



Indice

1. Introduzione	1
1.1 Struttura dei citometri a flusso	2
1.2 Peculiarità dei citometri a flusso	3
1.3 Parametri e segnali	4
1.4 Tempo	6
2. I segnali: lo scatter	9
2.1 Scatter in avanti	13
2.2 Scatter laterale	14
2.3 Scatter di Raman	16
2.4 Scatter depolarizzato	17
3. I segnali: fluorescenza, fosforescenza, impedenza, estinzione	19
3.1 Fluorescenza	19
3.1.1 <i>Fluorescenza depolarizzata</i>	21
3.1.2 <i>Autofluorescenza</i>	21
3.2 Fosforescenza	23
3.3 Impedenza	25
3.4 Estinzione	26
4. Componente idraulica	29
4.1 Generalità sui fluidi	29
4.1.1 <i>Flusso laminare e flusso vorticoso</i>	30
4.1.2 <i>Focalizzazione idrodinamica</i>	31
4.2 Fluidica di un citometro	32
4.2.1 <i>Sheath e core</i>	32
4.2.2 <i>Componenti della fluidica</i>	33
4.2.3 <i>Controllo del flow rate</i>	34
4.2.4 <i>Iniezione del campione</i>	35

4.2.5	<i>Interazione tra evento e luce incidente</i>	38
4.2.6	<i>Soluzioni progettuali particolari</i>	42
5.	Fonti luminose	45
5.1	Lampade ad arco	45
5.2	Laser	47
5.2.1	<i>Laser allo stato gassoso</i>	50
5.2.2	<i>Laser allo stato solido</i>	56
5.2.3	<i>Laser allo stato liquido</i>	64
5.3	LED	65
6	Banchi ottici	67
6.1	Fibre ottiche, prismi, specchi, lenti	67
6.2	Raccolta e trasporto dei segnali	69
6.3	Componenti del banco ottico	71
6.3.1	<i>Filtri per assorbimento</i>	72
6.3.2	<i>Filtri interferenziali</i>	72
6.3.3	<i>Filtri neutral density</i>	75
6.3.4	<i>Filtri polarizzatori</i>	75
6.3.5	<i>Beam splitter</i>	76
6.4	Tipologia dei banchi ottici	76
6.4.1	<i>Banchi ottici a trasmissione</i>	76
6.4.2	<i>Banchi ottici a riflessione</i>	77
6.4.3	<i>Banchi ottici multilaser</i>	79
6.4.4	<i>Soluzioni progettuali particolari</i>	81
7.	Trasduttori e componente circuitale	85
7.1	Trasduttori	85
7.1.1	<i>Fotodiodi</i>	85
7.1.2	<i>Fotodiodi a valanga</i>	85
7.1.3	<i>Fotomoltiplicatori</i>	86
7.1.4	<i>Fotomoltiplicatori multianodo</i>	89
7.1.5	<i>Charged-coupled device</i>	89
7.2	Componente circuitale	89
7.2.1	<i>Modello analogico</i>	91
7.2.2	<i>Modello digitale</i>	100
7.2.3	<i>Modello misto</i>	103
8.	File citometrico	105
8.1	Formato FCS	105
8.2	Segmenti	107
8.2.1	<i>Segmento Header</i>	107

8.2.2	<i>Segmento Text</i>	108
8.2.3	<i>Segmento Data</i>	109
8.2.4	<i>Segmento Analysis</i>	109
8.2.5	<i>Altri segmenti opzionali</i>	110
8.3	Chiavi (keywords)	111
8.3.1	<i>Chiavi standard</i>	111
8.3.2	<i>Chiavi non standard (custom)</i>	113
8.3.3	<i>Rapporti tra chiavi e rappresentazione dei dati</i>	114
8.3.4	<i>Rapporti tra chiavi e procedure di compensazione</i>	115
8.4	Limiti concettuali del formato FCS	116
9.	Analisi e rappresentazione del segnale	119
9.1	Pulse	119
9.1.1	<i>Analisi del pulse nei sistemi analogici</i>	120
9.1.2	<i>Analisi del pulse nei sistemi digitali</i>	121
9.1.3	<i>Applicazioni pratiche dell'analisi del pulse</i>	124
9.2	Rappresentazione del segnale	126
9.2.1	<i>Segnale acquisito/amplificato in modo lineare</i>	127
9.2.2	<i>Segnale acquisito/amplificato in modo logaritmico</i>	128
9.2.3	<i>Funzioni hyperlog, biexponential e logicle</i>	131
9.2.4	<i>Altre trasformate</i>	132
9.3	Range dinamico e dinamica del segnale	133
9.3.1	<i>Risoluzione effettiva</i>	134
9.3.2	<i>Picket fence</i>	135
10.	Rappresentazione e analisi dei dati	137
10.1	Rappresentazione dei dati	137
10.1.1	<i>Istogrammi</i>	137
10.1.2	<i>Citogrammi</i>	144
10.2	Analisi dei dati	152
10.2.1	<i>Misure di immunofluorescenza</i>	152
10.2.2	<i>Valutazione quantitativa del contenuto di DNA</i>	159
10.2.3	<i>Concetto di gate e concetto di regione</i>	163
10.2.4	<i>Analisi citometrica come analisi di pattern</i>	164
10.2.5	<i>Strumenti attuali ed evoluzioni future</i>	165
11	Standard, calibrazione e tecniche di controllo	167
11.1	Gli standard in Citometria a Flusso	167
11.1.1	<i>Standard naturali</i>	168
11.1.2	<i>Standard artificiali</i>	169
11.2	Aggiustamento (set-up) del banco ottico	178
11.3	Aggiustamento dei fotomoltiplicatori	180

11.4	Calibrazione	181
11.4.1	<i>Calibrazione in ERF</i>	183
11.4.2	<i>Calibrazione in MESF</i>	183
11.4.3	<i>Calibrazione in ABC</i>	183
11.4.4	<i>Calibrazione in FLU</i>	184
11.4.5	<i>Calibrazione in nanometri</i>	186
11.4.6	<i>Mean fluorescence intensity</i>	186
11.4.7	<i>Ratio between fluorescence intensities</i>	187
11.4.8	<i>Parametri di performance primaria</i>	189
11.5	Performance strumentale e suo controllo	189
11.5.1	<i>Accuratezza</i>	189
11.5.2	<i>Risoluzione</i>	193
11.5.3	<i>Sensibilità</i>	194
11.5.4	<i>Limite di bianco, limite di rilevabilità e limite di quantizzazione</i>	201
11.5.5	<i>Precisione</i>	206
11.5.6	<i>Specificità</i>	206
12.	Fluorocromi: cenni generali	209
12.1	Comportamento spettrale delle molecole fluorescenti	210
12.2	Rapporti con l'ambiente	213
12.2.1	<i>Effetti spettrali</i>	214
12.2.2	<i>Quenching, fading e fluorescence resonance energy transfer</i>	214
12.3	Gruppi accessori	216
13.	Fluorocromi coniugabili con anticorpi	219
13.1	Generalità	219
13.2	Grandi molecole proteiche	219
13.2.1	<i>Ficobiliproteine</i>	220
13.2.2	<i>Complesso peridininina-clorofilla-proteina</i>	224
13.2.3	<i>Amcyan e Amcyan 100</i>	226
13.3	Piccole molecole organiche	227
13.3.1	<i>Pireni</i>	228
13.3.2	<i>Piridilossazoli</i>	228
13.3.3	<i>Cumarine</i>	229
13.3.4	<i>Xanteni</i>	229
13.3.5	<i>Composti cianinici</i>	235
13.3.6	<i>Serie Alexa e altre serie</i>	241
13.4	Molecole polimeriche π -coniugate	247
13.5	Quantum dot	248
13.6	Fluorocromi tandem	249
13.6.1	<i>Tandem eccitabili nell'UV e nel NUV</i>	253

13.6.2	<i>Tandem eccitabili nel violetto</i>	255
13.6.3	<i>Tandem eccitabili nel blu</i>	257
13.6.4	<i>Tandem eccitabili nel verde-giallo</i>	259
13.6.5	<i>Tandem eccitabili nel rosso</i>	260
13.6.6	<i>Nuove soluzioni</i>	261
14.	Fluorocromi che si legano agli acidi nucleici	265
14.1	Generalità	265
14.2	Composti triarilici.....	270
14.3	Composti stilbenici	271
14.4	Composti fenilindolici.....	272
14.5	Composti bisbenzimidazolici	274
14.5.1	<i>Serie Hoechst</i>	274
14.5.2	<i>DyeCycle Violet</i>	279
14.6	Composti fenantridinici.....	280
14.6.1	<i>Propidio ioduro</i>	280
14.6.2	<i>Etidio bromuro</i>	285
14.6.3	<i>Alcaloidi benzofenantridinici</i>	285
14.7	Composti cianinici.....	286
14.7.1	<i>Molecole della serie TOTO</i>	286
14.7.2	<i>Molecole della serie TO-PRO</i>	288
14.7.3	<i>Molecole della serie SYTOX®</i>	290
14.7.4	<i>Molecole della serie SYTO</i>	291
14.7.5	<i>Molecole della serie SYBR</i>	292
14.8	Composti aromatici eterociclici	293
14.8.1	<i>Acridine</i>	293
14.8.2	<i>Oxazine</i>	296
14.8.3	<i>Arancio di tiazolo e suoi analoghi</i>	296
14.8.4	<i>7-Amino-Actinomomicina D</i>	297
14.8.5	<i>Pironina Y</i>	299
14.8.6	<i>LDS-751</i>	300
14.8.7	<i>Berberina</i>	301
14.9	Composti aromatici non eterociclici	303
14.9.1	<i>Antibiotici triciclici</i>	303
14.9.2	<i>Antrachinonici</i>	304
15.	Fluorocromi nello studio delle caratteristiche cellulari	307
15.1	Generalità	307
15.2	Contenuto di proteine	308
15.3	Contenuto di acidi nucleici e organizzazione cromatinica	309
15.4	Vitalità cellulare	309

15.4.1	Sonde impermeant per il DNA	309
15.4.2	Amine Reactive Dyes	310
15.4.3	Derivati della Fluoresceina	311
15.4.4	Calcofluor White	313
15.4.5	Trypan Blue	314
15.5	Potenziale di membrana	315
15.5.1	Carbocianine	315
15.5.2	Composti Oxonolici	318
15.5.3	Xanteni	319
15.6	Potenziale di membrana mitocondriale	319
15.6.1	JC-1	320
15.7	Massa mitocondriale	321
15.7.1	Arancio di nonil-Acridina	321
15.7.2	Molecole Mitotracker	321
15.7.3	Molecole MitoFluor	323
15.8	pH intracellulare	323
15.8.1	DCH	324
15.8.2	BCECF-AM	324
15.8.3	SNARF	324
15.9	Massa e pH lisosomiali.....	325
15.9.1	Molecole LysoTracker e molecole LysoHunt	325
15.9.2	Molecole LysoSensor	325
15.10	Determinazione dei radicali liberi	327
15.10.1	Diidroetidio	328
15.10.2	Diclorofluoresceina diacetato	328
15.10.3	Di-idrorodamina 123	328
15.10.4	Derivati del Tetrazolio	328
15.11	Contenuto di Calcio	329
15.11.1	Indo-1-acetossimetilestere	330
15.11.2	Derivati xantenici	332
15.11.3	Molecole Fura	332
15.11.4	BTC	335
15.12	Contenuto di Sodio	335
15.12.1	SBFI	335
15.12.2	Sodium Green	335
15.13	Contenuto di Potassio	336
15.14	Contenuto di Cloro	337
15.15	Contenuto di Magnesio	337
15.16	Contenuto di Glutazione	337
15.17	Contenuto di Metalli Pesanti	338
15.18	Determinazione della proliferazione cellulare	339

15.18.1 Esteri della Fluoresceina	340
15.18.2 Molecole PKH	340
15.18.3 Molecole della serie CellVue®	342
15.19 Determinazione della Multidrug resistance	342
15.19.1 Calceina acetossimetilestere	344
15.19.2 Rodamina 123	344
15.20 Determinazione della fluidità di membrana	344
16. Proteine fluorescenti	347
16.1 Generalità	347
16.2 Proteine fluorescenti e Citometria a Flusso	349
16.2.1 Green Fluorescent Proteins	350
16.2.2 Blue Fluorescent Proteins	351
16.2.3 Cyan Fluorescent Proteins	352
16.2.4 Yellow Fluorescent Proteins	352
16.2.5 Red Fluorescent Proteins	353
16.2.6 Infra-red Fluorescent Proteins	355
17. Spillover e compensazione	357
17.1 Spillover	357
17.1.1 Spillover intralaser	357
17.1.2 Spillover interlaser	361
17.2 Compensazione	362
17.2.1 Spreading post compensazione	364
17.2.2 Compensazione via hardware	368
17.2.3 Compensazione via software	370
17.2.4 Compensazione nei citometri multispettrali	373
18. Artefatti	375
18.1 Escapees	375
18.2 Debris	377
18.3 Interferenze dovute a fattori sierici	378
18.4 Interferenze dovute ai coniugati	378
18.5 Impedimenti sterici	379
18.6 Comparsa di un segnale inatteso	379
18.7 Scomparsa o attenuazione di un segnale atteso	382
Bibliografia	383