

【产品名称】

通用名：苯丙氨酸定量检测试剂盒（酶法）

英文名称：**Phenylalanine Kit (Enzyme)**

【包装规格】

96 人份/盒 480 人份/盒

【预期用途】

用于定量检测采集在 S&S903# 滤纸上的新生儿全血样品中苯丙氨酸的浓度。本试剂盒适用于新生儿苯丙酮尿症（PKU）的筛查检测。仅用于体外检测。

苯丙酮尿症（简称 PKU）是一种较常见的常染色体隐性遗传性氨基酸代谢病，发病率约 1/10,000。本病可因苯丙氨酸羟化酶缺乏引起，也可因辅酶因子 BH4 缺陷引起。这些缺陷致使苯丙氨酸不能被转化为酪氨酸，导致大量的苯丙氨酸及其代谢产物在体内堆积，引起中枢神经系统损害。其临床主要表现为：发育迟缓，毛发、皮肤及虹膜变浅，癫痫，进行性智力低下等。由于本病的早期发现早期治疗，对患儿的生长发育、智力发育不受影响，因此被我国列为新生儿疾病筛查项目之一。检测方法还有细菌抑制法、荧光法等。

【检验原理】

采用三氯醋酸（TCA）从干血片中萃取苯丙氨酸。苯丙氨酸被苯丙氨酸脱氢酶转化成苯丙酮酸。这个反应伴随着反应混合物中存在的辅酶 NAD⁺减少，生成 NADH，这个氧化还原反应中把添加的四唑盐转化成橙黄色物质 Formazane。Formazane 的量与样本中苯丙氨酸的量成正比。使用酶标仪检测其光密度值，即可换算成其对应的苯丙氨酸浓度值，酶标仪波长使用 450nm。

【主要组成成分】

名称 96 人份/盒 480 人份/盒 包装
酶稀释液（Triton X-100 缓冲液） 11ml/瓶 55ml/瓶

无色透明玻璃瓶或棕色玻璃瓶

底物（四唑盐） 11ml/瓶 55ml/瓶

中和液（碳酸盐缓冲液） 5.5ml/瓶 27.5ml/瓶

三氯醋酸溶液（3%） 17ml/瓶 85 ml/瓶

酶（冻干粉） 1 瓶（冻干粉） 5 瓶（冻干粉）

辅酶（冻干粉） 1 瓶（冻干粉） 5 瓶（冻干粉）

96 孔微孔板 2 块 10 块 铝箔袋

标准血片 S1~S5 1.1、2.8、5.3、9.6、17.3mg/dl 1 份 2 份 无色透明塑料袋

质控血片 C1: 2.2- 4.2 mg/dl C2: 4.6- 8.6 mg/dl 1 份 2 份

说明书 1 份

质量验证单 1 份

注：标准品或质控品的浓度若有改变，将在试剂盒内放通知单，同时电话通知。

【储存条件及有效期】

储存条件：2℃~8℃，防止冷冻。

有效期：12 个月。本试剂为一次性使用，酶和辅酶稀释后即使用，剩余不再使用。

【适用机型】

波长 450nm（参考波长 640 nm），美国 DYNEX 公司 CB 372 型酶标仪。

【样本要求】

遵循卫生部新生儿筛查血斑采集常规，采集并保存新生儿血斑。

【检验方法】

1. 检测前所有的试剂、样本和微孔板条达到室温（18~25℃）；
2. 配制酶和辅酶储存液
分别向酶和辅酶冻干粉瓶内加双蒸水 0.5ml，轻摇，避免产生泡沫，稀释后可在 2℃~8℃ 储存 2 天。
3. 配制酶和辅酶应用液
另取 2 只干净的烧杯，分别加入酶和辅酶储存液 0.5 ml，再各加入酶稀释液 5ml，在 18℃~25℃ 可保持稳定 8 小时，在 2℃~8℃ 不能延长稳定性。（若做 1/2 板，取 0.25 ml 储存液加酶稀释液 2.5 ml）。
4. 用打孔器打下直径 3mm 标准品、质控品、样本血斑放入 96 微孔板相应微孔中；
5. 每孔加 150 μl 三氯醋酸溶液，室温振荡（300—500U/分）60 分钟；
6. 加 50 μl 的中和液到另一块新的微孔板孔中；
7. 吸取 130μl 的标准品、质控品、样本萃取液到另一微孔板相应的微孔中，轻微振荡；
8. 加 50 μl 的酶应用液到每个孔中；
9. 加 50 μl 的辅酶应用液到每个孔中；
10. 在室温（18℃~25℃）下振荡温育 60 分钟（300 转/分）；
11. 每孔加 100 μl 底物，混匀，在 3~5 分钟内读取 OD 值，酶标仪使用波长 450nm（参考波长 640 nm）。
12. 结果计算：酶标仪附带软件自动计算样品浓度值。或按照下面方法手工计算：
 - a) 坐标纸上以标准品的荧光值和与其相对应的标准品浓度绘制标准曲线。OD 值为纵轴或 Y 轴，浓度为横轴或 X 轴。
 - b) 确定质控品和每个样品的苯丙氨酸浓度值：首先在 Y 轴上查找 OD 值，横向延伸至标准曲线，以标准曲线上的点拉垂直线与 X 轴相交，得出苯丙氨酸浓度值，判断结果。
 - c) 计算公式： $Y=aX+b$
 - d) 单位转换：1 mg/dl = 60.6 μmol/L

【参考值（参考范围）】

通过 5018 例血斑检测，经计算中位数为 1.34 mg/dl，97.5% 可信限为 2.85 mg/dl，99% 可信限为 3.1 mg/dl。参考值 2.85mg/dl

每个实验室应建立自己的参考值（参考范围）。

【检验结果的解释】

1. 若检测血斑的苯丙氨酸浓度大于 2.85mg/dL，为 "可疑阳性"，原血斑复查。若复查的结果仍高于 2.85mg/dL，应采集新的血斑，进行确认检验。
2. 检验结果本身不能成为治疗的惟一因素，必须与其他的临床观察和诊断试验相联系。
3. 质控品的结果必须控制在要求范围之内，否则检测结果不符合可接受范围，视为无效。

【检验方法的局限性】

1. 任何高浓度值的结果都要视为 '假阳性' 必须进行复查确定。另外存在任何苯丙氨酸病历或临床症状都要进行复查。
 2. 不排除药物对病人苯丙氨酸的直接影响。如果病人有 PKU 临床症状或相关病历，即使苯丙氨酸值正常也应该复查。
3. 应使用新生儿筛查专用 S&S 903# 滤纸采集血斑。使用其它滤纸结果将不同。
4. 采样时间应在出生后 72 小时并充分哺乳 6 次以上，以避免体内蛋白负荷不足而导致出现假阴性结果。

【产品性能指标】

1. 试剂盒外观整洁，文字符号标识清晰

2. 其液体组分：酶稀释液、底物、中和液、三氯醋酸溶液应清亮、无沉淀
3. 血制品经 HIV、HbsAg、HCV、梅毒、转氨酶抗体检测应呈阴性
4. 剂量—反应曲线的线性范围 1.1~17.3mg/dl（其确定值以随行质量验证单为准）。
5. 批内精密度 不大于 10 %
6. 批间精密度 不大于 15 %
7. 准确性 回收率为 85%~119 %
8. 灵敏度 最低可检出限小于 1.55 mg/dl
9. 特异性 与酪氨酸、组氨酸和甘氨酸无交叉反应

【注意事项】

1. 仅用于体外诊断。一次性使用产品，供专业人员使用。
2. 不同批号的试剂不可混用；超出有效期的试剂不可使用。
3. 按照实验程序加样，不可颠倒顺序，否则会导致实验失败。
4. 自备实验材料：酶标仪、振荡器、双蒸水或去离子水、移液器、移液槽、一次性手套。
5. 标本应视为存在潜在的生物危害，实验结束后作为潜在传染源处理。