

فلوسایتومتری

به زبان ساده و کاربردی

تألیف:

دکتر فاطمه رضایی نجیبی

دکتری ایمنی‌شناسی پزشکی - 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



تألیف فاطمه رضایی کهمینی، شهاب شاه‌گلدی، حمزه چوبیز
ناشر جامعه‌نگر
نوبت و سال چاپ اول ۱۳۹۸
شمارگان ۱۰۰ نسخه
صفحه آرایي آرساکو
طراحی جلد محبوبه اله‌مرادی
بها ۳۷۹۰۰ تومان
شابک ۹۷۸-۶۰۰-۱۰۱-۸۲۶-۸



فهرست مطالب

فصل ۱ • اصول و مبانی فلوسایتومتری	۱
خلاصه فصل	۱
۱-۱ تاریخچه فلوسایتومتری	۱
۲-۱ اساس دستگاه فلوسایتومتری با مروری بر دستگاه FACSCanto	۲
۳-۱ ساختمان داخلی دستگاه فلوسایتومتری	۳
۱-۳-۱ سیستم سیال	۴
۲-۳-۱ سیستم نوری	۶
۱-۲-۳-۱ انواع پراکنش نور کوئرتس پس از تحریک توسط منبع نوری	۷
۲-۲-۳-۱ فیلتر	۸
۳-۲-۳-۱ آشکارساز	۸
۳-۳-۱ بخش الکترونیک	۹
۴-۱ کاربرد فلوسایتومتری	۱۰
۵-۱ مزایا و معایب سیستم فلوسایتومتری	۱۰
۱-۵-۱ مزایا	۱۰
۲-۵-۱ معایب	۱۱
فصل ۲ • فلوروکروم؛ اندازه‌گیری میزان فلورسنت؛ کنترل کیفی و طراحی پتل فلوسایتومتری	۱۳
خلاصه فصل	۱۳
۱-۲ فلوروکروم	۱۳
۱-۱-۲ اندازه‌گیری میزان فلوروسانس	۱۷
۲-۱-۲ رایج‌ترین فلوروکروم‌های مورد استفاده در فلوسایتومتری	۱۷
۲-۲ طراحی پتل فلوسایتومتری	۱۹
۳-۲ کنترل کیفی در فلوسایتومتری	۲۶
۱-۳-۲ کنترل کیفی داخلی	۲۶
۱-۱-۳-۲ کنترل کیفی دستگاه	۲۶
۲-۱-۳-۲ کنترل کیفی آماده‌سازی نمونه	۲۶

۲۷.....	۳-۱-۳-۲ کنترل کیفی جمع‌آوری داده‌ها
۲۷.....	۴-۱-۳-۲ کنترل کیفی آنالیز داده
۲۷.....	۲-۳-۲ کنترل کیفی خارجی
۲۹.....	فصل ۳ آماده‌سازی سلول‌ها جهت انجام فلوسایتومتری
۲۹.....	خلاصه فصل
۲۹.....	۱-۳ آماده‌سازی سلول‌ها
۳۲.....	۱-۱-۳ روش تهیه بافر نمکی Hanks (HBSS) فاقد فنول رد
۳۲.....	۲-۱-۳ روش تهیه بافر استوک HEPES (غلظت ۱ مولار)
۳۲.....	۲-۳ تهیه سوسپانسیون سلولی از نمونه‌های خون و مغز استخوان
۳۴.....	۱-۲-۳ رنک‌آمیزی خون تام
۳۵.....	۳-۱-۱ روش رنک‌آمیزی خون تام با LDS-751
۳۶.....	۲-۲-۳ تکنیک‌ها، بهسازی و تخلیص لکوسیت‌ها
۳۷.....	۱-۲-۲-۳ رابوب‌گشی با استفاده از دکستران
۳۷.....	۲-۲-۲-۳ روش رسوب‌گیری گرانولی با استفاده از دکستران
۳۷.....	۳-۲-۲-۳ سانتریفیوژ گرانولان
۳۹.....	۴-۲-۲-۳ جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای توسط محیط فایکول
۴۰.....	۵-۲-۲-۳ جداسازی هم‌زمان برتروف‌ها و سلول‌های تک‌هسته‌ای توسط محیط فایکول
۴۱.....	۶-۲-۲-۳ انتخاب ایمونولوژیک سلول‌ها
۴۲.....	۷-۲-۲-۳ لیزکردن اریتروسیت‌ها
۴۳.....	۸-۲-۲-۳ لیز RBCها با استفاده از آب مقطر
۴۳.....	۹-۲-۲-۳ لیز RBCها با استفاده از آمونیوم کلرید
۴۳.....	۱۰-۲-۲-۳ نفوذپذیر ساختن و لیز RBCها با استفاده از ساون
۴۴.....	۳-۲-۳ بررسی خون تام لیزشده
۴۵.....	۱-۳-۲-۳ روش رنک‌آمیزی خون تام لیزشده
۴۶.....	۳-۳ تهیه سوسپانسیون سلولی از بافت‌های جامد و کشت‌های سلولی
۴۷.....	۱-۳-۳ روش تهیه سوسپانسیون لنفوسیتی از بافت‌های لنفاوی
۴۷.....	۲-۳-۳ روش تهیه سوسپانسیون سلولی از بافت‌های غیر لنفاوی جامد
۴۸.....	۳-۳-۳ روش تهیه سوسپانسیون سلولی از سلول‌های کشت داده شده
۴۸.....	۴-۳ فیکساسیون یا تثبیت سلول‌ها
۵۰.....	۵-۳ نفوذپذیرسازی سلول‌ها و تشخیص اجزای داخل سلولی
۵۱.....	۶-۳ استفاده از آنتی‌بادی‌های نشان‌دار به منظور شناسایی مارکرهای سلولی

۵۲.....	۱-۶-۳ واکنش آنتی ژن - آنتی بادی
۵۳.....	۲-۶-۳ تیتراسیون آنتی بادی ها
۵۴.....	۷-۳ حساسیت تکنیک فلوسایتومتری در تشخیص و اندازه گیری آنتی ژن های سطحی
۵۷.....	۸-۳ انواع روش های رنگ آمیزی مورد استفاده در تکنیک فلوسایتومتری
۵۹.....	۱-۸-۳ روش رنگ آمیزی مستقیم
۶۰.....	۲-۸-۳ روش رنگ آمیزی غیرمستقیم

۶۱.....	فصل ۴ شناسایی سلول در یک جمعیت هتروژن و بررسی فنوتیپ و عملکرد آن توسط تکنیک فلوسایتومتری
۶۱.....	خلاصه فصل
۶۱.....	۱-۴ شناسایی یک رده سلولی در یک جمعیت هتروژن و ناهمگن
۶۲.....	۲-۴ شناسایی سلول های نابزرگ در یک جمعیت هتروژن
۶۳.....	۱-۲-۴ برای جمعیت های سلولی با فراوانی پایین چه تعداد سلول باید توسط دستگاه قرائت گردد؟
۶۴.....	۲-۲-۴ اجتناب از بنای سلولی سلول های قرمز و سلول های مرده
۶۵.....	۳-۴ رنگ آمیزی شاخص های سطحی
۶۵.....	۱-۳-۴ روش رنگ آمیزی شاخص های سطحی
۶۶.....	۴-۴ رنگ آمیزی شاخص های درون سلولی
۶۷.....	۱-۴-۴ مسدودکننده های انتقال پروتئین
۶۸.....	۲-۴-۴ تحریک و فعال کردن سلول، کشت و رمان انکوباسیون
۶۸.....	۱-۲-۴-۴ پروتکل رایج برای تحریک اختصاصی سلول ها و 1 به منظور اندازه گیری سایتوکاین های داخل سلولی
۶۸.....	۳-۴-۴ روش رنگ آمیزی سایتوکاین داخل سلولی
۶۹.....	۱-۳-۴-۴ روش تهیه سوسپانسیون سلولی
۶۹.....	۲-۳-۴-۴ رنگ آمیزی شاخص های سطحی
۷۰.....	۳-۳-۴-۴ فیکس و نفوذپذیرکردن سلول
۷۰.....	۴-۳-۴-۴ رنگ آمیزی شاخص های درون سلولی
۷۰.....	۴-۴-۴ روش رنگ آمیزی هم زمان آنتی ژن های سطحی و درون سلولی

۷۱.....	فصل ۵ اندازه گیری کلسیم سیتوپلاسمی، میتوکندری، اندوپلاسمی و آزاد توسط فلوسایتومتری
۷۱.....	خلاصه فصل
۷۱.....	۱-۵ رنگ های مورد استفاده برای اندازه گیری تغییرات کلسیم سلول
۷۳.....	۲-۵ تغییرات کلسیم داخل سلولی پس از فعال شدن رسپتور
۷۳.....	۳-۵ اندازه گیری جریان کلسیم سیستم سیتوپلاسمی با استفاده از Indo-1

۷۴.....	۴-۵ اندازه‌گیری جریان کلسیمی به میتوکندری با استفاده از Rhod-2
۷۵.....	۵-۵ روش‌های آزمایشگاهی بررسی جریان داخل سلولی یون کلسیم
۷۵.....	۱-۵-۵ روش ردیابی جریان کلسیم داخل سلولی با استفاده هم‌زمان از دو رنگ Indo-1 و Rhod-2
۷۷.....	فصل ۶ : بررسی آپوپتوز توسط تکنیک فلوسایتومتری
۷۷.....	خلاصه فصل
۷۷.....	۱-۶ کلیات آپوپتوز
۷۸.....	۲-۶ انواع آپوپتوز
۷۹.....	۱-۲-۶ مرگ فعال القایی (AICD)
۷۹.....	۲-۲-۶ مرگ غیرفعال (PCD)
۸۲.....	۳-۶ نکروز
۸۳.....	۴-۶ آپوپتوز و خصوصیات رانش نوری سلول‌ها (FSC و SSC)
۸۳.....	۵-۶ آپوپتوز و تغییرات نردین، غشاء
۸۴.....	۱-۵-۶ روش رنگ‌آمیزی Annexin-V جهت بررسی آپوپتوز
۸۴.....	۲-۵-۶ روش رنگ‌آمیزی پرواز، وحشت و PI جهت بررسی آپوپتوز
۸۵.....	۳-۵-۶ روش رنگ‌آمیزی YO-PRO-1 جهت بررسی آپوپتوز
۸۶.....	۶-۶ آپوپتوز و تغییرات DNA
۸۷.....	۱-۶-۶ روش رنگ‌آمیزی PI جهت بررسی آپوپتوز و محتویات DNA سلولی
۸۸.....	۲-۶-۶ روش انجام تست TUNEL جهت بررسی آپوپتوز
۸۹.....	۳-۶-۶ مشکلات و معایب بررسی محتویات DNA با روش فلوسایتومتری
۹۰.....	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
۹۱.....	۲-۷-۶ مشکلات و معایب بررسی فسفاتیدیل‌های غشایی با روش فلوسایتومتری
۹۲.....	۸-۶ آپوپتوز و تغییرات میتوکندریال
۹۳.....	۱-۸-۶ روش رنگ‌آمیزی با رنگ‌های JC-1 و DiOC ₆ (رنگ‌های غیرقابل فیکساسیون جهت بررسی آپوپتوز)
۹۴.....	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 mΔΨ به روش فلوسایتومتری
۹۵.....	۹-۶ آپوپتوز و کاسپازها

۹۵	روش تعیین میزان فعالیت کاسپازها جهت بررسی آپوپتوز
۹۶	مزایای استفاده از تکنیک فلوسایتومتری در بررسی آپوپتوز
۹۷	معایب استفاده از تکنیک فلوسایتومتری در بررسی آپوپتوز
۹۹	فصل ۷ آنالیز داده‌های فلوسایتومتری با استفاده از نرم‌افزار FlowJo
۹۹	خلاصه فصل
۹۹	۱-۷ نمایش داده‌های فلوسایتومتری در نرم‌افزار FlowJo و Workspaces
۱۰۰	۱-۱-۷ بازکردن Workspaces جدید
۱۰۱	۲-۱-۷ اضافه کردن داده‌های فلوسایتومتری
۱۰۳	۳-۱-۷ نمایش ویرایش آیتم‌های نمایش داده شده در Workspace
۱۰۴	۲-۷ نمایش داده‌های فلوسایتومتری به صورت نمودار گرافیکی
۱۰۵	۱-۲-۷ انواع مختلف نمودار گرافیکی
۱۰۵	۱-۱-۲-۷ نمودار هیستوگرام
۱۰۵	۲-۱-۲-۷ نمودار نقطه‌ای
۱۰۶	۳-۱-۲-۷ نمودار Pseudocolor
۱۰۷	۴-۱-۲-۷ نمودار چگالی
۱۰۸	۵-۱-۲-۷ نمودار نقشه‌ای
۱۰۸	۶-۱-۲-۷ نمودار Three-Dimensional (3D) Polychromatic
۱۰۹	۳-۷ تعیین محدوده یا Gating
۱۱۰	۱-۳-۷ انواع مختلف Gate کردن
۱۱۲	۲-۳-۷ حذف کردن Gate
۱۱۲	۳-۳-۷ ایجاد Gate چندضلعی
۱۱۳	۴-۳-۷ ایجاد Gate به صورت هیستوگرام
۱۱۵	۴-۷ ایجاد گروه و استفاده از مزایای آن
۱۱۵	۵-۷ اضافه کردن آنالیز آماری
۱۱۶	۱-۵-۷ کپی کردن Gate و آنالیز آماری بر سایر نمونه‌های موجود در Workspace
۱۱۶	۲-۵-۷ حذف کردن آنالیز آماری
۱۱۷	۶-۷ جداول و خروجی FlowJo
۱۱۷	۱-۶-۷ ایجاد یک جدول جدید
۱۱۹	۷-۷ بازآرایی گرافیکی
۱۲۳	فهرست منابع
۱۲۵	نمایه



فلوسایتومتری ابزاری قدرتمند برای بررسی فنوتایپ و خصوصیات سلولی است. همین امر آن را دلیل 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 در ردیابی و تشخیص سرطان، بررسی سلول‌های خونی و ایمنی، پاتولوژی، بیولوژی سلولی و... دارد. اسناد 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، کنترل کیفی طراحی فلوسایتومتری، توضیح پروتوکول‌های رایج و همچنین معایب و مزایای این پروتوکول‌ها 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 نتایج تأثیر گذاشته، لذا آگاهی از جزئیات روش انجام آزمایش منجر به صرفه‌جویی در زمان، 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 توصیه می‌شود.

مؤلفین
تایستان ۹۸