

## 【产品名称】

通用名称：结核分枝杆菌利福平耐药突变基因检测试剂盒（PCR-Sanger 测序法）

## 【包装规格】20 人份/盒

## 【预期用途】

本产品用于体外定性检测肺结核患者痰样本的结核分枝杆菌罗氏固体培养物中结核分枝杆菌利福平耐药基因 rpoB 507-533 中具有明确耐药的 531 (TCG→TTG)、526 (CAC→TAC\CGC)、516 (GAC→GTC) 位密码子突变。

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 属分枝杆菌属。结核病为结核分枝杆菌引起的慢性传染性疾病。结核分支杆菌的高耐药性问题已成为新世纪结核病控制的三大难题之一，也是结核病疫情恶化的重要原因。利福平对结核病有较好疗效使其很快成为结核病短程化疗的主要药物<sup>[1][2]</sup>。因而，当结核菌株对其产生耐药时则严重影响其疗效。

研究表明结核分支杆菌耐 RFP 是由于其作用靶分子 RNA 多聚酶 β 亚单位的编码基因 (rpoB) 突变所致<sup>[3]</sup>，临床上 526、531、516 位氨基酸突变导致耐药最为常见<sup>[4]</sup>。利福平是利福霉素的半合成衍生物，通过与细菌 RNA 聚合酶 β 亚基结合，干扰、抑制细菌的转录过程，实现杀菌效果。rpoB 基因是细菌 RNA 聚合酶 β 亚基的编码基因，全长 3543 个碱基，当其中长 81 个碱基的核心区域—耐利福平决定区 (RRDR) 发生突变时，包括点突变或短的插入、缺失突变等，使 DNA 依赖性 RNA 聚合酶 β 亚单位酶活性改变，利福平不能与细菌 RNA 聚合酶 β 亚单位结合而表现为耐药。rpoB 基因突变一般是单个碱基突变或数个碱基联合突变，主要集中在 507-533 氨基酸位点的长 81 个碱基核心区域的范围内，其中约 80%-86% 的碱基突变发生在 3 个氨基酸位点上：531 位的丝氨酸转换为亮氨酸、526 位的组氨酸转换为酪氨酸、516 位的天冬氨酸转换为其他氨基酸。

本试剂盒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 TB 基因组 DNA 的 rpoB 基因设计 PCR 引物和相应的测序引物，采用 PCR 体外扩增法结合 PCR 直接测序技术，检测人结核分枝杆菌 rpoB 基因 507-533 位主要基因突变区。将提取的结核分枝杆菌基因组 DNA，经过 PCR 扩增 rpoB 基因，获得目的片段，使少量的结核分枝杆菌基因组 DNA 的特定片段成百万倍地增加，便于检测，接着纯化 PCR 产物，然后按照测序体系进行 PCR 测序反应，酒精纯化后 Sanger 测序，分析样本测序结果，实现 TB rpoB 基因突变点的检测。

## 【主要组成成分】

|      | 组分名称     | 规格      | 数量 | 主要成分                       |
|------|----------|---------|----|----------------------------|
| 扩增试剂 | 反应液      | 740μL/管 | 1  | 引物、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液          |
|      | 酶系       | 60μL/管  | 1  | 热启动脱氧核糖核酸聚合酶               |
| 质控品  | 耐药阳性质控品  | 30μL/管  | 1  | 含结核分枝杆菌目的片段的突变型脱氧核糖核酸      |
|      | 阳性野生型质控品 | 30μL/管  | 1  | 含结核分枝杆菌目的片段的野生型脱氧核糖核酸      |
|      | 阴性质控品    | 30μL/管  | 1  | 生理盐水                       |
| 测序试剂 | 测序引物     | 20μL/管  | 1  | 引物                         |
|      | 测序染料     | 40μL/管  | 1  | 脱氧核糖核苷酸、双脱氧核糖核苷酸，脱氧核糖核酸聚合酶 |
|      | 测序反应液    | 60μL/管  | 1  | 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液             |
|      | 去离子甲酰胺   | 200μL/管 | 1  | 甲酰胺                        |

不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。

**需自备的试剂：**灭菌纯化水，无水乙醇，70%乙醇（灭菌纯化水配制），PCR 产物纯化试剂盒（生产厂家：生工生物工程（上海）有限公司；货号：SK8412；规格：100 人份/盒），125 mmol/L EDTA，3 mol/L 醋酸钠 (pH5.2)，核酸提取试剂盒（离心柱法）（生产厂家：广州达安基因股份有限公司；货号：CAT.#DA-451；规格：20 反应/盒）。

**【储存条件及有效期】** -20℃~-15℃保存，有效期 9 个月。试剂盒生产日期和有效日期见产品标签。

**【适用仪器】** ABI Veriti DX Thermal Cycler（定性 PCR 仪），ABI 3500 Dx/3500xL Dx Genetic Analyzer（基因分析仪）

## 【样本要求】

- 1 适用标本类型：痰标本分离培养菌（罗氏固体培养基）。
- 2 培养菌采集要求：  
所采集的培养菌应为经临床报告为结核分枝杆菌复合群阳性的痰培养菌。
- 3 标本采集保存和运送：依据《中华人民共和国卫生行业标准（肺结核诊断标准）》（WS288-2008）附录 A 中 A.1.1 “痰标本的采集、运送和保存”方法执行。

## 【检验方法】

### 1 核酸提取（样本制备区）

样本核酸提取建议使用广州达安基因股份有限公司生产的核酸提取试剂盒（离心柱法）（货号：CAT.#DA-451），请按照试剂盒说明书进行操作；本试剂盒中的阴阳性质控品均不参与提取，直接加入反应管用于对环境和 PCR 检测试剂的质控。按试剂盒步骤提取的核酸 DNA，可立即加样或置于 -20±5℃ 保存备用。（提取后的核酸浓度应不低于 1×10<sup>3</sup> 个菌/mL）。

### 2 PCR 试剂准备（试剂制备区）

从试剂盒中取出反应液、酶系，室温融化后振荡混匀，8,000rpm 离心数秒后使用。  
取 N 个（N=待测样本个数+耐药阳性质控品+阳性野生型质控品+阴性质控品）反应管，TB 单人份 PCR 扩增体系配制如下表：

| 组分 | 反应液  | 酶系  | 总体积  |
|----|------|-----|------|
| 用量 | 37μL | 3μL | 40μL |

将各组充分混合，混合好后进行短时离心将管壁上的液体全部离心至管底，之后将 40μL 扩增体系分装到 PCR 管中。

3 加样（样本制备区）

往上述 PCR 反应管中分别加入提取后的待测样本核酸、阴性质控品和直接加入耐药阳性质控品、阳性野生型质控品各 10μL。盖紧管盖，8,000rpm 离心数秒后转移至扩增检测区。

4 PCR 扩增（扩增区）

将各反应管放入 PCR 仪，按下列条件扩增：50℃ 2 分钟，95℃ 15 分钟预变性，然后按（94℃ 30 秒→55℃30 秒→72℃ 45 秒）×40 个循环扩增；最后 72℃延伸 7 分钟。

5 产物纯化（产物分析区）

PCR 扩增结束以后，取 5μl PCR 产物进行 1-2%琼脂糖凝胶电泳，观察是否有目的条带扩增（目的条带大小为 450bp），如观察到目的条带，则将上述 PCR 产物及时进行纯化，具体操作详见 PCR 产物纯化试剂盒说明书。按试剂盒步骤纯化获得的 PCR 产物进行电泳鉴定定值（PCR 产物浓度范围为 10-50ng），可立即进行测序 PCR 或置于-20±5℃保存备用（保存时间不要超过 2 天）。

6 测序 PCR

经过电泳鉴定定值的PCR产物，按下述表格配制测序PCR体系：

| 试剂    | 用量           |
|-------|--------------|
| PCR产物 | XμL（约3-10ng） |
| 测序染料  | 2μL          |
| 测序反应液 | 3μL          |
| 测序引物  | 1μL          |
| 无菌纯化水 | 14-XμL       |
| 总体积   | 20μL         |

无菌纯化水用量视PCR产物加入体积而定，总体积应为20μL。

将各反应管放入定性PCR仪，按下列条件扩增：96℃ 1分钟→（96℃ 10秒→ 50℃ 5秒→60℃ 4分钟）×25个循环→4℃保温。

7 测序产物纯化（产物分析区）

- 7.1 取测序PCR反应结束后的PCR反应管，各PCR反应管加入2μL 125 mmol/L EDTA和2μL 3 mol/L醋酸钠（pH5.2）到管底。
- 7.2 再加入50μL 100%无水乙醇，盖紧管盖，短时振荡后，室温避光放置15分钟。
- 7.3 4℃下12,000rpm离心30分钟，立即小心去上清（若不能立即操作，请在操作前重新离心3分钟）。
- 7.4 每管加入150μL 预冷70%乙醇，4℃下12,000rpm离心10分钟，立即小心去上清（尽量将管底的70%乙醇吸干净，若不能立即操作，请在操作前重新离心3分钟），此步骤可重复操作一次。
- 7.5 室温避光放置15-30分钟（观察管底液体，使70%乙醇挥发干净），此步骤产物可密封避光置于-20±5℃保存5天。
- 7.6 加入10μL 去离子甲酰胺，短时振荡溶解DNA，进行短时离心将管壁上的液体全部离心至管底。
- 7.7 溶解后的样品在定性PCR仪上 95℃变性5分钟，迅速置冰中冷却4分钟后，准备上样电泳。

8 基因分析仪器测序

- 8.1 加样：变性后的测序产物加入与基因分析仪配套的 96 孔板，盖好，按加样顺序编辑样品列表。根据测序仪型号选用具有 IVD 标志的 Seq\_std\_BDTV3.1\_ASSYXL\_POP7 或 Seq\_std\_BDTV3.1\_ASSY\_POP7 进行测序。
- 8.2 使用 ABI 基因分析仪时，应用 ABI 公司 Data Collection®与 Sequencing Analysis 软件进行数据收集和分析。Data Collection®与 Sequencing Analysis 分析软件的进一步信息请参阅 Data Collection®与 Analysis Software 用户手册。测序结果自动保存在预设位置，反应结束后打开测序结果进行分析，得到.ab1、.phd.1 格式的文件。

9 结果分析

- 9.1 运行 SeqScanner 程序，导入测序结果。
- 9.2 在 Edit 菜单下按 Find 键，找到序列“GGAGTTCTTC”，从找到的序列往后的第 1-81 个碱基为 rpoB 基因 507-533 位核心突变区位点。对比野生型序列 (Mycobacterium tuberculosis H37Rv chromosome, NC\_000962) 逐个碱基比较，查找突变点，记录突变的碱基类型即可如：526CAC-CGC。如果不能找到此序列，可能样本序列个别碱基发生突变情况，应校正后重新查找。野生型序列 Mycobacterium tuberculosis H37Rv chromosome, rpoB 基因 507-533 位核心突变区位点（1-81bp）：  
507GGC 508ACC 509AGC 510CAG 511CTG 512AGC 513CAA 514TTC 515ATG 516GAC 517CAG 518AAC 519AAC 520CCG 521CTG 522TCG 523GGG 524TTG 525ACC 526CAC 527AAG 528CGC 529CGA 530CTG 531TCG 532GCG 533CTG
- 9.3 若测序峰图不能满足分析要求，应重新测序。

10 质控标准

- 10.1 TB 耐药阳性质控品：检测结果为 526 位点 CAC-CGC 突变型。
- 10.2 TB 阳性野生型质控品：检测结果为利福平敏感。
- 10.3 TB 阴性质控品：测序检测结果为未检出利福平基因。

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】根据临床样本的检测结果，本试剂盒测序峰图 raw data 的 rfu 值应不小于 100rfu。

【检验结果解释】

- 1 结果判定：测序结果和野生型菌株序列比对检测突变位点，给出突变类型如：526CAC-CGC、531TCG-TTG、516GAC-GTC 等。
- 2 检测结果阴性并不能排除样本中存在 TB 耐药基因，只能说明样本含有的 TB 耐药突变基因低于本试剂盒的最低检出量或者耐药基因在该样本整体 TB 群中占的比例低于 25%，测序无法检出。
- 3 测序结果为包含目的位点的一段 DNA 序列，该序列内的其他突变点也可以同时检出。

## 【检验方法的局限性】

- 1 浓度低于本试剂盒最低检出量的样本无法确保检测结果。
- 2 本试剂盒可以检测 TB 的 rpoB 基因突变，对 TB 其它基因耐药突变无法检测。

## 【产品性能指标】

- 1 检测范围：  
本试剂盒的检测范围为  $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$  个菌/mL。以临床结核分枝杆菌培养菌株样本，梯度稀释 6 个浓度为待检样本。
- 2 最低检出量：本试剂盒最低检出量为样本总浓度为  $1 \times 10^3$  个菌/mL 时可检出 25% 突变率。
- 3 精密度：  
批内及批间的浓度对数值变异系数 (CV%) 均小于 10%。
- 4 临床试验研究：  
临床试验结果表明，本试剂盒的阳性符合率为 93.8%，阴性符合率 94.6%，总符合率为 94.1%。

## 【注意事项】

- 1 本试剂盒仅用于体外检测。
- 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 试剂盒中组分需在有效期内使用，不使用本试剂盒提供的组分进行实验将可能导致错误结果。
- 5 试剂盒阴性质控品和阳性质控品虽经验证病毒已灭活，但没有任何一种已知的测试方法可以完全确保人源性物质不含有传染性物质。所有人源性物质都可能具有潜在的传染性，操作时应视为传染性物质进行处理。
- 6 实验人员必须进行专业培训。PCR 实验应分别在样品制备区，试剂准备区，扩增区和产物分析区进行，各区应相对分隔。人和实验用物品应从试剂制备区、样品制备区、产物分析区单向流动，PCR 试剂盒不可存放于产物分析区。
- 7 标本处理区应安装负压超净工作台。实验过程中必须穿工作服，各实验区工作服应分开。实验过程应带一次性手套，使用自卸管移液器。
- 8 所用消耗品应灭菌后一次性使用，实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区各阶段用品不能交叉使用。
- 9 对每次实验应进行质量控制。
- 10 本实验测序仪工作环境实验室温度可维持在  $15-30^\circ\text{C}$ ，无温度波动；湿度可维持在 20-80%，无凝露。
- 11 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；实验完毕应用 10% 次氯酸或 70% 酒精或紫外线灯处理工作台和移液器。
- 12 测序反应要求使用密封性能良好的反应管，否则会影响测序效果，反应后体积小于 8μL 应放弃测序。推荐使用 Axygen 0.2mL 反应管。
- 13 配制测序体系过程应在冰上进行，测序试剂应预先分装避免，避免反复冻融。
- 14 测序操作应交由受专业测序培训的人员操作。

## 【参考文献】

- 1 Stephen H. Gillespie. 2002, Evolution of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis: Clinical and Molecular Perspective. Antimicrobial agents and chemotherapy. p. 267 - 274.
- 2 Emma Huitric, Jim Werngren, et al. 2006, Resistance Levels and rpoB Gene Mutations among In Vitro-Selected Rifampin-Resistant Mycobacterium tuberculosis Mutants. Antimicrobial agents and chemotherapy. p. 2860 - 2862.
- 3 Miller LP1, Crawford JT, Shinnick TM. 1994. The rpoB gene of Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother. Antimicrob. Agents Chemother. 38(4):805-11.
- 4 Caws, M, PM Duy, DQ Tho, et al. 2006. Mutations Prevalent among Rifampin- and Isoniazid-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates from a Hospital in Vietnam. Journal of Clinical Microbiology. p. 2333 - 2337.

## 【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】

## 【说明书核准及修改日期】