

【产品名称】

通用名称：β-地中海贫血基因分型检测试剂盒（PCR-反向点杂交法）

【包装规格】

10 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒适用于体外定性检测全血样本中的β-珠蛋白基因 24 种突变。

β 地中海贫血（简称β 地贫）是我国南方常见的血红蛋白遗传病。本试剂盒能够检测中国人群发现的二十四种β 珠蛋白基因突变，其中包括 10 种常见的突变和 14 种少见的突变，此二十四种突变中特别包含有少数民族人群发现的突变。本试剂盒能用于β 地贫基因分型检测，适用于临床对β 地中海贫血的辅助诊断。

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β 珠蛋白基因中的 24 种基因突变的基因序列（包含了中国人常见的 99%以上的突变）设计特异性引物和探针，用生物素标记的引物进行靶片断扩增，扩增产物通过与包被在膜上的探针进行特异性杂交，通过洗膜，再通过酶结合上扩增产物上的标记物后催化底物显色、分析，可同时检测中国人群中所发现的 24 种基因突变。

【主要组成成分】

组分名称		规格	主要组成成分	数量
全血基因组 DNA 提取试剂	5×红细胞裂解液	3mL/瓶	NH ₄ Cl、KHCO ₃	1
	DNA 提取液 I	2.5mL/瓶	异硫氰酸胍、SiO ₂	1
	DNA 提取液 II	2.5mL/瓶	异硫氰酸胍	1
	DNA 洗涤液（浓缩液）	3.5mL/瓶	异丙醇	1
	DNA 溶解液	600 μL/管	Tris、EDTA	1
PCR 试剂	β-地贫 PCR 反应管(未贴标签管)	单管单人份	PCR buffer、引物、热启动 Taq 酶	10
	β-地贫阳性质控品	15 μL /管	β-地贫点突变 DNA	1
	β-地贫正常质控品	15 μL /管	β-地贫正常型 DNA	1
	阴性质控品	15 μL /管	灭菌纯化水	1
反向点杂交试剂	杂交液 I 浓缩液	50mL/瓶	SDS、SSC	1
	杂交液 II 浓缩液	30mL/瓶	SDS、SSC	1
	溶液 I	100 μL/管	POD	1
	溶液 II 浓缩液	50mL/瓶	柠檬酸钠	1
	溶液 III	2mL/管	TMB	2
	溶液 IV	100 μL/管	过氧化氢	1
	β-地贫杂交膜条	10 人份/袋	尼龙膜、探针	1

需自备的试剂：无水乙醇，灭菌纯化水

质控品说明：阳性质控品来源于临床收集的β 珠蛋白 CD41/42 杂合子血样提取的 DNA，正常质控品来源于临床收集的β 珠蛋白正常型血样提取的 DNA，阴性质控品为灭菌纯化水。

【储存条件及有效期】

全血基因组 DNA 提取试剂保存于室温；PCR 试剂保存于-20±5℃，反向点杂交试剂保存于 2-8℃，有效期为 9 个月。

避免反复冻融，反复冻融次数不超过 6 次；试剂开瓶后，在室温条件下放置时间不应超过 8 小时；试剂盒生产日期和有效期见产品标签。

【适用仪器】

电热恒温振荡水槽或自动杂交仪，ABI2720，9700 型 PCR 扩增仪。

【样本要求】

1. 标本采集：

全血：用一次性无菌注射器抽取受检者静脉血 2mL，注入含 EDTA 或枸橼酸钠抗凝剂的玻璃管，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。

2. 保存：标本可立即用于测试；在-20±5℃保存期为 6 个月；若要长期保存，需储存于-80±5℃；标本应避免反复冻融。

3. 运输：标本运送可以在 0℃左右条件下进行。

【检验方法】

一、全血基因组 DNA 提取

1. 实验前准备

1.1 在 5×红细胞裂解液瓶中加入 12mL 的灭菌纯化水稀释成 1×红细胞裂解液，并在管盖及管壁上打勾。

1.2 DNA 洗涤液（浓缩液）中加入 1.15mL 的无水乙醇，并在管盖及管壁上打勾。

注：若将 DNA 提取液 I 和 DNA 提取液 II 不恰当的置于低温环境时会有结晶体析出，需置于 37℃溶解混匀后再使用。

1.3 DNA 提取液 I 在取用前需充分振荡混匀，吸取 DNA 提取液 I 时应混悬，使下层颗粒能被充分吸取，若没吸取到颗粒状物将会影响提取得到的 DNA 质量。

1.4 将 DNA 溶解液置于干燥器 65℃预热。

2. 样本处理与核酸提取

2.1 取 1.5mL 灭菌离心管，加入 0.2mL 抗凝全血；

2.2 加入 0.2mL 1×红细胞裂解液，盖紧管盖，漩涡振荡 15 秒以充分混匀，后室温静置 3 分钟；

2.3 室温下 6000rpm 离心 5 分钟，弃上清，小心保留管底保留沉淀；

2.4 重复步骤 2.2~2.3 一次，尽可能吸净残存的上清液体；

2.5 充分振荡混匀 DNA 提取液 I 后，加入 200 μL 到以上沉淀中，充分混匀至细胞团块分散消失，室温静置 3 分钟，8000rpm 离心 40 秒，弃上清，小心保留管底沉淀；

2.6 加入 200 μL DNA 提取液 II 到沉淀中，充分混匀，8000rpm 离心 40 秒，弃上清，小心保留管底沉淀；

2.7 加入 200 μL DNA 洗涤液到沉淀中，充分混匀，8000rpm 离心 40 秒，弃上清，小心保留管底沉淀（重复一次）；

2.8 加入 200 μL 无水乙醇到沉淀中，充分混匀，8000rpm 离心 40 秒，弃上清，小心保留管底沉淀；

2.9 尽可能的吸去乙醇，打开管盖然后置于 65℃干燥约 10 分钟（以恰好干燥为宜）；

2.10 加 50 μL DNA 溶解液，充分混匀，65℃温育 3 分钟，8000rpm 离心 3 分钟，上清作为 PCR 反应模板进行 PCR 扩增或-20℃保存备用。

3. 阴阳性质控品处理

取装有阴性质控品和阳性质控品的离心管，6000rpm 离心 30 秒即可用于加样扩增。

二、PCR 扩增（在仪器上按照下列条件进行 PCR 循环程序的设置）

取 N 个 PCR 反应管(N=样品数+质控品数),编号后,在对应的 PCR 反应管中分别加入样品基因组 DNA (或质控品)2 μL，4000rpm 瞬时（10 秒）离心，按下述条件设置,进行 PCR 扩增：

50℃3 分钟，95℃预变性 15 分钟，然后按 94℃30 秒→68℃1 分钟 45 秒扩增，运行 45 个循环，最后 68℃延伸 10 分钟。

三、杂交操作

1 杂交前试剂配制

试剂名称	数量规格	配制方式	备注
杂交液 I 浓缩液	1 瓶（50mL）浓缩液	加 200mL 纯化水稀释	在低温出现结晶时需先预热再稀释
杂交液 II 浓缩液	1 瓶（30mL）浓缩液	加 120mL 纯化水稀释	在低温出现结晶时需先预热再稀释
溶液 II 浓缩液	1 瓶（50mL）浓缩液	加 200mL 纯化水稀释	在低温出现结晶时需先预热再稀释
溶液 IV	1 管（100 μL）	加 900 μL 纯化水稀释	

2 杂交

2.1 打开电热恒温振荡水槽，待温度稳定后用温度计校正摇床温度至 42℃。

2.2 取 N 个 15mL 离心管，插入离心管架；镊取 β-地贫点突变检测杂交膜条，并在膜条边缘编号；然后将每张膜条放入一支 15mL 离心管中，加入约 4mL 预热杂交液 I，备用。

2.3 将 PCR 产物加入对应编号的 5mL 离心管中，盖紧管盖；调整电热恒温振荡水槽低速转动（100~150 转/分），杂交过夜（4-18 小时）。

3 结合

3.1 按下表配制结合液（根据实际用量配制，现配现用）：

膜条数(张)	42℃的杂交液 II（mL）	溶液 I（μL）
1~3	20	10
4~5	30	15

注：以下操作按 5 人份量进行

3.2 弃杂交液 I,将膜条移入 50mL 离心管中,每 50mL 离心管中加入 30mL 结合液,放置于 42℃电热恒温振荡水槽中低速摇摆(100~150 转/分)，42℃反应 10 分钟，最多每管可同时结合 5 人份的膜条。

3.3 弃结合液，加入 35mL 预热至 42℃的杂交液 II（每管 20mL 杂交液 II，可洗 3 张膜条；每管 35mL 杂交液 II，可洗 5 张膜条，每管一次最多可洗 5 张膜条），42℃轻摇 10 分钟。

4 显色及扫描

4.1 按下表配制新鲜显色液（根据实际用量配制，现配现用；如出现配制后已经变蓝，请重新配制）：

膜条人份数	溶液 II（mL）	溶液 III（mL）	稀释后溶液 IV（μL）
1~3	20	1.0	10.0
4~5	30	1.5	15.0

4.2 弃杂交液 II，加入 35mL 溶液 II，在 20~25℃中轻摇 1 分钟。

4.3 弃溶液 II，加入 30mL 显色液，避光显色，在 20~25℃中轻摇 3~8 分钟。

★第一行出现 5 个及以上清晰斑点即可终止显色反应；若整体显色偏弱可适当延长显色时间 2~3 分钟！

4.4 显色反应结束后，立即弃显色液，加入 35mL 溶液 II，室温振荡 1~2 分钟。

4.5 弃溶液 II，加入 35mL 去离子水，轻摇 1~2 分钟。

4.6 取出膜条后用吸水纸吸去膜条表面水分，尽快在扫描仪上扫描膜条（若不能立即进行扫描，请冻存于-20±5℃）。

四、结果分析

参照达安膜条斑点识别分析系统（软著登字第：100565 号）操作说明书的要求，使用扫描仪扫描膜条，设定相应的参数并输出扫描结果，然后采用该软件进行数据分析，详见软件使用操作说明书。

五、质量控制

- 1. 所有样本显色反应控制点（CC）：信号值应≥cutoff 值，且为边缘清晰的蓝色圆点。
- 2. 阴性质控品杂交显色后仅显色控制点显阳性，其它位点显阴性。
- 3. 阳性质控品杂交显色后结果为 41-42M 杂合子。
- 4. 正常质控品杂交显色后结果为野生型。
- 5. 显色反应控制点：边缘清晰的蓝色圆点，则杂交过程正常。否则需要重新检查杂交过程。

在以上各项同时满足的条件下，本次检测实验有效，否则全部实验应重新进行。

【阳性判断值】

所有结果判断以软件计算的信号值为准。信号值反映的是斑点的积分光密度（IOD）。
显色控制点（CC）IOD≥cutoff 值为显色正常，当低于这个数值时将显示“ERROR”，原因是可能没有在正确的斑点区域选取，或者杂交过程出现异常。
CC 点和各型别位点 cutoff 参考值根据统计学方法计算得出，已预设的分析软件中。

【检验结果的解释】

1 膜条上的探针排列阵列如下表所示：

41-42/43N	-30/32N	-30/32N	71-72N	17N	β EN	654N	IVSI-1M	样品 编号
41-42M	-32M	-29M	71-72(+A)M	17M	β EM	654M	IVSI-5M	
43M	-30M	-28M	71-72(+T)M	Cap+1M	Cap+40-+43M	IntM	IVSII-5M	
41M(+T)	8M	8/9M	14/15M	27/28M	31M	37M	C. C	

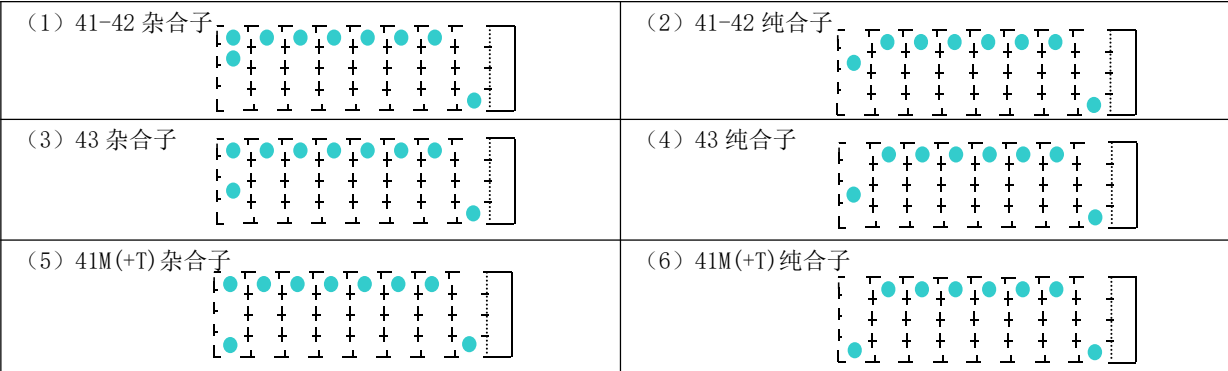
- 注：1. 41-42M=41-42(-TCTT/-TTCT/-CTTT)；2. 第 2、3 列的正常对照点均用-30/32N
- 2 结果判定：
- 2.1 阴性、阳性判定标准：各位点信号值的 cutoff 值已在软件中设置好，分析结束后软件自动生成信号值和相应的型别，其中“N”表示正常型位点，“M”表示突变型位点。
- 2.2 膜条阵列中各突变位点及其相对应的正常对照位点，列表如下：

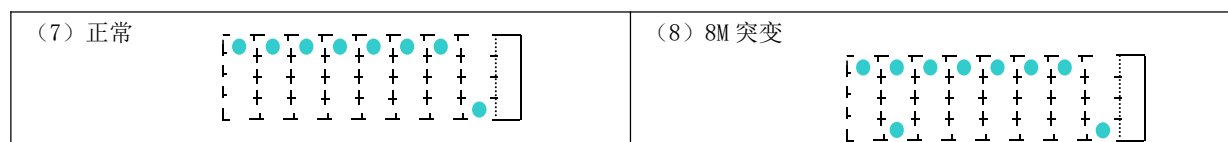
突变位点（M）	正常对照位点（N）
41-42M, 43M, 41M(+T)	41-42/43N
-32M, -30M, -29M, -28M	-30N/32N
71-72(+A)M, 71-72(+T)M	71-72N
17M	17N
β EM	β EN
654M	654N
8M、8/9M、14/15M、27/28M、31M、37M、Cap+1M、Cap+40-+43M、IntM、IVSI-1M、IVSI-5M 和 IVSII-5M	为少见突变类型，无正常对照探针，当该位点为阳性位点时，检测结果仅报告点突变，不能确定为纯合子还是杂合子。

2.3 检测结果举例如下表：

检测结果	报告内容（β-地贫点突变型）
41-42/43N, -30N/32N, 71-72N, 17N, β EN, 654N, 41-42M, CC 阳性见附图（1）	41-42 杂合子
-30N/32N, 71-72N, 17N, β EN, 654N, 41-42M, CC 阳性见附图（2）	41-42 纯合子
41-42/43N, -30N/32N, 71-72N, 17N, β EN, 654N, 43M, CC 阳性见附图（3）	43 杂合子
-30N/32N, 71-72N, 17N, β EN, 654N, 43M, CC 阳性见附图（4）	43 纯合子
41-42/43N, -30N/32N, 71-72N, 17N, β EN, 654N, 41M(+T), CC 阳性见附图（5）	41M(+T) 杂合子
-30N/32N, 71-72N, 17N, β EN, 654N, 41M(+T), CC 阳性见附图（6）	41M(+T) 纯合子
41-42/43N, -30N/32N, 71-72N, 17N, β EN, 654N, CC 阳性见附图（7）	正常
41-42/43N, -30N/32N, 71-72N, 17N, β EN, 654N, 8M, CC 阳性见附图（8）	8M 突变

- 2.4 检测结果阳性，表明该样本为相应的突变型。
- 2.5 不同突变位点同时阳性，代表所检测的样本存在双重或三重杂合子/纯合子。
- 2.6 若仅在野生型探针处（N）显示阳性，则表示待检样品没有上述 24 种突变。
- 2.7 附图





【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒不能检出除试剂盒设定的 24 种突变之外的其它点突变。
2. 样本因保存或运输不当造成基因组严重降解时可能无法检出。

【产品性能指标】

1. 最低检出量：本试剂对所检样本 DNA 浓度的最低检出量为 25ng/μL。
2. 交叉反应：本试剂盒中野生型与突变型探针之间无交叉反应。
3. 干扰物质：

内源性物质胆红素（浓度超过 20mg/mL）、甘油三酯（浓度超过 3000mg/dL）、血红蛋白（浓度超过 6g/dL）和白蛋白（浓度超过 1.0g/dL）及外源性物质得斯芬（Desferrioxamine）、奥贝安可（Deferiprone）、恩瑞格（Deferasirox）在本试剂盒的实验条件下，对检测结果无干扰。
4. 临床试验结果：本次研究共检测标本 1432 例，阳性符合率为 99.50%，阴性符合率为 99.37%，总符合率为 99.51%，Kappa 值为 0.990（P<0.001）。

【注意事项】

1. 本品仅用于体外诊断。
2. 实验前请仔细阅读本说明书；
3. 为了避免样本中任何潜在的生物危险，检测样品应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤和粘膜；样本的处理建议在可防止气雾外流的生物安全柜中操作，操作中使用的试管、吸头丢弃前需经灭菌处理。标本操作和处理均需符合相关法规要求：卫生部《微生物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. 实验人员必须进行专业培训，PCR 实验室应与杂交室分开。PCR 实验应分别在样品处理区，PCR 加样区，扩增区和杂交室分别进行，各区应相对分隔。人和实验用物品应从样品处理区 → PCR 加样区 → 扩增区 → 杂交室单向流动，PCR 试剂盒不可存放于杂交区。
5. 为试剂和标本准备阶段提供负压超净工作台，实验过程中请穿工作服，PCR 室和杂交室工作服应分开，戴一次性手套，使用自卸管移液器。
6. 对每次实验进行质量控制。
7. PCR 反应使用的 0.2mL 离心管、吸头等应高压灭菌并一次性使用；杂交操作时，仔细核对 DNA 扩增管与膜条的编号，使之相符。
8. 杂交全过程需避免用手接触膜条，并用镊子镊取膜条边角进行操作。避免划破膜条，并用铅笔在边角标记。
9. 本实验需在室温 20~30℃ 的环境下进行，若环境温度过低，实验结果可能不准确。
10. 杂交液 I、杂交液 II 中的 SDS 易结晶析出，浓缩液稀释前需温浴（40℃~50℃）使之溶解。
11. 如果显色反应控制点颜色显得较浅，可以适当延长显色时间 2~3 分钟。
12. 反应结束后，膜条进行扫描时务必先用吸水纸吸干表面水分，并且平整地放到扫描仪上。在图片预览时膜条上不出现水渍和褶皱现象，否则会影响信号分析结果的准确性。
13. 标本制备区所用过的吸头请打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃；
14. 实验完毕用 10%次氯酸或 70%酒精或紫外线灯处理工作台和移液器。
15. 达安图像分析软件适用于中山大学达安基因股份有限公司所有与膜条相关的产品，若用于分析其它公司的同类产品，不承担由此造成的后果。

【参考文献】

1. Xu XM, Zhou YQ, Luo GX, et al. J Clin Pathol. 2004, 57(5):517-22.
2. Rund D, Rachmilewitz E. N Engl J Med. 2005, 15;353(11):1135-46.
3. Pan HF, Long GF, Li Q, et al. Clin Genet. 2007, 71(5):419-26.

【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】

【说明书批准日期及修改日期】