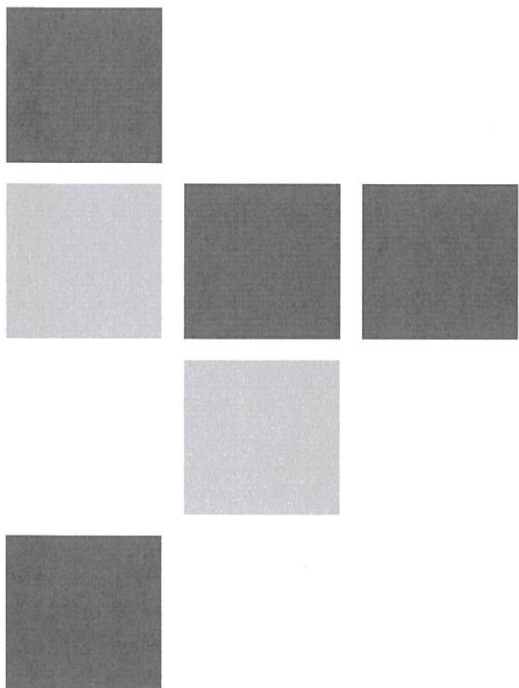




**耳聋易感基因检测试剂盒
(PCR+导流杂交法) 说明书**

**广州凯普医药科技有限公司
Hybribio Limited**

耳聋易感基因检测试剂盒（PCR+导流杂交法） 说明书

【产品名称】

通用名称：耳聋易感基因检测试剂盒（PCR+导流杂交法）

【包装规格】

30人份/盒或6人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人静脉全血中，耳聋相关基因（GJB2, GJB3, SLC26A4和 mtDNA）的 9个突变位点（mtDNA1494、mtDNA1555、SLC26A4-IVS7（-2）、SLC26A4-2168、GJB2-35、GJB2-176、GJB2-235、GJB2-299、GJB3-538）的检测。

可用于成人或儿童耳聋患者的病因诊断、遗传咨询及产前诊断，可帮助和提醒医生慎重使用特定种类的抗生素以避免造成携带基因突变的儿童致聋。

耳聋是一种严重影响人类生活质量的常见先天性疾病，它可以由单一基因突变或不同基因的复合突变引起，也可由环境因素（如医疗因素，环境暴露，创伤，药物等）或基因和环境两者共同作用而致。在中国，先天耳聋的发病率约占中国聋人的50%，而遗传耳聋约占先天耳聋的85%，其大多数为常染色体隐性遗传。我国遗传性耳聋患者所涉及的主要是线粒体DNA（mtDNA）、SLC26A4、GJB2和GJB3四种基因的突变。其中，mtDNA基因突变主要包括1494M、1555M；SLC26A4基因突变主要包括IVS7-M、2168M；GJB2基因突变主要包括35M、176M、235M和299M；GJB3突变主要以538M为主。具体突变类型见表1。



表1 本试剂盒检测的4个耳聋基因的9个突变类型

位点名称	检测的突变类型	突变点简称
mtDNA1494	C→T	1494M
mtDNA1555	A→G	1555M
SLC26A4-IVS7 (-2)	A→G	IVS-M
SLC26A4-2168	A→G	2168M
GJB2-35	-G	35M
GJB2-176	-GCTGCAAGAACGTGTG	176M
GJB2-235	-C	235M
GJB2-299	-AT	299M
GJB3-538	C→T	538M

【检验原理】

采用生物素标记的引物分别对耳聋易感基因突变区域进行特异性扩增，将扩增产物与标记不同突变类型耳聋易感基因探针的尼龙膜在导流杂交仪上进行导流杂交（flow-through hybridization），然后通过化学显色对结果进行判读。

【主要组成成分】

试剂盒主要成分见表2和表3。

表2 PCR扩增试剂盒组成

PCR扩增试剂盒组成 (-15℃以下储存)	规格 (管)		主要成分
	6人份/ 盒	30人份/ 盒	
A组PCR 混合液 (PCR MIX)	165 μL	825 μL	A引物混合液: 4对引物, 0.2 μM B引物混合液: 4对引物, 0.1 μM 1× Buffer、氯化镁: 3.0mM dNTPs: 0.4mM
B组PCR 混合液 (PCR MIX)	165 μL	825 μL	
DNA聚合酶	6 μL	30 μL	DNA 聚合酶: 5U/μL
空白对照	100 μL	100 μL	灭菌注射用水

表3 杂交试剂盒组成

杂交试剂盒组成 (2~8℃ 储存)	规格 (管)		主要成分
	6人份/盒	30人份/盒	
杂交液	24mL	120mL	2 × SSC、0.1% SDS
洗脱液1 (WB1)	19.2mL	96mL	0.5 × SSC、0.1% SDS
封阻液	6mL	30mL	TBS、脱脂奶粉、吐温-20
酶标液	3mL	15mL	链霉亲和素碱性磷酸酶 < 0.35mL/L
溶液A	19.2mL	96mL	TBS、吐温-20
杂交膜	6人份	30人份	26条氨基化探针、尼龙膜
显色液 (NBT/BCIP)	3mL	15mL	氯化硝基四氮唑蓝/5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸盐 (NBT/BCIP)

注：1. 不同批号试剂盒中各组分不可以互换。

2. 本检测需要用的其它主要试剂 (盒)

血液基因组提取试剂盒：采用潮州凯普生物化学有限公司生产的血液基因组DNA提取试剂盒（离心柱型），备案凭证号：粤潮械备20150017号。

【储存条件及有效期】

PCR扩增试剂盒于-15℃以下储存；杂交试剂盒于2~8℃储存；有效期12个月。

避免反复冻融，冻融次数应不超过10次。PCR扩增试剂盒低温运输（温度范围-75℃~0℃）；杂交试剂盒常温运输（温度范围-20℃~40℃），运输时间96小时。

生产日期：见标签。

有效期至：见标签。

【适用仪器】

1. PCR扩增仪：Bioer Life Express（博日PCR仪）；GeneAmp PCR System 9700。



2. 医用核酸分子快速杂交仪HHM-2; 医用核酸分子杂交仪HB-2012A。

【样本要求】

一、样本类型： 静脉全血

二、标本采集：

成人男性和女性及患儿：采用一次性无菌负压采血管或用一次性无菌针筒抽取被检者静脉血2mL置于无菌抗凝管中，抗凝剂采用EDTA抗凝，切勿用肝素抗凝。

三、标本保存和运送

样本采集后立即送检。4℃保存不超过3天，-20℃保存不超过3个月进行检测。样本冻融次数应不超过5次。标本运送时建议采用低温保存运送。

【检验方法】

一、DNA分离提取：

1. 取血液100 μL，采用凯普血液基因组DNA提取试剂盒（离心柱型）提取，具体操作步骤详见试剂盒说明书。
2. 取2 μL抽提好的DNA样本作为模板进行PCR扩增；剩余DNA样品存储于-20℃备用（-20℃保存不超过3个月，冻融次数不超过5次）；
3. 每次反应需要设置空白对照。

二、PCR扩增：

1. 耳聋易感基因扩增试剂准备（在试剂准备区进行）

从试剂盒中取出耳聋易感基因PCR混合液（PCR MIX）室温下溶解，旋涡振荡混匀后，8000转/分钟离心1分钟。从试剂盒中取出耳聋易感基因DNA聚合酶，8000转/分钟离心1分钟。然后按照表4配制扩增试剂。

表4 扩增试剂

	A组PCR混合液 (PCR MIX)	B组PCR混合液 (PCR MIX)	DNA聚合酶 (管)
1 人份用量	27.5 μ L	27.5 μ L	0.5 μ L
10人份用量	275 μ L	275 μ L	5 μ L
20人份用量	550 μ L	550 μ L	10 μ L
30人份用量	825 μ L	825 μ L	15 μ L

将配制好的扩增试剂充分混匀，8000转/分钟离心1分钟，向设定的n个PCR反应管中分别加入28 μ L配制好的扩增试剂，转移到样品处理区。

2. 加样（在样品处理区进行）

在对应的PCR反应管中分别加处理好的样品DNA（约20~40ng/ μ L），耳聋易感基因扩增试剂中加入样品DNA 2 μ L/人份，空白对照2 μ L，盖紧管盖，8000转/分钟离心1分钟。

3. 扩增程序

（以GeneAmp PCR System 9700扩增仪为例，温度速率为4 $^{\circ}$ C/sec）

95 $^{\circ}$ C	9min	} 40 cycle
95 $^{\circ}$ C	30sec	
55 $^{\circ}$ C	30sec	
72 $^{\circ}$ C	1min	
72 $^{\circ}$ C	5min	
16 $^{\circ}$ C	10sec	

三、杂交过程：（每个检测样品占用分隔室一孔，以下试剂用量为单孔用量）

实验前准备：

1. 将杂交检测试剂平衡至室温；
2. 杂交液在使用前预热至45 $^{\circ}$ C；
3. 若洗脱液1（WB1）中出现沉淀，可以加热至45 $^{\circ}$ C溶解；

杂交前准备：

1. 打开杂交仪的电源；
2. 在杂交仪后面的废液出口处安装好废液缸；

3. 根据控制面板指示, 选定[Manual Mode], 按[Enter]键进入温度设定界面, 输入温度为45℃后, 再按[Enter]键确认并进行升温;
4. 用蒸馏水充满反应室, 放置好金属多孔板并打开水泵, 排出多孔板上面的水分后关闭水泵;
5. 将与实验样品数相对应孔数的塑料薄膜放置在金属多孔板上;
6. 用镊子将杂交膜放置在塑料薄膜对应开孔上, 如有多余开孔则用parafilm封口膜覆盖, 这一步要确保杂交膜湿润且没有气泡;
7. 在杂交膜上面放置硅胶密封圈和分隔室;
8. 固定好压扣盖;
9. 开泵泵走残留在膜上的液体后关泵。

PCR产物杂交过程:

1. PCR产物(A组和B组)在95℃变性5~10 min, 然后冰水浴至少2 min, 在杂交仪已经准备好的条件下, 于45℃进行杂交实验;
2. 在杂交孔内加入0.8 mL预热至45℃的杂交液, 盖上盖板温育至少2 min后开泵排出, 关闭水泵;
3. 把步骤1中制备的已经变性的PCR产物DNA(A组和B组)溶液加入到0.8mL预热至45℃的杂交液中, 混匀, 然后加在薄膜上, 盖上盖板温育20min后开泵进行导流杂交;
4. 在45℃条件下, 用预热至45℃的洗脱液1(WB1)冲洗膜3~4次, 每次冲洗间隔5sec左右, 每次0.8mL。
5. 关闭水泵;

注意: 以上操作均应保持杂交液温度为45℃。

四、显色过程:

1. 按[Esc]键进入温度修改界面, 设定杂交仪温度为25℃后按[Enter]键确认;
2. 用0.5mL封阻液封闭膜, 开泵排出封阻液, 然后关泵, 再用0.5mL封阻液封闭5min; (此步骤不必降到25℃就可以进行)



3. 开泵，泵出封阻液，关泵；
4. 在温度为25℃时，加入0.5mL酶标液，温育5min；
5. 开泵泵走所有溶液；
6. 设定温度为36℃；
7. 用溶液A彻底洗膜4次，每次0.8mL；
8. 加入0.5mL显色液（NBT/BCIP），盖上盖板显色6 min；
9. 开泵泵出显色液（NBT/BCIP）；
10. 用杂交液洗膜三次，每次0.8mL，再用2mL蒸馏水漂洗；
11. 关泵，打开压扣盖，拿走分隔室，用镊子取出杂交膜，并放在吸水纸上；
12. 在1小时内分析结果。

【阳性判断值】

本试剂盒是定性检测试剂，不能做定量检测。

【检验结果的解释】

一、本试验结果可以通过肉眼观察判读。

1. 膜条上的探针排列顺序见表5。

表5 膜条上探针排位

Biotin	35N		176N	235N	299N
	35M		176M	235M	299M
1494N	1555N		538N	IVS-N	2168N
1494M	1555M		538M	IVS-M	2168M

注：上表中各突变点对应的“N”是指各耳聋易感基因的正常对照；“M”是指各耳聋易感基因的突变位点；Biotin为杂交反应对照。

2. 结果判定

观察整张膜条上出现的蓝紫色斑点。

- 空白对照：仅在生物素点出现蓝紫色斑点。

- **正常样本：** 在生物素点及所有正常探针处出现蓝紫色斑点。
- **阳性样本：** 正常探针及对应的突变探针位点都出现蓝紫色斑点，为该位点的杂合突变或异质突变；突变探针出现蓝紫色斑点，而对应的正常探针位点没有出现蓝紫色斑点，为该位点的纯合突变或均质突变。
- **其它：** 若某个检测位点的正常探针和突变探针都未出现蓝紫色斑点，可能该检测位点出现新的突变类型，建议做进一步分析，如测序等。

部分情况示意图：

●					
Bio	35N		176N	235N	299N
	35M		176M	235M	299M
1494N	1555N		538N	IVS-N	2168N
1494M	1555M		538M	IVS-M	2168M

空白对照

●	●		●	●	●
Bio	35N		176N	235N	299N
	35M		176M	235M	299M
●	●		●	●	●
1494N	1555N		538N	IVS-N	2168N
●	●		●	●	●
1494M	1555M		538M	IVS-M	2168M

正常样本

●	●		●	●	●
Bio	35N		176N	235N	299N
	35M		176M	235M	299M
●	●		●	●	●
1494N	1555N		538N	IVS-N	2168N
●	●		●	●	●
1494M	1555M		538M	IVS-M	2168M

1494M均质突变

●	●		●	●	●
Bio	35N		176N	235N	299N
	35M		176M	235M	299M
●			●	●	●
1494N	1555N		538N	IVS-N	2168N
	●				
1494M	1555M		538M	IVS-M	2168M

1555M均质突变

●			●	●	●
Bio	35N		176N	235N	299N
	35M		176M	235M	299M
●	●		●	●	●
1494N	1555N		538N	IVS-N	2168N
1494M	1555M		538M	IVS-M	2168M

35M突变纯合子

●	●			●	●
Bio	35N		176N	235N	299N
			●		
	35M		176M	235M	299M
●	●		●	●	●
1494N	1555N		538N	IVS-N	2168N
1494M	1555M		538M	IVS-M	2168M

176M突变纯合子

●	●	●		●	●
Bio	35N		176N	235N	299N
				●	
	35M		176M	235M	299M
●	●		●	●	●
1494N	1555N		538N	IVS-N	2168N
1494M	1555M		538M	IVS-M	2168M

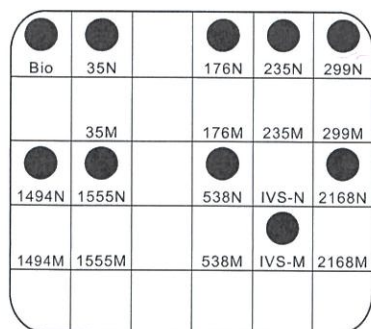
235M突变纯合子

●	●		●	●	
Bio	35N		176N	235N	299N
					●
	35M		176M	235M	299M
●	●		●	●	●
1494N	1555N		538N	IVS-N	2168N
1494M	1555M		538M	IVS-M	2168M

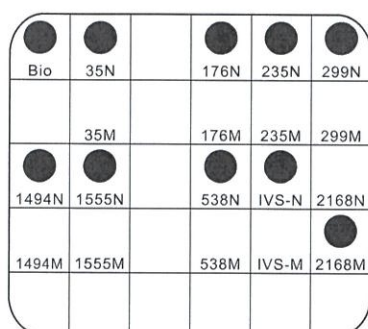
299M突变纯合子

●	●		●	●	●
Bio	35N		176N	235N	299N
	35M		176M	235M	299M
●	●			●	●
1494N	1555N		538N	IVS-N	2168N
			●		
1494M	1555M		538M	IVS-M	2168M

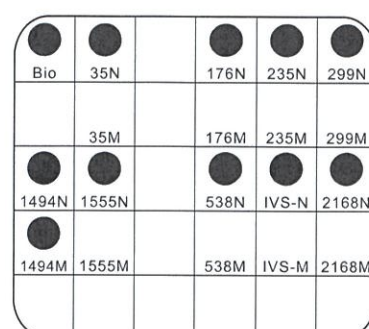
538M突变纯合子



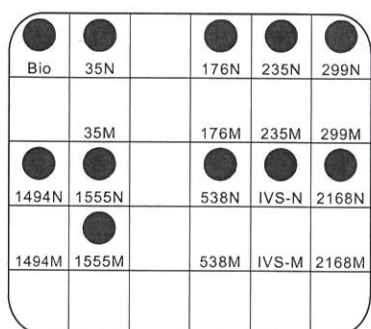
IVS-M突变纯合子



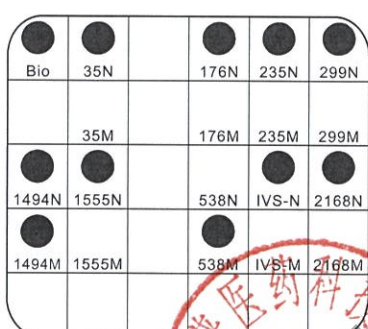
2168M突变纯合子



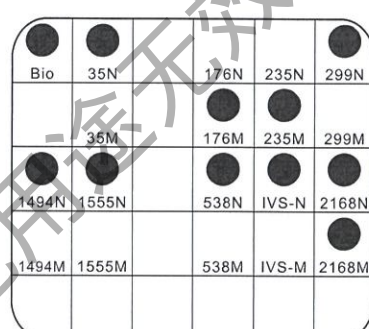
1494M异质突变



1555M异质突变



1494M异质与
538M纯合子复合
突变



176M、235M纯合
子与2168M杂合子
复合突变

二、结果常见问题分析

1. 弱/无信号

- 抽提的样本DNA含量很低，请仔细阅读DNA抽提说明书并严格按照操作说明书操作。
- 确保PCR产物中DNA完全变性成单链，如有必要，在使用前再次变性PCR产物。
- 杂交过程中未加酶标液或将封阻液与酶标液加入的顺序颠倒，导致显色失败。

2. 膜条某些位点出现非特异性杂交斑点。

- 洗膜的温度过低，或洗膜不够充分。
- 显色时间过长。

3. 很高的背景

- 可能由于封闭不足，致使未结合的酶标残留在膜上。确保封阻液完全



覆盖整个杂交膜。

■ 可能因为没有完全将未结合的试剂清洗干净，请确保在显色过程中杂交膜充分清洗，无残留液体。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒仅用于检测中国人群常见的4种耳聋易感基因中9个突变类型，并未涵盖耳聋基因相关的全部突变类型。因此，当本试剂盒检测结果为野生型时，不能排除被检者带有与耳聋基因相关的其它突变类型。
2. 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，为达到诊断目的，此检测结果要与临床检查、病史和别的检查结果结合使用。

【产品性能指标】

1. 准确性：以13份相对应突变位点的阳性参考品检测试剂盒，检测结果均为阳性。
2. 特异性：以正常人基因组DNA样本、非人类基因组DNA样本（淋球菌DNA样本、解脲支原体DNA样本）以及试剂盒检测范围外耳聋基因DNA样本（1174A>T突变，GJB2 512insAACG突变，GJB3 547G>A突变）作为阴性参考品检测试剂盒，检测结果均为阴性。
3. 最低检出量：以GJB2 -35、GJB2 -176、GJB2 -235、GJB2-299、GJB3-538、SLC26A4-IVS7、SLC26A4-2168（杂合子浓度为15~20 ng/ μ L）及mtDNA1494、mtDNA1555（突变DNA含量为10%）作为最低检出量参考品检测试剂盒，检测结果均为阳性。
4. 重复性：以235M杂合、IVS7-2M杂合（浓度为20~40 ng/ μ L）以及mtDNA1555、mtDNA1494（突变DNA含量为50%）作为重复性参考品分别对同一批试剂盒平行检测10次，10次检测结果均一致。
5. 批间测定结果的一致性：以4份重复性参考品分别对3个批次试剂盒平行检测10次，3个批次同一参考品10次检测结果均一致。

6. 高脂血样本中甘油三脂含量在6.70 mmol/L之内, 黄疸样本中胆红素含量在450 μ mol/L之内及溶血样本中血红蛋白含量在109 g/L之内对检测结果没有干扰。

7. 临床研究中, 对比试剂为微阵列芯片法产品, 9种突变位点 (mtDNA1494、mtDNA1555、SLC26A4-IVS7 (-2)、SLC26A4-2168、GJB2-35、GJB2-176、GJB2-235、GJB2-299、GJB3-538) 的诊断结果与对比试剂的总一致率均大于95%。Kappa值均>0.75 ($P < 0.0001$)。

【注意事项】

1. 实验前应仔细阅读说明书, 并严格按说明书进行;
2. 实验室应按临床基因扩增检验实验室管理规范进行管理, 每个区域配有专用的仪器和设备;
3. PCR试剂在使用前应解冻, 8000rpm离心1分钟;
4. 显色液 (NBT/BCIP) 含有毒物质, 可能会对未出生婴儿造成损害, 通过吸入和皮肤接触是有害的, 会对眼睛产生刺激作用。请戴手套在通风良好的地方使用;
5. 实验前应该对实验室进行紫外线消毒, 并用75%乙醇清洗工作台和微量加样器;
6. 实验所用移液器 (加样器) 的移液吸头不应重复使用, 并戴一次性手套;
7. 操作人员应受过专业培训和具有操作经验;
8. 本品仅用于体外诊断。

【参考文献】

1. 戴朴, 于飞, 康东洋, 等. 线粒体DNA1555位点和GJB2基因及SLC26A4基因的诊断及临床应用. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2005, 40(10): 769-773.
2. 郑文波, 罗建红, 郦云, 等. 中国人语前非综合征性耳聋患者GJB2基因的突变分析. 中华儿科杂志, 2000, 38: 610-613.



3. Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. Ann NY Acad Sci, 1991, 630:16-31.
4. Camp GV, Willems PJ, Smith RJH. Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity. Am J Hum Genet, 1997, 60: 758-764.
5. Rabionet R, Gasparini P, and Estivill X, Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins. Hum Mutat, 2000, 16(3): 190-202.
6. Leea KY, Choib SY, Baeb JW, et al. Molecular analysis of the GJB2, GJB6 and SLC26A4 genes in Korean Deafness Patients. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2008, 72(9): 1301-1309.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：广州凯普医药科技有限公司

住所：广州市黄埔区九龙镇中新知识城凤凰三横路71号2号试剂车间四楼

联系方式：020-34072008 传真：020-34072005

售后服务单位名称：广州凯普医药科技有限公司

联系方式：020-34072008 传真：020-34072005

生产地址：广东省广州市黄埔区九龙镇中新知识城凤凰三横路71号生产实验楼3层、6层A区，2号试剂车间1至4层，仓库1层A区、2层B区、3层B区

生产许可证编号：粤食药监械生产许20173077号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准20153401698

【说明书核准日期及修改日期】

核准日期：2020年06月24日

