

LUMINISCENČNÍ metody

Petr Breinek

Bioluminescence v přírodě

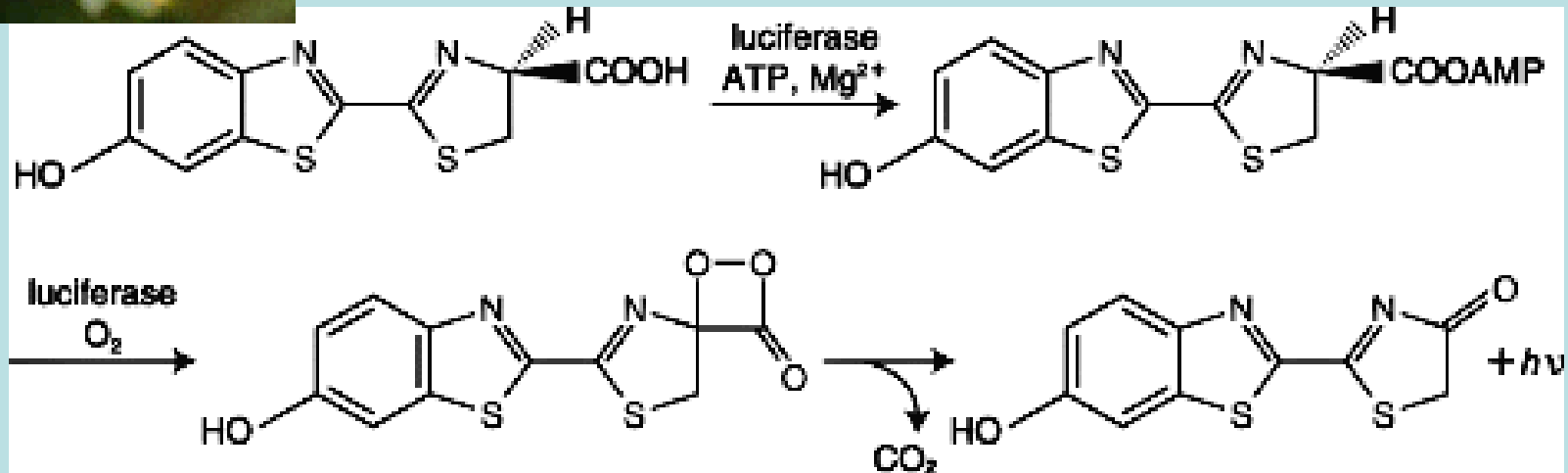
Světlušky, medúzy,
dřevokazné houby,
hlubokomořské ryby,.....





Světluška

princip: oxidace luciferinu



Luciferin + ATP → Luciferyl adenylát (**enzym luciferáza**)

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

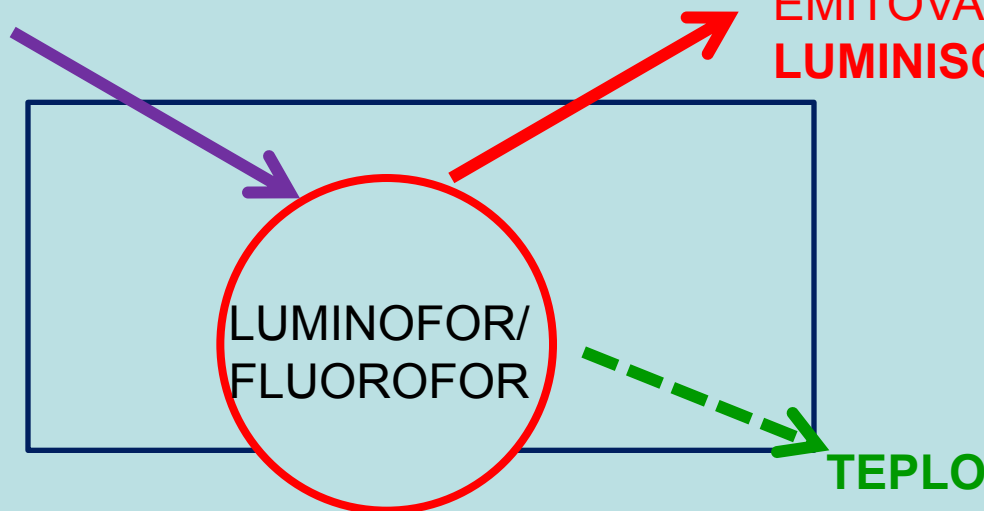
Reakcí jedné molekuly luciferinu je produkován jeden foton o vlnové délce odpovídající namodralému světlu. Při reakci se pouhé 4 % energie mění na energii tepelnou a zbytek, tedy 96 % energie je vyzářen. Světluška je tedy daleko účinnější zářič než běžná výbojka, která má tento poměr 9:1 (tedy jen 10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

Luminiscence

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

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



Rozdělení luminiscence podle zdroje excitace

- ✓ **Fotoluminiscence** - absorpce energie ve formě světla
- ✓ **Chemiluminiscence** a bioluminiscence - zdrojem energie je chemická 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**

Stanovované analyty

Porfyriny

Srdeční markery

Hormony

Vitamíny

Tumorové markery

Léky

Kostní markery

Prokalcitonin,...

Výhody: vysoká citlivost

Luminofory/fluorofory

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

✓ **Přirozené**

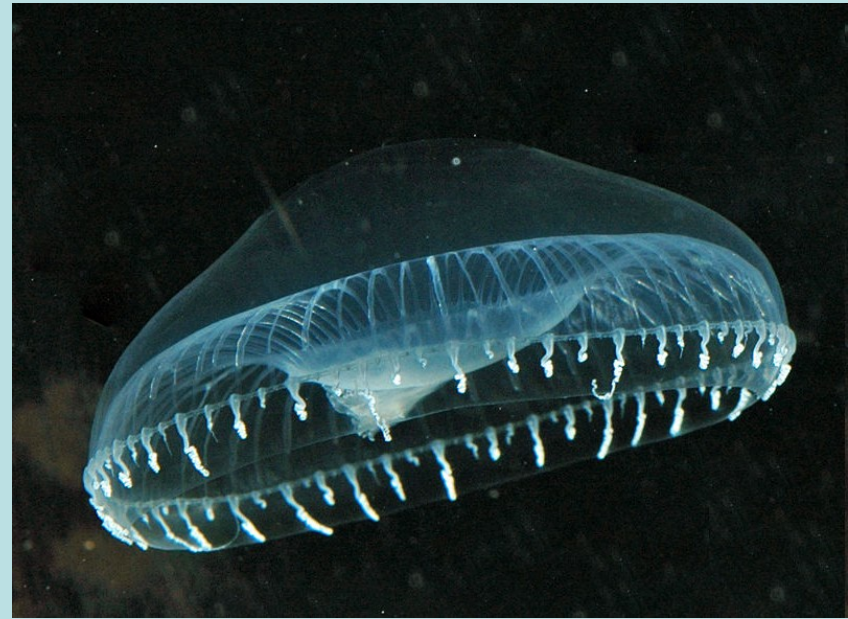
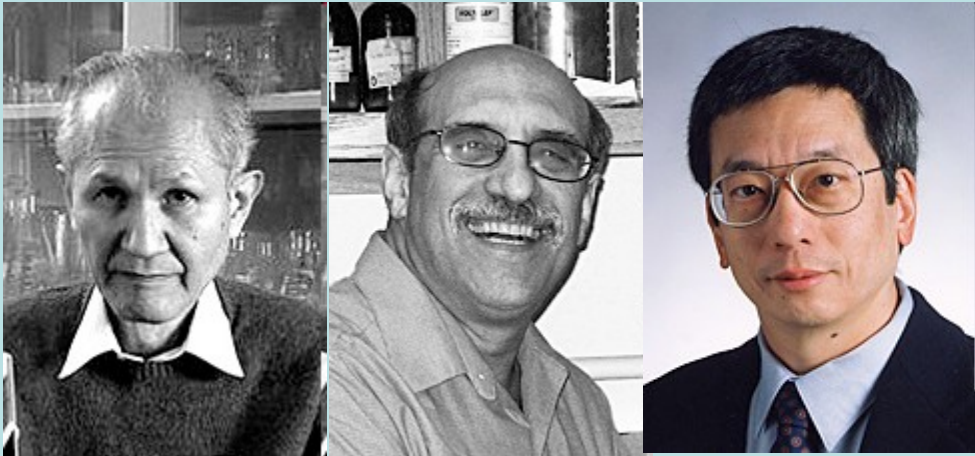
✓ **Analytické**

(fluorescenční značky nebo sondy)

Přirozené luminofory/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)

Nositelé Nobelovy ceny 2008 za chemii



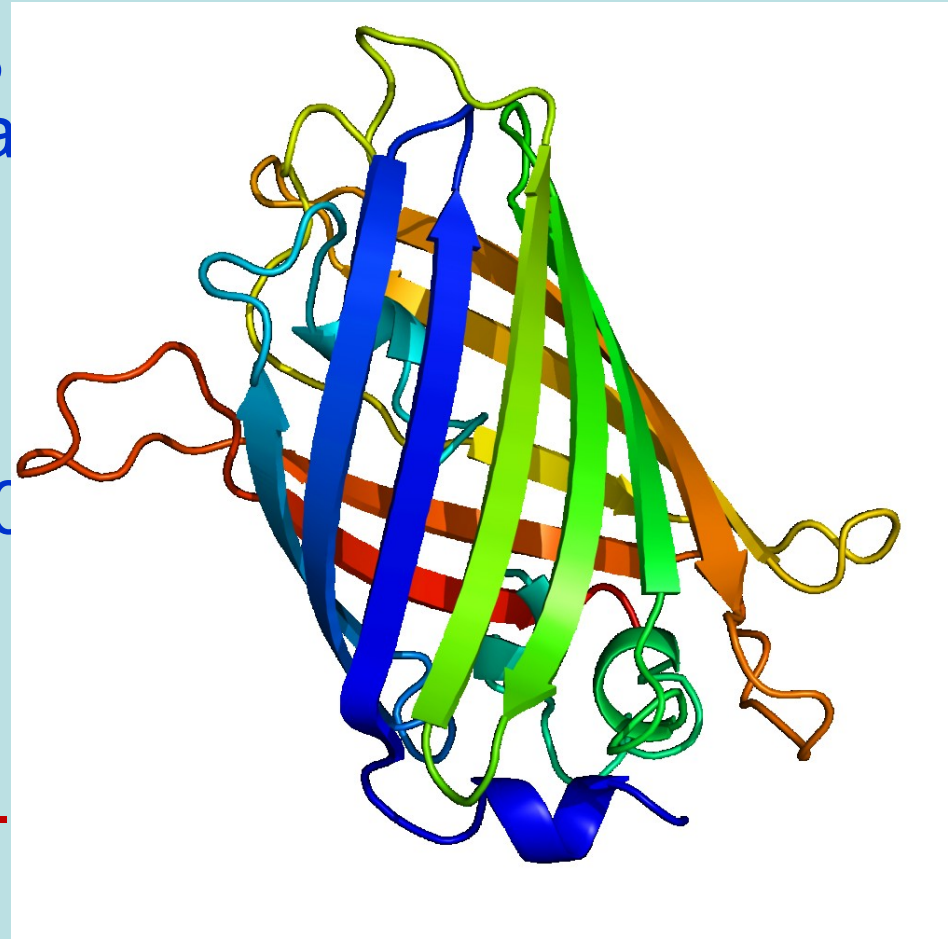
Osamu Shimomura jako první izoloval zelený fluoreskující protein z medúzy *Aequorea victoria* (GFP)

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)

Struktura GFP

- Protein má celkem 238 aminokyselin (26,9 kDa)
- GFP obsahuje běžné aminokyseliny, ale ve slunečním světle jeví lehce nazelenalou fluorescenci (kolem 500 nm), stejně jako živá *Aequorea Victoria* v moři...
- Klíčová sekvence (Ser-Tyr-Gly) se nachází „uvnitř plechovky“



Použití GFP v chemii a biologii

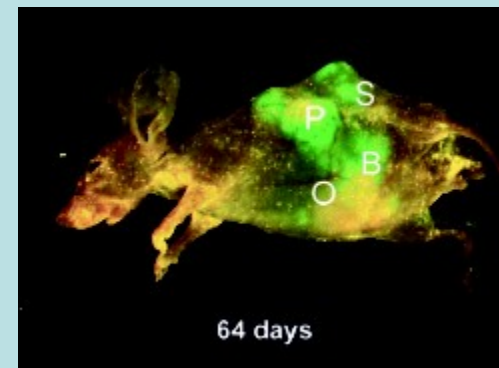
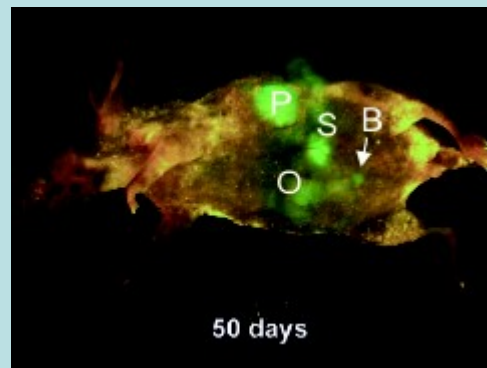
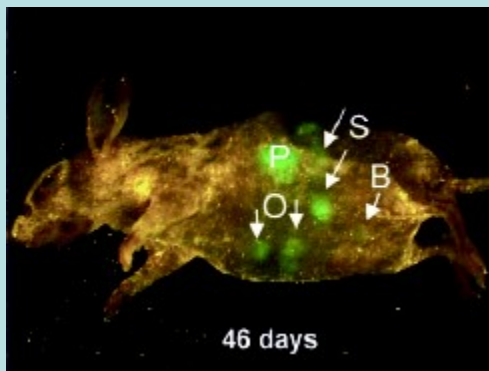
Lze připravit protein, který obsahuje sekvenci (např. Ser-Tyr-Gly)

Sekvenci z DNA medusy, která je zodpovědná za tvorbu GFP lze vpravit do DNA jiného organismu, např. i savce...



Použití GFP v chemii a biologii

- Nejde o bioluminiscenci (chemiluminiscenci), ale o fotoluminiscenci (excitace lampou, nebo laserem)
- obecně lepší rozlišení při sledování mikroskopem
- sledování genové exprese
- medicína a biologie: sledování metastáze tumoru



Analytické luminofory/fluorofory

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

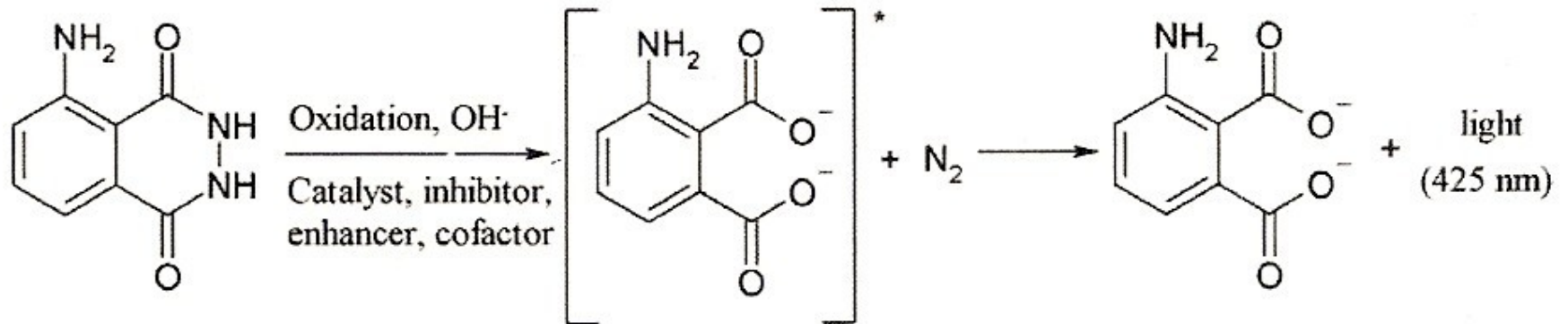
Nejčastěji jsou navázány jako značka (na protilátky nebo antigeny) nebo jsou použity jako substrát.

Luminol (5-aminoftalhydrazid)



(1928) – oxidace v bazickém prostředí

příklad použití: intenzivní reakce s hematinem detekce krevních skvrn)



Luminol

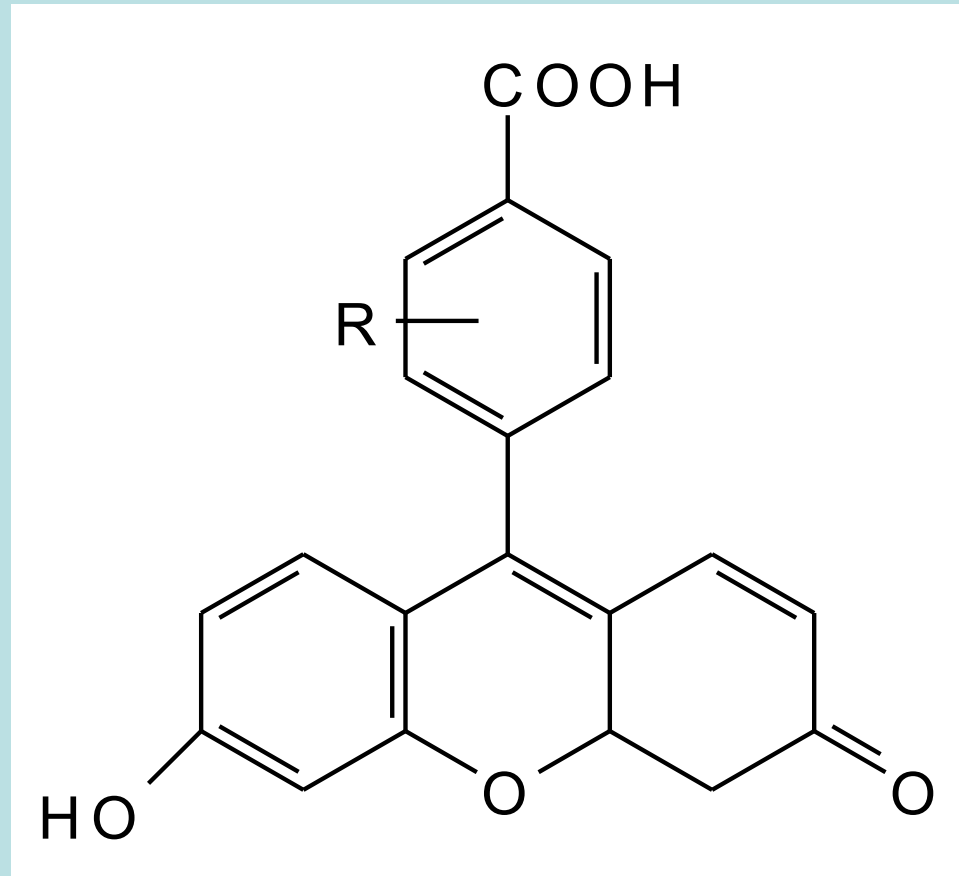


3-aminophthalate
excited state

3-aminophthalate
ground state



Fluorescein

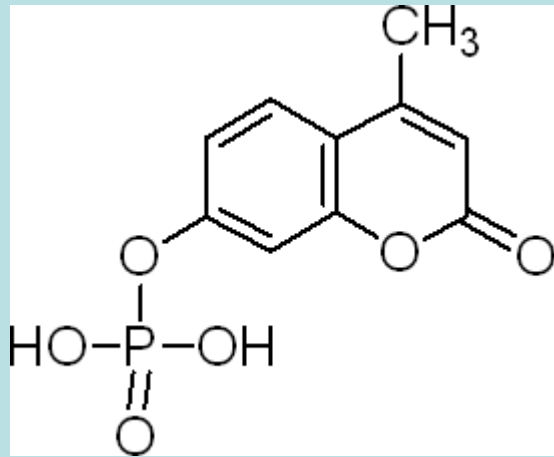


fluorescein

Methylumbelliferon (MU)



4-metylumbelliferyl fosfát \rightarrow 4-metylumbelliferon + fosfát
+ luminiscence

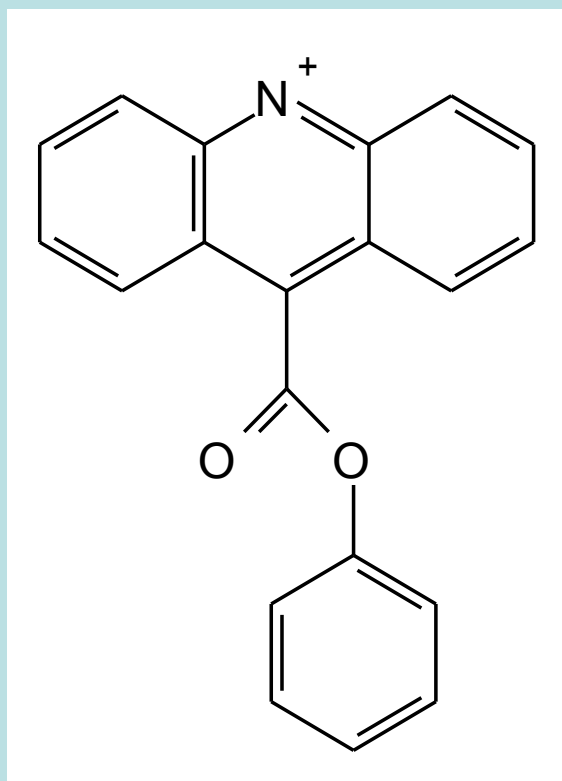


(defosforylace substrátu)

- Rychlost tvorby MU je přímo úměrná koncentraci analytu.
- Zdroj světla - rtuťová výbojka , $\lambda = 365 \text{ nm}$
- Fluorescence → vybrána vlnová délka 448 nm
- Měří se rychlost přeměny MUP na MU
- Kalibrací se vypočítá směrnice kalibrační závislosti a její převedení na koncentraci analytu.

Akridin a estery akridinu

Ester akridinu → Akridin + světlo



Akridin phenyl ester

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**

Fotoluminiscence

- Podle dosvitu sekundárního záření dělíme fotoluminiscenci na:

Fluorescenci (10^{-9} - 10^{-5} s)

Fosforescenci (10^{-2} s až dny)

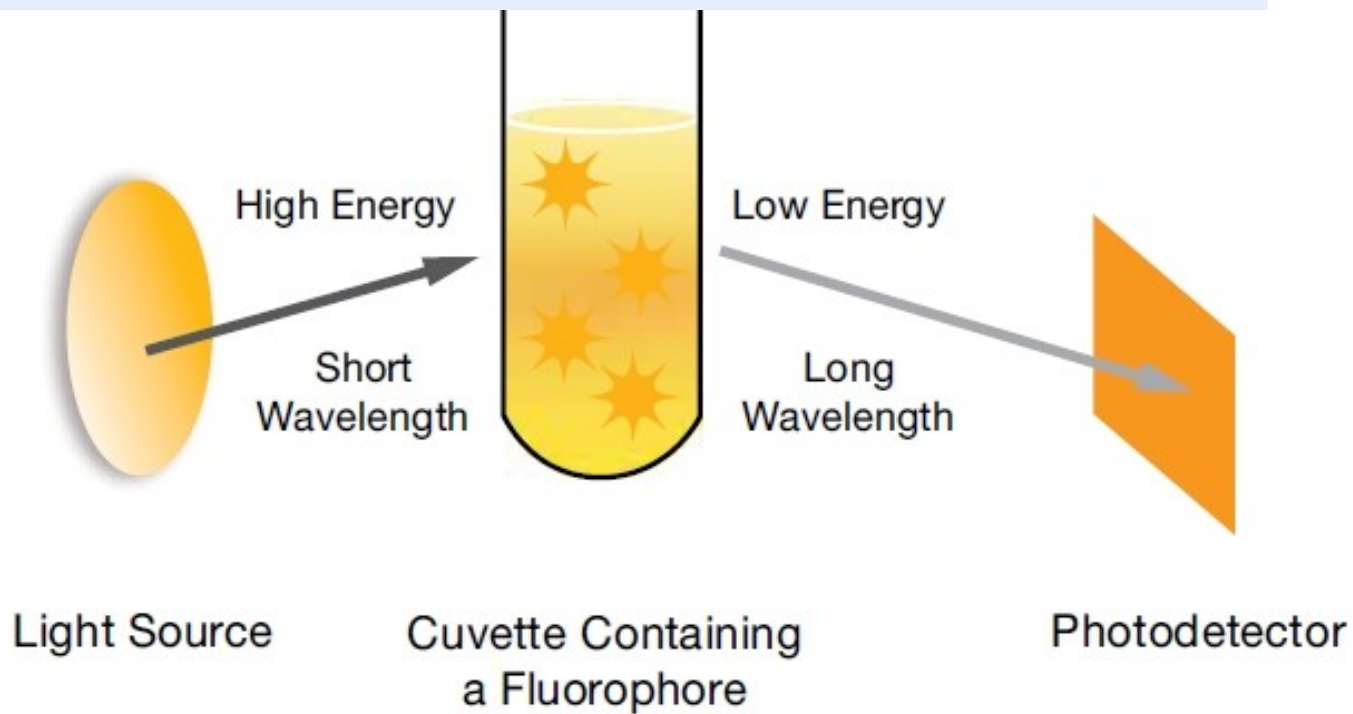
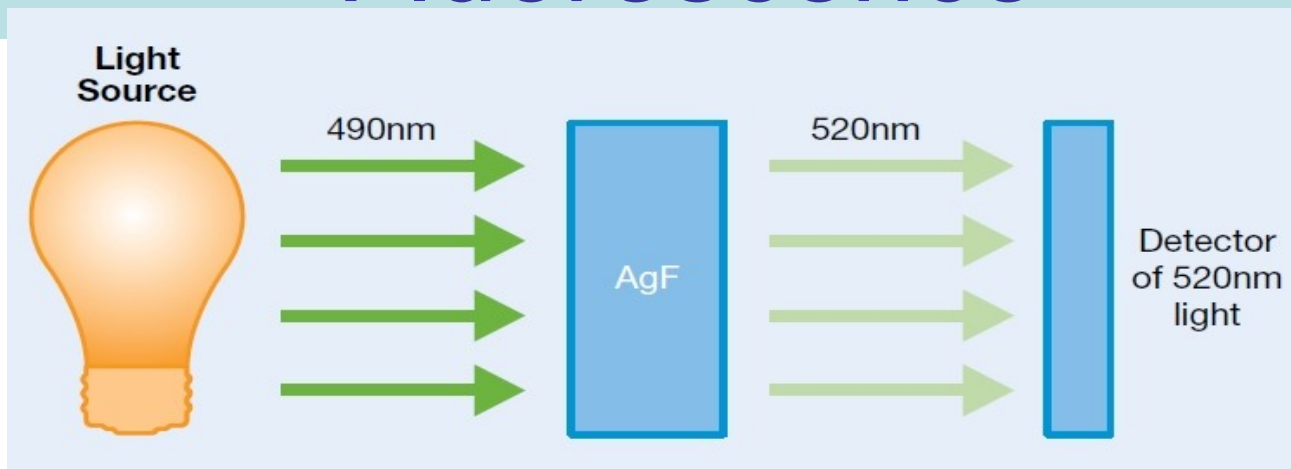
- Absorpce primárního záření v oblasti gama, rentgenového, ultrafialového nebo viditelného spektra

Fluorimetrie – absorpce UV záření

Přístrojová technika

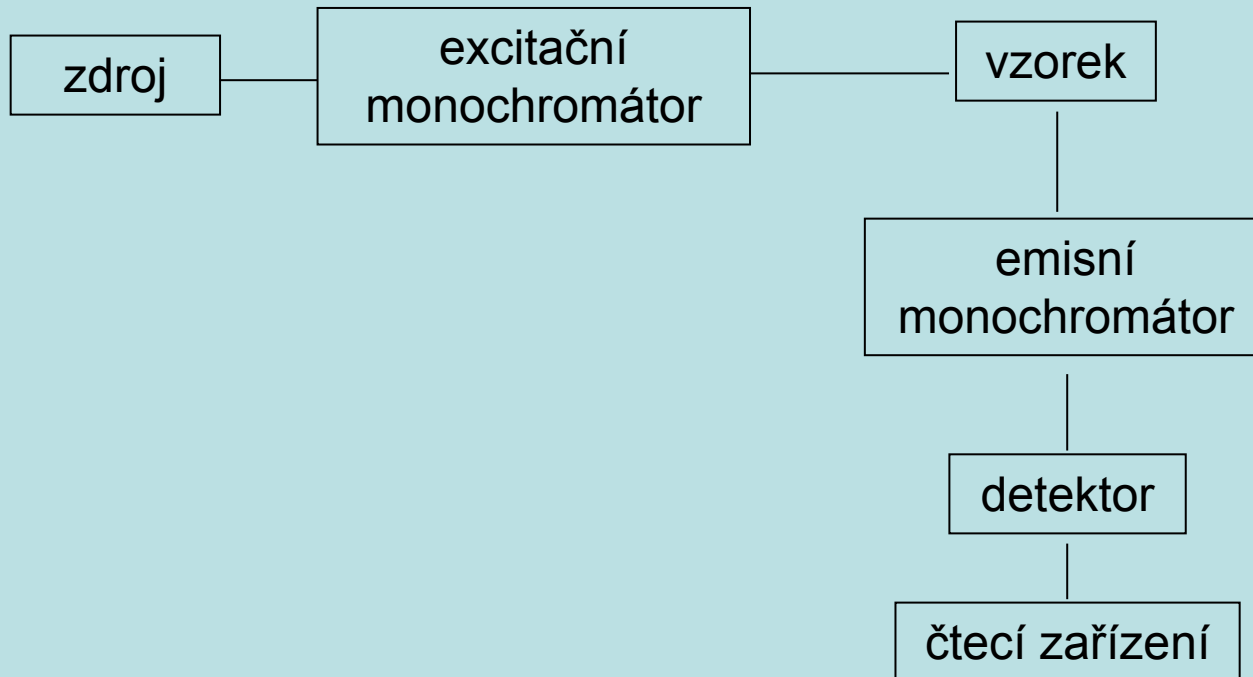
- **Zdroj excitačního záření** (Hg výbojka, halogenové výbojky, Xe výbojka, lasery).
- **Filtr** (Woodův filtr skla s příměsí NiO, CuO, CoO).
- **Měřicí prostor**
- **Interferenční filtr** propouštějící fluorescenční signál.
- **Detektor**

Fluorescence



Měření fluorescence

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



Veličiny fluorescence

- **Kvantový výtěžek**

poměr počtu vyzářených kvant fluorescence k počtu pohlcených fotonů

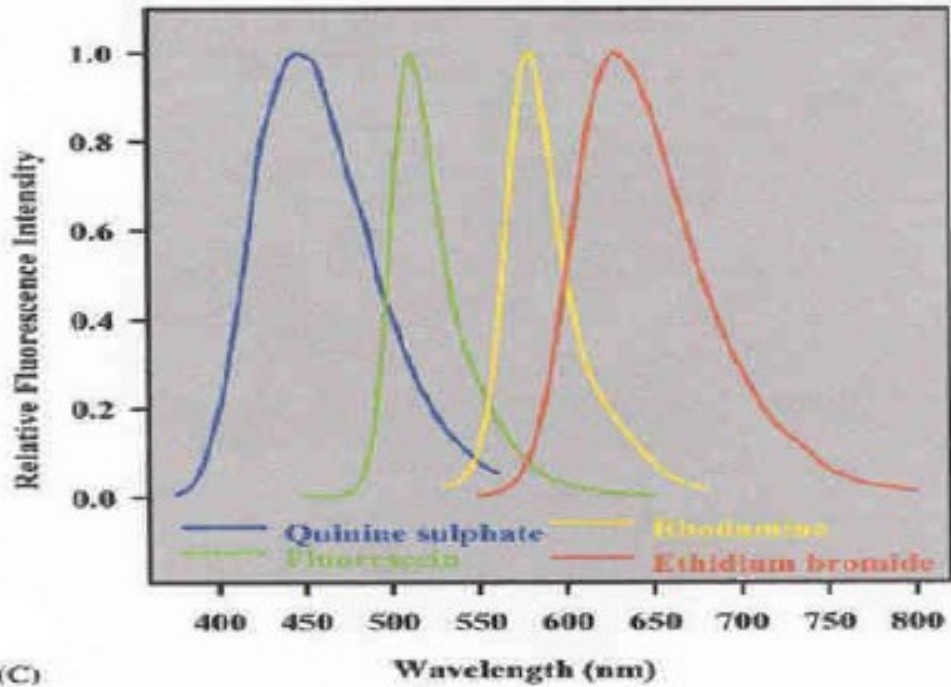
- **Doba života**

doba mezi pohlcením kvanta budícího záření a vyzářením kvanta fluorescence

- **Polarizace (anizotropie)**

může dát informaci o pohyblivosti molekuly fluorescenční látky v daném prostředí

Emisní spektrum

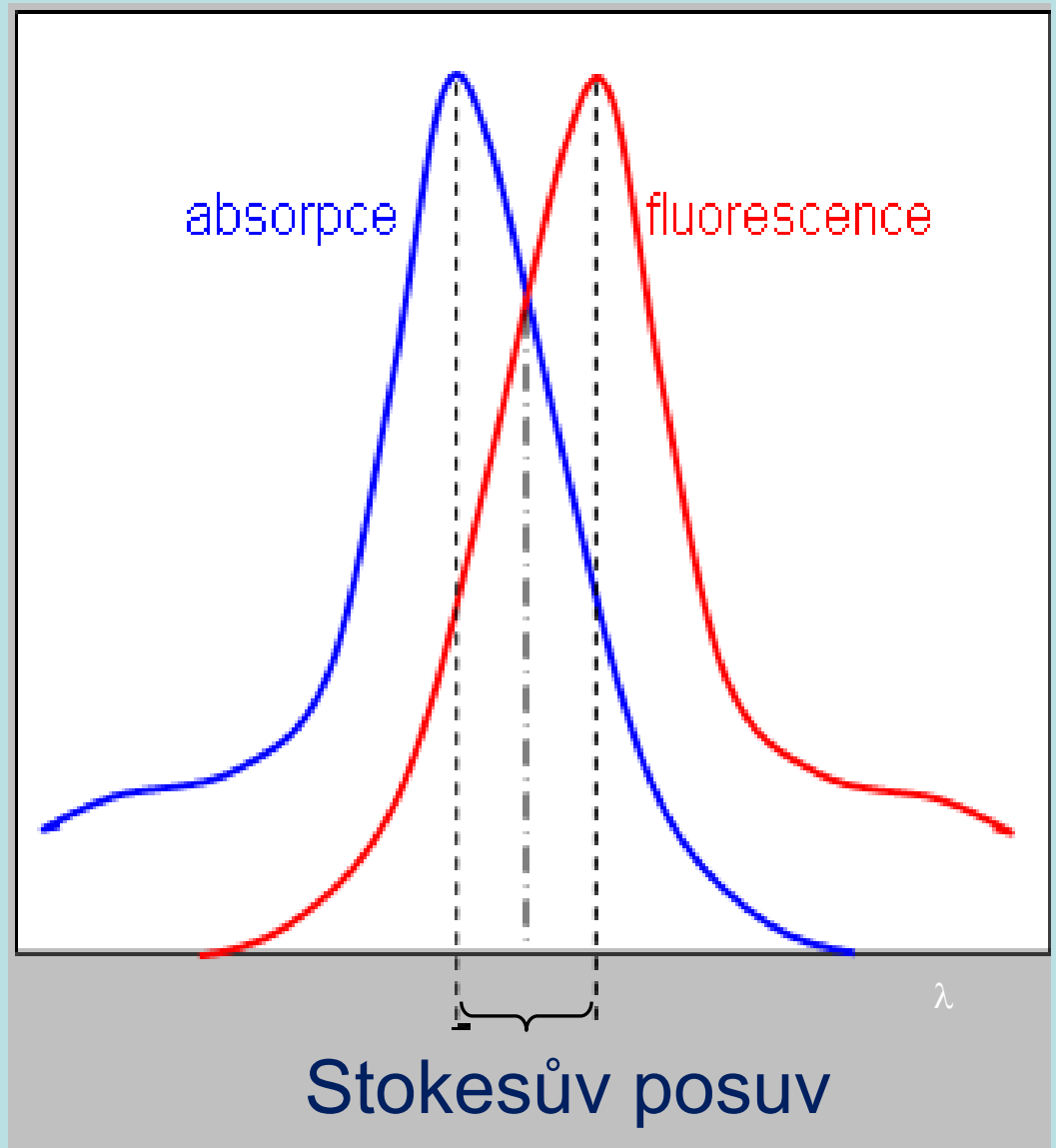


Stokesův posuv

Rozdíl vlnových délek absorpčního (excitačního) a emisního maxima

Emitované záření má větší vlnovou délku a tudíž nižší energii

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



Zhášení luminiscence

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

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

Chemiluminescence

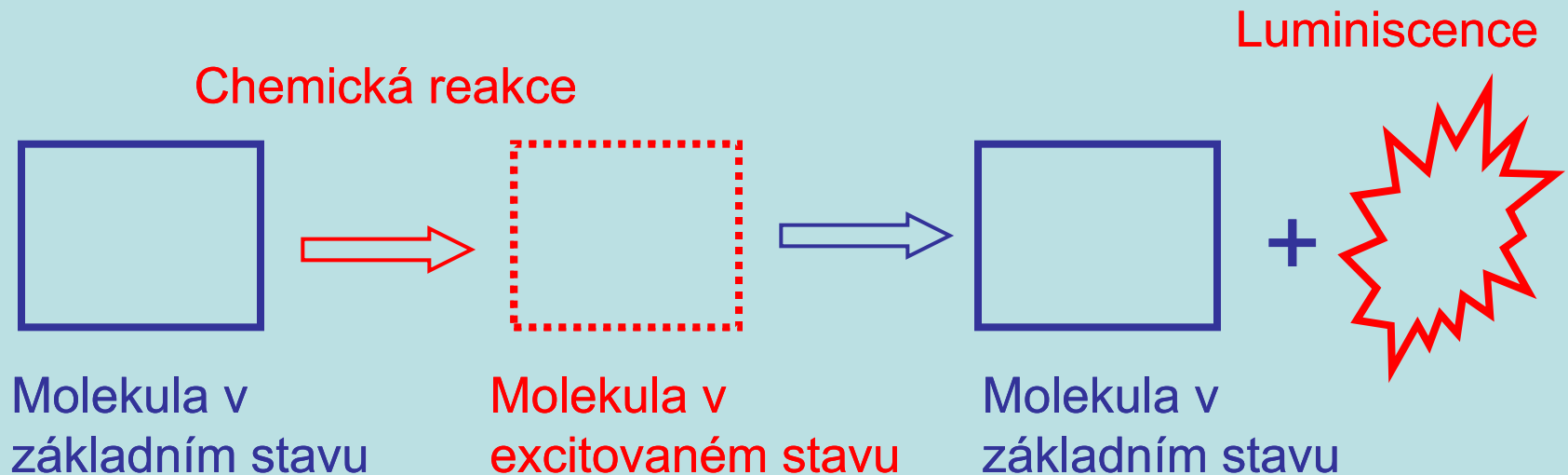
je vyvolána energií chemické reakce (většinou oxidace)

- 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



Fluorescenční imunoanalytické metody (FIA)

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

FIA

Fluoroimunoanalýza

= kombinace fluorometrie s imunoanalytickými metodami, kde značkovacím činidlem je fluorescenční látka

- **Kompetitivní FIA**

Naměřená fluorescence je nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného analytu

- **Nekompetitivní FIA (sendvičová technika)**

Naměřená fluorescence je přímo úměrná koncentraci stanovovaného analytu

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

CMIA

Chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročasticích

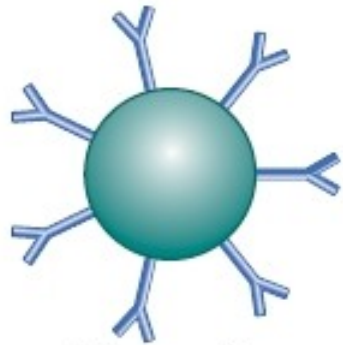
- Heterogenní imunoanalýza - separace pevnou fází
- Paramagnetické mikročastice
- Emise světla molekulou, která je produktem chemické reakce
- Systém není ozařován zdrojem světla.

Paramagnetické částice

Krystaly kysličníků železa

- ❖ velký povrch
- ❖ magnetické vlastnosti

CMIA



Magnetic
Microparticle

+



Sample

+



Patented
Acridinium Derivative
Conjugate

+



Base/Acid

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

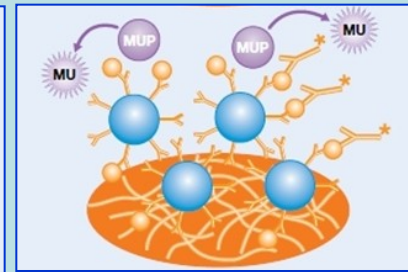
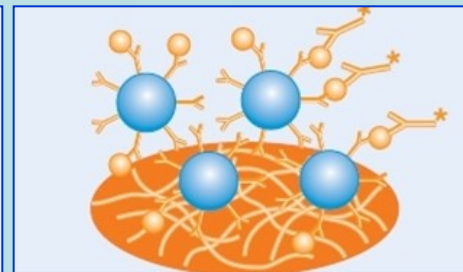
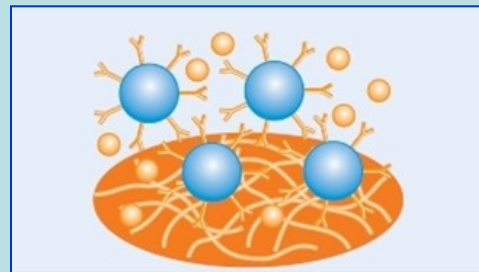
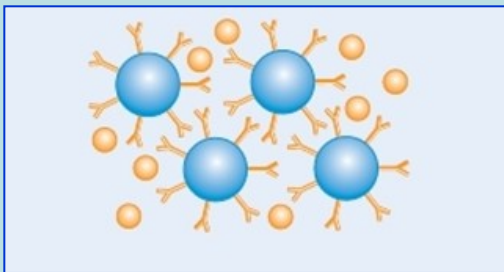
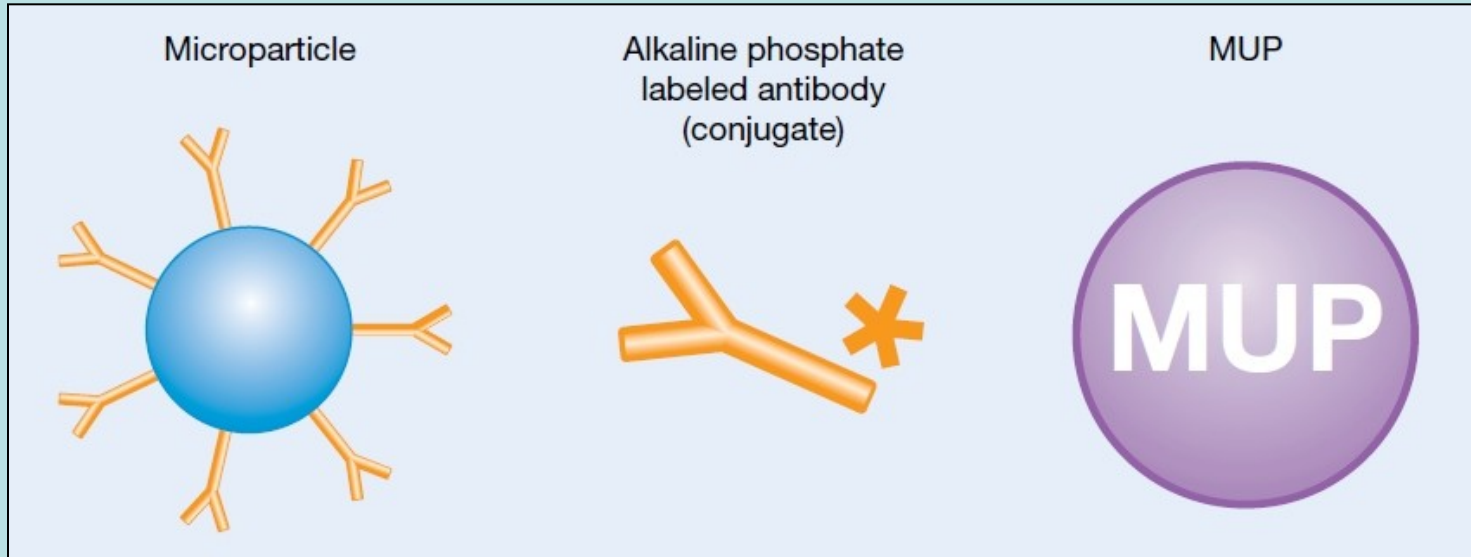
- Je-li fluorofor vázán na **velkou molekulu** (komplex značený antigen-protilátka), nemůže volně rotovat a emitované světlo kmitá ve stejné rovině jako excitující – **polarizace zůstane zachována**
- Volný fluorofor může volně rotovat, emitované světlo kmitá v jiné rovině než excitující – **polarizace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

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

MEIA

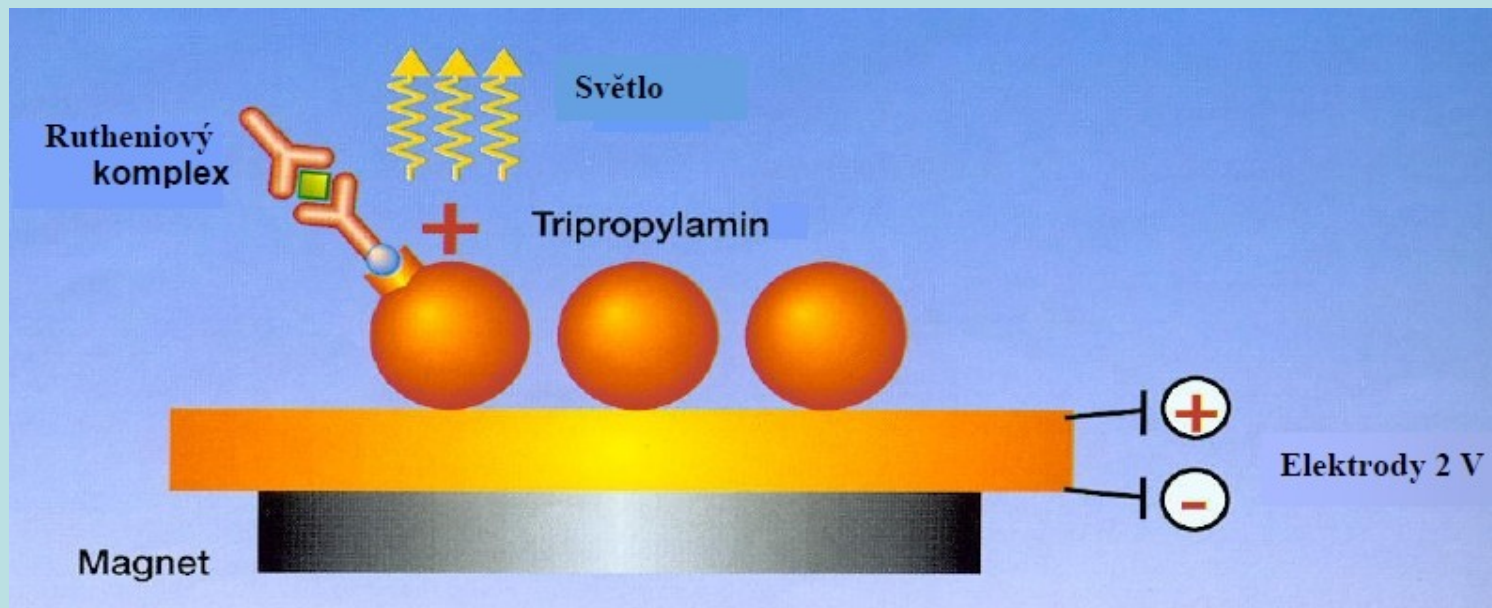


ECLIA

Elektrochemiluminiscenční imunoanalýza
modifikace chemiluminiscence, světlo je
generováno chemickými reakcemi
iniciovaných elektrochemicky



Elecsys 2010
(Roche)



- ✓ 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 $\text{TPA}^{\cdot+}$ (má redukční vlastnosti), snadno redukuje Ru^{3+} komplex na Ru^{2+} , Ru kation prochází reakcí cyklicky, nespotřebovává se, chová se jako enzym
- ✓ 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
- ✓ TPA se rozpadá na dipropylamin, je v reakci spotřebováván, slouží jako substrát

Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)



není Fish jako FISH...

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

Ukázky FISH

