

## 【产品名称】

通用名称：CYP2C19 基因分型检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

## 【包装规格】

大包装，20 人份/盒；大包装，48 人份/盒。

## 【预期用途】

本试剂盒适用于体外定性检测人全血样本的基因组 DNA 中 CYP2C19 基因 CYP2C19\*2（c. 681G>A）、CYP2C19\*3（c. 636G>A）、CYP2C19\*17（c. -806C>T）三个位点的多态性。

CYP2C19 是肝微粒体细胞色素 P450 的一种，是 CYP450 家族中最重要的药物代谢酶之一。研究发现 CYP2C19 可影响到氯吡格雷、奥美拉唑、阿米替林等多种重要临床应用药物的代谢。而其基因多态性是引起个体间和种族间对同一药物表现出不同代谢能力的重要原因之一。CYP2C19 基因包含多个能导致该酶活性发生改变的多态性位点，其中 CYP2C19\*2（c. 681G>A）、CYP2C19\*3（c. 636G>A）、CYP2C19\*17（c. -806C>T）为中国人人群中最为常见的多态性位点。CYP2C19\*2（c. 681G>A）、CYP2C19\*3（c. 636G>A）<sup>[1, 2]</sup>多态性导致 CYP2C19 酶活性降低，代谢底物的能力减弱；CYP2C19\*17（c. -806C>T）<sup>[2, 3]</sup>多态性导致该酶活性增强，代谢底物的能力增强。根据美国 FDA 的要求和中国药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南（试行）说明<sup>[4, 5]</sup>，患者使用氯吡格雷等临床应用药物前，建议对 CYP2C19 基因多态性进行检测。

本产品检测结果仅代表 CYP2C19\*2（c. 681G>A）、CYP2C19\*3（c. 636G>A）、CYP2C19\*17（c. -806C>T）三个位点基因多态性的检测结果，临床医生需要结合病例的实际情况进行判断，不能以本试剂盒检测结果作为临床用药调整的唯一依据，对患者用药剂量的调整，临床医生应根据多方检查结果综合考虑。本试剂盒检测结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据。

## 【检验原理】

本试剂盒针对人类基因组 DNA 中 CYP2C19 基因 CYP2C19\*2（c. 681G>A）、CYP2C19\*3（c. 636G>A）、CYP2C19\*17（c. -806C>T）位点的多态性设计特异性引物和探针，进行 PCR 扩增，用以检测不同的基因型别。特异性引物和探针，配以热启动 DNA 聚合酶等成份组成核酸扩增试剂，使用荧光 PCR 仪进行 PCR 扩增，并检测荧光信号，实现对未知样本的型别检测。同时设计了内标引物和探针，用于对核酸提取过程的监控，可减少假阴性结果的出现。

本试剂盒添加了相关的防污染组分（尿嘧啶 DNA 糖基化酶，即 UDG/UNG），其作用机理是选择性水解断裂含有 dU 的双链或者单链 DNA 中的尿嘧啶糖苷键，形成的有缺失碱基的 DNA 链，在碱性介质以及高温下会进一步水解断裂，从而被消除。

## 【主要组成成分】

| 组分名称                            |                       | 规格      | 数量 | 主要成分                                                                                 |
|---------------------------------|-----------------------|---------|----|--------------------------------------------------------------------------------------|
| PCR 检测试剂<br>（适用于大包装，20 人份/盒）    | CYP2C19 野生型 PCR 反应液 A | 340μL/管 | 1  | 特异性引物和探针、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液                                                              |
|                                 | CYP2C19 突变型 PCR 反应液 A | 340μL/管 | 1  | 特异性引物和探针、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液                                                              |
|                                 | CYP2C19 PCR 反应液 B     | 120μL/管 | 1  | 热启动 Taq 酶、尿嘧啶糖基化酶、dATP、dGTP、dCTP、dUTP                                                |
| PCR 检测试剂<br>（适用于大包装，48 人份/盒）    | CYP2C19 野生型 PCR 反应液 A | 816μL/管 | 1  | 特异性引物和探针、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液                                                              |
|                                 | CYP2C19 突变型 PCR 反应液 A | 816μL/管 | 1  | 特异性引物和探针、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液                                                              |
|                                 | CYP2C19 PCR 反应液 B     | 288μL/管 | 1  | 热启动 Taq 酶、尿嘧啶糖基化酶、dATP、dGTP、dCTP、dUTP                                                |
| 质控品（适用于大包装，20 人份/盒及大包装，48 人份/盒） | CYP2C19 阳性质控品         | 200μL/管 | 1  | 含 CYP2C19*2A 和 CYP2C19*2G，CYP2C19*3A 和 CYP2C19*3G，CYP2C19*17C 和 CYP2C19*17T 的 DNA 片段 |
|                                 | 阴性质控品                 | 200μL/管 | 1  | 纯化水                                                                                  |

注：1）不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。

2）需自备的试剂：核酸提取或纯化试剂（备案号：粤穗械备 20170666 号）。

3）阳性质控品说明：阳性质控品为人工合成的分别含 CYP2C19\*2A 和 CYP2C19\*2G，CYP2C19\*3A 和 CYP2C19\*3G，CYP2C19\*17C 和 CYP2C19\*17T 的 DNA 片段的混合物。

## 【储存条件和有效期】

- 1、试剂盒保存于-20±5℃，有效期 9 个月。
- 2、试剂盒应避免反复冻融，反复冻融次数不超过 8 次；在 4℃下可以保存 14 天；在 37℃下可以保存 72 小时；开瓶次数不超过 8 次。
- 3、试剂盒生产日期和有效期见产品标签。

【适用仪器】 ABI 7500、AGS4800。

## 【样本要求】

- 1、适用样本类型：全血。

- 2、样本采集：抽取受检者静脉血 2 mL 注入 EDTA 抗凝管中，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，密闭送检。
- 3、样本的保存和运送：可立即用于核酸提取；在 2~8℃ 保存期为 1 个月；在 -20±5℃ 保存期为 12 个月；若要长期保存，需储存于 -80±5℃；应避免反复冻融。运送采用冰壶加冰或泡沫箱加冰密封运输，运输时间不应超过 4 天。

【检验方法】

1、PCR 试剂准备（试剂准备区）

从试剂盒中取出 CYP2C19 野生型 PCR 反应液 A、CYP2C19 突变型 PCR 反应液 A 和 CYP2C19 PCR 反应液 B，室温融化后振荡混匀，8,000 rpm 瞬时离心后使用。将各组分充分混合配制成相应的 CYP2C19 野生型 PCR 反应管和 CYP2C19 突变型 PCR 反应管，之后进行瞬时离心，以使管壁上的液体全部离心至管底，再将 20 μL 的扩增体系分别分装到 PCR 反应管中。

CYP2C19试剂单人份野生型PCR反应管体系配制如下表：

| 组分 | CYP2C19野生型PCR反应液A | CYP2C19 PCR反应液B | 总体积   |
|----|-------------------|-----------------|-------|
| 用量 | 17 μL             | 3 μL            | 20 μL |

CYP2C19试剂单人份突变型PCR反应管体系配制如下表：

| 组分 | CYP2C19突变型PCR反应液A | CYP2C19 PCR反应液B | 总体积   |
|----|-------------------|-----------------|-------|
| 用量 | 17 μL             | 3 μL            | 20 μL |

2、样本处理和核酸提取（样本处理区）

- 1）使用广州达安基因股份有限公司核酸提取或纯化试剂（粤穗械备 20170666 号）进行核酸提取，按说明书进行操作。
- 2）采用分光光度计（如 NanoDrop2000 超微量分光光度计或其他分光光度计仪器）对提取后的核酸进行检测，核酸的纯度应满足 A260/A280 比值范围在 1.6~2.1 之间，浓度应在 0.5~50 ng/μL 之间（若低于 0.5 ng/μL 则重新提取，高于 50 ng/μL 则稀释至所需浓度范围）。按试剂盒步骤提取的基因组 DNA，可立即加样或置于 -20℃±5℃ 保存备用。基因组 DNA 于 -20℃±5℃ 可保存 1 个月，避免反复冻融。

注：本试剂盒中的 CYP2C19 阳性质控品不参与核酸提取，阴性质控品应与样本同步进行核酸提取。

3、加样（样本制备区）

向含有 2 种 PCR 反应液的 PCR 反应管中分别加入待测样本核酸（核酸浓度 0.5~50 ng/μL）、CYP2C19 阳性质控品和阴性质控品各 5 μL，盖紧管盖，8,000 rpm 瞬时离心后转移至扩增检测区。推荐 PCR 布板设置如下：

| 孔位编号 | CYP2C19野生型PCR反应管 | CYP2C19突变型PCR反应管 |
|------|------------------|------------------|
| A    | 阴性质控品            | 阴性质控品            |
| B    | 阳性质控品            | 阳性质控品            |
| C    | 样本1              | 样本1              |
| D    | 样本2              | 样本2              |
| E    | 样本3              | 样本3              |
| F    | 样本4              | 样本4              |
| G    | 样本5              | 样本5              |
| H    | 样本6              | 样本6              |

4、PCR 扩增（扩增检测区）

- 1）将 PCR 反应管放入仪器样品槽内，按对应顺序设置阳性质控品、阴性质控品和未知样本，并设置样本名称。
- 2）荧光通道选择：①选择 FAM 通道检测 CYP2C19\*2（c. 681G>A）位点基因多态性；②选择 VIC 通道检测 CYP2C19\*3（c. 636G>A）位点基因多态性；③选择 Texas Red 通道检测 CYP2C19\*17（c. -806C>T）位点基因多态性；④选择 CY5 通道检测内标基因；⑤选择参比荧光（Passive Reference）为 None。（若使用安杰思 AGS4800，请在“运行”增益设置栏勾选自动增益。）
- 3）设置循环条件如下表，反应体系体积设置为 25 μL。

| 步骤 | 温度(℃) | 时间    | 循环数 | 荧光收集 |
|----|-------|-------|-----|------|
| 1  | 50    | 2 分钟  | 1   | /    |
| 2  | 95    | 15 分钟 | 1   | /    |
| 3  | 94    | 15 秒  | 40  | /    |
|    | 55    | 45 秒  |     | 收集荧光 |

- 4）设置完成后，保存文件，运行程序。

5、结果分析(请参照各仪器使用说明书进行设置，以 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪为例)

反应结束后自动保存结果，根据分析后图像调节 Baseline 的 Start 值、End 值以及 Threshold 值（用户可根据实际情况自行调整，Start 值可设在 3~15、End 值可设在 5~20，在 Log 图谱窗口 Threshold 的 Value 值取样本最高荧光值的 1/20，使阈值线位于扩增曲线指数期），点击 Analysis 自动获得分析结果。

6、质量控制

以下要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行复检。

1) 阴性质控品：

CYP2C19 野生型 PCR 反应管中 FAM, VIC, Texas Red, CY5 检测通道均无明显指数增长期，无 Ct 值或  $Ct \geq 37$ ；  
CYP2C19 突变型 PCR 反应管中 FAM, VIC, Texas Red, CY5 检测通道均无明显指数增长期，无 Ct 值或  $Ct \geq 37$ 。

2) CYP2C19 阳性质控品：

CYP2C19 野生型 PCR 反应管中 FAM, VIC, Texas Red, CY5 检测通道均有明显对数扩增曲线，且  $Ct \leq 32$ ；  
CYP2C19 突变型 PCR 反应管中 FAM, VIC, Texas Red, CY5 检测通道均有明显对数扩增曲线，且  $Ct \leq 32$ 。

注：由于扩增效率的差异，阳性质控品各管、各通道请分别进行结果分析。

7、结果判断

设置了基线和阈值后，仪器会给出各样本的相应 Ct 值，一般情况下根据 Ct 值即可进行结果判断。

1) 内标结果判定：每次实验 CYP2C19 野生型 PCR 反应管 A 和 CYP2C19 突变型 PCR 反应管 A 中 CY5 通道均有明显对数扩增曲线，且  $Ct \leq 35$ ，满足此条件则继续进行其他通道结果判断；若不满足此条件，本次实验无效，建议确认核酸或样本质量后重新检测。

2) 结果判断：

| 通道        | 检测位点                      | 反应体系              |                   | 基因型        |
|-----------|---------------------------|-------------------|-------------------|------------|
|           |                           | 野生型 PCR 反应管       | 突变型 PCR 反应管       |            |
| FAM       | CYP2C19*2<br>(c. 681G>A)  | $Ct \leq 35$      | $Ct > 35$ 或无 Ct 值 | 野生型 (GG)   |
|           |                           | $Ct \leq 35$      | $Ct \leq 35$      | 杂合突变型 (AG) |
|           |                           | $Ct > 35$ 或无 Ct 值 | $Ct \leq 35$      | 纯合突变型 (AA) |
| VIC       | CYP2C19*3<br>(c. 636G>A)  | $Ct \leq 35$      | $Ct > 35$ 或无 Ct 值 | 野生型 (GG)   |
|           |                           | $Ct \leq 35$      | $Ct \leq 35$      | 杂合突变型 (AG) |
|           |                           | $Ct > 35$ 或无 Ct 值 | $Ct \leq 35$      | 纯合突变型 (AA) |
| Texas Red | CYP2C19*17<br>(c. 806C>T) | $Ct \leq 35$      | $Ct > 35$ 或无 Ct 值 | 野生型 (CC)   |
|           |                           | $Ct \leq 35$      | $Ct \leq 35$      | 杂合突变型 (TC) |
|           |                           | $Ct > 35$ 或无 Ct 值 | $Ct \leq 35$      | 纯合突变型 (TT) |

【阳性判断值】

通过临床样本检测结果分析，利用 ROC 曲线法最终确定本试剂盒的阳性判断参考值为 35。

【检验结果的解释】

- 1、若阴性质控品各检测通道出现明显指数增长曲线，且  $Ct < 37$ ，可能存在环境污染、试剂污染、PCR 产物污染或样本间交叉污染等，建议排除污染原因后重新检测；
- 2、若阳性质控品检测结果出现  $Ct$  值  $> 32$  或无 Ct 值，可能由于操作不当、试剂性能降低或无效、仪器故障或耗材存在抑制物等，建议结合临床样本的扩增情况排除原因，重新检测。
- 3、样本检测时内标检测结果应同时满足：CYP2C19 野生型 PCR 反应管和 CYP2C19 突变型 PCR 反应管中 CY5 检测通道均有明显对数扩增曲线，且  $Ct \leq 35$ ；若不满足此条件，建议确认样本质量后重新检测。

【检验方法的局限性】

- 1、本试剂盒检测浓度范围为 0.5-50 ng/ $\mu$ L，低于最低检测限或高于最高检测浓度的样品均无法检测。
- 2、除上述提及的 CYP2C19 基因的三个位点外，不能检测未在本试剂盒设计范围内的 CYP2C19 基因的其他位点。
- 3、样本检测结果和样本的收集、处理、运送及保存质量有关，其中任何失误都可能会导致假阴性结果。如果样本处理时没有控制好交叉污染，可能出现假阳性结果。

【产品性能指标】

- 1、阴性符合率：检测试剂盒范围外的人工合成的 DNA 片段和非人基因组核酸，检测结果均为阴性，符合率 100%。
- 2、阳性符合率：检测试剂盒检测范围内的 14 份阳性参考品，检测结果均与已知型别相符合，符合率为 100%。
- 3、检测下限为 0.5 ng/ $\mu$ L；检测上限为 50 ng/ $\mu$ L。用三批次试剂检测 0.5 ng/ $\mu$ L 样本和 50 ng/ $\mu$ L 样本，检测结果均与已知型别相符合，符合率为 100%。
- 4、重复性：不同操作人在不同时间段分别用三批次试剂检测 CYP2C19\*1 野生型、CYP2C19\*2 杂合突变型、CYP2C19\*3 杂合突变型、CYP2C19\*17 杂合突变型共 4 个样本，统计分析批内和批间的 Ct 值变异系数，结果显示 CV 值均不高于 5%。
- 5、交叉实验：本试剂盒与含 CYP2C19 \*4、CYP2C19\*5、CYP2C19\*6、CYP2C19\*8、CYP2C19\*9 等位基因的 DNA 片段无交叉反应，与 CYP2C19 的同源基因如 CYP2C8、CYP2C9 和 CYP2C18 基因不存在交叉反应。
- 6、干扰实验：在本试剂盒的实验条件下，样本中可能存在的内源性干扰物质如胆红素 (0.1 mg/mL)、组织胺 (0.1 mg/mL)、甘油三酯 (16.9mmol/L)、血红蛋白 (1.5g/mL)、白蛋白 (500mg/mL) 以及外源性干扰物质如阿司匹林 (50  $\mu$ g/mL)、氯吡格雷 (3  $\mu$ g/L)、EDTA 抗凝剂 (100mg/mL) 对 CYP2C19 样本检测结果均无干扰。

## 【注意事项】

- 1、本产品仅用于体外检测，结果仅供临床参考，用于辅助指导个体化用药，不得作为临床诊断的唯一依据。
- 2、保存不当会影响本试剂的性能进而导致假阴性结果的发生，请严格按照说明书储存条件保存试剂。
- 3、为了避免样本中任何潜在的生物危险，检测样本应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤和粘膜；样本的处理应在可防止气雾外流的生物安全柜中操作，样本制备区所用过的试管、吸头需打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃；样本操作和处理均需符合相关法规要求：包括卫生部《微生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。
- 4、建议实验室管理应参考 PCR 基因扩增实验室管理的相关规范且实验人员进行相关专业培训，实验过程可参考分区进行（试剂准备区、样本制备区、扩增检测区），各区各阶段用品不能交叉使用。
- 5、全程应避免 DNA 酶污染以及阳性质控品污染，实验过程中穿工作服，佩戴一次性手套和口罩。在洁净消毒、紫外光杀菌的化学通风橱或生物安全柜完成操作，避免有害物质进入呼吸道。
- 6、PCR 检测试剂使用前要完全解冻，8,000rpm 离心数秒后使用，但应避免反复冻融。
- 7、完成样本核酸提取后，建议马上进行下一步实验，否则请保存于-20℃待用，加入体系内的样本量应按本说明书严格执行。
- 8、如果在标本处理中没有控制好交叉污染，可能出现假阳性。
- 9、每次实验应包含阳性质控品以及阴性质控品，加入体系内的样本量应按本说明书严格执行。
- 10、产物处理：PCR 结束之后，产物容易引起污染，应由当天不再参与实验的人员将所有反应管放入生物安全垃圾处理袋或其他容器中确认完全封闭后方可丢弃。

## 【参考文献】

- 1、Pettersen AA, Arnesen H, Opstad TB, et al. The influence of CYP2C19\*2 polymorphism on platelet function testing during single antiplatelet treatment with clopidogrel. Thromb J, 2011, 94.
- 2、Tantry US, Bliden KP, Wei C, et al. First analysis of the relation between CYP2C19 genotype and pharmacodynamics in patients treated with ticagrelor versus clopidogrel: The ONSET/OFFSET and RESPOND genotype studies. Circulation: Cardiovascular Genetics, 2010, 3(6):556-566.
- 3、Frere C, Cuisset T, Gaborit B, et al. The CYP2C19\*17 allele is associated with better platelet response to clopidogrel in patients admitted for non-ST acute coronary syndrome. J Thromb Haemost, 2009, 7(8): 1409-1411.
- 4、SA Scott, K Sangkuhl, CM Stein, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C19 Genotype and Clopidogrel Therapy. 2013.
- 5、中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南（试行）. 2015.

## 【基本信息】

注册人/生产企业名称：广州达安基因股份有限公司

住所：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号

联系方式：

传真：020-32068820                      电话：400 000 0340    020-32290789

邮政编码：510665                      网址：<http://www.daangene.com>

售后和服务单位名称：广州达安基因股份有限公司

联系方式：

传真：020-32068820                      电话：400 000 0340    020-32290789

邮政编码：510665                      网址：<http://www.daangene.com>

生产地址：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号；

广州市高新技术产业开发区荔枝山路 6 号；

广州市黄埔区香山路 17 号 B104 号房。

生产许可证编号

## 【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

## 【说明书核准及修改日期】