



درآمدی بر فلو سایتومتری، اصول کلی و روش ها فشرده ای از فلو سایتومتری و برخی از روشهای پر کاربرد





میرماه

عنوان و نام پدیدآور	: درآمدی بر فلوسایتمتری، اصول کلی و روش‌ها؛ فشرده‌ای از فلوسایتمتری 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	: ۵۰۰۰ ریال : ۲-۰۲۵-۳۳۳-۶۰۰-۹۷۸
وضعیت فهرست نویسی	: فیبا
یادداشت	: تالیف شاهین محمدصادقی، عبدالرسول ملک‌پور، سعیده زاهدی، علی رستمی، هادی کاظمی.
یادداشت	: کتابنامه: ص. ۵۳.
عنوان دیگر	: فشرده‌ای از فلوسایتمتری و برخی از روش‌های پرکاربرد.
موضوع	: فلوسایتمتری
موضوع	: فلوسایتمتری — 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 ۵۸۵/۵/۸ د ۴ ۱۳۹۲
رده بندی دیویی	: ۶۱۶/۰۷۵۸۳
شماره کتابشناسی ملی	: ۳۲۷۳۶۷۶

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

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

ویراستار:

دکتر بابک یکتاپرست



میرماه

۱۳۹۲ خورشیدی



بیمارستان فوق تخصصی
خاتم الانبیاء (ص)

درآمدی بر فلوسایتومتری، اصول کلی و روش‌ها فشرده‌ای از فلوسایتومتری و برخی از روشهای پر کاربرد



مرکز
تحقیقات
علوم
اعصاب

تألیف: دکتر شاهین محمدصادقی، دکتر عبدالرسول ملک پور، سعیده زاهدی، علی رستمی، دکتر هادی کاظمی
ویراستار: دکتر بابک یکتاپرست
ناشر: میرماه (۲-۱-۲۲۷۲۹۰)
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: ۹۷۸-۶۰۰-۳۳۳-۰۲۵-۲

تمام حقوق اثر برای مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفاء محفوظ است.
خیابان ولیعصر^(ع) - خیابان رشید یاسمی - بیمارستان فوق تخصصی خاتم الانبیاء (ص)
تلفن: ۸۸۸۸۴۰۴۰

• مقدمه نگارندگان

در طی سال های دهه ۶۰ میلادی تلاش جمعی از دانشمندان فعال در عرصه سلول شناسی، منجر به ابداع روشی با عنوان فلوسایتومتری گردید که امکان شناسایی ذرات (سلول ها) و ارزیابی خصوصیات آن ها را امکان پذیر می ساخت. سرعت و دقت بالای این تکنیک، موجب شد تا خیلی زود جایگاه ویژه ای را در رشته های مختلفی چون آسیب شناسی، هماتولوژی، ایمنی شناسی، ژنتیک، بررسی های آزمایشگاهی برای پیوند اعضا، اقدامات تشخیص بیماری های عفونی و ... به خود اختصاص دهد.

همچنین با توجه به امکان بررسی وقایع چرخه 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 هدف ارائه یک دستورالعمل ساده و کاربردی، برای آشنایی با مفاهیم اولیه فلوسیتومتری 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 شیوه ای ساده و روان برای افراد مبتدی و علاقمند به این روش بیان گردد و در ادامه نیز به برخی پروتکل های رایج مورد استفاده، مشکلات احتمالی موجود و راه حل های آن ها اشاره شده. امید است بهره گیری از محتوای این کتاب و به کار بستن آن ها، بتواند زمینه ساز گام های موثری در عرصه پژوهش، تشخیص، کنترل و درمان بیماری ها باشد.

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

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

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

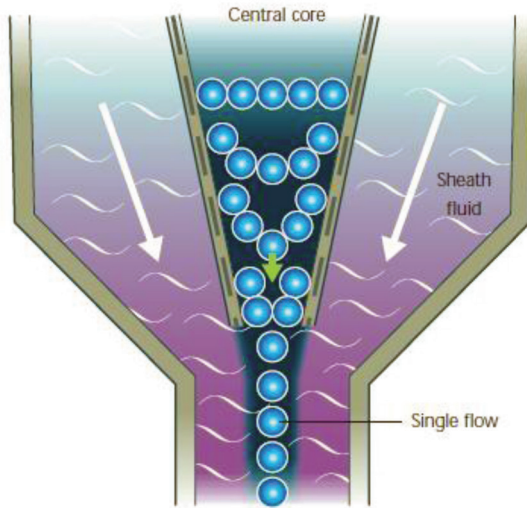
۵۳	منابع و مأخذ
----	---------------------

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 به وسیله 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 مرکز کانال و جریانی نزدیک به صفر را در نزدیکی 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 نمرة Reynold (Re)، از طریق فرمول زیر محاسبه نمود:

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

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 ویژگی های آن ذره (سلول) به ما می دهد. پرتوهای لیزری و لامپ Arc بیشترین منابع نوری هستند که در فلوسایتومتري مدرن استفاده می شوند.

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

نوری که در مسیر مستقیم تابیده می شود معمولاً حدود ۲۰ درجه از محور تابش لیزر منحرف می گردد. لذا این پرتوها به وسیله یک لنز مجتمع شده و دسته پرتو حاصل با عنوان کانال مستقیم تابش (FSC) نامیده می شود.

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

نوری که در زاویه ی ۹۰ درجه نسبت به خط برانگیختگی اندازه گیری می شود را تابش جانبی می نامند. کانال تابش جانبی (SSC) ^۱، اطلاعاتی در زمینه محتوای گرانولی یک ذره را به ما می دهد. شاخص های FSC و SSC برای هر ذره منحصر به فرد بوده و از مقایسه این دو شاخص، می توان به منظور تمایز انواع مختلف سلول در یک نمونه هتروژن استفاده کرد.

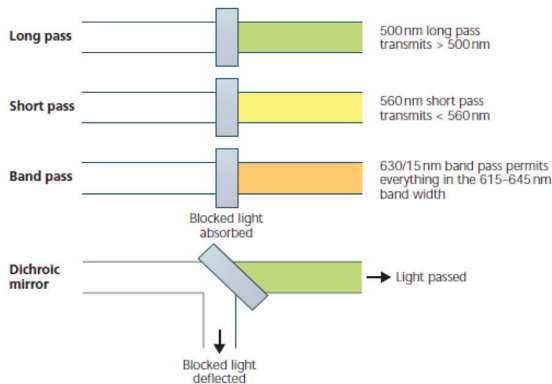
اندازه گیری های فلورسانس که در طول موج های مختلف انجام می شوند، می توانند اطلاعات کیفی و کمی را در مورد گیرنده های سطح سلول (که با فلوروکروم نشاندار شده اند) و همچنین مولکول های درون سلولی (مانند DNA و ستیوکین ها) در اختیار ما قرار دهند.

فلورسایتمترها برای تشخیص نوری که تابش شده، از کانال های فلورسانس مجزا استفاده می کنند. 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 می شوند. فوتومالتی پلایرها تجهیزاتی حساس تر بوده و به منظور سنجش های فلورسانس و پراکنده مورد استفاده قرار می گیرند.

ویژگی و اختصاصی بودن تشخیص به وسیله فیلترهای اپتیکی کنترل می شود. این فیلترها از عبور طول موج های خاصی جلوگیری کرده و طول موج های مورد نظر را عبور می دهند.

معمولاً فیلترها را بر حسب طول موجی که از خود عبور می دهند به سه دسته تقسیم می کنند. فیلترهای long pass به امواجی با طول موج های بالاتر از حد مورد نظر اجازه عبور می دهند در حالی که فیلترهای short pass به امواجی با طول موج های پایین تر اجازه عبور می دهند. دسته

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



شکل ۲- انواع متفاوت فیلترهای اپتیکی

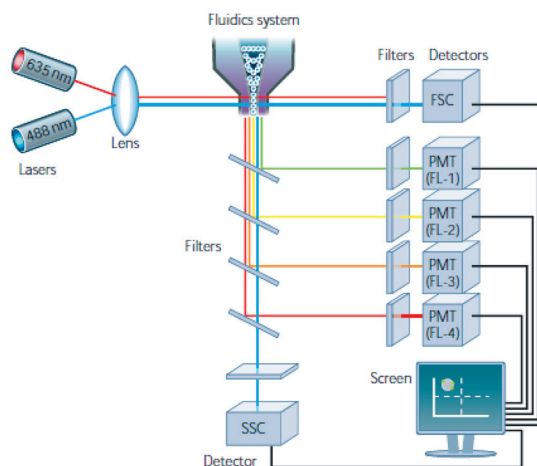
زمانی که فیلتر با زاویه ۴۵ درجه در مسیر پرتو نور ورودی قرار می گیرد، حالت دوگانه آینه و فیلتر را پیدا خواهد کرد. در چنین شرایطی فیلتر دو عمل انجام می دهد. اول اینکه امواج با طول موج مورد نظر را در جهت مستقیم از خود عبور می دهد و دوم اینکه امواج نور ناخواسته را با زاویه ۹۰ درجه نسبت به زاویه تابش اولیه منعکس و منحرف می کند. 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 می شود که ولتاژ آن با تعداد کل فوتون های نوری دریافت شده بوسیله فوتودتکتور تناسب دارد. این ولتاژ سپس به وسیله یک سری آمپلی فایرهای خطی یا لگاریتمی تقویت شده و از طریق مبدل های دیجیتال آنالوگ به جریان ها و سیگنال های الکتریکی در حدی که به صورت گرافیکی قابل رسم باشند (۱۰-۵ ولت)، تبدیل می شوند.

تقویت لگاریتمی معمولاً 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 به دست آمده از هر دکتور 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.



شکل ۳- شمای کلی یک دستگاه فلوسایتومتری

دسته بندی الکترواستاتیک سلول‌ها^۱

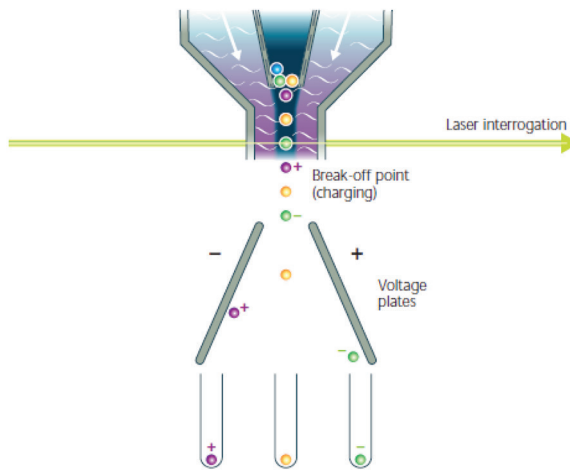
یکی از مهمترین کاربردهای فلوسایتومتری جداسازی سلول‌ها بر اساس زیرگروه‌ها یا بیان اپی توپ به منظور استفاده در مطالعات بیولوژیکی می‌باشد. این عمل فلوسایتمتر را جداسازی سلول یا آنالیز FACS^۲ می‌نامند.

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. Fluorescent 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. معمولاً 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)



شکل ۴- 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)، می تواند تعداد ۳۰ هزار تا ۱۰۰ هزار قطره را در ثانیه تولید کند، و این میزان برای جداسازی مناسب است. بالاتر رفتن شدت فوران می تواند موجب انسداد دهانه نازل شده و میزان خلوص آماده سازی نمونه را کاهش دهد.

فصل دوم

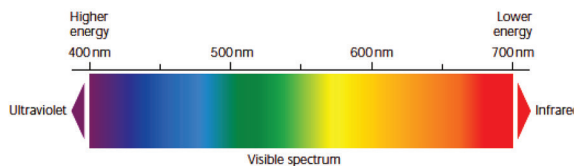
اصول فلورسانس

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 انگیزش^۱ و انتشار^۲ 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 می‌کند. طول موج پرتوها، رنگ نور را مشخص می‌سازد. 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 می‌گیرد. (شکل ۵)



شکل ۵- طیف الکترومغناطیسی

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 می‌توان آنها را بصورت گرما بر روی پوست احساس کرد و یا به وسیله فوتودتکتورها قابل سنجش هستند.

محدوده 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^۱

وقتی که نور بوسیله یک فلوروکروم جذب می‌شود، الکترون‌های آن برانگیخته شده و از یک حالت استراحت به لایه‌ای با سطح انرژی بالاتر حرکت می‌کنند. به این حالت، برانگیختگی الکترون^۲ گفته می‌شود. (شکل ۶)

باید توجه داشت میزان انرژی مورد نیاز برای ایجاد برانگیختگی، در هر فلوروکروم متفاوت خواهد بود. حالت برانگیختگی 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 لایه‌هایی با انرژی پایین‌تر و پایدارتر سقوط می‌کنند. به این حالت، استراحت الکترونی^۳ گفته می‌شود. زمانی که الکترون‌ها به مدار اولیه خود بر می‌گردند، باقی مانده انرژی تابشی به صورت فلورسانس آزاد می‌شود.

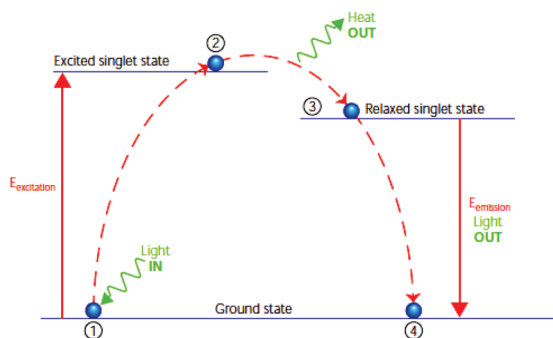
از آنجایی که انرژی برون فرست (Emission) فلوروکروم، دارای سطح انرژی پایین‌تری نسبت به انرژی برانگیختگی اولیه (Excitation) می‌باشد، رنگ نور متفاوتی نسبت به این سطح انرژی برانگیختگی از خود بروز خواهد داد.

از آنجایی که فلوروکروم در حالت Emission دارای انرژی پایین‌تری نسبت به حالت اولیه است رنگ نور متفاوتی نسبت به Excitation خواهد داشت. در واقع طول موج تابش هر فلوروکروم بلندتر از طول موج آن در حالت برانگیختگی است. تفاوت بین طول موج در حالت Emission و Excitation 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. Stokes shift

2. Excited electronic singlet state

3. Relaxed electronic singlet state

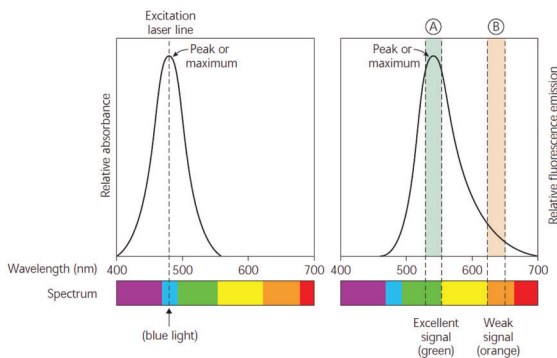


شکل ۶- تغییر استوکس

پس تمایز نور تولید شده به وسیله تابش، از نوری که به منظور انگیختگی استفاده می شود امری ضروری است. تشخیص این تفاوت در مواردی که مولکولهای فلورسانس دارای تغییرات استوکس بزرگتر باشند راحت تر خواهد بود. (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، پرتوهای نوری با طول موج بین ۴۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر را جذب می کند، اما در مورد پرتوهای با طول موج ۴۹۰ نانومتر بیشترین جذب را دارد. زمانی که تعداد فوتون های بیشتری جذب شوند فلورسانس قوی تری به دست خواهد آمد.

این شرایط بهینه را با عناوین بیشترین جذب و بیشترین طول موج‌های تابش می‌شناسند. بیشترین جذب معمولاً خط طیف مناسب برای انگیختگی را نیز نشان می‌دهد. در مورد FITC، بیشینه در طیف آبی قرار می‌گیرد. لیزر آبی رنگ آهن - آرگون معمولاً با این فلوروکروم استفاده می‌شود 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 محدوده ۴۷۵ تا ۷۰۰ نانومتر رخ می‌دهد و بیشینه آن در ۵۲۵ نانومتر است که همان طیف سبز می‌باشد. همان طور که در شکل ۷ 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 می‌شود؟

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، ویژگی‌های بیوشیمیایی و بیولوژیکی آن آنتی ژن و حامل آن (سلول) را می‌توان ارزیابی کرد.

پروپ‌های 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 فلوروکروم‌ها 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 می‌باشد.

رنگیزه‌های تک:

برخی از رنگیزه‌های تک، مانند FITC در طول ۳۰ سال اخیر کاربرد فراوان داشته‌اند، 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- رنگیزه‌های تک

رنگیزه‌های (توام) جفت:

در رنگیزه‌های توام، یک فلوروکروم کوچک بر پشت یک فلوروکروم بزرگتر سوار می‌شود. بدین ترتیب زمانی که رنگیزه اول انگیخته شده و به بالاترین حد انرژی خود می‌رسد، همه انرژی حاصل را به رنگیزه دوم که در مجاورت آن قرار دارد منتقل می‌کند. این عمل رنگیزه 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 رنگیژه جفت، برای پرتوهای لیزری با طول موج ۴۸۸ نانومتر تولید شده و استفاده از آن در اغلب فلوسایتومتری ها رایج است. رنگیژه های جفت به منظور مطالعات فلورسانس چند رنگی، به ویژه در ترکیب با تک رنگیژه ها بسیار مفید و کارا هستند. به عنوان مثال PE-Cy۷, percp, phycoerythrin, Alexa four,--cYy۵,۵۴۸ 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 وسیله دکتور 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 کار بردن فلوروکروم ها 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 پروسه ای تحت عنوان همبستگی فلورسانس در آنالیز داده ها به کار گرفته می شود، که درصد تداخل یک فلوروکروم در کانالی که به سنجش آن اختصاص نیافته است را محاسبه می کند. شکل ۸ به درک بهتر این مطلب کمک می کند. نمودارها، پروفایل تابشی دو فلوروکروم A و B که به وسیله کانالهای FL-1 و FL-2 سنجیده می شوند را نشان می دهند.

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

بر B همپوشانی دارد (سایه قرمز) و قسمتی از تابش های فلوروکروم B به کانال FL-1 (سایه آبی تیره) می رسد.

در مواردی که هر دو فلوروکروم به طور همزمان به کار گرفته شوند، به منظور محاسبه میزان نیاز به جبران فلورسانس در مجموعه داده ها، 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

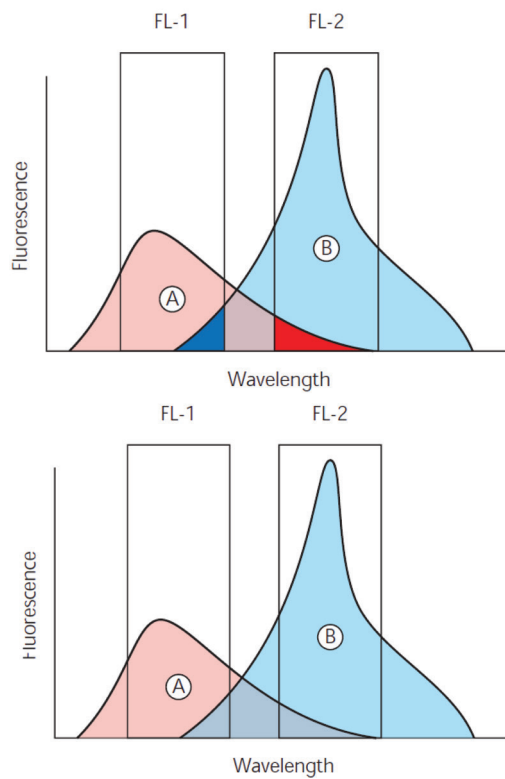
در این مثال، که دو فلوروکروم به منظور آزمایش دو رنگی مورد استفاده قرار گرفته اند، سنجش صحیح فلورسانس برای فلوروکروم A در کانال ۱، از طریق فرمول زیر محاسبه می شود.

$$A = (5\% \text{ از کل فلورسانس B}) - (\text{میزان کل فلورسانس سنجیده شده در FL1})$$

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

$$B = (17\% \text{ فلورسانس کل فلوروکروم A}) - (\text{میزان کل فلورسانس در FL2})$$

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.

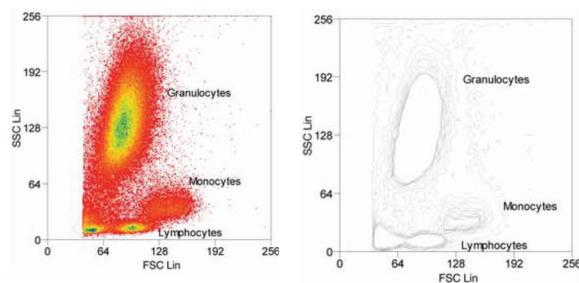


شکل ۸- همبستگی فلورسانس، A در کانال FL-1 و B در کانال FL-2 سنجیده می شود.

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. در گذشته 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 مرده دارای 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.



شکل ۹- آنالیز خون کامل لیز شده با استفاده از SSC/FSC

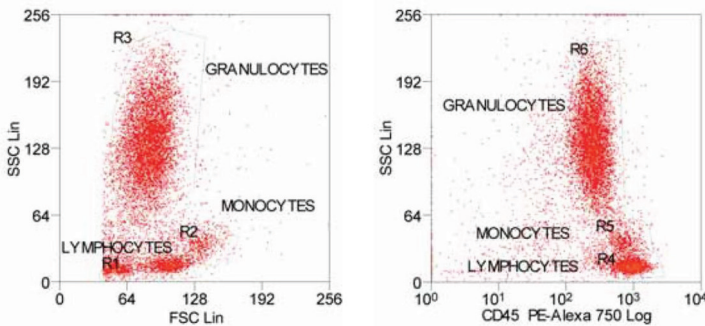
تفاوت ویژگی‌های فیزیکی گرانولوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها، افتراق این سلول‌ها را از یکدیگر و همچنین از آلاینده‌های سلولی امکان پذیر می‌سازد.

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

در روش‌های 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 می‌دهد.

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

ناحیه، به یک محدوده روی نقشه گفته می‌شود که اطلاعات فلوسایتومتری را بیان می‌کند.



شکل ۱۰- 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 محور Y ها، بیانگر SSC و محور X ها بیانگر میزان فلورسانس CD54 است.

CD54 مارکری است که بر روی همه گلبول‌های 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 می‌دهد، که در آنها یک پارامتر تابشی پراکنده را با یک پارامتر فلورسانس ترکیب می‌کنند.

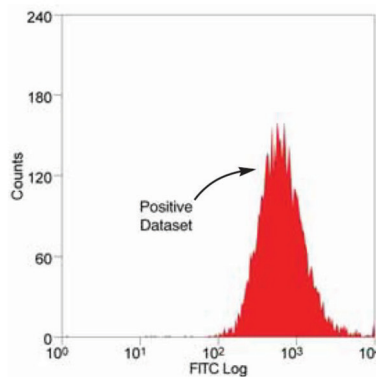
هیستوگرام‌های تک پارامتری

هیستوگرام‌های 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 مجموعه داده تلقی می‌شوند.

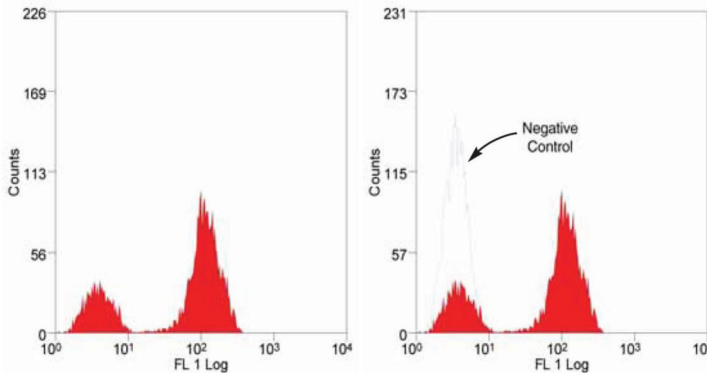
در حالت ایده آل، فلوسایتومتری به ما یک Peak واضح می‌دهد که می‌توان آن را به عنوان داده مثبت در نظر گرفت.

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/F۴ که با FITC کانژوگه شده است استفاده شده تا به وسیله آن ماکروفاژهای صفایی را رنگ آمیزی کند. این نمودار دو پیک را نشان می دهد. در سمت راست با استفاده از ایزوتوپ کنترل مناسب (IgG2b) موش صحرایی 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 دستگاه های فلوسایتومتری را پشتیبانی می کنند، اندازه گیری درصد رنگ آمیزی مثبت سلول ها را در هیستوگرام آسان می سازند. به عنوان مثال هیستوگرام F4/80 در شکل ۱۳، نشان دهنده آمارهای R2 و R3 می باشد که در این نوع نمودار به عنوان نواحی وسیله ای شناخته می شوند. (تجزیه آماری)

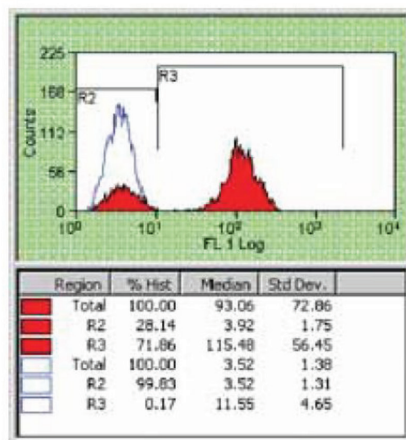
در شکل ۱۳، میزان ۹۹/۸۳٪ از نمونه های سلولی به عنوان کنترل منفی در ناحیه R2 هیستوگرام قرار دارند (ناحیه آبی). ۲۸/۴٪ سلول ها (سایه قرمز) نیز برای پروب F4/80 رنگ آمیزی منفی (R2) داشته و در مقایسه با آن ۷۱/۸۶٪ سلول ها در جمع داده های مثبت قرار دارند (R3). آمار بیشتر در مورد پیک ها (انحراف معیار و میانی) بصورت اتوماتیکی در اینجا فراهم است اما اینها در هر نرم افزار متفاوت خواهد بود.

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

هیستوگرام های دو بعدی (۲ پارامتری)

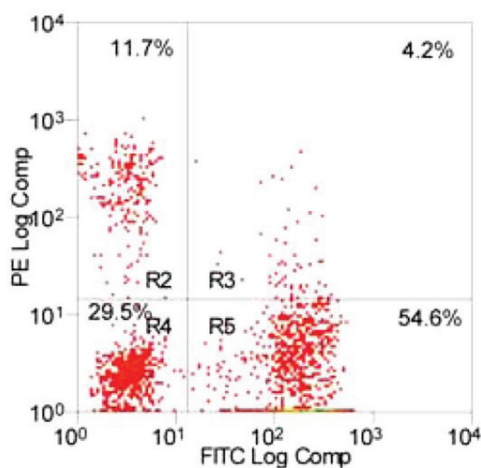
هیستوگرام های دو بعدی، نمودارهایی هستند که دو پارامتر سنجشی را نشان می دهند. در این نوع نمودار محور X ها نشانگر یکی از پارامترها و محور Y ها نشانگر پارامتر دیگر بوده و میزان و تعداد سلول ها، بر اساس تراکم نقاط در نواحی مخصوص به خود بر روی نمودار مشخص خواهند بود. این پارامترها می توانند SSC، FSC یا فلورسانس باشند. در شکل های ۹ و ۱۰، چند نمونه از

هیستوگرام دو پارامتری نشان داده شده اند.



شکل ۱۳- آنالیز آماری

هیستوگرام فلورسانس دو رنگی که در شکل ۱۴ دیده می شود مثال دیگری در این زمینه است. لنفوسیت ها با آنتی بادی علیه آنتی ژن $CD3$ که با FITC کانژوگه شده است رنگ آمیزی شده، نتایج آن بر روی محور X نشان داده می شود. بر روی محور Y که اطلاعات آن بوسیله کانال PE مشخص می شود، آنتی بادی علیه آنتی ژن HLA-DR مسئول شناسایی سلول های حامل این آنتی ژن می باشد. ($CD3$ و HLA-DR) مارکریایی برای شناسایی سلول های T و B هستند.

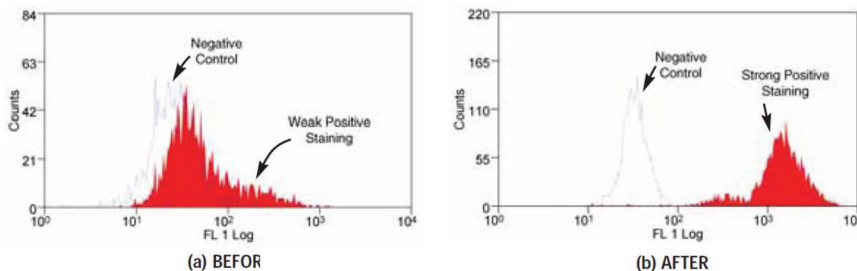


شکل ۱۴- هیستوگرام دو پارامتری - فلورسانس دو رنگی

در شکل ۱۴، ناحیه R2 دارای سلول های B است که با استفاده از PE نشاندار شده اند و مثبت بودن وجود آنها در طول محور PE مشخص است. ناحیه R مربوط به سلول های 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 کرده اند. و از آنجایی که با هر دو مارکر آنتی بادی رنگ آمیزی می شوند، در ناحیه خاص خود (R3) قرار می گیرند. ناحیه R4 مربوط به سلول هایی است که نسبت به هر دو رنگ PE و FITC منفی بوده اند. امروزه روش های نوین فلوسایتومتری، ارزیابی همزمان ۱۷ مارکر فلورسانس بر روی نمونه ها را به صورت همزمان امکان پذیر ساخته اند. لذا با انجام دادن تنها یک آزمایش و با استفاده از هیستوگرام های دو پارامتری می توان داده های فراوانی را در آنالیز نمونه به دست آورد.

آنتی ژن های درون سلولی

رنگ آمیزی آنتی ژن های درون سلولی امری دشوار است. زیرا پروپ های تولید شده بر پایه آنتی بادی نمی توانند به راحتی و با میزان مناسب از مرز غشای سلولی به داخل سلول نفوذ یابند. به منظور تسهیل شرایط، سلول ها 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 ویژگی های ساختاری سلول رخ دهد، امکان دستیابی پروپ ها به ساختارهای درون سلولی فراهم خواهد شد. امروزه بسیاری از کیت های تجاری موجود در بازار مانند Leucoperm™، معرف هایی را جهت انجام این مراحل بسیار سخت فراهم ساخته اند. (شکل ۱۵).



شکل ۱۵- کیت Leucoperm™ 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 داده های مثبت به دست آمده اند.

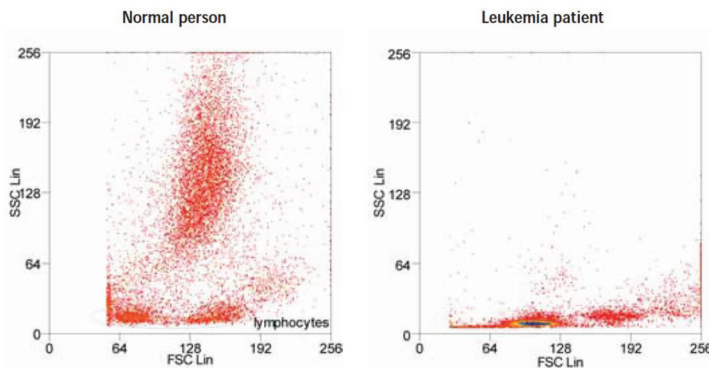
تعیین ایمونولوژیکی فنوتیپ

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 ایمونولوژیکی 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.



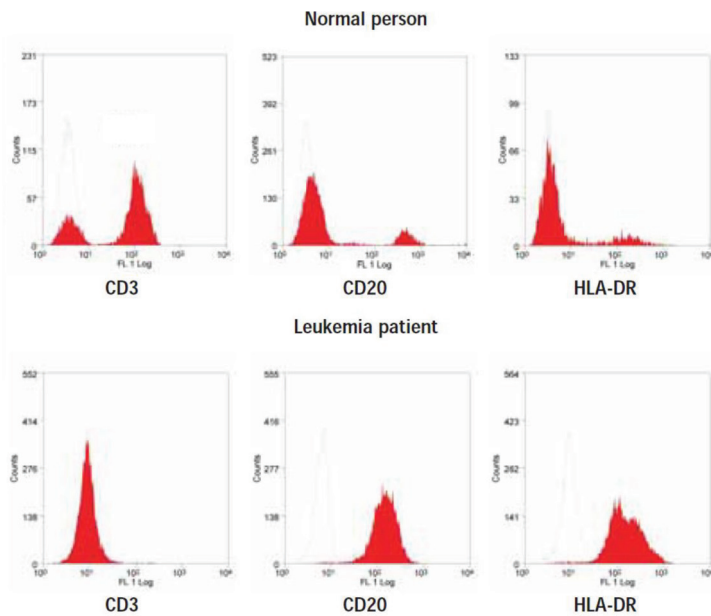
شکل ۱۶- تعیین ایمونولوژیکی فنوتیپ

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 فرد سالم، 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 رده سلولی B رنج می برد. البته دسته بندی دقیق نوع بیماری ممکن است نیاز به آنتی بادی مارکرهای بیشتری داشته باشد.



شکل ۱۷- 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 می‌دهد. این کار را می‌توان با استفاده از فلوروکروم‌های متاکروماتیک که به طور الکتروستاتیک به RNA تک رشته‌ای متصل شده و به روش جاگیری بین لایه‌ها با DNA هیبرید می‌شوند، انجام داد. از آن‌جا 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 هماتولوژیک شامل میلوماهای چندگانه استفاده کرد.

همان‌طور که گفته شد آنالیز همزمان DNA و RNA می‌تواند با استفاده از فلوروکروم متاکروماتیک اکریدین نارنجی^۱ (AO) که یکی از مشهورترین اعضای خانواده فلورسنت تتراکریدین است صورت گیرد. AO یک فلوروکروم منحصر به فرد و همه‌کاره است که می‌تواند در تشخیص انواع گسترده‌ای 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^{۱۱}. 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 (مثلاً Triton X-100). با این روش می‌توان به منظور دسترسی بهتر AO به DNA، هیستون‌ها را از کروموزوم‌ها 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

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

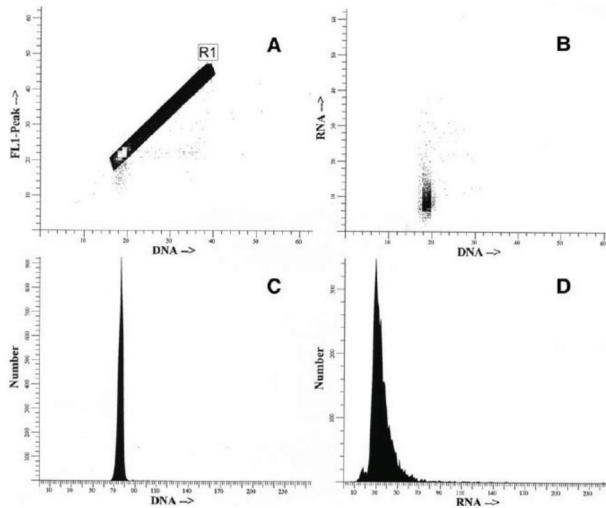
آنالیز:

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)

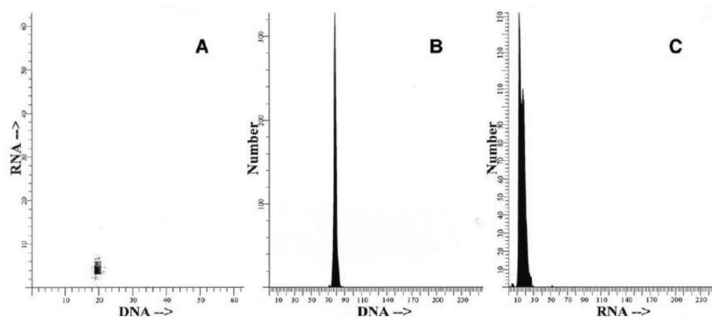
استاندارد محتوی RNA

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 کمی اندازه‌گیری کرد. لنفوسیت‌های تازه جمع‌آوری شده، رایج‌ترین و پایدارترین کنترل برای چنین منظوری هستند.

استانداردهایی که به وسیله RNase تیمار شده یا تیمار نشده‌اند، باید استفاده شده و همزمان اندازه‌گیری شوند. RNA و DNA موجود در سلول‌های مورد آزمایش را باید تحت شرایط مشابه با آنچه که در مورد نمونه‌های کنترل انجام می‌شود، 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 نرمال خون محیطی به عنوان یک کنترل بیولوژیک برای تشخیص کیفیت رنگ‌آمیزی AO و پایداری دوگانه $G1/G0$ متوسط کانال‌ها استفاده می‌شوند. (شکل ۱۹)



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

از لنفوسیت‌هایی که بعد از جداسازی درجه بندی شده فیکول - هاپیک و شمارش سلولی به دست آمده‌اند، و در میزان ۱۰۶ سلول در میلی لیتر آماده سازی شده‌اند، 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، خصوصاً در تومورهای 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)

شکل ۲۰- 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 سلول‌های دیپلوئید $G1/G0$ در (D) توجه کنید.

تفسیر هیستوگرام:

شاخص‌های 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 $G1/G0$ و محل‌های $M/S+G2$ قرار گیرد. شاخص‌های DNA با تقسیم ارزش کانالی متوسط (x-axis) برای پیک آنپلوئیدی، ارزش متوسط کانالی برای پیک دیپلوئید داخلی $G1/G0$ محاسبه می‌گردد.

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

شاخص‌های RNA توسط تقسیم متوسط فلورسانس $G1/G0$ و RNAی نمونه آزمایشی بر متوسط فلورسانس $G1/G0$ RNAی NPBL محاسبه می‌شوند.

اصول آنالیز محتوی RNA:

اندازه‌گیری 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 می‌گردد.

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 $G1/G0$ اتفاق می‌افتد همراه است. RNA سلولی می‌تواند در هیستوگرام DNA به منظور تشخیص تعداد سلول‌های در حال گذراندن مراحل سیکل مورد استفاده قرار گیرد.)

کاربرد های رایج آنالیز DNA به RNA

- ارزیابی تمایز سلولی فنوتیپ های سلولی
- تعیین فاز سیکل سلولی
- ارزیابی بیولوژیک بدخیمی های هماتولوژیک و تومورهای سخت
- اندازه گیری قابل بازیافت محتویات $\frac{DNA}{RNA}$ وابسته به کیفیت شرایط آماده سازی و رنگ آمیزی نمونه

بدخیمی های لنفو- رتیکولار

سلول های لوسمی از فاز لوسمی لنفوما به طرز مشخصی متحدالشکل بوده و نیازی به پردازش ندارند، در نتیجه برای چنین آنالیزی ایده آل هستند. با این حال، آنالیز نمونه های مغز استخوان، بسته به میزان انتشار بافت سرطانی و اجزای باقیمانده مغز استخوان بسیار متنوع است. باید از مقادیر RNA و پروفایل هیستوگرام نمونه های آسیب رده مغز استخوان طبیعی، برای راهنمایی در تفسیر اطلاعات جمع شده از این نوع نمونه ها، استفاده شود.

مقادیر DNA/RNA می توانند برای تشخیص و ارزیابی بیولوژیک میلوهای چندگانه، لوسمی حاد و مزمن و لوسمی میلوئید مزمن به کار گرفته شوند. (۳۱-۱۵). نمونه هایی از رنگ آمیزی AO در بدخیمی های هماتولوژیک مختلف در تصاویر ۲۱ و ۲۲ نشان داده شده اند.

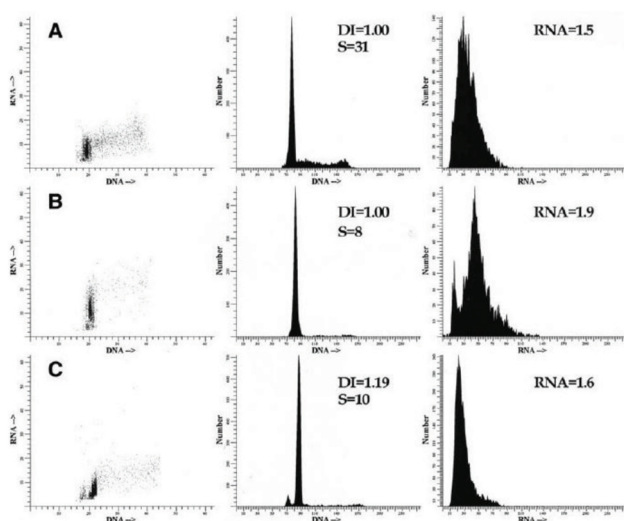
تومورهای جامد

آنالیز AO در نئوپلاسم های جامد، پیچیده تر است زیرا در این گونه تومورها عدم تقارن سلول توموری، شکست غشای سلولی و آلودگی با سلول های طبیعی میزبان وجود دارد. ارزیابی رنگ آمیزی نمونه های سیتوسپین با رایت- گیمسا در کیفیت نمونه ها و تفسیر این نتیجه ها، اهمیت حیاتی دارد. (یادداشت ۱۰ را ببینید). اگر سلول های دست نخورده توموری به اندازه کافی موجود باشند، تفسیر هیستوگرام می تواند با اطمینان آنالیز گردد. برای این منظور حداقل ۷۰٪ سلول های یک نمونه باید حاوی اجزای سرطانی بوده و از بین آنها، ۶۰٪ باید دست نخورده باشند. همچنین باید شاخص های RNA برای خط سلولی دیپلوئید در هیستوگرام های دیپلوئید DNA و خط سلولی آپلوئید برای هیستوگرام های آپلوئید گزارش شوند.

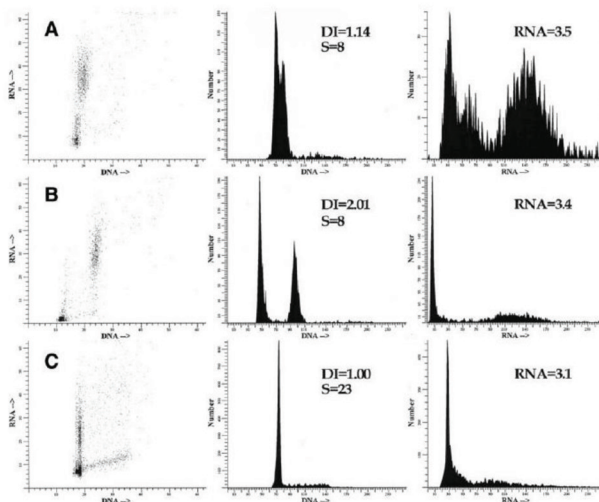
یادداشت ها:

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 سلول ها و خارج کردن پروتئین های محلول در اسید استفاده می شود. مایع استخراج شده را در دمای ۴-۰ درجه سانتیگراد انکوبه می کنیم. محلول را بعد از خارج کردن از انکوباسیون، vortex می کنیم. Vortex با تلاطم شدید باعث می شود که سلول های 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 می شود، تاکید بیشتری بر شستشو وجود دارد. شستشوی منظم با مایع سفید کننده می تواند میزان انتقال AO را کاهش دهد. اگر مشکل بعدی تمیز کردن هم چنان ادامه داشت، می توان بعد از هر پروتکل لوله ها 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 می شود: دست یابی به رنگ آمیزی اختصاصی و تعیین مقدار روی هم افتادگی طیف رنگی. بهتر است آماده سازی ها 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 فلورسانس DNA (سبز) انجام شود. همچنین نمونه ها باید به صورت متوالی و مستقل از هم جمع آوری شده و نفوسیت ها، با و بدون RNase آماده سازی گردند. این داده ها در تعیین گستره 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 آماده سازی نفوسیت ها انجام می شود تا گستره قابل قبولی از مقادیر RNA تعیین شود.
- ۷- غلظت سلول، به ویژه برای ترکیب های توموری و نفوسیتی از اهمیت بالایی برخوردار است. برای طبقه بندی دقیق جمعیت های نزدیک به دیپلوئید، به دو دسته های هایپوپلوئید (با شاخص DNA کمتر از ۱) یا هایپرپلوئید (با شاخص DNA بیشتر از ۱) نسبت های یکسانی از هر یک ضروری است.
- ۸- تنوع تراکم کروماتین در سلول های توموری جامد و NPBLs می تواند ناشی از طبقه بندی نادرست هیستوگرام باشد. سلول های توموری منشا گرفته از اپیتلیوم ممکن است اجازه رنگ بیشتری را به خود بگیرند، بنابراین فلورسانس آنها درخشان تر 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- آلودگی با بافت‌ها، یا گلبول‌های قرمز خون در سمت چپ جمعیت دیپلوئیدی بر روی هیستوگرام‌ها دیده می‌شوند و ممکن است با برآورد پیک هاپیودیپلوئیدی تداخل داشته و یا باعث مقادیر نادرست فاز F شوند؛ ولی استفاده از برنامه‌های تجاری موجود برای برطرف کردن دبرمان‌ها 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 هسته‌عریان 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.

• فصل پنجم

پروتوکل های رایج در فلوسایتومتری

برای عبور سلول ها از مجاری باریک فلوسایتومتر و همچنین به منظور جلوگیری از انسداد لوله های آن، نمونه باید به شکل مخلوطی از سلول های منفرد معلق با غلظت 10^5 – 10^7 سلول در میلی لیتر آماده شود. علاوه بر این، غلظت سلولی بر سرعت جریان دسته بندی سلول ها، که معمولاً ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰ سلول در ثانیه است نیز تاثیر می گذارد. البته باید توجه داشت که انجام عملیات جداسازی و دسته بندی با سرعت های بالاتر، می تواند منجر به کاهش خلوص آماده سازی شود.

بافر سالین فسفات، یک بافر سوسپانسیون رایج بوده و معمولاً آسان ترین نمونه ها برای فلوسایتومتری عبارتند از سلول های به هم نچسبیده کشت سلولی میکروارگانسیم های آب، باکتری ها و مخمرها. حتی آنالیز خون نیز در فلوسایتومتری کار ساده ای است. گلبول های قرمز در یک مرحله همولیز از محلول جدا سازی و خارج می شوند؛ پس از آن شناسایی لنفوسیت ها، گرانولوسیت ها و مونوسیت ها با ویژگی های SSC, FSC شان بسیار آسان خواهد بود.

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

استفاده از روش مکانیکی برای ساختارهایی مناسب است که اتصالات سلولی ضعیفی دارند. مانند سلول های متصل در کشت سلولی، سلول های مغز استخوان و بافت لنفاوی. در این روش، سوسپانسیون 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 می شود.

همچنین به منظور جدا کردن اتصالات پروتئین - پروتئین و ماتریکس خارج سلولی (که سلول ها را به یکدیگر متصل می کند)، از آنزیمهای خاصی استفاده می شود.

عملکرد این آنزیم ها بستگی به فاکتورهای 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 ۲/۵ - ۱/۵ دارد، اما قرار گرفتن در محیط اسیدی برای مدت طولانی به سلول آسیب زده و می تواند موجب از بین رفتن آنتی ژن های سطحی سلول (که مد نظر ما هستند) شود.

جاذب های یونی مانند EGTA^۱ و EDTA^۲ می توانند کاتیون های دو ظرفیتی که مسئول نگهداری فعالیت سلولی و قوام آنها هستند را از محیط جمع کنند. اما حضور آنها ممکن است فعالیت برخی آنزیم های 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 سلول ها اغلب تلاشی است که حاوی اشتباهاتی بوده و در عین حال این روش ها باعث می شوند که جدا سازی اپی توپ ها و سلول های مد نظر تحت شرایط تحقیقاتی به حد مطلوب خود برسد.

به هنگام مطالعه ساختارهای درون سلولی مانند سیتوکین ها از طریق فلوسایتومتري، غشای سلولی (پلاسمایی) باید نفوذ پذیر شده تا به رنگیزه ها یا مولکول های آنتی بادی، در زمانی که سلول قوام سر تا سری خود را حفظ می کند اجازه ورود دهد. به این منظور غلظت های پایین (حدود ۰/۱٪) پاک کننده های 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 نمی گنجد، اما برخی از رایج ترین پروتوکول های 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 ۷/۴ PH و ۱٪ BSA) را آماده سازی کنید.

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

۳- سریعاً با استفاده از بافر PBS/BSA یخ سلول ها را ذوب کرده و در لوله های مخروطی ۰/۵ میلی لیتری سانتی فیوژ بریزید.

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

2. Ethylenediaminetetraacetic acid

- ۴- محلول تهیه شده سلول ها را به مدت ۵ دقیقه با سرعت $g\ 400$ ، 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 $PH\ 7/4$ و $BSA\ 1\%$) 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 $g\ 400$ سانتریفیوژ کنید.
- ۴- مایع رویی را دور ریخته و پلت را در بافر PBS/BSA حل کنید.
- ۵- به مدت ۵ دقیقه و با دور $g\ 400$ 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 $PH\ 7/4$ و $BSA\ 1\%$) را آماده سازی کنید.
- ۲- سلول های کشت شده را با حرکات آرام و با استفاده از ۲ میلی لیتر بافر PBS/BSA برداشت کنید.
- ۳- سلول ها را به لوله مخروطی ۱۵ میلی لیتر وارد ساخته و تا ۱۰ میلی لیتر بافر به آن اضافه کنید.
- ۴- با دور $g\ 400$ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید.
- ۵- مایع رویی را دور ریخته و پلت سلولی را در PBS/BSA تازه حل کنید.
- ۶- به مدت ۵ دقیقه با دور $g\ 400$ 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 لوله مخروطی سانتریفیوژ با حجم ۱۵ میلی لیتر انتقال دهید.
- ۳- به مدت ۵ دقیقه به دور $g\ 400$ سانتر فیوژ کنید.
- ۴- مایع رویی را دور ریخته و پلت را در PBS/BSA حل کنید.

- ۵- ۱۰ میلی لیتر از بافر لیز کننده 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 $g \ 400$ سانتریفیوژ کند.
- ۸- ۱۰ میلی لیتر از PBS/BSA اضافه کرده و مخلوط کنید.
- ۹- دوباره در دور $g \ 400$ 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 10^6 Cell/ml $(0.7 - 1.2) \times 10^6$ باشد.

رنگ آمیزی مستقیم ایمونوفلورسنس سلول ها 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 سلول های خونی، در [] آمده است.

- ۱- سلول ها را با روش مخصوص خود آماده سازی کنید. (قسمت قبل را ببینید) سپس غلظت سلول ها را به حد 10^6 cell / ml برسانید. (از بافر PBS/BSA که حاوی یک درصد BSA و $7/4$ 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 دور $g \ 400$ سانتریفیوژ کنید. سپس مایع رویی را دور بریزید.

[به خون کامل، بافر لیز کننده گلبول های قرمز، مثلاً ۲ میلی لیتر 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 دور $g \ 400$ سانتریفیوژ کنید. سپس مایع رویی را دور بریزید]

سلول ها را در ۵/۲ ml بافر PBS/BSA و یا در صورت نیاز در محلول PBS/BSA حاوی ۰/۲ میلی لیتر از پارافرمالدئید ۰/۵٪ حل کنید.

اطلاعات مورد نیاز را از طریق فلوسایتومتری به دست 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. معمولاً 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 $1 \times 10^6 \text{ cell / ml}$ برسانید.

[خون کامل ممکن است نیازی به رقیق سازی نداشته باشد. اما در مواردی مانند لوسمی که شمارش سلول های 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 کننده تازه گلبول قرمز (مثلاً ۲ میلی 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 وسیله فلوسایتومتری کسب کنید. همیشه باید استانداردهای مناسب مثل نمونه های کنترل جفت شده با ایزوتیپ را مد نظر قرار داد.

رنگ آمیزی زنجیره های لامبدا و کاپا در خون کامل

در این روش از معرف های دو رنگی و کانژوگه مستقیم که زنجیره های سبک (لامبدا و کاپای ایمونوگلوبولین های انسانی را شناسایی می کنند) استفاده می شود. شناسایی بیان ایمونوگلوبولین های اختصاصی سطح لنفوسیت های B، نیازمند روش هایی برای زدودن ایمونوگلوبولین های سرمی است، در غیر این صورت شاهد اختلالاتی در نتایج آزمایش خواهیم بود.

۱- خون را در لوله های حاوی مواد ضد انعقاد مانند EDTA، هپارین یا اسید سیترات دکستروز جمع آوری 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 روش های قبل) به آن اضافه کنید. سپس مخلوط حاصل را تا دمای 37°C گرم کرده، به خوبی هم زده، به مدت ۵ دقیقه در دور 400g سانتریفیوژ کنید.

۳- حالا مایع رویی را با دقت بکشید. مواظب باشید که پلت سلولی را به هم نزنید. سپس پلت را در باقی مانده 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 غلظت های پیشنهادی به آنها اضافه کنید و به خوبی هم زده، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگه دارید.

۶- به آن ها بافر لیزکننده گلبول قرمز مثل ۲ میلی لیتر 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 400g 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 400g سانتریفیوژ کنید. سپس مایع رویی را دور بریزید.

۸- سلول ها را در 0.2 میلی لیتر PBS/BSA به همراه 0.5% پارافرمالدهید در PBS (در صورت نیاز) محلول کنید.

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

آنالیز آنتی ژن ها (سیتوکین های درون سلولی خون کامل)

آنالیز آنتی ژن ها یک روش سریع و آسان جهت ارزیابی سیتوکین های درون سلولی به وسیله فلوسایتومتری است. این روش، ارزیابی نمونه های کوچک را امکان پذیر می سازد. و احتمال بروز نتایج ناخواسته (که در فرایند جداسازی سلول های خون محیطی با روش سانتریفیوژ بر اساس شیب چگالی رخ می دهند) را به حداقل می رساند. شرایط القایی که در این جا شرح داده شده برای IL-2 ، $\text{TNF}\alpha$ و $\text{IFN-}\gamma$ مناسب است. و سایر سیتوکین ها به شرایط متفاوتی نیاز دارند.

این روش، نیازمند کیت های آزمایشگاهی است که به منظور فیکس و نفوذپذیر کردن سلول ها به کار می روند.

توجه: برای جمع آوری نمونه های خونی باید از لوله های 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 میلی لیتر از محیط کشت سلولی فاقد هر گونه افزودنی اضافه کنید.

۲- به یکی از لوله ها (گروه راکد)، تا حد غلظت 3mM، موننسنین اضافه کنید.

۳- به لوله دیگر (سلول های فعال)، PMA، Ionomycin و موننسنین 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 37°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 لوله ها بریزید.

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

۷- ۱۰۰ میکرولیتر از معرف $\text{Leucoperm}^{\text{TM}}\text{B}$ (که موجب نفوذپذیری سلول ها می شود)، و به میزان کافی آنتی بادی های ضد سیتوکین را نیز اضافه کنید.

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

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

رنگ آمیزی مستقیم آنتی ژن های درون سلولی

ارزیابی و بررسی آنتی ژن های درون سلولی قبل از رنگ آمیزی، نیاز به عملیاتی برای نفوذ پذیر کردن سلول دارد. روشی که در زیر توصیف می شود نتایج خوبی را به همراه خواهد داشت. البته روش ها و تکنیک های دیگری نیز جهت نفوذ پذیر کردن سلول ها به کار می روند که می توانند با نتایج موفق همراه شوند.

مراحل انجام کار:

- ۱- سلول ها را جمع آوری کرده و تعداد کل آنها را مشخص نمایید.
- ۲- آنها را دو بار با بافر شستشو (PBS حاوی یک درصد BSA و ۰/۱٪ سدیم آزاید) بشوئید.
- ۳- در صورت نیاز، آنتی ژن های سطح سلول را با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال کانژوگه مناسب رنگ آمیزی کنید. پس از رنگ آمیزی سلول ها را یک مرتبه در PBS شسته و مایع رویی را دور بریزید.
- ۴- معرف Leucoperm™ A (که یک محلول فیکس کننده سلول ها است) را به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ازای هر ۱۰۶ سلول، به مخلوط حاصل اضافه کرده سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.
- ۵- سلول ها را یک بار با محلول شستشو بشوئید.
- ۶- سلول ها را در معرف Leucoperm™ B (که یک محلول نفوذپذیری سلول هاست) طوری حل کنید که از ۵۰ μl به ازای هر ۱۰۶ سلول استفاده شود.
- ۷- ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی را در تعداد دلخواه لوله حاوی آنتی بادی های کانژوگه ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- ۸- یک مرتبه با محلول شستشو بشوئید و سپس در ۰/۲۵ میلی لیتر از PBS حاوی ۰/۵٪ پارافرمالدهید 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 ژن های 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 آنتی ژن های سلولی را با استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال کانژوگه رنگ آمیزی کنید. پس از رنگ آمیزی سلول ها را یک مرتبه با PBS شسته و مایع رویی را دور بریزید.

- ۴- سلول ها را در در دمای 8°C -۲ در معرف LeucopermTM (به میزان ۱۰۰ میکرولیتر آن به ازای هر ۱۰۶ سلول) حل کنید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- ۵- ۵۰۰ میکرولیتر از متانول مطلق سرد را به آن اضافه کرده، به هم زده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 8°C -۲ نگهداری کنید.
- ۶- یک مرتبه آن را با بافر شستشو بشوئید.
- ۷- سلول ها را در معرف LeucopermTM 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 نمایید.
- ۹- یک مرتبه با بافر شستشو شسته و در 0.25 میلی لیتر از PBS حاوی 0.5% پارافرمالدئید محلول کنید.
- ۱۰- تا زمان استفاده از فلوسایتومتر در دمای 4°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 مستقیماً 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 میلی لیتر AO:AO یک ماده موتازن است. خواص شیمیایی، فیزیکی و توکسیکولوژیک این ماده، هنوز به طور کامل بررسی نشده است، لذا با احتیاط استفاده شود. ۵۰ میلی گرم از پودر AO را برداشته و در یک بشر شیشه‌ای تمیز بریزید. ۵۰ میلی لیتر آب مقطر بیفزایید. روی بشر را با فویل آلومینیومی ببوشانید و محلول را تا زمانی که کاملاً 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 ورقه 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 کاملاً 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) : ۲/۱۷ گرم 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 $MgCl_2$: محلول PBS ۱۰ X، فاقد نمک های کلسیم و منیزیم را تا غلظت X_1 رقیق کنید. ۴۰۸ میلی لیتر محلول ۹/۴ مولار $MgCl_2$ به هر لیتر PBS بیفزایید PH را به ۷/۲-۷/۴ 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) : ۲۹ گرم نمک طعام را به ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر بیفزایید و به هم بزنید تا کاملاً حل شود. سپس در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگه دارید. این محلول تا ۳ ماه ماندگاری خواهد داشت.
- ۶- محلول ۰/۴ مولار سدیم فسفات دو بازی (Na_2HPO_4) : ۲۸/۳۹ گرم از Na_2HPO_4 (Fisher) را به ۵۰۰ میلی 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 بیفزایید 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 $10\times$ Triton، ۸ میلی لیتر از محلول ۱ نرمال HCL، ۱۵ میلی متر از محلول ۱ مولار NaCL را به ۷۶ میلی متر آب مقطر بیافزایید. PH را بر ۷/۲ (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 Na_2HPO_4 ، 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 ۱۲×۷۵ میلی متری، بریزید.

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

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

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

۷- فلوسیتومتر را با سفید کننده تمیز کرده و با دقت 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 فلوروکروم 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 فلوروکروم شما Phycoerythrin یا Allophycocerythrin 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

آنتی ژن 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 نمونه های آزمایش شناسایی می کند؟ واکنش های متقاطع آنتی بادی با آنتی ژن های موجود در نمونه را چک کنید. همه آنتی بادی ها با گونه های 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؟

آنتی بادی های کانژوگ با PE رنگ آمیزی موفق ندارند در حالی که آنتی بادی های مشابه کانژوگ FITC نتایج مناسبی دارند:

۱- آنتی بادی های کانژوگ 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 رنگ آمیزی تاثیر می گذارد. محلول تازه ای از پارافرمالدئید (PFA) تهیه کنید. سلول ها را می توان 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 کانژوگ است ارزیابی کنید.

۲- برخی رده های سلولی مشخص دارای گیرنده های CD^{۳۲}/FC CD^{۱۶} با تمایل اتصال کمتری هستند که از طریق قسمت FC به آنتی بادی متصل می شود. برای سلول های موش، آنتی بادی را در محلول Seroblock رقیق کنید.

۳- رنگ آمیزی غیر اختصاصی ممکن است به دلیل واکنش های مربوط به آنتی بادی ثانویه باشد. آنتی بادی ثانویه ای 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 تیترا 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 آنتی بادی ها را در غلظت مناسب بکار برده اید و این کار را با تیترا کردن آنتی بادی قبل از استفاده انجام دهید.

- ۲- رنگ آمیزی ضعیف در سیستم های غیر مستقیم رنگ آمیزی سلول می تواند به دلیل اثر Prozone باشد که در آن غلظت خیلی بالای آنتی بادی ها ممکن است نتایج ضعیفی به ما بدهد. لذا آنتی بادی ها را به دقت تیترا کنید.
- ۳- رنگ آمیزی ضعیف ممکن است به دلیل تعداد بیش از حد سلول ها باشد. تعداد و غلظت سلول ها را در حد توصیه شده فراهم کنید.
- ۴- رنگ آمیزی ضعیف سلول ها را می توان همچنین به دلیل بیان آنتی ژن ها باشد. میزان مورد انتظار آنتی ژن بیان شده و ثبت شده را بررسی کنید.
- ۵- اگر بیان آنتی ژن ضعیف باشد، آنتی بادی هایی را انتخاب کنید که با یک فلوروکروم درخشان تر کانژوگه شده باشند.
- ۶- استفاده از آنتی بادی هایی که با بیش از یک آنتی ژن خاص بافتی واکنش متقاطع می دهند، منجر به بروز رنگ آمیزی ضعیف می شود.
- ۷- مدت زمان و دمای انکوباسیون باید با آنتی بادی اولیه و ثانویه متناسب باشد.

پرو فایل تابش پراکنده غیر معمول

- ۱- مطمئن شوید که سلول های استفاده شده در فلوسایتومتري تا حد ممکن تازه هستند. پروفیل تابشی ممکن است سلول های مرده یا درمان (دبریس یا بقایای سلولی) را نشان دهد.
- ۲- روش های فعال سازی ممکن است بر خصوصیات 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 معرف ها ممکن است بر برخی آنتی ژن های خاص اثر بگذارد، بنابراین ممکن است نیاز به بازبینی پیش آید. به عنوان مثال EDTA بر روی برخی از مارک های پلاکت ها تاثیر گذار است.
- ۲- محلول های لیز کننده نیز ممکن است بر برخی آنتی ژن ها اثر گذار باشند. روشی را انتخاب کنید که با شناسایی و تشخیص آنتی ژن تداخل ایجاد نمی کند.
- ۳- برخی آنتی ژن ها بصورت درون سلولی بیان می شوند. در نتیجه باید از روش هایی برای افزایش نفوذ پذیری غشای سلولی استفاده شود. اطلاعات مربوط به سازندگان معرف ها را مطالعه کرده و معرف مناسب نفوذ پذیر کردن سلولی را انتخاب کنید.

منابع و مآخذ:

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 Cytometry 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 B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma: Development of Laboratory Model and Correlation with Four Taxonomic Systems.** 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 پروتکل های پرکاربرد نیز به منظور استفاده در آزمایشگاه ها در این کتاب گنجانده شده است.