

JC 病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

说明书

【产品名称】
通用名称：JC 病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）
【包装规格】
24 人份/盒
【预期用途】

本产品用于人体血清、血浆和尿液样本中 JC 病毒核酸的定量检测。JC 病毒(JCV)属多瘤病毒家族成员，感染后多以潜伏状态存在，当宿主免疫功能低下时可重新激活。JCV 具有明显的嗜神经性特点，严重免疫抑制患者感染 JCV 后可引起进行性多灶性脑白质病(PML)。PML 主要发生于淋巴网状内皮细胞恶性肿瘤如慢性淋巴细胞性白血病、淋巴增生障碍（如淋巴瘤）、实质性器官瘤、重度免疫抑制的患者（包括爱滋病、系统性红斑狼疮、韦格肉芽肿病、硬皮病、皮炎炎、多发性肌炎及类风湿性关节炎等）和器官移植后药物治疗所致严重免疫抑制患者。

JCV 还能在肾脏组织中复制，并通过尿液排出病毒。器官移植后，免疫抑制剂的使用是诱导多瘤病毒激活复制的重要原因，其中，40% 以上的肾移植患者可检测到 JCV 的复制。

国外研究认为，利用聚合酶链式反应(PCR)对尿液、血液或脑脊液特异性地检测 JCV DNA 是 PVAN 或 PML 早期诊断及预测的最佳方法。PCR 技术检测方法的灵敏度为 75%，特异度则高达 96%，同时可以区分 BKV 与 JCV 的感染。荧光定量 PCR 比常规 PCR 具有更高的灵敏度、特异性，操作更加快速、方便，是用于 JCV DNA 检测的理想手段。

实验操作人员应接受过基因扩增或分子生物学方法检测的专业培训，具备相关的实验操作资格，实验室应具备合理的生物安全防护设施及防护程序。

【检验原理】
本产品选取 JCV 基因组中一个相对保守的区域，设计特异性引物及探针，在样本核酸纯化之后采用实时荧光 PCR 对病毒 DNA 进行定量检测。

该法采用了 Taqman 荧光探针技术，这个探针带有一个荧光发光基团和一个荧光淬灭基团，完整的探针在特定光源激发下，发光基团所产生的荧光被淬灭基团全部吸收，样品无荧光。PCR 过程中，Taq 酶在延伸 DNA 链的同时，可通过自身的 5'→3'核酸外切酶活性降解与模板结合的特异性荧光探针，使荧光报告基团与淬灭基团分离，分离后的荧光报告基团在特定光源激发下产生荧光。监测整个 PCR 过程荧光信号的变化，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析。

同时，本产品采用内标质控体系，用于监测反应体系可能存在的抑制因素。内标模板与靶基因无同源性，内标探针选择的是与靶基因探针没有冲突的另一检测通道。

序号	产品组成	主要成分	配给量
1	浓缩液	PEG	1200 μL×1 管
2	裂解液	Tris-HCl、EDTA	1200 μL×1 管
3	PCR 反应液	引物、探针、dNTP、dUTP、Mg ²⁺	215 μL×1 管
4	酶混合物	Taq 酶、UDG 酶	15 μL×1 管
5	PCR 增强剂	Taq 酶、dNTP、Mg ²⁺	252 μL×1 管

6	内标模板	含有内标基因片段的重组质粒	30 μL×1 管
7	阴性质控品	纯化水	300 μL×1 管
8	定量标准品 I	体外纯化质粒 5×10 ⁴ copies/mL	30 μL×1 管
9	定量标准品 II	体外纯化质粒 5×10 ⁵ copies/mL	30 μL×1 管
10	定量标准品 III	体外纯化质粒 5×10 ⁶ copies/mL	30 μL×1 管
11	定量标准品 IV	体外纯化质粒 5×10 ⁷ copies/mL	30 μL×1 管

注 1：不同批次之间同一组分不可以相互替换
注 2：试剂盒以外必需的设备及材料：荧光定量 PCR 仪、漩涡混合器、生物安全柜、迷你离心机、干式恒温仪或水浴锅、移液器及无菌吸头、离心机及无菌离心管、PCR 反应管、无粉乳胶手套。

【储存条件和有效期】
-20±5℃避光保存，有效期 6 个月。
开封后冻融不超过冻融三次，稳定保存不超过 2 个月。采用冰壶或干冰密封或泡沫箱加冰密封运输，运输箱规格为 465×305×370cm，内置 7 个冰袋（750g）+9kg 干冰。
生产日期及失效日期见标签。

【适用仪器】
本产品适用于 ABI 7500，Stratagene Mx3000P 荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】
1. 样本类型：血浆或血清、尿液
2. 样本采集
1.1 血浆样本采集：用无菌注射器在受检者手臂弯曲处或手背处抽取静脉血 3～5mL，注入含有 EDTA 的无菌收集管，立即轻轻颠倒混匀，室温放置不超过 4 小时，待样本自行析出血浆或直接室温 1600rpm 离心 5 分钟分离出血浆，转移到 1.5mL 灭菌离心管中备用。
1.2 血清样本采集：用无菌注射器在受检者手臂弯曲处或手背处抽取静脉血 3～5mL，注入无菌收集管，室温放置不超过 4 小时，待样本自行析出血清或直接室温 1600rpm 离心 5 分钟分离出血清，转移到 1.5mL 灭菌离心管中备用。
1.3 尿液样本采集：留取中段晨尿 10～20mL（不超过容器体积的 2/3）密封送检。
3. 样本保存：样本应尽快检测，4℃保存不超过 24 小时，-20℃条件下可以保存数月，-70℃条件下可以长期保存。
4. 运输：运输过程中应采用不易碎的容器装载样本，并且视作潜在的传染源，避免外漏。采用冰壶或干冰密封或泡沫箱加冰密封运输，避免样本运输途中解冻，影响检测结果。
5. 干扰物质：肝素可能会抑制 PCR 反应，本试剂盒不适用于含有肝素的样本的检测。

【检验方法】
提前 30 分钟将试剂盒所需组分取出，室温融化，短暂震荡，瞬时离心。
1. 样本处理
1.1 血浆或血清
1) 在 1.5mL 离心管中加入 100μL 待测样本，然后加入 50μL 浓缩液，振荡 15 秒混匀；
2) 将上述离心管放入台式离心机，13000 rpm 离心 10 分钟后取出；
3) 小心吸出 150μL 上清液（尽量吸干上清液，但不要触及沉淀）并弃去，保留沉淀；
4) 向离心管中分别加入 25μL 裂解液，然后用吸头对准沉淀所在位置，将其挑离管底，并吹洗 5 次（关键步骤）；

5) 振荡 15 秒将沉淀充分打散；
6) 100℃条件下温育 10 分钟；
7) 13000 rpm 离心 10 分钟后将上清液转移至新的离心管，该上清液即纯化的 DNA 溶液。

1.2 尿液
将尿液送检管振荡 15 秒，彻底混匀（关键步骤）；取其中 1mL 至 1.5mL 离心管中，13000 rpm 离心 10 分钟后弃去上清；加入 50μL 裂解液，然后用吸头对准沉淀所在位置，将其挑离管底，并吹洗 5 次（关键步骤）；之后参照上述血浆或血清样本操作 5)～7)步骤。
提取后的核酸应立即进行检测。阴性质控品和定量标准品无需抽提，使用前室温融化混匀。

2. 试剂配制
2.1 确定反应数 N，N=待检样本数(n)+定量标准品(4)+阴性质控品(1)+1。计算加到反应混合物中的各个试剂的量，计算如下：

试剂	用量
PCR 反应液	8.5×N μL
酶混合物	0.5×N μL
PCR 增强剂	10×N μL
内标模板	1×N μL

2.2 取无菌离心管配制反应体系，试剂全部加入后震荡混匀，瞬时离心。
2.3 然后将上述混合液 20μL/管分装至 PCR 反应管中。
3. 加样
分别取阴性质控品、已处理样本和定量标准品 I～IV 5μL 加入 PCR 反应管中，盖紧管盖（避免气泡产生），瞬时离心将管壁上的液体全部甩至管底，然后立即进行 PCR 扩增反应。

4. PCR 扩增程序设置
4.1 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪(Version 1.4.0)
1) 面板设置：双击“7500 System Software”图标打开软件，单击“Create New Document”，默认首页面的各选项后点击“Finish”进入“Setup”界面；双击任意空白孔位跳出“Well Inspector”对话框，将“Passive Reference”栏内的“ROX”改为“（none）”，单击“Add Detector...”，在“Detector Manager”选项框中分别选择“Reporter”为“FAM”和“VIC”、“Quencher”为“（none）”的 2 种探针，并点击“Add To Plate Document”将探针添加入“Well Inspector”对话框，点击“Done”关闭“Detector Manager”窗口回到“Well Inspector”对话框，选中试剂所放的孔位，确认与仪器相对应，在“Use”栏内 2 种探针前划“√”，然后在“Task”栏内的下拉选框里选择相应的样本类型：“Unknown”（待测样本）、“NTC”（阴性对照）、“Standard”（标准品），依次选中每一个“Standard”（标准品）孔，在通道为“FAM”的“Quantity”框内输入相应的标准品浓度；选择各样本框，在“Sample Name”处输入各样本的唯一编号。
2) 反应条件设置：单击“Instrument”进入反应条件设置面板，在热循环参数控制面板“Thermal Cycle Protocol”内，制定所需的扩增程序（见下表），并在“Sample Volume”栏内输入 25，运行模式“Run Mode”选择“Standard 7500”、“Data Collection”选择“Stage 3, Step 2（60.0@0:35）”，确认无误后，将结果保存，点击“Start”开始扩增检测。

序号	阶段	温度	时间	循环数
1	UDG 酶反应	37℃	2 分钟	1
2	预变性	95℃	3 分钟	1

3	变性	94℃	15 秒	40
4	退火, 延伸, 荧光信号采集	60℃	35 秒	
5	仪器冷却	25℃	1 分钟	1

- 4.2 Mx3000P 型荧光定量 PCR 仪
- 1) 面板设置：双击“MxPro”图标打开软件，选择“Quantitative PCR (Multiple Standards)”，点击“OK”；选中试剂所放的孔位，确认与仪器相对应，然后在“Well type”的下拉选框里选择相应的样本类型：“Unknown”（待测样本）、“NTC”（阴性对照）、“Standard”（标准品）等，在“Collect fluorescence data”内的“FAM”和“HEX”通道前划“√”；依次选中每一个“Standard”（标准品）孔，在“Standard quantity”右侧的选项框内依次选择需要定量的通道“FAM”及输入相应的标准品浓度；双击各样本孔，跳出“Well Information”对话框，在“Name”框内输入各样本的唯一编号。
- 2) 反应条件设置：单击进入“Thermal Profile Setup”页面，在此页面设置所需的扩增程序（见下表），确认无误后，将结果保存，点击“RUN”开始扩增检测：

序号	阶段	温度	时间	循环数
1	UDG 酶反应	37℃	2 分钟	1
2	预变性	95℃	3 分钟	1
3	变性	94℃	15 秒	40
4	退火, 延伸, 荧光信号采集	60℃	35 秒	
5	仪器冷却	25℃	1 分钟	1

5. 结果分析条件设定
- 5.1 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪（Version 1.4.0）
- 反应结束后，根据 PCR 仪说明书及荧光曲线进行手动或自动调整基线和阈值。手动调整时，基线（Baseline）的起始点（Start）设定在 5~8 之间，终止点（Stop）设定在 12~15 之间，阈值线（Threshold）通常设定在 1000~5000 之间（视具体情况而定）。设定之后，点击“Analyze”（分析）按键，即可从“Report”窗口的“Ct”、“Quantity”处得到各样本的 Ct 值和相应的初始浓度。
- 5.2 Mx3000P 型荧光定量 PCR 仪
- 反应结束后，根据荧光曲线进行手动或自动调整基线和阈值，手动调整基线（Non-adaptive baseline）的起始点（Start）一般设定为 5~8，终止点（Stop）一般设定为 12~15，阈值线（Threshold fluorescence）通常设定在 500~2000 之间（视具体情况而定）。设定之后，可以从“Text report”窗口的“Ct(dRn)”、“Quantity(copies)”处得到各样本的 Ct 值和相应的初始浓度。

6. 质量控制
- 6.1 内标：试剂盒中提供了内标，用于监测 PCR 反应中可能出现的抑制情况。
- 6.2 阴性质控品：靶基因通道无 S 型曲线，报告界面无 Ct 值，内标通道有 S 型曲线。
- 6.3 定量标准品：用作阳性质控及绘制标准曲线。靶基因通道有 S 型曲线，且 Ct 值 < 37；内标通道有 S 型曲线。
- 6.4 标准曲线的相关系数 |R| (|r|) 应 > 0.99，或 R² (r²) 应 > 0.98。
- 以上条件必须在同一次实验中全部满足，否则本次实验结果无效。

【参考值范围】

测定值在 0~2×10³ copies/mL 的样本报告为“低于试剂盒最低检出限(2×10³ copies/mL)，测定值在 2×10³~5×10³ copies/mL 之间的样本，直接报告数值，并注明“供参考”，测定值在 5×10³ copies/mL~5×10⁸

copies/mL 之间的样本，直接报告所测定的数值。参考值范围由大量不同浓度的线性参考品的检测结果确定。

- 【检验结果的解释】
- 单个样本检测可能出现以下情况：
1. 在内标通道中没有出现 S 型曲线，则检测结果无效，建议重新测定。
 2. 在内标通道中出现 S 型曲线，同时在靶基因通道中无 S 型曲线，则检测样本为“低于试剂盒检出下限(2×10³ copies/mL)”。
 3. 在内标通道中出现 S 型曲线，同时在靶基因通道中有 S 型曲线，则有如下解释：
 - 3.1 测定值在 0~2×10³ copies/mL 的样本报告为“低于试剂盒最低检出限(2×10³ copies/mL)”。
 - 3.2 测定值在 2×10³~5×10³ copies/mL 之间的样本，直接报告数值，并注明“供参考”。例：检测结果为 3×10³ copies/mL，报告内容为“3×10³ copies/mL，供参考”。
 - 3.3 测定值在 5×10³ copies/mL~5×10⁸ copies/mL 之间的样本，直接报告所测定的数值；
 - 3.4 测定值 > 5×10⁸ copies/mL 的样本，建议将样本稀释至线性范围后重新测定，并根据下面公式计算样本浓度，结果注明为可报告数值。可报告数值(最终样本浓度)=稀释后浓度×稀释倍数
稀释倍数=(样本量+稀释液量)/样本量
 4. 最适样本类型、感染类型及感染后的最高病毒滴度时间未经验证，因此，在同一患者分次、多部位采集样本可能会避免假阴性。
 5. 不合理的样本采集、转运及处理，样本中的病毒滴度过低均有可能导致假阴性结果。
 6. 病毒检测靶序列的变异会导致假阴性结果。
 7. 本检测结果仅供临床参考，如需确诊请结合临床症状和其他检测手段。

- 【检验方法的局限性】
1. 当样本中被检测核酸浓度低于试剂盒的最低检出限时，可能会导致假阴性结果。
 2. 扩增产物的污染和核酸提取中标本间的交叉污染，很容易出现假阳性结果。因此，PCR 临床应用必须要有严格的实验室分区、实验室管理和质量控制措施。
 3. 样本中残留的蛋白质成分对 PCR 扩增有抑制作用，在样本处理的取上清时应避免吸入白色沉淀物质。

- 【产品性能指标】
1. 最低检出限：根据产品分析性能评估结果，本试剂盒的最低检出限为 2×10³ copies/mL。
 2. 线性检测范围：5×10³~5×10⁸ copies/mL。
 3. 分析特异性：
 - 3.1 对于可能存在检测干扰的病原体，包括甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、梅毒、BK 病毒、单纯疱疹病毒 I、单纯疱疹病毒 II、EB 病毒，人巨细胞病毒、结核杆菌、人乳头瘤病毒 HPV(6, 11, 16, 18)、沙眼衣原体、淋球菌、解脲脲原体 (UU)、肺炎支原体、肠道病毒 71 型、柯萨奇 a16 型(CA16)检测结果均为阴性。
 - 3.2 干扰物质：样本中常见干扰物质高浓度的胆红素 (281.3μmol/L)、甘油三酯 (67.01mmol/L)、血红蛋白 (164g/L) 对 PCR 结果无明显干扰。
 4. 精密性：同一批试剂对高低浓度的两个样本各进行 10 次重复检测，检测浓度对数值的变异系数 CV≤5% (n=10)。
 5. 临床试验：

临床实验结果显示：本试剂盒的血液样本的灵敏度为 98.60%，特异性为 100%；尿液样本灵敏度为 97.90%，特异性为 100%。

- 【注意事项】
1. 开始检测前请仔细阅读本说明书
 2. 本品仅用于体外诊断。
 3. 使用本产品时，应遵循临床基因扩增实验室的技术规范进行操作。临床基因扩增实验室应该分为以下三个区域、并且各个区域应具有以下表格中的必备物品：PCR 准备区-PCR 反应体系配制区；样本处理区-样本处理、加样区；检测区-PCR 扩增、荧光检测、结果分析区。各区的仪器、耗材、试剂等独立专用。

PCR 准备区	样本处理区	检测区
迷你离心机 旋涡混合器 冰箱（4℃；-20℃） 移液器一套 离心管架 消耗品：无粉乳胶手套， 无菌吸头、离心管、PCR 反应管 紫外灯	生物安全柜 台式高速离心机 旋涡混合器 冰箱（4℃；-20℃） 移液器一套 紫外灯 离心管架 消耗品：无粉乳胶手套， 无菌吸头、离心管 专用工作服和办公用品	荧光定量 PCR 仪 紫外灯 专用工作服 办公用品 无粉乳胶手套

4. 操作人员应经过以下专业培训，具有合格的操作技能方能上岗。
 - 4.1 本产品说明书要求的操作培训。
 - 4.2 临床基因扩增实验室各个区域仪器设备的操作培训。
 - 4.3 《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》法规的安全防护培训。
5. 请自备移液器，振荡器，迷你离心机，离心机，干式恒温仪或水浴锅，无菌吸头、离心管，PCR 反应管及无粉一次性乳胶手套（经常更换）。
6. 样本处理在生物安全柜内进行操作，防止污染环境和保护操作者。
7. 样本操作和处理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》。
8. 实验后的废弃物品，如吸头、扩增产物等需进行无害化处理后方可丢弃。
9. 试剂盒中的阳性质控品是体外纯化的质粒，无传染性，但操作时应仍视为传染性物质进行处理。
10. 样本核酸提取完毕后，建议立即进行检测，否则请保存于-20℃，并且在 24 小时内进行检测。
11. 实验完毕后使用 10%次氯酸或 75%乙醇处理操作台面和移液器、离心机、PCR 仪等仪器表面，然后紫外灯照射 25-30 分钟。
12. 不同批次试剂盒中各组份不可以互换，请在有效期内使用本试剂盒，不使用本试剂盒中的组分进行实验可能会导致错误的结果。

- 【参考文献】
- [1] Chapagain ML, Nguyen T, Bui T, Verma S, Nerurkar VR. Comparison of real-time PCR and hemagglutination assay for quantitation of human polyomavirus JC. Virol J. 2006;3:3.
 - [2] Seif I, Khoury G, Dhar R. The genome of human papovavirus JCV. Cell. 1979 Dec;18(4):963-77.

【基本信息】

生产企业名称：北京鑫诺美迪基因检测技术有限公司
住所：北京市北京经济技术开发区康定街 1 号 14 号楼 3 层 1 室
联系方式：010-67817816
售后服务单位：北京鑫诺美迪基因检测技术有限公司
联系方式：010-67817816

生产地址：北京市北京经济技术开发区康定街 1 号 14 号楼 2 层，北
京市北京经济技术开发区康定街 1 号 10 号楼 2 层
生产许可证编号：京食药监械生产许 20090031 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20163402078

【说明书批准及修改日期】2017.10.26

夏邑氏药