

Hoe werkt flowcytometrie?

Flowcytometrie werkt door cellen of deeltjes, gesuspendeerd in een vloeistof, door een laserstraal te leiden. De cellen verstrooien licht en zenden fluorescentie uit wanneer ze gelabeld zijn met specifieke fluorochromen, vaak gekoppeld aan antilichamen. Het instrument detecteert dit uitgezonden licht om verschillende parameters te analyseren, zoals:

- Celgrootte
- Granulariteit (interne complexiteit)
- Aanwezigheid en hoeveelheid van oppervlakte- en intracellulaire markers (met behulp van fluorescerend gelabelde antilichamen of probes)

Met deze technologie kunnen onderzoekers:

- Celpopulaties kwantificeren
- De status van de celcyclus analyseren
- Eiwitexpressiepatronen onderzoeken (zoals differentiatie en activatie)
- Intracellulaire activatieroutes beoordelen
- Verschillende metabole processen meten
- Specifieke cellen sorteren voor verdere analyse
- Pluripotente stamcellen karakteriseren en sorteren

Technologieën binnen flowcytometrie: Conventioneel vs. spectraal

Conventionele flowcytometrie

Bij conventionele flowcytometrie zijn detectoren ontworpen om licht op te vangen dat wordt uitgezonden op specifieke golflengten die overeenkomen met de gebruikte fluorochromen in het experiment. Het systeem maakt gebruik van vaste optische filters om de signalen te scheiden op basis van vooraf bepaalde golflengten.

Voordelen

- Eenvoudige en goed ingeburgerde technologie
- Betrouwbaar voor standaard en routinematige celanalyse met een beperkt aantal kleuren (meestal tot 8–10 kleuren)
- Lagere kosten en eenvoudiger op te zetten voor standaardassays

Nadelen

- Beperkte parametercapaciteit (minder detectiekanalen)
- Overlap van fluorescentiesignalen tussen kanalen kan de analyse compliceren

Geschikt voor

- Routinematige analyses van relatief eenvoudige experimentele ontwerpen waarbij slechts enkele markers hoeven te worden geanalyseerd

Spectrale flowcytometrie

Spectrale flowcytometrie gebruikt meerdere detectoren om licht over een breed spectrum te detecteren, in plaats van vaste filters voor specifieke golflengten. Vervolgens worden geavanceerde algoritmen toegepast om overlappende signalen van elkaar te scheiden ("unmixing"). Hierdoor kunnen veel meer parameters gelijktijdig worden geanalyseerd.

Voordelen

- Analyse van meer dan 30 parameters tegelijkertijd mogelijk, ideaal voor complexe en high-dimensional datasets
- Minder spectrale overlap vergeleken met conventionele systemen
- Grotere flexibiliteit in experimenteel ontwerp (bijvoorbeeld door gebruik van een breder scala aan fluorochromen)
- Correctie van autofluorescentie mogelijk. Sommige cellen en weefsels vertonen een hoge mate van autofluorescentie; spectrale flowcytometrie maakt correctie hiervan mogelijk, wat leidt tot een betere resolutie van de data

Nadelen

- Vereist geavanceerdere software en analysetechnieken
- Complexere experimentele opzet en paneldesign

Geschikt voor

- High-dimensional studies, zoals diepgaande immunofenotypering van complexe celpopulaties en analyses van autofluorescente monsters

Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS)

Cell sorting verwijst naar het isoleren van specifieke celpopulaties uit een gemengd monster op basis van onderscheidende kenmerken. Sortering op basis van flowcytometrie is een onmisbaar hulpmiddel voor het verkrijgen van zuivere celpopulaties voor verdere analyse, kweek of downstream toepassingen.

Met geavanceerde sorteermogelijkheden kunnen onderzoekers:

- Enkelvoudige cellen sorteren voor single-cell sequencing of klonering
- Zeldzame celpopulaties isoleren (zoals tumor-infiltrerende lymfocyten of stamcellen)
- Levende cellen zuiveren voor functionele assays of weefselkweek