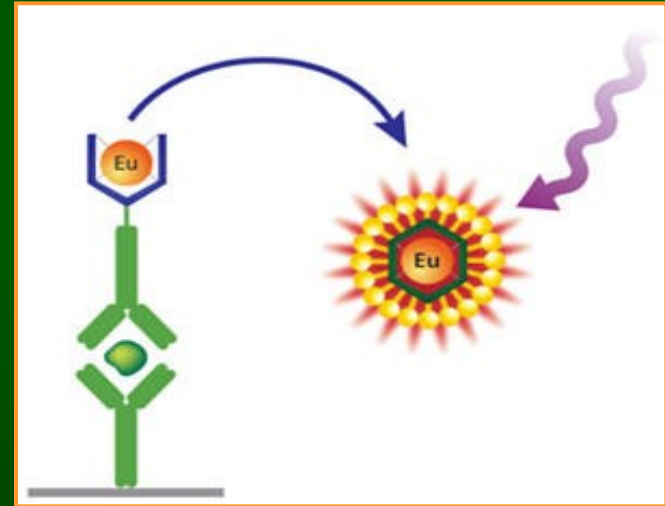


DELFLIA

Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent ImmunoAssay

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

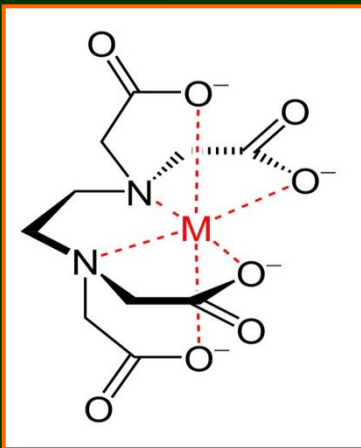
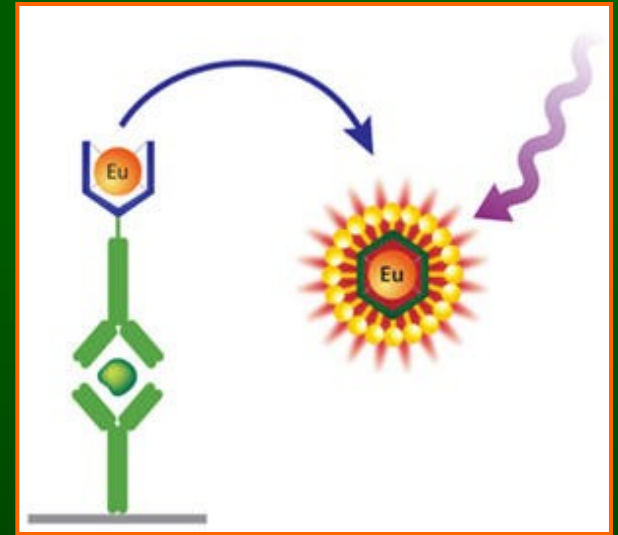


skupení prvku (př. 20°C)		stabilní izotop		elektronová konfigurace	
první izotop		první izotop		značka	
1 H	1 H	22 Ti	22 Ti		
2 He	2 He	22 Ti	22 Ti		
3 Li	3 Li	22 Ti	22 Ti		
4 Be	4 Be	22 Ti	22 Ti		
5 B	5 B	22 Ti	22 Ti		
6 C	6 C	22 Ti	22 Ti		
7 N	7 N	22 Ti	22 Ti		
8 O	8 O	22 Ti	22 Ti		
9 F	9 F	22 Ti	22 Ti		
10 Ne	10 Ne	22 Ti	22 Ti		
11 Na	11 Na	22 Ti	22 Ti		
12 Mg	12 Mg	22 Ti	22 Ti		
13 Al	13 Al	22 Ti	22 Ti		
14 Si	14 Si	22 Ti	22 Ti		
15 P	15 P	22 Ti	22 Ti		
16 S	16 S	22 Ti	22 Ti		
17 Cl	17 Cl	22 Ti	22 Ti		
18 Ar	18 Ar	22 Ti	22 Ti		
19 K	19 K	22 Ti	22 Ti		
20 Ca	20 Ca	22 Ti	22 Ti		
21 Sc	21 Sc	22 Ti	22 Ti		
22 Ti	22 Ti	22 Ti	22 Ti		
23 V	23 V	22 Ti	22 Ti		
24 Cr	24 Cr	22 Ti	22 Ti		
25 Mn	25 Mn	22 Ti	22 Ti		
26 Fe	26 Fe	22 Ti	22 Ti		
27 Co	27 Co	22 Ti	22 Ti		
28 Ni	28 Ni	22 Ti	22 Ti		
29 Cu	29 Cu	22 Ti	22 Ti		
30 Zn	30 Zn	22 Ti	22 Ti		
31 Ga	31 Ga	22 Ti	22 Ti		
32 Ge	32 Ge	22 Ti	22 Ti		
33 As	33 As	22 Ti	22 Ti		
34 Se	34 Se	22 Ti	22 Ti		
35 Br	35 Br	22 Ti	22 Ti		
36 Kr	36 Kr	22 Ti	22 Ti		
37 Rb	37 Rb	22 Ti	22 Ti		
38 Sr	38 Sr	22 Ti	22 Ti		
39 Y	39 Y	22 Ti	22 Ti		
40 Zr	40 Zr	22 Ti	22 Ti		
41 Nb	41 Nb	22 Ti	22 Ti		
42 Mo	42 Mo	22 Ti	22 Ti		
43 Tc	43 Tc	22 Ti	22 Ti		
44 Ru	44 Ru	22 Ti	22 Ti		
45 Rh	45 Rh	22 Ti	22 Ti		
46 Pd	46 Pd	22 Ti	22 Ti		
47 Ag	47 Ag	22 Ti	22 Ti		
48 Cd	48 Cd	22 Ti	22 Ti		
49 In	49 In	22 Ti	22 Ti		
50 Sn	50 Sn	22 Ti	22 Ti		
51 Sb	51 Sb	22 Ti	22 Ti		
52 Te	52 Te	22 Ti	22 Ti		
53 I	53 I	22 Ti	22 Ti		
54 Xe	54 Xe	22 Ti	22 Ti		
55 Cs	55 Cs	22 Ti	22 Ti		
56 Ba	56 Ba	22 Ti	22 Ti		
57 La	57 La	22 Ti	22 Ti		
58 Ce	58 Ce	22 Ti	22 Ti		
59 Pr	59 Pr	22 Ti	22 Ti		
60 Nd	60 Nd	22 Ti	22 Ti		
61 Pm	61 Pm	22 Ti	22 Ti		
62 Sm	62 Sm	22 Ti	22 Ti		
63 Eu	63 Eu	22 Ti	22 Ti		
64 Gd	64 Gd	22 Ti	22 Ti		
65 Tb	65 Tb	22 Ti	22 Ti		
66 Dy	66 Dy	22 Ti	22 Ti		
67 Ho	67 Ho	22 Ti	22 Ti		
68 Er	68 Er	22 Ti	22 Ti		
69 Tm	69 Tm	22 Ti	22 Ti		
70 Yb	70 Yb	22 Ti	22 Ti		
71 Lu	71 Lu	22 Ti	22 Ti		
72 Hf	72 Hf	22 Ti	22 Ti		
73 Ta	73 Ta	22 Ti	22 Ti		
74 W	74 W	22 Ti	22 Ti		
75 Re	75 Re	22 Ti	22 Ti		
76 Os	76 Os	22 Ti	22 Ti		
77 Ir	77 Ir	22 Ti	22 Ti		
78 Pt	78 Pt	22 Ti	22 Ti		
79 Au	79 Au	22 Ti	22 Ti		
80 Hg	80 Hg	22 Ti	22 Ti		
81 Tl	81 Tl	22 Ti	22 Ti		
82 Pb	82 Pb	22 Ti	22 Ti		
83 Bi	83 Bi	22 Ti	22 Ti		
84 Po	84 Po	22 Ti	22 Ti		
85 At	85 At	22 Ti	22 Ti		
86 Rn	86 Rn	22 Ti	22 Ti		
87 Fr	87 Fr	22 Ti	22 Ti		
88 Ra	88 Ra	22 Ti	22 Ti		
89 Ac	89 Ac	22 Ti	22 Ti		
90 Th	90 Th	22 Ti	22 Ti		
91 Pa	91 Pa	22 Ti	22 Ti		
92 U	92 U	22 Ti	22 Ti		
93 Np	93 Np	22 Ti	22 Ti		
94 Pu	94 Pu	22 Ti	22 Ti		
95 Am	95 Am	22 Ti	22 Ti		
96 Cm	96 Cm	22 Ti	22 Ti		
97 Bk	97 Bk	22 Ti	22 Ti		
98 Cf	98 Cf	22 Ti	22 Ti		
99 Es	99 Es	22 Ti	22 Ti		
100 Fm	100 Fm	22 Ti	22 Ti		
101 Md	101 Md	22 Ti	22 Ti		
102 No	102 No	22 Ti	22 Ti		
103 Lr	103 Lr	22 Ti	22 Ti		
104 Rf	104 Rf	22 Ti	22 Ti		
105 Db	105 Db	22 Ti	22 Ti		
106 Sg	106 Sg	22 Ti	22 Ti		
107 Bh	107 Bh	22 Ti	22 Ti		
108 Hs	108 Hs	22 Ti	22 Ti		
109 Mt	109 Mt	22 Ti	22 Ti		
110 Uun	110 Uun	22 Ti	22 Ti		
111 Uuu	111 Uuu	22 Ti	22 Ti		
112 Uub	112 Uub	22 Ti	22 Ti		
113 Uuq	113 Uuq	22 Ti	22 Ti		
114 Uuh	114 Uuh	22 Ti	22 Ti		
115 Uuo	115 Uuo	22 Ti	22 Ti		

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

DELFI - 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



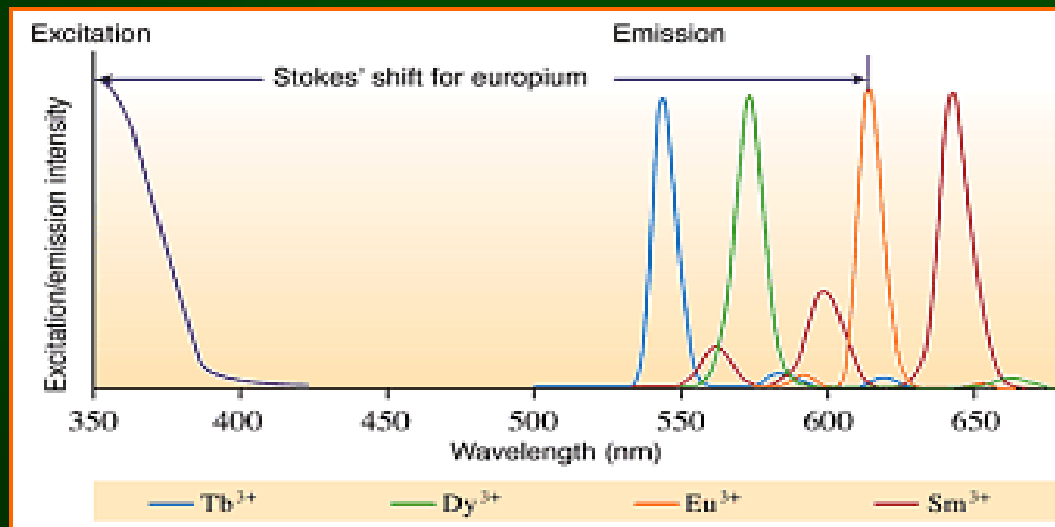
Cheláty

- 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

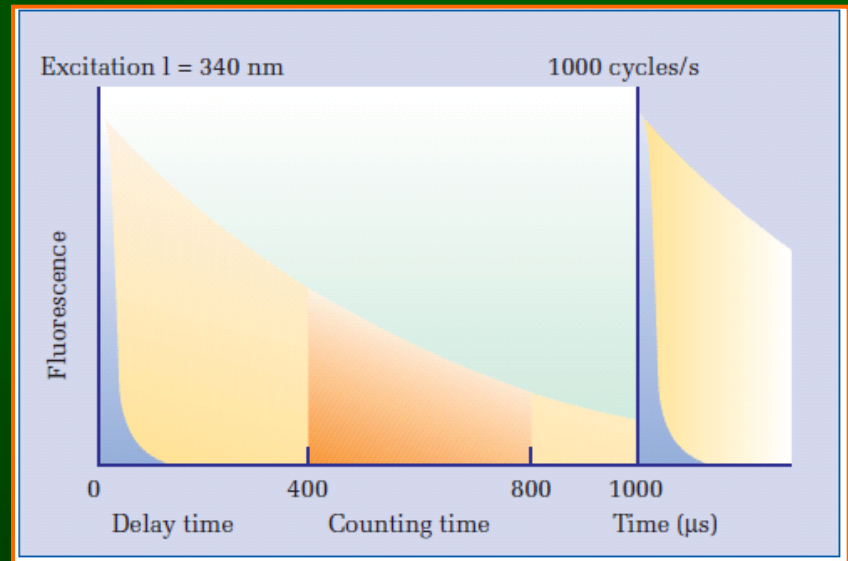
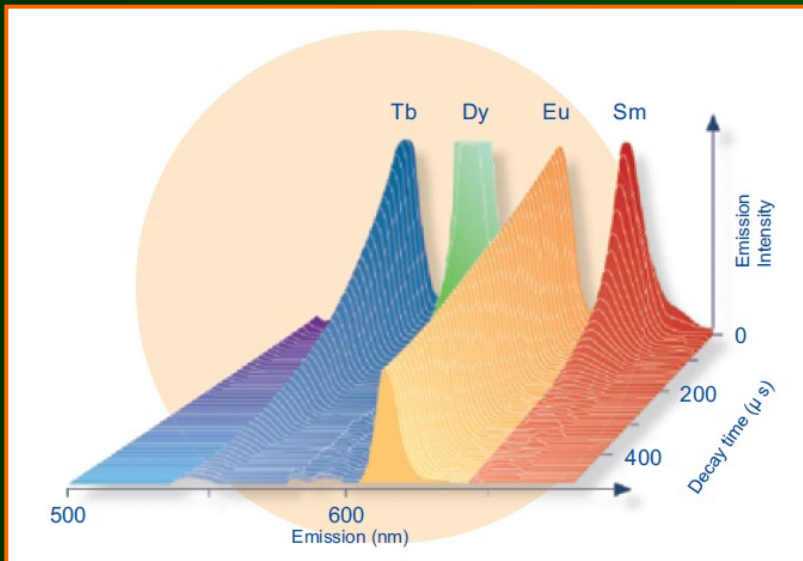
Fluoreskující chelát (s novým - luminogenním - ligandem):

- 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)

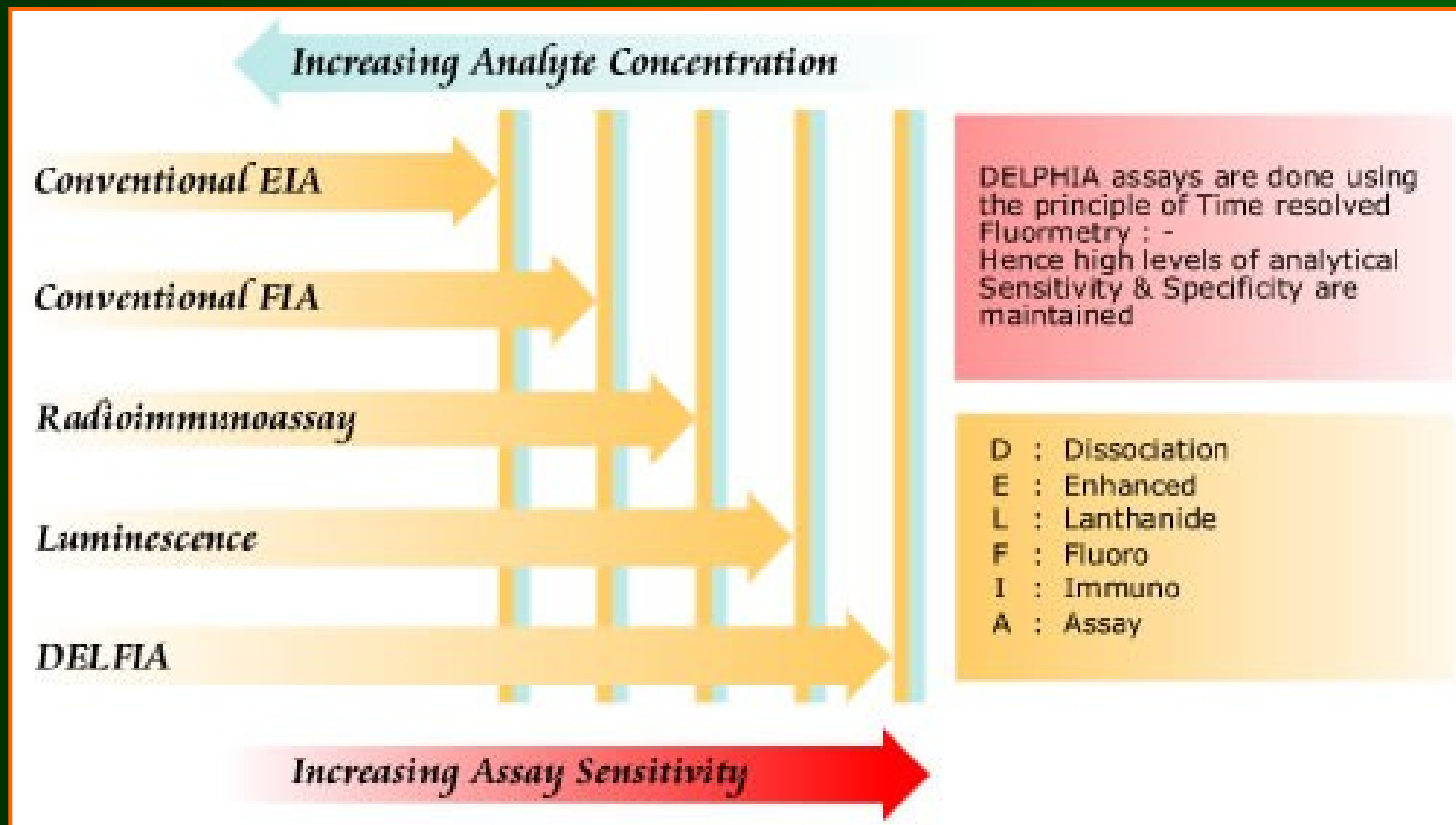
- fluorescence je **dlouhodobá**
 - doba emise delší než u běžných fluoroforů - řádově stovky mikrosekund



- 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

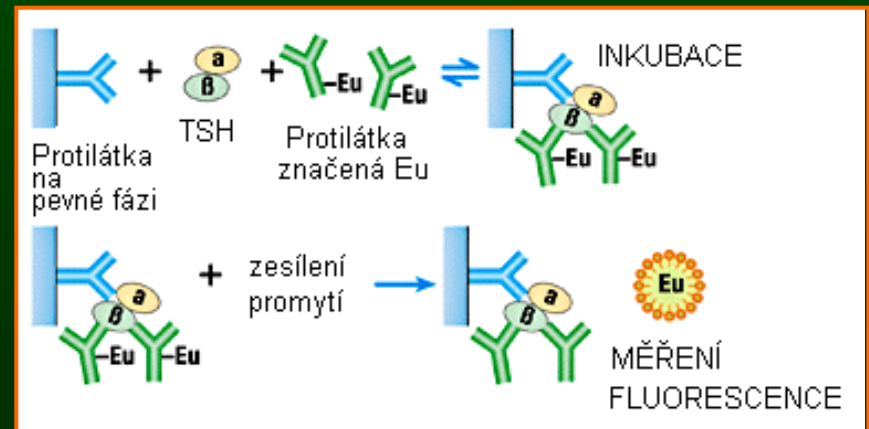
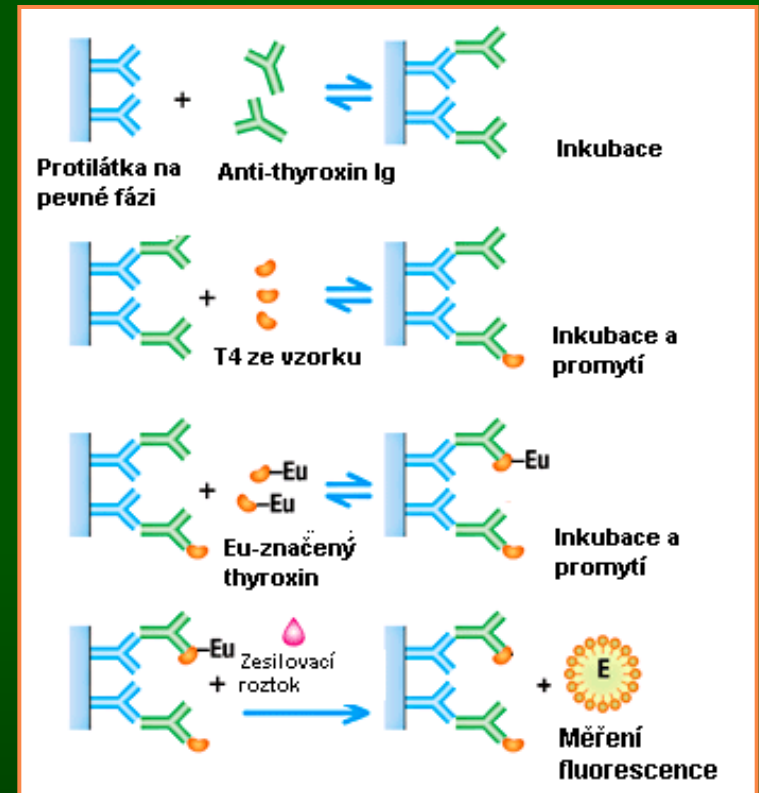
Uspořádání imunochemické reakce:

- kompetitivní:

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

- nekompetitivní (sendvičové):

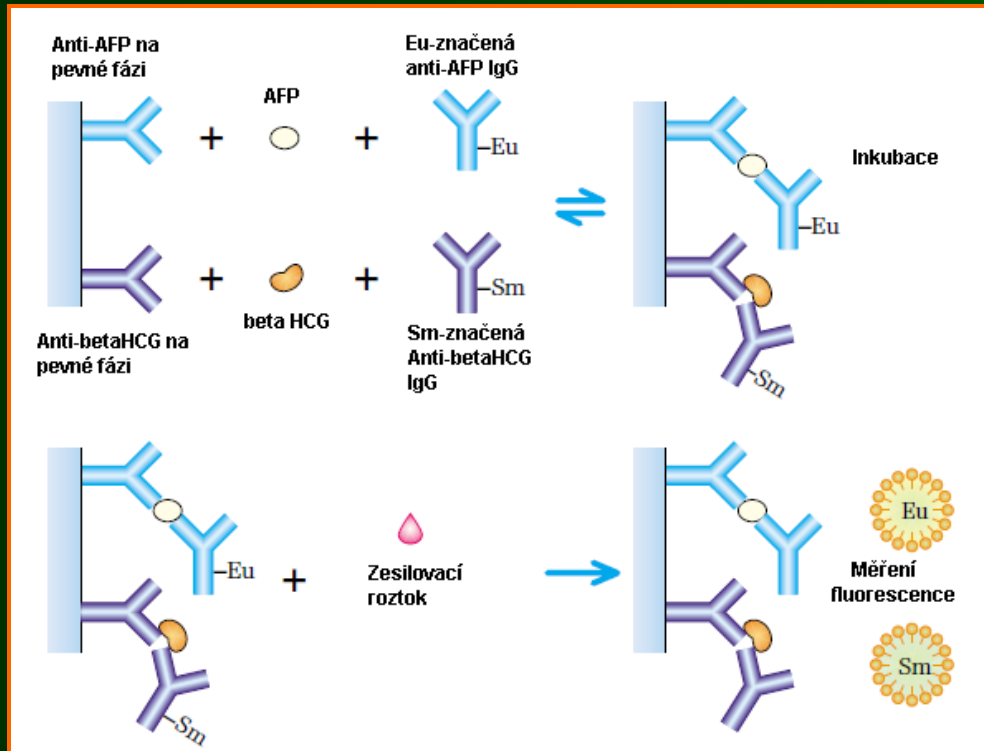
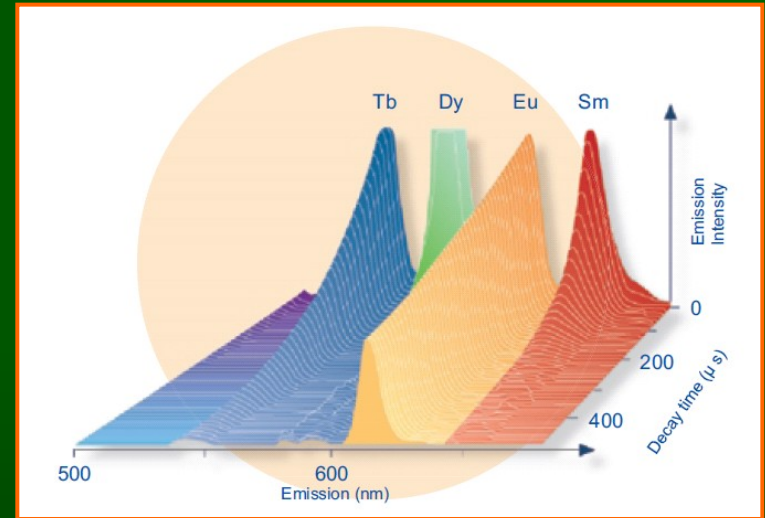
- fluorescenční sondou značená protilátka
- intenzita fluorescence přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku



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,...)

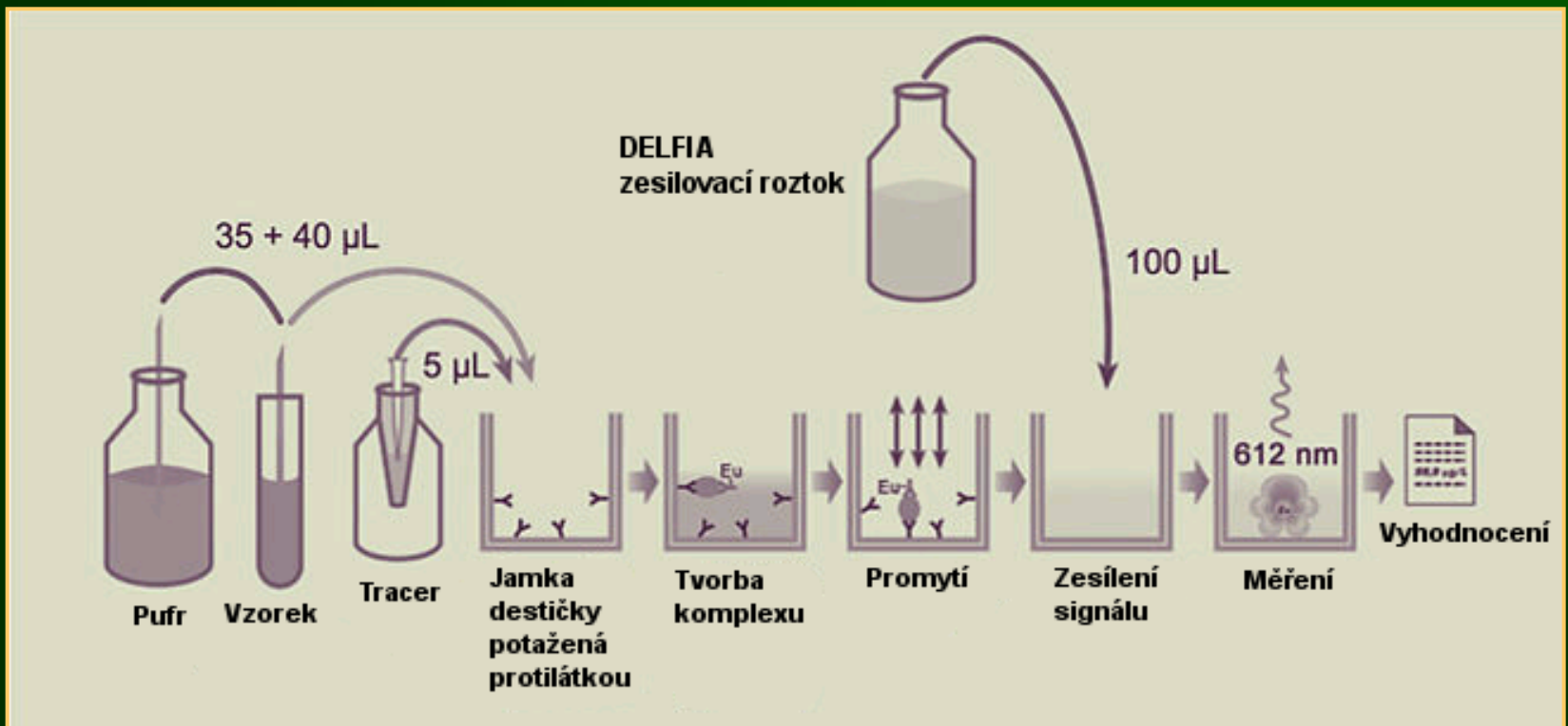
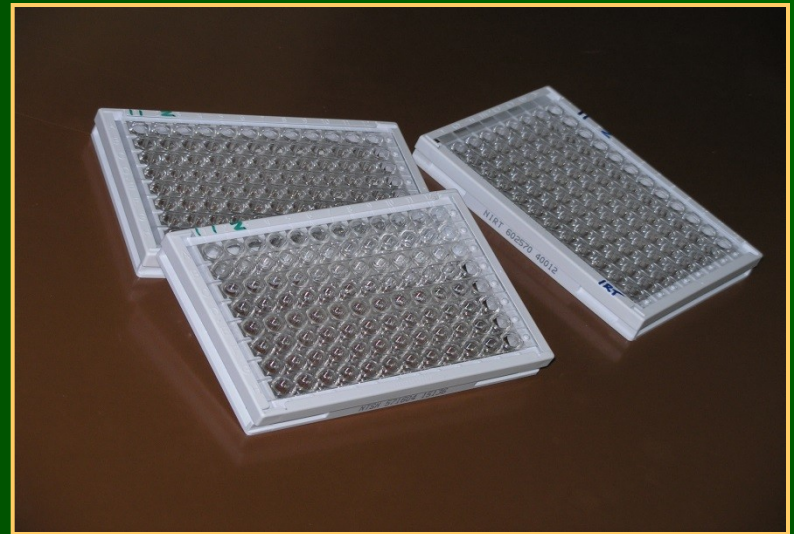
Novorozenecký screening (stanovení ze suché krevní skvrny):

- 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 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



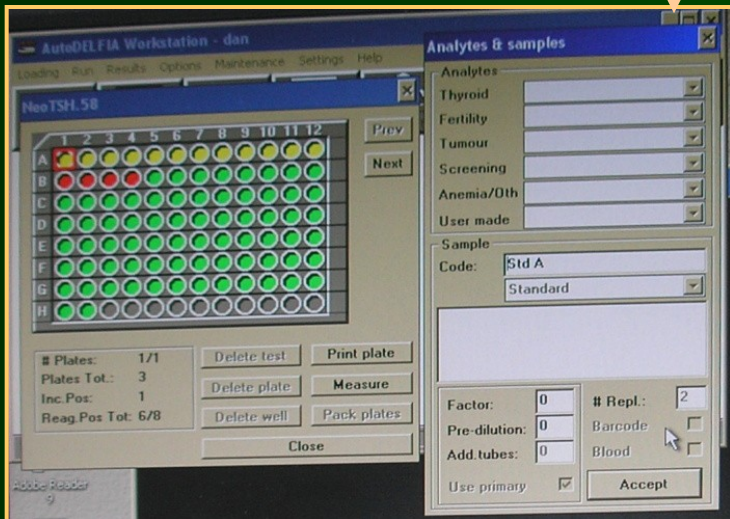
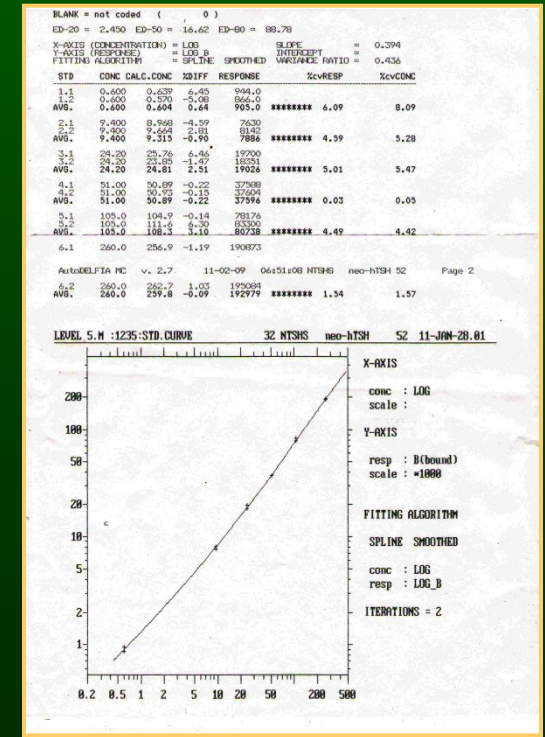
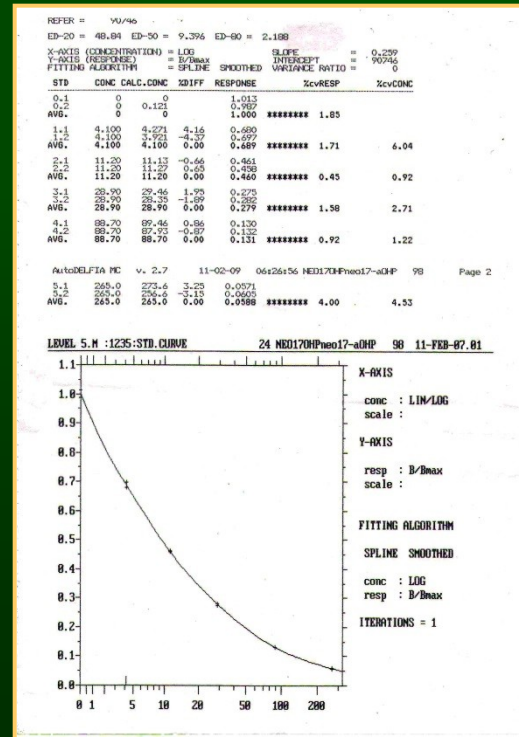
DELFLIA – suchá krevní skvrna



← 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 terčků)