

# OPTICKÉ SENSORY

Základem je interakce světelného záření s chemickými látkami.

Při konstrukci katalytických biosensorů se používají:

optické techniky:

- ❖ absorbance
- ❖ fluorescence
- ❖ luminiscence

Při konstrukci afinitních sensorů se používají:

- ❖ techniky nelineární optiky

## Optické měřicí techniky

- ❑ detektory
- ❑ zdroje světla

### detektory

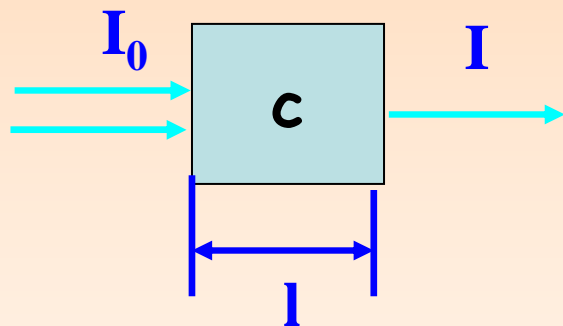
- ✓ fotonásobiče (nejcitlivější, ale vysoké napětí)
- ✓ fotodiody typu „avalanche“ (méně citlivé, šum)
- ✓ obyčejná dioda (1000x méně), velký šum, levné  
mechanicky stabilní, pro přenosná zařízení

### zdroj světla

- ✓ laser
- ✓ světloemitující diody (LED)
- ✓ výbojky (UV)
- ✓ lampa

## Absorbční spektrofotometrie

Pokles intenzity světelného paprsku po průchodu měřicí kyvetou je úměrný koncentraci stanovené látky. Rozptyl světla se obvykle zanedbává.

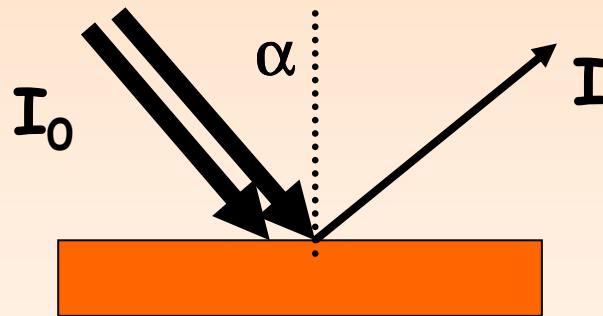


Lambert-Beerův zákon

$$A = \ln(I_0/I) = \epsilon \cdot c \cdot l$$

## Reflektivní techniky

- ✓ odraz světla od vhodného povrchu (opticky hustší)
- ✓ při totálním odrazu světla proniká část energie ve formě exponenciální vlny do spodních vrstev, což se využívá při studiu povrchových dějů.



## 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

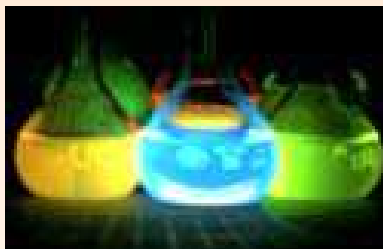
## emise

doba:

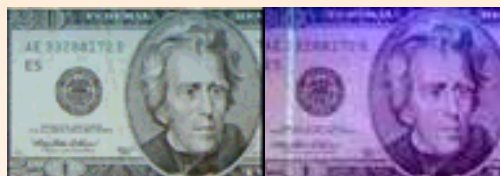
- ✓ fluorescence:  $10^{-8}$  –  $10^{-5}$  s
- ✓ fosforescence  $10^{-2}$  s – několik dní

sloučeniny, které emitují světlo:

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



fluorescenční  
barviva  
chininsulfát



bankovky

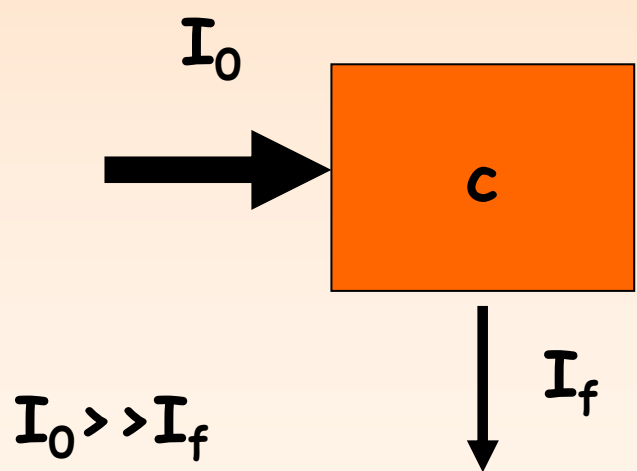


nápoj tonik

## Fluorescence

molekula absorbuje energii a přechází do excitovaného stavu, návrat do základního stavu je doprovázen emisí záření = fluorescence

**budící záření** - laser  
- polarizované záření

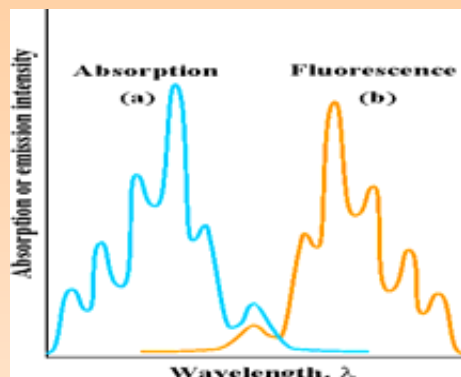


$$I_f = k \Phi_f \epsilon c l$$

$\Phi_f$  - kvantový výtěžek

$c$  - koncentrace fluoreskující látky

## ztráta energie mezi absorbcí a emisí



### fluorescenční emisní spektrum

- ✓ posunuto k větším  $\lambda$   
(30-50nm) Stokesův posun
  - ✓ je k němu zrcadlově symetrické
- ### fosforescenční emisní spektrum
- ✓ větší posun až 200 nm

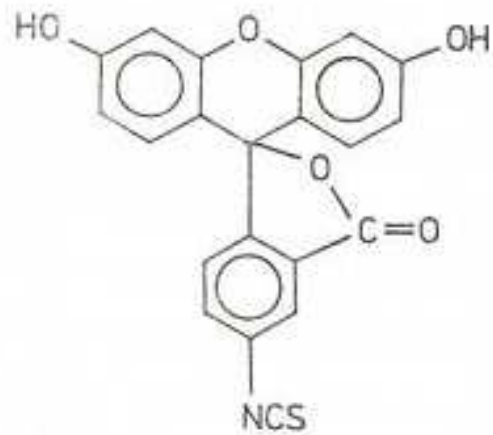
## **Základní charakteristika fluorescenčních molekul:**

- ❖ 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)

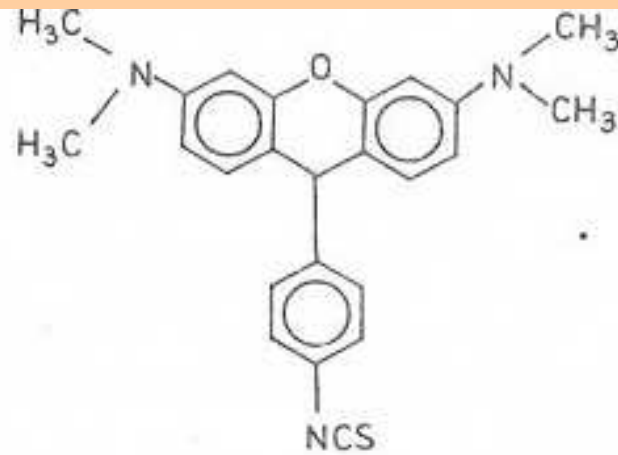
## Vlastnosti nejvýznamnějších fluorescenčních sond FIA

Sonda	Vlnová délka maxima (v nm)		$\epsilon$ (L/mol)	Kvantita- tivny výťažok	Fluorescen- čný čas (ns)
	absorpce	emisie			
Fluoresceini- zotiokyanát — FITC	492	520	$7 \times 10^4$	0,85	4,5
Rodamin B izotiokyanát — RBITC	550	585	$1,2 \times 10^4$	0,70	3,0
Tetrametylro- daminizotio- kyanát — TMRITC	550	580	$5 \times 10^4$	0,60	1,0
Umbeliferóny	380	450	$2 \times 10^4$		
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- teiny	550 až 620	580 až 660	$7 \times 10^5$ až $2,4 \times 10^6$	0,50 až 0,98	

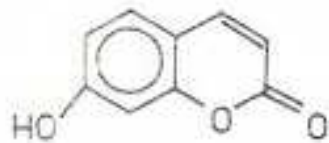
## Struktura některých fluorochromů



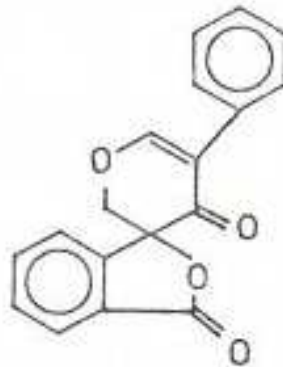
FITC



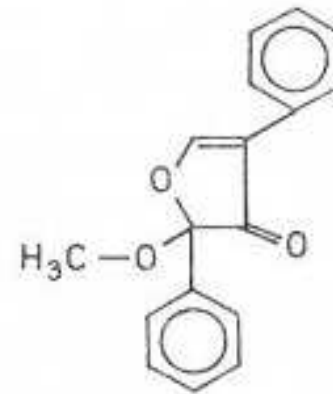
TMRITC



UMBELIFERÓN



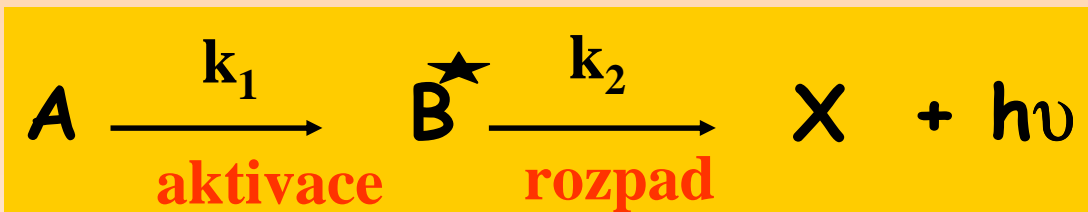
FLUORESKAMÍN



MDPF

## Luminiscence

emise světla z molekuly v excitovaném stavu, který vznikl jako důsledek chemických reakcí.



Intenzita vyzařovaného světla je závislá na čase, v určitém okamžiku prochází maximem:

$$t_{\max} = \frac{\ln(k_2 / k_1)}{k_2 - k_1}$$

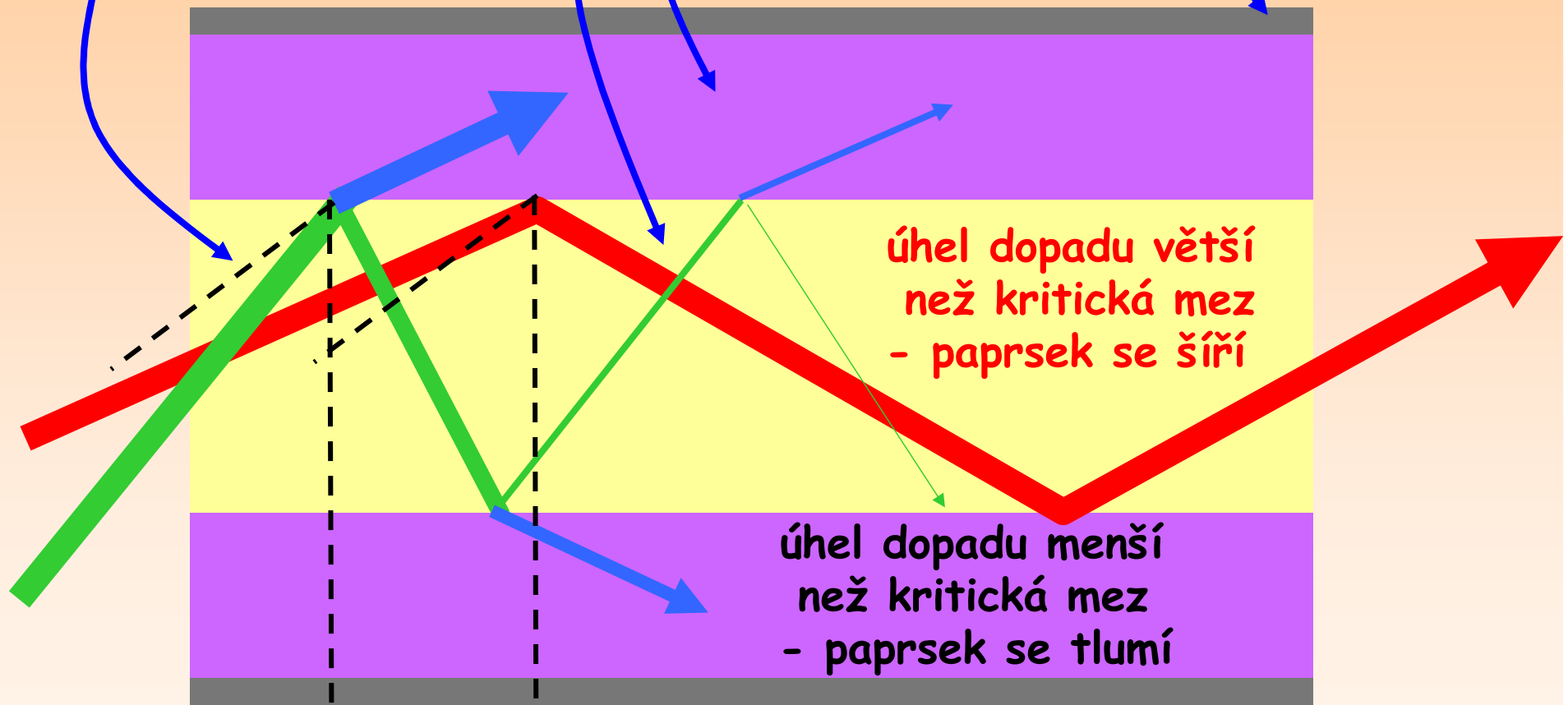
Kvantový výtěžek luminiscence:  
podíl počtu fotonů vyzářených  
a excitovaných molekul  
U bioluminiscence až 90%

# Optická vlákna

## Šíření paprsku ve světlovodu

kritická mez

jádro (core) - index lomu  $n_1$   
plášť (cladding) -  $n_2$ ,  $n_2 < n_1$   
mechanický obal



numerická apertura - úhel dopadu menší než kritická mez



## Materiál pro výrobu optických vláken

Jádro: křemen (UV)

sklo

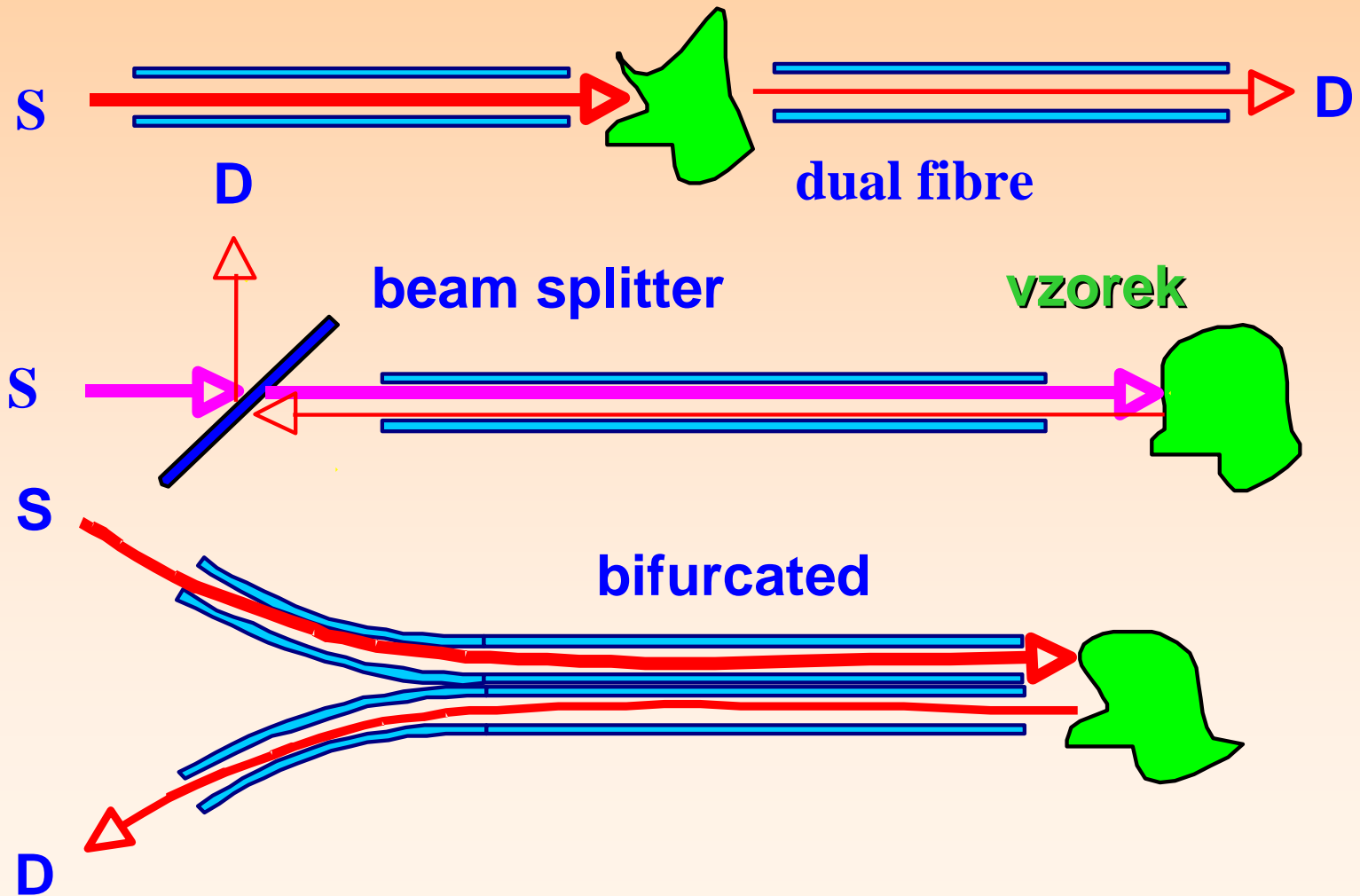
plast (levné)

Plášť: silikonový

Obal: plast (polykarbonát)

průměr vlákna: do stovek  $\mu\text{m}$

# Měřicí konfigurace pro optická vlákna



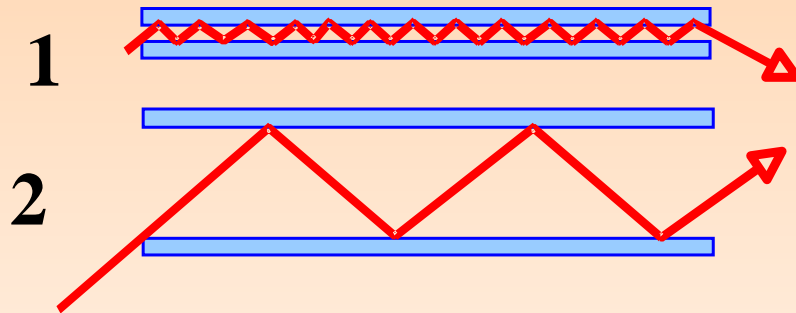
## Přímé ozařování (extrinsic sensing)

interakce se uskutečňují na konci vlákna  
nejběžnější použití v oblasti biosensorů

- ✓ jedno vlákno (nižší cena), zdroj laser
- ✓ modulace světelného paprsku (přerušováním)
- ✓ svazek vláken, více světla, levnější detektor

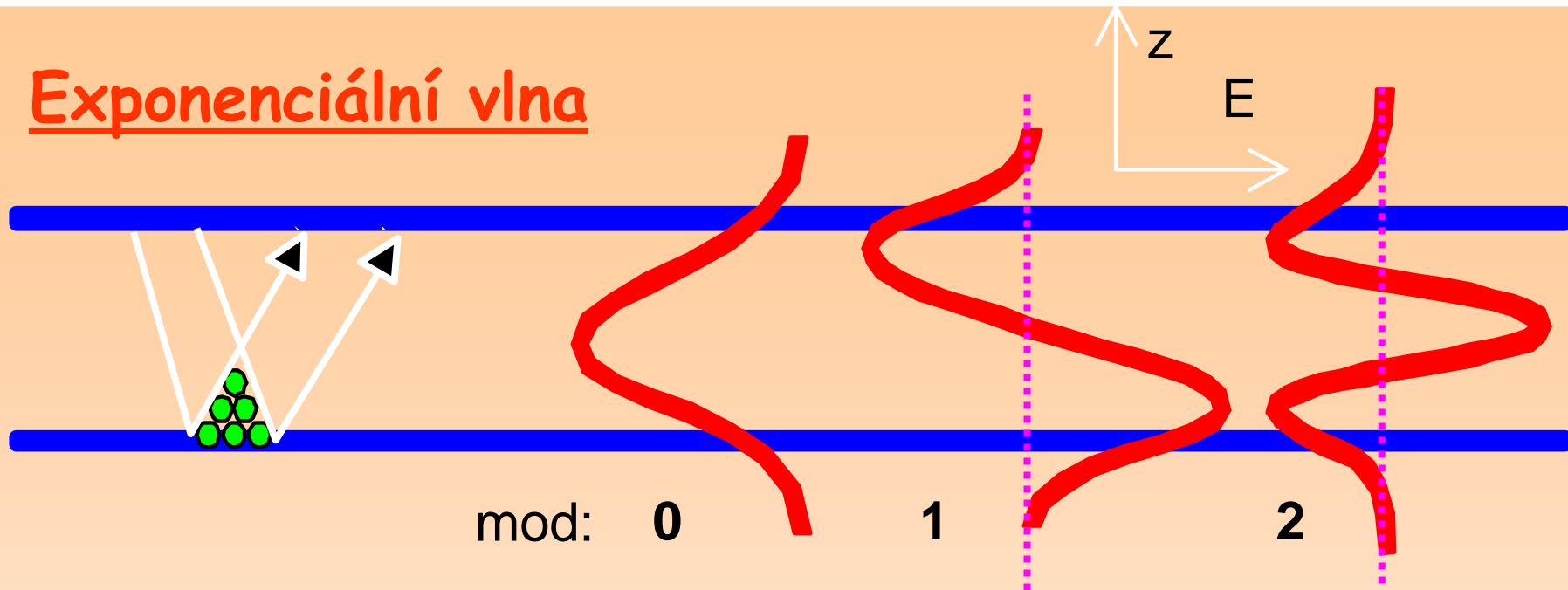
## Nepřímé ozařování intrinsic sensing

optický vodič neslouží jen k pasivnímu vedení světla  
chemické změny v okolí světlovodu se sledují  
na základě změněných podmínek pro vedení světla  
uvnitř světlovodu



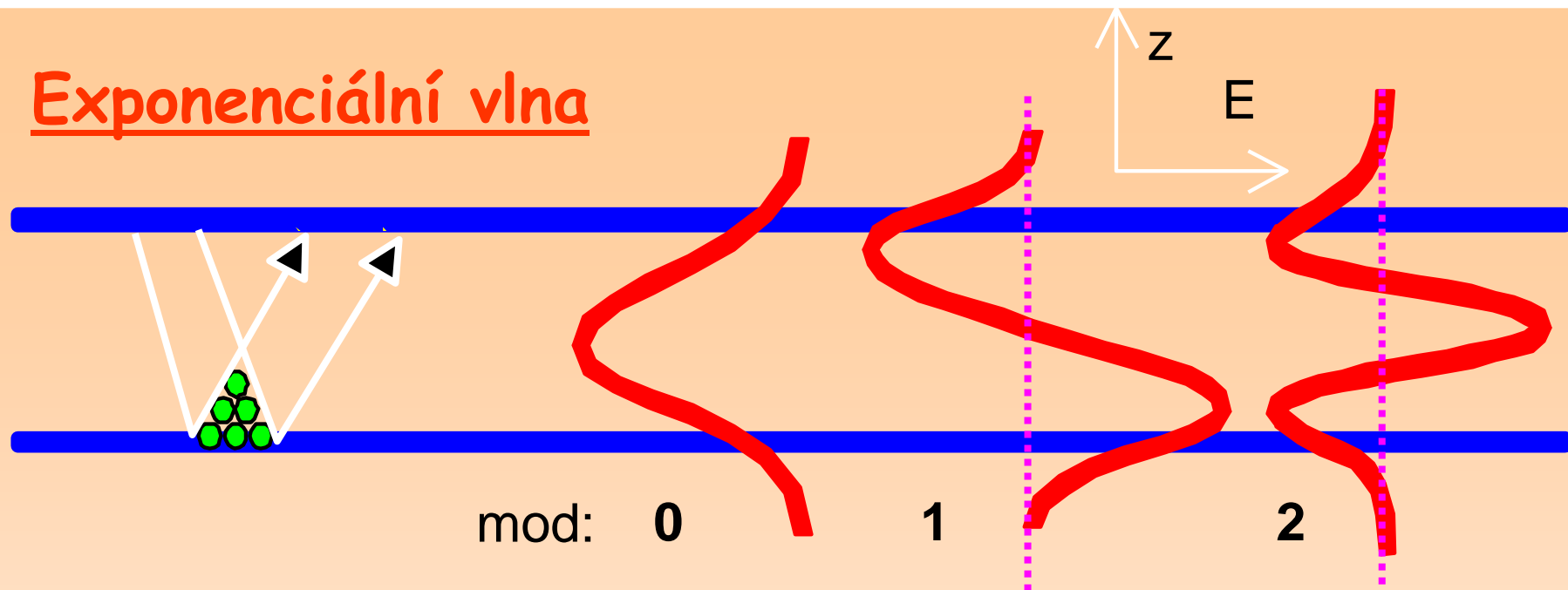
1. Velmi tenký světlovod (tloušťka asi vlnová délka světla), světlo se šíří v určitých diskrétních modech (více odrazů na jednotku délky)
2. Silný světlovod

## Exponenciální vlna



Při vedení světla uvnitř světlovodu dochází k interferenci mezi dopadajícím a odraženým světelným paprskem a tím vzniká elektromagnetické stojaté vlnění. tlumená (zhášivá) vlna (evanescent wave).

## Exponenciální vlna



- ✓ Na vnějším povrchu interakce s látkami elektromagnetická vlna se šíří do okolí mimo světlovod, přitom její intenzita klesá exponenciálně se vzdáleností od rozhraní („exponenciální vlna“)
- ✓ na vnějším povrchu světlovodu může docházet k interakcím s přítomnými látkami
- ✓ energetické profily exponenciální vlny jsou pro tři základní mody ukázány na obrázku
- ✓ pro vyšší mody narůstá podíl „vnější energie“ a zvětšuje se **penetrační hloubka**

## Enzymové optody (enzymové optické sensory)

- ✓ **přímé** opticky měřená látka se vyskytuje v biokatalytické reakci
- ✓ **zprostředkované** optické sensory využívají optické indikátory (pH, kyslík)

## Přímé optody

opticky měřená látka (nejčastěji fluorofor)  
se vyskytuje v katalytické reakci

### NADH

- slabý fluorofor ( $\Phi_f = 0,02$ )
- extince a emise 350 a 450 nm
- biorekogniční vrstva-dehydrogenasy  
(imobilizované před koncem vlákna)

zachycení koenzymu: konjugát s polyethylenglykolem,  
který neprochází membránou



### sensor pro alkohol

vzorek je oddělen teflonovou membránou  
NADH se nachází ve vnitřním roztoku sensoru

**metabolická aktivita celé buňky** (součást biosensoru)  
sleduje se vnitřní fluorescence NADH, která je úměrná  
metabolické aktivitě buňky

### **chlorofyl**

detekční systém toxicity látek, které inhibují fotosystém

### **flavinové koenzymy (FADH, FMNH<sub>2</sub>)**

pevně vázané v molekule oxidas  
(při vyšší koncentraci substrátu se zpomaluje zpětná  
oxidace redukované formy kyslíkem a intenzita  
redukovaného koenzymu narůstá)  
výhoda: reverzibilita systému

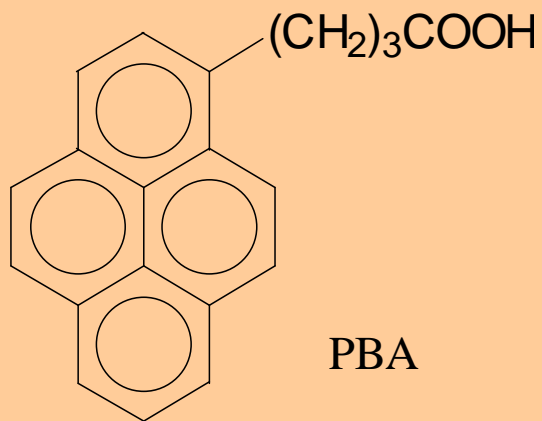
## Nepřímé optody „mediované“, extrinsic

- ✓ používají optické indikátory.
- ✓ sledování pH a kyslíku

**Detekce kyslíku** využívá zhášení fluorescence indikační molekuly, pokles intenzity fluorescence je dán Stern-Volmerovým vztahem:

$$I_f = I_{f0} / (1 + K_{SV} [O_2])$$

Indikátor se nachází v silikonové vrstvě před čelem optického vlákna.



**kyselina  
pyrenmásečná (PBA),  
excitace při 350 až 400 nm.**

**perylene a dekacyklen,  
organokovové komplexy ruthenia  
(excitovatelné při 460 nm,  
takže jako zdroj může sloužit modrá LED)**

## pH změny pomocí acidobazických indikátorů

- ✓ fluorescenční: 1-hydroxypyren-3,6,8-trisulfonová kys.  
(HPTS, pH přechod 5 až 8)  
4-methylumbelliferon
- ✓ absorbční: kresolová zeleň  
bromthymolová modř

## Chemiluminescence

schopnost absorbovat energii pomocí chemické reakce a pak ji emitovat ve formě fotonu

### účinnost luminiscence:

- ✓ chemickém výtěžku reakce vedoucímu k aktivovanému meziproduktu ( $B^*$ )
- ✓ podílu excitovaných molekul
- ✓ fluorescenčním výtěžku (blíží se 1)

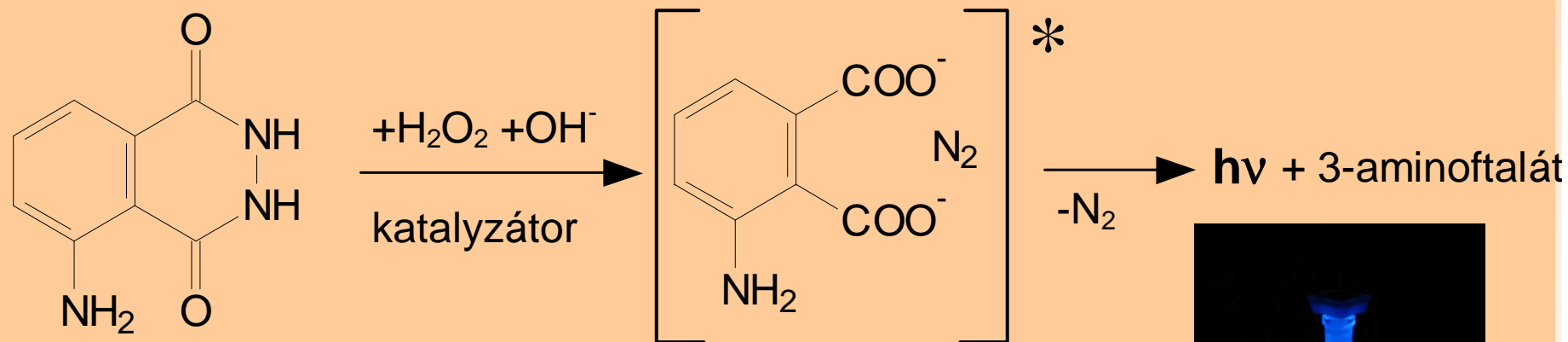
## detekce $H_2O_2$

**luminol** - (5-amino-2,3-dihydroftalazin-1,4-dion)  
intenzita světla je přímo úměrná koncentraci  $H_2O_2$

katalyzátor: ferrikyanid

hemin

peroxidasa (neutrální prostředí)



**Luminolová reakce**



**peroxyoxaláty** - luminiscence 0,25 výtěžek  
v přítomnosti  $H_2O_2$  vznikne aktivovaný meziprodukt,  
který nefluoreskuje, ale přenese energii  
na fluoreskující akceptor F  
(difenyllanthracen perylen) a ten vyzáří světlo

sloučeniny:

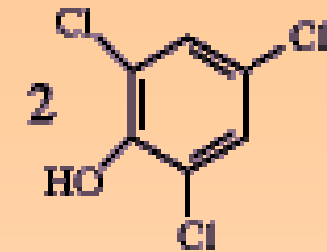
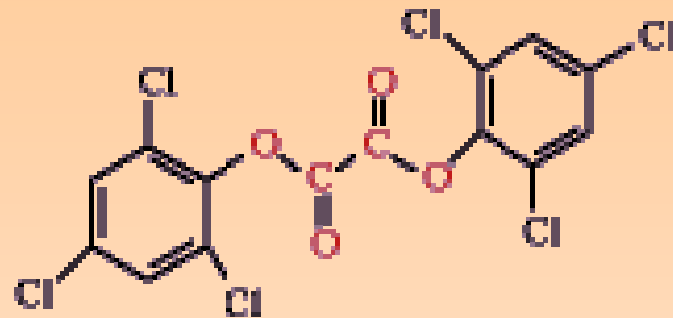
**TCPO** - bis(2,4,6-trichloro)fenyl oxalát

**CPPO** -bis(2,4,5-trichloro-6-pentoxycarbonyl)oxalát

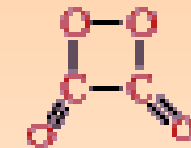
# TCPO



+



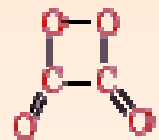
+



hydrogen peroxide

bis(2,4,6-trichlorophenyl)oxalate

1,2-dioxetanedione



+

fluorophore



fluorophore\*

+

$CO_2$



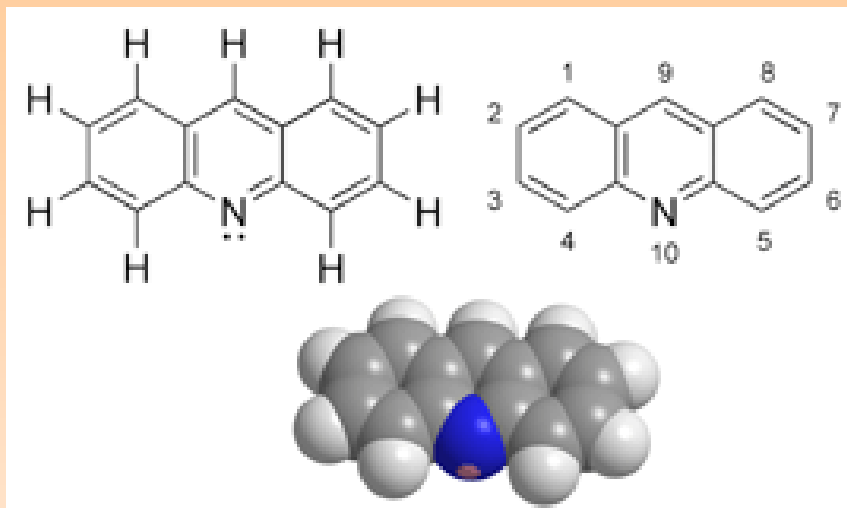
fluorophore

+

light



# akridinové soli



## Využití chemiluminiscenčních systémů v biosensorech

- ✓ citlivá detekce peroxidu vodíku vznikajícího v primární reakci oxidasy se stanovovaným substrátem
- ✓ k detekci hydrolas

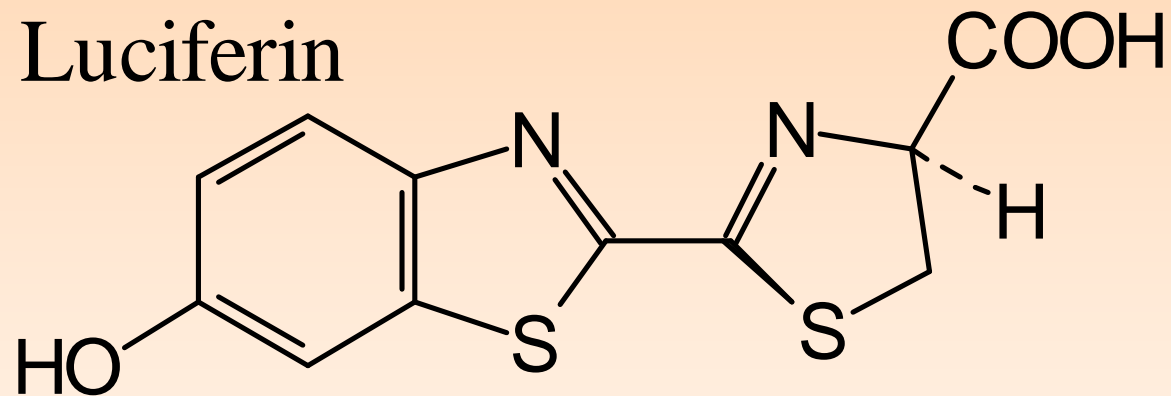
## Bioluminescence

emise světla při biochemické reakci v živém organismu

enzymy luciferasy

štěpí substráty luciferiny, emise světla

Luciferin



**Světluška** (firefly, *Photinus pyralis*) -  
luciferasa (EC 1.13.12.7) oxiduje luciferin za účasti  
ATP, emise při 560 nm (žlutozelené světlo)  
výtěžek 0,88!!

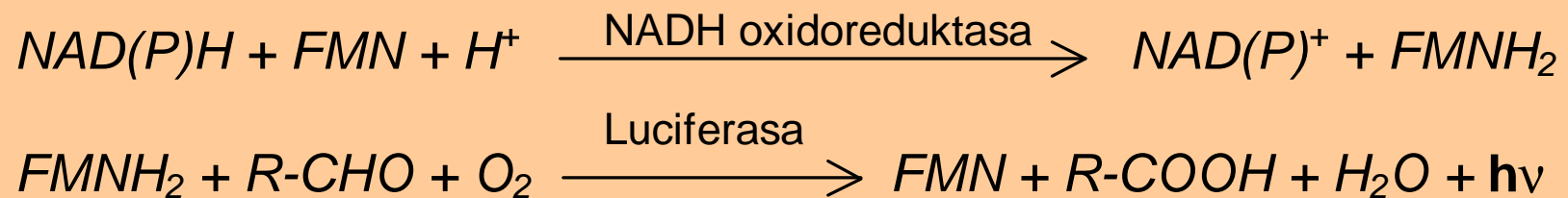


**Mořské bakterie** (*Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi*,  
*Photobacterium phosphoreum*)

luciferasa (EC 1.14.14.3) tvoří až 5% obsahu buňky,

oxiduje vyšší aldehydy (C8, např. dekanal, tetradekanal),

v buňce obsahují i enzym NAD(P)H:FMN oxidoreduktasu:



což umožňuje napojení na dehydrogenasy- spolu s bakteriální luciferasou jsou imobilizovány na konci optického vlákna

# APLIKACE BIOLUMINISCENCE

- ❖ Citlivá detekce ATP ( $10^{-12}$  M), stanovení biomasy
- ❖ Stanovení s účastí ATP (kreatinkinasa, ATPasa, pyruvátkinasa)
- ❖ Specifická detekce druhu mikroorganismu pomocí bakteriofágů nesoucích *lux* gen (z *Vibria*, u světlušek *luc* geny)
- ❖ Citlivá detekce těžkých kovů (arsen, rtuť): konjugát *mer-lux* (*mer* je promotor aktivovaný Hg) je vpraven do plazmidů v *E. coli*, v přítomnosti Hg se aktivuje, proběhne exprese luciferasy a následuje luminiscence, citlivost 200 nM rtuti
- ❖ Stanovení  $Ca^{2+}$  - působí rozpad a luminiscenci fotoproteinu (peroxoforma luciferinu vázána v komplexu s luciferasou *Aequora*).

# ZHODNOCENÍ OPTOD

## VÝHODY

- ❖ není třeba referentní prvek
- ❖ imobilizovaná fáze nemusí být ve fyzikálním kontaktu s optickým systémem (snadná výměna biovrstvy)
- ❖ stabilní kalibrace (zvláště při použití dvou vlnových délek)
- ❖ současně mohou reagovat na několik analytů (různé reagenty, různé vlnové délky) - vysoká hustota přenosu informací
- ❖ nemají vliv interference elektromagnetické povahy (lze provádět měření na velké vzdálenosti)
- ❖ při použití v živém organismu nehrozí elektrický šok (při zkratu)

## NEVÝHODY:

- ❖ není reference při měření intenzity světla (svítivost zdroje kolísá), proto je třeba kalibrace ve dvou bodech
- ❖ dynamický rozsah je omezený (pro pH 2 až 6 řádů, elektrochemicky 12!) odezvy jsou často pomalé
- ❖ dlouhodobá stabilita je limitována vyčerpáním indikátoru
- ❖ fotorozklad (raději "svítit" méně intenzivně)
- ❖ vadí světlo z okolí