

LUMINISCENČNÍ metody

Petr Breinek

Luminiscence

= emise světla (fotonů) atomy a molekulami (luminofory), které se nacházejí v excitovaném stavu (elektron se vrací z excitovaného stavu nebo vyšší energetické hladiny na nižší energetickou úroveň - do základního stavu)

Bioluminiscence v přírodě

Světlušky, medúzy,
dřevokazné
houby, hlubokomořské
ryby,



Princip:

Luciferin + ATP → Luciferyl adenylát (Luciferáza)

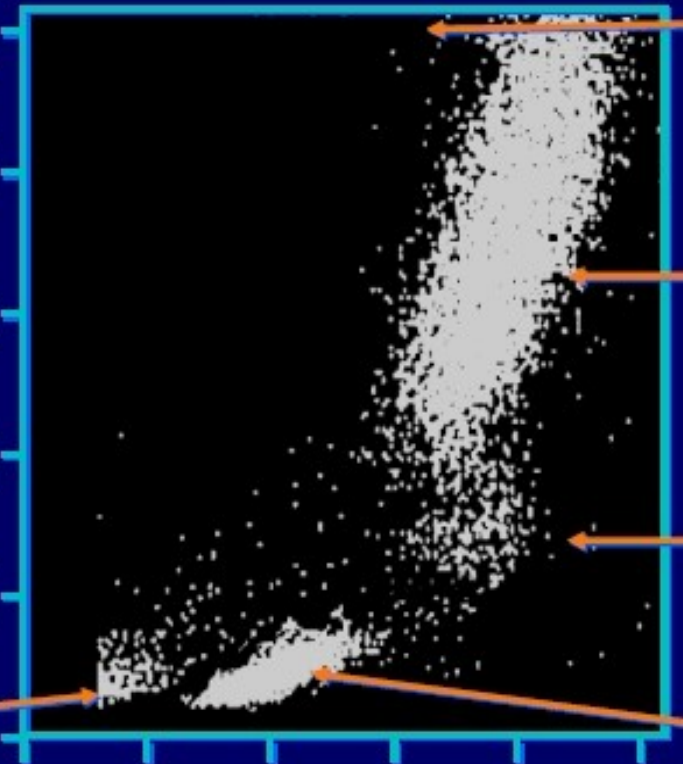
Luciferyl adenylát → Oxyluciferin + AMP + CO₂ + **světlo**

Reakcí jedné molekuly luciferinu je produkován jeden foton o vlnové délce odpovídající namodralému světlu. Při reakci se pouhé 4 % energie mění na energii tepelnou a zbytek, tedy 96 % energie je vyzářen. Světluška je tedy daleko účinnější zářič než běžná výbojka, která má tento poměr 9:1 (tedy jen 10 % energie přechází na světlo).

Průtoková cytometrie

SSC

1000
800
600
400
200
0



FSC

Eosinofily



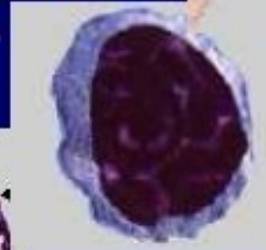
Neutrofil



Monocyty



Lymfocyty a



Bazofily



Trombocyty,
erytrocyty a
debris



Rozdělení (podle příčiny):

- **Fotoluminiscence** (fluorimetrická stanovení)
 - fluorescence
 - fosforescence

Excitace vyžaduje zdroj světla
- **Chemiluminiscence**
 - bioluminiscence

Excitace **bez zdroje** světla
- **Elektroluminiscence**
- Termoluminiscence, Radioluminiscence, Katodoluminiscence, Triboluminiscence

Použití luminiscence v KB

- **Imunoanalytické metody**
(s fluorescenčním markerem)
- **Fotoluminiscenční metody**
(fluorescenční metody)
- **Chromatografické metody**
(s fluorescenčním detektorem)

Stanovované analyty

Porfyriny

Srdeční markery

Hormony

Vitaminy

Tumorové markery

Léky

Kostní markery

Prokalcitonin,...

Výhody: **vysoká citlivost**

Fotoluminiscence

Fluorimetrie

FPIA

MEIA

DELFLIA

Fotoluminiscence

- Podle dosvitu sekundárního záření dělíme fotoluminiscenci na:

fluorescenci (10⁻⁹ - 10⁻⁵ s)

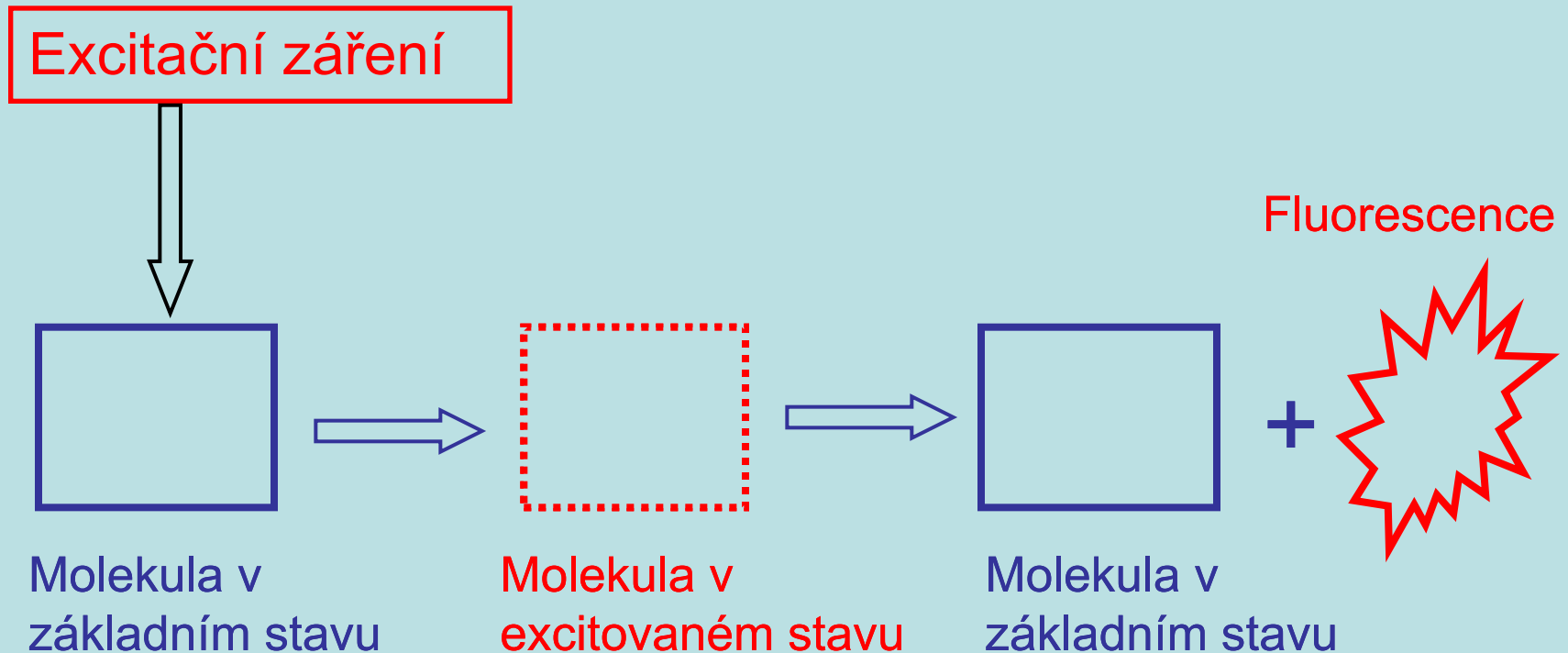
fosforescenci (10⁻² s až dny)

- Absorbce primárního záření v oblasti gama, rentgenového, ultrafialového nebo viditelného spektra

Fluorimetrie – absorbce UV záření

Fotoluminiscence

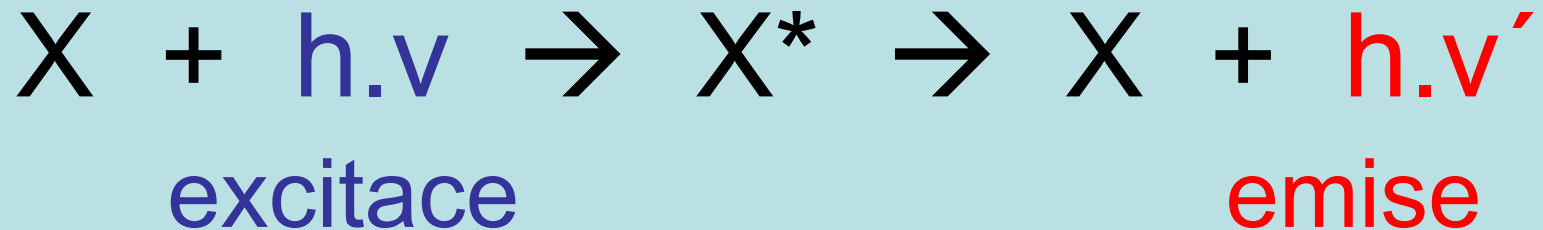
Zjednodušeně: je to děj, při kterém záření o kratší vlnové délce vyvolává v látce určitého složení vznik záření o delší vlnové délce



Princip

1. Absorbce energie (**excitace** fotonem) - atomy nebo molekuly přechází do vyšší kvantové hladiny
2. Vyzáření (**emise**) energie formou luminiscence při návratu do základního stavu
3. Luminiscenční záření má větší vlnovou délku než záření excitační
(část absorbované energie je spotřebována přestavbami molekuly, fotochemickými reakcemi, tvorbou tepla, reakcí molekuly s okolím,...)
Rozdíl od rozptylu světla kdy **nedochází** k absorpci energie

Princip



$$h\nu > h\nu' \text{ potom } \Lambda < \Lambda$$

$$E = h\nu = (h.c)/\lambda$$

Stokesův posun je rozdíl mezi vlnovou délkou excitačního (primárního) a emitovaného (sekundárního) záření

$$E = h \cdot \nu = (h \cdot c) / \lambda$$

E (energie fotonu)

h (Planckova konstanta = $6,6262 \cdot 10^{-34}$ J.s)

ν (frekvence)

c (rychlost světla ve vakuu $3 \cdot 10^{10}$ m/s)

λ (vlnová délka)

Veličiny fluorescence

- **Kvantový výtěžek**

poměr počtu vyzářených kvant fluorescence k počtu pohlcených fotonů

- **Doba života**

doba mezi pohlcením kvanta budícího záření a vyzářením kvanta fluorescence

- **Polarizace (anizotropie)**

může dát informaci o pohyblivosti molekuly fluorescenční látky v daném prostředí

Přístrojová technika

- **Zdroj excitačního záření** (Hg výbojka, halogenové výbojky, Xe výbojka, lasery).
- **Filtr** (Woodův filtr skla s příměsí NiO, CuO, CoO).
- **Měřicí prostor**
- **Interferenční filtr** propouštějící fluorescenční signál.
- **Detektor**

Schéma fluorimetru

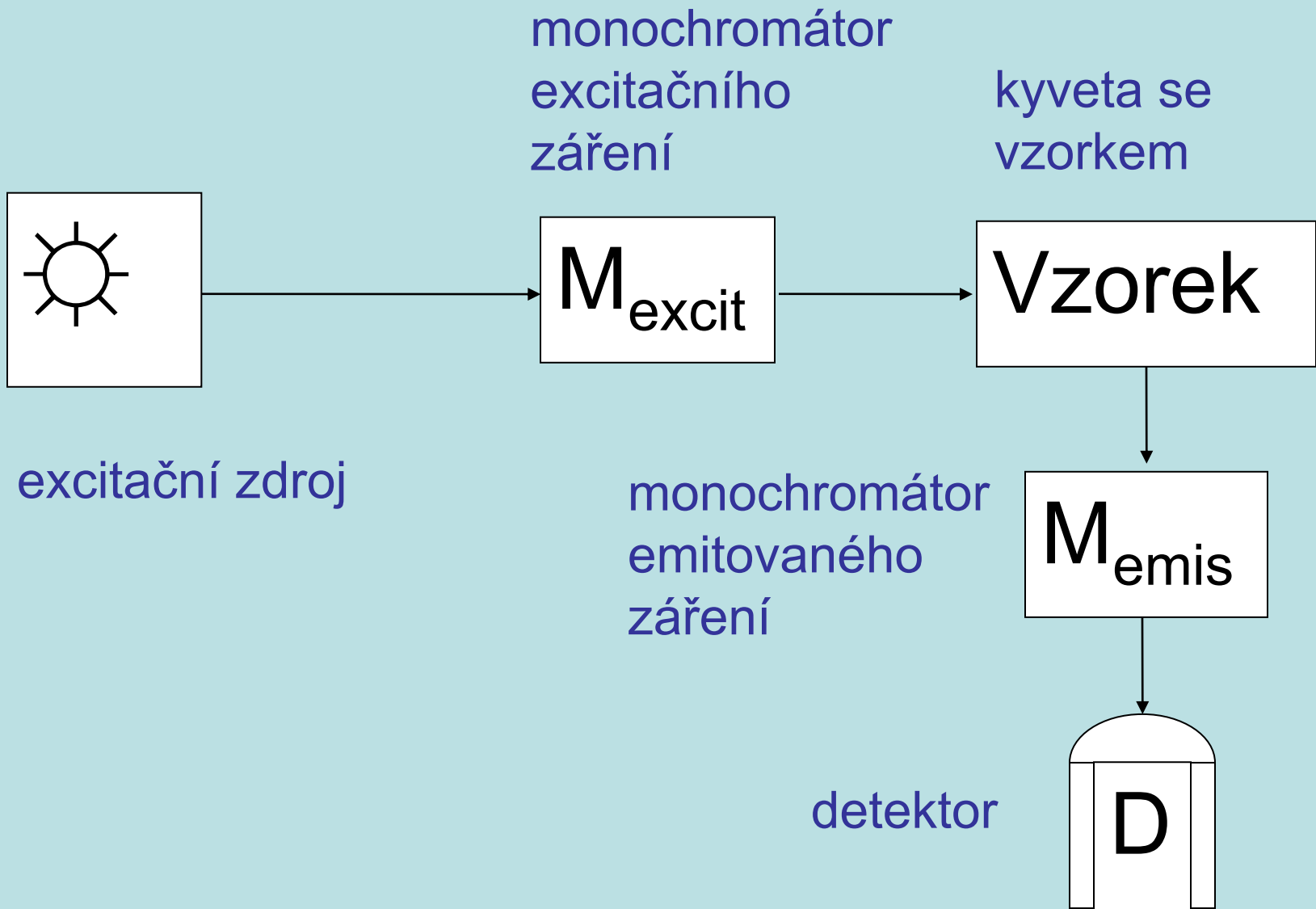
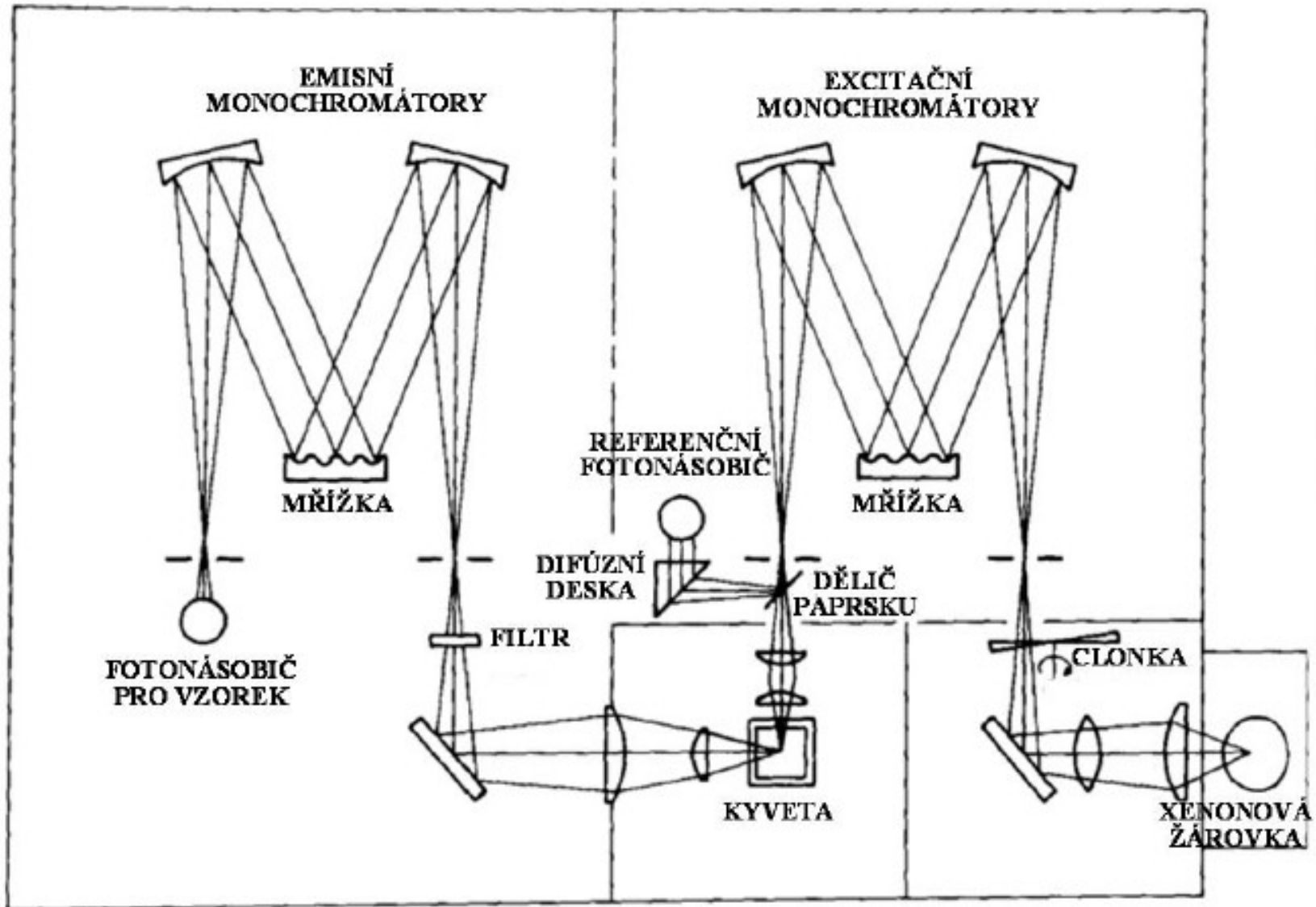


Schéma fluorimetru



Fluorofory

= molekuly nebo jejich části, které fluoreskují

- **Přirozené**
 - Aromatické aminokyseliny (v bílkovinách), např. tryptofan
 - NADH, riboflavin, FAD, porfyriny,...
- **Analytické**
(fluorescenční značky nebo sondy)

FPIA

Fluorescenční polarizační imunoanalýza Fluorescence Polarization Immunoassay

- K excitaci používá polarizované světlo
- Homogenní kompetitivní imunoanalýza (soutěží stanovovaný analyt a analyt značený fluoresceinem o vazebná místa na specifické protilátce)
- Využívá různé rychlosti rotace velkých a malých molekul (imunokomplexu a antigenu), které vedou ke změně polarizace
- Fluorescence vyvolaná lineárně polarizovaným světlem je také lineárně polarizovaná

Nutná podmínka:

- Významný rozdíl v rychlosti rotace malé molekuly antigenu a velké molekuly imunokomplexu
- Použití pouze pro stanovení koncentrace **malých antigenů** (např. léků,...)

- Malé molekuly (stanovovaný analyt a značený analyt) se otáčejí velkou rychlostí, po excitaci polarizovaným světlem značený analyt emituje fluorescenční záření do mnoha směrů. Při detekci polarizovaného světla se naměří pouze nízká intenzita tohoto záření
- Je-li značený analyt vázán na protilátku, (imunokomplex: značený antigen-protilátka), dojde ke snížení rychlosti rotace této velké molekuly, emitované světlo kmitá ve stejné rovině jako excitující – při detekci se naměří vysoká intenzita záření
- Čím vyšší koncentrace stanovovaného analytu, tím více bude tohoto analytu navázáno na protilátku a tedy tím méně značeného analytu, takže naměřené hodnoty fluorescence budou nízké a naopak při nízké koncentraci naměříme hodnoty vysoké. **Platí nepřímá úměra.**

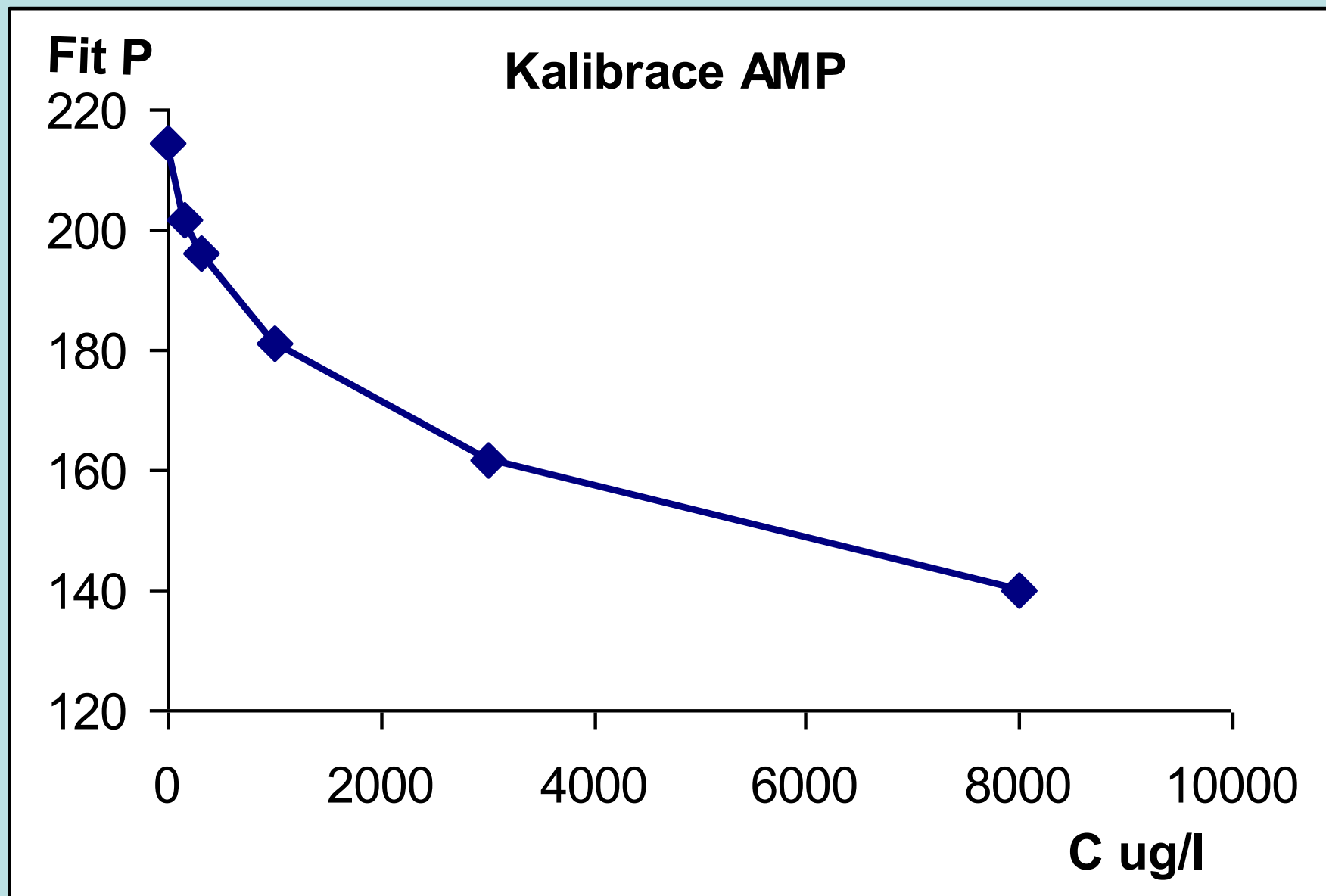
AxSYM(Abbott)

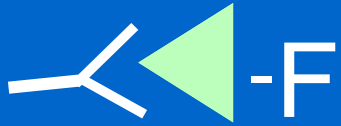
- FPIA
- MEIA
- ION CAPTURE
- REA



- Použití lineárně polarizovaného světla ($\lambda = 485 \text{ nm}$ - zdroj wolframová lampa + polarizační filtr)
- Při návratu molekuly fluoroforu do základní stavu emise zeleného světla při 525-550 nm.
- Přes polarizační filtr detekce fotonásobičem.
- Měření ve dvou polarizačních rovinách vektikální a horizontální poskytne výslednou intenzitu polarizovaného světla, která je nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu

Příklad kalibrační křivky stanovení amfetaminu

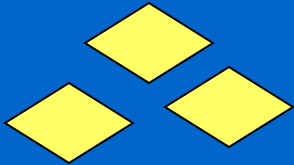




FPIA

Nízká koncentrace analytu ...

vzorek



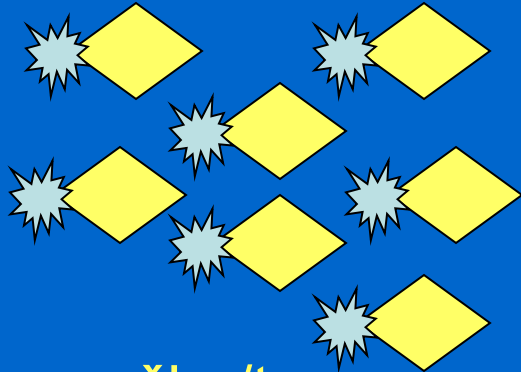
+

protilátka



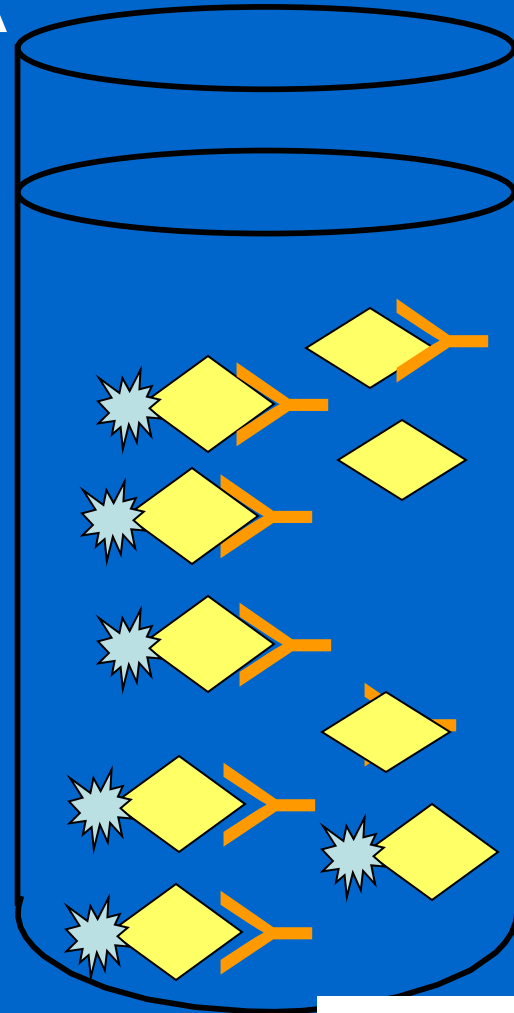
=

+



+

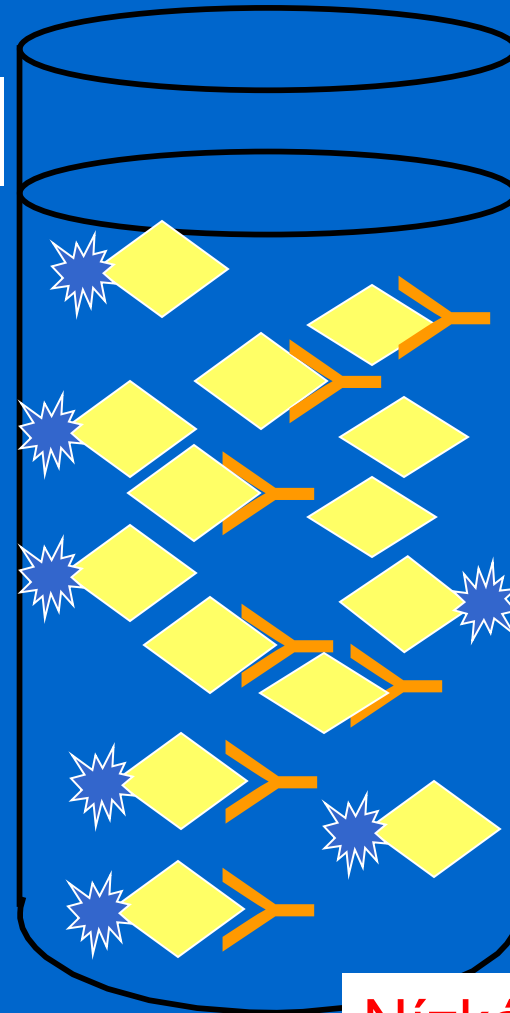
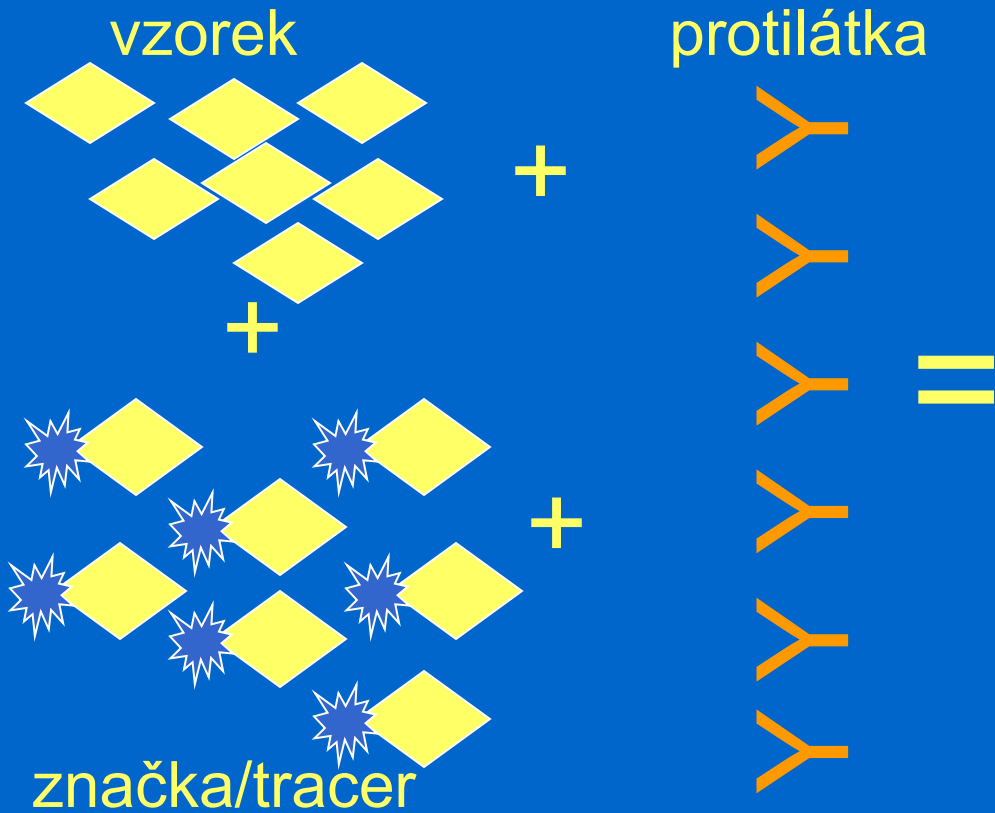
značka/tracer



Vysoká polarizace



Vysoká koncentrace analytu ...



Nízká polarizace

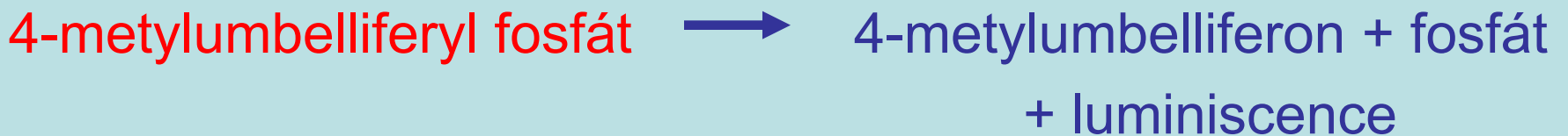
MEIA

Enzymová imunoanalýza na mikročasticích Microparticle Enzyme Immunoassay

- Heterogenní enzymová imunoanalýza na mikročasticích
- Immunokomplex značený enzymem (ALP)
- Fluorogenní substrát (MUP, 4-metylumbelliferylfosfát) reaguje s enzymem (ALP)
- Defosforylace substrátu (MUP → MU) (4-metylumbelliferon), **luminiscence**

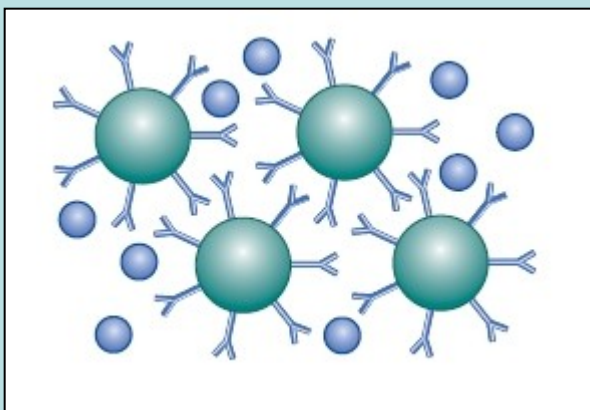
Defosforylace substrátu

ALP

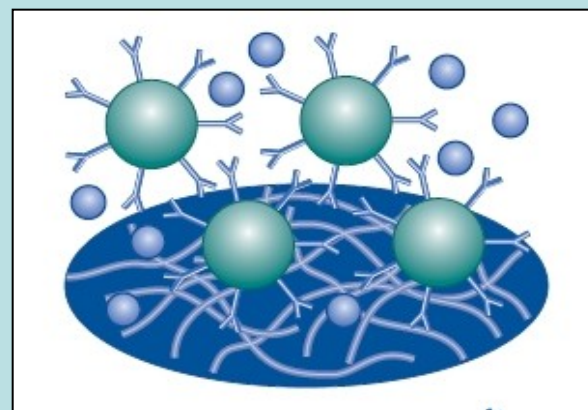


Světelný zdroj: Hg-výbojka (365 nm)

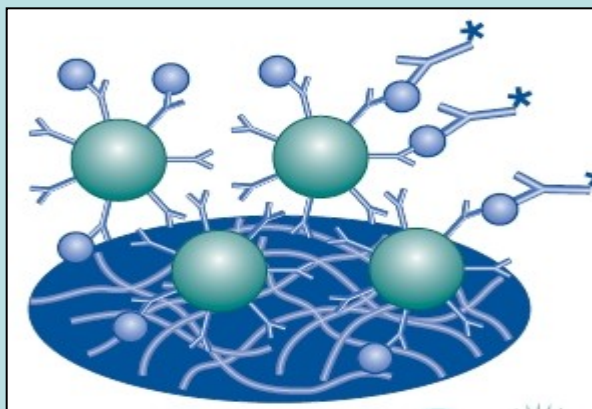
MU emituje fluorescenční záření(448 nm)



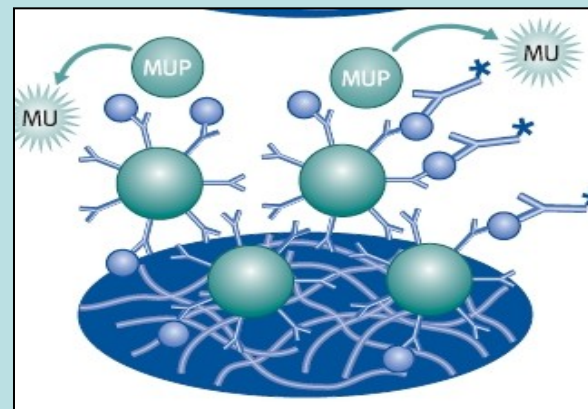
Inkubace vzorku a mikročastic s navázanou protilátkou



Část reakční směsi je přenesena na matrici se skleněnými vlákny



Dále je přidána protilátka značená ALP

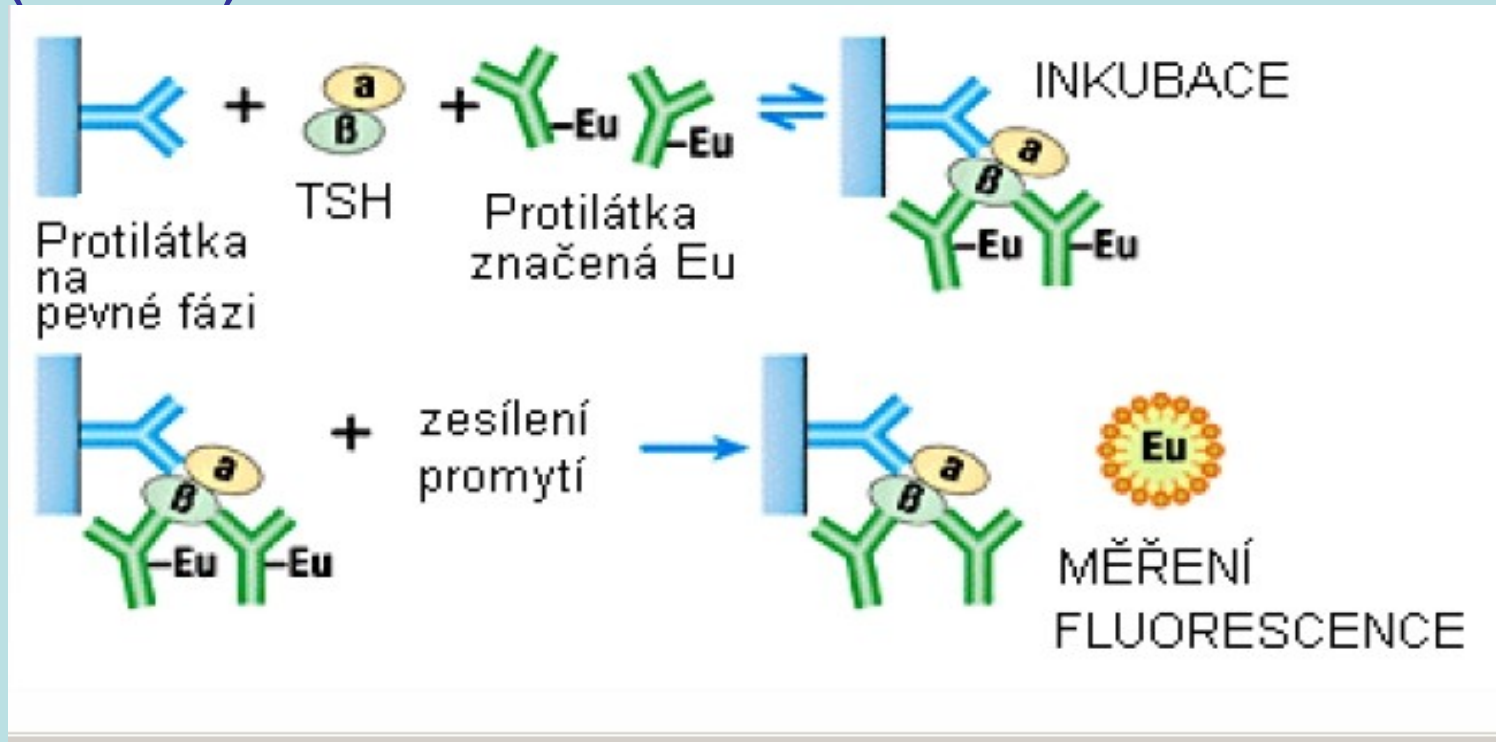


Po promytí je přidán substrát (MUP), po reakci se měří intenzita fluorescence

DELFLIA

Dissociation-enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay

Protilátky nebo antigeny jsou značeny **cheláty lanthanidů**: **Eu** (europia), **Sm** (samaria) a **Tb** (terbia)



- Cheláty lanthanoidů vykazují po své přeměně na sloučeninu se silnou fluorescencí velký Stokesův posun a delší dobu fluorescence.
- Nekompetitivní nebo kompetitivní sendvičová technika chráněná patentem.
- Detekce záření (620 nm)se zpožděním
(odstranění interferujícího záření)
- Pulzní zdroj (340nm, frekvence tisíce pulzů/s)
- Opakované měření (1000 a vícekrát)

Využití:

„Celoplošný laboratorní novorozenecký screening“

- **Kongenitální hypotyreóza (SKH)**
Snížená funkce štítné žlázy vede ke zvýšení koncentrace **TSH**
- **Kongenitální adrenální hyperplazie (CAH)**
Defekt steroidogeneze v kůře nadledvin;
nejčastěji deficit enzymu P450c21 (21-hydroxylázy)
zvýšení koncentrace **17 OHP** (17-0H-progesteronu)
- Fenylketonurie/hyperfenylalaninémie

v.č. 2962615

I.

0 2 HOME BACK

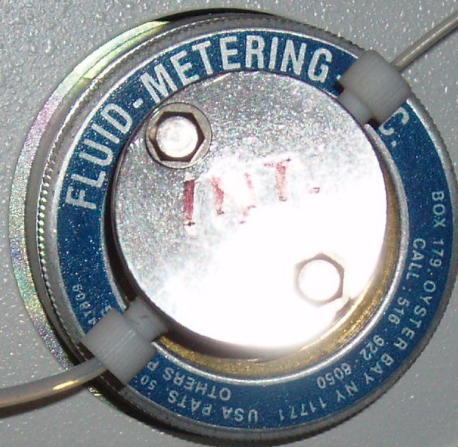
1296-031 DELFIA® PLATE PUNCH

WALLAC

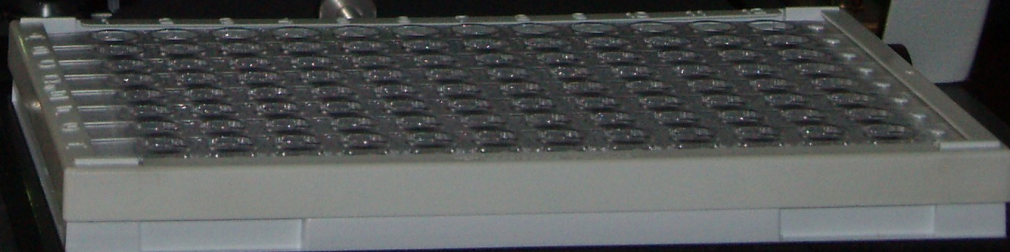
Kódové číslo
Příjmení a jméno
dítěte:
312
NIBBIN
NIBBIN

Terčíky s krevní skvrnou
jsou vkládány do jamek

ALLAC



Naplnění jamek činidly



HIM B42054300

v.č. 2962611



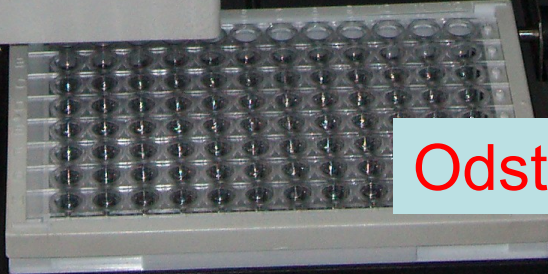
1296-061 DELFIA® DISKREMOVE

wallac

- VACUUM
- LEVEL
- POWER

HIM B42054301

1296-062 DELFIA VACUUM UNIT



Odstranění terčků z jamek



Fluorimetr s mikrotitrační destičkou

Chemiluminescence

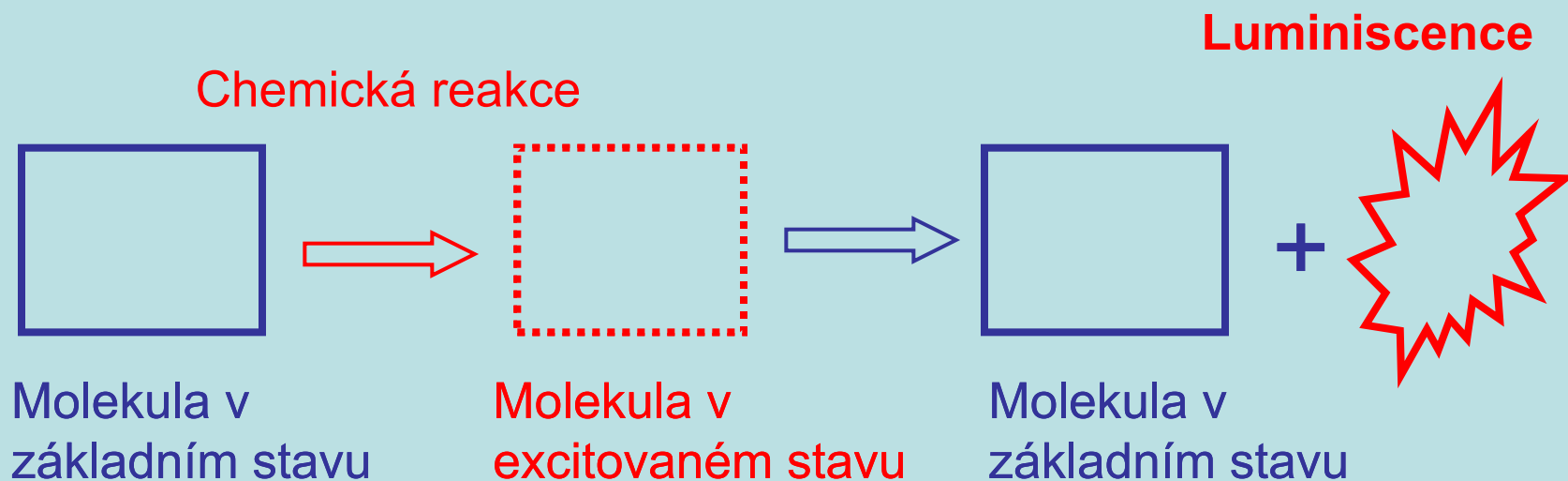
CMIA

ECLIA

- **Chemiluminescence** - je vyvolána energií chemické reakce.
- Termoluminescence – je vyvolána teplem, teploty až 500 °C
- **Elektrochemiluminescence**
modifikace chemiluminescence,
luminescence je generována chemickými reakcemi iniciovaných elektrochemicky (oxidace na anodě)

Chemiluminescence

Vzniká vyzářením fotonu z molekuly luminoforu po jeho chemické oxidaci působením oxidantů (H_2O_2 , O_2, \dots)

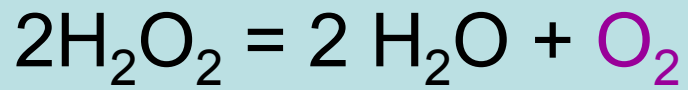
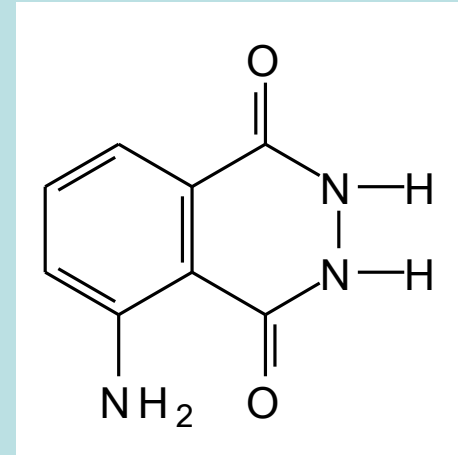


Analytické luminofory

- Luminol, isoluminol
- Fluorescein
- Methylumbelliferon (MU)
- Akridin a jeho estery
- Adamantyl dioxetan
- Cheláty lanthanidů (Europium)

Nejčastěji jsou navázány jako značka (na protilátky nebo antigeny) nebo jsou použity jako substrát.

Luminol



(Peroxidáza)

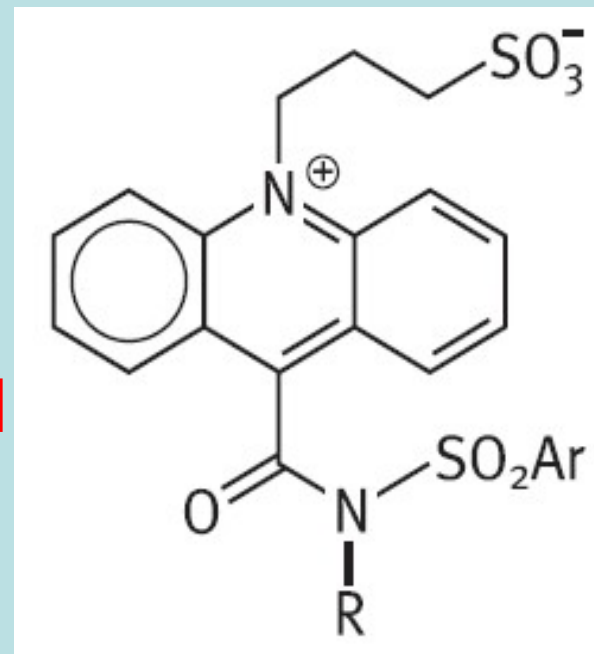


Chemiflex™ (Abbott)

Patentovaný ester akridinu

Akridinium(N-sulfonyl)karboxamid

Sloučenina je velmi stálá



Reakce:

- oxidace v kyselém prostředí (pH=2; HNO₃ a H₂O₂)
- změna prostředí na zásadité (NaOH)
- vznik nestabilní N-sulfonylpropylakridon v excitovaném stavu
- při přechodu do stabilní formy se uvolní CO₂ a energie v podobě světla (430nm)

Lumigen® (Siemens)

Fosfátový ester adamantyl dioxetanu

Reakce:

- defosforylace substrátu účinkem ALP
- vznik nestabilního meziprojektu v excitovaném stavu
- při jeho tvorbě je emitován tok fotonů/ luminiscence

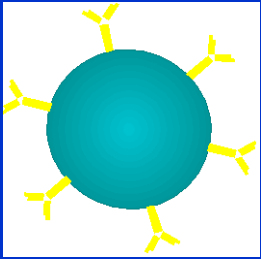
CMIA

Chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročasticích

- Heterogenní imunoanalýza - separace pevnou fází
- Paramagnetické mikročastice
- Emise světla molekulou, která je produktem chemické reakce
- Systém není ozařován zdrojem světla.

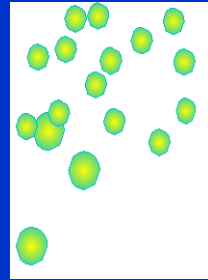
- I. Vzorek se přidá k paramagnetickým mikročásticím potaženými specifickou protilátkou. Analyt ze vzorku se naváže na mikročástice
(Paramagnetické částice – krystaly kysličníku železa - velký povrch a magnetické vlastnosti)
- II. Po promytí se přidá konjugát protilátek proti stanovovanému analytu s luminoforem
- III. Do reakční směsi se přidají roztoky H_2O_2 (Pre-Trigger) a NaOH (Trigger)
- IV. Změří se výsledná luminiscence
(v RLU jednotkách)

Paramagnetické
částice potažené
protilátkou



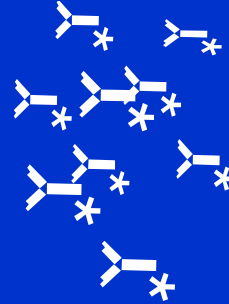
+

Vzorek/analyt

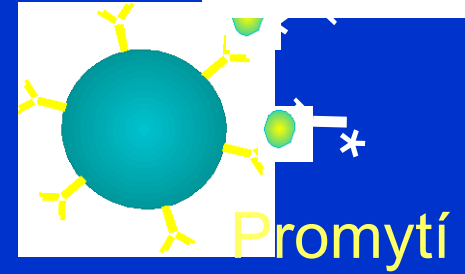


+

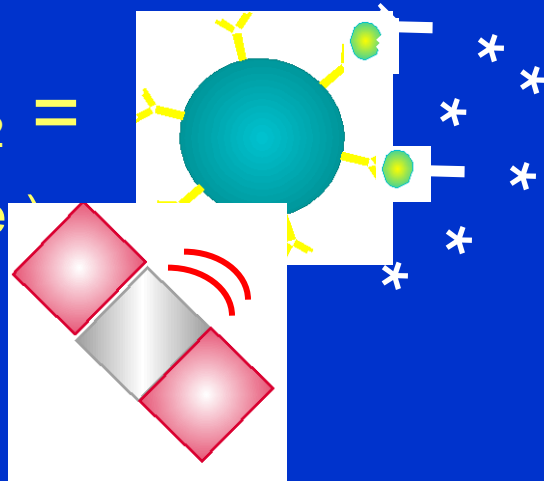
Konjugát



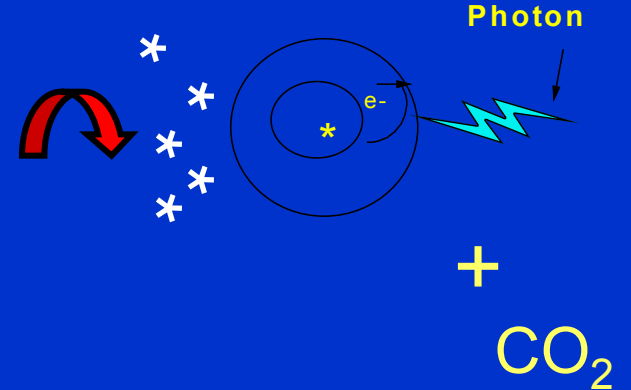
=



+ H_2O_2 =
(Pre-Trigger)



+ NaOH
(Trigger)



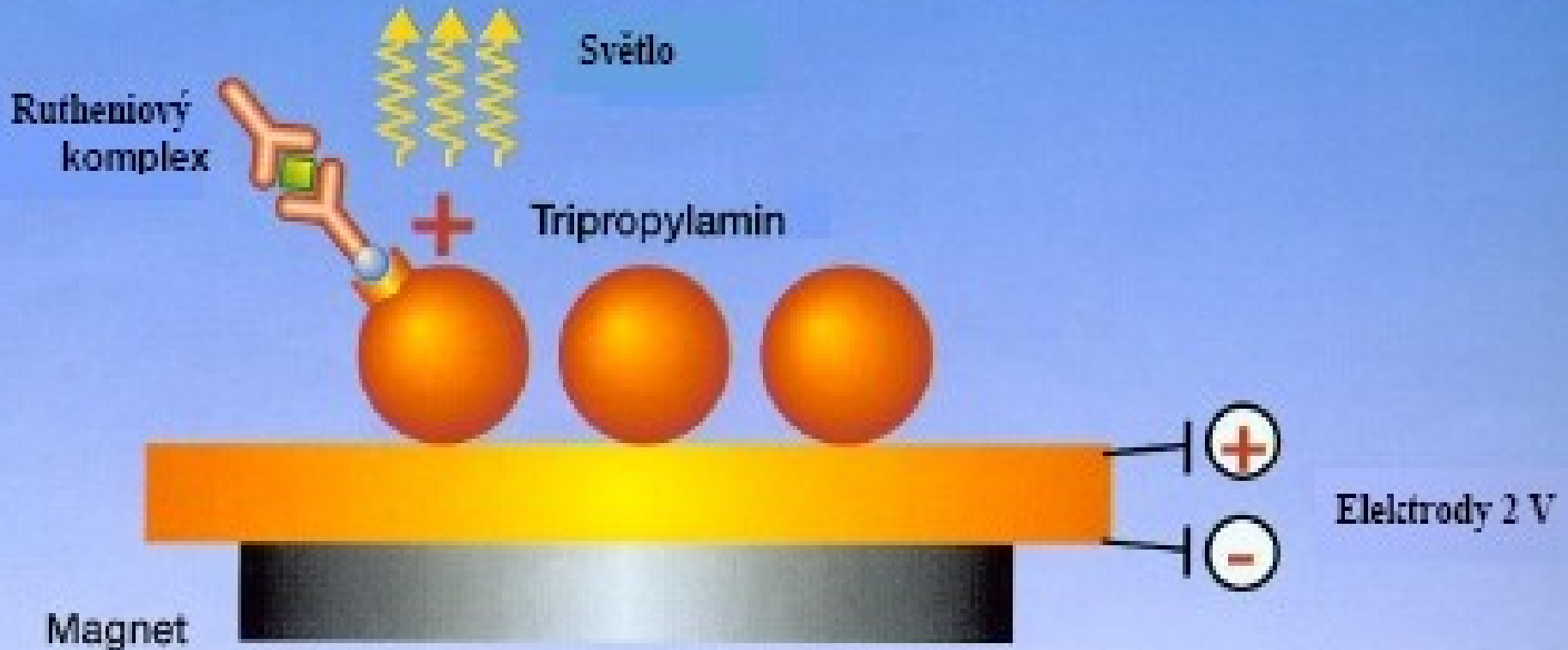
ECLIA

Elektrochemiluminiscence

modifikace chemiluminiscence, světlo je generováno chemickými reakcemi iniciovaných elektrochemicky



ECLIA



Na platinové elektrodě je chelát Ru^{2+} oxidován na Ru^{3+}
•Cheláty ruthenia se používají jako luminiscenční značka vzniklých imunokomplexů

- Na platinové elektrodě je chelát Ru^{2+} oxidován na Ru^{3+} ,
- Zároveň je tripropylamin (TPA^+) oxidován na radikál TPA^+ (má redukční vlastnosti), proto snadno redukuje Ru^{3+} komplex na Ru^{2+} ,
- Elektron z TPA přeskočí do vyšší energetické hladiny Ru-kationtu, přechodem elektronu do základního stavu dojde k luminiscenci a Ru-komplex je opět schopen další oxidace