



Claudio Ortolani

CITOMETRIA A FLUSSO

con il contributo di

Stefano Papa
Barbara Canonico
 Bruno Brando
 Sabrina Buoro
 Sabrina Buoro
 Mario d'Atri
 Antonello Tecchio
 Matteo Vidali

Con il contributo di:
Stefano Papa
Barbara Canonico
 Bruno Brando
 Sabrina Buoro
 Mario d'Atri
 Antonello Tecchio
 Matteo Vidali

Sotto gli auspici
 della Società Italiana
 per l'Analisi Citometrica
 Cellulare (ISCCA)

edi-ermes

Prezzo di prenotazione
€ 72,00
 Valido fino al 31 agosto 2019

Volume 17 x 24 cm

Brossura

Pagine previste 464, illustrato

ISBN 978-88-7051-693-7

€ 120,00

Citometria a Flusso non è un trattato qualsiasi: è una dichiarazione d'amore per una disciplina multiforme che ha permesso risultati straordinari pur rimanendo sempre tranquillamente nell'ombra.

Questo libro è il risultato di uno sforzo congiunto che ha coronato un'avventura accademica, scientifica e umana che si è protratta per quasi cinquant'anni. **Citometria a Flusso** è l'ultimo prodotto del lavoro di un'intera Scuola, che ha sempre saputo distinguere la Citometria a Flusso dalle sue applicazioni pratiche, cercando di dare a questa e a quelle gli spazi di competenza.

Citometria a Flusso è un gesto di amicizia che vuole mettere a disposizione di amici e colleghi uno strumento pratico per affrontare i grandi quesiti e i piccoli problemi pratici. Saranno gli amici e i colleghi, sostenendo nel tempo questo nostro lavoro, a dirci se ci siamo riusciti.

Claudio Ortolani e Stefano Papa

Sotto gli auspici della Società Italiana
 per l'Analisi Citometrica Cellulare (ISCCA)

edi-ermes - Viale E. Forlanini, 65 - 20134 Milano

Tel. 02.70.21.121 - Fax 02.70.21.12.83 - ediermes@eenet.it - www.ediermes.it

Indice

1. Introduzione
 2. I segnali: lo scatter
 3. I segnali: fluorescenza, fosforescenza, impedenza, estinzione
 4. Componente idraulica
 5. Fonti luminose
 6. Banchi ottici
 7. Trasduttori e componente circuitale
 8. Il file citometrico
 9. Analisi e rappresentazione del segnale
 10. Rappresentazione e analisi dei dati
 - 11 Standard, calibrazione e tecniche di controllo
 12. Fluorocromi: cenni generali
 13. Fluorocromi coniugabili con anticorpi
 14. Fluorocromi per acidi nucleici
 15. Fluorocromi nello studio delle caratteristiche cellulari
 16. Proteine fluorescenti
 17. Spillover e compensazione
 18. Artefatti
- Bibliografia
Indice analitico

9

Figura 9.5 Dopo una procedura di Area Scaling correttamente effettuata, il confronto tra le componenti A e H del *pulse* relativo al parametro FSC permette di evidenziare la presenza di doppietti e aggregati (in rosso nella figura), identificabili come eventi che rispetto ai valori di H presentano valori di A aumentati. Si noti come gli eventi in oggetto presentino valori aumentati anche a carico di W.

te nei doppietti. Anche in questo caso è possibile valutare lo *scatter* laterale (SSC) al posto dello *scatter* in avanti (FSC).

Grande cautela deve comunque essere messa in atto nell'analisi di popolazioni eterogenee, dove i possibili *outlier* non sono necessariamente doppietti, ma cellule singole dotate di parametri fisici diversi da quelli delle altre cellule presenti nel campione, come dimostrato da uno studio in cui questo metodo è stato utilizzato per discriminare tra T linfociti *resting* e T linfociti ciclianti (Bokmer, Bandala-Sanchez et al., 2011).

9.1.3.2 FL-A vs FL-W

Questo approccio concettualmente simile viene riservato alla determinazione dei doppietti in popolazioni cellulari marcate con un fluorocromo per il DNA, e consiste nella rappresentazione contemporanea dell'Area (A) e della Larghezza (W) relative al segnale di fluorescenza prodotto dal fluorocromo legato al DNA in maniera stechiometrica. Tale metodo riveste importanza pratica allo scopo di distinguere le cellule in fase G2/M dai doppietti costituiti da due cellule in fase G0/G1 aggregate fra di loro. In ambedue i casi infatti il contenuto di DNA sarà doppio, ma la larghezza del *pulse* prodotto dai doppietti (W) sarà maggiore di quello di una cellula in G2/M; di conseguenza, in un citogramma FL-A vs FL-W i doppietti saranno immediatamente riconoscibili per la loro tipica posizione, e potranno essere eliminati dal gate di acquisizione (Wersø, Chrest et al., 2001) (Figura 9.6).

Va infine ricordato che è stato anche dimostrato che l'analisi della forma del *pulse*, con particolare riferimento al rapporto tra le variabili H e W del *pulse* di fluorescenza, è in grado di fornire informazioni sulla distribuzione intracellulare di strutture proteiche rese fluorescenti da una marcatura specifica, come nel caso dello studio della traslocazio-

Analisi e rappresentazione del segnale 125

11

Fig. 11.13 Analisi bivaricata di due cluster positivi in modo mutuamente esclusivo per FLx e Fly. Il risultato dell'analisi viene rappresentato prima (a, b) e dopo (c, d) le procedure di compensazione. Si noti in a la posizione della popolazione FLx neg Fly pos, che si pone inopportuno lungo la bisettrice del citogramma, e il background del negativo x in b. A compensazione avvenuta, la popolazione FLx neg Fly pos assume la posizione prevista in alto a sinistra di c, ma l'aumento del suo coefficiente di variazione dovuto alle misure di compensazione dilata la sua proiezione sull'asse della FLx, aumentando drasticamente il background che passa da x a x'.

di un fluorocromo in un determinato strumento, ciò che è importante non è solo il numero di fotoni Q che entra nel trasduttore, bensì il numero di fotoelettroni che ne esce, definito dall'unità di misura Qr, che risulta dal rapporto tra numero di fotoelettroni e numero di molecole fluorescenti. Sarà quindi Qr e non Q l'unità di misura assunta nella determinazione della sensibilità dello strumento.

Inoltre, nella valutazione della sensibilità di un citometro, relativamente a ogni singolo canale e per ogni fluorocromo valutato, sarà da considerare non solo l'efficienza fotoelettronica Qr del suo specifico detector, ma anche il background totale, o B_{tot}, che definisce

196 CITOMETRIA A FLUSSO

Per prenotazioni inviare via fax allo 02.70.21.12.83 o inviare un'e-mail a: eeinfo@eenet.it:

edi-ermes - Viale Enrico Forlanini, 65 - 20134 Milano - Tel. 02.70.21.121 - Fax 02.70.21.12.83 - ediermes@eenet.it

n° **Citometria a flusso** - € ~~120,00~~ una - **Prezzo speciale riservato ai Soci ISCCA/ESCCA € 72,00** l'una + spese di spedizione (€ 3,00) - Quota valida fino al 31 agosto 2019

Carta di credito (senza addebito di spese postali)

Bonifico anticipato su Monte dei Paschi IT80J0103032971000001108746 (senza addebito di spese postali)

da spedire al seguente indirizzo:

Dott. n°

Via n°

CAP Città (.....)

P. IVA/C.F. Codice destinatario

Pagamento anticipato