

# **Fluorometrie, chemiluminiscence**

**Miroslava Beňovská, Petr Breinek**

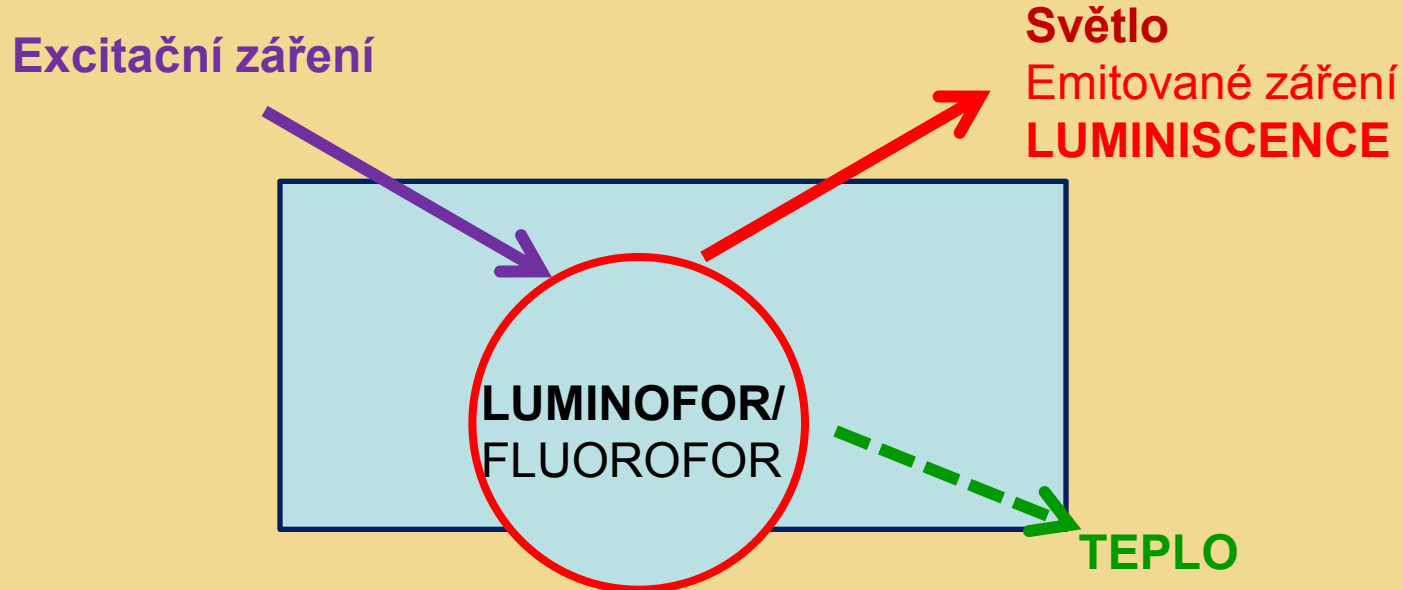
# Luminiscence

- Jev představující vyzařování přebytečné energie ve formě fotonů - dochází k němu při návratu excitovaných elektronů na základní hladiny
- Emise světla vzniká následně po excitaci atomů působením jiného záření, elektronů nebo při chemické reakci apod. a po jejich návratu do základního stavu
- Děj, při němž záření o kratší vlnové délce (větší frekvenci) vyvolává v látce určitého složení vznik záření o delší vlnové délce (nižší frekvenci)
- Část energie se vyzáří ve formě tepla (nesvítivé deexcitační procesy)

# Luminiscence

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!



# Druhy luminiscence

Luminiscence vzniká po dodání energie v různé podobě

- **Fotoluminiscence** – luminiscence je vyvolána elektromagnetickým zářením (zářivky) - do této kategorie patří **fluorescence** a **fosforescence**
- **Chemiluminiscence** – luminiscence je vyvolána chemickou reakcí (sem patří také bioluminiscence, kdy je emise světelného záření vytvořena živými organizmy – světlušky, medúzy)
- **Elektroluminiscence** – luminiscence je vyvolána elektrickým polem (reklamní panely, nouzové osvětlení)
- **Katodoluminiscence** – luminiscence je vyvolána dopadajícími elektrony (stínítko televizní obrazovky).
- **Termoluminiscence** – luminiscence je vyvolána vzrůstem teploty po předchozím dodání energie
- **Radioluminiscence** – luminiscence je vyvolána působením radioaktivního záření
- **Triboluminiscence** – luminiscence je vyvolána působením tlaku (při deformaci tělesa)
- **Sonoluminiscence** - vyvolána dopadem ultrazvuku

# Bioluminescence v přírodě

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



# Fotoluminiscence

- Podle délky trvání ▶ **fluorescence** ( $10^{-9}$  -  $10^{-5}$  s )  
▶ **fosforescence** ( $10^{-2}$  s až dny)
- Dochází k ní vlivem absorpce energie dopadajícího světelného záření
- Pokud po odstranění zdroje ozařování rychle vymizí ▶ fluorescence
- Pokud přetrvává (doznívá) i po odstranění zdroje ozařování ▶ fosforescence

# Fotoluminiscence



$X$  a  $X^*$  je základní a excitovaný stav molekuly  
 $h\nu$  a  $h\nu'$  dopadající a emitovaná světelná energie

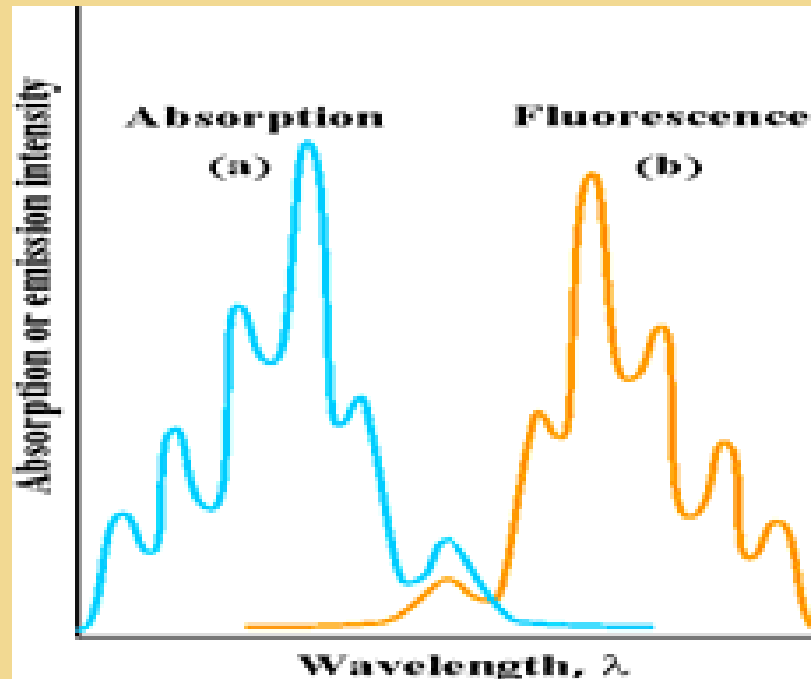
- Emitovaná energie záření je nižší než energie dopadajícího (primárního) záření
- Emitované (sekundární) záření má nižší frekvenci a delší vlnovou délku než světelné záření primární
- Rozdíl mezi vlnovou délkou excitačního a emitujícího záření - **Stokesův posun**

# Fluorescence

- Přejchod mezi tzv. povolenými stavy atomu
- K vyzáření **fotonů** dojde již za pár nanosekund (krátkodobé světélkování -  $10^{-8}$  až  $10^{-5}$  s).
- Představuje sekundární záření po absorpci elektromagnetického záření



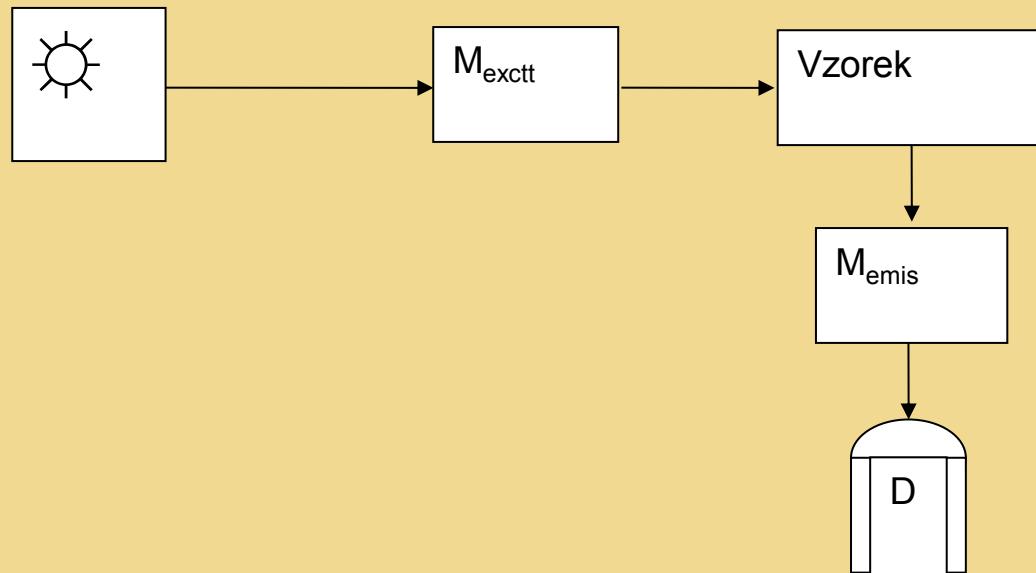
# Absorpční a fluorescenční spektrum



- Posunuto k delším vlnovým délkám než původní absorpční spektrum (**Stokesův posun**)
- Zaujímá zrcadlovou pozici  
**Stokesův posun** je rozdíl mezi vlnovou délkou excitačního (primárního) a emitovaného (sekundárního) záření

# Fluorimetr

- Zdroj světelného záření (xenonová, xenonová-rtuťová oblouková výbojka, laser)
- Monochromátor pro výběr excitačního záření
- Kyveta (křemenné)/vzorek
- Monochromátor pro sekundární (emisní) záření
- Detektor (fotonásobič)



# Přístrojová technika

Zdroje: xenonová oblouková výbojka  
xenonová-rtuťová oblouková výbojka  
laser

Kyvety: křemenné sklo  
křemen

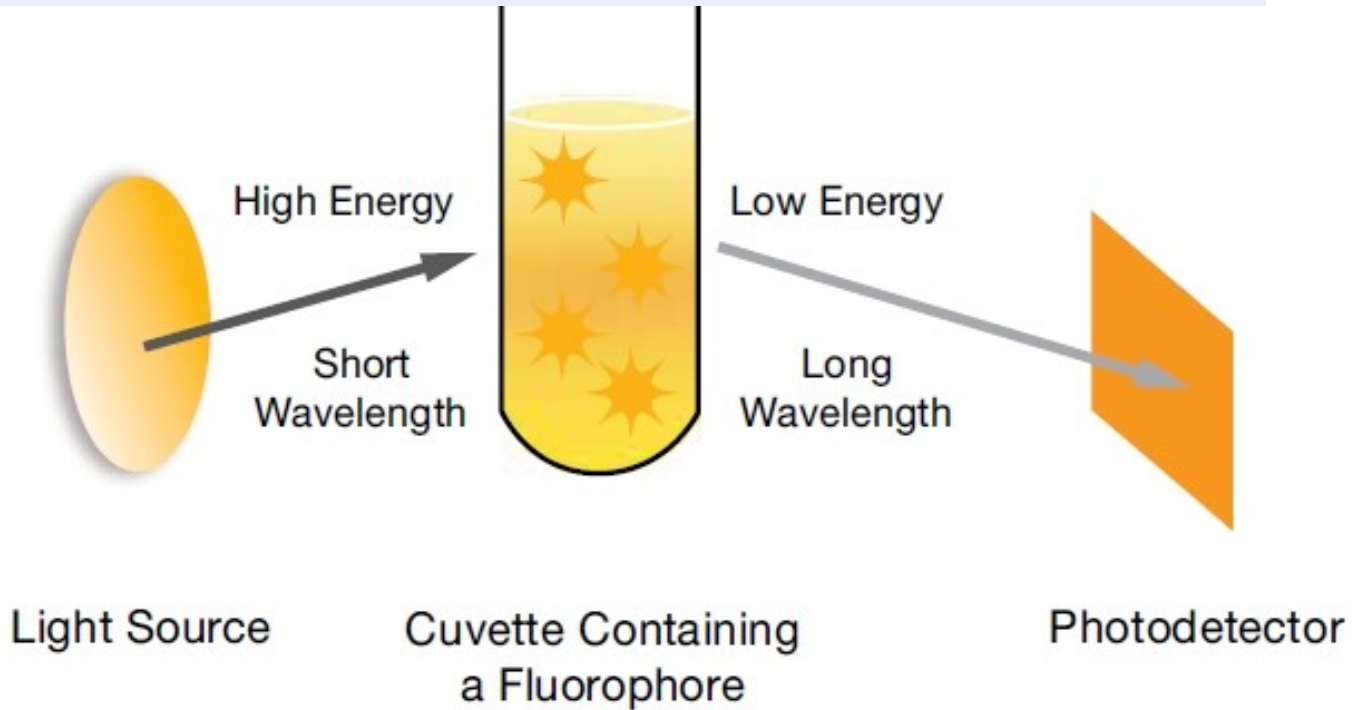
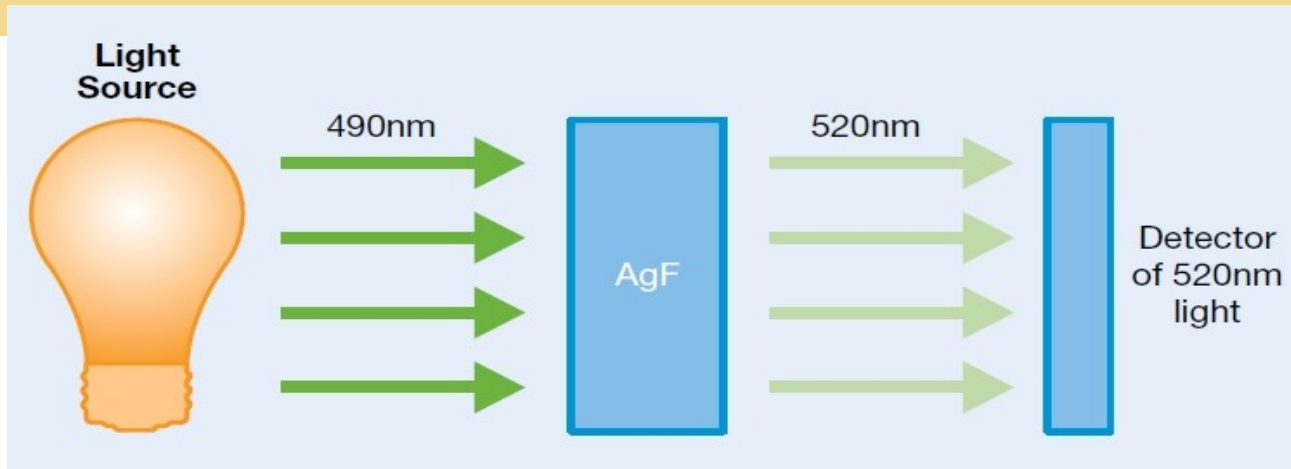
Detektor: fotonásobič  
kolmo ke směru dopadajícího  
primárního záření

Monochromátory

U imunoanal. metod se stejným fluorofem je nahrazuje:

**Interferenční filtr** propouštějící fluorescenční signál – fixní  
vlnová délka

# Fluorescence



# Měření fluorescence

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

# Fosforescence

- **Přechod tzv. zakázaný.**
- **Při fosforescenci se fotony vyzáří, ale trvá to až několik minut (dlouhodobé světélkování  $10^{-2}$  s až několik dní)**
- **Nemá v klinické laboratoři praktické využití**

# Chemiluminiscence

- Je luminiscence vyvolaná energií chemické reakce
- Vzniká vyzářením fotonu z molekuly luminoforu po jeho chemické oxidaci působením oxidantů ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2$ , ...)
- Dochází k produkci světelného záření excitovanými molekulami v průběhu chemické reakce
- Chemiluminiscence v živých organismech - bioluminiscence
- **$\text{A} + \text{B} \rightarrow \text{X}^* \rightarrow \text{P} + h\nu$**   
**A** a **B** jsou reaktanty, **X\*** je excitovaný meziprodukt, **P** je produkt v základním stavu a  $h\nu$  je energie emitovaného světelného záření
- Elektrochemiluminiscence - modifikace chemiluminiscence, luminiscence je generována chemickými reakcemi iniciovanými elektrochemicky

# Luminometr

- Skládá se z měrné komůrky a detektoru (fotonásobiče)
- Měrná komůrka (cela) se vzorkem a ostatními reaktanty obsahuje systém zrcadel – soustřeďují světelné záření na detektor
- Vznik záblesků světla - fotony
- Počet fotonů zachycuje citlivý fotonásobič



# Fluorofory, luminofory

- **Fluoreskující látky obsahují konjugované dvojné vazby**
- **Spontánně fluoreskuje málo biologických molekul - tryptofan a porfyriny**
- **Luminofory produkují záření při chemických reakcích**
- **V imunoanalýze jsou fluorofory a luminofory navázány jako značka na protilátky či antigeny nebo tvoří substrát, eventuelně vznikají až po jeho rozštěpení**

# Fluorofory, luminofory

## – často jako značka v imunoanalýze

### Příklady:

Akridin a jeho estery

Adamantyl dioxetan

Methylumbelliferon (MU)

Cheláty platinových kovů (ruténium)

Cheláty lanthanidů (europium)

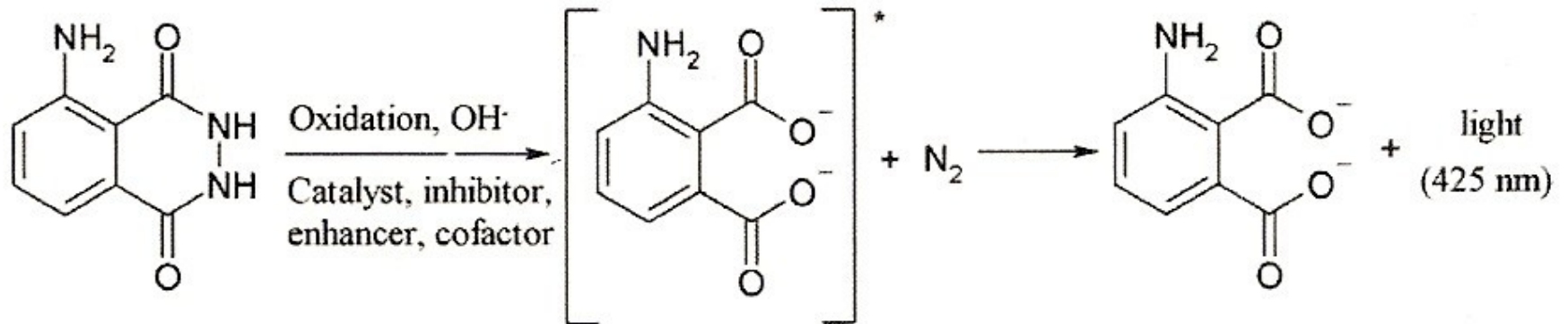
Luminol, isoluminol

Fluorescein

# Luminol (5-aminoftalhydrazid)



(1928) – oxidace v bazickém prostředí



Luminol

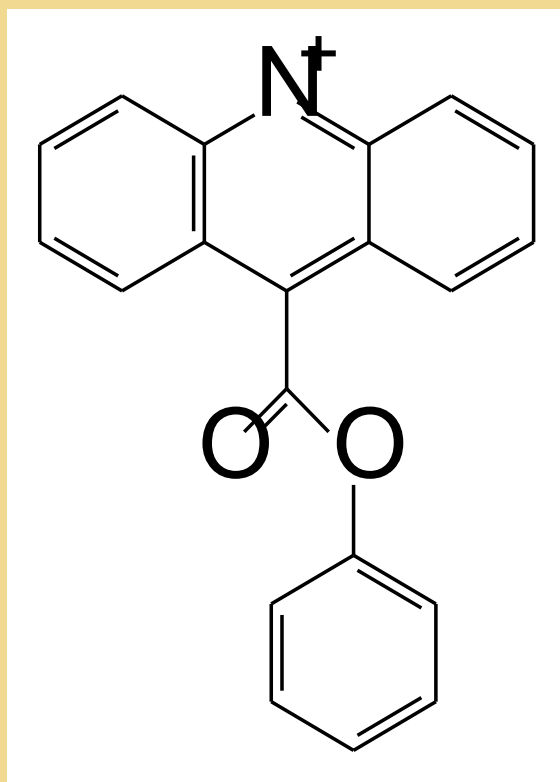


3-aminophthalate  
excited state

3-aminophthalate  
ground state



Ester akridinu  $\rightarrow$  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; 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)

# Využití luminiscence: Automatické imunochemické analyzátořy

- Spojení **luminiscenčních technik a imunoanalýzy** představují **automatické imunochemické analyzátořy**
- Na nich většina imunoanalytických metod v laboratorní medicíně
- Uplatnění biochemie, sérologie, transfúzní stanice
- Automatizace koncem 80. let
- Uplatnění pro analyty s nízkou koncentrací (nmol/l, pmol/l)
- Využití reakce antigen – protilátka
- Značená protilátka (případně antigen)
- Většinou heterogenní imunoanalýza (pevný povrch – paramagnetické částice, kulička)
- Doba analýzy 15 – 60 min
- Detekce s vysokou citlivostí (chemiluminiscence, elektrochemiluminiscence, fluorescence..)

# Jaká je výhoda při použití luminiscence?

## Vysoká citlivost metod

### ✓ Imunoanalytické metody

Např.

Kardiální markery (cTnI, cTnT, BNP, NT-proBNP)

Hormony (TSH, FT4, hCG, testosteron, prolaktin, ...)

Léky (digoxin, gentamicin, ...)

Tumorové markery (PSA, CEA, CA 125, AFP, ...)

### ✓ Chromatografie - detektor

# Luminiscenční

- Lumino Immuno Assay (**LIA**)
- Chemiluminescent Magnetic Immuno Assay (**CMIA**)
- Immuno Lumino Metric Assay (**ILMA**)
- ElectroChemiLuminiscence (**ECL**)



# Fluorescenční

- **Fluorescence Immuno Assay (FIA)**
- **Fluorescence Polarization Immuno Assay (FPIA)**
- **Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoro Immuno Assay (DELFI A)**
- **Time Resolved Amplified Cryptate Emission (TRACE)**

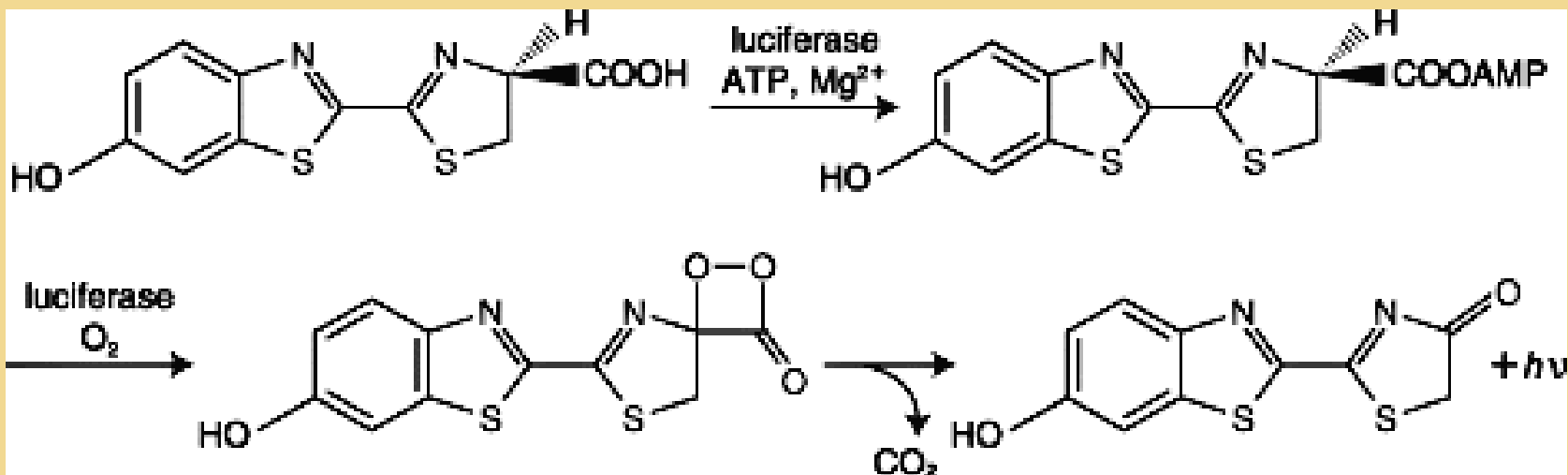
# Citlivosti metod

<b>Metoda</b>	<b>(g)</b>
EMIT	$10^{-6}$
FIA, FPIA, EIA	$10^{-9}$
RIA, REA, IRMA	$10^{-12}$
LIA, ILMA	$10^{-15}$



# Světluška

## Princip: oxidace luciferinu

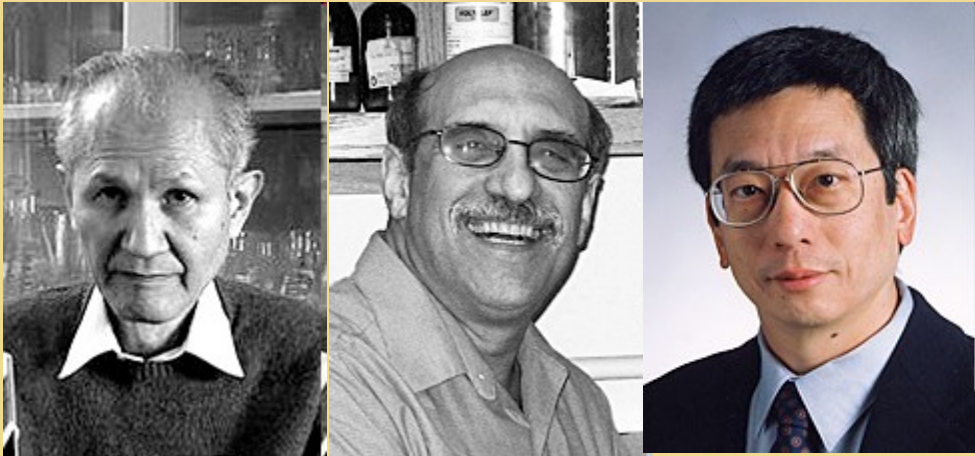


**Luciferin** + ATP → Luciferyl adenylát (**enzym luciferáza**)

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).

# 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)

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



# FISH

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

„Není Fish jako FISH“



# FISH - princip

- 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