



Berthold Technologies

GmbH & Co. KG
Calmbacher Straße 22
75323 Bad Wildbad,
Germany

www.Berthold.com





История

1949 Prof. Dr. Rudolf Berthold

1960 Dr. Fritz Berthold

1989 EG&G Inc. USA
(сейчас PerkinElmer)

2000 Family Dr. Fritz Berthold
and Hans J. Oberhofer





Направления деятельности

Управление процессами



Биоаналитика



Защита от радиации





Методы исследования

- ▶ Люминесценция
- ▶ Флуоресценция
- ▶ Поглощение света
- ▶ BRET
- ▶ FRET
- ▶ Alpha Screen
- ▶ Поляризационная флуоресценция
- ▶ Флуоресценция с разрешением по времени



Люминесценция



- ▶ Люминесценция – излучение света в диапазоне видимых длин волн (400-700 нм) атомами или молекулами вещества при переходе из возбужденного состояния в основное.
- ▶ Для хемилюминесценции источником энергии выступают химические реакции, часто окисление.
- ▶ Для биолюминесценции химические реакции, протекающие в живых организмах, катализируются ферментами (например, люцифераза светлячка).



Примеры биолюминесценции

Amphitretus pelagicus

Stenophore Deiopea

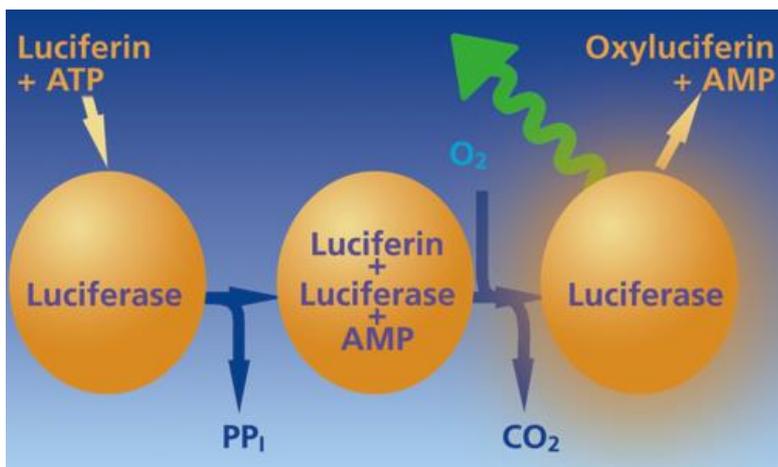


Photinus pyralis



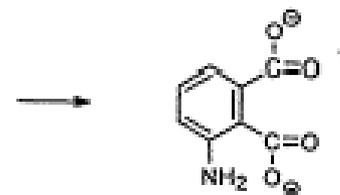
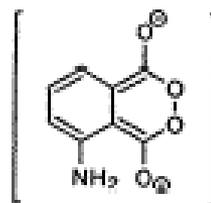
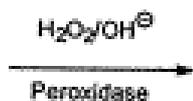
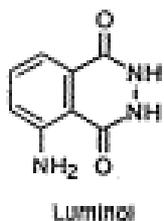


Люминесцентные реакции



Люциферин + АТФ
+ люцифераза

Люминол +
пероксидаза



0.03

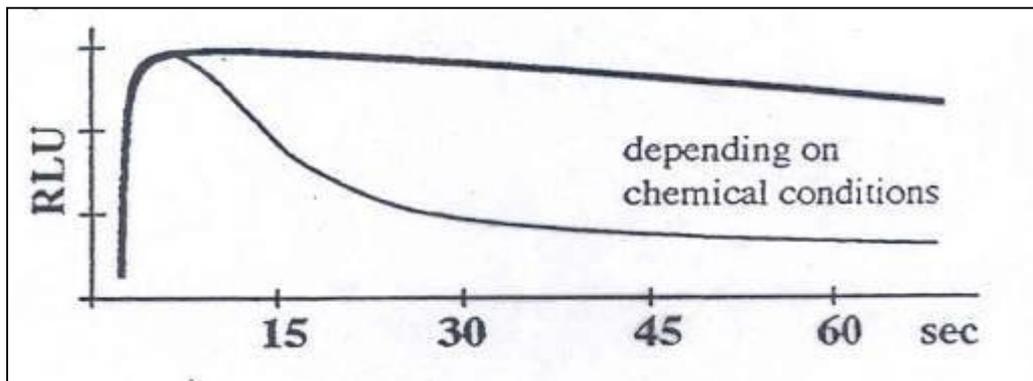


Кинетика Glow-типа

Люминесценция (Firefly)

Примеры:

- Определение АТФ
- Анализ репортерного гена



3 / 60 сек

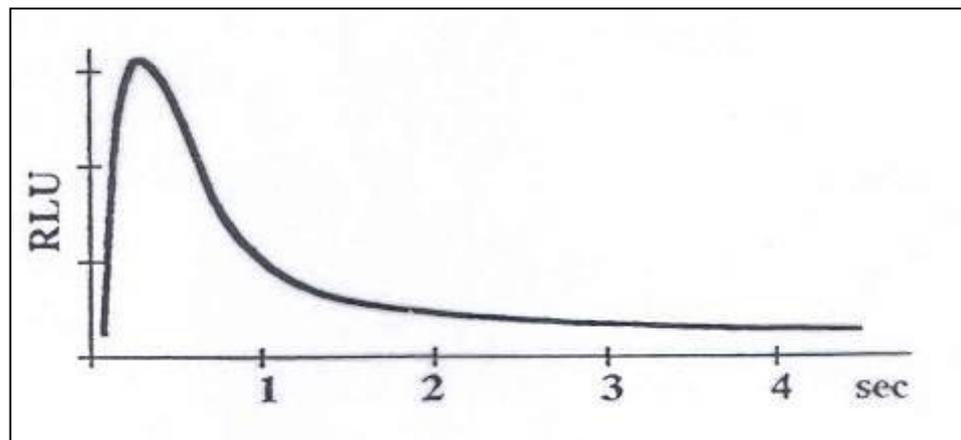


Кинетика Flash-типа

Люминесценция (Acridinium Ester)

Примеры:

- Анализ с помощью ДНК-зондов Gen-probe™
- Люминесцентные тест-наборы



0,4 / 1 сек

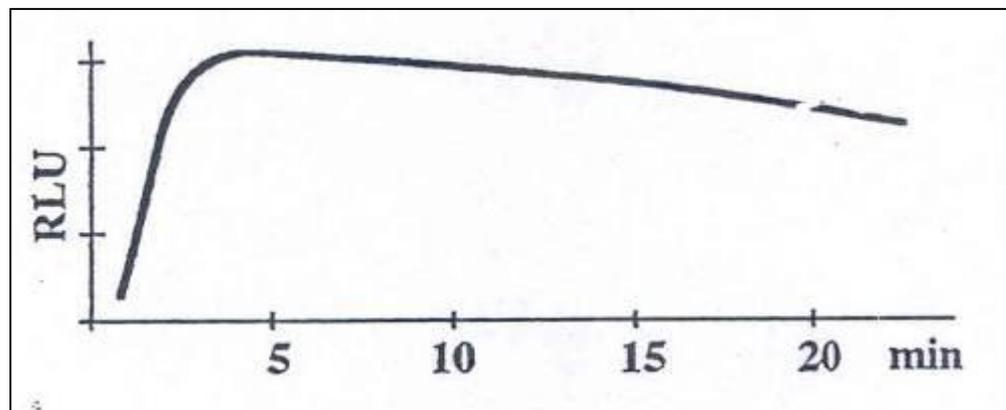


Кинетика Glow-типа

Активированная
люминесценция
люминола

Пример:

Иммунолюминесцент
ный анализ от
Equipar, Monobind и
т.д.



2 / 20 мин

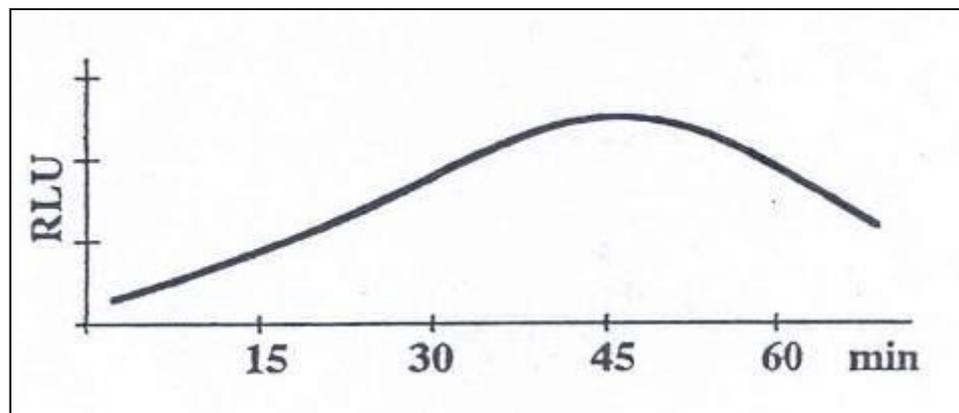


Кинетика Glow-типа

Клеточная
люминесценция

Пример:

Индукцированные
фагоциты +
люминол

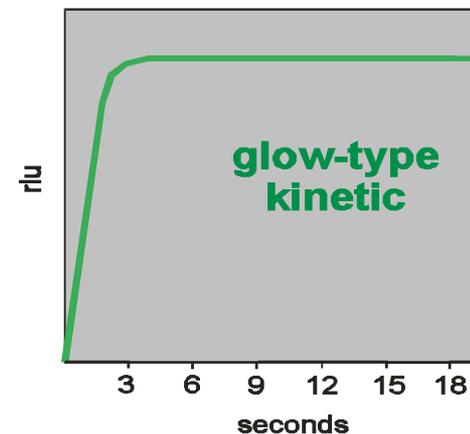
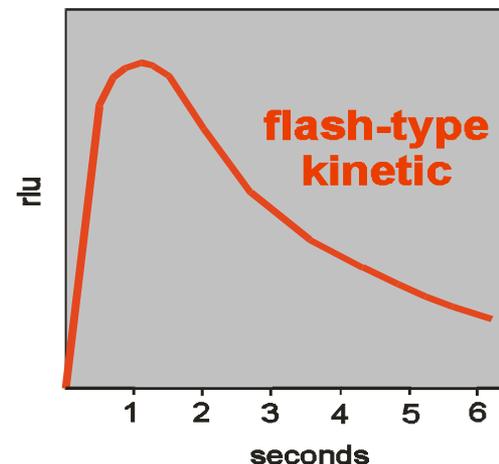


45 / 60 мин



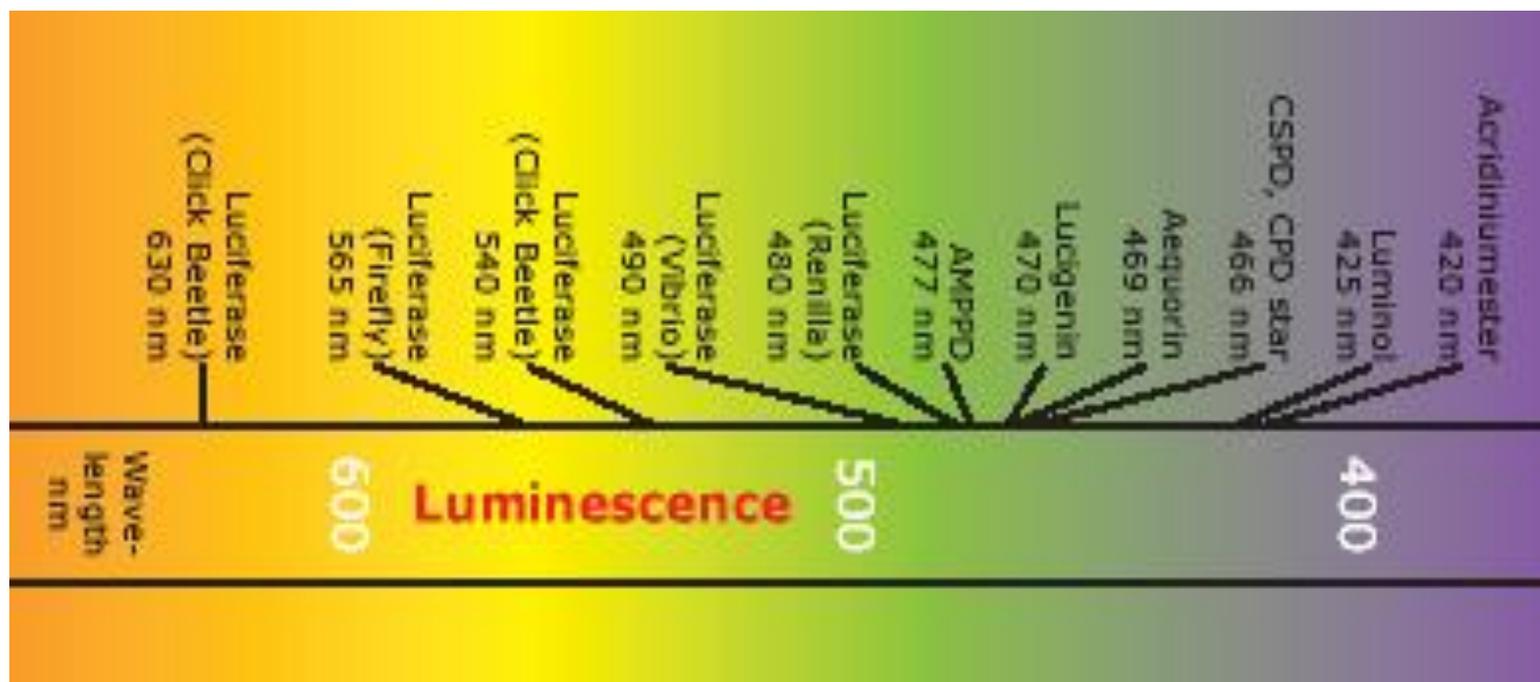
Кинетика и инжекторы

- ▶ Для «быстрых» реакций типа Flash требуется инжектор для ввода реагентов
- ▶ Для реакций типа Glow наличие инжектора не обязательно





Длины волн люминесцентных молекул





Приборы Berthold для люминесценции

Планшетные ридеры

- ▶ Mithras LB 940
- ▶ Mithras² LB 943
- ▶ Centro/Centro XS³ LB 960
- ▶ TriStar² LB 942

Пробирочные люминометры

- ▶ Lumat³ LB 9508
- ▶ Junior LB 9509

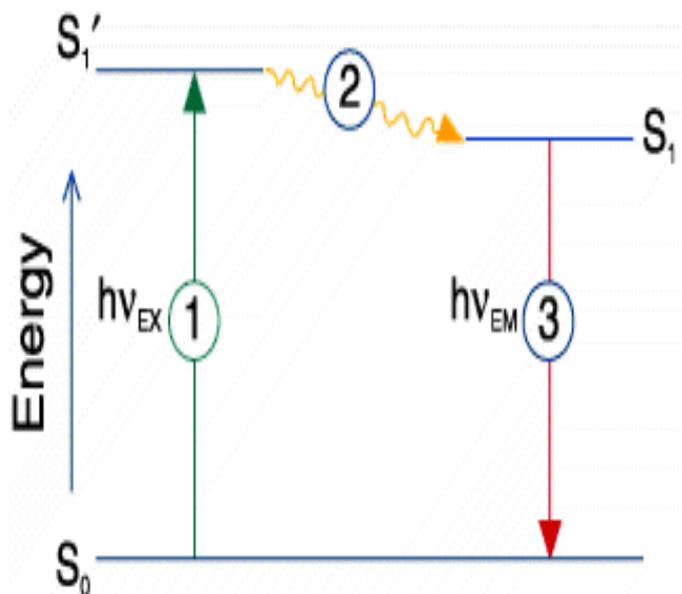
Система визуализации

- ▶ NightOWL II LB 983



Флуоресценция -

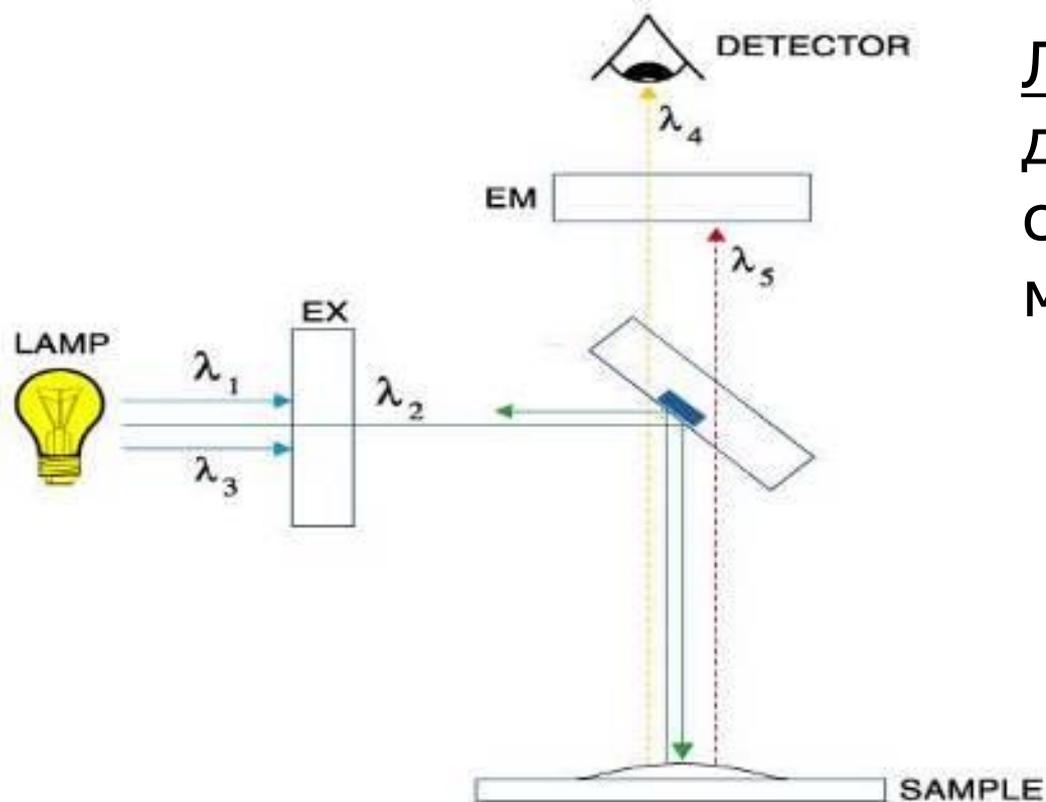
Явление поглощения молекулой света определенной длины волны с последующим испусканием света с большей длиной волны.



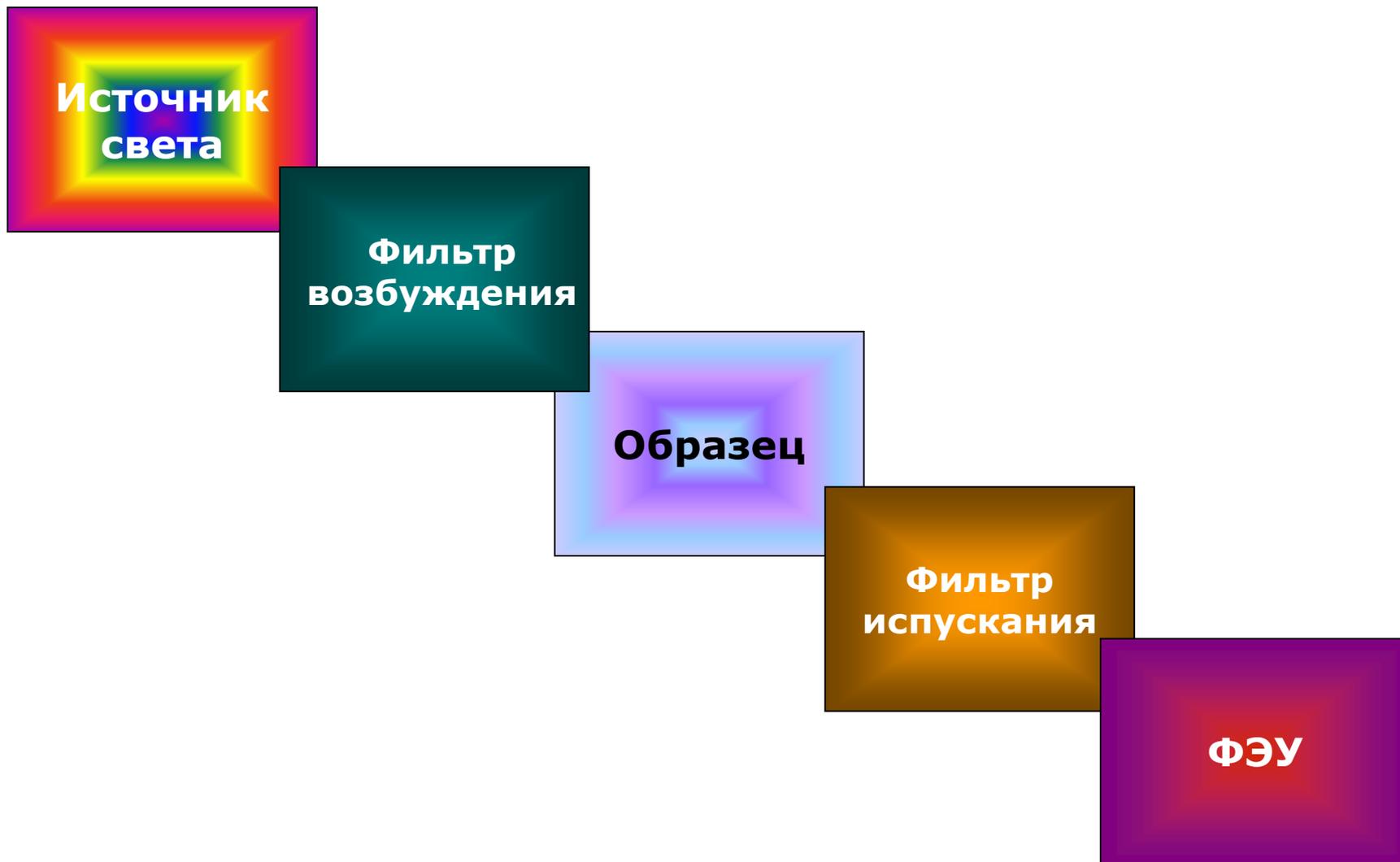
- ✘ Возбуждение 1
- ✘ Возбужденное состояние 2
- ✘ Испускание 3



Измерение флуоресценции

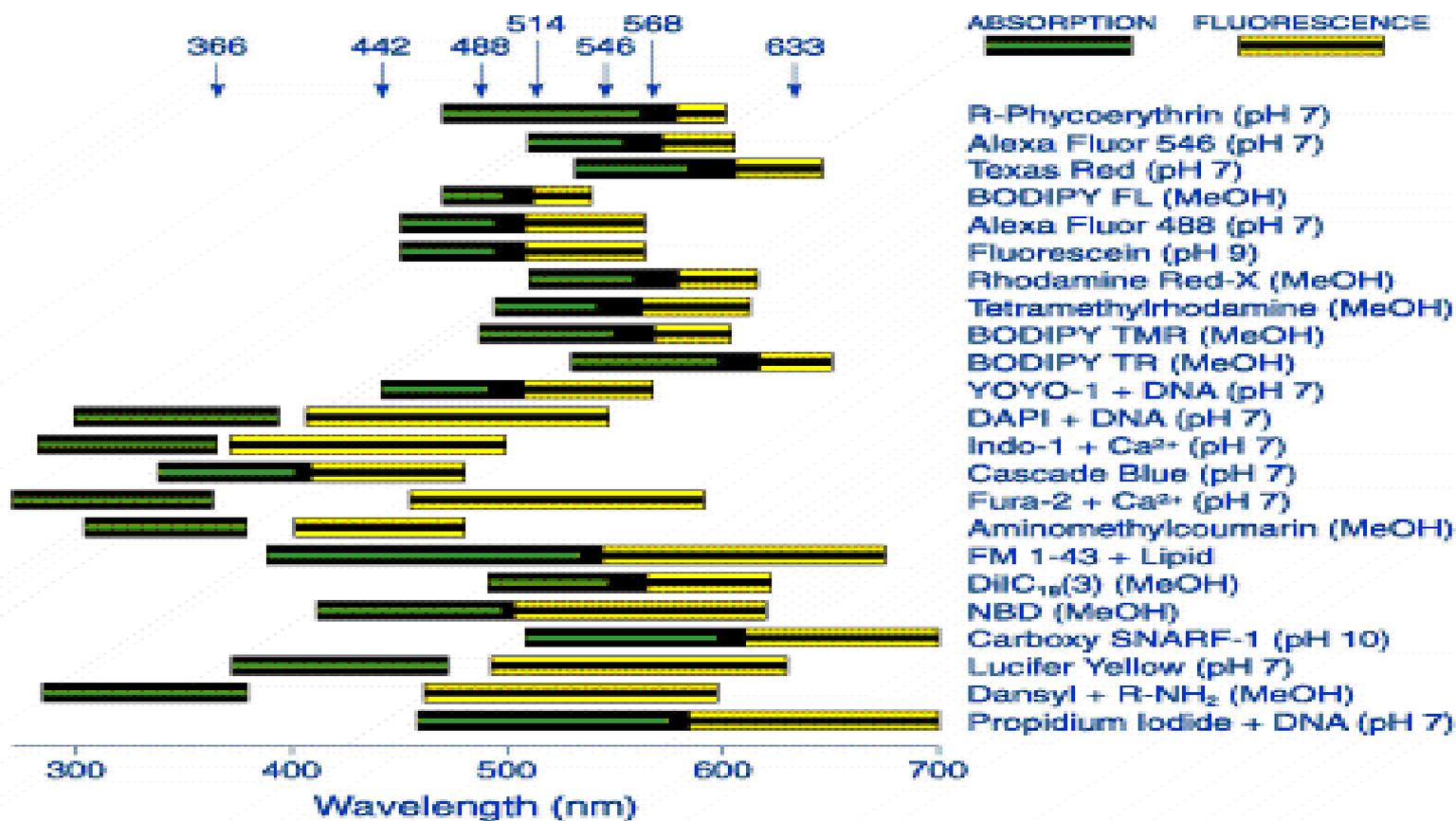


Лампа: спектральный диапазон 340-700 нм, световыход ниже при меньших длинах волн



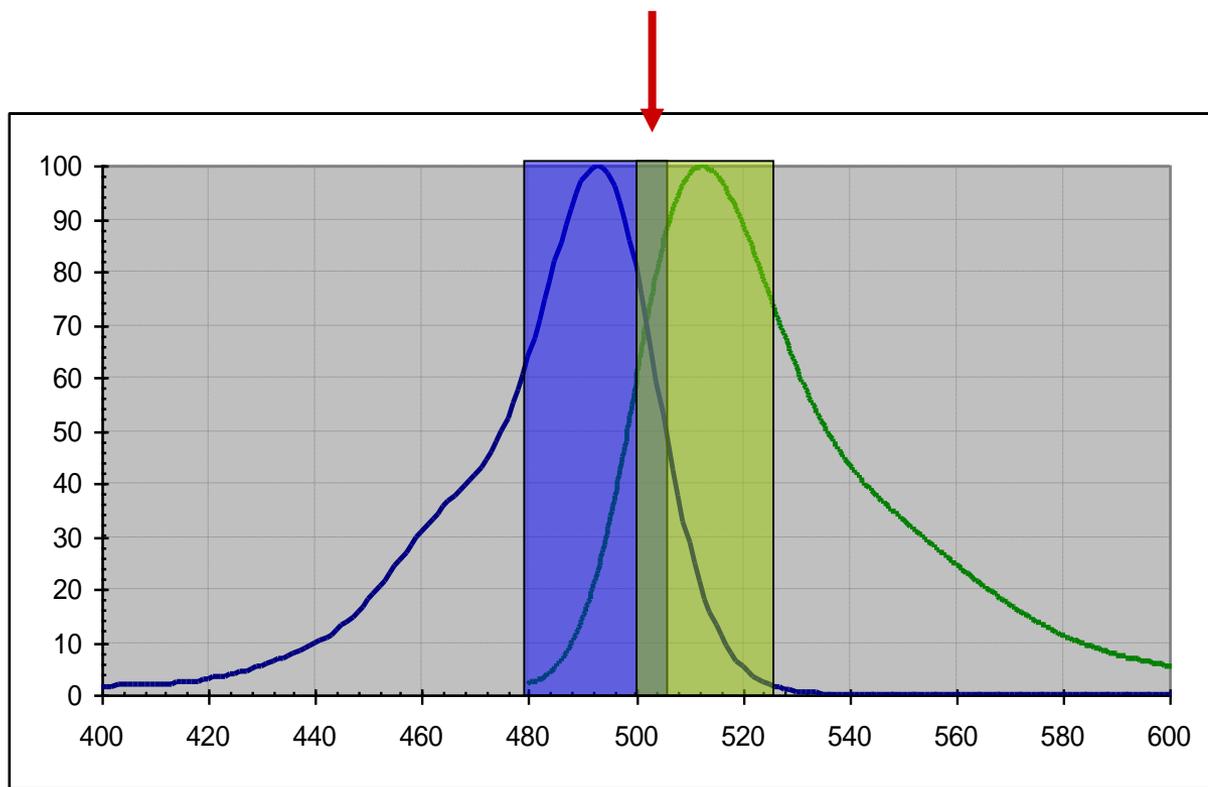


Флуорофоры

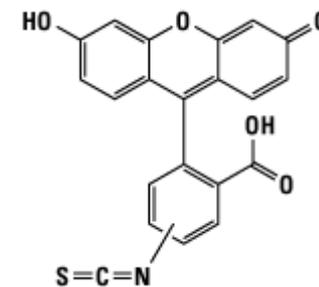




Выбор фильтров

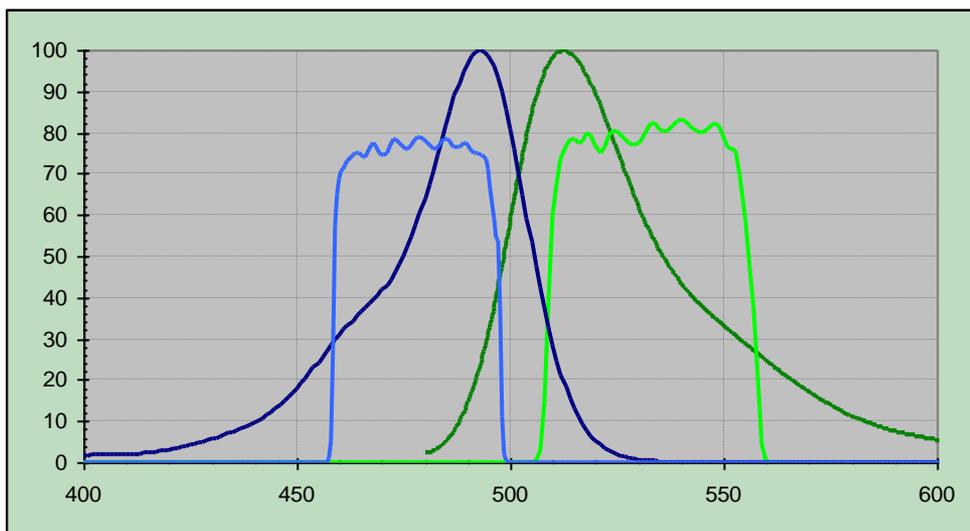


Спектры
поглощения
и испускания
флуоресцин
изотиоциана
та (FITC)





Выбор фильтров



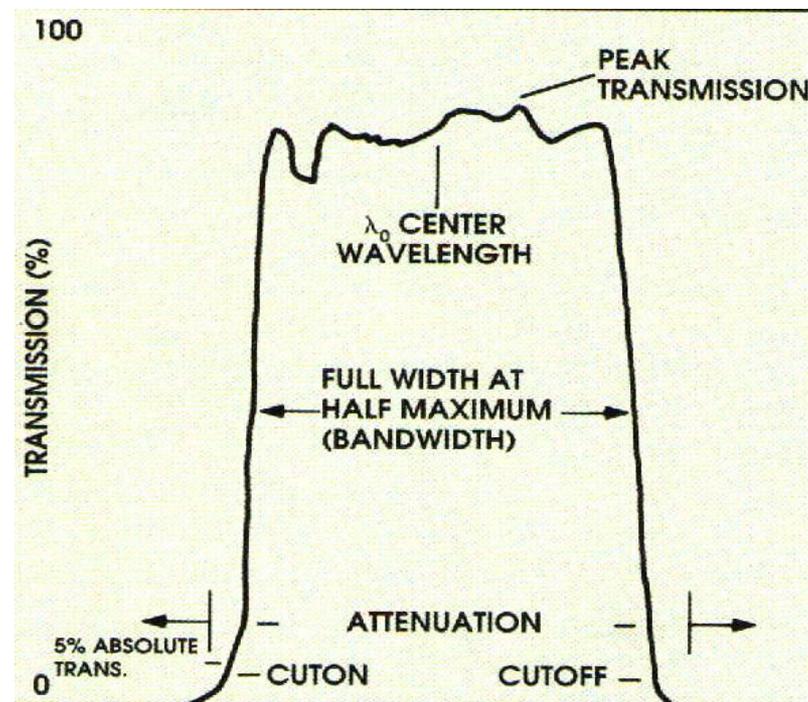
Полосы пропускания фильтров возбуждения и испускания не должны перекрываться!

Ex: 485 nm
Em: 535 nm



Параметры фильтров

- ▶ CWL: 485 нм
- ▶ FWHM: 14 нм
- ▶ T = (transmission): 60 %
- ▶ Diametr: 15 мм





Приборы Berthold для флуоресценции

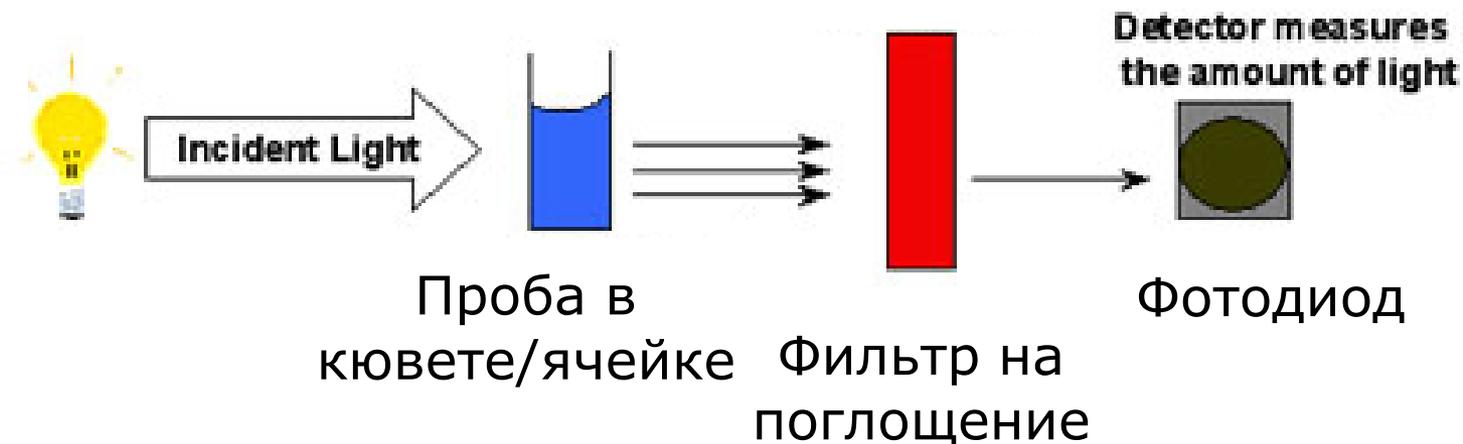
- ▶ Mithras LB 940
 - ▶ Mithras² LB 943
 - ▶ TriStar² LB 942
-
- ▶ NightOWL II LB 983





Поглощение (Absorbance)

- ▶ Измерение количества света, поглощенного раствором;
- ▶ Оптическая плотность – поглощение на единицу длины (толщины кюветы);
- ▶ Закон Бугера-Ламберта-Бера: $I(l) = I_0 e^{-k\lambda l}$





Приборы Berthold для измерения поглощения

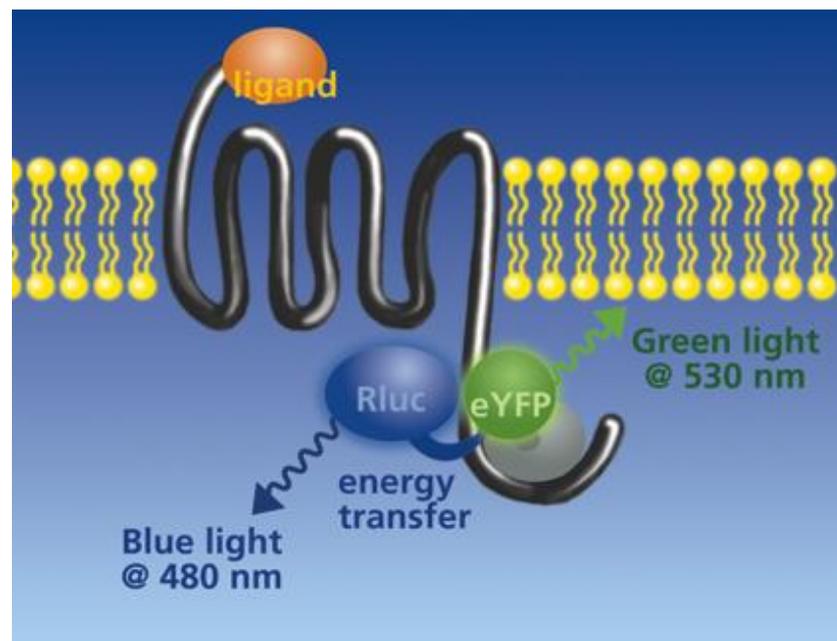
- ▼ Mithras LB 940
- ▼ Mithras² LB 943
- ▼ TriStar² LB 942
- ▼ Apollo 11 LB 913





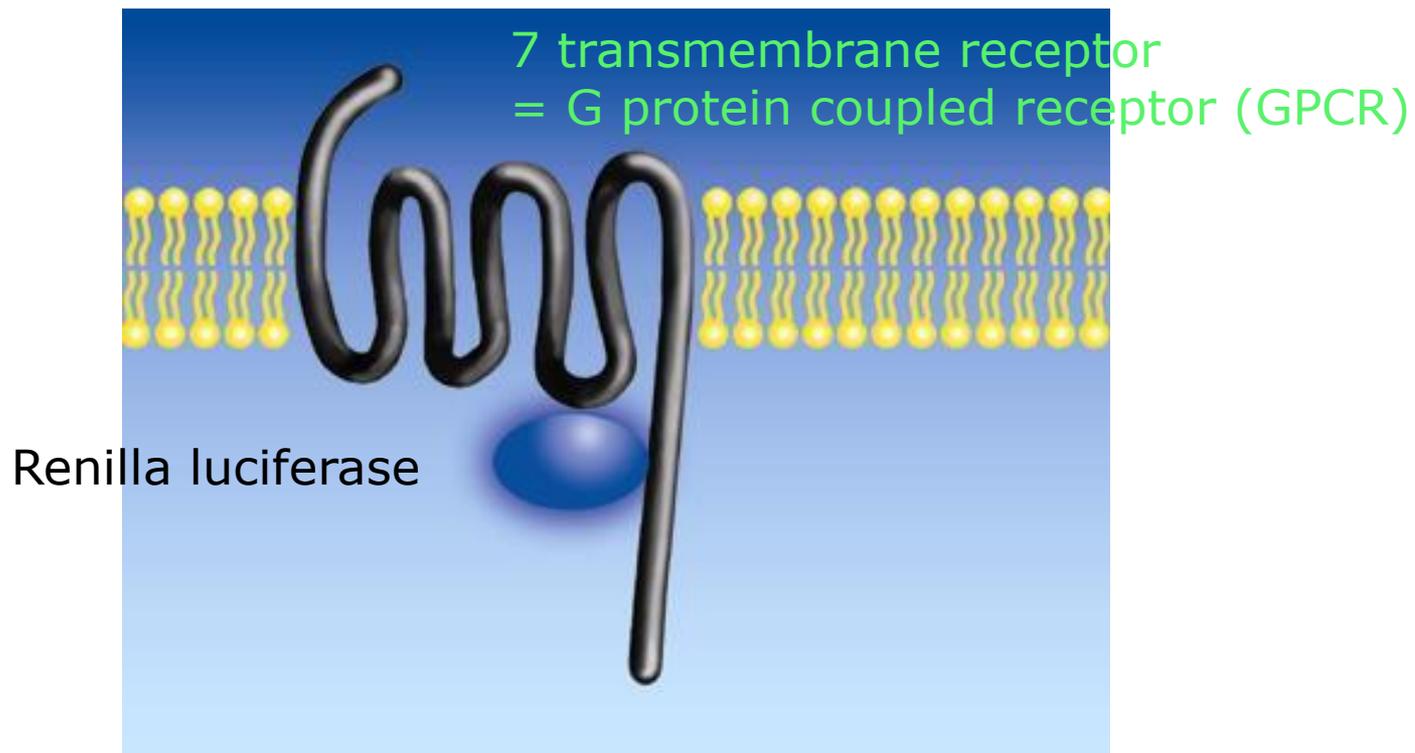
Bioluminescence Energy Transfer (BRET)

- Излучение люциферазы коралла *Renilla reniformis* переносится на флуоресцентный белок
- Считываются длины волн эмиссии флуоресцентного белка
- Происходит в непосредственной близости, благодаря взаимодействию присоединенных биомолекул

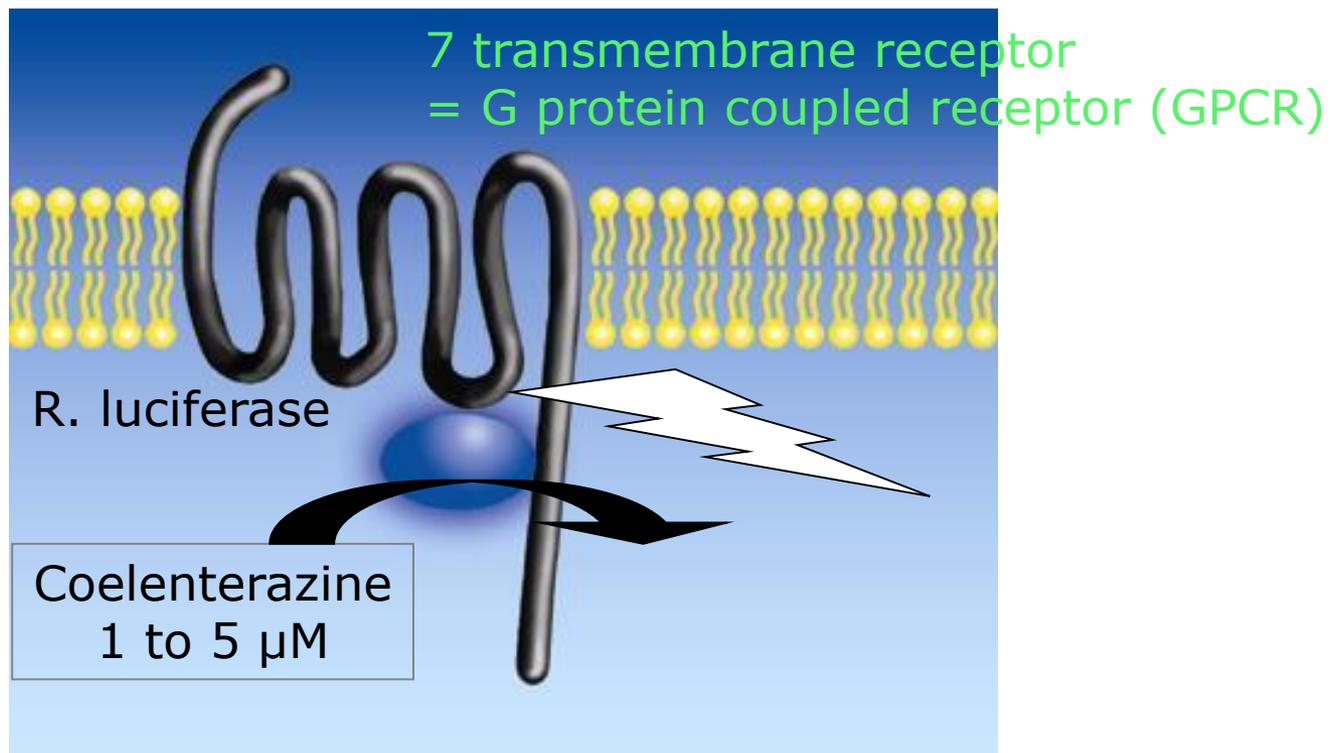




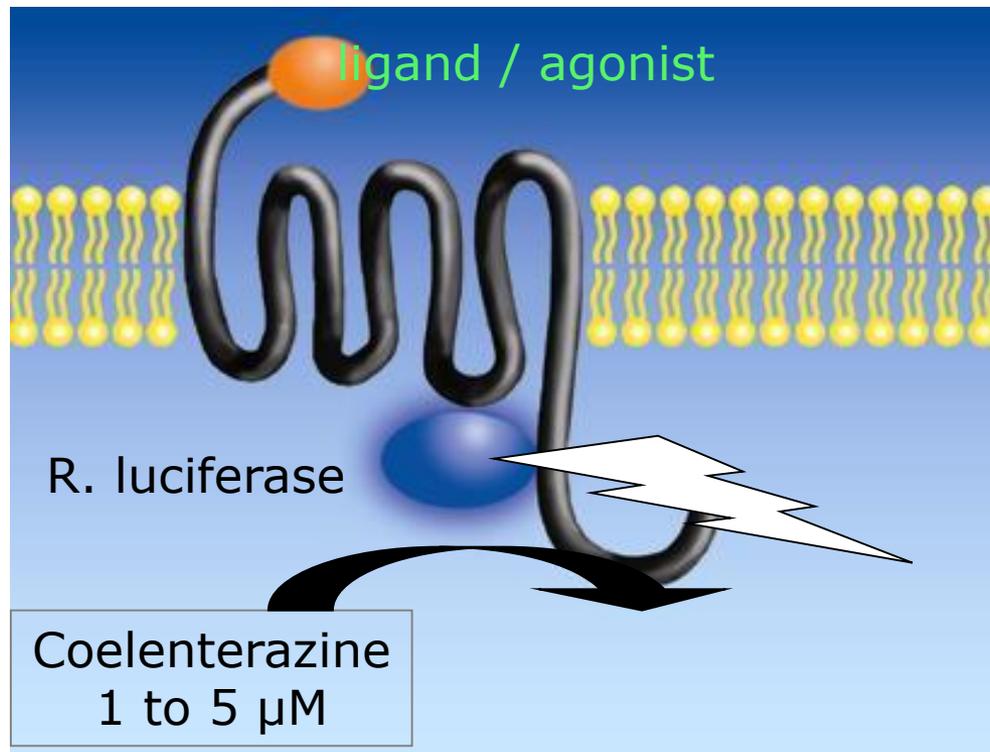
Как работает BRET?



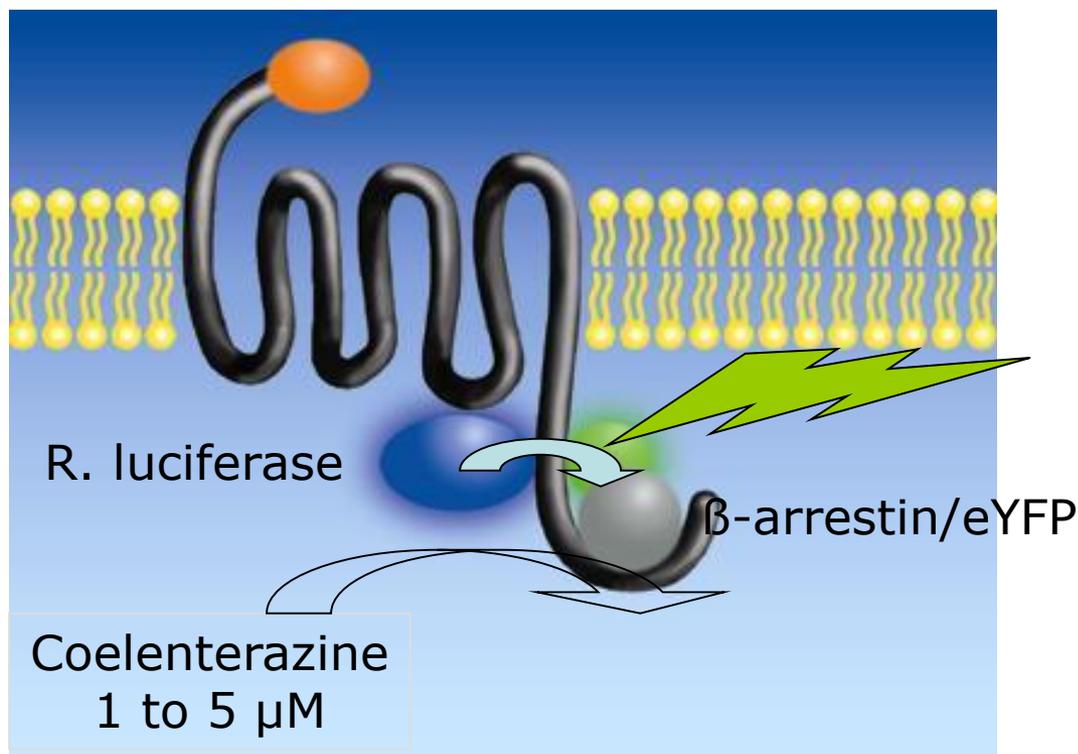
На примере G-белок сопряженного рецептора (GPCR).
Этот тип анализа подходит для целых клеток.



После добавления субстрата coelenterazine, люцифераза коралла *Renilla* излучает синий свет с максимумом на длине волны 480 нм



Присоединение лиганда вызывает активацию рецептора, включающую диссоциацию G-белковых субъединиц и фосфорилирование рецептора

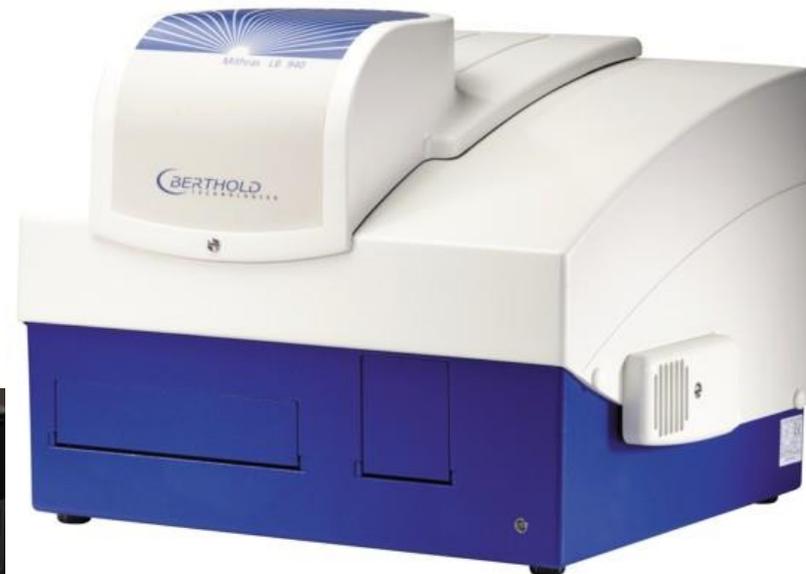


β-аррестин/еYFP химерный белок присоединен к активированному G-белок сопряженному рецептору; в результате этого близость люциферазы Renilla и функциональной группы еYFP достаточна для переноса энергии люциферазной реакции с излучением еYFP света специфичной длины волны



Приборы Berthold для BRET

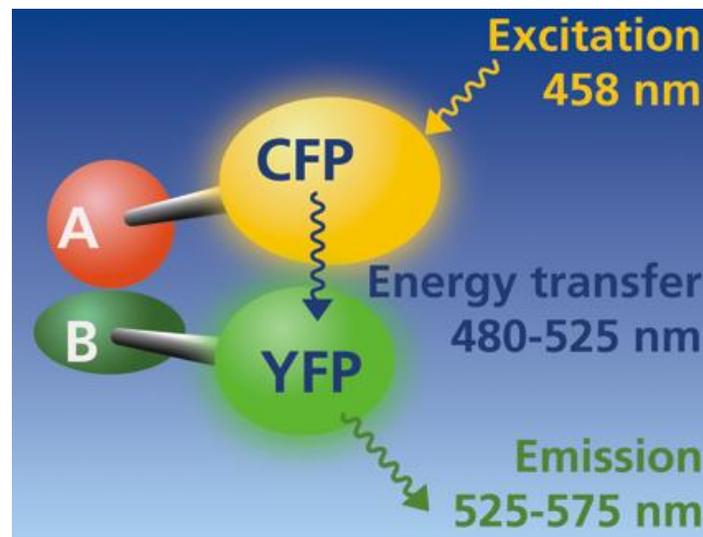
- ▼ Mithras LB 940
- ▼ Mithras² LB 943
- ▼ TriStar² LB 942





Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

Если две флуоресцентные молекулы с соответствующим перекрытием спектра оказываются в достаточной близости, тогда излучение флуоресценции одной молекулы (ДОНОРА) может быть поглощено и переизлучено второй молекулой (АКЦЕПТОРОМ)





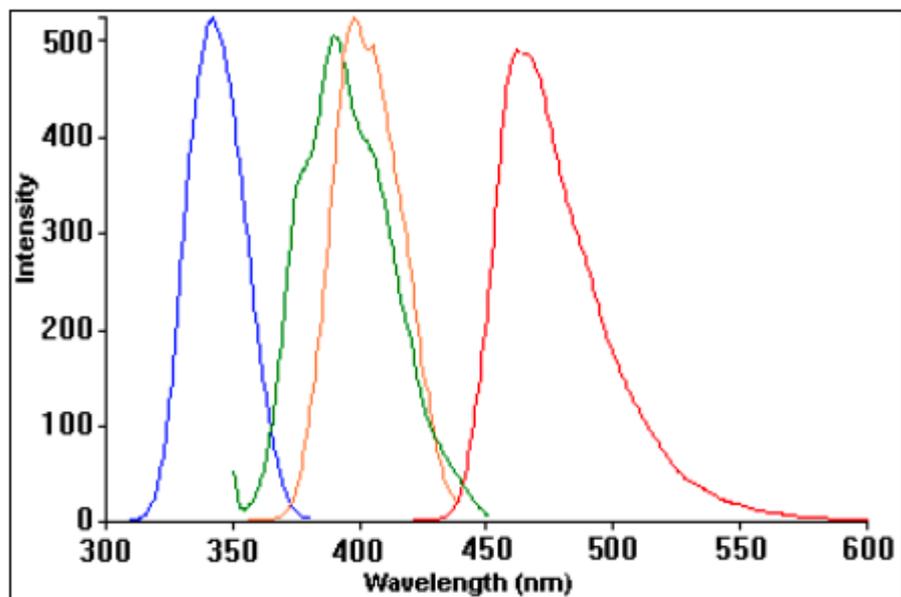
Пример спектра FRET:

ДОНОР (синим): максимум возбуждения около 340 нм

ДОНОР (зеленым): максимум испускания около 390 нм

АКЦЕПТОР (оранжевым): максимум возбуждения около 400 нм

АКЦЕПТОР (красным): максимум испускания около 460 нм



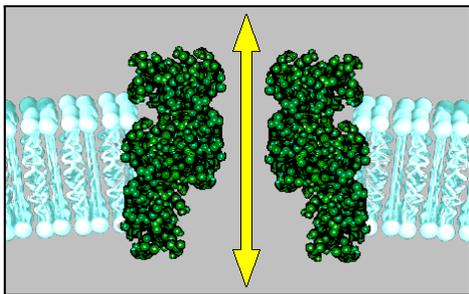


FRET используется в во многих исседованиях, где :

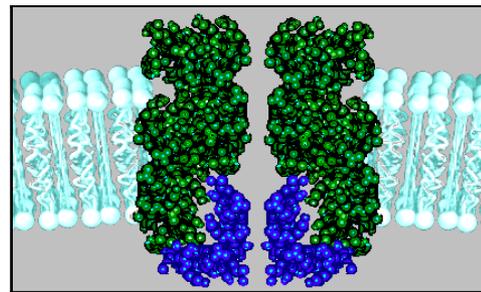
- изменяется структура макромолекул
- представляет интерес присоединение лиганда к макромолекуле

Например, присоединение белка к мембранным каналам вызывает их закрытие:

Membrane channel open

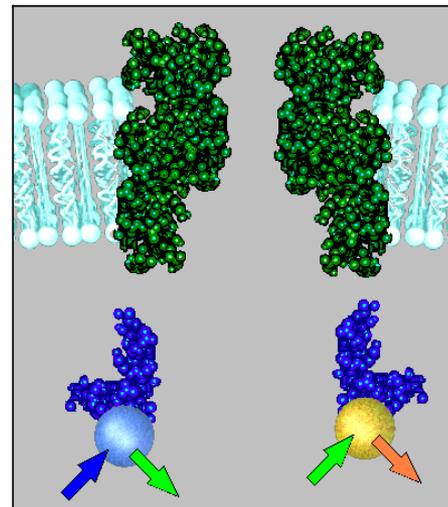


Membrane channel closed

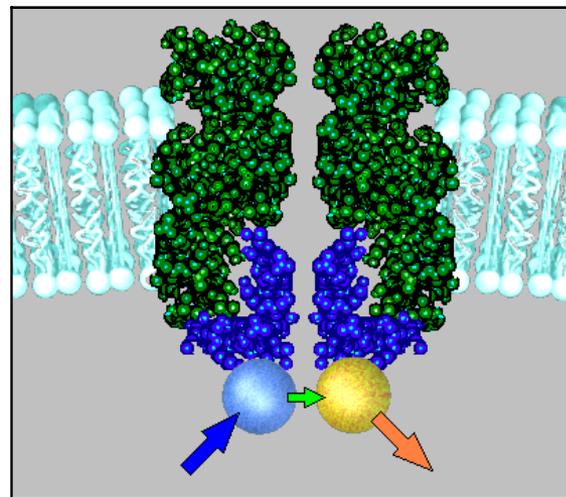




Когда белок свободен, донор (синий) и акцептор (оранжевый) пространственно разделены: не происходит передача энергии, так что спектры обоих не взаимодействуют. Когда образец возбуждают светом на 340 нм, донор поглощает его и флуоресцирует на 400 нм.

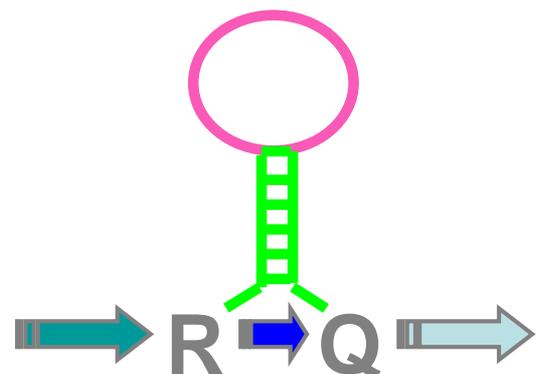
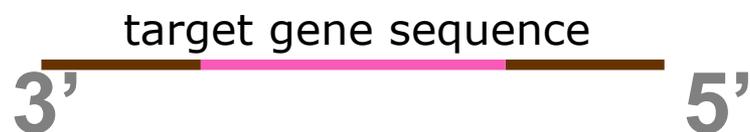


Однако, когда белок связывается с белком мембраны, происходит перенос энергии. Образец возбуждается светом 340 нм, который поглощается только донором. Фотоны, излученные донором, поглощаются акцептором, который в свою очередь флуоресцирует на 470 нм.

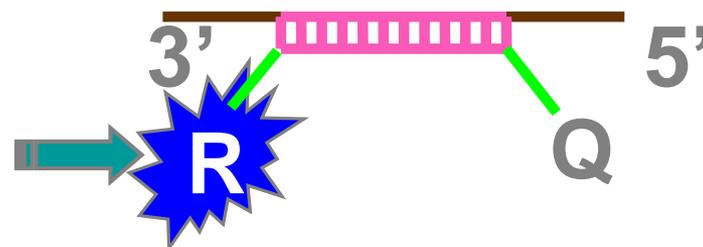




FRET



Зонд не связан
(ген-мишень не присутствует) =>
происходит перенос энергии (тушение R)



Зонд связан
(ген-мишень присутствует)
=> Отсутствует перенос энергии (наблюдается флуоресценция от R)



Типичные пары донор/акцептор

- ▶ Флуоресцеин / родамин
- ▶ Флуоресцеин / эозин
- ▶ Флуоресцеин / пиренбутират
- ▶ Антраниламид / нитротирозин
- ▶ Кумарин / бромид этидия



Приборы Berthold для FRET

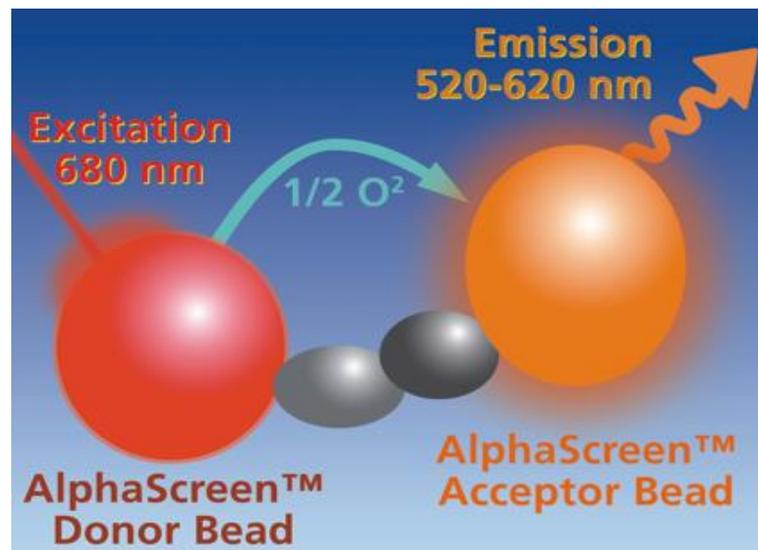
- ▶ Mithras LB 940
- ▶ Mithras² LB 943
- ▶ TriStar² LB 942





AlphaScreen™

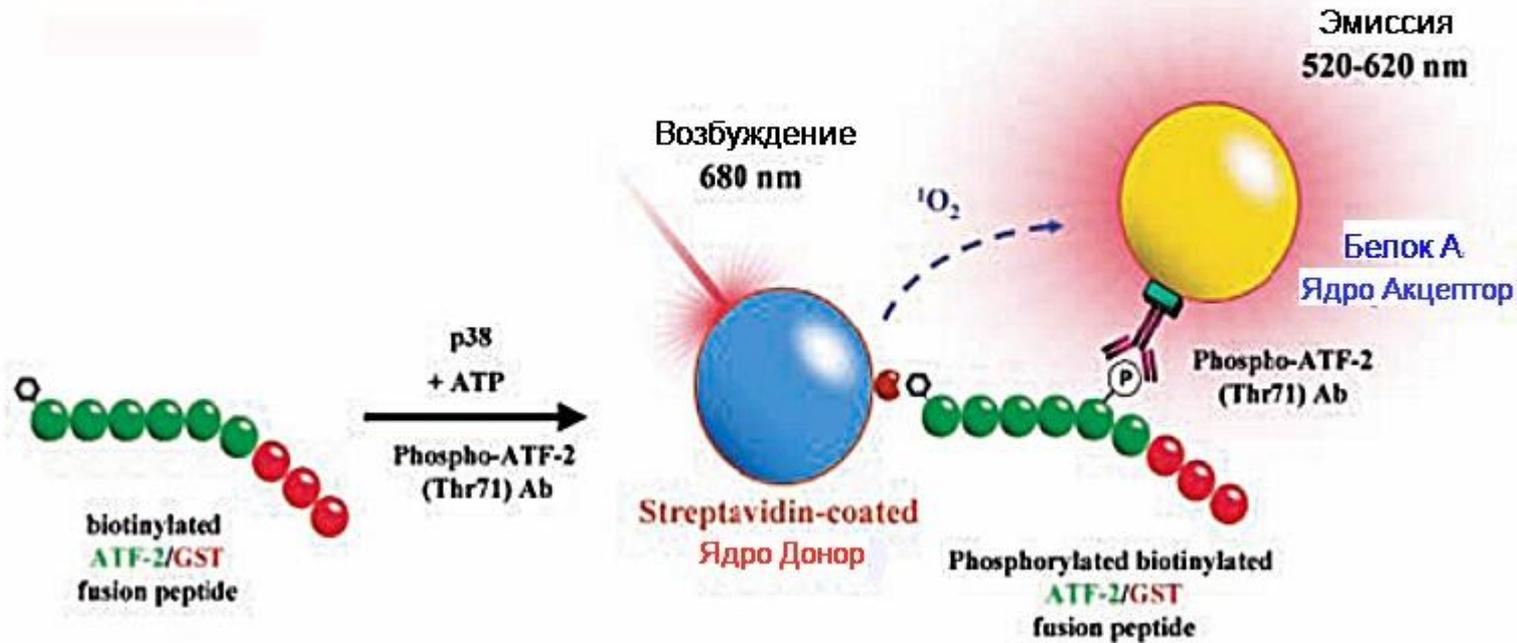
Amplified
Luminescent
Proximity
Homogeneous
Assay



Позволяет проводить скрининг широкого спектра мишеней, обеспечивает простое и надежное определение биомолекулярных структур и активных взаимодействий.



AlphaScreen™





Применение AlphaScreen™

- ▶ 1cAMP
- ▶ IP3
- ▶ Киназы
- ▶ Хеликазы
- ▶ Протеазы
- ▶ Рецептор – лигандное связывание (TNFα)
- ▶ Взаимодействие белок-белок

Наборы и «голые» ядра продаются PerkinElmer

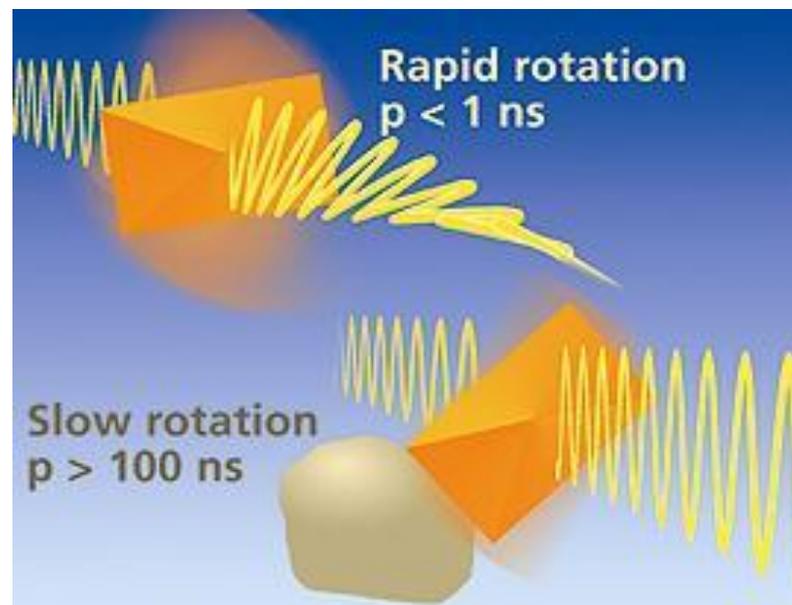
Приборы Berthold:

- ▶ Mithras LB 940
- ▶ Mithras² LB 943



Поляризация флуоресценции

- ▶ Возбужденное состояние имеет свое время жизни
- ▶ В течение этого времени несвязанный флуорофор вращается и поляризация испущенного света отличается от плоскости поляризации возбуждающего света.





Поляризация флуоресценции

- ▶ Для расчета поляризации требуются два измерения эмиссии: в первом используется фильтр испускания, с поляризацией, параллельной к фильтру возбуждения (S-plate), во втором – с перпендикулярной к фильтру возбуждения (P-plane).
- ▶ Необходимые условия:
 - ▶ Метка должна быть небольшой (мол. вес макс. 10,000)
 - ▶ Второй партнер должен быть большим для эффективного торможения
- ▶ Типичные метки:
 - ▶ FITC: ex 485, em 535
 - ▶ BODIPY: ex 530, em 585
 - ▶ TMR (TRITC): ex 530, em 585

Mithras LB 940

Mithras² LB 943



Флуоресценция с разрешением по времени

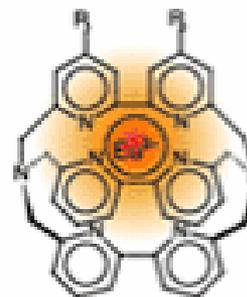
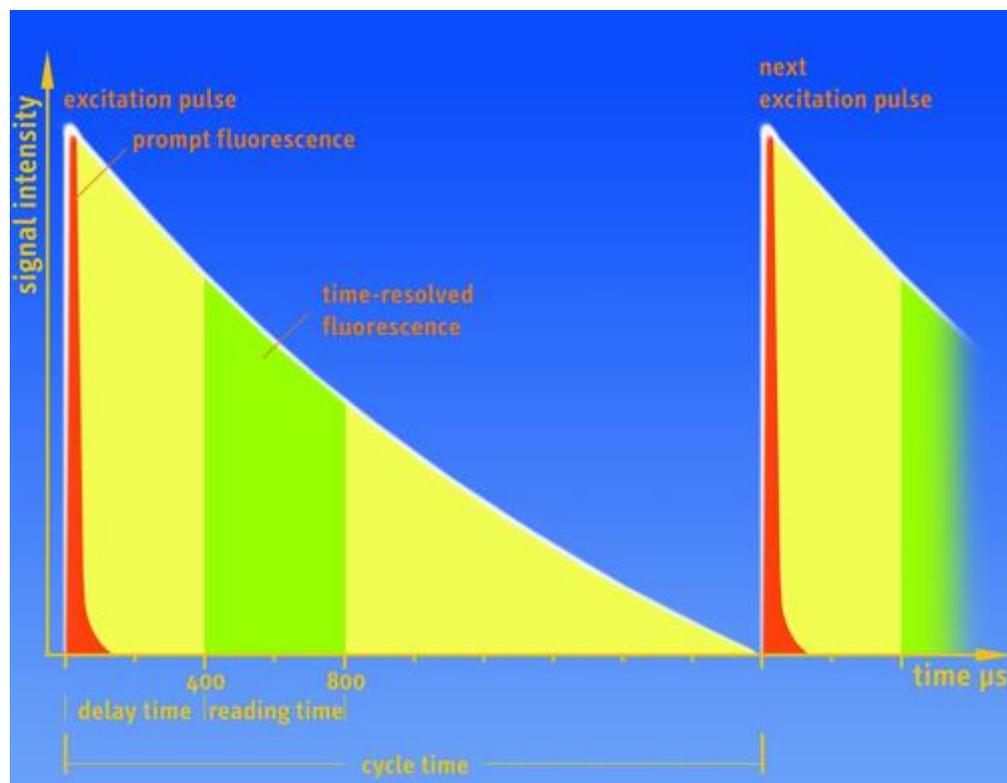
Лантаноиды:

Европий

Самарий

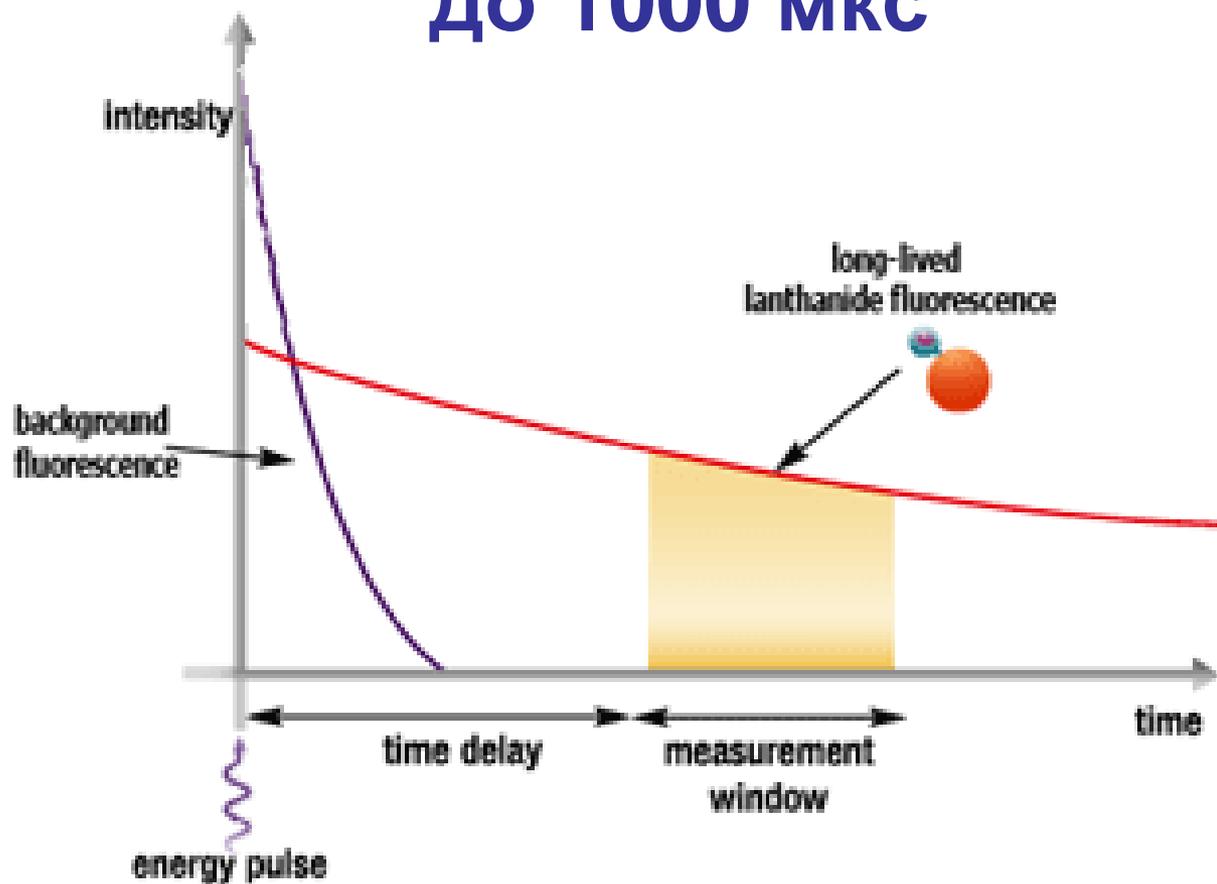
Тербий

Диспрозий





Долгоживущая флуоресценция: до 1000 мкс



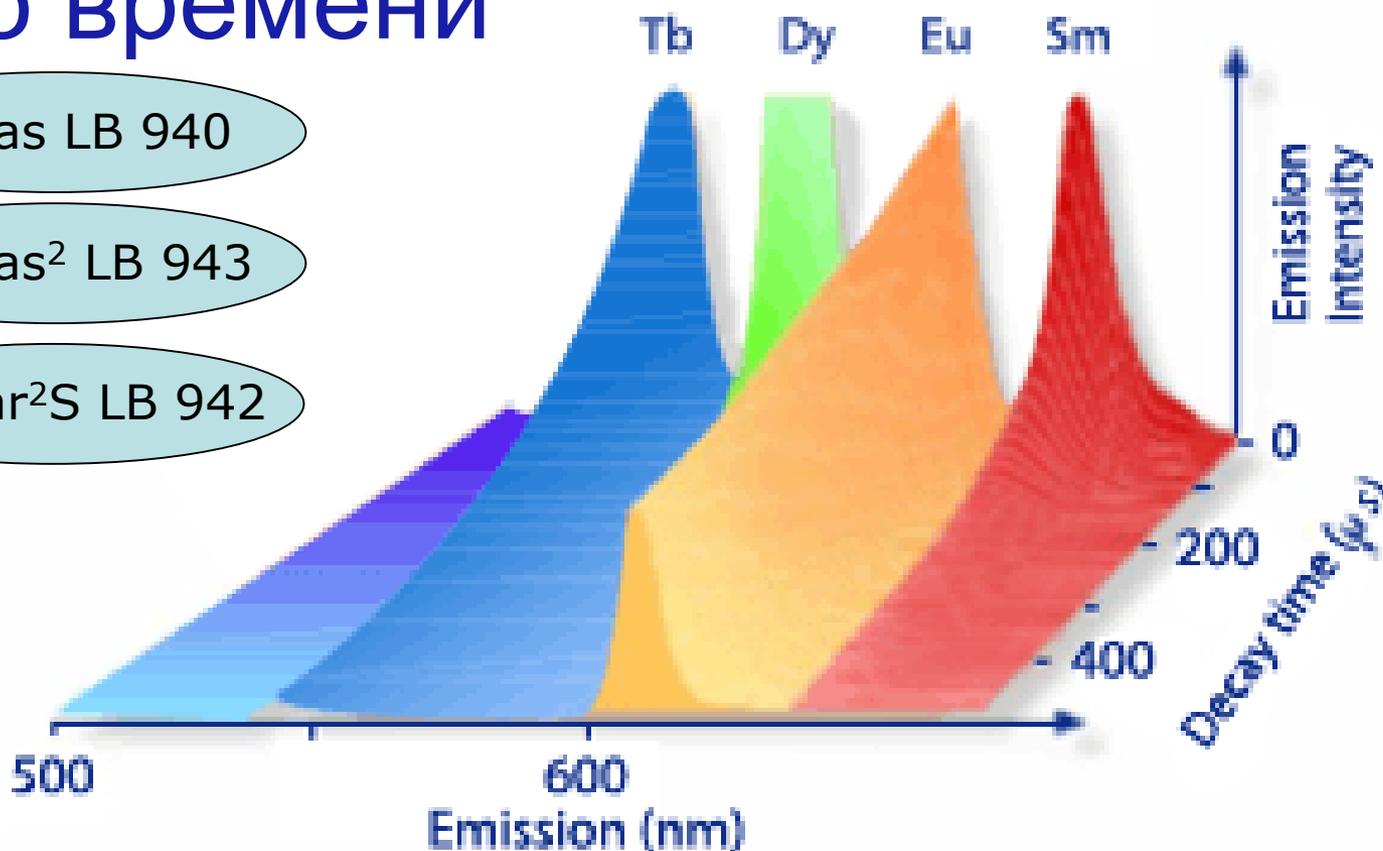


Флуоресценция с разрешением по времени

Mithras LB 940

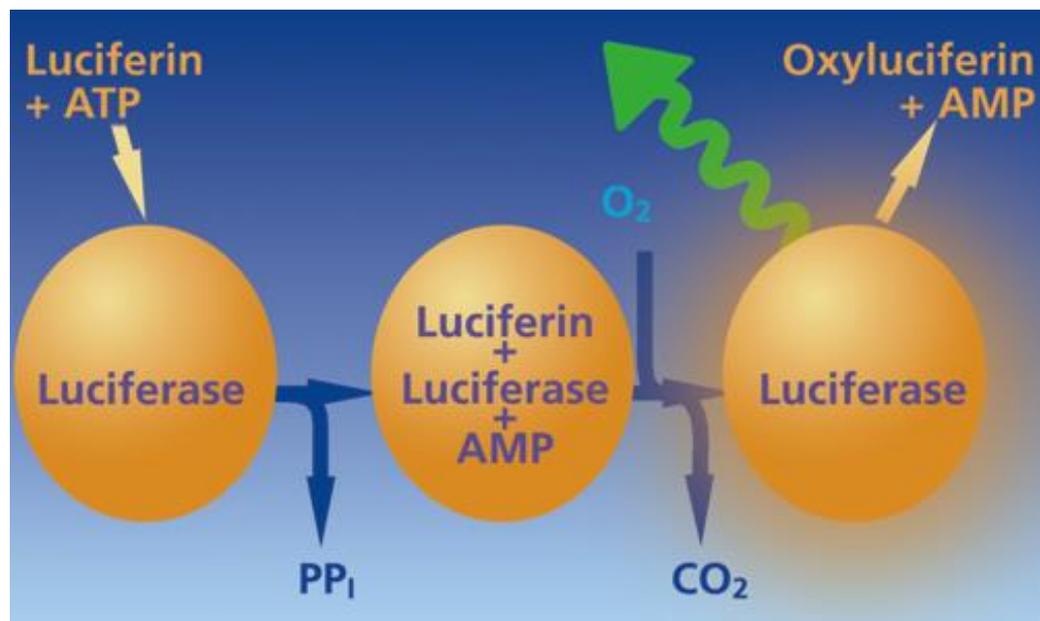
Mithras² LB 943

TriStar²S LB 942





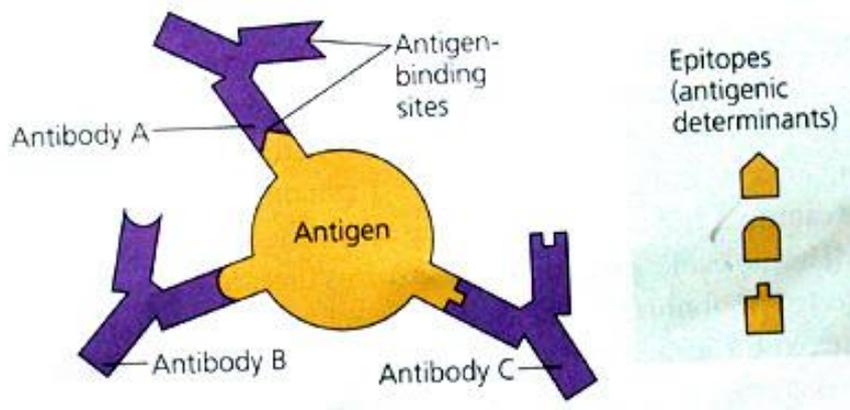
Определение АТФ



Анализ с использованием люциферазы



Иммуноанализ

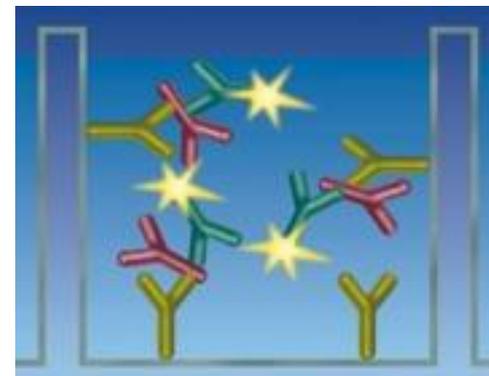


- ▶ Иммуноанализ является биохимическим тестом, который определяет уровень веществ в биологических жидкостях, обычно сыворотке и моче, используя реакцию антител или антитела к антигену
- ▶ Анализ имеет преимущество в специфичности связывания антитела со своим антигеном



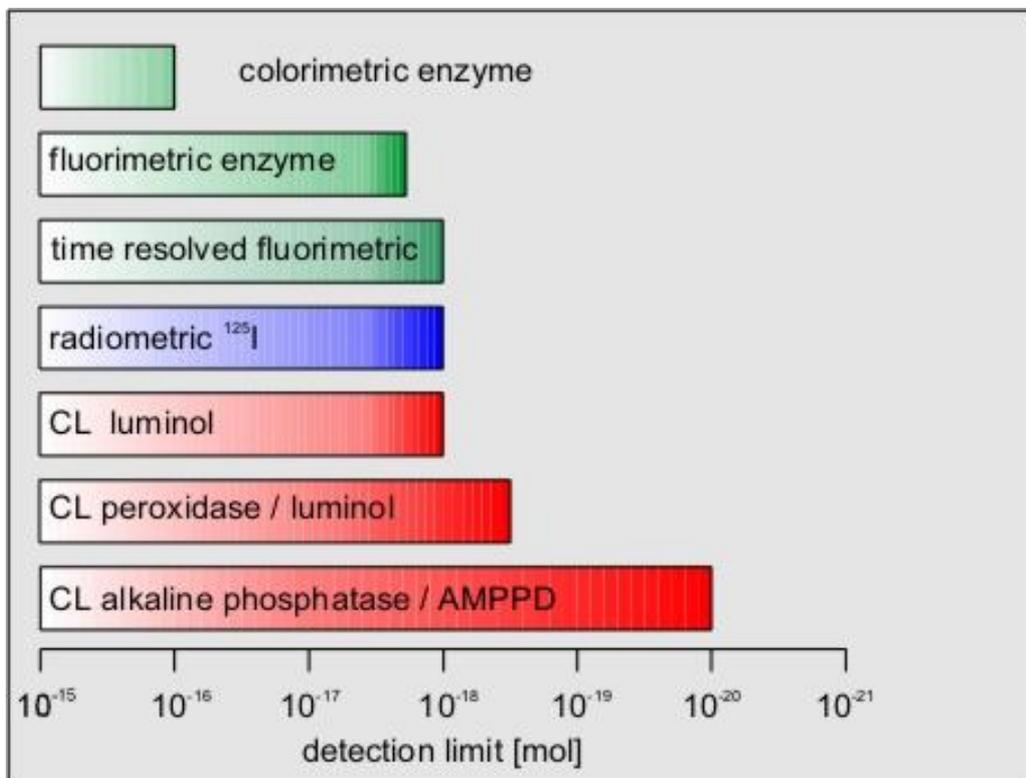
Люминесцентный иммуноанализ

- ▶ Метка может быть либо прямой меткой, либо ферментом
- ▶ Фермент катализирует реакцию превращения субстрата в конечный продукт
- ▶ В LIA/CLIA люминесцентный сигнал детектируется люминометром





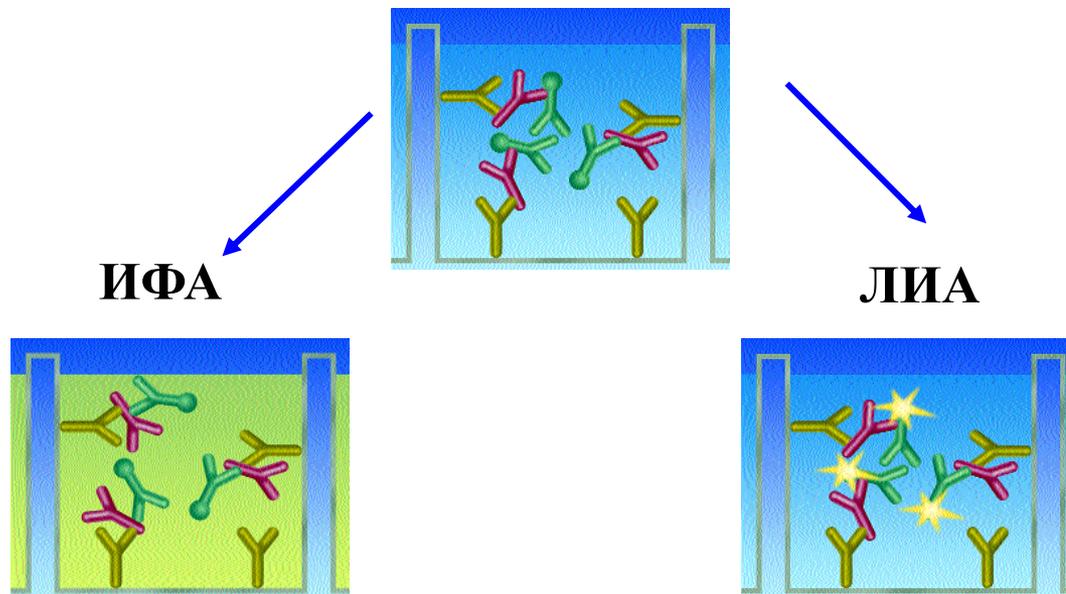
Пределы обнаружения





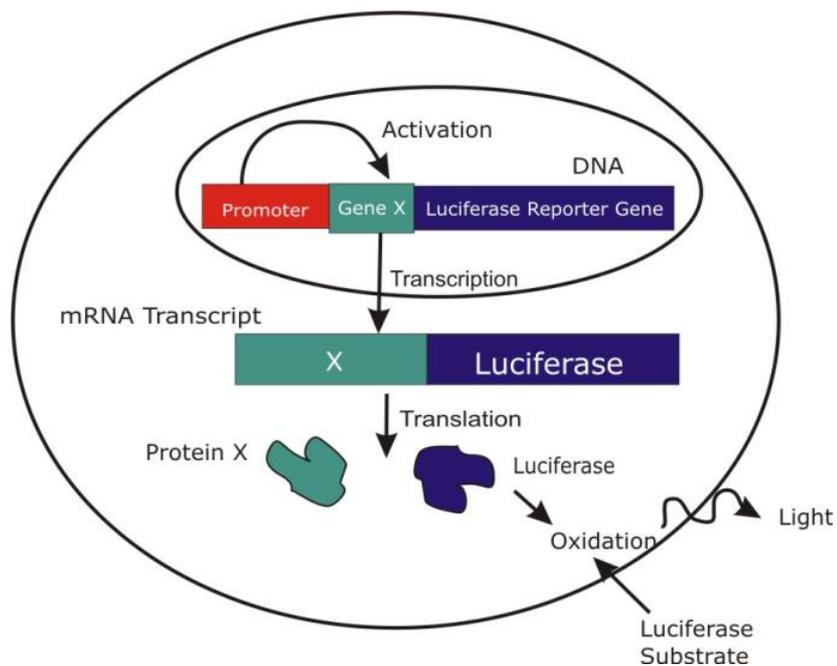
От ИФА к ЛИА

Просто смените субстрат, чтобы достигнуть 100 кратного увеличения чувствительности с динамическим диапазоном более 6 порядков, используя люминесцентный иммуноанализ (ЛИА).

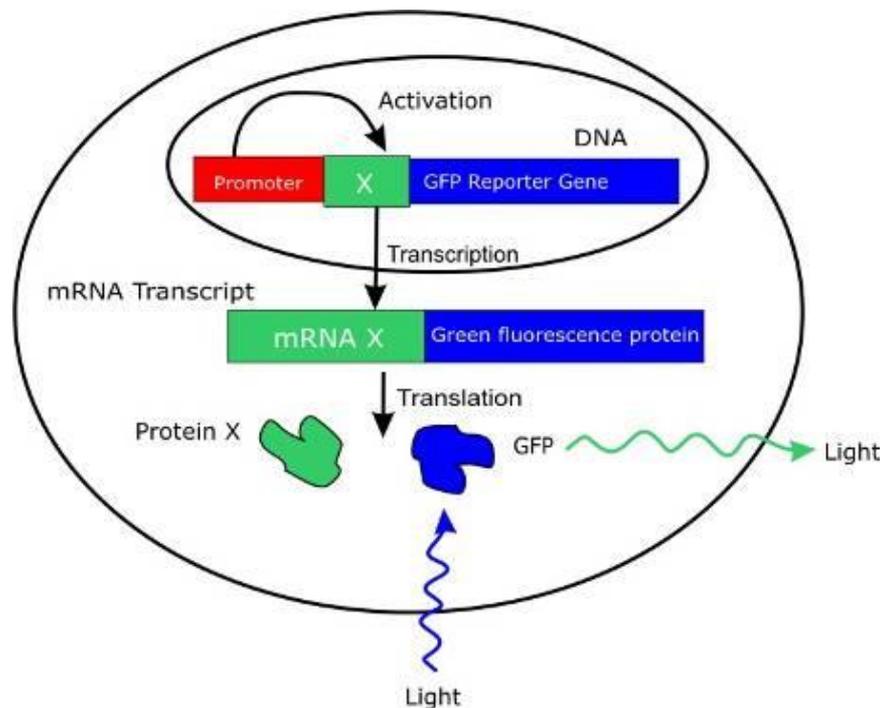




Анализ репортерного гена



Люцифераза



GFP



Методы детектирования при анализе репортерного гена

Reporter	Detection Method		
	Luminescence	Fluorescence	Absorbance
Luciferase	+		
β -Galactosidase (GUS)	+	+	+
β -Glucuronidase (b-Gal)	+	+	
Secreted placental alkaline phosphatase (SEAP)	+		+
Green Fluorescent Protein (GFP)		+	



Dual Luciferase Assay



- ▶ Два различных люциферазных репортных энзима
- ▶ Одновременная экспрессия в каждой клетке
- ▶ Люцифераза светлячка и Renilla
- ▶ Возможно выбирать соответствующие биолюминесцентные субстраты
- ▶ Отсутствие кросс-активации
- ▶ Валидация DLReady™
- ▶ Mithras LB 940, Mithras² LB 943, Centro LB 960 и Lumat³ LB 9508
- ▶ Готовый файл параметров для MikroWin



Chroma Glo™

- ▶ Chroma-Luc™ векторы, кодирующие люциферазы, испускающие зеленый и красный свет
- ▶ Пики люминесценции разделены > 75 нм
- ▶ Быстрая смена фильтров Em 510/Em 610
- ▶ Предопределенный файл параметров MikroWin
- ▶ Mithras LB 940, Mithras² LB 943

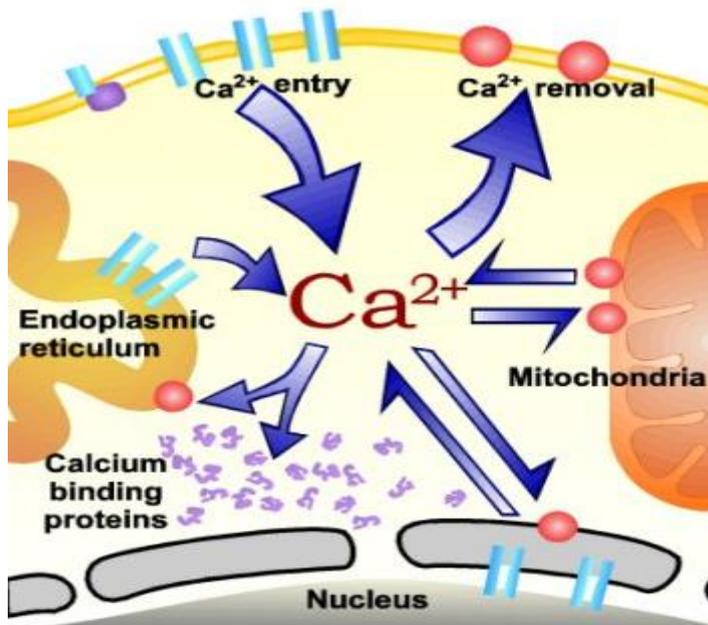


Приборы Berthold для анализа репортерного гена

- ▶ Абсорбция: Mithras LB 940, Mithras² LB 943, TriStar² LB 942, Apollo-11 LB 913
- ▶ Люминесценция: Mithras LB 940, Mithras² LB 943, TriStar² LB 942, Centro/Centro XS³ LB 960, Lumat³ LB 9508
- ▶ Флюоресценция: Mithras LB 940, Mithras² LB 943, TriStar² LB 942
- ▶ Chroma-Glo: Mithras LB 940, Mithras² LB 943, TriStar² LB 942



Мониторинг Ca^{2+}





Высокочувствительные системы визуализации

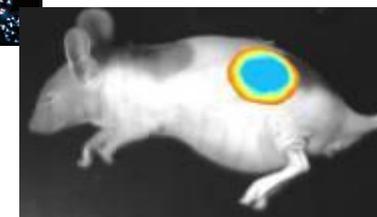
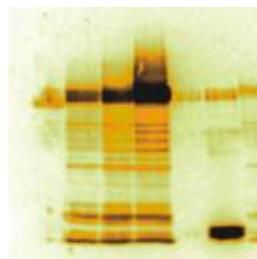
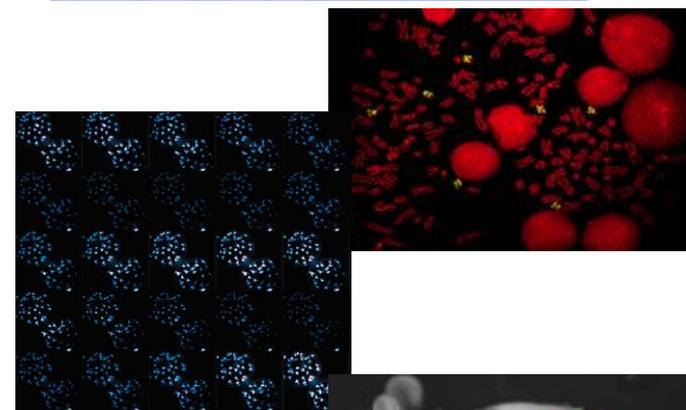
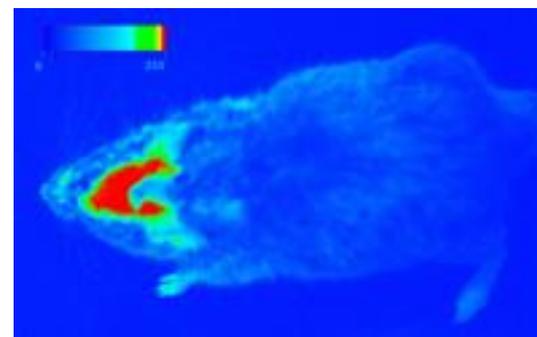
- ▶ Оснащены ПЗС-камерами медленного сканирования
- ▶ Камера NC 320 с фронтальным освещением идеально подходит для флюоресценции
- ▶ Камера NC 100 с обратным освещением оптимальна для люминесценции
- ▶ Эффективное термоэлектрическое охлаждение поддерживает низкую температуру матрицы, уменьшая темновой ток и увеличивая чувствительность.





Применения NightOWL

- ▶ In-vivo визуализация живых организмов
- ▶ In vivo визуализация инфекционных заболеваний
- ▶ Детекция активных форм кислорода
- ▶ FISH (флюоресцентная гибридизация in-situ)
- ▶ Визуализация гелей или блотов
- ▶ Исследования циркадных ритмов





Berthold Technologies

