INSO

23414
1st Edition

2023

Identical with
ISO/TS 23366:
2023

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران

Iran National Standards Organization

استاندارد ملی ایران
۲۳۴۱۴
چاپ اول
۱۴۰۲

فناوری نانو- الزامات ارزشیابی عملکرد برای کمّی‌سنجی مولکول‌های زیستی با استفاده از نانوذرات فلورسانت در ایمونوهیستوشیمی

Nanotechnologies — Performance evaluation requirements for quantifying biomolecules using fluorescent nanoparticles in immunohistochemistry

ICS: 07.120

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران، ضلع جنوب غربی میدان ونک، خیابان ولیعصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق‌پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران- ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و ۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج - ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶)

رایانامه: standard@inso.gov.ir

وبگاه: http://www.inso.gov.ir

Iran National Standards Organization (INSO)

No. 2592 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163, Karaj, Iran

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: standard@inso.gov.ir

Website: http://www.inso.gov.ir

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک مادهٔ ۷ قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد ، ابلاغ‌شده در دی ماه ۱۳۹۶، وظیفهٔ تعیین، تدوین، به‌روزرسانی و نشر استانداردهای ملی را بر عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند درکمیته ملی طرح، بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)[1]، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization
2- International Electrotechnical Commission
3- International Organization of Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)
4- Contact point
5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«فناوری نانو- الزامات ارزشیابی عملکرد برای کمّی‌سنجی مولکول‌های زیستی با استفاده از نانوذرات فلورسانت در ایمونوهیستوشیمی»

رئیس:	**سمت و/یا محل اشتغال:**
رضوی، شبنم (دکتری تخصصی بیوتکنولوژی پزشکی)	عضو هیئت علمی- دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران
دبیر:	
صادق حسنی، صدیقه (دکتری شیمی تجزیه-الکتروشیمی)	مدیر تحقیق و توسعه- شرکت آرال تجهیز آزما
اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
اسلامی‌پور، الهه (کارشناسی ارشد زیست‌شناسی)	کارشناس مسئول- گروه استاندارد و ایمنی ستاد ویژه فناوری نانو و میکرو
حسینی حسن‌آبادی، مریم (کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)	کارشناس- مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی مشهد
دارابی، عادله (دکتری تخصصی فیزیک)	عضو مستقل
رحیمی، فرزانه (دکتری تخصصی شیمی معدنی)	پژوهشگر پسادکتری- دانشگاه خواجه نصیرالدین طوسی
سهرابی جهرمی، ابوذر (دکتری فناوری نانو)	رئیس- هیئت مدیره شرکت راصد توسعه فناوری‌های پیشرفته
سیفی، مهوش (کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)	مشاور- گروه استاندارد و ایمنی ستاد ویژه توسعه فناوری نانو و میکرو
منهاج‌بناء، رابعه (دکتری تخصصی سم‌شناسی)	مدیر عامل- شرکت راهبران توسعه سبز
نجفی اصلی پاشاکی، شبنم (دکتری شیمی تجزیه)	مدیر فنی- آزمایشگاه‌های مرکز پژوهش‌های کاربردی علوم زمین البرز

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

سمت و/یا محل اشتغال:

هادیان، پروین
(کارشناسی ارشد شیمی‌تجزیه)

مسئول- آزمایشگاه نانو- پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی

ویراستار:

سیفی، مهوش
(کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)

مشاور- گروه استاندارد و ایمنی ستاد ویژه توسعه فناوری نانو و میکرو

فهرست مندرجات

عنوان **صفحه**

پیش‌گفتار ز
مقدمه ح
۱ هدف و دامنهٔ کاربرد ۱
۲ مراجع الزامی ۱
۳ اصطلاحات و تعاریف ۱
۴ اصول ۳
۵ انتخاب نانوذرات فلورسانت ۵
۵-۱ کلیات ۵
۵-۲ مشخصه‌های نانوذره ۶
۶ سامانه کمّی‌سنجی ۷
۶-۱ طراحی کلی ۷
۶-۲ پادتن ۸
۶-۳ روش اجرایی رنگ‌آمیزی ۱۲
۶-۴ پردازش تصویر ۱۲
۷ مقایسه‌پذیری نتایج ۱۴
۷-۱ تنظیم منبع نور ۱۴
۷-۲ ماده مرجع ۱۴
۸ مشخصه‌های عملکردی ۱۵
۸-۱ پس‌زمینه ۱۵
۸-۲ شاخص‌های وابسته به مواد مرجع ۱۷
۸-۳ استواری روش ۱۸
۹ صحه‌گذاری و تصدیق ۱۸
۹-۱ کلیات ۱۸
۹-۲ دقت آزمایشگاه منفرد ۱۹
۹-۳ تجدیدپذیری ۱۹
۱۰ گزارش‌دهی ۲۰
پیوست الف (آگاهی‌دهنده) مثالی از ماده مرجع ۲۱
پیوت ب (آگاهی‌دهنده) مثالی از روش ارزشیابی کلوخگی/انبوهش نانوذره ۲۳
کتاب‌نامه ۲۵

پیش‌گفتار

استاندارد «فناوری نانو- الزامات ارزشیابی عملکرد برای کمّی‌سنجی مولکول‌های زیستی با استفاده از نانوذرات فلورسانت در ایمونوهیستوشیمی» که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط بر مبنای پذیرش استانداردهای بین‌المللی/ منطقه‌ای به‌عنوان استاندارد ملی ایران به روش اشاره‌شده در مورد الف، بند ۷، استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تهیه و تدوین‌شده، در یکصدو سی‌ویکمین اجلاسیه کمیتهٔ ملی استاندارد فناوری نانو مورخ ۱۴۰۲/۰۹/۰۷تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک مادهٔ ۷ قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد، ابلاغ‌شده در دی ماه ۱۳۹۶، به‌عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران براساس استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوهٔ نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در صورت لزوم تجدیدنظر خواهند شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها ارائه شود، در هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط، موردتوجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

این استاندارد ملی بر مبنای پذیرش استاندارد بین‌المللی زیر به روش «معادل یکسان» تهیه و تدوین‌شده و شامل ترجمه تخصصی کامل متن آن به زبان فارسی می‌باشد و معادل یکسان استاندارد بین‌المللی مزبور است:

ISO/TS 23302: 2023, Nanotechnologies-Performance evaluation requirements for quantifying biomolecules using fluorescent nanoparticles in immunohistochemistry

مقدمه

نانوذرات فلورسانت در زمینه‌های پژوهشی و زیست‌فناوری، به‌عنوان ماده برچسب‌گذار رنگ‌آمیزی[1] ایمونوهیستوشیمی در حال گسترش بازار خود هستند.

به‌طور معمول، رنگ‌های فلورسانت مختلف، از جمله FITC (ایزوتیوسیانات فلورسانت)، رودامین ایزوتیوسیانات و سولفورودامین ۱۰۱ اسید کلرید، برای رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی استفاده شده‌اند. رنگ‌های فلورسانت هنوز هم برای مکان‌یابی[2] مولکول‌های زیستی هدف، به‌عنوان مثال، عمدتاً برای تحلیل کیفی پروتئین‌ها و زنجیره‌های قند، ابزار قدرتمندی هستند و همچنین برای تحلیل کمّی و تلفیق با الگوریتم‌های مختلف برای محاسبه شدت سیگنال مربوط به مقدار مولکول‌های زیستی هدف به‌کار می‌روند. سامانه کمّی‌سنجی به‌طور کلی شامل آماده‌سازی نمونه، رنگ‌آمیزی، مشاهده میکروسکوپی و عکاسی[3] و پردازش تصویر برای به‌دست آوردن نتایج کمّی است، همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است. برای اطمینان‌پذیر[4] بودن نتایج اندازه‌گیری کمّی‌سنجی، رنگ‌های فلورسانت درخشان‌تر و از لحاظ نوری پایدارتر در مواجهه با نور برانگیزش[5] مناسب‌تر هستند.

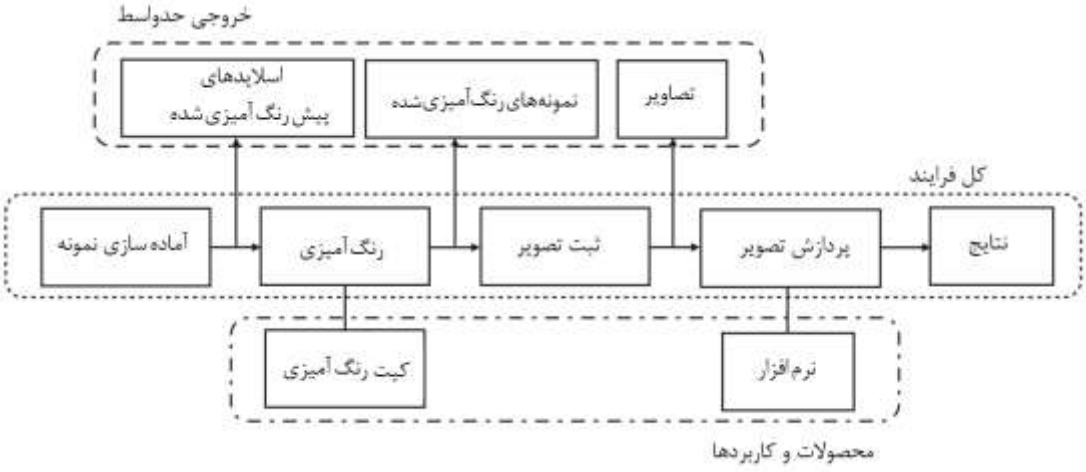
تعداد زیادی نانوذرات فلورسانت در بازار موجود هستند. به‌طور کلی، در مقایسه با رنگ‌های فلورسانت معمولی، درخشندگی بالاتری از خود نشان می‌دهند و در برابر رنگبری نوری[6] مقاوم‌تر هستند. مشخصه‌های نانوذرات فلورسانت می‌تواند یک مزیت برای کمّی‌سنجی مولکول‌های زیستی هدف با روش‌های ایمونوهیستوشیمی باشد که با همان الگوریتم استفاده‌شده برای کمّی‌سنجی با رنگ‌های فلورسانت معمولی تلفیق می‌شود [4][3][2][1].

در این زمینه، کیت‌های رنگ‌آمیزی مختلفی با نانوذرات فلورسانت و سامانه‌های کمّی‌سنجی مختلف توسعه یافته و در بازار موجود هستند [5]. بنابراین، نیاز به درک سازگاری سامانه‌های مختلف در زمینه‌های پژوهشی و صنعتی در حال گسترش است.

در این استاندارد به کمینه الزامات برای ارزشیابی عملکرد محصولات و کاربردها با استفاده از نانوذرات فلورسانت پرداخته شده است. این استاندارد اطلاعاتی ارائه می‌دهد که از قابلیت مقایسه نتایج کمّی‌سنجی نسبی با استفاده از نانوذرات فلورسانت اطمینان حاصل شود.

این استاندارد معیارهای عملکردی ویژه بخش صنعت را برای گردش کار[7] اندازه‌گیری مولکول‌های زیستی ارائه نمی‌کند. درصورت لزوم، کاربران همچنین می‌توانند استانداردهای موجود ویژه صنعت را نیز بررسی کنند.

1- Staining
2- Localization
3- Photography
4- Reliable
5- Excitation light
6- Photobleaching
7- Workflow



شکل ۱- فرایند کمّی‌سنجی هدف با استفاده از نانوذرات فلورسانت

فناوری نانو- الزامات ارزشیابی عملکرد برای کمّی‌سنجی مولکول‌های زیستی با استفاده از نانوذرات فلورسانت در ایمونوهیستوشیمی

۱ هدف و دامنهٔ کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، توصیف کمینه الزامات برای ارزشیابی عملکرد به‌کارگیری نانوذرات فلورسانت در ایمونوهیستوشیمی کمّی است.

۲ مراجع الزامی

در این استاندارد هیچ مرجع الزامی وجود ندارد.

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، اصطلاحات و تعاریف زیر به‌کار می‌رود[۱]:

۳-۱

نانوذره فلورسانت

fluorescent nanoparticle

نانوذره‌ای که فلورسانس نشر می‌دهد[۲] و به‌وسیله نوری با طول‌موج خاص برانگیخته می‌شود.

۳-۲

آرایه بلوک سلولی

cell block array

بلوک پارافینی دوباره جاسازی شده با استوانه‌های متعدد خارج‌شده از تعلیقه سلولی جاسازی شده پارافینی برای هیستوپاتولوژی است.

۱- اصطلاحات و تعاریف به‌کاررفته در استانداردهای ISO و IEC در وبگاه‌های www.iso.org/obp و www.electropedia.org قابل‌دسترس است.

2- Emitting

۳-۳

بخش آرایه بلوک سلولی

cell block array section

برش نازکی از آرایه بلوک سلولی است که از بریدن آرایه بلوک سلولی با استفاده از میکروتوم[1] به‌دست می‌آید و روی یک لام شیشه‌ای نصب می‌شود.

۴-۳

کلوخه

agglomerate

مجموعه‌ای از ذرات که به‌شکلی ضعیف یا نسبتا قوی به یکدیگر متصل شده‌اند، به‌طوری که مساحت سطح خارجی حاصله آنها مشابه مجموع مساحت سطوح تک‌تک اجزای تشکیل‌دهنده باشد.

یادآوری ۱- نیروهایی که کلوخه را نزدیک به یکدیگر نگه‌می‌دارد، نیروهای ضعیفی هستند مانند نیروهای وان‌درواِلس و یا درهم‌تافتگی‌های فیزیکی ساده.

یادآوری ۲- کلوخه‌ها به‌عنوان ذرات ثانویه نیز درنظرگرفته می‌شوند و ذرات اصلی منشاء، ذرات نوع اول نامیده می‌شوند.

[زیربند 3.1.2، استاندارد ISO 26824: 2022]

۵-۳

کلوخگی

agglomeration

فرایندی که طی آن کلوخه‌ها تشکیل می‌شوند.

۶-۳

انبوهه

aggregate

ذره متشکل از ذراتی با پیوندهای قوی یا جوش‌خورده که مساحت سطح خارجی منتجه آنها به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای کمتر از مجموع مساحت سطوح تک‌تک اجزاء تشکیل‌دهنده باشد.

یادآوری ۱- نیروهایی که یک انبوهه را کنار یکدیگر نگه می‌دارد نیروهای قوی هستند، مثلا پیوندهای کووالانسی یا یونی و یا نتیجه جوش‌خوردن و گره‌خوردگی فیزیکی پیچیده یا درغیر این صورت، ذرات به هم چسبیده قبلی.

1- Microtome

یادآوری ۲- انبوهه‌ها به‌عنوان ذرات ثانویه نیز درنظر گرفته می‌شوند و ذرات اصلی منشاء، ذرات اولیه نامیده می‌شوند.

[منبع: زیربند 3.1.3، استاندارد ISO 26824: 2022- یادآوری ۱ مطابقت داده شده است]

۳-۷

انبوهش

aggregation

فرایندی که طی آن انبوهه‌ها تشکیل می‌شوند.

۳-۸

بازده کوانتومی

quantum yield

تعداد کوانتوم‌های گسیل‌شده به ازای کوانتوم جذب‌شده است.

[منبع: زیربند 6.6.9، استاندارد ISO 22493: 2014]

۳-۹

ضریب خاموشی مولی

molar extinction coefficient

چگالی نوری ماده فلورسانت یک مولار در هر یک سانتی‌متر از مسیر نوری سل جذب است.

۳-۱۰

رنگبری نوری

photobleaching

از بین رفتن خواص فلورسانسی مولکول‌ها با نور که منجر به کاهش فلورسانس نمونه می‌شود.

[منبع: زیربند 3.2.31، استاندارد ISO 10934:2020]

۴ اصول

روش‌های ایمونوفلورسانس مبتنی بر رنگ‌آمیزی بخش‌های نازکی از بافت با پادتن‌های خاص هستند که مولکول‌های موردنظر مانند پروتئین‌ها و قندها را تشخیص می‌دهند. پادتن‌های خاص با ایمن‌سازی حیواناتی مانند بز، خرگوش یا موش، با مولکول‌های هدف آماده می‌شوند. درحالی‌که آنتی بادی‌های منوکلونال

(تک‌دودمانی) و پلی‌کلونال (چنددودمانی) برای روش‌های ایمونوفلورسانس استفاده می‌شود، پادتن‌ها باید با مواد فلورسانت مانند رنگ‌ها یا نانوذرات برچسب‌گذاری شوند. برای بررسی کمیت و مکان‌یابی مولکول‌های هدف، بخش‌های بافت با پادتن‌های برچسب‌گذاری‌شده فلورسانس، رنگ‌آمیزی می‌شوند. دو روش اساسی برای رنگ‌آمیزی با پادتن‌های برچسب‌گذاری‌شده وجود دارد: روش ایمونوفلورسانس مستقیم و ایمونوفلورسانس غیرمستقیم. روش ایمونوفلورسانس مستقیم با استفاده از یک پادتن منفرد برچسب‌گذاری‌شده با فلورسانس که مولکول‌های هدف را شناسایی می‌کند، انجام می‌شود. روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم با یک پادتن بدون برچسب، شناسایی مولکول‌های هدف (پادتن اولیه) و پادتن دیگری (پادتن ثانویه) که پادتن اولیه را شناسایی می‌کند، انجام می‌شود. هنگامی‌که پادتن اولیه (مانند IgG) در موش تولید می‌شود، پادتن ضد IgG موش، باید به‌عنوان پادتن ثانویه انتخاب شود. علاوه‌براین، سیستم‌های مولکولی دیگری که سیگنال فلورسانس را تقویت می‌کنند نیز در بازار موجود هستند. به‌عنوان مثال، سیستم آویدین-بیوتینیل برای این کاربرد به خوبی شناخته شده است. در سیستم آویدین-بیوتینیل، پادتن ثانویه را می‌توان با بیوتینیل برچسب‌گذاری کرد و با آویدین مزدوج‌شده[1] با مواد فلورسانت از جمله نانوذرات، به‌عنوان مثال، نقاط کوانتومی (QD)، یعنی ذرات نیمه‌رسانا با اندازه چند نانومتر واکنش داد. کمپلکس پادتن اولیه–پادتن ثانویه-آویدین-QD، یک سیگنال فلورسانس قوی با رنگبری نوری کمتر نشر می‌دهد. برای کمّی‌سنجی مولکول‌های هدف، استفاده از نانوذرات از جمله QD ترجیح داده می‌شود.

سیگنال فلورسانس از آزمونه رنگ‌آمیزی‌شده، به‌وسیله میکروسکوپی فلورسانس اندازه‌گیری می‌شود که یک روش تصویربرداری نوری است و به‌طور همزمان فلورسانس نشریافته از میدان دید را با استفاده از دوربین تشخیص می‌دهد. شدت فلورسانس، یعنی فلورسانس نشریافته، می‌تواند به‌عنوان یک مقدار شدت در میکروسکوپی فلورسانس اندازه‌گیری شود که با جمع کردن مقادیر شدت از گروهی از پیکسل‌های انفرادی در یک تصویر رقمی به‌دست آمده با استفاده از دوربین رقمی محاسبه می‌شود. علاوه‌بر اندازه‌گیری شدت فلورسانس یکپارچه، از شمارش نقاط روشن برای کمّی‌سنجی مولکول‌های زیستی هدف استفاده می‌شود.

مقایسه کمّی داده‌های شدت یا تعداد نقاط روشن، به طراحی آزمایشی صحیح و عملکرد مناسب کل سامانه نورسنجشی[2] کمّی نیاز دارد، از جمله دوربین رقمی، مانند یک افزاره بارجفت‌شده (CCD)[3] یا یک نیمه‌رسانای اکسید فلزی مکمل مرجع (sCMOS)[4]. مسائل مربوط به مقایسه کمّی داده‌های شدت شامل تنظیمات نرم‌افزاری کنترل‌گر و دوربین رقمی، از جمله مجموعه‌ای از تصاویر شمارش‌شده تیره برای تخمین متوازن‌سازی[5]، تصحیح میدان-مسطح، تصحیح زمینه، محک‌زنی[6] لامپ برانگیزش و اپتیک مجموعه فلورسانت در مرجع [15] توضیح داده‌شده است.

1- Conjugated
2- Photometric
3- Charge coupled device
4- Scientific complementary
5- Offset
6- Benchmarking

برای آنالیز کمّی با میکروسکوپی ایمونوفلورسانس، شدت فلورسانس یا تعداد نقاط روشن را می‌توان با مقدار اندازه‌گیری‌شده با «سنجش ایمونوجاذب مرتبط به آنزیم» (ELISA)[1] یا «مرتب‌کننده سلول فعال‌شده با فلورسانت» (FACS) [2] و یک منحنی کالیبراسیون ترسیم‌شده، مقایسه کرد (به زیربند الف-۳ مراجعه شود). میکروسکوپی فلورسانس، شدت فلورسانس یا تعداد نقاط درخشان را از برش نازک «رنگ‌آمیزی‌شده با مکانیسم ایمنی»[3] بافت‌ها و سلول‌ها اندازه‌گیری می‌کند. هرچند، تعداد مولکول‌های زیستی در هر سلول را اندازه‌گیری نمی‌کند. در این روش میکروسکوپی، شدت فلورسانس یا تعداد نقاط درخشان در یک برش از جمعیت سلول‌ها اندازه‌گیری می‌شود، گرچه هنگامی‌که شدت فلورسانس یا تعداد نقاط درخشان از تعداد کافی سلول در یک میدان دید اندازه‌گیری شود، با تعداد مولکول‌های زیستی در سلول‌ها همبستگی دارد. از این نظر، اندازه‌گیری میکروسکوپی شدت فلورسانس یا تعداد نقاط درخشان یک اندازه‌گیری نسبی است.

شدت فلورسانس به خودی خود، دارای یکای مرتبط در دستگاه بین‌المللی یکاها (SI) نیست، زیرا یک اندازه‌گیری نسبی است. تعداد نقاط روشن دارای «یکای یک» است اما در اصل یک اندازه‌گیری نسبی است. اندازه‌گیری شدت نسبی (RIM)[4] به‌صورت نسبت یک اندازه‌گیری شدت یا شمارش یک نقطه روشن به نقطه دیگر تعیین می‌شود. اندازه‌گیری شدت فلورسانس، تخمین درستی از نسبت تابندگی[5] بخشی یا تمام آزمونه به تابندگی بخشی یا همه همان آزمونه یا آزمونه دیگر است. برای شمارش نقاط روشن، نتایج را می‌توان به روشی مشابه با اندازه‌گیری‌های شدت فلورسانس یکپارچه تفسیر کرد.

شاخص‌های ارزشیابی عملکرد مقادیر کمّی و کاربرد CBA (آرایه بلوک سلولی) برای درک مقایسه‌پذیری بین مقادیری که سامانه‌های کمّی‌سنجی مختلف را تشکیل می‌دهند، در بندهای زیر توضیح داده شده است.

۵ انتخاب نانوذرات فلورسانت

۵-۱ کلیات

نانوذرات باید متناسب با هدف سامانه کمّی‌سنجی انتخاب شوند. عملکرد مورد نیاز نانوذرات با توجه به کمیت مولکول‌های زیستی هدف، عملکرد سامانه‌های تصویربرداری شامل حساسیت، طول‌موج‌های برانگیزش موجود، رنگ‌ها برای رنگ‌آمیزی از جمله رنگ‌آمیزی با چندرنگ، متفاوت است. برای انتخاب پادتن‌های برچسب‌گذاری‌شده با نانوذره، از جمله پادتن‌های برچسب‌گذاری‌شده موجود در بازار، عملکرد نانوذرات و میزان تیتر پادتن‌ها باید ارزشیابی شوند (به زیربند ۵-۲ مراجعه شود).

1- Enzyme-linked immuno-sorbent assay
2- Fluorescence activated cell sorter
3- Immunostained
4- Relative intensity measurement
5- Irradiance

۵-۲ مشخصه‌های نانوذره

هنگامی که برچسب‌گذاری نانوذره در آزمایشگاه انجام می‌شود، نانوذره باید براساس مشخصه‌های آن انتخاب شود. مشخصه‌های نانوذراتی که ارزشیابی می‌شوند باید شامل موارد زیر باشد اما به آنها نیز محدود نمی‌شود.

الف- درخشش[1]

درخشش برای کمّی‌سنجی مولکول‌های زیستی با استفاده از ایمونوهیستوشیمی مهم است. درخشش اولیه می‌تواند به‌عنوان یک مشخصه برای انتخاب نانوذرات استفاده شود. این یک درخشش نسبی است که با ضریب خاموشی مولی و بازده کوانتومی متناسب است. برای انتخاب نانوذرات، این پارامترها، یعنی ضریب خاموشی مولی و بازده کوانتومی، باید ارزشیابی شوند.

ضریب خاموشی مولی به‌عنوان چگالی نوری ماده فلورسانت یک مولار در هر یک سانتی‌متر از مسیر نوری سل جذب تعریف می‌شود که با نورسنجی جذبی اندازه‌گیری می‌شود. بازده کوانتومی به‌عنوان تعداد کوانتوم‌های گسیل‌شده بر کوانتوم جذب‌شده تعریف می‌شود و می‌توان با طیف‌نورسنج فلورسانت اندازه‌گیری کرد.

ب- زمان رنگبری نوری

هنگامی‌که رنگ‌های فلورسانت یا نانوذرات به‌طور مداوم به‌وسیله نور برانگیزش پرتودهی شوند، خروجی نشر آنها کاهش می‌یابد و در نهایت بی‌رنگ می‌شوند. زمانی که تعداد فوتون‌های نشریافته در ساعت نصف شوند، می‌توان آن را با نیمه‌عمر بی‌رنگ‌شدن مشخصه‌یابی کرد.

پ- اندازه ذره و توزیع اندازه

متوسط اندازه ذره باید با ضریب تغییرات (CV) آنالیز شود. برای این آنالیز، می‌توان از پراکندگی پویای نور (DLS)[2] و میکروسکوپی الکترونی روبشی (SEM)[3] استفاده کرد. برای آنالیز SEM برخی استانداردها [16] مفید هستند.

ت- انبوهش و کلوخگی

کلوخگی، فرآیند یا درجه‌ای از تشکیل کلوخه‌هایی است که مجموعه‌ای از ذرات هستند و با پیوند ضعیف یا نسبتا قوی به یکدیگر متصل شده‌اند. در کلوخگی، مساحت سطح خارجی حاصل‌شده، مشابه مجموع مساحت سطوح تک‌تک اجزای تشکیل‌دهنده است. انبوهش فرآیند یا درجه‌ای از تشکیل انبوهه‌هایی است که ذرات متشکل از آن با پیوند قوی یا جوش‌خورده هستند. در انبوهش، مساحت سطح خارجی حاصل‌شده، به‌طور قابل ملاحظه‌ای کمتر از مجموع مساحت سطوح تک‌تک اجزاء تشکیل‌دهنده است (به بند ۳ مراجعه شود).

1- Brightness
2- Dynamic light scattering
3- Scanning electron microscopy

مثالی از روش ارزشیابی انبوهش در پیوست **ب** نشان داده شده است.

یادآوری- مثال بالا شامل انبوهه و کلوخه نقاط کوانتومی در محیط‌های زیستی [6] همانند سایر انواع نانوذرات است. [7] [8] [9] [10] نقاط کوانتومی انبوهه‌شده اضافی را می‌توان جدا و حذف کرد [11].

ث- جذب غیراختصاصی نانوذرات

جذب غیراختصاصی نانوذرات فلورسانت می‌تواند بخشی از نوفه زمینه باشد، کیفیت تصاویر فلورومیکروسکوپی را کاهش می‌دهد و مانع آنالیز کمّی‌سنجی نسبی می‌شود. جذب غیراختصاصی نانوذرات باید ارزشیابی شود (به زیربند ۷-۱ مراجعه شود).

ج- یکنواختی نانوذرات

وقتی نانوذرات به‌عنوان مواد فلورسانت استفاده می‌شوند، تغییر در اندازه ذره می‌تواند سطح همبستگی بین کمیت مولکول‌های زیستی و شدت فلورسانس را کاهش دهد. اندازه ذره باید همراه با ضریب تغییرات (CV) ارزشیابی و گزارش شود.

۶ سامانه کمّی‌سنجی

۶-۱ طراحی کلی[1]

هنگام طراحی یک سامانه کمّی‌سنجی برای نانوذرات فلورسانت انتخابی، کاربرد مورد نظر باید تعریف و مستند شود. سامانه کمّی‌سنجی توضیح داده شده در این استاندارد، از فناوری ایمونوهیستوشیمی استفاده می‌کند. این فناوری، برای رنگ‌آمیزی سطح مقطع[2] نازکی از بافت‌ها که به‌طور خاص مولکول زیستی هدف را مشخص می‌کند، پادتن را به‌کار می‌برد. مقطع نازک را می‌توان از بافت‌های جاسازی و منجمدشده در پارافین ثابت‌شده با فرمالین تهیه کرد. سپس مقطع نازک با پادتن‌های مرتبط با نانوذرات رنگ‌آمیزی می‌شوند. در برخی موارد، می‌توان از سیستم مولکولی دیگری از جمله مزدوج‌شدن بیوتین-آویدین برای آشکارسازی پادتن متصل به مولکول‌های هدف استفاده کرد (به زیربند ۶-۲-۱ مراجعه شود). برای کمّی‌سنجی، لام‌های رنگ‌آمیزی‌شده با میکروسکوپ فلورسانس مشاهده می‌شوند و با دوربین رقمی، تصاویر بافت‌ها گرفته می‌شوند و سپس کمّی‌سنجی سیگنال‌های فلورسانس از تصویر بافت با نرم‌افزار تحلیل تصویر، انجام می‌شود. طراحی سامانه کمّی‌سنجی، باید تمام مراحل فرآیند، از مقاطع بافت آماده‌شده و مقادیر اندازه‌گیری‌شده تجربی، تا پردازش تصویر و کمّی‌سنجی نهایی داده‌ها با نرم‌افزار پردازش را پوشش دهد.

توصیف طراحی باید شامل مشخصات زیر باشد اما محدود به آن نباشد: نانوذره فلورسانت مورد استفاده و عملکرد آن، پادتن‌هایی شامل پادتن‌های برچسب‌گذاری‌شده با نانوذره و پادتن‌های بدون برچسب هنگام

1- Overall design
2- Sections

استفاده، شرایط رنگ‌آمیزی، سامانه میکروسکوپ با تجهیزات تصویربرداری، مشخصه‌های طیفی منبع نور استفاده‌شده و نرم‌افزار تحلیل تصویر. طرح باید برای اطمینان از انطباق[1] با الزامات سامانه، بازنگری شود.

برای انتخاب نرم‌افزار پردازش تصویر، الزامات نرم‌افزار باید توصیف شود. کمینه زمان مواجهه تصویربرداری برای کیفیت پردازش تصویر به‌وسیله نرم‌افزار و همچنین سایر تنظیمات[2] دستگاه بیان‌شده در زیربند ۶-۴، مهم است. روش اجرایی رنگ‌آمیزی، تصویربرداری و نرم‌افزار پردازش تصویر مستقل از یکدیگر نیستند. هرگاه روش آنالیز کمّی‌سنجی از نو توسعه یافته یا تغییر یابد، توصیف طراحی باید بررسی شود.

۶-۲ پادتن

۶-۲-۱ کلیات

پادتن‌های مختلفی در ایمونوهیستوشیمی استفاده می‌شوند. به‌عنوان مثال، یک پادتن منفرد برچسب‌گذاری‌شده برای روش‌های ایمونوفلورسانس مستقیم و مجموعه‌ای از دو پادتن شامل پادتن اولیه که یک مولکول‌زیستی هدف را شناسایی می‌کند و پادتن ثانویه برچسب‌گذاری‌شده که مولکول پادتن اولیه را شناسایی می‌کند. پادتن برچسب‌گذاری‌شده، با یک نانوذره به‌طور مستقیم یا با مولکول‌های متصل به مولکول‌های دیگر، برای مثال بیوتین متصل به آویدین، مزدوج می‌شود. با هر روش، پادتن که مولکول زیستی و نانوذره هدف را تشخیص می‌دهد، پس از رنگ‌آمیزی برای علامت‌گذاری مولکول‌های زیستی هدف، به هم متصل می‌شوند.

یادآوری- طرح‌های مختلف برچسب‌گذاری را می‌توان برای ایمونوهیستوشیمی به‌کار برد. طرح‌های برچسب‌گذاری معمول به شرح زیر است.

الف- پادتن اولیه– پادتن ثانویه بیوتینیل‌دار- نانوذرات آویدین‌دار؛

ب- پادتن بیوتینیل‌دار-نانوذرات آویدین‌دار؛

پ- نانوذرات با آنتی‌بادی اولیه متصل به سطح.

پادتن‌ها باید براساس مشخصه‌های مختلف شامل نوع پادتن، پادگن هدف، قابلیت کاربرد در روش، گونه‌های حیوانی، نوع ایمونوگلوبولین، میزان تیتر و میل ترکیبی انتخاب شوند. موضوعات خاصی که در زیر توضیح داده‌شده است باید درنظر گرفته شوند.

۶-۲-۲ نوع پادتن

برای انتخاب روش کمّی‌سنجی، نوع پادتن، یعنی مونوکلونال در مقابل پلی‌کلونال باید درنظر گرفته شود.

1- Conformity
2- Configurations

پادتن‌های مونوکلونال عموماً به یک مکان شناسایی منفرد (اپی‌توپ[1] منفرد) متصل می‌شوند که منجر به نسبت ۱:۱ نسبت به مولکول‌های نشانگر زیستی می‌شود و امکان کمّی‌سنجی مستقیم (به‌عنوان مثال به‌وسیله شدت فلورسانس) را فراهم می‌کند.

در مقابل، پادتن‌های پلی‌کلونال می‌توانند به چندین اپی‌توپ در همان مولکول‌زیستی متصل شوند که مزایایی را از نظر کارایی نشان‌گذاری[2] ارائه می‌کنند، اما از هرگونه کمّی‌سنجی مبتنی بر شدت جلوگیری می‌کنند. بسته به تفکیک‌پذیری فضایی، پادتن‌های پلی‌کلونال همچنان می‌توانند برای کمّی‌سنجی مولکول‌های زیستی با استفاده از روش شمارش تعداد نقاط فلورسانت در تصویر استفاده شوند (به زیربند ۶-۴-۲ مراجعه شود).

۶-۲-۳ پادگن هدف

پادگن هدف با توجه به نقش پادتن مورد استفاده در فرآیند رنگ‌آمیزی انتخاب می‌شود.

برای اینکه پادتن برای شناسایی مولکول های زیستی استفاده شود، به‌عنوان مثال، پادتن‌هایی برای روش ایمونوفلورسانس مستقیم و پادتن های اولیه برای روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم، پادگن باید به‌عنوان مولکول زیستی هدف تایید شود.

یک پادتن مونوکلونال، اپی‌توپی را که بخش خاصی از پادگن است، تشخیص می‌دهد. درصورت لزوم می‌توان اپی‌توپ را با فناوری‌های مختلف نقشه‌برداری اپی‌توپ تعیین کرد [13][14]. اطلاعات مربوط به اپی‌توپ می‌تواند برای کمّی‌سنجی مولکول‌های زیستی مفید باشد.

از سوی دیگر، پادگن پادتن ثانویه، پادتن‌های اولیه تشخیص‌دهنده مولکول‌های زیستی هدف هستند. قابلیت پادگنی پادتن‌های اولیه، عمدتاً به‌وسیله گونه‌های حیوانی (به زیربند ۶-۲-۵ مراجعه شود) و نوع ایمونوگلوبولین (به زیر بند ۶-۲-۶ مراجعه شود) تعیین می‌شود.

۶-۲-۴ کاربردپذیری پادتن در روش

پادتن مورد استفاده برای کمّی‌سنجی میکروسکوپی باید با کاربردپذیری آن در ایمونوهیستوشیمی تأیید شود. در بسیاری از موارد، پادتن‌های تجاری موجود برای کاربردهای خاص از جمله وسترن بلات[3]، فلوسایتومتری[4]، «سنجش رسوب‌گذاری ایمنی کروماتین» (ChIP)[5] و ایمونوهیستوشیمی صحه‌گذاری شده‌اند. حتی اگر پادتن برای ایمونوهیستوشیمی صحه‌گذاری شده باشد، باید قبل از استفاده، کاربردپذیری پادتن برای متناسب‌بودن با هدف تایید شود.

1- Epitope
2- Tagging
3- Western blotting
4- Flow cytometry
5- Chromatin immunoprecipitation assay

۶-۲-۵ گونه‌های حیوانی

معمولاً یک پادتن برای استفاده در ایمونوهیستوشیمی براساس واکنش ایمنی حیوانات در برابر ایمونوژن تولید می‌شود. پادتن پلی‌کلونال از سرم حیوان ایمن‌شده تهیه می‌شود. یک پادتن مونوکلونال با سلول‌های به‌دست‌آمده از حیوان ایمن‌شده، با فناوری‌های مختلف از جمله فناوری‌های هیبریدوما[1] و نمایش فاژی[2] تولید می‌شود. در هر دو مورد، منشا ایمونوگلوبولین، پادتن حیوان ایمن‌شده است. در روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم، پادتن ثانویه برای رنگ‌آمیزی با مکانیسم ایمنی براساس پادگن تشخیص داده‌شده انتخاب می‌شود. بنابراین، پادگن پادتن ثانویه، ایمونوگلوبولین پادتن اولیه است، به‌عنوان مثال: IgG موش و IgG خرگوش.

۶-۲-۶ طبقه ایمونوگلوبولین

پادتن‌ها عمدتاً به پنج ایزوتیپ (جورمونه)[3] (یا طبقه) از ایمونوگلوبولین‌ها شامل IgG، IgM، IgA، IgD و IgE طبقه‌بندی می‌شوند که براساس انواع زنجیره سنگین در مولکول پادتن ساختاریافته با جابه‌جایی[4] طبقه مولکولی، تقسیم‌بندی می‌شوند. به دلیل تفاوت‌هایی در پلی‌پپتیدهای زنجیره سنگین، این ایمونوگلوبولین‌ها می‌توانند نقش‌های متفاوتی را در فرآیندهای خاص پاسخ ایمنی ایفا کنند. تفاوت‌هایی در تعداد مونومرهای Y شکل وجود دارد که از تلفیق دو زنجیره سبک و دو زنجیره سنگین در یک پروتئین کامل تشکیل شده‌است. به‌عنوان مثال، مولکول IgM از پنج مونومر Y شکل تشکیل شده است، درحالی‌که مولکول IgG از یک مونومر منفرد تشکیل شده‌است.

هنگامی‌که یک پادتن مونوکلونال برای روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم استفاده می‌شود، رده ایمونوگلوبولین پادتن، حاوی داده مهمی است. زمانی‌که پادتن پلی‌کلونال برای پادتن اولیه استفاده می‌شود، انتخاب ایزوتیپ IgG راحت‌تر خواهد بود. اگرچه، پادتن مونوکلونال از یک کلون[5] سلول تولیدکننده پادتن تولید می‌شود. بنابراین کلون، یک ایزوتیپ منفرد از ایمونوگلوبولین تولید می‌کند. هنگامی‌که یک پادتن مونوکلونال استفاده می‌شود، مشخص کردن ایزوتیپ ایمونوگلوبولین این پادتن تولیدکننده، برای انتخاب پادتن ثانویه باید انجام شود. پادتن‌های ثانویه باید متناسب با ایزوتیپ پادتن اولیه انتخاب شود، به‌عنوان مثال، پادتن ضد IgG موش را می‌توان برای پادتن مونوکلونال اولیه تولیدشده از هیبریدومای موش انتخاب کرد.

1- Hybridoma
2- Phage display
3- Isotype
4- Switching
5- Clone

۶-۲-۷ میزان تیتر

با توجه به پادتن مورد استفاده، غلظت، میزان تیتر یا هر دو باید ارزشیابی شوند تا قبل از اندازه‌گیری برای هدف رنگ‌آمیزی، مناسب باشند.

غلظت پادتن مقدار کل پادتن (پروتئین) بر واحد حجم بدون توجه به درجه کارکرد پادتن است. غلظت پادتن خالص را می‌توان با اندازه‌گیری چگالی نوری (OD)، در nm ۲۸۰ تخمین زد. انتظار می‌رود چگالی نوری محلول پادتن ٪ ۱ (۱۰ mg/ml)، برابر با ۱۳ تا ۱۴ باشد. از کیت‌های سنجش پروتئین تجاری موجود نیز می‌توان برای تخمین غلظت استفاده کرد. میزان تیتر را می‌توان به‌عنوان غلظت کارکردی تخمین زده‌شده با روش اندازه‌گیری خاص ایمونوگلوبولین از جمله ELISA تعریف کرد.

اگرچه، پادتن‌ها بدون غلظت و میزان تیتر و فقط با رقت‌های توصیه‌شده برای کاربردهای مختلف عرضه می‌شوند، در این موارد می‌توان از فاکتور رقت محلول ذخیره[1] پادتن به‌عنوان شاخص کارکرد پادتن به جای تیتر آن استفاده کرد.

اطلاعات در مورد غلظت، تیتر و فاکتورهای رقت برای به‌دست آوردن نتایج پایدار از کمّی‌سنجی به‌وسیله ایمونوهیستوشیمی فلورسانس، از جمله فرآیندهای رنگ‌آمیزی مفید است.

۶-۲-۸ ویژگی[2]

ویژگی یک پادتن را می‌توان با روش‌های مختلفی ارزشیابی کرد. مثال‌ها به شرح زیر نشان داده شده است:

- وسترن بلات؛
- آنالیز با سلول‌های شناخته‌شده برای بیان مولکول‌های زیستی هدف؛
- آنالیز رقابتی با پپتید سنتزشده؛
- رسوب‌گذاری ایمنی- طیف‌سنج جرمی؛
- بررسی منفی‌بودن با از بین بردن یا بررسی کاهش با تضعیف حیوانات؛
- آرایه پپتیدی؛
- مقایسه با سایر پادتن‌های استفاده شده در گذشته؛
- آنالیز بافت‌ها یا سلول‌های تیمارشده[3] با فسفاتاز برای اصلاح فسفریل‌دار کردن پادتن خاص.

ارزشیابی مجدد پادتن‌های خریداری‌شده واقع‌بینانه نیست. در عمل، ارزشیابی ویژگی توسط سازنده پادتن می‌تواند به‌عنوان مقدمه‌ای برای انتخاب پادتن مورد استفاده قرار گیرد. درصورت امکان، توصیه می‌شود که پادتن‌های اصلی تهیه‌شده، با روش مناسبی غیر از روش کمّی‌سنجی مورد استفاده مانند وسترن بلات ارزشیابی شوند.

1- Stock
2- Specificity
3- Treated

۶-۳ روش اجرایی رنگ‌آمیزی

۶-۳-۱ شرایط رنگ‌آمیزی

برای طراحی روش اجرایی رنگ‌آمیزی باید به نکات زیر توجه شود:

- شرایط پیش‌عمل‌آوری شامل پارافین‌زدایی؛
- بازیابی آنتی‌ژن؛
- واکنشگر مسدودکننده، زمان مسدود کردن و شرایط شستشو پس از مسدود شدن.

یادآوری- در روش‌های معمول، اغلب برای مسدودکردن از سرم یک گونه حیوانی مطابق با پادتن ثانویه استفاده می‌شود.

- غلظت پادتن‌ها، زمان رنگ‌آمیزی پادتن و شرایط شستشو؛
- روش اجرایی نصب شامل استفاده از درپوش شیشه‌ای.

برای طراحی روش اجرایی رنگ‌آمیزی، شرایط با بیشینه‌کردن سیگنال‌های نمونه‌های مثبت و رابطه خطی بین کمیت هدف و شدت سیگنال و کمینه‌کردن اتصال غیراختصاصی نمونه‌های منفی، بهینه می‌شوند. اگرچه، در بعضی از موارد تفاوت‌هایی[1] وجود دارد.

۶-۳-۲ استواری شرایط[2] روش اجرایی رنگ‌آمیزی

برای طراحی روش اجرایی رنگ‌آمیزی، استواری آن باید درنظر گرفته شود. به‌ویژه، توصیه می‌شود تأثیر دمای آزمایشگاه در نظر گرفته شود. دمای اتاق با توجه به منطقه آب و هوایی و وجود تهویه مطبوع یکسان نیست. گستره دما برای مشخص کردن استواری فرآیند رنگ‌آمیزی مهم است. در روش اجرایی رنگ‌آمیزی، به‌ویژه برای بهبود درستی کمّی‌سنجی، باید از رنگ‌آمیزی خودکار یا ربات استفاده شود. اگر رنگ‌آمیزی توسط کارکنان انجام شود، مهارت آنها در برآورد پایداریپایداری باید لحاظ شود.

۶-۴ پردازش تصویر

۶-۴-۱ کیفیت تصویر و عوامل مرتبط

پارامترهای ذاتی تصویر شامل نسبت سیگنال به نوفه، اشباع‌شدگی شدت و تفکیک‌پذیری پیکسل، می‌توانند شاخص‌های کیفیت تصویر باشند که پردازش تصویر را ممکن می‌سازند، اما فقط به این موارد محدود نمی‌شود.

تصاویری که برای مقایسه کمّی اندازه‌گیری شدت نسبی (RIM) مورد استفاده قرار می‌گیرند، می‌توانند تحت تأثیر عوامل زیر باشند [15]:

1- Trade-offs
2- Robustness

- عدم یکنواختی شدت‌های سیگنال در سراسر میدان دید میکروسکوپ؛
- وجود متوازن‌سازی در مقادیر پیکسل در تصویر رقمی ثبت‌شده؛
- سیگنال‌های شدت در تصویر، بیش از گستره پویای خطی دوربین؛
- ثبت نادرست مقادیر پیکسل در فایل‌های داده تصویر به‌دلیل عواملی مانند عملیات فشرده‌سازی اتلافی یا اصلاح غیرمنتظره عمق بیت پیکسل هنگام ذخیره هر فایل؛
- نسبت کم سیگنال به نوفه شدت‌های سیگنال نور اندازه‌گیری‌شده؛
- ناپایداری در توان نوری منبع روشنایی.

برای تعیین شدت سیگنال، پروتکل تحلیل تصویر باید اصلاحات مربوط به متوازن‌سازی ذاتی سیگنال به آشکارساز، آشکارسازی سیگنال غیریکنواخت در سراسر میدان و اشباع شدگی ممکن آشکارساز را بررسی کند. این مسائل و راهبردهای ممکن نرمال‌سازی (بهنجارش)[1] در مرجع [15] توضیح داده شده است.

تنظیمات دستگاه، مانند شدت برانگیزش، بهره رقمی، گستره پویا و اندازه شکاف باید به‌طور مناسب تنظیم و ثبت شود.

هنگامی‌که نانوذرات بزرگ‌تر و درخشان‌تر در دسترس هستند، تعداد نقاط درخشان را می‌توان به‌عنوان مقدار اندازه‌گیری‌شده به جای شدت فلورسانس استفاده کرد. در این حالت، برای آشکارسازی یک نقطه درخشان، تفکیک‌پذیری یک تک‌نقطه درخشان می‌تواند نماینده کیفیت تصویر باشد.

۶-۴-۲ انتخاب نرم‌افزار پردازش تصویر

اگرچه روش‌ها و الگوریتم‌های کمّی‌سنجی مختلفی برای آشکارسازی مولکول زیستی موجود است، این روش‌ها باید به‌گونه‌ای انتخاب شوند که برای هدف مستندشده سامانه مناسب باشند (به زیربند ۵-۱ مراجعه شود). [1] دو دسته از روش‌های کمّی‌سنجی وجود دارد، به بیان دقیق‌تر، اندازه‌گیری‌هایی براساس شدت سیگنال فلورسانس آشکارسازی‌شده [3] و شمارش تعداد نقاط فلورسانت [4][5].

برای مثال، الگوریتم‌های RESA/PLACE (الگوریتم تفریق نمایی سریع/ تخصیص موضعی حیطه‌بندی بیان مبتنی بر پیکسل) در کمّی‌سنجی استفاده می‌شوند.[12] این الگوریتم‌ها تعریف سیگنال فلورسانس هدف و همچنین تعریف مکان‌یابی را با شناسایی محل تومور در نرم‌افزار هیستواسپات[2] («تومور پنهان») و شناسایی بخش‌های زیرسلولی (به‌عنوان مثال هسته‌ها، غشاءها، سیتوپلاسم) انجام می‌دهند.

علاوه بر کمّی‌سنجی شدت سیگنال، مولکول زیستی هدف را می‌توان با شمارش تعداد نانوذرات اندازه‌گیری کرد. به‌عنوان مثال، تعداد نانوذرات در نقطه درخشان در یک تصویر فلورسانس را می‌توان با سه مرحله تخمین زد که شامل تمایز یک نقطه درخشان ناشی از فلورسانس نانوذرات است و از نوفه نباشد، تعریف مساحت یک نقطه درخشان برگرفته از نانوذرات و تخمین تعداد نانوذرات در نقطه درخشان است [3].

1- Normalization
2- Histospot

۷ مقایسه‌پذیری نتایج

۷-۱ تنظیم منبع نور

برای مقایسه نتایج کمّی‌سنجی نسبی، منبع نور باید تنظیم شود تا میدان دید میکروسکوپ را به‌طور مناسبی روشن کند.

منبع نور را می‌توان با پایش مستقیم شدت نور از منبع نور یا شدت فلورسانس مواد فلورسانس پایدار روشن شده با منبع نور تنظیم کرد. شدت منبع نور را می‌توان با یک توان‌سنج[1] کالیبره‌شده با قابلیت ردیابی در دستگاه بین‌المللی یکاها (SI)، اندازه‌گیری کرد. از یک لام فلورسانت استاندارد تجاری و قابل دسترس می‌توان به‌عنوان ماده فلورسانس پایدار استفاده کرد.

شدت نور اندازه‌گیری‌شده یا شدت فلورسانس می‌تواند نشانگر شدت روشنایی مورد استفاده در میکروسکوپی کمّی‌سنجی نسبی باشد. نحوه کار با منبع نور در شدت نور ثابت برای به‌دست آوردن تصاویر پایدار فلورسانس مهم است. همچنین، درنظر گرفتن مقایسه‌پذیری نتایج کمّی‌سنجی مفید است. باید نتایج اندازه‌گیری شدت نور یا شدت فلورسانس ثبت شوند.

۷-۲ ماده مرجع

کمّی‌سنجی با میکروسکوپی فلورسانس، یک کمّی‌سنجی نسبی است. اندازه‌ده بدون یکا است و زمانی که سامانه‌های اندازه‌گیری متفاوتی استفاده می‌شوند، مقادیر متفاوتی نسبت به شدت فلورسانس یکسان دارد. برای مقایسه نتایج کمّی‌سنجی به‌دست آمده از سامانه‌های اندازه‌گیری مختلف یا آزمایشگاه‌های مختلف، باید ضریب تبدیل را براساس نتایج حاصل از نمونه یکسان، یعنی مواد مرجع با سامانه کمّی‌سنجی متفاوت، محاسبه کرد.

برای اطمینان از مقایسه‌پذیری نتایج حاصل از سامانه‌های کمّی‌سنجی مختلف، ماده مرجع نیز باید در سامانه قرار گیرد.

نکته - CBA را می‌توان به عنوان مواد مرجع استفاده کرد (به پیوست **الف** مراجعه شود).

هنگامی‌که بتوان ماده مرجع مناسب را شناسایی کرد، مقدار مولکول‌های زیستی هدف، به‌عنوان یک خاصیت ویژه از ماده مرجع، باید با روشی غیر از روش اندازه‌گیری طراحی‌شده از جمله FACS، ELISA و وسترن بلات اندازه‌گیری شود (به پیوست **الف** مراجعه شود). از آنجا که کمّی‌سنجی با میکروسکوپی ایمونوفلورسانس یک کمّی‌سنجی نسبی است، مقادیر اندازه‌گیری‌شده را نمی‌توان به‌طور مستقیم با سایر روش‌های کمّی‌سنجی اشاره‌شده در بالا، مقایسه کرد. این مقدار فقط یک نشانه تقریبی از مقدار مولکول‌های زیستی است، اما می‌تواند برای بحث در مورد فراوانی مولکول‌های زیستی در بافت‌ها یا سلول‌های هدف در برخی موارد مفید باشد.

1- Power meter

شدت فلورسانس می‌تواند تحت تأثیر ضخامت برش FFPE و تراوایی سلول‌ها قرار گیرد. ضخامت برش باید روی ضخامتی که معمولاً برای کمّی‌سنجی استفاده می‌شود تنظیم شود (مثلاً ۴ میکرومتر). تراوایی بافت‌های مختلف نمی‌تواند مانند سلول‌های کشت باشد، حتی اگر سلول‌ها با دقت انتخاب شوند. در این مورد می‌توان برش‌های نازک‌تر را برای کاهش اثر تراوایی درنظر گرفت.

تفاوت‌های بهربه‌بهر[1] مواد مرجع باید درنظر گرفته شود. داده‌های تطبیقی بین بهر موجود و بهر جدید از مواد مرجع برای تنظیم اختلافات بین بهرها لازم است.

۸ مشخصه‌های عملکردی

۸-۱ پس‌زمینه

۸-۱-۱ کلیات

شدت فلورسانس زمینه برای هر بافتی که اندازه‌گیری می‌شود، باید تعیین شود. توصیه می‌شود تصویر به‌دست آمده از رنگ‌آمیزی با مولکول‌های مزدوج‌شده با نانوذرات بدون پادتن اولیه برای تعیین پس‌زمینه استفاده شود. توصیه می‌شود سه نشانگر در نظر گرفته شود. برای مثال، هنگامی‌که از پادتن برچسب‌گذاری‌شده با بیوتینیل- نانوذرات نشاندارشده با آویدین استفاده شده، پس‌زمینه را می‌توان از تصویر بافت نشان‌دارشده، بدون پادتن‌های اولیه و ثانویه، تشخیص داد.

هنگامی‌که از برچسب‌گذاری نانوذرات آویدینی-پادتن بیوتینیل‌شده استفاده می‌شود، پس‌زمینه را می‌توان از تصویر بافت‌هایی رنگ‌آمیزی‌شده فقط با نانوذرات آویدینی بدون آنتی‌بادی اولیه و ثانویه، تعیین کرد.

سه نشانگر زیر که بر زمینه اثرگذار هستند باید ارزشیابی شوند:

الف- فلورسانس خودکار؛

ب- جذب غیراختصاصی نانوذرات؛

پ- جذب غیراختصاصی پادتن‌ها.

لازم است، هر شاخص برای هر بافتی که باید اندازه‌گیری شود، ارزشیابی شود. از آنجا که تحلیل آماری از چند نما عملی نیست، نقاط پَرت[2] با اندازه‌گیری حداقل در سه نما تأیید می‌شوند.

۸-۱-۲ فلورسانس خودکار

فلورسانس خودکار را می‌توان با رنگ‌آمیزی با پادتن اولیه و مولکول‌های مزدوج‌شده با نانوذارت، ارزشیابی کرد. برای مثال، بیشینه شدت فلورسانس از سه نما برای بافت‌های رنگ‌آمیزی‌شده با پادتن اولیه، پادتن

1- Lot-to-lot
2- Outliers

ثانویه برچسب‌گذاری‌شده با بیوتینیل بدون نانوذرات آویدینی را می‌توان به‌عنوان فلورسانس خودکار بافت استفاده کرد.

۸-۱-۳ جذب غیراختصاصی نانوذرات

جذب غیراختصاصی نانوذرات را می‌توان فقط با رنگ‌آمیزی مولکول‌های مزدوج‌شده با نانوذرات ارزشیابی کرد. برای مثال، بیشینه شدت فلورسانس از سه نما برای بافت‌هایی که فقط با نانوذرات آویدینی بدون پادتن اولیه و پادتن بیوتینیل‌شده ثانویه رنگ‌آمیزی شده‌اند را می‌توان به‌عنوان مقدار جذب غیراختصاصی نانوذرات مورد استفاده قرار داد.

۸-۱-۴ جذب غیراختصاصی پادتن‌ها

جذب غیراختصاصی پادتن‌ها را می‌توان با رنگ‌آمیزی از طریق تلفیق یکسان از پادتن‌ها و نانوذرات، و جلوگیری یا جایگزینی یک پادتن با یک پادتن ایزوتیپ (دسته یا گروه پادتن) ویژه که هدف نیست، ارزشیابی کرد.

جذب غیراختصاصی پادتن اولیه را به‌عنوان مثال می‌توان با اندازه‌گیری نمونه‌های رنگ‌آمیزی‌شده با یک پادتن ایزوتیپ ویژه غیرهدف به جای پادتن اختصاصی هدف و پادتن ثانویه مناسب با مولکول‌های مزدوج‌شده با نانوذرات ارزشیابی کرد. از این تلفیق می‌توان به‌عنوان کنترل تحلیل کیفی استفاده کرد. بیشینه شدت فلورسانس از سه نمای رنگ‌آمیزی می‌تواند به‌عنوان مقدار جذب غیرویژه پادتن اولیه استفاده شود.

جذب غیراختصاصی پادتن ثانویه را می‌توان برای مثال با اندازه‌گیری سیگنال‌های نمونه‌هایی که فقط با پادتن ثانویه و مولکول‌های مزدوج‌شده با نانوذرات رنگ‌آمیزی شده، بدون پادتن ویژه هدف ارزشیابی کرد. بیشینه شدت فلورسانس از سه نمای رنگ‌آمیزی می‌تواند به‌عنوان مقدار جذب غیر ویژه پادتن ثانویه استفاده شود.

۸-۱-۵ اتلاف شدت و تداخل‌ها

هنگامی‌که میدان دید به‌طور پیوسته روشن است، شدت فلورسانس می‌تواند به تدریج کاهش یابد. نیمه عمر رنگبری نانوذرات (به زیربند ۵-۲ مراجعه شود) استفاده‌شده برای اندازه‌گیری می‌تواند شاخصی از کاهش شدت باشد.

برای کاهش اتلاف شدت، استفاده از نانوذره فلورسانت جایگزین، روشنایی کمتر، زمان مواجهه کمتر، نرمال‌سازی (بهنجارش) مطابق منحنی رنگبری نوری فلورسانس و مواد ضد رنگبری نوری را می‌توان مورد توجه قرار داد.

از دست دادن شدت سیگنال به دلیل خاموش‌شدن یا جذب مواد نیز باید درنظر گرفته شود.

برای اندازه‌گیری‌های شمارش نقاط درخشان، از دست دادن شدت و تداخل‌ها برای شمارش نقاط درخشان بسیار مهم است. برای رسیدن به این هدف، کاهش شدت فلورسانس نانوذرات را می‌توان تا زمانی که درخشش کافی نانوذرات در طول اندازه‌گیری شمارش حفظ شود، نادیده گرفت.

۸-۲ شاخص‌های وابسته به مواد مرجع

۸-۲-۱ کلیات

کمّی‌سنجی در میکروسکوپ فلورسانس، یک کمّی‌سنجی نسبی است. مقدار اندازه‌گیری‌شده بدون یکا است. بنابراین، شاخص‌هایی که در اینجا توصیف شده‌اند فقط درصورتی معتبر هستند که از مواد مرجع یکسانی استفاده شود.

۸-۲-۲ حد آشکارسازی (LOD)

تخمین LOD باید انجام شود. در عمل، LOD براساس انحراف معیار (SD) سیگنال‌های پس‌زمینه تعیین‌شده در یک میدان دید تحلیل می‌شود. برای مثال، LOD را می‌توان روی مجموع میانگین شدت‌های سیگنال پس‌زمینه و سه برابر SD تنظیم کرد. در روش شمارش برای کمّی‌سنجی، LOD را می‌توان روی میانگین تعداد نانوذرات در هر نمای زمینه به اضافه سه برابر SD تنظیم کرد. ماده مرجع، به‌عنوان مثال CBA باید برای اندازه‌گیری سیگنال‌های پس‌زمینه استفاده شود تا از ایجاد تفاوت در لام‌ها جلوگیری شود.

LOD تعیین‌شده همچنین برای تفسیر نتایج شمارش نقاط درخشان، شامل آشکارسازی نقطه درخشان با تحلیل تصویر، مفید است.

هنگامی‌که از تعریف دیگری از LOD استفاده می‌شود، باید مستندسازی و گزارش شود.

۸-۲-۳ حد کمّی‌سنجی (LOQ)

حد کمّی‌سنجی باید در کمینه فلورسانس از یک برش استوانه‌ای که ضعیف‌ترین فلورسانس را در برش‌های CBA نشر می‌دهد، تعیین شود. سلول‌ها در یکی از استوانه‌های CBA باید از آنهایی باشند که یک مقدار به اندازه کافی کوچک از مولکول‌های زیستی هدف را برای کمّی‌سنجی بیان کنند.

برای شمارش نقاط درخشان، LOQ به حد آشکارسازی نقاط درخشان بستگی دارد. هنگامی‌که میزان درخشش نانوذره برای آشکارسازی نقاط درخشان کافی باشد، LOQ به‌عنوان تک نقطه درنظر گرفته می‌شود.

۸-۲-۴ خطی بودن و گستره پویا

رسم نمودار ارتباط بین نتایج اندازه‌گیری‌های کمّی و مقادیر از پیش اندازه‌گیری‌شده با اندازه‌گیری شدت فلورسانس از CBA رنگ‌آمیزی‌شده و آماده‌شده از سلول‌هایی که در آنها سطوح بیان پروتئین‌ها از ابتدا با روش‌های دیگری مانند FACS یا ELISA اندازه‌گیری شده است (یعنی مقدار داده‌شده)، امکانپذیر است.

هنگامی‌که مقدار اندازه‌گیری‌شده و مقدار داده‌شده به‌صورت نمودار رسم می‌شوند، یک خط رگرسیون (وایازش) می‌توان رسم کرد. مجموع فواصل هر نقطه اندازه‌گیری از خط رگرسیون می‌تواند نشانگر خطی بودن باشد. در نقاط اندازه‌گیری با شدت فلورسانس کم و غلظت بالای شدت فلورسانس، فاصله از خط رگرسیون زیاد است. دراین صورت، می‌توان یک مقدار آستانه تعیین کرد و نقطه اندازه‌گیری با فاصله زیاد از خط رگرسیون راحذف کرد. در نهایت، یک خط رگرسیون ترسیم‌شده به‌وسیله گروهی از نقاط که فاصله آنها به‌قدر کافی از خط رگرسیون کم است به‌دست می‌آید، و گستره پویا می‌تواند از کمترین شدت فلورسانس تا بیشترین شدت در خط رگرسیون تنظیم شود. بنابراین، برای تأیید اندازه مناسب گستره پویا، لازم است که یک خط سلولی با سطح بیان به اندازه کافی کم یا زیاد از مولکول‌های زیستی هدف تهیه شود. در هر مورد، بیشینه و کمینه شدت فلورسانس اندازه‌گیری‌شده از یک برش استوانه‌ای در CBA باید بیشینه و کمینه شدت فلورسانس در گستره پویا باشند.

خطی‌بودن و گستره پویای شمارش نقاط درخشان را می‌توان به همان روش، با جایگزینی شدت فلورسانس با تعداد نقاط درخشان تعیین کرد.

۸-۳ استواری روش

برای تعیین استواری روش، باید تأثیر انحرافات کوچک در پارامتر روش مربوط بر عملکرد روش و نتایج اندازه‌گیری، مورد بررسی قرار گیرد. پارامترهای روش مربوط که بر نتایج اثر می‌گذارند عبارتند از غلظت پادتن (هم پادتن اولیه و هم پادتن ثانویه برای کمّی‌سنجی غیرمستقیم ایمونوفلورسانس)، مقدار شستشو، و شدت نور برانگیزش (لیزر) که باید در طول آزمون پایداری تغییر کند.

علاوه‌بر این، فرآیند نورشیمیایی در فرایند غیرفعال کردن مولکول‌های فلورسانت برانگیخته و فرونشانی ناشی از برخورد مولکول‌های فلورسانت با مواد فرونشاننده، تحت تاثیر دما قرار دارد و با دما افزایش می‌یابد. این کار باعث کاهش شدت فلورسانس می‌شود. بنابراین، ارزشیابی استواری نه تنها شامل بررسی اثرات دما بر مرحله رنگ‌آمیزی می‌شود، بلکه بسته به نوع دستگاه، مرحله تصویربرداری فلورسانس و اندازه‌گیری واقعی را نیز شامل می‌شود، زیرا همه دستگاه‌ها دارای گرم‌خانه یا مرحله‌ای با دمای کنترل‌شده نیستند.

برای شمارش تعداد نقاط درخشان، اثرات دما باید ارزشیابی شود تا اطمینان حاصل شود که در محدوده انجام اندازه‌گیری‌ها، دما بر آشکارسازی نقاط درخشان اثر ندارد.

۹ صحه‌گذاری و تصدیق[1]

۹-۱ کلیات

قبل از اندازه‌گیری، باید سامانه کمّی‌سنجی با استفاده از نانوذرات فلورسانت صحه‌گذاری شود. در آغاز فرآیند صحه‌گذاری، هدف اندازه گیری و الزامات هدف، باید تعریف شوند. ماده مرجع مانند CBA، باید برای

1- Verification

جمع‌آوری داده، به‌طور مناسب طراحی شود تا اثبات شود که سامانه کمّی‌سنجی الزامات را برآورده کرده و برای هدف اندازه‌گیری مناسب است. طی فرآیندهای صحه‌گذاری، مشخصه‌های عملکردی توضیح‌داده‌شده در بند ۸ باید ارزشیابی شوند.

هنگامی که هدف کمّی‌سنجی شامل فرآیندهای تصمیم‌گیری بیشتری ازجمله تفسیر نتایج است، معیارهای پذیرش صحه‌گذاری باید براساس فرایند تصمیم نهایی طراحی شوند.

روش‌های صحه‌گذاری‌شده[1] که بدون اصلاحات مورد استفاده قرار می‌گیرند، باید قبل از استفاده برای اندازه‌گیری اهداف، به‌طور مستقل توسط کاربران آن روش تصدیق شوند. فرایند صحه‌گذاری در بیشتر موارد اهدافی را که باید در حین صحه‌گذاری برای اطمینان از برآورده‌شدن الزامات ارائه شوند، روشن می‌کند. به‌منظور جمع‌آوری داده‌های قابل مقایسه از لحاظ مشخصه‌های عملکردی، می‌توان همان مواد مرجع مورد استفاده در فرآیند صحه‌گذاری را برای تصدیق استفاده کرد).

۹-۲ دقت آزمایشگاه منفرد

دقت، معیاری برای تغییرپذیری در نتایج اندازه‌گیری‌های مستقل است که برای نمونه یکسان تحت شرایط معین به‌دست آمده است.

تکرارپذیری روش کمّی‌سنجی به‌وسیله نانوذرات فلورسانت باید تعیین شود. برای مثال، ماده مرجعی مانند CBA می‌تواند برای تعیین تکرارپذیری آنالیزهای نمونه بافت استفاده شود. اندازه‌گیری باید برای زمان‌های آماری معنادار، برای مثال یک اندازه‌گیری مستقل برای سه نمونه تکرار شود.

دقت متوسط همچنین برای ارزشیابی عملکرد روش کمّی‌سنجی نسبی مفید است. تخمین دقت متوسط را می‌توان براساس تکرارپذیری با تغییر کاربران یا روزهای اندازه‌گیری، برای مثال در سه روز مختلف، طراحی کرد. همچنین CBA برای تعیین دقت متوسط بسته به هدف اندازه‌گیری با سامانه کمّی‌سنجی نسبی، استفاده می‌شود.

۹-۳ تجدیدپذیری

میکروسکوپی فلورسانس کمّی با ایمونوهیستوشیمی، یک روش کمّی‌سنجی نسبی است و نتایج اندازه‌گیری‌ها، مثل شدت سیگنال فلورسانس یا تعداد نقاط درخشان، نمی‌توانند به‌طور مستقیم با سایر سامانه‌های کمّی‌سنجی به‌ویژه در آزمایشگاه‌های دیگر مقایسه شوند.

هنگامی که نتایج کمّی‌سنجی با نتایج سامانه‌های کمّی‌سنجی دیگر، به‌ویژه در آزمایشگاه‌های دیگر مقایسه می‌شوند، ماده مرجع یکسانی مانند CBA باید مورد استفاده قرار گیرد و برای مقایسه ضریب تبدیل باید محاسبه شوند.

1- Validated

درجه بالایی از تغییرپذیری در فرایند رنگ‌آمیزی وجود دارد. بنابراین، تجدیدپذیری باید با درنظر گرفتن فرآیند رزش[1] (رنگ‌کردن) ارزشیابی شود.

۱۰ گزارش‌دهی

گزارش داده باید شامل جزئیات کافی باشد تا امکان ارزیابی مستقل نتایج کمّی‌سنجی هدف را فراهم کند.

عناصر گزارش‌دهی باید شامل موارد زیر باشد، اما فقط به این موارد محدود نمی‌شود:

— شماره شناسه نمونه، توصیف منبع؛
— نام واکنشگرها، منبع، شمارهٔ بهر[2]؛
— پادتن‌ها – پادتن‌های اولیه و ثانویه برای ایمونوفلورسانس غیرمستقیم؛
— ماده مرجع استفاده‌شده؛
— پس‌زمینه و شاخص‌های مربوط به آن؛
— LOD، LOQ، گستره پویا (به زیربند ۸-۲ مراجعه شود)؛
— نتیجه صحه‌گذاری، تصدیق، یا هر دو؛
— توصیف کل سامانه اندازه‌گیری؛
— مشاهدات غیرمنتظره.

1- Dyeing
2- Lot

پیوست الف

(آگاهی‌دهنده)

مثالی از مواد مرجع

الف-۱ اصول

آرایه بلوک سلولی می‌تواند مثالی از ماده مرجع برای ارزشیابی روش‌های کمّی‌سنجی مولکول‌های زیستی[1] با استفاده از نانوذرات فلورسانت باشد.

الف-۲ سلول‌های کشت‌شده

الف-۲-۱ کلیات

سلول‌ها براساس سطح بیان هدف انتخاب می‌شوند تا زمانی که منحنی کالیبراسیون تشکیل می‌شود، بتواند یک سیگنال نماینده باشد.

الف-۲-۲ سلول‌ها

سلول‌های مخاطی[2] مشتق از غدد پستانی انسان، MCF7 (ATCC HTB-22)، T47D (ATCC HTB-113)، CAMA-1 (ATCC HTB21)، ZR-75 (ATCC CRL-1500)، UACC-812 (ATCC CRL-1897)، و سلول‌های مشتق‌شده از سرطان سینه التهابی، KPL4، استفاده شدند.

الف-۲-۳ آرایه بلوک سلولی

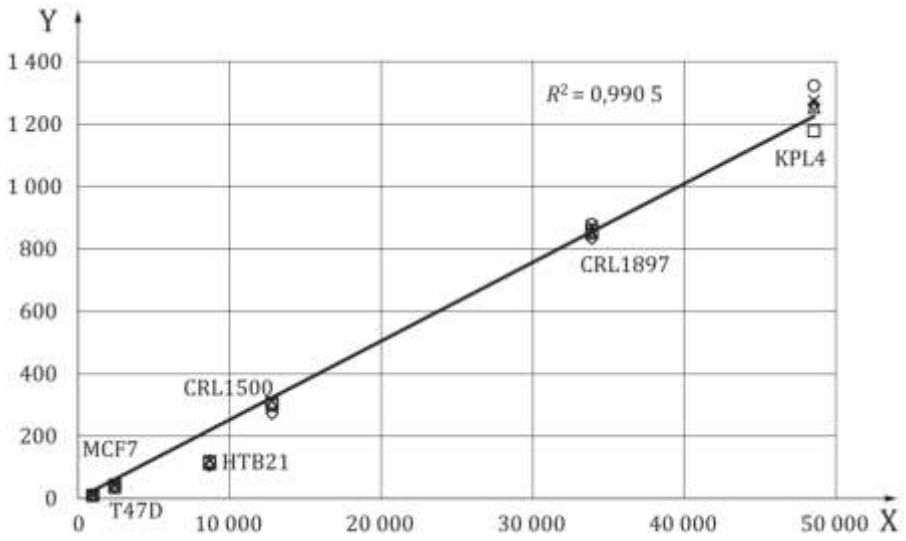
سلول‌های انتخاب‌شده به‌صورت مجزا در پارافین جاسازی می‌شوند. یک استوانه جامد از پارافین حاوی سلول‌ها از یک بخش متراکم شده سلولی جدا می‌شود. این استوانه «بلوک سلولی» نامیده می‌شود. تلفیقی از بلوک‌های سلولی به‌گونه‌ای طراحی شده است که هر غلظت هدف به‌عنوان نماینده برای ساخت منحنی کالیبراسیون مناسب باشد. بلوک‌های سلولی مرتب و آرایه‌شده و دوباره در پارافین جاسازی می‌شوند. یک بخش آرایه بلوک سلولی با یک برش نازک بلوک حاصل، آماده می‌شود.

الف-۳ منحنی کالیبراسیون

برای آنالیز کمّی به‌وسیله میکروسکوپی ایمونوفلورسانس، شدت فلورسانس یا تعداد نقاط درخشان را می‌توان با مقدار اندازه‌گیری‌شده با ELISA (سنجش ایمونوجاذب مرتبط با آنزیم) یا FACS (مرتب‌کننده سلول فعال‌شده با فلورسانس) برای تولید منحنی کالیبراسیون مقایسه کرد. شکل الف-۱ مثالی از منحنی

1- Biomolecules
2 - Epithelial

کالیبراسیون را نشان می‌دهد که تعداد نقاط درخشان را با سیگنال اندازه‌گیری‌شده از FACS مقایسه می‌کند.



راهنما:

X سیگنال FACS

Y سیگنال کمّی‌سنجی (PID)

□ روز ۱

× روز ۲

○ روز ۳

△ روز ۴

◇ روز ۵

شکل الف-۱ مثالی از منحنی کالیبراسیون: FACS برحسب کمّی‌سنجی نانوذرات فلورسانت

پیوست ب

(آگاهی‌دهنده)

مثالی از روش ارزشیابی کلوخگی/انبوهش نانوذره

ب-۱ کلیات

درجه کلوخگی/انبوهش بر عملکرد نانوذرات تاثیر می‌گذارد. اغلب نانوذرات با قابلیت کلوخگی/انبوهش کمتر برای سامانه‌های کمّی‌سنجی انتخاب می‌شوند.

مثالی از روش ارزشیابی کلوخگی/انبوهش ارائه شده است.

ب-۲ روش پراکندگی نور

ب-۲-۱ روش اجرایی

نانوذرات با میکروسکوپ الکترونی تصویربرداری می‌شوند. توزیع قطر ذره از روی تصویر اندازه‌گیری‌شده و متوسط قطر ذرات از توزیع محاسبه می‌شود. همچنین، توزیع اندازه خوشه انبوهه‌شده در آب با استفاده از روش پراکندگی نور اندازه‌گیری‌شده و متوسط اندازه خوشه انبوهه‌شده محاسبه می‌شود. افزایش متوسط اندازه خوشه در مقایسه با متوسط قطر ذره، نشان‌دهنده کلوخگی/انبوهش است.

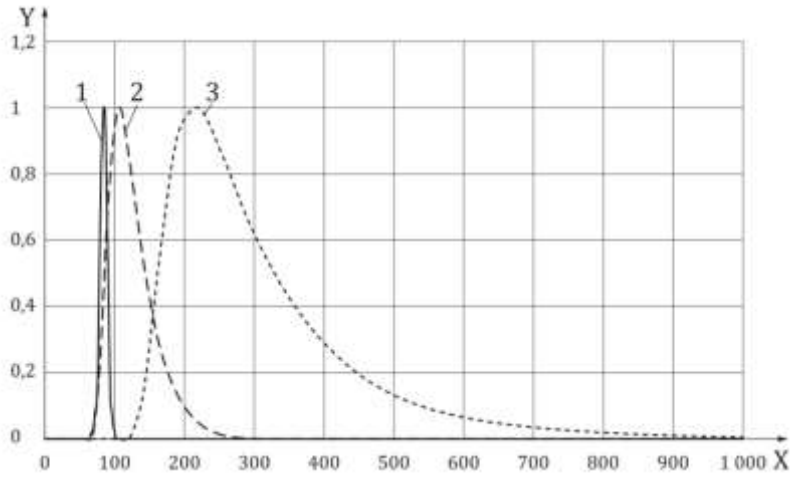
برای اندازه‌گیری می‌توان از پراکندگی پویای نور یا پراکندگی ایستای نور استفاده کرد. انتظار می‌رود از تجهیزات کالیبره‌شده با مواد مرجع (به‌عنوان مثال ذرات پلی‌استایرن استاندارد) استفاده شود.

ب-۲-۲ مثالی از نتیجه

نتیجه اندازه‌گیری نمونه‌های نانوذره در شکل ب-۱ نشان داده شده است.

خط توپر توزیع قطر ذره اندازه‌گیری‌شده با یک میکروگراف (ریزنگار) را نشان می‌دهد و قطر متوسط آن ۸۳ نانومتر محاسبه می‌شود. خطوط خط‌چین و نقطه‌چین توزیع به ترتیب اندازه‌های‌خوشه انبوهه‌شده نمونه ۱ و نمونه ۲ را نشان می‌دهند که با روش مبتنی بر پراکندگی نور اندازه‌گیری شده‌اند. اندازه‌های متوسط خوشه‌ها به ترتیب ۱۱۹ نانومتر و ۲۶۷ نانومتر محاسبه شده است.

در این مورد، حالت انبوهش/کلوخگی به‌عنوان حالتی تعریف می‌شود که اندازه متوسط خوشه بیش از دو برابر قطر متوسط ذره افزایش یابد. بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود که نمونه ۱ در حالت پراکنده و نمونه ۲ در حالت انبوهش/کلوخگی است.



راهنما:

X قطر ذره یا اندازه خوشه (nm)

Y تعداد بهنجارشده ذرات یا خوشه‌ها

۱ اندازه‌گیری‌شده با میکروگراف (ریزنگار)

۲ نمونه ۱

۳ نمونه ۲

شکل ب-۱ توزیع اندازه خوشه انبوهه‌شده و قطر ذره

قطر ذره با اندازه‌گیری ذرات به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی و اندازه‌گیری اندازه آنها با نرم‌افزار تحلیل اندازه ذره یا کولیس‌های الکترونیکی محاسبه شدند. از آنجا که در عکس میکروسکوپ الکترونی روبشی، تعیین اینکه ذرات انبوهه شده‌اند ممکن نیست، همه ذرات به‌عنوان ذرات مستقل اندازه‌گیری شدند.

اندازه خوشه انبوهه‌شده با استفاده از یک تحلیلگر اندازه ذره پراکندگی نور اندازه‌گیری شد. اندازه خوشه انبوهه‌شده با استفاده از این افزاره اندازه‌گیری شد.

کتاب‌نامه

[1] Li R. et al., “Cell culture block array for immunocytochemical study of protein expression in cultured cells.”, Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2005 Mar; 13(1):85-90.

[2] Yu J. et al., “A validation study of quantum dot multispectral imaging to evaluate hormone receptor status in ductal carcinoma in situ of the breast”, Human Pathology (2013) 44, 394-401.

[3] Gonda K. et al., “Quantitative diagnostic imaging of cancer tissues by using phosphor-integrated dots with ultra-high brightness”, Sci Rep. (2017) 7(1):7509.

[4] Yamaki S. et al.,“PD-L1 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma is a poor prognostic factor in patients with high CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes: highly sensitive detection using phosphor-integrated dot staining”, Int J Clin Oncol. 2017 Aug; 22(4):726-733.

[5] Peck A. R. et al., “Validation of tumour protein marker quantification by two independent automated immunofluorescence image analysis platforms”, Modern Pathology (2016) 29, 1143- 1154.

[6] Moquin A. et al., “Quantum dot agglomerates in biological media and their characterization by asymmetrical flow field-flow fractionation”, Eur J Pharm Biopharm (2015) Jan;89:290-9.

[7] Huang J-y. et al., “The effect of lipid nanoparticle PEGylation on neuroinflammatory response in mouse brain”, Biomaterials (2013) Oct;34(32):7960-70.

[8] [8] Dosev D. et al., “Inorganic lanthanide nanophosphors in biotechnology”, J Nanosci Nanotechnol (2008) Mar;8(3):1052-67.

[9] Muoth C. et al., “Impact of particle size and surface modification on gold nanoparticle penetration into human placental microtissues”, Nanomedicine (Lond) (2017) May;12(10):1119- 1133.

[10] Craig G. A. et al., “Synthesis, characterization, and functionalization of gold nanoparticles for cancer imaging”, Methods Mol Biol (2010) 624:177-93.

[11] Wu J.-K. et al., “Purification of quantum dot-based bioprobes via high-performance size exclusion chromatography”, Talanta (2016) Oct 1;159:64-73.

[12] [Camp R.L. et al., “Automated subcellular localization and quantification of protein expression in tissue microarrays”, Nat. Med. (2002) Nov;8(11):1223-7.

[13] Kwabena F.M.O. et al., “Mass spectrometric epitope mapping”, Review Mass Spectrom Rev. (2018) Mar;37(2):229-241.

[14] Itay M. et al., “Epitope mapping using combinatorial phage-display libraries: a graph-based algorithm”, Comparative Study Nucleic Acids Res. (2007) 35(1):69-78.

[15] ASTM F3294–18, Standard Guide for Performing Quantitative Fluorescence Intensity Measurements in Cell-based Assays with Widefield Epifluorescence Microscopy

[16] ISO 19749:2021, Nanotechnologies - Measurements of particle size and shape distributions by scanning electron microscopy

[17] ISO 26824:2022, Particle characterization of particulate systems — Vocabulary

[18] ISO 22493:2014, Microbeam analysis - Scanning electron microscopy — Vocabulary

[19] ISO 10934:2020, Microscopes - Vocabulary for light microscopy