

**APOE 和 SLCO1B1 基因多态性检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）说明书****【产品名称】**

通用名称：APOE 和 SLCO1B1 基因多态性检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）

**【包装规格】**

24 人份/盒、6 人份/盒。

**【预期用途】**

本试剂盒用于体外定性检测人体静脉全血样本中的载脂蛋白 E（APOE）基因 388 位点（c.388T>C）、526 位点（c.526C>T）和有机阴离子转运多肽 1B1 编码基因（SLCO1B1）388 位点（c.388A>G）、521 位点（c.521T>C）的多态性。

本试剂盒用于他汀类药物的用药指导。本试剂盒检测结果仅供临床参考，不应作为患者是否用药的唯一依据，临床医生应结合患者病情、疗效及其他实验室检测指标等对本试剂盒的检测结果进行综合判断。

他汀类药物（statins）自从问世以来就成为世界上临床使用最为广泛的降脂药，该类物质对抑制心脑血管疾病也有显著作用。他汀类药物可通过竞争性抑制 HMG-CoA（3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A）还原酶活性来减少胆固醇的生物合成，从而起到降低血脂的作用<sup>[1-2]</sup>，其使用疗效和不良反应与 APOE 和 SLCO1B1 基因多态性密切相关。

载脂蛋白 E（Apolipoprotein E, APOE）是一种存在于乳糜微粒和中间密度脂蛋白中的载脂蛋白，主要由肝脏和巨噬细胞产生，参与血脂的运输、存储和排泄<sup>[3-5]</sup>。人类 APOE 基因位于 19 号染色体 19q13.2。该基因的两个功能性 SNP rs429358（c.388T>C, Cys130Arg）和 rs7412（c.526C>T, Arg176Cys）构成 3 种单倍型，分别是 E2（rs429358T-rs7412T）、E3（rs429358T-rs7412C）、E4（rs429358C-rs7412C）。由三种单倍型构成 6 种不同的基因型（E2/E2、E3/E3、E4/E4、E2/E3、E2/E4 和 E3/E4）。E3/E3 是最常见的基因型，人群中的频率约 60%。调脂药物普伐他汀通过竞争性抑制 3-羟基 3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶（HMG-CoA 还原酶），从而抑制肝脏中胆固醇的合成，肝细胞表面低密度脂蛋白（LDL）受体的表达反馈性增加，加强受体介导的 LDL 的分解代谢及血液中 LDL 的清除。目前 FDA 已将 APOE2 列为普伐他汀药物反应相关的生物标记。基因型为 APOE E2/E2 的高血脂症患者普伐他汀的降脂疗效更好<sup>[5]</sup>。

有机阴离子转运多肽 1B1（OATP1B1，又称 OATP-C、OATP2 或 LST1）特异地表达在肝细胞基底膜上，在肝细胞摄取和清除内源性和外源性物质如胆汁酸、非结合型胆红素、甲状腺素、他汀类药物、瑞格列奈、依那普利拉、替莫普利、缬沙坦、奥美沙坦、甲氨蝶呤和伊立替康活性代谢产物 SN-38 等中发挥重要作用。

OATP1B1 由 SLCO1B1 基因编码，人类 SLCO1B1 基因位于 12 号染色体 12p12.2。该基因的两个功能性 SNP rs2306283(c.388A>G, Asn130Asp)和 rs4149056(c.521T>C, Val174Ala)构成 4 种单倍型，分别是 SLCO1B1\*1a (388A-521T)、SLCO1B1\*1b (388G-521T)、SLCO1B1\*5 (388A-521C) 和 SLCO1B1\*15 (388G-521C)。由四种单倍型构成 9 种不同的基因型 (\*1a/\*1a、\*1a/\*1b、\*1b/\*1b、\*1a/\*5、\*1a/\*15、\*1b/\*15、\*5/\*5、\*5/\*15、\*15/\*15)。该基因第 5 外显子 521T>C (Val174Ala) 多态性是亚洲人群中的主要遗传变异，等位基因频率为 10~15%，该多态性显著降低 OATP1B1 对其底物的摄取能力，使他汀类药物如普伐他汀、阿托伐他汀和罗苏伐他汀等的血药浓度升高。SLCO1B1 521T>C 多态性导致出现三种基因型：521TT（野生型纯合子）、521TC（突变型杂合子）和 521CC（突变型纯合子）。他汀类药物的严重不良反应包括肝功能下降和横纹肌溶解症等，携带 521C 等位基因的患者应用辛伐他汀、西立伐他汀时肌病的发生风险显著增加<sup>[6-7]</sup>。为降低他汀类药物严重不良反应的发生风险，建议临床上根据 SLCO1B1 基因型选择他汀类药物进行治疗。

### 【检验原理】

本试剂盒采用荧光 PCR 熔解曲线法，采用特异性引物扩增目的基因，再利用荧光标记探针与 PCR 产物形成的双链杂交体，根据双链杂交体的熔点不同，通过分析熔解曲线判断目的基因是否存在突变及相应的突变类型。

### 【主要组成成分】

1、主要组成成分见表 1。

表 1 试剂盒主要组成成分

| 试剂盒组成<br>(-15℃以下储存) | 规格（管）   |        | 主要成分                                                               |
|---------------------|---------|--------|--------------------------------------------------------------------|
|                     | 24 人份/盒 | 6 人份/盒 |                                                                    |
| PCR 混合液             | 408μL   | 102μL  | 脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)、<br>缓冲液、引物、探针                                      |
| DNA 聚合酶             | 24μL    | 6μL    | DNA 聚合酶 (Taq 酶)                                                    |
| 野生型对照               | 48μL    | 12μL   | APOE 388T 质粒<br>APOE 526C 质粒<br>SLCO1B1 388A 质粒<br>SLCO1B1 521T 质粒 |
| 突变型对照               | 48μL    | 12μL   | APOE 388C 质粒<br>APOE 526T 质粒<br>SLCO1B1 388G 质粒<br>SLCO1B1 521C 质粒 |

注：不同批号试剂盒中各组分不可以互换。

2、需要但未提供的材料：

- 1) 广州凯普医药科技有限公司生产的核酸提取或纯化试剂（型号：离心柱法 BSPC-D-M 型）（备案号：粤穗械备 20170053 号）
- 2) 广州凯普医药科技有限公司生产的核酸提取或纯化试剂（型号：磁珠法 CB-D-A 型）（备案号：粤穗械备 20181030 号）。
- 3) 空白对照建议使用灭菌注射用水，请用户自备。

### 【储存条件及有效期】

-15℃以下保存，有效期 12 个月。

避免反复冻融，冻融次数不超过 5 次。

生产日期、有效期至：见标签。

### 【适用仪器】

荧光 PCR 仪：使用上海宏石医疗科技有限公司的“全自动医用 PCR 分析系统（型号规格：SLAN-96S）”；罗氏诊断公司 Roche Diagnostics GmbH 的“实时荧光定量 PCR 仪 LightCycler 480（型号规格：LightCycler 480 II）”。

### 【样本要求】

一、样本类型：人体静脉全血样本

二、样本采集：

静脉全血样本：采用一次性无菌负压采血管或用一次性无菌针筒抽取被检者静脉全血 2mL 置于无菌抗凝管中，抗凝剂采用 K<sub>2</sub>EDTA，切勿用肝素抗凝。

三、样本保存和运送

样本采集后立即送检。2~8℃保存不超过 7 天，-15℃以下保存不超过 6 个月进行检测，-60℃以下保存不超过 3 年。样本冻融次数应不超过 5 次。样本运送时建议采用低温保存运送。

### 【检验方法】

一、样本准备（标本制备区）

1. 参考所购买的商用基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行操作。手动提取：使用广州凯普医药科技有限公司的“核酸提取或纯化试剂（型号：离心柱法 BSPC-D-M 型）（备案号：粤穗械备 20170053 号）”；自动化提取：使用广州凯普医药科技有限公司的“核酸提取或纯化试剂（型号：磁珠法 CB-D-A 型）（备案号：

粤穗械备 20181030 号）”。空白对照需参与平行提取。

2. 取 2 $\mu$ L 抽提好的 DNA 样本作为模板进行 PCR 扩增；剩余 DNA 样品存储于 -15 $^{\circ}$ C 以下备用，冻融次数不超过 5 次，保存时间不超过 6 个月。

## 二、扩增试剂准备（试剂准备区）

1. 从试剂盒中取出 PCR 混合液，室温下避光解冻，上下颠倒混匀后，6000 转/分钟离心 10 秒。从试剂盒中取出 DNA 聚合酶，6000 转/分钟离心 10 秒。然后按照表 2 配制扩增试剂。

表 2 扩增试剂的制备

| 组份      | PCR 混合液     | DNA 聚合酶    |
|---------|-------------|------------|
| 1 人份用量  | 17 $\mu$ L  | 1 $\mu$ L  |
| 10 人份用量 | 170 $\mu$ L | 10 $\mu$ L |

2. 将配制好的扩增试剂充分混匀，6000 转/分钟离心 1 分钟，向设定的 n 个 PCR 反应管，分别加入 18 $\mu$ L 配制好的扩增试剂，转移到样品处理区。

## 三、加样（标本制备区）

1. 在对应的 PCR 反应管中分别加入 2 $\mu$ L 处理好的样本 DNA、野生型对照、突变型对照、空白对照，盖紧管盖，稍做离心。（反应总体积为 20 $\mu$ L/人份）

2. 转移到检测区，放入相应的荧光 PCR 检测仪中，记录样本摆放顺序。

## 四、PCR 扩增与熔解曲线分析（扩增区）

扩增与熔解曲线分析步骤程序设定见表 3，荧光信号采集通道为 FAM 通道、HEX 通道、ROX 通道和 Cy5 通道。上海宏石 SLAN-96S 的检测模式为标准熔解曲线，Roche LightCycler 480 II 的检测模式为 Mono Color Hydrolysis Probe/UPL Probe。

表 3 扩增程序的设定

| 程序 | 循环数 | 温度              | 时间     | 采样模式       |
|----|-----|-----------------|--------|------------|
| 1  | 1   | 95 $^{\circ}$ C | 10 min | 无          |
| 2  | 45  | 95 $^{\circ}$ C | 15 sec | 无          |
|    |     | 56 $^{\circ}$ C | 20 sec | 单次采集荧光（可选） |
|    |     | 72 $^{\circ}$ C | 20 sec | 无          |
| 3  | 1   | 95 $^{\circ}$ C | 1 min  | 无          |
| 4  | 1   | 40 $^{\circ}$ C | 3 min  | 无          |

|            |   |         |            |                  |
|------------|---|---------|------------|------------------|
| Melt curve | 1 | 40℃→80℃ | Continuous | 0.05℃/ sec连续采集荧光 |
|------------|---|---------|------------|------------------|

### 【阳性判断值】

本试剂盒是定性检测试剂，不能用于定量检测。本说明书中各 $T_m$ 值是在上海宏石SLAN-96S仪器上所得的常见值作为参考值，见表4。当使用Roche LightCycler 480 II时， $T_m$ 值可能略有变动，以当次试验野生型对照和突变型对照的 $T_m$ 值为准。空白对照无熔解峰。

当仪器给出一个以上 $T_m$ 值时，请参考野生型对照、突变型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。

表4  $T_m$ 值参考

| 通道  | 检测项              | $T_m$ 参考值 (°C)                                         |
|-----|------------------|--------------------------------------------------------|
| FAM | APOE c.388T>C    | 突变型对照熔解峰 $T_m$ : 65.5±1.5<br>野生型对照熔解峰 $T_m$ : 60.2±1.5 |
| HEX | SLCO1B1 c.521T>C | 突变型对照熔解峰 $T_m$ : 56.5±1.5<br>野生型对照熔解峰 $T_m$ : 50.5±1.5 |
| ROX | APOE c.526C>T    | 突变型对照熔解峰 $T_m$ : 62.1±1.5<br>野生型对照熔解峰 $T_m$ : 67.6±1.5 |
| Cy5 | SLCO1B1 c.388A>G | 突变型对照熔解峰 $T_m$ : 60.2±1.5<br>野生型对照熔解峰 $T_m$ : 49.6±1.5 |

### 【检验结果的解释】

1. 野生型对照 4 个检测位点（APOE c.388T>C、APOE c.526C>T、SLCO1B1 c.521T>C、SLCO1B1 c.388A>G）的熔解峰为单峰且  $T_m$  值符合表 4 所示的相应  $T_m$  参考值范围；突变型对照 4 个检测位点（APOE c.388T>C、APOE c.526C>T、SLCO1B1 c.521T>C、SLCO1B1 c.388A>G）的熔解峰为单峰且  $T_m$  值符合表 4 所示的相应  $T_m$  参考值范围。

2. 当野生型对照和突变型对照的熔解峰  $T_m$  值符合表 4 所示的  $T_m$  值范围，即可对待测样本进行分析：

（1）通过比较待测样本在 PCR 体系中各通道的熔解峰与相应位点野生型对照、突变型对照熔解峰之间熔点（ $T_m$  值）的差异，判断样本是否发生突变。当样本熔解峰为单峰，且与野生型对照熔解峰  $T_m$  值差异（样本熔解峰—野生型对照熔解峰）在±1.5℃以内的即为野生型；当样本熔解峰为单峰，且与突变型对照熔解峰  $T_m$  值差异（样本熔解峰—突变型对照熔解峰）在±1.5℃以内的即为纯合突变型；当样本熔解峰为双峰，且一个熔解峰与突变型对照熔解峰  $T_m$  值差异（样本熔解峰—突变型对照熔解峰）在±1.5℃以内，另一个熔解峰与野生型对照熔解峰  $T_m$  值差异（样本熔解峰—野生型对照熔解峰）在±1.5℃以内即为杂合突变型。

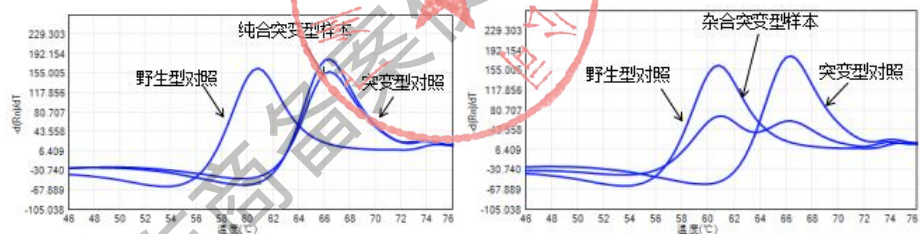
（2）若检测结果无熔解峰，该样本需重新检测，必要时重新提取 DNA 进行检测。

(3) 若待测样本在 PCR 体系中各通道的熔解峰与相应位点野生型对照、突变型对照熔解峰之间熔点 ( $\Delta T_m$  值) 的差异大于  $1.5^{\circ}\text{C}$  时, 重新对该样本 DNA 进行检测, 若再次检测的  $\Delta T_m$  仍大于  $1.5^{\circ}\text{C}$ , 则重新提取 DNA 进行检测。

本试剂盒检测结果分析参照表 5, 检测基因扩增熔解曲线结果见图 1。

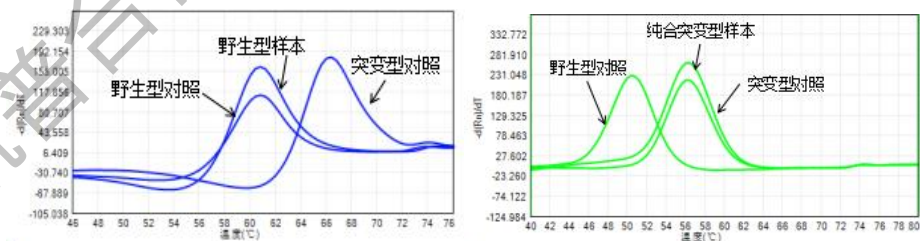
表 5 结果分析

| 通道  | 检测项              | 突变型<br>熔解峰 | 野生型<br>熔解峰 | 结果        |
|-----|------------------|------------|------------|-----------|
| FAM | APOE c.388 T>C   | +          | -          | 纯合突变型(CC) |
|     |                  | -          | +          | 野生型(TT)   |
|     |                  | +          | +          | 杂合突变型(TC) |
| HEX | SLCO1B1 c.521T>C | +          | -          | 纯合突变型(CC) |
|     |                  | -          | +          | 野生型(TT)   |
|     |                  | +          | +          | 杂合突变型(TC) |
| ROX | APOE c.526 C>T   | +          | -          | 纯合突变型(TT) |
|     |                  | -          | +          | 野生型(CC)   |
|     |                  | +          | +          | 杂合突变型(CT) |
| CY5 | SLCO1B1 c.388A>G | +          | -          | 纯合突变型(GG) |
|     |                  | -          | +          | 野生型(AA)   |
|     |                  | +          | +          | 杂合突变型(AG) |



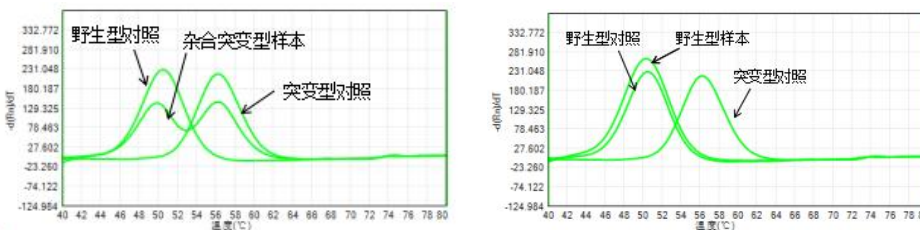
a

b



c

d



e

f

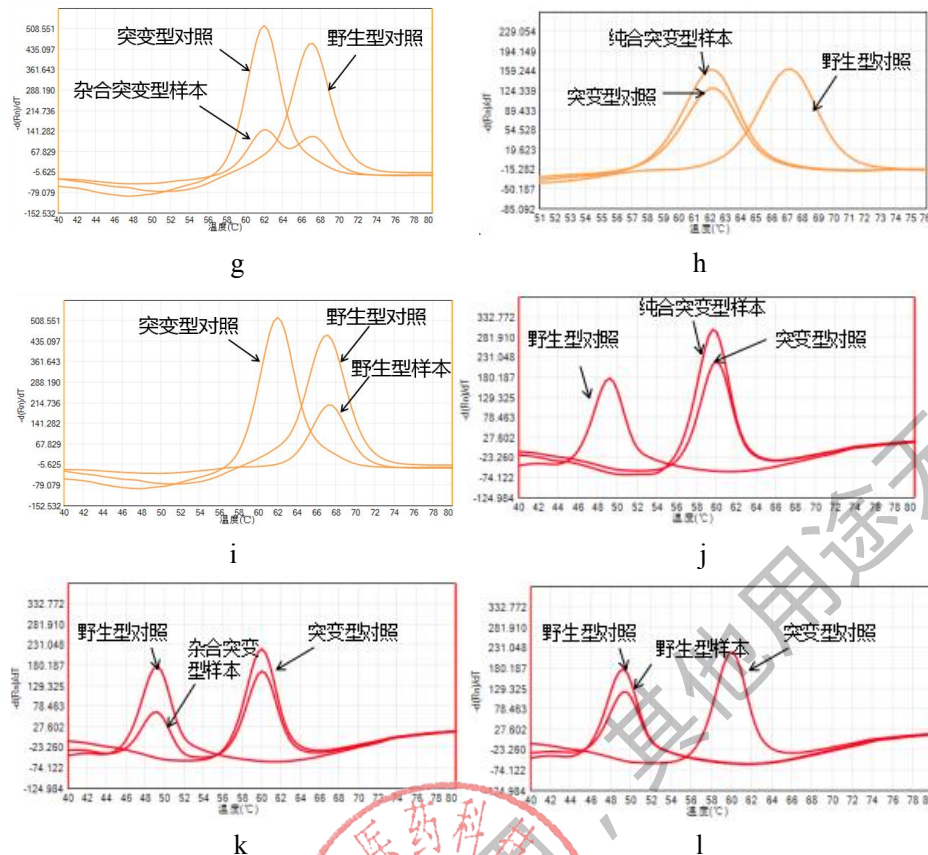


图1 本试剂盒样本检测结果图示

注：a、b、c对应APOE c.388 T>C位点检测结果（FAM通道）；d、e、f对应SLCO1B1 c.521T>C位点检测结果（HEX通道）；g、h、i对应APOE c.526 C>T位点检测结果（ROX通道）；j、k、l对应SLCO1B1 c.388A>G位点检测结果（CY5通道）。

### 【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒仅对 APOE 基因 c.388T>C、c.526C>T 位点和 SLCO1B1 基因 c.521T>C、c.388A>G 位点的多态性进行了验证，未包含全部的人类 APOE 基因和 SLCO1B1 多态性型别，因此当本试剂盒检测结果为野生型时，并不能排除被检测者携带有其他 APOE 和 SLCO1B1 基因多态性型别。
2. 本试剂盒所设计引物探针序列区域若存在其他基因变异，可能导致检测结果异常。
3. 不合理的样本采集、运送及处理或核酸过度降解均可能导致检测结果异常。
4. 本试剂盒检测结果用于辅助指导临床治疗药物的选择，仅供临床参考，不得作为临床诊治的唯一依据。

### 【产品性能指标】

1. 准确性：采用试剂盒检测范围内的准确性参考品（涵盖检测位点的野生型、纯合突变型、杂合突变型）进行检测，结果应符合相应的基因型别。
2. 特异性：采用非人类基因组的特异性参考品进行检测，结果应为未检出相应基因型别；采用试剂盒检测

范围外的特异性参考品进行检测，试剂盒检测范围内的结果应为相应基因型别；采用含外源性药物干扰的特异性参考品进行检测，试剂盒检测范围内的结果应为相应基因型别。

3. 检测限：检测浓度不高于5ng/μL的检测限参考品（涵盖检测位点的野生型、纯合突变型、杂合突变型），结果应符合相应的基因型别。

4. 重复性：采用重复性参考品，重复检测10次，结果均应为相应基因型别。

5. 干扰物验证：甘油三酯含量在6.70mmol/L之内、胆红素含量在450μmol/L之内、血红蛋白含量在109g/L之内、白蛋白含量在120 g/L之内对检测结果没有干扰；可能服用的他汀类常见治疗药物：洛伐他汀（终浓度5.0mg/mL）、氟伐他汀（终浓度5.0mg/mL）、辛伐他汀（终浓度5.0mg/mL），对本试剂盒的检测不具有干扰作用；常用降压药物：盐酸地尔硫卓（终浓度5.0mg/mL）、富马酸比索洛尔（终浓度5.0mg/mL）、厄贝沙坦（终浓度5.0mg/mL）对本试剂盒的检测不具有干扰作用；常用降糖药物：盐酸二甲双胍（终浓度5.0mg/mL）、格列齐特（终浓度5.0mg/mL）、达格列净（终浓度5.0mg/mL）对本试剂盒的检测不具有干扰作用。

6. 临床研究中，对比试剂为武汉友芝友医疗科技股份有限公司生产的人类SLCO1B1和APOE基因检测试剂盒（PCR-荧光探针法），共检测1130例临床样本。经统计，与对比试剂相比，APOE基因388位点，突变型一致率100%，95%CI: [98.05%,100%]、野生型一致率100%，95%CI: [99.59%,100%]、总一致率100%，95%CI: [99.66%,100%]；APOE基因526位点，突变型一致率100%，95%CI: [97.76%,100%]、野生型一致率100%，95%CI: [99.60%,100%]、总一致率100%，95%CI: [99.66%,100%]；SLCO1B1基因521位点，突变型一致率100%，95%CI: [98.53%,100%]、野生型一致率100%，95%CI: [99.56%,100%]、总一致率100%，95%CI: [99.66%,100%]；SLCO1B1基因388位点，突变型一致率100%，95%CI: [99.64%,100%]、野生型一致率100%，95%CI: [95.13%,100%]、总一致率100%，95%CI: [99.66%,100%]。Kappa=1, P<0.001。

#### 【注意事项】

1. 本试剂盒仅适用于体外诊断检测。
2. 避免反复冻融，如需多次使用，请在第一次融解后分装冻存。
3. 请严格按照相关主管部门颁布的基因扩增实验室管理规范执行。
4. 实验请严格分区操作，各区物品不得交叉使用，每个区使用专用的仪器和设备。
5. 试剂盒内各组分在使用前要充分溶解混匀后稍做离心。
6. 加样时应使样本加入反应液中，不应有样本黏附在管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。
7. 扩增完毕后取出反应管，请勿打开反应盖，并丢弃于指定的袋子中。

**【参考文献】**

- [1] 李琦文. HMG-CoA 还原酶抑制剂-他汀类药物的作用及机制[J]. 中国现代药物应用, 2014,(17):228-229.
- [2] Postmus I, Trompet S, Deshmukh HA, et al. Pharmacogenetic meta-analysis of genome-wide association studies of LDL cholesterol response to statins[J]. Nat Commun, 2014, 5:5068.
- [3] Song Y, Stampfer MJ, Liu S. Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease[J]. Ann Intern Med, 2004, 141: 137-147.
- [4] Zintzaras E, Kitsios G D, Triposkiadis F, et al. APOE gene polymorphisms and response to statin therapy[J]. Pharmacogenomics Journal, 2009, 9(4):248.
- [5] 药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南(试行)概要[J]. 实用器官移植电子杂志, 2015, 3(05):257-267.
- [6] Link E et al. SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy--a genomewide study.[J]. The New England journal of medicine, 2008, 359(8) : 789-99.
- [7] de Keyser C E et al. Single nucleotide polymorphisms in genes that are associated with a modified response to statin therapy: the Rotterdam Study.[J]. The pharmacogenomics journal, 2011, 11(1) : 72-80.

**【基本信息】**

注册人/生产企业名称：广州凯普医药科技有限公司

住所：广州市黄埔区九龙镇中新知识城凤凰三横路 71 号 2 号试剂车间四楼

联系方式：020-34072008      传真：020-34072005

售后服务单位名称：广州凯普医药科技有限公司

联系方式：020-34072008      传真：020-34072005

生产地址：

广东省广州市黄埔区九龙镇中新知识城凤凰三横路 71 号生产实验楼 3 层、6 层 A 区、601、602，2 号试剂车间 1 至 4 层，仓库 1 层 C 区、2 层 B 区、3 层 B 区，2 号标准车间 4 层 A 区、5 层 A 区、6 层 A 区

生产许可证编号：粤食药监械生产许 20173077 号

**【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】**

国械注准 20233401275

**【说明书核准及修改日期】**

说明书核准日期：2023 年 08 月 31 日

说明书修改日期：2023 年 11 月 03 日

