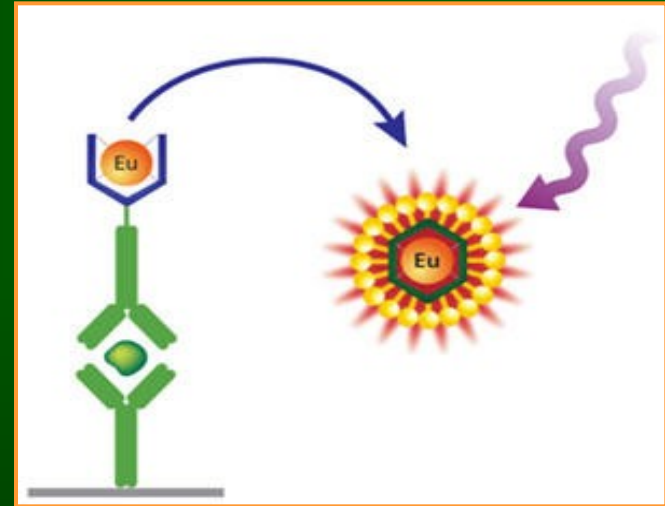


DELFA

Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent ImmunoAssay

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

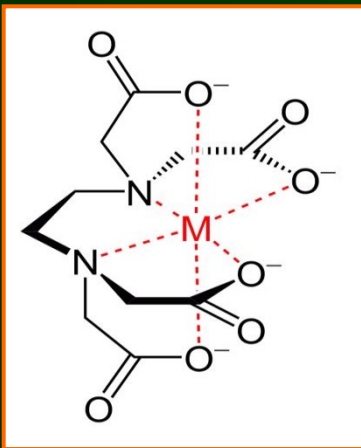
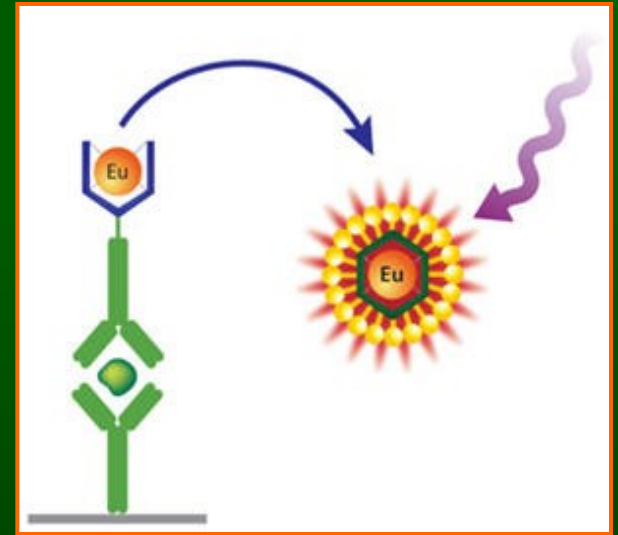


| skupení prvku (př. 20°C) | | atómové číslo | | elektronová konfigurace | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|----|----------------------|-----|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| první | | druhé | | značka | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| latinský název prvku | | latinský název prvku | | latinský název prvku | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| hmotnostní číslo | | hmotnostní číslo | | hmotnostní číslo | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | H | 2 | He | 10 | Ne | 18 | Ar | 36 | Kr | 54 | Xe | 86 | Rn | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | Li | 4 | Be | 11 | Na | 12 | Mg | 19 | K | 20 | Ca | 27 | Rb | 37 | Rb | 55 | Cs | 87 | Fr | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | B | 10 | C | 13 | Al | 14 | Si | 21 | Sc | 22 | Ti | 23 | V | 24 | Cr | 25 | Mn | 26 | Fe | 27 | Co | 28 | Ni | 29 | Cu | 30 | Zn | 31 | Ga | 32 | Ge | 33 | As | 34 | Se | 35 | Br | 36 | Kr | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | P | 16 | S | 23 | V | 24 | Cr | 31 | Ga | 32 | Ge | 33 | As | 34 | Se | 35 | Br | 36 | Kr | 41 | Nb | 42 | Mo | 43 | Tc | 44 | Ru | 45 | Rh | 46 | Pd | 47 | Ag | 48 | Cd | 49 | In | 50 | Sn | 51 | Sb | 52 | Te | 53 | I | 54 | Xe | | | | | | | | | | |
| 33 | As | 34 | Se | 41 | Nb | 42 | Mo | 43 | Tc | 44 | Ru | 45 | Rh | 46 | Pd | 47 | Ag | 48 | Cd | 49 | In | 50 | Sn | 51 | Sb | 52 | Te | 53 | I | 54 | Xe | 59 | Pr | 60 | Nd | 61 | Pm | 62 | Sm | 63 | Eu | 64 | Gd | 65 | Tb | 66 | Dy | 67 | Ho | 68 | Er | 69 | Tm | 70 | Yb | 71 | Lu |
| 81 | Tl | 82 | Pb | 83 | Bi | 84 | Po | 85 | At | 86 | Rn | 87 | Fr | 88 | Ra | 89 | Ac | 90 | Th | 91 | Pa | 92 | U | 93 | Np | 94 | Pu | 95 | Am | 96 | Cm | 97 | Bk | 98 | Cf | 99 | Es | 100 | Fm | 101 | Md | 102 | No | 103 | Lr | | | | | | | | | | | | |
| 118 | Og | 119 | Uue | 120 | Uub | 121 | Uuq | 122 | Uuh | 123 | Uuo | 124 | Uuq | 125 | Uuh | 126 | Uuo | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

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

DELFI A - princip

- Protilátka nebo antigen označeny fluorescenční sondou – chelátem lanthanidu
 - nejčastěji **Eu**ropium
- Po proběhlé imunochemické reakci:
 - přidání „zesilovacího“ roztoku ke vzniklému komplexu
 - odtržení **Eu** z komplexu
 - přeměna **Eu** na nový intenzivně fluoreskující chelát



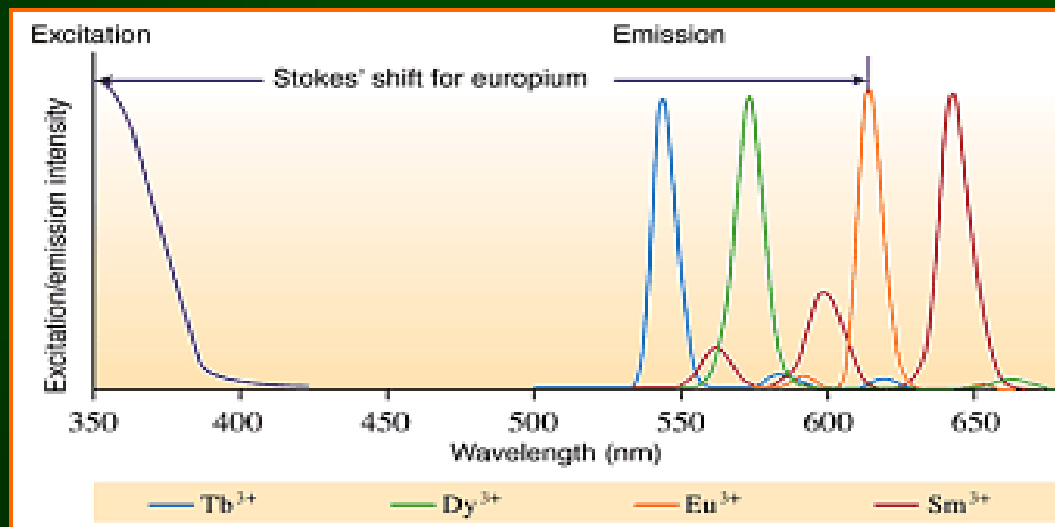
Cheláty

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

DELFA

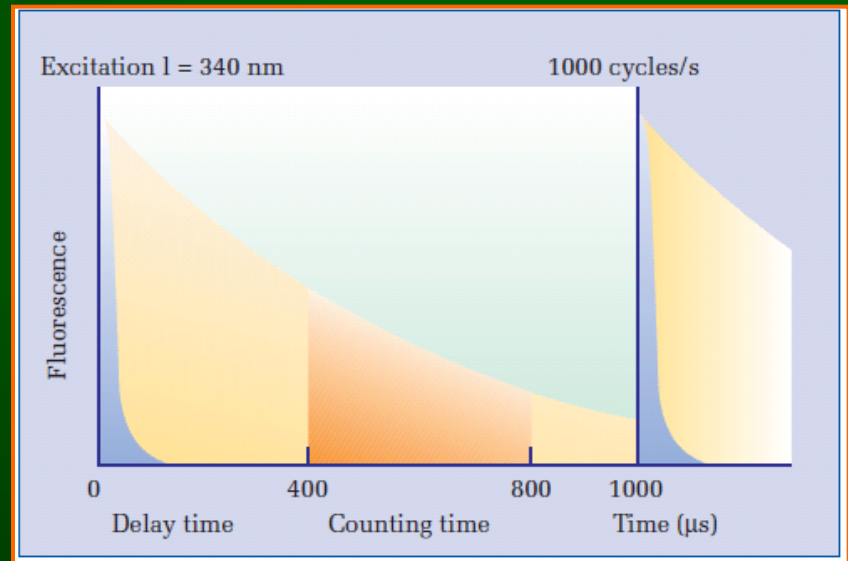
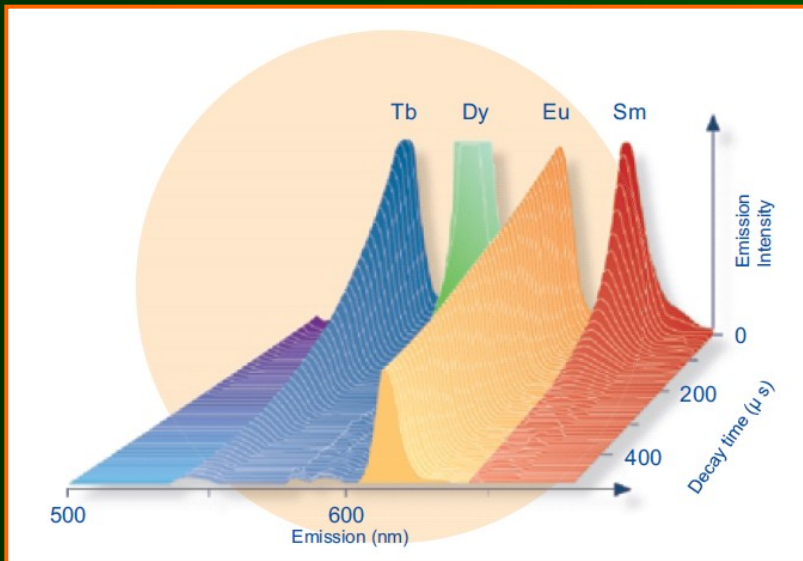
Fluoreskující chelát (s novým - luminogenním - ligandem):

- 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)

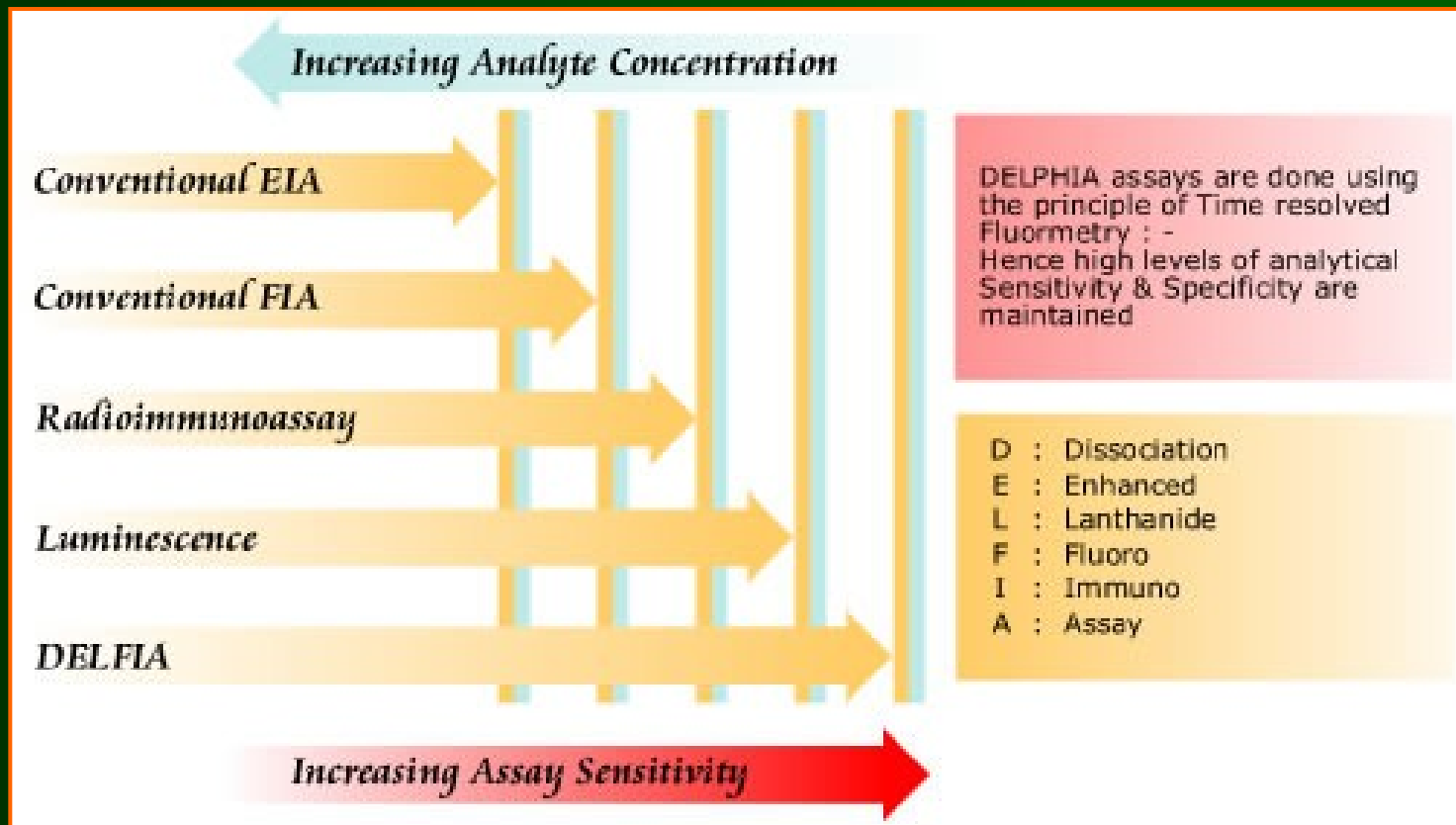
- fluorescence je **dlouhodobá**
 - doba emise delší než u běžných fluoroforů - řádově stovky mikrosekund



- 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

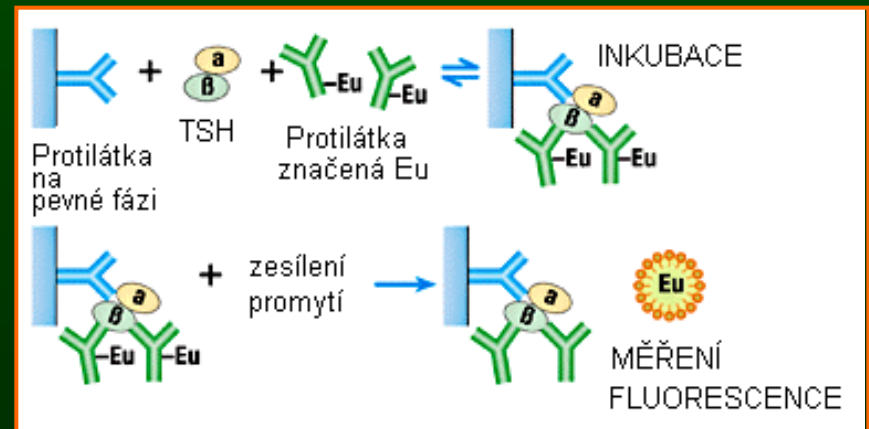
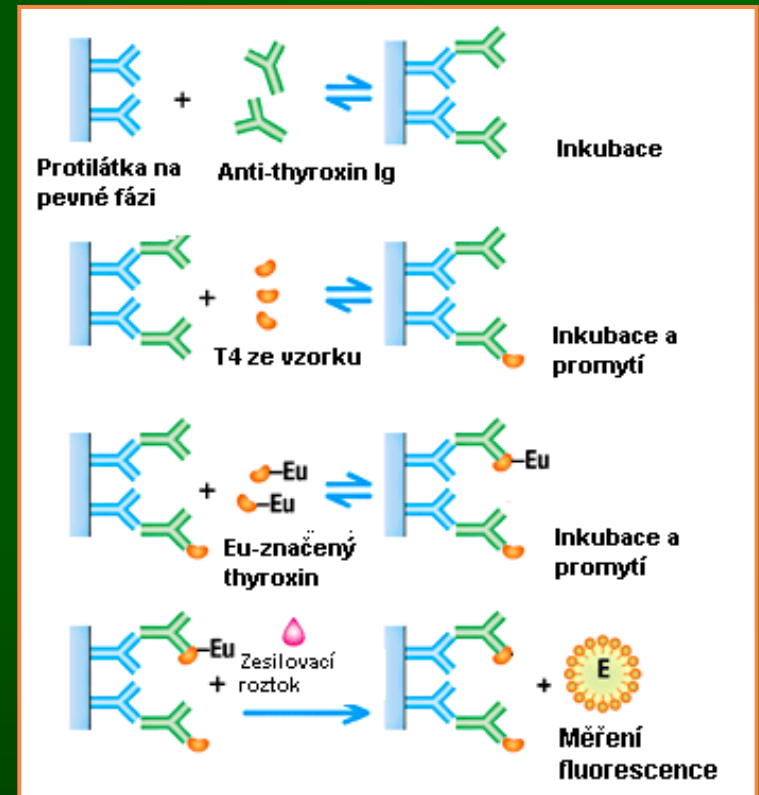
Uspořádání imunochemické reakce:

- kompetitivní:

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

- nekompetitivní (sendvičové):

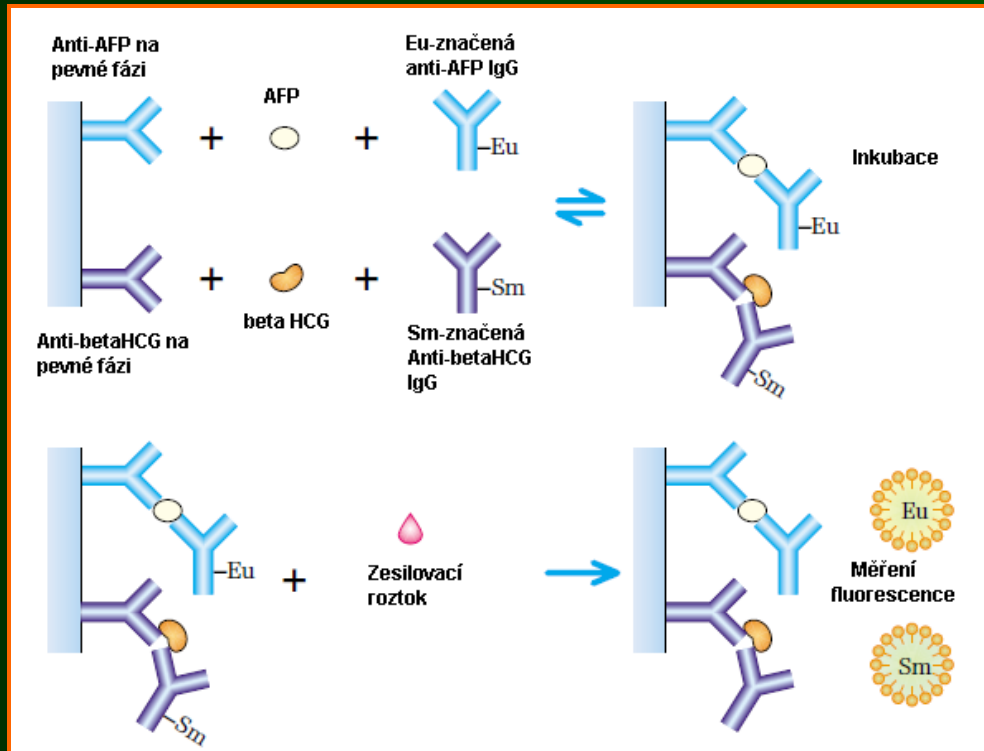
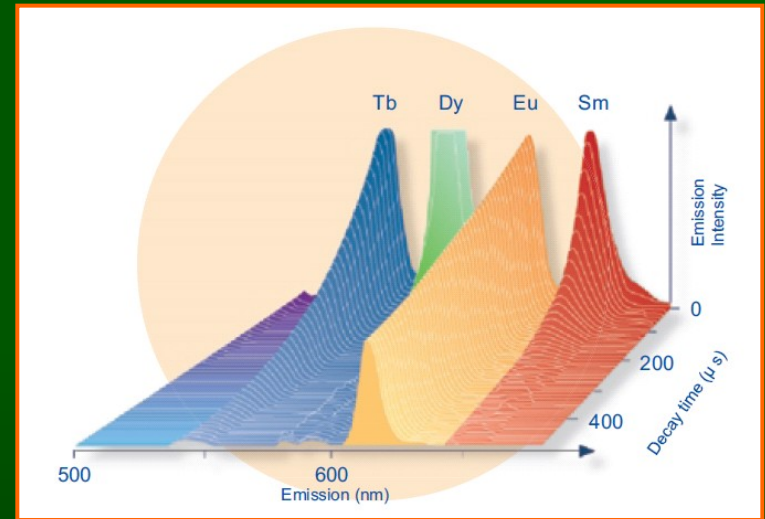
- fluorescenční sondou značená protilátka
- intenzita fluorescence přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku



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,...)

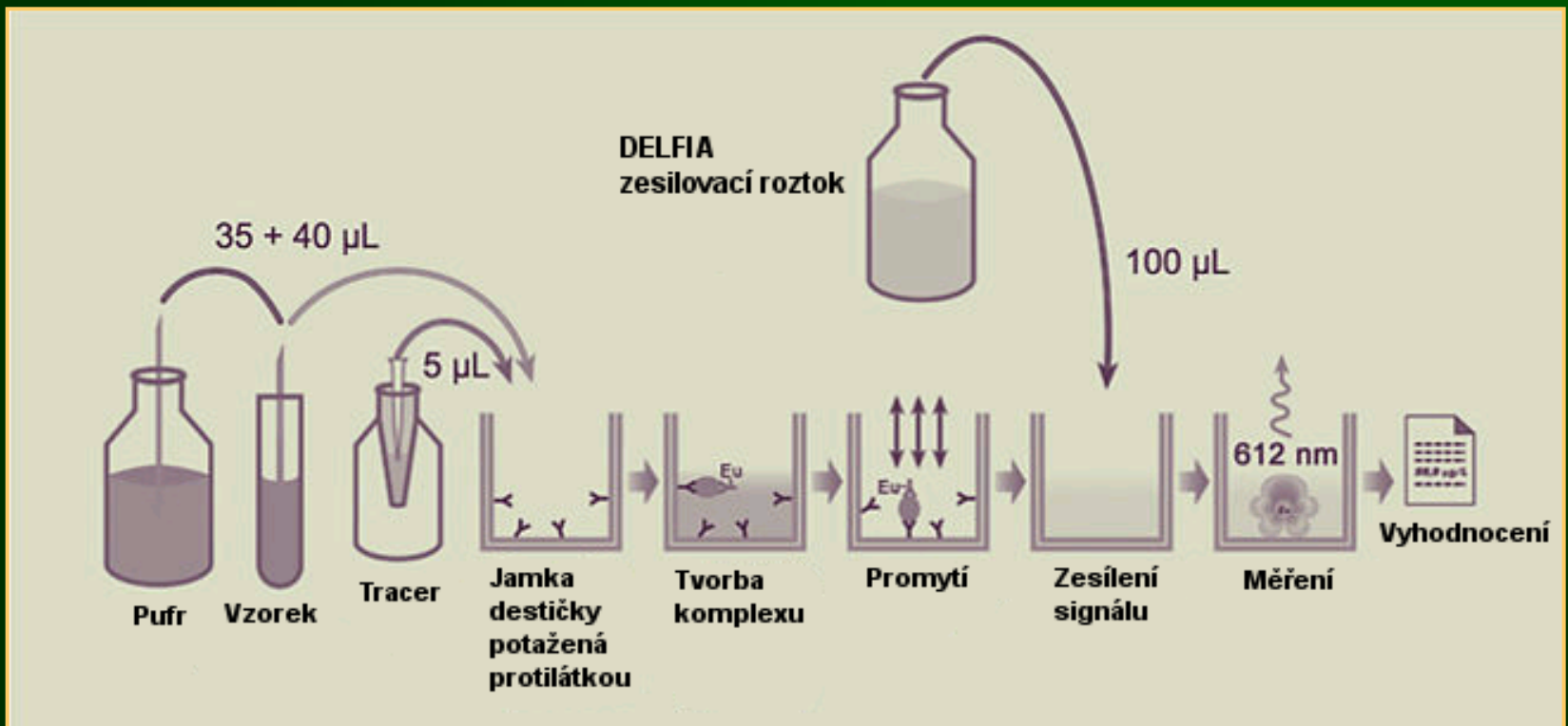
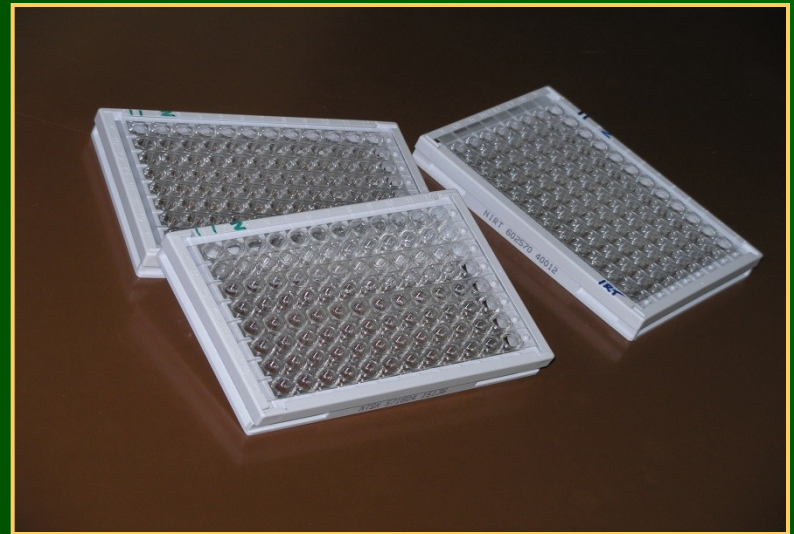
Novorozenecký screening (stanovení ze suché krevní skvrny):

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

DELFI

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 terčů (razička)



2 Dávkování činidel



3 Inkubace, třepání



4 Odstranění terčů z jamek (vakuová odsávačka)



5 Promytí destičky (promývačka)



6 Měření na fluorometru po přidání zesilovacího roztoku



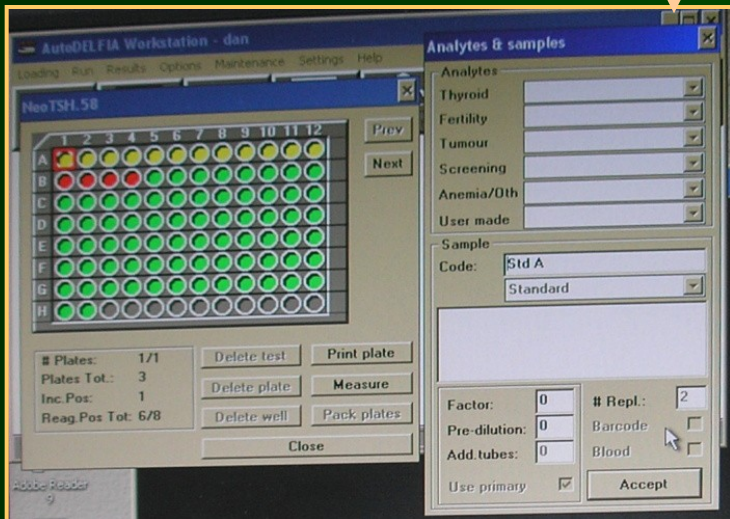
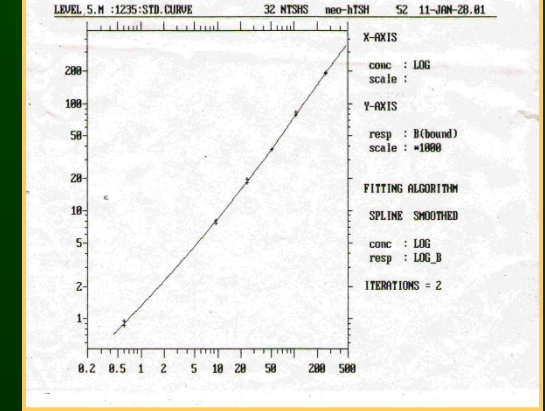
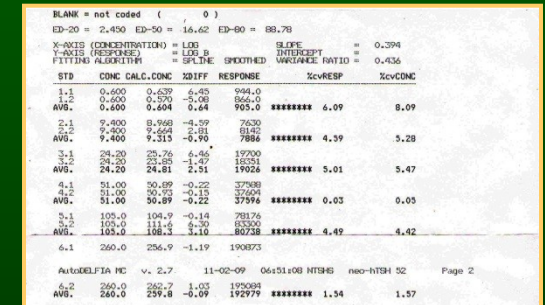
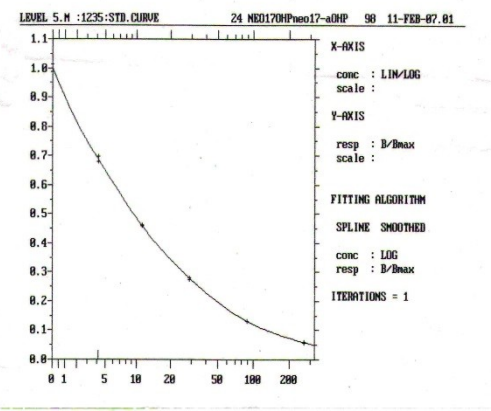
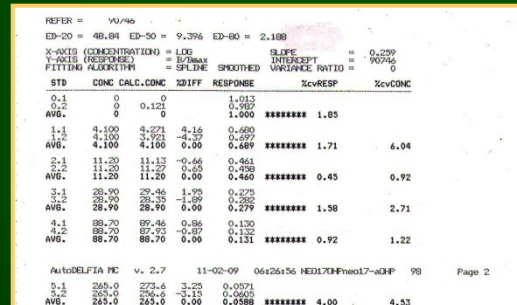
DELFLIA – suchá krevní skvrna



← 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 terčků)