



乙型肝炎病毒 丙型肝炎病毒 人类免疫缺陷病毒（1 型） 核酸检测试剂盒（PCR-荧光法）

DA0160~DA0163

【产品名称】

通用名：乙型肝炎病毒 丙型肝炎病毒 人类免疫缺陷病毒（1 型）核酸检测试剂盒（PCR-荧光法）

汉语拼音：Yixingganyan Bingdu Bingxingganyan Bingdu
Renleimianyiquexian Bingdu(1 Xing) Hesuan Jiance Shijihe
(PCR-Yingguangfa)

英文名：Nucleic Acid Test Kit for HBV HCV HIV(Real-time PCR)

【包装规格】

混样检测 48 个测试-拆分检测 48 个测试/盒。

混样检测 96 个测试-拆分检测 12 个测试/盒。

混样/拆分 24 个测试/盒。

预封装 24 个测试/盒。

【预期用途】

本试剂盒采用荧光 PCR/RT-PCR 扩增检测技术，用于混合和单一血清和血浆样本中的乙型肝炎病毒（HBV）、丙型肝炎病毒（HCV）及人类免疫缺陷病毒 1 型（HIV-1）核酸的定性检测。

【临床意义】

HBV、HCV、HIV-1 是威胁输血安全的主要传染性病原体，血清学分析灵敏度的提高使 HBV、HCV、HIV-1 经输血传播的危险性大为减少，但并不能完全杜绝。“窗口期”漏检是当前影响血液安全性进一步提高的瓶颈，对于献血者的筛选，单纯抗原或抗体血清学检测不能有效地保障血液安全。研究证实，基于核酸的检测技术比基于抗体的检测技术能更早的检测到病毒核酸，核酸检测敏感性高，可检出标本中极微量的核酸，在病毒感染后数天即能检出，可大大缩短“窗口期”。研究表明，混合血样核酸检测可将 HBV、HCV 和 HIV-1 感染的平均“窗口期”缩短 9 天（缩短“窗口期”20%）、59 天（82%）和 11 天（50%）；此外核酸检测还可以检出因病毒变异，免疫静默感染以及人工操作错误而漏检的被感染献血。核酸检测可以有效地预防经输血传播病毒性疾病，使输血传播疾病的危险性降到最低。

【检验原理】

本产品分别选取 HBV、HCV 和 HIV-1 基因组中一个相对保守的区域，设计特异性引物及探针。检测时，同时进行待检测样本的核酸提取纯化，之后采用三个反应管分别进行 HBV、HCV、HIV 病毒扩增检测，对 HBV 病毒采用实时荧光 PCR 法检测，对 HCV 病毒、HIV 病毒采用一步法实时荧光 RT-PCR 法检测。

本试剂盒可最多采用 12 份样本的混合，如果混合样本的检测结果显示反应性，则将混合样本拆分为单一样本进行检测。建议血站采用 8 个样本进行混合。

本产品包括混样检测用核酸提取试剂和拆分检测用核酸提取试剂。混合样本检测时，采用混样检测用核酸提取试剂进行核酸的提取，如需拆分检测，则采用拆分检测用核酸提取试剂进行核酸的提取。

【主要组成成份】

混样检测 48 个测试-拆分检测 48 个测试/盒：

组成成份			配给量
室温保存核酸提取试剂	混样检测用核酸提取试剂 48 测试	P-裂解液 1（避光保存）	125ml/瓶
		P-结合液 2	400ml/瓶
		P-洗涤液 3	160ml/瓶
		P-洗涤液 4	160ml/瓶
		P-洗脱液 5	5ml/瓶
		P-磁珠	2.5ml/瓶
		P-蛋白酶 K（溶于 1.1ml 无菌纯水）	48 测试/瓶
		P-Poly（A）RNA（溶于 400μl P-Poly（A）RNA 缓冲液）	48 测试/管
		P-Poly（A）RNA 缓冲液	0.5ml/管
	拆分检测用核酸提取试剂 48 测试	S-裂解液 1（避光保存）	65ml/瓶
		S-结合液 2	210ml/瓶
		S-洗涤液 3	160ml/瓶
		S-洗涤液 4	160ml/瓶
		S-洗脱液 5	5ml/瓶
		S-磁珠	2.5ml/瓶

		S-蛋白酶 K（溶于 0.55ml 无菌纯水） 48 测试/管		1 管
		S-Poly（A）RNA（溶于 400μl S-Poly（A）RNA 缓冲液） 48 测试/管		1 管
		S-Poly（A）RNA 缓冲液 0.5ml/管		1 管
	核酸提取 用耗材	枪头		96 个
		4ml 管		96 个
-20± 5℃保 存核酸 扩增试 剂和质 控品	核酸扩增 试剂	HCV	HCV 反应液（白色管） 1296μl/管	2 管
			RT-Taq 酶系 144μl/管	4 管
		HIV-1	HIV-1 反应液（黄色管） 1296μl/管	2 管
		HBV	HBV 反应液（绿色管） 1296μl/管	2 管
			Taq 酶系 144μl/管	2 管
	质控品	阴性质控品（正常人血浆） 2.4ml/管		2 管
		阳性质控品（含有灭活 HBV、HCV、HIV-1 病毒颗粒的血浆） 2.4ml/管		2 管
		内标（含有 HBV、HCV、HIV-1 重组假病毒） 2ml/管		1 管

混样检测 96 个测试-拆分检测 12 个测试/盒：

组成成份			配给量
室温保 存核酸 提取 试剂	混样检测 用核酸提 取试剂 96 测试	P-裂解液 1（避光保存） 250ml/瓶	1 瓶
		P-结合液 2 790ml/瓶	1 瓶
		P-洗涤液 3 320ml/瓶	1 瓶
		P-洗涤液 4 320ml/瓶	1 瓶
		P-洗脱液 5 10.6ml/瓶	1 瓶
		P-磁珠 5.0ml/瓶	1 瓶
		P-蛋白酶 K（溶于 1.1ml 无菌纯水） 48 测试/瓶	2 瓶
		P-Poly（A）RNA（溶于 400 μl P-Poly（A）RNA 缓冲液） 48 测试/管	2 管
		P-Poly（A）RNA 缓冲液 0.5ml/管	2 管

HBV, HCV, HIV-1, 第三版/0

	拆分检测用核酸提取试剂 12 测试	S-裂解液 1（避光保存） 16ml/瓶		1 瓶
		S-结合液 2 50ml/瓶		1 瓶
		S-洗涤液 3 40ml/瓶		1 瓶
		S-洗涤液 4 40ml/瓶		1 瓶
		S-洗脱液 5 1.3ml/管		1 管
		S-磁珠 0.65ml/管		1 管
		S-蛋白酶 K（溶于 0.15ml 无菌纯水） 12 测试/瓶		1 瓶
		S-Poly（A）RNA（溶于 400 μ l S-Poly（A）RNA 缓冲液） 12 测试/管		1 管
		S-Poly（A）RNA 缓冲液 0.5ml/管		1 管
	核酸提取用耗材	枪头		108 个
		4ml 管		108 个
-20$\pm$5°C 保存核酸扩增试剂和质控品	核酸扩增试剂	HCV	HCV 反应液（白色管） 1458 μ l/管	2 管
			RT-TaQ 酶系 162 μ l/管	4 管
		HIV-1	HIV-1 反应液（黄色管） 1458 μ l/管	2 管
		HBV	HBV 反应液（绿色管） 1458 μ l/管	2 管
			Taq 酶系 162 μ l/管	2 管
	质控品	阴性质控品（正常人血浆） 2.4ml/管		2 管
		阳性质控品（含有灭活 HBV、HCV、HIV-1 病毒颗粒的血浆） 2.4ml/管		2 管
		内标（含有 HBV、HCV、HIV-1 重组假病毒） 2ml/管		1 管

混样/拆分 24 个测试/盒：

组成成份			配给量
室温保存核酸提取试剂	核酸提取试剂 24 测试	裂解液 1（避光保存） 63ml/瓶	1 瓶
		结合液 2 100ml/瓶	2 瓶
		洗涤液 3 80ml/瓶	1 瓶
		洗涤液 4 80ml/瓶	1 瓶

		洗脱液 5 1ml/管		4 管
		磁珠 350 μ l/管		4 管
		蛋白酶 K (溶于 0.8ml 无菌纯水) 24 测试/管		1 管
		Poly (A) RNA (溶于 400 μ l Poly (A) RNA 缓冲液) 24 测试/管		1 管
		Poly (A) RNA 缓冲液 0.5ml/管		1 管
-20 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C保 存核酸 扩增试 剂和质 控品	核酸扩增 试剂	HCV	HCV 反应液 (白色管) 648 μ l/管	1 管
			RT-Taq 酶系 72 μ l/管	2 管
		HIV-1	HIV-1 反应液 (黄色管) 648 μ l/管	1 管
		HBV	HBV 反应液 (绿色管) 648 μ l/管	1 管
			Taq 酶系 72 μ l/管	1 管
	质控品	阴性质控品 (正常人血浆) 2.4ml/管		2 管
		阳性质控品 (含有灭活 HBV、HCV、HIV-1 病毒颗粒的血浆) 2.4ml/管		2 管
		内标 (含有 HBV、HCV、HIV-1 重组假 病毒) 1ml/管		1 管

预封装 24 个测试/盒:

组成成份			配给量
室温保 存核酸 提取试 剂 (预 封装 24 个测试	核酸提取 试剂	预封装四联板 (含裂解液 1、结合液 2、洗涤液 3、 洗涤液 4、洗脱液 5) 4 测试/板	5 板
		预封装单联板 (含裂解液 1、结合液 2、洗涤液 3、 洗涤液 4、洗脱液 5) 1 测试/板	4 板
		蛋白酶 K (溶于 1.4ml 无菌纯水) 24 测试/瓶	1 瓶
		磁珠 1.4ml/管	1 管

-20±5℃保存核酸扩增试剂和质控品		Poly (A) RNA (溶于 400μl Poly (A) RNA 缓冲液) 24 测试/管		1 管
		Poly (A) RNA 缓冲液 0.5ml/管		1 管
	核酸扩增试剂	HCV	HCV 反应液 (白色管) 648μl/管	1 管
			RT-Taq 酶系 72μl/管	2 管
		HIV-1	HIV-1 反应液 (黄色管) 648μl/管	1 管
		HBV	HBV 反应液 (绿色管) 648μl/管	1 管
			Taq 酶系 72μl/管	1 管
	质控品	阴性质控品 (正常人血浆) 2.4ml/管		2 管
		阳性质控品 (含有灭活 HBV、HCV、HIV-1 病毒颗粒的血浆) 2.4ml/管		2 管
		内标 (含有 HBV、HCV、HIV-1 重组假病毒) 1ml/管		1 管

备注: 混样/拆分 24 个测试/盒和预封装 24 个测试/盒包装规格均可用作混样检测, 也可用作拆分检测;
不同批号不同规格的试剂盒组分不可以互换使用。

以下试剂、耗材和仪器需自备

1. 1.5 ml, 2.0ml, 5.0ml 和 50ml 无菌离心管。
2. 0.2ml 八联 PCR 管及管盖
3. 50μl, 200 μl 以及 1000 μl 微量加样枪。
4. 100 μl, 200 μl 以及 1000 μl 带滤芯移液枪头。
5. 无粉一次性手套、口罩、帽子。
6. 0.2ml 八联管架, 1.5ml 和 5ml 离心管架。

【储存条件及有效期】

试剂盒保存温度: 核酸扩增试剂 质控品需-20℃±5℃保存并避免反复冻融, 其余可以室温保存。提取试剂盒中的蛋白酶 K 与 Poly (A) RNA 在溶解后 2 周内要 4℃保存, 长期需-20℃±5℃保存并避免反复冻融。

有效期: 12 个月

【适用仪器】

1. AFD9600 型核酸扩增实时荧光检测系统、ABI 7300 或 7500 Real-Time PCR System 或 AFD4800 型核酸扩增实时荧光检测系统或具有同等性能的实时荧光定量 PCR 系统。
2. Chemagic Magnetic Separation Module I 、DA3000 全自动核酸提取仪、DA3500 全自动核酸提取仪、DA3500S 全自动核酸提取仪或同类型并具有同等性能的核酸自动提取系统。
3. Chemagic Dispenser 或 PE 等全自动移液工作站。

【样本要求】

1. 样本的采集、保存、运输按卫生部有关文件要求进行。
2. 外观：血浆或血清为稻草黄色澄清液体，无乳糜、无纤维蛋白析出、无溶血、无异物。
3. 样本存放：枸橼酸钠或 EDTA 抗凝血，或非抗凝血，从采血时开始计算，在 2~8℃ 条件下可保存 5 天。若保存时间超过 5 天，需用 1500rpm 离心 15 分钟，分离血浆或血清，血浆或血清可在 -20℃ 条件下保存 1 个月以上。-70℃ 以下可长期保存，避免反复冻融。
4. 不要冰冻全血。

【检验方法】

一、混合样本检测

1. 样本混合与核酸提取

- 1.1 取出试剂盒中的内标、阴性质控品、阳性质控品于室温下解冻，解冻后置于冰上；
- (1) **混样检测 48 个测试或 96 个测试规格：**取出试剂盒中的 P-蛋白酶 K 和 P-Poly (A) RNA，按以下方法配制成使用液：在 P-蛋白酶 K 瓶中加入 1.1ml 无菌纯水，在 P-Poly (A) RNA 管中加入 400μl P-Poly (A) RNA 缓冲液，充分溶解混匀备用。
- (2) **混样/拆分 24 个测试/盒规格：**取出试剂盒中的蛋白酶 K 和 Poly (A) RNA，按以下方法配制成使用液：蛋白酶 K 瓶中加入 0.8ml 无菌纯水，在 Poly (A) RNA 管中加入 400μl Poly (A) RNA 缓冲液，充分溶解混匀备用。
- (3) **预封装 24 个测试/盒规格：**取出试剂盒中的蛋白酶 K 和 Poly (A) RNA，按以下方法配制成使用液：蛋白酶 K 瓶中加入 1.4ml 无菌纯水，在 Poly (A) RNA 管中加入 400μl Poly (A) RNA 缓冲液，充分溶解混匀备用。

1.2 待测样本进行编号登记，每 12 份待测样本作为一组，根据分组的数量准备无菌 5.0 ml 离心管，做好标记。

1.3 同一组中的 12 份待测样本，每份取 200 μ l，加入对应的无菌 5.0 ml 离心管（自备）中，构成初级混合样本，共计 2400 μ l。在每份初级混合样本中加入内标 20 μ l，混匀。

1.4 将准备好的混合样本进行自动提取，具体按照核酸自动提取仪说明书进行操作。

1.4.1 Chemagen MSM I 自动核酸提取仪设置

1.4.1.1 打开 Chemagen MSM I 自动核酸提取仪。

1.4.1.2 打开电脑点击 Chemagen Modul ev20.exe 文件，点击 OK 进入操作界面，选择提取 12 个样本的 needles，之后选择要做的样本的个数，选好后点击 OK。

1.4.1.3 根据提示和试剂盒说明书将一定量的 P-结合液 2，P-洗涤液 3 和 P-洗涤液 4 装到自动分液器相应的位置，并放出少量液体确保加液渠道畅通（液体流出时间不要过长，否则会浪费试剂）。

半自动分液器上缓冲液放置的位置和不同样本量对应的缓冲液的用量

缓冲液	位置	4 个样本	8 个样本	12 个样本
P-结合液 2	2	100ml	200ml	300ml
P-洗涤液 3	3	100ml	100ml	100ml
P-洗涤液 4	4	100ml	100ml	100ml

1.4.1.4 将装有一次性枪头的架子放到传送轨道的 1 号位置（从右往左）。

1.4.1.5 将装有 50ml 空管子的架子放到传送轨道的 4 号位置。

1.4.1.6 在 50ml 离心管中加入 50 μ l P-磁珠（先将磁珠轻柔混匀），然后将装有 P-磁珠的 50ml 离心管装到管架中并将管架放到传送轨道的 3 号位置。

1.4.1.7 将 4ml 管装入相应的管架，向管中加入 100 μ l P-洗脱液 5，然后将管架放到传送轨道的 5 号位置。

1.4.1.8 选择相应提取程序。

1.4.1.9 检查所有的管架和管子放置的位置是否正确。

1.4.1.10 裂解步骤：在 50ml 管中加入混合好的样本和内标，之后加入 2.4ml P-裂解液 1，随后加入 7 μ l P-Poly (A) RNA 和 20 μ l P-蛋白酶 K 的混合液。

1.4.1.11 将装有内标、样本、P-裂解液 1 与 P-Poly (A) RNA 和 20 μ l P-蛋白酶 K 的混合液的 50ml 管装入管架后放到传送轨道的 2 号位置。

1.4.1.12 所有试剂和样本都放好后关上传动轨道的保护盖，点击软件上的

Start 按钮，仪器进入提取程序。

1.4.1.13 运行结束后，洗脱好的样本可以进行扩增检测。

1.4.1.14 阴性质控品、阳性质控品各一管与样品同时处理，处理过程同样本处理过程。

1.4.2 DA3000 全自动核酸提取仪设置

1.4.2.1 打开 DA3000 全自动核酸提取仪电源开关，然后打开仪器的照明开关。

1.4.2.2 打开连接仪器的电脑，点击 DA3000 软件图标，进入 DA3000 全自动核酸提取软件操作界面。

1.4.2.3 进入软件界面后，点击“新建实验”图标，选择实验程序，输入实验编号，然后选择样品及质控品数量。点击下一步。

1.4.2.4 软件界面提示试剂及相应耗材的放置位置。

1.4.2.5 打开仪器舱门，严格按软件提示放置相应的实验物品。（注意：样本须无杂物、凝血、气泡、悬挂液滴。不合格样本会导致检测结果出错。装载试剂时避免气泡、沉淀物的产生。装载枪头时，须将枪头盒顺着枪头卡槽推进槽内，确保枪头盒放置到位。）

1.4.2.6 检查耗材及试剂放置的位置是否正确。

1.4.2.7 关闭仪器舱门。点击软件上的“开始”按钮，仪器启动实验程序。

1.4.2.8 运行结束后，洗脱好的样本可以进行扩增检测。

1.4.2.9 阴性质控品、阳性质控品各一管与样品同时处理，处理过程同样本处理过程。

1.4.3 DA3500S 全自动核酸提取仪设置

1.4.3.1 打开 DA3500S 全自动核酸提取仪电源开关。

1.4.3.2 打开连接仪器的电脑，点击 DA3500S 软件图标进入主界面，在主界面上选择实验模式“混检”，进入 DA3500S 全自动核酸提取软件操作界面。

1.4.3.3 进入软件界面后，点击“新建实验”图标，选择实验程序，输入实验编号，然后选择样品及质控品数量。点击下一步。

1.4.3.4 软件界面提示试剂及相应耗材的放置位置。

1.4.3.5 打开仪器舱门，严格按软件提示放置相应的实验物品。（注意：样本须无杂物、凝血、气泡、悬挂液滴。不合格样本会导致检测结果出错。装载试剂时避免气泡、沉淀物的产生。装载枪头时，须将枪头盒顺着枪头卡槽推进槽内，确保枪头盒放置到位。）

1.4.3.6 检查耗材及试剂放置的位置是否正确。

1.4.3.7 关闭仪器舱门。点击软件上的“开始”按钮，仪器启动实验程序。

1.4.3.8 运行结束后，洗脱好的样本可以进行扩增检测。

1.4.3.9 阴性质控品、阳性质控品各一管与样品同时处理，处理过程同样本处理过程。

注：上述提取的病毒核酸最好于 24 小时内用于 PCR/RT-PCR 扩增，如不马上进行扩增检测，应存放于-20℃并尽快使用。

2. 样本扩增检测

2.1 扩增体系的配制

将反应液取出完全融解并混匀后同酶系一起置于冰上，在配制扩增体系之前要经过短时离心将管壁上的液体全部离心至管底。以下为单测试扩增体系配制方法。

单测试	反应液 (μl)	RT-Taq/Taq 酶系 (μl)	扩增体系分装体积 (μl)
HBV	27 μl	Taq 酶系 3 μl	30 μl
HIV	27 μl	RT- Taq 酶系 3 μl	30 μl
HCV	27 μl	RT- Taq 酶系 3 μl	30 μl

以下为多测试扩增体系配制方法（12 测试为例）。

多测试	反应液 (μl)	RT-Taq/Taq 酶系 (μl)	扩增体系分装体积 (μl)
HBV	27 μl × 12	Taq 酶系 3 μl × 12	30 μl
HIV	27 μl × 12	RT- Taq 酶系 3 μl × 12	30 μl
HCV	27 μl × 12	RT- Taq 酶系 3 μl × 12	30 μl

反应液同酶系要进行充分混合，混合好后进行短时离心将管壁上的液体全部离心至管底，之后再按表中注明的分装体积分装到 0.2ml 的 8 联 PCR 管中。管上不能做标记，小心摆放不要将 3 种扩增体系搞混。

注：反应液要尽量避免反复冻融，如一次检测不能将 48 测试反应液用完，剩余的反应液和酶系要保存于-20℃并在下次试验时全部使用完。

2.2 加样：把提取好的核酸分别加入 HBV、HCV、HIV 反应管中，加样量如下：

HBV：取 20 μl 核酸纯化步骤中获得的洗脱液加入到 HBV 反应管。

HCV：取 20 μl 核酸纯化步骤中获得的洗脱液加入到 HCV 反应管。

HIV：取 20 μl 核酸纯化步骤中获得的洗脱液加入到 HIV 反应管。

加样后的反应管盖好管盖后置于管架上，用离心平板的离心机 3,000rpm 离心数秒，即可放入扩增仪扩增。

2.3 扩增与检测

2.3.1 ABI 7500 Real-Time PCR System 操作说明

- 2.3.1.1 先开电脑，再开定量PCR 仪主机电源，最后启动SDS 软件。
- 2.3.1.2 新建文件:菜单File → New, Assay 选择Absolute Quantification (实时定量模式)，打开一个空白文件。
- 2.3.1.3 探针设置: 双击任意一个孔打开Well Inspector 窗口。点击Add Detector 按钮，打开Detector Manager 窗口。点击File→ New, 新建探针。探针名称建议使用“基因_荧光”格式，如HIV_FAM、HCV_VIC 等。设置报告基团(FAM 和VIC)和淬灭基团TAMRA。完成后点OK。在Detector Manager 窗口选择相关探针，点击Add to Plate Document 按钮。点击Done关闭Detector Manager。
- 2.3.1.4 填样品表: 在96 孔表中选定样品孔，在Well Inspector 页面的Sample Name 栏中填入样品名称；在探针列表的Use 选项下的方框中打勾选择探针；在Task 栏中选定样品类型: 阴性质控品选NTC；未知样品选Unknown。参比荧光(Passive Reference)选none。关闭Well Inspector 窗口。
- 2.3.1.5 循环参数: 切换到 Instrument 页面，PCR 的反应体积默认为 50 μ L。扩增参数如下:
 - 50℃ 15 分钟，1 个循环；
 - 95℃ 15 分钟，1 个循环；
 - 94℃ 15 秒→55℃ 45 秒（此步采集荧光信号，标记为黄色块状区域），45 个循环；
 - 25℃ 1 分钟，1 个循环
- 2.3.1.6 启动扩增: 点击Save 按钮保存文件。确认96 孔板在主机内放置妥当后，点击Start 按钮开始PCR循环。
- 2.3.1.7 监控进程 切换到Results页面的Amp Plot子页面，可以实时显示PCR曲线随着循环增加而逐步增长的实际情况。如果Detector选FAM 或VIC，只显示对应探针的变化情况；如果选All，则同时显示所有探针的反应进程。
- 2.3.1.8 保存结果: 程序结束后，点Disconnect 按钮，然后File → Save 保存试验结果。
- 2.3.1.9 关机顺序: 确认试验已经结束后，首先关闭信号收集软件，然后关掉定量PCR仪主机的电源，最后关闭电脑。

2.3.2 AFD9600 型核酸扩增实时荧光检测系统操作说明

- 2.3.2.1 先开电脑，再开定量PCR 仪主机电源，最后启动AFD9600软件。
- 2.3.2.2 新建文件:菜单File (文件) → New (新建)，在Experiment

Settings (实验设置) 编辑Name (实验名)、Location (文件路径), 点击Finish (完成) 打开一个空白文件。

2.3.2.3 程序参数: 切换到Protocol (程序参数) 页面。扩增参数如下:

50°C 15 分钟, 1 个循环;

95°C 15 分钟, 1 个循环;

94°C 15 秒→55°C 45 秒 (此步采集荧光信号, 标记为蓝线), 45 个循环;

25°C 1 分钟, 1 个循环

2.3.2.4 样本参数: 点击Plate (样本参数) 页面, 在96 孔表中选定样品孔, 点击右键进入Well Settings (设置), 在Reporters (标记物) 栏选择相关探针(FAM 和VIC), 点击Add (添加) 按钮。同时填样品表: 在Sample Name (样本名称) 栏中填入样品名称; 在Sample Type (样本类型) 栏中选定样品类型: 阴性质控品选Negative Control; 未知样品选Unknown Sample。点击Apply (应用) 关闭设置窗口。

2.3.2.5 启动扩增: 点击保存按钮保存文件。确认96 孔板在主机内放置妥当后, 点击开始按钮开始PCR循环。

2.3.2.6 监控进程: 切换到Amplification Plot页面, 可以实时显示PCR曲线随着循环增加而逐步增长的实际情况。如果标记物选FAM或VIC, 只显示对应探针的变化情况; 如果选All, 则同时显示所有探针的反应进程。

2.3.2.7 保存结果: 程序结束后, 自动保存到文件路径。

2.3.2.8 关机顺序: 确认试验已经结束后, 首先关闭信号收集软件, 然后关掉定量PCR仪主机的电源, 最后关闭电脑。

2.3.3 AFD4800 型核酸扩增实时荧光检测系统操作说明

2.3.3.1 先开电脑, 再开定量 PCR 仪主机电源, 最后启动 AFD4800 软件, 选择对应的层 (上、中、下)。

2.3.3.2 点击 新建, 在试验名称中编辑实验名、文件路径, 保存后点击确定打开一个空白文件。

2.3.3.3 程序参数: 在程序参数页面。扩增参数如下:

50°C 15 分钟, 1 个循环;

95°C 15 分钟, 1 个循环;

94°C 15 秒→55°C 45 秒 (此步采集荧光信号, 打勾读取荧光), 45 个循环;

25°C 1 分钟, 1 个循环。

2.3.3.4 样本参数: 点击样本参数页面, 在上门菜单快捷键中选择当前程

序染料设置（通道1 FAM，通道2 VIC，其余为空）下面48孔表中选定样品孔，右边染料类型图片边沟上FAM和VIC，并在下面按钮中选择对应的样本类型：阴性质控品、未知样品等。

2.3.3.5 启动扩增：确认48孔板在主机内放置妥当后，点击开始按钮开始PCR循环。

2.4.2.6 监控进程：切换程序运行页面，可以实时显示PCR曲线随着循环增加而逐步增长的实际情况。如果标记物选FAM或VIC，只显示对应探针的变化情况。

2.3.3.7 保存结果：程序结束后，自动保存到文件路径。

2.4 分析条件设定

2.4.1 ABI 7500 Real-Time PCR System 分析条件说明

2.4.1.1 数据分析 切换到Result 页面，进入扩增曲线（Amplification Plot）子页面，查看软件已经自动分析好的试验结果。

注意：此时的数据是软件根据默认值（基线起点为3，终点为15）得到的初步结果，还需要根据本次试验的具体情况，精细调节Baseline（基线）的起止点后，重新分析，以得到更精确的数据。

2.4.1.2 基线的起点和终点确定原则 Baseline（基线）是指PCR开始时信号很低、接近背景且比较平稳的那个阶段。起点要避开开始几个循环由于高温导致的信号增高，设在信号已经降到背景高度且能维持平稳的地方，一般在4到10个循环之间；终点要避免覆盖信号已经开始有明显增长的地方，一般在本组数据中最小的Ct值前再3个循环处。另外，起点与终点之间最好能间隔8个循环以上，以满足统计基线标准偏差的数学要求。调整好起止点以后，再点击Analyze按钮，软件即自动计算新的阈值和Ct值，并更新试验报告。注意：此时扩增曲线页面上显示的阈值数字并不更新，但是这并不影响后台数据运算的准确。

2.4.1.3 线形图谱 在默认的设置中，PCR扩增曲线图谱的纵坐标代表经过空白校正后的相对荧光信号强度，横坐标代表PCR循环次数（从1到45）；纵坐标以对数表示，横坐标以线形表示。如果要看完全线形的S形图谱，请双击纵坐标轴线，打开坐标设置窗口，将纵坐标改成线形形式。

2.4.1.4 原始数据 切换到Component 子页面，察看原始数据。正常的FAM和VIC信号强度扩增中间呈S形增长。

2.4.1.5 原始数据 切换到Spectra 子页面，也可以察看原始数据。Spectra与Component这两个页面的区别是：Component显示的是信号强度随

时间（即 PCR 循环次数）的变化，是纵向的；而 Spectra 显示的是每个 PCR 循环点上信号强度在不同波长上的分布，也就是在整组滤光片上的分布，是横向的。

- 2.4.1.6 试验报告 切换到 Report 子页面，察看试验报告。确认无误后，保存结果。也可以从 File 菜单中选择 Export，再选择数据类型，输出各种类型的数据，包括 Ct 值、相对信号强度、原始数据、融解曲线数据和试验结果等。输出的数据可以用 Excel 打开，并可在 Excel 中重新生成扩增曲线、标准曲线等图谱。

2.4.2 AFD9600 型核酸扩增实时荧光检测系统分析条件说明

- 2.4.2.1 数据分析 打开文件，自动进入扩增曲线子页面，查看软件已经自动分析好的试验结果。

注意：此时的数据是软件根据默认值（FAM 基线起点为 3，终点为 8；VIC、A11 基线起点为 3，终点为 12；阈值线 0.05）得到的初步结果，还需要根据本次试验的具体情况，精细调节阈值线、基线的起止点后，重新分析，以得到更精确的数据。

- 2.4.2.2 查看调整数据 调整好起止点以后，再点击保存按钮，关闭文件后重新打开就是已调整好的数据。

- 2.4.2.3 原始数据 在数据栏中选择原始荧光值，察看原始数据。正常的 FAM 和 VIC 信号强度扩增中间呈 S 形增长。

- 2.4.2.4 试验报告 切换到数据结果子页面，察看试验报告。确认无误后，保存结果。也可以从文件菜单中选择导出数据，包括 Ct 值、测试结果阴阳性等。输出的数据可以用 Excel 打开，并可在 Excel 中重新生成扩增曲线、标准曲线等图谱。

2.4.3 AFD4800 型核酸扩增实时荧光检测系统分析条件说明

- 2.4.3.1 数据分析 打开文件，自动进入扩增曲线子页面，查看软件已经自动分析好的试验结果。

注意：此时的数据是软件根据默认值（FAM 基线起点为 3，终点为 10；VIC、A11 基线起点为 3，终点为 10；阈值线自动）得到的初步结果，还需要根据本次试验的具体情况，精细调节阈值线、基线的起止点后，重新分析，以得到更精确的数据。

- 2.4.3.2 查看调整数据 调整好起止点以后，再点击保存按钮，关闭文件后重新打开就是已调整好的数据。

- 2.4.3.3 原始数据 在定量分析界面左上角菜单快捷键，下拉菜单选择 FAM 和 VIC 通道，去掉自动分析的勾选来察看原始数据。正常的 FAM 和 VIC 信号强度扩增中间呈 S 形增长。

2.4.3.4 试验报告 在定量分析界面，察看试验报告。确认无误后，保存结果。也可以从文件菜单中选择导出数据，包括 Ct 值、测试结果阴阳性等。输出的数据可以用 Excel 打开，并可在 Excel 中重新生成扩增曲线、标准曲线等图谱。

如初级混合样本为有反应性，需拆分进行拆分检测

方案 1 将 12 份单样本分成 4 组，每组 3 个样本

每组 3 个样本各取 800 μ l，组成次级混合样本 2400 μ l，检测与初级混合样本基本相同。

如次级混合样本为有反应性，则组成该次级混合样本的 3 份样本仍需进行拆分检测（见方案 2）。

方案 2 将 12 份样本直接进行拆分检测。

二、拆分检测

上一步初级混合样本检测结果为阳性后，将构成初级混合样本的每份单样本分别进行检测，以确认最终的阳性样本。拆分检测时，每份样本的用量为 1ml。

Chemagen MSM I 自动核酸提取仪操作如下：

1. 取出试剂盒中的内标、阴性质控品、阳性质控品于室温下解冻，解冻后置于冰上；在 S-蛋白酶 K 瓶中加入 0.55ml 无菌纯水，在 S-Poly (A) RNA 管中加入 400 μ l S-Poly (A) RNA 缓冲液，充分溶解混匀备用。
2. 打开 Chemagen MSM I 自动核酸提取仪。
3. 打开电脑点击 Chemagen Modul ev20. exe 文件，点击 OK 进入操作界面，选择提取 12 个样本的 needles，之后选择要做的样本的个数，选好后点击 OK。
4. 根据提示和试剂盒说明书将一定量的 S-结合液 2、S-洗涤液 3 和 S-洗涤液 4 装到自动分液器相应的位置，并放出少量液体确保加液管道畅通。半自动分液器上缓冲液放置的位置和不同样本量对应的缓冲液的用量：

缓冲液	位置	4 个样本	8 个样本	12 个样本
S-结合液 2	2	100ml	100ml	150ml
S-洗涤液 3	3	100ml	100ml	100ml
S-洗涤液 4	4	100ml	100ml	100ml

5. 将装有一次性枪头的架子放到传送轨道的 1 号位置（从右往左）。
6. 将装有 50ml 空管子的架子放到传送轨道的 4 号位置。
7. 在 50ml 离心管中加入 50 μ l S-磁珠（先将磁珠轻柔混匀），然后将装有 S-磁珠的 50ml 离心管装到管架中并将管架放到传送轨道的 3 号位置。

8. 将 4ml 管装入相应的管架，向管中加入 100 μ l S-洗脱液 5，然后将管架放到传送轨道的 5 号位置。
9. 选择相应的提取程序（装机时会给出具体的程序名称）。
10. 检查所有的管架和管子放置的位置是否正确。
11. 裂解步骤：在 50ml 管中加入 1ml 样本、20 μ l 内标，之后加入 1.2ml S-裂解液 1，随后加入 7 μ l S-Poly (A) RNA 和 10 μ l S-蛋白酶 K 的混合液。
12. 将装有样本、内标、S-裂解液 1 与 S-Poly (A) RNA 和 10 μ l S-蛋白酶 K 的混合液的 50ml 管装入管架后放到传送轨道的 2 号位置。
13. 所有试剂和样本都放好后关上传动轨道的保护盖，点击软件上的 Start 按钮，仪器进入提取程序。
14. 运行结束后，洗脱好的样本可以进行扩增检测。
15. 阴性质控品、阳性质控品各一管与样品同时处理，处理过程同样本处理过程。

DA3000 全自动核酸提取仪操作如下：

1. 按照 1.4.2.1 和 1.4.2.2 操作开机及打开软件。
2. 进入软件界面后，在“新建实验”界面，输入实验 ID，选择实验类型：单检，加载单检实验程序，然后选择样品及质控品数量。点击下一步。
3. 后续操作按照 1.4.2.4 及其以下的步骤进行。

DA3500 全自动核酸提取仪操作如下：

1. 取出试剂盒中的内标、阴性质控品、阳性质控品于室温下解冻，解冻后置于冰上；在蛋白酶 K 瓶中加入 1.4ml 无菌纯水，在 Poly (A) RNA 管中加入 400 μ l Poly (A) RNA 缓冲液，充分溶解混匀备用。
2. 打开 DA3500 全自动核酸提取仪电源开关。
3. 打开连接仪器的电脑，点击 DA3500 软件图标，进入 DA3500 全自动核酸提取软件操作界面。
4. 进入软件界面后，点击“新建实验”图标，选择实验程序，输入实验编号，然后选择样品及质控品数量。点击下一步。
5. 软件界面提示预封装试剂及相应耗材的放置位置。
6. 打开仪器舱门，严格按软件提示放置相应的实验物品。（注意：样本须无杂物、凝血、气泡、悬挂液滴。不合格样本会导致检测结果出错。装载试剂时避免气泡、沉淀物的产生。装载枪头时，须将枪头盒顺着枪头卡槽推进槽内，确保枪头盒放置到位。）
7. 检查耗材及试剂放置的位置是否正确。

8. 关闭仪器舱门。点击软件上的“开始”按钮，仪器启动实验程序。
9. 运行结束后，洗脱好的样本可以进行扩增检测。
10. 阴性质控品、阳性质控品各一管与样品同时处理，处理过程同样本处理过程。

DA3500S 全自动核酸提取仪操作如下：

1. 取出试剂盒中的蛋白酶 K 和 Poly (A) RNA，按以下方法配制成使用液：
蛋白酶 K 瓶中加入 1.4ml 无菌纯水，在 Poly(A)RNA 管中加入 400μl Poly (A) RNA 缓冲液，充分溶解混匀备用。
2. 按照 1.4.3.1 操作开机。
3. 按照 1.4.3.2 步骤中进入主界面上选择实验模式时选择“单检”进入 DA3500S 全自动核酸提取软件操作界面。
4. 后续操作按照 1.4.3.3 及其以下的步骤进行。

注：上述提取的病毒核酸最好于 24 小时内用于 PCR/RT-PCR 扩增，如不马上进行扩增检测，应存放于-20℃并尽快使用。

三、质量控制

1. 通过阴性质控品和阳性质控品控制试剂盒的质量和检测的有效性。
2. 阴性质控品的检测结果应为 HBV、HCV、HIV 阴性。
3. 阳性质控品的检测结果应为 HBV、HCV、HIV 阳性。
4. 以上第 2、3 点均满足，才可认为此次试验结果有效。
5. 内标用于控制质控品反应管的检测结果有效性。反应管内的内标扩增曲线呈 S 形曲线且 Ct 值应大于 25 并小于 45，才可认为该反应管的检测结果有效。

四、判断标准

1. 阳性判断标准：对于 HBV、HCV 或 HIV 反应管，FAM 检测通路荧光信号增长，有明显 S 型扩增曲线且 Ct 值小于 40，则结果判为有反应性。如果检测的是混合样本，则需拆分进行拆分检测，以确认最终的有反应性的样本。拆分检测为有反应性的样本，应按照国家卫生部的有关要求处理。
2. 阴性判断标准：对于 HBV、HCV 或 HIV 反应管，FAM 检测通路荧光信号无增长，无明显 S 型扩增曲线，则结果判为阴性。如果检测的是混合样本，则判定该组混合样本为阴性。
3. 灰度区复检结果判断：FAM 检测通路扩增曲线呈 S 型曲线且 Ct 值大于 40

的区域设为灰度区，必须进行复检。复检结果判断同“阳性判断标准”和“阴性判断标准”；如检测结果仍处于灰度区，判定为有反应性，混合样本可以进行拆分检测，以确定有反应性的样本。

【检验方法的局限性】

核酸检测从理论上并不能完全检测出“窗口期”感染。

【产品性能指标】

使用 1ml 的单样本检测，本试剂盒灵敏度 HBV 不高于 100IU/ml，HCV 不高于 100IU/ml，HIV 不高于 100IU/ml；使用混合样本检测，本试剂盒灵敏度 HBV 不高于 500IU/ml，HCV 不高于 500IU/ml，HIV 不高于 500IU/ml。

【说明】

如没有配备核酸自动提取系统，可以使用手动试剂进行核酸提取。建议采用达安公司生产的病毒核酸提取试剂盒或具有同等性能的产品（如 Roche High Pure Viral Nucleic Acid Kit 11858874001）。下面以达安生产的核酸提取试剂为例详述核酸提取步骤。

初级混合样本核酸提取

- 1) 首先将样本浓缩液、裂解液、洗液 A、洗液 B，洗脱液解冻并以手摇匀，溶解可能出现的沉淀。试验结束后，剩余浓缩液、裂解液、洗液 A、洗液 B、洗脱液应于室温保存。
- 2) 取出内标、阴性质控品、阳性质控品于室温下解冻，然后置于冰上。将待测血浆样本进行登记编号，每 12 份待测样本作为一组，根据分组的数量准备无菌 5.0 ml 离心管，做好标记，登记在案。
- 3) 同组中的 12 份待测血浆样本，每份取 200 μ l，加入对应的无菌 5.0 ml 离心管中，构成初级混合样本，共计 2400 μ l。在每份初级混合样本中加入内标 20 μ l，混匀。
- 4) 每份准备好的混合样本加入 240 μ l 浓缩液，立即用手或漩涡振荡器混匀至看不到明显絮状沉淀颗粒。
- 5) 所有样本冰上放置 25 分钟。此时取出试剂盒中的消化液室温下解冻，解冻后置于冰上。
- 6) 冰浴后，室温 12000 rpm 离心 8 分钟。
- 7) 小心吸出上清 2430 μ l，每一样本加入 350 μ l 裂解液，用 1000 μ l 枪头反复吹打，直至将沉淀块打散并完全消失，在此过程中尽量不要产生泡沫。然后每一样本依次加入 54 μ l 消化液（使用前摇匀成混浊状），用枪头吹打混匀。剩余消化液应放回-20℃保存。
- 8) 样本 72℃温育 10 分钟。此时液体应澄清透明，接着以 8000 rpm 瞬时离

心消除泡沫。

9) 将过滤柱塞入滤液收集管,然后将每一管液体转移至对应的过滤柱中,在柱盖上编好号码,12000 rpm 离心 1 分钟。

10) 换滤液收集管,在过滤柱中加入 450 μ l 洗液 A,12000 rpm 离心 1 分钟。

11) 换新收集管,在过滤柱中加入 500 μ l 洗液 B,12000 rpm 离心 1 分钟。

注意离心后小心不要让过滤柱底部接触到收集管中的洗液。

12) 将收集管换成 1.5 ml 无菌离心管,14000 rpm 空离 2 分钟,将膜上残余的乙醇彻底甩干。

13) 换用新的 1.5 ml 无菌离心管,然后在柱中靠近膜中央处加入 50 μ l 洗脱液,静置 1 分钟后 12000 rpm 离心 1 分钟,收集的滤液即为提取的病毒核酸溶液,可用于后续的扩增过程。

如初级混合样本为有反应性,需拆分进行拆分检测

方案 1 将 12 份单样本分成 4 组,每组 3 个样本

每组 3 个样本各取 800 μ l,组成次级混合样本 2400 μ l,检测与初级混合样本基本相同。

如次级混合样本为有反应性,则组成该次级混合样本的 3 份样本仍需进行拆分检测(见方案 2)。

方案 2 将 12 份样本直接进行拆分检测(试剂准备同初级混合样本提取)

1) 每份待检单样本取 1000 μ l,加入 100 μ l 样本浓缩液,振荡混匀后冰浴 25 分钟,然后 12000rpm 离心 8 分钟。

2) 小心吸出上清 960 μ l,残液剩约 150 μ l。每一样品依次加入 350 μ l 裂解液,用 1000 μ l 枪头反复吹打均匀,尽量不要产生泡沫。然后加入 54 μ l 消化液(消化液使用前应摇匀成混浊状),并用枪头吹打混匀。

3) 样本 72 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟。后续过程同上述的混合样本核酸提取。

【注意事项】

1. 试验前请仔细阅读本说明书。
2. 在生物安全柜内进行试剂和标本准备,试验过程中穿工作服,戴口罩和带一次性手套,使用自卸管式移液器。
3. 所有标本都需被视为潜在污染源,应在生物安全柜内小心处理,如果不慎外溢,立刻消毒并用终浓度为 0.5% 的次氯酸钠溶液(稀释漂白水)清洗。
4. 肝素可抑制 PCR 反应。不推荐使用加入了肝素的样本。
5. 试剂使用前要完全解冻后稍事离心,但应避免反复冻融。
6. 吸取血浆时注意勿带入红细胞。

7. 混匀沉淀时如果没有特殊说明,用移液器吹打效果较佳。
8. 如果在标本处理中没有控制好交叉污染,可能出现假阳性。
9. 为使实验室工作区被扩增产物污染的可能性降到最低,实验室管理应严格按照 PCR 基因扩增实验室的管理规范,试验人员必须进行专业培训,实验室工作区必须被严格区分试剂准备区、标本制备区、扩增和产物分析区。工作人员和物品在各区只能单向流动,在工作区之间转移时必须使用适当的防污染措施。试剂准备区作为混合工作液预备区;标本制备区,作为标本和质控品预备区。扩增和产物分析区有 ABI 7300 或 7500 Real-Time PCR System 或性能相当的其它检测系统。
10. 各工作区域的仪器、移液器和试剂必须放在特定位置。
11. 所用消耗品应灭菌后一次性使用,试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;
12. 对每次试验进行质量控制。
13. 移液器必须定期校准,保证准确度 CV 值不超过 3%、精确度 CV< 5%。
14. 标本制备区所用过的吸头需打入盛有消毒剂的容器,并与废弃物一起灭菌后方可丢弃。试验完毕用 10%次氯酸或 75%酒精或紫外线灯处理工作台面和移液器;
15. 本试剂盒内的阳性质控品和检测样本均应视为具有传染性物质,因此标本操作和处理均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》。

【参考文献】

1. Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. 1996 The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *New England Journal of Medicine*, 334:1685-90.
2. Kleinman SH, Busch MP. General overview of transfusion transmitted infections. In: Petz LD, Swisher S, Kleinman SH, Spence R, Strauss RG, eds. 1995 *Clinical practice of transfusion medicine*, 3rd ed. New York: Churchill Livingstone 809-21.
3. Busch MP, Stramer SL, Kleinman SH. 1997 Evolving applications of nucleic acid amplification assays for prevention of virus transmission by blood components and derivatives. In: Garratty G, ed. *Applications of molecular biology*. Bethesda, American Association of Blood Banks 121-73. (Presented at a workshop during the 50th Annual Meeting of the AABB, October 1997, Denver, CO).

4. Esteban, J. I., A. Gonzalez, J. M. Hernandez, et al. 1990. Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a study of transfusion-associated hepatitis. *N Engl J Med.* 323:1107-11200.
5. Busch, M. P., S. L. Stramer, and S. H. Kleinman. 1997. Evolving applications of nucleic acid amplification assays for prevention of virus transmission by blood components and derivatives. In: Garrity G (ed): *Applications of Molecular Biology to Blood Transfusion Medicine*. AABB. Bethesda, MD. 123-176.
6. Stramer, S. L., S. Caglioti, and D. M. Strong. 2000. NAT of the United States and Canadian Blood Supply. *Transfusion.* 40:1165-1168.
7. McDonough, S., C. Giachetti, Y. Yang, D. Kolk, B. Billyard, and L. Mimms. 1998. High throughput assay for the simultaneous or separate detection of human immunodeficiency virus (HIV-1) and hepatitis C virus (HCV). *Infusion Therapy and Transfusion Medicine.* 25:164-169.
8. Nelson, N. C., A. BenCheikh, E. Matsuda, and M. Becker. 1996. Simultaneous detection of multiple nucleic acid targets in a homogeneous format. *Biochem.* 35:8429-8438.
9. Centers for Disease Control. 1987. Recommendations for prevention of HIV transmission in health care settings. In *United States Morbid. And Mortal. Weekly Rep.* 36, Supplement No. 2S.
10. Valinsky, J.E., C. Bianco. 2000. Supplemental testing for HCV: To what extent could nucleic acid amplification testing (NAT) replace HCV RIBA 3.0. *Transfusion.* 40, 10S, 32S.
11. Stramer, S.L. et al. Application of Nucleic Acid Testing to Blood Borne Pathogens and Emerging Technologies OBRR/CBER/FDA Workshop - December 4, 2001.
12. Linnen, J.M., J.M. Gilker, A. Menez, A. Vaughn, A. Broulik, J. Dockter, K. Gillote-Taylor, K. Greenbaum, D.P. Kolk, L. T. Mimms, C. Giachetti. 2002. Sensitive detection of genetic variants of HIV-1 and HCV with an HIV-1/HCV assay based on transcription-mediated amplification. *J. Virol. Methods.* 102, 135-139.
13. 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》。

【批准文号】

【生产企业】

企业名称：广州达安基因股份有限公司

注册及生产地址：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号

邮政编码：510665 电话：8008304008 020-32290789

传真：020-32068820 网址：www.daangene.com

【说明书批准及修改日期】