شبکه آزمایشگاهی فناوری نانو

فصلنامه

دانش آزمایشگاهی ایران

ISSN 2538-3450

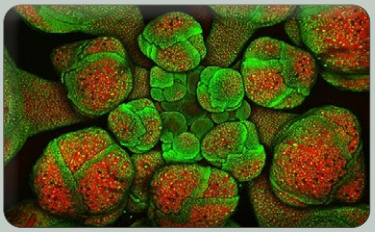
سال یازدهم ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۴۰۲ ■ شماره پیاپی ۴۱

طیف‌سنجی جرمی زمان پرواز

توسعه شبکه‌سازی آزمایشگاه‌ها

توسعه جریان دانش در شبکه آزمایشگاهی

اندازه‌گیری آرسنیک در برنج با روش جذب اتمی تولید هیدرید



انواع نشانگرها در میکروسکوپ روبشی لیزری هم‌کانون (بخش اول)

بررسی اندازه‌گیری اجزاء آروماتیک، اولفین و غیراشباع در انواع سوخت به روش کروماتوگرافی گازی با ستون کاپیلاری ۱۰۰ متری و قدرت تفکیک بالا

نقش آزمایشگاه در کنترل کیفیت مخازن تحت فشار بدون درز (بخش دوم)

مروری بر مقاومت گریس در برابر آب

www.IJLK.ir
info@ijlk.ir

نویسندگان
پروین هادیان[۱و۲*]
*parvinhadian@gmail.com

بخش اول

انواع نشانگرها در میکروسکوپ روبشی لیزری هم‌کانون

چکیده

میکروسکوپ روبشی لیزری هم‌کانون به شدت به فلورسانس، به‌عنوان پایه تصویربرداری متکی است، حساسیت بالای این روش و قابلیت هدف قرار دادن اجزای ساختاری و فرآیندهای دینامیکی نمونه مانند سلول‌ها و بافت‌های زنده تثبیت شده، نشان دهنده اهمیت بالای این موضوع است. بسیاری از نشانگرهای فلورسنت با استفاده از مواد شیمیایی آلی آروماتیک سنتز می‌شوند که برای اتصال به یک ماکرومولکول زیستی (مانند پروتئین یا اسید نوکلئیک) یا برای قرار گرفتن در یک منطقه ساختاری خاص مانند اسکلت سلولی، میتوکندری، دستگاه گلژی، شبکه آندوپلاسمی و یا هسته طراحی می‌شوند. همچنین نشانگرهای دیگر برای نظارت بر فرآیندهای دینامیکی و متغیرهای محیطی محلی، از جمله غلظت یون‌های فلزی، pH، گونه‌های اکسیژن فعال و پتانسیل غشایی استفاده می‌شوند. رنگ‌های فلورسنت در نظارت بر یکپارچگی سلولی (زنده در مقابل مرده یا آپوپتوز)، اندوسیتوز، اگزوسیتوز، سیالیت غشاء، انتقال پروتئین، انتقال سیگنال و فعالیت آنزیمی مفید هستند. علاوه‌بر این، نشانگرهای فلورسنت به‌طور گسترده برای نقشه‌برداری ژنتیکی و تجزیه و تحلیل کروموزوم در زمینه ژنتیک مولکولی استفاده می‌شوند.

واژه‌های کلیدی

میکروسکوپ روبشی لیزری هم‌کانون، فلورسنت، نشانگرهای فلورسنت.

مقدمه

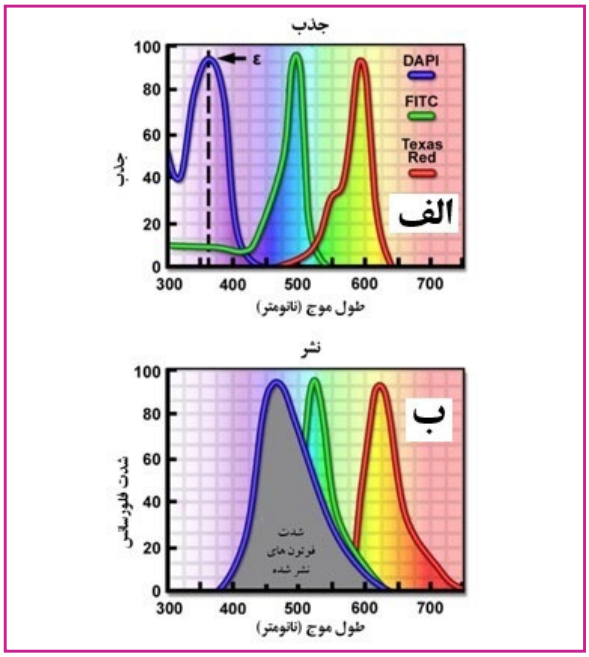
تاریخچه نشانگرهای فلورسنت مصنوعی به اواخر دهه ۱۸۰۰ باز می‌گردد، بسیاری از رنگ‌های مورد استفاده در بافت‌شناسی مدرن در آن زمان توسعه یافتند. از این میان می‌توان به پارا روزانیلین، متیل ویولت، مالاشیت گرین، سافرانین O[۳]، متیلن بلو و رنگ‌های آزو (نیتروژن) متعدد مانند قهوه‌ای بیسمارک اشاره کرد. اگرچه این نشانگرها بسیار رنگی بودند و می‌توانستند نوارهایی از نور مرئی را جذب کنند، اما بیشتر آنها فلورسنت ضعیفی داشتند و برای میکروسکوپ‌های مبتنی بر فلورسنت که چندین دهه بعد ساخته شدند، مفید نبودند. با این حال، در این دوره، چندین رنگ مصنوعی بر پایه حلقه‌های هتروسیکل گزانتن و آکریدین سنتز شدند که دارای فلورسنت بسیار شدیدی هستند و زمینه‌ای برای توسعه نشانگرهای فلورسنت مصنوعی مدرن فراهم آوردند. در این میان، قابل توجه‌ترین رنگ‌های فلورسنت اولیه، گزانتن‌های جایگزین، فلورسین، رودامین B[۴] و آکریدین نارنجی بودند [۱].

رنگ‌های فلورسنت در اوایل قرن بیستم به‌عنوان رنگ‌های حیاتی برای تصویربرداری از باکتری‌ها، تک یاخته‌ها و تریپانوزوم‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت معرفی شدند، اما تا سال ۱۹۲۰ که این میکروسکوپ برای اولین بار برای مطالعه اتصال رنگ در بافت‌های ثابت و سلول‌های زنده مورد استفاده قرار گرفت، استفاده گسترده‌ای از آن مشاهده نشد [۲]. با این حال، در اوایل دهه ۱۹۴۰ بود که آلبرت کونز[۵] روشی را برای نشان‌دار کردن آنتی‌بادی‌ها با استفاده از رنگ‌های فلورسنت ابداع کرد و در نتیجه، زمینه گسترش علم ایمونوفلورسانس را فراهم نمود [۳]. در طول ۶۰ سال گذشته، پیشرفت‌ها در ایمونولوژی و زیست‌شناسی سلولی مولکولی طیف گسترده‌ای از آنتی‌بادی‌های ثانویه را تولید کرده و بینشی را در مورد طراحی مولکولی ردیاب‌های فلورسنت که در مناطق خاصی از کمپلکس‌های ماکرومولکولی هدف قرار می‌گیرند، ارائه کرده است.

ارتباط فناوری نشانگرهای فلورسنت و علم زیست‌شناسی سلولی مولکولی با کشف پروتئین سبز فلورسنت[۶] استخراج شده از عروس دریایی و توسعه انواع باندهای طیفی جهش یافته آن، به‌طور چشمگیری تغییر یافت [۴]. اخیراً نیز توسعه نقاط کوانتومی نیمه‌هادی فلورسنت کننده با اندازه نانومتری، راه جدیدی را برای تحقیق در میکروسکوپ روبشی لیزری هم‌کانون و میدان وسیع فراهم کرده است [۵]. علیرغم پیشرفت‌های متعدد در سنتز رنگ‌های فلورسنت در چند دهه گذشته، شواهد بسیار کمی در مورد قوانین طراحی مولکولی برای توسعه نشانگرهای جدید، به ویژه با توجه به تطبیق طیف‌های جذبی با طول موج‌های تحریک لیزر هم‌کانون وجود دارد. در نتیجه، تعداد نشانگرهایی که کاربرد گسترده‌ای در میکروسکوپ هم‌کانون پیدا کرده‌اند، زیرمجموعه محدودی از هزاران کشف انجام شده‌است.

ویژگی‌های اساسی نشانگرها

نشانگرها با توجه به ویژگی‌های جذب و فلورسانس، از جمله پروفایل‌های طیفی، طول موج‌های بیشینه جذب، نشر و شدت فلورسانس ساطع شده، فهرست‌بندی و توصیف می‌شوند [۶]. یکی از مفیدترین عوامل کمّی برای مشخص کردن طیف‌های جذب، ضریب خاموشی مولی است که با نماد یونانی (e) نشان داده می‌شود (شکل (۱)) که معیار مستقیمی از توانایی یک مولکول برای جذب نور است. ضریب خاموشی برای تبدیل واحد جذب به واحد غلظت مولی مفید است و با اندازه‌گیری جذب در طول موج مرجع (به‌طور معمول بیشینه، مشخصه گونه‌های جذب‌کننده)، غلظت مولی در طول مسیر نوری مشخص تعیین می‌شود.



شکل (۱): پروفایل‌های طیفی جذب و نشر نرمال شده فلورسنت نشانگرهای مصنوعی پرکاربرد، به‌عنوان تابعی از طول موج. (الف): طیف‌های تحریک و (ب): طیف‌های نشری برای نشانگرهای شکل (الف) [۱].

بازده کوانتومی یک نشانگر، اندازه کمّی از بازده نشر فلورسانس است و به‌عنوان نسبت تعداد فوتون‌های ساطع شده به تعداد فوتون‌های جذب شده بیان می‌شود. به عبارت دیگر، بازده کوانتومی نشان‌دهنده احتمال نشر یک فوتون گسیل شده (فلورسانس) بر اثر تحریک معین است. بازده کوانتومی به‌طور معمول بین مقدار صفر و یک متغیر است و مولکول‌های فلورسنت که بیشتر به‌عنوان نشانگر در میکروسکوپ به کار می‌روند، دارای بازده کوانتومی از بسیار کم (۰/۰۵ یا کمتر) تا نزدیک به واحد هستند. به‌طور کلی، بازده کوانتومی بالا در بیشتر کاربردهای تصویربرداری، مطلوب است. بازده کوانتومی نشانگرهای

معین در اثر عوامل محیطی بسیاری مانند غلظت یون فلزی، pH و قطبیت حلال، گاهی تا حد زیادی متفاوت می‌شود [۶].

در بیشتر موارد، ضریب خاموشی مولی برای جذب فوتون به‌صورت اندازه‌گیری کمّی و در یک طول موج مشخص بیان می‌شود، در حالی که بازده کوانتومی، ارزیابی کلی از انتشار فوتون‌های یکپارچه در کل باند طیفی نشانگر است (شکل (۱-ب)). برخلاف لامپ‌های قوس الکتریکی که با فیلترهای تداخلی، باندهای کوچکی از آن به‌منظور استفاده در میکروسکوپ فلورسانس میدان گسترده استفاده می‌شوند، سیستم‌های لیزری مورد استفاده در میکروسکوپ هم‌کانون، تحریک را به خطوط طیفی لیزری خاصی محدود می‌کنند که پهنایی در حد چند نانومتر دارد [۱]. طیف نشر فلورسانس برای هر دو منبع تحریک، با فیلترهای باند یا طولانی‌گذر مشابه کنترل می‌شود که می‌تواند ده‌ها تا صدها نانومتر را پوشش دهد. در زیر سطوح اشباع، شدت فلورسانس با حاصلضرب ضریب خاموشی مولی و بازده کوانتومی نشانگر متناسب است، رابطه‌ای که می‌تواند برای قضاوت در مورد اثربخشی نشر به‌عنوان تابعی از طول موج(های) تحریک استفاده شود. به‌طور کلی، طیف جذب یک نشانگر بسیار کمتر به شرایط محیطی نسبت به طیف نشری فلورسانس وابسته است [۶].

نشانگرهایی که برای کاربردهای میکروسکوپ هم‌کانون انتخاب می‌شوند باید سطح روشنایی و سیگنال به اندازه کافی پایداری را برای دستگاه فراهم کنند تا داده‌های تصویری، عاری از اثرات ناخواسته باشد، علاوه‌بر این، برخی اجزای دستگاه باعث کاهش شدت سیگنال می‌شوند. به‌عنوان مثال، دریچه هم‌کانونی میکروسکوپ که برای به‌دست آوردن لایه‌های نازک نوری نقش موثری ایفا می‌کنند، مسئول کاهش ۲۵ تا ۵۰ درصدی شدت انتشار است، صرف نظر از اینکه چقدر تلاش برای تنظیم دقیق آن انجام شده باشد [۱]. همچنین آشکارسازهای فوتو مولتی‌پلایرتیوب متداول‌ترین آشکارسازها در میکروسکوپ هم‌کانون هستند، اما از بازده کوانتومی پایین رنج می‌برند که تابعی از طول موج است و منجر به از دست دادن سیگنال وابسته به طول موج در سراسر طیف نشری (به ویژه در نواحی قرمز و مادون قرمز) می‌شوند [۷]. در مجموع، تلفات نور در میکروسکوپ هم‌کانون می‌تواند منجر به کاهش بیش از ۵۰ برابر شدت در میکروسکوپ‌های فلورسانس میدان گسترده شود. با این استدلال روشن می‌شود که انتخاب نشانگر، یکی از حیاتی‌ترین جنبه‌های کار با میکروسکوپ هم‌کانون است و کارایی ابزار نیز باید به دقت در نظر گرفته شود تا تصاویر با کیفیت بالا تهیه شود.

همان‌طور که پیش‌تر بحث شد، توسعه نشانگرهای فلورسنت به دلیل عدم آگاهی از خواص مولکولی مسئول تولید فلورسانس بهینه، محدود شده‌است و قوانین طراحی به اندازه کافی درک نشده‌اند تا به‌عنوان راهنمای توسعه نشانگرهای کارآمدتر مفید باشند. موفقیت فعلی در توسعه نشانگرهای فلورسنت جدید که قادر به عملکرد رضایت‌بخش در میکروسکوپ هم‌کانون هستند، گواه بر پیشرفت حاصل از استفاده داده‌های تجربی و فرضیات، در مورد ساختار مولکولی است که بسیاری از آنها برای اولین بار بیش از صدها سال پیش سنتز شدند.

رنگ‌های فلورسنت سنتی

در انتخاب نشانگرهای فلورسنت برای میکروسکوپ هم‌کانون، باید به قابلیت‌های خاص دستگاه برای تحریک و تشخیص نشر فلورسانس در مناطق طول موجی که توسط سیستم‌های لیزری و آشکارسازها ایجاد می‌کنند، توجه داشت. اگرچه لیزرهای فعلی مورد استفاده در میکروسکوپ هم‌کانون (جدول (۱)) خطوط مجزایی در بخش‌های فرابنفش، مرئی و مادون قرمز نزدیک ایجاد می‌کنند، اما مکان این خطوط طیفی همیشه با بیشینه مقدار جذب نشانگرهای محبوب منطبق نیستند. البته لازم نیست که خط طیفی لیزر به‌طور دقیق با طول موج بیشینه جذب نشانگر مطابقت داشته باشد، شدت انتشار فلورسانس توسط ضریب خاموشی نشانگر در طول موج تحریک تنظیم می‌شود (همان‌طور که در بالا مطرح شد). محبوب‌ترین لیزرها برای میکروسکوپ هم‌کانون عبارتند از: لیزر آرگون خنک شده با هوا، لیزر یون کریپتون-آرگون، لیزرهای دیود آبی و انواع سیستم‌های هلیوم - نئون. در مجموع، این لیزرها قادر به تحریک در ده تا دوازده طول موج مشخص بین ۴۰۰ تا ۶۵۰ نانومتر هستند.

جدول (۱): خطوط طیفی لیزر و قوس الکتریکی در میکروسکوپ میدان گسترده و هم‌کانون [۱].

نوع لیزر	فرابنفش	بنفش	آبی	سبز	زرد	نارنجی	قرمز
یون آرگون	۳۵۱، ۳۶۴	–	۴۷۷، ۴۸۸ ۴۵۷،	–	–	–	–
دیود آبی	–	۴۰۵، ۴۴۰	–	–	–	–	–
دیود حالت جامد	۳۵۵	۴۳۰، ۴۴۲	۴۵۷، ۴۷۳	۵۳۲	۵۶۱	–	–
هلیوم - کادمیوم	۳۲۲، ۳۵۴	۴۴۲	–	–	–	–	–
کریپتون - آرگون	–	–	۴۸۸	–	۵۶۸	–	۶۴۷
هلیوم - نئون سبز	–	–	–	۵۴۳	–	–	–
هلیوم - نئون زرد	–	–	–	–	۵۹۴	–	–
هلیوم - نئون نارنجی	–	–	–	–	–	۶۱۲	–
هلیوم - نئون قرمز	–	–	–	–	–	–	۶۳۳
دیود قرمز	–	–	–	–	–	–	۶۵۰، ۶۳۵
لامپ جیوه	۳۶۵	۴۰۵ ،۴۳۶	۵۴۶	–	۵۷۹	–	–
لامپ زنون	–	۴۶۷	–	–	–	–	–

بسیاری از نشانگرهای فلورسنت کلاسیک که سال‌ها با موفقیت در میکروسکوپ فلورسانس میدان گسترده مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۲ و ۶]، از جمله فلورسین ایزوتیوسیانات، لیزامین، رودامین و قرمز تگزاس، در میکروسکوپ هم‌کانون نیز مفید هستند. فلورسین یکی از محبوب‌ترین نشانگرهایی است که تاکنون طراحی شده‌است و کاربرد گسترده‌ای در نشانه‌گذاری ایمونوفلورسانس دارد. این رنگ دارای حداکثر جذب در ۴۹۵ نانومتر است که به خوبی با خط طیفی ۴۸۸ نانومتری (آبی) تولید شده با لیزرهای آرگون و کریپتون - آرگون و همچنین خطوط اصلی ۴۳۶ و ۴۶۷ از لامپ‌های قوس الکتریکی جیوه و زنون منطبق است (به ترتیب). علاوه‌بر این، بازده کوانتومی فلورسین بسیار بالا است و اطلاعات قابل توجهی در مورد ویژگی‌های این رنگ با توجه به خواص فیزیکی و شیمیایی آن جمع‌آوری شده‌است [۸]. با این حال، شدت انتشار فلورسانس فلورسین به شدت تحت تأثیر عوامل محیطی (مانند pH) است و گستردگی طیف انتشار آن بیشتر در نشان‌گذاری دوگانه و سه‌گانه با سایر نشانگرها همپوشانی دارد.

تترا متیل رودامین[۷] و مشتق ایزوتیوسیانات[۸] به دلیل تحریک کارآمد آنها با خط طیفی ۵۴۶ نانومتری از لامپ‌های تخلیه قوس جیوه، بیشتر در تحقیقات نشان‌گذاری چندگانه در میکروسکوپ فلورسانس میدان وسیع استفاده می‌شوند. این نشانگرها با خطوط ۵۱۴ یا ۵۶۸ نانومتری از لیزرهای یون آرگون و لیزر کریپتون - آرگون تداخلی با فلورسین ندارند [۹] و همچنین، شدت انتشار فلورسانس مشتقات رودامین به شرایط محیطی نسبت به فلورسین، کمتر وابسته است.

تعدادی از رنگ‌های آکریدین که برای اولین بار در قرن نوزدهم جدا شدند، به‌عنوان نشانگرهای فلورسنت در میکروسکوپ هم‌کانون مورد استفاده قرار می‌گیرند [۲]. پرکاربردترین آنها، آکریدین نارنجی، شامل هسته اصلی آکریدین با جایگزین گروه عاملی دی متیل آمینو در موقعیت‌های ۳ و ۶ سیستم سه حلقه‌ای است. در محدوده pH فیزیولوژیکی، نیتروژن هتروسیکل پروتونه می‌شود و به‌طور عمده به‌عنوان یک گونه کاتیونی در محلول وجود دارد. آکریدین نارنجی با درهم‌آمیزی هسته آکریدین بین جفت‌های باز متوالی DNA به شدت متصل می‌شود و فلورسانس سبز را با حداکثر طول موج ۵۳۰ نانومتر نشان می‌دهد [۲ و ۶]. این نشانگر همچنین به RNA یا DNA تک رشته‌ای متصل می‌شود، اما زمانی که به این ماکرومولکول‌ها متصل می‌شود، طول موج بیشینه طولانی‌تر (به‌طور تقریبی ۶۴۰ نانومتر: قرمز) دارد. در سلول‌های زنده، آکریدین نارنجی در غشای سلولی پخش می‌شود (با مشارکت در پروتونه شدن) و در لیزوزوم‌ها و سایر وزیکول‌های اسیدی تجمع می‌یابد. مشابه بیشتر آکریدین‌ها و هتروسیکل‌های نیتروژنی چند هسته‌ای، آکریدین نارنجی دارای طیف جذب به نسبت گسترده‌ای است که امکان استفاده از این نشانگر را با چندین طول موج از لیزر یون آرگون فراهم می‌کند.

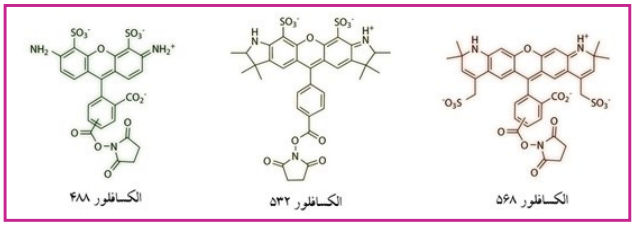
یکی دیگر از نشانگرهای سنتی محبوب که در میکروسکوپ هم‌کانون مورد استفاده قرار می‌گیرد، مشتقات فنانتیدین، پروپیدیوم یدید و اتیدیوم برماید است. پروپیدیوم یدید به روشی مشابه آکریدین‌ها (از طریق درونی) به DNA متصل می‌شود تا فلورسانس نارنجی - قرمز با طول موج ۶۱۷ نانومتر تولید کند [۱۰]. همچنین نشانگرهای دارای بار مثبت، میل ترکیبی بالایی برای اتصال به RNA دو رشته‌ای دارند. پروپیدیوم دارای بیشینه مقدار جذب در ۵۳۶ نانومتر است و می‌تواند با خطوط طیفی ۴۸۸ نانومتری یا ۵۱۴ نانومتری لیزر آرگون - یون (یا کریپتون - آرگون) یا خط ۵۴۳ نانومتری از لیزر هلیوم - نئون سبز تحریک شود. عوامل محیطی می‌توانند بر طیف فلورسانس پروپیدیوم تأثیر بگذارند، به ویژه هنگامی که رنگ با محیط‌های حاوی گلیسرول استفاده می‌شود. اتیدیوم برومید از نظر ساختاری مشابه پروپیدیوم یدید است و به شکل مشابه، به DNA متصل می‌شود [۱۰]، اما به دلیل رنگ پس زمینه بیشتری که ایجاد می‌کند، به اندازه پروپیدیوم موثر نیست.

DNA و کروماتین را نیز می‌توان با رنگ‌هایی که از بیرون به مارپیچ دوگانه متصل می‌شوند، رنگ‌آمیزی کرد. محبوب‌ترین نشانگرها در این دسته عبارتند از: ۴ و۶- دی آمیدینو-۲- فنیل ایندول[۹] و رنگ‌های بیس بنزیمید[۱۰] که با شماره‌های معینی مشخص می‌شوند. این نشانگرها به‌طور کامل محلول در آب هستند و از بیرون، به خوشه‌های جفت باز غنی از آدنین - تیمین در DNA دو رشته‌ای با افزایش چشمگیری در شدت فلورسانس متصل می‌شوند. هر دو رنگ را می‌توان با خط طیفی ۳۵۱ نانومتری لیزر پر قدرت یون آرگون یا خط ۳۵۴ نانومتری از لیزر هلیوم - کادمیم تحریک کرد. مشابه آکریدین‌ها و فنانتیدین‌ها، این نشانگرهای فلورسنت گزینه‌های محبوبی برای رنگ‌آمیزی هسته سلول در فرآیند رنگ‌آمیزی چندگانه هستند. تابش فلورسانس آبی ایجاد شده از این نشانگر با نشر سبز، زرد و قرمز نشانگرهای دیگر در ساختارهای سلولی، کنتراست چشمگیری ایجاد می‌کند.

رنگ‌های الکسافلور

پیشرفت‌های امروزی در فناوری نشانگرها، مرهون پروب‌های (ردیاب‌های) مولکولی مانند رنگ‌های الکسافلور است [۱۱]. این مشتقات سولفونات شده رودامین، بهره کوانتومی بالاتری برای نشر فلورسانس نسبت به پروب‌های مشابه خود دارند (شکل (۲)). علاوه‌بر این، پایداری نوری[۱۱] را تقویت می‌کنند، خطوط جذبی یکسان با خطوط لیزر دارند، به pH وابسته نیستند و به راحتی در آب حل می‌شوند. مقاومت به نور رنگ‌بری[۱۲] در رنگ‌های الکسافلور بسیار مورد توجه است، به طوری که چنانچه با منبع لیزری پرقدرتی تحریک شود، شدت فلورسانس ساطع شده از آن برای یک دوره زمانی طولانی باقی می‌ماند. این قابلیت، نشانگر الکسافلور را برای بررسی سلول‌های زنده و بافت‌های برش خورده با روش‌های سنتی آماده‌سازی، مجهز می‌کند.

رنگ‌های الکسافلور در محدوده وسیعی از طول موج‌ها (فرابنفش تا مادون قرمز نزدیک) تحریک شده و نشر دارند. نامگذاری رنگ‌های الکسافلور با نوشتن طول موج خطوط طیفی که موجب تحریک آنها می‌شود، انجام می‌گیرد. به‌عنوان مثال، الکسافلور ۴۸۸، برای تحریک در خط ۴۸۸ nm لیزر آرگون کریپتون و یا الکسافلور ۵۶۸ برای تحریک خط طیفی ۵۶۸ nm طراحی شده‌است.

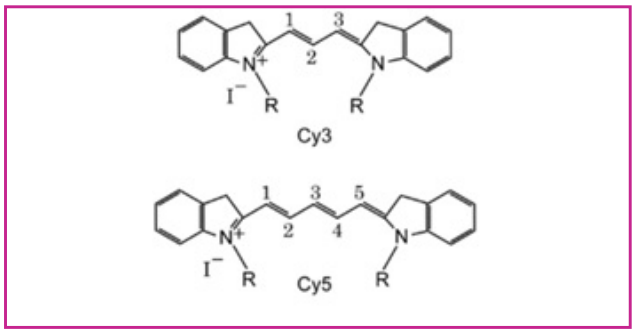


شکل (۲): ساختار مولکولی نشانگرهای الکسافلور. از چپ به راست: الکسافلور ۴۸۸، الکسافلور ۵۳۲ و الکسافلور ۵۶۸ [۱۳].

برخی از رنگ‌های الکسافلور به‌طور مشخص برای تحریک در ناحیه لیزر دیود آبی (۴۰۵ nm)، لیزر هلیوم - نئون زرد نارنجی (۵۹۴ nm) و یا لیزر هلیوم - نئون قرمز (۶۳۳ nm) طراحی و ساخته شده‌اند. از آنجایی که سری رنگ‌های الکسافلور در طول موج‌های زیادی وجود دارند، این امکان وجود دارد که برای نشان‌گذاری چندگانه، فقط از این رنگ‌ها استفاده شود. حتی خانواده‌ای از این پروب‌ها به‌طور دائم در حال گسترش هستند که با وجود طول موج تحریک نزدیک به هم، طیف‌های نشری متمایزی ایجاد می‌کنند. به‌عنوان مثال، الکسافلور ۴۸۸، الکسافلور ۵۰۰ و الکسافلور ۵۱۴ هر سه به‌طور عینی مشابه هم هستند و رنگ سبز روشن دارند، اما پروفایل طیف نشری آنها به‌طور کامل مجزا است. به اضافه اینکه، هر سه نشانگر می‌توانند با یک لیزر یون آرگون تحریک و به‌صورت تفکیک شده در کانال‌های مختلف آشکارسازی شوند.

رنگ‌های سیانین

خانواده رنگ‌های سیانین، Cy7، Cy5، Cy3، Cy2 و مشتقات آنها، از هسته هتروسیکل نیتروژن ایندول اشباع نشده با دو واحد آروماتیک که از طریق یک پل پلی آلکنی با تعداد کربن‌های متفاوت به هم متصل شده‌اند (شکل (۳))، تشکیل می‌شوند [۶]. این پروب‌ها پروفایل تحریک و انتشار فلورسانسی را مشابه بسیاری از رنگ‌های سنتی مانند فلورسین و تترا متیل رودامین از خود نشان می‌دهند، اما در آب حلالیت بالاتری دارند و پایداری نوری و بازده کوانتومی بالاتری نیز دارند. بیشتر رنگ‌های سیانین نسبت به رنگ‌های سنتی خود از نظر محیطی پایدارتر هستند و شدت انتشار فلورسانس آن‌ها حساسیت کمتری به pH و محیط آلی دارند. به روشی مشابه رنگ‌های الکسافلور، طول موج‌های تحریک سری سیانین به‌طور خاص برای استفاده با لیزرهای رایج و منابع تخلیه قوس تنظیم شده‌است و انتشار فلورسانس را می‌توان با ترکیب فیلترهای سنتی تشخیص داد.



شکل (۳): ساختار مولکولی دو نمونه از رنگ‌های سیانین [۱۴].

رنگ‌های سیانینی که در بازار عرضه می‌شوند، به راحتی به‌عنوان رنگ‌های واکنش‌پذیر یا فلوروفور همراه با طیف گسترده‌ای از آنتی‌بادی‌های ثانویه، دکسترین، استرپتاویدین و آویدین سفید تخم‌مرغ در دسترس هستند [۱۲]. رنگ‌های سیانین همگی دارای مناطق طیفی جذب وسیع‌تری نسبت به اعضای خانواده الکسافلور هستند، که آنها را در انتخاب منابع تحریک لیزری برای میکروسکوپ هم‌کانون تا حدودی متنوع‌تر می‌کند [۷]. به‌عنوان مثال، با استفاده از خط طیفی ۵۴۷ نانومتری یک لیزر یون آرگون، Cy2 به‌طور تقریبی دو برابر بیشتر از الکسافلور ۴۸۸ در انتشار فلورسانس کارآمد است. به روشی مشابه، خط لیزر یون آرگون ۵۱۴ نانومتری، Cy3 را با بازده بسیار بالاتری نسبت به الکسافلور ۵۴۶ تحریک می‌کند. مشخصات انتشار رنگ‌های سیانین از نظر عرض طیفی با سری الکسافلور قابل مقایسه است.

مشتقات Cy5 با طول موج بلند در سری رنگ‌های سیانین گنجانده می‌شود که در ناحیه قرمز (۶۵۰ نانومتر) برانگیخته شده و در طول موج‌های قرمز دور (۶۸۰ نانومتر) منتشر می‌شوند. نشانگر Cy5 به‌طور موثری با خط طیفی ۶۴۷ نانومتری لیزر کریپتون - آرگون، خط ۶۳۳ نانومتری لیزر هلیوم - نئون قرمز یا خط ۶۵۰ نانومتری لیزر دیود قرمز برانگیخته می‌شود و لذا دست را برای انتخاب نوع لیزر باز می‌گذارد. مشابه سایر نشانگرهای فلورسانس کننده در ناحیه طیفی مادون قرمز دور، Cy5 برای چشم انسان قابل مشاهده نیست و فقط به‌صورت الکترونیکی قابل تشخیص است (با استفاده از یک سیستم دوربین تخصصی یا مولتی‌پلایر نوری). بنابراین، این ردیاب به ندرت در آزمایش‌های فلورسانس میدان گسترده معمولی استفاده می‌شود.

در بخش دوم این مقاله، به انواع نشانگرهای فلورسنت کننده محیطی، نشانگرهای اندامک، نقاط کوانتومی و پروتئین‌های فلورسنت کننده به‌طور مفصل پرداخته خواهد شد.

نتیجه‌گیری

بسیاری از نشانگرهای سنتی که سال‌ها در کاربردهای میدان وسیع مفید بوده‌اند، زمانی که با خطوط طیفی لیزری با طول موج ثابت محدود می‌شوند، کیفیت پایینی دارند. امروزه مجموعه نشانگرهایی که در میکروسکوپ هم‌کانون سودمند هستند، به سرعت در حال رشد بوده و پیشرفت‌های مستمر در طراحی دستگاه، از سیستم‌های روبش دوگانه لیزری تا تصویربرداری چند طیفی، محدودیت‌های پیرامون این روش را کاهش داده است.

پی‌نوشت

۱. کارشناسی ارشد شیمی تجزیه، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
۲. عضو کارگروه تخصصی میکروسکوپ پروبی روبشی

3. Safranin O
4. Rhodamine B
5. Albert Coons
6. Green Fluorescent Protein (GFP)
7. Tetramethylrhodamine (TMR)
8. Tetramethylrhodamine (TRITC)
9. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)
10. Hoechst
11. Photostability
12. Photobleaching
13 A charge-coupled device (CCD)

مراجع

[1] Claxton, N.S.; Fellers, T.J.; Davidson, M.W. Laser scanning confocal microscopy. In Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation, 2nd ed.; Webster, J.G., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2006; pp. 1–37.

[2] F. H. Kasten, Introduction to Fluorescent Probes: Properties, History, and Applications, in W. T. Mason (ed.), Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity, New York: Academic Press, 17-39, 1999.

[3] A. H. Coons, H. J. Creech, R. N. Jones, and E. Berliner, Demonstration of Pneumococcal Antigen in Tissues by use of Fluorescent Antibody, J. Immunol., 45: 159- 170, 1942.

[4] R. Y. Tsien, Building and Breeding Molecules to Spy on Cells and Tumors, FEBS Letters, 579: 927-932, 2005.

[5] M. Bruchez, Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, and A. P. Alivisatos, Semiconductor Nanocrystals as fluorescent Biological Labels, Science, 218: 2013-2016, 1998.

[6] I. Johnson, Fluorescent Probes for Living Cells, Histochem. J., 30: 123-140, 1998.

[7] K. R. Spring, Detectors for Fluorescence Microscopy, in A. Periasamy (ed.), Methods in Cellular Imaging, New York: Oxford University Press, 40-52, 2001.

[8] M. W. Wessendorf and T. C. Brelje, Which Fluorophore is Brightest. A Comparison of the Staining Obtained Using Fluorescein, Tetramethylrhodamine, Lissamine Rhodamine, Texas Red and Cyanine 3.18, Histochemistry, 98: 81-85, 1992.

[9] A. Entwistle and M. Noble, the use of Lucifer Yellow, BODIPY, FITC, TRITC, RITC and Texas Red for Dual Immunofluorescence Visualized with a Confocal Scanning Laser Microscope, Journal of

Microscopy, 168: 219-238, 1992.

[10] M. J. Waring, Complex Formation Between Ethidium Bromide and Nucleic Acids, J. Mol. Biol., 13: 269-282, 1965.

[11] R. P. Haugland, The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Chicago: Invitrogen Molecular Probes, 2005.

[12] B. Ballou, G. W. Fisher, A. S. Waggoner, D. L. Farkas, J. M. Reiland, R. Jaffe, B. Mujumdar, S. R. Mujumdar, and T. R. Hakala, Tumor Labeling in vivo using Cyanine-Conjugated Monoclonal

Antibodies, Cancer Immunol. Immunother., 41: 257-263, 1995.

[13] https://biotium.com/blog/cf-dyes-what-started-it-all-part-1-a-history-of-fluorescence

[14] https://en.wikipedia.org/wiki/Cyanine.

شبکه آزمایشگاهی فناوری نانو

فصلنامه

دانش آزمایشگاهی ایران

ISSN 2538-3450

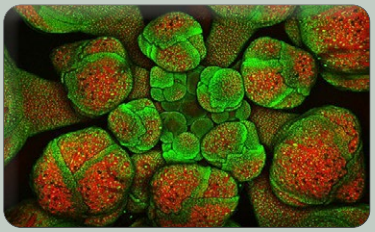
سال یازدهم ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۴۰۲ ■ شماره پیاپی ۴۱

طیف‌سنجی جرمی زمان پرواز

توسعه شبکه‌سازی آزمایشگاه‌ها

توسعه جریان دانش در شبکه آزمایشگاهی

اندازه‌گیری آرسنیک در برنج با روش جذب اتمی تولید هیدرید



انواع نشانگرها در میکروسکوپ روبشی لیزری هم‌کانون (بخش اول)

بررسی اندازه‌گیری اجزاء آروماتیک، اولفین و غیراشباع در انواع سوخت به روش کروماتوگرافی گازی با ستون کاپیلاری ۱۰۰ متری و قدرت تفکیک بالا

نقش آزمایشگاه در کنترل کیفیت مخازن تحت فشار بدون درز (بخش دوم)

مروری بر مقاومت گریس در برابر آب

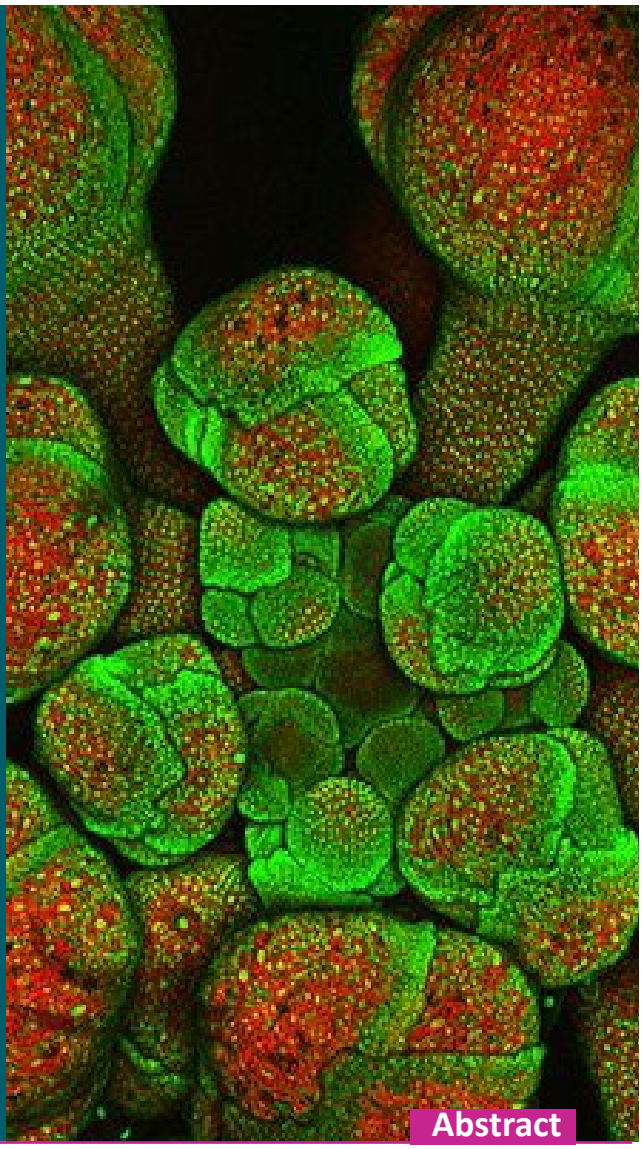
www.IJLK.ir
info@ijlk.ir

No.41 ■ Spring 2023 ■ Issue 1 ■ Volume 11
Iranian Journal of Laboratory Knowledge

Author
Parvin Hadian
*parvinhadian@gmail.com
1. MSc. Analytical Chemistry, Nanotechnology laboratory, Agriculture Biotechnology Research institute of Iran.
2. SPM Experts Workgroup

Laser Scanning Confocal Microscopy

Part 2



Abstract

Biological laser scanning confocal microscopy relies heavily on fluorescence as an imaging mode, primarily due to the high degree of sensitivity afforded by the technique coupled with the ability to specifically target structural components and dynamic processes in chemically fixed as well as living cells and tissues. Many fluorescent probes are constructed around synthetic aromatic organic chemicals designed to bind with a biological macromolecule (for example, a protein or nucleic acid) or to localize within a specific structural region, such as the cytoskeleton, mitochondria, Golgi apparatus, endoplasmic reticulum, and nucleus. Other probes are employed to monitor dynamic processes and localized environmental variables, including concentrations of inorganic metallic ions, pH, reactive oxygen species, and membrane potential. Fluorescent dyes are also useful in monitoring cellular integrity (live versus dead and apoptosis), endocytosis, exocytosis, membrane fluidity, protein trafficking, signal transduction, and enzymatic activity. In addition, fluorescent probes have been widely applied to genetic.

Keywords
Laser scanning confocal microscopy, Fluorescence, Fluorophores

Iran Nanotechnology Laboratory Network

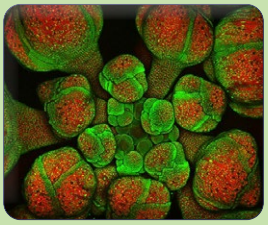
Iranian Journal of laboratory Knowledge

ISSN 2538-3450

Volume 11 ▪ Issue 1 ▪ Spring 2023 ▪ No.41

Time-of-Flight Mass Spectrometry

Arsenic determination in rice by hydride generation atomic absorption method



Laser Scanning Confocal Microscopy (Part 1)

Investigating determination of aromatic, olefinic and unsaturated components in different kinds of fuel by gas chromatography with capillary 100m column and high resolution

The Role of the Laboratory in the Quality Control of Seamless Gas Cylinders. (Part 2)

An Overview of Grease Water Resistance

www.IJLK.ir
info@ijlk.ir