

受理号：CSZ2200246

# 体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：人类 APOE 基因分型检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

产品管理类别：第三类

申请人名称：广州达安基因股份有限公司

国家药品监督管理局

医疗器械技术审评中心

## 目 录

基本信息.....	3
一、 申请人名称.....	3
二、 申请人住所.....	3
三、 生产地址.....	3
技术审评概述.....	4
一、 产品概述.....	4
二、 临床前研究概述.....	7
三、 临床评价概述.....	12
四、 产品受益风险判定.....	12
综合评价意见.....	14

## 基本信息

### 一、申请人名称

广州达安基因股份有限公司

### 二、申请人住所

广州市高新技术产业开发区香山路 19 号

### 三、生产地址

广州市高新技术产业开发区香山路 19 号；广州市高新技术产业开发区荔枝山路 6 号；广州市黄埔区香山路 17 号 B104 号房

## 技术审评概述

### 一、产品概述

#### (一) 产品主要组成成分

本产品含有 APOE 388 PCR 反应液 A、APOE 526 PCR 反应液 A、APOE PCR 反应液 B、APOE 阳性质控品 1、APOE 阳性质控品 2、APOE 阳性质控品 3、阴性质控品，主要组成成分见表 1。

表 1 试剂盒主要组成成分

组分名称	规格	数量	主要成分	
PCR 检测试剂（大包装，适用于 20 人份/盒）	APOE 388 PCR 反应液 A	180 $\mu$ L/管	1	特异性引物和探针
	APOE 526 PCR 反应液 A	180 $\mu$ L/管	1	特异性引物和探针
	APOE PCR 反应液 B	450 $\mu$ L/管	1	热启动 Taq 酶、UDG 酶和 dNTPs、热启动 Taq 酶稀释液
PCR 检测试剂（大包装，适用于 48 人份/盒）	APOE 388 PCR 反应液 A	425 $\mu$ L/管	1	特异性引物和探针
	APOE 526 PCR 反应液 A	425 $\mu$ L/管	1	特异性引物和探针
	APOE PCR 反应液 B	1060 $\mu$ L/管	1	热启动 Taq 酶、UDG 酶和 dNTPs、热启动 Taq 酶稀

				释液
质控品(大包装,适用于20人份/盒及48人份/盒)	APOE 阳性质控品 1	100 $\mu$ L/管	1	含 APOE 388T 和 APOE 526C DNA 片段的野生型阳性质控品
	APOE 阳性质控品 2	100 $\mu$ L/管	1	含 APOE 388T 和 APOE 388C, APOE 526T 和 APOE 526C DNA 片段的杂合突变型阳性质控品
	APOE 阳性质控品 3	100 $\mu$ L/管	1	含 APOE 388C 和 APOE 526T DNA 片段的纯合突变型阳性质控品
	阴性质控品	400 $\mu$ L/管	1	纯化水

## (二) 产品预期用途

本试剂盒适用于体外定性检测人静脉全血样本基因组 DNA 中 APOE 基因 388 位点 (T>C) 和 526 位点 (C>T) 的多态性, 可以对 APOE 基因的 6 种基因型进行检测, 即 E2/E2 (rs429358-388T/T, rs7412-526T/T)、E3/E3 (rs429358-388T/T, rs7412-526C/C)、E4/E4 (rs429358-388C/C, rs7412-526C/C)、E2/E3 (rs429358-388T/T, rs7412-526T/C)、E2/E4 (rs429358-388T/C, rs7412-526T/C) 和 E3/E4 (rs429358-388T/C, rs7412-526C/C)。

人类 APOE 基因位于 19 号染色体 19q13.2, 该基因的两个功能多态性位点 rs429358 (c.388T>C, Cys130Arg) 和 rs7412

(c.526C>T, Arg176Cys) 构成 E2 (rs429358T-rs7412T)、E3 (rs429358T-rs7412C)、E4 (rs429358C-rs7412C) 3 种单倍型, 由这 3 种单倍型构成 6 种不同的基因型 (E2/E2、E3/E3、E4/E4、E2/E3、E2/E4 和 E3/E4)。他汀类药物是目前全球公认的可有效降低冠心病发病率和死亡率的一线药物, 高脂血症则是冠心病的重要危险因素之一, 也是其重要病理基础。ApoE 是一种多态蛋白质, 参与脂质的储存、运输及排泄, 其多态性是引起个体间和种族间对同一他汀类降脂药物表现出不同代谢能力的重要原因之一, 临床上可根据此基因的不同表型指导患者正确选择调脂药物, 以降低冠心病的发生率和心血管疾病的风险。目前 FDA 已将 APOE2 列为普伐他汀药物反应相关的生物标记。药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南(试行)中也明确指出基因型为 APOE E2/E2 的高血脂症患者普伐他汀治疗的降脂疗效更好。因此, 建议患者使用他汀类药物前, 对 APOE 基因的多态性进行检测。

本产品仅针对 APOE 基因的 6 种基因型的检测性能进行了临床验证, 检测结果不能作为临床用药调整的唯一依据, 临床医生应结合病例的实际情况及多方检查结果进行综合判断。本试剂盒检测结果仅供临床参考, 不能单独作为确诊或排除病例的依据。

### **(三) 产品包装规格**

大包装，20 人份/盒；大包装，48 人份/盒。

### **(四) 产品检验原理**

本试剂盒针对人类基因组 DNA 中 APOE 基因的 6 种基因型检测对应的 APOE 388T>C 位点和 APOE 526C>T 位点的单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) 分别设计特异性引物和探针, 配以热启动 DNA 聚合酶等成分组成核酸扩增试剂, 使用荧光 PCR 仪进行 PCR 扩增, 并检测荧光信号, 根据野生型和突变型检测结果在荧光值上的差异实现对样本型别的检测。

本试剂盒添加了相关的防污染组分 (尿嘧啶 DNA 糖基化酶, 即 UDG/UNG 酶), 其作用机理是选择性水解断裂含有 dU 的双链或者单链 DNA 中的尿嘧啶糖苷键, 形成的有缺失碱基的 DNA 链, 在碱性介质以及高温下会进一步水解断裂, 从而被消除。

## **二、临床前研究概述**

### **(一) 主要原材料**

本产品生产工艺过程所用的主要原材料包括引物、荧光探针、热启动 Taq 酶、UDG 酶、dNTPs、热启动 Taq 酶稀释液、含 APOE 388T 和 APOE 526C 的质粒 DNA、含 APOE 388T 和

APOE 526C 的质粒 DNA 与含 APOE 388C 和 APOE 526T 的质粒 DNA 的混合液溶液、含 APOE 388C 和 APOE 526T 的质粒 DNA。其中，引物、荧光探针、热启动 Taq 酶、含 APOE 388T 和 APOE 526C 的质粒 DNA、含 APOE 388T 和 APOE 526C 的质粒 DNA 与含 APOE 388C 和 APOE 526T 的质粒 DNA 的混合液溶液、含 APOE 388C 和 APOE 526T 的质粒 DNA 由申请人自行生产，UDG 酶、dNTPs 为外购，申请人制定了各主要原材料质量要求并经检验合格。

申请人设计了完整的企业参考品，包括阳性参考品、特异性参考品、最低检测限参考品、重复性参考品。其中，阳性参考品 12 份，由能够覆盖本试剂盒检测位点基因型别经测序证实的临床全血样本 DNA 和细胞基因组 DNA 制备而成，基因型别包含野生型、杂合突变型和纯合突变型。特异性参考品 8 份，N1-N7 为人工合成的本试剂盒检测范围外的质粒大片段，N8 为大肠杆菌基因组 DNA。最低检测限参考品 6 份，由能够覆盖本试剂盒检测位点基因型别的临床全血样本 DNA 和细胞基因组 DNA 制备而成，型别包含野生型、杂合突变型和纯合突变型。重复性参考品由试剂盒检测位点杂合突变型的临床全血样本 DNA 制备而成。各项企业参考品综合用于产品检测准确性、灵敏度、特异性和重复性评价。

## (二) 生产工艺及反应体系研究

申请人通过企业内部试验确定最佳的生产工艺及反应体系，包括 PCR buffer、PCR 反应液、质控品的配液工序、分装工序、组装工序等，同时对试剂用量、样本用量、PCR 反应条件、提取方法、适用仪器等进行研究，还包括对样本类型的研究、样本稳定性的研究。

## (三) 分析性能评估

本产品分析性能包括核酸提取性能、适用的样本类型、检出限、分析特异性、准确度、精密度，申请人提交了有效运行的质量管理体系下生产的 3 批产品在所有适用机型上的性能评估资料。

在核酸提取纯化性能评估中，申请人通过对提取试剂的提取纯度、重复性、核酸提取效率在适用仪器上进行验证，确认试剂盒选择的提取试剂可作为本产品对人类 APOE 基因全血样本的提取方法。

在样本适用类型研究中，申请人对同源全血样本检测的一致性和相关性研究，以及对三种抗凝全血样本检测的准确度研究结果，最终确认本产品适用的样本类型为 EDTA-2Na 抗凝静脉全血、EDTA-2K 抗凝静脉全血和柠檬酸钠抗凝静脉全血样本。

在检出限性能评估中，申请人通过对已知基因型的临床全

血样本进行梯度稀释,对系列浓度样本分别进行 20 次重复检测,以阳性检出率为 95% 的浓度作为最低检出限。最终确定该产品的最低检出限为 1 ng/ $\mu$ L,并对 APOE 不同基因型样本进行重复检测验证,确认本产品最低检出限为 1 ng/ $\mu$ L。

在交叉反应性能评估中,申请人对 APOA1 75AA 质粒、APOA1 83CC 质粒、APOA2 256CC 质粒、APOC3 455CC 质粒、APOC3 482TT 质粒、APOE 219GG 质粒和 APOE 491TT 质粒(APOE 388TT 野生型、APOE 526CC 野生型),以及大肠杆菌基因组 DNA 进行交叉反应评价,结果显示上述样本与本产品不产生交叉反应。

干扰试验中,申请人对含高浓度干扰物质的人全血临床样本进行检测,结果表明临床中可能存在的潜在内源性干扰物质如胆红素(80 mg/dL)、血红蛋白(1000 mg/dL)、甘油三酯(3000 mg/dL)和白蛋白(4000 mg/L)以及外源性干扰物质如 EDTA-2Na 抗凝剂(10 mg/mL)、EDTA-2K 抗凝剂(10 mg/mL)、柠檬酸钠(5 mg/mL)、辛伐他汀(40 mg/L)、普伐他汀(1.2mg/L)对本产品的检测结果无干扰。

在准确度的性能评估中,申请人对企业参考品中的特异性参考品、阳性参考品、重复性参考品、最低检测限参考品进行符合性验证,并对 APOE 388T>C 和 APOE 526C>T 三种基因

型的临床样本和细胞基因组进行样本检测准确度验证，结果表明本产品的样本准确度符合要求。

在精密度的性能评估中，申请对 5 ng/ $\mu$ L 和 20 ng/ $\mu$ L 2 个不同浓度的 4 种不同型别的人全血样本进行检测，结果表明各浓度样本检测结果为对应基因型，批内、批间、日内、日间、操作者间重复性好，核酸提取再现性好。

#### **(四) 阳性判断值或参考区间研究**

申请人通过 ROC 曲线法分析对 QV 值进行建立研究，然后对 280 例人全血样本进行研究分析，最终确定本产品的 QV 值为 95。申请人进一步使用本产品和已上市同类产品同时对临床样本进行检测，对 QV 值的适用性进行验证，结果显示本产品与对比试剂检测结果符合率良好。

#### **(五) 稳定性研究**

申请人对本产品实时稳定性、加速稳定性、使用稳定性（冻融、开瓶稳定性）、运输稳定性等进行研究，确定了在各种条件下试剂的有效保存时间。

实时稳定性研究：将本产品储存于  $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$  条件下，分别于 0 月、3 月、6 月、9 月、11 月对外观、准确性、特异性、最低检测限、重复性、质控品等进行考察，各项指标均符合要求，确定产品在规定的储存条件下，可稳定保存 9 个月。

此外，申请人对产品加速稳定性、冻融稳定性、开瓶稳定性、运输稳定性以及样本稳定性分别进行了研究。结果显示，产品的性能均满足产品说明书声称的要求。

### 三、临床评价概述

申请人在中南大学湘雅医院、浙江省人民医院、晋城大医院、南昌大学第二附属医院共 4 家临床机构完成临床试验。采用试验用体外诊断试剂与已上市同类产品进行比较研究试验，确认本产品的临床性能。共入组 1184 例样本，样本类型为抗凝静脉全血。其中，ApoE 基因 388T>C 位点，TT 型 950 例，TC 型 220 例，CC 型 14 例；ApoE 基因 526C>T 位点，CC 型 1030 例，CT 型 149 例，TT 型 5 例。

试验结果显示，本产品与对比试剂对于临床样本检测的符合率如下：ApoE 基因 388T>C 位点，TT 型 100%(95%CI: 99.60%，100%)，TC 型 100%(95%CI: 98.28%，100%)，CC 型 100%；ApoE 基因 526C>T 位点，CC 型 100%(95%CI: 99.63%，100%)，CT 型 100%(95%CI: 97.49%，100%)，TT 型 100%。

综上所述，该产品临床试验设计符合《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》的相关要求，临床试验结果显示该产品与对比方法一致性较好，临床性能满足临床需求。

### 四、产品受益风险判定

申请人对已知危险（源）进行风险评价，按照风险可接受准则判断每个危险(源)的风险是否达到可接受水平，对合理可行降低的风险、不经过风险/收益分析既判定为不可接受的风险采取控制措施，并对具体措施进行实施验证，同时重新对采取措施后的风险进行估计，确认其风险水平是否可接受。但为保证用械安全，基于对主要剩余风险的规避，需要在说明书中提示以下信息：

1、本产品仅针对 APOE 基因的 6 种基因型的检测性能进行了临床验证，检测结果不能作为临床用药调整的唯一依据，临床医生应结合病例的实际情况及多方检查结果进行综合判断。本试剂盒检测结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据。

2、警示及注意事项：产品说明书中介绍了该产品检验方法的局限性及使用中的注意事项。

## 综合评价意见

依据《医疗器械监督管理条例》（国务院令第 739 号）、《体外诊断试剂注册与备案管理办法》（国家市场监督管理总局令第 48 号）等相关医疗器械法规与配套规章，经对申请人提交的注册申报资料进行系统评价，申报产品符合安全性、有效性的要求，符合现有认知水平，建议准予注册。

2024 年 1 月 2 日

附件：产品说明书

## 人类 APOE 基因分型检测试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

### 【产品名称】

人类 APOE 基因分型检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

### 【包装规格】

大包装，20 人份/盒；大包装，48 人份/盒。

### 【预期用途】

本试剂盒适用于体外定性检测人静脉全血样本基因组 DNA 中 APOE 基因 388 位点(T>C)和 526 位点(C>T)的多态性，可以对 APOE 基因的 6 种基因型进行检测，即 E2/E2 (rs429358-388T/T, rs7412-526T/T)、E3/E3 (rs429358-388T/T, rs7412-526C/C)、E4/E4 (rs429358-388C/C, rs7412-526C/C)、E2/E3 (rs429358-388T/T, rs7412-526T/C)、E2/E4 (rs429358-388T/C, rs7412-526T/C) 和 E3/E4 (rs429358-388T/C, rs7412-526C/C)。

人类 APOE 基因位于 19 号染色体 19q13.2，该基因的两个功能多态性位点 rs429358 (c.388T>C, Cys130Arg) 和 rs7412 (c.526C>T, Arg176Cys) 构成 E2 (rs429358T-rs7412T)、E3 (rs429358T-rs7412C)、E4 (rs429358C-rs7412C) 3 种单倍型<sup>[1]</sup>，由这 3 种单倍型构成 6 种不同的基因型 (E2/E2、E3/E3、E4/E4、E2/E3、E2/E4 和 E3/E4)。他汀类药物是目前全球公认的可有效降低冠心病发病率和死亡率的一线药物，高脂血症则是冠心病的重要危险因素之一，也是其重要病理基础<sup>[2]</sup>。ApoE 是一种多态蛋白质，参与脂质的储存、运输及排泄，其多态性是引起个体间和种族间对同一他汀类降脂药物表现出不同代谢能力的重要原因之一，临床上可根据此基因的不同表型指导患者正确选择调脂药物，以降低冠心病的发生率和心血管疾病的风险。目前 FDA 已将 APOE2 列为普伐他汀药物反应相关的生物标记。药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南(试行)<sup>[3]</sup>中也明确指出基因型为 APOE E2/E2 的高血脂症患者普伐他汀治疗的降脂疗效更好。因此，建议患者使用他汀类药物前，对 APOE 基因的多态性进行检测。

本产品仅针对 APOE 基因的 6 种基因型的检测性能进行了临床验证，检测结果不能作为临床用药调整的唯一依据，临床医生应结合病例的实际情况及多方检查结果进行综合判断。本试剂盒检测结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据。

### 【检验原理】

本试剂盒针对人类基因组 DNA 中 APOE 基因的 6 种基因型检测对应的 APOE 388T>C 位点和 APOE 526C>T 位点的单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) 分别设计特异性引物和探针，配以热启动 DNA 聚合酶等成分组成核酸扩增试剂，使用荧光 PCR 仪进行 PCR 扩增，并检测荧光信号，根据野生型和突变型检测结果在荧光值上的差异实现对样本型别的检测。

本试剂盒添加了相关的防污染组分 (尿嘧啶 DNA 糖基化酶，即 UDG/UNG 酶)，其作用机理是选择性水解断裂含有 dU 的双链或者单链 DNA 中的尿嘧啶糖苷键，形成的有缺失碱基的 DNA 链，在碱性介质以及高温下会进一步水解断裂，从而被消除。

### 【主要组成成分】

	组分名称	规格	数量	主要成分
PCR 检测试剂 (大包装, 适用于 20 人份/盒)	APOE 388 PCR 反应液 A	180 μL/管	1	特异性引物和探针
	APOE 526 PCR 反应液 A	180 μL/管	1	特异性引物和探针
	APOE PCR 反应液 B	450 μL/管	1	热启动 Taq 酶、UDG 酶和 dNTPs、热启动 Taq 酶稀释液

PCR 检测试剂（大包装，适用于 48 人份/盒）	APOE 388 PCR 反应液 A	425 $\mu\text{L}$ /管	1	特异性引物和探针
	APOE 526 PCR 反应液 A	425 $\mu\text{L}$ /管	1	特异性引物和探针
	APOE PCR 反应液 B	1060 $\mu\text{L}$ /管	1	热启动 Taq 酶、UDG 酶和 dNTPs、热启动 Taq 酶稀释液
质控品（大包装，适用于 20 人份/盒及 48 人份/盒）	APOE 阳性质控品 1	100 $\mu\text{L}$ /管	1	含 APOE 388T 和 APOE 526C DNA 片段的野生型阳性质控品
	APOE 阳性质控品 2	100 $\mu\text{L}$ /管	1	含 APOE 388T 和 APOE 388C、APOE 526T 和 APOE 526C DNA 片段的杂合突变型阳性质控品
	APOE 阳性质控品 3	100 $\mu\text{L}$ /管	1	含 APOE 388C 和 APOE 526T DNA 片段的纯合突变型阳性质控品
	阴性质控品	400 $\mu\text{L}$ /管	1	纯化水

注：（1）不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。

（2）需自备的试剂：本公司生产的核酸提取或纯化试剂（粤穗械备 20170666 号）。

（3）质控品说明：阳性质控品均为体外人工合成的 DNA 片段，使用时均应视为具有潜在传染性的物质，操作和处理均需符合相关法规要求。

#### 【储存条件和有效期】

试剂盒保存于  $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ ，有效期为 9 个月。

试剂盒应避免反复冻融，反复冻融次数不超过 4 次；在  $2\sim 8^{\circ}\text{C}$  下可以保存 12 天；在  $37^{\circ}\text{C}$  下可以保存 96 小时；开瓶后保存于  $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ ，开瓶次数不超过 4 次，开瓶 4 次后可保存 9 个月； $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$  冷链运输条件下 5 天内不影响本试剂盒的检测性能。

试剂盒生产日期和有效期见产品标签。

#### 【适用仪器】

ABI 7500（国械注进 20163220767，软件版本号 V2.4）。

#### 【样本要求】

1. 适用样本类型：人静脉全血。
2. 样本采集：抽取受检者静脉全血不少于 1 mL 注入 EDTA 或柠檬酸钠抗凝管中，立即轻轻颠倒玻璃管混合 5~10 次，使抗凝剂与静脉全血充分混匀，密闭送检。
3. 样本的保存和运送：可立即用于核酸提取；在  $2\sim 8^{\circ}\text{C}$  保存期为 1 个月；在  $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$  保存期为 12 个月；在  $-80\pm 5^{\circ}\text{C}$  保存期为 2 年；应避免反复冻融，冻融不超过 10 次。运送采用冰壶加冰或泡沫箱加冰密封运输，运输时间不应超过 4 天。

#### 【检验方法】

##### 1. PCR 试剂准备（试剂准备区）

从试剂盒中取出 APOE 388 PCR 反应液 A、APOE 526 PCR 反应液 A 和 APOE PCR 反应液 B、阴性质控品、APOE 阳性质控品 1、APOE 阳性质控品 2、APOE 阳性质控品 3，室温融化后振荡混匀，8,000 rpm 瞬时离心后使用。

APOE 388 PCR 反应管体系的配制

组分	APOE 388 PCR 反应液 A ( $\mu\text{L}$ )	APOE PCR 反应液 B ( $\mu\text{L}$ )	总体积 ( $\mu\text{L}$ )
N 人份用量	$(N+4) \times 8 \mu\text{L}$	$(N+4) \times 10 \mu\text{L}$	$(N+4) \times 18 \mu\text{L}$

APOE 526 PCR反应管体系的配制

组分	APOE 526 PCR反应液A (μL)	APOE PCR反应液B (μL)	总体积 (μL)
N人份用量	(N+4) ×8 μL	(N+4) ×10 μL	(N+4) ×18 μL

将APOE 388 PCR反应液A与APOE PCR反应液B充分混合配制成APOE 388 PCR反应管，将APOE 526 PCR反应液A与APOE PCR反应液B充分混合配制成APOE 526 PCR反应管，瞬时离心，以使管壁上的液体全部离心至管底，分别取18 μL的扩增体系分装到每个PCR反应管中。

备注：“N”代表待检测样本数；“4”代表质控品个数。

## 2. 样本处理和核酸提取（样本处理区）

- 核酸提取使用本公司生产的核酸提取或纯化试剂（粤穗械备20170666号）。
- 建议采用分光光度计（NanoDrop2000超微量分光光度计或其他分光光度计仪器）对提取后的核酸进行检测，浓度应不低于10 ng/μL（若低于10 ng/μL确认样本问题后重新提取，高于100 ng/μL稀释后再加样）。按试剂盒步骤提取的基因组DNA，可立即加样或置于-20±5℃保存不超过2年。避免反复冻融。
- 本试剂盒中的阴性质控品需参与核酸提取。

## 3. 加样（样本制备区）

往分装有18 μL扩增体系的对应的2个位点PCR反应管中分别加入阴性质控品、APOE阳性质控品1、APOE阳性质控品2、APOE阳性质控品3和待测样本核酸（推荐浓度为20 ng/μL）各2 μL，使各反应总体积为20 μL。盖紧管盖，8,000 rpm瞬时离心后转移至扩增检测区。

## 4. PCR扩增（扩增检测区）

4.1 将 PCR 反应管放入仪器样品槽内。

4.2 仪器设置

- 打开 ABI 7500 软件，点击“New Experiment”新建一个实验，“instrument”设置为“7500 (96 wells)”，“type of experiment”设置为“Genotyping”，“reagents”设置为“TaqMan® Reagents”，“ramp speed”设置为“Standard (~2 hours to complete a run)”，确认仪器设置为“Pre-PCR Read”、“Amplification”和“Post-PCR Read”。
- 在“Plate Setup”窗口，点击“Creat New Snp Assay”，选中 SNP Assay1 后，点击“Edit▼”，编辑 SNP Assay，按下列 2 个表格分别对 2 个检测位点的 PCR 反应孔位进行设置命名，按样本对应顺序分别在“Task”设置阴性质控品（Negative control）、APOE 阳性质控品 1（Positive Control Allele 1/Allele 1）、APOE 阳性质控品 2（Positive Control Allele 1/Allele 2）、APOE 阳性质控品 3（Positive Control Allele 2/Allele 2）以及未知样本（Unknown），并在“Sample Name”一栏中设置样本名称。选择参比荧光（Passive Reference）为 ROX。（注：2 个检测位点均需单独设置阴阳性质控品）

SNP Assay Name	APOE 388T>C	Assay ID	/		
Allele 1 Name or Base (s)	wild	Reporter	FAM	Quencher	NFQ-MGB
Allele 2 Name or Base (s)	mutant	Reporter	VIC	Quencher	NFQ-MGB

SNP Assay Name	APOE 526C>T	Assay ID	/		
Allele 1 Name or Base (s)	wild	Reporter	VIC	Quencher	NFQ-MGB
Allele 2 Name or Base (s)	mutant	Reporter	FAM	Quencher	NFQ-MGB

3) 打开Run Method窗口，设置反应体积为20 μL，并设置循环条件如下：

步骤	温度	时间	循环数	备注

1	60℃	30 秒	1×	收集荧光
2	95℃	5 分钟	1×	✓
3	95℃	15 秒	40×	/
	60℃	1 分钟		收集荧光
4	60℃	30 秒	1×	收集荧光

4) 设置完成后, 保存文件, 运行程序。

## 5. 结果分析

运行结束后自动保存结果, 点击Analysis, 选择Allelic Discrimination Plot窗口, 自动获得分析结果。

## 6. 质量控制

### 6.1 阴性质控品

阴性质控品检测结果为阴性, 位于等位基因分型散点图左下角, 为黑色正方形。

### 6.2 APOE 阳性质控品

APOE阳性质控品1: 检测结果为APOE 388T>C和APOE 526C>T位点野生型, 等位基因分型散点图上为红色图形(靠近X轴)。

APOE阳性质控品2: 检测结果为APOE 388T>C和APOE 526C>T位点杂合突变型, 等位基因分型散点图上为绿色图形(靠近对角线)。

APOE阳性质控品3: 检测结果为APOE 388T>C和APOE 526C>T位点纯合突变型, 等位基因分型散点图上为蓝色图形(靠近Y轴)。

## 7. 结果判断

APOE 388T>C 和 APOE 526C>T 位点基因分型检测结果: 野生型为等位基因分型散点图上的红色图形(靠近 X 轴), 杂合突变型为等位基因分型散点图上的绿色图形(靠近对角线), 纯合突变型为等位基因分型散点图上的蓝色图形(靠近 Y 轴), 具体如图 1 所示。具体结果判读如下表 1。

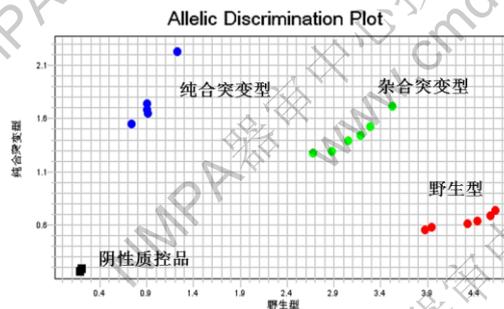


图 1 ABI 7500 仪器结果判读 (APOE 388T>C 和 APOE 526C>T 位点)

表 1 散点图分型结果

分型结果	APOE 388T>C		APOE 526C>T	
	分型结果	散点图颜色	分型结果	散点图颜色
E2/E2	野生型 (TT)	红色	纯合突变型 (TT)	蓝色
E2/E3	野生型 (TT)	红色	杂合突变型 (CT)	绿色
E3/E3	野生型 (TT)	红色	野生型 (CC)	红色
E2/E4	杂合突变型 (TC)	绿色	杂合突变型 (CT)	绿色

E3/E4	杂合突变型 (TC)	绿色	野生型 (CC)	红色
E4/E4	纯合突变型 (CC)	蓝色	野生型 (CC)	红色
阴性		左下角黑色	/	左下角黑色

#### 【阳性判断值】

通过样本的检测，基于 PCR 扩增的荧光值差异结合适用仪器的软件分析功能，Quality Value 设置为 95，仪器可自动给出分析结果，无需进行调整。

#### 【检验结果的解释】

1. 若阴性质控品检测结果不是位于等位基因分型散点图左下角的黑色菱形或黑色正方形，可能是由于存在环境污染、试剂污染、PCR 产物污染或样本间交叉污染等导致，建议排除污染原因后重新检测。
2. 若检测的样本分型为 x，则可能是由于样本存在污染、核酸浓度不在本试剂盒检测浓度范围内或核酸样本中不含目的检测片段，需确认污染问题或者调整样本核酸浓度重新检测。

#### 【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒检测核酸浓度范围为 1~100 ng/μL，低于最低检测限或高于最高检测浓度的样本本试剂盒无法给出正确的分型结果。
2. 本试剂盒除上述提及的 APOE 388T>C 和 APOE 526C>T 位点外，不能检测未在本试剂盒设计范围内的 APOE 基因的其他位点。
3. 样本检测结果和样本收集、处理、运送及保存质量有关，其中任何失误都将会导致假阴性结果。如果样本处理时没有控制好交叉污染，可能出现分型不准确或图形为 x 的结果。
4. 本产品检测结果仅代表对 APOE 388T>C 和 APOE 526C>T 位点多态性检测，不能作为临床用药调整的唯一依据，临床医生应结合病例的实际情况及多方检查结果进行综合判断。

#### 【产品性能指标】

1. 特异性：检测本试剂盒检测范围外的企业特异性参考品，符合率 100%。
2. 准确性：检测本试剂盒检测范围内的企业阳性参考品，符合率为 100%。
3. 检测范围：本试剂盒可以准确检测 1~100 ng/μL 浓度范围内的样本核酸。
4. 重复性：不同操作人在不同时间段分别用三批次试剂检测重复性参考品，结果均为对应基因型。
5. 交叉实验：本试剂盒与人类基因如 APOA1、APOA2、APOC3 不存在交叉反应，与非人类基因组大肠杆菌也无交叉反应。
6. 干扰实验：在本试剂盒的实验条件下，样本中可能存在的内源性干扰物质以及外源性干扰物质，血红蛋白 (1000 mg/dL)、胆红素 (80 mg/dL)、甘油三酯 (3000 mg/dL)、白蛋白 (4000 mg/L)、EDTA-2Na 抗凝剂 (10 mg/mL)、EDTA-2K 抗凝剂 (10 mg/mL)、柠檬酸钠 (5 mg/mL)、辛伐他汀 (40 mg/L)、普伐他汀 (1.2 mg/L) 对试剂盒的检测结果均无干扰。
7. 临床评价：在 4 家临床机构完成 1184 例样本的临床试验，与已经批准上市的同类产品相比：APOE 388T>C 位点野生型符合率 100%、杂合突变型符合率 100%、纯合突变型符合率 100%；APOE 526C>T 位点野生型符合率 100%、杂合突变型符合率 100%、纯合突变型符合率 100%；一致性系数 (Kappa 值) 为 1.00。

#### 【注意事项】

1. 本产品适用机型应具有终点荧光法等位基因分型的功能。

2. 本产品仅用于体外检测，结果仅供临床参考，用于辅助指导个体化用药，不得作为临床诊断的唯一依据，实验前请仔细阅读本说明书。
3. 保存不当会影响本试剂的性能进而导致假阴性结果的发生，请严格按照说明书储存条件保存试剂。
4. 本试剂盒 APOE 388T>C 位点检测结果分析图的横坐标为 FAM 通道，纵坐标为 VIC 通道；APOE 526C>T 位点检测结果分析图的横坐标为 VIC 通道，纵坐标为 FAM 通道。
5. 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：包括卫生部《病原微生物实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。
6. 全程应避免DNA酶污染，实验过程中穿工作服，佩戴一次性手套和口罩。在洁净消毒、紫外光杀菌的化学通风橱或生物安全柜完成操作，避免有害物质进入呼吸道。
7. 建议实验室管理应参考PCR基因扩增实验室管理的相关规范且实验人员进行相关专业培训，实验过程可参考分区进行（试剂准备区、样本制备区、扩增检测区），各区各阶段用品不能交叉使用。
8. PCR检测试剂使用前要完全解冻，8,000 rpm离心数秒后使用，但应避免反复冻融。
9. 如果在标本处理中没有控制好交叉污染，可能出现分型不准确或图形为x的结果。
10. 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-20±5℃待用。
11. 产物处理：PCR结束之后，产物容易引起污染，应由当天不再参与实验的人员将所有反应管放入生物安全垃圾处理袋或其他容器中确认完全封闭后方可丢弃。
12. 质控品使用前需充分混匀，加样时需确保加样量和孔位准确，避免空吸或污染的现象。

#### 【参考文献】

1. Jaroslav A. Hubacek, Michal Vrablik. Effect of apolipoprotein E polymorphism on statin-induced decreases in plasma lipids and cardiovascular events[J]. Drug Metabolism and Drug Interactions, 2011, 26(1): 14.
2. Dimitra Georgiadou, Angeliki Chroni, Alexander Vezeridis, et al. Biophysical Analysis of Apoli poprotein E3 Variants Linked with Development of Type III Hyperlipoproteinemia[J]. PLoS One, 2011, 6(11): 1-11.
3. 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南（试行）. 2015.

#### 【基本信息】

注册人/生产企业名称：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

联系方式：

售后和服务单位名称：

联系方式：

生产地址：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号；  
广州市高新技术产业开发区荔枝山路 6 号；  
广州市黄埔区香山路 17 号 B104 号房。

生产许可证编号：

#### 【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

#### 【说明书核准日期及修改日期】