

【产品名称】

通用名称：VKORC1 和 CYP2C9 基因检测试剂盒（PCR-电化学基因芯片法）

【包装规格】

24 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒适用于定性检测外周全血样本的人基因组 DNA 中细胞色素 CYP2C9 基因 430（*2）、1075（*3）位点和维生素 K 环氧化物还原酶复合体 1（VKORC1）基因的 1173、1639 位点突变。

本试剂盒检测结果仅代表对 CYP2C9 基因和 VKORC1 基因位点的检测结果，临床医生需要结合病例的实际情况进行判断，不能以本试剂盒检测结果作为临床用药调整的唯一依据，对患者用药剂量的调整临床医生应根据多方检查结果综合考虑。

华法林（warfarin）是香豆素类口服抗凝药，是目前国内外最常用的长效抗凝药，多用于人工瓣膜置换、静脉血栓形成（肺栓塞）、房颤等的口服抗凝治疗。其抗凝效果常以凝血酶原时间（prothrombin time, PT）及国际标准化比率（international normalized ratio, INR）作为监测指标。维生素K环氧化物还原酶复合体亚单位1基因（VKORC1）的基因多态性和细胞色素P450 2C9 基因（CYP2C9）是影响华法林用量个体差异最主要的两个遗传因素。检测这两大基因有助于临床鉴别对华法林药物敏感性增加的患者，能够快速确定华法林剂量范围，保证疗效，减少出血风险。把华法林的基因检测结果和INR监控相结合，可以更有效、迅速地调整华法林维持剂量，从而在达到疗效的同时减少华法林的出血风险。

【检验原理】

本试剂盒针对人类基因组DNA中对华法林药物代谢敏感四个SNP位点，设计特异性引物和探针（包括捕获探针和信号探针），其中特异性引物进行多重复合扩增获得四个SNP位点的扩增产物；捕获探针分别固定在特制的印刷电路板金电极表面，制备成芯片VKORC1和CYP2C9基因电化学芯片，用于捕获PCR多重扩增产物；信号探针与PCR产物特异结合。由于信号探针标记有二茂铁分子，会通过夹心杂交产生电流的变化。应用芯片电化学基因芯片分析系统检测出相应电流值（信号值），并对各个SNP位点的碱基信息进行判定。

【主要组成成分】

组分名称		规格	数量	主要成分
PCR 试剂/电化学杂交试剂	PCR 反应液 A	888μL/管	1	PCR 缓冲液, 引物
	PCR 反应液 B	72μL/管	1	热启动酶, 尿嘧啶-DNA 糖基化酶, 三磷酸脱氧核糖核苷
	质控品	50μL/管	1	人基因组核酸
	空白对照	50μL/管	1	灭菌纯化水
	杂交液 I	1680μL/管	1	探针
	杂交液 II	240μL/管	1	蛋白质
	杂交液III	480μL/管	1	高氯酸钠
电化学传感器（芯片）		8 个/包	3	印刷电路板

注：不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。

【储存条件及有效期】

- 1 PCR 试剂/电化学杂交试剂保存于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ ，避免反复冻融；电化学传感器（芯片）保存于 $18\sim 25^{\circ}\text{C}$ ；有效期 9 个月。试剂盒生产日期和有效日期见产品标签。
- 2 运输条件下（ $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 储存的试剂使用泡沫箱加干冰密封运输，开箱时干冰未消耗完）；72 小时内不影响本试剂盒的检测性能；
- 3 试剂使用时开瓶（复融）后 24 小时内其检测性能不受影响；
- 4 试剂使用前反复冻融次数最多不能超过 4 次；
- 5 电化学传感器（芯片）使用时打开铝箔袋后 14 天内必须使用完。

【适用仪器】

ABI2720, ABI9700 型 PCR 仪，DA9000 芯片电化学基因芯片检测仪。

注：DA9000 电化学基因芯片检测仪作为与本试剂盒配套使用的专用仪器。

【样本要求】

- 1 适用标本类型：外周全血。
- 2 标本采集：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。
- 3 标本保存和运送：标本可立即用于测试；在 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存期为 12 个月；若要长期保存，需储存于 $-80\pm 5^{\circ}\text{C}$ ；标本应避免反复冻融。标本运送采用冰壶加冰或泡沫箱加冰密封运输，运输时间不应超过 4 天。

【检验方法】

1 核酸提取

建议取 200μL 样本进行核酸提取。可采用广州达安基因股份有限公司生产的全血基因组 DNA 提取试剂盒（规格：20 反应/盒，货号：Cat. #DA-452），该试剂盒可用于对人全血基因组 DNA 的提取，请按照试剂盒说明书进行操作，提取后的 DNA 浓度应高于 5ng/μL，

当样本浓度高于 100ng/μL 时建议将样本稀释至 100ng/μL 进行检测；并且 A260/A280 介于 1.6~2.0 之间。

本试剂盒中的质控品均不参与提取，其中空白对照用于对环境进行监控；质控品用于 PCR 检测试剂的质控。

2 PCR 扩增

2.1 PCR 试剂准备

取适量 PCR 反应管，每管加入 PCR 反应液 A 37μL、PCR 反应液 B 3μL（也可根据 PCR 反应用量，计算各组所需总量，混匀后分装 40μL 于单个 PCR 反应管中）；

2.2 加样

于上述 PCR 反应管中分别加入提取后的样本核酸 10μL，另取两管分别加入质控品和空白对照各 10μL，8,000g 离心数秒，放入 PCR 扩增仪。

2.3 在适用的仪器上按照下列条件进行 PCR 循环程序的设置

50℃ 3 分钟，95℃ 预变性 15 分钟，然后按 94℃ 30 秒→ 56℃ 35 秒→72℃ 40 秒扩增，45 个循环，最后 72℃ 延伸 7 分钟。

3 杂交操作

3.1 取一 0.2mL 的离心管，依次加入 70μL 杂交液 I，10μL 杂交液 II，20μL 杂交液 III 以及 25μL PCR 产物，充分混匀（注意尽量不要有气泡），将混匀的液体移入电化学芯片的管中，压紧管盖。在芯片插入芯片电化学基因芯片检测系统的检测模块前，检查是否已正确地标记，确认样本管的序列号与芯片是否匹配。

3.2 芯片电化学基因芯片检测系统的使用

3.2.1 开机和用户登录：打开仪器背面左下的主电源开关，然后按压在仪器正面键盘下方的圆形电源开关 1-2 秒。当登录界面出现时，点击“用户名”框与“密码”对话框，分别输入用户名及正确密码（可通过仪器键盘或屏幕键盘输入），然后点击“登录”按钮。

3.2.2 输入待测样本序列号：在触摸显示屏上点击一个芯片检测模块（比如：A1）的文本字段框，闪烁的光标会在文本字段框上显示，提示可进行输入序列号。直接用仪器键盘输入样本序列号，或者点击触摸屏上的按钮，然后点击屏幕键盘输入序列号。点击键盘的“Enter”键或“Tab”键移到下个检测模块。继续输入余下检测模块对应的样本序列号。

3.2.3 将基因芯片装载到仪器检测模块中：此时确保检测模块的塑料手柄位于最右端，并且各检测模块左边的 LED 灯显示蓝色（提示检测模块可装载芯片）。抓住芯片上的塑料把手，将有 e-DNA 字样的面朝上顺着检测模块开口的方向插入到最里面。将检测模块的手柄由最右往最左滑动，将芯片定位在检测模块中，LED 灯显示橙色。

注：样本的序列号输入与装载芯片于检测模块的时间顺序可任意选择，但一定要确保样本管的序列号与输入到仪器里的芯片序列号完全对应。

3.2.4 选定仪器运行的杂交程序：在触摸显示屏上点击一个芯片检测模块（比如：A1）的文本字段框，点击屏幕上的“详细”按钮，出现本仪器已有的所有杂交程序，点击“Warfarin”，点击“下一个”移到下个检测模块，继续为余下装载有芯片的检测模块选择杂交程序。选定完毕，LED 灯显示黄色。

注：如果本次检测的所有样本均需运行相同的杂交程序，点击“Apply to all”，选择对应杂交程序，则本次所有需检测模块的程序均已选定。

3.2.5 启动测试：点击“启动”按钮启动测试，检测模块上的 LED 灯开始闪烁绿灯，30 秒（跟环境温度有关）左右，LED 灯显示稳定的绿灯，说明检测正常继续。

3.2.6 完成测试：检测模块的 LED 显示闪烁的蓝色灯时提示测试已完成，可将检测模块的手柄由最左往最右滑动，将芯片移走，根据实验室有关规则进行丢弃。

3.2.7 生成和查看报告：点击“报告”主选项标签。定义搜索条件，点击“查找”按钮。在报告列表中点击要查看的样本报告。报告列表框外有箭头标签，可点击进行上下左右翻动查阅。在“报告类型”栏中选择报告类型。点击“查看”按钮，会显示所选的样本报告，报告页面可通过箭头标签上下翻动查阅。并可进行“输出”、“打印”报告文档。点击“关闭”按钮，可退出查看报告界面。

3.2.8 输出检测报告到外部的储存器：插入可用的 USB 储存器，仪器的 USB 端口默认地定位为“D:\PDFs”。点击“报告”主选项栏，定义搜索条件，然后点击“查找”按钮。选择在报告框里的所有需要输出的报告。点击“输出”按钮。在弹出界面，选择输出方式及输出位置。选择“.PDF”输出打印报告，选择“TXT”可输出信息处理系统使用的结果文件或作电子数据表查看。当弹出界面显示确认数据的成功输出时，点击“确定”按钮。

4 结果分析

靶基因	等位基因位点
CYP450 2C9	430C>T (* 2)
	1075A>C (* 3)
VKORC1	1173C>T
	-1639G>A

说明：以上表格列出了本试剂盒检测的 2 个靶基因中 4 个等位基因位点所对应的基因型，以 1075 A>C (* 3) 为例说明，A 代表的是野生型的碱基，C 代表的是突变型的碱基。

4.1 检测报告中的“基因型结果”一栏会给出以上各个等位基因位点的碱基信息。检测报告可以打印，也可以直接查看电子版本的信息，详细的信息可以阅读芯片电化学基因芯片系统说明书。

4.2 有效的结果：芯片高信号控制点（HiS Control）和芯片低信号控制点（LoS Control）通过测试，且所有的 SNP 位点均报告出相应等位基因位点碱基结果。

4.3 无效的结果：芯片高信号控制点（HiS Control）或芯片低信号控制点（LoS Control）不通过测试，或者所有的 SNP 位点中任何一个或几个位点报告的基因型结果为“low signal”“error”“contradictory score”“indeterminate score”等，该实验视为无效，建议重新测试。

5 质量控制

- 5.1 质控品：相应检测位点检测结果为：430C/C、1075A/A、1173T/T、-1639A/A。
- 5.2 空白对照：只有芯片高信号控制点（HiS Control）和芯片低信号控制点（LoS Control）通过测试，其他等位基因位点的结果均报告为“low signal”。
- 以上各项同时满足的条件下本次实验有效，否则全部试验应重新进行。

【参考区间】

使用本试剂盒和对照试剂（金标准测序）对临床样本进行检测，当位点信号值小于 10nA 时，视该信号值为背景信号，报告单报告该位点型别为“low signal”；当位点信号值不小于 10nA 时，直接作为碱基判定依据，报告单即正常报出该位点碱基。

芯片高信号控制点（HiS Control）、芯片低信号控制点（LoS Control）和各型别位点 cutoff 值根据统计学方法计算得出，已预设芯片电化学基因芯片检测系统自动运行的分析软件中。

【检验结果的解释】

- 1 结果判定：芯片高信号控制点（HiS Control）、芯片低信号控制点（LoS Control）和各型别位点 cut off 值已预设由芯片电化学基因芯片检测系统自动运行的分析软件中，分析结束后软件自动生成样本的检测报告单，报告出各位点型别。
- 2 常见结果判定举例：

编号	检测报告结果	说明
1	430C/C、1075A/A、1173T/T、-1639A/A	见附图（1）
2	430C/C、1075A/A、1173C/T、-1639G/A	见附图（2）
3	430C/C、1075A/C、1173T/T、-1639A/A	见附图（3）
4	430C/C、1075A/C、1173C/T、-1639G/A	见附图（4）

检测结果		
靶基因	等位基因位点	基因型结果
CYP450 2C9	430C>T (*2)	T/T
CYP450 2C9	1075A>C (*3)	A/A
VKORC1	1173C>T	T/T
VKORC1	-1639G>A	A/A
LowSignal Test	LoS control	Pass
HighSignal Test	His control	Pass

附图（1）

检测结果		
靶基因	等位基因位点	基因型结果
CYP450 2C9	430C>T (*2)	C/C
CYP450 2C9	1075A>C (*3)	A/A
VKORC1	1173C>T	C/T
VKORC1	-1639G>A	G/A
LowSignal Test	LoS control	Pass
HighSignal Test	His control	Pass

附图（2）

检测结果		
靶基因	等位基因位点	基因型结果
CYP450 2C9	430C>T (*2)	C/C
CYP450 2C9	1075A>C (*3)	A/C
VKORC1	1173C>T	T/T
VKORC1	-1639G>A	A/A
LowSignal Test	LoS control	Pass
HighSignal Test	His control	Pass

附图（3）

检测结果		
靶基因	等位基因位点	基因型结果
CYP450 2C9	430C>T (*2)	C/C
CYP450 2C9	1075A>C (*3)	A/C
VKORC1	1173C>T	C/T
VKORC1	-1639G>A	G/A
LowSignal Test	LoS control	Pass
HighSignal Test	His control	Pass

附图（4）

- 3 检测结果中 CYP2C9 基因中相应等位基因位点（包括 430C>T、1075A>C）中有位点出现突变基因时（详见检测报告），患者对华法林药物敏感，用药量应适当降低。
- 4 根据临床试验数据统计：430C>T（* 2）位点的突变频率为 0.23%，1075A>C（* 3）位点的突变频率为 10.53%，1173C>T 和-1639G>A 位点的突变频率为 99.38%；当 430C>T（* 2）位点出现突变结果时，建议复检或采用测序法进行确认。
- 5 检测结果中 VKORC1 基因中相应等位基因位点（包括 1173C>T、-1639G>A）中有位点出现突变基因时（详见检测报告），患者对华法林药物敏感，用药量应适当降低。
- 6 网站 www.WarfarinDosing.org 可根据病人的详细信息综合评价并给出推荐的华法林起始剂量，这些信息包括病人的身高、体重、性别、年龄、种族等个体信息以及病人的 CYP2C9 基因和 VKORC1 基因中相应位点的基因信息。

【检测方法的局限性】

- 1 CYP2C9 和 VKORC1 这两类易感基因中有很多位点的基因型多态性结果会影响华法林用药的个体化差异和种族差异，本试剂盒只特异检测两个基因中的 4 个等位基因位点的基因信息。
- 2 样本检测结果和样本收集、处理、运送及保存质量有关，其中任何失误都将会导致假阴性结果。如果样本处理时没有控制好交叉污染，可能出现假阳性结果。
- 3 当 1075A>C 的检测结果为 1075C/C 时，本试剂盒无法分辨其是否为突变型杂合子还是突变型纯合子，建议对该位点进行测序复核以明确结果，其他位点检测结果不受影响。

【产品性能指标】

- 1 根据产品性能评估结果，本试剂对所检样本 DNA 浓度的最低检出量为 5ng/μL。
- 2 根据产品性能评估结果，本试剂在适用仪器上扩增的检测结果显示试剂盒检测准确性高、批内和批间重复性好、并且各型别的

检测不存在交叉反应。

3 根据产品性能评估结果, 含高浓度的胆红素(浓度超过 20 mg/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)的临床抗凝全血样本对检测结果无干扰; 药峰浓度的临床常用药物胺碘酮(Amiodarone)、氟康唑(Fluconazole)、新诺明(Sulfamethoxazole)对检测结果无干扰。

4 根据产品性能评估结果, α -地中海贫血基因、 β -地中海贫血基因, HBV 耐药基因 preC/BCP 突变基因、YMDD 突变基因等人类相关突变基因对检测结果无干扰。

5 根据临床试验统计结果, 有效检测样本数 1285 例, 其中待考核试剂盒检测结果与对照方法(金标准测序法)检测结果相符的例数为 1282 例。待考核试剂盒与对照方法(金标准测序法)的检测符合率为 99.7%。临床结果显示, 本试剂盒可以检出 CYP2C9 基因中 430(*2)、1075(*3)位点和 VKORC1 基因中的 1173、1639 位点突变。由于中国人群中 430T、1173C、-1639G 出现频率较少, 导致临床实验中, 该 3 个基因型的检测例数小于 20 例。

【注意事项】

1 本品仅用于体外检测。

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 实验室应与检测室分开。PCR 实验应分别在样品处理区, PCR 加样区, 扩增区和检测室分别进行, 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 → 检测室单向流动, PCR 试剂盒不可存放于检测室。

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 室和检测室工作服应分开, 带一次性手套, 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。

8 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;

9 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。

10 必须保持电化学传感器(芯片)的干燥, 使用完毕后须在 7 天之内将其移开芯片电化学基因芯片系统。

【参考文献】

1 YIN T, MIYATA T. Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1—rationale and perspectives[J]. Thromb Res, 2007, 120(1):1-10.

2 YASAR U, I, UNDRESEN S, ELIASSON E, et al. Linkage between the CYP2C8 and CYP2C9 genetic polymorphisms[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 299(1):25-28.

3 Elizabeth A. Sconce, Tayyaba I. Khan, et al. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. BLOOD, 10 OCTOBER 2005 VOLUME 106, NUMBER 7.

4 Algorithms using clinical and genetic data (CYP2C9, VKORC1) are relevant to predict warfarin dose in patients with different INR targets. Thrombosis Research 126(2010)e235-e237.

5 华法林药物基因组学的研究推动其个体化医疗的进程. 中国药理学与毒理学杂志, 23 (2):146 -151.

【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: 邮政编码: 510665

电话: 400 000 0340 020-32290789

传真: 020-32068820

网址: <http://www.daangene.com>

售后服务单位名称: 广州达安基因股份有限公司

联系方式: 邮政编码: 510665

电话: 400 000 0340 020-32290789

传真: 020-32068820

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

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】

【说明书核准及修改日期】