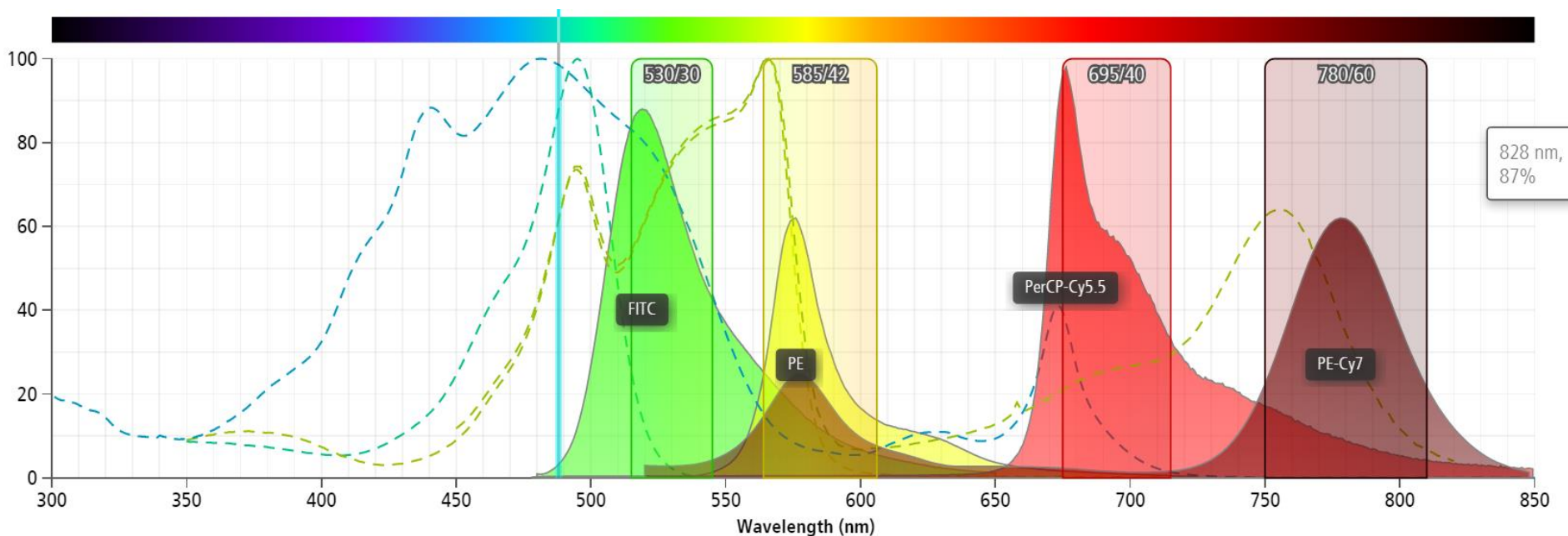
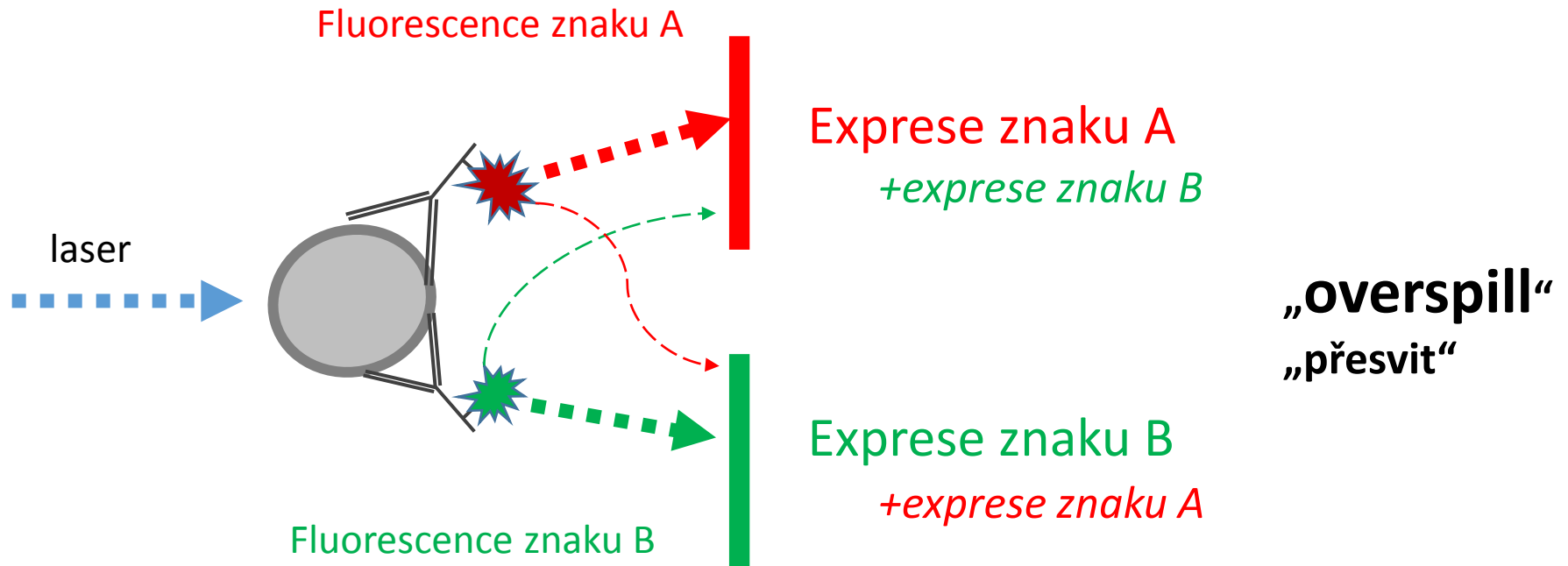


Kompenzace v průtokové cytometrii

Michaela Nováková



Proč musíme kompenzovat?

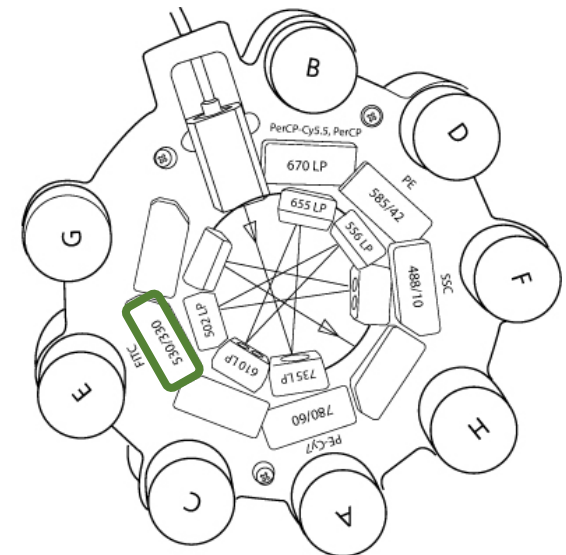
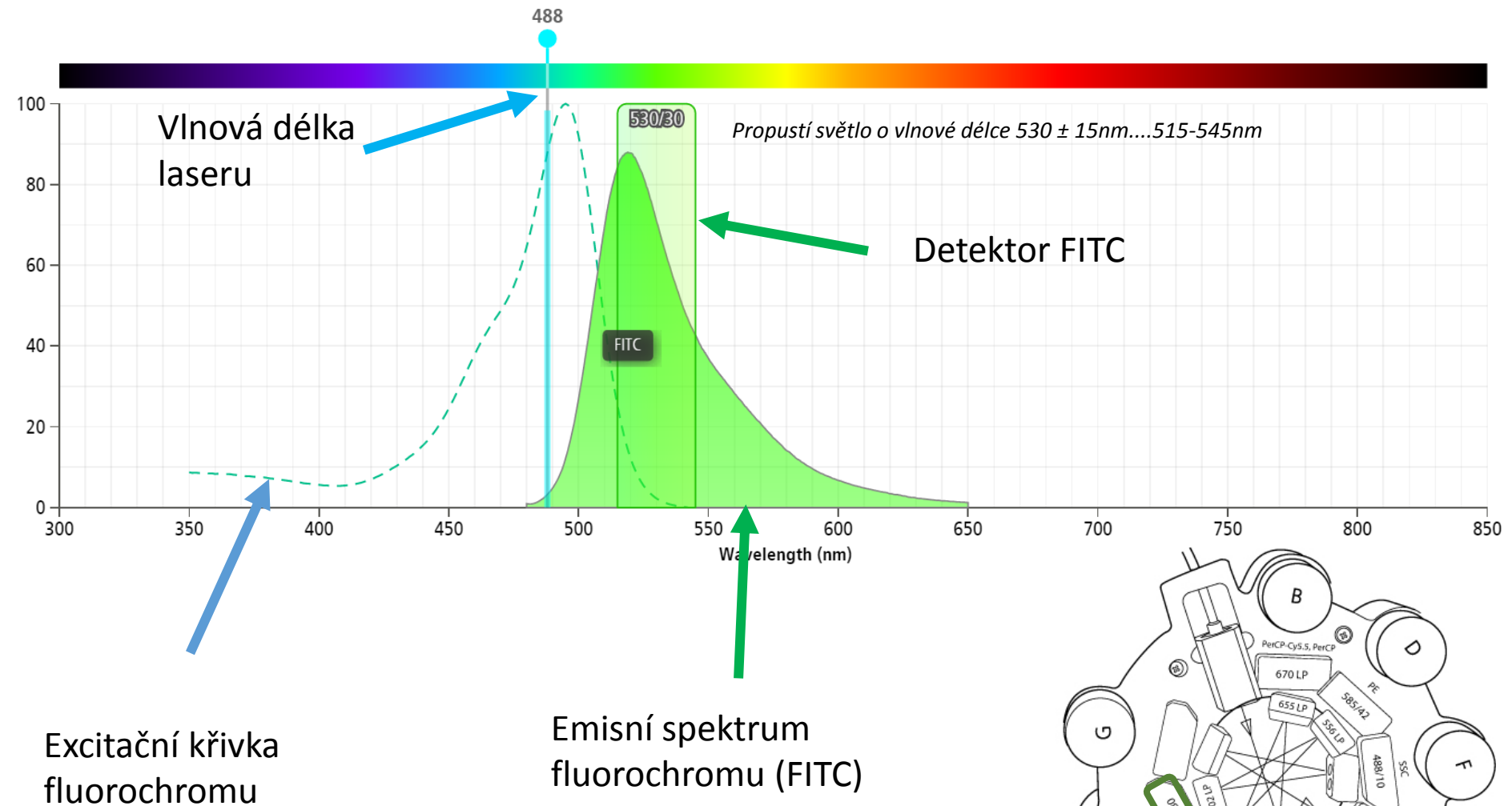


- (bohužel) neplatí, že signál jediného fluorochromu detekujeme na jediném detektoru
- abychom se s tímto problémem vyrovnali (a věděli, odkud pochází signál), musíme tomu:
 - rozumět
 - umět předcházet
 - umět data matematicky upravit (kompenzovat)

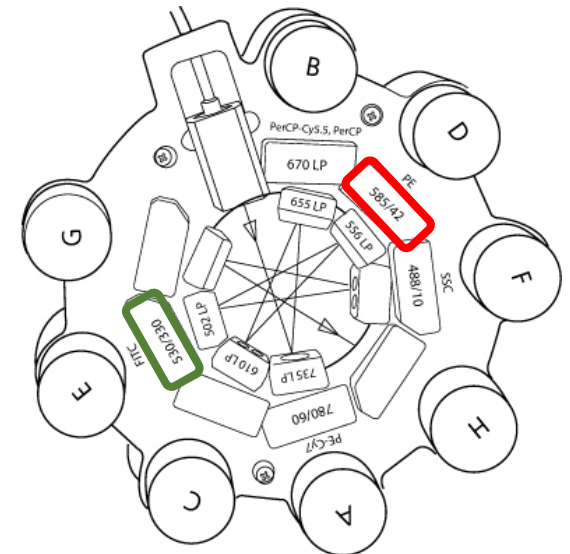
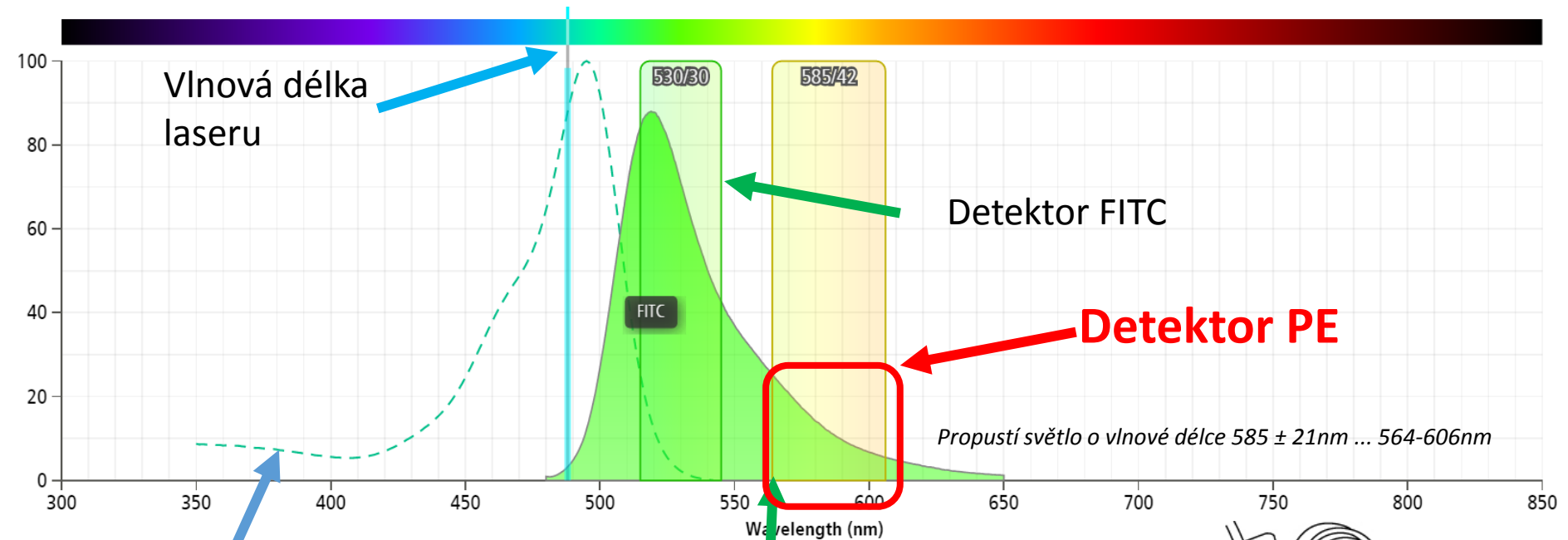
Jak vzniká „nechtěný“ signál?

- emise fluorochromu detekována sousedními detektory
- „zbytková“ fluorescence tandemu
- stejné emisní spektrum při cross laserové excitaci

Spektrum fluorochromu FITC



Co detekujeme v PE?

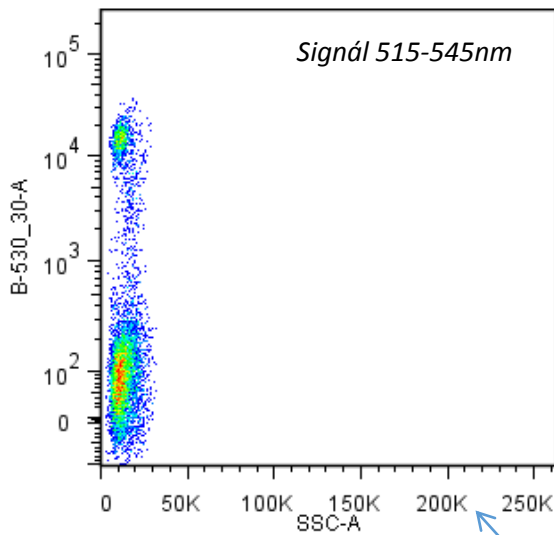


Část signálu je zachycena sousedním detektorem

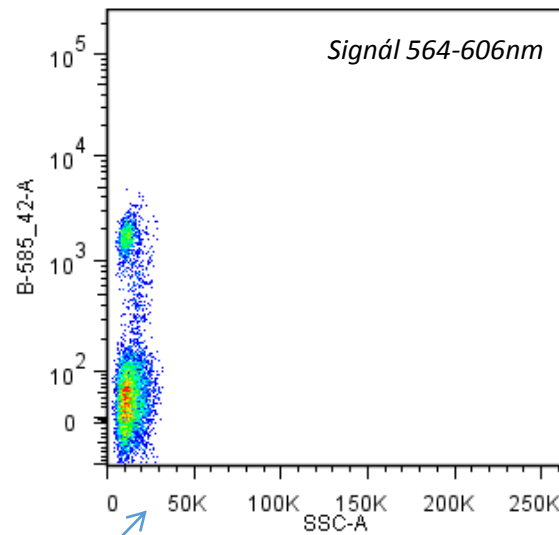
Jak vypadají neupravená (nekompenzovaná) data?

- Co se stane když změřím FITC?

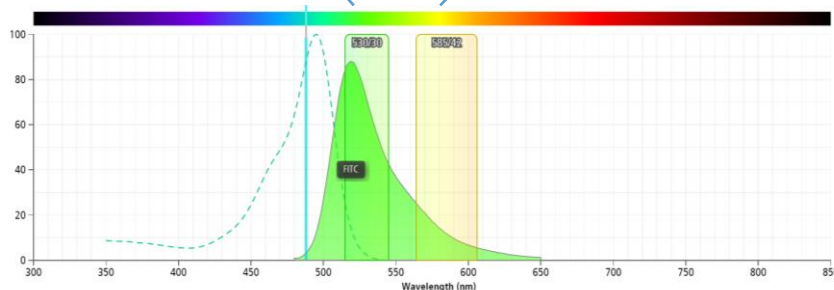
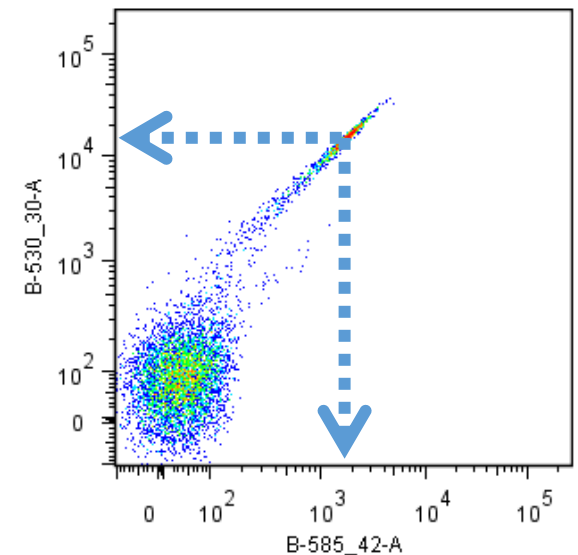
Detektor pro FITC



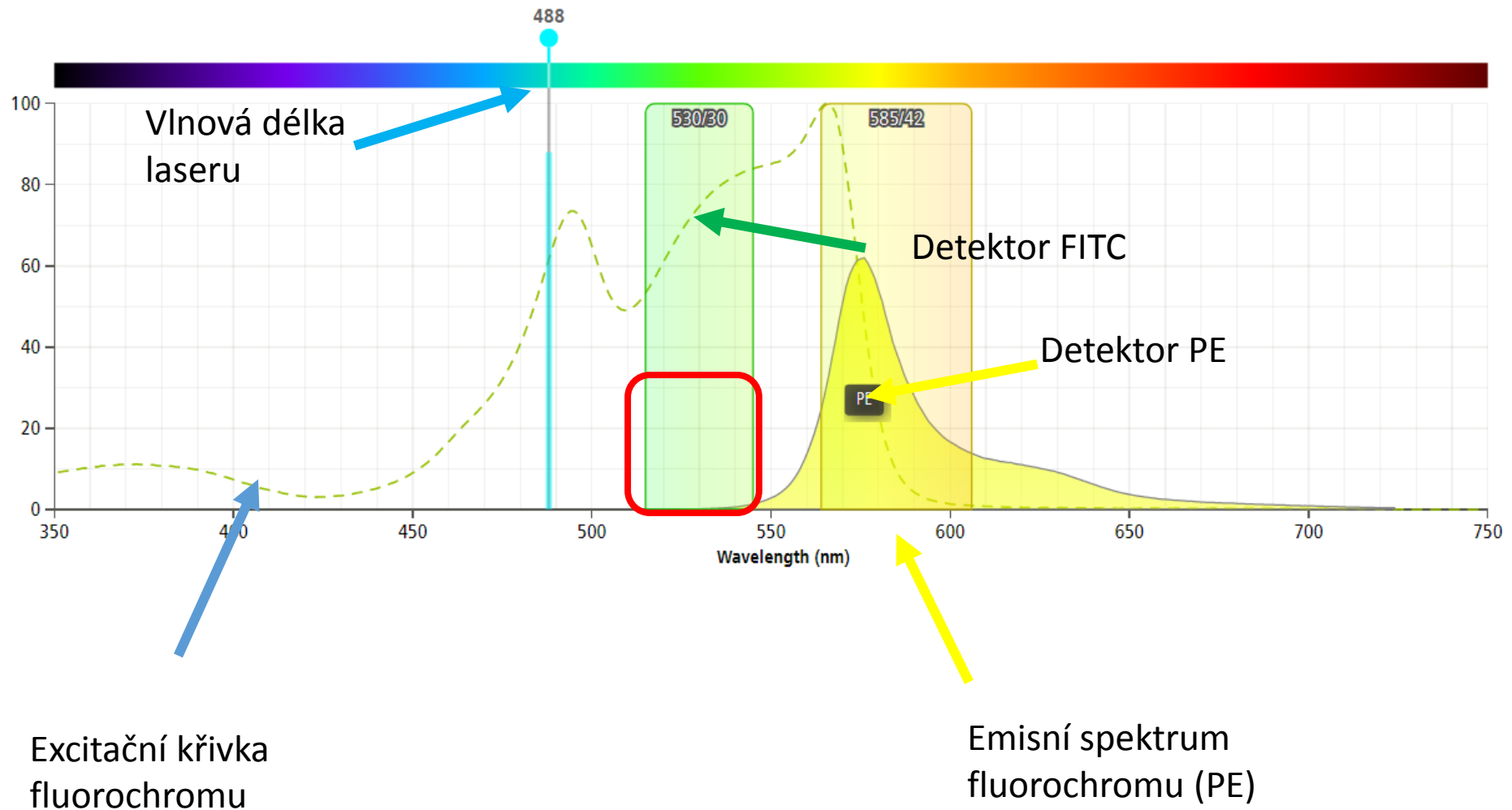
Detektor pro PE



FITC vs PE



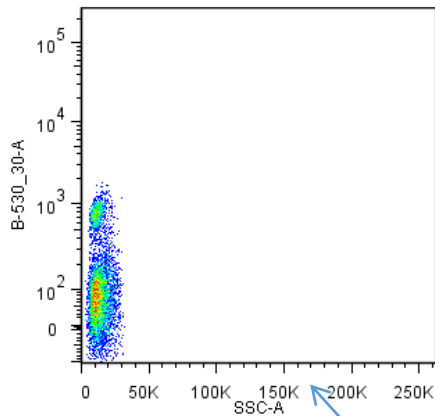
A obráceně?



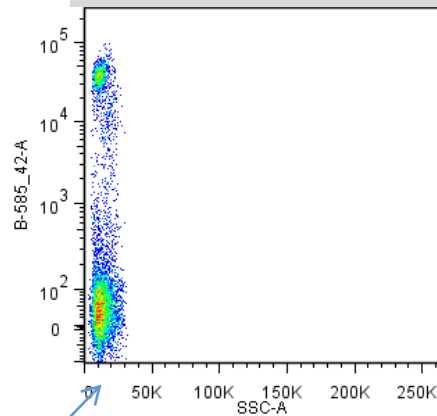
A když změříme PE?

- Co se stane když změřím PE?

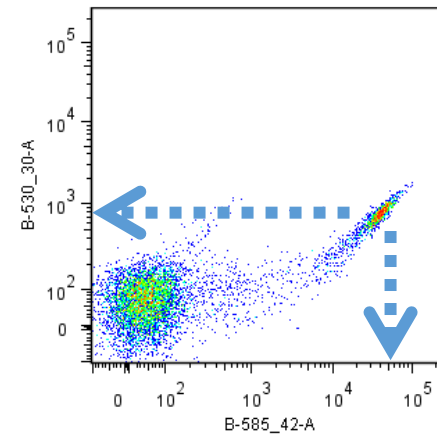
Detektor pro FITC



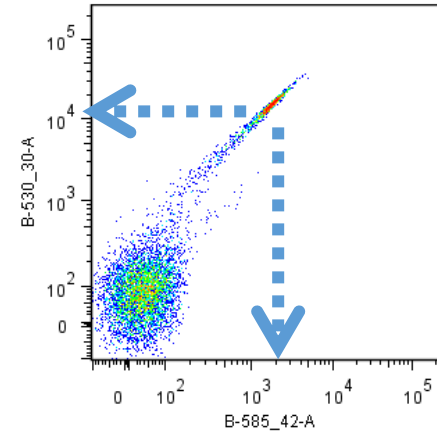
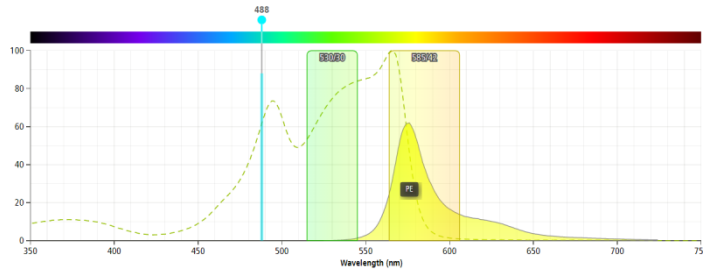
Detektor pro PE



FITC vs PE

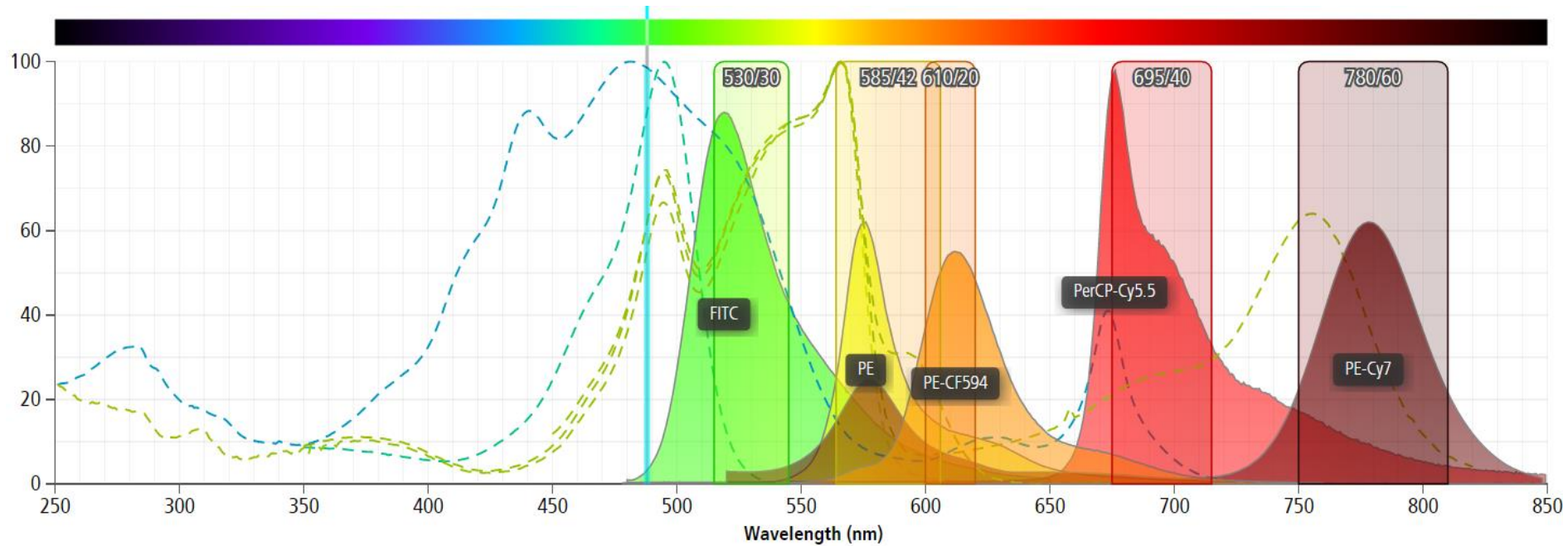


PE



FITC

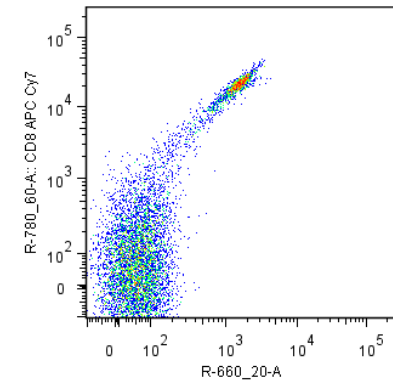
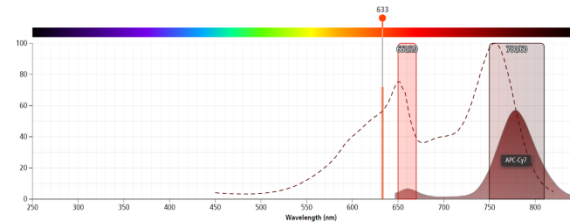
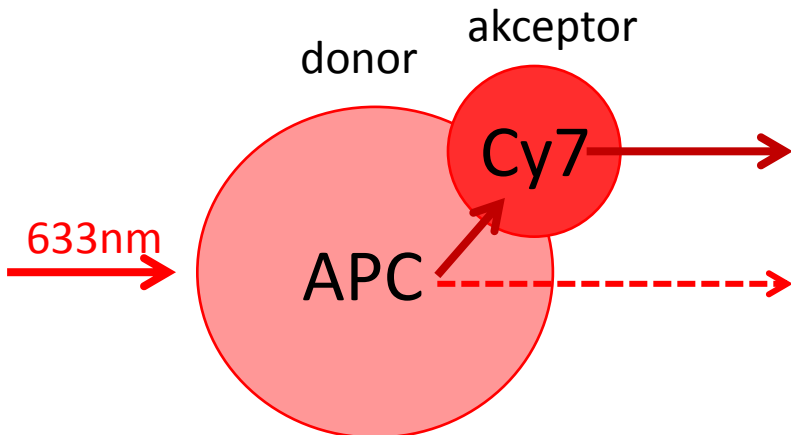
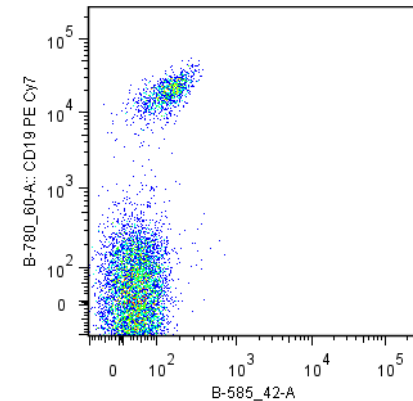
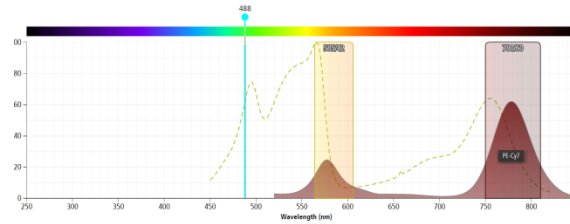
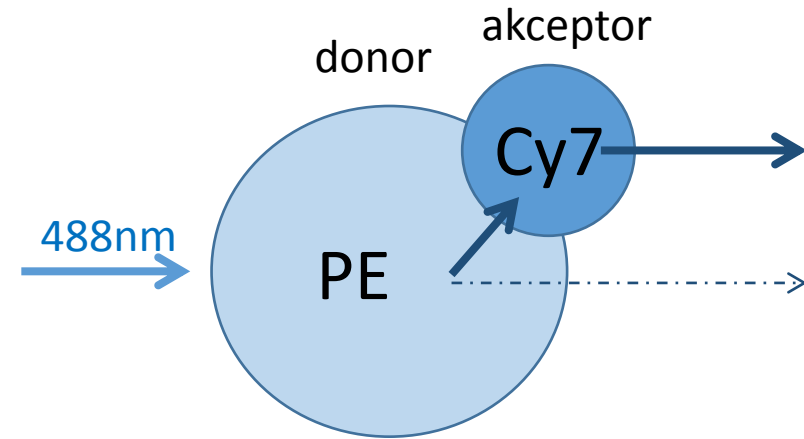
Realita mnohobarevného panelu



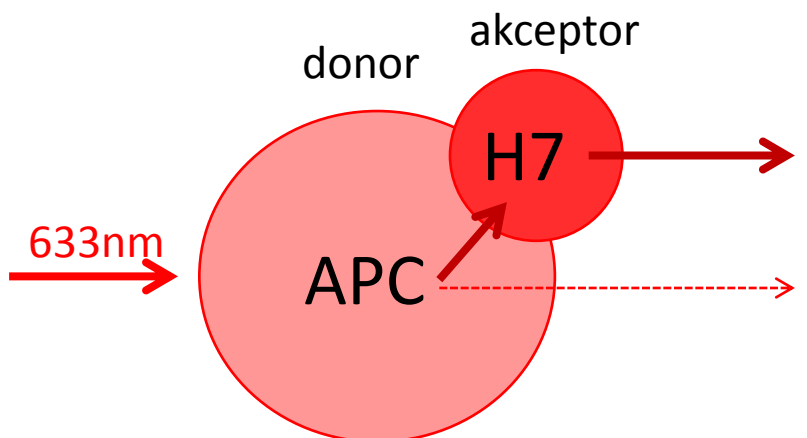
Jak vzniká „nechtěný“ signál?

- emise fluorochromu detekována sousedními detektory
- „zbytková“ fluorescence tandemu
- stejné emisní spektrum při cross laserové excitaci

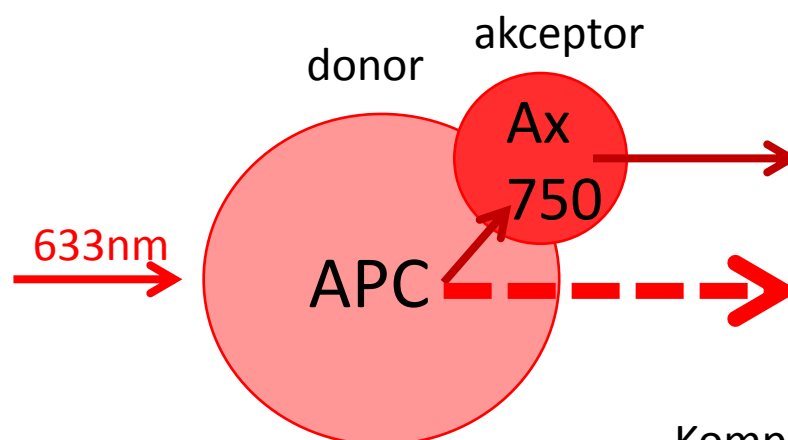
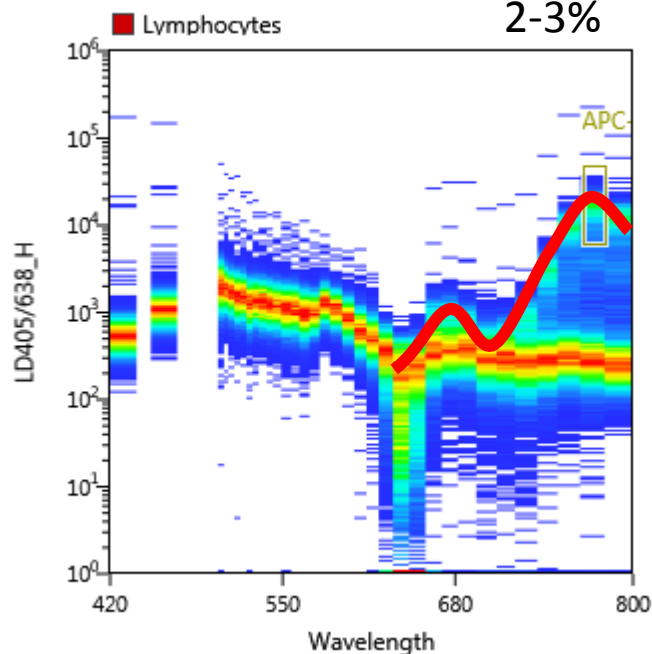
Co to je tandem?



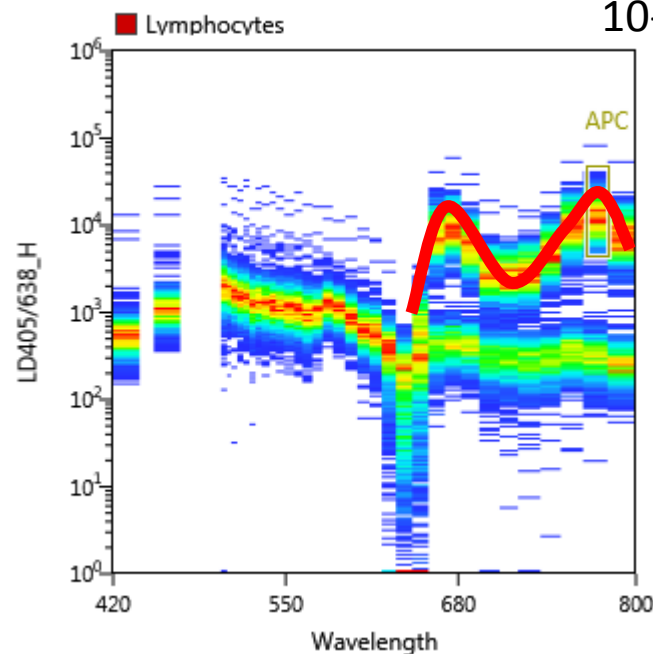
Není tandem jako tandem!



Kompenzace
2-3%



Kompenzace
10-15%



Rozdíly mezi tandemy

Variabilita mezi

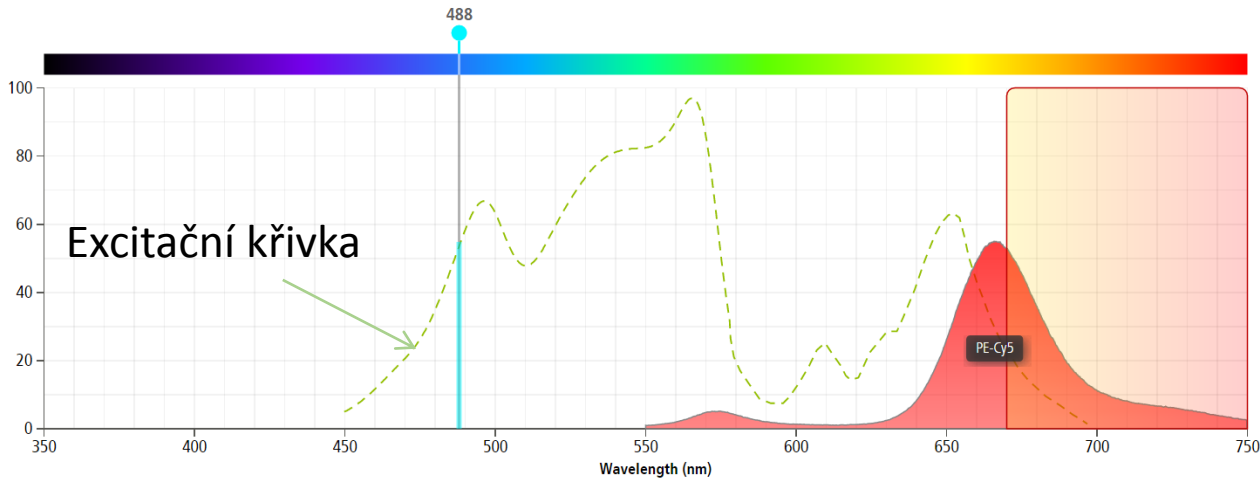
- jednotlivými konjugáty (např. APC-H7 vs APC-Ax750)
- jednotlivými protilátkami (např. CD8 APC-H7 vs CD45 APC-H7)
- jednotlivými šaržemi
- stejnou protilátkou po určité době používání (expozice světlu)

Jak vzniká „nechtěný“ signál?

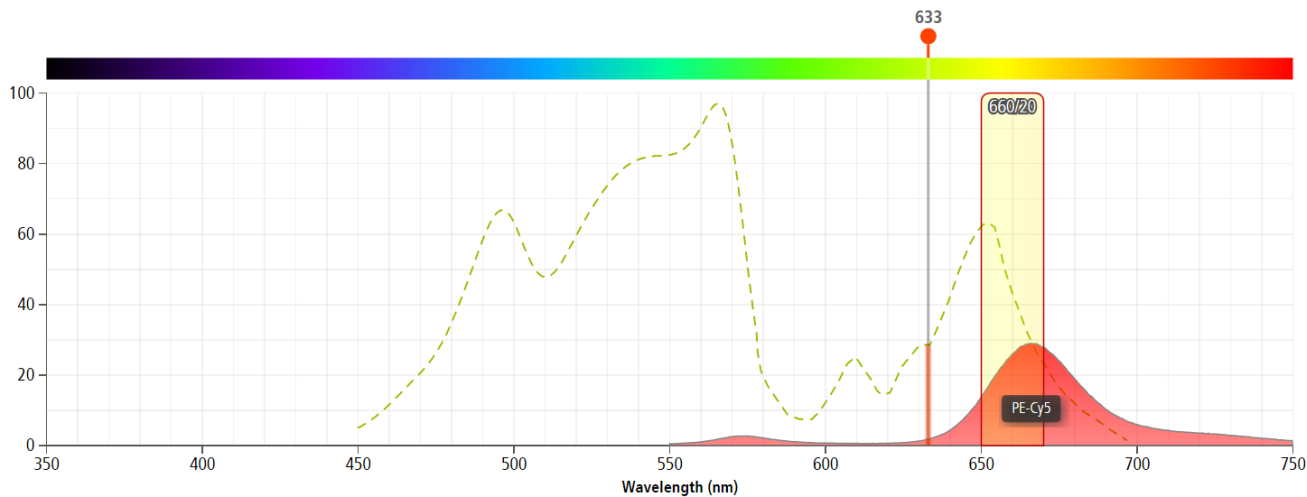
- emise fluorochromu detekována sousedními detektory
- „zbytková“ fluorescence tandemu
- stejné emisní spektrum při cross laserové excitaci

Cross laser excitace

PE-Cy5: excitace 488nm laser



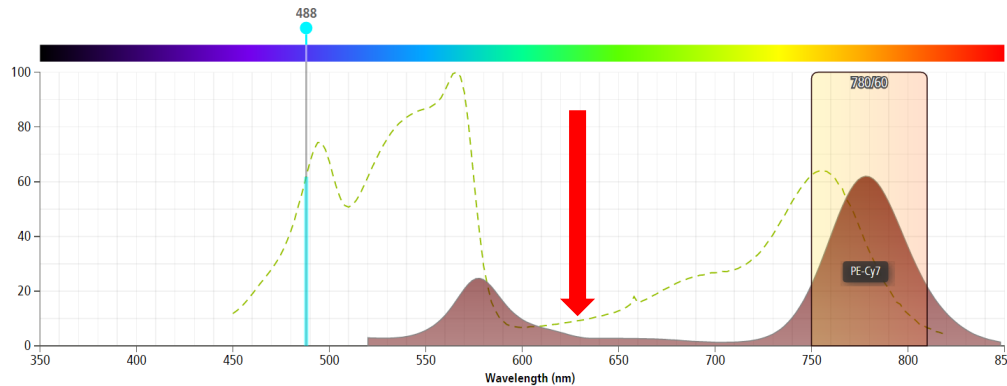
PE-Cy5: excitace 633nm laser



Cross laser excitace

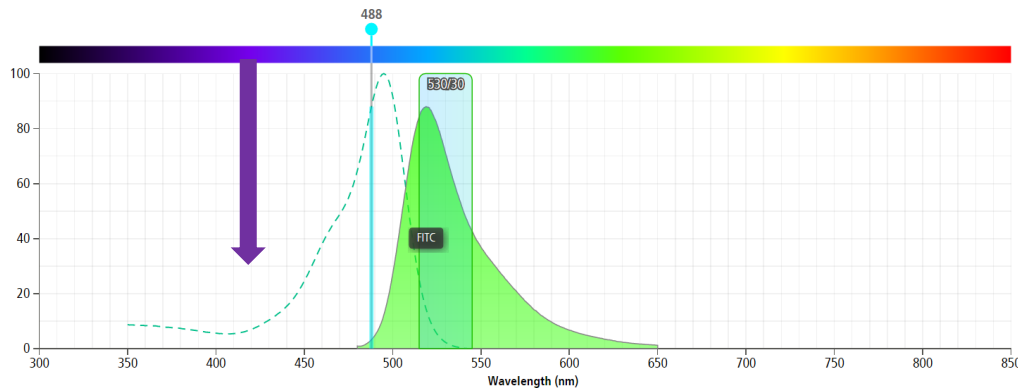
Týká se:

- Tandemů (excitace akceptoru)
 - Např. PE-Cy7: akceptor Cy7 excitace 633nm laserem



- Netandemů excitovatelných více lasery

- Např. FITC: malá excitace i 405nm laserem



Souhrn I

- Signál na detektoru vzniká jako souhrn signálů pocházejícího z fluorochromu, který na daném detektoru detekovat chceme, a přesvitů z ostatních fluorochromů
- Pro přesnou analýzu skutečné exprese daného znaku proto musíme tyto přesvity kompenzovat

SSM matrix

SSM													
☐ Show All	Display SSM	-A :: CD4 _APC H7-A :: C _APC-A :: CD4 _BV605-A :: CD _BV711-A :: CD _BV786-A :: CD _FITC-A :: CD4 _PB-A :: CD4 _PE Cy7-A :: C _PE-A :: CD4 _PO-A :: CD45 _PerCP Cy5-5-											
☒ _AF700-A :: CD4 _A	Export SSM	100	31,4238	0,3633	-0,1193	8,9575	4,6618	0,0439	0,0249	0,6664	0,0116	0	3,1447
☒ _APC H7-A :: CD4 _APC H7-A		2,2064	100	3,9639	-0,1734	0,1966	11,5958	0,0399	0,0526	2,0247	0	-0,1589	0,0934
☒ _APC-A :: CD4 _APC-A, _APC-A		26,1756	8,4527	100	0,2647	2,462	0,9041	0,004	19,1553	0,0867	0	3,1817	1,772
☒ _BV605-A :: CD45 _BV605-A, CD4 ...		0,0521	0,0175	0,1521	100	29,1942	9,9768	0,0059	11,7107	0,4796	1,5387	0,7258	8,4051
☒ _BV711-A :: CD45 _BV711-A, CD4 ...		38,2098	13,8561	0,4293	0,1018	100	52,4233	0,0071	15,5542	2,5887	0,002	1,0114	12,4818
☒ _BV786-A :: CD45 _BV786-A, CD4 ...		0,3573	8,055	0,0802	0,1774	3,8114	100	0,0126	10,6033	2,215	0,0063	0,7584	0,0501
☒ _FITC-A :: CD4 _FITC-A, _FITC-A		0	0	0,0152	0,5482	0	0	100	0,055	0,2258	13,9147	4,0889	5,916
☒ _PB-A :: CD4 _PB-A, _PB-A		0	0	0,0089	1,3919	0,0515	0	0,0114	100	0	0	16,9679	0
☒ _PE Cy7-A :: CD4 _PE Cy7-A		0,179	6,0103	0,1238	1,1041	0,5183	15,9191	0,1319	0,0133	100	6,0056	0	5,8636
☒ _PE-A :: CD4 _PE-A, _PE-A		0,0177	0	0,0344	18,9292	1,7845	0,3842	0,985	0,0221	2,373	100	0,214	61,668
☒ _PO-A :: CD45 _PO-A, _PO-A		0	0	0,0164	110,4148	21,2654	6,8462	0,3466	1,914	0	0,1946	100	0,1799
☒ _PerCP Cy5-5-A :: CD4 _PerCP Cy...		8,3206	3,1603	0,6324	-0,3295	17,676	6,86	0,0546	0,0258	9,5771	0,0699	-0,3303	100

Nguyen, Perfetto et al. Quantifying Spillover Spreading for Comparing Instrument Performance and Aiding in Multicolor Panel Design". Cytometry A. 2013.*This metric is intrinsic, as it is independent of fluorescence intensity. The combination of all such values for one instrument can be represented as a spillover spreading matrix (SSM)....*

SSM matrix	FITC	PE	PerCP Cy5-5	PE Cy7	APC	APC R700	APC H7	PacBlue	PacOrange	BV605	BV711	BV786
FITC	0.00	0.43	0.94	0.21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.25	0.12	0.27
PE	0.11	0.00	3.36	0.53	0.00	0.09	0.00	0.00	0.00	1.20	0.76	0.27
PerCP Cy5-5	0.07	0.07	0.00	1.00	0.28	1.06	0.49	0.00	0.00	0.00	1.20	0.95
PE Cy7	0.00	0.75	0.90	0.00	0.10	0.16	0.66	0.00	0.00	0.09	0.22	1.53
APC	0.00	0.00	0.43	0.12	0.00	1.95	0.88	0.00	0.00	0.00	0.35	0.34
APC R700	0.00	0.00	0.60	0.23	0.70	0.00	2.03	0.00	0.00	0.00	0.67	0.60
APC H7	0.00	0.00	0.00	0.39	0.72	0.55	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.04
PacBlue	0.34	0.20	0.71	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.69	0.58	0.35	0.29
PacOrange	0.28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.30	0.00	0.34	0.00	3.46	1.07	0.89
BV605	0.10	0.17	1.25	0.22	0.13	0.43	0.08	0.51	0.23	0.00	1.29	1.08
BV711	0.00	0.00	1.56	0.44	0.23	2.58	1.12	0.49	0.00	0.00	0.00	2.68
BV786	0.00	0.00	0.00	0.40	0.10	0.22	0.75	0.26	0.00	0.13	0.39	0.00

Jak data upravit?

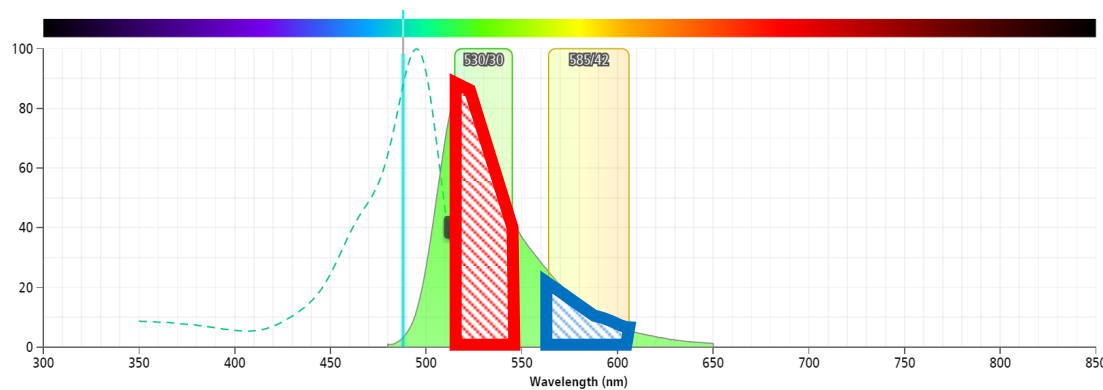
- emise fluorochromu detekována sousedními detektory
- „zbytková“ fluorescence tandemu
- stejné emisní spektrum při cross laserové excitaci



Není (až tak moc) důležité jak, ale co s tím!

Matematická korekce:

Na detektoru, do kterého fluorochrom přesvěcuje (PE), odečteme % signálu detekovaném na primárním detektoru (FITC)

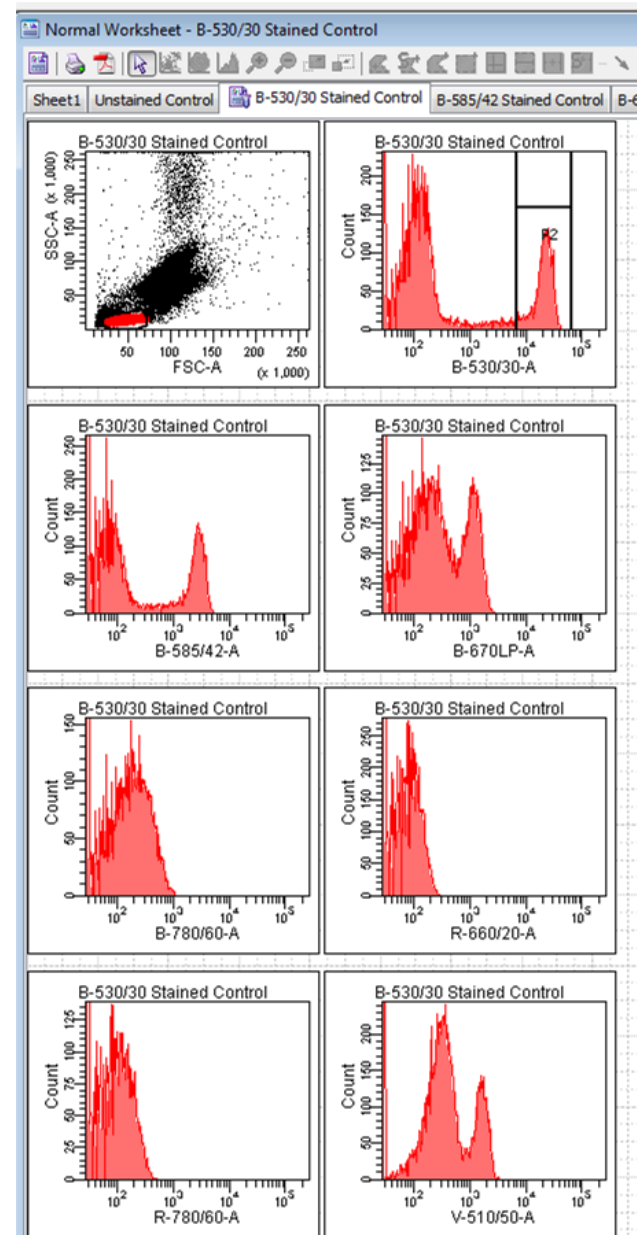
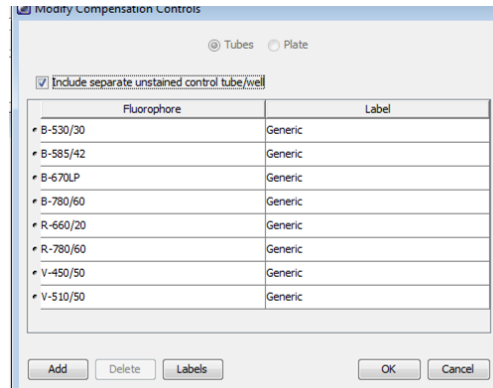
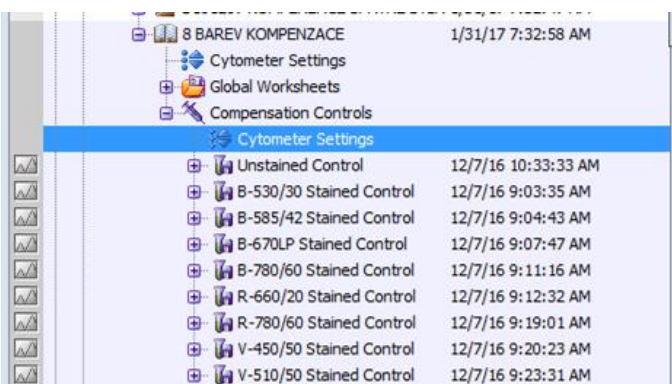


10-15%

Jak kompenzovat?

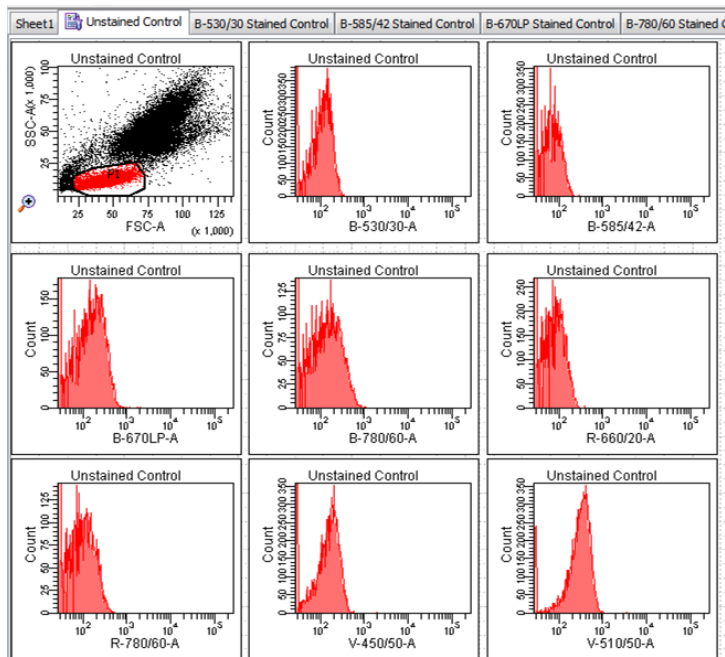
- Jednobarevné zkumavky:
 - Změříme přesvit fluorochromu na ostatní (nežádoucí) detektory (nehledě na to, jak vzniká)
- Kompenzace se spočítá tak, aby měl po kompenzaci (=procentuálního zmenšení signálu) medián pozitivní populace a negativní populace stejnou hodnotu MFI

Jak kompenzovat?



Neznačená zkumavka=stejný typ buněk, jako pozitivní kontrola!

Pozitivní kontrola:
Signál ve FITC je pravda
Ostatní signály jsou přesvit!



Výsledkem je matice

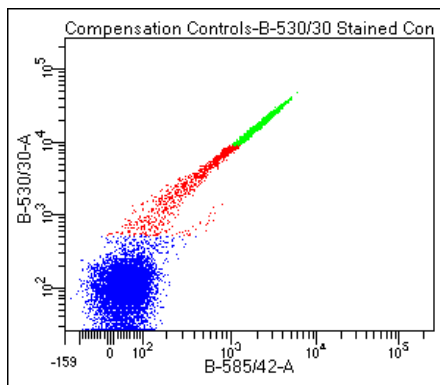
Do čeho svítí

Co svítí

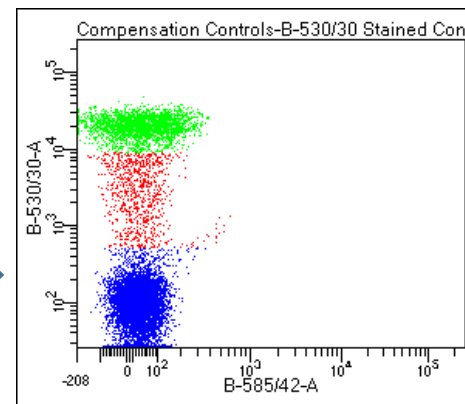
Parameter	Spectral Overlap	Cytometer							
%	B-530/30	B-585/42	B-670LP	B-780/60	R-660/20	R-780/60	V-450/50	V-510/50	
B-530/30	100.00	1.63	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.27
B-585/42	11.89	100.00	0.00	0.90	0.00	0.00	0.02	0.14	0.14
B-670LP	4.42	47.46	100.00	3.04	1.24	0.08	0.05	0.22	0.22
B-780/60	0.75	7.62	29.66	100.00	0.27	2.53	0.07	0.09	0.09
R-660/20	0.01	0.16	2.53	0.02	100.00	1.71	0.11	0.00	0.00
R-780/60	0.00	0.04	5.16	3.19	14.33	100.00	0.09	0.00	0.00
V-450/50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	1.65	1.65
V-510/50	5.62	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	25.34	100.00	100.00

Save Cancel

Např. FITC (B-530/30)
přesvěcuje do
detektoru pro
PE (B-585/42)
11.89%

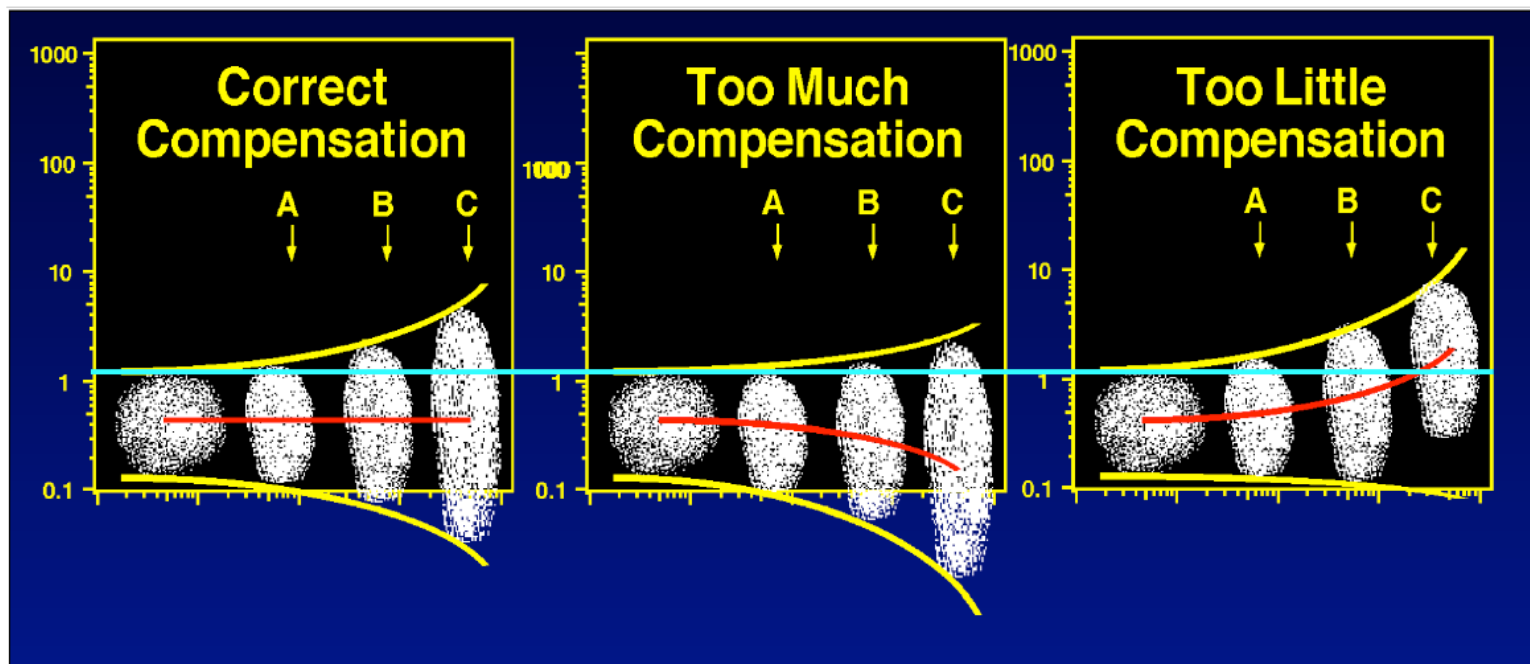


11.89%



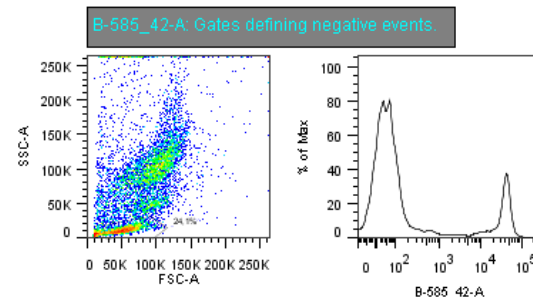
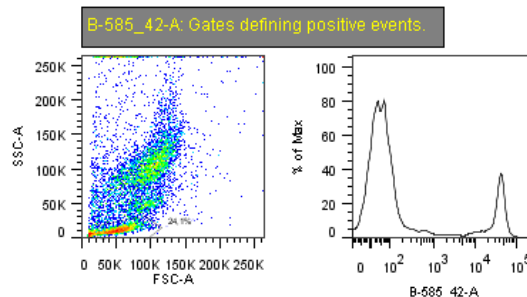
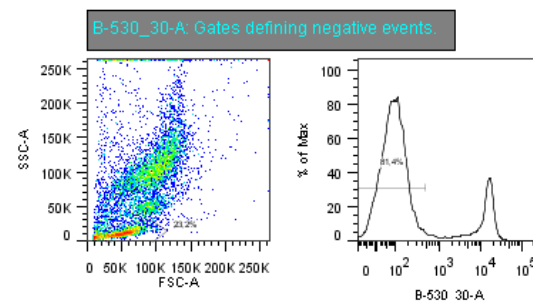
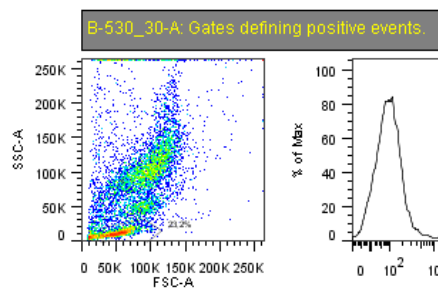
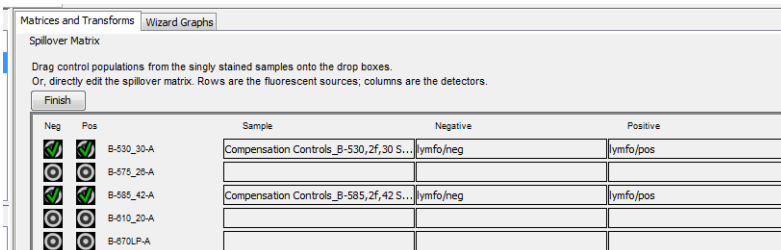
Na co nezapomenout

- Pro kompenzaci vybrat takové znaky, které jsou exprimovány alespoň tak silně, jako v experimentu
- Správná negativní kontrola – musí mít stejnou autofluorescenci



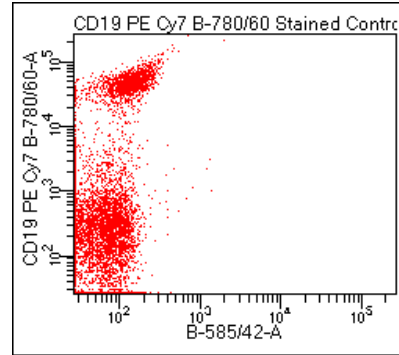
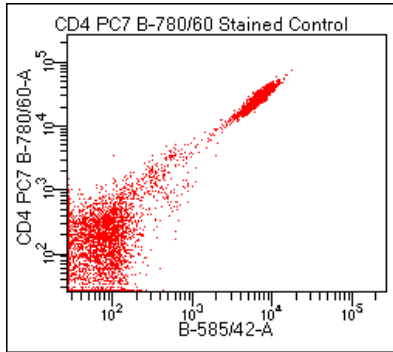
Souhrn II

- % kompenzace můžeme změřit pomocí jednobarevných zkumavek
- Hodnoty jsou spočítány tak, aby medián pozitivní a negativní populace byl stejný
- Spočítat kompenzaci umí BD Diva software, ale lze i dodatečně – FlowJo, Summit...

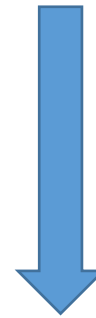


A jsme zpátky u tandemů

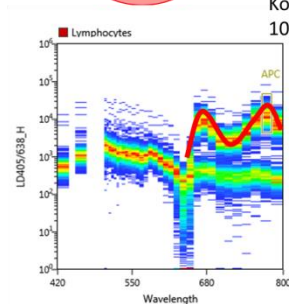
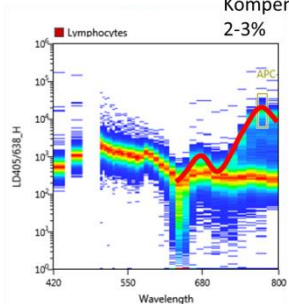
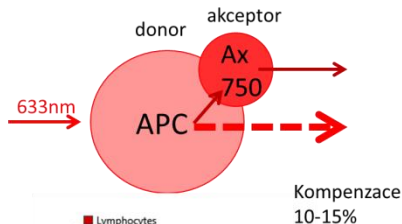
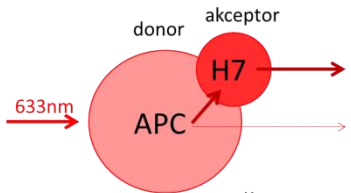
CD4 PE-Cy7 vs CD19 PE-Cy7



Každý tandem je trochu jiný



Specifická kompenzace pro každou protilátku konjugovanou s tandemem!



Kuličky nebo buňky?

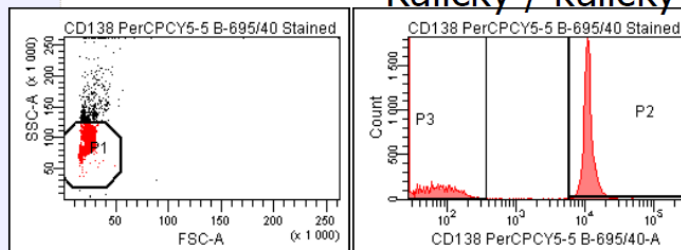
Kuličky / buňky

Obojí je správně! A dokonce to můžeme i kombinovat!

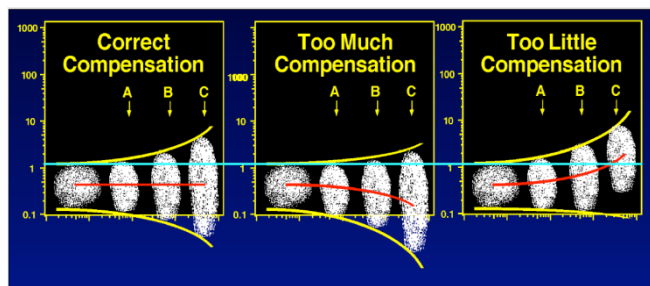
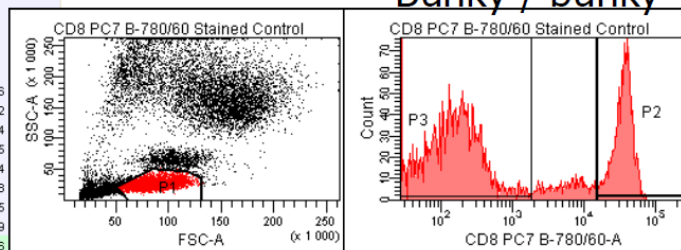
Rozhoduje:

- Exprese/intenzita
 - mám materiál s pozitivní populací? Např. CD25, CD34
 - Není na buňkách vyšší než na kuličkách? Např. CD57
 - Nebo obráceně např. CD49d
 - Počet buněk/kuliček (ideálně cca 1000)
- Přítomnost negativní populace a její gating
 - Např. CD14 vs. CD138

Kuličky / kuličky



Buňky / buňky



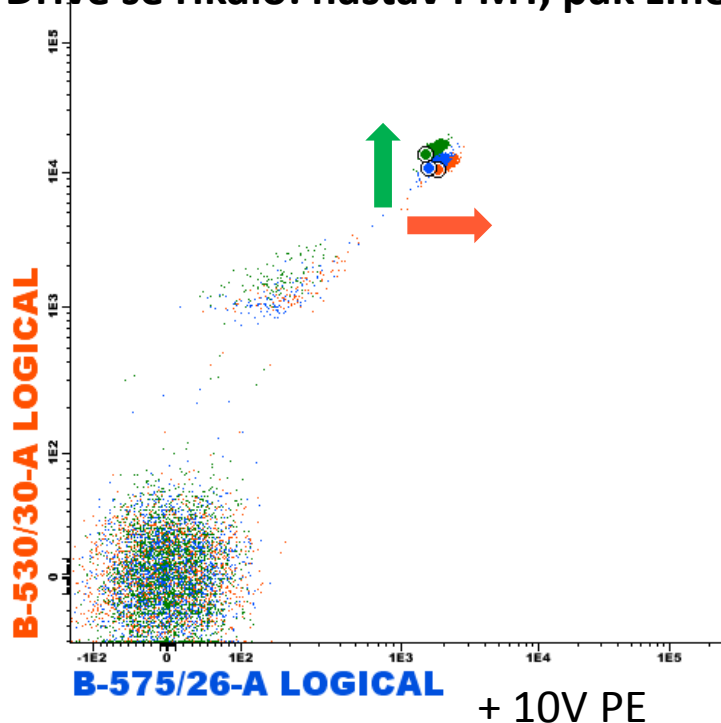
Pozor na správný gating negativní populace! Je jen jedna!!

Souhrn III

- Tandemy potřebují reagent specific kompenzací:
 - Buď pro každý experiment (zkumavku) příprava matice zvlášť
 - Nebo velká matice s generic a specific kompenzacemi
- Kompenzace můžeme měřit na buňkách –a to různých typech, nebo na kuličkách – jen musí vždy odpovídat negativní populaci! (autofluorescence!)

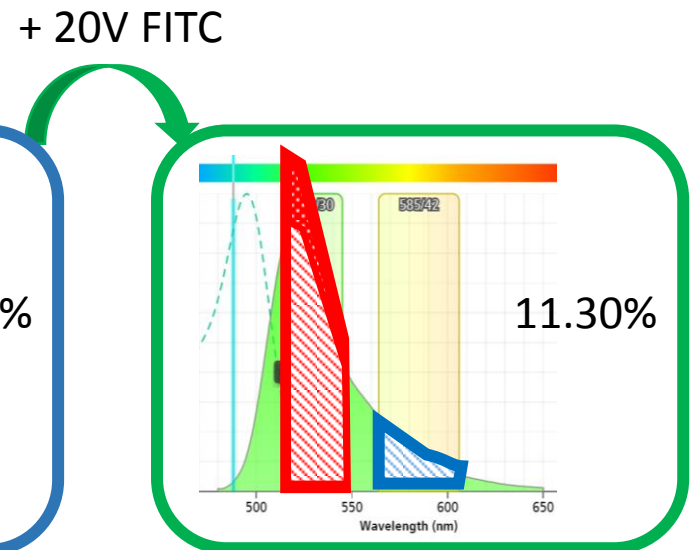
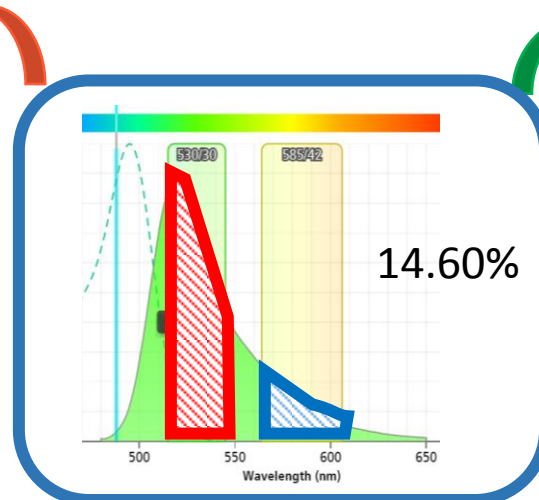
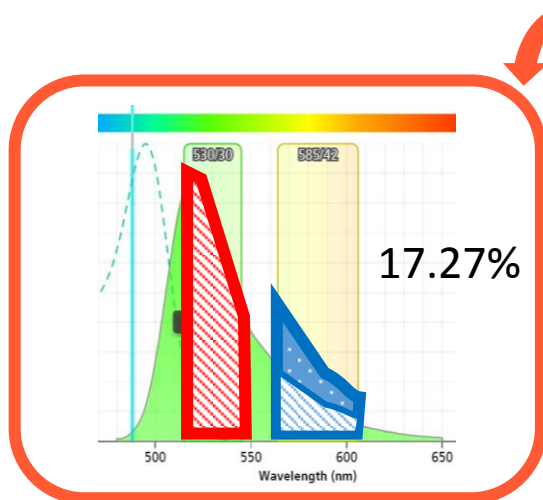
Jakou roli hraje PMT?

Dříve se říkalo: nastav PMT, pak změř kompenzaci, ta platí pro experimenty s daným PMT



PMT FITC	PMT PE	% kompenzace
566V	469V ↑	17.27
566V	459V	14.60
586V ↑	459V	11.30

Změna PMT=>změna MFI (poměru MFI mezi oběma detektory) =>změna kompenzace!



Application settings

- Není důležité PMT, ale MFI populace v jednotlivých kanálech (resp.poměr)
- Pokud dosahují stále stejného MFI, kompenzace je stejná
- Princip **Application settings** na BD přístrojích:
 - pomocí CST Změna PMT tak, aby MFI byla stále stejná=> kompenzace stejná!

Detector Settings (Continued)

Laser	Detector	Parameter	Dim Bead Median Channel	Dim Bead % Robust CV	PMTV	Δ PMTV	Qr	Br	P/F
Blue	FSC	FSC	18899	2.21	591	4	N/A	N/A	Pass
Blue	F	SSC	57006	1.94	403	-3	N/A	N/A	Pass
Blue	E	B-530/30	74	52.17	502	-2	0.0367	100	Pass
Blue	D	B-585/42	153	48.08	555	1	0.1914	244	Pass
Blue	B	B-670LP	256	43.28	518	1	0.0112	39	Pass
Blue	A	B-780/60	165	80.98	679	8	0.0119	2	Pass
Red	C	R-660/20	476	20.8	514	-2	0.0360	142	Pass
Red	A	R-780/60	268	23.48	517	3	0.0070	834	Pass
Violet	B	V-450/50	87	88.48	487	-9	0.0454	2954	Pass
Violet	A	V-510/50	155	49.87	557	-8	0.0112	917	Pass

BD FACS Lyric

- Nastavení „Lyse Wash settings“ – kompenzace se změří v něm
- Při měření s použitím jakýchkoli PMTV se kompenzace přepočítá z nastavení Lyse Wash bez nutnosti měření

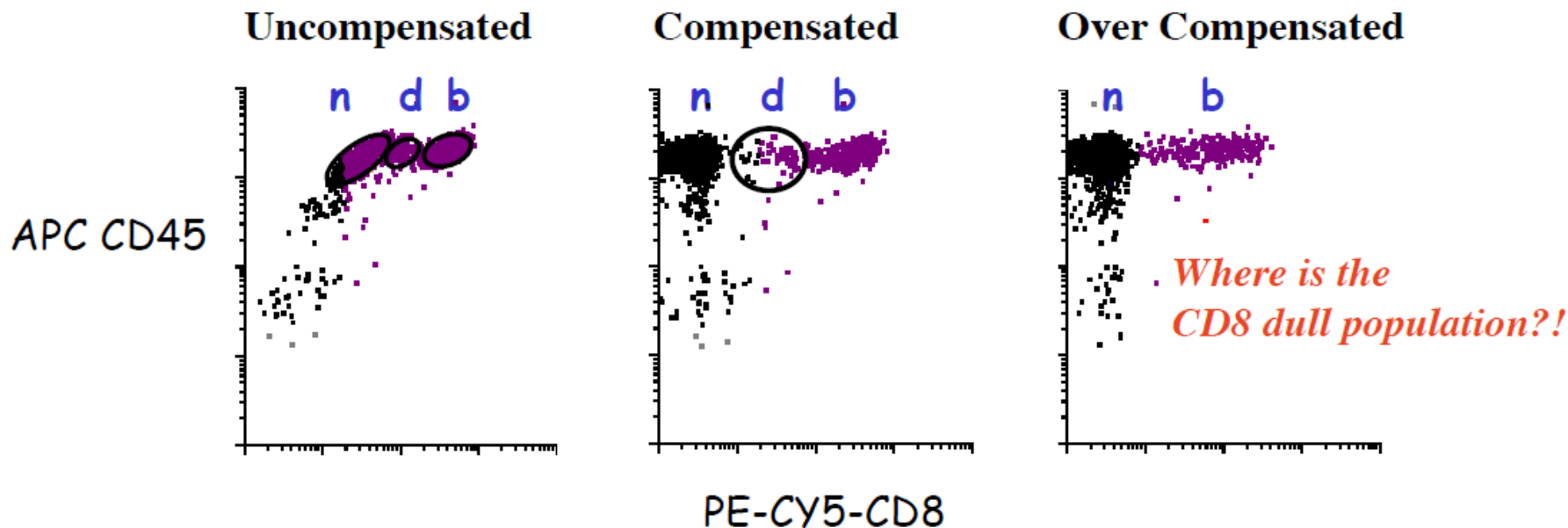
Souhrn IV

- Kompenzace je jen číslo
- Emisní spektrum se změnou PMTv nemění, mění se jen poměr mezi detekovaným signálem v primárním kanálu a sekundárním
- Pokud je poměr signálů stejný, kompenzace je stejná
- Primárně jde o intenzitu fluorescence, ne o PMTv!
- SSM matrix – vystihuje skutečný přesvit nezávisle na voltážích (charakteristika přístroje)

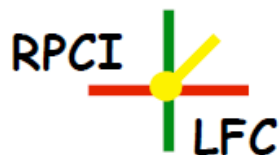
Jak a kdy měřit kompenzaci?

- **U application settings/standardizovaného nastavení**
(každodenní úprava PMT k dosažení cílových hodnot)
teoreticky jen pokud se:
 - Mění spektrum fluorochromů:
 - Tandemy – nová šarže, degradace
 - Mění optika cytometru
 - (doporučení výrobce)
- **U cytometer settings** (stejně PMT)
 - Mění MFI fluorochromů na jednotlivých detektorech (jejich poměr)
 - Mění spektrum fluorochromů:
 - Tandemy – nová šarže, degradace
 - Mění optika cytometru

Importance of ACCURATE Compensation



n = negatives
d = dim positives
b = bright positives



Compensation

(An informal perspective)

Prelude: You are free to copy and distribute this document at will—but please do so in its entirety, complete with figures. For information on obtaining a hardcopy for this purpose, click [here](#). To reference this material, please include the WWW address as well as the latest modification date: May 24, 2000.

Address any questions, comments, or suggestions to [Mario Roederer](#).

Introduction. Compensation is probably the least understood process accompanying flow cytometric analyses. Perhaps this is because it is often described with the linear algebra elements needed for its computation, and many of us have forgotten what linear algebra is, much less how to do it. However, proper compensation is absolutely crucial for some aspects of flow cytometry, one of which is antigen density measurements. Unfortunately, because compensation is often misunderstood, and because there is so much incorrect mythology about it floating around, many laboratories do not set compensation properly.

In this "perspective," I will try to address the issues surrounding compensation, attempt to dispel many of the myths, and hope that by the end, that I have not confused anyone but rather have convinced them what proper compensation is.

Please start with the quiz, and work through the perspective in order suggested. The [table of contents](#) below will allow you to go directly to any page.

Start with the [Quiz](#)!

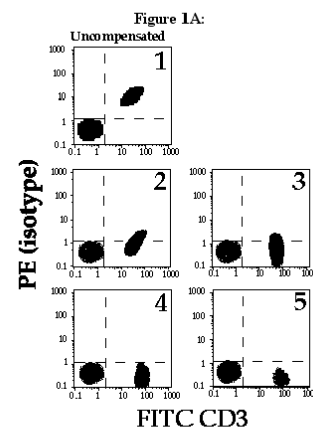
If you are really adventurous, you can navigate through a more detailed (and more rigorous) discussion of compensation, complete with examples of the math, examples of the pitfalls of poor compensation, etc. I recommend this only after you have finished with the more informal, relaxed discussion... To start the detailed discussion, click [here](#).

Compensation Quiz (part 1)

(Go back to the [Introduction](#)).

For a quick test of whether or not you know how to properly compensate a sample, answer three questions based on the figures shown.

In this hypothetical experiment, cells were stained with FITC CD3 and with a PE isotype control, and collected at different compensation values to correct for the FITC spillover into the PE channel (panel 1 is uncompensated; 2-5 are for increasing compensation values).



Quiz, Question #1: Which panel represents proper compensation?

Quiz, Question #2: On what basis did you make this determination?

After you have answered these questions, go to [part 2](#) of the quiz.

3 zlatá pravidla kompenzace

- Jednobarevné kompenzační zkumavky musí mít alespoň tak vysokou intenzitu jako v experimentu
- Vždy používat stejnou protilátku jako v experimentu (platí pro tandemy! U netandemů nevadí)
- Vždy shodná pozitivní a negativní populace se stejnou autofluorescencí (kuličky s kuličkami, buňky s buňkami)

Děkuji za pozornost!