



IMMUNOLÓGIAI ÉS
BIOTECHNOLÓGIAI
INTÉZET



8. Praktikum: Durchflusszytometrie, Zelltrennungs Methoden

Grundlagen der Immunologie

Universität Pécs, Klinisches Zentrum
Institut für Immunologie und Biotechnologie
Pécs, 2023.

Durchflusszytometrie Praktikum 1.

Schritte des Praktikums:

1. Antikoaguliertes peripheres Blut sammeln. (schon erledigt)
2. **Markierung der Zelloberfläche mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern:** Füge 50 μ l Blut den Reagenzgläsern hinzu die bereits die Antikörper enthalten und inkubiere sie für 30 Minuten!
3. **Hämolyse:** Füge 1 ml Hämolyse Puffer hinzu und inkubiere für 10 Minuten!
4. Waschen: Füge 2 ml PBS hinzu und Zentrifugiere die Reagenzgläser 5 Minuten lang bei 1000 RPM
5. Entsorgt den Überstand und Resuspendiert die Probe in 500 μ l FACS-Fix Lösung! (FACS-Fix: PBS + 0,5% Paraformaldehyd, **GIFTIG**)
6. Messen der Proben mit BD FACSCalibur™ Durchflusszytometer und Analyse der Ergebnisse mit dem BD CellQuest™ Programm.



Handschuhe tragen!

Durchflusszytometrie Praktikum 2.

- Inhalt der vorbereiteten Reagenzgläser:
 1. Röhre: anti-CD3-FITC + anti-CD4-PE
 2. Röhre: anti-CD3-FITC + anti-CD8-PE
 3. Röhre: anti-CD19-FITC + anti-CD5-PE
 4. Röhre: enthält keine Antikörper = Kontrolle der Autofluoreszenz
 5. Röhre: enthält keine Antikörper = Kontrolle der Autofluoreszenz
- Verwendete Fluorochrome (siehe später):
 - **FITC: Fluorescein isothiocyanat**
 - **PE: Phycoerythrin**



BD FACSCalibur™
Durchflusszytometer

Definition der Durchflusszytometrie

- Warum Zytometrie?
 - Eine Methode die in der Lage ist bestimmte Zellparameter zu analysieren (z.B. Zellzahl, Zellgröße, Körnung, Anwesenheit bestimmter Proteine auf der Zelloberfläche oder im Zytoplasma, DNA Gehalt, usw., siehe andere Folien)
- Warum Durchflusszytometrie?
 - Basiert auf den Fluss suspendierter Partikel (z.B. Zellen) die in einen Strom organisiert werden der einen Laserstrahl kreuzt. (siehe später)
- Wofür kann es genutzt werden?
 - Es ist in der Lage zur **schnellen, multiparametrischen** Analyse großer Zellmengen. Das heißt das verschieden Parameter jeder untersuchten Zelle gleichzeitig gemessen werden. (Größe, Granularität/Körnung, andere, abhängig von Markierung, siehe Später)

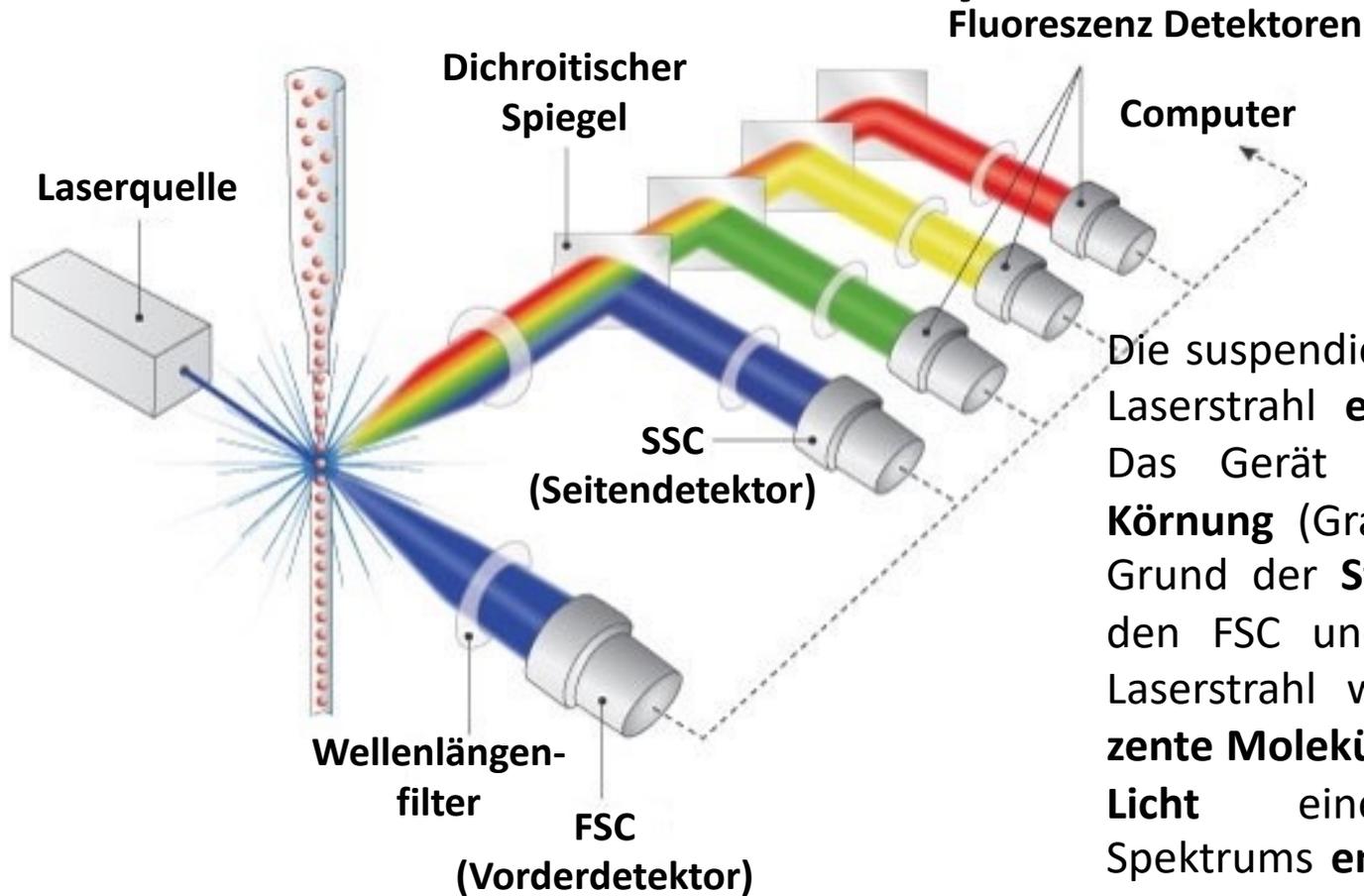


Ein Hämocytozometer:
Der Forscher/Kliniker
kann 100-200 Zellen pro
Minuten zählen.



BD FACSCanto™ II Durchflusszytometer:
Kann bis zu 10.000 Zellen
in einer Sekunde zählen.^[1.]

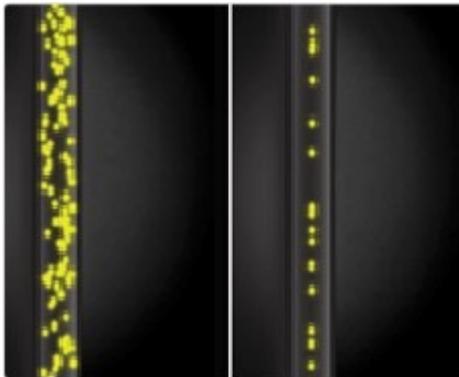
Das zugrundeliegende Prinzip der Durchflusszytometrie



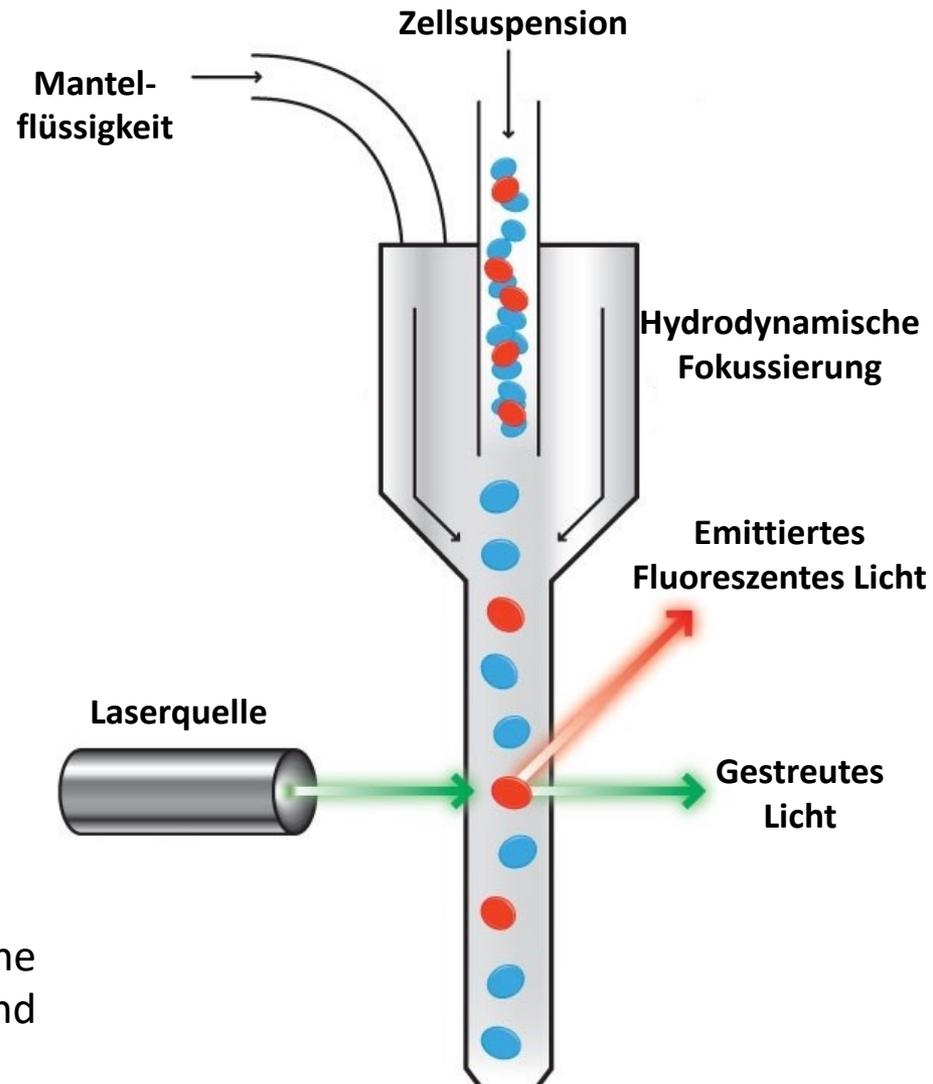
Die suspendierten Zellen kreuzen den Laserstrahl **eine nach der anderen**. Das Gerät berechnet **Größe** und **Körnung** (Granularität) der Zelle auf Grund der **Streuung des Lichtes** in den FSC und SSC Detektoren. Der Laserstrahl wird außerdem **Fluoreszente Moleküle erregen** die daraufhin **Licht** eines charakteristischen Spektrums **emittieren**. Das emittierte fluoreszente Licht wird zu den entsprechenden **Detektoren** durch **dichroitische Spiegel** oder Filter^{2.]} reflektiert.

Hydrodynamische Fokussierung

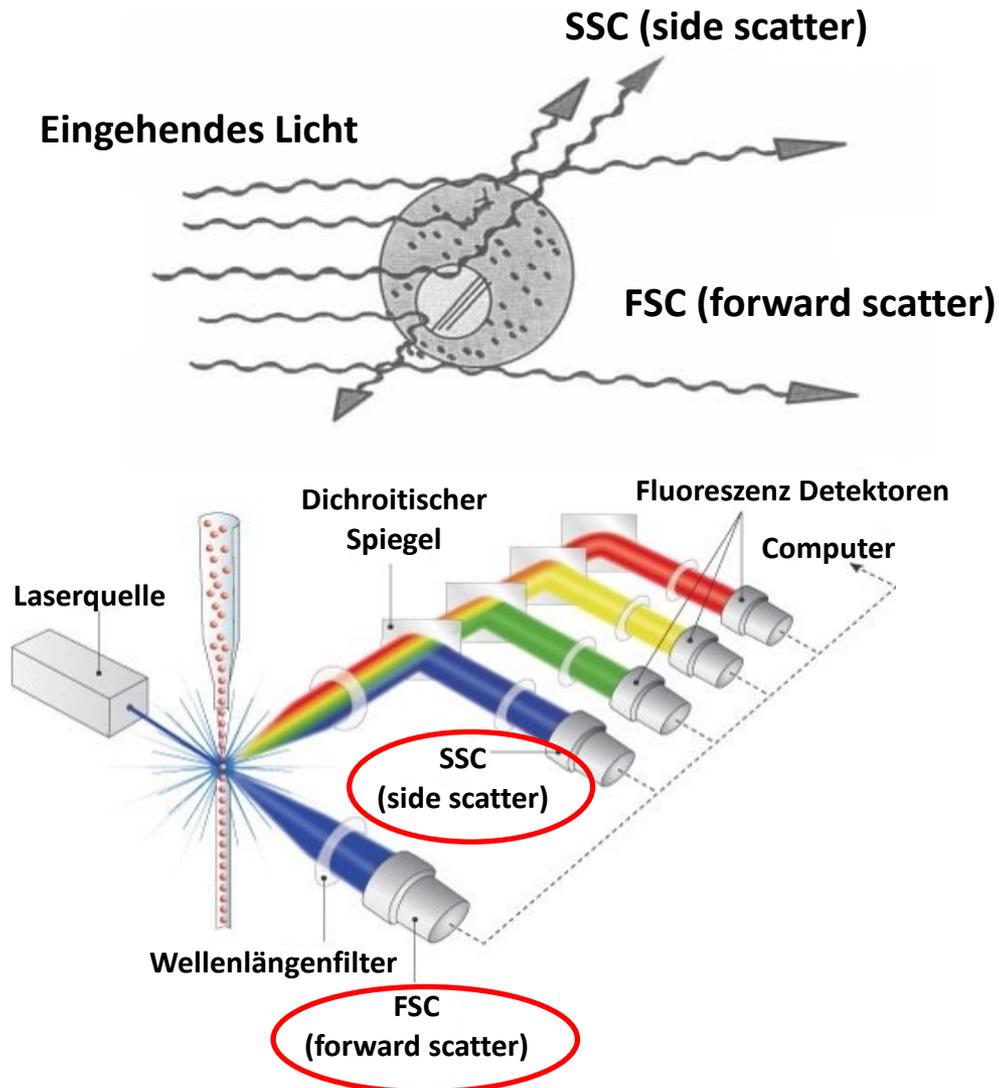
- Die **Mantelflüssigkeit** (in der Regel PBS) wird die suspendierten Zellen in eine Reihe ausrichten. Die Zellen fließen **eine nach der anderen** in einer geraden Linie in der **Kapillare**. Der **Laserstrahl** ist auf die Kapillare fokussiert..
- Ultraschall kann auch für die Fokussierung der Zellen genutzt werden (akustische Fokussierung).



Das Attune® Durchflusszytometer, das akustische Fokussierung nutzt, mit ausgeschalteter (links) und angeschalteter (rechts) Fokussierung.



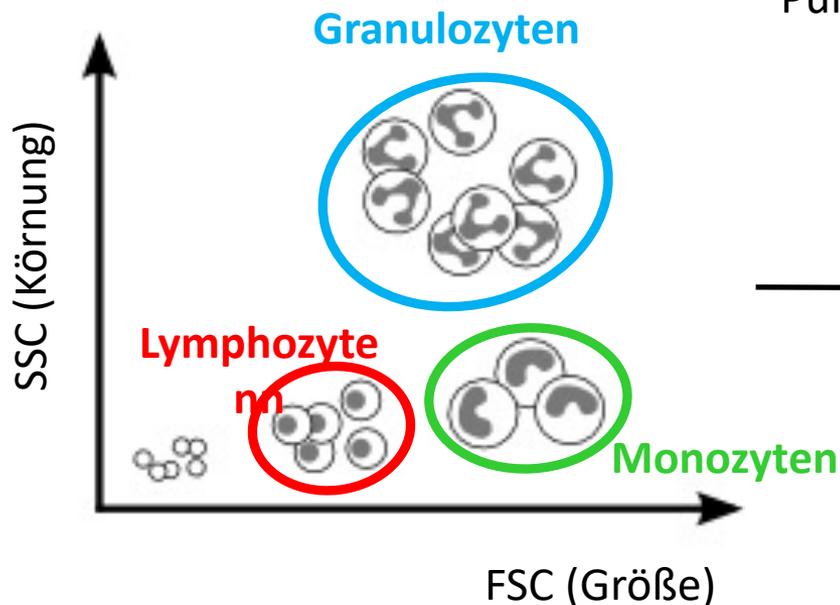
Die FSC und SSC Detektoren



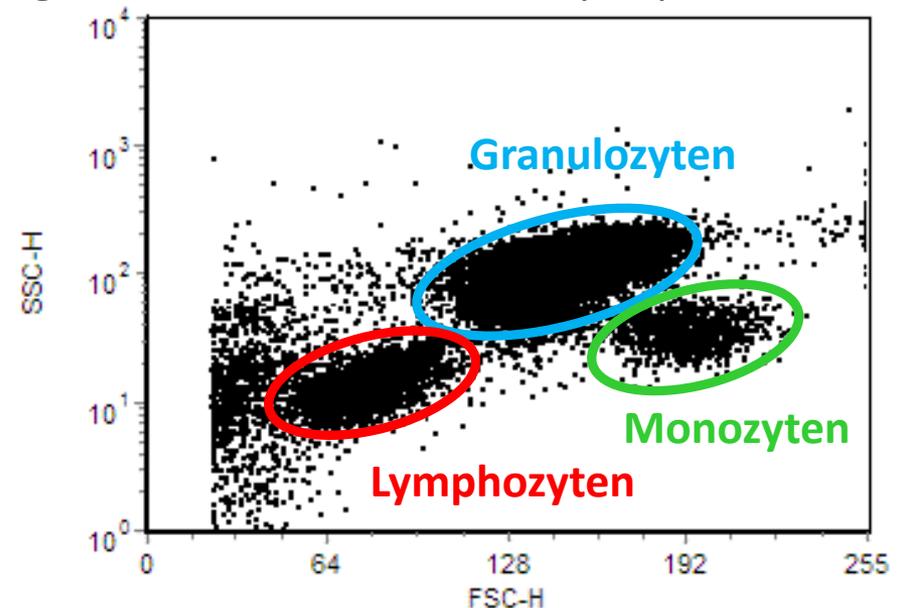
- Der **FSC** (forward scatter) Detektor befindet sich in der Achse der Laserquelle und erkennt vorwärts gestreutes Licht das **der Größe der Zelle entspricht**. Vorwärtsstreuung entsteht durch die Oberfläche der Zellmembran
- Der **SSC** (side scatter) Detektor steht in einem etwa 90° Winkel zum Laserstrahl. Seitliche Streuung des Lichts wird durch lamellare Strukturen in der Zelle verursacht (z.B. Mitochondrien, Granulen, Vesikel, usw.) und ist **Proportional zu der Körnung/Granularität** der Zelle.

Einführung in Punktdiagramme aus FSC und SSC Daten

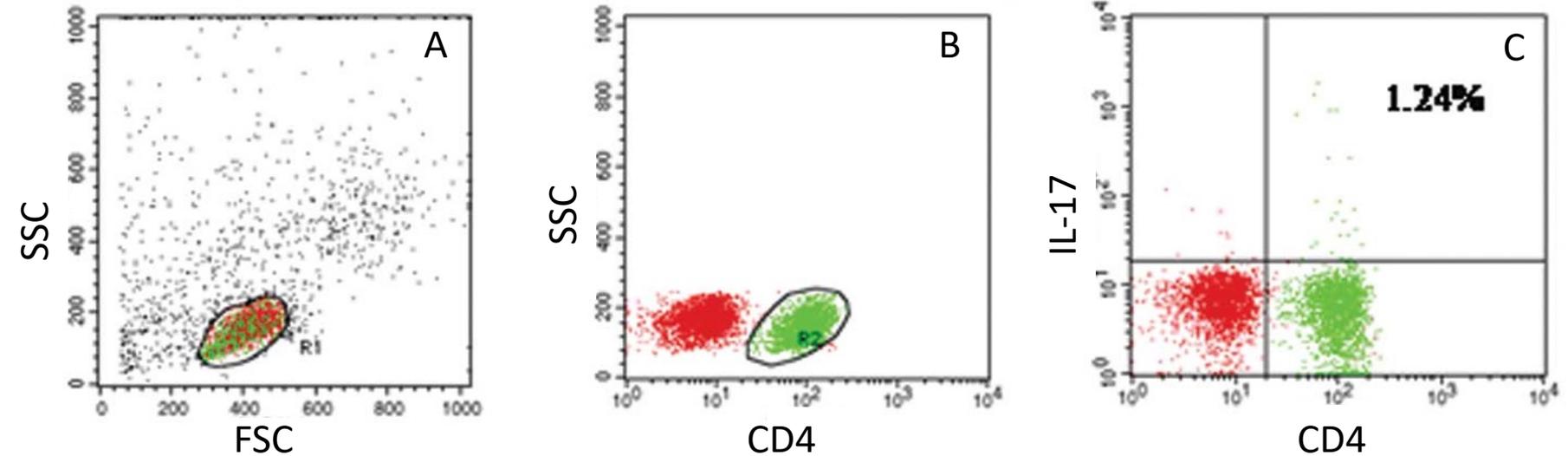
Das **Punktdiagramm (dot plot)** ist die am häufigsten genutzte Methode zur Visualisierung der Daten von durchflusszytometrischen Messungen. Es zeigt die Zellen in einem **zweidimensionalen Koordinatensystem** wo jeder Punkt eine individuelle Zelle darstellt und die Achsen spezifische Parameter repräsentieren die vom Untersucher festgelegt werden. Zellen mit ähnlichen Parametern bilden Gruppen die **Zellpopulationen** genannt werden. Diese kann man selektiv für andere Parameter untersuchen (**“gating”**).



Punktdiagramm von menschlichem peripherem Blut



Gating Beispiel

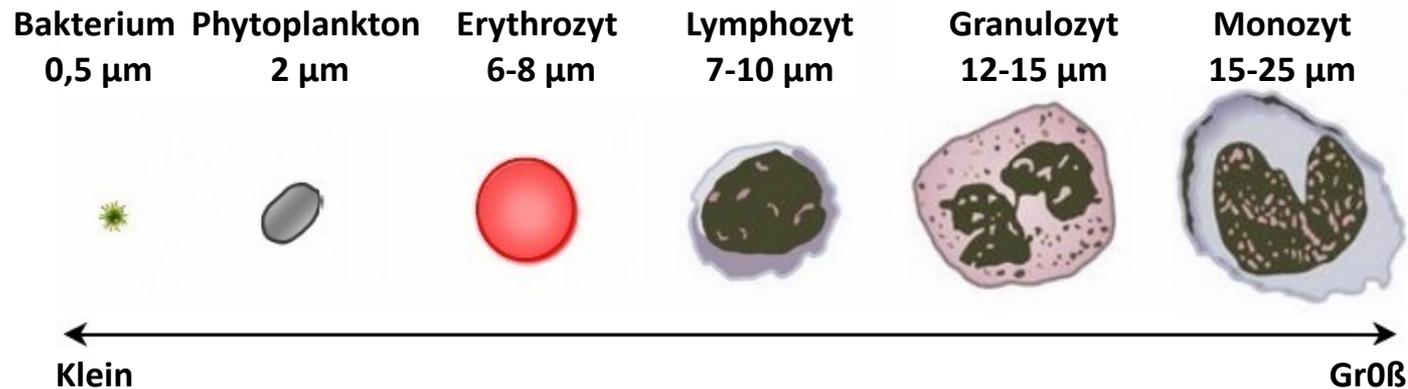


Sie wollten das Verhältnis von Th17 Zellen (siehe 2. Praktikum) in der Probe feststellen. Das Blut wurde mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD4 und IL-17 markiert, dann wurden die Proben mit einem Durchflusszytometer untersucht.

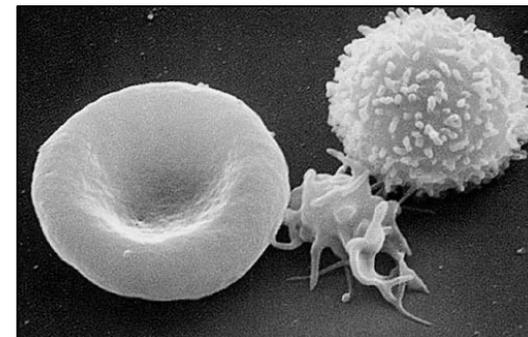
- **A:** Lymphozyten wurden aufgrund von Größe (FSC) und Körnung (SSC) gewählt. → (R1 gate)
- **B:** CD4+ Zellen wurden in der Lymphozytenpopulation ausgewählt. (R2, grünes gate)
- **C:** Das Verhältnis der CD4+ und IL-17+ Zellen wurde im Lymphozyten-Gate gemessen. (der obere rechte Quadrant, 1.24% aller Lymphozyten.)

Durchflusszytometrie und Erythrozyten

- Erythrozyten sollten aus den Proben entfernt werden weil:
 - Ihre **Größe** den Lymphozyten **ähnel**t.
 - Sie weitaus häufiger im Blut vorkommen als Lymphozyten und deswegen Signale von Lymphozyten blockieren.

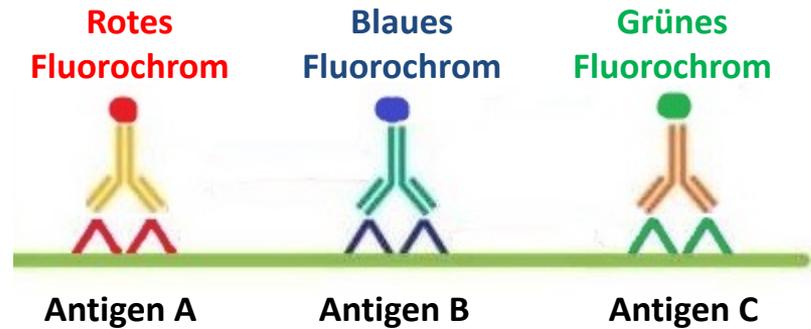
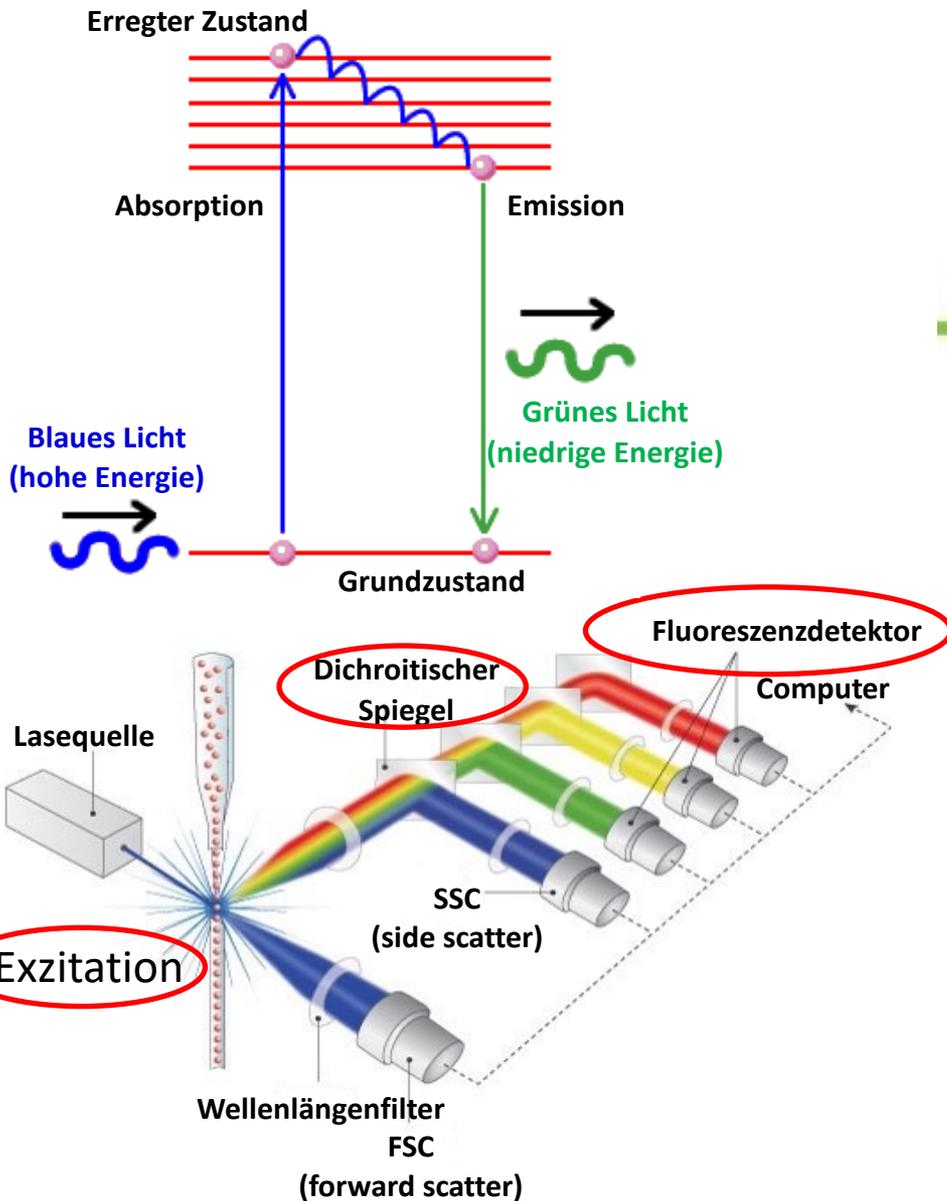


- Methoden zur Elimination der Erythrozyten:
 - **Hämolyse**
 - **Ficoll-Gradienten-Zentrifugation** (später)



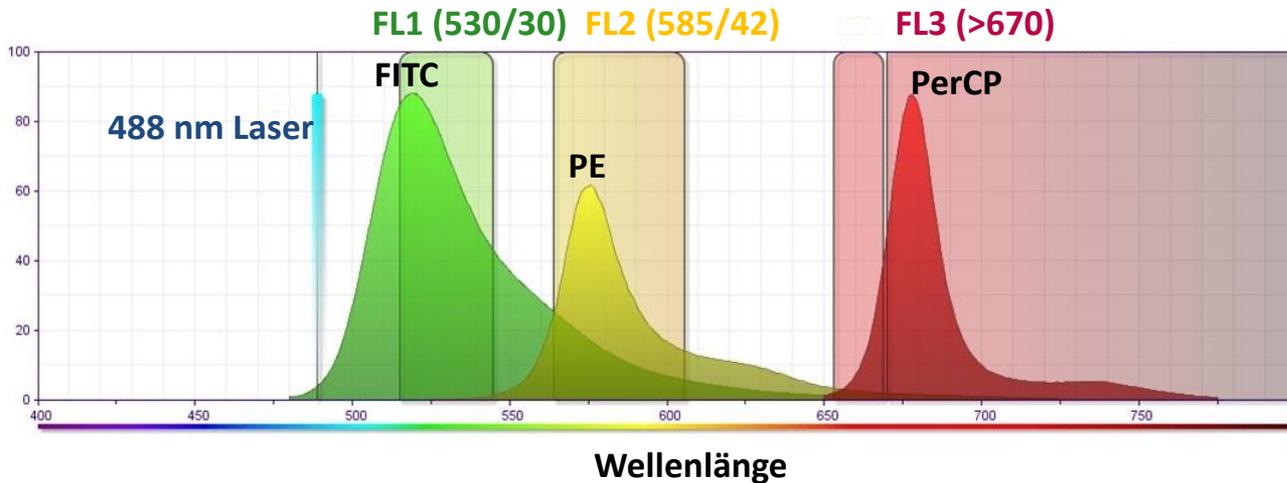
RBK, TCT und ein Lymphozyt

Immunofluoreszenz Markierung



Das Instrument kann nicht nur die Größe und Granularität einer Zelle berechnen, sondern auch **Fluoreszenz** detektieren. Der Laser **erregt** das Fluorochrom das am markierenden Antikörper befestigt wurde, welches dann Fluoreszentes Licht emittiert das für das Fluorochrom charakteristisch ist (**Emissionsspektrum**). Das emittierte Licht wird auf die entsprechenden Detektoren mithilfe von **Dichroitischen Spiegeln** oder Filtern reflektiert.

Das Fluoreszenzspektrum



Lasers of BD FACSCalibur:^[3.]

488 nm Argon Laser

635 nm roter Dioden Laser

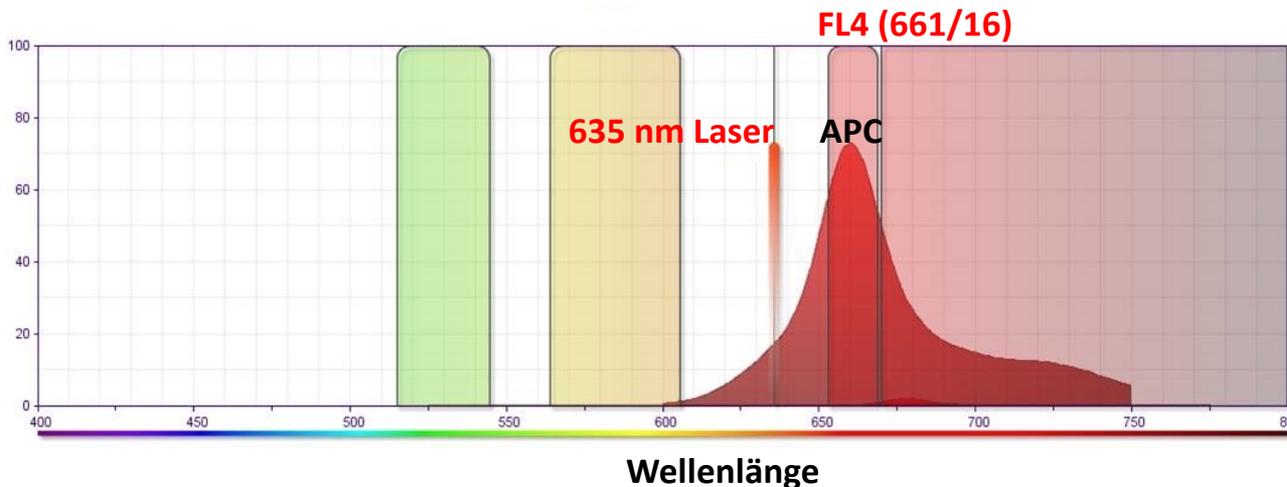
Detektoren of BD FACSCalibur:

FL1: 515-545 nm (530/30)

FL2: 564-606 nm (585/42)

FL3: >670 nm

FL4: 653-669 nm (661/16)



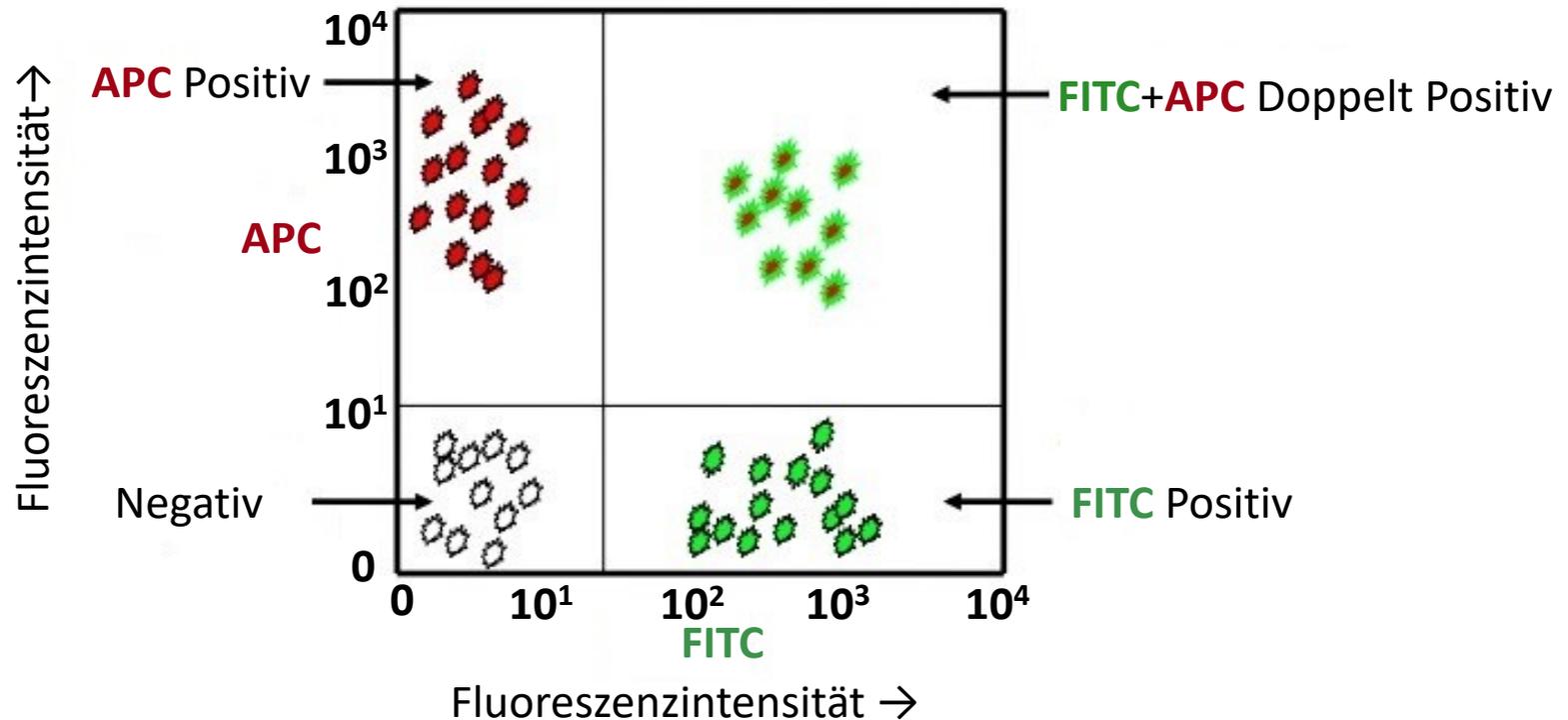
Im Gegensatz zu Lasern, die Licht einer einzigen Wellenlänge emittieren, strahlen Fluorochrome ein **Lichtspektrum** aus. Diese **überlappen** einander häufig.

Fluorochrome

Fluorochrome	Color	Excitation wavelength (nm)	Laser for excitation (nm)	Emission wavelength (nm)
Hoechst 33342	Blue	350	355, 375	461
Brilliant Violet™ 421	Blue	407	405	421
BD Horizon™ V450	Blue	404	405	448
Pacific Blue™	Blue	401	405	452
BD Horizon™ V500	Green	415	405	500
AmCyan	Green	457	405	491
Alexa Fluor® 488	Green	495	488	519
FITC	Green	494	488	519
PE	Yellow	496, 564	488, 532, 561	578
Brilliant Violet™ 605	Orange	407	405	602
BD Horizon™ PE-CF594	Orange	496, 564	488, 532, 561	612
PI	Orange	351	488, 532, 561	617
7-AAD	Red	543	488, 532, 561	647
APC†	Red	650	633, 635, 640	660
Alexa Fluor® 647	Red	650	633, 635, 640	668
PE-Cy™5†	Red	496, 564	488, 532, 561	667
PerCP	Red	482	488, 532	678
PerCP-Cy™5.5	Far Red	482	488, 532	695
Alexa Fluor® 700	Far Red	696	633, 635, 640	719
PE-Cy™7	Infrared	496, 564	488, 532, 561	785
APC-Cy7	Infrared	650	633, 635, 640	785
BD APC-H7	Infrared	650	633, 635, 640	785

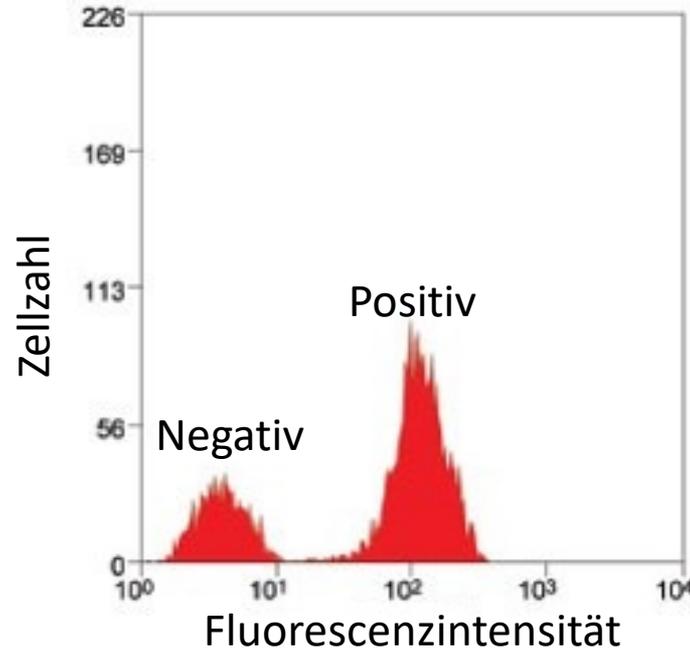
Fluorochrome, die vom selben Laser erregt werden und Licht des gleichen Spektrums emittieren, sollten nicht zusammen in einer Probe genutzt werden da die markierten Antigene nicht voneinander zu unterscheiden sind. (Häufige Kombinationen: **FITC** + **PE** + **APC**)

Fluoreszenz in Punktdiagrammen



Die Messung ist **quantitativ**, die detektierten Fluoreszenzintensitäten können als Zahlen angegeben werden. (=Man kennt auch das **Maß der Positivität.**)

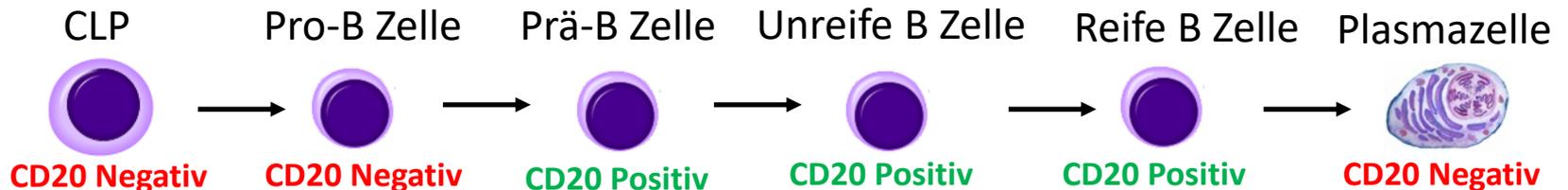
Daten im Histogramm



Normales Histogramm: Die horizontale Achse zeigt die Fluoreszenzintensität (Stärke des Signals) an die vom Detektor gemessen wurde während die vertikale Achse die Zahl der gemessenen Zellen repräsentiert. Im obigen Beispiel können zwei Zellpopulationen differenziert werden, eine negative und eine positive.

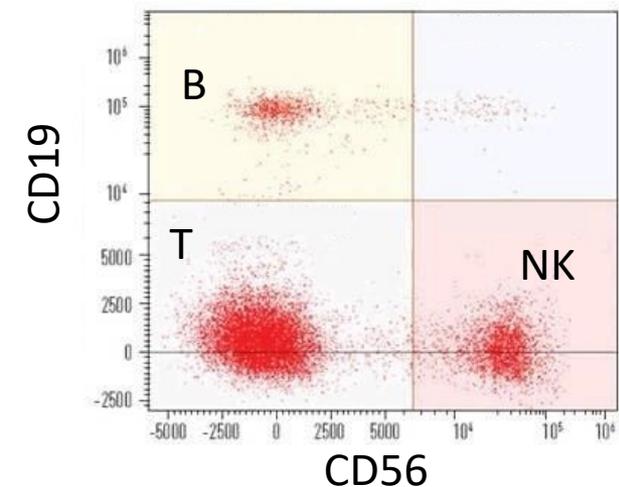
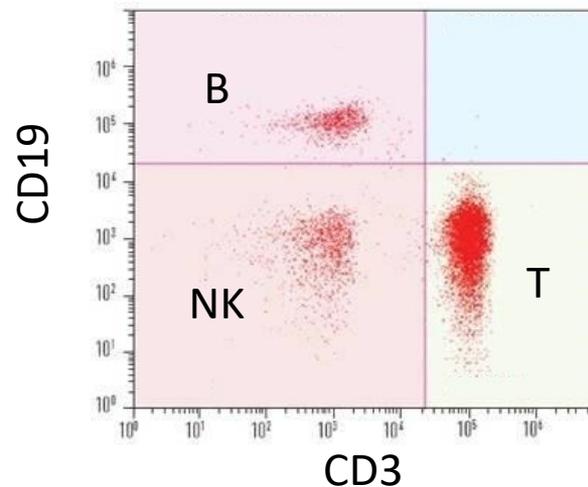
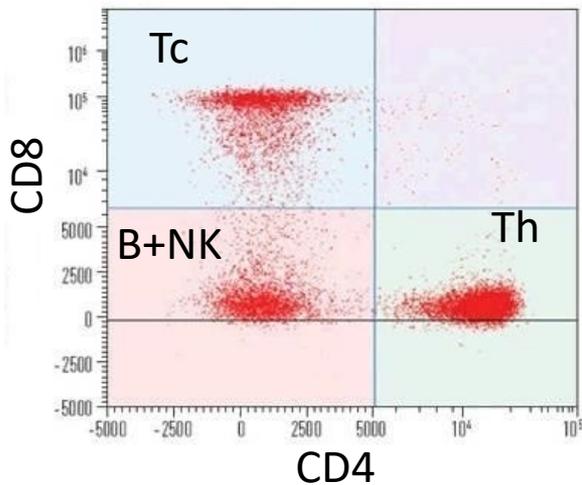
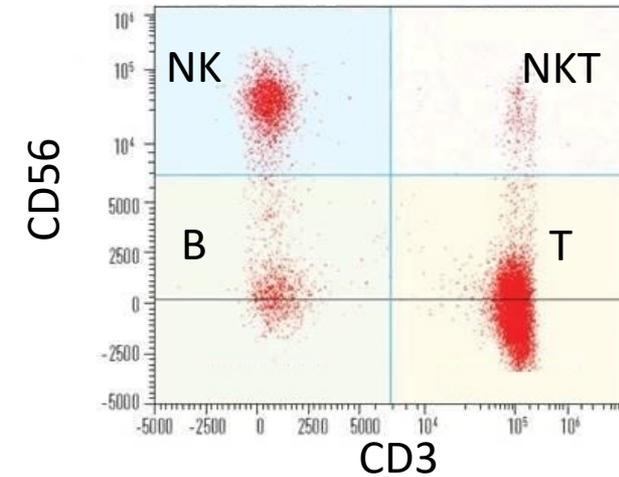
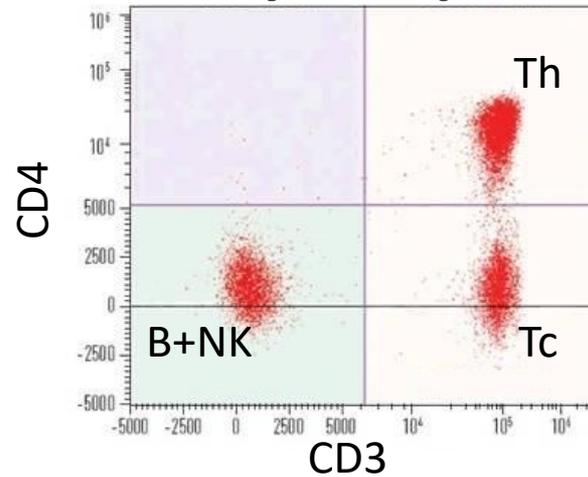
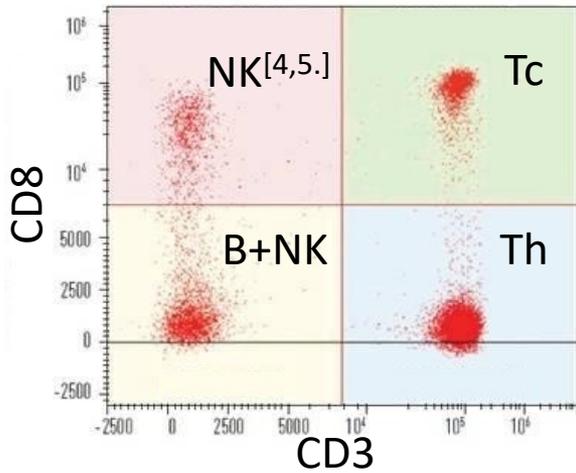
Typen von CD-Markern

- **Abstammungsmarker:** Moleküle die nur auf Zellen bestimmter Abstammung exprimiert werden.
 - Z.B.: CD3 → auf allen T Zellen CD19 → auf allen B Zellen
- **Reifungsmarker:** Der Immunphänotyp kann in unterschiedlichen Phasen der Zellreifung unterschiedlich sein, bestimmte Moleküle werden nur auf unreifen Zellen, andere nur auf reifen, voll funktionsfähigen, Zellen exprimiert, etc.
 - Z.B.: CD20 (Ist auch ein Abstammungsmarker da er nur auf B Zellen gefunden werden kann)^[1.]



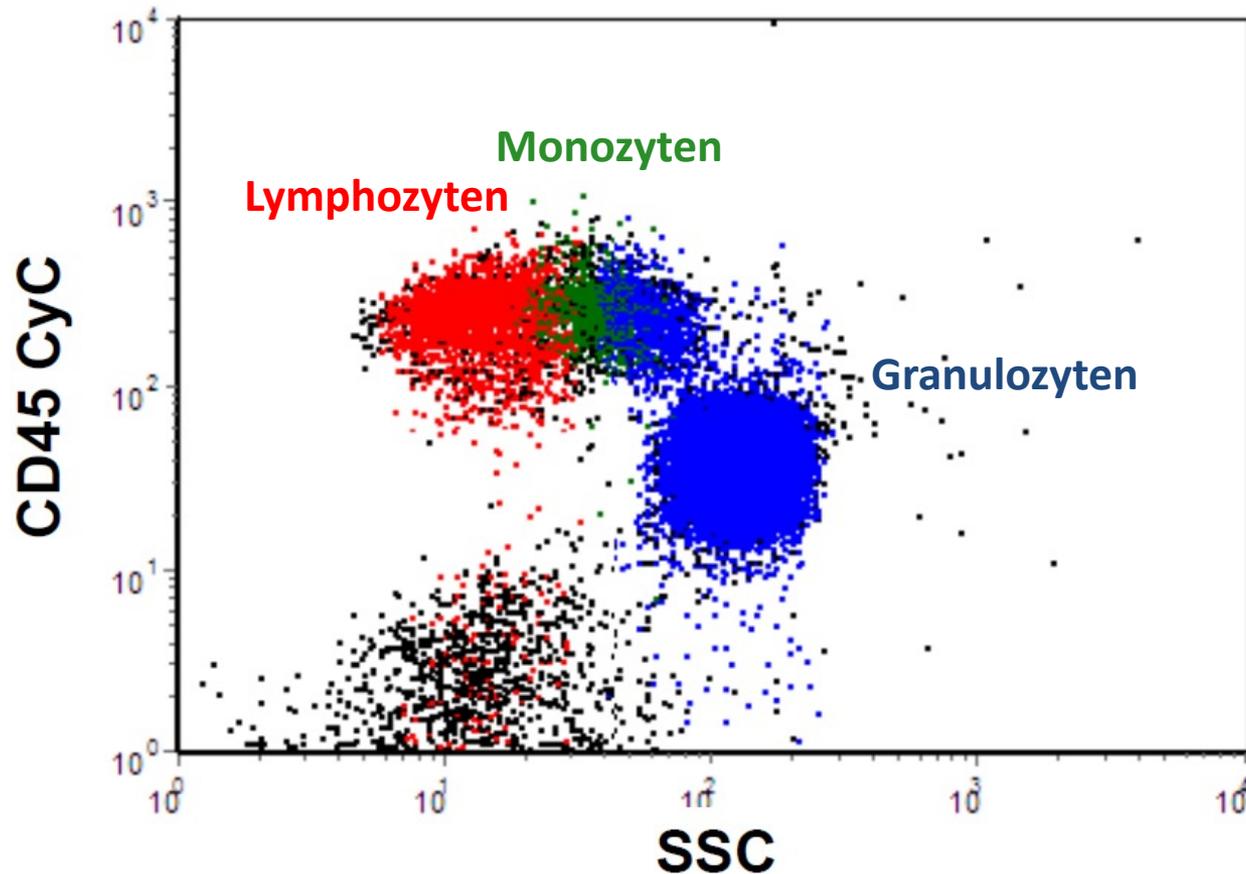
- **Aktivierungsmarker:** Moleküle die von aktivierten Zellen exprimiert werden, während sie auf ruhenden Zellen entweder Fehlen oder nur schwach exprimiert werden, z.B.:
 - CD25 (Die alpha-Kette des Interleukin-2 Rezeptors, IL-2R α , siehe später)
 - CD80 und CD86 (B7-1 und B7-2, sogenannte kostimulator Moleküle die von aktivierten Antigenpräsentierende Zellen exprimiert werden, siehe später)

Lymphozytenpopulationen des normalen menschlichen peripheren Bluts



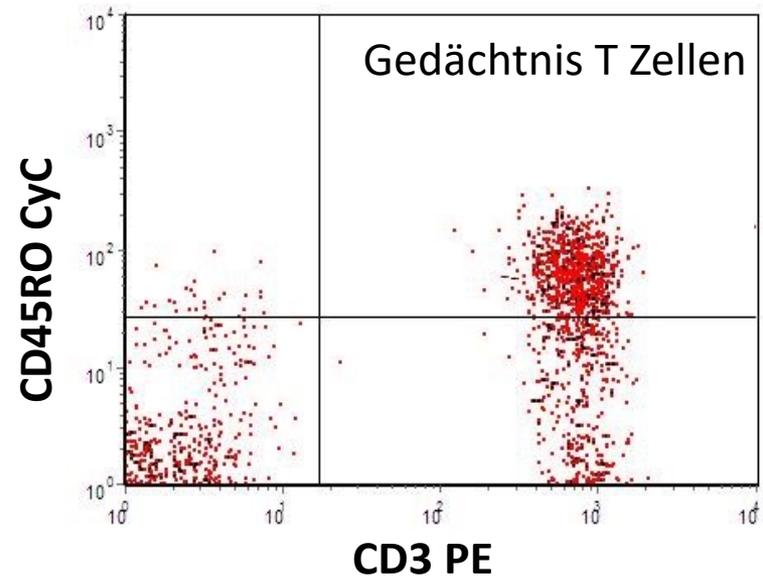
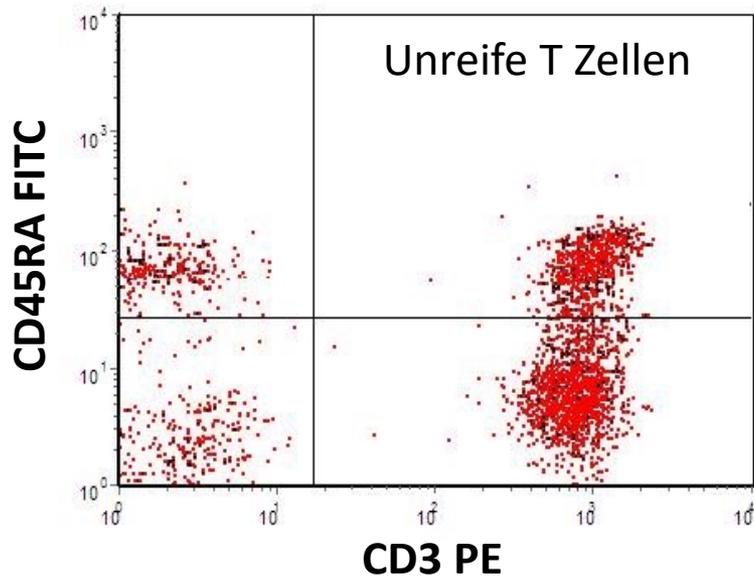
Marker: **CD3** → T Zelle, **CD4** → Th Zelle, **CD8** → Tc Zelle, **CD19** → B Zelle, **CD56** → NK Zelle

CD45 in humanem peripheren Blut



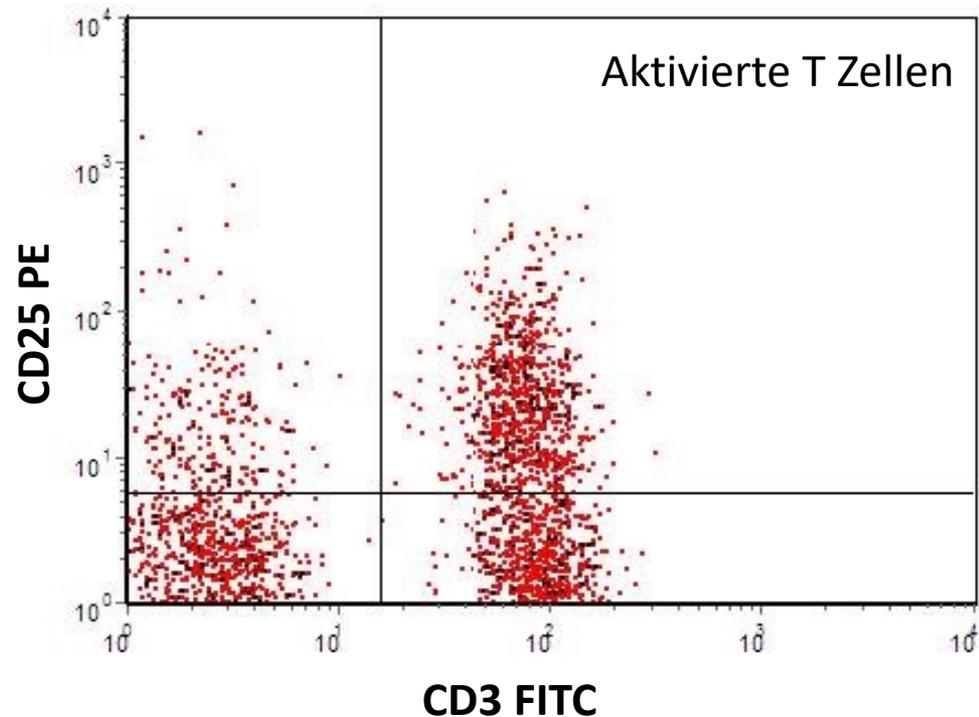
Das **CD45** kann auf **allen Leukozyten** gefunden werden. Darum wird es als **Pan-leukozyten Marker** angesehen.

CD45RA und CD45RO Isoformen im normalen menschlichen Blut



Funktion des **CD45**: Es ist eine **Phosphatase** die in die Zellmembran eingebettet ist. Es hat verschiedene Isoformen, **CD45RA** kann auf **unreifen T Zellen** gefunden werden während **CD45RO** von **Gedächtnis T Zellen** exprimiert werden.^[6.] (siehe Vorlesung für Details)

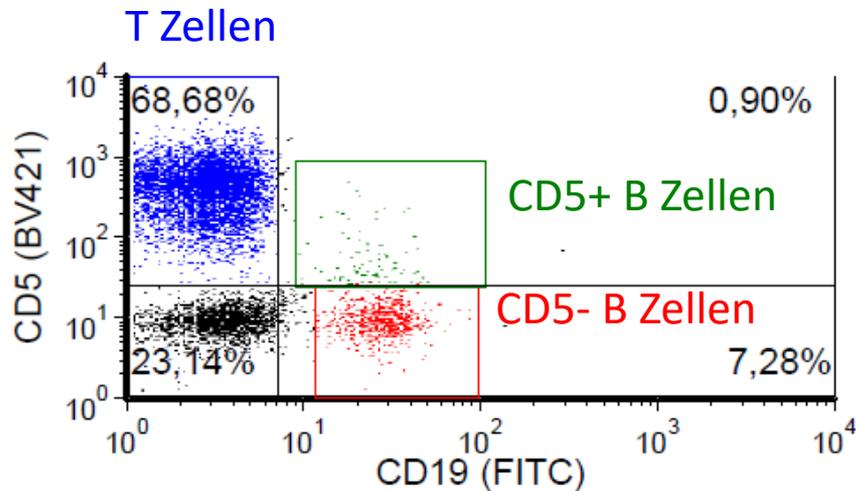
CD25 Expression in T Zellen des menschlichen Blutes



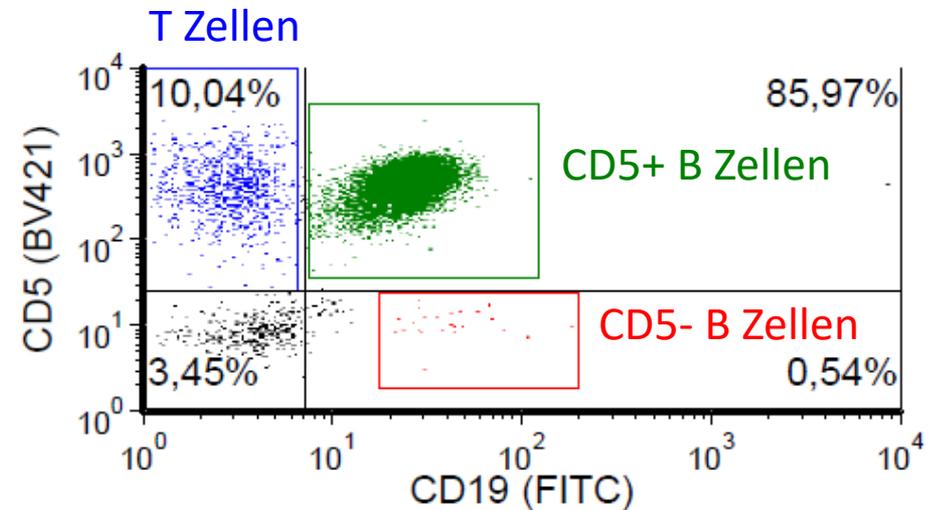
CD25: Es ist die alpha Kette des Interleukin-2 Rezeptors ($IL-2R\alpha$) die nur auf aktivierten Lymphozyten zu finden ist.^[7.] (Siehe Vorlesungen für Details)

Humane CD5+ B Zellen

Peripheres Blut eines gesunden Spenders:



B-Zell Chronische Lymphozytäre Leukämie (B-CLL):



Bedeutung der Durchflusszytometrie 1.

- Kann den Immunophänotyp der Zellen in der Probe bestimmen (**Immunophenotyping**):
 - Diagnostik und Differenzialdiagnose **maligner hämatologischer Erkrankungen**^[8, 9.]
 - Diagnostik und Differenzialdiagnose der **Immundefizienzen** ^[10.]
 - Beobachtung der **Autoimmunen Krankheiten**
 - Beobachtung des prä- und post-**transplantations** Zustand^[11.]
 - Bestimmung des **HLA Haplotyps**^[12.] (siehe später)
 - Diagnostik und Beobachtung **infektiöser Krankheiten**
- **Quantitative** Messungen:
 - Bestimmung des **Anteils der Zellen** die das untersuchte Antigen exprimieren
 - Bestimmung der **Stärke der Antigenexpression** in den untersuchten Zellpopulationen
- Bestimmung des **DNA und RNA** Gehalts:^[13.]
 - Untersuchung der Apoptose
 - Untersuchung des Zellzyklus
 - Bestimmung des Retikulozitenanteils
 - Detektion der Aneuploidie

Bedeutung der Durchflusszytometrie 2.

- **Funktionelle Tests:**
 - Messen der **Phagozytose**^[14.]
 - Messen des **intrazellulären Kalziumspiegels**^[15.]
 - Messung des intrazellulären pH
 - Messung der Menge und Aktivität von Enzymen
 - Untersuchung der Chemotaxis
 - Messung der Produktion von Reaktiven Sauerstoff Spezies
 - Messung des proliferativen Index
- **Messung von Zytokinspiegeln**^[16.] (CBA, mehr dazu unter serologischen Tests)
- **Zelltrennung**^[17.] (Zellsortierung, siehe später)
- Automatisierte Hämatologische Analysierer → **Blutzählung** (ohne Fluoreszenzmarker)

Die nächsten Folien werden Ihnen Beispiele verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten der Durchflusszytometrie zeigen. Sie dienen nur der visualisierung, Sie müssen das gezeigte Material **nicht lernen/wissen**, aber Sie müssen in der Lage sein **Punktdiagramme zu analysieren** und **die Anwendungen** der Durchflusszytometrie zu benennen!

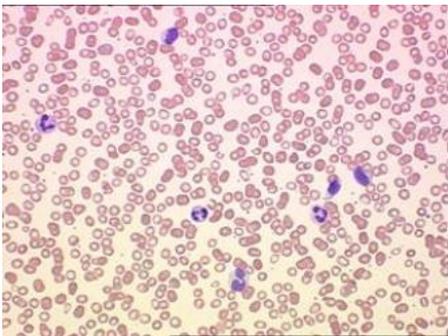
Immunphänotypisierung Beispiel 1

Eine routine Blutuntersuchung zeigt abnormal hohe Lymphozyten Zahlen. (Lymphozytose)

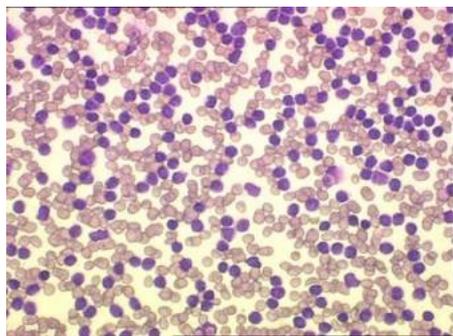


Durchflusszytometrie

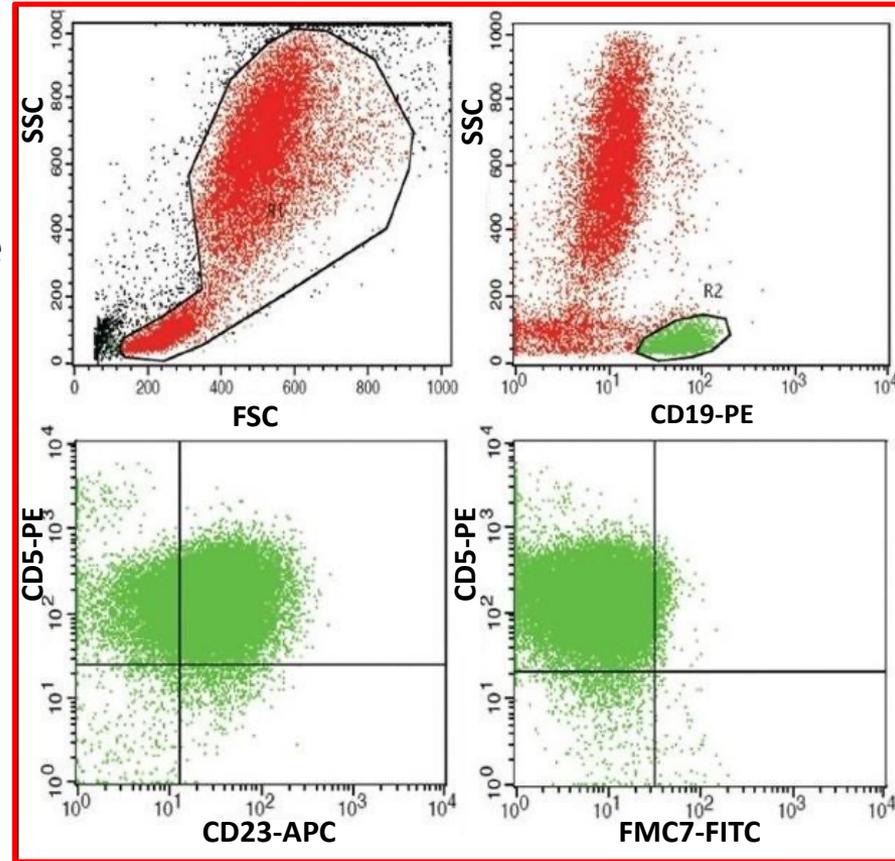
Frage: Was für Zellen sind es?



Normaler Blutausstrich



Blutausstrich des Patienten



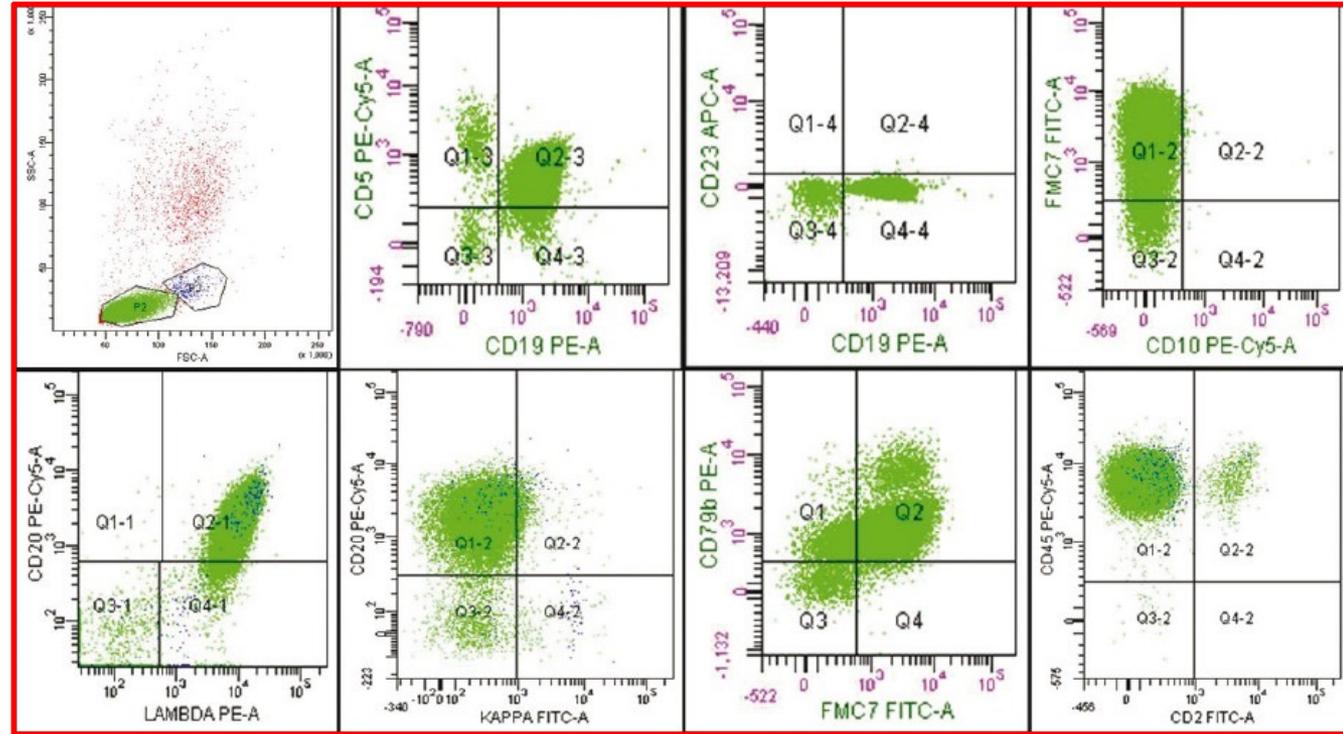
Immunphänotyp:

CD5+/CD23+/CD19+/FMC7-

↓
Diagnose: B-Zell Chronische Lymphozytäre Leukämie (B-CLL)

Immunphänotypisierung Beispiel 2

Der Patient wurde aufgrund von Lymphozytose und vergrößerten Lymphknoten (Lymphadenomegalie) untersucht.



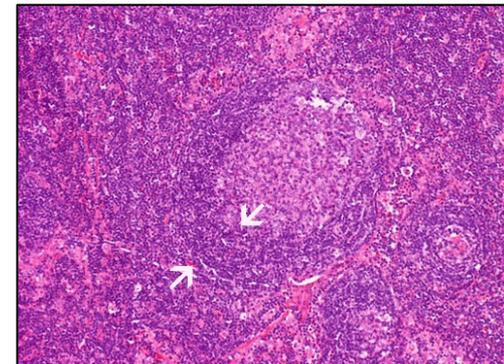
Frage: Was für Zellen sind es?

Immunphänotyp:

- **CD5+**
- **CD19+**
- CD20+
- CD45+
- CD79b+
- **FMC7+**
- Lambda+
- **CD10-**
- **CD23-**

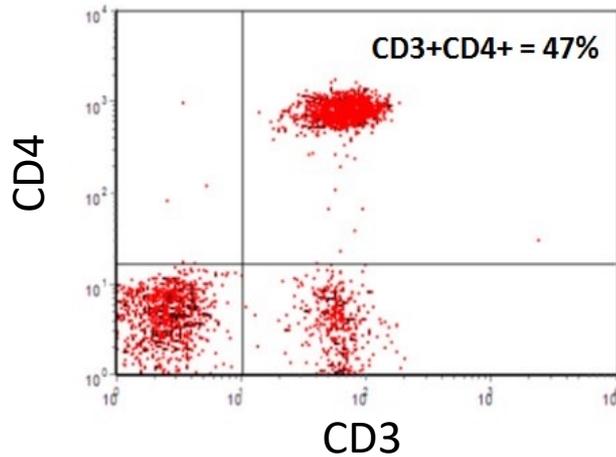
Diagnose: Mantelzelllymphom (MCL) in Leukämischer Phase

Breitere Mantelzone (mit Pfeilen markiert) rund um ein Lymphfollikel bei MCL. (Lymphknoten, HE-Färbung)



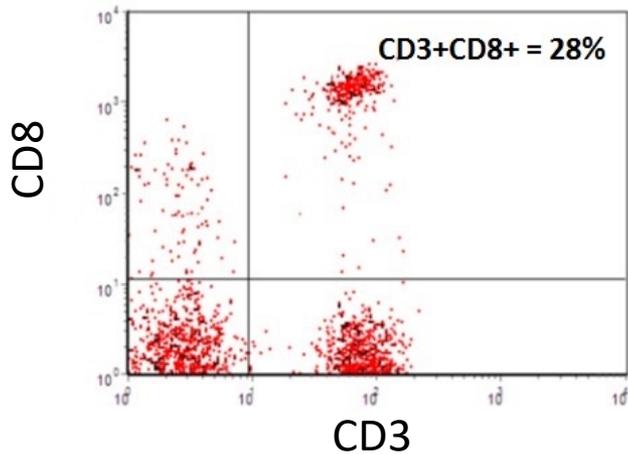
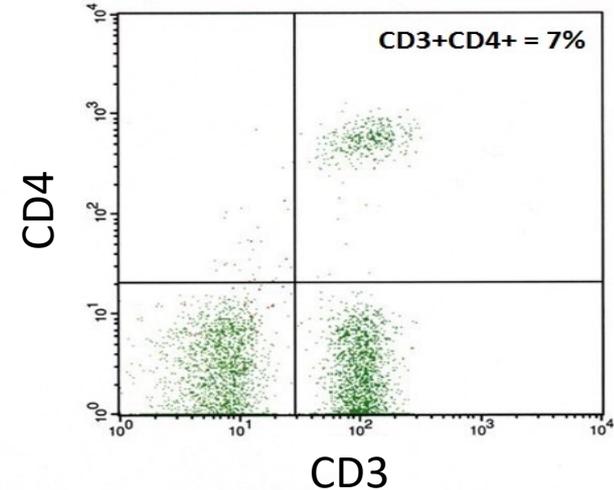
Nachsorge eines Patienten mit Immundefizienz

CD4/CD8 Verhältnis im Blut eines gesunden Spenders

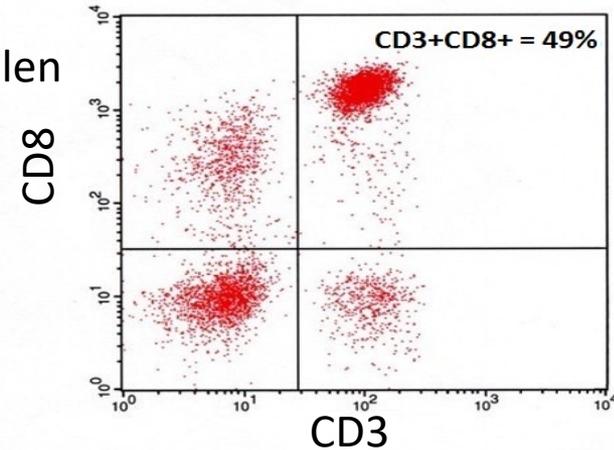


Helfer T Zellen

Pathologisches CD4/CD8 Verhältnis im Blut eines Patienten mit HIV:



Zytotoxische T Zellen



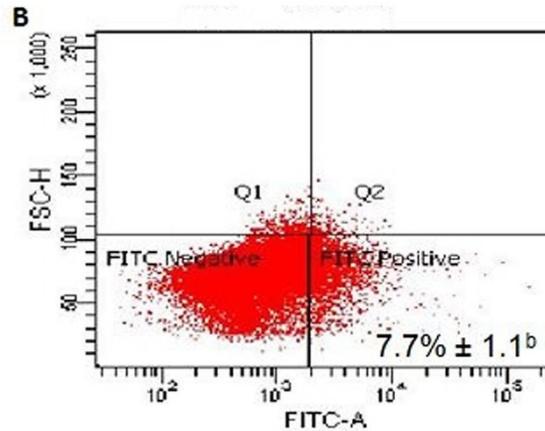
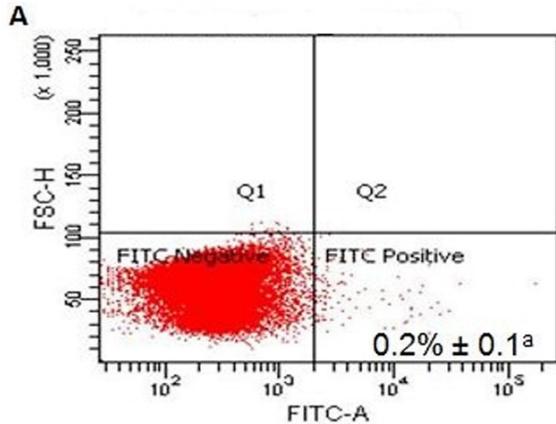
Messung der Phagozytose

A: Unbehandelte Makrophagen

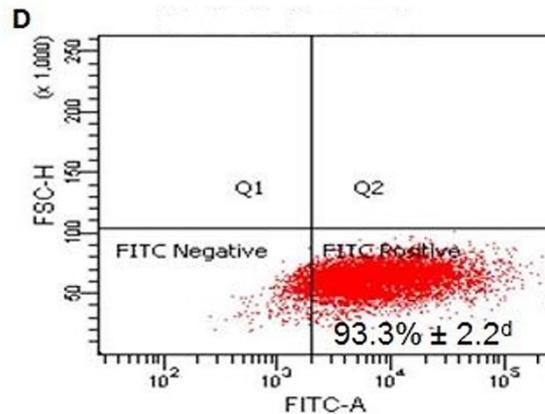
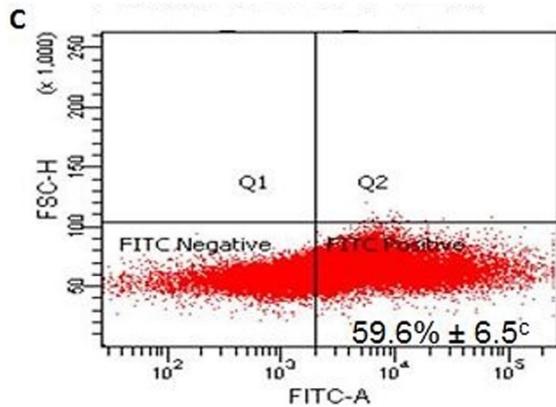
inkubieren ohne FITC-konjugierte Perlen

B: Unbehandelte Makrophagen

inkubieren mit FITC-konjugierten Perlen



Behandlung der Makrophagen verbessert ihre Phagozytose Fähigkeit.



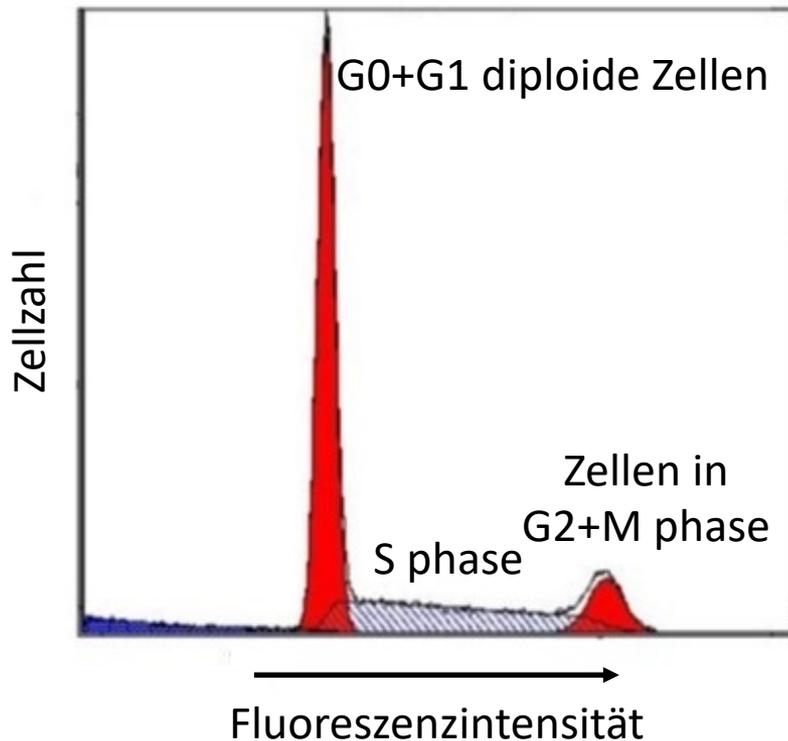
C: Macrophagen behandelt mit Polysacchariden mit FITC-konjugierten Perlen inkubiert.

D: Macrophagen behandelt mit **LPS** mit FITC-konjugierten Perlen inkubiert.

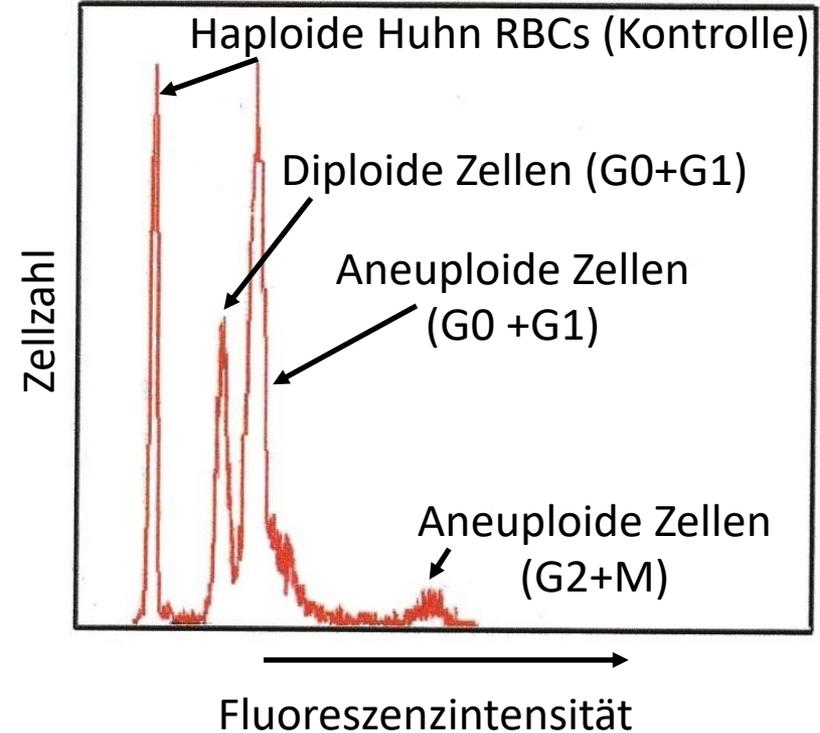
Untersuchen des DNA-Gehalts von Tumoren

Die Zellen werden mit Fluorochromen inkubiert die DNA binden, dann wird die Intensität des emittierten fluoreszenten Lichtes mit Durchflusszytometrie gemessen.

Normal:



Biopsie eines Hepatozellulären Karzinoms:^[18.]



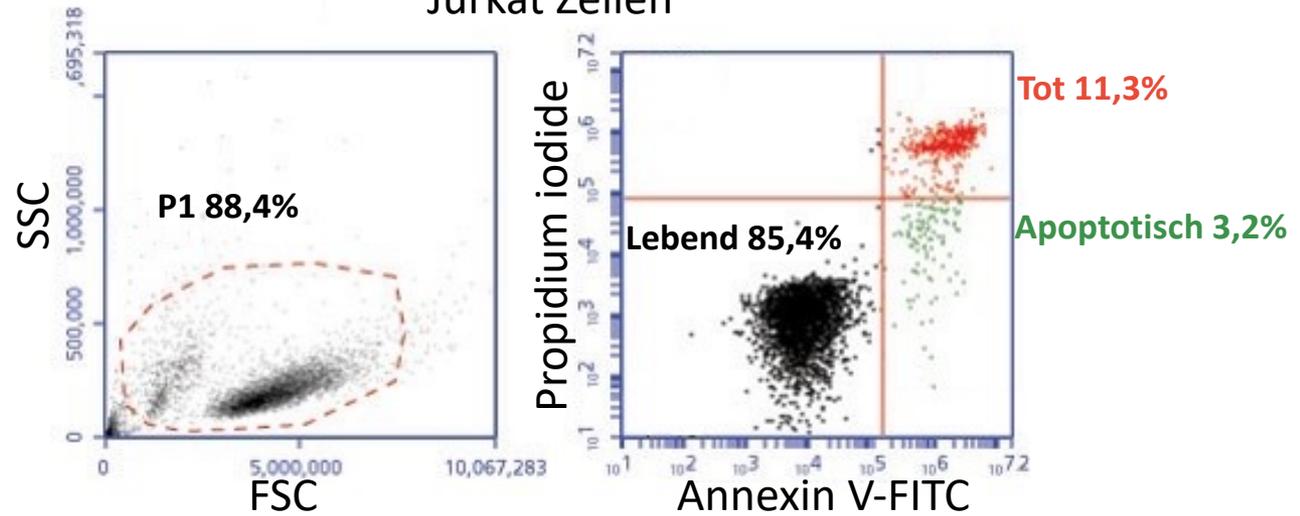
Aneuploidie: Abnormale Zahl von Chromosomen (z.B. 60 statt 46 in Zellen die in der G0 Phase sind)

Zell-Viabilität Test

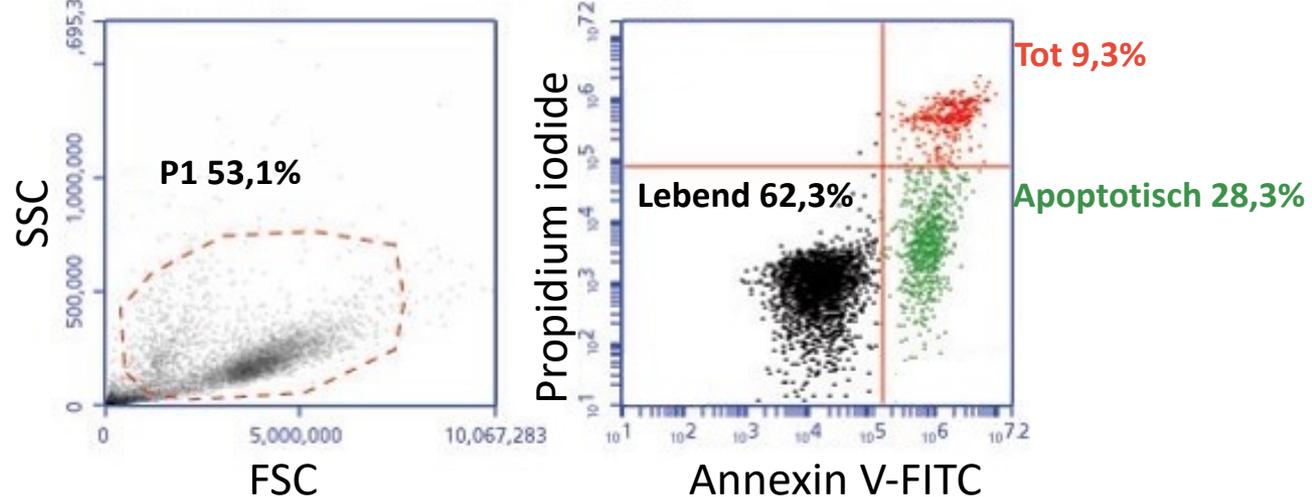
Propidium Iodid: Ein fluoreszentes Molekül das DNA bindet und die intakte Zellmembran lebender Zellen nicht überqueren kann

Annexin V: Es bindet Phosphatidylserin das in der Zellmembran apoptotischer Zellen gefunden werden kann.

Jurkat Zellen

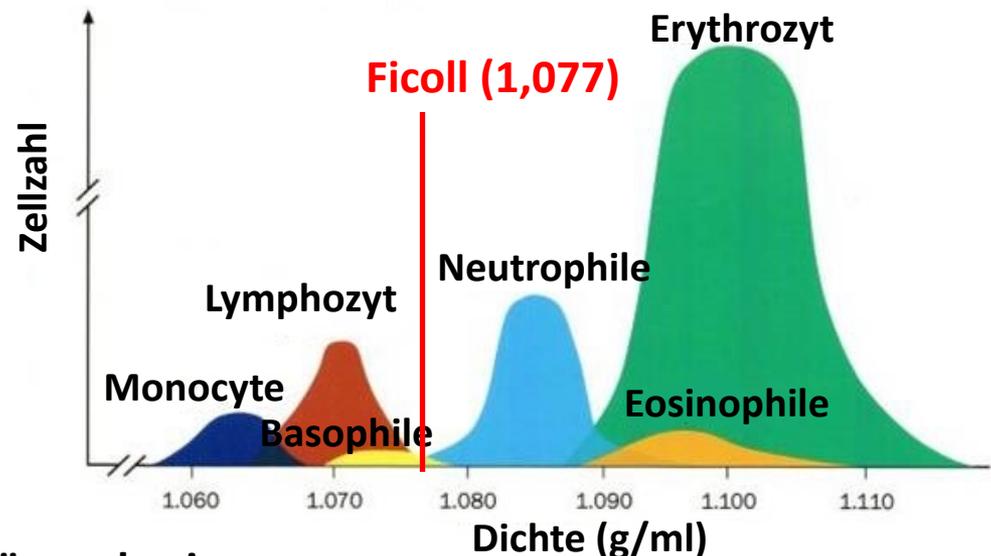


Jurkat Zellen + Camptothecin (Chemotherapie)



Isolation mononuklearer Zellen

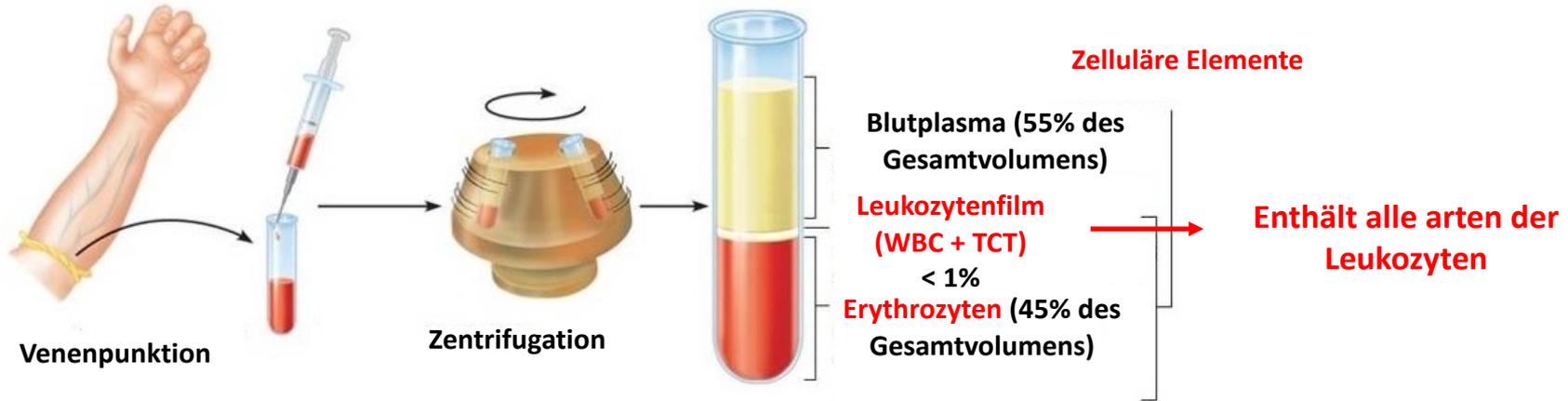
- **Methoden die auf physischen Parametern basieren:**^[19.]
 - Filtration (basiert auf unterschiedlicher Größe der Zellen)
 - Dichte-gradienten Zentrifugation (z.B. **Ficoll-Gradienten Zentrifugation**, basiert auf der unterschiedlichen Dichte der Blutzellen)



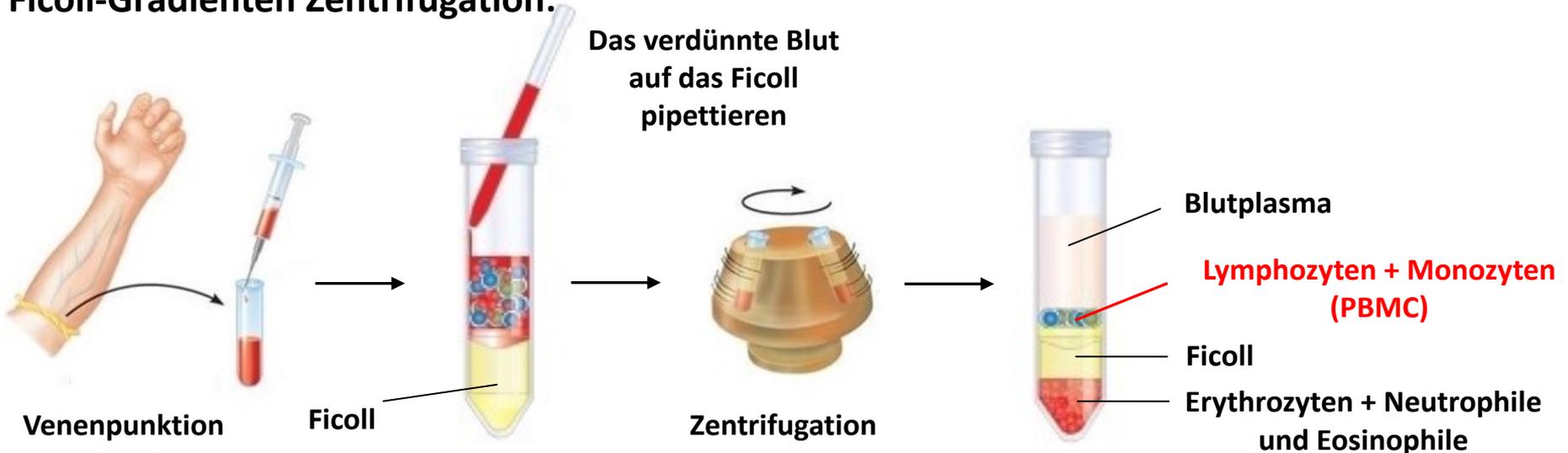
- **Methoden die auf Leukozytenadhärenz basieren:**
 - Nylonwolle: Monozyten und B Zellen binden an Nylon
 - Plastik-/Glasoberflächen: Monozyten binden an die Oberfläche, Lymphozyten können entfernt werden

Ficoll-Gradienten Zentrifugation 1

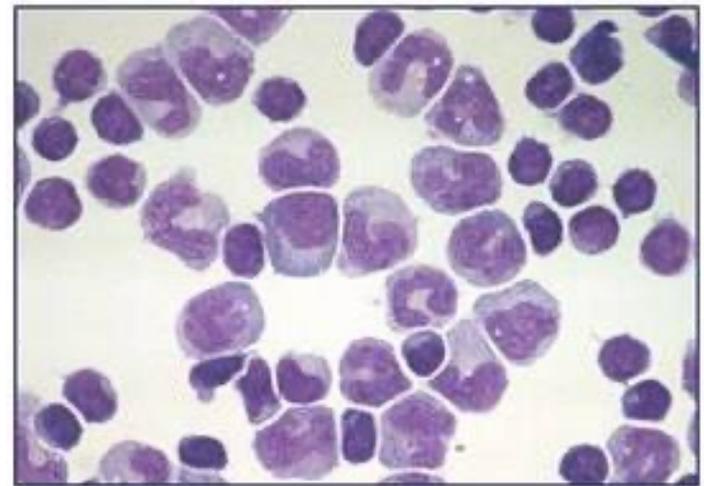
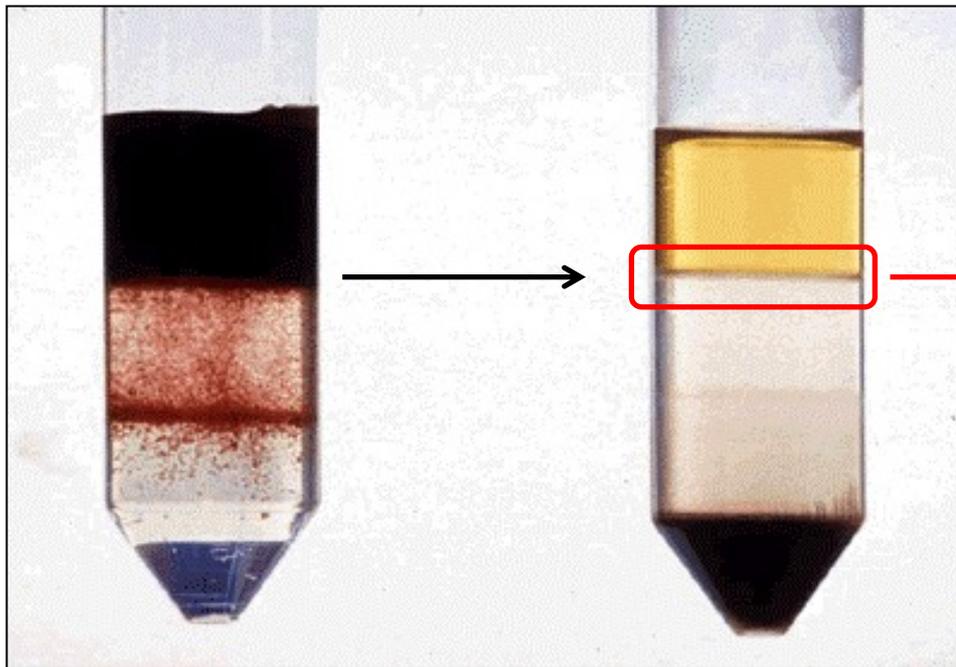
Normale Zentrifugation:



Ficoll-Gradienten Zentrifugation:



Ficoll-Gradienten Zentrifugation 2



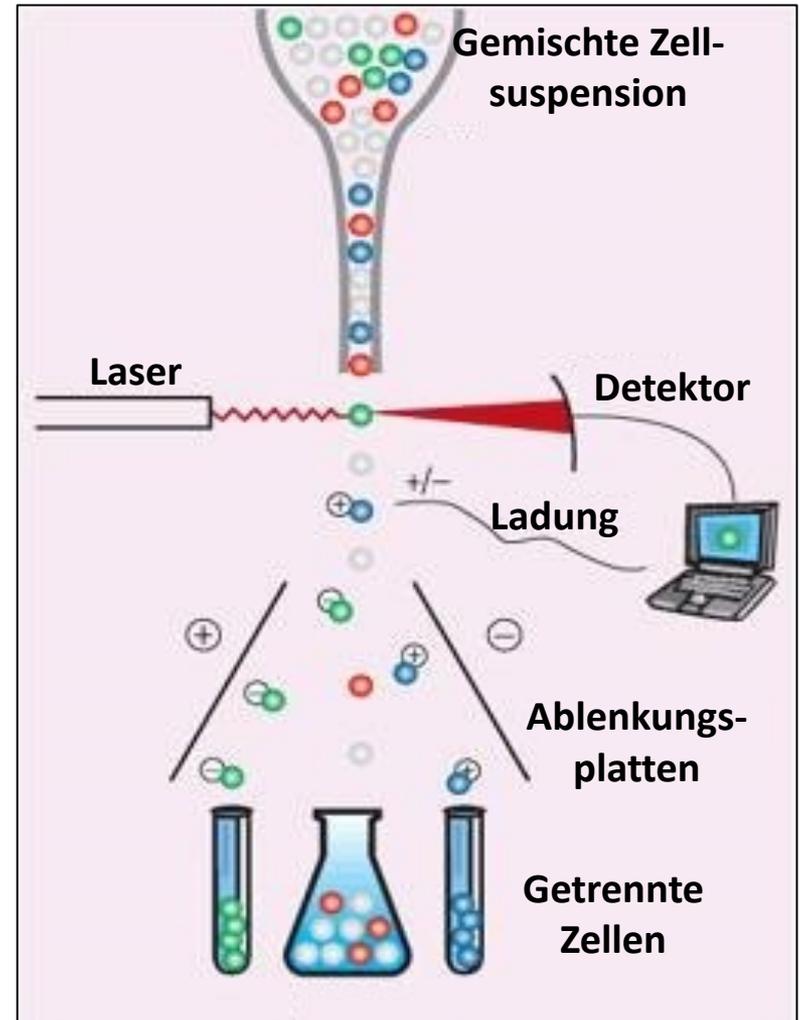
Mononukleäre Zelle des peripheren Blutes (**PBMC** – “peripheral blood mononuclear cells”, Leukozyten mit einem nicht-segmentierten Nukleus): **Lymphozyten, Monozyten** (kann auch basophile Granulozyten enthalten) [20.]

Sortierung

Sortierung: Eine Methode zur **Zelltrennung** die auf Durchflusszytometrie basiert.

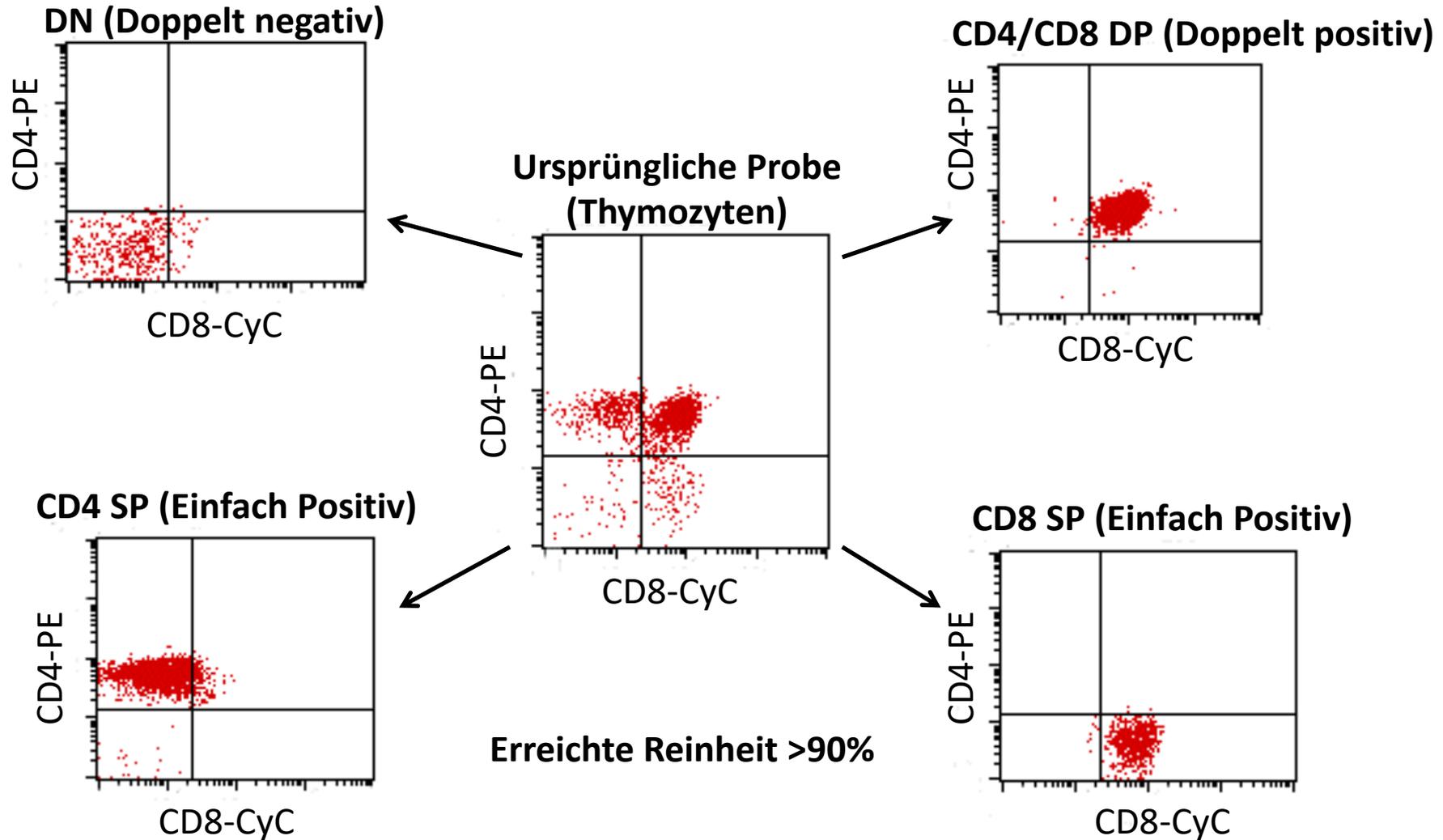
FACS: Fluoreszenz Activierte Zellsortierung

1. Jede Zelle wird in einen einzigen Tropfen getan.
2. Die Zelle kreuzt den Laserstrahl, das fluoreszente Molekül wird Licht emittieren das die Detektoren erreicht.
3. Die Tropfen erhalten elektrische Ladungen anhand von voreingestellten Parametern.
4. Die geladenen Tropfen werden durch die Ablenkungsplatten in unterschiedliche Richtungen gelenkt.
5. Die Tropfen die die Zellen enthalten werden in unterschiedlichen Gläsern gesammelt.



Die getrennten Zellen sind Überlebensfähig

Sortieren eines Maus-Thymus

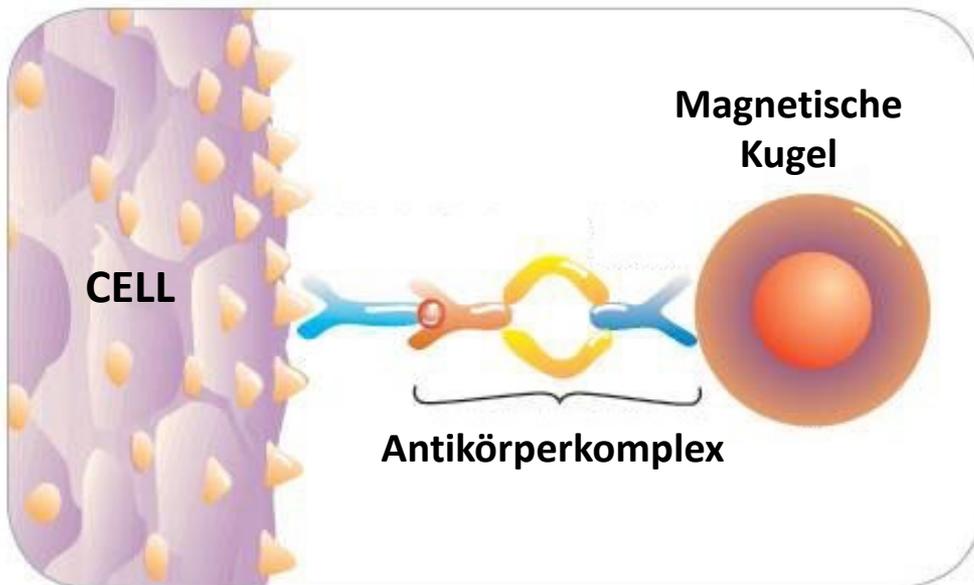


Immunmagnetische Zelltrennung (MACS)



Positive Auswahl: Markierte Zellen die an die Wand des Reagenzglas binden

Negative Auswahl: Unmarkierte Zellen im Überstand



Der EasySep™ Magnet von Stemcell Technologies™.

References 1.

1. BD Biosciences: **BD FACSCanto II** (https://www.bdbiosciences.com/documents/facscanto_techspecs.pdf)
2. McCoy JP Jr¹: **Basic principles of flow cytometry.** *Hematol Oncol Clin North Am.* 2002 Apr;16(2):229-43.
3. BD Biosciences: **BD FACSCalibur** (https://www.bdbiosciences.com/documents/facscalibur_brochure.pdf)
4. Addison EG¹, North J, Bakhsh I, Marden C, Haq S, Al-Sarraj S, Malayeri R, Wickremasinghe RG, Davies JK, Lowdell MW: **Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity.** *Immunology.* 2005 Nov;116(3):354-61.
5. Campbell JP¹, Guy K, Cosgrove C, Florida-James GD, Simpson RJ: **Total lymphocyte CD8 expression is not a reliable marker of cytotoxic T-cell populations in human peripheral blood following an acute bout of high-intensity exercise.** *Brain Behav Immun.* 2008 Mar;22(3):375-80. Epub 2007 Oct 18.
6. Altin JG¹, Sloan EK: **The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation.** *Immunol Cell Biol.* 1997 Oct;75(5):430-45.
7. Létourneau S¹, Krieg C, Pantaleo G, Boyman O: **IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets.** *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Apr;123(4):758-62. doi: 10.1016/j.jaci.2009.02.011.
8. Craig FE¹, Foon KA: **Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms.** *Blood.* 2008 Apr 15;111(8):3941-67. doi: 10.1182/blood-2007-11-120535. Epub 2008 Jan 15.
9. Virgo PF¹, Gibbs GJ: **Flow cytometry in clinical pathology.** *Ann Clin Biochem.* 2012 Jan;49(Pt 1):17-28. doi: 10.1258/acb.2011.011128. Epub 2011 Oct 25.
10. O'Gorman MR¹, Zollett J, Bensen N: **Flow cytometry assays in primary immunodeficiency diseases.** *Methods Mol Biol.* 2011;699:317-35. doi: 10.1007/978-1-61737-950-5_15.

References 2.

11. Maguire O¹, Tario JD Jr, Shanahan TC, Wallace PK, Minderman H: **Flow cytometry and solid organ transplantation: a perfect match.** *Immunol Invest.* 2014;43(8):756-74. doi: 10.3109/08820139.2014.910022.
12. Bray RA¹, Tarsitani C, Gebel HM, Lee JH: **Clinical cytometry and progress in HLA antibody detection.** *Methods Cell Biol.* 2011;103:285-310. doi: 10.1016/B978-0-12-385493-3.00012-7.
13. Darzynkiewicz Z¹, Halicka HD, Zhao H: **Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry.** *Adv Exp Med Biol.* 2010;676:137-47.
14. Lehmann AK¹, Sornes S, Halstensen A: **Phagocytosis: measurement by flow cytometry.** *J Immunol Methods.* 2000 Sep 21;243(1-2):229-42.
15. June CH¹, Abe R, Rabinovitch PS: **Measurement of intracellular calcium ions by flow cytometry.** *Curr Protoc Cytom.* 2001 May;Chapter 9:Unit 9.8. doi: 10.1002/0471142956.cy0908s02.
16. Morgan E¹, et al.: **Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology.** *Clin Immunol.* 2004 Mar;110(3):252-66.
17. Tomlinson MJ¹, Tomlinson S, Yang XB, Kirkham J: **Cell separation: Terminology and practical considerations.** *J Tissue Eng.* 2013;4:2041731412472690. doi: 10.1177/2041731412472690. Epub 2012 Dec 28.
18. Ashraf Tabll¹ and Hisham Ismail^{2,3}: **The Use of Flow Cytometric DNA Ploidy Analysis of Liver Biopsies in Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma** (<http://www.intechopen.com/books/liver-biopsy/the-use-of-flow-cytometric-dna-ploidy-analysis-of-liver-biopsies-in-liver-cirrhosis-and-hepatocellul>)
19. Fuss IJ¹, Kanof ME, Smith PD, Zola H: **Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood.** *Curr Protoc Immunol.* 2009 Apr;Chapter 7:Unit7.1. doi: 10.1002/0471142735.im0701s85.
20. Mitre E¹, Taylor RT, Kubofcik J, Nutman TB: **Parasite antigen-driven basophils are a major source of IL-4 in human filarial infections.** *J Immunol.* 2004 Feb 15;172(4):2439-45.