



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



Realizováno v rámci dotačního programu „Operační program výzkum, vývoj a vzdělávání“, program Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy, Výzvy č. 02_18_056 ESF výzva pro vysoké školy II

název projektu: ESF pro VŠ II na UK

reg. č.: CZ.02.2.69/0.0/0.0/18_056/0013322

studijní podpora pro volitelný kurz: CVOL0276

Laboratorní metody imunologie – příprava, zavedení, hodnocení

metoda :

Průtoková cytometrie

Ústav imunologie a klinické biochemie (ÚIKB), 3.LF UK

M. Hudec, P. Kučera, K. Riegerová, M. Riegerová, A. Říhová, A. Tomášková

A. Část teoretická

A.1 Průtoková cytometrie = flow cytometry

Pojem průtoková cytometrie:

- 1) „měření buněk v pohybu“
- 2) proces umožňující kvalitativní i kvantitativní analýzu fyzikálních (optických) a chemických (fluorescenčních) vlastností jednotlivých buněk (částic)**

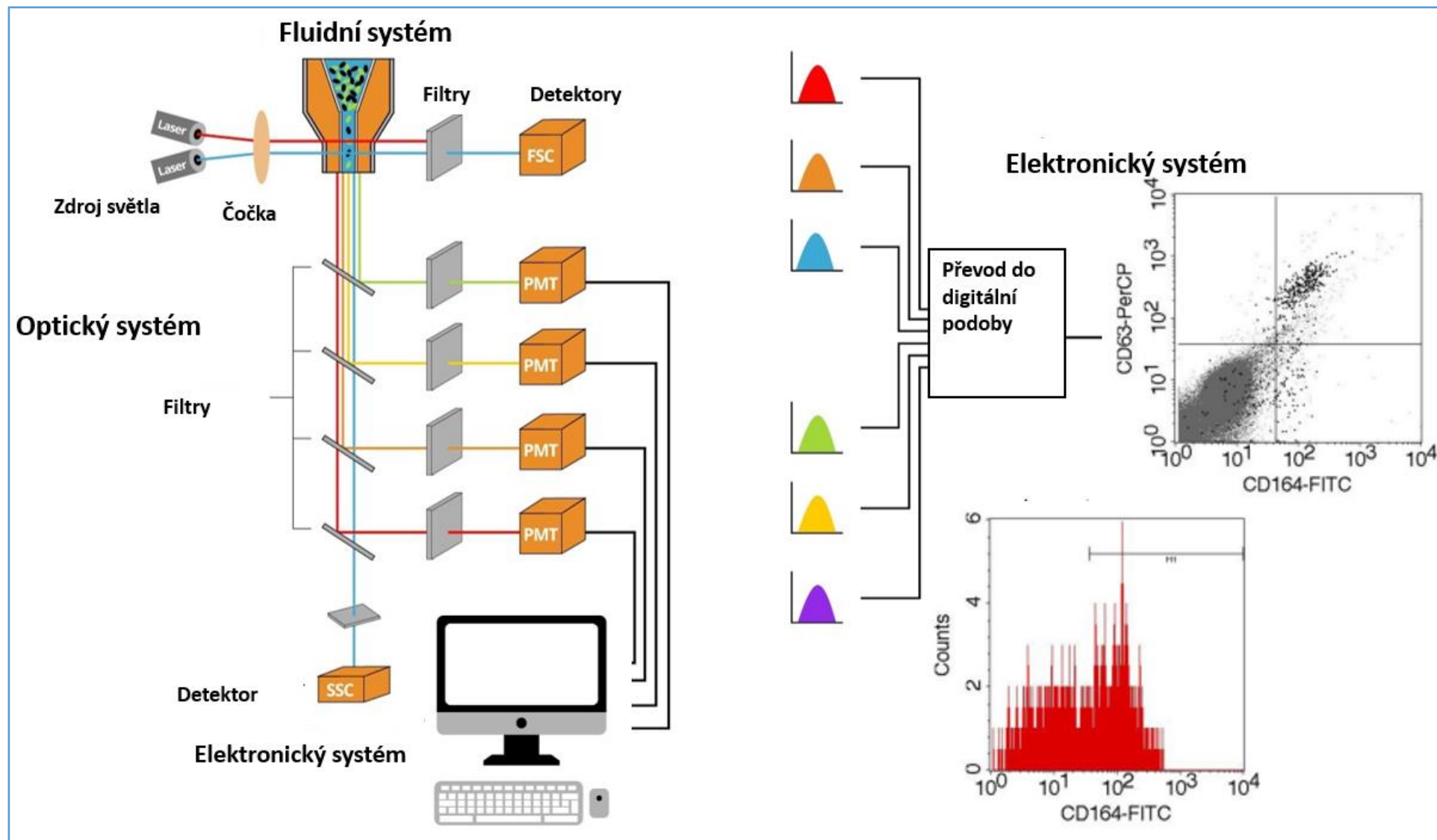
Výhody:

- 1) možnost stanovení mnoha vlastností a charakteristik na úrovni 1 buňky(částice) při 1 měření
- 2) možnost analýzy velkého množství buněk při 1 měření (dle typu přístroje 1500 – 100 000 částic/s)

Nevýhody:

- 1) omezená možnost lokalizace antigenů
- 2) časově omezená možnost uchování výchozího materiálu/připravených vzorků

A.2 Průtokový cytometr – hlavní součásti přístroje



A.2.1 Fluidní systém

Princip:

- ❖ vzorek (suspenze částic/buněk) ve zkumavce či mikrozkušavce je umístěn do inžektážní jednotky
- ❖ odtud je suspenze přenesena do průtokové kyvety
- ❖ laminární proudění nosné kapaliny zajišťuje hydrodynamickou fokusaci

Pojmy:

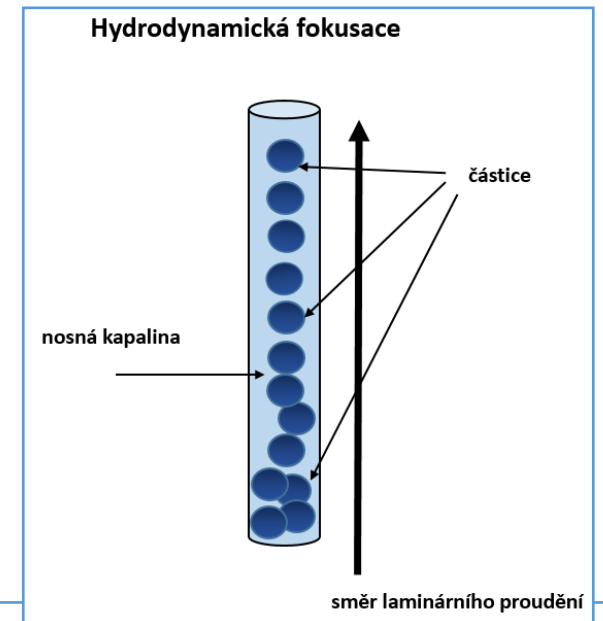
❖ Laminární proudění

druh proudění charakterizovaný spojitými nekřížícími se proudnicemi



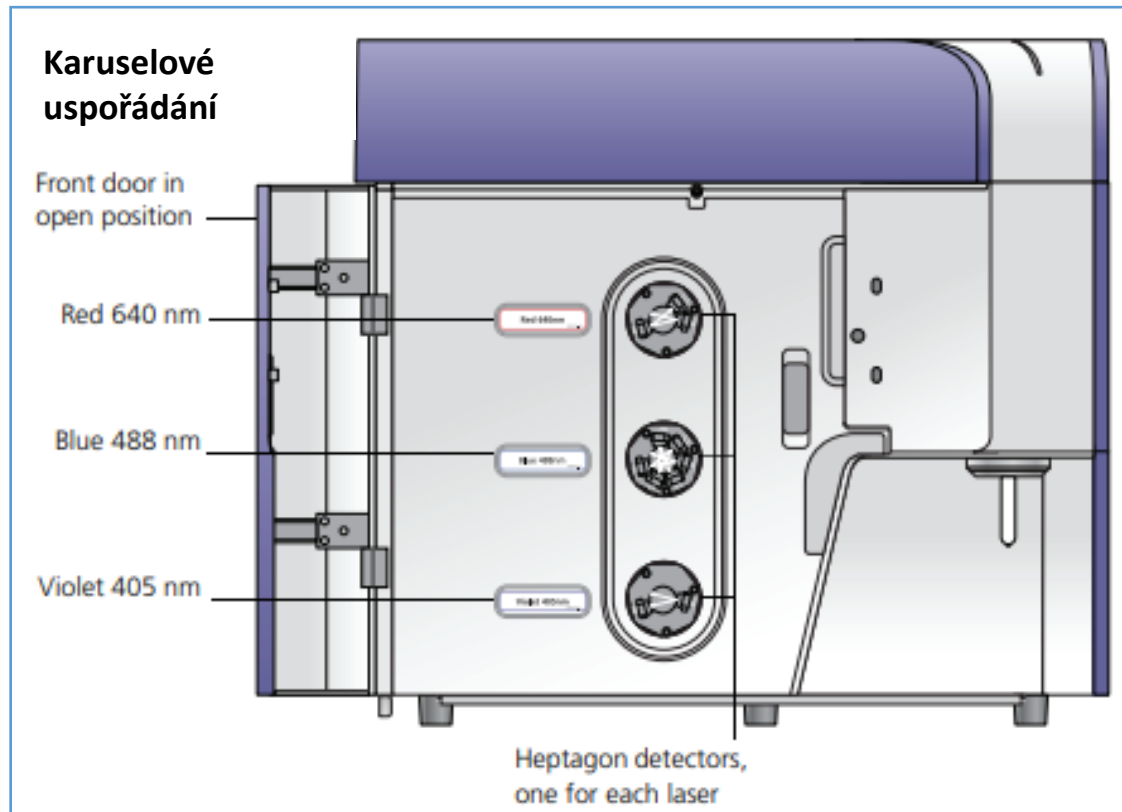
❖ Hydrodynamická fokusace

- ❖ proces, při kterém dochází k usměrnění částic proudem nosné kapaliny

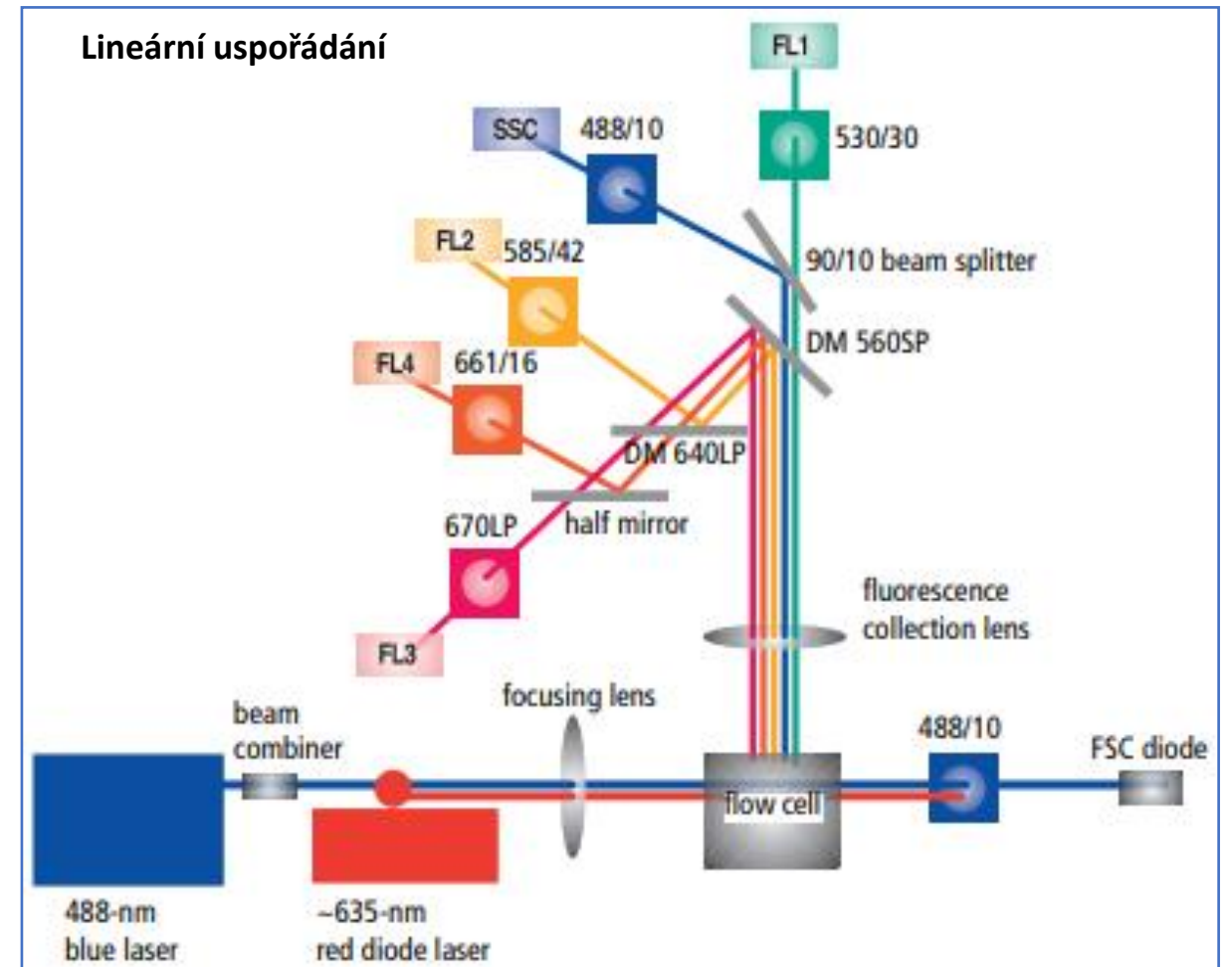


A.2.2 Optický systém

- ❖ část excitační: laser(y), soustava čoček a hranolů
- ❖ část sběrná: zrcadla, filtry, detektory



http://core.tmmu.edu.cn/attachments/158/BD_FACSVerse_Users_Guide.pdf



https://wwwbdbiosciences.com/documents/BD_FACS caliber_instructions.pdf

A.2.2.1 Optický systém excitační část

LASER = Light amplification by stimulated emission of radiation

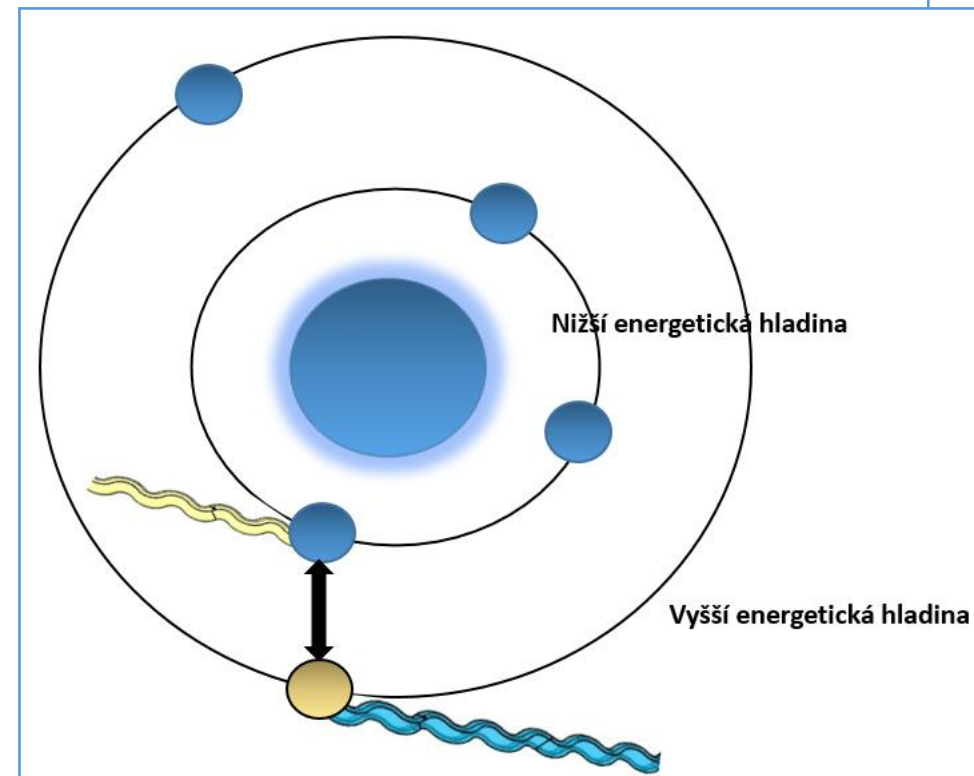
- ❖ zdroj monochromatického světla (jediná vlnová délka)
- ❖ zdroj koherentního vlnění = vlnění o stejné frekvenci, stejného směru kmitání a stejné fáze (nebo se stejným fázovým rozdílem).
- ❖ stabilní zdroj záření

v průtokovém cytometru nejčastěji :

modrý (488 nm), červený (640 nm), fialový (405 nm)

Princip :

- ❖ energie elektronu nabývá určitých „dovolených“ hodnot (energetických hladin)
- ❖ dojde-li excitaci elektronu, jeho energie přejde na vyšší hladinu
- ❖ při nárazu fotonu (světelného paprsku) do excitovaného elektronu, se elektron vrací ke své nižší energetické hladině
- ❖ zároveň elektron vyzáří druhý foton – shodný s prvním
- ❖ v laseru jsou excitované elektrony vloženy mezi 2 zrcadla
- ❖ první foton stimuluje jeden elektron, který vyzáří druhý foton
- ❖ dochází k opakování procesu (díky zrcadlům)
- ❖ vznikají identické fotony



A.2.2.2 Optický systém sběrná část

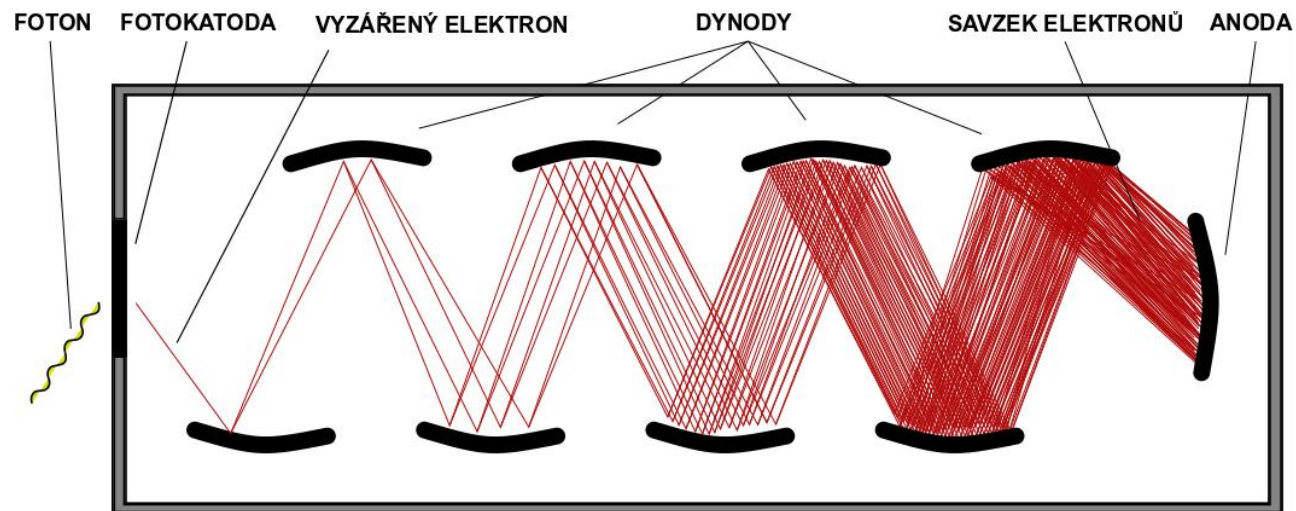
❖ Fotodioda

konverze optického signálu na elektrický
pro silné signály

❖ Fotonásobič

konverze optického signálu na elektrický
pro slabší signály

vyšší citlivost , možnost poškození příliš intenzivním signálem



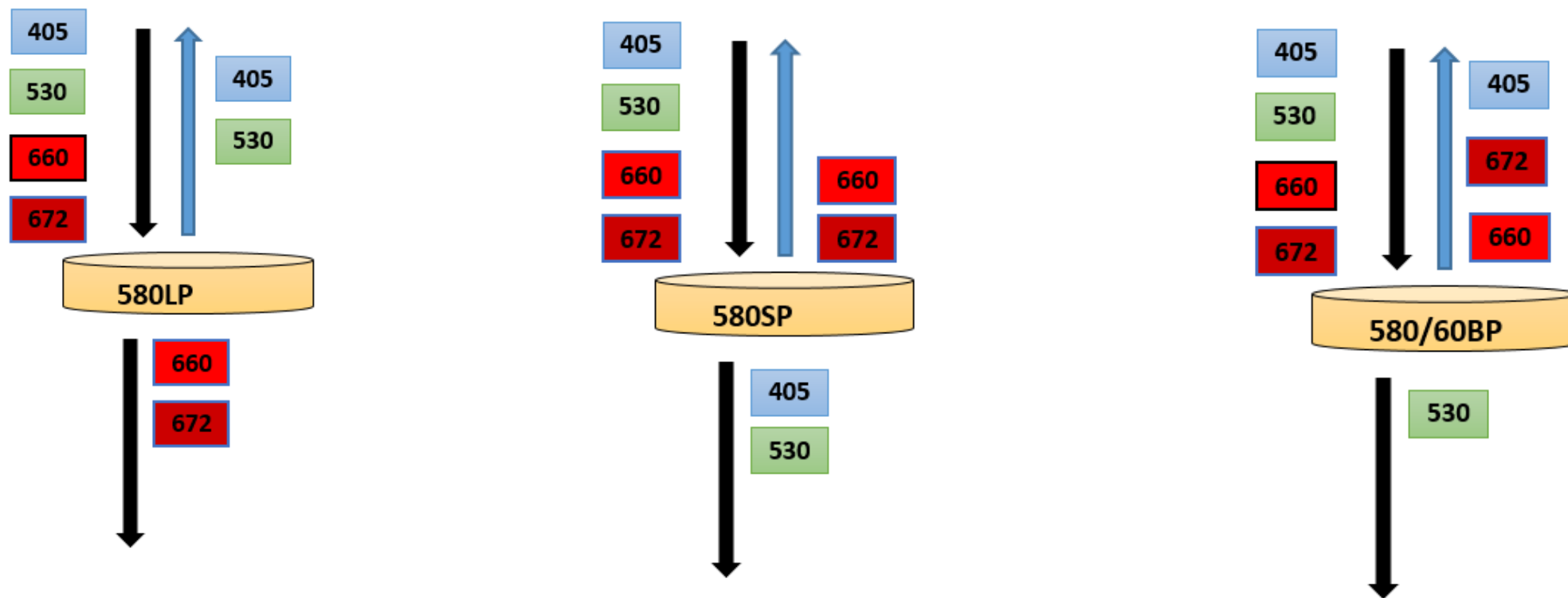
A.2.2.2 Optický systém sběrná část

❖ Optické filtry

long pass filtr - propouští vlnové délky vyšší než udaná vlnová délka

short pass filtr - propouští všechny vlnové délky kratší než udaná vlnová délka

band pass filtr - propouští dané rozmezí vlnových délek



A.2.3 Elektronický systém

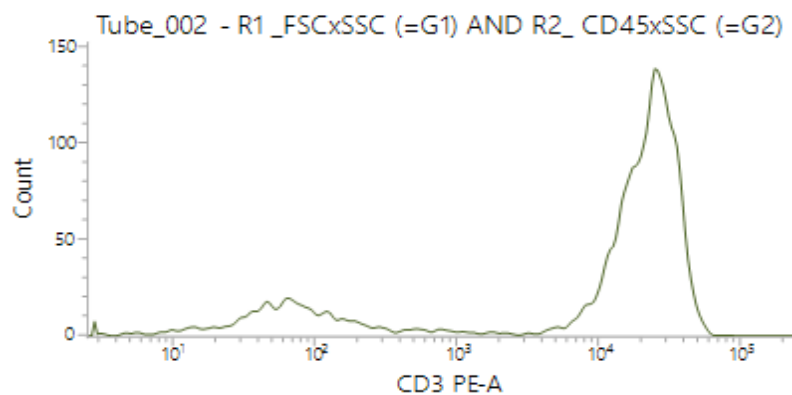
- ❖ záznam intenzity světelného signálu v podobě napěťového pulsu + lin/log úprava napěťového signálu
- ❖ vizualizace prostřednictvím speciálního programu – grafická a statistická podoba

Statistika

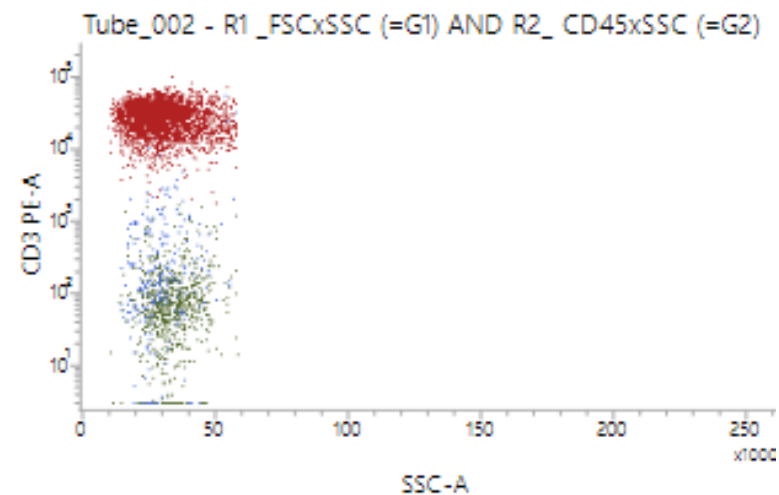
Name	Events	% Parent	% Grandparent	% Total	FSC-A Mean	SSC-A Mean	CD19 FITC-A Mean	CD19 FITC-A Max	CD19 FITC-A Mode
Tube_002:All Events	10,000	***	***	100.00	147,392	116,258	330	260,157	0
Tube_002:R1_FSCxSSC (=G1)	4,127	41.27	***	41.27	117,944	31,505	229	6,344	0
Tube_002:R2_CD45xSSC (=G2)	4,914	49.14	***	49.14	117,157	32,646	245	6,344	0
Tube_002:R1_FSCxSSC (=G1) AND R2_CD45xSSC (=G2)	4,087	40.87	***	40.87	117,968	31,457	229	6,344	0
Tube_002:G4_CD19 z G3_ (=R1 a R2)	3,158	77.27	31.58	31.58	115,712	30,807	178	6,344	0
Tube_002:G5_CD3 z G3 (=R1 a R2)	234	5.73	2.34	2.34	123,301	30,893	1,262	3,065	1,024

Vizualizace dat

Histogram (hodnoty 1 parametru)



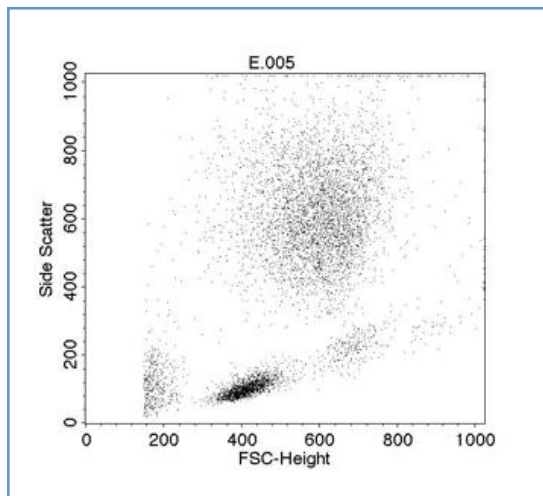
Dot plot - bodový graf (hodnoty 2 parametrů)



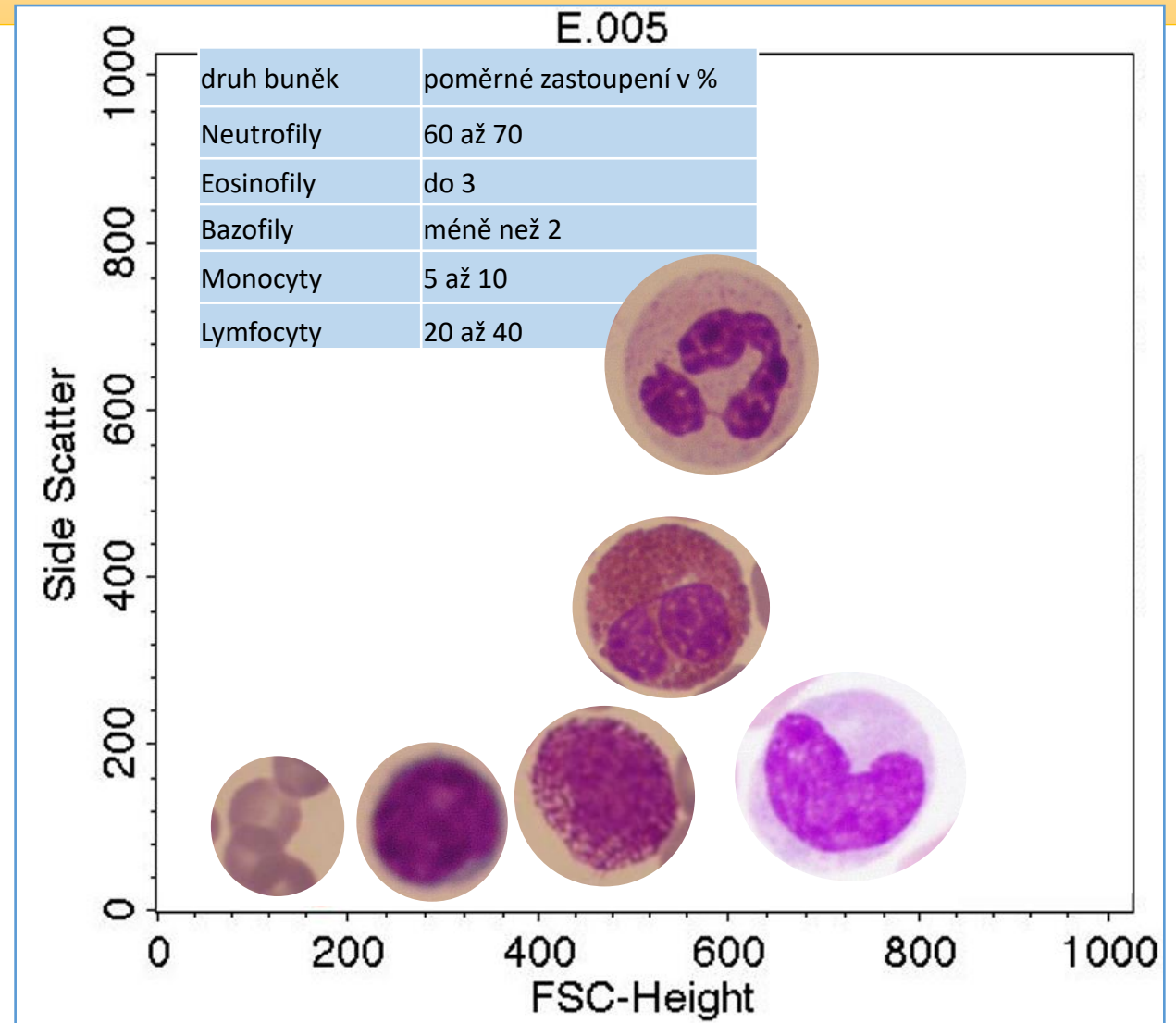
A.3 Základní parametry měřené v průtokové cytometrii

A.3.1 FSC x SSC

- ❖ dopřední (čelní) rozptyl – **Forward scatter – FSC**
 - ❖ detektorem signálu je fotodioda
 - ❖ informace o velikosti částic
 - ❖ odlišení buněk od buněčné drtě
 - ❖ informace o vnější členitosti buněk
- ❖ boční rozptyl – **Side scatter – SSC**
 - ❖ detektorem signálu je fotonásobič
 - ❖ informace vnitřní struktury buňky

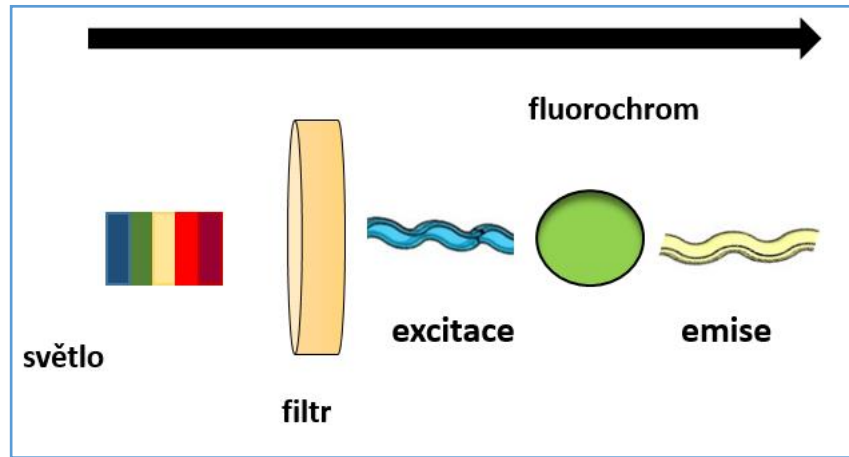


lidská krev po lýze erytrocytů



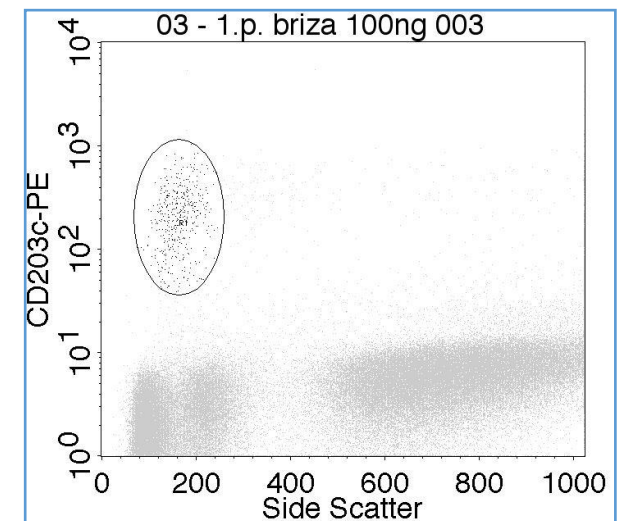
A.3.2 Fluorescence

- ❖ fyzikálně chemický děj, sekundární záření, které je charakterizováno vyzářením energie ve velmi krátké době (řádově 10^{-9} - 10^{-6} sekundy) , emise světla látkou, která absorbovala světlo nebo jiné elektromagnetické záření
- ❖ fluorochromy = barviva schopná absorbovat světelnou energii dané délky a následně ji vyzářit v jiné (nižší) vlnové délce → excitace x emise



fluorochrom	FITC	PE	APC	PerCP
excitační laser	488 nm	488 nm	630-8 nm	488 nm
emise	525 nm	575 nm	660 nm	670 nm

- ❖ využití fluorescenčních sond → kvalitativní a kvantitativní informace o membránových nebo cytoplasmatických receptorech
- ❖ intenzitu fluorescence ovlivňuje: typ fluorochromu, vazebná kapacita konjugátu fluorochrom – MoAb, množství epitopů na buňce, detektorem signálu je fotonásobič, a to pro každý fluorochrom zvlášť



A.3.2 Fluorescence

Fluorescenční barviva (fluorochromy) – příklady:

FITC = fluorescein isothiokyanát

PE = fykoerythrin

PerCP = peridinin-chlorofyl-protein

APC = alofykokyanin

Cy = Cyanin

Zjišťované CD znaky (*Cluster of Designation*) – příklady:

CD45 = jednořetězcový transmembránový protein exprimovaný ve vysoké hladině na všech buňkách hematopoetického původu, kromě erytrocytů a krevních destiček .

CD203c = transmembránový ektoenzymem exprimovaný na bazofilech a žírných buňkách

CD 63 = glykoprotein exprimovaný granulocyty, krevními destičkami, T buňkami, monocyty/makrofágy a endoteliálními buňkami. Expozice CD63 na buněčném povrchu je obvykle závislá na aktivaci.

CD19 = transmembránový glykoprotein exprimovaný na B lymfocytech a folikulárních dendritických buňkách; ztrácí se na plazmatických buňkách.

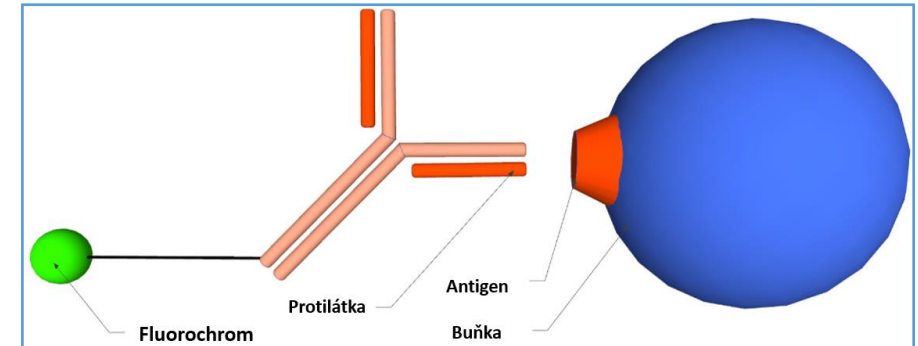
CD3 = T buněčný receptorový komplex (CD3/TCR) exprimovaný na T lymfocytech periferní krve a zralých thymocytech.

Monoklonální protilátky – příklady

anti-Hu CD45, anti-Hu CD3, anti-Hu CD19.....

Fluorescenční sondy - příklady

anti-Hu CD45/PE, anti-Hu CD45/APC, anti-Hu CD3/FITC, anti-Hu CD3/PerCP, anti-Hu CD19/APC.....



A.3.2 Fluorescence

- ❖ fluorochromy: samostatné, tandemové → excitace primárního fluorochromu aktivuje excitaci sekundárního fluorochromu = přenos nefluorescenční energie

Relativní intenzita jasu některých fluorochromů

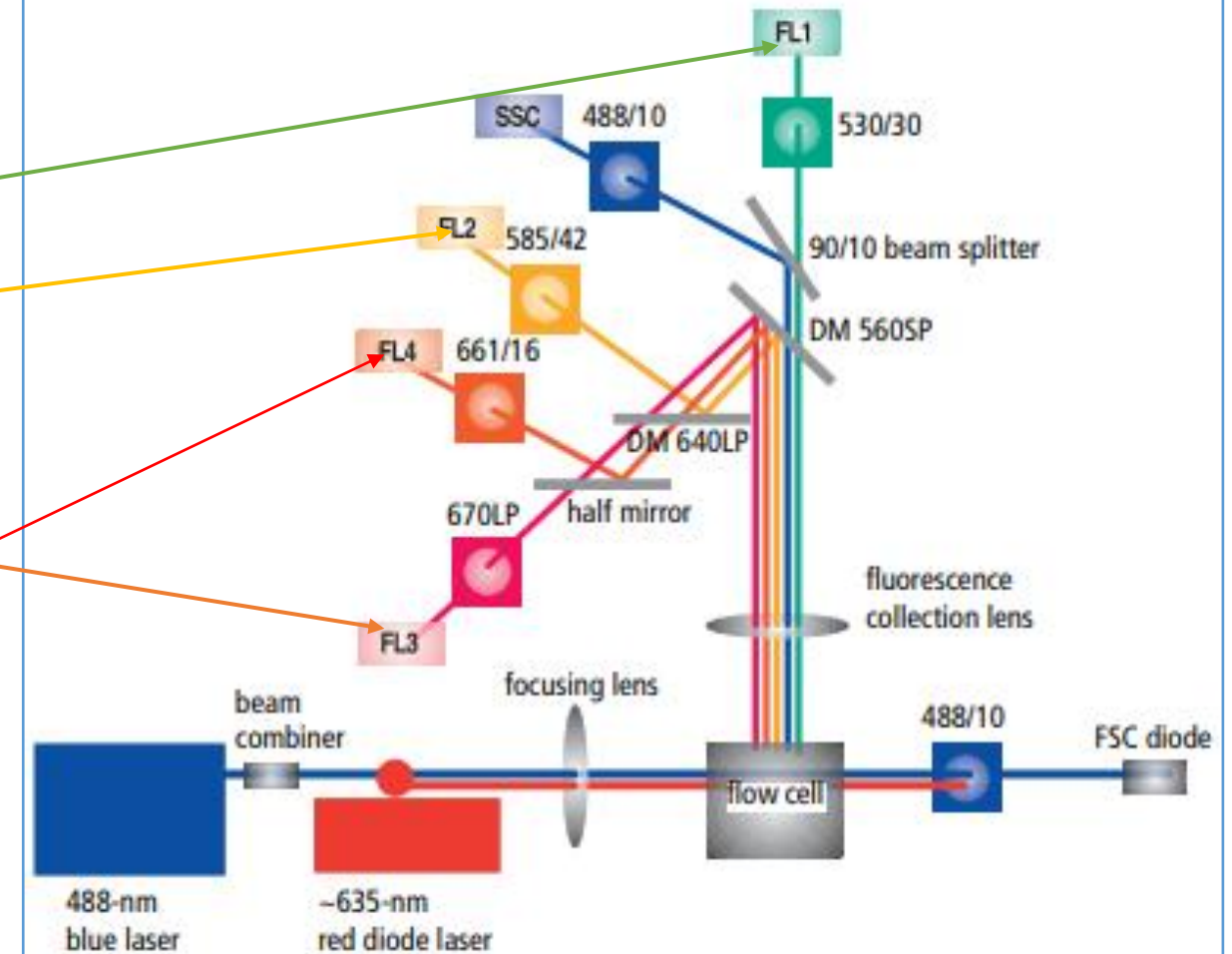
⊕ 488nm:

- FITC slabší
- PE vysoká
- PerCP slabší
- PerCP-Cy5.5 slabší
- PE-Cy7 vysoká
- PE-Cy5 vysoká
- PE-Texas Red vysoká

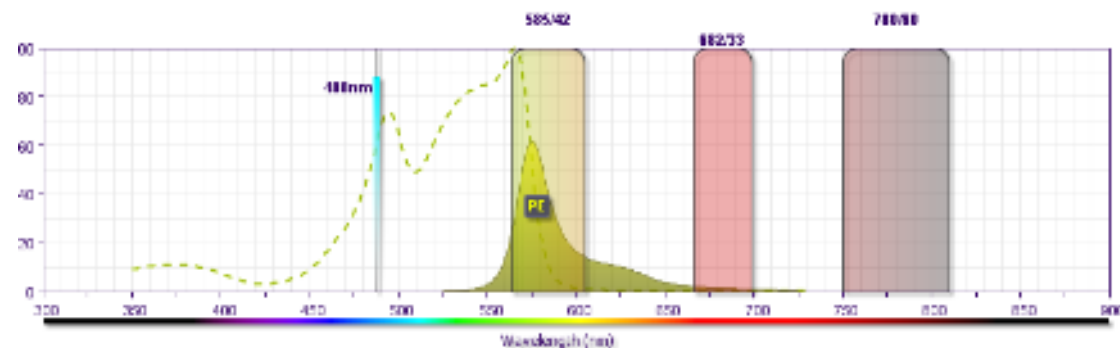
⊕ 638nm:

- APC střední
- APC-Cy7 střední

Figure 1-7 Optics system with FL4 option

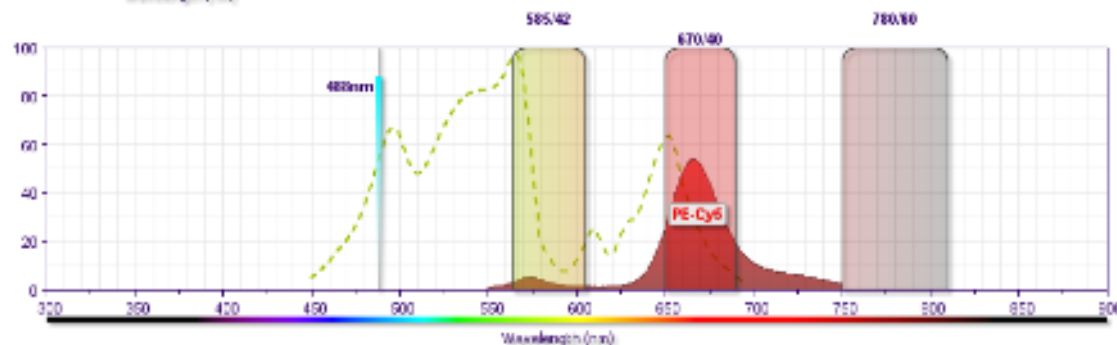


Tandemové fluorochromy - spektra

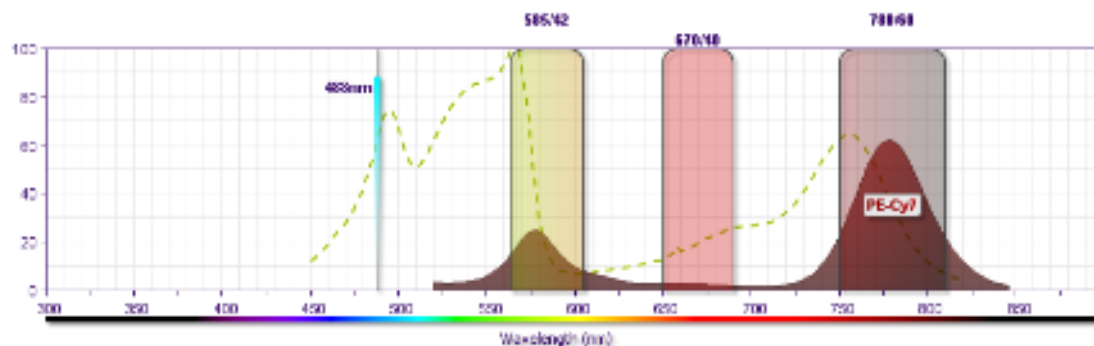


R-Phycoerythrin (PE)
Emission @ 576 nm

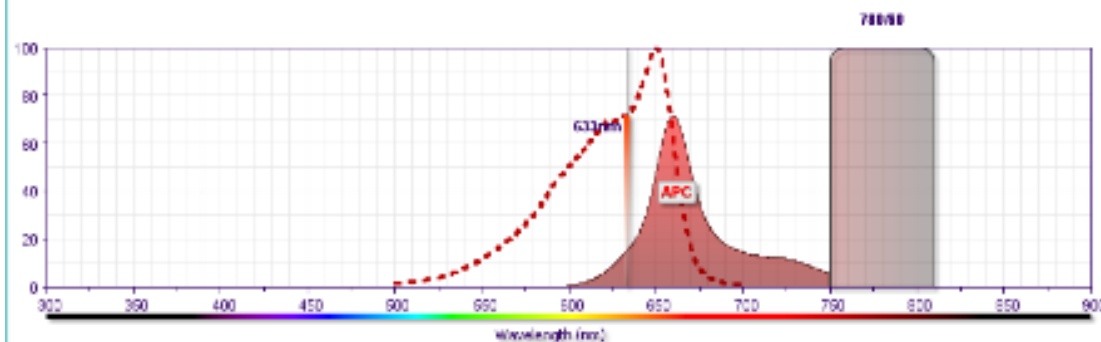
PE-Cy5
Emission @ 670 nm



PE-Cy7
Emission @ 778 nm

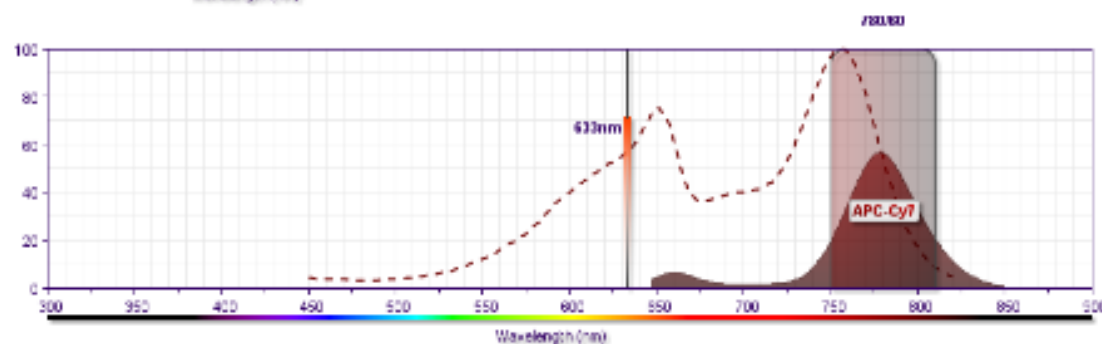


Tandemové fluorochromy - spektra

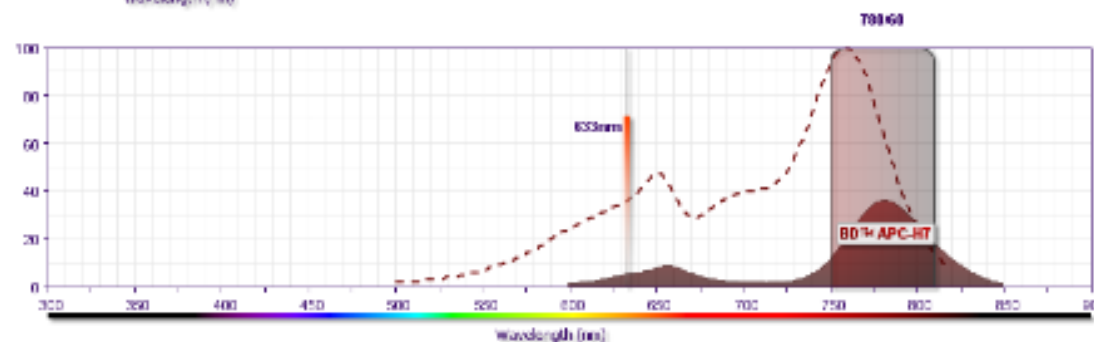


Allophycocyanin (APC)

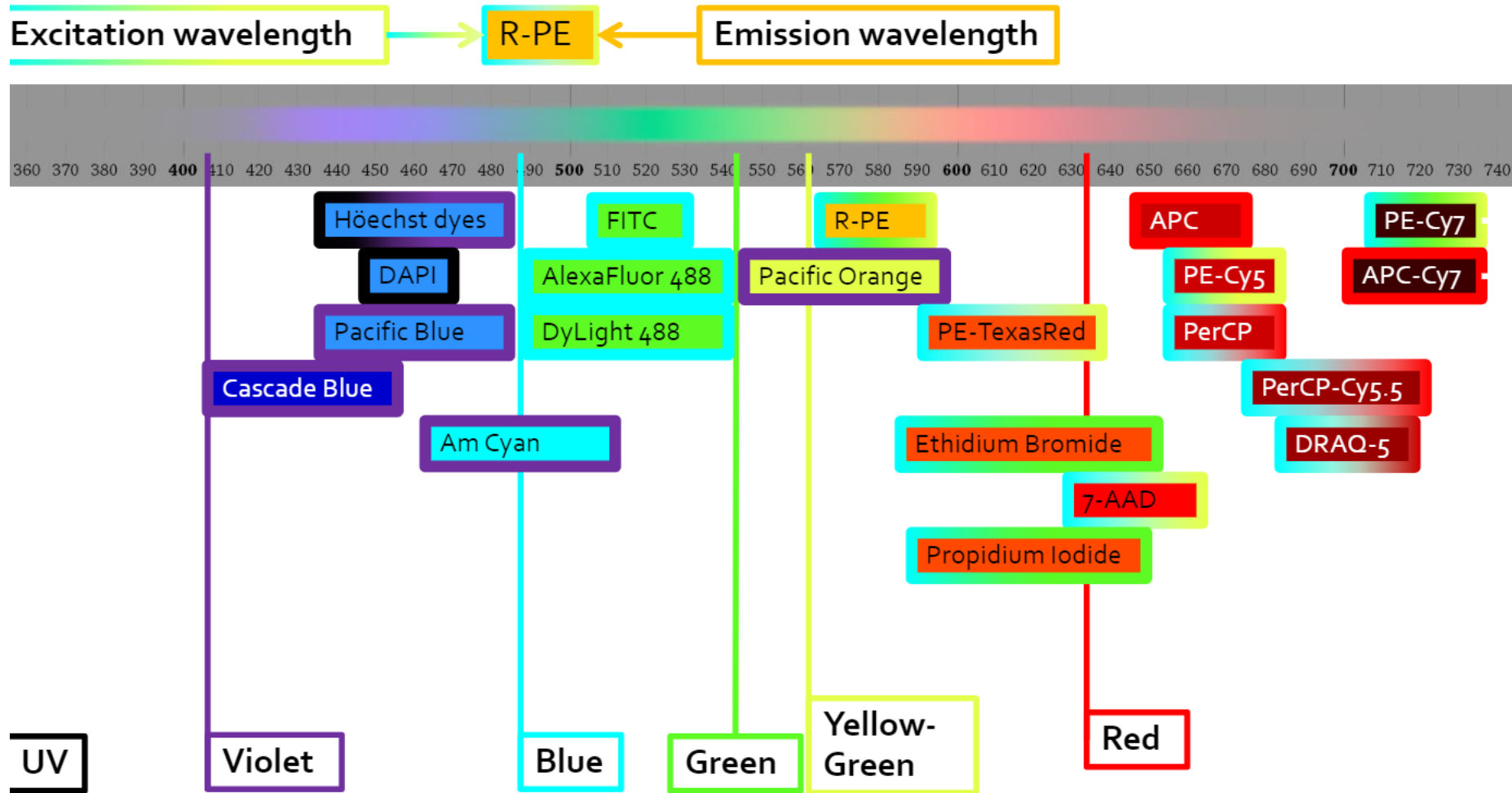
APC-Cy7



BD APC-H7

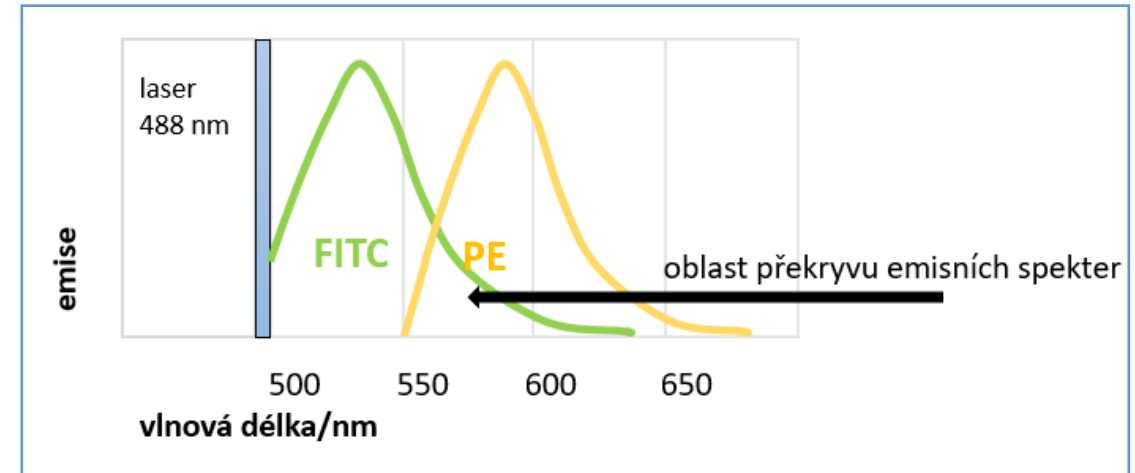
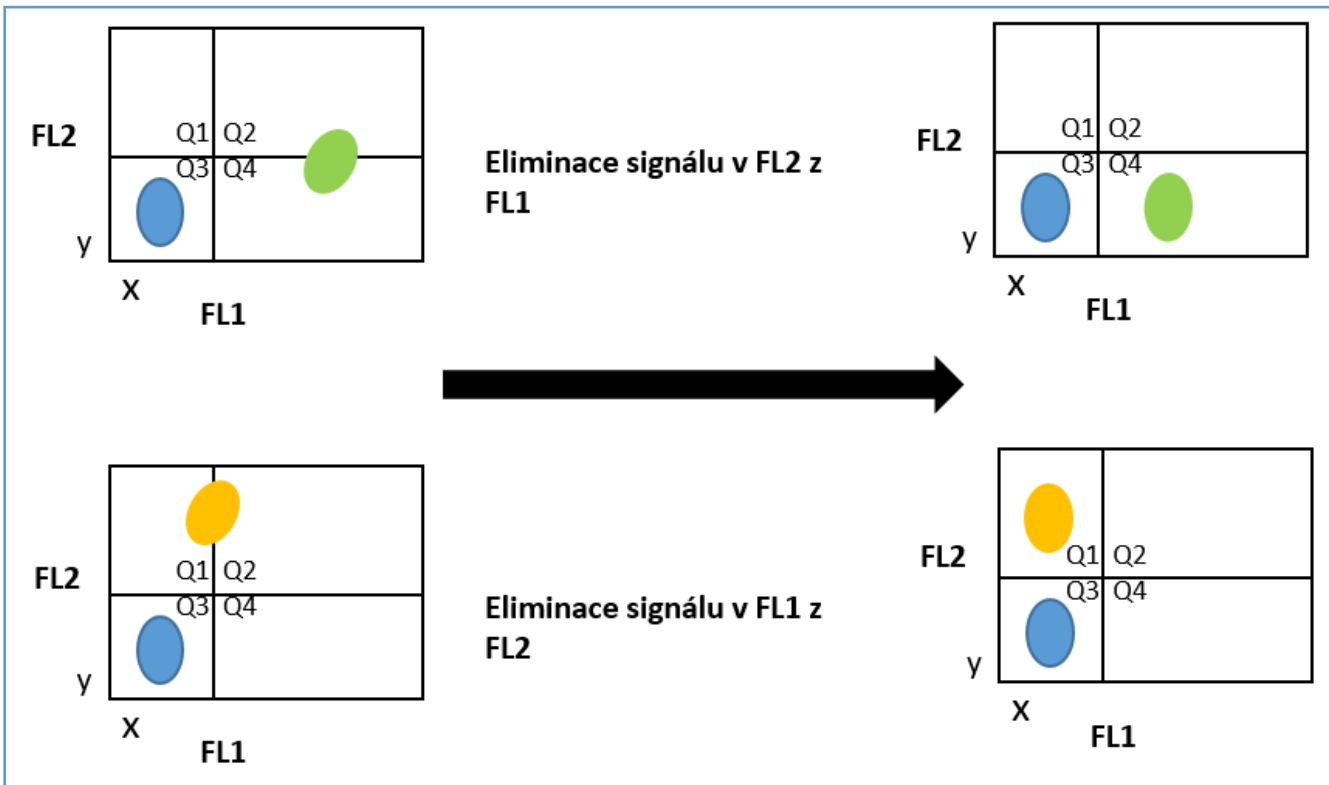


Barevné spektrum



A.3.2 Fluorescence

- ❖ překryvy emisních spekter fluorochromů – nutná kompenzace, u starších přístrojů manuálně – prostřednictvím “jednobarevných kontrol“

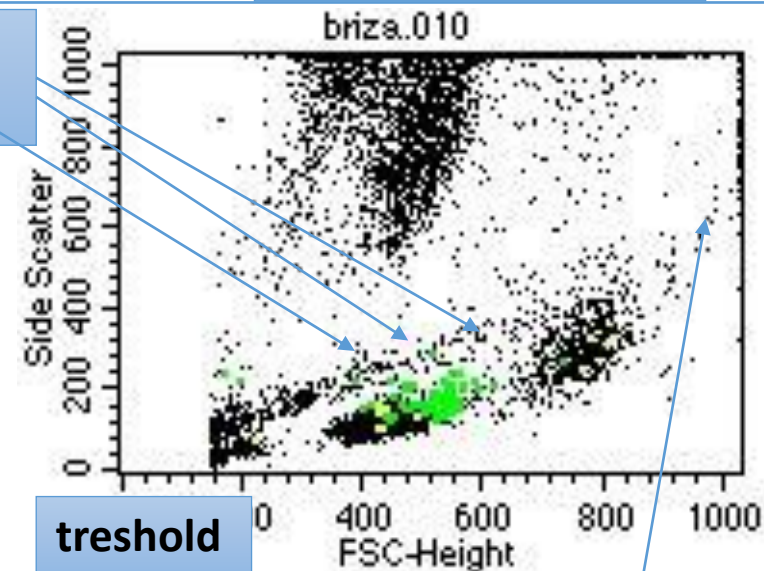


A.4 Plánování experimentu v průtokové cytometrii

- ❖ stanovení účelu, hypotézy, studium literatury → vytvoření rámcové představy o experimentu →
- ❖ → brát v potaz technické specifikace cytometru a fluorochromů (počet laserů + detektorů → počet fluorochromů) →
- ❖ → sestavení optimálního panelu fluorescenčních sond
- ❖ optimalizace přípravy vzorků (suspenzí) – od odběru materiálu po měření připraveného vzorku
- ❖ optimalizace technického nastavení cytometru pro daný experiment
- ❖ práce s vyhodnocovacím programem

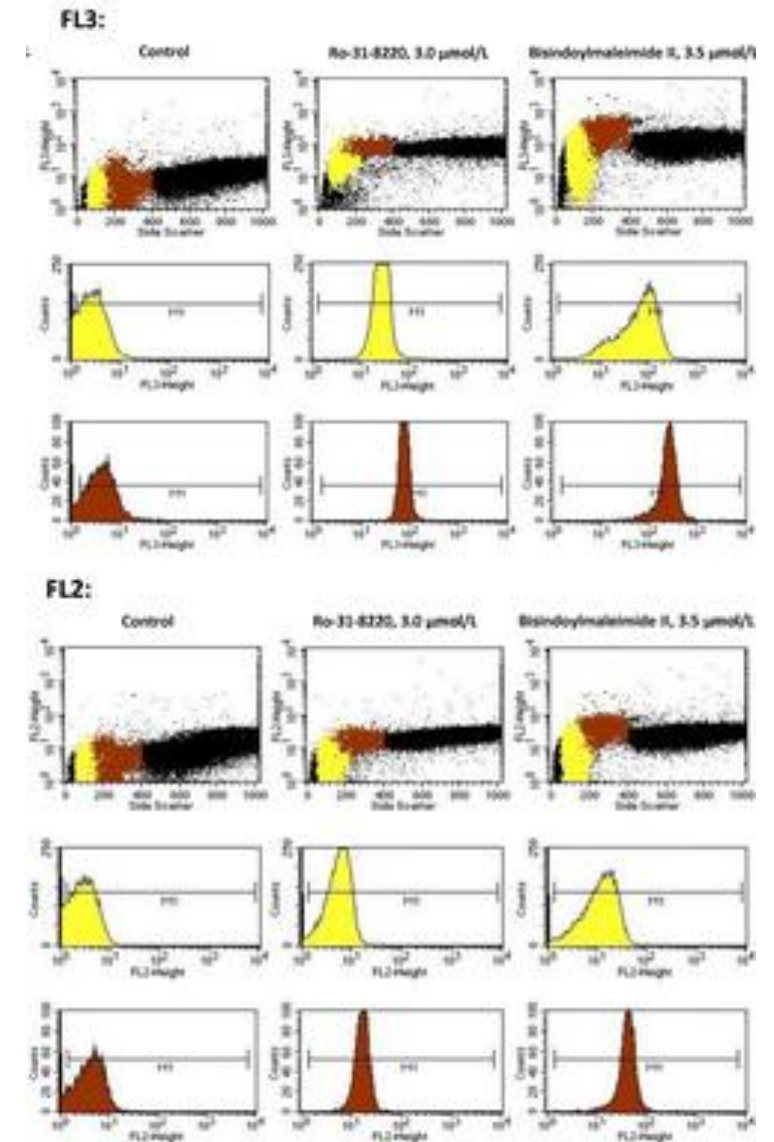
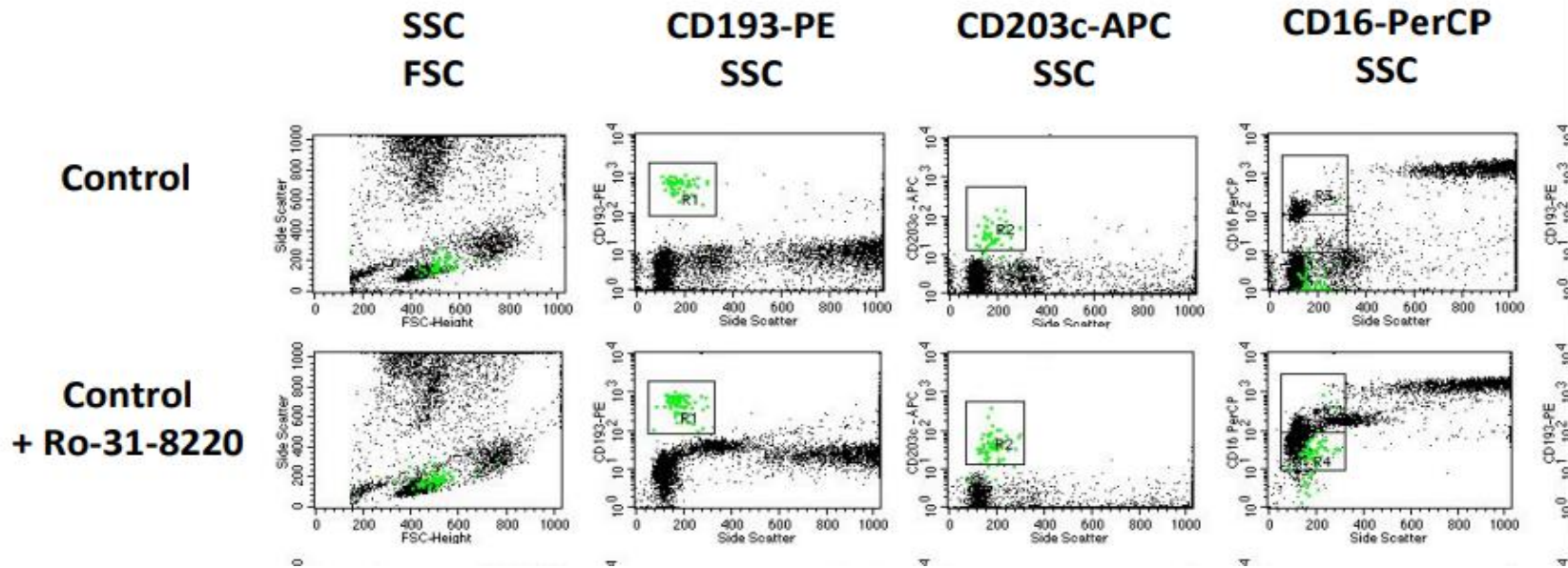
pro neutrofilů snížit
napětí na SSC

shlukování
trombocytů



A.4 Plánování experimentu v průtokové cytometrii

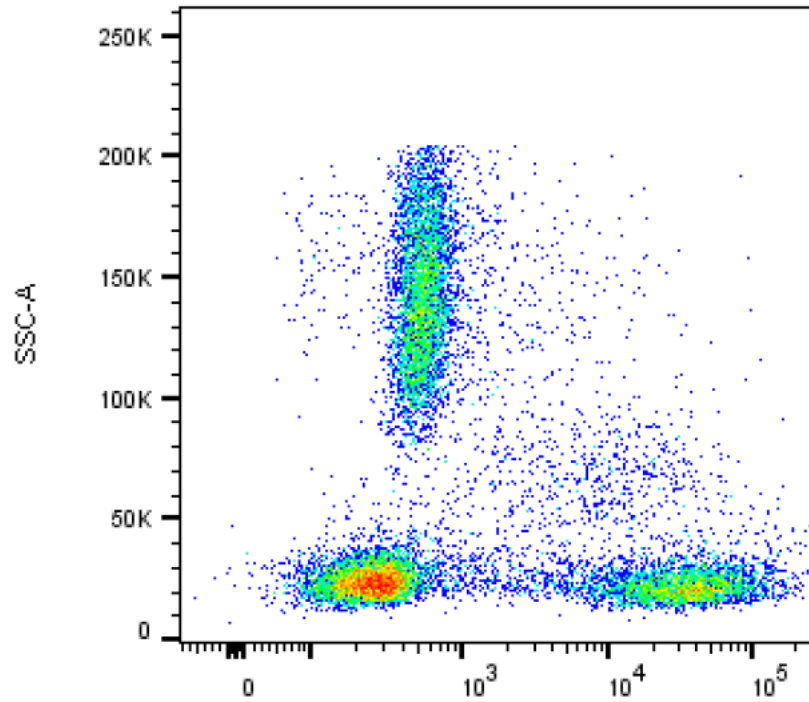
testovaná látka může mít vlastnosti fluorochromu



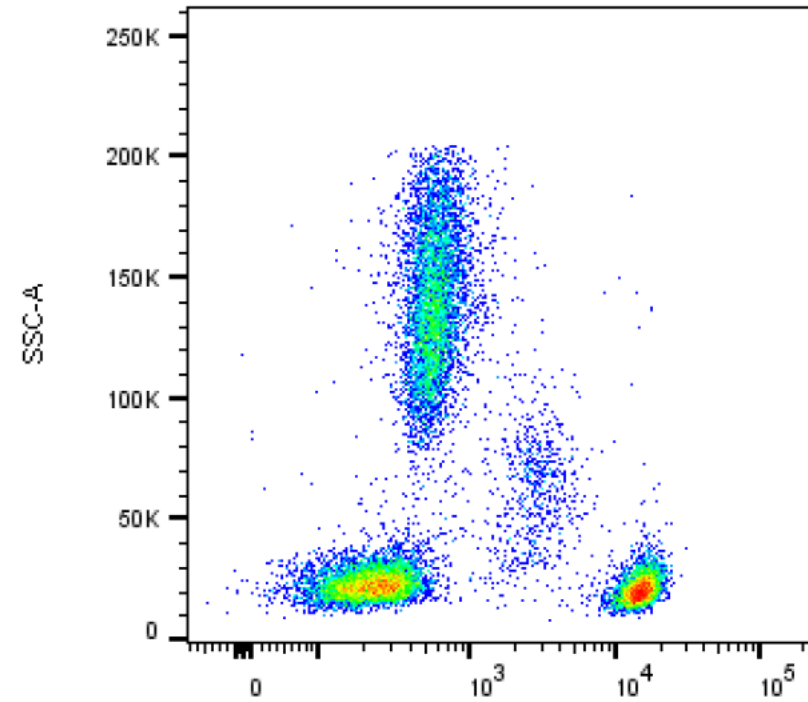
Updates on the surface antigens of basophils: CD16 on basophils of patients with respiratory or insect venom allergy and the rejection of CD203c and CD63 externalization decoupling by bisindolylmaleimides. Heneberg P, Riegerová K, Říhová A, Šimčíková D, Kučera P. Clin Exp Allergy, 2018, Oct 04

A.4 Plánování experimentu v průtokové cytometrii

vznik aberantních signálů na podkladě reakce Ag x Ab



BD Horizon™ BUV563 Mouse Anti-Human CD4



BD Horizon™ BUV563 Mouse Anti-Human CD4

A.4. Plánování experimentu v průtokové cytometrii

Možnost využití komerčních sad - zjednodušení práce +, cenová náročnost -, sjednocení výsledků i mezi laboratořemi ??

exbio KLINICKÉ PRODUKTY VÝZKUMNÉ PRODUKTY SUCHÁ ČINIDLA O EXBIO

KOMBITEST CD3 FITC / CD4 PE-Cy 7 / CD8 APC-Cy 7 / CD16 + CD56 PE / CD19 APC / CD45 PerCP-Cy 5,5



50 testů Na skladě ED7075 27 878 Kč

1 **Přidat do košíku**

*Ceny jsou včetně DPH

Datasheet ke stažení

CS

EN

SDS ke stažení

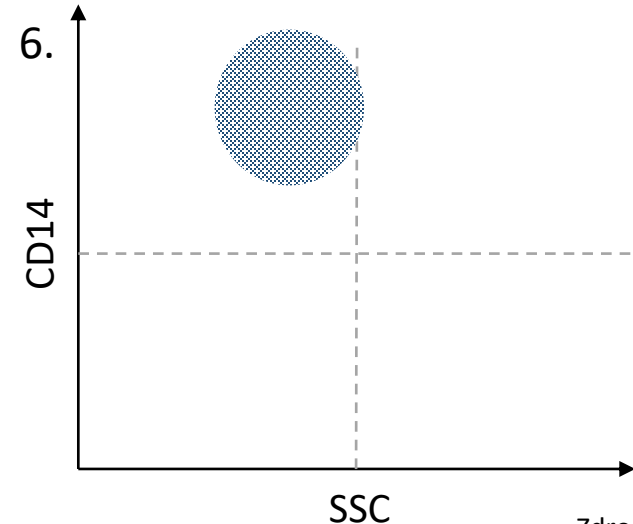
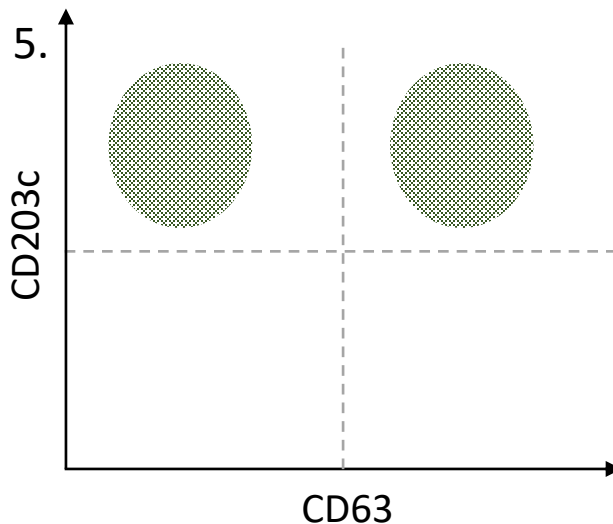
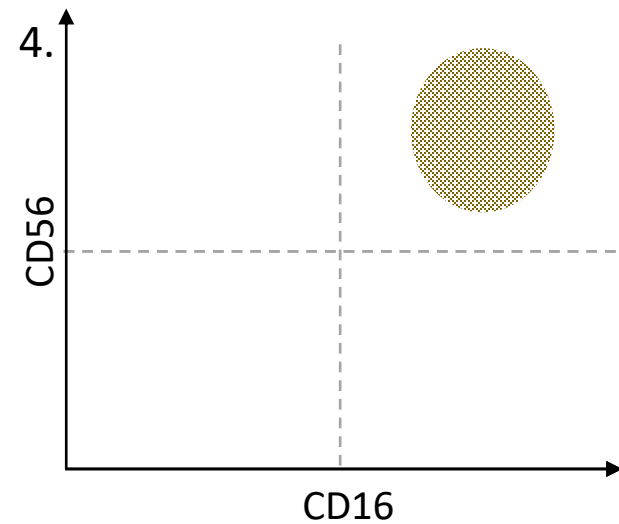
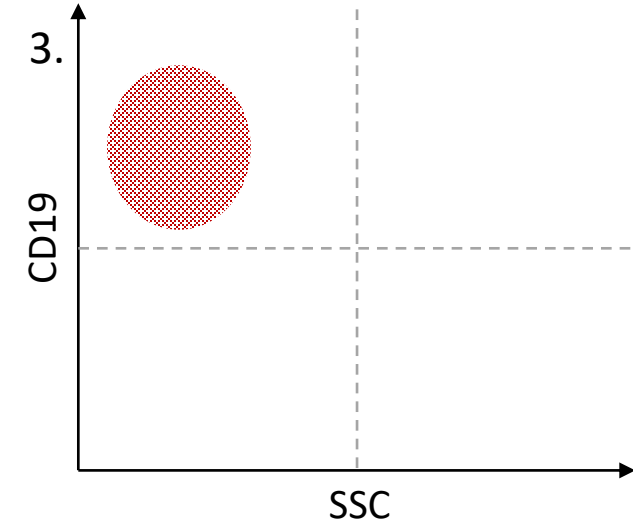
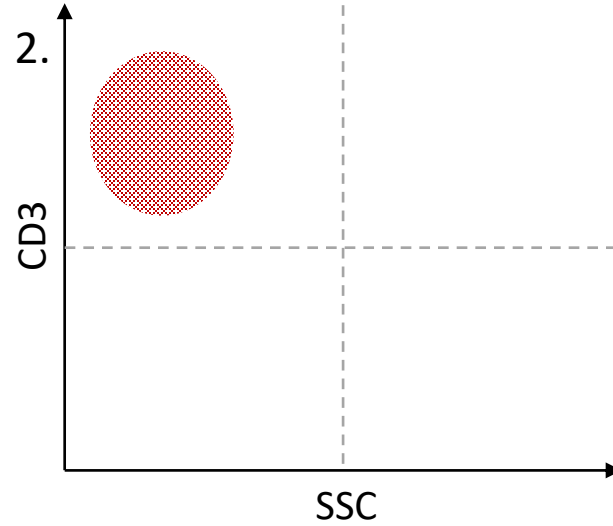
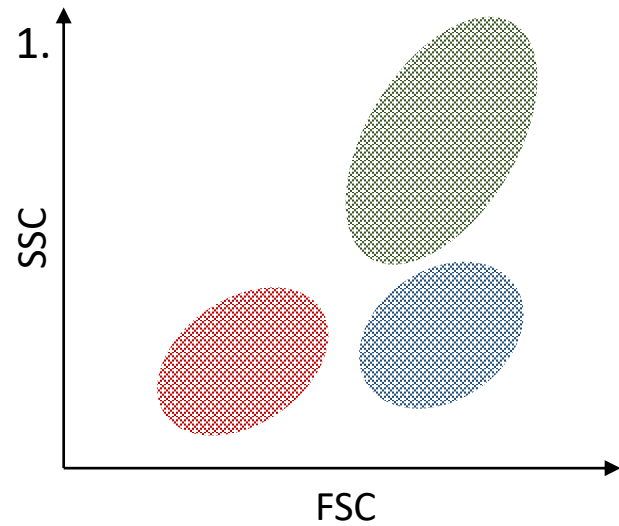
CS

EN

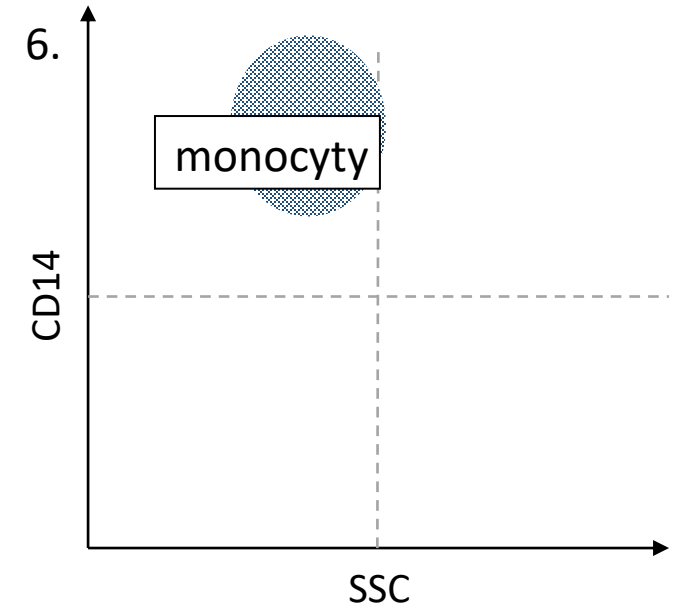
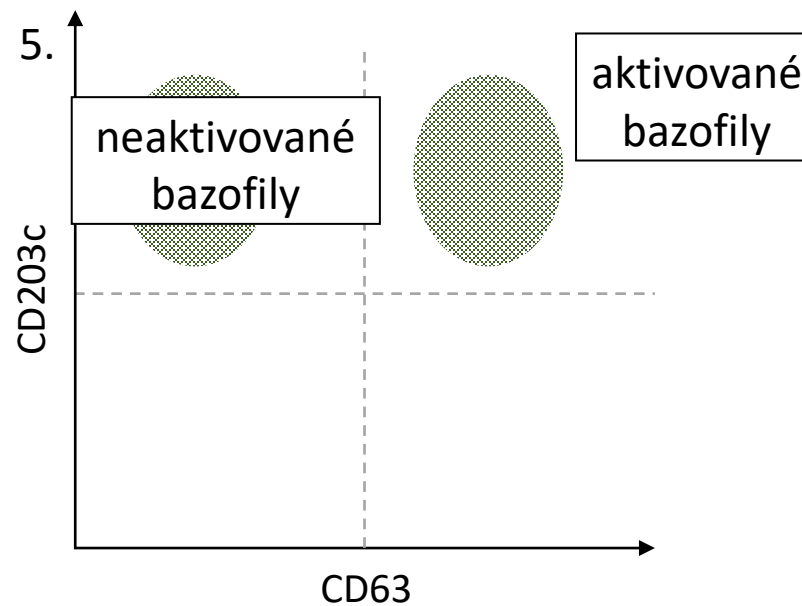
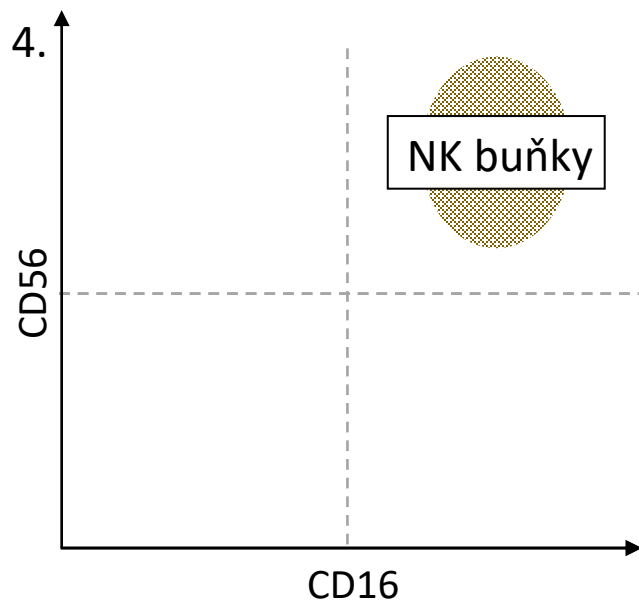
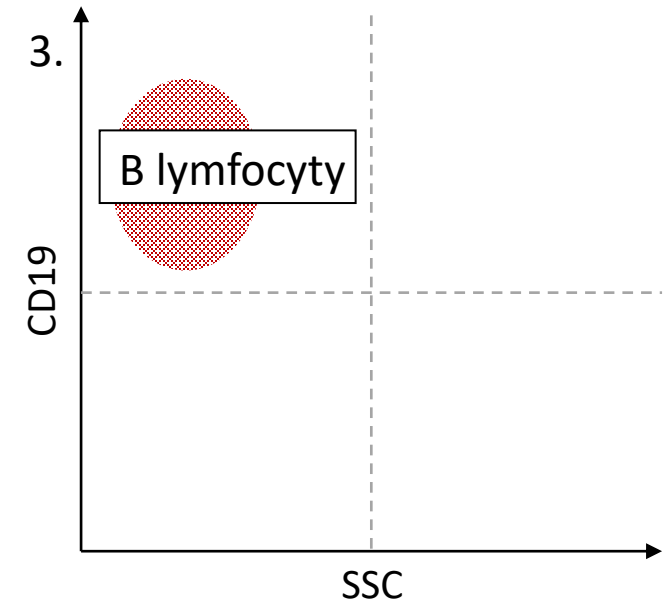
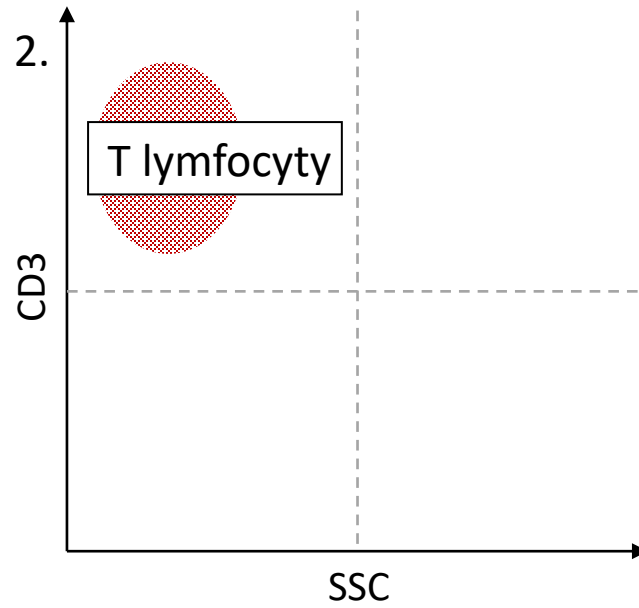
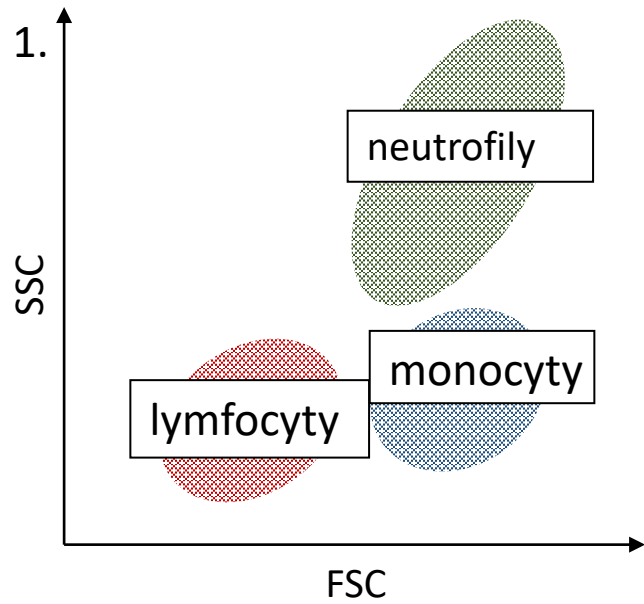
Subpopulace lymfocytů	Jednotka	n	Průměr
CD3+	%	12	71,1
	buněk/ μ l	12	2007
CD3+ CD8+	%	12	27,0
	buněk/ μ l	12	762
CD3+ CD4+	%	12	42,6
	buněk/ μ l	12	1203
CD3-CD16+ CD56+	%	12	16,3
	buněk/ μ l	12	461
CD3-CD19+	%	12	11,0
	buněk/ μ l	12	310

A.5 Opakování - ověření znalostí - zadání

1. Umístěte do grafu č. 1 populace buněk s jejich názvy dle velikosti a granularity
2. Které populace leukocytů jsou zobrazeny v grafech č. 2 -6 ?



A.5 Opakování - ověření znalostí - řešení



B. Část praktická

B.1 Biologický, chemický a pomocný materiál, technické vybavení

Biologický a chemický materiál

- ❖ lidská venózní krev odebraná do zkumavky s heparinem
- ❖ pracovní roztok B = PBS (ROTH, bez Mg^{+2} a Ca^{+2} , pH=7,4), použití roztoku: ředění ostatního, zde uvedeného materiálu + purifikace
- ❖ IL 3: zásobní roztok c = 10ng/ml
- ❖ hmyzí jedy (včela, vosy): zásobní roztoky c = 100 μ g/ml
- ❖ anti Ig-E: zásobní roztok c = 0,2 mg/ml
- ❖ protilátky značené fluorochromem: anti CD45/PerCP, anti CD203c/PE, anti CD63/FITC, anti CD3/PE, anti CD19/FITC
- ❖ roztok pro lýzu erytrocytů – 15mM NH_4Cl
- ❖ ledová tříšť
- ❖ kit FagoFlowEx

Technické vybavení

- ❖ pipetman: 20 μ l, 200 μ l, 5000 μ l
- ❖ nádoba na ledovou tříšť
- ❖ stojan na zkumavky
- ❖ centrifuga s chlazením
- ❖ cytometr
- ❖ termoblok
- ❖ kádinky
- ❖ míchačka

Pomocný jednorázový materiál

- ❖ buničina
- ❖ plastik: špičky, zkumavky
- ❖ rukavice, desinfekce

B.2 Identifikace B a T lymfocytů

B.2.1 Princip testu a schéma pracovního postupu

Princip: B a T lymfocyty jsou ve vzorku lidské periferní krve identifikovány po lýze erytrocytů prostřednictvím měření exprese znaků CD3+ (T lymfocyty) a CD19+ (B lymfocyty) na leukocytech (CD45+) metodou průtokové cytometrie

Schéma pracovního postupu:

charakterizace

- ❖ označení vzorku (popsání zkumavky)
- ❖ pipetovat 80 μ l heparinizované krve do zkumavky + 20 μ l roztoku B

značení

- ❖ do zkumavky přidat 30 μ l směsi protilátek konjugovaných s fluorochromem, která obsahuje: 10 μ l anti CD45/PerCP + 10 μ l anti CD3/PE + 10 μ l anti CD19/FITC
- ❖ inkubace zkumavky 20min / na ledu/ ve tmě

purifikace

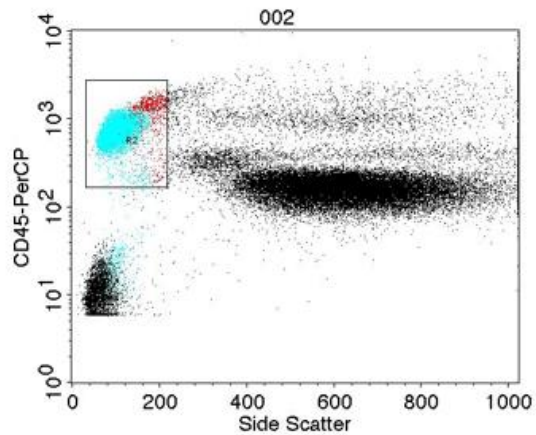
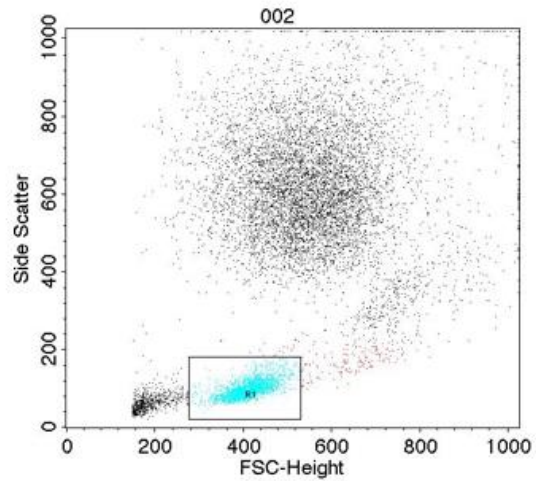
- ❖ přidat do zkumavky 1,5 ml lyzačního roztoku
- ❖ inkubace zkumavky 11min/ lab. teplota/ve tmě
- ❖ odstředění zkumavky: 1500 ot./min/5min/4 °C
- ❖ slítí supernatantu, k peletu na dně zkumavky přidat 2,5ml pracovního roztoku B
- ❖ odstředění zkumavky: 1500 ot./min/5min/4 °C
- ❖ slítí supernatantu, k peletu na dně zkumavky přidat 0,5ml pracovního roztoku B

cytometrie

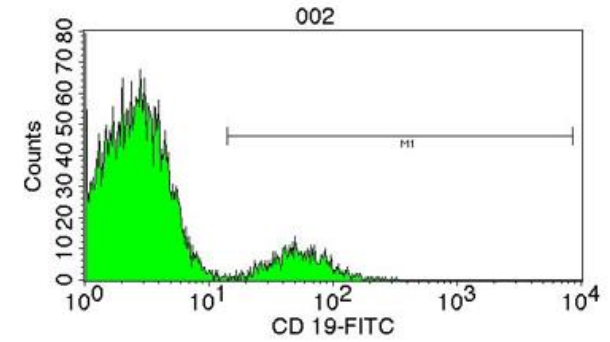
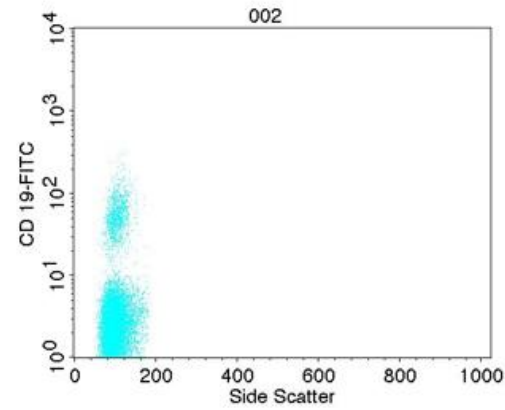
- ❖ měření + analýza vzorku na přístroji FASC Calibur a FASC Verse

B.2.2 Cytometrická analýza

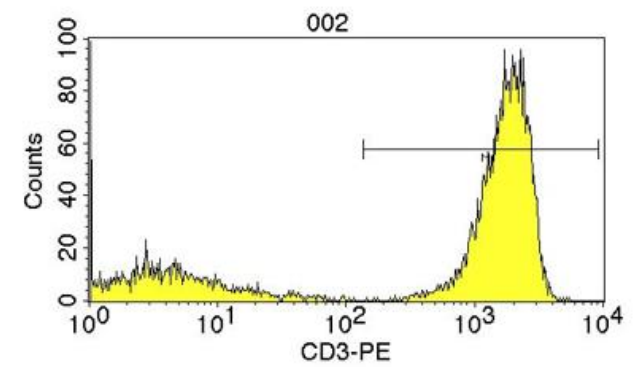
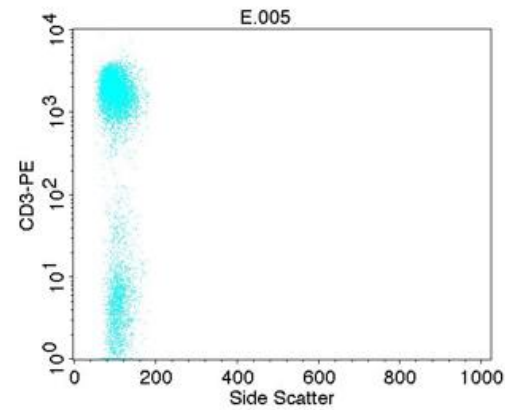
Lymfocyty



B lymfocyty (CD45+, CD19+)



T lymfocyty (CD45+, CD3+)



Zdroj: ÚIKB

B.3 Bazotest – test aktivace bazofilních granulocytů

B.3.1 Princip testu

- ❖ testování alergické reakce zprostředkované protilátkami IgE analýzou expozice proteinu CD63 na povrchu bazofilů (buňky CD203c+, CD45+) po jejich stimulaci alergenem v lidské periferní krvi s heparinem pomocí průtokové cytometrie.
- ❖ **Princip:**
 - ❖ spuštění aktivace bazofilů in vitro v přítomnosti senzibilizujícího alergenu, následuje měření expozice aktivačního znaku bazofilů (proteinu CD63) na povrchu buněk CD203c+ pomocí monoklonální protilátky značené fluorochromem metodou průtokové cytometrie.
 - ❖ jestliže je ve vzorku obsaženo dostatečné množství alergenně specifických molekul IgE, které jsou navázané na povrchu bazofilů prostřednictvím vysokoafinitního receptoru FcγRI, přidaný alergen způsobí přemostění receptorů, které vede k plné aktivaci bazofilů, které je spojené s procesem vylití obsahu zánětlivých působků z cytoplazmatických granúl ven z buňky (degranulaci). V důsledků degranulace dochází k expozici transmembránového proteinu cytoplazmatických granúl CD63 na povrchu bazofilů. Ten je následně detekován monoklonální protilátkou anti-CD63 konjugovanou s fluorochromem FITC. Populace bazofilů je ve směsi leukocytů identifikována monoklonální protilátkou anti-CD203c konjugovanou s fluorochromem PE. Populace leukocytů je ověřena monoklonální protilátkou anti-CD45 konjugovanou s fluorochromem PerCP. Pozitivní kontrolu představuje vzorek, kde jsou bazofily aktivované monoklonální protilátkou anti-IgE, která zastupuje stimulační účinek specifického alergenu.

B.3.2 Schéma pracovního postupu

charakterizace

- ❖ označení vzorků: zkumavka č.1 – nula, zkumavka č. 2- pozitivní kontrola, zkumavka č. 3 – alergen
- ❖ pipetovat 80 μ l heparinizované krve do každé zkumavky

preinkubace

- ❖ příprava reakční směsi pro preinkubaci: 80 μ l krve + 20 μ l IL3 (výsledná c = 2ng/ml) do každé zkumavky
- ❖ inkubace 30 min/37°C

aktivace

- ❖ přidat: zkumavka č.1 - 100 μ l pracovního roztoku B, zkumavka č.2 - 100 μ l anti-IgE (výsledná c=2 μ g/ml), zkumavka č. 3 - 100 μ l hmyzího jedu c= 1 μ g/ml
- ❖ inkubace zkumavek 20 min/37°C
- ❖ zastavení aktivace: zchlazení – 5min na ledu

značení

- ❖ do každé zkumavky přidat 30 μ l směsi protilátek konjugovaných s fluorochromem, která obsahuje: 10 μ l anti CD45/PerCP + 10 μ l anti CD203c/PE + 10 μ l anti CD63/FITC
- ❖ inkubace zkumavek 20min / na ledu/ ve tmě

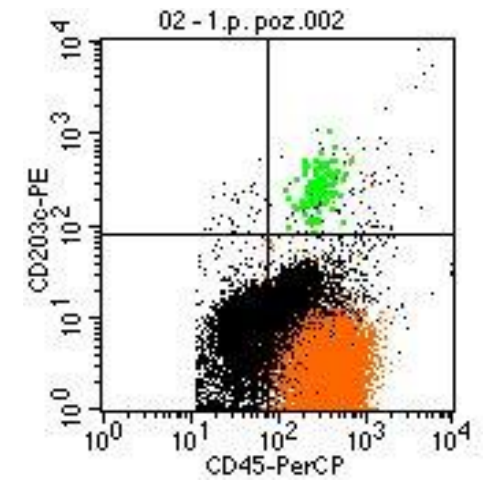
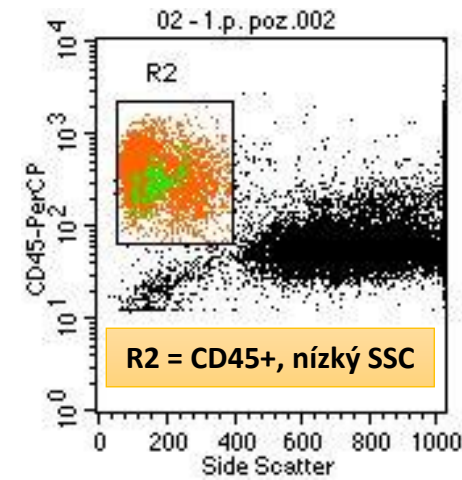
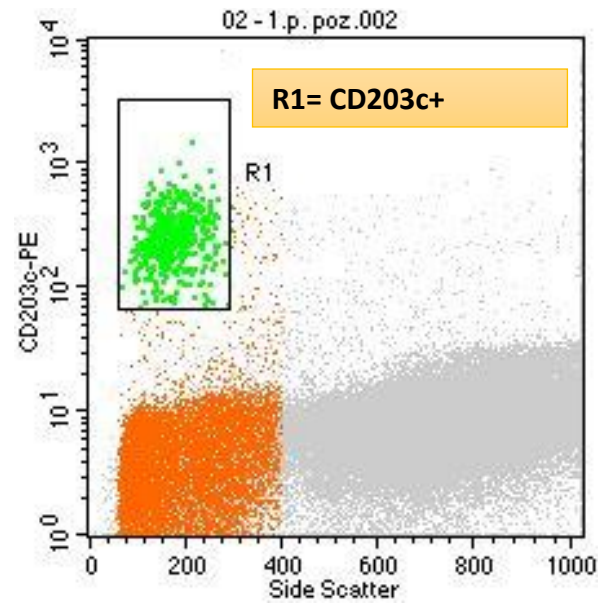
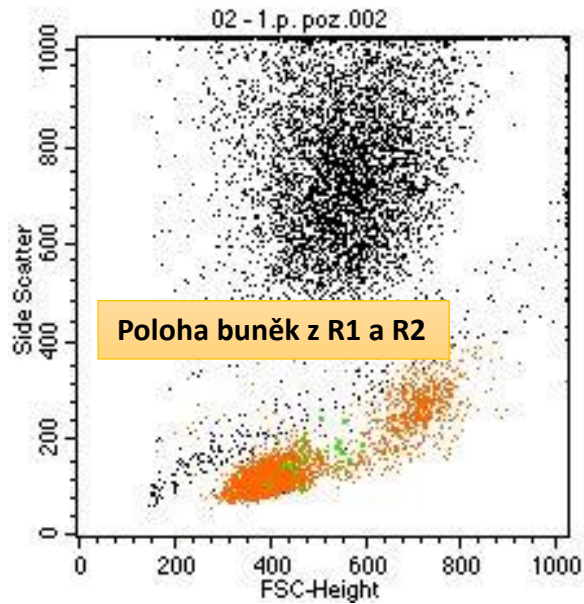
purifikace

- ❖ přidat do každé zkumavky 1,5 ml lyzačního roztoku
- ❖ inkubace zkumavek 11min/ lab. teplota/ve tmě
- ❖ odstředění zkumavek: 1500 ot./min/5min/4 °C
- ❖ slítí supernatantu, k peletu na dně každé zkumavky přidat 2,5ml pracovního roztoku B
- ❖ odstředění zkumavek: 1500 ot./min/5min/4 °C
- ❖ slítí supernatantu, k peletu na dně každé zkumavky přidat 0,5ml pracovního roztoku B

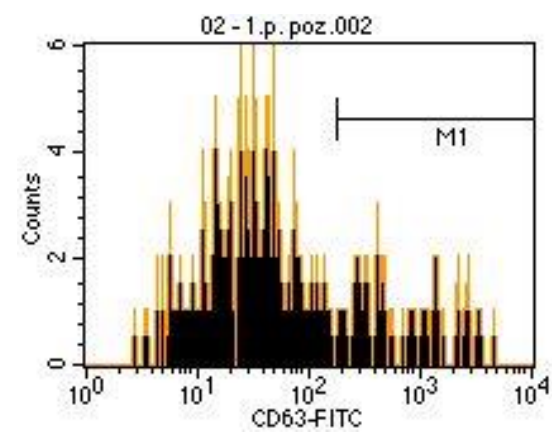
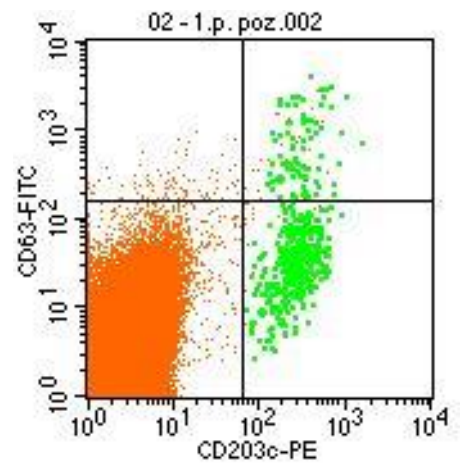
cytometrie

- ❖ měření + analýza vzorků na přístroji FASC Calibur a FASC Verse

B.3.3. Cytometrická analýza



CD 203c+ a CD 63+ z R2 →



← M = CD63+ z R1 + R2

Zdroj: ÚIKB

B.4 Stanovení fagocytární aktivity neutrofilů

B.4.1 Princip testu

- ❖ Cytometrické vyšetření fagocytární aktivity neutrofilních granulocytů měřením respiračního vzplanutí po stimulaci těchto buněk *E. coli* ve vzorcích periferní krve, odebrané do heparinu
- ❖ Respirační (oxidační) vzplanutí je reakce některých fagocytů (neutrofilů a makrofágů), při níž se krátkodobě zvyšuje buněčná spotřeba kyslíku a fagocyty začnou na obranu produkovat několik druhů toxických látek. K respiračnímu vzplanutí dochází zpravidla po pohlcení patogenů (hlavně bakterií) těmito leukocyty. Dochází k aktivaci NADPH oxidázy v membráně fagolysosomálních váčků, kde se pohlcené bakterie nachází. NADPH oxidáza produkuje superoxidové ionty (O_2^{-1}), které se následně pomocí enzymu superoxid dimustáza mohou převádět na peroxid vodíku (H_2O_2), navazující chemické či enzymatické reakce produkují další toxické produkty → hydroxylový radikál ($\cdot OH$), chlornan (ClO^{-1}) a další. Následně je v leukocytech aktivován enzym indukovatelná NO syntáza (iNOS), která umožňuje produkci oxidu dusnatého (NO). Uvedené látky jsou schopné zlikvidovat bakterii uvnitř fagolysosomu, zároveň se dostávají z buňky ven → vedlejším produktem jejich činnosti může být poškození tkání.
- ❖ **Princip testu:**
 - ❖ při pohlcení bakterií (v testu *E. coli*) je ve fagocytech aktivován enzym NADPH-oxidáza, který je spouštěčem respiračního vzplanutí → vzniká ClO^{-1} → uvnitř fagocytů: $ClO^{-1} +$ dihydrorhodamin 123 → rhodamin 123 (= produkt s fluorescenčními vlastnostmi) → cytometrické měření intenzity exprese

B.4.2 Schéma pracovního postupu

❖ kit FagoFlowEx

charakterizace, aktivace

- ❖ označení vzorků: zkumavka č.1 – nula, zkumavka č. 2- pozitivní (stimulační) kontrola, zkumavka č. 3 – vzorek stimulovaný *E.coli*
- ❖ pipetovat 50μl heparinované krve do každé zkumavky +
zk. č. 1: ---
zk. č. 2: 10μl PMA (phorbol12- myristate13- acetát)
zk. č. 3: 10μl *E. coli*

značení

- ❖ zk. č. 1,2,3: přidat 10μl DHR123 (dihydrorhodamin 123)

inkubace

- ❖ 30min/37°C

purifikace – lýza erytrocytů

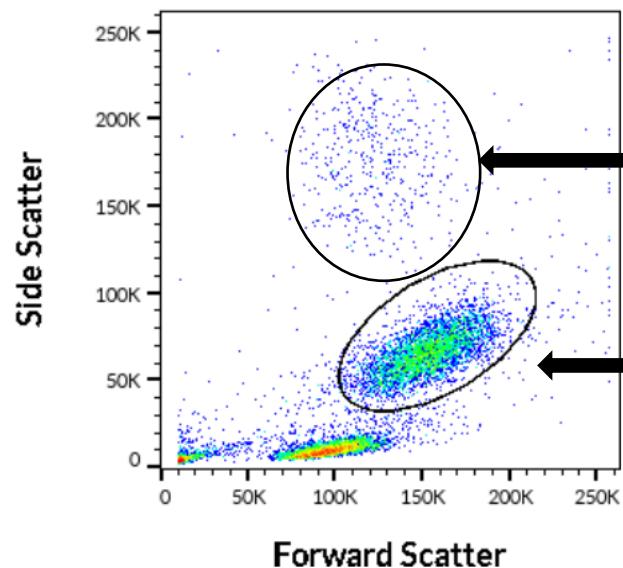
- zkumavky č. 1,2,3
- ❖ přidat 50μl lyzačního pufu
- ❖ inkubace 5min/ lab. t
- ❖ přidat 1ml H₂O
- ❖ inkubace 5 -10min/ lab. t

cytometrie

- ❖ měření + analýza vzorků na přístroji FASC Calibur a FASC Verse

B.4.3 Cytometrická analýza

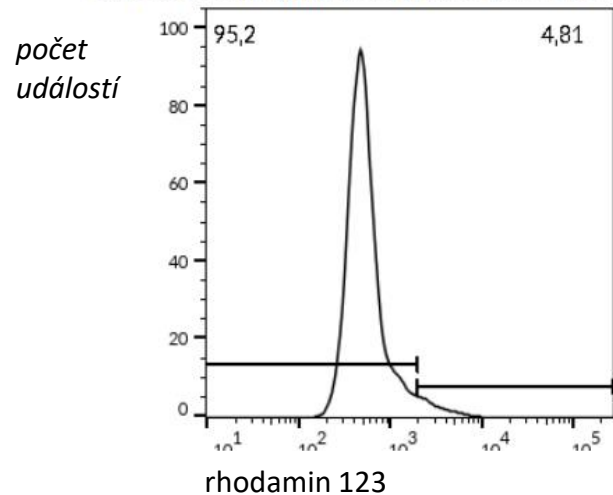
- ❖ při pohlcení bakterií dojde k posunu populace neutrofilních granulocytů v rámci parametrů FSC x SSC



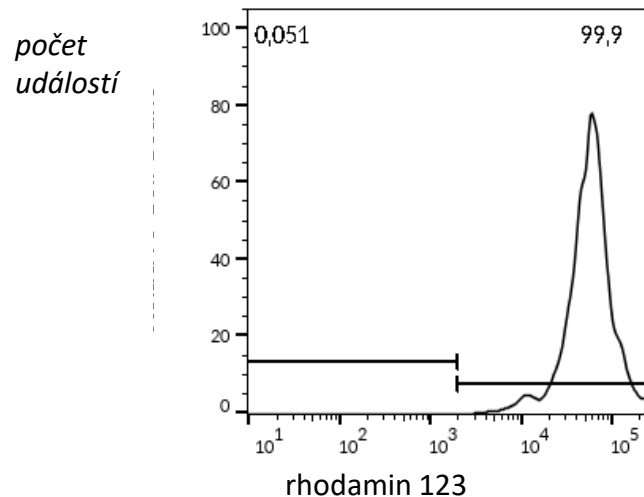
R1= populace neutrofilů bez známek pohlcení bakterií

R2 = populace neutrofilů po fagocytóze

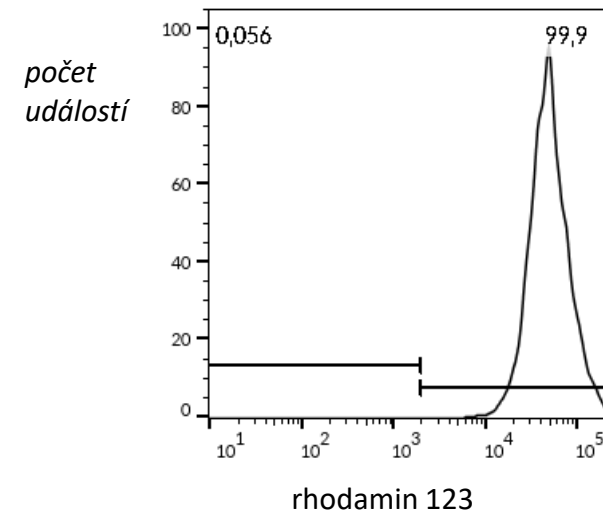
Obr. 2b Histogram granulocytů negativní kontroly.



Obr. 2a Histogram granulocytů pozitivní kontrol!



Obr. 2c Histogram stimulovaných granulocytů.



C. Použitá literatura, elektronické zdroje

ANDRÝS, Ctirad et al. *Laboratorní příručka: laboratorní vyšetření v klinické imunologii a alergologii*. 2., dopl. vyd. Hradec Králové: TAH, 2007. 163 s. ISBN 978-80-254-0951-0.

GRUHN, Günter, FRATZSCHER, Wolfgang a HEIDENREICH, Eberhard. *Chemické inženýrství*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1990. 485 s. Oborové encyklopedie SNTL. ISBN 80-03-00183-8.

HOŘEJŠÍ, Václav., BARTŮŇKOVÁ Jiřina.: *Základy imunologie*. Triton 2009, ISBN 978-80-7387-280-9.

MARINOV, Iuri. *Průtoková cytometrie v klinické hematologii*. 2., přeprac. a rozš. vyd. Praha: Triton, 2008. 148 s. ISBN 978-80-7387-143-7.

PECKA, Miroslav a BLÁHA, Milan. *Praktická hematologie: laboratorní metody*. Vyd. 1. Český Těšín: Infiniti art, 2010. 343 s. ISBN 978-80-903871-9-5

<https://www.bd.com/cs-cz/company/about-bd>

<https://www.exbio.cz/>

https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSCalibur_instructions.pdf

http://core.tmmu.edu.cn/attachments/158/BD_FACSVerse_Users_Guide.pdf

