

# Fortbildungskurse

## Einführung in die Durchflusszytometrie: Trainingsvorbereitung



**BD Biosciences**  
Customer Support  
Training, Application and Technical Support  
Tullastraße 8-12  
69126 Heidelberg  
Telefon: 06221 305-212  
E-Mail: [backofficebdb@europe.bd.com](mailto:backofficebdb@europe.bd.com)  
[www.bd.com/de](http://www.bd.com/de)

## Einführung in die Durchflusszytometrie: Trainingsvorbereitung

© 2014 BD. Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil dieser Veröffentlichung darf ohne schriftliche Genehmigung von BD Biosciences in irgendeiner Art und Weise reproduziert, übertragen, transkribiert, in Archivierungssystemen gespeichert oder in eine Fremdsprache oder Computersprache übersetzt werden, sei es in elektronischer, mechanischer, magnetischer, optischer, chemischer, manueller oder sonstiger Form.

Die in diesem Benutzerhandbuch enthaltenen Informationen können ohne vorherige Ankündigung geändert werden. BD Biosciences behält sich das Recht vor, seine Produkte und Dienstleistungen zum Zweck der Integration der neuesten technischen Entwicklungen jederzeit zu ändern. Die Informationen in diesem Handbuch wurden mit größter Sorgfalt zusammengestellt. Dennoch übernimmt BD Biosciences keine Haftung für eventuelle Fehler oder Auslassungen sowie für Schäden, die sich aus der Verwendung dieser Informationen ergeben könnten. BD Biosciences begrüßt kundenseitige Korrektur- und Verbesserungsvorschläge.

BD FACStation Software © 2014 BD. Diese Software ist Eigentum von Becton, Dickinson and Company. Mit dem Kauf dieser Software erwirbt der Käufer eine nicht übertragbare und nicht exklusive persönliche Lizenz. Sofern die gültigen Gesetze keine ausdrückliche Gestattung für bestimmte Fälle vorsehen, darf die Software in keiner Form dupliziert, reproduziert oder kopiert werden.

Die BD FACStation-Software wurde erstellt mit MacApp®, © Apple® Computer, Inc. Die MacApp-Software ist Eigentum von Apple Computer, Inc. und darf von BD Biosciences nur zusammen mit dieser Software weitergegeben werden. Apple Computer Inc. gibt keinerlei Garantien für dieses Produkt. Dies gilt auch für die Garantie der Marktgängigkeit und der Eignung für einen bestimmten Zweck.

BD, das BD Logo, BD Calibrite, BD FACSComp, BD CellQuest, BD Attractors, BD Multiset, BD FACS, BD FACSort, BD FACStation, BD FACSCalibur, BD FACScan, BD FACSort, BD FACStar<sup>PLUS</sup>, BD FACS Vantage, BD FACSCanto, BD LSR II, BD SPA II, BD FACSArray und der BD FACSAria sind Marken der Becton, Dickinson and Company.

Apple, Mac, Macintosh und Power Macintosh sind Marken von Apple Computer, Inc., eingetragen in den USA und anderen Ländern. Finder und Power Mac sind Marken von Apple Computer, Inc.

Microsoft und Windows sind eingetragene Marken der Microsoft Corporation.

ModFit<sup>LT</sup> und Quanticalc sind Marken der Verity Software Firma, Inc.

Sapphire ist eine Marke und Coherent ist eine eingetragene Marke von COHERENT INC.

Alle anderen in diesem Handbuch erwähnten Firmen- und Produktnamen können Marken der jeweiligen Inhaber sein.

### **Patente**

PE und APC: US 4 520 110, 4 859 582, 5 055 556; Europa 76 695; Kanada 1 179 942

PerCP: US 4. 876.190

Cy5.5 und Cy7: US 5 268 486; 5 486 616; 5 569 587; 5 569 766 und 5 627 027

PE-Cy7: US 4,542,104

APC-Cy7: US 5,714,386

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>Vorwort</b>	
Für mehr Informationen .....	iii
<b>Kapitel 1: Überblick</b>	5
<b>Kapitel 2: Flüssigkeitssystem</b>	9
<b>Kapitel 3: Lichtstreuung und Fluoreszenzen</b>	14
3.1 Lichtstreuung .....	15
3.2 Fluoreszenzen .....	17
3.3 Mehrfarbendarstellung .....	21
<b>Kapitel 4: Optisches System</b>	22
4.1 Optische Bank .....	22
4.2 Anregungsoptik .....	25
4.3 Sammeloptik .....	26
4.4 Optische Filter .....	27
<b>Kapitel 5: Elektronisches System</b>	30
5.1 Signaldetektion .....	31
5.2 Schwellenwert (Threshold) .....	36
<b>Kapitel 6: Datenanalyse</b>	37
6.1 Datensammlung und deren Darstellungen .....	37
6.2 Fenster setzen (Gating) .....	40
6.3 Datenanalyse für die Anwendung auf Subpopulationen .....	41

6.4 Datenanalyse und andere Anwendungen .....	45
<b>Kapitel 7: Sortieren</b>	49
7.1 Sortieren .....	49
<b>Kapitel 8: Laser und -Justierung</b>	53
8.1 Wie arbeiten Laser .....	53
8.2 Laser- Justierung .....	55
<b>Kapitel 9: Lösungen</b>	56

# Vorwort

---

Die beste Lernmethode, ein Durchflusszytometer zu bedienen, ist, dieses zu benutzen. Der Lernprozess wird erleichtert, wenn die Prinzipien der Durchflusszytometrie und ihrer Technologie verstanden werden.

Dieses Handbuch enthält grundlegende Informationen über die Durchflusszytometrie. Unterschiede zwischen “Benchtop” Zytometern (BD FACScan, BD FACSort, BD FACSCalibur, BD FACSCanto, BD FACSArray und BD LSR) und “Stream-in-Air” Zytometern (BD FACSVantage SE, BD FACS Aria, BD FACStar<sup>Plus</sup>) sind in den entsprechenden Lektionen beschrieben. Das Lesen dieses Handbuches und die Beantwortung der Fragen am Ende jeder Lektion unterstützen den Lernprozess während des praktischen Anwendertrainings “Durchflusszytometrie” bei BD Biosciences.

**Die Bearbeitung dauert ca. 2,5 Stunden. Bitte lesen Sie es sorgfältig durch, bevor Sie die praktisch orientierte Trainingseinheit beginnen. Die Lösungen wurden angehängt.**

Wenn Sie Fragen oder Probleme haben sollten, kontaktieren Sie bitte in den USA die Tel.-Nr. 1-800-448-2347, Option 4.

In Europa melden Sie sich entweder bei der für Sie zuständigen Niederlassung von BD Biosciences, dem für Sie zuständigen Produkt- oder Applikationsspezialisten oder beim Flow-Support in Heidelberg unter der Tel.-Nr. +49 (0)6221 305-212.

## Für mehr Informationen

Mehr Informationen allgemein zur Durchflusszytometrie finden Sie in der folgenden Literatur:

- Givan AL. *Flow Cytometry: First Principles*. New York, NY: Wiley-Liss; 1992 (ISBN 0-471-56095-2)

- Melamed MR. *Flow Cytometry and Sorting*. New York, NY: Wiley-Liss; **1990** (ISBN 0-471-56235-1)
- Shpiro H. *Practical Flow Cytometry*. 3rd ed. New York, NY: Alan R. Liss; **1994** (ISBN 0-471-30376-3)
- Weitere Literaturangaben finden Sie vor allem im Internet u. a. unter:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>  
<http://www.isac-net.org/index.htm>  
<http://flowcyt.cyto.purdue.edu/>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PROW/guide/45277084.htm>  
<http://www.bio.umass.edu/mcbfacs/flowcat.html>  
<http://www.bigelow.org/cytometry/>  
<http://facs.scripps.edu>

Auf der folgenden Internetseite können Sie ein **online Training** “Introduction to Flow Cytometry” durchführen:

[http://www.bdbiosciences.com/immunocytometry\\_systems/support/training/online/](http://www.bdbiosciences.com/immunocytometry_systems/support/training/online/)

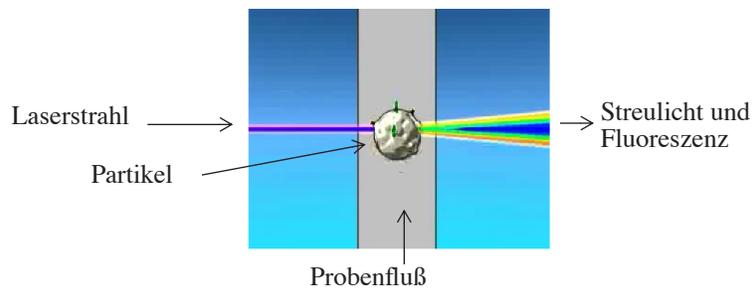
Auf dieser Seite öffnen Sie “Introduction to Flow Cytometry” und starten es durch Klicken auf “Lauch BD Intro to Flow Training”.

Weiteres Trainingsmaterial oder Tutorials für die PC- oder Macintosh-Systeme finden Sie ebenfalls auf dieser Internetseite wie z.B. eine Einführung in die HTS Option für den BD FACSCalibur oder Kurzanleitungen für die CellQuest Pro Software.

## Überblick

---

Die Durchflusszytometrie ist eine Technologie, die verschiedene physikalische Eigenschaften einzelner Partikel, gewöhnlich Zellen, gleichzeitig misst und analysiert, während sie in einem Flüssigkeitsstrom transportiert jeweils einzeln einen Laserstrahl passieren. Die Merkmale, die gemessen werden, sind die relative Partikelgröße, die relative Granularität oder interne Komplexität und die relative Fluoreszenzintensität. Diese Eigenschaften werden durch ein gekoppeltes optisch-elektronisches System bestimmt, das ermittelt, wie die Zelle oder Partikel das einfallende Laserlicht streut und die Fluoreszenzen emittiert, siehe Abb. 1-1.



**Abbildung 1-1** Was ist Durchflusszytometrie?

Ein Durchflusszytometer besteht aus drei Hauptkomponenten: Flüssigkeitssystem, Optik und Elektronik, siehe Abb. 1-2.

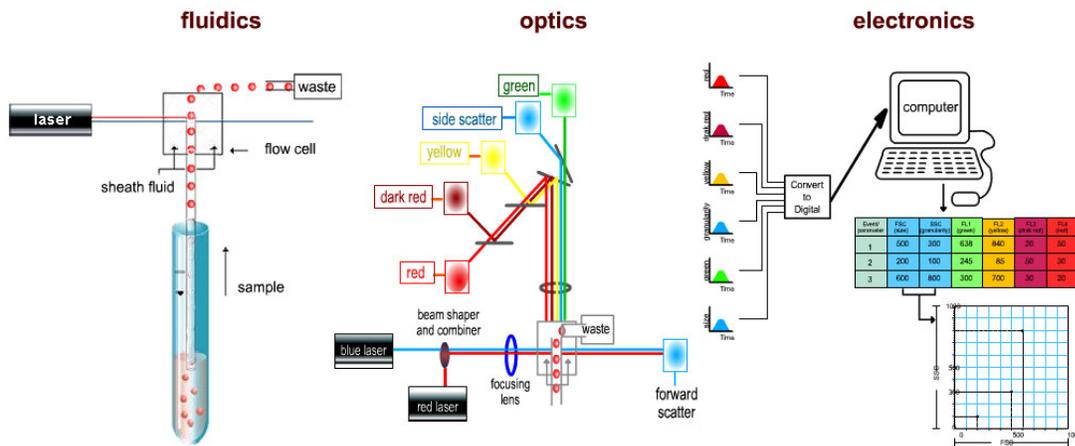


Abbildung 1-2 Die drei Hauptbestandteile eines Durchflusszytometers

- Das Flüssigkeitssystem transportiert die Partikel und führt sie in einem laminaren Probenstrom, hydrodynamisch fokussiert, zur Analyse durch den Laserstrahl.
- Das optische System besteht sowohl aus einem (oder mehreren) Lasern, dessen fokussiertes, kohärentes Licht die Partikel in der Trägerflüssigkeit anstrahlt als auch aus optischen Filtern, die die austretenden Lichtsignale zu den entsprechenden Detektoren leiten.
- Das elektronische System wandelt die Lichtsignale in den Detektoren zuerst in elektronische und dann in digitale Signale um, die dann vom Computer bearbeitet werden können. Für einige Geräte, die mit einer Sortiereinheit ausgerüstet sind, entscheidet das elektronische System, wann mit dem Sortieren begonnen wird und lenkt die Partikel entsprechend ab.

In einem Durchflusszytometer werden die Partikel in der Trägerflüssigkeit durch einen Laserstrahl transportiert. Jedes suspendierte Partikel oder jede Zelle von 0,2 – 150 Mikrometer Größe ist für die Analyse geeignet. Gewebe muss vor der Analyse zerkleinert werden, damit einzelne Zellen freigelegt werden, siehe Abb. 1-3. Der Teil des Flüssigkeitssystems, in dem die Partikel zum Analysenpunkt transportiert werden, heißt Probenfluss. Dieser ist von einem weiteren Flüssigkeitsstrom, dem Hüllstrom, umgeben. Wenn Partikel das Laserlicht passieren, streuen sie das auftreffende Laserlicht. Alle Fluoreszenzmoleküle auf den Partikeln fluoreszieren. Das streuende und fluoreszierende Licht wird von den entsprechend positionierten Linsen gesammelt. Eine Kombination aus Strahlteilern (Splitter) und Filtern leitet das streuende und fluoreszierende Licht zu

den entsprechenden Detektoren. Die Detektoren erzeugen elektronische Signale, deren Intensität proportional zu den auftreffenden optischen Signalen ist.

Es werden von jedem Partikel alle verfügbaren Messdaten erfasst. Die Eigenschaften oder Parameter von einem Partikel basieren auf seiner Lichtstreuung und den Fluoreszenzmerkmalen. Die Daten werden im Computer gesammelt und zusammen mit einer vorab festgelegten Anzahl zu messender Partikel in einer sog. "List Mode" Datei gespeichert. Diese kann auch nachträglich analysiert werden, um weitere Informationen über Sub-Populationen in dieser Probe zu erhalten.

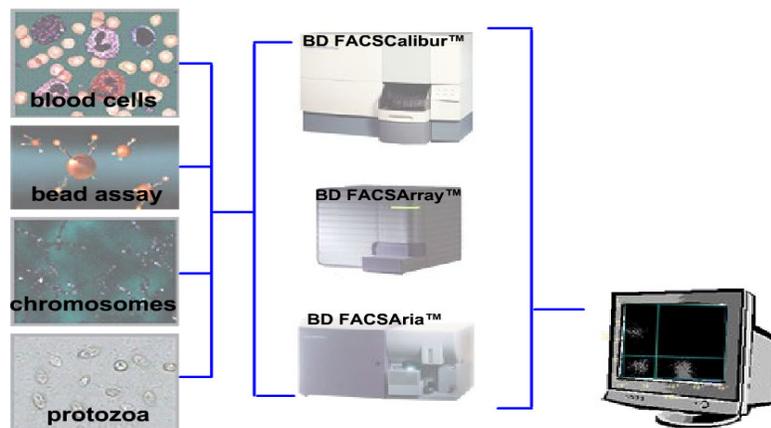


Abbildung 1-3 Messung unterschiedlicher Partikel an verschiedenen BD Durchflusszytometern

## Prüfungsfragen: Überblick

1 Welche Merkmale von Zellen oder Partikeln können von einem Durchflusszytometer gemessen werden?

---

2 Was für eine Lichtquelle wird in den meisten Durchflusszytometern benutzt?

---

3 Was sind die drei Hauptkomponenten eines Durchflusszytometers?

---

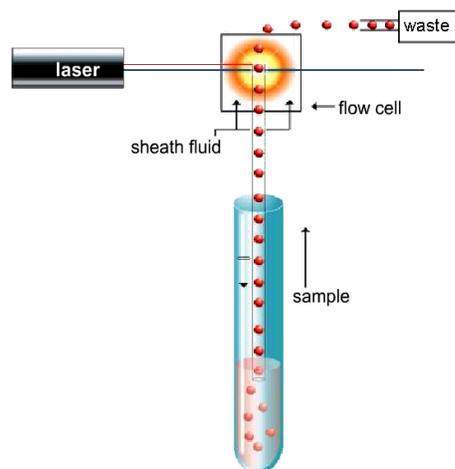
4 Was für eine Probenart ist für die Durchflusszytometrie am besten geeignet?

---

- 5** Wie lautet der Name des Teils des Flüssigkeitsstroms, in dem sich die Zellen befinden?  
\_\_\_\_\_
- 6** Wenn mit Fluoreszenzmolekülen markierte Zellen den fokussierten Laserstrahl passieren, werden welche zwei Typen von Lichtsignalen aufgenommen?  
\_\_\_\_\_
- 7** Das emittierte Licht eines Partikels wird gesammelt durch: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
- 8** Die elektronischen Signale, die durch einen Detektor produziert werden, sind proportional zu: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
- 9** Alle durchflusszytometrischen Messungen können gleichzeitig an einer Zelle durchgeführt werden. Wahr.....Falsch.....  
\_\_\_\_\_
- 10** Partikel müssen als Einzelzellen in Suspensionen vorliegen, damit sie vom Durchflusszytometer analysiert werden können. Wahr..... Falsch.....  
\_\_\_\_\_

## Flüssigkeitssystem

Die Aufgabe des Flüssigkeitssystems ist, die Partikel für die Analyse im Flüssigkeitsstrom suspendiert zum und durch den Laserstrahl zu transportieren. Für eine optimale Anstrahlung muss der Flüssigkeitsstrom die Partikel möglichst in die Mitte der Messkammer durch den Laserstrahl transportieren (*interrogation point*). Außerdem soll jeweils nur eine Zelle oder Partikel den Laserstrahl passieren.



**Abbildung 2-1** Das Flüssigkeitssystem

Um dieses ausführen zu können, wird die Probe in die Messzelle in den Strom der schnell fließenden Trägerflüssigkeit (Hüllstrom) oder auch Mantelflüssigkeit genannt unter höherem Druck "injiziert". Die Messkammer eines "Benchtop" Zytometers (z.B. BD FACSCalibur, BD FACSCanto) wird Durchflusszelle

genannt. Bei einem "Stream-in-Air" Zytometer (z.B. BD FACSVantage, BD FACSAria) wird die Probe in einer modifizierten Messkammer, einer spitz geformten Düse (nozzle), zentral in die Trägerflüssigkeit "injiziert". Der Flüssigkeitsstrahl schießt aus der Düse, und die darin vereinzelt Partikel passieren in einem definierten räumlichen Punkt (*intersection point*) den fokussierten und justierten Laserstrahl, siehe Abb. 2-2.

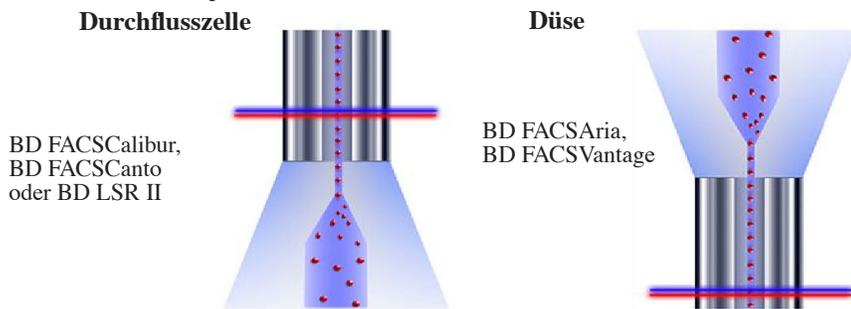


Abbildung 2-2 Verschiedene Flüssigkeitssysteme in BD Durchflusszytometer

Basierend auf den physikalischen Grundlagen eines laminaren Stroms, bleibt der Probenfluss getrennt von der Trägerflüssigkeit aber koaxial zu diesem. Die Trägerflüssigkeit beschleunigt die Partikel und führt sie in die Mitte des Probenflusses. Dieser Vorgang wird als **hydrodynamische Fokussierung** bezeichnet. Zur Veranschaulichung der hydrodynamischen Fokussierung in jeder Messkammer, siehe Abb. 2-3 und Abb. 2-4.

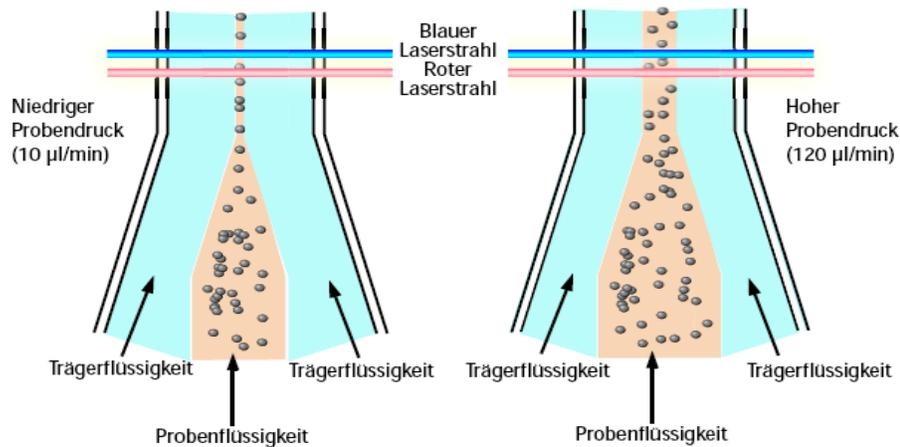
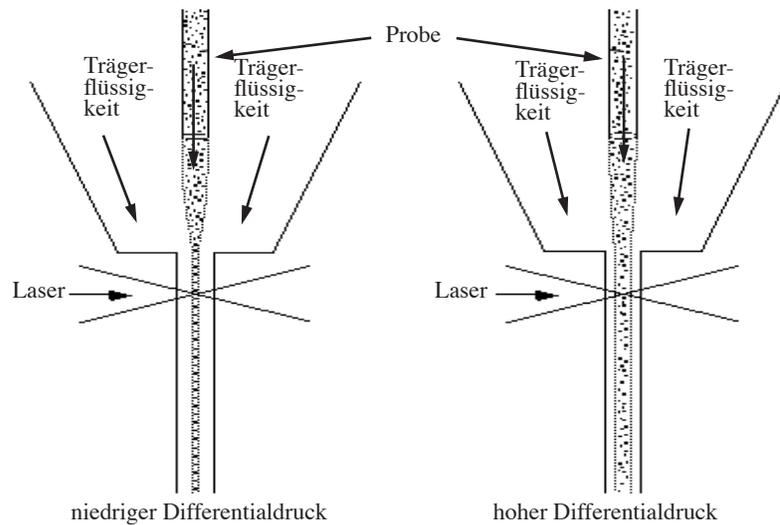


Abbildung 2-3 Hydrodynamische Fokussierung des Probenflusses in der Durchflusszelle



**Abbildung 2-4** Hydrodynamische Fokussierung des Probenflusses durch eine Düsen Spitze

Der Probendruck und der Druck der Trägerflüssigkeit sind unterschiedlich voneinander. Der Probendruck ist immer größer als der Druck der Trägerflüssigkeit. Der Probendruckregler kontrolliert die Probenflussrate beim Wechseln des Probendrucks relativ zum Druck der Trägerflüssigkeit.

- In BD Benchtop Zytometern wird der Probenstrom aufwärts durch eine optisch klare Region der Durchflusszelle, auch Küvette genannt, unter Druck gesetzt; die Partikel passieren den Laserstrahl während sie in der Durchflusszelle sind, siehe Abb. 2-2 und 2-3. Die meisten Benchtop Zytometer haben feste Probendruckeinstellungen (LO, MED und HI) oder wie beim BD LSR II Zytometer zusätzlich einen Justierknopf für Feineinstellungen. Probendruckeinstellungen in anderen Zytometern wie z.B. BD FACSCanto werden über die Software kontrolliert.
- Bei den Stream-in-Air Zytometern wird der Probenstrom mittels einer dünnen Kanüle in die Düsen Spitze injiziert und die Partikel werden erst nach Austritt aus der Düse vom Laserstrahl in der Luft angestrahlt, siehe Abb. 2-2 und 2-4. Die Probendruckeinstellung kann innerhalb bestimmter Grenzen variiert werden.

Ein Erhöhen des Probendrucks erhöht die Fließrate durch Vergrößern der Breite des Probenflusses. Dieses führt dazu, dass mehr Zellen zur gleichen Zeit in den Strom eintreten können. Mit einem breiten Probenfluss können einige Zellen den Laserstrahl nicht mittig passieren und fangen den Laserstrahl in einem weniger optimalen Winkel auf. Dieses sollte für entsprechende Anwendungen beachtet werden.

- Die höhere Fließrate wird im allgemeinen für qualitative Messungen wie die Immunphäotypisierung verwendet. Die Messdaten der Einzelpartikel sind nicht absolut optimal gut aufgelöst, da die Zellen weniger in einer Linie in dem breiten Probenfluss sind, die Messzeit wird aber durch eine höhere Fließrate verkürzt. Die typische Probenkonzentration liegt im Bereich von  $2 \times 10^5$  -  $1 \times 10^7$  Zellen/ml.
- Eine niedrigere Fließrate vermindert die Breite des Probenflusses und schränkt die Position der Zelle in einen eng begrenzten Raum ein. Der größte Teil der Zellen passiert den Laserstrahl genau im Fokus. Auf diese Weise werden die Zellen vom Licht optimal angestrahlt und dieses wird von den Zellen einheitlicher emittiert. Eine niedrige Fließrate wird im allgemeinen bei Anwendungen verwendet, bei denen eine präzise Auflösung unbedingt erforderlich ist, wie der DNA-Zellzyklusanalyse.

Die eigentliche Wirkung der Flüssigkeitskomponenten ist für Partikel, die den Laserstrahl kreuzen, kritisch. Daher muss der Anwender darauf achten, dass das Flüssigkeitssystem immer luftblasenfrei ist, von Zellschrott frei ist und jeder Zeit unter Druck steht.

### Prüfungsfragen: Flüssigkeitssystem

- 1 Der Zweck des Flüssigkeitssystems in einem Durchflusszytometer ist folgender:\_\_\_\_\_.
- 2 Welche zwei Faktoren können die Bestrahlung der Partikel in dem Laserstrahl beeinflussen?  
\_\_\_\_\_
- 3 Wieviele Zellen oder Partikel sollten zur gleichen Zeit den Laserstrahl passieren?\_\_\_\_\_
- 4 Die Partikelsuspension wird in die \_\_\_\_\_ in der \_\_\_\_\_ injiziert.  
\_\_\_\_\_
- 5 Der Vorgang, den Probenfluss innerhalb der Trägerflüssigkeit zu zentrieren, heißt:\_\_\_\_\_.
- 6 Welcher Regler kontrolliert den Durchmesser des Probenflusses?  
\_\_\_\_\_
- 7 Was bedeuten die drei möglichen Druckeinstellungen bei den meisten BD Benchtop Zytometern?  
\_\_\_\_\_
- 8 Erhöhen des Probendrucks führt zum \_\_\_\_\_ der Probenflussrate und verändert die \_\_\_\_\_ des Probenflusses.  
\_\_\_\_\_
- 9 Gute Datenauflösung wird für DNA Studien gefordert. Welche Fließrate wird empfohlen?  
\_\_\_\_\_
- 10 Ein breiter Probenfluss verringert die Auflösung. Wahr.....Falsch.....  
\_\_\_\_\_
- 11 Eine hohe Fließrate kann bei der Durchführung von qualitativen Messungen verwendet werden. Wahr.....Falsch.....

## Lichtstreuung und Fluoreszenzen

---

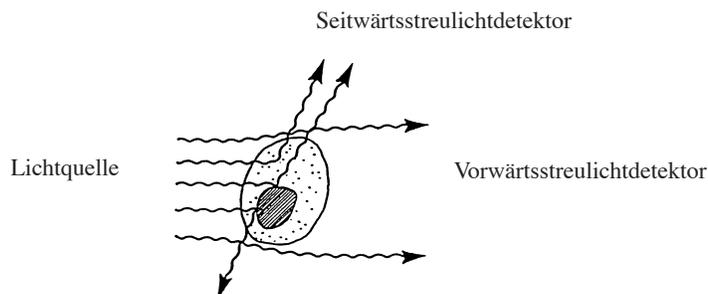
Das Kapitel 2 befasste sich mit dem Flüssigkeitssystem und damit, wie die Partikel oder Zellen im Probenfluss hintereinander aufgetrennt und jeweils einzeln durch den Fokus des Laserstrahls fließen (Hydrodynamische Fokussierung). Bevor wir uns näher mit dem optischen System des Durchflusszytometers befassen (Kap. 4), ist es sinnvoll, die Eigenschaften der Lichtstreuung und Fluoreszenzen eingehend zu erläutern.

### 3.1 Lichtstreuung

In der Durchflusszytometrie tritt dann Lichtstreuung auf, wenn ein Partikel einer kolloidalen Lösung das einfallende Laserlicht ablenkt (**TYNDALL-Effekt**). Das Maß dieser Streuung hängt von den physikalischen Eigenschaften des Partikels ab, nämlich von seiner Größe und internen Komplexität. Faktoren, die die Lichtstreuung beeinflussen, sind die Zellmembran, der Kern und alle granulären Zellkomponenten (z.B. Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat, Vakuolen, Phago-/Lysosomen, ggf. phagozytierte u. unverdauliche Ablagerungen, Endosporen, Chloroplasten, etc.). Ebenso tragen die Zellform und Oberflächenbeschaffenheit zur totalen Lichtstreuung bei.

Das *Vorwärtsstreulicht* (Forward Scatter, FSC) ist proportional zur Zelloberfläche oder –größe. Der FSC entspricht hauptsächlich dem gebeugten Licht und wird entlang der Achse des einfallenden Lichts mittels einer Photodiode detektiert, siehe Abb. 3-1. Jedes Partikel erzeugt im Lichtstrahl ein FSC-Signal. Deshalb wird der FSC als Signal zur Detektion von Partikeln angesehen, wenn man deren Größe unabhängig von den Fluoreszenzen als gegeben ansieht. In der Immunphänotypisierung wird der FSC zum Triggern der Signalverarbeitung verwendet (FSC-Schwellenwert, Threshold).

Das *Seitwärtsstreulicht* (Side Scatter, SSC) ist proportional zur internen Komplexität, auch Zellgranularität genannt. Hauptsächlich entsteht der SSC aus der Messung des gebrochenen und reflektierten Lichts, das bei jedem Berührungspunkt in der Zelle durch Änderung des refraktären Index auftritt, siehe Abb. 3-1. Der SSC wird im 90° Winkel zum einfallenden Licht mittels einer Sammellinse gebündelt und danach von einem Strahlsplitter (Brewster Spiegel) zum entsprechenden Detektor umgelenkt.



**Abbildung 3-1** Merkmale der Lichtstreuung einer Zelle

Die gleichzeitige Messung des FSC und SSC und deren korrelierte Darstellung ermöglicht die Unterscheidung von Zelltypen in einer heterogenen Zellpopulation.

So können z.B. Leukozyten-Subpopulationen anhand ihrer FSC- und SSC-Signale differenziert werden, siehe Abb. 3-2.

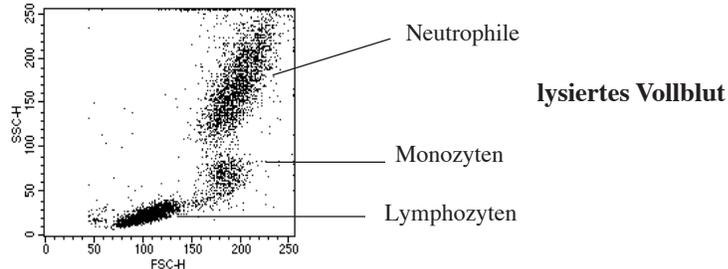


Abbildung 3-2 Zell- Subpopulationen basierend auf FSC gegen SSC

### Prüfungsfragen: Lichtstreuung

- 1 Wie entsteht die Lichtstreuung?  
\_\_\_\_\_
- 2 Welche Bestandteile einer Zelle bewirken die Lichtstreuung?  
\_\_\_\_\_
- 3 Lichtstreuung in der gleichen Richtung wie der Laserstrahl heißt: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
- 4 FSC ist proportional zur: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
- 5 Lichtstreuung im 90° Winkel zum Laserstrahl gebündelt heißt: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
- 6 SSC ist proportional zur \_\_\_\_\_ oder \_\_\_\_\_ der Zelle.  
\_\_\_\_\_
- 7 Die korrelierten Messungen beider Parameter, dem \_\_\_\_\_ und \_\_\_\_\_ ermöglicht die Unterscheidung von Zelltypen in einer heterogenen Zellpopulation.  
\_\_\_\_\_

## 3.2 Fluoreszenzen

Ein Molekül mit fluoreszierenden Eigenschaften absorbiert Lichtenergie in einem Bereich, der charakteristisch für diese Verbindung ist. Die Energie des absorbierten Lichts hebt ein Elektron des Moleküls in einen höheren Energielevel. Das angeregte Elektron geht schnell in den Grundzustand ( $10^{-9}$ – $10^{-6}$  s) zurück und emittiert die überschüssige Energie als Lichtquant in Form eines Photons. Dieser Energieübergang wird als *Fluoreszenz* bezeichnet.

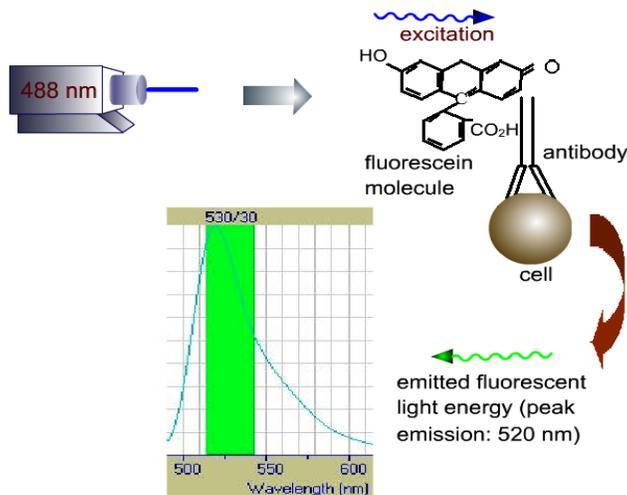


Abbildung 3-3 Wie entsteht Fluoreszenz?

Die Fluoreszenzintensität ist proportional zu den gebundenen Fluorochromen. Je mehr gebundene Fluorochrome, umso mehr Fluoreszenz wurde emittiert und umso höher ist die Fluoreszenzintensität, in Abb. 3-4 dargestellt auf der x-Achse.

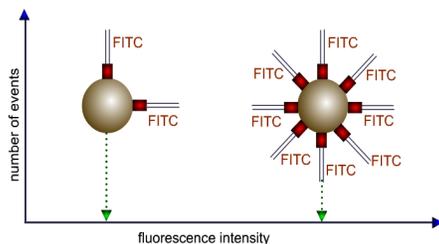


Abbildung 3-4 Fluoreszenzintensität

Der Energiebereich des Lichtes, innerhalb dessen eine Fluoreszenzverbindung angeregt werden kann, wird als *Absorptionsspektrum* bezeichnet. Weil mehr Energie im Absorptionsübergang verbraucht als im Fluoreszenzübergang emittiert wird, sind die emittierten Wellenlängen länger (größer) als die absorbierten. Der Bereich der emittierten Wellenlängen für eine Einzelverbindung wird als *Emissionsspektrum* bezeichnet.

Der Argon-Ionen Laser wird gewöhnlich in Durchflusszytometern verwendet, weil das 488 nm Licht mehr als ein Fluorochrom anregt (mehr Informationen zum Laser in Kapitel 8). Eines der Fluorochrome ist das Fluorescein Isothiocyanat (FITC). In dem Absorptionsspektrum von FITC ist die 488 nm Kurve identisch zum FITC Absorptionsmaximum, siehe Abb. 3-5. Bei Anregung mit dieser Wellenlänge resultiert daraus die höchste FITC Emission. Wird das Fluorochrom durch eine andere Wellenlänge innerhalb des Absorptionsspektrums angeregt, entsteht ebenfalls Emissionslicht, aber nicht mit derselben Intensität.

Es können mehr als ein Fluorochrom gleichzeitig verwendet werden, wenn jedes sich bei 488 nm anregen lässt, und die Wellenlängen der entsprechenden Emissionspeaks sich nicht extrem überlappen. Diese Kriterien besitzt die Kombination von FITC und R-Phycoerythrin (R-PE). Das Emissionsspektrum jedes einzelnen Fluorochroms wird in Abb. 3-6 auf Seite 19 gezeigt. Obwohl das Absorptionsmaximum von R-PE nicht bei 488 nm liegt, wird das Fluorochrom bei der Wellenlänge genug angeregt, um eine adequate Fluoreszenzemission für die Detektion zu liefern. Wichtiger ist der Peak der Emissionswellenlänge von FITC bei 530 nm und für R-PE bei 570 nm. Die Peaks der Emissionswellenlängen sind weit genug voneinander entfernt, damit sie von zwei unabhängigen Detektoren detektiert werden können. Die Anzahl der detektierten Fluoreszenzsignale ist proportional zur Zahl der Fluorochrommoleküle auf dem Partikel.

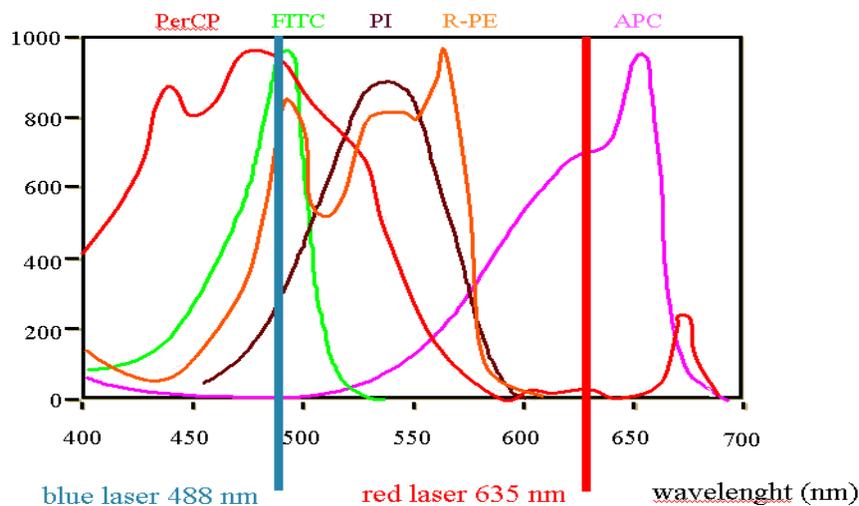


Abbildung 3-5 Absorptionsspektren der gebräuchlichen Fluorochrome

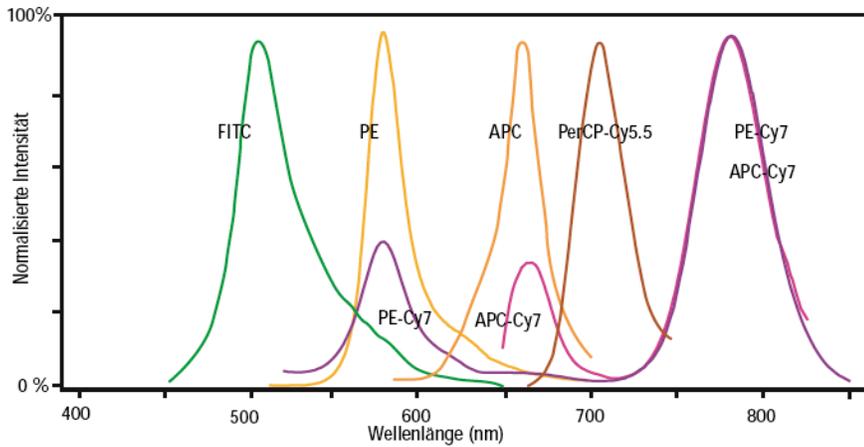


Abbildung 3-6 Emissionsspektren der gebräuchlichen Fluorochrome

Ist ein Fluoreszenzfarbstoff an einem monoklonalen Antikörper gebunden, dann kann dadurch, basierend auf den einzelnen Antigen-Oberflächenmarker der Zelle, die Identifizierung eines bestimmten Zelltyps erfolgen, siehe Abb. 3-7. In einer gemischten Zellpopulation können differente Fluorochrome benutzt werden, um unterschiedliche Subpopulationen zu unterscheiden. Das Färbemuster jeder Subpopulation korreliert mit den entsprechenden FSC- und SSC-Daten. Es dient zur Identifizierung der Zellen in der Probe und zur Berechnung des prozentualen Anteils. Darüber hinaus können diese Zellen sortiert werden, wenn es gefordert wird.

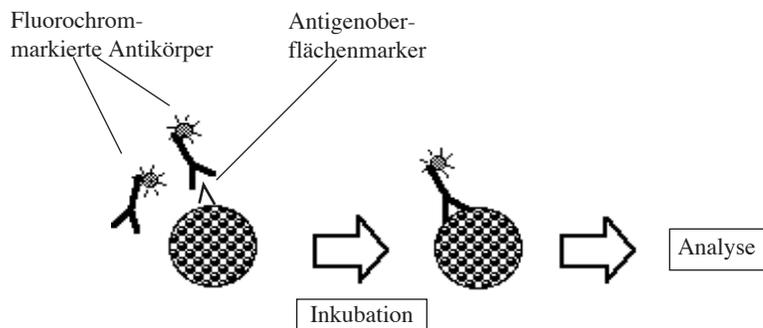


Abbildung 3-7 Spezifische Bindung Fluorochrom-gekoppelter Antikörper an ihre Antigene auf der Zelloberfläche

**Prüfungsfragen: Fluoreszenzen**

- 1 Wenn Moleküle Lichtenergie absorbieren und innerhalb von  $10^{-9}$ – $10^{-6}$  Sekunden die überschüssige Energie wieder als Photonen freigeben, dann emittieren sie \_\_\_\_\_.
- 2 Charakteristische Wellenlängenbereiche, in denen Fluoreszenzverbindungen angeregt werden können, heißen \_\_\_\_\_.
- 3 Die größere Wellenlänge des emittierten Lichts durch ein Fluorochrom ergänzt sein \_\_\_\_\_.
- 4 Welcher Laser wird am häufigsten in der Durchflusszytometrie verwendet?  
\_\_\_\_\_
- 5 Beide Fluorochrome, FITC und R-PE, werden bei dieser Wellenlänge von einem Argon-Ionen Laser angeregt: \_\_\_\_\_.
- 6 Die beiden Fluoreszenzfarbstoffe, die im allgemeinen in der Durchflusszytometrie gebraucht werden, heißen: \_\_\_\_\_ und \_\_\_\_\_.
- 7 Fluorochrom-konjugierte Antikörper werden zur Detektion von \_\_\_\_\_  
benutzt.  
\_\_\_\_\_

### 3.3 Mehrfarbendarstellung

Es können mehr als ein Fluorochrom (Farbe) gleichzeitig verwendet werden. In dem nachfolgenden Beispiel wird jedes Fluorochrom mit einem 488 nm Laser angeregt. Beachten Sie, dass die Emissionsspektren der einzelnen Fluorochrome jeweils überlappen. Dieses wird als **Überlappung (Spillover)** bezeichnet. Auf der folgenden Internetseite können Sie sich die Absorptions- und Emissionsspektren der einzelnen Fluorochrome anzeigen lassen: <http://www.bdbiosciences.com/spectral/>. Die einzelnen Säulen zeigen den Emissionsbereich an z.B. für FITC von 515-545 nm. Dieser ist abhängig von den verwendeten Filtern vor den Detektoren, mehr Informationen hierzu finden Sie in Kapitel 4 unter Abschnitt Optische Filter.

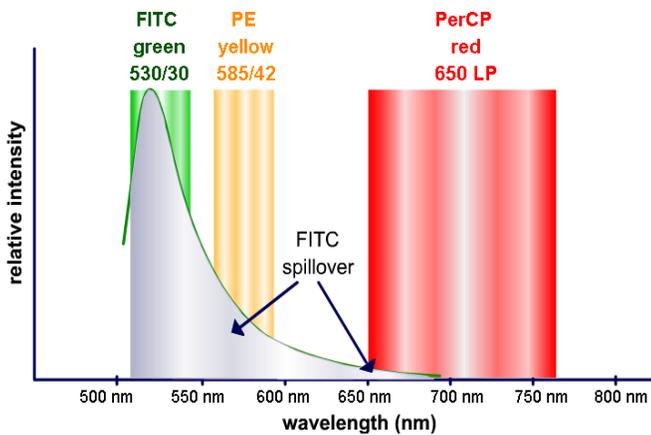


Abbildung 3-8 Die Überlappung von FITC in PE und PerCP

Weil das FITC Signal in andere Detektoren strahlt, erscheinen gefärbte Zellen oder Partikel nicht nur in FITC positiv, sondern auch in den anderen Farben. Um den Überlappungsbereich zu korrigieren, muss kompensiert werden. Die Kompensation wird über die Hardware (BD FACScan) oder über die Software (BD FACSCanto) durchgeführt. In diesem Beispiel wird FITC gegen PE kompensiert. Die positive FITC Population darf keine positive Population in PE zeigen, dieser sollte nach Korrektur negativ sein, siehe Abb. 3-9.

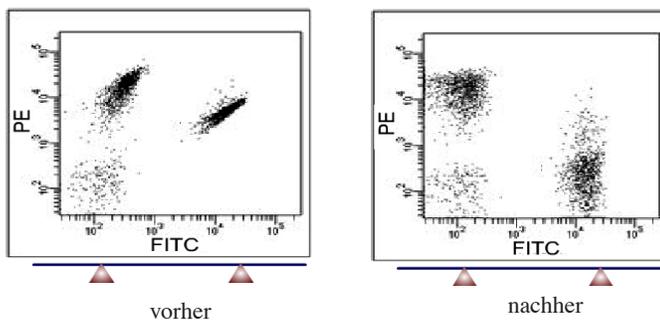


Abbildung 3-9 Kompensation FITC gegen PE vor und nach der Korrektur

## Optisches System

Das optische System umfasst eine Anregungs- und eine Sammeloptik. Die Anregungsoptik besteht aus einem oder mehreren Lasern und Linsen, die den Laserstrahl formen und fokussieren. Die Sammeloptik besteht aus Sammellinsen, um das emittierte Licht entstanden aus der Wechselwirkung zwischen Partikel und Laserstrahl zu sammeln, und aus einem System optischer Spiegel und Filter, wodurch die spezifischen Wellenlängen des gesammelten Lichtes zu bestimmten optischen Detektoren geleitet werden. Auf der optischen Bank des Durchflusszytometers sind alle diese Komponenten zusammengefasst, siehe Abb 4-1.

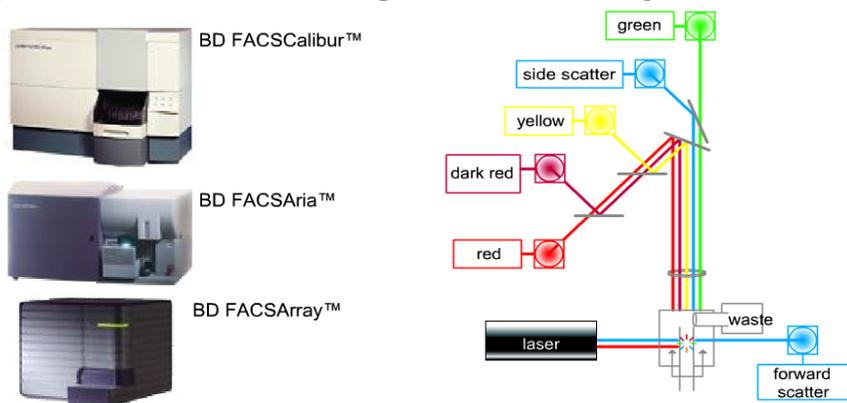
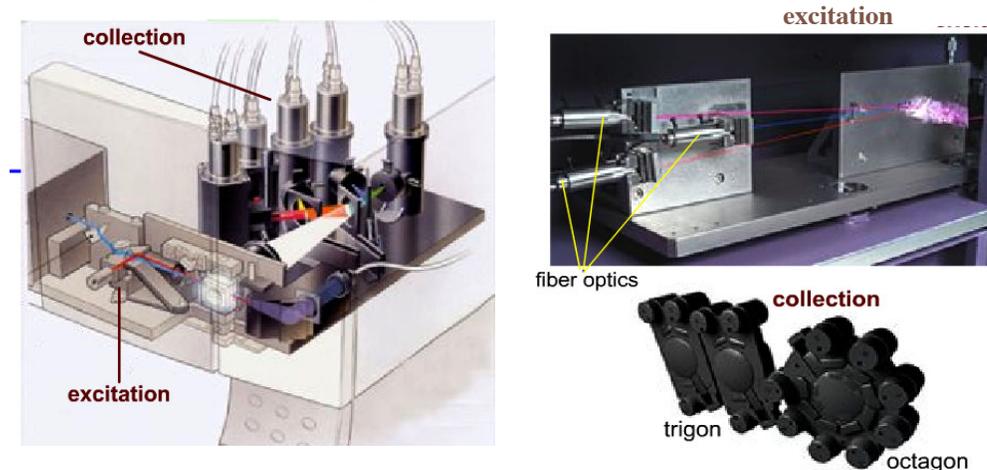


Abbildung 4-1 Optische Bank von BD Durchflusszytometern

### 4.1 Optische Bank

Die optische Bank eines Durchflusszytometers liefert eine stabile Oberfläche, wodurch die Lichtquelle und die Anregungs- und Sammeloptik in festen und stabilen Positionen gehalten werden. Die optischen Signale eines Benchtop

Analysers sind deshalb so stabil, weil die Durchflusszelle in ihrer Ausrichtung mit dem Laserstrahl ebenfalls auf der optischen Bank fixiert ist. Dadurch ist sichergestellt, dass der Laserstrahl den Probenstrom immer gleichbleibend stabil - ohne tägliche Abweichung - trifft. Die optische Bank zweier BD Benchtop Zytometer wird in Abb. 4-2 gezeigt.



**Abbildung 4-2** Optische Bank vom BD FACSCalibur (links) und BD FACSCanto (rechts)

In einem Stream-in-Air Zytometer wird der Laserstrahl erst durch eine achromatische Linse fokussiert, um dann den Flüssigkeitsstrom in einem optimalen Winkel und Position zu treffen, wenn dieser aus der Spitze der Durchflusszelle ausgetreten ist. Weil es jedoch durch die x-y-z-Positionierung der Durchflusszelle viele Variationen beim Ausrichten des Flüssigkeitsstromes in den Fokus des Laserstrahls gibt, ist die Ausrichtung in einem Stream-in-Air Zytometer weniger stabil als in einem Benchtop Analyzer und muss daher täglich optimiert werden. Durch falsche Ausrichtung des Laserstrahls auf den Probenfluss kann es zu einer ungleichmäßigen Bestrahlung der Partikel kommen und daraus resultierend zu einer Variabilität der emittierten Signale. Dieses wiederum stellt sich in den Messergebnissen in einer schlechten Präzision dar. Die optische Bank für ein Stream-in-Air Zytometer wird in Abb. 4-3 gezeigt. Der BD Vantage SE

verwendet bewegliche Laser und Laseroptik. Daher ist eine Anwenderjustage notwendig.

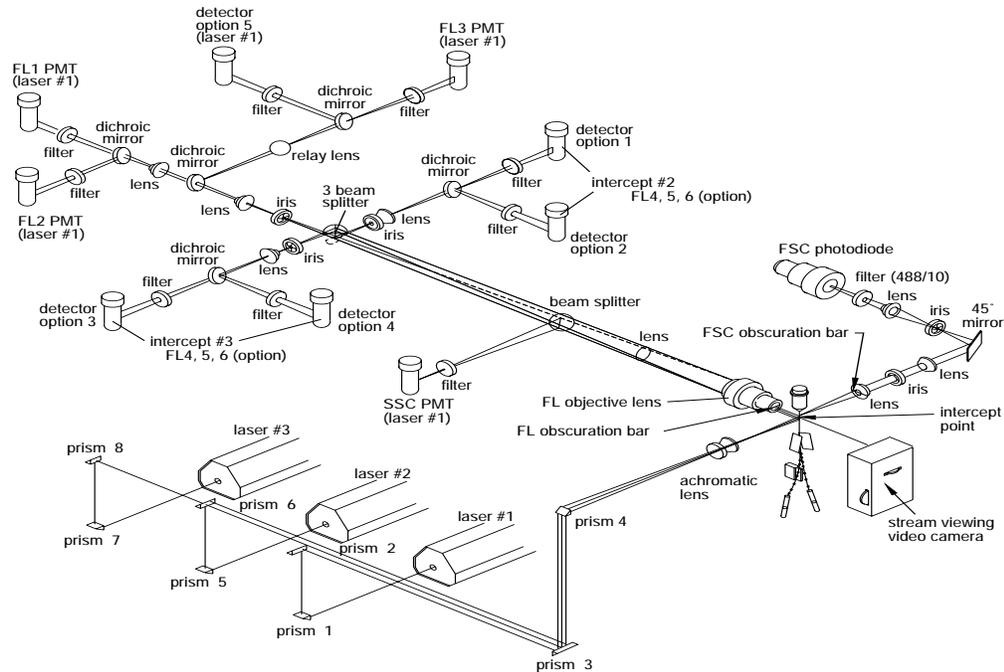


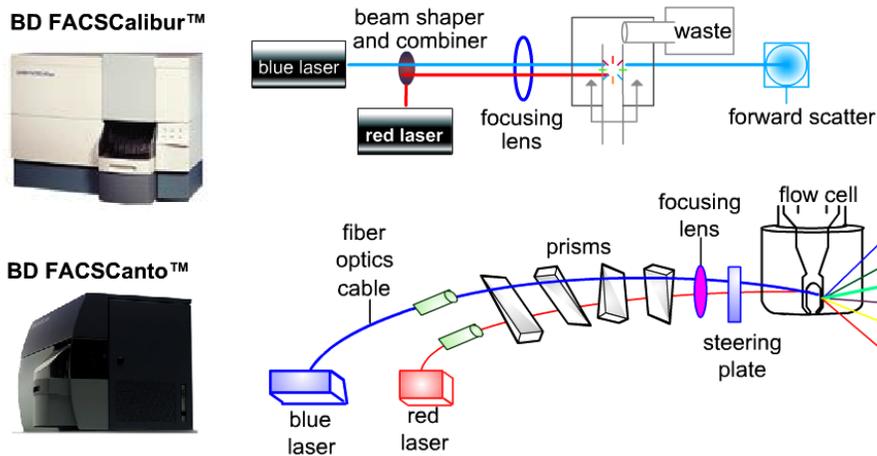
Abbildung 4-3 Diagramm der optischen Bank eines BD FACSVantage SE Stream-in-Air Durchflusszytometers

### Prüfungsfragen: Optische Bank

- 1 Die optische Bank liefert eine stabile Oberfläche für die Interaktionen des Laserlichtes mit der \_\_\_\_\_.
- 2 Welche zwei Komponenten des Durchflusszytometers müssen perfekt ausgerichtet sein, um Zellen einheitlich auszuleuchten? \_\_\_\_\_
- 3 Die Ausrichtung der Durchflusszelle bei Stream-in-Air Durchflusszytomern erfordert eine tägliche Optimierung. Wahr.....Falsch.....
- 4 Bei Benchtop Durchflusszytomern sichert die fixierte \_\_\_\_\_, dass der Laserstrahl den \_\_\_\_\_ konstant von Tag zu Tag trifft.

## 4.2 Anregungsoptik

BD Durchflusszytometer haben verschiedene Komponenten in ihrem Anregungsoptiksystem. In der folgenden Abbildung finden Sie die Anregungsoptik eines BD FACSCaliburs und eines BD FACSCantos.



**Abbildung 4-4** Anregungsoptik eines BD FACSCaliburs und BD FACSCantos

Die Anregungsoptik eines BD FACSCaliburs besteht aus einem blauen und roten Laser, Prismen, Blende und einer Linse zum Fokussieren und Leiten des Laserstrahls zur Durchflusszelle.

Die Anregungsoptik des BD FACSCanto besteht aus Laser, Glasfaserkabel, Prismen, einer Fokussierlinse und einer Blende, die den Laserstrahl in die Durchflusszelle leitet. Laser werden in allen BD Durchflusszytometern als Anregungsquelle verwendet wie in Kapitel 8 detailliert beschrieben. In der folgenden Abbildung finden Sie eine Liste der bisher verwendeten Laser in BD Zytometern. Der 488 nm Laser ist der am meisten verwendete Laser in BD Zytometern.

Instrument	Laser Wavelength (nm)
BD FACSCalibur™	488
	635
BD FACSVantage™ SE	488
	407
	UV*
	633
BD™ LSR II	488
	633
	UV*
	405
BD FACSAria™	488
	633
	405
BD FACSArray™	532
	635

\* UV = 325 - 364 (nicht sichtbar fürs menschliche Auge)

Abbildung 4-5 Liste der bei BD verwendeten Laser in Durchflusszytometer

### 4.3 Sammeloptik

Die Sammeloptik ist so entworfen worden, um das Maximum des Lichts, das beim Passieren einer Probe durch den Laserstrahl entsteht, zu sammeln. Eine Linse sammelt emittiertes Licht des Partikel-Laserstrahlzusammenstosses und ein System von optischen Spiegeln und Filtern leiten die spezifischen Wellenlängen des gesammelten Lichts zu den optischen Detektoren. Bei einem BD FACSCanto oder BD FACSAria wird das gesammelte Licht über Glasfaserkabel zu den Detektoren geleitet, siehe Abb. 4-6 und Abb. 4-7.

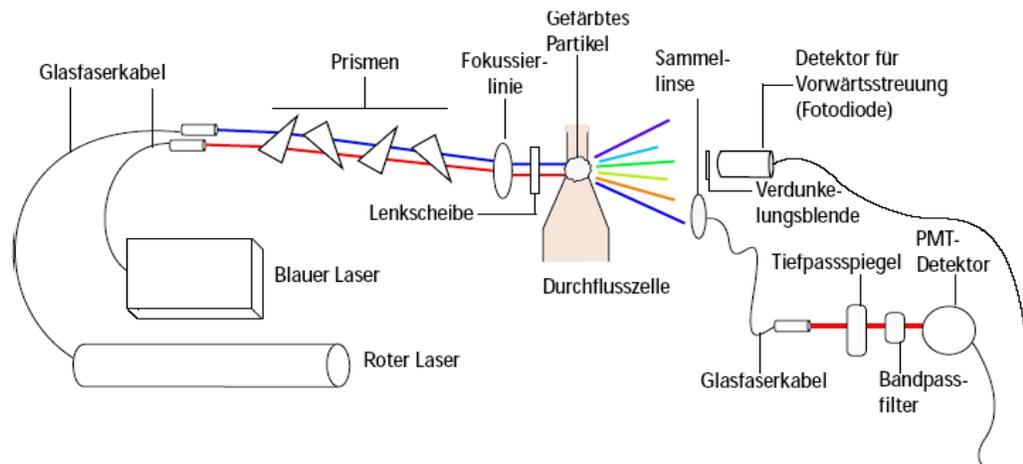


Abbildung 4-6 Lichtweg im BD FACSCanto

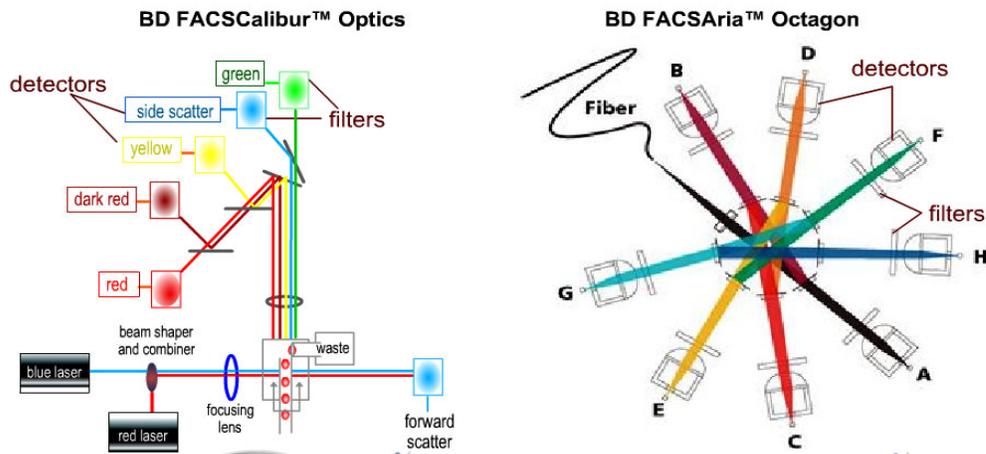


Abbildung 4-7 Detektoren und Filter der Sammeloptik von BD FACSCalibur und BD FACSAria

## 4.4 Optische Filter

Wenn eine Zelle oder ein Partikel das Laserlicht passiert, dann werden alle emittierten Signale durch ein System bestehend aus Spiegeln und optischen Filtern zu den Detektoren geleitet. Das Vorwärtsscattersignal (FSC) wird von einer Photodiode verarbeitet, wohingegen das Seitwärtsscattersignal (SSC) und die Fluoreszenzsignale (FLx), die oft sehr schwach sind, zu Photomultiplier-Röhren (PMT's) geleitet werden. Die Spezifität eines Detektors für einen bestimmten Fluoreszenz-Farbstoff wird dadurch optimiert, indem ein Filter vor dem PMT befestigt wird, der nur einen engen Bereich bestimmter Wellenlängen zum Detektor hindurchlässt, siehe Abb. 4-7. Die dadurch selektierte spektrale Bandbreite des Lichtes liegt nahe dem Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffes. Solche Filter werden als Bandpass- (BP) Filter bezeichnet und sind mit dem Mittelwert und der Bandbreite des erlaubten Lichtdurchtritts gekennzeichnet (z.B. 530/30 nm für den BP-Filter vor dem FITC Detektor; spektrale Bandbreite  $530 \pm 15$  nm oder Lichtwellenlängen zwischen 515 und 545 nm).

Andere gebräuchliche Filter in der Durchflusszytometrie sind der Kurzpass-Filter (Short Pass, SP), welcher Licht der gleichen Wellenlänge oder geringer als die spezifische Wellenlänge hindurchlässt, und Langpass-Filter (Long Pass, LP (= Tiefpass-Filter, TP, im BD FACSCanto)), welcher Licht der gleichen Wellenlänge oder größer als die spezifische Wellenlänge hindurchlässt, siehe Abb. 4-8 auf Seite 28.

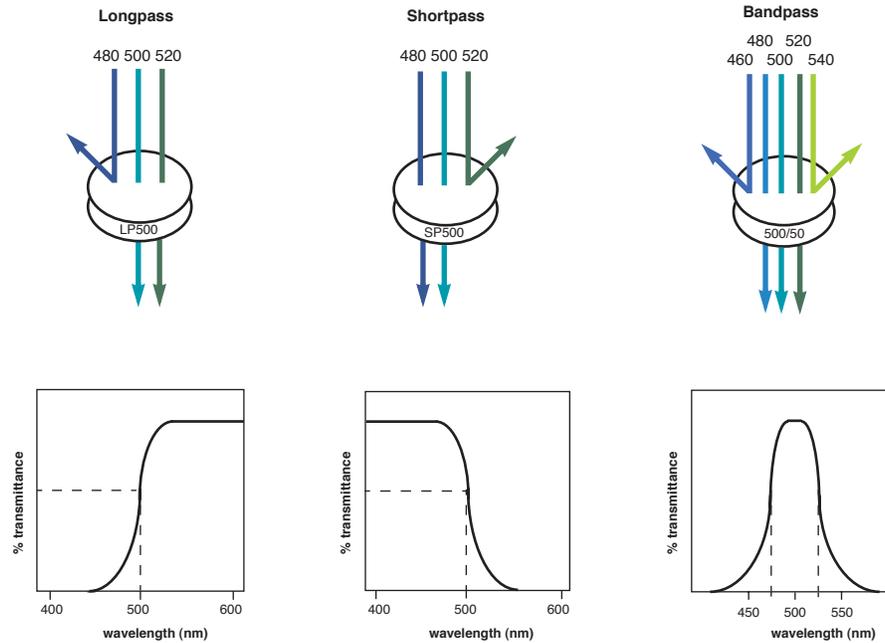


Abbildung 4-8 Lichtdurchlässigkeiten durch den Langpass, Kurzpass oder Bandpass Filter

Strahlsplitter sind optische Bauteile, die Licht unterschiedlicher Wellenlänge in verschiedene Richtungen leiten. Dichromatische Spiegel sind eine Art Strahlsplitter. Der SP560 dichromatische Spiegel in Abb. 4-9 lässt Licht der Wellenlänge 560 nm oder geringer hindurch. Licht der Wellenlänge größer als 560 nm wird im 45 ° Winkel reflektiert.

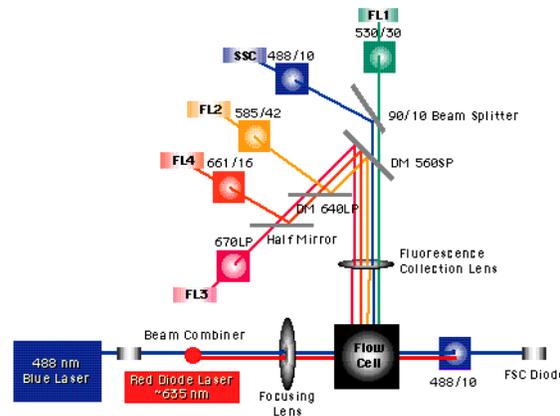


Abbildung 4-9 Detektoren, Filter und Spiegel des BD FACSCaliburs Durchflusszytometers

Im BD FACSCanto oder BD FACSAria besteht die Emissionsoptik aus einem Octagon (Achteck) für den blauen Laser und einem Trigon (Dreieck) für den roten Laser, siehe Abb. 4-10. Durch Reflexion statt Transmission wird eine maximale

Lichtausbeute erreicht. Wenn das aufgefangene Licht aus dem Glasfaserkabel in das Achteck Array eintritt, trifft es zuerst auf einen dichroischen 735LP Filter (A), der alles Licht mit Wellenlängen über 735 hindurchlässt und reflektiert niedrigere Wellenlängen zum nächsten PMT. Die Anordnung der Filter und Spiegel sorgt dafür, dass die einzelnen PMTs im Wesentlichen nur die Signale eines bestimmten Fluorochroms erhalten.

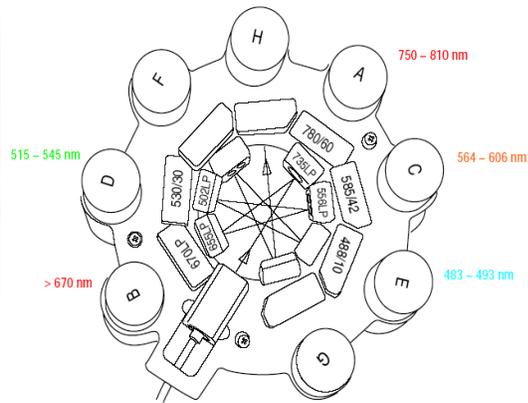


Abbildung 4-10 Octagon und Trigon des BD FACSCanto

## Prüfungsfragen: Optische Filter

- 1 Optische Filter sind vor den Detektoren befestigt, um \_\_\_\_\_.
- 2 Ein 530/30 Bandpass Filter lässt Licht der Wellenlänge zwischen \_\_\_\_\_ und \_\_\_\_\_ nm hindurch.
- 3 Ein \_\_\_\_\_ wird gebraucht, um Lichtsignale bestimmter Wellenlängen zu splitten und lenkt die Lichtsignale zum jeweils vorgesehenen Detektor ab.
- 4 Ein \_\_\_\_\_ Filter lässt spezifische Wellenlängen gleicher oder geringer Wellenlänge durch wohingegen ein \_\_\_\_\_ Filter die Wellenlängen gleicher oder größer als die spezifische Wellenlänge hindurchlässt.

# 5

## Elektronisches System

Die Hauptfunktion des elektronischen Systems beinhaltet das Quantifizieren der Spannungspulse, das Konvertieren der analogen Signale in digitale Werte, die Durchführung der Kompensation und das Transferieren der Daten zum Computer für die Analyse, siehe Abb. 5-1.

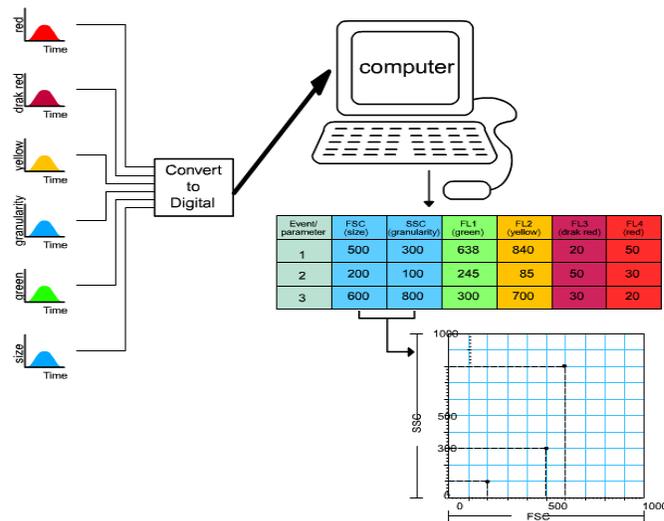


Abbildung 5-1 Das elektronische System der BD Durchflusszytometer

Das elektronische System besteht aus Photodektoren, Amplifier, Signalprozessoren und der Computer Workstation, siehe Abb. 5-2 auf Seite 31.

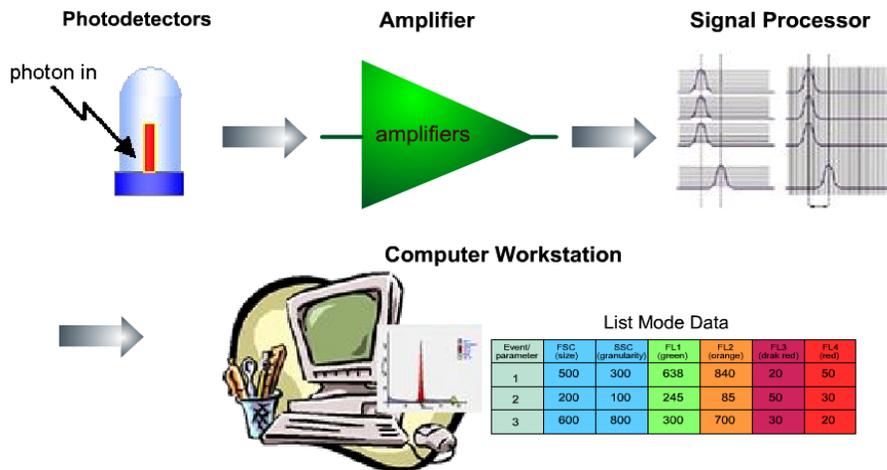


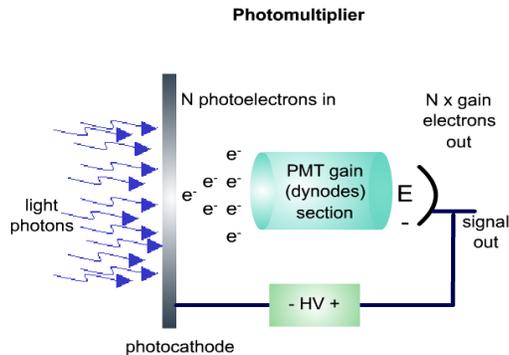
Abbildung 5-2 Die Hauptkomponenten des elektronischen Systems

Es werden zwei verschiedene Photodetektoren in den BD Durchflusszytometern verwendet, die Photodioden und Photomultipliertubes (PMTs). Amplifier verändern den Signalinput und produzieren eine Ausgangsspannung. Einige Amplifier wandeln den Strom eines Photodetektors in ein Spannungssignal um. Es gibt zwei verschiedene Arten von Signalprozessoren, analoge und digitale. Der Signalprozessor kombiniert alle Messungen eines einzelnen Partikels in ein Ereignis, das zur Analyse zum Computer weitergeleitet wird. Der Computer speichert die Daten und zeigt sie in der Analyse an.

## 5.1 Signaldetektion

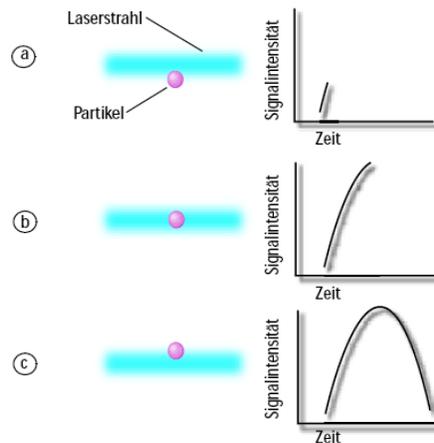
Lichtsignale werden erzeugt, wenn Partikel den Laserstrahl in dem Flüssigkeitsstrom passieren. Diese Lichtsignale werden durch Photodetektoren in elektronische Signale (Spannungsveränderungen) umgewandelt und nachfolgend bei der Daten-Digitalisierung in entsprechende Messkanalwerte klassifiziert. Zwei Arten von Photodetektoren werden in BD Durchflusszytometern eingesetzt: Photodioden und Photomultiplier-Röhren (PMT's). Die Photodiode reagiert weniger sensitiv auf die Lichtsignalintensität als ein PMT und wird deshalb für die Detektion des starken FSC-Signals benutzt. PMT sind Sekundärelektronenvervielfacher und werden benutzt, um die schwachen Lichtsignale des SSC und der Fluoreszenzen in adequate elektronische Signale umzuwandeln. Im BD FACSAArray Bioanalyzer wird eine APD ("avalanche photodiode") Photodiode verwendet, um die "Far Red" (z.B. PE-Cy7) und "Near Infrared" (z.B. APC-Cy7) Signale zu detektieren, da sie sehr sensitiv zu Signalen in dem roten Wellenlängenbereich sind.

Ein Spannungspuls wird erzeugt, wenn ein Partikel in den Laserstrahl eintritt und dabei beginnt, das auftreffende Licht zu streuen oder fluoreszierende Strahlung zu emittieren. Treffen die Photonen dieses Lichtsignals auf eine Seite der PMT (Photokathode) oder der Photodiode, werden durch die Quantenenergie äquivalent dazu Elektronen angeregt, die ihrerseits teilweise die Energie auf Sekundärelektronen ( $e^-$ ) übertragen und dadurch wird ein proportional größerer elektrischer Strom erzeugt, siehe Abb. 5-3.



**Abbildung 5-3** Funktionsweise eines Photomultipliertubes (PMT)

Der elektrische Strom fließt zum Verstärker und wird in einen Spannungspuls umgewandelt. Der höchste Punkt des Spannungspulses wird erreicht, wenn das Partikel vollständig vom Laserstrahl beleuchtet wird und somit die maximale Intensität der Streuung oder Fluoreszenz erreicht wird. Beim Austritt des Partikels aus dem Laserstrahl nimmt die Anzahl der emittierten Photonen wieder ab, die Intensität des am Detektor erzeugten elektrischen Stroms wird geringer und nähert sich seinem Ausgangssignal (Dunkelstrom). Der vom Partikel beim Durchqueren des Laserstrahls verursachte Spannungspuls nähert sich seinem Ende, siehe Abb. 5-4.



**Abbildung 5-4** Erzeugung eines Spannungspulses

Die Signalintensität des Spannungspulses hängt von der Zahl der detektierten Photonen, der PMT-Spannung oder Vorverstärkerwert und dem Verstärkerwert ab. Signale können durch Anlegen einer elektrischen Hochspannung an den PMT verstärkt werden, um damit einen größeren elektrischen Strom zu erzeugen oder durch Erhöhung der Verstärkerspannung. Die Verstärkereinstellungen können linear oder logarithmisch sein (Lin oder Log). Logarithmische Verstärkung wird oft genutzt, um das sog. negative Signal von den schwach positiven Signalen zu trennen (Fluoreszenz), und eine lineare Verstärkung wird oft genutzt, um die Streuung und die Fluoreszenz Parameter nur in einem sehr engen Bereich zu verstärken (max. 4-6fache Differenz).

## Analoge Signalprozessoren

Der Spannungspuls wird durch den Analog Digital Wandler (ADC) zu einem entsprechenden digitalen Wert klassifiziert. Der ADC klassifiziert in analogen Signalprozessoren jeweils in Abständen von 10 mV im Bereich von 0 – 10,24 Volt in den entsprechenden digitalen Wert der zur Verfügung stehenden 1024 Wandlerkanäle (0, 1, 2, ..., 1023). Z.B. entspricht ein Spannungspuls im Bereich von 0-10 mV der Kanalnummer 0. Die klassifizierte Kanalnummer des Messparameters wird durch ein GPIO-Kabel (General Purpose In/Out) zum Computer geleitet, siehe Abb. 5-5. Der Messparameter wird dann an der entsprechenden Position in der Datendarstellung angezeigt.

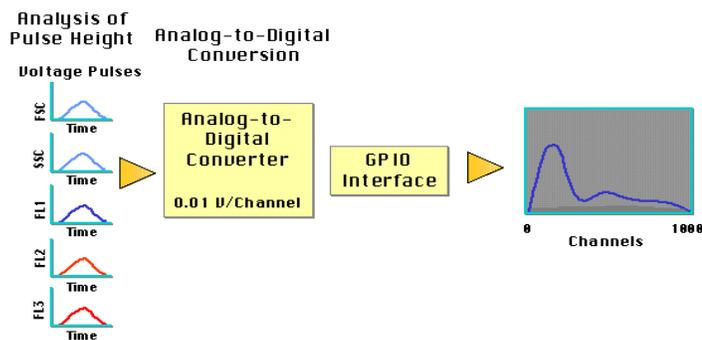


Abb. 4-6: Spannungspuls durch ADC Wandler in Kanäle umgewandelt

## Digitale Signalprozessoren

Digitale Signalprozessoren wandeln gemessene Impulse in digitale Werte um. Die gemessenen Werte beinhalten den Pulspeak, die Pulsfläche und die Pulsweite. Messungen, die Ergebnisse von 2 oder mehr Detektoren kombinieren, enthalten

die Fluoreszenzkomensation und die Ratio. Die gemessenen Werte können linear oder logarithmisch sein. Die Daten werden mit 18 Bit auf einer Skala von 262144 Kanälen ( $10^5$ ) dargestellt. Einen Vergleich der analogen und digitalen Datenverarbeitungssysteme sehen Sie in der folgenden Abbildung. Die Vorteile einer digitalen Datenverarbeitung liegen zum einen in der höheren Auflösung (Umwandlung von 14 Bit auf 18 Bit), die Daten sind präziser (keine Totzeiten, kontinuierliche Digitalisierung durch Abtasten der Impulse von 10 Millionen mal pro Sekunde) und man hat keinen Umrechnungsfehler durch die log-Verstärkung.

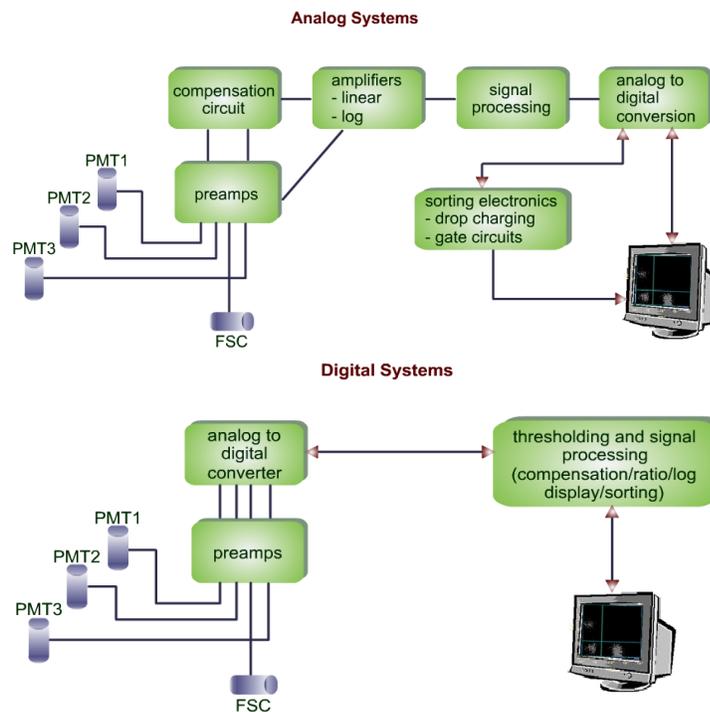


Abbildung 5-5 Analoge und digitale Systeme

### Time-Delay (Zeitverzögerung)

BD Zytometer verwenden meistens mehrere Laser. Diese Laser werden in einer bestimmten Reihenfolge positioniert, damit die Laserstrahlen sich nicht kreuzen. Die räumliche Trennung der Strahlen erzeugt verschiedene Signale eines einzelnen Partikels zu unterschiedlichen Zeiten. Die Time-Delay Elektronik stellt sicher, dass alle Parameter eines Partikels zusammen bearbeitet werden. Im BD FACSCalibur System bewegt sich der Probenstrom aufwärts. Eine Zelle passiert zuerst den roten Laserstrahl und Mikrosekunden später den blauen Laserstrahl. Die Time-Delay Kalibrierung bestimmt die Zeit, wie lange eine Zelle benötigt, um den Weg zwischen den beiden Laserstrahlen zurückzulegen und setzt den Time-Delay

auf diese Zeit fest. Die Pulssignale ausgelöst durch ein Partikel an zwei Lasern erreichen die Elektronik somit gleichzeitig. Im BD FACSAria bewegt sich der Probenstrom abwärts. Der rote Laserstrahl trifft zuerst auf die Probe, dann der blaue und dann der violette Laserstrahl. Der Time-Delay setzt die Zeiten fest, damit die Signale des einen Partikels gleichzeitig prozessiert werden, siehe Abb. 5-7.

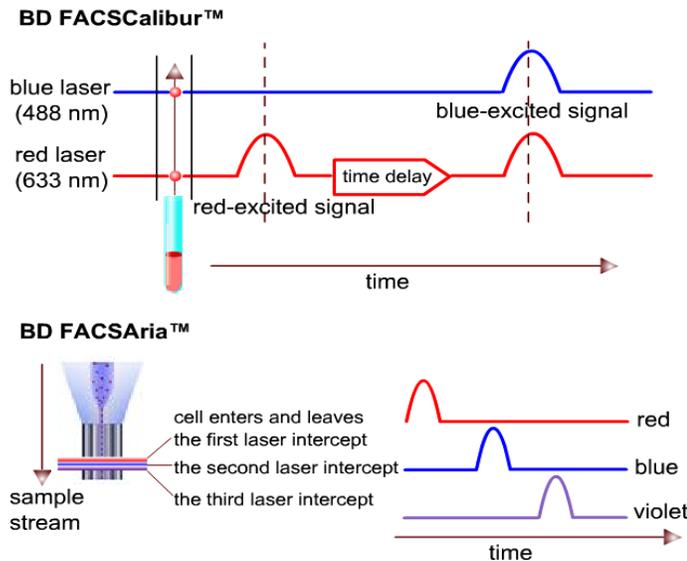


Abbildung 5-6 Time-Delay am BD FACSCalibur und BD FACSAria

### Prüfungsfragen: Signaldetektion

- 1 Vorwärtsstreulicht wird durch eine \_\_\_\_\_ detektiert.  
\_\_\_\_\_
- 2 Seitwärtsstreulicht und die Fluoreszenzen werden durch hoch sensitive \_\_\_\_\_ detektiert.  
\_\_\_\_\_
- 3 Die Lichtdetektoren erzeugen Strom, welcher zu den Verstärkern geleitet wird. Dieser wandelt den Strom in Spannungen um, welcher proportional der Lichtintensität ist, der sie trifft. Wahr.....Falsch.....  
\_\_\_\_\_
- 4 Wozu dient ein ADC Wandler?  
\_\_\_\_\_

## 5.2 Schwellenwert (Threshold)

Ein elektronischer Schwellenwert kann die Zahl der vom Durchflusszytometer detektierten Ereignisse begrenzen. Dazu wird der Schwellenwert auf einen ausgewählten Messparameter gesetzt. Entsprechend der Definition eines Schwellenwertes werden nur die Signale digitalisiert und zum Computer weitergeleitet, die eine größere oder zumindest die gleiche Intensität des gewählten Kanalwertes haben, siehe Abb. 5-8. Z.B. wird der Schwellenwert bei der Immunphänotypisierung deshalb auf den Messparameter FSC gesetzt, um kleine Partikel wie Zellschrott, Thrombozyten oder lysierte Erythrozyten von der Signalumwandlung auszuschliessen. Der Schwellenwert kann je nach Anwendung auch auf andere Parameter gesetzt werden.

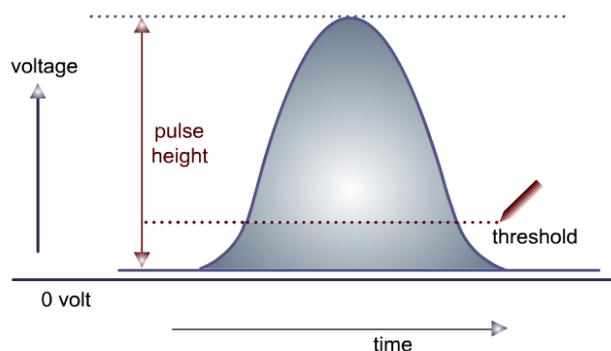


Abbildung 5-7 Der Threshold

Bei einigen Benchtop Analyzern, die mit einem zusätzlichen zweiten Laser ausgestattet sind, ist die Auswahl eines sekundären Schwellenwert-Parameters möglich. Wurde der zweite Schwellenwertparameter zusätzlich aktiviert, dann müssen die Partikel beide Kanalwerte erzielen, um als gültiges Ereignis anerkannt zu werden.

### Prüfungsfragen: Schwellenwert

- 1 Der FSC Schwellenwert kann benutzt werden, um Signale, die vom \_\_\_\_\_ erzeugt wurden, zu eliminieren.  
\_\_\_\_\_
  
- 2 Wenn zwei Schwellenwertparameter angewählt wurden, müssen die Partikel den einen und den anderen Kanalwert erreichen, um als Ereignis anerkannt zu werden. Wahr.....Falsch.....  
\_\_\_\_\_

## Datenanalyse

---

### 6.1 Datensammlung und deren Darstellungen

Die detektierten Lichtsignale werden in äquivalente elektronische Pulse umgewandelt, und dann durch den Signalprozessor analog bzw. digital verarbeitet. Jedes Signal wird in eine Zahl konvertiert und dabei definierten Messkanälen zugeordnet. Diese Messdaten werden vom Computersystem gespeichert. Je höher das Signal, desto höher der Wert. Diese Durchflusszytometriedaten werden gemäß einem Standardformat, dem Flow Cytometry Standard (FCS), gespeichert. Dieser Standard wird von der Gesellschaft für Analytische Zytologie<sup>a</sup> definiert. Der Computer speichert die Daten des Zytometers als sogenannte *Listmode* Dateien. Gemäß dem FCS Standard (FCS 2.0 oder 3.0) enthält die gespeicherte Messdatei eine Textbeschreibung der gemessenen Probe, Angaben zum Messgerät, mit dem die Daten gesammelt wurden, den Datensatz und die Ergebnisse der Datenanalyse.

Eine einzige Zelle, von der vier Parameter (FSC, SSC, FL1 und FL2) gemessen wurden, erzeugt 8 Bytes an Daten. Werden bei der Messung einer Probe z.B. 10.000 Ereignisse erfasst und abgespeichert, dann umfasst eine FCS Datendatei ca. 80 kB Speicherdaten.

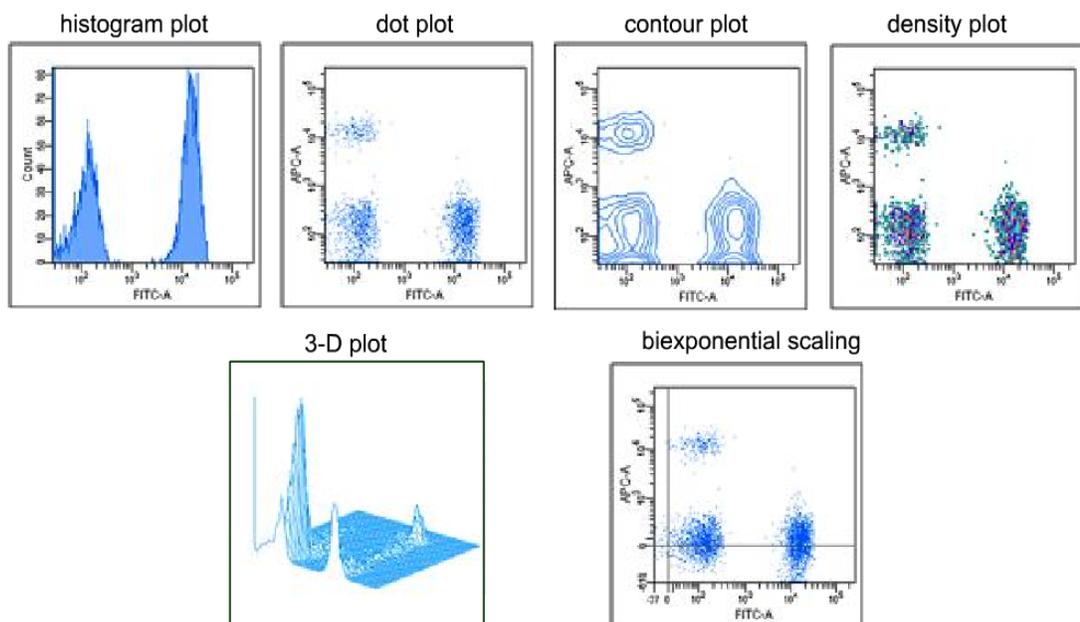
---

<sup>a</sup>

Data file standard for flow cytometry. Data File Standards Committee of Society for Analytical Cytology. Cytometry, 1990; 11(3): 323-332

Ist die Messung in einer Datendatei gespeichert, dann können die Zellpopulationen in verschiedenen Darstellungen gezeigt werden. Ein einzelner Parameter, wie z.B. FSC oder FL1 (FITC), kann durch ein Ein-Parameter Histogramm dargestellt werden. Dabei werden entlang der horizontalen Achse (x-Achse, Abszisse) die Parametersignalwerte entsprechend ihrer Messkanäle zugeordnet und entlang der vertikalen Achse die Summe der Ereignisse pro Messkanal dargestellt, siehe Abb. 6-1. Signale mit gleicher Zuordnung der Intensität werden also im gleichen Kanal angezeigt. Stärkere Signale fallen in Kanäle mit höherem Wert als schwächere Signale, erscheinen also auf der x-Achse weiter rechts.

In einer Darstellung können auch gleichzeitig zwei Messparameter dargestellt werden. Ein Parameter wird auf der x-Achse angezeigt und der andere Parameter auf der y-Achse. Es gibt verschiedene Modelle wie die Punktwolkendarstellung (Dot Plot), die Konturliniendarstellung (Contour Plot) und die Dichtedarstellung (Density Plot). Dreidimensionale Daten können ebenfalls dargestellt werden, wobei horizontal die x- und y-Achse die Messparameter repräsentieren und die vertikale z-Achse die Anzahl der Ereignisse pro Kanal (3-D Plot), siehe Abb. 6-1.



**Abbildung 6-1** Grafische Darstellungen der Durchflusszytometriedaten

Die biexponentielle Darstellung ermöglicht die Darstellung der negativen Werte, die bei einer nicht aktivierten biexponentiellen Skalierung unterhalb der y-Achse fallen würden. Diese Darstellung verbessert die Auflösung zwischen schlecht aufgelösten Populationen und ist hilfreich bei der Analyse von komplexen Daten.

Biexponentielle Darstellungen werden nur bei der digitalen Datenakquisition verwendet, siehe Abb. 6-2.

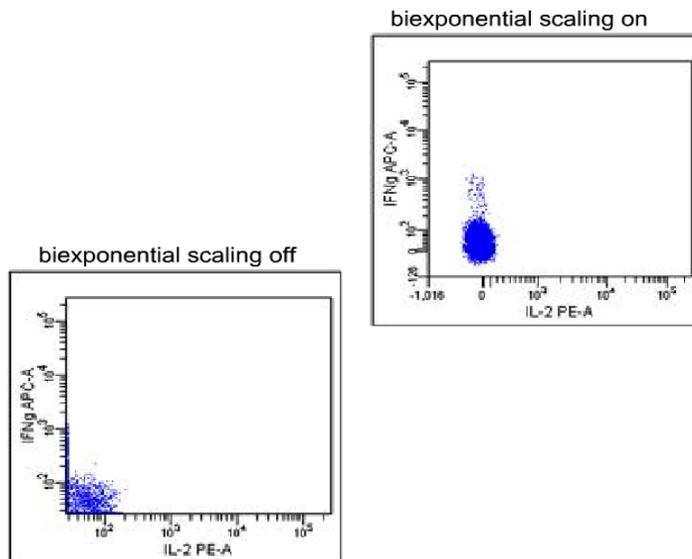


Abbildung 6-2 Biexponentielle Darstellung

## Prüfungsfragen: Datensammlung und deren Darstellungen

- 1 Was stellt die horizontale Achse im Histogramm dar?  
\_\_\_\_\_
- 2 Eine Punktwolkendarstellung kann benutzt werden, um \_\_\_\_\_  
Parameter anzuzeigen.  
\_\_\_\_\_
- 3 Was repräsentiert die z-Achse in der 3-D Darstellung (CellQuest Software)?  
\_\_\_\_\_

## 6.2 Fenster setzen (Gating)

In einer 1- oder 2-D Darstellung kann mit Hilfe der grafischen Maus ein Fenster (Region) auf dem Computerbildschirm gezeichnet werden, das nur eine Teilmenge der dargestellten Messereignisse umfasst. Diese Region kann unter bestimmten Bedingungen auch als *Gate* bezeichnet werden, wenn beide, Region und Gate, denselben numerisch oder grafisch definierten Bereich der dargestellten Messparameter umfassen (dann gilt:  $R1 = G1$ ). Die Region wird dazu benutzt, um die Eigenschaften der darin enthaltenen Partikel für die weitere Analyse zu definieren. Eine Partikelpopulation kann auch mit Hilfe eines Gates definiert werden, indem die unterschiedlichen Messeigenschaften dieser Population, die in verschiedenen Regionen (z.B.  $R1, R2, R3$ ) definiert wurden, zu einem zusammenfassenden, übergeordneten Gate (z.B.  $G4 = R1 \text{ and } R2 \text{ and } R3$ ) verknüpft werden. Verknüpfungen erfolgen mittels **Boolscher Operatoren** (*and, not, or*).

In einer Vollblutprobe sind verschiedene Zellpopulationen vorhanden. Wenn die Analyse nur auf die Lymphozyten eingeschränkt werden soll, kann ein(e) Gate/Region basierend auf der Zellgröße und der Granularität in der FSC/SSC Darstellung gesetzt werden, um allein auf Basis der Zellgröße die Lymphozyten zu bestimmen. Die endgültige Darstellung zeigt zusätzlich die Fluoreszenzeigenschaften der Lymphozyten, siehe Abb. 6-3.

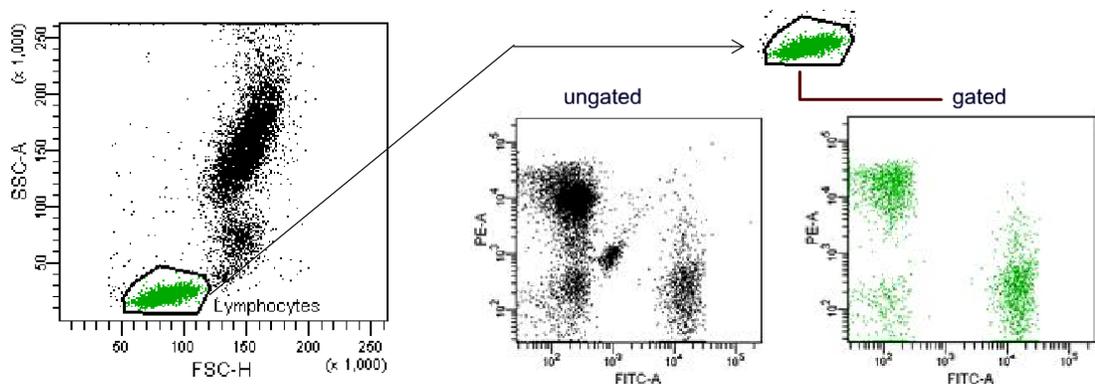


Abbildung 6-3 Anwenden eines Gates, um die Analyse auf Lymphozyten einzuschränken

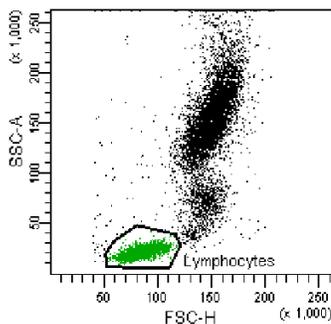
### Prüfungsfragen: Fenster setzen (Gating)

- 1 Ein Gate kann dazu benutzt werden, um in einer Probe die Analyse der Zellen auf eine spezifische Population zu beschränken. Wahr.....Falsch.....

### 6.3 Datenanalyse für die Anwendung auf Subpopulationen

Die Datenanalyse besteht aus der Anzeige von Daten der List Mode Datendatei in einer Darstellung (Plot) und anschließender Berechnung der Ereignisverteilung in dieser Darstellung. Wie schon erwähnt, können verschiedene Darstellungsmodelle für die Präsentation der Daten benutzt werden. Die Datendarstellung oder -berechnung kann mittels Gating auf spezielle Populationen eingeschränkt werden.

In der Punktwolkendarstellung in Abb. 6-4 wurde z.B. ein(e) Gate/Region um die gezielt zu untersuchende Population gezeichnet, welches in diesem Fall die Lymphozyten sind. Das Gate oder die Region stellt dabei einen Grenzbereich um diese Zellsubpopulation dar, um damit die Zellereignisse für die Analyse zu isolieren oder zu sortieren.



**Abbildung 6-4** Punktwolkendarstellung mit einem Gate, das die Lymphozytenpopulation beschreibt

Die Messdaten der Zellereignisse in diesem Gate können dann in einem nachfolgenden Plot dargestellt werden. In den folgenden Beispielen werden die unterschiedlichen Wege zu sehen sein, wie z.B. die Fluoreszenzdaten von Zellen in einem Gate analysiert und die Prozentwerte der verschiedenen Subpopulationen bestimmt werden.

In einer Ein-Parameter Darstellung (Histogramm) können neben Regionen auch eindimensionale Histogramm- Statistikmarker gesetzt werden. Dagegen kann in einer Zwei-Parameter Punktwolkendarstellung zusätzlich zu den Regionen nur ein zweidimensionaler Quadrant- Statistikmarker verwendet werden. In dreidimensionalen Darstellungen können weder Regionen noch Statistikmarker verwendet werden, doch lassen sich die mittels Gating definierten Daten darstellen. Insgesamt lassen sich alle statistischen Daten einer Analyse in eine sog. Spreadsheet-Datei abspeichern und exportieren (*Export*) und weitere Daten nachfolgender Analysen anhängen (*Append*).



darin jeweils nur die negative, einzeln positive oder doppelt positive Population statistisch zu erfassen. Der untere linke Quadrant (*LL*, lower left) zeigt Ereignisse, die für beide Parameter negativ sind. Der obere linke Quadrant (*UL*, upper left) enthält Ereignisse, die für den Parameter der y-Achse (CD19-PE) positiv sind, aber negativ für den x-Achsen Parameter (CD3-FITC). Der untere rechte Quadrant (*LR*, lower right) enthält Ereignisse, die für Parameter auf der x-Achse (CD3-FITC) positiv sind, aber negativ für den y-Achsen Parameter (CD19-PE). Der obere rechte Quadrant (*UR*, upper right) enthält Ereignisse, die für beide Parameter (CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>) positiv sind („doppelt positiv“).

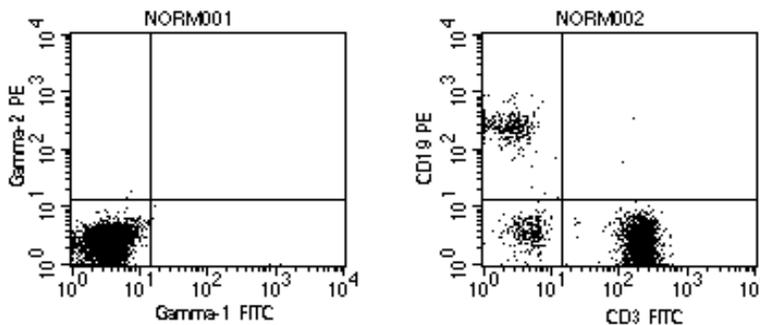


Abbildung 6-7 Punktwolkendarstellung der Ak-Isotypenkontrolle (NORM001) und CD3-FITC/CD19-PE (NORM002) mit Quadrantenmarkern

Um den Prozentanteil der CD3<sup>-</sup>/CD19<sup>+</sup> Lymphozyten zu bestimmen, wird der Wert für **%Gated** im oberen linken Quadranten (UL) durch die Ereignisse im Gate, siehe Abb. 6-8, geteilt:  $296 / 2839 = 10.43 \%$ .

Quadrant Statistics

File: NORM002                      Log Data Units: Linear Values  
 Sample ID: 481|A|                  Tube: CD3/CD19  
 Acquisition Date: 24-Sep-93      Gate: G1  
 Gated Events: 2839                  Total Events: 6000

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	296	10.43	4.93	2.74	2.39	270.11	239.43
UR	5	0.18	0.08	140.12	136.26	130.53	59.57
LL	279	9.83	4.65	4.66	4.34	3.87	3.57
LR	2259	79.57	37.65	224.31	212.28	2.14	1.78

Abbildung 6-8 Quadranten-Statistik

Anstelle der Quadrantenmarker besteht die Alternative, Regionen um die Populationen zu setzen, um damit eine Statistik zu erhalten. Es können verschiedene Formen von Regionen verwendet werden, siehe Abb. 6-9; anschließend wird die Regionen-Statistik benutzt, um die Prozentwerte der

spezifischen Populationen herauszufinden. In Abb. 6-10 ist **%Gated** von **R4** der CD3<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup> Lymphozyten:  $40 / 2866 = 1.40 \%$ .

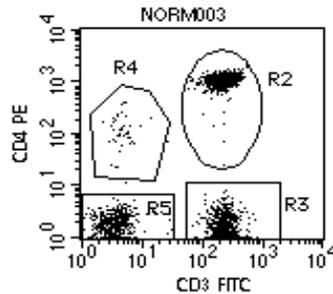


Abbildung 6-9 Punktwolkendarstellung von CD3-FITC/CD4-PE mit vier Regionen

Region Statistics

File: NORM003	Sample ID: 481 A
Tube: CD3/CD4	Gate: G1
Gated Events: 2866	Total Events: 6000
X Parameter: FL1-H CD3 Leu4 (Log)	Y Parameter: FL2-H CD4 Leu3 (Log)

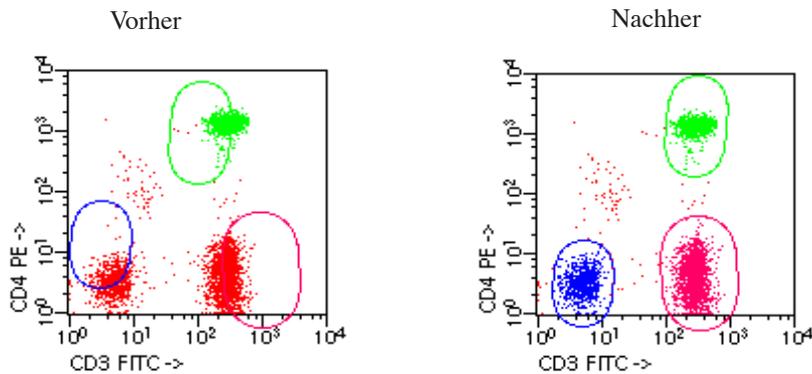
  

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
R1	2866	100.00	47.77	196.91	102.19	484.05	29.25
R2	1271	44.35	21.18	246.06	234.08	1084.74	1061.58
R3	1035	36.11	17.25	240.91	227.57	1.53	1.37
R4	40	1.40	0.67	4.86	4.57	135.29	109.51
R5	517	18.04	8.62	3.93	3.45	1.92	1.77

Abbildung 6-10 Region-Statistik

Jedoch gibt es einen Nachteil bei Verwendung beider Analysenmethoden, wenn mehrere Files von unterschiedlichen Patientenproben zu analysieren sind. Wenn von einem Datensatz (File) Regionen um die Populationen gezeichnet oder Quadrantenmarker gesetzt werden und danach der nächste Datensatz eingelesen werden soll, dann kann es möglich sein, dass die Populationen aufgrund der Probenvariabilität außerhalb der Regionen oder Marker liegen. In diesem Fall müssen die Regionen oder Marker für jeden Datensatz rejustiert werden.

BD patentierte eine neue Analysenmethode, die diese Situation vermeidet. Diese neue Technologie heißt **Cluster-Analyse**. BD Multiset<sup>TM</sup> und die BD Attractor<sup>TM</sup> Software verwenden eigenständig bewegliche Regionen, sog. **Attractoren**, für die automatische Cluster-Analyse. In diesen Softwareprogrammen wandern die Regionen selbständig mit den Zellpopulationen (Cluster) in definierten Grenzen, falls sich die Position eines Cluster von einem Datensatz zum nächsten verschoben hat, siehe Abb. 6-11 auf Seite 45.



**Abbildung 6-11** Zwei-Parameter Darstellung in der BD Attractor Software mit elliptischen Regionen (Attraktoren) vor und nach der Analyse.

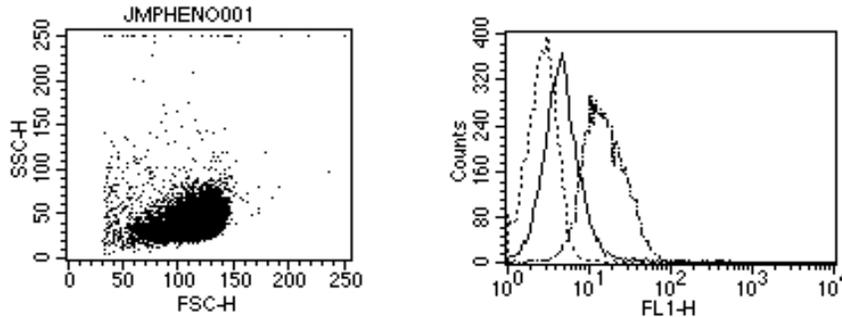
## 6.4 Datenanalyse und andere Anwendungen

Die bis hier dargestellten Analysemethoden werden angewandt, um den Prozentwert nur einer Population innerhalb eines gemischten Probenansatzes verschiedener Zellen abzuschätzen. Dieses ist auch der Grund dafür, warum in den vorab beschriebenen Kapiteln nur die Werte für %Gated und %Total in der Statistik ausgewählt wurden.

Wenn jedoch bei einer geklonten Zelllinie bestimmt werden soll, ob die Zellen einen Zellmarker tragen, dann wird nicht nach dem Prozentwert ermittelt, sondern wie viele Moleküle dieses Zellmarkers exprimiert werden. Voraussetzung dafür ist, dass die geklonte Zelllinie auch wirklich aus nur einer einzelnen Population besteht. Dann sind alle Zellen entweder zu 100 % negativ oder positiv für den Zellmarker. Dabei kann es vorkommen, dass die Expression sehr gering ist – schwach positiv - und es deshalb schwierig wird, zwischen negativ und positiv zu unterscheiden.

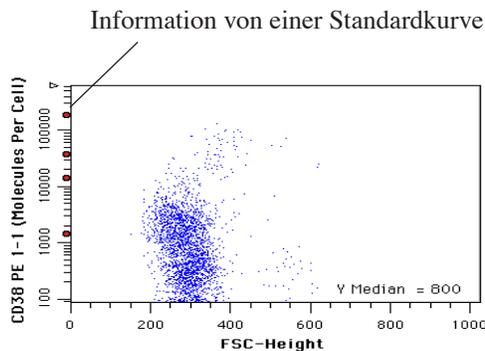
Als Unterscheidungskriterium wird die mittlere Fluoreszenzintensität der negativen mit der positiven Zellpopulation verglichen, wobei entweder der berechnete geometrische Mittelwert oder der Median der Fluoreszenzintensität betrachtet wird. Ist der entsprechende Statistikwert nach Setzen der Marker durch den Anwender größer als der der Isotypkontrolle, dann werden die Zellen als positiv beschrieben. Je größer der Differenzwert zwischen den negativen und positiven Zellen, umso mehr Moleküle pro Zelle werden exprimiert und desto weiter wandert die Population in den positiven Bereich.

Die Punktwolkendarstellung in Abb. 6-12 zeigt die Streuung einer einzelnen Population. Die überlagerten Kurven in der Histogramm-Darstellung (= **Overlay**) zeigen die Daten der Isotypkontrolle verglichen mit den Färbungen zwei verschiedener Antikörper. Der geometrische Mittelwert für jede Datenkurve ist jeweils 2, 5 und 20 (von links nach rechts). In diesem Beispiel liegt die Schwierigkeit für den Anwender darin, dass er entscheiden muss, ob die mittlere Histogrammkurve eine positive Expression darstellt oder nicht.



**Abbildung 6-12** Analyse von positiven Zellen

Außer durch Messung der Positivität können anhand des geometrischen Mittelwerts oder des Medians auch die Menge der exprimierten Moleküle (Liganden) pro Zelle geschätzt werden. Spezielle Software wie z.B. BD Quantical<sup>TM</sup> verwendet den Medianwert in Verbindung mit den Daten einer Standardkurve, um die Zahl der gebundenen Antikörper pro Zelle zu berechnen. Ein Beispiel wird in Abb. 6-13 gezeigt. Die Kreise auf der y-Achse zeigen Werte einer Standardkurve. Diese Information kann benutzt werden, um daraus die Zahl der Liganden pro Zelle zu berechnen.



**Abbildung 6-13** Quantical berechnet die Zahl der gebundenen Antikörper pro Zelle<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Daten von Dr. David Miller freundlichst zur Verfügung gestellt worden, Community Blood Centers of South Florida.

Für die DNA Analyse wird eine andere spezielle Software wie ModFit *LT* verwendet. Weil die Populationen, die in einem DNA Histogramm (G0/G1, S und G2+M) dargestellt werden, nicht getrennt sind, siehe Abb. 6-14, werden spezielle Algorithmen zur Berechnung der Zellzahlen benötigt. Die Fläche unter der Kurve wird integriert und daraus der Prozentanteil jeder Population berechnet.

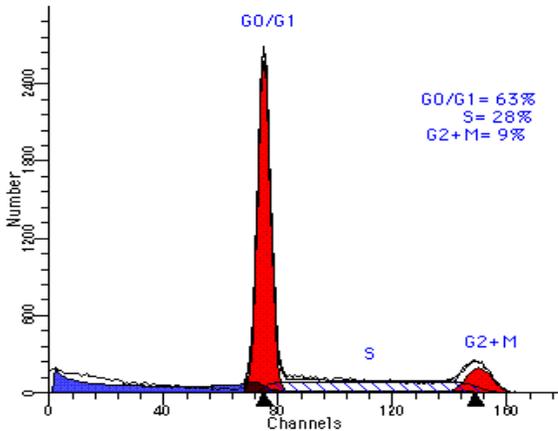


Abbildung 6-14 DNA Histogramm

Komplexere DNA Analyse kann durchgeführt werden, wenn die Propidiumjodid (PI)-Färbung mit einer Antikörperfärbung kombiniert wird, um Oberflächen- oder intrazelluläre Antigene zu identifizieren.

### Prüfungsfragen: Datenanalyse und andere Anwendungen

1 Warum würden Sie eine zwei-dimensionale Punktwolkendarstellung eher verwenden als ein Histogramm?

---

2 Bezogen auf Abb. 6-5 und Abb. 6-6:

Wieviel Prozent der Lymphozyten sind NICHT CD3<sup>+</sup>? \_\_\_\_\_

Wieviel Prozent aller Ereignisse sind CD3<sup>+</sup>? \_\_\_\_\_

3 Die Population im LL Quadranten ist die doppelt-positive Population.  
Wahr.....Falsch.....

---

**4** Wie hoch ist der Prozentwert der Lymphozyten in Abb. 6-7 und 6-8, die CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>-</sup> sind?

---

**5** Regionen können nur rechteckig gezeichnet werden.  
Wahr.....Falsch.....

---

**6** Nennen Sie den Nachteil beim Gebrauch der Regionen, wenn mehrere Datensätze analysiert werden?

---

**7** Welche Art der Datenanalyse vermeidet das Problem der Nichtübereinstimmung von Region und Zellpopulation?

---

**8** Welche Statistiken werden für quantitative Studien benutzt und um den Grad der Positivität zu bestimmen?

---

## 7.1 Sortieren

In den meisten Anwendungen fließt ein Partikel nach Passieren des Laserstrahls in den Abfallbehälter. Das Sortieren ermöglicht, interessante Zellen für spätere Analysen aufzufangen und zu sammeln. Gesammelte Zellen können dann mikroskopisch, biochemisch oder funktionell analysiert werden. Nicht alle Benchtop Durchflusszytometer sind mit einer Sortiereinheit ausgerüstet. Das BD FACSCalibur Durchflusszytometer kann zusätzlich mit dieser Funktion nachgerüstet werden. Das BD FACSAria ist mit einem High Speed Sorting Modul ausgerüstet, mit dem ca. 25000 Zellen/sec sortiert werden können, optional als Einzelzellablage auf Mikrotiterplatten oder Objektträger. In BD Durchflusszytometern werden zwei verschiedene Sortiermechanismen verwendet, *Droplet Sorting* und *Catcher-Tube Sorting*, wie in Abb. 7-1 dargestellt.

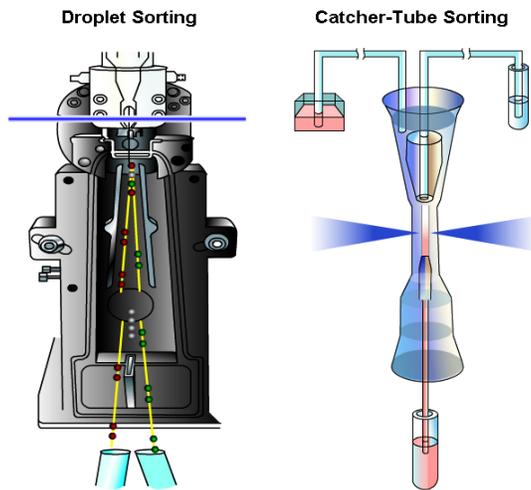


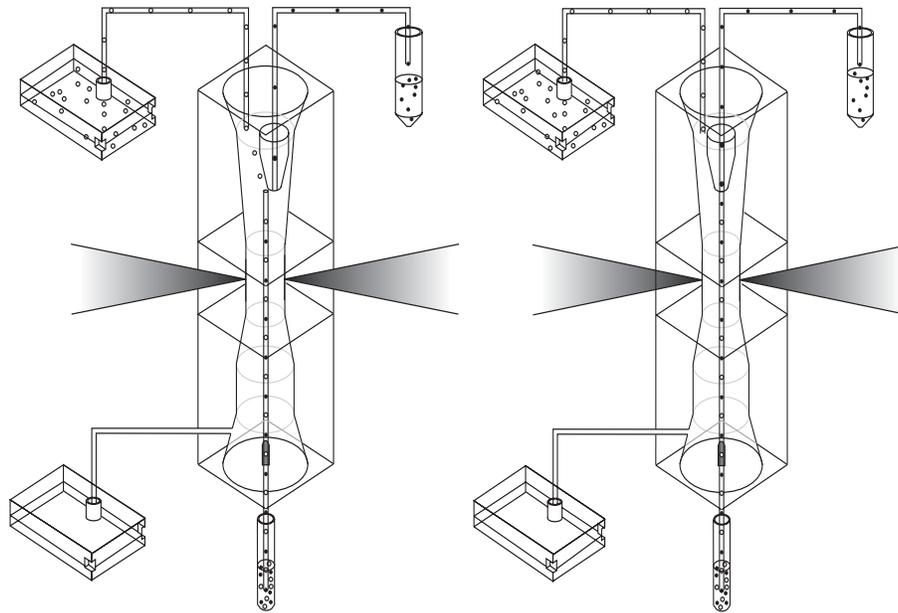
Abbildung 7-1 Zwei verschiedene Sortiermechanismen

Um Partikel oder Zellen zu sortieren, muss zuerst die interessante Zelle vom Durchflusszytometer identifiziert und direkt anschließend aussortiert werden. Ist die entsprechende Population einmal in einer Messdaten Darstellung identifiziert, wird eine Region um diese Population gezeichnet. Dadurch wird ein logisches Gate definiert. Dieses Gate wird in der Zytometersoftware als das Sortiergate geladen. Das Sortiergate identifiziert die interessanten Zellen, die aus dem Strom heraussortiert werden sollen.

Unterschiedliche Zytometer haben verschiedene Methoden, um die interessanten Partikel einzufangen. Das BD FACSCalibur System, ein Benchtop Analysengerät, benutzt als mechanisches Bauteil ein Einfangröhrchen (= Catcher tube) zum Sortieren der Zellen. Dieses Einfangröhrchen ist im oberen Abschnitt der Durchflusszelle eingebaut und bewegt sich mit einer maximalen Rate von bis zu 300 Zellen/ Sekunde in den Probenstrom hinein und wieder hinaus, um die gewünschten Zellen zu sammeln.

Passiert eine Zelle den Laserstrahl, dann analysiert das elektronische System des BD FACSCalibur auf Basis des definierten Sortiergates, ob es sich um eine Zielzelle handelt. Sind die Kriterien erfüllt wird gemäß dem vorher ausgewählten Sortiermodus die Zelle eingefangen. Der Sortiermodus legt fest, ob die Zelle in Relation zur exakten Zellzahl und/oder Reinheit eingefangen werden soll. Weil die Laserausrichtung und die Fließgeschwindigkeit fest eingestellt sind, bleibt die Zeit konstant, die eine ausgewählte Zelle vom Laserkreuzpunkt zum Einfangröhrchen benötigt.

Wurde die Entscheidung getroffen, diese Zelle einzufangen, dann wartet das elektronische System einen festgelegten Zeitraum, damit die Zelle das Einfangröhrchen erreichen kann. Durch Vor- und Zurückschwingen des Einfangröhrchens in den Probenstrom wird die Zielzelle eingefangen. Abb. 7-2 (links) zeigt das Einfangröhrchen in der ruhenden Position im Trägerflüssigkeitsstrom. Abb. 7-2 (rechts) zeigt das Einfangröhrchen in der Position im Probenfluss, bereit, um eine Zielzelle einzufangen.



**Abbildung 7-2** (Links) Einfangröhrchen in der Trägerflüssigkeit; (Rechts) Einfangröhrchen im Probenstrom

BD FACSVantage SE und BD FACSAria, Stream-in-Air Durchflusszytometer, isolieren die interessanten Zellen, indem der Probenstrom in hochfrequente Schwingung entlang der Fließrichtung versetzt wird. Dadurch bricht die Flüssigkeitssäule auseinander, und es entstehen einzelne Tropfen mit konstantem Abstand zueinander. Bleibt die Trägerflüssigkeitgeschwindigkeit und die Schwingungsfrequenz der Düsen spitze konstant, dann bleibt auch das Muster der Tropfenbildung konstant. Auf Grundlage dieser konstanten Bedingungen sind diese Zytometer in der Lage, den Abstand zwischen den Tropfen präzise zu berechnen und so die im Tropfen eingeschlossene Zelle zu sortieren.

BD FACSVantage und BD FACSAria wenden eine Spannungsladung auf die Tropfen an, die eine Zelle mit den vordefinierten Sortierkriterien enthält. Positiv und negativ geladene Metallplatten sind entlang einer Seite des Probenstroms angebracht. Passiert der elektrisch geladene Tropfen mit z.B. positiver Ladung die negativ geladene Metallplatte, dann wird der Tropfen aus seiner Flugbahn zum

Sammelröhrchen umgelenkt. Dieser Vorgang ist jeweils abhängig von der Polarität der geladenen Tröpfchen, siehe Abb. 7-3. BD FACSVantage SE sortiert bis zu zwei Zielpopulationen, ausgerüstet mit digitaler Elektronikoption bis zu vier Zielpopulationen. BD FACSAria kann bis zu vier Zielpopulationen gleichzeitig sortieren.

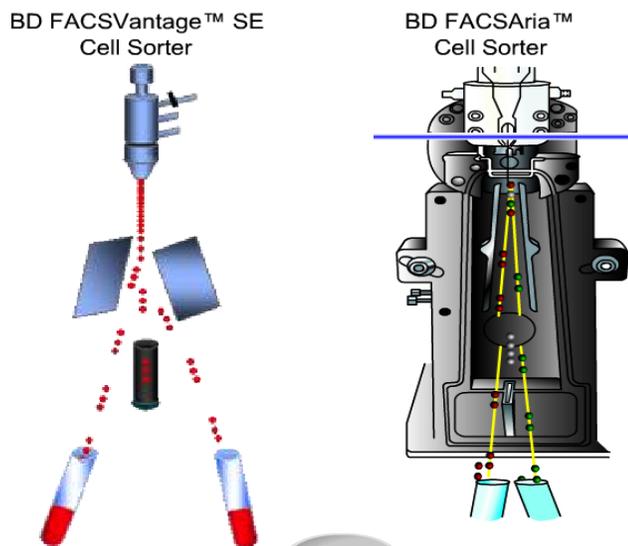


Abbildung 7-3 Sortierkomponenten des BD FACSVantage SE und BD FACSAria

### Prüfungsfragen: Sortieren

- 1 Um individuelle Zellen zu trennen, \_\_\_\_\_ der Flüssigkeitsstrom des BD FACSVantage SE entlang seiner Achse.  
\_\_\_\_\_
- 2 Wieviele Zellen sind in einem sortierten Tropfen enthalten (BD FACSVantage SE)?  
\_\_\_\_\_
- 3 Wie heißt das Teil am BD FACSCalibur, um sortierende Zellen einzufangen?  
\_\_\_\_\_
- 4 Was verwendet BD FACSVantage SE, um geladene Tropfen anzuziehen oder abzustößen?  
\_\_\_\_\_

# Laser und -Justierung

---

## 8.1 Wie arbeiten Laser

Die Bezeichnung LASER ist ein Akronym für *light amplification by stimulated emission of radiation*.

Licht wird auf folgende Weise erzeugt. Gaslaser bestehen aus Zylinder oder Plasmaröhren, die mit einem Edelgas wie Argon gefüllt sind. Das Edelgas wird durch eine Hochspannung ionisiert, so dass die Elektronen in den ionisierten Gasatomen Energie absorbieren und in einen höheren Energiezustand übergehen. Gehen die angeregten Elektronen wieder in den Grundzustand zurück - alle auf einmal oder in verschieden schnellen Schritten-, dann geben sie Photonen mit einer spezifischen Wellenlänge jeder Übergangsstufe ab.

Die Optik an beiden Enden der Plasmaröhre reflektiert Photonen durch die Röhre hin und zurück. Diese Photonen reagieren mit anderen angeregten Elektronen, wodurch die gleichzeitige Freigabe weiterer Photonen erfolgt, die in Wellenlänge, Phase und Richtung identisch sind. Wenn jedes Photon in der Lage ist, mehrere andere Photonen zu stimulieren, dann resultiert daraus eine Lichtverstärkung oder Laser. An jedem Ende der Plasmaröhre befindet sich ein Brewster Fenster (Brewster Window), welches Licht einer Polarisationssebene durchlässt.

Ein Elektromagnet, der um die Plasmaröhre angeordnet ist, erzeugt ein magnetisches Feld, das die Elektronen in die Mitte der Röhre bündelt. Dadurch

stossen keine Elektronen an der Röhrenwand an, wodurch die Stromdichte in der Mitte erhöht wird, was wiederum eine höhere Lichtemission zur Folge hat.

Ein kleiner Prozentsatz dieses Lichts wird durch eine halbdurchlässige Optik vorne an der Röhre (Ausgangskoppler oder Output Coupler) durchgelassen. Dieses Licht ist der Laserstrahl. Die Wellenlänge des ersten Lasers in einem Benchtop Durchflusszytometer ist mittels eines Filters am Ausgangskoppler auf 488 nm fixiert, siehe Abb. 8-1. Auch ein zweiter, roter Diodenlaser für Benchtop Durchflusszytometer erhältlich. Es handelt sich um einen Halbleiterlaser, der eine Wellenlänge von 635 nm emittiert. Bei einem Stream-in-Air Durchflusszytometer wird die Wellenlänge des Laserstrahls durch Justieren der Position des High Reflektor Spiegels um genau die Wellenlänge des gebrochenen Lichts reflektiert, die das Prisma passiert. Nur die selektierte Wellenlänge wird zwischen Ausgangskoppler (Output Coupler) und hohem Reflektor Spiegel (High Reflector) reflektiert. Die Ausgangsleistung des Lasers wird gemessen und durch einen Regelkreis auf einem konstanten Wert gehalten.

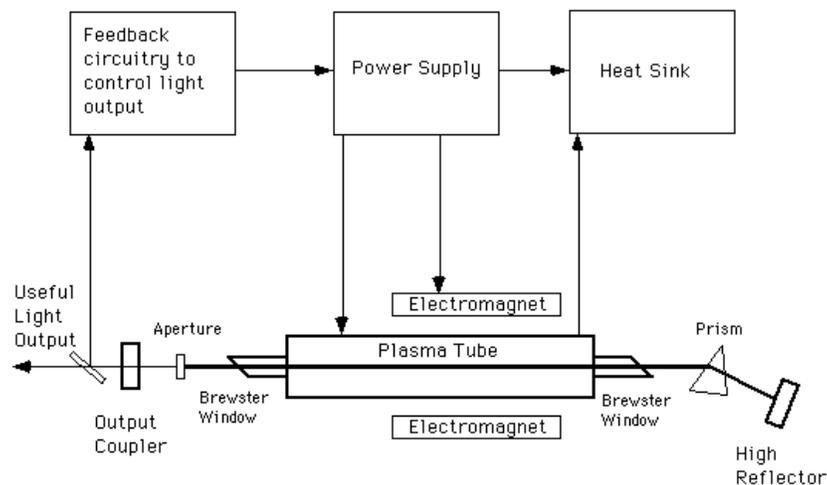


Abbildung 8-1 Erzeugung von Laserlicht in einem Gaslaser

In BD Durchflusszytometern werden weitere folgende Laser verwendet:

- Coherent Sapphire Solid State- Laser, 488 nm, 20 mW
- Helium/Neon- Laser, 633, nm, 20 mW
- UV- Laser
- Point Source Violet Solid State- Laser, 407 nm, 10-17 mW

In Abb. 4-5, Kapitel Optisches System, ist aufgef hrt, welche Laser in welchem BD Durchflusszytometer verwendet werden.

## 8.2 Laser- Justierung

Im Durchflusszytometer wird der Laserstrahl auf den Probenfluss fokussiert. Dieser Kreuzpunkt muss konstant bleiben. Um dies zu gewährleisten, wird der Laserkopf in einer festen Position gehalten. Der Strahl passiert eine Optik (Beam Expander), die ihn elliptisch formt. Danach geht der Strahl durch eine Fokuslinse, mit der eine Fokussierung auf den Kreuzpunkt zwischen Laserstrahl und Probenstrom erreicht wird. In Benchtop Durchflusszytometern ist der Laser in seiner Ausrichtung fixiert und muss deshalb vom Anwender nicht justiert werden. Stream-in-Air Durchflusszytometer dagegen benutzen auswechselbare Laser und einstellbare Laseroptiken; daher ist hier eine Justage durch den Anwender notwendig.

### Prüfungsfragen: Laser und -Justierung

- 1 Ein \_\_\_\_\_ Laser emittiert Licht der Wellenlänge 488 nm.  
\_\_\_\_\_
- 2 Die Form des Laserstrahls ist elliptisch, nachdem er durch die Fokussier-Optik geleitet wurde. Wahr.....Falsch.....  
\_\_\_\_\_
- 3 Welches ist die Wellenlänge des roten Diodenlasers in einem Benchtop Analyser?  
\_\_\_\_\_
- 4 Die Wellenlänge des Lasers in einem Stream-in-Air Durchflusszytometer kann durch die Justage der Position des \_\_\_\_\_ an der Rückseite des Lasers selektiert werden.

# Lösungen

---

## Prüfungsfragen: Überblick auf Seite 7

- 1 Relative Größe, relative Granularität oder interne Komplexität und relative Fluoreszenzintensität
- 2 Ein Laser
- 3 Das Flüssigkeitssystem, die Optik und die Elektronik
- 4 Eine Einzelzellsuspension
- 5 Probenfluss
- 6 Streulicht und Fluoreszenz
- 7 Linsen
- 8 den auftreffenden optischen Signalen
- 9 Wahr
- 10 Wahr

**Prüfungsfragen: Flüssigkeitssystem auf Seite 13**

- 1 Den Probenfluss zentral in den Laserstrahl zu positionieren.
- 2 Die Breite und die Position des Stroms
- 3 Eine
- 4 Trägerflüssigkeit; Messkammer
- 5 Hydrodynamische Fokussierung
- 6 Der Probendruckregler
- 7 Niedrig, Mittel und Hoch (LO, ME und HI)
- 8 Anstieg, Breite
- 9 Eine niedrige Fließrate
- 10 Wahr
- 11 Wahr

**Prüfungsfragen: Lichtstreuung auf Seite 16**

- 1 Wenn ein Partikel das einfallende Licht ablenkt
- 2 Die Zellmembran, der Kern und interne granuläre Zellkomponenten
- 3 Vorwärtsstreulicht (FSC)
- 4 Zelloberfläche oder –größe
- 5 Seitwärtsstreulicht (SSC)
- 6 Granularität oder internen Komplexität
- 7 FSC und SSC

**Prüfungsfragen: Fluoreszenzen auf Seite 20**

- 1 Lichtphotonen
- 2 Absorptionsspektrum
- 3 Emissionsspektrum
- 4 Der Argon-Ionen Laser
- 5 488 nm
- 6 Fluorescein Isothiocyanat (FITC) und R-Phycoerythrin (R-PE)
- 7 Antigen Oberflächenmarker

**Prüfungsfragen: Optische Bank auf Seite 24**

- 1 Anregungs- und Sammeloptik
- 2 Der Laserstrahl und der Probenstrom
- 3 Wahr
- 4 Messzelle, Probenstrom

**Prüfungsfragen: Optische Filter auf Seite 29**

- 1 Den Wellenlängenbereich zu begrenzen, die den Detektor erreichen
- 2 515 und 545
- 3 Strahlsplitter
- 4 Kurzpass, Langpass

**Prüfungsfragen: Signaldetektion auf Seite 35**

- 1 Photodiode
- 2 Photomultiplerröhrchen (tubes)
- 3 Wahr
- 4 Wandelt Spannungspulse in Kanalnummern um

**Prüfungsfragen: Schwellenwert (Threshold) auf Seite 36**

- 1 Dreck, Zellschrott oder elektronisches Rauschen
- 2 Falsch

**Prüfungsfragen: Datensammlung und deren Darstellungen auf Seite 39**

- 1 Den Parametersignalwert in Messkanäle
- 2 Zwei
- 3 Die Zahl der Ereignisse pro Kanal

**Prüfungsfragen: Fenster setzen (Gating) auf Seite 40**

- 1 Wahr

### **Prüfungsfragen: Datenanalyse und andere Anwendungen auf Seite 47**

- 1 Eine Punktwolkendarstellung erlaubt eine zweiparametrische Ansicht der Daten. Jedes Ereignis hat eine Position in der Darstellung gemäß seines Kanalwerts für beide Parameter. Histogramme können nur einen Parameter in Bezug zur Zahl der Ereignisse darstellen.
- 2 21.41%  
37.87%
- 3 Falsch
- 4 79.57%
- 5 Falsch
- 6 Wenn sie von einem Datenfile in der Darstellung das nächste einladen und die Regionen sehr knapp um die Populationen gezeichnet wurden, können die Subpopulationen wegen der Probenvariabilität außerhalb der Regionen liegen.
- 7 Cluster- Analyse
- 8 Geometrischer Mittelwert oder Median

### **Prüfungsfragen: Sortieren auf Seite 52**

- 1 schwingt
- 2 Eine
- 3 Einfangröhrchen (= Catcher tube)
- 4 Ablenkungsplatten (= geladene Metallplatten)

**Prüfungsfragen: Laser und -Justierung auf Seite 55**

- 1 Argon
- 2 Wahr
- 3 635 nm
- 4 Hoher Reflektor