

受理号：CSZ1900358

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：二十项遗传性耳聋基因突变检测试剂盒
(飞行时间质谱法)

产品管理类别：三类 6840

申请人名称：广州市达瑞生物技术股份有限公司

国家药品监督管理局

医疗器械技术审评中心

目 录

基本信息.....	3
一、申请人名称	3
二、申请人住所	3
三、生产地址	3
技术审评概述.....	4
一、产品概述.....	4
二、临床前研究概述	7
三、临床评价概述	16
四、产品收益风险判定	18
综合评价意见	20

基本信息

一、申请人名称

广州市达瑞生物技术股份有限公司

二、申请人住所

广州市高新技术产业开发区荔枝山路 6 号自编 2 号 404

三、生产地址

广州高新技术产业开发区荔枝山路 6 号，1 号楼 4 楼
401-408 室；2 号楼 1 楼、4 楼

技术审评概述

一、产品概述（一）产品主要组成成分

产品主要组成成分见下表：

试剂盒 分类	试剂名称	规格	数量	试剂组分
检测试剂盒	多重 PCR 缓冲液	150 μL /管	1 管	三羟甲基氨基甲烷盐 酸盐、氯化钾、水
	氯化镁缓冲液	120 μL /管	1 管	Mg^{2+} (镁离子)、 Cl^{-} (氯离子)，水
	dNTP 混合物	50 μL /管	1 管	水、脱氧核糖核苷酸
	D20 PCR 引物混合物	120 μL /管	1 管	20 对寡核苷酸混合物
	多重 PCR 酶	30 μL /管	1 管	高保真 DNA 聚合酶、 甘油
	D20 阳性质控品	10 μL /管	1 管	GJB2: 235delC 杂合型 基因组 DNA，浓度为 15ng/ μL
	D20 多位点阳性 质控品	10 μL /管	1 管	水、GJB2: 176_191del16 突变、 GJB3: 538C>T 突变、

试剂盒 分类	试剂名称	规格	数量	试剂组分
				SLC26A4: 2168A>G 突变、12S rRNA: m. 1555A>G 突变质粒, 浓度约为 4.56×10^9 copies
	D20 阴性质控品	10 μ L/管	1 管	GJB2、GJB3、SLC26A4、12S rRNA 野生型基因组 DNA, 浓度为 15ng/ μ L
	磷酸酶缓冲液	100 μ L / 管	1 管	水、氯化镁、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐
	磷酸消化酶	38 μ L/管	1 管	虾碱性磷酸酶、甘油
	延伸缓冲液	100 μ L / 管	1 管	水、硫酸铵、氯化钾、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐
	D20 延伸引物混合物	115 μ L/管	1 管	20 条寡核苷酸混合物
	延伸终止混合液	26 μ L/管	1 管	水、双脱氧核糖核苷酸

试剂盒 分类	试剂名称	规格	数量	试剂组分
	反应催化酶	9 μ L/管	1 管	水、丙三醇、氯化钾、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐、乙二醇四乙酸、二硫苏糖醇、高特异性扩增聚合酶
芯片试剂盒	脱盐树脂	9 g/瓶	1 瓶	阳离子交换树脂
	质谱芯片	96 孔/张	1 张	硅衬底、3-羟基-2-吡啶甲酸、2-吡啶甲酸

试剂盒具体组成成分、配套试剂及软件见说明书。

（具体内容详见产品说明书）

（二）产品预期用途

本产品用于定性检测人外周全血样本中人基因组 DNA 中 4 个遗传性耳聋相关基因的 20 个突变位点，包括 GJB2 上的 35 del G、176_191 del16、235 del C、299_300 del AT、167delT，GJB3 上的 538C>T、547G>A，SLC26A4 上的 IVS7-2A>G、2168A>G、281C>T、589G>A、1174A>T、1226G>A、1229C>T、IVS15+5G>A、1975G>C、2027T>A、2162C>T，和线粒体 12S rRNA 上的 m.1555A>G、m.1494C>T。

本产品用于遗传性耳聋的辅助诊断。本产品的检测结果仅代表对相关位点的检测，不能作为患者是否有遗传性耳聋倾向的诊断和排除的唯一指标，检测结果仅供临床医生参考，如需确诊病例，请结合临床症状及其他检测手段综合进行评估，检测结果不得作为临床诊治的唯一标准。

(三) 产品包装规格

96 人份/盒

(四) 产品检验原理

根据所选择的多态性位点设计多重 PCR 特异性扩增引物和延伸引物，PCR 反应扩增包含多态性位点的基因序列，特异延伸引物在 SNP 位点上延伸 1 个碱基，样本经特定处理后与芯片基质共结晶，瞬时纳秒 ($10^{-9}s$) 强激光激发，基质将吸收的激光脉冲能量转移给待分析样本，按质荷比加以分离。离子捕获仪收集并储存脉冲信号，并对其进行质谱分析，通过比较 A、T、G 和 C 的信号强度及毗邻信号间质量的差异 ($ddATP=271.2Da$, $ddCTP=247.2Da$, $ddGTP=287.2Da$, $ddTTP=327.1Da$) 可得出模板序列的信息。

二、临床前研究概述

(一) 主要原材料

1. 主要原材料的选择

本产品在制备过程中主要原材料包括检测试剂中的多重 PCR 缓冲液、氯化镁缓冲液、dNTP 混合物、PCR 引物、

多重 PCR 酶、磷酸酶缓冲液、磷酸消化酶、延伸缓冲液、延伸引物、延伸终止混合液、反应催化酶、D20 阳性质控品、D20 多位点阳性质控品、D20 阴性质控品；芯片试剂中的脱盐树脂和质谱芯片等。

主要原材料中 D20 阳性质控品为含 GJB2: 235delC 突变杂合体的基因组 DNA；D20 多位点阳性质控品为含 GJB2: 176_191del16 突变、GJB3: 538C>T 突变、SLC26A4: 2168A>G 突变、12S rRNA: m.1555A>G 突变位点的质粒，由申请人设计后由专业的合成公司合成；D20 阴性质控品为本试剂盒检测范围内 20 个位点野生型的基因组 DNA；PCR 引物、延伸引物为申请人自行设计后由专业的合成公司合成；其余主要原材料均为外购方式获得。申请人选择有资质的供应商提供原料，通过功能性试验筛选出最佳原材料和供应商，制定了各主要原材料质量要求并经检验合格。

2.企业参考品和质控品设置情况

企业参考品包括阳性参考品、阴性参考品、检测限参考品和重复性参考品。

阳性参考品共 23 份，涵盖该产品可检出的所有突变类型。其中，17 份由对应的型别突变的全血基因组 DNA 制备而成，6 份由对应的突变型质粒 DNA 和野生型人类基因组 DNA 按拷贝数混合制备而成；阴性参考品 10 份，其中 3 例

由试剂盒检测范围内 20 个位点野生型全血样本基因组 DNA 制备而成, 4 例由地贫突变位点全血样本基因组 DNA 制备而成, 3 例由试剂盒检测范围外的人耳聋基因突变全血样本基因组 DNA 制备而成; 最低检测限参考品 23 份, 涵盖该产品可检出的所有突变类型。其中, 15 份由对应的型别突变的全血基因组 DNA 制备而成, 2 份由野生型人基因组 DNA 和相应型别突变全血基因组 DNA 制备而成, 6 份由对应的突变型质粒 DNA 和野生型人类基因组 DNA 按拷贝数 1:1 混合制备而成; 重复性参考品 3 份, 由对应的型别突变的全血基因组 DNA 制备而成。

试剂盒包含 2 份阳性质控品和 1 份阴性质控品, 用于检测过程的质量控制。其中, D20 阳性质控品由一定浓度的 GJB2: 235delC 杂合型基因组 DNA 组成, D20 多位点阳性质控品由重组质粒组成, 阴性质控品由试剂盒检测范围内 20 个位点野生型的基因组 DNA 制备而成。

(二) 生产工艺及反应体系研究

申请人对试剂盒反应体系的研究中包括: 多重 PCR 酶用量的优化、PCR 扩增条件优化、多重 PCR 引物浓度、优化磷酸消化酶的用量和反应时长、延伸反应中酶的用量优化、优化延伸引物的用量、延伸终止混合液用量的优化、延伸反应循环数的优化、脱盐树脂用量的优化、样品点样体积的优化、

激光脉冲次数的优化、样本类型、样本采集、保存及运输、核酸模板用量初步研究、质控体系的建立、实验结果的判定标准研究。

通过功能性实验，最终确定了最佳的反应体系。申请人根据试剂盒中试剂及组件的主要生产工艺的研究结果，确定了最佳的生产工艺。

(三) 分析性能评估

本产品分析性能包括准确性、精密度、重复性、分析特异性、抗干扰以及核酸提取试剂的性能评估。

1. 准确性研究

阴阳性参考品符合率评估中，分别使用三个批次的试剂盒对企业阴/阳性参考品在适用机型上进行检测，检测结果为阳性符合率 100%、阴性符合率 100%。

2. 精密度

在运行间、日间、人员间、仪器间和批间精密度符合率评估中，申请人在适用机型上使用连续生产的三批试剂盒对外周血样本（已涵盖不同基因的不同突变类型）进行检测，检测结果的分子量的 ANOVA 方差分析的显著性 P 均大于 0.05 且均为相应型别，符合率均为 100%。

重复性评估中，申请人在适用机型上使用连续生产的三批试剂盒对稀释到检测限浓度的3份重复性参考品进行重复检测10次，检测结果表明重复性和批间差均满足技术要求规定的性能指标要求。

临床样本精密度评估中，申请人在适用机型上使用连续生产的三批试剂盒对外周血进行重复检测3次，三个批次试剂盒对样本进行重复三次的检测结果均为相应型别，结果符合率100%。

最低检出限浓度水平的精密度评估中，申请人在适用机型 DR MassARRAY 上使用连续生产的三批试剂盒对稀释至最低检测限浓度水平的外周血进行重复检测3次，三个批次试剂盒对样本进行重复三次的检测结果均为相应型别，结果符合率100%。

3. 分析特异性

申请人使用试剂盒对分别加入了不同梯度潜在干扰物质（胆红素、甘油三酯、血红蛋白、链霉素和阿米卡星）的外周全血（原浓度及稀释至最低检测限浓度水平浓度）提取的DNA在适配机型上进行检测。结果显示当样本中胆红素浓度 $\leq 0.32\text{mg/mL}$ 、甘油三酯体积比 $\leq 5\%$ 、血红蛋白浓

度 $\leq 18\text{mg/mL}$ 和链霉素浓度 $\leq 15\text{g/mL}$ 和阿米卡星浓度 $\leq 15\mu\text{g/mL}$ 的范围内时, 均不干扰本试剂盒的检测结果, 且不影响试剂盒对最低 DNA 浓度 ($2.5\text{ng}/\mu\text{L}$) 样本的检测结果。

在靶突变最低检出限浓度水平样本的干扰研究评估中, 申请人使用连续生产的三批试剂盒对稀释至最低检测限浓度水平的含不同潜在干扰物质 (胆红素、甘油三酯、血红蛋白、链霉素和阿米卡星) 的样本进行重复检测 3 次, 本试剂盒可以准确地检测出样本的相应类型, 说明外周全血样本胆红素浓度 $\leq 0.32\text{mg/mL}$ 、甘油三酯体积比 $\leq 5\%$ 、血红蛋白浓度 $\leq 18\text{mg/mL}$ 、链霉素浓度 $\leq 15\text{g/mL}$ 和阿米卡星 $\leq 15\mu\text{g/mL}$ 范围内时, 不影响试剂盒对最低 DNA 浓度 ($2.5\text{ng}/\mu\text{L}$) 样本的检测结果。

GJB3 基因突变样本的干扰评估中, 申请人使用试剂盒对分别加入了不同梯度潜在干扰物质 (胆红素、甘油三酯、血红蛋白、链霉素和阿米卡星) 的干扰样本 (检测试剂盒范围内 2 例 GJB3 耳聋基因突变阳性外周全血样本) 在适配机型 DR MassARRAY 上进行检测。结果显示当样本中胆红素浓度 $\leq 0.32\text{mg/mL}$ 、甘油三酯体积比 $\leq 5\%$ 、血红蛋白浓度 $\leq 18\text{mg/mL}$ 和链霉素浓度 $\leq 15\text{g/mL}$ 和阿米卡星浓度

≤15μg/mL 的范围内时，对该试剂盒 GJB3: 538C>T 突变杂合体 and GJB3: 547G>A 突变杂合体检测不造成干扰。

4. 最低检出限

最低检测限评估中，申请人设置了 3 个浓度梯度的人基因组 DNA，并对每个浓度的 DNA 样本进行重复检测 10 次，将具有 100%检出率的最低浓度设定为检测限。

在检测限测定评估中，申请人使用连续生产的三批试剂盒对稀释至最低检测限浓度水平的 23 份检测限参考品进行检测，检测结果显示检测限参考品符合率为 100%。

两种样本类型检测限评估中，申请人使用连续生产的三批试剂盒对稀释至最低检测限浓度水平的外周血（包含试剂盒检测范围外突变样本和其他遗传性疾病样本）进行检测，检测结果显示均为相应型别，结果符合率为 100%。

5. 提取试剂盒性能研究

针对核酸提取试剂性能研究，申请人采用临床样本平行

比较了不同厂家核酸提取或纯化试剂的提取性能，通过对比提取所得 DNA 的浓度和检测结果，最终确定广州市达瑞

生物技术股份有限公司的核酸提取或纯化试剂可以为该产品的配套提取试剂。

6. 其他性能研究

6.1 环境污染产生的可能性研究

为了验证试剂盒对环境产生污染的可能性，申请人在扩增室的五点处放置装有高压灭菌纯化水的培养皿，在第三天将所有培养皿中的水用提取试剂进行核酸提取，并使用连续生产的三批试剂盒进行检测，实验研究表明本试剂盒不会造成环境污染。

6.2 相邻峰检测结果的研究

相邻峰检测结果验证评估中，申请人使用连续生产的三批试剂盒对 GJB2: 235delC 及 SLC26A4: IVS7-2A>G 突变复合杂合体样本和 SLC26A4: IVS7-2A>G 野生型样本进行检测，检测结果发现对于峰位较近的位点，一个峰较高时对临近峰的结果判定是没有影响的。

6.3 不同靶板（芯片）孔间交叉污染研究

不同靶板（芯片）孔间交叉污染评估中，申请人在一个阴性质控周围设置了阳性质控，并使用连续生产的三批

试剂盒进行检测，检测结果显示均为相应型别，不同靶板（芯片）孔间不会造成检测结果交叉污染。

（四）阳性判断值

对于 20 个突变位点（GJB2 上的 35 del G、176_191 del16、235 del C、299_300 del AT、167delT，GJB3 上的 538C>T、547G>A，SLC26A4 上的 IVS7-2A>G、2168A>G、281C>T、589G>A、1174A>T、1226G>A、1229C>T、IVS15+5G>A、1975G>C、2027T>A、2162C>T，和线粒体 12S rRNA 上的 m.1555A>G、m.1494C>T），申请人使用受试者工作特征曲线（receiver operating characteristic curve，简称 ROC 曲线）通过已知检测结果的临床样本确定阳性判断值。当 20 个位点的野生型及突变型中至少一个峰的峰高 ≥ 2 时， $SNR \geq 3$ 时，则认为结果可靠，可进行下一步判定：根据突变型峰值/野生型峰值进行判定，如果峰高比 > 3 则判定为纯合突变（野生型峰值为 0 时，其峰高比接近无穷大，也符合该判定），如果 $0.5 \leq \text{峰高比} \leq 3$ ，则判读为杂合突变，其他情况（也就是如果 < 0.5 ），则判读为野生型。

为验证阳性判断值，申请人使用试剂盒对已知检测结果的临床样本进行检测。检测结果表明建立的阳性判断值能准确判断检测范围内的 20 个突变位点的突变状态。

(五) 稳定性研究

申请人对本产品的实时稳定性、开瓶稳定性、冻融稳定性、运输稳定性以及样本稳定性进行了研究，确定了在各种条件下本产品及样本的有效保存时间。

研究结果表明：检测试剂盒储存于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ ；芯片试剂盒储存于室温 $15\sim 30^{\circ}\text{C}$ ；本试剂盒在以上所述储存条件下的有效期为9个月。

本试剂盒允许开瓶12次，开瓶12次后可以保存8个月；反复冻融次数不超过12次，反复冻融12次后可保存6个月；在储存温度下，运输时间不应超过10天。

样本稳定性研究表明，EDTA抗凝管采集的外周全血样本置于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存时可以保存60天，在 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存时可以保存6年，冻融次数不超过4次。外周全血提取的DNA样本置于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 可以保存6个月。

三、临床评价概述

本产品依据《遗传性耳聋相关基因突变检测试剂注册技术审查指导原则》进行审评。申请人在广州医科大学附属第三医院、杭州市第一人民医院、广州市妇女儿童医疗中心、云南省第一人民医院、山东省第二人民医院和中山大学孙逸仙纪念医院共六家临床试验机构开展了临床试验。临床试验

采用考核试剂与对比方法进行比较研究，确认考核试剂的临床性能。

本次临床试验的适用人群为：临床听力检测异常、需进行耳聋基因检测辅助诊断的患者，以及有耳聋家族史的人群等。临床试验中，最终满足适用人群要求且符合研究方案的全血样本共 1201 例，共计 436 阳性样本，765 阴性样本。各突变位点的情况如下：

针对 GJB2 基因：c.35delG 突变 13 例，野生型 1188 例；c.176_191del16 突变 29 例，野生型 1172 例；c.235delC 突变 137 例，野生型 1064 例；c.299_300delAT 突变 36 例，野生型 1165 例；167delT 突变 2 例，野生型 1199 例。

针对 GJB3 基因：c.538C>T 突变 13 例，野生型 1188 例；c.547G>A 突变 11 例，野生型 1190 例。

针对 SLC26A4 基因：c.281C>T 突变 11 例，野生型 1190 例；c.589G>A 突变 11 例，野生型 1190 例；c.1174A>T 突变 21 例，野生型 1180 例；c.1226G>A 突变 21 例，野生型 1180 例；c.1229C>T 突变 26 例，野生型 1175 例；IVS15+5 G>A 突变 13 例，野生型 1188 例；c.1975G>C 突变 10 例，野生型 1191 例；c.2027T>A 突变 17 例，野生型 1184 例；c.2162 C>T 突变 5 例，野生型 1196 例；IVS7-2 A>G 突变 120 例，野生型 1081 例；c.2168A>G 突变 47 例，野生型 1154 例。

针对线粒体 12S rRNA 基因：m.1555A>G 突变 19 例，野生型 1182 例；m.1494C>T 突变 14 例，野生型 1187 例。

采用四格表总结考核试剂和对比方法的检测结果，计算突变型符合率、野生型符合率及总符合率，并计算其 95%置信区间。临床试验结果显示：与 Sanger 测序法相比，考核试剂检测范围内 20 个突变位点的突变型符合率为 100%（95%CI：0.99~1）、野生型符合率为 99.9%（95%CI：0.993~0.999）、总符合率为 99.9%（95%CI：0.996~0.999）；采用 Kappa 进行统计学分析，20 个突变位点的 Kappa 值为 0.99。结果表明考核试剂与 Sanger 测序法具有良好的检测一致性。

综上，该产品关键临床试验设计符合《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》要求，作为罕见病相关产品，基于现有临床试验数据，认为产品临床性能基本满足临床要求。

四、产品收益风险判定

根据申请人提供的申报资料，在目前认知水平上，认为该产品上市带来的获益/受益大于风险。

尽管目前认为该产品的受益大于风险，但为保证用械安全，基于对主要剩余风险的防控，已在产品说明书中提示以下信息：

1. 适用范围:

本产品用于定性检测人外周全血样本中人基因组 DNA 中 4 个遗传性耳聋相关基因的 20 个突变位点, 包括 GJB2 上的 35 del G、176_191 del16、235 del C、299_300 del AT、167delT, GJB3 上的 538C>T、547G>A, SLC26A4 上的 IVS7-2A>G、2168A>G、281C>T、589G>A、1174A>T、1226G>A、1229C>T、IVS15+5G>A、1975G>C、2027T>A、2162C>T, 和线粒体 12S rRNA 上的 m.1555A>G、m.1494C>T。

本产品用于遗传性耳聋的辅助诊断。本产品的检测结果仅代表对相关位点的检测, 不能作为患者是否有遗传性耳聋倾向的诊断和排除的唯一指标, 检测结果仅供临床医生参考, 如需确诊病例, 请结合临床症状及其他检测手段综合进行评估, 检测结果不得作为临床诊治的唯一标准。

2. 检验方法的局限性及注意事项: 产品说明书中介绍了该产品检验方法的局限性及使用中的注意事项。

综合评价意见

本申报项目为境内第三类医疗器械产品注册。本产品为用于罕见病的体外诊断试剂，申请人的注册申报资料基本符合现行要求，据《医疗器械监督管理条例》（国务院令 第 680 号）、《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）等相关医疗器械法规与配套规章，经系统评价后，建议准予注册，但申请人需在该产品上市后进一步完成以下工作：鉴于耳聋基因的突变位点属于罕见病，申请人提交的临床试验资料虽然覆盖了全部位点，但个别位点例数较少，经审评认为该产品基本满足临床使用要求，为进一步确认产品的临床性能，建议申请人在该产品上市后收集至少 5 家临床机构的临床数据，在下一次延续注册时提交：临床数据可为真实世界应用数据或临床试验数据；重点收集上市前临床试验中例数较少的突变位点；结合临床诊断结果或实验室检测结果等进行统计分析。该项临床资料内容应当符合《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》中关于临床试验报告的要求，并附数据表，由出具数据的各临床机构按法规要求签字签章。

2023 年 1 月 4 日

附件：产品说明书

二十项遗传性耳聋基因突变检测试剂盒（飞行时间质谱法）

说明书

【产品名称】

通用名称：二十项遗传性耳聋基因突变检测试剂盒（飞行时间质谱法）

【包装规格】

96 人份/盒

【预期用途】

本产品用于定性检测人外周全血样本中人基因组 DNA 中 4 个遗传性耳聋相关基因的 20 个突变位点，包括 GJB2 上的 35 del G、176_191 del16、235 del C、299_300 del AT、167delT，GJB3 上的 538C>T、547G>A，SLC26A4 上的 IVS7-2A>G、2168A>G、281C>T、589G>A、1174A>T、1226G>A、1229C>T、IVS15+5G>A、1975G>C、2027T>A、2162C>T，和线粒体 12S rRNA 上的 m.1555A>G、m.1494C>T。

本产品用于遗传性耳聋的辅助诊断。本产品的检测结果仅代表对相关位点的检测，不能作为患者是否有遗传性耳聋倾向的诊断和排除的唯一指标，检测结果仅供临床医生参考，如需确诊病例，请结合临床症状及其他检测手段综合进行评估，检测结果不得作为临床诊治的唯一标准。

耳聋是影响人类健康和造成人类残疾的常见疾病。我国 2006 年第二次全国残疾人抽样调查显示，听力残疾者 2780 万，占全国残疾人的 31%，其中 80 余万为 7 岁以下听障儿童。我国每年新生聋儿（不包括迟发性聋和药物性聋）人口大于 3 万，新生儿中耳聋的发病率为 1‰。耳聋病因约 50%患者是由于基因遗传的因素造成的，属于遗传性耳聋。影响它的基因主要包括 GJB2、GJB3、SLC26A4 等，这几个基因分别会导致先天性感音神经性耳聋、后天高频感音神经性耳聋、后天迟发性耳聋等。

【检验原理】

根据所选择的多态性位点设计多重 PCR 特异性扩增引物和延伸引物，PCR 反应扩增包含多态性位点的基因序列，特异延伸引物在 SNP 位点上延伸 1 个碱基，样本经特定处理后与芯片基质共结晶，瞬时纳秒 (10^{-9} s) 强激光激发，基质将吸收的激光脉冲能量转移给待分

析样本，按质荷比加以分离。离子捕获仪收集并储存脉冲信号，并对其进行质谱分析，通过比较 A、T、G 和 C 的信号强度及毗邻信号间质量的差异(ddATP=271.2Da, ddCTP=247.2Da, ddGTP=287.2Da, ddTTP=327.1Da) 可得出模板序列的信息。

【主要组成成分】

试剂盒分类	试剂名称	规格	数量	试剂组分
检测试剂盒	多重 PCR 缓冲液	150μL/管	1 管	三羟甲基氨基甲烷盐酸盐、氯化钾、水
	氯化镁缓冲液	120μL/管	1 管	Mg ²⁺ (镁离子)、Cl ⁻ (氯离子)，水
	dNTP 混合物	50μL/管	1 管	水、脱氧核糖核苷酸
	D20 PCR 引物混合物	120μL/管	1 管	20 对寡核苷酸混合物
	多重 PCR 酶	30μL/管	1 管	高保真 DNA 聚合酶、甘油
	D20 阳性质控品	10μL/管	1 管	GJB2：235delC 杂合型基因组 DNA，浓度为 15ng/μL
	D20 多位点阳性质控品	10μL/管	1 管	水、GJB2：176_191del16 突变、GJB3：538C>T 突变、SLC26A4：2168A>G 突变、12S rRNA：m.1555A>G 突变质粒，浓度约为 4.56*10 ⁹ copies
	D20 阴性质控品	10μL/管	1 管	GJB2、GJB3、SLC26A4、12S rRNA 野生型基因组 DNA，浓度为 15ng/μL
	磷酸酶缓冲液	100μL /管	1 管	水、氯化镁、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐
	磷酸消化酶	38μL/管	1 管	虾碱性磷酸酶、甘油
	延伸缓冲液	100μL /管	1 管	水、硫酸铵、氯化钾、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐
	D20 延伸引物混合物	115μL/管	1 管	20 条寡核苷酸混合物
	延伸终止混合液	26μL/管	1 管	水、双脱氧核糖核苷酸
	反应催化酶	9μL/管	1 管	水、丙三醇、氯化钾、三羟甲基氨基

试剂盒分类	试剂名称	规格	数量	试剂组分
				基甲烷盐酸盐、乙二胺四乙酸、二硫苏糖醇、高特异性扩增聚合酶
芯片试剂盒	脱盐树脂	9g/瓶	1 瓶	阳离子交换树脂
	质谱芯片	96 孔/张	1 张	硅衬底、3-羟基-2-吡啶甲酸、2-吡啶甲酸

注：1）不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。

2）自备试剂：分析纯无水乙醇，高压灭菌纯化水，核酸提取或纯化试剂（备案号：粤穗械备 20160260 号，货号 DR-HS-A004）。

3）自备耗材：96 孔板（使用 Axygen 公司的 96 孔无裙边 PCR 板，货号：PCR-96-FLT-C），封口膜（使用 Thermo 公司的 PCR 封口膜，货号：AB-0558）。

4）配套软件：飞行时间质谱检测系统随机软件（广州市达瑞生物技术股份有限公司，版本号：1.0.0）

【储存条件及有效期】

检测试剂盒储存于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ ；芯片试剂盒储存于室温 $15\sim 30^{\circ}\text{C}$ ；本试剂盒在以上所述储存条件下的有效期为 9 个月。

本试剂盒允许开瓶 12 次，开瓶 12 次后可以保存 8 个月；反复冻融次数不超过 12 次，反复冻融 12 次后可保存 6 个月；在储存温度下，运输时间不应超过 10 天。

试剂盒生产日期和失效日期见产品包装标签。

【适用仪器】

1. 飞行时间质谱检测系统，型号：DR MassARRAY；
2. 核酸扩增仪。

【样本要求】

1. 样本类型：外周血。
2. 样本采集：

外周全血：用采血管（EDTA 抗凝）采集不少于 0.5mL 外周全血，采集完毕后，轻柔颠倒采血管 4 次并及时将采血管放置于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存，保存时间不超过 60 天。

3. 储存：外周血样本可于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 储存，建议冻融次数不超过 4 次，可储存 6 年。

【检验方法】

1. DNA 提取

建议使用广州市达瑞生物技术股份有限公司的核酸提取或纯化试剂（备案号：粤穗械备 20160260 号，货号 DR-HS-A004）提取 DNA，具体操作可根据核酸提取试剂盒说明书进行。提取的 DNA 可置于 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存，储存时间应不超过 6 个月。

2. PCR 扩增

2.1 体系配制

1) 将 PCR 试剂取出，多重 PCR 酶放在冰上，其他试剂放在常温下溶解。根据检测样本数目，按下表配制 PCR 反应体系，然后将试剂放回到 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存：

组分	反应体积 $1 \times (\mu\text{L})$
高压灭菌纯化水	0.80
多重 PCR 缓冲液	0.50
氯化镁缓冲液	0.40
dNTP 混合物	0.10
D20 PCR 引物混合物	1.00
多重 PCR 酶	0.20
DNA	2.00
反应体系总量	5.00

2) 在 1.5mLPCR 管上注明项目名称及配制时间；

3) 将 PCR 反应总体系的各组分（DNA 除外），按照项目所需的量添加到 1.5mLPCR 管中，配制成 PCR 反应混合物；

4) 将 1.5mLPCR 管放到振荡器上震荡、混匀，瞬时离心。

2.2 将反应体系加入 96 孔板

1) 按 $3 \mu\text{L}$ /孔的量加入 PCR 反应混合物到 96 孔板相应的孔内；

2) 按 $2 \mu\text{L}$ /孔的量加入相应的 DNA 样本到 96 孔板相应的孔内，并用膜将 96 孔板封住；

3) 96 孔板放到振荡器上震荡混匀，震荡时用手按住 96 孔板；

4) 将 96 孔板瞬时离心；

5) 上 PCR 仪进行扩增反应，设置反应条件如下：

95 $^{\circ}\text{C}$	2 分钟	} 45 循环
95 $^{\circ}\text{C}$	30 秒	
56 $^{\circ}\text{C}$	30 秒	

72C° 1 分钟

72C° 5 分钟

4C° 保存

6) 反应结束后，从 PCR 仪拿出，将 96 孔板 2000rpm 瞬时离心。

3. 去 dNTPs 反应

3.1 将试剂取出，磷酸消化酶放到冰上，其它试剂于常温下融化。按下表配制反应体系，配完后将试剂放回-20±5C°保存：

组分	反应体积 1× (μL)
高压灭菌纯化水	1.53
磷酸酶缓冲液	0.17
磷酸消化酶	0.30
反应体系总量	2.00

3.2 向 96 孔板每孔加 2μL 体系，加完后，换一张新的膜将 96 孔板封住；

3.3 96 孔板放到震荡器上震荡，震荡时用手按住 96 孔板；

3.4 将 96 孔板瞬时离心；

3.5 上 PCR 仪进行反应，反应条件如下：

37C° 40 分钟

85C° 5 分钟

4C° 保存

3.6 反应结束后，2000rpm 瞬时离心 96 孔板。

4. 延伸反应

4.1 将延伸反应的试剂取出，反应催化酶放到冰上，其它试剂于常温下融化。根据检测样本数，配制延伸反应体系，如下：

组分	反应体积 1× (μL)
高压灭菌纯化水	0.619
延伸缓冲液	0.200
延伸终止混合液	0.200
D20 延伸引物混合物	0.940

反应催化酶	0.041
反应体系总量	2.000

4.2 每孔加 2 μ L 体系，加完后，换一张新的膜将 96 孔板封住；

4.3 用手按住 96 孔板，放到震荡器上震荡；

4.4 将 96 孔板 1000 rcf 瞬时离心；

4.5 上 PCR 仪进行反应，反应条件为：

95C°	30 秒		
95C°	5 秒		
52C°	5 秒	} 5 循环	} 40 循环
80C°	5 秒		
72C°	3 分钟		
4C°	保存。		

4.6 反应结束后，2000rpm 瞬时离心；

4.7 每孔加入 41 μ L 的高压灭菌纯化水（此时每孔内的总体积应为 50 μ L），加完后，换一张新的膜将 96 孔板封住；

4.8 96 孔板放到震荡器上震荡，震荡时用手按住 96 孔板，混匀后 2000rpm 瞬时离心。

5. 质谱检测

5.1 打开“板管理系统”软件，编辑实验计划文件，包括样本的位置，样本名称和所用的引物，连接质谱仪与所建立的实验计划文件。

5.2 点 Start All 图标，启动软件，并检查各项指示灯是否正常。

5.3 点击“芯片托盘进入/退出”按钮，把芯片放在托盘上，再放到芯片甲板上，记录芯片的位置（左边记为 1，右边记为 2）。手不要触及芯片表面；将 96 板放到标有 MTP1/2 的位置，按 A₁ 在左下角的方向放，固定好；芯片第一次使用时，在标准品槽内加入 75 μ L 的标准品，芯片非第一次使用时不需添加标准品。然后再点击“芯片托盘进入/退出”按钮，关闭夹板。

5.4 点击“添加/维持树脂”按钮，打开树脂槽，添加树脂或者补充高压灭菌纯化水（A.第一次使用时把 9g 树脂全部倒入树脂槽内，并加入 5.2mL 高压灭菌纯化水，用枪头混匀。B.非第一次使用时，需观察液面，若水的液面低于树脂面，则应补充适量的高压灭菌纯化水，使得水的液面高于树脂面。C.树脂溶液加入树脂槽后，需尽快使用，且不能放置超过

30 天。)

5.5 程序设置参数如下：

①实验设置	实验名称	选择所编辑的实验计划文件
	分析的孔	自动
	使用自动调节	☒
	启动点样状态	750
	树脂体积(μL)	10
	样本体积(nL)	12
②分析设置	激光脉冲[次]	20
	最大采集次数	9
	最少优质光谱次数	5
	最多优质光谱次数	5
	质谱分析结束后自动关闭电源	☒
	分析校准样品	芯片第一次使用： ☒ 非第一次使用： ☐
③芯片点样设置	标准操作（所有选项打开）	芯片第一次使用： ☒ 非第一次使用： ☐
	在芯片上点标准品	☐
	添加树脂到板 1	☒
	添加树脂到板 2	☐
	转移样本到芯片上	☒
	转移芯片到分析仪	☒
	分析芯片	☒
	冷却板	☒
	设定值 (C°)	14

5.6 打完质谱后，点击“从分析仪上移走旧芯片”按钮，把芯片退回芯片甲板上，然后点击“芯片托盘进入/退出”按钮，取出 96 孔板，封膜后于-20±5C°保存；将芯片装回包装盒内并置于除湿器内保存(芯片开启后需尽快使用，保存时间不要超过 30 天)，回收标准品于-20±5C°保存，然后点击“芯片托盘进入/退出”按钮，关闭夹板。

备注：标准品为仪器自带。

6. 质控标准

6.1 D20 阳性质控品：检测结果应为 GJB2：235delC 突变杂合体。

6.2 D20 多位点阳性质控品：检测结果应为 GJB2：176_191del16 突变纯合体、GJB3：538C>T 突变纯合体、SLC26A4：2168A>G 突变纯合体、12S rRNA：m.1555A>G 突变纯合体。

6.3 D20 阴性质控品：检测结果应为 20 个位点野生型。

以上 6.1、6.2 和 6.3 需要同时满足，且检出峰的分辨率 ≥ 750 ，信噪比 $SNR \geq 3$ ，否则需要重新进行实验。

7. 结果分析

根据飞行时间质谱检测系统（型号：DR MassARRAY，厂商：广州市达瑞生物技术股份有限公司，注册证号：粤械注准 20182220875）随机软件（版本号：1.0.0）的数据进行分析，得到每个样本的 20 个基因位点的质谱结果分型峰图峰高，根据参考值范围进行结果判断。20 个基因位点的分子量和基因型情况如下表：

基因	SNP ID	突变型别	基因型 1	基因型 1 分子量 (Da)	基因型 2	基因型 2 分子量 (Da)
SLC26A4	rs111033318	2027T>A	T	4713.10	A	4769.00
GJB2	rs80338943	235delC	DEL	4873.20	C	4913.20
SLC26A4	rs200455203	1975G>C	C	5048.30	G	5088.40
SLC26A4	rs111033305	1226G>A	A	5288.50	G	5304.5
GJB3	rs74315319	538C>T	C	5408.60	T	5488.50
GJB2	rs750188782	176_191del 16	GCTGCAA GAACGTG TG	5874.90	DEL	5930.80
12S rRNA	rs267606617	m.1555A> G	G	6000.90	A	6080.90
SLC26A4	rs121908363	2162C>T	C	6049.00	T	6128.90
GJB2	rs111033204	299_300del AT	AT	6240.10	DEL	6256.10
SLC26A4	SLC26A4_281	281C>T	C	6410.20	T	6490.10
GJB2	rs80338942	167delT	DEL	6589.30	T	6629.20

GJB3	rs74315318	547G>A	G	7026.60	A	7106.50
12S rRNA	rs267606619	m.1494C>T	C	7186.70	T	7266.60
SLC26A4	rs111033380	589G>A	G	7564.00	A	7643.90
SLC26A4	rs192366176	IVS15+5G>A	G	7961.30	A	8041.20
SLC26A4	rs111033313	IVS7-2A>G	A	8159.40	G	8175.40
SLC26A4	rs201562855	1174A>T	A	8272.40	T	8328.30
SLC26A4	rs111033220	1229C>T	T	8714.70	C	8730.70
GJB2	rs80338939	35delG	G	8793.8	DEL	8817.8
SLC26A4	rs121908362	2168A>G	G	8904.8	A	8984.7

【阳性判断值】

当 20 个位点的野生型及突变型中至少一个峰的峰高 ≥ 2 时，SNR ≥ 3 时，则认为结果可靠，可进行下一步判定：

根据突变型峰值 / 野生型峰值进行判定，如果峰高比 > 3 则判定为纯合突变（野生型峰值为 0 时，其峰高比接近无穷大，也符合该判定），如果 $0.5 \leq \text{峰高比} \leq 3$ ，则判读为杂合突变，其它情况（也就是如果 < 0.5 ），则判读为野生型。

当 20 个位点中任一位点的野生型及突变型峰值均 < 2 时，建议该样本重新检测。

【检验结果的解释】

- 1.若检测样本的 20 个位点质谱结果峰图中，所有位点野生型及突变型中至少一个峰的峰高 ≥ 2 且突变型峰高/野生型峰高 ≥ 0.5 时，则提示该样本存在相应基因突变，需要进一步的临床诊断。
- 2.若检测样本的 20 个位点质谱结果峰图中，所有位点野生型及突变型中至少一个峰的峰高 ≥ 2 且突变型峰高/野生型峰高 < 0.5 时，则提示该样本为耳聋基因突变阴性，不存在在本试剂盒检测范围内的耳聋基因突变位点。
- 3.若检测样本的 20 个位点中任一位点的野生型及突变型峰高均 < 2 时，建议该样本重新检测。
4. 请结合临床诊断信息（如初步确诊为耳聋患者、药物敏感性个体、疑似病例），对检出突变的检测结果进行解读。例如应结合听力检查和影像学检查结果等，向具有资质的单位进行遗传咨询和康复指导。

【检验方法的局限性】

- 1.本试剂盒只用于体外检测,检测结果仅供临床参考,不能单独作为确诊或排除病例的依据。
- 2.样本检测结果与样本收集、处理、运送及保存质量有关,其中任何失误都将会导致假阴性结果;如果标本处理时没有控制好交叉污染,可能出现假阳性结果。
- 3.未在本试剂盒检测范围内的其他突变型别无法检测。
- 4.该产品不能涵盖与遗传性耳聋相关的全部位点,未检出突变不能排除携带其他突变位点。
- 5.对于样本浓度过低或未按照要求保存的样本,可能出现扩增效率较差,即质谱峰高<2时,样本重新检测的情况。

【产品性能指标】

- 1.检测限:检测限参考品(浓度为2.5ng/μL)检测结果均为相应型别,符合率为100%。
- 2.准确度:阳性参考品检测结果均为对应型别的阳性,阴性参考品检测结果均为阴性,本试剂盒准确度为100%。
- 3.特异性:检测野生型人类基因组DNA参考品及其他基因突变(GJB2 c.512_513insAACG、SLC26A4 c.1804-6G>A、SLC26A4 c.812A>G及地贫α、β基因突变)干扰检测结果均为阴性,本试剂盒特异性为100%。
- 4.重复性:重复10次检测3例重复性参考品,检测结果都为相应型别,符合率为100%。
- 5.干扰性实验:样本的胆红素浓度≤0.32mg/mL、甘油三酯体积比≤5%、血红蛋白浓度≤18mg/mL和链霉素浓度≤15g/mL和阿米卡星浓度≤15ug/mL的范围内时,均不干扰本试剂盒的检测结果。
- 6.单基因遗传病α、β地贫、血友病、G6PD缺乏症、苯丙酮尿症、肝豆状核变性不会影响本试剂盒的检测效果,可被正确检出相应型别。
- 7.采用本试剂盒检测含有其他耳聋基因突变位点(如SLC26A4 c.1804-6G>A、SLC26A4 c.812A>G、SLC26A4 c.754T>C、SLC26A4 c.2086C>T、GJB2 c.512_513insAACG、GJB2 c.109G>A、GJB3 c.250G>A、12SrRNA m.1503G>A等)的样本,试剂盒检测范围内的位点均能正确检出相应型别。
- 8.本试剂盒检测结果不受仪器、人员、试剂批次的影响,不同靶孔之间不存在交叉污染。
- 9.临床试验:在6家临床试验单位共入组外周全血有效检测样本数为1201例,与对比方法对比,突变位点的突变型符合率为100%、野生型符合率为99.9%、总符合率为99.9%。

【注意事项】

- 1.本试剂盒用于体外检测,实验前请仔细阅读本说明书,请在有效期内使用。
- 2.本试剂盒建议使用一次性耗材,以防止污染。本试剂盒使用过程中,建议使用带滤芯吸头。

3.为了避免样本中任何潜在的生物危险,检测样本应视为具有传染性物质,避免接触到皮肤和粘膜;样本的处理建议在可防止气雾外流的生物安全柜中操作,操作中使用的试管、吸头丢弃前需经灭菌处理。标本操作和处理均需符合相关法规要求:卫生部《病原微生物实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。

4.实验人员必须进行专业培训,严格按照说明书操作,按照实验过程严格分区进行,实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备,各区各阶段用品不能交叉使用。

5.按要求进行防护措施,如手套、工作服,废弃物等处理,需要符合国家相关规定。

【标识的解释】



怕雨



向上



怕晒

【参考文献】

1.HuX.,et al.,Mutational analysis of the SLC26A4 gene in Chinese sporadic nonsyndromic hearing-impaired children.Int J Pediatr Otorhinolaryngol,2012,76(10):p.1474-80.

2.Li,S.X.,et al.,Cordblood-Based High-Throughput Screening for Deafness Gene of 646 Newborns in Jinan Area of China.Clin Exp Otorhinolaryngol,2015,8(3):p.211-7.

3.Ma,D.,et al.,Genetic counseling for patients with nonsyndromic hearing impairment directed by gene analysis.Mol Med Rep, 2016(1791-3004 (Electronic)).

4.Svidnicki,M.C.,et al.,Screening of genetic alterations related to non-syndromic hearing loss using MassARRAY iPLEX(R) technology. BMC Med Genet, 2015(1471-2350 (Electronic)).

5.Wei,Q.,et al.,Genetic mutations of GJB2 and mitochondrial 12S rRNA in nonsyndromic hearing loss in Jiangsu Province of China. J Transl Med, 2013. 11(1479-5876 (Electronic)): p. 163.

6.Guaran,V.,et al.,Association between idiopathic hearing loss and mitochondrial DNA mutations:a study on 169 hearing-impaired subjects. Int J Mol Med, 2013,32(1791-244X (Electronic)):p.10.

7.刘丹,et al,4023 例新生儿耳聋基因线粒体 12S rRNA 突变的研究.中国优生与遗传杂志,2014,22(12):p.76-77.

8.崔庆佳,et al,GJB2、SLC26A4 基因相关耳聋儿童的听力损失特点分析.听力学及言语疾病杂志,2014,22(2):120-123.

9.马琳,et al,我国常见耳聋基因及其在临床预防和阻断耳聋中的应用.中国优生与遗传杂

志,2015,23(1):126-127(111).

10. 韩德民, 新生儿听力及耳聋基因联合筛查. 中国医学文摘耳鼻咽喉科学,2012,27(6):p.290-292.

11. 孙莉莉,et al, 耳聋基因诊断及其在遗传性耳聋预防和阻断中的应用研究. 中国产前诊断杂志(电子版),2011,3(2):p32-36.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：广州市达瑞生物技术股份有限公司

住所：广州市高新技术产业开发区荔枝山路 6 号自编 2 号 404

联系方式：

电话：；传真：

网址：；邮编：

售后服务单位名称：

联系方式：

电话：；传真：

网址：；邮编：

生产地址：广州高新技术产业开发区荔枝山路 6 号，1 号楼 4 楼 401-408 室；2 号楼 1 楼、4 楼

生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准日期及修改日期】



医课汇
公众号
专业医疗器械资讯平台
WECHAT OF
HLONGMED



hlongmed.com
医疗器械咨询服务
MEDICAL DEVICE
CONSULTING
SERVICES



医课培训平台
医疗器械任职培训
WEB TRAINING
CENTER



医械宝
医疗器械知识平台
KNOWLEDG
ECENTEROF
MEDICAL DEVICE



MDCPP.COM
医械云专业平台
KNOWLEDG
ECENTEROF MEDICAL
DEVICE