

β-地中海贫血基因检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）说明书

【产品名称】

通用名称：β-地中海贫血基因检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）

【包装规格】

48 测试/盒

【预期用途】

本产品用于β-珠蛋白基因 21 个位点的 21 种突变的定性检测。

本产品适用于β-地中海贫血的体外临床辅助诊断，可以定性检测出中国人常见的β-珠蛋白基因 21 个位点的 21 种突变（分别为：c.-140C>T, c.-123A>T, c.-78A>G, c.-79A>G, c.-80T>C, c.-81A>C, c.-82C>A, c.45_46insG, c.48_49insG, c.52A>T, c.79G>A, c.91A>G, c.92+1G>T, c.92+5G>C, c.84_85insC, c.113G>A, c.216_217insA, c.130G>T, c.124_127delTTCT, c.315+5G>C, c.316-197C>T）。

【检验原理】

本试剂盒采用荧光 PCR 熔解曲线法，根据靶与探针杂交后熔点的变化检测β-珠蛋白基因突变。对于每一份样本，本试剂盒分两管对其进行检测，对应扩增试剂中的 HBB PCR Mix A 和 HBB PCR Mix B。

【主要组成成分】

组成	组分名称	主要成分	规格	数量
扩增试剂	HBB PCR Mix A	引物、探针（四条探针分别由 FAM、HEX、ROX 和 Cy5 标记）、dNTPs 混合液	990 μL/管	1 管
	HBB PCR Mix B	引物、探针（三条探针分别由 FAM、HEX 和 Cy5 标记，另外两条探针由 ROX 标记）、dNTPs 混合液	990 μL/管	1 管
	HBB 酶混合液	Taq 酶、UNG 酶	22 μL/管	1 管
对照试剂	HBB 阳性对照	野生型质粒	50 μL/管	1 管
	HBB 阴性对照	Tris-HCl 缓冲液	50 μL/管	1 管
溶解试剂	DNA 溶解液	Tris-HCl 缓冲液	14 mL/瓶	1 瓶

注：建议不同批号组分之间不互换。

【储存条件及有效期】

-18℃ 以下避光保存，有效期 12 个月。

试剂盒内各组分有效期与试剂盒相同。反复冻融建议不超过 3 次，建议采用 4℃ 以下温度运输。生产日期及失效日期见包装标签。

【适用仪器】

本试剂盒适用于带有 FAM、HEX、ROX 和 Cy5 检测通道且具有熔解曲线分析功能的实时 PCR 扩增仪，包括：Bio-Rad CFX96 实时荧光 PCR 扩增仪、全自动医用 PCR 分析系统(SLAN-96S)。

【样本要求】

本试剂盒的检测对象为从外周血提取的人类基因组 DNA。样本类型为外周血，而外周血中人类基因组 DNA 需采用经过验证的方法（厦门致善生物科技有限公司的磁珠法全血 DNA 提取系统和 QIAGEN 公司的全血 DNA 提取试剂盒）进行提取。

【检验方法】

1. 试剂准备——配液区

① 首先将所有的试剂从冰箱取出，平衡至室温。PCR 反应液配制：取 n×19.8 μL HBB PCR Mix A（n 根据反应管数确定）和 n×0.2 μL HBB 酶混合液加入到 1.5 mL 离心管中，混匀，3000 rpm 离心数秒；另取 n×19.8 μL HBB PCR Mix B 和 n×0.2 μL HBB 酶混合液加入到另一 1.5 mL 离心管中，混匀，3000 rpm 离心数秒。PCR 反应液应即配即用，隔夜使用需-18℃ 以下贮存。

② PCR 反应液的分装：PCR 反应液 A/B 分别以每管 20 μL 分装于 PCR 薄壁反应管。

③ 将配制好的 PCR 反应管转移至提取区，贮存于-18℃ 以下直至样本提取完。

2. 样本提取及加样——提取区

① 使用经验证的提取方法提取外周血的人类基因组 DNA，最后采用本试剂盒中提供的 DNA 溶解液溶解 DNA。

② 用紫外分光光度计测定提取的基因组 DNA 的浓度和纯度，DNA 样本的 OD_{260nm}/OD_{280nm} 应在 1.6-2.0 范围之内，且 OD_{260nm}/OD_{230nm}≥2.0[若 OD_{260nm}/OD_{230nm}<2.0，需要使用本试剂盒中提供的 DNA 溶解液将 DNA 样本进行适度稀释（通常稀释 10 倍），但需保持样本浓度高于 0.2 ng/μL]。

③ 用微量加液器向每支 PCR 薄壁反应管中加入 5 μL 相应的 DNA 样本（DNA 浓度应不低于 0.2 ng/μL，推荐浓度为 10 ng/μL）或阴/阳性对照品，并立即盖严管盖。

④ 将已加入模板的 PCR 薄壁反应管转移至 PCR 扩增区。

3. PCR 扩增及熔解曲线分析——扩增区

PCR 扩增与熔解曲线分析步骤可设置为一个程序，在实时荧光 PCR 仪上连续完成，也可分阶段先在普通 PCR 仪器上进行扩增，再于实时 PCR 仪器上进行熔解曲线分析。

① PCR 扩增

本试剂盒反应体系设为 25μL，PCR 反应程序为：50℃ 2min→95℃ 10min→（95℃ 15s→55℃ 15s→76℃ 20s）×55 个循环。

② 熔解曲线分析

在具有多色熔解曲线分析功能的实时 PCR 仪上进行，程序设置如下：95℃ 1min→35℃ 3min→40℃-80℃ 以 0.4℃/5s 的升温速率进行熔解曲线分析，且在此阶段采集 FAM、HEX、ROX 和 Cy5 通道荧光信号。程序运行完毕，将 PCR 薄壁反应管（闭管）取出放入凹布袋，将封口封严，按污染源处理。

【阳性判断值】

阳性对照（即野生型）在各体系及各通道中的熔点（ T_m ）值范围如下：

反应体系 A：FAM 通道 63.3℃±1℃；HEX 通道 64.6℃±1℃；ROX 通道 64.9℃±1℃；Cy5 通道 58.6℃±1℃。

反应体系 B：FAM 通道 65.9℃±1℃；HEX 通道 66.4℃±1℃；ROX 通道 65.6℃±1℃，56.3±1℃；Cy5 通道 65.6℃±1℃。

本说明书中各 T_m 值是在特定 Bio-Rad CFX96 仪器上所得的常见值作为参考值。当使用其它仪器时， T_m 值可能略有变动，以当次试验阳性对照（野生型）所得的 T_m 值为准。

T_m 值以仪器自动判读所得为准，当仪器给出一个以上 T_m 值时，请参考阳性对照和阴性对照的峰型选择有效 T_m 值。当出现仪器无法自动给出 T_m 值的情况时，可通过调整基线或直接人工判读的方法获得 T_m 值。

【检验结果的解释】

通过比较待测样本在 A 和 B 体系中共八个检测通道的 9 个熔解峰（如图 1）与阳性对照之间熔点的差异来判断样本是否发生突变及突变的类型。当样本熔解峰与阳性对照熔解峰差异（ ΔT_m 值）在±1℃ 以内的即为野生型峰，差异超过±2℃ 的即为突变型峰。主要包括以下几种情况：

① 若样本的八个检测通道都只有野生型峰（图 1 黑色曲线），则该样本为野生型，没有包含附表 1 所列的突变位点；

② 若样本某个通道既有野生型峰又有突变型峰（图 1 绿色曲线）或有一个融合峰（图 1 紫色曲线），而其它通道为野生型峰，则样本为该种突变的杂合型。通过计算对应野生型峰与突变型峰熔点的差异（ ΔT_m 值），参考附表 1，判断突变的类型；

③ 若样本在某个通道有突变型峰（无对应的野生型峰），而其它通道均为野生型峰，则样本为该种突变的纯合型（图 1 蓝色曲线）。通过计算对应野生型与突变型峰熔点的差异（ ΔT_m 值），参考附表 1，判断突变的类型；

④ 若样本在某两个通道既有野生型峰又有突变型峰，而其它通道为野生型峰，则样本为两种突变的双杂合型（图 1 红色曲线）。通过计算对应野生型与突变型峰熔点的差异（ ΔT_m 值），参考附表 1，判断突变的类型。

注意：实验室环境污染、试剂污染、样本交叉污染可能导致假阳性结果；试剂运输、保存不当或试剂配制不准确可能会引起试剂检测效能下降，出现假阴性或检测不准确的结果。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒采用的是荧光 PCR 熔解曲线法，该方法可以检测探针覆盖区域的序列变异，故可能检测到附表 1 所列突变之外的突变。

2. 由于本试验只是筛选核酸序列而不是氨基酸序列，虽然本试剂盒设计时已经做了充分考虑，但是鉴于人类基因的复杂性，仍有可能发生多态性或者同义突变被判为突变型的情况。

3. 个别型别突变间 (c.-80T>C 突变与 c.-81A>C 突变, c.45_46insG 突变与 c.48_49insG 突变) 因 ΔT_m 值相近而可能产生交叉 (附表 1), 当 ΔT_m 值发生交叉时, 检测结果只能判定为含有两种突变中的一种。

【产品性能指标】

- 1. 本产品对野生型、杂合突变型和纯合突变型人类基因组 DNA 样本的检测限均为 1 ng/反应。
- 2. 本产品进行临床试验共验证 1391 例人类基因组 DNA 样本, 结果表明, 与益生堂公司的 β -地中海贫血基因检测试剂盒和基因测序相比, 本产品野生型符合率为 100%, 突变型符合率为 99.9%, 总符合率为 99.9%。
- 3. 检测重复性参考品 HBB MA1 和 HBB MA2, 各进行 8 个平行重复试验, 检测结果均为对应的基因型, 重复性为 100%。
- 4. 本产品对 6 种常见的 α -地中海贫血突变型 (东南亚缺失型、左侧缺失型、右侧缺失型、CS、QS 和 WS) 和本试剂盒未包含的其它 β -地中海贫血突变类型 (CAP M 和 IVS-II-110) 无交叉反应。

【注意事项】

- 1. 本试剂盒仅用于体外诊断, 操作人员必须经过培训且具有一定的经验, 试剂盒使用前请仔细阅读说明书。
- 2. 请严格按照基因扩增检验实验室的管理规范进行试验操作: 如 PCR 试验严格分区操作; 各区应有专用的手套、移液器等, 不得交叉使用, 避免污染; 工作人员应遵循从一区到二区的单方向工作原则, 各工作区相对隔离; 进行 PCR 试验的工作桌面及相关物品应定期用 1%次氯酸钠、75%酒精、1 M 盐酸或紫外灯进行灭菌和消毒。
- 3. 试验操作所需的消耗用品应一次性使用, 使用前进行无菌处理。试剂盒中各试剂充分融化后请短暂离心。反应液分装时应尽量避免产生气泡。PCR 反应管经瞬时离心后, 上机前应避免振摇, 应注意检查各反应管是否盖紧, 以免污染仪器。
- 4. PCR 反应混合液应避光保存, 每次试验应设置阴性和阳性对照。
- 5. 不同 DNA 提取试剂盒溶解 DNA 可能使用不同的缓冲液, 为减小 T_m 值的波动, 请改用本试剂盒中的 DNA 溶解液作为样本 DNA 的溶解液, 若不能更改样本 DNA 的溶解液, 请用本试剂盒中的 DNA 溶解液对样本进行适度稀释 (例如稀释 10 倍)。
- 6. 极少数双杂合突变型样本的两种突变可能为同一探针覆盖, 这种情况下,

该通道产物峰无野生型峰, 只有两个突变型峰 (图 1 黄色曲线)。根据两种突变熔点的差异, 可能会出现突变双峰或一个融合峰。若是双峰, 可以根据野生型峰与突变峰 T_m 值的差异判断突变的类型; 若出现的是融合峰, 先根据野生型峰与突变峰 T_m 值的差异判断可能的突变类型, 再参考父母的基因型确认突变的具体类型。s

- 7. 当样本浓度低或质量较差时, 反应体系 B 中 FAM 通道的检测结果可能会出现熔点低于 50°C 的熔解峰, 此为探针本身引起, 不影响结果判读。
- 8. 不同批号的试剂请勿混用, 请在有效期内使用试剂盒。
- 9. 尽量避免反复冻融, 如果需要多次使用, 请在第一次融解后将制品分装冻存, 再根据需要取用。

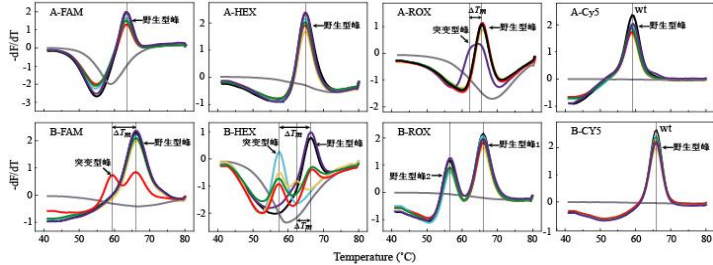


图 1 典型的样本检测结果。其中 A-FAM、A-HEX、A-ROX 和 A-CY5 为体系 A 检测结果; B-FAM、B-HEX、B-ROX 和 B-CY5 为体系 B 检测结果。

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 厦门致善生物科技股份有限公司
住所: 厦门火炬高新区 (翔安) 产业区翔安北路 3701 号之 1 号楼
联系方式: 400-661-8810; 0592-7615088
售后服务单位名称: 厦门致善生物科技股份有限公司
联系方式: 400-661-8810; 0592-7615088
生产地址: 厦门火炬高新区 (翔安) 产业区翔安北路 3701 号之 1 号楼及 11 号楼 3 层 A 区、4 层
生产许可证编号: 闽药监械生产许 20100283 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20173401093

【说明书核准日期及修改日期】2022 年 12 月 7 日

附表 1 本试剂盒可以检测的突变类型及各突变型在对应通道的 ΔT_m 值波动范围

HGVS 命名(c.)	突变类型	反应体系 A [$\Delta T_m = T_m(\text{野生}) - T_m(\text{突变})$]				反应体系 B [$\Delta T_m = T_m(\text{野生}) - T_m(\text{突变})$]				
		FAM	HEX	ROX	Cy5	FAM	HEX	ROX-1 ^e	ROX-2 ^f	Cy5
316-197C>T	IVS-II-654 (C>T)	5.8±0.70	-	-	-	-	-	-	-	-
-78A>G	-28 (A>G)	-	7.2±0.54	-	-	-	-	-	-	-
-79A>G	-29 (A>G)	-	6.1±0.49	-	-	-	-	-	-	-
-80T>C ^a	-30 (T>C)	-	3.3±0.49	-	-	-	-	-	-	-
-81A>C ^a	-31 (A>C)	-	3.0±0.62	-	-	-	-	-	-	-
-82C>A	-32 (C>A)	-	9.3±0.59	-	-	-	-	-	-	-
45_46insG ^b	CD14-15 (+G)	-	-	3.3±0.48	-	-	-	-	-	-
48_49insG ^b	CD15-16 (+G)	-	-	2.9±0.59	-	-	-	-	-	-
52A>T	CD17 (A>T)	-	-	5.6±0.48	-	-	-	-	-	-
92+5G>C	IVS-I-5 (G>C)	-	-	-	4.9±0.58	-	-	-	-	-
91A>G ^g	CD30 (A>G)	-	-	-	5.0±0.62	3.7±0.59	-	-	-	-
92+1G>T	IVS-I-1 (G>T)	-	-	-	-7.5±0.86	1.0±0.61	-	-	-	-
79G>A	CD26 (G>A)	-	-	-	-	6.6±0.61	-	-	-	-
84_85insC	CD27-28 (+C)	-	-	-	-	4.4±0.67	-	-	-	-
124_127delTTCT	CD41-42 (-TTCT)	-	-	-	-	-	9.0±0.80	-	-	-
130G>T	CD43 (G>T)	-	-	-	-	-	4.0±0.40	-	-	-
113G>A	CD37 (G>A)	-	-	-	-	-	5.1±0.49	-	-	-
216_217insA	CD71-72 (+A)	-	-	-	-	-	-	4.8±0.40	-	-
315+5G>C	IVS-II-5 (G>C))	-	-	-	-	-	-	-	6.1±0.63	-
-123A>T	-73 (A>T)	-	-	-	-	-	-	-	-	4.7±0.82
-140C>T	-90 (C>T)	-	-	-	-	-	-	-	-	7.1±0.83

注: ^a这两种突变均引起 β^+ -地贫, 引起临床症状相似, 但两者由于 ΔT_m 相近而彼此不能区分, 只能与野生型区分。若需具体区分两者, 可用测序或其它方法进一步验证。 ^b这两种突变均引起 β^0 -地贫, 引起临床症状相似, 但两者由于 ΔT_m 相近而彼此不能区分, 只能与野生型区分。若需具体区分两者, 可用测序或其它方法进一步验证。 ^c表中“-”指检测样本本熔解峰与对应野生型熔解峰 T_m 差异的在 $\pm 1^\circ\text{C}$ 之内。 ^d表中黑体字为野生型与对应通道突变型 $\Delta T_m \pm 3SD$, 由多次试验得到的统计结果。 ^e ΔT_m 值由 $T_m(\text{野生型 1}) - T_m(\text{突变})$ 得到。 ^f ΔT_m 值由 $T_m(\text{野生型 2}) - T_m(\text{突变})$ 得到。 ^gc.91A>G 杂合突变在反应体系 A 的 Cy5 通道和反应体系 B 的 FAM 通道均有 T_m 值的变化, 而 c.92+5G>C 和 c.84_85insC 双杂合突变亦出现类似的熔点变化, 故要区分这两种基因型, 需结合父母的基因型 (产前诊断) 或病人的表型。