

人 CYP2C19 基因多态性检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）

说明书

【产品名称】

通用名称：人 CYP2C19 基因多态性检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）

【包装规格】

24 人份/盒、48 人份/盒。

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人外周全血样本的 CYP2C19 基因多态性,可检测的位点包括 CYP2C19*2（c.681G>A）、CYP2C19*3（c.636G>A）以及 CYP2C19*17（c.-806C>T）。本产品检测结果仅供临床参考，不应作为患者是否用药的唯一依据，临床医生应结合患者病情、疗效及其他实验室检测指标等对本产品的检测结果进行综合判断。

CYP2C19 酶是一种重要的人体内药物代谢酶同工酶，是 CYP450 家族中最重要的药物代谢酶之一，参与人体内多种药物（如:氯吡格雷、S-美芬妥英、奥美拉唑、伏立康唑、安定、去甲安定）的代谢。CYP2C19 基因的遗传变异导致 CYP2C19 酶活性的个体差异,其中 CYP2C19*1 为野生型等位基因,其编码的酶具有正常活性,CYP2C19*2（c.681G>A）和 CYP2C19*3（c.636G>A）是中国人群中主要存在的两种导致 CYP2C19 酶缺陷的等位基因，人群中的占比大概为 30%和 5%，而 CYP2C19*17（c.-806C>T）作为一种增强代谢的基因在中国人群的发生频率约为 0.5%~4%。临床上，将携带 CYP2C19*17/*17 纯合型或 CYP2C19*1/*17 杂合型称为超快代谢者（UM），将 CYP2C19*1/*1 纯合型称为快代谢者（EM），将 CYP2C19*1/*2、CYP2C19*1/*3、CYP2C19*2/*17 或 CYP2C19*3/*17 杂合型称为中间代谢者（IM），将 CYP2C19*2/*2、CYP2C19*3/*3 纯合型或 CYP2C19*2/*3 杂合型称为慢代谢者（PM）。

氯吡格雷是一种抗血小板药物，广泛用于急性冠脉综合征、缺血性脑血栓、闭塞性脉管炎和动脉硬化及血栓栓塞引起的并发症。UM 患者应用常规剂量的氯吡格雷后抗血小板功能增强，出血风险增大，而 PM 患者应用常规剂量后抗血小板功能减弱，血栓风险增大。目前，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。

阿米替林为三环类抗抑郁药，主要用于焦虑性或激动性抑郁症的治疗，调整携带 CYP2C19 突变等位基因患者阿米替林的起始用药剂量有助于降低初始治疗的失败率。CPIC 指南建议 EM 和 IM 基因型患者应用常规起始剂量的阿米替林，而 PM 基因型个体阿米替林的起始剂量应降低至常规剂量的 50%，并进行治疗药物监测。

伏立康唑是一种广谱三唑类抗真菌药，CYP2C19 是其主要代谢酶之一，EM 与 PM 个体间伏立康唑的血液浓度存在显著差异，FDA 批准的药物说明书中指出应用伏立康唑前需检测 CYP2C19 基因型，以确保用药安全。

相关的临床或实验室诊断方法：

传统的基因多态性检测方法有 PCR-基因芯片杂交法、Sanger 测序法和 qPCR 法等。

【检验原理】

本试剂盒采用多重 PCR 结合荧光探针熔解曲线技术，利用不同荧光标记的探针对人抗凝外周全血样本进行多位点同时扩增检测。

多重 PCR：根据 NCBI GenBank 数据库公布的 CYP2C19 基因信息，选择在人群发生频率高的基因位点 CYP2C19*2、CYP2C19*3 以及 CYP2C19*17，根据各位点所在区域的基因序列特点，设计高度特异的引物探针进行多重 PCR 检测。同时以人类基因组 DNA 上的β-actin 基因做内控（Internal Control，IC），监测实验有效性。

荧光探针熔解曲线技术：利用荧光探针与靶标序列杂交形成杂交链熔解温度（Tm）不同来判读靶点的基因型。

此外，本产品建立了 UNG 酶防污染体系，PCR 反应液中以 dUTP 取代 dTTP，UNG 酶的作用原理是选择性水解断裂含有 dU 的双链或单链 DNA 中的尿嘧啶糖苷键，消除 PCR 产物污染，从而达到 PCR 防污染的作用。UNG 酶的最佳活性温度为 50℃，95℃ 可被灭活。

本产品可检测的位点多态性信息如下表：

基因	位点多态性	检测通道
CYP2C19	c.681 G/G	FAM
	c.681 G/A	
	c.681 A/A	
	c.636 G/G	VIC
	c.636 G/A	
	c.636 A/A	
	c.-806 C/C	ROX
	c.-806 C/T	
	c.-806 T/T	
β-actin	-	CY5

【主要组成成分】

组成	24 人份		48 人份		主要成分
	规格	数量	规格	数量	
反应液I	572μL	1 管	1144μL	1 管	引物、探针、dN(UTP、PCR 缓冲液、UNG 酶
反应液II	26μL	1 管	52μL	1 管	DNA 聚合酶
N 质控品	20μL	1 管	20μL	1 管	c.681 G/A、c.636 G/A、c.-806 C/T、β-actin 质粒 DNA 混合液
空白对照	300μL	1 管	300μL	1 管	纯化水
样本处理液	6mL	1 管	6mL	2 管	NaOH、纯化水

说明：不同批号试剂盒中各组分不可以互换使用。

【储存条件及有效期】

试剂盒置于-30℃~-15℃避光保存，有效期为 12 个月。

试剂盒开瓶后-30℃~-15℃避光保存，效期内性能稳定。

试剂盒在 37℃可避光保存 5 天。

试剂盒可反复冻融 10 次。

试剂盒在箱内温度不超过 25℃的条件下，可运输 7 天。

生产批号、生产日期、使用期限见标签。

【适用仪器】

Bio-Rad CFX96、SLAN-96P/S 实时荧光定量 PCR 仪

【样本要求】

适用样本

抗凝全血样本：对外周抗凝全血样本的检测，所用抗凝剂为乙二胺四乙酸（Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA）或枸橼酸钠，不能使用肝素（20 IU/mL）抗凝。

采样方法

抗凝全血样本：抽取静脉血不少于 0.4mL，放入含有抗凝剂的管中，标记好样本的姓名和编号等样本信息。

样本保存

抗凝全血在室温放置可保存 24 小时，2~8℃可保存 1 个月，-18℃以下可保存 5 年，冷冻保存时应避免反复冻融。

样本运输

抗凝全血运输时需泡沫箱加冰袋密封，且在途不宜超过 72 小时。

【检验方法】

样本处理

从试剂盒中取出样本处理液置于室温融化并震荡混匀备用，将待检抗凝全血样本充分颠倒混匀后取出 5μL，加入 200μL 样本处理液，震荡混匀，短暂离心 3~5 秒，做好标识。

反应液准备

从试剂盒中取出其余组分置于室温融化并震荡混匀，短暂离心 5~10 秒。根据该次实验的检测需求计算各组分的用量，反应液需求量=待检样本数+1 个 N 质控品+1 个空白对照。

每人份反应体系的配制如下表所示：

组分	反应液 I（μL/人份）	反应液 II（μL/人份）	总量（μL/人份）
反应体系	22	1	23

配制完成后，振荡混匀，离心 10~20 秒，按 23μL/人份将反应液分装到八联管或 96 孔 PCR 板中，做好标识。

加样（注意避免交叉污染）

分别吸取处理后待检样本、N 质控品以及空白对照各 2μL，依次加到各反应孔中，盖紧管盖，做好标识，短暂离心 5~10 秒。

PCR 扩增

将上述已加模板的反应管置于荧光 PCR 仪中，并记录好样本摆放顺序，按下表设置 PCR 扩增参数。

序号	步骤	温度	时间	循环数
1	UNG 酶反应	50℃	2 min	1
2	预变性	95℃	5 min	1
3	变性	95℃	15 sec	40
4	退火、延伸	62℃	30 sec	
5	熔解程序	95℃	2 min	1
		42℃	4 min	
		42~80℃	收集荧光	
检测通道：FAM、VIC、ROX、CY5				

结果分析

按照分析软件生成的熔解曲线图像，根据各个信号通道上的特定 Tm 值范围内有无熔解峰来鉴定样本的基因型别。由于仪器软件只能自动读取高于阈值线的熔解峰的 Tm 值，因此，当软件无法自动给出 Tm 值时，可通过适当调节阈值或者人工判读的方式获得 Tm 值。

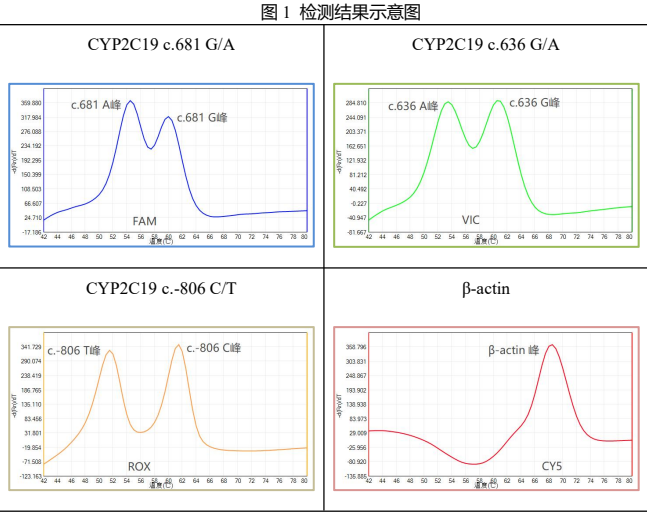
【阳性判断值】

空白对照：FAM、VIC、ROX、CY5 通道均为阴性。

N 质控品：本质控品采用混合质粒样本作为阳性对照来监控实验的有效性，包含本试剂盒所检测的 3 种杂合突变型基因的质粒以及内参基因β-actin 的质粒，每个通道的检测结果应均为阳性，且熔解峰 Tm 值应均在参考范围之内，满足以上条件，表明本次实验成功有效，可对待检样本进行分析。

待检的人全血样本检测结果：FAM、VIC、ROX、CY5 通道应均为阳性，且熔解峰 Tm 值应均在参考范围之内，其中 CY5 通道作为内控β-actin 基因的检测通道。任意检测位点或内参基因β-actin 出现无熔解峰或熔解峰 Tm 值不在参考范围之内，说明该检测结果无效，建议重新检测。

表 1 各位点多态性的 Tm 值参考范围			
基因	位点多态性	Tm 值参考范围	信号通道
CYP2C19	c.681 G/G	58.19~62.52℃	FAM
	c.681 G/A	58.19~62.52℃ 52.57~56.99℃	
	c.681 A/A	52.57~56.99℃	
	c.636 G/G	59.35~63.11℃	VIC
	c.636 G/A	59.35~63.11℃ 51.62~56.56℃	
	c.636 A/A	51.62~56.56℃	
	c.-806 C/C	58.84~63.33℃	ROX
	c.-806 C/T	58.84~63.33℃ 48.94~53.15℃	
	c.-806 T/T	48.94~53.15℃	
β-actin	-	66.62~69.49℃	CY5



【检验结果的解释】

本试剂盒一孔反应液即可对一个样本的 3 个基因位点进行多态性分析，在设计上，作为内控（IC）的β-actin 基因单独使用 CY5 通道，因此每个样本的 4 个通道都必须为阳性。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒可检测中国人群中常见的 CYP2C19*2（c.681G>A）、CYP2C19*3（c.636G>A）以及 CYP2C19*17（c.-806C>T）3 个基因位点的多态性，其他位点类型在本试剂盒检测范围之外无法检出。
2. 本试剂盒内的引物和探针所覆盖区域可能存在其他未知单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism, SNP），从而影响引物和探针的结合效率导致无法检出。
3. 全血样本含有大量的 PCR 抑制物及有色物质，直接使用可能会导致检测信号偏低或者漏检，须使用本试剂盒中配套的样本处理液进行适当的预处理。

【产品性能指标】

准确性

采用 3 批产品对准确性进行研究，结果显示 CYP2C19*2（c.681G>A）、CYP2C19*3（c.636G>A）以及 CYP2C19*17（c.-806C>T）3 个位点的所有基因型本试剂盒均能准确检出。

最低检测限

对白细胞计数≥0.5×10⁹/L 的全血样本或浓度≥0.5ng/μL 的 DNA 样本均能准确检出。

分析特异性

本试剂盒对不受血液中常见内源物质（甘油三酯≤11.47mmol/L、总胆固醇≤14.66mmol/L、总胆红素≤356.73μmol/L、血红蛋白≤10g/L）和外源药物（硫酸氢氯吡格雷≤300mg/d）的干扰；对常用的抗凝剂（EDTA≤7.2mg/L、枸橼酸钠≤109mmol/L）无抑制反应；对结构类似物（如：大肠杆菌 DNA、同源基因）均无交叉反应。

精密度

使用本试剂盒对检测范围内的所有基因型样本重复检测 10 次，重复结果一致且所有基因型均能准确检出。

【注意事项】

1. 试剂盒必须严格按照所要求的保存条件保存，各组分使用前请充分融化、混匀并离心后再开盖使用，以保证反应体系体积完整及防止潜在的污染。
2. 请严格分区操作实验，各区物品均为专用，实验室环境污染、试剂污染、样本交叉污染可能导致假阳性结果；试剂运输、保存不当或试剂配制不准确可能会引起试剂检测效能下降、出现假阴性或检测不准确的结果。
3. 本试剂盒适用样本为 EDTA 或枸橼酸钠抗凝的外周全血，若使用其他类型的样本，出现检测结果差异与本试剂盒质量无关。
4. 每次实验应进行质量控制。
5. 检测样本应视为具有传染性物质，操作和处理均需符合相关法规要求。
6. 实验中使用的吸头请直接打入盛有消毒剂的废液缸内，并与其他废弃物一同灭菌后方可丢弃。

【参考文献】

- [1] 罗招凡,何嘉辉,方伟祯,庄豪,潘昆貽,雷娟.广州地区心血管病患者 CYP2C19*1、CYP2C19*17 基因多态性对氯吡格雷疗效的影响[J].中国卫生检验杂志,2017,27(13):1831-1833+1837.
- [2] 钟诗龙,韩雅玲,陈纪言,袁晋青,孙艺红,王效增,李毅.氯吡格雷抗血小板治疗个体化用药基因型检测指南解读[J].中国实用内科杂志,2015,35(01):38-41.
- [3] 基于药物基因组学的抗血小板药物个体化药学服务指引(2020 年版)[J].今日药学,2020,30(09):584-591.
- [4] 杨瑞,刘慧,陈泽姮,戚听听,张赞玲,屈强.临床药师基于 CYP2C19 基因检测指导氯吡格雷个体化用药及其疗效评价[J].中国临床药理学与治疗学,2019,24(08):938-943.
- [5] 谢婧,杨莉萍,刘璐,胡欣.CYP2C19*17 基因对氯吡格雷临床疗效影响的 Meta 分析[J].中国药房,2012,23(28):2618-2621.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：深圳会众生物技术有限公司

住所：深圳市宝安区新安街道兴东社区丰业源工业厂区厂房 B1 夏谷 101

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

生产地址：深圳市宝安区新安街道兴东社区丰业源工业厂区厂房 B1夏谷101、西乡街道宝安大道洪盛工业园三号厂房301

生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准及修改日期】