

**【注意事项】**

- 1 本实验必须在通过国家卫生部认证的临床基因扩增检验实验室中进行，所有操作需严格遵循国家卫生部确认的 SOP 文件；
- 2 操作人员必须经过培训，合格后方可上岗；
- 3 标本准备和处理阶段须在生物安全柜中进行；
- 4 在 PCR 配制区用的白大褂、手套和帽子等，不能带入其它区域；
- 5 实验全过程必须配带一次性的 PE 或橡胶手套，扩增结束后不要打开管子，应密封丢弃于指定的容器内；
- 6 实验过程中要求十分的仔细小心，以保证实验的准确性。结束后用 75%酒精或 10%次氯酸清理实验工作台，并用紫外灯照射，以防止实验室污染；
- 7 本试剂盒仅用于体外诊断。

**【批准文号】** 国食药监械（准）字 2007 第 3401340 号

**【生产企业】** 杭州博日科技有限公司

地址：杭州市滨江区滨安路 1192 号

邮政编码：310053

电话：0571-87774567；

传真：0571-87774303

网址：[www.bioer.com.cn](http://www.bioer.com.cn)

## 乙型肝炎病毒核酸扩增（PCR）荧光定量检测试剂盒说明书

## 【产品名称】

通用名称：乙型肝炎病毒核酸扩增（PCR）荧光定量检测试剂盒

英文名称：HBV PCR Fluorescence Quantitative Detection Kit

【包装规格】48 人份/盒

## 【用途】

本试剂盒用于人血清或血浆中乙型肝炎病毒核酸（HBV DNA）的定量检测。

## 【检验原理】

本试剂盒从人血清或血浆中提取乙型肝炎病毒核酸（HBV DNA），在引物的引导下，以四种脱氧核苷酸为底物，通过耐热 DNA 聚合酶的酶促作用，对 HBV DNA 进行体外扩增。在体系中采用 Taqman 探针法并结合竞争性内标技术来定量检测人血清或血浆中乙型肝炎病毒核酸（HBV DNA）的数量。可用于临床对乙型肝炎的辅助诊断和抗病毒药物的疗效观察。

## 【主要组成成份】

	试剂盒组成	数量	组份
样本提取试剂	蛋白酶 K	0.5ml×1	蛋白酶 K
	裂解液	5ml×1	含有异硫氰酸胍的溶液
	结合液	12.5ml×1	含有氯化钠的溶液
	磁珠悬液	0.5ml×1	含有磁性微粒的溶液
	洗液	10ml×2	含有氯化钠的溶液
	洗脱液	5ml×1	TE 缓冲液
	溶液 A	4.8ml×1	含有 PEG 的溶液
	溶液 B	1.2ml×1	Tris-HCl 缓冲液
核酸扩增试剂	HBV PCR 反应液	900ul×2	含有引物、探针和 dNTP 的溶液
	Taq 酶	20ul×1	Taq 酶
	UDG 酶	6ul×1	UDG 酶
对照品	阴性对照	200ul×1	HBV DNA 阴性的混合血清
	临界阳性对照	200ul×1	含有约 $1 \times 10^4$ IU/ml 的 HBV 基因片段的非传染性 DNA
	强阳性对照	200ul×1	含有约 $1 \times 10^6$ IU/ml 的 HBV 基因片段的非传染性 DNA
工作标准品	工作标准品 1: $(1-5) \times 10^7$ IU/ml	40ul×1	含有约 $10^7$ IU/ml 的 HBV 基因片段的非传染性 DNA
	工作标准品 2: $(1-5) \times 10^6$ IU/ml	40ul×1	含有约 $10^6$ IU/ml 的 HBV 基因片段的非传染性 DNA
	工作标准品 3: $(1-5) \times 10^5$ IU/ml	40ul×1	含有约 $10^5$ IU/ml 的 HBV 基因片段的非传染性 DNA
	工作标准品 4: $(1-5) \times 10^4$ IU/ml	40ul×1	含有约 $10^4$ IU/ml 的 HBV 基因片段的非传染性 DNA
内标	内标	500ul×1	含有适量的非 HBV 基因片段的非传染性 DNA

工作标准品 1-4 的参数根据批号不同而不同。详见试剂盒盒内标签。工作标准品 1-4 用国家参考品或经国家参考品标定的企业工作参考品进行标定。

**【储存条件及有效期】**

- 1) 试剂盒必须在冷冻条件下运输。
- 2) 试剂盒保存: (a) 提取试剂盒可在室温保存; 若要长期保存建议将蛋白酶 K 于 4℃ 保存。  
(b) PCR 反应试剂盒须 -20℃ 以下保存, 应避免反复冻融。
- 3) 有效期: 本试剂盒有效期 12 个月, 请在有效期内使用。

**【适用仪器】**

博日公司 ThermoCell 恒温金属浴, Gene-pure 自动核酸纯化仪和 Line-Gene 系列荧光定量 PCR 检测系统及其它厂家同类荧光定量 PCR 检测系统。

**【样本要求】**

- 1 样本采集: 用无菌注射器抽取受检者 1ml 静脉血, 注入无菌 1.5ml 离心管中, 于室温静置 2 小时, 转入 4℃ 静置 1 小时, 8000rpm 离心 5 分钟, 吸取 200ul 上清 (注意勿吸入红细胞), 转入另一无菌 1.5ml 离心管中, 即为血清标本。
- 2 存放: 待测血清保存于 -20℃, 但应避免反复冻融。
- 3 运输: 标本运输应采用泡沫盒加冰袋。

**【检验方法】****(一) 标本提取 (在标本处理区进行)****1) 自动提取法**

- 1 取出 10ul 蛋白酶 K 加入到 96 孔板内 (第 2 和 8 排);
- 2 加入 10ul 内标到相应孔内;
- 3 加入 100ul 待测血清和对照品到相应孔内;
- 4 取出 100ul 裂解液分别加入到以上各孔内, 在振荡器上振荡混匀;
- 5 将 96 孔板盖上硅胶盖 (**注: 将硅胶盖与板孔盖严**), 然后放置到 100℃ 恒温金属浴上并盖上保温盖, 温育 30 分钟;
- 6 取出 96 孔板, 小心取下硅胶盖 (**注: 谨防硅胶盖上的液滴溅出而造成交叉污染**), 在温育后的混合液中加入 250ul 结合液, 并在第 3 和 9 排加入 400ul 洗液, 在第 4 和 10 排加入 100ul 洗脱液;
- 7 将装有磁珠悬液的离心管快速颠倒摇晃 10 次, 使磁珠颗粒在缓冲液中充分悬浮分散均匀, 再在第 2 和 8 排孔中分别加入 10ul 磁珠悬液, 手工混匀或振荡混匀 (**注: 勿使孔内的液体溅出**);
- 8 将 96 孔板放置到自动核酸纯化仪上, 插上干净套管;
- 9 运行已设定好的提取程序, 运行时间大约 15 分钟;
- 10 程序运行完毕后, 取出 96 孔板, 将含 HBV-DNA 的洗脱液转移到 0.5ml 离心管中进行 PCR 反应或保存于 -20℃。 **建议: 在第 5 和 11 排加入消毒液, 将最后的磁珠回收至消毒液中。**

**2) 简易提取法**

取待测血清各 100ul, 分别加到 0.5ml 离心管中; 加入 100ul 溶液 A 和 5ul 内标, 振荡混匀, 13,000rpm 离心 10min; 吸弃上清。 **注意: 尽可能吸弃上清且不碰沉淀**; 再加入 25ul 溶液 B, **注意: 溶液 B 中含有微球, 在加液前尽可能混匀, 并在移液器取样前吹打均匀后吸取**; 剧烈振荡, **注意: 尽可能使沉淀分散**; 100℃ 干浴或沸水浴 10min; 13,000rpm 离心 10min, 保留上清备用。提取液保存于 -20℃。

**(二) PCR 反应液配制 (在试剂准备区进行)**

- 1 试剂配制: 将试剂盒中的 HBV PCR 反应液、标准品及提取好的对照品进行室温解冻。试剂配制前, 将所有试剂振荡后短暂离心。按标本的数量加上标准品和对照品的数量进行 PCR 反应配置, 配置如下:

每个反应的试剂用量:

试剂	PCR 反应液	Taq 酶	UDG 酶
用量	37.7 u1	0.3 u1	0.1u1

混合好上述反应液后, 以每管 38u1 分装于 0.2ml 的 PCR 反应管中。将分装好的 PCR 反应管转移至标本处理区。

2 加样: 分装好的反应管分别加入已提取好的标本、对照品及标准品各 2u1。

3 PCR 反应 (在 PCR 检测区进行)

反应程序设置如下:

37°C: 5 分钟;  
94°C: 2 分钟;  
95°C: 5 秒; }  
60°C: 40 秒; } 40 个循环

仪器检测通道选择: 荧光信号收集设定为 F1 (FAM) 和 F2 (HEX) 通道,

运行之前, 设置程序在 60°C 运行 15 秒, 检测荧光本底值, 调节增益使荧光 F1 (FAM) 通道本底值在 10-20 之间, F2 (HEX) 通道本底值在 30-40 之间。

### 【结果分析与判定】

1 将四个工作标准品的浓度输入, F1 (FAM) 和 F2 (HEX) 通道选择样点拟合法进行分析, F1 (FAM) 通道基线 (零点调整) 取为 12—14 个循环的荧光信号, F2 (HEX) 通道基线 (零点调整) 取为 23—25 个循环的荧光信号, 噪声容限以基线超过正常阴性对照品扩增曲线 (无规则的噪音线) 的最高点, 或根据仪器噪音情况另行调整, 并且基线调整的位置在 0.5-5 的范围内, 然后进行定量分析。

2 检测样本中  $1 \times 10^3 \text{ IU/ml} \leq \text{HBV DNA} \leq 1 \times 10^8 \text{ IU/ml}$ , 测定结果有效, 可直接报告阳性及相应的拷贝量;

3 检测样本中  $\text{HBV DNA} > 1 \times 10^8 \text{ IU/ml}$ , 即可直接报告为  $> 1 \times 10^8 \text{ IU/ml}$ , 也可用正常人 HBV DNA 阴性血清按 10 倍梯度做相应稀释, 使其拷贝量落在  $1 \times 10^5 - 5 \times 10^7 \text{ IU/ml}$  范围内再重新测定, 测定结果应以稀释倍数进行校正;

4 检测样本 HBV DNA 的拷贝量为  $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^3 \text{ IU/ml}$  时, 建议对该样本进行双份重试, 如双份样本重试仍在  $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^3 \text{ IU/ml}$ , 则按实际值计算, 如双份或一份重试均  $< 1 \times 10^2 \text{ IU/ml}$ , 则判断为阴性;

5 Ct 值不显示时或 HBV DNA 的拷贝量  $< 1 \times 10^2 \text{ IU/ml}$ , 该样本 HBV DNA 为阴性。

### 【质量控制】

1 标准曲线的相关系数小于等于 -0.970, 阴性对照的 Ct 值应不显示, 强阳性对照的 HBV DNA 拷贝量应为  $5 \times 10^5 - 5 \times 10^7 \text{ IU/ml}$ , 临界阳性对照的 HBV DNA 拷贝量应为  $1 \times 10^3 - 9 \times 10^4 \text{ IU/ml}$ , 否则实验视为无效。

2 内标 Ct 值应小于等于 35, 实验视为有效。如果检测结果中内标 Ct 值大于 35 时, 可判定 PCR 检测受到抑制, 建议样本重新测定或稀释后重新测定。

### 【试验局限性】

内源物质干扰试验, 中重度高血脂样本 (500-1000mg/dL) 会影响实验结果。建议去除血脂干扰后再进行检测。

### 【产品性能指标】

本试剂盒的灵敏度为  $1 \times 10^3 \text{ IU/ml}$ , 线性范围为  $1 \times 10^3 \text{ IU/ml} \leq \text{HBV DNA} \leq 1 \times 10^8 \text{ IU/ml}$ 。