

LUMINISCENČNÍ metody

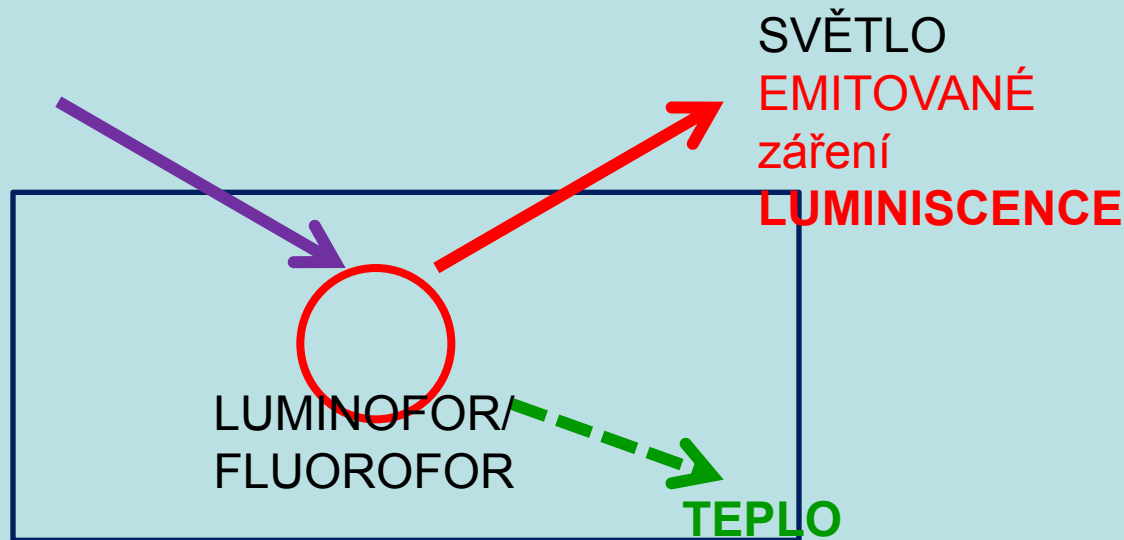
Petr Breinek

Luminiscence

je jev, při kterém vzniká světlo (fotony) po předchozím dodání energie (excitaci) materiálu.

Luminiscence je charakteristická svojí dobou trvání, která o několik řádů převyšuje doby života termálních kmitů (záření černého tělesa), t.j. tepelné záření není luminiscence!

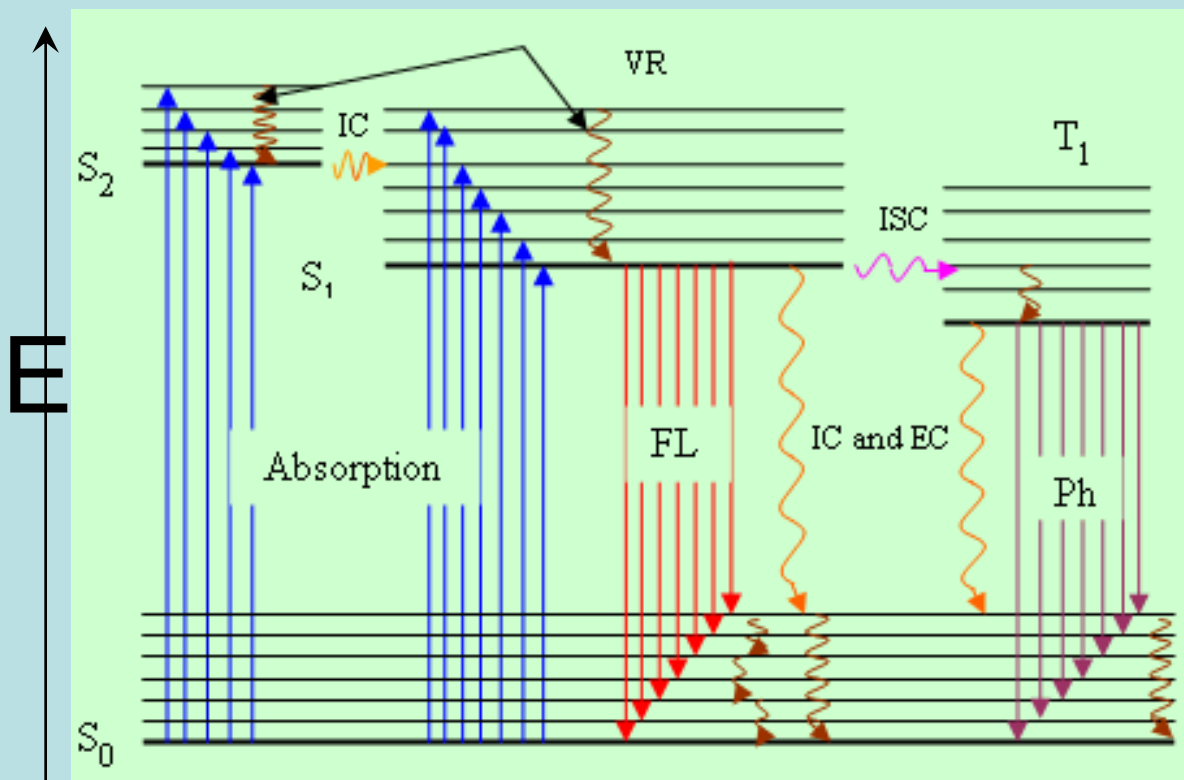
EXCITAČNÍ
záření



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)

Schéma zářivých a nezářivých přechodů fotoluminiscenční molekuly (Jablonského diagram)



Nezářivé přechody:

VR - vibrační relaxace

IC - vnitřní konverze

ISC - mezisystémová konverze

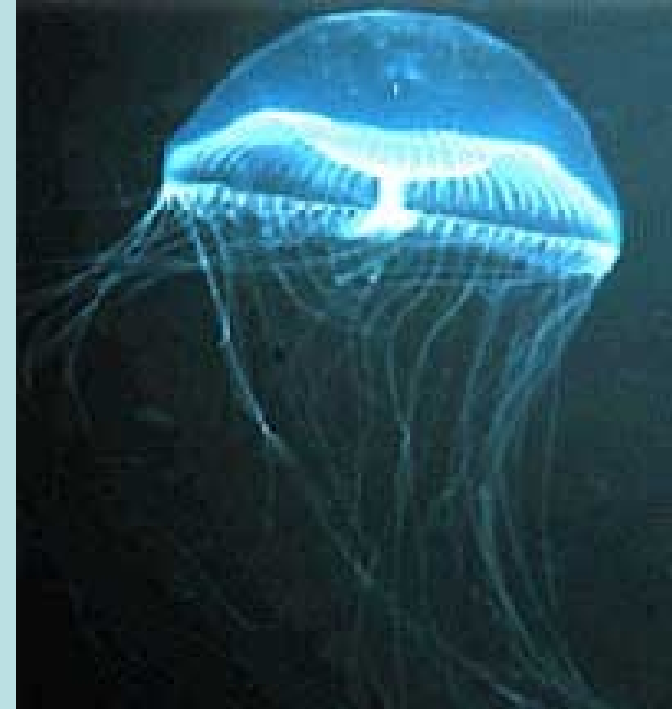
Zářivé přechody:

Fluorescence - přechod do nižšího elektronového stavu se stejnou multiplicitou $S_1 \rightarrow S_0$
(FL) spinově povolený přechod

Fosforescence - přechod mezi stavy s různou multiplicitou $T_1 \rightarrow S_0$
(Ph) spinově zakázaný přechod

Bioluminescence v přírodě

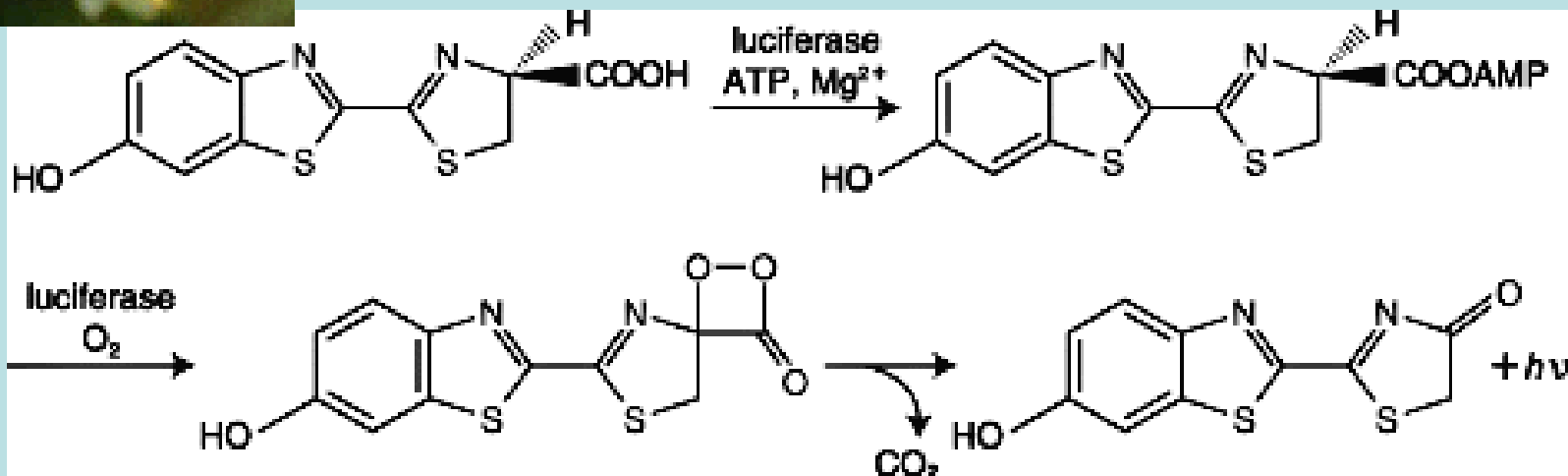
Světlušky, medúzy,
dřevokazné houby,
hlubokomořské ryby,.....





Světluška

princip: oxidace luciferinu



Luciferin + ATP \rightarrow Luciferyl adenylát (**enzym luciferáza**)

Luciferyl adenylát \rightarrow 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).

Faktory ovlivňující citlivost fluorescence

1. Intenzita zdroje
2. Účinnost optického systému
3. Štěrbiny monochromátoru
4. Citlivost detektoru

Rozdělení luminiscence podle zdroje excitace

- ✓ **Fotoluminiscence** - absorpce energie ve formě světla
- ✓ **Chemiluminiscence a bioluminiscence** - zdrojem energie je chemická nebo biochemická reakce
- ✓ **Elektroluminiscence** – zdrojem je el. proud; **Katodoluminiscence** – zdrojem je proud elektronů ; **Thermoluminiscence**; **Radioluminiscence** – zdrojem je radioaktivní záření; **Mechanoluminiscence** – zdrojem je mechanická energie; **Krystaloluminiscence** – krystalizace je doprovázena luminiscencí; **další zdroje**

Použití luminiscence v KB

- **Fotoluminiscenční metody**

(fluorescenční metody)

- **Imunoanalytické metody**

(s fluorescenčním markerem)

- **Chromatografické metody**

(s fluorescenčním detektorem)

Stanovované analyty

Porfyriny

Srdeční markery

Hormony

Vitamíny

Tumorové markery

Léky

Kostní markery

Prokalcitonin,...

Výhody: vysoká citlivost

Principy fluorescenčních stanovení

1. Přímé metody
měříme přirozenou fluorescenci vzorku
2. Nepřímé metody
nefluoreskující vzorek přeměníme na fluoreskující derivát
3. Zhášecí metody
sledujeme pokles intenzity fluorescence určitého fluoroforu, která v nastává v důsledku zhášecí schopnosti vzorku

Fotoluminiscence

- Podle dosvitu sekundárního záření dělíme fotoluminiscenci na:

fluorescenci (10⁻⁹ - 10⁻⁵ s)

fosforescenci (10⁻² s až dny)

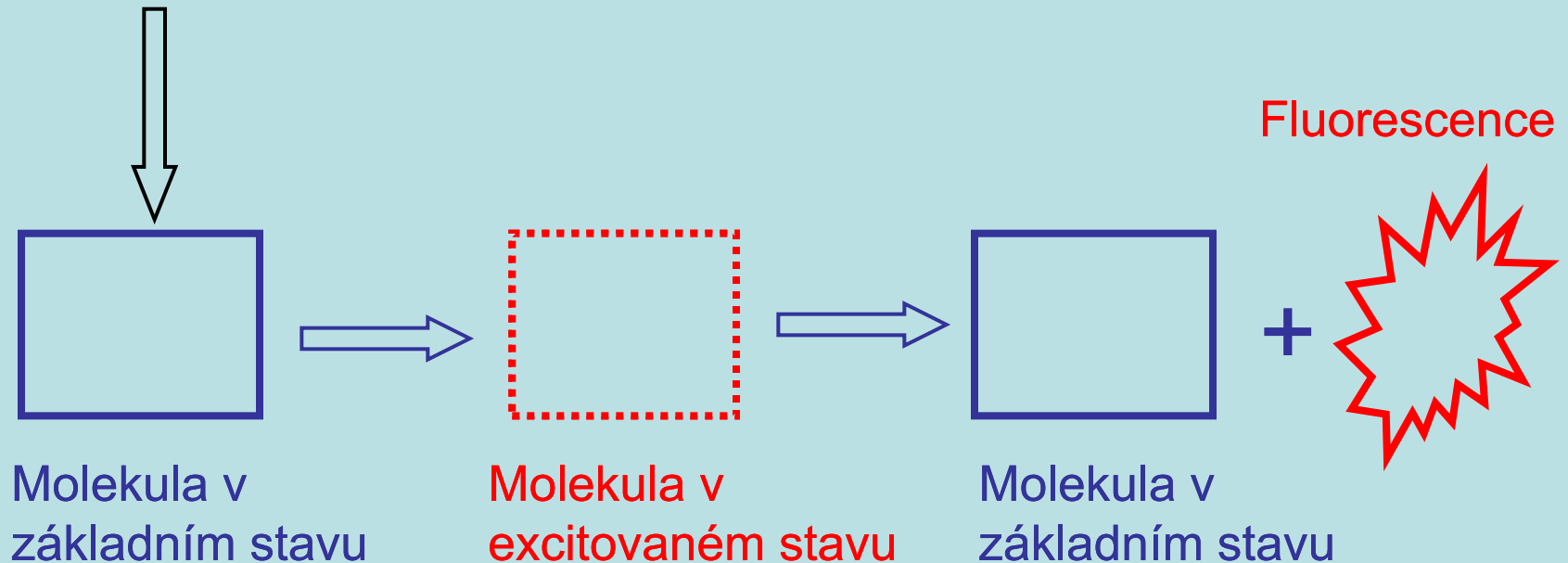
- Absorbce primárního záření v oblasti gama, rentgenového, ultrafialového nebo viditelného spektra

Fluorimetrie – absorbce UV záření

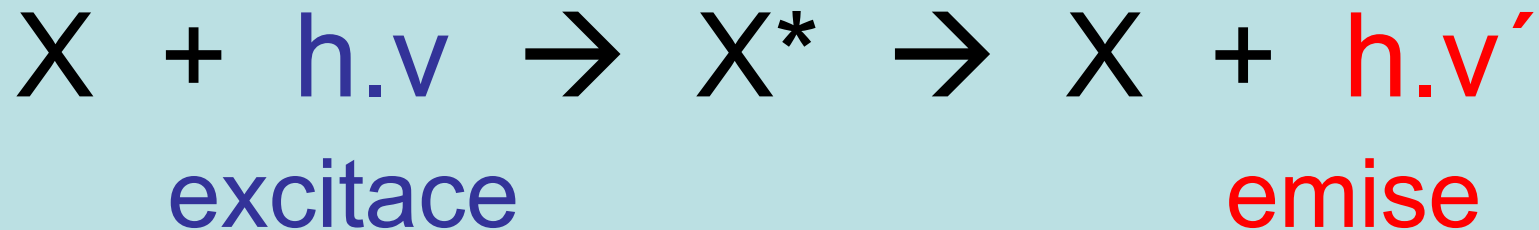
Fotoluminiscence

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

Excitační záření



Princip



$h\nu > h\nu'$ potom $\Lambda < \Lambda$

 $E = h \cdot c / \lambda$

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)

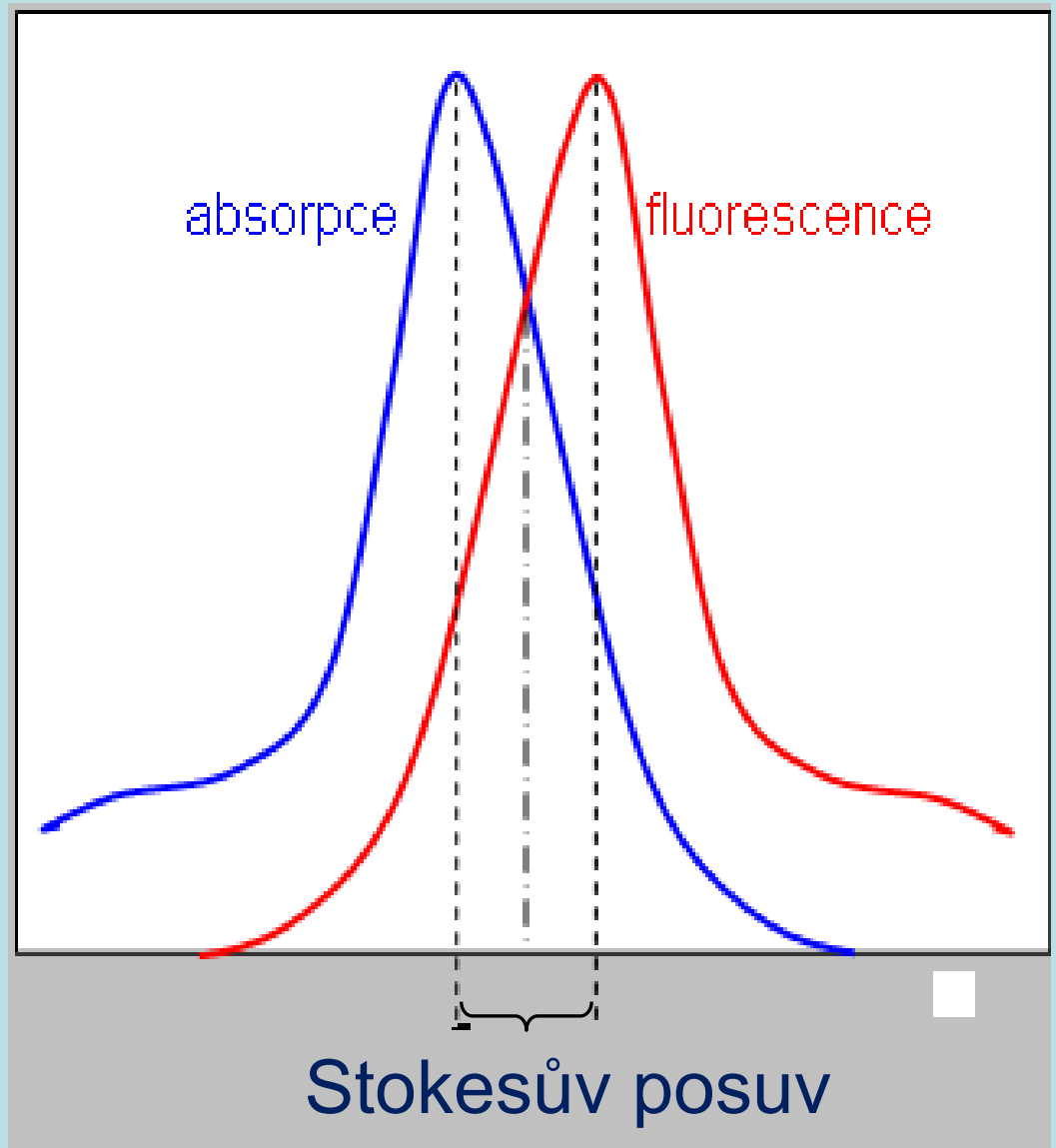
Λ (vlnová délka)

Stokesův posuv

Rozdíl vlnových délek absorpčního (excitačního) a emisního maxima

Emitované záření má větší vlnovou délku a tudíž nižší energii

$$E = h \cdot c / \lambda$$



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

Zhášení luminiscence

- luminiscenci konkuruje jiný děj, který vede k poklesu intenzity luminiscence
- všechny možné procesy zhášení ještě nejsou zcela vysvětleny

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**

Měření fluorescence

- Fluorimetry
- Spektrofluorimetry
- Fluorescenční skenery
- Fluorescenční mikroskopy
- Průtokové cytometry

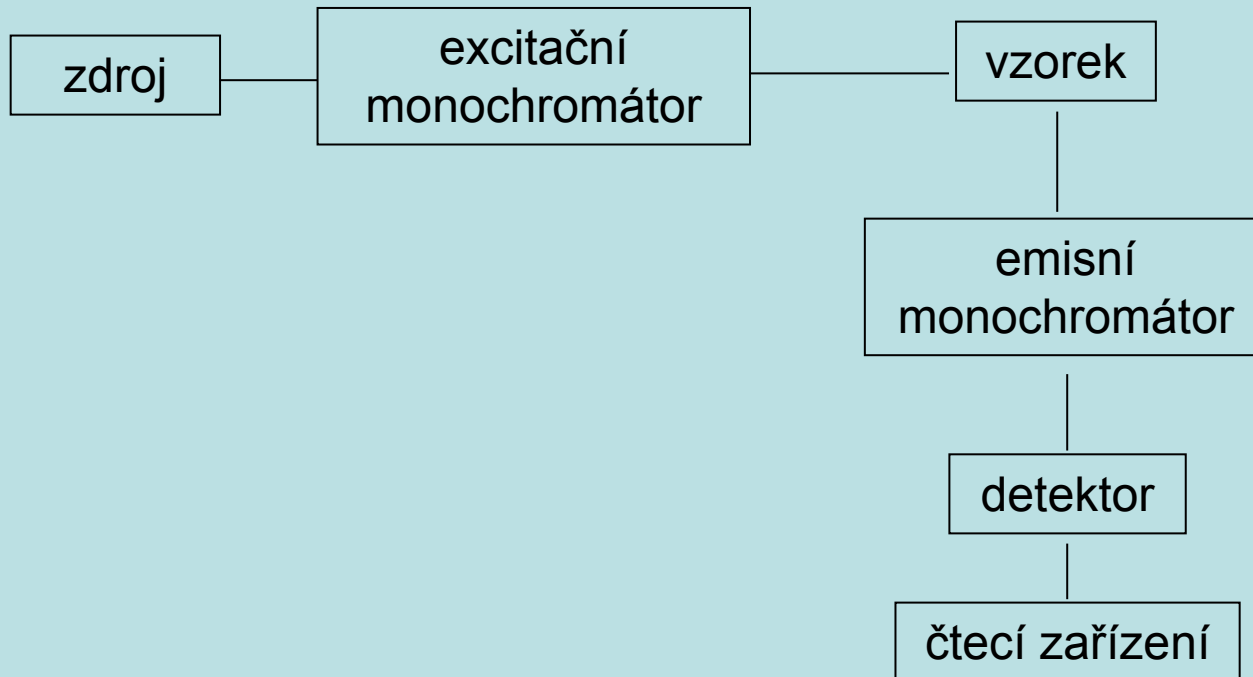
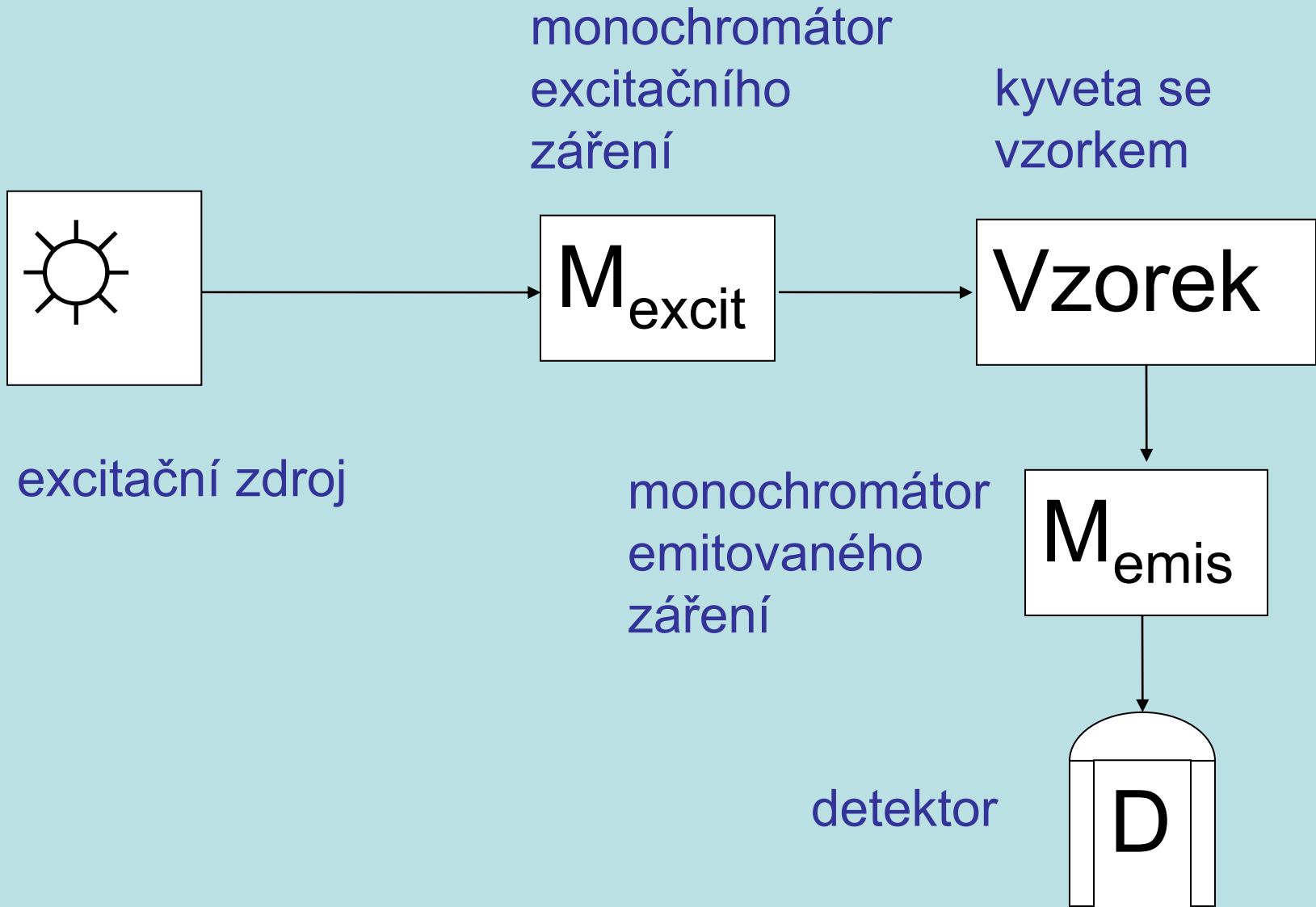


Schéma fluorimetru



Chemiluminescence

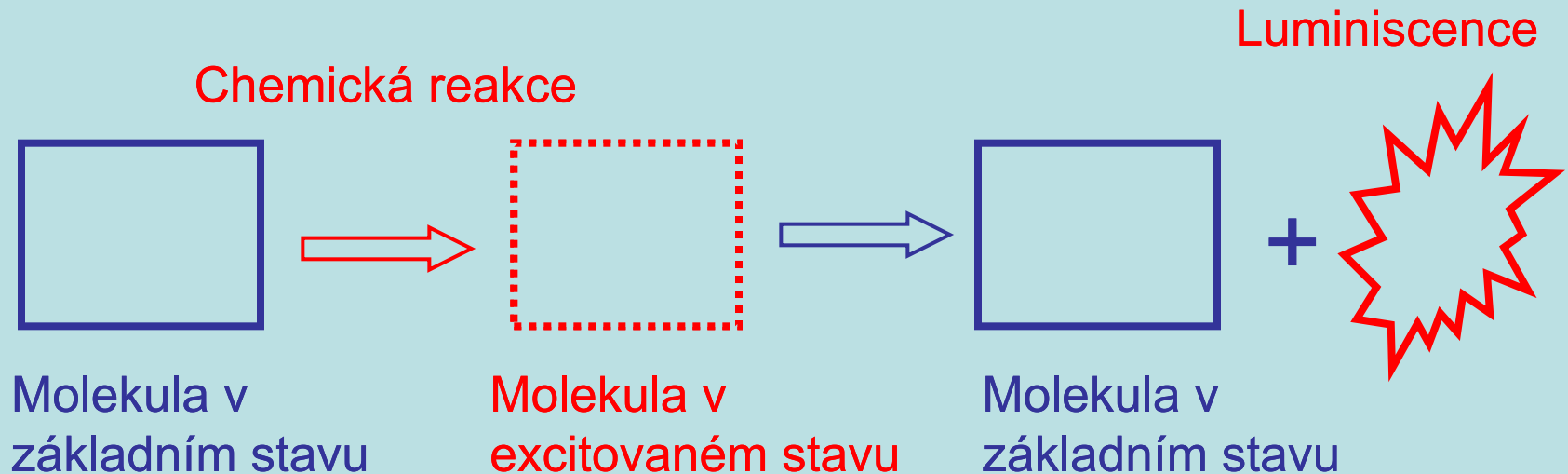
je vyvolána energií chemické reakce (většinou oxidace)

jednoduché přístrojové vybavení bez zdroje primárního záření, nižší vliv matrice, stanovení nižších koncentrací

- **Elektrochemiluminescence**

je modifikace chemiluminescence, kdy luminescence je generována chemickými reakcemi iniciovaných elektrochemicky

Chemiluminescence



Luminofory/fluorofory

jsou molekuly nebo jejich části, které vyzařují luminiscenční záření (fluoreskují)

- **Přirozené**

- Aromatické aminokyseliny (v bílkovinách), např. tryptofan

- NADH, riboflavin, FAD, porfyriny

- **Analytické**

(fluorescenční značky nebo sondy)

Přirozené fluorofory

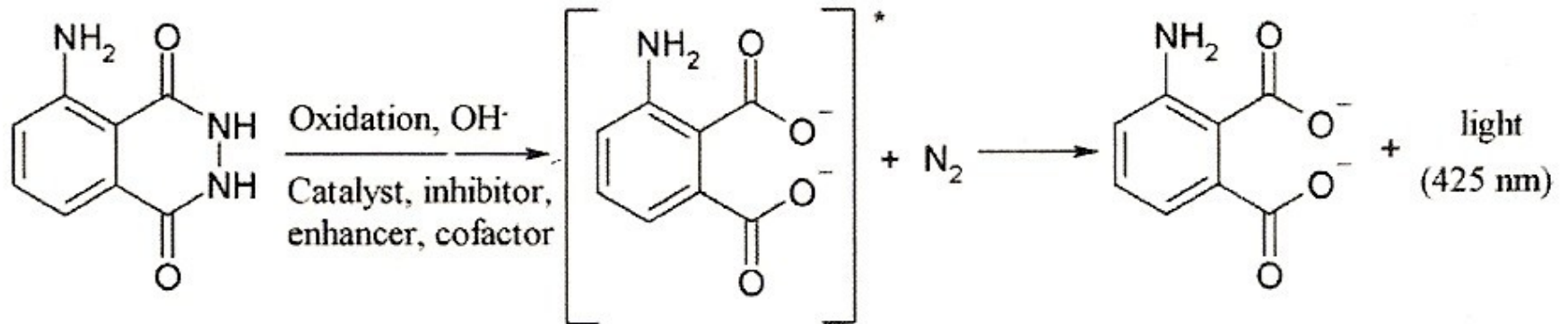
- Polyaromatické uhlovodíky
- Vitamin A, E
- FAD, FMN (450/525 nm) x FADH, FMNH
- NADH (340/460 nm) x NAD⁺
- Karoteny
- Chinin
- Steroidy
- Aromatické aminokyseliny
- Nukleotidy
- Fluoreskující proteiny - GFP (green fluorescent protein)

Analytické luminofory/fluorofory

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

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

Luminol (5-aminoftalhydrazid)



Luminol



3-aminophthalate
excited state

3-aminophthalate
ground state

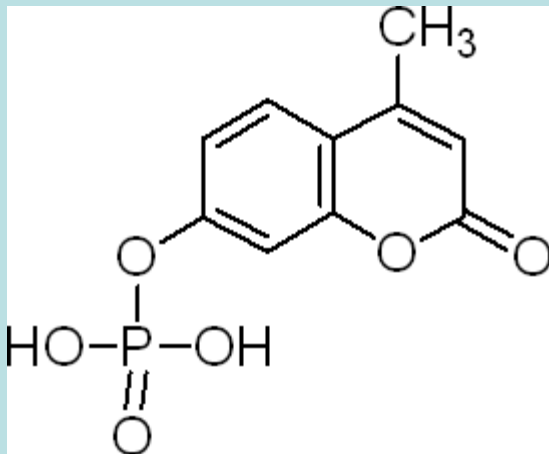


Methylumbelliferon (MU)

ALP



4-methylumbelliferyl fosfát \rightarrow 4-methylumbelliferon + fosfát
+ luminiscence



(defosforylace substrátu)

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, DPC)

Fosfátový ester adamantyl dioxetanu

Reakce:

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

Luminiscence lanthanoidů

Některé komplexy Ln(III) mají velmi neobvyklé spektrální vlastnosti:

- ✓ **dlouhý čas vyhasínání luminiscence**
- ✓ **Stokesův posun může být i více než 100 nm**
- ✓ **emisní spektrum obsahuje ostré píky**

Fluorescenční imunoanalytické metody (FIA)

- **CMIA** (chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročásticích) **CHEMILUMINESCENT MICROPARTICLE IMMUNOASSAY**
- **ECLIA** (elektrochemiluminiscence)
- **FPIA** (fluorescenční polarizační imunoanalýza) **FLUORESCENCE POLARIZATION IMMUNOASSAY**
- **MEIA** (enzymová imunoanalýza na mikročásticích) **MICROPARTICLE ENZYME IMMUNOASSAY**

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.

- Intenzita záření odpovídá počtu chemiluminiscenčních molekul
(1 molekula = 1 kvantum světla)
- Reakční postupy mohou být jedno nebo dvou stupňové
- Kompetitivní uspořádání

Paramagnetické částice

Krystaly kysličníků železa

- ❖ velký povrch
- ❖ magnetické vlastnosti

ECLIA

Elektrochemiluminiscenční imunoanalýza

modifikace chemiluminiscence, světlo je generováno chemickými reakcemi iniciovaných elektrochemicky

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

- Ru kation prochází reakcí cyklicky, nespotřebovává se, chová se jako enzym
- Cheláty ruthenia se používají jako luminiscenční značka vzniklých imunokomplexů
- TPA se rozpadá na dipropylamin, je v reakci spotřebováván, slouží jako substrát

Elecsys 2010 (Roche)

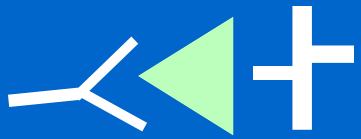


FPIA

Fluorescenční polarizační immunoanalýza Fluorescence Polarization Immunoassay

- Homogenní kompetitivní immunoanalýza, měření se provádí ve dvou polarizačních rovinách
- Využívá různé rychlosti rotace velkých a malých molekul, které vedou ke změně polarizace (použití pouze pro malé molekuly, např. léky)
- Výsledná polarizace je nepřímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku.
- Fluorescence vyvolaná lineárně polarizovaným světlem je také lineárně polarizovaná

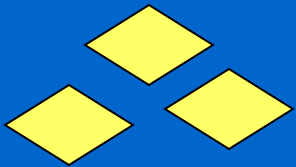
- Je-li fluorofor vázán na **velkou molekulu** (komplex značený antigen-protilátka), nemůže volně rotovat a emitované světlo kmitá ve stejné rovině jako excitující – **polarizace zůstane zachována**
- Volný fluorofor může volně rotovat, emitované světlo kmitá v jiné rovině než excitující – **polarizace se zeslabuje**



FPIA

Nízká koncentrace analytu ...

vzorek



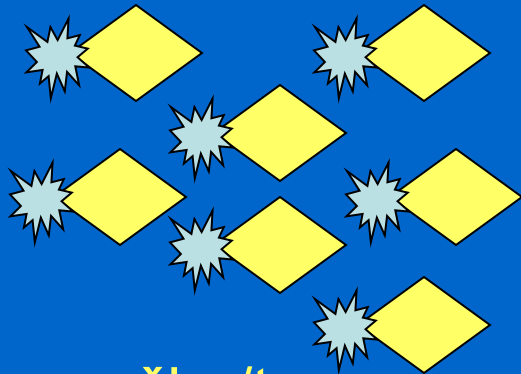
+

protilátka



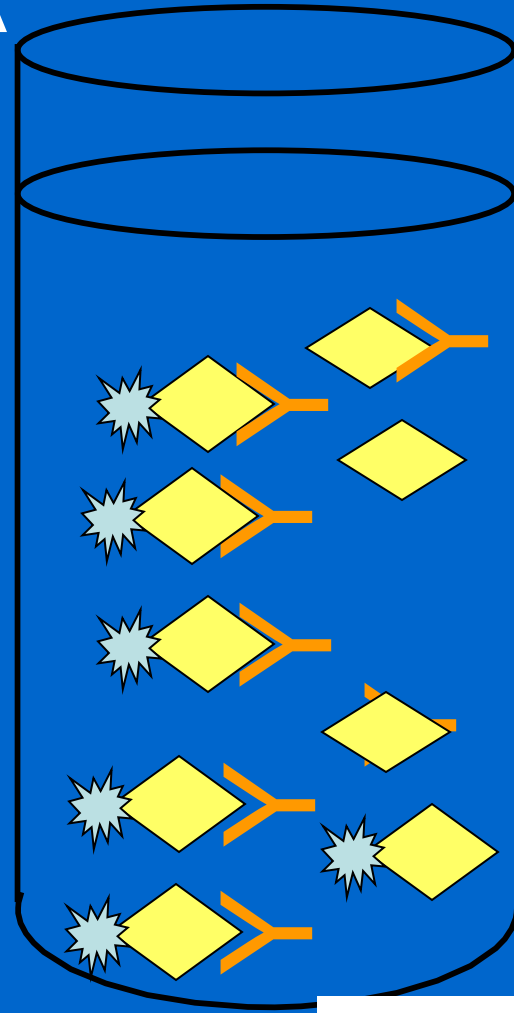
=

+



+

značka/tracer

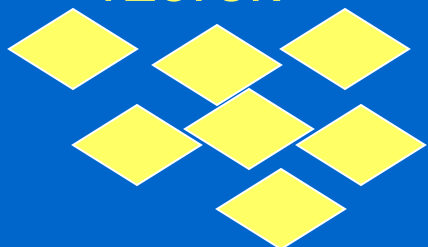


Vysoká polarizace



Vysoká koncentrace analytu ...

vzorek



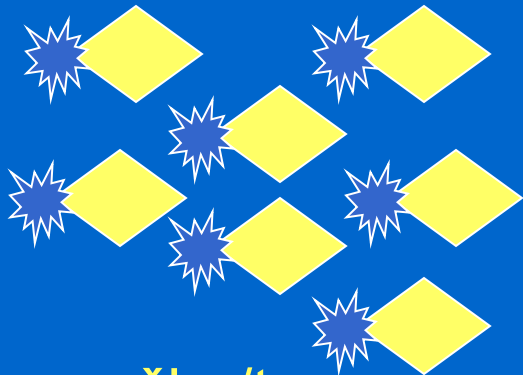
+

protilátka



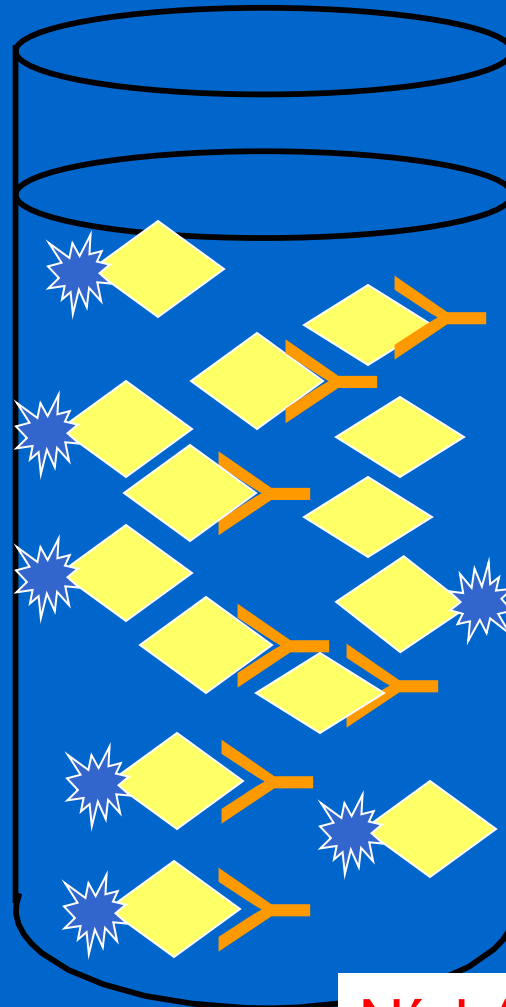
=

+



+

značka/tracer



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**

DELFLIA

Dissociation-enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay

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

Cheláty lanthanoidů vykazují velký Stokesův posun a delší dobu emise.

(Pozn.: použití jako luminofor v obrazovkách barevných televizorů)

Nekompetitivní sendvičová technika chráněná patentem.

- Po imunochemické reakci se tento chelát přemění na fluoreskující sloučeninu
- Detekce záření se zpožděním (odstranění interferujícího záření)
- **Pulzní zdroj** (340nm, tisíce pulzů/s)

Po každém záblesku:

400 μ s prodleva

400 μ s měření emitovaného záření

(Nespecifická emise 10 ns)

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

•TRACE

Time Resolved Amplified Cryptate Emission Časově modulovaná detekce fluorescence

- Homogenní fluorescenční imunoanalýza
- Využití kryptandů (=sloučeniny, které fluorofor Eu^{3+} váží v trisdipyridylové „kleci“)
- Kryptandem je značený antigen nebo protilátka
- Na druhou protilátku je vázán fluorofor, který je excitován při jiné vlnové délce než Eu
- Immunokomplex je excitován laserem při 337 nm
- Energie přenesená z kryptandu na fluorofor je detekována při 665 nm jako prodloužený signál

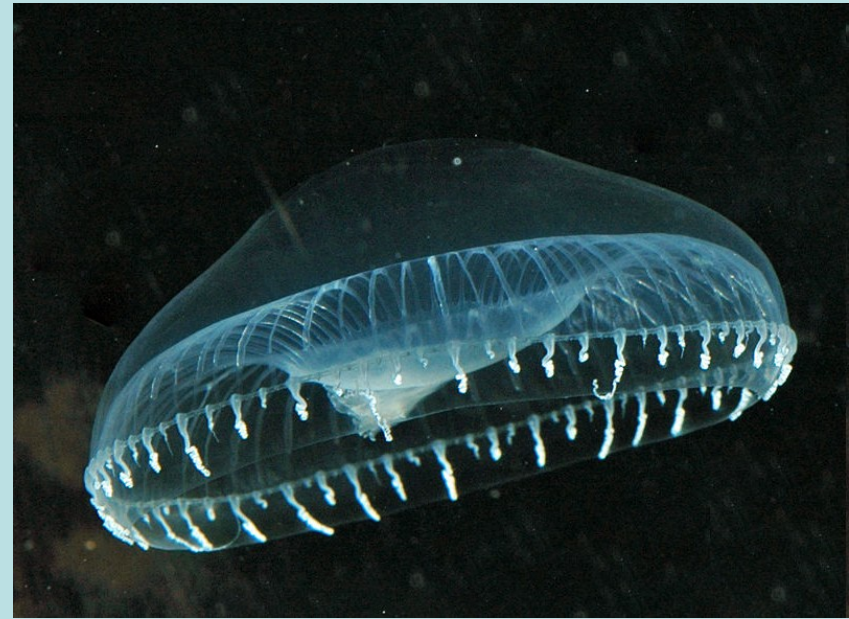
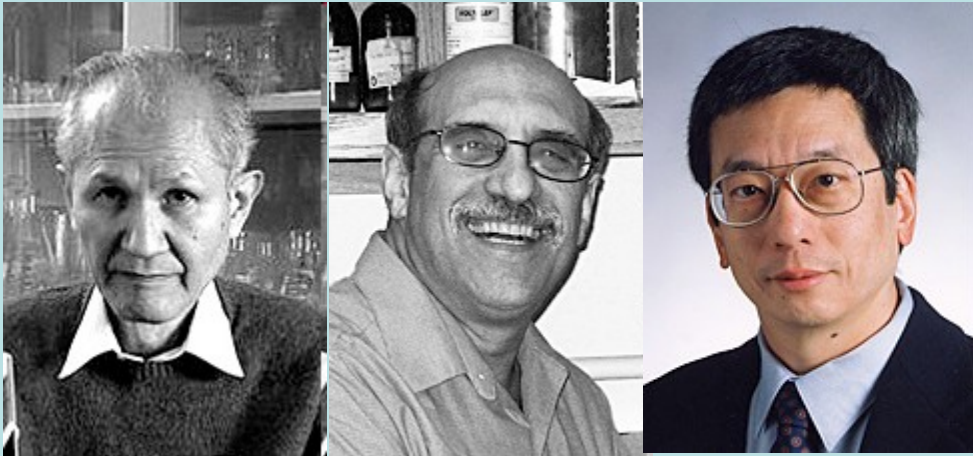
FISH

- Fluorescence In Situ Hybridization je cytogenetická metoda, která umožňuje detekci a lokalizaci konkrétních sekvencí DNA v chromosomech
- tato metoda je určena k mapování genů a sledování chromosomálních abnormalit, atd.
- pro detekci se využívá fluorescenční mikroskopie

FISH

- krátký jednovláknový (single stranded) úsek DNA, který je komplementární k hledané sekvenci, je označen fluorescenční značkou
- v rozpletených úsecích DNA dochází k navázání na komplementární části
- dochází k nalezení a označení části sekvence, která kóduje zkoumaný úsek

Nositelé Nobelovy ceny 2008 za chemii



Osamu Shimomura jako první izoloval zelený fluoreskující protein z medúzy *Aequorea victoria* (GFP)

Martin Chalfie první prakticky využil fluorescenčního proteinu (značení neuronů pro hmatové receptory)

Roger Y. Tsien objasnil fluorescenční mechanismus GFP a různými modifikacemi rozšířil paletu barev (emitovaného záření)

Použití GFP v chemii a biologii

- lze připravit protein, který obsahuje sekvenci (např. Ser-Tyr-Gly), který má vlastnosti stejné jako ostatní proteiny, ale je mnohem lépe detekovatelný
- genové inženýrství – sekvenci z DNA medusy, která je zodpovědná za tvorbu GFP lze vpravit do DNA jiného organismu, např. i savce...



GFK – Green Fluorescent Králík