

人运动神经元存活基因 1（SMN1）检测试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名称：人运动神经元存活基因 1（SMN1）检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

48 人份/盒、48 人份×2/盒

【预期用途】

本产品用于体外检测人静脉全血样本基因组 DNA 中的运动神经元存活基因 1（SMN1）第 7 外显子和第 8 外显子拷贝数变异，用于 SMA 的携带者检测。该预期用途的应用应符合国家及地方卫生管理部门的相关规定。

脊髓性肌萎缩症（Spinal Muscular Atrophy, SMA）是一种由于脊髓前角细胞运动神经元变性，导致近端肢体和躯干进行性、对称性肌无力和肌萎缩的遗传性神经肌肉病，属常染色体隐性遗传病，该病患者临床表现差异大，从出生到成人期均可发病，发病率约为 1/10000-1/6000，携带率约为 1/72~1/47。

SMA 的主要致病基因为运动神经元存活基因 1（Survival Motor Neuron 1, SMN1），该基因定位于人染色体 5q13.2。正常人有至少 2 个拷贝的正常 SMN1 基因，其基因型包括常见的[1+1]型和罕见的[2+1]型和[2+2]型；携带者只有 1 个拷贝的正常 SMN1 基因，其基因型包括常见的[1+0]型及较少见的[1+1^q]型、[2+0]型和[2+1^q]型。SMA 患者突变类型主要为 SMN1 双等位基因纯合缺失突变（[0+0]基因型），少部分为 SMN1 复合杂合突变（[0+1^q]基因型）。SMN1 缺失大部分为外显子 7 合并外显子 8 共同缺失，少部分仅为外显子 7 缺失。常用的 SMN1 基因拷贝数检测方法包括多重连接依赖性探针扩增（MLPA），定量聚合酶链反应法（qPCR）等。根据 SMN1 基因拷贝数的检测，可以实现对 SMA 患者、携带者及正常人的检测；当检出 SMN1 基因纯合缺失时为 SMA 患者，当检出一个 SMN1 基因拷贝数时为 SMA 携带者，当检出两个及以上 SMN1 基因拷贝数时为正常人。

【检验原理】

本试剂盒检测靶基因为运动神经元存活基因 1（Survival Motor Neuron 1, SMN1）（NG_008691.1），该基因定位于 5q13.2，转录本编号 NM_000344.4，共有 8 个外显子（1, 2a/2b, 3-8）。在人基因组中，SMN2 基因与 SMN1 基因同源性>99.9%，两者仅存在 5 个碱基差异，为降低 SMN2 基因对 SMN1 基因检测的干扰，本试剂盒针对 SMN1 基因和 SMN2 基因第 7 外显子和第 8 外显子碱基差异位点（c.840 位点 C/T 和 c.*239 位点 G/A）分别设计了可特异性识别 SMN1 基因的 Taqman 探针，使用锁核酸（LNA）对探针进行修饰。

试剂盒基于实时荧光定量 PCR 技术，两个反应管分别对第 7 外显子和第 8 外显子进行检测。在 SMN1 基因 7 号外显子目标碱基位点（c.840 位点）两侧和 8 号外显子目标碱基位点（c.*239 位点）两侧分别设计引物，并在目标碱基位点处分别设计可特异性识别 SMN1-E7 和 SMN1-E8 的探针，两个反应管中均包含内标基因 RPP30 的引物和探针，可对内标基因的保守序列进行检测。SMN1-E7 反应体系中以 FAM 通道为检测信号，HEX 通道为内标信号；SMN1-E8 检测体系中以 ROX 通道为检测信号，HEX 通道为内标信号。PCR 反应过程中，结合到扩增产物上的探针在 PCR 延伸过程中被具有 5'-3'外切酶活性的 DNA 聚合酶酶切，使探针的荧光基团与淬灭基团分开，受到激发发出荧光，仪器通过检测荧光强度的变化实现对目标产物的检测。试剂盒反应体系中建立了 dUTP/UDG 防污染系统。

使用 E7 反应液+酶液配制反应体系检测第 7 外显子，使用 E8 反应液+酶液配制反应体系检测第 8 外显子，样本检测时应在两个体系中分别同时检测空白对照、2 拷贝对照、1 拷贝对照和 0 拷贝对照，对检测过程中的试剂、仪器性能、实验环境和操作过程进行质量监测。当对照品检测结果符合质控要求时，可利用相对定量中的比较 Ct 法分别计算各个样本 SMN1-E7 和/或 SMN1-E8 的 RQ 值，结合阳性判断值分析样本第 7 外显子和/或第 8 外显子的拷贝数。RQ 值的计算公式如下：

待检样本或 2 拷贝对照目标基因 $\Delta Ct =$ 目标基因 Ct - 内标基因 Ct

待检样本目标基因 $\Delta\Delta Ct =$ 待检样本 ΔCt - 2 拷贝对照 ΔCt

待检样本目标基因 $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

【主要组成成分】

组分名称	主要组成成分	48 人份/盒		48 人份×2/盒	
		规格	数量	规格	数量
E7 反应液	dNTP Mix、dUTP、引物、探针、UDG 酶	840 μL	1 管	840 μL	2 管
E8 反应液	dNTP Mix、dUTP、引物、探针、UDG 酶	840 μL	1 管	840 μL	2 管
酶液	DNA 聚合酶	48 μL	1 管	48 μL	2 管
2 拷贝对照	基因组 DNA	200 μL	1 管	200 μL	1 管
1 拷贝对照	基因组 DNA	200 μL	1 管	200 μL	1 管
0 拷贝对照	人工合成质粒	200 μL	1 管	200 μL	1 管
空白对照	体外诊断试剂用纯化水	800 μL	1 管	800 μL	1 管

注：不同批号试剂盒中 E7 反应液、E8 反应液不可以互换使用，其余组分可以互换使用。

以下是本试剂盒不包含，但对该试验必需的试剂/耗材：

（1）核酸提取或纯化试剂：广东辉锦创兴生物医学科技有限公司（备案号：粤顺械备 20220038）。

（2）0.2mL PCR 8 联管、无 DNase 和 RNase 的过滤吸头。

【储存条件及有效期】

1. 试剂盒应置于-20℃±5℃条件下避光保存，有效期为 12 个月。
2. 试剂盒开盖后置于-20℃±5℃条件下避光保存，开盖不影响有效期，使用时应尽量避免反复冻融，冻融次数不超过 5 次。
3. 试剂盒应采用冷链运输，确保运输过程中满足试剂盒储存条件。
4. 生产日期和失效日期详见产品标签。

【适用仪器】

宏石 SLAN-96P 全自动医用 PCR 分析系统

【样本要求】

1. 样本类型：人 EDTA 抗凝全血样本。
2. 样本采集：从受检者手臂弯曲处或手背处抽取静脉血 2~5mL，放入含有 EDTA 抗凝剂的管中，轻轻颠倒混匀 5~10 次，标记好样本的姓名和编号等样本信息。
3. 样本保存：抗凝全血在室温保存不超过 24 小时，2℃~8℃保存不超过一个月，-20℃±5℃保存不超过两年。冷冻保存时应避免反复冻融，冻融次数不超过 3 次。提取的 DNA 样本建议立即检测，否则请于-20℃±5℃保存，保存时间不超过两年。应避免反复冻融，冻融次数不超过 5 次。

【检验方法】

注：PCR 实验应按要求进行分区，各区域温湿度可控。建议温度范围 15℃~30℃，湿度范围 40%~70%。

1. 样本处理（标本制备区）

按照广东辉锦创兴生物医学科技有限公司的核酸提取或纯化试剂（粤顺械备 20220038）说明书要求进行基因组 DNA 的提取。建议对照品参与样本的平行提取。

可使用紫外分光光度计对提取的样本 DNA 的浓度和纯度进行测定。本试剂盒对待测基因组 DNA 浓度要求为 2~250ng/μL，纯度（A260/A280）要求为 1.7~2.0，若纯度（A260/A280）超出该比值范围，建议用户重新取血样提取 DNA。

2. PCR 扩增试剂准备（试剂制备区）

- 1）从试剂盒中分别取出 E7 反应液、E8 反应液、酶液，在室温充分解冻并涡旋混匀后，瞬时离心使液体聚集管底；
- 2）计算所需测定的反应数量 N=待检样本数+3（2 拷贝对照）+1（1 拷贝对照）+1（0 拷贝对照）+1（空白对照），其中 2 拷贝对照用于拷贝数的计算，为减少试验误差，每次试验均需设置 3 个重复；
- 3）每份试剂反应体系配制如下表：

SMN1-E7 反应体系	
组分	1 人份用量（μL）
E7 反应液	17.5
酶液	0.5

SMN1-E8 反应体系	
组分	1 人份用量（μL）
E8 反应液	17.5
酶液	0.5

按上表计算各组分的用量，分别配制检测不同靶标的反应混合液，充分混匀后按每管 18μL 分装到 PCR 管中。

注：配液时应考虑损耗，配制出比理论使用量多一定比例的混合反应液。

3. 加样（标本制备区）

- 1）按空白对照、2 拷贝对照（3 个重复）、待检样本、1 拷贝对照、0 拷贝对照的加样顺序，在分装好反应混合液的 PCR 管中分别加入 2 μL 样本 DNA，反应总体积 20 μL；
- 2）盖好 PCR 反应管盖，涡旋混匀，瞬时离心使所有液体集中到反应管底部，移至扩增区上机检测。

4. PCR 扩增（PCR 扩增区）

将 PCR 反应管放入荧光定量 PCR 仪器中，使用 SLAN-96P 时，选择模块控温，SMN1-E7 选取 FAM 通道，SMN1-E8 选取 ROX 通道，RPP30 选取 HEX 通道。按下表设置反应条件进行 PCR 扩增：

步骤	温度	时间	循环数
1	37℃	2 分钟	1
2	95℃	5 分钟	1
3	95℃	15 秒	40
	58℃	40 秒（采集荧光）	

5. 结果获取

- 1）基线设定：基线的起点可选择 3~6 之间；基线终点可选择 12~18 之间，基线终点需根据最高浓度样本扩增情况设定；
- 2）阈值设定：分别对 SMN1-E7（FAM）、SMN1-E8（ROX）和 RPP30（HEX）设置阈值，当扩增曲线算法设置为“绝对荧光值法”时，三个通道阈值一般可设置为 100。临床上由于不同仪器荧光信号强度可能存在差异，可根据实际情况自行设置合适的阈值，阈值一般设置在扩增曲线的指数扩增期中段；
- 3）结果分析：设定好基线和阈值后，进行结果分析即可获取 Ct 值。根据 Ct 值可计算每个待测样本的 RQ 值。

6. 质量控制程序

对照品	质控标准		
	Ct 值	SMN1-E7 的 RQ 值	SMN1-E8 的 RQ 值
2 拷贝对照	3 次重复检测的 Ct 均值标准：SMN1-E7<27, SMN1-E8<26, RPP30<28	/	/
1 拷贝对照	RPP30<28	0.25<RQ≤0.71	0.25<RQ≤0.69
0 拷贝对照	RPP30<27	RQ<0.25 或无 RQ 值	RQ<0.25 或无 RQ 值
空白对照	所有 Ct 值>35 或无 Ct 值	/	/

注：根据检验目标基因的不同分别对 SMN1-E7 和/或 SMN1-E8 的检测结果进行质控，以上要求必须在同一次实验中同时满足，否则检测结果视为无效，应重新检测。

【阳性判断值】

计算待测样本的 RQ 值（计算公式参考说明书【检验原理】部分内容），参照下表进行结果的判读：

A. SMN1-E7 拷贝数判读		
RQ 值	拷贝数	结果判定
RQ<0.25 或无 RQ 值	0	纯合缺失型
0.25<RQ≤0.71	1	杂合缺失型
RQ≥0.79	2 拷贝及以上	正常型
RQ=0.25 或 0.71<RQ<0.79	灰区，建议复测或使用其它检测技术检测	/

B. SMN1-E8 拷贝数判读

RQ 值	拷贝数	结果判定
RQ<0.25 或无 RQ 值	0	纯合缺失型
0.25<RQ≤0.69	1	杂合缺失型
RQ≥0.77	2 拷贝及以上	正常型
RQ=0.25 或 0.69<RQ<0.77	灰区，建议复测或使用其它检测技术检测	/

为建立试剂盒的阳性判断值，使用人运动神经元存活基因 1（SMN1）检测试剂盒（PCR-荧光探针法）和多重连接依赖性探针扩增（MLPA）技术分别检测 409 例临床样本，样本分为训练集和验证集。利用 ROC 曲线法对所有样本 SMN1-E7 和 SMN1-E8 的 RQ 值分别进行分析，根据约登指数确定了 RQ 值的阳性判断值。

【检验结果的解释】

- 若 2 拷贝对照、1 拷贝对照、0 拷贝对照任一检测结果不符合试剂盒质控要求，提示试剂性能降低或失效，建议更换试剂或对照品后重新检测。
- 若空白对照任一检测通道有扩增曲线且 Ct 值≤35，提示实验环境可能存在污染，此次实验无效，建议重新检测。
- 若待检样本内标通道（HEX）Ct 值>30 或无信号，提示扩增失败，可能为样本 DNA 质量不佳或扩增试剂失效，建议重新提取样本 DNA 或更换试剂后重新检测。
- 若待检样本目标通道（FAM 或 ROX）和内标通道（HEX）均无扩增曲线或 Ct 值>35，结果为未检出外显子拷贝数。可能原因为漏加样本或者样本为非人类基因组，建议确认样本类型后重新检测。
- 若检测结果 RQ 值落在灰区，需重新检测。在确认样本纯度满足试剂盒要求的前提下，可将 DNA 浓度浓缩或稀释至 15–30ng/μL 进行复检。若复检结果仍落在灰区，建议结合多重连接探针扩增技术（MLPA）进行拷贝数分析。
- 当 SMN1-E7 和 SMN1-E8 检测结果均能判读出拷贝数时，对于不同拷贝数结果组合，可参考下表进行解释并结合临床进行后续处置：

SMN1-E7 拷贝数	SMN1-E8 拷贝数	结果解释	进一步措施
≥2	≥2	第 7、8 外显子拷贝数正常，为正常人。	/
≥2	0 或 1	第 7 外显子拷贝数正常，第 8 外显子拷贝数缺失，可能为正常人。	现有研究数据表明该拷贝数组合在正常人群中占比较少，应确认两个反应管加样是否正确，否则建议重新检测。
1	1	第 7、8 外显子均为杂合缺失，为携带者。	建议患者进行遗传咨询，对于有生育需求的患者，建议其配偶进行 SMN1 拷贝数检测。
1	≠1	仅第 7 外显子杂合缺失，可能为携带者。	现有研究数据表明该拷贝数组合在正常人群中占比较少，应确认两个反应管加样是否正确，否则建议重新检测。
0	0、1 或 ≥2	第 7 外显子纯合缺失，可能为患者。	本试剂盒仅用于携带者检测，建议采用 MLPA 技术或其它辅助诊断用试剂进行检测。

- SMA 携带者检测主要针对 SMN1 外显子 7 拷贝数，当检测到 SMN1 外显子 7 为 1 拷贝时，即为 SMA 携带者，若父母双方均为携带者，其子代有 25% 的 SMA 患病风险。由于 SMN1 缺失大部分为外显子 7 合并外显子 8 共同缺失，故外显子 8 的检测结果可起到一定的辅助确认作用，单独的 SMN1 外显子 8 缺失不能确定为 SMA 携带者。
- 仅为生殖腺嵌合体的携带者，采用血液细胞检测可能为阴性结果。

【检验方法的局限性】

- 本试剂盒仅能检出由 SMN1 基因第 7 外显子或第 7 和第 8 外显子杂合缺失导致的 SMA 携带者。不能检出 SMN1 微小突变导致的 [1+1] 型携带者和 2 个拷贝 SMN1

基因在同一条染色体上的 [2+0] 型携带者。

- 本试剂盒仅对 SMN1 基因第 7 外显子和第 8 外显子的拷贝数变异检测结果进行了验证，可检出的拷贝数类型包括 0 拷贝、1 拷贝和 2 拷贝及以上。对 SMN1 基因其他外显子的拷贝数变异不具有检出能力。
- 本试剂盒基于 PCR 扩增的 Taqman 探针法设计，以基因组上特定位置的 DNA 片段为检测靶标，当试剂盒的引物或探针结合位置发生多态性或点突变时，可能导致检测结果呈现假阳性。
- 本试剂盒不能检测 SMN1-E7 和 SMN1-E8 靶标序列之外的任何变化，也无法检测由基因组结构变化导致的基因融合、拷贝数中性倒位和易位。
- 由于 SMN2 基因序列和 SMN1 基因具有高度同源性，高拷贝的 SMN2 基因有可能会影响检测结果判断。
- 本试剂盒的检测结果会受到模板 DNA 质量的影响，不合理的样本采集、运输、保存和处理，以及不当的试验操作和试验环境均有可能导致出现假阴性或假阳性的错误结果。
- 有症状患者的杂合缺失需要进一步采取合适的方法确认。
- 本试剂盒的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，为达到诊断目的，此检测结果要与临床检查、病史、连锁遗传分析及其他的检查结果综合使用。

【产品性能指标】

- 外观：组分齐全，包装外观清洁、无泄漏、无破损。标识、标签字迹清晰完整。
- 准确性：检测 17 份 SMN1 多拷贝参考品，15 份 SMN1 单拷贝参考品和 3 份 SMN1 纯合缺失参考品，结果均为相应的 SMN1 基因外显子拷贝数，符合率 100%；检测 42 例经 MLPA 技术确认 SMN1 拷贝数的临床样本，包括 25 例 SMN1 多拷贝样本、14 例 SMN1 单拷贝样本和 3 例 SMN1 纯合缺失样本，结果均为相应的 SMN1 基因外显子拷贝数，符合率 100%。
- 精密性：使用 3 批试剂盒对中、低浓度下不同 SMN1 基因拷贝数的临床样本进行了连续 20 天检测。统计其检测结果，并对批内、批间、日内、日间、不同仪器、操作者以及实验空间精密性进行了评价。研究结果显示各项检测结果的 RQ 值或扩增 Ct 值的变异系数均不大于 5%。
- 检测限：使用 3 批试剂盒对不同浓度梯度下不同 SMN1 拷贝数的临床样本进行检测，分别建立和验证了试剂盒的最低检测限和最高检测限。最终得出试剂盒的最低检测限和最高检测限分别为 2ng/μL 和 250ng/μL。
- 分析特异性
 - 抗干扰能力评价：①对内源性干扰物质的研究表明，200g/L 血红蛋白、60g/L 白蛋白、37mmol/L 甘油三酯、342μmol/L 胆红素对本试剂盒的检测结果均无影响；②对外源性干扰物质的研究表明，500mg/L 对乙酰氨基酚、100mg/L 头孢克肟、10mg/L 氯雷他定、600mg/L 盐酸拉贝洛尔、11mg/L EDTA 二钾抗凝剂、45mg/mL 枸橼酸钠抗凝剂和 150IU/mL 肝素抗凝剂对本试剂盒的检测结果均无影响。
 - 交叉反应评价：分别对以下 3 种情况下的交叉反应进行研究：①SMN2 基因多拷贝（2–4 拷贝）的样本；②血液样本中常见微生物，如大肠杆菌、巨细胞病毒等；③检测范围外的相似症状临床样本，如杜氏肌营养不良症样本、肌萎缩侧索硬化症（ALS）样本、病毒性脊髓炎样本、继发性肌肉萎缩（非缺失型）样本、α 地中海贫血样本等。研究结果表明上述情形对本试剂盒的检测结果均无影响。
- 临床试验：在 5 家临床试验机构进行了临床试验，共入组静脉全血样本 10461 例，与临床参考方法（MLPA）进行一致性分析，结果显示本试剂盒对 SMN1 基因第 7 外显子和第 8 外显子检测结果的阴性符合率和阳性符合率均为 100%。

【注意事项】

- 本试剂盒仅供体外诊断使用。
- 实验前请仔细阅读本说明书，并严格按照说明书要求操作。
- 检测样本应视为具有感染性物质，操作时应注意防护，并且废弃物处理均需符合相关法规要求。
- 临床实验室应严格按照《医疗机构临床基因扩增实验室管理办法》现行有效版本等有关分子生物学实验室、临床基因扩增实验室的管理规范执行。
- 携带者检测前后应进行遗传咨询，强调残余风险。无论其外周血基因检测结果是否提示为携带者，再次生育时均应进行产前诊断。

- 本试剂盒的使用者应该是接受过 PCR 技术训练的试验者。实验过程严格分区，各区物品均为专用，避免交叉使用造成污染。
- PCR 反应液中含对光敏感的荧光素标记探针，在试验过程中常规光条件下并不会影响试验结果，但应避免将之暴露于不必要的强光源下。

【标识的解释】

符号	
含义	体外诊断医疗器械

【参考文献】

- [1] 北京医学会医学遗传学分会，北京罕见病诊疗与保障学会.脊髓性肌萎缩症遗传学诊断专家共识[J].中华医学杂志,2020,100(40): 3130-3139. DOI:10.3760/cma.j.cn 12137-20200803-02267.
- [2] 单基因病携带者筛查共识专家组,中华医学会医学遗传学分会遗传咨询学组,胡婷,郭君荣,刘珊玲,卢彦平,常清贤.脊髓性肌萎缩症携带者筛查遗传咨询专家共识[J].中华医学遗传学杂志,2024,41(6):661-668.
- [3] 中华医学会医学遗传学分会遗传病临床实践指南撰写组,潘建延,谭虎,等.脊髓性肌萎缩症的临床实践指南 [J].中华医学遗传学杂志, 2020, 37(3) : 263-268. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2020.03.007.
- [4] Bruno Maranda, Li Fan, Jean-François Soucy, Louise Simard, Grant A. Mitchell, Spinal muscular atrophy: Clinical validation of a single-tube multiplex real time PCR assay for determination of SMN1 and SMN2 copy numbers, Clinical Biochemistry, Volume 45, Issues 1–2, 2012,Pages 88-91,ISSN 0009-9120, DOI:10.1016/j.clinbiochem.2011.10.019.
- [5] A. Alimanović and J. Šutković, “Polymerase chain reaction detection methods of Survival Motor Neuron genes: a review”, Bioengineering Studies, vol. 1, no. 1, pp. 37–43, Dec. 2020.
- [6] Su YN, Hung CC, Lin SY, etal. Carrier screening for spinal muscular atrophy (SMA) in 107,611 pregnant women during the period 2005-2009: a prospective population-based cohort study. PLoS One. 2011 Feb 25;6(2):e17067. doi: 10.1371/journal.pone.0017067. PMID: 21364876; PMCID: PMC3045421.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：广东辉锦创兴生物医学科技有限公司
住所：佛山市顺德区龙江镇东涌社区居民委员会人民西路 68 号新基国际创意园 C 座 201
联系方式：0757-29266029
售后服务单位名称：广东辉锦创兴生物医学科技有限公司
联系方式：0757-29266029
生产地址：佛山市顺德区龙江镇东涌社区居民委员会人民西路 68 号新基国际创意园 C 座 201、A 座 202
生产许可证编号：粤药监械生产许 20245525 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准 20253402699

【说明书批准日期/生效日期及修改日期】

2025 年 12 月 29 日