

【产品名称】

通用名称：乙型肝炎病毒 YMDD 基因突变检测试剂盒（PCR-反向点杂交法）

【包装规格】10 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测临床乙肝病人血清或血浆中 HBV pol 逆转录酶区 C 区 YMDD 基因突变（rtM204I、rtM204V）、B 区 rtL180M 突变。

拉米夫定（Lamivudine, 3TC or Epivir）等核苷类似物通过抑制乙型肝炎病毒（HBV）逆转录酶活性而有效地抑制 HBV 的复制，降低 HBV DNA 水平。但在长期服用后，一些病人体内 HBV 多聚酶（pol）发生了突变而出现耐药现象，导致 HBV DNA 反弹，转氨酶升高，最常见的是 pol 逆转录酶区 C 区 YMDD 基因突变即 rtM204I/V 突变，B 区的 rtL180M 突变不仅能恢复 C 区突变株（rtM204I/V）的复制能力，而且能够增加对核苷类似物药物的耐受程度。因此，临床上定时监测抗病毒治疗过程中 HBV 基因组的变化有助于判断疗效，调整临床治疗方案^[1,2]。

试剂盒检测结果仅供参考，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 pol 逆转录酶区 C 区和 B 区突变位点设计特异性引物和探针，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，可检测 HBV 聚合酶基因 C 区 YMDD 基因突变（rtM204I、rtM204V）、B 区 rtL180M 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	500μL/管	Triton X-100、NP-40	1
	DNA 浓缩液	2000μL/管	聚乙二醇	1
	HBV YMDD 突变 PCR 反应管（未贴标签管）	单管单人份	PCR buffer, 引物, taq 酶	10
	HBV YMDD 突变阳性质控品	50μL/管	含 HBV L180/I204 的 YMDD 突变型片段的病毒样颗粒	1
	HBV YMDD 突变阴性质控品	50μL/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	100μL/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	100μL/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	500μL/管	Triton X-100、NP-40	1
	DNA 浓缩液	2000μL/管	聚乙二醇	1
	HBV YMDD 突变 PCR 反应液	420μL/管	PCR buffer, 引物	1
	HBV YMDD 突变酶系	30μL/管	Taq 酶	1
	HBV YMDD 突变阳性质控品	50μL/管	含 HBV L180/I204 的 YMDD 突变型片段的病毒样颗粒	1
	HBV YMDD 突变阴性质控品	50μL/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	100μL/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	100μL/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。

需自备试剂：去离子水。

质控品说明：HBV YMDD 突变阳性质控品为含 HBV L180/I204 的 YMDD 突变型片段的病毒样颗粒。HBV YMDD 突变阴性质控品来源于 HBV 阴性的正常人血浆，以上质控品均经过灭活处理。

【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。

产品的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，溶血样本、肝素对本试剂盒的检测结果有干扰，因此采样时应重视防止样本发生溶血，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 50μL 转移到 1.5mL 离心管中，加 50μL 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 25μL 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 50μL，加 50μL 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 25μL 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 YMDD 突变 PCR 反应液 42μL/人份+HBV YMDD 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：直接使用单管单人份 PCR 反应管，然后分别加入处理后样品、阳性质控品 5μL，盖紧管盖，混匀，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，通过数字键和方向盘键设置循环条件（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 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。

4.1.2 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。

4.1.3 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。

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

4.1.5 结合液现用现配（1 人份）：10μL 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：100μL 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 5 mL 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 60 分钟；

4.2.4 取洁净 50mL 离心管，加入 20mL 预热杂交液 II；将 5 mL 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℃ 生化摇摆仪（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，生化摇摆仪（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，生化摇摆仪上摇摆 2 分钟；

配制显色液 1 人份：1mL 溶液 II+100μL 溶液 III+0.5μL 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+10μL 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，生化摇摆仪上摇摆 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（C.C.）：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：1（L180），4（I204），6（P.C.），7（C.C.）号位点检测阳性。

6.3 阴性质控品：只有 7（C.C.）号位点检测阳性。

以上要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，全部实验应重新进行。

【阳性判断值】

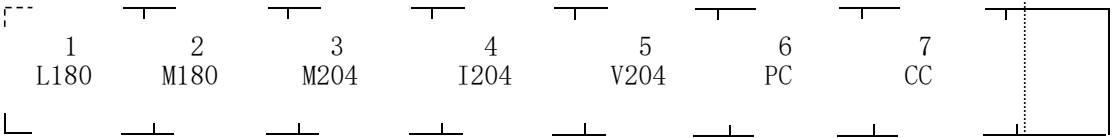
所有结果判断以软件计算的信号值为准。信号值反映的是斑点的积分光密度（IOD）。

显色控制点（C.C.）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。

C.C. 点、P.C. 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：



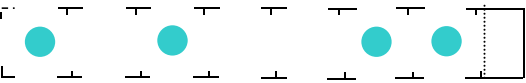
注：对于 rt180 位点：L180 为野生型，M180 为突变型；rt204 位点：M204 为野生型，I204 和 V204 为突变型。

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. 若 7 号阳性，其它位点均阴性表明样本未检测到 HBV DNA，浓度低于试剂盒的检测下限；若 6 号阳性表明 HBV DNA 阳性；若同一点位（RT180 或 RT204）不同型别探针点均阴性而 6 号阳性则表明可能有其它类型突变，需测序确认；常见结果举例如下表：

常见检测结果	报告内容
1, 3, 6, 7 号阳性，见附图（1）	L180, M204（野生型）
2, 3, 6, 7 号阳性	M180, M204（rt180 位点突变）
1, 4, 6, 7 号阳性，见附图（2）	L180, I204（rt204 位点突变）
2, 5, 6, 7 号阳性，见附图（3）	M180, V204（rt180 位点和 rt204 位点突变）
2, 4, 5, 6, 7 号阳性，见附图（4）	M180, I204/V204（rt180 位点和 rt204 位点突变）
1, 2, 4, 5, 6, 7 号阳性，见附图（5）	L180/M180, I204/V204（rt180 和 rt204 位点野生株突变株共存）

3. 常见型别附图

（1）L180/M204



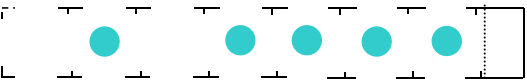
（2）L180/I204



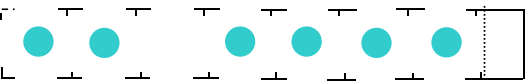
（3）M180/V204



（4）M180/I204, V204



（5）L180, M180/I204, V204



4. 对于检测结果阳性的报告，表明该样本有 HBV 拉米夫定野生型（或突变型）病毒的遗传物质 DNA 存在。
5. 虽然本试剂盒的检测特异性、灵敏度均较高，但检测结果阴性并不能排除样本含有病毒，可能说明样本含有的病毒浓度低于本试剂盒的检测下限。
6. 当在 rt180，rt204 位点出现多个点阳性，代表所检测的样本存在混合感染，不能明确混合感染中病毒株所占的比例。

【检测方法的局限性】

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. 本试剂盒最小检出量为 5×10^3 IU/mL。
2. 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 95.7%，特异性为 98.8%，准确度为 97.7%，对不同 YMDD 基因突变检测结果无差异。

【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；沉淀加入 25μL 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皱褶现象，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] Stephen, Locarnini, et al. Antiviral chemotherapy for chronic hepatitis B infection: lessons learned from treating HIV-infected patients[J]. Journal of Hepatology, 1999.
- [2] SF Lok, M Hussain, C Cursano, et al. Evolution of hepatitis B virus polymerase gene mutations in hepatitis B e Antigen-negative patients receiving lamivudine therapy[J]. Hepatology, 2000.

【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

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】

【说明书核准日期及修改日期】