

人类白细胞抗原 B 位点 5801 基因检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 使用说明书

【产品名称】

人类白细胞抗原 B 位点 5801 基因检测试剂盒 (PCR-荧光探针法)

【包装规格】

20 测试/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测静脉全血样本中提取的基因组 DNA 的 HLA-B*5801 基因。

本产品检测结果仅代表对 HLA-B*5801 基因的检测结果,为别嘌醇临床应用提供参考。临床医生需结合病例的实际情况进行判断,不能以本产品检测结果作为临床诊断的唯一依据。

别嘌醇是治疗痛风的一线药物,是一种黄嘌呤氧化酶抑制剂,主要用于治疗痛风和防止痛风性肾病、继发性高尿酸血症以及重症癫痫的辅助治疗。但是,该药可引起过敏综合征 (HSS)、Stevens-Johnson 综合征 (SJS) 和中毒性表皮坏死松解症 (TEN) 等严重皮肤不良反应 (SCARs)。

国内外的大量研究表明,HLA-B*5801 等位基因与别嘌醇引发的严重皮肤不良反应呈现很强的相关性,而中国人群 (尤其是汉族人群) 携带此等位基因的频率较高 (10~20%)。2012 年美国风湿管理学会痛风管理指南建议对严重过敏反应的高危人群 (中国裔汉族,韩国裔,泰国裔等),应该进行 HLA-B*5801 等位基因检测。2020 年更新的美国风湿管理学会痛风管理指南将 HLA-B*5801 等位基因检测范围扩大到非裔美国人。

【检验原理】

本产品针对人类 HLA-B*5801 等位基因,设计特异的引物和探针,在反应体系含有 HLA-B*5801 阳性模板的情况下,PCR 反应得以进行并释放荧光信号,利用仪器对 PCR 过程中相应通道的信号强度进行实时监测和输出,实现检测结果的定性分析。同时本产品根据人类 GAPDH 基因设计了内标引物探针,通过对内标 VIC 或 HEX 通道信号的监测和输出,实现对样本质量和加样操作的监控。

本产品反应体系中添加 UNG 酶,用于防止 PCR 产物污染。体系中以 dUTP 代替 dTTP,得到含有 dUTP 的扩增产物 (U-DNA)。UNG 酶可以特异性降解 U-DNA。在 PCR 开始前增加保温步骤,UNG 酶即可将反应体系中已有的 U-DNA 污染物中的尿嘧啶碱基降解,在随后变性条件下 DNA 链断裂,从而消除 U-DNA 污染,保证扩增结果的特异性和准确性。同时变性条件下 UNG 酶被灭活,不会再降解新扩增的 U-DNA,不会影响反应液的扩增性能。

【主要组成成分】

本产品主要由 5801 PCR 反应液、反应酶、阳性对照和空白对照组成,具体组成见表 1。

表 1: 试剂盒组成

管号	标签名称	主要组成成分	装量规格
1	5801 PCR 反应液	PCR 缓冲液、dNTPs、特异性引物和探针、内标引物和探针、UNG 酶、参比染料 ROX	1 管 (480μL)
2	反应酶	Taq 酶	1 管 (12μL)
3	YZYMT-039 阳性对照	HLA-B*5801 质粒	1 管 (200μL)
4	YZYMT-039 空白对照	Tris-HCl 缓冲液 (10mM)	1 管 (200μL)

本试剂盒未包括血液基因组 DNA 提取试剂盒 (推荐: 武汉友芝友医疗科技股份有限公司, 货号 YZYMT-028, 鄂汉械备 20180027 号)、8 联 PCR 管或 96 孔 PCR 板等实验所需试剂及耗材,进行检测前用户需自备。

【储存条件及有效期】

1. 试剂盒在 -20±5℃ 避光保存,有效期为 12 个月。
2. 试剂盒开瓶后, -20±5℃ 可以保存至效期末。
3. 试剂盒在使用时应尽量减少试剂冻融次数,并保证冻融不多于 6 次。
4. 试剂盒可以采用冷链 (-20±5℃) 运输,运输时间不超过 5 天;或者采用泡沫箱加干冰运输,运输时间不超过 3 天,运输过程中温度不超过 0℃。
5. 生产日期及有效期至: 见标签。

【适用仪器】

1. 本产品适用于 ABI 7500 和 SLAN-96S 实时荧光定量 PCR 仪。
2. 本产品要求仪器使用 FAM 通道采集 HLA-B*5801 基因的扩增荧光信号,使用 VIC/HEX 通道采集内标基因扩增荧光信号。
3. 相关参数设置:
 - 1) 荧光通道设置: FAM 通道: 报告基团 FAM, 淬灭基团 NFQ-MGB; VIC/HEX 通道: 报告基团 VIC/HEX, 淬灭基团 TAMRA; 参比染料: ROX。
 - 2) 基线设置: 在 SLAN-96S 荧光定量 PCR 仪上进行结果分析时,“扩增曲线算法”设置为“绝对荧光值法”。进行结果分析时,基线一般设置为 3~15,即基线的起始点设置为第 3 个循环,终点设置为第 15 个循环,基线的设置范围可以根据具体扩增情况进行微调。
 - 3) 阈值设定: 根据样本扩增指数增长的拐点进行阈值划定,阈值的划定范围可以根据具体扩增情况进行微调。

【样本要求】

1. 血液样本

样本采集: 按照医院常规采集 EDTA 抗凝、枸橼酸钠抗凝静脉全血的方法进行样本采集。

样本保存及运输: 抗凝全血样本 2~8℃ 保存不超过 30 天, -20±5℃ 保存不超过 2 年,冻融次数不超过 6 次。全血的运输必须遵守国家和当地有关规定。

2. 血液基因组 DNA 的提取

1) DNA 提取及质量要求: 使用商业化的血液基因组 DNA 提取试剂盒。推荐使用血液基因组 DNA 提取试剂盒 (武汉友芝友医疗科技股份有限公司, 货号 YZYMT-028, 鄂汉械备 20180027 号) 进行 DNA 提取。提取 DNA 的 A260/A280 在 1.6~2.1 之间。

2) DNA 保存及运输: DNA 样本 2~8℃ 保存不超过 5 天, -20±5℃ 保存不多于 2 年,冻融不超过 6 次。DNA 样本使用冷链 (-20±5℃) 运输,运输时间不超过 5 天。

3) 本产品能检测浓度为 5~100ng/μL 的 DNA 样本。

【检验方法】

1. 试剂准备: (试剂准备区)

1) 从冰箱中取出试剂盒,平衡至室温,各组分充分融解,快速离心 10 秒。

2) 反应体系配制:

按照表 2 所示试剂用量配制 PCR 反应体系,核算当次实验所需要的反应数 (n),按照 23μL/孔分装量将反应液分装到 n 个反应管内。PCR 反应管转移至样本准备区,剩余试剂放回 -20℃±5℃ 冰箱冷冻避光保存。
n = 样本数 + YZYMT-039 空白对照 (1T) + YZYMT-039 阳性对照 (1T)

表 2: 5801 PCR 反应体系配制

体系组分	单个反应加液体积
5801 PCR 反应液	22.5μL
反应酶	0.5μL
总计	23μL

2. 样本准备: (样本准备区)

1) 样本 DNA 提取: 参考所购买的商用基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行操作。

2) 加样:

- a) 将待测样本的基因组 DNA、YZYMT-039 阳性对照、YZYMT-039 空白对照,分别加入已装有 5801 PCR 反应体系的反应管中,加入量为 2μL/孔。
- b) 盖好 PCR 反应管盖,记录样本加样情况,离心后将 PCR 反应管转移到核酸扩增区进行上机检测。若 PCR 反应管内加入模板后遇临时情况不能立即上机,建议将加好模板的 PCR 反应管放于 2~8℃ 条件暂时保存,并在 24 小时内尽快上机检测。

3. PCR 扩增: (核酸扩增区)

- 1) 开机,并进行仪器性能自检。
- 2) 取样本准备区准备好的 PCR 反应管,放置在仪器样品槽相应位置,并记录放置顺序。

- 3) 按表 3 设置仪器扩增相关参数, 并开始进行 PCR 扩增。反应结束后, 根据扩增曲线, 划定合适基线 (一般起始设定为 3, 终止设定为 15) 和荧光阈值 (一般将阈值划定在扩增曲线对数形式下指数增长期的中间), 得到不同通道 Ct 值并按照表 4 进行结果判定。

表 3: 仪器扩增相关参数

体系	总体积为 25 μ L		
信号采集	5801 PCR 反应体系	HLA-B*5801 基因—FAM 通道采集荧光信号 内标基因—VIC/HEX 通道采集荧光信号 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪参比染料: ROX	
PCR 反应条件	阶段	条件	循环数
	UNG 处理	37 $^{\circ}$ C: 10 分钟 (min)	1
	预变性	95 $^{\circ}$ C: 5 分钟 (min)	1
	PCR	95 $^{\circ}$ C: 15 秒 (s)	45
		60 $^{\circ}$ C: 30 秒 (s) (设置在此阶段结束时采集荧光信号)	
		72 $^{\circ}$ C: 30 秒 (s)	

【阳性判断值】

通过参考值的研究, 根据临床样本的检测数据绘制 ROC 曲线, 并使用临床样本进行验证, 确定本产品检测目标基因的 Ct 阳性判断值为 36。

【检验结果的解释】

1. 试剂盒有效性判定:

- 1) ZYMT-039 阳性对照: FAM、VIC/HEX 通道 Ct 值 $\leq$ 33, 扩增曲线有明显指数增长期。
- 2) ZYMT-039 空白对照: FAM、VIC/HEX 通道无扩增曲线, 或者扩增曲线为直线或轻微斜线, 无明显指数增长期, 无 Ct 值或 Ct 值 $\geq$ 38。

2. 样本有效性的判定:

内标基因: 样本检测中 VIC/HEX 通道 Ct 值 $\leq$ 36, 扩增曲线有明显指数增长期。

3. 检测结果的判定:

按照下表 4 对样本检测结果进行判定, 确定样本是否携带 HLA-B*5801 基因。

表 4: 样本结果判定

FAM 通道	VIC/HEX 通道	HLA-B*5801 结果	是否携带 HLA-B*5801
Ct 值 $>$ 36 或无 Ct 值	Ct 值 $\leq$ 36	阴性	否
Ct 值 $\leq$ 36	Ct 值 $\leq$ 36	阳性	是

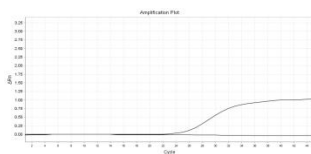


图 1: 阴性样本检测示意图

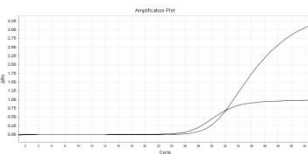


图 2: 阳性样本检测示意图

【检验方法的局限性】

1. 样本检测结果与样本的收集、处理和保存过程有关, 其中任何失误都将导致检测结果的不准确。如果样本处理时未控制好 DNA 的质量, 可能出现假阴性的结果。
2. 本产品检测结果仅供临床参考, 为别嘌醇用药提供参考, 不得作为临床诊治的唯一依据。对患者应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
3. 本产品仅限于从 EDTA 抗凝、枸橼酸钠抗凝静脉全血中提取的人类基因组 DNA 的检测; 检测系统仅适用于 ABI7500 和 SLAN-96S 实时荧光定量 PCR 仪; 样本检测应严格按照说明书要求操作。

【产品性能指标】

1. 检测国家参考品中的 5 份阳性参考品和中、高浓度的阳性样本基因组 DNA, 结果全部为阳性。
2. 检测国家参考品中的 15 份阴性参考品和中、高浓度的阴性样本基因组 DNA, 结果全部为阴性。
3. 检测 2 份非人源基因组 DNA 的企业参考品, 各通道无有效扩增, 无 Ct

值。

4. 检测稀释至 5ng/ μ L 的国家参考品中的 5 份阳性参考品和阳性样本基因组 DNA, 结果全部为阳性。
5. 平行检测企业重复性参考品 10 次, 结果均应为阳性, 且相应检测通道的 Ct 值变异系数 CV $\leq$ 5.0%。
6. 精密度试验表明批内、批间、日内、日间、不同实验室间检测重复性好。
7. 本产品可以检测浓度为 5~100ng/ μ L 的人类基因组 DNA。
8. 交叉反应: 本产品与 HLA-B*5705, 5804, 5805, 5809, 5810, 5811, 5812, 5813, 5815, 5817, 5819, 5821, 5822, 5823, 5824, 5828 有交叉反应。
9. 干扰物质: 血液样本中甘油三酯 $\leq$ 6 mmol/L, 胆固醇 $\leq$ 9.2 mmol/L, 胆红素含量 $\leq$ 170 μ mol/L, 白蛋白含量 $\leq$ 5 μ mol/L, 血红蛋白含量 $\leq$ 20g/L 不会干扰本产品检测结果; 别嘌醇药物血药浓度 $\leq$ 3 μ g/mL 不会干扰本产品检测结果。
10. 临床评价: 在境内 3 家具有临床实验资质的医院进行临床试验, 共入组 1050 例全血样本, 本产品检出 HLA-B*5801 阳性 99 例, 阴性 951 例; 与已上市同类产品检测结果进行对比, 阳性符合率为 100% (95%CI: 96.26%~100%), 阴性符合率为 100% (95%CI: 99.60%~100%), 总符合率为 100% (95%CI: 99.64%~100%), 显示出本产品与已上市同类产品具有较好的一致性

【注意事项】

1. 本产品仅用于体外诊断, 对检验结果的解释需与临床实际相结合。
2. 不同批号试剂盒内各组分不可以互换。
3. 检测样本时应同时检测阳性对照和空白对照, 对产品的性能、仪器性能、实验环境及操作进行监测, 确保样本检测结果准确可靠。
4. 本产品内阳性对照不具有传染性, 但在使用时建议将其视为具有潜在传染性物质进行处理。
5. 本产品内用剩的试剂及实验过程中的废弃物建议按照医疗废弃物进行处理。
6. 临床实验室应严格按照主管机构有关分子生物学实验室、临床基因扩增实验室的管理规范执行。
7. 有输血史及骨髓移植的人群不适用于本产品检测。

【标识的解释】

符号	意义
IVD	体外诊断医疗器械

【参考文献】

1. Shuen-Iu Hung, Wen-Hung Chung, Lieh-Bang Liou, et al. HLA-B*5801 allele as a genetic marker for severe cutaneous adverse reactions caused by allopurinol. PNAS, 2005, 11(102):4134-9.
2. D Khanna, et al. 2012 American College of Rheumatology guidelines for management of gout. Arthritis Care & Research, 2012, 64 (64) :1431-1446.
3. FitzGerald JD, et al. 2020 American College of Rheumatology guidelines for management of gout. Arthritis Care & Research, 2020, 72 (6) :744-760.
4. 《全国临床检验操作规程》第四版。

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 武汉友芝友医疗科技股份有限公司

住所: 武汉市东湖新技术开发区高新二路 388 号武汉光谷国际生物医药企业加速器 1.2 期 23 栋 1 单元 4、5 层

联系方式: 027-65330996

售后服务单位: 武汉友芝友医疗科技股份有限公司

联系方式: 027-65330996

生产地址: 武汉市东湖新技术开发区高新大道 858 号生物医药园加速器一期 A4 栋西侧 1 楼

生产许可证编号: 鄂食药监械生产许 20120580 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准 20223401434

【说明书核准日期及修改日期】

2022 年 10 月 26 日