

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

LUMINISCENČNÍ ZNAČENÍ V IMUNOCHEMICKÉ ANALÝZE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

HRADEC KRÁLOVÉ 2010

LUKÁŠ GREBENÍČEK

Tuto bakalářskou práci jsem vypracoval sám na základě dostupné literatury a informací získaných ze zdrojů uvedených v seznamu literatury.

Chtěl bych tímto poděkovat PharmDr. Haně Sklenářové, Ph.D., za odborné vedení, trpělivost, ochotu, cenné rady a připomínky při zpracovávání bakalářské práce.

Lukáš Grebeníček

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATP	Adenosintrifosfát
Ig	Imunoglobulin
FITC	Fluorescein-5-thioizokyanát
TRITC	Tetramethylrhodamin-5-izothiokyanát
DNS-Cl	Dansyl chlorid
NBD-Cl	4-chloro-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol
ANS	1-anilinonaftalén-8-sulfonát
TNS	2-p-toluidinonaftalén-6-sulfonát
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
DELFA	Dissociation-enhanced Lanthanide fluoroimmunoassay
FPIA	Fluorescenční polarizační imunoanalýza
MEIA	Microparticle Enzyme Immunoanalysis
FISH	Fluorescence in situ hybridizace
CK-MB	Kreatin kináza MB
HCG	Lidský choriový gonadotropin
PMA	Phorbol-myristát-acetát
NADPH	Nikotin adenin dinukleotid fosfát
NO	Oxid dusnatý

1 Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	3
2. Úvod.....	5
3. Druhy luminiscence	6
3.1 Fotoluminiscence	6
3.2 Chemiluminiscence.....	7
3.3 Bioluminiscence.....	9
4. Imunochemie	10
4.1. Antigen.....	10
4.2 Protilátka	11
4.3 Vazba Antigen-Protilátka	12
5. Imunochemické metody	13
6. Luminiscenční metody.....	16
6.1 Luminiscenční značení	17
6.1.1 Fluorescenční značky	18
6.1.2 Fluorescenční sondy	20
6.1.3. Fluorescenční imunoanalýza	22
6.1.4 Luminiscenční značky.....	24
6.1.5 Luminiscenční imunoanalýza	25
7. Vybraná stanovení analytů luminiscenčními metodami	25
8. Shrnutí.....	31
9. Závěr	33
10. Seznam použité literatury	34

2. Úvod

Luminiscence je jev, při kterém dochází k samovolnému vyzáření energie ve formě světla. Působením energie na látku dojde k přesunu elektronů na vyšší energetické hladiny, při zpětném přechodu do základního stavu, na nižší energetické hladiny, dochází k vyzáření fotonu, jehož velikost je přímo úměrná obsahu látky.

Sloučeniny vykazující luminiscenci jsou z organického nebo biologického hlediska často velmi důležité látky, u kterých sledování luminiscenčních vlastností může přinést důležité poznatky, například o jejich struktuře, v biochemii pro studium uspořádání biopolymerů, nebo pro stanovení celé řady nízkomolekulárních látek, v poslední řadě také využití v lékařství například pro zobrazování v magnetické rezonanci [1].

Cílem práce je poskytnout informace o nejpoužívanějších luminiscenčních značkách, jejich využití v imunochemických metodách a uplatnění těchto metod v klinické praxi. K vyhledávání použité literatury a odborných článků byly použity databáze ScienceDirect, PubMed a Google.

3. Druhy luminiscence

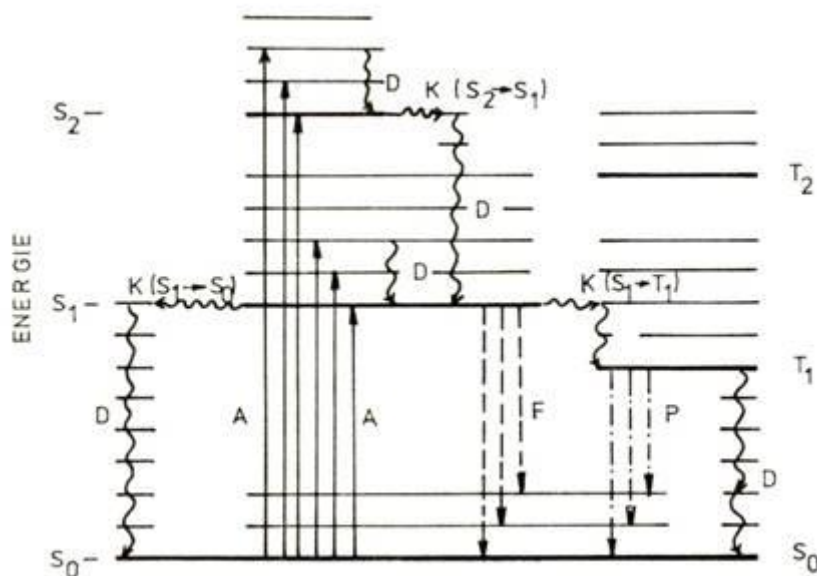
Existuje mnoho různých druhů luminiscence, záleží na typu energie, která vybudí elektrony luminoforů, tedy látek schopných luminiscence, do excitovaného stavu. Vzájemně se liší aktivací elektronu do excitovaného stavu a způsobem vyzáření energie.

Tabulka 1: Typ luminiscence podle druhu energie

Typ luminiscence	Buzení
Fotoluminiscence	Fotony
Chemiluminiscence	Chemická reakce
Bioluminiscence	Biologické procesy

3.1 Fotoluminiscence

Absorbovaná energie je v tomto případě dodána ve formě světelného záření. Fotoluminiscence je forma sekundárního světelného záření, které látka emituje po absorpci primárního světelného záření o vhodné vlnové délce. Primární záření je absorbováno v případě, že jeho frekvence odpovídá energii elektronů v atomech látky. Tuto absorbovanou energii ale molekula částečně ztrácí například ve formě tepla, srážkou s jinými molekulami, nezářivými přechody nebo jinými zhašecími procesy. Zbylá energie je pak vyzářena ve formě fotoluminiscenčního záření, a protože mají elektrony menší energii než primární záření, je emisní spektrum fotoluminiscence posunuto k delším vlnovým délkám. Fotoluminiscenci je možné dále dělit podle doby emise světla neboli dosvitu na fluorescenci ($10^{-10} - 10^{-7}$ s) a fosforescenci (10^{-6} a více) [2].



Obr. 1: Jablonského Diagram [3].

Na Jablonského diagramu je znázorněn proces, který nastává mezi absorpcí a emisí světla. Po absorpci světelného kvanta budícího záření přechází elektrony ze singletního stavu S₀ do excitovaných singletních stavů S₁, S₂, a tripletních stavů T₁ a T₂. Molekula obvykle přejde z rovnovážné vibrační hladiny stavu S₀ do některé z vibračních hladin excitovaných stavů. K deexcitaci molekuly dochází buď zářivými, nebo nezářivými přechody. Fluorescence je tedy spinově dovolený zářivý přechod, obvykle z rovnovážné vibrační hladiny stavu S₁ do některé z vibračních hladin stavu S₀. Fosforescence je zářivý přechod z vyššího (T₁) do energeticky nižšího stavu o rozdílné multiplicitě (S₀) [3].

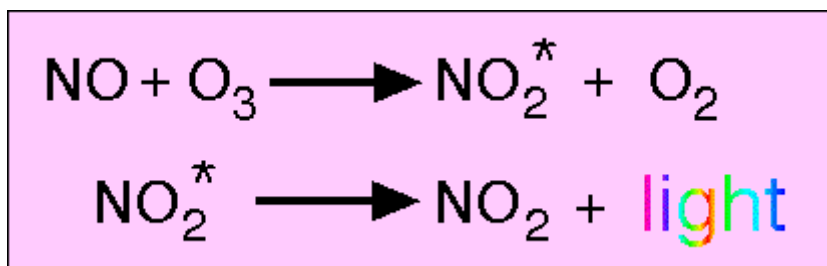
3.2 Chemiluminiscence

Chemiluminiscence nastává tehdy, produkuje-li chemická reakce elektronově excitované látky, které emitují fotony, aby dosáhly základního stavu. Chemická reakce může probíhat přímým reakčním systémem, analyt reaguje s chemiluminiscenčním činidlem a po jeho chemické oxidaci nastává přechod na vyšší energetickou hladinu,

nebo nepřímým reakčním systémem, kde analyt slouží jako inhibitor nebo zesilovač chemické reakce.

Využití chemiluminiscence se dnes používá v mnoha oborech. Chemiluminiscenční metody mají široké uplatnění zejména díky vysoké citlivosti a snadné detekci. Imunologický test patří v klinických laboratořích mezi nejpoužívanější metodu založenou na chemiluminiscenci. Tento souhrnný test má své uplatnění v klinické chemii, imunologii, virologii, toxikologii a endokrinologii pro hodnocení funkce štítné žlázy. Dále se uplatňuje ve stanovení plodnosti, funkci myokardu, chudokrevnosti, k terapeutickému monitorování a diagnostice zneužívání drog, i k diagnostice rakoviny a infekčních nemocí. V klinickém výzkumu se používá k měření aktivity enzymů, repertoáru genů, bílkovin, nukleových kyselin a reaktivních forem kyslíku [4].

Jedním z příkladu chemiluminiscenční reakce může být plamen, kde reakcí paliva s okysličovadlem vzniká produkt, který vyzařuje světlo. Mezi nejjednodušší reakce, při nichž dochází k luminiscenci je reakce oxidu dusnatého a ozónu [5, 6].



Obr. 2: Reakce oxidu dusnatého s ozónem [5].

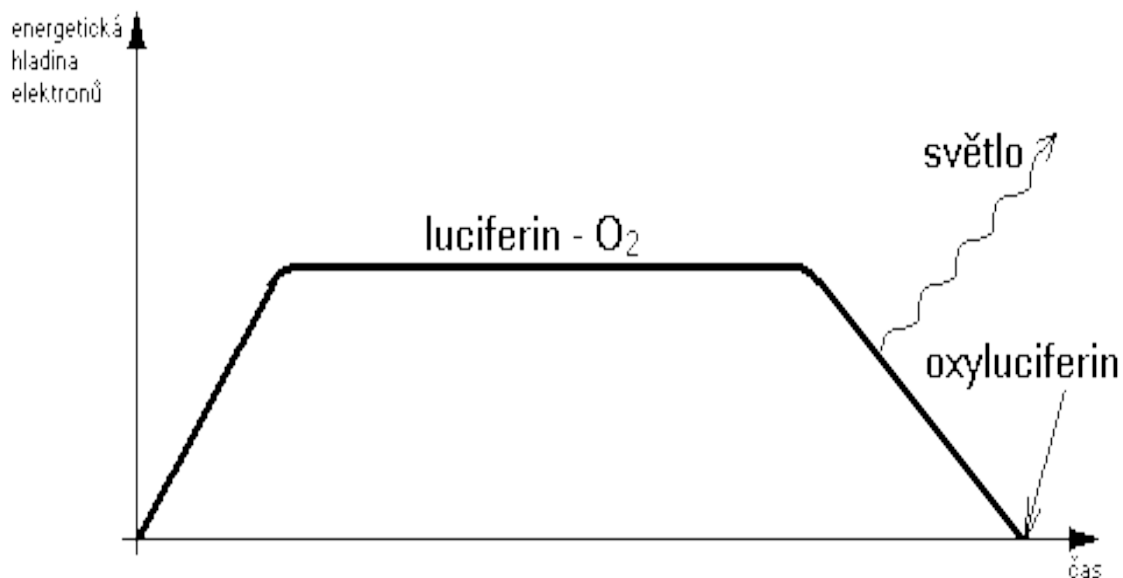
Oxid dusnatý reaguje s ozónem za vzniku oxidu dusičitého, který je v excitovaném stavu. Vrací se do stavu o nižší energii uvolněním fotonů světla. Reakce se provádí za nízkého tlaku, aby se předešlo kolizím s jinými částicemi a tudíž při co nejmenší ztrátě

energie. Reakce je součástí metody, která se využívá k detekci oxidu dusnatého ve výfukových plynech automobilů, nebo detekci oxidu dusnatého v ovzduší [5, 6].

Chemiluminiscenční reakce mohou probíhat ve všech fázích, pevné, kapalné i plynné. Použití plynné a kapalné fáze má velmi široké uplatnění, kdežto chemiluminiscence na pevné fázi je omezena mnoha faktory. Chemiluminiscence je mnohdy slabá a k detekci slouží zejména oxidativní změny v materiálech. Intenzita chemiluminiscence je charakteristická pro určitý druh materiálu a pomůže tak určit jejich složení.

3.3 Bioluminiscence

Bioluminiscence je vyzařování světla živým organismem. Světlo vzniká v organismu během zvláštní biochemické reakce. Luciferin reaguje s kyslíkem díky enzymu luciferáza, který hraje roli katalyzátoru chemické reakce. Vzniká oxyluciferin, který je již v excitovaném stavu a při přechodu na základní hladinu je vyzářeno světlo. Jako zdroj energie je potřeba ATP (adenosintrifosfát) [7].



Obr. 3: Vývoj energetické hladiny elektronů vybuzených molekul oxyluciferinu [8].

Bioluminiscence byla nalezena u mnoha mořských živočichů ať už bezobratlovců nebo obratlovců, některých suchozemských živočichů, dále u bakterií a plísní. U rostlin nebo živočichů žijících ve sladkých vodách bioluminiscence zcela chybí. Bioluminiscence tedy pravděpodobně vznikla v oceánech, kde slouží ke komunikaci, obraně, odpuzování nebo lovu živočichů.

Bioluminiscence má také široké uplatnění v diagnostice, mnoho metod a testů je založeno na tomto jevu. V mnoha oborech patří k důležitým a nezastoupitelným metodám.

4. Imunochemie

Arrhenius charakterizoval imunochemii jako vědu o chemických reakcích látek, které vznikly po injekci cizích látek do těla zvířat a vyvolaly imunitní odpověď.

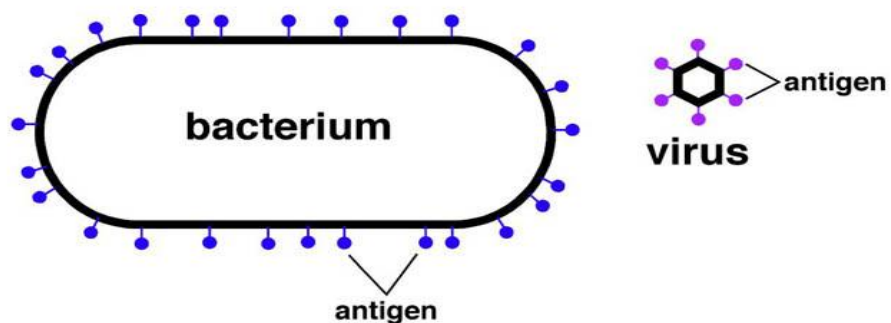
Imunochemie je založena na reakci antigenu s protilátkou. Reakce musí být komplementární, neboť jen specifická protilátka reaguje se specifickým antigenem. Reakce by rovněž nevznikla v neadekvátním prostředí, které zodpovídá za sílu vazby a umožní adekvátní průběh reakce.

4.1. Antigen

Antigeny jsou makromolekulární látky, přirozeně se vyskytující nebo uměle syntetizovány. Po vpravení do vhodného organismu, jsou schopny vyvolat imunitní odpověď tím, že stimulují tvorbu protilátek. Jsou to většinou větší částice, někdy i malé molekuly a v některých případech i buňky vlastního organismu. Jako antigeny mohou působit chemické látky, proteiny, různě komplexní polysacharidy, lipidy, lipoproteiny, bakterie, nebo viry. Antigeny můžeme rozlišovat na kompletní a nekompletní. Kompletní antigen se označuje jako imunogen, který je schopen vyvolat imunitní odpověď. Nekompletní antigen neboli haptén, může být rozeznán protilátkami, ale nevyvolá jejich tvorbu. Imunogenem se stane, až po navázání na vhodný nosič kdy

vznikne konjugát, který je imunogenní. Antigen obsahuje na povrchu své molekuly oblast zvanou epitop (determinanta), tedy oblast proti které tvoří imunitní systém specifické protilátky, na které se může specificky navázat. Epitop haptenu je pak jednou z determinantů na struktuře konjugátu [9].

Na obrázku níže je ukázka antigenních epitopů na buňce bakterie, nebo viru.

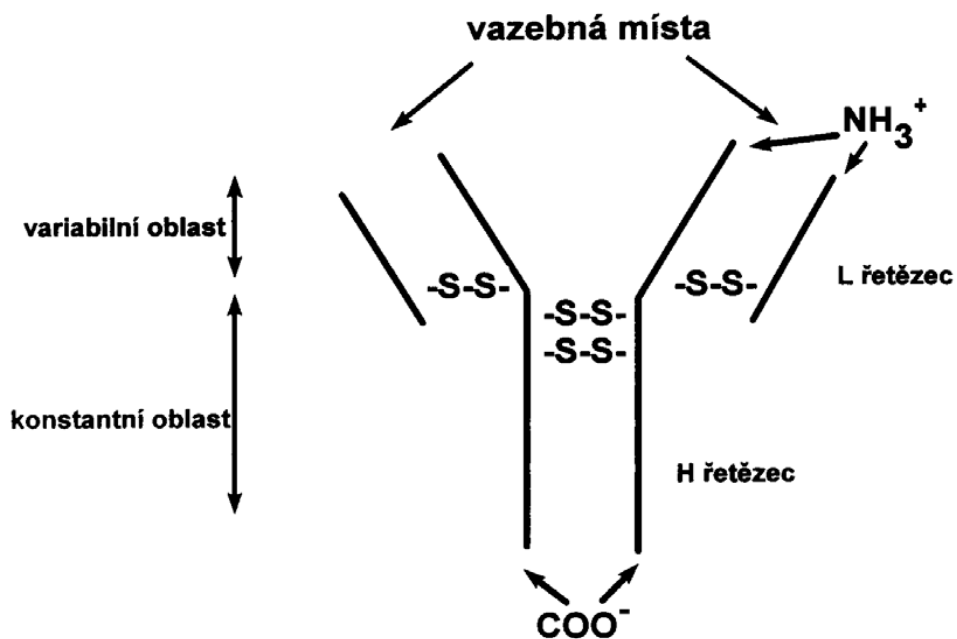


Obr. 4: Antigen [10].

4.2 Protilátka

Protilátky jsou svým složením proteiny, které jsou schopné identifikovat a zneškodnit tělu cizí látky. Po stimulaci antigenem zajišťují tvorbu protilátek plazmatické buňky, které jsou produkovány B lymfocyty v kostní dřeni. Protilátky se označují jako imunoglobuliny (Ig). Molekula imunoglobulinu je tvaru Y a skládá se ze dvou identických lehkých (L) a těžkých (H) řetězců. Tyto řetězce jsou spojeny disulfidickými vazbami. Jedna molekula imunoglobulinu obsahuje jeden typ těžkého a jeden typ lehkého řetězce. Těžké řetězce se skládají z pěti funkčních domén α , δ , μ , γ , ϵ . Tyto

domény určují, o jaký typ imunoglobulinů se jedná. Rozlišujeme 5 tříd imunoglobulinů: IgG, IgM, IgA, IgE, IgD. Lehké řetězce jsou dva κ nebo λ a určují typ imunoglobulinové domény. Každý imunoglobulin má C konec a N konec. C konec tvoří konstantní část molekuly, N konec tvoří variabilní část molekuly. N konec slouží jako vazebné místo antigenu a nazývá se paratop. Kromě imunoglobulinu M, který má 10 vazebných míst, mají ostatní imunoglobuliny 2 vazebná místa pro antigen [9, 11].



Obr. 5: Struktura protilátky [11].

4.3 Vazba Antigen-Protilátka

Vazebná místa protilátek tvoří nekovalentní komplexy s molekulami antigenu. Jejich stabilitu určují mezimolekulové síly. Uplatňují se zde vodíkové vazby, van der Waalsovy síly, iontové a hydrofóbní interakce. Komplex antigen-protilátka je

reverzibilní a při jejich reakci nastává rovnovážný stav, který je vyjádřen asociační konstantou [9, 12].

$$K = \frac{[Ab \cdot H]}{[Ab] \cdot [H]} \quad K = \text{asociační rovnovážná konstanta}$$

Afinita je síla vazby mezi jedním epitopem antigenu a jedním paratopem protilátky. Afinita vyjadřuje energii vazby a je dána součtem všech přitažlivých a odpudivých sil vazby [9].

Avidita vyjadřuje celkovou energii vazby všech vazeb mezi epitopy antigenu a paratopy protilátky. Je tedy dána součtem vazebních afinit ve vzniklé molekule. Komplex antigenů a protilátek se nazývá imunokomplex [9, 12].

5. Imunochemické metody

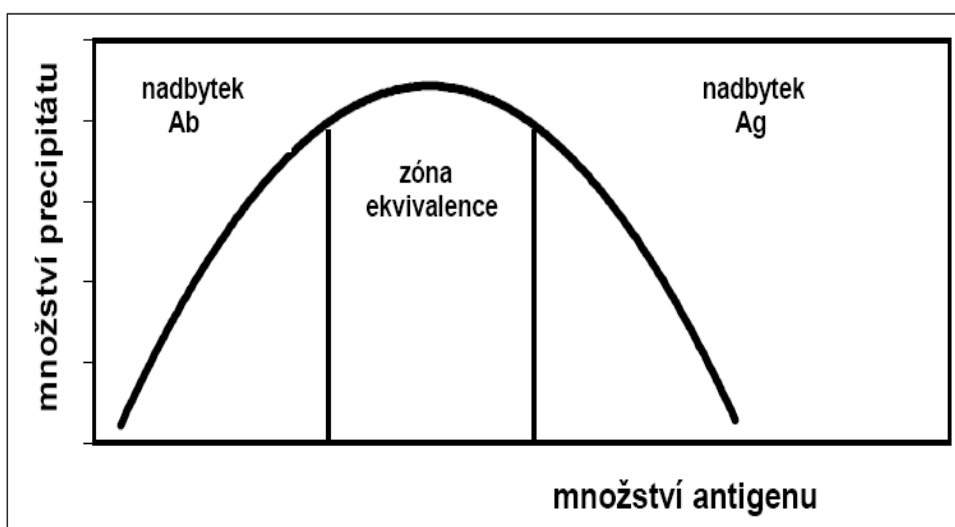
Jsou založeny na již výše zmiňované reakci antigenu s protilátkou. Vzniklý komplex antigen-protilátka lze stanovit různými metodami. Jejich úloha v klinických laboratořích je nepřeborná. Pomocí těchto metod můžeme stanovit např. antigeny různých mikroorganismů, koncentrace protilátek v biologických tekutinách, stanovení koncentrace různých proteinů, hormonů, léků, nízkomolekulárních látek, nebo stanovení krevních skupin.

Imunochemické reakce se provádí v roztoku nebo gelu, který slouží jako tzv. nosič. Dochází ke vzniku precipitátu nebo aglutinátu. U precipitace je přítomen solubilní antigen, u aglutinace korpuskulární. Můžeme hodnotit množství vzniklého zákalu, tedy jeho kvantitu, nebo přesně stanovit o jaký druh antigenu, nebo typ protilátky se jedná, tedy kvalitu.

Precipitát vzniká v roztoku po reakci rozpustného antigenu s odpovídající protilátkou. Reakce zpočátku probíhají velmi rychle a pokračují pomaleji po několik hodin. Výsledkem této reakce je vznik malých agregátů, které zapříčiní zakalení roztoku. Množství antigenu by mělo být v mírném nadbytku, aby došlo k jeho úplnému navázání s protilátkou. Jestliže budeme do zkumavek obsahujících známé množství

protilátky přidávat antigen, většinou obsažený ve vzorku, vznikne v některých zkumavkách precipitát a jeho množství odpovídá přesné koncentraci antigenu ve vzorku [11].

Vztah mezi koncentrací antigenu a množstvím precipitátu v roztoku se známou koncentrací protilátky můžeme vyjádřit Heidelbergovou kvantitativní imunoprecipitační křivkou [11].



Obr. 6: Kvantitativní imunoprecipitační křivka [13].

Křivku charakterizují tři úseky. Část vzestupná, sestupná a zóna ekvivalence. Ve vzestupné části, kterou charakterizuje nadbytek protilátky, se tvoří rozpustné komplexy protilátek, které se váží na jeden antigen. V této části je množství vzniklého komplexu úměrné koncentraci přítomného antigenu. V sestupné části, která naopak charakterizuje nadbytek antigenu, se na jednu molekulu protilátky váže víc molekul antigenů a precipitát nevzniká. V prostřední části křivky v tzv. zóně ekvivalence dochází k vzájemnému propojování molekul a vznikají nerozpustné mřížkovité struktury, které vytvářejí precipitát [11, 14].

Detekce se provádí většinou měřením vzniklého zákalu. Světlo, které prochází roztokem je rozptylováno a je měřeno nefelometricky nebo turbidimetricky. V případě

nefelometrie se měří intenzita rozptýleného světla. Měří se pod úhlem, který je odlišný od směru dopadajícího záření (kolmo). Nefelometr používá jako zdroj záření nejčastěji laser. Turbidimetrie je založena na měření prošlého světla precipitátem v přímém směru a k detekci lze využít spektrofotometry. Citlivost precipitačních reakcí lze zvýšit navázáním protilátky nebo antigenu na latexové částice, které zesilují rozptyl světla v zákalu [11].

Imunochemické reakce v gelu probíhají rovněž za vzniku precipitátu. Agarový a agarózový gel patří mezi nejpoužívanější. Do gelu se nanese v různém množství antigen nebo protilátka a difuzí dochází k tvorbě precipitačního prstence. Rozlišujeme jednoduchou, nebo dvojitou difúzi, u jednoduché je antigen, nebo protilátka navázána v gelu a druhá složka se v něm pohybuje. U dvojité difúze se obě složky volně pohybují v gelu a difundují proti sobě za vzniku precipitátu. Vzniklé precipitační prstence se pak měří a z jejich průměru lze získat koncentraci sledované látky. Tyto jednoduché metody, mezi které patří rovněž elektroforéza, se staly základem několika komerčních testů [11, 14].

V imunochemických metodách se používají specifické typy protilátek, které se vyrábí za přísných podmínek. Jejich specifita spočívá také v tom, jak reagují s antigenem.

Polyklonální protilátky se připravují imunizací zvířat, nejčastěji kozy, králíka, nebo ovce antigenem. Krevní sérum zvířete, které obsahuje protilátky proti antigenu použitého k imunizaci, se nazývá antisérum. Mezi nejpoužívanější antigeny k imunizaci se používají biopolymery např. proteiny, polysacharidy a méně pak nukleové kyseliny. Pokud byl k imunizaci použit jeden antigen, hovoříme o monospecifickém antiséru. Polyklonální protilátky jsou schopny reagovat s různými epitopy antigenu a naopak antigen stimuluje tvorbu několika protilátek. Polyklonální protilátky tedy obsahují protilátky proti většímu počtu antigenů a jsou produkovány různým počtem B lymfocytů [11, 15].

Monoklonální protilátky vznikají z jediného klonu B lymfocytů. Vznikají v laboratorních podmínkách tzv. hybridomovou teorií, která spočívá ve fúzi nádorových buněk s lymfocyty sleziny imunizované myši. První fáze přípravy probíhá stejně jako u

polyklonálních protilátek, poté se provede buněčná suspenze sleziny imunizovaného laboratorního zvířete a nechá se fúzovat s myelomovými buňkami. Vzniklé buněčné linie jsou pak uchovávány v selekčním médiu. Monoklonální protilátky reagují pouze s jedním epitopem antigenu a jsou specifické. Monoklonální protilátky ale nejsou díky tomu schopny vytvářet precipitát tak jak je tomu u polyklonálních protilátek. Nelze je tudíž používat v precipitačních metodách. Uplatnění našly v kvalitativní imunoanalýze [11, 15].

V moderních imunochemických metodách se ke zvýšení citlivosti reakce používá značení jednoho z reaktantů reakce, jehož detekce je citlivější než stanovení imunoprecipitátu. Značkou může být radioizotop, enzym nebo luminiscenční látka.

6. Luminiscenční metody

Při vývoji imunochemických metod se značenými molekulami se využívají kompetitivní a nekompetitivní reakce.

Kompetitivní reakce jsou reakce, u nichž dochází ke smíchání antigenu a protilátky simultánně, nebo postupně. Simultánní stanovení reprezentuje reakce, při nichž neznačený a značený antigen soutěží o vazbu na protilátce. Avidita protilátky musí být pro oba antigeny totožná, poté je pravděpodobnost vazby protilátky na vázaný antigen nepřímo úměrná koncentraci neznačeného antigenu. Při postupné kompetitivní reakci dochází k navázání neznačeného antigenu k protilátce a po proběhnutí reakce se naváže značený antigen, který se váže na volná vazebná místa protilátky. Dojde ke stanovení frakce značeného antigenu a poté, se výpočtem stanoví koncentrace neznačeného antigenu. Postupné navázání antigenu má oproti simultánnímu navázání výhodu, že se dá stanovit mnohem menší koncentrace antigenu.

Nekompetitivní metody se vyznačují tím, že se na povrch nosiče (pevné fáze) naváže protilátka v nadbytku specifická pro antigen, který chceme stanovit. Antigen se nechá reagovat s protilátkou a v další fázi dojde k promytí a odstranění nežádoucích proteinů. Dalším krokem je navázání sekundární značené protilátky, která reaguje

s dalším epitopem již navázaného antigenu. Značená protilátka navázána k antigenu je po promytí stanovena a její koncentrace je přímo úměrná koncentraci antigenu ve stanovovaném materiálu. Použité protilátky mohou být monoklonální i polyklonální.

Imunochemické metody se dělí také podle toho, zda dochází k oddělení volné a vázané frakce imunokomplexu na heterogenní a homogenní.

Heterogenní metoda používá k oddělení obou frakcí nejčastěji separační metody. Precipitace a adsorpce na pevnou fázi patří mezi nejpoužívanější. Precipitace vzniká přidáním látky, která sráží proteiny, nebo přidáním druhé precipitující protilátky, která je specifická pro první protilátku. Nevýhodou je časová náročnost. Při adsorpci na pevné fázi dochází k navázání protilátky na nosič kovalentní vazbou nebo fyzikální adsorpcí. Nosičem může být polystyrenová zkumavka, mikrotitrační destička, magnetické latexové částice nebo celuloza. Dochází k soutěžení značeného a neznačeného antigenu o vazebná místa na protilátce. Stanovení vzniklého imunokomplexu je ukončeno přidáním činidla s indikátorem.

Homogenní imunoanalýza nevyžaduje oddělení volného a vázaného značeného imunokomplexu. U této metody dojde ke změně aktivity značené molekuly po vazbě na specifické agens. Metoda je rychlejší a jednodušší, protože po proběhlé inkubaci všech složek reakce se měří aktivita značené molekuly [12, 16, 17, 18].

6.1 Luminiscenční značení

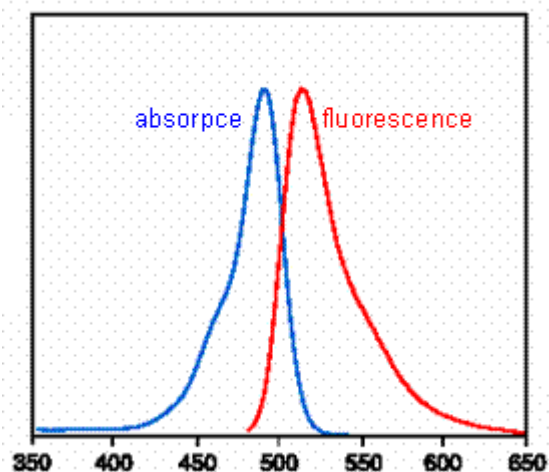
Molekuly bez vlastní luminiscence lze derivatizovat luminiscenčními značkami. Luminiscenční značky se mohou dělit na fluorofory a luminofory. Po navázání na antigen nebo protilátku a po jejich ozáření, nebo proběhlé chemické reakci dochází k vyzáření světla v určitém barevném spektru typickém pro každou značku a intenzita závisí na koncentraci stanovovaného agens. Luminiscenční značky se používají zejména ke zvýšení citlivosti metody, stanovení velmi nízkých koncentrací analytu a poskytují také údaje o struktuře látky, nebo funkci látky ve zkoumaném systému. Fluorofory a luminofory se mohou vázat kovalentní vazbou, nebo jako sondy různým typem nekovalentní vazby. Ve své molekule by měly mít vhodné funkční skupiny, jako jsou

karboxylové kyseliny, aminokyseliny, sulfonové kyseliny, anhydridové skupiny nebo sloučeniny s izokyanátem či izothiokyanátem a mnoho dalších [17, 19].

6.1.1 Fluorescenční značky

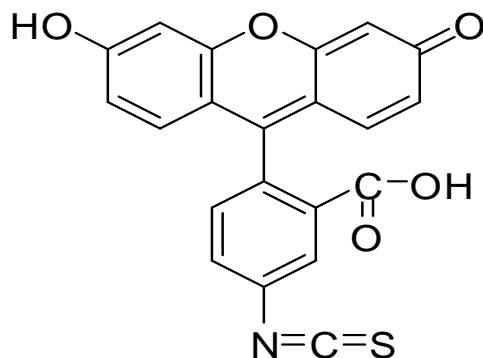
Fluorofory se dělí do dvou skupin na vlastní a nevlastní. Vlastní se vyskytují přirozeně v mnoha látkách, jako jsou proteiny, nebo některé enzymy obsahující hem. Nevlastní fluofory jsou přidány k látkám, které nemají vhodné fluorescenční vlastnosti a označují se jako fluorescenční značky, nebo sondy. Nevlastní fluofory se mohou ještě dělit podle toho, zda se mění, nebo nemění po vazbě na buněčné struktury. Zároveň je důležité, aby při vazbě nedošlo k poškození stanovovaného systému [3].

Mezi nejpoužívanější fluorescenční značky patří fluorescein, fluoreskamin, rhodamin, fykobiliproteiny, umbeliferon, porfyriny, kovové cheláty a mnoho dalších. Fluorescenční značky se váží k agens kovalentní vazbou. Mezi základní charakteristiky fluorescenčních značek patří maximální vlnová délka excitačního a emisního světla, molární absorpční koeficient a kvantový výtěžek, který vyjadřuje poměr mezi počtem absorbovaných a vyzářených fotonů. Další charakteristikou je fluorescenční čas, trvání fluorescence po excitaci [3, 17, 19].



Obr 7: Absorpční a fluorescenční spektrum fluoresceinu [3].

Nejznámějšími fluorescenčními značkami jsou fluorescein-5-thioizokyanát, označovaný jako FITC, a tetramethylrhodaminizokyanát označovaný jako TRITC.



Obr 8: Fluorescein-5-thioizokyanát [3].

Další molekulou, která slouží jako fluorescenční značka zejména pro proteiny je dansyl chlorid označována jako DNS-CL. Je excitována zářením kolem 350 nm a emituje záření při 520 nm. Záleží však na polaritě prostředí, rovněž jako u fluorescenční značky Akrylodanu, derivátu prodanu.

Fluorescenční značky, které mají ve svém středu atom bóru, se označují jako BODIPY. Jejich výhodou je zejména vysoký kvantový výtěžek a nezávislost na polaritě okolí a pH prostředí. Jejich absorpční a emisní spektrum se pohybuje v rozmezí 510-675 nm. BODIPY se využívají ke značení proteinů, nukleotidů, dextranů, enzymových substrátů, mastných kyselin a mnoha dalších látek.

Fluoreskamin a 4-chloro-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol označovaný jako NBD chlorid nejprve vytvoří konjugát s amino skupinou substrátu a poté fluoreskují. Tyto značky našly své uplatnění při stanovení léčiv a mnoha dalších nízkomolekulárních látek.

Další skupinou, o které bych se rád zmínil, jsou látky, které vznikají syntézou z původní molekuly, zachovávají si její chemické vlastnosti, ale na rozdíl od ní fluoreskují. Molekula etheno-ATP je analogem adenosin trifosfátu (ATP) a vykazuje fluorescenční vlastnosti. Vznikají také látky na úrovni nukleovýchází adeninu a guaninu a molekuly na bázi cholesterolu nebo estradiolu se využívají například pro

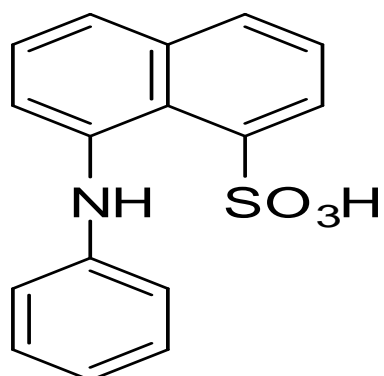
studium interakcí steroidů s buněčnými membránami. Existuje mnoho dalších fluorescenčních značek, které se liší svým účinkem a uplatněním [3].

6.1.2 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy se váží nekovalentní vazbou k substrátu a mění často své fluorescenční vlastnosti. Měly by mít vysokou hodnotu fluorescence, signál by měl být odlišitelný od fluorescenčního pozadí, které vyvolávají některé substráty například proteiny. Umožňují získat důležité informace o sledované látce a množství. Dnes známých fluorescenčních sond je v řádech tisíců.

Používají se ke studiu membrán, jejich tloušťky, nebo membránového potenciálu, k měření změn konformace bílkovin, viskozity prostředí, polaritě prostředí, nebo ke studiu nukleových kyselin [3, 17].

Fluorescenční sondy pro polaritu prostředí studují většinou strukturu a stupeň polárnosti různých vazebných míst na proteinech. Sledují i případné vytěsňování fluorescenčních sond na proteinech, způsobené nejčastěji aktivací enzymů. Můžeme zde zařadit fluorescenční sondu 1-anilinonaftalén-8-sulfonát označovanou jako ANS, a dále fluorescenční sondu 2-p-toluidinonaftalén-6-sulfonát označovanou jako TNS.



Obr. 9: Molekula fluorescenční sondy ANS [3].

Fluorescenční sondy pro studium buněčných membrán se váží na nepolárních místech uhlíkových řetězců, zbytků mastných kyselin. Sledují zejména transport a metabolismus lipidů v buňkách, přenos signálu zprostředkovaný lipidy, potenciál membrány, viskozitu membrány a interakce léčiv s membránou.

Membránové sondy lze rozdělit do dvou skupin:

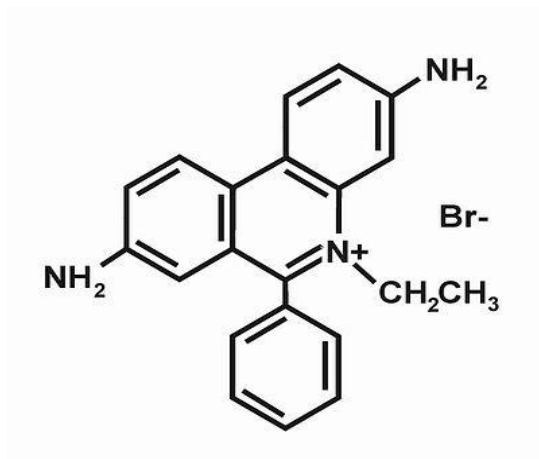
1. Fluofory přirozených lipidů (sfingolipidy, fosfolipidy, steroidy).
2. Malé amfifilní a organické lipofilní fluofory.

Do první skupiny patří sondy, jejichž zanoření do lipidové

vrstvy lze měnit délkou řetězců připojených k fluoroforům. Připojením fluoresceinu, nebo rhodaminu k fosfolipidovým povrchům lze získat vhodné lipidové sondy. Byly připraveny také fluorescenční analogy sfingolipidů, steroidů, nebo liposacharidů.

Druhá skupina membránových sond slouží ke studiu charakteristiky membránového okolí a poskytuje informace o polaritě, viskozitě, nebo uspořádání lipidů. Sondy jsou rovněž citlivé na prostředí, ve kterém se pohybují.

Nukleové kyseliny a také nukleotidy nefluoreskují. Pro vizualizaci chromozomů v DNA se používá celá řada fluorescenčních sond, jako jsou akridinová oranž, ethidium bromid, propidium jodid, nebo Hoechst 33342 využíván zejména v molekulární biologii. Ethidium bromid má interkalační účinky, při práci s ním se musí dodržovat přísná pravidla. Cyaninová barviva se používají pro stanovení nukleových kyselin v roztocích nebo gelech. Tyto sondy slouží také ke sledování apoptózy, přesněji ke sledování aktivace specifických genů a proteinů.



Obr 10: Molekula Ethidium bromidu [3].

Fluorescenčními indikátory mohou být označovány chemické sondy, které mají citlivost k určité látce. Existuje mnoho indikátorů pro řadu látek například pro vápník, hořčík, sodík, draslík, chlór, kyslík, aminy, nebo měření pH.

Fluorescenční indikátory využívají spektrálního posuvu v závislosti na přítomnosti dané látky a její koncentrace se měří na základě poměrů intenzit při různých vlnových délkách excitace a emise. Další skupinou jsou indikátory, které vykazují zvýšené fluorescenční vlastnosti v přítomnosti dané látky, aniž by docházelo k spektrálnímu posuvu. Pro studium živých buněk se používají acetoxymetylové a acetátové estery fluorescenčních indikátorů. Estery snadno pronikají buněčnou membránou a uvnitř buňky vzniká původní indikátor. Mezi fluorescenční indikátory pro důkaz vápníku patří například Calcium green, nebo Fura-2 [3].

6.1.3. Fluorescenční imunoanalýza

Metody založené na fluorescenci patří dnes k základním metodám v mnoha oborech. Jsou vyhledávané díky své jednoduchosti, citlivosti a dají se snadno automatizovat. Je známo několik uspořádání, které používají firmy v uzavřených systémech.

Metoda FRET - Fluorescence Resonance Energy Transfer, umožňuje sledovat interakce mezi dvěma různými molekulami. Molekuly jsou označeny různými fluorofory, které jsou vybrány tak, aby se emisní spektrum jednoho z nich nepřekrývalo s excitačním spektrem druhého. Pokud spolu molekuly vzájemně reagují a jejich fluorofory se dostanou dostatečně blízko, může se energie přenést z jednoho na druhý. Při zhášení fluorescence dostaneme emisní signál jednoho z nich, který je pozorován fluorescenčním mikroskopem. Nejčastěji se tato metoda používá například při měření interakce mezi signální molekulou a jejím receptorem.

Metoda DELFIA - Dissociation-enhanced Lanthanide fluoroimmunoassay, využívá ke značení protilátek cheláty kovů Europia a Samaria. Jejich slabá fluorescence je zesílena uvolněním iontů do prostředí, tím se značně prodlouží životnost fluorescence, až o 5 řádů. Tohoto jevu se využívá k měření [12, 16].

Fluorescenční polarizační imunoanalýza (FPIA) je homogenní kompetitivní metoda, která je hojně využívána pro stanovení léků a při terapeutickém sledování lékových hladin. Měří se fluorescence v rovině polarizovaného světla a jako značka se používá například molekula fluoresceinu, nebo ruthenia. Velikost signálu je nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného analytu [13, 16].

Metoda MEIA – Microparticle Enzyme Immunoanalysis, využívá alkalickou fosfatázu (ALP) jako značku a jako substrát 4-methyl-umbelifylfosfát. Po separaci imunokomplexu pomocí specifických mikročástic se při enzymatické reakci uvolní 4-methyl-umbeliferon a měří se jeho fluorescence. Metoda v imunochemických analyzátoch umožňuje stanovit velké množství vzorků za relativně krátký časový úsek [16].

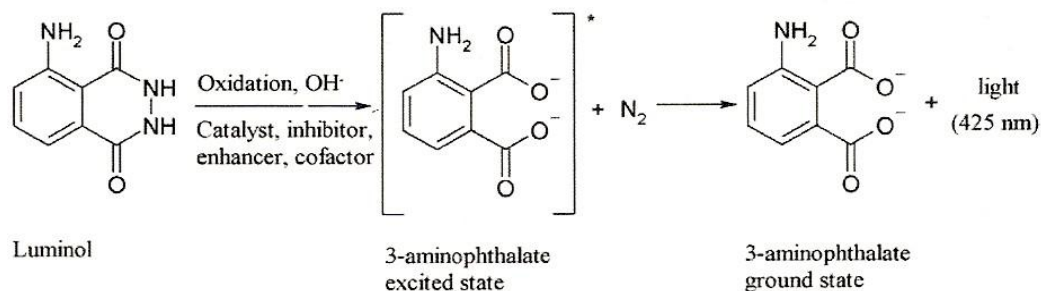
Existuje mnoho dalších metod založených na fluorescenci. Za zmínku stojí metoda FISH - Fluorescence in situ hybridization, která umožňuje detekci a lokalizaci konkrétních sekvencí DNA v chromozomech. Slouží k mapování genů a sledování chromozomálních abnormalit, k detekci se využívá fluorescenční mikroskopie.

6.1.4 Luminiscenční značky

Luminofoxy používané ke značení jsou v biologických materiálech poměrně stabilní a interference jsou minimální. K luminiscenci dochází po aktivaci luminiscenčních značek, většinou exergonickou chemickou reakcí, kdy jsou luminofoxy excitovány například oxidací. Chemiluminiscence je hojně využívána i v praktickém životě v mnoha oborech například v kriminalistice k zajištění stop. V klinické diagnostice se používá nejčastěji ve výzkumu DNA, proteinů, nebo k detekci nebezpečných látek v ovzduší [16, 20].

Mezi nejpoužívanější luminofoxy patří akridinové estery, aromatické hydrazidy, isoluminol a luminol. Jako katalyzátory, které slouží k zesílení luminiscenční reakce, se používají nejčastěji peroxidáza, luciferáza a ionty přechodných kovů. Luciferáza se uplatňuje v bioluminiscenci, kde zesiluje signál luciferinu vyskytujícího se například v těle světlušek. Luciferin se uplatňuje při stanovení ATP [17, 21].

Luminol, jako vůbec první chemiluminiscenční látka byl objeven v roce 1928. Uplatnil se zejména v kriminalistice, později v biochemii a biologii. Při chemiluminiscenci vyzařuje luminol modré světlo. Luminol může být katalyzován také látkami přírodního původu například porfyriny, molekula hemu obsahuje železnaté ionty, které jsou také schopny katalyzovat reakci luminolu. Luminiscenci luminolu lze provést velice snadno z dostupných chemikálií v základně vybavené chemické laboratoři. Luminiscence luminolu se provádí v bazickém prostředí, které zajišťuje pufr, po oxidaci většinou peroxidem vodíku a proběhlé katalýze můžeme sledovat chemiluminiscenci, která je intenzivní několik sekund a slabá intenzita záření trvá několik minut. Reakci ovlivňuje kvalita použitých chemikálií, mohou se přidat fluorescenční barviva, které změní barvu vyzařovaného světla [20, 21].



Obr 11: Oxidace luminolu

6.1.5 Luminiscenční imunoanalýza

Luminiscenční imunoanalýza je využívána jako neradioaktivní varianta v mnoha analytických systémech. Je velice citlivá, dokáže stanovit velmi malé koncentrace hledané látky. Značí se většinou antigen, který pak reaguje v heterogenním uspořádání a po oddělení imunokomplexu dojde k oxidaci a vzniklé světlo se měří na luminometru. Velké analyzátory pro chemiluminiscenční detekci jsou vhodné pro laboratoře s větším počtem vzorků [16, 17].

Elektrochemiluminiscence využívá k aktivaci činidel oxidace na anodě a značené mikročástice. Mikročástice jsou potaženy nejčastěji streptavidinem a váží imunokomplex, který obsahuje antigen s protilátkou a protilátku značenou rutheniem. Celý komplex je zachycen magnetickým polem a na elektrodě po přidání substrátu a vložení napětí vzniká elektroluminiscenční emise [16].

7. Vybraná stanovení analytů luminiscenčními metodami

Od 90. let minulého století patří luminiscence k nejpoužívanějším analytickým metodám, zejména v klinické biochemii a imunochemii. Řada klinických laboratoří využívá chemiluminiscenční analyzátory, k neznámějším patří analyzátory IMMULITE. Imunochemické testy využívají k diagnostice analyzovaných látek reakce antigenu

s protilátkou, která je značena chemiluminiscenční látkou. Jako chemiluminiscenční markery se používají luminofory, nebo chemiluminiscenční reakce katalyzované enzymy. Analýza se provádí v běžných tělních tekutinách jako je krev, plazma či sérum. K výhodám patří malá potřeba vzorku, která se pohybuje v nmol/l, vysoká citlivost, selektivita reakce zaručuje reaktivitu pouze s hledanou látkou. Rychlost analýzy a množství stanovení usnadňují diagnózu lékaře. Rozdíl oproti radiometrickým metodám je v likvidaci odpadů, kdy se nepracuje s nebezpečnými látkami a zkvalitňuje se tak bezpečnost práce zdravotnického pracovníka. Uvedené metody bývají většinou ve spojení s jinou metodou, nebo slouží k detekci.

Tabulka 2: Stanovení analytů pomocí chemiluminiscenčního analyzátoru v klinické biochemii [22].

Diagnostická skupina	Specifické testy
Alergie	Screningové testy alergenů Specifické testy IgE, IgG Specifické alergeny Skupinové alergeny Molekulární alergeny
Anémie	Erythropoetin Feritin Vitamín B 12 Kyselina listová (folát)
Diabetes mellitus	Albumin C- peptid Insulin
Infekční onemocnění	Helicobacter pylori Cytomegalovirus CMV Virus Epstein- Barrové EBV Syfilis

Kardiovaskulární markery	Myoglobin Troponin CK- MB (kreatinkináza- MB) Homocystein
Kostní metabolismus	Kalcitonin Osteokalcin
Nádorové markery	Prostatický specifický antigen Beta-2-Mikroglobulin
Terapeutické monitorování léčiv	Fenobarbitaly Digoxin Kyselina valproová Karbamazepin
Reprodukční endokrinologie	Estradiol Estriol HCG (Lidský choriový gonadotropin) Progesteron Prolaktin Testosteron
Tyreoidální diagnostika	T3 (trijodtyronin) T4 (tetrajodtyronin)

Stanovení kardiovaskulárních markerů: Kardiomarkery jsou enzymy, proteiny, nebo hormony. Jsou používány pro stanovení diagnózy infarktu myokardu a pomáhají určit jeho rozvoj a rozsah. Určité kardiomarkery jsou specifické pro srdce, jiné bývají zvýšené i při poškození kosterních svalů. Standardně jsou používány troponiny jako ukazatelé nekrózy svalu, myoglobin a specifickým ukazatelem popisujícím poškození myokardu je CK-MB mass (kreatinkináza-MB). Kardiomarkery mají různé doby vzestupu a poklesu koncentrace, kterých se používá ke zjištění doby, kdy došlo k infarktu myokardu, případného pokračování a progresu. Pro časnou diagnostiku je doporučována takzvaná multimarkerová strategie. V poslední době jsou objevovány

stále nové markery, které by se mohly využívat v kardiologické diagnostice. Současně s markery dochází k rozvoji laboratorních technologií pro jejich diagnostiku.

Pro diagnostiku kardiálních markerů existuje v dnešní době řada testů. Nově vznikající metoda založená na proteinových biočipech umožňuje stanovení několika analytů z jednoho vzorku. Měření kardiálních markerů touto metodou je založeno na principu sendvičové imunoanalýzy, na přesně definovaných pozicích jsou umístěny biočipy s navázanou protilátkou proti jednotlivým markerům. Pro detekci protilátek je využívána chemiluminiscence peroxidu vodíku s luminolem katalyzována křenovou peroxidázou. Luminiscence je z jednotlivých biočipů snímána kamerou a množství světla je pak přepočítáno na koncentraci markerů ve vzorku. Jako vzorek je doporučováno sérum a koncentrace se uvádí v pikogramech na litr. Stanovení kardiálních markerů metodou proteinových biočipů umožňuje komplexnější pohled na diagnostiku poškození myokardu [23].

Stanovení Feritinu: Feritin je protein a slouží jako zásobní forma železa v organismu. Stanovení se používá k vyšetření metabolismu železa, sledování léčby a k diagnostice anémií. Slouží k rozlišení sideropenických anémií od sideroblastických. Feritin je vhodný pro monitorování renálních anémií, kdy probíhá léčba erythropoetinem a je sledováno využití železa a poruchy jeho distribuce. Feritin rovněž slouží jako indikátor hladiny železa v organismu.

Pro stanovení se využívá různých metod, mezi nimi rovněž fluorescenční a luminiscenční imunoanalýzy. Stanovení je založeno většinou na imunologické aglutinaci usnadněné reakcí s latexovými částicemi. Latexové částice obsahují navázanou protilátku proti antigenu ve vzorku a vzniklý imunokomplex se detekuje na luminometru.

Tyreoidální diagnostika: Stanovují se většinou autoprotilátky, které bývají nejčastěji se vyskytujícími v lidské populaci. Zejména protilátky proti lidskému tyreoglobulinu, které vznikají autoimunitní destrukcí štítné žlázy a jsou důležité pro diagnostiku autoimunitních tyreopatií a řadu dalších onemocnění štítné žlázy.

Vyšetření se provádí ze srážlivé krve, nebo séra ve skleněných zkumavkách. Vzorek musí být dopraven včas a hodnocení se provádí z výsledků koncentrace přítomných protilátek v 1 ml vzorku. Vyšetření je zaměřené na protilátky typu Ig G a provádí se i současně s vyšetřením tyreoidální peroxidázy [24].

Existuje mnoho testů na bázi imunochemických reakcí, které umožňují velmi rychlou diagnostiku například v terénu, nebo u lůžka pacienta. Testy jsou založeny na bázi takzvané suché chemie. Reagencie jsou zakotveny v porézním materiálu, který je připevněn k plastové podložce, na níž se nanáší vzorek a odečítá výsledek. Testy využívají různého uspořádání a průběhů chemické reakce.

Stanovení reaktivních molekul kyslíku: Díky své vysoké senzitivitě je chemiluminiscence zesílena luminofory často využívána pro detekci reaktivních kyslíkatých metabolitů. Chemiluminiscence se využívá rovněž k měření aktivity fagocytů a je nejvýhodnější metodou pro kvantitativní sledování oxidačního vzplanutí fagocytů. Fagocyty reagují na zánět tvorbou vysoce reaktivních kyslíkových metabolitů. Dochází k tvorbě superoxidu a následně peroxidu vodíku. Peroxid vodíku slouží jako substrát pro myeloperoxidázovou reakci, při které dochází k elektronově excitačním stavům, které emitují fotony a to se projeví chemiluminiscencí fagocytů. Chemiluminiscence se vyvolá přidáním stimulu, který aktivuje fagocyty. Používá se většinou phorbol-myristát-acetát označovaný jako PMA. Dochází k aktivaci NADPH oxidázy. Pro zesílení chemiluminiscence se přidá luminol. Vyšetřuje se spontánní aktivita chemiluminiscence a chemiluminiscence zesílena stimulem. Intenzita chemiluminiscence se vyhodnocuje na chemiluminiscenčním přístroji, kde se měří takzvaný vrchol chemiluminiscence a čas potřebný k jeho dosažení. Touto metodou lze zachytit poruchy v NADPH oxidázovém a myeloperoxidázovém systému a diagnostikovat chronickou granulomatózu. Lze sledovat rovněž ovlivnění metabolismu fagocytů léky, chemikáliemi, antioxidanty, nebo probíhající léčebnou procedurou [25].

Stanovení buněčného NO: Oxid dusnatý v lidském organismu vzniká v endoteliálních buňkách a snadno difunduje do hladkého svalstva, kde aktivuje enzym guanylylcyklázu a ten přes řadu působků snižuje hladinu nitrobuněčného vápníku, snižuje se

kontrakce a dochází k vazodilataci cév a ovlivnění krevního tlaku. NO ovlivňuje také trombocyty, u kterých ovlivňuje jejich adhezivní a agregační mechanismy [26].

Chemiluminiscenční stanovení NO přímou metodou je založeno na reakci oxidu dusnatého s ozónem, při kterém vzniká oxid dusičitý v excitovaném stavu. Při návratu excitovaných molekul do základního stavu je přebytečná energie vyzářena ve formě světla (viz obr 2). Intenzita chemiluminiscence je přímo úměrná koncentraci oxidu dusnatého. Chemiluminiscenční metoda patří k nejcitlivějším metodám stanovení oxidu dusnatého, rychlost reakce umožňuje stanovení v plynné i kapalně fázi. Metoda je využitelná pro měření oxidu dusnatého ve vydechovaném vzduchu [27].

8. Shrnutí

Tato práce zahrnuje přehled nepoužívanějších luminiscenčních značek, jejich možnosti použití ke značení látek různého složení a využití v imunochemických metodách k vizualizaci vzniklého produktu. Pozornost byla zaměřena zejména na využití metod v klinické praxi a jejich uplatnění v mnoha oborech. Informace použité v této bakalářské práci byly čerpány z literatury za období 1999-2010.

Jsou zde zahrnuty základní informace o luminiscenci, jaké látky jsou schopny emitovat záření, jak k ní dochází a čeho se využívá ke stanovení obsahu látek. Dále jsou uvedeny nejznámější druhy luminiscence, objasnění jejich vzniku na základě budící energie. Široké uplatnění luminiscence v různých oborech svědčí o jednoduchosti testů založených na luminiscenčním záření a také o vysoké citlivosti.

V další kapitole je popsána reakce mezi antigenem a protilátkou, jak k ní dochází a co je potřeba pro její vznik. Jsou zde popsány antigeny, jaké molekuly mohou vystupovat jako antigeny, důležité součásti molekuly a místa kde dochází k vazbě s protilátkou. Protilátky jsou popsány jako látky, které specificky vznikají jako reakce na výskyt určitých antigenů. V kapitole je popsána molekula protilátky, její oblasti a podle čeho se imunoglobuliny dělí do 5 tříd. Dále jsou popsány mezimolekulové síly a energie vazby uplatňující se ve vazbě antigenu s protilátkou.

V kapitole imunochemických metod je popsáno využití metod založených na reakci antigenu s protilátkou, použití nosičů, dále co je potřeba dodržet pro úspěšnost metody, principy stanovení a hodnocení vzniklého imunokomplexu. Část kapitoly je věnována druhům protilátek využívaných v imunochemických metodách.

V úvodu kapitoly luminiscenčních metod jsou popsány kompetitivní a nekompetitivní metody, rozdíly v jejich průběhu a hodnocení vzniklého produktu a dále rozdělení podle toho zda dochází, nebo nedochází k separaci značeného a neznačeného imunokomplexu. Další část kapitoly popisuje rozdělení luminiscenčních značek, princip jejich navázání na stanovovanou látku a hodnocení vyzářeného světla. Jsou zde popsány také jejich výhody v případě použití a jejich chemické vlastnosti.

Následuje rozdělení podle toho, zda vykazují fluorescenci, nebo jsou využívány chemiluminiscenční reakce. Dále dochází k charakteristice fluorescenčních značek, jejich rozdělení podle typu vazby k stanovované látce a následuje výčet používaných značek a sond, jejich výhody a využití ke značení určitých látek. Zmínka je taky o fluorescenčních indikátorech. Jsou zde také popsány nejpoužívanější imunochemické metody založené na fluorescenci a na fluorescenčním značení, jejich principy, výhody a oblasti použití. Popsány jsou rovněž luminiscenční značky, k jejich aktivaci dochází chemickou reakcí, včetně podrobného popisu luminolu. V poslední části kapitoly jsou popsány luminiscenční imunochemické metody, jejich výhody a automatizace v podobě chemiluminiscenčních analyzátorů v klinické praxi.

Poslední kapitola bakalářské práce obsahuje vybraná stanovení pomocí luminiscenčních metod, jsou zde vyzdvihovány rozdíly oproti jiným podobným metodám. V kapitole je jen malý výčet používaných stanovení. Metody jsou využívány v mnoha oborech.

9. Závěr

Bakalářská práce informuje o možnostech luminiscenčního značení v imunochemických metodách, možnostech použití ke stanovení nativního materiálu a podat všeobecný pohled na tuto analytickou skupinu metod.

Uplatnění luminiscenčního značení v laboratorních metodách se dnes neustále rozšiřuje, je využíváno v mnoha oborech k různým stanovením. Jsou využívány v biochemii, imunologii, mikrobiologii, hematologii, toxikologii, kriminalistice, histologii, životním prostředí, nebo v klinickém výzkumu k stanovení různých látek, antigenů, protilátek, alergenů, hormonů, léčiv, bakterií, toxinů a drog. Existuje řada testů umožňující rychlou diagnostiku různých látek až po automatické analyzátory založené na metodách FPIA, MEIA, nebo chemiluminiscenci využívané v klinických oborech a výzkumu k stanovení několika set vzorků denně. Úloha luminiscenčních metod v praxi je dnes nezastupitelná.

10. Seznam použité literatury

1. Caravan P., a kol. Gadolinium[III] Chelates as MRI Contrast Agens: Structure, Dynamics and Applications. Chemical Reviews 99 [1999] 2293-2352.
2. Pekárková P. Komplexy europia[III] luminiscenční vlastnosti a využití v analytické chemii, Diplomová práce., Brno , 2007.
3. Fišar Z. Fluorescenční spektroskopie v neurovědách.
<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfišar/fluorescence/Default.htm>. [únor 2010]
4. Kricka L.J. Clinical applications of chemiluminescence. Anal. Chim. Acta. 500 [1-2][2003] 279- 286.
5. http://www.shsu.edu/~chm_tgc/chemilumdir/chemiluminescence2.html. [únor 2010]
6. Chemiluminescence. <http://www.chemistryexplained.com/Ce-Co/Chemiluminescence.html>. [únor 2010]
7. Chemistry of Bioluminescence. <http://www.lifesci.ucsb.edu/~biolum/chem/>. [únor 2010]
8. Bioluminiscence. <http://www.quido.cz/100/biolum.htm>. [únor 2010]
9. Riegelová K. Metody imobilizace proteinů na povrch mikrotitračních destiček, Diplomová práce., Brno, 2009.
10. http://showcase.unis.org/UNIScienceNet/Bact_virus_antigen_700.jpg. [březen 2010]
11. Imunochemické metody. [che1.lf1.cuni.cz/html/imuno.pdf](http://www1.lf1.cuni.cz/html/imuno.pdf). [březem 2010]
12. Maier V., Ševčík J. Imunoanalýza nízkomolekulárních látek,
<http://analytika.upol.cz/elektromigrace/docs/imunoanalyza/INL.pdf>. [březen 2010]
13. Šrámek J. Imunochemické metody,
<http://www.stefajir.cz/files/ImunohistoMetody.pdf>. [březen 2010]

14. Interakce antigenu s protilátkou.
rum.bf.jcu.cz/public/kopecky/04/04_Interakce.doc . [březen 2010]
15. Krylov V. Klonovní pomocníci. *Vesmír*. 79, [2000] 446- 448.
16. Zima T., Štulík K., Juláková E. *Klinická a Toxikologická analýza. Česká společnost chemická, Praha, 2008.*
17. Zajoncová L. FIA a CIA.
http://biochemie.upol.cz/doc/skripta/imch/11_FIA_CIA.pdf. [březen 2010]
18. Imunochemické metody.
http://biochemie.upol.cz/doc/skripta/kbc/Imunochemicke_metody.pdf. [březen 2010]
19. Gubitza G., Schmid G. *Luminiscence Imunoassays*. Elsevier, Graz, 2005.
20. Šimša D., Skopal J. Chemická luminiscence luminolu a jeho syntéza ze snadno dostupných chemikálií, *Chem. Listy* 102 [2008] 1017-1019.
21. Šimůnek O. Chemiluminiscence,
http://chemiluminiscence.xf.cz/chemiluminiscence_II_final.pdf. [duben 2010]
22. Siemens Healthcare Diagnostics. s.r.o. IMMULITE soupravy, IMMULITE 2000.
lm.biovendor.cz/download.php?file=52pict_small.pdf. [duben 2010]
23. Ulrychová M., Tichý M., Horáček J.M., Pudil R., Horáková L. Stanovení kardiálních markerů technologií proteinových biočipů- multimarkerová strategie.
<http://www.stapro.cz/bullfons/22009/lab01.pdf>. [duben 2010]
24. Bakešová L. *Laboratorní příručka*.
<http://www.fnhk.cz/cze/index.php?dir=111>. [duben 2010]
25. Bartůňková J., Paulík M. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Grada avicenum, Praha, 2005.
26. Pecka M. *Laboratorní hematologie v přehledu, fyziologie a patologie hemostázy*. FINIDR, s.r.o, Český Těšín, 2004.

27. Kupková Z., Beneš L. Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého. Chem. Listy. 98 [2004] 116-122.