

lo mrzlih nočeh, ko se temperature spustijo pod nič stopinj Celzija; znani so primeri, ko sta bila metulja med parjenjem zjutraj prekrita z ivjem ali snegom. Naselitev te vrste v bolj celinskih predelih Evrope ali celo zahodne Sibirije, ki jih večidel prekriva gozd iz rdečega bora, o čemer so včasih sanjali, sicer ni mogoča, švicarskim lepidopterologom pa se je v predprejšnjem stoletju vendarle posrečil vnos v borove gozdove klimatsko ugodnega kantona Wallis, kjer je danes postala. Iz tega dela Švice izvirajo, tako kot reja švicarskega entomologa Uweja Kauza, danes marsikje po svetu gojeni primerki tega metulja, ki je sicer v vseh naravnih delih svojega areala strogo zaščiten; vsakršen lov ali nabiranje sta tam prepovedana, v času letanja pa mu je prilagojena tudi cestna razsvetljava. Genetske analize kažejo, da se je ta

rod že zgodaj ločil od drugih predstavnikov, ki jih danes združujemo pod imenom *Actias*.

#### Literatura:

Brechlin, R., 2013: *Two new taxa of the genus Actias, Leach 1815 from China (Lepidoptera: Saturniidae)*.

*Entomo-Satsphingia* 6, (1): 8-13.

Brockhoff, H., *osebne informacije*.

Nässig, W. A., 1994: *Notes on the systematics of the maenas-group of the genus Actias, Leach 1815 (Lepidoptera: Saturniidae)*. *Nachrichten des Entomologischen Vereins Apollo N.F.*, 15 (3): 327-338.

Voelschow, A., 1902: *Die Zucht der Seidenspinner*. *Schwerin*.

Ylla i Ullastre, J., 1997: *Història natural del lepidòpter: Graellsia isabelae (graells 1849)*. Barcelona.

Zolotuhin, V. V., 2011: *The Actias Leach, 1815 in the Far East: how many species? Neue Entomologische Nachrichten*, 67: 40-56.

Odkrivanje in analiza biološkega gradiva s pomočjo svetlobnih reakcij • Kemija

## Odkrivanje in analiza biološkega gradiva s pomočjo svetlobnih reakcij

Marko Jeran

Kemiluminiscenca je področje kemije, ki se trenutno še razvija. Vendar njen pomen hitro narašča, saj je zelo uporabna tudi v vsakdanjem življenju. V naravi je bioluminiscenca zelo razširjen pojav: za sporazumevanje in obrambo pred »napadalci« jo uporabljajo alge, plankton, žuželke (značilni primer so kresnice), globokomorske ribe, mikroorganizmi ter veliko ostalih živih bitij (Homšak, 2011).

Kemiluminiscenca je proces proizvodnje elektromagnetnega valovanja v obliki svetlobe s pomočjo kemijske reakcije. Sevanje svetlobe je lahko ultravijolično, vidno ali pa infrardeče. Gre za proces, ko zaradi eksotermne reakcije molekule preidejo v elektronsko vzbujeno stanje. Ko se te molekule vračajo v osnovno stanje, sprostito fotone

(energijo v obliki svetlobe). Največkrat se to dogaja v tekočem ali trdnem agregatnem stanju (Homšak, 2011).

Kemiluminiscenco danes uporabljajo predvsem v medicini in biokemiji. Velik del raziskav pa je bil narejen tudi na področju forenzične znanosti, ki daje odgovore na povsem etična vprašanja. V omenjenem prispevku so opisani nekateri najbolj raziskani in najbolj uveljavljeni načini uporabe luminescence.

### Kemiluminiscenca

Kemiluminiscenca je oddajanje svetlobe zaradi kemijske reakcije pri sobni temperaturi brez prisotnosti plamena (Mohan, Turro, 1974). Je pojav, pri katerem med eksotermno reakcijo nastane produkt v elektronsko

vzbujenem stanju. Ko se vzbujeni produkt vrača v osnovno stanje, izseva energijo v obliki fotona (svetloba). Največkrat se proces odvija v tekočem ali trdnem agregatnem stanju (Jeran, Cvar, Podgoršek, 2012). Kemiluminiscenco delimo na posredno in neposredno.

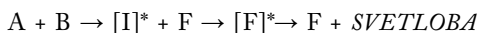
Neposredno kemiluminiscenco lahko poenostavljeno prikažemo s splošno reakcijsko shemo:



A in B sta reaktanta,  $[I]^*$  je snov v vzbujenem stanju. Reakcija med luminolom in vodikovim peroksidom je primer neposredne kemiluminiscence.

V primerih, ko vzbujeno stanje snovi samo ni dovolj učinkovito sevalno sredstvo, lahko preda energijo neki drugi zvrsti (senzibilizatorju, F), ki potem izseva energijo. V tem primeru govorimo o posredni kemiluminiscenci. Primer je svetloba, ki jo sevajo aktivirane svetlobne paličice, popularni »modni« dodatek obiskovalcev diskotek, zabav in drugih srečanj mladih. Splošno reakcij-

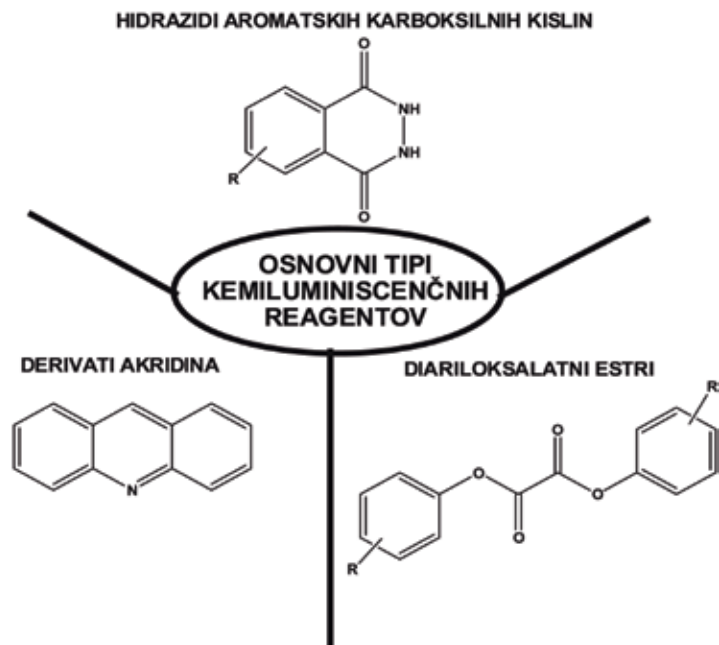
sko shemo posredne kemiluminiscence kaže spodnji zapis (Vrtačnik) :



Kemiluminiscenca se je v času zelo spreminjala, tako tudi njen pomen in vloga na posameznih področjih (kemija, biokemija, medicina, farmacija, biologija, biotehnologija) (Jeran, Cvar, Podgoršek, 2012; Jeran, Drogenik, 2010). V ta namen se je razvila velika knjižnica spojin, ki so sposobne sevati svetlobo oziroma energijo v obliki fotonov. Doslej je znanih več kot 25 različnih strukturnih vrst spojin. Intenzivnost raziskav na tem področju je velika, zato si lahko obetamo, da se bo število znanih kemiluminiscenčnih reagentov v prihodnje še povečalo (Jeran, Cvar, Podgoršek, 2012).

**Med dobro znane kemiluminiscenčne reagente sodijo:**

- derivati akridina,
- diariloksalatni estri,
- hidrazidi aromatskih karboksilnih kislin



*Shema 1: Osnovni tipi kemiluminiscenčnih reagentov.*

## Luminol

Luminol je reagent in je raziskovalno eden izmed najbolj obetavnih analogov hidrazidov aromatskih karboksilnih kislin. Med oksidacijo oddaja turkizno modro svetlobo, ki je dobro vidna v zatemnjenih prostorih. Njegova vloga pri reakcijah je pomembna tako s komercialnega kot tudi uporabnostnega vidika. Prvi je kemiluminiscenco luminola opazil leta 1928 kemik Albrecht, od takrat so jo začeli tudi intenzivno raziskovati (Jeran, Cvar, Podgoršek, 2012). Oksidacija luminola lahko poteka v protičnem (alkohol, voda) in aprotičnem topilu (*dimetil sulfoksid* - DMSO, dimetil formamid - DMF). Mehanizma se v obeh vrstah topil precej razlikujeta. V različnih topilnih sistemih so potrebni različni oksidanti, zato se spektri sevanja svetlobe med seboj razlikujejo. V aprotičnih topilih sta za kemiluminiscenco potrebna le molekularni kisik in močna baza. Največja valovna dolžina izsevane svetlobe je 485 nanometrov. V protičnih topilih potrebujemo za oksidacijo močno bazo, molekularni kisik ali vodikov peroksid in katalizator. Največja valovna dolžina v tem primeru znaša približno 425 nanometrov. V obeh vrstah topil povzroči sevanje vzbujeni aminoftalatni ion (Jeran, Cvar, Podgoršek, 2012).

Trajanje sevanja svetlobe je odvisno predvsem od koncentracije vodikovega peroksida  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Pomembno vlogo ima tudi katalizator. Najpogosteje uporabljajo ione  $\text{Cu}^{2+}$ . Uporabni so tudi ioni  $\text{Co}^{2+}$  in  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$

(Grofelnik, Drobnič, 2008). Kot vir bakrovih(2+) ionov največkrat uporabljajo bakrov sulfat pentahidrat,  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ . Za vir kobalta je primeren kobaltov(II) klorid heksahidrat,  $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ . Vir  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  kompleksov predstavljajo soli alkalijskih oziroma zemeljskoalkalijskih kovin.

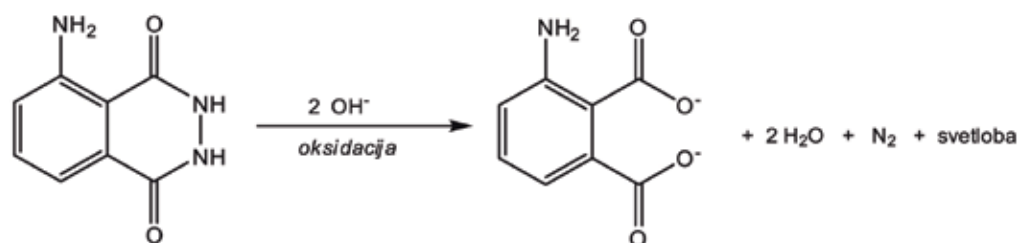
## Spremljanje kemiluminiscenčnih reakcij

Kemiluminiscenčne reakcije lahko spremljamo na več načinov. Prvi izmed njih je merjenje časa trajanja sevanja svetlobe, drugi določanje jakosti nastale svetlobe.

Slika 1: Kemiluminiscenca luminola v vodnem mediju.



Shema 2: Reakcijska shema oksidacije luminola v bazičnem mediju.



Jakost svetlobe pri kemiluminiscenčnih reakcijah lahko merimo na več različnih načinov. Za merjenje jakosti svetlobe pri kemiluminiscenčnih reakcijah pogosto uporabljajo različne senzorje, fotodiode in veliko občutljivejše fotopomnoževalke (*photomultiplier tube, PMT*) (Jeran, Drofenik, 2010). Fotopomnoževalke uporabljajo predvsem za merjenje zelo nizkih jakosti, saj so zelo občutljive in ojačajo svetlobni tok. Delujejo po načelu fotoelektričnega pojava, zaradi visoke natančnosti pa jih uporabljajo v medicini in diagnostiki (Homšak, 2011).



Slika 2: Svetlobni senzor.

Slika 3: Fotopomnoževalka.



### Uporaba kemiluminiscenčnih reakcij

Kemiluminiscenčne reakcije se najbolj uporabljajo na sledečih področjih:

- farmacevtska industrija (analize, nadzor kakovosti),
- forenzika,
- klinična imunologija,
- raziskave rakavih obolenj, tumorjev,
- kemiluminiscenčni imunski testi,
- analize anorganskih snovi v tekoči fazi,
- analize organskih vrst; uporabno v kombinaciji z encimi, kjer substrat ni neposredno vključen v kemiluminiscenčno reakcijo, ampak je to nastali produkt reakcije,
- odkrivanje in določanje vsebnosti biomolekul v sistemih, kot so ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) – test, pri katerem se uporabljajo protitelesa in barvne spremembe za ugotavljanje snovi,
- *Western-blot*,
- odkrivanje izdihanega dušikovega oksida pri astmatikih,
- kromatografske tehnike, pri katerih je pomembna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*).

## 1. Odkrivanje biološkega gradiva v forenzični medicini na mestu kaznivega dejanja

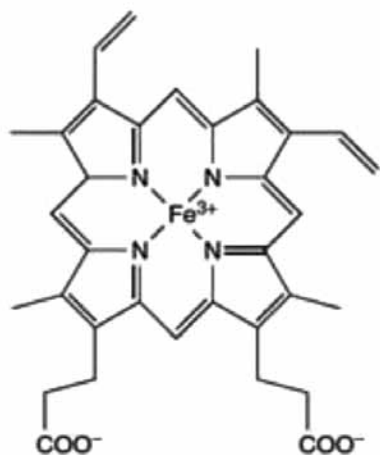
Potreba po odkrivanju latentnih (zabrisanih) krvnih sledi pri preiskavah kaznivih dejanj sega že v začetke prejšnjega stoletja. V tem obdobju so razvili različne teste za dokazovanje zabrisane krvi. Večina testov temelji na katalitični aktivnosti hemoglobina, ki je sestavni del eritrocitov v človeški krvi. Testi niso specifični, saj je hemoglobin mogoče najti v krvi vseh vretenčarjev. Osnova testov je redoks reakcija, v kateri hemoglobin katalizira oksidacijo spojin, ki v reakciji sodelujejo kot reagenti. Test je pozitiven, če se pojavi sprememba v barvi reagenta ali sevanje svetlobe (kemiluminiscenca). Najpogosteje uporabljeni reagent za dokazovanje zabrisanih krvnih sledi je hidrazid 3-aminoftalne kisline, bolj znan kot luminol. Ker testi temeljijo na oksidacijsko-redukcijski reakciji, lahko pride ob stiku s spojinami, ki vsebujejo hemov obroč, kot so encimi peroksidaze, ali v prisotnosti oksidirajočih agensov do napačno pozitivnih rezultatov. Kljub tej slabosti so izredno pomembno orodje za osnovno ugotavljanje prisotnosti krvi v zabrisanih madežih pri preiskovanju krajev

kaznivih dejanj. Forenzični strokovnjak mora pri razlagi rezultatov upoštevati to slabost (Grofelnik, Drobnič, 2008).

Prvi poskusi, pri katerih so uporabili luminol za predhodno testiranje prisotnosti krvi v zabrisanih krvnih sledeh, so bili opravljeni že leta 1937. Izvedel jih je Walter Specht z Inštituta za sodno medicino in kriminalistiko v Jeni (Nemčija). Na različne podlage, kot so trata, opeke ali kamni, je pljuskal kri. Prisotnost je dokazoval z luminolom. Test je od takrat doživel nekaj manjših sprememb. Grodsky je leta 1951 pripravil mešanico pudra, ki je vsebovala luminol, natrijev karbonat in natrijev perborat. Mešanico je bilo treba raztopiti v destilirani vodi. Raztopina je postala najpogosteje uporabljeni test za preiskavo krajev kaznivih dejanj z domnevno zabrisanimi krvnimi madeži. Uporaba natrijevega karbonata ni bila najboljša, saj je bila reakcija zelo počasna in kratkotrajna. Raztopina je bila neobstojna in strupena. Leta 1966 je Weber naredil novo testno raztopino, ki jo sestavljajo luminol, natrijev ali kalijev hidroksid in vodikov peroksid. Tako pripravljeno raztopino je bilo treba hraniti v hladnem prostoru, odmaknjeno od neposredne svetlobe. Njena obstojnost je bila kratkotrajna (osem ur). Webrovo kombinacijo spojin danes imenujemo klasični luminolni test. Če popršimo latentne krvne sledi, nastane modrozeleno sevanje svetlobe. Pokaže se, da luminol sodi med tiste spojine, ki oddajo zadovoljivo količino svetlobe (Grofelnik, Drobnič, 2008).

V svetu klasični luminolni test zaradi pomanjkljivosti, kot so toksičnost, neobstočnost, zamudna priprava, napačno pozitivna reakcija na detergente z belilom (vodikov peroksid), kratek čas sevanja svetlobe (kemiluminiscenca) in popolna zatemnitev prostorov pri izvajanju testa, izpodrivajo novejši testi. Ti testi temeljijo na izboljšanih reagentih, njihova osnova je prav tako luminol, vendar je kemijsko spremenjen, formule so patentno zaščitene. Med najbolj poznanimi testi je BlueStar® Forensic test,

Shema 3: Odsek strukture hema.



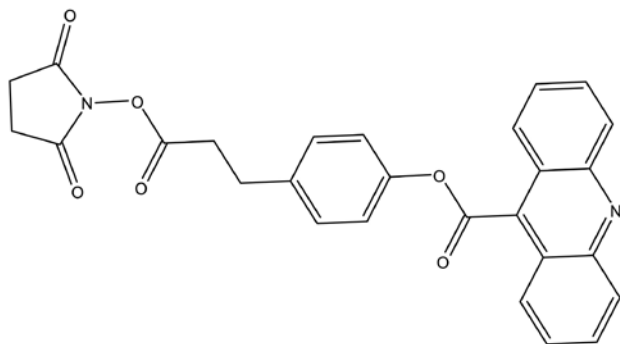
ki ga prodajajo v obliki tablet ali raztopin. Izumitelj novega testa je Loïc Blum z Univerze Claude Bernard v Lyonu (Francija). BlueStar® Forensic test je namenjen odkrivanju spranih, očiščenih in prostemu očesu nevidnih krvnih sledi. BlueStar® Forensic test ne vpliva na DNA, saj jo lahko uporabimo za nadaljnje forenzične preiskave. Prav tako test ni toksičen v primerjavi s klasičnim luminolnim testom in pozitivno vpliva na določevanje krvnih skupin (Grofelnik, Drobnič, 2008).

Opravljenih je bilo že nekaj študij, s katerimi so dokazali prednosti uporabe BlueStar® Forensic testa v primerjavi s klasičnim luminolnim testom. Na oddelku Univerzitetne klinike v mestu Nantes v Franciji so dokazali, da se v razredčitvi krvne sledi 1:1000 še nahaja zadostna količina DNA, ki ji lahko določimo koncentracijo, da je intenzivnost kemiluminiscence veliko višja in traja dlje časa kot pri klasičnem luminolu ter da lahko hitro opazimo, ali je reakcija BlueStar® Forensic testa uspešno potekla s krvno sledjo ali s katero drugo snovjo. Na Nacionalnem inštitutu za kriminalistične raziskave francoskega obrambnega ministrstva so izvedli drugo razvojno študijo, s katero so dokazali, da se v razredčitvi krvne sledi 1:1000 še nahaja zadostna količina DNA, ki jo lahko zaznamo, kljub temu da je bila krvna sled v tridesetih dneh večkrat napršena z BlueStar® Forensic testom. Na Mestnem policijskem uradu v Saint Louisu so izvedli primerjalno študijo BlueStar® Fo-

rensic testa in luminolnega testa. Hoteli so dokazati, kako starost krvne sledi in temperatura vplivata na potek reakcije ter kako se testa odzoveta, če je krvna sled obdelana z belilom. Budowle s sodelavci iz Zveznega preiskovalnega urada (Federal Bureau of Investigation, FBI) je dokazal, da BlueStar® Forensic test ne vpliva na dejanske lastnosti DNA. Namen prikazane študije je bil dokazati, da BlueStar® Forensic test v Centru za forenzične preiskave (Policija, Ministrstvo za notranje zadeve) da pričakovane rezultate. Validacija metode je postopek preverjanja, ali je metoda (test) primerna za reševanje določenega analiznega problema. V Sloveniji je bil omenjeni test uporabljen pri pršenju raztopin na vzorce, in sicer v Centru za forenzične preiskave (Policija, Ministrstvo za notranje zadeve) (Grofelnik, Drobnič, 2008).

## 2. Kemiluminiscenčni imunski testi

Kemiluminiscenca je znana kot zelo zmogljiva analitska metoda, za katero so značilni visoka občutljivost, selektivnost in območje enakomerne naraščanja. Za analize tehnike je pri kemiluminiscenci najpomembnejša prav možnost izvajanja zelo občutljivih testov v širokem razponu koncentracij, pri katerih potrebujejo razmeroma poceni opremo. V praksi je to običajno v kombinaciji z neko dopolnilno tehniko. Najpogosteje uporabljena komplementarna tehnika so kemiluminiscenčni imunski testi, pri katerih označevalce protiteles, kot so akridinijevi estri (ti v prisotnosti vodikovega peroksida povzročajo kemiluminiscenco), uporabljajo za zaznavanje pikomolarnih koncentracij analizirane snovi (Araujo-Filho, Melo-Junior, Carvalho Jr., 2011).



*Shema 4: Predstavnik akridinijevega estra, ki ga uporabljamo v medicini.*

Imunski testi, ki temeljijo na kemiluminiscenčnih reakcijah, so veliko bolj natančni in imajo večji razpon uporabe kot metode starejše generacije. Zelo so uporabni v biotehnologiji in mikrobiologiji (Fereja, Hymete, Gunasekaran, 2013).

Vse več medicinskih strokovnjakov in kemikov se zanima za omenjene analize tehnike. Njihov razvoj je odvisen od uporabe občutljivih in visokoselektivnih kemiluminiscenčnih sond. Izboljšave v občutljivosti bodo vodile k odkrivanju novih tehnik odkrivanja tumorjev. Tehnični napredek obljublja odkrivanje zelo nizkih koncentracij v serumu z uporabo nanodelcev kot označevalcev in kemiluminiscenčne reakcije (Araujo-Filho, Melo-Junior, Carvalho Jr., 2011).

Kemiluminiscenčni imunski testi so hitra in preprosta metoda brez radioaktivnega onesnaževanja, njihova občutljivost pa je običajno višja od fluorescentnih in encimskih. V današnjih časih je metoda z uporabo nanodelcev, zlasti kovinskih, kot bioloških označevalcev pritegnila že veliko pozornosti (Araujo-Filho, Melo-Junior, Carvalho Jr., 2011).

### 3. Kemiluminiscenca v raziskavah rakavih obolenj in tumorjev

Kljub dolgoletnim raziskavam in stotinam poročil o označevalcih tumorjev v onkologiji je število takih, ki so se pokazali kot klinično koristni, zelo malo. Veliko je tudi imunskih testov na podlagi protiteles, razmeroma malo je še vedno kemiluminiscenčnih in bioloških reakcij, ki bi jih uporabljali v kliničnih laboratorijih. Znani so tudi primeri, ko so kemiluminiscenčne reakcije uporabili za zgodnje odkrivanje raka na materničnem vratu (A Bio-Rad Company: An introduction to ELISA).

Rast tumorja in metastaz kot tudi učinkovitost zdravil so spremljali pri živalih, tako da so v miši vbrizgali luminiscenčne rekombinantne celice tumorja in opazovali proizvedeno svetlobo. Druga možnost je, da neznane metastaze in tumorje odkrijejo *in vivo* z

uporabo celic, ki kot sonde za ugotavljanje mesta tumorja oddajajo svetlobo (Araujo-Filho, Melo-Junior, Carvalho Jr., 2011).

### 4. ELISA (encimski imunski test)

ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) je biokemijska metoda v imunologiji, pri kateri uporabljamo protitelesa in barvne spremembe za ugotavljanje snovi, po navadi antigena, v tekočem vzorcu. Uporabljajo jo kot diagnostični pripomoček v medicini (testi HIV, testi za virus zahodnega Nila in tako dalje) in rastlinski patologiji ter v industriji za preverjanje kakovosti in odkrivanje možnih alergenov.

Antigeni iz vzorca so pritrjeni na podlago. Nanjo nanese protitelo, tako da se lahko poveže z antigenom. Ta antigen se poveže z encimom in na koncu dodamo še snov, ki vsebuje substrat encima. Pri tej reakciji ponavadi substrat spremeni barvo – to je dokaz za prisotnost iskane snovi v vzorcu.

ELISA vključuje vsaj eno protitelo, ki je specifično za določen antigen. Vzorec z neznano količino antigena vezemo na trdno podlago. Potem dodamo specifično protitelo, ki z antigenom ustvari kompleks. Protitelo se lahko z encimom poveže s kovalentno vezjo ali pa ga zazna sekundarno protitelo, ki je s konjugacijo povezano z encimom. Med vsakim korakom trdno podlago speremo z detergentom, da odstranimo nevezane antigene.

Poznamo neposredno (direktno, sendvič), posredno (indirektno) in tekmovalno ELISA.

#### Neposredna ELISA

Uporabljajo jo za analizo antigena vzorca. Protitelo za antigen, ki ga določamo, je vezano na trdno podlago (slika 4). Dodamo vzorec, ki vsebuje preiskovani antigen, ter podlago speremo, da odstranimo nevezane antigene. Dodamo protitelesa, ki so označena z encimom. Ponovno speremo podlago, da odstranimo nevezana protitelesa, in

dodamo substrat, ki ob prisotnosti encima razvije barvo, ter opazujemo intenzivnost barve.

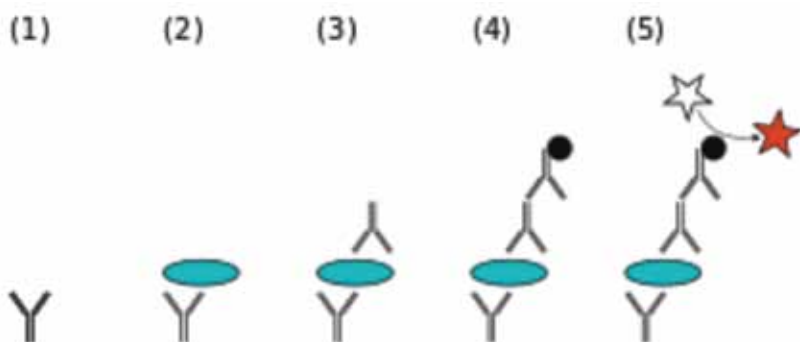
Ta metoda ima dve glavni prednosti:

- je hitrejša od ostalih, saj zahteva manj korakov, in
- manj občutljiva za napake, saj ima manj korakov in sodelujočih reagentov (A Bio-Rad Company: An introduction to ELISA).

spremljanje sprememb barve najpogosteje uporabljamo spektrometer.

Encim deluje kot ojačevalec; četudi je povezanih le nekaj protiteles, označenih z encimom, encimske molekule proizvedejo veliko signalnih molekul.

Glavna pomanjkljivost posredne metode je, da metoda ni specifična. Ko uporabimo katerikoli serum kot vir preiskovanega antigena, se lahko beljakovine prilepijo na steno



*Slika 4: Neposredna (sendvič) ELISA. (1) Na površini plošče so vezana protitelesa; (2) dodamo vzorec in preiskovani antigen, ki se veže na pritrjeno protitelo; (3) dodamo označevalno protitelo, ki se veže na antigen; (4) dodamo encimsko označeno protitelo, ki se veže na označevalno protitelo; (5) dodamo substrat, ki ob prisotnosti encima spremeni barvo.*

## B. Posredna ELISA

Na trdno podlago vežemo preiskovani antigen in dodamo vzorec s primarnimi protitelesi, ki so navadno raztopljeni v serumu druge živalske vrste, da se druga nespecifična protitelesa ne bi vezala. Podlago speremo in tako odstranimo nevezana protitelesa ter dodamo sekundarna protitelesa, označena z encimom, ki se vežejo na že vezana protitelesa. Speremo nevezana označena protitelesa in dodamo substrat, ki ob prisotnosti encima razvije barvo. Spremembo barve pokažejo sekundarna protitelesa, vezana na primarna. Večja kot je koncentracija primarnih protiteles, večja je sprememba barve. Za

naše podlage, tako da morajo zelo majhne koncentracije merjene snovi v serumu tekrovati z ostalimi beljakovinami v njem, da bi se vezale na površino. Prejšnja neposredna oziroma sendvič ELISA pa ima za to rešitev: z uporabo »sprožilnega« protitelesa, specifičnega za testirani antigen, tega potegne iz molekul seruma (A Bio-Rad Company: An introduction to ELISA).

Ima tri glavne prednosti:

povečano občutljivost, ker je več kot eno protitelo vezano na primarno protitelo, varčnost, saj potrebujejo manj protiteles, in večjo specifičnost zaradi uporabe dveh protiteles.

## C. Tekmovalna ELISA

To je najkompleksnejša ELISA. Uporabljajo jo za merjenje koncentracije antigena (ali protitelesa) v vzorcu z opazovanjem motenj v pričakovanem izhodnem signalu. Neoznačeno protitelo izpostavimo ustreznemu antigenu (vzorec). Ta vezani protitelesni



oziroma antigeni kompleks potem dodamo v posodo (na trdo podlago) z vezanim antigenom. Podlago speremo in s tem odstranimo nevezana protitelesa (več kot je antigena v vzorcu, več kompleksov se tvori in zato manj nevezanih protiteles). Dodamo sekundarno protitelo, ki je povezano z encimom. Dodamo substrat, preostali encimi pa izločijo signal; največkrat pojav opazimo kot spremembo barve.

Za odkrivanje HIV-a je podlaga prekrita z antigeni HIV. Uporabimo dve specifični protitelesi: eno, povezano z encimom s konjugacijo, in drugo, prisotno v serumu (če je ta pozitiven za protitelo). Med protitelesoma se pojavi tekmovanje za isti antigen, kar povzroči močnejši signal. Serum predhodno izpostavimo temperaturi 37 stopinj Celzija in ga speremo. Če so prisotna protitelesa, je potek reakcije med njimi in antigenom uspešen. Tako za specifična protitelesa HIV, označena z encimom, ne ostane nobenega antigena. Ta protitelesa ostanejo nevezana in se s spiranjem odstranijo. Dodamo substrat; ker pa ni encima, na katerega bi lahko deloval, pozitiven rezultat ne pokaže barvne spremembe (A Bio-Rad Company: An introduction to ELISA).

V kemiluminiscenčnih testih ELISA je substrat omejujoči reagent v reakciji: ko se porabi, začne sevanje svetlobe upadati ter polagoma izgine. Dobro pripravljen postopek z uporabo pravilne razredčitve protiteles bo rezultiral v stabilni svetlobi, kar omogoča uspešno zaznavanje proteinov. Če protitelesa niso dovolj razredčena, je prisotnih preveč encimov, zato se bo substrat prehitro porabil ter nikoli ne bo dosežena stabilna svetloba. To je najpomembnejši vzrok za občutljivost kemiluminiscenčnih testov ELISA. Da bi se izognili tem problemom, je ključnega pomena, da dodamo ustrezno količino protiteles. Dobavitelji protiteles navadno predlagajo vrsto razredčitve za uporabo svojih protiteles v ELISA. Območje redčenja je pogosto primerno za poskuse, ki jih zaznavamo z razmeroma neobčutljivim kromogenim

substratom. Veliko večje redčenje pa je potrebno za srednjo učinkovitost z občutljivim kemiluminiscenčnim substratom.

## Zaključek

Svetlobni procesi (luminiscenca) kažejo svojo uporabnost na vsakem koraku. Veliko metod je še v razvojni fazi. Okoli nas je veliko materialov, za katere ne vemo, da se vajo svetlobo, ker nimamo dovolj občutljivih instrumentov, da bi opravili analizo. Velik izziv za raziskovalce so biološki materiali, ki ob reakcijah oddajajo svetlobo. Tovrstna vprašanja rešujejo interdisciplinarno, s povezovanjem in sintezo znanj. Na tem čudovitem področju raziskovalce čaka še veliko trdega dela in zanimivih spoznanj.

### Literatura:

- Mohan, A., Turro, N., 1974: *A facile and effective chemiluminescence demonstrations experiment. Journal of Chemical Education*, 54: 528-529.
- Jeran, M., Cvar, S., Podgoršek, A., 2012: *Uporaba fluorescenčnih barvil kot emisijskih občutljivcev pri kemiluminiscenčnih reakcijah v vodnem mediju. Kemija v šoli in družbi*, 42: 10-16.
- Vrtačnik, M.: *Projekt Operativnega programa razvoja človeških virov za obdobje 2007-2013, Po sledeh zločina - forenziki na delu, dostopno na: [http://kompetence.uni-mb.si/spletna\\_gradiva/183\\_KEM\\_Vrtacnik\\_gr6\\_PoSledehZlocina-forenzikiNaDelu.pdf](http://kompetence.uni-mb.si/spletna_gradiva/183_KEM_Vrtacnik_gr6_PoSledehZlocina-forenzikiNaDelu.pdf) (spletni vir, citirano: 17. 2. 2013, 16:00).*
- Jeran, M., Drofènik, I., 2010: *Študij uporabe kemiluminiscence luminola in organskih hidrazinov. Kemija v šoli in družbi*, 22 (4): 11-16.
- Homšak, M., 2011: *Uvedba emisijskega občutljivca v kemiluminiscenco hidrazidov aromatskih karboksilnih kislin. Raziskovalno delo, II. gimnazija Maribor (mentorja: Marko Jeran in Sanja Cvar).*
- Grofelnik, G., Drobnič, K., 2008: *Uporabnost forenzičnega Bluestar<sup>®</sup> Forensic testa pri latentnih krvnih sledih. Revija za kriminalistiko in kriminologijo*, 59 (2): 166-173.
- Araujo-Filho, J. L. S., Melo-Junior, M. R., Carvalho Jr., L. B., 2011: *Potential applications of the chemiluminescent methods in tumoral diseases investigation. International Journal of pharma and bio sciences*, 2: 392-400.
- Fereja H., T., Hymete, A., Gunasekaran, T., 2013: *A Recent Review on Chemiluminescence Reaction. ISRN Spectroscopy: 1-12.*
- A Bio-Rad Company: An introduction to ELISA,*

dostopno na: <http://www.abdserotec.com/an-introduction-to-elisa.html> (spletni vir, citirano 25. 2. 2014).

Wilson, R., Schiffrin, D. J., 1996: Chemiluminescence of Luminol Catalyzed by Electrochemically Oxidized Ferrocenes. *Analytica Chimica Acta*, 68: 1254–1257.

Barni, F., Lewis, W. S., Berti, A., Miskelly, M. G., Lago, G., 2007: Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta*, 72: 896–913.



**Marko Jeran** je študent Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani. Za luminiscenčne pojave se je začel zanimati že v srednji šoli, pri študiju pa zanimanje za tovrstne pojave še pogloblja. V službi je na Kemijskem inštitutu v Ljubljani, kjer je raziskovalno dejaven v skupini za organsko kemijo, ki jo vodi dr. Barbara Mohar. Raziskovalno delo nadgrajuje tudi v start-up podjetju PhosPhoenix SARRL v Franciji pri dr. Michaelu Stephanu. Vključen je v projektno-raziskovalno delo, ki obsega razvoj kiralnih kovinskih katalizatorjev za pripravo organskih spojin, zanimivih za farmacevtsko industrijo. Dejaven pa je tudi kot mentor dijakin in dijakov Biotehniškega izobraževalnega centra Ljubljana in Tehniške gimnazije v Ljubljani. Slovenska znanstvena fundacija mu je leta 2014 podelila priznanje za večletno odlično promoviranje in populariziranje znanosti.

Iz zgodovine slovenske geologije • *Gorski svetovalec Lipold*

## Gorski svetovalec Lipold

### Ob dvestoletnici rojstva prvega šolanega slovenskega geologa Marka Vincenca Lipolda

Mihael Brenčič

»Letos sta prišla v preiskavo Krajinskega in Goriškega dva učena gospoda, namreč gorski svetovalec Lipolt, rojen Slovenec iz spodnjega Štajarskega, in D. Stur, rojen Slovak. Prvi bode obhodil loški kanton, idrijske gore, potem celo krajnsko stran na levem bregu Save do koroske in štajarske meje, od Teržica do Zagorja. Priljudna gospoda, s kterima smo se v Ljubljani pomenkovali, sta nam razodela, da ona vsakemu, kteri koli od nju zavoljo posebnega kamnja ali rud, ki se v njegovem kraju nahajajo, kakega razjasnjenja ali nasvetovanja želi, iz serca rada po svoji vednosti in po svoji prepričbi brez plačila postrežeta. Njuni namen ni le zemlj-slovne posebnosti naše dežele nabirati, temuč tudi vse, karkoli nju vednost v povzdigo kmetijstva, gojzdnarstva in rudnarstva svetovati

zamore, vsakemu povedati.« To je besedilo, ki je del krajšega članka z naslovom *Zemlj-znanska preiskava Krajinskega in Goriškega*, objavljenega 31. maja leta 1856 v *Kmetijskih in rokodelskih novicah* v rubriki *Novičar iz austrijskih krajev*. Novinar se je podpisal z začetnico D. Za to kratico se je najverjetneje skrival duhovnik, zgodovinar in ljubiteljski naravoslovec Peter Hicingner. Med drugim je avtor prispevka zapisal tudi »Gotovo bo marsikteremu v korist, v rudništvu zvedena moža za svet poprašati pri kopanji rude, ker se mnogi brez vednosti v to reč zarinejo in dragi dnar in čas tratijo. Oba gospoda sta nas pa tudi naprosila, po »Novicah« na znanje dati, da bi ju možje, ktere ta vednostnika, v težavni preiskavi podpirali in jima posebnosti svojih