

DELFINIA

RNDr. Alena Mikušková

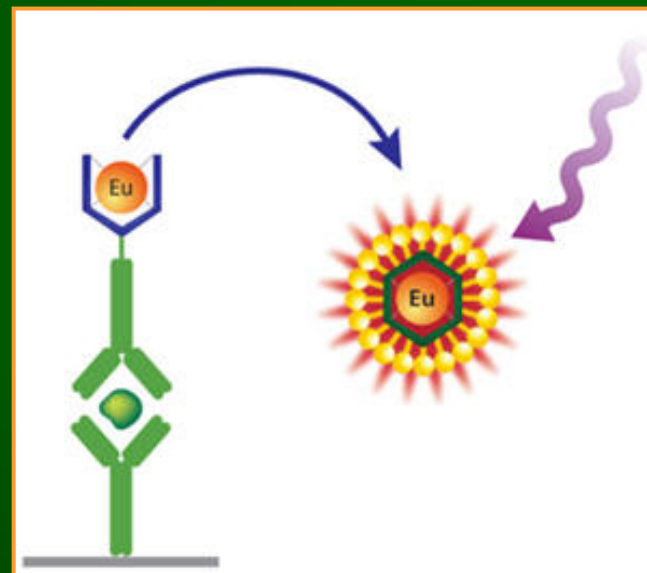
FN Brno – Pracoviště dětské medicíny, OKB



DELFLIA

Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent ImmunoAssay

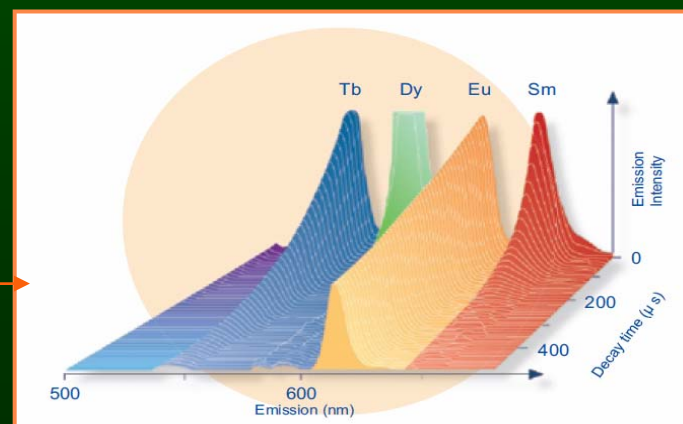
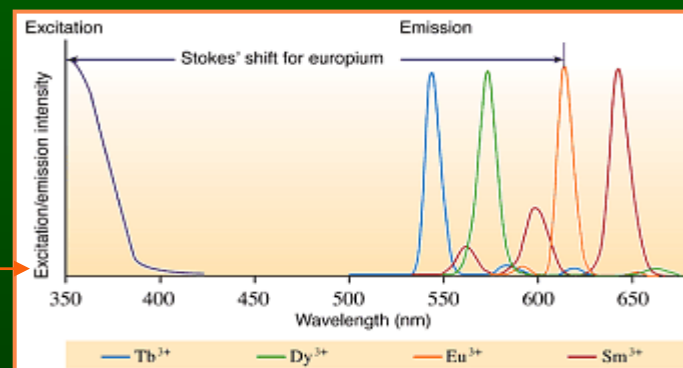
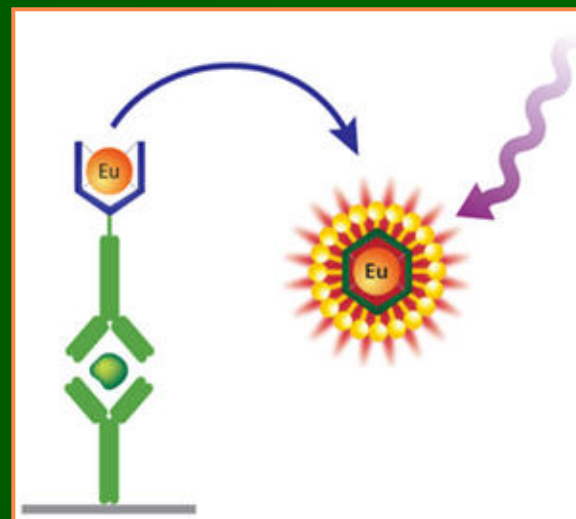
- fluoroimunoanalytická metoda
- firma Wallac Oy - LKB Pharmacia (fin.)
- stanovení nízko- i vysokomolekulárních analytů
 - velmi citlivá
 - velmi specifická
- časově modulované měření fluorescence chelátu lanthanidů
 - Europium
 - Terbium
 - Sammarium
 - Dysprosium



skupenství prvku (př. 20°C)																oxidací číslo										skupenství prvku (př. 20°C)										oxidací číslo																																																																																																																				
skupenství prvku (př. 20°C)																oxidací číslo										skupenství prvku (př. 20°C)										oxidací číslo																																																																																																																				
1	H															2	He															3	Li	Be															4	B	C	N	O	F	Ne	5	Na	Mg															6	Al	Si	P	S	Cl	Ar	7	K	Ca	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr	8	Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe	9	Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn	10	Fr	Ra	Ac	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr	Uuo
lanthanidy																actinidy																																																																																																																																								

DELFI - princip

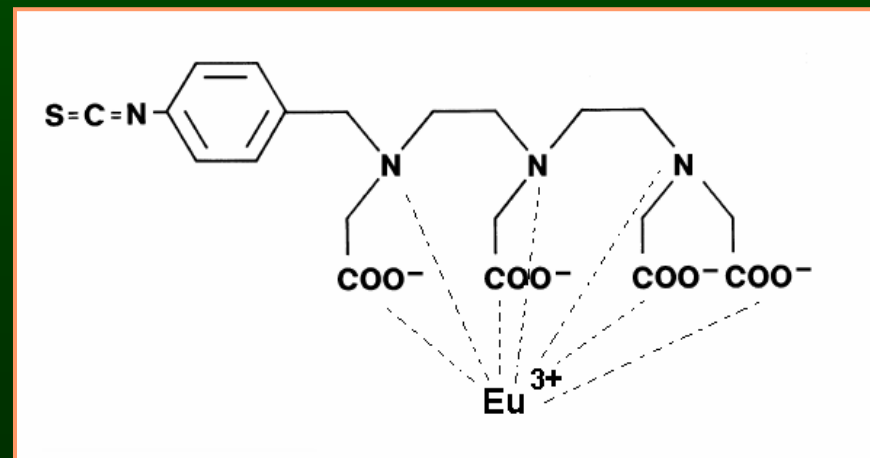
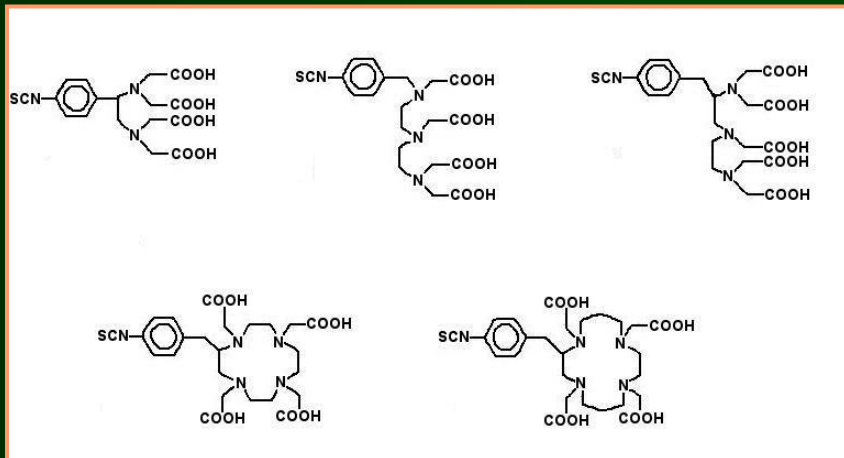
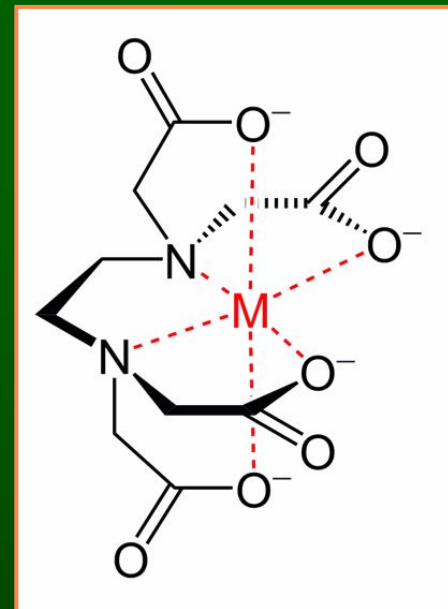
- Protilátka nebo antigen označeny fluorescenční sondou
 - chelát lanthanidu, nejčastěji Europia
- Po proběhlé imunochemické reakci: přidání „zesilovacího“ roztoku ke vzniklému komplexu
 - odtržení Eu z komplexu
 - přeměna Eu na nový intenzivně fluoreskující chelát
- fluorescence s velkým Stokesovým posunem fluorescenčního spektra
 - rozdíl mezi vlnovou délkou excitace a fluorescence
- vzorek pulzně excitován UV zářením (340 nm)
- fluorescence měřena v dlouhovlnné části VIS spektra
 - př. Europium 620 nm
- fluorescence je dlouhodobá
 - (řádově stovky mikrosekund)



DELFIA - Chelátové značení protilátek

Cheláty

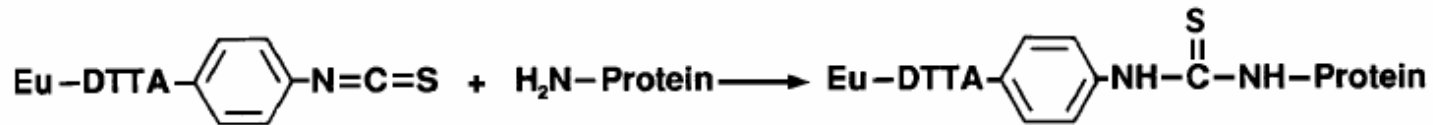
- komplexní (koordinační) sloučeniny centrálního atomu a dvoj- nebo vícevazných ligandů
- ligandy tvoří s centrálním atomem cyklická uspořádání
 - chelátový efekt - významné zvýšení stability komplexů ve srovnání s jednovaznými ligandy
- použitý chelát musí být hydrofilní, stabilní a snadno navázatelný na protilátku
- nejčastěji cheláty lanthanidu s izothiokyanátový deriváty polyaminopolyoctových kyselin (EDTA, DTTA, DTPA,...)



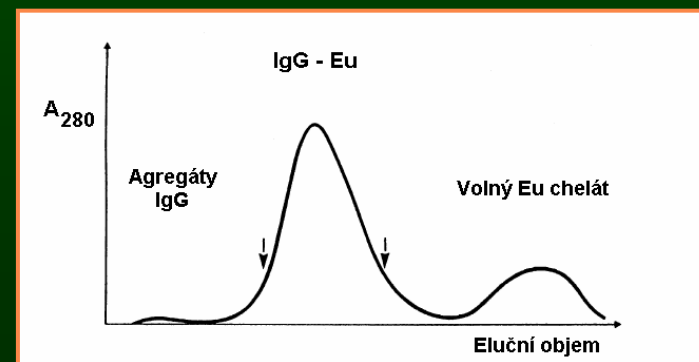
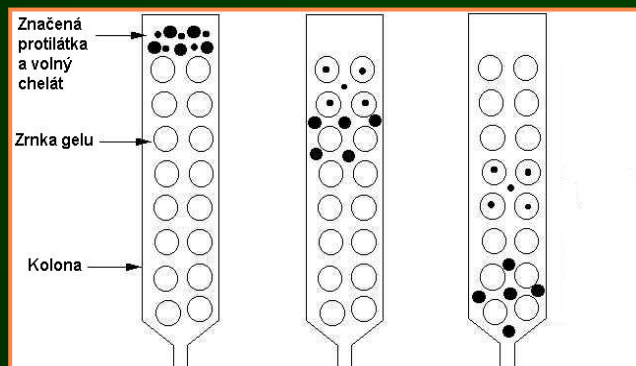
DELFIA - Chelátové značení protilátek

Označení protilátky chelátem

- nesmí ovlivnit vlastnosti protilátky – afinitu, specifitu, rozpustnost
- reakce izothiokyanátové skupiny chelátu a aminoskupiny lysinu v proteinovém řetězci protilátky:



- oddělení značené protilátky od nadbytku nenavázaného chelátu - gelová filtrace
 - oddělení značeného antigenu od nenavázaného chelátu – HPLC
- eluát z kolony monitorován při 280 nm, jímá se odpovídající frakce



DELFLIA

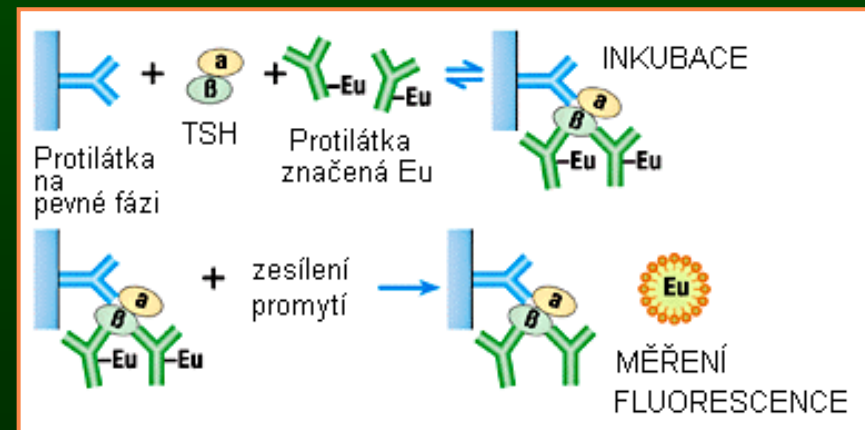
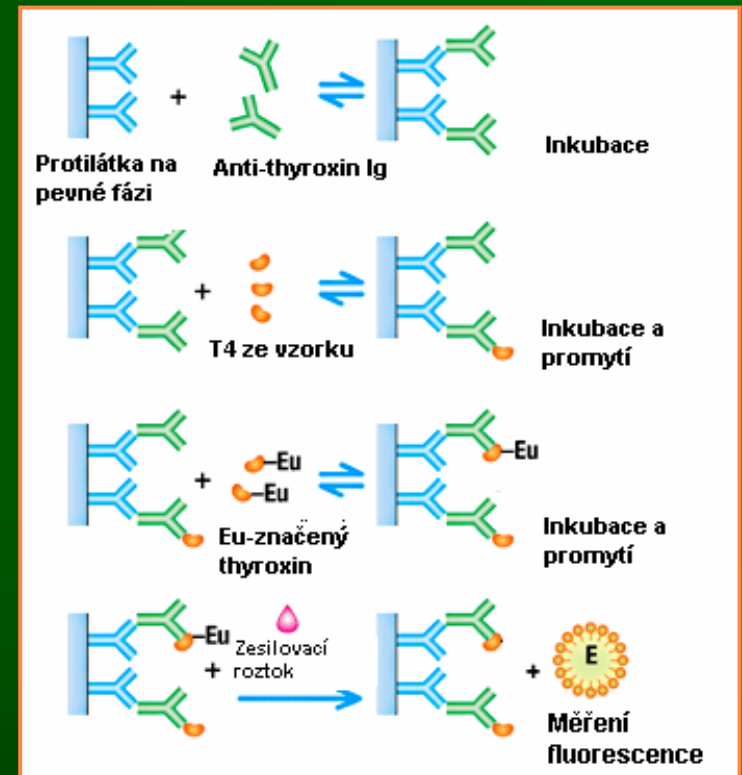
Uspořádání imunochemické reakce:

- 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

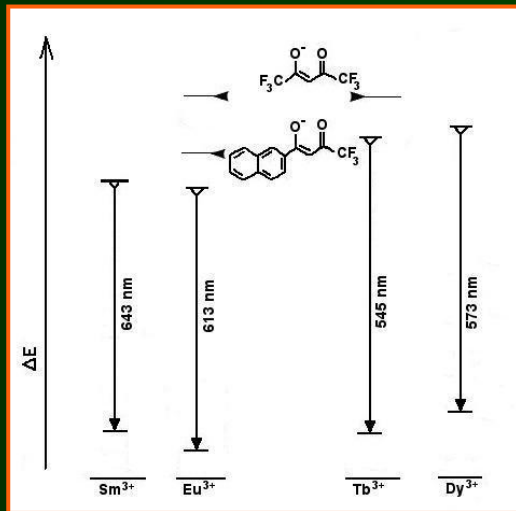


DELFA - disociace lanthanidu z komplexu, vznik fluorescenčních chelátů

- ion lanthanidu z komplexu odtržen vlivem kyselého pH
- přeměněn na vysoce fluorescenční chelát přidáním přebytku luminogenního ligandu
- vhodnými ligandy jsou β -diketony:



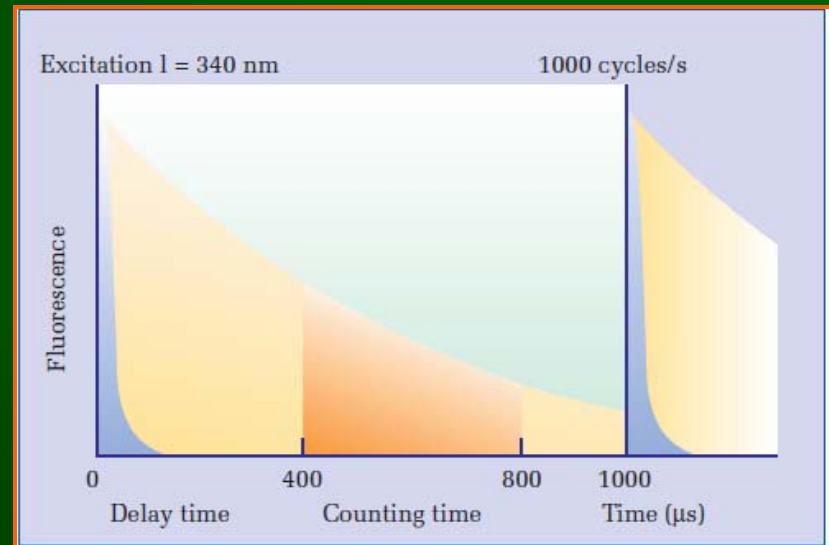
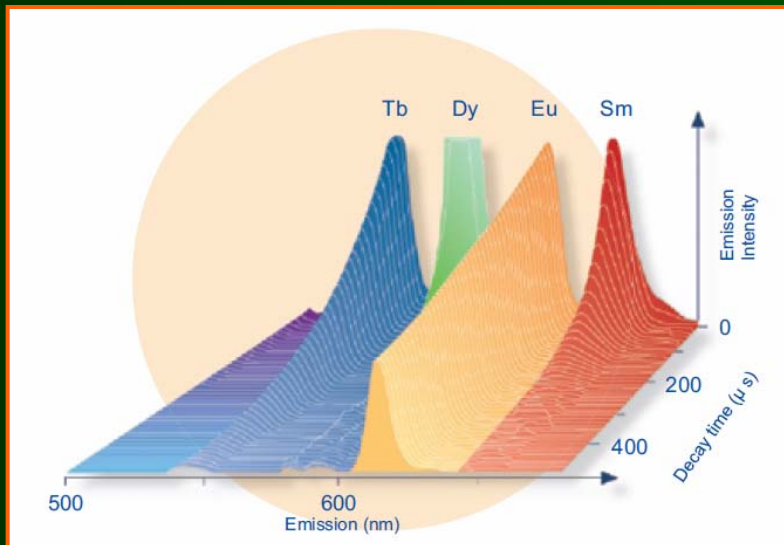
- R1... světlo absorbující aromatická skupina, např. naftyl-, benzofuryl-, furyl-, thienyl-, atd.
- R2... fluorovaný uhlovodíkový zbytek, v molekule zajišťuje optimální rozložení elektronové hustoty pro tvorbu komplexu
- ligand se váže na koordinační místo lanthanidu svými dvěma ketoskupinami



- výběr luminogenního ligandu závisí na energetických požadavcích konkrétního lanthanidu
 - excitovaná energetická (tripletová) hladina ligandu musí ležet mírně výše než emisní hladina iontu
- Kyselý reakční roztok kromě ligandů obsahuje
 - detergent
 - pomocné reagensie
 - udržují výsledný chelát ve formě micel

DELFLIA - Time-resolved fluorometry (TRF)

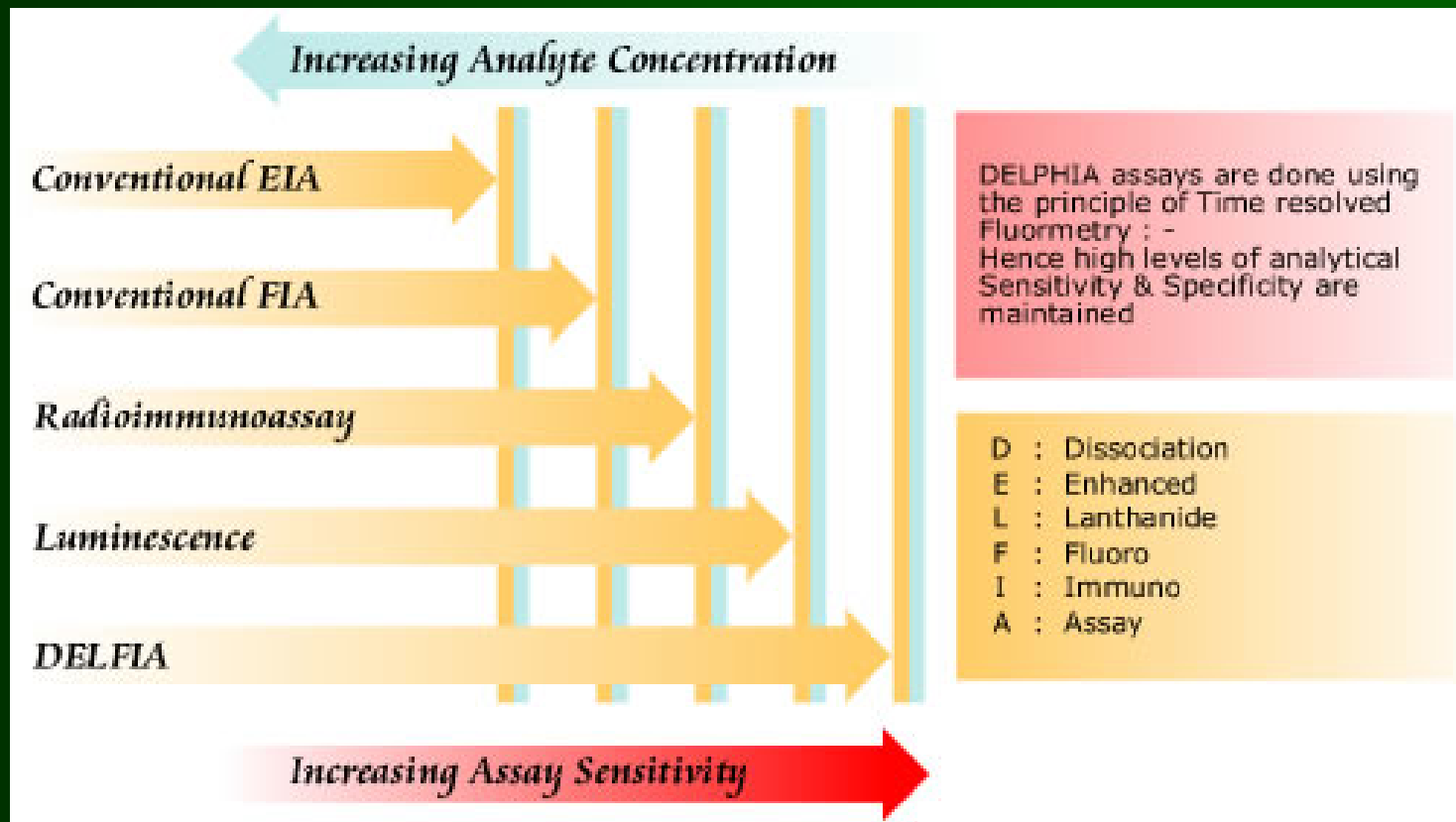
- fluorescence - intenzivní a dlouhodobá
 - doba emise delší než u běžných fluoroforů - řádově stovky mikrosekund



- vzorek pulzně excitován vlnovou délkou 340 nm
- fluorescenční záření se začne měřit se zpožděním stovek mikrosekund
 - V době, kdy už vyhasla fluorescence pozadí
- vlastní měření - 400 mikrosekund
- cyklus (pulsní excitace - prodleva - měření) trvá 1 milisekundu
 - během měření vzorku (1 sekunda) se 1000x opakuje

DELPHIA

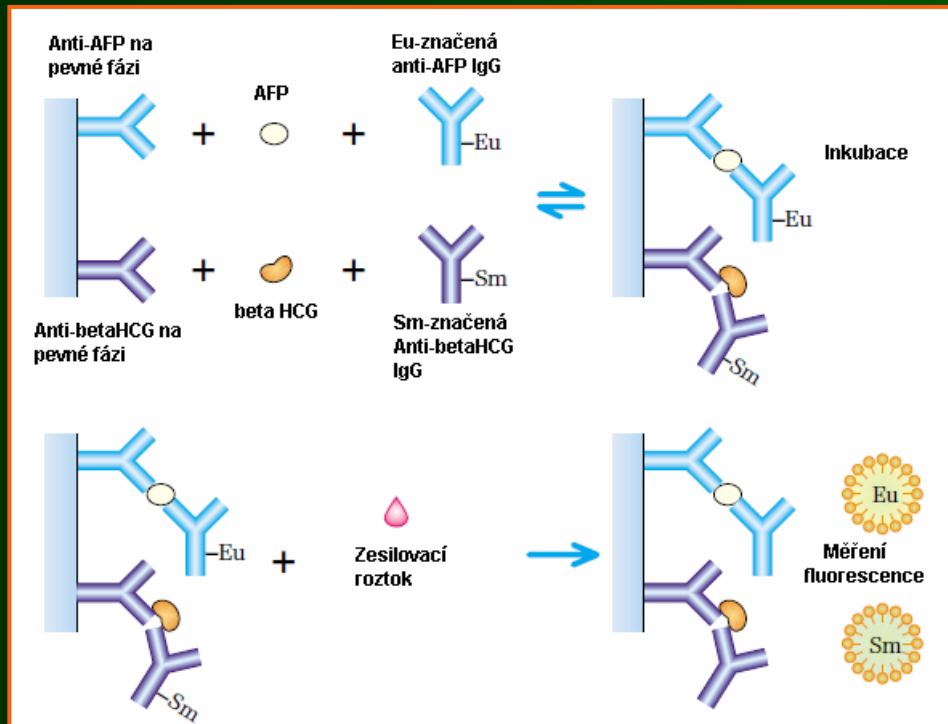
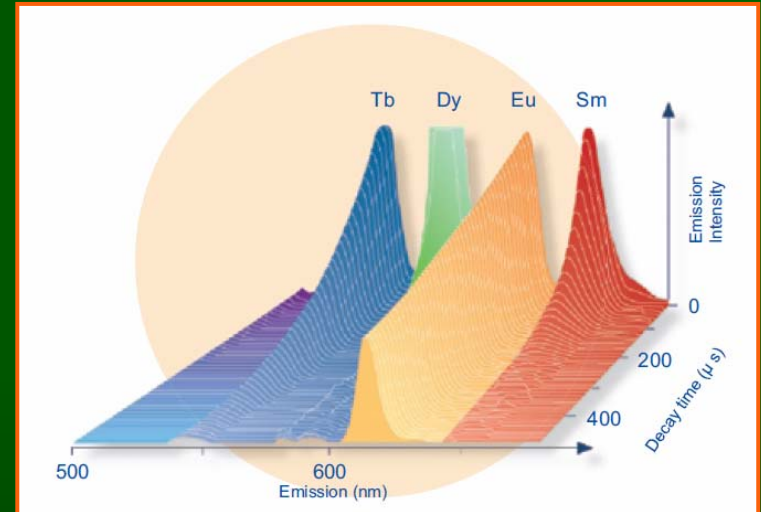
- vysoká citlivosť
- vysoká špecifita



DELFI - současné stanovení více analytů

Fluorescence lanthanidů:

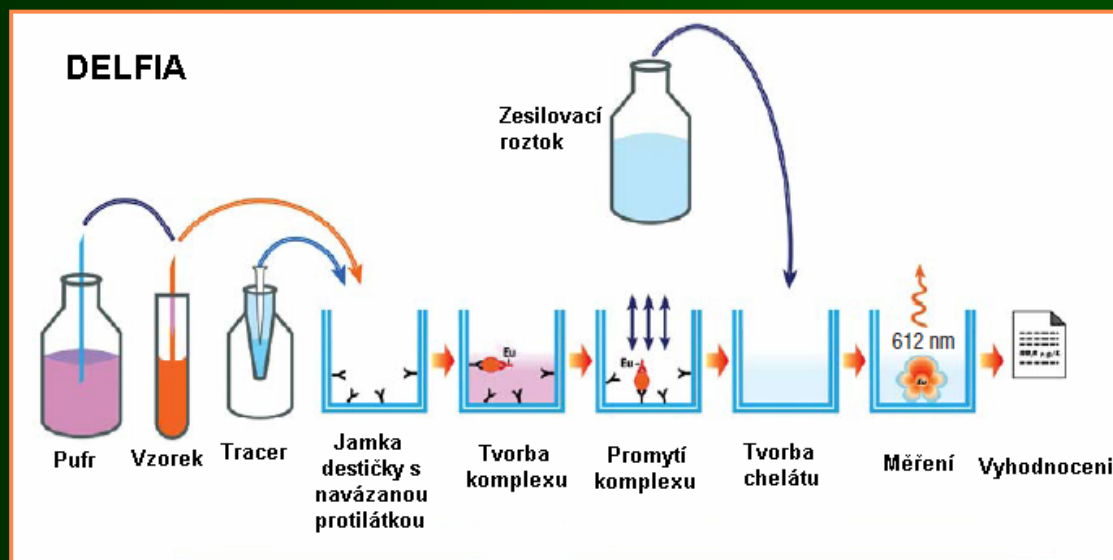
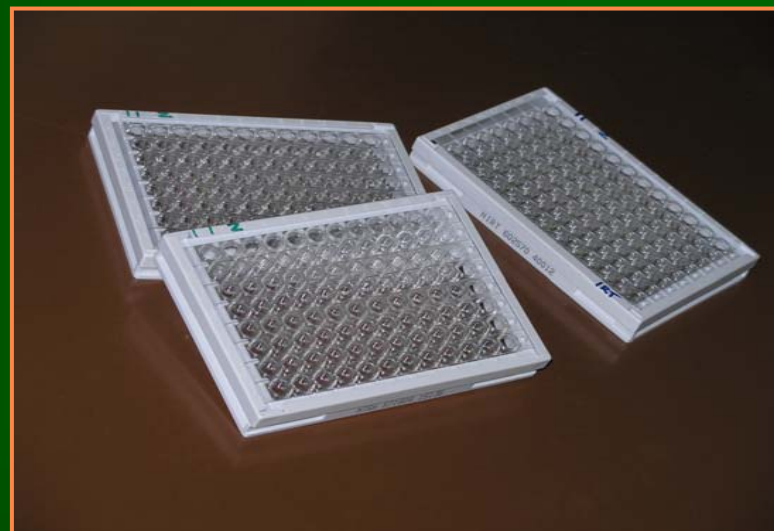
- úzké emisní píky při různých vln. délkách
- různá doba trvání fluorescence
 - při měření se nepřekrývají vlnové délky ani časy odečtu fluorescence



- paralelní stanovení až čtyř analytů
- použití chelátu Tb a Dy jako 3. a 4. fluorescenční značky vedle Eu a Sm
 - nutno použít v reakční směsi další luminogenní ligand
- fluorometry s možností TRF a automatické korekce překryvu
- stanovení čtvrtého analytu (Dy) - horší citlivost

DELFLIA - praktické provedení

- práce v mikrotitračních destičkách
 - specifická protilátka (obvykle monoklonální) navázána na pevné fázi
- vznik značeného komplexu v jamce destičky
- promytí komplexu
- přidání tzv. Enhancement Solution
 - luminogenní ligand
 - silně kyselý pufr
 - detergent



- odtržení stabilního chelátu z komplexu, přeměna na fluoreskující chelát
- měření fluorescence
 - TRF fluorometr
- v prvních jamkách destičky dávkovány kalibrátory
 - kalibrační křivka

DELFIA X AutoDELFLA

„Manuální“ linka DELFIA



Analyzátor AutoDELFLA



- 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)

DELFLIA – praktické provedení



← Diagnostický set - mikrotitrační destičky, roztoky, kalibrátory, kontroly

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

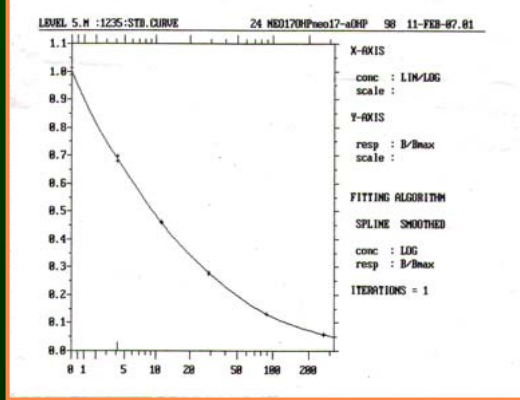
Softwarově zpracovaná kalibrační křivka
 kompetitivní uspořádání sendvičové uspořádání

```

REFE: = 14176
ED-20 = 48.84 ED-50 = 9.376 ED-80 = 2.188
X-AXIS (CONCENTRATION) = LOG SLOPE = 0.289
Y-AXIS (RESPONSE) = B/Imax INTERCEPT = 9074.0
FITTING ALGORITHM = SPLINE SMOOTHED UNBIASED RATIO = 9074.0
    
```

STD	CONC	CALC.CONC	SDIFF	RESPONSE	IcvRESP	IcvCONC
0-1	0	0	0	1.013		
0-2	0	0.121	-0.121	0.957		
AVG.	0	0	0	1.000	*****	1.05
1-1	4.100	4.271	-0.16	0.490		
1-2	4.100	1.921	+2.179	0.977		
AVG.	4.100	4.100	0.00	0.689	*****	1.71
2-1	11.20	11.33	-0.66	0.461		6.04
2-2	11.20	11.27	-0.07	0.768		
AVG.	11.20	11.20	0.00	0.440	*****	0.45
3-1	28.70	29.44	-0.75	0.275		2.71
3-2	28.70	29.35	-0.65	0.502		
AVG.	28.70	28.70	0.00	0.279	*****	1.58
4-1	88.70	87.44	+0.86	0.130		1.22
4-2	88.70	87.03	+0.87	0.132		
AVG.	88.70	88.70	0.00	0.131	*****	0.92

AutoDELFLIA INC v. 2.7 11-02-09 06126156 HED17M7M017-NEP 98 Page 2

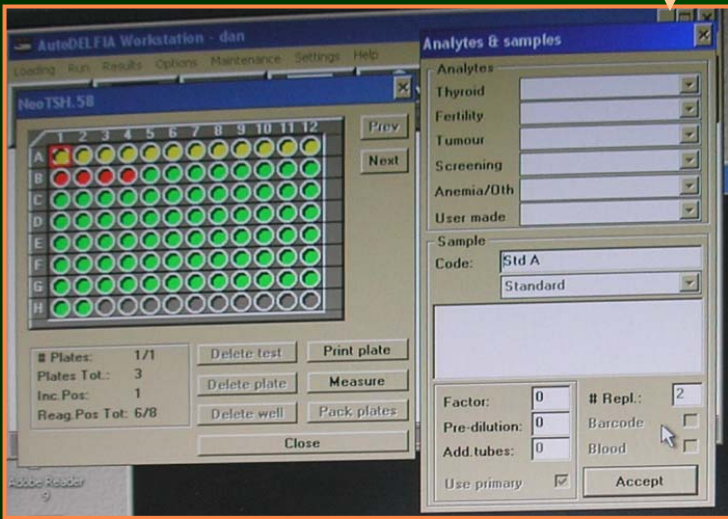
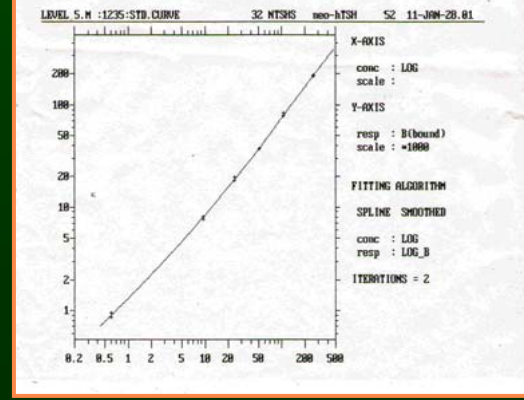


```

BLANK = not coded ( / 0 )
ED-20 = 2.450 ED-50 = 16.62 ED-80 = 88.78
X-AXIS (CONCENTRATION) = LOG SLOPE = 0.394
Y-AXIS (RESPONSE) = B/Imax INTERCEPT = 9074.0
FITTING ALGORITHM = SPLINE SMOOTHED UNBIASED RATIO = 0.436
    
```

STD	CONC	CALC.CONC	SDIFF	RESPONSE	IcvRESP	IcvCONC
1-1	0.200	0.209	-0.009	944.0		
1-2	0.200	0.270	-0.070	944.0		
AVG.	0.200	0.244	0.044	951.0	*****	6.09
2-1	8.400	8.568	-0.168	743.0		8.09
2-2	8.400	9.524	-1.124	814.0		
AVG.	8.400	9.315	-0.915	784.0	*****	4.29
3-1	24.20	25.76	-1.56	1970.0		5.28
3-2	24.20	25.28	-1.08	1625.0		
AVG.	24.20	24.81	-0.61	1924.0	*****	5.01
4-1	81.00	80.89	+0.22	3798.0		5.47
4-2	81.00	80.95	+0.15	3768.0		
AVG.	81.00	80.89	-0.22	3794.0	*****	0.03
5-1	105.0	104.9	+0.14	2817.0		0.05
5-2	105.0	111.4	-6.40	8330.0		
AVG.	105.0	108.3	-3.10	8073.0	*****	4.42
6-1	260.0	256.9	+3.10	19087.0		

AutoDELFLIA INC v. 2.7 11-02-09 06151108 NTS46 neo-NTSH 52 Page 2



DELFLA - využití

DELFLA lze použít pro široké spektrum analytů

- chelátem lze označit každou sloučeninu obsahující amino- nebo karboxyskupinu
- Proteiny
- Peptidy
- Oligonukleotidy
- Malé organické molekuly (steroidy, aminokyseliny, léky,...)
- Např. proteiny, hormony
 - tyroidní panel (TSH, T3, T4, fT3, fT4, TBG, protilátky proti tyroidní peroxidáze a tyreoglobulinu)
 - reprodukční hormony (HCG, FSH, LH, estradiol, progesteron, prolaktin, testosteron, SHBG)
 - screening v těhotenství (free- β HCG, HCG, estriol, AFP, PAPP-A)
 - inzulin, růstový hormon, cytokiny
 - PSA a další

Analytické postupy

- diagnostické sety a automatizované uzavřené analytické systémy
- postupy vypracované přímo v laboratoři

Využití DELFIA – novorozenecký screening

DELFIA + suchá krevní skvrna

- kapka kapilární krve z patičky novorozenců
- odebrána na kartičku filtračního papíru
 - ze suché krevní kapky vyražen terčík
 - extrakce analytu z terčíku
 - použití extraktu k analýze



1963 - poprvé použita suchá krevní skvrna

- screening metabolických poruch novorozenců - prof. Guthrie (USA)

- **NS** - vyhledávání novorozenců se zvýšeným rizikem některých vzácných onemocnění
 - odběr krve všem novorozencům 3. den po narození
 - stanovení specifických markerů pro vyhledávané choroby

- **Novorozenecký screening (DELFI) v ČR**

TSH - kongenitální hypotyreóza

- vrozená snížená funkce štítné žlázy

17-hydroxy-progesteron - kongenitální adrenální hyperplazie

- vrozená nedostatečnost tvorby hormonů nadledvin

Imunoreaktivní trypsinogen IRT - cystická fibróza

- vrozená porucha transportu chloridů



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



DELFA – příklady dalších aplikací

Stanovení aktivity kináz

- enzymy proteinkinázy fosforylují určité aminokyseliny v peptidickém řetězci
- posouzení úrovně fosforylace pomocí Eu-značených protilátek proti fosforylovaným aminokyselinám

Metody s Eu-značenými oligonukleotidy

- využití Eu-oligonukleotidů pro detekci a kvantifikaci amplifikačních produktů
 - např. pro detekci genových mutací, virů atd.

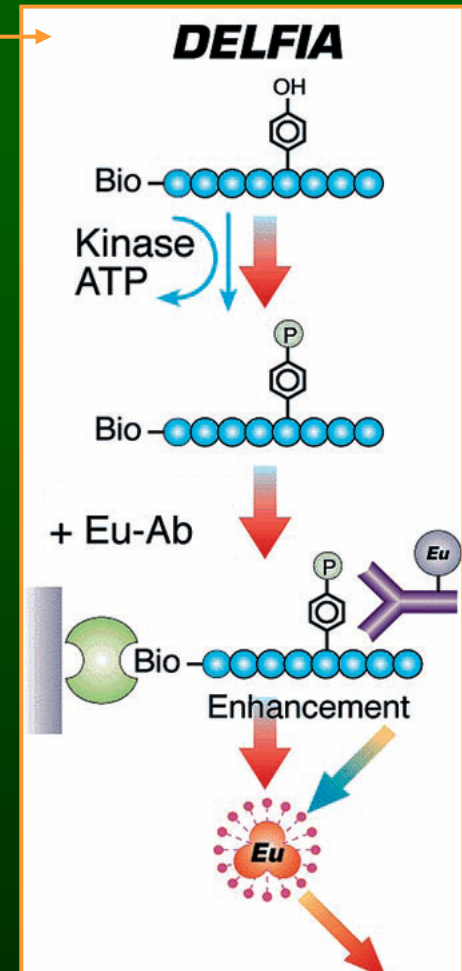
Metody založené na sledování syntézy DNA (např. studium buněčné proliferace)

- zabudování pyrimidinového analogu 5-bromo-2'-deoxyuridinu do nově syntetizovaných řetězců DNA místo thymidinu
- imunochemická detekce Eu-značenými monoklonálními protilátkami proti 5-bromo-2'-deoxyuridinu

Sledování interakcí ligand – receptor

- jeden z dvojice pomocí streptavidinu – biotinu fixován na mikrotitrační destičce
- proti druhému namířena Eu-značená protilátka

př. tyrozinkináza



Děkuji za pozornost...



...ale i těm,
kteří se
nudili !

...těm, které
problematika
zajímala...