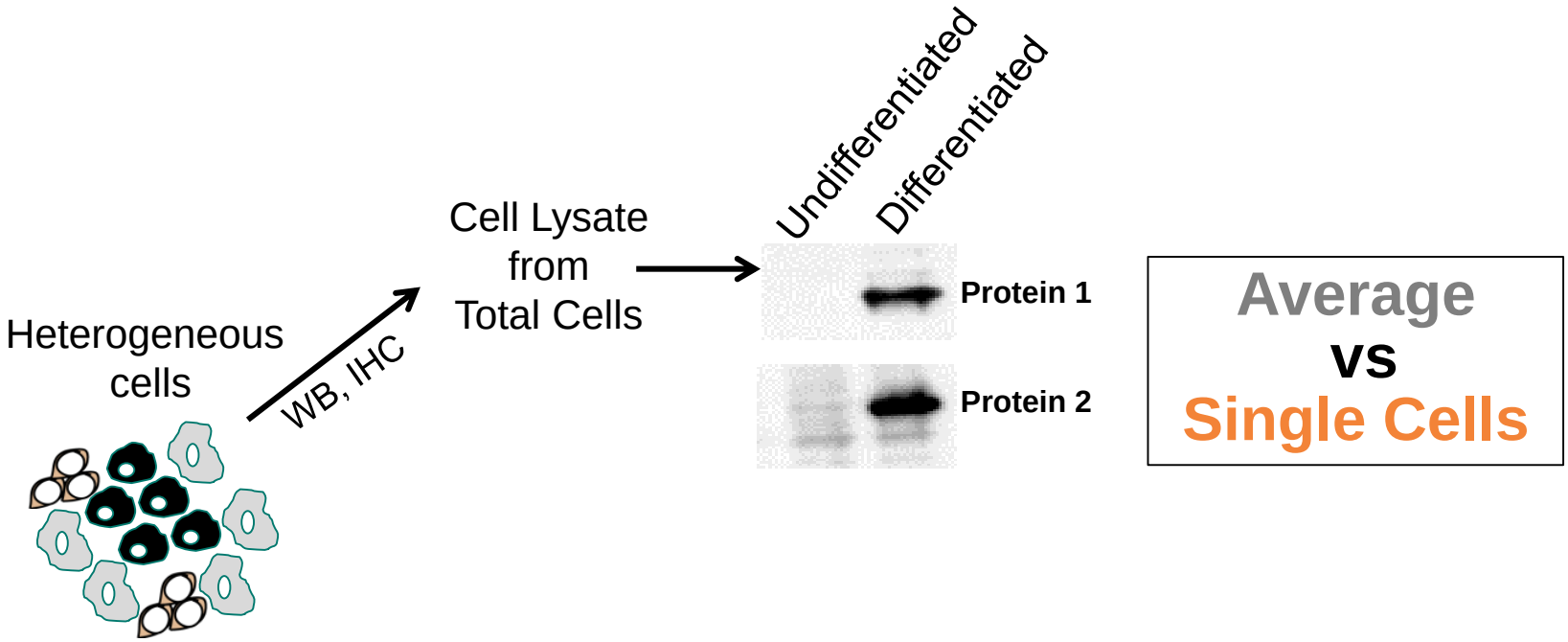
Considerations in designing panels

Biology
Antigen density &
Co-expression

Instrument
Set-up and
Sensitivity

Fluorochrome
Brightness and
Spillover

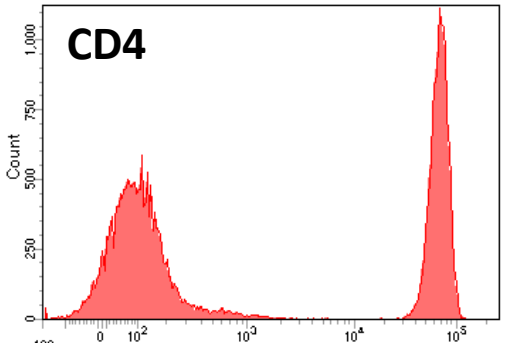
The power of flow cytometry: enables single-cell protein expression analysis & quantitation



Leucocyte antigen expression

- **Primary**

  Well characterized, easily classified as positive or negative, typically define broad subsets or lineages
  - Examples: CD3, CD4



Mahnke YD, Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin Lab Med*. 2007;27:469-485.

How to know the expression levels of your cells?

- Previous lab work
- Scientific literature
- Testing
- Asking to BD: “Our scientific support can help you!” (help.biosciences@europe.bd.com or Applications_spain@bd.com)

Defining the human antigen proteome

- Assess the density of surface antigens of all known CD markers on normal blood cells
- Create an antigen density and expression resource for use in multicolor panel design

Cell	Antigen	Molecules per Cell	Reference
T cell	TCR	100,000	Cho, B. et al. 2000. *PNAS*. 98:1723.
	CD2	55,000	Ginaldi, L. et al. 1996. *J Clin Pathol*. 49:539.
	CD3	124,000	Ginaldi, L. *et al. 1996. Br J Haematol. 93:921.*
	CD5	90,000	Ginaldi, L. et al. 1996. J Clin Pathol. 49:539.
	CD7	20,000	Ginaldi, L. *et al. 1996. Br J Haematol. 93:921.*
	CD45	>200,000	Glatting, G. *et al. 2006. J Nucl Med. 47:1335.*
CD4+ T cell	CD4	100,000	Davis, K. *et al. 1998. Cytometry. 33:197.*
	CD28	20,000	Bryl, E. *et al. 2005. Arthritis Rheum. 52:2996.*
	CCR5	4,000-24,000	Reynes, J. *et al. 2006. J Infect Dis. 181:927.*
CD8+ T cell	CD8	90,000	Takada, S. *et al. 1987. J Immunol. 139:3231.*
	CD28	15,000	Bryl, E. *et al. 2005. Arthritis Rheum. 52:2996.*
B cell	CD19	18,000	Ginaldi, L. *et al.* 1998. *Pathobiology*. 66:17.
	CD20	109,000	Ginaldi, L. *et al.* 1998. *Pathobiology*. 66:17.
	CD21	210,000	Ginaldi, L. *et al.* 1998. *Pathobiology*. 66:17.
	CD22	14,000	Ginaldi, L. *et al.* 1998. *Pathobiology*. 66:17.
	HLA-DR	85,000	Ginaldi, L. *et al.* 1998. *Pathobiology*. 66:17.
	CD11a	10,000	Unternaehrer, J. *et al.* 2007. *PNAS*. 104:234.
	CD40	2,000	Unternaehrer, J. *et al.* 2007. *PNAS*. 104:234.
	CD86	16,000	Unternaehrer, J. *et al.* 2007. *PNAS*. 104:234.
	CD80	2,000	Unternaehrer, J. *et al.* 2007. *PNAS*. 104:234.
Dendritic cell	CD11a	27,000	Unternaehrer, J. *et al.* 2007. *PNAS*. 104:234.
	CD40	17,000	Unternaehrer, J. *et al.* 2007. *PNAS*. 104:234.
	CD80	132,000	Unternaehrer, J. *et al.* 2007. *PNAS*. 104:234.
	CD86	208,000	Unternaehrer, J. *et al.* 2007. *PNAS*. 104:234.
Monocyte	CD14	110,000	Antal-Szalmas, P. *et al. 1997. J. Leukoc. Biol. 61:721.*
	CD32	21,000	Antal-Szalmas, P. *et al. 1997. J. Leukoc. Biol. 61:721.*
	CD64	13,000	Antal-Szalmas, P. *et al. 1997. J. Leukoc. Biol. 61:721.*
Neutrophil	CD14	3,500	Antal-Szalmas, P. *et al. 1997. J. Leukoc. Biol. 61:721.*
	CD16	225,000	Antal-Szalmas, P. *et al. 1997. J. Leukoc. Biol. 61:721.*
NK cell	CD56	10,000	Ginaldi, L. *et al.* 1996. *J Clin Pathol*. 49:539.
Red Blood Cell	Glycophorin A	340,000	Antal-Szalmas, P. *et al. 1997. J. Leukoc. Biol. 61:721.*
Basophil	CD23	15,000	MacGlashan, D. *et al. 2000. J Leuk Biol. 68:479.*

BD Biosciences

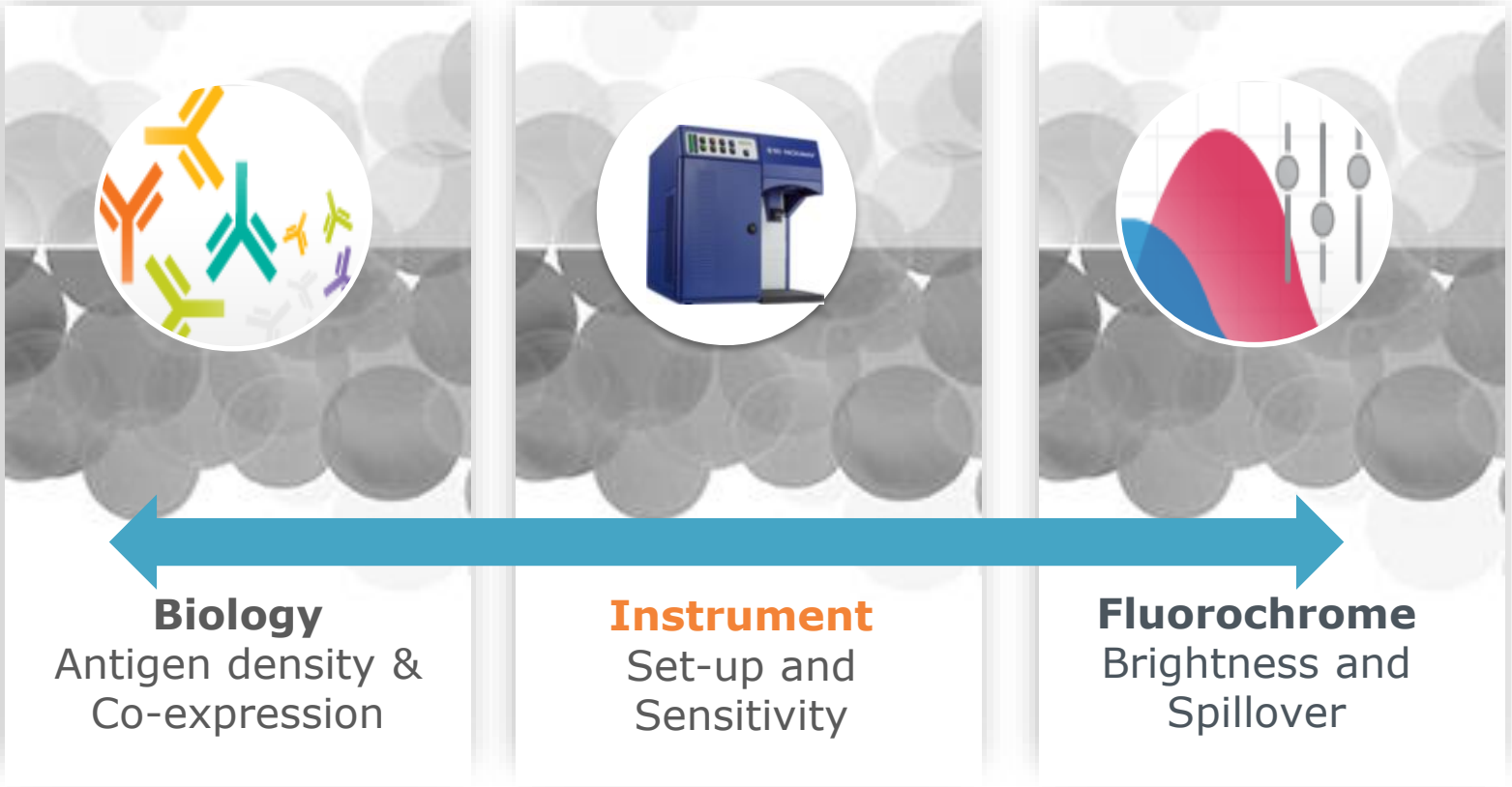
Density of Common Human Surface Markers

Subset	Antigen	Density molecules/cell
Lymphocytes	CD3	32,000
	CD4	36,400
	CD8	65,500
	CD19	7,800
T Cells ($CD3^+CD4^+$ Lymphocytes)	CD25	600
	$CD25^{hi}$	3,400
	CD27	10,900
	CD28	7,700
	CD45RA	33,400
	CD45RO	12,600
	CD122	5,300
	CD127	2,000
	CD132	400
	CD194 (CCR4)	2,500
	CD197 (CCR7)	2,000
B Cells ($CD19^+$ Lymphocytes)	CD20	24,600
	$CD24^{mid}$	3,000
	$CD24^{hi}$	16,100
	CD27	3,200
	$CD38^{mid}$	2,800
	$CD38^{hi}$	15,900
	CD138	400
	IgD^{mid}	4,900
	IgD^{hi}	23,800
	IgG	28,100
	IgM	3,800

Antigen density determined on human whole blood samples using PE conjugated antibodies to each antigen and BD Quantibrite™ beads for quantitation.

Elements of multicolor flow cytometry

Considerations in designing panels



Biology
Antigen density &
Co-expression

Instrument
Set-up and
Sensitivity

Fluorochrome
Brightness and
Spillover

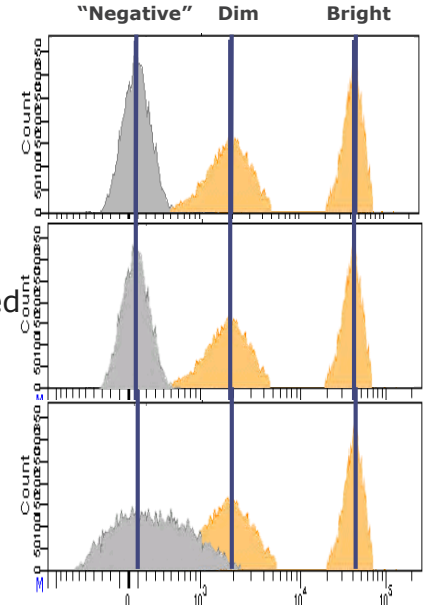
Resolution vs background & spread

- Resolution: The degree to which a flow cytometer can distinguish dimly stained cells from unstained cells.

Negative population has low background; populations well resolved.

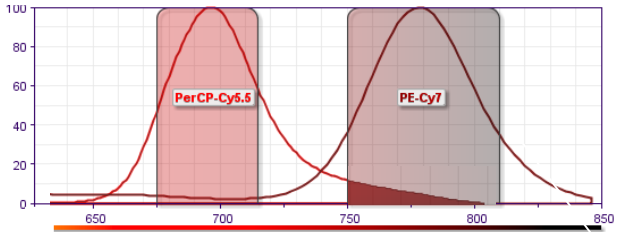
Negative population has high background; populations not resolved.

Negative population has low background but high rSD (spread); populations not resolved.



The ability to resolve populations is a function of both **background** *and* **spread** of the negative population.

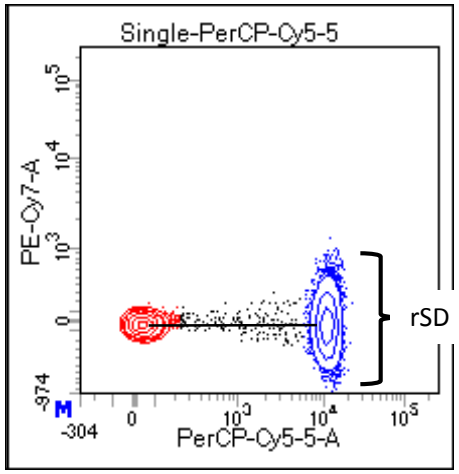
Fluorescence spillover



Fluorochromes spill over into other detectors; for example, PerCP-Cy5.5 spills into the PE-Cy7 detector.

This fluorescence spillover contributes to:

- Increased background (MFI)
- Spread (measured as rSD)

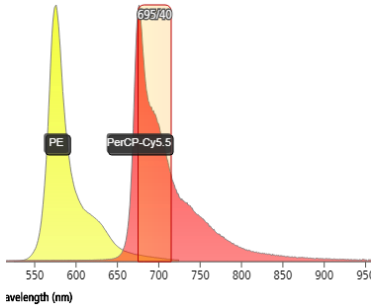


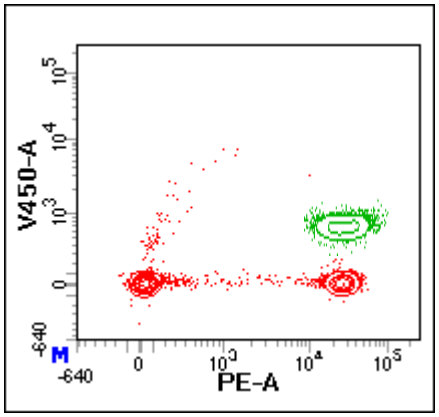
This "background" is subtracted in the process called compensation.

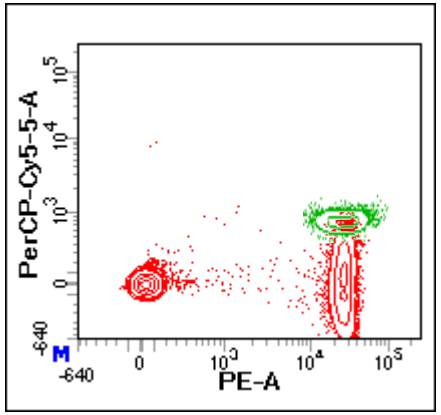
	Negative		Positive	
	MFI	**rSD**	**MFI**	**rSD**
No comp	12	29	3,098	291
Comp	4	29	3	289

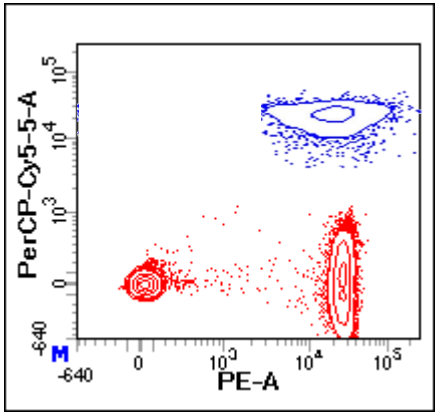
Spread affects the panel resolution

- CD4 PE causes spread in PerCP-Cy5.5 channel







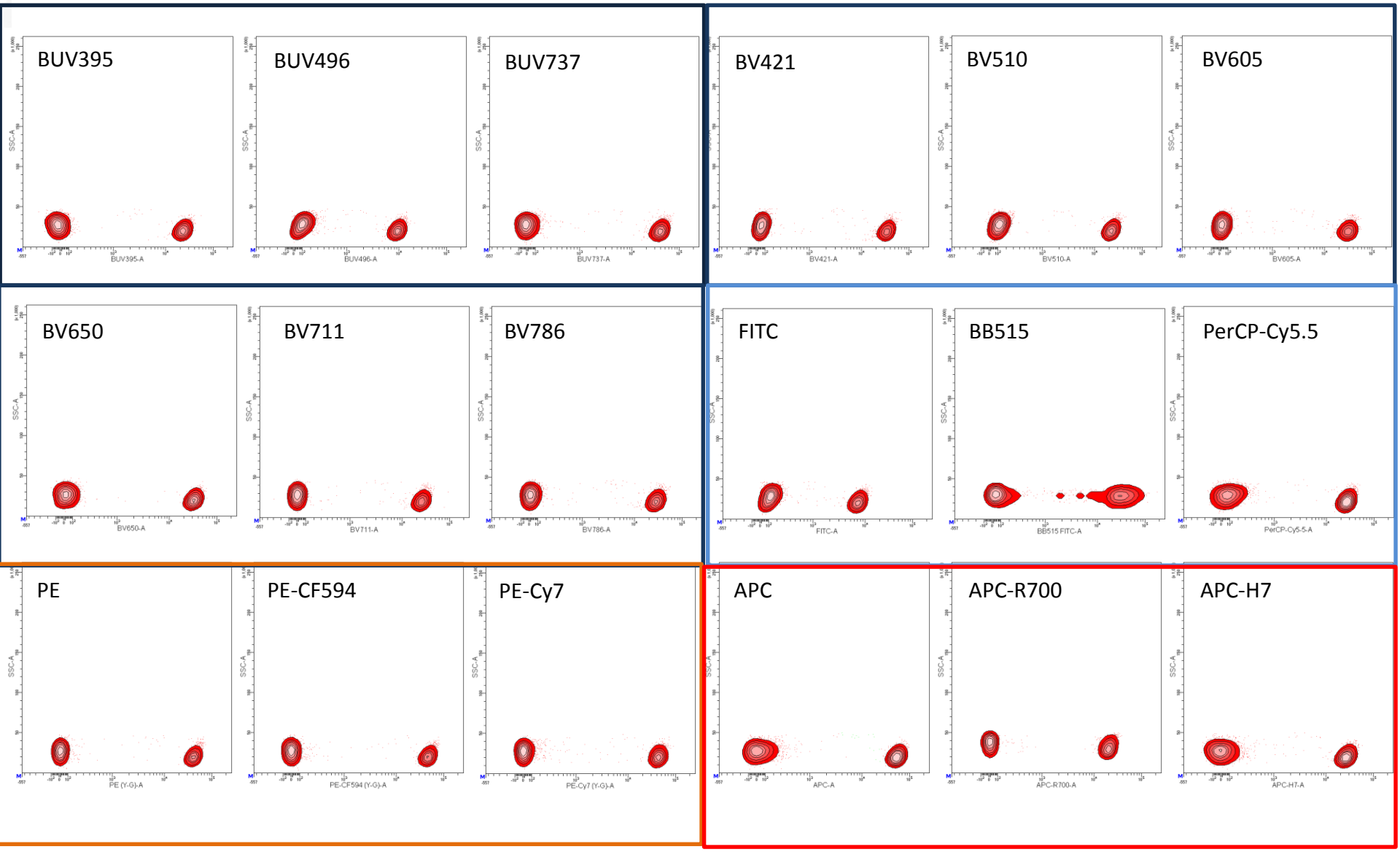


Assessing resolution using CD4, CD19 and CD127

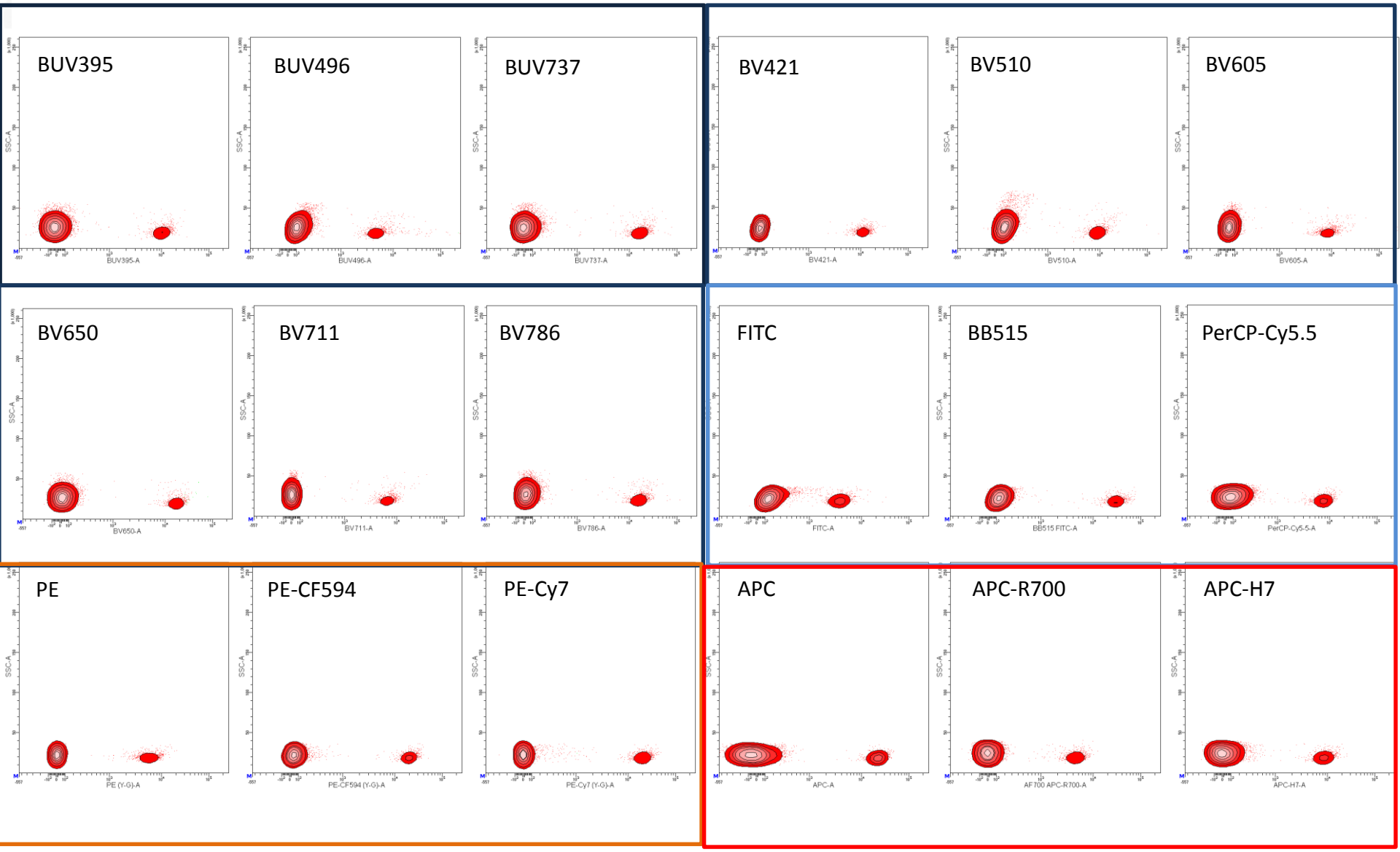
- CD4, CD19 and CD127 are receptors known to be expressed at high (45,000 receptors), medium (10,000 receptors) and low (2,500 receptors) density, respectively, on normal human lymphocytes
- Blood cells are stained with antibody conjugated with different fluorochromes compatible with the instrument configuration

BD

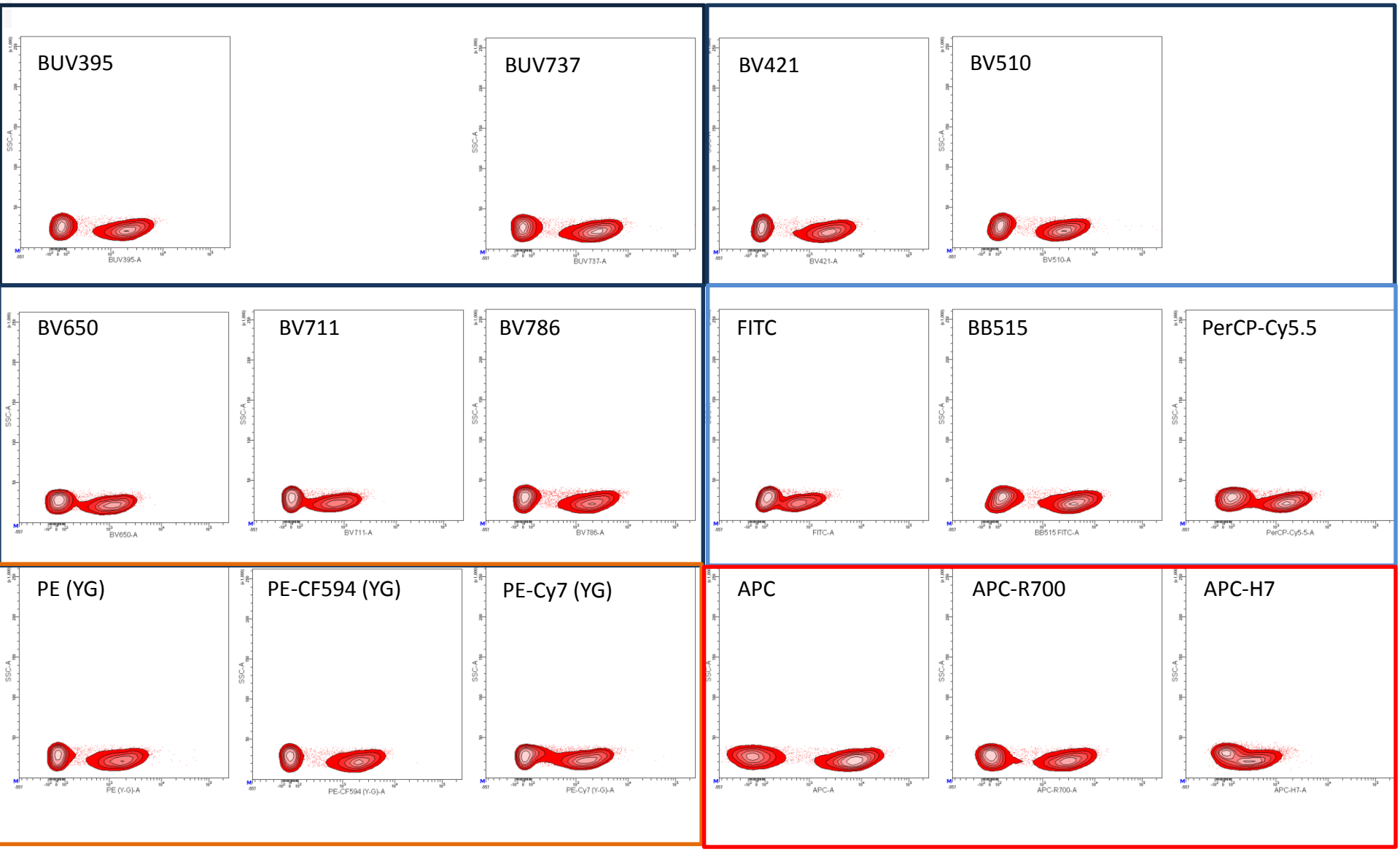
Resolution: CD4 (high)



Resolution: CD19 (medium)

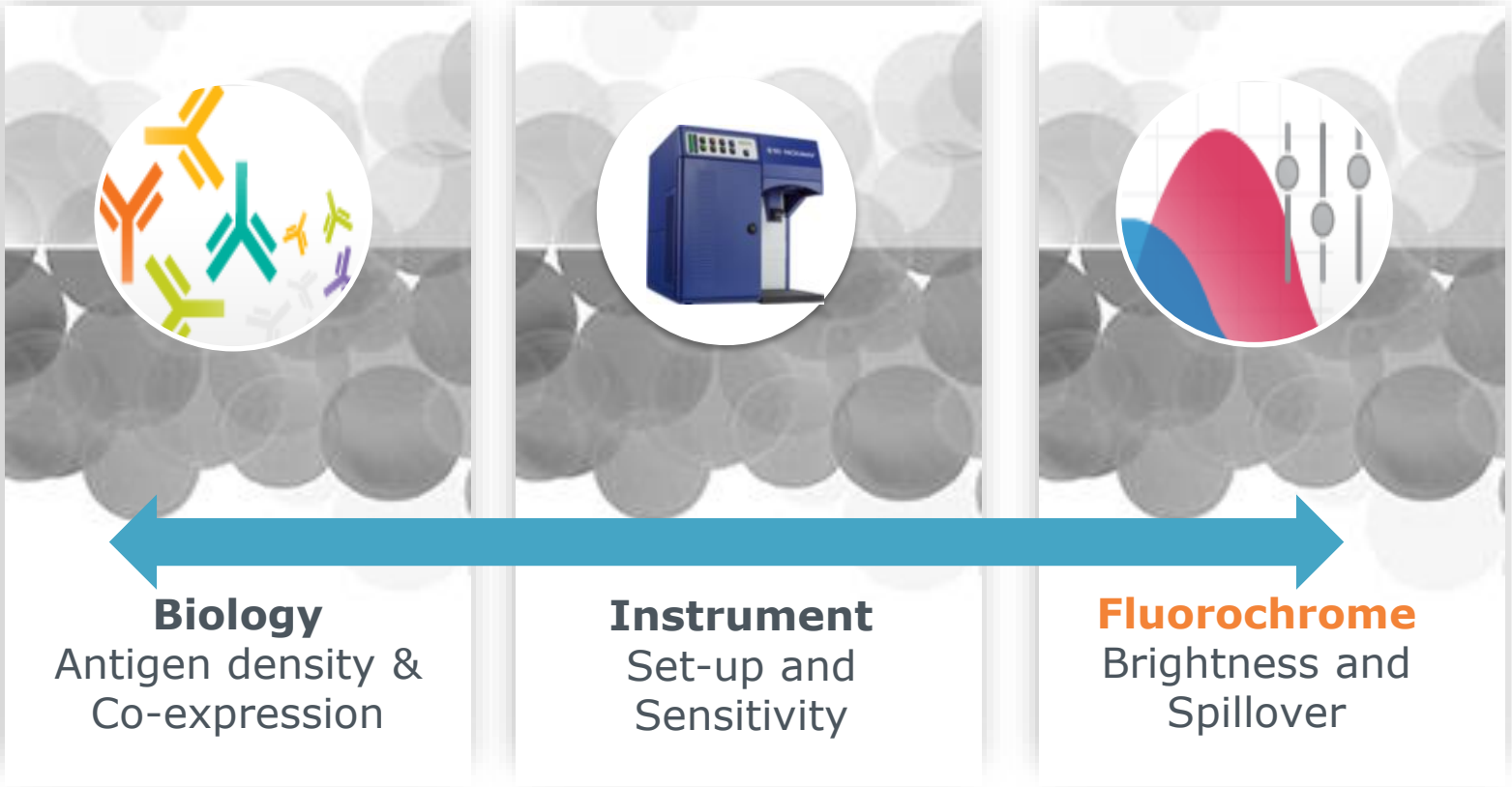


Resolution: CD127 (low)



Elements of multicolor flow cytometry

Considerations in designing panels

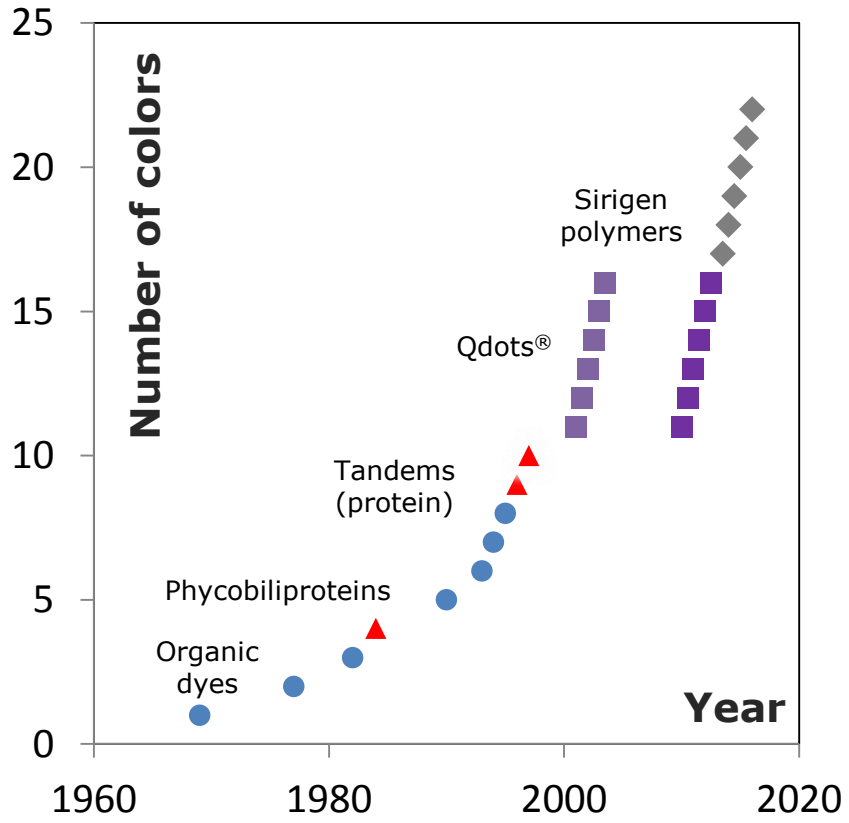


Biology
Antigen density &
Co-expression

Instrument
Set-up and
Sensitivity

Fluorochrome
Brightness and
Spillover

Evolution of fluorochromes



- The development of new fluorescent dye choices, plus development of monoclonal antibody reagents, has driven major advances in flow cytometry.

CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. Engel P, Boumsell L, Balderas R, et al. *J Immunol.* 2015 Nov 15;195(10):4555-4563.

BD

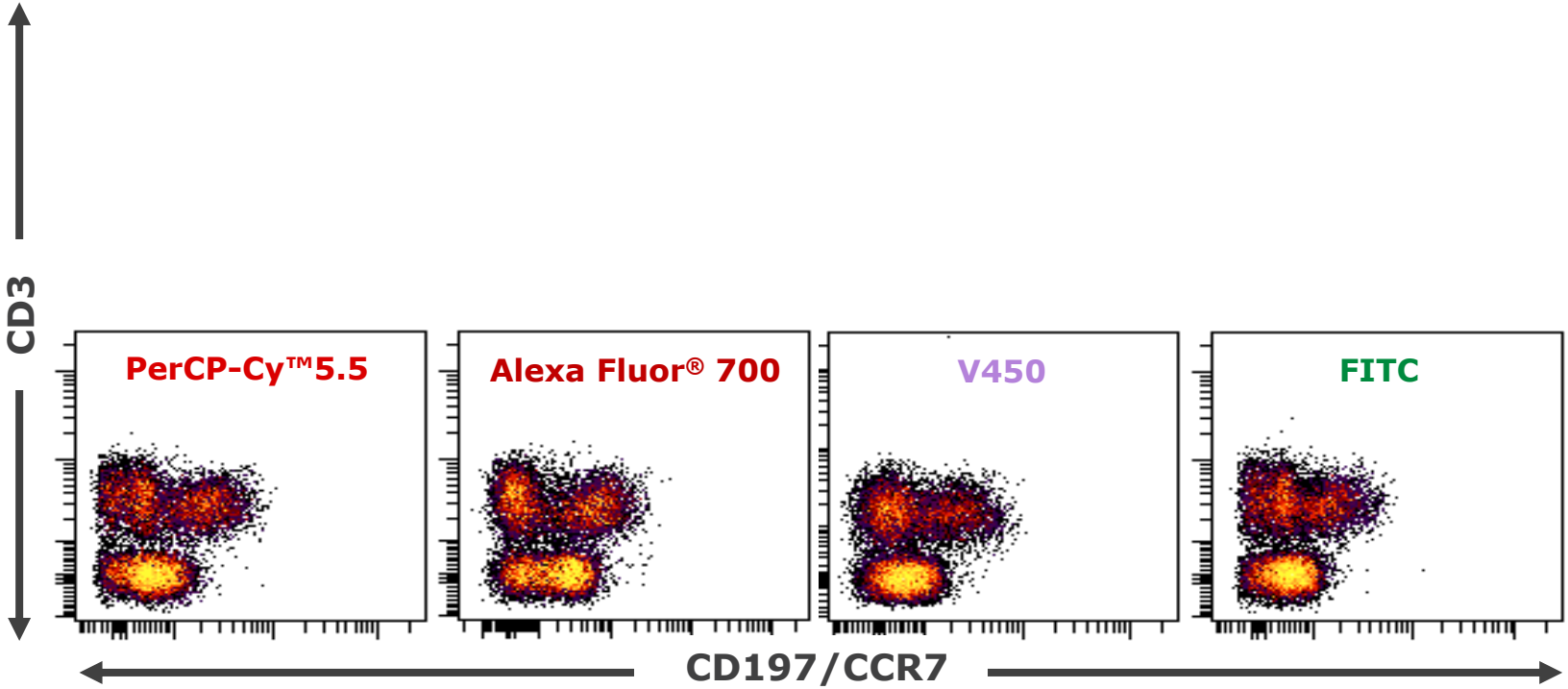
Fluorochrome choices

Laser	Emission							
Ultraviolet (355 nm)	BUV395		BUV496	BUV563		BUV661	BUV737	BUV805
Violet (405 nm)		BV421 V450	BV480 BV510 V500		BV605	BV650	BV711	BV786
Blue (488 nm)			BB515 FITC Alexa Fluor® 488	PE	PE-CF594	PE-Cy™5	BB700 PerCP PerCP-Cy5.5	PE-Cy™7
Yellow/Green (561 nm)				PE	PE-CF594	PE-Cy5	PE-Cy5.5	PE-Cy7
Red (640 nm)						APC Alexa Fluor® 647	APC-R700 Alexa Fluor® 700	APC-H7 APC-Cy7

Choice of fluorochromes depends on the available instrument configuration and the total number of markers being used in an experiment.

BD

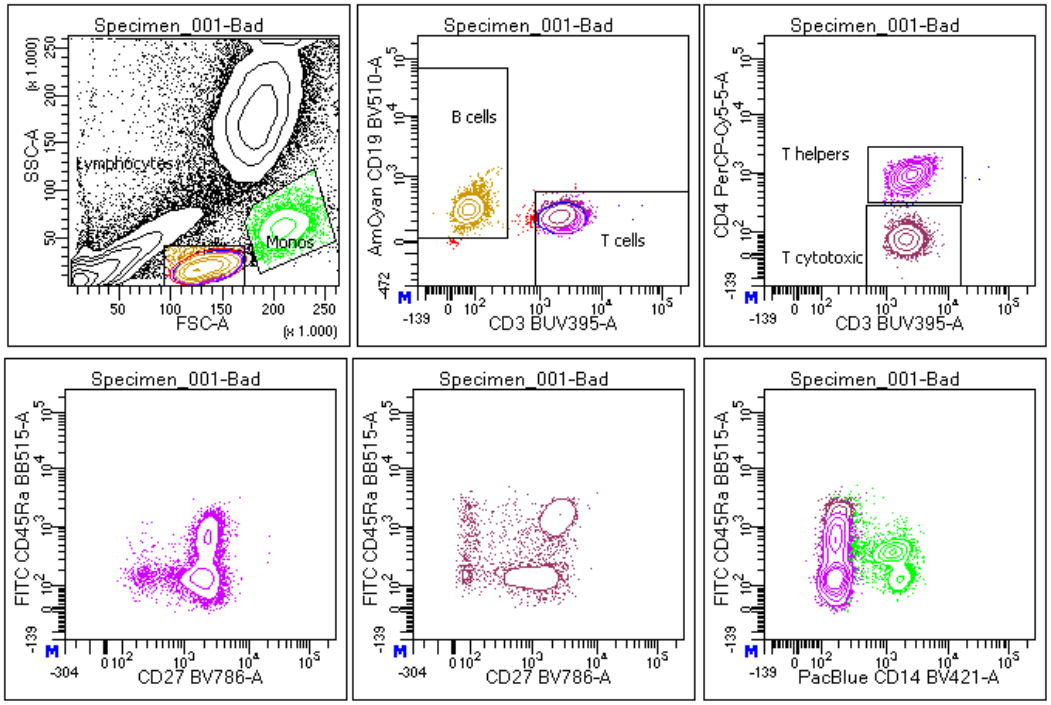
Fluorochromes reveal biology



- The proper choice of fluorochrome helps us understand more about the biology of the experiment
- Bright dyes are important when looking at dim antigens

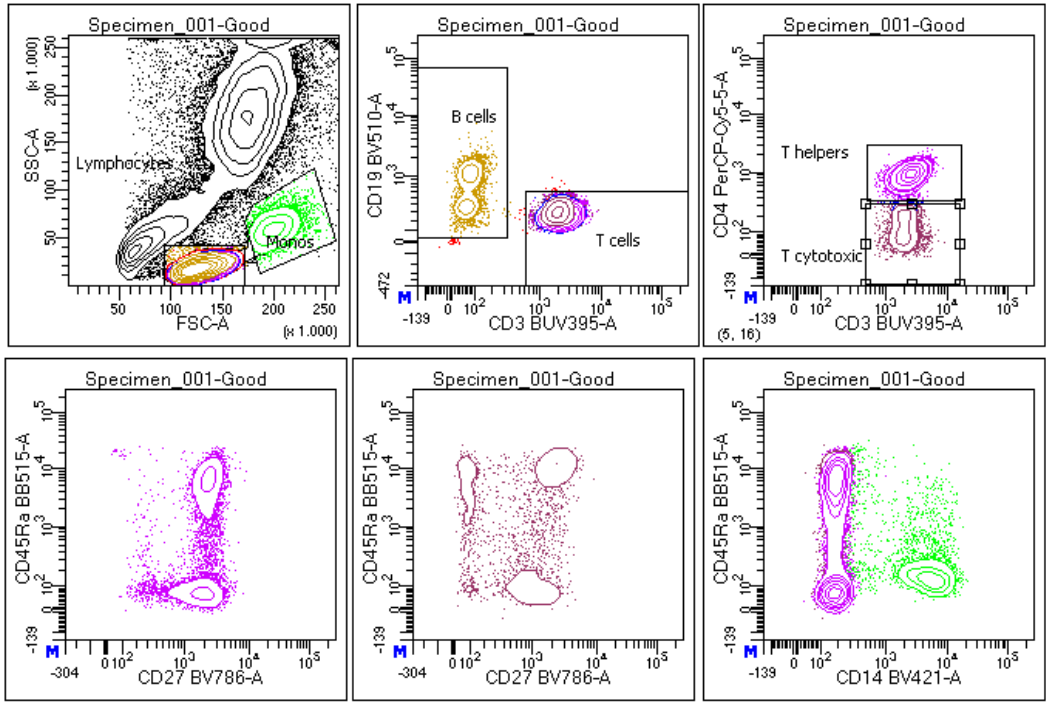
BD

What about using the “vintage” fluorochromes?



BUV395	CD3
PacBlue	CD14
AmCyan	CD19
BV786	CD27
FITC	CD45Ra
PerCP-Cy5.5	CD4

What about using the “vintage” fluorochromes?



BUV395	CD3	BUV395
PacBlue	CD14	**BV421**
AmCyan	CD19	**BV510**
BV786	CD27	BV786
FITC	CD45Ra	**BB515**
PerCP-Cy5.5	CD4	PerCP-Cy5.5

New BD Horizon Brilliant™ dyes

- Seven fluorochromes excited by the violet laser
  - Base polymers: BV421, BV510 and BV480[new]
  - Tandems: BV605, BV650, BV711 and BV786
- Six fluorochromes excited by the 355-nm UV laser
  - Base polymer: BUV395
  - Tandems: BUV496, BUV563, BUV661, BUV737, BUV805
- Two fluorochromes excited by the blue laser
  - BB515 brighter alternative to FITC
  - BB700 brighter alternative to PerCP-Cy5.5
- … and more

Fluorochrome characterization

- Fluorochromes have intrinsic properties relevant to panel design
  - Brightness
  - Spillover

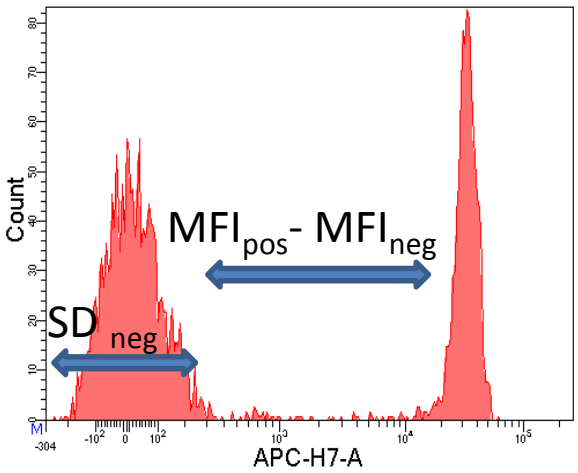
Fluorochrome characterization: Brightness

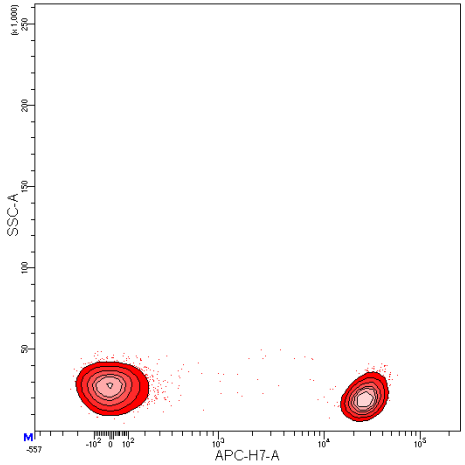
- Blood cells are stained with anti-CD4 conjugated with fluorochromes compatible with the instrument configuration
- Samples are acquired using optimized Instrument Settings
- Stain index is calculated and fluorochromes are ranked by brightness

Sensitivity measured by Stain Index

$$\text{Stain Index} = (MFI_{Pos} - MFI_{Neg}) / (2 \times rSD_{Neg})$$

SI: 360

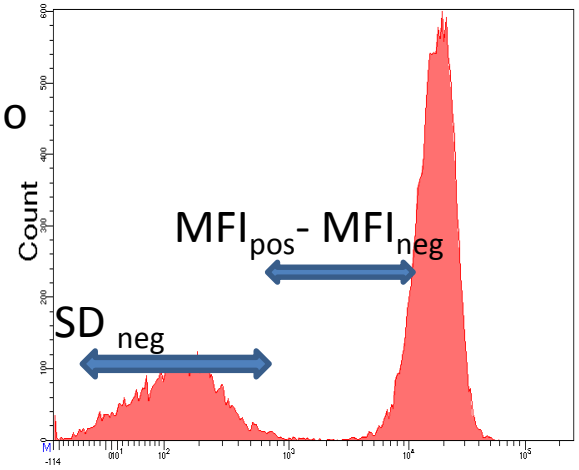




Sensitivity measured by Stain Index

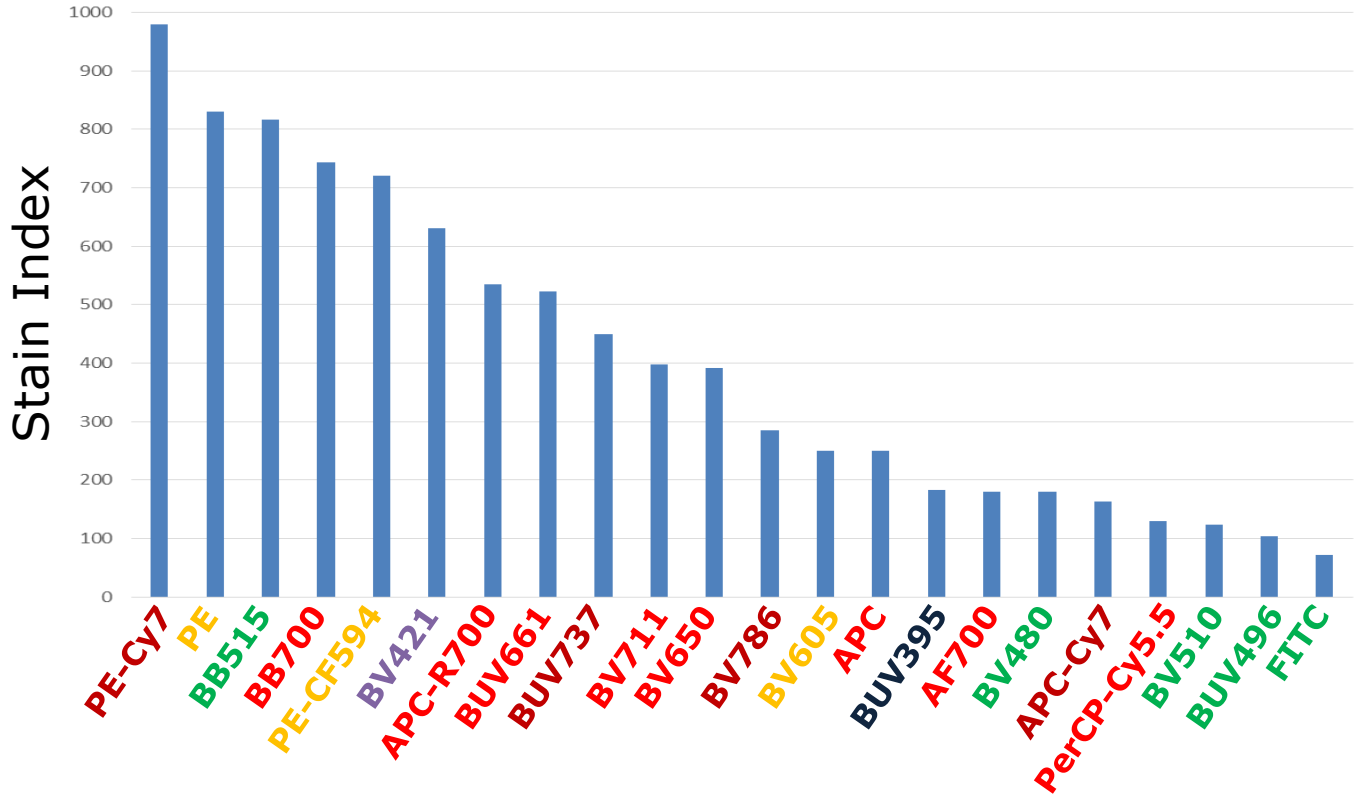
$$\text{Stain Index} = (MFI_{Pos} - MFI_{Neg}) / (2 \times rSD_{Neg})$$

SI: 135
ha bajado



Fluorochrome characterization: Brightness

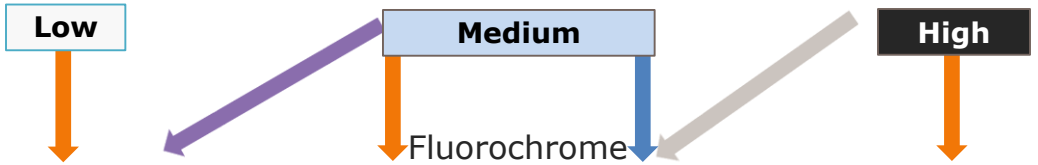
Specific fluorochrome ranking



- Ranks each individual fluorochrome for a true understanding of brightest to dimmest on a specific instrument
- This data can be paired with antigen density data for optimal fluorochrome-marker selection

BD

Fluorochrome characterization: Brightness
Antigen/fluorochrome combinations



Laser	Very Bright	Bright	Moderate	Dim
Ultraviolet (355 nm)		BD Horizon BUV661 BD Horizon BUV737 BD Horizon BUV563	BD Horizon BUV395 BD Horizon BUV496	BD Horizon BUV805
Violet (405 nm)	BD Horizon BV421 BD Horizon BV650 BD Horizon BV711	BD Horizon BV480 BD Horizon BV605 BD Horizon BV786	BD Horizon BV510	BD Horizon V450 BD Horizon V500
Blue (488 nm)	BD Horizon BB515 BD Horizon PE-CF594 PE-Cy5	PE PE-Cy7	FITC Alexa Fluor® 488 PerCP-Cy5.5	PerCP
Yellow/Green (561 nm)	PE BD Horizon PE-CF594 PE-Cy5 PE-Cy7			
Red (640 nm)		APC Alexa Fluor® 647 BD Horizon APC-R700		Alexa Fluor® 700 APC-H7 APC-Cy7

Basic concept of panel design:

"for low expressed antigens use brightest available fluorochrome".

BD

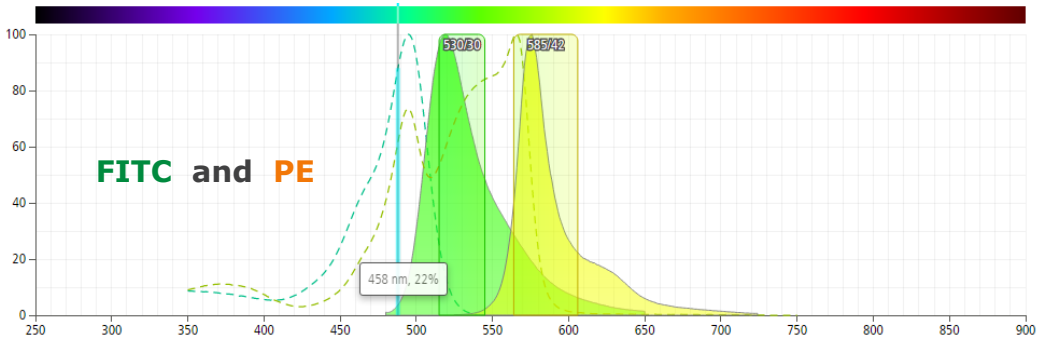
Fluorochrome characterization: Spillover

- Fluorescence spillover is an important factor in creating a panel design with good **resolution** of populations of interest

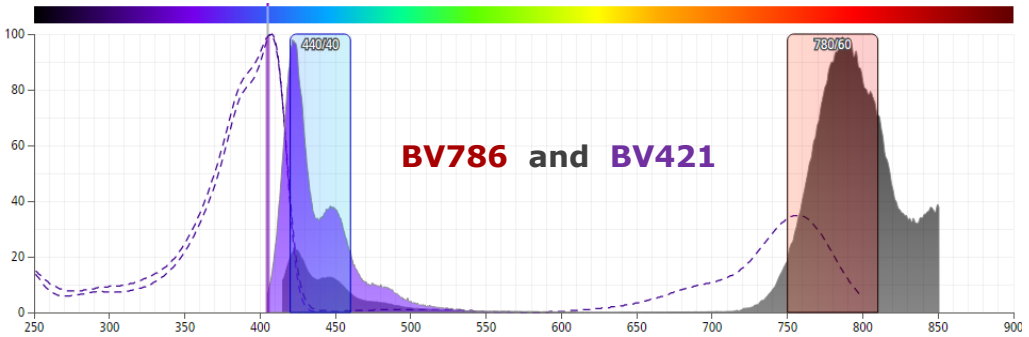
- Incorrect or poor calculation of spillover values (SOVs) negatively impacts the quality of data obtained from an assay

What are some sources of spillover?

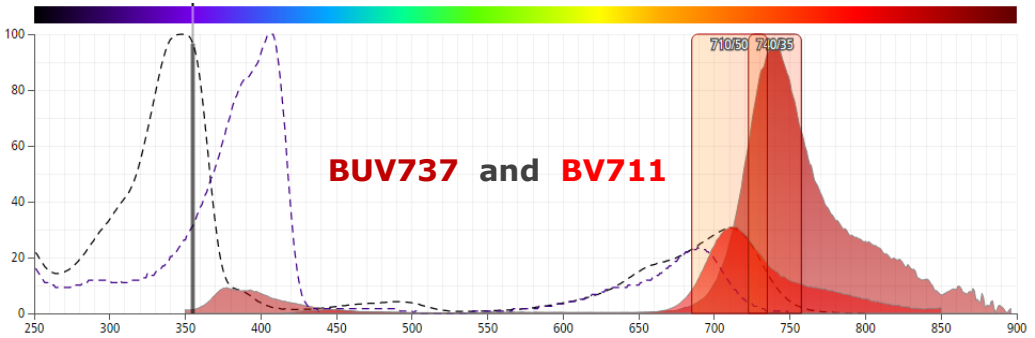
Adjacent detectors



Residual base fluorescence



Similar emission spectra (cross-laser)



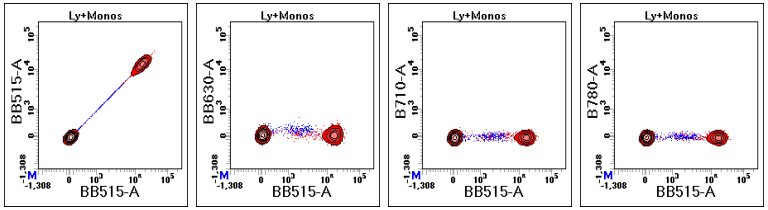
BD

Fluorochrome characterization:
Spread analysis

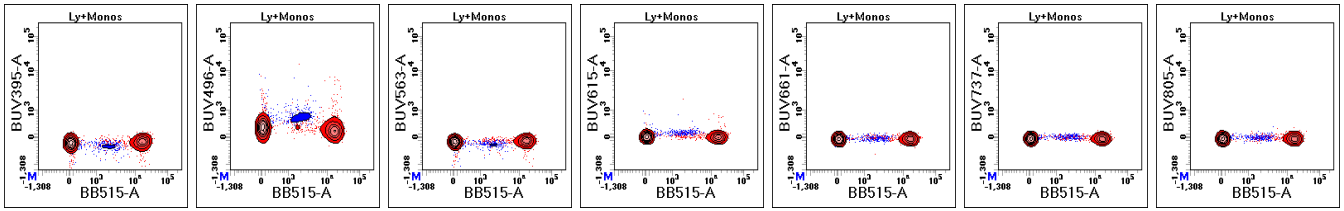
- Blood cells are stained with anti-CD4 conjugated with fluorochromes compatible with the instrument configuration
- Samples are acquired using optimized instrument settings
- For each fluorochrome, an nxn analysis is performed to visually assess the spread introduced into each detector

CD4s by BB515

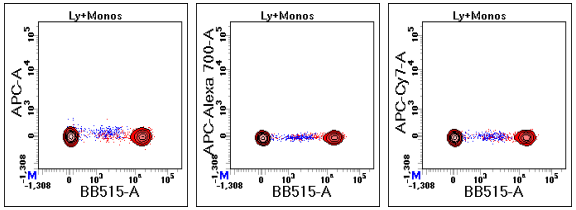
B



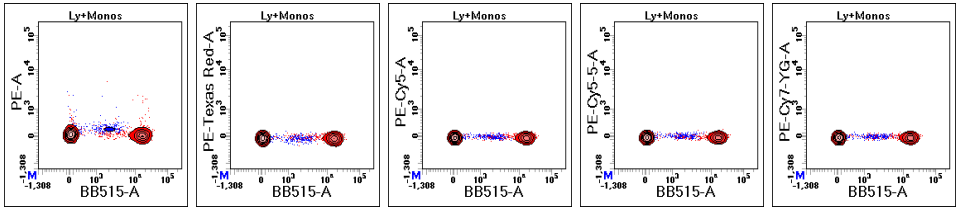
UV



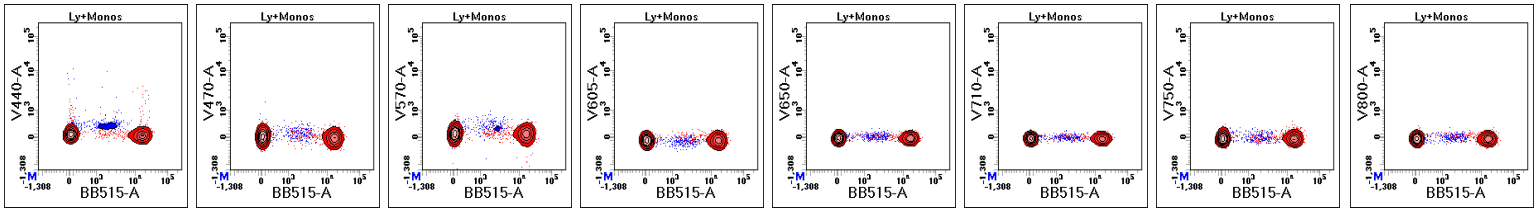
RED



G



V



CD4s by BB515

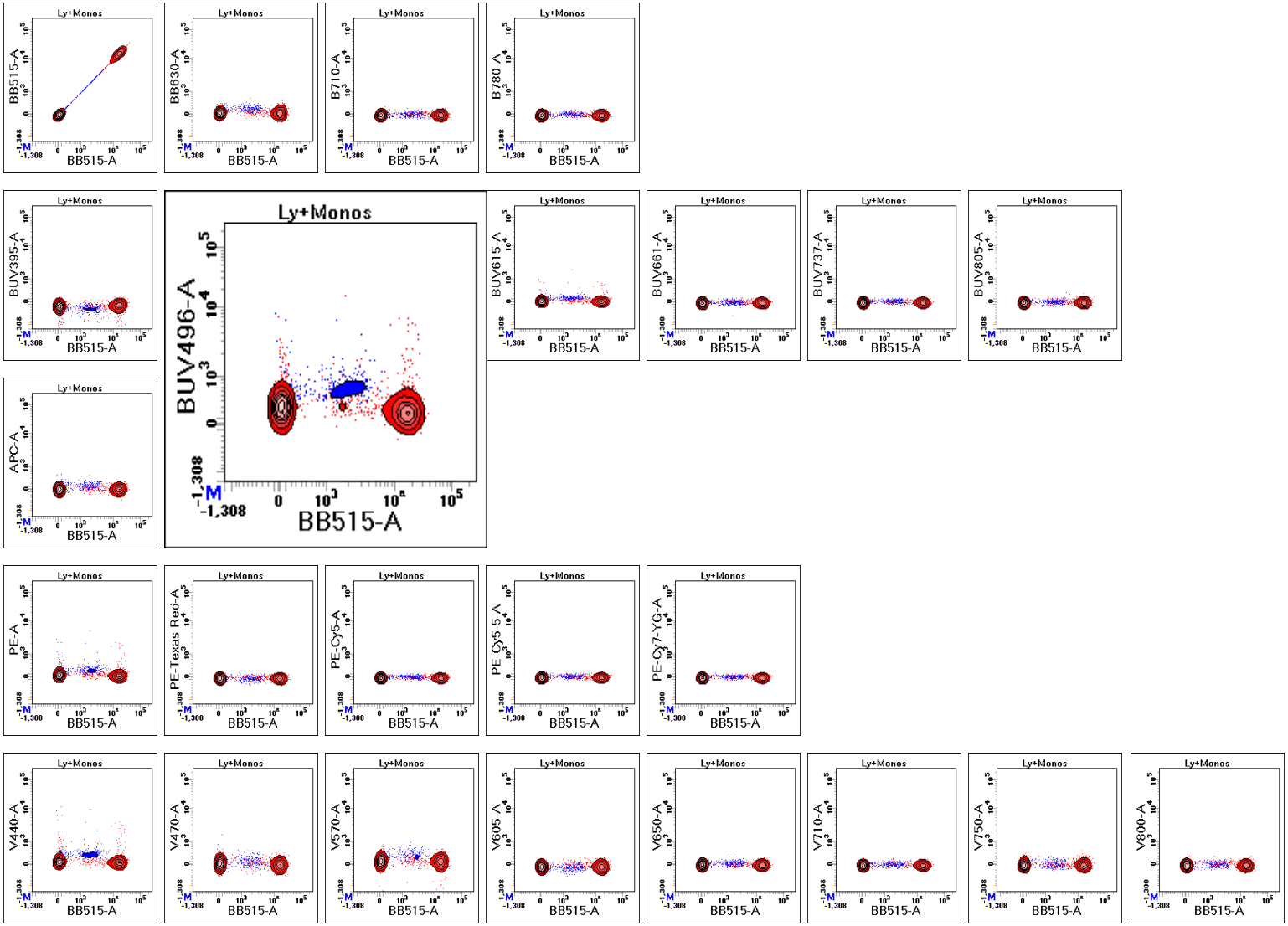
B

UV

RED

G

V



CD4s by BB515

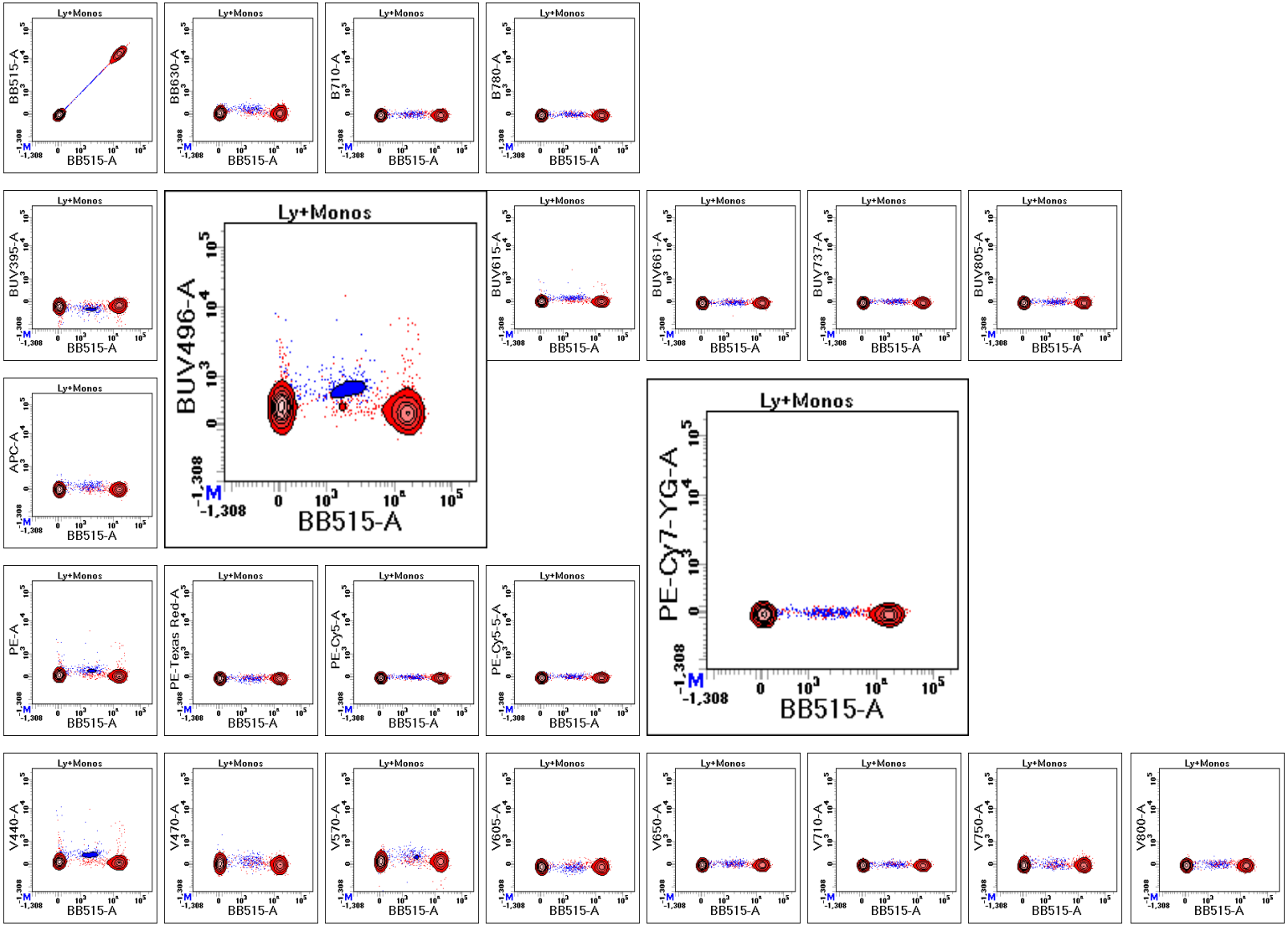
B

UV

RED

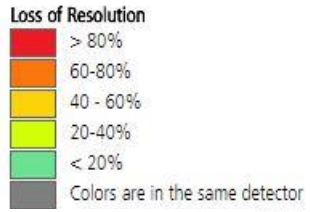
G

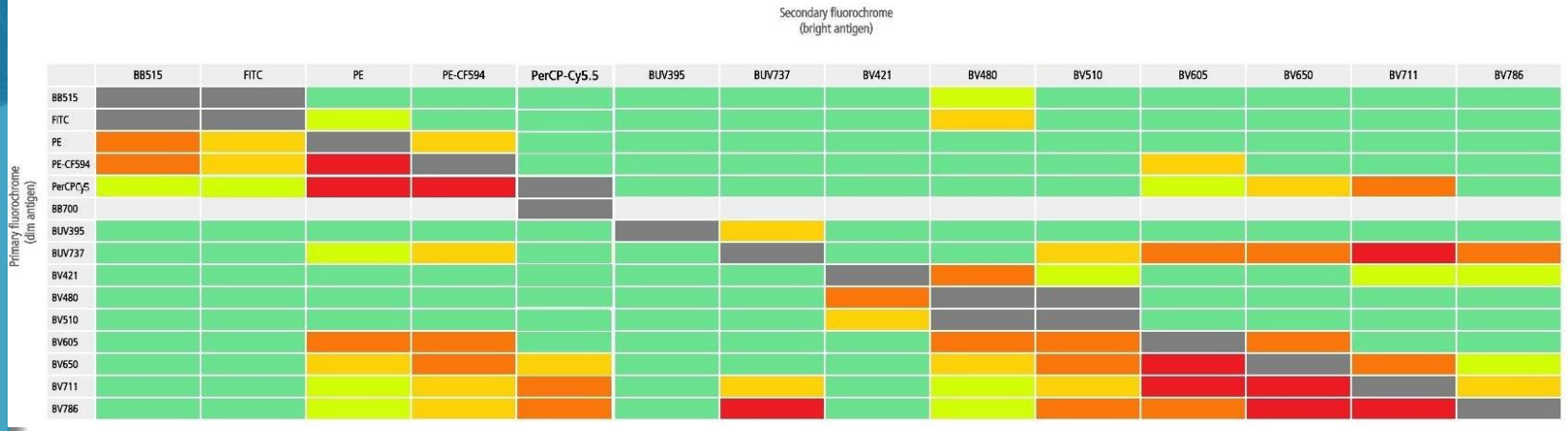
V



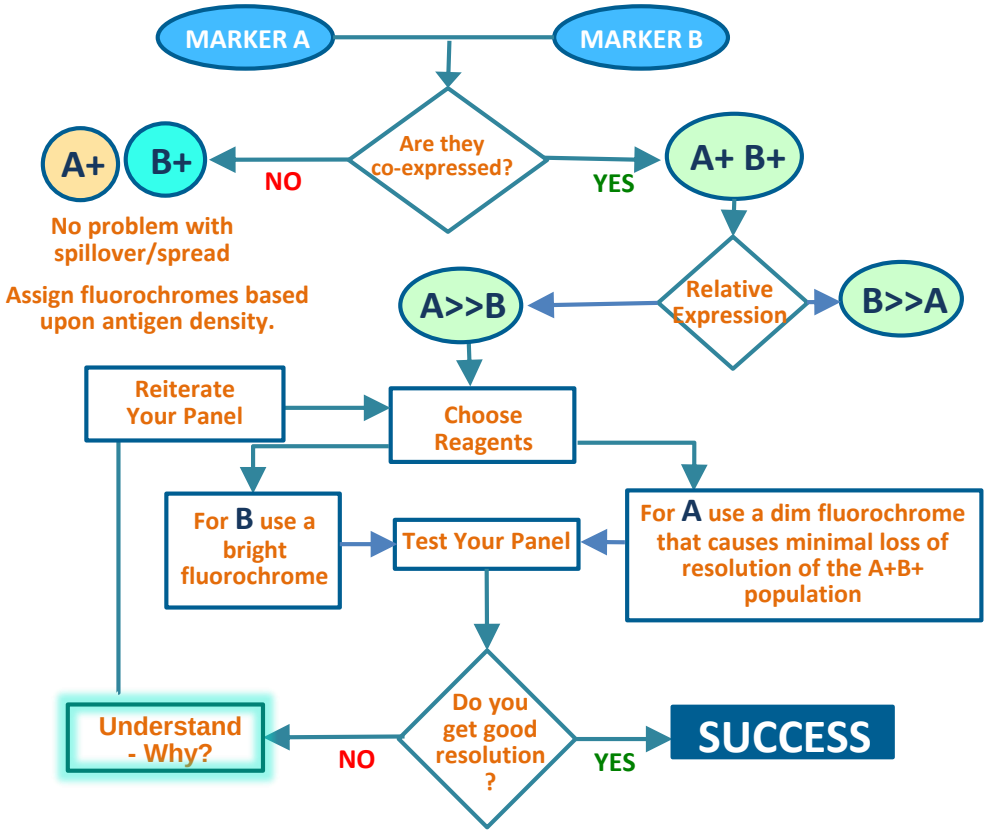
Do I have to know this?

- RIM (Resolution impact matrix)
  - The loss of resolution in different cytometer configurations can be measured
  - It depends on optical filters in the cytometer (optical configuration)





The panel design process

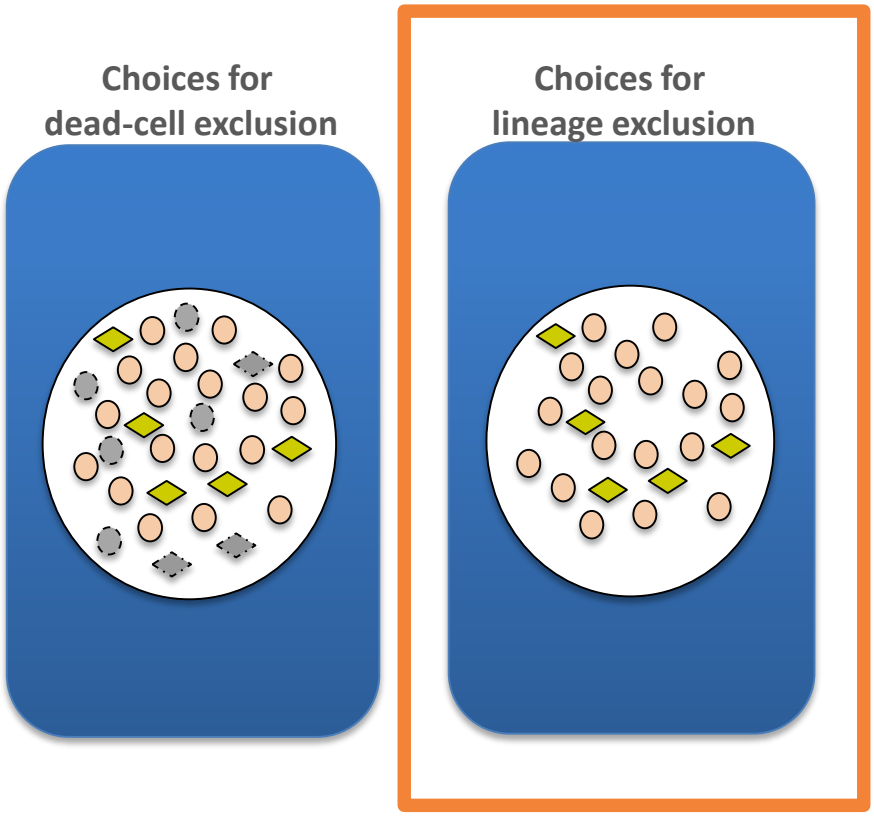


Other factors to take into account in Panel design…

- We will apply the principles of panel design to achieve optimal resolution of key memory T-cell populations:
  - Design panels on multiple instruments with varying capabilities

Exclude unwanted cells

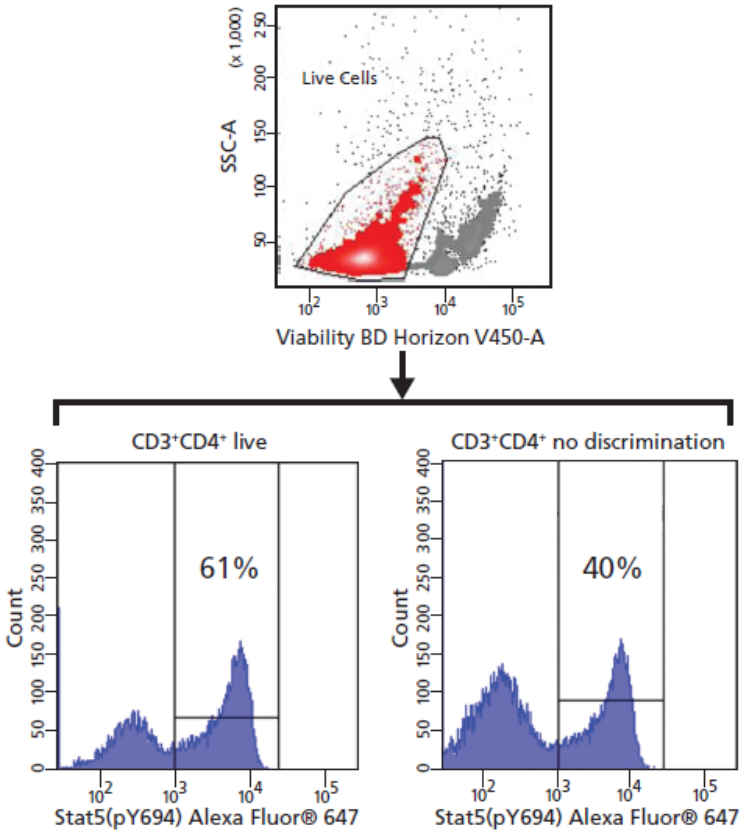
Dead cells
Lineage cells
Cells of interest



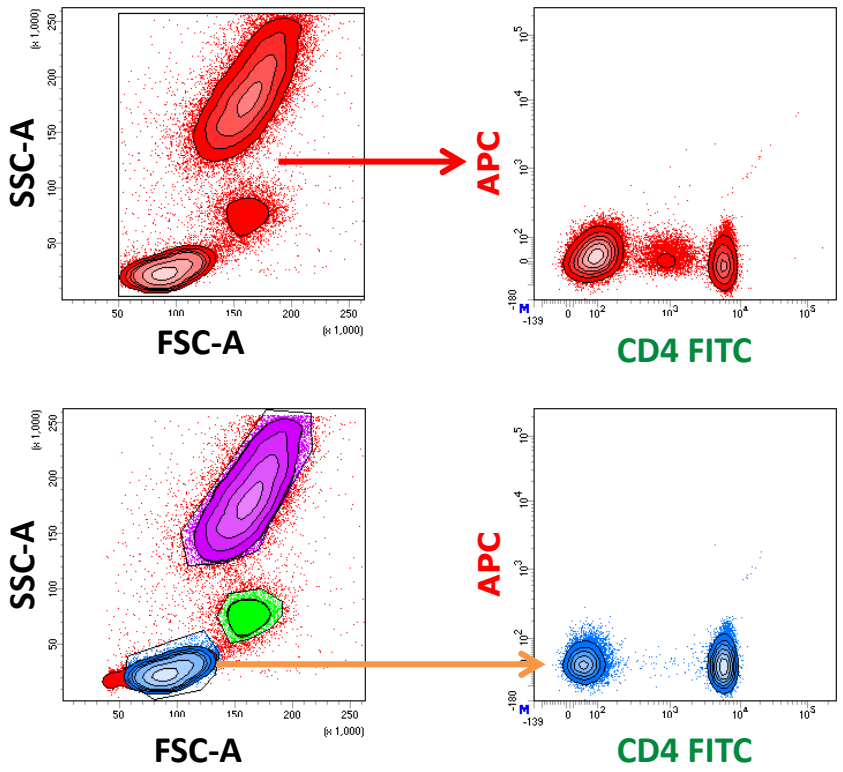
BD

Viability Staining Improves Results

- Gating out dead cells leads to more accurate statistics

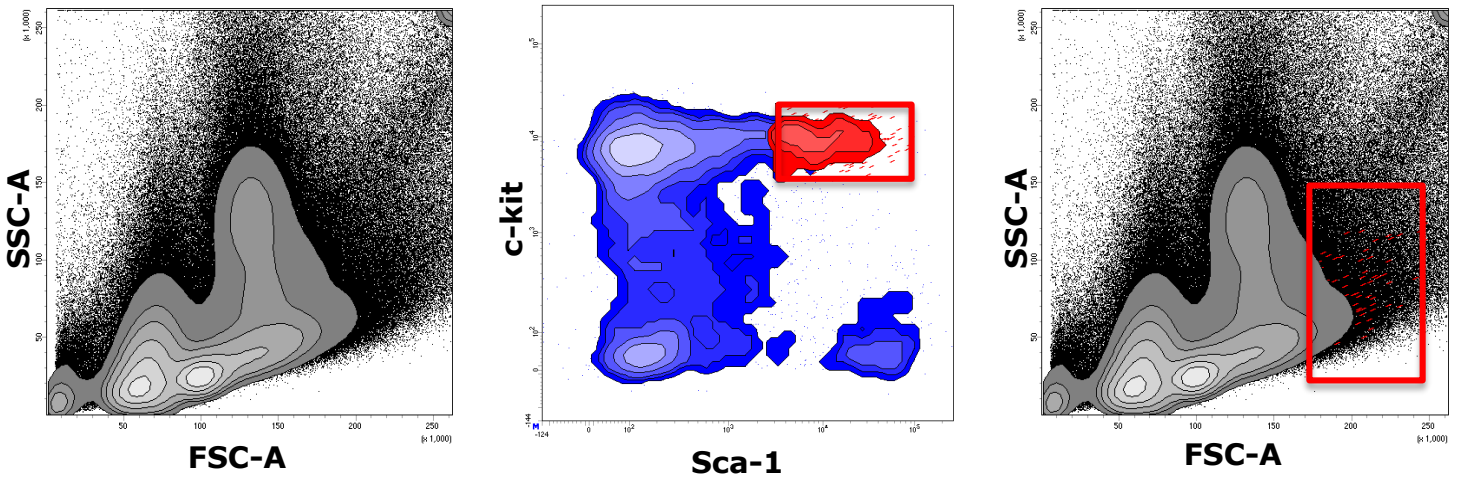


Lineage exclusion by light scatter



- In peripheral blood, different cell lineages can be easily discriminated based on light scatter.

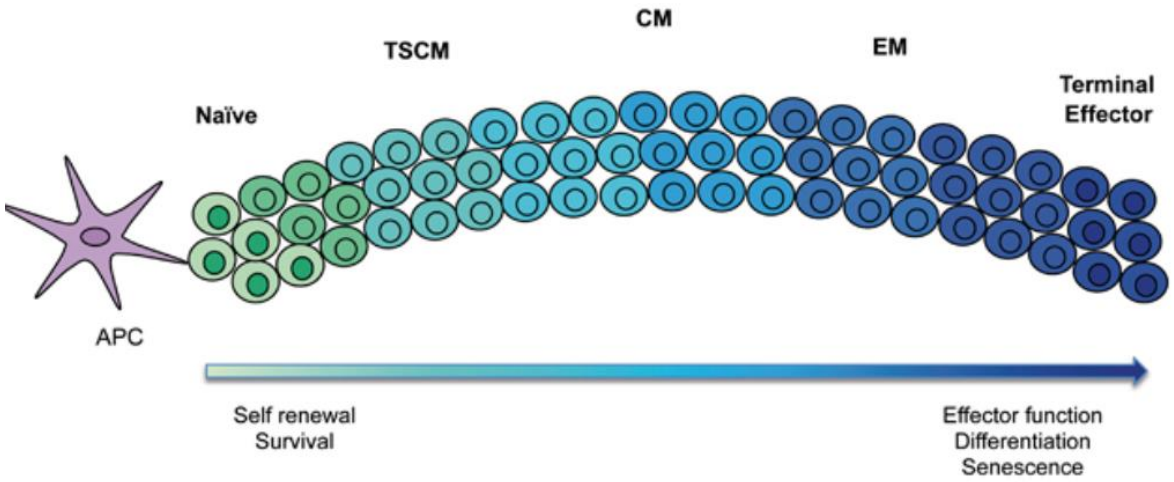
Lineage Exclusion by Light Scatter is not Sufficient for Rare Population Detection



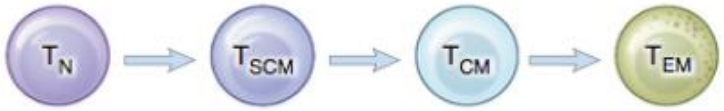
- In samples such as mouse bone marrow, detection of rare stem cells is confounded by the overwhelming presence of lineage cells
- The use of lineage markers is needed to clearly detect rare populations of interest.

Experimental goal

- Use best panel design practices to optimize panels for identification of different T-cell subsets



Panel design: Know the biology



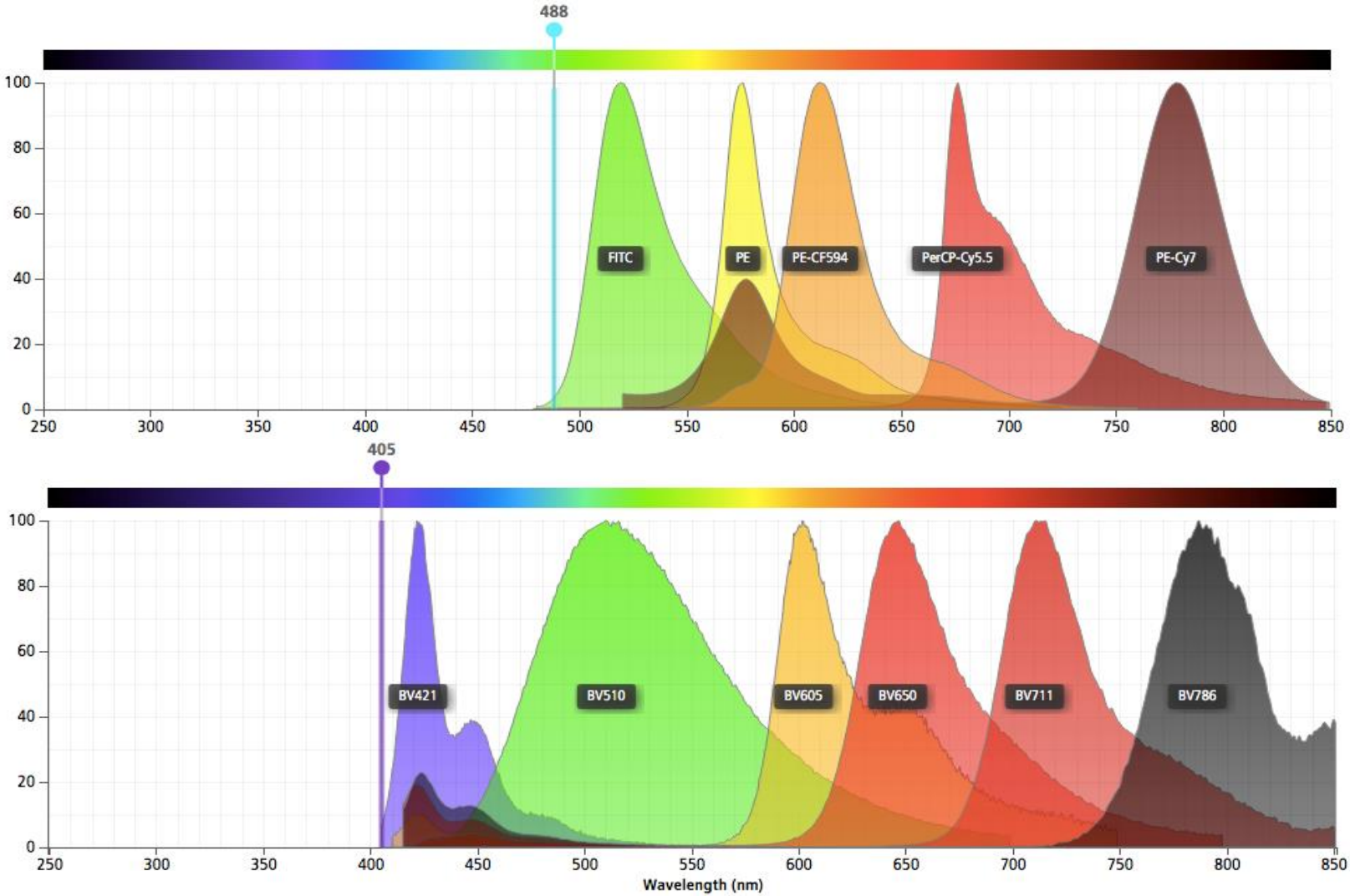
Marker	Ag Density	Class	T_N	T_{SCM}	T_{CM}	T_{EM}
CD95	Low	Tertiary	-	+	++	+
CD183/CXCR3	Low	Tertiary	+	+	++	+
CD197/CCR7	Low	Primary	+	+	+	-
CD27	Medium	Primary	+	+	+	-
CD45RO	Low-to-Hi	Secondary	-	-	++	++
CD45RA	Low-to-Hi	Secondary	+++	+++	+	+
Lin/LD	Med-to-Hi	Primary	+++	+++	+++	+++
CD3	High	Primary	+++	+++	+++	+++
CD8	High	Primary	+++	+++	+++	+++

BD

Different systems configurations…

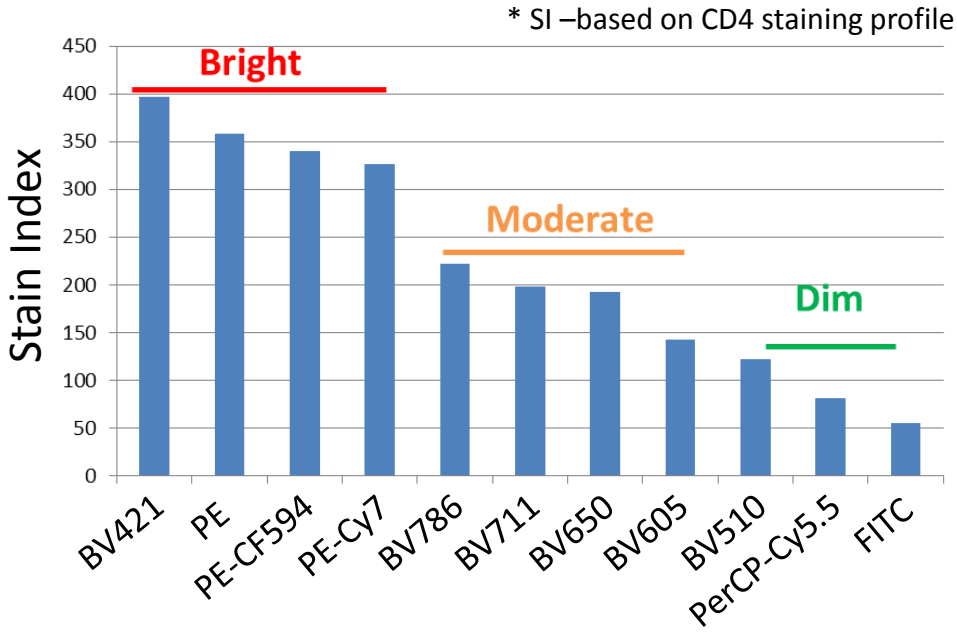
- Laser sources
- Filters

2-Laser system: Blue/Violet configuration

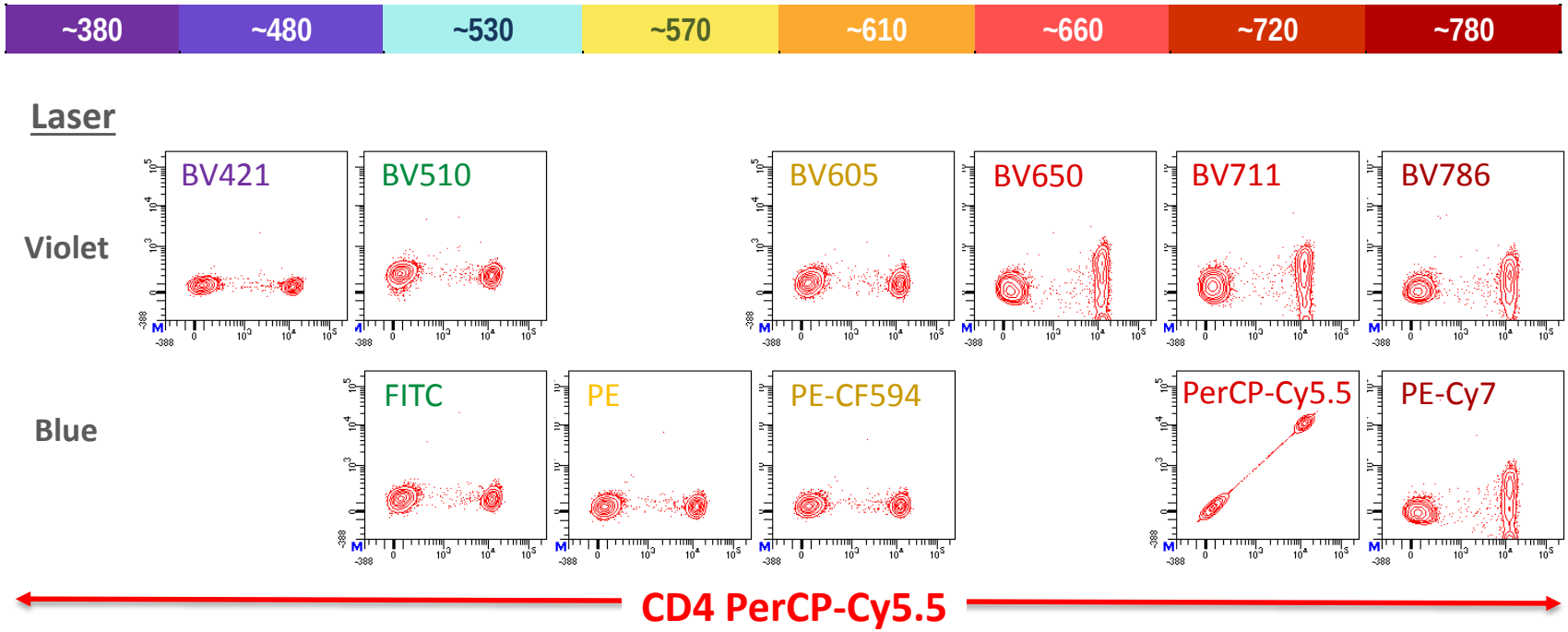


2-Laser system:
Instrument characterization

X-20 2-Laser configuration	
405 nm	BV421
	BV510
	BV605
	BV650
	BV711
	BV786
488 nm	FITC
	PE
	PE-CF594
	PerCP-Cy5.5
	PE-Cy7

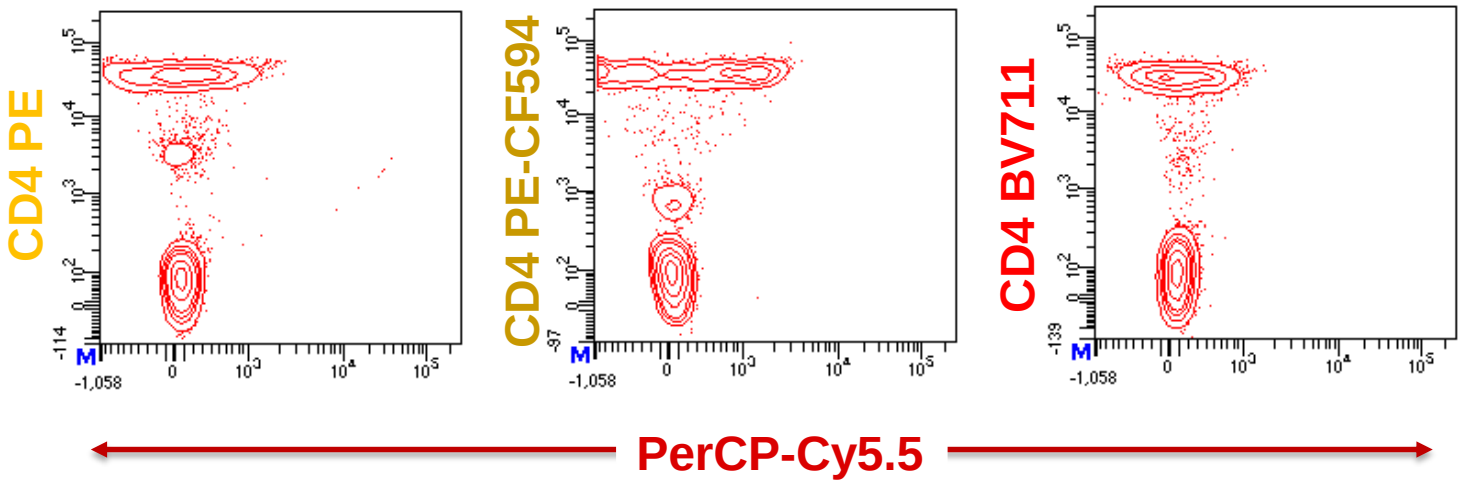


Spread Analysis: PerCP-Cy5.5



- PerCP-Cy5.5 is a dim fluorochrome with significant impact on other fluorochromes (adjacent and cross-laser)

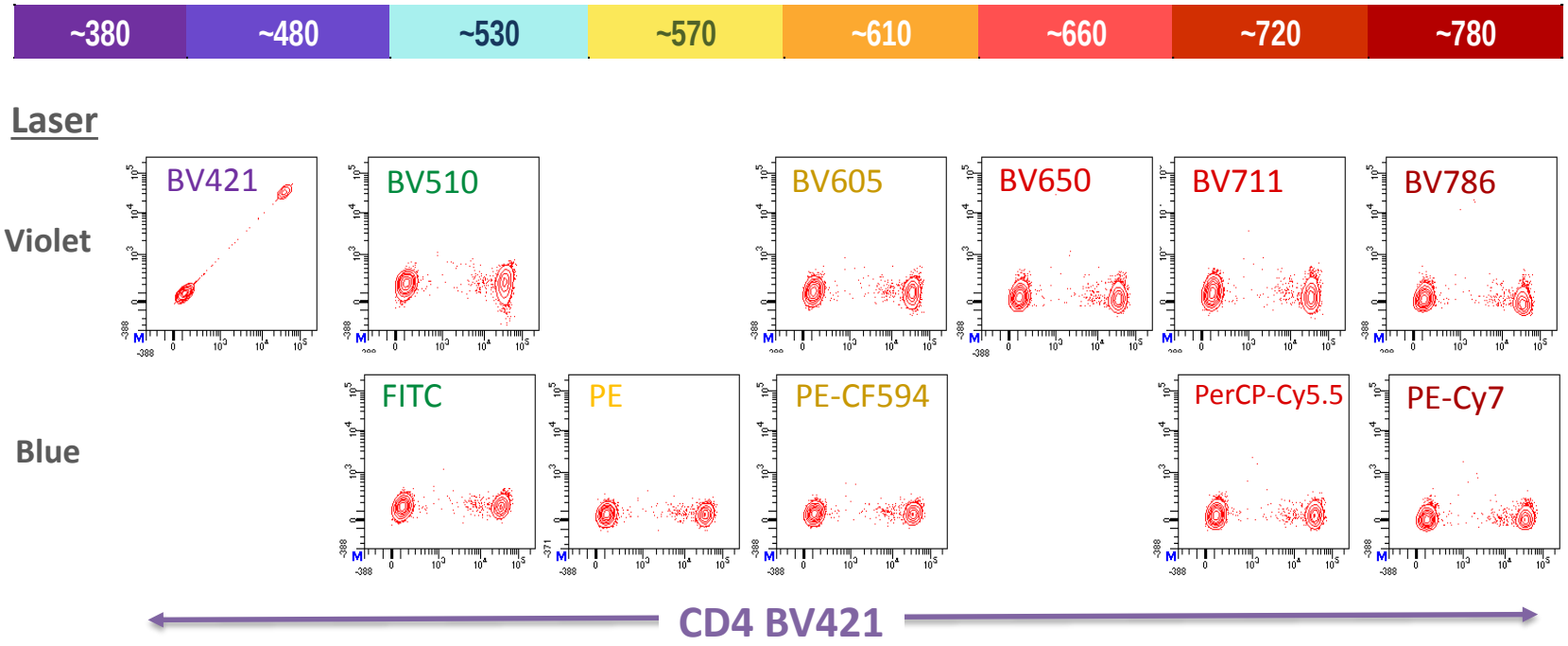
Spread Analysis:
Fluorochromes impacting PerCP-Cy5.5



- PerCP-Cy5.5 is a dim fluorochrome with significant impact on other fluorochromes (adjacent and cross-laser)
- PerCP-Cy5.5 is also impacted by other fluorochromes
- The viability dye 7-AAD is detected in the same channel
- PerCP-Cy5.5 is a good choice for a dump channel

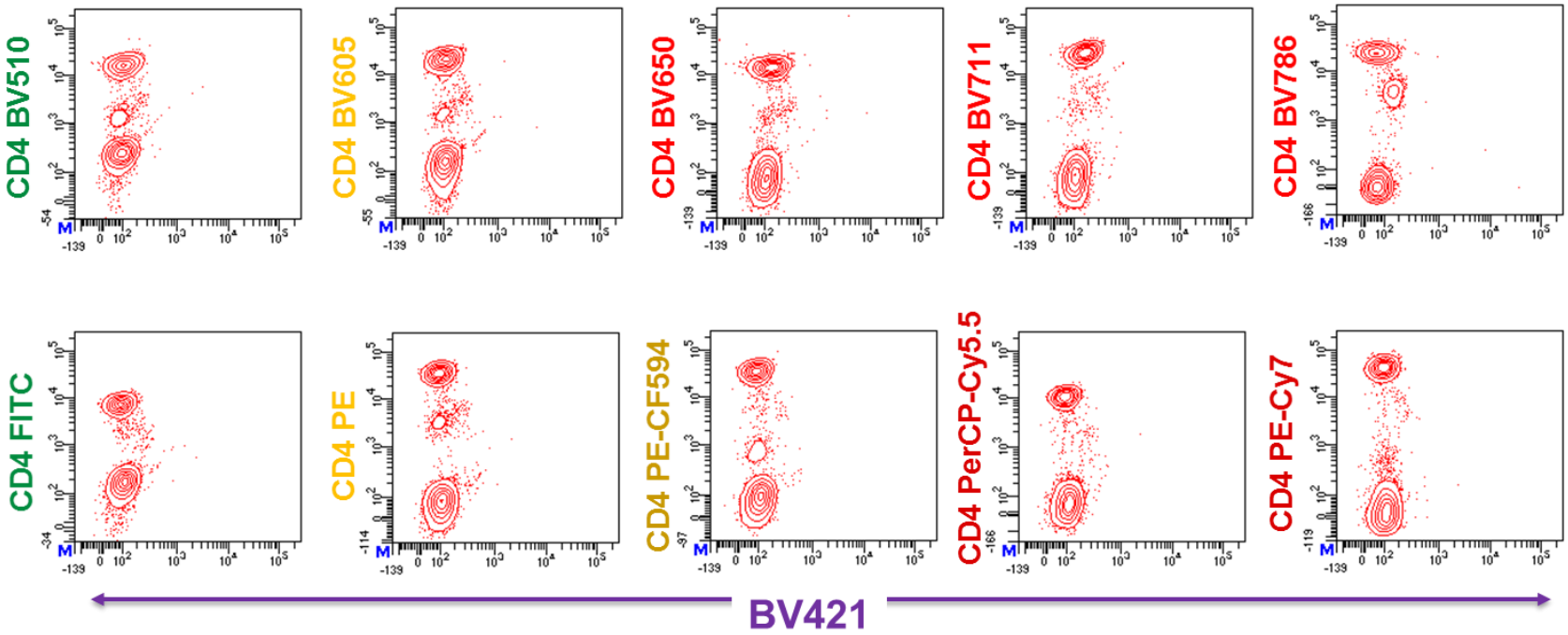
BD

Spread Analysis: BV421



- BV421 is a bright fluorochrome with minimal impact on other fluorochromes

Spread Analysis:
Fluorochromes impacting BV421



- BV421 is a bright fluorochrome with minimal impact on other fluorochromes
- BV421 is minimally impacted by other fluorochromes
- BV421 is a good choice for critical markers expressed at low levels (CD183/CXCR3, CD95)

2-Laser system panel design

ANTIGEN		ASSIGNMENT	
Marker	Ag Density	Fluorochrome	Laser
CD95	Low	PE	
CD183/CXCR3	Low	BV605	
CD197/CCR7	Low	BV786	
CD27	Medium	BV421	
CD45RO	Low-to-High	PE-CF594	
CD45RA	Low-to-High	PE-Cy7	
*Lin/LD	Med-to-High	FITC	
CD3	High	PerCP-Cy5.5	
CD8	High	BV510	

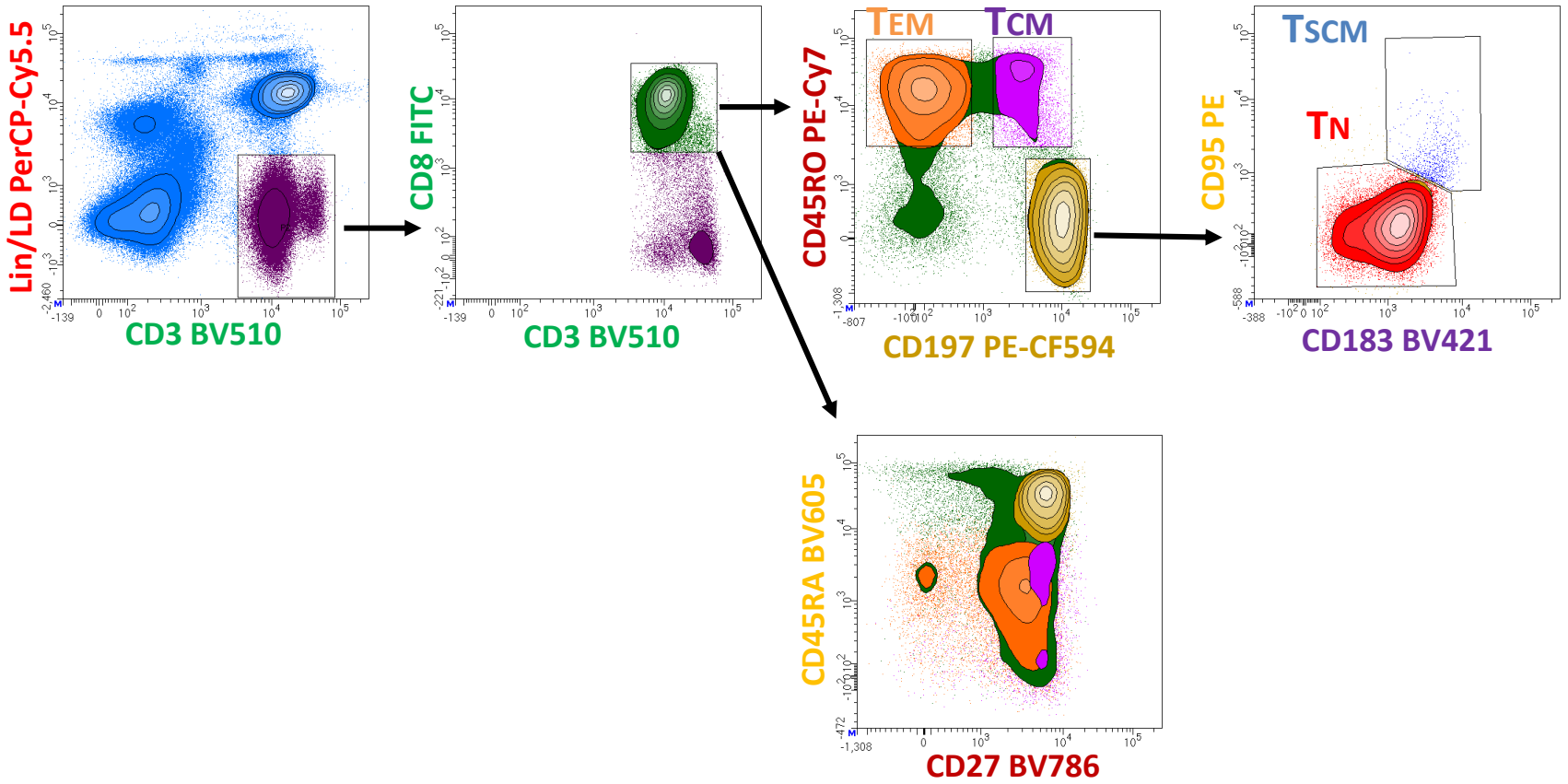
* Lineage markers – CD4, CD19, CD14

2-Laser system panel design

ANTIGEN		ASSIGNMENT	
Marker	Ag Density	Fluorochrome	Laser
CD95	Low	PE	
CD45RA	Low-to-High	BV605	
CD27	Medium	BV786	
CD183/CXCR3	Low	BV421	
CD197/CCR7	Low	PE-CF594	
CD45RO	Low-to-High	PE-Cy7	
CD8	High	FITC	
*Lin/LD	Med-to-High	PerCP-Cy5.5	
CD3	High	BV510	

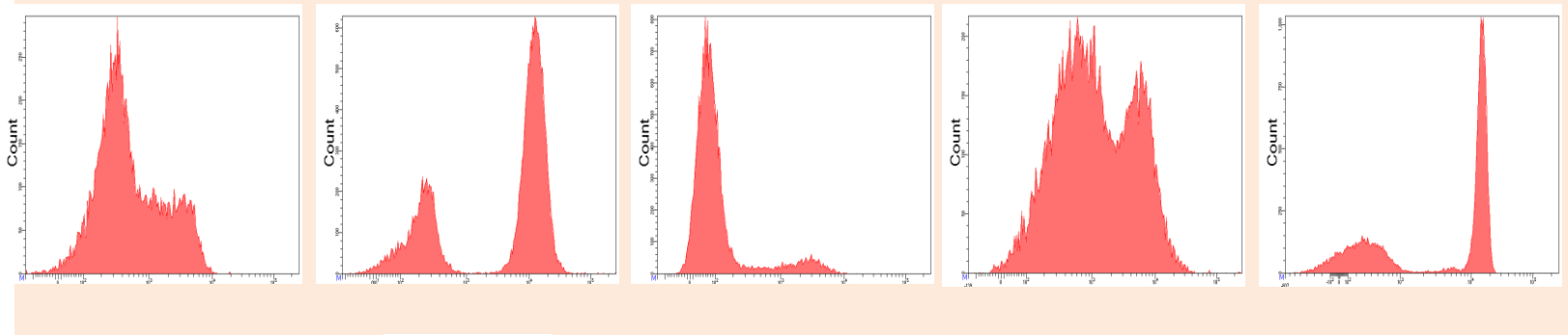
BD

2-Laser panel

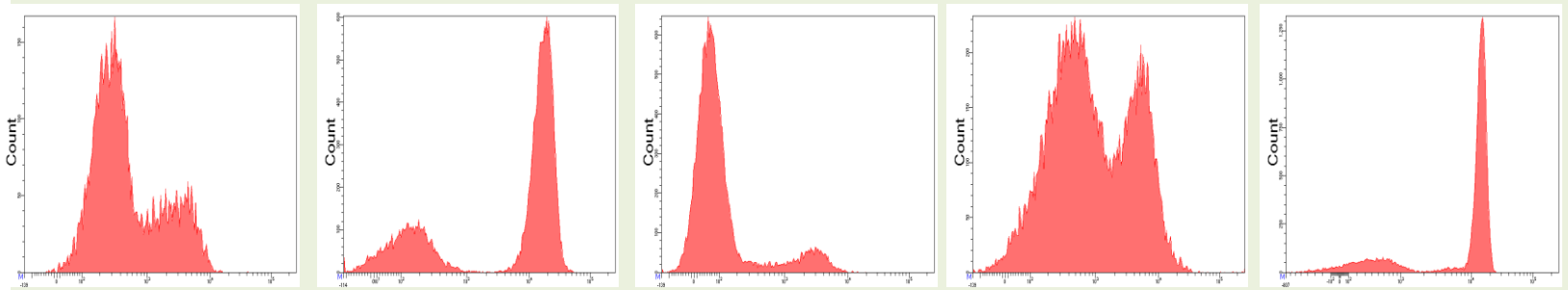


Panel review: Maintained resolution

Single Stain



CXCR3 BV421	CD3 BV510	CD8 FITC	CD95 PE	CD4/CD19/CD14 PerCP-Cy5.5

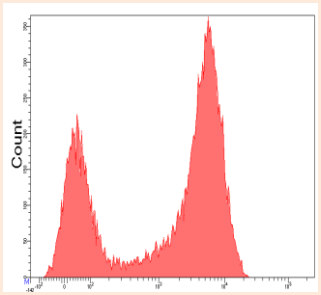


Panel

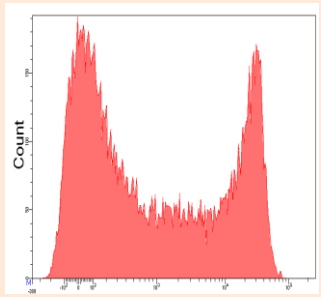
BD

Panel review: Loss of resolution

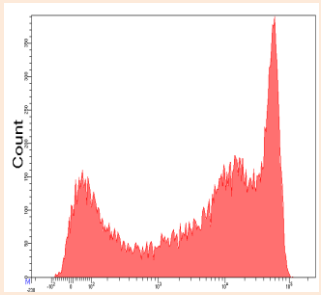
Single Stain



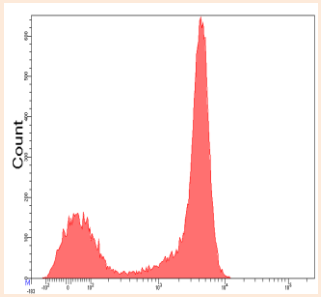
CCR7
PE-CF594



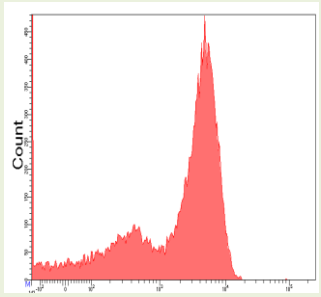
CD45RO
PE-Cy7

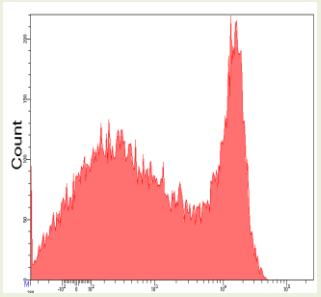


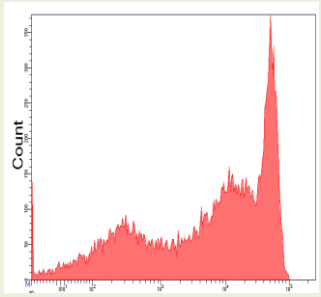
CD45RA
BV605

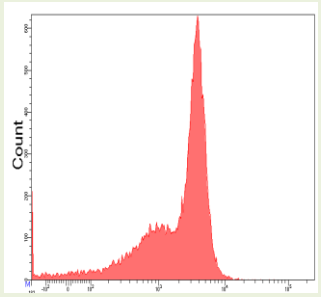


CD27
BV786









Panel

BD

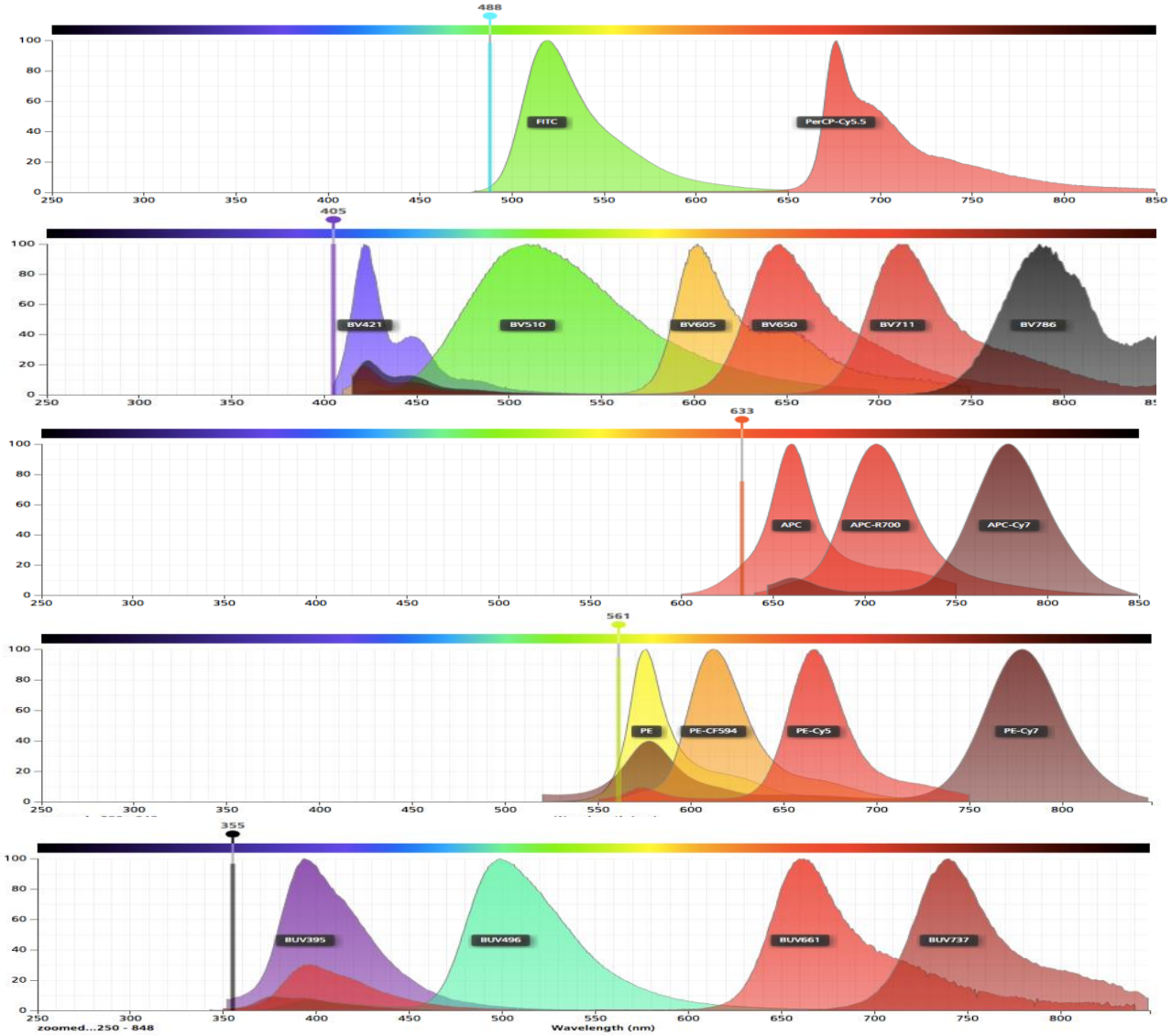
2-Laser configuration panel review

Marker	Ag Density	Fluorochrome	Resolved	Impacted
CD95	Low	PE	√	
CD183/CXCR3	Low	BV421	√	
CD197/CCR7	Low	PE-CF594		X
CD27	Medium	BV786		X
CD45RO	Low-to-Hi	PE-Cy7		X
CD45RA	Low-to-Hi	BV605		X
Lin/LD	Med-to-Hi	PerCP-Cy5.5	√	
CD3	High	BV510	√	
CD8	High	FITC	√	

- PE and BV421 allowed for good resolution of T_{SCM}
- BV510 and PE-CF594 impact the resolution of BV605
- BV605 is impacting the resolution of BV786

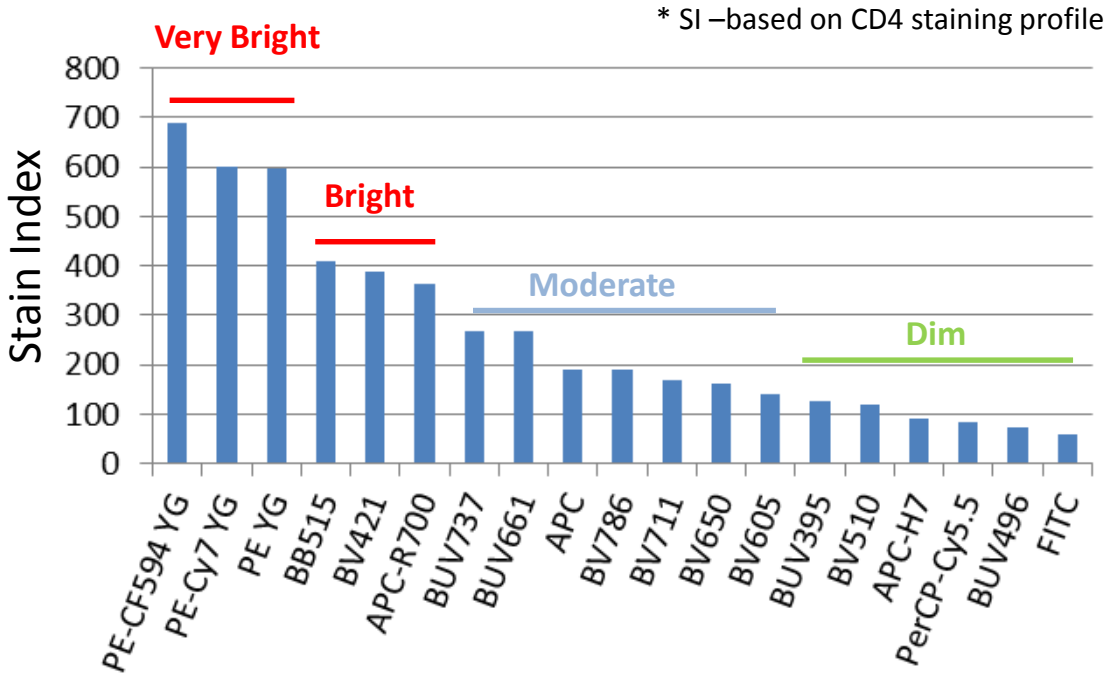
BD

5-Laser system: B/V/R/YG/UV configuration



5-Laser system:
Instrument characterization

X-20 5-Laser Configuration	
355 nm	BUV395
	BUV496
	BUV661
	BUV737
405 nm	BV421
	BV510
	BV605
	BV650
	BV711
	BV786
488 nm	FITC
	PerCP-Cy5.5
561 nm	PE
	PE-CF594
	PE-Cy7
640 nm	APC
	APC-R700
	APC-H7



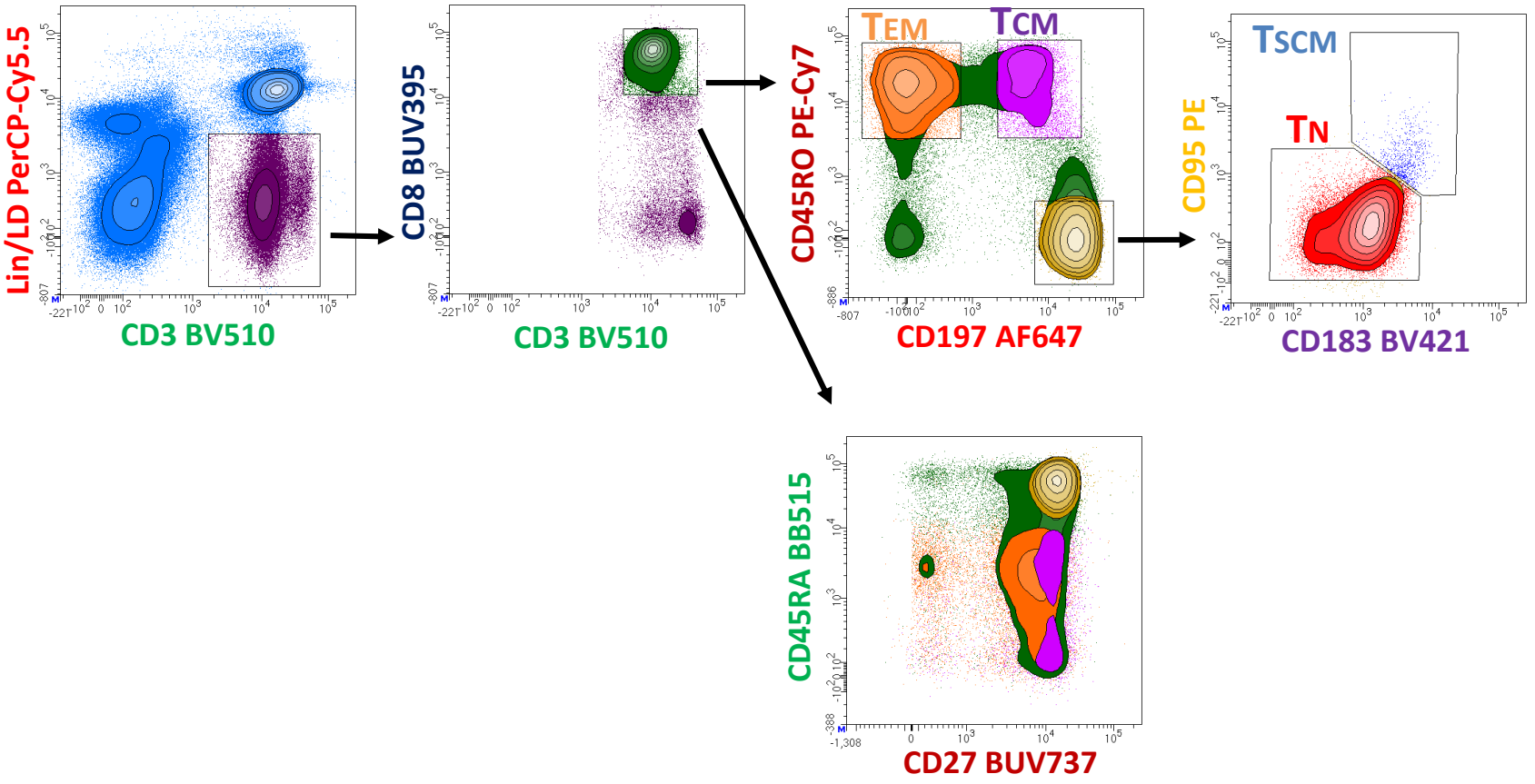
5-Laser configuration: Panel design

5-Laser System

Markers	Ag Density	Fluorochrome
CD95	Low	**PE-YG** (-B)
CD183/CXCR3	Low	BV421
CD197/CCR7	Low	AF647
CD27	Medium	**BUV737** (BV786)
CD45RO	Low-to-Hi	**PE-Cy7-YG** (-B)
CD45RA	Low-to-Hi	**BB515** (FITC)
Lin/LD	Med-to-Hi	PerCP-Cy5.5
CD3	High	BV510
CD8	High	**BUV395** (APC-H7)

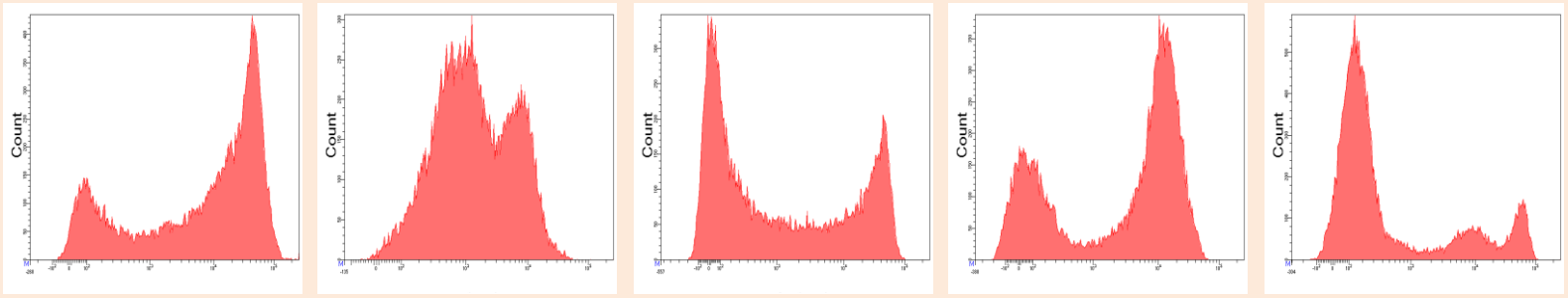
BD

5-Laser panel



Panel review: Maintained resolution

Single Stain



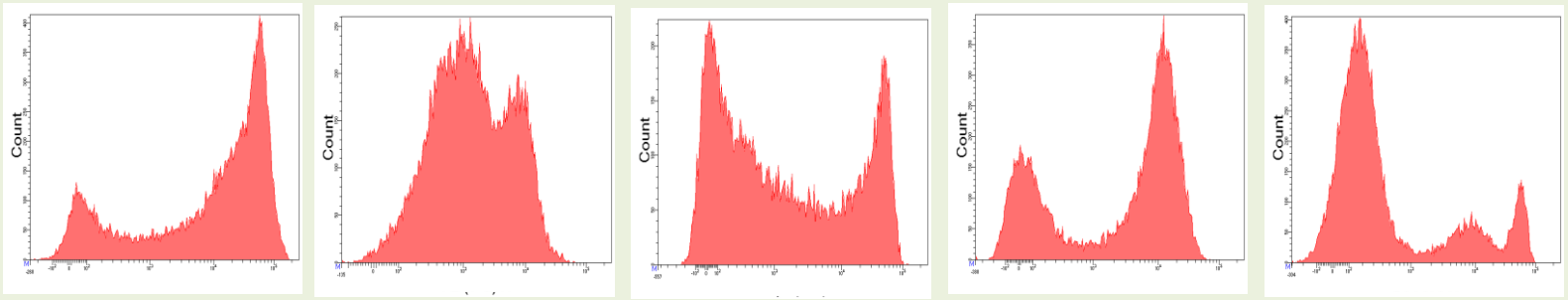
CD45RA
BB515

CD95
PE

CD45RO
PE-Cy7

CD197
AF647

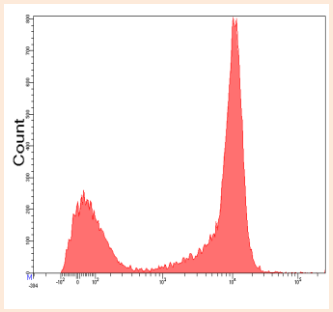
CD8
BUV395



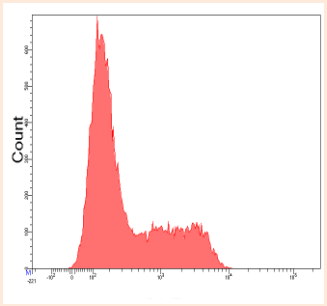
Panel

Panel review: Maintained resolution

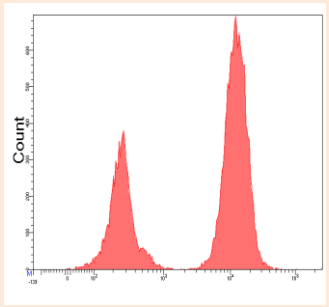
Single Stain



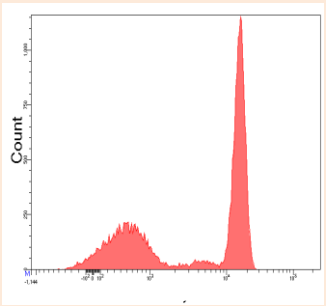
CD27
BUV737



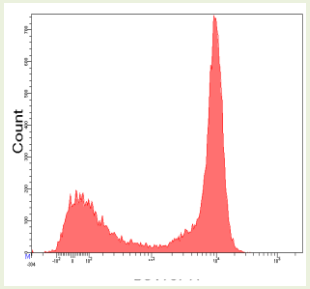
CD183
BV421

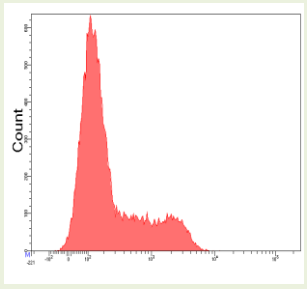


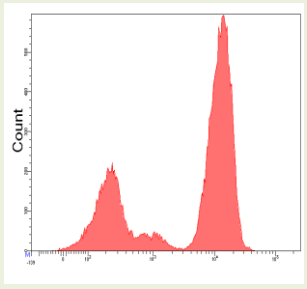
CD3
BV510

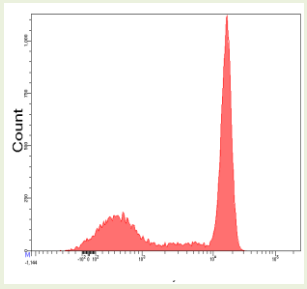


CD4/19/14
PerCP-Cy5.5









Panel

5-Laser configuration panel review

Marker	Ag Density	Fluorochrome	Resolved	Impacted
CD95	Low	PE	√	
CD183/CXCR3	Low	BV421	√	
CD197/CCR7	Low	AF647	√	
CD27	Medium	BUV737	√	
CD45RO	Low-to-Hi	PE-Cy7	√	
CD45RA	Low-to-Hi	BB515	√	
Lin/LD	Med-to-Hi	PerCP-Cy5.5	√	
CD3	High	BV510	√	
CD8	High	BUV395	√	

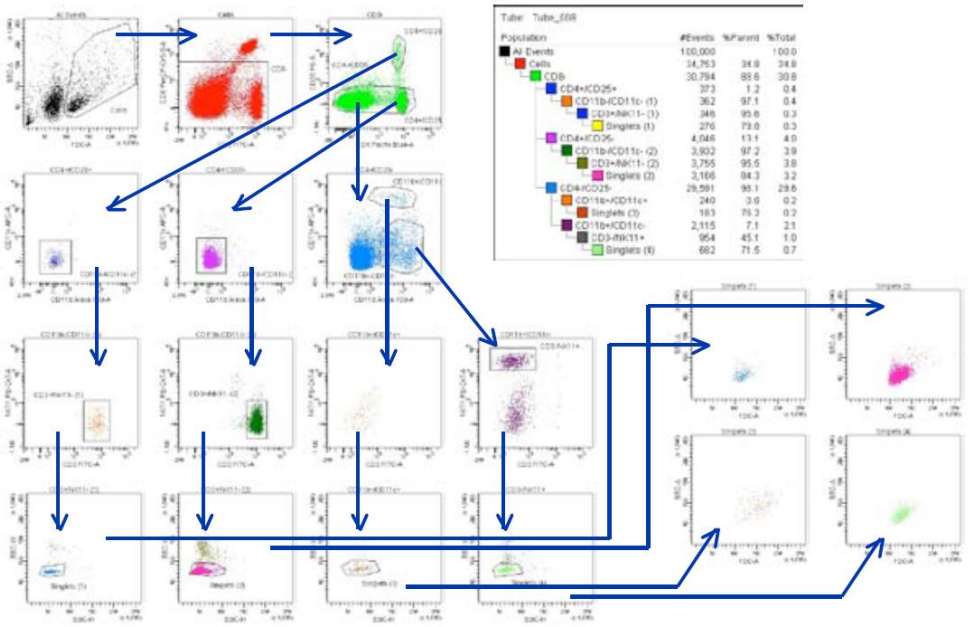
BD

Designing a panel

Departamento de aplicaciones

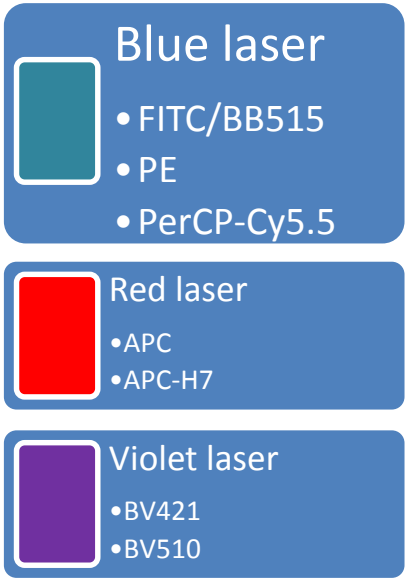
Barcelona 2019

Our aim: design (correctly) a simple panel



A. Cytometer configuration

- Cytometer: FACSCantoII 3L 8C

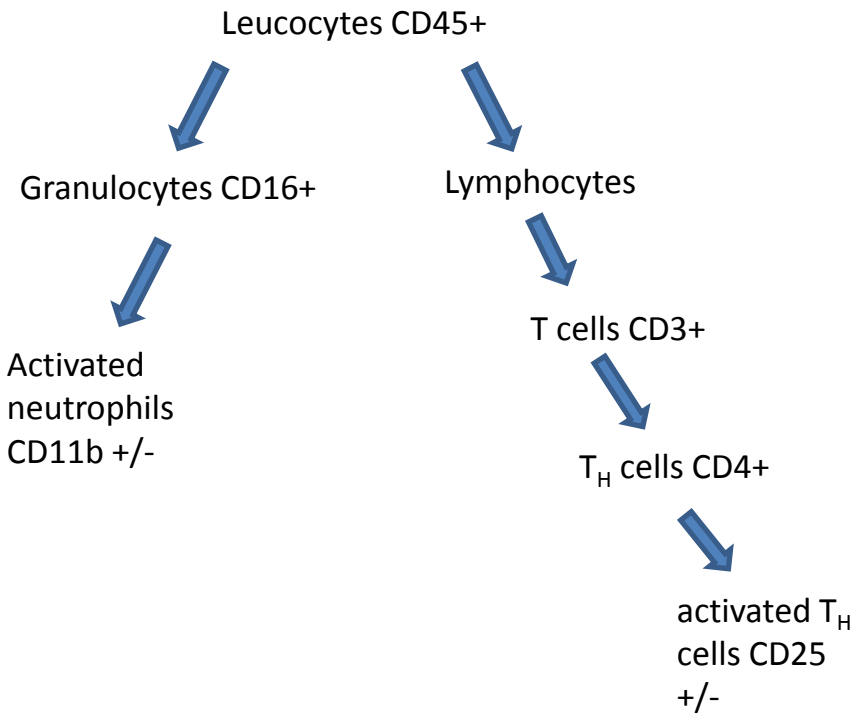


B. Fluorochrome brightness

Fluorochome		Brightness
405 nm	BV421	High
	BV510	Dim
488 nm	FITC	Dim
	PE	High
	PerCP-Cy5.5	Dim
	PE-Cy7	High
640 nm	APC	High
	APC-H7	Dim

C. Markers: their expression levels & coexpression

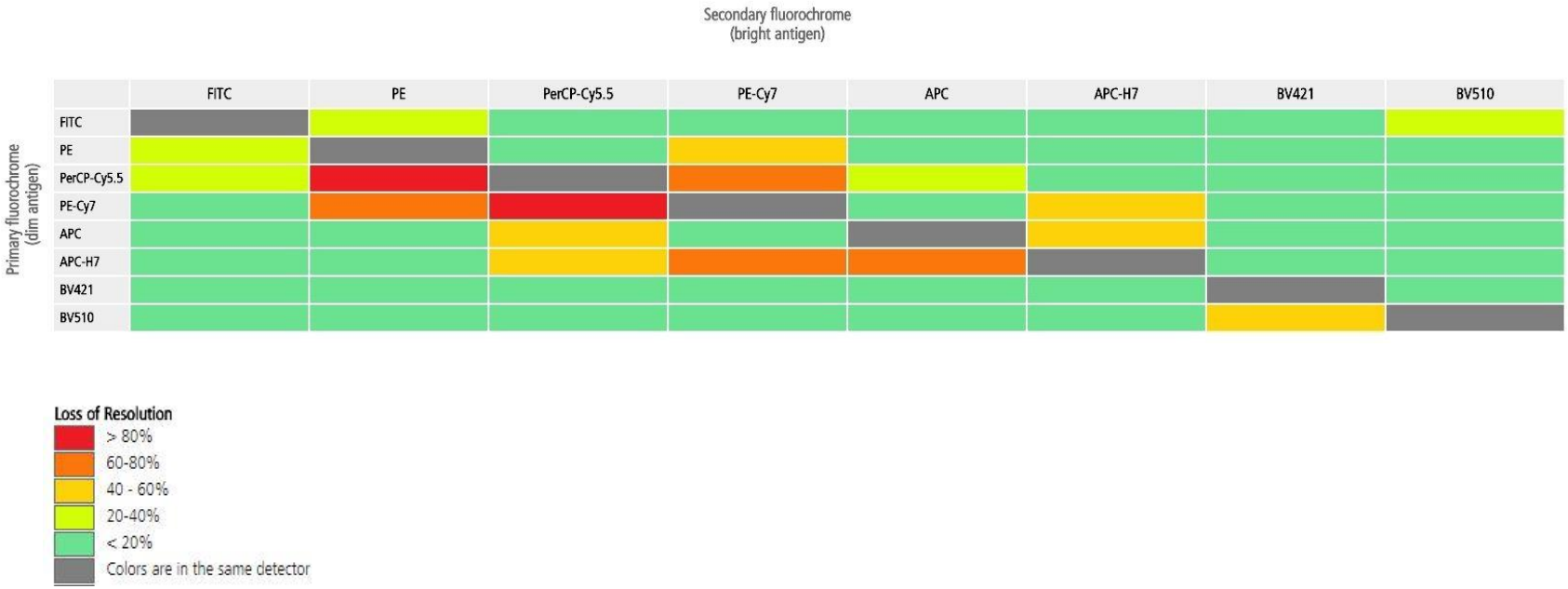
- Hierarchy and population of interest



- Expression levels:

Marker	Ag density
CD3	High
CD4	High
CD25	Low
CD11b	Low
CD16	Medium
CD45	High

D. Spread/coexpression issues (Resolution Impact Matrix)



Matching rules

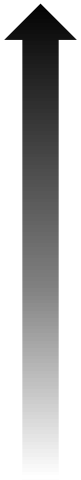
Marker	Ag density
CD3	High
CD4	High
CD25	Low
CD11b	Low
CD16	Medium
CD45	High

1) Ag. Density <-> Flurochrome brightness
2) Coexpression in populations of interest

Fluorochome	Brightness
BV421	High
BV510	Dim
FITC	Dim
PE	High
PerCP-Cy5.5	Dim
PE-Cy7	High
APC	High
APC-H7	Dim

Matching rules

Marker	Ag density
CD45	High
CD3	High
CD4	High
CD16	Medium
CD25	Low
CD11b	Low



Fluorochome	Brightness
BV421	High
PE	High
APC	High
PE-Cy7	High
PerCP-Cy5.5	Moderate
FITC	Moderate
BV510	Moderate
APC-H7	Dim

Designing a panel

Soluciones panel

Matching rules

Marker	Ag density
CD45	High
CD3	High
CD4	High
CD16	Medium
CD25	Low
CD11b	Low

Fluorochome	Brightness
BV421	High
PE	High
APC	High
PE-Cy7	High
PerCP-Cy5.5	Moderate
FITC	Moderate
BV510	Moderate
APC-H7	Dim

	A	B	C
CD45	FITC	PerCP-Cy5.5	FITC
CD3	PerCP-Cy5.5	FITC	PerCP-Cy5.5
CD4	BV510	BV510	BV510
CD16	APC	APC	PE-Cy7
CD25	PE	PE	PE
CD11b	BV421	BV421	BV421

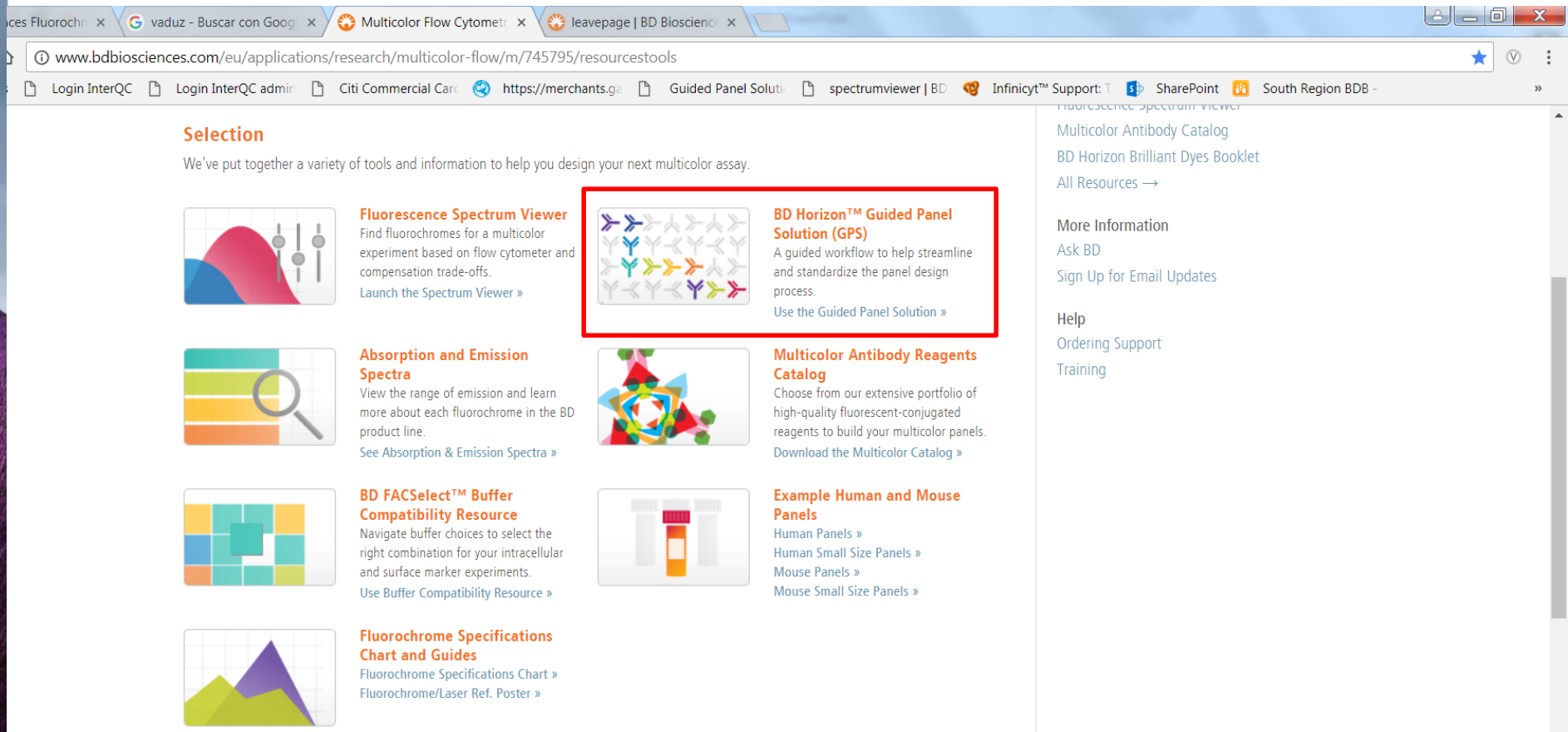
GPS

Departamento de aplicaciones

Barcelona 2019

http://www.bdbiosciences.com/eu/applications/research/multicolor-flow/m/745795/resourcestools

Some useful tools

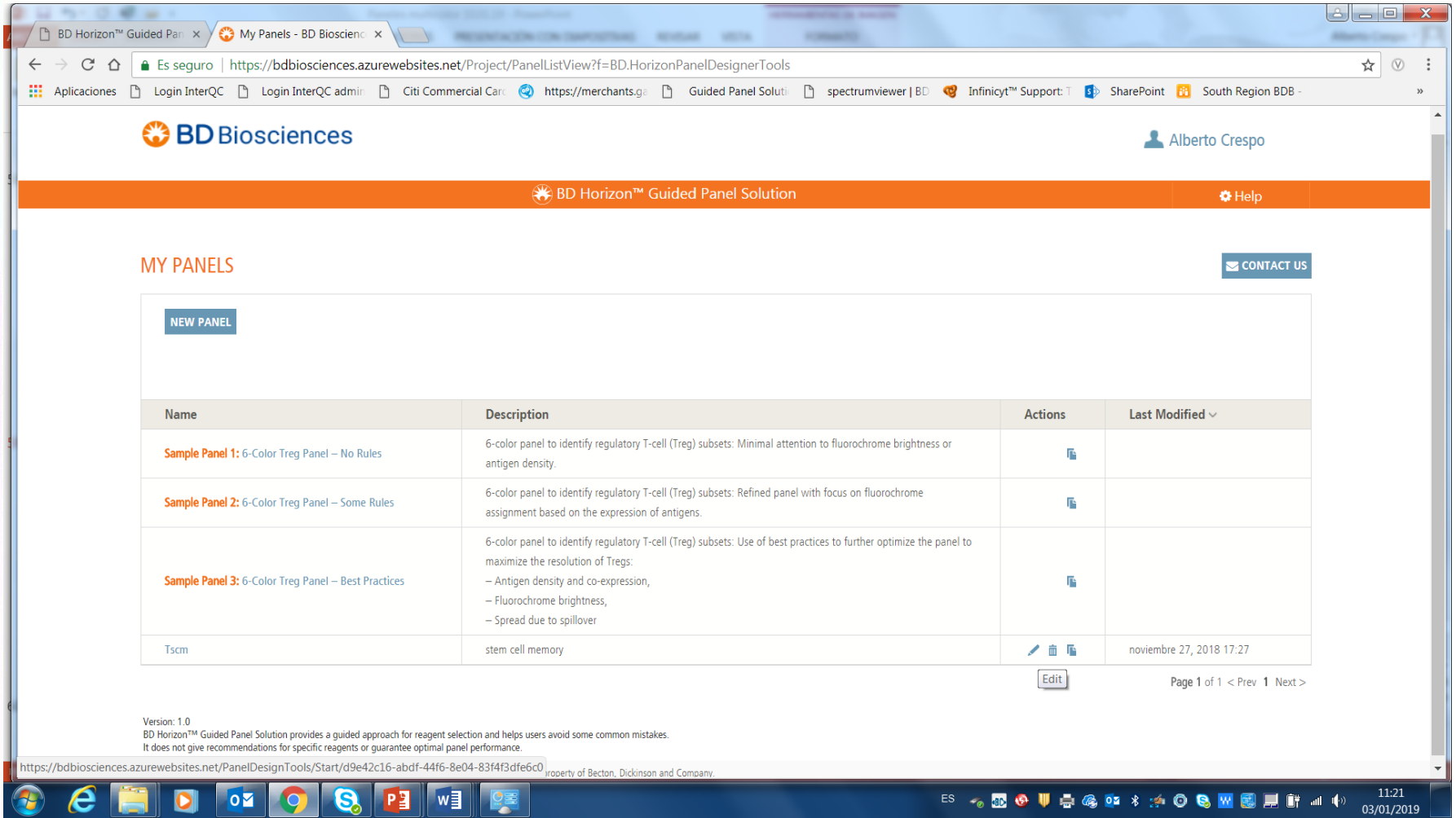


https://www.bdbiosciences.com/us/tools/s/gps

Some useful tools

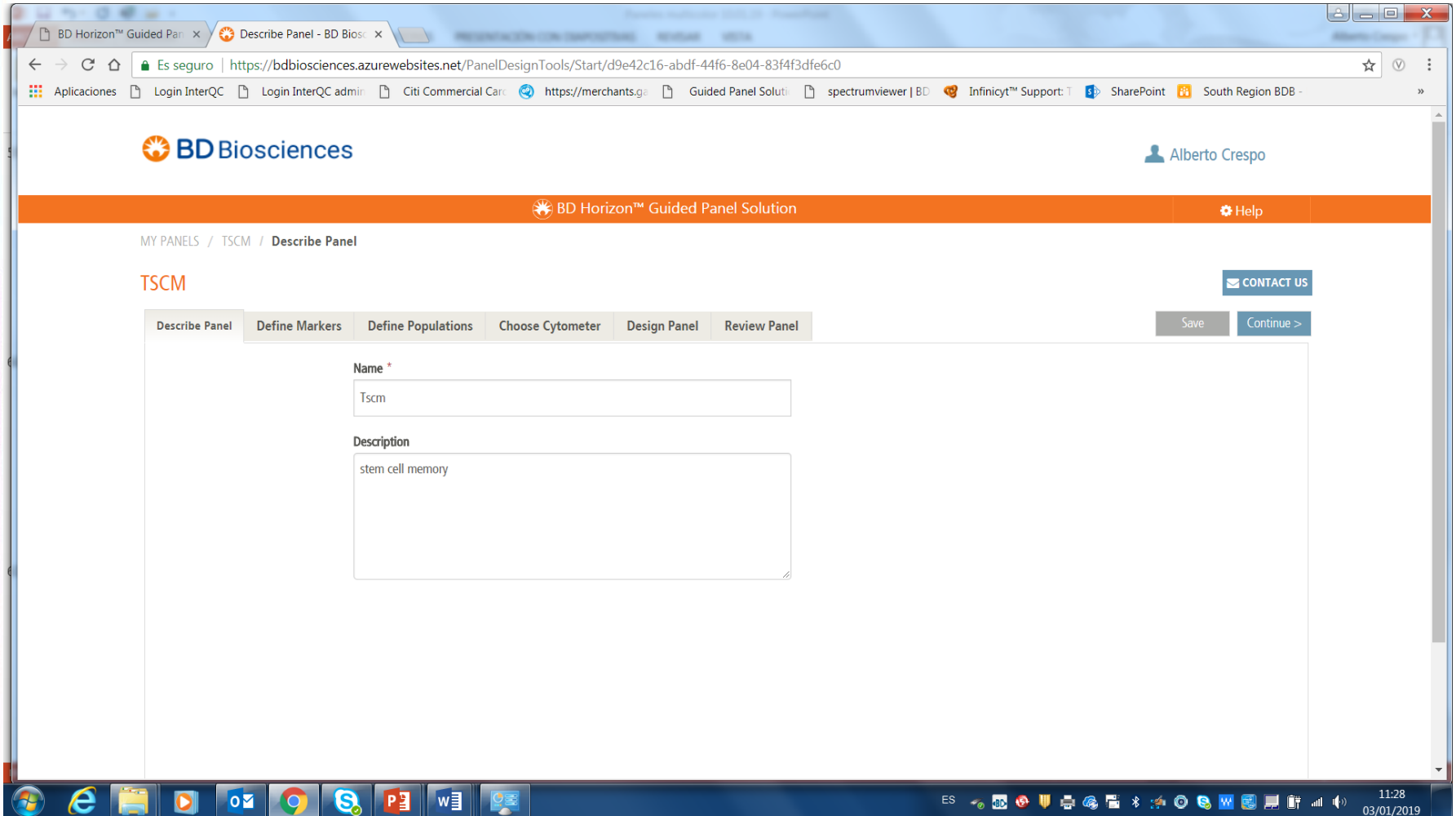
https://www.bdbiosciences.com/us/tools/s/gps

Some useful tools



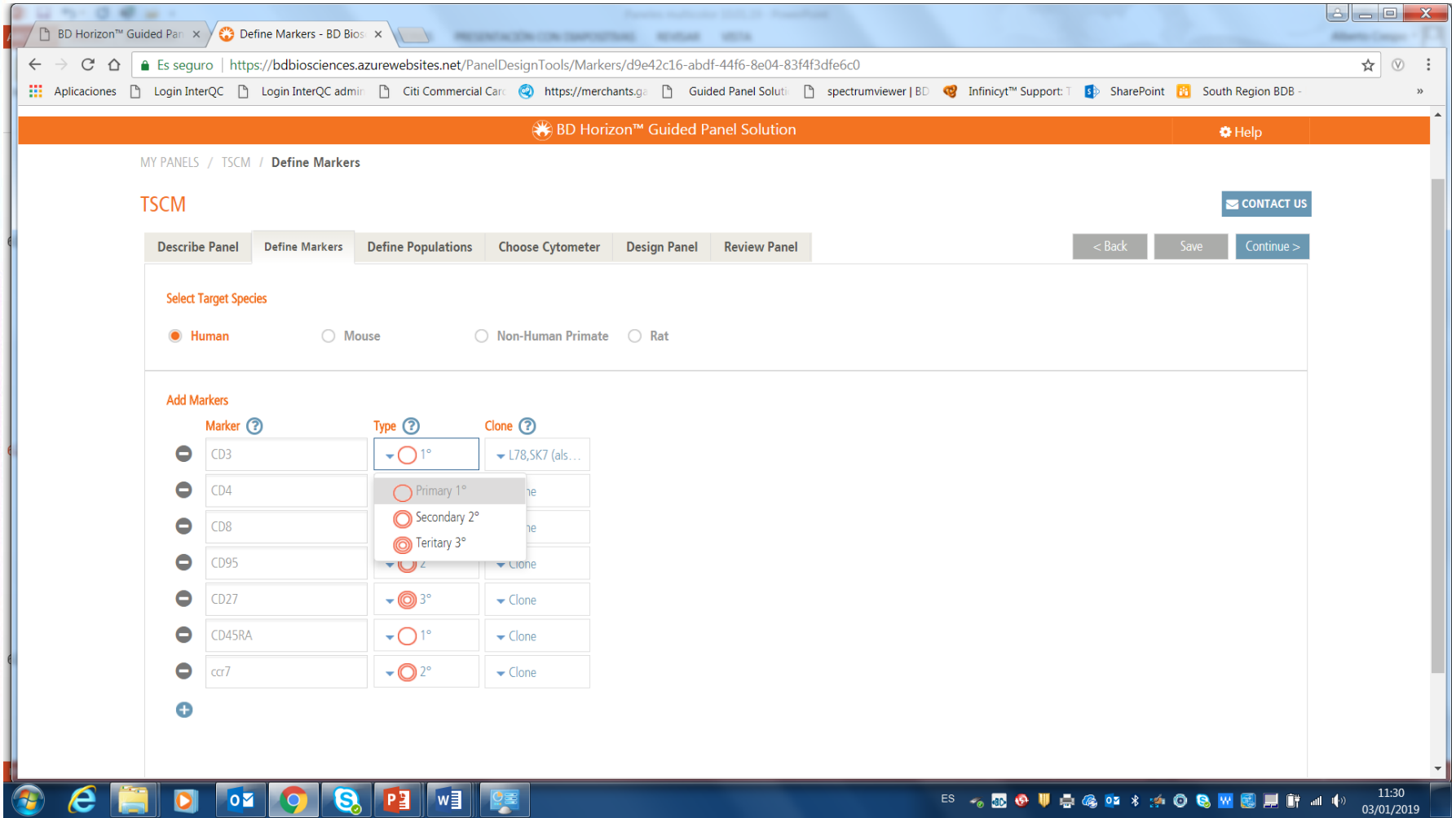
https://www.bdbiosciences.com/us/tools/s/gps

Some useful tools



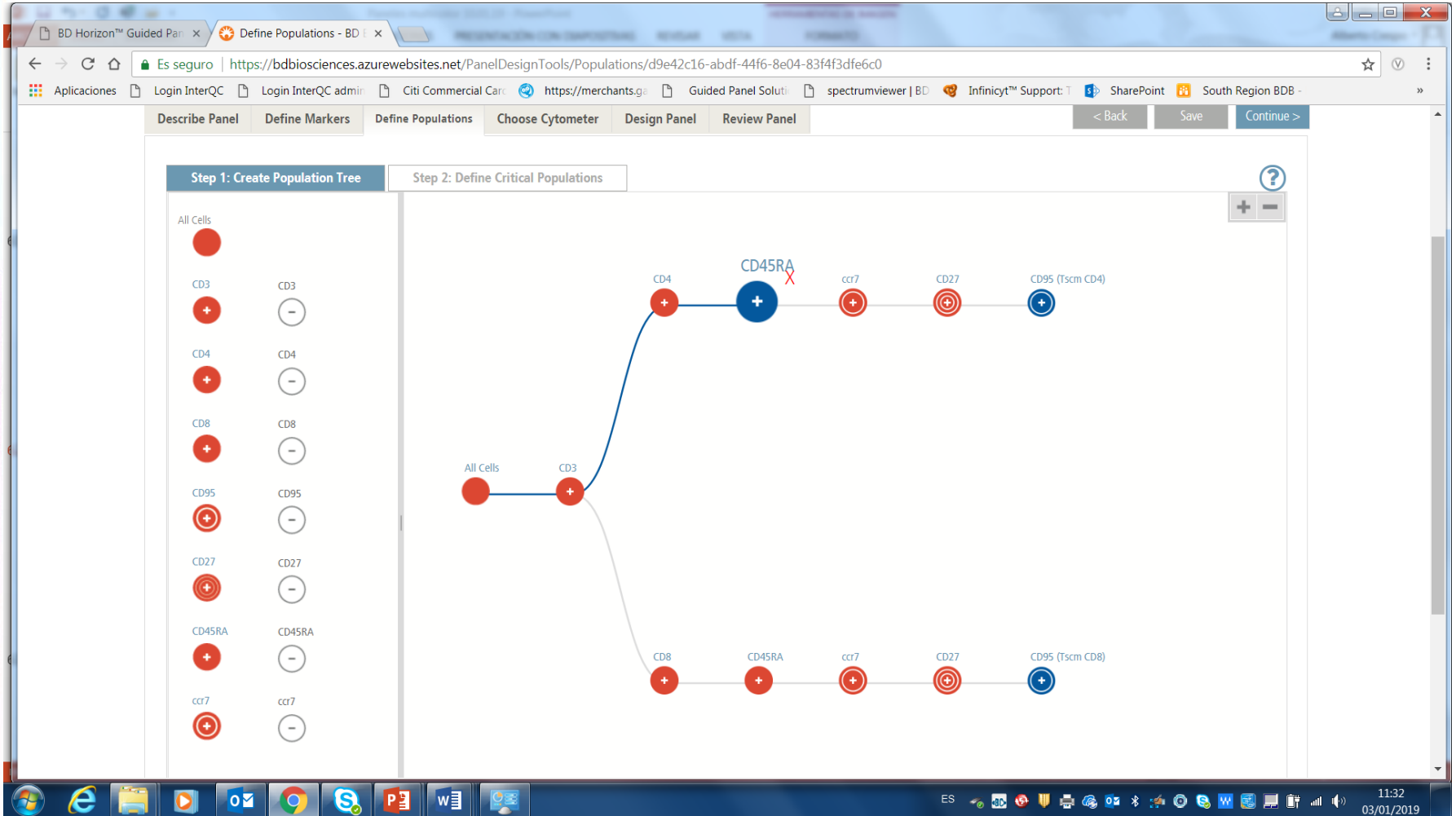
https://www.bdbiosciences.com/us/tools/s/gps

Some useful tools



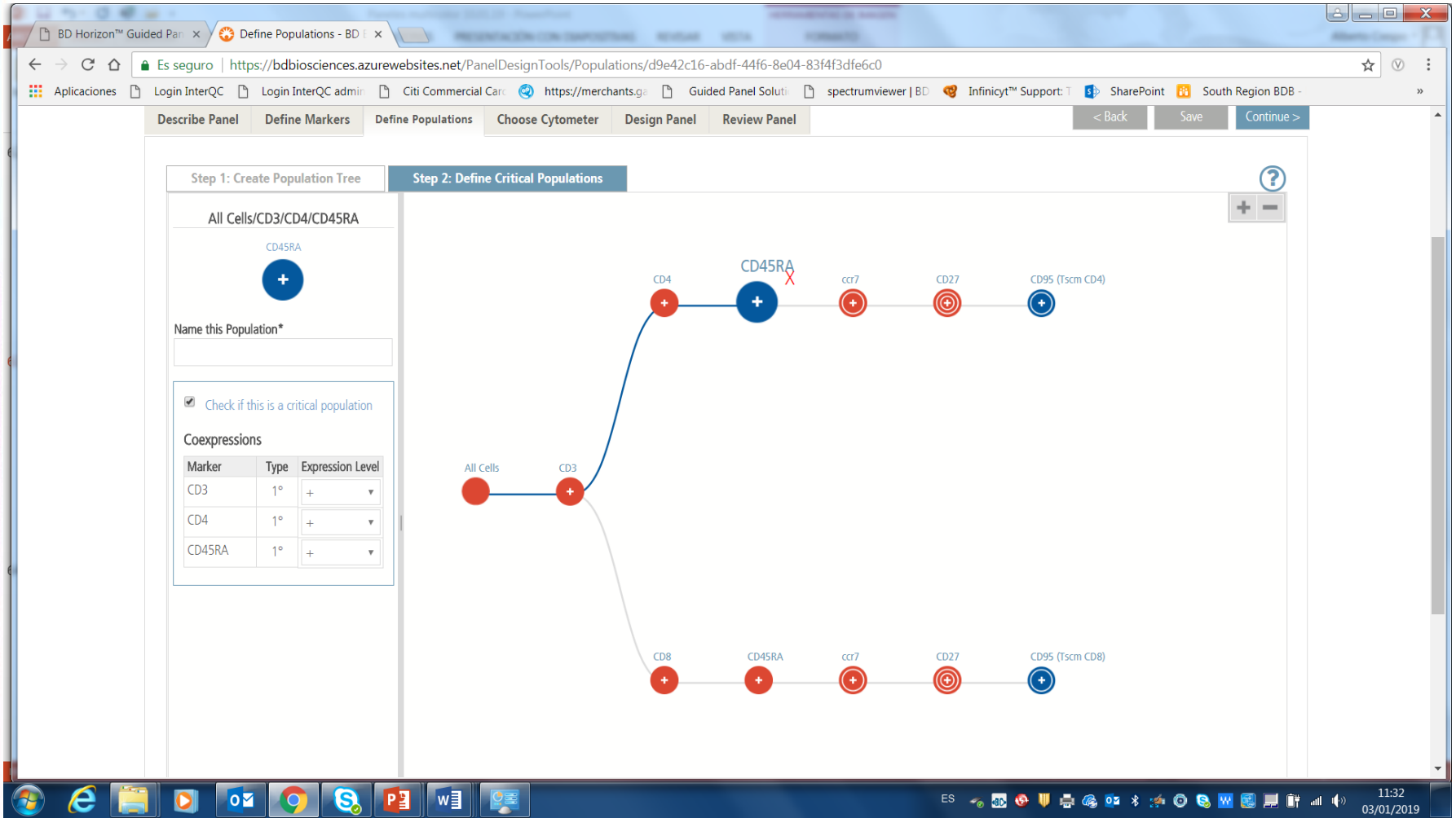
https://www.bdbiosciences.com/us/tools/s/gps

Some useful tools



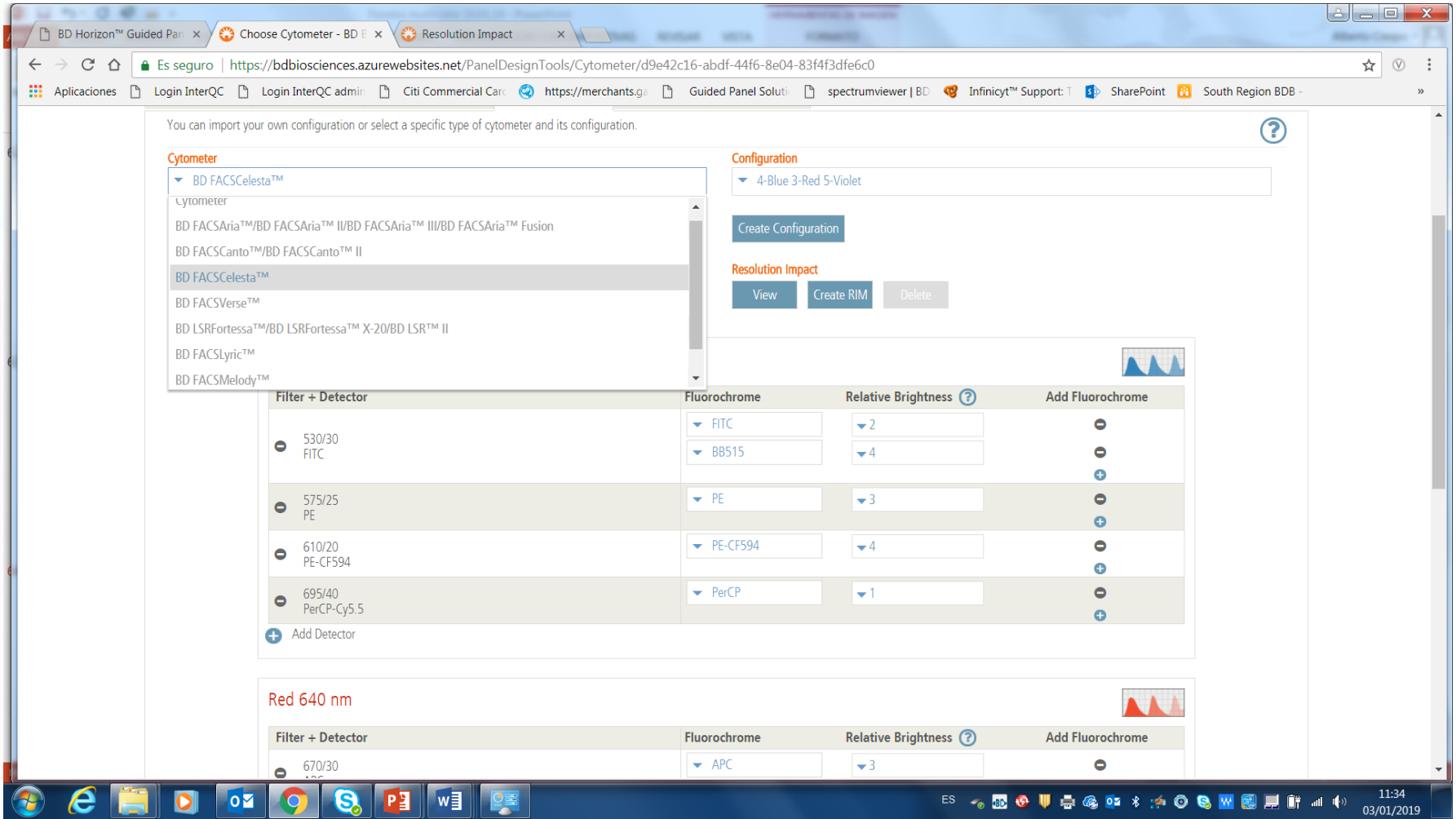
https://www.bdbiosciences.com/us/tools/s/gps

Some useful tools



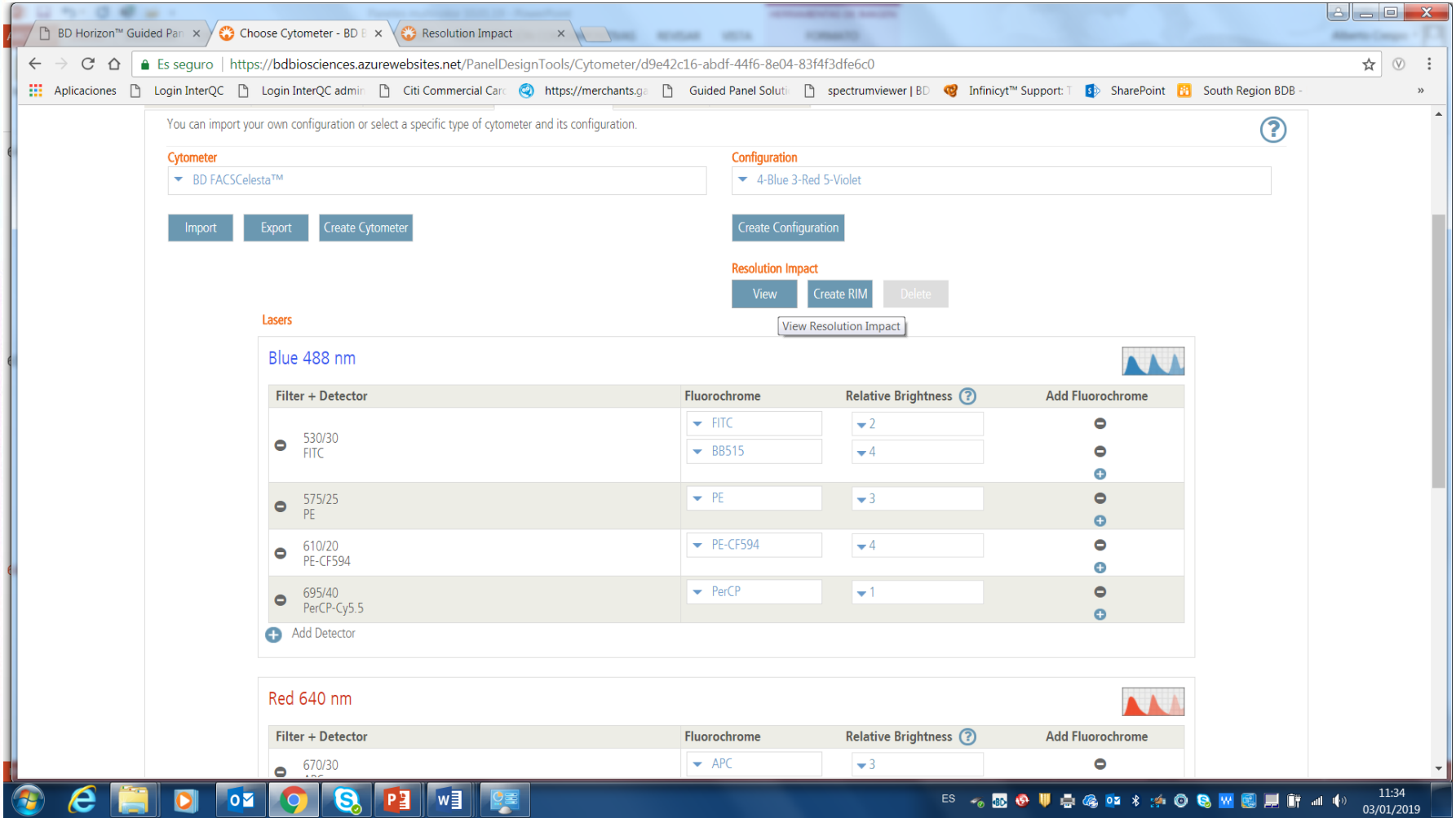
https://www.bdbiosciences.com/us/tools/s/gps

Some useful tools



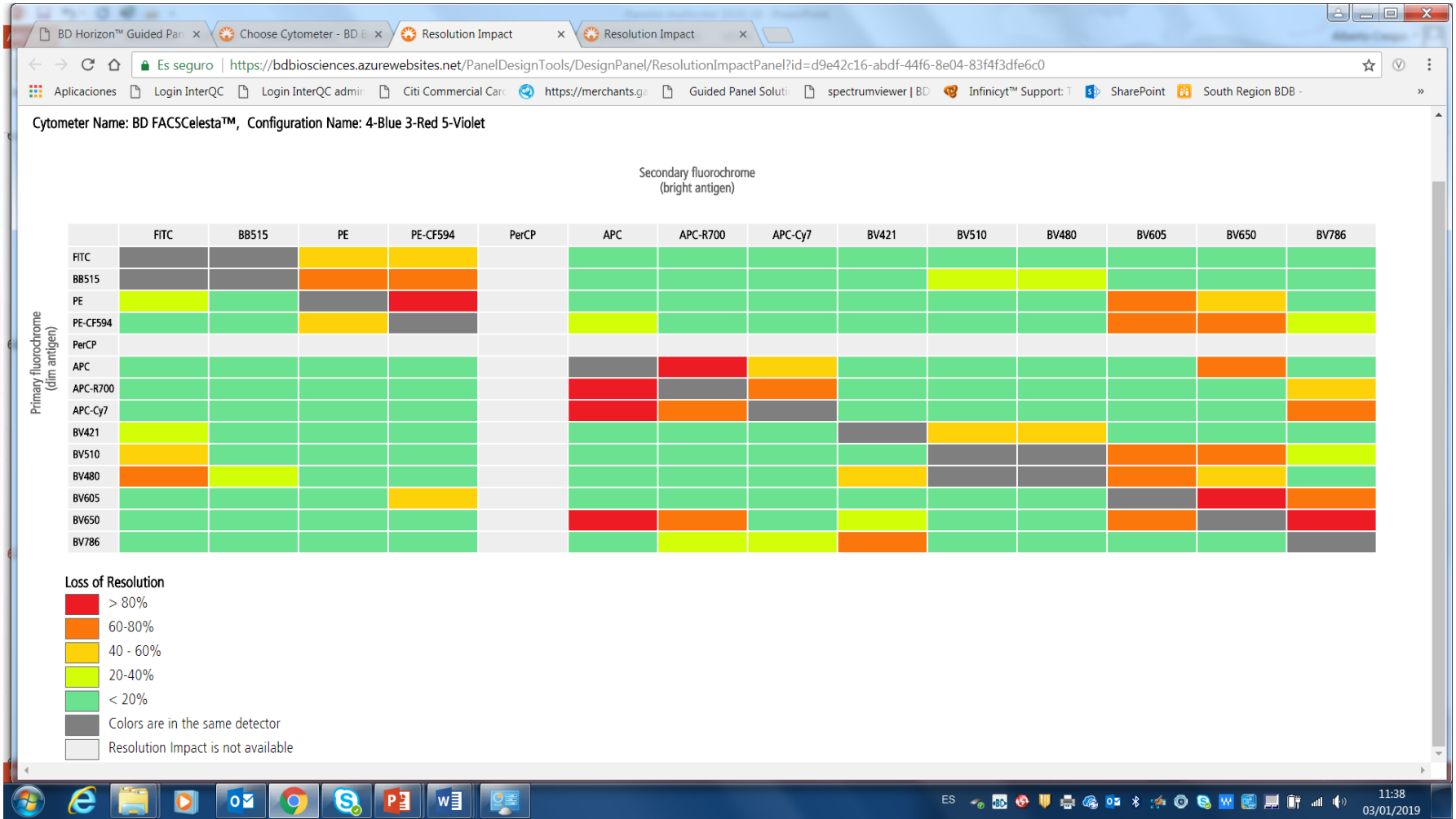
https://www.bdbiosciences.com/us/tools/s/gps

Some useful tools



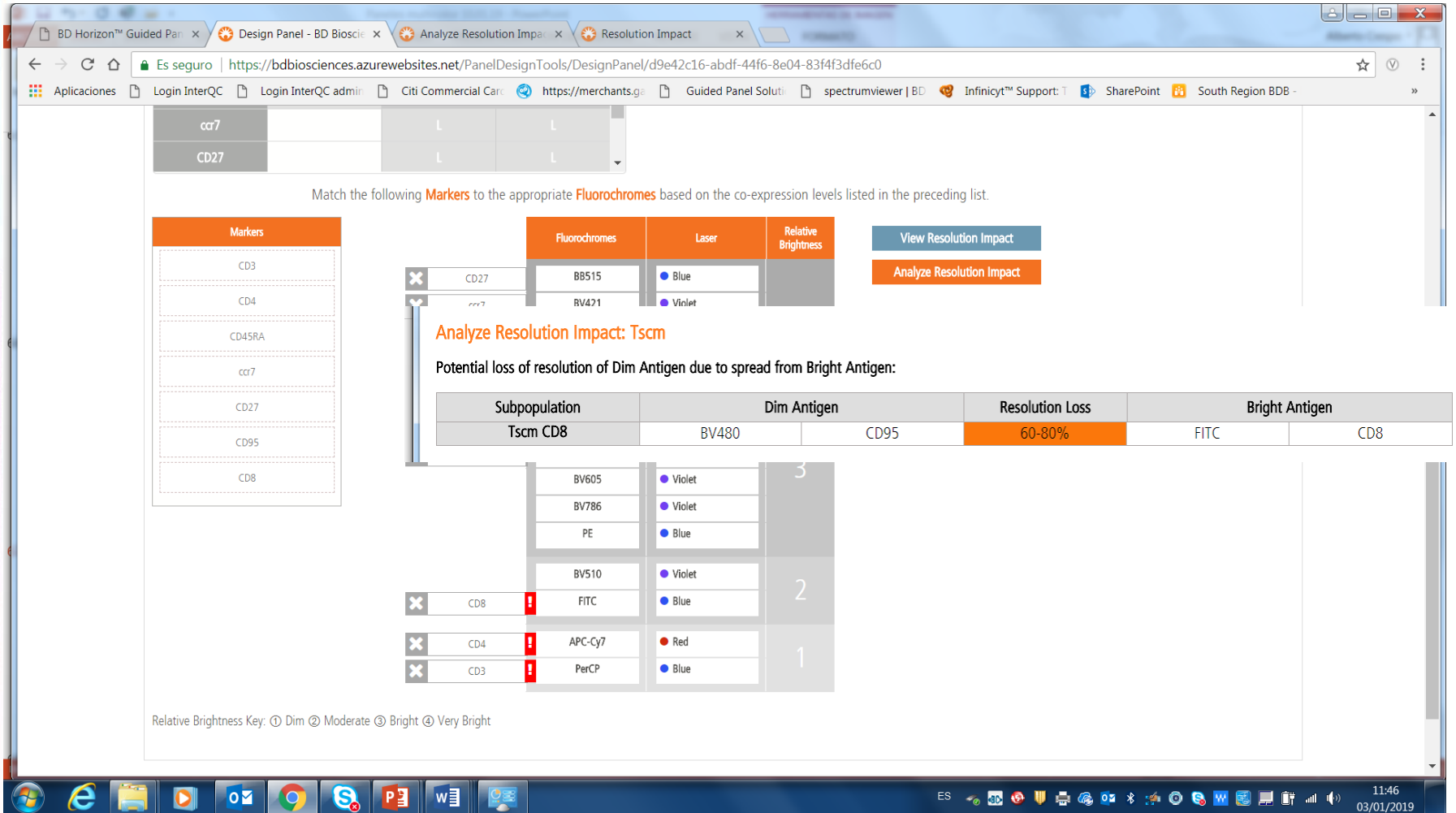
https://www.bdbiosciences.com/us/tools/s/gps

Some useful tools



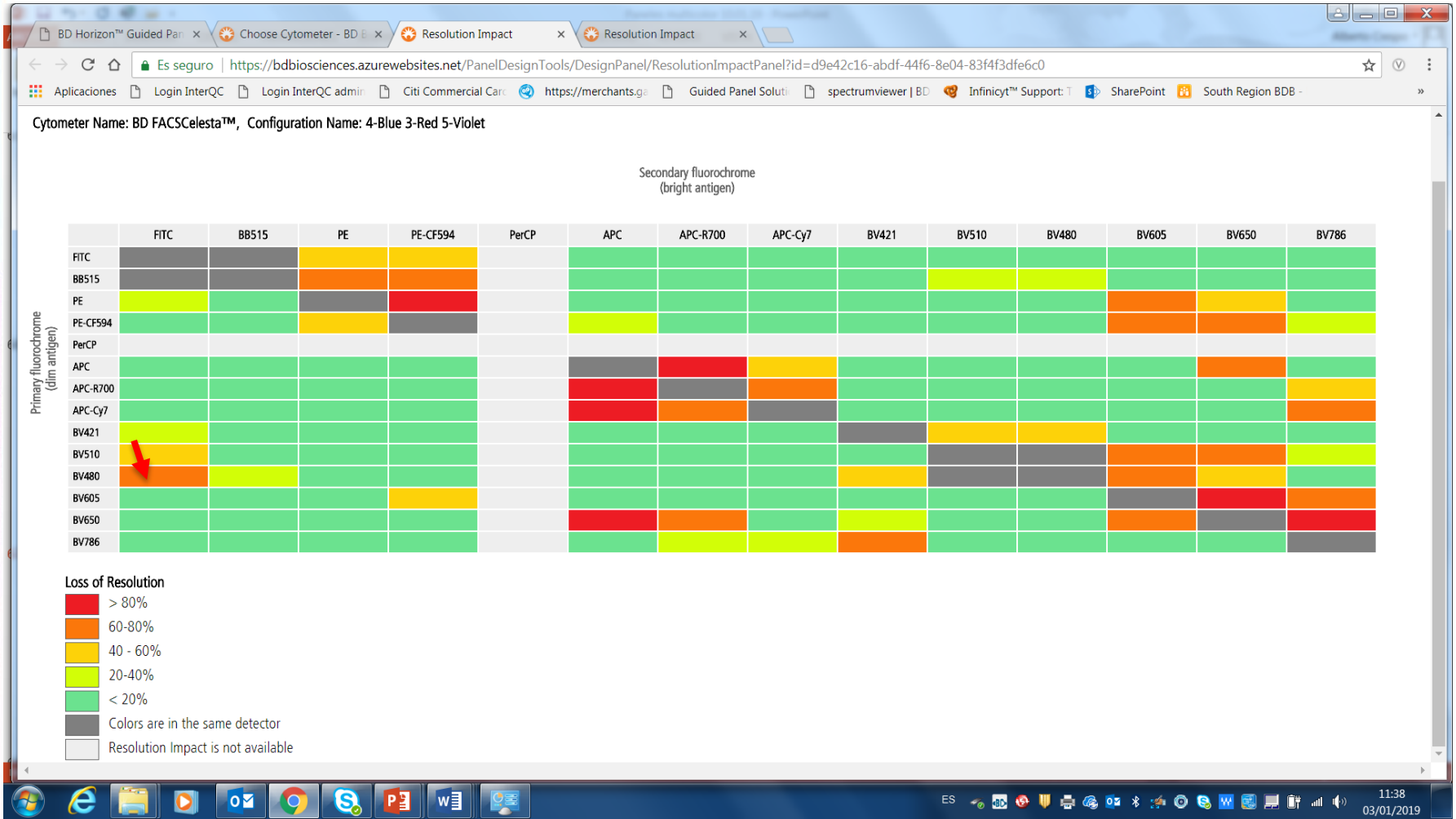
https://www.bdbiosciences.com/us/tools/s/gps

Some useful tools



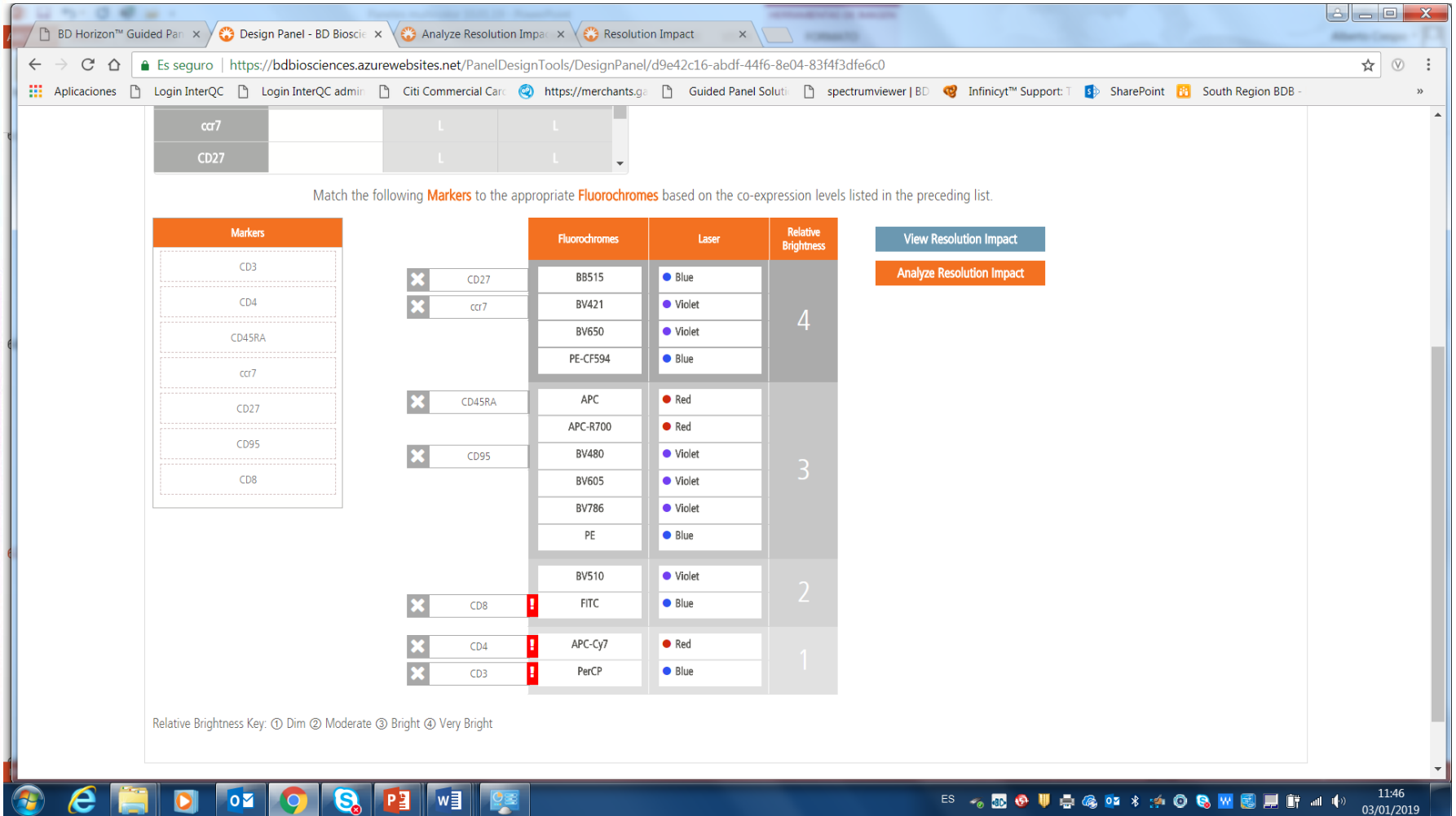
https://www.bdbiosciences.com/us/tools/s/gps

Some useful tools



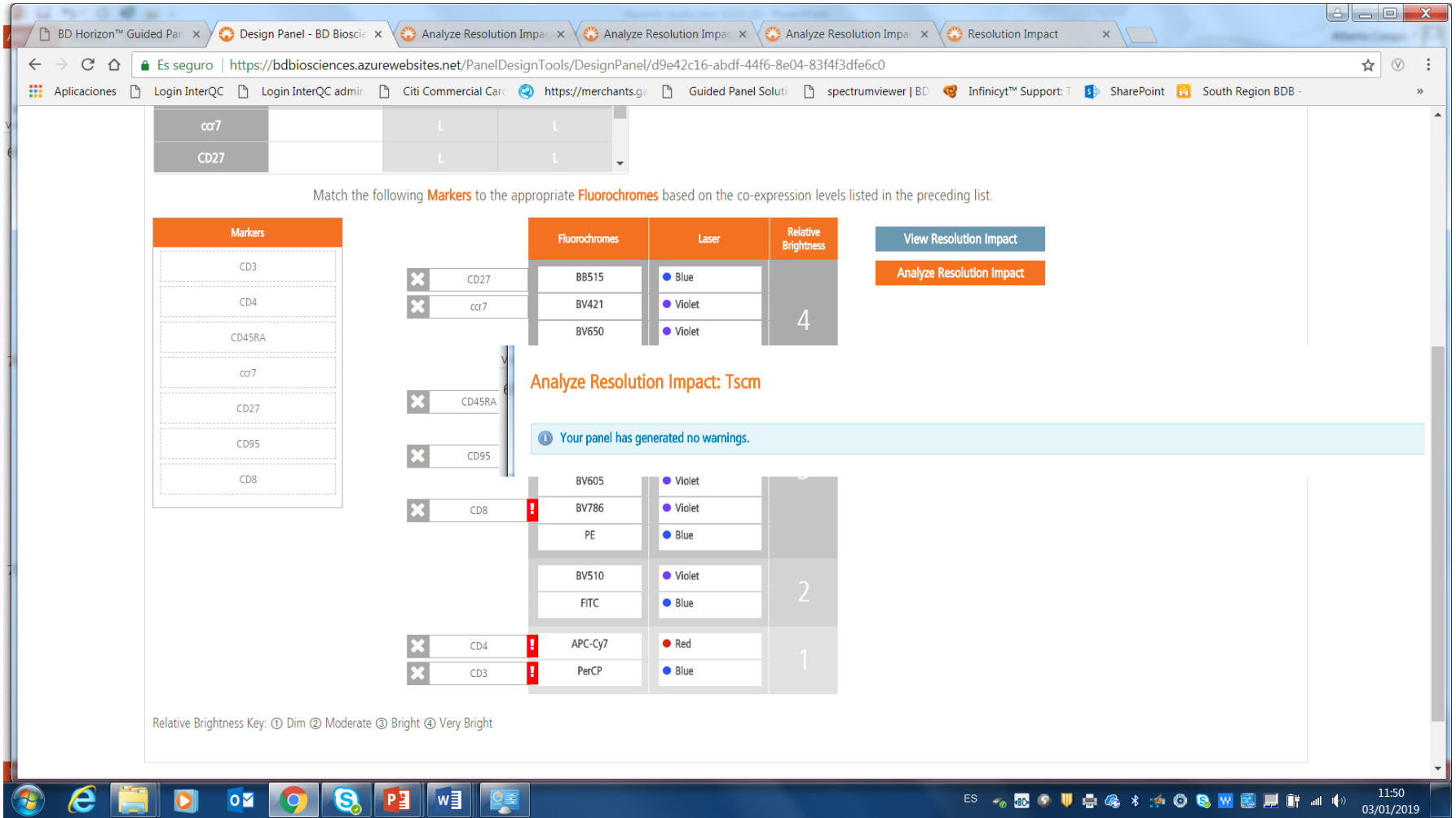
https://www.bdbiosciences.com/us/tools/s/gps

Some useful tools



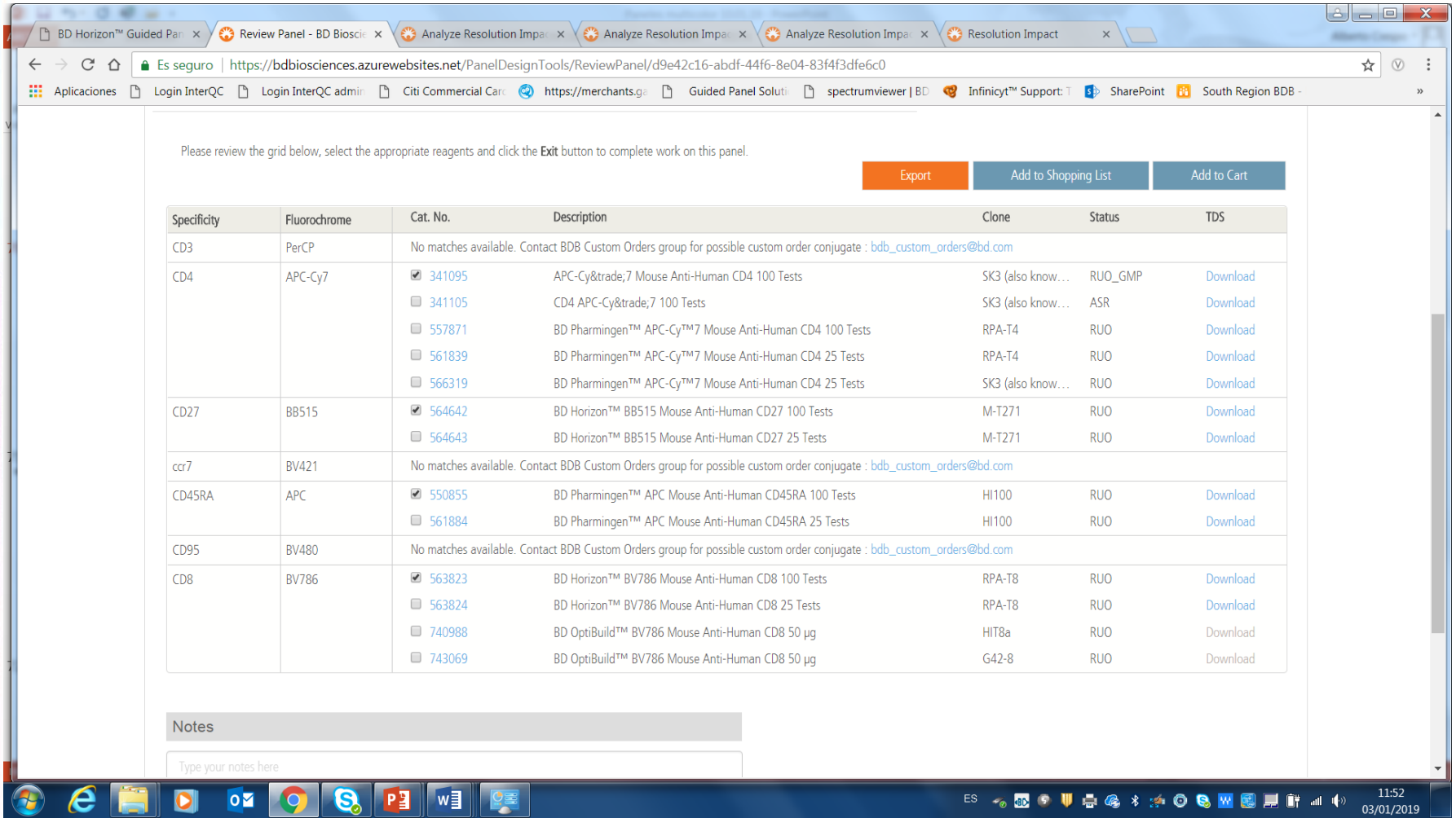
https://www.bdbiosciences.com/us/tools/s/gps

Some useful tools



https://www.bdbiosciences.com/us/tools/s/gps

Some useful tools



Summary

- Multicolor flow cytometry has become more accessible with advances in system capability and fluorochrome availability
- When designing a panel it is important to have:
  - Information about cell biology
  - Information about available flow cytometers
    - Familiarity with excitation and detection optics to understand what fluorochromes are usable
  - Information about spectral characteristics of usable fluorochromes
    - Fluorochrome resolution ranking
    - Impact of fixation method on fluorochrome brightness

BD

REVEALING A NEW
HORIZON

Thank you!

BD