

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）说明书

【产品名称】

通用名称：葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）

英文名称：Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Gene Mutations Test Kit (Fluorescence Melting Curve Analysis)

【包装规格】

48 测试/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测人外周血基因组 DNA 中的中国人群常见的 12 种 G6PD 基因突变：c.95A>G、c.383T>C、c.392G>T、c.487G>A、c.517T>C、c.592C>T、c.871G>A、c.1004C>A、c.1024C>T、c.1360C>T、c.1376G>T、c.1388G>A。

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶（G6PD）缺乏症是最常见的一种遗传性酶缺乏病，由位于 X 染色体上的 G6PD 基因突变导致 G6PD 酶活性降低或缺乏，红细胞不能抵抗氧化损伤而遭受破坏，从而引起溶血性贫血。本产品可以定性检测上述 12 种中国人群常见 G6PD 基因突变类型。

【检验原理】

本试剂盒采用荧光 PCR 熔解曲线法，根据靶与探针杂交产物熔点的差异检测 G6PD 基因突变。对于每一份样本，本试剂盒分两管对其进行检测，对应扩增试剂中的 G6PD PCR 混合液 A 和 G6PD PCR 混合液 B。

【主要组成成份】

试剂盒组成	组分名称	主要成分	规格	数量
扩增试剂	G6PD PCR 混合液 A	引物、探针、脱氧核糖核苷三磷酸（dNTPs 混合液）	980 μL/管	1 管
	G6PD PCR 混合液 B	引物、探针、脱氧核糖核苷三磷酸（dNTPs 混合液）	980 μL/管	1 管
	G6PD 酶混合液	耐热 DNA 聚合酶（Taq 酶）、尿嘧啶 DNA 糖基化酶（UNG 酶）	44 μL/管	1 管
对照试剂	G6PD 野生型对照	含 5 个野生型扩增靶基因线性质粒	50 μL/管	1 管
	G6PD 阴性对照	不含靶基因的溶液（三羟甲基氨基甲烷-盐酸、乙二胺四乙酸）（Tris-HCl、EDTA）	50 μL/管	1 管
溶解试剂	DNA 溶解液	三羟甲基氨基甲烷-盐酸、乙二胺四乙酸（Tris-HCl、EDTA）	14 mL/瓶	1 瓶

注：建议不同批号组分之间不互换。

【储存条件及有效期】

-18℃ 以下避光保存，有效期为 12 个月。

试剂盒内各组分有效期与试剂盒相同。反复冻融建议不超过 3 次。建议采用 4℃ 以下温度运输。

【适用仪器】

本试剂盒适用于带有 FAM、HEX、ROX 和 Cy5 检测通道且具有熔解曲线分析功能的实时 PCR 扩增仪，包括：Bio-Rad CFX96 实时荧光 PCR 扩增仪、全自动医用 PCR 分析系统（SLAN-96S）。

【样本要求】

本试剂盒的检测对象为人类基因组 DNA，请尽量保持基因组 DNA 提取方法的一致性。选用厦门致善生物科技有限公司 Lab-aid 820 磁珠法全血 DNA 提取系统或 QIAGEN 公司的全血 DNA 提取试剂盒。

【检验方法】

1. 试剂准备——配液区

① 首先将所有的试剂从冰箱取出，平衡至室温。PCR 反应液配液标准为：取 $n \times 19.6 \mu\text{L}$ G6PD PCR 混合液 A（n 根据反应管数确定）和 $n \times 0.4 \mu\text{L}$ G6PD 酶混合液加入到 1.5 mL 离心管中，振荡混匀数秒，然后瞬时离心（如 3000 rpm 离心 5 秒）；另取 $n \times 19.6 \mu\text{L}$ G6PD PCR 混合液 B 和 $n \times 0.4 \mu\text{L}$ G6PD 酶混合液加入到另一 1.5 mL 离心管中，振荡混匀数秒，然后瞬时离心。PCR 反应液应即配即用，隔夜使用需 -18℃ 以下贮存。

② PCR 反应液的分装：PCR 反应液 A/B 分别以每管 20 μL 分装于 PCR 薄壁反应管。

③ 将配制好的 PCR 反应管转移至提取间，贮存于 -18℃ 以下直至样本提取完。

2. 样本提取及加样——提取区

① 使用适当的 DNA 提取方法（采用本公司磁珠法或 QIAGEN 公司全血 DNA 提取试剂盒）提取样本（外周血）的人类基因组 DNA，最后采用本试剂盒中提供的 DNA 溶解液溶解 DNA。

② 用紫外分光光度计测定提取的 DNA 样本的浓度和纯度，DNA 样本的 $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ 应在 1.6~2.0 范围之内，且 $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{230\text{nm}} \geq 2.0$ [若 $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{230\text{nm}} < 2.0$ ，需要使用本试剂盒中提供的 DNA 溶解液将 DNA 样本进行适度稀释（通常稀释 10 倍），但需保持样本浓度高于 1 ng/μL]。

③ 用微量加液器向每支 PCR 薄壁反应管中加入 5 μL 相应的 DNA 样本（浓度不低于 1 ng/μL）或阴性/野生型对照品，并立即盖严管盖。

④ 将已加入模板的 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可设置为一个程序，在实时荧光 PCR 仪上连续完成，也可分阶段先在普通 PCR 仪器上进行扩增，再于实时 PCR 仪器上进行熔解曲线分析。

① PCR 扩增

本试剂盒反应体系设为 25 μL，PCR 反应程序为：50℃ 2min → 95℃ 10min → （95℃ 15s → 65℃ ~56℃（每个循环下降 1℃）15s → 76℃ 20s）× 10 个循环 → （95℃ 15s → 55℃ 15s → 76℃ 20s）× 50 个循环。若使用实时荧光 PCR 仪，可以设置在 55℃ 退火阶段采集 FAM、HEX、ROX 和 Cy5 通道荧光信号。

② 熔解曲线分析

在具有多色熔解曲线分析功能的实时 PCR 仪上进行，程序设置如下：95℃ 1min → 35℃ 3min → 40℃ ~85℃ 以 0.4℃/5s 的升温速率进行熔解曲线分析，且在此阶段采集 FAM、HEX、ROX 和 Cy5 通道荧光信号。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。

【参考值（参考范围）】

野生型对照在各体系及各通道中的 T_m 值范围如下：

反应体系 A：FAM 通道 68.6℃ ± 1℃；HEX 通道 64.6℃ ± 1℃；ROX 通道 70.6℃ ± 1℃；Cy5 通道 66.5℃ ± 1℃。

反应体系 B：FAM 通道 50.4℃ ± 1℃，70.4℃ ± 1℃；HEX 通道 65.8℃ ± 1℃；ROX 通道 70.6℃ ± 1℃；Cy5 通道 69.0℃ ± 1℃。

本说明书中各 T_m 值是在特定 Bio-Rad CFX96 仪器上所得的常见值作为参考值。当使用其它仪器时， T_m 值可能略有变动，以当次试验野生型对照所得的 T_m 值为准。

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型选择有效 T_m 值。当出现仪器无法自动给出 T_m 值的情况时，可通过调整基线或直接人工判读的方法获得 T_m 值。

【检验结果的解释】

通过比较待测样本在 A 和 B 体系中共八个检测通道的熔解峰（如图 1）与野生型对照对应通道的熔解峰之间熔点（ T_m 值）的差异判断样本是否发生突变。当样本熔解峰与野生型对照对应熔解峰差异（ ΔT_m 值）在 ±1℃ 以内的即为野生型峰，差异超过 ±2℃ 的即为突变型峰。主要包括以下几种情况：

① 若样本的八个检测通道都只有 9 个野生型熔解峰（简称野生峰），则该样本为野生型（图 1 黑色曲线），没有包含附表 1 所列的突变位点；

② 若样本在某个通道既有野生峰又有突变峰（图 1 紫色曲线）或者有一个野生峰和突变峰的融合峰（图 1 橙色曲线），而其它的熔解峰均为野生峰，则样本为该种突变的杂合型。通过计算对应野生峰与突变峰熔点的差异

(ΔT_m 值), 参考附表 1, 判断突变的类型;

- ③ 若样本在某个通道有突变峰(无对应的野生峰), 而其余的熔解峰均为野生峰, 则样本为该种突变的纯合型(图 1 红色曲线)。通过计算对应野生峰与突变峰熔点的差异(ΔT_m 值), 参考附表 1, 判断突变的类型;
- ④ 若样本在某两个通道(图 1 蓝色曲线)或一个通道(图 1 绿色曲线)有两个突变峰(两种突变在同一通道时, 根据熔点的差异, 可能会出现双峰或一个融合峰), 其余的熔解峰为野生峰, 则样本为两种突变的双杂合型。通过计算对应的野生峰与突变峰熔点的差异(ΔT_m 值), 参考附表 1, 判断突变的类型。

注意:

1. 体系 B 中 FAM 通道有两个野生峰(野生峰 1 和野生峰 2, 见图 1), 其中 c.95A>G 突变对应的野生峰为野生峰 1, c.383T>C 突变和 c.392G>T 突变对应的野生峰为野生峰 2, 当该通道出现突变时, 请注意选择正确的野生峰进行 ΔT_m 值的计算。
2. 由于 G6PD 基因位于 X 染色体上, 而正常男性只有一条 X 染色体, 故男性只有野生型或纯合突变型。
3. 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。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒采用的是荧光 PCR 熔解曲线法, 该方法可以检测探针覆盖区域的序列变异, 故可能检测到附表 1 所列突变之外的突变。
2. 由于本试验只是检测核酸序列而不是氨基酸序列, 虽然本试剂盒设计时已经做了充分考虑, 但是鉴于人类基因的复杂性, 仍有可能发生多态性或者同义突变被判为突变型的情况。
3. 理论上可能出现 383T>C 和 392G>T 同时发生的罕见情况, 熔解峰呈现为左侧含有一个肩峰的重叠峰, 可与野生型(阳性对照)显著区分, 与 383T>C 和 392G>T 各自的纯合型熔解峰也有所区别(峰型), 但不易准确判断 383T>C 和 392G>T 突变的发生情况, 建议通过其它方法确认具体的突变类型。

【产品性能指标】

1. 本产品野生型、杂合突变型、纯合突变型和男性半合子突变型检测限均为人类基因组 DNA 5 ng/反应。
2. 本产品可对 G6PD 野生型、12 种杂合突变型和 12 种纯合突变型样本进行特异检测。
3. 结合试剂盒批内、批间重复性试验和临床试验, 结果表明, 各基因型样本 ΔT_m 值标准偏差均在 0.34℃ 之内, 试剂盒重复性良好。
4. 本产品临床试验验证 1395 例人类基因组 DNA 样本, 研究结果表明, 与基因测序比较, 本产品的临床灵敏度为 100%、临床特异性为 100%、阳性预测值为 100%、阴性预测值为 100%、约登指数为 1。

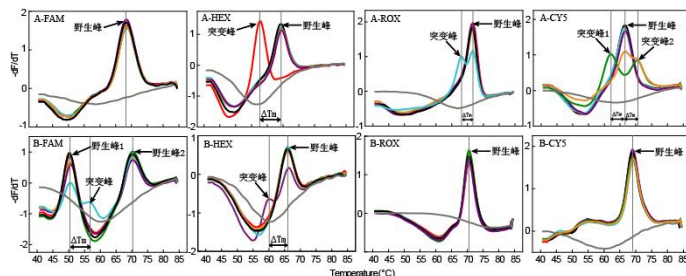
【注意事项】

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。试剂盒中各试剂充分融化后请短暂离心。反应液分装时应尽量避免产生气泡。PCR 反应管经瞬时离心后, 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。
4. PCR 反应混合液应避光保存, 每次试验应设置阴性和野生型对照。
5. 不同 DNA 提取试剂盒溶解 DNA 可能使用不同的缓冲液, 为减小 T_m 值的波动, 请改用本试剂盒中的 DNA 溶解液作为样本 DNA 的溶解液, 若不能更改样本 DNA 的溶解液, 请用本试剂盒中的 DNA 溶解液对样本进行适度稀释(例如稀释 10 倍)。
6. 检测女性样本时, 若多种突变同时发生, 则本试剂盒无法区分这些突变为顺式或为反式, 需要用其它可检测单倍型的方法确认。
7. 不同批号的试剂请勿混用, 请在有效期内使用试剂盒。
8. 尽量避免反复冻融, 如果需要多次使用, 请在第一次融解后将制品分装冻存, 再根据需要取用。

图 1 典型的样本检测结果。其中 A-FAM、A-HEX、A-ROX 和 A-Cy5 为体系 A 检测结果; B-FAM、B-HEX、B-ROX 和 B-Cy5 为体系 B 检测结果。



【生产企业】

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: 400-661-8810; 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 号楼及 11 号楼 3 层 A 区

【医疗器械生产企业许可证编号】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 20153400623

【说明书核准及修改日】2020 年 07 月 27 日

附表 1 本试剂盒可以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.)	反应体系 A [$\Delta T_m = T_m(\text{野生}) - T_m(\text{突变})$]				反应体系 B [$\Delta T_m = T_m(\text{野生}) - T_m(\text{突变})$]				
	FAM	HEX	ROX	Cy5	FAM-1 ^c	FAM-2 ^d	HEX	ROX	Cy5
1360C>T	5.3±0.79	-	-	-	-	-	-	-	-
1376G>T	-	-	-	-3.9±0.90	-	-	-	-	-
1388G>A	-	-	-	3.7±0.91	-	-	-	-	-
871G>A	-	7.1±0.80	-	-	-	-	-	-	-
1004C>A	-	-	-3.2±0.83	-	-	-	-	-	-
1024C>T	-	-	3.4±0.83	-	-	-	-	-	-
95A>G	-	-	-	-	-6.1±0.88	-	-	-	-
383T>C	-	-	-	-	-	5.2±0.85	-	-	-
392G>T	-	-	-	-	-	7.5±0.71	-	-	-
487G>A	-	-	-	-	-	-	6.0±0.80	-	-
592C>T	-	-	-	-	-	-	-	-	6.0±0.89
517T>C	-	-	-	-	-	-	-	3.3±0.80	-

注: ^a表中“-”指检测样本熔解峰与对应野生型熔解峰 T_m 差异的在 $\pm 1^\circ\text{C}$ 之内。 ^b表中黑体字为野生型与对应通道突变型 $\Delta T_m \pm 3\text{SD}$, 由多次试验得到的统计结果。

^c ΔT_m 值由 $T_m(\text{野生峰 1}) - T_m(\text{突变峰})$ 得到。 ^d ΔT_m 值由 $T_m(\text{野生峰 2}) - T_m(\text{突变峰})$ 得到。