فلوسایتومتری

به زبان ساده و کاربردی

JPH.ir

تألیف:

دکتر فاطمه رضایی کهمینی

دکتری ایمنی‌شناسی پزشکی و مدرس دانشگاه

شهاب شاه گلدی

کارشناس ارشد ایمنی‌شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران

دکتر حمزه چوبین

دکتری ویروس‌شناسی پزشکی و مدیر دپارتمان مولکولی کمپانی پیشتاز طب زمان

مقدمه

فلوسایتومتری ابزاری قدرتمند برای بررسی فنوتایپ و خصوصیات سلولی است، همین امر آن را تبدیل به یک تکنیک بسیار کاربردی و حائز اهمیت در بیولوژی مولکولی کرده است. پیشرفت‌های اخیر در ایجاد دستگاه‌های پیشرفته فلوسایتومتری، تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، رنگ‌های فلوئورسانس، رایانه و نرم‌افزارهای جدید و قدرتمند، دریچه‌ی جدیدی جهت استفاده از تکنیک فلوسایتومتری و اهمیت آن در آزمایشگاه‌های بالینی و تحقیقاتی گشوده است. امروزه این تکنیک کاربرد وسیعی در تشخیص سرطان، بررسی سلول‌های خونی و ایمنی، پاتولوژی، بیولوژی سلولی و... دارد و استفاده از آن، چنان فراگیر شده است که محققان حوزه‌ی بیولوژی سلولی ناگزیر به دانستن اصول فلوسایتومتری و همچنین تفسیر نتایج مندرج از آن هستند. این کتاب شامل اطلاعات جامعی درباره‌ی اصول اولیه دستگاه فلوسایتومتری، تفسیر داده‌های فلوسایتومتری، آماده‌سازی نمونه، کنترل‌کیفی، طراحی پنل فلوسایتومتری، توضیح پروتوکل‌های رایج و همچنین معایب و مزایای این پروتوکل‌ها و... می‌باشد. لازم به ذکر است که تمامی مراحل فلوسایتومتری (آماده‌سازی نمونه، انتخاب فلوروکروم، میزان بیان آنتی‌ژن بر سطح و یا داخل سلول، کلون آنتی‌بادی، بافرهای مورد استفاده و...) بر روی صحت نتایج تأثیر گذاشته، لذا آگاهی از جزئیات روش انجام آزمایش منجر به صرفه‌جویی در زمان و هزینه شده و بدین طریق نیاز به تکرار آزمایش را کاهش می‌دهد. در این کتاب هر آنچه برای انجام یک فلوسایتومتری و تفسیر نتایج آن لازم است، به‌صورت طبقه‌بندی‌شده به زبان ساده و قابل درک توضیح داده شده است؛ بنابراین خواندن این کتاب به تمام دانشجویان و محققین حوزه‌ی بیولوژی سلولی توصیه می‌شود.

مؤلفین

تابستان ۹۸

JPH.ir

فهرست مطالب

فصل ۱ ● اصول و مبانی فلوسایتومتری ۱

خلاصه فصل ۱

۱-۱ تاریخچه فلوسایتومتری ۱

۱-۲ اساس دستگاه فلوسایتومتری با مروری بر دستگاه FACSCanto ۲

۱-۳ ساختمان داخلی دستگاه فلوسایتومتری ۳

۱-۳-۱ سیستم سیال ۴

۱-۳-۲ سیستم نوری ۶

۱-۳-۲-۱ انواع پراکنش نور فلوئورسانس پس از تحریک توسط منبع نوری ۷

۱-۳-۲-۲ فیلتر ۸

۱-۳-۲-۳ آشکارساز ۸

۱-۳-۳ بخش الکترونیک ۹

۱-۴ کاربرد فلوسایتومتری ۱۰

۱-۵ مزایا و معایب سیستم فلوسایتومتری ۱۰

۱-۵-۱ مزایا ۱۰

۱-۵-۲ معایب ۱۱

فصل ۲ ● فلوروکروم؛ اندازه‌گیری میزان فلورسنت؛ کنترل کیفی و طراحی پنل فلوسایتومتری ۱۳

خلاصه فصل ۱۳

۲-۱ فلوروکروم ۱۳

۲-۱-۱ اندازه‌گیری میزان فلوئورسانس ۱۷

۲-۱-۲ رایج‌ترین فلوروکروم‌های مورد استفاده در فلوسایتومتری ۱۷

۲-۲ طراحی پنل فلوسایتومتری ۱۹

۲-۳ کنترل کیفی در فلوسایتومتری ۲۶

۲-۳-۱ کنترل کیفی داخلی ۲۶

۲-۳-۱-۱ کنترل کیفی دستگاه ۲۶

۲-۳-۱-۲ کنترل کیفی آماده‌سازی نمونه ۲۶

JPH.ir

۴-۵ اندازه‌گیری جریان کلسیمی به میتوکندری با استفاده از Rhod-2 ..... ۷۴
۵-۵ روش‌های آزمایشگاهی بررسی جریان داخل‌سلولی یون کلسیم ۷۵
۵-۵-۱. روش ردیابی جریان کلسیم داخل‌سلولی با استفاده هم‌زمان از دو رنگ Indo-1 و Rhod-2 ..... ۷۵

فصل ۶ • بررسی آپوپتوز توسط تکنیک فلوسایتومتری ۷۷
خلاصه فصل ۷۷
۱-۶ کلیات آپوپتوز ۷۷
۲-۶ انواع آپوپتوز ۷۸
۱-۲-۶ مرگ فعال القایی (AICD) ۷۹
۲-۲-۶ مرگ غیرفعال (PCD) ۷۹
۳-۶ نکروز ۸۲
۴-۶ آپوپتوز و خصوصیات پراکنش نوری سلول‌ها (FSC و SSC) ۸۳
۵-۶ آپوپتوز و تغییرات نفوذپذیری غشاء ۸۳
۱-۵-۶ روش رنگ‌آمیزی 7-AAD جهت بررسی آپوپتوز ۸۴
۲-۵-۶ روش رنگ‌آمیزی هم‌زمان هوخست و PI جهت بررسی آپوپتوز ۸۴
۳-۵-۶ روش رنگ‌آمیزی YO-PRO-1 جهت بررسی آپوپتوز ۸۵
۶-۶ آپوپتوز و تغییرات DNA ۸۶
۱-۶-۶ روش رنگ‌آمیزی PI جهت بررسی آپوپتوز و محتویات DNA سلولی ۸۷
۲-۶-۶ روش انجام تست TUNEL جهت بررسی آپوپتوز ۸۸
۳-۶-۶ مشکلات و معایب بررسی محتویات DNA با روش فلوسایتومتری ۸۹
۴-۶-۶ مشکلات و معایب تست TUNEL ۹۰
۷-۶ آپوپتوز و تغییرات پروتئین‌ها و فسفولیپیدهای غشایی ۹۰
۱-۷-۶ روش رنگ‌آمیزی Annexin V جهت بررسی آپوپتوز ۹۰
۲-۷-۶ مشکلات و معایب بررسی فسفاتیدیل‌های غشایی با روش فلوسایتومتری ۹۱
۸-۶ آپوپتوز و تغییرات میتوکندریال ۹۲
۱-۸-۶ روش رنگ‌آمیزی با رنگ‌های JC-1 و DiOC۶ (رنگ‌های غیرقابل فیکساسیون) جهت بررسی آپوپتوز ۹۳
۲-۸-۶ روش رنگ‌آمیزی CMXRos (قابل فیکساسیون) جهت بررسی آپوپتوز ۹۴
۳-۸-۶ روش رنگ‌آمیزی TMRE جهت بررسی آپوپتوز ۹۴
۴-۸-۶ مشکلات و معایب بررسی m۵۴ به روش فلوسایتومتری ۹۴
۹-۶ آپوپتوز و کاسپازها ۹۵

۶-۹-۱ روش تعیین میزان فعالیت کاسپازها جهت بررسی آپوپتوز ۹۵
۶-۱۰ مزایای استفاده از تکنیک فلوسایتومتری در بررسی آپوپتوز ۹۶
۶-۱۱ معایب استفاده از تکنیک فلوسایتومتری در بررسی آپوپتوز ۹۷

فصل ۷ ● آنالیز داده‌های فلوسایتومتری با استفاده از نرم‌افزار FlowJo ۹۹
خلاصه فصل ۹۹
۷-۱ نمایش داده‌های فلوسیتومتری در نرم‌افزار FlowJo و Workspaces ۹۹
۷-۱-۱ بازکردن Workspaces جدید ۱۰۰
۷-۱-۲ اضافه‌کردن داده‌های فلوسایتومتری ۱۰۱
۷-۱-۳ نمایش و ویرایش آیتم‌های نمایش داده شده در Workspace ۱۰۳
۷-۲ نمایش داده‌های فلوسایتومتری به‌صورت نمودار گرافیکی ۱۰۴
۷-۲-۱ انواع مختلف نمودار گرافیکی ۱۰۵
۷-۲-۱-۱ نمودار هیستوگرام ۱۰۵
۷-۲-۱-۲ نمودار نقطه‌ای ۱۰۵
۷-۲-۱-۳ نمودار Pseudocolor ۱۰۶
۷-۲-۱-۴ نمودار چگالی ۱۰۷
۷-۲-۱-۵ نمودار نقشه‌ای ۱۰۸
۷-۲-۱-۶ نمودار Three-Dimensional (3D) Polychromatic ۱۰۸
۷-۳ تعیین محدوده یا Gating ۱۰۹
۷-۳-۱ انواع مختلف Gate کردن ۱۱۰
۷-۳-۲ حذف‌کردن Gate ۱۱۲
۷-۳-۳ ایجاد Gate چندضلعی ۱۱۲
۷-۳-۴ ایجاد Gate به‌صورت هیستوگرام ۱۱۳
۷-۴ ایجاد گروه و استفاده از مزایای آن ۱۱۵
۷-۵ اضافه‌کردن آنالیز آماری ۱۱۵
۷-۵-۱ کپی‌کردن Gate و آنالیز آماری بر سایر نمونه‌های موجود در Workspace ۱۱۶
۷-۵-۲ حذف‌کردن آنالیز آماری ۱۱۶
۷-۶ جداول و خروجی FlowJo ۱۱۷
۷-۶-۱ ایجاد یک جدول جدید ۱۱۷
۷-۷ بازآرایی گرافیکی ۱۱۹
فهرست منابع ۱۲۳
نمایه ۱۲۵

JPH.ir

۳-۶-۱ واکنش آنتی‌ژن ـ آنتی‌بادی ۵۲
۳-۶-۲ تیتراسیون آنتی‌بادی‌ها ۵۳
۳-۷ حساسیت تکنیک فلوسایتومتری در تشخیص و اندازه‌گیری آنتی‌ژن‌های سطحی ۵۴
۳-۸ انواع روش‌های رنگ‌آمیزی مورد استفاده در تکنیک فلوسایتومتری ۵۷
۳-۸-۱ روش رنگ‌آمیزی مستقیم ۵۹
۳-۸-۲ روش رنگ‌آمیزی غیرمستقیم ۶۰

فصل ۴ ● شناسایی سلول در یک جمعیت هتروژن و بررسی فنوتیپ و عملکرد آن توسط تکنیک فلوسایتومتری ۶۱

خلاصه فصل ۶۱
۴-۱ شناسایی یک رده سلولی در یک جمعیت هتروژن و ناهمگن ۶۱
۴-۲ شناسایی سلول‌های نادر در یک جمعیت هتروژن ۶۲
۴-۲-۱ برای جمعیت‌های سلولی با فراوانی پایین چه تعداد سلول باید توسط دستگاه قرائت گردد؟ ۶۳
۴-۲-۲ اجتناب از بقایای سلولی، سلول‌های قرمز و سلول‌های مرده ۶۴
۴-۳ رنگ‌آمیزی شاخص‌های سطحی سلول ۶۵
۴-۳-۱ روش رنگ‌آمیزی شاخص‌های سطحی ۶۵
۴-۴ رنگ‌آمیزی شاخص‌های درون‌سلولی ۶۶
۴-۴-۱ مسدودکننده‌های انتقال پروتئین ۶۷
۴-۴-۲ تحریک و فعال‌کردن سلول، کشت و زمان انکوباسیون ۶۸
۴-۴-۲-۱ پروتکل رایج برای تحریک اختصاصی سلول‌های T به‌منظور اندازه‌گیری سایتوکاین‌های داخل‌سلولی ۶۸
۴-۴-۳ روش رنگ‌آمیزی سایتوکاین داخل‌سلولی ۶۸
۴-۴-۳-۱ روش تهیه سوسپانسیون سلولی ۶۹
۴-۴-۳-۲ رنگ‌آمیزی شاخص‌های سطحی ۶۹
۴-۴-۳-۳ فیکس و نفوذپذیرکردن سلول ۷۰
۴-۴-۳-۴ رنگ‌آمیزی شاخص‌های درون‌سلولی ۷۰
۴-۴-۴ روش رنگ‌آمیزی هم‌زمان آنتی‌ژن‌های سطحی و درون‌سلولی ۷۰

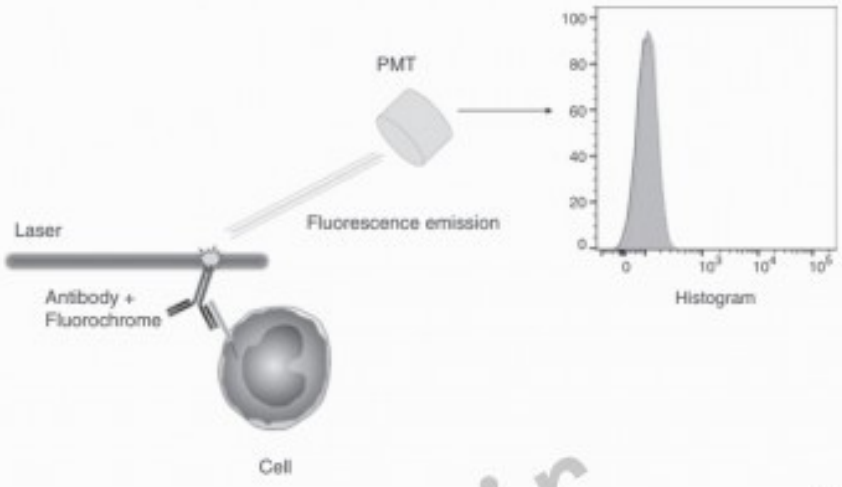
فصل ۵ ● اندازه‌گیری کلسیم سیتوپلاسمی، میتوکندری، اندوپلاسمی و آزاد توسط فلوسایتومتری ۷۱

خلاصه فصل ۷۱
۵-۱ رنگ‌های مورد استفاده برای اندازه‌گیری تغییرات کلسیم سلول ۷۱
۵-۲ تغییرات کلسیم داخل‌سلولی پس از فعال‌شدن رسپتور ۷۳
۵-۳ اندازه‌گیری جریان کلسیم سیستوپلاسمی با استفاده از Indo-1 ..... ۷۳

JPH.ir

۲-۴-۱-۳ کنترل کیفی جمع‌آوری داده‌ها ۲۷
۲-۴-۱-۴ کنترل کیفی آنالیز داده ۲۷
۲-۴-۲ کنترل کیفی خارجی ۲۷

فصل ۳ • آماده‌سازی سلول‌ها جهت انجام فلوسایتومتری ۲۹
خلاصه فصل ۲۹
۳-۱ آماده‌سازی سلول‌ها ۲۹
۳-۱-۱ روش تهیه بافر نمکی Hanks (HBSS) فاقد فنول رد ۳۲
۳-۱-۲ روش تهیه بافر استوک HEPES (غلظت ۱ مولار) ۳۲
۳-۲ تهیه سوسپانسیون سلولی از نمونه‌های خون و مغز استخوان ۳۲
۳-۲-۱ روش رنگ‌آمیزی خون تام ۳۴
۳-۲-۱-۱ روش رنگ‌آمیزی خون تام با LDS-751 ..... ۳۵
۳-۲-۲ تکنیک‌های جداسازی و تخلیص لکوسیت‌ها ۳۶
۳-۲-۲-۱ رسوب گرانشی با استفاده از دکستران ۳۷
۳-۲-۲-۲ روش رسوب‌گیری گرانشی با استفاده از دکستران ۳۷
۳-۲-۲-۳ سانتریفیوژ گرادیان غلظتی ۳۷
۳-۲-۲-۴ جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای توسط محیط فایکول ۳۹
۳-۲-۲-۵ جداسازی همزمان نوتروفیل‌ها و سلول‌های تک‌هسته‌ای توسط محیط فایکول ۴۰
۳-۲-۲-۶ انتخاب ایمونولوژیک سلول‌ها ۴۱
۳-۲-۲-۷ لیزکردن اریتروسیت‌ها ۴۲
۳-۲-۲-۸ لیز RBCها با استفاده از آب مقطر ۴۳
۳-۲-۲-۹ لیز RBCها با استفاده از آمونیوم کلرید ۴۳
۳-۲-۲-۱۰ نفوذپذیر ساختن و لیز RBCها با استفاده از ساپونین ۴۳
۳-۲-۳ بررسی خون تام لیزشده ۴۴
۳-۲-۳-۱ روش رنگ‌آمیزی خون تام لیزشده ۴۵
۳-۳ تهیه سوسپانسیون سلولی از بافت‌های جامد و کشت‌های سلولی ۴۶
۳-۳-۱ روش تهیه سوسپانسیون لنفوسیتی از بافت‌های لنفاوی ۴۷
۳-۳-۲ روش تهیه سوسپانسیون سلولی از بافت‌های غیر لنفاوی جامد ۴۷
۳-۳-۳ روش تهیه سوسپانسیون سلولی از سلول‌های کشت داده شده ۴۸
۳-۴ فیکساسیون یا تثبیت سلول‌ها ۴۸
۳-۵ نفوذپذیرسازی سلول‌ها و تشخیص اجزای داخل‌سلولی ۵۰
۳-۶ استفاده از آنتی‌بادی‌های نشان‌دار به‌منظور شناسایی مارکرهای سلولی ۵۱



شکل ۱-۱

نمای کلی دستگاه فلوسایتومتر. آنتی‌بادی کونژوگه به فلوروکروم به آنتی‌ژن اختصاصی بر سطح و یا درون سلول مورد نظر متصل می‌شود. سلول از مقابل منبع نوری دستگاه عبور کرده که منجر به تحریک فلوروکروم و نشر آن در طول موج خاصی می‌گردد. نشر فلوروکروم توسط ابزارهای موجود در دستگاه فلوسایتومتر ثبت گردیده و با استفاده از نرم افزار به صورت هیستوگرام یا سایر نمودارها نمایش داده می‌شود.

۳-۱ ساختمان داخلی دستگاه فلوسایتومتری

مجموعه‌ای از چندین علوم مختلف منجر به تشکیل سیستم فلوسایتومتری گردیده است که ازجمله آن‌ها می‌توان به علوم مکانیک سیالات، نورشناسی، بیولوژی، شیمی، بیوشیمی، الکترونیک، آمار و پردازش داده اشاره کرد.

دستگاه فلوسایتومتر از سه بخش اصلی تشکیل شده است که عبارتند از:

- **سیستم فلوئیدیک**[1] **(سیال)**: این بخش مسئول به وجود آوردن یک جریان خطی و یکنواخت برای عبور سلول‌ها از جلوی مسیر نور لیزر است.
- **سیستم نوری**[2] **(سیتومتر)**: این بخش شامل منابع لیزر، آیینه‌ها، فیلترهای نوری و آشکارسازها می‌باشد که سیگنال نوری را از منبع به سمت آشکارسازها هدایت می‌کنند.
- **سیستم الکترونیکی**[3]: این بخش شامل تبدیل‌کننده‌های سیگنال نوری به سیگنال الکتریکی است که پس از تقویت و دیجیتالی کردن، داده‌ها را پردازش کرده و به کامپیوتر ارسال می‌کنند (شکل ۱-۲).

1. Fluidics
2. Optics
3. Electronics

فصل

۱

اصول و مبانی فلوسایتومتری

JPH.ir

خلاصه فصل

فلوسایتومتری ابزاری قدرتمند برای بررسی فنوتایپ و خصوصیات سلولی است که بر پایه خصوصیات پراکنش نور فلورسنت توسط فلوروکروم کونژوگه به منوکلونال آنتی‌بادی اختصاصی علیه رسپتورهای سطحی و یا پروتئین‌های داخل سلولی پایه‌گذاری شده است. با استفاده از این روش می‌توان انواع متفاوتی از زیرجمعیت‌های مختلف سلولی را در یک جمعیت هتروژن شناسایی نمود. ابتدا این روش توسط ایمنولوژیست‌ها برای جداسازی انواع مختلف جمعیت سلولی از یکدیگر مورد استفاده قرار گرفت و امروزه در تمامی حوزه‌ها ازجمله حوزه‌های تحقیقاتی و تشخیص بیماری‌ها کاربرد گسترده‌ای دارد. در این فصل به زبان ساده تاریخچه فلوسایتومتری و اصول اولیه دستگاه مورد بحث و بررسی قرار می‌گیرد.

۱-۱ تاریخچه فلوسایتومتری

اولین دستگاه **فلوسایتومتر بر پایه ایمپدانس**[1] با استفاده از **اصول Coulter**[2] توسط Wallace H. Coulter در سال ۱۹۵۳ اختراع شد. Mack Fulwyle مخترع پیشرو در زمینه فلوسایتومتری به‌خصوص جداسازکننده‌های سلولی[3] است. تکنیک جداسازی سلول‌ها با استفاده از فلوسایتومتری در سال ۱۹۶۵ منتشر شد. در دسامبر سال ۱۹۶۸ Wolfgang Göhde در **دانشگاه موئنستر**[4] با استفاده از روش‌های جذب، تکنیک پالس سایتوفوتومتری را معرفی و اولین دستگاه

---

1. Impedance-based flow cytometry

۲. Wallace H. Coulter مهندس برق، مخترع و بازرگان امریکایی که دارای ۸۵ اختراع بوده و اصل مشهور خود یعنی ایجاد روش‌هایی برای شمارش و اندازه‌گیری ذرات میکروسکوپی بر پایه ذرات معلق شده در مایعات می‌باشد.

3. Cell sorting
4. University of Münster