

受理号：CSZ2200341

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：BMPIR1A/PLAC8 基因甲基化检测试剂盒（数字 PCR 法）

产品管理类别：第三类

申请人名称：广州优泽生物技术有限公司

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.....	6
三、 临床评价概述.....	12
四、 产品受益风险判定.....	13
综合评价意见.....	16

基本信息

一、申请人名称

广州优泽生物技术有限公司

二、申请人住所

广州国际生物岛螺旋三路 6 号第三层 303 单元

三、生产地址

广州市黄埔区科学城瑞和路 79 号瑞博奥大楼 I 期 5 楼 502
房/广州国际生物岛螺旋三路 6 号第三层 303 单元

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

表 1. 产品主要组成成分

A 盒			
组分	主要成分	24 人份/盒	48 人份/盒
转化液	亚硫酸氢铵	1.5mL×3 管	1.5mL×6 管
结合液	盐酸胍	15mL×1 瓶	15mL×2 瓶
洗涤液	纯化水	2.5mL×1 瓶	2.5mL×2 瓶
纯化液	异丙醇、乙醇、氢 氧化钠	5.5mL×1 瓶	5.5mL×2 瓶
洗脱液	TE 溶液	0.7mL×1 瓶	0.7mL×2 瓶
微滴发生 油	矿物油	3.5mL×1 瓶	3.5mL×2 瓶
滤柱	-	24 个×1 包	24 个×2 包
收集管	-	24 个×1 包	24 个×2 包

B 盒			
组分	主要成分	24 人份/盒	48 人份/盒

预混液	dNTPs, 2×PCR Buffer, 聚合酶	550μL×1 管	550μL×2 管
阳性对照	肝癌细胞系 DNA	100μL×1 管	100μL×2 管
阴性对照	非肝癌细胞系 DNA	100μL×1 管	100μL×2 管
引物 1-F	寡聚核苷酸片段	25μL×1 管	25μL×2 管
引物 1-R	寡聚核苷酸片段	25μL×1 管	25μL×2 管
探针 1-M	FAM 标记寡聚核苷酸 片段	8μL×1 管	8μL×2 管
探针 1-NM	HEX 标记寡聚核苷酸 片段	8μL×1 管	8μL×2 管
引物 2-F	寡聚核苷酸片段	25μL×1 管	25μL×2 管
引物 2-R	寡聚核苷酸片段	25μL×1 管	25μL×2 管
探针 2-M	FAM 标记寡聚核苷酸 片段	8μL×1 管	8μL×2 管
探针 2-NM	HEX 标记寡聚核苷酸 片段	8μL×1 管	8μL×2 管

(二) 产品预期用途

本试剂盒用于体外定性检测人血清中游离 DNA (cfDNA) 中的 BMP1A 和 PLAC8 基因甲基化水平。

本产品适用于临床上对疑似原发性肝细胞癌、混合型癌的辅助诊断，包括临床肝区影像学检查和既有临床检查怀疑肝区占位性病变的患者，检测结果阳性不作为肝癌临床确诊的唯一依据，检测结果阴性也不能排除肝癌的可能。该检测不能作为肝癌早期诊断或确诊的依据，不宜用于普通人群的肿瘤筛查。

(三) 产品包装规格

24 人份/盒、48 人份/盒。

(四) 产品检验原理

提取血清中的游离 DNA，然后用亚硫酸盐转化在机体内未发生甲基化的胞嘧啶，通过脱氨基反应产生尿嘧啶磺酸盐，在机体内已经发生甲基化的胞嘧啶不会被亚硫酸盐转化。将亚硫酸盐转化的 DNA 做数字 PCR 扩增，反应中的引物探针能区分靶基因甲基化和非甲基化序列。应用数字 PCR 对甲基化和非甲基化微滴进行检测，读取 FAM 与 HEX 荧光通道下产生荧光的液滴数量。使用生成的靶基因甲基化和非甲基化微滴数量计算甲基化率，根据甲基化率判断样本的阴阳性。

二、临床前研究概述

(一) 主要原材料

1. 主要原材料的选择

该产品的主要原材料包括预混液、引物和探针、肝癌细胞系（Huh-7）基因组 DNA 和正常细胞系（WBC）基因组 DNA。这些原料均是通过外购的方式获得。

其中引物的序列均由申请人自行设计，由合成公司经过合成、修饰、纯化方式获得；预混液由供应商化学合成、克隆表达后获得；肝癌细胞系（Huh-7）基因组 DNA 和正常细胞系（WBC）基因组 DNA 由供应商提取纯化获得。

申请人对主要原材料进行了供应商的选择，通过功能性实验筛选出合格供应商，制定了各主要原材料的技术要求和质量标准并经检验合格。

2. 企业参考品和质控品设置情况

该产品企业参考品包括阳性参考品、阴性参考品、最低检测限参考品和精密度参考品。

企业参考品包括 BMPR1A 基因和 PLAC8 基因相应位点甲基化阳性和阴性的样本，甲基化状态均经过甲基化特异性数字 PCR 和测序的方法验证。

阳性企业参考品包括 6 种，分别命名为阳性参考品 P1-P6，由不同浓度的肝癌细胞系（Huh-7）基因组 DNA 和正常细胞系（WBC）基因组 DNA 按不同甲基化比例混合的样本。

阴性企业参考品包括 7 种,分别命名为阴性企业参考品 N1-N7, N1-N3 为不同浓度的正常细胞系 (WBC) 基因组 DNA 样本; N4-N6 为分别掺入不同干扰物质的正常细胞系 (WBC) 基因组 DNA 样本; N7 为一定浓度的含有其他不同肿瘤相关的基因甲基化的样本。

最低检测限参考品有 1 种,命名为 L,为一定浓度的低甲基化比例的混合样本。

精密度企业参考品包括 2 种,分别命名为精密度企业参考品 J1、J2。J1 为一定浓度的高甲基化比例的混合样本,J2 为一定浓度的低甲基化比例的混合样本。

该产品设置了阳性质控和阴性质控,用于检测过程中试剂盒和仪器的质量控制。此外,每个样本均检测 2 个内部质控,用于结果的判读和评估样本的质量。

(二) 生产工艺及反应体系研究

申请人对该产品反应体系的研究包括引物探针浓度的确定、预混液的选择、阴/阳性质控品的确定等;对 PCR 反应条件的研究包括退火温度及时间、循环数等;对样本的用量以及样本保存时间进行了研究。

通过功能性实验，最终确定了最佳反应体系。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

该产品分析性能评估内容包括：准确性（阳性符合率、阴性符合率）、精密度、检测限、分析特异性的评估；核酸提取试剂的性能研究。

准确度研究使用三批试剂盒对若干临床血清样本（高甲基化率、低甲基化率阳性样本及甲基化率阴性样本）进行检测，试剂盒检测结果与测序结果阳性符合率和阴性符合率均为 100%。

精密度研究使用精密度企业参考品和临床样本混合的阴性样本和阳性样本，使用三批试剂盒对样本进行检测。对三批试剂盒的批次内/间、日内/日间（20 天）、操作者间及不同实验室间的精密度进行评价。研究结果显示，试剂盒对 **BMP1A** 和 **PLAC8** 基因甲基化水平检测变异系数不大于 10%。

最低检测限研究中，申请人使用不同甲基化比例的样本，每浓度梯度使用三批试剂盒检测 20 次，将检出率大于等于 95% 的最低浓度水平确定为最低检测限。使用三批试剂盒对不同甲基化比例的临床样本进行最低检测限的验证。

分析特异性研究包含交叉反应研究和干扰研究，交叉反应研究包括结肠癌基因组 DNA（含 SDC2 基因）及其他常见甲基化基因（包含 BCAT1、NDRG4、SEPTIN9、BMP3、RNF180、SOX17 基因）、其它消化道肿瘤（包含食道癌、胰腺癌、胃癌、肠癌、胆管癌）、良性肝病（包含重度肝硬化失代偿期）、自身免疫性疾病样本等，结果显示均无交叉反应。同时，申请人对甲基化转化前后的样本进行研究，结果显示，该产品仅能特异性的对甲基化转化后样本中 BMPR1A 基因和 PLAC8 基因的甲基化水平进行有效的检测。

干扰研究结果显示，样本中含有以下干扰物：胆红素（0.2mg/mL）、胆固醇（5mg/mL）、葡萄糖（10mg/L）、甘油三酯（12mg/mL）、尿酸（0.235mg/mL）、红细胞（0.4%, v/v）、血红蛋白（10mg/mL）和血清白蛋白（40 mg/mL），以及常见肝病药物，包含恩替卡韦分散片（0.0015mg/mL）、护肝片（2.1mg/mL）、联苯双脂滴丸（0.015mg/mL）、胱氨酸片（0.15mg/mL）、复方甘草酸苷片（0.1125mg/mL）、甘草酸二铵胶囊（0.225mg/mL），对检测结果均无影响。

申请人对核酸提取试剂盒性能进行研究，并根据与该产品的组合性能研究结果，确定推荐的核酸提取试剂符合检测要求。

(四) 阳性判断值研究

申请人对该产品阳性判断值的研究采用临床来源的血清样本。阳性判断值研究入组（包含建立和验证）样本数共计 1998 例，包括肝细胞癌、肝细胞癌-肝内胆管癌（混合型癌）、良性肝脏疾病、其他肿瘤样本等。对五种不同的判读方法的灵敏度和特异性、肝癌分期、阴性样本进行分析和比较，最终确定阳性判断值为“BMPR1A 基因 $\geq 5.5\%$ 或当 $4.0\% \leq \text{BMPR1A 基因} < 5.5\%$ ，PLAC 基因 $\geq 10\%$ 为阳性；BMPR1A 基因 $< 4\%$ 或当 $4.0\% \leq \text{BMPR1A 基因} < 5.5\%$ ，PLAC 基因 $< 10\%$ 为阴性”。

(五) 稳定性研究

申请人对该产品的稳定性研究包括货架效期稳定性、运输稳定性、使用稳定性（包括开瓶稳定性、冻融稳定性）及样本稳定性（包括血清、血清提取 DNA 及提取转化后 DNA 的稳定性）。

货架有效期稳定性：将三批试剂盒置于规定储存条件下放置 0、3、6、7 个月，每到一一个时间节点使用企业参考品对试剂盒的性能进行检测，结果显示试剂盒在生产后保存至 7 个月各项性能指标均符合产品技术要求，产品有效期可达 6 个月。

此外，申请人对产品的运输稳定性、使用稳定性和样本稳定性分别进行了研究。结果显示，产品的性能均能满足产品说明书的声称。

三、临床评价概述

该产品在中山大学肿瘤防治中心、广州医科大学附属第一医院、解放军总医院第三医学中心三家临床试验机构进行临床试验，采用试验体外诊断试剂与临床参考标准进行比较研究，确认本产品的临床性能。其中，原发性肝癌和其他肿瘤病例采用病理诊断确诊，其他疾病根据相关诊疗指南将病理诊断与影像学、血清学标志物结合综合判断。入组病例包括肝细胞癌、肝内胆管癌、混合型癌、其他常见癌种、肝脏良性疾病（肝囊肿、病毒性肝炎、脂肪肝、肝硬化等），临床试验入组病例还包括依据非侵入性方法无法进行明确诊断的肝脏疾病人群。临床试验样本类型为血清。

产品临床灵敏度和特异度评价共纳入临床病例 1503 例，其中，非侵入性方法无法进行明确诊断的肝脏疾病病例 96 例，其中肝癌病例 524 例，非肝癌的其他病例 979 例（包括其他易产生干扰的肿瘤及各种良性疾病病例）。试验结果显示：本产品临床灵敏度为 95.42% (95%CI: 93.63% ~ 97.21%)，特异度 96.02% (95%CI: 94.79% ~ 97.24%)。上述结果显示试验体外诊断试剂具有较好的临床灵敏度和特异度，满足临床使用需求。

另外，采用试验体外诊断试剂对 56 例肝癌患者手术前后的样本进行连续检测，所有病例术前检测结果为阳性，术后检测结果为阴性，表明肝癌手术切除后血浆中甲基化水平降低。

综上所述，临床试验结果显示本产品的临床性能满足技术审评要求。

四、产品受益风险判定

本公司参照 YY/T0316-2016 《医疗器械 风险管理对医疗器械的应用》对医疗器械产品的安全风险分析方式，对 BMPR1A/PLAC8 基因甲基化检测试剂盒（数字 PCR 法）进行风险分析。

（一）受益评估

该产品适用于临床上疑似原发性肝细胞癌、混合型癌的辅助诊断，包括临床肝区影像学检查和既有临床检查怀疑肝区占位性病变的患者，不能作为肿瘤早期诊断或确诊的依据，不宜用于普通人群的肿瘤筛查，检测结果阳性不作为肝癌临床确诊的唯一依据，检测结果阴性也不能排除肝癌的可能。其临床应用的主要受益在于：该产品为患者提供一种原发性肝癌辅助诊断方法的选择。该试剂盒对原发性肝细胞癌、混合型癌诊断的临床灵敏度为 95.42%，特异度为 96.02%。

（二）风险评估

根据申请人提供的申报资料，通过对该产品从生产原材料、配制、检测、包装、运输、储存、使用方法及安全注意事项、保存和用后处理等全过程危害判定、风险估计、预防化解，从产品技术要求和使用说明书及企业规章制度对产品质量的全过程控制和风险防范措施，已将产品的安全风险系数降到了验收准则规定的可接受范围内，同时采取降低风险的措施后没有引入新的风险。经综合评价，在目前认知水平上，认为该产品上市带来的受益大于风险。该产品已知和可预见的安全风险主要有以下几个方面：

1. 与预期用途有关的安全风险，例如该产品不能用于肝内胆管癌的辅助诊断，不能作为肝癌早期诊断或确诊的依据，需结合其他的检查结果综合判断。不宜用于普通人群的肿瘤筛查。

2. 与储存或运输有关安全风险，例如在不正确的储存和运输条件下储存、运输试剂盒。

3. 与使用有关的安全风险，例如使用仪器和试剂时没有按照说明要求进行操作。

4. 生物危险，例如使用后或失效的产品直接丢弃或产品使用过程中产生的废弃物未按照医疗器械废物统一销毁处理。

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

1. 预期用途

本试剂盒用于体外定性检测人血清中游离 DNA（cfDNA）中的 BMPR1A 和 PLAC8 基因甲基化水平。

本产品适用于临床上对疑似原发性肝细胞癌、混合型癌的辅助诊断，包括临床肝区影像学检查和既有临床检查怀疑肝区占位性病变的患者，检测结果阳性不作为肝癌临床确诊的唯一依据，检测结果阴性也不能排除肝癌的可能。该检测不能作为肝癌早期诊断或确诊的依据，不宜用于普通人群的肿瘤筛查。

2. 警示及注意事项：该试剂盒说明书中明确了该试剂盒检查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体外诊断试剂产品注册，属于境内同品种首个产品。依据《医疗器械监督管理条例》（国务院令 第 739 号）、《体外诊断试剂注册与备案管理办法》（国家市场监督管理总局令 第 48 号）等相关医疗器械法规与配套规章，经对申请人提交的注册申报资料进行系统评价，申报产品符合安全性、有效性的要求，符合现有认知水平，建议准予注册。

2023 年 6 月 20 日

附件：产品说明书

BMPR1A/PLAC8 基因甲基化检测试剂盒（数字 PCR 法）

说明书

【产品名称】

BMPR1A/PLAC8 基因甲基化检测试剂盒（数字 PCR 法）

【包装规格】24 人份/盒，48 人份/盒。

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人血清中游离 DNA（cfDNA）中的 BMPR1A 和 PLAC8 基因甲基化水平。

本产品适用于临床上对疑似原发性肝细胞癌、混合型癌的辅助诊断，包括临床肝区影像学检查和既有临床检查怀疑肝区占位性病变的患者，检测结果阳性不作为肝癌临床确诊的唯一依据，检测结果阴性也不能排除肝癌的可能。该检测不能作为肝癌早期诊断或确诊的依据，不宜用于普通人群的肿瘤筛查。

【检验原理】

提取血清中的游离 DNA，然后用亚硫酸盐转化在机体内未发生甲基化的胞嘧啶，通过脱氨基反应产生尿嘧啶磺酸盐，在机体内已经发生甲基化的胞嘧啶不会被亚硫酸盐转化。将亚硫酸盐转化的 DNA 做数字 PCR 扩增，反应中的引物探针能区分靶基因甲基化和非甲基化序列。应用数字 PCR 对甲基化和非甲基化微滴进行检测，读取 FAM 与 HEX 荧光通道下产生荧光的液滴数量。使用生成的靶基因甲基化和非甲基化微滴数量计算甲基化率，根据甲基化率判断样本的阴阳性。

【主要组成成分】

1. BMPR1A/PLAC8 基因甲基化检测试剂盒（数字 PCR 法）包含 A 盒和 B 盒，见表 1。

表 1. 试剂盒组成

A 盒				B 盒			
组分	主要成分	24 人份/盒	48 人份/盒	组分	主要成分	24 人份/盒	48 人份/盒
转化液	亚硫酸氢铵	1.5mL×3 管	1.5mL×6 管	预混液	dNTPs,2×PCR Buffer、聚合酶	550μL×1 管	550μL×2 管
结合液	盐酸胍	15mL×1 瓶	15mL×2 瓶	阳性对照	肝癌细胞系 DNA	100μL×1 管	100μL×2 管
洗涤液	纯化水	2.5mL×1 瓶	2.5mL×2 瓶	阴性对照	非肝癌细胞系 DNA	100μL×1 管	100μL×2 管
纯化液	异丙醇、	5.5mL×1 瓶	5.5mL×2 瓶	引物 1-F	寡聚核苷酸片	25μL×1	25μL×2

	乙醇、氢氧化钠		
洗脱液	TE 溶液	0.7mL×1 瓶	0.7mL×2 瓶
微滴发生油	矿物油	3.5mL×1 瓶	3.5mL×2 瓶
滤柱	-	24 个×1 包	24 个×2 包
收集管	-	24 个×1 包	24 个×2 包

	段	管	管
引物 1-R	寡聚核苷酸片段	25μL×1 管	25μL×2 管
探针 1-M	FAM 标记寡聚核苷酸片段	8μL×1 管	8μL×2 管
探针 1-NM	HEX 标记寡聚核苷酸片段	8μL×1 管	8μL×2 管
引物 2-F	寡聚核苷酸片段	25μL×1 管	25μL×2 管
引物 2-R	寡聚核苷酸片段	25μL×1 管	25μL×2 管
探针 2-M	FAM 标记寡聚核苷酸片段	8μL×1 管	8μL×2 管
探针 2-NM	HEX 标记寡聚核苷酸片段	8μL×1 管	8μL×2 管

2. 需要但未提供的试剂:

提取试剂盒: 游离 DNA 提取试剂盒 (抽滤法) (广州优泽生物技术有限公司, 粤穗械备 20180127 号);

无水乙醇;

TE Buffer (灭菌) pH8.0。

【储存条件及有效期】

试剂盒 A 盒于 10℃~30℃ 保存。试剂盒 B 盒于 -25℃~-15℃ 保存。试剂盒有效期 6 个月。应避免反复冻融, 冻融次数应不超过 3 次。建议在冷链条件下运输。具体的生产日期及使用期限详见产品标签。

【适用仪器】

Bio-Rad QX200™ Droplet Digital™ PCR (数字 PCR™) 系统 (包括 QX200™ 微滴生成仪和 QX200™ 微滴分析仪)。

其他推荐使用的实验室设备: 96 孔 PCR 仪 (可设置 2℃/S 的升降温, 推荐用 C1000 Touch™ 热循环仪)。

【样本要求】

血清样本, 血清量应不少于 1.5mL。若不能及时处理, 血清样本在 -20℃±5℃ 保存不超过 7 天或 -80℃±5℃ 保存不超过 45 个月; 核酸样本可在 2~8℃ 保存不超过 24 小时, 在-

20℃±5℃条件下保存不超过1个月，核酸样本应避免反复冻融，冻融次数应不超过3次；

转化后DNA样本在2~8℃保存不超过24小时。

【检验方法】

1. 游离DNA(cfDNA)的甲基化处理

1.1 制备洗涤液

按照标签说明在洗涤液中加入无水乙醇，颠倒混匀。在瓶身标签上标记好配制时间。加入乙醇后室温储存效期为4周。

1.2 游离DNA(cfDNA)甲基化

1.2.1 样本准备

DNA样本若冷冻储存，在室温条件下于冰盒上融化10分钟。

1.2.2 亚硫酸盐转化

① 吸取提取好的全部核酸样本(约35μL)分别加至不同的PCR管内，同时每批检验要设置阴阳对照，阴阳对照各使用30μL。再在每个PCR管内加入130μL转化液，涡旋振荡混匀，瞬时离心。

② 进入反应程序：98℃孵育8分钟，54℃孵育60分钟。

③ 程序结束前，将每个滤柱套入收集管内，并加入600μL结合液备用。程序结束后瞬时离心，将反应体系分别加入滤柱内，盖紧盖子，上下颠倒混匀。17,000×g离心1分钟，弃滤液。

④ 往每个滤柱内加入100μL洗涤液，17,000×g离心1分钟。

⑤ 往每个滤柱内加入200μL的纯化液，室温静置20分钟，且保证所有样本在20分钟内完成17,000×g离心1分钟的操作。

⑥ 第二次往每个滤柱内加入200μL洗涤液，17,000×g离心1分钟，弃滤液。

⑦ 第三次往每个滤柱内加入200μL洗涤液，17,000×g离心4分钟，弃滤液，(*注意：滤液不可接触滤柱底部)。

⑧ 将每个滤柱移至新的对应数量的1.5mL离心管内，吸取20μL洗脱液加至每个滤柱内(*注意：加在滤柱中心位置)，室温静置5分钟，17,000×g离心1分钟，收集滤液，滤液为经过重亚硫酸盐转化后的cfDNA。

注意：转化液对氧气敏感。未用完的余液应丢弃，每次使用新开封的溶液。

注意：阴性对照和阳性对照需要进行甲基化处理，与核酸样本同步操作。

2. 数字PCR

本试剂盒含有 2 套引物探针，每套引物探针扩增程序不同，需要分 2 次配制 PCR 反应体系，分别扩增。应分别配制和扩增引物探针 1 反应体系（对应 BMPR1A 基因位点）、引物探针 2 反应体系（对应 PLAC8 基因位点）。

2.1 PCR 反应液准备

① 取出预混液、相应的引物探针，冰上融化。

② PX1™ PCR 板封膜机开机设定程序为 180℃，5 秒钟。

③ 根据样本数量，分别配制 BMPR1A 和 PLAC8 的 PCR 反应体系。用一个洁净的 1.5mL 离心管，按表 2. 首先将 1 至 5 试剂按比例混合均匀，将 12μL/孔的混合试剂分装至 8 联管或 96 孔 PCR 板（根据样本量）中，再加入 8μL/孔的试剂 6，涡旋震荡混匀后稍离心，冰上备用。

表 2-1. BMPR1A 基因数字 PCR 反应体系的配制

试剂	加入量 (μL/test)
1.预混液	10
2.引物 1-F	0.8
3.引物 1-R	0.8
4.探针 1-M	0.2
5.探针 1-NM	0.2
6.甲基化的游离 DNA 样本 或甲基化的阴性对照 或甲基化的阳性对照	8
总体积	20

表 2-2. PLAC8 基因数字 PCR 反应体系的配制

试剂	加入量 (μL/test)
1.预混液	10
2.引物 2-F	0.8
3.引物 2-R	0.8
4.探针 2-M	0.2
5.探针 2-NM	0.2

6.甲基化的游离 DNA 样本 或甲基化的阴性对照 或甲基化的阳性对照	8
总体积	20

④ 取出固定微滴发生卡的卡座，在 DG8™微滴发生卡中排孔加入 PCR 反应体系 20μL/孔，下排孔加入微滴发生油 70μL/孔，并在表面覆盖上 DG8™密封垫。将 DG8™微滴发生卡放入 QX200™微滴生成仪里，生成数字 PCR 微滴聚集于上排孔。

 上：油包水 孔中：样本 孔	DG8™微滴发生卡置于底座中。
	DG8™微滴发生卡中有 3 排加样孔，中排孔加入反应体系样本；下排孔加入 70μL/孔微滴发生油。 *不能有空孔，不足 8 个样本时用 TE Buffer 替代核酸配制 PCR 反应体系。 *使用 20μL 枪加 PCR 反应体系（建议使用量程不超过 50ul 的枪），加样时枪头接近孔一侧底部，与侧壁呈 15°角，缓慢打出，不要将枪按至超过第一档位置以免引起气泡。 *若有气泡，应用洁净的 Tip 将气泡剔除。
	加样完毕后，表面覆盖一次性 DG8™密封垫。注意两边的小孔都要钩牢。
	放入 QX200™ 微滴生成仪，按启动生成微滴，约 2.5 分钟完成。

图 1. 数字 PCR 微滴发生盒使用图示

2.2 数字 PCR 反应

① 从上排孔缓慢吸取 45μL 微滴液，移入 96 孔半裙边 PCR 板，盖膜，将膜有红线标记的一面即反光亮面朝上。将 96 孔板放入 PX1™ PCR 板热封仪，封膜，约 2 分钟完成。

	微滴生成于 DG8™微滴发生卡上排孔，使用 50μL 排枪配 200μL 枪头，枪头与孔壁呈 30-45°；吸取体积为 45μL，移入 96 孔半裙边 PCR 板中，注意缓慢吸取，约 5 秒（如使用电动移液枪选 1 档速度）。 *注意转移时控制速度，避免微滴破裂及产生气泡。
---	---



图 2. 数字 PCR 封膜使用图示

② 封好膜后，应该在 30 分钟内进行 PCR 反应（或 4℃ 冰箱 4 小时内），将 96 孔板放入 PCR 仪内。反应程序见表 3。

表 3. 反应程序列表

引物探针 1			引物探针 2		
预变性	95 °C	10 分钟	预变性	95 °C	10 分钟
延伸	94 °C	30 秒	延伸	94 °C	30 秒
45 个循环	49 °C	1 分钟	45 个循环	54 °C	1 分钟
酶失活	98 °C	10 分钟	酶失活	98 °C	10 分钟

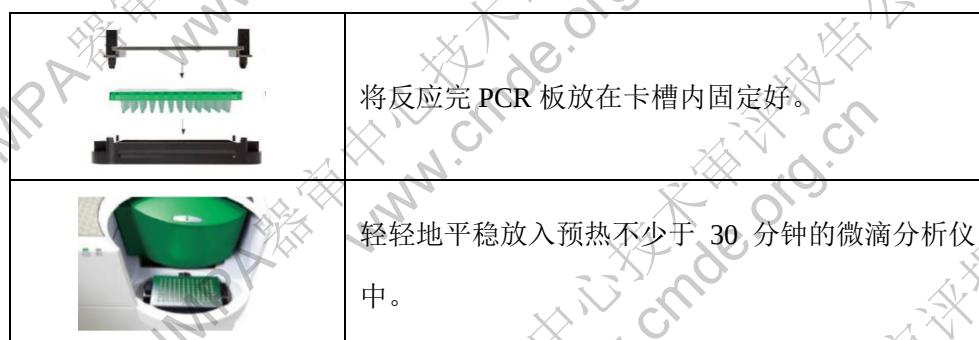


图 3. 数字 PCR 微滴分析仪使用图示

2.3 数据收集及分析

① 样本信息建立。PCR 反应结束后，96 孔板放入 QX200™ 微滴分析仪中进行数据收集。打开 QuantaSoft™ 软件，按照样本量及样本布局，建立样本模块信息，见图 4 及表

4，设置完成后运行。

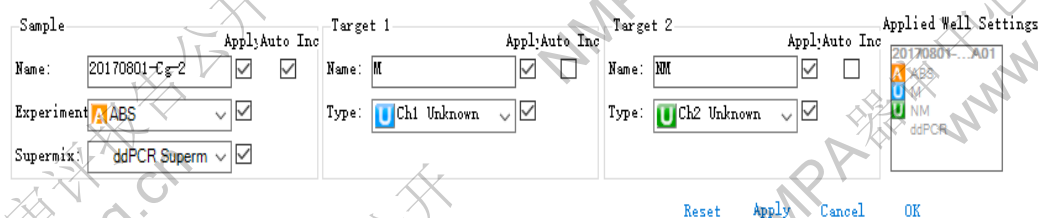


图 4. 样本信息建立

表 4. 样本信息建立

Sample 框	Target 1 框	Target 2 框
“Name”输入样本名称	Name 输入“M”	Name 输入“NM”
“Experiment”选择“ABS”	Type 选择“Ch1 Unknown”	Type 选择“Ch2 Unknown”
“Supermix”选择“数字 PCR Supermix for Probes(no dUTP)”		

② 数据分析。数据读取完成后，点击界面左侧 Analyze 按钮，选择 2D Amplitude 选项，自动显示当前样本的 2D 散点图。

阈值选择。首先分析试验中阳性对照和阴性对照的 2D 图谱分析，2D 图分为上下左右 4 个区域（图 5），移动阈值线，使阴阳性对照信号重叠的椭圆形信号区完全处于左下方区域，阴性对照信号集中区域均在左下方和右下方区域，此时 Ch1 和 Ch2 的阈值即为阴阳对照的阈值。点击方形选择按钮和“+”按钮，然后将左上区域和右上区域的信号点全部覆盖为蓝色，完成信号选择（图 6）。

用同样的方法调整每个样本结果的阈值线，并完成信号选择。

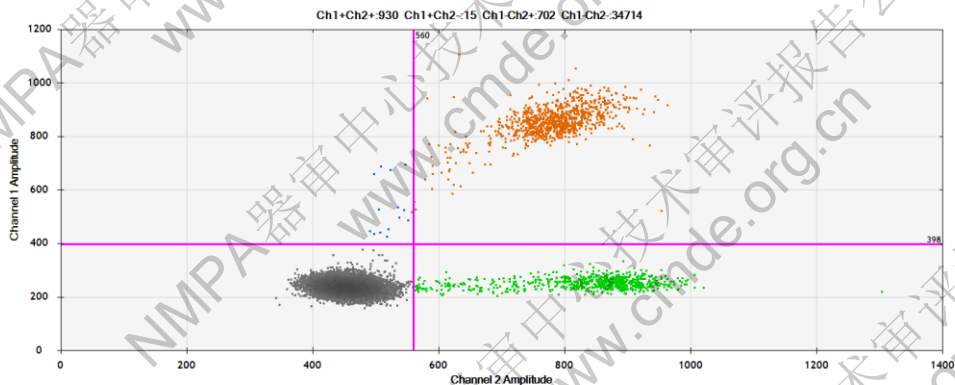


图 5. 阈值选择 1

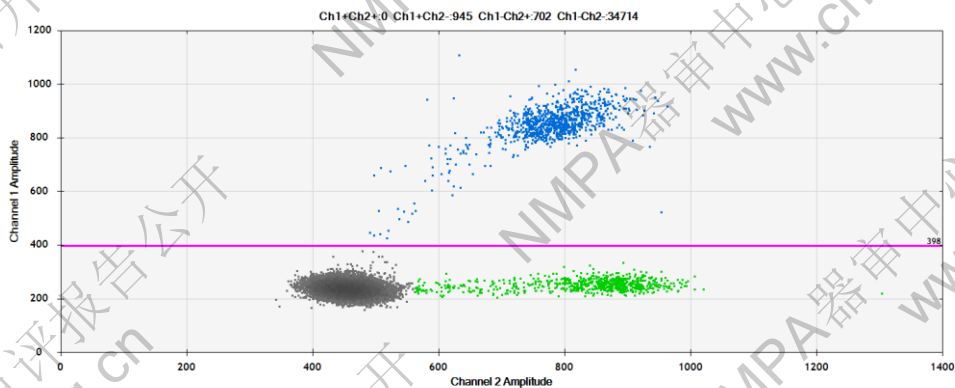


图 6. 阈值选择 2

③ 计算。样本调整划分阈值，甲基化数据收集和分析显示在 QuantaSoft™软件界面中

(图7)。样本的甲基化率由下列公式计算。

Well	E	Experiment	Sample	T	Target	Status	Conc(copies/μL)	Positives	Negatives	Ch1+Ch2+	Ch1+Ch2-	Ch1-Ch2+	Ch1-Ch2-	Linkage	AcceptedDroplets
E03	A	ABS	PLAC8-E03	U	M	Manual	64.9	814	14350	0	814	49	4301	0	15164
E03	A	ABS	PLAC8-E03	U	NM	Manual	3.8	49	15115	0	814	49	14301	0	15164

图7. 结果分析界面1

甲基化率=[“Ch1+Ch2-”/ (“Ch1+Ch2-”+“Ch1-Ch2+”)]×100%。

或点击“Events”图8，蓝色柱为甲基化微滴信号数，绿色为非甲基化微滴信号数。

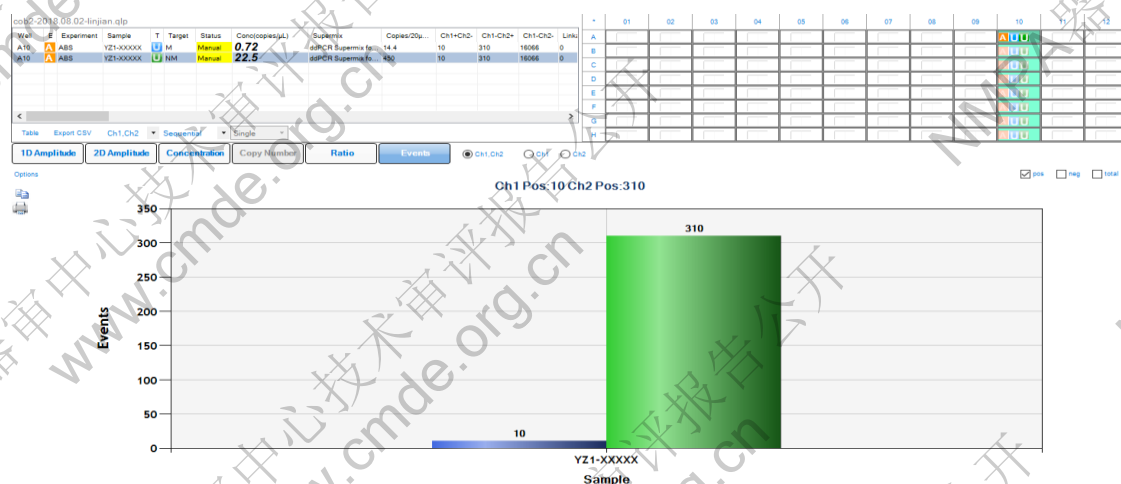


图8. 结果分析界面2

甲基化率=[蓝色柱数值/ (蓝色柱数值+绿色柱数值)]×100%

【阳性判断值或者参考区间】

使用 BMPR1A/PLAC8 基因甲基化检测试剂盒（数字 PCR 法）试剂盒检测 1299 例临床血清样本，采用 ROC 曲线法确定阳性判断值。检测 769 例临床血清样本对该试剂盒的阳性判断值进行验证。阳性判断值的结果如表 5 所示。

表 5. 阳性判断值

BMPR1A 甲基化率 (%)	PLAC8 甲基化率 (%)	判断结果
≥5.5	<10.0 或 ≥10.0	阳性
4.0≤结果<5.5	≥10.0	阳性
4.0≤结果<5.5	<10.0	阴性
<4.0	<10.0 或 ≥10.0	阴性

【检验结果的解释】

1. 质控品性能指标

该试剂盒包含阳性对照和阴性对照。应在每次反应中添加对照品检测以判断检测反应是否有效。阳性对照和阴性对照的甲基化率应该在有效范围内(表 6) 否则此次测试结果无效。

表 6. 数字 PCR 反应有效性参数信息

对照结果	BMPR1A 甲基化率	PLAC8 甲基化率
阳性对照有效	$\geq 40.0\%$	$\geq 80.0\%$
阴性对照有效	$< 5.5\%$	$< 5.5\%$

2. 检验结果判读

对每个样本进行检测，检测 BMPR1A 和 PLAC8 基因的甲基化和非甲基化微滴数量，通过微滴数量比值计算 BMPR1A 和 PLAC8 基因的甲基化率。

阳性结果：BMPR1A 甲基化率 $\geq 5.5\%$ ，PLAC8 甲基化率为任意值时为阳性；BMPR1A 甲基化率（%） $\geq 4.0\%$ 或 $< 5.5\%$ ，PLAC8 甲基化率 $\geq 10\%$ 时为阳性；

阴性结果： $4.0\% \leq$ BMPR1A 甲基化率 $< 5.5\%$ ，PLAC8 甲基化率 $< 10.0\%$ 时为阴性；BMPR1A 甲基化率 $< 4.0\%$ ，PLAC8 甲基化率为任意值时为阴性。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，不能作为确诊肝癌的证据。
2. 本产品不能用于肝内胆管癌的辅助诊断。
3. 由于肝癌检测依赖于样本中肿瘤 DNA 的量，所以可能受样本收集过程、样本储存方式、病人个体因素（如年龄、其他疾病）以及肿瘤级别影响，血清的采集应达到要求，否则将影响检测结果，不当的试验操作和实验环境均有可能导致假阴性或假阳性结果。有关假阴性结果的可能分析：

- ① 不合理的样本采集、转运及处理导致样本中游离 DNA 的降解从而减少提取的产量，同时当某些运输和不当处理造成白细胞膜破裂后，会有部分基因组 DNA 混入游离 DNA 中，影响检测结果；

- ② 样本发生溶血；

- ③ 未经验证的其他干扰因素或者 PCR 抑制因子。

【产品性能指标】

1. 外观

试剂盒外包装应完好无损，印刷文字、图案、批号和有效期正确无误，外观清洁、无泄漏、无破损；各组分齐全、完整、液体无渗漏；包装标签应清晰易识别。

2. 阳性符合率

对阳性企业参考品 P1-P6 各检测 1 次，阳性符合率为 100%。

3. 阴性符合率

对阴性企业参考品N1-N7各检测1次，阴性符合率为100%。

4. 精密度

对精密度企业参考品J1（强阳性）和精密度企业参考品J2（弱阳性）各测试10次，应全部为阳性，且引物探针1和引物探针2的甲基化率值的CV%均小于10%。

5. 最低检出限

对最低检测限企业参考品L各检测20次，阳性率均 $\geq 95\%$ （ $n \geq 19$ ）。

6. 特异性

对弱阳性样本进行干扰验证，胆红素（0.2mg/mL）、血红蛋白（10mg/mL）、蛋白（血清白蛋白，40mg/mL）、甘油三酯（12mg/mL）、红细胞（0.4%，v/v）、胆固醇（5mg/mL）、尿酸（0.235mg/mL）和葡萄糖（10mg/mL）、嗯替卡韦分散片（0.0015mg/mL）、护肝片（2.1mg/mL）、联苯双脂滴丸（0.015mg/mL）、胱氨酸片（0.15mg/mL）、复方甘草酸苷片（0.1125mg/mL）、甘草酸二铵胶囊（0.225mg/mL）对检测结果没有影响。

对SCD2基因的阳性细胞系DNA（HCT116细胞DNA，结肠癌），重度肝硬化失代偿期血清样本，其他消化道肿瘤样本（包括食道癌、胰腺癌、胃癌、肠癌、胆管癌），自身免疫性疾病样本进行检测，检测结果全部为阴性。

7. 临床性能

在3家临床试验机构，入组1503例临床样本，使用本产品进行检测，以临床诊断标准作为对比方法。临床试验结果显示，本产品的临床灵敏度为95.42%，特异性为96.02%。

【注意事项】

1. 本品含人源细胞系提取核酸，不具有潜在感染性。
2. 本品仅用于体外诊断。
3. 使用者应为专业实验人员，并接受过专业数字PCR实验技能训练，参考数字PCR设备使用说明书进行操作。
4. 试验前请仔细阅读本说明书，熟悉和掌握需使用的各种试剂与仪器的使用方法和注意事项。
5. 不能使用超过有效期的试剂。
6. 为避免交叉污染，建议使用带滤芯的移液枪头。
7. 临床实验室应严格按照《医疗机构临床基因扩增实验室管理办法》（卫办医政发〔2010〕194号或现行有效版本）等有关分子生物学实验室、临床基因扩增实验室的管理规范执行，

严格分区。

【标识的解释】

	制造商
	体外诊断医疗器械
	查阅使用说明
	温度极限
	产品编号
	批次代码
	有效期
	生产日期

【参考文献】

1. Xu RH, Wei W, Krawczyk M, et al. Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. Nat Mater. 2017 Nov; 16(11):1155-1161.
2. Hao X, Luo H, Krawczyk M, et al. DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of common cancers[J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Jul 11; 114(28):7414-7419.
3. Brychta N, T Krahn T, Ahsen O. Detection of KRAS Mutations in Circulating Tumor DNA by Digital PCR in Early Stages of Pancreatic Cancer[J]. Clin Chem. 2016 Nov; 62 (11):1482-1491.
4. Zhao YX, Xue F, Sun JF, et al. Genome-wide methylation profiling of the different stages of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma development in plasma cell-free DNA reveals potential biomarkers for early detection and high-risk monitoring of hepatocellular carcinoma[J]. Clin Epigenetics. 2014 Dec 2; 6(1):30.
5. Liao WJ, Yang HY, Xu HF, et al. Noninvasive detection of tumor-associated mutations from circulating cell-free DNA in hepatocellular carcinoma patients by targeted deep sequencing[J]. Oncotarget, 2016 Jun 28;7(26):40481-40490.
6. Picicocchi M, Cardin R, Vitale A, et al. Circulating free DNA in the progression of liver damage

to hepatocellular carcinoma[J].Hepatol Int. 2013 Oct;7(4):1050-1057.

7. 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规范[M]. 人民卫生出版社, 2015.

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 广州优泽生物技术有限公司

住所: 广州国际生物岛螺旋三路6号第三层303单元

联系方式: 020-82514610

售后服务单位名称: 广州优泽生物技术有限公司

联系方式: 020-82514610

生产地址: 广州市黄埔区科学城瑞和路79号瑞博奥大楼I期5楼502房/广州国际生物岛螺旋三路6号第三层303单元

生产许可证编号或者生产备案凭证编号:

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准及修改日期】

