

人 CYP2C9 和 VKORC1 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：人 CYP2C9 和 VKORC1 基因检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）

【包装规格】

6 人份/盒、48 人份/盒。

【预期用途】

本产品用于体外定性检测人全血样本中 CYP2C9 基因 c.430 C>T 位点（CYP2C9*2）、CYP2C9 基因 c.1075 A>C 位点（CYP2C9*3）和 VKORC1 基因 c.-1639 G>A 位点三个位点的基因多态性。

本试剂盒检测结果仅供临床参考，不应作为患者用药的唯一依据，临床医生应结合患者病情、疗效及其他实验室检测指标对本产品的检测结果进行综合判断。

细胞色素 P450 超家族（Cytochrome P450 proteins, CYP）是一类主要位于

肝脏、肠道中的单加氧酶，可催化多种内外源物质的代谢，是人体内代谢药物的主要酶^[1]。CYP2C9（Cytochrome P450 2C9）是 CYP450 第二亚家族的重要成员，能羟化代谢许多不同性质的药物，如抗凝血药^[2]、抗高血压药^[3]、抗糖尿病药^[4]等。研究表明中国人群 CYP2C9 常见的基因突变形式为 CYP2C9*2 和 CYP2C9*3，其编码的酶活性分别比野生型 CYP2C9*1 降低了 30%和 80%^[5]。

维生素 K 环氧化物还原酶复合体亚基 1（VKORC1）通过将维生素 K 环氧化物（KO）还原为还原型维生素 K（KH₂），参与体内维生素 K 的循环。报道显示 VKORC1 是抗凝药物华法林的作用靶点，位于该基因启动子区（-1639 G>A）的单核苷酸突变可影响 VKORC1 的表达，是导致抗凝药物用药剂量个体差异的主要原因之一^[6]。

本试剂盒预期人群为正在服用华法林或将要服用华法林需长期抗凝的患者，包括静脉血栓患者，心脏瓣膜疾病患者的血栓预防，肺栓塞患者，曾有血栓栓塞疾病的患者，房颤患者的血栓预防等。本产品尚未与具体药物联合进行临床试验，仅针对靶基因突变的检测性能进行临床验证。

【检验原理】

本试剂盒采用荧光 PCR 熔解曲线法，采用特异性引物扩增目的基因，再利用荧光标记探针与 PCR 产物形成的双链杂交体，根据双链杂交体的熔点不同，经过熔解曲线分析，来判断目的基因是否存在突变及相应的突变类型。

【主要组成成分】

主要组成成分见表 1。

表 1 试剂盒主要组成成分

试剂盒组成	规格（管）		主要成分
	6 人份/盒	48 人份/盒	
PCR 混合液	105μL	840μL	脱氧核糖核苷三磷酸（dNTPs）、缓冲液（含 Tris-HCL、(NH ₄) ₂ SO ₄ 、MgSO ₄ ）、引物和探针
DNA 聚合酶	3μL	24μL	DNA 聚合酶（Taq 酶）
野生型对照	25μL	25μL	CYP2C9 430CC、CYP2C9 1075AA 和 VKORC1 -1639GG 的混合质粒
突变型对照	25μL	25μL	CYP2C9 430TT、CYP2C9 1075CC 和 VKORC1 -1639AA 的混合质粒

注：不同批号组分之间不能互换。

需要但未提供的材料：

- 1) 空白对照品可采用灭菌注射用水，请用户自备。
- 2) 核酸提取或纯化试剂（型号：离心柱法 BSPC-D-M 型）【备案号：粤穗械备 20170053 号】或核酸提取或纯化试剂（型号：磁珠法 DR-4801-KZ 型）

【备案号：粤潮械备 20210003】

【储存条件及有效期】

-15℃以下保存，有效期 12 个月。

避免反复冻融，冻融次数不超过 6 次。

采用冰袋加干冰包装运输，运输时间不超过 100 个小时，运输温度范围为

-75℃~0℃

生产日期：见标签。

有效期至：见标签。

【适用仪器】

荧光 PCR 仪：上海宏石 SLAN-96S；Roche LightCycler 480 II。

【样本要求】

本试剂盒适用于人全血（K₂EDTA 抗凝）样本的检测。检测前需提取样本中人类基因组 DNA，具体方法及要求参见检验方法中样本准备。建议全血样本采集后若未能立即提取，可于 2~8℃ 保存并在 7 天内完成提取；如无法在 7 天内完成提取，可将样本于 -20±5℃ 或 -70±5℃ 保存，并在 6 个月内完成提取。样本冻融次数应不超过 5 次。样本运输遵循于 2013-06-01 实施的《血液运输要求 WS/T 400-2012》要求进行低温运输。

【检验方法】

一、样本准备（标本制备区）

1. 使用广州凯普医药科技有限公司的核酸提取或纯化试剂（型号：离心柱法 BSPC-D-M 型）【产品备案号：粤穗械备 20170053 号】或潮州凯普生物化学有限公司的核酸提取或纯化试剂（型号：磁珠法 DR-4801-KZ 型）【产品备案号：粤潮械备 20210003】提取样本 DNA。空白对照需参与提取。

2. 取 2μL 抽提好的 DNA 样本作为模板进行 PCR 扩增；剩余 DNA 样品存储于 -20±5℃ 或 -70±5℃ 备用，冻融次数不超过 5 次，保存时间不超过 6 个月。

二、扩增试剂准备（试剂准备区）

1. 从试剂盒中取出 PCR 混合液，室温下避光解冻，上下颠倒混匀后，8000 转/分钟离心 10 秒。从试剂盒中取出 DNA 聚合酶，8000 转/分钟离心 10 秒。然后按照表 2 配制扩增试剂：

表 2 扩增试剂的制备

组份	PCR 混合液	DNA 聚合酶
1 人份用量	17.5μL	0.5μL
10 人份用量	175μL	5μL

2. 将配制好的扩增试剂充分混匀，8000 转/分钟离心 1 分钟，向设定的 n 个 PCR 反应管，分别加入 18μL 配制好的扩增试剂，转移到样品处理区。

三、加样（标本制备区）

1. 在对应的 PCR 反应管中分别加入 2μL 处理好的样本 DNA、野生型对照、

突变型对照、空白对照，盖紧管盖，稍做离心。（反应总体积为 20μL/人份）

2. 转移到检测区，放入相应的荧光 PCR 检测仪内，记录样本摆放顺序。

四、PCR 扩增与熔解曲线分析（扩增区）

扩增与熔解曲线分析步骤程序设定见表 3，荧光信号采集通道为 FAM 通道，ROX 通道和 CY5 通道。上海宏石 SLAN-96S 的检测模式为标准熔解曲线，Roche LightCycler 480 II 的检测模式为 Mono Color Hydrolysis Probe/UPL Probe。

表 3 扩增程序的设定

程序	循环数	温度	时间	采样模式
1	1	95℃	10 min	无
2	45	95℃	15 sec	无
		56℃	20 sec	采集荧光
		72℃	20 sec	无
3	1	95℃	1 min	无
4	1	40℃	3 min	无
Melt curve	1	40℃→80℃	Continuous	0.05℃/ sec 连续采集荧光

【阳性判断值】

本试剂盒是定性检测试剂，不能用于定量检测。本说明书中各 T_m 值是在上海宏石 SLAN-96S 仪器上所得的常见值作为参考值，见表 4。当使用 Roche LightCycler 480 II 时， T_m 值可能略有变动，以当次试验野生型对照和突变型对照的 T_m 值为准。

当仪器给出一个以上 T_m 值时，请参考相应位点的野生型对照、突变型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。

表4 T_m 参考值

通道	检测项	T_m 参考值(°C)
FAM	CYP2C9 c.1075 A>C	突变型对照熔解峰 T_m : 47.5±1.5
		野生型对照熔解峰 T_m : 55.5±1.5
ROX	VKORC1 c.-1639 G>A	突变型对照熔解峰 T_m : 63±1.5
		野生型对照熔解峰 T_m : 71±1.5
Cy5	CYP2C9 c.430 C>T	突变型对照熔解峰 T_m : 51±1.5
		野生型对照熔解峰 T_m : 61±1.5

【检验结果的解释】

1.野生型对照 3 个检测位点（CYP2C9 c.430 C>T、CYP2C9 c.1075 A>C、VKORC1 c.-1639 G>A）的熔解峰为单峰且 T_m 值符合表 4 所示的相应 T_m 参考值范围；突变型对照 3 个检测位点（CYP2C9 c.430 C>T、CYP2C9 c.1075 A>C、VKORC1 c.-1639 G>A）的熔解峰为单峰且 T_m 值符合表 4 所示的相应 T_m 参考值范围。空白对照无熔解峰。

2.当野生型对照和突变型对照的熔解峰 T_m 值符合表 4 所示的 T_m 值范围，即可对待测样本进行分析：

(1) 若样本的检测位点有熔解峰，各检测位点判读如下：

样本熔解峰类型	$ \Delta T_m $ 类型	结果判读
左单峰	$ \text{样本熔解峰} - \text{突变型对照熔解峰} \leq 1.5$	纯合突变型
	$ \text{样本熔解峰} - \text{突变型对照熔解峰} > 1.5$	重新检测*
右单峰	$ \text{样本熔解峰} - \text{野生型对照熔解峰} \leq 1.5$	野生型
	$ \text{样本熔解峰} - \text{野生型对照熔解峰} > 1.5$	重新检测*
双峰	$ \text{样本熔解峰} - \text{突变型对照熔解峰} \leq 1.5$ 且 $ \text{样本熔解峰} - \text{野生型对照熔解峰} \leq 1.5$	杂合突变型
	$ \text{样本熔解峰} - \text{对应的对照熔解峰} > 1.5$	重新检测*

注：“*”表示 $|\Delta T_m| > 1.5^\circ\text{C}$ 时，重新对该样本 DNA 进行检测，若再次检测的 $|\Delta T_m|$ 仍大于 1.5℃，则重新提取 DNA 进行检测。

(2) 若检测结果无熔解峰，该样本需重新检测，必要时重新提取 DNA 进行检测。

本试剂盒检测结果分析参照表 5，检测基因扩增熔解曲线结果见图 1。

表 5 结果分析

通道	检测项	突变型 熔解峰	野生型 熔解峰	结果
FAM	CYP2C9 c.1075A>C	+	-	纯合突变型(CC)
		-	+	野生型(AA)
		+	+	杂合突变型(AC)
ROX	VKORC1 c.-1639 G>A	+	-	纯合突变型(AA)
		-	+	野生型(GG)

通道	检测项	突变型 熔解峰	野生型 熔解峰	结果
		+	+	杂合突变型(GA)
CY5	CYP2C9 c.430 C>T	+	-	纯合突变型(TT)
		-	+	野生型(CC)
		+	+	杂合突变型(CT)

注：“+”表示有熔解峰，“-”表示无熔解峰。

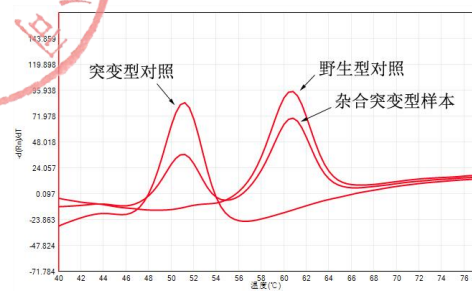
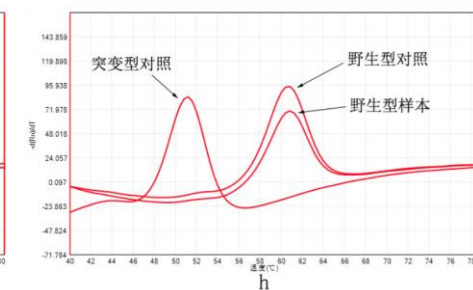
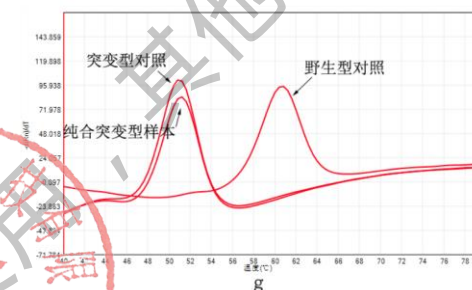
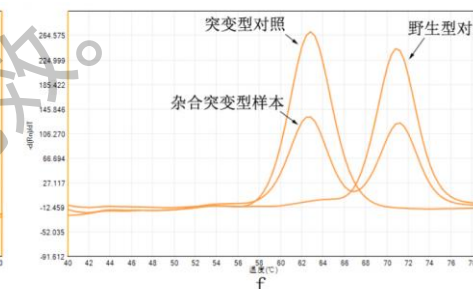
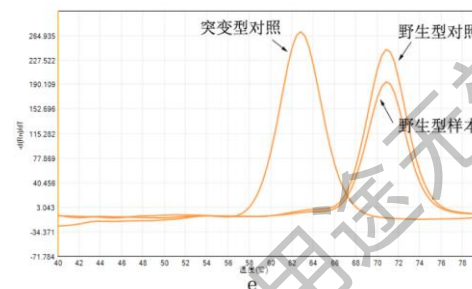
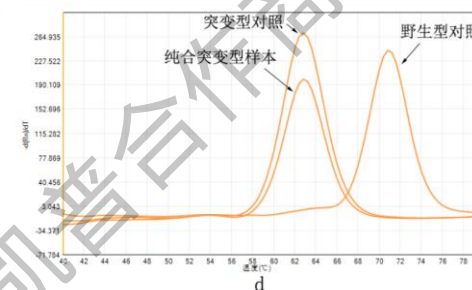
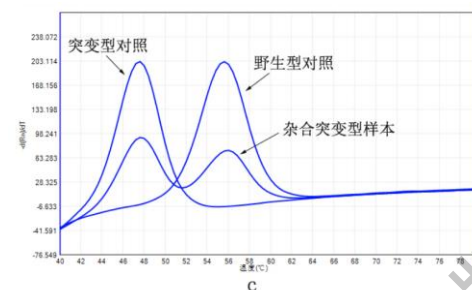
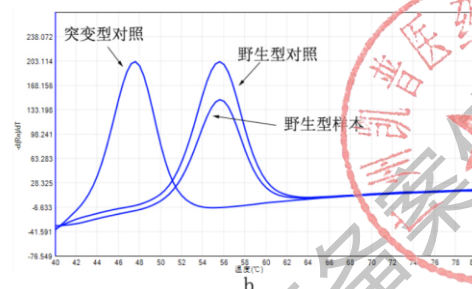
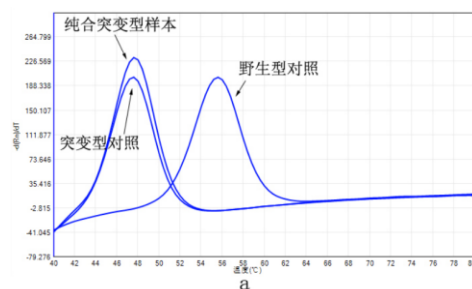


图1 本试剂盒样本检测结果图示

注：a、b、c对应CYP2C9 c.1075A>C位点检测结果（FAM通道）；d、e、f对应VKORC1 c.-1639 G>A位点检测结果（ROX通道）；g、h、i对应CYP2C9 c.430 C>T位点检测结果（CY5通道）

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒检测结果用于辅助指导临床治疗药物的选择，仅供临床参考不得作为临床诊治的唯一依据。
2. 本试剂盒所设计引物探针序列区域若存在其他基因变异，可能导致检测结果异常。

【产品性能指标】

1. 准确性：检测试剂盒检测范围内准确性参考品，检测结果符合相应的基因型别。
2. 特异性：检测试剂盒检测范围外的特异性参考品，检测结果为相应基因型别；检测非人类基因组的特异性参考品，检测结果为未检出相应基因型别。检测试剂盒检测范围内的含干扰性物质的参考品，结果应符合相应的基因型别。
3. 检测限：检测检测限参考品（浓度5ng/μL），检测结果符合相应的基因型别。
4. 重复性：检测重复性参考品10次，结果一致且均为对应基因型别。
5. 干扰物验证：高血脂样本中甘油三酯含量在6.70mmol/L之内，黄疸样本中胆红素含量在450μmol/L之内，溶血样本中血红蛋白含量在109g/L之内以及高白蛋白（500mg/mL）样本对检测结果没有干扰。外源性干扰物质阿司匹林（50 μg/mL）、华法林（3 μg/L）、格列齐特（5mg/mL），

厄贝沙坦（5mg/mL）对样本检测结果无干扰。

6. 临床试验总结：在三家临床单位完成1105个样本，与已批准上市的同类试剂相比，总一致率100.00%，杂合突变一致率100.00%，纯合突变一致率100.00%，突变一致率（阳性一致率）为100.00%，野生型一致率（阴性一致率）为100.00%。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅适用于体外诊断检测。
2. 避免反复冻融，如需多次使用，请在第一次融解后分装冻存。
3. 请严格按照相关主管部门颁布的基因扩增实验室管理规范执行。
4. 实验请严格分区操作，各区物品不得交叉使用，每个区使用专用的仪器和设备。PCR试剂盒不应存放于标本制备区。
5. 试剂盒内各组分在使用前要充分溶解混匀后稍做离心。
6. 加样时应使样本加入反应液中，不应有样本黏附在管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。推荐在制备反应试剂和添加DNA模板时，使用单独、专用的移液枪和滤芯枪头。
7. 扩增完毕后取出反应管，请勿打开反应盖，并丢弃于指定的袋子中。
8. 本试剂盒不适用使用肝素锂作为抗凝剂的血液样本。

【参考文献】

1. Mangold U, Eichel J, Batschauer A, et al. Gene and cDNA for plant cytochrome P450 proteins (CYP72 family) from *Catharanthus roseus*, and transgenic expression of the gene and a cDNA in tobacco and *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Science*, 1994, 96(94):129–136.
2. Schwarz U I . Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C9 gene[J]. *European Journal of Clinical Investigation*, 2003, 33 Suppl 2(Suppl 2):23-30.
3. Bonnabry P , Leemann T , Dayer P . Role of human liver microsomal CYP2C9 in the biotransformation of lornoxicam[J]. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 1996, 49(4):305-308.
4. Kanamitsu S I, Ito K, Okuda H, et al. Prediction of in vivo drug-drug interactions based on mechanism-based inhibition from in vitro data: inhibition of 5-fluorouracil metabolism by (E)-5-(2-Bromovinyl)uracil[J]. *Drug Metabolism & Disposition*, 2000, 28(4):467-474.
5. 司大勇. CYP2C 亚家族药物代谢酶基因多态性及功能研究[D]. 吉林大学, 2008.
6. Yuan, H.-Y. A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity[J]. *Human Molecular Genetics*, 2005, 14(13):1745-1751.

【基本信息】

注册人：广州凯普医药科技有限公司

住所：广州市黄埔区九龙镇中新知识城凤凰三横路71号2号试剂车间四楼

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

生产地址：广东省广州市黄埔区九龙镇中新知识城凤凰三横路71号生产实验楼3层、6层A区，2号试剂车间1至4层，仓库1层A区、2层B区、3层B区

生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准日期及修改日期】