

Princíp a možnosti aplikácie luminometrie

J. ŠUBÍK — V. ŠUBÍKOVÁ

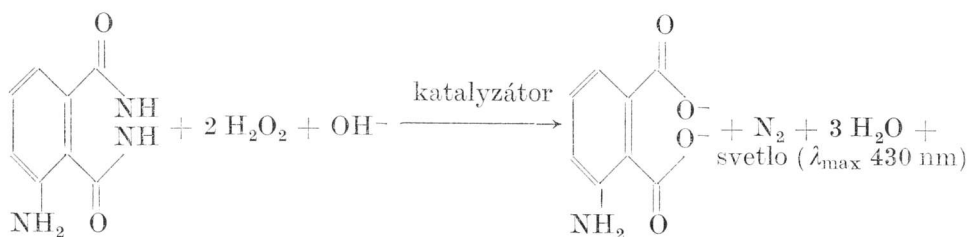
Luminometria je veľmi citlivá, špecifická, rýchla a perspektívna analytická metóda používaná v biochémmi, mikrobiológii, potravinárstve, poľnohospodárstve i v priemysle. Dnes už komerčne vyrábaný luminiscenčný fotometer a štandardné činidlá umožňujú využiť túto metódu tak vo výskume, ako aj v rutinných analýzach [1, 2].

Luminometria je založená na reakciách, pri ktorých dochádza k vyžarovaniu svetla. Rozlišujeme bioluminiscenciu a chemiluminiscenciu. V prvom prípade dochádza k vyžarovaniu svetla v živých organizmoch pri reakciách katalyzovaných enzymaticky. K takýmto organizmom patria niektoré baktérie, morské riasy, červy, kôrovce, ryby a každému veľmi dobre známe svätojánske mušky. Aj keď sa tento jav už veľmi dávno pozoroval, jeho chemická podstata bola dlho neznáma. Za posledných 30 rokov však bola opísaná nielen táto, ale aj 13 ďalších bioluminiscenčných reakcií [1—3]. Chemiluminiscenciu objavili r. 1877 a odvtedy sa už opisalo viac ako 100 takýchto reakcií. Prebiehajú prevažne v organických systémoch, aj keď sú známe niektoré anorganické plyny vyvolávajúce chemiluminiscenciu. Princípom tejto metódy sú chemické reakcie, pri ktorých dochádza k excitácii elektrónu v molekule a k následnému vyžiareniu svetla po jeho návrate do pôvodnej polohy [1, 4]. Účinnosť fotónu v takýchto reakciách je však menej ako 1 %, pretože väčšina molekúl stráca excitačnú energiu vo forme tepla. Efektívnejšie sú bioluminiscenčné reakcie, kde enzým riadi reakciu smerom k tvorbe svetla za účinnosti fotónu 10—90 %.

V súčasnosti najpoužívanejšie luminiscenčné merania sa zakladajú na troch systémoch využívajúcich chemiluminiscenciu luminolu, bioluminiscenciu baktérií a bioluminiscenciu svätojánskej mušky.

Chemiluminiscencia luminolu

Luminol je organický amín, ktorý v prítomnosti peroxidov v alkalickom prostredí vytvára modré svetlo. Reakcia je katalyzovaná kovmi alebo derivátmi hemínu

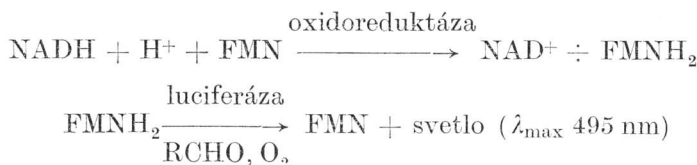


Účinnosť fotónu je asi 1 % a optimálne pH 10–11. Túto reakciu katalyzuje pri neutrálnom pH aj peroxidáza a oxidázové enzýmy. Citlivosť tejto metódy je menej ako pg (10^{-12} g) peroxidu a 0,1 pg peroxidázy v 1 ml.

Chemiluminiscencia luminolu sa použila na automatické merania glukózy v krvi a v moči, na stanovenie kyseliny močovej, xantínu, aldehydov, aminokyselín, stopových prvkov, hemoglobínu a myoglobínu. Touto reakciou sa stanovila aj peroxidáza, superoxid dismutáza, oxidáza a kataláza. Reakcia so značenou peroxidázou a luminolom sa použila aj v imunotestoch. Tento systém sa dá použiť aj na meranie fagocytózy [1, 4–9].

Bioluminiscencia baktérií

Táto luminometrická metóda sa zakladá na tejto reakcii

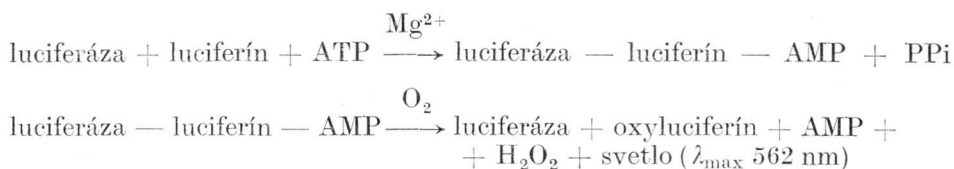


Účinnosť fotónu je tu asi 10 %, takže citlivosť tohto systému je 10^{-17} mólov NADP alebo NADPH. Oxidoreduktáza je špecifická k NADH alebo NADPH, takže túto metódu možno použiť na určenie všetkých 150 NADH-špecifických, 140 NADPH-špecifických, 45 NAD/P/H-špecifických enzýmov a ich substrátov. Systém je citlivý aj na anestetické plyny a toxické látky a môže sa použiť ako citlivá metóda na ich stanovenie. Pri mnohých enzymatických imuno-reakciách sa používa dehydrogenáza ako značený enzým. Tieto analýzy bakteriálnou bioluminiscenciou sú potom oveľa citlivejšie a špecifickejšie ako spektrofotometrické stanovenia.

Bakteriálnou bioluminiscenciou môžu byť v jednej vzorke súčasne stanovené NAD⁺ a NADH alebo NADP a NADPH. NAD⁺ a NADP možno rozložiť alkalickou extrakciou, NADH a NADPH kyslou extrakciou. NAD⁺ možno previesť redukciou na NADH vhodnými enzýmami, ako napr. dehydrogenázou jablčnanu. Podobne NADP možno redukovať na NADPH dehydrogenázou glukózo-6-fosfátu [1–3, 10–13].

Bioluminiscencia svätojánskej mušky

Princíp tejto reakcie je takýto: molekula ATP reaguje s luciferínom pri katalytickom účinku enzýmu luciferázy za tvorby fotónu podľa chemických reakcií



Táto reakcia s citlivosťou 10^{-18} mólov, je najcitlivejšia bioluminiscenčná reakcia. Pri použití čistých činidiel je táto reakcia špecifická iba k ATP.

ATP sa v bunke zúčastňuje na mnohých metabolických reakciách a tak jej hladina v bunke je prísne regulovaná. Každý typ buniek má relatívne konštantné množstvo ATP. Akékoľvek zmeny v metabolizme napr. vplyvom stresu, inhibítorov, inaktivačných faktorov a pod. sa odrazia na hladine ATP. Preto možno túto reakciu použiť na meranie množstva buniek, na sledovanie vplyvu inhibítorov alebo stimulátorov, vplyvu teploty, kyslíka, žiarenia, vírusových alebo bakteriálnych infekcií, antibiotík a pod. na živé systémy. Samozrejme, táto reakcia sa dá použiť aj na meranie všetkých ATP-špecifických enzýmov a substrátov, ktorých je asi 200. Navyše možno kombinovať iné enzýmové reakcie s ATP-špecifickými enzýmovými reakciami.

Kvantitatívne stanovenie mikrobiálnych buniek (baktérie, kvasinky, huby) možno uskutočniť podobne ako pri meraní ATP somatických buniek, iba mikrobiálne ATP sa uvoľní z bunky s činidlom uvoľňujúcim nukleotidy. Takto sa dá stanoviť množstvo živých mikrobiálnych buniek vo vode, v pôde, aktívnom kale, olejoch, pive, moči, ďalej sa dá stanoviť množstvo a vitalita erytrocytov, vitalita spermii, množstvo rakovinových buniek a pod. Okrem kvantitatívneho stanovenia počtu buniek sa táto metóda dá použiť aj na stanovenie účinku dezinfekčných látok, pri cytolýze, titracii vírusov, protilátok, antisér, ako aj pri štúdiu mnohých enzýmov a izoenzýmov [1—3, 10, 14—22].

Z tohto krátkeho prehľadu vyplýva, že luminometria je veľmi citlivá a rýchla analytická metóda. Z jej stále častejšieho a širšieho použitia sa dá predpokladať, že čoskoro nahradí mnohé zdĺhavé a prácne analytické metódy v mikrobiológii, biochémií, poľnohospodárstve, potravinárstve i v priemysle. Luminiscenčný fotometer je jednoduché a nenáročné zariadenie a treba dúfať, že nebude trvať príliš dlho, kým sa objaví aj v našich laboratóriách.

Súhrn

Práca opisuje princípy luminometrických analytických metód a ich využitie v mikrobiológii a v priemysle.

Literatúra

1. SEITZ, R. — NEARY, M. P.: In: *Methods of Biochemical Analysis*. Glick, D. (Ed.). New York, 1976, s. 161.
2. CORMIER, M. J. — LEE, J. — WAMPER, J. E.: *Ann. Rev. Biochem.*, *44*, 1975, s. 255.
3. SCHRAM, E.: *Arch. Int. Physiol. Biochem.*, *81*, 1973, s. 561.
4. ISACSON, U. — WETTERMARCK, G.: *Anal. Chim. Acta*, *68*, 1974, s. 339.
5. SEITZ, W. R. — HERCULES, D. M.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, *2*, 1973, s. 273.
6. BOSTICK, D. T. — HERCULES, D. M.: *Anal. Chem.*, *47*, 1975, s. 447.
7. NOUJAIM, A. A. — EDISS, C. — WEIBE, L. I.: *Liquid Scintillation Science and Technology*. New York, Academic Press 1976.
8. PRATT, J. J. — WOLDRING, M. G. — VILLERIUS, L.: *J. Immunol. Meth.*, *21*, 1978, s. 179.
9. VELAN, B. — HALMANN, M.: *Immunochem.*, *15*, 1978, s. 331.
10. SHARPE, A. N.: In: *Sampling — Microbiological Monitoring of Environments*. Board, R. G. — Lovelock, D. W. (Eds). London, Academic Press 1979, s. 197.
11. HASTINGS, J. W. — NEALSON, K. H.: *Ann. Rev. Microbiol.*, *31*, 1977, s. 549.
12. BROLIN, S. E. — HJERTEN, S.: *Mol. cell. Biochem.*, *17*, 1977, s. 61.
13. BROLIN, S. E.: *Bioelectrochem. Bioenergetics*, *4*, 1977, s. 257.
14. ROSE, A. H. — TEMPEST, D. W.: *Advances in Microbial Physiology*. London—New York, Academic Press 1977.
15. TARKKANEN, P. — DRIESCH, R. — GREILING, H.: *Z. Anal. Chem.*, *290*, 1978, s. 180.
16. KEES, U. — LEWENSTEIN, A. — BACHOFEN, R.: *Eur. J. appl. Microbiol.*, *2*, 1975, s. 59.
17. THORE, A. — ANSEHN, S. — LUNDIN, A. — BERGMAN, S.: *J. clin. Microbiol.*, *1*, 1975, s. 1.
18. LEVIN, G. V. — CLENDENNING, J. R. — CHAPPELLE, E. W. — HEIM, A. H. — ROCEK, E.: *Biol. Sci.*, *19*, 1964, s. 37.
19. BARRARO, A. — ROZEK, S.: *Acta Soc. Bot. Poloniae*, *XLIV*, 1975, s. 377.
20. TIFFT, E. C. — SPIEGEL, S. J.: *Environ. Sci. Technol.*, *10*, 1976, s. 1268.
21. NUNGESTER, W. J. — PARADISE, L. J. — ADAIR, J. A.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, *132*, 1969, s. 582.
22. ADEY, G. — WARDLEY-SMITH, B. — WHITE, D.: *Life Sci.*, *17*, 1975, s. 1849.

Принцип и возможности применения люминотрии

Резюме

Работа описывает принципы люминотрических аналитических методов и их применение в микробиологии и в промышленности.

Principle and application possibilities of luminometry

Summary

The paper describes the principles of luminometric analytical methods and their application in microbiology, biochemistry and industry.