

CYP2D6*10、CYP2C9*3、ADRB1(1165G>C)、AGTR1(1166A>C)、ACE(I/D)检测

试剂盒（PCR-熔解曲线法）说明书

【产品名称】

CYP2D6*10、CYP2C9*3、ADRB1(1165G>C)、AGTR1(1166A>C)、ACE(I/D)检测试剂盒（PCR-熔解曲线法）

【包装规格】

24 人份/盒、48 人份/盒

【预期用途】

本品用于体外定性检测从高血压病人外周血提取的人基因组 DNA 中 CYP2D6*10、CYP2C9*3、ADRB1(1165G>C)、AGTR1(1166A>C)、ACE(I/D)的基因型。

高血压是心脑血管疾病诸多危险因素中最重要的独立危险因素，然而，治疗高血压的药物在临床上出现的个体反应差异十分普遍，其主要的原因是由于与药物相关的药物代谢酶和受体发生了遗传变异（表 1）。

表 1 高血压药物相关基因型的临床意义

突变名称	功能意义	相关药物
CYP2D6*10	代谢酶功能显著降低	β -受体阻滞剂
CYP2C9*3	代谢酶功能显著降低	血管紧张素 II 受体拮抗剂
ADRB1 (C1165G)	受体敏感性增强	β -受体阻滞剂
AGTR1 (A1166C)	受体敏感性下降	血管紧张素 II 受体拮抗剂
ACE (I/D)	作用靶点的敏感性改变	血管紧张素转换酶抑制剂

CYP2C9 是细胞色素 P450 家族中的重要成员，占肝微粒体 P450 总量的 20%，该酶催化约 12% 的临床常用药物。CYP2C9 基因存在多态性，主要为 CYP2C9*1（Arg144/Ile359）、CYP2C9*2（Cys144/Ile359）、CYP2C9*3（Arg144/Leu359），其中 CYP2C9*1 为正常酶活性。中国人群中主要存在的遗传变异为 CYP2C9*3，导致酶活性降低，影响药物代谢。

CYP2D6 在肝脏总 CYP 中仅占 1-2%，但经其催化代谢的药物多达 80 多种，不同个体 CYP2D6 的活性最大可相差 1000 倍。在中国人群中最常见的多态性为 CYP2D6*10，约 51.6% 的中国人携带此遗传变异。该多态性导致 CYP2D6 的酶活性降低，且极不稳定，从而影响药物代谢。

血管紧张素 II 是肾素-血管紧张素系统的重要体液因子，其 90% 以上的效应通过血管紧张素 II 的 1 型受体（AGTR1）介导。AGTR1 基因定位于 3q21-q25，全长 55kb，编码 359 个氨基酸残基的受体蛋白。该基因存在多态性，其中 A1166C 位点在高血压的药物治疗中具有重要意义。

β 1 肾上腺素受体属于 G 蛋白偶联受体超家族，由 ADRB1 基因编码，该基因存在多态性。研究表明 ADRB1 基因 G1165C 多态性与高血压药物治疗相关。

血管紧张素转换酶是肾素-血管紧张素系统的关键酶，由 ACE 基因编码，该基因定位于 17 号染色体长臂 2 区 3 带，序列长 21kb。ACE 基因存在多种遗传多态性，其中第 16 内含子中存在的 287bp 的 Alu 插入片段（I）和缺失片段（D）的多态性与高血压药物治疗相关。

【检验原理】

本试剂盒基于实时 PCR 平台结合了特异引物、荧光探针和熔解曲线技术，检测 DNA 样品中 CYP2D6*10、CYP2C9*3、ADRB1(1165G>C)、AGTR1(1166A>C)、ACE(I/D)的多态性（SNP）。本试剂盒结合特别的 PCR 反应程序和特殊 Taq 酶的使用，利用特异引物对靶序列进行高精度 PCR 扩增，通过分析比较特异的荧光探针

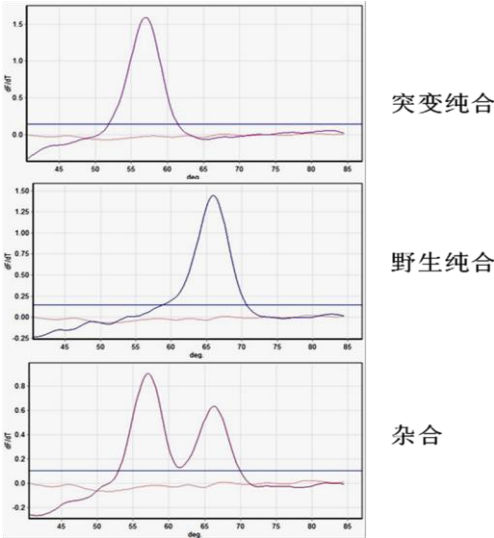


图 1 基因分型检测结果示意

与靶序列结合所产生的熔解曲线 Tm 值的变化,进行 SNP 分型。只出现 1 个熔解峰时为纯合型(包括野生纯合、突变纯合),同时出现 2 个峰时为杂合型(图 1)。

本试剂盒共包含 3 个反应体系,其中反应 A 检测 AGTR1 基因(标记 FAM 荧光)和 CYP2C9 基因(标记 ROX 荧光),反应 B 检测 ACE 基因(标记 FAM 荧光)和 CYP2D6 基因(标记 ROX 荧光),反应 C 检测 ADRB1 基因(标记 FAM 荧光)和内参基因(标记 ROX 荧光),内参基因选择的是 12 号染色体上 Kras 基因中的一段序列。采用荧光定量 PCR 法,以 HeLa 细胞人基因组 DNA 为参照,对参考品和对照品中质粒量值进行溯源。

【主要组成成分】

表 2 试剂盒组成

名称	组分	24 人份	48 人份
PCR 反应液 I _A	20-100pM 的 CYP2C9 和 AGTR1 基因特异性引物和探针	220μl ×1 管	220μl ×2 管
PCR 反应液 I _B	20-100pM 的 CYP2D6 和 ACE 基因特异性引物和探针	220μl ×1 管	220μl ×2 管
PCR 反应液 I _C	20-100pM 的 ADRB1 基因和内参基因特异性引物和探针	220μl ×1 管	220μl ×2 管
PCR 反应液 II	0.1U/μl Taq 酶、0.8mM dNTP、8mM MgCl ₂ 等	415μl ×1 管	415μl ×2 管
溶液 A	PCR 增效剂	415μl ×1 管	415μl ×2 管
阳性对照品	包含 3000 拷贝/μl 的阳性质粒(AGTR 基因型为 C、CYP2C9 基因型为 C、CYP2D6 基因型为 T、ADRB1 基因型为 G、ACE 基因型为 D)和 10ng/μl 的人基因组 DNA(AGTR 基因型为 AA、CYP2C9 基因型为 AA、CYP2D6 基因型为 CC、ADRB1 基因型为 CC、ACE 基因型为 II)	40μl ×1 管	
空白对照品	纯化水	50μl ×1 管	

检测必须但试剂盒中不包含的组分:

- 1.5ml 离心管(用于配制 PCR 反应液和 DNA 提取);
- 0.2ml PCR 管或 8 联 PCR 管或 96 孔 PCR 板;
- 带滤塞的吸头(1ml、200μl 和 10μl);
- DNA 提取试剂盒 QIAamp DNA Blood Mini Kit(供应商:凯杰企业管理(上海)有限公司,货号 51104 或 51106);
- 纯化水(高浓度样本稀释用)。

【储存条件及有效期】

- 置于-20℃条件下储存,有效期 6 个月。
- 使用泡沫箱及不少于 1/3 容积的冰袋保温运输后,-20℃条件下可保存至效期末。
- 4-10℃避光条件下储存或运输不得超过 7 天。 -20℃储存时,冻融次数不超过 5 次。
- “生产日期”和“有效期至”见试剂盒标签。

【适用仪器】

适用于 ABI7500、SLAN-96P 型号的 Real-time PCR 扩增仪。

【样本要求】

1. 适用样本为 EDTA 抗凝的全血;样本在 4-10℃保存不超过 7 天,-20℃保存不超过 1 个月,冻融不超过 6 次。
2. 使用商业化的试剂盒来提取人类基因组 DNA,推荐使用 Qiagen 公司的 QIAamp DNA Blood Mini Kit(货号 51104 或 51106)提取全血样品,所提 DNA 需用紫外分光光度计测定浓度和纯度,其 DNA OD260/OD280 的值应在 1.8~2.0,浓度应在 10~100ng/μl 之间,样本 DNA 质量不合格者不得用于检测,建议低于 10ng/μl 者重新取样进行核酸提取,高于 100ng/μl 者予以适当稀释至规定的浓度范围,建议稀释至 50ng/μl,稀释方法为:取 50μl 提取的 DNA 加入 (DNA 浓度-50) μl 的纯化水(如 DNA 浓度为 126ng/μl,则取 50μlDNA

加入 76μl 纯化水)。提取完的 DNA 建议立即进行检测, 否则请于-20℃以下保存, 保存时间不要超过 6 个月, 冻融不超过 5 次。

【检验方法】

一、核酸提取（样本处理室）

严格按照血液 DNA 提取试剂盒说明书提取核酸。提取过程中应采取必要的标记方法, 避免试剂漏加及样本混淆。

二、试剂准备（试剂准备室）

将试剂从冰箱取出, 室温融化, 混匀, 1000rpm 快速离心 20 秒, 备用。

三、反应体系配制（试剂准备室）

1. 根据检测样本数计算所需反应数, 如样本数为 n, 则需做 n+2 个反应 (包含一个阳性对照反应和一个无模板对照反应)。
2. 根据表 3 计算所需各反应液的体积, 并配制反应体系, 反应体系混匀后 3000rpm 快速离心 30 秒, 分装至 PCR 管中, 每管 18μl。

四、加样（样本处理室）

取 2μl 提取的样品 DNA 加入 PCR 反应管, 盖上管盖, 1000rpm 离心或轻甩, 排除管底气泡; 阳性对照反应所用模板为试剂盒中阳性对照品, 空白对照反应所用模板为试剂盒中所带空白对照品。

五、上机检测（扩增室）

1. 将 PCR 管按顺序放入 PCR 仪, 设置反应程序

(1) SLAN-96P 荧光定量 PCR 仪程序设置

表 4 PCR 反应参数

阶段	温度	时间	检测荧光	循环数
预变性	95℃	2min		1
循环段	94℃	30sec		50
	56℃	30sec	√	
	72℃	30sec		
	95℃	30sec		1
	46℃	20sec		
熔解段	46→75℃		√	1

注:

- a. 该软件熔解曲线设置时只需设置熔解的起始温度和结束温度。
- b. 荧光检测通道选择 FAM 和 ROX 检测通道。

表 3 加样表

组分	反应 A	反应 B	反应 C
PCR 反应液 I _A	8μl	--	--
PCR 反应液 I _B	--	8μl	--
PCR 反应液 I _C	--	--	8μl
PCR 反应液 II	5 μl	5 μl	5 μl
溶液 A	5 ul	5 ul	5 ul
总体积	18 μl	18 μl	18 μl

(2) ABI7500 荧光定量 PCR 仪程序设置

表 5 PCR 反应参数

阶段	温度	时间	检测荧光	循环数
预变性	95℃	2min		1
循环段	94℃	30sec		50
	56℃	32sec	√	
	72℃	30sec		
熔解段	95℃	30sec		1
	46℃	60sec		
	46→75℃		√	

- 设置程序时, 应取消参比荧光, 具体步骤为“Setup”→“Plate Setup”→“Assign Targets and Samples”→“Select the dye to use as the passive reference”设置为“None”。
- Melt 分析时, 设置温度 46~75℃; 选择 Continuous 模式时, 每步设置 1%, 检测荧光; 选择 StepAndHold 模式时, 每个步骤升高 0.3℃, 在每个温度都收集荧光。荧光检测通道选择 FAM 和 ROX 检测通道。

2. 运行 PCR 反应程序，保存文件。

六、结果获取

1. SLAN 荧光定量 PCR 仪运行结束后，使用配套软件对本次试验的结果进行熔解曲线导数图（-dF/dT）分析。
2. ABI7500 Software v2.0 以上版本软件不支持同时查看多个荧光通道的熔解曲线，实验结束后，按如下步骤查看结果：软件界面中点击“Setup”→“Plate Setup”→“Assign Targets and Samples”选中需要查看的反应孔→“Assign target(s) to the selected wells”中只勾选需要查看的一个荧光通道→“Analysis”→“Reanalyse”→“Melt Curve”中查看熔解曲线结果；查看另外一个荧光通道结果时，重复此过程。
3. 杂合基因型样本检测结果为双峰，ABI7500 软件只能识别峰高较高的 T_m 值，需手动读取峰高较低的 T_m 值，具体步骤为：在“Melt Curve”界面，点击所要查看的反应孔（只能选择一个孔位），拉动“竖直虚线”至需要识别熔解峰的最高点，即可得到该峰 T_m 值；若该峰顶部为一段水平线段，则拉至该线段中间，读取 T_m 值。检测结果为宽峰时，若不能识别低 T_m 值熔解峰，则以熔解曲线前部上升处最高点读取 T_m 值，若不能识别高 T_m 值熔解峰，则以熔解曲线后部下降起始点读取 T_m 值（如图 2）。

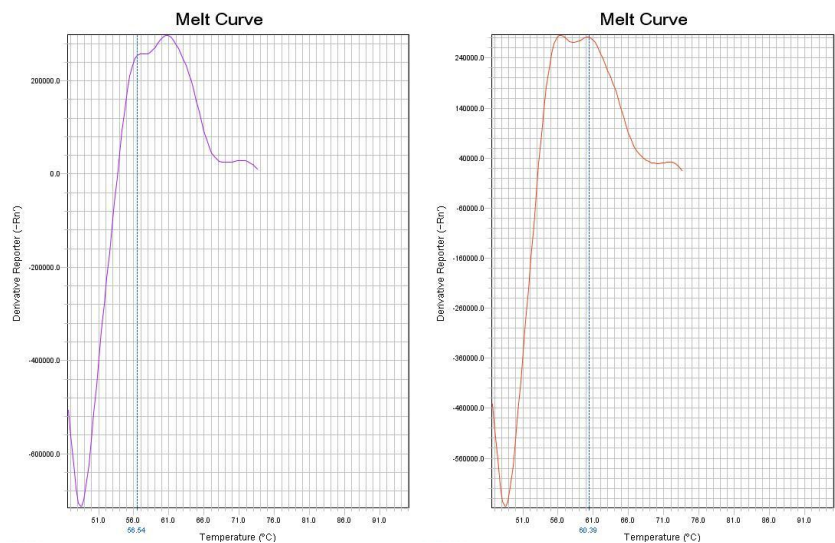


图 2 ABI7500 软件宽峰结果 T_m 值判读

【阳性判断值】

峰高大于阳性对照品峰高的 1/5，且 T_m 值与阳性对照品 T_m 值偏差小于 1.5℃（ADRB1 基因偏差小于 2℃）为阳性结果。

表 6 阳性对照品峰高和 T_m 值范围

基因	峰高		T _m 值（℃）	
	ABI7500	Slan-96P	ABI7500	Slan-96P
CYP2C9	241656.8~848239.2	93.69~200.07	56.02~57.62	56.26~57.36
			64.00~65.60	64.66~65.60
AGTR1	193556.2~467763.8	100.57~199.67	52.19~53.75	52.31~53.29
			60.56~62.04	61.52~62.98
CYP2D6	179976.8~822273.2	61.75~182.21	56.60~58.16	57.42~58.72
			66.20~67.88	66.68~67.78
ADRB1	147705.6~587514.4	69.34~166.84	55.63~57.09	55.17~56.59
			59.71~61.23	60.46~62.02
ACE	179769.6~989346.4	98.03~205.79	50.20~51.66	49.54~51.54
			57.26~58.82	57.96~58.98

【检验结果的解释】

1. 空白对照应无明显熔解峰，若分析后出现明显熔解峰，可能为试剂受到污染或操作过程中的污染，请排除污染源后重新检测。
2. 阳性对照管在熔解曲线分析后应有 2 个熔解峰或宽峰，且峰高和 T_m 值应符合表 6 所示；若阳性对照管无熔解峰，或只出现 1 个熔解峰，该批次样本需重新检测。请确认所使用的试剂是否仍在有效期内，确定操作是否严格按照说明书进行。
3. 反应管 C 的内参通道 (ROX) 在熔解曲线分析后应有 1 个熔解峰，若无熔解峰，可能为样本 DNA 存在 PCR 抑制剂，应重新取样提取基因组 DNA。
4. 若满足以上要求，表明此次实验成功，对样品管进行分析：
 - (1) A 反应管 FAM 通道为 AGTR1 (1166A>C) 检测通道，以对照品反应管为参照，同时出现与对照品相同的两个峰 (T_m 值偏差小于 1.5°C) 的样本为 A/C 杂合子，只出现一个低 T_m 值熔解峰的样本为 A/A 纯合，只出现一个高 T_m 值熔解峰的样本为 C/C 纯合；
 - (2) A 反应管 ROX 通道为 CYP2C9*3 检测通道，以对照品反应管为参照，同时出现与阳性对照品相同的两个峰 (T_m 值偏差小于 1.5°C) 的样本为 CYP2C9*1*3 杂合子(A/C)，只出现一个低 T_m 值熔解峰的样本为 CYP2C9*1 纯合(A/A)，只出现一个高 T_m 值熔解峰的样本为 CYP2C9*3 纯合(C/C)；
 - (3) B 反应管 FAM 通道为 ACE (I/D) 检测通道，以对照品反应管为参照，同时出现与阳性对照品相同的两个峰 (T_m 值偏差小于 1.5°C) 的样本为 I/D 杂合子，只出现一个低 T_m 值熔解峰的样本为 D/D 纯合，只出现一个高 T_m 值熔解峰的样本为 I/I 纯合；
 - (4) B 反应管 ROX 通道为 CYP2D6*10 检测通道，以对照品反应管为参照，同时出现与阳性对照品相同的两个峰 (T_m 值偏差小于 1.5°C) 的样本为 CYP2D6*1*10 杂合子(C/T)，只出现一个低 T_m 值熔解峰的样本为 CYP2D6*10 纯合(T/T)，只出现一个高 T_m 值熔解峰的样本为 CYP2D6*1 纯合(C/C)；
 - (5) C 反应管 FAM 通道为 ADRB1 (1165G>C) 检测通道，以对照品反应管为参照，同时出现与阳性对照品相同熔解峰 (T_m 值偏差小于 2.0°C) 的样本为 G/C 杂合子，只出现一个低 T_m 值熔解峰的样本为 C/C 纯合，只出现一个高 T_m 值熔解峰的样本为 G/G 纯合。ABI7500 仪器 v2.0 以上版本软件中，该位点杂合型样本检测结果为宽峰，与纯合型样本熔解峰差异如图 3。
 - (6) 若任意检测通道检测结果无熔解峰，该样本必须重新检测，必要时重新提取 DNA 进行检测；若反应 B 的 ROX 通道多次检测均无熔解峰，而 FAM 通道和反应 A、反应 C 检测结果正常，则怀疑该样本为 CYP2D6 基因缺失。

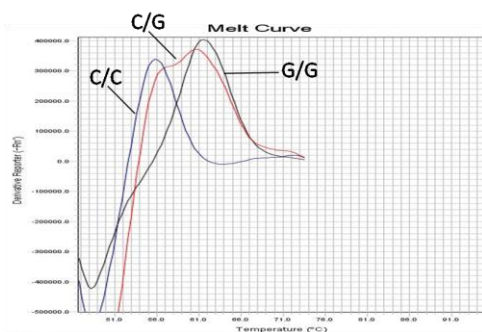
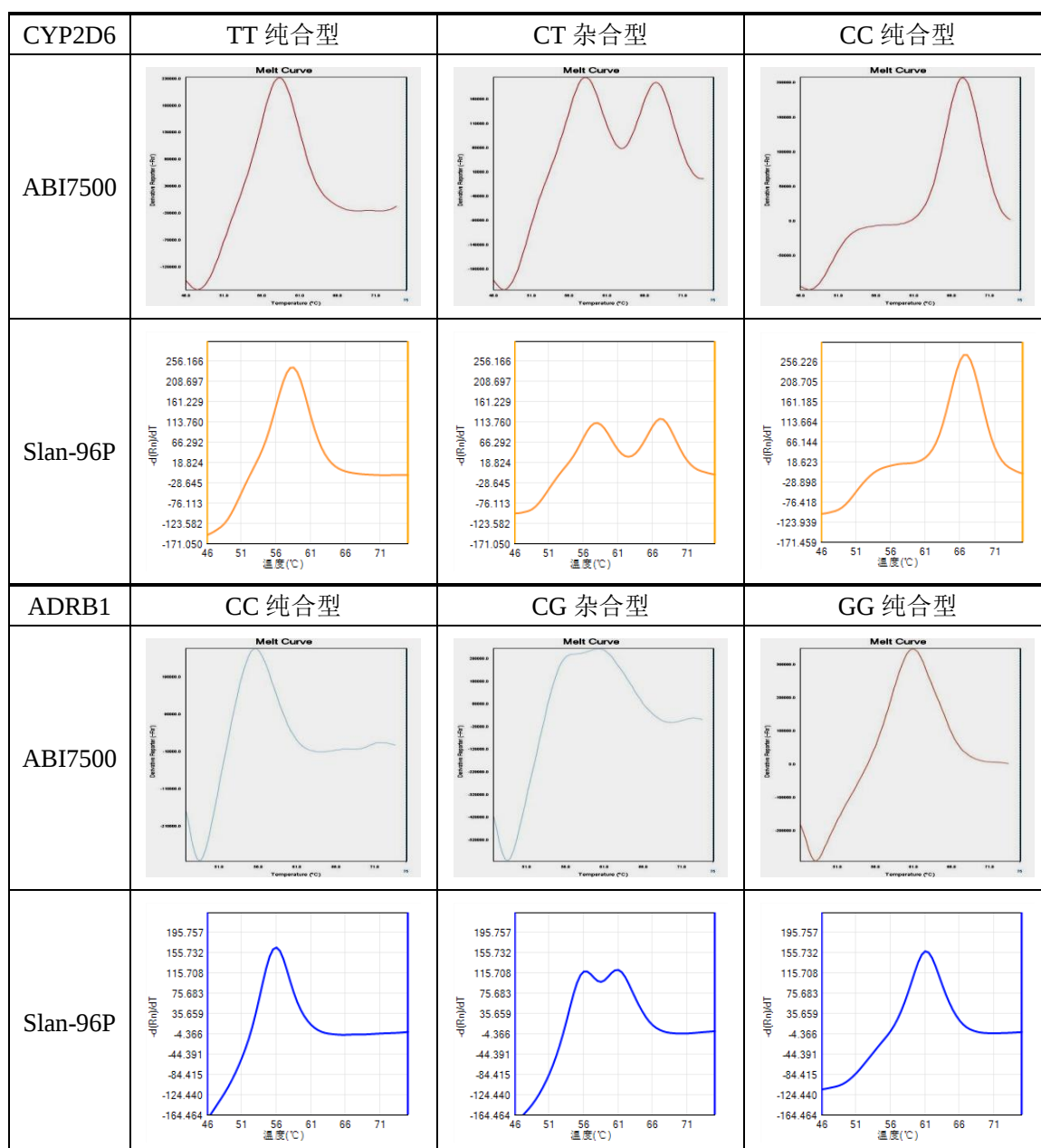


图 3 ADRB1 基因杂合型与纯合型检测结果（熔解峰）对比

表 7 各基因型熔解曲线峰图示例

AGTR1	AA 纯合型	AC 杂合型	CC 纯合型
ABI7500			
Slan-96P			
CYP2C9	AA 纯合型	AC 杂合型	CC 纯合型
ABI7500			
Slan-96P			
ACE	DD 纯合型	ID 杂合型	II 纯合型
ABI7500			
Slan-96P			



【检验方法的局限性】

本试剂盒仅适用于规定的仪器和检测系统，检测结果仅供临床参考，不得作为临床诊治的唯一依据。

本试剂盒不适用于三个月内有输血史者，此类样本可能出现假阳性结果。

若本试剂盒所设计引物探针序列区存在其它基因变异，可能导致假阴性检测结果。

【产品性能指标】

1. 经 1050 例高血压患者的全血样本临床试验，本品与测序法作对照，各 SNP 位点亚型符合率均在 99%以上。
2. 试剂盒应外观清洁、无泄漏、无破损，标志、标签字迹清楚；各组分融化后应澄清透明，无沉淀。
3. 检测 16 份基因型参考品，结果均符合相应基因型别。
4. 最低检出限为 2ng/μl 人基因组 DNA；将 6 份最低检出量参考品分别做 10 次平行检测，可稳定检出且结果均符合相应基因型别。
5. 用 2 份企业内部精密性参考品分别作 10 次平行检测，结果均为符合相应基因型别且 Tm 值极差≤1.5℃。
6. 2g/L 血红蛋白、342μM 胆红素、37mM 脂类（甘油三酯）等干扰物质，对检测结果未见有干扰。
7. 乙肝病毒、丙肝病毒等血液病原体，对检测结果未见有干扰。
8. 阿莫西林、快克复方氨酚烷胺胶囊、美托洛尔、缬沙坦、依那普利等药物，对检测结果未见有干扰。
9. 五项靶基因间无交叉反应。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外研究。实验前请仔细阅读说明书。
2. PCR 检测应在有资质的临床 PCR 实验室进行，实验室应严格按照卫生部《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》卫办医政发〔2010〕194 号文件规定进行资质认定和管理。
3. 实验过程中必须使用专用的移液枪和一次性带滤塞的加样吸头。
4. PCR 操作各阶段应在不同的分区进行，分别为试剂准备室、样本处理室和 PCR 扩增室。人、物单向流动。PCR 试剂盒不应存放在样本处理区。
5. 加样时应使样品完全落入反应液中，不应有样品粘附于管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。
6. PCR 操作各阶段使用专用的仪器和设备。
7. 扩增完毕立即取出反应管，密封在专用塑料袋内，丢弃于指定地点。
8. 实验前及实验完毕后应该对实验室进行紫外线消毒，并用 70%乙醇擦拭工作台和微量加样器。
9. 试剂盒各组份应在有效期内使用，不同批次的试剂盒成分不得混用。

【参考文献】

1. Sekino K, Kubota T, Okada Y, Yamada Y, Yamamoto K, Horiuchi R, Kimura K, Iga T. Effect of the single CYP2C9*3 allele on pharmacokinetics and pharmacodynamics of losartan in healthy Japanese subjects. *Eur J Clin Pharmacol*. 2003 Nov; 59(8-9):589-592. Epub 2003 Sep 19.
2. Zhou, S.F. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: part II. *Clinical pharmacokinetics* **48**, 761-804 (2009).
3. Hong, X. *et al.* CYP2C9*3 allelic variant is associated with metabolism of irbesartan in Chinese population. *European journal of clinical pharmacology* **61**, 627-634 (2005).
4. Baudin, B. Polymorphism in angiotensin II receptor genes and hypertension. *Experimental physiology* **90**, 277-282 (2005).
5. Sookoian, S. *et al.* A1166C Angiotensin II Type 1 Receptor Gene Polymorphism May Predict Hemodynamic Response to Losartan in Patients with Cirrhosis and Portal Hypertension. *Am J Gastroenterol* **100**, 636-642 (2005).
6. Johnson, J. *et al.* Beta 1-adrenergic receptor polymorphisms and antihypertensive response to metoprolol. *Clin. Pharmacol. Ther.* **74**, 44-52 (2003).
7. Sofowora, G.G. *et al.* A common beta1-adrenergic receptor polymorphism (Arg389Gly) affects blood pressure response to beta-blockade. *Clinical pharmacology and therapeutics* **73**, 366-371 (2003).
8. Fiuza-Luces, C. *et al.* Is the ACE I/D polymorphism associated with extreme longevity A study on a Spanish cohort. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System* **12**, 202-207 (2011).

【基本信息】

注册人/生产企业名称：无锡锐奇基因生物科技有限公司	售后服务单位名称：无锡锐奇基因生物科技有限公司
住所：无锡市滨湖区马山梅梁西路 88 号-A6	联系方式
联系方式	电 话：0510-85998856
	传 真：0510-85998276
	网 址：www.riqigen.com

生产地址：无锡市滨湖区马山梅梁西路 88 号一期 3 号楼第 3 层、GLP 楼第 5 层

生产许可证编号：苏食药监械生产许 20120026 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】 国械注准 20183400390

【说明书核准日期及修改日期】 2018年9月18日