

Центр коллективного пользования проточной цитофлуориметрии

История создания

ЦКП проточной цитофлуориметрии был организован как инфраструктурное подразделение ИЦиГ в 2006 г. в связи с необходимостью дальнейшего развития в Институте методической и приборной базы для научно-исследовательских работ по клеточной биологии.

Задачи, которые могут решаться на базе ЦКП проточной цитофлуориметрии:

- подсчет клеток/анализ жизнеспособности: скрининг цитотоксичности, оптимизация клеточных культур, мониторинг биопроцессов;
- исследование апоптоза: характеристика клеточных линий, скрининг лекарственных соединений, мониторинг биопроцессов;
- анализ, детекция антигенов: анализ экспрессии белка/антигена, скрининг гибридом, детекция CD маркеров, определение цитокинов;
- анализ клеточного цикла: характеристика клеточных линий, скрининг соединений, нарушающих клеточный цикл, мониторинг биопроцессов;
- клеточный трекинг: распределение *in vitro/in vivo*, клеточная токсичность, пролиферация клеток;
- флуоресцентные белки: экспрессия GFP, комбинированный анализ: эффективность трансфекции и жизнеспособность;
- сортировка клеток (выделение клеточной популяции, обладающей определенными свойствами): анализ минорных клеточных популяций (стволовые клетки, дендритные клетки, тетрамеры, GFP-, YFP-, BFP-экспрессирующие клетки).

Направления деятельности

Основным направлением деятельности Центра является предоставление сотрудникам ИЦиГ квалифицированных услуг по анализу клеток, клеточных органелл или прочих частиц или сортировке данных объектов с целью получения чистых или обогащенных образцов, пригодных для дальнейшей работы.

Материально-техническая база

Центр оснащен проточным цитометром BD FACSAria, включающим в себя:

1. Приборный модуль.

1.1. Оптическая система

Оптическая скамья для 2 лазеров. Лазеры с воздушным охлаждением на длинах волн 488 нм и 633 нм. Питание лазеров – 110 или 220 V.

1.2. Детекторы

- Фотодиод для измерения прямого светорассеяния (FSC).
- Система детекторов BD Octagon™ для лазера на 488 нм: Детектор бокового светорассеяния (SSC) и 5 детекторов флуоресценции (может быть расширена с добавлением двух дополнительных детекторов флуоресценции).
- Система детекторов BD Trigon™ для лазера 633 нм: по два детектора флуоресценции (может быть расширена с добавлением одного дополнительного детектора флуоресценции).

1.3. Набор оптических фильтров

1.4. Модуль для сортировки

- Поддерживает использование излучения нескольких лазеров и окон сортировки прямоугольной формы при высокоскоростной сортировке. В режиме обогащения достигается скорость сортировки до 100 000 частиц в секунду. Скорость сортировки зависит от сортируемой популяции, желаемого выхода и чистоты сортировки, а также от качества сортируемого образца.
- Свободная и независимая установка критериев сортировки в зависимости от выхода, чистоты и точности подсчета.
- Режим «AbortSave» (сбор отброшенных частиц) позволяет максимально увеличить выход сортируемой фракции из образца путем отдельного сбора всех отброшенных при сортировке событий.
- Закрытая камера сортировки эффективно предотвращает образование аэрозолей (может быть дополнена модулем ACDU для сбора фракций в различные емкости с системой контроля образования аэрозолей).

Набор оптических фильтров

Для твердотельного лазера Coherent Sapphire (20 mW) 488 нм (голубой)

PMT	Фильтр	Детектируемый флуорохром	
A	BP 780/60	PE-Cy7	Дихроическое зеркало: LP 735
B	BP 695/40	PE-Cy5.5 или PerCP-Cy5.5	Дихроическое зеркало: LP 635
C	BP 675/20	PE-Cy5 или PerCP или FuraRed (кальций)	Дихроическое зеркало: LP 610
D	BP 610/20	PE-TxRed	Дихроическое зеркало: LP 595
E	BP 585/42 или 576/26	PE или PI	Дихроическое зеркало: LP 556
F	BP 530/30	FITC	Дихроическое зеркало: LP 502
o	BP 488/10	боковое светорассеяние (SSC)	

Для гелий-неонового лазера HeNe (17 mW) 635 нм (красный)

PMT	Фильтр	Детектируемый флуорохром	
A	BP 780/60	APC-Cy7	Дихроическое зеркало: LP 735
B	BP 660/20	APC	
C	BP 710/20	APC-Cy5.5	Дихроическое зеркало: LP 710

Дополнительный модуль BD ACDU™ (Automated Cell Deposition Unit)

- Позволяет пользователю производить сортировку в различные емкости для сбора фракций (в том числе планшеты, микроскопные стекла, чашки Петри). Совместим со всеми используемыми режимами сортировки. Поддерживается установка оператором требуемого количества собираемых клеток. Поддерживается режим сортировки нескольких субпопуляций клеток в одну емкость в заранее установленными оператором пропорциях.

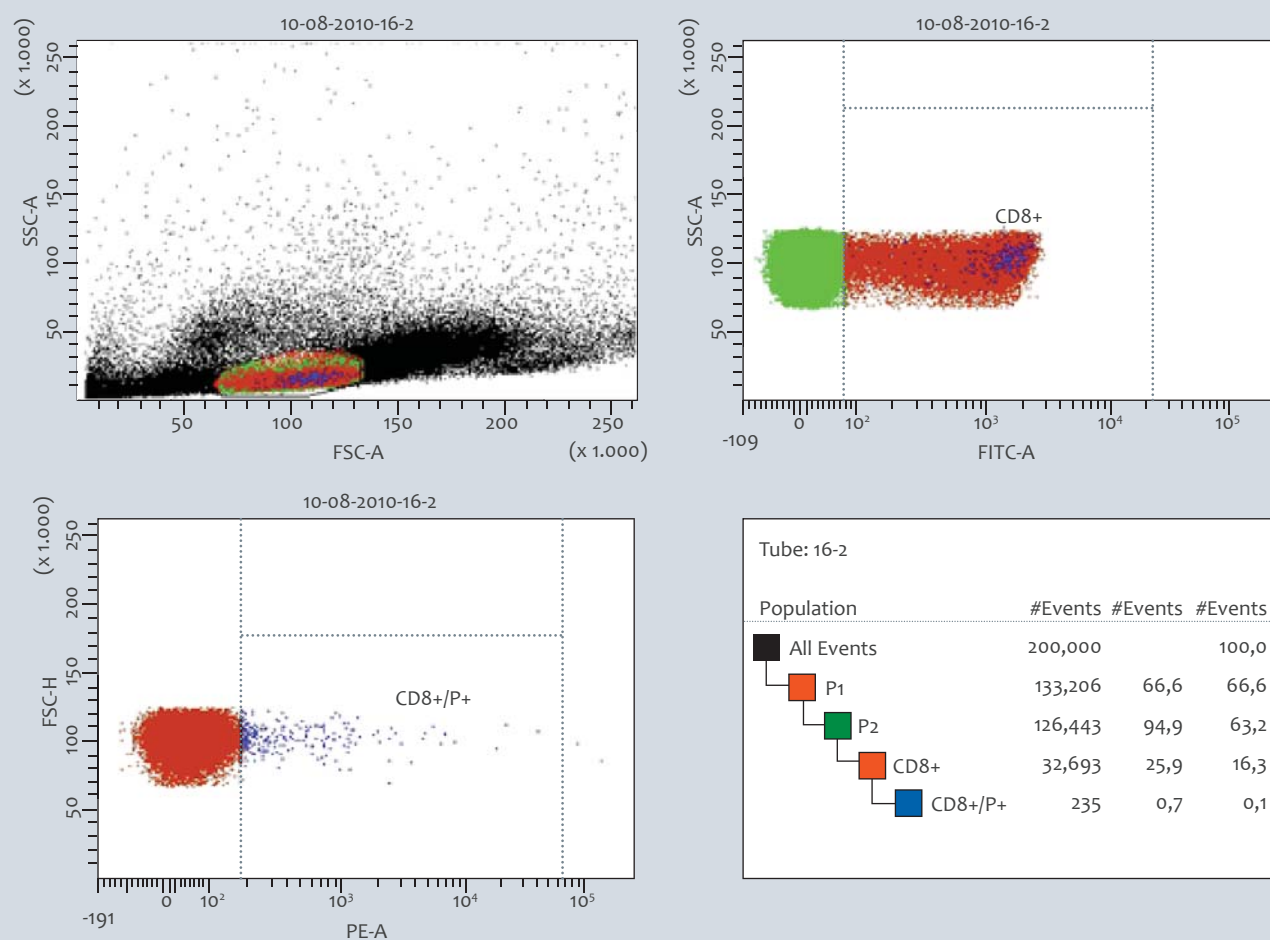
1.5. Система подачи жидкостей

- Система «Sense-in-Cuvette», «Sort-in-Air» (измерение в проточной кварцевой кювете, сортировка на выходе из кюветы с образованием капель с частицами).
- Автоматическая подача образца из пробирок различных размеров (2,5 мл, 5 мл и 15 мл). Поддержание заданной оператором температуры образца. Автоматическое встряхивание образца для предотвращения осаждения клеток.

- Емкость с проточной жидкостью и емкость для отработанного раствора в станции подачи жидкостей снабжены детекторами уровня. Емкости для воды, этанола и промывочного раствора в станции подачи жидкостей.
- Встроенная система подачи давления и вакуума. Не требуется подключения внешних насосов или компрессоров.
- Автоматическая процедура подготовки прибора к стерильной сортировке.
- Автоматические процедуры включения и выключения с промывкой всех каналов подачи жидкости в приборе.
- Размеры сопла 70 мкм и 100 мкм.
- Замена емкостей для проточной жидкости и отработанного раствора возможна без прерывания процесса сортировки через специальную емкость.

1.6. Электроника

- Компенсация флуоресцентных сигналов по всем параметрам для всех лазеров.
- Возможность установки нескольких пороговых



Образец представления результатов для определения наличия ВИЧ-специфической активности цитотоксических лимфоцитов человека с использованием техники МНС-пентамеров.



значений при сборе данных на различных лазерах и различных параметрах.

- Измерение величины, площади и ширины импульса для каждого параметра.
 - Все необработанные данные собираются и сохраняются в линейном виде. Конверсия данных в логарифмический вид производится в соответствии с математической таблицей логарифмов без использования логарифмических умножителей.
 - Одновременная сортировка до четырех фракций (функция QuadraSort™).
2. Программное обеспечение BD FACSDiVa™
- Сохранение данных, ориентированное на форматы баз данных.
 - Сохранение всех данных в линейном виде, что обеспечивает легкую и математически правильную программную компенсацию после сбора данных.
 - Легкая настройка панелей реагентов и профилей проб.

- Отображение видеоизображения точки разбиения капель и боковых потоков непосредственно в окне программы.
- Возможность создания сложных иерархических гейтов при многоцветном анализе.
- Автоматическая компенсация для всех параметров после измерения одноцветных контролей, что позволяет существенно упростить анализ и интерпретацию данных исследований, проводимых с использованием одноцветных реагентов.
- Счетчики сортировки с отдельным счетчиком для отброшенных частиц и автоматическим расчетом выхода сортировки, что позволяет установить оптимальные установки сортировки для каждой клеточной субпопуляции.
- Встроенная поддержка модуля ACDU (Advanced Cell Deposition Unit) для сбора сортируемых фракций в различные емкости.

- Отображение точечных графиков, графиков плотности, контурных графиков, гистограмм.
- Полный набор инструментов для статистической обработки данных.

Общие правила работы в ЦКП для пользователей

Для сотрудников ИЦиГ СО РАН

- Заявка на проведение работ должна быть предоставлена не менее чем за сутки до проведения работ.
- Заявка должна быть согласована с сотрудником ЦКП, который будет проводить работы.
- В заявке должны быть указаны количество образцов для анализа и параметры анализа (детектируемые флюорохромы).
- Заявки могут быть предоставлены либо по электронной почте кому-либо из сотрудников ЦКП за 2 суток, либо в устной форме за 1 сутки до проведения работ.
- Все заявки должны быть согласованы с заведующим лабораторией, в которой работает сотрудник, оформляющий заявку.

Для сотрудников сторонних организаций

- Заявка на проведение работ должна быть предоставлена не менее чем за месяц до начала работ. В течение этого времени заявка согласовывается с дирекцией ИЦиГ СО РАН и оформляется в виде официального договора на проведение работ.

- Для сторонних организаций возможны два варианта договоров: договор на проведение НИР, в результате которого ИЦиГ в лице ЦКП берет на себя часть затрат по проведению НИР и получает права на участие в научных публикациях, или хоздоговор, по которому всю финансовую нагрузку берет на себя заказчик. В последнем случае ИЦиГ не претендует ни на какую интеллектуальную собственность, но заказчик обязан указать в публикациях (при условии наличия таковых), что работа проводилась в ЦКП проточной цитометрии ИЦиГ СО РАН.
- После оформления и подписания соответствующего договора заказчик обязан предоставлять заявки в том же порядке, что и сотрудники ИЦиГ.

Контактная информация

Руководитель ЦКП Константин Анатольевич Семьянов
г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10,
ИЦиГ СО РАН
e-mail: konstantin.semyanov@gmail.com
Ответственный за техническую эксплуатацию
Ярослав Рейнгольдович Ефремов
e-mail: yarex@bionet.nsc.ru