



人运动神经元存活基因 1 (SMN1) 检测试剂盒 (PCR-荧光探针法)

说明书

【产品名称】

通用名称: 人运动神经元存活基因 1 (SMN1) 检测试剂盒 (PCR-荧光探针法)

【包装规格】

24 人份/盒、48 人份/盒。

【预期用途】

本试剂盒用于体外检测人外周全血样本基因组 DNA 中运动神经元存活基因 1 (SMN1) 外显子 7 的拷贝数变异。

通过对 SMN1 基因外显子 7 的检测, 可检出 SMN1 基因纯合缺失型、杂合缺失型和正常型。纯合缺失型、杂合缺失型和正常型对应的 SMN1 基因拷贝数分别为: 0、1 和 2。检测结果用于脊髓性肌萎缩症的辅助诊断。

临床适应症背景:

脊髓性肌萎缩症 (spinal muscular atrophy, SMA) 是由于脊髓运动神经元退行性病变, 导致骨骼肌萎缩和全身肌肉萎缩的遗传性神经肌肉疾病。该病呈常染色体隐性遗传病。SMA 临床表现为进行性、对称性、以肢体近端为主的肌无力与肌萎缩。约 95% SMA 患者是由于 SMN1 基因第 7 外显子纯合缺失所致^[1]。根据 SMN1 基因拷贝数的检测, 可以实现对 SMA 患者、携带者及正常人的诊断: 当检出 SMN1 基因拷贝数为 0 个时为 SMA 患者, 当检出 1 个 SMN1 基因拷贝数时为 SMA 携带者, 当检出 2 个 SMN1 基因拷贝数时为正常人^[2]。检测适用人群: 疑似脊髓性肌萎缩症的患者、确诊脊髓性肌萎缩症的患者或有脊髓性肌萎缩症家族病史等高危人群。

相关的临床或实验室诊断方法:

临床上常用于辅助脊髓性肌萎缩症检测的方法主要有肌电图、肌肉活检、组织化学染色、血清肌酸磷酸激酶 (CPK) 与基因检测。

【检验原理】

本试剂盒采用多重 PCR 结合荧光探针技术, 通过比较 Ct 法进行基因拷贝数的分析。

多重 PCR-荧光探针技术: 根据 NCBI GenBank 数据库公布的 SMN1 基因序列, 在 SMN1 基因外显子 7 特异位点两侧设计特异性的引物序列, 扩增 SMN1 基因片段, 同时扩增 β -actin 基因作为内控。针对每个扩增子设计特异的荧光探针, 探针 5' 端标记报告荧光基团 (R), 3' 端标记淬灭荧光基团 (Q); 当两种荧光基团同时标记在探针上时, 报告基团发出的荧光被淬灭基团淬灭, 当反应体系中有与探针碱基互补配对的模板出现时, 探针与模板特异性的杂交, 在每个 PCR 循环的延伸阶段 Taq DNA 聚合酶利用其 5'-3' 外切酶活性水解探针, 报告基团与淬灭基团分开后发出特征性的荧光信号^[3-9]。

比较 Ct 法: 通过收集和分析特定荧光信号的 Ct 值, 根据比较 Ct 法进行拷贝数的定量分析, 从而确定样本 SMN1 基因的拷贝数。

扩增体系靶序列对应的荧光标记基团及淬灭基团

	SMN1	β -actin
报告基团	VIC	CY5
淬灭基团	NFQ-MGB	BHQ3

目的基因: SMN1; 内参基因: β -actin 基因, 参比荧光: ROX

本试剂盒设置了 UNG 酶防污染体系。UNG 酶通过选择性水解断裂含有 dU 的双链或单链 DNA 中的尿嘧啶糖苷键, 消除 PCR 产物污染, 该酶的最佳活性温度为 50°C, 95°C

可被灭活。本试剂盒以 dUTP 取代 dTTP 可避免 PCR 产物污染。

【主要组成成分】

组成	24 人份/盒		48 人份/盒		主要成分
	规格	数量	规格	数量	
反应液 I	592 μ L	1 管	1184 μ L	1 管	尿嘧啶-N-糖基化酶 (UNG 酶)、脱氧核糖核苷三磷酸 (dN (U) TP)、脱氧尿苷三磷酸 (dUTP)、缓冲液 (10 $\times$ HA Buffer、5 $\times$ Probe qPCR Buffer)、参比荧光 ROX、引物、探针
反应液 II	6.5 μ L	1 管	13 μ L	1 管	High Affinity HotStart Taq 酶
A 对照品	70 μ L	1 管	70 μ L	1 管	正常人类基因组 DNA (SMN1 基因拷贝数为 2)
A 质控品 I	20 μ L	1 管	20 μ L	1 管	杂合缺失型人类基因组 DNA (SMN1 基因拷贝数为 1)
A 质控品 II	20 μ L	1 管	20 μ L	1 管	正常人类基因组 DNA (SMN1 基因拷贝数为 2)
空白对照	300 μ L	1 管	300 μ L	1 管	纯化水

说明: 不同批号试剂盒中各反应液组分不可以互换使用, 其余组分可以互换使用。

自备试剂 (本试剂盒不包括, 但在实验中必须使用的试剂)

全血基因组 DNA 提取试剂: 使用深圳会众生物技术有限公司的“核酸提取试剂” (型号: I, 备案号: 粤深械备 20180290 号)。

【储存条件及有效期】

试剂盒-20°C $\pm$ 5°C 避光保存, 有效期 12 个月。试剂盒开瓶后置于-20°C $\pm$ 5°C 避光保存, 效期内性能稳定。

试剂盒在 37°C 可避光保存 5 天。

试剂盒反复冻融不超过 6 次。

生产批号、生产日期、使用期限见标签。

【适用仪器】

厂家: Life Technologies Holdings Pte Ltd, 仪器名称: 实时荧光定量 PCR 仪 Real-Time PCR Instrument, 型号规格: 7500。

厂家: Bio-Rad Laboratories, Inc. 仪器名称: 实时定量 PCR 仪 CFX96 Real-Time System, 型号规格: CFX96。

【样本要求】

1. 适用样本

本试剂盒适用于人外周抗凝全血样本的核酸检测, 所用抗凝剂为枸橼酸钠或乙二胺四乙酸 (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA), 不能使用肝素抗凝, 20IU/mL 肝素抗凝剂是本试剂盒的外源性干扰物质。

2. 采样方法

抽取静脉血不少于 0.4 mL, 放入含有抗凝剂的管中, 标记好样本的姓名和编号等样本信息。

3. 样本保存

抗凝全血样本在室温放置可保存 24 小时, 2~8°C 可保存一个月, -18°C 以下可保存两年, 冷冻保存时应避免反复冻融。提取的 DNA 样本-18°C 以下可保存 5 年。

4. 样本运输

抗凝全血样本运输时需用泡沫箱加冰袋密封, 且在途可保存 72 小时。

【检验方法】

1. DNA 获取

使用深圳会众生物技术有限公司的“核酸提取试剂” (型号: I, 备案号: 粤深械备 20180290 号) 提取人基因组 DNA。PCR 扩增前, 可采用核酸定量仪或紫外分光光度计对模板 DNA 浓度和纯度进行测定。本试剂盒要求待检测基因组 DNA 浓度为 2~180 ng/ μ L, 纯度 (A260/A280) 为 1.7~2.0。

2. 反应液配制

首先取出所有组分置于室温解冻并振荡混匀, 2000 rpm 离心 5 sec。

PCR 反应体系份数 N=待检样本数+3 管 A 对照品+1 管 A 质控品 I+1 管 A 质控品 II+1 管空白对照, 每次试验均需设置 A 对照品 (3 个重复), 1 人份反应体系的配制见下表:

组分	反应液 I (μ L/人份)	反应液 II (μ L/人份)	总量 (μ L/人份)
反应体系	22.75	0.25	23.0

根据所需人数份数计算各组分的用量配制完成后, 振荡混匀, 2000 rpm 离心 5 sec, 按照 23 μ L/管分装。

3. 加样

操作时按照空白对照、A 对照品、待检样本及 A 质控品 I、A 质控品 II 的顺序进行加样, 加样量为 2 μ L, 反应总体积为 25 μ L, 盖紧管盖于 2000 rpm 离心 5 sec 后置于荧光 PCR 仪中并记录放置顺序 (尽量避免仪器四周边缘位置的使用)。

注: 待检样本及 A 对照品避免加入八联管两端边缘反应孔且避免使用荧光 PCR 仪四周边缘反应孔位置。

4. PCR 扩增

按下表设置 PCR 扩增参数

步骤		温度	时间	循环数
1	UNG 酶反应	50°C	1min	1
2	预变性	95°C	5min	
3	变性	95°C	15sec	40
4	延伸及荧光检测	60°C	35sec	

报告基团: VIC、CY5; 淬灭基团: NFQ-MGB、BHQ3.

5. 结果分析条件设定

内控 (Endogenous Control) 为 β -actin 基因; 参比样本 (Reference Sample) 为 A 对照品; 参比荧光 (Reference fluorescence) 为 ROX。

调整基线 (Baseline): start=3, end=18~22 (一般自动设置或手动设置在扩增曲线拐点区的前一个循环, 保持目标基因与内控基因扩增曲线斜率一致)。

调节阈值 (Threshold): 分别对 SMN1 (VIC) 和 β -actin (CY5) 设置阈值, 各通道阈值范围为 VIC: 0.4~0.6, CY5: 0.6~0.8; 由于仪器偏差各通道荧光信号强度大小可能稍微存在差异, 可根据实验条件自行设置阈值。

6. 质控标准

序号	质控品	质控标准
1	A 对照品	3 次重复检测的 Ct 均值标准: 24<SMN1<29, 21< β -actin<26
2	A 质控品 I	1. Ct 值标准: 25<SMN1<30, 21< β -actin<26, 2. RQ 值 (Expression 值) 标准: SMN1=0.25~0.75,
3	A 质控品 II	1. Ct 值标准: 23<SMN1<28, 20< β -actin<25, 2. RQ 值 (Expression 值) 标准: SMN1=0.75~1.25,



4	空白对照	所有 Ct 值均>35 或无 Ct 值; RQ 值 (Expression 值) <0.25 或无 RQ 值 (Expression 值)
以上要求须在同一次实验中同时满足, 否则, 本次实验视为无效。		

7. 结果计算

SMN1 基因 (目的基因) 用 VIC 标记的探针检测, β -actin 基因 (参比基因) 用 CY5 标记探针, ROX 为参比荧光, 对照样本为 A 对照品。按下述公式进行计算样本 SMN1 基因的拷贝数:

待检样本 (或对照样本) 目的基因 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{参比基因}}$

待检样本目的基因 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{待检样本}} - \Delta Ct_{\text{对照样本}}$

待检样本目的基因 RQ 值 (Expression 值) $= 2^{-\Delta\Delta Ct}$

【参考区间】

通过采用临床样本对参考区间的研究, 当基因存在 0 个拷贝其 RQ 值 (Expression 值) 参考区间 < 0.25 或无 RQ 值 (Expression 值), 当基因存在 1 个拷贝其 RQ 值 (Expression 值) 参考区间为 0.25~0.75, 当基因存在 2 个拷贝其 RQ 值 (Expression 值) 参考区间为 0.75~1.25。

结果判读见下表:

目标基因检测结果	结果判读	
RQ 值 (Expression 值)	拷贝数	基因型
< 0.25 或无 RQ 值 (Expression 值)	0	纯合缺失型
0.25~0.75	1	杂合缺失型
0.75~1.25	2	正常型

【检验结果的解释】

- 在内控 β -actin 基因 Ct 值 ≤ 30 的前提下, 才能根据 RQ 值 (Expression 值) 进行待测样本基因型的判读; 如待测样本反应体系内控 β -actin 基因 Ct > 30 或提示无荧光信号, 提示扩增失败, 可能是样本 DNA 质量不佳, 建议重新提取 DNA 或者经测定后做相应的处理, 如纯化、浓缩或者稀释。
- 当检测结果的 RQ 值 (Expression 值) 为 0.25 或 0.75 或 1.25 时, 均为临界值, 须重新检测。在样本满足试剂盒检测纯度的要求下, 可将 DNA 浓度浓缩或稀释至 10~20ng/ μ L 进行复检, A 对照品设置三个重复, 取均值进行分析; 若复检结果依然为临界值, 请结合其他方法进行拷贝数分析。
- 当检测结果的 RQ 值 (Expression 值) > 1.25 时, 未进行研究, 拷贝数不明确, 如需明确请结合其他方法进行拷贝数分析。

【检验方法的局限性】

- 本试剂盒仅能检测 SMN1 基因第 7 外显子的缺失情况, 另有少数 SMN1 基因的微小突变在本试剂盒检测范围之外, 即本试剂盒不能检测出点突变造成的功能缺失患者。
- 本试剂盒不能实现对 SMA 携带者为 “2+0” 类型 (即携带 2 个 SMN1 拷贝, 但是 2 个 SMN1 基因位于同一条染色体) 的检测。
- 当有脊髓性肌萎缩症症状的患者检测结果为 1 个拷贝 (杂合缺失型) 时, 需进一步采用其他合适的方法确认。
- 本试剂盒的检测结果仅供临床参考, 不能单独作为确诊或排除病例的依据, 为达到诊断目的, 此检测结果要与临床检查、病史、连锁遗传分析及其他检查结果综合使用。

【产品性能指标】

1. 测定准确性

均用 3 批产品对测定准确性进行研究, 选择纯合缺失型样本、杂合缺失型样本和正常

型样本进行检测, 样本均稀释高、中、低 3 个浓度, 每个浓度重复 3 次, 计算产品阳性符合率为 90/90, 阴性符合率为 45/45。

2. 最低检测限

均用 3 批产品对最低检测限进行研究, 选择纯合缺失型、杂合缺失型和正常型样本进行检测分析, 样本均稀释 7 个浓度梯度, 每个浓度重复检测 12 次, 并验证重复检测 20 次, 试剂盒能稳定检出基因组 DNA 的最低浓度为 2ng/ μ L。

3. 分析特异性

3.1 内源性干扰评价

均采用 3 批产品对内源性可疑干扰物进行干扰评价, 结果显示当全血样本中甘油三酯 ≤ 14.7 mmol/L 或总胆红素 ≤ 353.2 μ mol/L 或白蛋白 ≤ 58.3 g/L 时, 不影响本试剂盒检测结果, 溶血样本不影响本试剂盒检测结果。

3.2 外源性干扰评价

均采用 3 批产品对外源性可疑干扰物进行干扰评价, 结果显示 20IU/mL 肝素抗凝剂会影响本试剂盒检测结果, 2mg/mL 枸橼酸钠或 5mg/mL EDTA 抗凝剂不影响本试剂盒检测结果, 4mg/mL 沙丁胺醇或 10 μ g/mL 维生素 D 不影响本试剂盒检测结果。

3.3 交叉反应评价

均采用 3 批产品对交叉反应进行研究, 检测 7 种本试剂检测范围外的临床样本, 包含巨细胞病毒感染全血样本、DMD 假肥大型肌营养不良症样本, 肌萎缩侧索硬化症样本, 继发性肌肉萎缩 (非缺失型) 样本、脊髓炎样本, $\alpha\alpha$ /--^{SEA} 缺失型地贫全血样本、大肠杆菌 DNA 样本, 每种样本选择 3 个浓度, 结果显示均无交叉反应。

均采用 3 批产品检测 3 种 SMN2 基因不同拷贝数的临床样本, 样本均为 3 个浓度, 结果显示 SMN2 拷贝数为 2、3 和 4 时均无交叉反应。

均采用 3 批产品检测 3 种 SMN1 基因外显子 7 和 8 不同拷贝数的临床样本, 样本均为 3 个浓度, 结果显示 SMN1 外显子 8 小于等于 2 个拷贝时均无交叉反应。

4. 精密度

在不同地点均采用 3 批产品对精密度进行研究, 选择纯合缺失型、杂合缺失型和正常型样本, 每种样本类型选择 2 个浓度, 不同人操作, 一天做 2 次, 共做 20 天。结果以检测的 RQ 值 (Expression 值) 进行汇总统计, 计算 RQ 值 (Expression 值) 批内精密度和批间精密度变异系数 (CV 值) 均小于 5.0%。

5. 效率一致性分析

检测 5 份线性参考品, 将目标基因与内参基因对应浓度 Ct 值的差值 (ΔCt) 与浓度的 log 值进行线性回归分析, 回归直线的斜率绝对值均小于 0.1。目标基因与内参基因的扩增效率 (Eff%) 均满足在 90~110% 区间, 线性相关系数 $R^2 > 0.98$ 。

6. 临床试验

本产品在 3 家临床试验机构开展, 结果表明: SMN1 基因外显子 7 的 0 拷贝 (纯合缺失型) 符合率为 100%、1 拷贝 (杂合缺失型) 符合率为 100%、2 拷贝 (正常型) 符合率为 100%、总符合率为 100%。

【注意事项】

- 每次实验均需设置 A 对照品, 为保证结果的一致性, 请将 A 对照品设置 3 次重复, 待样本及 A 对照品尽可能的减少使用边缘位置的反应孔。
- 建议将样本 DNA 浓缩或稀释至 10~20ng/ μ L, 以减少与 A 对照品的实验差异性。
- 实验室严格分区操作, 各区物品均为专用, 避免交叉使用造成污染。
- 实验过程中需避光操作, 每次实验需按要求进行质量控制; 操作人员应具有操作经验和

接受过专业培训。

- 试剂盒各组分使用前请充分融化、混匀并短暂离心。
- 检测样本应视为具有传染性物质, 操作和处理均需要符合相关法规的需求。
- 本试剂盒仅用于体外诊断。

【参考文献】

- 中华医学会医学遗传学分会遗传病临床实践指南编写组. 脊髓性肌萎缩症的临床实践指南[J]. 中华医学遗传学杂志, 2020, 037(003):263-268.
- 北京医学会医学遗传学分会, 北京罕见病诊疗与保障学会. 脊髓性肌萎缩症遗传学诊断专家共识[J]. 中华医学杂志 2020 年 100 卷 40 期, 3130-3140.
- Philippe Burlet, Lydie Btirglen et al. Large scale deletions of the 5q13 region are specific to Werdnig-Hoffmann disease [J]. Med Genet. 1996; 33:281-283.
- Akanchha Kesari, Hanna Rennert et al. SMN1 dosage analysis in spinal muscular atrophy from India[J]. BMC Medical Genetics. 2005, 6:22.
- Sheng YZ, Xiong F, Chen YJ, et al. Molecular characterization of SMN copy number derived from carrier screening and from core families with SMA in a Chinese population[J]. European Journal of Human Genetics, 2010, 18(9).
- Gabriel Sanchez, Alain Y. Dury, Lyndsay M. Murray et al. A Novel Function for the Survival Motoneuron Protein as a Translational Regulator[J]. HMG Advance Access published November 6, 2012.
- Charles M. Strom1, Ben Anderson, Mei Peng et al. 1000 sample comparison of MLPA and RT-PCR for carrier detection and diagnostic testing for Spinal Muscular Atrophy Type 1[J]. Open Journal of Genetics 2013. Genetics, 2013.3: 111-114.
- Jin He, Qi-Jie Zhang, Qi-Fang Lin, Ya-Fang Chen, Xiao-Zhen Lin, Min-Ting Lin, Shen-Xing Murong, Ning Wang, Wan-Jin Chen. Molecular analysis of SMN1, SMN2, NAIP, GTF2H2, and H4F5 genes in 157 Chinese patients with spinal muscular atrophy[J]. Gene, 2013, 518(2).
- 闫杨, 宋楠, 王红梅, 等. 应用多重连接依赖探针扩增技术对脊髓性肌萎缩症患者及致病基因携带者进行基因诊断[J]. 中国优生与遗传杂志, 2016, 024(009):16-17

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 深圳会众生物技术有限公司

住所: 深圳市宝安区新安街道兴东社区丰业源工业厂区厂房 B1 夏谷 101

联系方式: 400-8616-360

售后服务单位名称: 深圳会众生物技术有限公司

联系方式: 400-8616-360

生产地址: 深圳市宝安区新安街道兴东社区丰业源工业厂区厂房 B1 夏谷 101、西乡街道宝安大道洪盛工业园三号厂房 301

生产许可证编号: 粤食药监械生产许 20203605 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20223400080

【说明书核准及修改日期】核准日期: 2022 年 01 月 19 日

修改日期: 2022 年 02 月 11 日