

乙型肝炎病毒基因分型检测试剂盒(PCR 荧光法)说明书

【产品名称】

通用名称：乙型肝炎病毒基因分型检测试剂盒(PCR 荧光法)

【包装规格】 32 人份/盒

【预期用途】

本产品用于对已经其他方法确诊的乙型肝炎病毒核酸阳性的人血清或血浆样本进行乙型肝炎病毒基因分型（包括 B 和 C 型）分析，为临床实验室对乙型肝炎病毒抗病毒药物治疗提供分子生物学上的参考依据。不建议用于对未知样品中乙肝病毒核酸阴性或阳性的定性检测。

适应症：由乙型肝炎病毒感染引起的肝炎等疾病。相关研究表明，乙型肝炎病毒基因有着多种类型，不同的基因型之间存在着致病性上的差异，慢性乙型肝炎病情严重程度和活动性与病毒复制水平呈正相关，C 型乙型肝炎病毒 DNA 水平明显高于 B 型，所以与 B 型比较，C 型患者易慢性化，病情严重，易发展为肝硬化和肝癌，且干扰素抗病毒应答率低，预后差。因此，乙型肝炎病毒基因分型检测可为临床实验室对乙型肝炎病毒抗病毒药物治疗提供分子生物学上的参考依据。

【检验原理】

本试剂盒选用乙型肝炎病毒保守基因片段设计特异引物及特异 Taqman-MGB 探针，该探针能与引物扩增区域中间的一段 DNA 模板发生特异性结合，在 PCR 延伸反应过程中，Taq 酶的外切酶活性将 5'端荧光基团从探针上切割下来，使之游离于反应体系中，从而脱离了 3'端荧光淬灭基团的屏蔽，即能接受光刺激而发出可供仪器检测的荧光，从而实现在全封闭反应体系中对患者样本中乙型肝炎病毒基因型 B、C 型进行分型检测。

【主要组成成分】

组成	组成成分	规格
核酸提取液	含 50mM 三羟甲基氨基甲烷 (Tris-HCl)(PH 8.0)、5%Chelex-100	1.8mL×1
乙型肝炎病毒 B 型反应混合液	含三羟甲基氨基甲烷（Tris-HCl）、氯化钾、氯化镁、脱氧核糖核苷三磷酸（dNTP）、引物、荧光探针	1.2mL×1
乙型肝炎病毒 C 型反应混合液	含三羟甲基氨基甲烷（Tris-HCl）、氯化钾、氯化镁、脱氧核糖核苷三磷酸（dNTP）、引物、荧光探针	1.2mL×1
Taq 酶	含 Taq DNA 酶及抗体	28μL×1
乙型肝炎病毒 B 型阳性对照品 (C 型阴性对照)	含灭活后的病毒血清	100μL×1
乙型肝炎病毒 C 型阳性对照品 (B 型阴性对照)	含灭活后的病毒血清	100μL×1

注：不同批号试剂盒中各组分不可以互换；

【储存条件及有效期】

-20℃保存，有效期 12 个月。

试剂盒开封后未使用完试剂请置-20℃保存，且反复冻融次数不得超过三次，如试剂需运输，在 4℃条件下不得超过 7 天。

生产日期及使用期限详见产品标签或外包装盒。

【适用仪器】

ABI 7300 、 7500 荧光 PCR 扩增仪。

【样本要求】

1. 样本：血清或血浆
2. 采集： 用一次性的针筒抽取病人静脉血 1mL，置于灭菌的一次性试管中室温自然凝固【不可用肝素抗凝】，或 2000-4000rpm 离心 20 分钟，吸取分离出的样本 0.2mL 左右送检。血清标本—20℃保存，不宜反复冻融。

【检验方法】

1. 样本处理【样本处理区】

取待测血清或血浆样本、阳性对照品各 50μL(冻存血清使用前在室温融解并充分混匀)分别加入 50μL 核酸提取液(内含固体沉淀颗粒物，为使颗粒均匀分布，每次取样时请用吸头反复吸打)，振荡混匀 15sec，100℃水浴或干浴 10min 然后 12,000rpm 离心 10min。取上清供 PCR 扩增用，或-20℃储存备用。

2. 试剂配制【试剂准备区】

分别从试剂盒中取出乙型肝炎病毒 B 型反应混合液和乙型肝炎病毒 C 型反应混合液，在室温下融化并振荡混匀后，2000rpm 离心 10sec。计算所需反应试剂人份数 n[n=样本数+对照数（2）]，每人份分别配制如下两个反应体系：

体系 1	组分	乙型肝炎病毒 B 型反应混合液	Taq 酶	总体积
	体积	35.6μL	0.4μL	36μL
体系 2	组分	乙型肝炎病毒 C 型反应混合液	Taq 酶	总体积
	体积	35.6μL	0.4μL	36μL

按 n 人份计算上述各试剂的用量，加入一适当容积的离心管中，混匀。按 36μL 量分装到 PCR 薄壁管中，然后转移到样本处理区。

3. 加样【样本处理区】

按一定顺序向反应液中分别加入 4μL 的 B 型和 C 型阳性对照、样品处理上清液，盖紧反应管，转移至 PCR 检测区。

4. PCR 扩增及荧光检测【PCR 检测区】

将各反应管按一定顺序放入 PCR 仪上，按以下程序进行 PCR 扩增：

步 骤	循 环 数	温 度	时 间
1	1	95℃	3min
2	40	94℃	15sec
		60℃	30sec

检测荧光选择： 请选择 FAM 荧光。

【阳性判断值】

检测限为 1000IU/mL。

【检验结果的解释】

阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品的最高点。在阈值以上的荧光曲线应当是具有明显的 S 型曲线，B 型和 C 型阳性对照 CT 值应小于 38，该试剂盒中 B 型阳性对照品可作为 C 型检测的阴性对照品，同样 C 型阳性对照品可作为 B 型检测的阴性对照品，阴性对照 CT 值无数据。否则该次实验视为无效，应检查仪器、试剂、扩增条件等方面的误差。

- 1、如果一份样本检测结果显示 B 型反应液检测 CT 值小于 40，而 C 型反应液检测阴性，可判定该样本乙型肝炎病毒基因型为 B 型。
- 2、如果一份样本检测结果显示 C 型反应液检测 CT 值小于 40，而 B 型反应液检测阴性，可判定该样本乙型肝炎病毒基因型为 C 型。
- 3、如果一份样本检测结果显示 B 型反应液检测 CT 值小于 40，而 C 型反应液检测 CT 值也小于 40，且 B 型和 C 型阴性对照均为阴性，排除交叉污染的可能性，则可判定该样本乙型肝炎病毒基因型为 B 型和 C 型混合型。
- 4、如果一份样本检测结果显示 B 型反应液和 C 型反应液检测阴性，可判定该样本为非 B 和 C 基因型样本，建议进一步确定该样本是否为乙型肝炎病毒阳性样本。

【检验方法的局限性】

本检验方法不能作为临床确诊的依据。

【产品性能指标】

- 1、根据临床研究结果本试剂盒对 B 型、C 型及 B/C 混合型的样本的最低检测量为 1000IU/mL，经试验验证，本品对 B 型和 C 型乙型肝炎病毒的总检出率为 100%（250/250），和 DNA 测序结果总符合率为 96.4%（241/250），检测非乙型肝炎病毒样本特异性 100%（0/150）。
- 2、精密度：一份弱阳性的样本连续重复 10 次检测，其 Ct 值的 CV 值小于 10%。

【注意事项】

- 1、有关实验室管理规范请严格按照行业行政主管部门颁布的有关基因扩增检验实验室的管理规范执行。
- 2、本试剂盒仅用于体外检测。
- 3、实验室严格分区操作：

第一区：试剂准备区-准备扩增所需试剂

第二区：样本处理区-待检测样本和对照品的处理

第三区：PCR 检测区-PCR 扩增检测

- 4、各区物品均为专用，不得交换使用，避免污染，每次实验完后立即清洁工作台。
- 5、使用不含荧光物质的一次性手套、一次性专用离心管、自卸式移液枪和带滤芯吸头。
- 6、反应液分装时应尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄露污染仪器。
- 7、加样时应使样品完全加入反应液中，不应有样品粘附于管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。
- 8、扩增完毕请立即取出反应管，密闭在专用塑料袋中，放于指定地点，等待统一处理。
- 9、实验中用过的吸头请直接打入盛有 1%的次氯酸钠的废物缸内，并与其他废弃物品一同灭菌后丢弃。
- 10、工作台及各种实验用品应定期用 1%的次氯酸钠、75%酒精或紫外灯进行消毒。
- 11、PCR 反应混合液应避光低温保存。
- 12、不同批号的试剂请勿混用，并请在有效期范围内使用。

【参考文献】

- 1.《体外诊断试剂说明书编写指导原则》
- 2.《临床实验室定量测定室内质量控制指南》
- 3.《临床基因扩增检验实验室管理暂行办法》
4. Real time quantitative PCR. Genome Res. 6:986-994
5. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reaction. Bio/Technology 11:1026-1030
6. Williams JF. Optimization strategies for the polymerase chain reaction. Biotechniques 1989, 7:762-768

【基本信息】

注册人/生产企业名称：艾康生物技术（杭州）有限公司
住所：杭州市西湖区振中路 210 号
联系方式：电话：0571-87775858；传真：0571-87775851
售后服务单位名称：艾康生物技术（杭州）有限公司
联系方式：电话：400-118-2266；传真：0571-87775851
生产地址：杭州市西湖区振中路 210 号；杭州市临安区开源街 8 号 3 幢（仓库地址）
生产许可证编号：浙食药监械生产许 20120007 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20163400005

【说明书核准日期及修改日期】

核准日期：2020.09.29
修改日期：2022.04.25