

# Mehr Licht

Lumineszenz-Technik bietet hohe Empfindlichkeit für neue Anwendungsgebiete



Bettina Felletschin

**Die vielfältigen Anwendungen der Chemi- und Biolumineszenz in Forschung, Klinik und der pharmazeutischen Industrie zeigen, dass die Lumineszenz-Technologie bereits in vielen Bereichen dominiert und zu einer schnell wachsenden analytischen Technologie gehört. Darüber hinaus bietet Lumineszenz eine sehr hohe Sensitivität, Selektivität und Umweltfreundlichkeit, um nur einige Vorteile zu nennen.**

Lumineszenz ist im Tierreich in den unterschiedlichsten Organismen anzutreffen, aber vor allem Tiefsee-Organismen setzen auf diese Lichtquelle. Zu den Tieren mit Leuchtorganen gehören beispielsweise die Leuchtkäfer (Glühwürmchen; Lampyridae), verschiedene Kopffüßer wie der Vampirtintenfisch (*Vampyroteuthis infernalis*), die Leuchtqualle (*Pelagia noctiluca*) und viele Tiefseefische.

Unter Lumineszenz versteht man die Emission von Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich zwischen 400 und 700 nm durch Atome oder Moleküle in elektronisch angeregten Zuständen als direkte Folge einer chemischen Reaktion. Bei Chemilumineszenz erfolgt die Anregung des Systems durch eine chemische Reaktion (meistens Oxidation, z. B. Luminol zum Nachweis von Blut), bei Biolumineszenz erfolgt die Anregung des Systems durch eine chemische Reaktion in lebenden Organismen, katalysiert durch ein Enzym (Oxidation von Luciferin im Leuchtkäfer).

## Die Methode

In Luminometern wird normalerweise ein Photomultiplier als Detektor eingesetzt. Das Licht aus der Lumineszenz-Reaktion erreicht dabei die licht-sensitive Kathode des Photomultipliers. Man unterscheidet dabei zwischen zwei Verfahren, der Strommessung und dem so genannten „Photon-Counting“. Bei der Strommessung werden

die Elektronen an der Anode gemessen und verstärkt. Ein Faktor definiert die Umrechnung der Stromsignale in „relative light units“ (RLUs), die das Gerät als Messwert ausgibt.

Beim so genannten „Photon-counting“ werden die Impulse in drei Kategorien eingeteilt. Nur Signale, deren Amplituden zwischen A und B liegen (vgl. Diagramm), werden in RLUs umgewandelt und ausgegeben. Kleinere Signale, also das Rauschen des Photomultipliers, und größere Signale, also eventuelle Radioaktivität des Materials oder kosmische Strahlung, werden nicht berücksichtigt. Somit ist das Signal beim „Photon-counting“ stabiler und temperaturunabhängiger als bei der Strommessung. Der Dunkelstrom ist wesentlich geringer und führt dabei zu einer höheren Sensitivität. Häufige Kalibrierungen, wie bei der Strommessung sind beim „Photon-counting“ nicht notwendig.

Die Injektion von Startreagenzien erlaubt die Messung der Lichtemission gleich vom Beginn der Reaktion an. Ein Injektor in Messposition ist besonders bei den so genannten „Flash-type“-Reaktionen, wie mit Acridiniumester, Luminol oder Aequorin erforderlich, in denen das meiste Licht in den ersten beiden Sekunden ausgestrahlt wird. Die „JET“-Technologie steht für Präzision und Exaktheit von 98 %, um ein definiertes Volumen in die Probe zu injizieren und die Partikel komplett zu durchmischen. Reagenzinjektoren erlauben außerdem die komplette Befüllung von allen benötigten Reagenzien in die Mikroplatte bzw. das Röhrchen. Bei hohem Durchsatz ist dadurch eine enorme Arbeitserleichterung gegeben.

## Auf dem Markt

Luminometer gibt es in vielen Größen und Ausführungen auf dem Markt. Es gibt üblicherweise zwei Probenformate, die Probenröhrchen und die Mikroplatten. Es ist klar, dass die Handhabung der Probenröhrchen aufwändiger ist als die der Mikroplatte, in der bis zu 1536 Proben auf einmal im Gerät gemessen werden können. Bei einigen Anwendungen jedoch, wie z. B. bei zellulärer Lumineszenz oder Toxizitätstests von Umweltproben, werden große Test-Volumina bevorzugt, die nur im Röhrchenformat erreichbar sind.

Es gibt tragbare Röhrchenluminometer, nicht schwerer als 2 kg, die im Gelände einfach zu transportieren und zu handhaben

**Autorin:** B. Felletschin, Applikationsspezialistin  
Bioanalytische Instrumente, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad

sind. Viele Röhrenluminometer können mit Reagenz-Injektoren und/oder einer Heizung ausgestattet sein. Eine Temperierung ist z. B. beim Arbeiten mit Zellen erforderlich, um Körpertemperatur zu simulieren. Für hohen Probanddurchsatz sind Röhrenluminometer verfügbar, die mit einem Probenwechsler ausgestattet bis zu 160 Probenröhren hintereinander vermessen können.

Mikroplattenluminometer sind ebenfalls in verschiedenen Ausführungen, mit Temperierung, Schüttelfunktion und/oder Reagenzinjektoren, verfügbar. Die meisten Mikroplattenluminometer sind ausgestattet für die Verwendung von 96 und 384 Well-Mikroplatten. Luminometer können zusammen mit dem PC oder alleine als Stand-alone-Geräte mit Keypad und/oder integriertem Drucker betrieben werden.

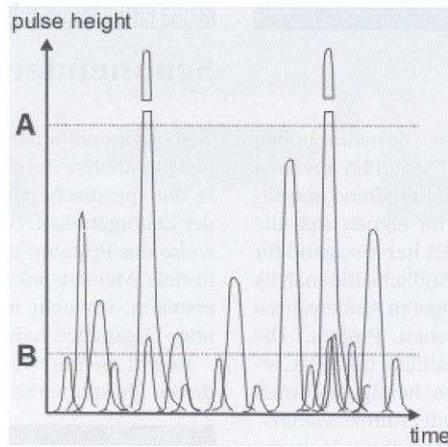
Immer größerer Beliebtheit erfreuen sich die so genannten Multimode-Geräte auf dem Markt, die nicht nur Lumineszenz,

## Für Reporter Gene Assays hat sich wegen seiner hohen Sensivität der Luciferase-Assay durchgesetzt

sondern auch Fluoreszenz, Absorption und andere Techniken in Mikroplatte, wie z. B. den „Bioluminescence-Resonance-Energy-Transfer“ (BRET) durchführen können. Dadurch spart man nicht nur den Platzbedarf vieler Einzelgeräte, sondern benötigt nur eine einzige Gerätesoftware für Messung und Auswertung. Darüber hinaus bieten die Geräte den Vorteil, dass man unterschiedliche Messverfahren kombinieren kann.

## Anwendungen

ATP als biologischer Indikator kann schnell und einfach mit Luciferase detektiert werden. Durch die Zugabe von Coenzym A wurde die eigentlich als Flash-type ablaufende Reaktion in eine Glow-type-Reaktion



Prinzip des „Photon-counting“: Einteilung der Impulse aus dem Photomultiplier in drei Kategorien

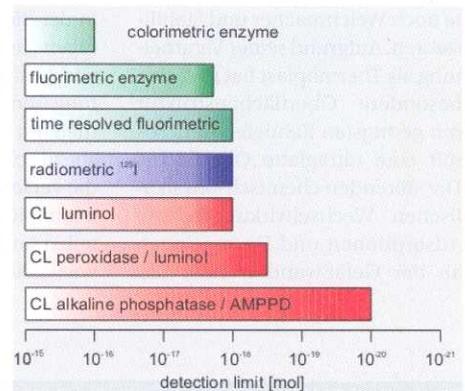
umgewandelt, sodass auch tragbare Geräte ohne Injektoren verwendet werden können. Die ATP-Messung wird hauptsächlich zur Bestimmung von Biomasse und biologischer Kontamination, aber auch bei Zellbasierten Anwendungen wie Apoptose, Zell-Proliferation und Zell-Zytotoxizität eingesetzt. In der Nahrungsmittelindustrie wird die ATP-Reaktion häufig zur Hygiene-Testung verwendet.

Eine andere wichtige Anwendung sind die sog. Reporter-Gen-Untersuchungen (Reporter Gene Assays). Nach der Klonierung und Sequenzierung von Genen stellt man heute die Frage nach der Funktion der codierten Proteine in den Mittelpunkt. Aufgrund der hohen Sensitivität hat sich auch hier der Luciferase-Assay durchgesetzt. Um die Transfektionseffizienz zu bestimmen, bietet der Dual-Luciferase-Assay viele Vorteile, bei dem die Aktivität eines Promoters mit Photinus-Luciferase gemessen und anschließend im selben Reaktionsansatz die Aktivität der Renilla-Luciferase als interner Standard bestimmt wird. Die Nachteile der früheren Standardisierungsmethoden mit Co-Reportern werden so überwunden.

Neuartige Vektoren mit Luciferasen, die grünes und rotes Licht emittieren (Chroma-Glo) und deren Wellenlängen sich nur um 75 nm unterscheiden, sind ideal für du-



Röhren-Luminometer, ausgestattet mit integrierter Software und Drucker und zwei Reagenz-Injektoren



Vergleich der Sensitivität verschiedener Techniken mit Lumineszenz (Immunoassay)

ale Messungen, in denen ähnliche Reporter benötigt werden und die Zugabe einer einzelnen Reagenz vorteilhaft ist.

In letzter Zeit werden immer mehr Immunoassays auf Lumineszenz-Basis entwickelt. Das liegt vor allem daran, dass das Patent der „Enhanced Luminescence“ (ECL) ausgelaufen ist und man nun die Vorteile der Lumineszenz kostengünstig nutzen kann. Die Umstellung von einem kommerziellen „Enzyme-linked Immunosorbent assay“ (ELISA oder EIA) auf den Luminescence Immunoassay (LIA) kann einfach über den Austausch des Substrates erfolgen.

[www.Berthold.com/bio](http://www.Berthold.com/bio)



## Wer Wasser will, soll zahlen...

Es gibt internationale Bestrebungen, auch die Wassermärkte zu „liberalisieren“. Wer die Ware Wasser nicht bezahlen kann, sitzt auf dem Trockenen. Wie die Menschen vor den verschlossenen Rohren in diesem philippinischen Slum.

„Brot für die Welt“ und viele der Partner im Süden setzen sich dafür ein, dass der Zugang zu sauberem Wasser als Menschenrecht durchgesetzt wird. Bitte unterstützen auch Sie uns.

Ich möchte mehr Infos über die Arbeit von „Brot für die Welt“

- Senden Sie mir Unterlagen über Ihre Aktion, Ihre Partner und den Einsatz der Spendenmittel.
- Ich bitte um kostenlosen Bezug der Quartals-Nachrichtenbörse rund um unsere Eine Welt „Der Ferne Nächste“.

Name \_\_\_\_\_

Straße \_\_\_\_\_

PLZ/Ort \_\_\_\_\_

Postbank Köln  
500500-500  
Postfach 10 11 42  
70010 Stuttgart

**Brot für die Welt**  
[www.brot-fuer-die-welt.de](http://www.brot-fuer-die-welt.de)