

# Luminiscence

aplikace v metodách  
molekulární biologie,  
imunologie a biochemie

# Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

- Hematologická a imunologická vyšetření
- Hygienický monitoring (mikrobiologická kontaminace)
- Toxikologické testy
- Molekulární biologie (reporterové geny)

Množství komerčních testovacích souprav, které jsou využívány v klinické biochemii, imunologii, toxikologii, virologii, endokrinologii

Diagnostika:

Thyroidní funkce, fertility, poškození myokardu, anemie, koncentrace léčiv, monitorování odbourávání léčiv, rakoviny, infekčních nemocí.

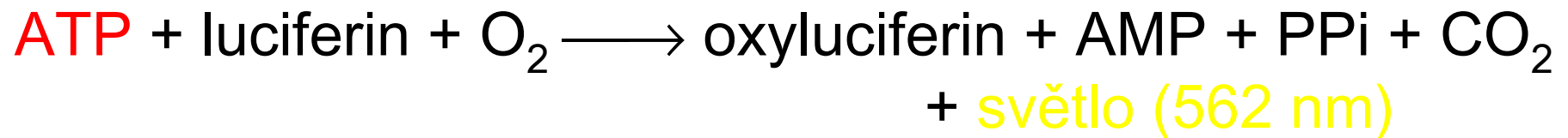
## Rozdělení luminiscenčních metod podle principu

1. ATP assays (sterility tests, proliferation, toxicity)
2. Luminescence-based immunoassays (WB and ELISA)
3. Gene expression

## Luminometrické metody založené na měření ATP

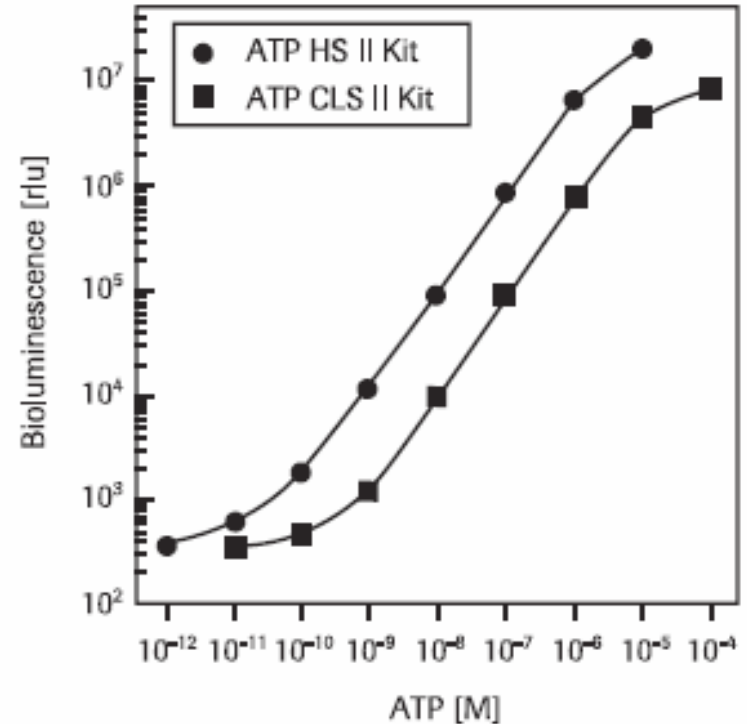
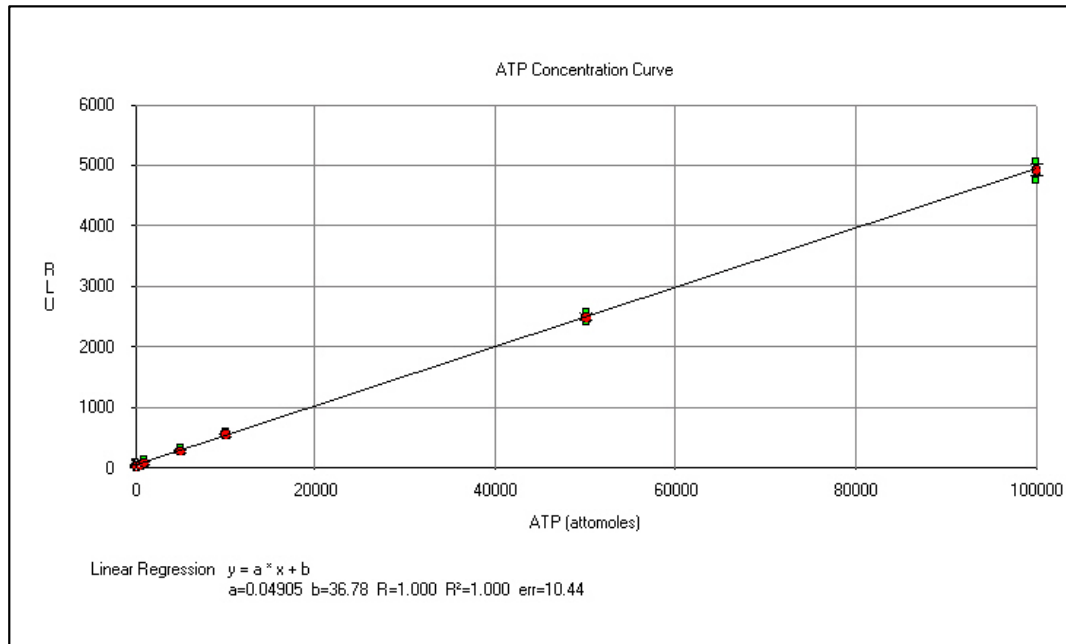
### Princip metody:

Luciferáza



Touto metodou se stanovuje buď přímo množství ATP ve zkoumaném vzorku nebo aktivita enzymů nebo substrátů, které jsou spřaženy s tvorbou nebo spotřebou ATP (např. stanovení  $\beta$ -podjednotky kreatin kinázy používané v diagnostice akutního infarktu myokardu)

# ATP Concentration Curve



## ATP Detection limits

- ATP limit of detection 100 attomol/well.
- Dedicated luminometer (i.e. Bio-Tek Clarity) is 10 attomol/well.

# Využití metod založených na stanovení ATP

Měření ATP v bakteriálních, rostlinných a živočišných buňkách

Pomocí CL metody za využití luciferázy se stanovuje ATP, které je obsažené ve všech živých buňkách. Množství ATP lineárně koreluje s počtem živých buněk.

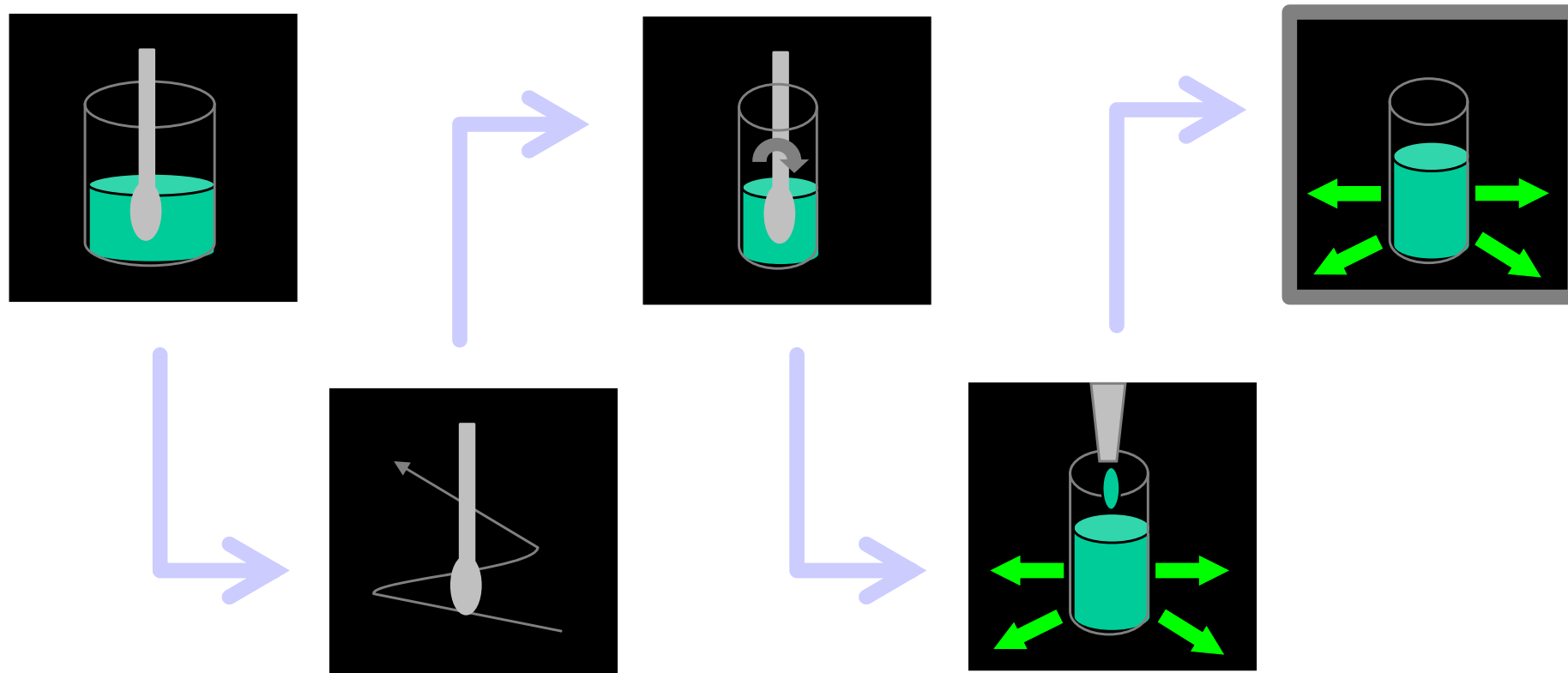
- stanovení buněčné proliferace a cytotoxicity (např. sledování sensitivity bakterií k antibiotikům, sledování cytotoxicity protinádorových léčiv apod.)
- monitorování hygieny pracovního prostředí (např. potravinářství)
- měření biomasy mikroorganismů ve vodných roztocích a fermentorech

# Monitorování hygieny pracovního prostředí a účinnosti čisticích postupů

Výhody oproti konvenčním mikrobiologickým postupům:  
Rychlost a jednoduchost, vysoká sensitivita a přesnost, stanovení celkové biologické kontaminace (ta může pocházet z reziduí výrobků, z kontaktu s lidskou pokožkou nebo z mikroorganismů).



# Monitorování hygieny pracovního prostředí a účinnosti čistících postupů CL stanovením ATP – stěr z pracovní plochy



# Měření biomasy mikroorganismů ve vodných roztocích

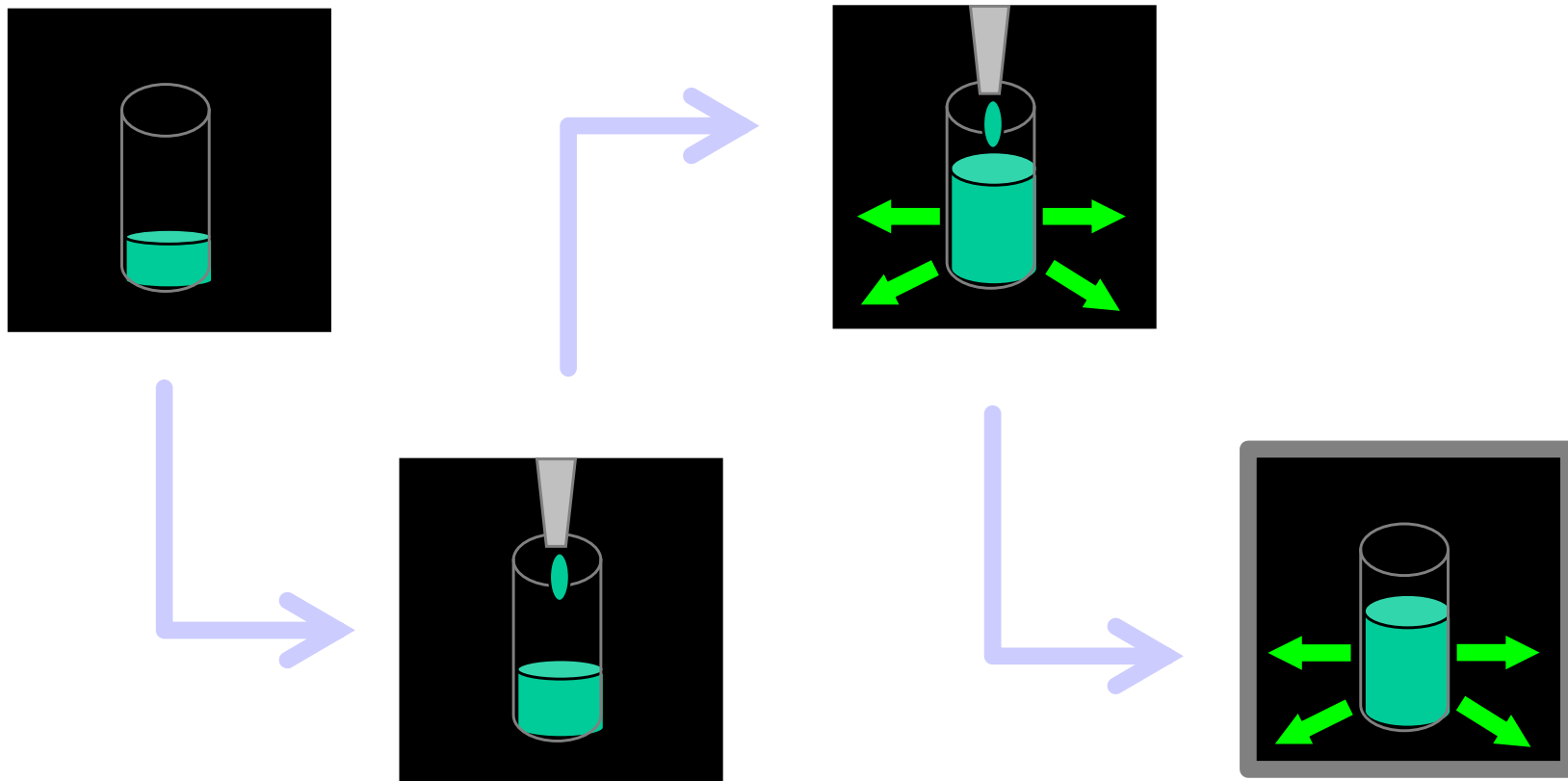
## Materiál

- vodné roztoky

## Indikace

- mikrobiální znečištění pitných a užitkových vod
- mikrobiální znečištění potravinářských výrobků

# Měření množství mikroorganismů ve vodných roztocích



# Stanovení proliferace eukariotických buněk

Stanovení na základě měření obsahu ATP ve vzorku. Rychlá a sensitivní alternativa k metodám využívajícím radioaktivně značené prekursorů tvorby DNA (např.  $^3\text{H}$ -tymidin). Uváděná sensitivita řádově 100 buněk.

# ApoSENSORTM ADP/ATP Ratio Assay Kit

Biovision

Kit utilizes CL detection of the ADP and ATP levels for a rapid screening of apoptosis, necrosis, growth arrest, and cell proliferation simultaneously in mammalian cells.

Increased levels of ATP and decreased levels of ADP have been recognized in proliferating cells. In contrast, decreased levels of ATP and increased levels of ADP are recognized in apoptotic cells which further much more pronounced in necrosis than apoptosis.

ADP level is measured by its conversion by ADP Converting Enzyme to ATP that is subsequently detected using the same reaction.

## Interpretation of Results:

Cell Fate	ADP Level	ATP Level	ADP/ATP
Proliferation	Very Low	High	Very Low
Growth Arrest	Low	Slightly Increased	Low
Apoptosis	High	Low	High
Necrosis	Much Higher	Very Low	Much Higher

# Imunodiagnostika

ELISA, Western blotting, Arrays

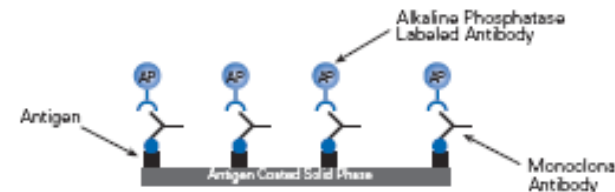
- Secondary Ab labeled with AP or HRP
- Substrate for Conjugate produces luminescence

## Immunoassay Schemes Employing an Alkaline Phosphatase Label for Detection with CSPD® Substrate



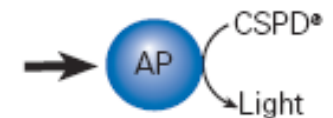
Sandwich Immunoassay

Direct capture of antigen by bound antibody and detection of antigen by AP labeled antibody



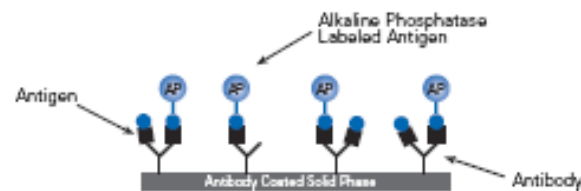
Monoclonal Screening

Direct capture of monoclonal antibody by bound antigen and detection of monoclonal antibody by AP labeled antibody



Competitive Assay

Competition between bound antigen and solution antigen for AP labeled antibody



Competitive Assay

Competition between AP labeled antigen and unlabeled antigen for bound antibody

# Značení křenovou peroxidasou - substráty

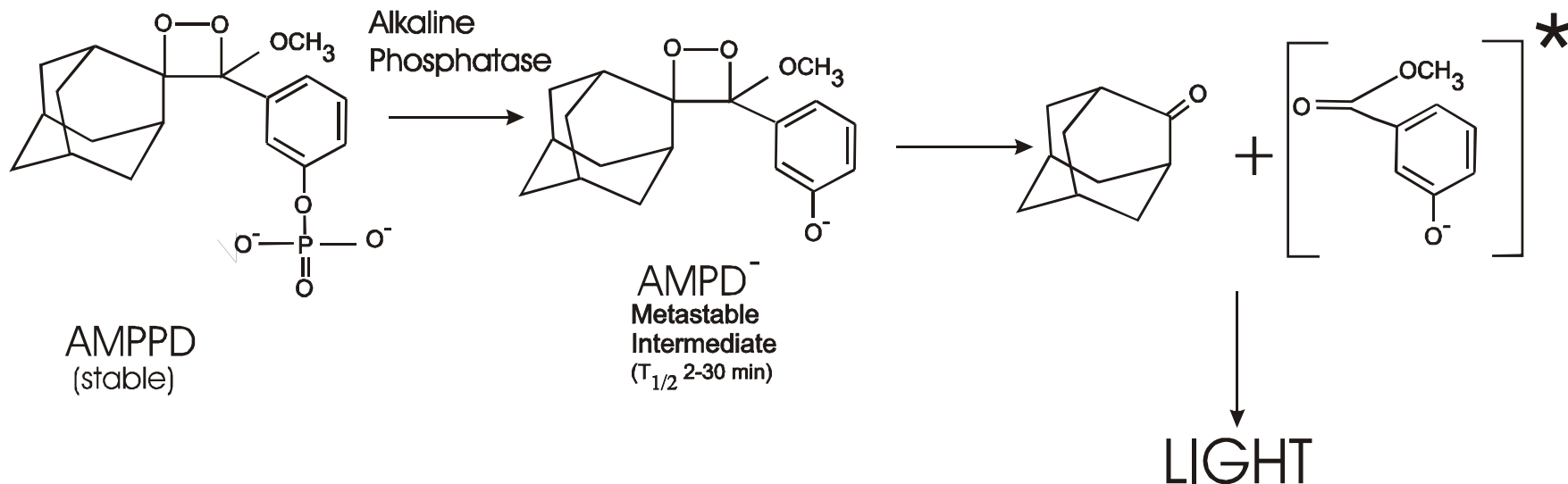
1. Detekce založená na luminolu (a příbuzných luminoforech)  
Luminol a jeho analogy jsou ko-substrátem pro HRP. V přítomnosti oxidantu se luminol oxiduje např. peroxidem vodíku. Intenzita a trvání CL signálu jsou úměrné aktivitě HRP. V kitech jsou používány enhancery CL (např. luciferin) a naopak látky potlačující pozadí.
2. Detekce založená na akridanových esterech  
Akridanové estery emitují v přítomnosti HRP a peroxidu vodíku intenzivní glow reakci.

# Značení alkalickou fosfatasou - substráty

## 1 *Dioxetany*

Stabilizované adamantyl 1,2-dioxetanové substráty pro alkalickou fosfatasu

(např. AMPPD, CSPD® nebo CDP®-Star) představují jednoduchou a rychle reagující assay pro alkalickou fosfatasu. Detekční limit - 1 zmolů (= 603 molekul enzymu)



## 2 *Akridan-enol fosfáty*

Detekční limit - 305 zmolů enzymu

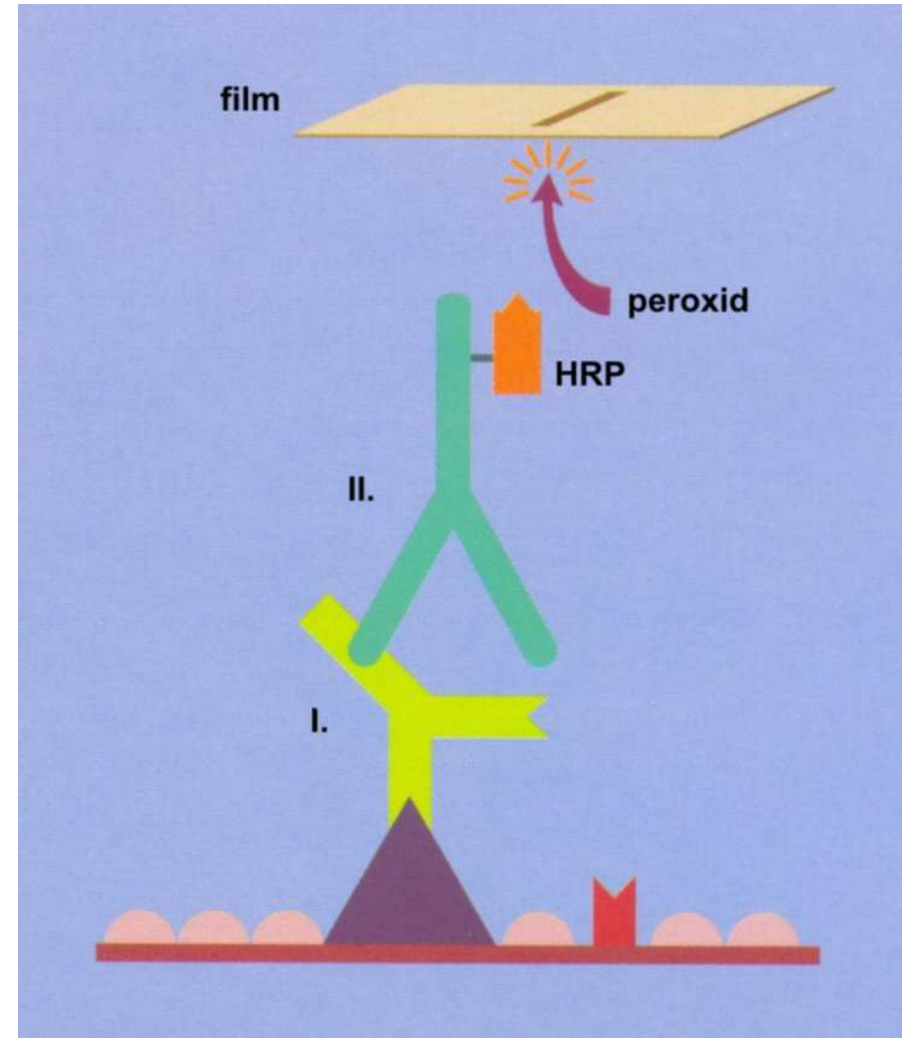


# Značení glukoso oxidasou

Využívá glukoso oxidasu jako enzymovou značku. Enzym produkuje peroxid vodíku. Jeho tvorba je analyzována systémem isoluminol-peroxidasa.

# Western-blotting

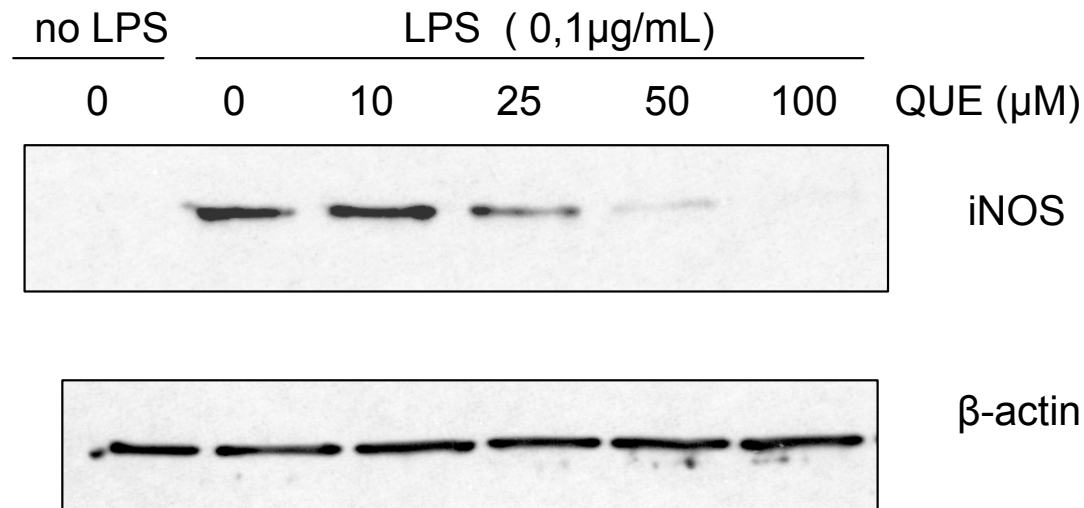
- Vyblokování nespecifických vazebných míst
- Inkubace s primární protilátkou proti námi sledovanému proteinu
- Inkubace se sekundární protilátkou značenou křenovou peroxidázou (HRP)



# Vizualizace WB pomocí CL

- Substráty od různých firem lišící se citlivostí
- fotografický film případně ultrasenzitivní kamery

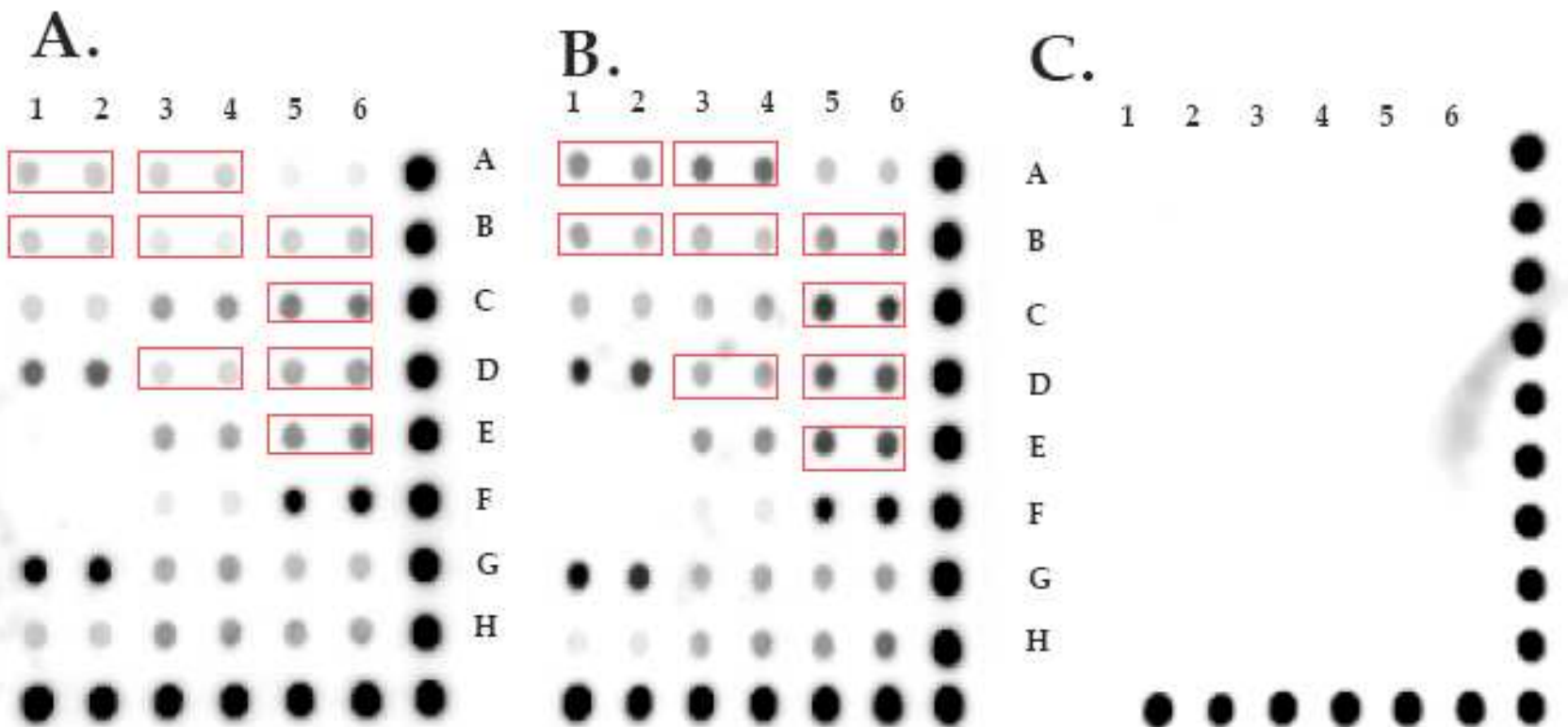
Příklad:



# Gene and protein arrays

## TranSignal™ Transcription Reporter Array

Typical results • TranSignal™ Transcription Reporter Array

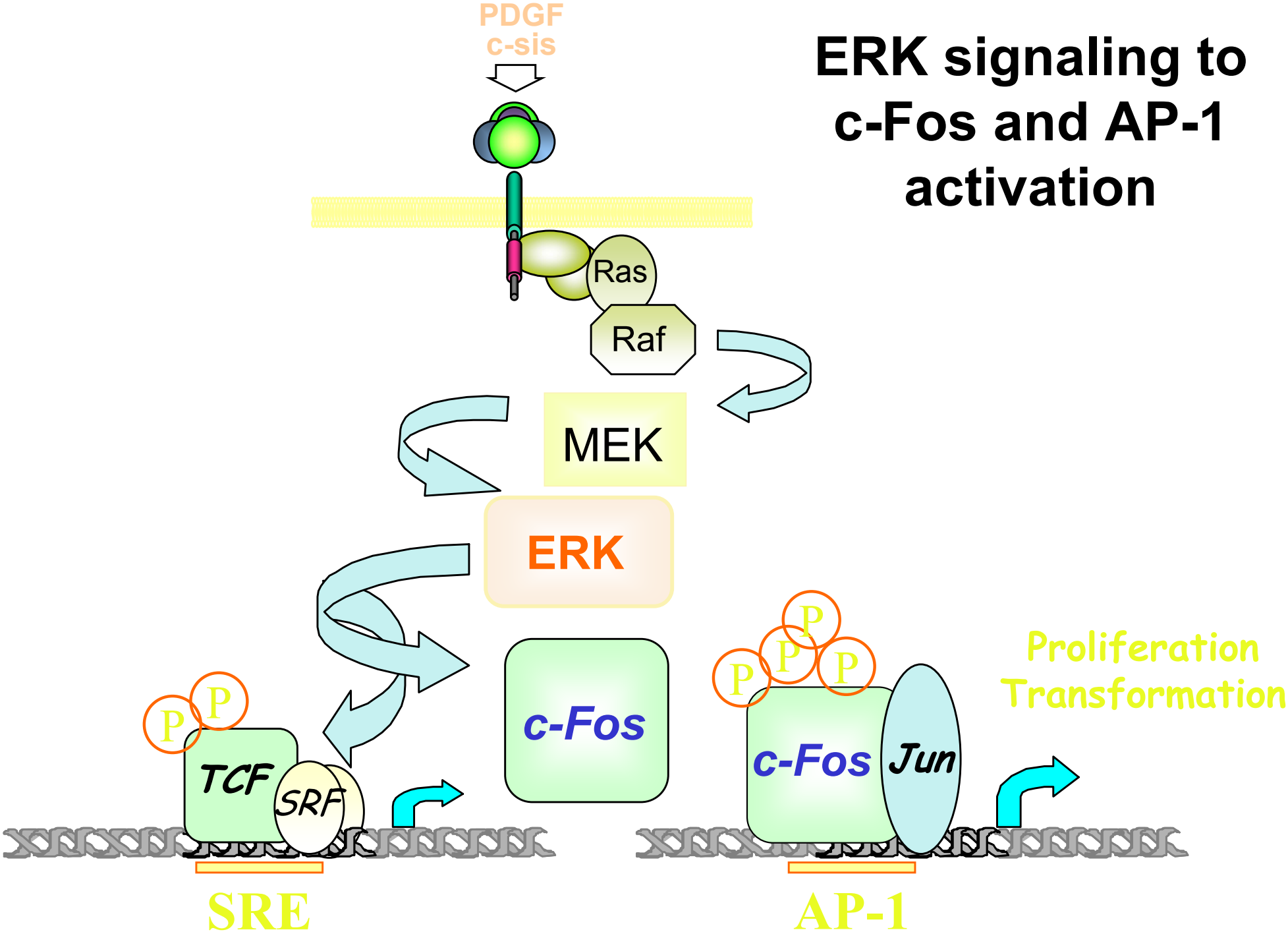


# Reporter gene assay

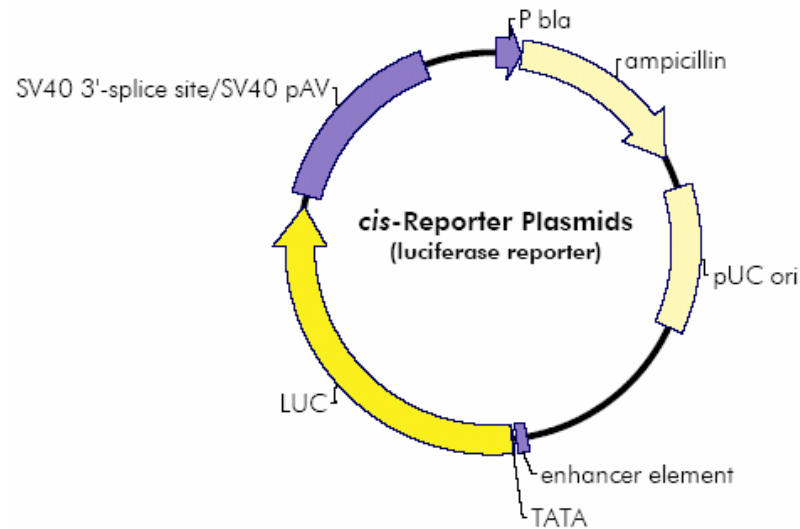
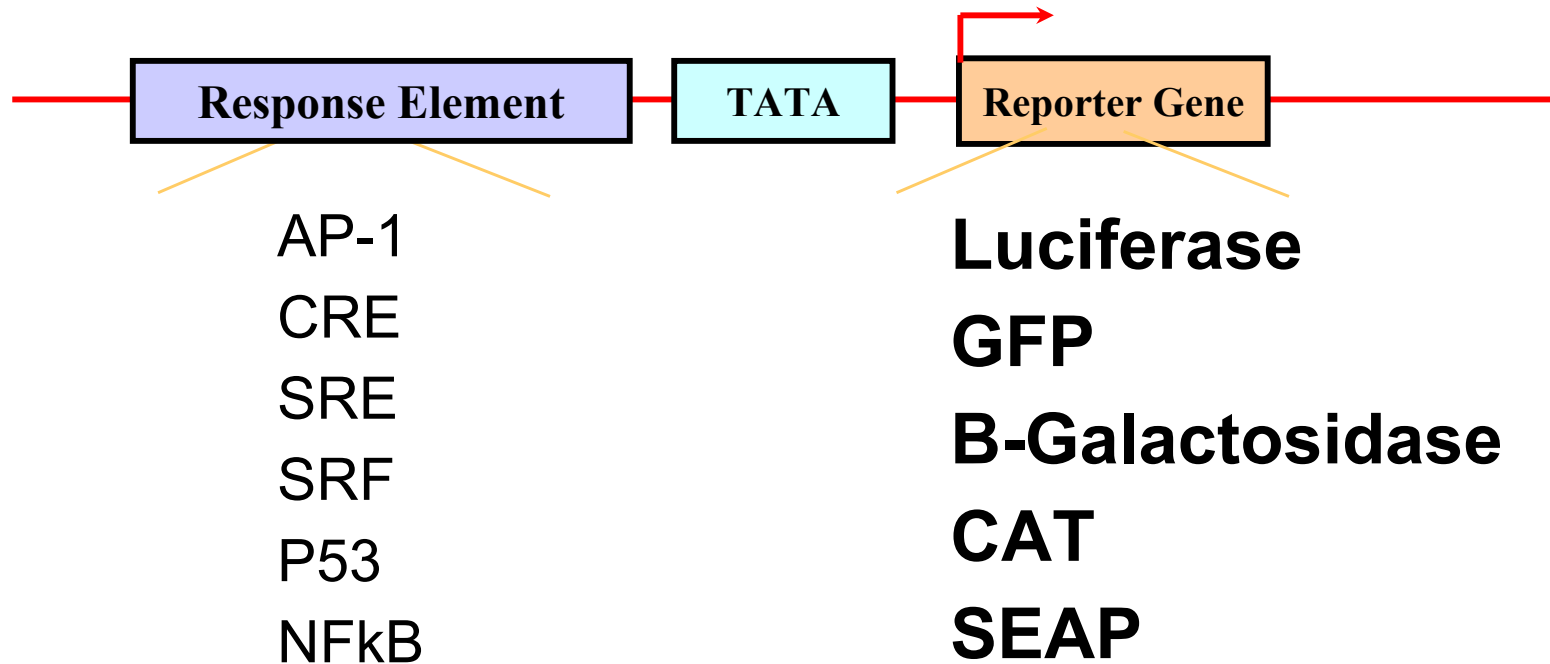
Princip spočívá ve využití kódující sekvence luciferázy jako reporterového genu pro monitorování aktivity promotorů v kontrole genové exprese.

Konstrukt DNA obsahující kódovací oblast pro luciferázu kombinovanou se sekvencí s testovanou schopností genové regulace se vnese do studovaných buněk. Po inkubaci se měří výsledek exprese daného reporterového genu jako ukazatel účinnosti testovaného promotoru.

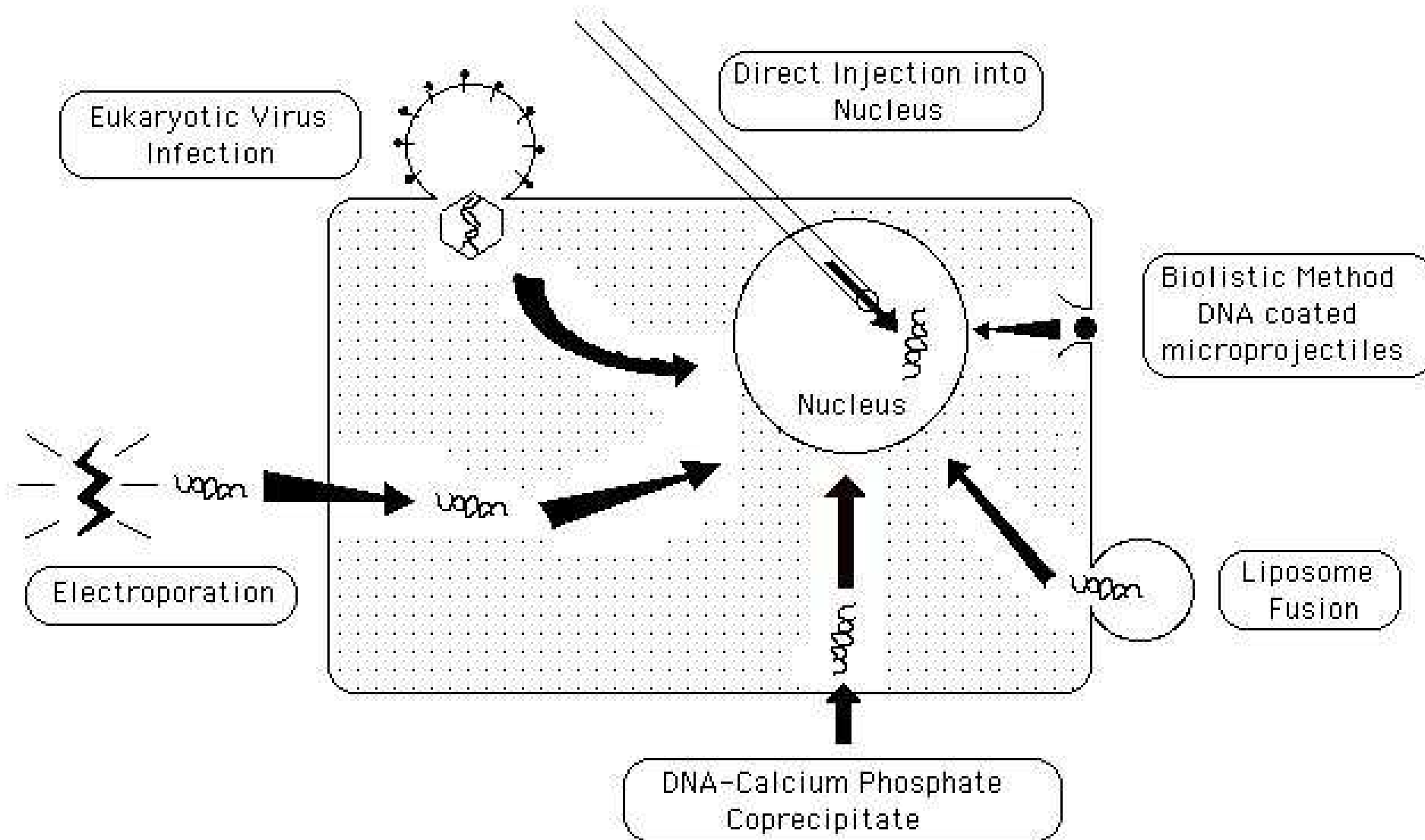
# ERK signaling to c-Fos and AP-1 activation



# Reporter systems to study how signaling pathways regulate transcription

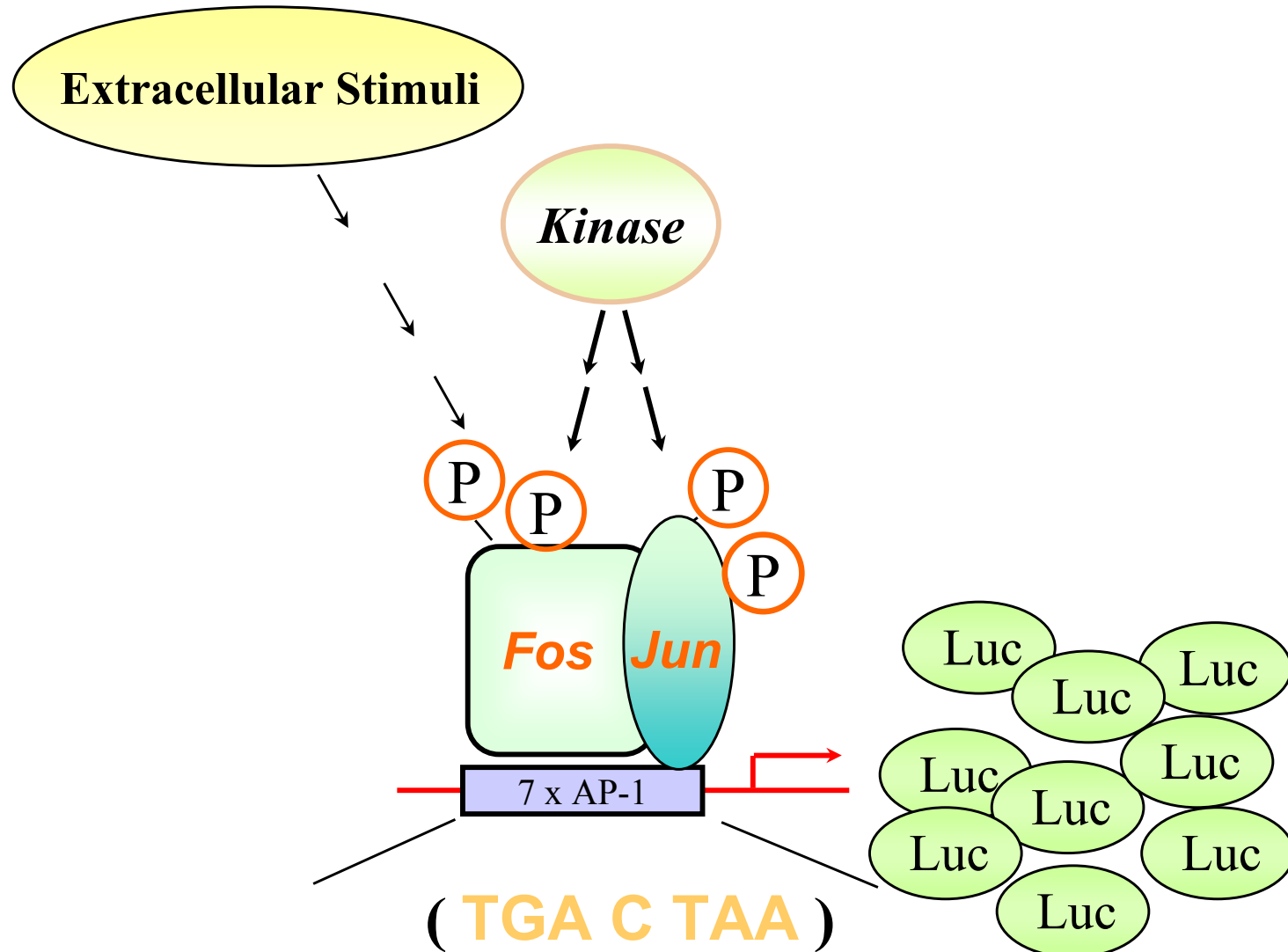


# Metody transfekce





# Luciferase reporter systems to study how signaling pathways regulate transcription



# Reporter systems

## Firefly Luciferase

Monomeric enzyme of 61kDa catalyzes a two-step oxidation reaction to yield light, usually in the green to yellow region. The gene encoding firefly luciferase (*luc*) is a monomer that does not require any post-translational modifications; it is available as a mature enzyme directly upon translation from its mRNA.

## Renilla Luciferase

Monomeric enzyme 36kDa that catalyzes the oxidation of coelenterazine to yield coelenteramide and blue light.

## Click Beetle Luciferase

Click beetle and firefly luciferase belong to the same beetle luciferase family. What makes the click beetle unique is the variety of luminescence colors they emit. Complementary DNAs cloned from the ventral light organ encode four luciferases capable of emitting luminescence ranging from green to orange (544–593nm) such as a red luciferase (611nm) and two green luciferases (544nm each).

# Single & Dual reporter assay

## Single-Reporter Assays

Assays based on a single reporter provide the quickest and least expensive means for acquiring gene expression data from cells.

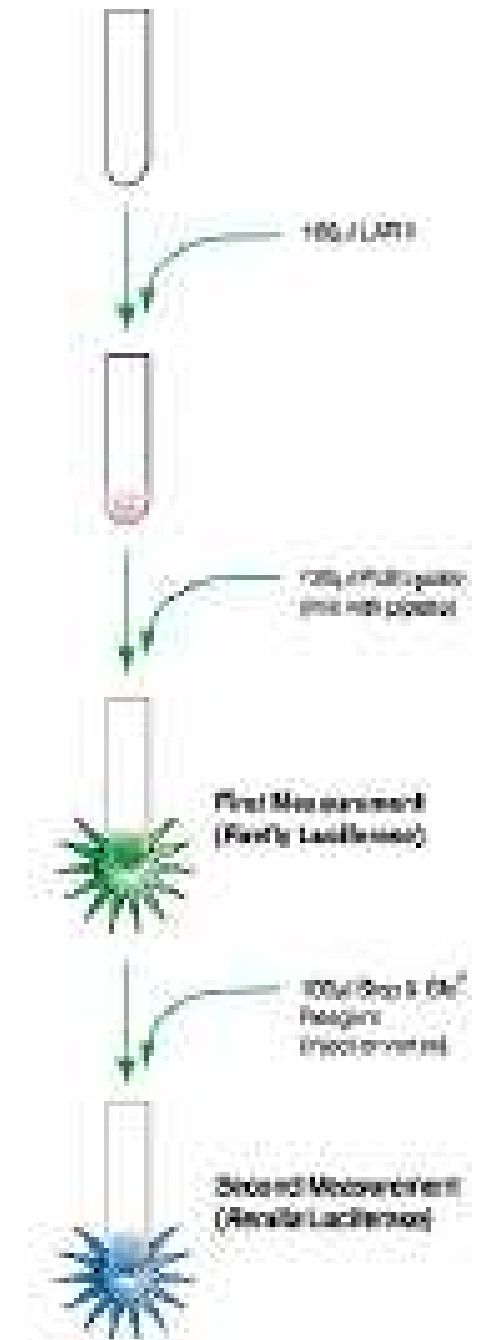
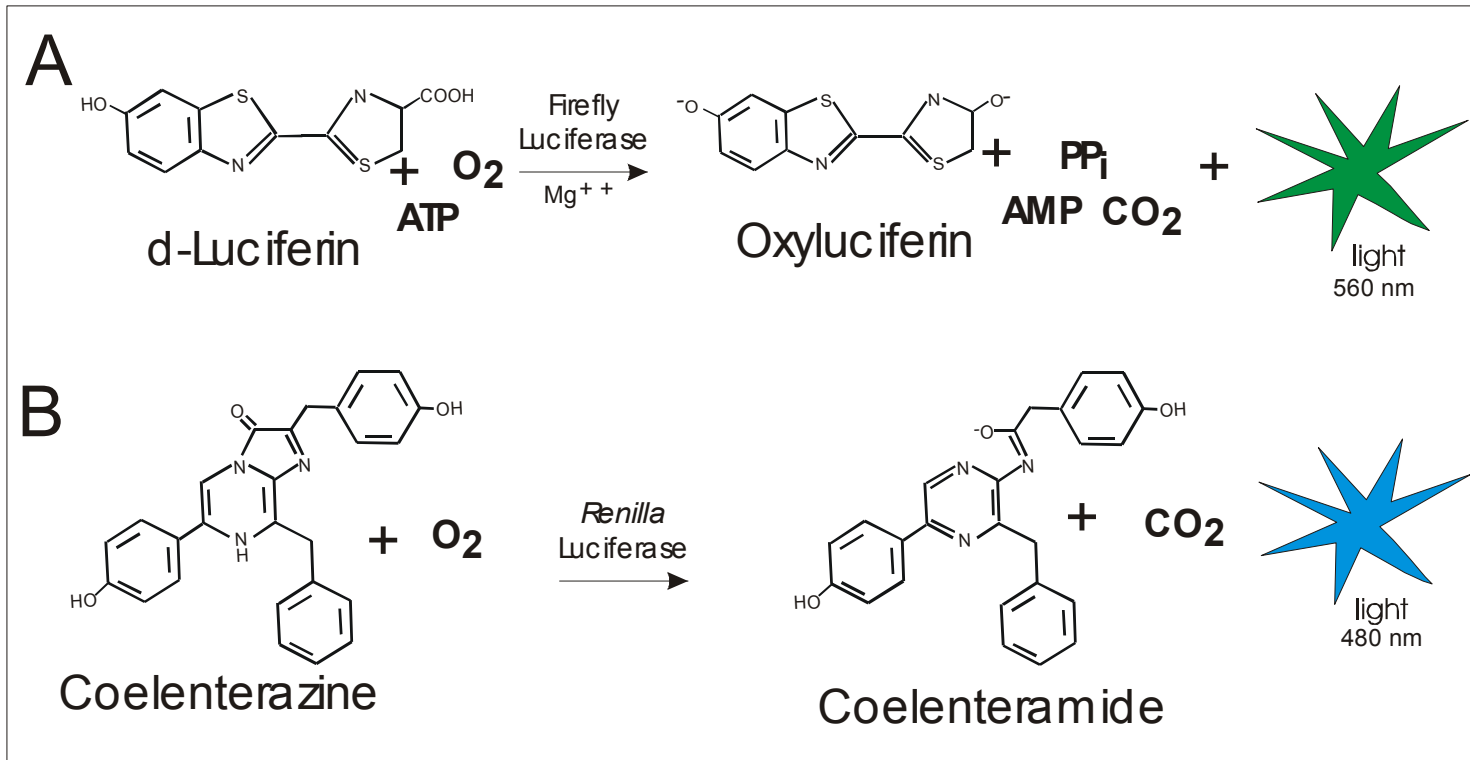
## Dual-reporter assay

The most commonly used dual-reporter assay is based on combining the chemistries for firefly and Renilla luciferases.

These luciferases use different substrates and thus can be differentiated by their enzymatic specificities. The method comprises adding two reagents to each sample, with a measurement of luminescence following each addition. Addition of the first reagent activates the firefly luciferase reaction; addition of the second reagent extinguishes firefly luciferase and initiates the Renilla luciferase reaction.

Dual-reporter and dual-color assays allow the user either to measure expression of two different reporter genes or one reporter gene and cell viability. In all cases, the assays allow both measurements to be made sequentially from each sample.

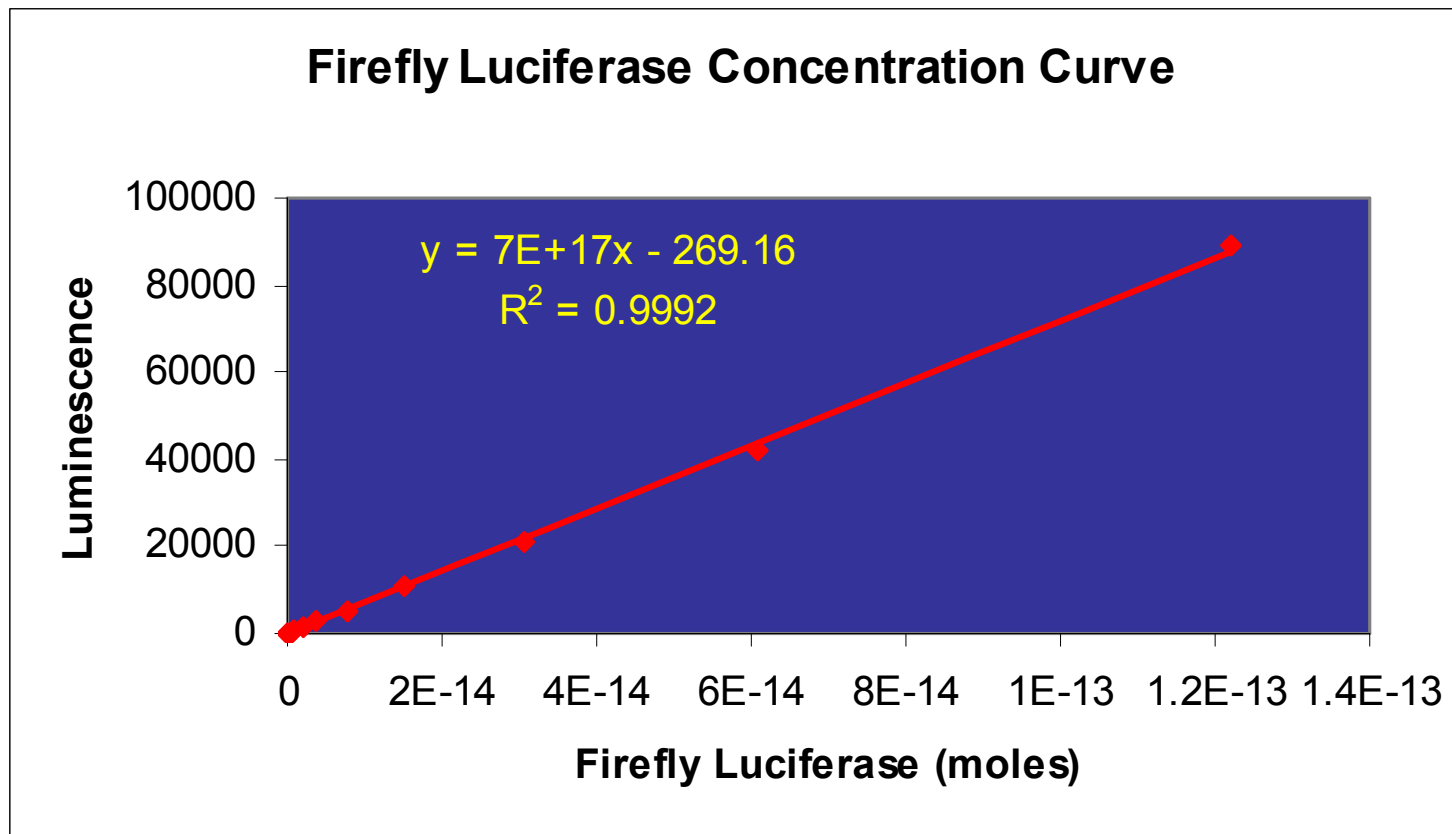
# Dual reporter assay



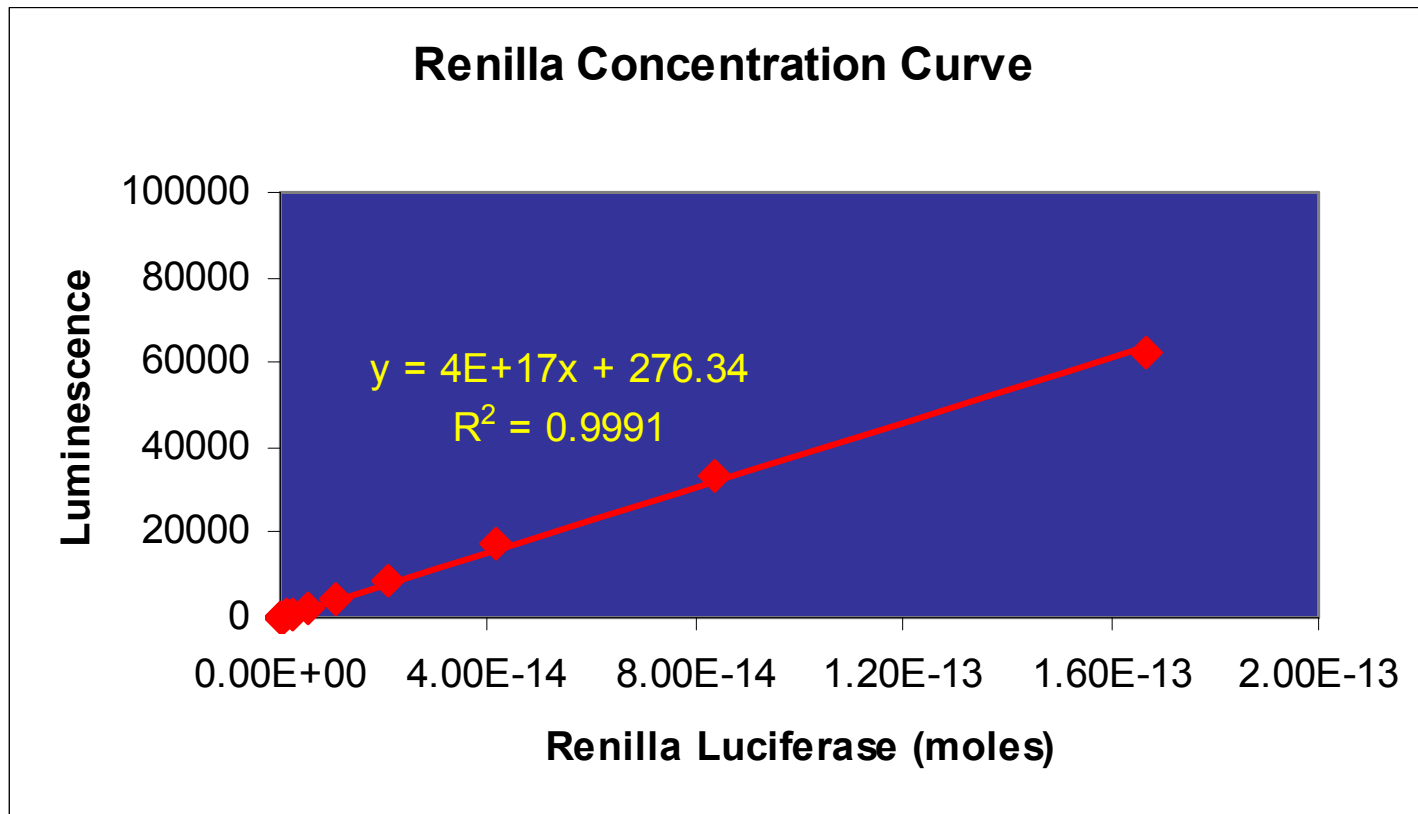
## Benefits of a dual assay

- i) reducing variability that can obscure meaningful correlations
- ii) normalizing interfering phenomena that may be inherent in the experimental system
- iii) normalizing differences in transfection efficiencies between samples.

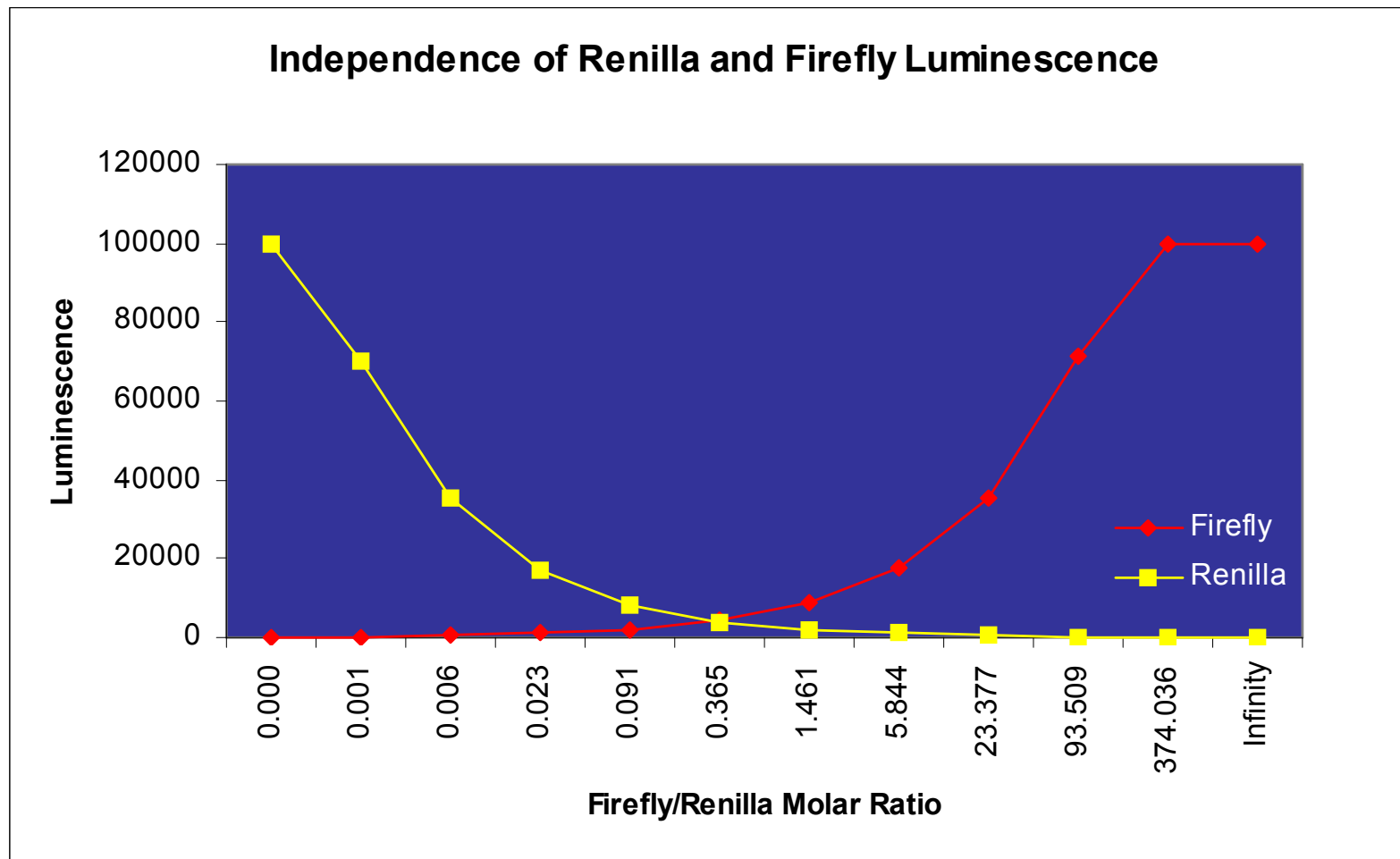
# Glow Luminescent Firefly Luciferase Signal



# Glow Luminescent Renilla Luciferase Signal



# Firefly and Renilla Signal independence



# Detection of reporter in live cells

## Secreted human placental alkaline phosphatase activity (SEAP)

The SEAP gene product is secreted from transfected cells and is thus easily detected in a sample of culture medium, without destroying cells and without time-consuming sample preparation.

## *Metridia longa* secreted luciferase

*Metridia longa* secreted luciferase was cloned from the marine copepod *Metridia longa*, encodes a 24 kDa protein. This secreted luciferase gene was sequence-optimized by deleting possible cis-acting sites (splice sites) and increasing the overall GC content to prolong mRNA half-life. The sequence was also human codon-optimized.

## Live Cell Substrates for luciferases

Recently, nondestructive live cell substrates were developed, which allow monitoring of Renilla luciferase without cell lysis. Renilla luciferase requires only oxygen and coelenterazine to generate luminescence, providing a simple luciferase system with which to measure luminescence from living cells. Unfortunately, coelenterazine is unstable in aqueous solutions and so it has been difficult and inconvenient to measure Renilla luciferase.

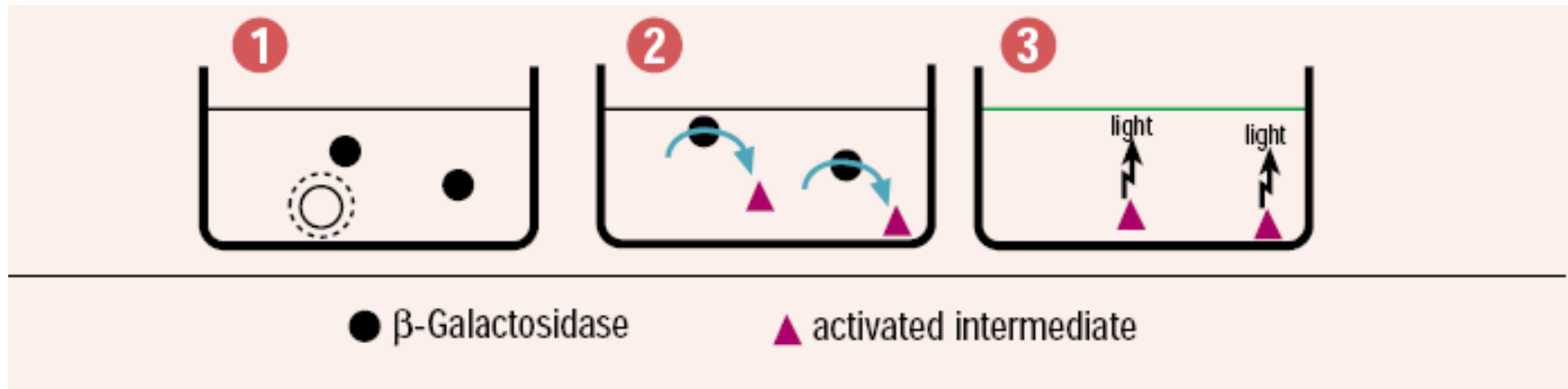


# Detection of non-CL reporters by CL

## CL $\beta$ -Gal Reporter Gene Assay

Detection of  $\beta$ -galactosidase enzymatic activity in transfected cells or in tissues isolated from transgenic animals

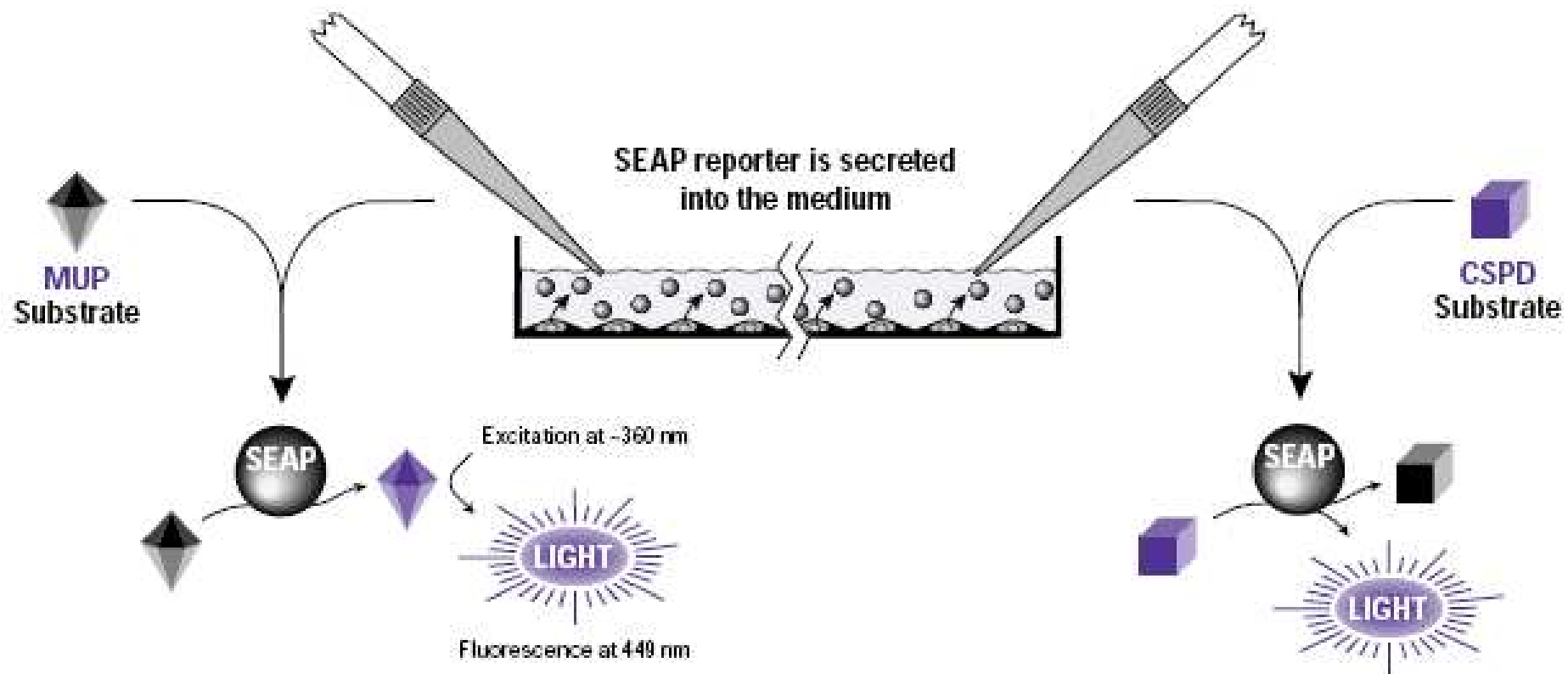
$\beta$ -Galactosidase activity is released into the assay medium by gentle cell lysis (step 1). The substrate Galacton Plus is protonated and accumulates as a stable intermediate without emitting light (step 2). Raising the pH to  $> 12$  deprotonates the intermediate, which decomposes and emits light. Light emission is measured in a luminometer (step 3).



# Secreted human placental alkaline phosphatase activity (SEAP) detection

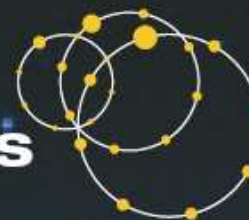
The new *fluorescent*  
Great EscAPe SEAP Assay

The original *chemiluminescent*  
Great EscAPe SEAP Assay



# Luminescence Assay Systems

Simpler. Brighter. Smarter.



luc<sup>lite</sup>

britelite

steady<sup>lite</sup> HTS

ATP<sup>lite</sup>

fire<sup>lite</sup>

Application	Reporter Gene Assay	Reporter Gene Assay	Reporter Gene Assay	Cytotoxicity/ Cell Proliferation	Dual Reporter Gene Assay*
Half-life (hours)	4 to 5	0.5	4 to 5	5	4 to 5
Sensitivity	Low	High	Moderate	As little as 5 cells/well	Moderate
Phenol Red Sensitivity	High	Moderate	Moderate	High	High
Automatable	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Plate Format	96 384	96 384 1536	96 384 1536	96 384	96 384
Wicking	Low	Low	Low	N/A	Moderate
Homogeneous Assay	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Instrumentation	TopCount® & MicroBeta™, EnVision™ & Fusion™	TopCount & MicroBeta, EnVision & Fusion, ViewLux™ & ImageTrak™	TopCount & MicroBeta, EnVision & Fusion, ViewLux & ImageTrak	TopCount & MicroBeta, EnVision & Fusion, & ViewLux	TopCount & MicroBeta, EnVision & Fusion, & ViewLux

\*fire<sup>lite</sup> is not available in the U.S.

# Bioluminescence resonance energy transfer (BRET)

For monitoring protein-protein interactions, where a fusion protein is made using the bioluminescent Renilla luciferase and another protein fused with a fluorescent molecule. Interaction of the two fusion proteins results in energy transfer from the bioluminescent molecule to the fluorescent molecule, with a concomitant change from blue light to green light.

## *Další využití CL*



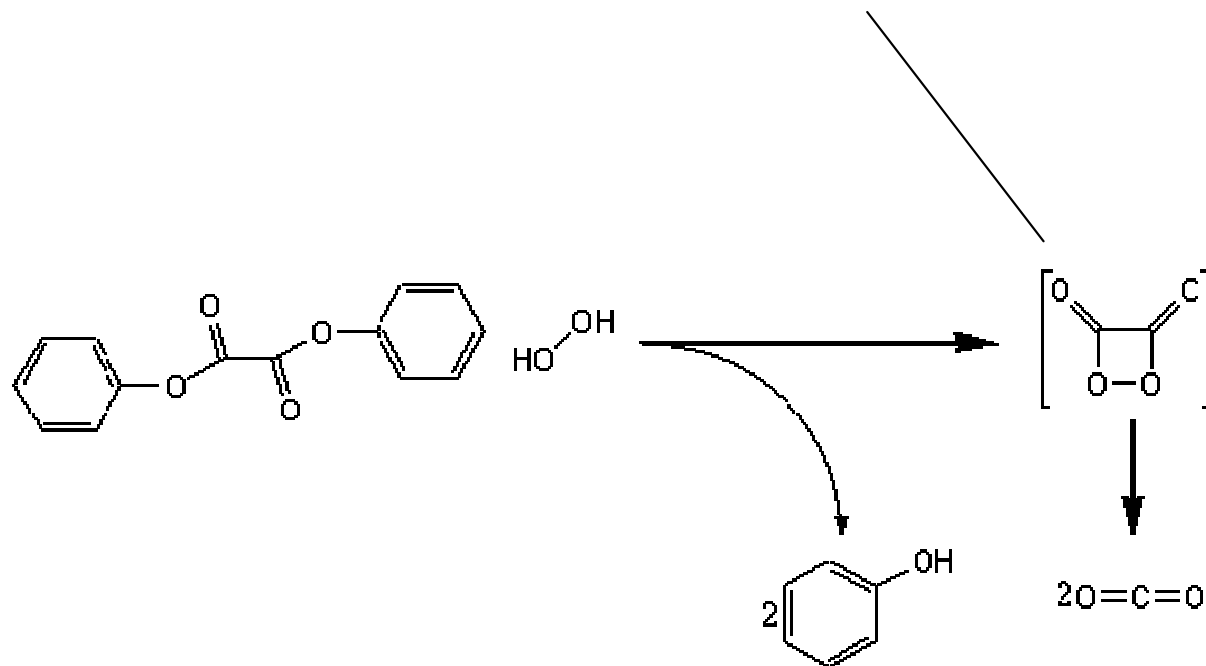
Uvnitř svítící tyčinky je zatavená skleněná ampule s peroxidem vodíku.

Ten působí jako oxidant v reakci emitující světlo. Během reakce dochází k následujícím pochodům:

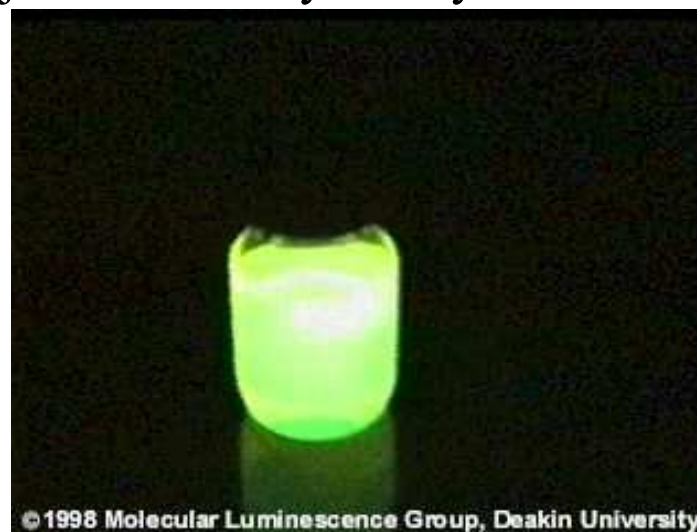
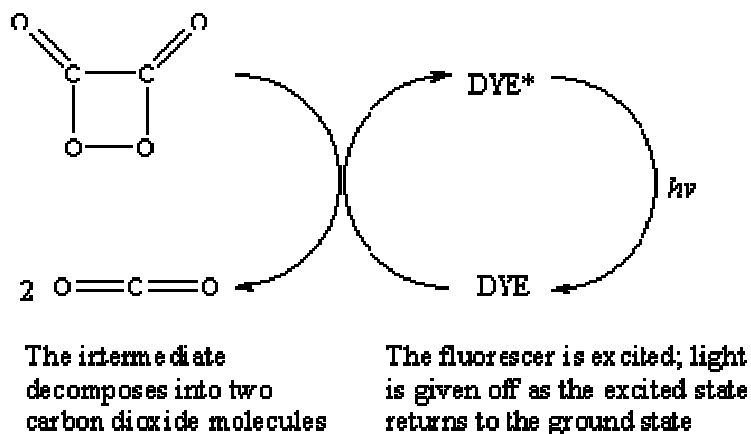
1. Oxidace oxalátového esteru peroxidem vodíku
2. Dekompozice dioxetan-dionového meziprojektu
3. Relaxace fluorescenční barvičky

Reakce je spuštěna rozbitím skleněné ampule

1,2-dioxetane-3,4-dione je molekula s vysokou energií

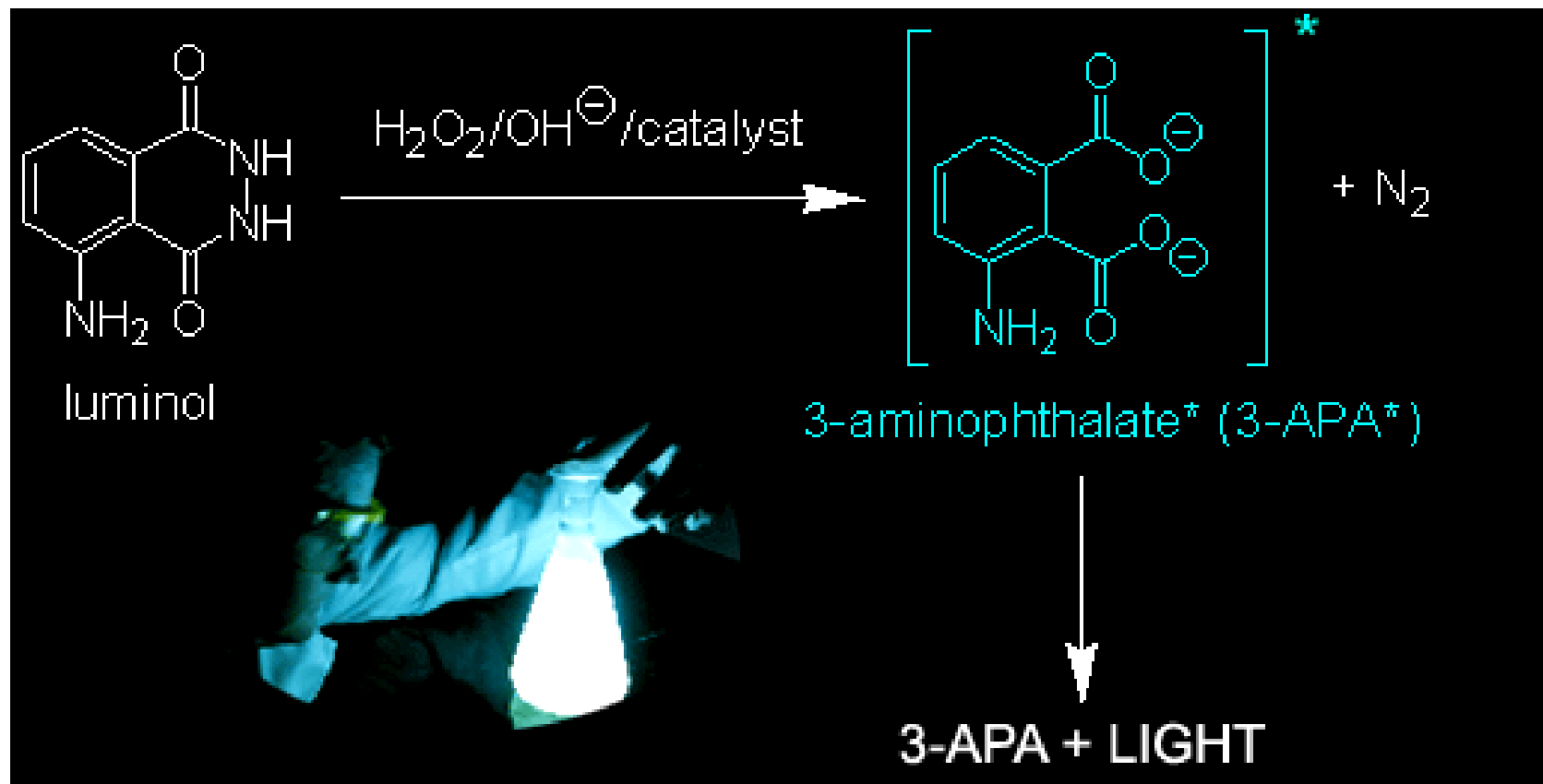
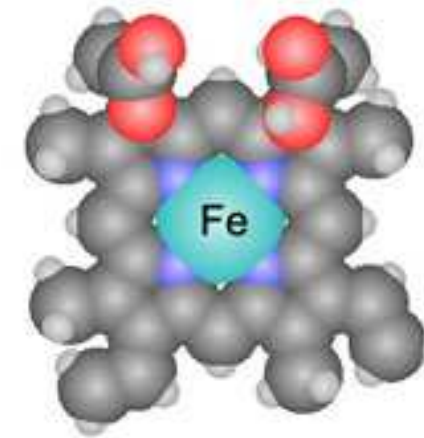


Reaguje s barvičkou uvnitř tyčinky (většinou je to difenyl anthracen) a barvička je excitována. Při návratu do základního stavu jsou emitovány fotony.



## *Další využití CL*

*Kriminalistika: hemoglobin obsahuje železo.  
Využití v detekci krevních skvrn.*



# Shrnutí na příkladu

## PRODUCT SELECTION GUIDE

Select your type of application

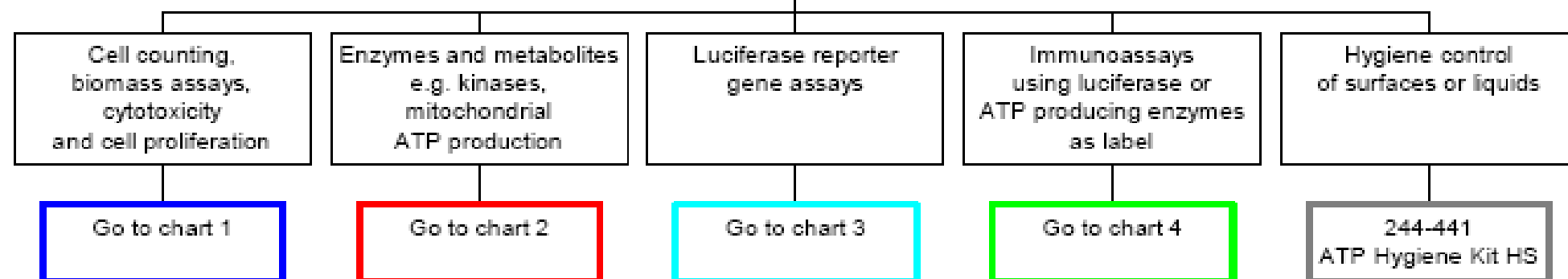


Chart 1  
Cell counting, biomass assays and cytotoxicity/cell proliferation

