

FIA a CIA

FIA fluorescenční imunoanalýza
(fluorescence immuno-assay)

CIA chemiluminiscenční imunoanalýza

Značky pro antigeny a protilátky:

- ❖ radioizotop
- ❖ enzym
- ❖ fluorescenční sonda
- ❖ luminiscenční sonda
- ❖ kovové částice (Au nebo Ag)

FIA

Princip: stejný jako RIA a EIA metody značku tvoří fluorescenční sonda.

Fluorescenční sondy:

- ✓ **Fluorescein-isothiokyanát (FITC)**
- ✓ **Tetramethyl-rhodamin-isothiokyanát (TMRITC)**

Detekce:

- ✓ **fluorometry**
- ✓ **počítače fotonů**

Luminiscence

**excitace atomů působením jiného záření, elektrony...
a následným návratem atomu do základního stavu,
čímž dojde k vyzáření fotonu**

fluorescence:

**po odstranění zdroje záření – záření vymizí
fluorescence – přechody mezi povolenými stavy,
nic nebrání vypouštění fotonů již za pár nanosekund**

fosforescence:

**po odstranění zdroje záření, záření pokračuje
fosforescence je přechod zakázaný, nic však fotony
nezadrží, takže i při fosforescenci dojde k vyzáření
fotonů, ale někdy to trvá i pár minut**

druhy luminiscence:

- ✓ foto-luminiscence - vyvolá foton
- ✓ elektro- - elektrické pole
- ✓ katodo- - proud elektronů
- ✓ chemi- - chemická reakce
- ✓ bio- - živými organismy
- ✓ termo- - tepelné záření
- ✓ radio- - jaderné záření
- ✓ tribo- - působením tlaku
- ✓ sono- - zvukem
- ✓ mechano- - mechanicky



bioluminescence

sekundární záření fluorescence a fosforescence emise

doba:

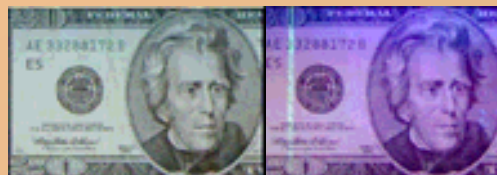
- ✓ fluorescence: $10^{-8} - 10^{-5}$ s
- ✓ fosforescence 10^{-2} s – několik dní

sloučeniny, které emitují světlo:

- ✓ anorganické soli (soli vzácných zemin, uranylu)
- ✓ organické látky z aromatickými cykly



fluorescenční
barviva
chininsulfát

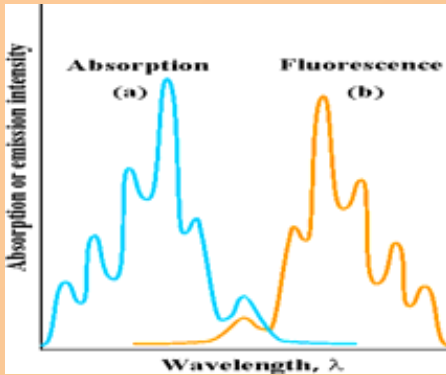


bankovky



nápoj tonik

ztráta energie mezi absorbcí a emisí



fluorescenční emisní spektrum

✓ posunuto k větším λ

(30-50nm) Stokesův posun

✓ je k němu zrcadlově symetrické

fosforescenční emisní spektrum

✓ větší posun až 200 nm

Základní charakteristika fluorescenčních molekul:

- ❖ **vlnová délka maxima absorpčního (excitačního) světla**
- ❖ **vlnová délka maxima emisního světla**
- ❖ **molární absorpční koeficient**
- ❖ **kvantový výtěžek (poměr mezi počtem absorbovaných a vyzářených fotonů)**
- ❖ **fluorescenční čas (délka trvání fluorescence po excitaci)**

Vlastnosti nejvýznamnějších fluorescenčních sond FIA

Sonda	Vlnová délka maxima (v nm)		ϵ (L/mol)	Kvantita- tívný výťažok	Fluorescen- čný čas (ns)
	absorpcie	emisie			
Fluoresceini- zotiokyanát — FITC	492	520	7×10^4	0,85	4,5
Rodamin B izotiokyanát — RBITC	550	585	$1,2 \times 10^4$	0,70	3,0
Tetrametylo- daminizotio- kyanát — TMRITC	550	580	5×10^4	0,60	1,0
Umbeliferóny	380	450	2×10^4		
Fluoreskamin	394	475	$6,3 \times 10^3$	0,10	7,0
2-metoxy-2,4- -difenyl-3(2H)- -furanón — MDFP	390	480	$6,4 \times 10^3$	0,10	
Porfyriny	400 až 410	619 až 633			
Chlorofyly	430 až 453	648 až 669			
Fykobilipro- teíny	550 až 620	580 až 660	7×10^5 až $2,4 \times 10^6$	0,50 až 0,98	

Zdroj excitačního záření: laserové zdroje

Citlivost FIA: vysoce citlivá metoda
ale biologické materiály (proteiny) mohou
v menší míře fluoreskovat, zvyšuje se hodnota
fluorescenčního pozadí.
citlivost 10^{-9} až 10^{-12} mol.l⁻¹

Požadavky kladené na fluorescenční sondy:

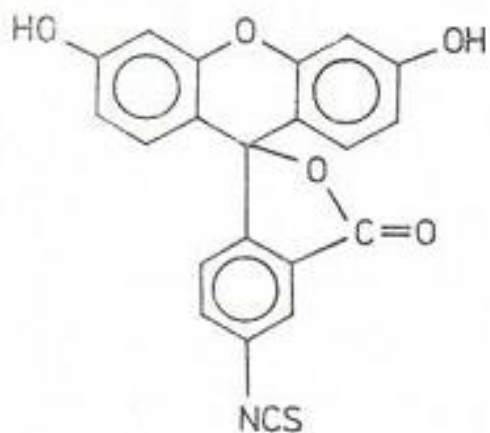
- ✓ musí mít vysokou intenzitu fluorescence
- ✓ fluorescenční signál musí být odlišitelný od pozadí
- ✓ vazbou na Ag nebo Ab se nesmí měnit její vlastnosti

Speciální fluorescenční sondy:

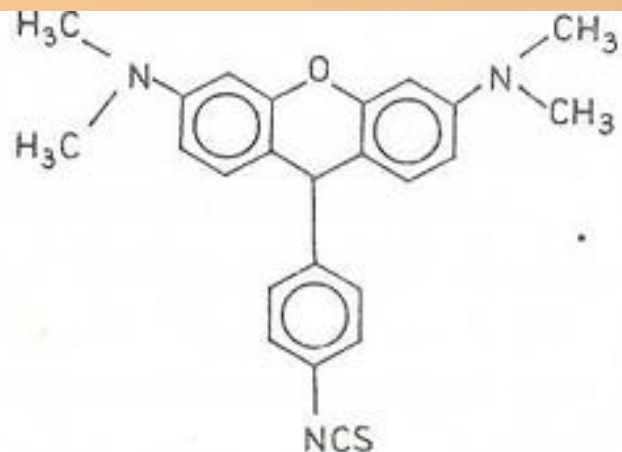
vzácných zemin a jejich cheláty

detekce antigenů a protilátek : citlivost: 10^{-14} mol/l

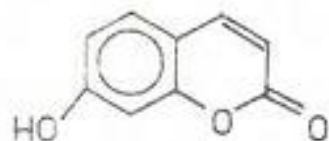
Struktura některých fluorochromů



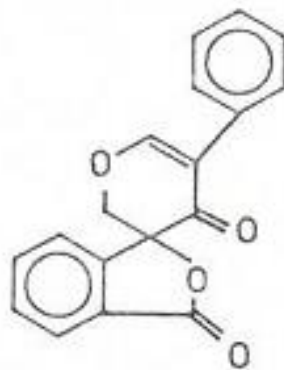
FITC



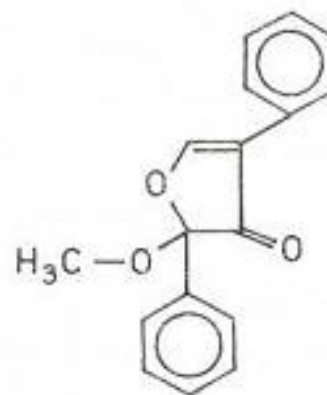
TMRITC



UMBELIFERÓN



FLUORESKAMÍN



MDPF

Rozdělení FIA metod

- ❖ heterogenní
- ❖ homogenní

Heterogenní FIA

**Volné označené Ag nebo Ab
oddělit od vázaných v imunokomplexech.**

Separace:

- ❖ **separační FIA**
 - precipitace
 - označený reaktant v tuhé fázi
- ❖ **Sendvičové techniky v tuhé fázi s označenými Ab
imunofluorometrické analýzy IFMA**

Separční fluoroimunoanalýza (Sep-FIA)

kompetice mezi označeným a neoznačeným Ag
o limitované množství protilátek.
Někdy je možné označit i Ab.

Oddělení imunokomplexů:

- ✓ sekundární protilátka
 - síran amonný
 - polyethylenglykol
 - ✓ nejčastěji:
- málo se používá
(zvyšuje se fluorescence pozadí)
zakotvení jednoho z reaktantů
na tuhou fázi

tuhá fáze - mikročástice

- ✓ polysacharidy
- ✓ polyakrylamid
- ✓ polystyren
- ✓ magnetické

Postup:

- ❖ na částice se naváže reaktant
- ❖ proběhne reakce
- ❖ částice oddělí centrifugací
- ❖ změří se fluorescence částic

Význam:

komerční soupravy pro stanovení léků, hormonů

Magnetické částice

- ✓ **polyglutaraldehydové kuličky s příměsí ferofluidu (disperze Fe_3O_4) a FITC**
- ✓ **směs niklu obalených antigenem, polystyrenem a FITC**

separace pomocí magnetického nebo gravitačního pole

Imunofluorometrická analýza (IFMA)

Princip:

Stanovení antigenu:

- ✓ na tuhou fázi se imobilizuje primární protilátka
- ✓ ze vzorku se navazuje specifický antigen (mikrob, vir, protein, proteohormon)
- ✓ množství navázaného vzorku se kvantifikuje pomocí označené sekundární protilátky (sendvičová technika).

Stanovení protilátek: na tuhou fázi se naváže antigen, který ze vzorku vychytává specifické protilátky a ty se kvantifikují pomocí antiizotypových označených protilátek.

Tuhá fáze pro IFMA: polyakrylamidové kuličky nebo disky polymethakrylátu nebo acetátnitrátu celulosy.

Homogenní FIA

nevyžaduje oddělení volného a v imunokomplexu vázaného Ag před měřením fluorescence
většinou jsou založeny na kompetitivním principu.

Využití:

- ✓ stanovení Ag o vysoké koncentraci (mg/l)
- ✓ stanovení haptenu (100 x nižší koncentrace)

Princip:

vazba Ab způsobí změny ve fluorescenčních vlastnostech označeného Ag

Využívá se

- ❖ fluorescenční polarizace
- ❖ zhášení
- ❖ stupňování fluorescence (zvyšování)
- ❖ excitační přenos
- ❖ označený substrát

❖ **Fluorescenčně-polarizační imunoanalýza (FPIA)**

- ✓ když se použije na ozáření polarizované světlo imitují se také polarizované fotony
- ✓ když se fluorofor naváže na haptenu, jeho náhodné rotace snižují polarizační signál.
- ✓ pokud se naváže konjugát na specifickou Ab, rotace se zpomalí, čím se polarizační signál zesílí

jen pro hapteny do 20 kDa

Firma Abbott dodává automatický fluorimetrický přístroj na stanovení různých léků a hormonů (kardiotonika, antihistaminika, cytostatika, opiáty, antibiotika)

20 analýz za 10 minut

digoxin (0,2 µg/l)

❖ **Stupňování fluorescence**

po vazbě Ag na specifickou Ab se fluorescence zvyšuje

**fluorescenční sonda: dansylové deriváty
např. kyselina anilinnafthalensulfonová**

❖ **Zhášení fluorescence**

(fluorescence quenching immunoassay)

používají se fluoresceinové deriváty, jejichž fluorescence se sníží (zhášejí) po navázání specifické Ab (zhášejí po nespecifické konjugaci s proteiny)

- navazují se na specifické antifuoresceinové protilátky (zhášení)
- antigen označený FITC reaguje s příslušnou protilátkou

Dvě modifikace:

- ✓ **FIA s přímým zhášením**
- ✓ **FIA s nepřímým zhášením**

Přímé zhášení:

reaguje haptén nebo Ag označený FITC s Ab

Pro kvantifikaci hapténů (opiáty, antibiotika, hormony)
a pro některé kompletní antigeny (Ig a albumin)
reaguje Ag nebo H označený FITC s Ab proti Ag nebo H.

Nepřímé zhášení:

O značený antigen soutěží dvě protilátky:

jedna Ab je specifická

pro analyzovaný Ag a druhá je proti FITC

žádný volný Ag: zhášení je nejmenší

vysoká c Ag: antiFITC reagují s fluoroforem (zhášení).

Použití ke stanovení velkých antigenů.

❖ **Fluorescenční imunoanalýza
s excitačním přenosem FETIA**
(Fluorescence excitation transfer immunoassay)

Dvě fluorescenční značky: FITC a TMRITC

s odlišnou vlnovou délkou fluorescence

Jedna značka označení Ag a druhá Ab

**FITC má vlnovou délku emise stejnou, jako
je vlnová délka excitace TMRITC**

**V imunokomplexech fluorescenci FITC
pohlcuje TMRITC**

Na základě fluorescence TMRITC se zjistí konc. Ab

Z poměru FITC/TMRITC se určí koncentrace Ag

Použití: stanovení proteinů i hapténů

❖ Fluoroimunoanalýza s označeným substrátem

SLFIA (*substrate labeled fluoroimmunoassay*)

Ag se označí **fluorogenem** (dvě složky):

- ✓ substrát určitého enzymu
- ✓ prekurzor fluoroforu (schopný fluorescence)

enzym se nachází v roztoku

Ag značený fluorogenem reaguje s Ab

(sterické důvody nedovolí přístup enzymu k fluorogenu
žádná fluorescence)

přidá neznačený Ag = z komplexu se uvolní
značený Ag, ke kterému už má enzym přístup,
rozštěpí fluorogen a vzniká fluorescence

fluorogen: galaktosylumbeliferon

enzym: β -galaktosidasa

Použití: komerční soupravy pro nízkomolekulární léky
stanovení některých proteinů



fluorimetr

Chemiluminiscenční analýza (CIA)

Při některých exergonických chemických reakcích vzniká viditelné záření
meziprodukty nebo konečné produkty jsou v excitovaném stavu, vracejí se do základního stavu za emise záření.

Bioluminiscence

reakce probíhá v živých organismech
většinou ji katalyzuje luciferasa, která rozkládá substrát luciferin



Luminiscence

```
graph TD; L[Luminiscence] --> C[Chemiluminiscence]; L --> B[Bioluminiscence]; L --> F[Fluorescence]; C --- C2[ ]; B --- B2[ ]; F --- F1[ ]; F --- F2[ ];
```

Chemiluminiscence

Bioluminiscence

Fluorescence

Chemiluminofory

látka která je schopná chemiluminiscence

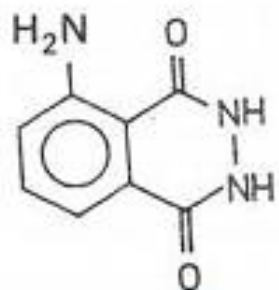
- ✓ luminol
 - ✓ izoluminol
 - ✓ akridinové estery
 - ✓ aromatické hydrazidy
- CIA** značka, která se mění
(při reakci se spotřebovává)

katalyzátory

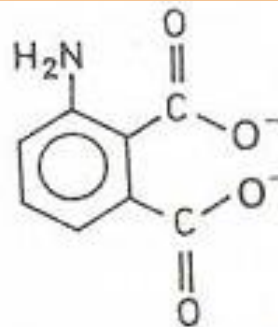
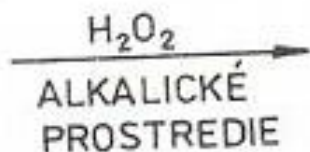
- ✓ peroxidasa
 - ✓ luciferasa
- značka, která se nemění**

Stupeň chemiluminiscence se měří **luminometry**

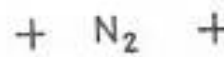
Oxidace luminolu a struktura izoluminolu a akridinových esterů



LUMINOL

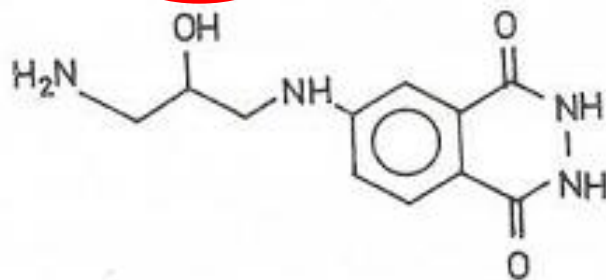


AMINOFTALÁTOVÝ DIANIÓN

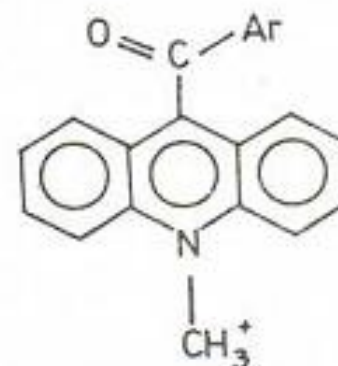


MODRÉ SVETLO

pH 10-11



IZOLUMINOL



AKRIDÍNOVÉ ESTERY

Aromatické hydrazidy

Chemiluminiscenční imunoanalýza

značka: luminol, izoluminol značka, která se mění
vazba na Ag , haptén nebo Ab
stejné uspořádání jako při heterogenní EIA

Příklad analýzy:

- ✓ označí se Ag (luminolem)
- ✓ heterogenní uspořádání
- ✓ kompetitivní reakce (označený Ag v přítomnosti neoznačených standardních a neznámých množství Ag)
- ✓ oddělí se imunokomplexy
- ✓ reakce s oxidačním činidlem (H_2O_2 , alkalické prostředí)
- ✓ vzniklé světlo se měří na luminometru

Použití: pro stanovení hapténů (hormonů)

Citlivost: srovnatelná s RIA

Luminiscenční technika s Ag v tuhé fázi SPALT (*solid-phase antigen luminescence technique*)

- ✓ značka na Ab
- ✓ antigen imobilizace na pevnou fázi (polystyrenové kuličky)
- ✓ vznik komplexů
- ✓ přidá se oxidační činidlo a katalyzátor
- ✓ vznik luminiscence, měří se luminometry

obměna:

Místo specifické Ab se může chemiluminoforem značit i sekundární Ab (sendvičové uspořádání)

Chemiluminiscenční imunoanalýza

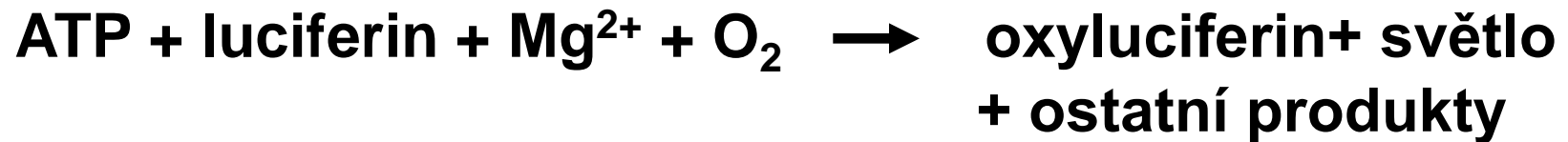
značka: peroxidasa, luciferasa značka, která se nemění

Peroxidasa nahrazuje katalyzátor a urychluje oxidaci luminolu peroxidem vodíku na aminoftalátový dianion.

- ❖ Ag nebo Ab se označí peroxidasou, ale nezjišťuje se jeho aktivita jako u EIA.
- ❖ Množství peroxidasou značeného imunokomplexu se detekuje (přidá se H_2O_2 + luminol)
- ❖ měří intenzita vzniklé chemiluminiscence

Stanovení ATP

Luciferasa je enzym, který katalyzuje bioluminiscenci svatojánských mušek. V CIA metodách se moc nepoužívá, ale umožňuje citlivé stanovení ATP:



Použití:

- ✓ přímé stanovení ATP,
- ✓ určování životnosti buněk (živá buňka, obsahuje ATP)



Luminometr formát Orion



**fy EAST
PORT**

**mikrodestičkový, počítač fotonů
moderní fotonásobiče**



fluoroscan luminoscan

fy Trigon Plus