

JC 病毒核酸测定试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

- 【产品名称】JC 病毒核酸测定试剂盒（PCR-荧光探针法）
- 【包装规格】24 人份/盒
- 【预期用途】

本产品用于体外定量检测人体晨尿样本中的 JC 病毒（JCV）核酸。JC 病毒系 DNA 病毒，与 BK 病毒基因组的大小结构及 DNA 序列非常类似，没有包膜，外被衣壳蛋白，内含一环状的小双链 DNA。JC 病毒（JCV）属多瘤病毒家族成员，是一种机会感染性病原。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。免疫抑制剂的使用是诱导多瘤病毒激活复制的重要原因。通过监测肾移植患者体内的 JCV 载量，可用于肾移植术后 JCV 感染的早期诊断，对预防 JCV 感染造成的多瘤病毒相关性肾病（PVAN）具有一定意义。定量检测 JC 病毒的含量，可用于 JC 病毒感染的辅助诊断。

【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，在样本核酸提取纯化之后采用实时荧光 PCR 监测整个 PCR 过程荧光信号的变化，并通过定量标准品对未知样本的病毒含量进行定量分析。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通道（FAM 通道）无冲突的另一检测通道（HEX/VIC 通道）。PCR 检测使用尿苷酶（UDG）防污染体系，经加热可以选择性地降解含 U 碱基的核酸片段，以防止先前 PCR 扩增产物的污染。

【主要组成成分】表 1 主要组成成分

序号	组分名称	主要成分	规格及装量
1	裂解液	胍盐溶液	4.8mL×1 瓶
2	磁珠	硅基磁珠	480μL×1 管
3	洗液 1	盐溶液	6.6mL×1 瓶
4	洗液 2	纯水	3.6mL×1 瓶
5	洗脱液	Tris	1.2mL×1 管
6	蛋白酶 K	蛋白酶 K	240μL×1 管
7	助沉剂	助沉剂	96μL×1 管
8	JCV 引物探针混合液	引物、探针	120μL×1 管
9	JCV PCR 反应液	Taq 酶、UDG 酶、dNTP、Mg ²⁺	600μL×1 管
10	JCV 内标质控品	内标质粒	120μL×1 管
11	JCV 阴性质控品	生理盐水	600μL×1 管
12	JCV 临界阳性质控品	灭活阳性样本	600μL×1 管
13	JCV 阳性质控品	灭活阳性样本	600μL×1 管
14	JCV 定量标准品 I	灭活阳性样本	600μL×1 管
15	JCV 定量标准品 II	灭活阳性样本	600μL×1 管
16	JCV 定量标准品 III	灭活阳性样本	600μL×1 管
17	JCV 定量标准品 IV	灭活阳性样本	600μL×1 管

- 注 1：不同批次之间同一组分不可以相互替换。
- 注 2：自备试剂包括：异丙醇、无水乙醇、生理盐水。
- 注 3：试剂盒以外必需的设备及耗材：荧光定量 PCR 仪、干式恒温仪、漩涡混合器、生物安全柜、磁力架（磁分离器）、移液器及吸头、离心管、高速离心机、微型离心机、PCR 反应管、无粉乳胶手套、一次性口罩。

【储存条件和有效期】磁珠、裂解液、洗液 1、洗液 2 与洗脱液请于 10～30℃条件下避光保存，注意使用后拧紧瓶盖，防止有效成分挥发。其余组分于-20℃±5℃避光

保存，效期 12 个月，产品效期详见外包装。开瓶后冻融次数及稳定性要求：开瓶后稳定保存不超过 3 个月，反复冻融次数不超过 3 次。

- 【适用仪器】适用于 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪、Bio-Rad CFX-96 型荧光定量 PCR 仪、罗氏 Cobas z480 型荧光定量 PCR 仪。
- 【样本要求】1. 样本类型：晨尿
- 2. 样本采集：留取中段晨尿 5～20mL 密封送检。
- 3. 样本保存：样本在 2～8℃保存不超过一周，-20℃±5℃条件下可以保存 6 个月。
- 4. 运输：运输过程中应将样本视作潜在的传染源，密封冷冻运输，避免解冻和漏液。
- 【检验方法】1. 首次使用注意事项
- 1.1 裂解液中加入 2.6mL 异丙醇，充分混匀后即可使用。若摇匀后仍有不溶物，请于 70℃下温育至溶解，冷却至室温后即可使用。
- 1.2 洗液 1 中加入 5.85mL 无水乙醇，充分混匀后即可使用。
- 1.3 洗液 2 中加入 9.1mL 无水乙醇，充分混匀后即可使用。
- 完成以上步骤后请注意标记。

- 2. 样本处理
- 2.1 将尿液送检管振荡 15s，彻底混匀后立即可取 1mL 至 1.5mL 离心管中（若样本不足 1mL，请用生理盐水稀释至 1mL，并记录所添加生理盐水体积分），13000 rpm 离心 10min 后小心弃去上清 950μL，注意避免触碰离心管底部。
- 注：JCV 阴性质控品、JCV 临界阳性质控品、JCV 阳性质控品及定量标准品 I～IV：融化并振荡 15s 混匀后取 200μL 各加到 1.5mL 离心管中，补加生理盐水至 1mL，振荡 15s，13000 rpm 离心 10min 后小心弃去上清 950μL，其余步骤同 2.2～2.7。
- 2.2 向离心管内加入 10μL 蛋白酶 K、4μL 助沉剂、300μL 裂解液，20μL 磁珠（每次吸取前需颠倒或使用移液器吹吸混匀磁珠），5μL 内标质控品，振荡混匀各离心管 5s，于室温轻柔颠倒混匀 10min，使磁珠和核酸充分结合。
- 2.3 瞬时离心 10s 后将离心管放在磁分离架上，颠倒 2 次冲洗粘附在管盖上的磁珠，静置 1min 后弃去上清液，并注意吸弃管盖残余液体。
- 2.4 加入 500μL 洗液 1，振荡 5s 使磁珠重新悬浮，瞬时离心 10s 后置于磁分离架上，静置 1min 后弃去上清液。
- 2.5 加入 500μL 洗液 2，振荡 5s 使磁珠重新悬浮，瞬时离心 10s 后置于磁分离架上，静置 1min 后弃去上清液，并再次吸弃管底残余液体，晾干 5min。
- 2.6 加入 50μL 洗脱液，用移液器缓慢吹打管壁上的磁珠使之浸于洗脱液中，55℃温育 10min，期间轻轻晃动溶液两次。
- 2.7 将离心管置于磁分离架上静置 1min，磁分离后及时将上清液转移至新的离心管。提取完的 DNA 建议立即进行检测，否则请于-20℃±5℃保存。

- 3. PCR 试剂配制
- 3.1 检测反应设置阴性质控、临界阳性质控、阳性质控及定量标准品 I～IV，每孔均设有内标以监控提取步骤及体系对 PCR 反应可能存在的抑制。
- 3.2 配制过程
- 1) 提前 30min 将于冷冻保存的试剂取出，室温融化，使用前振荡 5s，瞬时离心 10s。
- 2) 确定反应数 N，N=待检样本数（n）+质控品数（7）+1。计算如下：

表 2 PCR 体系配制		
试剂	JCV 引物探针混合液（μL）	JCV PCR 反应液（μL）
A	5×N	25×N

- 3) 取离心管配置反应体系，试剂全部加入后振荡 5s，瞬时离心 10s。
- 4) 然后将上述混合液按 30μL/管分装至 PCR 反应管中备用。
- 4. 加样

将 JCV 阴性质控品、JCV 临界阳性质控品、JCV 阳性质控品、JCV 定量标准品（I、II、III、IV）和待测样本的 DNA 提取液各 20μL 分别加入对应的 PCR 反应管中，盖紧管盖，瞬时离心 5s 将管壁上的液体全部甩至管

底，如有气泡，轻弹、离心直至气泡去除，然后立即进行 PCR 反应。

- 5. PCR 扩增程序设置
- 5.1 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪（Version 2.3）
- 1) 面板设置：双击“7500 System Software”图标打开软件，单击“Advanced Setup”，进入“Experiment Properties”界面，对实验进行命名。选择机型为 7500（96 Wells），选择实验类型为“Quantitation-Standard Curve”，选择荧光收集方式为“TaqMan® Reagents”。选择反应时长，单击“Plate Setup ”进入“Define Targets and Samples”编辑界面：在“Define Targets”对话框内，根据需要单击“Add New Target”可添加多个 Targets，在“Target name”中输入相应的编号名称，将“Reporter”改为“FAM”及“VIC”，将“Quencher”改为“None”；在“Define Samples”对话框内，根据需要单击“Add New Sample”可添加多个 Samples，在“Sample name”中输入相应编号名称。单击打开“Assign Targets and Samples”编辑界面：在“View Plate Layout”界面选中样本所放的孔位，确认与仪器相对应；在“Assign Target（s） to the selected wells”对话框中，将对应的 Target 划“√”，并在“Task”栏内选择相应的样本类型：“U”（待测样本）、“S”（标准品）、“N”（阴性对照），对样本类型为“S”的单孔，将定量标准品对应的浓度输入“Quantity”；在“Assign Sample（s） to the selected wells”对话框中，将对应的 Sample 划“√”；在“Select the dye to use as the passive reference”对话框界面中选择“（none）”。
- 2) 反应条件设置：单击“Run Method”进入反应条件设置面板，编辑所用扩增程序（见表 3），并在“Reaction Volume Per Well”内输入“50”；点击“Add Stage”可以选择“Holding”或者“Cycling”，其中“Holding”为添加一个温度步骤，“Cycling”为添加一个可循环的若干温度步骤；点击“Add Step”可以选择“Before”或者“After”，即可在一个 Stage 的前或后添加一个 step；在“Number of Cycles”可以更改为相应的循环数。确认无误后，点击“Start”后将结果保存，即可开始扩增检测。

表 3 PCR 扩增程序				
序号	阶段	温度	时间	循环数
1	UDG 酶反应	37℃	2min	1
2	预变性	95℃	5min	10
3	变性	94℃	15s	
4	退火，延伸	60℃	35s	35
5	变性	94℃	15s	
6	退火，延伸，荧光信号采集（FAM、VIC/HEX）	60℃	35s	
7	仪器冷却	25℃	1min	1

- 5.2 Bio-Rad CFX-96 型荧光定量 PCR 仪
- 1) 面板设置：双击“Bio-Rad CFX Manager”图标打开软件，单击“PrimePCR”，选择“Probe”进入设置界面。单击“Plate”下的“Edit Selected”对荧光收集通道标准品浓度等进行设置；在“Target Name”选择荧光收集通道“FAM”和“VIC”；单击“Sample Type”下拉菜单选择样本类型，如“Unknown”（待测样本）、“Standard”（标准品）、“NTC”（阴性对照）等；单击“Experiment Settings”对“Targets”和“Samples”进行编辑修改。对样本类型为“Standard”的单孔，分别在“Concentration”依次输入标准品浓度并勾选，设置结束后点击“OK”。
- 2) 反应条件设置：单击“Protocol”下的“Edit Selected”反应体系大小及编辑所用扩增程序（见表 3），直接点击温度和时间即可对温度步骤中的温度及保持时间进行修改；点击“Insert Step”在程序中增加一个温度步骤；点击“Add Plate Read to Step”，在程序中指定获取荧光数据的步骤；点击“GOTO”步骤的重复次数，改变程序中的循环次数；点击“Delete Step”在程序中删除选中的步骤。设置完成后，单击“Start Run”后，选择文件保存的位置并编辑文件名后，即可进行扩增检测。

表 4 PCR 扩增程序

序号	阶段	温度	时间	循环数
1	UDG 酶反应	37℃	2min	1
2	预变性	95℃	5min	1
3	变性	94℃	15s	10
4	退火, 延伸	60℃	35s	
5	变性	94℃	15s	
6	退火, 延伸, 荧光信号采集 (FAM, VIC/HEX)	60℃	35s	35
7	仪器冷却	25℃	1min	

5.3 罗氏 Cobas z480 型荧光定量 PCR 仪

- 1) 面板设置: 在“User Defined Workflow”操作系统, 双击“LightCyclerR480 SW UDF 2.0.0”图标打开软件, 输入用户名和密码登录后进入软件主界面, 点击“New Experiment”进入程序设定界面。点击“Experiment”, 在“Detection Format”下拉菜单选择“Dual Color Hydrolysis Probe/UPL Probe”。点击“Sample Editor”, 在 Step1 中选择“Abs Quant”(绝对定量); 在 Step2 中选择对应的样本反应孔, 在右侧编辑栏中分别对每个反应孔进行编辑: 在“Sample Name”编辑样本名称, “Quantification Sample Type”选择样本类型“Unknown”(待测样本)、“Positive Control/Calibrator”(阳性对照)、“Negative Control”(阴性对照)、“Standard”(标准品); 在 Step3 中, 对“Sample Type”为“Standard”的样本, 在“Concentration”输入标准品浓度。
- 2) 反应条件设置: 点击“Experiment”, 在“Reaction Volume”输入反应体系大小。按照所需 PCR 反应条件进行编辑(见表 3): 在“Program Name”添加反应步骤, 并选择“Cycles”(循环数)和“Analysis Mode”; 单击每个“Program”对各步骤的反应温度及时间进行编辑。在荧光信号采集阶段, Analysis Mode 下拉菜单中选择 Quantification, Acquisition Mode 下拉菜单中选择 Single。设置完成后, 单击“Start Run”选择保存位置并编辑文件名称, 即可进行扩增检测。

表 5 PCR 扩增程序

序号	阶段	温度	时间	循环数
1	UDG 酶反应	37℃	2min	1
2	预变性	95℃	5min	1
3	变性	94℃	15s	10
4	退火, 延伸	60℃	35s	
5	变性	94℃	15s	
6	退火, 延伸, 荧光信号采集 (FAM, VIC/HEX)	60℃	35s	35
7	仪器冷却	37℃	1min	

6. 试验结果的计算或读取

反应结束后, 使用 PCR 仪配套软件对本次试验结果进行分析, 其基线(噪音线)及阈值线为自动设置。当发生背景信号过高等情况而使得扩增曲线水平部分出现异常时, 请手动设置基线; 另外, 因为不同的基因扩增出的信号大小和指数期的位置会有所不同, 当阈值线位置不当而导致结果分析有误时, 请手动设置阈值线, 以下为手动设置基线及阈值线的方法。

6.1 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪

基线设置: 点击 Analysis settings 选择基线设置不正确的反应孔, 取消“Auto Threshold”和“Auto Baseline”选项, 设置“Start /End Cycle”为扩增信号出现的前一个循环点击“Analysis”。

阈值线设置: 点击 Analysis settings 选择基线设置不正确的基因, 取消“Auto Threshold”设置“threshold”数值点击“Analysis”。

6.2 Bio-Rad CFX-96 型荧光定量 PCR 仪

基线设置: 在“定量”选项卡的荧光基团选择器中选择一个荧光基团, 方法是单击扩增图表下方荧光基团名称旁边的框, 选择设置基线阈值以打开“基线阈值”窗口, 调整每个反应孔的开始和结束基线循环, 在“基线循环”窗格中, 通过单击行号选择一个或多个反应孔, 单击左上角可选择全部反应孔, 按住 Ctrl 键可选择多个单独的反应孔, 而按住 Shift 键则可选择多个连续的反应孔, 为所有选定的反应孔调整基线起点循环和基线终点循环, 或在电子表格底部更改开始和结束循环数, 单击确定。

阈值设置: 单击扩增图表中的阈值线, 然后垂直移动鼠标指针即可。

6.3 罗氏 Cobas z480 型荧光定量 PCR 仪

基线设置: 点击 Analysis, 在 create new analysis 中选择 Abs Quant/Fit

Points, 在弹出框中点击√, 选择 Noise Band 窗口, 在 Noiseband (Auto) 下拉菜单中选择 noiseband (Fluoresc) 选项, 单击扩增图表中的噪音线(基线), 然后垂直移动鼠标指针即可。

阈值设置: 在 Noise Band 窗口, 选择 Analysis 窗口, 单击 Threshold (Auto), 然后垂直移动鼠标指针即可调整阈值线。

7. 质量控制

- 7.1 内标: HEX/VIC 通道应出现 S 型曲线, Ct 值<30, 高 JC 病毒载量样本扩增有可能抑制内标扩增, 属正常现象。
- 7.2 阴性质控品: FAM 通道无 S 型曲线, 或在报告界面无 Ct 值显示。
- 7.3 临界阳性质控品: FAM 通道有 S 型曲线, 且测定范围 500 ~ 5×10⁴copies/mL, CT≤30。
- 7.4 阳性质控品: FAM 通道有 S 型曲线, 且测定范围 5×10⁴~5×10⁶copies/mL, CT≤23。
- 7.5 定量标准品 I~IV: 用于绘制标准曲线, FAM 通道有 S 型曲线。标准曲线的相关系数 |R| (|r|) ≥0.99, 或 R² (r²) ≥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。

【参考区间】

通过对临床样本的分析, 测定值在 2×10³ copies/mL~5×10⁸ copies/mL 之间的样本, 可以准确定量, 可直接报告数值; 测定值>5×10⁸ copies/mL 的样本, 建议将样本用无菌生理盐水稀释至线性范围后重新测定, 并根据下面公式计算样本 JC 病毒载量, 结果注明为可报告数值。

可报告数值(最终样本 JC 病毒载量)=稀释后 JC 病毒载量×稀释倍数
稀释倍数=(样本量+稀释液量)/样本量

测定值在 1×10³~2×10³copies/mL 之间的样本, 低于本试剂盒线性范围, 直接报告数值, 并注明“供参考”; 测定值在 0~1×10³ copies/mL 的样本(或 CT>32) 报告为“低于试剂盒最低检测限(1×10³ copies/mL)”。

【检验结果的解释】

1. 如果内标通道无 S 型曲线, 检测结果无效, 应重新检测。高 JC 病毒载量样本, 由于竞争抑制, 内标通道无 S 型曲线属于正常情况。
2. 如果内标通道有 S 型曲线, 同时 FAM 通道检测无 S 型曲线, 则检测报告为“低于试剂盒最低检测限(1×10³ copies/mL)”。
3. 如果内标通道有 S 型曲线, 同时 FAM 通道检测有 S 型曲线, 则有如下解释:
- 3.1 如果待检样本测定值<1×10³ copies/mL(或 CT>32), 则报告为“低于试剂盒最低检测限(1×10³ copies/mL)”。
- 3.2 测定值在 1×10³ copies/mL~2×10³ copies/mL 之间的样本, 直接报告数值, 并注明“供参考”。
- 3.3 测定值在 2×10³ 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, 建议将样本用无菌生理盐水稀释至线性范围后重新测定, 并根据下面公式计算样本 JC 病毒载量, 结果注明为可报告数值。
- 可报告数值(最终样本 JC 病毒载量)=稀释后 JC 病毒载量×稀释倍数
稀释倍数=(样本量+稀释液量)/样本量

【检验方法的局限性】

1. 本检测结果仅供临床参考。
2. 当样本中 JC 病毒载量低于试剂盒的最低检测限时, 可能无法准确检出。
3. 扩增产物的污染和核酸提取中标本间的交叉污染, 会导致假阳性结果。因此, PCR 临床实验室需要有严格的实验室分区、实验室管理和质量控制措施。
4. 不合理的样本采集、转运及处理有可能影响实验结果。
5. JC 病毒检测靶序列的变异会导致假阴性结果。
6. 请严格按照本说明书要求进行试剂操作及存储, 错误的操作及试剂盒储存条件的改变均可能导致结果的不准确。

【产品性能指标】

1. 最低检测限: 根据产品分析性能评估结果, 本试剂盒的最低检测限为 1×10³ copies/mL。
2. 分析特异性:
- 2.1 对于可能存在检测干扰的病原体: BK 病毒、人类乳头瘤病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、沙眼衣原体、解脲脲原体、单纯疱疹病毒 I、

- 单纯疱疹病毒 II 和淋球菌, 本试剂盒检测结果均为阴性。
- 2.2 干扰物质: 高浓度的尿素(≤40mg/dL)、高浓度的蛋白(≤10mg/mL)、高浓度的胆红素(≤15mg/dL)、高浓度的肌酸酐(≤5mg/dL)、高浓度的葡萄糖(≤120mg/dL)、高浓度的环孢素(≤1237.5mg/L)、高浓度的硫唑嘌呤(≤562.5mg/L)和高浓度的醋酸泼尼松片(≤90mg/L)对 PCR 结果无明显干扰。
3. 精密度: 同一批试剂对高低浓度的 2 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%。
4. 线性检测范围: 2×10³ copies/mL~5×10⁸ copies/mL。
5. 临床试验: 根据临床样本检测结果试验数据的统计分析可知, 考核试剂的检测结果准确可靠, 与对照试剂相比较有很好的一致性和相关性。

【注意事项】

1. 本产品仅用于体外诊断。
2. 本试剂盒中的阴性质控品为生理盐水, 临界阳性质控品、阳性质控品和定量标准品均为灭活的样本, 均无传染性, 但操作时应仍视为传染性物质进行处理。
3. 开始检测前请仔细阅读本说明书, 操作人员应经过专业培训, 具有合格的操作技能, 并严格按照说明书要求进行操作。
4. 样本操作和处理、实验后的废弃物, 如吸头、扩增产物的处理需符合相关法规要求: 卫生部《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》等。
5. 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。实验过程应分区进行(试剂准备区、样本制备区、扩增和产物分析区), 各区的仪器、耗材、试剂等独立专用, 不得交叉使用, 各区间人员流动及空气流动应有严格要求, 最大限度避免交叉污染。
6. 为了保护操作者和避免环境污染, 样本处理应在生物安全柜内进行操作。
7. 实验用的消耗品(如离心管、吸头等)应保证无核酸酶及其他污染。
8. PCR 仪应定期校准及维护, 以保证实验结果的可靠性。

【参考文献】

- [1] Comar M, Zanotta N, Bovenzi M, Campello C. JCV/BKV and SV40 viral load in lymphoid tissues of young immunocompetent children from an area of north-east Italy. J Med Virol. 2010 Jul; 82 (7) :1236-40.
- [2] Serena Delbue;Mariano Ferraresso;Luciana Ghio;Camilla Carloni;Silvia Carluccio;Mirco Belingheri;Alberto Edefonti;Pasquale Ferrante. A Review on JC Virus Infection in Kidney Transplant Recipients. Clinical and Developmental Immunology. 2013;2013:1-7.
- [3] Michelle Pinto;Simon Dobson. BK and JC virus: A review. Journal of Infection. 2014; 68 (1) : S2-8.

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 北京旌准医疗科技有限公司
住 所: 北京市北京经济技术开发区经海四路 156 号院 14 号楼 4 层
联系方式:
电话号码: 010-56380023
传真号码: 010-56380029
售后服务单位名称: 北京旌准医疗科技有限公司
联系方式:
电话号码: 010-56380023
传真号码: 010-56380029
生产地址: 北京市北京经济技术开发区经海四路 156 号院 14 号楼 4 层、11 号楼 4 层
生产许可证编号: 京食药监械生产许 20200028 号
【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】
国械注准 20193400981
【说明书核准日期及修改日期】
2019 年 12 月 09 日