

اصول و روش‌های عملی فلوسایتومتری

Flow Cytometry Principles and Practical Methods

تألیف:

دکتر مرضیه ابراهیمی

(عضو هیات علمی پژوهشگاه رویان)

احسان جان زمین، فاضل صحرانشین سامانی، پردیس خسروانی



پژوهشگاه رویان

پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فن‌آوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی،
مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران

اصول و روش‌های عملی فلوسایتومتری = Flow cytometry principles and practical method / تالیف مرضیه ابراهیمی... [و دیگران]: [برای] پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی.

عنوان و نام پدیدآور:

مشخصات نشر:

مشخصات ظاهری:

شابک:

وضعیت فهرست نویسی:

یادداشت:

موضوع:

موضوع:

شناسه افزوده:

شناسه افزوده:

شناسه افزوده:

رده بندی کنگره:

رده بندی دیویی:

شماره کتابشناسی ملی:

تهران: پژوهشگاه رویان، ۱۳۹۲

۱۱۲ ص.

۹۷۸-۶۰۰-۹۲۵۸۷-۶-۵، ۱۱۵۰۰۰ ریال

فیبا

تالیف مرضیه ابراهیمی، احسان جان‌رمی، فاضل صحرانشین‌سامانی، پردیس خسروانی.

فلوسایتومتری

فلوسایتومتری -- کاربرد تشخیصی

ابراهیمی، مرضیه، ۱۳۵۲ -

پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌فناوری سلول‌های بنیادی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی

پژوهشگاه رویان

۱۳۹۲ الف ۸ / ۵ / ۵۸۵ QH

۶۱۶/۰۷۵۸۲

۳۱۲۵۱۱۲



اصول و روش‌های عملی فلوسایتومتری

تالیف دکتر مرضیه ابراهیمی، احسان جان‌زمین، فاضل صحرانشین‌سامانی، پردیس خسروانی

ناشر انتشارات پژوهشگاه رویان (وابسته به جهاد دانشگاهی)

توبیت چاپ اول / ۱۳۹۱

صفحه‌آرایی و کارشناسی امور چاپ و نشر شهره روحبانی

طراحی جلد سعید تقی‌نیا

لیتوگرافی و چاپ قائم جلال جوربند

صحافی عطف

شابک ۹۷۸-۶۰۰-۹۲۵۸۷-۶-۵

شمارگان ۱۰۰۰ نسخه

قیمت ۱۱۵۰۰۰ ریال

نشانی: تهران، ۴۵ متری رسالت، خیابان بنی‌هاشم، میدان بنی‌هاشم، خیابان بنی‌هاشم شمالی، خیابان حافظ شرقی، پژوهشگاه رویان، انتشارات پژوهشگاه رویان (وابسته به جهاد دانشگاهی)، صندوق پستی: ۱۶۶۳۵-۱۴۸

Web: www.royaninstitute.org

Email: publication@royaninstitute.org

مقدمه نویسندگان ...

امروزه استفاده از روش‌های نوین آزمایشگاهی در زمینه تحقیقات پایه و علوم بالینی گسترش بسیار یافته است. شاید بتوان به جرات گفت شناسایی چندین شاخص سلولی در زمانی کوتاه، بررسی مجموعه‌ای از سلول‌ها و جداکردن سلول‌های دلخواه از میان مجموعه‌های چند سلولی، بررسی شاخص‌هایی چون تقسیم سلول، مرگ سلول، ناهنجاری‌های کروموزومی و حتی بیان ژن‌ها و به تصویر کشیدن و کمی کردن چندین شاخص سلولی که همه توسط فلوسایتومتری امکان‌پذیر گردیده است؛ نه تنها انقلابی در حوزه‌های مختلف علوم پایه ایجاد کرده، بلکه شناسایی برخی از بیماری‌ها از جمله سرطان‌ها را نیز در زمانی کوتاه برای متخصصان علوم پزشکی امکان‌پذیر ساخته است.

علی‌رغم کارآمد بودن روش فلوسایتومتری در تشخیص بیماری‌ها و استفاده گسترده آن در بسیاری از مراکز تحقیقاتی و بیمارستانی کشور، کتابی جامع به زبان فارسی در این زمینه در دسترس دانشجویان، محققان و سایر کاربران این تکنیک قرار نداشت تا راهگشای مشکلات آنان باشد. لذا بر آن شدیم تا مجموعه تجربیات خود را در این زمینه گردآوری نموده و در اختیار همگان قرار دهیم. در فصول ابتدایی کتاب حاضر شرح مبانی بنیادی فلوسایتومتری با بیانی ساده و شیوا شرح داده شده است. در فصول بعد روش‌های عملی استفاده از دستگاه، روش‌های رنگ‌آمیزی و آماده‌سازی نمونه و در نهایت چگونگی ارائه داده‌ها و حصول نتیجه مناسب با استفاده از نرم‌افزارهای موجود بیان شده است.

در این اثر که حاصل تلاش بی‌وقفه مولفان می‌باشد سعی شد تا نوشتاری روان، گویا و به دور از پیچیدگی ارائه شود. ویرایش علمی و ادبی کتاب نیز به دقت و در چندین نوبت انجام شده است تا اثر منتشره عاری از اشتباهات علمی و اشکالات نوشتاری باشد. با تمام دقت به کار رفته، این اثر خالی از اشکال نبوده و پیشنهادات و نظرات اساتید و دانشجویان محترم راهگشای ما خواهد بود.

بر خود لازم می‌دانیم از حمایت‌های بی‌دریغ جناب آقای دکتر حسین بهاروند رئیس پژوهشکده سلول‌های بنیادی پژوهشگاه رویان و تمامی محققین و دانشجویان این گروه که کمک آنان در این اثر ماندگار شده است، کمال تشکر را داشته باشیم. هم‌چنین مساعدت آقایان دکتر حمید گورابی، دکتر احمد وثوق و دکتر عبدالحسین شاهوردی اعضای هیات

رئیس پژوهشگاه رویان که چاپ اثر را میسر ساختند و نیز خدمات ارزشمند و موثر خانم شهره روحبانی کارشناس محترم انتشارات پژوهشگاه رویان را ارج می‌نهیم.

انتشار این اثر با حمایت مالی پژوهشگاه رویان و ستاد توسعه پژوهش و کاربرد سلول‌های بنیادی در معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری صورت گرفت است. لذا لازم می‌دانیم از مساعدت جناب آقای دکتر محمد واسعی دبیر ستاد توسعه سلول‌های بنیادی تشکر و قدردانی نماییم.

گروه مولفان هم‌چنین سپاسگزار حمایت‌های خانواده‌های خود طی آماده‌سازی این اثر هستند و این کتاب را به آنان و تمامی دانش‌پویان و دوست‌داران علوم سلولی و بالینی تقدیم می‌کنند.

دکتر مرضیه ابراهیمی
پروفسور خسروانی
فاضل صحرانشین سامانی
احسان جان زمین

فصل اول: مبانی و اصول دستگاه فلو سائتومتری

۲	تاریخچه پیدایش فلو سائتومتری
۲	سیستم دید آورنده جریان (Fluidics System)
۳	سیستم نوری (Optical System)
۳	سیستم الکترونیک (Electronic System)
۳	مبانی ساختاری دستگاه فلو سائتومتر
۳	سیستم پدید آورنده ی جریان (Fluidics System)
۵	سیستم نوری (Optical System)
۵	سرنوشت نور پس از برخورد به سلول ها
۸	آشکارسازها (Detectors)
۸	فوتودیود (Photodiode)
۸	لوله های تقویت کننده فوتون (Photomultiplier Tubes; PMTs)
۹	سیستم الکترونیک (Electronic System)
۱۱	مبانی اولیه تنظیم دستگاه
۱۱	فهرست وضعیت (List Mode)
۱۳	نمایش داده ها
۱۵	آستانه (Threshold)
۱۶	چگونگی تنظیم آستانه
۱۶	تنظیم صحیح خروجی سیگنال ها
۱۹	تصحیح هم پوشانی رنگ ها (Compensation)
۲۵	چگونه می توان نسبت به انجام درست تصحیح هم پوشانی (Compensation) اطمینان یافت؟
۲۸	گزیده منابع و وب سایت ها

فصل دوم: آنتی بادی ها، فلوروکروم ها و روش های رنگ آمیزی

۳۰	مقدمه
۳۰	آنتی بادی ها

۳۱	فلوروکرومها
۳۹	انتخاب غلظت موثر آنتی‌بادی (Antibody Titration)
۴۰	روش‌های رنگ‌آمیزی
۴۰	رنگ‌آمیزی مستقیم (Direct Staining)
۴۱	رنگ‌آمیزی غیرمستقیم (Indirect Staining)
۴۱	کنترل ایزوتايب و جلوگیری از اتصال نابه‌جای آنتی‌بادی
۴۲	زمان و دمای انکوباسیون
۴۳	تثبیت نمونه (Fixation) و نفوذپذیر کردن سلول (Permeabilization)
۴۴	گزیده منابع و وب‌سایت‌ها

فصل سوم: روش‌های عملی فلوسایتومتری

۴۶	مقدمه
۴۶	ایمنوفنو تایپینگ و بررسی شاخص‌های سلولی
۴۶	رتگ‌آمیزی مستقیم
۴۹	رتگ‌آمیزی غیرمستقیم
۵۰	رتگ‌آمیزی شاخص‌های درون سلولی (داخل سیتوپلاسمی و داخل هسته‌ای)
۵۲	رتگ‌آمیزی DNA و آنالیز چرخه سلولی
۵۷	سنجش میزان زنده بودن سلول‌ها
	رنگ‌آمیزی با یدید پروپیدیوم (Propidium Iodide; PI) و یا رنگ فلورسئس
۵۸	۷ – آمینوآکتینومایسین D و (7-Aminoactinomycin D; 7AAD)
۵۹	آپوپتوز
۶۲	بررسی آپوپتوز به وسیله رنگ‌آمیزی Annexin و PI
۶۴	رنگ‌های ردیاب (Tracking Dyes)
۶۵	شروع کار با دستگاه فلوسایتومتری مدل BD FACS Calibur تک‌لیزره با سه فیلتر
۷۴	گزیده منابع و وب‌سایت‌ها

فصل چهارم: آنالیز داده‌ها

۷۶	نمایش داده‌ها
۷۷	تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها
۷۸	محدوده بندی و تعیین خروجی (Gating)
۸۰	محدوده بندی معکوس (Back Gating)

۸۰	محدوده‌بندی استدلالی (Logical Gating)
۸۳	نمودار با دو پارامتر فلورسنس و تفسیر آن
۸۴	نمونه کنترل و اهمیت آن در محدوده‌بندی
۸۶	بررسی آماری
۸۷	میانگین شدت فلورسنس (Mean Flourescence Intensity; MFI)
۸۸	گزیده منابع و وب سایت‌ها

فصل پنجم: جداسازی سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلو‌سایتومتری

۹۰	مقدمه
	دستگاه‌های جداساز سلول بر مبنای فلو‌سایتومتری (Fluorescence Activated Cell Sorters)
۹۰	
۹۰	جداکننده‌های مکانیکی (Mechanical Cell Sorters)
۹۰	جداکننده‌های الکترواستاتیک (Electrostatic Cell Sorters)
۹۴	آماده‌سازی نمونه جهت جداسازی
۹۴	آماده‌سازی سلول‌ها، غیر چسبنده (سوسپانسیون)
۹۵	روش تهیه بافر جداسازی
۹۵	آماده‌سازی سلول‌های چسبنده جهت جداسازی
۹۶	آماده‌سازی دستگاه
۹۷	مشکلات جداسازی سلول بر پایه فلو‌سایتومتری (FACS) و راه‌های رفع آن
۹۷	کاهش میزان خلوص (Purity)
۹۹	کاهش بازیافت سلول (Recovery)
۹۹	کاهش میزان زنده بودن (Viability)
۹۹	اصول ایمنی زیستی (Biosafety)
۱۰۰	گزیده منابع و وب سایت‌ها

ضمائم

۱۰۲	اشکالات کار با فلو‌سایتومتری و راه حل‌های رفع آن
۱۰۳	جدول رنگ‌های فلورسنس کاربردی در فلو‌سایتومتری
۱۰۷	Legend
۱۰۸	واژه‌نامه