

CYP2C19 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：CYP2C19 基因多态性检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）

【包装规格】

48 测试/盒

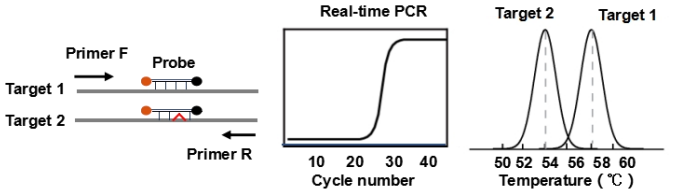
【预期用途】

用于定性检测人外周静脉血 DNA 中 CYP2C19 基因*2（c.681G>A）、*3（c.636G>A）、*17（c.-806C>T）三个多态性位点，每个位点均可区分野生型、纯合突变型和杂合突变型。

CYP2C19 参与心肌梗死、卒中、外周动脉疾病治疗药物氯吡格雷的代谢，其编码基因的遗传变异可导致酶活性的个体差异，从而将人群分为超快代谢、快代谢、中间代谢和慢代谢四种类型^[1-2]。*1 为正常型等位基因；*2 和*3 为功能缺失型等位基因，编码无活性的酶^[3]；*17 为功能增强型等位基因，与出血风险增加有关^[4]。

【检验原理】

本试剂盒采用荧光 PCR 熔解曲线法（原理如下图），首先用引物扩增人 CYP2C19 基因，然后进行熔解曲线分析，最后根据不同基因型模板与特定探针杂交体熔解过程中的 T_m 值的差异来判断样本的 CYP2C19 基因*2（c.681G>A）、*3（c.636G>A）、*17（c.-806C>T）位点的多态性。对于每一份样本，本试剂盒仅需一管对其进行检测，对应扩增试剂中的 2C19 PCR 反应管。



【主要组成成分】

组成	组分名称	主要成分	规格	数量
扩增试剂	2C19 PCR 反应管	引物、探针（3 条探针分别由 FAM、HEX 和 ROX 标记）、dNTPs、酶	8 测试/条	6 条
	2C19 野生型对照	野生型质粒	10 测试/支	1 支
对照试剂	2C19 阴性对照	DNA 溶解液	10 测试/支	1 支
	PCR 八联管管盖	透明 PCR 八联管管盖	8 测试/条	6 条

注：建议不同批号组分之间不互换。
核酸提取试剂未包含在本试剂盒中。使用厦门致善生物科技股份有限公司的 Lab-Aid 824 全血基因组 DNA 提取试剂（备案号：闽厦械备 20170144 号）。

【储存条件及有效期】

本试剂盒于-25℃~8℃避光保存，有效期为 12 个月。试剂盒开封后，未使用完的 PCR 反应管应放回铝箔自封袋（封紧自封条）并置于 2~8℃避光保存；若未使用完的 PCR 反应管外的泡罩包装完整，则保存期限为 7 个月；若未使用完的 PCR 反应管外的泡罩包装已拆开，则保存期限为 3 个月。试剂盒可于-18℃~37℃的温度范围内运输，运输时间≤12 天。生产日期及失效日期见包装标签。

【适用仪器】

经验证可用的仪器为全自动医用 PCR 分析系统（SLAN-96S；上海宏石医疗科技有限公司）。

【样本要求】

适用于人外周静脉血样本，采用 EDTA 抗凝，采血体积应不低于 200 μL。采集后的血样在 2~8℃温度下可保存 5 天。若无法及时对样本进行 DNA 提取，可将样本置于-20℃以下保存，冻融次数≤5 次，保存时间≤6 个月。样本的提取方法及要求见检验方法中的样本提取及加样。

【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 2C19 PCR 反应管的泡罩包装，取出 n 测试试剂（n 根据当次实验需要确定），剩余的试剂放回铝箔自封袋并将封条封紧，于 2~8℃避光保存。
- ② 取出 n 测试透明 PCR 八联管管盖（n 根据当次实验需要确定），剩余的管盖放回自封袋并将封条封紧。
- ③ 将待用的 2C19 PCR 反应管、透明 PCR 八联管管盖、2C19 野生型对照和 2C19 阴性对照转移至提取间，于 2~8℃避光保存直至样本提取完。

2. 样本提取及加样——提取区

- ① 使用厦门致善生物科技股份有限公司的 Lab-Aid 824 全血基因组 DNA 提取试剂（备案号：闽厦械备 20170144 号）提取人基因组 DNA。提取后的人基因组 DNA 可暂放置在 2~8℃保存，并于 2 周内完成检测。若需长期保存人基因组 DNA，可于-20℃以下保存，冻融次数≤5 次，保存时间≤12 个月。
- ② 打开原装的 2C19 PCR 反应管管盖并丢弃，用微量加液器向每支 PCR 薄壁反应管中加入 25 μL 相应的 DNA 样本或阴性/野生型对照品，之后立即用待用的透明 PCR 八联管管盖盖严。

注：本试剂盒采用野生型对照和阴性对照进行质量控制，因此每次实验应设置野生型和阴性对照。阴性/野生型对照在第一次使用前，需先离心 1min，然后分别加入 250 μL 的纯化水进行溶解，充分振荡混匀 20 s，瞬时离心。溶解后的阴性/野生型对照品于-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 20 s，瞬时离心数秒后，除去气泡。
- 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

扩增与熔解曲线分析步骤为一个程序，在全自动医用 PCR 分析系统（SLAN-96S；上海宏石医疗科技有限公司）上连续完成。

① 反应程序设定如下：

阶段	条件	循环数
UNG 酶处理	50℃ 2 分钟	1
预变性	95℃ 10 分钟	1
PCR 循环	95℃ 15 秒	10
	65℃ 15 秒（每个循环下降 1℃）	
	76℃ 20 秒	
	95℃ 15 秒	
PCR 循环	55℃ 26 秒（可设置在此阶段采集荧光）	50
	76℃ 20 秒	
	95℃ 1 分钟	
	45℃ 3 分钟	
熔解曲线分析	45℃~85℃，设置在此阶段采集 FAM、HEX 和 ROX 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】

检测体系中各通道野生峰的熔点（ T_m ）参考值范围如下：
FAM 通道：62.42~64.96℃；

HEX 通道: 57.13~59.32℃;

ROX 通道: 66.38~68.77℃;

在检测体系中多态性位点的 ΔT_m 参考值范围如下:

FAM 通道: 5.25~6.76℃;

HEX 通道: -6.89~-5.17℃;

ROX 通道: 4.91~6.09℃;

本说明书中各 T_m 值是在全自动医用 PCR 分析系统 (SLAN-96S; 上海宏石医疗科技有限公司) 上所得的常见值作为参考值。

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形选择有效 T_m 值。

【检验结果的解释】

每次实验应设置野生型对照和阴性对照, 且检测结果须满足以下条件: 野生型对照在三个通道均应有熔解峰且熔点在对应通道的野生峰的熔点参考值范围内, 阴性对照应无任何熔解峰, 则该次实验有效, 可继续进行待测样本的判读。

若待测样本在三个通道中任何一个通道无熔解峰, 表明样本基因组 DNA 有问题【浓度低于检测限或质量达不到要求, 建议重新提取 DNA 并重新进行检测】, 检测结果无效。

若待测样本在三个通道均有熔解峰, 则包括以下几种情况:

- ① 样本在三个通道均只有一个熔解峰, 且该熔解峰的熔点在野生峰的熔点参考值范围内, 则该熔解峰为野生型特征峰, 该样本为野生型 (图 1 黑色曲线, 用 W 表示);
- ② 样本在某个通道只有一个熔解峰, 且该熔解峰的熔点不在野生峰的熔点参考值范围内, 但当次实验野生型对照减去该样本熔解峰的熔点的差值 (ΔT_m 值) 在野生峰和突变峰熔点差值的参考范围内, 则该熔解峰为突变型特征峰, 该样本为该通道对应检测位点的纯合突变型 (图 1 红色曲线, 用 P 表示); 参考附表 1, 判断突变的类型;
- ③ 样本在某个通道有两个熔解峰, 其中一个熔解峰的熔点在野生峰的熔点参考值范围内, 且两个熔解峰的熔点差值 (ΔT_m 值) 在野生峰和突变峰熔点差值的参考范围内, 则该样本既含有野生型特征峰又含有突变型特征峰, 即该样本为该通道对应检测位点的杂合突变型 (图 1 绿色曲线, 用 W+P 表示); 参考附表 1, 判断其突变的类型;
- ④ 若待测样本熔解峰均不符合以上 3 种情况, 建议重新提取 DNA 并重新进行检测; 若复检结果仍不符合, 则可能存在未知突变, 建议采用测序或其它方法进行确认。

最后, 根据 FAM、HEX 和 ROX 通道的检测结果, 参考附表 2, 即可判断标本的 CYP2C19 基因型和代谢类型。

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。

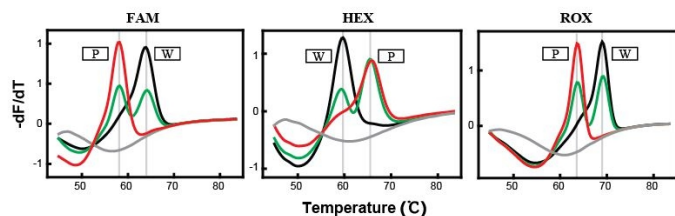


图 1 典型样品检测结果

【检验方法的局限性】

1. 探针覆盖区域内可能发生除附表 1 所列位点之外的未知突变, 出现此情况时请用测序或其它方法进一步验证。
2. 本试剂盒检测结果仅供临床参考, 不作为个体化治疗的唯一依据, 临床医

生应结合患者病情、药物适应症、治疗反应及其它实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。

【产品性能指标】

1. 准确性: 检测企业参考品盘中的野生型参考品、纯合突变型参考品和杂合突变型参考品 (均为试剂盒检测范围内人 CYP2C19 分型参考品), 检测结果应均为相应的基因型。
2. 检测限: 检测浓度不高于 1 ng/μL 的野生型检测限参考品、纯合突变型检测限参考品和杂合突变型检测限参考品, 检测结果应均为相应的基因型。
3. 特异性: 1) 交叉反应: 检测企业参考品盘中的特异性参考品 (非人类基因组和本试剂盒检测范围外多态位点和序列同源基因的阴性参考品), 结果应均为阴性。2) 干扰试验: 样本中常见的干扰物质, 包括: 总胆红素 (170.0 μmol/L)、胆固醇 (8.0 mmol/L)、白蛋白 (100.0 g/L)、血红蛋白 (200g/L)、甘油三酯 (12.0 mmol/L)、抗凝剂 (15g/L) 和常用药物氯吡格雷对检测结果均无影响。。
4. 重复性: 检测企业参考品中的重复性参考品各 10 次, 检测结果一致, T_m 值的变异系数 (CV) $\leq 5\%$, 且为对应基因型。
5. 临床评价: 本产品在三家临床单位共检测了 1053 例临床样本, 与 Sanger 基因测序法及竞品试剂盒的检测结果对比, 本产品的临床灵敏度为 100%, 特异性为 100%, 总符合率为 100%, Kappa 系数为 1。

【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。
4. 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, 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。
5. PCR 反应管应避光保存, 每次试验应设置阴性和野生型对照。
6. 不同批号的试剂请勿混用, 请在有效期内使用试剂盒。
7. 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。
8. 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. 药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南 (试行)
2. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C19 Genotype and Clopidogrel Therapy: 2013 update (September 2013)
3. Hulot JS, Bura A, Villard E, et al. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects [J]. Blood, 2006, 108(7):2244-2247.
4. Sibbing D, Koch W, Gebhard D, et al. Cytochrome 2C19*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement [J]. Circulation, 2010, 121(4):512-518.

【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：0592-7615088

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

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 20213400005

【说明书核准日期及修改日期】

2021 年 1 月 5 日

附表 1 本试剂盒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

突变类型 HGVS 命名 (c.)	体系 $[\Delta T_m = T_m(\text{野生型对照/野生峰}) - T_m(\text{突变峰})]$		
	FAM	HEX	ROX
681G>A	5.25~6.76℃	-	-
636G>A	-	-6.89~-5.17℃	-
-806C>T	-	-	4.91~6.09℃

注：表中“-”指检测样本的熔解峰在野生峰熔点参考值范围内。

附表 2 本试剂盒 CYP2C19 基因型及代谢类型对照表

代谢类型	基因型	熔解峰结果		
		FAM 通道	HEX 通道	ROX 通道
超快代谢	*1/*17	W	W	W+P
超快代谢	*17/*17	W	W	P
快代谢	*1/*1	W	W	W
中间代谢	*1/*3	W	W+P	W
中间代谢	*3/*17	W	W+P	W+P
中间代谢	*2/*17	W+P	W	W+P
中间代谢	*1/*2	W+P	W	W
慢代谢	*3/*3	W	P	W
慢代谢	*2/*2	P	W	W
慢代谢	*2/*3	W+P	W+P	W