

【产品名称】通用名称：人类 HLA-B*5801 基因检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】25 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定性检测人外周血样本基因组 DNA 中的 HLA-B*5801 基因。

人类主要组织相容性抗原分子对于 T 淋巴细胞免疫的专一性鉴别扮演极重要的角色，HLA-B*5801 为 HLA-B 位点型别的其中一种，目前根据多项国内外研究可知，针对亚裔特别是汉族人群，HLA-B*5801 和治疗痛风、高尿酸的常用药——别嘌醇（Allopurinol）发生药物过敏高度相关。带有遗传标志 HLA-B*5801 的个体，在服用此药后发生失明、致死及史蒂文森综合征候群等的风险高很多。因此，通过检测 HLA-B*5801 等位基因是否携带，可降低患者应用别嘌醇诱发 SJS/TEN 等的风险。美国 FDA 及日本、中国台湾地区的医疗监管部门已明确要求，医生在对亚裔人群使用别嘌醇前，必须进行 HLA-B*5801 基因检测，并且此项检测已被纳入医保范围。

本试剂检测结果代表对 HLA-B*5801 基因的检测结果，仅供临床医师个体化用药提供参考，检测结果不得作为患者病情评价的唯一指标，必须结合患者临床表现和其他检测方法对病情进行综合分析。

【检验原理】

本试剂盒选用两对 HLA-B*5801 特异性引物，结合特异性探针，该探针能与引物扩增区域中间的两段 DNA 模板发生特异性结合，在 PCR 延伸反应过程中 Taq 酶的外切酶活性将 5'端荧光基团从探针上切割下来，使之游离于反应体系中，从而脱离了 3'端荧光淬灭基团的屏蔽，即能接受光刺激而发出可供仪器检测的荧光。本试剂盒选用 FAM 通道和 VIC（HEX）通道同时检测，从而实现在全封闭反应体系中对 HLA-B*5801 核酸的自动化检测。

该试剂盒中的内标选用一对管家基因特异性引物，结合特异性探针，该探针能与引物扩增区域中间的一段 DNA 模板发生特异性结合，内标选用 TEXAS RED 通道，从而实现在全封闭反应体系中对检测过程的监控，可有效监控假阴性的发生。

【主要组成成份】

组成	主要成分	规格
HLA-B*5801 主反应液	Tris-HCl (pH8.9)、KCl、MgCl ₂ 、dTTP、dATP、dGTP 和 dCTP	325μL×1
HLA-B*5801 引物探针混合液	引物、荧光探针	115μL×1
Taq 酶	Taq DNA 酶及抗体	10μL×1
HLA-B*5801 阳性对照	主要成分为 B5801 质粒	50μL×1
阴性对照	主要成分为 NaCl	50μL×1

注：1.不同批号试剂盒中各组分不可以互换；

2.核酸提取试剂盒需自备，使用苏州天隆生物科技有限公司生产的核酸提取试剂盒（磁珠法）（苏苏械备 20160722 号）。

【储存条件及有效期】

试剂-20℃±5℃，可保存 12 个月。

未使用完的试剂继续冷冻保存不影响其稳定性，试剂反复冻融 3 次后-20℃±5℃可保存 30 天；试剂开瓶后，在室温条件下放置不超过 8 小时；本产品应以冰盒或者冷藏车进行运输，运输温度-25℃~8℃，模拟运输实验表明运输条件不会影响产品的稳定性和有效期，但运输时间不应超过 7 天。

生产日期及失效日期见包装标签。

【适用仪器】

扩增检测仪器选择具有 FAM、VIC（HEX）和 TEXAS RED 三个通道的荧光定量 PCR 仪，ABI7500 荧光 PCR 扩增仪、西安天隆 TL 988 实时荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

1. 标本：外周血。

2. 外周血采集：外周血用一次性无菌注射器抽取受检者静脉血 3~5mL，注入含 EDTA 抗凝剂的玻璃管，立即轻轻颠倒玻璃管混合 5~10 次，使抗凝剂与静脉血充分混匀。

3. 存放：标本可立即检测；外周血 2~8℃保存应不超过 48 小时；-20℃±5℃下保存，不超过 3 个月；-70℃下保存不超过 12 个月，但应避免反复冻融。

4. 运输：采用冰盒加冰或泡沫箱加冰密封进行运输。

【检验方法】

1. 样本处理【样本处理区】

使用苏州天隆生物科技有限公司生产的核酸提取试剂盒进行提取，提取过程请严格按照其说明书进行。将提取好的 DNA 样本，用紫外分光光度计检测浓度和 DNA 质量，1ng/μL≤DNA 浓度要求≤100ng/μL。DNA 浓度低于 1ng/μL 时，建议重新进行样本处理；DNA 浓度高于 100ng/μL 时，建议适当稀释后进行实验。DNA 的质量要求 OD260/280 值在 1.7~2.0 之间。

2. 试剂配制【试剂准备区】

从检测试剂盒中取出 HLA-B*5801 主反应液、HLA-B*5801 引物探针混合液和 Taq 酶，在室温下融化并振荡混匀后，2000rpm 离心 10 秒。计算所需反应试剂测试数 $n[n=测试数+对照数(2)]$ ，每测试反应体系配制如下：

试剂	HLA-B*5801 主反应液	HLA-B*5801 引物探针混合液	Taq 酶
用量	13μL	4.6μL	0.4μL

按 n 测试计算上述各试剂的用量，加入一适当容积的离心管中混匀。按 18μL 量分装到 PCR 薄壁管中，然后转移到样本处理区。

3. 加样【样本处理区】

单个反应总体积为 20μL，因此往上述分装有 18μL 反应液的 PCR 薄壁管中按顺序分别加入 2μL 阳性对照(无需提取)、2μL 阴性对照(无需提取)、2μL 样品提取产物，盖紧反应管，转移至 PCR 检测区。

4. PCR 扩增及荧光检测【PCR 扩增区】

将各反应管按一定顺序放入荧光定量 PCR 仪上，按以下程序进行 PCR 扩增：

步骤	循环数	温度(℃)	时间(min: sec)
1	1	95	03:00
		95	00:15
2	40	62	00:30 (收集荧光)

检测荧光选择：HLA-B*5801 FAM 和 VIC(HEX)，内标 TEXAS RED

【检验结果的解释】

阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品的最高点。阳性对照 Ct 值应小于 30，阴性对照 Ct 无数值，样本的内标 TEXAS RED 通道检测 Ct 值小于或等于 36，否则该次实验视为无效，应检查仪器、试剂、扩增条件等方面的误差。样本结果解释见下表：

FAM 通道	VIC (HEX) 通道	结果判读
Ct≥40.0	/ (注 ¹)	HLA-B*5801 DNA 阴性
Ct≤36.0	Ct≥40.0	
Ct≤36.0	Ct≤36.0	
		HLA-B*5801 DNA 阳性 (注 ²)
36.0<Ct<40.0	/ (注 ¹)	灰区 (注 ³)
Ct≤36.0	36.0<Ct<40.0	

注：1.“/”表示不考虑；2.该通道检测结果不能区分以下几种稀有型别：HLA-B*5804, 5805, 5809, 5810, 5811, 5812, 5813, 5815, 5817, 5819, 5821, 5822, 5823, 5824 和 5828；3.灰区样本重新检测，若 FAM 通道和 VIC (HEX) 通道均满足 Ct≤36 则为 HLA-B*5801 阳性，否则为 HLA-B*5801 阴性。

【阳性判断值】

FAM 通道和 VIC (HEX) 通道同时检测 Ct 值小于或等于 36，则判断该样本为 HLA-B*5801 阳性。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒不能直接用于检测外周血和其他组织样本。
2. 实验区域污染、气溶胶污染有可能造成假阳性结果。
3. 不合理的样本采集、转运、储存及处理过程均有可能导致错误的检测结果。
4. 本检验仪对所选定的基因位点多态性进行检测，若检测点附近存在其他稀有变异，可能造成检测不出。

【产品性能指标】

1. 外观：试剂盒包装完好，盛装各试剂的冻存管及离心管无破损，标签完好。
2. 阴性符合率：8 份阴性参考品，检验结果均应为阴性，符合率 (-/-) 为 8/8。
3. 阳性符合率：8 份阳性参考品 (HLA-B*5801)，检验结果均应为阳性，符合率 (+/+) 为 8/8。
4. 检测限：浓度为 1ng/μL 检测限参考品 L1 和 L2，分别重复 20 次，至少 17 次检测结果为阳性，检测结果符合率均应≥17/20。
5. 精密性：精密性参考品 J 高 (HLA-B5801) 和 J 低 (HLA-B5801)，分别重复测试 10 次，Ct 值的变异系数 (CV%) ≤5.0%。
6. 干扰物：500mg/mL 游离血红蛋白、18mM 甘油三酯、0.8mg/mL EDTA 和 180μmol/L 胆红素抗凝剂对结果无明显影响，高于正常临床剂量 10 倍量的别嘌醇、苯溴马隆、丙磺舒及秋水仙碱对结果无明显影响。
7. 本试剂盒与 HLA-B*27、HLA-B*35、HLA-B*40、HLA-B*44、HLA-B*46、HLA-B*1516、HLA-B*5802、HLA-B*5701 等无交叉反应。

【注意事项】

1. 有关实验室管理规范请严格按照卫办医政发 (2010) 194 号颁布的《医疗机构临床基因扩增实验室管理办法》等有关分子生物学实验室、临床基因扩增实验室的管理规范执行。
2. 本试剂盒仅用于体外检测。
3. 本试剂盒的所有操作应严格按照说明书进行。
4. 实验室严格分区操作：
 - (1) 第一区：试剂准备区—准备扩增所需试剂；
 - (2) 第二区：样本处理区—待检测样本和对照品的处理；
 - (3) 第三区：PCR 扩增区—PCR 扩增检测。
5. 各区物品均为专用，不得交换使用，避免污染，每次实验完毕立即清洁工作台。
6. 使用不含荧光物质的一次性手套、一次性专用离心管、自卸式移液枪和带滤芯吸头。
7. 试剂准备和标本处理应使用超净工作台 (负压式) 或防污染罩，以防止对环境污染。
8. 反应液分装时应尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄露污染仪器。
9. 加样时应将样品完全加入反应液中，不应有样品粘附于管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。
10. 扩增完毕请立即取出反应管，密闭在专用塑料袋中，放于指定地点，等待统一处理。
11. 实验中用过的吸头请直接打入盛有 1%次氯酸钠的废物缸内，并与其他废弃物品一同灭菌后丢弃。
12. 工作台及各种实验用品应定期用 1%次氯酸钠、75%乙醇或紫外灯进行消毒。
13. PCR 反应混合液应避光、低温保存。
14. 不同批号的试剂请勿混用，并请在有效期范围内使用。

【参考文献】

1. 体外诊断试剂说明书编写指导原则
2. Hung SI, Chung WH, Liou LB, et al. HLA-B*5801 allele as a genetic marker for severe cutaneous adverse reactions caused by allopurinol. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(11):4134-4139.
3. Chiu ML, Hu M, Ng MH, et al. Association between HLA-B*58:01 allele and severe cutaneous adverse reactions with allopurinol in Han Chinese in Hong Kong. Br J Dermatol, 2012, 167(1):44-49.
4. Niihara H, Kaneko S, Ito T, et al. HLA-B*58:01 strongly associates with allopurinol-induced adverse drug reactions in a Japanese sample population. J Dermatol Sci, 2013, 71(2):150-152.
5. Cao ZH, Wei ZY, Zhu QY, et al. HLA-B*58:01 allele is associated with augmented risk for both mild and severe cutaneous adverse reactions induced by allopurinol in Han Chinese[J]. Pharmacogenomics, 2012, 13(10):1193-1201.
6. Bunce M, Barnardo MC, Welsh KI. The PCR-SSP Manager computer program: a tool for maintaining sequence alignments and automatically updating the specificities of PCR-SSP primers and primer mixes[J]. Tissue Antigens, 1998, 52(2):158-174.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：苏州天隆生物科技有限公司
 住所：苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 07 栋 501 室
 联系方式：0512-62525631 传真号码：0512-62956337 网址：www.medtl.cn
 售后服务单位名称：苏州天隆生物科技有限公司
 联系方式：0512-62525631 传真号码：0512-62956337 网址：www.medtl.cn
 生产地址：苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 07 栋 (NW-07) 501 室、苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 06 栋 (NW-06) 504 室
 生产许可证编号：苏食药监械生产许 20140001 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20203400434

【说明书核准日期及修改日期】2020.04.24