مهندس نیلوفر حسن

مروری بر دستگاه کمی لومینسانس و روش الکتروکمی لومینسانس

لغت کمی لومینسانس(Chemi Luminescence) همانطور که از اسمش مشخص است "پرتاب نور طی واکنش های شیمیایی" است. شدت این نورها (در اصطلاح علمی: فوتون ها) به قدری ضعیف است که نه تنها نمی توان با چشم غیر مسلح دید بلکه با هر تجهیزاتی نمی توان آن ها را اندازه گیری کرد. بنابرین می توان به این نتیجه رسید که دستگاه کمی لومینسانس دستگاهی بسیار حساس و دقیقی است که می تواند چنین فوتون هایی را اندازه گیری کند.

آزمایشگاه های مدرن با رویکردی به نیازمندی های خود که روز به روز پیچیده تر می شود، برای کسب سرعت، صحت و دقت بیشتر تمایل به استفاده از دستگاه های خودکار به ویژه در بخش های هورمون شناسی و تشخیص ایمنی دارند. با استفاده از امکانات مدرن اتلاف مواد اولیه و انرژی انسانی به حداقل می رسد. علاوه بر آن صحت و دقت و قدرت تکرار پذیری نتایج افزایش می یابد.

به طور کلی الکتروکمی لومینسانس فرآیندی است که با میانجی گری متعددی از جمله ترکیبات روتنیم، اسمیم، رنیم و یا دیگر عناصر شناخته شده رخ می دهد. تمام این مولکول ها برای انجام واکنش نیاز به یک مولکول آمینی دارند که مصرف می شود ولی خودشان دوباره شارژ شده و واکنش تولید نور را ادامه می دهند که این خاصیت تولید سیگنال از یک مولکول را تقویت می کند و به ایجاد حساسیت روش الکتروکمی لومینسانس کمک می کند. نقطه قوت این روش در توانایی در اختیار گرفتن و به عبارت دیگر احاطه داشتن بر زمان و مکان انجام واکنش است.

معرفی روش الکتروکمی لومینسانس

✔ اساس روش الکتروکمی لومینسانس

روش های سنجش مولکول ها در علوم زیستی یکی از مهم ترین شاخه های تحقیقاتی به شمار می آید. گاه نقاط عطفی در این میان پدید می آید و روش جدیدی مطرح می شود و تا رسیدن به نقطه عطف دیگر و روشی تازه، تحقیقات در جهت اصلاح و بهبود روش قبلی ادامه می یابد. بدیهی است که هر روش محاسن و معایب خاص خود را داشته و با توجه به این ویژگی ها، گسترش یافته و یا محدود می شود. گاهی روش های جدید، به الزام جایگزین روش های قبلی نیست، بلکه به موازات آنها از محدودیت های موجود می کاهد.

در ابتدای نیمه دوم قرن بیستم، محصول سیستم ایمنی همورال یعنی آنتی بادی ها یکی از نقاط عطف مورد بحث را به وجود آوردند. آنتی بادی ها با اتصال اختصاصی به مولکولی که بر ضد آن تهیه شده اند، به عنوان ابزاری برای سنجش های اختصاصی و سریع در اختیار محققان قرار گرفتند. روش هایی که از آنتی بادی ها به عنوان شناساگر بهره می گیرند، روش های سنجش ایمنی (Immunoassay) نام دارند.

یکی از انواع طبقه بندی سنجش های ایمنی بر اساس نوع ماده نشاندار بنا شده است. به عنوان مثال Radioimmunoassay، Enzyme immunoassay، Immunofluorescence و ... که در این میان روش سنجش ایمنی رادیواکتیو دارای قدمت بیشتری نسبت به سایر روش ها است.

در روش سنجش ایمنی رادیواکتیو هرکدام از جزو آنتی ژن یا آنتی بادی را می توان با ماده رادیواکتیو

نشاندار ساخت. استفاده از ماده رادیواکتیو به عنوان نشانگر باعث ایجاد معایبی از جمله خطر تشعشع و نیمه عمر کوتاه کیت ها شده است.

روش سنجش ایمنی که بعد از روش رادیواکتیو ابداع شده روش سنجش های ایمنی آنزیمی (ELA) است که مانند روش قبل اساس آنها بر واکنش آنتی ژن– آنتی بادی است، با این تفاوت که جهت ردیابی واکنش مذکور به جای عناصر رادیواکتیو از آنزیم و واکنش آنزیمی استفاده می شود.

تکنولوژی که در سال های اخیر طراحی شده است به نام کمی لومینسانس (CL) یا لومینسانس (L) معروف است که محصول نهایی قابل سنجش آن نور است. کمی لومینسانس به تابش نور از محصول تهییج شده یک واکنش شیمیایی، زمانی که به سطح پایه بر می گردد، اطلاق می شود. مثال بسیار ساده برای این واکنش آتش گرفتن یک چوب کبریت است. در این فرآیند گوگرد در طی یک واکنش شیمیایی، اکسید شده و تولید نور می کند. با تلفیق یک واکنش کمی لومینسانس و یک واکش ایمونولوژیک می توان با اندازه گیری مقدار نور تابش یافته، غلظت مولکول ها را تعیین کرد.

شکل (۱) : شعله چوب کبریت که بیان کننده یک واکنش کمی لومینسانس است

اصول پایه و تعریف کمی لومینسانس

وقتی یک الکترون از سطح تهییج شده یا بالاتر به سطح پایین تر انرژی می رسد و انرژی خود را به صورت نور متصاعد می کند، واکنش را به نام لومینسانس می شناسیم. انواع متعددی از پدیده لومینسانس شناخته شده اند که شامل فلورسانس، فسفرسانس و کمی لومینسانس است . پدیده کمی لومینسانس از سایر پدیده های لومینسانس متفاوت است و در آن واکنش شیمیایی یا الکتروشیمیایی (و نه پدیده فوتولومینسانس) باعث تهییج نمی شود ولی حاصل این تهییج مشابه فلورسنس بوده و در حین بازگشت الکترون به سطح پایه انرژی، نور منتشر می شود.

الکتروکمی لومینسانس نوعی از کمی لومینسانس است که در آن واکنشی که به تولید نور می انجامد با جریان الکتریکی آغاز و با قطع آن خاتمه می یابد و نور تولید شده در این روش تنها در محل الکترود ایجادگر جریان الکتریکی به وجود می آید. کنترل زمان تابش نور، مشکل تداخل بیش از حد نور تابش شده از نمونه های مجاور را رفع می کند و همچنین کنترل محل تابش نور (تنها در سطح الکترود) باعث می شود تا بتوان تمامی نور تولید شده از نمونه را در محلی بسیار نزدیک به دستگاه دتکتور متمرکز کرد. این موضوع، با افزایش نسبت سیگنال به نویز (نور زمینه) دقت را بالا برده و همچنین با تمرکز نور بر سطح دتکتور، حساسیت را تا حد بسیار زیادی افزایش می دهد. در حال حاضر، سایر روش های ایمونواسی فاقد چنین حساسیتی است. همچنین با کنترل محل تابش نور می توان نور تابش یافته از بیش از یک واکنش ایمونولوژیک در یک نمونه را همزمان در محل های مختلف قابل اندازه گیری کرد و بدین ترتیب می توان غلظت چند ماده را در نمونه به صورت همزمان تعیین کرد. از مزایای دیگر این روش امکان انجام آزمایش در زمانی بسیار کوتاه است.

مقایسه فلورسانس و فسفرسانس با کمی لومینسانس

کمی لومینسانس با فلورسانس و فسفرسانس که در آن ها حالت الکترونی تهییج شده محصول واکنش شیمیایی است تا حاصل جذب یک فوتون، فرق دارد. کمی لومینسانس در تضاد با یک واکنش فوتوشیمیایی قرار می گیرد که در آن نور برای هدایت یک واکنش شیمیایی گرماگیر به کار گرفته می شود. در این جا

نور از یک واکنش شیمیایی گرماده به وجود می آید . یک نمونه ی استاندارد از کمی لومینسانس در مجموعه ی آزمایشگاهی تست لومینول است. در این جا، خون به وسیله ی لومینسانس به دنبال تماس با آهن موجود در هموگلوبین، معین می شود. هنگامی که کمی لومینسانس در ارگانیسم های زنده اتفاق می افتد، این پدیده بیو لومینسانس نامیده می شود. یک لایت استیک(light stick) از طریق کمی لومینسانس به انتشار نور می پردازد.

جنبه های کاربردی زیستی کمی لومینسانس

دانشمندان جرم شناسی، از این دستگاه برای حل کردن پرونده های جنایی استفاده می کنند. در این خصوص، آن ها لومینول و پروکسید هیدروژن را به کار می گیرند . آهن خون به عنوان یک کاتالیزور عمل می کند و با لومینول و پروکسید هیدروژن برای تولید نور آبی به مدت ۳۰ ثانیه، واکش نشان می دهد. چون تنها یک مقدار اندک آهن برای عمل کمی لومینسانس نیاز است، مقدار اندکی از خون کافی است .

تفاوت های کمی لومینسانس با الایزاریدر

منطق دستگاه کمی لومینسانس در اندازه گیری غلظت نمونه ها، کاملاً با دستگاه الایزا ریدر متفاوت است. در نتیجه حتماً نمونه ها را با کیت های کمی لومینسانس باید آماده کرد. همچنین تفاوت عمده این دستگاه با دستگاه الایزا ریدر، نداشتن لامپ (منبع نور خارجی) و فیلتر است که به جای این منبع نور، از فوتون های پرتاب شده طی واکنش های شیمیایی استفاده می کند. این دستگاه دارای قطعه ای به نام-PMT(Photo Mul tiplier) است که می تواند این فوتون های ضعیف را اندازه گیری کند. قابل ذکر است که در جهان چندین نوع PMT موجود است که همگی در یک طول موج و برای کارایی خاصی تولید شده اند که همه آن ها برای کمی لومینسانس اصلاً مناسب نیست. بنابراین در خرید این دستگاه دقت کنید که مبنای طراحی بر همان PMT باشد.

در کشورهایی همچون آمریکا، ژاپن و اکثر کشور های اروپایی روش الایزا به طور کامل کنار گذاشته شده و کمتر از این روش استفاده می کنند، اما در ایران این روش هنوز طرفداران خود را دارد. اما چرا جایگاه روش الایزا در دنیا کم رنگ شده است؟چند دلیل عمده برای این سوال وجود دارد:

- پایداری تست های کمی لومینسانس نسبت به الایزا بسیار بالا است.
- زمان انجام تست های کمی لومینسانس بسیار پایین تر از زمان انجام تست الایزا است.
- تکرارپذیری در روش کمی لومینسانس بسیار بالاتر از روش الایزا است.

حساسیت روش الایزا آنقدر نیست که بتواند به تمامی محدوده ها دسترسی داشته باشد در حالیکه در روش کمی لومینسانس به دلیل ماهیت شمارش فوتون های پرتاب شده، می تواند به هر کدام محدوده های جوابدهی دسترسی داشته باشد. به عبارت دیگر رنج دینامیکی خطی کمی لومینسانس در این دستگاه ۱۰ به توان ٦ است ولی جذب نور الایزا بسیار پایین تر است.

باید بدانید که اساس کار کمی لومینسانس بر دو نوع است:

۱) اندازه گیری غلظت به روش آنالوگ

در این روش تمامی فوتون های پرتاب شده از یک نمونه مریض را به صورت یک ولتاژ آنالوگ می سنجد و همان ولتاژ را به غلظت نسبت می دهد. یکی از معایب این روش حساس نبودن به تعداد فوتون های پرتاب شده است یعنی به طور مثال تعداد ۱۰۰۰ عدد فوتون با ۱۰۵٦ فوتون را با یک ولتاژی اندازه گیری می کند. درنتیجه این روش از حساسیت بالایی برخوردار نیست. از مزایا این روش آسان بودن تولید و کالیبراسیون و هزینه نسبتاً پایین آن برای تولید کننده است.

۲) اندازه گیری غلظت بر روش شمارش فوتون(Photon Counting)

در این روش همان طور که از اسمش مشخص است، تک تک فوتون های ساطع شده را با استفاده از

یک تکنولوژی پیشرفته شمارش می کند و این خود مزیت بسیار خوبی بشمار می آید، در نتیجه برخلاف روش قبلی از حساسیت بالایی برخوردار است. یعنی می تواند فرق بین ۱۰۰۰ عدد فوتون و ۱۰۵۶ عدد فوتون را احساس کند. دستگاه LUMEX و همچنین اکثر (نه همه) دستگاه های خارجی از این روش پیروی می کنند و در آینده نیز تمامی تجهیزات به سمت همین روش روی می آورند. از معایب این روش می توان به بالا بودن هزینه و دقت کالیبراسیون برای خود کارخانه تولید کننده است .

اصول روش الکتروکمی لومینسانس (ECL)

الکتروکمی لومینسانس فرآیندی است که با واسطه مولکول های متعددی از جمله ترکیبات روتنیم، اسمیم، رنیم و یا دیگر عناصر شناخته شده رخ می دهد. فرایند الکتروکمی لومینسانس باعث تولید پیش سازهای پایدار در سطح الکترود می شود که محصول نهایی این واکنش تولید نور است.

پایه و اساس ECL در استفاده از کمپلکس روتنیوم تریس و تریپروپیلامین (TPA) است که محصول نهایی به صورت نور قابل اندازه گیری است. آغاز واکنش توسط جریان الکتریکی بوده که در پایان منجر به تولید نور از کمپلکس روتنیوم تریس خواهد شد. در این مرحله ولتاژی الکتریکی به کمپلکس ایمنولوژیک روتنیوم تریس اعمال می شود که این کمپلکس به استرپتوآویدین پوشیده شده در سطح میکروپارتیکل ها متصل شده است. استفاده از واکنش الکتریکی از مزایای این روش است که می توان دقیقاً کل واکنش را تحت کنترل قرار داد.

مزایای استفاده از ECL

الکتروکمی لومینسانس تکنولوژی جدیدی است که دارای مزایای نسبت به تکنیک های تشخیصی دیگر است. از جمله این مزایا می توان به موارد زیر اشاره کرد:

- قابلیت اتوماسیون کامل دستگاه که خطای تکنیکی را کامل حذف می کند.
- دارای معرف غیر ایزوتوپی بسیار پایدار و با کاربرد آسان است.
- حساسیت بالا جهت اندازه گیری آنالیت ها با مقادیر بسیار کم و همچنین در مدت زمان کوتاه
- سنجش با کیفیت بالا
- برگشت سریع و آماده شدن برای سنجش دیگر
- قابلیت تشخیص همه آنالیت ها با استفاده از این تکنیک و در یک نوع فاز جامد (عدم استفاده از چاهک مخصوصی برای هر تست)
- با توجه به عملکرد دستگاه قدرت تکرار پذیری بسیار بالا و کاهش مصرف معرف ها و در نتیجه کاهش هزینه ها و کاهش زمان را می توان از ویژگی های این سیستم بیان کرد

محدودیت های استفاده از ECL

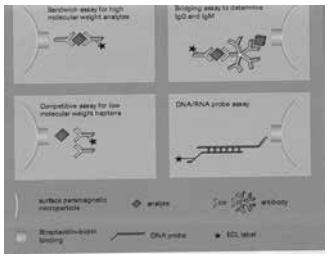
همان طور که قبلاً اشاره شد، هر روشی علاوه بر مزایا دارای معایب و محدودیت هایی نیز است که این محدودیت ها شامل:

- بسته بودن سیستم (در این روش بایستی حتماً از دستگاه و کیت ها و محلول ها و همچنین سر سمپلر و چاهک های مخصوصی استفاده شود که کاملاً انحصاری و در اختیار یک شرکت مشخص است)
- هزینه قابل توجه دستگاه و همچنین کیت ها و محلول های آن

روش انجام تست در ECL

چهار روش در سیستم الکتروکمی لومینسانس وجود دارد:

- روش رقابتی جهت اندازه گیری آنالیت های کوچک
- روش ساندویچ (یک مرحله ای و دو مرحله ای) جهت اندازه گیری آنالیت های بزرگ
- روش پل زدن (Bridging) برای تشخیص آنتی بادی ها
- روش سنجش پروب های نوکلوئیداسید



(شکل ۲)

روش ساندویچی

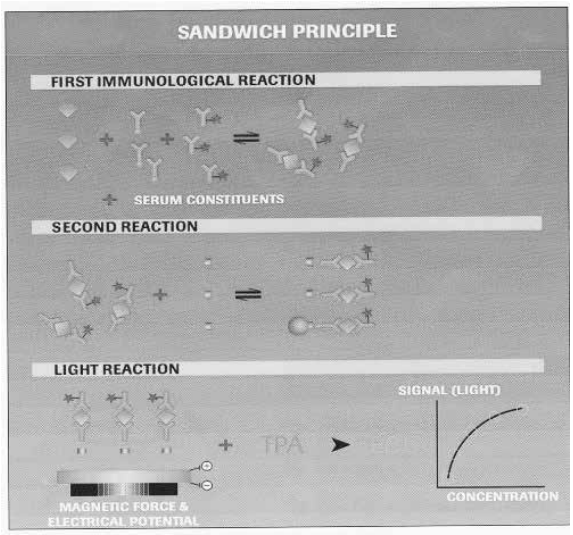
روش ساندویچ برای اندازه گیری آنالیت ها پروتئینی مانند هورمون TSH به کار می رود.

● در مرحله اول نمونه با آنتی بادی بیوتینه TSH و آنتی بادی اختصاصی TSH که با روتنیوم نشاندار شده است مخلوط می شود. در زمان انکوباسیون اول آنتی بادی اختصاصی با TSH موجود در نمونه اتصال پیدا می کند.

● در مرحله دوم استرپتوآویدین متصل به میکروپارتیکل ها اضافه می شود. در انکوباسیون دوم آنتی بادی بیوتینه به استرپتوآویدین که در سطح میکروپارتیکل ها پوشیده شده متصل می شود.

● پس از انکوباسیون دوم مخلوط واکنش شامل کمپلکس ایمنی به سلول اندازه گیری دستگاه ECL منتقل می شود. کمپلکس ایمنی بر روی الکترود مغناطیسی قرار گرفته و نمونه ها و معرف های اضافی توسط محلول شستشو خارج می شود. سپس واکنش الکتروکمی لومینسانس که باعث ایجاد نور می شود در سطح الکترود مغناطیسی انجام می پذیرد.

● در این مرحله میزان نور تولید شده با غلظت TSH موجود در نمونه رابطه مستقیم دارد. ارزیابی و محاسبه غلظت مولکول با استفاده از منحنی کالیبراسیون که آن نیز به واسطه غلظت استانداردها رسم شده است توسط دستگاه به صورت خودکار انجام می شود.



شکل ۳

روش پل زدن (Bridging)

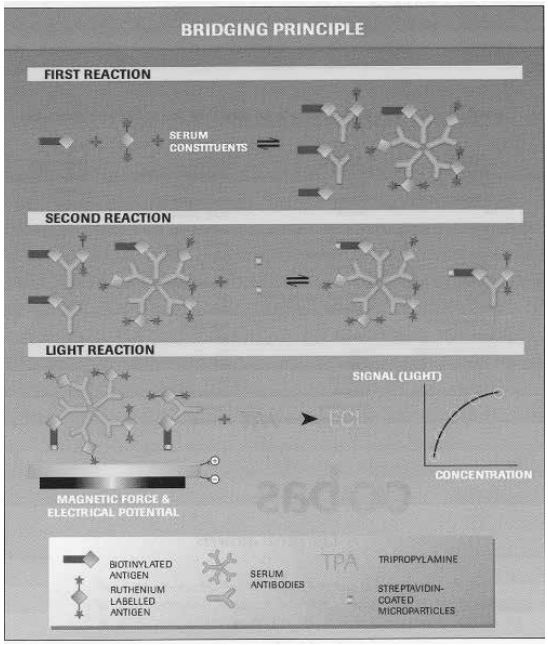
در این روش از دو نوع آنتی ژن کنژوگه شده (کنژوگه با بیوتین و کنژوگه با روتنیوم) استفاده می شود. این روش شبیه به روش ساندویچ بوده با این تفاوت که در این روش آنتی بادی مورد سنجش است(مانند IgG – IgM و IgA)

● در اولین گام، آنتی بادی مورد هدف در سرم به آنتی ژن نشاندار متصل شده و کمپلکس ایمنی تشکیل می دهند.

● در مرحله دوم این کمپلکس ایمنی به استرپتوآویدین پوشیده شده در سطح میکروپلیت ها متصل می شود.

● پس از انکوباسیون دوم مخلوط واکنش شامل کمپلکس ایمنی به سلول اندازه گیری دستگاه ECL منتقل می شود. کمپلکس ایمنی بر روی الکترود مغناطیسی متصل شده و نمونه ها و معرف های اضافی توسط محلول شستشو خارج می شود. سپس واکنش ECL در سطح الکترود که باعث ایجاد نور می شود صورت می پذیرد.

● در این مرحله میزان نور تولید شده با مقدار مولکول موجود در نمونه رابطه مستقیم دارد. در روش ECL ارزیابی و محاسبه غلظت مولکول از طریق منحنی کالیبراسیون انجام شده که آن نیز به واسطه غلظت استانداردها رسم شده است



شکل ٤

نتیجه گیری

روش الکتروکمی لومینسانس را با توجه به مزایایی که قبلاً ذکر شده از جمله دقت، صحت، قابلیت سنجش چند مولکول متفاوت به طور همزمان در نمونه مورد آزمایش، جوابدهی سریع حتی برای تست های فوق تخصصی و عدم اتلاف وقت و در نتیجه رضایت مندی هرچه بیشتر بیماران و پزشکان محترم که هدف تمامی همکاران است را در بر داشته است، می توان روشی در نظر گرفت که نسبت به سایر روش ها برتری دارد. با این روش، کمی لومینسانس نیز یک روش نوین در سنجش مولکول ها است ولی به دلایلی که در این مقاله جایگاه مطرح کردن این بحث نیست، جایگاه خود را به سرعت به الکتروکمی لومینسانس تغییر داده است و چنانچه آزمایشگاهی شرایط انجام تست به روش الکتروکمی را داشته و همچنین کیفیت در پاسخ دهی به بیماران را در سرلوحه عملکرد خود قرار داده باشد، مطمئناً این روش را به سایر روش ها ترجیح خواهد داد.

اصول نگهداری

نگهداری روزانه:

– تمیز کردن پروب نمونه و محلول و مسیر جریان ، بررسی تراکم داخل محفظه

نگهداری هفتگی:

– تمیز کردن پروب جرعه کشی و تمیز کردن انکوباتور

نگهداری هر دو هفته:

– تمیزکردن محل شستشو و تمیز کردن مجرای مایعات

نگهداری در صورت نیاز:

– تعویض دریچه باریک و سلول اندازه گیری–تمیز کردن محفظه آب و محفظه دور ریز و هم زن

کنترل کیفی و کالیبراسیون

برای کالیبراسیون دستگاه از محلول های تجاری آماده شرکت مربوطه استفاده می شود که با عنوان SAP test موجود است. محلول های این دستگاه شامل BCR1,BCR2,Isap است که با دستورالعملی به نام آزمون محیط مصنوعی عملکرد دستگاه را می سنجد.

منابع:

1-http://hnlab.ir/HNLab sectionIntroduction/Hormone-Immunology/Luminescence

2-http://www.parsiantebzaman.com/farsi-ProductChemiTheori.html

3-https://t.me/wwwlabworldir

4-http://novinmedco.ir/LearnDetails.aspx?MSID=36

-5https://t.me/joinchat/BfksDUAjK9s_HyuqltMkqw