

آماده سازی سلول برای فلوسیتومتری

مانند سلول های چسبنده از کشت بافت، مغز استخوان و بافت لنفاوی، به خوبی عمل می کند.

در جداسازی مکانیکی، بافت خرد شده در یک سوسپانسیون به طور مکرر از طریق یک سوزن ریز سنجنده عبور داده می شود. در صورت لزوم، این کار می تواند با آسیاب کردن انجام شود.

بافت همچنین می تواند توسط آنزیم ها جداسازی شود. در جداسازی آنزیمی، آنزیم ها برهمکنش های بین پروتئین ها و ماتریکس خارج سلولی که سلول ها را در کنار هم نگه می دارد، مختل می کنند.

آنزیم ها بر اساس عواملی مانند pH، دما و سایر کوفاکتورها انتخاب می شوند که همگی بر عملکرد آنزیم ها تأثیر می گذارند.

رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس مستقیم و غیرمستقیم تکنیک های رنگ آمیزی مختلفی برای فلوسایتومتری وجود دارد. از جمله این تکنیک ها، رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس است که می تواند مستقیم یا غیرمستقیم باشد. رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس مستقیم شامل تیمار سلول ها با یک آنتی بادی نشاندار شده با فلورسانس است. رنگ آمیزی غیرمستقیم گاهی اوقات تکنیک ساندویچ نامیده می شود، که در آن معرف اولیه نشاندار نمی شود، بلکه توسط یک معرف ثانویه که با فلوروکروم نشاندار شده است، شناسایی می شود. این ها هر دو می توانند آنتی بادی باشند، که در آن آنتی بادی ثانویه برای آنتی بادی اولیه اختصاصیت دارد.

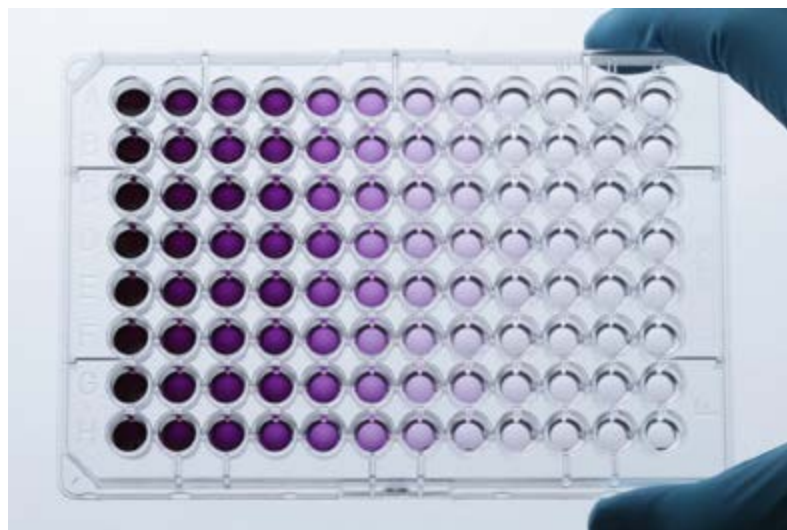
به طور کلی، رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس آسان است، اما اختصاصیت و شدت اتصال می تواند تحت تأثیر عوامل مختلفی قرار گیرد.

فلوسیتومتری یک تکنیک رایج است که برای اندازه گیری بیان مولکول ها، شناسایی سلول ها و تجزیه و تحلیل اندازه و حجم سلول استفاده می شود. این روش معمولاً شامل برچسب گذاری سلول ها با آنتی بادی ها یا لیگندهای فلورسنت است که به اهداف خاص در سلول مورد نظر متصل می شوند.

انواع نمونه ها

ساده ترین نمونه هایی که برای فلوسایتومتری آماده می شوند، سلول های کشت معلق، میکروارگانیسم های موجود در آب، باکتری ها و مخمرها هستند. استفاده از خون کامل نیز نسبتاً آسان است، زیرا گلبول های قرمز خون را می توان با لیز حذف کرد و سپس انواع گلبول های سفید خون را می توان شناسایی کرد.

سلول های منفرد برای فلوسایتومتری باید از بافت های جامد تولید شوند. این کار با جداسازی بافت انجام می شود. جداسازی مکانیکی برای بافت هایی که پیوند سستی دارند،



رنگ آمیزی تک سلولی

رنگ آمیزی تک سلولی تکنیکی است که برای تشخیص آنتی ژن های سطحی استفاده می شود. بافت لنفاوی یا خون محیطی نمونه هایی از سوسپانسیون های تک سلولی هستند که می توان از آنها استفاده کرد.

در این روش، سلول ها در لوله ها یا صفحات میکروتیتر (صفحات مسطح با چاهک های زیاد که می توانند برای نگهداری محلول ها استفاده شوند) با آنتی بادی ها انکوبه می شوند. آنتی بادی ها می توانند بدون برچسب یا با فلورسانس برچسب گذاری شوند. سپس

سلول ها با محلول بافر شسته می شوند تا آنتی بادی هایی که به سلول ها متصل نشده اند، حذف شوند.

سوسپانسیون تک سلولی همچنین می تواند برای تشخیص آنتی ژن های درون سلولی استفاده شود. این امر مستلزم آن است که غشای پلاسمایی به رنگ ها یا آنتی بادی ها اجازه عبور از طریق سوسپانسیون های تک سلولی ثابت و نفوذپذیر را بدهد. این روش می تواند محتوای DNA سلولی را به طور دقیق اندازه گیری کند.

علاوه بر این، میزان از دست دادن سلول کم است، به این معنی که می توان آن را فقط روی چند سلول انجام داد.

پروتکل های آماده سازی سلول ها برای فلوسایتومتری سوسپانسیون تک سلولی را می توان برای تشخیص آنتی ژن هایی که از نظر حساسیت به دنا تورا سیون یا نحوه اتصال آنتی بادی به آنتی ژن پس از نفوذپذیری سلول کمی متفاوت هستند، اصلاح کرد.

آنتی ژن های داخلی و سطحی یک سلول را می توان همزمان با رنگ آمیزی سطح سلول برای بیان آنتی ژن و همچنین درون سلولی برای بیان آنتی ژن اندازه گیری کرد. با این حال، نوع برچسب گذاری آنتی بادی مهم است، زیرا برخی از آنها، مانند فلورسانس پروتئین کلرو فیل پریدینین (PerCP)، پس از نفوذپذیری از بین می روند.

رنگ آمیزی سلول های غیر زنده

سلول های غیر زنده، سلول های مرده هستند و بنابراین یکپارچگی غشای خود را از دست داده اند. این بدان معناست

که نمی توان از آنها در آماده سازی های سلولی ثابت یا نفوذپذیر استفاده کرد. ۷-آمینو اکتینومایسین D یا AAD-۷ در اینجا قابل استفاده است. AAD-۷ فلورسنت می تواند به DNA متصل شود، اما این اتصال می تواند با افزودن اکتینومایسین D یا AD که فلورسنت نیست، مسدود شود.

سلول های کشت بافت

تهیه سلول ها از کشت بافت عموماً آسان تر از سوسپانسیون های تک سلولی است. سلول هایی که در سوسپانسیون رشد می کنند را می توان به تدریج در یک لوله سانتریفیوژ ریخت، سانتریفیوژ کرد و در بافر رنگ آمیزی فلوسایتومتری دوباره معلق کرد.

رده های سلولی چسبنده ابتدا باید جدا شوند. پس از جدا شدن، توده های باقی مانده باید جدا شوند. سپس می توان آنها را سانتریفیوژ کرد و در بافر رنگ آمیزی فلوسایتومتری دوباره معلق کرد و برای فلوسایتومتری استفاده کرد.

منبع:

This is a translation into Farsi of an article originally published in English :Ryding ,Sara". Cell Preparation for Flow Cytometry. "News-Medical. <https://www.news-medical.net/life-sciences/Cell-Preparation-for-Flow-Cytometry.aspx> ,Last Updated :Oct.2018 ,23