

非缺失型α-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：非缺失型α-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】

本试剂盒适用于体外定性检测人外周血提取的基因组 DNA 中α2-珠蛋白基因上 3 种中国人群中常见的非缺失型α-地中海贫血相关基因突变，分别为 c.369C>G, c.377T>C 和 c.427T>C。

α-地中海贫血(简称α-地贫)是由于α-珠蛋白基因突变导致珠蛋白肽链表达失衡而引起的单基因隐性遗传病。中国人群中常见的α-珠蛋白突变类型除 3 种缺失型(-α^{3.7}/、-α^{4.2}/和--SEA/)外，还包括 3 种非缺失型(c.369C>G, c.377T>C 和 c.427T>C)，而非缺失型α-地贫是导致临床上血红蛋白 H 病（Hb H 病）漏检的主要原因之一。本试剂盒可作为α-地贫 3 种缺失型检测的补充，以满足临床对α-地贫检测完整性的需要。

【检验原理】

本产品采用荧光 PCR 熔解曲线法，首先通过特异性引物扩增人α2-珠蛋白基因，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α2-珠蛋白基因是否存在突变及相应的突变类型。

【主要组成成分】

组成	组分名称	主要成分	规格	数量
扩增试剂	非缺失型α-地贫 PCR 反应液	引物、探针（其中，FAM 标记探针检测 c.369 和 c.377 位点；ROX 标记探针检测 c.427 位点；HEX 标记探针检测内参基因）、脱氧核糖核苷三磷酸混合液	990 μL/管	1 管
	非缺失型α-地贫 酶混合液	Taq 酶、尿嘧啶-N-糖基化酶	12 μL/管	1 管
对照试剂	非缺失型α-地贫野生型对照	野生型质粒	50 μL/管	1 管
	非缺失型α-地贫阴性对照	氨基丁三醇-盐酸缓冲液	50 μL/管	1 管
溶解试剂	DNA 溶解液	氨基丁三醇-盐酸缓冲液	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】

本试剂盒于-18℃以下避光保存，有效期为 18 个月，试剂盒内各组分有效期以包装上标识的有效期为准。生产日期及失效日期见包装盒标签。

反复冻融建议不超过 3 次，并于 4℃以下低温运输。

【适用仪器】

本试剂盒适用于带有 FAM、HEX 和 ROX 检测通道且具有熔解曲线分析功能的实时 PCR 扩增仪（Bio-Rad CFX96）和全自动医用 PCR 分析系统（SLAN-96S、SLAN-96P、SLAN-48P）。

【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，而外周血中的人类基因组 DNA 需采用经过验证有效的方法进行提取。

【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 反应液配液标准为：取 n×19.8 μL 非缺失型α-地贫 PCR 反应液（n 根据反应管数确定）和 n×0.2 μL 非缺失型α-地贫酶混合液加入到 1.5 mL 离心管中，振荡混匀数秒，然后瞬时离心（如 3000 rpm 离心 5 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：非缺失型α-地贫 PCR 反应液分别以每管 20 μL 分装于 PCR 薄壁反应管中。
- ③ 将配制好的 PCR 反应管转移至提取间，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 使用经过验证有效的提取方法（推荐使用厦门致善生物科技有限公司的磁珠法全血 DNA 提取系统或 QIAGEN 公司的全血 DNA 提取试剂盒）提取外周血的人类基因组 DNA，最后采用本试剂盒提供的 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），但需保证样本浓度大于 1 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(≥1 ng/μL)或阴性/野生型对照，并立即盖紧管盖。
- 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

本试剂盒反应体系设为 25 μL，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 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℃)	
		76℃ 20 秒	
熔解曲线分析程序	PCR 循环程序	95℃ 15 秒	50
		55℃ 15 秒(可设置在此处采集荧光)	
		76℃ 20 秒	
	Bio-Rad CFX 96 机型使用	95℃ 1 分钟	1
		35℃ 3 分钟	
熔解曲线分析程序	SLAN 系列机型使用	40℃~85℃，设置在此阶段每 0.4℃采集 FAM、HEX 和 ROX 通道荧光信号	1
		95℃ 1 分钟	
	SLAN 系列机型使用	35℃ 3 分钟	1
		40℃~85℃，设置在此阶段采集 FAM、HEX 和 ROX 通道荧光信号，升温速率为：0.04℃/S	
		95℃ 1 分钟	

*地中海贫血基因联检通用反应程序如下：

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℃ 30 秒	10

	PCR 循环程序	70℃ 30 秒（每个循环下降 1℃）	50
		76℃ 45 秒	
		95℃ 30 秒	
		60℃ 30 秒（可设置在此处采集荧光）	
熔解曲线分析程序	SLAN 系列机型使用	76℃ 45 秒	1
		95℃ 1 分钟	
		35℃ 3 分钟	
		40℃~85℃，设置在此阶段采集 FAM、HEX 和 ROX 通道荧光信号，升温速率为：0.04℃/S	

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】

野生型对照在各通道中的 T_m 值范围如下：

机型	FAM	HEX	ROX
Bio-Rad CFX96	67.4℃±1.0℃	68.6℃±1.0℃	59.6℃±1.0℃
SLAN-96S	66.63~69.56	67.94~70.95	59.60~62.42

本说明书中各 T_m 值是在特定 Bio-Rad CFX96 仪器和全自动医用 PCR 分析系统（SLAN-96S）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，以当次试验野生型对照所得的 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】

本试剂盒中的 HEX 通道为内参基因（人类基因组上的一个保守基因）的检测通道，该通道在正常检测中，应均有稳定的熔解峰。对于待测样本，首先查看 HEX 通道是否有熔解峰（内控峰，在 Bio-Rad CFX96 上的 T_m 值范围为 68.6℃±1.0℃，当使用其它品牌型号仪器时可能略有波动，可参考野生型对照的 T_m 值变化情况进行调整），若无熔解峰，则表明样本基因组有问题（浓度低于检测限或质量达不到要求）；若 HEX 通道有熔解峰，再比较待测样本在另外两个检测通道（FAM 和 ROX 通道）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。当样本熔点峰值与野生型对照熔点峰值的差异（ ΔT_m 值）在±1℃ 以内即为野生型峰，差异超过±2℃ 即为突变型峰。主要包括以下几种情况（如表 1、表 2）：

- ① 内控峰正常，若样本在其它两个检测通道均只有野生型峰（图 1 黑色曲线），则样本的 $\alpha 2$ -珠蛋白基因没有包含表 1 或表 2 所列的突变位点；
- ② 内控峰正常，若样本在某个检测通道既有野生型峰，又有突变型峰，而在另一个检测通道为野生型峰（图 1 绿色曲线），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），参考表 1 或表 2，判断突变的类型；
- ③ 内控峰正常，若样本在某个检测通道只有一个突变型峰，而在另一个检测通道为野生型峰（图 1 红色曲线），则样本为该种突变的纯合型，通过计算对应野生型峰与突变型峰熔点的差异（ ΔT_m 值），参考表 1 或表 2，判断突变的类型；
- ④ 内控峰正常，若样本在两个检测通道既有野生型峰，又有突变型峰（图 1 蓝色曲线）；或在某一检测通道有两个突变型峰，另一检测通道为野生型峰（图 1 粉色曲线），则样本为两种突变的双杂合型，通过计算对应野生型与突变型峰熔点的差异（ ΔT_m 值），参考表 1 或表 2，判断突变的类型。

注意：

- 1. 本试剂盒检测的是 $\alpha 2$ -珠蛋白基因常见突变，若样本有一个 $\alpha 2$ -珠蛋白基因在本试剂盒的检测区域发生缺失（如：东南亚缺失型、左侧缺失型、

- 右侧缺失型等），则本试剂盒检测的是另一个等位基因的突变情况。
- 2. 若样本的两个 $\alpha 2$ -珠蛋白基因均在本试剂盒的检测区域发生缺失，则内控峰正常，而其它检测通道无产物峰（图 1 橙色曲线）。
- 3. 此外，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。

【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 5 ng/反应。
- 2. 本产品临床试验共验证 1019 例人类基因组 DNA 样本，结果表明，对比基因测序法，本产品的临床灵敏度为 100%、临床特异性为 100%、阳性预测值为 100%、阴性预测值为 100%、约登指数为 1.0、总符合率为 100%。
- 3. 对国家参考品进行检测：试剂盒范围内的国家阳性参考品应检出且为相应基因型别；国家参考品盘中的阴性参考品和试剂盒范围外的国家阳性参考品检测结果应为未检出突变；取试剂盒范围内的两份国家阳性参考品，各进行 10 个平行检测，结果均为对应的基因型，重复性为 100%。

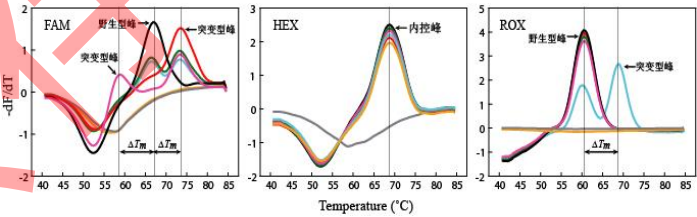


图 1 典型的样本检测结果。

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（CFX96）

突变类型			$\Delta T_m = T_m(\text{野生}) - T_m(\text{突变})$		
HGVS 命名(c.)	碱基改变	表型	FAM	HEX	ROX
427T>C	CD142(TAA>CAA)	Hb CS	-	-	-8.3±0.81
369C>G	CD122(CAC>CAG)	Hb WS	7.8±0.81	-	-
377T>C	CD125(CTG>CCG)	Hb QS	-6.2±0.84	-	-

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±1℃ 之内。

b 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。

表 2 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（SLAN-96S）

突变类型			$\Delta T_m = T_m(\text{野生}) - T_m(\text{突变})$		
HGVS 命名(c.)	碱基改变	表型	FAM	HEX	ROX
427T>C	CD142(TAA>CAA)	Hb CS	-	-	-9.77~6.72
369C>G	CD122(CAC>CAG)	Hb WS	5.81~9.18	-	-
377T>C	CD125(CTG>CCG)	Hb QS	-7.87~4.66	-	-

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±1℃ 之内。

b 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。

【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野生型对照。
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. 不同批号的试剂请勿混用，请在有效期内使用试剂盒。
7. 尽量避免试剂反复冻融，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。

【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

传真：0592-7615089

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

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】 国械注准 20193401797

【说明书核准日期及修改日期】 2022 年 12 月 4 日