

# LUMINISCENČNÍ metody

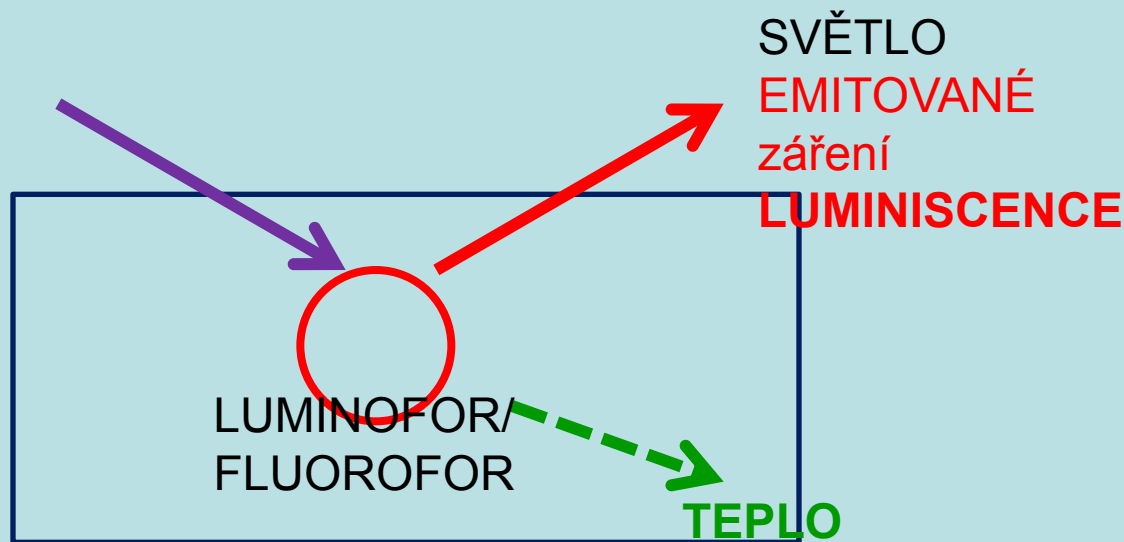
Petr Breinek

# 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!

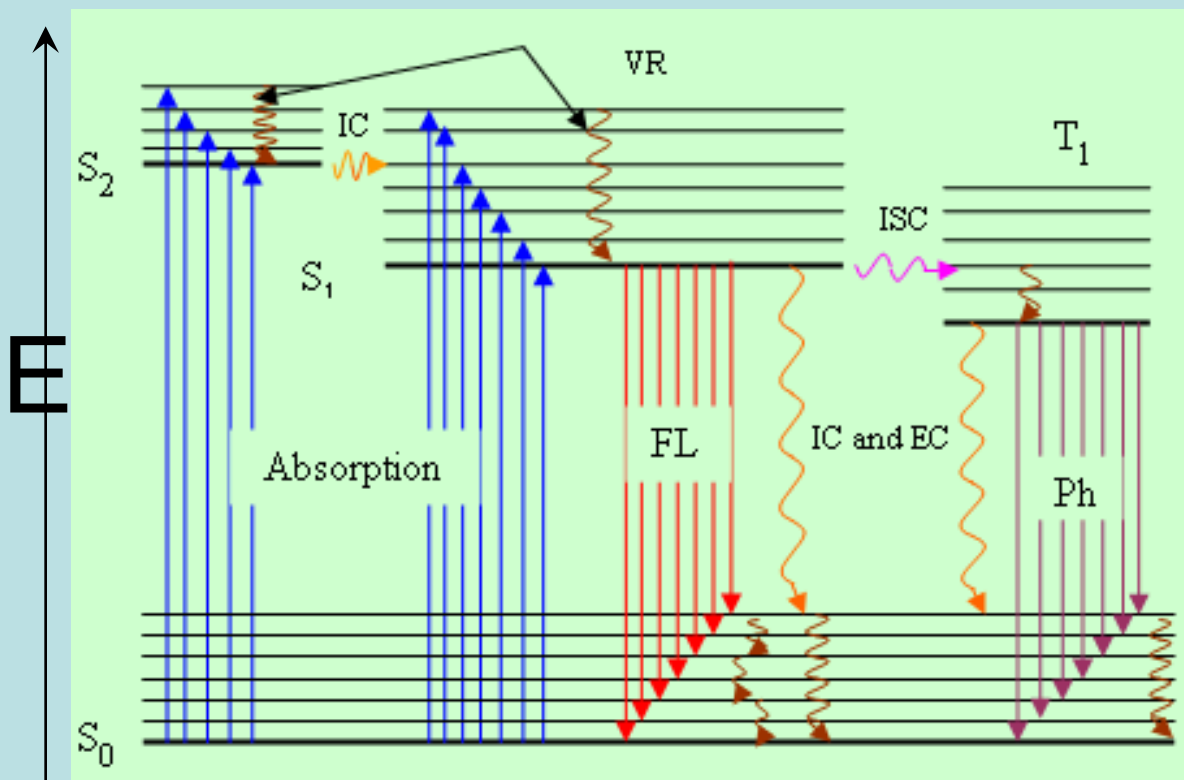
**EXCITAČNÍ**  
záření



# 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

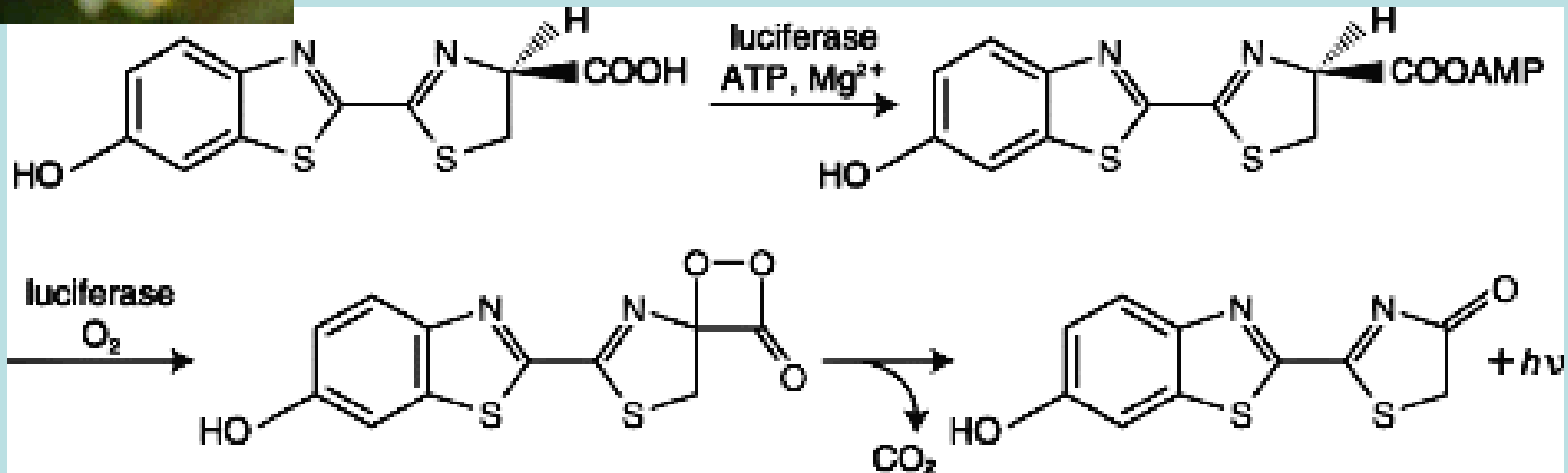
Světlušky, medúzy,  
dřevokazné houby,  
hlubokomořské ryby,.....





# Světluška

## princip: oxidace luciferinu



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

Luciferyl adenylát → Oxyluciferin + AMP + CO<sub>2</sub> + **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<sup>-9</sup> - 10<sup>-5</sup> s )

fosforescenci (10<sup>-2</sup> s až dny)

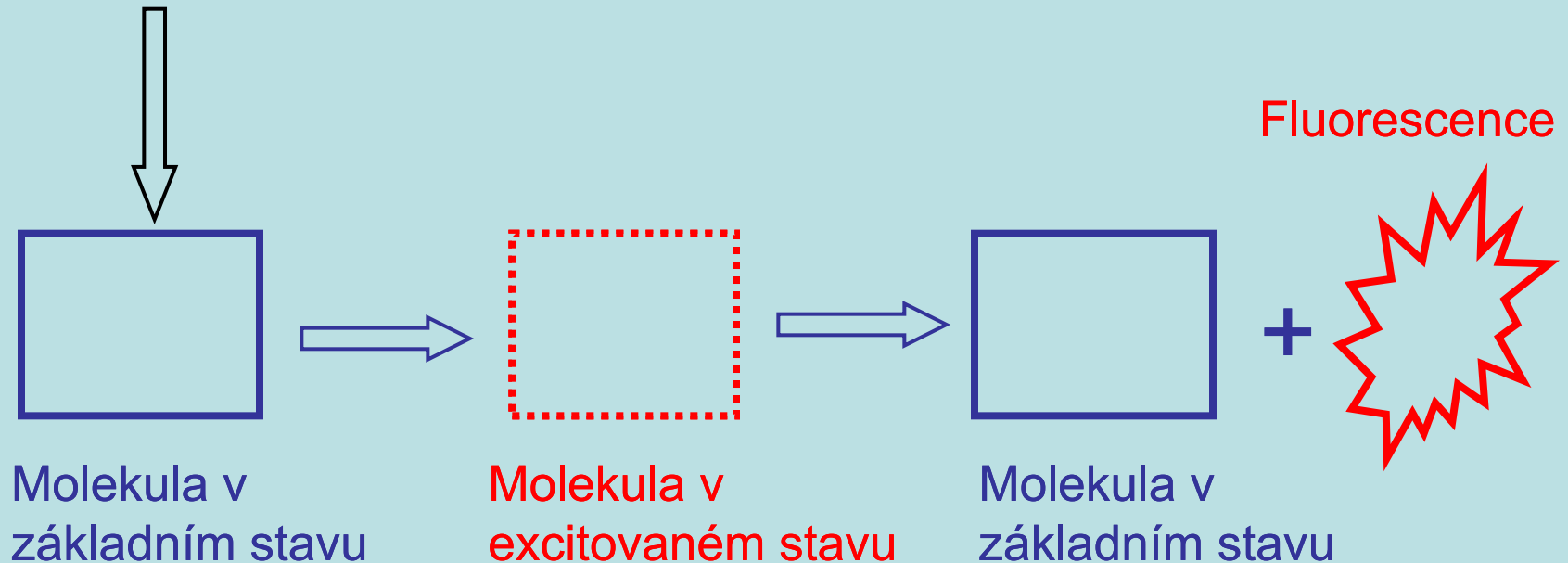
- Absorbce primárního záření v oblasti gama, rentgenového, ultrafialového nebo viditelného spektra

**Fluorimetrie** – absorbce UV záření

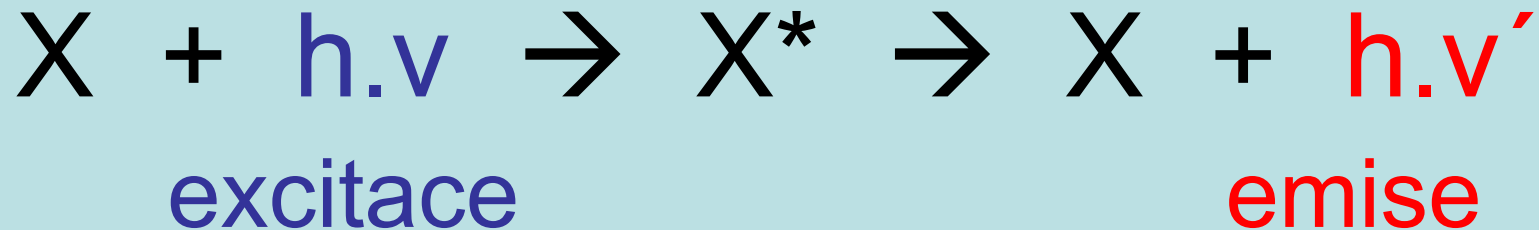
# Fotoluminiscence

*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



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

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

E (energie fotonu)

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

$\nu$  (frekvence)

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

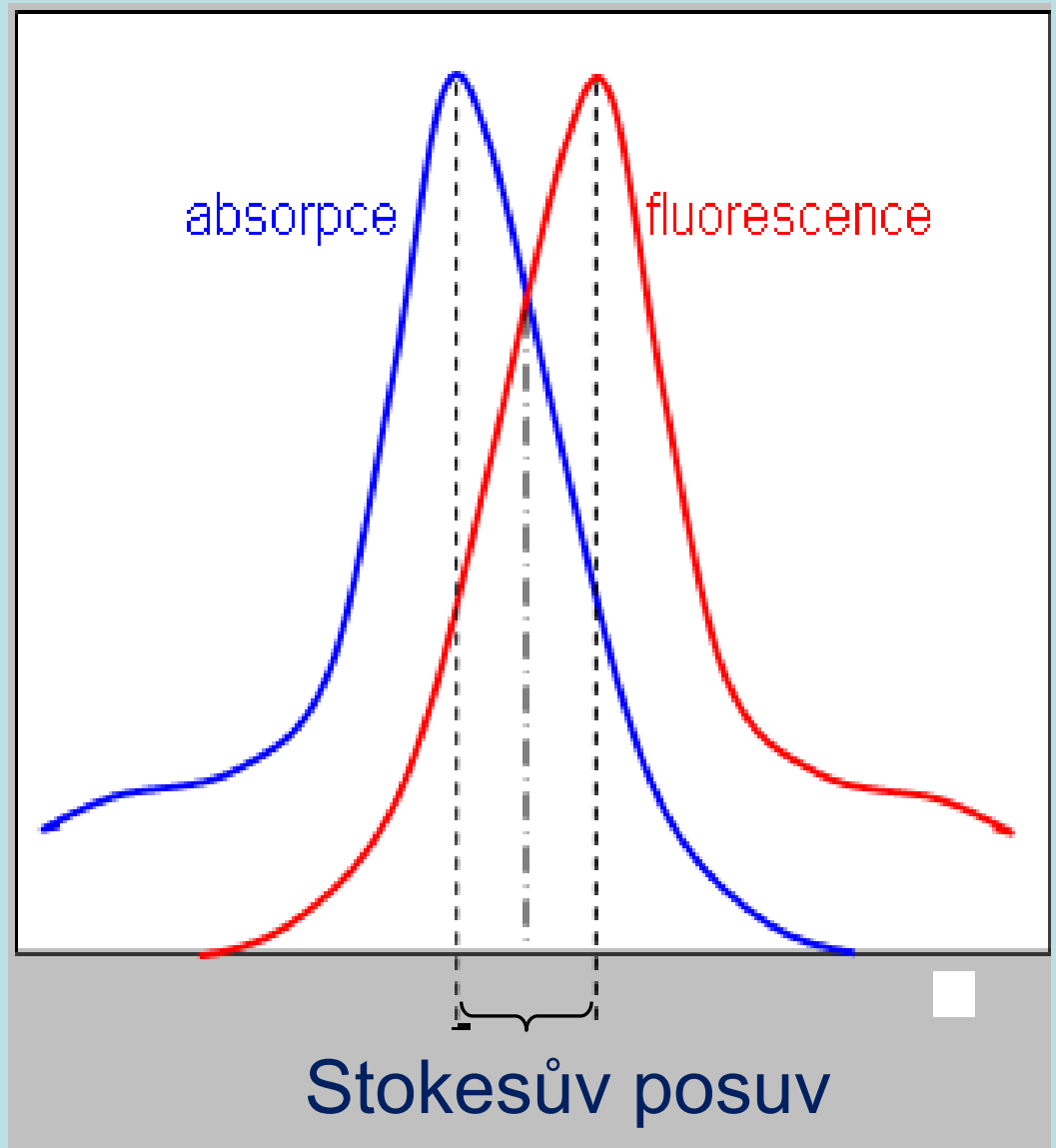
$\Lambda$  (vlnová délka)

# 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

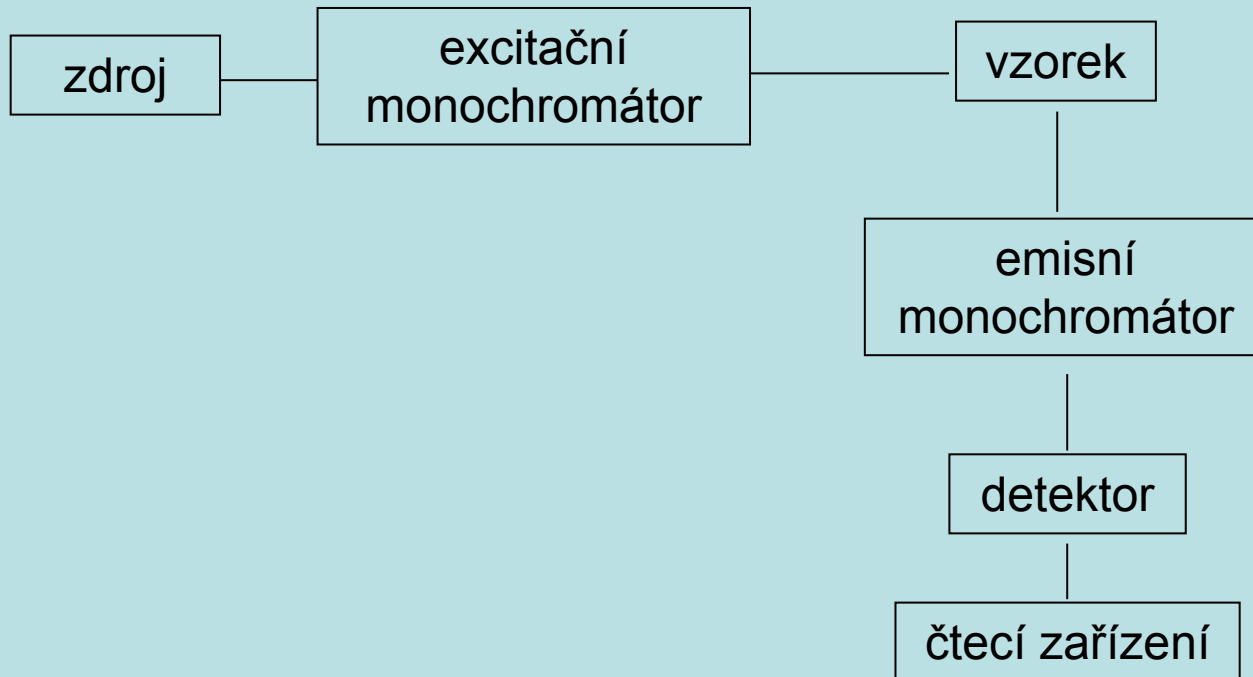
- luminiscenci konkuruje jiný děj, který vede k poklesu intenzity luminiscence
- všechny možné procesy zhášení ještě nejsou zcela vysvětleny

# Přístrojová technika

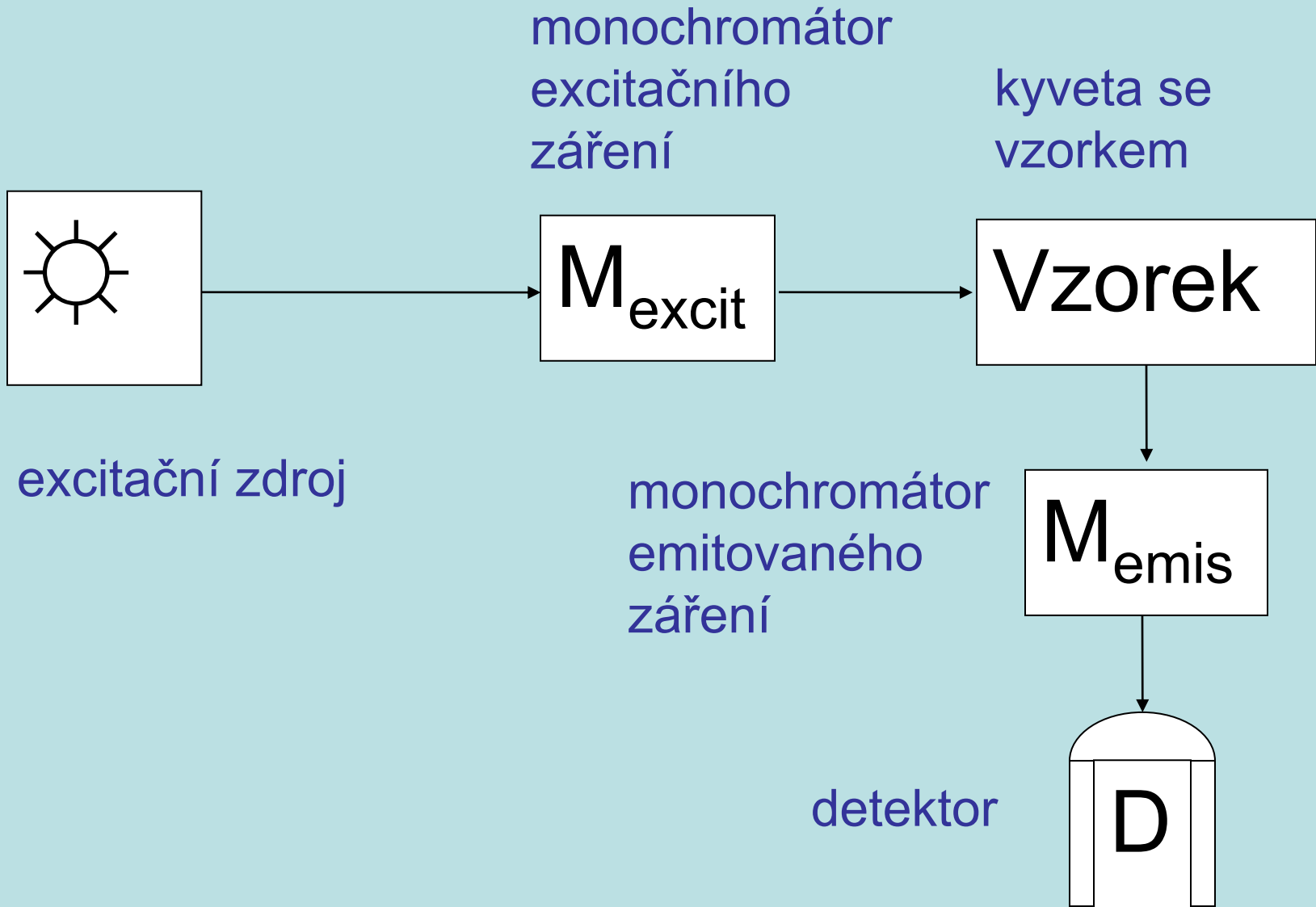
- **Zdroj excitačního záření** (Hg výbojka, halogenové výbojky, Xe výbojka, lasery).
- **Filtr** (Woodův filtr skla s příměsí NiO, CuO, CoO).
- **Měřicí prostor**
- **Interferenční filtr** propouštějící fluorescenční signál.
- **Detektor**

# Měření fluorescence

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



# Schéma fluorimetru



# Chemiluminescence

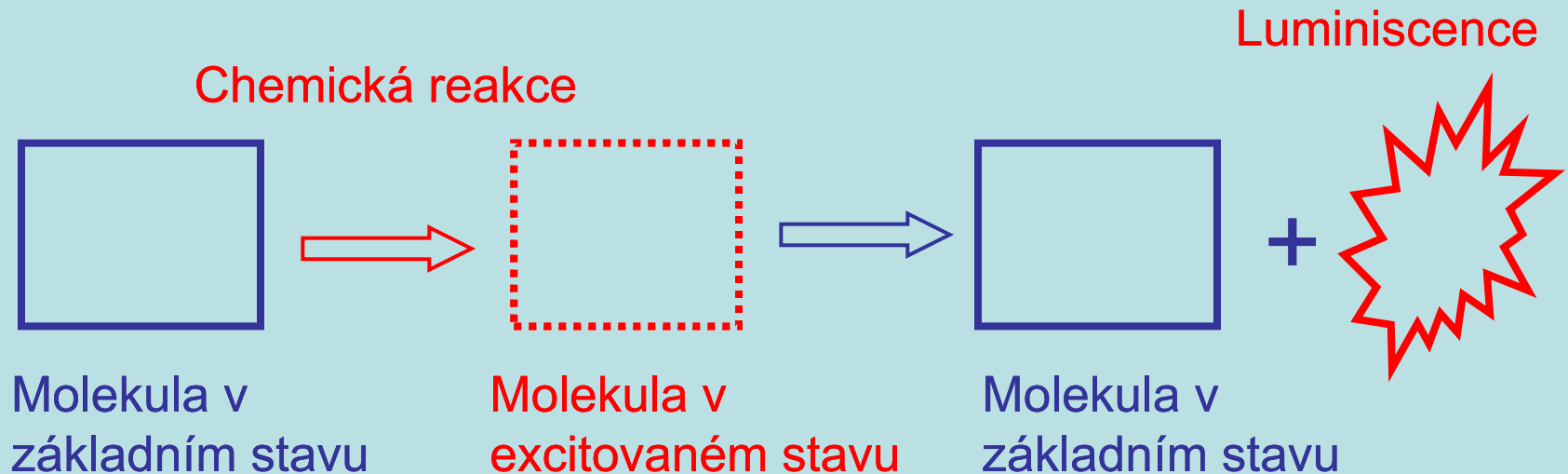
je vyvolána energií chemické reakce (většinou oxidace)

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<sup>+</sup>
- Karoteny
- Chinin
- Steroidy
- Aromatické aminokyseliny
- Nukleotidy
- Fluoreskující proteiny - GFP (green fluorescent protein)

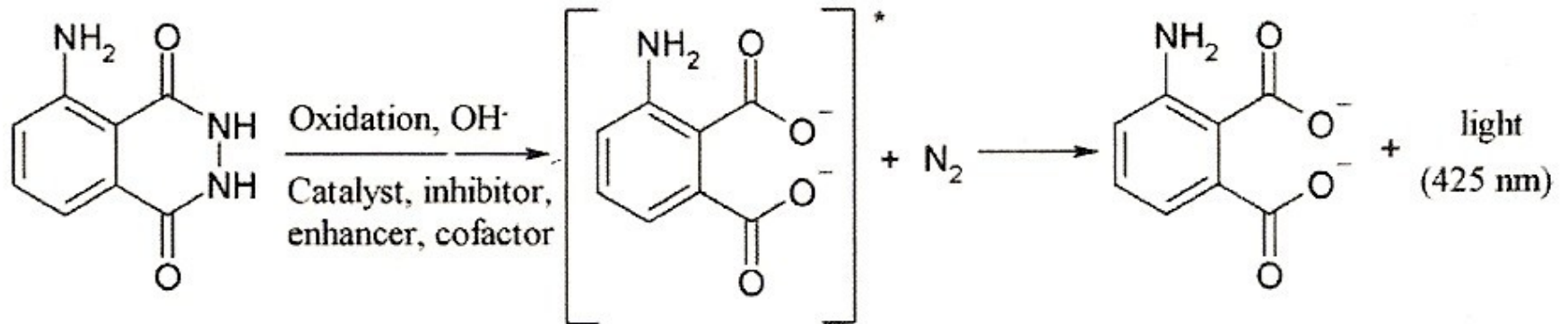


# Analytické luminofory/fluorofory

- 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

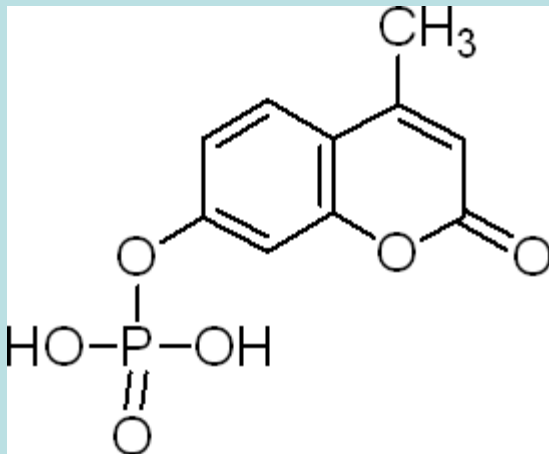


# Methylumbelliferon (MU)

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; HNO<sub>3</sub> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- změna prostředí na zásadité (NaOH)
- vznik nestabilní N-sulfonylpropylakridon v excitovaném stavu
- při přechodu do stabilní formy se uvolní CO<sub>2</sub> 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  $\text{Ru}^{2+}$  oxidován na  $\text{Ru}^{3+}$ ,  
zároveň je tripropylamin ( $\text{TPA}^+$ ) oxidován na radikál  $\text{TPA}^{\cdot+}$   
(má redukční vlastnosti,  
snadno redukuje  $\text{Ru}^{3+}$ komplex na  $\text{Ru}^{2+}$ ,  
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)



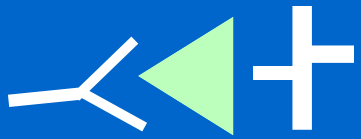
# FPIA

## Fluorescenční polarizační imunoanalýza Fluorescence Polarization Immunoassay

- Homogenní kompetitivní imunoanalýza, 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**

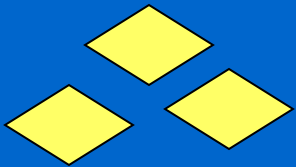




# FPIA

Nízká koncentrace analytu ...

vzorek



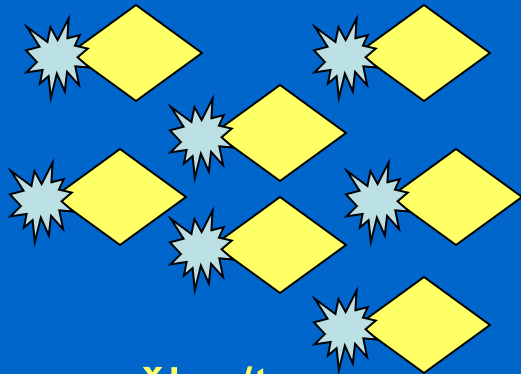
+

protilátka



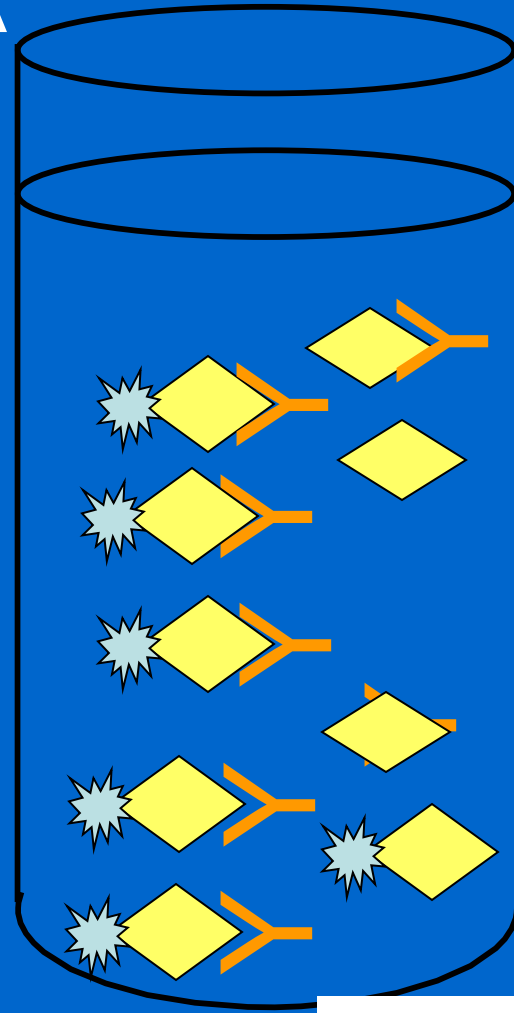
=

+

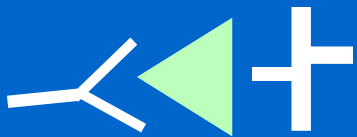


+

značka/tracer

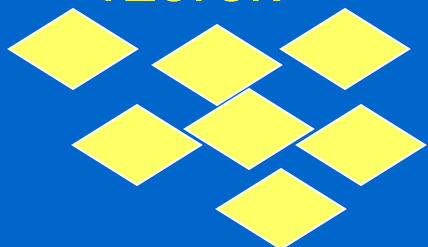


Vysoká polarizace



Vysoká koncentrace analytu ...

vzorek

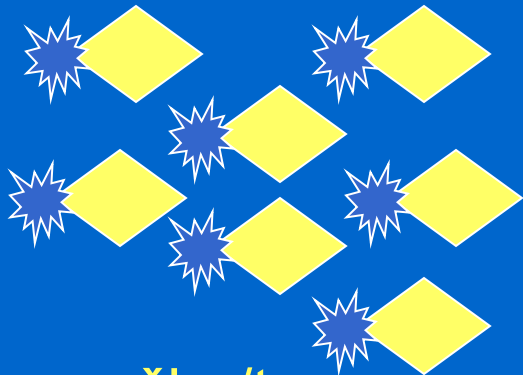


+

protilátka

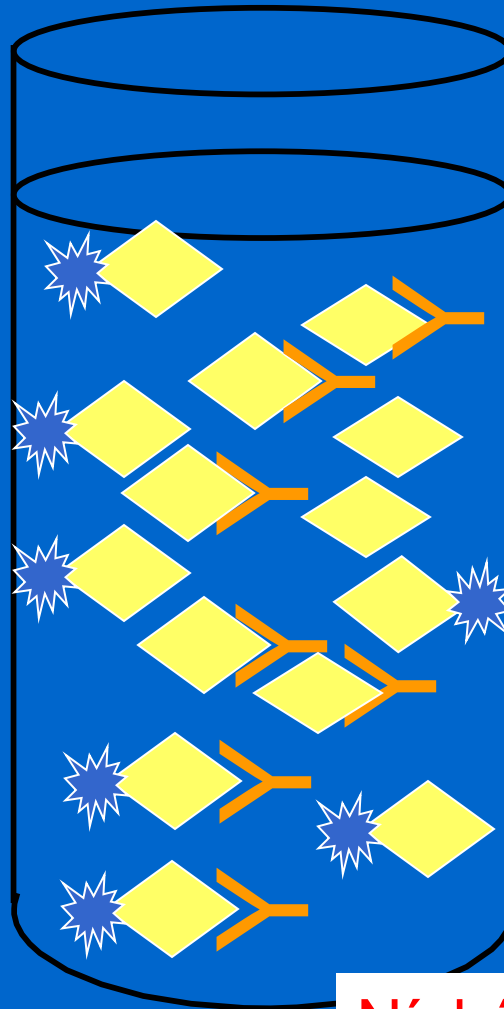


=



+

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  $\mu$ s prodleva

400  $\mu$ 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  $\text{Eu}^{3+}$  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

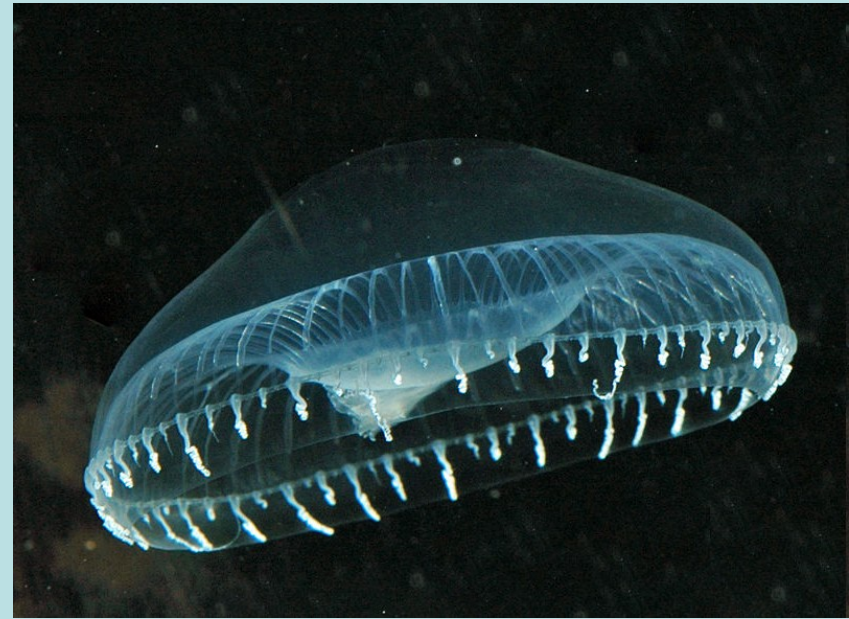
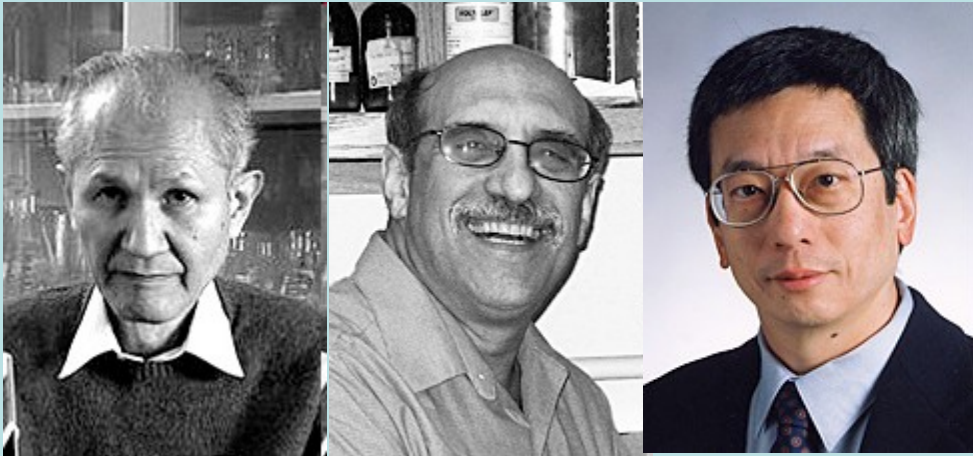
- Fluorescence In Situ Hybridization je cytogenetická metoda, která umožňuje detekci a lokalizaci konkrétních sekvencí DNA v chromosomech
- tato metoda je určena k mapování genů a sledování chromosomálních abnormalit, atd.
- pro detekci se využívá fluorescenční mikroskopie



# 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