

EB 病毒核酸定量检测试剂盒（数字 PCR 法）

产品目录号：本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

【产品名称】

EB 病毒核酸定量检测试剂盒（数字 PCR 法）

【型号、规格】

型号：T-24；规格：24 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于 EB 病毒（EBV）核酸的定量检测。检测结果仅供临床参考，不能单独作为诊断和治疗依据。**本试剂盒仅供科研使用。**

EBV 属于 γ 疱疹病毒，以人类为唯一宿主，主要侵染 B 细胞和上皮细胞，传播范围广泛，成年人中的血清抗体阳性率可达 95%。病毒在初次感染免疫功能正常的个体时通常表现为无症状或自限性的病毒感染综合症，而后转为潜伏感染，等待免疫能力下降时再激活或感染易感个体。

依据感染个体年龄与免疫状况，EBV 感染引发的症状包括发热性上呼吸道感染、单核细胞增多、肺炎等器官病变、甚至移植后淋巴增生性病变，严重时可能导致移植物丧失功能。

【检验原理】

本试剂盒利用液滴数字 PCR 技术，结合 TaqMan 荧光探针技术对 EBV 的 EBNA1 基因保守区进行特异性检测。通过微流控生物芯片可以生成数万个纳升级油包水液滴，液滴中包裹了单拷贝 DNA 模板和 PCR 反应液，将液滴进行两步法 PCR 反应，PCR 反应结束后读取液滴的荧光信号，然后进行定量统计分析，从而实现对本样本中 EBV 的精准定量检测。检测探针的 3' 端标记淬灭基团，5' 端标记荧光报告基团（FAM）。同时试剂盒内设有对内标基因（IC）进行检测的引物与探针，可对采样、提取和 PCR 扩增等步骤进行质控，确保检测过程的精准可靠。此外，本产品使用含 UNG 酶/dUTP 的扩增体系，防止 PCR 产物污染。

【主要组成成分】

本试剂盒具体组成如表 1。试剂盒中不含核酸提取成份，推荐使用商品化试剂盒完成核酸提取。

表 1. 试剂盒组成成分

名称	规格 (标签量)	数量	管盖 颜色	主要成分
PCR A (EBV)	190 μ L/管	1 管	黄色	DNA 聚合酶、 dNTP、缓冲液
检测液 (EBV)	190 μ L/管	1 管	本色	引物、探针
阳性对照品 (EBV)	100 μ L/管	1 管	红色	含 EBV EBNA1 基因特异片段的 质粒和含人 RNase P 基因特

				异片段的质粒
DEPC 水	500 μ L /管	1 管	本色	DEPC 水

说明：不同批号试剂盒内的各组分不可互换。

【储存条件及有效期】

试剂盒组分用铝箔袋封装，需避光保存在 $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ ，有效期为 12 个月，开瓶后使用不影响产品有效期。使用完毕后于 $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存。需避免反复冻融，冻融次数不超过 5 次。试剂盒在运输过程中，需要泡沫箱加冰袋密封运输，运输时间不超过一周，运输温度不高于室温。

【适用仪器】

新羿制造科技（北京）有限公司生产的样本制备仪（Drop Maker M1）和生物芯片分析仪（Chip Reader R1 或 Chip Reader R2）。

【样本要求】

1. 适用的样本类型：血浆、脑脊液

2. 样本采集：

（1）血浆：采用 EDTA 抗凝管收集受检者 3~5 mL 静脉血，轻轻颠倒混匀，室温放置不超过 4 小时，室温 1600 rpm 离心 5 分钟分离出血浆，转移到 1.5 mL 灭菌离心管备用。血浆标本可在 -80°C 冰箱长期保存，避免反复冻融。

（2）脑脊液：以腰部穿刺采集 1-2 mL 样本于无菌样本管中，密封送检。

3. 保存方法：样本采集后，须当日完成检测。否则按下述方案保存：2~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存，不超过 24 小时；24 小时内无法检测的样本应置于 -20°C 以下保存，保存时间不超过 3 个月，长期保存需在 -70°C 及以下保存，冷冻保存需避免反复冻融，冻融次数不超过 5 次。

【检验方法】

1. 核酸提取：将临床样品按照核酸提取试剂盒说明书中相应的要求和步骤进行提取，提取的核酸可直接用于检测。若样本提取后不立即检测，可存于 -70°C 备用，避免反复冻融。

2. 试剂准备：在试剂准备区进行，根据阴性对照（DEPC 水）、阳性对照及待测样本数量（n）按下表配制 PCR 扩增试剂 mix，然后将其从传递窗传递到样本制备区，置于冰上。

试剂组分	30 μ L 反应体系
PCR A（EBV）	7.5 μ L
检测液（EBV）	7.5 μ L

将 mix 在 1.5 mL 离心管中涡旋混合 10 s，瞬时离心后，向 0.2 mL PCR 反应管（自备）中分装 15 μ L PCR 反应液，然后将其从传递窗传递到样本制备区。

3. 模板加样：在样本制备区进行，取 15 μ L 阳性对照（本试剂盒提供）、阴性对照（DEPC 水，本试剂盒提供）或样本提取的核酸加入到反应体系中，混匀，离心除气泡，置于冰上。

4. 液滴生成：在样本制备区进行，使用新羿制造科技（北京）有限公司提供的样本制备仪生成液滴，所用芯片与耗材为新羿制造科技（北京）有限公司样本制备通用试剂盒（10001）提供，参照样本制备通用试剂盒说明书进行相关操作，液滴生成完成后，立即进行扩增反应，或放置在 4°C 环境下 1h 内开始 PCR 扩增反应。

5. 扩增反应：在 PCR 扩增区进行，将含有微液滴的密封 8 联排管放在 PCR 仪上进行 PCR 扩增反应，扩增条件设定如下（升降温速度设置为 $1.5^{\circ}\text{C}/\text{s}$ ）：

	步骤	温度	时间	循环数
1	热启动	95°C	10 min	1
2	变性	94°C	30 s	40
	退火，延伸	56°C	1 min	
3	仪器冷却	12°C	5 min	1

设置完毕，保存文件，运行反应程序。

6. 液滴检测：使用新羿制造科技（北京）有限公司微液滴检测通用试剂盒（10002），在新羿生物芯片分析仪上检测，具体操作方法见微液滴检测通用试剂盒说明书。

7. 结果分析：芯片检测结束后，进行数据分析，根据 2D 散点图和阳性对照的检测结果，划定合适的阳性区域（一般将阳性区域划定在以 FAM 或 VIC 信号集中的区域为中心的位置），得到 FAM 或/和 VIC 通道拷贝数。

【阳性判断值】

通过统计学方法确定临界参考值（阈值，EBV：5 拷贝/体系，IC：10 拷贝/体系）。

【检验结果的解释】

1. 实验质量控制

（1）阳性对照的判读：“EBV 阳性、IC 阳性”。

（2）阴性对照（DEPC 水），“EBV 阴性、IC 阴性”。

2. 样本的 FAM 和 VIC 阳性信号及阴性信号区域需与阳性对照品各信号区域的位置基本一致，然后进行阴阳性判读。

3. 对于测定值在 $10-10^5$ 拷贝之间的样本，报告相应的测定结果。

4. 对于测定值 $>10^5$ 拷贝的样本，报告注明 $>10^5$ 拷贝，若需精确定量可稀释 1000 倍后进行复检。

5. 对于测定值 ≥ 5 拷贝而 <10 拷贝的样本，同时 IC 检测结果为阳性，表明病毒载量低，测定值仅供参考；建议重复测定，如果测定值仍在 5-10 拷贝，则为阳性；如果测定值小于 5 拷贝，则为

- 阴性样本。
6. 对于测定值<5 拷贝的样本，同时 IC 检测结果为阳性，报告为“EBV 阴性”。
7. 对于 EBV 与 IC 测定值均在阈值之下时，表明样本在采集、提取中存在问题，报告“无法判读”。
- 8.异常结果处理

异常情况	可能原因	解决方案
◆ 没有检测到任何阳性液滴	◆ 芯片受到物理损伤 ◆ 分析仪或软件故障	◆ 检查芯片是否损伤 ◆ 检查分析仪及软件是否出现故障
◆ 阴性对照出现阳性结果	◆ PCR 产物交叉污染	◆ 保证操作环境的洁净 ◆ PCR 实验实行严格分区

【产品性能】

批内精密密度变异系数 CV≤5%。

【检验方法的局限性】

- 1 样本检测结果与样本收集、处理、运送及保存质量有关，其中任何失误都将会导致结果不准确。如果样本处理时没有控制好交叉污染，可能出现假阳性结果。
- 2 采用本试剂盒进行检验得到的结果仅供参考；不合理的样本采集、运输和处理均有可能导致假阴性结果；检测的靶序列的变异会导致假阴性结果。

【注意事项】

- 1 本品仅供科研使用，使用前请仔细阅读本说明书。
- 2 试验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项，对每次实验进行质量控制。
- 3 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，所有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，各区各阶段用品不能交叉使用。
- 4 实验操作人员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。
- 5 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替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。
- 6 所有的试剂在使用前，均需在室温下充分融化、混匀后使用。PCR 扩增混合液易粘着于管壁，使用前请瞬时离心数秒。

【参考文献】

[1] Hindson BJ, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. Anal Chem. 2011. 83(22): p. 8604-10.

[2] Pinheiro LB, et al. Evaluation of a droplet digital polymerase

chain reaction format for DNA copy number quantification. Anal Chem, 2012. 84(2): p. 1003-11.

[3] Upton DA, et al. Post-transplant lymphoproliferative disorders, Epstein-Barr virus infection, and disease in solid organ transplantation: Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. Clin Transplant, 2019. 33(9): p. e13652.

[4] Marieke L, et al. Epstein-Barr virus-positive posttransplant lymphoproliferative disease after solid organ transplantation: pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, and management. Transplantation DIRECT, 2016. 2: p. e48.

【基本信息】

生产企业：新羿制造科技（北京）有限公司
生产地址：北京市昌平区科技园区超前路甲 1 号 8 号楼 101 室
联系方式：010-82481061
电子邮箱：info@targetingone.com

【产品标准】

Q/CP XYZZ 106-2019 菌种检测试剂盒