

【产品名称】人运动神经元存活基因 1(SMN1)检测试剂盒(PCR-熔解曲线法)

【包装规格】32 测试/盒

【预期用途】

本产品适用于体外定性检测人 EDTA 抗凝全血样本本人基因组 DNA 中运动神经元存活基因 SMN1 基因第 7 外显子和/或第 8 外显子的拷贝数。

脊髓性肌萎缩(spinal muscular atrophy, SMA)是以脊髓前角运动神经元退化变性为特征, 临床表现为进行性、对称性肢体近端及躯干肌肉无力、萎缩和瘫痪的一种常染色体隐性遗传病。肌肉萎缩呈对称性, 下肢较上肢严重, 身体近端较远端易受侵犯。由于肌肉渐进性的退化, 患者站立、爬行、吞咽, 甚至呼吸等正常生理功能都会逐渐丧失, 严重者导致死亡。此病的发病年龄从婴儿到成年皆有可能, 其发病率为 1/10000~1/ 6000, 人群携带率为 1/60~1/40。

SMA主要致病基因是位于染色体5q11.2-q13.3上的运动神经元存活基因(survival motor neuron, SMN)。SMN蛋白缺失会导致胚胎早期细胞大量凋亡, 大部分细胞可以耐受低水平的SMN蛋白, 但脊髓前角细胞无法耐受低水平的SMN蛋白, 从而导致SMA。人基因组有两个紧邻的高度同源的SMN基因——端粒侧的SMN1和着丝粒侧的SMN2, 两者仅有5个碱基的差异, 分别位于第7、8外显子和第6、7内含子中。SMN1与SMN2基因均能转录, 其中SMN1为SMA的主要致病基因, SMN2则属于调节基因。据统计, 约95%的SMA患者表现为SMN1基因第7和/或第8外显子的纯合缺失, 其余5%左右的患者为SMN1外显子7杂合缺失和SMN1基因的点突变复合杂合子。

试剂盒检测结果用于SMA的辅助诊断, 不得作为患者病情评价的唯一指标, 必须结合患者临床表现和其他检测方法对病情进行综合分析。

【检验原理】

本试剂盒基于实时荧光定量 PCR, 结合了竞争性 PCR、饱和荧光染料、熔解曲线分析及归一化软件处理技术, 用于 DNA 样本中 SMN1 基因的拷贝数检测。利用实时 PCR 技术使目的基因与内参基因在竞争性扩增中达到平台期, 扩增产物浓度很好地反映底物模板中两个基因拷贝数的相对关系。饱和荧光染料特异性结合双链 DNA 发出荧光, 而单链 DNA 不产生荧光, 经熔解分析, 通过实时检测双链 DNA 熔解过程中荧光信号值的变化, 根据不同扩增产物熔解温度与浓度的差异, 目的基因与内参基因形成不同熔解峰, 通过软件对数据进行归一化处理, 计算出 P 值与 R 值, 并以此判断 SMN1 基因的拷贝数。同时, 对试剂盒设置了阴性质控和阳性质控, 防止假阴性和假阳性的出现。

【主要组成成分】

表 1. 主要组成成分		
组分名称	主要成分	规格
SMN1-7 主反应液	含 Tris-HCl、MgCl ₂ 、dNTPs、引物、染料	568μL×1
SMN1-8 主反应液	含 Tris-HCl、MgCl ₂ 、dNTPs、引物、染料	568μL×1
SMN 酶混合液	含酶、抗体等混合物	16μL×1
0 拷贝质控品	人工合成质粒	40μL×1
SMN1-7 单拷贝质控品	人工合成质粒	20μL×1
SMN1-7 两拷贝质控品	人工合成质粒	20μL×1
SMN1-8 单拷贝质控品	人工合成质粒	20μL×1
SMN1-8 两拷贝质控品	人工合成质粒	20μL×1

注: 不同批号试剂盒中各组分切忌互换; 核酸提取试剂盒需自备, 使用西安天隆科技有限公司生产的核酸提取或纯化试剂(陕西械备 20140007 号)。

【储存条件及有效期】

-20℃±5℃条件下避光储存, 有效期 10 个月。

试剂盒反复冻融不得超过 6 次; 试剂开盖后, 在室温条件下放置时间不超过 8 小时。生产日期及失效日期见包装标签。

【适用仪器】

适用于 Roche Light Cycler® 480 实时荧光定量 PCR 仪、西安天隆 Gentier 96E 全自动医用 PCR 分析系统。

【样本要求】

1. 样本类型: 全血样本。

2. 采集与保存: 全血样本的采集使用一次性无菌注射器抽取受检者静脉血 2~5mL, 注入含 EDTA 抗凝剂的玻璃管, 立即轻轻颠倒玻璃管混合 5~10 次, 使抗凝剂与静脉血充分混匀。实验室送检样本建议立即检测, 如未能立即检测可于 2℃~8℃条件下保存时间不超过 4 天, -20℃或以下条件可保存 12 个月, 但应避免反复冻融。

3. 样本提取 DNA 需用紫外分光光度计测定浓度, 10ng/μL≤DNA 浓度要求≤120ng/μL, OD260/OD280 在 1.7~2.0 内。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】

1. 样本处理【样本处理区】

使用西安天隆科技有限公司生产的核酸提取或纯化试剂(陕西械备 20140007 号)进行提取, 请在提取过程中严格按照其说明书进行。

2. 试剂配制【试剂准备区】

从试剂盒中分别取出 SMN1-7 主反应液、SMN1-8 主反应液和 SMN 酶混合液, 在室温下融化并振荡混匀后, 2000rpm 快速离心 10sec。计算需准备反应试剂人份数[n=样本数+3(质控品数)], 每人份反应体系配制如下:

反应混合液的配制:

表 2. PCR 反应液配制组分表		
试 剂	主反应液	SMN 酶混合液
1T 用量 (μL)	17.75	0.25

表 3. 待检基因与试剂组分对应表 (以竖列为基准)		
检测基因	7 号外显子 SMN1 基因	8 号外显子 SMN1 基因
反应液	SMN1-7 主反应液	SMN1-8 主反应液
	SMN 酶混合液	
	0 拷贝质控品	
质控品	SMN1-7 单拷贝质控品	SMN1-8 单拷贝质控品
	SMN1-7 两拷贝质控品	SMN1-8 两拷贝质控品

按上表 2 计算所需试剂使用量, 分别配制待检基因 PCR 反应混合液, 加入到一个适当体积的离心管中, 充分混匀后, 分别按 18 μL 量分装到八联管或 96 孔板中, 转移至样本处理区。

3.加样【样本处理区】

以检测 7 号外显子 SMN1 基因为例, 在 SMN1-7 基因 PCR 反应混合液中分别加入 0 拷贝质控品、SMN1-7 单拷贝质控品、SMN1-7 两拷贝质控品及待测样品提取基因组 DNA 各 2μL, 总检测体积为 20μL。盖紧反应管, 进行瞬时低速离心, 转移至 PCR 扩增区。PCR 反应板布局见表 4 中推荐。

表 4. 八联管建议布局 (以 7 号外显子 SMN1 基因为例)	
反应液	样品
SMN1-7 反应混合液	0 拷贝质控品
SMN1-7 反应混合液	SMN1-7 单拷贝质控品
SMN1-7 反应混合液	SMN1-7 两拷贝质控品
SMN1-7 反应混合液	待测样品
SMN1-7 反应混合液	待测样品
SMN1-7 反应混合液	待测样品
SMN1-7 反应混合液	待测样品
SMN1-7 反应混合液	待测样品

4. PCR 扩增及荧光检测【PCR 扩增区】

将各反应管按一定顺序放入荧光定量 PCR 仪上, 设置反应程序, 如表 5 和表 6 所示。

表 5. Roche Light Cycler® 480 实时荧光定量 PCR 仪					
步骤	阶段类型	循环数	目标温度	恒温时长	分析模式
1	预变性	1	95℃	5min	None
2	扩增	10	95℃	10sec	None
			Touchdown64-60℃	30sec	
3	扩增	25	95℃	10sec	Quantification
			60℃ (Single)	15sec	
			95℃	60sec	Melting Curves
4	熔解曲线	1	40℃	60sec	
			65℃	1sec	
			90℃ (Continuous)	Acquisitions(per℃)	
5	冷却	1	40℃	30sec	None

荧光检测通道选择 SYBR Green I/HRM Dye(483-533)检测通道; Roche Light Cycler® 480 I:Acquisitions:8per℃; Roche Light Cycler® 480 II:Acquisitions:25per℃

表 6. 天隆 Gentier 96E 全自动医用 PCR 分析系统					
步骤	阶段类型	循环数	目标温度	恒温时长	荧光
1	预变性	1	95℃	05:00	N
2	扩增	10	95℃	00:10	N
			降落 64-60℃	00:30	N
3	扩增	25	95℃	00:10	N
			60℃	00:15	采集
			95℃	00:60	N
4	熔解曲线	1	40℃	00:60	N
			65℃	00:01	N
			90℃	--	10 次/℃
5	冷却	1	40℃	00:30	N

荧光检测通道选择 SYBR Green/FAM 检测通道。

5. 数据分析

西安天隆 Gentier 96E 全自动医用 PCR 分析系统在扩增完成后, 可直接将原始数据导入天隆多重熔解曲线数据分析软件 (版本号: V1) 进行结果分析; 使用 Roche LightCycler® 480 仪器 PCR 扩增完成后, 在 Melt Curve Genotyping 界面进行 Calculate 后, 于 Melt Curve 处导出 TXT 文件, 之后导入天隆多重熔解曲线数据分析软件进行

结果分析，具体设置流程如下：
5.1 打开天隆多重熔解曲线数据分析软件，点击文件-打开，对于 Gentier 96E 仪器数据直接选定原始数据打开，对于 Roche LightCycler ®480 仪器数据选定导出的 TXT 文件进行打开；
5.2 点击样本设置，进入样本设置界面，将两拷贝质控品样本类型设置为 Std，0 拷贝质控品、单拷贝质控品及待检样本设置为 Unk，检测目标根据检测需求选择 SMN1-7 或 SMN1-8，点击确定；
5.3 点击参数设置，目标基因根据检测需求选择 SMN1-7 或 SMN1-8，点击确定，软件自动输出分析结果。

【阳性判断值】

1. 7 号外显子 SMN1 基因的判定
- 1.1 0 拷贝：当参考值 P 值为 0 时，表示该样本 7 号外显子 SMN1 基因为 0 拷贝；
- 1.2 单拷贝：通过正态分布进行统计分析，当参考值 $R \leq 0.70$ 时，表示该样本 7 号外显子 SMN1 基因为单拷贝；
- 1.3 两拷贝及以上：通过正态分布进行统计分析，当参考值 $R \geq 0.74$ 时，表示该样本 7 号外显子 SMN1 基因为两拷贝及以上。
2. 8 号外显子 SMN1 基因的判定
- 2.1 0 拷贝：当参考值 P 值为 0 时，表示该样本 8 号外显子 SMN1 基因为 0 拷贝；
- 2.2 单拷贝：通过正态分布进行统计分析，当参考值 $R \leq 0.70$ 时，表示该样本的 8 号外显子 SMN1 基因为单拷贝；
- 2.3 两拷贝及以上：通过正态分布进行统计分析，当参考值 $R \geq 0.74$ 时，表示该样本 8 号外显子 SMN1 基因为两拷贝及以上。

【检验结果的解释】

1. 试剂盒有效性情况判断
- 1.1 7 号外显子 SMN1 基因
- 1.1.1 0 拷贝质控品在熔解分析后，熔解曲线 Tm2 值在 $77.0^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 出现单一熔解峰；若分析后出现其他熔解峰，可能为试剂受到污染或操作过程中污染，请排除污染源后重新检测；
- 1.1.2 单拷贝质控品 $R \leq 0.70$ ，如不在此范围内，应排除仪器、试剂或操作原因后重新检测。
- 1.2 8 号外显子 SMN1 基因
- 1.2.1 0 拷贝质控品在熔解分析后，熔解曲线 Tm2 值在 $83.0^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 出现单一熔解峰；若分析后出现其他熔解峰，可能为试剂受到污染或操作过程中污染，请排除污染源后重新检测；
- 1.2.2 单拷贝质控品 $R \leq 0.70$ ，如不在此范围内应排除仪器、试剂或操作原因后重新检测。
2. 样本有效性的判断
- 2.1 如果检测后扩增曲线未达到平台期，说明此样本的浓度过低，需要重新提取或者浓缩 DNA，提高样本浓度后进行检测，试剂盒最低检测 DNA 浓度为 $10\text{ng}/\mu\text{L}$ ；
- 2.2 对于浓度高于 $120\text{ng}/\mu\text{L}$ 的样本，建议稀释至试剂盒规定的样本浓度范围后再进行检测；
- 2.3 检测样本 7、8 号外显子 SMN1 基因熔解曲线 ΔTm 值在 [3.5, 5]。7 号外显子 SMN1 基因熔解曲线 Tm1 值在 [72, 73.5]，熔解曲线 Tm2 值 [76, 78]；8 号外显子 SMN1 基因熔解曲线 Tm1 值在 [78, 79.5]，熔解曲线 Tm2 值 [82, 84]。
3. 检测结果的判定：
- 若满足上述 1 和 2 的要求，表明此时检测成功，通过样本管进行分析，并对每例样本的 P 值和 R 值进行如下判定：
- 3.1 检测结果判定：若 7 号外显子 SMN1 的 P 值为 0，则表示该样本的 7 号外显子 SMN1 基因为 0 拷贝，即纯合缺失；若 8 号外显子 SMN1 的 P 值为 0，则表示该样本的 8 号外显子 SMN1 基因为 0 拷贝，即纯合缺失；其他样本分别以两拷贝质控品作为标准品，检测结果按表 7 进行判定。

表 7. 检测结果判读表

检测基因	R 值	拷贝数分析
7 号外显子 SMN1 基因	$R \leq 0.70$	单拷贝，即杂合缺失
	$R \geq 0.74$	两拷贝或以上
	$0.70 < R < 0.74$	建议重新取样进行检测，或使用其他检测技术进行检测
8 号外显子 SMN1 基因	$R \leq 0.70$	单拷贝，即杂合缺失
	$R \geq 0.74$	两拷贝或以上
	$0.70 < R < 0.74$	建议重新取样进行检测，或使用其他检测技术进行检测

注：P 值为 SMN1 基因对应熔解峰的峰高值；R 值为待检样本 SMN1 基因熔解峰峰高值与两拷贝质控品 SMN1 基因熔解峰峰高比值。

3.2 检测结果如图 1 所示：

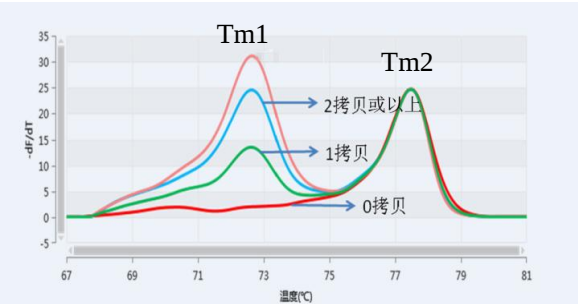


图 1. 检测结果示意图

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒仅限规定的样本类型和检测系统。
2. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对患者个体化治疗的选择应结合其症状、体征、病史、实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
3. 不合理的样本采集、转运及处理，以及不当的实验操作和环境均有可能导致假阴性或假阳性结果。
4. 本试剂盒仅适用于判定 SMN1 基因拷贝数，对于在同一条染色体上的 2 拷贝及以上的情况并不能进行区分判定，这种情况需要结合其他手段进行分析判断。
5. 基因存在的点突变、缺失突变等其他突变类型，不在试剂盒的检测范围内。
6. 有症状患者的杂合缺失需要进一步采用合适的方法确认。

【产品性能指标】

1. 外观：试剂盒包装完好，盛装各试剂的冻存管及离心管均无破损，标签完好。
2. 阴性符合率：检测 5 份 7、8 号外显子 SMN1 基因均为两拷贝或以上拷贝数的阴性参考品，阴性符合率(-/-)为 5/5。
3. 阳性符合率：检测 4 份覆盖 7、8 号外显子 SMN1 基因 0 拷贝、单拷贝的阳性参考品，阳性符合率(+ /+)为 4/4。
4. 检测限：试剂盒最低样本检测浓度为 $10\text{ng}/\mu\text{L}$ 。
5. 精密度：1 份 7、8 号外显子 SMN1 基因均为单拷贝的精密度参考品，分别对 7 号外显子 SMN1 基因、8 号外显子 SMN1 基因进行重复检测 10 次，R 值的变异系数(CV,%) $\leq 6\%$ 。
6. 干扰物：500mg/mL 游离血红蛋白、5mM 甘油三酯、0.8mg/mL EDTA 抗凝剂、3mg/dL 胆红素、44.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿莫西林、86.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 乙酰氨基酚、410ng/mL 甲氧氯普胺、6680ng/mL 奥美拉唑、35.7mmol/L 沙丁胺醇、8020pg/mL 异丙托溴铵和溶血样本，对结果无明显影响。
7. 交叉反应：试剂盒与常见血源性病原体乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、甲型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、巨细胞病毒、EB 病毒、人类疱疹病毒 6 型、人类疱疹病毒 8 型、细小病毒 B19、立克次体、螺旋体、金黄色葡萄球菌、白色念球菌等均不发生交叉反应。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅适用于体外检测，在试验前请仔细阅读本说明书。
2. 应由具备专业经验或者经培训合格的人员进行操作。
3. 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。
4. 实验室应按试剂准备区、标本处理区、扩增区和产物分析区分隔使用。操作过程应将工作服、帽、鞋、手套等穿戴齐全，各区物品均为专用，不得交叉使用，避免污染。
5. 试验前后应对实验室进行紫外线消毒，并用 75%乙醇擦拭工作台和微量加样器。
6. 检测结果会受到 DNA 的质量、操作环境，以及其他因素的影响，而造成极少数的假阳性或者假阴性的检测结果。使用者必须了解检测过程中可能存在的潜在错误和局限性。
7. 扩增完毕请立即取出反应管，密闭在专用塑料袋中，放于指定地点，等待统一处理。
8. 试剂盒的各组分应在有效期内使用，不同批次的试剂盒组分不得混用。

【参考文献】

[1] D Amico A, Mercuri E, Tiziano F D, et al. Spinal muscular atrophy[J]. 2011,6:71-80.

[2] Zhou LM, Palais R A, Paxton C N, et al. Copy number assessment by competitive PCR with limiting deoxynucleotide triphosphates and high-resolution melting[J]. Clinical Chemistry, 2015, 61(5): 724-733.

[3] Kubo Y, Nishio H, Saito K. A new method for SMN1 and hybrid SMN gene analysis in spinal muscular atrophy using long-range PCR followed by sequencing[J]. Journal of human genetics, 2015, 60(5): 233-239.

[4] Ruggiu M, McGovern V L, Lotti F, et al. A role for SMN exon 7 splicing in the selective vulnerability of motor neurons in spinal muscular atrophy[J]. Molecular and Cellular Biology, 2012, 32(1): 126-138.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：苏州天隆生物科技有限公司
住所：苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 07 栋 501 室
联系方式：0512-62525631 传真号码：0512-62956337 网址：www.medtl.cn
售后服务单位名称：苏州天隆生物科技有限公司
生产地址：苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 07 栋(NW-07)501 室，苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 06 栋(NW-06)504 室
生产许可证编号：苏食药监械生产许 20140001 号
【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20213400937
【说明书核准日期及修改日期】2021.11.12