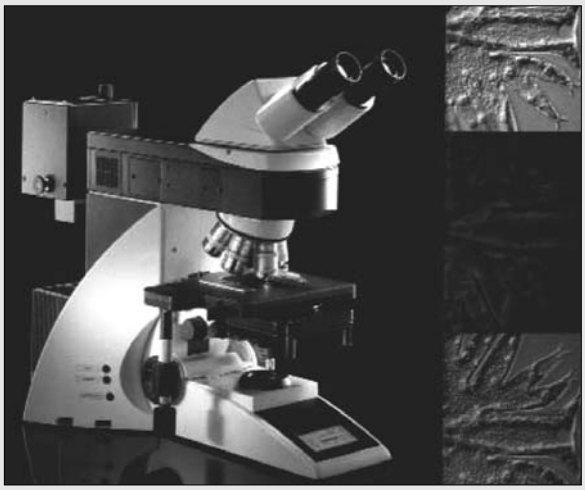
دکتر مجتبی صلوتی- متخصص فیزیک پزشکی
مهندس فرانک سقطچی- عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
اکبر باشی زاده- کارشناس آزمایشگاه تشخیص طبی

# فلورسنس و کاربردهای آن در آزمایشگاه



**در سال ۱۳۷۷ میلادی فردی هلندی به نام لیوون هوک توانست به کمک وسیله ای شامل یک عدسی چشمی مستقر در بین دو صفحه فلزی میکروب ها را ببیند. وی این میکروارگانیسم ها را جانوران کوچک نامید. علم میکروب شناسی با این اختراع ساده آغاز شد. هم اکنون دستگاه ساده لیوون هوک با بزرگنمایی ۳۰۰ برابر، به میکروسکوپ الکترونی با بزرگنمایی بیش از ۲۵۰۰۰۰ برابر دگرگون شده است.**

### گونه های میکروسکوپ

میکروسکوپ ها را به دو دسته نوری و الکترونی بخش می کنند. منبع نور در میکروسکوپ های نوری، نور مرئی و یا پرتوهای فرابنفش است. گونه های میکروسکوپ های نوری روزمره عبارت است از

الف) زمینه روشن، ب) زمینه تاریک، ج) فاز کنتراست و د) فلورسنس.

### میکروسکوپ فلورسانس

با توجه به این نکته که توان دید نوری به گونه ی مستقیم وابسته به طول موج نور مورد استفاده است، قدرت تفکیک میکروسکوپ را با کاربرد اشعه ماوراء بنفش می توان دو برابر کرد.

چون شیشه نسبت به اشعه ماوراء بنفش با طول موج کم حاجب است، و جنس عدسی ها از کوارتز بوده و همچنین چون چشم نمی تواند اشعه ماوراء بنفش را مشاهده کند، باید برای حفظ تصویر روی میکروسکوپ، دوربین تعبیه شود. در ضمن گرانی و پیچیدگی میکروسکوپ ماوراء بنفش سبب شده که کمتر مورد استفاده قرار گیرد و در عوض میکروسکوپ فلورسانس که موارد کاربری زیادی دارد، استفاده شود. در واقع این میکروسکوپ همان میکروسکوپ ماورابنفش اولیه تغییر یافته است و در آزمایشگاه های ایمونولوژی و سرولوژی کاربرد دارد.

### کاربرد میکروسکوپ فلورسانس

میکروسکوپ فلورسنس نوع خاصی از میکروسکوپ های نوری است که برای مشاهده نمونه به وسیله آن، بخش یا مولکول های ویژه ای در داخل سلول با مواد فلورسنت یا نورافشان رنگ آمیزی می شوند. در واقع، زمانی که هدف تشخیص پروتیین های خاص یا جایگاه آن ها در سلول باشد، روش های معمول رنگ آمیزی که پروتیین ها را به طور عام رنگ آمیزی می کنند، قابل استفاده نیستند. برای رنگ آمیزی اختصاصی معمولاً از پادتن های مخصوص متصل به مواد فلورسنت استفاده می شود. به عنوان مثال، اگر هدف تشخیص جایگاه های پروتیین اکتین باشد، استفاده از ماده رنگی متیلن بلو که همه گونه های پروتیین ها را رنگ می کند، کارا نخواهد بود. استفاده از پادتن اختصاصی ضداکتین نیز به تنهایی مفید نیست، زیرا پادتن ها رنگ ندارند و قابل تشخیص نیستند، اما پادتن ضداکتین متصل به ماده فلورسنت به طور اختصاصی به اکتین

داخل سلول متصل می شود و جایگاه اتصال به طور غیرمستقیم با تشخیص جایگاه مواد فلورسنت تعیین می شود (شکل ۱).

### اجزای میکروسکوپ فلورسنس

برای کار با میکروسکوپ فلورسنس، ابتدا از نمونه مورد نظر لام تهیه کرده و سپس آن را توسط مواد رنگی مخصوص فلورسنت مانند رودامین، فلورسین و ... رنگ آمیزی می کنیم و در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار می دهیم. میکروسکوپ فلورسنس دارای اجزای زیر است:

● قسمت اصلی در واقع همان میکروسکوپ معمولی است که دارای عدسی های شیئی و چشمی است. چون شیشه نسبت به اشعه ماوراء بنفش با طول موج کم حاجب است، دستگاه عدسی از کوارتز تشکیل شده و برای حفظ تصویر باید دوربین تعبیه شود.

● دوربین عکسبرداری که در بالای میکروسکوپ واقع شده است (جهت تهیه عکس و اسلاید.)

● منبع تغذیه و تایمر اشعه UV که در روی آن مدت زمان روشن بودن دستگاه مشخص می شود (باید توجه کرد پس از مدت زمان مشخصی باید لامپ دستگاه را عوض کرد، چرا که پس از این مدت بازده مفید خود را از دست می دهد. لذا شایان توجه است که فقط در زمان استفاده، دستگاه را روشن نموده و بلافاصله پس از اتمام کار آن را خاموش کرد.)

● میکروسکوپ های فلورسنت به دو دسته فیلتر مجهز هستند؛ دسته اول بین منبع نور و نمونه قرار دارند و فقط اجازه می دهند که امواج قابل جذب توسط ماده فلورسنت عبور کنند و دسته دوم بین نمونه و عدسی چشمی قرار گرفته و تنها به امواج تابیده شده از ماده فلورسنس اجازه عبور می دهند.

جدول ۱) نوع میکروسکوپ های متاول در میکروب شناسی تشخیصی

| Organism group | Bright- Fild microscopy | Flaore scence microscopy | Dark Fild micrpscopy | Electron microscopy |
|---|---|---|---|---|
| Bacteria | + | + | ± | - |
| Fungi | + | + | - | - |
| Parasites | + | + | - | ± |
| Virucs | - | + | - | ± |

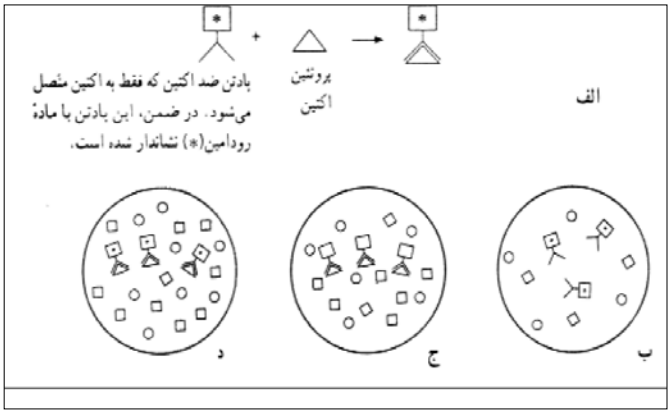
+ Commonly used, ± Limited used, - rarely used

● منبع تولید اشعه UV که تقریباً پشت میکروسکوپ و در امتداد عدسی های چشمی قرار گرفته است. این قسمت دارای لامپی است (لامپ جیوه ای با فشار بالا یا لامپ هیدروژنی) که قادر به تولید اشعه ماوراء بنفش با طول موج خاص است. همچنین این قسمت دارای یک سیستم خنک کننده نیز است.

میکروسکوپ های فلورسنت در حقیقت همان میکروسکوپ های معمولی هستند که در آن ها تغییراتی داده شده است، بدین ترتیب که از یک منبع نوری قوی، فیلترهای تقویت کننده برای ایجاد طول موجی که بتواند نور فلورسانس ایجاد کند و فیلترهای بازدارنده جهت حذف امواج مزاحم تشکیل شده اند. فیلترهای بازدارنده بایستی طوری انتخاب شوند که کلیه نورهای مزاحم با طول موج های گوناگون را جذب کنند. در روش های ایمونوفلوروسنت باید از طول موج نور تابشی نزدیک به طول موج نور تاباننده استفاده شود.

### پدیده فلورسنت

برخی از ترکیبات شیمیایی اشعه ماوراء بنفش را جذب می کنند و اثر آن را به صورت نوری با طول موج بلندتر که برای چشم قابل درک است، باز می تاباند. این پدیده را فلورسنت می گوییم. وقتی یک شیء فلورسنت را در معرض اشعه ماوراءبنفش قرار دهند، به شکل جسم رنگی و درخشان در زمینه تاریک دیده می شود. به موادی که در اثر تابش اشعه ماوراءبنفش نور مرئی تابش می کنند، فلوروکروم گفته می شود. رودامین و فلورسین دو نمونه از رنگ های معمول فلورسنت هستند که به ترتیب نور قرمز و سبز از خود تابش می کنند (جدول ۱).




شکل ۱) تشخیص مولکول‌ها با استفاده از پادتن نشانارشده با ماده فلورسنس

## ایمونوفلورسنس

فلورسنس خاصیتی است که در آن بر اثر تابش نور به یک ماده فلورسنت، نور تک رنگ (نورونی) با طول موج مشخص منعکس می شود. ایمونوفلورسنس در حقیقت یک تکنیک هیستوشیمیایی یا سیتوشیمیایی است که به منظور مشخص کردن و تعیین محل آنتی ژن ها به کار می رود. این تکنیک در سال ۱۹۴۱ توسط کنز ابداع شد. وی بتا آنتراس را که دارای فلورسنس آبی است، به آنتی سرم ضد پنوموکک متصل نمود و جهت نشان دادن آنتی ژن های باکتریایی در بافت از آن استفاده کرد. مدتی بعد همکاران کنز، آنتی سرم ها را با فلورسین که فلورسنت سبز داشته و باعث می شود تا آنتی بادی متصل به آن از اتوفلورسنس آبی بافت متمایز شود، کونژوگه نموده، مورد استفاده قرار دادند.

روی همرفته، در این روش آنتی بادی اختصاصی را با مواد فلورسنت کونژوگه می کنند. آنتی سرم کونژوگه در اثر مجاورت با سلول ها یا بافت های اختصاصی به آن ها متصل شده و روی آنتی ژن ثابت می شود، بدین ترتیب یک کمپلکس پایدار به وجود می آید. سپس طی فرایند شستشو، پروتیین های غیراختصاصی را خارج نموده، مجموعه این کمپلکس باقیمانده را با میکروسکوپ فلورسنس مورد بررسی قرار می دهند. در این حالت در یک زمینه تاریک، آنتی بادی فلورسنت متصل شده به آنتی ژن نور روشنی را از خود باز می تاباند.

فلوروکرم هایی نظیر رودامین یا فلورسین، مواد فلورسنتی هستند که در آزمایشگاه ها مورد استفاده قرار می گیرند. این مواد از یک طیف خاص جذب و انعکاس نور برخوردارند. فلورسین ایزوتیوسیانات (FITC)، نوع شیمیایی خاصی از فلوروسین است که به آسانی در pH قلیایی با ریشه ۴ لیزین و انتهای آمینو پروتیین ها پیوند کووالان ایجاد می کند. حداکثر میزان جذب نور آن طول موج ۴۹۰ تا ۴۹۵ نانومتر بوده و بازتاب آن نور سبزی با طول موج ۵۲۵ نانومتر است، در حالی که حداکثر طول موج تابش نور تترامتیل رودامین ایزوتیوسیانات (که نور فلورسنت نارنجی دارد)، ۵۲۵ نانومتر بوده و حداکثر بازتاب آن نیز ۵۷۰ نانومتر برای پروتیین کونژوگه با رودامین است. در جدول (۲) مشخصات فلوروکروم ها ارائه شده است.

روی همرفته دستیابی به یک نور فلورسنت مناسب به سه فاکتور بستگی دارد:

- توانایی ماده فلورسنت در تبدیل نور معمولی به امواج فلورسنت
- غلظت رنگ در نمونه بافت
- مقدار امواج تابیده شده و جذب شده

## روش و تفسیر آزمایش ایمونوفلورسنس

در واقع با استفاده از ایمونوفلورسنس می توان گونه های آنتی ژن های موجود در بافت یا سلول های زنده در سوسپانسیون را نشان داد. حساسیت بالا و اختصاصی بودن این روش باعث شده تا امروزه این تکنیک به طور وسیعی مورد استفاده قرار گیرد. جهت آزمایش ایمونوفلورسنس ابتدا بایستی آنتی سرم به آنتی ژن مورد نظر را در حیواناتی نظیر بز و خرگوش تهیه نمود. مقدار آنتی سرم تهیه شده باید زیاد و متناسب باشد، به نحوی که در هر میلی لیتر آنتی سرم یک تا چند میلی گرم آنتی بادی اختصاصی وجود داشته باشد. ابتدا لازم است با استفاده

از هماگلوتیناسیون غیرفعال و پرسیپتاسیون، ظرفیت و توانایی آنتی سرم تعیین شود. ویژگی آنتی بادی نیز باید با استفاده از تکنیک های دیفیوژن دوگانه و ایمونوالکتروفورز تعیین شده و آنتی بادی های مزاحم موجود در محیط یا آنتی گلوبولین به کمک جاذب های ثابت ایمونولوژی حذف شوند.

پس از دستیابی به آنتی سرم های اختصاصی و پرقدرت می توان با استفاده از پرسیپتاسیون به کمک سولفات آمونیوم یا مجموعه ای از پرسیپتاسیون در محیط نمکی و کروماتوگرافی تعویض یونی بر روی سلولز -DEAE، آنتی سرم مزبور را تخلیص نمود. به این ترتیب می توان با حذف پروتیین های اضافی و غیر اختصاصی که با چسبیدن به بافت باعث اشتباه در آزمایش می شوند، حساسیت آزمایش را افزایش داد.

در گام بعد آنتی سرم را باید کونژوگه کرد. برای کونژوگه نمودن می توان از انکوباسیون ایمونوگلوبولین مورد نظر با فلورسین یا رودامین به صورت تترامتیل رودامین ایزوتیوسیانات به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد یا گاماگلوبولین بهره جست. پس از آن به کمک ژل فیلتراسیون یا دیالیز شدید می توان رنگ های اضافی را که به صورت آزاد وجود دارند، خارج کرد ودرصورت لزوم با استفاده از دیالیز تحت فشار و یا استفاده از پلیمرهای محلول در آب به تغلیظ آنتی بادی کونژوگه پرداخت.

جدول ۲) خواص فلوکروم ها در رنگ کردن سلول ها

| فلوروکروم | Exitation(nm) | Emission(nm) | رنگ | مصرف |
|---|---|---|---|---|
| DAPI | ۳۶۵ | ۴۵۵ | آبی | رنگ کردن DNA بازهای A,T میکروسکوپ ایمنوفلورسنت |
| فلورسین | ۴۹۵ | ۵۲۵ | سبز | میکروسکوپ ایمنوفلورسنت ، فلوسایتومتری |
| Hoechst 33258 | ۳۶۰ | ۴۷۰ | آبی | میکروسکوپ ایمنوفلورسنت ، رنگ کردن DNA بازهای A,T |
| R- فایکوسیانین | ۵۵۵ - ۶۱۸ | ۶۳۳ | قرمز | |
| B - فایکواریتروین | ۵۴۵ ، ۵۶۵ | ۵۷۵ | قرمز ، پرتقالی | میکروسکوپ ایمنوفلورسنت |
| R فایکواریتروین | ۴۸۰-۵۴۵،۵۶۵ | ۵۷۵ | قرمز ، پرتقالی | فلوسایتومتری |
| رودامین | ۵۵۲ | ۵۷۰ | قرمز | |
| تگزاس قرمز | ۵۹۶ | ۶۲۰ | قرمز | |
| ۷- امینوآکتینومایسین D | ۵۲۳ | ۶۲۷ | قرمز | رنگ کردن DNA ، RNA |

سپس با استفاده از روش اسپکتروفتومتری غلظت گاماگلوبین و نسبت رنگ/پروتیین و یا فلورسین/پروتیین را در نمونه مورد نظر تعیین کرد. بهتر است مواد نشاندار شده با فلوروکروم در مکان تاریک و در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شوند.

## روش های ایمونوفلورسنس

روی همرفته حساسیت آزمایش های ایمونوفلورسنس بیش از آزمایش فیکساسیون کمپلمان "CFT" و کمتر از آزمایش پیشگیری از هماگلوتیناسیون "HI" است. همچنان که انتظار می رود، استفاده از این تکنیک به گونه های گوناگون شدنی است. در اینجا به کوتاه برخی از این روش ها را بازگویی می کنیم.

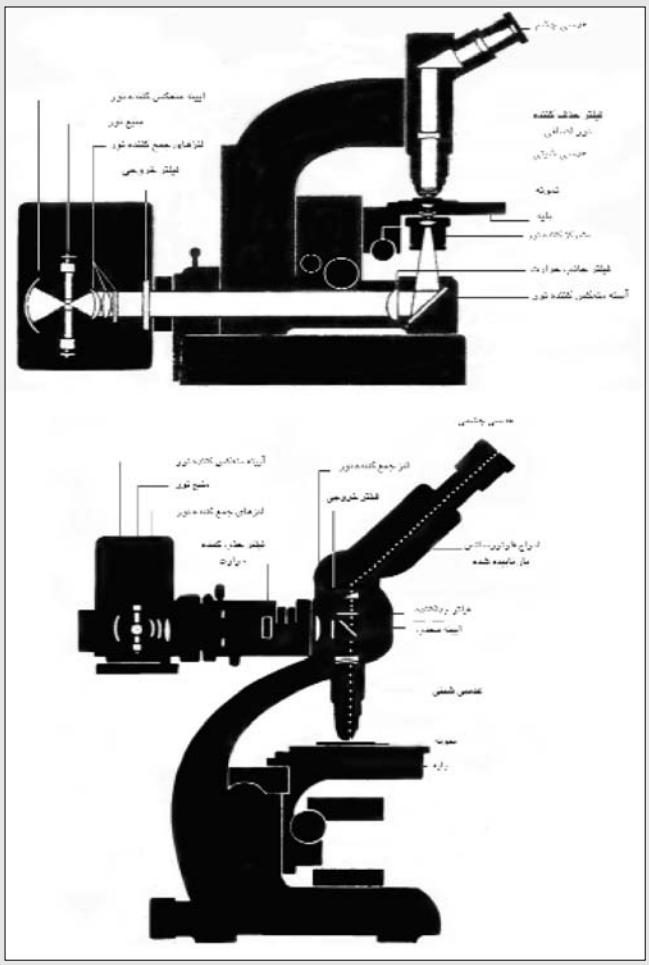
**الف) ایمونوفلورسنس مستقیم:**

دراین روش آنتی سرم کونژوگه یکراست به نمونه بافت یا سوسپانسیون سلول زنده افزوده می شود (شکل ۳.) نیاز کونژوگه نمودن گونه های آنتی سرم ضد آنتی ژن های گوناگون از جمله نقاط ضعف استفاده از این روش است که باعث می شود کمتر از آن در کارهای روزمره استفاده شود.

**ب) ایمونوفلورسنس غیرمستقیم:**

این روش برای نشان دادن آنتی بادی های موجود در سرم کاربرد داشته و در آزمایشگاه های بالینی به میزان زیادی مورد استفاده قرار می گیرد. در این روش ضرورت خالص سازی و کونژوگه نمودن گونه های آنتی بادی ها منتفی می شود، زیرا با کونژوگه نمودن آنتی سرم ضد کلاس های گوناگون ایمونوگلوبین های انسانی می توان آنتی بادی ضد گونه های آنتی ژن ها را در سرم بیماران نشان داد. شکل (۳) در حقیقت ایمونوفلورسنس غیرمستقیم یک واکنش آنتی گلوبولین تست کومبس است. برای سنجش اختصاصی بودن این آنتی بادی ها، می توان از روش بلوک نمودن و خنثی سازی استفاده کرد. امروزه با توجه به پیشرفت های حاصله در این تکنیک روش های

**برخی از ترکیبات شیمیایی اشعه ماوراء بنفش را جذب می کنند و اثر آن را به صورت نوری با طول موج بلندتر که برای چشم قابل درک است باز می تاباند. این پدیده را فلورسنت می گوییم**



◀شکل ۲)
الف:شمای یک میکروسکوپ فلورسنس نور از پایین
ب:تصویر یک میکروسکوپ فلورسنس نور از بالا

گوناگون کونژوگه نمودن آنتی سرم ضد کمپلمان برای تشخیص کمپلکس های آنتی ژن-آنتی بادی- کمپلمان و ایمونوفلورسنس دوگانه با استفاده از هر دو رنگ رودامین و فلورسین ابداع شده است. به هر حال روش های گوناگون نشان دادن آنتی بادی موجود در سرم به کمک تکنیک ایمونوفلورسنس غیرمستقیم عبارتند از:

- روش آنتی گلوبولین
- تست پیشگیری از واکنش Ag-Ab توسط آنتی بادی موجود در سرم
- روش آنتی کمپلمان

**سیستم بیوتین-آویدین**

آویدین یک گلیکوپروتیین بازی از آلبومین تخم مرغ است. بیوتین می تواند با پیوندهای کوولان به سادگی به پروتیین آنتی بادی پیوند شود و سپس با آویدین پیوسته به فلوروکروم واکنش دهد. پس از واکنش آنتی ژن موجود در سرم، آنتی گلوبولین کونژوگه با بیوتین را اضافه می کنند و از آنجایی که تعداد زیادی مولکول بیوتین می تواند به یک آنتی گلوبولین متصل شود، اضافه نمودن فلوروکروم های متصل به آویدین باعث ظهور یک فلورسنس شفاف و پایدار می شود. از جمله سایر مزایای این روش آن است که آویدین کونژوگه با فلوروکروم به سوبسترایی غیر از بیوتین متصل نمی شود و امکان استفاده از آویدین کونژوگه در کلیه آزمایش هایی که آنتی بادی های کونژوگه با بیوتین به کار می رود، وجود دارد.

**ایمونو فلورسنس کمی**

تازگی ها با استفاده از آنتی ژن ها و آنتی بادی های نشاندار شده با مواد فلوروکروم، روش های کمی ایمونولوژیک توسعه یافته است. در این روش ها با استفاده از میکروفلورومتر مقدار نوری را که از نمونه فلورسنس باز می تابد، اندازه گیری می کنند. در این حال، مقادیر ایمونوگلوبین ها با استفاده از رقابت آنتی سرم اختصاصی نشاندار برای اتصال به آنتی ژن آزاد و یا ثابت برروی فاز جامد اندازه گیری می شود. پس از اندازه گیری با مراجعه به منحنی های استاندارد مقادیر برحسب

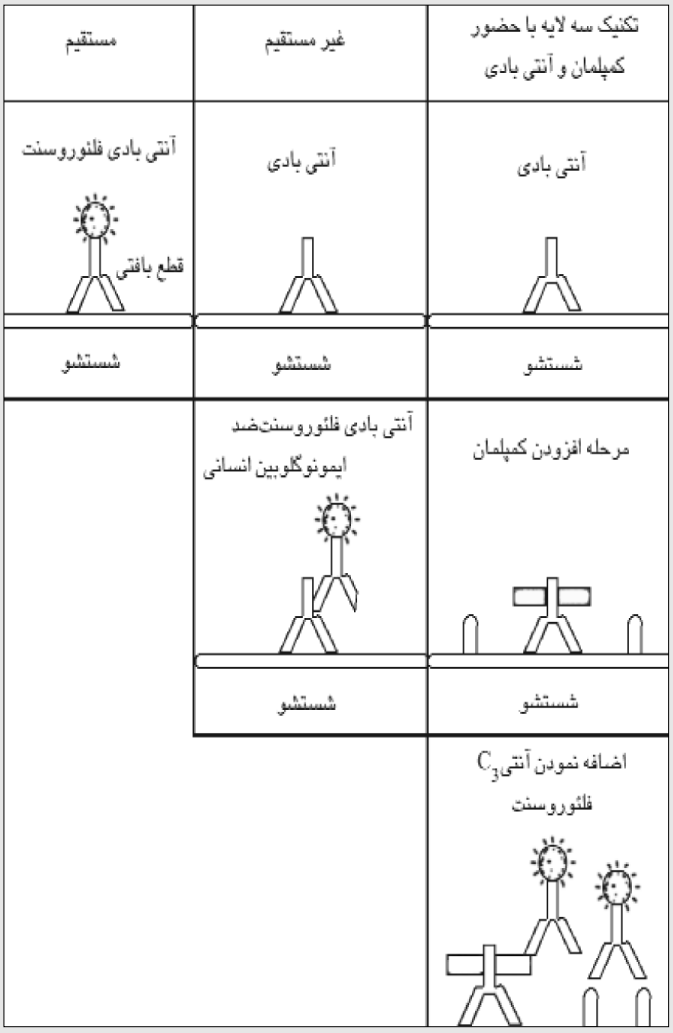
میلی گرم در دسی لیتر به دست می آید.

به کمک ایمونوفلورسنس غیرمستقیم آنتی سرم ضد گونه های آنتی ژن های سلولی نظیر DNA یا هسته را می توان اندازه گیری کرد. در این روش ها، سوبسترا مثلا DNA را بر روی یک سطح پلیمر در فاز جامد ثابت کرده و با سرم مورد آزمایش مجاور می کنند. سپس آنتی ایمونوگلوبین فلورسنت به کمپلکس آنتی ژن-آنتی بادی متصل می شود. در این حال مقدار ماده فلورسنت متصل شده، با روش فلورومتریک اندازه گیری می شود. روش ایمونوفلورسنس کمی از نظر حساسیت با روش های ایمونوآنزیماتیک برابری می کند.

**کاربرد بالینی ایمونوفلورسنس**

سال هاست که روش های ایمونوفلورسنس مستقیم و غیرمستقیم درآزمایشگاه های بالینی به شکل گسترده‌ای مورد استفاده قرار می گیرد. حساسیت بالا و ویژگی مطلوب آزمایش های ایمونوفلورسنس باعث شده تا این تکنیک به عنوان یک ابزار تشخیصی مهم مورد توجه قرار گیرد. از این آزمایش در تعیین و شمارش دستجات گوناگون لنفوسیتی نظیر سلول های B، سلول های T و زیرگروه های آن ها و مطالعه نسبت سلول های TH به TS در بیماری ها و حالات گوناگون مرضی، تعیین اتوآنتی بادی ها در بیماری های اتوایمن نظیر نشان دادن آنتی بادی های ضدهسته "ANA" در بیماران مبتلا به لوپوس ارتیماتوز، نشان دادن آنتی بادی های درون بافتی، بررسی حضور اجزای کمپلمان در اندام ها و بافت های آسیب دیده، مطالعه وضعیت ایمونوپاتولوژیک حاصل از تهاجم آنتی بادی های گوناگون به بافت ها، نشان دادن اجرام پاتوژن در مقاطع هیستوپاتولوژیک، مطالعات کروموزومی، ردیابی و تعیین انوع آنتی ژن های توموری در بافت های گوناگون، بررسی و مطالعه آنتی ژن های بافت های پیوندی، مطالعه بر روی پذیرنده های هورمونی و آنزیمی، همچنین بررسی و تحقیق بر روی نقش این مواد در اندام ها، بررسی پروتیین ها و ایمونوگلوبولین های سرمی، مطالعه مولکول های سطحی سلول های ایمونولوژیک، نشان دادن آنتی بادی های ضدآنتی ژن های میکروارگانیسم ها در بیماری های عفونی نظیر لیستریوز و بروسلوز و سایر بیماری های باکتریایی می توان استفاده کرد.

**با استفاده از ایموفلورسنس می توان انواع آنتی ژن های موجود در بافت یا سلول های زنده در سوسپانسیون را نشان داد**




شکل ۳) ایمونوفلورسنس مستقیم و غیر مستقیم در ایمونوفلورسنس، آنتی بادی فلوسنس مستقیما بر روی نمونه بافت (آنتی ژن) تاثیر داده می شود.
الف) در ایمونوفلورسنس غیر مستقیم ابتدا آنتی سرم (سرم مجهول) را روی نمونه بافت تاثیر داده، سپس آنتی سرم فلورسنس ضد ایمونولوگلوبین انسانی را به آن اضافه می کنند.
ب) آنتیی.
پ) در صورت استفاده از کمپلمان می تون تکنیک را سه لایه نموده، با اضافه نمودن آنتی سرم فلورسنت ضد کمپلمان به مطالعه نمونه پرداخت.