



# 人类 PML-RARA 融合基因分型检测试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

Cat:#XK-103

## 【产品名称】

通用名称：人类 PML-RARA 融合基因分型检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

## 【包装规格】

24 人份/盒

## 【预期用途】

本试剂盒适用于体外定性检测人体外周血或骨髓样本中 PML-RARA（L 型和 S 型）融合基因。

急性早幼粒细胞白血病（APL，M3 型）患者有 90% 以上是由染色体核型 t(15;17)(q22;q21) 易位导致，该易位使 15q22 中的 PML 基因与 17q21 中的 RARA 基因融合，产生 PML-RARA 和 RARA-PML 两个融合基因。根据 PML 基因断裂位点不同形成 L 型、V 型和 S 型三种 PML-RARA 融合基因，正确区分对临床治疗判定预后具有指导作用。因 APL 常进展很快，早期诊断和确定治疗方案对预后非常重要。针对 PML-RARA 融合基因的检测方法主要有传统的 DNA 印迹技术（Southern Blot）、荧光原位杂交技术（FISH）以及荧光 PCR 技术等。DNA 印迹技术对特定融合基因定性定量检测、基因突变分析、酶切图谱分析、基因重排和丢失检测方面具有广泛的应用，具有灵敏度高的特点，但同时也具有操作复杂、放射性污染、半衰期短、不稳定等缺点，难以在临床大规模使用；荧光原位杂交技术利用荧光标记的特异核酸探针与靶 DNA 分子杂交，通过在荧光显微镜或共聚焦激光扫描仪下观察荧光信号来确定与特异探针杂交后靶 DNA 被染色的数量，是目前临床常用的检测融合基因的方法，但其结果判读依赖于判读者的主观判读能力，对相关经验和判读技术要求较高，主观性较强，成本较高、通量低；荧光 PCR 技术具有检测速度快、准确性高、通量大、灵敏度高和成本低的优势，对急性早幼粒细胞白血病患者的诊断有重要意义。

本试剂盒的检测结果仅供临床参考，不可作为临床诊断的唯一依据。

## 【检验原理】

本试剂盒利用实时荧光 PCR 技术，根据 PML-RARA L 型和 S 型融合基因的序列特征设计特异性的扩增引物和检测探针，经过优化组合形成两个 RT-PCR 反应。其中，PML-RARA L 型 PCR 反应液 A 可检测 PML-RARA L 型，PML-RARA S 型 PCR 反应液 A 可检测 PML-RARA S 型。用试剂盒中提供的 PCR 检测试剂配制成 PCR 反应管，把提取的样本核酸加入 PCR 反应管中，PML-RARA 融合基因 RNA 在逆转录酶作用下反转录成相应的 cDNA，然后在 DNA 聚合酶的作用下，应用 TaqMan 探针技术扩增目的 cDNA 并进行实时荧光 PCR 检测，根据各反应中出现的扩增信号情况，通过分析扩增曲线及 Ct 值判定样本中是否含有相应的融合基因，从而鉴定融合基因类型。

## 【主要组成成分】

| 组分名称     |                        | 分装量     | 数 量 | 主要成分                                         |
|----------|------------------------|---------|-----|----------------------------------------------|
| PCR 检测试剂 | PML-RARA L 型 PCR 反应液 A | 55μL/管  | 1 管 | 引物、探针、TE 溶液                                  |
|          | PML-RARA S 型 PCR 反应液 A | 55μL/管  | 1 管 | 引物、探针、TE 溶液                                  |
|          | PML-RARA PCR 反应液 B     | 840μL/管 | 1 管 | BSA、Tris-cl 溶液、KCl、MgCl <sub>2</sub> 、DEPC 水 |
|          | PML-RARA PCR 反应液 C     | 100μL/管 | 1 管 | 热启动 Taq 酶、MLV 酶、RNA 酶抑制剂、dNTP Mix            |
| 质控品      | PML-RARA 阴性质控品         | 500μL/管 | 1 管 | DEPC 水、PML-RARA 内标假病毒                        |
|          | PML-RARA L 型阳性质控品      | 250μL/管 | 1 管 | DEPC 水、PML-RARA L 型假病毒、PML-RARA 内标假病毒        |
|          | PML-RARA S 型阳性质控品      | 250μL/管 | 1 管 | DEPC 水、PML-RARA S 型假病毒、PML-RARA 内标假病毒        |

注：

- 不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。
- 核酸提取试剂：江苏康为世纪生物科技股份有限公司生产的“核酸提取或纯化试剂”（苏泰械备 20190282 号）；或广州达安基因股份有限公司生产的“核酸提取或纯化试剂”（备案号：粤穗械备 20170583）。

## 【储存条件及有效期】

试剂盒在 -20±5℃ 保存，有效期 9 个月，反复冻融次数应不超过 8 次。试剂盒开瓶次数不超过 8 次，运输时间不应超过 5 天。生产日期及有效期见包装标签。

## 【适用仪器】

本试剂盒适用于 ABI 7500 实时荧光 PCR 仪。

## 【样本要求】

- 适用的样本类型：外周血、骨髓。
- 样本采集：抽取受检者静脉血或骨髓 3~5mL，注入含有 EDTA 抗凝或枸橼酸钠抗凝剂的玻璃管内，立即轻轻颠倒玻璃管混合 5~10 次，使抗凝剂与静脉血或骨髓充分混匀，密闭送检。（避免使用肝素抗凝，肝素对 PCR 反应有抑制作用。）

3. 样本的保存和运送：样本采集后请立即进行核酸提取或在 2~8℃ 条件下保存应不超过 24 小时；在 -20±5℃ 保存期为 12 个月。标本运输应采用冰壶加冰或泡沫箱加冰，在冷冻和密封状态下运输。
4. 提取好的 RNA 应立即进行 PCR 检测或者置于 -80±5℃ 保存不超过 3 个月。

### 【检验方法】

#### 1. 核酸提取（样本制备区）

严格按照“核酸提取或纯化试剂”说明书操作步骤进行待检样本 RNA 的提取。阴性质控品和阳性质控品可取 50μL 加入裂解液或生理盐水，然后按说明书的相应步骤进行 RNA 提取。

#### 2. PCR 试剂准备（试剂准备区）

- 2.1 首先将所有的试剂从冰箱取出，待其温度平衡至室温后，备用。
- 2.2 检测体系分为 2 管：分别从试剂盒中取出 PML-RARA L 型 PCR 反应液 A、PML-RARA S 型 PCR 反应液 A、PML-RARA PCR 反应液 B、PML-RARA PCR 反应液 C，振荡混匀数秒，3000rpm 离心数秒。取 N 个 PCR 反应管（N=待测样本个数+阴性质控品+阳性质控品），每管 PCR 反应液的分装标准如下表，PCR 反应液以每管 20μL 分装于 PCR 反应管中。

| 名 称               | 组 分                    | 单人份分装体积 | 总体积  |
|-------------------|------------------------|---------|------|
| PML-RARA L 型反应管配制 | PML-RARA L 型 PCR 反应液 A | 2μL     | 20μL |
|                   | PML-RARA PCR 反应液 B     | 16.6μL  |      |
|                   | PML-RARA PCR 反应液 C     | 1.4μL   |      |
| PML-RARA S 型反应管配制 | PML-RARA S 型 PCR 反应液 A | 2μL     | 20μL |
|                   | PML-RARA PCR 反应液 B     | 16.6μL  |      |
|                   | PML-RARA PCR 反应液 C     | 1.4μL   |      |

#### 3. 加样（样本制备区）

往上述PCR反应管中分别加入对应的待测样本核酸、阳性质控品核酸和阴性质控品核酸各5μL。盖紧管盖，8000rpm瞬时离心后转移至扩增检测区。

#### 4. PCR 扩增（扩增区）

- 4.1 将反应管放入仪器样品槽内。
- 4.2 仪器操作
  - 4.2.1 ABI 7500 仪器设置
    - 4.2.1.1 打开“Setup”窗口，按样本对应顺序设置阴性质控(NTC)、阳性质控以及未知样本(Unknown)，并在“Sample Name”一栏中设置样本名称；探针检测模式设置为：Reporter Dye1: FAM, Quencher Dye1: NONE; Reporter Dye2: VIC, Quencher Dye2: NONE。
    - 4.2.1.2 打开instrument窗口，设置程序如下：

| 步骤 (steps) | 温度 (Temperature) | 时间 (Time) | 循环数 (Cycles) |
|------------|------------------|-----------|--------------|
| 1          | 50℃              | 15min     | 1            |
| 2          | 95℃              | 10min     | 1            |
| 3          | 95℃              | 15sec     | 45           |
|            | *58℃             | 45sec     |              |

A. \*步骤 (58℃ 45sec) 采集荧光信号；

- 4.2.1.3 设置完成后，保存文件，运行程序。
- 4.2.1.4 程序运行完毕，将 PCR 反应管闭管取出，放入塑料袋封口，按污染源处理。

#### 5. 结果获取

- 5.1 扩增曲线特征的描述：扩增曲线一般呈“S”型。
- 5.2 基线设定：根据实验情况，应该选择荧光本底值较稳定的一段区域作为基线的设定范围。
- 5.3 阈值设定：超过阴性质控品扩增曲线的最高点即可。
- 5.4 结果分析：设定好基线和阈值线后，即可进行结果分析。选择 FAM 通道，可以得到待测样本、质控品的检测结果；选择 VIC 通道，可以得到内标的检测结果。

#### 6. 实验的有效性判断

- 6.1 PML-RARA 阴性质控品的检测结果应为：内标（VIC 通道）Ct 值≤32，且 PML-RARA L 型和 S 型基因（FAM 通道）无明显扩增曲线。
  - 6.2 PML-RARA L 型阳性质控品的检测结果应为：内标（VIC 通道）Ct 值≤32，且 PML-RARA L 型基因（FAM 通道）Ct 值≤33。
  - 6.2 PML-RARA S 型阳性质控品的检测结果应为：内标（VIC 通道）Ct 值≤32，且 PML-RARA S 型基因（FAM 通道）Ct 值≤33。
- 以上要求必须在同次实验中满足，否则检测结果视为无效，须重新检测。

## 【阳性判断值】

通过参考值的研究试验确定本试剂盒阳性判断值为：

内标基因（VIC 通道）的 Ct 值 $\leq$ 36，且 PML-RARA L 型基因（FAM 通道）Ct 值 $\leq$ 39 时判断样本为 PML-RARA L 型阳性；

内标基因（VIC 通道）的 Ct 值 $\leq$ 36，且 PML-RARA L 型基因（FAM 通道）Ct 值 $>$ 39 或者无 Ct 值时判断样本为 PML-RARA L 型阴性；

内标基因（VIC 通道）的 Ct 值 $\leq$ 36，且 PML-RARA S 型基因（FAM 通道）Ct 值 $\leq$ 39 时判断样本为 PML-RARA S 型阳性；

内标基因（VIC 通道）的 Ct 值 $\leq$ 36，且 PML-RARA S 型基因（FAM 通道）Ct 值 $>$ 39 或者无 Ct 值时判断样本为 PML-RARA S 型阴性；

内标基因（VIC 通道）的 Ct 值 $>$ 36 或者无 Ct 值时，则判定为该样本不合格。

## 【检验结果的解释】

### 1. PML-RARA L 型检验结果的解释

- 若 PML-RARA L 型 PCR 反应管中样本反应孔的 FAM 检测通道（PML-RARA L 型基因）有扩增曲线且 Ct 值 $\leq$ 39；内标基因的 VIC 检测通道有扩增曲线且 Ct 值 $\leq$ 36，判断结果有效，可直接报告 PML-RARA L 型阳性。
- 若 PML-RARA L 型 PCR 反应管中样本反应孔的 FAM 检测通道（PML-RARA L 型基因）有扩增曲线且 Ct 值 $>$ 39 或无 Ct 值；内标基因的 VIC 检测通道有扩增曲线且 Ct 值 $\leq$ 36，判断结果有效，可直接报告 PML-RARA L 型阴性。
- 若 PML-RARA L 型 PCR 反应管中样本反应孔内标基因的 VIC 检测通道有扩增曲线且 Ct 值 $>$ 36 或无 Ct 值，则该样本不合格，应查找并排除原因，并对此样本进行重复实验（若重复实验的检测结果仍无效，请与本公司联系）。

### 2. PML-RARA S 型检验结果的解释

- 若 PML-RARA S 型 PCR 反应管中样本反应孔的 FAM 检测通道（PML-RARA S 型基因）有扩增曲线且 Ct 值 $\leq$ 39；内标基因的 VIC 检测通道有扩增曲线且 Ct 值 $\leq$ 36，判断结果有效，可直接报告 PML-RARA S 型阳性。
- 若 PML-RARA S 型 PCR 反应管中样本反应孔的 FAM 检测通道（PML-RARA S 型基因）有扩增曲线且 Ct 值 $>$ 39 或无 Ct 值；内标基因的 VIC 检测通道有扩增曲线且 Ct 值 $\leq$ 36，判断结果有效，可直接报告 PML-RARA S 型阴性。
- 若 PML-RARA S 型 PCR 反应管中样本反应孔内标基因的 VIC 检测通道有扩增曲线且 Ct 值 $>$ 36 或无 Ct 值，则该样本不合格，应查找并排除原因，并对此样本进行重复实验（若重复实验的检测结果仍无效，请与本公司联系）。

## 【检验方法的局限性】

- 本试剂盒只能对 PML-RARA（L 型、S 型）融合形式进行检测，其他基因的融合形式不在本试剂盒的检测范围内。
- 本试剂盒的使用仅限于规定的样本类型及检测系统。
- 阴性结果不能完全排除融合基因的存在，扩增反应体系中融合基因浓度低于反应体系的最低检测限亦可造成假阴性结果。
- 不合理的样本采集、处理、运送、保存及不当的实验操作和实验环境均有可能导致假阴性或假阳性结果。
- 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对患者个体化治疗的选择应结合其临床症状、体征、病史、其他实验室检测及治疗反应等情况综合考虑。

## 【产品性能指标】

- 最低检测限：本试剂盒的最低检测限为 PML-RARA L 型和 PML-RARA S 型融合基因 20copies/ $\mu$ L。
- 阴阳性参考品符合率：检测 10 份企业阳性参考品，检测结果均应为相应型别阳性；检测 12 份企业阴性参考品，检测结果应全为阴性。
- 精密度：采用企业重复性参考品进行精密度评价，其 Ct 值的变异系数（CV 值）不高于 5.0%。
- 分析特异性：
  - 交叉反应：检测试剂盒外序列相近的 29 种融合基因（CBFB-MYH11、E2A-PBX1(TCF3-PBX1)、FIP1L1-PDGFR $\alpha$ 、MLL-AF4(KMT2A-AFF1)、MLL-AF9(KMT2A-MLLT3)、SIL-TAL1(STIL-SCL)、TEL-AML1(ETV6-RUNX1)、AML-MDS1、DEK-CAN、MLL-PTD、MLL-AF1q、MLL-AF1p、MLL-AF6、MLL-AF10、MLL-AF17、MLL-ELL、MLL-ENL、SET-CAN、TLS-ERG、ZNF198-FGFR1、BCR-FGFR1、TEL-PDGFRB、NPM1-MFL1、NPM1-ALK、E2A-HLF、RPN1-EVI1、NUP98-HOXD13、NUP98-HOXA9、AML1-EAP）均为阴性，上述融合基因与本试剂盒均不存在交叉反应。
  - 干扰物质：样本中可能存在的干扰物质如胆红素（340  $\mu$ mol/L）、甘油三酯（5mmol/L）和血红蛋白（6g/L），均不干扰本试剂盒的检测结果。

## 【注意事项】

- 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。
- 试剂使用前要室温平衡完全解冻。试剂盒中组份需在有效期内使用，不使用本试剂盒提供的组份进行试验将可能导致错误结果。
- 为了避免样本中任何潜在的生物危险，检测样本应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤和粘膜；样本的处理应在可防止气雾外流的生物安全柜中操作，样本制备区所用过的试管、吸头需打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方

可丢弃；样本操作和处理均需符合相关法规要求：卫生部《微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. 完成样本核酸提取后，建议马上进行下一步实验，否则请保存于 $-80\pm 5^{\circ}\text{C}$ 待用。
5. 每次实验应设置阴、阳性质控品。
6. 样本处理过程严格控制好交叉污染，否则可能出现假阳性。阴性结果不能完全排除融合基因的存在，扩增反应体系中融合基因浓度低于反应体系的最低检测限亦可造成假阴性结果。PCR 反应液应避免反复冻融，如果需要多次使用，请在第一次融解后将试剂按适当量分装后保存。
7. 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。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。
8. 本试剂盒不含有源或动物源物质，不具有感染性。

#### 【参考文献】

1. Gallagher RE, Li YP, Rao S, Paietta E, Andersen J, Etkind P et al. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases with PML-RAR alpha break/fusion sites in PML exon 6: identification of a subgroup with decreased in vitro responsiveness to all-trans retinoic acid. Blood 1995; 86: 1540 - 1547.
2. Grimwade D, Howe K, Langabeer S, Davies L, Oliver F, Walker H et al. Establishing the presence of the t(15;17) in suspected acute promyelocytic leukaemia: cytogenetic, molecular and PML immunofluorescence assessment of patients entered into the M.R.C. ATRA trial. M.R.C. Adult Leukaemia Working Party. Br J Haematol 1996; 94: 557 - 573.
3. Slack JL, Willman CL, Andersen JW, Li YP, Viswanatha DS, Bloomfield CD et al. Molecular analysis and clinical outcome of adult APL patients with the type V PML-RARAlpha isoform: results from intergroup protocol 0129. Blood 2000; 95: 398 - 403.
4. Cassinat B, Zassadowski F, Balitrand N, Barbey C, Rain JD, Fenaux P et al. Quantitation of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia patients with t(15;17) translocation using real-time RT-PCR. Leukemia 2000; 14: 324 - 328.
5. de The H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. Nature 1990; 347: 558 - 561.
6. Lemons RS, Eilender D, Waldmann RA, Rebentisch M, Frej AK, Ledbetter DH et al. Cloning and characterization of the t(15;17) translocation breakpoint region in acute promyelocytic leukemia. Genes Chromosomes Cancer 1990; 2: 79 - 87.
7. Petkovich M, Brand NJ, Krust A, Chambon P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. Nature 1987; 330: 444 - 450.

#### 【基本信息】

注册人名称：广州血康陆道培生物技术有限公司

住所：广州市黄埔区崖鹰石路 10 号 B415 号

联系方式：

售后服务单位名称：广州血康陆道培生物技术有限公司

联系方式：

受托企业名称：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

生产地址：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号

生产许可证编号：粤食药监械生产许 20040999 号

#### 【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

#### 【说明书核准日期及修改日期】