

人类白细胞抗原 B5801 基因检测试剂盒（PCR-荧光染料法）说明书
（仅供科研使用）

- 【产品名称】
人类白细胞抗原 B5801 基因检测试剂盒（PCR-荧光染料法）
- 【包装规格】
6T/盒
- 【预期用途】

本产品用于体外定性检测人外周血基因组中 HLA-B5801 等位基因。

在降尿酸治疗的药物选择上，黄嘌呤氧化酶抑制剂（XOI）别嘌醇和非布司他同时被推荐为一线药物，但目前非布司他缺乏安全性数据。别嘌醇的剂量：美国风湿病学会痛风治疗指南建议为了减少开始降尿酸治疗后痛风复发，以及减少别嘌醇严重超敏反应综合征（AHS）的发生而针对性确定使用量。AHS 是影响别嘌醇用药的主要原因，在美国的发生率约在 1：1000，其中严重的 AHS 在 20%-25%，同时使用噻嗪类利尿剂和肾脏受累是 AHS 发生的危险因素，AHS 常常发生在开始治疗的前几个月，小剂量开始能减少其发生。由于 HLA-B5801 基因阳性患者发生严重 AHS 的风险明显增高，指南建议在别嘌醇开始治疗之前，对高危人群（汉人、泰国人、CKD3 期以上的韩国人）进行快速 PCR 筛查 HLA-B5801 基因。近年来，随着非布司他的普及应用，相关药敏反应研究的不断增多，各项研究中也指出在使用非布司他治疗之前亦需检测患者是否对别嘌醇存在过敏风险。目前常见的人类白细胞抗原 B5801 基因的检测方法有 HLA SBT 分型、RT-PCR 等。

【检验原理】

本产品根据英国 IMG/HLA 数据库公开的 HLA-B5801 的信息设计检测人类白细胞抗原 B5801 等位基因的特异性引物，结合荧光染料进行荧光定量 PCR 扩增，通过熔解曲线进行结果的判断。

在检测体系内加入内标基因的引物，对提取和检测过程进行监控。

PCR 检测使用尿苷酶（UDG）防污染体系，经加热可以选择性地降解 U-DNA，以防止先前 PCR 扩增产物的污染。

【主要组成成分】

表 1 试剂盒主要组成成分			
序号	产品组成	主要成分	规格及装量
1	HLA-B5801 PCR 反应液	Taq 酶、UDG 酶、Mg ²⁺ 、dNTP	75μL×1 管
2	HLA-B5801 引物混合液	引物混合液	51μL×1 管
3	HLA-B5801 阳性质控品	HLA-B5801 型基因组 DNA	32μL×1 管
4	HLA-B5801 阴性质控品 1	非 HLA-B5801 型基因组 DNA	32μL×1 管
5	HLA-B5801 阴性质控品 2	纯化水	500μL×1 管

注 1：试剂盒各组分均不得与其他产品或不同批号产品中的相应组成成分进行互换。

注 2：试剂盒不包含，但对试验必需的自备设备、试剂和耗材：荧光定量 PCR 仪、旋涡混合器、生物安全柜、移液器、干式恒温仪或水浴锅、高速离心机、PCR 反应管、1.5mL 离心管、无水乙醇、商品化核酸提取试剂盒。

【储存条件及有效期】

试剂盒生产日期、失效日期：见外包装盒。

-20℃±5℃避光保存，有效期 12 个月。

运输条件：不高于-15℃避光运输。

试剂开封后，-20℃±5℃保质期为 3 个月，反复冻融不得超过 3 次。

【适用仪器】

ABI7500 型荧光定量 PCR 仪、伯乐 CFX-96 型荧光定量 PCR 仪、罗氏 Cobas z 480 型荧光定量 PCR 仪。

- 【样本要求】
- 1. 样本类型：EDTA 抗凝外周血。
- 2. 样本采集：在受检者手臂弯曲处或手背处抽取静脉血 3-5mL，置于 EDTA 抗凝管（紫盖）内，轻轻颠倒混匀；
- 3. 样本保存：在 2-8℃保存不超过一周，-20℃±5℃保存不超过 6 个月。

【检验方法】

- 1. 样本准备
- 1.1 样本处理和核酸提取
- 本试剂盒不包含核酸提取成分，待测样本提取如采用商品化的自动核酸提取仪及其配套试剂，推荐使用台湾圆点奈米技术股份有限公司的全自动核酸提取仪（SLA-D14800，备案号：国械备 20151812 号，备案号：国械备 20140202 号），配套北京旌准医疗科技有限公司的核酸提取或纯化试剂（Blood DNA Extraction Kit）（备案号：京经械备 20190156），具体操作参见仪器和该试剂盒说明书；如采用手动提取，推荐使用天根生化科技(北京)有限公司核酸提取纯化试剂(血液基因组 DNA 提取试剂盒；体外诊断试剂备案号：京海械备 20150135)，具体操作参见该试剂盒说明书，并注意以下事项。
- 1) 提取 DNA 浓度需满足 OD260/OD280=1.6-2.3；
- 2) 推荐 DNA 上样量 60-150ng；
- 3) 提取完的 DNA 建议立即进行检测，否则请于-20℃±5℃保存。

- 1.2 质控品准备
- 将 HLA-B5801 阳性质控品、HLA-B5801 阴性质控品 1 和 HLA-B5801 阴性质控品 2 从试剂盒取出，室温融化，涡旋振荡 10s，快速离心 15s。HLA-B5801 阴性质控品 2 与待测样本一同进行 DNA 提取。

2. PCR 扩增

- 2.1 质控品设置
- 每次试验都应设置阴性质控品、阳性质控品。
- 2.2 PCR 反应体系配制
- 2.2.1 提前将试剂取出，室温融化，涡旋振荡 10s，快速离心 15s。
- 2.2.2 确定反应数 N，N=待检样本数(n)+质控品数(3)+1。计算见表 2。

表 2 体系配置	
试剂	用量(μL)
HLA-B5801 PCR 反应液	12.5×N
HLA-B5801 引物混合液	8.5×N
总计	21.0μL×N

- 2.2.3. 取 1 个离心管配制上述反应体系，试剂全部加入后涡旋振荡 15s，2000 rpm 离心 15s。
- 2.2.4. 将上述混合液按 21 μL/管分装至 PCR 反应管中。
- 2.3 加样：各取 4μL HLA-B5801 阳性质控品、HLA-B5801 阴性质控品 1、提取后的 HLA-B5801 阴性质控品 2 和待测样本 DNA 分别加入对应的 PCR 反应管中，盖紧管盖，瞬时离心 10s 将管壁上的液体全部甩至管底，如有气泡，轻弹、离心直至气泡去除，然后立即进行 PCR 反应。

表 3 推荐样本摆放位置						
名称	1	2	3	4	5	6
HLA- B5801	①	②	③	PC	NC1	NC2

注：①-③代表样本；PC 代表 HLA-B5801 阳性质控品，NC1 代表 HLA-B5801 阴性质控品 1，NC2 代表 HLA-B5801 阴性质控品 2。

2.4 PCR 扩增程序设置

2.4.1 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪

- 1) 面板设置：双击“7500 System Software”图标打开软件，单击“Advanced Set

- up”，进入“Experiment Properties”界面，选择“Quantitation-Standard Curve”和“SYBR®Green Reagents”。然后再单击“Plate Setup ”进入“Define Targets and Samples”编辑界面：在“Define Targets”对话框内，根据需要单击“Add New Target”可添加多个 Targets，将 Target name 改为相应编号名称，将“Reporter”改为“SYBR”，将“Quencher”改为“None”；在“Define Samples”对话框内，根据需要单击“Add New Sample”可添加多个 Samples，将 Target name 改为相应编号名称。然后再单击“Assign Targets and Samples”，将该界面中“Select the dye to use as the passive reference”一栏中的“ROX”改为“None”，然后在“View Plate Layout”界面选中试剂所放的孔位，确认与仪器相对应。在“Assign Target(s) to the selected wells”栏中，在对应的 Target 和 Sample 前划“√”，然后在“Task”栏内选择相应的样本类型：“U”（待测样本）、“S”（阳性对照）、“N”（阴性对照）。
- 2) 反应条件设置：单击“Run Method”进入反应条件设置面板，制定所需的扩增程序（见表 4），并在“Reaction Volume Per Well”内输入 25；点击“Add Stage”可以选择 Holding 或者 Cycling Holding 为只添加一个温度步骤，Cycling 为添加一个可循环的几个温度步骤。点击“Add Step”可在一个 Cycling Stage 中添加一个 step。选择“Before”或者“After”即可添加温度步骤，根据需要更改温度和时间；在“Number of Cycles”可以更改为相应的循环数。确认无误后，点击“Start”将结果保存，开始扩增检测。

表 4 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪反应程序			
过程	温度	时间	循环数
UDG 酶反应	37℃	10min	1
预变性	95℃	10min	1
变性	95℃	15s	35
退火	62℃	20s	
延伸，荧光信号收集	72℃	30s	
熔解曲线	95℃	15s	1
	60℃	1min	
	60℃~95℃	1%速率升温	
	95℃	30s	
仪器冷却	60℃	15s	1
	25℃	1min	

- 其他参数为默认设置。
- 2.4.2. Bio-Rad CFX-96 型荧光定量 PCR 仪
- 1) 面板设置：双击“Bio-Rad CFX Manager”图标打开软件，单击“PrimePCR”进入设置界面。单击“Plate”下的“Create New”对荧光收集通道的反应孔进行设置：在“Select Fluorophores”选择荧光收集通道“SYBR”；选中反应孔，单击“Sample Type”下拉菜单选择样本类型，如“Unknown”（待测样本）、“NTC”（无模板对照）等，在“SYBR”处打勾；根据实验需要可在“Target Name”中输入扩增基因名称，在“Sample Name”输入所选检测孔的样品名称，并打勾确认，设置结束后点击“OK”。
- 2) 反应条件设置：单击“Protocol”下的“Create New”进入设置界面，需编辑反应体系及扩增程序（见表 5），在图形或文本模式下可以直接对温度和保持时间进行编辑。单击“Insert Step”在程序中增加一个温度步骤，单击“Delete Step”在程序中删除选中步骤，单击“Add Plate Read To Step”，在程序中指定获取荧光数据的时间。点击“GOTO”步骤的重复次数，改变程序中的循环次数，点击“GOTO”步骤数可改变 GOTO 循环中所包含的步骤。设置完成后，单击“Start Run”后，选择文件保存的位置并编辑文件名后，即可进

行扩增检测。

表 5 Bio-Rad CFX-96 型荧光定量 PCR 仪反应程序			
过程	温度	时间	循环数
UDG 酶反应	37℃	10min	1
预变性	95℃	10min	1
变性	95℃	15s	35
退火	62℃	20s	
延伸，荧光信号收集	72℃	30s	
熔解曲线	95℃	5s	1
	65℃	5s	
	65℃~95℃	0.5℃/s 升温	
仪器冷却	25℃	1min	1

其他参数为默认设置。

2.4.3. 罗氏 Cobas z 480 型荧光定量 PCR 仪

- 1) 面板设置：在“User Defined Workflow”操作系统，双击“LightCycler®480 SW UDF 2.0.0”图标打开软件，输入用户名和密码登录后进入软件主界面，点击“New Experiment”进入程序设定界面。点击“Experiment”，在“Detection Format”下拉菜单选择“SYBR Green I /HRM Dye”。点击“Sample Editor”，在 Step1 中选择“Abs Quant”（绝对定量）；在 Step2 中选择对应的样本反应孔，在右侧编辑栏中分别对每个反应孔进行编辑：在“Sample Name”编辑样本名称，“Quantification Sample Type”选择样本类型“Unknown”（待测样本）、“Positive Control/Calibrator”（阳性对照）、“Negative Control”（阴性对照）。
- 2) 反应条件设置：点击“Experiment”，在“Reaction Volume”输入反应体系大小。按照所需 PCR 反应条件进行编辑（见表 6）：在“Program Name”添加反应步骤，并选择“Cycles”（循环数）和“Analysis Mode”；单击每个“Program”对各步骤的反应温度及时间进行编辑。在荧光信号采集阶段，Analysis Mode 下拉菜单中选择 Quantification，Acquisition Mode 下拉菜单中选择 Single。在熔解曲线阶段，Analysis Mode 下拉菜单中选择 Melting Curves，Acquisition Mode 下拉菜单中选择 Continuous。设置完成后，单击“Start Run”选择保存位置并编辑文件名称，即可进行扩增检测。

表 6 罗氏 Cobas z 480 型荧光定量 PCR 仪反应程序			
过程	温度	时间	循环数
UDG 酶反应	37℃	10min	1
预变性	95℃	10min	1
变性	95℃	15s	35
退火	62℃	20s	
延伸，荧光信号收集	72℃	30s	
熔解曲线	95℃	5s	1
	60℃	5s	
	95℃	20 acquisitions/℃	
	60℃	15s	
仪器冷却	25℃	1min	1

其他参数为默认设置。

3. 结果分析

反应结束后，使用 PCR 仪配套软件对本次试验结果进行分析。通过样品的熔解曲线及 Tm 值进行结果的判断。

3.1 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪

点击“Ananlysis”下的“Melt Curve”直接进入熔解温度及熔解曲线峰值的查看。

3.2 Bio-Rad CFX-96 型荧光定量 PCR 仪

在结果查看界面，点击“Melt Curve”进行熔解温度及熔解曲线峰值的查看；如出现熔解峰较低情况，可通过鼠标上下拖动阈值线以显示熔解温度。

3.3 罗氏 Cobas z 480 型荧光定量 PCR 仪

点击左侧“Analysis”模块，在 Creat new analysis 下拉框中选择分析的类型“Tm Calling”，出现对话框，点击右下角“√”按钮，进入 Tm 分析窗口；确定波峰数目“Max Peaks (2 or less)”，选择检测模式“SYBR Green I Format”；点选“Calculate”即可得到每个样品之 Tm 值和进行熔解曲线峰值的查看。

4. 质量控制

每次试验应设置阴性质控品和阳性质控品，且应符合以下要求，否则试验结果不成立。

4.1 HLA-B5801 阳性质控品：在 88℃±2℃出现 HLA-B5801 靶基因熔解峰，在 83.5℃±2℃无内标峰或有内标峰但峰高低于靶基因熔解峰。

4.2 HLA-B5801 阴性质控品 1：在 83.5℃±2℃出现内标熔解峰，在 88℃±2℃无靶标熔解峰。

4.3 HLA-B5801 阴性质控品 2：在 83.5℃±2℃无内标熔解峰并在 88℃±2℃无靶标熔解峰。

4.4 待测样本：在 83.5℃±2℃出现内标熔解峰或在 88℃±2℃出现靶标熔解峰。

【阳性判断值或者参考区间】

1. 在 88℃±2℃出现靶标熔解峰且熔解峰峰高是 83.5℃±2℃处内标熔解峰峰高的 50%以上（如无内标熔解峰，表示靶标熔解峰峰高远大于内标熔解峰），则判断为 HLA-B5801 阳性。

2. 在 83.5℃±2℃出现内标熔解峰而在 88℃±2℃没有出现靶基因熔解峰，判断为 HLA-B5801 阴性。

【检验结果的解释】

若在 83.5℃±2℃出现内标熔解峰并在 88℃±2℃出现靶基因熔解峰，且靶基因熔解峰信号值低于二分之一内标熔解峰信号值，建议重新采集样本后进行检测或进行 SBT 测序分型。

【检验方法的局限性】

1. 本检测结果仅供临床参考。
2. 当样本 DNA 浓度低于试剂盒的最低检测限时，可能无法准确检出。
3. 扩增产物的污染和核酸提取中标本间的交叉污染，会导致不确定结果。因此，PCR 临床实验室需要有严格的实验室分区、实验室管理和质量控制措施。
4. 不合理的样本采集、转运及处理有可能影响实验结果。
5. 请严格按照本说明书要求进行试剂操作及存储，错误的操作及试剂盒储存条件的改变均可能导致结果的不准确。
6. 本试剂盒仅限于检测 HLA-B5801 基因的多态性，其它多态性不在本试剂盒检测范围内。

【产品性能指标】

1. 最低检测限：40ng 样本即可准确判读实验结果。
2. 准确性：本试剂盒的准确率大于 99%。
3. 干扰物质：高浓度血红蛋白（≤200g/L）、高浓度甘油三酯（≤37mmol/L）、高浓度胆红素（≤342umol/L）对 PCR 结果无明显干扰。

【注意事项】

1. 本产品中的阴阳性质控品为核酸，无传染性，但操作时应仍视为传染性物质进行处理。
2. 开始检测前请仔细阅读本说明书，操作人员应经过专业培训，具有合格的

操作技能，并严格按照说明书要求进行操作。

3. 样本操作和处理、试验后的废弃物，如吸头、扩增产物的处理需符合相关法规要求：卫生部《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》等。

4. 使用本产品时，应遵循临床基因扩增实验室的技术规范进行操作。试验过程应分区进行（试剂准备区、样本制备区、扩增和产物分析区）各区的仪器、耗材、试剂等独立专用，不得交叉使用，各区间人员流动及空气流动应有严格要求，最大限度避免交叉污染。

5. 为了保护操作者和避免环境污染，样本处理应在生物安全柜内进行操作。6. 试验用的消耗品（如离心管、吸头等）应保证无核酸酶及其他污染。

7. PCR 仪应定期校准及维护，以保证试验结果的可靠性。

【参考文献】

1. Hung S I, Chung W H, Liou L B, et al. HLA-B*5801 allele as a genetic marker for severe cutaneous adverse reactions caused by allopurinol[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(11):4134.
2. 邓智远, 杨健, 杨文林. 中国大陆汉族别嘌呤醇重症药疹病人 HLA-B*5801 等位基因的检测[J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2013(6):379-382.
3. Tassaneeyakul W, Jantararoungtong T, Chen P, et al. Strong association between HLA-B*5801 and allopurinol-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in a Thai population.[J]. Pharmacogenetics & Genomics, 2009, 19(9):704-9.

【基本信息】

生产企业名称：北京旌准医疗科技有限公司

住所：北京市北京经济技术开发区经海四路 156 号院 14 号楼 4 层

联系方式：电话号码：010-56380023 传真号码：010-56380029

售后服务单位名称：北京旌准医疗科技有限公司

联系方式：电话号码：010-56380023 传真号码：010-56380029

生产地址：北京市北京经济技术开发区经海四路 156 号院 14 号楼 4 层、11 号楼 4 层

【说明书核准日期及修改日期】

2020.07.03-V03