

# **ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΒΙΟΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ**

**ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ – ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ  
ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ - ΒΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ**

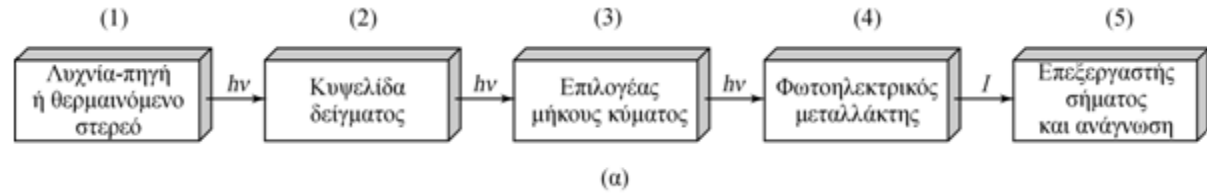
**Ε.Σ.ΛΙΑΝΙΔΟΥ  
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**

***lianidou@chem.uoa.gr***

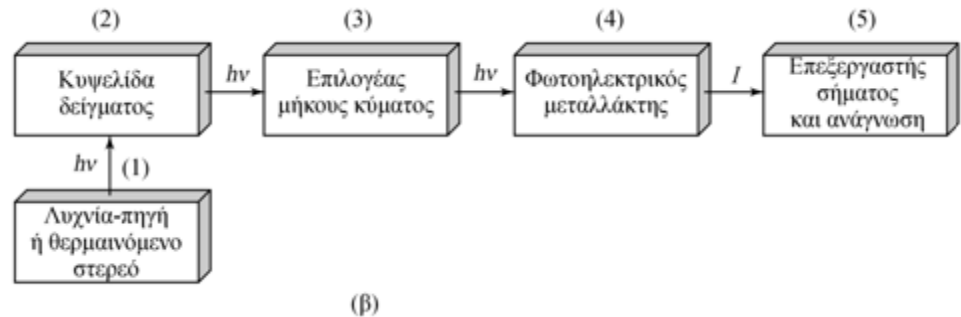
**ΑΘΗΝΑ 2018**

# ΟΠΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

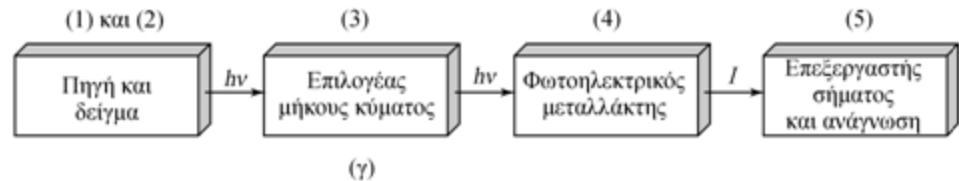
α) απορρόφηση



β) φθορισμομετρία



γ) εκπομπή



Μόρια – άτομα

Μοριακή απορρόφηση – ατομική απορρόφηση

Μοριακός φθορισμός – ατομικός φθορισμός

Μοριακή εκπομπή – ατομική εκπομπή

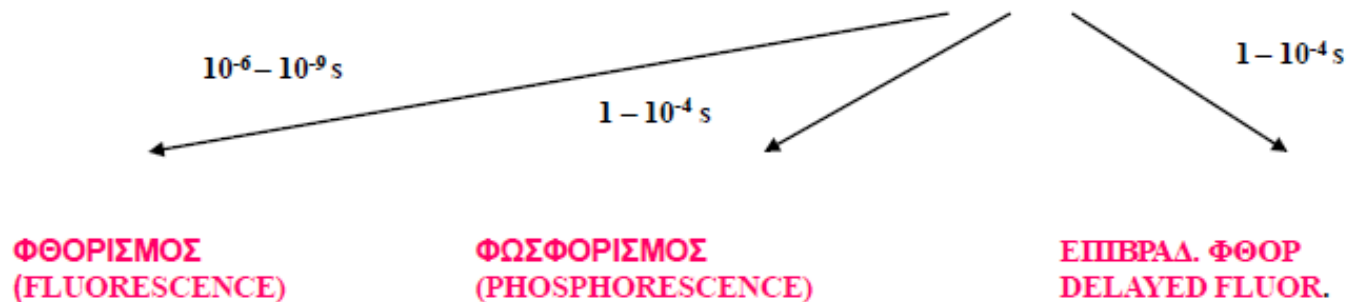
# Φωταύγεια (Luminescence)

## ΠΗΓΗ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ

- ✓ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΡΕΥΜΑ
- ✓ ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΡΑΔΙΕΝΕΡΓΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ
- ✓ ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΧΗΜΙΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ
- ✓ ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΧΗΜΙΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΣΕ ΖΩΝΤΑΝΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ
- ✓ ΘΕΡΜΟΤΗΤΑ
- ✓ ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΤΡΙΒΗΣ
- ✓ ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΦΩΤΟΝΙΩΝ

## ΕΙΔΟΣ ΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ

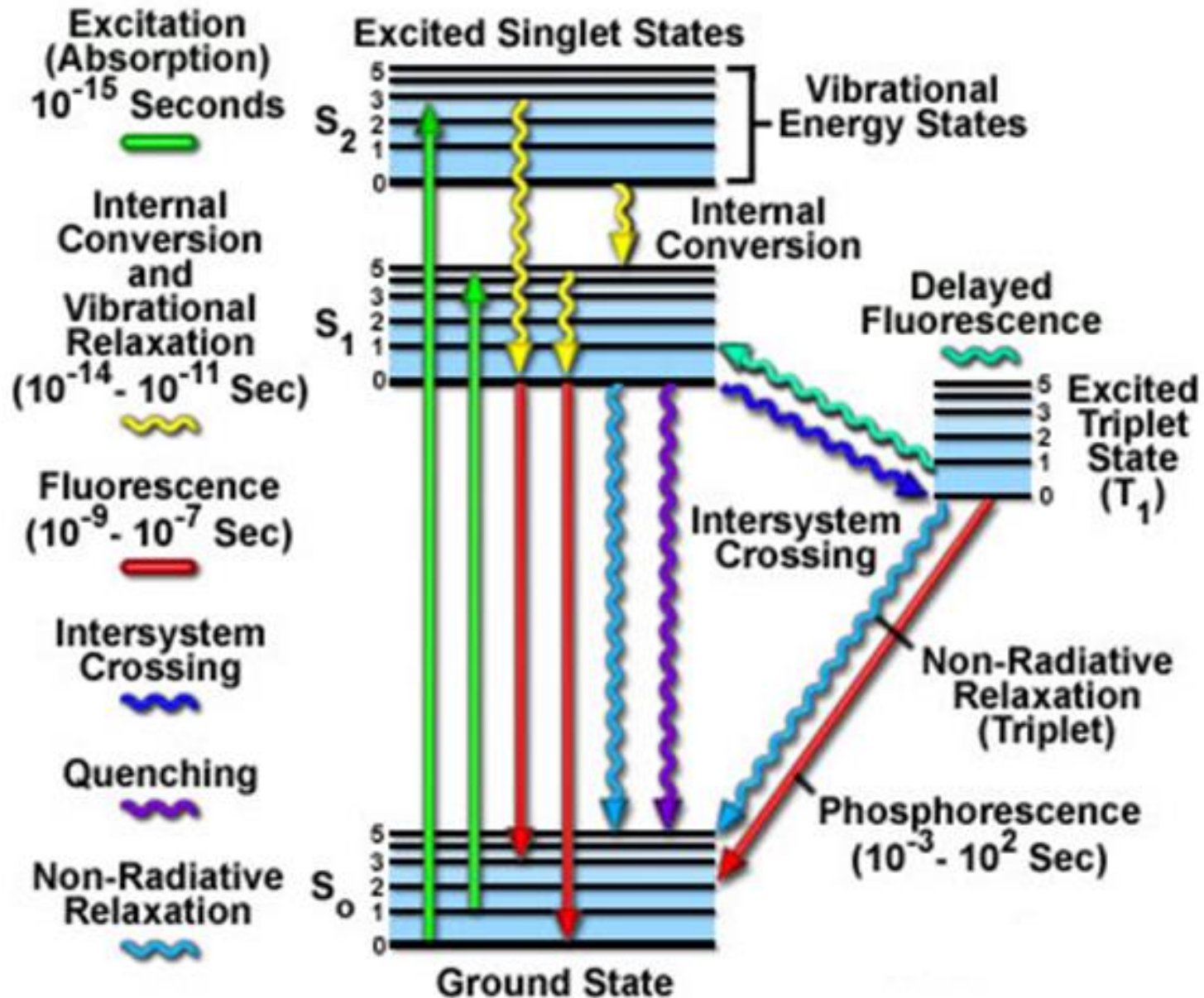
- ΗΛΕΚΤΡΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ  
(ELECTROLUMINESCENCE)
- ΡΑΔΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ  
(RADIOLUMINESCENCE)
- ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ  
(CHEMILUMINESCENCE)
- ΒΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ  
(BIOLUMINESCENCE)
- ΘΕΡΜΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ  
(THERMOLUMINESCENCE)
- ΤΡΙΒΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ  
(TRIBOLUMINESCENCE)
- ΦΩΤΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ  
(PHOTOLUMINESCENCE)



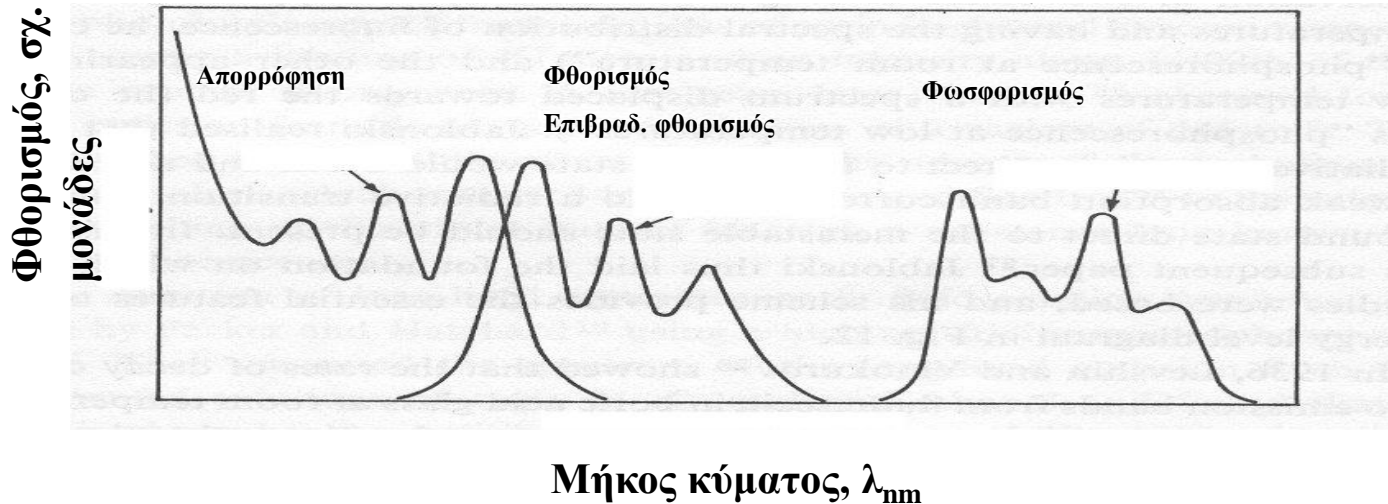
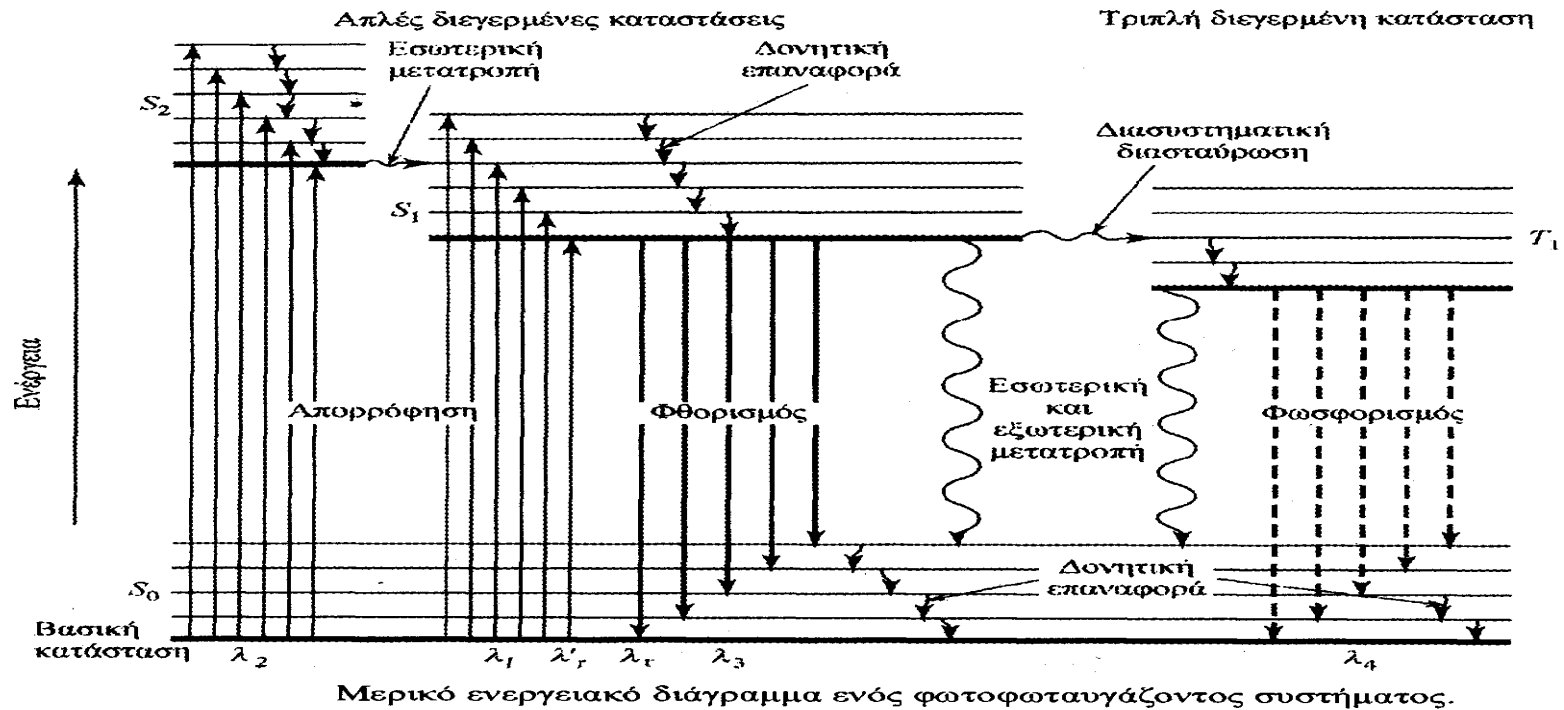
# ΣΤΑΘΜΟΙ ΣΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑΣ

ΕΤΟΣ	ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ	ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ
1565	MONARDES	ΠΡΩΤΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ
1833	BREWSTER	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗΣ
1845	HERSCHEL	ΦΑΣΜΑ ΚΙΝΙΝΗΣ
1852	STOKES	ΟΡΙΣΜΟΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ
1864	STOKES	ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ
1867	GORPELSRODER	ΠΡΩΤΟΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ
1877	BAYER	ΥΠΟΓΕΙΑ ΣΥΓΚΟΙΝΩΝΙΑ ΡΗΝΟΥ-ΔΟΥΝΑΒΗ
1920	DESHA	ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ
1925	BAYLE FABRE	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ
1955	BOWMAN	ΠΡΩΤΟ ΦΑΣΜΑΤΟΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΟ
1960	SCHALOW	LASERS
1968	BOWMAN	ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΣΤΗΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ
ΔΕΚΑΕΤΙΑ 80-90		ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ
90 - 2010		ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ – ΠΟΣΟΤΙΚΗ PCR, FISH, in vivo imaging

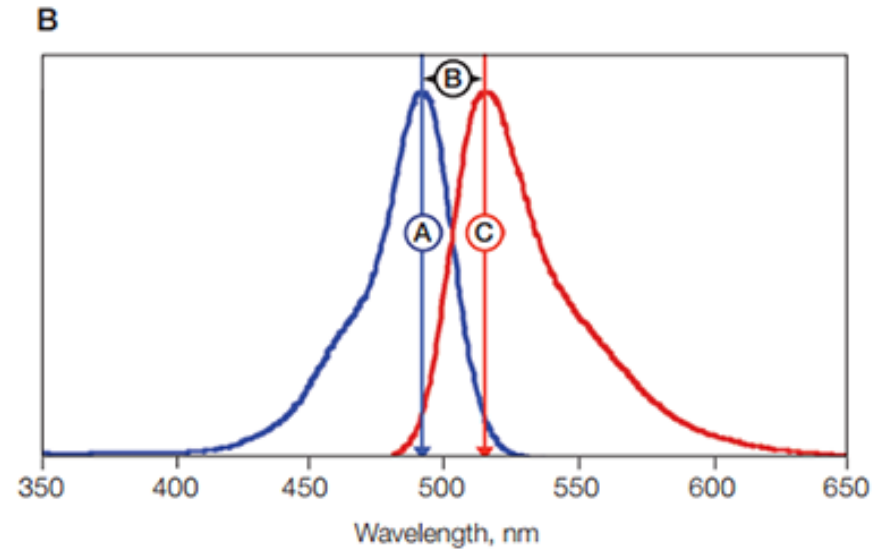
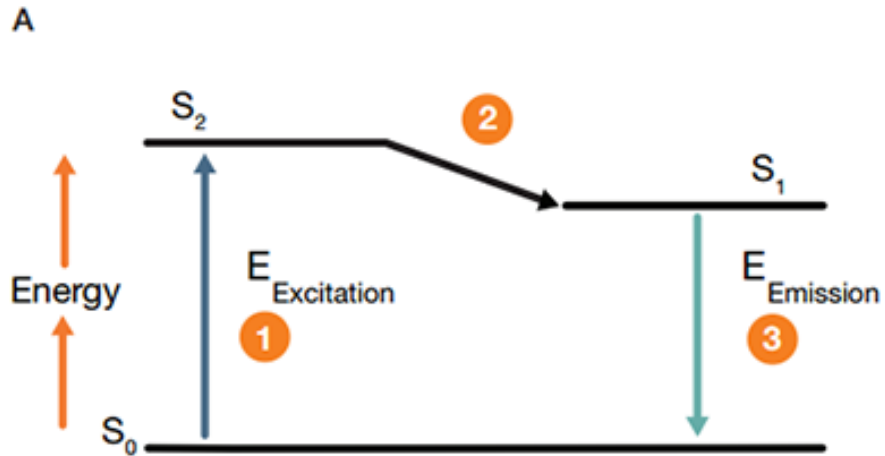
# Μηχανισμοί φωτοφωταύγειας



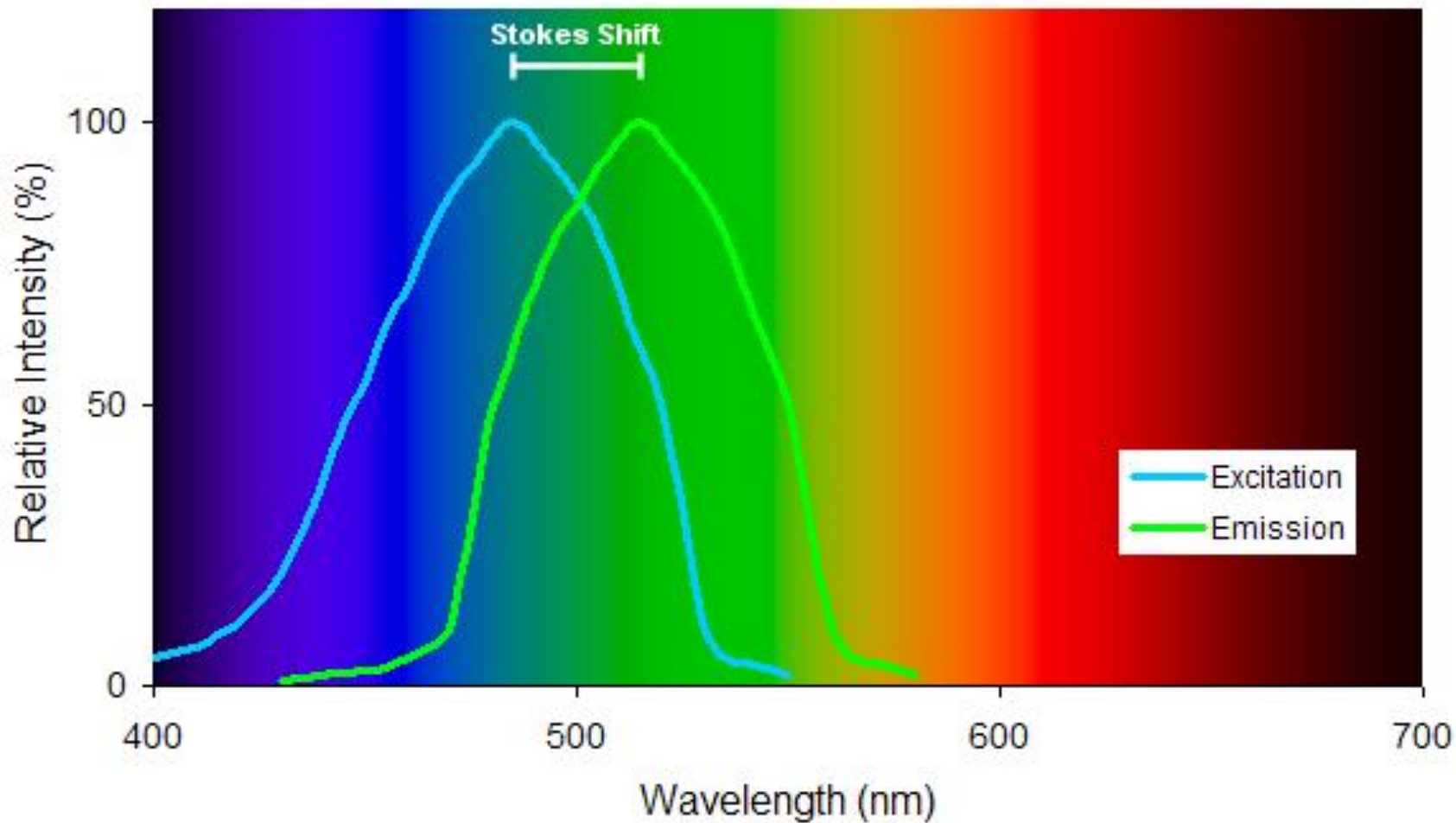
# ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΦΩΤΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ



# Fluorescence: excitation and emission spectra

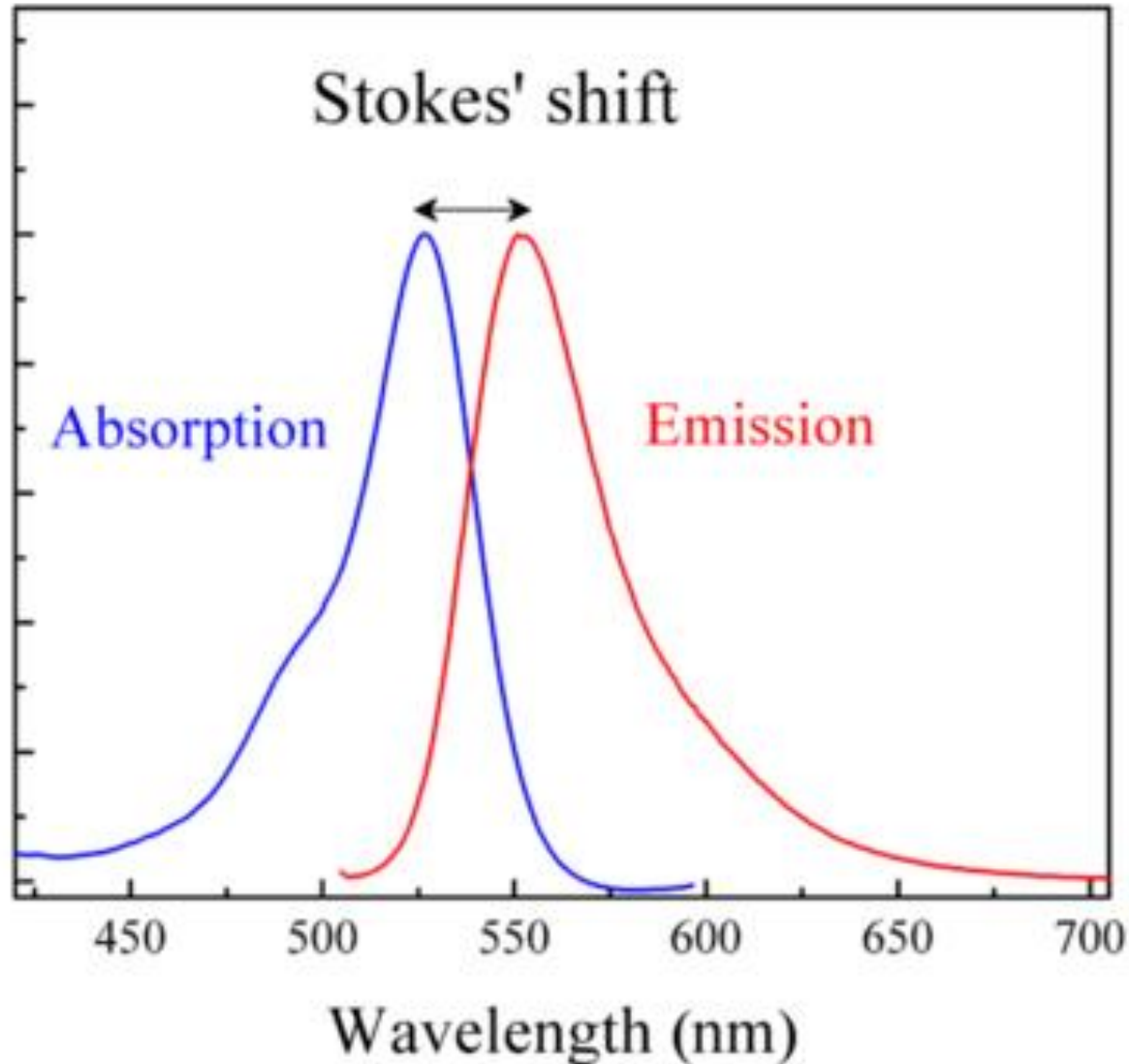


# μήκος κύματος διέγερσης ( $\lambda_{exc}$ ) και μήκος κύματος εκπομπής φθορισμού ( $\lambda_{em}$ )





Stoke's shift: η απόσταση μεταξύ των μεγίστων μήκους κύματος διέγερσης ( $\lambda_{exc}$ ) και μήκους κύματος εκπομπής φθορισμού ( $\lambda_{em}$ )



# ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟ

## ξένα μόρια

απορρόφηση ακτινοβολίας διεγέρσεως ή φθορισμού (φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου)  
αλληλεπίδραση με το φθορίζον μόριο (απόσβεση)  
εκπομπή φθορισμού των ξένων μορίων

## διαλύτης

αύξηση πολικότητας-----> αύξηση φθορισμού  
αύξηση ιξώδους -----> αύξηση φθορισμού

## pH

## θερμοκρασία

αύξηση θερμοκρασίας -----> μείωση φθορισμού  
μείωση θερμοκρασίας -----> αύξηση φθορισμού

Οξυγόνο. η παρουσία του οξυγόνου παρεμποδίζει είτε με άμεση οξείδωση της φθορίζουσας ουσίας προς μη-φθορίζον προϊόν, η με απόσβεση φθορισμού.

Φωτοδιάσπαση. Πολύ ισχυρή ακτινοβολία διεγέρσεως μπορεί να προκαλέσει φωτοδιάσπαση της φθορίζουσας ουσίας

Συγκέντρωση. η ένταση της ακτινοβολίας φθορισμού εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωση της φθορίζουσας ουσίας (ποσοτική φθορισμομετρία)

# ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟ

## Χημική δομή

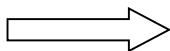
- αρωματικοί πυρήνες ---> Αύξηση φθορισμού
- πολλαπλοί συζυγιακοί δεσμοί ---> Αύξηση φθορισμού
- διεγέρσεις τύπου π-->π' ---> Αύξηση φθορισμού
- (μικρή πιθανότητα διασυστηματικής διασταυρώσεως)
- διεγέρσεις τύπου η-->π' -----> Μείωση φθορισμού
- (μεγάλη πιθανότητα διασυστηματικής διασταυρώσεως)
- επίπεδα μόρια ---> μοριακή ακαμψία ---> Αύξηση φθορισμού
- υποκαταστάτες
- ηλεκτρονιοδότες (NH<sub>2</sub>, OH) ---> Αύξηση φθορισμού
- ηλεκτρονιόφιλοι (COOH, NO<sub>2</sub>, Cl, Br, J) ---> μείωση φθορισμού

## ΦΩΤΑΥΓΕΙΑ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΔΟΜΗ

✓ Υπαρξη  $\pi$ - ηλεκτρονιακού συστήματος ( $\lambda_{ex} > 220\text{nm}$ )

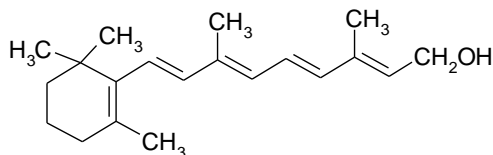
✓ Εκτεταμένο  $\pi$ - ηλεκτρονιακό σύστημα συνεπάγεται

Φθορισμός



Μεγάλα μήκη κύματος

Φωσφορισμός



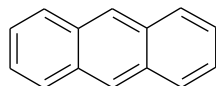
**Vitamin A<sub>1</sub>**

$\lambda_{ex} = 333\text{nm}$ ,  $\lambda_{em} = 500\text{nm}$



**Βενζόλιο**

S<sub>1</sub> 263 nm, T<sub>1</sub> 340 nm



**Ανθρακένιο**

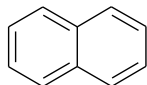
S<sub>1</sub> 376 nm, T<sub>1</sub> 680 nm

✓ Χαμηλότερη διεγερμένη απλή κατάσταση

$\pi^* - \pi$   $\longrightarrow$  Ισχυρός φθορισμός (φωσφ.)

$\pi^* - n$   $\longrightarrow$  Ασθενής φθορισμός, ισχυρός  
φωσφορισμός σε περιβ. μεγάλου  
ιξώδους

## Ναφθαλίνο

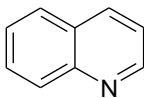


$\pi^* - \pi$

Φθορισμός

Φωσφορισμός

## Κινολίνη

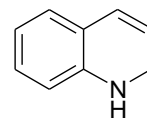


$\pi^* - n$

Δε φθορίζει

(μη πολικ. διαλ)

## Ινδόλιο



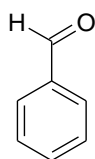
$\pi^* - \pi$

Φθορισμός

Φωσφορισμός

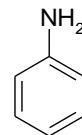
✓ *o* - *p* - υποκαταστάτες  $\longrightarrow$  αύξηση φθορισμού

✓ *m* - υποκαταστάτες  $\longrightarrow$  ελάττωση φθορισμού



-NO<sub>2</sub>  
-COOH  
-CH<sub>2</sub>COOH  
+  
-Cl, -Br, -I  
-O-  
-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>

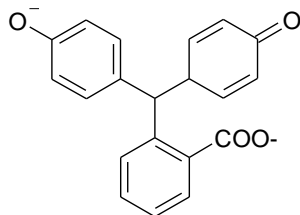
Δε φθορίζει



-OH  
-O-CH<sub>3</sub>  
-NH<sub>2</sub>  
-NHCH<sub>3</sub>  
-F

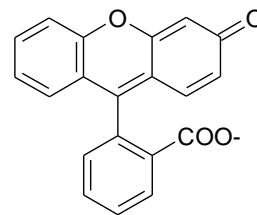
Φθορίζει

✓ Αύξηση μοριακής ακαμψίας  $\longrightarrow$  αύξηση φθορισμού



ΦΑΙΝΟΛΟΦΘΑΛΕΪΝΗ

(ΔΕ ΦΘΟΡΙΖΕΙ)



ΦΛΟΥΟΡΕΣΚΕΪΝΗ

(ΦΘΟΡΙΖΕΙ)

## ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑΣ

✓ **ΥΨΗΛΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (zero background technique)**

✓ **ΜΕΓΑΛΗ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (multiparameter technique)**

*ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ:*

*$\lambda_{ex}$ ,  $\lambda_{em}$ ,  $\tau$ ,  $\lambda_{phosph.}$ ,  $P$ , μη ειδικές παράμετροι*

✓ **ΑΠΛΗ ΚΑΙ ΣΧΕΤΙΚΑ ΧΑΜΗΛΟΥ ΚΟΣΤΟΥΣ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ**

## ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ

✓ Συντελεστής  
κβαντικής απόδοσης

$$\Phi_F = \frac{\text{Αρ. εκπεμπ. φωτονίων}}{\text{Αρ. αποροφ. φωτονίων}} = \frac{k_f}{k_f + \sum k_{\text{non-f}}}$$
$$0 < \Phi_F < 1$$

✓ Ισχύς απορροφούμενης  
ακτινοβολίας

$$P_A = P_0 - P_t = P_0 (1 - e^{-2.303 \epsilon bc})$$

✓ Ισχύς εκπεμπόμενης  
ακτινοβολίας

$$F = \Phi_F P_A = \Phi_F P_0 (1 - e^{-2.303 \epsilon bc})$$

$$(2,303 \epsilon bc - (2,303 \epsilon bc)^2/2! + (2,303 \epsilon bc)^3/3!)$$

✓ Σε πολύ αραιά διαλύματα ( $\epsilon bc < 0.05$ )

$$F = 2.303 \Phi_F P_0 \epsilon bc = K c$$

✓ Χρόνος ζωής φθορισμού

$$\tau_F = \Phi_F \tau_n$$

✓ Ισχύς φθορισμού σε χρόνο  $t$  μετά  
τη διέγερση

$$F_t = F_0 e^{-t/\tau}$$

✓ Πόλωση φθορισμού

$$P = (F_H - F_V) / (F_H + F_V)$$

## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΩΝ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ

### ✓ ΣΚΕΛΑΣΗ (SCATTERING)

⇒ *Rayleigh* (μόρια διαλύτη,  $\ll \lambda$ )

⇒ *Tyndall* (μικρά σωματίδια,  $< \lambda$ )

⇒ *Raman* (δονητικές και περιστροφικές κινήσεις μορίων διαλύτη)

### ✓ ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

### ✓ ΑΠΟΣΒΕΣΗ (QUENCHING)

### ✓ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΦΙΛΤΡΟΥ (INNER FILTER EFFECT)

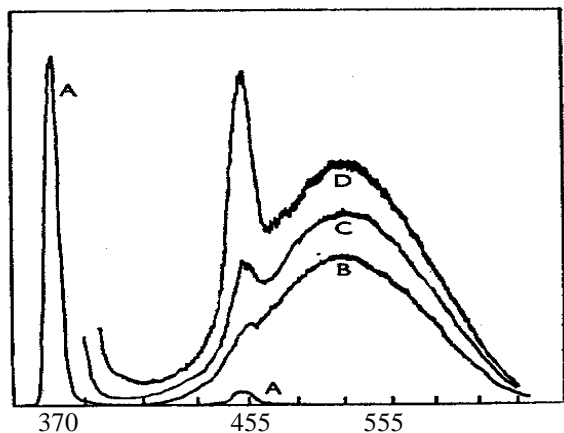


# ΑΠΟΣΒΕΣΗ (QUENCHING)

Μείωση της εντάσεως φθορισμού κάτω από την αναμενόμενη τιμή

Οφείλεται:

- Στην αποδιέγερση των διεγερμένων μορίων της προσδιοριζόμενης ουσίας A λόγω συγκρούσεων
- Στο σχηματισμό συμπλόκων διαφορετικών φασματικών χαρακτηριστικών
- Σε φωτοδιάσπαση
- Σε αυτοαπορρόφηση του φθορισμού από μόρια της ουσίας A που βρίσκονται στη θεμελειώδη κατάσταση

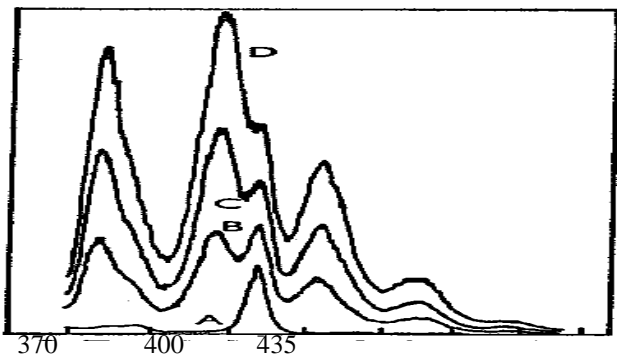


**Φάσμα εκπομπής θεικής κινίνης ( $\lambda_{ex}=366nm$ ) και παρεμπόδιση από σκέδαση Raman**

A- H<sub>2</sub>O; B- 0,1μg/ml κινίνης (σε ίδια ευαισθησία)

C, D- 0,1 μg/ml κινίνης (υψηλή ευαισθησία)

λ, nm

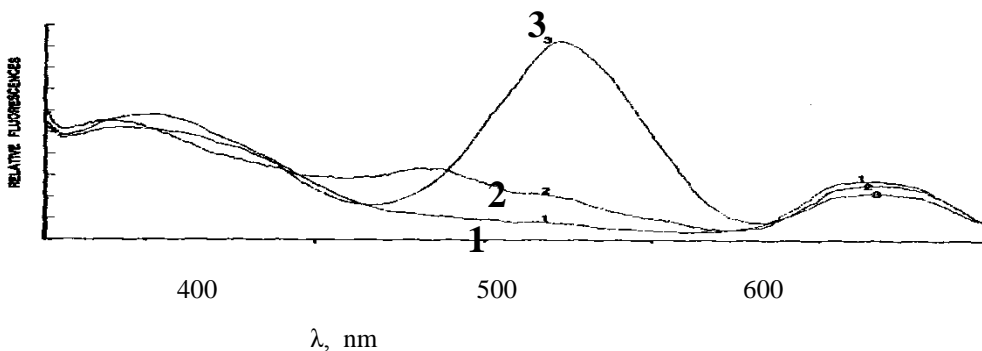


**Φάσμα εκπομπής ανθρακενίου σε κυκλοεξάνιο και παρεμπόδιση από σκέδαση Raman**

A- διαλύτης

B, C, D- ανθρακένιο σε διάφορες συγκεντρώσεις

λ, nm



1. Φυσιολογικός ορός
2. Αιμολυμένος ορός
3. Ικτερικός ορός

## ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑΣ

- Φθορισμόμετρα (φίλτρα)
- Φασματοφθορισμόμετρα (μονοχρωμάτορες)
- Φθορισμόμετρα τύπου ELISA (φίλτρα)
- Φθορισμόμετρα χρονικά διαχωριζόμενου φθορισμού (time resolved fluorimeters)

## ΠΗΓΕΣ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ

-Λυχνίες τόξου υδραργύρου [υψηλής (366nm) και χαμηλής πίεσης (254nm)]

-Λυχνίες τόξου αερίου ξένου (συνεχές φάσμα, 250-600nm)

α) συνεχούς εκπομπής

β) στιγμιαίας εκπομπής

-Λείζερ (ενισχυτές φωτός εξαναγκασμένης εκπομπής)

α) μονοχρωματικοί

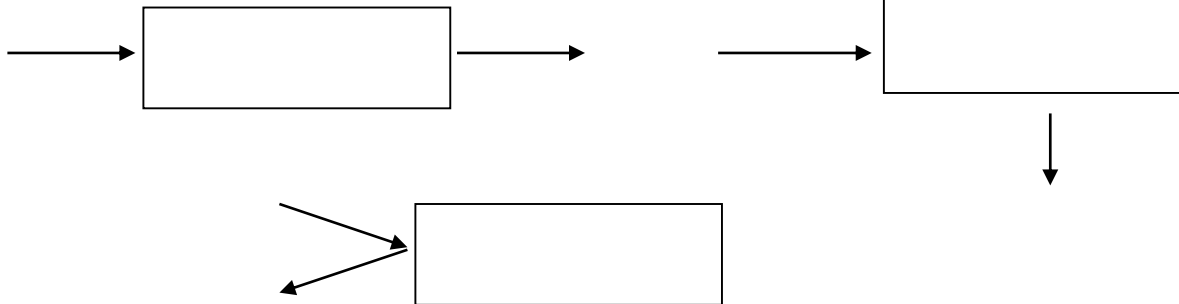
β) λέιζερ χρωστικών με επιλογή μήκους κύματος

## ΕΠΙΛΟΓΕΙΣ ΜΗΚΟΥΣ ΚΥΜΑΤΟΣ

-Φίλτρα (υάλου αποκοπής ή συμβολής)

-Μονοχρωμάτορες (πρίσματος, φράγματος)

## ΚΥΨΕΛΙΔΕΣ

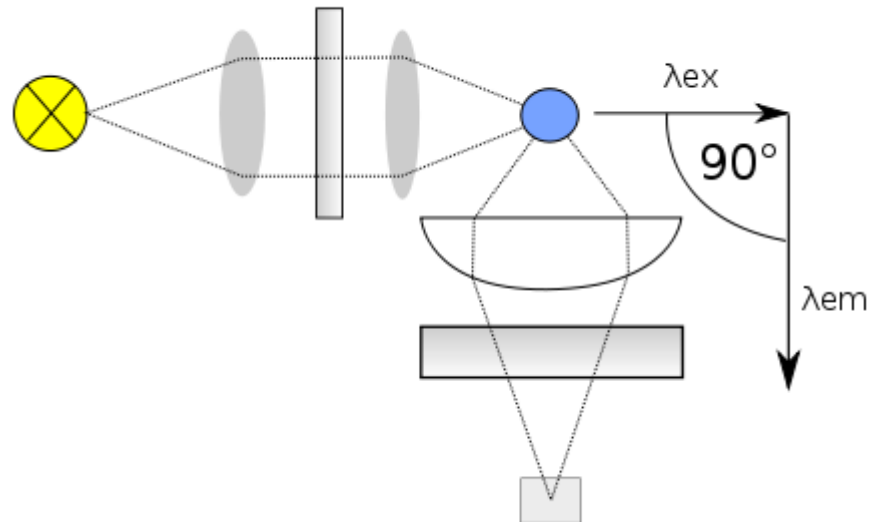


## ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ

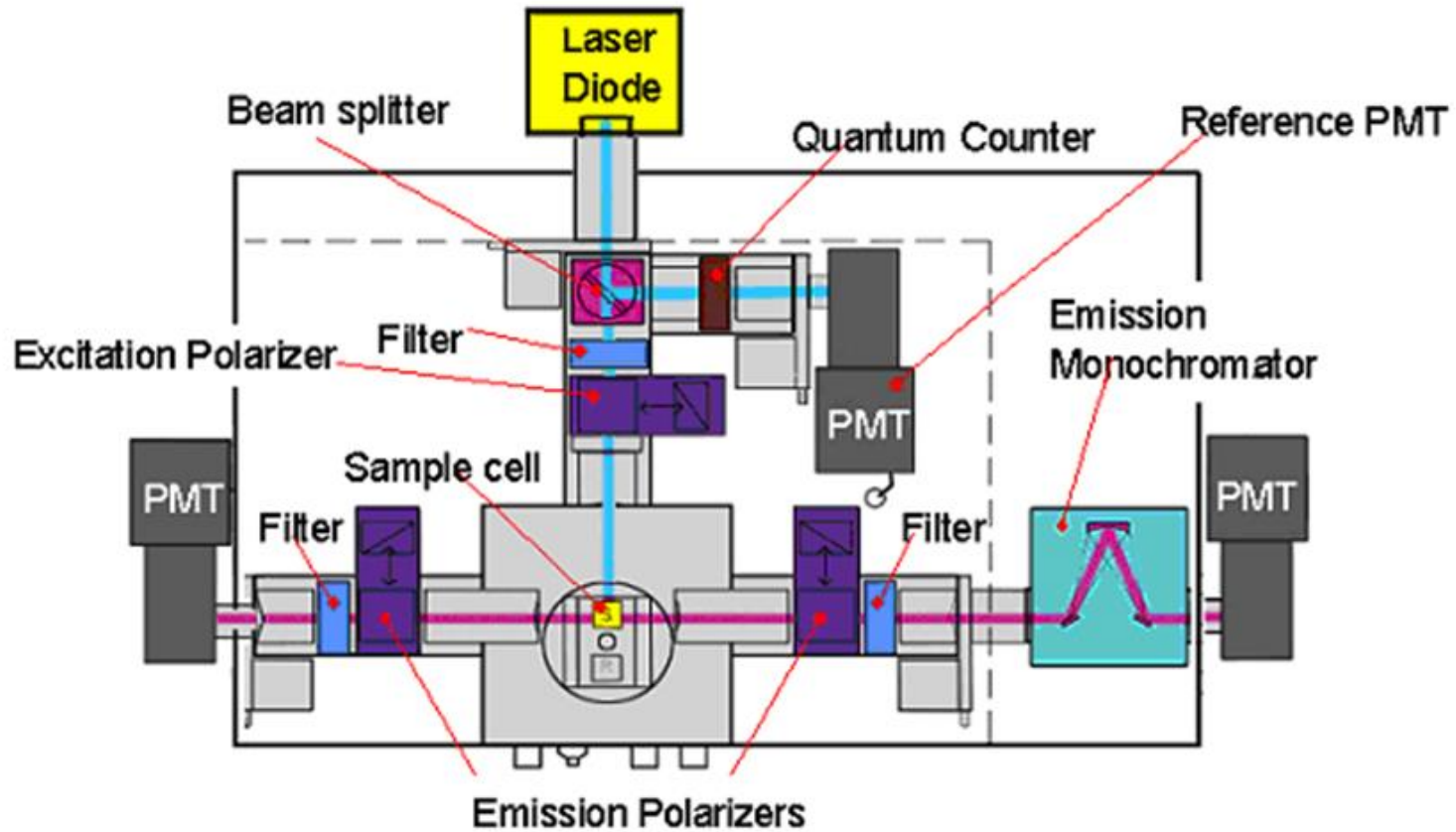
-Φωτοπολλαπλασιαστές (PMT)

-Ανιχνευτές ζεύξης φορτίου (Charge-coupled detectors)

# Σχηματική παράσταση ενός κλασσικού φθορισμομέτρου



# Σχηματική παράσταση ενός φθορισμομέτρου



# Φθορισμόμετρα για αναλύσεις ELISA

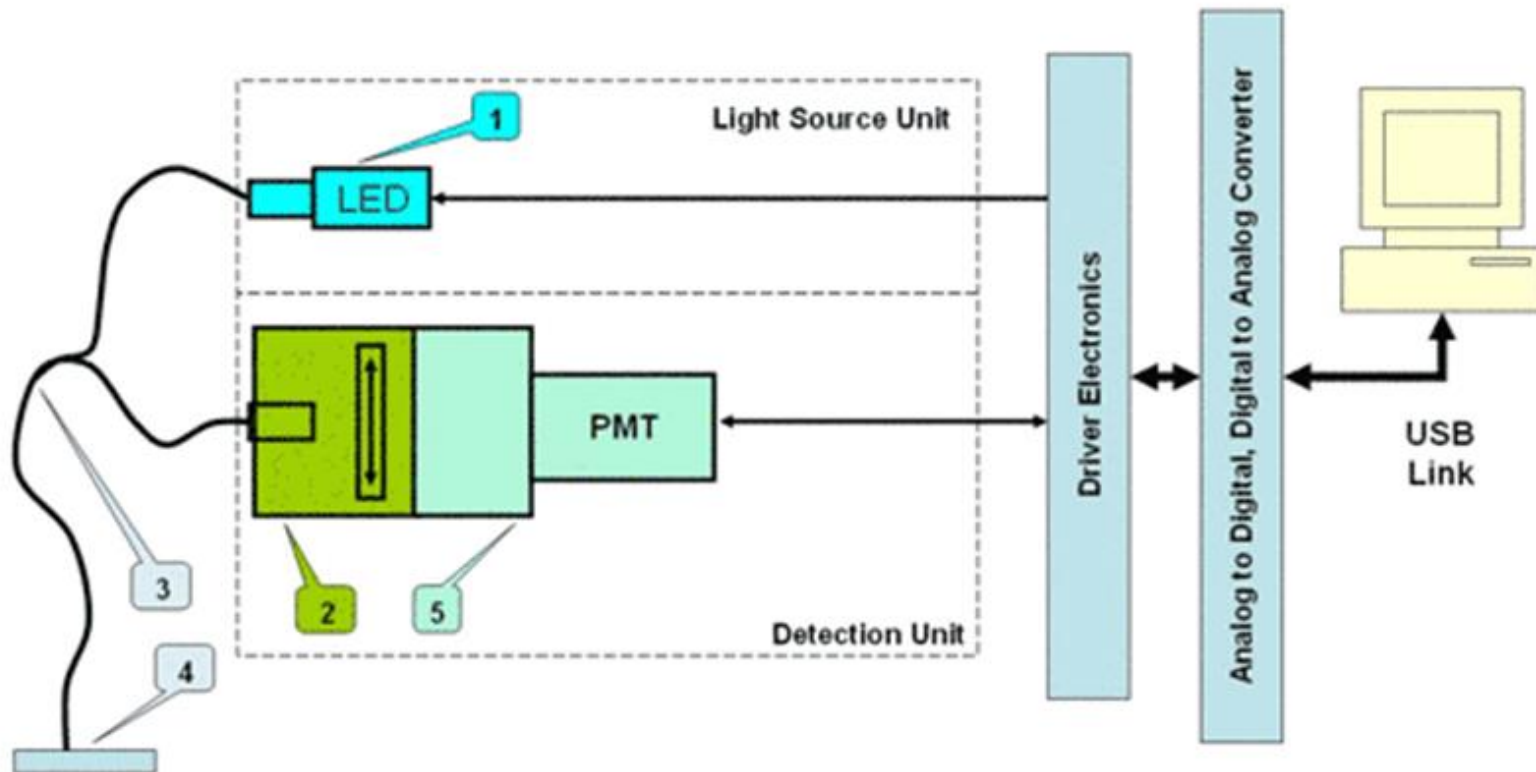


# Φορητό φθορισμόμετρο για μέτρηση φθορισμού χλωροφύλλης σε φυτά





# Σχηματική παράσταση ανακλαστικού φθορισμομέτρου που αξιοποιεί τις οπτικές ίνες



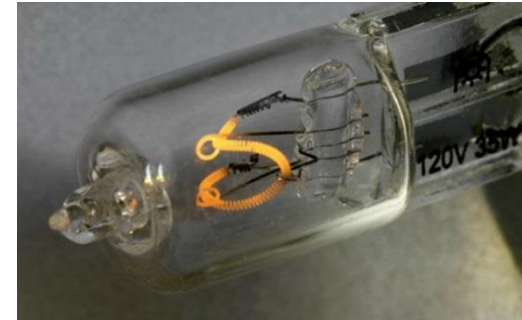
# ΠΗΓΕΣ ΦΩΤΟΣ

## Κύρια χαρακτηριστικά

- Σταθερότητα
- Ενταση
- Περιοχή μήκους κύματος

## Κυριώτερα είδη

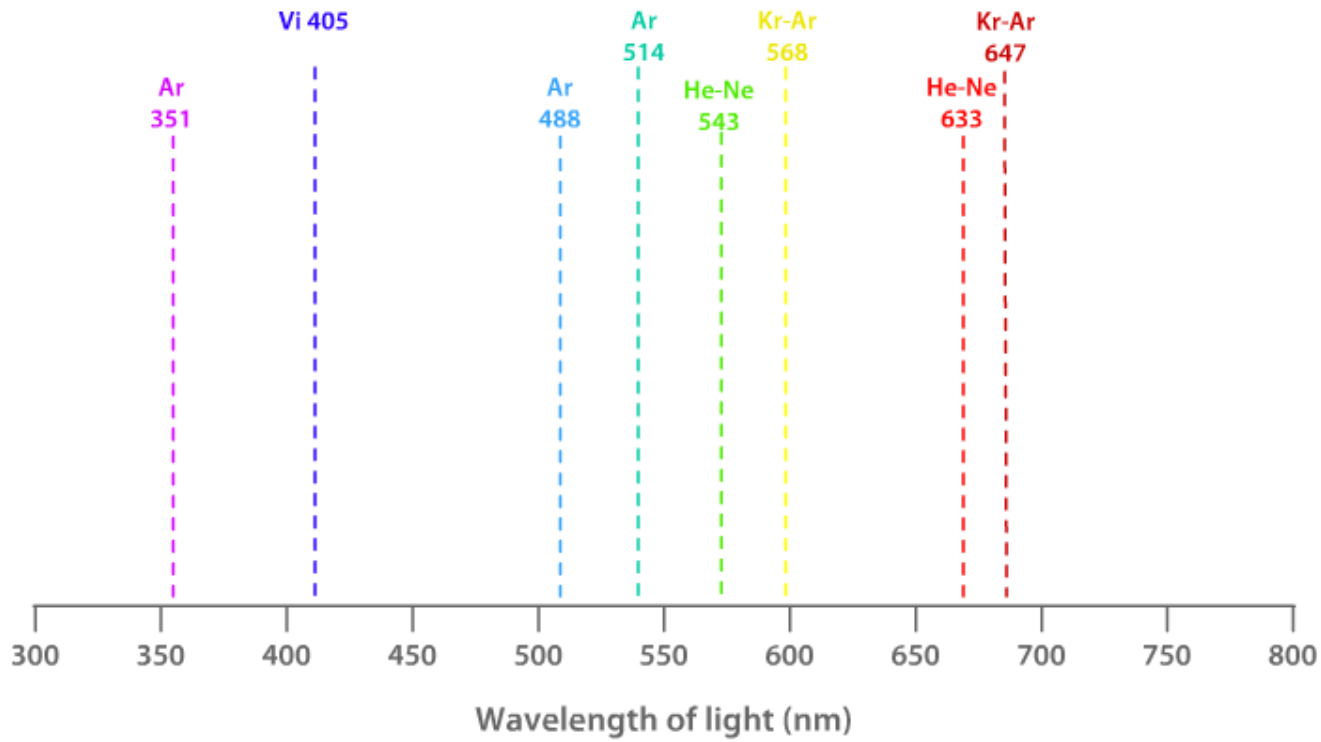
- Λυχνία τόξου Hg υψηλής πίεσεως (γραμμικό φάσμα, έντονη γραμμή: 366nm)
- Λυχνία τόξου Hg χαμηλής πίεσεως (γραμμικό φάσμα, έντονη γραμμή: 254nm)
- Λυχνία τόξου Hg χαμηλής πίεσεως με επικάλυψη φωσφόρου (300 – 400 nm)
- Λυχνία τόξου αερίου Ξένου (συνεχές φάσμα 250 – 600 nm)
- Lasers : υψηλός βαθμός μονοχρωματικότητας, μεγάλη ισχύς εκπεμπόμενης ακτινοβολίας



# ΠΗΓΕΣ ΦΩΤΟΣ:

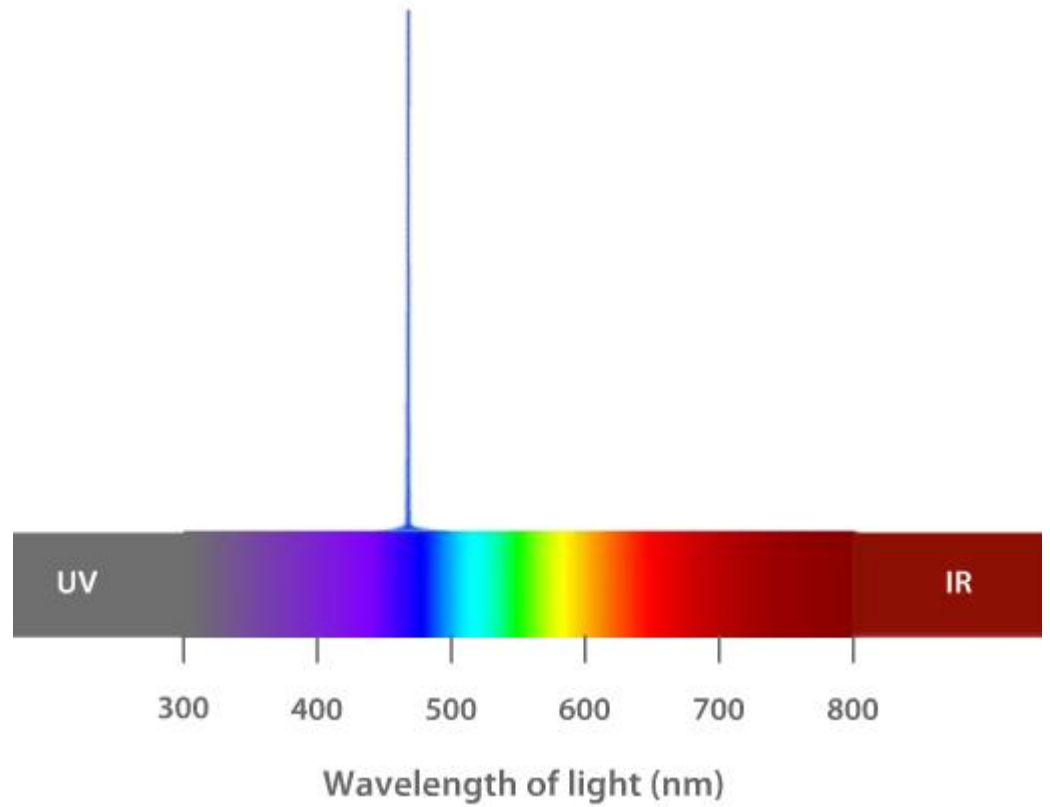
## laser : αυστηρά μονοχρωματική ακτινοβολία

### Laser Excitation



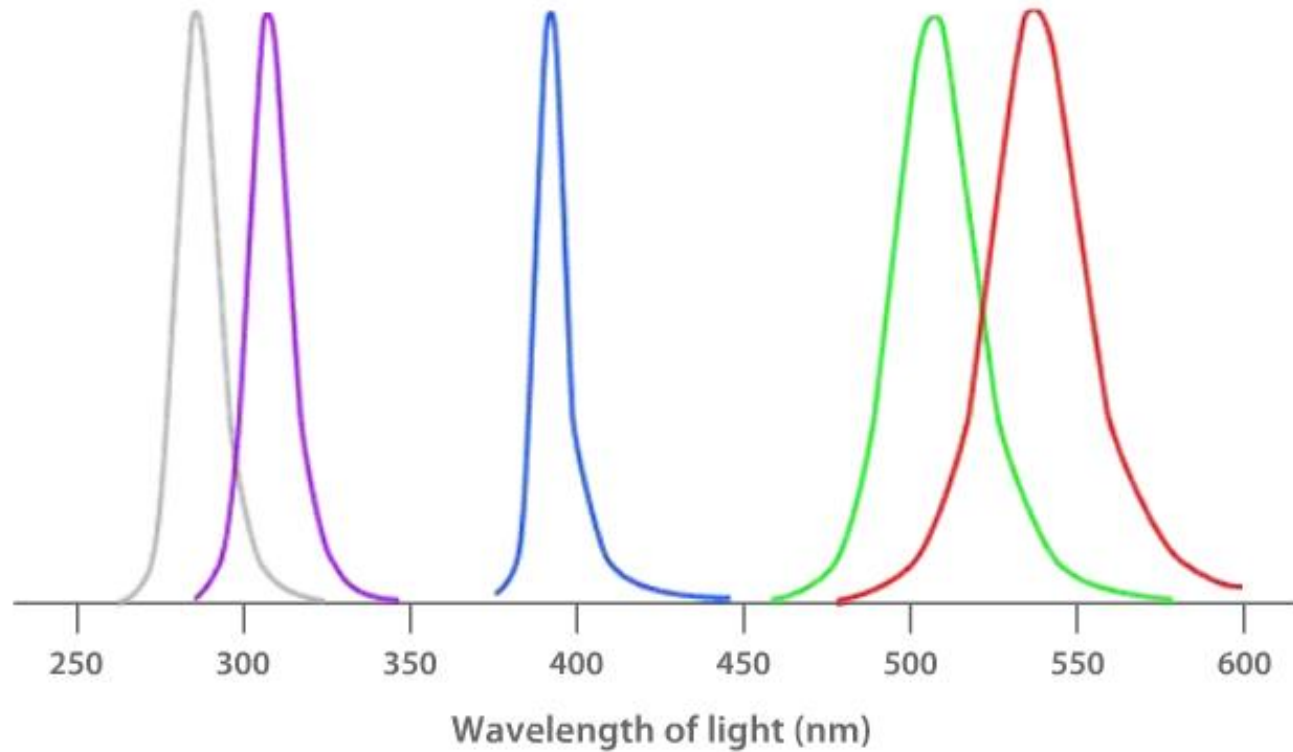
# ΠΗΓΕΣ ΦΩΤΟΣ:

## laser Αργού: μονοχρωματική ακτινοβολία



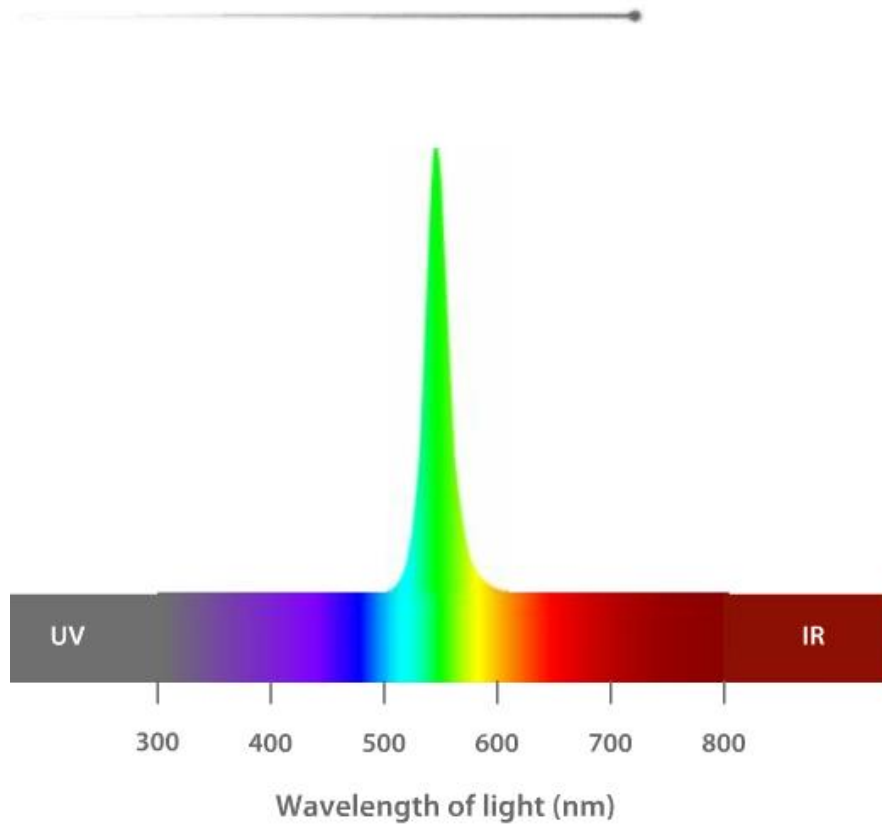
# ΠΗΓΕΣ ΦΩΤΟΣ: LED: light emitting diodes

## LED Light Sources



# ΠΗΓΕΣ ΦΩΤΟΣ: LED: light emitting diodes

Excitation Sources



LED

Green light

# ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΕΩΣ

## ΑΜΕΣΕΣ

- Βιταμίνες
- Φάρμακα (salicylates, furosemid, quinolones, LSD)
- Αμινοξέα (tryptophane, tyrosine, phenylalanine)
- Αλκαλοειδή (morphine, codeine, papaverin)
- Πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες (fluorene, benz(a)pyrene, anthracene, perylene)

## ΕΜΜΕΣΕΣ

- Μετατροπή της προς προσδιορισμό ουσίας σε φθορίζον προϊόν μέσω χημικής αντίδρασης
- Μέσω κατάλληλης ιχνηθέτησης με ένζυμο και αντίστοιχο φθορισμογόνο υπόστρωμα
- Μέσω κατάλληλης ιχνηθέτησης με έντονα φθορίζουσα ουσία

**T A B L E 4-1. EXAMPLES OF ANALYTES  
MEASURED BY FLUORESCENCE**

<b>Analytes</b>	<b>Therapeutic Drugs</b>
Bile acids	Amikacin
Bilirubin	Carbamazepine
Calcium	Digoxin
Catecholamines	Gentamicin
Estrogens (urinary)	Lidocaine
Glucose	Phenobarbital
Magnesium	Phenytoin
Nucleotides	Primidone
Protoporphyrin	Procainamide
<b>Coagulation</b>	Quinidine
Antithrombin III	Theophylline
Heparin	Tobramycin
Plasminogen	<b>Hormones</b>
<b>Enzymes</b>	Cortisol
CK-MB	FSH
Glucosidases	hCG
Hydrolases	LH
Oxidoreductases	Thyroid uptake
Proteases	Thyroxine
	TSH
	<b>Other</b>
	Ferritin
	IgE

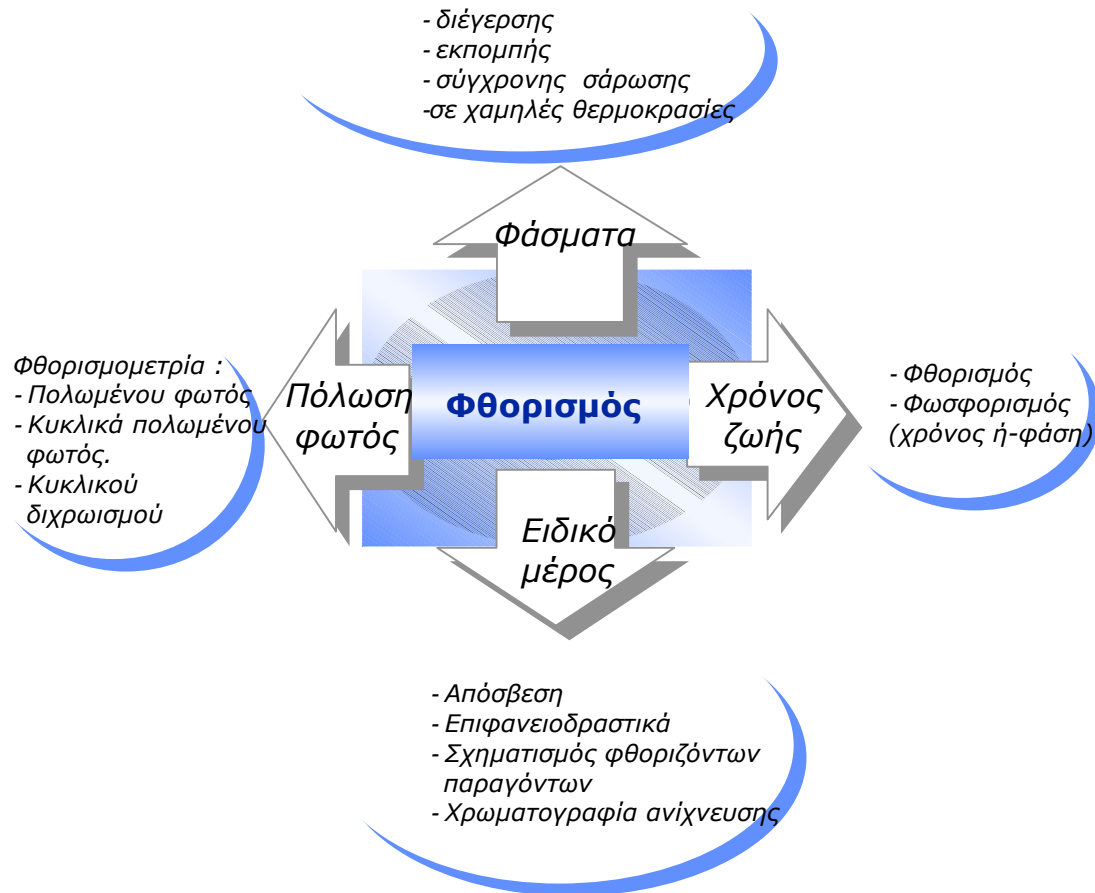
Abbreviations: CK-MB: creatinine kinase isoenzyme-muscle brain dimer; FSH: follicle-stimulating hormone; hCG: human chorionic gonadotropin; LH: luteinizing hormone; TSH: thyroid-stimulating hormone; IgE: gamma E immunoglobulin.



# Εφαρμογές των έμμεσων φθορισμομετρικών μεθόδων

- ✓ Μέθοδοι διαχωρισμού με ανιχνευτή φθορισμού  
*(Χρωματογραφικές τεχνικές, τριχοειδής ηλεκτροφόρηση)*
- ✓ Μέθοδοι ποσοτικοποίησης νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών
- ✓ Ενζυμική ανάλυση
  - α) Προσδιορισμός ενεργότητας ενζύμων
  - β) Προσδιορισμός υποστρωμάτων
- ✓ Προσδιορισμός μεγέθους και ολικών διαστάσεων μακρομορίων επισημασμένων με φθορισμοφόρα  
*(Φθορισμομετρία πολωμένου φθορισμού)*
- ✓ Μελέτη σύνδεσης μικρομορίων, π.χ. φαρμάκων με πρωτεΐνες  
*(Τεχνική φθορίζοντος ιχνηθέτη)*
- ✓ Μετρήσεις αποστάσεων μεταξύ ομάδων μακρομορίου με βάση το φαινόμενο μεταφοράς ενέργειας
- ✓ Μικροσκοπία φθορισμού  
*(Χρώση κυττάρων, χρήση επισημασμένων αντισωμάτων ειδικών για τα συστατικά του κυττάρου)*
- ✓ Φθορισμοανοσοχημικοί προσδιορισμοί
- ✓ Μέθοδοι υβριδοποίησης DNA

# ΠΟΛΥΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΟΤΗΤΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑΣ



# ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑΣ

## ΥΨΗΛΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ

### ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΟΡΙΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΣΕΩΣ

- Φωτομετρία => ελάχιστη ανιχνεύσιμη διαφορά ισχύος μεταξύ προσπίπτουσας και διερχόμενης ακτινοβολίας
- Φθορισμομετρία => μέγεθος θορύβου στο κύκλωμα ανιχνευτή-ενισχυτή
- Το φθορισμόμετρο πρέπει να διακρίνει μεταξύ σκότους και μιας ελάχιστης τιμής εντάσεως φθορισμού
- $10^2$ – $10^4$  μεγαλύτερη ευαισθησία από την φασματοφωτομετρία απορροφήσεως

## ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

- Πειραματικές παράμετροι:  $\lambda_{ex}$ ,  $\lambda_{em}$ ,  $\tau$  (decay time),  $\lambda$  phosph., P (βαθμός πολώσεως), δομή μορίων

## ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

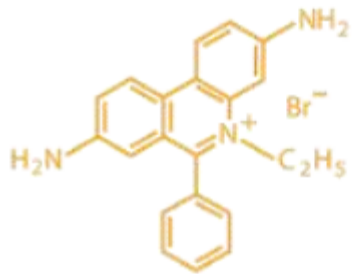
- Σχετικά μικρή ακρίβεια (2-10%)
- Δυνατότητα ανεπιθύμητων αλληλεπιδράσεων των διεγερμένων μορίων (απόσβεση, φωτοαποσύνθεση)

# Εφαρμογές της φθορισμομετρίας και της φθορισμομετρικής ανάλυσης στη σύγχρονη βιολογία

## **Ορισμένες πολύ σημαντικές εφαρμογές:**

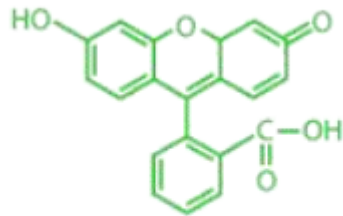
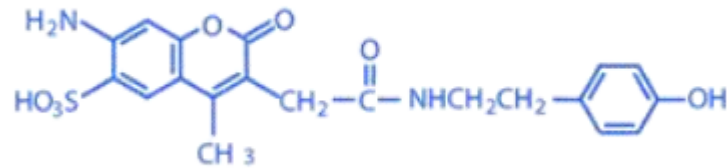
- ***Ανοσοπροσδιορισμοί (ELISA)***
- ***DNA sequencing***
- ***Ηλεκτροφόρηση DNA , RNA***
- ***Real time PCR***
- ***Fluorescent in situ Hybridization (FISH)***
- ***Flow cytometry (κυτταρομετρία ροής)***

# Φθορίζουσες ουσίες που χρησιμοποιούνται πολύ στη σύγχρονη βιολογία



**Ethidium bromide**

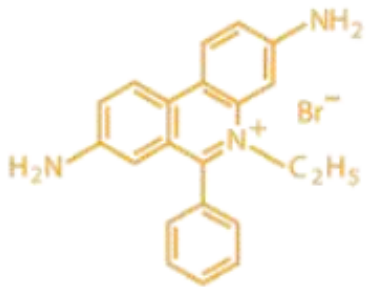
**Alexa Fluor 350**



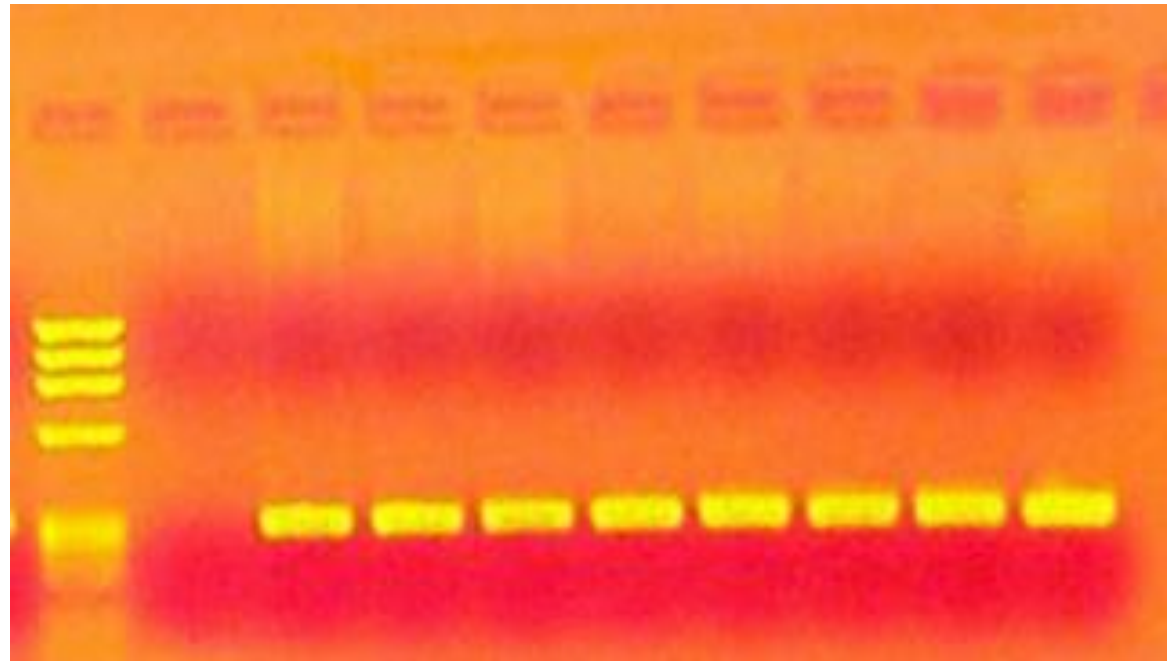
**Fluorescein**

# Ηλεκτροφόρηση DNA , RNA

- βρωμιούχο αιθίδιο: φθορίζει όταν σχηματίζει σύμπλοκο παρεμβολής με το DNA . Διεγείρεται στο UV

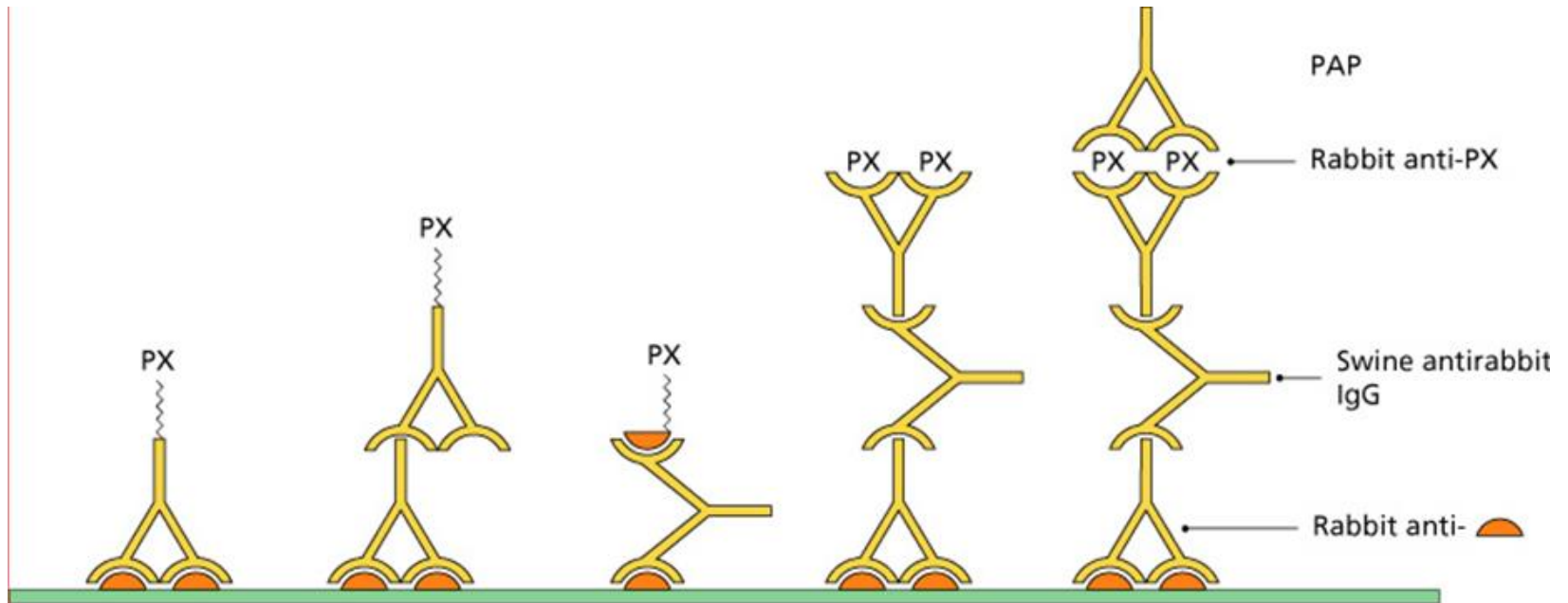
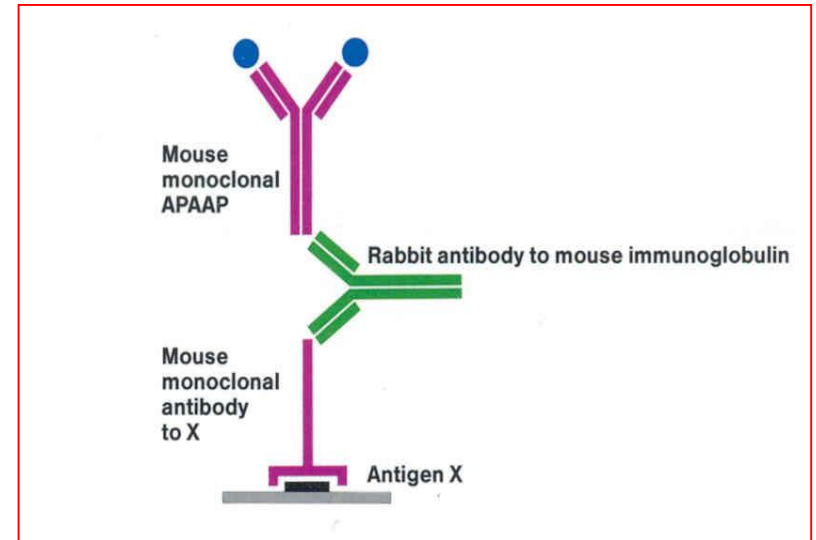


Ethidium bromide

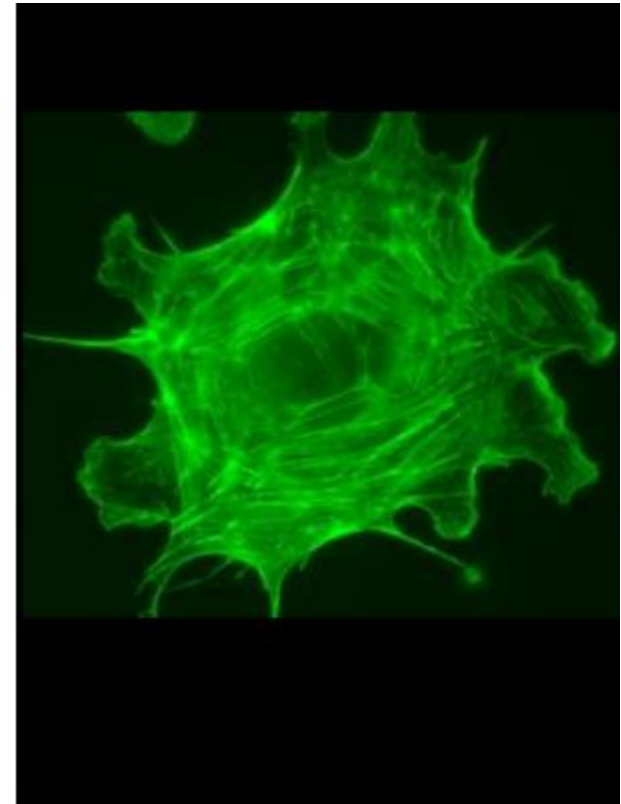
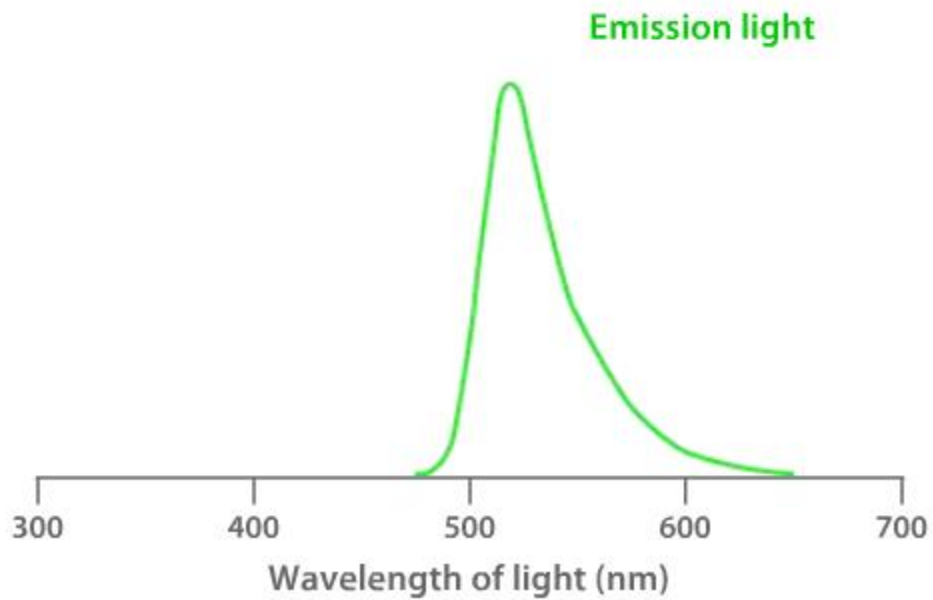


# Ανοσοφθορισμός (immunofluorescence)

- Βασίζεται στην ιχνηθέτηση αντισωμάτων με φθορίζοντα μόρια με σκοπό την ανίχνευση των αντιγόνων τους σε κύτταρα και ιστούς

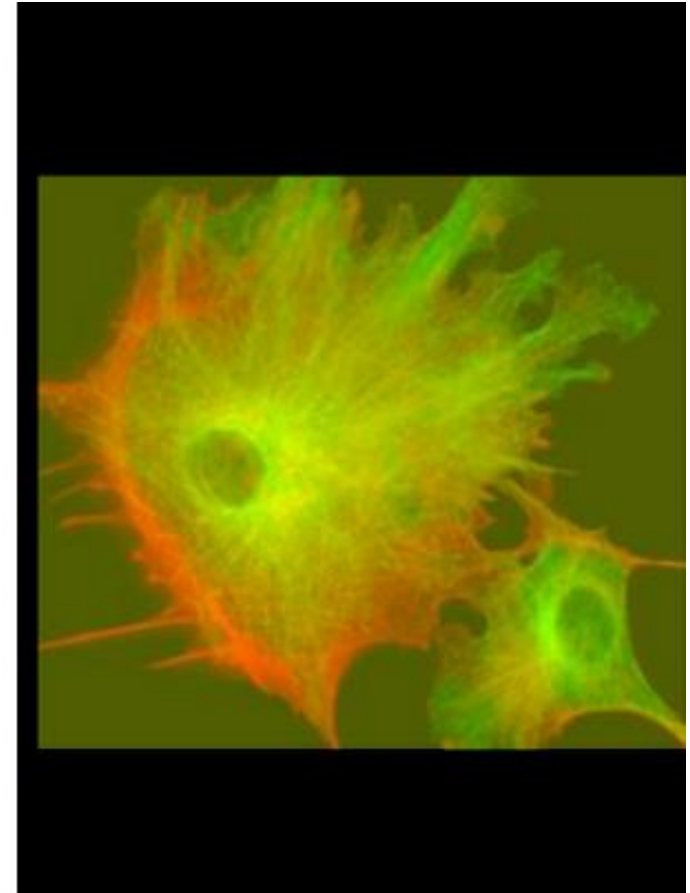
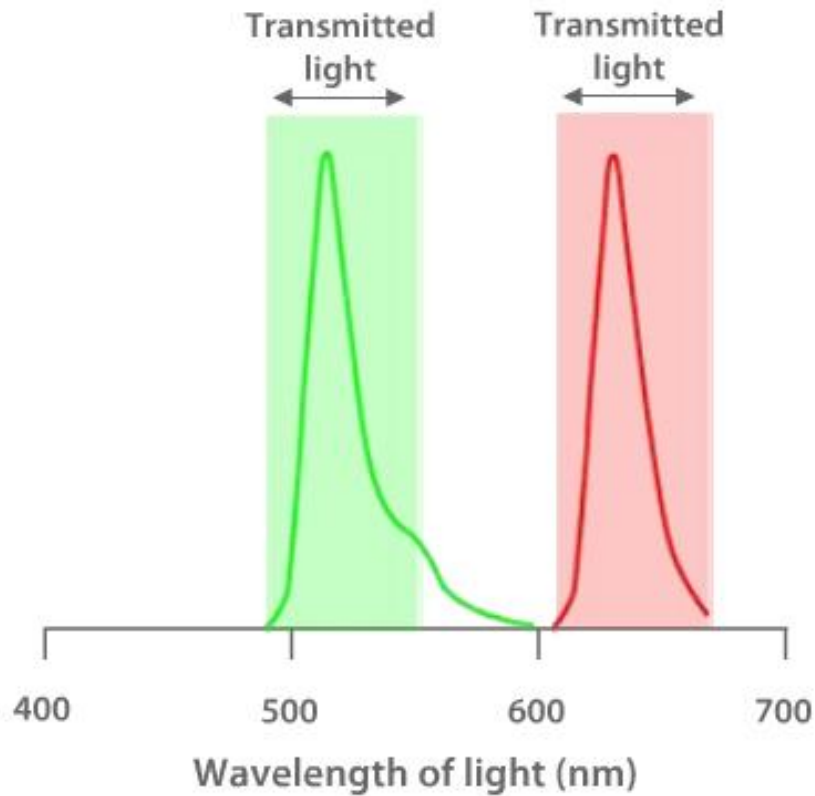


# Μονοχρωματικός ανοσοφθορισμός (Immunofluorescence)

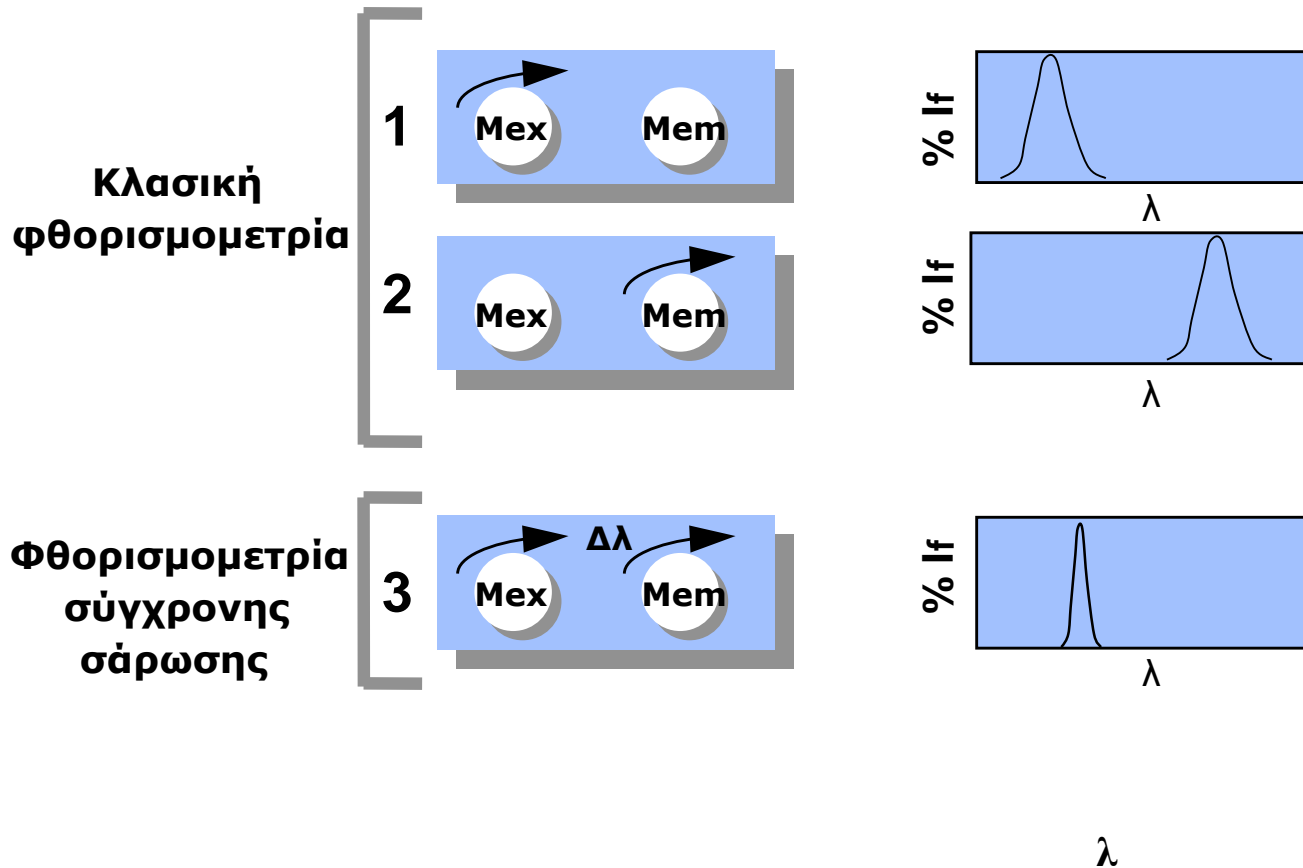




# Πολλαπλές φθορίζουσες χρωστικές: Multiple dyes



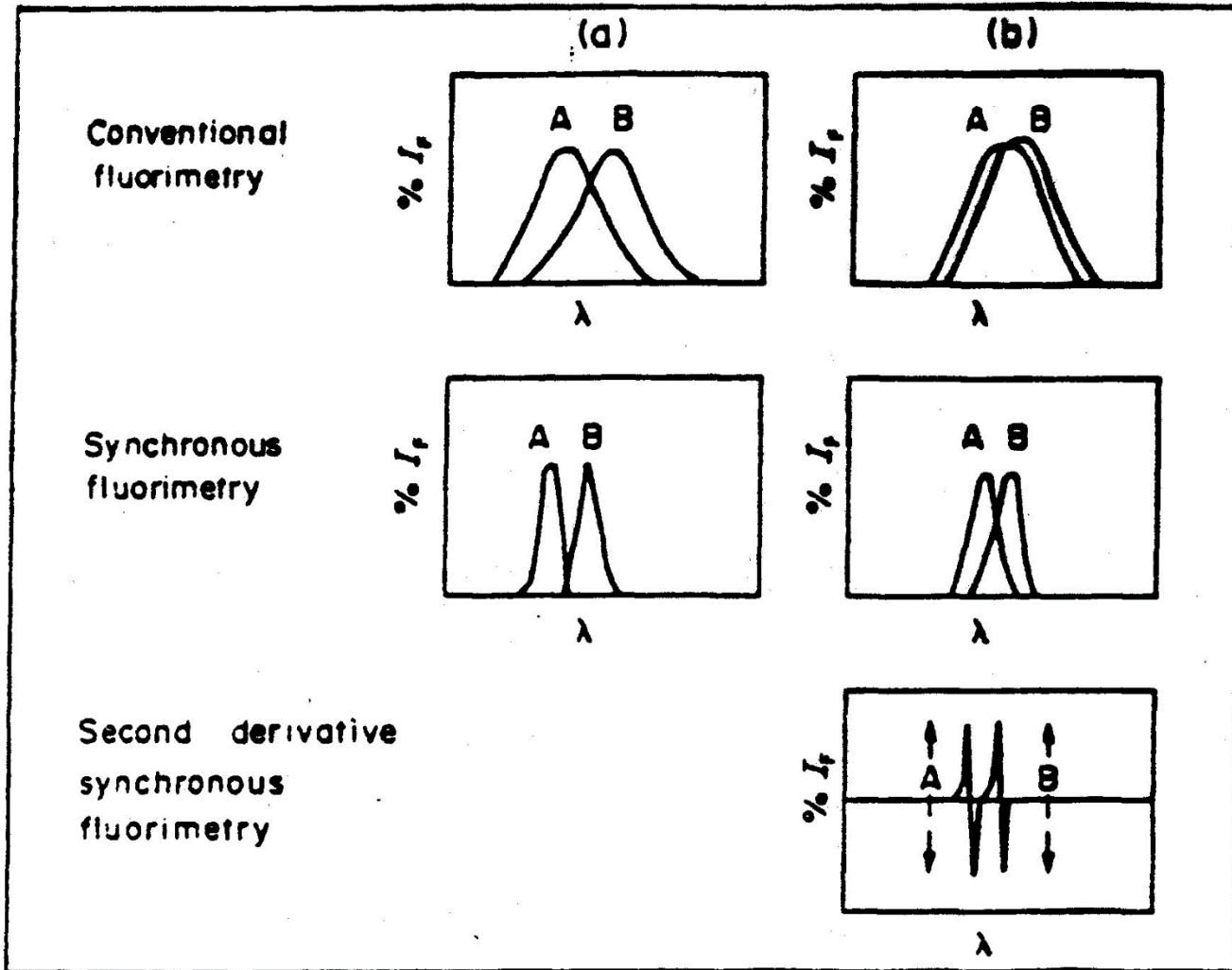
# ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ ΣΥΓΧΡΟΝΗΣ ΣΑΡΩΣΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ( $\Delta\lambda = \text{const}$ )



## Βασικά χαρακτηριστικά φάσματος:

- Ελάττωση ημιεύρους κορυφής
- Απλοποίηση φάσματος
- Ελάττωση φασματικής περιοχής αναλυτικού ενδιαφέροντος

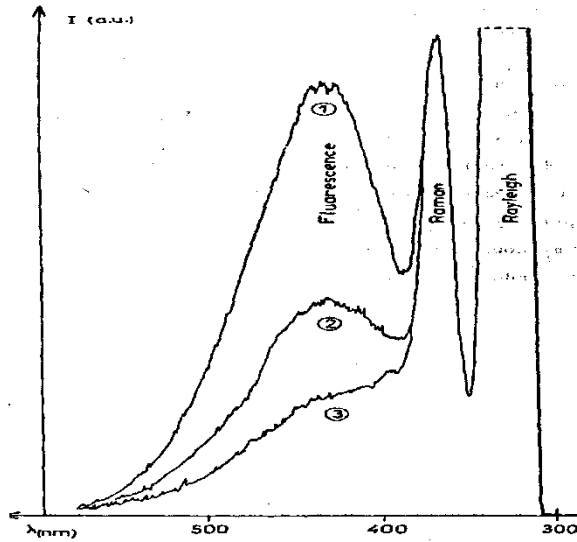
# Synchronous fluorescence spectroscopy



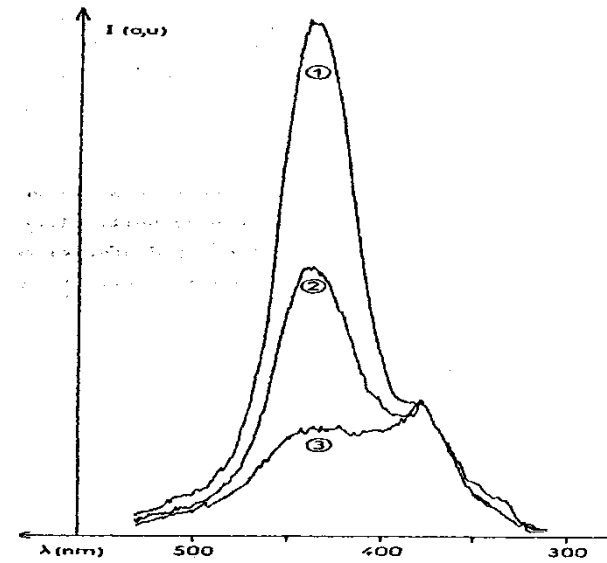
**ΦΑΣΜΑΤΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ  
ΔΙΑΙΘΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΤΟΥ  
ΛΥΣΕΡΓΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (LSD),  $\lambda_{ex}=325$   
nm**

**ΦΑΣΜΑΤΑ ΣΥΓΧΡΟΝΗΣ  
ΣΑΡΩΣΗΣ,  $\Delta\lambda = 110$  nm**

1) 1 ng/ml 2) 0.3 ng/ml 3) H<sub>2</sub>O



**DOL= 0.1 ng/ml**



**DOL= 2 ng/l**

## ΑΡΧΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΧΡΟΝΙΚΑ ΔΙΑΧΩΡΙΖΟΜΕΝΟΥ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ (Time-resolved Fluorimetry)

- ✓ Χρήση ιχνηθετών μεγάλου χρόνου ζωής φθορισμού (ιόντα λανθανίδων)
- ✓ Διέγερση δείγματος με βραχύ παλμό ακτινοβολίας
- ✓ Μέτρηση μετά απόσβεση βραχύβιου φθορισμού υποβάθρου

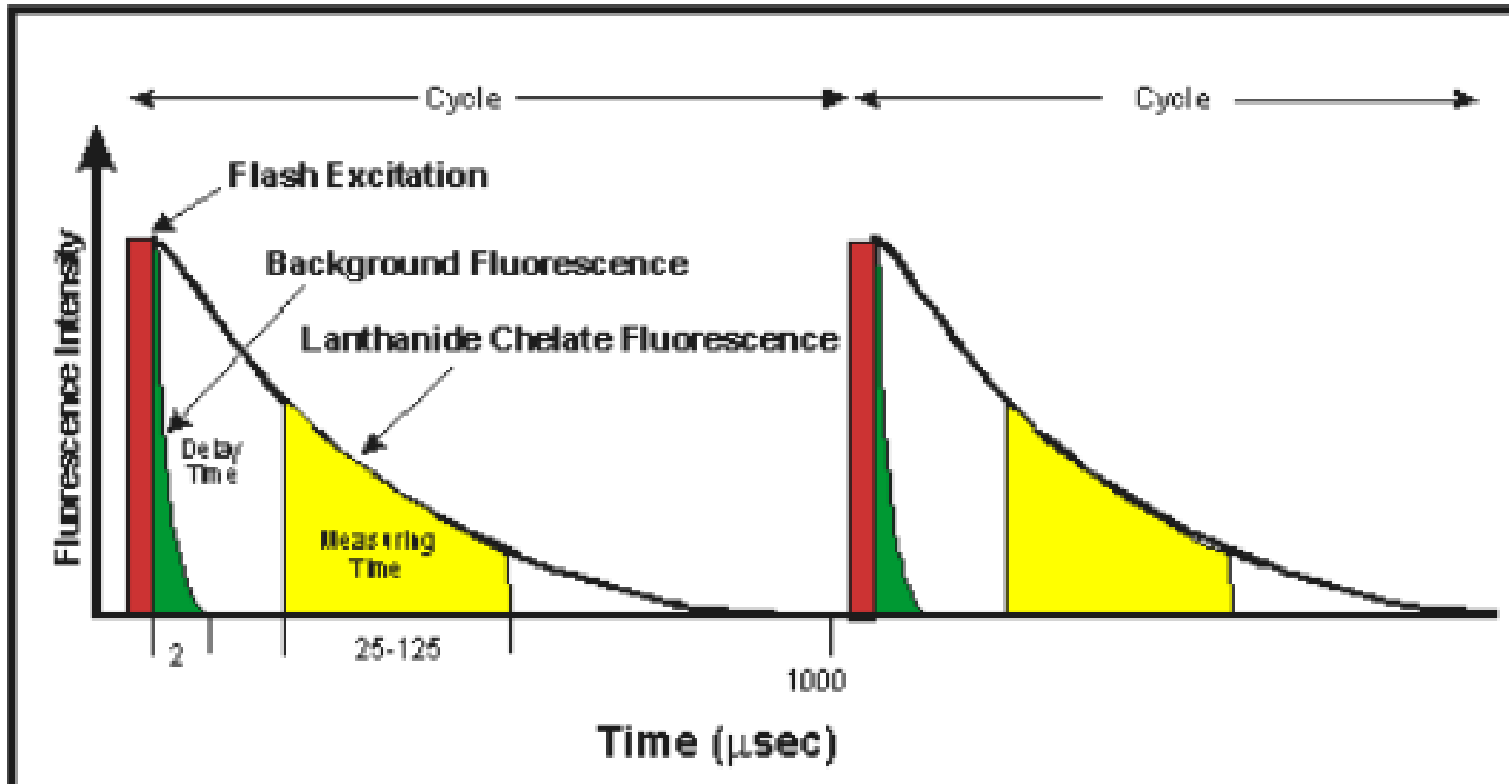
### ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ:

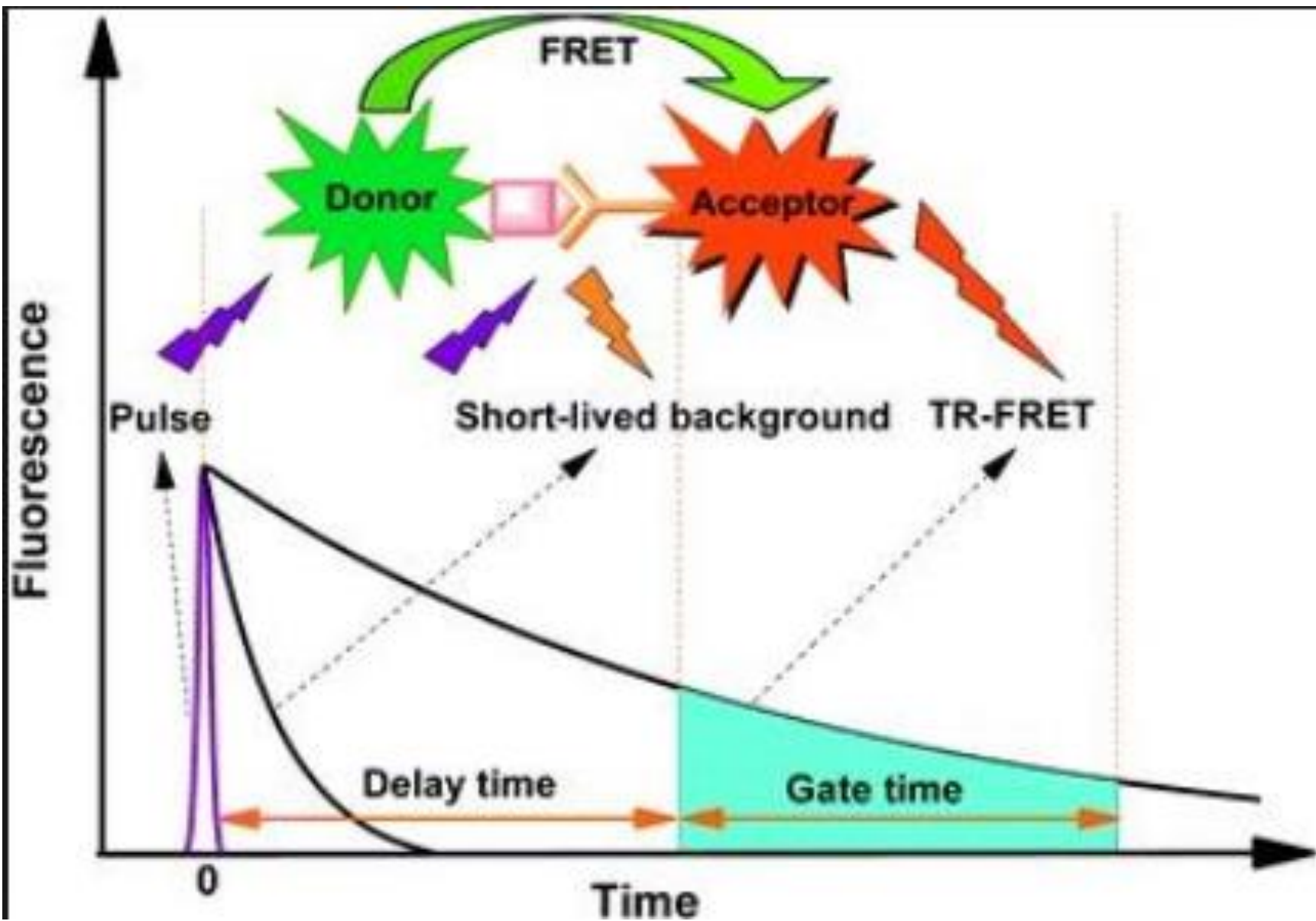
- Ελάττωση ακτινοβολίας υποβάθρου
- Ανοσοχημικοί προσδιορισμοί
- Μέθοδοι υβριδοποίησης DNA

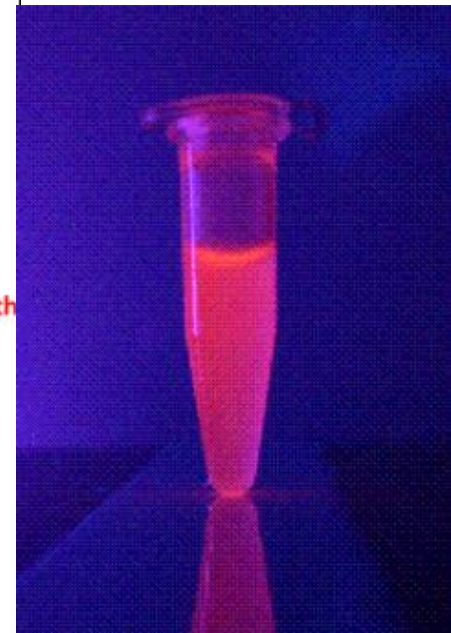
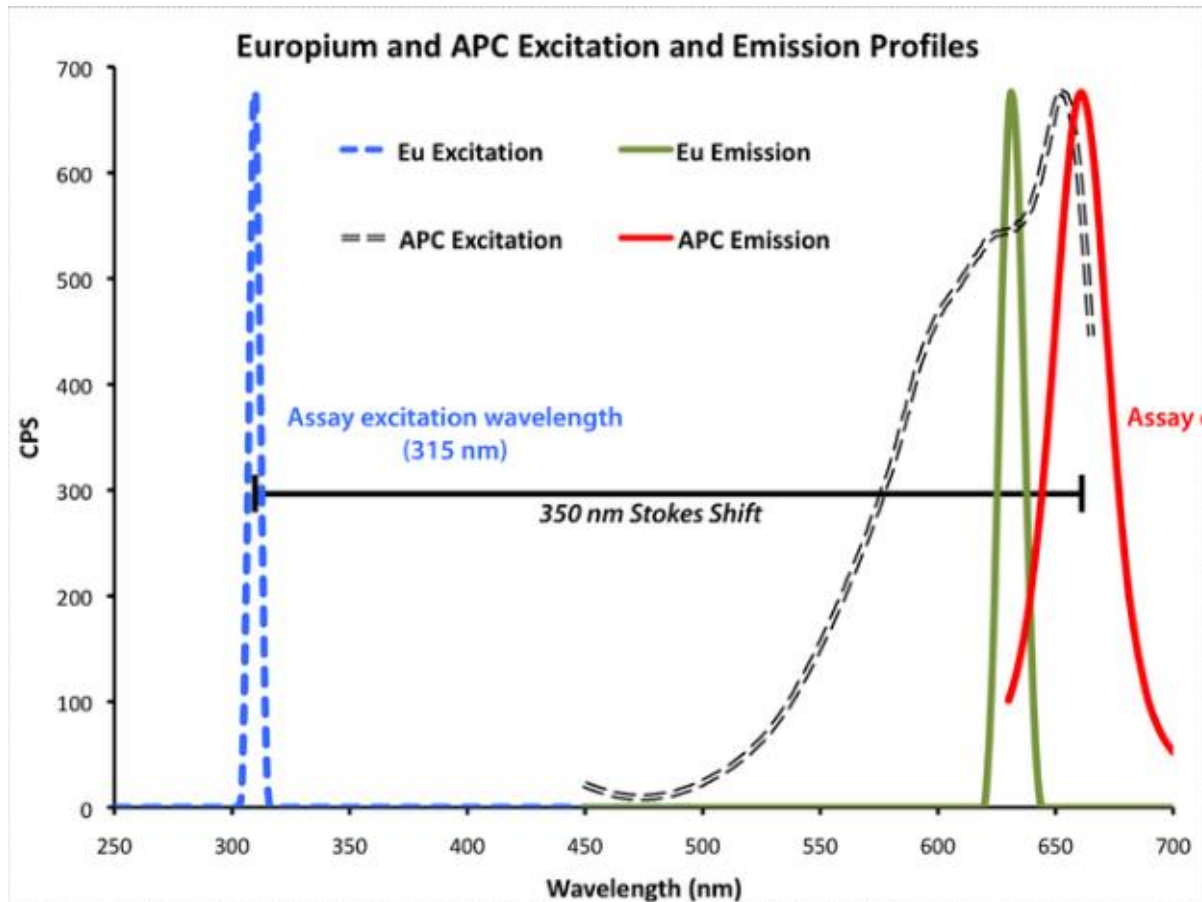
### Απόσβεση φθορισμού συμπλόκων ενώσεων λανθανιδών

Chelate	Excitation(nm)	Emission (nm)	Fluorescence Lifetime ( $\tau$ ) ( $\mu$ sec)	Suggested Emission Filter
Europium (Eu)	340	615	730	620/40
Samarium (Sm)	340	642	50	645/40
Terbium (Tb)	320	545	1050	545/40
*(Dyprosium (Dy)	320	572	16	575/15
*Ruthenium (Ru)	459	620	0.4	620/40

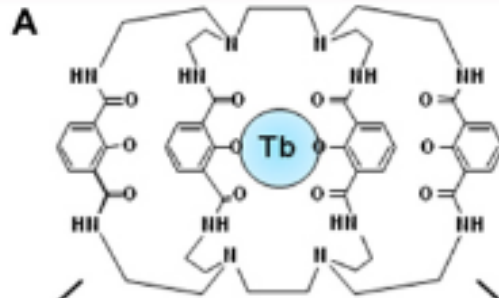
## Time resolved fluorescence



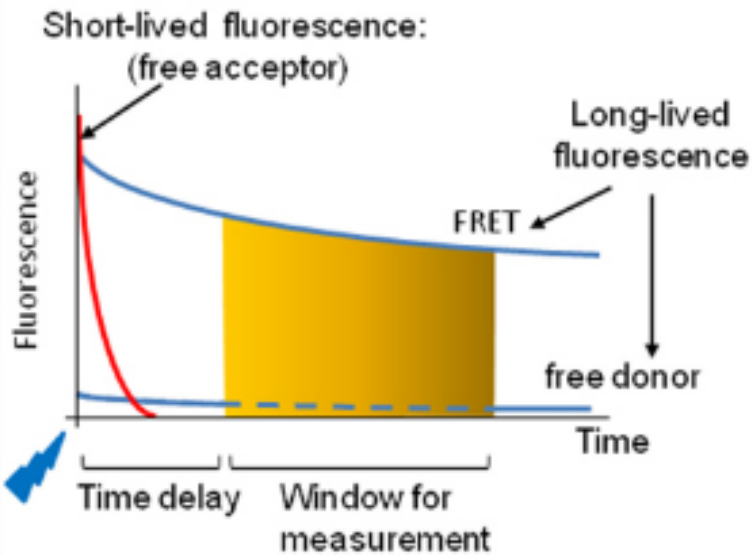






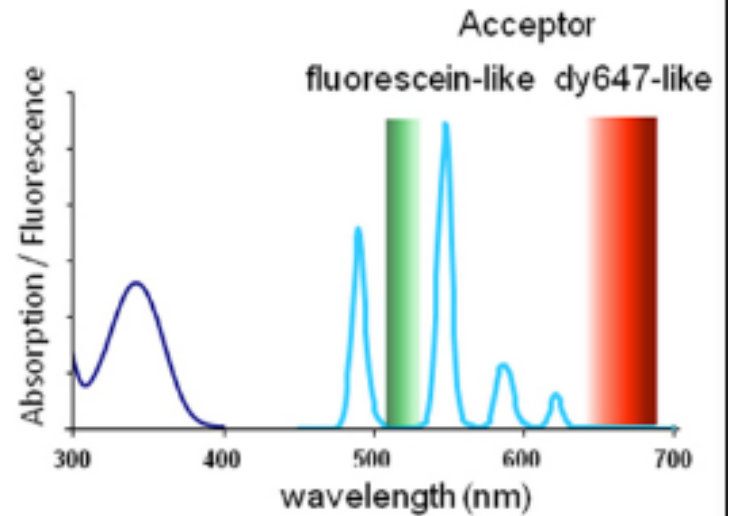


**B** Temporal selectivity



→ High signal-to-noise ratio

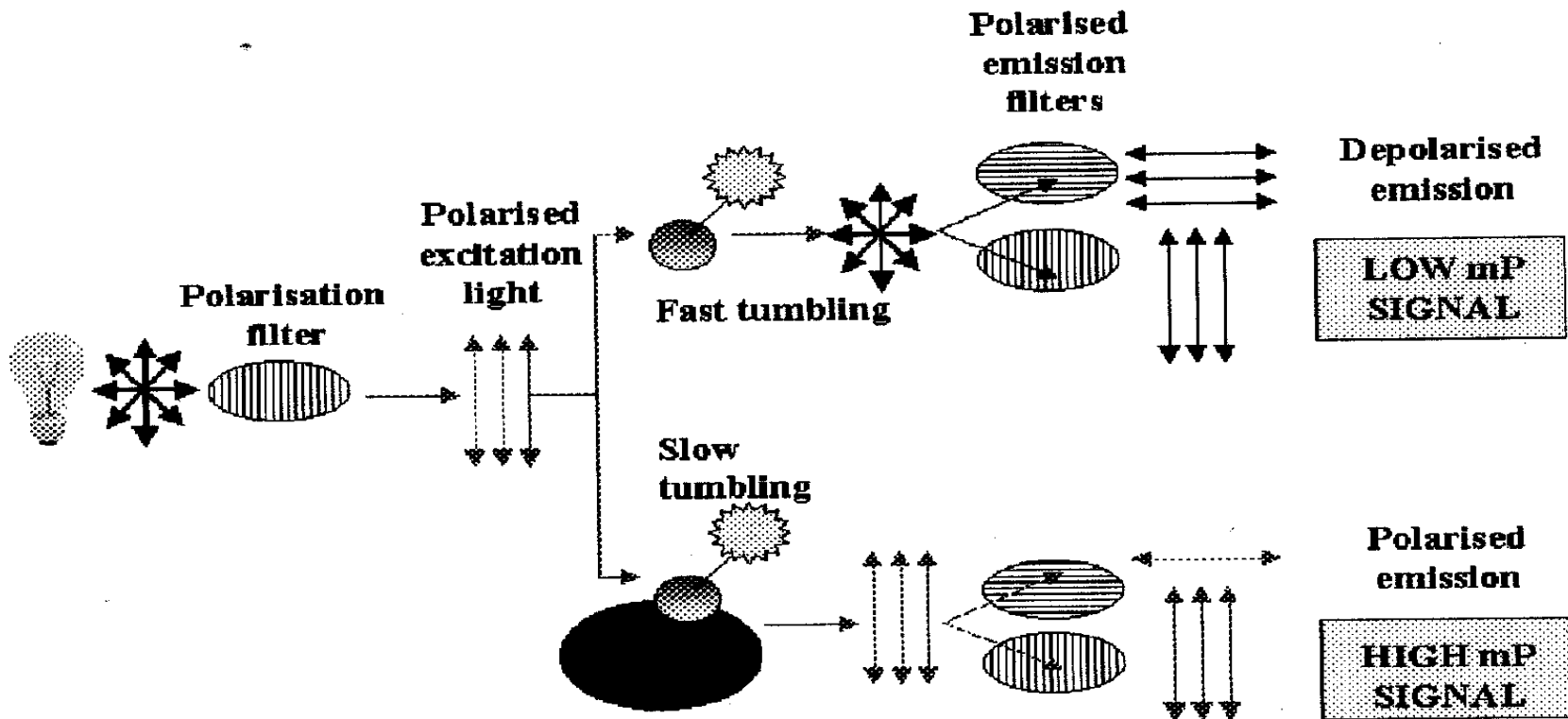
**C** Spectral compatibility



→ Possibility of multiplexing

# ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑΣ ΠΟΛΩΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

## (FLUORESCENCE POLARIZATION)



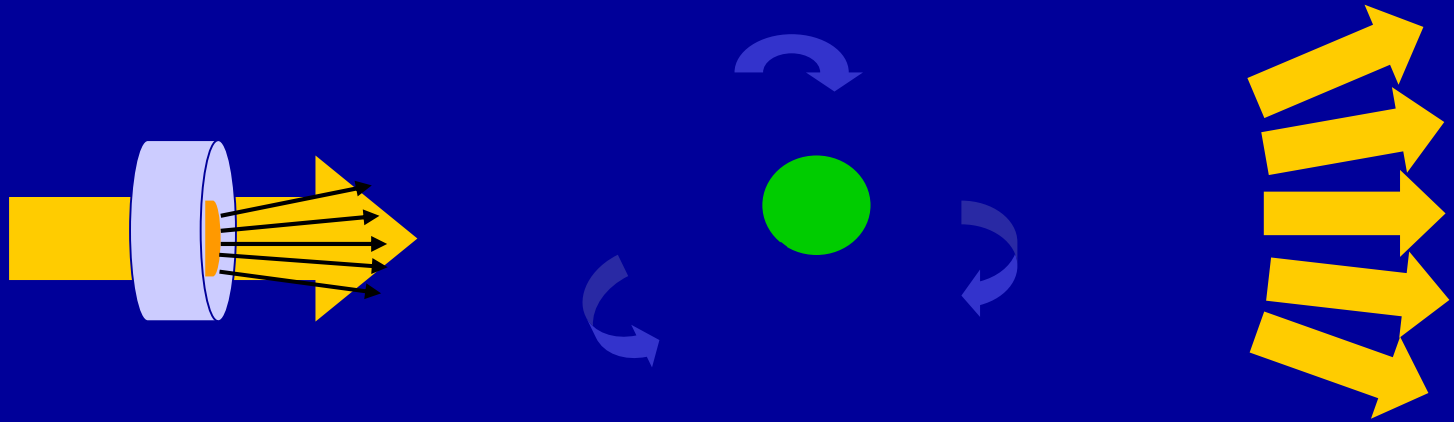
# Fluorescence Polarization Immunoassay (FPIA)

- ✓ Βασίζεται στην μέτρηση του βαθμού πόλωσης της εκπεμπομένης ακτινοβολίας φθορισμού
- ✓ Ο βαθμός πόλωσης του εκπεμπομένου φθορισμού μιας ουσίας η οποία διεγέρθηκε με πολωμένο φως εξαρτάται από την ταχύτητα περιστροφής του μορίου της ουσίας.
- ✓ Η ταχύτητα περιστροφής ενός μορίου σε διάλυμα εξαρτάται από το μέγεθός του.

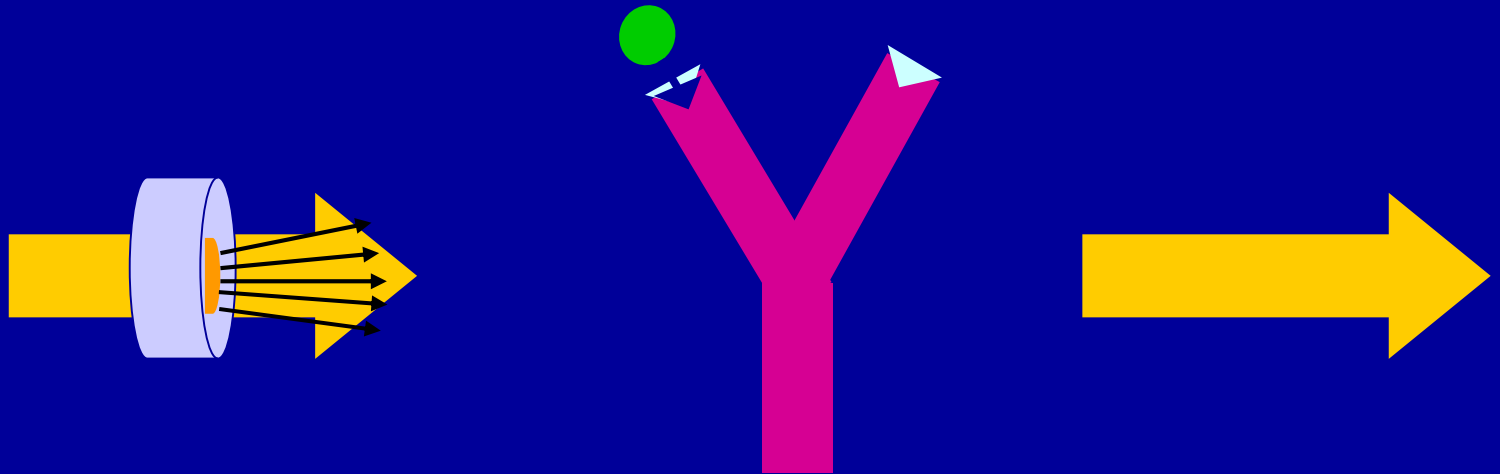


**D = φάρμακο**

**F = φλουορεσκεΐνη**

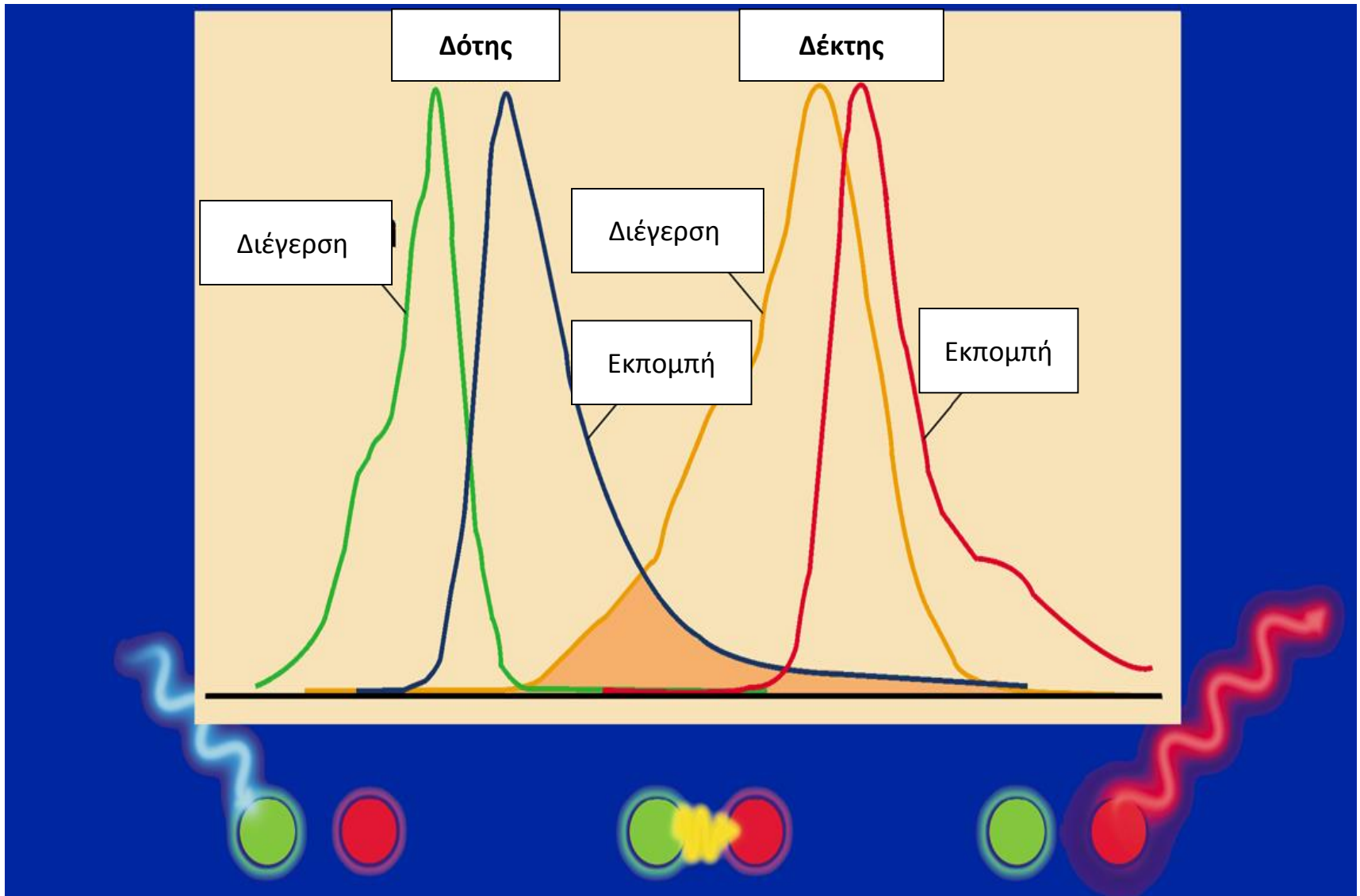


**Γρήγορη** περιστροφή του ελεύθερου επισημασμένου φαρμάκου προκαλεί **μείωση** της πόλωσης του εκπεμπομένου φθορισμού



**Αργή** περιστροφή του δεσμευμένου επισημασμένου φαρμάκου προκαλεί **αύξηση** της πόλωσης του εκπεμπομένου φθορισμού

# ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΜΕΣΩ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)



# Fluorescence: Green Fluorescent protein (GFP)

[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2008/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/)

The Nobel Prize in Chemistry 2008	▼
Nobel Prize Award Ceremony	▼
Osamu Shimomura	▼
Martin Chalfie	▼
Roger Y. Tsien	▼

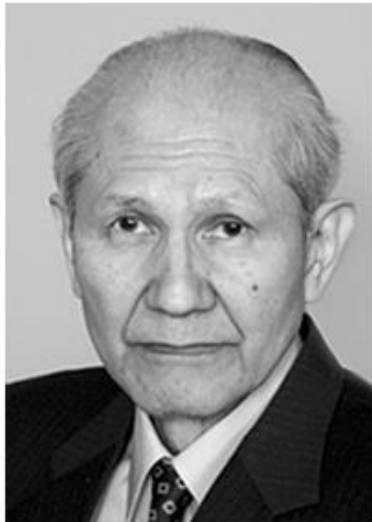


Photo: U. Montan

**Osamu Shimomura**



Photo: U. Montan

**Martin Chalfie**

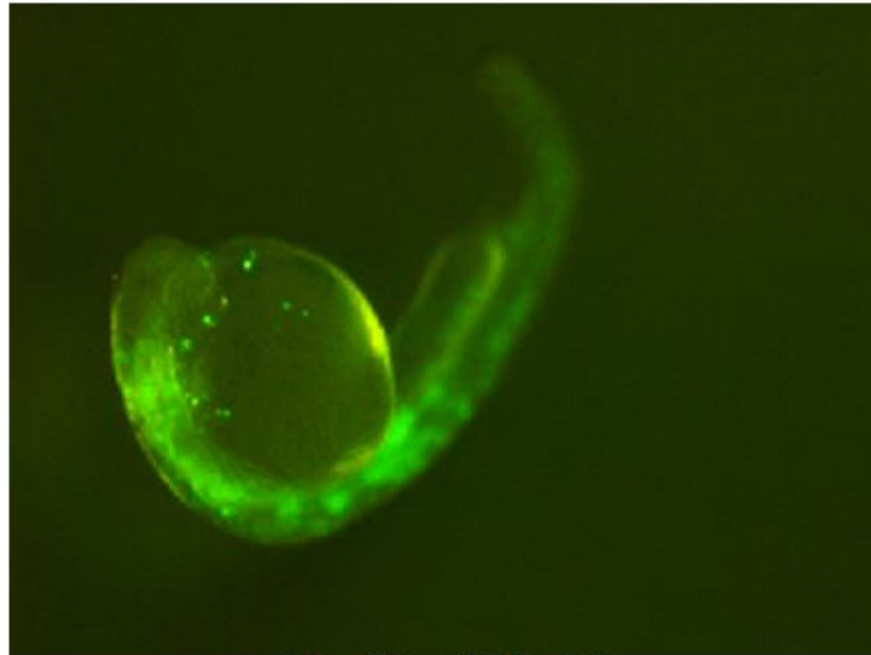


Photo: U. Montan

**Roger Y. Tsien**

The Nobel Prize in Chemistry 2008 was awarded jointly to Osamu Shimomura, Martin Chalfie and Roger Y. Tsien *"for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP"*.

# Fluorescence: Green Fluorescent protein (GFP)



Zebrafish - GFP labelled

# GFP

[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2008/advanced-chemistryprize2008.pdf](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/advanced-chemistryprize2008.pdf)

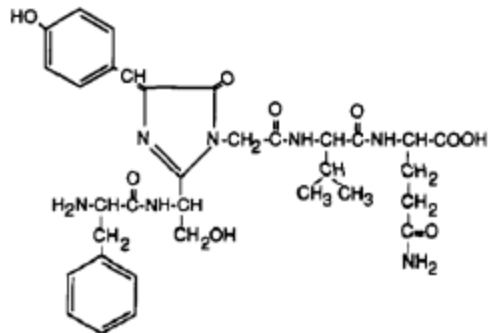


Figure 1. The fluorescence chromophore formed by amino acid residues 65-67 (Ser-Tyr-Gly) in the primary structure of GFP (From Cody et al., 1993).

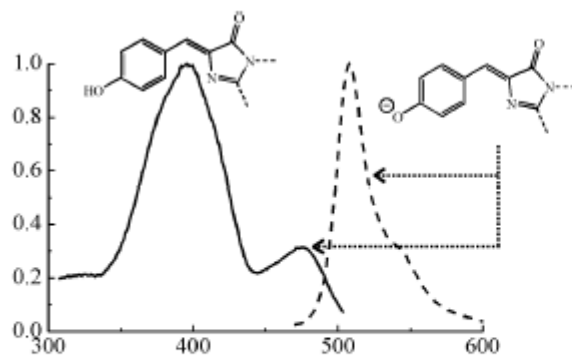
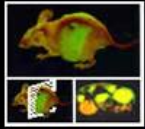


Figure 2. Fluorescence excitation (full-line curve) and emission (dashed curve) spectra of native GFP from *Aequorea victoria* (Tsien et al., 1998).

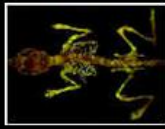


# GFP: In vivo imaging

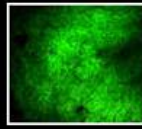
Green/Red Fluorescent Protein to visualize, image and quantify drug efficacy on tumor growth, metastasis, angiogenesis and gene expression in real time.



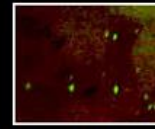
Whole-body imaging of liver metastases in MetaMouse<sup>®</sup>/OncoBrite<sup>®</sup>



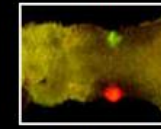
Skeletal metastases in MetaMouse<sup>®</sup>/OncoBrite<sup>®</sup>



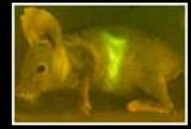
Whole-body imaging of tumor angiogenesis in AngioMouse<sup>®</sup>



Whole-body imaging of single glioma cells in the brain in MetaMouse<sup>®</sup>/OncoBrite<sup>®</sup>



Whole-body dual color imaging of GFP and RFP mammary tumors in MetaMouse<sup>®</sup>/OncoBrite<sup>®</sup>

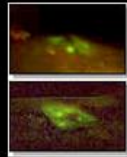


Whole-body imaging of gene expression in the GeneBrite<sup>®</sup> model

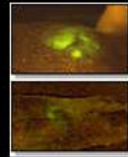
## WHOLE-BODY REAL TIME IMAGING OF METASTATIC GROWTH AND DRUG RESPONSE

DRUG RESPONSE ON HUMAN METASTATIC TUMORS GROWING ORTHOTOPICALLY IN MICE

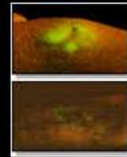
Days



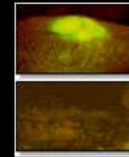
0



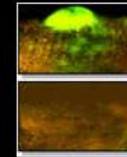
2



4



6

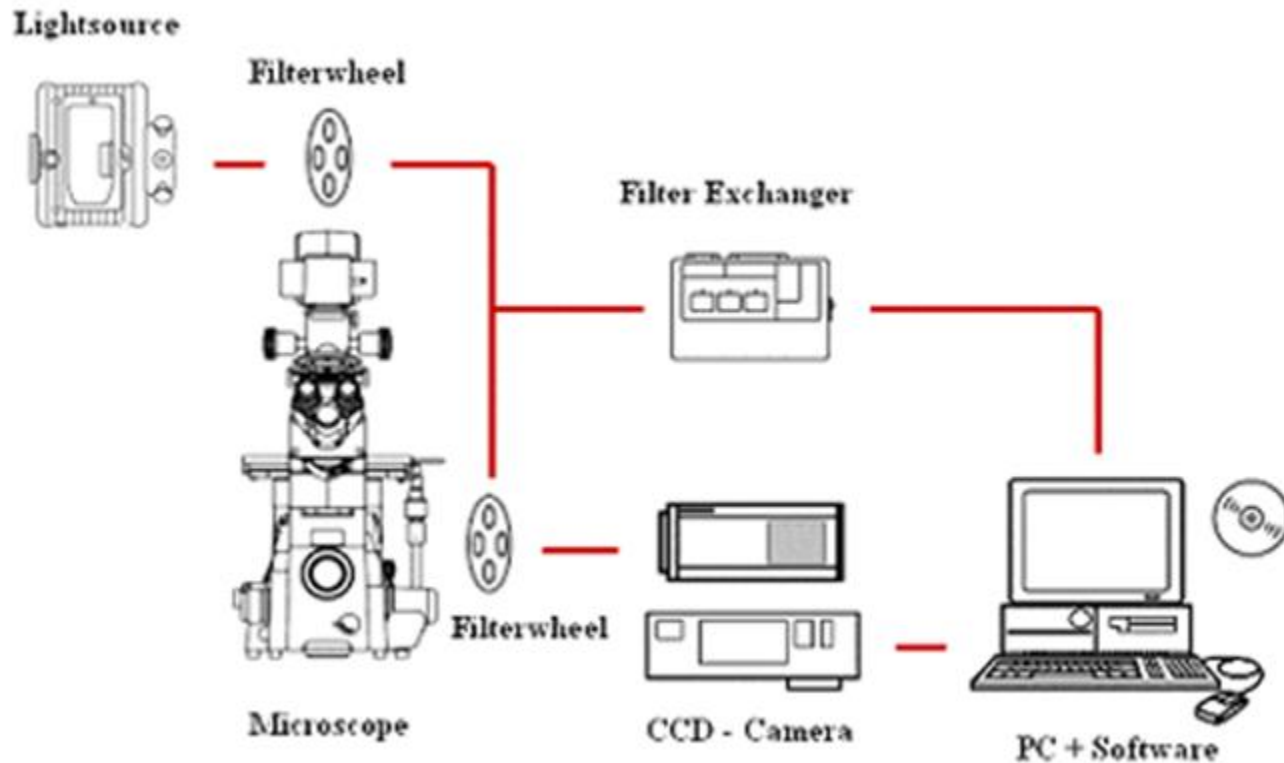


8

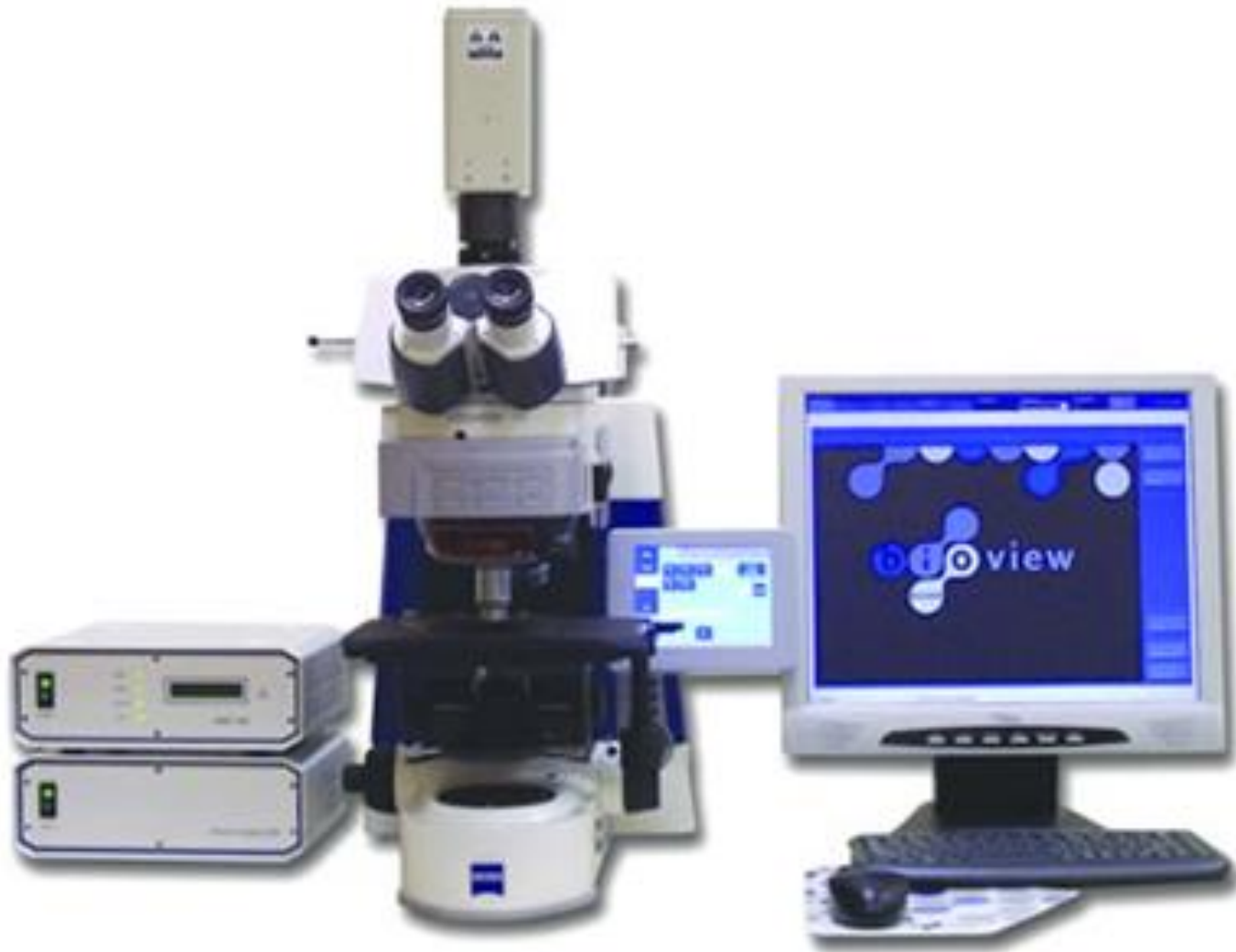
Control

Drug Treated

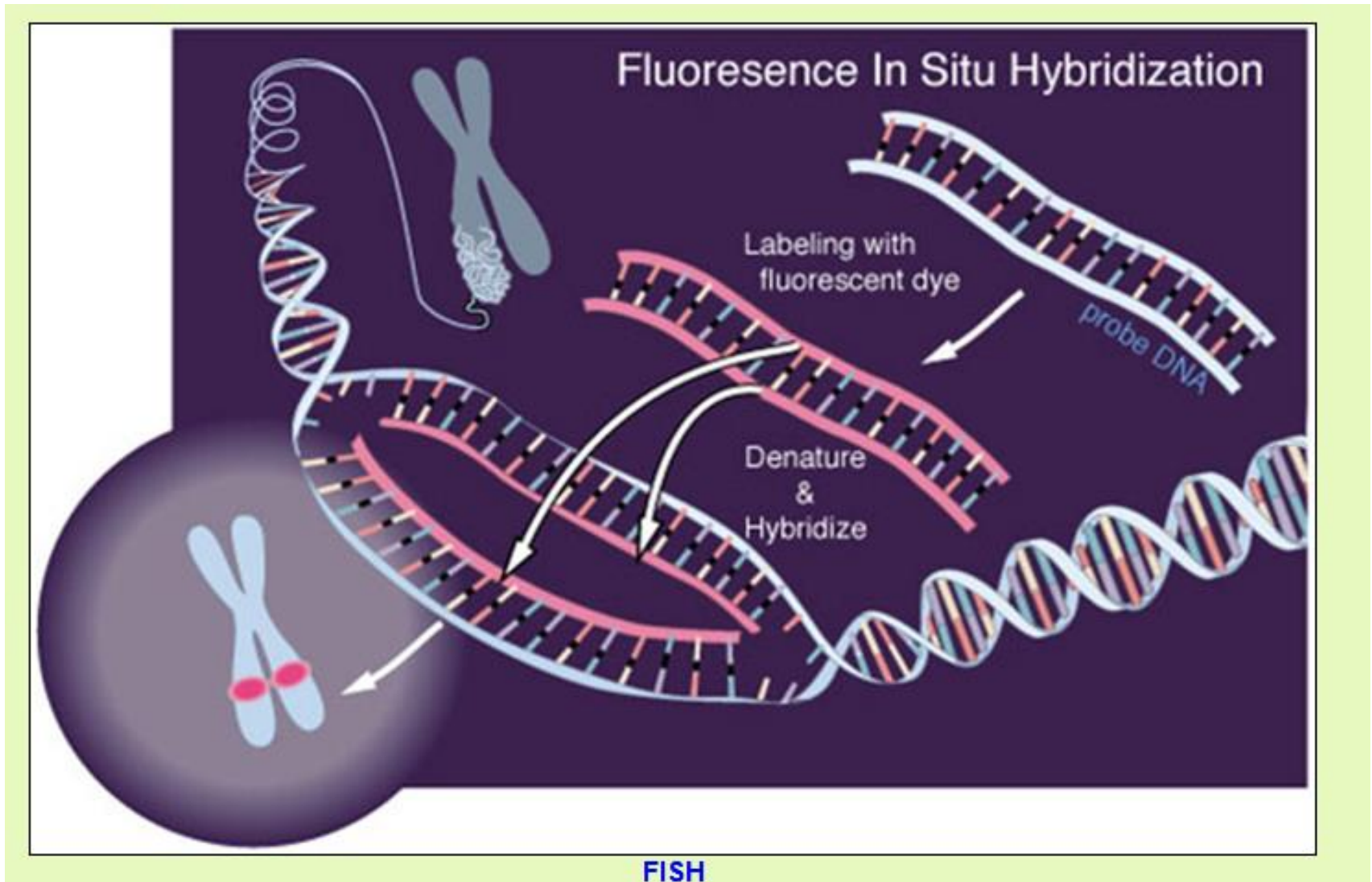
# Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)



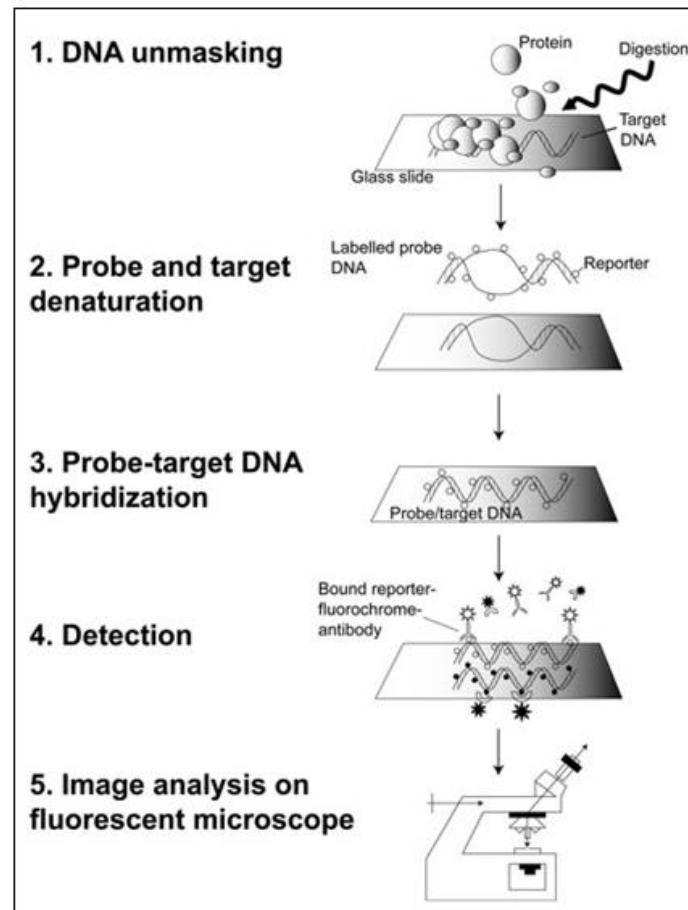
# Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)



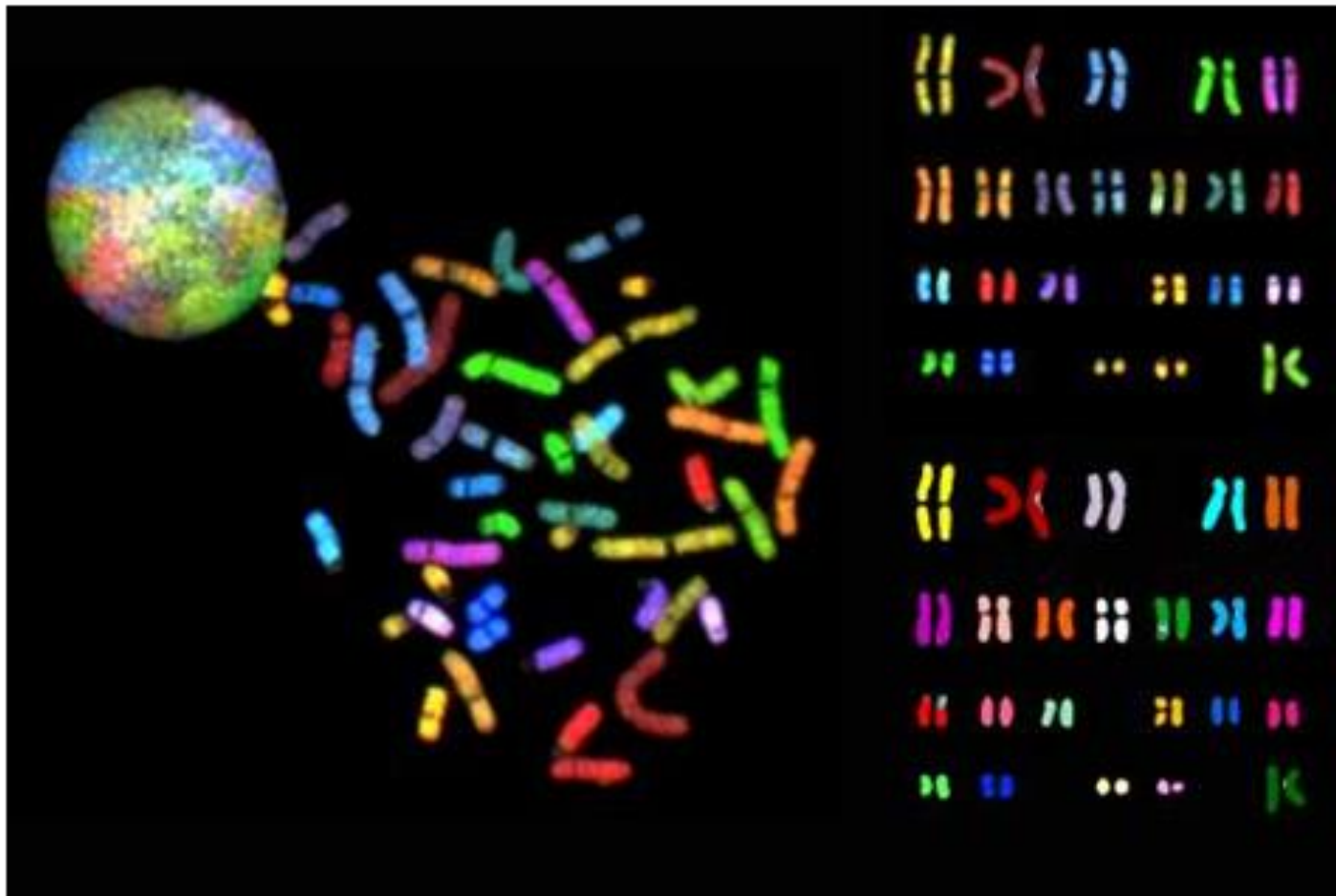
# Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)



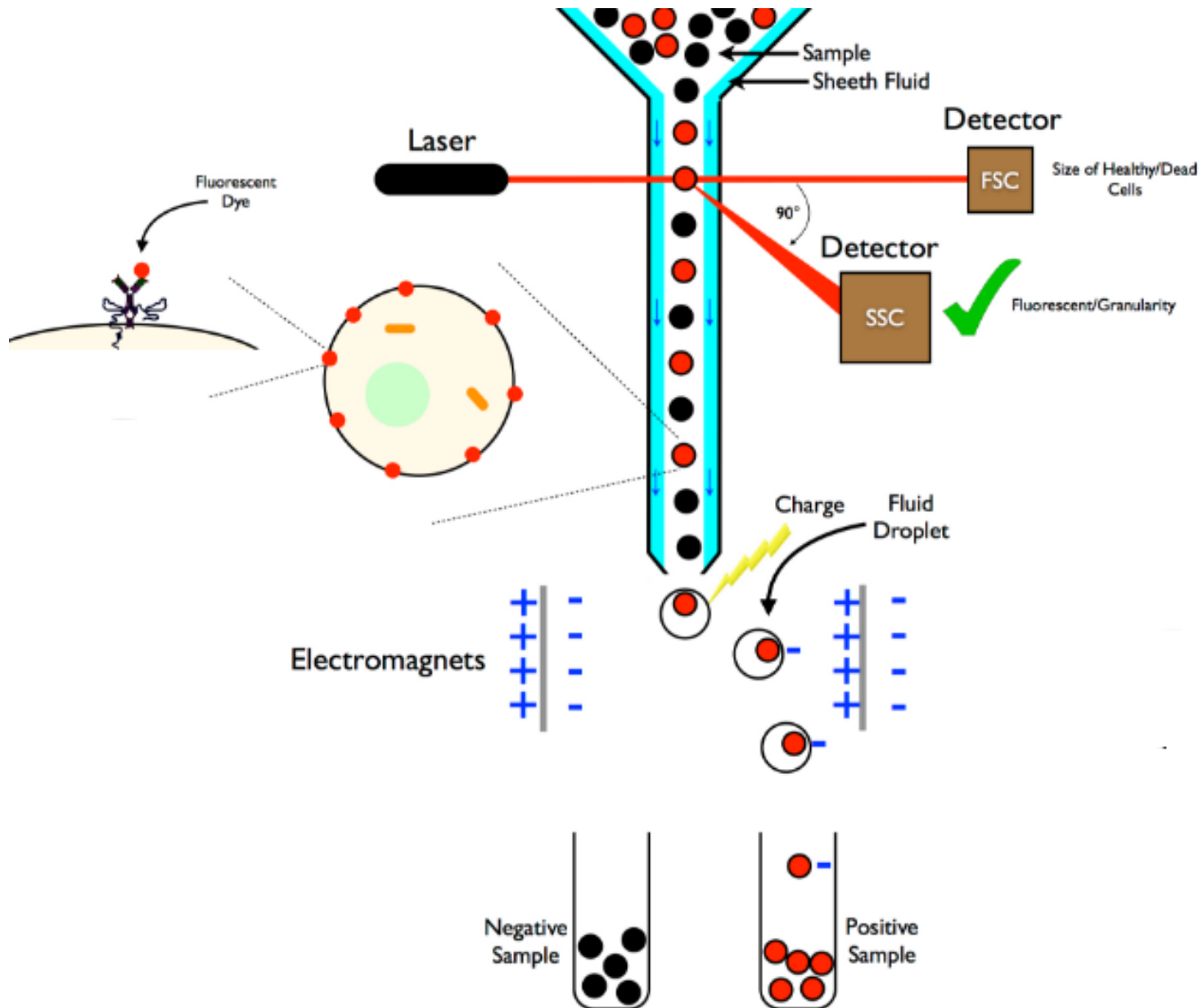
# Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)



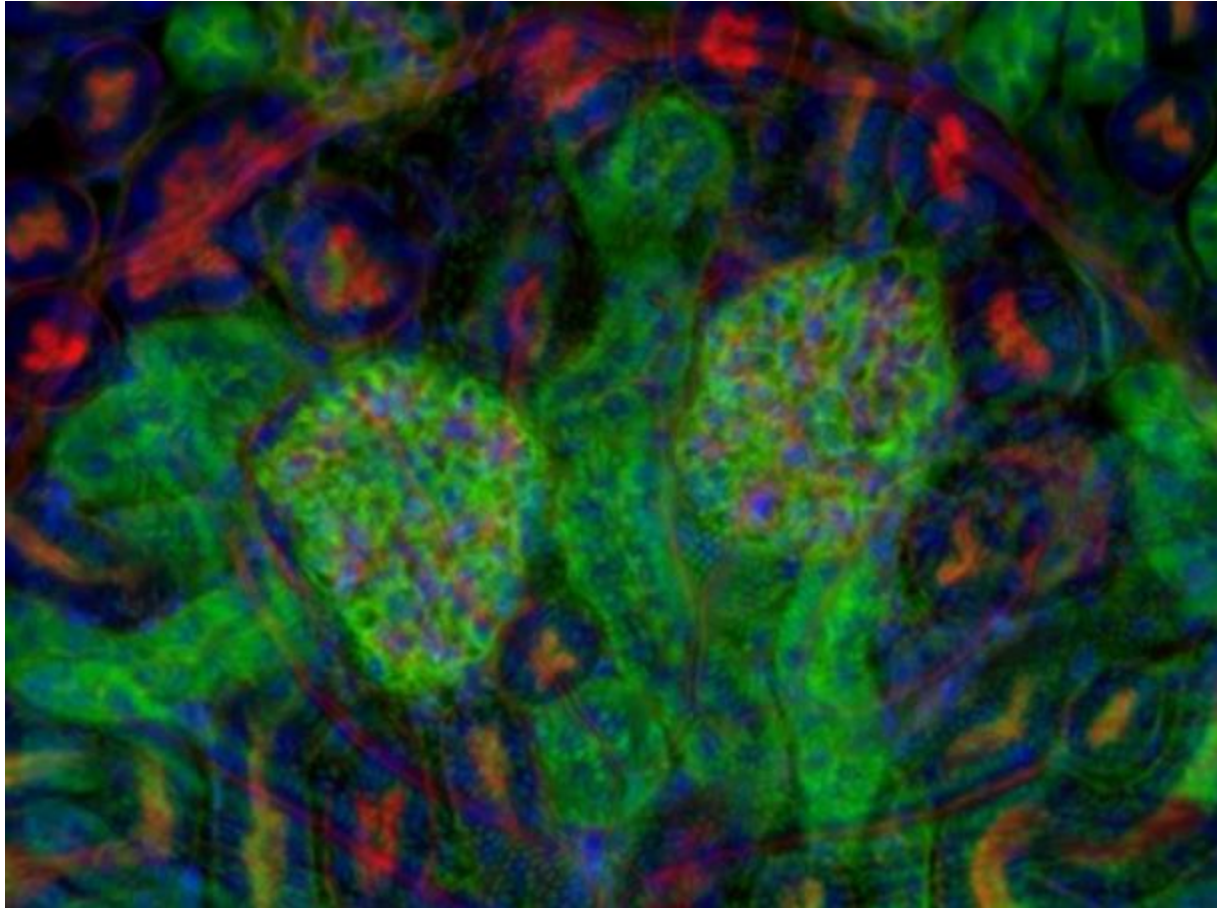
# Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)



# Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

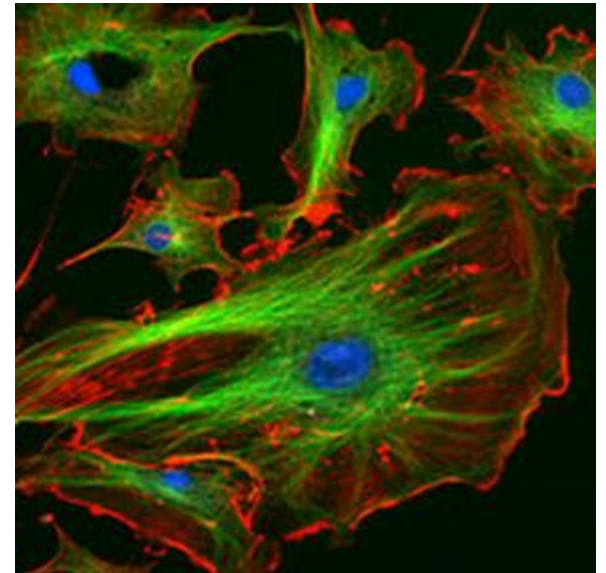
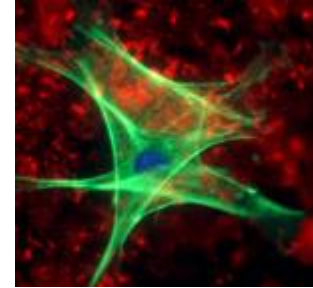
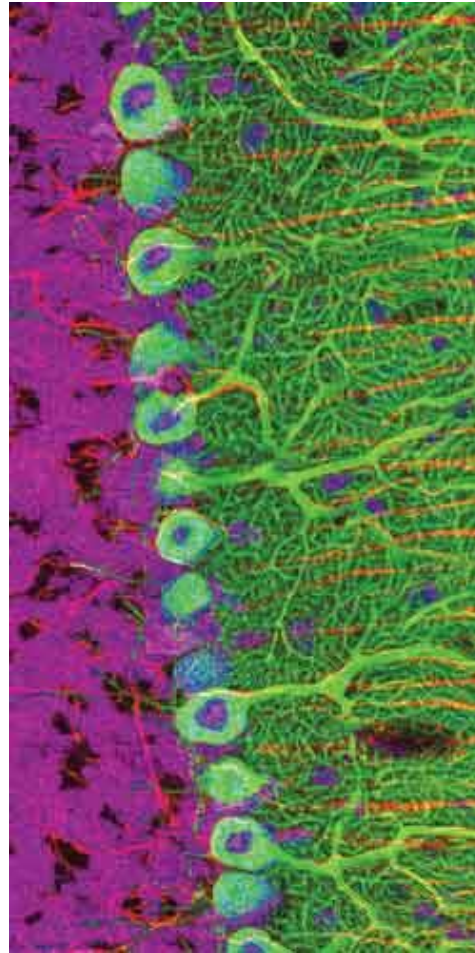
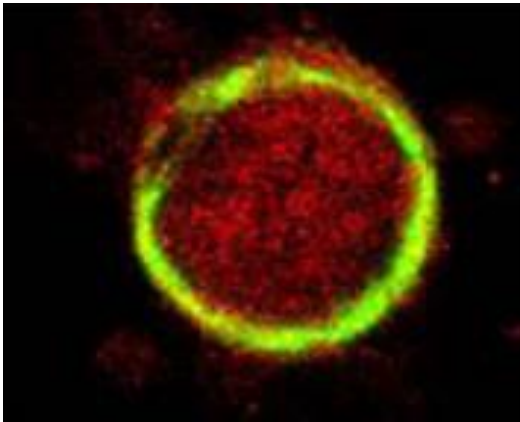
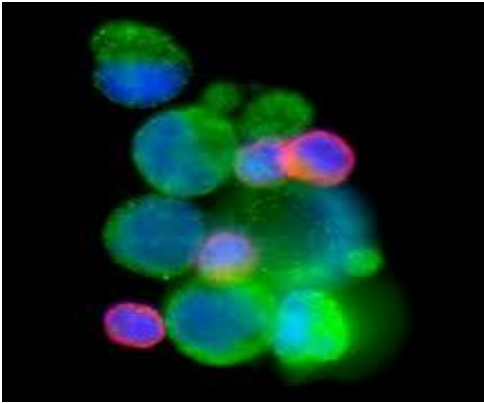


# Ανοσοφθορισμός (Immunofluorescence) Πολλαπλές φθορίζουσες χρωστικές: Multiple dyes

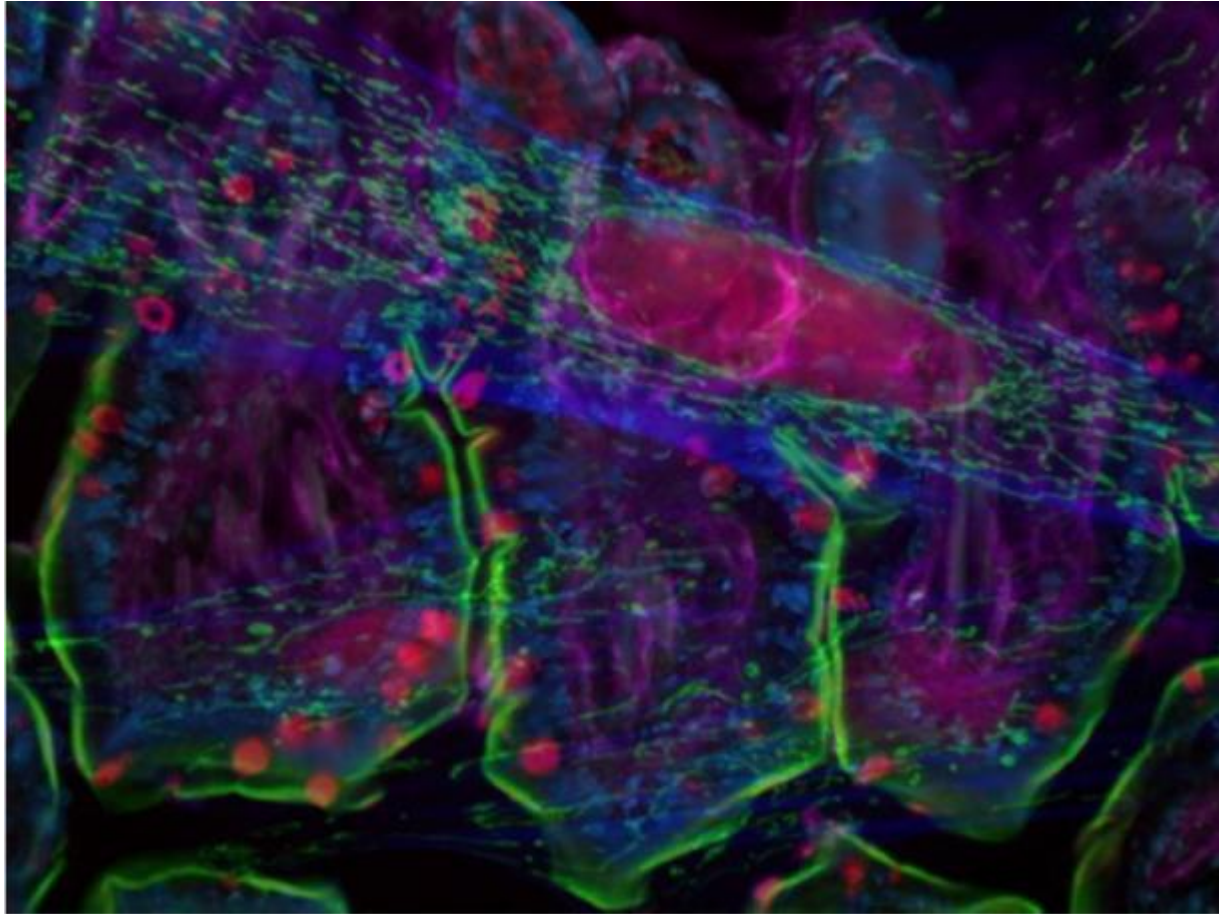




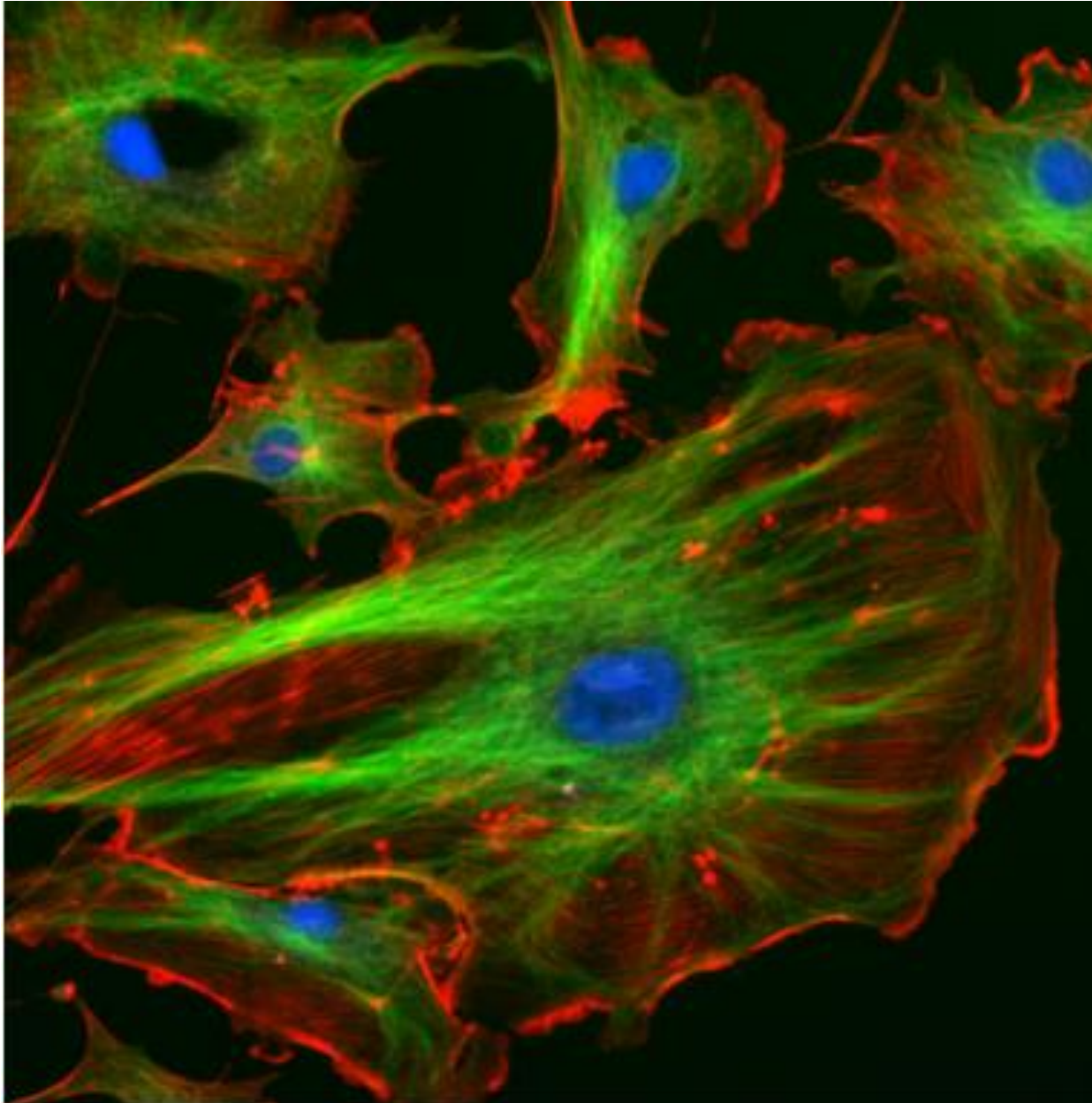
# Ανοσοφθορισμός (Immunofluorescence) Πολλαπλές φθορίζουσες χρωστικές: Multiple dyes



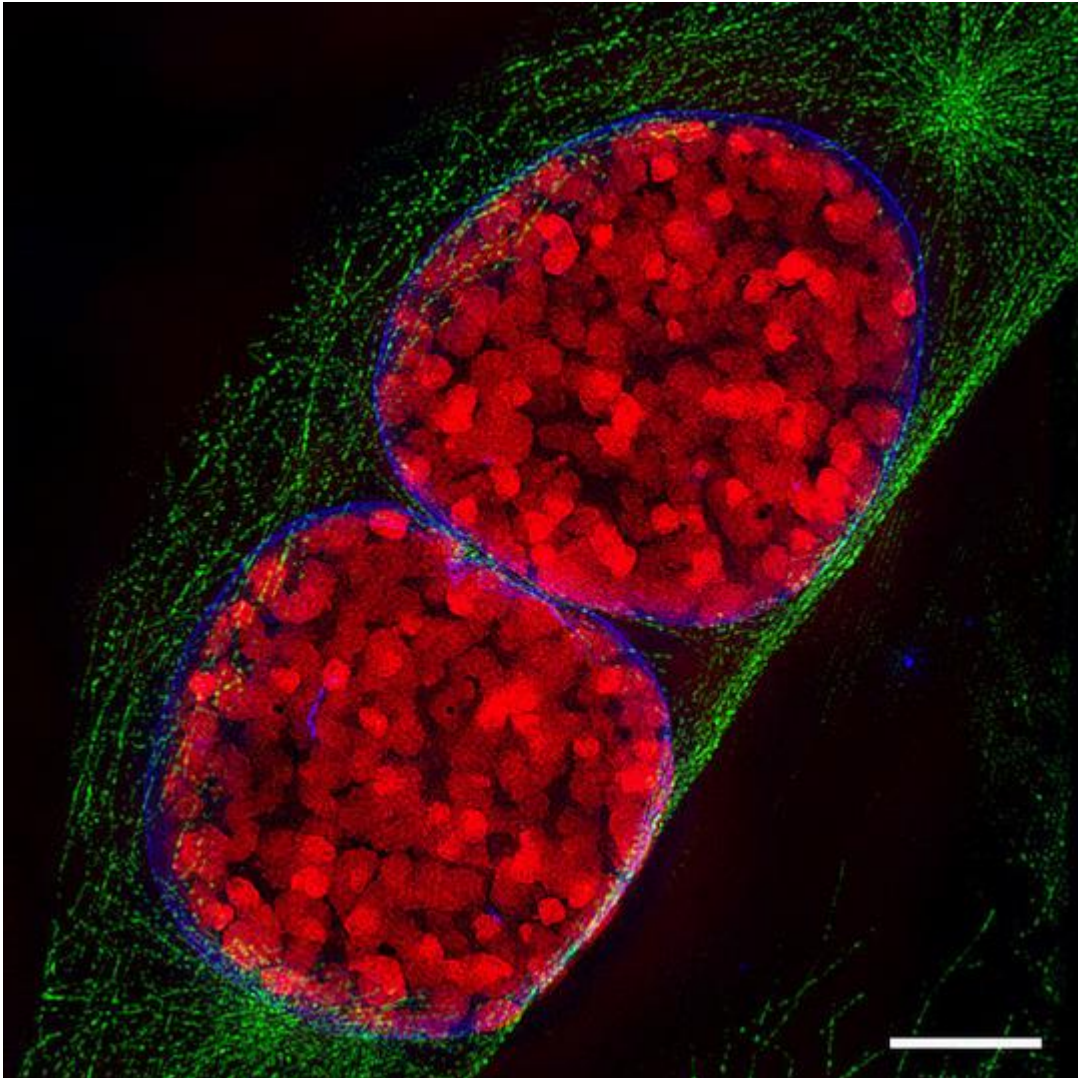
# Ανοσοφθορισμός (Immunofluorescence) Πολλαπλές φθορίζουσες χρωστικές: Multiple dyes



# Ανοσοφθορισμός (Immunofluorescence) Πολλαπλές φθορίζουσες χρωστικές: Multiple dyes

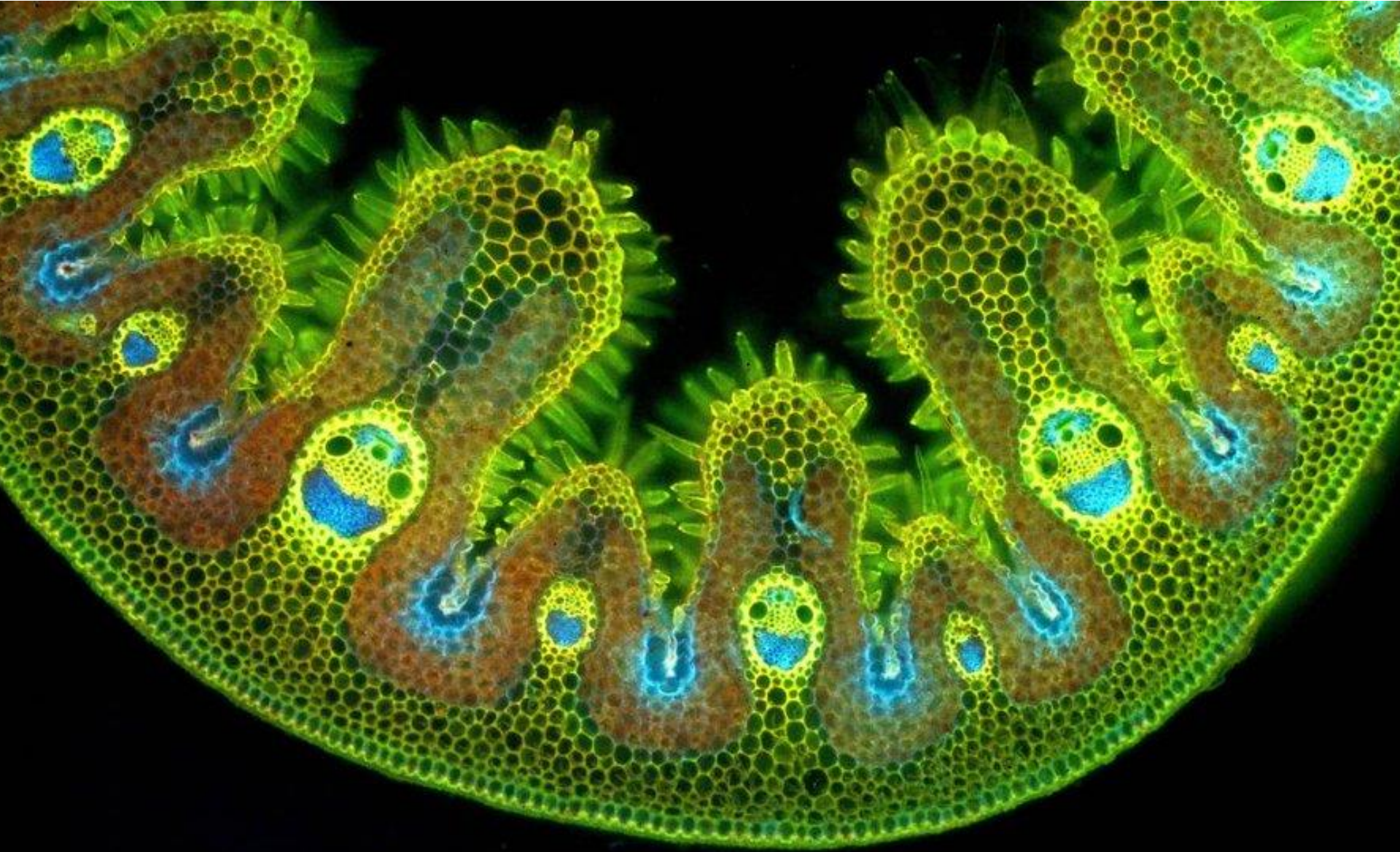


Fluorescence microscope image of two mouse cell nuclei in prophase (scale bar is 5  $\mu\text{m}$ )



Schermelleh, Let al,  
(2008). "[Subdiffraction Multicolor Imaging of the Nuclear Periphery with 3D Structured Illumination Microscopy](#)". *Science* **320** (5881): 1332–6

**Ανοσοφθορισμός (Immunofluorescence)  
Πολλαπλές φθορίζουσες χρωστικές: Multiple dyes**



# ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ

- **Φωταύγεια (luminescence)**: παραγωγή σωματιδίου σε διεγερμένη κατάσταση με
  - Απορρόφηση ακτινοβολίας
  - Χημική αντίδραση
- **Χημειοφωταύγεια (chemiluminescence)**: φαινόμενο φωταύγειας το οποίο λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια ορισμένων χημικών αντιδράσεων. Το διεγερμένο σωματίδιο είναι ενδιάμεσο ή τελικό προϊόν της αντίδρασης.



- **Βιοφωταύγεια (bioluminescence)**:  
αν η αντίδραση είναι ενζυμική  
ή λαμβάνει χώρα σε ζώντες οργανισμούς



# ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ

- Η χημειοφωταύγεια εξελίσσεται συγχρόνως με τη χημική αντίδραση
- Η ισχύς της ακτινοβολίας είναι ανάλογη της συγκέντρωσης ( $P_l = k c$ )
- Αέρια φάση
- Υγρή φάση – διαλύματα
- Στερεά φάση



- Η χημειοφωταύγεια έχει πολύ υψηλή ευαισθησία διότι το σήμα διακρίνεται ξεκάθαρα σε ένα μηδενικό σήμα υποβάθρου (background)

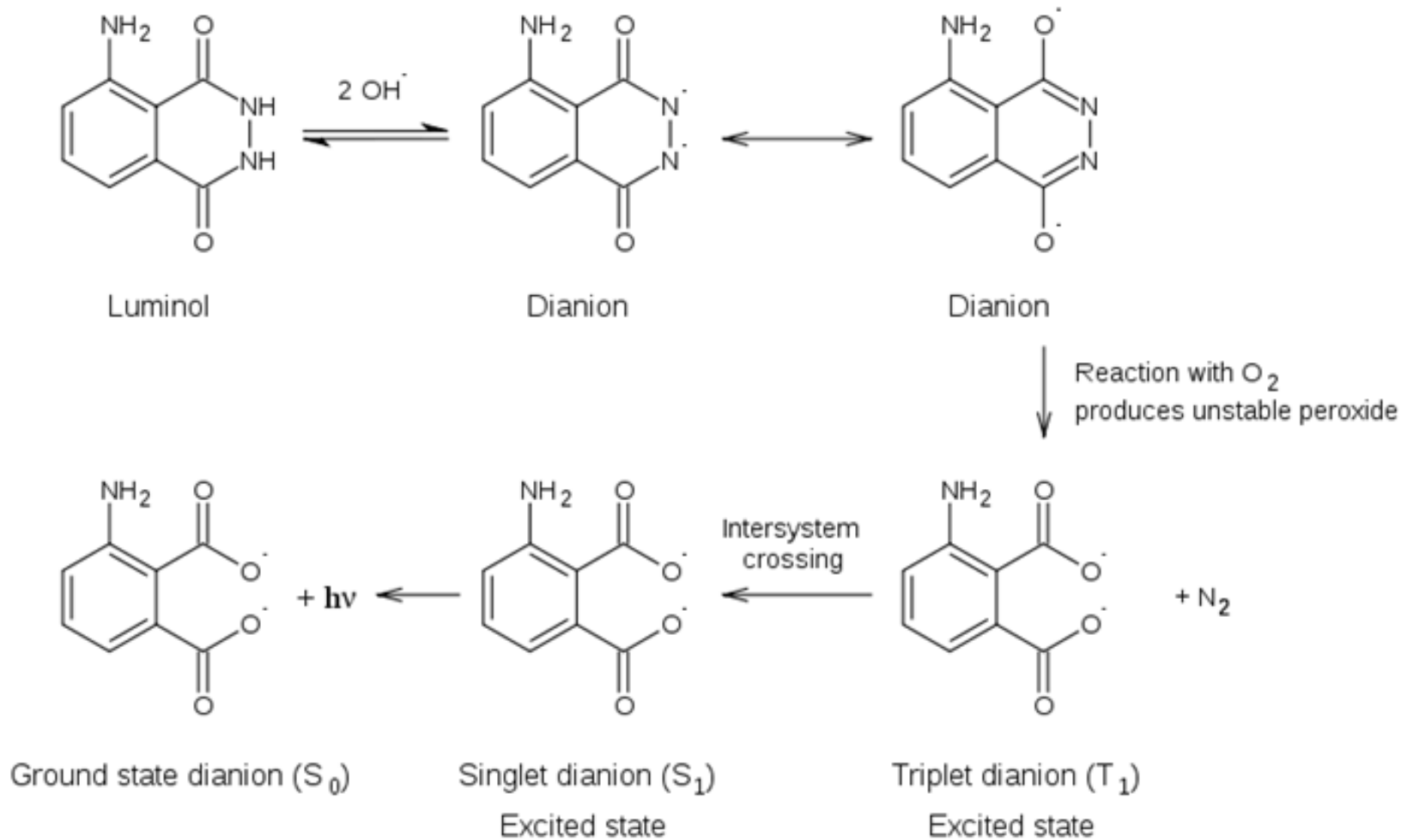
# ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ: ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ ΛΟΥΜΙΝΟΛΗΣ





# ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ

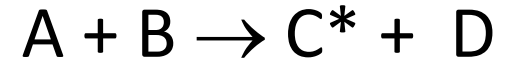
## η αντίδραση της λουμινόλης



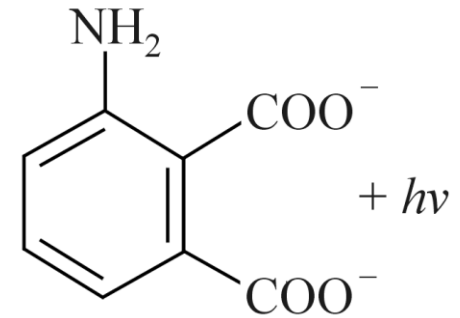
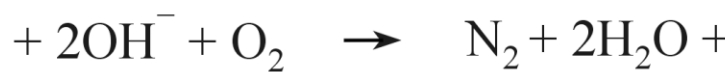
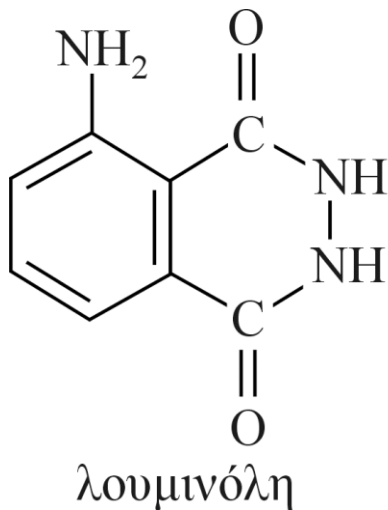
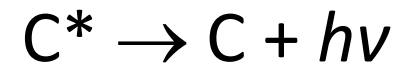
# ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΑΠΟΔΟΣΗ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ

- Άμεσος μηχανισμός

- Αντίδραση διέγερσης:



- Αντίδραση αποδιέγερσης:



3-αμινοφθαλικό ιόν

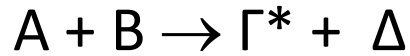


- Έμμεσος μηχανισμός (μεταφοράς ενέργειας, energy transfer) – χημειοδιέγερση (chemi-excitation)
  - Αντίδραση παραγωγής ενέργειας:  $A + B \rightarrow \Gamma^*$
  - Αντίδραση μεταφοράς ενέργειας:  $\Gamma^* + E \rightarrow \Gamma + E^*$
  - Αντίδραση αποδιέγερσης:  $E^* \rightarrow E + h\nu$

$$\Phi_{\text{χημειοφωταύγειας}} = \Phi_{\text{αντίδρασης}} \times \Phi_{\text{διέγερσης}} \times \Phi_{\text{μεταφοράς}} \times \Phi_{\text{εκπομπής}}$$

- $\Phi_{\text{μεταφοράς}} = \frac{\text{αριθμός σωματιδίων } E^* \text{ που σχηματίζονται}}{\text{αριθμός σωματιδίων } \Gamma^* \text{ που αντιδρούν}}$

- $\Phi_{\text{εκπομπής}} = \frac{\text{αριθμός φωτονίων που εκπέμπονται}}{\text{αριθμός σωματιδίων } E^* \text{ που σχηματίζονται}}$



$$\Phi_{\text{χημειοφωταύγειας}} = \Phi_{\text{αντίδρασης}} \times \Phi_{\text{διέγερσης}} \times \Phi_{\text{εκπομπής}}$$

- $\Phi_{\text{αντίδρασης}} = \frac{\text{αριθμός μορίων A ή B που αντιδρούν}}{\text{συνολικός αριθμός μορίων A ή B}}$
- $\Phi_{\text{διέγερσης}} = \frac{\text{αριθμός σωματιδίων Γ που σχηματίζονται}}{\text{αριθμός μορίων A ή B που αντιδρούν}}$
- $\Phi_{\text{εκπομπής}} = \frac{\text{αριθμός φωτονίων που εκπέμπονται}}{\text{αριθμός σωματιδίων Γ* που σχηματίζονται}}$
- $\Phi_{\text{χημειοφωταύγειας}} = \frac{\text{αριθμός φωτονίων που εκπέμπονται}}{\text{συνολικός αριθμός μορίων A ή B}}$

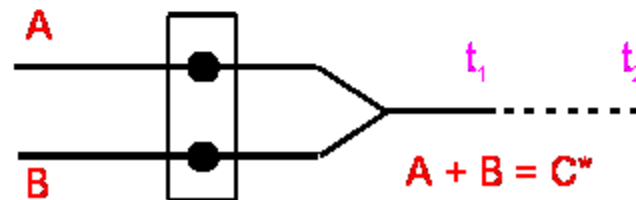
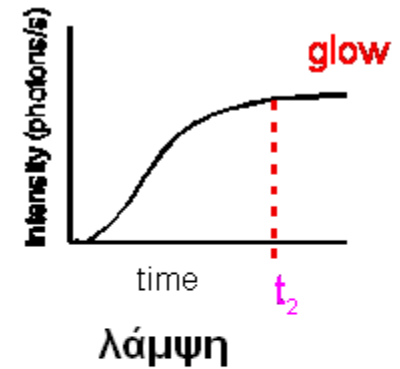
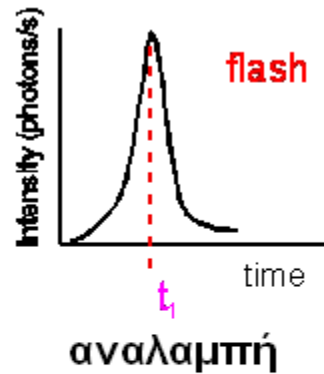
Χημειοφωταύγεια: συνήθως <1%, σε ορισμένες περιπτώσεις 20%

Βιοφωταύγεια: 10 – 100%

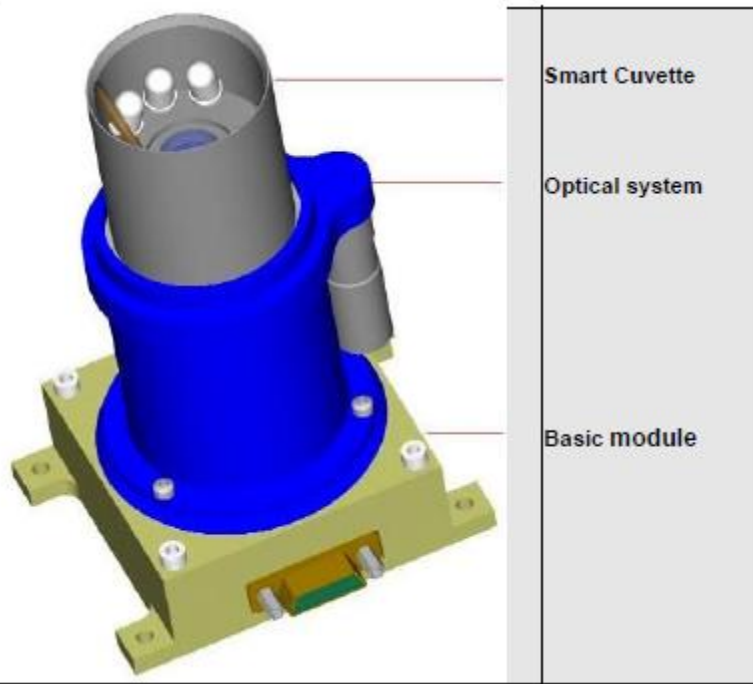
# ΦΩΤΟΜΕΤΡΑ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ

- Σύστημα ανάμειξης αντιδραστηρίων, ανάμειξη και ταχεία μεταφορά μπροστά από τον ανιχνευτή
- Σύστημα ανίχνευσης ακτινοβολίας, μέτρηση ισχύος ακτινοβολίας
- Σύστημα καταγραφής και επεξεργασίας του σήματος

$$I_{CL} = \Phi_{CL} \frac{dC}{dt}$$



# ΦΩΤΟΜΕΤΡΑ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ



# ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ

- Υψηλή ευαισθησία (ATP:  $10^{-10}$  mol/L, NADH:  $10^{-16}$  mol/L,  $H_2O_2$ :  $10^{-9}$  mol/L)
- Γραμμική περιοχή έως και 6 τάξεις μεγέθους
- Ταχύτητα αναλύσεων (s – min)
- Εκλεκτικότητα (βιοφωταύγεια, ανοσοπροσδιορισμοί)
- Μη τοξικά αντιδραστήρια
- Αποφυγή χρήσης ραδιενεργών ουσιών

# **ΒΙΟΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ**

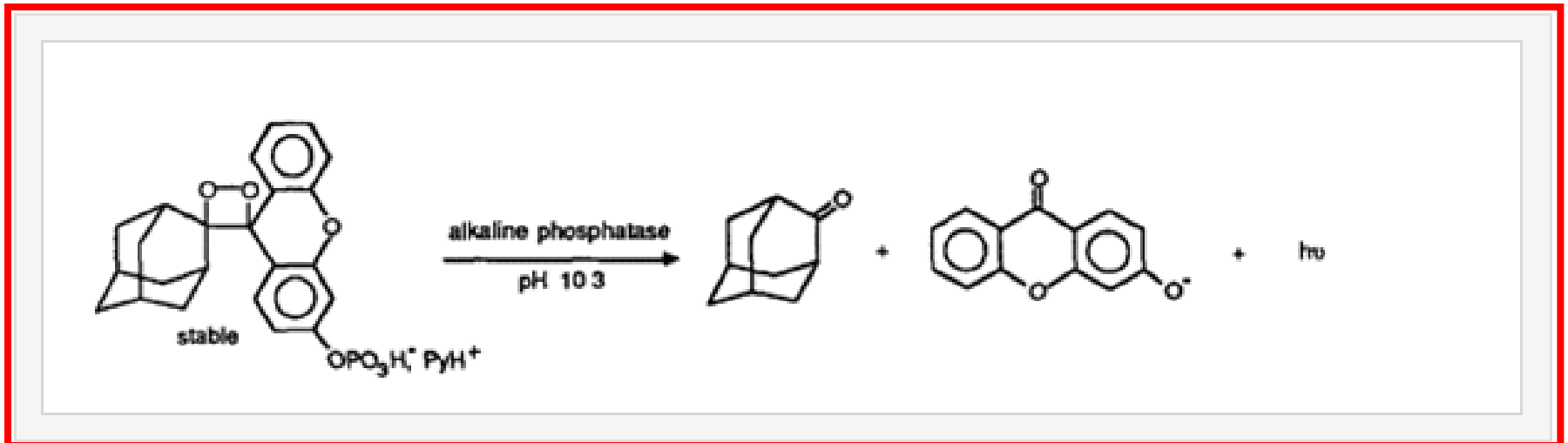
- **Βιοαισθητήρες (biosensors)**
- **Τελικό στάδιο ανίχνευσης σε μεθόδους διαχωρισμού (HPLC, τριχοειδής ηλεκτροφόρηση)**
- **Ανοσοπροσδιορισμοί (immunoassays)**
- **Ανίχνευση και ταυτοποίηση πρωτεϊνών (western blot)**
- **Ανάλυση DNA (southern blot, δοκιμασίες υβριδισμού)**
- **Ανάλυση RNA (northern blot)**



# ΒΙΟΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ

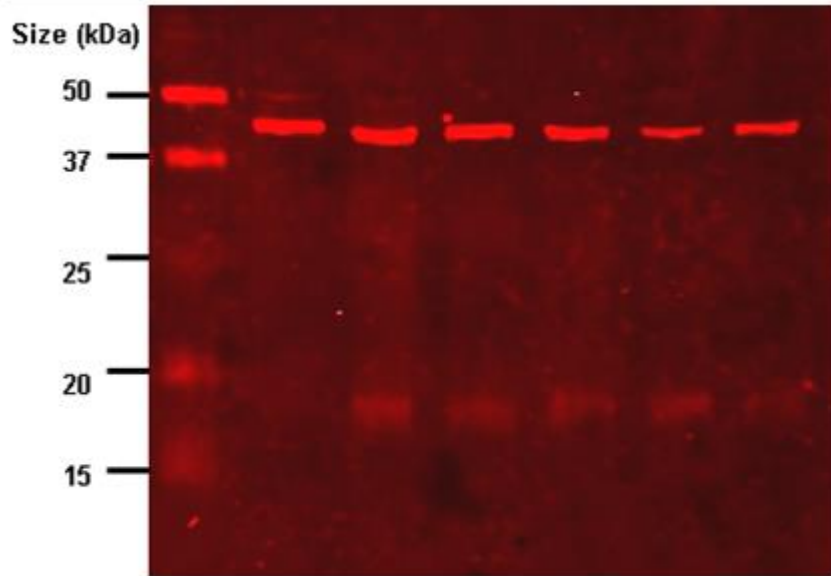
- Ανοσοπροσδιορισμοί τύπου Sandwich
- Ενζυμο – ιχνηθέτης αλκαλική φωσφατάση
- Υπόστρωμα AMPPD

Εφαρμογές: πληθώρα ουσιών κλινικού ενδιαφέροντος, πχ TSH, PSA, AFP κα

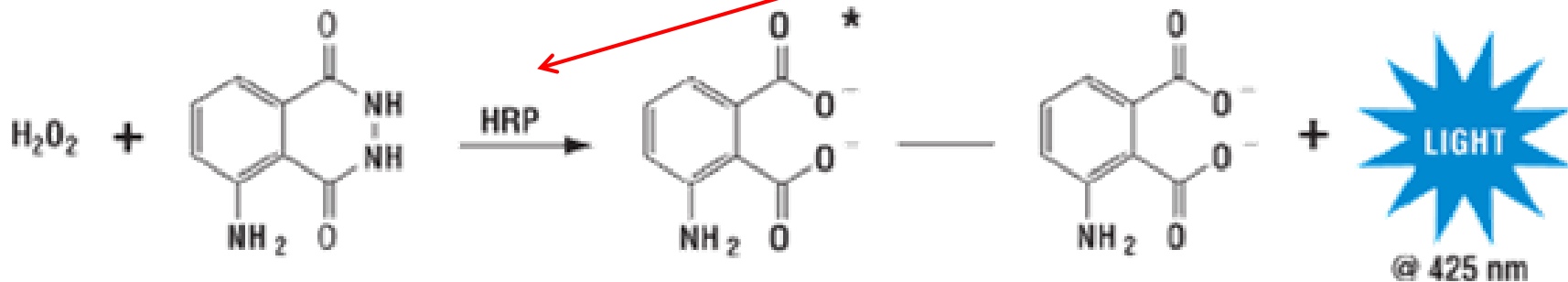


# ΒΙΟΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ

- Ανίχνευση και ταυτοποίηση πρωτεϊνών (western blot)

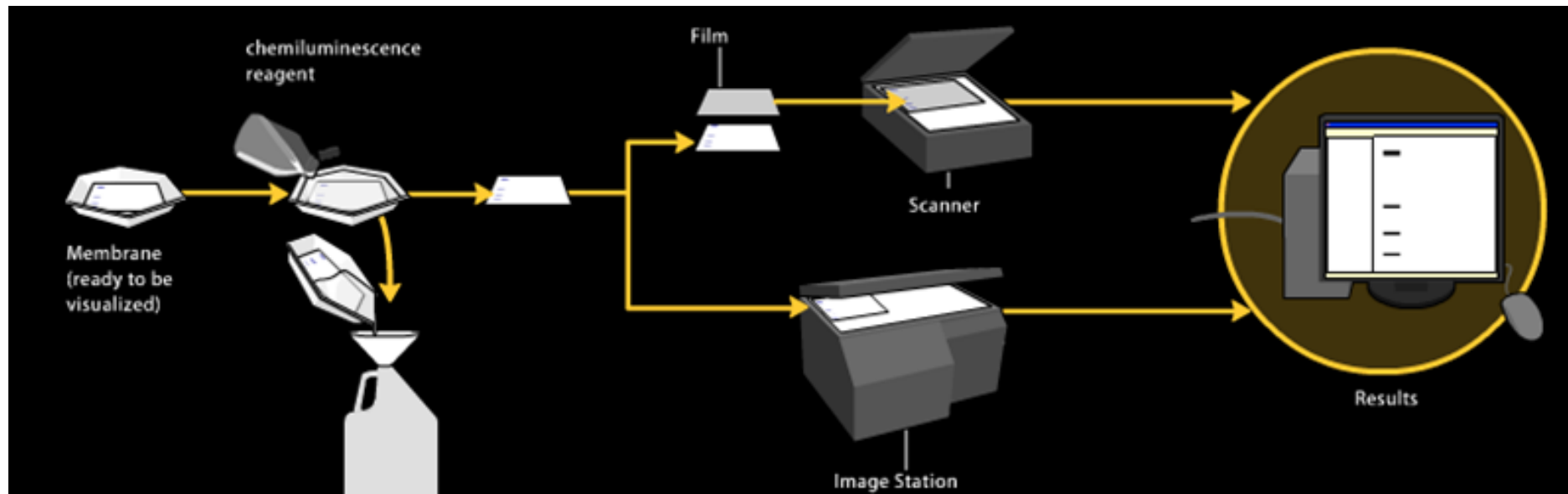


- western blot
- Το αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει είναι επισημασμένο με το ένζυμο HRP

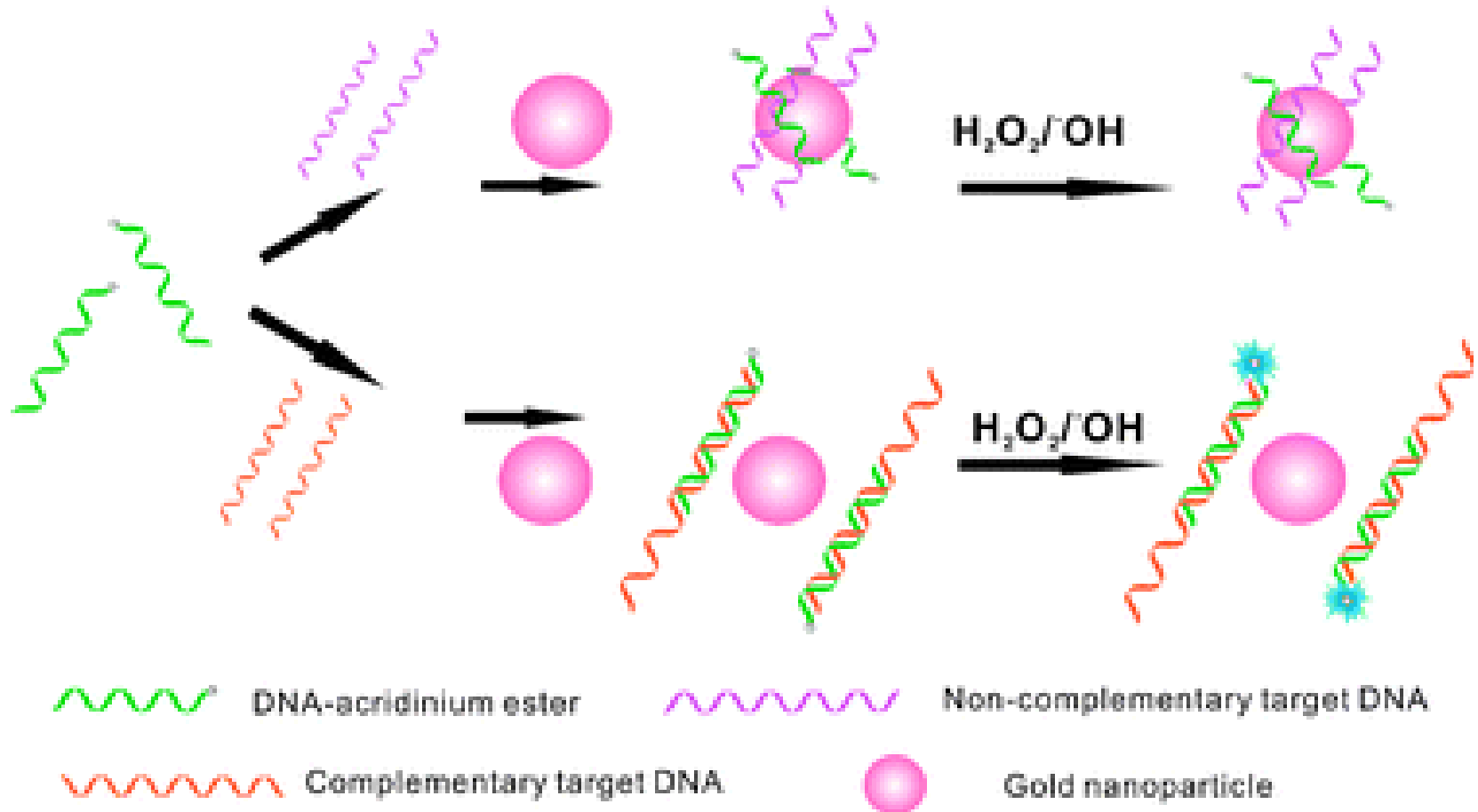


# ΒΙΟΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ

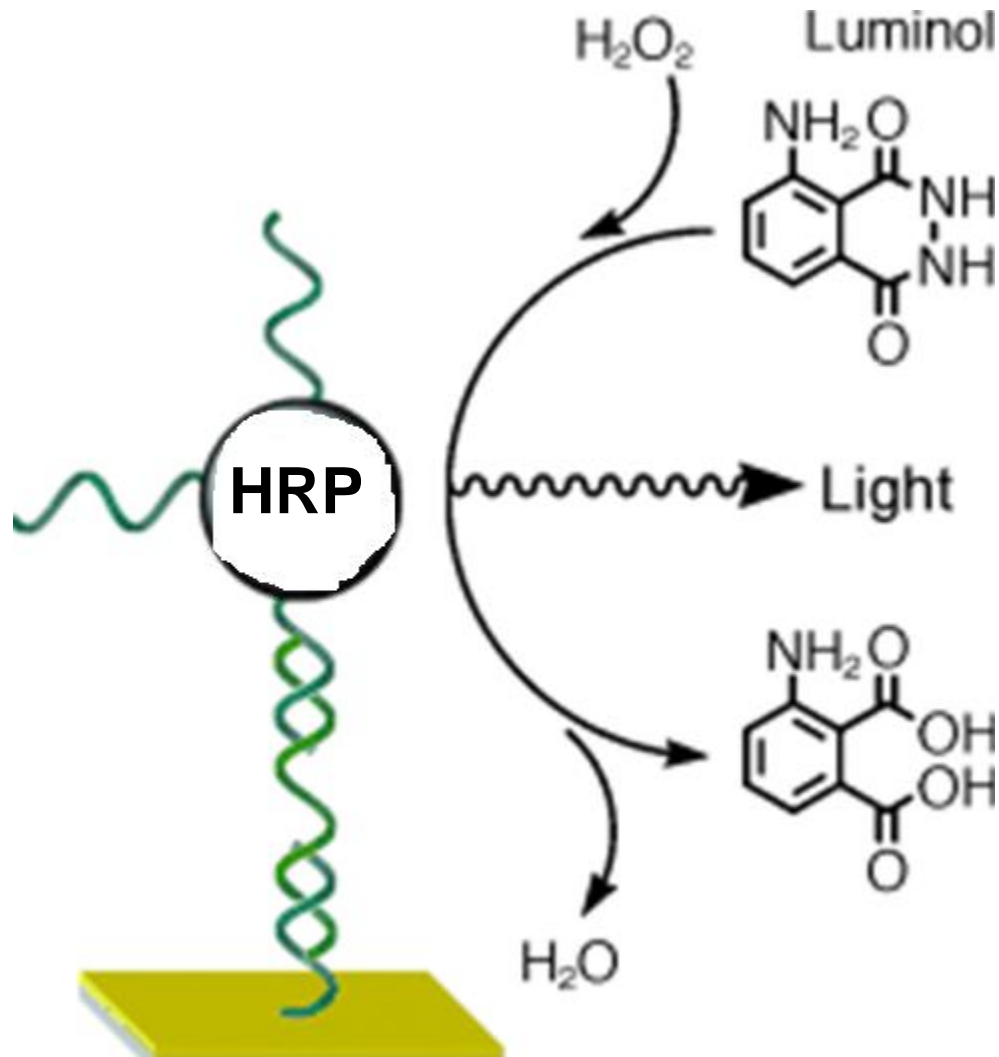
- Ανίχνευση και ταυτοποίηση πρωτεϊνών (western blot)



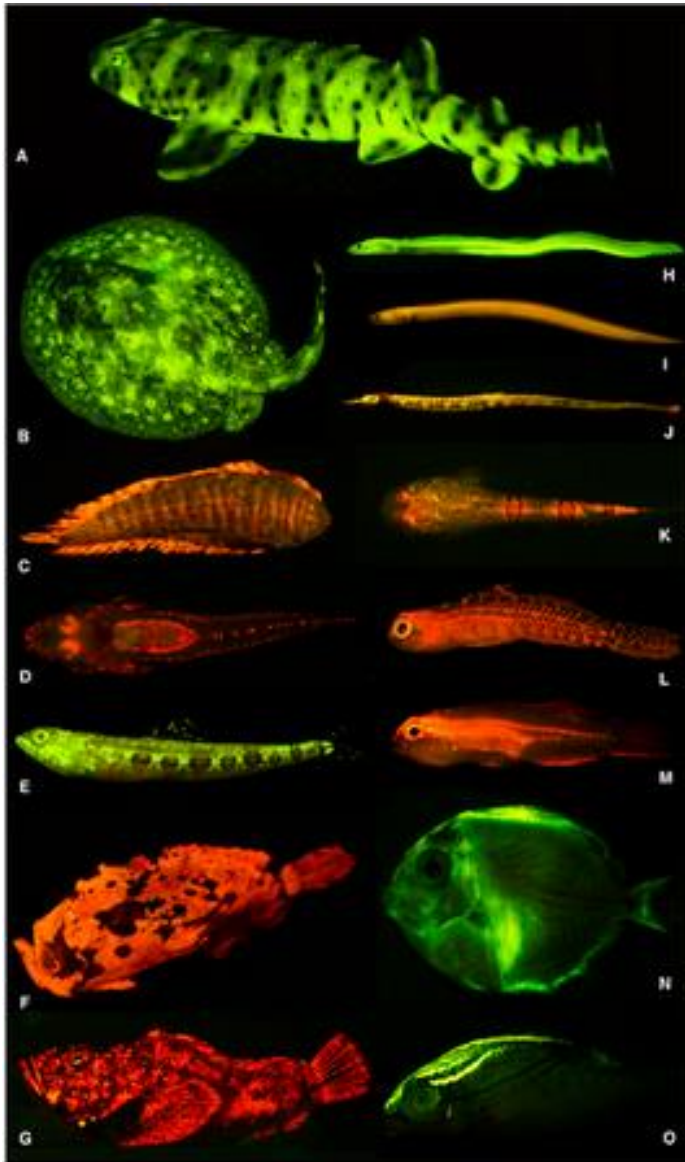
# Εφαρμογές χημειοφωταύγειας εστέρων ακριδινίου στην ανάλυση DNA



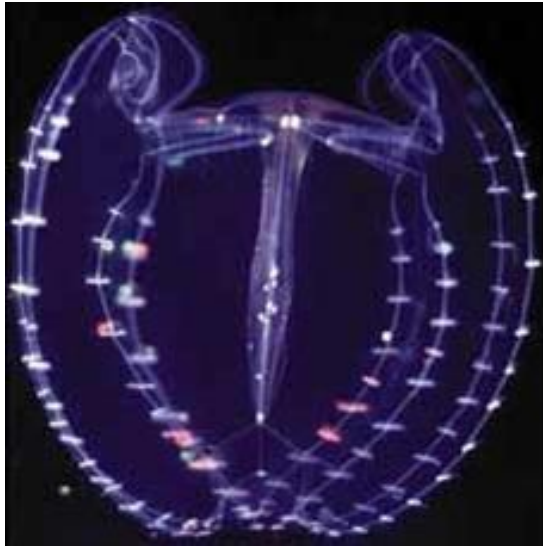
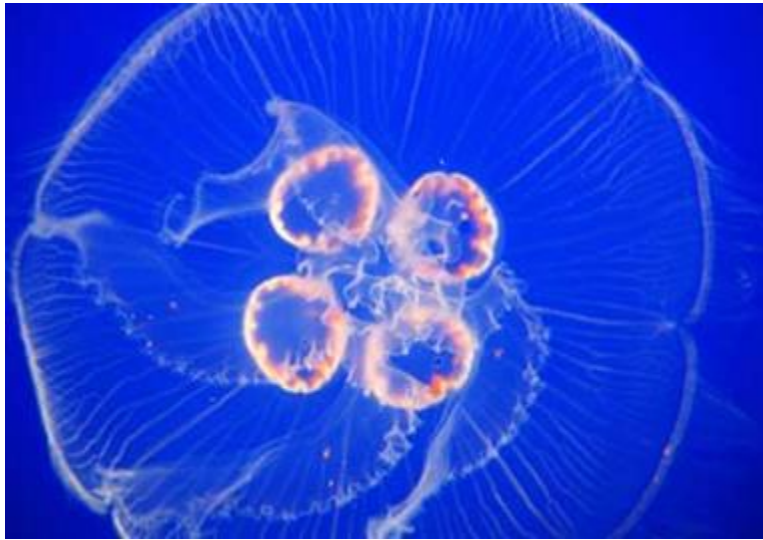
# Εφαρμογές χημειοφωταύγειας λουμινόλης στην ανάλυση DNA



# ΒΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (bioluminescence)



# ΒΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (bioluminescence)



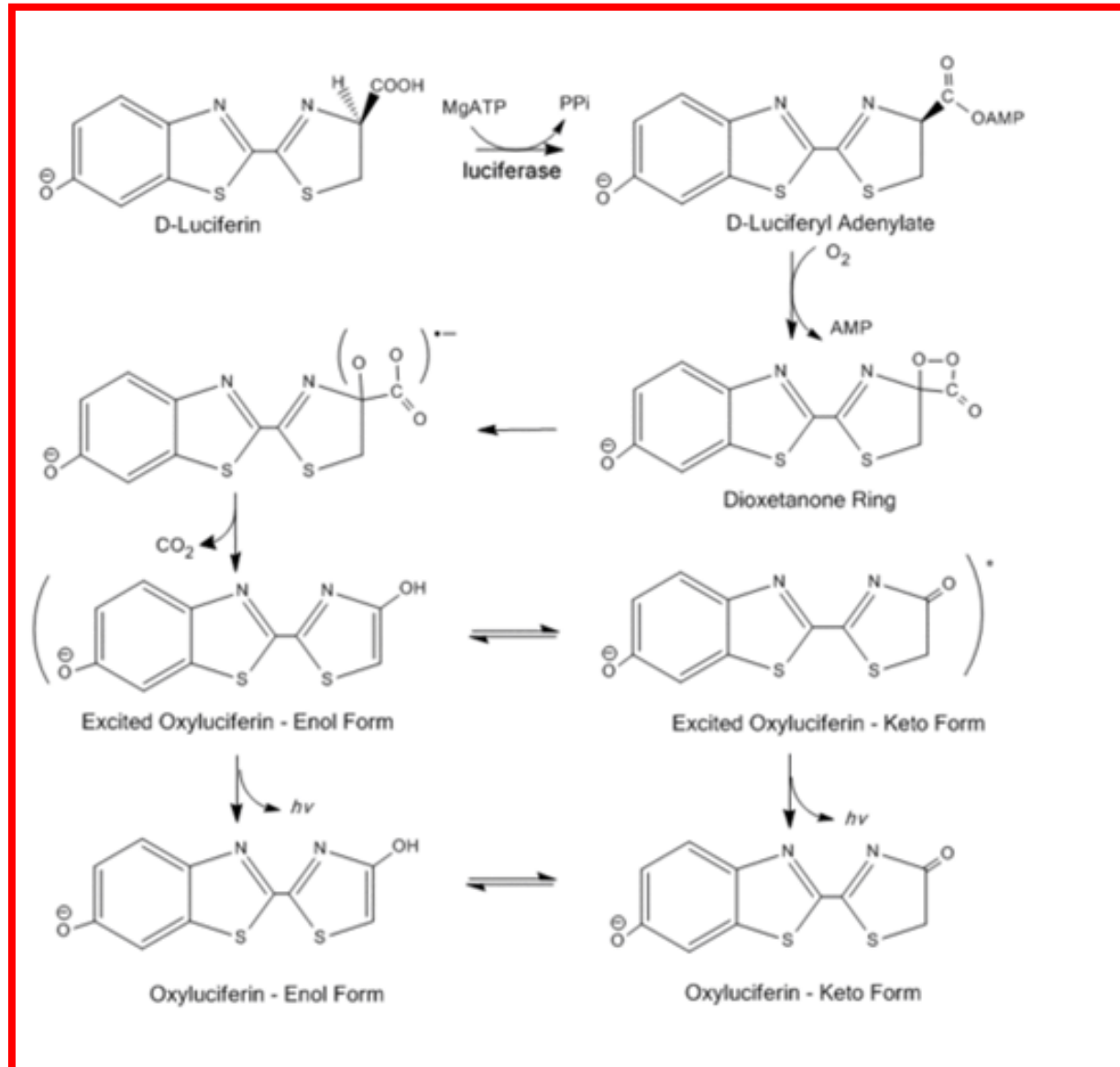
# ΒΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (bioluminescence)

- Ζωντανοί οργανισμοί όπως η πυγολαμπίδα παράγουν φώς μέσω της οξείδωσης ενός μικρού μορίου, της λουσιφερίνης, και η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο λουσιφεράση
- Διαφορετικές λουσιφερίνες παράγουν διαφορετικά χρώματα
- Το περιβάλλον που δημιουργείται από την λουσιφεράση όταν συνδέεται με την λουσιφερίνη επηρεάζει επίσης το χρώμα του εκπεμπόμενου φωτός
- Η μεταφορά ενέργειας από ένα μόριο δότη σε μία πρωτεΐνη μόριο-αποδέκτη είναι ένας άλλος μηχανισμός παραγωγής βιοφωταύγειας. Το πιο διάσημο παράδειγμα είναι η μεταφορά ενέργειας από μία φωτοπρωτεΐνη που φυσιολογικά εκπέμπει μπλέ χρώμα (πχ λουσιφεράση) σε μία πρωτεΐνη που ονομάζεται Green Fluorescent Protein, (GFP) η οποία καταλήγει στην εκπομπή πράσινου φωτός

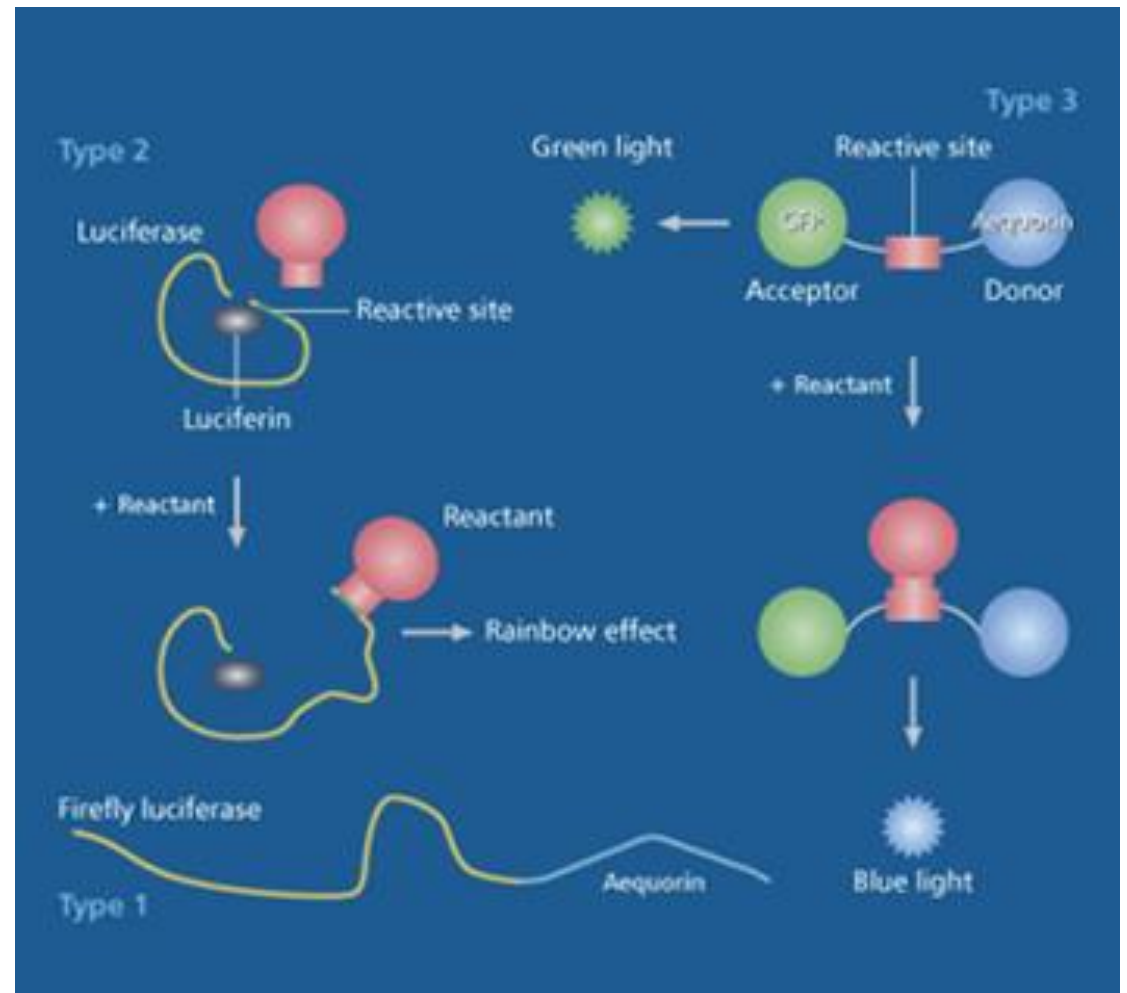
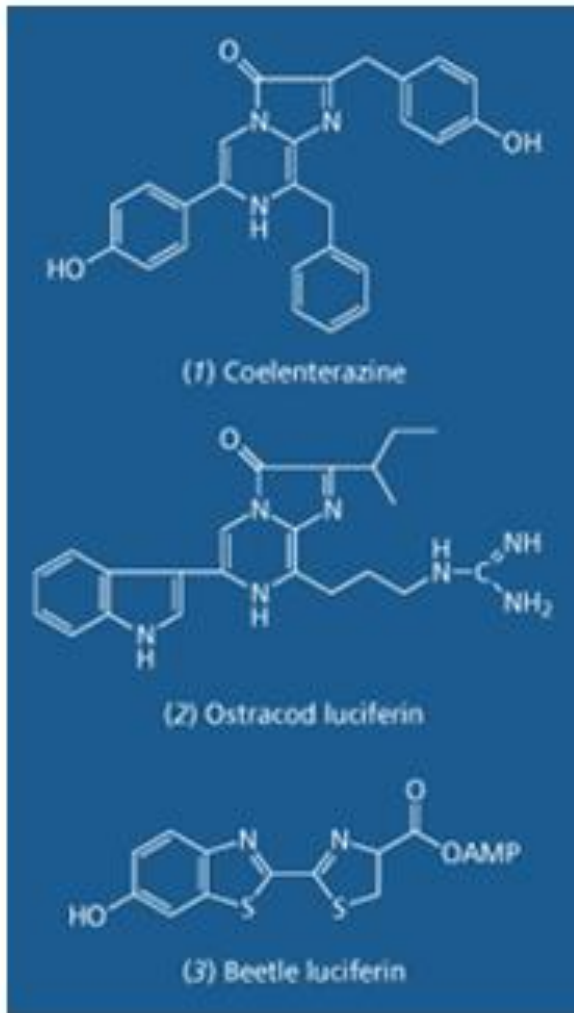


# ΒΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (bioluminescence)

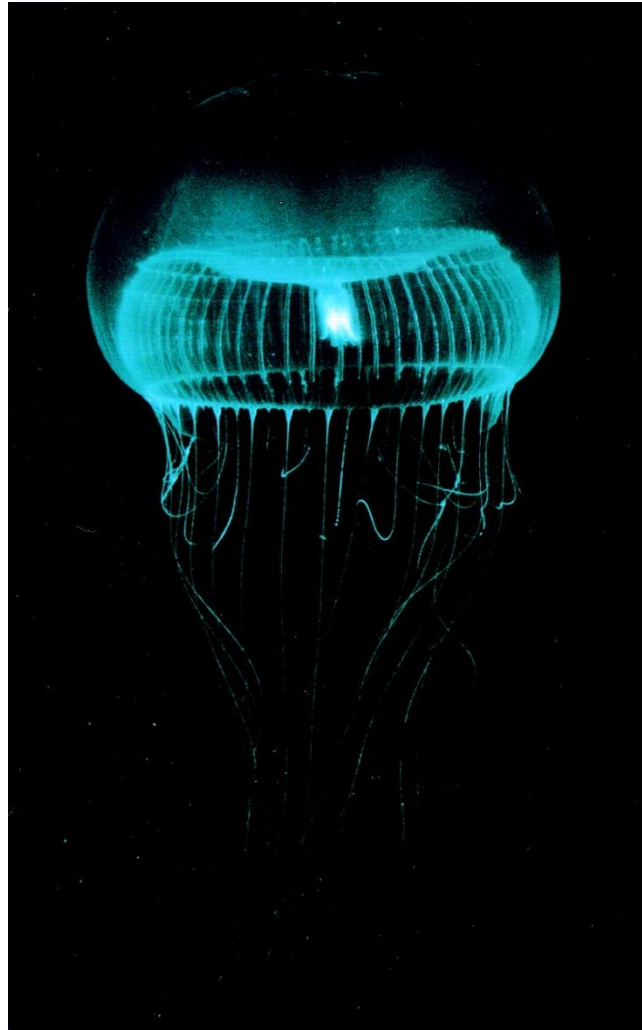
## Luciferin - luciferase



# Luciferase



**The hydromedusa *Aequorea victoria*.**



**Haddock S H D et al. PNAS 2001;98:11148-11151**

# ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΒΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ

- Στα τέλη της δεκαετίας του 80 βρέθηκε ότι όταν προστεθεί mRNA ή DNA που κωδικοποιεί αυτές τις πρωτεΐνες σε ζωντανούς οργανισμούς τότε το εκπεμπόμενο φώς μας επιτρέπει να δούμε τις χημικές αντιδράσεις μέσα στα κύτταρα , ακόμα και σε κυτταρικά οργανίδια
- Ενδοπλασματικό δίκτυο, GFP

