بسم الله الرحمن الرحیم

در آمدی بر فلوسایتومتری، اصول کلی و روش ها

فشرده ای از فلوسایتومتری و برخی از روشهای پر کاربرد

مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفاء

بیمارستان فوق تخصصی خاتم الانبیاء (ص)

میرماه

عنوان و نام پدیدآور	: درآمدی بر فلوسایتومتری، اصول کلی و روش‌ها: فشرده‌ای از فلوسایتومتری و برخی از روش‌های پرکاربرد/ تالیف شاهین محمدصادقی... [و دیگران]؛ ویراستار بابک یکتاپرست؛ [برای] بیمارستان تخصصی و فوق تخصصی خاتم‌الانبیاء (ص)، مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا.
مشخصات نشر	: تهران : میرماه ، ۱۳۹۲.
مشخصات ظاهری	: ۵۶ ص.: مصور (رنگی).
شابک	: ۵۰۰۰۰ ریال : ۲-۰۲۵-۳۳۳-۶۰۰-۹۷۸
وضعیت فهرست نویسی	: فیپا
یادداشت	: تالیف شاهین محمدصادقی، عبدالرسول ملک‌پور، سعیده زاهدی، علی رستمی، هادی کاظمی.
یادداشت	: کتابنامه: ص. ۵۳.
عنوان دیگر	: فشرده‌ای از فلوسایتومتری و برخی از روش‌های پرکاربرد.
موضوع	: فلوسایتومتری
موضوع	: فلوسایتومتری -- کاربرد تشخیصی
شناسه افزوده	: محمدصادقی، شاهین
شناسه افزوده	: یکتاپرست، بابک، ویراستار
شناسه افزوده	: بیمارستان تخصصی و فوق تخصصی خاتم‌الانبیاء (ص). مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا
رده بندی کنگره:	QH ۵۸۵/۵/ف ۸ د ۴ ۱۳۹۲
رده بندی دیویی	: ۶۱۶/۰۷۵۸۲
شماره کتابشناسی ملی	: ۳۲۷۲۶۷۶

در آمدی بر فلوسایتومتری، اصول کلی و روش ها

فشرده ای از فلوسایتومتری و برخی از روشهای پر کاربرد

تألیف:

دکتر شاهین محمدصادقی

عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

دکتر عبدالرسول ملک پور

مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

سعیده زاهدی

مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

علی رستمی

مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

دکتر هادی کاظمی

رییس مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا،عضو هیئت علمی دانشگاه شاهد

ویراستار:

دکتر بابک یکتاپرست

میرماه

۱۳۹۲ خورشیدی

در آمدی بر فلوسایتومتری، اصول کلی و روش‌ها

فشرده‌ای از فلوسایتومتری و برخی از روشهای پرکاربرد

تألیف : دکتر شاهین محمدصادقی، دکتر عبدالرسول ملک پور، سعیده زاهدی، علی رستمی، دکتر هادی کاظمی
ویراستار : دکتر بابک یکتاپرست
ناشر: میرماه (۲-۲۲۷۲۲۹۰۱)
گرافیک جلد و متن: مهدیه ناظم زاده
لیتوگرافی و چاپ: قائم چاپ جوربند
صحافی: عطف
نوبت و سال انتشار: نخست/ ۱۳۹۲
شمارگان: ۱۰۰۰ نسخه
قیمت: ۵۰۰۰ تومان
شابک: ۲- ۰۲۵-۳۳۳-۶۰۰-۹۷۸

تمام حقوق اثر برای مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفاء محفوظ است.

خیابان ولیعصر(عج) - خیابان رشید یاسمی- بیمارستان فوق تخصصی خاتم الانبیاء (ص)
تلفن: ۸۸۸۸۴۰۴۰

مقدمه نگارندگان

در طی سال های دهۀ ۶۰ میلادی تلاش جمعی از دانشمندان فعال در عرصه سلول شناسی، منجر به ابداع روشی با عنوان فلوسایتومتری گردید که امکان شناسایی ذرات (سلول‌ها) و ارزیابی خصوصیّات آن‌ها را امکان پذیر می ساخت. سرعت و دقت بالای این تکنیک، موجب شد تا خیلی زود جایگاه ویژه‌ای را در رشته‌های مختلفی چون آسیب شناسی، هماتولوژی، ایمنی‌شناسی، ژنتیک، بررسی های آزمایشگاهی برای پیوند اعضاء، اقدامات تشخیص بیماری‌های عفونی و ... به خود اختصاص دهد.

همچنین با توجه به امکان بررسی وقایع چرخۀ سلولی و نقایص موجود در فرایندهای سلولی به وسیله فلوسایتومتری، تشخیص انواع لوسمی ها و لنفوم ها نیز به یکی از کاربردهای مهم فلوسایتومتری در پزشکی تبدیل شده است. بر این اساس از فلوسایتومتری، هم به منظور تشخیص بدخیمی ها و تعیین پیش آگهی آنها و هم برای ارزیابی درمان استفاده می شود.

علاوه بر موارد یادشده برخی از انواع فلوسایتومتری که دارای ظرفیت جداسازی انتخابی سلولها می باشند، در مراکز پژوهشی و پروژه های تحقیقاتی مورد استفاده می گیرند.

این کتاب با هـدف ارائه یک دستـورالعمـل ساده و کاربـردی، برای آشنـایی با مفاهیم اولیـه فلوستومتری و اصول و مبانی کار با دستگاه فلوسایتومتر به رشته تحریر در آمده.

در ابتدای کتاب سعی شده تا اصول بنیادی و کلیدی فلوسایتومتری و عملکرد دستگاه به شیوه‌ای ساده و روان برای افراد مبتدی و علاقمند به این روش بیان گردد و در ادامه نیز به برخی پروتکل‌های رایج مورد استفاده، مشکلات احتمالی موجود و راه حل‌های آن ها اشاره شده.

امید است بهره‌گیری از محتوای این کتاب و به کار بستن آن‌ها، بتواند زمینه ساز گام‌های موثری در عرصه پژوهش، تشخیص، کنترل و درمان بیماری‌ها باشد.

عنوان	صفحه

فصل اول: اصول فلوسایتومتری	**۹**
سیستم های مایع (سیال)	۹
اپتیک و تشخیص	۱۰
پردازش سیگنال	۱۲
دسته‌بندی الکترواستاتیک سلول‌ها	۱۳
فصل دوم: اصول فلورسانس	**۱۵**
فلوروکروم‌ها و نور	۱۵
نور چیست؟	۱۵
تغییر استوکس	۱۶
حداکثر جذب و حداکثر تابش	۱۷
چرا از یک پروب فلورسنت استفاده می‌شود؟	۱۸
کدام فلوروکروم‌ها برای فلوسایتومتری مناسب هستند؟	۱۹
رنگیزه‌های تک	۱۹
رنگیزه‌های (توام) جفت	۱۹
همبستگی فلورسانس	۲۰
فصل سوم: آنالیز داده ها	**۲۳**
دروازه‌ها و نواحی	۲۳
هیستوگرام‌های تک پارامتری	۲۵
هیستوگرام‌های دو بعدی (۲ پارامتری)	۲۶
آنتی‌ژن‌های درون سلولی	۲۸
تعیین ایمونولوژیکی فنوتیپ	۲۹
فصل چهارم: آنالیز همزمان DNA و RNA با استفاده از فلوسایتومتری	**۳۱**
آنالیز	۳۲
استاندارد محتوی RNA	۳۳
استانداردهای سلولی	۳۳
تفسیر هیستوگرام	۳۴
اصول آنالیز محتوی RNA	۳۴
کاربردهای رایج آنالیز DNA و RNA	۳۵
بدخیمی های لنفو- رتیکولار	۳۵
تومورهای جامد	۳۵
یادداشت	۳۵

فصل پنجم: پروتوکل‌های رایج در فلوسایتومتری **۳۹**
روش آماده سازی نمونه ۴۰
دستور آماده سازی سلول‌ها ۴۰
رنگ‌آمیزی مستقیم ایمونوفلورسانس سلول‌ها و خون ۴۲
رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس غیرمستقیم سلول‌ها و خون ۴۳
رنگ‌آمیزی زنجیره‌های لامبدا و کاپا در خون کامل ۴۴
آنالیز آنتی ژن‌ها (سیتوکین های درون سلولی خون کامل) ۴۵
رنگ‌آمیزی مستقیم آنتی‌ژن‌های درون سلولی ۴۵
رنگ‌آمیزی مستقیم آنتی‌ژن‌های درون سلولی: روش متانول ۴۶
آنالیز همزمان DNA و RNA با استفاده از فلوسایتومتری ۴۷
محلول‌های ذخیره‌ای ۴۸
محلول‌های کار ۴۸
روش کار ۴۹

فصل ششم: رفع مشکلات و موانع احتمالی **۵۰**
عدم رنگ‌آمیزی ۵۰
رنگ‌آمیزی غیراختصاصی ۵۱
رنگ‌آمیزی ضعیف ۵۱
پروفایل تابش پراکنده غیر معمول ۵۲
رنگ‌آمیزی غیر منتظره (غیردلخواه) ۵۲

منابع و مأخذ **۵۳**

فصل اول

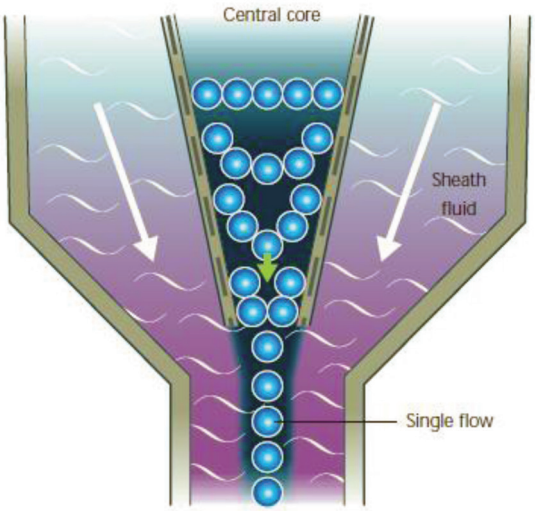
اصول فلوسایتومتری

سیستم های مایع (سیال)

اندازه گیری خواص ذرات به صورت انفرادی، یکی از اصول بنیادین در فلوسایتومتری است. زمانی که یک نمونه از یک محلول به فلوسایتومتر تزریق می گردد، ذرات بصورت تصادفی در فضای سه بعدی پراکنده می شوند. بر این اساس نمونه باید به جریانی از ذرات مجزا (منفرد) تبدیل شود تا بتواند در معرض سیستم تشخیصی دستگاه قرار گیرد. این روند به‌وسیلهٔ سیستم سیال به وقوع می پیوندد.

سیستم سیال فلوسایتومتر، دارای یک کانال مرکزی (Central Core) است که نمونه از طریق آن به دستگاه تزریق می شود. این کانال مرکزی، به وسیله یک غلاف خارجی حاوی مایعی با سرعت جریان بسیار بالا احاطه می شود. سرعت بالای جریان مایع در این غلاف، با اثر کششی عظیمی که بر نمونه تزریق شده وارد می کند، نقش مهمی در ایجاد یک جریان منفرد سلولی برعهده دارد.

به عبارت دیگر تاثیر این سیستم بر روی جریان مایع مرکزی موجب می شود که به صورت سهمی، بیشترین شدت جریان را در مرکـز کانال و جریانی نزدیک به صفـــر را در نزدیکـی دیواره های کانال داشته باشیم (شکل ۱). این پدیده که تمرکز هیدرودینامیک نامیده می شود، موجب ایجاد جریانی از سلول های منفرد در دستگاه فلوسایتومتر می گردد. تحت شرایط ایده آل (جریان لایه ای) مایع کانال مرکزی با مایع غلاف خارجی مخلوط نمی گردد.



شکل ۱-تمرکز هیدرودینامیک باعث بوجود آمدن یک جریان منفرد سلولی می شود.

خصوصیات جریان مایع مرکزی را می توان با نمره Reynold(Re) ، از طریق فرمول زیر محاسبه نمود:

$$\mathrm{Re} = \frac{PVD}{\mu}$$

D = قطر لوله V = جریان متوسط مایع μ = ویسکوزیته مایع

تا زمانی که Re کمتر از ۲۳۰۰ باشد ، جریان همیشه به صورت لایه ای خواهد بود. اما اگر Re از ۲۳۰۰ بیشتر شود، جریان آشفته ای بوجود خواهد آمد که موجب انتشار ذرات می شود.
بدون تمرکز هیدرودینامیک، نازل مسدود شده و بررسی سلول در چنین شرایطی مقدور نخواهد بود.

اپتیک و تشخیص:

پس از تمرکز هیدرودینامیک، هر یک از ذرات، در معرض تشعشع یک یا چند پرتو نوری قرار می گیرند. چنانچه یک آنتی ژن از سطح یا درون سلول، با یک فلوروکروم نشاندار شده باشد، انتشار فلورسانس یا تشعشع نوری، اطلاعاتی را در مورد ویژگی‌های آن ذره (سلول) به ما می‌دهد.
پرتوهای لیزری و لامپ Arc بیشترین منابع نوری هستند که در فلوسایتومتری مـــدرن استفاده می‌شوند.

لامپ های لیزری، امواجی با طول موج منفرد را در یک یا چند فرکانس تولید می‌کنند (نور منسجم). لامپهای Arc ارزان‌تر از لامپهای لیزری بوده و مکانیسم انتشار نور در آنها از طریق اشتعال گاز محبوس در یک لوله صورت می‌گیرد. ضمن اینکه لامپهای Arc، امواجی با چند طول موج متفاوت تولید می‌کنند. در نتیجه نور ناشی ازاین لامپ‌ها ناپایدار و نامنسجم بوده و در نهایت نیازمند فیلتراسیون است.

نوری که در مسیر مستقیم تابیده می‌شود معمولاً حدود ۲۰ درجه از محور تابش لیـزر منحـــرف می‌گردد. لذا این پرتوها به وسیلهٔ یک لنز مجتمع شده و دسته پرتو حاصل با عنوان کانال مستقیم تابش (FSC) نامیده می‌شود.

شدت FCS با اندازه ذره متناسب بوده و می‌تواند به منظور تشخیص و افتراق بین سلول‌های مرده (تکه سلول های مرده) و سلول‌های زنده مورد استفاده قرار گیرد.

نوری که در زاویه‌ی ۹۰ درجه نسبت به خط برانگیختگی اندازه‌گیری می‌شود را تابش جانبی می‌نامند. کانال تابش جانبی (SSC) [1]، اطلاعاتی در زمینه محتوای گرانولی یک ذره را به ما می‌دهد. شاخص‌های FSC و SSC برای هر ذره منحصر به فرد بوده و از مقایسه این دو شاخص، می‌توان به منظور تمایز انواع مختلف سلول در یک نمونه هتروژن استفاده کرد.

اندازه‌گیری‌های فلورسانس که در طول موج‌های مختلف انجام می شوند، می‌توانند اطلاعات کیفی و کمی را در مورد گیرنده‌های سطح سلول (که با فلوروکروم نشاندار شده‌اند) و همچنین مولکول‌های درون سلولی (مانند DNA و ستیوکین‌ها) در اختیار ما قرار دهند.

فلوسایتومترها برای تشخیص نوری که تابش شده، از کانال‌های فلورسانس مجزا استفاده می‌کنند. تعداد دتکتورها بر اساس نوع دستگاه و کارخانه سازنده آن متفاوت است. همچنین این دتکتورها ممکن است از نوع فوتودیودهای سیلیکونی یا فوتومالتی پلایر (PMT) باشند. فوتودیودهای سیلیکونی معمولاً زمانی که سیگنال قوی باشد و به منظور سنجش تابش مستقیم، به کار گرفته می‌شوند. فوتومالتی پلایرها تجهیزاتی حساس تر بوده و به منظور سنجش‌های فلورسانس و پراکنده مورد استفاده قرار می‌گیرند.

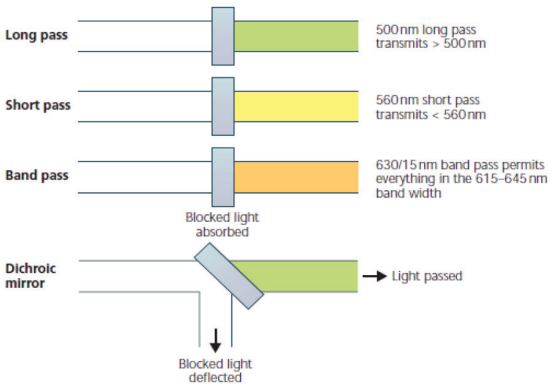
ویژگی و اختصاصی بودن تشخیص به وسیله فیلترهای اپیتکی کنترل می‌شود. این فیلترها از عبور طول موج‌های خاصی جلوگیری کرده و طول موج‌های مورد نظر را عبور می دهند.

معمولا فیلترها را بر حسب طول موجی که از خود عبور می‌دهند به سه دسته تقسیم می‌کنند.

فیلترهای long pass به امواجی با طول موج‌های بالاتر از حد موردنظر اجازه عبور می‌دهند در حالی که فیلترهای short pass به امواجی با طول موج‌های پایین‌تر اجازه عبور می‌دهند. دسته

1. Side Scatter Channel

سوم، فیلترهای band pass هستند که تنها امواجی با طول موج مخصوص و در یک طیف باریک (پهنای باند مشخص) از آن‌ها عبور می کنند. همهٔ این فیلترها از طریق مکانیسم جذب نور از عبور آن جلوگیری می‌کنند.



شکل۲- انواع متفاوت فیلتر های اپتیکی

زمانی که فیلتر با زاویه ۴۵ درجه در مسیر پرتو نور ورودی قرار می‌گیرد، حالت دوگانه آینه و فیلتر را پیدا خواهد کرد. در چنین شرایطی فیلتر دو عمل انجام می دهد. اول اینکه امواج با طول موج مورد نظر را در جهت مستقیم از خود عبور می دهد و دوم اینکه امواج نور ناخواسته را با زاویه ۹۰ درجه نسبت به زاویه تابش اولیه منعکس و منحرف می‌کند.

برای تشخیص چندین سیگنال به طور همزمان، سفارش و انتخاب دقیق فیلترها امری بسیار مهم و ضروری است.

پردازش سیگنال

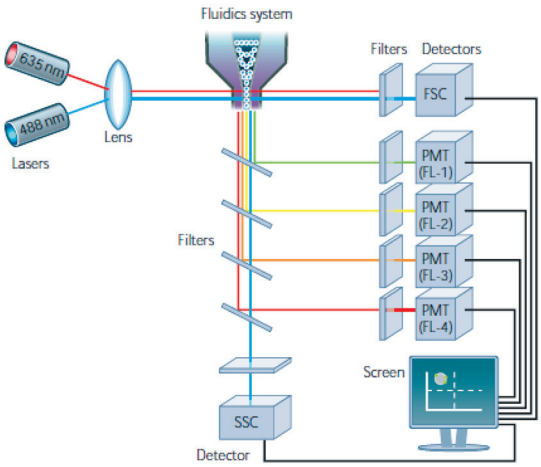
برخورد اشعه نور به فوتودتکتور، موجب ایجاد جریان الکتریکی ضعیفی در حد میکرو آمپر می‌شود که ولتاژ آن با تعداد کل فوتون‌های نوری دریافت شده بوسیله فوتودتکتور تناسب دارد.

این ولتاژ سپس به وسیله یک سری آمپلی فایرهای خطی یا لگارتیمی تقویت شده و از طـریق مبدل‌های دیجیتال آنالوگ به جریان‌ها و سیگنال‌های الکتریکی در حدی که به صورت گرافیکی قابل رسم باشند (۱۰- ۵ ولت)، تبدیل می‌شوند.

تقویت لگاریتمی معمولا به منظور مطالعات فلورسانس استفاده می‌شود، زیرا این روش سیگنال‌های ضعیف را تقویت کرده و سیگنال‌های قوی را متراکم و فشرده می‌کند. در نتیجه منجر به توزیع شده و به راحتی بر روی هستیوگرام قابل مشاهده خواهد بود. اما در مواردی مانند آنالیز DNA که طیف وسیعی از سیگنال‌ها وجود دارد استفاده از روش مقیاس گذاری خطی مناسب‌تر است.

مقادیر به‌دست آمده از هر دتکتور به عنوان یک پارامتر در نظر گرفته می‌شود. به عنوان مثال تابش مستقیم، تابش جانبی یا فلورسانس.

اطلاعات مورد نیاز هر پارامتر به عنوان یک رویداد شناخته شده و به تعداد سلول‌هایی که یک مشخصه فیزیکی را بیان می‌کنند و یا مرتبط با مارکر مورد نظر می‌باشند بستگی دارد.



شکل۳- شمای کلی یک دستگاه فلوسایتومتری

دسته بندی الکترواستاتیک سلول‌ها [1]

یکی از مهمترین کاربردهای فلوسایتومتری جداسازی سلول‌ها بر اساس زیرگروه‌ها یا بیان اپی توپ به منظور استفاده در مطالعات بیولوژیکی می‌باشد. این عملِ فلوسایتومتر را جداسازی سلول یا آنالیز FACS [2] می‌نامند.

پس از اینکه نمونه از نظر هیدرودینامیکی متمرکز شد، هر ذره به وسیله تابش نور نشاندار می‌شود. سیگنال‌های پراکنده و امواج فلورسانسِ ساطع شده از سلول‌های مد نظر، بر اساس مجموعه ضوابط

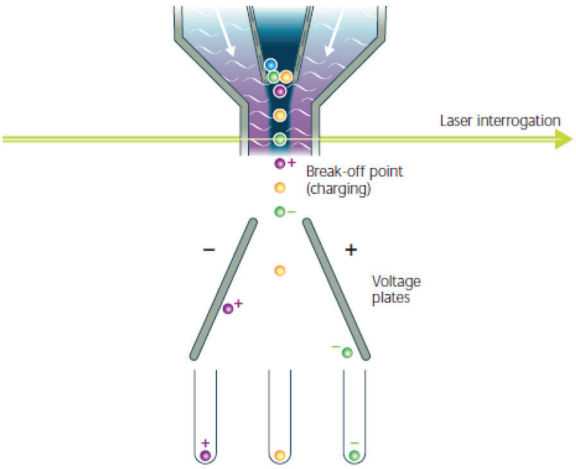
1. Electrostatic Cell Sorting
2. Fluorscent Activating Cell Sorting

مقرر دستگاه فلوسایتومتر، دسته بندی و مقایسه می شوند. اگر ذره با ضوابط مطابقت داشت، جریان مایع هنگام خروج از نازل سیستم سیال، شارژ الکتریکی می گردد.

در واقع شارژ الکترواستاتیکی درست در زمانی اتفاق می افتد که قطره حاوی ذره یا سلول خاص از جریان مایع جدا می شود. این لحظه را نقطه انفصال می نامند.

معمولا به منظور جلوگیری از بروز نقطه انفصال در فواصل نامنظم و همچنین به منظور ثابت نگهداشتن اندازه قطرات، نازل با بسامد (فرکانس) زیاد می لرزد.

سرانجام قطرات از یک فیلد قوی الکترواستاتیک عبور کرده و بر اساس شارژ الکتریکی شان به سمت چپ یا راست منحرف می شوند. (شکل ۴)



شکل٤- جداسازی الکترواستاتیک سلول ها

سرعت جداسازی جریان به فاکتورهای مختلفی از جمله اندازه ذرات و سرعت تشکیل قطرات بستگی دارد. یک نازل معمولی در حدود ۵۰ تا ۷۰ میکرومتر قطر دارد، که بسته به شدت فوران (پرتاب)، می‌تواند تعداد ۳۰ هزار تا ۱۰۰ هزار قطره را در ثانیه تولید کند، و این میزان برای جداسازی مناسب است. بالاتر رفتن شدت فوران می‌تواند موجب انسداد دهانه نازل شده و میزان خلوص آماده‌سازی نمونه را کاهش دهد.

فصل دوم

اصول فلورسانس

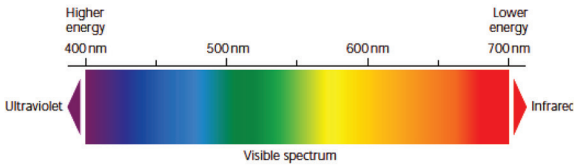
فلوروکروم ها و نور

فلوروکروم ها اصولاً رنگیزه‌هایی هستند که انرژی نور را در یک طول موج خاص (به عنوان مثال از لیزر) دریافت کرده و آن را در یک طول موج بالاتر و بزرگتر تابش می‌کنند. این دو پدیده را انگیختگی[1] و انتشار[2] می‌نامند. پدیده تابش خیلی سریع و در حد نانوثانیه رخ می‌دهد و آن را فلورسانس می‌نامند.

قبل از آشنایی با انواع فلوروکروم‌ها، بهتر است با اصول تابش و جذب نور بیشتر آشنا شویم.

نور چیست؟

نور، نوعی از انرژی الکترومغناطیسی است که بصورت امواج ساطع شده و با فرکانس و طول موج مشخص در فضا حرکت می کند. طول موج پرتوها، رنگ نور را مشخص می سازد. نوری که به وسیله چشم انسان قابل مشاهده است در یک محدوده مشخص با طول موج ۳۸۰ تا ۷۰۰ نانومتر (بین امواج فرا بنفش و فرو سرخ) قرار می گیرد. (شکل ۵)



شکل ۵ – طیف الکترومغناطیس

1. Excitation
2. Emission

نور خورشید دارای امواج فرابنفش (UV) و مادون قرمز (IR) نیز هست که چشم انسان قادر به مشاهده آنها نیست. ولی می توان آنها را بصورت گرما بر روی پوست احساس کرد و یا به وسیلهٔ فوتودتکتورها قابل سنجش هستند.

محدودهٔ نور مرئی را همچنین می‌توان بر اساس رنگ پرتو نوری به زیر گروههایی تقسیم نمود. کلمه اختصاری ROYGBV می‌تواند در به خاطر سپردن رنگ‌های تشکیل دهنده این طیف (قرمز، نارنجی، زرد، سبز، آبی بنفش) مفید باشد. نور قرمز دارای بیشترین طول موج و کمترین انرژی بوده و نور بنفش دارای بیشترین انرژی و کمترین طول موج می‌باشد.

تغییر استوکس[1]

وقتی که نور بوسیلهٔ یک فلوروکروم جذب می‌شود، الکترون‌های آن بر انگیخته شده و از یک حالت استراحت به لایه‌ای با سطح انرژی بالاتر حرکت می‌کنند. به این حالت، انگیختگی الکترون[2] گفته می‌شود. (شکل ۶)

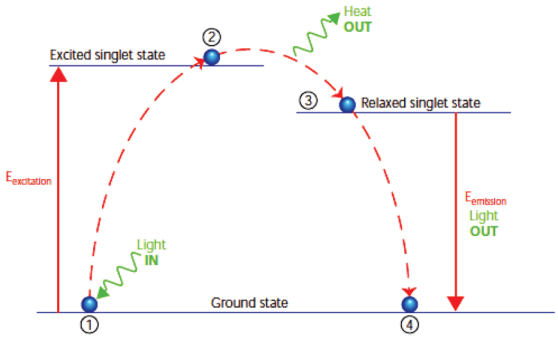
باید توجه داشت میزان انرژی مورد نیاز برای ایجاد انگیختگی، در هر فلوروکروم متفاوت خواهد بود.

حالت انگیختگی تنها برای مدت ۱۰-۱ ثانیه باقی خواهد ماند، زیرا فلوروکروم دچار تغییرات ساختاری درونی شده و به همین دلیل مقداری از انرژی جنبشی آن بصورت حرارت از دست خواهد رفت. در نتیجه الکترونها نیز به لایه هایی با انرژی پایین تر و پایدارتر سقوط می‌کنند. به این حالت، استراحت الکترونی[3] گفته می شود. زمانی که الکترونها به مدار اولیه خود بر می‌گردند، باقی مانده انرژی تابشی به صورت فلورسانس آزاد می‌شود.

از آنجایی که انرژی برون فرست (EEmission) فلوروکروم، دارای سطح انرژی پایین تری نسبت به انرژی انگیختگی اولیه (EExcitation) می‌باشد، رنگ نور متفاوتی نسبت به این سطح انرژی انگیختگی از خود بروز خواهد داد.

از آنجایی که فلوروکروم در حالتEEmission دارای انرژی پایین‌تری نسبت به حالت اولیه است رنگ نور متفاوتی نسبت به EExcitation خواهد داشت. در واقع طول موج تابش هر فلوروکروم بلندتر از طول موج آن در حالت برانگیختگی است. تفاوت بین طول موج در حالت EEmssion و EExcition به عنوان تغییر بنیادین نامیده می‌شود. این مقدار طول موج، اصولاً (بصورت پایه‌ای) مشخص می‌کند که یک فلوروکروم برای مطالعات فلورسانس مناسب است یا خیر.

1. Stockes shift
2. Excited electronic singlet state
3. Relaxed electronic singlet state

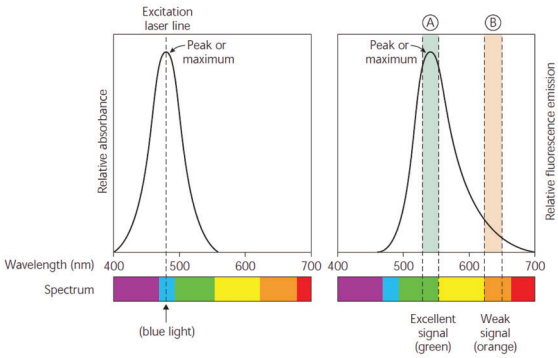


شکل٦-تغییراستوکس

پس تمایز نور تولید شده به وسیله تابش، از نوری که به منظور انگیختگی استفاده می‌شود امری ضروری است. تشخیص این تفاوت در مواردی که مولکولهای فلورسانس دارای تغییرات استوکس بزرگتر باشند راحت‌تر خواهدبود. (شکل ۶)

حداکثر جذب و حداکثر تابش:

طول موج انگیختگی به تعداد کل فوتون هایی که یک فوتوکروم جذب می کند، بستگی دارد:



شکل ۷-جذب نور(سمت چپ)و تابش نور(سمت راست) در مورد FITC

به عنوان مثال FITC ، پرتو های نوری با طول موج بین ۴۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر را جذب می‌کند، اما در مورد پرتوهای با طول موج ۴۹۰ نانومتر بیشترین جذب را دارد.

زمانی که تعداد فوتون‌های بیشتری جذب شوند فلورسانس قوی‌تری به دست خواهد آمد.

این شرایط بهینه را با عناوین بیشترین جذب و بیشترین طول موج‌های تابش می‌شناسند. بیشترین جذب معمولا خط طیف مناسب برای انگیختگی را نیز نشان می دهد.

در مورد FITC، بیشینه در طیف آبی قرار می گیرد. لیزر آبی رنگ آهن – آرگون معمولاً با این فلوروکروم استفاده می شود که در طول موج ۴۸۸ نانومتر دچار انگیختگی شده و نزدیک به حداکثر جذب فلوروکروم لیزر FITC یعنی ۴۹۰ نانومتر است.

تابش فلورسانس FITC، در محدودهٔ ۴۷۵ تا ۷۰۰ نانومتر رخ می‌دهد و بیشینه آن در ۵۲۵ نانومتر است که همان طیف سبز می‌باشد. همان طور که در شکل۷ مشاهده می‌شود، اگر از فیلترهایی استفاده شود که همه پرتوهای نوری را جذب کرده و تنها به نوری که از طریق کانال A که در بیشینه آن اندازه‌گیری می‌شود اجازه عبور می‌دهند، FITC بصورت سبز دیده می‌شود. حال اگر فلورسانس FITC به وسیله کانال B سنجیده شود، نور آن به رنگ نارنجی و در قدرت بسیار ضعیف‌تر مشاهده خواهد شد. از این رو رنگ فلورسانس، به رنگی اطلاق می‌شود که یک فلوروکروم در بالاترین طول موج با حالت پایدار از خود ساطع می‌کند. در واقع چگونگی تنظیم فلوسایتومتر برای اندازه‌گیری فلورسانس، رنگ فلوروکروم را مشخص خواهد نمود.

چرا از یک پروب فلورسنت استفاده می شود؟

هدف از تولید یک پروب فلورسنت مانند یک آنتی بادی متصل به یک فلوروکروم این است که یک اپی توپ (آنتی ژن) خاص را مورد هدف قرار دهد. با اتصال پروب به این آنتی ژن و با استفاده از یک فلوستیومتر، ویژگی های بیوشیمایی و بیولوژیکی آن آنتی ژن و حامل آن (سلول) را می‌توان ارزیابی کرد.

پروب های فلورسنت دارای کاربردهای بسیار گسترده‌ای هستند که برخی از مهمترین آن‌ها عبارتند از:

- شناسایی و شمارش دقیق سلول‌ها، گیرنده‌های سطح سلولی یا ارگانل‌های داخل سلولی
- دسته‌بندی و جداسازی سلولی
- تعیین فنوتیپ ایمونولوژیکی سلولی
- آزمایش‌های نفوذ کلسیم
- مشخص کردن محتوای اسید نوکلئیکی سلول
- اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی
- مطالعه فعالیت آپوپتوزی

با تغییر نور انگیختگی و استفاده از دو یا چند فلوروکروم، می‌توان چند پارامتر از نمونه را در آن واحد ارزیابی کرد. این موضوع اساس مطالعات فلورسانس چند رنگی می‌باشد.

کدام فلوروکروم ها برای فلوسایتومتری مناسب هستند؟

تعداد مولکول‌های فلورسنتی که قابلیت کاربرد در فلوسایتومتری را دارا باشند، بسیار زیاد است و بحث در مورد همه آن‌ها، خارج از حوصله این کتاب. اما مشخصات برخی از آن‌ها، که بیشترین استفاده را در تشخیص اپی توپ‌های درون سلولی یا سطح سلولی دارند، در جدول صفحه ۲۱ آمده است. این جدول شامل رنگیزه‌های غالب و آخرین دستاوردها در زمینه پروب‌های فلورسنت بوده و از تنوع کافی برای پاسخگویی به نیازهای محققین برخوردار می باشد.

رنگیزه های تک:

برخی از رنگیزه‌های تک، مانند FITC در طول ۳۰ سال اخیر کاربرد فراوان داشته اند، اما اکنون رقیبانی مانند Alexa four که دارای پرتوهای نوری پایدارتر و قدرت فلورسنس بیشتر هستند، جایگزین آنها شده‌اند.

Single dyes

Dye	Laser excitation line (nm)	Maximal absorbance (nm)	Maximal emission (nm)	Fluorescence color
Alexa Fluor® 405	405, 407	401	421	
Alexa Fluor® 430	405, 407	433	541	
Alexa Fluor® 488	488	495	519	
Alexa Fluor® 633	633, 635, 647	632	647	
Alexa Fluor® 647	633, 635, 647	650	665	
Alexa Fluor® 660	633, 635, 647	663	690	
Alexa Fluor® 680	633, 635, 647	679	702	
Alexa Fluor® 700	633, 635, 647	702	723	Infrared
APC	633, 635, 647	650	661	
FITC	488	490	525	
Pacific Blue™	405, 407	410	455	
PerCP	488	490	675	
Phycoerythrin	488	490, 565	578	

شکل ۸–رنگیزه های تک

رنگیزه های (توام) جفت:

در رنگیزه های توام، یک فلوروکروم کوچک بر پشت یک فلوروکروم بزرگتر سوار می شود. بدین ترتیب زمانی که رنگیزهٔ اول انگیخته شده و به بالاترین حد انرژی خود می‌رسد، همهٔ انرژی حاصل را به رنگیزه دوم که در مجاورت آن قرار دارد منتقل می‌کند. این عمل رنگیزهٔ دوم را فعال کرده، موجب تابش فلورسانس می‌گردد. در واقع این روش، یک راهکار هوشمندانه برای ایجاد تغییرات بنیادی بالاتر

است. از این طریق تعداد رنگ‌هایی که از یک طول موج لیزر می‌توان آنالیز کرد، افزایش خواهد یافت.

مهمترین رنگیزهٔ جفت، برای پرتوهای لیزری با طول موج ۴۸۸ نانومتر تولید شده و استفاده از آن در اغلب فلوسایتومتری ها رایج است. رنگیزه های جفت به منظور مطالعات فلورسانس چند رنگی، به ویژه در ترکیب با تک رنگیزه ها بسیار مفید و کارا هستند. به عنوان مثال PE-Cy۷, percp ۵,۵-cYy--, Alexa four, phycoerythrin ۴۸۸ همگی می توانند در طول موج ۴۸۸ نانومتر انگیخته شوند، اما تابش های ناشی از آن ها، به رنگ سبز، زرد، بنفش و فروسرخ می باشند که هر کدام به وسیلهٔ دتکتور مجزا سنجیده می شوند.

Tandem dyes

Dye	Laser excitation line (nm)	Maximal absorbance (nm)	Maximal emission (nm)	Fluorescence color
APC-Alexa Fluor® 750	633, 635, 647	650	779	Infrared
APC-Cy5.5	633, 635, 647	650	695	
APC-Cy7	633, 635, 647	650	785	Infrared
PerCP-Cy5.5	488	496, 546	695	
PE-Alexa Fluor® 610	488	496, 546	627	
PE-Alexa Fluor® 647	488	496, 546	667	
PE-Alexa Fluor® 680	488	496, 546	702	
PE-Alexa Fluor® 700	488	496, 546	723	Infrared
PE-Alexa Fluor® 750	488	496, 546	779	Infrared
PE-Cy5.5	488	496, 546	695	
PE-Cy5	488	496, 546	667	
PE-Cy7	488	496, 546	785	Infrared
PE-Texas Red®	488	496, 546	615	

همبستگی فلورسانس:

باید توجه داشت که در مطالعات فلورسانس چند رنگی ، این امکان وجود دارد که هم پوشانی هایی رخ دهد. در صورت استفاده همزمان از دو یا چند فلوروکروم در یک آزمایش، این احتمال هست که پروفایل تابشی آنها بر هم منطبق شود . در چنین شرایطی سنجش صحیح فلورسانس تابش شده برای هر یک از فلوروکروم ها کار دشواری خواهد بود. البته می توان با به کاربردن فلوروکروم‌ها در انتهای طیف از بروز این پدیده جلوگیری کرد (به عنوان مثال phycoerythrin و Alexa four 405)، اما این روش همیشه عملی نیست.

در عوض پروسه‌ای تحت عنوان همبستگی فلورسانس در آنالیز داده‌ها به کار گرفته می‌شود، که درصد تداخل یک فلوروکروم در کانالی که به سنجش آن اختصاص نیافته است را محاسبه می‌کند. شکل ۸ به درک بهتر این مطلب کمک می‌کند. نمودارها، پروفایل تابشی دو فلوروکروم A و B که به وسیلهٔ کانالهای FL-1 و FL-2 سنجیده می‌شوند را نشان می‌دهند.

به دلیل اینکه پروفایل‌های تابشی این دو بسیار به یکدیگر نزدیک هستند، قسمتی از پروفایل A

بر B همپوشانی دارد (سایه قرمز) و قسمتی از تابش‌های فلوروکروم B به کانال FL-1 (سایه‌ی آبی تیره) می‌رسد.

در مواردی که هر دو فلوروکروم به طور همزمان به کار گرفته شوند، به منظور محاسبهٔ میزان نیاز به جبران فلورسانس در مجموعهٔ داده‌ها، باید در ابتدا مقدار کنترل های اولیه از مقدار کل کسر شود.

بدین ترتیب که ابتدا فلوروکروم A را به تنهایی استفاده کرده و درصدی از کل تابش که در کانال FL-2 به دست می آید را مشخص می کنیم. سپس این روش برای فلوروکروم B نیز تکرار می شود، با این تفاوت که در این زمان کانال FL-1 در حالت Spillover است.

مثال: فرض کنید نتایج حاصل از بررسی های بالا به شرح زیر باشد.

	Spillover Fluorescence	
	FL-1	**FL-2**
Fluorochrome A	N/A	**17%**
Fluorochrome B	**5%**	N/A

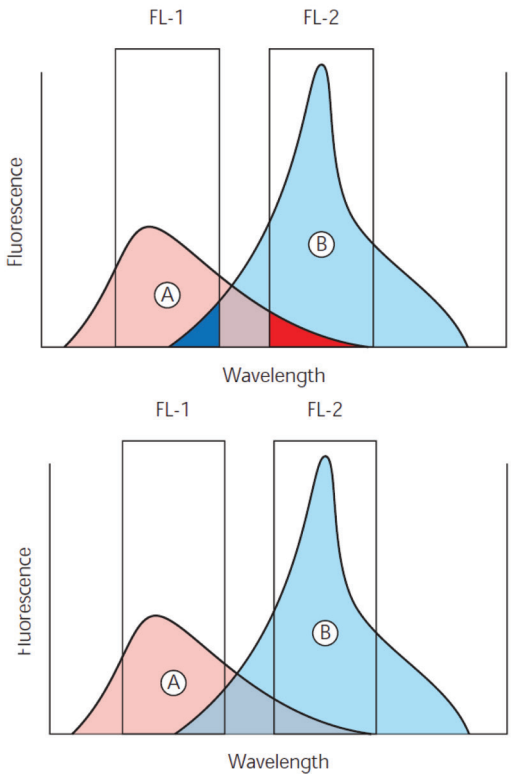
در این مثال، که دو فلوروکروم به منظور آزمایش دو رنگی مورد استفاده قرار گرفته اند، سنجش صحیح فلورسانس برای فلوروکروم A در کانال ۱ ، ازطریق فرمول زیر محاسبه می شود.

A = (FL1 میزان کل فلورسانس سنجیده شده در) − (B از کل فلورسانس ٪۵)

و بر اساس همین فرمول، سنجش صحیح فلوروکروم B در کانال FL-2 به روش زیر محاسبه خواهد شد.

B = (FL2 میزان کل فلورسانس در) − (A فلوروکروم کل فلورسانس ٪۱۷)

خوشبختانه امروزه به کارگیری نرم افزارهای آنالیزور فلوسایتومتری مدرن، که محاسبات جبران فلورسانس را به طور خودکار انجام می دهند، از مشکلات کار به میزان قابل توجهی کاسته است.



شکل ۸- همبستگی فلورسانس، A در کانال FL-1 و B در کانال FL-2 سنجیده می شود.

فصل سوم

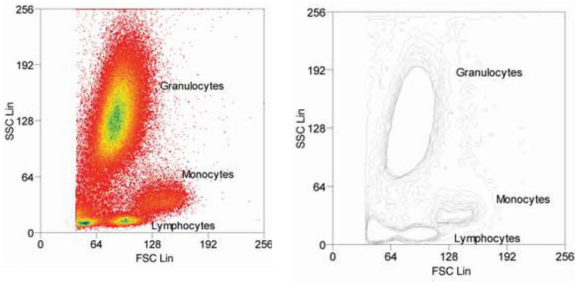
آنالیز داده‌ها

دروازه‌ها و نواحی

بررسی انتخابی سلول‌های مورد نظر و حذف نتایج مرتبط با سلول‌های ناخواسته مثل سلول‌های مرده و دبرمان، یکی از مهمترین اصول فلوسایتومتری است. این اصل را Gating می‌نامند.

درگذشته جدا سازی سلول‌ها با روشهای سنتی و بر اساس خواص فیزیکی صورت می‌گرفت. به عنوان مثال جداسازی دبریس‌های سلولی و توده‌ها از سلول‌های منفرد، براساس تفاوت اندازه‌شان و از طریق پراکنش مستقیم انجام می‌گرفت. (سلول‌های مرده‌دارای پراکنش مستقیم کمتر و پراکنش جانبی بیشتری نسبت به سلول‌های زنده هستند)

آنالیز سلول‌های خونی کاملاً لیز شده، مهمترین کاربرد Gating است. شکل ۹ نمودارهای نسبت SSC به FSC، در مواردی که از تعداد زیادی سلول استفاده می‌شود را نشان می‌دهد.



شکل۹- آنالیز خون کامل لیز شده با استفاده از FSC/SSC

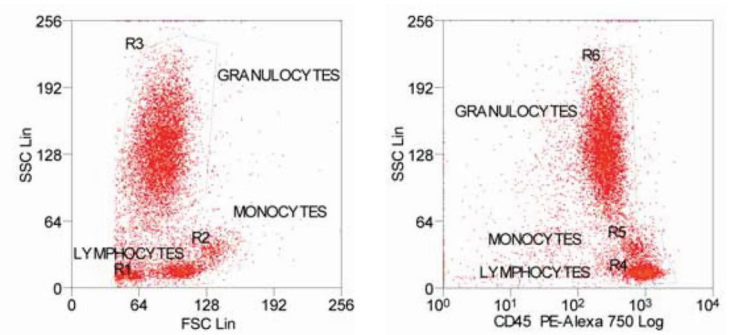
تفاوت ویژگی‌های فیزیکی گرانولوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها، افتراق این سلول‌ها را از یکدیگر و همچنین از آلاینده‌های سلولی امکان پذیر می‌سازد.

در نمودار تراکم، هر نقطه نمایندهٔ یک سلول است که از دستگاه عبور کرده. نقاط داغ (سبز / زرد) نشاندهندهٔ تعداد زیاد فرایندهایی است که از جمعیت صحیح سلولی منتج می شود. رنگ‌ها به نمودار وجههٔ سه بعدی می‌بخشند. پس از یک تجربهٔ کوچک، تمایز انواع زیر گروه‌های سلول‌های خونی نیز نسبتاً ساده و قابل انجام است.

در روش های جدیدتر Gating، از پارامترهای فلورسانس به همراه پارامترهای پراکنده استفاده می‌شود. نمودار سمت چپ شکل ۱۰، یک نقشه FSC/SSC برای سلول‌های خون کامل همولیز شده، (که دارای تعداد سلول‌های کمتری نسبت به شکل ۹ است) را نشان می دهد.

لنفوسیتها، مونوسیتها و گرانولوسیتها به ترتیب در نواحی ۱، ۲ و ۳ جدا سازی شده اند. (R1 ، R2 و R3)

ناحیه، به یک محدوده روی نقشه گفته می شود که اطلاعات فلوسایتومتری را بیان می کند.



شکل۱۰- آنالیز خون کامل لیز شده با استفاده از فلورسانس و تابش پراکنده

در سمت راست، همان سلول‌ها بر روی نموداری نمایش داده شده‌اند که در آن محورy ها، بیانگر SSC و محور x ها بیانگر میزان فلورسانس CD54 است.

CD54 مارکری است که بر روی همه گلبول های سفید وجود دارد، اما تراکم آن در این سلول‌ها یکسان نیست. همچنین گلبولهای قرمز فاقد این مولکول در سطح خود هستند.

در یک تعریف سنتی لنفوسیت‌ها دارای SSC پایین و مقدار فلورسانس CD54 بالایی هستند(R4). گرانولوسیت‌ها دارای SSC بالا و مقدار فلورسانس CD54 پایین هستند(R6)، و مونوسیت‌ها چیزی بین این دو هستند (R5).

تفاوت مهم لنفوسیت‌هایی که در R1 قرار گرفته‌اند و آنهایی که در R4 قرار گرفته‌اند، فقدان

گلبول‌های قرمز در گروه دوم است. در واقع گروه دوم دارای خلوص بالاتری می‌باشند.

این موضوع، اهمیت آن دسته از استراتژی‌های Gating را نشان می دهد، که در آنها یک پارامتر تابشی پراکنده را با یک پارامتر فلورسانس ترکیب می‌کنند.

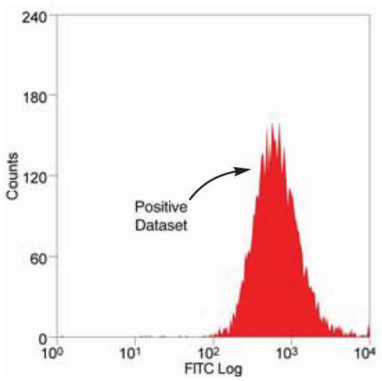
هیستوگرام های تک پارامتری

هیستوگرام های تک پارامتری نمودارهایی هستند که سنجش یک پارامتر (فلورسانس نسبی شدت پراکندگی نور) را بر روی محور x ها و تعداد فرآیندها (سلول‌های شمرده شده) را بر روی محور y ها نشان می‌دهند.

نمونه هیستوگرام شکل ۱۱ به منظور ارزیابی تعداد کل سلول‌های یک نمونه که دارای ویژگی‌های منتخب و مد نظر هستند و هر کدام یک نشانگر (آنتی ژن) خاص را بیان می‌کنند، استفاده می‌شود. در واقع تعداد سلول‌هایی که دارای ویژگی‌های مورد نظر هستند، به عنوان موارد مثبت مجموعهٔ داده تلقی می‌شوند.

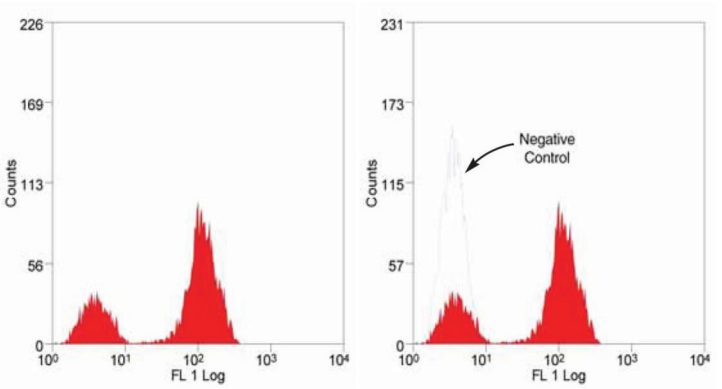
در حالت ایده آل، فلوسایتومتری به ما یک Peak واضح می‌دهد که می‌توان آن را به عنوان داده مثبت در نظر گرفت.

در بسیاری از موارد، آنالیز جریان بر روی مخلوطی از سلول‌ها انجام می‌شود که چندین Peak را بر روی هیستوگرام به ما می‌دهند.



شکل ۱۱- یک هیستوگرام تک پارامتری

به منظور شناسایی داده مثبت، باید فلوسایتومتری را در حضور کنترل‌های منفی ایزوتیپ‌ها نیز تکرار کرد. (شکل ۱۲)



شکل ۱۲- کدام یک داده مثبت تلقی می شود؟ در سمت چپ از آنتی بادی موش صحرایی علیه موش ۸۰/F٤ که با FITC کانژوگه شده است استفاده شده تا به وسیلهء آن ماکروفاژهای صفاقی را رنگ آمیزی کند. این نمودار دو پیک را نشان می دهد. در سمت راست با استفاده از ایزوتوپ کنترل مناسب (IgG2b موش صحرائی کنترل منفی مستقل FITC) که تصویر آن بر روی هیستوگرام هم پوشانی داشته(خطوط آبی)، داده های مثبت را می توان Peak قرمز بلند تر در نظر گرفت.

بسته های نرم افزاری آنالیز، که دستگاه‌های فلوسایتومتری را پشتیبانی می‌کنند، اندازه‌گیری درصد رنگ آمیزی مثبت سلول‌ها را در هیستوگرام آسان می‌سازند. به عنوان مثال هیستوگرام F4/80 در شکل ۱۳، نشان دهنده آمارهای R3 و R2 می‌باشد که در این نوع نمودار به عنوان نواحی وسیله‌ای شناخته می شوند. (تجزیهٔ آماری)

در شکل ۱۳، میزان ۹۹/۸۳ ٪ از نمونه‌های سلولی به عنوان کنترل منفی در ناحیه R2 هیستوگرام قرار دارند (ناحیهٔ آبی). ٪ ۲۸/۴ سلول‌ها (سایه قرمز) نیز برای پروب F4/80 رنگ‌آمیزی منفی (R2) داشته و در مقایسه با آن ٪ ۷۱/۸۶ سلول‌ها در جمع داده‌های مثبت قرار دارند (R3).

آمار بیشتر در مورد پیک‌ها (انحراف معیار و میانی) بصورت اتوماتیکی در اینجا فراهم است اما اینها در هر نرم افزار متفاوت خواهد بود.

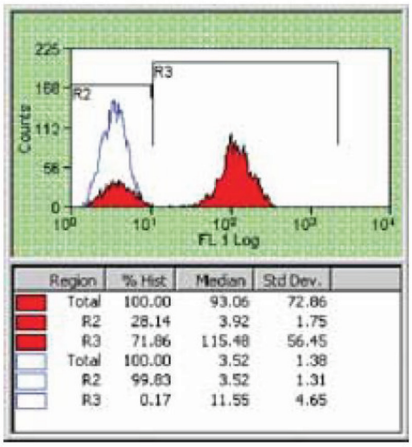
این چنین آنالیز را می توان برای هستیوگرام های دو پارامتری نیز بکار گرفت.

هسیتوگرام‌های دو بعدی (۲ پارامتری)

هسیتوگرام‌های دو بعدی، نمودارهایی هستند که دو پارامتر سنجشی را نشان می دهند. در این نوع نمودار محور x ها نشانگر یکی از پارامترها و محور y ها نشانگر پارامتر دیگر بوده و میزان و تعداد سلول‌ها، بر اساس تراکم نقاط در نواحی مخصوص به خود بر روی نمودار مشخص خواهند بود.

این پارامترها می‌توانند SSC ، FSC یا فلورسانس باشند. در شکل های ۹ و ۱۰، چند نمونه از

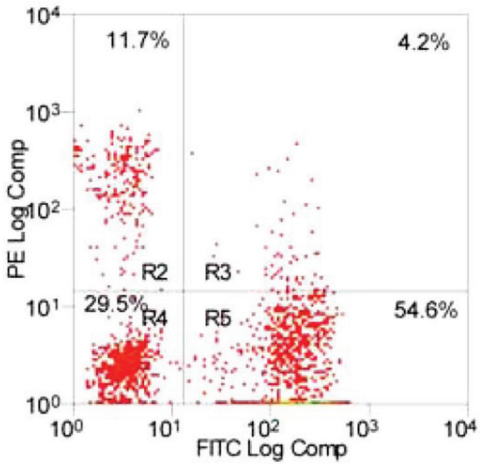
هیستوگرام دو پارامتری نشان داده شده اند.



Region	% Hist	Median	Std Dev.
Total	100.00	93.06	72.86
R2	28.14	3.92	1.75
R3	71.86	115.48	56.45
Total	100.00	3.52	1.38
R2	99.83	3.52	1.31
R3	0.17	11.55	4.65

شکل۱۳- آنالیز آماری

هیستوگرام فلورسانس دو رنگی که در شکل ۱۴ دیده می شود مثال دیگری در این زمینه است. لنفوسیت‌ها با آنتی بادی علیه آنتی ژن CD۳ که با FITC کانژوگه شده است رنگ آمیزی شده، نتایج آن بر روی محور x نشان داده می‌شود. بر روی محور y که اطلاعات آن بوسیله کانال PE مشخص می‌شود، آنتی بادی علیه آنتی‌ژن HLA-DR مسئول شناسایی سلول‌های حامل این آنتی‌ژن می‌باشد. (HLA-DR و CD۳ مارکرهایی برای شناسایی سلول‌های T و B هستند.)



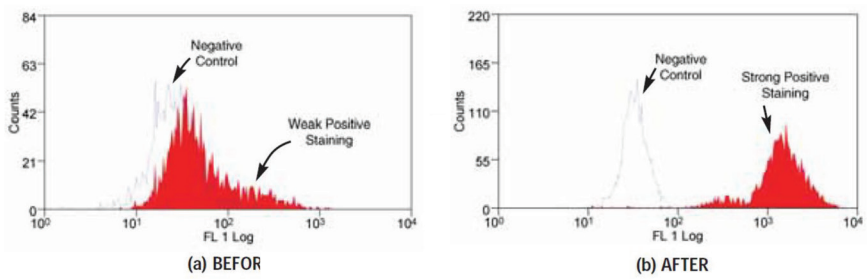
شکل ۱٤- هسیتوگرام دو پارامتری- فلورسانس دو رنگی

در شکل ۱۴، ناحیهٔ R2 دارای سلول‌های B است که با استفاده از PE نشاندار شده‌اند و مثبت بودن وجود آنها در طول محور PE مشخص است. ناحیهٔ R مربوط به سلول‌های T است که با FITC نشاندار شده و در طول محور FITC به صورت مثبت نشان داده شده اند. در بالا و راست نمودار، تعداد کمی Tcell فعال (حدود ۴٪) وجود دارند که آنها نیز HLA-DR را بر سطح خود بیان کرده‌اند. و از آنجایی که با هر دو مارکر آنتی بادی رنگ آمیزی می‌شوند، در ناحیهٔ خاص خود (R3) قرار می‌گیرند. ناحیه R4 مربوط به سلول‌هایی است که نسبت به هر دو رنگ PE و FITC منفی بوده‌اند. امروزه روش‌های نوین فلوسایتومتری، ارزیابی همزمان ۱۷ مارکر فلورسانس بر روی نمونه‌ها را به صورت همزمان امکان پذیر ساخته‌اند. لذا با انجام دادن تنها یک آزمایش و با استفاده از هیستوگرام‌های دو پارامتری می‌توان داده‌های فراوانی را در آنالیز نمونه به دست آورد.

آنتی ژن های درون سلولی

رنگ آمیزی آنتی ژن‌های درون سلولی امری دشوار است. زیرا پروب‌های تولید شده بر پایه آنتی‌بادی نمی‌توانند به راحتی و با میزان مناسب از مرز غشای سلولی به داخل سلول نفوذ یابند. به منظور تسهیل شرایط، سلول‌ها را قبل از اضافه کردن فلوروکروم، در یک سوسپانسیون قرار میدهند تا فیکس شده و دیواره آن‌ها نفوذ پذیر شود. با این روش بدون اینکه تغییری در ویژگی‌های ساختاری سلول رخ دهد، امکان دستیابی پروب‌ها به ساختارهای درون سلولی فراهم خواهد شد.

امروزه بسیاری از کیت‌های تجاری موجود در بازار مانند Leucoperm™، معرف‌هایی را جهت انجام این مراحل بسیار سخت فراهم ساخته اند. (شکل ۱۵).



شکل ۱۵- کیت Lencoperm™ در ترکیب با یک آنتی بادی ، جهت شناسایی MOMA2 که یک آنتی ژن درون سلولی ماکروفاژها و مونوسیت های موش است استفاده شده. توجه کنید که پس از فیکس کردن نمونه و ایجاد نفوذ پذیری (b) ، چگونه داده‌های مثبت به‌دست آمده اند.

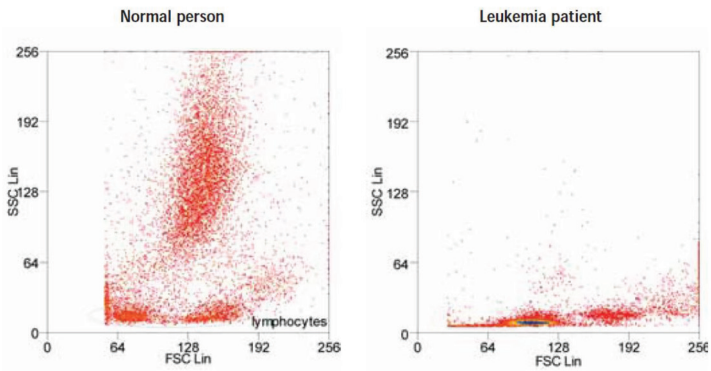
تعیین ایمونولوژیکی فنوتیپ

تمام سلول‌های نرمال، بسته به نوع رده سلولی و میزان بلوغ، دارای مارکرهای متنوعی بر روی سطح خود هستند. رشد سلول‌های ناهنجار موجب بروز تداخلاتی در بیان طبیعی مارکرها می‌شود. این پدیده منجر به بیان بیش از حد برخی از مارکرها و بیان کمتر برخی دیگر می‌شود.

تعیین ایمونولوژیک فنوتیپ سلول‌ها به کمک فلوسایتومتر یکی از راه‌های افتراق سلول‌های بیمار از سلول‌های سالم است و امروزه استفاده از این روش به عنوان یکی از مهمترین کاربردهای کلینیکی فلوسایتومتری در تشخیص میلوما، لنفوما و لوسمی بسیار رایج می‌باشد.

همچنین می‌توان از فلوسایتومتری به منظور ارزیابی میزان اثربخشی اقدامات درمانی، در مبتلایان به بیماری‌های فوق و یا سایر سرطان‌ها استفاده کرد.

به عنوان مثال در شکل ۱۶ تفاوت بین پروفایل خونی یک فرد سالم و فردی که از لوسمی رنج می‌برد، با استفاده از نقاط FSC و SSC قابل مشاهده است.



شکل۱۶- تعیین ایمنولوژیک فنوتیپ

در یک فرد سالم انواع سلول‌های خونی به خوبی تعریف شده‌اند، در حالی که این مسئله در مورد خون یک فرد دارای لوسمی، غیر عادی بوده و از پروفایل عادی و معمولی آن تبعیت نمی‌کند. آزمایش لنفوسیت‌های بیمار به منظور تشخیص مارکرهای خاص سطح سلولی نیز اطلاعات بیشتری را در مورد این شرایط به ما می‌دهد.

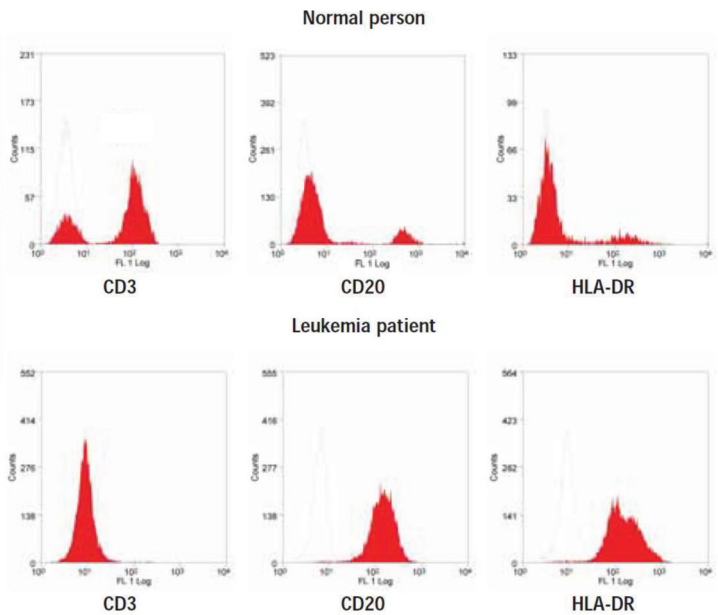
CD3 : خون یک فردسالم، دارای نسبت بالایی از لنفوسیت‌های CD3 مثبت هستند. در حالی که در خون بیمار مبتلا به لوسمی، علائمی از آنتی ژن CD3 مشاهده نمی‌شود.

CD20 : در افراد دارای لوسمی سلول‌های زیادی وجود دارند که با رنگ آمیزی CD20، مثبت می‌شوند، در حالی که در افراد سالم میزان کمی از سلول‌ها مارکر CD20 را نشان می‌دهند.

HLA-DR : در فرد مبتلا به لوسمی رنگ آمیزی HLA-DR مثبت است. اما در فرد سالم تنها تعداد بسیار اندکی از سلول ها با رنگ آمیزی HLA-DR مثبت می شوند.

زمانی که در پروفایل خونی یک فرد، نتایج رنگ آمیزی CD3: neg، CD20: pos و HLA-DR: pos باشد، یک متخصص باید تشخیص دهد که این بیمار از لنفوما یا لوسمی ردهٔ سلولی B رنج می برد.

البته دسته بندی دقیق نوع بیماری ممکن است نیاز به آنتی بادی مارکرهای بیشتری داشته باشد.



شکل۱۷- تشخیص لوسمی

فصل چهارم

آنالیز همزمان DNA و RNA با استفاده از فلوسایتومتری

آنالیز همزمان DNA و RNA با فلوسایتومتری، اطلاعاتی از وضعیت رونویسی سلول‌ها و نیز محتوای DNA به ما می دهد. این کار را می توان با استفاده از فلوروکروم های متاکروماتیک که به طور الکتروستاتیک به RNA تک رشته ای متصل شده و به روش جاگیری بین لایه‌ها با DNA هیبرید می‌شوند، انجام داد. از آن جا که زنده بودن سلول شرط لازم برای آنالیز است، باید از سلول‌های تازه تهیه شده استفاده کرد. از آنالیز همزمان DNA/RNA می‌توان در طبقه‌بندی، ارزیابی و تشخیص بیولوژیک بدخیمی‌های هماتو رتیکولار شامل میلوماهای چندگانه استفاده کرد.

همان طور که گفته شد آنالیز همزمان DNA و RNA می‌تواند با استفاده از فلوروکروم متاکروماتیک اکریدین نارنجی[1] (AO) که یکی از مشهورترین اعضای خانواده فلورسنت تئاکریدین است صورت گیرد. AO یک فلوروکروم منحصر به فرد و همه کاره است که می تواند در تشخیص انواع گسترده ای از اجزای سلولی استفاده شود. با ترکیب میزان سنجی DNA و RNA و با استفاده از AO می‌توان بین جمعیت‌های سلولی با محتوای DNA یکسان، تفاوت قائل شد و فعالیت ترجمه‌ای، تکثیر سلولی و وضعیت تمایز آن‌ها را ارزیابی نمود[11]. AO یک ترکیب ۳، ۶ دی متیل آمینو آکریدین است که صرف نظر از ترکیب اصلی یا نوع اتصال، به نوکلئیک اسیدهای دو رشته‌ای می‌چسبد. سلول‌هایی که قرار است رنگ شوند، باید با شوینده غیر یونی در PH پایین و با پروتئین‌های سرمی نفوذپذیر گردند(مثلا Triton X-100). با این روش می‌توان به منظور دسترسی بهتر AO به DNA ، هیستون‌ها را از کروموزوم ها جدا کرد. فلوروکروم در حضور EDTA در ترکیب دو رشته‌ای نوکلئیک اسیدها جا می‌گیرد و به طور الکتروستاتیک به مقدار زیاد بر روی RNA جمع

1.Acridine Orange

می‌شود. در حین انگیختگی، DNA حداکثر طول موج ۵۳۰ نانومتر (سبز) را ساطع می‌کند و RNA با نشر حداکثر، طول موج بالای ۶۳۰ نانومتر (قرمز) را ساطع می‌کند. AO هم چنین می‌تواند به RNA دو رشته‌ای سلول متصل شده و باعث افزایش کاذب اندازه‌گیری محتوای DNA شود. لذا از آن جا که rRNA و tRNA سلولی ساختار دورشته‌ای دارند، باید قبل از مرحله پردازش با استفاده از EDTA، به طور انتخابی تخریب شوند.

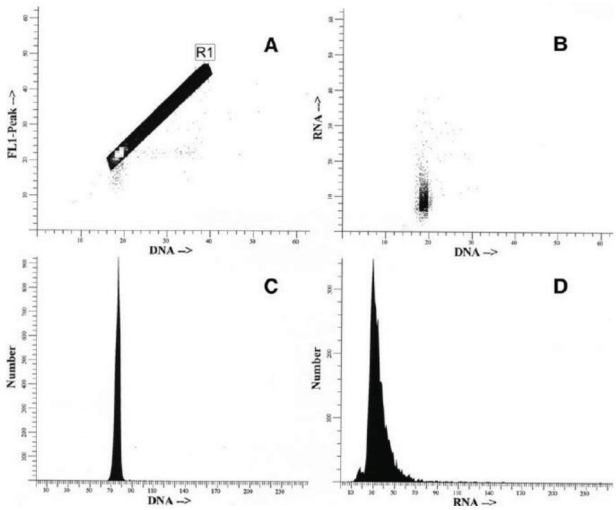
آنالیز:

ابزارها و کاربردها:

انگیختگی AO بین ۴۵۵ و ۴۹۰ نانومتر حاصل می شود. از آن جا که طول موج انتشاری AO متصل به DNA با فلورسانس قرمز ناشی از RNA همپوشانی دارد، برای به حداقل رساندن این رخداد باید از ترکیب فیلترها استفاده شود.

که در این مورد بهترین گزینه استفاده از یک 550-longpass (LP) دو رنگ با یک 525-bandpass (BP) برای فلورسانس DNA و یک 630-LP برای فلورسانس RNA می باشد. اقدامات جبرانی دیگری نیز ممکن است برای کاهش تابش همپوشان نیاز باشد. (یادداشت ۵ را ببینید)

در صورت نیاز باید از گزینش دوگانه استفاده کرد. (شکل ۱۸)



شکل ۱۸: یک پروتکل فراگیر معمول که یک هیستوگرام تفریق دوگانه است (پیک به ازای انتگرال فلورسانس) (A)، تظاهر دو مقداری (B) DNA/RNA، و هیستوگرام یک مقداری DNA و RNA (به ترتیب C و D)

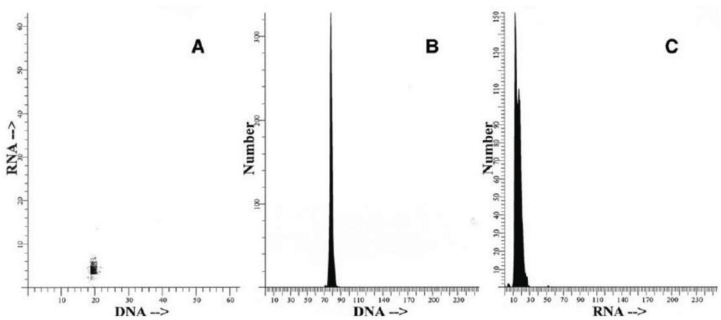
استاندارد محتوی RNA

محتوای DNA و RNA سلولی را می‌توان از طریق مقایسه مقادیر این مولکول‌ها با میزان آن‌ها در سلول‌های بیولوژیکی استاندارد مانند لنفوسیت‌ها، رده‌های سلولی و سلول‌هایی از این دست، به صورت کمّی اندازه گیری کرد. لنفوسیت‌های تازه جمع آوری شده، رایج ترین و پایدارترین کنترل برای چنین منظوری هستند

استانداردهایی که به وسیله RNase تیمار شده یا تیمار نشده اند، باید استفاده شده و همـزمان اندازه گیری شوند. RNA و DNA موجود در سلول‌های مورد آزمایش را باید تحت شرایط مشابه با آنچه که در مورد نمونه‌های کنترل انجام می شود، اندازه‌گیری کرد. محتوی RNA از تقسیم سطح آزمایشی آن به سطح کنترل به دست می‌آید. هم چنین از لنفوسیت‌ها می‌توان برای کالیبره کردن محتوی DNA به منظور مشخص شدن شاخص‌های DNA استفاده کرد.

استانداردهای سلولی

لنفوسیت‌های نرمـــال خون محیطـی به عنوان یک کنتـــرل بیولوژیک برای تشخیص کیفیت رنگ‌آمیزی AO و پایداری دوگانه G۱/G۰ متوسط کانال‌ها استفاده می‌شوند. (شکل ۱۹)



شکل ۱۹- (A) هیستوگرام دو پارامتری DNA/RNA (B و C) هیستوگرام های تک پارامتری DNAو RNA

از لنفوسیت‌هایی که بعد از جداسازی درجه بندی شده فیکول- هایپک و شمارش سلولی به دست آمده اند، و در میزان ۱۰۶ سلول در میلی لیتر آماده سازی شده اند، می‌توان برای ساخت درجاتی از ارقام متوسط کانالی قابل قبول RNA استفاده کرد. (یادداشت ۶ را ببینید)

سوسپانسیون لنفوسیت‌ها باید به صورت همزمان رنگ آمیزی شده و به صورت همزمان با هر دسته از نمونه‌ها آنالیز شود.

همچنین می‌توان از NPBLs جهت تعیین تعداد کروموزوم‌های هسته، خصوصا در تومورهایی با Peak های نزدیک به سلول‌های دیپلوئید استفاده کرد. (یادداشت ۷ و ۸ را ببینید) قسمت‌های مساوی از NPBL (یعنی ۱۰۰ از هر کدام) و سوسپانسیون سلول‌های توموری باید با هم مخلوط شده و با Acridine Orange رنگ‌آمیزی شوند. (شکل ۲۰)

شکل۲۰- دو پارامتر DNA/RNA (A)

(B) تک پارامتر

(C و D) هیستوگرام DNA نمونه تومور قبل از مخلوط شدن با NPBLs، آنالیز AO بعد از مخلوط شدن مقادیر مساوی از سوسپانسیون سلول‌های توموری با NPBLs. به افزایش در تعداد سلول های دیپلوئید G۱/G۰ در (D) توجه کنید.

تفسیر هیستوگرام:

شاخص های DNA و اطلاعات چرخه سلولی را می‌توان از طریق برنامه‌های نرم افزاری تجاری یا به صورت دستی اندازه‌گیری کرد. برای آنالیز دستی، مکان‌نما باید بر روی پیک‌های G۱/G۰ و محل های M/S+G۲ قرار گیرد. شاخص‌های DNA با تقسیم ارزش کانالی متوسط (x-axis) برای پیک آنپلوئیدی، ارزش متوسط کانالی برای پیک دیپلوئید داخلی G۱/G۰ محاسبه می‌گردد.

به صورت تئوری شاخص DNA دیپلوئید برابر با یک است. درصد سیکل سلولی را می‌توان با استفاده از تعداد حقیقی سلول ها شامل سطح زیر نمودار محاسبه کرد.

شاخص‌های RNA توسط تقسیم متوسط فلورسانس G۱/G۰ و RNAی نمونه آزمایشی بر متوسط فلورسانس G۱/G۰ RNAی NPBL محاسبه می‌شوند.

اصول آنالیز محتوی RNA:

اندازه گیری RNA ، در واقع یک تخمین از محتوی RNA ریبوزومی است که بیش از ۸۰ ٪ از محتوی RNA سلولی را شامل می‌شود. این به یک انعکاس غیرمستقیم از قدرت‌های ترجمه‌ای سلول‌های مورد آنالیز بر می گردد.

آنالیز RNA می‌تواند در موارد زیر استفاده شود:

۱- شناسایی جمعیت‌های مختلف سلولی (لنفوسیت host cell و سلول توموری) در نمونه‌ها

۲- ارزیابی موقعیت سیکلی سلول‌ها. (پیشرفت سیکل سلولی با افزایش مقدار RNA که در طول G۱/G۰ اتفاق می‌افتد همراه است. RNA سلولی می‌تواند در هیستوگرام DNA به منظور تشخیص تعداد سلول‌های در حال گذراندن مراحل سیکل مورد استفاده قرارگیرد.)

کاربرد های رایج آنالیز DNA به RNA

- ارزیابی تمایز سلولی فنوتیپ‌های سلولی
- تعیین فاز سیکل سلولی
- ارزیابی بیولوژیک بدخیمی‌های هماتولوژیک و تومورهای سخت
- اندازه‌گیری قابل بازیافت محتویات $\frac{DNA}{RNA}$ وابسته به کیفیت شرایط آماده‌سازی و رنگ‌آمیزی نمونه

بدخیمی‌های لنفو - رتیکولار

سلول‌های لوسمی از فاز لوسمی لنفوما به طرز مشخصی متحدالشکل بوده و نیازی به پردازش ندارند، در نتیجه برای چنین آنالیزی ایده‌آل هستند. با این حال، آنالیز نمونه‌های مغز استخوان، بسته به میزان انتشار بافت سرطانی و اجزای باقیمانده مغز استخوان بسیار متنوع است. باید از مقادیر RNA و پروفایل هیستوگرام نمونه‌های آسپیره شدهٔ مغز استخوان طبیعی، برای راهنمایی در تفسیر اطلاعات جمع شده از این نوع نمونه‌ها، استفاده شود.

مقادیر DNA/RNA می‌توانند برای تشخیص و ارزیابی بیولوژیک میلومای چندگانه، لوسمی حاد و مزمن و لوسمی میلوئید مزمن به کار گرفته شوند. (۳۱-۱۵). نمونه‌هایی از رنگ‌آمیزی AO در بدخیمی‌های هماتولوژیک مختلف در تصاویر ۲۱ و ۲۲ نشان داده شده اند.

تومورهای جامد

آنالیزAO در نئوپلاسم‌های جامد، پیچیده‌تر است زیرا در این گونه تومورها عدم تقارن سلول توموری، شکست غشای سلولی و آلودگی با سلول‌های طبیعی میزبان وجود دارد. ارزیابی رنگ آمیزی نمونه‌های سیتوسپین با رایت- گیمسا در کیفیت نمونه‌ها و تفسیر این نتیجه‌ها، اهمیت حیاتی دارد. (یاداشت ۱۰ را ببینید.) اگر سلول‌های دست نخورده توموری به اندازهٔ کافی موجود باشند، تفسیر هیستوگرام می‌تواند با اطمینان آنالیز گردد. برای این منظور حداقل ۷۰ ٪ سلول‌های یک نمونه باید حاوی اجزای سرطانی بوده و از بین آنها، ۶۰ ٪ باید دست نخورده باشند. همچنین باید شاخص‌های RNA برای خط سلولی دیپلوئید در هیستوگرام‌های دیپلوئید DNA و خط سلولی آنپلوئید برای هیستوگرام‌های آنپلوئید گزارش شوند.

یاداشت ها:

۱- برای این که شما بتوانید در استفاده از این روش به موفقیت برسید، خالص بودن محلول AO

بسیار مهم است. همچنین بهتر است که AO از شرکت های معتبر تهیه شده باشد.

۲- برای رسیدن به بهترین رنگ آمیزی باید رقت های مختلفی از این محلول را تهیه کرد تا بتوان به مناسب ترین غلظت محلول کاری دست پیدا کرد.

۳- محلول A برای نفوذپذیری سلول‌ها و خارج کردن پروتئین‌های محلول در اسید استفاده می‌شود. مایع استخراج شده را در دمای ۴-۰ درجه سانتیگراد انکوبه می‌کنیم. محلول را بعد از خارج کردن از انکوباسیون، vortex می‌کنیم. Vortex با تلاطم شدید باعث می‌شود که سلول‌های حساس به محلول A، غشای سلولی خودشان را از دست بدهند.

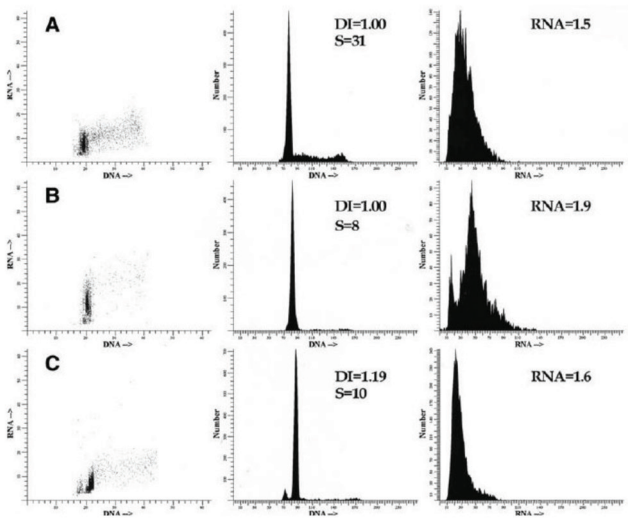
۴- بعد از استفاده از محلول AO ، به محلولی برای تمیز کردن فلوسایتومتر نیاز است. اگر از دستگاه برای مصارف دیگری هم استفاده می‌شود، تاکید بیشتری بر شستشو وجود دارد. شستشوی منظم با مایع سفید کننده می‌تواند میزان انتقال AO را کاهش دهد. اگر مشکل بعدی تمیز کردن هم چنان ادامه داشت، می توان بعد از هر پروتکل لوله‌ها را تعویض کرد.

۵- نمونه های دو تایی تیمار شده با و بدون RNase و DNase باید با AO رنگ آمیزی شوند. این کار با دو هدف انجام می‌شود: دست یابی به رنگ آمیزی اختصاصی و تعیین مقدار روی هم افتادگی طیف رنگی. بهتر است آماده سازی‌ها با DNase تیمار شده انجام شوند تا از اختصاصی بودن AO برای RNA اطمینان حاصل شود (فلورسانس با رنگ قرمز). در مقابل، آماده سازی با تیمار RNase باید به منظور جمع آوری فلورسنس DNA (سبز) انجام شود. همچنین نمونه ها باید به صورت متوالی و مستقل از هم جمع آوری شده و لنفوسیت ها، با و بدون RNase آماده سازی گردند. این داده ها در تعیین گسترهٔ روی هم افتادگی طیف رنگی و به جهت جبران اختلاف اهمیت دارند.

۶- بعد از تعیین روی هم افتادگی طیف رنگی برای فلوسایتومتری DNA و RNA، یک سری عملیات آماده‌سازی لنفوسیت‌ها انجام می‌شود تا گستره قابل قبولی از مقادیر RNA تعیین شود.

۷- غلظت سلول، به ویژه برای ترکیب‌های توموری و لنفوسیتی از اهمیت بالایی برخوردار است. برای طبقه‌بندی دقیق جمعیت‌های نزدیک به دیپلوئید، به دو دسته‌ی هایپوپلوئید (با شاخص DNA کمتر از ۱) یا هایپرپلوئید (با شاخص DNA بیشتر از ۱) نسبت‌های یکسانی از هر یک ضروری است.

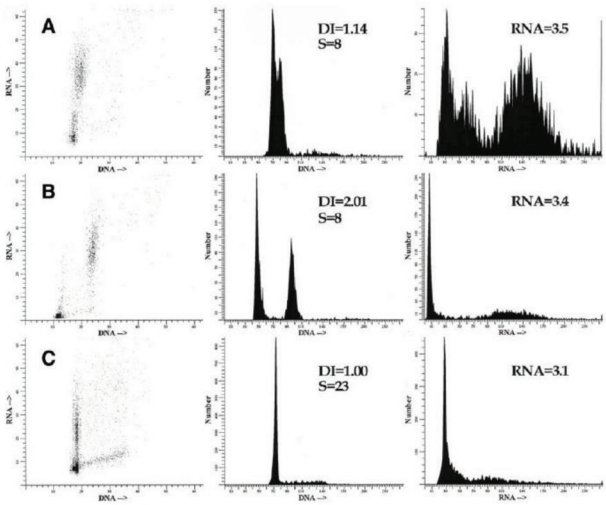
۸- تنوع تراکم کروماتین در سلول‌های توموری جامد و NPBLsها می‌تواند ناشی از طبقه‌بندی نادرست هیستوگرام باشد. سلول‌های توموری منشا گرفته از اپیتیلوم ممکن است اجازه رنگ بیشتری را به خود بگیرند، بنابراین فلورسانس آنها درخشان‌تر از NPBLs ها خواهد بود.



شکل ۲۱-(A-C) الگوهای لوسمی لنفوسیتی حاد تیپک، چپ DNA/RNA وسط: هیستوگرام DNA تک پارامتری راست: انتشار RNA یک پارامتری

(A) یک جزء تکثیری بالا و محتوی RNA پایین را نشان می دهد.

(B) محتوای RNA در حال افزایش با فعالیت تکثیری پایین تر را نشان می دهد.



شکل ۲۲- (A و B) دو مورد انتشار میلومای چندگانه با سطوح RNA ی بالا و اندیس های مختلف DNA (C) الگوی پیتیک AML با RNA بالا و تکثیر بالا (چپ: DNA/RNA، وسط: هیستوگرام DNA تک پارامتری، راست: انتشار RNA تک پارامتری)

۹- آلودگـــی با بافت‌ها، یا گلبول‌های قرمز خـــون در سمت چپ جمعیت دیپلوئیدی بر روی هیستوگرام‌ها دیده می‌شوند و ممکن است با برآورد پیک هایپودیپلوئیدی تداخل داشته و یا باعث مقادیر نادرست فاز F شوند؛ ولی استفاده از برنامه‌های تجاری موجود برای برطرف کـــردن دبرمان[1] ها و مدل‌های مجتمع، در حل این مشکلات موثر خواهد بود.

۱۰- نمونه‌های حاوی بیش از ۳۰٪ اجزای غیر نئوپلاستیک را باید حذف کرد. اگر لنفوسیت‌ها غالب هستند، بهتر است دریچهٔ سنجش نور را باز کرده و فلورسانس DNA/RNA را دوباره محاسبه کرد. اگر میزان هسته عریان بیش از ۴۰٪ باشد، نمونه ممکن است برای ارزیابی RNA نامناسب باشد. چنین نمونه‌هایی تنها برای آنالیز پلوئیدی DNA و چرخهٔ سلول به کار می‌روند.

1.Debries

فصل پنجم

پروتوکل های رایج در فلوسایتومتری

برای عبور سلول‌ها از مجاری باریک فلوسایتومتر و همچنین به منظور جلوگیری از انسداد لوله‌های آن، نمونه باید به شکل مخلوطی از سلول های منفرد معلق با غلظت $۱۰^{۷}$–$۱۰^{۵}$ سلول در میلی‌لیتر آماده شود. علاوه بر این، غلظت سلولی بر سرعت جریان دسته بندی سلول ها، که معمولا ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰ سلول در ثانیه است نیز تاثیر می‌گذارد. البته باید توجه داشت که انجام عملیات جداسازی و دسته‌بندی با سرعت‌های بالاتر، می‌تواند منجر به کاهش خلوص آماده‌سازی شود.

بافر سالین فسفات، یک بافر سوسپانسیون رایج بوده و معمولاً آسان ترین نمونه‌ها برای فلوسایتومتری عبارتند از سلول های به هم نچسبیدهٔ کشت سلولی میکروارگانسیم‌های آب، باکتری‌ها و مخمرها.

حتی آنالیز خون نیز در فلوسایتومتری کار ساده‌ای است. گلبولهای قرمز در یک مرحله همولیز از محلول جدا سازی و خارج می شوند؛ پس از آن شناسایی لنفوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها و مونوسیت‌ها با ویژگی‌های FSC, SSC شان بسیار آسان خواهد بود.

البته در برخی مواقع محققین نیاز دارند تا سلول‌های کشت شده در محیط جامد مانند سلول‌های کبدی و سلول‌های توموری را آنالیز کنند. در چنین مواردی به منظور تولید سلول‌های تک، مواد جامد بایستی زدوده شوند. این عمل را می‌توان به روش مکانیکی یا آنزیمی انجام داد.

استفاده از روش مکانیکی برای ساختارهایی مناسب است که اتصالات سلولی ضعیفی دارند. مانند سلول‌های متصل در کشت سلولی، سلول‌های مغز استخوان و بافت لنفاوی. در این روش، سوسپانسوین بافت جدا شده را باید چندین مرتبه از یک نیدل با اندازه کوچک عبور داد. و پس از آن در صورت لزوم، سونیکاسون و آسیاب کردن انجام می‌شود.

همچنین به منظور جدا کردن اتصالات پروتئین – پروتئین و ماتریکس خارج سلولی (که سلول‌ها را به یکدیگر متصل می‌کند)، از آنزیمهای خاصی استفاده می شود.

عملکرد این آنزیم ها بستگی به فاکتورهایی مانند PH، دما و کوفاکتورها دارد. لذا در انتخاب یک آنزیم باید دقت لازم صورت گیرد. به عنوان مثال پپسین بهترین فعالیت را در PH مابین ۲/۵ – ۱/۵ دارد، اما قرار گرفتن در محیط اسیدی برای مدت طولانی به سلول آسیب زده و می‌تواند موجب از بین رفتن آنتی ژن‌های سطحی سلول (که مد نظر ما هستند) شود.

جاذب‌های یونی مانند EGTA[1] وEDTA[2] می‌توانند کاتیون‌های دو ظرفیتی که مسئول نگهداری فعالیت سلولی و قوام آنها هستند را از محیط جمع کنند. اما حضور آنها ممکن است فعالیت برخی آنزیم‌های مشخص را مهار کند. به عنوان مثال کلاژناز برای فعالیت خود به Ca^{2+} نیاز دارد.

باید توجه داشت که تراکم زدایی مکانیکی و آنزیمی سلول‌ها اغلب تلاشی است که حاوی اشتباهاتی بوده و در عین حال این روش‌ها باعث می‌شوند که جدا سازی اپی توپ‌ها و سلول‌های مد نظر تحت شرایط تحقیقاتی به حد مطلوب خود برسد.

به هنگام مطالعهٔ ساختارهای درون سلولی مانند سیتوکین‌ها از طریق فلوسایتومتری، غشای سلولی (پلاسمایی) باید نفوذ پذیر شده تا به رنگیزه ها یا مولکول‌های آنتی بادی، در زمانی که سلول قوام سر تا سری خود را حفظ می‌کند اجازه ورود دهد. به این منظور غلظت‌های پایین (حدود ٪۰/۱) پاک‌کننده‌های غیر یونی مانند ساپونین معمولاً مناسب هستند.

روش آماده سازی نمونه

به طور خلاصه روش آماده سازی نمونه بستگی به مواد آغازی و همچنین ماهیت اپی توپ دارد. البته شرح مفصل تمام جزئیات مراحل آماده سازی در این مقال نمی‌گنجد، اما برخی از رایج ترین پروتوکل‌های استاندارد در این فصل مطرح خواهند شد.

دستور آماده سازی سلول ها

الف) سلول های ذخیره شده در نیتروژن مایع

۱– بافر PBS/BSA (بافر سالین فسفات PH ۷/۴ و ٪۱ BSA) را آماده‌سازی کنید.

۲– سلول ها را با دقت از نیتروژن مایع خارج کنید.

۳– سریعاً با استفاده از بافر PBS/BSA یخ سلول‌ها را ذوب کرده و در لوله‌های مخروطی ۰/۵ میلی‌لیتری سانتریفیوژ بریزید.

1. Ethyleneglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
2. Ethylenediaminetetraacetic acid

۴- محلول تهیه شده سلول‌ها را به مدت ۵ دقیقه با سرعت g ۴۰۰، سانتریفیوژ کنید.
۵- مایع رویی را دور بریزید و پلت سلولی بدست آمده را در حجم مناسبی از PBS/BSA حل کنید.

ب) رده سلولی کشت بافت در سوسپانسیون

۱- بافر PBS/BSA (بافر سالین فسفات PH ۷/۴ و ٪۱ BSA) را آماده سازی کنید.
۲) سلول ها را از فلاسک کشت سلول به داخل لوله های مخروطی ۱۵ میلی لیتری سانتریفیوژ وارد سازید.
۳- به مدت ۵ دقیقه در دور g ۴۰۰ سانتریفیوژ کنید.
۴- مایع رویی را دور ریخته و پلت را در بافر PBS/BSAحل کنید.
۵- به مدت ۵ دقیقه و با دور g ۴۰۰ سانتریفیوژ کنید.
۶- مایع رویی را دور ریخته و سلول ها را در میزان مناسبی از بافر PBS/BSA حل کنید.

ج) رده های سلولی متصل در کشت بافت:

۱- بافر PBS/BSA (بافر سالین فسفات PH ۷/۴ و ٪۱ BSA) را آماده سازی کنید.
۲- سلول‌های کشت شده را با حرکات آرام و با استفاده از ۲ میلی لیتر بافر PBS/BSA برداشت کنید.
۳- سلول‌ها را به لولۀ مخروطی ۱۵ میلی لیتر وارد ساخته و تا ۱۰ میلی لیتر بافر به آن اضافه کنید.
۴- با دور g ۴۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانترفیوژ کنید.
۵- مایع رویی را دور ریخته و پلت سلولی را در PBS/BSA تازه حل کنید.
۶- به مدت ۵ دقیقه با دور g ۴۰۰ سانتریفیوژ کنید.
۷- مایع رویی را دور ریخته و پلت را در میزان مناسب PBS/BSA حل کنید.

(د) آماده سازی سلول ها از بافت های جامد لنفاوی

۱- بافت را در یک پتری دیش استریل قرار داده و سلول ها را با استفاده از سرنگ و نیدل حاوی حدود ۵ میلی لیتر PBS/BSA ، با حرکات آرام رفت و برگشتی پیستون سرنگ از بافت جدا کنید.
۲- سوسپانسیون سلولی را از پتری دیش به یک لولۀ مخروطی سانتریفیوژ با حجم ۱۵ میلی لیتر انتقال دهید.
۳- به مدت ۵ دقیقه به دور g ۴۰۰ سانتر فیوژ کنید.
۴- مایع رویی را دور ریخته و پلت را در PBS/BSA حل کنید.

۵- ۱۰میلی لیتر از بافر لیز کنندهٔ آمونیوم کلراید را به آن اضافه کنید.

۶- آن را مخلوط کرده و به مدت ۲ دقیقه نگهداری کنید. (دقت کنید که زمان نگهداری از دو دقیقه بیشتر نشود)

۷- به مدت ۵ دقیقه در دور g ۴۰۰ سانتریفیوژ کند.

۸- ۱۰ میلی لیتر از PBS/BSA اضافه کرده و مخلوط کنید.

۹- دوباره در دور g ۴۰۰ و به مدت ۵ دقیقه سانتر فیوژ کنید.

۱۰- مایع رویی را دور ریخته، پلت را با حجم نهایی ۱۰ میلی لیتر PBS/BSA حل کنید.

۱۱- با استفاده از لام هموسیتومتر سلول ها را شمارش کنید.

۱۲- سوسپانسیون سلولی را در صورت لزوم طوری تنظیم کنید تا تعداد سلولها $(۰/۷ - ۱/۲) \times ۱۰^{۷}$ Cell/ml باشد.

رنگ آمیزی مستقیم ایمونوفلورسنس سلول‌ها و خون

این تکنیک در مواردی که فلوروکروم مستقیماً به آنتی بادی اولیه متصل است کاربرد دارد . مثل مشتقات FITC ، PE و Alexa four

توجه: روش مخصوص رنگ آمیزی سلول‌های خونی، در [ ] آمده است.

۱- سلول‌ها را با روش مخصوص خود آماده سازی کنید. (قسمت قبل را ببینید) سپس غلظت سلول‌ها را به حد 10^6 cell / ml برسانید. (از بافر PBS/BSA که حاوی یک درصد BSA و۷/۴ PBS هستند استفاده کنید)

[نمونه خون کامل را می توان به صورت رقیق نشده استفاده کرد. اما در مواردی مثل لوسمی ها که شمارش سلولها بالا باشد، استفاده از ضد انعقادهایی مثل EDTA و هپارین کاربرد خواهد داشت.]

۲- ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی [خون کامل] را در لوله آزمایش، بریزید.

۳- آنتی بادی را در رقت های توصیه شده اضافه کرده و به خوبی هم بزنید، و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.

۴-سلول ها را با ۲ میلی لیتر از PBS/BSA شسته و به مدت ۵ دقیقه در دورg۴۰۰ سانتریفیوژ کنید. سپس مایع رویی را دور بریزید.

[به خون کامل، بافر لیز کنندهٔ گلبول‌های قرمز، مثلا ۲ میلی‌لیتر AbD Serotec Erythrolyse اضافه کنید و به خوبی هم بزنید. مخلوط حاصل را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته و پس از آن به مدت ۵ دقیقه در دورg۴۰۰ سانتریفیوژ کنید. سپس مایع رویی را دور بریزید]

سلول‌ها را در ۵/۲ ml بافر PBS/BSA و یا در صورت نیاز در محلول PBS/BSA حاوی ۰/۲ میلی‌لیتر از پارا فرمالدئید ۰/۵٪ حل کنید.

اطلاعات مورد نیاز را از طریق فلوسایتومتری به‌دست آورید. توجه داشته باشید که استانداردهای مناسب را همیشه باید در نظر گرفت. به عنوان مثال یک نمونه کنترل جفت شده با ایزوتیپ.

رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس غیر مستقیم سلول ها و خون

این تکنیک زمانی کاربرد دارد که از آنتی بادی های پلی کلونال و مونوکلونال غیر کانژوگه یا کانژوگه با بیوتین استفاده می شود. معمولا در این موارد باید از یک عامل ثانویه به منظور مشخص کردن آنتی بادی اولیه استفاده شود. به عنوان مثال معرف Avidin در مورد Biotin.

توجه: روش های اختصاصی خون در داخل [ ] آمده است.

۱- سلول ها را به طور مناسب آماده سازی کنید و سوسپانسیون سلولی را با استفاده از بافر PBS/BSA به غلظت 1×10^6 cell / ml برسانید.

[خون کامل ممکن است نیازی به رقیق سازی نداشته باشد. اما در مواردی مانند لوسمی که شمارش سلول‌های خون بالا است، استفاده از مواد ضد انعقادی مثل EDTA و هپارین توصیه می شود.]

۲- ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی [خون کامل] را در لوله آزمایش بریزید.

۳- آنتی بادی اولیه را در زمان های سفارش شده اضافه کرده، به خوبی هم زده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگه دارید.

۴- ۲ ml از بافر PBS/BSA را اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه با دور ۴۰۰g سانتریفیوژ کنید. سپس مایع رویی را دور بریزید.

۵- معرف ثانویه را در غلظت سفارش شده اضافه کرده، به خوبی هم زده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.

۶- سلول ها را با ۲ ml از PBS/BSA شسته و به مدت ۵ دقیقه، با دور ۴۰۰g سانتریفیوژ کنید. سپس مایع رویی را دور بریزید.

[به سوسپانسیون خون، بافر لیز کنندهٔ تازه گلبول قرمز (مثلا ۲میلی لیتر از محلول Serotec's Erythrolyse) اضافه کنید و به خوبی هم بزنید. مخلوط حاصل را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. سپس به مدت ۵ دقیقه با دور ۴۰۰g سانتریفیوژ کرده و مایع رویی را دور بریزید].

۷- سلول ها را در ۰/۲ ml از PBS/BSA ، یا محلول PBS/BSA به همراه ۰/۵ ٪ پارافرمالدئید (در صورت نیاز) دوباره حل کنید.

۸- اطلاعات مورد نیاز را به وسیلهٔ فلوسایتومتری کسب کنید. همیشه باید استانداردهای مناسب مثل نمونه‌های کنترل جفت شده با ایزوتیپ را مد نظر قرار داد.

رنگ آمیزی زنجیره های لامبدا و کاپا در خون کامل

در این روش از معرف‌های دو رنگی و کانژوگهٔ مستقیم که زنجیره‌های سبک (لامبدا و کاپای ایمونوگلوبولین‌های انسانی را شناسایی می‌کنند) استفاده می‌شود.

شناسایی بیان ایمونوگلوبولین‌های اختصاصی سطح لنفوسیت‌های B، نیازمند روش‌هایی برای زدودن ایمونوگلوبولین‌های سرمی است، در غیر این صورت شاهد اختلالاتی در نتایج آزمایش خواهیم بود.

۱- خون را در لوله‌های حاوی مواد ضد انعقاد مانند EDTA، هپارین یا اسید سیترات دکستروز جمع‌آوری کنید.

۲- دو تا سه میلی لیتر از خون کامل را در یک لوله ۲۵ میلی لیتری بریزید. پس از آن ۲۰ تا ۲۵ میلی لیتر از PBS/BSA (با فرمولاسیون ذکر شده در روش‌های قبل) به آن اضافه کنید. سپس مخلوط حاصل را تا دمای ۳۷ ^{O}C گرم کرده، به خوبی هم زده، به مدت ۵ دقیقه در دور ۴۰۰g سانتریفیوژ کنید.

۳- حالا مایع رویی را با دقت بکشید. مواظب باشید که پلت سلولی را به هم نزنید. سپس پلت را در باقی ماندهٔ مایع رویی حل کنید.

۴- مراحل شستشوی ۱ ، ۲ و ۳ را دو باره تکرار کنید.

۵- ۱۰۰ میکرولیتر از خون شسته شده را در تعداد مورد نیاز از لوله های آزمایش بریزید. آنتی بادی را در غلظت‌های پیشنهادی به آنها اضافه کنید و به خوبی هم زده، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگه دارید.

۶- به آن‌ها بافر لیزکننده گلبول قرمز مثل ۲ میلی‌لیتر از محلول Serotec's Erythrolyse اضافه کنید و به خوبی هم بزنید. مخلوط حاصل را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگه دارید و پس از آن، در دور ۴۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید. سپس مایع رویی را دور بریزید.

۷- سلول ها را با ۲ میلی لیتر PBS/BSA شستشو دهید و به مدت ۵ دقیقه در دور ۴۰۰g سانتریفیوژ کنید. سپس مایع رویی را دور بریزید.

۸- سلول ها را در ۰/۲ میلی لیتر PBS/BSA به همراه ۰/۵ ٪ پارافرمالدئید در PBS (در صورت نیاز) محلول کنید.

۹- اطلاعات مورد نیاز را به وسیله دستگاه فلوسایتومتری به دست آورید. همیشه باید استانداردهای لازم مثل نمونه کنترل جفت شده با ایزوتیپ را مد نظر قرار داد.

آنالیز آنتی ژن‌ها (سیتوکین‌های درون سلولی خون کامل)

آنالیز آنتی ژن‌ها یک روش سریع و آسان جهت ارزیابی سیتوکین‌های درون سلولی به وسیلهٔ فلوسایتومتری است. این روش، ارزیابی نمونه‌های کوچک را امکان پذیر می‌سازد. و احتمال بروز نتایج ناخواسته (که در فرایند جداسازی سلول‌های خون محیطی با روش سانتریفیوژ بر اساس شیب چگالی رخ می‌دهند) را به حداقل می‌رساند. شرایط القایی که در این جا شرح داده شده برای IL-2، TNFα و IFN-γ مناسب است. و سایر سیتوکین‌ها به شرایط متفاوتی نیاز دارند.

این روش، نیازمند کیت‌های آزمایشگاهی است که به منظور فیکس و نفوذپذیر کردن سلول‌ها به کار می روند.

توجه : برای جمع آوری نمونه‌های خونی باید از لوله‌های حاوی هپارین استفاده شود. زیرا EDTA موجب بروز اختلالاتی در روند تحریک و انگیختگی سلول خواهد شد.

۱- دو لوله آزمایش انتخاب کرده و در هریک، نیم میلی لیتر خون بریزید. سپس به آنها نیم میلی‌لیتر از محیط کشت سلولی فاقد هر گونه افزودنی اضافه کنید.

۲- به یکی از لوله‌ها (گروه راکد)، تا حد غلظت 3mM ، مونسین اضافه کنید.

۳- به لوله دیگر (سلول‌های فعال)، PMA ، Ionomycin و مونسین اضافه کنید تا حداکثر غلظتشان به ترتیب به 10 ng / ml ، 2mM و 3mM برسد.

۴- مخلوط حاصل را به مدت ۲ تا ۴ ساعت در دمای ۳۷° C ، در شرایطی جوی با ۵ درصد CO_2 نگهداری کنید.

۵- پس از پایان انکوباسیون، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه را در تعداد مناسب از لوله‌ها بریزید.

۶- در این مرحله آنتی‌بادی‌های سطح سلولی را اضافه کرده (در صورتی که در آزمایشتان مورد نیاز است) و به مدت ۵ دقیقه انکوبه کنید.

۷- ۱۰۰ میکرولیتر از معرف LeucopermTM B (که موجب نفوذپذیری سلول‌ها می‌شود)، و به میزان کافی آنتی بادی‌های ضد سیتوکین را نیز اضافه کنید.

۸- مخلوط حاصل را به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه نمائید.

۹- نمونه را دو بار با بافر PBS شتسشو داده و سپس به وسیلهٔ فلوسایتومتری ارزیابی کنید.

رنگ آمیزی مستقیم آنتی ژن های درون سلولی

ارزیابی و بررسی آنتی ژن‌های درون سلولی قبل از رنگ آمیزی، نیاز به عملیاتی برای نفوذ پذیر کردن سلول دارد. روشی که در زیر توصیف می‌شود نتایج خوبی را به همراه خواهد داشت. البته روش‌ها و تکنیکهای دیگری نیز جهت نفوذ پذیر کردن سلول‌ها به کارمی روند که می‌توانند با نتایج موفقی همراه شوند.

مراحل انجام کار:

۱- سلول‌ها را جمع آوری کرده و تعداد کل آنها را مشخص نمائید.

۲- آنها را دو بار با بافر شستشو (PBS حاوی یک درصد BSA و ۰/۱٪ سدیم آزاید) بشوئید.

۳- در صورت نیاز، آنتی‌ژن‌های سطح سلول را با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال کانژوگه مناسب رنگ آمیزی کنید. پس از رنگ آمیزی سلول‌ها را یک مرتبه در PBS شسته و مایع رویی را دور بریزید.

۴- معرف LeucopermTM A (که یک محلول فیکس کننده سلول‌ها است) را به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ازای هر ۱۰۶سلول، به مخلوط حاصل اضافه کرده سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.

۵- سلول‌ها را یک بار با محلول شستشو بشوئید.

۶- سلول‌ها را در معرف LeucopermTM B (که یک محلول نفوذپذیری سلول هاست) طوری حل کنید که از ۵۰µl به ازای هر ۱۰۶ سلول استفاده شود.

۷- ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی را در تعداد دلخواه لوله حاوی آنتی بادی‌های کانژوگه ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمائید.

۸- یک مرتبه با محلول شستشو بشوئید و سپس در ۰/۲۵ میلی‌لیتر از PBS حاوی ۰/۵٪ پارافرمالدئید محلول کنید.

۹- تا زمان استفاده از فلوسایتومتر در دمای ۴°C نگهداری کنید (ترجیحاً به مدت ۲۴ ساعت).

رنگ آمیزی مستقیم آنتی ژن های درون سلولی: روش متانول

این روش خصوصاً به منظور بررسی و آنالیز برخی آنتی ژنهای هسته ای مانند Ki-۶۷ و PCNA کاربرد خوبی دارد.

توجه: انجام این روش به منظور تشخیص آنتی ژن های سطح سلول با استفاده از کانژوگه های Phycoerythrin با پاسخ مناسب همراه نخواهد بود.

۱- سلول ها را جمع آوری کرده و تعداد نهایی (تعداد کل) آنها را مشخص کنید.

۲- دو بار با بافر شستشو بشوئید. (PBS حاوی یک درصد BSA و ۰/۱٪ سدیم آزاید).

۳- در صورت نیاز در این مرحله آنتی‌ژن‌های سلولی را با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال کانژوگه رنگ آمیزی کنید. پس از رنگ آمیزی سلول‌ها را یک مرتبه با PBS شسته و مایع رویی را دور بریزید.

۴- سلول ها را در در دمای $2\text{-}8^{o}c$ در معرف $Leucoperm^{TM}$ (به میزان ۱۰۰ میکرولیتر آن به ازای هر ۱۰۶ سلول) حل کنید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمائید.

۵- ۵۰۰ میکرولیتر از متانول مطلق سرد را به آن اضافه کرده، به هم زده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای $2\text{-}8^{o}c$ نگهداری کنید.

۶- یک مرتبه آن را با بافر شستشو بشوئید.

۷- سلول ها را در معرف $Leucoperm^{TM}$ محلول کنید. به طوری که به ازای هر 10^{6} سلول از ۱۰۰ میکرولیتر معرف استفاده شود.

۸- ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی را در تعداد دلخواه لوله های آزمایش، که حاوی آنتی بادی های کانژوگه مستقیم است ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمائید.

۹- یک مرتبه با بافر شستشو شسته و در ۰/۲۵ میلی لیتر از PBS حاوی ۰/۵٪ پارافرمالدئید محلول کنید.

۱۰- تا زمان استفاده از فلوسایتومتر در دمای $4^{o}c$ نگهداری کنید (ترجیحاً به مدت ۲۴ ساعت).

آنالیز همزمان DNA و RNA با استفاده از فلوسایتومتری

برخی اصول کلی:

۱- همه محلول های ذخیره ای، به جز محلول کار AO را قبل از آماده سازی نمونه، تهیه کنید. AO باید در زمان رنگ آمیزی نمونه آماده شود.

۲- تمام ظروف شیشه ای که برای آماده سازی محلول ها استفاده می شوند، باید RNase free باشند.

۳- از لنفوسیت های خونی محیطی و آسپیره های مغز استخوان، بعد از سانتریفیوژ شیب-Ficol Hypaque نمونه برداری می شود. تومورهای جامد و بیوپسی های مغز استخوان را باید به دقت خرد و مخلوط کرده تا به صورت سلول های منفرد در آیند.

۴- مایعات و آسپیره هایی که به خوبی با سرنگ جمع آوری شده اند یا مستقیما در بافر حل شده و یا به دلیل وجود گلبول های قرمز خون، با استفاده از سانتریفیوژ گرادیان، نسبت به جداسازی گلبول های قرمز از محلول اقدام می شود.

۵- نمونه ها باید در نمک بافری فسفات (PBS) همراه با $MgCl_2$ شسته شوند و غلظت سلولی به 10^{6} سلول در میلی لیتر برسد. اگر قرار باشد از نشانه گذارهای غشای سطحی استفاده شود، مراحل PBS و $MgCl_2$ باید حذف شوند.

محلول های ذخیره ای

۱- محلول یک میلی گرم بر میلی‌لیتر AO:AO یک ماده موتاژن است. خواص شیمیایی، فیزیکی و توکیسکولوژیک این ماده، هنوز به طورکامل بررسی نشده است، لذا با احتیاط استفاده شود.

۵۰ میلی‌گرم از پودر AO را برداشته و در یک بشر شیشه‌ای تمیز بریزید. ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر بیفزایید. روی بشر را با فویل آلومینیومی بپوشانید و محلول را تا زمانی که کاملا حل شود، به هم بزنید. دقت کنید که نباید نور به آن برسد. محلول را با یک کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف کنید. سپس آن را در دمای ۴ درجه و دور از تابش نور (پوشیده شده در یک ورقهٔ آلومینیومی)، نگه دارید. این محلول تا ۱ سال ماندگاری خواهد داشت (یادداشت ۲ را ببینید).

۲- محلول مولار اسید سیتریک ۲٪ : ۱۹/۲۱ گرم اسید سیتریک را به ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر بیفزایید و تا زمانی که کاملا حل شود به هم بزنید . محلول حاصل را در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگه دارید. این محلول تا دو ماه ماندگاری خواهد داشت.

۳- محلول ۱۰ میلی مولار اتیلن دی آمین تترااستیک اسید (EDTA) : ۲/۱۷گرم EDTA را به ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه کنید. محلول را تا زمان حل شدن به هم بزنید و سپس در دمای ۴ درجه نگه دارید. این محلول تا دو ماه ماندگاری خواهد داشت.

۴- محلول PBS با ۲ میلی مولار MgCl۲ : محلولPBS ۱۰ X، فاقد نمک های کلسیم و منیزیم را تا غلظت X۱ رقیق کنید. ۴۰۸ میلی لیتر محلول ۹/۴ مولار MgCl۲ به هر لیتر PBS بیفزایید PH را به ۲/۷-۴/۷ برسانید. حجم های تولید شده می توانند تا ۳ ماه در دمای اتاق نگهداری شوند. (در موقع کار دما باید ۴ درجه باشد.)

۵- محلول یک مولار سدیم کلرید(Nacl) : ۲۹گرم نمک طعام را به ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر بیفزایید و به هم بزنید تا کاملا حل شود. سپس در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگه دارید. این محلول تا ۳ ماه ماندگاری خواهد داشت.

۶- محلول ۰/۴مولار سدیم فسفات دو بازی (Na۲HPO۴): ۲۸/۳۹ گرم از Na۲HPO۴ (Fisher) را به ۵۰۰میلی لیتر آب مقطر افزوده و تا حل شدن کامل به هم بزنید در ۲۲ درجه سانتیگراد (دمای اتاق) نگه دارید. این محلول تا یک ماه ماندگار است.

۷- محلول Triton 10 X: ۱۰ میلی لیتر از تریتون 10X را به ۹۰ میلی لیتر آب مقطر بیافزایید و در دمای ۴ درجه نگه دارید. این محلول تا ۳ ماه ماندگاری خواهد داشت.

محلول های کار:

محلول های کار از محلول های ذخیره ای که در بالا توضیح داده شده، تهیه می شوند.

۱- محلول A : یک میلی لیتر از Triton ۱۰X، ۸ میلی لیتر از محلول ۱ نرمال HCL، ۱۵ میلی‌متر از محلول ۱ مولار NaCL را به ۷۶ میلی متر آب مقطر بیافزایید. PH را بر ۱/۲ (به وسیله محلول ۱ نرمال HCL) تنظیم کنید و در ۴ درجه سانتیگراد نگه دارید. این محلول ۲ هفته ماندگاری دارد.

۲- محلول B: ۵۰ میلی لیتر از محلول ۱۰ میلی مولار EDTA، ۷۵ میلی متر محلول ۱۰ مولار Nacl، ۱۷۵/۵ میلی لیتر از محلول ۰/۴ مولار Na۲HPO، ۹۲/۵ میلی لیتر از محلول ۰/۲ مولار سیتریک اسید به ۱۲۰ میلی لیتر آب مقطر افزوده PH را روی ۶ تنظیم کنید. (با محلول ۱ نرمال NaOH یا HCL) در ۴ درجه سانتیگراد نگه دارید.این محلول یک ماه ماندگار است.

۳- محلول کار AO: ۰/۱ میلی متر از محلول AO ذخیره را با ۹/۹ میلی لیتر از محلول B مخلوط کنید. محلول را روزانه تهیه کنید و روی یخ نگه دارید. EDTA به AO در حال واکنش با RNA می چسبد تا نمونه های فشرده ایجاد کند.

روش کار:

رنگ آمیزی:

مراحلی که ذکر می شود باید در دمای ۴-۰ درجه سانتیگراد و در لوله های شیشه ای انجام شود:

۱- سوسپانسیون سلولی را به یک غلظت ۱۰۶ سلول بر میلی لیتر در PBS با محلول ۲ میلی مولار $MgCl_2$ برسانید. سلول ها می توانند در اتانول فیکس شده و یا با Triton 100X، نفوذ پذیر گردند.

۲- محلول A و AO کاری را روی یخ نگه دارید.

۳-۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی تازه تهیه شده را برداشته و در یک لوله شیشه ای ۷۵×۱۲ میلی متری، بریزید.

۴- ۰/۴ میلی لیتر از محلول A را افزوده. ۴۵ ثانیه در دمای ۴-۰ درجه سانتیگراد انکوبه کنید.

۵- ۱/۲میلی لیتر از محلول کاری AO را افزوده و فورا آنالیز کنید.

۶- مراحل ۵-۳ را برای هر نمونه تکرار کنید.

۷- فلوسیتومتر را با سفید کننده تمیز کرده و بادقت با آب مقطر شستشو دهید.

فصل ششم

رفع مشکلات و موانع احتمالی

اگر در روند آزمایش مشکلی پیش آمد و نتایج مد نظر کسب نشد لیست زیر را چک کرده تا به راه حل مشکل دست یابید.

عدم رنگ آمیزی:

۱- مطمئن شوید که همه آنتی بادی ها در شرایط سفارش شده بوسیله کارخانه سازنده آن نگهداری شده اند.

۲- مطمئن شوید که از تاریخ انقضاء آنتی بادی های خریداری شده نگذشته باشد.

۳- مطمئن شوید که آنتی بادی های اولیه و ثانویه مناسب به فرآیند واکنش اضافه شده باشند.

۴- مطمئن شوید که آنتی بادی به یک فلوروکروم کانژوگه شده باشد. اگر نه، مطمئن شوید که آنتی بادی ثانویه به همراه فلورکروم مناسب استفاده شده باشد.

۵- مطمئن شوید که آنتی بادی ثانویه فعال و کارا است . آیا با آنتی بادی های اولیه دیگر با موفقیت جواب داده است؟

۶- مطمئن شوید که از آنتی بادی ثانویه مناسب که آنتی بادی اولیه شما را تشخیص می دهد استفاده شده است یا خیر؟

۷- اگر فلوکروم شما Phycoerythrin یا Allophycoerythrin است مطمئن شوید که این ماده قبلاً یخ نزده باشد.

۸- آیا آنتی ژن هدف بر روی بافت یا سلول نمونه موجود است؟ مقالات گذشته را جهت بیان

آنتی‌ژن چک کنید و از یک کنترل مثبت شناخته شده در بیان آن آنتی ژن در کنار نمونه های آزمایش استفاده کنید.

۹- آیا آنتی بادی آنتی ژن را در نمونه‌های آزمایش شناسایی می‌کند؟ واکنش‌های متقاطع آنتی بادی با آنتی‌ژن‌های موجود در نمونه را چک کنید. همه آنتی‌بادی‌ها با گونه‌های موجود واکنش متقاطع نخواهند داد.

۱۰- مطمئن شوید که جهت انگیختن فلوروکروم از لیزر مناسب استفاده شده یا خیر و همچنین آیا کانال مناسب جهت آنالیز تابش ها استفاده شده است؟

آنتی‌بادی‌های کانژوگه با PE رنگ‌آمیزی موفقی ندارند در حالی که آنتی‌بادی‌های مشابه کانژوگه FITC نتایج مناسبی دارند:

۱- آنتی بادی‌های کانژوگه با PE ممکن است یخ زده باشند. ویال دیگری از آنتی بادی بخرید.

۲- ممکن است اشکال از پارافرمالدئید باشد (PFA). شکسته شدن PFA ممکن است تولید متانول کند. که بر روی رنگ‌آمیزی تاثیر می‌گذارد. محلول تازه‌ای از پارافرمالدئید (PFA) تهیه کنید. سلول‌ها را می‌توان خیلی سریع بدون فیکس کردن ارزیابی کرد.

رنگ آمیزی غیر اختصاصی

۱- رنگ آمیزی غیر اختصاصی ممکن است به دلیل فلورسانس خود بخودی باشد. راه حل این موضوع این است که میزان فلورسانس خودبخودی را با یک لوله که یک حاوی سلول هایی بدون آنتی بادی های کانژوگه است ارزیابی کنید.

۲- برخی رده‌های سلولی مشخص دارای گیرنده‌های CD۱۶ CD۳۲/FC با تمایل اتصال کمتری هستند که از طریق قسمت FC به آنتی‌بادی متصل می‌شود. برای سلول‌های موش، آنتی بادی را در محلولSeroblock رقیق کنید.

۳- رنگ آمیزی غیر اختصاصی ممکن است به دلیل واکنش‌های مربوط به آنتی بادی ثانویه باشد. آنتی بادی ثانویه‌ای را انتخاب کنید که با بافت هدف واکنش متقاطع ندهد.

۴- مطمئن شوند که در مراحل شستشو این عمل را به اندازه کافی انجام داده اید.

۵- آنتی بادی آزمایش را به دقت تیتر کنید. رنگ آمیزی غیر اختصاصی را می توان با کاهش غلظت آنتی بادی کم تر کرد.

رنگ آمیزی ضعیف:

۱- رنگ آمیزی ضعیف می تواند در اثر رقیق کردن بیش از حد آنتی بادی ها ایجاد شود. مطمئن شوید که آنتی‌بادی‌ها را در غلظت مناسب بکار برده اید و این کار را با تیتر کردن آنتی‌بادی قبل از استفاده انجام دهید.

۲- رنگ آمیزی ضعیف در سیستم های غیر مستقیم رنگ آمیزی سلول می تواند به دلیل اثر Prozoning باشد که در آن غلظت خیلی بالای آنتی بادی ها ممکن است نتایج ضعیفی به ما بدهد. لذا آنتی بادی ها را به دقت تیتر کنید.

۳- رنگ آمیزی ضعیف ممکن است به دلیل تعداد بیش از حد سلول‌ها باشد. تعداد و غلظت سلول ها را در حد توصیه شده فراهم کنید.

۴- رنگ آمیزی ضعیف سلول‌ها را می توان همچنین به دلیل بیان آنتی ژن‌ها باشد. میزان مورد انتظار آنتی ژن بیان شده و ثبت شده را بررسی کنید.

۵- اگر بیان آنتی ژن ضعیف باشد، آنتی بادی‌هایی را انتخاب کنید که با یک فلوروکروم درخشان‌تر کانژوگه شده باشند.

۶- استفاده از آنتی بادی‌هایی که با بیش از یک آنتی ژن خاص بافتی واکنش متقاطع می‌دهند، منجر به بروز رنگ آمیزی ضیعف می شود.

۷- مدت زمان و دمای انکوباسیون باید با آنتی بادی اولیه و ثانویه متناسب باشد.

پروفایل تابش پراکنده غیر معمول

۱- مطمئن شوید که سلول های استفاده شده در فلوسایتومتری تا حد ممکن تازه هستند. پروفیل تابشی ممکن است سلول های مرده یا دبرمان (دبریس یا بقایای سلولی) را نشان دهد.

۲- روش های فعال سازی ممکن است برخصوصیات تابشی سلول ها اثر گذار باشد.

۳- اگر شما از محلول لیز کننده استفاده می کنید. مطمئن شوید که این محلول تازه بوده و با دقت تهیه شده است.

رنگ آمیزی غیر منتظره (غیره دلخواه)

۱- برخی معرف‌ها ممکن است بر برخی آنتی‌ژن‌های خاص اثر بگذارد، بنابراین ممکن است نیاز به بازبینی پیش آید. به عنوان مثال EDTA بر روی برخی از مارکرهای پلاکت ها تاثیر گذار است.

۲- محلول‌های لیز کننده نیز ممکن است بر برخی آنتی‌ژن‌ها اثر گذار باشند. روشی را انتخاب کنید که با شناسایی و تشخیص آنتی ژن تداخل ایجاد نمی کند.

۳- برخی آنتی ژن‌ها بصورت درون سلولی بیان می شوند. در نتیجه باید از روش‌هایی برای افزایش نفوذ پذیری غشای سلولی استفاده شود. اطلاعات مربوط به سازندگان معرف‌ها را مطالعه کرده و معرف مناسب نفوذ پذیرکردن سلولی را انتخاب کنید.

منابع و ماخذ:

1. Andreeff M: Flow cytometry of leukemia, in Flow Cytometry and Sorting edn 2. New York,: Wiley-Liss; 1990.
2. Andreeff M, Darzynkiewicz Z, Sharpless TK, Clarkson BD, Melamed MR: **Discrimination of human leukemia subtypes by flow cytometric analysis of cellular DNA and RNA**. Blood 1980, 55:282-293.
3. Barlogie B, Maddox AM, Johnston DA, Raber MN, Drewinko B, Keating MJ, Freireich EJ: **Quantitative cytology in leukemia research.** Blood cells 1983, 9:35.
4. Barlogie B, McLaughlin P, Alexanian R: **Characterization of hematologic malignancies by flow cytometry**. Analytical and quantitative cytology and histology/the International Academy of Cytology [and] American Society of Cytology 1987, 9:147.
5. Brown M, Wittwer C: **Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology**. Clinical chemistry 2000, 46:1221-1229.
6. CC Stewart J, Nicholson: Immunophenotyping. New York: John Wiley & Sons; 2000.
7. Collste LG, Darzynkiewicz Z, Traganos F, Sharpless TK, Sogani P, Grabstald H, Whitmore Jr WF, Melamed MR: **Flow cytometry in bladder cancer detection and evaluation using acridine orange metachromatic nucleic acid staining of irrigation cytology specimens**. The Journal of urology 1980, 123:478.
8. Darzynkiewicz Z: **Differential staining of DNA and RNA in intact cells and isolated cell nuclei with acridine orange**. Methods Cell Biol 1990, 33:285-298.
9. Darzynkiewicz Z, Kapuscinski, J.: Acridine orange: a versatile probe of nucleic acids and other cell constituents, in Flow Cytrometry and Sorting edn 2. New York: Wiley-Liss; 1990.
10. Darzynkiewicz Z: **Simultaneous analysis of cellular RNA and DNA content**. Essential Cytometry Methods 2009:307.
11. Darzynkiewicz Z, Sharpless T, Staiano-Coico L, Melamed MR:

Subcompartments of the G1 phase of cell cycle detected by flow cytometry. Proceedings of the National Academy of Sciences 1980, 77:6696.

12. Darzynkiewicz Z, Traganos F, Melamed MR: **New cell cycle compartments identified by multiparameter flow cytometry.** Cytometry 1980, 1:98-108.
13. Frey T: **Nucleic acid dyes for detection of apoptosis in live cells.** Cytometry 1995, 21:265-274.
14. Gonzalez K, McVey S, Cunnick J, Udovichenko IP, Takemoto DJ: **Acridine orange differential staining of total DNA and RNA in normal and galactosemic lens epithelial cells in culture using flow cytometry.** Current eye research 1995, 14:269-273.
15. Grunwald D: **Flow cytometry and RNA studies**. Biology of the Cell 1993, 78:27-30.
16. Haugland. R: **Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals**. Molecular Probes 1996:51-17.
17. Hiddemann W, Schumann J, Andreef M, Barlogie B, Herman CJ, Leif RC, Mayall BH, Murphy RF, Sandberg AA: **Convention on nomenclature for DNA cytometry**. Cancer genetics and cytogenetics 1984, 13:181-183.
18. Johnson I, Spence MTZ: Molecular Probes Handbook, a Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies: Life Technologies; 2010.
19. **Kazemi H**, Rahgozar M, Speckmann E, Gorgi A: **Effect of cannabinoid receptor activation on spreading depression.** Iranian journal of basic medical sciences, 2012, 15: 926-936
20. **Kazemi H**, Gorji A: **Migraine in children and adolescents.** Iran J child neurology, 2010, 4: 1-6
21. Larson AM, Dougherty MJ, Nowowiejski DJ, Welch DF, Matar GM, Swaminathan B, Coyle MB: **Detection of Bartonella (Rochalimaea) quintana by routine acridine orange staining of broth blood cultures**. Journal of clinical microbiology 1994, 32:1492-1496.
22. Longobardi GA: **Flow cytometry: first principles**. Edited by: New York: Wiley-Liss; 2001.
23. Lopez-Roman A, Armengol JA: **A fast and easy fluorescent counterstaining**

method for neuroanatomical studies by using Acridine Orange. Journal of neuroscience methods 1995, 60:39-42.

24. Myc A, Traganos F, Lara J, Melamed MR, Darzynkiewicz Z: **DNA stainability in aneuploid breast tumors: Comparison of four DNA fluorochromes differing in binding properties**. Cytometry 1992, 13:389-394.
25. Ormerod MG, Royal Microscopical S: Flow cytometry: Wiley Online Library; 2000.
26. Preisler HD, Raza A, Gopal V, Banavali SD, Bokhari J, Lampkin B: **The Study of Acute Leukemia Cells by Means of Acridine Orange Staining and Flow Cytometry**. Leukemia & Lymphoma 1994, 13:61-73.
27. Shapiro HM, Leif RC: Practical flow cytometry, vol 736: Wiley Online Library; 2003.
28. Smithwick RW, Bigbie Jr MR, Ferguson RB, Karlix MA, Wallis CK: **Phenolic acridine orange fluorescent stain for mycobacteria**. Journal of clinical microbiology 1995, 33:2763-2764.
29. Traganos F, Darzynkiewicz Z: **Lysosomal proton pump activity: supravital cell staining with acridine orange differentiates leukocyte subpopulations**. Methods in Cell Biology 1994, 41:185-195.
30. Traganos F, Darzynkiewicz Z, Sharpless T, Melamed MR: **Simultaneous staining of ribonucleic and deoxyribonucleic acids in unfixed cells using acridine orange in a flow cytofluorometric system**. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 1977, 25:46.
31. Tyrer HW, Golden JF, Vansickel MH, Echols CK, Frost JK, West SS, Pressman NJ, Albright CD, Adams LA, Gill GW: **Automatic cell identification and enrichment in lung cancer. II. Acridine orange for cell sorting of sputum**. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 1979, 27:552.
32. Watson JV: Introduction to flow cytometry: Cambridge Univ Pr; 2004.
33. Barlogie B, Alexanian R, Gehan EA, Smallwood L, Smith T, Drewinko B: **Marrow cytometry and prognosis in myeloma**. Journal of Clinical Investigation 1983, 72:853.

34. Barlogie B, Alexanian R, Dixon D, Smith L, Smallwood L, Delasalle K: **Prognostic implications of tumor cell DNA and RNA content in multiple myeloma**. Blood 1985, 66:338-341.
35. Srigley J, Barlogie B, Butler JJ, Osborne B, Blick M, Johnston D, Kantarjian H, Reuben J, Batsakis J, Freireich EJ: **Heterogeneity of non-Hodgkin's lymphoma probed by nucleic acid cytometry**. Blood 1985, 65:1090-1096.
36. Andreeff M, Hansen H, Cirrincione C, Filippa D, Thaler H: **Prognostic Value of DNA/RNA Flow Cytometry of Bâ€گCell Nonâ€گHodgkin›s Lymphoma: Development of Laboratory Model and Correlation with Four Taxonomic Systemsa**. Annals of the New York Academy of Sciences 1986, 468:368-386.
37. El-Naggar AK, Batsakis JG, Teague K, Giacco G, Guinee VF, Swanson D: **Acridine orange flow cytometric analysis of renal cell carcinoma. Clinicopathologic implications of RNA content**. The American journal of pathology 1990, 137:275.
38. Enker WE, Kimmel M, Cibas ES, Cranor ML, Melamed MR: **DNA/RNA content and proliferative fractions of colorectal carcinomas: a five-year prospective study relating flow cytometry to survival**. Journal of the National Cancer Institute 1991, 83:701-707.
39. Rahman M: **Introduction to flow cytometry**. AbD Serotec 2006.

هدف اصلی از تالیف و نگارش این کتاب در دسترس قرار گرفتن اطلاعات فلوسایتومتری بصورت مفید و ساده برای دانشجویان و تکنسین هایی است که می خواهند با روش بسیار جذاب و پرکاربرد فلوسایتومتری آشنا گردند. این کتاب با در اختیار گذاشتن اطلاعات مفید و اصولی درباره فلوسایتومتری و کاربرد های آن مشکلات بسیاری از افراد علاقمند و مبتدی در این زمینه را مرتفع خواهد ساخت. همچنین برخی از پروتکل‌های پرکاربرد نیز به منظور استفاده در آزمایشگاه ها در این کتاب گنجانده شده است.