



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **331806**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.
C12Q 1/44 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20042992	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.12.19 PCT/IT2002/00811
(22)	Inng.dag	2004.07.13	(85)	Videreføringsdag	2004.07.13
(24)	Løpedag	2002.12.19	(30)	Prioritet	2001.12.21, IE, 011100
(41)	Alm.tilgj	2004.09.20			
(45)	Meddelt	2012.04.10			
(73)	Innehaver	Actial Farmacêutica Lda, Rua dos Ferreiros 260, PT-9000-082 FUNCHAL (MADEIRA), Portugal			
(72)	Oppfinner	Claudio de Simone, Via Nuoro, 10, IT-00040 ARDEA , Italia			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Analytisk fremgangsmåte for in vitro deteksjon av alkalisk sfingomyelinase og kit for anvendelse ved slik fremgangsmåte
(56)	Anførte publikasjoner	N.A. DENISOVA et al., Role of membrane lipids in regulation of vulnerability to oxidative stress in PC12 cells: implication for aging, Free Radical Biology & Medicine, 2001, vol. 30(6), side 671-678, E. SOFIC et al., Antioxidant and pro-oxidant capacity of catecholamines and related compounds. Effects of hydrogen peroxide on glutathione and sphingomyelinase activity in pheochromocytoma PC12 cells: potential relevance to age-related diseases, J Neural Transm, 2001, vol. 108, side 541-557
(57)	Sammendrag	

Foreliggende oppfinnelse omfatter en analytisk fluormetrisk fremgangsmåte og et kit for anvendelse ved slike fremgangsmåter for å analysere tilstedeværelsen av alkalisk sfingomyelinase (SMase) i avføring av en pasient som har behov for en slik analyse siden alkalisk SMase er en markør for alvorlige patologiske tilstander som cancer.

1

Foreliggende oppfinnelse angår en analytisk fremgangsmåte for å påvise tilstedeværelsen av alkalisk sfingomyelinase i avføring eller biologiske væsker av pasienter som har behov for en slik vurdering. Oppfinnelsen angår også et kit for å utføre den analytiske fremgangsmåten.

5

Mer spesifikt er fremgangsmåten ifølge den foreliggende oppfinnelsen en *in vitro* fluormetriefremgangsmåte for å detektere alkalisk sfingomyelinase som, som vil bli beskrevet detaljert i det følgende, er en markør av alvorlige patologiske tilstander som kolonkreft og slektsrelatert adenomatøs polypose.

10

Enzymet sfingomyelinase (sfingomyelin fosfodiesterase, SMase) katalyserer hydrolysen av sfingomyelin til ceramid og kolinfosfat.

15

Tre forskjellige typer av SMase (syre, nøytrale og alkalisk) har blitt identifisert opptil nå og de foreligger i forskjellige isoformer som følger:

20

- lysosomal syre SMase (A-SMase);
- cytosolisk Zn^{2+} -avhengig syre SMase;
- membrannøytral magnesium-avhengig SMase (N-SMase);
- cytosolisk magnesium-uavhengig N-SMase; og
- alkalisk SMase.

25

SMaser har vist seg å spille en roll i et stort mangfold av fysiologiske og patologiske prosesser, som inkluderer: lysosomal hydrolyse av endocytosert SM, ceramid-mediert cellesignalisering, aterogenese, terminal differensiering, stopp av cellesykluser, apoptose, betennelse og regulering av eukaryote stressreaksjoner.

30

I motsetning til syre og nøytral SMase, som foreligger i cellen som respektive lysosomale og membran-bundne enzymer, har alkalisk SMase vevs- og artsforskjell. Hos mennesker finner man den alkaliske SMasen i tarmmukosa og i gallen. Alkalisk SMase begynner å dukke opp i duodenum, når et høyt nivå i tykktarmen, spesielt i den distale del av jejunumet og foreligger i betydelige mengder i kolon og rektum. Denne SMasen har optimal alkalisk pH ved 9,0, er Mg^{2+} -uavhengig, galledalt-avhengig og trypsin-resistent.

35

Den viktigheten som patologiske alkalisk SMase har, har man bare i det siste lagt merke til og det har ført til forskjellige utførelser av forskjellige studier, hovedsakelig på grunn av de følgende årsaker.

- 5 Først kan enzymet være ansvarlig for hydrolysen av kostholds-sfingomyelin som forekommer i alt vesentlig i melk, egg, kjøtt og fisk. For det andre kan dette enzymet regulere kolesterolabsorpsjon. For det tredje foreslås det at tilstedeværelsen av alkalisk SMase i intestinaltrakten og dens selektive reduksjon som er blitt detektert i kolorektalkarsinomet at dette enzymet spiller en rolle med hensyn til intestinal
- 10 karsinogenese siden, under fysiologiske betingelser, det stimulerer apoptose og beskytter den intestinale slimhinnen mot karsinogenese.

- Tidligere studier har også vist at, under fysiologiske betingelser, dissosieres alkalisk SMase av gallesaltet fra intestinal slimhinnemembran til lumen. Imidlertid, under
- 15 patologiske betingelser, hvorved gallesaltkonsentrasjon øker unormalt, kan dissosiasjon av alkalisk SMase ved hjelp av gallesaltet overgå biosyntesen av enzymet som resulterer i et lavt aktivitetsnivå av alkalisk SMase i slimhinnen og en unormalt økt utsondring av enzymet i avføringen eller i biologiske væsker, dvs. galle. Som konsekvens kan et overskudd av alkalisk SMase som utsondres i avføringen eller i biologiske væsker over
 - 20 det normale, bunnivåer, tydes som en verdifull diagnostisk markør for kolonrektal karsinom og slektsrelatert adenomatøs polypose, og således; behovet for en pålitelig analysemetode for å detektere alkalisk SMase i avføringen eller i biologiske væsker av pasienter som med stor sannsynlighet lider av de tidligere nevnte patologier av intestinaltrakten.

- 25 I tillegg inneholder noen bakteriestammer (for eksempel *Streptococcus thermophilus* *Lactobacilli*) høye nivåer av SMase og vurderingen av alkalisk SMase kan tilveiebringe en fremgangsmåte for å evaluere forandringer i antallet av nevnte bakterie, dvs. etter en behandling med probiotika eller/og probiotisk-baserte produkter.

- 30 Tidligere fremgangsmåter for å analysere alkalisk SMase er allerede kjent. Aktiviteten av SMasene kan bestemmes enten *in vivo* gjennom celler som er merket med en radioaktiv forløper av SM og deretter bestemme de merkede produktnivåer eller *in vitro* ved anvendelse av radiomerkede SM eller en kromogen analog av SM eller farget eller
- 35 fluorescerende derivater av nøytral SM.

Disse kjente og vanlige anvendte analyser er ikke absolutt tilfredsstillende siden de er i utgangspunktet meget farlige, da det dreier seg om radioaktive analysemetoder og disse er mindre sensitive enn en fluorimetrisk analyse.

- 5 N.A. Denisova et al., Free Radical Biology & Medicine, 2001, vol.30 (6), side 671-678 beskriver rollen til membranlipider for regulering av sårbarheten til PC12-celler i forbindelse med oksidativt stress og hvilke implikasjoner dette har for aldring. Anvendelse av Amplex red fluorescensmetoden for måling av sfingomyelinaseaktivitet er kjent fra både Denisova et al. og E. Sofic et al., J Neural Trans, 2001, vol. 108, side
10 541-557.

Foreliggende oppfinnelse omfatter fremgangsmåte for in vitro deteksjon av alkalisk sfingomyelinase i en prøve av biologisk materiale fra en pasient, kjennetegnet ved at den omfatter de følgende trinn:

- 15 a) suspendere prøven i en homogeniseringsbuffer som inneholder 0,24-0,26 M sukkrose, 0,14-0,16 M KCl, 45-55 mM KH_2PO_4 , justert til rundt pH 7,4;
b) sentrifugere prøven minst én gang og gjenvinne supernatanten;
c) måle proteininnholdet i supernatanten;
d) tilsette til en prøve av supernatanten en analysebuffer som inneholder 44-55
20 mM Tris/HCl, 1,9-2,2 mM EDTA, 0,14-0,16 M NaCl pH 8,9-9,1, 28-31 μM sfingomyelin og en analysebuffer som inneholder gallesaltene TC, TDC, GC, GDC i konsentrasjon på 2,9-3,1 mM;
e) inkubere analyseblandingen ved rundt 37°C i rundt 1 time;
f) blande en prøve fra trinn d) med 28-30 μM sfingomyelin og inkuberer i
25 rundt 1 time ved omtrent 37°C;
g) tilsette til reaksjonen, buffer som inneholder 44-55 mM Tris/HCl pH 7,3 – 7,5, 9-11 mM β -glycerofosfat, 745-755 μM ATP, 4-6 mM EDTA, 4-6 mM EGTA, 95-105 Amplex Red reagens, 7-9 U/ml alkalisk fosfatase, 0,1-0,3 U/ml kolin oxidase og 1,5-2,5 U/ml pepperotperoxidase.
30 h) inkubere reaksjonsblandingen i minst en time ved rundt 37°C, lysbeskyttet;
i) måle fluorescensen ved anvendelse av en eksitering i området 530-560 og emisjonsdetektering ved rundt 590 nm.

- Vider omfatter oppfinnelsen et kit for å detektere alkalisk sfingomyelinase i et biologisk
35 materiale fra en pasient, kjennetegnet ved at den omfatter testrør som hver for seg inneholder prøver av de følgende reagenser:

4

- a) sfingomyelin som skal hydrolyseres ved pH i området mellom 8,9-9,1 ved hjelp av alkalisk sfingomyelinase tilstede i avføring eller biologiske væsker for å gi fosforylkolin;
- b) alkalisk fosfatase for å katalysere hydrolysen av fosforylkolin til kolin;
- 5 c) kolinoksidase for å oksidere kolin til hydrogenperoksid;
- d) pepperrotperoksidase for å støtte reaksjon av hydrogenperoksid;
- e) Amplex Red reagens (10-acetyl-3,7-dihydroksyfenoksazin) for å gi den fluorescerende forbindelse resorufin hvis fluorescens er en markør for den alkaliske sfingomyelinasen som foreligger i avføringen eller biologiske
- 10 væsker, og
- f) lyofilisert bakteriell sfingomyelinase for anvendelse som standardkonsentrat;
- g) en analysebuffer ved pH 8,9-9,1 som inneholder EDTA;
- h) galle salter TC, TDC, GC, GCDC;
- i) en rekasjonsbuffer som inneholder EDTA og EGTA, β -glycerofosfat of
- 15 ATP.

Et formål av den foreliggende oppfinnelsen er å tilveiebringe en pålitelig, billig fremgangsmåte eller analysemetode bedre for alkalisk SMase i avføringen eller biologiske væsker av pasienter som med stor sannsynlighet lider av kolorektal karsinom

20 og slektsrelatert adenomatøs polypose, eller gallebære eller leversykdommer, som løser problemene med de kjente fremgangsmåtene.

Et ytterligere formål med den foreliggende oppfinnelsen er å tilveiebringe et analytisk kit for anvendelse i den tidligere nevnte analysemetoden.

25

Et annet formål med den foreliggende oppfinnelsen er vurderingen av bakteriell kolonisering ved forskjellige helsetilstander eller etter sykdommer eller behandling med legemidler eller probiotika eller næringsmiddeltilskudd.

30 Den fluormetriske, indirekte analysemoden ifølge den foreliggende oppfinnelsen er basert på den følgende reaksjonssekvensen.

Under virkning av alkalisk SMase som finnes i avføring eller andre biologiske væsker, hydrolyseres sfingomyelin til ceramid og fosforylkolin, under virkning av alkalisk

35 fosfatase, hydrolyseres til kolin. Ved tilstedeværelsen av kolinoksidase produseres kolinhydrogenperoksid (H_2O_2).

Den sistnevnte forbindelsen, ved tilstedeværelsen av pepperrotperoksidase, forårsaket til å reagere med 10-acetyl-3,7-dihydroksyfenoksazin, en sensitiv fluorgensubstans for H_2O_2 (i det følgende referert til som "Amplex Red Reagent") som fører til den i høy grad fluorescerende forbindelsen resorufin. Fluorescens måles med en

5 fluortellemikroplate - fluormeter ved anvendelse av en eksitering ved 530-560 nm og fluorescensdetektering ved 590 nm.

Basert på den tidligere nevnte reaksjonssekvensen og fluorescensdetekterings-
hjelpeidler innbefatter analysemetoden ifølge foreliggende oppfinnelse for analysering

10 av alkalisk SMase de følgende trinnene som fokuserer på avføring. Imidlertid vil det være tydelig for en person med kunnskap innenfor fagområdet at denne fremgangsmåten kan på enkel måte anvendes også i forbindelse med biologiske væsker som væske fra galle med passende rutineavvik,

- 15 1) å samle opp en prøve av pasientens avføring og å tørke den;
- 2) å veie ca. 3-4 gram av den tørkede prøven og suspendere den i 20 ml av en homogeniseringsbuffer som inneholder 0,25 M sukrose, 0,15 M KCl, 50 mM KH_2PO_4 , pH 7,4;
- 3) å sentrifugere prøven ved 4000 omdreininger per minutt ved +4°C i 60
- 20 minutter;
- 4) å gjenvinne supernatanten og sentrifugere igjen i 15 minutter ved 4000 rpm ved +4°C;
- 5) å måle proteininnholdet i supernatanten med Pierce Protein analysen med bovin serumalbumin som standard ved anvendelse for hver prøve et område
- 25 av proteinkonsentrasjonen mellom 32 mg/ml og 40 mg/ml og pipettere 25 μ l av hver prøve i brønner;
- 6) å tilsette hver 25 μ l prøve 65 μ l av analysebuffer som inneholder 50 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, 0,15 M NaCl pH 9,0 og 10 μ l av 29 μ M sfingomyelin og i analysebuffer å tilsette gallsalter (TC, TDC, GC, GCDC)
- 30 i en konsentrasjon på 3 mM;
- 7) å inkubere ved 37°C i 1 time;
- 8) å pipettere 100 μ l av hver standard (se nedenfor) og 10 μ l sfingomyelin (29 μ M), å inkubere i 1 time ved 37°C som prøvene;
- 9) å tilsette etter 1 time 100 μ l av en reaksjonsbuffer som inneholder 50 mM
- 35 Tris/HCl pH 7,4, 10 mM β -glyserofosfat, 750 μ M ATP, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 100 μ M Amplex Red, 8 U/ml alkalisk fosfatase, 0,2 U/ml kolinoksidase, 2 U/ml pepperrotperoksidase;

- 10) å inkubere reaksjonene i en time eller lengre ved 37°C, lysbeskyttet;
- 11) å måle fluorescensen i en fluorescensmikroplateleser ved anvendelse av en eksitering i området på fra 530-560 nm og emisjonsdetektering ved 590 nm;
- 12) for hvert punkt, å korrigere bakgrunnsfluorescensen ved å trekke fra verdiene avledet fra ikke-sfingomyelinase kontrollprøve.

5

Oppfinnelsen angår også et kit for å detektere alkalisk sfingomyelinase i avføringen til en pasient eller biologiske væsker til en pasient ifølge den tidligere nevnte fremgangsmåten som innbefatter testrør som inneholder separatprøver av de følgende reagenser:

10

- a) sfingomyelin som skal hydrolyseres ved hjelp av alkalisk sfingomyelinase som foreligger i avføringen eller biologiske væsker for å gi fosforylkolin; ’
- b) alkalisk fosfatase for å katalysere hydrolysen av fosforylkolin til kolin;
- 15 c) kolinoksidase for å oksidere kolin til hydrogenperoksid;
- d) pepperrotperoksidase for å støtte reaksjon av hydrogenperoksid med
- e) Ampler Red reagens (10-acetyl-3,7-dihydroksyfenoksazin) for å gi den fluorescerende forbindelse resorufin hvis fluorescens er en markør for den alkaliske SMasen som foreligger i avføringen eller biologiske væsker, og
- 20 f) lyofilisert bakteriell sfingomyelinase for anvendelse som standardkonsentrat.

For å utføre den analytiske fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen på en egnet måte har man i tillegg behov for de tidligere nevnte kit bestanddeler behov for de følgende ytterligere materialer og utstyr:

25

- Sukrose;
- Kaliumklorid (KCl);
- Kaliumfosfat, monobsisk (KH₂PO₄);
- Trizmabase;
- 30 EDTA;
- Natriumklorid;
- Taurokolat (TC);
- Taurodeoksykolat (TDC);
- Glykokolat (GC);
- 35 Glykochenodeoksykolat (GCDC);
- β-glycerofosfat;
- ATP-dinatriumsalt;

EGTA;

BCA proteinanalysereagens;

Bovint serumalbumin;

En kjølt sentrifuge;

5 En mikroplateleser som er i stand til målinger ved 550-562 nm, og

En fluortellemikroplate fluormeter.

For å gjennomføre kvantifiseringen av SMase-aktiviteten bør man gjennomføre de følgende målinger.

10

Fremstilling av standardkurve

Kittet er supplert med et standardpreparat av SMase, som består av bakterielt ekstrakt som inneholder en type av SMase som fungerer ved pH 9. De følgende operasjoner bør utføres.

15

Å lage en SMase-kalibreringskurve: å fortynne standardkonsentratet for å gjøre seriefortynninger.

Å rekonstituere SMase-standardten med 1 ml analysebuffer (pH 9,0); denne

20

rekonstitusjonen produserer en stamoppløsning på 96 mU/ml.

Å pipettere 0,500 ml analysebuffer i hvert rør. Anvendelse av stamoppløsningen for å produsere en fortynningsserie. Å blande hvert rør grundig før den neste overføringen.

Den ufortynnede standarden tjener som den høye standarden (96 mU/ml), og

25

standardkurven vil inneholde de følgende konsentrasjoner (mU/ml): 96-48-24-12-6-3.

Buffer tjener som nullstandard (0 mM/ml).

Typiske standardkurver

I figur 1 viser standardkurven for eksempelformål. En standardkurve bør genereres for

30

hvert sett av undersøkte prøver.

Beregning av resultater

Man må lage et gjennomsnitt av duplikatmålingene for hver standard og prøve å trekke fra gjennomsnittsnulstandard fluorescensen.

35

Man må overføre fluorescensen for standardene mot aktiviteten (mU/ml) av standardene og tegne den beste kurven. For å bestemme SMase-aktiviteten for hver prøve må man

først finne fluorescensverdien på y-aksen og lage en forlenget horisontal linje på standardkurven. Ved krysningsstedet forlenger man en vertikal linje til x-aksen og leser den tilsvarende SMase-aktivitet.

- 5 Den beskrevne fremgangsmåten er i stand til å analysere SMase-aktiviteten *in vitro*; den har blitt utviklet med den intensjon å detektere alkaliske SMase i en organisk prøve.

For å analysere spesifikt den alkaliske SMasen anvender fremgangsmåten betingelser som detekterer syren og nøytral SMase-aktivitet. Faktisk så:

10

- er homogeniseringsbufferen den nøytrale pH, men har ikke protease- og fosfataseinhibitorer for å ekskludere den nøytrale SMasen siden den sistnevnte er sensitiv overfor protease- og fosfataseaktiviteter og er følgelig inhibert ved disse enzymer;

15

- i homogeniseringsbufferen finnes ikke $MgCl_2$ som blokkerer aktiviteten av Mg-avhengig nøytral SMase;
- reaksjonsbufferen inneholder β -glyserofosfat og ATP for å utelukke videre syre SMase-aktivitet ved nøytral pH, og denne bufferen foreligger EDTA og EGTA i høy konsentrasjon for å inhibere nøytral SMase.

20

P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for in vitro deteksjon av alkalisk sfingomyelinase i en prøve av biologisk materiale fra en pasient, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter de følgende trinn:

- a) suspendere prøven i en homogeniseringsbuffer som inneholder 0,24-0,26 M sukrose, 0,14-0,16 M KCl, 45-55 mM KH_2PO_4 , justert til rundt pH 7,4;
- b) sentrifugere prøven minst én gang og gjenvinne supernatanten;
- c) måle proteininnholdet i supernatanten;
- d) tilsette til en prøve av supernatanten en analysebuffer som inneholder 44-55 mM Tris/HCl, 1,9-2,2 mM EDTA, 0,14-0,16 M NaCl pH 8,9-9,1, 28-31 μM sfingomyelin og en analysebuffer som inneholder gallesaltene TC, TDC, GC, GCDC i konsentrasjon på 2,9-3,1 mM;
- e) inkubere analyseblandingen ved rundt 37°C i rundt 1 time;
- f) blande en prøve fra trinn d) med 28-30 μM sfingomyelin og inkuberer i rundt 1 time ved omtrent 37°C;
- g) tilsette til reaksjonen, buffer som inneholder 44-55 mM Tris/HCl pH 7,3 – 7,5, 9-11 mM β -glycerofosfat, 745-755 μM ATP, 4-6 mM EDTA, 4-6 mM EGTA, 95-105 Amplex Red reagens, 7-9 U/ml alkalisk fosfatase, 0,1-0,3 U/ml kolin oxidase og 1,5-2,5 U/ml pepperotperoxidase;
- h) inkubere reaksjonsblandingen i minst en time ved rundt 37°C, lysbeskyttet;
- i) måle fluorescensen ved anvendelse av en eksitering i området 530-560 og emisjonsdetektering ved rundt 590 nm.

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at fluorescenslesingen er, for hver prøve, korrigert med hensyn til bakgrunnsfluorescens ved å trekke fra verdiene avledet fra en ikke-sfingomyelinase kontrollprøve.

3.

Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at proteininnholdet måles ved en Pierce Protein analysemetode.

4.

Fremgangsmåte i følge krav 1 der det biologiske materialet er avføring fra en pasient
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter følgende trinn:

- 5 a) tørke en prøve av pasientens avføring;
- b) veie omtrent 3-4 gram av den tørkede prøven og suspendere den i 20 ml av en homogeniseringsbuffer som inneholder 0,25 M sukrose, 0,15 M KCl, 50 mM KH_2PO_4 , pH 7,4;
- c) sentrifugere prøven ved 4000 rpm ved +4°C i 60 minutter;
- 10 d) gjenvinne supernatanten og sentrifugere igjen i 15 minutter ved 4000 rpm ved +4°C;
- e) måle proteininnholdet i supernatanten med Pierce Protein analysen med bovint serumalbumin som standard, ved å anvende for hver prøve et område av proteinkonsentrasjonen mellom 32 mg/ml og 40 mg/ml og pipettere 25 µl av hver prøve i brønner;
- 15 f) tilsette hver 25 µl prøve 65 µl av analysebuffer som inneholder 50 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, 0,15 M NaCl pH 9,0 og 10 µl av 29 µM sfingomyelin og i analysebufferen tilsette gallesaltene TC, TDC, GC, GCDC i konsentrasjon på 3 mM;
- 20 g) inkubere ved 37°C i 1 time;
- h) pipettere 100 µl av hver standard lyofilisert bakteriell sfingomyelinase og 10 µl sfingomyelin 29 µM, og inkubere i 1 time ved 37°C som prøvene;
- i) tilsette etter 1 time 100 µl av en reaksjonsbuffer som inneholder 50 mM Tris/HCl pH 7,4, 10 mM p-glyserofosfat, 750 µM ATP, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 100 µM Amplex Red, 8 U/ml alkalisk fosfatase, 0,2 U/ml kolinoksidase, 2 U/ml pepperrotperoksidase;
- 25 j) inkubere reaksjonene i en time eller lengre ved 37°C, lysbeskyttet;
- k) måle fluorescensen i en fluorescensmikroplateleser ved anvendelse av eksitering i området på fra 530-560 og emisjon ved 590 nm;
- 30 l) for hvert punkt, å korrigere bakgrunnsfluorescensen ved å trekke fra verdiene avledet fra ikke-sfingomyelinase kontrollprøve.

5.

Fremgangsmåten i følge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at
35 den anvendes på biologiske væsker.

6.

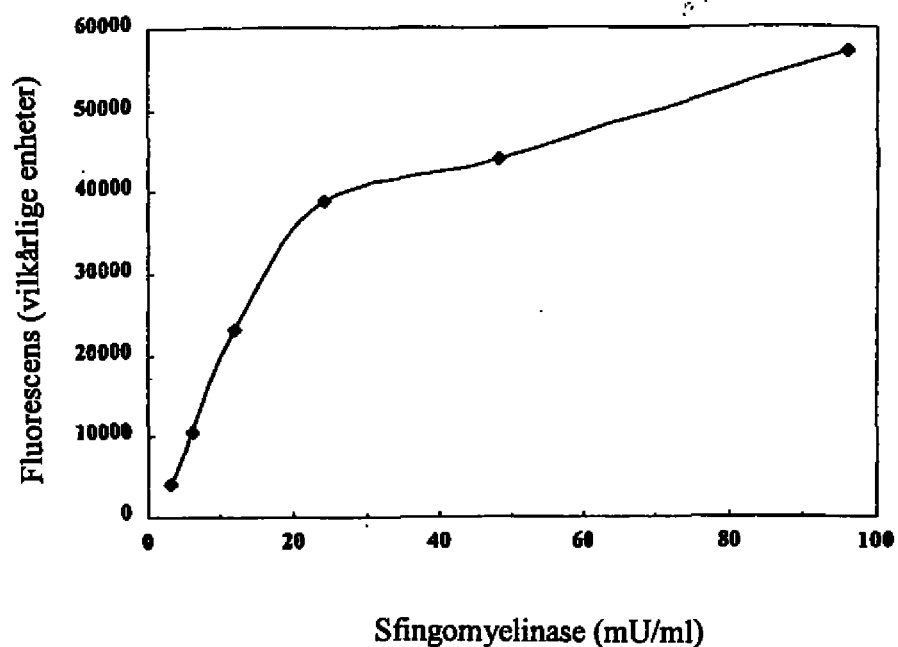
Kit for å detektere alkalisk sfingomyelinase i et biologisk materiale fra en pasient,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter testrør som hver for
 seg inneholder prøver av de følgende reagenser:

5

- a) sfingomyelin som skal hydrolyseres ved pH i området mellom 8,9-9,1 ved hjelp
 av alkalisk sfingomyelinase tilstede i avføring eller biologiske væsker for å gi
 fosforylkolin;
- b) alkalisk fosfatase for å katalysere hydrolysen av fosforylkolin til kolin;
- 10 c) kolinoksidase for å oksidere kolin til hydrogenperoksid;
- d) pepperrotperoksidase for å støtte reaksjon av hydrogenperoksid;
- e) Amplex Red reagens (10-acetyl-3,7-dihydroksyfenoksazin) for å gi den
 fluorescerende forbindelse resorufin hvis fluorescens er en markør for den
 alkaliske sfingomyelinasen som foreligger i avføringen eller biologiske væsker,
- 15 og
- f) lyofilisert bakteriell sfingomyelinase for anvendelse som standardkonsentrat;
- g) en analysebuffer ved pH 8,9-9,1 som inneholder EDTA;
- h) galle salter TC, TDC, GC, GCDC;
- i) en rekasjonsbuffer som inneholder EDTA og EGTA, β -glycerofosfat og ATP.

20

1/1



Figur 1. Detektering av sfingomyelinase ved anvendelse av fluorescensanalysen. Hver reaksjon inneholdt den indikerte mengden av bakterie sfingomyelinase i en spesifikk analysebuffer.

Reaksjoner ble inkubert ved 37°C i en time. Fluorescensen ble målt med en fluorescens mikroplateleser ved anvendelse av en eksitering ved 530 nm og fluorescensdetektering ved 590 nm.