

【产品名称】

人类白细胞抗原 B27 核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)

【包装规格】

32 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定性检测人全血样本中人类白细胞抗原 B27 基因(包括 B2702、B2704、B2705 亚型)。

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是以中轴和外周关节受累为特点,慢性炎症和新骨的形成为主要病变的风湿性疾病。发病者多见于青少年,起病 10 年内即可出现严重的关节功能障碍,当脊柱、骶髂关节和髋关节发生病变后,病变不可逆转。其中人类白细胞抗原 B27 (human leukocyte antigen-B27, HLA-B27)被认为与 AS 有着强相关性,即 AS 患者 HLA-B27 的阳性率高达 90%。本公司开发的试剂盒可以检出跟 AS 有关的 B2702、B2704、B2705 亚型,但不能区分不同基因亚型,本试剂仅用于强直性脊柱炎的辅助诊断,检测结果不得作为患者病情评价的唯一指标,必须结合患者临床表现和其他检测方法对病情进行综合分析。

【检验原理】

本试剂盒选用一对 HLA-B27 特异性引物,结合特异性探针,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,本试剂盒选用 FAM 通道,从而实现在全封闭反应体系中对 HLA-B27 核酸的自动化检测。

试剂盒中的内标选用一对管家基因特异性引物,结合特异性探针,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,内标选用 VIC 通道,从而实现在全封闭反应体系中对检测过程的监控,可有效监控假阴性的发生。

【主要组成成分】

组成	主要成分	规格
核酸提取液	含 Triton-100、Chelex-100	1.8 mL×1
10×红细胞裂解液	含 NH ₄ Cl、NaHCO ₃ 、EDTA-Na ₂	5 mL×1
B27 反应混合液	含 Tris-HCl、KCl、MgCl ₂ 、dNTP、引物、探针	1.2 mL×1
Taq 酶	含 Taq DNA 酶及抗体	28 μL×1
B27 阳性对照	主要成分为 B2704 基因组 DNA(重组克隆),浓度≥1.0×10 ³ copies/mL	100 μL×1
阴性对照	主要成分为 NaCl	100 μL×1

注:本试剂盒采用煮沸法提取核酸,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℃±5℃保存,有效期 12 个月。

未使用完的试剂继续冷冻保存不影响其稳定性,试剂反复冻融三次后,-20℃±5℃下可保存 30 天;试剂开瓶后,在室温条件下放置时间不超过 8 小时;本产品应以冰盒或者冷藏车进行运输,模拟运输实验表明,运输条件不会影响产品的稳定性和有效期,但运输时间不应超过 7 天。生产日期及失效日期见包装标签。

【适用仪器】

扩增检测仪器为具有 FAM 和 HEX/VIC 荧光通道的 ABI 7500 荧光 PCR 扩增仪和西安天隆公司的天隆 TL988-IV 四通道荧光定量 PCR 扩增仪。

【样本要求】

1. 标本:全血。
2. 采集:用一次性无菌注射器抽取受检者静脉血 3~5mL,注入含 EDTA 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。
3. 存放:2~8℃保存,不超过 24 小时;-20℃以下保存,不超过 3 个月;-70℃以下长期保存,但应避免反复冻融。
4. 运输:采用泡沫箱加冰密封进行运输。

【检验方法】

1. 样本处理【样本处理区】

- 1.1 取 5mL 的 10×红细胞裂解液中加入 45mL 的无菌去离子水稀释成 1×红细胞裂解液;
- 1.2 1.5mL 离心管,加入抗凝血 500μL;
- 1.3 加入 1000μL 的 1×红细胞裂解液,颠倒混匀,室温静置 5min;
- 1.4 室温下离心,5000rpm 离心,5 分钟,弃上清,保留沉淀;
- 1.5 加入 500μL 的 1×红细胞裂解液,颠倒混匀,室温静置 5min;
- 1.6 室温下离心,5000rpm 离心,5 分钟,弃上清,保留沉淀,尽可能吸除残存液体;
- 1.7 沉淀中加入 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),混匀后 2000rpm 离心 10sec,100℃水浴或干浴 10min,12000rpm 离心 10min,上清供 PCR 扩增用(如样本裂解产物当天不使用,请于-20℃保存);

注意: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。

2. 试剂配制【试剂准备区】

从试剂盒中取出 B27 反应混合液,在室温下融化并振荡混匀后,2000 rpm 离心 10 sec。计算需准备反应试剂测试数[n=样本数+对照品数(2)]。每人份反应体系配制如下:

试剂	B27 反应混合液	Taq 酶
用量	35.2μL	0.8μL

按 n 测试计算上述各试剂的用量,加入一适当体积的离心管中,充分混匀后,按 36μL 量分装到 PCR 反应管中,转移至样本处理区。

3. 加样【样本处理区】

按一定顺序向反应液中分别加入 4μL 的阴性对照(无需抽提)、B27 阳性对照(无需抽提)、样品处理上清液,盖紧反应管,转移至扩增区。

4. PCR 扩增及荧光检测【扩增区】

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(℃)	反应时间
1	1	95	3min
		94	15sec
2	40	60	30sec

检测荧光选择:目的基因(FAM)、内标(VIC),荧光数据采集在 60℃。

【阳性判断值】

FAM 通道检测 Ct 值小于或等于 38 时，则判断该样本为 HLA-B27 阳性。

【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。阳性对照 FAM 通道 Ct 值应小于 38，阴性对照 FAM 通道 Ct 无数值；在阈值以上的荧光曲线应当是具有明显的 S 型曲线，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. 检测样本 FAM 通道 Ct 值 $\leq$ 38.0 者判为阳性。
2. 检测样本 FAM 通道 Ct 值 $>$ 38.0 的样本建议重做，重做结果 FAM 通道 Ct 值 $<$ 40 者为阳性，否则为阴性。
3. 检测样本 FAM 通道 Ct 无数值且 VIC 通道 Ct 值应小于 39 者判为阴性。

【检验方法的局限性】

检测结果不能直接作为临床确诊或排除病例的依据，仅供临床医生参考使用。同时，检测结果和样本的采集、保存和运输条件有关，其中任何环节失误都可导致假阴性的结果；如果在样本处理过程中发生交叉污染，则可能出现假阳性的结果。

【产品性能指标】

1. 外观：试剂盒包装完好，盛装各试剂的冻存管或离心管无破损，标签完好。
2. 分析特异性：本试剂盒与 HLA-A1、HLA-DRB1、EB、HLA-B58、HLA-DQ、HLA-B8、HLA-DPB1、HLA-B2703、HLA-B2707、B2709、B2711、B2706 无交叉反应；或检测国家阴性参考品，检验结果均应为阴性。
3. 阳性符合率：8 份阳性参考品(包括 HLA-B2704 亚型 3 份，HLA-B2705 亚型 3 份，HLA-B2702 亚型 2 份)，检验结果均应为阳性，符合率(+/+)为 8/8；或检测国家阳性参考品，检验结果均应为阳性。
4. 检测限：浓度为 500copies/mL 的检测限参考品 L1~L3(分别为 HLA-B2704 亚型、HLA-B2705 亚型、HLA-B2702 亚型)，分别重复 20 次，至少 17 次检测结果为阳性，检测结果符合率应 $\geq$ 17/20；或检测国家检测限参考品，检验结果均应为阳性。
5. 精密性：精密性参考品 J 高(HLA-B2704)、J 低(HLA-B2705)，分别重复测试 10 次，Ct 值的变异系数(CV,%) $\leq$ 5.0%。
6. 干扰物：500mg/mL 的游离血红蛋白、18mM 甘油三酯和 0.8mg/mL EDTA 抗凝剂对结果无明显影响；750mg/kg 的消炎痛、500mg/mL 的波尼松和 15g/kg 的柳氮磺吡啶对结果无明显影响。

【注意事项】

1. 本试剂盒为体外检测试剂，操作人员应经过专业培训并具有一定经验。
2. 为保证实验结果的准确性和可靠性请使用已校准的移液器，选用合格的一次性使用的 PCR 反应管、离心管、枪头等进行样本处理及配液等操作，所有用具应不含 DNA 酶。
3. 实验请严格分区操作：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 扩增区-PCR 扩增检测，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。
4. 本产品使用前应在室温充分融化，混匀并瞬时低速离心。
5. 样本处理应在生物安全柜中进行，以保护操作人员安全和防止对环境的污染。
6. 每次实验应设置阴性对照和阳性对照，不同批号的试剂请勿混用，在有效期内使用试剂盒。
7. 待测样本尽可能新鲜，提取过程应严防 DNA 酶污染及操作不当导致的 DNA 降解。
8. -70℃保存的样本，加样前应在室温充分融化、混匀并瞬时低速离心后使用。
9. 分装有反应液的反应管应扣盖或装入密封袋内再转移至样本处理区。
10. 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。
11. 反应液分装时尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧，避免泄露污染仪器。
12. 扩增完毕取出反应管，密封在专用塑料袋内，丢弃于指定地点。
13. 实验中用过的枪头请直接打入盛有 10%次氯酸钠的废物缸内，并与其他废弃物一同丢弃。
14. 工作台及各种实验用物品经常用 10%次氯酸钠、75%酒精和紫外灯进行消毒。
15. 实时荧光 PCR 仪需经常校正和清洁载样板孔。
16. 本试剂盒涉及的待测样本应视为具有传染性物质，操作和处理均需符合卫生部《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》相关要求。

【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/Technology11:1026-1030.
6. Williams JF. Optimization strategies for the polymerase chain reaction. Biotechniques 1989, 7:762-768.
7. Salvarani C, Fries W. Clinical features and epidemiology of spondyloarthritis associated with inflammatory bowel disease [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(20):2449-2455.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：苏州天隆生物科技有限公司

住所：苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 07 栋 501 室

联系方式：0512-62525631 传真：0512-62956337 网址：www.medtl.cn

售后服务单位名称：苏州天隆生物科技有限公司

联系方式：0512-62525631 传真：0512-62956337 网址：www.medtl.cn

生产地址：苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 07 栋(NW-07)501 室、苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 06 栋(NW-06)504 室

生产许可证编号：苏食药监械生产许 20140001 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20163400302

【说明书核准日期及修改日期】2021.01.14