



Tübingen, den 16. Januar 2008

Chemolumineszenz und Farbstoffe

Bio- und Chemolumineszenz

Lumineszenz ist der Sammelbegriff für alle Arten von Leuchterscheinungen eines Systems unter Energieeinwirkung jeglicher Art. Unter dem Oberbegriff Lumineszenz verbirgt sich die Emission von Strahlung.

Die emittierte Strahlung beruht auf der Rückkehr angeregter Elektronen von einem angeregten Elektronenzustand in einen tiefergelegenen Elektronenzustand bzw. den Elektronengrundzustand. (Strahlende Desaktivierung)

Im Folgenden soll näher auf den Begriff der Chemo- und Biolumineszenz eingegangen werden.

Von Chemolumineszenz spricht man, wenn bei einer chemischen Reaktion Licht emittiert wird, wobei zu beachten ist, dass dieses nicht thermischen Ursprungs (Temperaturstrahlung) ist.

Thermolumineszenz tritt auf, wenn eine Probe langsam erwärmt wird, ohne sie zum Glühen zu bringen. Zunächst wird Wärmeenergie frei, anschließend wird Licht emittiert.

Wichtig bei der Chemolumineszenz ist, dass die Anregungsenergie aus der chemischen Reaktion selbst stammt. Die bei der Reaktion freiwerdende Energie wird in Form von Licht abgegeben.

Biolumineszenz bezeichnet die Fähigkeit von Lebewesen selbst Licht zu erzeugen. Biolumineszenz ist eine Spezialform der Chemolumineszenz. Sie basiert ebenfalls auf chemischen Prozessen bei denen Energie in Form von Licht abgegeben wird.

Das Grundschema einer Reaktion, das der Biolumineszenz zugrunde liegt, ist folgendes: Es handelt sich um eine Oxidationsreaktion eines Stoffes mit Sauerstoff. Durch enzymatische Katalyse wird ein bestimmter Stoff umgesetzt, wobei meistens eine Abspaltung einer Teilgruppe stattfindet.

Das beteiligte Enzym bezeichnet man als Luciferase, der umzusetzende Stoff als Luciferin.

Biolumineszenz erfüllt in der Natur verschiedene Funktionen, beispielsweise :

- dient es als Warn- oder Drohsignal
- dient zur Kommunikation unter Artgenossen
- dient zur Anlockung von Beute oder Sexualpartnern

Besonders verbreitet ist Biolumineszenz unter Meeresbewohnern. 90 % aller Tiefseeorganismen weisen Biolumineszenz auf. Auch bei Insekten ist Biolumineszenz weit verbreitet.



Abb. 1 *Aequorea victoria*

Aequorea victoria ist eine Quallenart aus dem Pazifischen Ozean, die an Nordamerikanischen Küsten vorkommt. Diese Quallenart besitzt hell fluoreszierende Punkte um den Seitenrand des Glockenkörpers. Der biologische Zweck dieses Leuchtorgans ist noch nicht verstanden.

Die Fluoreszenz tritt in Verbindung mit einer vorangehenden Chemolumineszenzreaktion auf. Aequorin ist ein Photoprotein, das blaues Licht ausstrahlt. Die Chemolumineszenz beruht auf der Bindung von Ca^{2+} - Ionen an Aequorin. Ein zusätzliches fluoreszierendes Protein, GFP (grün fluoreszierendes Protein), ist in der Lage das blaue, vom Aequorin stammende, Licht zu absorbieren (auch UV-Strahlung führt zur Anregung) und die Energie in Form von grüner Fluoreszenz zu emittieren.

In der Molekularbiologie macht man sich das GFP-Gen zu nutze, in dem man es spezifisch mit anderen Proteingenen fusioniert. Durch die Fluoreszenz des GFP kann die räumliche und zeitliche Expression anderer Proteine in lebendem Gewebe direkt beobachtet werden.

Fluorescein Darstellung

Geräte : Reagenzglasklammer, Reagenzglas, Becherglas (500ml oder größer), UV-Lampe

Chemikalien: 0,75g Phthalsäureanhydrid, 1,5g Resorcin, 0,5g Zinkchlorid, verd. NaOH, H_2O

Durchführung:

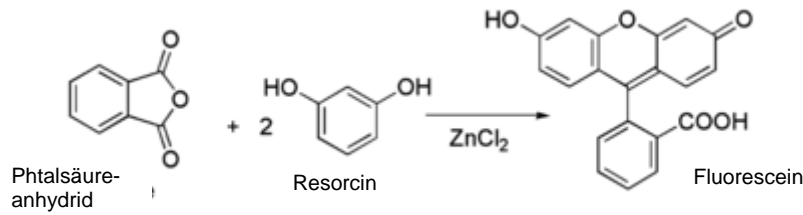
In einem Reagenzglas werden 0,75g Phthalsäureanhydrid, 1,5g Resorcin und 0,5g Zinkchlorid vorsichtig erhitzt, bis eine rote Schmelze entsteht. Nach dem Abkühlen fügt man wenig verd. NaOH zu und gießt den Reagenzglasinhalt in ein großes, mit Wasser gefülltes, Becherglas.

Beobachtung:

Es ist eine deutlich grüne Fluoreszenz zu beobachten, die unter UV-Licht verstärkt wird.

Erklärung:

Es reagieren jeweils ein Molekül Phthalsäureanhydrid und zwei Moleküle Resorcin zu einem polyzyklischen Ringsystem. Das ausgedehnte π -Elektronensystem wird durch Lichtabsorption angeregt und gibt die aufgenommene Energie in Form von Fluoreszenz wieder ab.



Anwendung:

Fluorescein ist ein Fluoreszenzfarbstoff der bei Anregung mit blauem Licht grünes Licht (Wellenlängenbereich 520 –530 nm) emittiert. In der Immunologie findet er Verwendung bei der FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting). Dabei können Zellen mit Fluorescein markierten Antikörpern gekoppelt werden und dadurch sichtbar gemacht werden. Durch Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe und Antikörpern können Zellen voneinander getrennt und unterschieden werden.

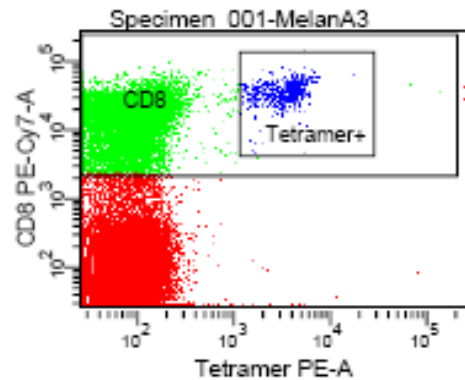


Abb.2 Dot Plot, Ergebnis der FACS-Analyse

Fluorescein wird weiterhin zum Nachweis von Br^- eingesetzt. Der Nachweis beruht auf der Bromierung des Fluorescein, wobei Tetrabromfluorescein (Eosin) entsteht, welches rot ist.

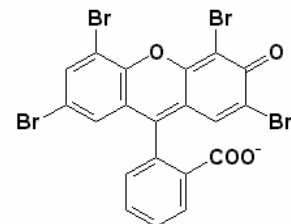


Abb. 3 Tetrabromfluorescein

Chemolumineszenz des Luminol

Geräte: 2000ml Becherglas, 2x 600ml Bechergläser, 2x 400ml Bechergläser

Chemikalien: 1g Luminol, 10%ige NaOH, 3%ige Kaliumhexacyanoferrat(III)-lösung, 30%ige H_2O_2 -Lösung, dest. H_2O

Ansetzen der Lösungen: **Lösung A:** 1g Luminol, 50 ml 10%ige NaOH-Lösung in 450ml H_2O

Lösung B: 500ml 3%ige Kaliumhexacyanoferrat(III)-lösung (15g in 485 ml H_2O)

Vorbereitung:

Lösung C: 50ml Lösung A in 350ml H_2O geben

Lösung D: 50ml Lösung B in 350ml H_2O geben und 3ml 30%iges H_2O_2 hinzugeben

Versuchsdurchführung:

In einem 2000ml Becherglas befinden sich einige Körnchen Kaliumhexacyanoferrat(III). Die Lösungen C und D werden gleichzeitig in das Becherglas gegossen.

Beobachtung: Beim Ineinandergießen beider Flüssigkeiten tritt helles, blaues Leuchten ein.

Anwendung:

Luminol findet in der Kriminalistik beim Nachweis von Blutspuren Anwendung. Unter Einwirkung von H_2O_2 wird Luminol (5-Amino-1,2,3,4-tetrahydrophthalazin-1,4-dion) zuerst zu Diazachinon und anschließend zu einem Peroxidation oxidiert. Aufgrund der katalytischen Wirkung des im Häm enthaltenen komplexierten Fe^{2+} , erfolgt eine Abspaltung von N_2 unter Entstehung des Aminophtalsäuredianions in einem angeregten Zustand. Unter Lichtabgabe wird der energetische Grundzustand wieder erreicht.

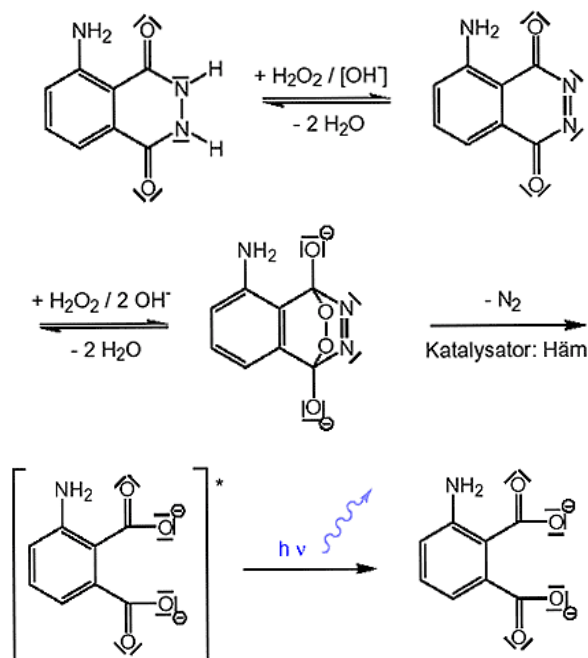


Abb. 4 Reaktionsschema zur Luminol-Chemolumineszenz

Luminol findet weiterhin Anwendung in der Untersuchung pflanzlicher Abwehrreaktionen. Pflanzen reagieren auf ein Pathogen unter anderem mit der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, wobei in der pflanzlichen Zelle H_2O_2 gebildet wird. Das entstandene H_2O_2 kann durch eine enzymatisch katalysierte Oxidation von Luminol in Anwesenheit von H_2O_2 zu oxidiertem Luminol umgesetzt werden. Bei der Reaktion wird Energie in Form von Licht frei, welches in einem Luminometer registriert werden kann.

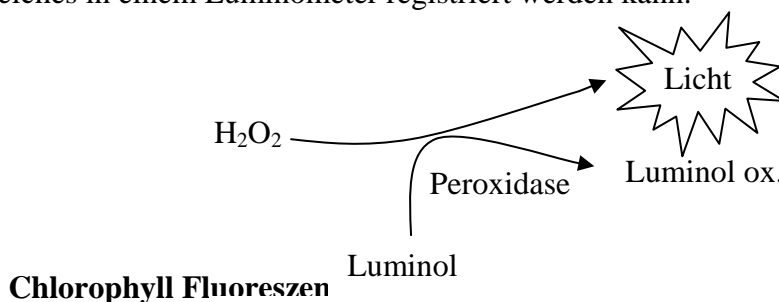


Abb. 5 Messung des „Oxidativen Burst“

Geräte: Mörser, Pistill, Filtertrichter, Filterpapier, Petrischale, Messzylinder, UV-Lampe, Schere

Chemikalien: Aceton, CaCO₃, Seesand, grüne Blätter (Tomate)

Herstellung einer Rohchlorophyll-Lösung

Die Blätter werden in kleine Stücke zerschnitten und in einem Mörser mit 30 ml Aceton (für die Extraktion des Chlorophylls) unter Zusatz von ca. 5g Seesand und 1g CaCO₃ (zur Neutralisation des sauren Zellsaftes) verrieben. Der erhaltene Chlorophyllextrakt (in dem außerdem Carotinoide und Xantophylle enthalten sind) wird filtriert.

Versuchsdurchführung:

Der gewonnene Chlorophyllextrakt wird in eine Petrischale gegeben und im Dunkeln mit UV-Licht bestrahlt. Sofort tritt die charakteristische blutrote Fluoreszenz des Chlorophylls auf. Von den in dem Zellsaftextrakt enthaltenen Pigmenten zeigt nur Chlorophyll eine Eigenfluoreszenz.

Erklärung:

Durch die UV-Strahlung werden die Chlorophyllmoleküle elektronisch angeregt. Bei der Rückkehr der Chlorophyll-Moleküle in den Grundzustand wird die elektronische Anregungsenergie in Form roter Lichtquanten abgegeben.

In lebenden Pflanzen wird die Energie der Anregung durch Sonnenlicht zum größten Teil für die Photosynthese genutzt und nur ein geringer Teil wird als Wärme oder Fluoreszenz an die Umgebung abgegeben.

Indigosynthese nach A. von Baeyer

Geräte: Magnetrührer, Rührfisch, 100 ml Becherglas, (Saugflasche, Büchnertrichter, Nutsche, Filterpapier, Wasserstrahlpumpe)

Chemikalien: 1g o-Nitrobenzaldehyd, 3ml Aceton, 4ml H₂O, 4 ml 1N NaOH

Durchführung:

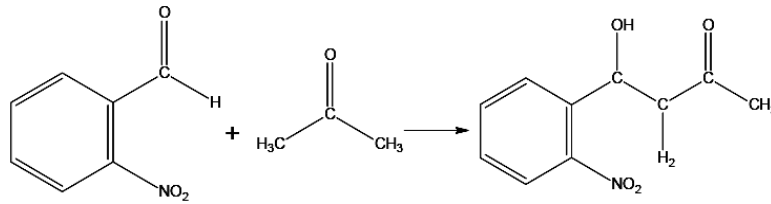
In einem 100 ml Becherglas wird 1g o-Nitrobenzaldehyd in 3 ml Aceton gelöst und 4 ml H₂O zugegeben. Der klaren Lösung werden 4 ml 1N NaOH unter Rühren zugetropft.

Beobachtung:

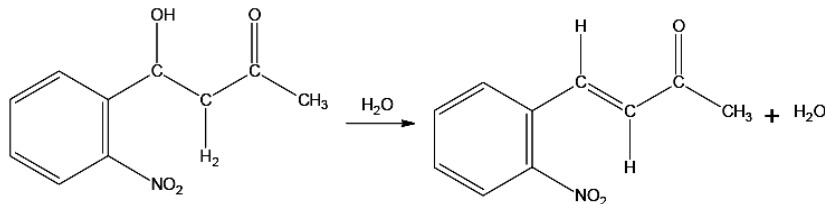
Es tritt eine leichte Erwärmung ein, die Lösung färbt sich dunkel, es fällt ein dunkler Niederschlag aus der einen deutlichen metallisch-kupferfarbenen Oberflächenglanz aufweist.

Der Niederschlag kann abgesaugt und anschließend mit Ethanol gewaschen werden. Das Produkt ist ein kristallines metallisch-kupferfarben glänzendes Pulver.

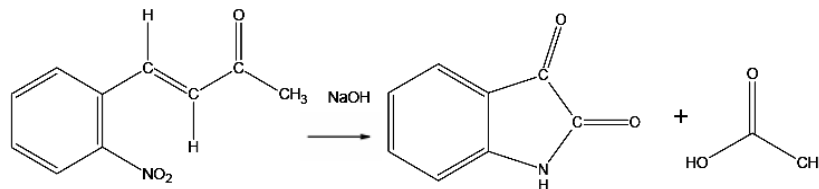
Erklärung: Zuerst erfolgt eine Kondensation von o-Nitrobenzaldehyd mit Aceton in alkalischer Lösung.



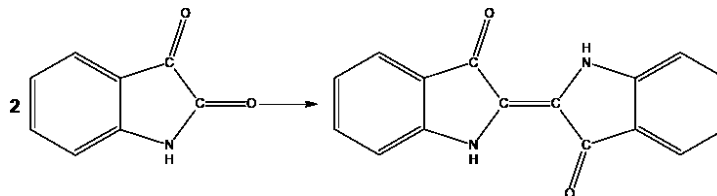
Das zugegebene Wasser wirkt katalytisch und führt dazu, dass sich unter Abspaltung von H_2O eine Doppelbindung ausbildet.



Nach Zugabe von NaOH entsteht unter Abspaltung von Essigsäure Isatin.



Im letzten Schritt verbinden sich zwei Moleküle Isatin zu einem Molekül Indigo unter Freigabe von O_2 .



Das wichtigste Technische Verfahren zur Synthese von Indigo ist die von Karl Heumann entwickelte Heumann'sche Synthese. Von geschichtlicher Bedeutung ist die Synthese nach A. von Baeyer, dem die erste künstliche Herstellung von Indigo gelang. Die pflanzliche Gewinnung von Indigo erfolgt aus der indischen Indigofera-Pflanze.

Färben von Baumwolle mit Indigo

Geräte: 2 Bechergläser (100ml, 250ml), Magnetrührer, Rührfisch, Thermometer, Tiegelzange oder Pinzette

Chemikalien: 5 NaOH-Plätzchen, 0,5g Indigo, 1g Natriumdithionit, 50ml Wasser, zusätzliches Wasserbad

Durchführung:

In einem 100 ml Becherglas werden 0,5g Indigo, 1g Natriumdithionit und 5 NaOH-Plätzchen in 50 ml H₂O gelöst und auf (ca. 70 °C) erhitzt.

Nach kurzer Zeit färbt sich die ursprünglich dunkelblaue Lösung schmutzig gelb, nur an der Oberfläche bleibt die Lösung blau. Die entstandene Lösung (= Küpe) wird in ein, mit 250 ml Wasser gefülltes, Becherglas überführt. Darin werden die zu färbenden Baumwollfetzen eingetunkt und die Lösung bis zum Sieden erhitzt. Die Lösung darf dabei nicht gerührt werden, um eine Sauerstoffzufuhr zu vermeiden.

Nach ca. 5 Minuten können die Baumwollfetzen entnommen, kurz mit Wasser abgespült und an der Luft getrocknet werden.

Beobachtung: Die leicht geblichen Baumwollfetzen färben sich an der Luft sofort intensiv blau.

Erklärung: Indigo ist ein wasserunlöslicher Küpenfarbstoff. Durch Zugabe von Natriumdithionit, das als Reduktionsmittel fungiert, geht der wasserunlösliche blaue Indigofarbstoff in die wasserlösliche, gelbe Leuko-Form über. Durch Oxidation mit Luftsauerstoff entsteht aus der Leuko-Form erneut der wasserunlösliche blaue Indigofarbstoff.

Anwendung: Indigo ist der älteste bekannte organische Farbstoff und findet als solcher schon sehr lange in der Textilfärbung Anwendung.

Ein neuzeitlicherer Einsatz findet Indigo in der Immunologie im Bereich der ELISPOT-Technologie (ELISPOT- Enzyme Linked Immuno Spot Technique).

Indigo dient hier zur Detektion produzierter enzymgekoppelter Antikörper. Bei dem an den Antikörper gekoppeltem Enzym handelt es sich um eine Alkalische Phosphatase, d.h. einem Enzym, welches in der Lage ist von einem Substrat einen Phosphatrest abzuspalten.

Als Substrat dient 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat. Der Phosphatrest wird enzymatisch abgespalten und Indoxyl mit Hilfe eines Oxidationsmittels (Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid) zu Indigo oxidiert. Indigo schlägt sich als farbiger Niederschlag an der Stelle nieder an der der enzymgekoppelte Antikörper gebunden wurde.

