

苯丙酮尿症(PKU) 筛检试剂盒 (400/1000 次)

用于定量检测人类新生儿干血斑样品中的 L-苯丙氨酸

用于体外诊断
请由专业人士操作



400

REF

5610-01



1000

REF

5610-02



Enzolve Technologies Ltd.
Belfield Innovation Park,
University College Dublin,
Belfield, Dublin 4, Ireland.

联系方式:

Telephone +353 1 716 3633

Fax +353 1 716 3632

E-mail info@enzolve.com

适用范围

Enzolve 公司的苯丙酮尿症 (PKU) 筛检试剂盒是以酶学比色测试法为基础，用于定量检测新生儿血液样品中的苯丙氨酸浓度（样品使用 Whatman 903[®]号滤纸采集）的产品。

此测试适用于筛检新生儿的苯丙酮尿症 (PKU)或高苯丙氨酸血症。虽然检测结果超标不能完全确诊为苯丙酮尿症 (PKU)或高苯丙氨酸血症，但可以表明此类新生儿急需接受进一步的检查。

背景

苯丙酮尿症 (PKU)是一种常见的氨基酸代谢病，是由于苯丙氨酸代谢途径中酶的缺陷所引起的高苯丙氨酸遗传紊乱症¹。世界范围内，苯丙酮尿症 (PKU)的平均发病率为 1:15,000，且随各国间人种的不同而有差异¹。由于患者体内缺乏足够的苯丙氨酸羟化酶(E.C. 1.14.16.1)，不能催化苯丙氨酸转化为酪氨酸，导致新生儿血液和其他体液中苯丙氨酸及其相关代谢产物浓度的提高，影响新生儿大脑的正常发育，并进一步导致智力发育迟缓¹⁻³。这个过程可以通过早期诊断和限制饮食中苯丙氨酸摄入量来加以预防，一旦拖延则会增加发育迟缓的风险¹⁻³。

除了酶学方法之外，目前普遍用于检测新生儿血液中苯丙氨酸含量的方法有三种：(1) Guthrie 细菌抑制法 (BIA)⁴；(2) 茚三酮定量荧光检测法⁵和 (3) 串联质谱法 (MS/MS)⁶。前两种方法容易因受到抗生素的干扰而产生 BIA 法的假阴性或者荧光检测法假阳性的结果，串联质谱法虽然完全自动，并且灵敏度高，不受任何因素干扰，但需要昂贵的检测设备和内部控制，并且需要由训练有素的人员操作。

Enzolve 公司生产的苯丙酮尿症 (PKU) 筛检试剂盒是一款性价比高，以酶法比色检测为基础、用于定量检测新生儿干血斑样本 (DBS) 中苯丙氨酸含量的产品，有助于新生儿苯丙酮尿症 (PKU) 广泛筛检项目的开展。其检测结果不受其他氨基酸或常规代谢产物以及大多数抗生素的影响，从而减少了获取假阳性或假阴性结果的可能性。其步骤简单快速（约 10 分钟），效果明显，稳定性突出，可用于大规模自动化操作。

检测原理

Enzolve 公司的苯丙酮尿症 (PKU) 筛检试剂盒使用一种经重组改造的苯丙氨酸脱氢酶(PheDH) (E.C. 1.4.1.20)催化血液中苯丙氨酸发生氧化脱氨反应，此反应以 NAD⁺ 作为辅因子⁷⁻⁹。



生成的 NADH 通过 Diaphorase/tetrazolium 偶连反应系统 (2)转化成 NAD⁺，此步骤可以有效防止产物抑制，并推动整个脱氢反应至几乎 100%完全转化^{10,11}。使用 Enzolve 公司特有的工程化酶 Diaphorase，可以用简单、快速、准确、灵敏的比色法检测血液中的苯丙氨酸含量。

试剂盒组成

成分	说明	规格	REF	规格	REF
		400 次	5610-01	1,000 次	5610-02
酶试剂	保存在缓冲液中的细菌重组苯丙氨酸脱氢酶(1.9-2.1 U/ml*) 和心肌黄酶 (3.8-4.2 U/ml*)，缓冲液中含有叠氮钠作为保护剂	2 瓶 2 ml/瓶	5511-01	5 瓶 2 ml/瓶	5511-01
酶缓冲液	缓冲液中含有去污剂和叠氮钠作为保护剂	1 瓶 20 ml/瓶	5512-01	1 瓶 50 ml/瓶	5512-02
辅酶试剂	NAD ⁺ 干粉，四氮唑盐，缓冲液和作为保护剂的叠氮化钠	2 瓶 135 mg/瓶	5513-01	5 瓶 135 mg/瓶	5513-01
苯丙氨酸标准和对照	标准品：用 Whatman 903® 滤纸收集的含有四种不同浓度苯丙氨酸的人类干血斑样品 (S1, S2, S3, S4)； 对照：用 Whatman 903® 滤纸收集的分别含有低浓度和高浓度苯丙氨酸的人类干血斑样品 (C1, C2)。标准品和对照的苯丙氨酸浓度范围均在 1 – 20 mg/dL 之间。每张卡片上都注明了准确浓度，由附有干燥剂的拉链塑料袋封装保存。每张卡片有 8 个血斑。	1 套 (每个包装有 6 片)	5516-01	1 套 (每个包装有 6 片)	5516-01

* 1U = 1 μ mol 底物在 25°C, pH 10.5 条件下每分钟的转化率。
试剂盒保存在 2-8°C 条件下。

其他必需品

REF	商品名称
5600-07	苯丙氨酸提取液 (10x) 30% 三氯乙酸 (TCA)，使用之前先用去离子水或蒸馏水 10 倍稀释。
5600-02	酶标板 (96 孔，平底)
5600-01	打孔器 (4.75 mm)
5600-06	平板密封器
5600-03	多通道移液器 有 570/690 nm 滤光片 (双波长) 或 570 nm 滤光片 (单波长)的酶标仪。

真空管转移法还需要以下设备：

5600-05	过滤板 (96 孔，有 0.2 μ m PVDF 膜的丙烯酸板)
5600-04	用于 96 孔板的真空管 真空泵

血样收集

新生儿血液应用 Whatman 903® 号样本采集滤纸收集，采集过程依据美国临床实验室标准化委员会 (NCCLS) 认证的标准步骤 LA4-A3¹²，血样收集时间应该至少在婴儿出生 24 小时之后 (以 48-72 小时为佳)。为了获得准确的结果，新生儿应该正常喂食，例如母乳或者婴儿奶粉^{13,14}。

试剂的制备和保存 (足够 200 次检测)

- 酶试剂：**1 瓶酶试剂 (2 mL) 中加入 9 mL 酶缓冲液，并且轻轻的混匀 (总共 11 mL)。稀释后的酶试剂在 2-8°C 条件下可以稳定保存 30 天。
- 辅酶试剂：**1 瓶辅酶试剂中加入 33 mL 蒸馏水或去离子水，轻轻混匀，不要剧烈摇动。新配制的辅酶试剂在 2-8°C 条件下可以稳定保存 30 天。
- 工作液：**配制前，将稀释后的酶试剂和配制的辅酶试剂置于室温下平衡。按 1:3 的比例将两种试剂混合 (1 份稀释后的酶试剂加入 3 份辅酶试剂)，此即为工作液。工作液在每次使用之前均要新鲜配制，其在 2-8°C 条件下最长可稳定保存 8 小时。

检测步骤

干血斑中苯丙氨酸的提取和转移

手动样品转移

1. 取试剂盒中提供的血液苯丙氨酸标准品 S1-S4 和对照 C1-C2 卡片，用打孔器制作直径 4.75 mm (3/16")的圆形纸片，分别放入 96 孔板微孔中（建议一式两份）。将病人样本分别加入到剩下的孔中，并标注位置。用密封器密封所有未使用的孔。
2. 吸取 70 μ L 苯丙氨酸提取液(3% TCA)加入到孔中，并在室温下(18-25 $^{\circ}$ C)轻轻摇动 30-45 分钟，定期检查酶标板，确保圆纸片完全浸没在提取液中。
3. 保温结束之后，吸出 50 μ L 提取液到相应位置的新酶标板中，注意孔与孔之间要一一对应。

真空管样品转移

1. 取试剂盒中提供的血液苯丙氨酸标准品 S1-S4 和对照 C1-C2 卡片，用打孔器制作直径 4.75 mm (3/16")的圆形纸片，分别放入 96 孔过滤板中（建议一式两份）。将病人样本分别加入到剩下的孔中，并标注位置。用密封器密封所有未使用的孔。
2. 吸取 60 μ L 苯丙氨酸提取液(3% TCA)加入到孔中，并在室温下(18-25 $^{\circ}$ C)轻轻摇动 30-45 分钟，定期检查过滤板，确保圆纸片完全浸没在提取液中。
3. 保温结束之后，用真空泵真空抽取 2x10 秒，将提取物从 96 孔过滤板转移到新的 96 孔酶标板中，为了正确转移样品，请依照设备说明书小心操作。

样品检测

4. 向酶标板每孔中加入 200 μ L 新鲜配制的工作液，同时确保孔中**没有气泡产生**，然后将酶标板置于室温(18-25 $^{\circ}$ C)条件下保持 10-12 分钟。
5. 保温之后立即测定酶标板在 570 和 690 nm (双波长) 或 570 nm (单波长)处的吸光值。

计算

目前，只要提供了标准品的浓度，大多数附带有分析软件的酶标仪都可以利用线性回归分析法自动计算所测的结果。然而，对于手动计算来讲，测试时必须先画标准曲线，以标准品 S1-S4 在 570nm 和 690nm 处吸光值的差值（或只用 570nm 处吸光值）作为 y 轴，同时以与其对应的苯丙氨酸浓度作为 x 轴，在二维坐标中标出四个点（S1-S4），画出通过 4 个点的最理想直线，便为**标准曲线**。对照中的苯丙氨酸浓度(C1 和 C2) 和病人血样便可通过标准曲线直接计算。

注意此说明书中所有的浓度都是以 mg/dL 为单位的，如果要转变成以 μ mol/dL 为单位，则要做相应的转换(1 mg/dL = 60.5 μ mol/dL)。

Enzolve 公司的苯丙酮尿症 (PKU) 筛检试剂盒的典型标准曲线如下图(图 1)。请注意此图只用作参考，用户在每次检测时务必要重新画新的标准曲线。

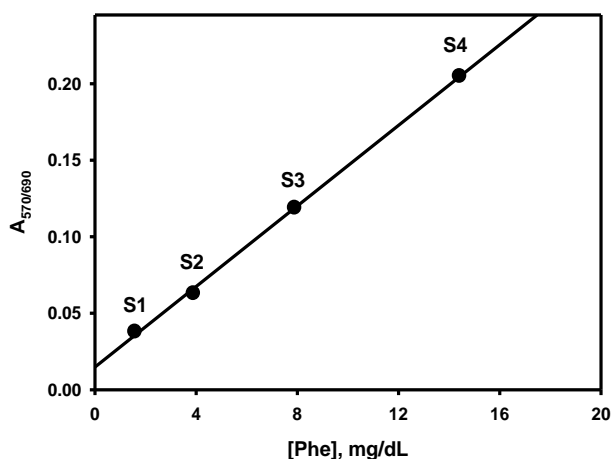


图 1. Enzolve 公司苯丙酮尿症 (PKU) 筛检试剂盒的典型标准曲线

定性对照/溯源性

为了监测测试效果并保证测试结果的有效性，检测时，应该在每块酶标板中均加入干血斑标准品和对照，试剂盒中有附用于内部对照的含低浓度(C1)和高浓度(C2)苯丙氨酸的干血斑样品。同样的，测试时，酶标板内也应该加有含不同苯丙氨酸浓度水平的干血斑作为外部参考对照。

如果测得的每个对照浓度均在对照卡所标的范围以内，则测试结果有效。如果数据中有一个不在规格范围以内，则检测结果不可信，并且后者情况下所检测的病人血样结果**不能**被报告。

如果病人样品中的苯丙氨酸浓度低于分析的最低值，那么有必要再重复一次操作以便排除样品或者操作程序错误的可能。

Enzolve 公司苯丙酮尿症 (PKU) 筛检试剂盒里面的血液苯丙氨酸标准品和对照均来源于 Second ISNS Reference Preparation for Neonatal Screening (2nd ISNS-RPNS).

ISNS – International Society for Neonatal Screening

理想的数据范围

用 Enzolve 公司的苯丙酮尿症 (PKU) 筛检试剂盒总共分析测试了 450 个干血斑样品，所有测得的样品中苯丙氨酸实际浓度都低于 2.1 mg/dL，并且在文献^{16,17}所报告的范围以内呈平均值为 0.69 mg/dL 的正态分布，标准偏差为 0.33 mg/dL。

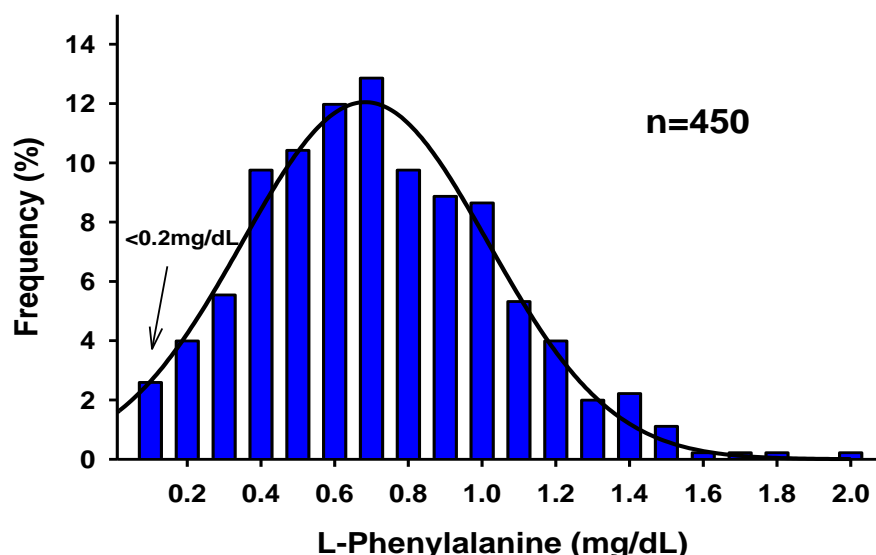


图 2. 健康人群血液中苯丙氨酸水平正态分布图

下表中的数据是分别用 95%、99%、99.9%级别的 Enzolve 公司苯丙酮尿症(PKU) 筛检试剂盒检测所获得的苯丙氨酸水平阈值。

百分比	阈值 (mg/dL)
95	1.34
99	1.54
99.9	1.78

建议每个实验室均建立自己的正常统计范围和统计阈值。

线性和灵敏性

根据美国临床实验室标准化委员会 (NCCLS) 推荐的操作指南 EP6-P¹⁵，Enzolve PKU 筛检试剂盒估计可分析高至 20 mg/dL，低至 0.2 mg/dL 的血液苯丙氨酸浓度。

数据比较

分别使用 Enzolve 公司苯丙酮尿症 (PKU) 筛检试剂盒、另一种商业化应用的酶测试法和串联质谱分析法(MS/MS)来平行分析病人的干血斑样品。此研究中所取的样品来自正常的健康人群、已经被诊断出患有苯丙酮尿症的病人以及有其他精神紊乱但非苯丙酮尿症的病人 (non-PKU)。

结果表明, Enzolve 公司的试剂盒所测得的数据略低于串联质谱法, 相比较, 另一种商业化应用的酶测试法所测得的数据则比串联质谱法高 20%, 并且系数相关性较差 (图 3)。

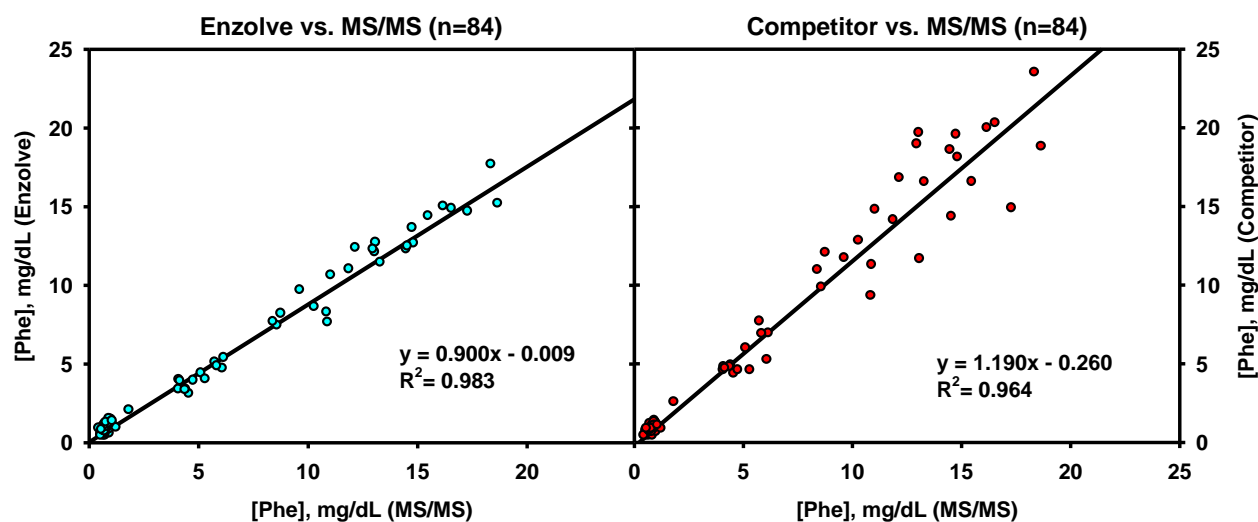


图 3. 分别用两种酶法(Enzolve 和 竞争产品)测定血液中苯丙氨酸浓度所得结果与串联质谱法所测得的结果的比较

底物特异性和干扰因素

用普遍存在的氨基酸、抗生素和代谢产物来测试 Enzolve 公司苯丙酮尿症(PKU) 筛检试剂盒的底物特异性发现, 四环素是唯一潜在的干扰底物, 目前没有发现其他可以干扰检测并导致假阳性或假阴性结果的抗生素和代谢产物。

测试准确度

通过对相同样品的多重测定 (板内检测) 或 N 重测定 (板间检测), 我们算出 Enzolve 产品板内检测和板间检测准确度。

分析类型	结果		
	浓度范围 (mg/dL)	变异系数 (%)	N
板内变异	3.55 – 16.54	5.2 – 10.2	40
板间变异	3.85 – 15.43	5.3 – 11.5	20

注意事项及预防

所有试剂中均含有 0.095% 的叠氮钠作为保护剂, 叠氮钠可能与铅和铜管反应生成高度爆炸性的金属化合物, 所以, 当处理含叠氮化合物的试剂时, 为防止叠氮化合物的聚集, 请务必用大量清水冲洗。

样品提取液中含有 3% 的三氯乙酸(TCA), 其有腐蚀性, 所以操作时应当注意采取适当的防护措施。

试剂盒中干血斑对照和标准品均来自人类血液样品, 经我们检测显示, 其对 HIV 1 和 2 型抗体、乙型和丙型肝炎表面抗原均呈阴性。尽管如此, 操作人员应该了解所有的人体血液样品都可能具有潜在的危险性, 所以在操作处理过程中注意采取适当的防护措施。

血样采集如果早于 24 小时, 可能会产生假阳性或假阴性结果。

如果检测结果显示超标, 应该继续通过其他的检测方法作进一步验证。

建议每个实验室均建立自己的正常统计范围和统计阈值。

Enzolve 公司的苯丙酮尿症 (PKU) 筛检试剂盒是供经过适当培训并认证合格的实验人员使用, 不适用于自我检测或当做非处方销售。

建议所有用户汇报检测结果前先熟悉此试剂盒的使用。

建议检测结果由经过培训的专业人士负责解释, 临床介入之前同时应该考虑其他的临床信息。

建议在操作时所有的标准、对照和样品都一式两份, 直到实验室工作人员完全熟悉掌握此检测步骤。以下事项必须注意:

- a. 每块酶标板中都需要设置有标准和对照。
- b. 所有试剂都在 2-8°C 条件下密封保存, 并且每次在使用前先先要平衡到室温。
- c. 为获得可靠结果, 应严格按照使用说明中的步骤进行操作, 任何由于改变试剂或检测步骤所导致的结果都由用户负责。
- d. 检测前应正确维护和校准检测仪器, 所有使用的仪器设备均应获得 CE 认证。
- e. 在标签标明的有效期之后不要继续使用该试剂盒或其中的试剂。
- f. 稀释或重新配制的溶液在建议的稳定保存期之后或溶液变浑浊或变色之后请勿使用。
- g. 不要使用任何有明显破损或者明显被污染的化学试剂。
- h. 为了减少获得假阳性结果的可能性, 请不要重复使用酶标板。

参考文献

1. Scriver CR, Kaufman S. (2002) in: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases (Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S, Valle D., Childs, B, Kinzler, K.W., Vogelstein, B. eds.) VIII edition. McGraw Hill, 1667
2. Waisbren SE, Mahon BE, Schnell RR, Levy HL (1987) Pediatrics 79:351
3. Smith L, Beasley MG, Ades AE (1990) Arch Dis Childhood 65:472
4. Guthrie R, Susi A (1963) Pediatrics 32:338
5. Hoffman GL, Laessig RH, Hassemmer DJ, Makouski ER (1984) Clin Chem 30:287
6. Chace DH, Sherwin JE, Hillman SL, Lorey F, Cunningham GC (1998) Clin Chem 44:2405
7. Asano Y, Nakazawa A, Endo K (1987) J Biol Chem 262:10346
8. Wendel U, Hummel W, Langenbeck U (1989) Anal Biochem 180:91
9. Wendel U, Koppelkamm M, Hummel W, Sander J, Langenbeck U (1990) Clin Chim Acta 192:165
10. Guilbault GC, Kramer DN (1964) Anal Chem 36:2497
11. Guilbault GC, Kramer DN (1965) Anal Chem 37:1219
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1997) Approved Standard LA4-A3 "Blood collection on filter paper for neonatal screening programs". 3rd edition, NCCLS, Villanova, PA
13. Doherty LB, Rohr FJ, Levy HL (1991) Pediatrics 87:240
14. American Academy of Pediatrics, Committee on Genetics: Issues in Newborn Screening (1992) Pediatrics 89:345
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1986) Proposed Guideline EP6-P "Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods" NCCLS, Villanova, PA
16. Reilly A. A et al. (1998) Clin Chem 44:317-326
17. Koch R. K. Am Fam Physician (1999) 60:1462-1466

体外诊断的指令符号 (IVDD 98/79/EC)

 0050	- 欧洲共同体认证
	- 产品编号
	- 产品批次号
	- 使用说明书
	- 用于体外诊断
	- 工业制造
	- 在此日期前使用
	- 可进行<n>次测试
	- 温度限制
	- 酶试剂
	- 酶缓冲液
	- 辅酶试剂
	- 干血斑标准品
	- 干血斑对照