

人类白细胞抗原 B27 核酸检测试剂盒（PCR 荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名称：人类白细胞抗原 B27 核酸检测试剂盒（PCR 荧光探针法）

【包装规格】

32 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人全血样本中 HLA-B*27 基因的 B*27:04 和 B*27:05 两种亚型，不能区分两种亚型的杂合型和纯合型。

HLA-B*27 基因是具有高度多态性的 HLA B 座位上的一个等位基因，1973 年，Eric Thorsby 和 Brewerton 等人证明该基因与强直性脊柱炎（AS）相关。此后，HLA-B*27 作为诊断强直性脊柱炎的特异性指标，在临床上得到了广泛的应用。国内学者报道的数据显示，亚洲的正常健康人群中 HLA-B*27 基因携带率为 5%~10%，AS 患者中 HLA-B*27 阳性率高达 90%~95%，因此，HLA-B*27 基因是强直性脊柱炎的易感基因之一。学者研究发现 AS 并不是与所有 HLA-B*27 亚型均存在相关性，而只是与其中某些亚型有高度相关性。B*27:02、B*27:04、B*27:05 亚型与 AS 的发生呈正相关，中国汉族人群中 B*27:04 和 B*27:05 为优势亚型。本试剂盒同时检测 HLA-B*27:04 和 B*27:05 亚型 DNA，但彼此不区分。

本试剂盒适用于临床医生对强直性脊柱炎（AS）疾病的辅助诊断，不能作为该疾病确诊或排除的唯一依据，仅作为辅助诊断供临床医生参考，不能以本试剂盒检测结果作为临床是否用药的唯一依据，临床医生应结合患者病情及其他实验室检测指标等因素综合判断是否对患者用药。

【检验原理】

本试剂盒采用实时荧光定量 PCR 的 Taqman 探针法，针对 HLA-B*27 基因和内参对照基因 ACTB（β-actin）分别设计特异性引物和探针，在一个反应管中进行双通道检测，其中 HLA-B*27 基因的探针报告基因为 FAM，ACTB 基因的探针报告基因为 HEX。在 PCR 过程中，引物及探针首先特异性结合到靶序列上时，然后在 PCR 延伸过程中，Taq 酶以其 5'端外切酶活性将结合在靶序列上的探针报告基团酶解下来，游离的 5'标记报告基团荧光信号可被检测到。通过每个 PCR 循环检测到的荧光信号强度，建立实时扩增曲线，从而确定 Ct 值。PCR 反应结束后，每一个样本会得到两个 Ct 值，HEX 通道的 ACTB Ct 值可以对管内抑制导致的结果进行质量控制，而 FAM 通道的 HLA-B*27 Ct 值，则可判定样本是否含有 HLA-B*27 基因核酸片段。该试剂盒添加了防污染成分 UDG 酶，UDG 酶可将反应体系中已有的 U-DNA 污染物中的尿嘧啶碱基降解，消除污染的 U-DNA 从而防止其后续扩增。

【主要组成成分】

本试剂盒由以下三个组分组成：

组分名称	主要组成成分	规格	数量	管盖颜色
B27 PCR 反应液	引物探针、dNTP、Taq 酶、UDG	610μL/管	1 管	绿色
B27 阳性对照	质粒	48μL/管	1 管	黄色
空白对照	超纯水	96μL/管	1 管	本色

注：不同批号试剂盒中的各组分不可以互换。

本试剂盒中不包含核酸提取或纯化试剂及相关耗材，本试剂盒适用的核酸提取或纯化试剂为：广州美基生物科技有限公司的核酸提取或纯化试剂，备案号：粤穗械备 20150062 号。

【储存条件及有效期】

1. 试剂盒应置于≤-15℃条件下避光保存，有效期为 12 个月。
2. 试剂盒开盖后可在 2~8℃避光保存不超过 2 周。
3. 试剂盒在使用时应尽量避免反复冻融，冻融次数不可超过 5 次。

【适用仪器】

ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪、宏石 SLAN-96P 全自动医用 PCR 分析系统。

【样本要求】

1. 本试剂盒适用样本类型为人全血。
2. 样本采集：应依据《全国临床检验操作规程（第四版）》相关要求采集，抗凝剂需采用 EDTA，切勿使用肝素抗凝。
3. 血液标本采集后，应尽量于当日进行 DNA 提取，如需保存，室温保存不应超过 48h，2~8℃保存不应超过一周，-20±5℃保存不应超过两年，-20±5℃条件下冻融不超过 4 次，-70℃及以下可保存 4 年。
4. 提取完的 DNA 浓度不应低于 2ng/μL。如提取后样本中 DNA 浓度高于 200ng/μL 时，可以将提取后 DNA 进一步稀释至 2~200ng/μL 范围后使用。建议提取的 DNA 样本尽快进行检测，如需保存，在 2~8℃保存不应超过一个月，-20±5℃保存不应超过两年，-20±5℃条件下冻融不超过 4 次。

【检验方法】

1. PCR 反应液准备（在试剂准备区进行）

- 1) 从试剂盒中取出 B27 PCR 反应液，室温避光放置，充分解冻后瞬时离心，涡旋混匀，再次瞬时离心使液体聚集管底；
- 2) 根据所需测定的反应数目，按 18μL/反应分装至 PCR 反应孔中；
- 3) 剩余试剂应立即放回冰箱避光保存。

2. 加样（在样品制备区进行）

- 1) 在分装好的 PCR 反应孔中分别加入 2μL 待测 DNA 样本、B27 阳性对照和空白对照，反应总体积 20μL；
- 2) 盖好 PCR 反应管盖，瞬时离心使所有液体集中到反应管底部，移至扩增区上机检测。

3. PCR 扩增（在扩增区进行）

将 PCR 反应管放入荧光定量 PCR 仪器中，使用 SLAN-96P 时，选择模块控温，B27 选取 FAM 通道，ACTB 选取 HEX 通道；使用 ABI7500 时，无需选择控温方式，探针模式设置为 B27 Reporter Dye: FAM, Quencher Dye: NFQ-MGB; ACTB Reporter Dye: VIC, Quencher Dye: None, Passive Reference: None。按下表设置反应条件进行 PCR 扩增：

步骤	温度	时间	循环数
1	37 °C	10min	1
2	95 °C	10min	1
3	95 °C	15sec	40
	56 °C	40sec（采集荧光）	

4. 结果获取

- 1) 扩增曲线特征的描述：扩增曲线一般呈 S 型；
- 2) 基线设定：对于 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪，将基线的 Start Cycle 设定为 5，将 End Cycle 设定为 15。对于宏石 SLAN-96P 全自动医用 PCR 分析系统，扩增曲线设为绝对荧光值法，将基线的 Start Cycle 设定为 5，将 End Cycle 设定为 15；
- 3) 阈值设定：以高于所有噪音线且略高于正常空白对照扩增曲线（无规则的噪音线）的最高点作为阈值，即空白对照“NoCt”或“Undetermined”为准；
- 4) 结果分析：设定好基线和阈值后，即可进行结果分析获取 Ct 值。选择 FAM 通道即为 B27 的检测结果，HEX/VIC 通道即为 ACTB 的检测结果。

5. 质量控制程序

- 1) 外部对照：试剂盒包含 B27 阳性对照和空白对照，应在每次实验中同时检测，用以判读实验有效性。其中空白对照用以监控是否存在污染，B27 阳性对照用以监控试剂、操作和程序的有效性，只有当结果满足下表条件时，才能进行样本结果的判读：

对照品	B27 结果	ACTB 结果
B27 阳性对照	Ct≤30.2	Ct≤29.2
空白对照	无 Ct 值	无 Ct 值

- 2) 内部对照：内部对照 ACTB 用以监控检测样品的质量，如果 ACTB Ct>31，则该样品的反应无效。

注：以上要求必须在同一次实验中同时满足，否则检测结果视为无效，应重新检测。

【阳性判断值】

按下表根据检测结果 Ct 值进行判断：

B27 结果	ACTB 结果	样本判断结果
$\Delta Ct \leq 5.5$	$Ct \leq 31$	B27 阳性
$\Delta Ct > 5.5$ 或无 ΔCt 值	$Ct \leq 31$	B27 阴性
任意结果	$Ct > 31$ 或无 Ct 值	无效

* $\Delta Ct = Ct(B27) - Ct(ACTB)$

【检验结果的解释】

- 当空白对照不满足要求时，说明试剂或环境可能存在污染，可能出现假阳性或假阴性结果，应清除污染后重复实验。
- 当 B27 阳性对照不满足要求时，说明可能试剂保存不当或配制不准确、程序设置错误或仪器异常，可能出现假阴性结果，应进一步分析原因后重复实验。
- 当空白对照和 B27 阳性对照满足要求时，先根据 ACTB Ct 值判断样本的检测有效性，然后使用样本 ΔCt 值判断样本类型：
 - ACTB $Ct \leq 31$ 、 $\Delta Ct \leq 5.5$ 时，判断该样本为 B27 阳性；
 - ACTB $Ct \leq 31$ 、 $\Delta Ct > 5.5$ 或无 ΔCt 值时，判断该样本为 B27 阴性；
 - ACTB $Ct > 31$ 或无 Ct 值时，说明可能样本浓度低或存在 PCR 抑制反应，B27 任意结果均判读该次检测无效，应重复检测；如果重复检测结果情况相同，应重复提取样本后再检测。

【检验方法的局限性】

- 本试剂盒检测结果仅用于疾病的辅助检测，不作为疾病诊断的唯一依据。
- 不合理的样本采集、运输和处理均有可能导致错误的检测结果。
- 不在本试剂盒检测范围内的强直性脊柱炎相关的 B27 罕见型别会导致假阴性，需用其他方法进一步确定。
- 本试剂盒的使用者应该是接受过 PCR 技术训练的试验者。

【产品性能指标】

- 准确性：检测 3 份国家阳性参考品（CNGB030122/HLA18002-08、CNGB030153/HLA18024-09、CNGB030150/HLA18021-10），结果为 B27 阳性。检测 10 份企业阳性参考品（P1~P10），结果为 B27 阳性。
- 特异性：检测 7 份国家阴性参考品（CNGB030299/HLA19061-01、CNGB030307/HLA19069-02、CNGB030295/HLA19057-03、CNGB030306/HLA19068-04、CNGB030290/HLA19052-05、CNGB030125/HLA18005-06、CNGB030315/HLA19077-07），结果为 B27 阴性。检测 10 份企业阴性参考品（N1~N10），结果为 B27 阴性。
- 最低检测限：本试剂盒的最低检测限为 2ng/μL。
- 精密度：检测 4 份企业精密度参考品（J1~J4），分别重复 10 次，结果均为阳性，且 Ct 值的变异系数（CV）均不高于 5.0%。
- 干扰实验：本试剂盒在血液中添加以下浓度的干扰物质，对检验结果无影响：血红蛋白 $\leq 20\text{g/dL}$ 、胆红素 $\leq 5\text{mg/dL}$ 、白蛋白 $\leq 5\text{g/dL}$ 、甘油三酯 500mg/dL、乙醇 $\leq 5\%$ 、乙醛 $\leq 5\%$ 、美洛昔康 $\leq 1.5\mu\text{g/mL}$ 、双氯芬酸钠 $\leq 20\mu\text{g/mL}$ 、布洛芬 $\leq 40\mu\text{g/mL}$ 、泰丁美酮 $\leq 200\mu\text{g/mL}$ 、柳氮磺胺吡啶 $\leq 200\mu\text{g/mL}$ 、塞来昔布 $\leq 40\mu\text{g/mL}$ 、吡罗昔康 $\leq 4\mu\text{g/mL}$ 、吡罗美辛 $\leq 10\mu\text{g/mL}$ 、蔡普生 $\leq 100\mu\text{g/mL}$ 。
- 临床试验：本试剂盒在三家临床单位完成 1510 例样本的临床试验，与对比方法的阳性符合率为 99.78%[95%CI: 98.78%~99.96%]，阴性符合率为 100%[95%CI: 99.64%~100%]，总符合率为 99.93%[95%CI: 99.63%~99.99%]。

【注意事项】

- 本试剂盒仅供体外诊断使用。
- 实验前请仔细阅读本说明书，并严格按照说明书要求进行操作。
- 所有化学药品都具有潜在危险性，血液样本应视为潜在的感染源，操作时应注意防护，并且废弃物处理均需符合相关法规要求。
- 临床实验室应按照卫生部的《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》配备设备及操作人员。
- 实验过程严格分区，即试剂准备区、样品处理区、扩增区，各区实验服、手套和帽子等不能带入其它区域，各区仪器设备不能带入其它区域。
- B27 PCR 反应液中含对光敏感的荧光素标记探针，在试验过程中常规光条件下并不会影响试验结果，但应避免将之暴露于不

必要的强光下。

- 请使用滤芯吸头，实验中废弃的吸头应弃于含 10%次氯酸的废液缸中。
- 实验全过程必须带一次性手套。
- 实验完毕用 10%次氯酸或 75%酒精清理实验工作台及移液器等相关物品，并用紫外灯照射。
- 随意替换试剂盒中的任何试剂，都可能影响使用效果，不同批号试剂不能组合混用，请勿使用过期产品。

【标识的解释】

符号	
含义	体外诊断医疗器械

【参考文献】

- [1] Carter KW, Pluzhnikov A, Timms AE, et al. Combined analysis of three whole genome linkage scans for Ankylosing Spondylitis[J]. Rheumatology, 2007, 46(5) : 763-771.
- [2] Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, et al. Ankylosing spondylitis and HLA - B27[J]. Lancet, 1973, 1(7809) : 904-907.
- [3] 何华庆, 肖莉, 韩玲, et al. 江西地区强直性脊柱炎患者 HLA-B27 基因 PCR-SBT 分型研究[J]. 实验与检验医学, 2017(05):35-37.
- [4] 刘巧灵, 范春梅. 强直性脊柱炎患者 HLA-B27 基因亚型分析[J]. 福建医药杂志, 2018(4):26-29.
- [5] Li, Haibo, Li, Qiuxia, Ji, Chen, 等. Ankylosing Spondylitis Patients with HLA-B*2704 have More Uveitis than Patients with HLA-B*2705 in a North Chinese Population[J]. Ocular Immunology & Inflammation, 2016:1-5.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：广东辉锦创兴生物医学科技有限公司

住所：佛山市顺德区龙江镇东涌社区居民委员会人民西路 68 号新基国际创意园 C 座 201

联系方式：0757-29266029

售后服务单位名称：广东辉锦创兴生物医学科技有限公司

联系方式：0757-29266029

生产地址：佛山市顺德区龙江镇东涌社区居民委员会人民西路 68 号新基国际创意园 C 座 201、A 座 202

生产许可证编号：粤药监械生产许 20245525 号

【医疗器械注册编号/产品技术要求编号】

国械注准 20243401657

【说明书批准日期/生效日期及修改日期】

2024 年 09 月 02 日