

缺失型α-地中海贫血基因检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）说明书

【产品名称】

通用名称：缺失型α-地中海贫血基因检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）

【包装规格】

48 测试/盒

【预期用途】

本产品适用于体外定性检测人外周静脉血样本基因组 DNA 中α-珠蛋白基因上 3 种中国人群中常见的缺失型α-地中海贫血杂合型缺失类型，分别为东南亚缺失型（--SEA/）、左侧缺失型（-α^{4.2}/）和右侧缺失型（-α^{3.7}/）。

缺失型α-地中海贫血是人类最常见的常染色体隐性遗传病之一，其病因是由于α-珠蛋白基因大片缺失所致。α-珠蛋白基因位于 16 号染色体上，每条 16 号染色体均包括 1 拷贝α2-珠蛋白基因和 1 拷贝α1-珠蛋白基因。上述 3 种类型中，东南亚缺失型同时缺失了α2-珠蛋白基因和α1-珠蛋白基因，缺失长度约为 20 kb；左侧缺失型缺失了整个α2-珠蛋白基因，但保持α1-珠蛋白基因完整，缺失长度约为 4.2kb；右侧缺失型缺失了α2-珠蛋白基因的 3'端和α1-珠蛋白基因的 5'端，形成由α2-珠蛋白基因 5'端和α1-珠蛋白基因 3'端构成的融合基因，缺失片段约为 3.7 kb。

【检验原理】

本产品采用荧光 PCR 熔解曲线法，首先引物扩增人α-珠蛋白基因和内参基因，再通过对荧光标记探针与 PCR 产物形成的双链杂交体进行熔解曲线分析来判断样本的α-珠蛋白基因是否存在片段缺失及相应的缺失类型。

【主要组成成分】

组分名称	主要成分	数量	规格
缺失型α-地贫 PCR 反应液 A	引物、探针、脱氧核糖核 苷三磷酸（dNTP/dUTP 混合液）	1 支	970 μL
缺失型α-地贫 PCR 反应液 B	引物、探针、脱氧核糖核 苷三磷酸（dNTP/dUTP 混合液）	1 支	970 μL
缺失型α-地贫酶混合液	耐热 DNA 聚合酶（Taq 酶）、尿嘧啶 DNA 糖基化 酶（UNG 酶）	1 支	60 μL
缺失型α-地贫野生型对照	含四个野生型扩增靶基 因的质粒	1 支	50 μL
缺失型α-地贫阴性对照	三羟甲基氨基甲烷、乙二 胺四乙酸二钠（Tris、 EDTA•2H ₂ O 钠）	1 支	50 μL
DNA 溶解液	三羟甲基氨基甲烷、乙二 胺四乙酸二钠（Tris、 EDTA•2H ₂ O 钠）	1 瓶	14 mL

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 6 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。生产日期及失效日期见包装标签。

【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外周静脉血样本，样本使用 EDTA 抗凝。基因组 DNA 浓度范围 2~200 ng/μL。

【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×19.4 μL 缺失型α-地贫 PCR 反应液 A（n 根据反应管数确定）和 n×0.6 μL 缺失型α-地贫酶混合液加入到 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×19.4 μL 缺失型α-地贫 PCR 反应液 B（n 根据反应管数确定）和 n×0.6 μL 缺失型α-地贫酶混合液加入到 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）。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：缺失型α-地贫 PCR 反应液分别以每管 20 μL 分装于 PCR 薄壁反应管中。
- ③ 将配制好的 PCR 反应管转移至提取间，贮存于-18℃ 以下直至样本提取结束。

2. 样本提取及加样——提取区

- ① 用厦门致善生物科技股份有限公司 Lab-Aid 820 核酸提取 Mini 试剂（备案号：闽厦械备 20150011 号）提取人外周静脉血样本中的基因组 DNA，并采用本试剂盒提供的 DNA 溶解液溶解 DNA。
- ② 用紫外分光光度计测定提取的基因组 DNA 的浓度和纯度，DNA 样本的 OD_{260nm}/OD_{280nm} 应在 1.6~2.0 范围之间，且 OD_{260nm}/OD_{230nm}≥2.0 [若 OD_{260nm}/OD_{230nm}<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），但需保证样本浓度大于 2 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（≥2 ng/μL）或阴性/野生型对照，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

本试剂盒反应体系设为 25 μL，PCR 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 反应程序设定如下：

程序名称	阶段	条件	循环数
PCR 反应程序	UNG 酶处理	50℃ 2 分钟	1
	预变性	95℃ 10 分钟	1
	降落循环程序	95℃ 30 秒	10
		70℃ 30 秒（每个循环下降 1℃）	
		76℃ 45 秒	
	PCR 循环程序	95℃ 30 秒	50
		60℃ 30 秒（可设置在此阶段采集荧光）	
76℃ 45 秒			
熔解曲线分析程序	95℃ 1 分钟	1	
	35℃ 3 分钟		
	40℃~85℃，设置在此阶段每 0.4℃ 采集 FAM 和 ROX 通道荧光信号		

- 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。

【阳性判断值】

野生型对照在各通道中的熔解峰的 T_m 值范围如下：

反应体系 A：FAM 通道 $60.2^{\circ}\text{C}\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ ； ROX 通道 $68.1^{\circ}\text{C}\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 。

反应体系 B：FAM 通道 $64.9^{\circ}\text{C}\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ ； ROX 通道 $63.0^{\circ}\text{C}\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 。

本说明书中各 T_m 值是在特定 SLAN96 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】

本产品检测一个样本包括两个 PCR 反应体系和四个检测通道（每个反应体系两个检测通道），即每个样本需要查看四个通道的熔解峰情况综合判断样本的基因型，其中：反应体系 A 中的 FAM 通道（A-FAM）检测内参基因（人基因组上的一个保守基因），在正常检测中均有稳定的内控熔解峰（内控峰）；反应体系 A 中的 ROX 通道（A-ROX）检测右侧缺失型（ $-\alpha^{3.7}/$ ），野生型峰与缺失型峰的熔点差异（ ΔT_m ）为 7.11 ± 0.67 ；反应体系 B 中的 FAM 通道（B-FAM）检测东南亚缺失型（ $-\text{SEA}/$ ），野生型峰与缺失型峰的熔点差异（ ΔT_m ）为 8.87 ± 0.86 ；反应体系 B 中的 ROX 通道（B-ROX）检测左侧缺失型（ $-\alpha^{4.2}/$ ），野生型峰与缺失型峰的熔点差异（ ΔT_m ）为 -4.62 ± 0.51 。各种基因型在各体系各通道的熔解峰情况见表 1，典型的检测结果见图 1。

表 1 缺失型 α -地中海贫血基因检测试剂盒结果判读标准

样本类型	基因型	检测通道			
		A-FAM	A-ROX	B-FAM	B-ROX
正常	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	内控峰	W	W	W
	$\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$	内控峰	W+M	W	W
杂合缺失型	$\alpha\alpha/-\alpha^{4.2}$	内控峰	W	W	W+M
	$-\text{SEA}/\alpha\alpha$	内控峰	W	W+M	W
复合杂合缺失型	$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$	内控峰	M	W	W+M
	$-\text{SEA}/-\alpha^{3.7}$	内控峰	M	W+M	W
	$-\text{SEA}/-\alpha^{4.2}$	内控峰	/	W+M	M

注：W 代表野生型峰，M 代表缺失型峰，“/”指检测样本在对应通道无熔解峰。

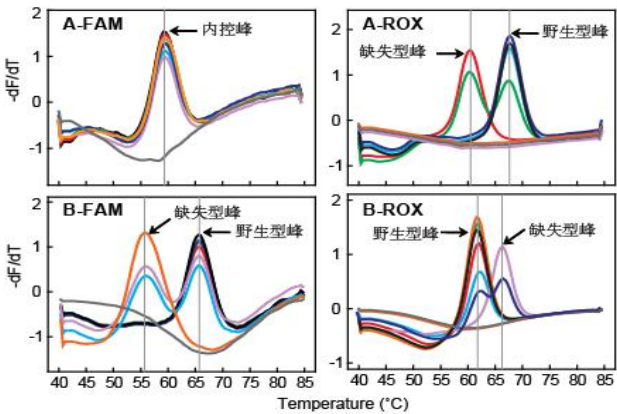


图 1 缺失型 α -地中海贫血基因检测试剂盒样本检测的典型结果。

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。

【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，故可能检测到表 1 所列缺失类型之外的突变，这类样本需要用其它方法进一步验证。
2. 虽然本产品设计时已经尽量避免引物和探针结合区域的多态性，但是鉴于人类基因的复杂性，仍有可能个别发生未知多态性的情况，故若检测样本出现上述判读表 1 情况之外的结果，请用别的方法进一步验证或咨询厂家售后。

【产品性能指标】

1. 本试剂盒可对 3 种中国人群常见的缺失型 α -地中海贫血相关缺失类型进行定性检测。详见“预期用途”。
2. 对企业参考品进行检测：阴性参考品和阳性参考品符合率均为 100%；最低检出限浓度相应参考品可检出，且为相应基因型别；重复性参考品全部可检出且为相应的基因型别。
3. 试剂盒检测杂合缺失型样本的最低检出限为 $2\text{ng}/\mu\text{L}$ ，检测复合杂合缺失型样本的最低检出限为 600 拷贝/ μL 。
4. 分析特异性：1）交叉反应：对可能产生交叉反应的其他常见地中海贫血缺失及突变型（包括： $-\text{THAI}$ 、 α^{QS} 、 α^{CS} 和 α^{WS} ）进行检测，结果在各个通道均为野生峰；2）干扰物质：样本中常见的干扰物质，包括：总胆固醇（ $2.18\text{ mmol/L}\sim 9.13\text{ mmol/L}$ ）、甘油三酯（ $0.40\text{ mmol/L}\sim 6.78\text{ mmol/L}$ ）及血红蛋白（ $94\text{ g/L}\sim 196\text{ g/L}$ ）对检测结果均无影响。
5. 本产品临床试验共验证 1156 例人基因组 DNA 样本，结果表明，对比 GAP-PCR 方法，本产品的临床灵敏度为 100%、临床特异性为 100%、总符合率为 100%。

【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，上机前应避免振荡，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，请改用本试剂盒的 DNA 溶解液作为样本 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. 不同批号的试剂请勿混用，请在有效期内使用试剂盒。
7. 尽量避免试剂反复冻融，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。

【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：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、4 层

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 20173403211

【说明书核准日期及修改日期】：2022 年 12 月 7 日

仅供存档