

Biofizika gyakorlat Coulter számláló, flow citometria jegyzőkönyv:

A gyakorlat célja

A mérés elsődleges célja, a Coulter számláló jobb megismerése. A vörsejtek szuszpenziója egy kis nyíláson áramlik keresztül elektromos árammal egyidejűen. Az egyes vörsejtek átjutnak a nyíláson, és a sejt mérete által meghatározott impedanciaváltozást okoznak a nyílásban. A rendszer megszámlolja az egyes sejteket és ez alapján megadhatjuk a sejt méret eloszlást. A mintánkként megszámlolt sejtek száma kb. százszor nagyobb, mint a szokásos mikroszkóppal meghatározható sejtszám, így kb. 10-edére csökkentve a statisztikai hibát.

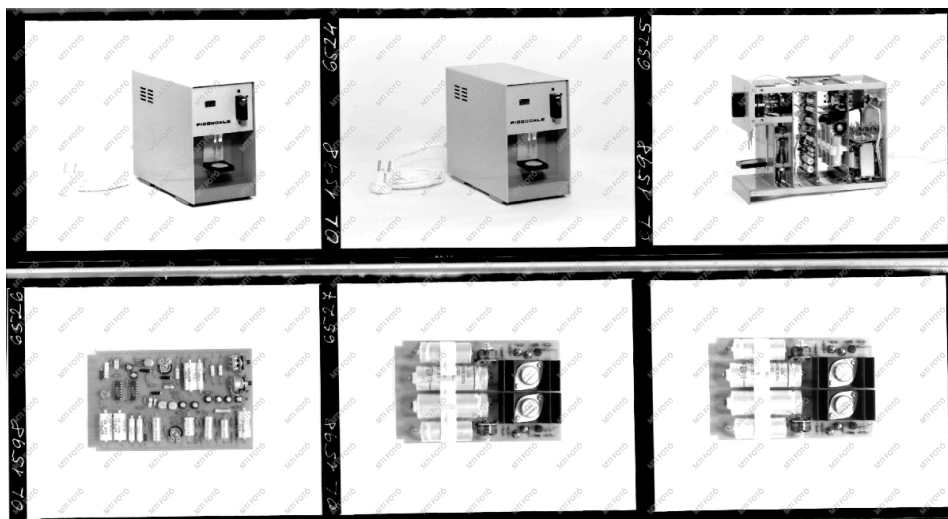
Az áramlási citometria elméleti alapjainak megismerése is része a mérésnek, Az áramlási citometria („Flow cytometria”) sejtek gyors, multiparaméteres vizsgálatára alkalmas laboratóriumi módszer. Segítségével kevert sejt populációkban az egyes sejt típusok külön mérhetőek, analizálhatóak és szeparálhatóak fenotípusuk, vagy funkcionális állapotuk szerint.

Gyakorlaton elvégzett feladatok

Alapvetően két mérést végeztünk el, az elsőben három oldatot mértünk. Egy referencia só oldatot, hogy lássuk a háttérrel, egy a cég által biztosított referencia oldatot kalibráláshoz és ismeretlen oldatot. A második mérés során 0-10 voltig mértünk végig egy oldatot.

Használt anyagok és eszközök, fontos körülmények

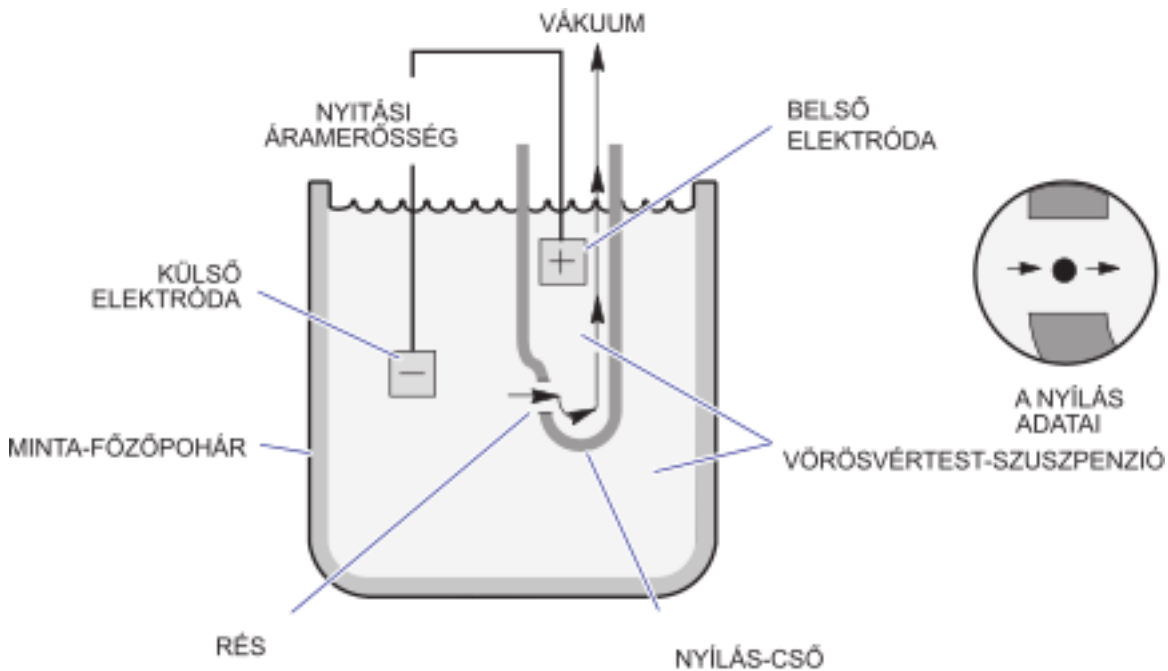
Egy PicoScale mérőeszközt és három mérő oldatot.



Rövid elméleti összefoglalás

Coulter-módszer

A Coulter-módszer pontosan számolja a sejteket és meghatározza méretüket az elektromos ellenállásban bekövetkező változások érzékelésével és mérésével, mikor egy részecske (mint például egy sejt) a vezetőképes folyadékban átjut egy kis nyíláson. Az alábbi ábra mutatja be ezt az alapelvet:



Amint az egyes sejtek átjutnak a nyíláson, visszatartják az áramot és mérhető impulzust hoznak létre. Az impulzusok száma jelzi a részecskék számát. Az egyes impulzusok magassága arányos az adott részecske térfogatával.

Míg az impulzusok száma jelzi a részecskeszámot, addig a létrejött elektromos impulzus amplitúdója a sejttérfogattól függ. A részecskék nyíláson belüli viselkedésének elméleti elemzése azt mutatja, hogy a sejt által létrehozott elektromos impulzus magassága az a karakterisztika, mely leginkább mutat arányosságot a sejttérfogathoz.

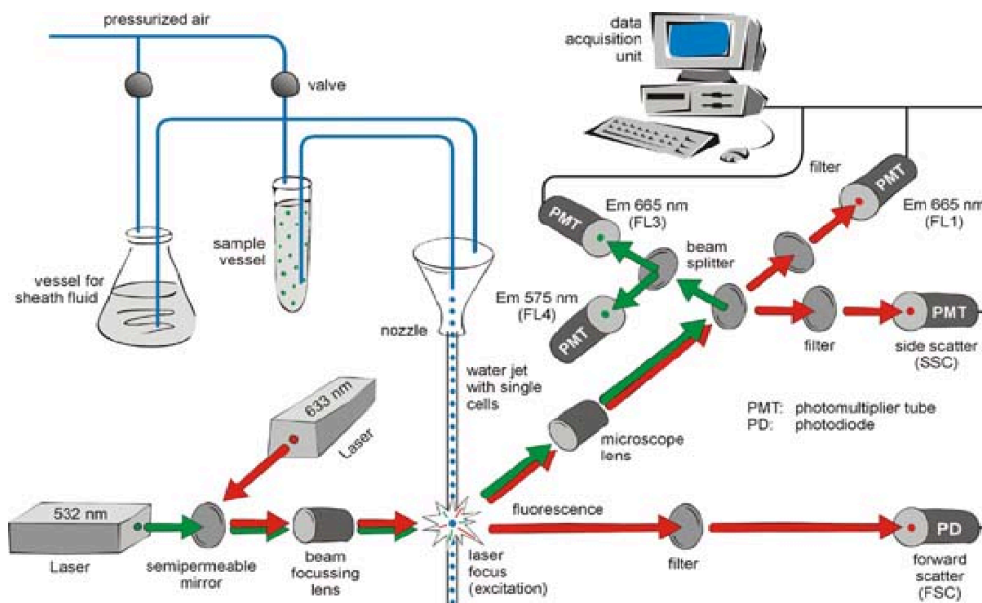
Differenciál-diszkriminátor

A differenciál-diszkriminátor (DD) olyan berendezés, amely a beérkező jelsorozatból csak azokat a jeleket engedi át (vagyis csak azokra a jelekre szolgáltat kimenőjelet a számláló felé), amelyek amplitúdója két meghatározott feszültség közé esik. Ezt a feszültségintervallumot a diszkriminátor "ablaká"-nak szoktuk nevezni.

Az áramlási citometria elve

Az áramlási citometria („Flow cytometria”) sejtek gyors, multiparaméteres vizsgálatára alkalmas laboratóriumi módszer. Segítségével kevert sejtpopulációkban az egyes sejttípusok külön mérhetőek, analizálhatók és szeparálhatóak fenotípusuk, vagy funkcionális állapotuk szerint.

A rutinban használt áramlási citométerek segítségével egy mintában, egyidőben mérhető a sejtek nagysága, granuláltsága, és 4-6 fluoreszcens molekula jele. Így egy-egy sejttípusról 4-6 különböző paramétert tudunk egyszerre meghatározni.



Mérési adatok

Először olvassuk be a mérési adatokat. Az első mérés:

```

meres1 = readtable("coultter_meres.xlsx", "Sheet", "1meres", "ReadRowNames", true);
meres1{"sárga", :} = meres1{"sárga", :} ./ 10;
meres1{:, "atlag"} = 1;
meres1{"sárga", "atlag"} = mean(meres1{"sárga", 1:3});
meres1{"piros", "atlag"} = mean(meres1{"piros", 1:3});
meres1{"fekete", "atlag"} = mean(meres1{"fekete", 1:3});
disp(meres1)

```

	első	masodik	harmadik	atlag
sárga	1.8	2.7	3.6	2.7
piros	611	582	636	609.67
fekete	334	342	333	336.33

A második mérés:

```

meres2 = readtable("coultter_meres.xlsx", "Sheet", "2meres");
meres2.Ud = meres2.IDszint ./ 10;
meres2{:, "atlag"} = (meres2{:, "első"} + meres2{:, "masodik"})/2;
disp(meres2)

```

IDszint	első	masodik	Ud	atlag
10	367	368	1	367.5
15	351	362	1.5	356.5
20	345	342	2	343.5
25	309	322	2.5	315.5
30	152	223	3	187.5
35	178	188	3.5	183
40	122	114	4	118
45	90	97	4.5	93.5

50	66	68	5	67
55	54	58	5.5	56
60	44	47	6	45.5
65	37	41	6.5	39
70	36	34	7	35
75	31	31	7.5	31
80	27	28	8	27.5
85	22	22	8.5	22
90	19	20	9	19.5
95	19	17	9.5	18
100	21	18	10	19.5

Első mérés

Az első mérés során megállapíthatjuk, hogy a mért értékek olyan kicsik. Vagyis a háttér olyan jelentéktelen, hogy nem szükséges számolnunk vele.

```
disp(meres1("sárga",:))
```

	első	masodik	harmadik	atlag
sárga	1.8	2.7	3.6	2.7

```
c_hatter = meres1{"sárga","atlag"} * 10^4;
disp(c_hatter)
```

2.7000e+04

A második mérés során kalibráljuk a mérőműszert, vagyis meghatározzuk a h értékét. A tényleges

koncentrációt a cég megadta. $C_{\text{tényleges}} = 4.61 \cdot 10^6 \frac{1}{\mu\text{l}}$. A képlet alapján tehát $h = \frac{C_{\text{tényleges}}}{C_{\text{mért}}} = \frac{4.61 \cdot 10^6 \frac{1}{\mu\text{l}}}{n \cdot 10^4 \frac{1}{\mu\text{l}}}$.

```
c_tenyleges = 4.61*10^6;
c_mert = meres1{"fekete","atlag"} * 10^4;
h = c_tenyleges/c_mert;
disp(h)
```

1.3707

Tehát a h értéke 1,3707.

Ezek alapján a piros oldat koncentrációja:

```
c_piros = h * meres1{"piros","atlag"} * 10^4;
disp(c_piros)
```

8.3565e+06

Második mérés

Ismeretlen koncentrációjú oldat impulzus válaszát váltakozó integrál diszkriminátor szinteken mértük.

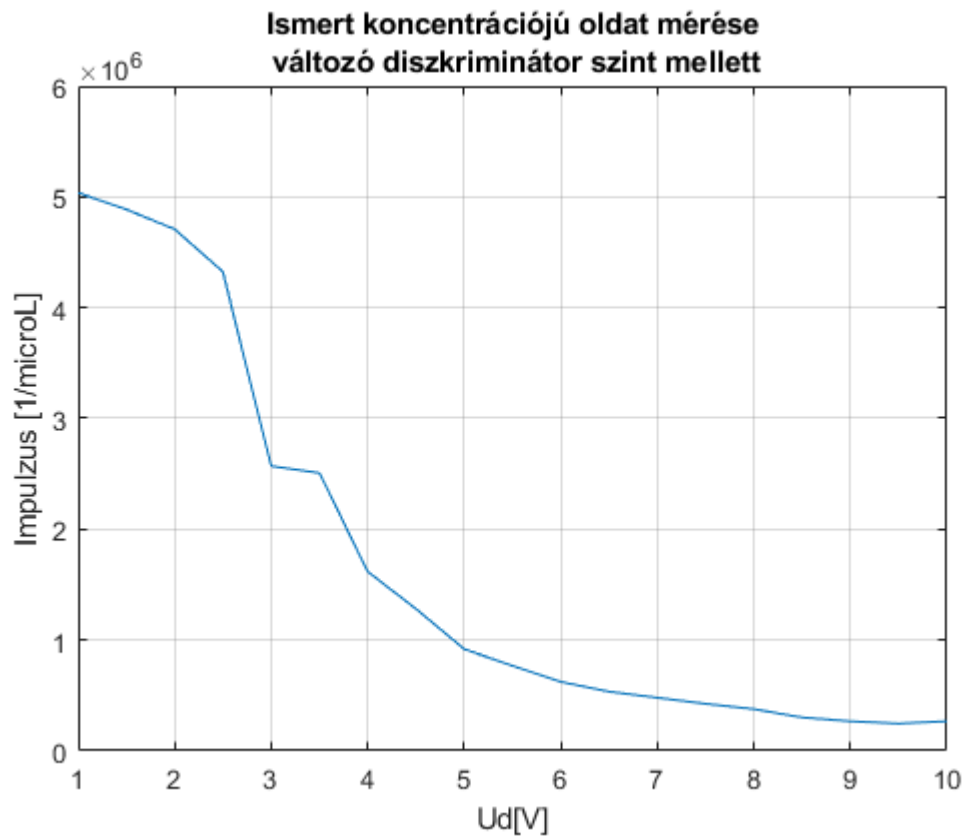
```
meres2{:, "atlag_tenyleges"} = meres2{:, "atlag"} * h * 10^4;
```

```
disp(meres2)
```

<u>IDSzint</u>	<u>első</u>	<u>masodik</u>	<u>Ud</u>	<u>atlag</u>	<u>atlag_tenyleges</u>	<u>difference</u>
10	367	368	1	367.5	5.0372e+06	0
15	351	362	1.5	356.5	4.8864e+06	1.5077e+05
20	345	342	2	343.5	4.7082e+06	1.7819e+05
25	309	322	2.5	315.5	4.3244e+06	3.8379e+05
30	152	223	3	187.5	2.57e+06	1.7544e+06
35	178	188	3.5	183	2.5083e+06	61680
40	122	114	4	118	1.6174e+06	8.9093e+05
45	90	97	4.5	93.5	1.2816e+06	3.3581e+05
50	66	68	5	67	9.1834e+05	3.6323e+05
55	54	58	5.5	56	7.6757e+05	1.5077e+05
60	44	47	6	45.5	6.2365e+05	1.4392e+05
65	37	41	6.5	39	5.3456e+05	89093
70	36	34	7	35	4.7973e+05	54827
75	31	31	7.5	31	4.2491e+05	54827
80	27	28	8	27.5	3.7693e+05	47973
85	22	22	8.5	22	3.0155e+05	75387
90	19	20	9	19.5	2.6728e+05	34267
95	19	17	9.5	18	2.4672e+05	20560
100	21	18	10	19.5	2.6728e+05	0

A kapott értékeket pedig ábrázoltuk:

```
figure
plot(meres2.Ud, meres2.atlag_tenyleges)
title({'Ismert koncentrációjú oldat mérése'; ' változó diszkriminátor szint mellett'})
xlabel('Ud[V]')
ylabel('Impulzus [1/microL]')
grid on
```



Ezután a különböző diszkriminátor szintek különbségeit számoltuk és ez alapján állítottunk elő egy gyakorisági eloszlást.

```

meres2.difference = zeros(length(meres2.atlag_tenyleges),1);
for i = 2:length(meres2.atlag_tenyleges)-1
    meres2.difference(i) = (meres2.atlag_tenyleges(i-1) - meres2.atlag_tenyleges(i));
end
disp(meres2(:, "difference"))

```

difference

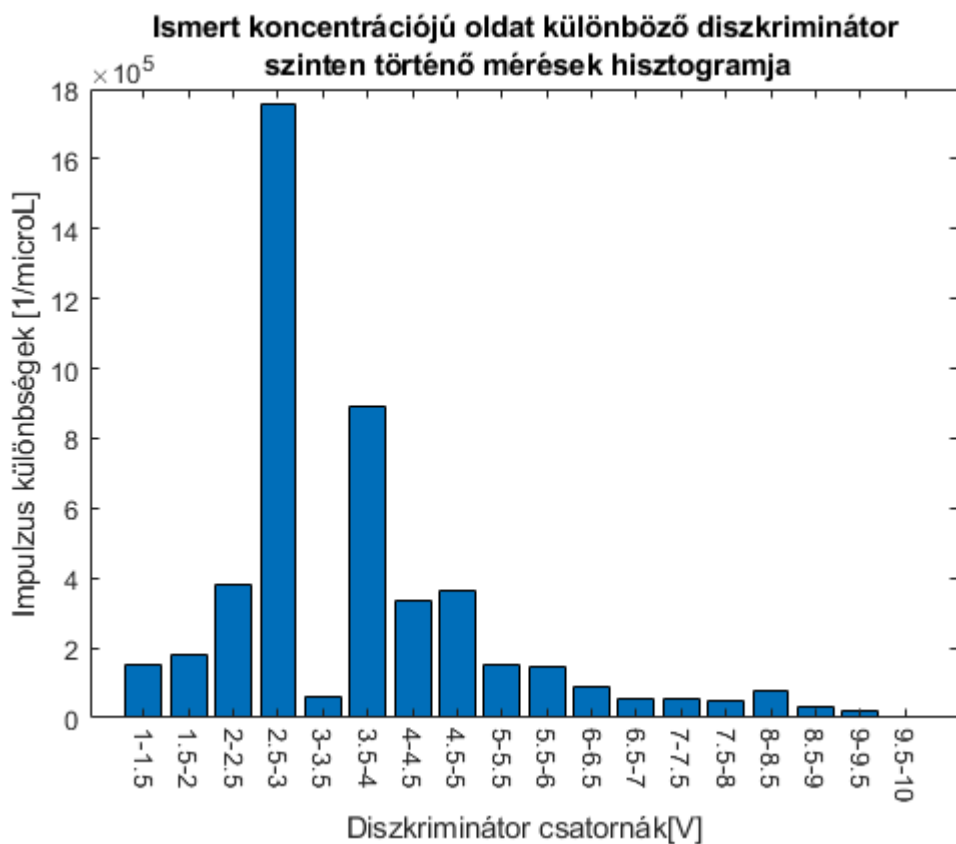
```

_____
0
1.5077e+05
1.7819e+05
3.8379e+05
1.7544e+06
61680
8.9093e+05
3.3581e+05
3.6323e+05
1.5077e+05
1.4392e+05
89093
54827
54827
47973
75387
34267
20560
0

```

Majd ezt is ábráztuk:

```
figure
bar(meres2.Ud(2:end),meres2.difference(2:end))
xticks(meres2.Ud(2:end))
xticklabels({'1-1.5','1.5-2','2-2.5','2.5-3','3-3.5','3.5-4','4-4.5','4.5-5','5-5.5','5.5-6','6-6.5','6.5-7','7-7.5','7.5-8','8-8.5','8.5-9','9-9.5','9.5-10'})
xtickangle(-90)
title({'Ismert koncentrációjú oldat különböző diszkriminátor'; 'szinten történő mérések hisztogramja'})
xlabel('Diszkriminátor csatornák[V]')
ylabel('Impulzus különbségek [1/microL]')
```



A mérés elég nagy hibával végezhető, az idő rövidségére való tekintettel ennek ellenére csak két mérést volt lehetőségünk elvégezni. A számok sajnos elég bizonytalanok.