

白血病融合基因检测试剂盒（荧光 PCR 法）说明书

【产品名称】

通用名称：白血病融合基因检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】

20 测试/盒

【预期用途】

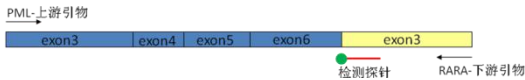
本试剂盒用于体外定性检测人骨髓样本中的 PML-RARα, AML1-ETO 和 BCR-ABL1 3 种融合基因。

本试剂盒用于白血病的辅助诊断：约 95% 的 CML（慢性粒细胞白血病）患者中可检测 BCR-ABL 融合基因，约 90% 的 M2b 型（急性 M2b 型粒细胞白血病）患者可检测到 AML1-ETO 融合基因，约 90% 以上的 APL（急性早幼粒细胞白血病）白血病患者可检测到 PML-RARα 融合基因，因此对这些融合基因的检测有助于临床对 CML、APL 和 M2b 病人的确诊，确定合适的治疗方案，从而进行疗效评价并有助于临床医生获得对患者预后判断的信息。

【检验原理】

本试剂盒采用多重荧光 RT-PCR 法扩增，根据各融合基因的序列特征设计特异性的扩增引物和检测探针（见图 1）并经过优化组合形成两个 PCR 反应及一个逆转录反应。对于每一份样品，本试剂盒进行一次逆转录，逆转录产物加入扩增试剂中的 FG PCR 反应液 A、B 进行检测。其中，反应液 A 可检测 PML-RARα（FAM 通道），AML1-ETO（ROX 通道），反应液 B 可检测 BCR-ABL1（FAM 通道），根据各反应中出现的扩增信号情况判定样本中是否含有融合基因，并通过分析扩增信号的检测通道鉴定融合基因类型。

图 1 PML-RARα融合基因检测原理示意图



【主要组成成份】

试剂盒组成	组分名称	主要成分	规格	数量
逆转录试剂	FG RT 反应液	RT buffer, Random Primer, dNTP Mixture 与 Mg^{2+}	297 μL/管	1 管
	FG RT 酶混合液	MMLV、Recombinant RNase Inhibitor	33 μL/管	1 管
扩增试剂	FG PCR 反应液 A	引物、探针、buffer、dNTPs	436 μL/管	1 管
	FG PCR 反应液 B	混合液	436 μL/管	1 管
	FG 聚合酶	Taq 酶、UNG 酶	15 μL/管	1 管
对照试剂	FG 阳性对照	人工合成的 4 种装甲 RNA，包括 PML-RARα、AML1-ETO、BCR-ABL1、GUSB	30 μL/管	1 管
	ddH ₂ O	/	100 μL/管	1 管

备注：试剂盒内不同批次组分不可互换使用。

本试剂盒的使用不需要配备产品不包含但对试剂必须的试剂组分。

【储存条件及有效期】

-18℃ 以下避光保存，有效期为 12 个月，试剂盒内各组分有效期与试剂盒一致。反复冻融次数≤5 次。拆封后未用完的试剂需立即保存于原储存条件，并在 8 周内使用完毕。需低温（10℃ 以下）运输，运输时间不超过 5 天。

生产日期及失效日期/使用期限见外包装标签。

【适用仪器】

本试剂盒适用于 ABI7500 荧光 PCR 仪和全自动医用 PCR 分析系统（SLAN-96S）。

【样本要求】

本试剂盒的检测对象为人骨髓样本（2~3mL），提取方法选用 Trizol

法（具体操作步骤见附录 1），提取后总 RNA 的浓度应在 20 ~300 ng/μL 之间。本试剂盒用于样本质量控制的内标来源于样本总 RNA 中的管家基因 GUSB，存在于样本总 RNA 内，样本在提取总 RNA 时可同步将其提取出来。

注意：

- ①骨髓样本应使用 EDTA 抗凝，绝对避免使用肝素抗凝，肝素对 PCR 反应有抑制作用。
- ② RNA 极易降解，骨髓样本采集后请立即提取，或存放于 2~8℃ 并于 24 小时内提取。
- ③ RNA 降解对检测有较大影响，为避免 RNA 降解，提取应在无 RNA 酶的环境中进行，如生物安全柜或超净工作台中，并使用无 RNA 酶的吸嘴、EP 管、PCR 薄壁反应管等耗材。操作过程请全程带上乳胶手套、口罩等防护措施避免在样本中引入 RNA 酶。提取好的 RNA 应立即进行逆转录处理或存放于 -70℃，存放时间不超过 3 年，反复冻融不超过 3 次。

【检验方法】

1 逆转录试剂准备——提取区

- ①首先将逆转录试剂及 FG 阳性对照从冰箱取出并平衡至室温，振荡混匀 30 秒，3000 rpm 离心数秒。
- ②取 10μL FG 阳性对照于 EP 管中，70℃ 裂解 5min 释放 RNA，短暂离心后作为阳性对照 RNA 与待检标本 RNA 一起逆转录。源于样本总 RNA 的内标 GUSB 将在样本逆转录的同时一并被逆转录。逆转录反应体系配制见下表：

试剂	用量（μL）/反应
FG RT 反应液	13.5
FG RT 酶混合液	1.5
总 RNA	5

2 逆转录——提取区

- ①将配制的逆转录体系振荡混匀数秒，3000 rpm 离心数秒。
- ②逆转录反应条件

$$\begin{cases} 37^{\circ}\text{C} & 15\text{min (逆转录反应)} \\ 85^{\circ}\text{C} & 5\text{sec (逆转录酶的失活反应)} \end{cases}$$

3 PCR 试剂准备——配液区

- ①首先将所有的试剂从冰箱取出并平衡至室温。PCR 反应液分两管配制，分别对应 FG PCR 反应液 A、B，对于每管反应液的配液标准为：取 $n \times 19.8 \mu\text{L}$ PCR 反应液和 $n \times 0.2 \mu\text{L}$ FG 聚合酶加入到 1.5 mL 离心管中（ n =待检样本数+3），振荡混匀数秒，3000 rpm 离心数秒。配好的 PCR 反应液必须贮存在 -18℃ 以下并在 4 小时内使用。FG PCR 反应液 A、B 中均含有内标基因的扩增引物和探针，在样本 cDNA 进行扩增时同步完成内标基因的扩增与检测。

- ② PCR 反应液的分装。FG PCR 反应液 A、B 分别以每管 20 μL 分装于 PCR 薄壁反应管。

- ③将配制好的 PCR 反应管装入凹凸袋转移至提取间。

4 加样——提取区

- ①用微量加液器向每支 PCR 薄壁反应管中分别加入 5 μL 相应的 cDNA 样本、阳性对照品、ddH₂O，并立即盖严管盖。
- ②加样后将 PCR 薄壁反应管瞬时离心（如 3000 rpm 离心 5 秒），使样本与反应液进行混合。
- ③将已加入模板的 PCR 薄壁反应管转移至 PCR 扩增区。

5 PCR 扩增——扩增区

白血融合基因检测试剂盒（荧光 PCR 法）说明书

①仪器的程序设定如下：

体系	本试剂盒反应体系设为 25 μL		
	阶段	条件	循环数
PCR 反应程序	UNG 处理	50℃, 2 分钟	1
	预变性	95℃, 10 分钟	1
	Touchdown 循环程序	95℃, 20 秒	10
		65℃, 1 分钟 (每个循环下降 1℃)	
		72℃, 1 分钟	
	PCR 循环程序	95℃, 20 秒	40
		56℃, 32 秒	
		72℃, 1 分钟	

②程序运行完毕，将 PCR 薄壁反应管（闭管）取出放入凹凸袋，将封口封严，按污染源处理。

【阳性判断值】

1. 阈值线设置：各通道阈值线应在阴性对照噪声信号的上方并同时位于阳性对照的指数扩增期。
2. 阳性对照品的参考值（参考范围）见表 1。
3. ddH₂O 在 2 个反应体系中无扩增信号。

表 1 阳性对照品的参考值（参考范围）

仪器	体系	通道	参考值范围
SLAN-96S	反应液 A	FAM	Ct 值<20
		ROX	Ct 值<14
		Cy5	Ct 值<14.5
	反应液 B	FAM	Ct 值<24
		Cy5	Ct 值<15
ABI 7500	反应液 A	FAM	Ct 值<18.5
		ROX	Ct 值<14.5
		Cy5	Ct 值<15
	反应液 B	FAM	Ct 值<23
		Cy5	Ct 值<16.5

4. 待检标本临界 Ct 值参考范围。

SLAN-96S：待检标本在反应液 A 和 B 的内标基因通道（Cy5 通道）所得 Ct 值≥25 时，检测结果不符合要求，建议重新取样检测。当内标基因（Cy5 通道）Ct 值<25 时，按照表 2 进行判断：

表 2 SLAN-96S 临界 Ct 值

融合基因型	反应液 A		反应液 B
	FAM	ROX	FAM
PML-RARα	+	—	—
AML1-ETO	—	+	—
BCR-ABL1	—	—	+

注：+ 表示 Ct 值≤29.6 则判断为阳性；— 表示 Ct 值>29.6 或者无扩增信号则判定为阴性。

ABI 7500：待检标本在反应液 A 和 B 的内标基因通道（Cy5 通道）所得 Ct 值≥23 时，检测结果不符合要求，建议重新取样检测。当内标基因（Cy5 通道）Ct 值<23 时，按照表 3 进行判断：

表 3 ABI 7500 临界 Ct 值

融合基因型	反应液 A		反应液 B
	FAM	ROX	FAM
PML-RARα	+	—	—
AML1-ETO	—	+	—
BCR-ABL1	—	—	+

注：+ 表示 Ct 值≤29.2 则判断为阳性；— 表示 Ct 值>29.2 或者无扩增信号则判定为阴性。

注意：本试剂盒所使用的内标为 GUSB 管家基因，针对内标设计了两条引物一条探针，在扩增中每个样本均有内标的扩增信号，可对加样误差和样本质量进行控制。

【检验结果的解释】

本试剂盒采用两个反应管检测一份样本，以实现 3 种融合基因的筛查，

检测体系中加入内参基因用于指示扩增成功与否。如果两个反应管中均只有内参基因的扩增信号（Cy5 信号）则样本不含所筛查的 3 种融合基因；如果两个反应管中出现 Cy5 之外的信号且在 Ct 阳性设定值（Cut-off 值）范围内，则证明该样本存在融合基因（融合基因的类型参照表 2 或表 3 进行判断）。原则上一个样本只含有一种融合基因，即两个反应中仅有一个可能出现除 Cy5 之外的信号，但不排除一些特殊的样品，如处于急变期的病人样本可能出现两种融合基因。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒只能筛查所选试剂盒所覆盖的 3 种融合基因，其它稀有的融合基因不在本试剂盒的检测范围内。
2. 本试剂盒仅能检测融合基因，而不能检测出具体融合形式，需进一步实验以确定具体的融合形式。
3. 本试剂盒的使用仅限于规定的样本类型及检测系统。
4. 阴性结果不能完全排除融合基因的存在，样本中白细胞含量过少、核酸过度降解或者低于反应体系的最低检测限亦可造成阴性结果。
5. 不合理的样本采集、转运及处理，以及不当的试验操作和实验环境均有可能导致假阴性或假阳性结果。
6. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对患者个性化治疗的选择应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。

【产品性能指标】

1. 最低检出限：检测检测限参考品 FG S1、FG S6、FG S7、FG S8、FG S9、FG S10，最低检出限为 20 copies/μL。检测限参考品包含内容为 20copies/μL 的各融合基因装甲 RNA 和浓度为 20000copies/μL 的内标基因 GUSB 装甲 RNA。
2. 阴阳性参考品符合率：检测企业参考品中的 21 份阳性参考品和 40 份阴性参考品，符合率为 100%。
3. 精密性：检测企业参考品盘中的精密性参考品 FG S1、FG S6、FG S7，试剂盒的批内批间 CV 值<5%。
4. 分析特异性
 - a) 阴性验证：对 20 份浓度为 200ng/μL 阴性参考品进行检测，结果均为阴性；
 - b) 交叉反应：反应液 A 和 B 之间不存在交叉情况，检测试剂盒外序列相近的 20 种融合基因（NPM-RARα, AML1-MTG16, AML1-EAP, AML1-MDS1/EV11, TEL-ABL1, MLL-AF9, MLL-AF6, MLL-AF9, MLL-AF17, E2A-HLF, PLZF-RARα, TEL-AML1, SIL-TAL1, FIP1L1-PDGFRα, SET-CAN, DEK-CAN, TEL-PDGFRB, MLL-AF1p, MLL-AF1q 和 MLL-ENL）均为阴性。
5. 临床试验共检测 2049 例骨髓总 RNA 样本，致善试剂盒检测结果与测序结果比较，灵敏度为 100%，特异性为 100%，总符合率 100%。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外诊断使用，操作人员必须经过培训并具有一定经验，试剂盒使用前请仔细阅读说明书全文。
2. 进行逆转录相关操作时，应严格按照 RNA 操作规范进行试验，避免 RNA 降解。
3. 请严格按照《医疗机构临床基因扩增管理办法》（卫办医政发〔2010〕609 号规定）进行试验操作：如 PCR 试验严格分区操作；各区应有专用的手套、移液器等，不得交叉使用，避免污染。工作人员应遵循从一区到二区的单方向工作原则，各工作区相对隔离；进行 PCR 试验的工作桌面和及相关物品应定期用 1%次氯酸钠、75%酒精、1mol/L 盐酸或紫外灯进行灭菌和消毒。
4. 试验操作所需的消耗用品应一次性使用，使用前进行无菌处理。试剂盒中各试剂充分融化后请短暂离心。反应液分装时应尽量避免产生气泡。PCR 反应管经瞬时离心后，上机前应避免振荡，应注意检查各反应管是否盖紧，以免污染仪器。

白血病融合基因检测试剂盒（荧光 PCR 法）说明书

- 5.每次试验应设置阴阳性对照。
- 6.PCR 反应混合液应避光保存。
- 7.尽量避免反复冻融，如果需要多次使用，请在第一次融解后将制品按适当量分装后保存。
- 8.本试剂盒不含有人源或动物源性物质，不具有感染性。

【基本信息】

注册人/生产企业名称：厦门致善生物科技股份有限公司
住所：厦门火炬高新区（翔安）产业区翔安北路 3701 号之 1 号楼
联系方式：电话 0592-7615088 / 400-661-8810；
传真 0592-7615089
售后服务单位名称：厦门致善生物科技股份有限公司
联系方式：电话 0592-7615088 / 400-661-8810；
传真 0592-7615089
生产地址：厦门火炬高新区（翔安）产业区翔星路 88 号台湾科技企业育成中心 W602A 室
厦门火炬高新区（翔安）产业区翔安北路 3701 号之 1 号楼
生产许可证编号：闽食药监械生产许 20100283 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准 20183400429

【说明书核准日期及修改日期】

2019 年 07 月 10 日

附录 1 Trizol 法提取 RNA

一试剂耗材准备（以下为提取 1 份样本的量，同时提取多个样本时按照样本数增加试剂和耗材准备量）

- 1.Trizol 试剂（life tech）：1mL
- 2.10×红细胞裂解液（天根）：1.5mL
- 3.DEPC H₂O（足够溶解 RNA 和稀释红细胞裂解液的量）：150mL
- 4.氯仿(200μL)、异丙醇(500μL)、75%的乙醇(1mL)
- 5.50mL 离心管(1 个)
- 6.EP 管（1.5mL,4 个）
- 7.冰及冰盒（1 个，大些）
- 8.高速冷冻离心机（50mL 离心管和 1.5mL 离心管）
- 9.RNase free 的枪尖、离心管

二提取步骤

- 1.首先将 10×红细胞裂解液使用 DEPC H₂O 稀释至 1×。
- 2.将 2~3mL 人骨髓样本倒入干净的 50mL 离心管中，加入 5 倍体积的 1×红细胞裂解液，充分摇晃混匀后置于冰上放置 15 分钟，每隔 5 分钟取出充分摇晃一次。
- 3.将上述混合液在 4℃条件下，680g 转速下离心 10 分钟，此时白细胞会沉淀在管底。
- 4.将上清倒掉，小心不要倒掉白细胞沉淀，向离心管中再加入 2 倍体积的 1×红细胞裂解液，涡旋振荡至白细胞重悬均匀，4℃条件下，680g 转速下离心 10 分钟，此时白细胞会沉淀在管底。
- 5.倒掉上清，小心不要倒掉白细胞沉淀，向离心管中再加入 1mL 1×红细胞裂解液，用微量移液器反复吹吸至白细胞再次重悬，并转移至干净的 EP 管（1.5mL）中。4℃条件下，680g 转速下离心 10 分钟，此时白细胞会沉淀在管底。
- 6.向细胞中加入 1mL Trizol,悬浮沉淀混匀后（注：禁用漩涡振荡器）室温（或 15~30℃加热）放置 5 分钟，使其充分裂解。
- 7.12,000g 离心 5 分钟，将上清转移至新的 EP 管中，弃沉淀。
- 8.按照 200μL 氯仿/mL Trizol 向上清中加入氯仿，震荡混匀后室温（或 15-30℃加热）放置 15 分钟。（注：禁用漩涡振荡器）
- 9.4℃ 12,000g 离心 15 分钟
- 10.吸取上层水相至另一个离心管中。（注：千万不要吸取中间界面，若同时

提取 DNA 和蛋白质，则保留下层酚相存于 4℃冰箱）

11. 按 0.5ml 异丙醇/mL Trizol 的比例，加入异丙醇混匀室温放置 5-10 分钟。
- 12.4℃ 12,000g 离心 10 分钟。弃上清，RNA 沉淀于管底。
- 13.按 1mL75%乙醇/mL Trizol 的比例，加入 75%乙醇温和震荡离心管，悬浮沉淀。
- 14.4℃ 8,000g 离心 5 分钟，尽量弃上清。
- 15.室温晾干（5~10 分钟）。
- 16.用 50μL DEPC 水溶解。