

人类 HLA-B*5801 基因检测试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名称：人类 HLA-B*5801 基因检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

48 人份/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测抗凝全血样本提取的基因组 DNA 中 HLA-B*5801 基因。

根据 2005 年发表于 PNAS 期刊的文献，HLA-B*5801 基因被发现与华人因使用别嘌呤醇（Allopurinol）药物而引起的 SCAR(Severe Cutaneous Adverse Reactions:严重的皮肤不良反应)，包括史蒂芬综合征（Stevens-Johnson Syndrome,SJS）及毒性上皮溶解（Toxic Epidermal Necrolysis,TEN）等有很强关联性。患者服用别嘌呤醇前进行 HLA-B*5801 基因筛查可能有助于减少别嘌呤醇所致 SCAR 的发生。HLA-B*5801 属于等位基因，其检测方法主要有聚合酶链-顺序特异性引物反应法(PCR-SSP)、聚合酶链-限制性长度多态性法(PCR-RFLP)和聚合酶链-直接测序法(PCR-SBT)检测。本产品测试结果仅代表对人类 HLA-B*5801 基因的检测结果，可为临床医生个体化使用别嘌呤醇药物提供参考。

【检验原理】

本试剂盒针对 HLA-B*5801 基因设计一套特异性引物和探针组合，一个反应体系中通过两个通道检测目标基因。在反应体系中含有对应基因型模板的情况下，PCR 反应得以进行，检测反应管中释放相应的荧光信号。利用仪器对 PCR 反应过程中相应通道的信号强度进行实时检测和输出，实现检测结果的定性分析。

【主要组成成分】

组分名称	规格	数量	主要成分
B5801-PCR 反应液	1.09 mL/管	2 管	PCR 缓冲液、dNTPs、检测引物（BPC01 和 BPC02）和探针（BPCP1（FAM）和 BPCP2（ROX））、内标引物（BPCIC01 和 BPCIC02）和探针（BPCP3（JOE））
B5801-酶混合液	0.1 mL/管	1 管	Golden Taq DNA 聚合酶、尿嘧啶糖基化酶
B5801-阴性对照	0.2 mL/管	1 管	三（羟甲基）氨基甲烷盐酸缓冲液
B5801-阳性对照	0.2 mL/管	1 管	线性化的 HLA-B*5801 质粒和内标质粒混合液

注：1.不同批次试剂盒各组分不可以互换。

2.本试剂盒需要配套用品安徽同科生物科技有限公司生产的核酸提取或纯化试剂（皖六械备 20170002 号）。

【储存条件及有效期】

-20±5℃避光保存，有效期 12 个月。

试剂盒开瓶后，如不立即使用可在 2-8℃条件下保存 6 天；反复冻融次数不超过 6 次；试剂盒应在-25℃~8℃条件下进行运输，运输时间不超过 5 天。

【适用仪器】

ABI 7500 和 TK-6000 实时荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】**1 适用的样本类型**

抗凝全血

2 样本采集

静脉取血 1mL 于 EDTA 抗凝管中。

3 样本保存和运输

样本采集后，应尽量于当日进行 DNA 提取，如保存于 2~8℃，建议于 3 日内完成 DNA 提取，如保存-20±5℃，建议于 30 日内完成 DNA 提取，避免反复冻融（反复冻融次数不超过 6 次）。提取好的 DNA 应-20±5℃保存，可以保存 1 年，避免反复冻融（冻融次数不超过 6 次）。

如果样本采集后需要进行短时间（2 小时以内）运输，可于室温下进行运输，如需长时间（2 小时以上）运输，建议于 2~8℃条件下运输（运输时间不超过 3 天）。如果 DNA 提取后需要进行运输，建议于-20±5℃进行运输（运输时间不超过 5 天）。

【检验方法】**1 试剂准备（在试剂准备区进行）**

1.1 从冰箱中取出试剂盒平衡至室温，各组分充分溶解，快速离心 10 秒。

1.2 核算当次实验所需的反应数（n），按比例（PCR 反应液 43.5μL/反应+酶混合液 1.5μL/反应）取相应量的 PCR 反应液和酶混合液，充分振荡混匀制备成 PCR 反应混合液，低速离心 30 秒，分别按照 45μL/反应分装至荧光 PCR 反应管中，将其转移至样本处理区，剩余试剂放回-20±5℃冰箱冷冻避光保存。

$n = \text{样本数} + \text{阴性对照} + \text{阳性对照}$

2 待测样本、对照品的前处理（在样本处理区进行）**2.1 待测样本处理**

按照安徽同科生物科技有限公司生产的核酸提取或纯化试剂进行样本基因组 DNA 的提取。将抽提好的基因组 DNA，用紫外分光光度计检测 DNA 浓度和纯度，纯度 OD260/OD280 在 1.7-2.0，DNA 浓度要求（1-40 ng/μL），如小于 1 ng/μL 应重新进行样本基因组 DNA 的处理，如大于 40 ng/μL，可将其用纯化水稀释至 1-40 ng/μL。

2.2 对照品处理

阳性对照不需要提取，阴性对照采用核酸提取或纯化试剂（皖六械备 20170002 号）进行基因组 DNA 的提取备用。

3 加样（在样本处理区进行）

取待测样本的基因组 DNA、阳性对照、阴性对照各 5 μL，分别加到装有 PCR 混合反应液的反应管中。盖上管盖（如有气泡，可用手指弹击，去

除气泡)，低速离心 30 秒至管壁无明显液珠。

4 PCR 扩增（核酸扩增区）

4.1 将 PCR 反应管放入 PCR 扩增仪样品槽，按对应顺序设置待检样本、阳性对照、阴性对照。

4.2 荧光检测通道选择

4.2.1 ABI7500

选择 FAM 通道 (Reporter: FAM, Quencher: None)、JOE 通道 (Reporter: JOE, Quencher: None)、ROX 通道 (Reporter: ROX, Quencher: None)，参比荧光 (Passive Reference) 设置为 None。设置 Sample Volume 为 50。

4.2.2 TK-6000

选择 FAM 通道、JOE 通道、ROX 通道。设置 Reaction Volume 为 50。

4.3 仪器参数设置

温度	时间	循环数	备注
50°C	2 分钟	1	——
95°C	10 分钟	1	——
95°C	15 秒	45	——
60°C	30 秒		——
72°C	30 秒		收集荧光

5 结果分析

反应结束后保存结果，对 FAM 通道、JOE 通道和 ROX 通道进行结果分析。根据分析后的图像调节 Baseline 的 Start 值、End 值（用户可根据实际情况参照仪器使用说明自行调整）：只显示某种荧光检测通道，同时选中阴性对照和阳性对照，阈值线刚好超过阴性对照扩增曲线（无规则的噪音线）的最高点，以此作为检测该荧光通道的阈值线，进行分析，使各项参数符合下述“6 质量控制”中的要求，然后记录样本 Ct 值结果。

6 质量控制

结果分析完成后，其结果应满足：

6.1 阳性对照：FAM、ROX 通道 Ct 值 ≤ 35 ，扩增曲线有明显的指数增长期。

6.2 阴性对照：FAM、ROX、JOE 无扩增曲线，或者扩增曲线为直线或轻微斜线，无明显指数增长期，无 Ct 值或 Ct 值 > 38 。

6.3 上述两个条件必须同时满足，否则本次试验无效，应重新试验。

【阳性判断值】

通过参考值研究（ROC 曲线法）确定本产品检测目标基因的阳性判断值如下：

反应液	JOE	FAM	ROX	HLA-B*5801 结果
B5801-PCR 反应液	Ct 值 ≤ 38	Ct 值 ≤ 38	Ct 值 ≤ 38	阳性
		Ct 值 ≤ 38	Ct 值 > 38	阴性
		Ct 值 > 38	Ct 值 > 38	阴性
		Ct 值 > 41	Ct 值 ≤ 38	阴性
		$38 < \text{Ct 值} \leq 41$	Ct 值 ≤ 38	灰区
	Ct 值 > 38	PCR 抑制反应或不足的样本 DNA 量		重新测试

【检验结果的解释】

- 1 当内标 APC 基因 (JOE 通道) 的 Ct 值 ≤ 38 , 检测 HLA-B*5801 的 ROX 通道 Ct 值 ≤ 38 且 FAM 通道的 Ct 值 ≤ 38 , 判定为 HLA-B*5801 阳性。
- 2 当内标 APC 基因 (JOE 通道) 的 Ct 值 ≤ 38 , 检测 HLA-B*5801 的 ROX 通道 Ct 值 > 38 或者检测 HLA-B*5801 的 ROX 通道 Ct 值 ≤ 38 (且 FAM 通道 Ct 值 > 41), 判定为 HLA-B*5801 阴性。
- 3 当内标 APC 基因 (JOE 通道) 的 Ct 值 > 38 或无 Ct 值时, 判定样本不合格, 建议重新测试。
- 4 当内标 APC 基因 (JOE 通道) 的 Ct 值 ≤ 38 且检测 HLA-B*5801 的 ROX 通道 Ct 值 ≤ 38 时, FAM 通道 Ct 值处于检测灰区 ($38 < Ct \leq 41$), 则需进行重复测试, 若重复试验结果 FAM 通道 Ct 值仍在检测灰区内, 则建议进行测序确认结果。

【检验方法的局限性】

- 1 样本检测结果与样本的收集、处理和保存过程有关, 其中任何失误都将导致检测结果的不准确。不合理的样本采集、运送及处理或核酸过度降解均有可能导致假阴性结果。
- 2 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。

【产品性能指标】**1 阴阳性符合率**

对不同浓度的 HLA-B*5801 阴阳性企业参考品进行检测, 阴阳性符合率为 100%。

2 可耐受上限和检测限

可耐受总量为 200ng 的人基因组 DNA, 而无非特异性。对低至 5ng 的人基因组 DNA 可准确检测 HLA-B*5801 的阴阳性。

3 精密度

使用试剂盒重复检测 HLA-B*5801 阳性参考品 10 次, 检测结果皆为阳性, 且检测结果 Ct 值变异系数 $CV \leq 5\%$ 。

4 特异性**(1) 干扰试验**

干扰物质 (200 g/L 血红蛋白、90 g/L 人血白蛋白、11 g/L 抗凝剂乙二胺四乙酸二钾盐、37mmol/L 甘油三酯、684 μ mol/L 胆红素、80 μ g/mL 别嘌呤、1000 μ g/mL 氨苄西林丙磺舒、40 μ g/mL 阿司匹林、4 μ g/mL 阿托伐他汀钙片、40 μ g/mL 非布司他、6mg/mL 枸橼酸氢钾钠、20 μ g/mL 吡罗昔美、20 μ g/mL 尼美舒利、500 μ g/mL 保泰松、300 μ g/mL 对乙酰氨基酚缓释片、100 μ g/mL 非诺贝特、300 μ g/mL 布洛芬、100 μ g/mL 氯沙坦钾、4 μ g/mL 苯磺酸氨氯地平、600 μ g/mL 碳酸氢钠和 60 μ g/mL 苯溴马隆) 对检测没有影响。



(2) 交叉反应

本产品与样本中可能存在的病原体微生物的 DNA（金黄色葡萄球菌、白色念珠菌和乙型肝炎病毒 DNA）无交叉反应。本产品与同源性较高序列 HLA-B*5705、HLA-B*5804、HLA-B*5805、HLA-B*5809、HLA-B*5810、HLA-B*5811、HLA-B*5812、HLA-B*5813、HLA-B*5819、HLA-B*5821、HLA-B*5835、HLA-B*5876、HLA-B*5883、HLA-B*5884、HLA-B*5895、HLA-B*5896、HLA-B*5897、HLA-B*5898、HLA-B*5899 有交叉反应。

5 临床评价

本产品在三家临床机构与已上市同类产品进行同品种比对研究试验，共入组 1028 例样本，检测结果经比对分析，阳性符合率为 100%，阴性符合率为 100%，总符合率为 100%，Kappa 值为 1，P=0.000。

【注意事项】

- 1 本品仅用于体外诊断，使用前请仔细阅读本说明书，实验前请熟悉和掌握仪器的操作方法和注意事项。
- 2 实验室管理应严格按照 PCR 基因扩增实验室的管理规范，实验人员必须进行专业培训，实验过程严格分区进行，所用消耗品应灭菌后一次性使用，实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区用品不能交叉使用。
- 3 所有检测样品应视为具有传染性物质，实验过程中穿工作服，戴一次性手套并经常更换手套以避免样品间的交叉污染；样本操作、废弃物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》。

【参考文献】

- 1 IuHung S, Chung WH, Liou LB, et. al. HLA-B*5801 allele as a genetic marker for severe cutaneous adverse reactions caused by allopurinol. PNAS, 2005, 102(11): 4134-4139.
- 2 Chiu MLS, Hu M, Ng MHL, et. al. Association between HLA-B*58:01 allele and severe cutaneous adverse reactions with allopurinol in Han Chinese in HongKong. British J Dermatol, 2012, 167 (1): 44-49.
- 3 Tassaneeyakul W, Jantararoungtong T, et. al. PeiChen Strong association between HLA-B*5801 and allopurinol-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in a Thai population. Pharmacogenetics and Genomics, 2009, 19(8): 704-709.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：安徽同科生物科技有限公司
住所：金寨县现代产业园区金梧桐创业园 A7 楼
联系方式：
售后服务单位名称：安徽同科生物科技有限公司
联系方式：

生产地址：安徽省金寨县现代产业园区金梧桐创业园 A7 楼 1 楼和 2 楼
生产许可证编号：

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】

【说明书核准日期及修改日期】

