

人 SLC01B1 和 APOE 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：人 SLC01B1 和 APOE 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、48 人份/盒。

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人外周全血中 SLC01B1 c.388A>G、SLC01B1 c.521T>C、APOE c.388T>C 和 APOE c.526C>T 位点的多态性。本产品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产品的检测结果进行综合判断。

他汀类药物，即 3-羟基-3 甲基戊二酰辅酶 A（HMG-CoA）还原酶抑制药，是通过竞争性抑制内源性胆固醇合成限速酶 HMG-CoA 还原酶来降低总胆固醇（TC）、低密度脂蛋白（LDL）和三酰甘油(TG)，同时升高高密度脂蛋白(HDL)，现已成为冠心病预防和治疗的最有效药物。

有机阴离子转运多肽 1B1（OATP1B1，又称 OATP-C、OATP2 或 LST1）由 SLC01B1 基因编码，特异地表达在肝细胞基底膜上，在他汀类药物代谢中负责将他汀类药物由肝细胞膜表面转运进入肝细胞内。SLC01B1 基因具有遗传多态性，其中 c.388A>G（Asp130Asn，rs2306283）和 c.521T>C（Val174Ala，rs4149056）是两种常见的单核苷酸多态性，可以形成 4 种单倍型 SLC01B1*1a（c.388A-c.521T）、SLC01B1*1b（c.388G-c.521T）、SLC01B1*5（c.388A-c.521C）和 SLC01B1*15（c.388G-c.521C）。研究表明，当 SLC01B1 基因突变导致转运体的活性改变或表达异常时，会对他汀类药物吸收产生影响，从而影响他汀类药物的脂质效能。

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。人类 APOE 基因位于 19 号染色体 19q13.2。该基因的两个功能性 SNP c.388T>C（rs429358，Cys130Arg）和 c.526C>T（rs7412，Arg176Cys）构成 3 种单倍型，分别是 E2（c.388T-c.526T）、E3（c.388T-c.526C）、E4（c.388C-c.526C）。由 3 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）。研究表明，携带 APOE 基因 E2 等位基因服用他汀类药物的降脂疗效更明显。相反的，携带 E4 等位基因的个体冠状动脉性心脏病（CHD）比其他等位基因人群高出 2.11 倍且服用他汀类药物降脂疗效最差。目前 FDA 已将 APOE E2 列为普伐他汀药物反应相关的生物标记。

相关的临床或实验室诊断方法：

传统的基因多态性检测方法有 PCR-基因芯片杂交法、Sanger 测序法和 qPCR 法等。

【检验原理】

本产品采用多重 PCR 结合荧光探针熔解曲线技术，利用不同荧光标记的探针对人抗凝外周全血样本进行多位点同时扩增的检测。

多重 PCR：根据 NCBI GenBank 数据库公布的 SLC01B1 和 APOE 基因信息，选择人群中常见的 SLC01B1 c.388A>G、SLC01B1 c.521T>C、APOE c.388T>C、APOE c.526C>T 四个位点作为检测位点，根据各位点所在区域的基因序列特点，设计高度特异的引物探针进行多重 PCR 检测。同时以人类基因组 DNA 上的β-actin 基因做内控（Internal Control，IC），监测实验有效性。

荧光探针熔解曲线技术：利用荧光探针与靶标序列杂交形成杂交链熔解温度（Tm）不同来判读靶点的基因型。

此外，本产品建立了 UNG 酶防污染体系，PCR 反应液中以 dUTP 取代 dTTP，UNG 酶的作用原理是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，从而达到 PCR 防污染的作用。UNG 酶的最佳活性温度为 50℃，95℃ 可被灭活。

本产品可检测的位点多态性信息如下表：

基因	位点多态性	检测通道
β-actin	-	FAM
SLC01B1	c.388 A/A	
	c.388 A/G	
	c.388 G/G	
APOE	c.521 T/T	VIC
	c.521 T/C	
	c.521 C/C	
	c.388 T/T	ROX
APOE	c.388 T/C	
	c.388 C/C	
	c.526 C/C	CY5
APOE	c.526 C/T	
	c.526 T/T	

【主要组成成分】

组成	24 人份		48 人份		主要成分
	规格	数量	规格	数量	
反应液 I	572μL	1 管	1144μL	1 管	引物、探针、dN(UTP、PCR 缓冲液、UNG 酶
反应液 II	26μL	1 管	52μL	1 管	DNA 聚合酶
K 质控品	20μL	1 管	20μL	1 管	SLC01B1 c.388 A/G、SLC01B1 c.521 T/C、APOE c.388 T/C、APOE c.526 C/T、β-actin 质粒 DNA 混合液
空白对照	300μL	1 管	300μL	1 管	纯化水
样本处理液	6mL	1 管	6mL	2 管	NaOH、纯化水

说明：不同批号试剂盒中各组分不可以互换使用。

【储存条件及有效期】

试剂盒置于-30℃~-15℃避光保存，有效期为 12 个月。
试剂盒开瓶后，-30℃~-15℃避光保存，效期内性能稳定。
试剂盒在 37℃可避光保存 5 天。
试剂盒反复冻融不超过 10 次。
试剂盒在箱内温度不超过 25℃的条件下，可运输 7 天。
生产批号、生产日期、使用期限见标签。

【适用仪器】

Bio-Rad CFX96、SLAN-96P/S 实时荧光定量 PCR 仪

【样本要求】

适用样本

抗凝全血样本：对人外周抗凝全血样本的检测，所用抗凝剂为乙二胺四乙酸（Ethylenediaminetetraacetic acid，EDTA）或枸橼酸钠，不能使用肝素（20 IU/mL）抗凝。

采样方法

抗凝全血样本：抽取静脉血不少于 0.4mL，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。

样本保存

抗凝全血在室温放置可保存 24 小时，2~8℃可保存 1 个月，-18℃以下可保存 5 年，冷冻保存时应避免反复冻融。

样本运输

抗凝全血运输时需用泡沫箱加冰袋密封，且在途不宜超过 72 小时。

【检验方法】

样本处理

从试剂盒中取出样本处理液置于室温融化并震荡混匀备用，将待检抗凝全血样本充分颠倒混匀后取出 5μL，加入 200μL 样本处理液，震荡混匀，短暂离心 3~5 秒，做好标识。

反应液准备

从试剂盒中取出其余组分置于室温融化并震荡混匀，短暂离心 5~10 秒。根据该次实验的检测需求计算各组分的用量，反应液需求量=待检样本数+1 个 K 质控品+1 个空白对照。

每人份反应体系的配制如下表所示：

组分	反应液 I（μL/人份）	反应液II（μL/人份）	总量（μL/人份）
反应体系	22	1	23

配制完成后，振荡混匀，离心 10~20 秒，按 23μL/人份将反应液分装到 8 联管或 96 孔 PCR 板中，做好标识。

加样（注意避免交叉污染）

分别吸取处理后待检样本、K 质控品以及空白对照各 2μL，依次加到各反应孔中，盖紧管盖，做好标识，短暂离心 5~10 秒。

PCR 扩增

将上述已加模板的反应管置于荧光 PCR 仪中，并记录好样本摆放顺序，按下表设置 PCR 扩增参数。

序号	步骤	温度	时间	循环数
1	UNG 酶反应	50℃	2 min	1
2	预变性	95℃	5 min	1
3	变性	95℃	15 sec	40
4	退火、延伸	62℃	30 sec	
5	熔解程序	95℃	2 min	1
		40℃	4 min	1
		40~76℃	收集荧光	1
检测通道：FAM、VIC、ROX、CY5				

结果分析

按照分析软件生成的熔解曲线图像，根据各个信号通道上的特定 Tm 值范围内有无熔解峰来鉴定样本的基因型别。由于仪器软件只能自动读取高于阈值线的熔解峰的 Tm 值，因此，当软件无法自动给出 Tm 值时，可通过适当调节阈值或者人工判读的方式获得 Tm 值。

【阳性判断值】

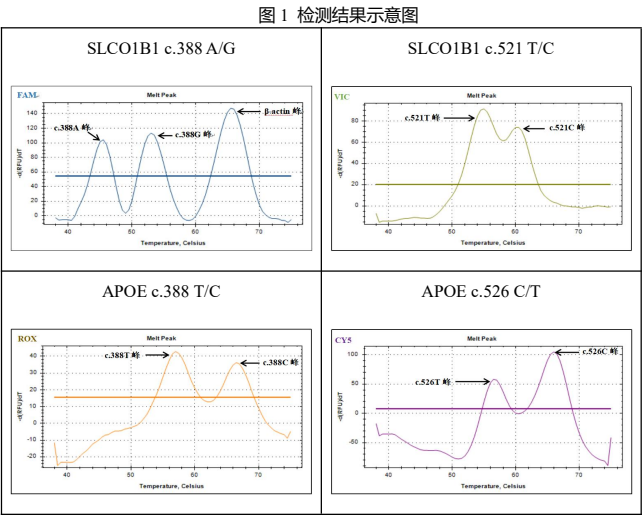
空白对照：FAM、VIC、ROX、CY5 通道均为阴性。

K 质控品：本质控品采用混合质粒样本作为阳性对照来监控实验的有效性，包含本试剂盒所检测的 4 种杂合突变型基因的质粒以及内参基因β-actin 的质粒，每个通道的检测结果应均为阳性，且熔解峰 Tm 值应在参考范围之内，满足以上条件，表明本次实验成功有效，可对待检样本进行分析。

待检的人全血样本检测结果：FAM、VIC、ROX、CY5 通道应均为阳性，且熔解峰 Tm 值应在参考范围之内，其中 FAM 通道包含作为内控的β-actin 基因，每次检测也应为阳性，任意检测位点或内参基因β-actin 出现无熔解峰或熔解峰 Tm 值不在参考范围之内，说明该检测结果无效，建议重新检测。

表 1 各位点多态性的 Tm 值参考范围

基因	多态性	Tm 值参考范围	信号通道
β-actin	-	63.17~67.35 °C	
SLCO1B1	c.388 A/A	42.86~49.73 °C	FAM
	c.388 A/G	42.86~49.73 °C 50.68~56.07 °C	
	c.388 G/G	50.68~56.07 °C	
	c.521 T/T	53.50~58.32 °C	VIC
	c.521 T/C	53.50~58.32 °C 58.47~63.76 °C	
APOE	c.521 C/C	58.47~63.76 °C	ROX
	c.388 T/T	55.69~60.71 °C	
	c.388 T/C	55.69~60.71 °C 64.75~70.43 °C	
	c.388 C/C	64.75~70.43 °C	CY5
	c.526 C/C	64.55~69.50 °C	
	c.526 C/T	64.55~69.50 °C 55.26~59.79 °C	
	c.526 T/T	55.26~59.79 °C	



【检验结果的解释】

- 1.本试剂盒一管反应液即可对 4 个基因位点进行多态性分析，每个信号通道对应一个检测位点，因此需要查看 4 个通道的熔解峰信息来综合判读样本的基因型别；
 - 2.本试剂盒的内参基因β-actin 在设计上与 SLCO1B1 c.388A>G 位点共用一个信号通道，因此该通道最多时会同时出现三个熔解峰。使用 CFX96 仪器检测时，“Melt Curve”窗口只能显示峰最高的两个峰的 Tm 值，需要手动读取第三个峰的 Tm 值。
- 【检验方法的局限性】
- 1.本试剂盒只检测中国人群中 SLCO1B1 c.388A>G、SLCO1B1 c.521T>C、APOE c.388T>C 和 APOE c.526C>T 共 4 个常见的基因位点，其他位点类型在本试剂盒检测范围之外无法检出。
 - 2.本试剂盒内的引物和探针所覆盖区域可能存在其他未知单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism, SNP），从而影响引物和探针的结合效率导致无法检出。
 - 3.全血样本含有大量的 PCR 抑制物及有色物质，直接使用可能会导致检测信号偏低或者漏检，须使用本试剂盒中配套的样本处理液进行预处理。

【产品性能指标】

准确性

采用 3 批产品对准确性进行研究，结果显示 SLCO1B1 c.388A>G、SLCO1B1 c.521T>C、APOE c.388T>C 和 APOE c.526C>T 4 个位点的所有基因型本试剂盒均能准确检出。

最低检测限

对白细胞计数≥1.0×10⁹/L 的全血样本或浓度≥0.5ng/μL 的 DNA 样本均能准确检出。

分析特异性

本试剂盒对不受血液中常见内源物质（甘油三酯≤11.47mmol/L、总胆固醇≤14.66mmol/L、总胆红素≤356.73μmol/L、血红蛋白≤10g/L）和外源药物（匹伐他汀≤4mg/d、辛伐他汀≤40mg/d、普伐他汀≤40mg/d、阿托伐他汀≤80mg/d）的干扰；对常用的抗凝剂（EDTA≤7.2mg/L、枸橼酸钠≤109mmol/L）无抑制反应；对结构类似物（如：大肠杆菌 DNA、同源基因）均无交叉反应。。

精密度

使用本试剂盒对检测范围内的所有基因型样本重复检测 10 次，重复结果一致且所有基因型均能准确检出。

【注意事项】

- 1.试剂盒必须严格按照所要求的保存条件保存，各组分使用前请充分融化、混匀并离心后再开盖使用，以保证反应体系体积完整及防止潜在的污染。
- 2.请严格分区操作实验，各区物品均为专用，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。
- 3.本试剂盒适用样本为 EDTA 或枸橼酸钠抗凝的外周全血，若使用其他类型的样本，出现检测结果差异与本试剂盒质量无关。
- 4.每次实验应进行质量控制。
- 5.检测样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。
- 6.实验中使用的吸头请直接打入盛有消毒剂的废液缸内，并与其他废弃物一同灭菌后方可丢弃。

【参考文献】

[1].中国成人血脂异常防治指南制订联合委员会.中国成人血脂异常防治指南(2016

年)[J].中华健康管理学杂志,2017,11(1):7-28

[2].李洋,艾丽菲热·买买提,王永涛,付真彦,马依彤.他汀类药物抵抗及其分子机制研究进展[J].中国动脉硬化杂志,2019,27(04):364-368.

[3].Alice C. Rodrigues, et al. Pharmacogenetics of OATP Transporters Reveals That SLCO1B1 c.388A>G Variant Is Determinant of Increased Atorvastatin Response[J]. IJMS,2011,12(9):

[4].王京伟,李艳,乔斌,陈娟娟.华中地区汉族人群 SLCO1B1 与 APOE 基因多态性分析及临床意义[J].实用医学杂志,2018,34(18):3041-3046.

[5].高辉,王杨,陈婉婷,卫波.SLCO1B1 和 APOE 基因多态性与他汀类药物疗效的相关性[J].实用医学杂志,2019,35(14):2300-2303.

【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：

售后服务单位名称：

联系方式：

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：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准及修改日期】