

人类白细胞抗原 B27 基因检测试剂盒 (PCR-荧光染料法) 说明书

- 【产品名称】人类白细胞抗原 B27 基因检测试剂盒 (PCR-荧光染料法)
- 【包装规格】24 人份/盒
- 【预期用途】用于体外定性检测人静脉全血样本中 HLA-B27 基因。

强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS) 是脊柱及其附属组织的慢性进行性炎性疾病，属于脊柱关节病的一种亚型，主要累及骶髂关节、脊柱关节、椎旁软组织及四肢关节。临床上以持续性炎症，炎症高度活动和低度活动交替为特征。研究认为，AS 是一种具高度遗传性的疾病，青壮年为主要高发人群，发病年龄通常低于 30 岁 (常见为 15-30 岁)。70 年代初期，发现白细胞抗原 (human leukocyte antigen,HLA) HLA-B27 抗原与 AS 密切相关，此后，HLA-B27 在 AS 诊断中的作用日益受到重视，已成为临床上 AS 的重要辅助诊断方法。目前常见的人类白细胞抗原 B27 检测方法有流式细胞术 (FCM)、SSP、PCR 等。

- 【检验原理】本产品根据 IMGT/HLA 数据库公开的 HLA-B27 的信息设计检测人类白细胞抗原 B27 等位基因的特异性引物，结合 EvaGreen 荧光染料进行real-time PCR 扩增，通过溶解曲线进行结果的判断。
- 在检测体系内加入内标基因的引物，对提取和检测过程进行监控。
- 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 U-DNA，以防止先前 PCR 扩增产物的污染。

表 1 试剂盒主要组成成分			
序号	产品组成	主要成分	规格及装量
1	HLA-B27 PCR 反应液	Taq 酶、UDG 酶、Mg ²⁺ 、dNTP	300μL×1 管
2	HLA-B27 PCR 引物混合液	引物	180μL×1 管
3	荧光染料	EvaGreen	24μL×1 管
4	HLA-B27 阳性质控品	HLA-B27 型别灭活标本 DNA	20μL×1 管
5	HLA-B27 阴性质控品 1	HLA-B 其他型别灭活标本 DNA	20μL×1 管
6	HLA-B27 阴性质控品 2	体外纯化内标质粒 DNA	800μL×1 管

- 注 1：试剂盒各组分均不得与其他产品或不同批号产品中的相应组成成分进行互换。
- 注 2：试剂盒不包含，但对试验必需的自备设备、试剂和耗材：
 - 荧光定量 PCR 仪、旋涡混合器、生物安全柜、移液器、干式恒温仪或水浴锅、高速离心机、PCR 反应管、1.5mL 离心管、无水乙醇、商品化核酸提取试剂盒。
- 【储存条件及有效期】-20℃±5℃避光保存，有效期 9 个月。
- 试剂盒生产日期、失效日期：见外包装盒。
- 试剂开封后，-20℃±5℃条件下保质期为 3 个月，但反复冻融不得超过 3 次。

- 运输条件：不高于-15℃避光运输。
- 【适用仪器】ABI7500 型荧光定量 PCR 仪、伯乐 CFX-96 型荧光定量 PCR 仪、罗氏 Cobas z 480 型荧光定量 PCR 仪。
- 【样本要求】
 - 1. 样本类型：抗凝全血标本。
 - 2. 样本采集：
 - 在受检者手臂弯曲处或手背处抽取静脉血 3-5mL，置于 EDTA 抗凝管 (紫盖)内，轻轻颠倒混匀；

- 3. 样本保存：在 -2-8℃条件下保存不超过一周，-20℃±5℃条件下保存不超过 6 个月。
- 4. 运输：不高于-15℃避光运输。
- 【检验方法】
 - 1. 样本处理
 - 1.1 样本处理和核酸提取
 - 本试剂盒不包含核酸提取成分，待测样本和阴性质控品 2 处理采用商品化的核酸提取试剂盒，推荐使用天根生化科技(北京)有限公司核酸提取或纯化试剂(体外诊断试剂备案号：京昌械备 20200001 号，货号 YDP348)，具体操作参见该试剂盒说明书，并注意以下事项。
 - 1) 提取 DNA 浓度需满足 OD260/OD280=1.6-2.0；
 - 2) 推荐 DNA 上样浓度 15-150ng/μL；
 - 3) 提取完的 DNA 建议立即进行检测，否则请于-20℃±5℃保存。

- 1.2 准备
 - HLA-B27 阴性质控品 2 提前取出并平衡至室温，充分解冻并持续振荡 15s 混匀，瞬时离心 10s，准备相应数量的离心管进行后续提取。
- 2. PCR 扩增
 - 2.1 质控品检测
 - 每次试验都应设置阴性质控品、阳性质控品。

- 2.2 反应体系的配制
 - 2.2.1 准备工作：试剂提前取出并平衡至室温，融化后使用前振荡 15s，瞬时离心 10s。
 - 2.2.2 反应体系配制：确定反应数 N，N=待检样本数(n)+质控品数(3)+1。计算加到反应混合物中的各个试剂的量，计算如下：

表 2 体系配置		
HLA-B27 PCR 反应液	HLA-B27 PCR 引物混合液	荧光染料
12.5μL×N	7.5μL×N	1.0μL×N

- 2.3 反应体系分管
 - 上述混合液振荡 15s，瞬时离心 10s。按 21μL/管分装至 PCR 反应管中。
- 2.4 加样
 - 取 4μL 阳性质控品、阴性质控品 1、提取后阴性质控品 2 和待测样本 DNA 分别加入对应的 PCR 反应管中，盖紧管盖，瞬时离心 10s 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。

表 3 推荐样本摆放位置								
名称	1	2	3	4	5	6	7	8
HLA- B27	①	②	③	④	⑤	STD	NC1	NC2

- 注：①-⑤代表样本；STD 代表 HLA-B27 等位基因阳性质控品，NC1 代表阴性质控品 1，NC2 代表阴性质控品 2。
- 2.5 PCR 扩增程序设计
 - 2.5.1 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 Set up”，进入“Experiment Properties”界面，选择“Q uantitation-Standard Curve”和“SYBR®Green Reagents”。然后再单击“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，将 Target name 改为相应编号名称，将“Reporter”改为“SYBR”，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，将 Target name 改为相应编号名称。然后再单击“Assign Targets and Samples”，将该界面中“ROX”一栏改为“(none)”，然后在“View Plate Layout”界面选中试剂所放的孔位，确认与仪器相对应。在“Assign Target(s) to the selected wells”栏中，在对应的 Target 和 Sample 前划“√”，然后在“Task”栏内选择相应的样本类型：“U” (待测样本)、“S” (阳性对照)、“N” (阴性对照)。
 - 2) 反应条件设置：单击“Run Method”进入反应条件设置面板，制定所需的扩增程序 (见表 4)，并在“Reaction Volume Per Well”内输入 25；点击“Add

Stage”可以选择 Hoding 或者 Cycling Hoding 为只添加一个温度步骤，Cycling 为添加一个可循环的几个温度步骤。点击“Add Step”可在一个 Cycling Stage 中添加一个 step。选择“Before”或者“After”即可添加温度步骤，根据需要更改温度和时间；在“Number of Cycles”可以更改为相应的循环数。确认无误后，点击“Start”将结果保存，开始扩增检测。

表 4 反 应 程 序			
过程	温度	时间	循环数
UDG 酶 反 应	37℃	2 min	1
预变性	95℃	3min	1
变性	94℃	15s	35
退火	62℃	25s	
延伸	72℃	30s	
延伸	72℃	5min	1
温度曲线	95℃	15s	1
	60℃	1%速率升温	
	95℃		
	60℃		

- 2.5.2 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“Prime PCR”，选择“SYBR”进入设置界面：单击“Plate”下的“Create New”进入面板编辑，单击“Scan Made”下拉框选择“SYBR/FAM only”，在“Sample Type”下拉框选择所选反应孔的检测样本类型，包括“Unknown” (待测样本)、“Positive Control” (阳性对照)、“Negative Control” (阴性对照)，选中反应孔在“SYBR”处打勾，根据试验需要可在“Target Name”中输入扩增基因名称，在“Sample Name”输入所选检测孔的样品名，并打勾确认。设置结束后点击“OK”。
 - 2) 反应条件设置：单击“Protocol”下的“Create New”进入设置界面，需编辑反应体系及扩增程序 (见表 5)，在图形或文本模式下可以直接对温度和保持时间进行编辑。单击“Insert Step”在程序中增加一个温度步骤，单击“Delete Step”在程序中删除选中步骤，单击“Add Plate Read To Step”，在程序中指定获取荧光数据的时间。点击“GOTO”步骤的重复次数，改变程序中的循环次数，点击“GOTO”步骤数可改变 GOTO 循环中所包含的步骤。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 5 反应程序			
过程	温度	时间	循环数
UDG 酶反应	37℃	2min	1
预变性	95℃	3min	1
变性	94℃	15s	35
退火	62℃	25s	
延伸	72℃	30s	
延伸	72℃	5min	1
温度曲线	95℃	6s	1
	65℃	5s	
	95℃	0.5℃	

- 2.5.3 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“LightCycler® z480 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“SYBR Green I /HRM Dye”。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)。

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 6): 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。在熔解曲线阶段, Analysis Mode 下拉菜单中选择 Melting Curves, Acquisition Mode 下拉菜单中选择 Continuous。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 6 反应程序

过程	温度	时间	循环数
UDG 酶反应	37℃	2min	1
预变性	95℃	3min	1
变性	94℃	15s	35
退火	62℃	25s	
延伸	72℃	30s	
延伸	72℃	5min	1
温度曲线	95℃	5s	1
	65℃	5s	
	95℃	0.03℃/s	

3. 结果分析

反应结束后, 使用 PCR 仪配套软件对本次试验结果进行分析。通过样品的熔解曲线及 Tm 值进行结果的判断。

3.1 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪

点击“Ananlysis”下的“Melt Curve”直接进行熔解温度及熔解曲线峰值的查看。

3.2 Bio-Rad CFX-96 型荧光定量 PCR 仪

在结果查看界面, 点击“Melt Curve”进行熔解温度及熔解曲线峰值的查看; 如出现熔解峰较低情况, 可通过鼠标上下拖动阈值线以显示熔解温度。

3.3 罗氏 Cobas z 480 型荧光定量 PCR 仪

点击左侧“Analysis”模块, 在 Creat new analysis 下拉框中选择分析的类型“Tm Calling”, 出现对话框, 点击右下角“√”按钮, 进入 Tm 分析窗口; 确定波峰数目“Max Peaks (2 or less)”, 选择检测模式“SYBR Green I Format”; 点选“Calculate”即可得到每个样品之 Tm 值和进行熔解曲线峰值的查看。

4. 质量控制

每次试验应设置阴性质控品和阳性质控品, 且应符合以下要求, 否则试验结果不成立。

4.1 内标: 在 83℃±2℃出现内标熔解峰。

4.2 HLA-B27 阴性质控品: 在 83℃±2℃出现内标熔解峰而在 90℃±2℃无靶基因熔解峰。

4.3 HLA-B27 阳性质控品: 在 83℃±2℃出现内标熔解峰并在 90℃±2℃出现靶基因熔解峰, 靶基因熔解峰信号值不低于四分之一内标熔解峰信号值。

【阳性判断值】

1. 在 83℃±2℃出现内标熔解峰并在 90℃±2℃出现靶基因熔解峰, 靶基因熔解峰信号值不低于四分之一内标熔解峰信号值, 判断为 HLA-B27 阳性。

2. 在 83℃±2℃出现内标熔解峰而在 90℃±2℃没有出现靶基因熔解峰, 判断为 HLA-B27 阴性。

【检验结果的解释】

若在 83℃±2℃出现内标熔解峰并在 90℃±2℃出现靶基因熔解峰, 靶基因熔解峰信号值低于四分之一内标熔解峰信号值, 建议对样本进行 SBT 测序分型。

【检验方法的局限性】

1. 本检测结果仅供临床参考。

2. 当样本 DNA 浓度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, 会导致不确定结果。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. 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。

6. 本试剂盒仅限于检测 HLA-B27 基因的多态性, 其它多态性不在本试剂盒检测范围内。

7. 本试剂盒无法区分 HLA-B27 等位基因是纯合子或杂合子。

【产品性能指标】

1. 最低检测限: 40ng 样本即可准确判读实验结果。

2. 特异性: 使用试剂盒检测 HLA-B27 阴性参考品, 检测结果均为阴性。

3. 准确性: 使用试剂盒检测 HLA-B27 阳性参考品, 检测结果均为阳性。

4. 精密度: 同一批试剂重复检测精密度参考品, 检测结果均为对阳性, 且检测结果 Tm 值变异系数 CV 值≤5%。

5. 干扰物质: 高浓度血红蛋白 (≤200g/L)、高浓度甘油三酯 (≤37mmol/L)、高浓度胆红素 (≤342umol/L)、类风湿因子 (≤150mmol/L)、ANA、吡罗昔康 (≤15μg/mL)、美洛昔康 (≤6μg/mL)、塞来昔布 (≤0.75mg/mL)、双氯芬酸钠 (≤4.5μg/mL)、吲哚美辛 (≤8.4μg/mL)、蔡丁美酮 (≤3.9mg/mL)、布洛芬 (≤4.6mg/mL)、蔡普生 (≤0.13mg/mL) 及柳氮磺胺吡啶 (≤150μg/mL) 对 PCR 结果无明显干扰。

6. 交叉反应: 本产品与同源序列很高且与 AS 疾病相关的 HLA-B2702、HLA-B2703、HLA-B2707、HLA-B2708、HLA-B2710、HLA-B2714、HLA-B2715 及 HLA-B2719 亚型有交叉反应。

7. 临床性能: 在三家临床试验机构进行与已上市产品的对比临床试验, 入组全血样本, 有效评价病例数共 1013 例, 阳性符合率为 100.00%, (95%CI: 98.65%,100.00%); 阴性符合率为 99.87%, (95%CI:99.25%,100.00%); 总符合率为 99.90%, (95%CI:99.45%,100.00%)。

【注意事项】

1. 本产品仅用于体外诊断。

2. 本产品中的阴阳性质控品为核酸, 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、试验后的废弃物物品, 如吸头、扩增产物的处理需符合相关法规要求: 卫生部《微生物和生物医学试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试验室的技术规范进行操作。试验过程应分区进行 (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. 试验用的消耗品 (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, 以保证试验结果的可靠性。

【参考文献】

1 《体外诊断试剂注册管理办法》(国家食品药品监督管理总局令第 5 号)

2 《国家食品药品监督管理总局关于发布体外诊断试剂说明书编写指导原则的通告》(2014 年第 17 号)

3 白世杰,托娅,张保平等.强直性脊柱炎及其相关基因 HLA-B27 检测的研究现状[J].分子诊断与治疗杂志,2016,(3):206-211.

4 Infantes,S.,Lorente,E.,Bamea,E. et al.Natural HLA-B*2705 protein ligands with

glutamine as anchor motif: Implications for HLA-B27 association with spondyloar thropathy[J].The Journal of biological chemistry,2013,288(15): 10882- 10889.

5 Olerup O.HLA-B27 typing by a group-specific PCR amplification [J]. Tissue Antigens, 1994, 43:253-256.

【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凉水河一街7号院一区2号楼1层101

联系方式:

电话号码: 010-56380026

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: 010-56380026

传真号码: 010-56380029

生产地址: 北京市北京经济技术开发区凉水河一街7号院一区2号楼-1层、1

层、2层、4层

生产许可证编号: 京药监械生产许20200028号

【医疗器械注册编号/产品技术要求编号】

国械注准20233401272

【说明书核准日期及修改日期】

核准日期: 2023年09月18日