

人类 CYP2C19 基因分型检测试剂盒（PCR-熔解曲线法）说明书

【产品名称】

人类 CYP2C19 基因分型检测试剂盒（PCR-熔解曲线法）

【包装规格】

24 人份/盒、48 人份/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测从人外周血提取的 DNA 中 CYP2C19 基因的*1、*2、*3、*17 四种基因型。

细胞色素 P450 是由一组结构和功能相关的血红蛋白超家族基因编码的同工酶，是药物在体内的主要代谢酶系，其中 CYP2C19 与药物代谢关系密切。CYP2C19 主要参与药物在体内的羟化反应。

由于遗传多态性，CYP2C19 酶活性存在显著的个体差异和种族差异，表现为酶活性升高、下降或完全失活，影响药物代谢，从而导致基因型不同的患者中药物的疗效和毒副作用明显差异。中国人群中频率最高的多态性为第 5 外显子 681G>A(CYP2C19*2)和第 4 外显子 636G>A(CYP2C19*3)，当这两个位点发生变异时，CYP2C19 酶活性降低，药物代谢表现为慢代谢型，此类患者服用通过 CYP2C19 酶代谢的药物（奥美拉唑等）时易发生毒副反应，而服用前体药物(氯吡格雷等)时因代谢产物生成较少而疗效不佳或无效。另有一种多态性为-806C>T（CYP2C19*17），该位点发生变异时，表现为 CYP2C19 酶活性升高。

本品用于定性检测 DNA 中 CYP2C19 基因的*1、*2、*3、*17 四种基因型组合状态，辅助推断患者的药物代谢速率类型（表 1），为医生制定合理的用药方案提供参考依据。

表 1 CYP2C19 基因型与表现型对照

可能的表现型	基因型	基因多态性示例
超快代谢型（UM）	携带 1~2 个 17 型等位基因	*17/*17， *1/*17
快代谢型（EM）	野生型，携带 2 个 1 型等位基因	*1/*1
中代谢型（IM）	携带 1 个无活性的等位基因	*1/*2， *1/*3
慢代谢型（PM）	携带 2 个无活性的等位基因	*2/*2， *3/*3， *2/*3

注：示例以外的其它类型因缺乏临床数据，不作类别归属。

【检验原理】

本试剂盒基于实时 PCR 平台结合了特异引物、荧光探针和熔解曲线技术，检测 DNA 样品中 CYP2C19 基因多态性（SNP）。本试剂盒结合特别的 PCR 反应程序和特殊 Taq 酶的使用，利用特异引物对靶序列进行高精度 PCR 扩增，通过分析比较特异的荧光探针与靶序列结合所产生的熔解曲线 Tm 值的变化，进行 SNP 分型。只出现 1 个熔解峰时为纯合型（包括野生纯合、突变纯合），同时出现 2 个峰时为杂合型（图 1）。

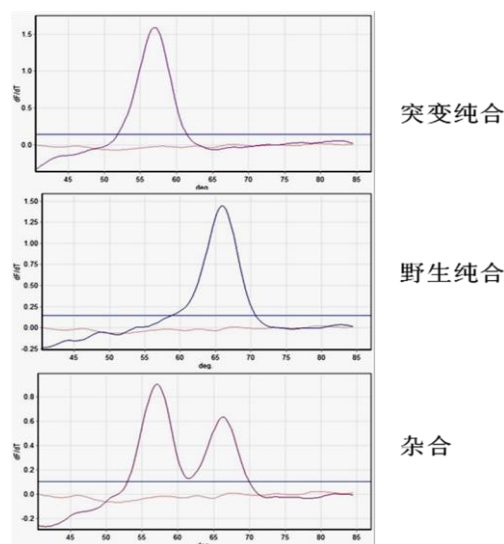


图 1 基因分型检测结果示意

【主要组成成分】

表 2 试剂盒组成

名称	组分	24 人份	48 人份
PCR 反应液 I _A	20-100pM 的 CYP2C19*2 和*3 特异性引物和探针	220μl ×1 管	220μl ×2 管
PCR 反应液 I _B	20-100pM 的 CYP2C19*17 和内控基因特异性引物和探针	220μl ×1 管	220μl ×2 管
PCR 反应液 II	0.1U/μl Taq 酶、0.8mM dNTP、8mM MgCl ₂ 等	275μl ×1 管	275μl ×2 管
溶液 A	PCR 增效剂	275μl ×1 管	275μl ×2 管
阳性对照品	包含 CYP2C19 基因 636A 基因型质粒、681A 基因型质粒、-806T 基因型质粒和基因型为 636G、681G、-806C 的基因组 DNA	30μl ×1 管	
空白对照品	纯化水	50μl ×1 管	

检测必须但试剂盒中不包含的组分：

1.5ml 离心管（用于配制 PCR 反应液和 DNA 提取）；

0.2ml PCR 管或 8 联 PCR 管或 96 孔 PCR 板；

带滤塞的吸头（1ml、200μl 和 10μl）；

DNA 提取试剂盒 QIAamp DNA Blood Mini Kit（货号 51104 或 51106）。

【储存条件及有效期】

置于-20℃条件下储存，有效期 6 个月。

4~10℃避光条件下储存或运输不得超过 7 天。 -20℃储存时，冻融次数不超过 5 次。

“生产日期”和“有效期至”见试剂盒标签。

【适用仪器】

适用于 ABI7500、SLAN-96P 型号的 Real-time PCR 扩增仪。

【样本要求】

1. 适用样本为 EDTA 抗凝的全血；样本在 4-10℃保存不超过 7 天， -20℃保存不超过 1 个月，避免反复冻融。
2. 使用商业化的试剂盒来提取人类基因组 DNA，推荐使用 Qiagen 公司的 QIAamp DNA Blood Mini Kit (货号 51104 或 51106) 提取全血样品，所提 DNA 需用紫外分光光度计测定浓度和纯度，其 DNA OD260/OD280 的值应在 1.8~2.0，浓度应在 10~100ng/μl 之间，样本 DNA 质量不合格者不得用于检测，建议低于 10ng/μl 者重新取样进行核酸提取，高于 100ng/μl 者予以适当稀释至规定的浓度范围，提取完的 DNA 建议立即进行检测，否则请于 -20℃以下保存，保存时间不要超过 6 个月。

【检验方法】

一、核酸提取（样本处理室）

严格按照血液 DNA 提取试剂盒说明书提取核酸。提取过程中应采取必要的标记方法，避免试剂漏加及样本混淆。

二、试剂准备（试剂准备室）

将试剂从冰箱取出，室温融化，混匀，1000rpm 快速离心 20 秒，备用。

三、反应体系配制（试剂准备室）

1. 根据检测样本数计算所需反应数，如样本数为 n，则需做 n+2 个反应（包含一个阳性对照反应和一个无模板对照反应）。
2. 根据表 3 计算所需各反应液的体积，并配制反应体系，反应体系混匀后 3000rpm 快速离心 30 秒，分装至 PCR 管中，每管 18μl。

表 3 加样表

组分	反应 A	反应 B
PCR 反应液 I _A	8 μl	--
PCR 反应液 I _B	--	8 μl
PCR 反应液 II	5 μl	5 μl
溶液 A	5 μl	5 μl
总体积	18 μl	18 μl

四、加样（样本处理室）

取 2μl 提取的样品 DNA 加入 PCR 反应管，盖上管盖，1000rpm 离心或轻甩，排除管底气泡；阳性对

照反应所用模板为试剂盒中阳性对照品，空白对照反应所用模板为试剂盒中所带空白对照品。

五、上机检测（扩增室）

1. 将 PCR 管按顺序放入 PCR 仪，设置反应程序

（1） SLAN-96P 荧光定量 PCR 仪程序设置

表 4 PCR 反应参数

阶段	温度	时间	检测荧光	循环数
预变性	95℃	2min		1
循环段	94℃	15sec		50
	56℃	30sec	√	
	72℃	10sec		
	95℃	30sec		1
	45℃	20sec		
熔解段	45→75℃		√	1

注：a. 该软件熔解曲线设置时只需设置熔解的起始温度和结束温度。

b. 荧光检测通道选择 FAM 和 ROX 检测通道。

（2） ABI7500 荧光定量 PCR 仪

表 5 PCR 反应参数

阶段	温度	时间	检测荧光	循环数
预变性	95℃	2min		1
循环段	94℃	15sec		50
	56℃	32sec	√	
	72℃	10sec		
熔解段	95℃	30sec		1
	45℃	30sec		
	45→75℃		√	

- 设置程序时，应取消参比荧光，具体步骤为“Setup”→“Plate Setup”→“Assign Targets and Samples”→“Select the dye to use as the passive reference”设置为“None”。
- Melt 分析时，设置温度 45~75℃；选择 Continuous 模式时，每步设置 1%，检测荧光；选择 StepAndHold 模式时，每个步骤升高 0.3℃，在每个温度都收集荧光。荧光检测通道选择 FAM 和 ROX 检测通道。

2. 运行 PCR 反应程序，保存文件。

六、结果获取

1. SLAN 荧光定量 PCR 仪运行结束后，使用配套软件对本次试验的结果进行熔解曲线导数图（-dF/dT）分析。
2. ABI7500 Software v2.0 以上版本软件不支持同时查看多个荧光通道的熔解曲线，实验结束后，按如下

- 步骤查看结果：软件界面中点击“Setup”→“Plate Setup”→“Assign Targets and Samples”选中需要查看的反应孔→“Assign target(s) to the selected wells”中只勾选需要查看的一个荧光通道→“Analysis”→“Reanalyse”→“Melt Curve”中查看熔解曲线结果；查看另外一个荧光通道结果时，重复此过程。
3. 杂合基因型样本检测结果为双峰，ABI7500 软件只能识别峰高较高的 T_m 值，需手动读取峰高较低的 T_m 值，具体步骤为：在“Melt Curve”界面，点击所要查看的反应孔（只能选择一个孔位），拉动“竖直虚线”至不能识别峰的最高点，即可得到该峰 T_m 值；若该峰顶部为一段水平线段，则拉至该线段中间，读取 T_m 值。

【阳性判断值】

T_m 值符合下表要求且峰高大于阳性对照品峰高的 1/5，为阳性结果。

表 6 阳性 T_m 值范围

	检测通道	熔解峰	T _m 值 (°C)
反应 A	FAM	636-A	57.84±1.5
		636-G	66.94±1.5
	ROX	681-A	52.83±1.5
		681-G	61.82±1.5
反应 B	FAM	-806-T	52.40±1.5
		-806-C	62.30±1.5

【检验结果的解释】

- 空白对照应无明显熔解峰，若分析后出现明显熔解峰，可能为试剂受到污染或操作过程中的污染，请排除污染源后重新检测。
- 阳性对照管在熔解曲线分析后应有 2 个熔解峰，且 T_m 值应符合表 6 所示 T_m 值范围；若阳性对照管无熔解峰，或只出现 1 个熔解峰，该批次样本需重新检测。请确认所使用的试剂是否仍在有效期内，确定操作是否严格按照说明书进行。
- 反应管 B 的内参通道（ROX）在熔解曲线分析后应有 1 个熔解峰，若无熔解峰，可能为样本 DNA 存在 PCR 抑制剂，应重新取样提取基因组 DNA。
- 若满足以上要求，表明此次实验成功，对样品管进行分析：
 - A 反应管 FAM 通道为 CYP2C19*3 (636G>A) 检测通道，同时出现两个峰且 T_m 值分别符合 57.84±1.5°C 和 66.94±1.5°C 的样本为 A/G 杂合型，只出现一个熔解峰且 T_m 值符合 57.84±1.5°C 的样本为 A/A 纯合型，只出现一个熔解峰 T_m 值符合 66.94±1.5°C 的样本为 G/G 纯合型；
 - A 反应管 ROX 通道为 CYP2C19*2 (681G>A) 检测通道，同时出现两个峰且 T_m 值分别符合 52.83

±1.5℃和 61.82±1.5℃的样本为 A/G 杂合型，只出现一个熔解峰且 T_m 值符合 52.83±1.5℃的样本为 A/A 纯合型，只出现一个熔解峰 T_m 值符合 61.82±1.5℃的样本为 G/G 纯合型；

(3) B 反应管 FAM 通道为 CYP2C19*17(-806C>T)检测通道，同时出现两个峰且 T_m 值分别符合 52.40±1.5℃和 62.30±1.5℃的样本为 C/T 杂合型，只出现一个熔解峰且 T_m 值符合 52.40±1.5℃的样本为 T/T 纯合型，只出现一个熔解峰 T_m 值符合 62.30±1.5℃的样本为 C/C 纯合型；

(4) 若任意检测通道检测结果为阴性（无熔解峰），该样本必须重新检测，必要时重新提取 DNA 进行检测。

表 7 检测结果与代谢型对照

代谢型	基因型	碱基序列		
		-806	636	681
超快代谢	CYP2C19*1*17	C/T	G/G	G/G
	CYP2C19*17*17	T/T	G/G	G/G
快代谢	CYP2C19*1*1	C/C	G/G	G/G
中代谢	CYP2C19*1*2	C/C	G/G	A/G
	CYP2C19*1*3	C/C	A/G	G/G
慢代谢	CYP2C19*2*2	C/C	G/G	A/A
	CYP2C19*3*3	C/C	A/A	G/G
	CYP2C19*2*3	C/C	A/G	A/G
		C/C	A/G	A/A
		C/C	A/A	A/G
		C/C	A/A	A/A

【检验方法的局限性】

本试剂盒仅适用于规定的仪器和检测系统，检测结果仅供临床参考，不得作为临床诊治的唯一依据。若本试剂盒所设计引物探针序列区存在其它基因变异，可能导致检测结果异常。

【产品性能指标】

1. 经 1050 例冠心病、消化道疾病以及恶性肿瘤患者全血样本临床试验，本品与测序法作对照，各表现型符合率均在 97%以上。
2. 试剂盒应外观清洁、无泄漏、无破损，标志、标签字迹清楚；各组分融化后应澄清透明，无沉淀。
3. 检测 14 份基因型参考品，结果均符合相应基因型别。
4. 将 4 份最低检出量参考品分别做 10 次平行检测，可稳定检出且结果均符合相应基因型别。
5. 用 2 份企业内部精密性参考品分别作 10 次平行检测，结果均符合相应基因型别且 T_m 值极差≤1.5℃。
6. 2g/L 血红蛋白、342μM 胆红素和 37mM 脂类（甘油三酯）等干扰物质，对检测结果未见有干扰。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外研究。实验前请仔细阅读说明书。
2. PCR 检测应在有资质的临床 PCR 实验室进行，实验室应严格按照卫生部《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》卫办医政发〔2010〕194 号文件规定进行资质认定和管理。
3. 实验过程中必须使用专用的移液枪和一次性带滤塞的加样吸头。
4. PCR 操作各阶段应在不同的分区进行，分别为试剂准备室、样本处理室和 PCR 扩增室。人、物单向流动。PCR 试剂盒不应存放在样本处理区。
5. 加样时应使样品完全落入反应液中，不应有样品粘附于管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。
6. PCR 操作各阶段使用专用的仪器和设备。
7. 扩增完毕立即取出反应管，密封在专用塑料袋内，丢弃于指定地点。
8. 实验前及实验完毕后应该对实验室进行紫外线消毒，并用 70%乙醇擦拭工作台和微量加样器。
9. 试剂盒各组分应在有效期内使用，不同批次的试剂盒成分不得混用。

【参考文献】

1. Sim, S.C. *et al.* A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clinical pharmacology and therapeutics* **79**, 103-113 (2006).
2. Rudberg, I., Mohebi, B., Hermann, M., Refsum, H. & Molden, E. Impact of the ultrarapid CYP2C19*17 allele on serum concentration of escitalopram in psychiatric patients. *Clinical pharmacology and therapeutics* **83**, 322-327 (2008).
3. Collet JP, Hulot JS, Pena A, et al, Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study. *Lancet*. (2009) 373(9660):309-17.
4. Zou JJ, Xie HG, Chen SL, et al, Influence of CYP2C19 loss-of-function variants on the antiplatelet effects and cardiovascular events in clopidogrel-treated Chinese patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Eur J Clin Pharmacol*. (2013);69(4):771-7.
5. Sofi, F. et al. Cytochrome P450 2C19*2 polymorphism and cardiovascular recurrences in patients taking clopidogrel: a meta-analysis. *The pharmacogenomics journal* **11**, 199-206 (2011).

【基本信息】

注册人/生产企业名称：无锡锐奇基因生物科技有限公司

住所：无锡市滨湖区马山梅梁西路 88 号-A6

联系方式 电 话：0510-85998856

传 真：0510-85998276

网 址：www.riqigen.com

售后服务单位名称：无锡锐奇基因生物科技有限公司

联系方式 电 话：0510-85998856

 传 真：0510-85998276

 网 址：www.riqigen.com

生产地址：无锡市滨湖区马山梅梁西路 88 号一期 3 号楼第 3 层、GLP 楼第 5 层

生产许可证编号：苏食药监械生产许 20120026 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准 20183400120

【说明书核准日期及修改日期】

2018 年 4 月 2 日