

مروری بر روش‌های کمی والکتروکمی لومینسانس در آزمایشگاه

با تلفیق یک واکنش کمی لومینسانس و یک واکنش ایمنولوژیک می‌توان مقدار نور تابش یافته را سنجش و غلظت مولکول‌ها را تعیین کرد. امروزه آزمایشگاه‌ها تشخیص طبی، برای کسب سرعت، صحت و دقت بیشتر تمایل به استفاده از دستگاه‌های خودکار به ویژه در بخش‌های هورمون و ایمنی شناسی را دارند. به طور کلی الکتروکمی لومینسانس فرآیندی است که با واسطه مولکول‌های متعددی از جمله ترکیبات روتنیم،... رخ می‌دهد. فرایند الکتروکمی لومینسانس باعث تولید پیش‌سازهای پایدار در سطح الکتروود می‌شود که محصول نهایی این واکنش تولید نور است. استفاده از واکنش الکتروکمی که کل واکنش را دقیقاً تحت کنترل دارد و انجام آزمایش در زمانی بسیار کوتاه از مزایای این روش است.

کمی لومینسانس و الکتروکمی لومینسانس (ECL)

وقتی یک الکترون از سطح بالاتر به سطح پایین تر انرژی می‌رسد و انرژی را به صورت نور متصاعد می‌کند، لومینسانس نامیده می‌شود. انواع متعددی از پدیده لومینسانس شامل فلورسانس و کمی لومینسانس شناخته شده‌اند. پدیده کمی لومینسانس با سایر پدیده‌های لومینسانس متفاوت است. واکنش شیمیایی یا الکتروشیمیایی باعث تهییج نیست ولی حاصل این تهییج مشابه فلورسانس بوده و در حین بازگشت الکترون به سطح پایه انرژی، نور منتشر می‌شود. در چند سال گذشته در جهت بهبود کمی لومینسانس روش الکتروکمی لومینسانس ابداع شده است. الکتروکمی لومینسانس نوعی از کمی لومینسانس است که در آن واکنشی که به تولید نور

چنانکه مشخص است، محصول سیستم ایمنی همورال یعنی آنتی بادی‌ها که با اتصال اختصاصی به مولکولی که بر علیه آن ساخته شده، به عنوان ابزاری برای سنجش‌های اختصاصی و سریع در اختیار محققان قرار گرفت. روش‌های سنجش ایمنی (Immunoassay)، شناسایی یک مولکول خاص (آنتی بادی)، اولین مرحله در این نوع سنجش‌ها محسوب می‌شود. روش‌های سنجش مولکولی یا سنجش ایمنی (واکنش بین آنتی ژن و آنتی بادی) یکی از مهم‌ترین شاخه‌های ارزیابی و تحقیقاتی است. گاه در این میان روش جدیدی مطرح می‌شود و تحقیقات در جهت اصلاح و بهبود روش قبلی ادامه می‌یابد. بدیهی است که هر روش محاسن و معایب خاص خود را داشته و با توجه به این ویژگی‌ها، گسترش و یا محدود می‌شود. یکی از انواع طبقه بندی سنجش‌های ایمنی بر اساس نوع ماده نشاندار بنا شده که به عنوان مثال، Radio & Enzyme immunoassay، Immuno fluorescence بوده که در این میان روش سنجش ایمنی رادیواکتیو دارای قدمت بیشتری نسبت به سایر روش‌ها است. در روش سنجش ایمنی رادیواکتیو هر جزء، آنتی ژن یا آنتی بادی را می‌توان با ماده رادیواکتیو نشاندار کرد. استفاده از ماده رادیواکتیو به عنوان نشانگر معایبی از جمله خطر تشعشع و نیمه عمر کوتاه کیت را ایجاد می‌کند. روش سنجش ایمنی که بعد از روش رادیواکتیو ابداع گردیده سنجش‌های 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 می‌شود.

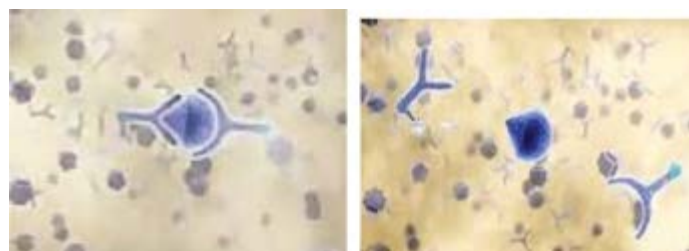
طراحی تکنولوژی کمی لومینسانس (CL) که محصول قابل سنجش در آن نور و تابش نور حاصل تهییج یک واکنش شیمیایی است، هنگامی که به سطح پایه می‌رسد. مثال بسیار ساده برای این واکنش آتش گرفتن یک چوب کبریت است در این فرآیند گوگرد در طی یک واکنش شیمیایی، اکسید شده و تولید نور می‌کند.

می انجامد با جریان الکتریکی آغاز و با قطع آن خاتمه می یابد و نور تولید شده در این روش تنها در محل الکتروُد، جریان الکتریکی به وجود می آید. در حال حاضر، سایر روش های ایمنونواسی فاقد چنین حساسیتی می باشند.

چند روش از روش های آنالیز الکترو کمی لومینسانس:

I- روش رقابتی جهت اندازه گیری آنالیت های کوچک مثل FT3 استفاده می شود.

- در گام نخست سرم و آنتی بادی ضد FT3 که با کمپلکس روتنیوم نشاندار شده است در داخل چاهک اضافه می شود- در مرحله دوم FT3 بیوتینه شده و استرپتوآویدین که به میکروپارتیکل ها متصل شده است اضافه می گردد. FT3 بیوتینه شده و FT3 آزاد موجود در سرم جهت اتصال با آنتی بادی ضد FT3 که با کمپلکس روتنیوم نشاندار شده است رقابت می نمایند. هرچه میزان FT3 آزاد بیشتر باشد FT3 بیوتینه کمتری به آنتی بادی ضد FT3 متصل می شود و در نتیجه میزان کمتری از آنها به میکروپارتیکل ها متصل خواهند شد و بالعکس.



- پس از انکوباسیون دوم مخلوط واکنش شامل کمپلکس ایمنی (FT3 متصل شده به آنتی بادی اختصاصی خود) به سلول اندازه گیری منتقل می شود. کمپلکس ایمنی با واسطه میکروپارتیکل به سطح الکتروُد مغناطیسی متصل می شود و نمونه ها و معرف های اضافی توسط محلول شستشو خارج می شوند.

- در روش ECL، کنژوگه روتنیوم پایه و اساس کمی لومینسانس است که با تحریک الکتریکی تولید نور می نمایند. در این روش رقابتی میزان نور تولید شده ارتباط معکوس با غلظت FT3 موجود در نمونه دارد. ارزیابی و محاسبه غلظت مولکول از طریق منحنی کالیبراسیون که بواسطه غلظت استاندارد ها رسم شده است انجام می گردد.

II- روش ساندویچ (برای اندازه گیری آنالیت های بزرگ پروتئینی مانند هورمون TSH)

- در مرحله اول نمونه با آنتی بادی بیوتینه TSH و آنتی بادی اختصاصی TSH که با روتنیوم نشاندار شده است مخلوط می گردد. 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 گردد.

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

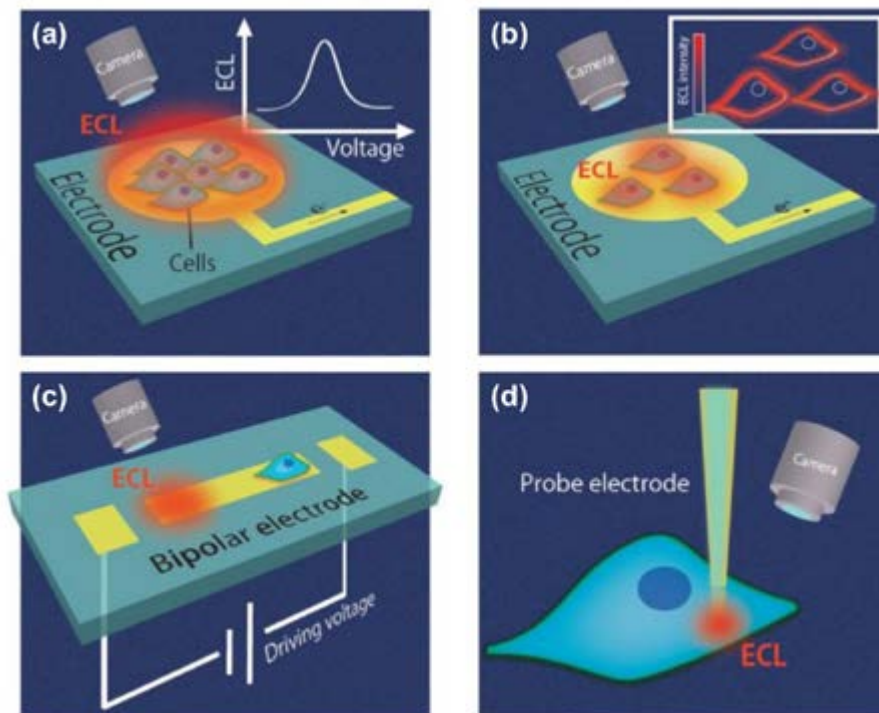
- در این مرحله میزان نور تولید شده با غلظت TSH موجود در نمونه رابطه مستقیم دارد. در روش ECL ارزیابی و محاسبه غلظت مولکول با استفاده از منحنی کالیبراسیون که آن نیز به واسطه غلظت استاندارد ها رسم شده است توسط دستگاه به صورت خودکار انجام می گردد.

مزایای روش الکترو کمی لومینسانس ECL

- قابلیت تشخیص اکثر آنالیت ها (عدم استفاده از چاهک مخصوصی برای هر تست، با توجه به عملکرد دستگاه قدرت تکرار پذیری بالا و کاهش مصرف معرف ها و در نتیجه کاهش هزینه ها و زمان رami توان از ویژگی های این سیستم بیان کرد. البته حساسیت بالا جهت اندازه گیری آنالیت ها با مقادیر بسیار کم و همچنین در مدت زمان کوتاه - اتوماسیون کامل دستگاه که منجر به کاهش خطای تکنیکی شده، محدوده خطی وسیع و سنجش با کیفیت بالا - دارای معرف غیر ایزوتوپی و غیر آنزیمی بسیار پایدار و با کاربرد آسان می باشد.

محدودیت الکترو کمی لومینسانس ECL

- هزینه قابل توجه دستگاه، همچنین کیت ها و محلول های آن، البته بسته بودن سیستم (در این روش بایستی حتما از دستگاه و کیت ها و محلول ها و همچنین سرسپلر و چاهک های مخصوصی استفاده شود که کاملاً



انحصاری و در اختیار یک شرکت مشخص است)

نگهداری روزانه / هفتگی / هر دو هفته: تمیز کردن پروب نمونه، بررسی مسیر جریان داخل محفظه / تمیز کردن پروب و انکوباتور / تمیز نمودن محل شستشو و مجرای مایعات

کنترل و کالیبراسیون

با توجه به بسته بودن این تکنیک، بخش قابل توجهی از کنترل کیفی وابسته به بررسی نتایج نگهداری است که در کتابچه راهنمای دستگاه بیان شده و معمولاً به صورت روزانه انجام می گیرد. 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، عملکرد دستگاه را می سنجد.

نتیجه

کمی لومینسانس یک روش نوین در سنجش مولکول ها بوده اما جایگاه خود را سریعاً به الکتروکمی لومینسانس تغییر داد. چنانچه آزمایشگاهی شرایط انجام تست به روش الکتروکمی را داشته و همچنین کیفیت را در سرلوحه عملکرد خود قرار داده باشد مطمئناً این روش را به سایر روش ها ترجیح خواهد داد. روش الکتروکمی لومینسانس را با توجه به مزایایی که ذکر شد، 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، که در نتیجه رضایت مندی هرچه بیشتر گروه هدف را تامین می کند، در یک نمونه مورد آزمایش، آنالیت مجهول ممکن است آنتی ژن یا آنتی بادی باشد چنانچه فرض بر این باشد که آنالیت مورد نظر آنتی ژن است، روتینیوم بر روی آنتی بادی متصل (کنژوگه) می شود که توانایی اتصال به آنتی ژن را خواهد داشت که به آن آنتی بادی بایوتینه شده گفته می شود. بیوتین و استرپتوآویدین میل شدیدی جهت اتصال به یکدیگر دارند. میکروپارتیکل هایی که سطح آنها از استرپتوآویدین پوشیده

شده است، به واکنش اضافه می شود. در مدت زمان انکوباسیون که این مواد در کنار یکدیگر قرار گرفته و به هم متصل می شوند کمپلکسی تشکیل می شود که در یک انتها میکروپارتیکل ها و در انتهای دیگر روتینیوم قرار دارد. جهت تثبیت این کمپلکس از میدان مغناطیسی استفاده شده که باعث اتصال میکروپارتیکل ها به سطح جامد فلزی خواهد شد. بعد از تثبیت، واکنش طی اعمال یک ولتاژ الکتریکی آغاز می شود، این واکنش در انتها منجر به تولید نور می شود (روتینیوم، نقش منتشرکننده نور را دارد). نور حاصله را می توان با استفاده از یک تقویت کننده نور (فوتومولتی پلایر) به یک آشکارساز (Detector) رسانید و میزان فوتون های ساطع شده را اندازه گیری کرد. با استفاده از استانداردهای از پیش تعیین شده برای دستگاه می توان به میزان آنالیت مورد نظر پی برد.

منابع:

- A review of recent trends in analytical applications of Electrogenerated chemiluminescence / 2017-An enzymatic calculation system based on Electrochemiluminescence and fluorescence of luminol and cyclic voltammetry/ Journal: Biosensors and Bioelectronics – October 2018