

فلوسایتومتری

فلوسایتومتر دستگاهی است که خصوصیات سلول را همانطور که در حال جریان درون یک مایع است، اندازه گیری می کند. نام دیگر روش فلوسایتومتری FACS است (Felocent Activated Cell Sorting) در واقع سلول هایی که با ماده ی فلورسنت نشاندار شده اند، دستگاه آن ها را اسکن می کند.

مزایای روش فلوسایتومتری

1- بررسی چندین خاصیت سلول بطور همزمان. (سایز، گراندولوسیتی...)

2- اگر دستگاه به sorter مجهز باشد میتوان سلول های مورد نظر را از هم جدا کرد.

3- در مدت زمان کوتاهی می توان بسیاری از خصوصیات سلول را بررسی کرد.

اصل فلو سایتومتری بر اساس فلورسنت است . به سلول نشاندار به ماده ی فلورسنت پرتو تابانده می شود و پرتوی بازتابی از سلول اندازه گیری می شود(مانند میکروسکوپ فلورسنت).

اما فلوسایتومتری نسبت به میکروسکوپ فلورسنت محاسنی دارد از جمله اینکه خود دستگاه اطلاعات آماری می دهد، سلول ها شمارش می شوند ، می توان سلول زنده را بررسی کرد ، در مدت زمان کوتاهی می توان اطلاعات مورد نظر را بدست آورد، در مورد بررسی میزان بیان یک مارکر (کم یا زیاد بودن آن در هر سلول) در میکروسکوپ فلورسنت به صورت کیفی(+ +++) بیان میشود اما اختلافات کوچک فلورسنت در دستگاه فلوسایتومتر به طور دقیق به صورت عددی نشان داده می شود. و اینکه میکروسکوپ فلورسنت user develope است و به تشخیص فرد کاربر بستگی دارد.

ماده ی فلورسنت در یک محلول موجب تحریک می شود و بعد از تحریک، نوری با طول موج متفاوت از خود ساطع می کند. تحریک با نور موجب افزایش انرژی الکترون و رفتن به مدار بالا میشود، الکترون دربرگشت به مدار پایین باعث ساطع شدن رنگ خاصی می شود.

از جمله رنگ های فلورسنت می توان به FITC و PE اشاره نمود.

هر کدام از این مواد فلورسنت، رنگ خاصی ساطع می کنند و توسط فیلتر های خاصی detect می شوند

کاربردهای فلوسایتومتری

1- ساده ترین و فراوانترین کاری که می توان با فلوسایتومتری انجام داد تشخیص فنوتیپ سلول با استفاده از مارکر های سطح سلولی است. علاوه بر بیان یک مارکر میزان بیان آن مارکر را نیز می توان تعیین کرد.

2- اندازه گیری بیان یک ماده در سلول مثل IL-12 در درون سلول.

برای تعیین میزان اینترلوکین با روش الایزا ، تنها می توان میزان آن را در سوپرناتانت محیط کشت اندازه گرفت و دیگر نمی توان تعیین کرد که کدام یک از رده های سلولی میزان بیشتر و کدام رده میزان کمتری تولید کرده اند . اما با روش فلوسایتومتری ، اگر از فلو دو رنگ استفاده کنیم (یک انتی بادی علیه CD4 و یکی علیه IL-17) می توان تعیین کرد که کدام رده ی سلولی بیشتر و کدام میزان کمتری اینترلوکین تولید کرده اند.

3- با کمک فلوسایتومتری می توان سیکل سلول و میزان تکثیر سلولی را نیز اندازه گرفت. (چون در طی تکثیر سلولی میزان DNA زیاد می شود .

چندین رنگ فلور سنت وجود دارند که قابلیت اتصال به DNA را دارند. مهمترین آن ها که کاربرد گسترده ای دارد پروپیدیوم یدید است (PI) . PI در بین زنجیره های دو رشته ای اسید نوکلئیک قرار می گیرد و توسط لیزر آرگون در طول موج 488 nm تحریک می شود و نور فلورسانس قرمز را از خود پراکنده می سازد و چون از ورود این رنگ توسط سلول های زنده به داخل جلوگیری می شود ، یک راه تشخیص سلول های زنده از مرده ، استفاده از همین نوع رنگ است.

4- میزان RNA : محتوای DNA و RNA را می توان به طور هم زمان در سلول هایی که نفوذ پذیر شده اندبا نشان دار کردن آن ها به وسیله ی آکریدین نارنجی (AO) اندازه گیری نمود.

5- میزان پروتئین : با استفاده از آنتی بادی های اختصاصی نشان دار میتوان پروتئین مورد نظر را اندازه گیری کرد. محتوای کل پروتئین سلول را می توان با رنگامیزی سلول های فیکس شده تخمین زد. این رنگها می تواند SulfoRodamin 110 ویا FITC باشند.

6- تعیین فعالیت آنزیم های درون سلولی: یکی از کاربردهای فلوسایتومتری تعیین کینتیک آنزیم های داخل سلولی است. مثلا برای تعیین فعالیت پروتئاز ، رودامین به سوبسترهای پپتید های مختلف می چسبد که با فعالیت پروتئازی این رودامین آزاد می شود و از این طریق می توان فعالیت پروتئازی را اندازه گرفت.

7-قابلیت نفوذپذیری غشا: تغییرات نفوذپذیری غشا را می توان با استفاده از رنگ های که به DNA متصل می شوند بررسی نمود کث اتیدیوم بروماید EB ، SYTO ،PI ،Yo-PRO و بعضی از این رنگ ها در سلول سالم و دست نخورده به علت فعالیت غشای سلولی نمی توانند وارد شوند که در صورت ورود به سلول نشان دهنده ی افزایش قابلیت نفوذ غشا هستند.

از دیگر کاربرد های فلوسایتومتری مطالعه ی اکسیداتیوهای داخل سلولی و سنجش PH داخل سلولی و آنالیز و جداسازی کروموزوم ها ، مرگ برنامه ریزی شده ی سلول ، تشخیص تومور، کنترل پیوند اعضا، تشخیص باکتری، شناسایی اسپور قارچ/پروتوزوئرها/ ویروس / آزمون اثر داروها، میکربیولوژی موادغذایی، داروسازی، تعیین جنسیت سلول است.

کلینیک مجازی ژنتیک پزشکی