

人类 HLA-B27 核酸检测试剂盒（PCR 荧光法）说明书

【产品名称】 人类 HLA-B27 核酸检测试剂盒（PCR 荧光法）

【包装规格】 32 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒适用于体外定性检测人全血样本中的 HLA-B27 基因（亚型包括 B2702、B2704、B2705）。

强直性脊柱炎（ankylosing spondylitis, AS）是一种骶髂及椎旁小关节受累为主的慢性异质性疾病。诊断主要建立在影像学检查基础上，缺乏实验室特异性诊断指标。HLA-B27 是一种主要组织相容性复合物 I 类分子，表达于大多数人类有核细胞和血小板表面，与强直性脊柱炎的发生密切相关。HLA-B27 阳性率在强直性脊柱炎患者高达 91%以上，而正常人群在 10%以下，目前对疑似强直性脊柱炎患者进行 HLA-B27 检测已成为临床诊断的辅助手段。

适应症：强直性脊柱炎高危人群。

【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，从而实现在全封闭反应体系中对 HLA-B27 核酸的自动化检测。

【主要组成成分】

试剂盒组成	组成成分	规格
核酸提取液	含三羟甲基氨基甲烷、氯化钠、Chelex-100、巯基乙醇、内标模板	3.6mL×1
B27 反应混合液	含三羟甲基氨基甲烷、氯化钾、氯化镁、dNTP、引物、荧光探针	1.2mL×1
Taq 酶	含 Taq DNA 酶及抗体	14μL×1
B27 阳性对照	含 B27 基因组 DNA(重组克隆)	100μL×1
阴性对照	含 TE 缓冲液	100μL×1
10×红细胞裂解液	含氯化铵、碳酸氢钠、乙二醇四乙酸	5mL×1

注：不同批号试剂盒中各组分不可以互换

需自备试剂：纯化水

【储存条件及有效期】

-20℃ 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，但试剂反复冻融不得超过三次。

生产日期及使用期限详见产品标签或外包装盒。

【适用仪器】

具有 FAM、VIC 荧光通道的 ABI7500 型荧光 PCR 扩增仪。

【样本要求】

1. 样本：全血。

2. 采集：用一次性无菌注射器抽取受检者静脉血 3-5 毫升，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：样本可立即检测；全血在 2-8℃ 条件下保存应不超过 48 小时；避免反复冻融。

4. 运输：采用冰壶加冰或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 将 10×红细胞裂解液用纯化水稀释成 1×红细胞裂解液；

1.2 1.5 mL 离心管，加入全血 500 μL；

1.3 加入 1mL 的 1×红细胞裂解液，颠倒混匀，室温静置 5 min；

1.4 室温下离心，5000 rpm 离心，5 分钟，弃上清，保留沉淀；

1.5 加入 500 μL 的 1×红细胞裂解液，颠倒混匀，室温静置 5 min；

1.6 室温下离心，5000 rpm 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 100 μL 核酸提取液，混匀后 2000 rpm 离心 10 sec, 100℃ 水浴或干浴 10 min, 12000 rpm 离心 10 min，上清供 PCR 扩增用（如样本裂解产物当天不使用，请于-20℃ 保存）；

1.8 阴性对照、B27 阳性对照直接取出 50μL，加入 50μL 核酸提取液，混匀后 100℃ 水浴或干浴 10min, 12000rpm 离心 10min, 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人份数[n=样本数+2(对照品数)]。每人份反应体系配制如下：

试 剂	B27 反应混合液	Taq 酶
用 量	35.6 μL	0.4 μL

计算上述各试剂的使用量，加入一适当体积的离心管中，充分混匀后，按 36 μL 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）

分别加入 4 μL 的阴性对照、B27 阳性对照、样品处理上清液，盖紧反应管，转移至检测区。

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℃	3 min
2	40	94℃	15 sec
		60℃	30 sec

检测荧光选择：请选择 FAM、VIC 荧光检测通道，荧光数据采集在 60℃。

【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 无数值且 VIC 通道 Ct 值应小于 40；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≤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 40 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。

【产品性能指标】

1. 检测限：不高于 10ng/反应。
2. 特异性：本试剂盒与 B2706、B2707、B2709 亚型无交叉反应。
3. 精密度：Ct 值的 CV 值均不高于 5%。
4. 重复性：两份阳性的样本连续重复 10 次检测，均能稳定检出，Ct 值的变异系数（CV）应不大于 5.0%。
5. 抗干扰性：0.4g/mL 的血红蛋白、4mg/mL 的血脂、16mg/L 胆红素对检测结果无影响。
6. 对比试验：我公司试剂盒与基因测序法进行对比试验，统计其阳性符合率为 99.14%，阴性符合率为 99.33%，总符合率为 99.27%。

【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/Technology11:1026-1030.
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 20153400732

【说明书核准日期及修改日期】

核准日期：2020.01.14

修改日期：2022.04.22