



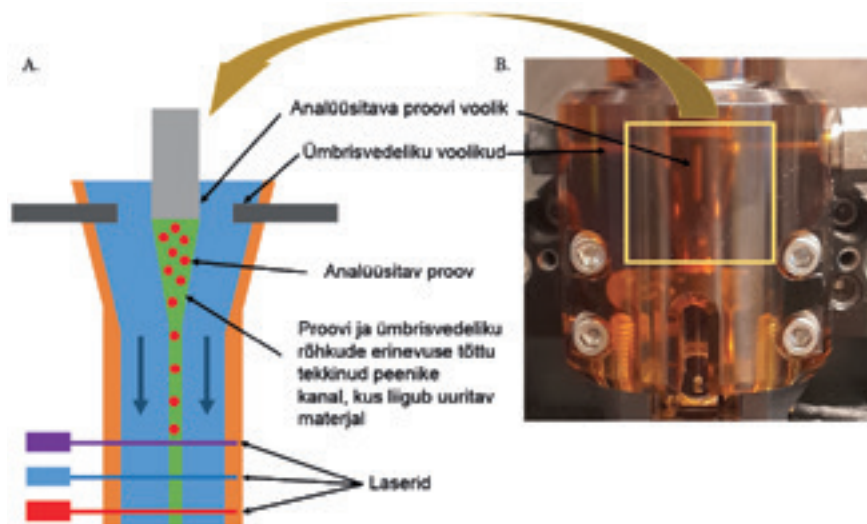
ponendist: vedelikuosast (ingl *fluidics*) ning optilisest ja elektroonilisest osast. Vedelikuosast kuuluvad tavaliselt kompressor või peristaltiline pump ja eri klappide võrgustik ning vedelikuosa põhiülesanne on toimetada proov punkti, kus neid saab laseriga uurida. Optiline osa koosneb laseritest ja optilistest filtritest. Fotokordistitest, analoog-digitaalsetest muunduritest ja arvutist koosnev elektrooniline osa mõõdab fluorestsentsi intensiivsust, annab sellele numbrilise väärtuse ning esitab tulemuse graafiliselt.

Tänapäeval töötavad kõik läbivoolu-tsütöfluorimeetrid vedelikega. Selleks et masin väljastaks õige tulemuse, peab analüüsivat materjali (näiteks rakke) uurima üksikhaaval. Teisisõnu, igal ajahetkel võib olla laserikiire teel ainult üks rakk korraga.

Et mõista, kuidas FACS sellega hakkama saab, tasub vaadelda näidet looduse kohta. Kujutage ette, et mägede vahel voolab lai jõgi. Vee peal ujub mitukümmend palli. Pallid on eri värvusega: sinised, rohelised ja punased. Nad ujuvad ühe rühmana, kus eri värvusega pallid paiknevad segamini. Kui jõe vooluteele tekib kitsaskoht, näiteks mäed asuvad üksteisele väga lähedal, muutub lai jõgi selles piirkonnas kitsaks ojak. Ahta oja veevoolus saab olla ainult üks pall korraga. Mõne aja möödudes on kõik pallid üksikhaaval kitsa koha siiski läbinud. Läbivoolu-tsütöfluorimeeter toimib samalaadse põhimõtte alusel. FACS-is on lehtrikujuline küvett (◇ 2).

Küvetti pumbatakse ümbrisvedelik, mille joa keskel paikneb analüüsiv proov. Proovile mõjuva kõrgema rõhu tõttu on proovivedeliku voolukiirus suurem kui ümbritsevale vedelikuvoole mõjuv rõhk. Seepärast tekib ümbrisvedeliku sees väikese läbimõõduga kanal (vt ◇ 2). Mida suurem on proovile mõjuv rõhk, seda laiemaks muutub küvetti läbiva kanali diameeter, kuid üldjuhul eeldab kanali laius, et proovis olevad rakud saavad selle läbida ainult reas üksteise järel.

Läbivoolu-tsütöfluorimeetriga



◇ 2. FACS-i ehk läbivoolu-tsütöfluorimeetri küvetti skeem (A) ja tegelik kujutis (B)

analüüsivat materjal on enamasti märgistatud fluorestsentsvärvidega. Kasutusel on nii „vabad“ värvid, nagu näiteks DNA-ga seotud värv DAPI, kui ka antikehadega seotud värvid, millega saab märgistada kindlaid valke raku pinnal või sees. Igal juhul tuleb fluorestsentsisignaali saamiseks fluorokroomide ergastada ja seda otsustavalt täidavad masinasse sisse ehitatud laserid. Kuna analüüsivate fluo-

**Esimene läbivoolu-tsütomeeter tehti teise maailmasõja ajal, kui Ameerika sõjaväel tekkis vajadus õhuproovidest kiiresti avastada, kas on kasutatud bioloogilist relva.**

restsentsvärvide valik on väga lai ja nende ergastamisspektrid mõneti erinevad, on tsütöfluorimeetritel enamasti mitu laserit. Üldjuhul võib neid olla kuni kolm, kuid kõige võimsamad analüsaatorid sisaldavad kuni seitse laserit ja võimaldavad tuvastada igal uuritava rakul kuni 27 fluorokroomi.

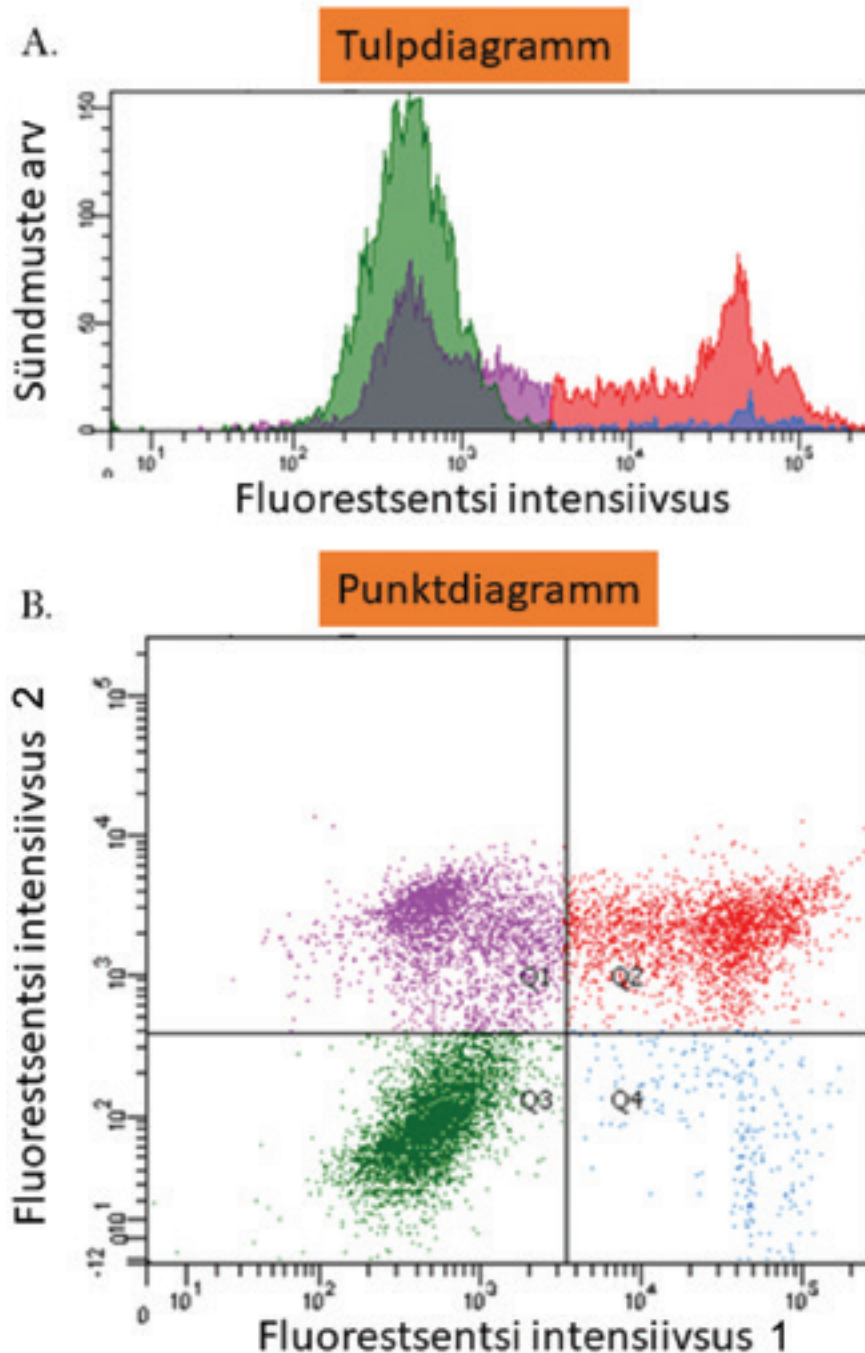
Laserite kiirus on fookustatud küvetti keskele niimoodi, et iga raku valgustab ühel hetkel ainult üks laser. Selline joondamine võimaldab tuvastada kõiki rakuga seostunud fluorokroomide ning eraldi analüüsida igat proovis olevat raku. Pärast

fluorokroomide ergastamist saadud fluorestsentsisignaale suunatakse optiliste fiibritega fotokordistitesse. Selleks et eri värvussignaale oleks võimalik üksteisest eristada, paikneb iga detektori ees optiline filter. Teiste sõnadega, ühes eksperimendis vastab igale fluorokroomile vaid üks detektor. Näiteks, kui analüüsivad rakud on värvitud kümne fluorokroomiga, peab läbivoolu-tsütöfluorimeetril olema vähemalt kümme fotokordistit.

Fotoelektronkordistisse saabuvad footonid, kuid fotokordistist väljuvad elektronid. Mida rohkem footoneid siseneb, seda rohkem elektrone väljub. See tähendab, et olenevalt fluorestsentsi intensiivsusest tekib detektoril suurem või väiksem pinge. Pinge muutusi loendab analoog-digitaalne muundur ja annab neile vastavad numbrilised väärtused.

Sel viisil saab eri värvide fluorestsentsiintensiivsus erinevad digitaalsed numbrid. Signaal tabatakse väga kiiresti ja moodsad aparatuurid võimaldavad analüüsida kuni 70 000 raku sekundis. Kui nüüd tulla tagasi artikli alguses toodud näite juurde ja arvutada, kui palju aega kuulub 100 haruldase raku loendamiseks (sagedus 1 : 1 000 000), siis ilmneb, et tsütöfluorimeeter saab sellega hakkama ainult 24 minutiga.

Nagu öeldud, annab läbivoolu-tsütöfluorimeeter fluorestsentsi intensiivsusele numbrilised väärtused,



◇ 3. FACS-i tulpdiagrammid (A) ja punktdiagrammid (B), mille kasutamise valik oleb tihti sellest, kui palju on katses fluorokroome, mida on vaja eristada

mida saab visualiseerida graafikute-na. Niiviisi on võimalik rakke teatud parameetrite järgi eristada. Seda on vaja nii baasteadustes kui ka meditsiinipraktikas, et näiteks teha kiiresti kindlaks patsiendi teatud raku- de arv.

Andmeid analüüsitakse kahte tüüpi graafikute kujul: tulpdiagrammid (ingl *histograms*) ja punktdiagrammid (ingl *dot-plots*). Kui uuritavaid rakke värvida ainult ühe vär-

viga, siis kasutakse tulemuste visualiseerimiseks tulpdiagramme, mille X-teljel on ühe kindla fluorokroomi fluorestsentsiintensiivsuse numbrid ja Y-teljel sündmuste arv, st rakkude arv, kui analüüsitakse helenduvaid rakke (vt ◇ 3A).

Juhul kui analüüsitavad rakud on värvitud vähemalt kahe fluorokroomiga, on tulemusi mugavam analüüsida punktdiagrammide kujul (vt # 3B). Punktdiagrammi telgedel on

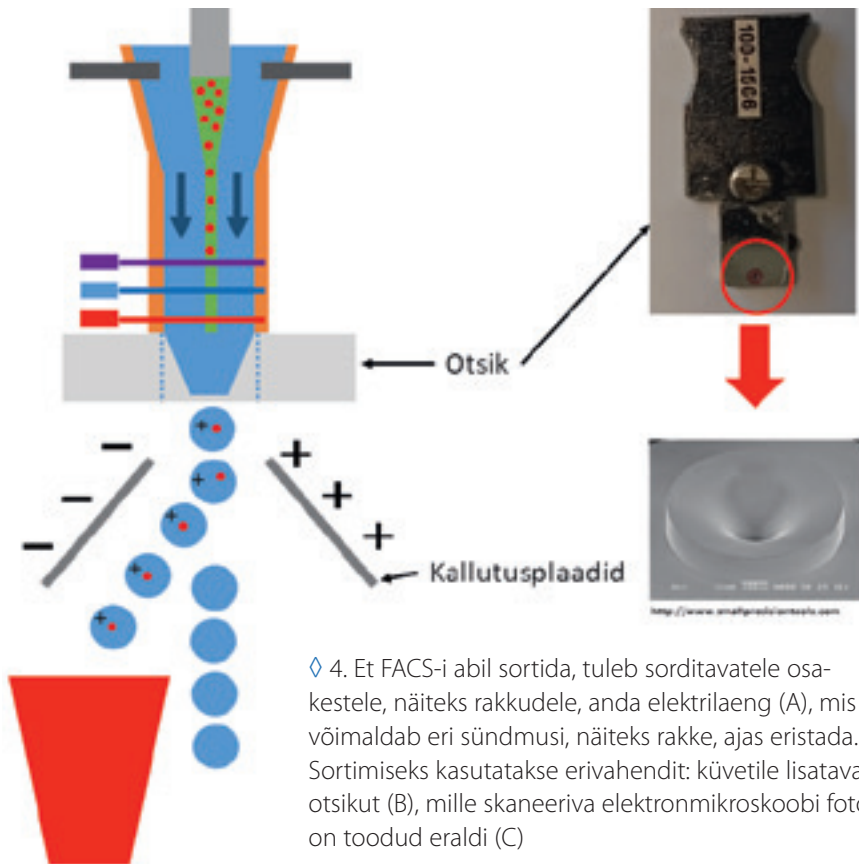
kahe värvi fluorestsentsi-intensiivsus, mis tähendab, et ühe graafiku peal näeb kahe värvi tulemusi korraga. Tulpdiagrammi peal moodustavad sarnased sündmused kүүru, ent punktdiagrammil näevad sarnaste rakkude kogumid välja pilvena. Statistiliste andmete saamiseks joonistatakse analüüsiprogrammides pilvede ümber n-ö väravad (vt ◇ 3B mustad jooned ja väravad Q1–Q4). Iga rakupopulatsiooni kohta saadakse tulemus eraldi.

Kuigi punktdiagrammi on mugav kasutada, võib mitmevärvilist eksperimenti analüüs olla väga keeruline. Juhul kui katses kasutatakse kahte värvi, piisab ainult ühest punktdiagrammist. Kolme värvi korral läheb vaja kahte punktdiagrammi, nelja värvi korral aga kuut graafilist joonist. Kümne fluorestsentsmärgisega rakukogumi analüüsimiseks tuleb koostada tervelt 45 punktdiagrammi.

Läbivoolu-tsütofluorimeetrial on veel üks oluline otstarve: sortida rakke. Selleks peavad FACS-il olema erilised liseseadmed, mis võimaldavad muuta küvetist väljuva pideva joa tilgaliseks, rakendada tilkadele elektrilaenguid ja suunata neid tugeva elektrivälja abil kõrvale (vt ◇ 4A).

Rakusorterites (ingl *cell sorter*) paigaldatakse küveti alla eriline otsik (ingl *nozzle*), mille kuju soodustab tilkade teket (vt ◇ 4B ja 4C). Ühekaupa reastatud rakud satuvad tilkadesse. Kui rakkude ja tilkade suhe on optimaalne, tekib olukord, kus igas üksikus tilgas saab registreerida ainult ühe raku.

Väga tähtis on aru saada, et kõigepealt tabatakse fluorestsentsisignaali ning alles pärast seda muutub koonusjast küvetist lähtuv rakke sisaldav juga tilgakujuliseks. See joondamine võimaldab häälestada rakusorteri nii, et masin teab täpselt, milline rakk millises tilgas paikneb. Kasutaja valib/asetab rakkude sortimiseks vajalikke rakke tulp- või punktdiagrammi põhjal analüüsides vastava (teadlast huvitava) rakukogumi ümber väravad ehk piirid. Kui laseri teele jääva tilga sisse satub õige rakk, annab masin sellele laengu. Laetud tilk satub kahe kallu-



tusplaadi vahele. Mõlemad metallplaadid on püsivalt laetud, kuid ühel on positiivne ja teisel negatiivne

laeng. Positiivselt laetud tilgad kallutatakse negatiivselt laetud plaadi poole ja vastupidi. Mida suurem on

tilga laeng, seda rohkem kaldub tilk vastava plaadi suunas.

Muutes tilkade laengu polaarsust (positiivne või negatiivne) ja tugevust, saab korraga sortida kuni kuus rakupopulatsiooni kuues suunas. Laeng antakse rakkudele väga kiiresti ning ajakohased instrumentid lubavad sortida isegi kuni 40 000 raku sekundis. Et tagada uuritava proovi korrektsus, piiratakse sortimise kiirust: kuni 5000 sündmust sekundis.

Rakkude sortimine kas kuju, suuruse või pinnamarkerite järgi on vajalik selleks, et lahendada teaduslikke probleeme nii hematoloogias, tsütogeneetikas kui ka tüvirakkude uurimisel. Samas annab võimalus rakke sortida meedikutele vabamad käed, et näiteks eraldada patsiendi vereseerumist pahaloomulisi rakke. ■

**Dmitri Lubenets** (1981) on rakubioloog, Tartu ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi insener.

**Sulev Kuuse** (1962) on rakubioloog, Tartu ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi vivaariumi juhataja.

**Toivo Maimets** (1957) on Tartu ülikooli rakubioloogia professor.

# Laika matkaautode müük, rent ja teenindus

Müügil ka laias valikus matkaautode lisavarustust!

Iv Pluss TALLINN Pärnu mnt 556, Laagri 677 9060 myyk@ivpluss.ee

Iv Pluss TARTU Ilmatsalu põik 3 740 90 66 tartu@ivpluss.ee



Iv Pluss AS

