



Agencia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile



Società Italiana di Citometria

Con il sostegno di

Beckman Coulter Italia



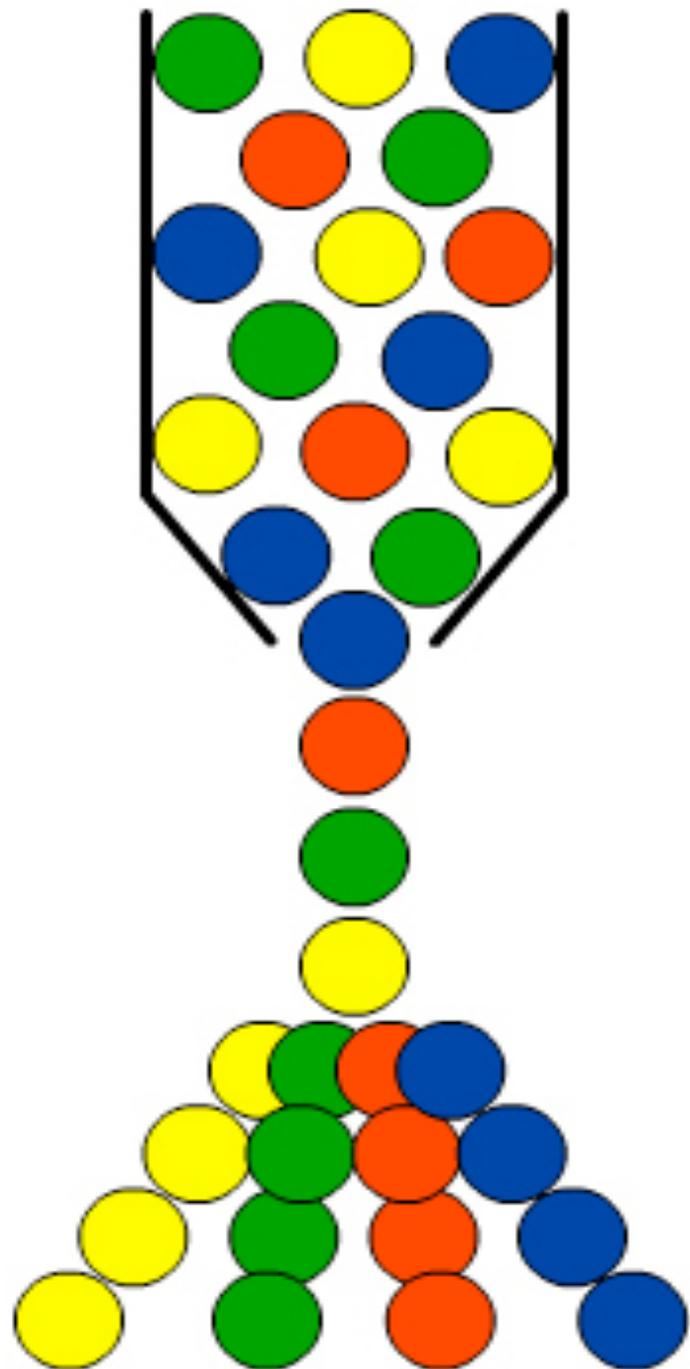
## Workshop

**Fast and fluo:  
high processing flow  
cytometry techniques  
for green biotech, the  
environment and the  
food chain**

*Tanti, piccoli e importanti:  
analizzare microrganismi e  
particelle con la citometria  
a flusso*

Salone dei Convegni  
ENEA Sede Lungotevere  
Thaon di Revel, Roma

**15 APRILE 2019**



## Introduzione

Sergio Lucretti

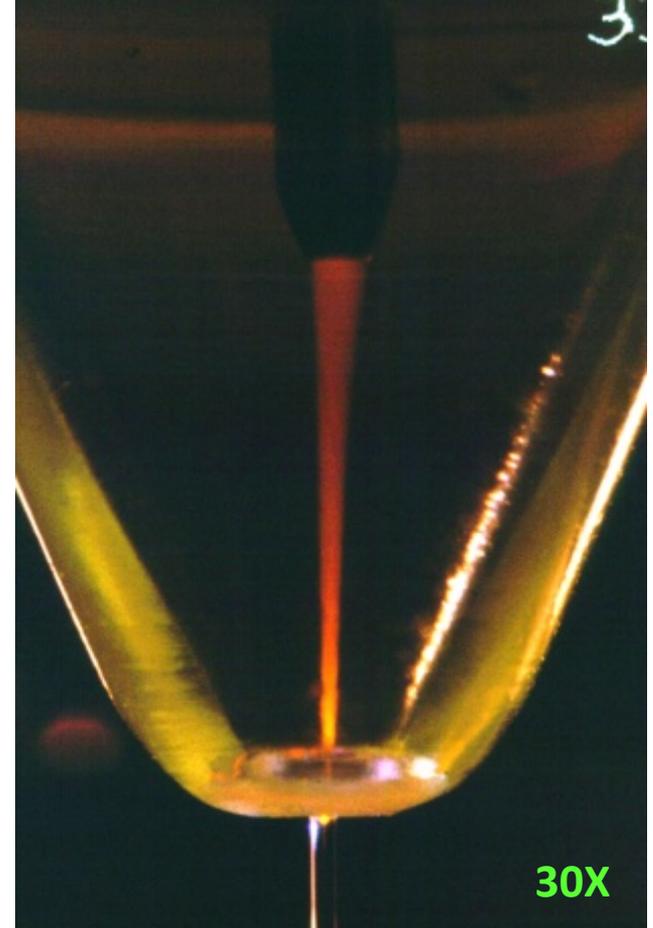
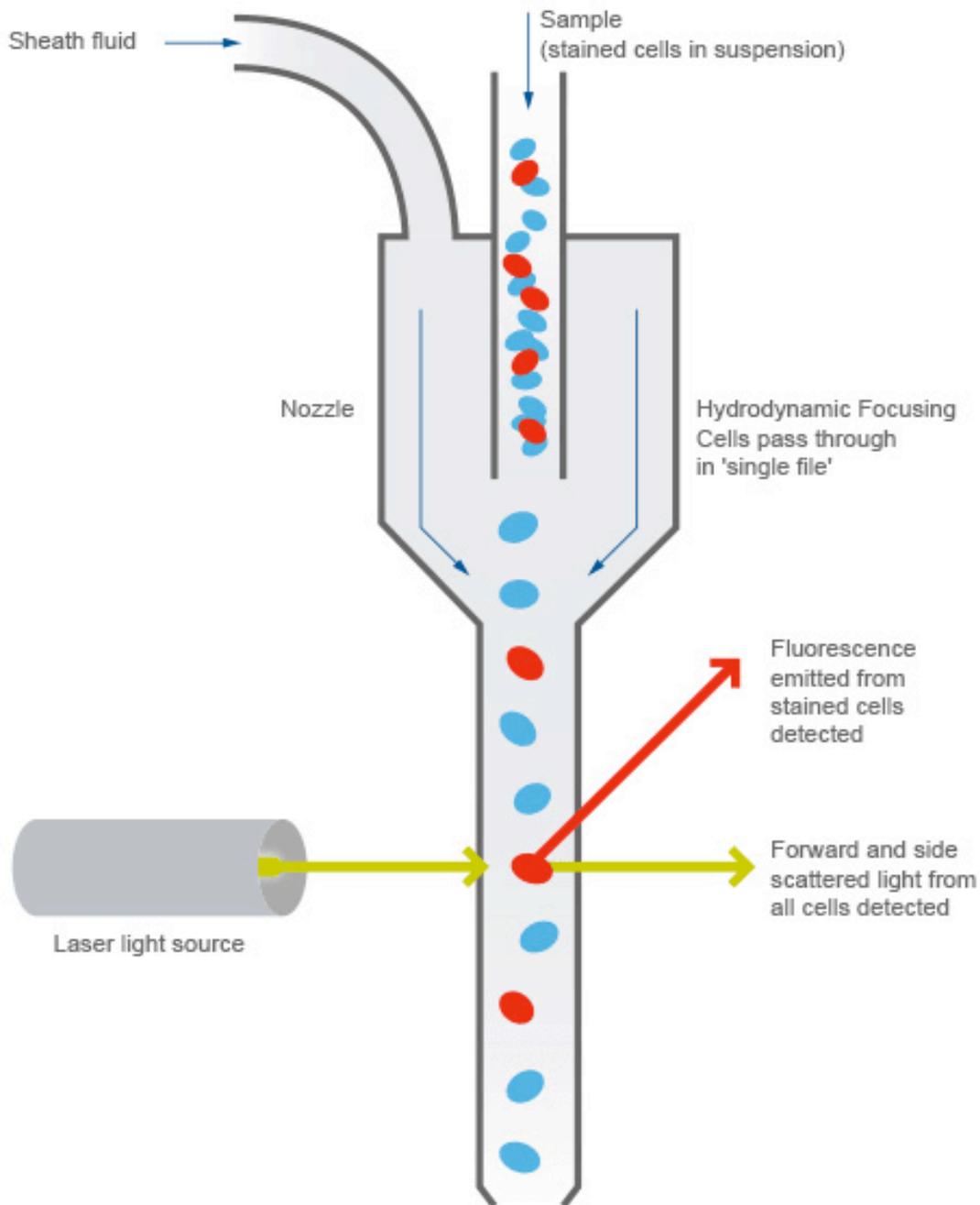
Questo Workshop si tiene a circa 25 anni dal primo Corso Internazionale Teorico-Pratico su temi non bio-medici svolto presso il Centro Ricerche della Casaccia (07-11 Novembre 1994) e presenta una panoramica orientativa su alcune applicazioni della citometria a flusso in settori in grande sviluppo attinenti alla microbiologia, sia in ambito alimentare che ambientale, alle biotecnologie ed alle scienze omiche in pianta e altri organismi.

Partendo dai principi fondanti della citometria a flusso, come la focalizzazione idrodinamica delle particelle per la costituzione di un flusso laminare che ne consenta l'analisi "ad una ad una" e in rapida successione usando piu' parametri fisico-chimici correlati alla singola particella, verranno presentati piu' esempi di impiego basati sia sulla sola caratterizzazione che sulla sua peculiare capacita' separativa tramite *flow sorting*.

Le presentazioni spazieranno dall'analisi di vescicole extracellulari, alla separazione di cromosomi e nuclei in sospensione, all'analisi di batteri e micro alghe sia in ambienti contaminati che in matrici alimentari (e.g. latte) con un ambito dimensionale che considera più di tre ordini di grandezza.

La grande versatilità della citometria a flusso "esotica" trova chiaro riscontro sia nell'interesse crescente dei ricercatori che nello sviluppo di strumentazioni sempre piu' "user friendly" ed orientate a specifiche applicazioni... *Fast & Fluo... and Useful*.

# Flow Cytometry



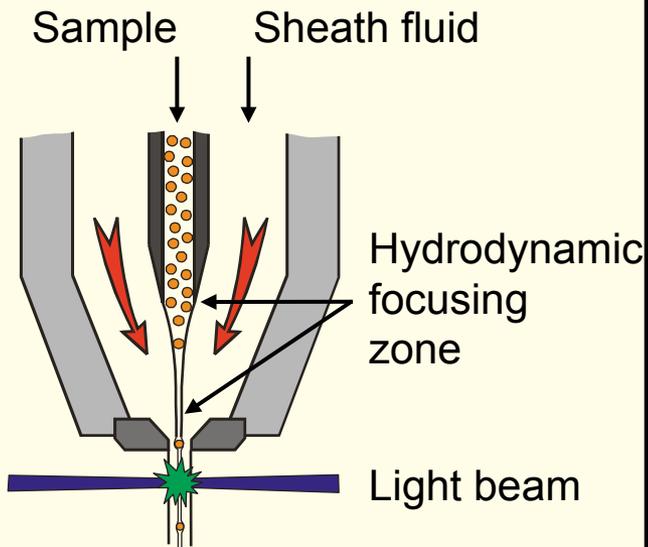
*“Esotica” o no, la citofluorimetria a flusso funziona così...*

# Citofluorimetria a Flusso... e' tutto qui, o quasi

Per ottenere passaggio di singole particelle allineate nella camera di analisi (o cella di flusso) :

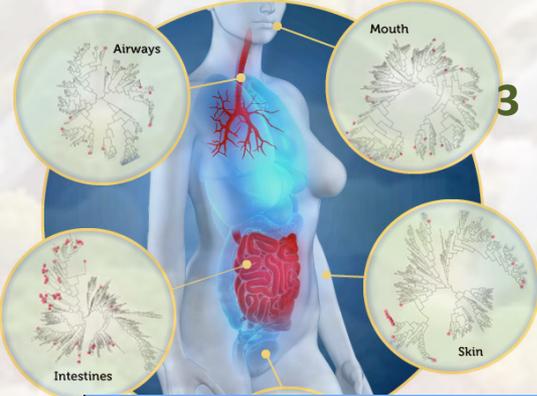
## Focalizzazione idrodinamica

### Hydrodynamic focusing

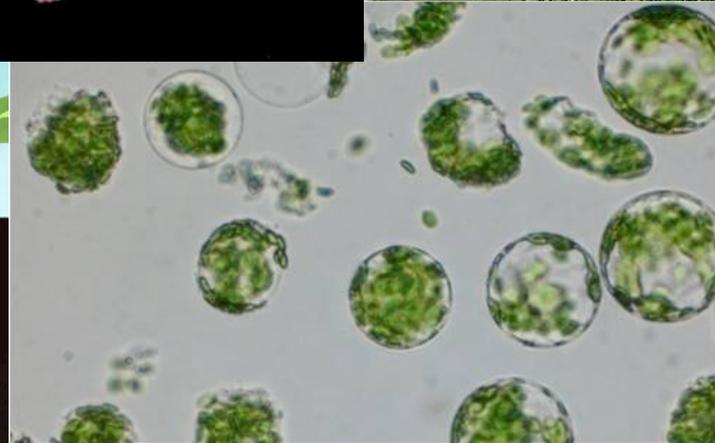
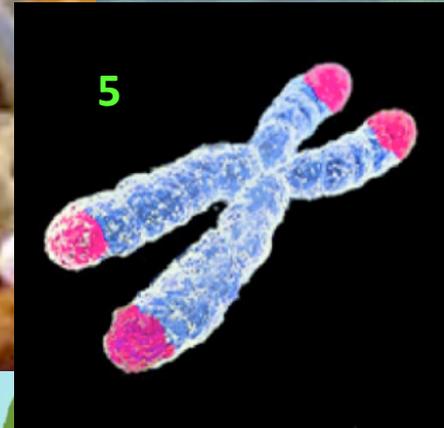
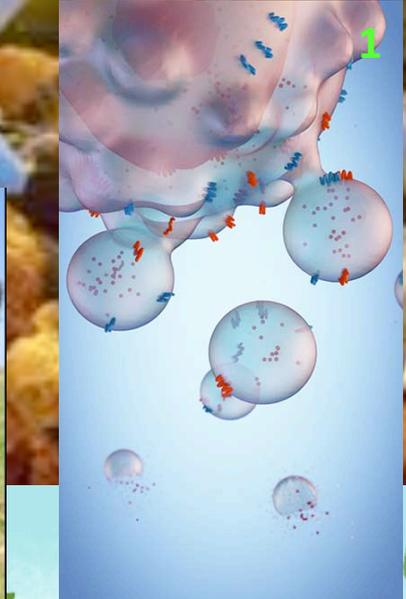


Nozzle

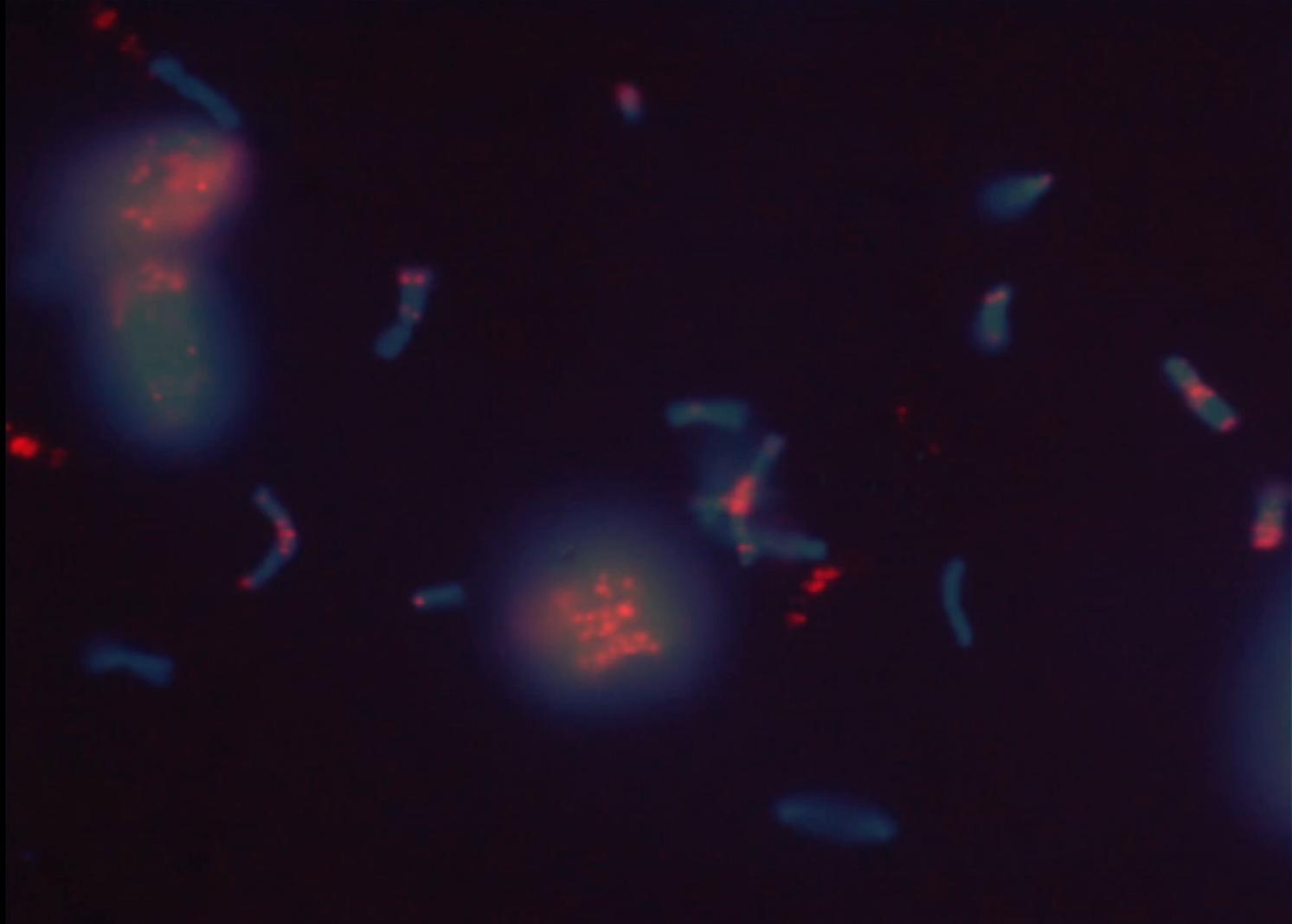
Il campione una volta all'interno della cella di flusso viene inguainato dallo *sheath fluid* di rivestimento ed entra in una prima regione chiamata *nozzle*. Il *nozzle* è la componente "cruciale" e più delicata di un citometro a flusso, in quanto al suo interno il campione viene sottoposto ad un processo di **focalizzazione idrodinamica**. Dall'incontro tra lo *sheath fluid* (fluido di rivestimento) ed il campione si creano, nel *nozzle*, due flussi coassiali: uno interno (iniettato da un'ago all'interno del *nozzle*) contenente le particelle d'analizzare (*core flow*) ed uno esterno costituito dallo *sheath*. Il flusso che si genera nella camera di flusso deve essere **laminare**, in modo tale che i due fluidi scorrano l'uno rispetto all'altro senza mescolarsi.



Adapted from Mazmanian

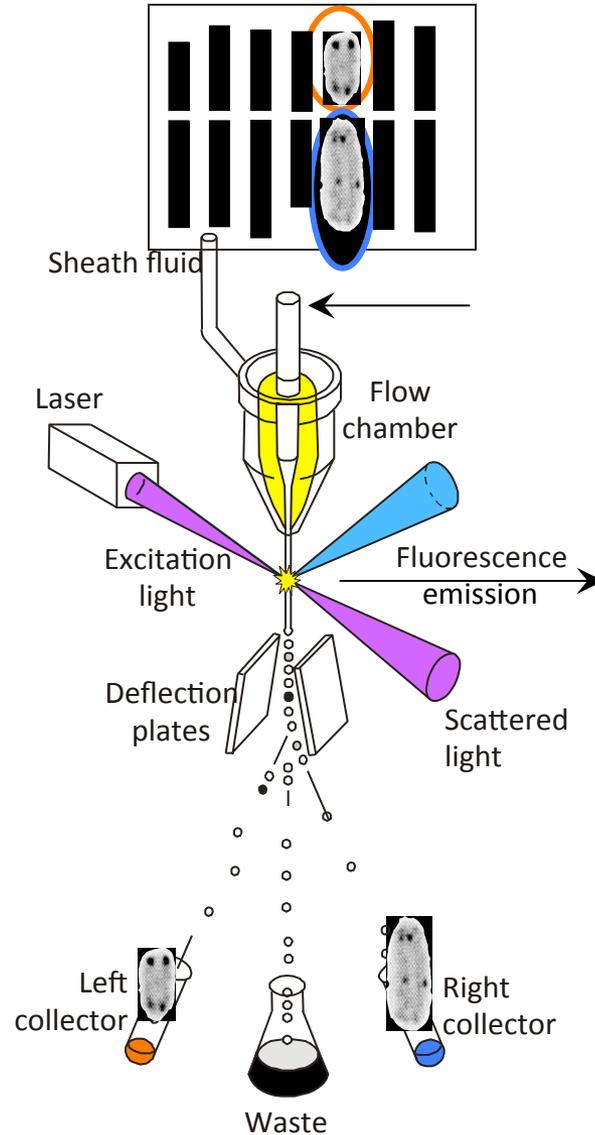


*“Esotica” ma intorno e dentro noi*

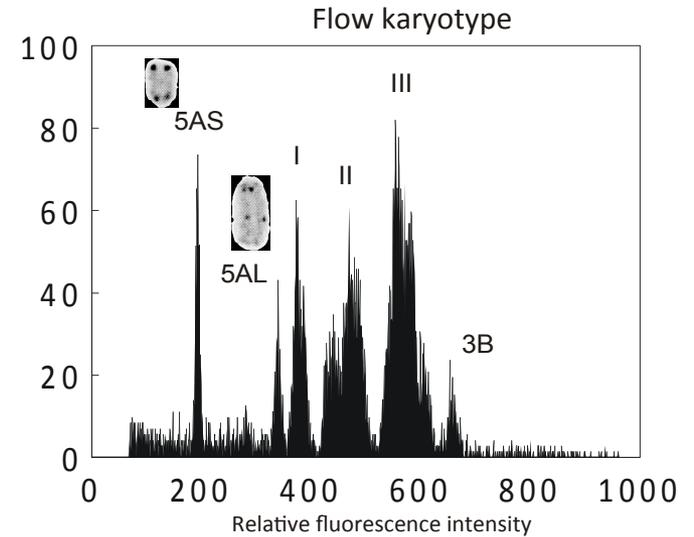


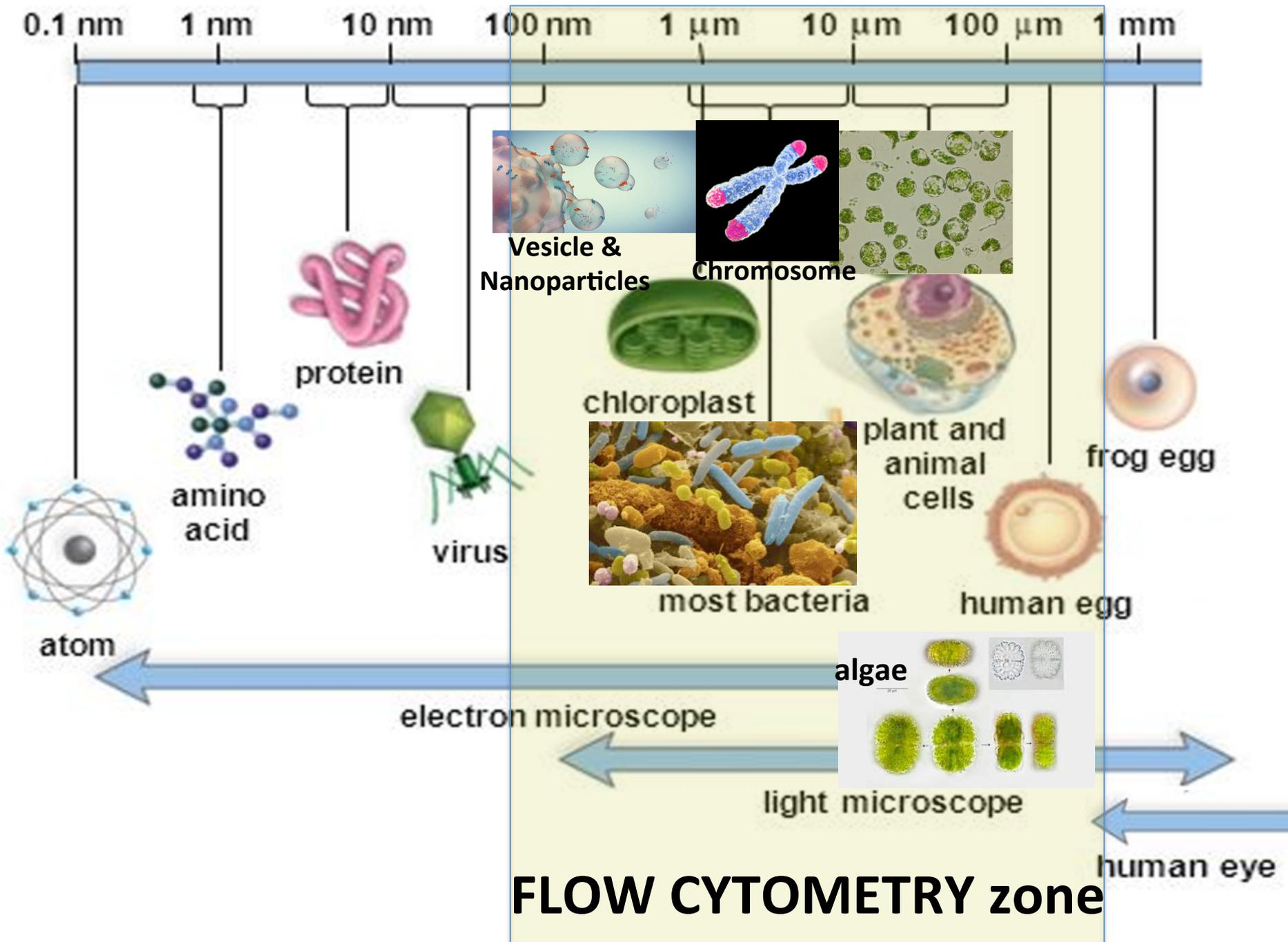
Sospensione di nuclei e cromosomi ibridati con una sonda molecolare coniugata ad un fluorocromo: in **BLU** il segnale del DNA, in **ROSSO** la sonda  
...L'attenzione si focalizza su cio' che interessa, i dati sono piu' facilmente interpretabili,  
E la comprensione della biologia ad essi collegata ne risulta facilitata, o addirittura fattibile...

Chromosomes in suspension



*Un esempio di flow sorting:  
caratterizzazione fine del  
cariotipo e isolamento di  
singoli cromosomi..  
dal tutto al singolo elemento separato:  
una specificita' della CF*





Flow Virometry: A powerful tool to functionally characterize viruses 2017 J. Virol. doi: 10.1128/JVI.01765-17 ...a dozen different viruses ranging from 40 nm to giant viruses have been probed by this approach, recently dubbed “flow virometry”...

Extracellular Vesicle Flow Cytometry Analysis and Standardization [Front Cell Dev Biol.](#) 2017; 5: 78 doi: [10.3389/fcell.2017.00078](#)

Flow Cytometric Assessment of Bacterial Abundance in Soils, Sediments and Sludge *Front. Microbiol.* 2016 [doi.org/10.3389/fmicb.2016.00903](#)

Cell Reports Resource A High-Throughput Screen for Yeast Replicative Lifespan Identifies Lifespan-Extending Compounds 2017 *Cell Reports* 21. doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.002

A deep learning-enabled portable imaging flow cytometer for cost-effective, high throughput, and label-free analysis of natural water samples 2018 *Light: Science & Applications* DOI 10.1038/s41377-018-0067-0

FISHIS: Fluorescence In Situ Hybridization in Suspension and Chromosome Flow Sorting Made Easy. 2013, *PLoS One*. DOI [10.1371/journal.pone.0057994](#)

Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9- cytidine deaminase fusion 2017 *Nature Biotech* DOI 10.1038/nbt.3811

Flow cytometry: a versatile technology for specific quantification and viability assessment of micro-organisms in multistrain probiotic products 2018 *Journal of Applied Microbiology* DOI 10.1111/jam.13666

Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines 2018 *Experimental & Molecular Medicine* DOI 10.1038/s12276-018-0071-8