

遗传性耳聋基因检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）说明书

【产品名称】

通用名称：遗传性耳聋基因检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）

【包装规格】

48 测试/盒

【预期用途】

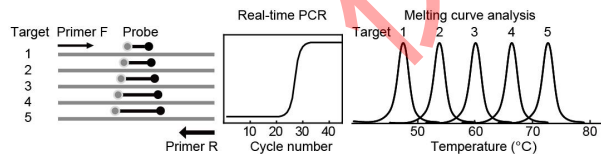
本试剂盒适用于体外定性检测从外周静脉血样本、唾液样本和血斑样本中提取获得的人类基因组 DNA 中 4 个耳聋基因的 15 种突变（其分别为 **GJB2**: c.35delG, c.176-191del16bp, c.235delC, c.299-300delAT; **GJB3**: c.538C>T; **mtDNA**: m.1494C>T, m.1555A>G; **SLC26A4**: c.919-2A>G, c.1174 A>T, c.1226 G>A, c.1229 C>T, c.1707+5 G>A, c.1975 G>C, c.2027 T>A, c.2168A>G）。

耳聋是临床上常见的遗传性疾病之一，我国听力言语残疾者占残疾人总数的 33.52%。GJB2、SLC26A4、mtDNA 是导致中国大部分遗传性耳聋发生的三个最常见的致病基因，21%的聋人带有 GJB2 突变^[1]，15%的聋人带有 SLC26A4 突变^[2]，44%的聋人带有 mtDNA 突变，对以上几个基因进行检测可为绝大部分耳聋患者明确遗传学病因，此外，GJB2 突变、SLC26A4 突变和 mtDNA 突变在正常人群的携带率分别为 3%、2~3%和 1/300。GJB2 基因在人类的耳蜗毛细胞中高表达，若其编码区域发生突变，产生没有生物活性的蛋白质，会影响缝隙连接蛋白所组成通道的正常功能，阻碍细胞间信息传递，影响细胞外钾离子回流，使 Corti 氏器呈高钾状态，进而影响耳蜗毛细胞的电生理活动，导致听力下降^[3]。GJB3 基因突变引起的耳聋主要以常染色体显性遗传方式^[4,5]，其特点是，只要父母双方有一方是该基因突变的携带者，则子女必定成为耳聋患者。SLC26A4 基因编码离子转运相关蛋白，该基因突变可导致常染色体隐性耳聋 DFNB4 和 Pendred 综合征（可表现为前庭水管扩大或伴内耳畸形、神经性聋和甲状腺肿^[6]），是仅次于 GJB2 突变引起的常染色体隐性遗传耳聋的病因。线粒体基因 mtDNA 突变导致的耳聋主要与氨基糖甙类药物使用有关。突变携带者对氨基糖甙类药物异常敏感，低剂量使用就会出现耳鸣，甚至严重的听力下降；该突变遵循母系遗传方式。

本试剂盒用于耳聋的辅助诊断，其检测结果不作为诊断耳聋的唯一依据，临床医生应结合患者其他诊断信息对检测结果进行综合判断。

【检验原理】

本产品采用荧光 PCR 熔解曲线法（原理如下图）。首先用引物扩增人 4 个耳聋基因，再通过对荧光标记探针与 PCR 产物形成的双链杂交体进行熔解曲线分析来判断样本的 4 个耳聋基因是否存在突变及相应的突变类型。对于每一份样本，本试剂盒需 4 个 PCR 反应体系对其进行检测，对应扩增试剂中的耳聋 PCR 反应管 A/B/C/D。



【主要组成成分】

组成	组分名称	主要成分	规格	数量
扩增试剂	耳聋检测 PCR 反应管 A（蓝色标记）	引物、探针（五条探针分别由 FAM、HEX、ROX-1、ROX-2 和 Cy5 标记）、dNTPs、Taq 酶和 UNG 酶	8 测试/条	6 条
	耳聋检测 PCR 反应管 B（红色标记）	引物、探针（四条探针分别由 FAM、HEX、ROX 和 Cy5 标记）、dNTPs、Taq 酶和 UNG 酶	8 测试/条	6 条
	耳聋检测 PCR 反应管 C（紫色标记）	引物、探针（三条探针分别由 FAM、HEX 和 Cy5 标记）、dNTPs、Taq 酶和 UNG 酶	8 测试/条	6 条

	耳聋检测 PCR 反应管 D（绿色标记）	引物、探针（两探针分别由 FAM 和 HEX 标记）、dNTPs、Taq 酶和 UNG 酶	8 测试/条	6 条
对照试剂	耳聋检测野生型对照	野生型质粒（包含四个基因 15 个位点的野生型片段，浓度为 3.0×10^3 拷贝/ μ L）	32 测试/支	1 支
	耳聋检测阴性对照	DNA 溶解液	32 测试/支	1 支
耗材	PCR 八联管管盖	透明 PCR 八联管管盖	8 测试/条	24 条

注：自备器械和试剂包括厦门致善生物科技股份有限公司生产的唾液 DNA 样本采集管（闽厦械备 20170022 号）和核酸提取或纯化试剂（建议使用厦门致善生物科技股份有限公司生产的闽厦械备 20150011 号、闽厦械备 20150058 号和闽厦械备 20160058 号）。

【储存条件及有效期】

-25~8℃ 避光保存，有效期 18 个月。

试剂盒内各组分最终效期以外包装盒标签上打印日期为准；拆封后未使用的反应管需用自封袋封好并放入干燥剂存放于原储存温度，并且在 7 天内用完；耳聋检测野生型对照和耳聋检测阴性对照在首次溶解使用后，需放置 -18℃ 以下保存，并且反复冻融不得超过 4 次；可于 -18~37℃ 条件下运输，运输时间不超过 14 天。生产日期及失效日期见包装标签。

【适用仪器】

本试剂盒适用的仪器为：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人外周静脉血样本或血斑样本或唾液样本，外周静脉血样本使用 EDTA 抗凝。检测前需提取样本中人类基因组 DNA，具体方法及要求参见检验方法中的样本提取及加样。建议全血样本采集若未立即提取，可于 2~8℃ 储存并在 7 天内完成提取；或于 -18℃ 以下储存，并在 6 个月内完成提取。建议血斑样本在 2~8℃ 储存，并在 30 天内完成提取；或于 -18℃ 以下储存，并在 12 个月内完成提取。建议唾液样本在室温条件下储存，并于 12 个月内完成提取，唾液采集方法为先用饮用水将口腔内的杂物洗漱干净，再向采集漏斗中吐入唾液至所需刻度线高度后旋下漏斗，盖紧采集管管盖并混匀液体。具体要求详见厦门致善生物科技股份有限公司生产的唾液 DNA 样本采集管说明书。

【检验方法】

1. 试剂准备——配液区

- ① 首先从试剂盒中取出铝箔袋，撕开封口，打开自封条，然后打开耳聋检测 PCR 反应管 A/B/C/D 的泡罩包装，取出 n 人份试剂（n 根据当次实验需要确定），剩余试剂应放回铝箔自封袋并将封条封紧，于 -25~8℃ 避光保存。
- ② 取出 n 人份透明 PCR 八联管管盖（n 根据当次实验需要确定）
- ③ 将待用的耳聋检测 PCR 反应管 A/B/C/D、透明 PCR 八联管管盖、耳聋检测野生型对照和耳聋检测阴性对照（瞬时离心，如 3000 rpm 离心 10 秒），转移至提取间，于 -25~8℃ 避光保存直至样本提取完。

2. 样本提取及加样——提取区

- ① 对于外周静脉血样本，用厦门致善生物科技股份有限公司的 Lab-Aid 820 核酸提取 Mini 试剂（备案号：闽厦械备 20150011 号）提取人外周静脉血样本中的基因组 DNA，并采用本提取试剂盒提供的洗脱液稀释 DNA；对于血斑样本，用厦门致善生物科技股份有限公司的 Lab-Aid 824 核酸提取 Micro 试剂（备案号：闽厦械备 20160058 号）提取血斑样本中的人基因组 DNA，如需要可采用本提取试剂盒提供的洗脱液稀释 DNA；对于唾液样本，用厦门致善生物科技股份有限公司的 Lab-Aid 824 核酸提取 Midi 试剂（备案号：闽厦械备 20150058 号）提取唾液样本中的人基因组 DNA，如需要可采用本提取试剂盒提供的洗脱液稀释 DNA。

由外周静脉血样本提取获得的 DNA 样本的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 应在 1.6~2.0 范围之间，且 OD₂₆₀/OD₂₃₀ ≥ 2.0，DNA 浓度应高于 1 ng/ μ L。若样本的 OD_{260nm}/OD_{230nm} < 2.0，可经提取试剂盒中提供的洗脱液进行适当稀释（通

常稀释 10 倍），且稀释后浓度应高于 1 ng/μL。对于浓度过低或纯度不符合要求的样本，则需要重新提取 DNA 再次进行检测；由血斑样本提取获得的 DNA 浓度应高于 1 ng/μL，由于 DNA 含量较少，一般不建议进行吸光值检测，若确实有需要吸光值检测，检测时应先使用提取试剂提供的洗脱液进行调零，OD₂₆₀ 值控制在 0.1 到 1.0 之间，数值会比较准确；由唾液样本提取获得的 DNA 浓度应高于 1 ng/μL，且获得的 DNA 样本的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 应在 1.6~2.2 范围之间，可经提取试剂盒中提供的洗脱液进行适当稀释（通常稀释 10 倍），且稀释后浓度应高于 1 ng/μL。对于浓度过低或纯度不符合要求的样本，则需要重新提取 DNA 再次进行检测。

提取的 DNA 样本若未立即用于检测，可保存于 2~8℃并于 1 个月内检测；或于 -18℃以下储存，并在 12 个月内检测；DNA 样本在超低温 -70℃以下可保存 3 年；核酸样本反复冻融不超过 4 次。

② 用微量加液器向每支 PCR 薄壁反应管中加入 25μL 相应的 DNA 样本或阴性/野生型对照，并立即盖严管盖。每次运行需对每个反应体系均设置阴性和野生型对照，对照品第一次使用前需加入 800μL 灭菌后纯水进行溶解，充分振荡混匀 20 秒，瞬时离心，溶解后的对照品需于 -18℃以下贮存，反复冻融≤4 次。

③ 将已加入模板的 PCR 薄壁反应管于涡旋振荡器中充分振荡混匀 20s，瞬时离心。

④ 将离心后的 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

本试剂盒反应体系设为 25 μL，扩增与熔解曲线分析步骤设置为一个程序，在 SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统上连续完成。

① 反应程序设定如下：

程序名称	阶段	条件	循环数
PCR 反应程序	UNG 酶处理	50℃ 2 分钟	1
	预变性	95℃ 10 分钟	1
	降落循环程序	95℃ 15 秒	10
		65℃ 15 秒（每个循环下降 1.0℃）	
		76℃ 20 秒	
	PCR 循环程序	95℃ 15 秒	50
		55℃ 26 秒（可设置在此阶段采集荧光）	
		76℃ 20 秒	
熔解曲线分析程序		95℃ 1 分钟 35℃ 3 分钟 40℃~85℃，设置在此阶段采集 FAM、HEX、ROX 和 Cy5 通道荧光信号，升温速率：0.04℃/s	1

② 程序运行完毕，将 PCR 薄壁反应管（闭管）取出放入凹凸袋，将封口封严，按污染源处理。

【参考区间】

野生型对照在各体系及各通道中的熔点（ T_m ）参考区间如下：

- A: FAM 通道 65.31℃±1℃; HEX 通道 68.73℃±1℃;
ROX 通道 62.38℃±1℃; Cy5 通道 60.36℃±1℃。
- B: FAM 通道 65.29℃±1.58℃; HEX 通道 62.28℃±1.02℃;
ROX 通道 62.85℃±1.1℃; Cy5 通道 70.61℃±1.05℃。
- C: FAM 通道 62.06℃±1℃; HEX 通道 54.81℃±1℃;
Cy5 通道 61.07℃±1℃。
- D: FAM 通道 66.82℃±1℃; HEX 通道 64.30℃±1℃。

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，请参考野生型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】

野生型对照的十三个通道应均有熔解峰且熔点在对应的参考值范围内，阴

性对照无任何熔解峰，则该次实验有效，继续进行待测样本的判读。

对每一份样本，若在十三个通道中任何一个通道无熔解峰，表明样本基因组有问题，检测结果无效；若样本在十三个通道均有熔解峰，通过比较待测样本在 A、B、C 和 D 体系中共十三个检测通道（如图 1）与野生型对照之间熔点（ T_m 值）的差异判断样本是否发生突变。当样本熔解峰与野生型对照熔解峰差异（ ΔT_m 值）在 ±1℃ 以内的即为野生型峰，差异超过 ±2℃ 的请参照附表 1 判断具体位点的突变类型。其具体情况如下：

- ① **野生型**：样本在十三个检测通道都只有野生型峰（图 1 黑色曲线）；
- ② **杂合型**：样本在某个通道既有野生型峰，又有突变型峰，或者为野生峰和突变峰的融合峰，而其它通道为野生型峰（图 1 中 A-HEX 绿色曲线）；
- ③ **纯合型**：样本在某个通道只有一个突变型峰，而其它通道为野生型峰（图 1 中 D-HEX 紫色曲线）；
- ④ **复合杂合型**：样本在某两个或以上通道有突变型峰，而其它通道为野生型峰，则样本为复合杂合型（图 1 中 A-ROX 红色曲线和蓝色曲线）。

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，该方法可以检测到发生在探针覆盖区域内、试剂盒范围外的序列变异，但是这些变异不属于本试剂盒预期用途所规定的检测范围。
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. D 体系是用于检测线粒体相关突变位点（m.1494C>T, m.1555A>G）。由于线粒体突变属于异质性突变，因此其存在不同程度的突变水平（0-100%）。应通过与对应野生型峰的形状进行区分辨别，本体系的检测限为 20% 以上的突变。

【产品性能指标】

1. 本产品检测不同基因型样本的检测下限为人类基因组 DNA 25ng/反应。
2. 国家参考品符合率：检测国家阴性参考品和试剂盒范围外的国家阳性参考品，结果为野生型或未检出突变；检测试剂盒范围内的国家阳性参考品，结果均为相对位点突变型。
3. 企业参考品符合率：检测企业参考品中 10 份特异性参考品，结果均为野生型；检测 15 份纯合突变型参考品和 15 份杂合突变型参考品，结果均为对应基因型；检测企业参考品中 1 份重复性参考品各 10 次，结果一致且为对应基因型。
4. 特异性：常见的内源性和外源性干扰物质在相应浓度下：包括胆红素（600.0μmol/L）、胆固醇（40.0mmol/L）、血红蛋白（40 g/L）和甘油三酯（56.0mmol/L），庆大霉素（24mg/mL）、链霉素（64mg/mL）、卡那霉素（30μg/mL）、妥布霉素（4μg/mL）、唾液淀粉酶（400U/L）、溶菌酶（1.3mg/mL）、漱口水（100μL/mL）、牙膏（20mg/mL）、薄荷糖（65mg/mL）和食物残渣（30mg/mL）等，不影响本试剂盒的检测结果。
5. 共验证 2572 例临床样本，结果表明，对比 SANGER 基因测序方法，本产品的灵敏度、特异性、阳性预测值、阴性预测值和总符合率均为 100%。

【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。冻存的阴性/野生型对照品溶液在使用前应充分融化，并振荡混匀，短暂离心。PCR 反应管加入模板后应充分振荡混匀并瞬时离心，尽量避免产生气泡。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. 耳聋检测 PCR 反应管 A/B/C/D 应避光保存，每次试验应设置阴性和野生型对照。
5. 不同批号的试剂请勿混用，请在有效期内使用试剂盒。
6. 对照品尽量避免反复冻融，应控制反复冻融≤4 次。如果需要多次使用，请在第一次溶解后将野生型对照分装冻存，再根据需要取用。
7. 反应结束后，需将 PCR 薄壁反应管（闭管）取出放入凹凸袋，将封口封严，按污染源处理。

【参考文献】

- [1] 戴朴, 朱秀辉, 袁永一, et al. Pendred 综合征基因热点突变筛查赤峰市聋哑学校大前庭水管综合征患者[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2006, 41 (7): 497-500
- [2] 戴朴, 韩东一, 冯勃, et al. 大前庭水管综合征的基因诊断和 SLC26A4 基因突变分析[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2006, 13 (5): 303-307.
- [3] Mukherjee M, Phadke S, Mittal B. Connexin 26 and autosomal recessive non-syndromic hearing loss[J]. Indian Journal of Human Genetics, 2003, 9 (2): 40.

- [4] Xia J-h, Liu C-y, Tang B-s, et al. Mutations in the gene encoding gap junction protein β -3 associated with autosomal dominant hearing impairment[J]. Nature genetics, 1998, 20 (4): 370-373.
- [5] Liu X-Z, Xia X J, Xu L R, et al. Mutations in connexin31 underlie recessive as well as dominant non-syndromic hearing loss[J]. Human molecular genetics, 2000, 9 (1): 63-67.
- [6] Van Laer L, Cryns K, Smith R J, et al. Nonsyndromic hearing loss[J]. Ear and hearing, 2003, 24 (4): 275-288.

【基本信息】

注册人/生产企业/售后服务单位名称：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

联系电话：400-661-8810；0592-7615088

传真：0592-7615089

网址：www.zsandex.com

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 20193400249

【说明书核准日期及修改日期】

2022 年 12 月 7 日

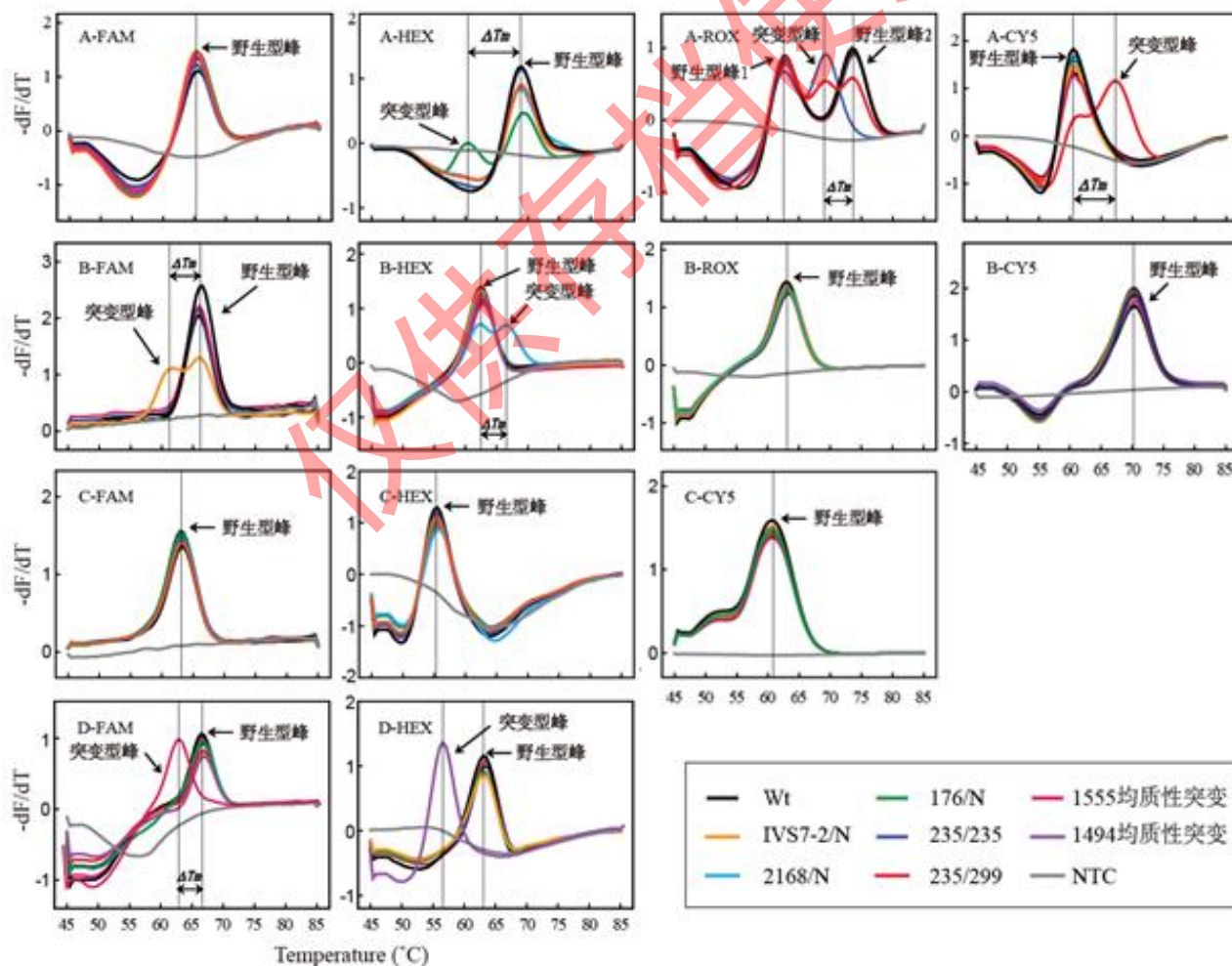


图 1 典型的样本检测结果。其中 A-FAM、A-HEX、A-ROX 和 A-Cy5 为体系 A 检测结果；B-FAM、B-HEX、B-ROX 和 B-Cy5 为体系 B 检测结果；C-FAM、C-HEX 和 C-Cy5 为体系 C 检测结果；D-FAM 和 D-HEX 为体系 D 检测结果。

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

基因	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 [$\Delta T_m = T_m(\text{野生}) - T_m(\text{突变})$]				反应体系 C [$\Delta T_m = T_m(\text{野生}) - T_m(\text{突变})$]			反应体系 D [$\Delta T_m = T_m(\text{野生}) - T_m(\text{突变})$]	
	HGVS 命名(c.)	FAM	HEX	ROX-1	ROX-2	Cy5	FAM	HEX	ROX	Cy5	FAM	HEX	Cy5	FAM	HEX
GJB2	c.35delG	5.19±0.76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	c.176_191del16	-	9.22±0.51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GJB3	c.538 C>T	-	-	9.02±0.64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GJB2	c.235delC	-	-	-	4.82±0.93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	c.299_300delAT	-	-	-	-	-6.97±0.87	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SLC26A4	c.919-2 A>G	-	-	-	-	-	5.42±1.34	-	-	-	-	-	-	-	-
	c.2168 A>G	-	-	-	-	-	-	-4.54±1.48	-	-	-	-	-	-	-
	c.1174 A>T	-	-	-	-	-	-	-	6.05±0.73	-	-	-	-	-	-
	c.1226 G>A	-	-	-	-	-	-	-	-	-4.51±1.97	-	-	-	-	-
	c.1229 C>T	-	-	-	-	-	-	-	-	7.0±0.57	-	-	-	-	-
	c.1707+5 G>A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.1±1.52	-	-	-	-
	c.1975 G>C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-7.84±0.58	-	-	-
	c.2027 T>A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-6.5±2.01	-	-
	m.1555 A>G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.44±1.09	-
	m.1494 C>T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.1±0.56

注：^a表中“-”指检测样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。

^b表中黑体字为野生型与对应通道突变型 $\Delta T_m \pm 3\text{SD}$ ，由多次试验得到的统计结果。

^c表中 ROX-1 的 ΔT_m 为由 $T_m(\text{野生型 1}) - T_m(\text{突变})$ 得到，ROX-2 的 ΔT_m 为由 $T_m(\text{野生型 2}) - T_m(\text{突变})$ 得到。