

【产品名称】

通用名称：乙型肝炎病毒前 C 区/BCP 区突变检测试剂盒 (PCR-反向点杂交法)

【包装规格】10 人份/盒

【预期用途】

本品用于体外定性检测临床乙肝病人血清或血浆样本中乙型肝炎病毒 (HBV) 前 C 区 ntA1896 (nt1896G→A)、ntA1899 (nt1899G→A)、C 基因启动子 (BCP) 区 ntT1762/A1764 (nt1762A→T、nt1764G→A) 联合突变。

研究表明，在部分 HBeAg 阴性的乙肝患者中，由于前 C 区 ntA1896 (nt1896G→A) 变异导致 HBeAg 合成和分泌障碍，而 HBV 仍在复制。ntA1899 (nt1899G→A) 变异常和 ntA1896 相伴出现，提示病毒有较高的复制水平和传染性；HBV C 基因启动子 (BCP) 区 ntT1762/A1764 (nt1762A→T、nt1764G→A) 联合突变，可使 HBeAg 表达降低，和前 C 区 ntA1896 变异协同影响血清学转换。ntT1762/A1764 双变异与活动性肝脏炎症和肝功能损害程度相关，对乙肝患者进行 HBV 前 C 区和 BCP 区突变检测有助于临床正确认识 HBeAg 的感染状态，为 HBV 引起的肝脏疾病的诊断和治疗提供辅助依据^[1,2]。

结果仅供临床参考，不单独作为确诊或排除病例的依据。

【检验原理】

本试剂盒针对 HBV 前 C 区和 BCP 区设计特异性引物和杂交探针，预先将特异性探针包被在尼龙膜上，再利用生物素标记的引物对靶片断进行 PCR 扩增，PCR 产物和膜条上的特异性探针杂交，靶标中的型特异性片断会和特异性探针结合，未结合的 PCR 产物通过洗膜去除，最后进行显色和结果分析，从而可检测 HBV 前 C 区 ntA1896 (nt1896G→A)、ntA1899 (nt1899G→A) 突变，BCP 区 ntT1762/A1764 (nt1762A→T、nt1764G→A) 联合突变。

【主要组成成分】

单管单人份规格试剂：

组分名称		规格	主要组成成分	数量
PCR 试剂	DNA 提取液	500 μL/管	Triton X-100、NP-40	1
	DNA 浓缩液	2000 μL/管	聚乙二醇	1
	HBV preC/BCP 突变 PCR 反应管 (未贴标签管)	单管单人份	PCR buffer, 引物, taq 酶	10
	HBV preC/BCP 突变阳性质控品	50 μL/管	含 HBV preC/BCP 目的片段的病毒样颗粒	1
	HBV preC/BCP 突变阴性质控品	50 μL/管	HBV 阴性血浆	1
反向点杂交试剂	杂交液 I 浓缩液	50mL/瓶	SDS, SSC	1
	杂交液 II 浓缩液	30mL/瓶	SDS, SSC	1
	溶液 I	100 μL/管	POD	1
	溶液 II 浓缩液	25mL/瓶	柠檬酸钠	1
	溶液 III	1mL/管	TMB	2
	溶液 IV	100 μL/管	过氧化氢	1
	杂交膜条	10 人份/袋	尼龙膜, 探针	1

大包装规格试剂：

组分名称		规格	主要组成成分	数量
PCR 试剂	DNA 提取液	500 μL/管	Triton X-100、NP-40	1
	DNA 浓缩液	2000 μL/管	聚乙二醇	1
	HBV preC/BCP 突变 PCR 反应液	420 μL/管	PCR buffer, 引物	1
	HBV preC/BCP 突变酶系	30 μL/管	Taq 酶	1
	HBV preC/BCP 突变阳性质控品	50 μL/管	含 HBV preC/BCP 目的片段的病毒样颗粒	1
	HBV preC/BCP 突变阴性质控品	50 μL/管	HBV 阴性血浆	1
反向点杂交试剂	杂交液 I 浓缩液	50mL/瓶	SDS, SSC	1
	杂交液 II 浓缩液	30mL/瓶	SDS, SSC	1
	溶液 I	100 μL/管	POD	1
	溶液 II 浓缩液	25mL/瓶	柠檬酸钠	1
	溶液 III	1mL/管	TMB	2
	溶液 IV	100 μL/管	过氧化氢	1
	杂交膜条	10 人份/袋	尼龙膜, 探针	1

注：不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。

需自备的试剂：去离子水。

质控品说明：HBV preC/BCP 突变阳性质控品为含 A1762/G1764、A1896/G1899 突变型 HBV 片段的病毒样颗粒。HBV preC/BCP 突变阴性质控品为 HBV 阴性 HBV 阴性的正常人血浆（经过灭活处理）。

【储存条件及有效期】

PCR 试剂保存于 -20±5℃，应避免反复冻融，反向点杂交试剂保存于 2~8℃。试剂盒有效期为 8 个月。

试剂盒生产日期和有效日期见产品标签。

【适用仪器】ABI2720、9700 型定性扩增仪，电热恒温振荡水槽。

【样本要求】

1. 标本采集：

血清：用一次性无菌注射器抽取受检者静脉血 2mL，注入无菌的干燥玻璃管，室温放置 30~60 分钟或水平离心机，1,500rpm 离心 5 分钟后析出血清，吸取上层血清备用。

血浆：用一次性无菌注射器抽取受检者静脉血 2mL，注入含 EDTA（乙二胺四乙酸二钠）或枸橼酸钠抗凝剂的玻璃管，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，静置 5~10 分钟后即可分离出血浆。

在本试剂盒检测下限处，肝素和溶血样本对本试剂盒的检测结果有干扰。血清中可能存在的干扰物有血色素，肝素等，采样时应防止溶血、避免使用肝素抗凝管。

2. 保存：标本可立即用于测试，也可在-20±5℃长期保存。

3. 运输：标本运送在 0℃左右条件下进行。

【检验方法】

1. 标本处理

将血清或血浆 50 μL 转移到 1.5mL 离心管中，加 50 μL DNA 浓缩液混匀，12,000rpm 离心 10 分钟，弃上清（用枪头吸尽上清）。加入 25 μL DNA 提取液，振荡数秒充分溶解沉淀。4,000rpm 离心 30 秒。100℃保温 10 分钟（误差不超过 1 分钟）。12,000rpm 离心 5 分钟，备用。

2. 阳性、阴性质控品

取阳性、阴性质控品各 50 μL，加 50 μL DNA 浓缩液混匀，12,000rpm 离心 10 分钟，弃上清（用枪头吸尽上清）。加入 25 μL DNA 提取液，振荡数秒充分溶解沉淀。4,000rpm 离心 30 秒。100℃保温 10 分钟（误差不超过 1 分钟）。12,000rpm 离心 5 分钟，备用。

3. PCR 扩增

3.1 大包装的 PCR 扩增操作：按比例（HBV preC/BCP 突变 PCR 反应液 42μL/人份+HBV preC/BCP 突变酶系 3μL/人份）取相应量的 PCR 反应液及酶系，充分混匀后按 45μL/管分装至 0.2mL 离心管中，然后分别取处理后样品、阳性质控品 5μL，加入到 0.2 离心管中，6,000rpm 瞬时（3 秒）离心，将各反应管放入 PCR 仪。

3.2 单管单人份的 PCR 扩增操作：取 PCR 反应管若干，然后分别加入处理后样品、阳性质控品 5 μL，加入 PCR 反应管中，6,000rpm 瞬时（3 秒）离心，将各反应管放入 PCR 仪。

3.3 编辑

3.3.1 打开 PCR 仪开关，待显示主界面后按 F2，通过数字键和方向键设置循环条件（ABI2720、9700 型定性扩增仪操作步骤相同）：50℃→3 分钟；93℃→5 分钟；（93℃ 30 秒→54℃ 45 秒→72℃ 30 秒）×45 个循环；最后 72℃保温 7 分钟。

3.3.2 按 F1 键，在 Reaction Volume 一栏通过数字键设置扩增体积为 50μL。

3.3.3 按 F1 键，开始运行程序。

4. 杂交操作

4.1 杂交前试剂配制

4.1.1 自备试剂：去离子水。

4.1.2 杂交液 I：将杂交液 I 浓缩液 50℃水浴溶解，充分摇匀后用去离子水稀释而成（杂交液 I 浓缩液与去离子水体积比为 1：4）。室温储存，使用前需充分溶解混匀。

4.1.3 杂交液 II：将杂交液 II 浓缩液 50℃水浴溶解，充分摇匀后用去离子水稀释而成（杂交液 II 浓缩液与去离子水体积比为 1：4）。室温储存，使用前需充分溶解混匀。

4.1.4 溶液 II：将溶液 II 浓缩液用去离子水稀释而成（溶液 II 浓缩液与去离子水体积比为 1：4）。常温储存，使用前需充分溶解混匀。

4.1.5 溶液 IV：稀释 10 倍，如：10 μL+90 μL 去离子水，混匀。

4.1.6 结合液现用现配（1 人份）：10 μL 溶液 I +2mL 充分溶解混匀的杂交液 I（按此比例配制，如 10 人份：100 μL 溶液 I +20mL 充分溶解混匀的杂交液 I）。

4.2 杂交显色

4.2.1 杂交液 I 与杂交液 II 预热至 42℃，备用；打开水浴水槽，待温度稳定后用温度计校正水槽温度至 42℃。

4.2.2 取 N 个（N=样品数）5mL 离心管插入 5mL 的离心管架，镊取本试剂盒中杂交膜条边缘并编号，对应将膜条放入离心管中，加入 4mL（±0.5mL）预热杂交液 I（完全浸没膜条），备用；

4.2.3 将 PCR 产物加入对应的 5mL 离心管中，务必盖紧管盖。然后将 5mL 的离心管架侧面朝下并用水槽的弹簧固定，使得膜条在杂交过程中横向摆动，低速转动（100~150 转/分），杂交 45 分钟；

4.2.4 取洁净 50mL 离心管，加入 20mL 预热杂交液 II；将 5mL 离心管中膜条取出放入准备好的 50mL 离心管中，每个 50mL 离心管可最多同时放入 10 张膜条，放入水浴水槽（42℃），100 转/分，水浴 5 分钟，弃杂交液 II。重复（步骤 4.2.4）2 次；

4.2.5 弃杂交液 II，将 50mL 离心管倒置于吸水纸上，吸干管底液体，每个 50mL 离心管中加入 20mL 结合液，放置于 20~30℃生化摇床（或摇摆式脱色摇床）上摇摆（30~50 转/分），避光（黑色塑料薄膜包好离心管）反应 10 分钟（样本量较少时，可在 5mL 或者 15mL 离心管内进行操作）；

4.2.6 弃结合液，将 50mL 离心管倒置于吸水纸上，吸干管底液体，加入 20mL 20~30℃杂交液 I，生化摇床（或脱色摇床）上摇摆 3 分钟，弃杂交液 I。重复（步骤 4.2.6）2 次；

4.2.7 弃杂交液 I，将 50mL 离心管倒置于吸水纸上，吸干管底液体。加入 20mL 溶液 II，生化摇床（或脱色摇床）上摇摆 2 分钟；

配制显色液 1 人份：1mL 溶液 II+100 μL 溶液 III+0.5 μL 稀释 10 倍后的溶液 IV）×2（根据实际用量配制，现配现用，如出现配制后已经变蓝，请重新配制）

如，22mL 显色液配制：20mL 溶液 II+2mL 溶液 III+10 μL 稀释 10 倍后的溶液 IV

4.2.8 弃溶液 II，将 50mL 离心管倒置于吸水纸上，吸干管底液体。加入相应量的显色液，避光反应 5-10 分钟（样本量较少时，可在 5mL 或者 15mL 离心管内进行显色处理）；当显色弱时，可适当延长显色时间。

4.2.9 显色反应结束后，立即弃显色液，加入 20mL 溶液 II，生化摇床（或脱色摇床）上摇摆 2 分钟。弃溶液 II，加入 20mL 去离子水，轻摇 2~3 分钟取出。用吸水纸吸去膜条表面水分，尽快在扫描仪上扫描膜条（若不能立即进行扫描，请冻存于-20±5℃）。

5. 结果分析

参照达安膜条斑点识别分析系统操作说明书的要求，使用扫描仪扫描膜条，设定相应的参数并输出扫描结果，然后采用该软

件进行数据分析，详见软件使用操作说明书。

6. 质控标准

- 6.1 显色反应控制点（CC）：信号值应≥cutoff 值，且为边缘清晰的蓝色圆点，则杂交过程正常。否则需要重新检查杂交过程。
 - 6.2 阳性质控品：膜条上 1（A1762/G1764），4（A1896/G1899），7（PC），8（CC）号位点阳性；
 - 6.3 阴性质控品：只有 8（CC）号位点阳性；
- 以上各项同时满足的条件下本次实验有效，否则全部试验应重新进行。

【阳性判断值】

所有结果判断以软件计算的信号值为准。信号值反映的是斑点的积分光密度（IOD）。
显色控制点（CC）IOD≥cutoff 值为显色正常，当低于这个数值时将显示“ERROR”，原因是可能没有在正确的斑点区域选取，或者杂交过程出现异常。
CC 点、PC 点和各型别位点 cutoff 参考值根据统计学方法计算得出，已预设的分析软件中。

【检验结果的解释】

膜条上各型 HBV 探针排列如下：

1	2	3	4	5	6	7	8	编
A1762/G1764	T1762/A1764	G1896/G1899	A1896/G1899	G1896/A1899	A1896/A1899	PC	CC	号

注：A1762/G1764 为 HBV BCP 区野生型探针，T1762/A1764 为 HBV BCP 区突变型探针；G1896/G1899 为 HBV 前 C 区野生型探针，A1896/G1899、G1896/A1899、A1896/A1899 为 HBV 前 C 区突变型探针。

- 1. 阴性、阳性判定标准：各位点信号值的 cutoff 值已在软件中设置好，分析结束后软件自动生成信号值和相应的型别。
- 2. 各基因型结果判定（1，2 号探针对应 BCP 区，3，4，5，6 号探针对应前 C 区）如下表，若只有 8 号点阳性，其它点阴性表明 HBV DNA 检测阴性或低于本试剂盒检测下限；若 7 号点阳性表明 HBV DNA 检测阳性；若同一检测区域（BCP 区或前 C 区）不同型别探针点均阴性，而 7，8 号探针阳性表明存在其它类型突变，需测序确认。

检测结果	报告内容
1，3，7，8 阳性见附图（1）	A1762/G1764，G1896/G1899（野生型）
2，3，7，8 阳性见附图（2）	T1762/A1764，G1896/G1899（BCP 区突变）
1，4，7，8 阳性见附图（3）	A1762/G1764，A1896/G1899（前 C 区突变）
2，6，7，8 阳性见附图（4）	T1762/A1764，A1896/A1899（BCP 区突变、前 C 区突变）
1，2，4，7，8 阳性见附图（5）	A1762/G1764，T1762/A1764，A1896/G1899（BCP 区野生、突变株共存，前 C 区突变）
1，3，4，7，8 阳性见附图（6）	A1762/G1764，A1896/G1899，G1896/G1899，（BCP 区野生型，前 C 区野生、突变株共存）

3. 常见型别附图：

- (1) BCP 区野生型、前 C 区野生型 A1762/G1764，G1896/G1899
- (2) BCP 区突变、前 C 区野生型 T1762/A1764，G1896/G1899
- (3) BCP 区野生型、前 C 区 AG 突变 A1762/G1764，A1896/G1899
- (4) BCP 区突变、前 C 区突变 T1762/A1764，A1896/A1899
- (5) BCP 区混合感染、前 C 区突变 A1762/G1764，T1762/A1764，A1896/G1899
- (6) BCP 区野生型、前 C 区混合感染 A1762/G1764，A1896/G1899，G1896/G1899

- 4. 对于检测结果 7 号点阳性的，表明该样本有 HBV 病毒的遗传物质 DNA 存在，检测结果阴性并不能排除样本含有病毒，只能说明样本含有的病毒浓度低于本试剂盒的检测下限。
- 5. 对于检测过程中，BCP 区或前 C 区出现多个点阳性代表可能是野生型或各种突变类型的病毒混合感染，但不能计算出其具体的比例。

【检验方法的局限性】

低于本试剂盒最小检出量浓度的样品无法进行突变检测；未在本试剂盒设计范围内的突变位点无法检出。

【产品性能指标】

- 1. 最小检出量：本试剂盒的最小检出量为 5×10^3 IU/mL。

2. 交叉反应：试剂盒与 HCV（丙型肝炎病毒）、HIV-1（人类免疫缺陷病毒 1 型）、TP（梅毒）无交叉反应。
3. 试剂盒的临床试验结果显示：本试剂盒的灵敏度为 96.6%，特异性为 99.6%，准确度为 97.3%，对 HBV 前 C 区和 BCP 区不同突变型检测结果无差异。

【注意事项】

1. 本品仅用于体外诊断。
2. 实验前请仔细阅读本说明书；
3. 为了避免样本中任何潜在的生物危险，检测样品应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤和粘膜；样本的处理建议在可防止气雾外流的生物安全柜中操作，操作中使用的试管、吸头丢弃前需经灭菌处理。标本操作和处理均需符合相关法规要求：卫生部《微生物生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。
4. 试剂盒阴性质控品和阳性质控品虽经验证病毒已灭活，但没有任何一种已知的测试方法可以完全确保人源性物质不含有传染性物质。所有人源性物质都可能具有潜在的传染性，操作时应视为传染性物质进行处理。
5. 实验人员必须进行专业培训，PCR 实验室应与杂交室分开。PCR 实验应分别在样品处理区，PCR 加样区，扩增区和杂交室分别进行，各区应相对分隔。人和实验用物品应从样品处理区 → PCR 加样区 → 扩增区 → 杂交室单向流动，PCR 试剂盒不可存放于杂交区。
6. 为试剂和标本准备阶段提供负压超净工作台，实验过程中请穿工作服，PCR 室和杂交室工作服应分开，带一次性手套，使用自卸管移液器。
7. 对每次实验进行质量控制。
8. 标本处理：加入浓缩液后去上清步骤需小心操作，浓缩液尽量吸去，不碰及沉淀；沉淀中加入 25 μL DNA 提取液时，因 DNA 提取液内含不溶于水的颗粒物质，吸取时需用加样器充分混匀。如出现因吸头嘴部太细不能吸取或取样后堵塞吸头的现象，可先用无菌剪刀将吸头嘴部剪去一截。
9. PCR 反应使用的 1.5mL 离心管、吸头等应高压灭菌并一次性使用；杂交操作时，仔细核对 DNA 扩增管与膜条的编号，使之相符。
10. 杂交全过程需避免用手接触膜条，并用镊子镊取膜条边角进行操作。避免划破膜条，并用铅笔在边角标记。油性笔标记会影响信号分析的准确性。
11. 本实验需在室温 20~30℃ 的环境下进行，若环境温度过低，实验结果可能不准确。
12. 杂交液 I、杂交液 II 中的 SDS 易结晶析出，浓缩液稀释前需温浴 (40℃~50℃) 使之溶解。
13. 如果显色反应控制点颜色显得较浅，可以适当延长显色时间 3~5 分钟。
14. 反应结束后，膜条进行扫描时务必先用吸水纸吸干表面水分，并且平整地放到扫描仪上。在图片预览时膜条上不出现水渍和褶皱现象，否则会影响信号分析结果的准确性。
15. 标本制备区所用过的吸头请打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃；
16. 实验完毕用 10% 次氯酸或 70% 酒精或紫外线灯处理工作台和移液器。

【参考文献】

1. Yotsuyanagi H, Hino K, Tomita E, et al. J Hepatol. 2002;37(3):355-63.
2. Gandhe SS, Chadha MS, Walimbe AM, et al. J Viral Hepat. 2003;10(5):367-82.

【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：

传真：020-32068820

电话：020-32290789, 400 000 0340

邮政编码：510665

网址：<http://www.daangene.com>

售后和服务单位名称：广州达安基因股份有限公司

联系方式：

传真：020-32068820

电话：020-32290789, 400 000 0340

邮政编码：510665

网址：<http://www.daangene.com>

生产地址：广州市高新技术产业开发区香山路 19 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】