

人类 CYP2C19 基因检测试剂盒（PCR-荧光探针法）
使用说明书

【产品名称】

人类 CYP2C19 基因检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

20 人份/盒

【预期用途】

该产品用于定性检测全血样本的 CYP2C19 基因 CYP2C19*2、CYP2C19*3 和 CYP2C19*17 三个位点的多态性。

本产品检测结果仅代表对人类 CYP2C19 基因的检测结果，为临床医生个体化用药提供参考。本试剂盒仅用于临床辅助诊断，具体临床应用时，临床医生需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诊断的唯一依据。

CYP2C19 是 CYP450 家族中最重要的药物代谢酶之一，许多内源性底物、以及临床上大约 2% 的药物都由其催化代谢。研究发现 CYP2C19 可影响到氯吡格雷、奥美拉唑、地西泮、苯妥英钠等许多重要临床应用药物的代谢，而其基因多态性是引起个体间和种族间对同一药物表现出不同代谢能力的重要原因之一。

CYP2C19 基因野生型为 CYP2C19*1/*1 型，中国人群中较常见的等位基因型是 CYP2C19*2 型、CYP2C19*3 型和 CYP2C19*17 型，其中 CYP2C19*2 型和 CYP2C19*3 型可引起 CYP2C19 基因编码的酶活性减弱，代谢底物的能力减弱，造成活性代谢产物不能生成，导致氯吡格雷抵抗。此基因型携带者称为弱代谢者，中国人群中的弱代谢者 99% 为*2 和*3 型等位基因。CYP2C19*17 型可引起 CYP2C19 基因编码的酶活性增强，代谢底物的能力增强，此基因型携带者称为强代谢者。2010 年美国 FDA 要求氯吡格雷药物标签上注明 CYP2C19 与疗效的关系，并建议使用前检测 CYP2C19 基因的多态性。

表 1：本试剂盒检测 CYP2C19 基因多态性类型

基因	基因多态性	碱基	检测通道
CYP2C19	CYP2C19*2G	CCG	FAM
	CYP2C19*2A	CCA	VIC
	CYP2C19*3G	TGG	FAM
	CYP2C19*3A	TGA	VIC
	CYP2C19*17C	C	FAM
	CYP2C19*17T	T	VIC

【检验原理】

本试剂盒针对 CYP2C19 基因三个位点的不同多态性，设计 3 套特异性引物和探针组合，一个反应体系中通过两种不同通道检测一个位点的基因多态性。在反应体系中含有不同基因型模板的情况下，PCR 反应得以进行并释放不同的荧光信号。利用仪器对 PCR 过程中相应通道的信号强度进行实时监测和输出，实现检测结果的定性分析。

表 2：试剂盒组成

管号	标签名称	主要组成成分	装量规格 (20 人份/盒)
1	CYP2C19*2 反应液	PCR 缓冲液、特异性引物和探针、内标引物、 探针和模板、Taq 酶、UNG 酶	1 管 (480μL)
2	CYP2C19*3 反应液	PCR 缓冲液、特异性引物和探针、内标引物、 探针和模板、Taq 酶、UNG 酶	1 管 (480μL)
3	CYP2C19*17 反应液	PCR 缓冲液、特异性引物和探针、内标引物、 探针和模板、Taq 酶、UNG 酶	1 管 (480μL)
4	弱阳性对照	CYP2C19*2G 和 CYP2C19*2A、 CYP2C19*3G 和 CYP2C19*3A、 CYP2C19*17C 和 CYP2C19*17T 的质粒混合液	1 管 (200μL)
5	空白对照	Tris-HCl 缓冲液(10mM)	1 管 (200μL)

【储存条件及有效期】

- 20℃±5℃ 避光保存，有效期 9 个月。
- 试剂盒在使用时应尽量减少试剂冻融次数，并保证不多于 6 次冻融。
- 生产日期及失效日期见包装标签。

【适用仪器】

- 本试剂盒适用于 StratageneMX3000P、AB7500、LightCycler 480 等实时荧光定量 PCR 仪。
- 本试剂盒要求仪器使用 FAM、VIC 通道采集不同多态性的 CYP2C19 基因扩增荧光信号，使用 ROX 通道采集内标基因扩增荧光信号。

【样本要求】

本试剂盒适用于 2mlEDTA 抗凝新鲜全血中提取人类基因组 DNA 的检测。所提取 DNA 需用紫外分光光度计测定浓度及纯度，要求 DNA 的 A260/280 在 1.8-2.0 之间，-20℃ 以下保存，避免反复冻融。

【检验方法】

- 试剂准备：（试剂准备区）
 - 从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温，各组充分融解，快速离心 10 秒。
 - 核算当次实验所需要的反应数（n），按照 23μL/孔分装量将每种反应液分别分装到 n 个反应管内。PCR 反应管转移至样本准备区，剩余试剂放回-20℃±5℃ 冰箱冷冻避光保存。
$$n = \text{样本数} + \text{空白对照 (1T)} + \text{弱阳性对照 (1T)}$$
- 样本准备：（样本准备区）
 - 样本 DNA 提取：推荐使用天根血液基因组 DNA 提取试剂盒（TIANamp Blood DNA Kit DP318）用于血液基因组 DNA 的提取。所提取 DNA 需用紫外分光光度计测定浓度及纯度，要求 DNA 的 A260/280 在 1.8-2.0 之间。
 - 加样：
 - 将待测样本的基因组 DNA、弱阳性对照、空白对照，分别加入已装有 3 种 PCR 反应液的反应管中，即每个待测样本分别用此 3 种 PCR 反应液进行检测，加入量为 2μL 孔。待测样本的基因组 DNA 推荐浓度为 5-15ng/μL。
 - 盖好 PCR 反应管盖，记录样本加样情况。将 PCR 反应管转移到核酸扩增区进行上机检测。若 PCR 反应管内加入模板后遇临时情况不能立即上机，建议将加好模板的 PCR 反应管放于 2~8℃ 条件暂时保存，并在 24 小时内尽快上机检测。
- PCR 扩增：（核酸扩增区）
 - 开机，并进行仪器性能自检。
 - 取样本准备区准备好的 PCR 反应管，放置在仪器样品槽相应位置。并记录放置顺序。
 - 按表 3 设置仪器扩增相关参数，并开始进行 PCR 扩增。反应结束后，根据扩增曲线，划定合适基线（一般起始设定为 3，终止设定为 15）和荧光阈值（一般将阈值划定在扩增曲线对数形式下指数增长期的中间），得到不同通道 Ct 值并按照表 4 进行结果判定。

表 3：仪器核酸扩增相关参数

体系	总体积为 25μL		
信号采集	CYP2C19*2 反应液	CYP2C19*2G—FAM 通道采集荧光信号	
		CYP2C19*2A—VIC 通道采集荧光信号	
	CYP2C19*3 反应液	CYP2C19*3G—FAM 通道采集荧光信号	
		CYP2C19*3A—VIC 通道采集荧光信号	
	CYP2C19*17 反应液	CYP2C19*17C—FAM 通道采集荧光信号	
		CYP2C19*17T—VIC 通道采集荧光信号	
PCR 反应条件	内标系统		内标基因—ROX 通道采集荧光信号
	阶段	条件	循环数
	UNG 处理	37℃：10 分钟（min）	1
	预变性	95℃：5 分钟（min）	1
		95℃：15 秒（s）	40
	PCR	62℃：60 秒（s）（设置在此阶段结束时采集荧光信号）	

【检验结果的解释】

1. 试剂盒有效性判定：
- 1) 弱阳性对照：FAM、VIC 通道 Ct 值≤30，扩增曲线有明显指数增长长期。
- 2) 空白对照：FAM、VIC 通道无扩增曲线，或者扩增曲线为直线或轻微斜线，无明显指数增长长期，无 Ct 值或 Ct 值≥38。
- 3) 内标基因：ROX 通道 Ct 值≤32，有明显扩增曲线。检测样本的反应管中，若 FAM、VIC 通道有信号，ROX 通道信号较低或无信号，此为样本基因组 DNA 加入过量，建议将样本稀释至合适浓度后进行检测。
2. 检测结果的判定：
- 按照下表 4 对样本检测结果进行判定，确定样本基因多态性。

表 4：结果判定

反应液	基因型	FAM 通道	VIC 通道
CYP2C19*2 反应液	CYP2C19*2 位点 G/G 纯合野生	Ct 值≤36	Ct 值>36 或无 Ct 值
	CYP2C19*2 位点 G/A 杂合突变	Ct 值≤36	Ct 值≤36
	CYP2C19*2 位点 A/A 纯合突变	Ct 值>36 或无 Ct 值	Ct 值≤36
CYP2C19*3 反应液	CYP2C19*3 位点 G/G 纯合野生	Ct 值≤36	Ct 值>36 或无 Ct 值
	CYP2C19*3 位点 G/A 杂合突变	Ct 值≤36	Ct 值≤36
	CYP2C19*3 位点 A/A 纯合突变	Ct 值>36 或无 Ct 值	Ct 值≤36
CYP2C19*17 反应液	CYP2C19*17 位点 C/C 纯合野生	Ct 值≤36	Ct 值>36 或无 Ct 值
	CYP2C19*17 位点 C/T 杂合突变	Ct 值≤36	Ct 值≤36
	CYP2C19*17 位点 T/T 纯合突变	Ct 值>36 或无 Ct 值	Ct 值≤36

【检验方法的局限性】

1. 样本检测结果与样本的收集、处理和保存过程有关，其中任何失误都将导致检测结果的不准确。如果样本处理时未控制好 DNA 的质量，可能出现假阴性的结果。
2. 本试剂盒未包含全部的人类 CYP2C19 基因型别，因此当本试剂盒检测结果为阴性时，并不能排除被检测者带有人类 CYP2C19 基因位点。本试剂盒检测结果仅供临床参考，用于指导个体化用药，不得作为临床诊治的唯一依据。

【产品性能指标】

1. 试剂盒包装完整，无内容物溢出；标签外观完整，无脱落，标签标识内容清晰；试剂盒内组成正确，无重复、缺失组份的情况
2. 使用试剂盒 3 种反应液检测 CYP2C19 基因突变型参考品，应检测出对应突变。
3. 使用试剂盒 3 种反应液检测 CYP2C19 基因野生型参考品，应不得检出突变。
4. 试剂盒最低检出限可达到：1ng 样本中能准确检测出对应基因型。
5. 使用试剂盒重复检测对应基因型参考品 10 次，应检出对应基因型，且检测结果 Ct 值变异系数 CV≤5%。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅供体外诊断使用。
2. 不同批号试剂不能混用。
3. 本试剂盒内弱阳性对照不具有传染性，但在使用时建议将其视为具有潜在传染性物质进行处理。
4. 本试剂盒内用剩的试剂及实验过程中的废弃物建议按照医疗废弃物进行处理。

【参考文献】

1. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, et al. Cytochrome p450 polymorphisms and response to clopidogrel. N Engl J Med. 2009;360:354-62.
2. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. N Engl J Med 2007;357:2001-2015.
3. Lee S.-J. (2013). Clinical application of CYP2C19 pharmacogenetics toward more personalized medicine. Front. Genet. 3:318.
4. Chang FH, Zhang ZX, Bai TY, Wang MJ, Fan L, et al. (2010) The study on the

polymorphisms of CYP2C19 genes associated with susceptibility to liver cancer. Zhongguo Yao Li Tong Xun 27: 22-23.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：武汉友芝友医疗科技股份有限公司

住所：武汉市东湖新技术开发区高新二路 388 号武汉光谷国际生物医药企业加速器 1.2 期 23 栋 1 单元 4、5 层

联系方式：027-65330996

售后服务单位名称：武汉友芝友医疗科技股份有限公司

联系方式：027-65330996

生产地址：武汉市东湖新技术开发区高新大道 858 号生物医药园加速器一期 A4 栋西侧 1 楼

生产许可证编号：鄂食药监械生产许 20120580 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准 20153400246

【说明书核准日期及修改日期】

2019 年 12 月 11 日