

Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je molekulárně biologická metoda, která umožňuje identifikovat a kvantifikovat různé znaky v buňce. Záměrně neuvádíme, které znaky to jsou, neboť tato metoda je velmi univerzální a v podstatě závisí jen na použité protilátce. Vzhledem k univerzálnosti metody a jejímu rozšíření se tak seznam možných aplikací rozšiřuje každým dnem.

Pro analýzu musí být buňky v suspenzi. Na převedení buněk do suspenze používá tzv. nosná kapalina. V případě celých tkání je nutné tkáň rozrušit a uvolnit jednotlivé buňky do suspenze s nosnou kapalinou. Princip průtokové cytometrie je založen na detekci fluorescenčního signálu. Buňka sama fluoreskuje málokdy, proto využíváme fluorescenčně značené protilátky pro sledování požadovaných znaků. Buňky pak protékají speciální celou konstruovanou tak, aby v daný okamžik protékala celou právě jedna buňka z analyzované suspenze. Tato buňka je ozářena sadou laserů o specifických vlnových délkách a sleduje se vyzářená fluorescence. Tento přístup se nazývá imunofenotypizace a lze jej využít k typizaci jakékoliv buňky, například leukemické buňky nebo buňky nakažené virem HIV. Lze také sledovat míru syntézy DNA, RNA, intenzity buněčného cyklu a apoptózy. Na základě této charakterizace je možné roztřídit buňky podle sledovaných znaků.

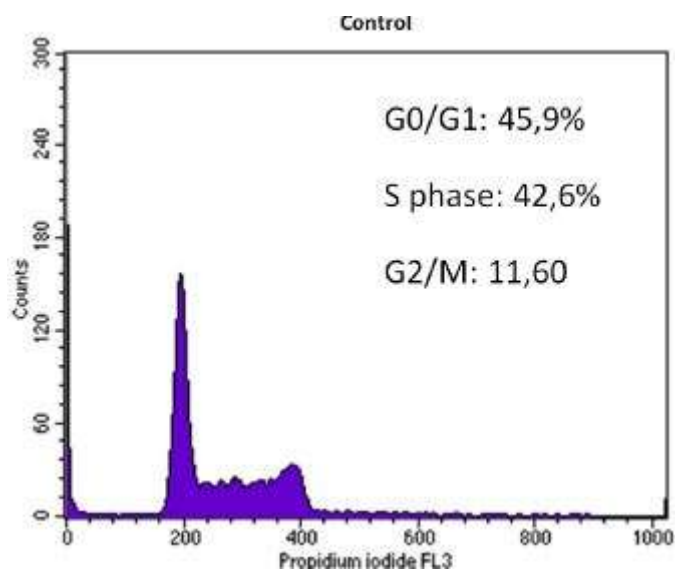
Výstupem z měření na průtokovém cytometru je mnohorozměrný graf, do kterého se zanesou intenzita každého ze sledovaných znaků. Statistickou analýzou se poté roztřídí jednotlivé buňky do skupin podle intenzity jednotlivých znaků. Na základě těchto skupin lze určit jednotlivé populace a jejich zastoupení ve vzorku.

Další možností, kterou průtoková cytometrie nabízí, je možnost třídění buněk. Před samotným tříděním proběhne imunofenotypizace a za laserovou celou dojde k rozprášení buněčné suspenze tak, aby každá kapka nesla jen jednu buňku. Pokud počítač vyhodnotí přítomnost žádaného znaku, vychýlí pomocí elektrického proudu kapičku nesoucí žádoucí buňku mimo hlavní proud a sebere ji do samostatné nádoby. Dnešní průtokové cytometry už umožňují sortování na základě více parametrů. V tom případě počítač dá každé kapce jinak silný impulz a řídí tak míru jejich vychýlení a kapky s různými impulzy jsou zachyceny do oddělených nádob. Buňky nesoucí analyzovaný znak je tak možno vytřídit od buněk nenesoucích požadovaný znak. Je možné izolovat jednotlivé buněčné linie, případně odlišovat buňky s nově transfekovaným genem od buněk, u nichž transfekce nebyla účinná. Třídit se ovšem nemusí pouze celé buňky, je možno třídit také organely, nebo jen chromozomy.

Obr. 1 Průtokový cytometr FACS Aria

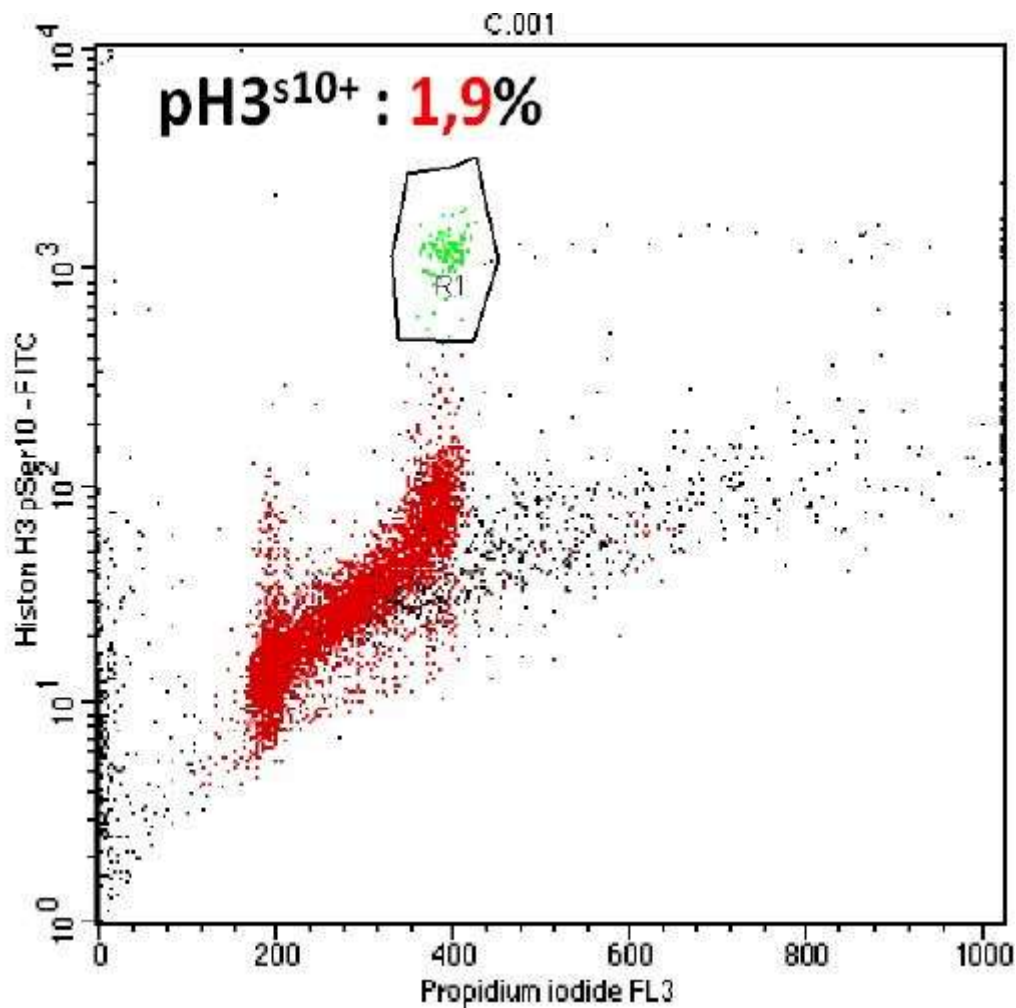


Obr. 2 Buněčný cyklus



Buněčný cyklus: Záznam normálního buněčného cyklu leukemické buněčné linie.

Obr. 3 Fosforylace histonů



Fosforylace histonů: Záznam z průtokového cytometru. Červené body označují buňky s nemodifikovaným histonem, zelené buňky mají histony modifikované fosforylací. Tato modifikace slouží k regulaci proteinové aktivity. Histony jsou strukturální proteiny vážící se na DNA a upravující strukturu chromozomů.