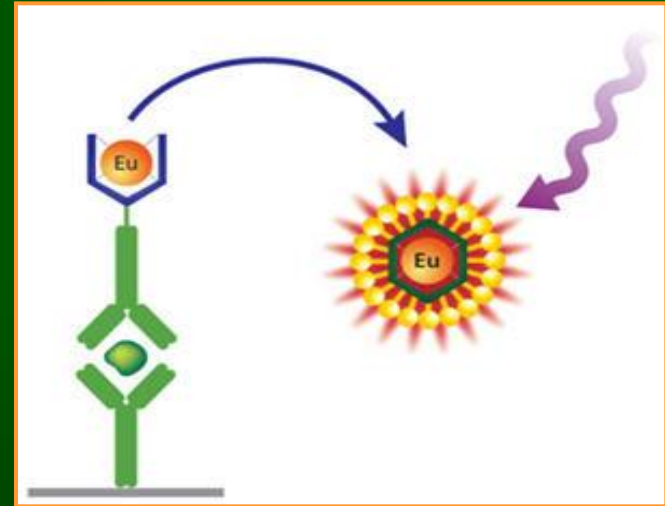


DELFLIA

Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent ImmunoAssay

- Fluoroimunoanalytická metoda
 - velmi citlivá metoda
 - specifická metoda
- Stanovení analytů
 - nízkomolekulárních
 - vysokomolekulárních
 - finská firma Wallac Oy

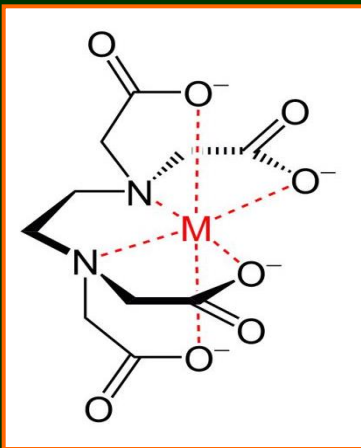
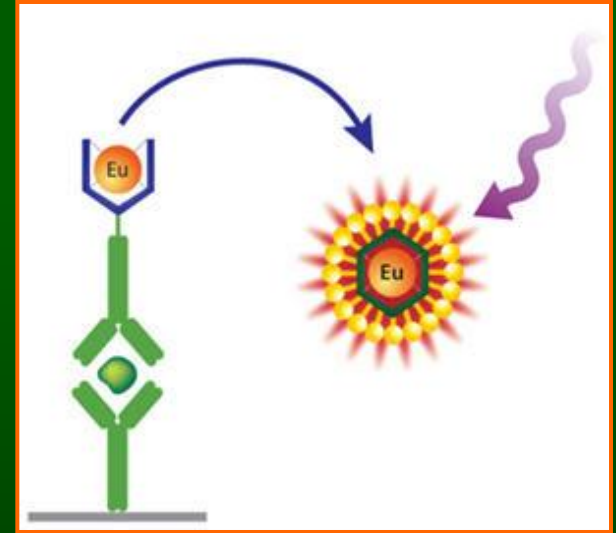


1	2	skupení prvku (při 20° C)																oxidací číslo										elektronová konfigurace										18	19	20																																																																															
1	H	He																																					He	HeLIUM	2																																																																														
2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
lanthanoidy		Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu																																																																																																								
aktinoidy		Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr																																																																																																								

- využívá časově modulované měření fluorescence chelátu lanthanidů
 - Europium
 - Terbium
 - Samarium
 - Dysprosium

DELFI A - princip

- Protilátka nebo antigen označeny fluorescenční sondou – stabilním chelátem lanthanidu
 - nejčastěji **Europium**
- Po proběhlé imunochemické reakci:
 - přidání „zesilovacího“ roztoku ke vzniklému komplexu
 - odtržení **Eu** z komplexu
 - přeměna **Eu** na nový intenzivně fluoreskující chelát (s novým - luminogenním ligandem)

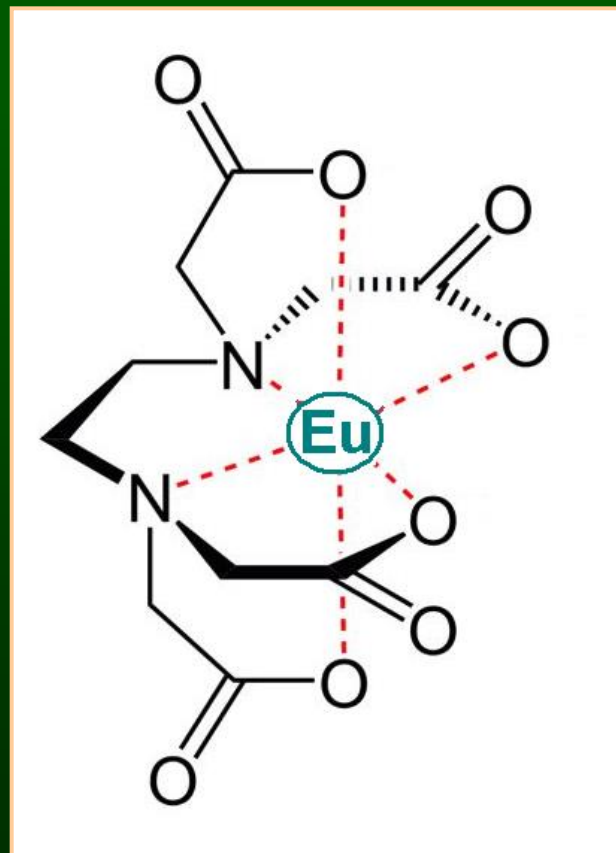
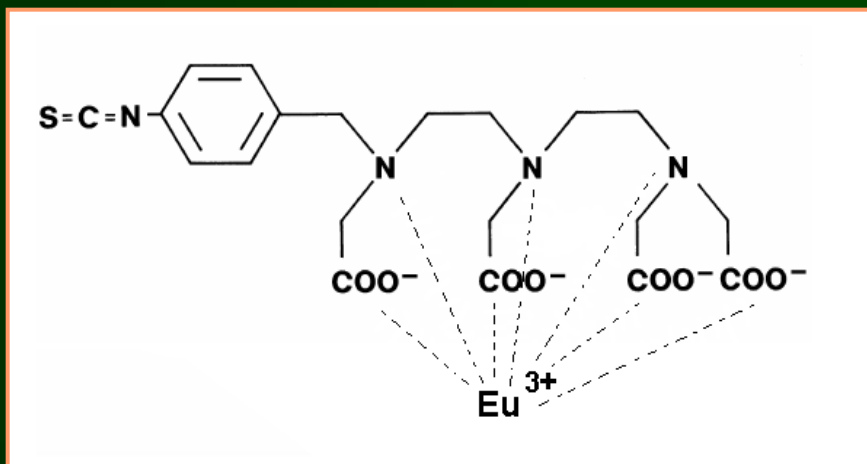
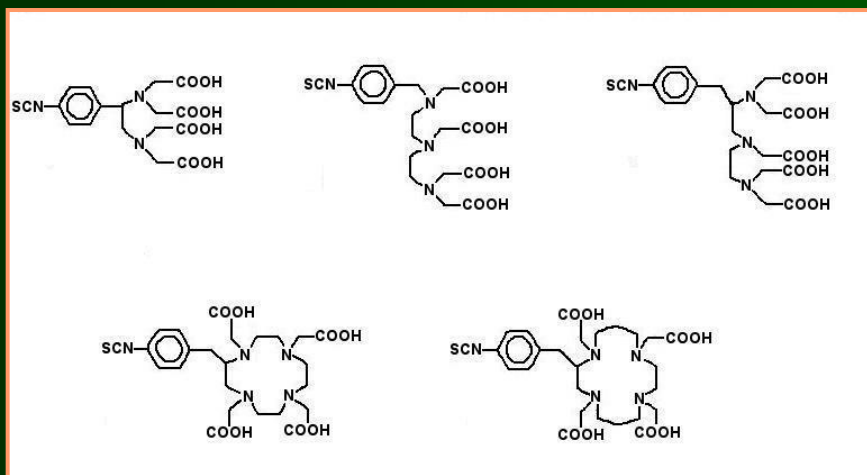


Cheláty

- komplexní (koordinační) sloučeniny centrálního atomu a dvoj- nebo vícevazných ligandů
- ligandy tvoří s centrálním atomem cyklická uspořádání
 - chelátový efekt - významné zvýšení stability komplexů ve srovnání s jednovaznými ligandy

DELFIA - Chelátové značení protilátek

- nejčastěji cheláty lanthanidu s izothiokyanátofenyl-deriváty polyaminopolyoctových kyselin (EDTA, DTTA, DTPA,...)

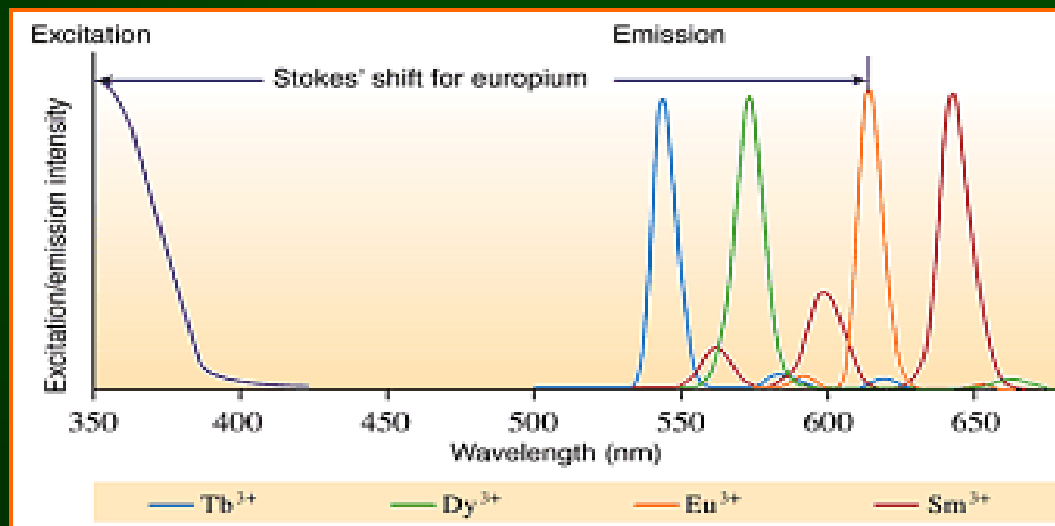


DELFA

Po proběhlé imunochemické reakci vzniká

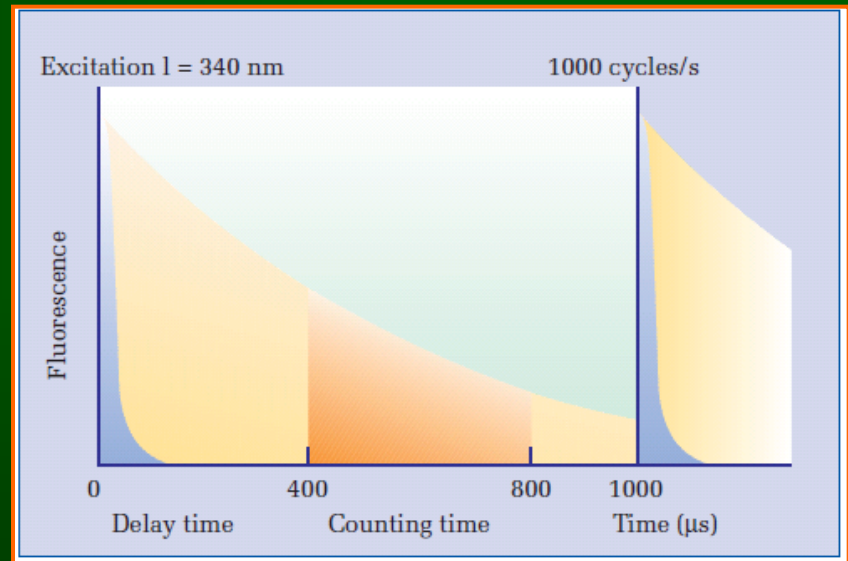
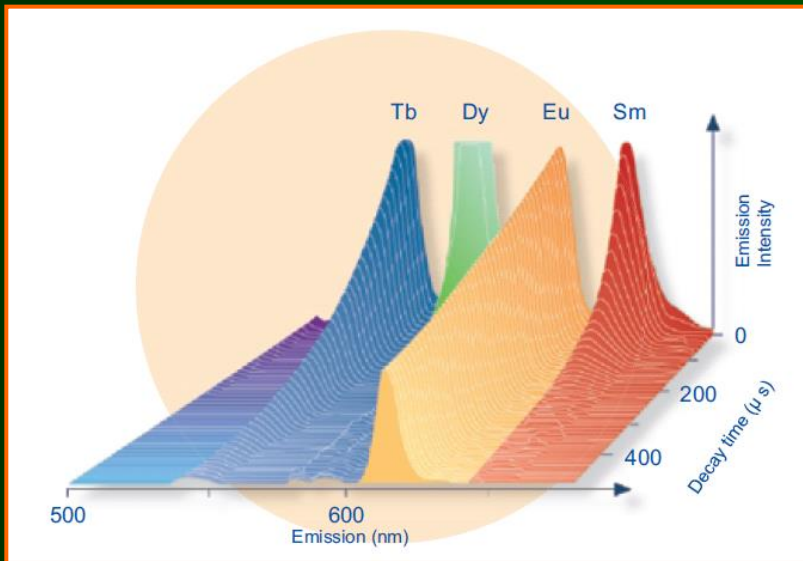
Fluoreskující chelát (s novým - luminogenním - ligandem):

- Fluorescence s velkým **Stokesovým posunem** fluorescenčního spektra (rozdíl mezi vlnovou délkou excitace a fluorescence)
- Vzorek pulzně excitován zářením o vlnové délce 340 nm
- Fluorescence měřena v dlouhovlnné části viditelného spektra (Eu - 620 nm)
 - eliminace pozadí (případná fluorescence matrice se projevuje pouze v krátkovlnnější oblasti)



DELFLIA - Time-resolved fluorometry (TRF)

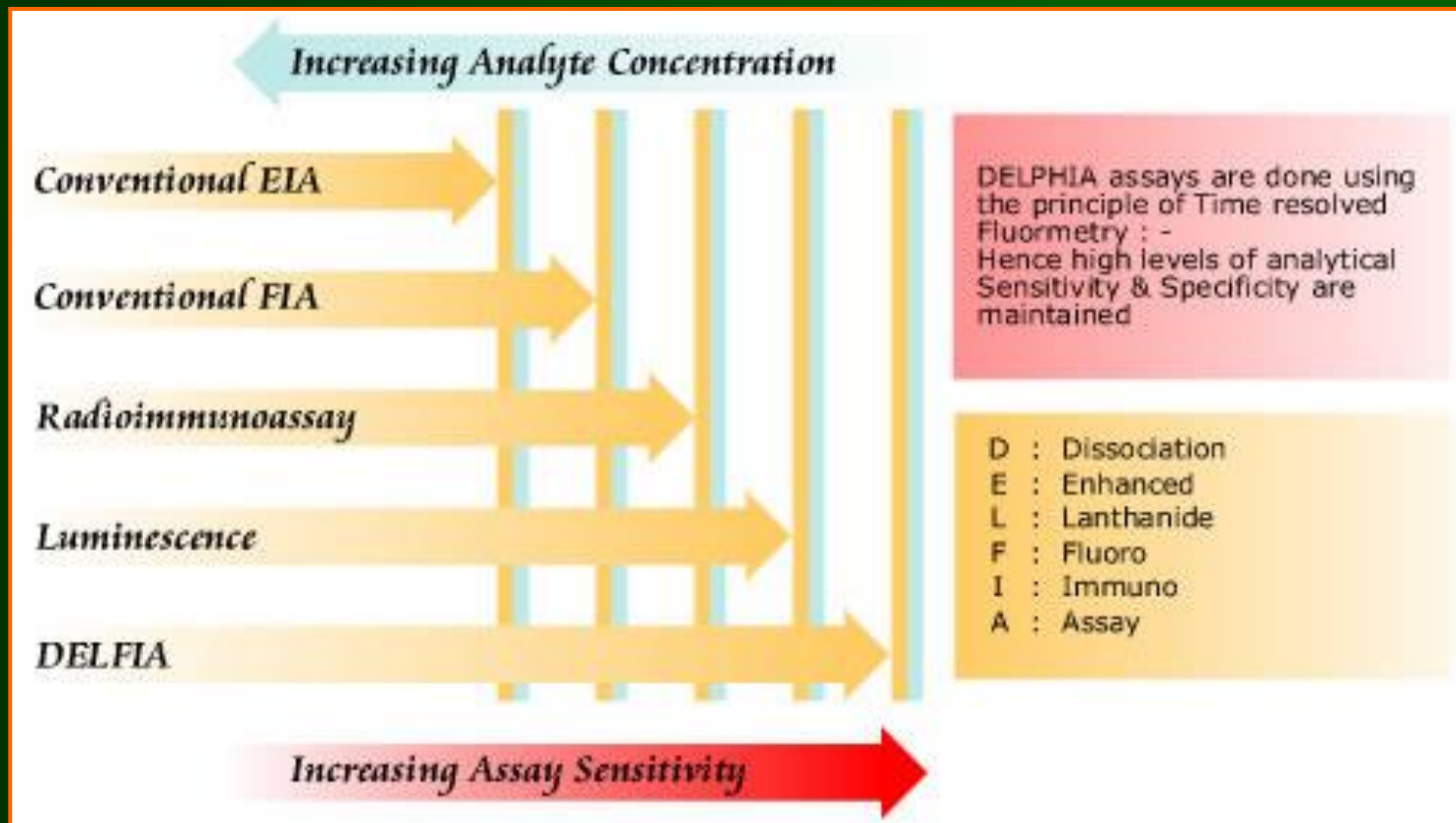
- fluorescence je **dlouhodobá**
 - doba emise delší než u běžných fluoroforů - řádově stovky mikrosekund



- Fluorescenční záření se začne měřit se zpožděním stovek mikrosekund (začíná v době, kdy už vyhasla fluorescence pozadí, která je podstatně kratší – nanosekundy) a samotné měření trvá také 400 mikrosekund.
- Cyklus (pulsní excitace - prodleva - měření) trvá 1 milisekundu, během měření vzorku (1 sekunda) se tedy 1000x opakuje

DELPHIA

- Vysoká citlivost a špecifita



DELFLIA

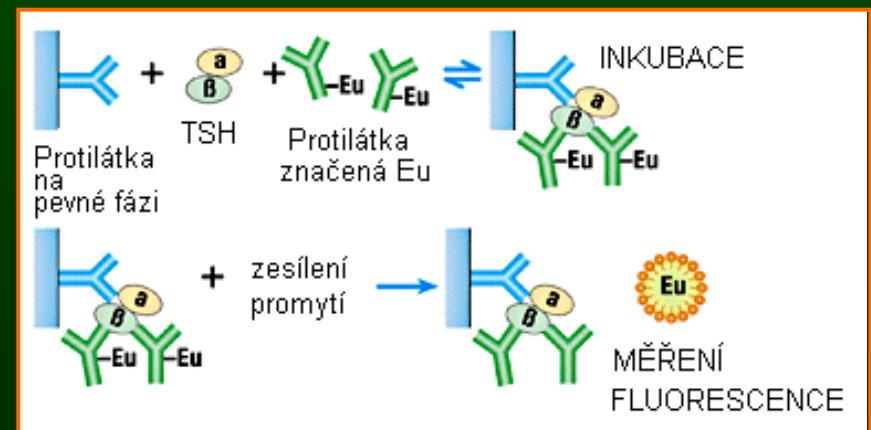
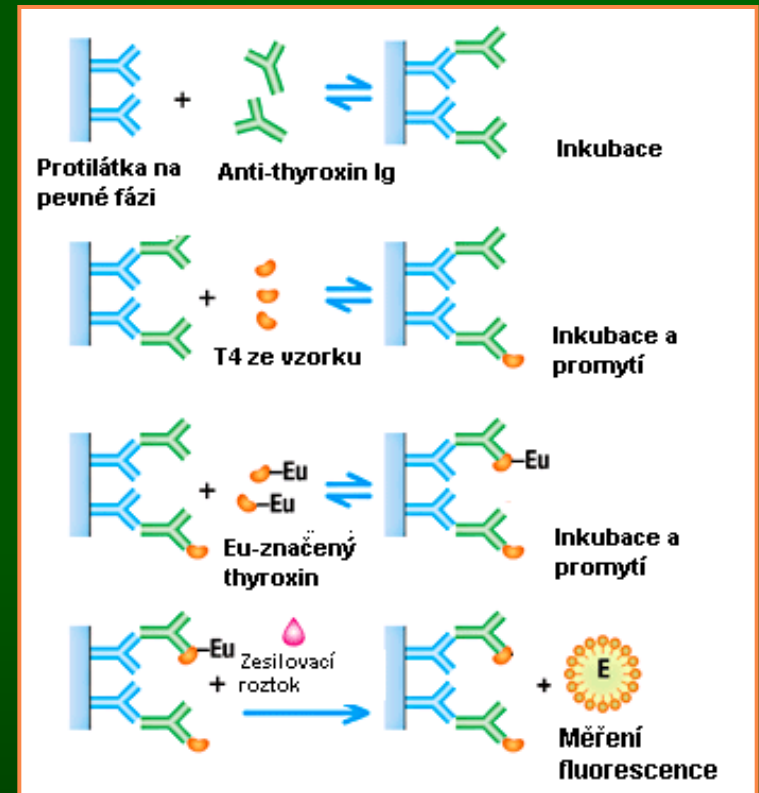
Uspořádání imunochemické reakce:

- kompetitivní:

- fluorescenční sondou značený antigen
- intenzita fluorescence nepřímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku

- nekompetitivní (sendvičové):

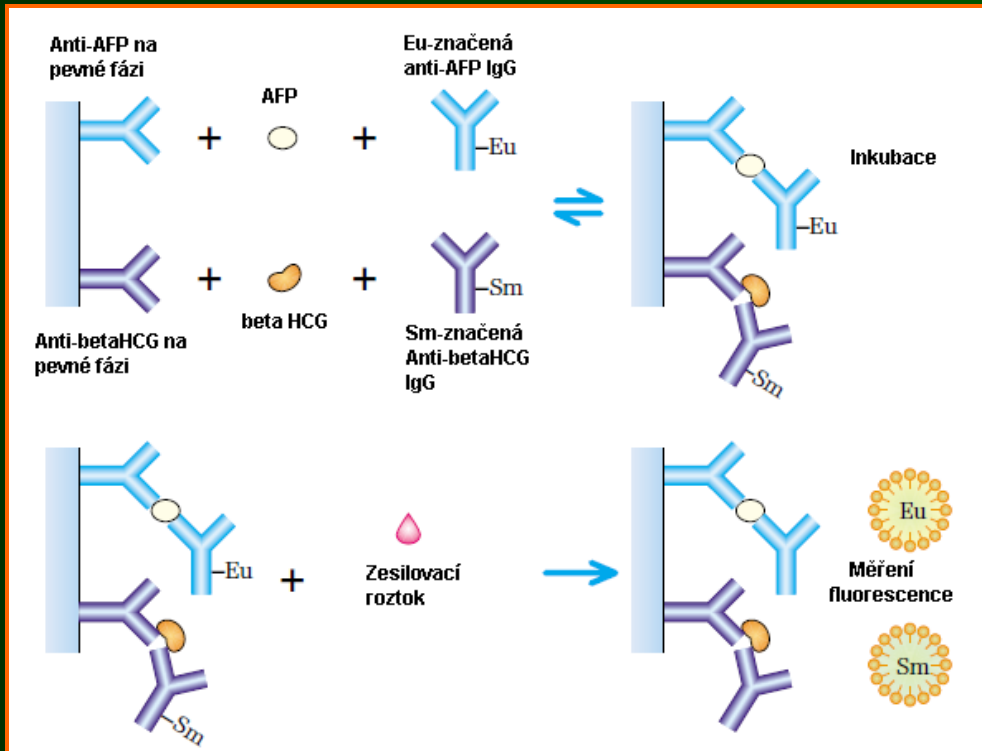
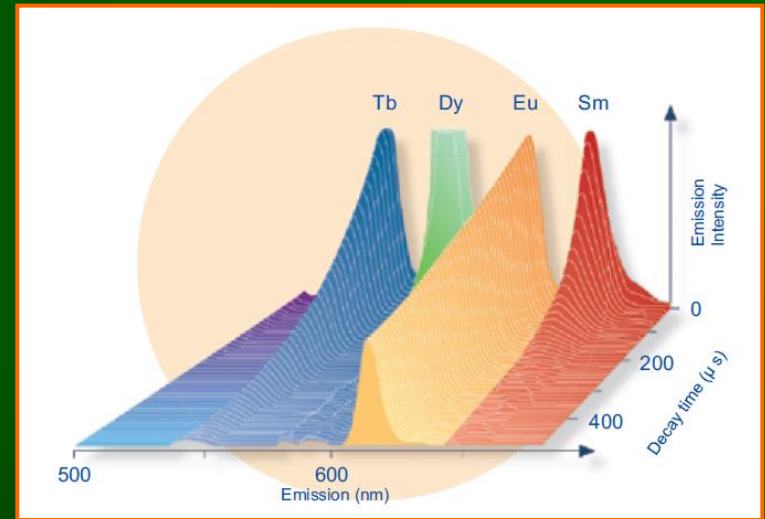
- fluorescenční sondou značená protilátka
- intenzita fluorescence přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku



DELFLIA - současné stanovení více analytů

Fluorescence lanthanidů:

- Úzké emisní píky při různých vlnových délkách (Eu 613 nm, Sm 643 nm)
- Různá doba trvání fluorescence Eu, Sm



- Při měření se nepřekrývají vlnové délky ani časy odečtu fluorescence Eu a Sm - umožňuje současné stanovení dvou analytů

DELFLA - využití

DELFLA lze použít pro široké spektrum analytů (v principu lze lanthanidem označit každou stabilní sloučeninu obsahující aminoskupinu):

- Proteiny
- Peptidy
- Oligonukleotidy
- Malé organické molekuly (steroidy, aminokyseliny, léky,...)

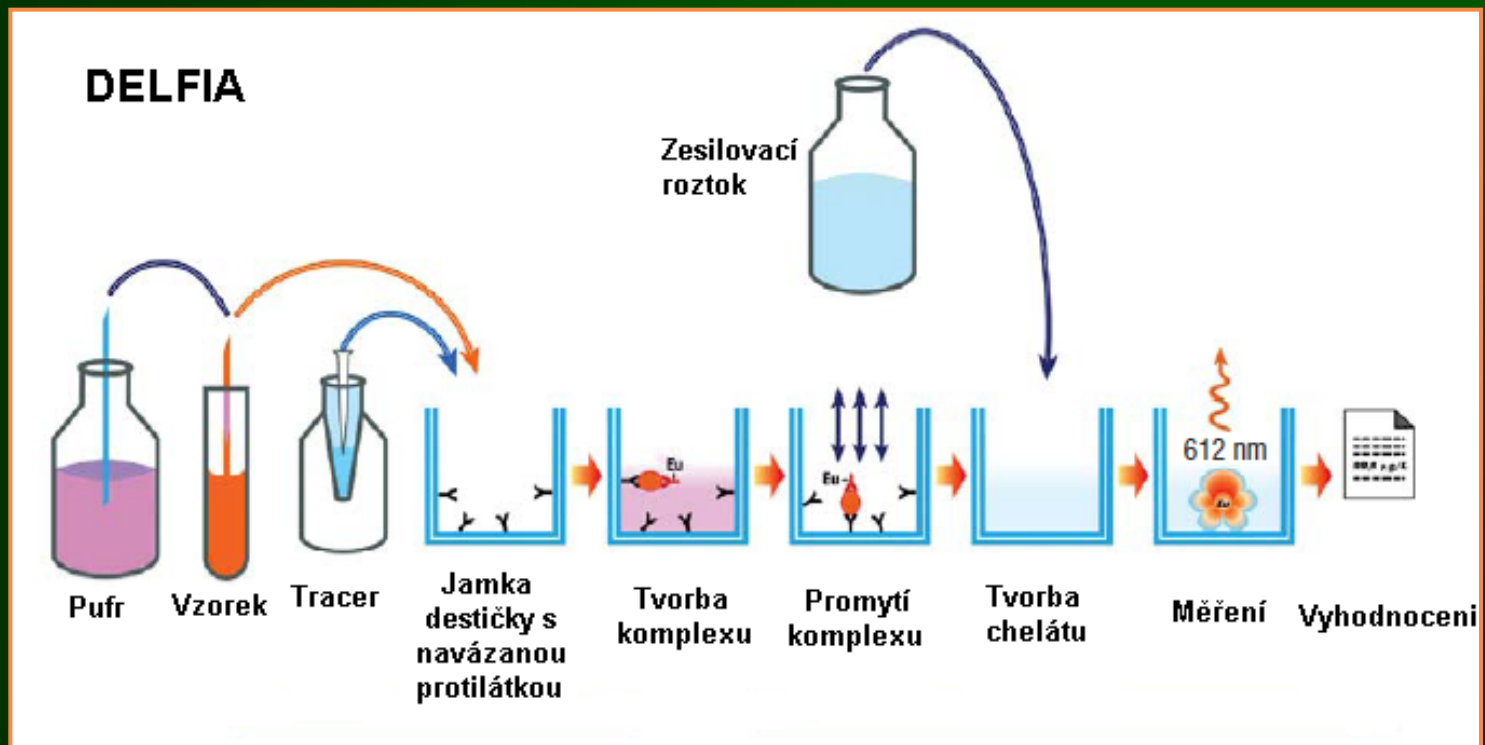
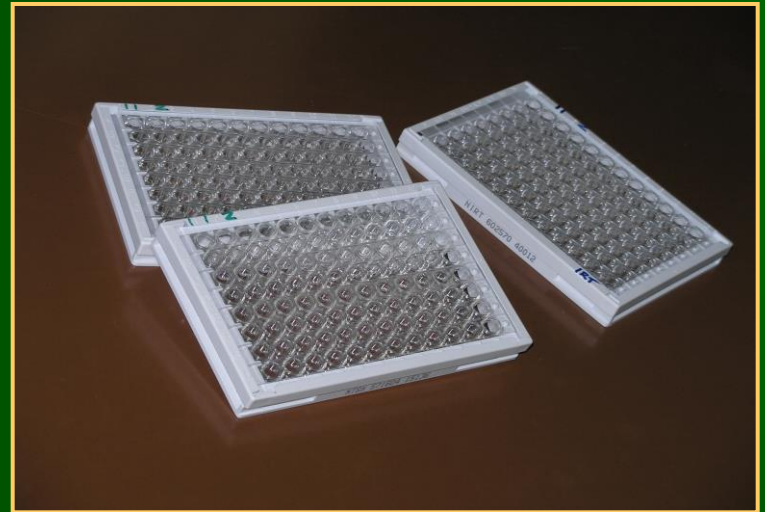
Novorozenecký screening (stanovení ze suché krevní skvrny):

- TSH (kongenitální hypotyreóza)
- 17-hydroxy-progesteron (kongenitální adrenální hyperplázie)
- Imunoreaktivní trypsinogen IRT (cystická fibróza)

DELFLIA

praktické provedení

- Pracuje se v mikrotitračních destičkách v uspořádání 8x12 jamek se specifickou protilátkou (obvykle monoklonální) vázanou na pevné fázi



DELFLIA (suchá krevní skvrna)

1 Vyrážení terčků (razička)



2 Dávkování činidel



3 Inkubace, třepání



4 Odstranění terčků z jamek (vakuová odsávačka)



5 Promytí destičky (promývačka)



6 Měření na fluorometru po přidání zesilovacího roztoku



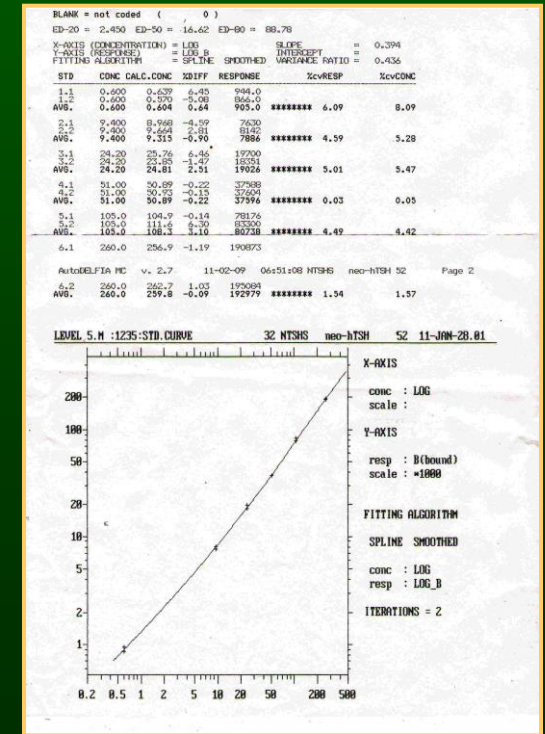
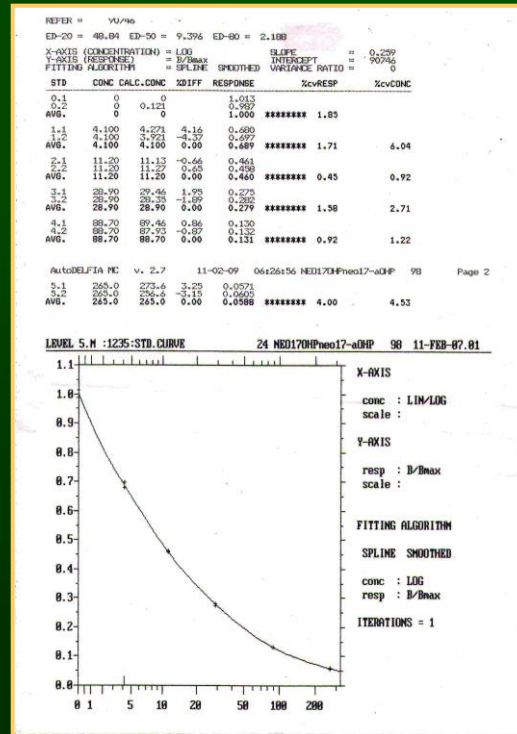
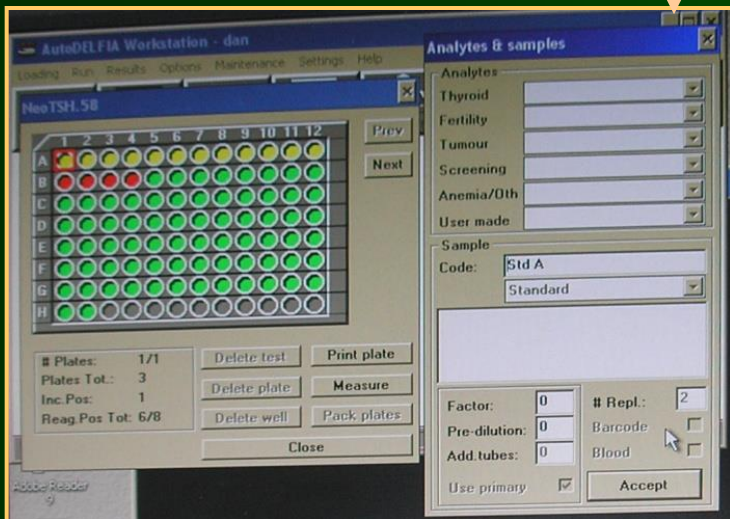
DELFLIA – suchá krevní skvrna



← Diagnostický set obsahuje mikrotitrační destičky, roztoky, kalibrátory a kontroly (ve formě suché krevní skvrny)

Umístění kalibrátorů, kontrol a patientských vzorků na destičce ● kalibrátor ● kontrola ● pacient

Softwarově zpracovaná kalibrační křivka: kompetitivní uspořádání sendvičové uspořádání



DELFIA X AutoDELFIA

„Manuální“ linka DELFIA



Analyzátor AutoDELFIA



- Metodu DELFIA lze plně automatizovat při práci s kapalným materiálem (plasma, sérum)
- Při práci se suchou krevní skvrnou není dosud běžná automatizace prvního kroku (vyrážení terčů)

Děkuji za pozornost...

*...a za to, že
k dané
problematice
nepřístupujete
tímto způsobem...*

