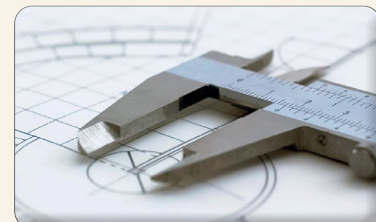


کاربرد میکروسکوپ الکترونی عبوری در زمینه توسعه، تحلیل و تشخیص نقایص دستگاه‌ها و قطعات صنعت نیمه‌هادی

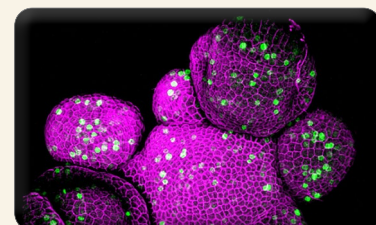
توسعه شبکه‌سازی آزمایشگاه‌ها



تعیین خلوص مواد با استفاده از دستگاه گرماسنج روبشی تفاضلی (DSC)



تعیین و ارزیابی منابع عدم قطعیت در آزمون ضربه شارپی



انواع نشانگرها در میکروسکوپ روبشی لیزری هم‌کانون (بخش دوم)



عدم قطعیت در فرآیند نمونه‌برداری



اعتباربخشی به نتایج در آزمایشگاه تشخیص و آنالیز مواد مخدر؛ شناسایی کانابینوئیدها به روش کروماتوگرافی لایه نازک

نویسنده

پروین هادیان^{۱*}

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

*parvinhadian@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۲۹

بخش دوم

انواع نشانگرها در میکروسکوپ روبشی لیزری هم کانون

چکیده

میکروسکوپ روبشی لیزری هم کانون به شدت به فلورسانس، به عنوان پایه تصویربرداری متکی است؛ حساسیت بالای این روش و قابلیت هدف قرار دادن اجزای ساختاری و فرآیندهای دینامیکی نمونه به عنوان مثال: سلولها و بافت‌های زنده تثبیت شده، نشان دهنده اهمیت بالای این موضوع است. بسیاری از نشانگرهای فلورسنت با 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 مثل 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، آگزوسیتوز، سیالیت غشاء، انتقال پروتئین، انتقال سیگنال و فعالیت آنزیمی مفید هستند. علاوه بر این، نشانگرهای فلورسنت به طور گسترده برای نقشه‌برداری ژنتیکی و تجزیه و تحلیل کروموزوم در زمینه ژنتیک مولکولی استفاده می‌شوند.

واژه‌های کلیدی

میکروسکوپ روبشی لیزری هم کانون، فلورسنت، نشانگرهای فلورسنت.

در بخش اول این مقاله، به تاریخچه نشانگرهای فلورسنت پرداخته شد. رنگ‌های فلورسنت در اوایل قرن بیستم به‌عنوان رنگ‌های حیاتی برای تصویربرداری از باکتری‌ها، تک یاخته‌ها و تریپانوزوم‌ها با 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. در طول ۶۰ سال گذشته، پیشرفت‌ها در ایمونولوژی و زیست‌شناسی سلولی و 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 [۱].

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 [۲]. 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. در بخش اول، به انواع رنگ‌های فلورسنت سنتی به‌عنوان مثال، فلورسین، مشتقات رودامین، ۴ و ۶ دیامیدینو-۲ فنیلیندول^۱ و غیره، رنگ‌های الکسافلور و رنگ‌های سیانین پرداخته شد. در ادامه، به سایر نشانگرهای مورد استفاده در ردیابی هدف با استفاده از میکروسکوپ هم‌کانون می‌پردازیم.

ردیاب‌های فلورسانس کننده محیطی

نشانگرهای طراحی شده برای بررسی محیط داخلی سلول‌های زنده به‌طور گسترده توسط محققان مورد بررسی قرار گرفته‌اند و صدها مورد برای بررسی اثراتی همچون غلظت موضعی فلزات قلیایی و قلیایی خاکی، فلزات سنگین (از نظر بیوشیمیایی به‌عنوان کوفاکتورهای آنزیمی) یون‌های معدنی، تیول‌ها و سولفیدها، نیتريت، pH، قطبیت حلال و پتانسیل غشاء توسعه یافته‌اند [۳ تا ۵]. در واقع، آزمایش‌ها در این عرصه بر تغییرات طول موج و یا شدت طیف‌های جذب و انتشار، که با استفاده از نشانگرهایی که به یون‌های کلسیم متصل می‌شوند، به‌منظور اندازه‌گیری چگالی شار درون سلولی متمرکز بودند. این ردیاب‌ها با درجه خاصی از گزینش‌پذیری به یون هدف متصل می‌شوند تا پاسخ اندازه‌گیری شده را ایجاد کنند. کلسیم یک یون مهم متابولیکی است که نقش حیاتی را در پاسخ سلولی به انواع بسیاری از محرک‌های خارجی ایفا می‌کند. نوسانات گذرا در غلظت یون کلسیم، باعث ایجاد پاسخ در سلول‌ها می‌شود. نشانگرها باید طوری طراحی شوند که نه تنها غلظت‌های موضعی کلسیم را اندازه‌گیری کنند، بلکه باید تغییرات کمی در هنگام پیشرفت چگالی امواج شار در کل سیتوپلاسم را نیز گزارش کنند. بسیاری از مولکول‌هایی که برای اندازه‌گیری سطح کلسیم طراحی شده‌اند، بر پایه عوامل کیلیت‌کننده غیرفلورسنت اتیلن گلیکول اسید تتراستیک^۲ و BAPTA^۳ هستند که سال‌ها برای جداسازی یون‌های کلسیم در محلول‌های بافر استفاده می‌شوند. دو مورد از رایج‌ترین ردیاب‌های کلسیمی، شاخص‌های نسبت‌سنجی فوراً-۴^۴ و ایندو-۱^۵ هستند، اما این نشانگرها به‌خصوص در میکروسکوپ هم‌کانون مناسب نیستند [۳]. لذا از تعداد محدودی از این رنگ‌ها، بیشتر به‌صورت ترکیبی برای اندازه‌گیری کلسیم با استفاده از میکروسکوپ هم‌کانون استفاده می‌شود [۶]. فوراً قرمز، یک هتروسیکل چند هسته‌ای ایمیدازول و بنزوفوران است که کاهش فلورسانس را در ۶۵۰ نانومتر، هنگام اتصال کلسیم نشان می‌دهد.

هنگامی که مخلوطی از نشانگرهای فلو-۳ و فوراً قرمز در ۴۸۸ نانومتر برانگیخته شود و فلورسانس در بیشینه مقدار انتشار (به ترتیب ۵۲۵ و ۶۵۰ نانومتر) از هر دو نشانگر اندازه‌گیری شود، پاسخ نسبی به شار یون کلسیم به‌دست می‌آید. از آنجایی که شدت انتشار فلو-۳ به‌طور یکنواخت افزایش و فوراً قرمز کاهش می‌یابد، زمانی که غلظت رنگ در ناحیه مورد بررسی ثابت شود، یک نقطه ایزوبستی به‌دست می‌آید.

اندازه‌گیری کمی یون‌هایی غیر از کلسیم، همچون منیزیم، سدیم، پتاسیم و روی، به روشی مشابه، با استفاده از نشانگرهای مشابه انجام می‌شود [۳ و ۴]. یکی از پر طرفدارترین کاوشگرها برای منیزیم، mag-fura-2 است که از لحاظ ساختاری شبیه فوراً قرمز است، همچنین در محدوده اشعه فرابنفش برانگیخته می‌شود و مشکلات مشابهی همانند فوراً-۲ و ایندو-۱ را در میکروسکوپ هم‌کانون ارائه می‌دهد. نشانگرهای برانگیخته شده در ناحیه نور مرئی برای تجزیه و تحلیل بسیاری از کاتیون‌های تک ظرفیتی و دو ظرفیتی که در غلظت‌های مختلف در ماتریکس سلولی وجود دارند، در دسترس هستند. نشانگرهای فلورسانس مهم برای pH داخل سلولی شامل یک مشتق پیرن معروف به HPTS^۶ یا پیرائین، مشتق فلورسین BCECF^۷ و یک گزارتن جایگزین دیگر به نام کربوکسی سنارف-وان^۸ است [۷]. از آنجا که بسیاری از نشانگرهای معمولی به pH محیط اطراف حساس هستند، تغییرات در شدت فلورسانس که بیشتر به برهم‌کنش‌های زیستی نسبت داده می‌شود، ممکن است در واقع در نتیجه پروتونه شدن نشانگر رخ دهد. بنابراین، در اندازه‌گیری هم‌زمان غلظت یون کلسیم و pH، بیشتر با ترکیب یک نشانگر pH، مانند اسنارف-وان، با یک شاخص یون کلسیم (مانند فوراً-۲) انجام می‌شود.

نشانگرهای اندامک

نشانگرهایی که اندامک‌های درون سلولی، به‌عنوان مثال: میتوکندری، لیزوزوم، دستگاه گلژی و شبکه آندوپلاسمی را

اسفنگولیپیدها رنگ آمیزی می‌شوند [۱۰]. این عوامل، بسیار چربی دوست بوده و بنابراین، به‌عنوان نشانگر برای مطالعه انتقال و متابولیسم لیپید در سلول‌های زنده مفید هستند. چندین مورد از مفیدترین فلوروفورها برای دستگاه گلژی حاوی هسته پیچیده هتروسیکلیک، BODIPY هستند [۴ و ۹]. هنگامی که نشانگر BODIPY با اسفنگولیپیدها جفت می‌شود، بسیار انتخابی عمل کرده و در مقابل نور رنگ‌بری^{۱۴} مقاومت می‌کنند به طوری که بسیار برتر از بسیاری از رنگ‌های دیگر است. علاوه بر این، طیف انتشار این نشانگرها به غلظت (تغییر از سبز به قرمز در غلظت‌های بالاتر) وابسته است و آنها را برای مکان‌یابی و شناسایی ساختارهای درون سلولی که مقادیر زیادی لیپید را انباشته می‌کنند، مفید می‌سازد.

محبوب‌ترین پروب‌های سنتی برای آنالیز فلورسانس شبکه آندوپلاسمی به ترتیب رنگ‌های کربوسیانین و زانتن، DiOC₆^{۱۵} و چندین مشتق رودامین هستند [۴ و ۹]. با این حال، این رنگ‌ها باید با احتیاط استفاده شوند، زیرا می‌توانند در میتوکندری، دستگاه گلژی و سایر نواحی چربی دوست درون سلولی تجمع پیدا کنند. کاوشگرهای جدیدتر و پایدارتر برای رنگ آمیزی انتخابی شبکه آندوپلاسمی توسط چندین سازنده توسعه داده شده‌اند. به ویژه، اعضای آگزازول از خانواده داپوکسیل تولید شده با پروب‌های مولکولی، عوامل بسیار خوبی برای نشان‌گذاری انتخابی شبکه آندوپلاسمی در سلول‌های زنده، به تنهایی یا در ترکیب با رنگ‌های دیگر هستند. این پروب‌ها پس از تثبیت با فرمالدئید باقی می‌مانند، اما می‌توانند با مواد شوینده نفوذپذیر، از بین بروند. یکی دیگر از کاوشگرهای مفید، برفلدین ای^{۱۶} است، یک متابولیت قارچی پیچیده استروئیدی که به‌عنوان یک مهار کننده انتقال پروتئین به خارج از شبکه آندوپلاسمی عمل می‌کند.

نقاط کوانتومی

بلورهای نانومتری از نیمه‌هادی‌های خالص به‌عنوان نقاط کوانتومی شناخته می‌شوند که مانند یک عامل نشان‌گذاری فلورسنت مفید برای سلول‌های زنده و ثابت در هر دو میکروسکوپ فلورسانس و هم‌کانون مورد استفاده قرار می‌گیرند. به‌منظور اتصال نقاط کوانتومی به ترکیبات زیستی همچون پروتئین‌ها، آنتی‌بادی‌ها و غیره، این بلورهای نیمه‌هادی ریز خالص شده را با یک پوسته پلیمری آبدوست می‌پوشانند (شکل ۱). این پروب‌ها مزایای قابل توجهی نسبت به رنگ‌های آلی و پروتئین‌های فلورسنت دارند؛ به‌عنوان مثال، پایداری طولانی مدت در برابر نور، شدت فلورسانس بالا و رنگ‌های متعدد با قابلیت تحریک تک طول موج [۱۱].

نقاط کوانتومی به روشی شبیه به دیویدهای نیمه‌هادی ساطع کننده نور^{۱۷}، روشنایی ایجاد می‌کنند، اما به جای یک محرک الکتریکی، با جذب فوتون فعال می‌شوند. فوتون جذب شده یک جفت الکترون-حفره ایجاد می‌کند که به سرعت با

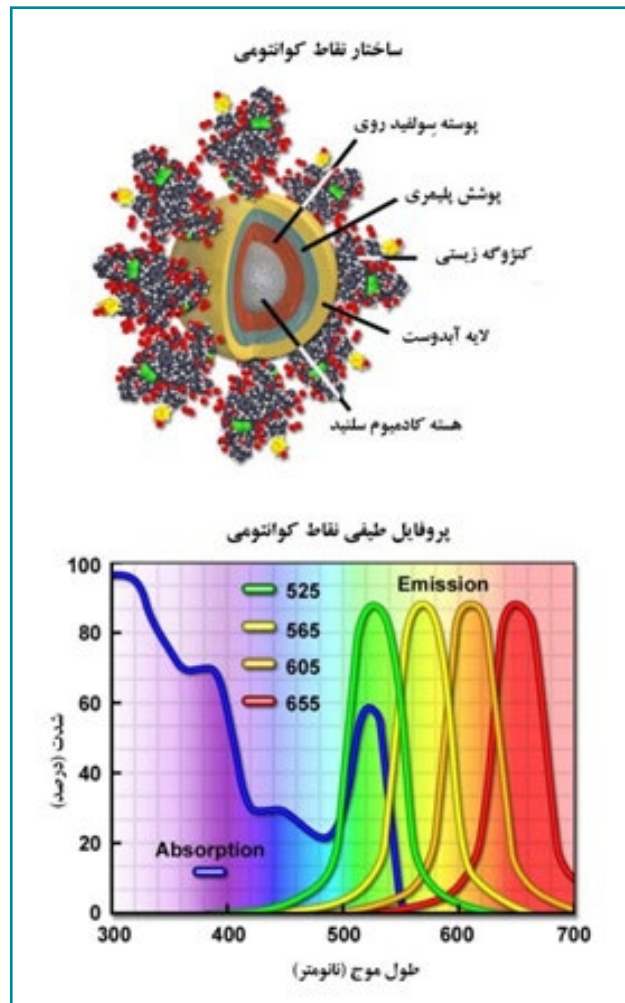
هدف قرار می‌دهند، برای نظارت بر انواع فرآیندهای زیستی در سلول‌های زنده با استفاده از میکروسکوپ هم‌کانون مفید هستند [۳ و ۴]. به‌طور کلی، نشانگر اندامک، از یک هسته فلئوئورو کروم متصل به یک نیمه گزینش‌پذیر تشکیل شده‌است که از طریق پیوندهای کووالانسی، الکترواستاتیک، آگریز و یا غیره به اندامک مورد نظر متصل می‌شود. بسیاری از نشانگرهای فلورسنت که برای انتخاب اندامک‌ها طراحی شده‌اند، می‌توانند در غشای سلولی نفوذ کنند (بنابراین، در سلول‌های زنده مفید هستند)؛ پروب‌های اندامک برای بررسی انتقال، تنفس، میتوز، مرگ، تجزیه پروتئین، پدیده‌های غشایی و غیره در سلول‌های زنده مفید هستند.

ردیاب‌های میتوکندری، از جمله مفیدترین نشانگرها برای بررسی تنفس سلولی هستند و بیشتر همراه با رنگ‌های دیگر در تحقیقات مورد استفاده قرار می‌گیرند. نشانگرهای سنتی به‌عنوان مثال رودامین ۱۲۳ و تترامتیل روزامین، هنگامی که سلول‌ها تثبیت می‌شوند، به سرعت از بین می‌روند؛ بنابراین، تا حد زیادی با استفاده از نشانگرهای جدیدتر و خاص‌تر که با ردیاب‌های مولکولی ساخته شده‌اند، جایگزین می‌شوند [۴]. این موارد، شامل سری محبوب میتوتراکر^{۱۰} و میتوفلور^{۱۰} از هتروسیکل‌های گزانتن، بنزوکسازول، ایندول و بنزیمیدازول است که از نظر ساختاری متنوع بوده و در انواع پروفایل‌های طیفی تحریک و انتشار موجود هستند. رنگ‌های میتوتراکر پس از تثبیت سلولی در فرمالدئید به خوبی حفظ می‌شوند و بیشتر می‌توانند در برابر عوامل نفوذپذیر چربی دوست مقاومت کنند [۸]. در مقابل، پروب‌های میتوفلور به‌طور خاص، برای سلول‌هایی که به‌صورت فعال تنفس می‌کنند، طراحی شده‌اند و برای روش‌های تثبیت و رنگ‌آمیزی مناسب نیستند [۴]. یکی دیگر از نشانگرهای محبوب میتوکندری، با عنوان جی‌سی-وان^{۱۱}، به‌عنوان نشانگر پتانسیل غشا و در آزمایش‌های رنگ‌آمیزی متعدد با سلول‌های ثابت مفید است. به‌طور کلی، آمین‌های بازی ضعیف که قادرند از غشاها عبور کنند، کاندیدای ایده‌آلی برای بررسی سنتر زیستی و پاتوژن در لیزوزوم‌ها هستند [۴ و ۵]. ردیاب‌های لیزوزومی سنتی شامل مشتقات غیراختصاصی فنازین و آکریدین قرمز و آکریدین نارنجی هستند که پس از پروتونه شدن، در وزیکول‌های اسیدی تجمع می‌یابند [۵ و ۹]. دانه‌ها و ماکرومولکول‌های لاتکس نشاندار شده با فلورسنت همچون دکستران نیز می‌توانند در لیزوزوم‌ها با اندوسیتوز تجمع کنند. با این حال، مفیدترین ابزار برای بررسی خواص لیزوزومی با میکروسکوپ هم‌کانون، رنگ‌های ردیاب لیزو^{۱۲} و حسگر لیزو^{۱۳} هستند که با استفاده از پروب‌های مولکولی توسعه یافته‌اند [۴ و ۹]. ردیاب‌های لیزو که در انواع طول موج‌های تحریک و انتشار وجود دارند، دارای گزینش‌پذیری بالایی برای اندام‌های اسیدی بوده و قادر به نشان‌دار کردن سلول‌ها در غلظت‌های نانومولاری هستند. شدت فلورسانس به‌طور چشمگیری در سری حسگر لیزو پس از پروتونه شدن افزایش می‌یابد و این رنگ‌ها را به‌عنوان شاخص pH مفید می‌کند [۴].

پروتئین‌ها و لیپیدها در دستگاه گلژی طبقه‌بندی و پردازش می‌شوند و به‌طور معمول با مشتقات فلورسنت سرآمیدها و

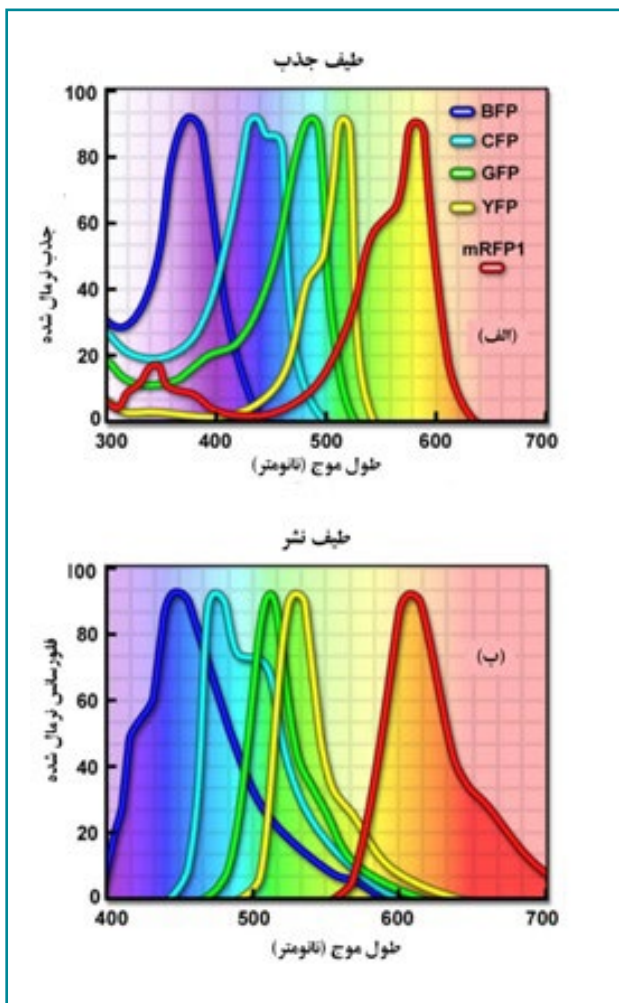
مشخصات پروفایل انتشار برای نقاط کوانتومی که در ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ یا ۶۰۰ نانومتر برانگیخته می‌شوند، مشابه است؛ با این تفاوت که شدت فلورسانس در طول موج‌های تحریک کوتاه‌تر به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد. عرض، در نیمه ارتفاع پروفایل انتشار یک نقطه کوانتومی معمولی حدود ۳۰ نانومتر است و نیمرخ طیفی به سمت طول موج‌های بلندتر (دارای «دم» با شدت بالاتر) منحرف نمی‌شود، این مورد در بیشتر فلوروکروم‌های آلی مشاهده می‌شود. این ویژگی باعث می‌شود بدون تداخل طیف‌های نشری بتوان از نقاط کوانتومی متفاوتی برای نشان‌گذاری نمونه استفاده کرد. برای کاربردهای زیستی، بلورهای کادمیوم سلنید با یک پوسته متشکل از سولفید روی پوشانده شده‌است تا خواص نوری را بهبود بخشد. سپس، هسته با یک فیلم پلیمری و لیگاندهای دیگر پوشانده می‌شود تا آب‌گریزی را کاهش دهد و کارایی اتصال ماکرو مولکول‌های مزدوج را بهبود دهد. محصول نهایی یک ذره فعال زیستی است که اندازه آن از ۱۰ تا ۱۵ نانومتر است [۱۳] و در فرآیندهای نشان‌گذاری، به جای معرف‌های رنگ‌آمیزی کلاسیک استفاده می‌شود.

تابش هم‌زمان یک فوتون که انرژی کمتری دارد، به حالت اولیه باز می‌گردد. مفیدترین نیمه‌هادی که تاکنون برای تولید نقاط کوانتومی زیستی کشف شده، کادمیوم سلنید^{۱۸} است؛ ماده‌ای که در آن انرژی فوتون‌های ساطع شده تابعی از اندازه فیزیکی ذرات نانوبلور است. بنابراین، نقاط کوانتومی با اندازه‌هایی که تنها به اندازه یک دهم نانومتر با هم تفاوت دارند، طول موج‌های متفاوتی از نور ساطع می‌کنند، در حالی که اندازه‌های کوچک‌تر، طول موج‌های کوتاه‌تری ساطع می‌کنند و بالعکس.



شکل (۱): ساختار و پروفایل طیفی نقاط کوانتومی. هسته کادمیوم سلنید با پوسته سولفید روی محصور شده‌است، سپس یک پوشش پلیمری و در نهایت یک لایه بیرونی آبدوست که کنژوگه زیستی به آن متصل شده‌است، روی آن قرار گرفته است. پروفایل جذب، یک افتادگی را در ۴۰۰ نانومتر نشان می‌دهد، در حالی که طیف‌های انتشار همگی دارای پروفایل‌های متقارن مشابه هستند [۱].

برخلاف نشانگرهای آلی معمولی یا پروتئین‌های فلورسنت که پروفایل‌های طیفی بسیار مشخصی را نشان می‌دهند، نقاط کوانتومی طیف جذبی دارند که با کاهش طول موج به‌طور پیوسته افزایش می‌یابد (شکل (۲)). همچنین در مقابل، شدت انتشار فلورسانس محدود به یک پیک متقارن با بیشینه مقدار طول موج است که به اندازه نقطه بستگی دارد، اما مستقل از طول موج تحریک [۱۲] است. بنابراین،



شکل (۲): پروفایل‌های طیفی فلورسنت، برای پروتئین‌های فلورسنت که در نواحی آبی تا نارنجی-قرمز، طیف مرئی ساطع می‌کنند (تابع جذب یا انتشار نرمال شده به‌عنوان تابعی از طول موج رسم شده‌است). (الف): طیف جذب و (ب): طیف نشری پروتئین‌های فلورسنت قسمت (الف) [۱].

در واقع، پروتئین‌های فلورسنت را می‌توان با استفاده از فناوری شبیه‌سازی DNA تکمیلی نو ترکیب، تقریباً به هر پروتئینی در سلول‌های زنده ترکیب کرد و محصول ژن پروتئین فیوژن حاصل را در رده‌های سلولی با روش استاندارد کشت بافت، بیان نمود. عدم نیاز به کوفاکتورهای فعال‌سازی اختصاصی سلول، پروتئین‌های فلورسنت را به‌عنوان ردیاب‌های تعمیم یافته از سایر ماکرومولکول‌های زیستی همچون فیکوبیلی پروتئین‌ها بسیار مفیدتر می‌کند که برای تولید فلورسانس نیاز به درج رنگدانه‌های جانبی دارند. یکی از اولین گونه‌ها که به‌عنوان GFP تقویت شده^{۲۰} شناخته می‌شود، حساسیت دمایی GFP را کاهش و کارایی بیان آن را در سلول‌های پستانداران افزایش می‌دهد. پروتئین‌های ترکیب شده با eGFP را می‌توان در شدت نور کم و برای مدت زمان طولانی‌تری مشاهده کرد. این ترکیب با خط طیفی ۴۸۸ نانومتری از لیزرهای آرگون و یون کریبتون-آرگون در میکروسکوپ هم‌کانون برانگیخته می‌شوند. مطالعات روی GFP جهش یافته نشان داد که قادر است ویژگی‌های جذب و انتشار را در کل منطقه طیفی مرئی نشان دهد، این مهم، محققان را قادر می‌سازد تا ترکیبات ردیاب را برای مشاهده هم‌زمان دو یا چند پروتئین فلورسنت مجزا در یک ارگانیسم منفرد ایجاد کنند (پروفایل‌های طیفی در شکل (۲)). در اولین تحقیقات، با جایگزین کردن اسید آمینه‌های GFP، انواع جهش یافته پروتئین فلورسنت آبی^{۲۱} و پروتئین فلورسنت فیروزه‌ای^{۲۲} را به‌دست آوردند که پروفایل‌های طیفی جذب و انتشار GFP را به مناطق با طول موج پایین‌تر تغییر داد [۱۵]. استفاده از این مشتقات در ترکیب با GFP، در آزمایش‌های انتقال انرژی تشدید فلورسانس^{۲۳} و سایر تحقیقاتی که بر تصویربرداری فلورسانس چند رنگ تکیه دارند، مفید هستند. پروتئین فلورسنت آبی را می‌توان با خط ۳۵۴ نانومتری از یک لیزر پر قدرت آرگون تحریک کرد، در حالی که مشتق فیروزه‌ای، با تعدادی از خطوط لیزر بنفش و آبی، از جمله دیود آبی ۴۰۵ نانومتری، طول موج ۴۴۲ نانومتری لیزر هلیوم-کادمیم و خط ۴۵۷ نانومتری از لیزر استاندارد یون آرگون تحریک می‌شود.

یکی دیگر از مشتقات محبوب پروتئین فلورسنت‌ها، پروتئین فلورسنت زرد^{۲۴} است که براساس تجزیه و تحلیل ساختاری بلوری GFP طراحی شد تا طیف جذب و انتشار را به رنگ قرمز تغییر دهد [۱۵]. پروتئین فلورسنت زرد به‌طور بهینه با خط طیفی ۵۱۴ نانومتری لیزر یون آرگون برانگیخته می‌شود و انتشار شدیدتری نسبت به پروتئین فلورسنت سبز تقویت شده ارائه می‌دهد، اما به pH پایین و غلظت یون هالوژن بالا حساس‌تر است. مشتق پروتئین فلورسنت زرد تقویت شده^{۲۵} با خط لیزر آرگون-یون ۵۱۴ نیز مفید است؛ زیرا می‌توان آن را با کارایی به نسبت بالا، با خط ۴۸۸ نانومتری از لیزرهای آرگون و کریبتون-آرگون تحریک نمود. هر دوی این مشتقات پروتئین فلورسنت به‌طور گسترده در تحقیقات FRET در ترکیب با CFP به کار می‌روند؛ علاوه‌بر این، در مطالعات مربوط به انتقال چند

در میکروسکوپ هم‌کانون، نقاط کوانتومی با بیشتر خطوط طیفی تولید شده توسط سیستم‌های لیزری رایج، از جمله یون آرگون، هلیوم-کادمیم، کریبتون-آرگون و هلیوم-نون سبز تحریک می‌شوند. به ویژه نقاط کوانتومی در مناطق فرابنفش و بنفش، لیزر دیود آبی و لیزرهای حالت جامد پمپ شده با دیود که دارای خطوط طیفی برجسته در ۴۴۲ نانومتر و زیر آن هستند، به خوبی تحریک می‌شوند [۱۱ و ۱۲]. لیزر دیود آبی با طول موج ۴۰۵ nm یک منبع تحریک اقتصادی است که به دلیل ضریب خاموشی بالای آنها در این طول موج، برای استفاده با نقاط کوانتومی بسیار موثر است. یکی دیگر از مزایای استفاده از این نشانگرها در میکروسکوپ هم‌کانون، توانایی تحریک چندین اندازه مختلف نقاط کوانتومی (و رنگ‌های طیفی) در یک نمونه با یک طول موج تکی است که این پروب‌ها را کاندیدی عالی برای آزمایش‌های نشان‌گذاری متعدد می‌کند.

پروتئین‌های فلورسنت

طی چند سال گذشته، کشف و توسعه پروتئین‌های فلورسنت طبیعی و مشتقات آن به سرعت در طیف وسیعی از فرآیندهای درون سلولی در موجودات زنده مورد استفاده قرار گرفت [۱۴]. این نشانگرهای زیستی، توانایی تجسم، نظارت و ردیابی تک مولکول‌ها را با وضوح زمانی و مکانی بالا در آزمایش‌های حالت ایستا و پویا در اختیار دانشمندان قرار داده‌اند. انواع موجودات دریایی، منبع بیش از ۱۰۰ پروتئین فلورسنت هستند که محققان را با پالت متعادلی از نشانگرهای زیستی غیرتجانمی برای تجزیه و تحلیل فلورسانس منفرد، دوگانه و چند طیفی مسلح می‌کنند. از جمله مزایای پروتئین‌های فلورسنت نسبت به پروب‌های نیمه‌هادی آلی سنتی و جدید که در بالا توضیح داده شد، پاسخ آنها به طیف گسترده‌تری از رویدادها و سیگنال‌های زیستی است. این ماکرومولکول‌های زیستی همراه با توانایی هدف قرار دادن خاص اجزای داخل سلولی، عدم سمیت یا سمیت بسیار کم فوتودینامیک و سازگاری گسترده با بافت‌ها و ارگانیسم‌ها، مرز جدید و هیجان‌انگیزی را در تصویربرداری سلول‌های زنده ارائه می‌کنند.

اولین عضو این سری، کشف پروتئین فلورسنت سبز^{۱۹}، از عروس دریایی اقیانوس اطلس شمالی بود و مشخص شد که درجه بالایی از فلورسانس را بدون کمک سوپستراها یا کوآنزیم‌های اضافی از خود نشان می‌دهد [۱۱ و ۱۲]. در GFP، قسمت فلورسنت، یک مشتق تری پپتیدی از سرین، تیروزین و گلیسین است که برای فعال شدن به اکسیژن مولکولی نیاز دارد، اما هیچ کوفاکتور یا آنزیم اضافی ندارد. بررسی‌های بعدی نشان داد که ژن GFP می‌تواند در سایر ارگانیسم‌ها، از جمله پستانداران، بیان شود تا آنالوگ‌های کاملاً کاربردی ایجاد کند که هیچ اثر زیستی نامطلوبی از خود نشان ندهد.

پروتئین مفید هستند.

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 طول‌موج‌های تحریک لیزر هم‌کانون وجود دارد؛ در نتیجه، تعداد نشانگرهایی که کاربرد گسترده‌ای در میکروسکوپ هم‌کانون پیدا کرده‌اند، زیرمجموعه محدودی از هزاران کشف انجام شده‌است.

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 معرفی سیستم‌های لیزری جدید و پر قدرت نیز محدودیت‌های پیرامون این روش را کاهش داده است.

پی‌نوشت

1. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)
2. Ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA)
3. 1,2-bis(o-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA)
4. fura-2
5. indo-1
6. 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid (HPTS)
7. (2',7'-bis-(Carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein (BCECF)
8. carboxy SNARF-1
9. MitoTracker
10. Mito Fluor
11. JC-1
12. LysoTracker
13. Lyso Sensor
14. Photobleaching
15. 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide
16. Brefeldin A
17. light-emitting diode (LED)
18. Cadmium selenide (CdSe)
19. Green Fluorescent Protein (GFP)
20. The enhanced green fluorescent protein (eGFP)
21. blue fluorescent protein (BFP)
22. Cyan fluorescent proteins (CFP)
23. Fluorescence resonance energy transfer (FRET)
24. Yellow fluorescent protein (YFP)
25. Enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP)

- [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] I. Johnson, Fluorescent Probes for Living Cells, *Histochem. J.*, 30: 123-140, 1998.
- [3] A. R. Hibbs, *Confocal Microscopy for Biologists*, New York: Kluwer Academic, 2004.
- [4] R. P. Haugland, *The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Chicago: Invitrogen Molecular Probes, 2005.
- [5] 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.
- [6] D. Schild, A. Jung, and H. A. Schultens, Localization of Calcium Entry through Calcium Channels in Olfactory Receptor Neurons using a Laser Scanning Microscope and the Calcium Indicator Dyes Fluo-3 and Fura-Red, *Cell Calcium*, 15: 341-348, 1994.
- [7] D. Willoughby, R. C. Thomas, and C. J. Schwiening, Comparison of Simultaneous pH Measurements made with 8-Hydroxypyrene- 1,3,6-trisulphonic acid (HPTS) and pH-Sensitive Microelectrodes in Snail Neurons, *Pflugers Arch.*, 436: 615-622, 1998.
- [8] M. Poot, Y.-Z. Zhang, J. A. Kramer, K. S. Wells, L. J. Jones, D. K. Hanzel, A. G. Lugade, V. L. Singer, and R. P. Haugland, Analysis of Mitochondrial Morphology and Function with Novel Fixable Fluorescent Stains, *J. Histochem. Cytochem.*, 44: 1363-1372, 1996.
- [9] I. Johnson, Fluorescent Probes for Living Cells, *Histochem. J.*, 30: 123-140, 1998.
- [10] R. E. Pagano and O. C. Martin, Use of Fluorescent Analogs of Ceramide to Study the Golgi Apparatus of Animal Cells, in J. E. Celis, *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, Volume 2, 507-512, 1998.
- [11] X. Gao, L. Yang, J. A. Petros, F. F. Marshall, J. W. Simons, and S. Nie, In vivo Molecular and Cellular Imaging with Quantum Dots, *Curr. Opin. Biotech.*, 16: 63-72, 2005.
- [12] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, and S. Weiss, Quantum Dots for Live Cells, in vivo Imaging, and Diagnostics, *Science*, 307: 538-544, 2005.
- [13] D. R. Larson, W. R. Zipfel, R. M. Williams, S. W. Clark, M. P. Bruchez, F. W. Wise, and W. W. Webb, Water Soluble Quantum Dots for Multiphoton Fluorescence Imaging in vivo, *Science*, 300: 1434-1436, 2003.
- [14] E. J. G. Peterman, H. Sosa, and W. E. Moerner, Single-Molecule Fluorescence Spectroscopy and Microscopy of Biomolecular Motors, *Ann. Rev. Phys. Chem.* 55: 79-96, 2004.
- [15] R. M. Wachter, M.-A. Elsliger, K. Kallio, G. T. Hanson, and S. J. Remington, Structural Basis of Spectral Shifts in the Yellow- Emission Variants of Green Fluorescent Protein, *Structure*, 6:1267-1277, 1998.

Author

Parvin Hadian^{1,2*}

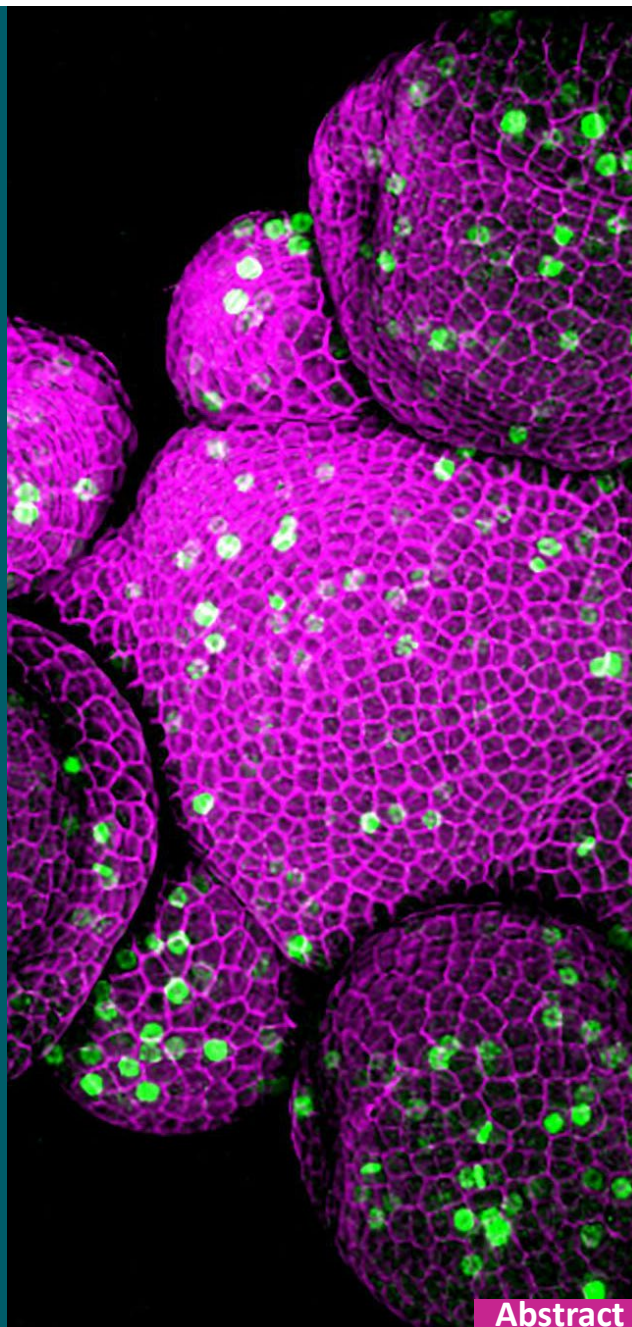
*parvinhadian@gmail.com

1. MSc. Analytical Chemistry,
Nanotechnology laboratory, Agriculture
Biotechnology Research institute of Iran.

2. SPM Experts Workgroup

Fluorophores for 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

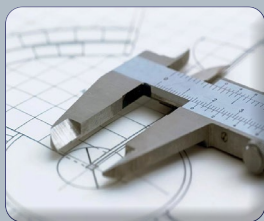
Laser scanning confocal microscopy,
Fluorescence, Fluorophores.



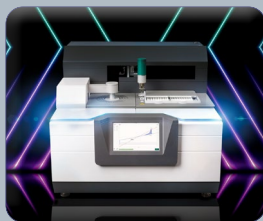
Utilization of Transmission Electron Microscopy for development, analysis, and failure detection in semiconductor industry



Uncertainty in the sampling process



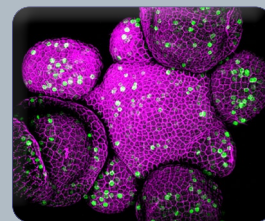
Determining and evaluating sources of uncertainty in the Charpy impact test



Determining the purity of materials using a differential calorimetry device



Determination of modulus of elasticity based on plate load test (PLT) results – case study



Fluorophores for Confocal Microscopy (part 2)