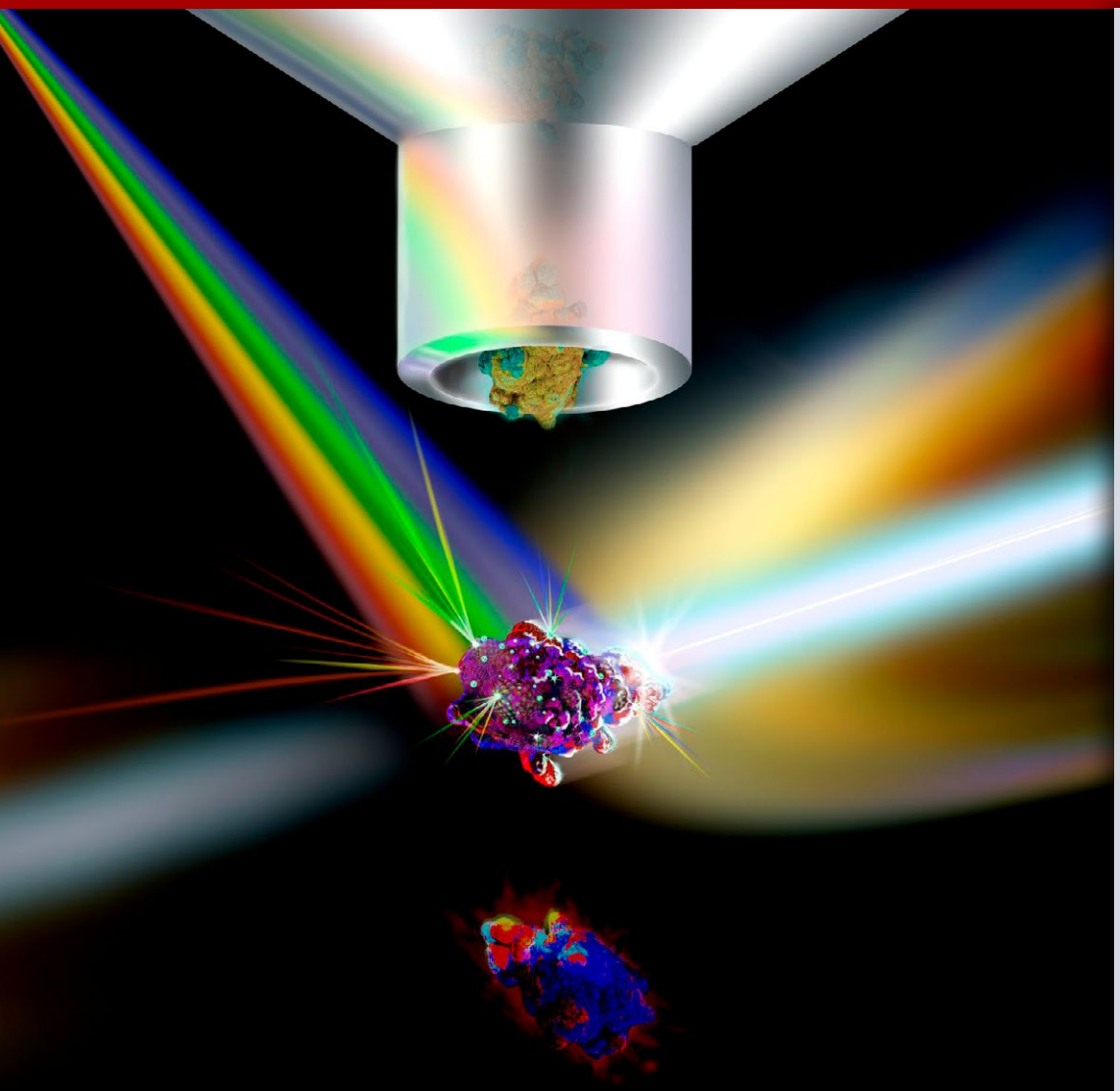
شبکه آزمایشگاهی فناوری نانو

فصلنامه تخصصی

دانش آزمایشگاهی ایران

سال نهم ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۴۰۰ ■ شماره پیاپی ۳۴

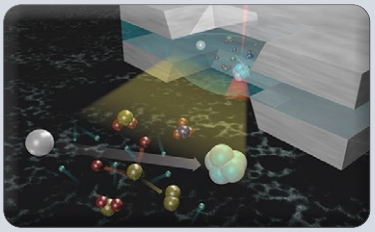
ISSN 2538-3450



معرفی روش آنالیز فلوسایتومتری

به اشتراک‌گذاری تجربیات کارشناسان آزمایشگاه‌ها؛ برنامه زنده اینترنتی شبکه آزمایشگاهی

معرفی روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز هم‌زمان



معرفی اصول عملکرد میکروسکوپ الکترونی عبوری محیطی درجا / بهنگام مجهز به سلول مایع

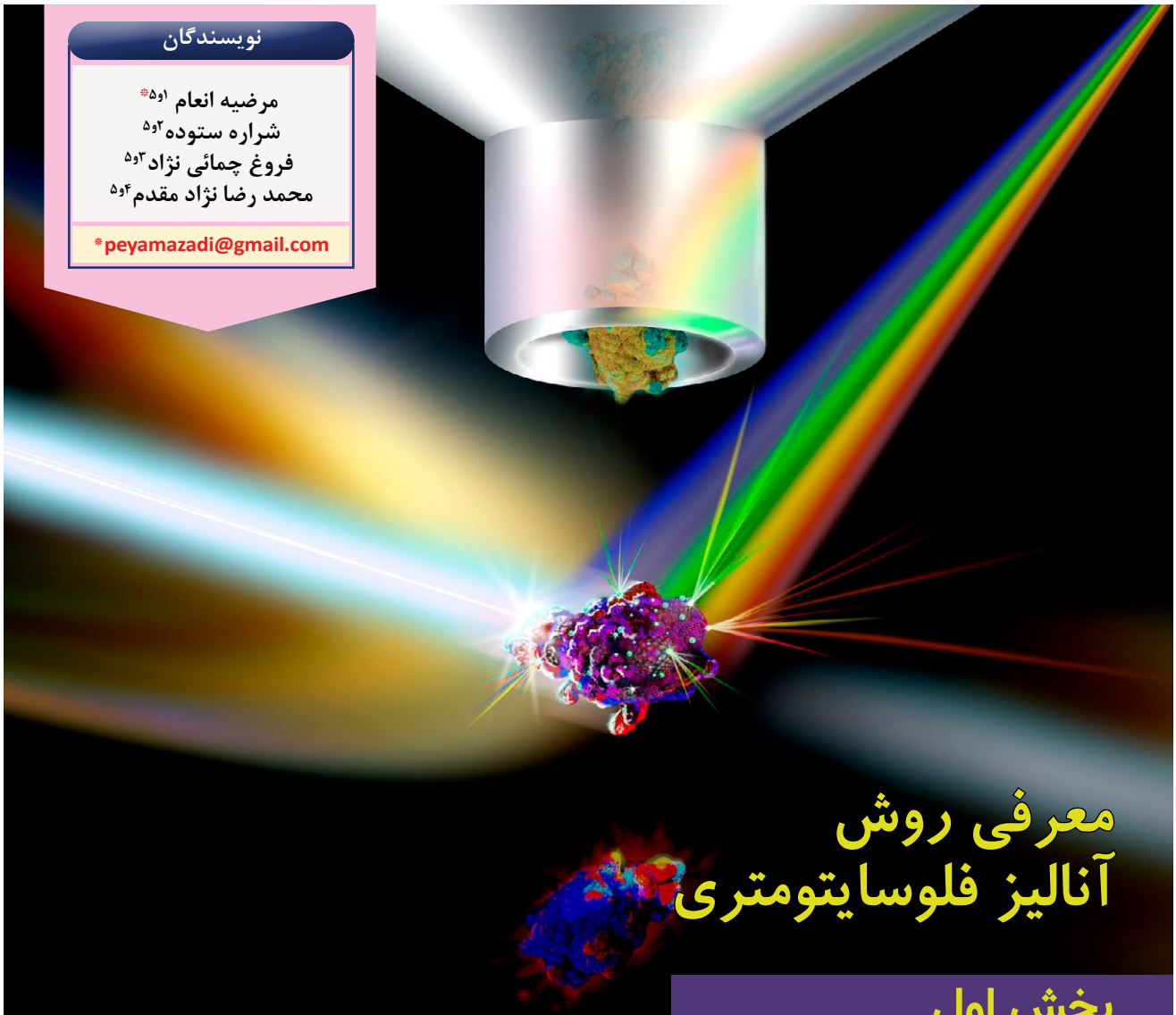
معرفی آزمون خستگی فرتینگ یا خستگی - سایشی مواد با بارگذاری خمشی متناوب

جداسازی و شناسایی اجزاء تشکیل دهنده اسانس و اسیدهای چرب تری گلیسریدی در گیاه کلپوره به روش کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی

کاربردهای جدید رزونانس مغناطیس هسته

www.IJLK.ir
info@ijlk.ir

نویسندگان
مرضیه انعام [۱و۵*]
شراره ستوده [۲و۵]
فروغ چمائی نژاد [۳و۵]
محمد رضا نژاد مقدم [۴و۵]
*peyamazadi@gmail.com



معرفی روش آنالیز فلوسایتومتری

بخش اول

اساس روش و اجزای تشکیل دهنده دستگاه فلوسایتومتر

چکیده

فلوسایتومتری روشی کارآمد در سلول شناسی است که قادر به اندازه‌گیری و آنالیز هم‌زمان چندین عامل فیزیکی نظیر اندازه و گرانولیتی از یک سلول منفرد و یا هر ذره محلول دیگری است. علاوه بر این، کارایی این روش به ویژگی پرتوهای نوری منتشر شده از رنگ‌های فلورسانس یا آنتی‌بادی‌های مونوکلونال کنژوگه متصل به مولکول هدف در سطح یا درون سلول بستگی دارد. اجزای دستگاه فلوسایتومتر شامل سیستم جریان سیال، سیستم اپتیکی (لیزر و فیلترها)، پردازشگر سیگنال، نرم‌افزار و سیستم تقسیم‌بندی الکتروستاتیکی سلول، در مجموع ابزاری قدرتمند در تحلیل دقیق جمعیت‌های سلولی پیچیده در مدت زمان کوتاه ایجاد کرده است. با توجه به اینکه این روش در زمینه‌های مختلفی از جمله تشخیص پزشکی، ایمنی شناسی، آسیب شناسی، بیولوژی مولکولی، علوم گیاهی، میکروبیولوژی و غیره کاربرد وسیعی دارد.

واژه‌های کلیدی

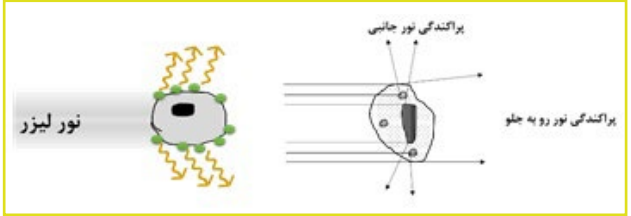
فلوسایتومتر، سلول، اندازه، گرانولیتی، رنگ فلورسانس.

مقدمه

در طی سال‌های دهه ۶۰ میلادی، تلاش جمعی از دانشمندان فعال در عرصه سلول‌شناسی، منجر به ابداع روشی با عنوان فلوسایتومتری شد که امکان شناسایی ذرات از جمله سلول‌ها و ارزیابی ویژگی‌های آنها را فراهم آورد. سرعت و دقت بالای این روش موجب شد تا خیلی زود جایگاه ویژه‌ای در حوزه‌های مختلف علوم پزشکی و زیستی به خود اختصاص دهد [۱]. حاصل تلاش‌های اولیه در این زمینه، ایجاد دستگاه تک عاملی بود که فقط اندازه سلول‌ها را شناسایی می‌کرد. اما امروزه دستگاه‌های فلوسایتومتری قدرتمندی پا به عرصه گذاشته‌اند که قادر به تشخیص هم‌زمان تا ۱۴ عامل مختلف از صدها هزار ذره منفرد در ثانیه هستند [۲]. آنالیز این حجم وسیع از داده‌های حاصل از هر آزمون، کار بسیار حساس و تخصصی است و با گراف‌ها و نمودارهای به دست آمده و به کمک نرم‌افزارهای اختصاصی تجزیه و تحلیل می‌شوند. این روش، کاربرد زیادی در حوزه تشخیص پزشکی به ویژه تشخیص و طبقه‌بندی سلول‌های خونی طبیعی از غیرطبیعی و لذا تشخیص انواع بدخیمی‌های خونی، بررسی پاسخ به درمان در بدخیمی‌ها و ایدز و همچنین سنجش عوامل اختصاصی در تشخیص و پیش آگهی بیماری دارد. همچنین در حوزه تحقیقاتی در بررسی میزان مرگ سلولی و آپاپتوز/ نکروز، میزان ماده ژنتیکی/ DNA، بررسی زنده‌مانی سلول‌های کشت و باکتری، بررسی روند سیکل سلولی، تعیین کاریوتایپ و غیره نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳ تا ۷].

اساس روش

در روش فلوسایتومتری، هدف، اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی ذرات بصورت منفرد است. اگرچه ذرات سنتتیک و اجزای جدا شده از سلول و همچنین ذرات کوچکتر از سلول را می‌توان با این روش آنالیز نمود، غالبا سلول‌های جانوری، گیاهی و میکروبی با این روش مورد بررسی قرار می‌گیرند. سلول‌های موجود در نمونه پس از تزریق به دستگاه در جریانی از سیال قرار گرفته و تک تک از مقابل پرتوی نور لیزر عبور می‌کنند [۸]. نور پس از برخورد با هر سلول در زوایای مختلف شکسته می‌شود. پرتوهای نوری که از امتداد لبه‌های سلول عبور می‌کنند کمترین زاویه شکست را داشته و تقریبا رو به جلو پراکنده می‌شوند. این پراکندگی نور، پراکندگی نور رو به جلو[۶] نامیده شده و می‌تواند معیاری از اندازه ذره یا سلول باشد. پرتوهای نوری که از میان ذره یا سلول عبور می‌کنند در اثر برخورد با محتوای داخلی آن در زوایای بزرگتری شکسته و به اطراف پراکنده می‌شود. این پراکندگی‌های نور که پراکندگی نور جانبی[۷] نامیده می‌شود در زاویه ۹۰ درجه نسبت به پرتوی نور لیزر، اندازه‌گیری شده و میزان پیچیدگی ساختاری درون سلول مثل گرانولیتی آن را نشان می‌دهد (شکل (۱)).

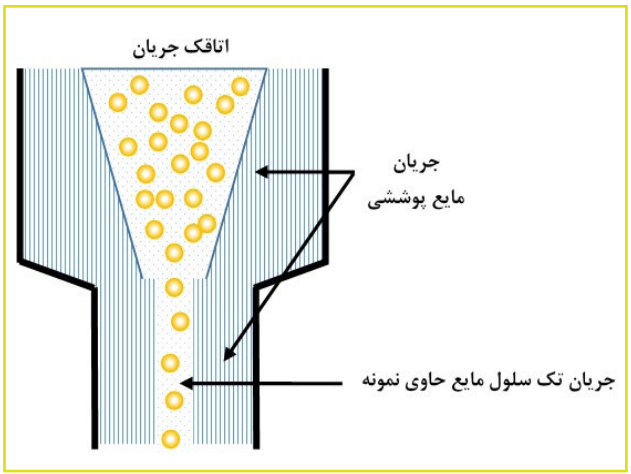


شکل (۱): شکست نور لیزر در برخورد با سلول و پراکندگی آن در زوایای رو به جلو (FSC) و جانبی (SSC) (سمت راست)، ایجاد نشر فلورسانس از آنتی‌بادی‌های کنژوگه متصل به سلول (سمت چپ)

در این روش، علاوه بر اندازه و ساختار سلول، مارکرها یا همان آنتی‌ژن‌های سطحی و سیتوپلاسمی سلول‌ها نیز حائز اهمیت هستند. این آنتی‌ژن‌ها را می‌توان با آنتی‌بادی متصل به رنگ فلورسانس یا با استفاده از فلوروکروم آزاد نشان‌دار کرد. الکترون‌های موجود در ساختار مولکولی رنگ فلورسانس در برخورد با نور لیزر تهییج شده و در بازگشت به حالت پایه، دامنه مشخصی از نور مرئی را منتشر می‌سازد. بنابراین، تابش نور لیزر به سلول‌های نشان‌دار باعث نشر فلورسانس می‌شود (شکل (۱)). شدت‌های بالاتر نشر فلورسانس، نشان دهنده حضور بیشتر آنتی‌ژن در سلول است. بدین ترتیب جمعیت‌های مختلف سلولی از نظر اندازه (FSC)، گرانولیتی (SSC) و میزان بیان آنتی‌ژن (نشر فلورسانس) از هم افتراق داده می‌شوند. نور پراکنده شده به شکل FSC و SSC و همچنین نشر فلورسانس توسط فیلترها از هم تفکیک و توسط آشکارسازها جمع‌آوری و به کمک مبدل به جریان الکتریکی (ولتاژ) تبدیل می‌شود. جریان الکتریکی با استفاده از سیستم پردازشگر به داده‌های دیجیتال تبدیل شده که توسط کامپیوتر به‌صورت نمودار نمایش داده می‌شود [۹]. همچنین برخی دستگاه‌های فلوسایتومتر قادرند سلول‌ها را براساس ویژگی‌های یاد شده به‌صورت فیزیکی و با ایجاد الکتریسیته ساکن بر سطح سلول، از هم تفکیک نمایند. در واقع چنین دستگاه‌هایی مرتب کننده سلول فعال شده با فلئورسنت[۸] بوده و لذا در جداسازی رده‌های مختلف سلولی کاربرد دارند [۲]. البته پنج قسمت اصلی دستگاه‌های فلوسایتومتری، شامل سیستم جریان سیال، سیستم اپتیکی (لیزر-فیلترها)، پردازشگر، بخش نرم‌افزاری و سیستم تقسیم‌بندی الکتریسیته ساکن سلول‌هاست که در ادامه درباره چگونگی عملکرد آنها شرح مختصری ارائه می‌شود.

سیستم جریان سیال

همان‌طور که گفته شد، توانایی روش فلوسایتومتری در اندازه‌گیری ویژگی‌های تک تک ذرات یکی از مهمترین کاربردهای روش فلوسایتومتری است [۱۰]. در دستگاه فلوسایتومتری یک سیستم جریان سیال وجود دارد که بستری به‌منظور حمل سلول‌ها (ذرات) از محل ورود به دستگاه تا محل پرتو لیزر و سپس مخزن ضایعات[۹] است. سیستم جریان سیال به‌گونه‌ای طراحی شده تا جریانی از سلول‌های منفرد را ایجاد نماید و به این شکل عمل می‌کند؛ نمونه به شکل محلول به دستگاه تزریق شده و ذرات موجود در آن در یک فضای سه بعدی به نام اتاقک جریان[۱۰] پخش می‌شوند. اتاقک جریان در دو نوع مختلف شامل فلوسل[۱۱] و نوک نازل[۱۲] وجود دارد که بسته به نوع فلوسایتومتر (رومیزی[۱۳] یا نوع جریان در هوا[۱۴]) متفاوت است. اتاقک جریان با استفاده از بخش بزرگتری حاوی مایعی با سرعت بسیار بالا به نام مایع پوششی[۱۵] احاطه شده‌است. مایع حاوی نمونه با سرعتی کمتر از اتاقک جریان خارج شده و در مرکز جریان مایع پوششی قرار می‌گیرد. در واقع، عملکرد جریان مایع پوششی که همواره سرعتش از سرعت مایع حاوی نمونه بیشتر است، اثری به نام اثر تمرکز هیدرودینامیکی ایجاد می‌کند [۸] (شکل (۲)).



شکل (۲): نمایی از سیستم جریان سیال

تمرکز هیدرودینامیکی باعث می‌شود که سلول‌ها یا ذرات موجود در مایع نمونه بعد از کشانده شدن به داخل جریان به‌صورت تک تک از سوراخ انتهایی تا نقطه مقابل تابش لیزر عبور نمایند. با قرار گرفتن سلول (ذره) به‌صورت منفرد در مرکز جریان سیال، بهترین حالت برای برخورد لیزر و در نتیجه پراکندگی نور و نشر فلورسانس ایجاد می‌شود [۱۱].

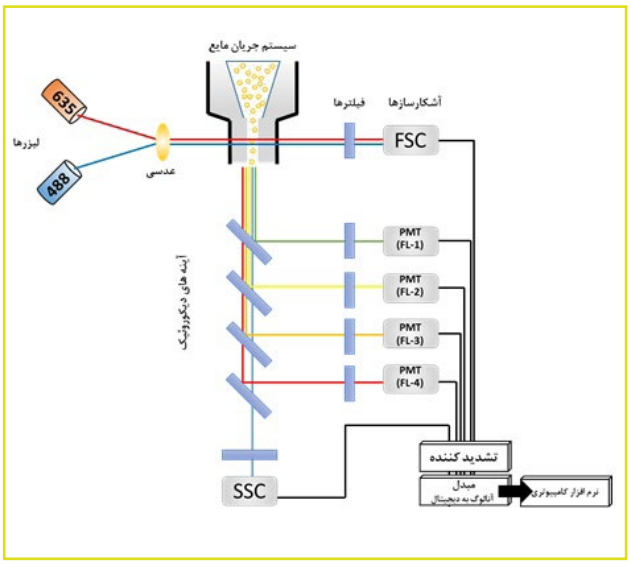
با تنظیم فشار مایع پوششی و مایع حاوی نمونه، بیشتر سلول‌ها از مرکز اشعه لیزر عبور می‌کنند؛ بنابراین، نور لیزر تابیده به سلول‌ها و نشر پراکنده شده از آنها یکنواخت‌تر خواهد بود. برای آنالیزهایی که به دقت و وضوح بیشتری نیازمندیم، مانند آنالیز DNA، با همین تغییر نسبت فشار جریان پوششی به جریان نمونه، سرعت عبور ذرات از مقابل پرتو لیزر آهسته‌تر شده تا دقت آنالیز دستگاه بیشتر شود. بنابراین، فعالیت صحیح اجزای سیستم جریان سیال دستگاه فلوسایتومتری برای در مرکز قرار گرفتن ذرات و در نتیجه برخورد مناسب پرتو لیزر به ذرات مورد آنالیز ضروری است. همچنین در طی آنالیز باید اطمینان حاصل شود که سیستم مایع فاقد حباب‌های هوا و ذرات ناخواسته باشد و در تمام مدت آزمایش میزان فشار مناسب و یکنواختی اعمال شود [۱۲].

سیستم اپتیکی (لیزر-فیلترها)

سیستم اپتیکی دستگاه فلوسایتومتر شامل دو بخش است. بخش اول، منبع نور لیزر که موجب برانگیختگی رنگ فلورسانس شده و بخش دوم شامل مجموعه‌ای از فیلترها است که نشر فلورسانس حاصل را جمع‌آوری و به آشکارساز[۱۶] منتقل می‌نماید (شکل (۳)). در این سیستم با قرار دادن عدسی‌هایی در مسیر منبع نور لیزر می‌توان پرتوهای نوری را متمرکز نمود. سکوی نوری طراحی شده در فلوسایتومترها سبب می‌شود تا نقطه تلاقی پرتو لیزر در قسمت مرکزی جریان نمونه ثابت نگه داشته شود. بنابراین می‌توان اطمینان داشت که لیزر به‌طور صحیح به ذرات موجود در جریان نمونه برخورد می‌کند.

انواع منبع نور لیزر بکار رفته در فلوسایتومتر شامل لیزرهای آبی، قرمز، زرد و بنفش است که به ترتیب با طول موج‌های ۴۸۸، ۶۳۷، ۴۰۵ و ۵۶۱ نانومتر کار می‌کنند که هر یک می‌توانند طیفی از رنگ‌های فلورسانس را برانگیخته نماید. به‌عنوان مثال، فلورسین ایزوتیوسیانات[۱۷] که حداکثر جذب را در طول موج ۴۸۸ نانومتر دارد و به خوبی با لیزر آبی برانگیخته می‌شود. طول موج ۴۸۸ نانومتر در لیزر آبی با یونیزاسیون گاز آرگون با استفاده از پالس‌های الکتریکی با ولتاژ بالا ایجاد می‌شود [۱۱].

نور لیزر از هر منبعی، پس از برخورد با سلول شکسته شده و در زوایای مختلف به اطراف پراکنده می‌شود. میزان این نوع از پراکندگی نور بستگی به ویژگی‌های ظاهری سلول دارد. پرتوهای نوری که در برخورد با لبه‌های سلول با کمترین زاویه منحرف می‌شود، در راستای منبع نور لیزر منعکس شده و شدت آن بیانگر اندازه سلول است. این پراکندگی FSC نام دارد. پرتوهای نوری که در برخورد با محتویات درونی سلول با بیشترین زاویه منحرف می‌شود در جهات مختلف منعکس شده و شدت آن بیانگر گرانولیتی درون سلول است. این پراکندگی که در زاویه ۹۰ درجه نسبت به منبع نور لیزر اندازه‌گیری می‌شود، SSC نام دارد. پرتوهای FSC و SSC صرفا پرتوهای منعکس شده از سلول در اثر برخورد لیزر هستند و نشان دهنده ویژگی‌های فیزیکی سلول (اندازه و میزان گرانولیتی) بوده و هیچ ارتباطی به مقدار فلورسانس سلول -ناشی از رنگ‌های متصل شده به اجزای سلولی- ندارند. بنابراین، از دستگاه فلوسایتومتر برای بررسی خواص فیزیکی سلول‌هایی که با ماده فلورسانس هم رنگ‌آمیزی نشده باشند، می‌توان استفاده نمود [۱۱ و ۱۲].



شکل (۳): نمای کلی از اجزای تشکیل دهنده دستگاه فلوسایتومتر، موقعیت فیلترها و آشکارسازها

وجود آنتی‌ژن‌های اختصاصی در هر رده سلولی مهمترین ویژگی در تشخیص جمعیت‌های مختلف سلولی است. به‌علاوه میزان بیان آن نشان‌دهنده مراحل یا شرایطی است که سلول در آن قرار دارد. بر این اساس می‌توان سلول‌ها را با آنتی‌بادی‌های کنژوگه با رنگ فلورسانس نشان‌دار کرد. رنگ فلورسانس در برخورد با نور لیزر تهییج شده و دامنه‌ای از نور مرئی را از خود نشر می‌دهد. فلوسایتومترها می‌توانند الگوهای انتشار نور در طیف مرئی در محدوده ۳۵۰ الی ۸۰۰ نانومتر را ثبت کنند. اگرچه دستگاه فلوسایتومتر قادر به ثبت محدوده خارج از طیف الکترومغناطیس است اما استفاده از طول موج‌هایی با انرژی بالاتر(اشعه گاما و اشعه X) سبب شکست پیوند کوالان در سیستم زیستی می‌شود و امواج با انرژی کمتر (مایکروویو و امواج رادیویی) نشر فلورسانس کافی تولید نمی‌کنند [۱۲ و ۱۳].

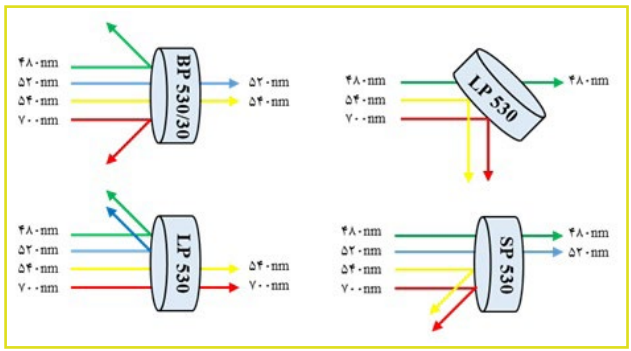
در نهایت، پراکندگی‌های نوری FSC و SSC و همچنین نشر فلورسانس که پس از برخورد نور لیزر به یک سلول ایجاد می‌شود با استفاده از فیلترها به‌صورت اختصاصی دریافت و از هم تفکیک می‌شوند.

فیلترها

پراکندگی نور و نشر فلورسانس ایجاد شده از هر سلول از طریق مجموعه‌ای از فیلترهای نوری تفکیک شده و به آشکارسازها منتقل می‌شوند. هر یک از فیلترها به‌صورت انتخابی دامنه مشخصی از طیف مرئی را از خود عبور می‌دهد. بنابراین، به هر فیلتر یک عدد اختصاص می‌یابد که بیانگر محدوده طول موجی است که از آن فیلتر عبور می‌کند. به‌طور کلی پنج نوع فیلتر در فلوسایتومترها مورد استفاده قرار می‌گیرد.

فیلترهای بندپس[18] که به اختصار BP نامیده شده و طول موج‌های محدوده مشخصی را عبور می‌دهند. به‌عنوان مثال، فیلتر BP530/30 که تنها طول موج‌هایی در محدوده ۵۱۵ الی ۵۴۵ نانومتر (۵۳۰±۱۵ nm) را از خود عبور می‌دهد. این نوع از فیلترها رایج‌تر هستند. فیلترهای لانگ‌پس[19] که به اختصار LP نامیده می‌شوند، طول موج‌های مساوی و یا بلندتر از طول موج مورد نظر را عبور می‌دهند. فیلترهای شورت‌پس[20] که به اختصار SP نامیده شده و طول موج‌های مساوی یا کوتاه‌تر از طول موج مورد نظر را عبور می‌دهند. به‌عنوان مثال، فیلتر LP۵۳۰ که طول موج‌های ۵۳۰ و بالاتر و فیلتر SP۵۳۰ که طول موج‌های ۵۳۰ و پایین‌تر از آن را از خود عبور می‌دهند.

آینه‌های دیکوروئیک[21] یا بازتابنده[22] نوعی فیلتر آینه‌ای بسیار دقیق هستند که با زاویه ۴۵ درجه نسبت به پرتوهای نوری قرار می‌گیرند. بخش کوچکی از پرتوهای نوری رسیده به هر آینه با توجه به محدوده طول موج مربوطه از آن عبور و مابقی عمود بر آینه بعدی منعکس می‌شود. آینه بعدی نیز پرتوهای نوری مربوط به طول موج خود را عبور داده و باقیمانده را به آینه بعدی منعکس می‌کند. به این ترتیب، یک دسته پرتو که مخلوطی از طول موج‌های متفاوت است، به تدریج به طول موج‌های مختلف تفکیک می‌شوند [۱۱ و ۱۳] (شکل (۴)).



شکل (۴): نمایی از فیلترهای فلوسایتومتری.

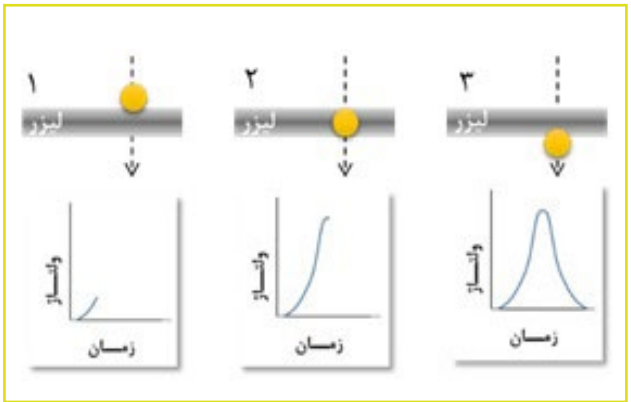
فیلترهای چگالی خنثی[23] نیز با انعکاس یا جذب بخشی از پرتوهای نوری در هر طول موجی از شدت آن کاسته و آن را متعادل می‌کند. در مقابل هر فیلتر یک آشکارساز قرار گرفته که پرتوهای نوری عبور یافته از آن فیلتر را دریافت می‌کند.

پردازشگر

دستگاه‌های فلوسایتومتر قادرند بدون محدودیت، داده‌های فراوانی را در زمانی اندک جمع‌آوری کنند. دریافت و ثبت حداقل ۱۱ داده مربوط به نشر فلورسانس و ۲ داده مربوط به FSC و SSC، از هزاران سلول در مدت یک ثانیه و ترسیم نمودار حاصل از این داده‌ها رایج است [۱۴]. داده‌های فلوسایتومتری در ابتدا پرتوهای نوری منتشر شده از یک سلول است که باید به شکلی مناسب به‌منظور نمایش در بخش نرم‌افزاری تبدیل شود. پردازشگر این کار را انجام می‌دهد. پردازشگر شامل آشکارسازها و مبدل است. آشکارسازها سیگنال‌های نوری را به جریان الکتریکی و مبدل این جریان الکتریکی را به داده

دیجیتال تبدیل می‌کند. داده دیجیتال شکل مناسبی از داده برای نمایش در بخش نرم‌افزاری است.

آشکارسازها نقش مهمی در پردازش داده ایفا می‌کنند. پرتوهای نوری حاصل از یک سلول پس از عبور از فیلترها به شکل تفکیک شده روی هر آشکارساز منعکس و در آن آشکارساز جریانی از الکترون‌ها را ایجاد می‌کند. دو نوع آشکارساز با نام دیودهای نوری[۲۴] و لوله‌های تشدید کننده نوری[۲۵] براساس میزان حساسیتی که دارند مورد استفاده قرار می‌گیرند. اگرچه PD مبدلی کارآمد در تبدیل پرتوهای نوری به جریان الکترون شناخته می‌شوند اما آشکارسازهای PMT در مقایسه با PD حساسیت بیشتری دارند. به همین علت، PD در تشخیص سیگنال‌های نوری قوی ایجاد شده از FSC بکار می‌رود در حالی که PMT معمولا سیگنال‌های نوری ضعیف ایجاد شده توسط SSC و نشر فلورسانس را تشخیص می‌دهد. سیگنال‌های نوری دریافت شده توسط PMT یا PD، براساس شدت‌شان تبدیل به تعداد مناسبی از الکترون‌ها شده تا جریان الکتریکی ایجاد شود. جریان الکترون ایجاد شده با استفاده از آشکارسازها در واقع یک سیگنال آنالوگ است که به یک تشدید کننده هدایت و در آنجا تبدیل به یک پالس الکتریکی قوی‌تر یا ولتاژ می‌شود. بیشینه مقدار سیگنال نوری (پراکندگی نور یا نشر فلورسانس) زمانی به دست می‌آید که یک سلول در مرکز نور لیزر قرار گیرد. زمانی که این سلول منبع نور را ترک می‌کند پالس الکتریکی دوباره به سطح پایه باز می‌گردد (شکل (۵)). سیگنال آنالوگ حاصل به‌منظور پردازش با کامپیوتر، ابتدا با یک مبدل آنالوگ به دیجیتال[۲۶] تبدیل به یک سیگنال دیجیتال شده و سپس یک داده دیجیتال ایجاد می‌کند که در نمودارهای نقطه‌ای[۲۷] یا هیستوگرام‌ها[۲۸] نمایش داده می‌شود [۱۵].



شکل (۵): مقدار پالس الکتریکی (ولتاژ) در مراحل مختلف عبور سلول از مقابل نور لیزر.

دو نوع تشدید کننده، خطی[۲۹] و لگاریتمی[۳۰] وجود دارد. اگرچه داده حاصل از این دو نوع تشدید کننده یکسان است، اما با توجه به رویکرد مورد استفاده در تبدیل سیگنال آنالوگ به داده دیجیتال، توزیع داده متفاوتی دارند. همچنین دامنه دینامیک عامل مهم دیگری در انتخاب تشدید کننده‌های خطی یا لگاریتمی است. دامنه دینامیک حداقل و حداکثر سیگنال قابل تشخیص است. در مواردی نظیر بررسی محتوای DNA طی سیکل سلولی، دامنه دینامیک محدودی مورد نیاز بوده (اختلاف تنها دو برابری در مقدار DNA) و تشدید کننده‌های خطی مناسب‌ترند در حالی که تشدید کننده‌های لگاریتمی در مواردی نظیر بیان مارکرهای سطحی که نیازمند دامنه دینامیکی وسیع است (اختلاف بیان ۱۰۰ تا ۱۰۰۰۰ برابری بین سلول‌ها) کاربرد دارند [۱۶].

به‌طور کلی، طول موج عبوری از فیلتر مطابق با طول موج منتشر شده از رنگ فلورسانس است. به‌عنوان مثال، رنگ FITC پس از تهییج با لیزر آبی (۴۸۸ نانومتر) بازنشر فلورسانس با پیک ۵۱۹ نانومتر دارد که به خوبی از فیلتر BP530/30 (دامنه ۵۱۵-۵۴۵ نانومتر) عبور کرده و روی آشکارساز مقابل این فیلتر منعکس می‌شود. با توجه به اینکه هر رنگ فلورسانس به شکل کنژوگه با آنتی‌بادی، مختص یک آنتی‌ژن سلولی است، بنابراین در یک آزمایش مشخص، داده‌های حاصل از هر آشکارساز مربوط به یک رنگ فلورسانس و نماینده حضور یک آنتی‌ژن است.

بخش نرم‌افزاری

پس از آنکه پراکندگی نور و نشر فلورسانس توسط سیستم اپتیکی و شناساگرها به سیگنال الکتریکی تبدیل شد، اطلاعات به داده دیجیتال تبدیل شده و کامپیوتر می‌تواند آنها را تفسیر نماید. داده‌های مربوط به هر سلول شامل FSC، SSC و نشر فلورسانس، به‌طور مجزا، با عنوان یک رویداد[۳۱] ذخیره شده و براساس متغیرهای تعیین شده از سوی کاربر پردازش می‌شوند. حاصل این پردازش، نمودارهای نقطه‌ای و هیستوگرام‌ها هستند (شکل‌های (۶) و (۷)).

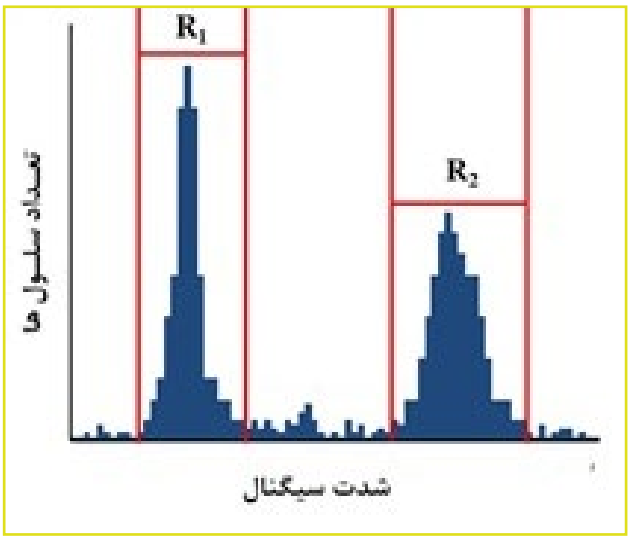
بخش نرم‌افزاری دستگاه فلوسایتومتری اهمیت بالایی دارد چراکه آنالیز داده‌ها برای کاربر به کمک این بخش قابل درک و استخراج می‌شود. اصل اساسی در آنالیز داده‌ها، انتخاب و نمایش جمعیت سلولی مورد نظر و یافتن آن از بین هزاران سلول دیگر است. به فرایند انتخاب یک جمعیت سلولی، گتینگ[۳۲] گفته می‌شود. هر گت[۳۳] بخشی از مساحت سطح یک نمودار را به خود اختصاص داده و در برگیرنده مجموعه‌ای از رویدادهاست که ویژگی پراکندگی نور یا نشر فلورسانس مشابهی داشته‌اند. لذا مطابق با نوع گتینگ، جمعیت یکدستی از سلول‌ها برای آنالیزهای بعدی انتخاب شده و نتایج مربوط به ذرات ناخواسته مانند سلول‌های مرده و قطعات سلولی از حوزه بررسی خارج می‌شود. مثال بسیار کاربردی از گتینگ، بررسی سلول‌های سفید خونی شامل گرانولوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها است که به دلیل ویژگی‌های فیزیکی (اندازه و گرانولیتی) متفاوت‌شان از هم قابل تشخیص هستند. در صورتی که بخواهیم جمعیت لنفوسیت را بررسی کنیم، فرآیند گتینگ براساس اندازه سلول (FSC) روی نمودار FSC در مقابل SSC انجام می‌شود [۱۲] (شکل (۶)).

به طور کلی برای انجام فرآیند گتینگ، دانستن مواردی

نظیر اندازه سلول‌های مورد نظر، مارکرهای سطحی، تغییرات اندازه سلول در شرایط مختلف و داشتن کنترل مثبت ضروری است. بسته به اینکه هدف از آنالیز، بررسی یک آنتی‌ژن و یا بیش از یک آنتی‌ژن باشد، می‌توان به ترتیب از نمودارهای تک عاملی یا دو عاملی استفاده نمود.

■ نمودارهای تک عاملی

در صورتی که سلول‌ها با یک رنگ فلورسانس نشان‌دار شده باشند یا بخواهیم سلول‌ها را از منظر یک آنتی‌ژن بررسی نماییم، از نمودار تک عاملی استفاده می‌کنیم. هیستوگرام، نموداری تک عاملی است که برای نمایش داده‌های مربوط به یک آشکارساز ترسیم می‌شود. محور x شدت سیگنال دریافتی هر رویداد و محور y تعداد رویدادهای خوانش شده را نشان می‌دهد. رویدادهایی با شدت سیگنال مشابه در محل مشخصی از محور x متمرکز شده و به شکل قله، نشان‌دهنده جمعیت سلولی همسان است. فرآیند گتینگ می‌تواند در محدوده جمعیت سلولی همسان انجام شود [۱۲] (شکل (۶)).

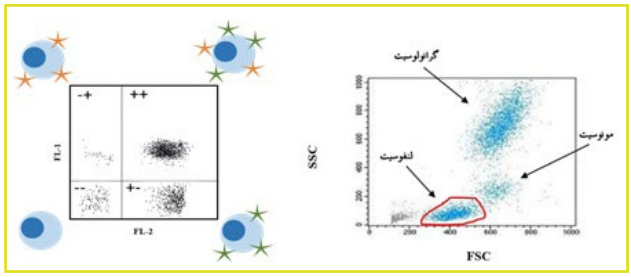


شکل (۶): نمودار هیستوگرام؛ R_1 و R_2 چگونگی گتینگ دو جمعیت سلولی را نشان می‌دهد.

■ نمودارهای دو عاملی

نمودارهای دو عاملی رویکرد دیگری در آنالیز داده‌های فلوسایتومتری هستند. زمانی که هدف از آنالیز، بررسی هم‌زمان دو یا بیشتر آنتی‌ژن باشد از این رویکرد استفاده می‌شود. هر یک از محورهای x و y در این نوع نمودار، شدت سیگنال دریافتی از یک آشکارساز مجزا را نشان می‌دهند. تعداد رویدادها نیز به‌صورت تراکمی از نقاط در سطح نمودار نمایش داده می‌شود. به همین علت به نمودارهای دو عاملی، نمودار نقطه‌ای نیز گفته می‌شود. هر نقطه می‌تواند مربوط به یک رویداد و یا چند رویداد کاملا یکسان باشد. رویدادهایی که از نظر هر دو عامل یکسان باشند در محل مشخصی از سطح نمودار ظاهر شده و نشان‌دهنده جمعیت سلولی همسان است [۱۲] (شکل (۷)).

علامت کوادرانت سطح نمودار نقطه‌ای را به چهار منطقه تقسیم کرده تا جمعیت‌های منفی، تک مثبته و دو مثبته از هم تمیز داده شوند. جمعیت منفی، سلول‌هایی هستند که برای هر دو عامل حداقل شدت سیگنال را ایجاد کرده و جمعیت‌های تک مثبته و دو مثبته به ترتیب برای یکی از دو عامل و هر دو عامل سیگنال قوی ایجاد کرده‌اند. موقعیت هر یک از این جمعیت‌ها در شکل (۷) نشان داده شده‌است.



شکل (۷): نمودار FSC در مقابل SSC سلول‌های سفید خون و گتینگ لنفوسیت‌ها (سمت راست)، موقعیت جمعیت‌های منفی، تک مثبته و دو مثبته با توجه به کوادرانت (سمت چپ).

■ سیستم تقسیم‌بندی الکتریسیته ساکن سلول‌ها

یکی از عملکردهای مهم فلوسایتومتری، توانایی جداکردن و دسته‌بندی یک زیرجمعیت از سلول‌هایی است که با معیارهای متعدد آنالیز شده‌اند. این تفکیک زمانی صورت می‌گیرد که سلول‌ها با فشار از دهانه محفظه‌ای که در آن هستند خارج شوند. زمانی که جریان مایعی با فشار از یک منفذ خارج شود و با فرکانسی مناسب در معرض لرزش قرار گیرد، می‌تواند به یک سری قطرات هم‌شکل شکسته شود. در فلوسایتومتری لرزش محفظه نمونه با استفاده از بلور پیزوالکتریک در یک فرکانس بالا، جریان سیال را به یک سری قطرات هم‌شکل می‌شکند. این قطرات به حدی ریز هستند که هر یک می‌توانند تنها حاوی یک سلول باشد. بدین ترتیب سلول‌هایی که در طول دستگاه حرکت می‌کنند، به شکل قطرات ریزی از هم مجزا می‌شوند. زمانی که کامپیوتر، سلولی را شناسایی کند که با عوامل تعیین شده توسط اپراتور مطابقت دارد، یک شارژ الکتریکی روی آن قطره اعمال می‌شود. منفی یا مثبت بودن این شارژ الکتریکی براساس معیارهای خاصی تعیین می‌شود. قطرات باردار در اثر میدان الکتریکی به سمت چپ یا راست منحرف شده و بدین ترتیب از هم تفکیک می‌شوند. جمعیت‌های به شدت خالص سلولی با سرعت نسبتا بالایی دسته‌بندی می‌شوند (شکل (۶)). اخیرا دستگاه BD سیستم جدیدی را به خدمت گرفته که در آن سلول‌ها با یک تونل گیرنده چرخان[۳۴] از جریان مایع برداشت می‌شوند. با این فناوری تا ۳۰۰ سلول در ثانیه تفکیک می‌شوند. این فناوری وابسته به تشکیل ذرات نبوده و در یک محیط بسته انجام می‌شود. بنابراین، آئروسلی تولید نشده و خطر ناشی از نمونه‌های زیستی را رفع می‌کند.

نتیجه گیری

فناوری فلوسایتومتری تاثیر زیادی در روند توسعه حوزه های مختلف علوم زیستی و پزشکی داشته است. فناوری‌های کمی وجود دارد که بتواند با مقدار کم و در بازه زمانی کوتاه، عوامل متعددی از یک نمونه را ارزیابی کند. اساس کار فلوسایتومتری یعنی ارزیابی تک تک سلول‌ها یا ذرات عبور یافته از مقابل منبع نور لیزر و سپس ایجاد و آنالیز یک مجموعه داده بسیار مرتبط به هم علاوه بر این، توانایی جدا کردن فیزیکی بخشی از جمعیت سلولی در این فناوری منحصر به فرد است. فلوسایتومتری دارای کاربردهای متنوع در حوزه‌های مختلف نظیر علوم بالینی، زیست شناسی سلولی، میکروبیولوژی، علوم گیاهی و جانوری، صنعت داروسازی، بیولوژی تولید مثل و غیره است. روش‌های عملی در هر یک از این حوزه‌ها با توجه به اهداف کاربردی توسعه یافته‌اند.

پی‌نوشت

۱. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی دزفول
۲. دانشجوی دکترای تخصصی میکروبیولوژی، پارک علم و فناوری یزد (شرکت آرا پژوهان امین یزد)
۳. کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی دزفول
۴. دکتری تخصصی نانوفناوری پزشکی، مرکز تحقیقات ریزفناوری زیستی، پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی- ابن سینا
۵. عضو کارگروه زیست فناوری

6. Forward Scatter (FSC) or Forward Angle Light Scatter (FALS)
7. Side Scatter (SSC) or Right Angle Light Scatter (RALS)
8. Fluorescent Activated Cell Sorter (FACS)
9. Wast
10. Flow Chamber
11. Flow cell
12. Nozzle tip
13. Bench top cytometer
14. Stream-in-air
15. Sheath Fluid
16. Detector
17. Fluorescein isothiocyanate (FITC)
18. Bandpass
19. Longpass
20. Shortpass
21. Dichroic mirrors
22. Reflective
23. Neutral Density filters (ND)
24. Photodiode (PDs)
25. Photomultiplier Tubes (PMTs)
26. Analog to Digital converter
27. Dot plot
28. Histogram
29. Linear
30. Logarithmic
31. Event
32. gating
33. gate
34. rotating catcher tube

مراجع

[1] Mohammadsadeghi SM, A., Zahedi, S., Rostami, A., Kazemi, H. Tehran. Mirmah., Introduction to flow cytometry, general principles and methods. Tehran: Mirmah; 2013. 56 p.

[2] Wilkerson MJ. Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. Veterinary Clinics: Small Animal Practice. 2012;42(1):53-71.

[3] Díaz M, Herrero M, García LA, Quirós C. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. Biochemical engineering journal. 2010;48(3):385-407.

[4] Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. Blood, The Journal of the American Society of Hematology. 1997;90(8):2863-92.

[5] Landay A, Ohlsson-Wilhelm B, Giorgi JV. Application of flow cytometry to the study of HIV infection. Aids. 1990;4(6):479-98.

[6] Tiersch TR, Chandler RW, Wachtel SS, Elias S. Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content. Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology. 1989;10(6):706-10.

[7] Dolezel J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. Journal of applied Genetics. 1997;38(3).

[8] Macey MG. Principles of flow cytometry. Flow Cytometry: Springer; 2007. p. 1-1.5

[9] Shapiro HM, Telford WG. Lasers for flow cytometry: current and future trends. Current protocols in cytometry. 2018;83(1):1.9. 1-.9. 21.

[10] Derakhshannia E. Principles of flowcytometry. Laboratory diagnosis. 2018;152:30-5.

[11] Zarkesh Esfahani SH, Etemadifar, Z. Principles of flow cytometry and its application in life sciences2013.

[12] Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. Critical reviews in biotechnology. 2017;37(2):163-76.

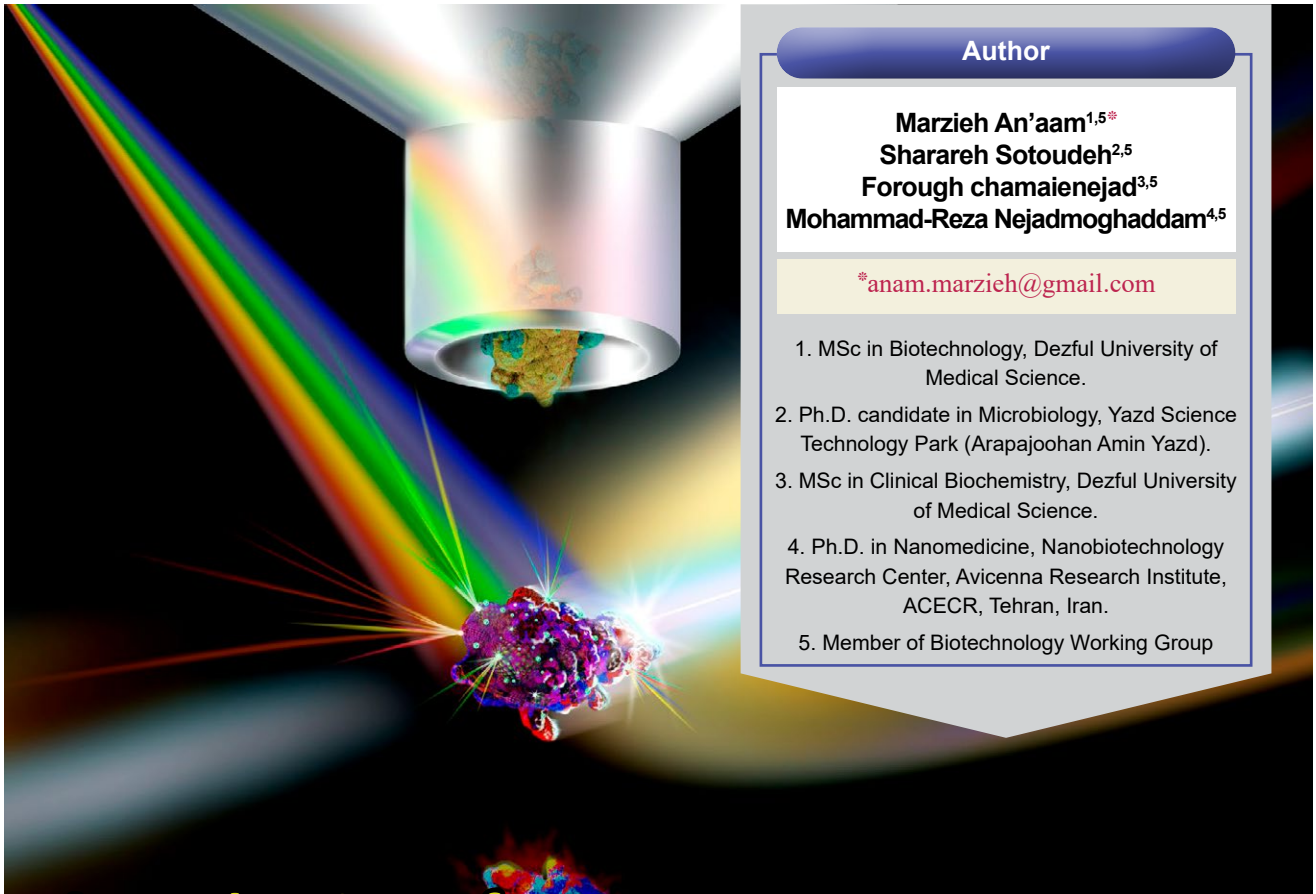
[13] Flores-Gonzalez J, Cancino-Díaz JC, Chavez-Galan L. Flow cytometry: From experimental design to its application in the diagnosis and monitoring of respiratory diseases. International Journal of Molecular Sciences. 2020;21(22):8830.

[14] De Rosa S, Roederer M. Eleven-color flow cytometry. A powerful tool for elucidation of the complex immune system. Clinics in laboratory medicine. 2001;21(4):697-712, vii.

[15] Snow CK. Flow cytometer electronics. Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology. 2004;57(2):63-9.

[16] Giesecke C, Feher K, von Volkmann K, Kirsch J, Radbruch A, Kaiser T. Determination of background, signal-to-noise, and dynamic range of a flow cytometer: a novel practical method for instrument characterization and standardization. Cytometry Part A. 2017;91(11):1104-14.

No.34 ■ Summer 2021 ■ Issue 2 ■ Volume 9
Iranian Journal of Laboratory Knowledge



Author

Marzieh An'aam[1,5*]
Sharareh Sotoudeh[2,5]
Forough chamaienejad[3,5]
Mohammad-Reza Nejadmoghaddam[4,5]

*anam.marzieh@gmail.com

1. MSc in Biotechnology, Dezful University of Medical Science.
2. Ph.D. candidate in Microbiology, Yazd Science Technology Park (Arapajoohan Amin Yazd).
3. MSc in Clinical Biochemistry, Dezful University of Medical Science.
4. Ph.D. in Nanomedicine, Nanobiotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran.
5. Member of Biotechnology Working Group

Introduction of flow cytometric analysis method

Part 1: principle and components of the flow cytometer

Abstract

Flowcytometery is an efficient technique in cytology that is capable of simultaneously measuring and analyzing multiple physical properties such as size and granularity of a single cell or any other soluble particle. In addition, the efficiency of this technique depends on the light scattered features of fluorescence dyes or conjugated monoclonal antibody fluorescence that bind to the target molecule on surface or inside the cell.

The flowcytometer components, including fluidics system, optics (laser and filters), signal processor, software and electrostatic cell sorting, together provide a powerful tool for accurate analysis of complex cell populations in a short time. Since this technique is widely used in various fields such as medical diagnosis, immunology, pathology, molecular biology, plant science, microbiology, etc., it is important to understand the components and function of flow cytometry.

Keywords

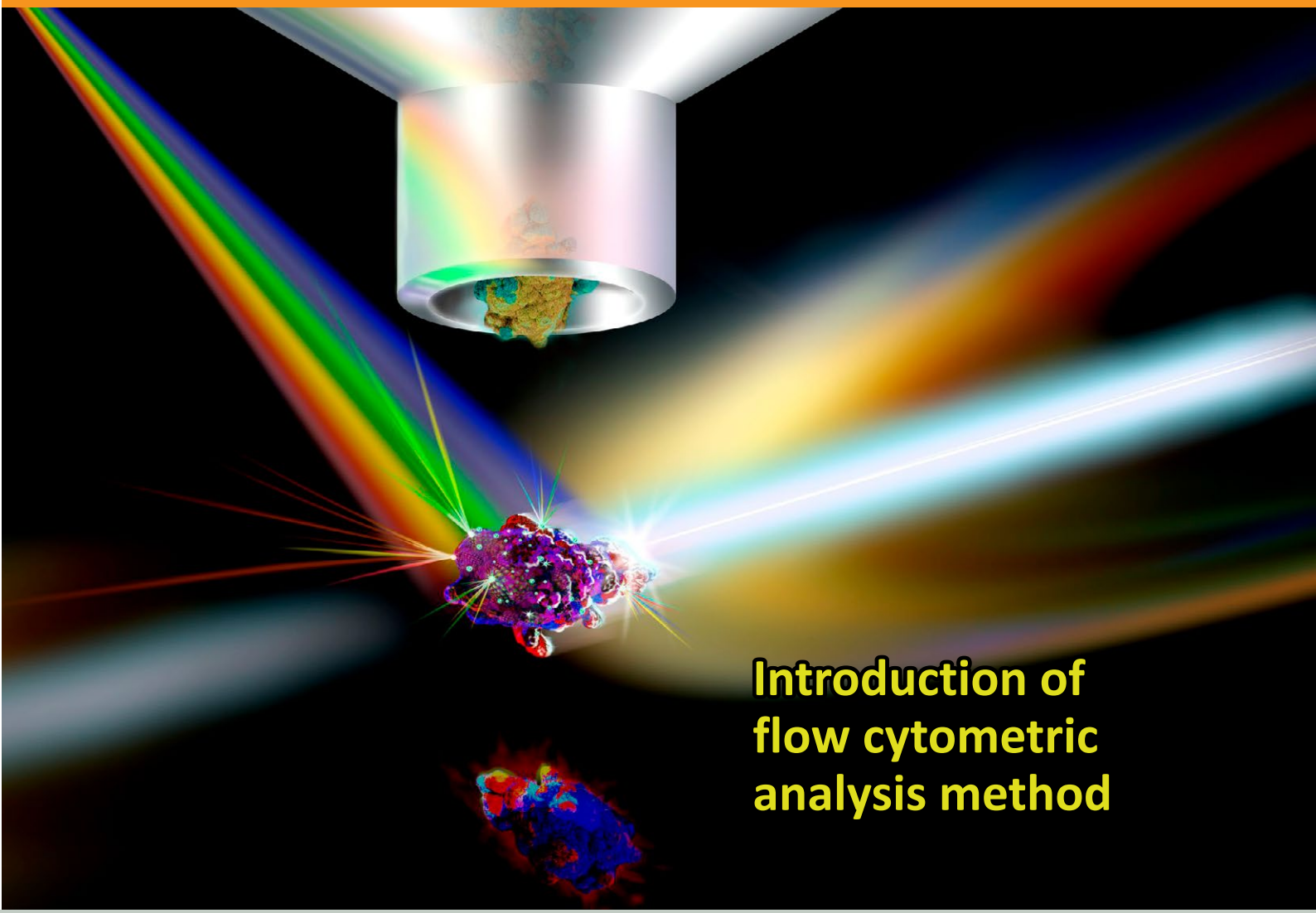
Flowcytometer, Cell, Size, Granularity, Fluorescence dye

Iran Nanotechnology Laboratory Network

Iranian Journal of Laboratory Knowledge

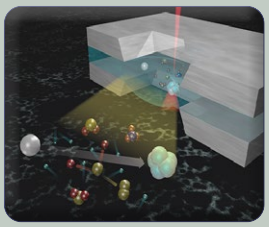
ISSN 2538-3450

Volume 9 ▪ Issue 2 ▪ Summer 2021 ▪ No.34



Introduction of Real-time PCR method

Separation and identification of essential oil and triglyceride fatty acidsIn Teucrium polium plant by gas chromatography mass spectrometry method.



An introduction to In-situ Environmental Transmission Electron Microscopy equipped with a liquid cell

Introduction to fretting fatigue or fatigue-wear testing of materials under bending cyclic loading

New Applications of Nuclear Magnetic Resonance

www.IJLK.ir
info@ijlk.ir