

【产品名称】

通用名称：缺失型 α-地中海贫血基因检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】20 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒适用于体外定性检测人外周全血样本中东南亚型缺失（ α^{SEA} ）、右侧缺失（ $\alpha^{\text{3.7}}$ ）和左侧缺失（ $\alpha^{\text{4.2}}$ ）三种 α-地中海贫血基因。
地中海贫血（thalassemia，简称“地贫”）是最常见的单基因遗传病之一，主要分为 α-地贫和 β-地贫两种。α-地贫主要(>95%)是由于 α 珠蛋白基因的缺失引起，是典型的基因缺失型遗传病，主要集中在东南亚、少数非洲地区和中国南方；其中中国南方是 α-地贫高发地区，广西、广东、江西、四川发病率分别高达 14.95%、4.11%、2.60%、1.92%。α-珠蛋白基因突变类型主要有东南亚型缺失（ α^{SEA} ）、右侧缺失（ $\alpha^{\text{3.7}}$ ）和左侧缺失（ $\alpha^{\text{4.2}}$ ）等缺失型，以及 α^{CS} 、 α^{QS} 、 α^{WS} 点突变（ α^{T} ）等非缺失型。此病无有效常规治疗手段，应用相应技术方法通过人群筛查及产前诊断阻止重症患儿出生是国内外公认的首选预防措施。
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。

【检验原理】

本试剂盒利用实时荧光 PCR 技术，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值相对定量方式，同时分析 ζ 、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 基因相对拷贝数，得知目的基因的缺失数目（内参基因拷贝数不变），从而实现缺失型 α-地中海贫血基因快速检测。针对参比基因 β-actin，目的检测基因 ζ 、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 相应的缺失片段区域分别设计特异性引物和荧光探针，4 条探针分别用荧光基团 ROX、FAM、CY5、HEX 标记，信号分别对应上述 4 种基因的扩增信号。
上述引物探针配以对应的 PCR 反应 Buffer、Taq 酶、核苷酸单体（dNTPs）、Mg²⁺ 等成分，可实现对未知样本中 β-actin 基因和 ζ 、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 珠蛋白基因的缺失片段区域的扩增，扩增结果通过本公司专门设计的相应分析软件，对扩增目的片段的相应基因的拷贝数进行分析，得出最终的检测结果。
为了进一步保证检测结果的准确性，每次试验还加入校准品和质控品，用于监控核酸提取和定量检测的整个过程，减少假阴性和假阳性结果的出现。

【主要组成成分】

组分名称		规格	主要成分	数量
全血基因组 DNA 提取试剂（柱提法）	红细胞裂解液	20mL/瓶	NH ₄ Cl, KHCO ₃	1
	提取液 A	3.4mL/瓶	Tris-HCl, NaCl	1
	提取液 B	400μL/管	SDS	1
	提取液 C(干粉)	-	蛋白酶 K	1
	提取液 D	3.6mL/瓶	CH ₃ N ₃ • HCl	1
	溶解液	1.8mL/管	灭菌纯化水	1
	离心柱	20 个/袋	——	1
	收集管	20 个/袋	——	1
检测试剂	反应液 A	520μL/管	Buffer、MgCl ₂ 、酶	1
	反应液 B	80μL/管	引物，探针	1
	正常基因型（α α / α α）校准品 1	50μL/管	人白细胞	1
	正常基因型（α α / α α）校准品 2	50μL/管	人白细胞	1
	正常基因型（α α / α α）质控品	50μL/管	人白细胞	1
	东南亚缺失型（ α^{SEA} / α α）质控品	50μL/管	人白细胞	1
	阴性质控品	50μL/管	灭菌纯化水	1

注：1. 不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。 2. 需自备试剂：无水乙醇，75%乙醇。 3. 提取液 C 使用前加 220u1 DNA 溶解液溶解。

【储存条件及有效期】

全血基因组 DNA 提取试剂（柱提法）保存于 18~25℃，检测试剂保存于-20±5℃，有效期 9 个月。
提取液 C(干粉)溶解后保存于-20℃±5℃。
避免反复冻融。
试剂盒生产日期和有效日期见产品标签。

【适用仪器】Agilent Strategen MX3005P、Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

- 1 适用样本类型：外周全血
- 2 样本采集要求：
全血：用一次性无菌注射器抽取受检者静脉血 2mL，注入含 EDTA 或枸橼酸钠抗凝剂的玻璃管，立即轻轻颠倒玻璃管混合 5~10 次，使抗凝剂与静脉血充分混匀，密闭送检。
- 3 保存：标本可立即用于测试；在-20±5℃保存期为 6 个月；若要长期保存，需储存于-80±5℃；标本应避免反复冻融。
- 4 运输：标本运送可以在 0℃左右条件下进行。
- 5 DNA 浓度要求：用于检测的 DNA 浓度应在 10ng/μL-100ng/μL 范围内。

【检验方法】

- 1 标本处理
- 1.1 在实验前按此比例配制消化液：

名称	每人份加入量
提取液 A	170μL
提取液 B	20μL
提取液 C	10μL
每人份总体积	200μL

- 1.2 需先准备好无水乙醇，75%乙醇。
- 1.3 实验操作如下：
- 1.3.1 在 1.5mL 的离心管中，加入 1.0 mL 红细胞裂解液及 200μL 的 EDTA 抗凝全血，颠倒混匀 10 秒，5,000rpm 离心 2 分钟，吸去上清，保留约 50μL 的管底沉淀。
- 1.3.2 加入 200μL 消化液到沉淀中，用振荡器充分振荡混匀至沉淀完全消失，56℃水浴消化 30 分钟（注：需把沉淀充分振散开来，否则会影响消化，最终影响 DNA 得率；消化期间每隔 10 分钟摇匀消化液，使消化更充分）。
- 1.3.3 加入 180μL 提取液 D 到已消化好的消化液中，反复颠倒至液体呈均匀混浊状。
- 1.3.4 加入 200μL 无水乙醇到经提取液 D 处理的消化液中，反复颠倒至液体呈清亮透明状，然后转移至离心柱中，室温静置 2 分钟，10,000rpm 离心 1 分钟，弃滤液。
- 1.3.5 加 600μL 75%乙醇到离心柱中，10,000rpm 离心 1 分钟，弃滤液。
- 1.3.6 重复步骤 1.3.5 一次。
- 1.3.7 将离心柱 10,000rpm 再离心 2 分钟以去除残留液体。
- 1.3.8 将离心柱放在另一洁净 1.5mL 离心管中，打开离心柱管盖，室温放置 3-5 分钟（挥发残留乙醇），在柱中央加入 60μL 56℃预温的溶解液，室温放置 3-5 分钟。
- 1.3.9 10,000rpm 离心 1 分钟，收集溶解液，用于检测或-20℃保存备用。

2 校准品及质控品处理

- 2.1 校准品处理：取装有正常基因型(α α / α α)校准品 1、正常基因型(α α / α α)校准品 2 的离心管，8,000rpm 离心 30 秒，然后按 1.3.2~1.3.9 的提取步骤操作。
- 2.2 阳性质控品处理：取装有正常基因型(α α / α α)、东南亚缺失型(-^{SEA}/α α)质控品的离心管，8,000rpm 离心 30 秒，然后按 1.3.2~1.3.9 的提取步骤操作。
- 2.3 阴性质控品处理：取装有阴性质控品的离心管，5,000rpm 离心 30 秒，即可直接加样上机。

3 PCR 扩增

- 3.1 根据受检样本量，按（受检样本数 N+2 个正常基因型校准品+1 个正常基因型质控品+1 个东南亚缺失型质控品+1 个阴性质控品）的量做复管测试，取相应数量的 8 联 PCR 反应管，按下表顺序分别加入反应液，可根据 PCR 反应用量，计算各组分所需总量，混匀后分装 15μL 于单个 PCR 反应管中：

反应液名称	每人份反应液量
反应液 A	13μL
反应液 B	2μL
每人份总反应液体积	15μL

- 3.2 在加有反应液的 PCR 反应管中加入 5μL 待测标本 DNA（包括处理后的校准品 1、校准品 2 和正常、东南亚及阴性质控品），盖好相应的 PCR 盖后，8,000rpm 离心 30 秒，放入荧光定量 PCR 扩增仪的中间 48 个孔位置，建议每次最多做 24 个样本，其放置位置如下表灰色区域（箭头所示位置）：

A													
B													
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- 3.3 荧光定量 PCR 仪上，选取需检测反应管位置，选择四种荧光标记物的检测通道，分别为 FAM、HEX、ROX、CY5，对反应管编号（把校准品分别编号为“1,2”其余样本依次编号），设置总体积为 20μL。扩增检测条件设置为：37℃ 15 分钟，95℃ 5 分钟，1 个循环；95℃ 45 秒→56℃ 45 秒，2 个循环；92℃ 30 秒→62℃ 1 分钟，35 个循环（62℃采集荧光）；保存文件，运行。

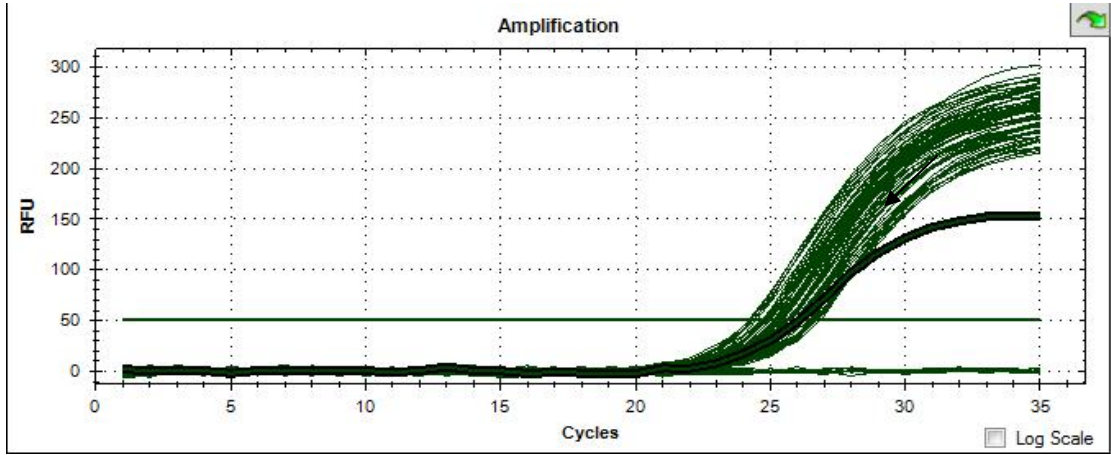
4 结果分析

- 4.1 反应结束后保存检测数据文件

分析条件设置：根据分析后图像调节各荧光通道 Threshold 值（以选取扩增曲线的最佳线性区域为原则，选取的区域必须在对数扩增区）。然后导出各检测管 4 个荧光通道的 Ct 值至 Excel 文件。具体操作如下：

- 4.1.1 确定荧光基线位置

进行结果分析前，需将四个通道的基线位置分别调整到各个通道荧光值的对数扩增区，建议将其调整至最低扩增效率曲线荧光终值的 1/3 位置，如下图：



该图中，选取粗线荧光曲线的终值作为标准（箭头所指区域），经确定该荧光终值为 150，即其基线选择在 50 位置

- 4.1.2 Agilent Strategen MX3005P 软件中结果以 Excel 文件导出过程：

- 4.1.2.1 打开运行完成的软件，点击右上方的“Analysis”按钮；再按处于软件中间的“Results”按钮，此时出现了该次实验所有样本的荧光曲线图；
缺失型 α 地贫，第二版/1

- 4.1.2.2 在荧光曲线图的右边标志着“Area to analyze”的框框内点击“Text report”左边的按钮，此时“Area to analyze”的框框下面出现了“Column”等框框；
- 4.1.2.3 在“Column”框框中依次点击选取“Replicate”、“Well”、“Dye”、“Well Type”、“Threshold(dR)”和“Ct(dR)”等6个选项。
- 4.1.2.4 点击软件左上方的“File”按钮，选取“Export Text Report”选项中的子选项“Export Text Report to Excel”，此时6个选项中的所以数据都导出在Excel表中，此时为只读格式。
- 4.1.2.5 将导出的结果以Excel表的格式保存，命名即可。
- 4.1.3 Bio-Rad CFX96 荧光定量PCR仪软件中结果以Excel文件导出过程：
- 4.1.3.1 打开运行完成的软件，点击左上方的“Export”项；再点击该项中的“Custom Export”项，此时出现了导出数据的相关信息框，有“Export Format”、“Sample Description”、“Quantification”等。
- 4.1.3.2 在“Export Format”框中选取“Excel 2003(*.xls)”；在“Sample Description”框中选取“Well”、“Fluorophore”、“Replicate Number”；在“Quantification”框中选取“Cq”和“Cq Standard Deviation”，点击“Custom Export”框中最下面的“Export”按钮，按照对话框的提示，命名保存即可。

4.2 结果分析

- 4.2.1 打开AnyPCR地贫报告系统，点击该软件中的“项目（A）”选项中的“PCR”按钮，出现一个分析数据的界面。在该界面中间的“参考”框框中输入“1”to“2”；孔数为“2”。（注：“1”to“2”为标准品的相应流水号）
- 4.2.2 点击该界面左上角的按钮，打开通用4.1方式导出的excel表结果，然后按“分析”按钮。此时该软件界面的右边出现了相应的样本流水号（Index）、检测基因型（Result）、根据基因型判断出的中国常见检测结果（Detail）及相应的建议（Suggest）等信息，其中还包括荧光信号，Ct值等，标识FAM通道为ζ基因、HEX通道为α2基因、CY5通道为α1基因、ROX通道为β-actin基因。

4.2.3 结果输出

4.2.3.1 检测结果以报告单格式输出

- 4.2.3.1.1 结果分析后双击结果框中的样本，出现“编辑记录”框，根据里面的要求填写被检者的基本信息（如样本编号、姓名、性别、年龄、联系电话和住址等）及检查信息（如检查项目、检查日期、标本号、临床表现、检测结果等），填写完后按“保存”即可。
- 4.2.3.1.2 依次填写完所有样本的检测信息，按软件界面右上方的按钮，单击该项中的“浏览窗口（Z）”项，此时出现一个“数据浏览”框，所有更改后的信息都在该框中显示出来。
- 4.2.3.1.3 单击所要打印的样本（也可选取所有样本），然后单击软件界面右上方的按钮，再单击该项中的“打印（P）”项，即以报告单的格式打印出相应被检者的检测信息。

4.2.3.2 检测结果以Excel格式输出

结果分析后，单击软件左上方的按钮，再根据对话框的要求填写相应信息，按“保存”即可。此时保存的是软件分析的原始结果信息，包括：样本编号“No”、经计算得出的ζ、α1、α2珠蛋白基因目的片段的相对拷贝数、经拷贝数进一步分析计算得出的基因型“Result”、根据基因型判断出的中国常见检测类型“Detail”、根据数据分析后提出的建议“Suggest”及各个通道的原始数据等信息。

5 结果判定

根据软件分析后，即可在导出的报告单中，或Excel表中获得被检者的具体检测信息。若建议“Suggest”栏中有要求复检的，需进行复检。各种类型标本检测结果判读如下表：

软件判读结果			分析结果的解读
Result	Detail	Suggest	
α α / α α	未检测到α珠蛋白基因缺失		正常型
- - / α α	本地区最常见的基因型为- ^{SEA} / α α		SEA杂合子
α - / α α	本地区最常见的基因型为- α ^{3.7} / α α		3.7杂合子
- α / α α	本地区最常见的基因型为- α ^{4.2} / α α		4.2杂合子
α - / α -	本地区最常见的基因型为- α ^{3.7} / - α ^{3.7}		3.7纯合子
- α / - α	本地区最常见的基因型为- α ^{4.2} / - α ^{4.2}		4.2纯合子
- - / α -	本地区最常见的基因型为- ^{SEA} / - α ^{3.7}		HBH病（SEA合并3.7）
- - / - α	本地区最常见的基因型为- ^{SEA} / - α ^{4.2}		HBH病（SEA合并4.2）
- - / - -	- ^{SEA} / - ^{SEA}	疑似barts’水肿胎,建议复检	SEA纯合子

6 质量控制

- 6.1 正常基因型（α α / α α）校准品1、2、正常基因型（α α / α α）质控品、东南亚缺失型（-^{SEA} / α α）质控品的4个荧光检测通道扩增曲线均呈典型的“S”型；
- 6.2 阴性质控品：扩增曲线无对数增长长期或无Ct值显示；
- 6.3 正常基因型（α α / α α）质控品：经检测及软件分析判定为α α / α α；
- 6.4 东南亚缺失型（-^{SEA} / α α）质控品：经检测及软件分析判定为- / α α；
- 6.5 以上要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

【阳性判断值或者参考区间】

所有结果判断以软件分析计算的2^{-ΔΔCt}值为准。参考值范围根据统计学方法计算得出，已预设的分析软件中；软件中设有临界值，当分析数值处于临界值时，软件会判定建议复检，当复检结果仍无法得出确定结果时，请采用第三方检测试剂进行检测。

【检验结果的解释】

- 1 每次实验均需检测正常基因型（α α / α α）质控品，东南亚缺失型（-^{SEA} / α α）质控品，质控品结果满足质量控制要求时方可进行检测结果的分析与判定；对于未知样本，首先观察有无明显的S型扩增曲线，如有再进行结果分析。
- 2 判断结果时，请结合临床表型，若基因型与临床表型不相符，需进行复检或采用第三方检测试剂进行检测。

【检测方法的局限性】

- 1 本方法是针对ζ、α1、α2基因的相对拷贝数定量分析，检测结果只反映受检标本是否有ζ、α1、α2基因缺失，而不能提供具体的缺失类型。
- 2 虽然本试剂盒采用的定量检测方法在一定程度上可以消除微量外源污染，但样本检测结果和样本收集、处理、运送及保存质量有关，其中任何失误都将会导致结果误判，如果样本处理时没有控制好交叉污染，可能出现假阳性结果。
- 3 本试剂盒仅适用于α-地中海贫血基因缺失检测，而不适用于α-地中海贫血基因点突变检测。

【产品性能指标】

- 1 试剂盒的最低检出量为 10ng/μL；有效检测浓度范围为 10ng/μL-100ng/μL；
- 2 试剂盒批内及批间精密度的变异系数（CV%）均小于 10%；
- 3 本试剂盒能特异性扩增人类基因组 ζ、α 1、α 2、β-actin 基因，与人类基因组中其它基因或 DNA 片段无交叉反应，α-地贫基因点突变样本、β-地贫基因点突变样本、唐氏综合征样本均不会影响检测结果的准确性；
- 4 干扰试验结果显示，临床样本中可能存在的内源性物质血红素（浓度 20 mg/mL）甘油三酯（浓度 3000mg/dL）、血红蛋白（浓度 6g/dL）和白蛋白（浓度 1.0g/dL），药峰浓度的常用治疗药物得斯芬、奥贝安可、恩瑞格不会影响检测结果的准确性；
- 5 临床研究试验结果表明，与对照试剂相比，阳性符合率为 99.35%，阴性符合率为 99.44%，总符合率为 99.38%。

【注意事项】

- 1 实验室管理应严格按照 PCR 基因扩增实验室的管理规范，实验人员必须进行专业培训，实验过程严格分区进行（试剂准备区、标本制备区、扩增和产物分析区），所用消耗品应灭菌后一次性使用，实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区各阶段用品不能交叉使用；
- 2 为试剂和标本准备阶段提供生物安全柜，实验过程中穿工作服，带一次性手套，使用自卸管移液器；
- 3 试剂使用前要完全解冻，8,000rpm 离心数秒后使用；
- 4 标本制备区所用过的吸头请打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃；
- 5 实验完毕用 10%次氯酸或 75%酒精或紫外线灯处理工作台和移液器；
- 6 本试剂盒内标准品、质控品等血样标本应视为具有传染性物质，操作和处理均需符合相关法规要求：卫生部《微生物生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。

【参考文献】

- 1 Muncie HL Jr, Campbell J. Alpha and beta thalassemia. Am Fam Physician. 2009; 15; 80(4):339-44
- 2 Xu XM, Zhou YQ, Luo GX, et al. The prevalence and spectrum of alpha and beta thalassaemia in Guangdong Province: implications for the future health burden and population screening. J Clin Pathol, 2004, 57 (5):517-22.
- 3 Maciag M, Adamowicz-Salach A, Siwicka A, Spychalska J, Burzynska B. The use of real-time PCR technique in the detection of novel protein 4.2 gene mutations that coexist with thalassaemia alpha in a single patient. Eur J Haematol. 2009 Oct; 83(4):373-7.
- 4 Kenneth J. Livak, Thomas D. Schmittgen. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} Method. METHODS. 2001; 25: 402 - 408.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：广州达安基因股份有限公司

住所：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号

联系方式：

传真：020-32068820 电话：020-32290789, 400 000 0340
邮政编码：510665 网址：http://www.daangene.com

售后和服务单位名称：

联系方式：

传真：020-32068820 电话：020-32290789, 400 000 0340
邮政编码：510665 网址：http://www.daangene.com

生产地址：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号；广州市高新技术产业开发区荔枝山路 6 号；广州市黄埔区香山路 17 号 B104 号房。

生产许可证编号

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号

【说明书批准日期及修改日期