

受理号：CSZ2100118

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：胚胎植入前染色体非整倍体检测试剂盒
(半导体测序法)

产品管理类别：第三类

申请人名称：序康医疗科技(苏州)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
产品审评摘要.....	4
一、 产品概述.....	4
二、 临床前研究摘要.....	6
三、 临床评价摘要.....	11
四、 风险分析及说明书提示.....	13
综合评价意见.....	15

基本信息

一、申请人名称

序康医疗科技（苏州）有限公司

二、申请人住所

中国（江苏）自由贸易试验区苏州片区星湖街218号生物医药
产业园一期项目B7楼201单元

三、生产地址

中国（江苏）自由贸易试验区苏州片区星湖街218号生物医药
产业园一期项目B7楼201单元；A2楼326单元

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

产品试剂盒由以下组分组成，主要组成成分见表 1。

表 1 试剂盒主要组成成分

试剂盒	试剂名称	成分
A 部分	细胞裂解液	三羟甲基氨基甲烷盐酸盐，乙二胺四乙酸二钠，氯化钾，二硫苏糖醇
	细胞裂解酶	蛋白酶，甘油，二硫苏糖醇
	预扩增缓冲液	三羟甲基氨基甲烷盐酸盐，氯化钾，硫酸镁，硫酸铵，聚乙二醇辛基苯基醚，寡核苷酸序列，脱氧核糖核酸，无核酸酶水
	预扩增酶	DNA 聚合酶，甘油，二硫苏糖醇
	扩增缓冲液	三羟甲基氨基甲烷盐酸盐，氯化钾，硫酸镁，硫酸铵，聚乙二醇辛基苯基醚，脱氧核糖核酸，无核酸酶水
	扩增酶	DNA 聚合酶，甘油，二硫苏糖醇
	洗脱液	无核酸酶水
B 部分	阴性对照品	染色体正常的成纤维细胞
	阳性对照品 1	21 号染色体三体的成纤维细胞
	阳性对照品 2	XO 染色体异常的成纤维细胞
	空白对照品	无核酸酶水
C 部分	标签引物 1~48	寡核苷酸序列
D 部分	磁珠	磁珠、聚乙二醇 6000、氯化钠

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试管婴儿过程中体外培养胚胎的囊胚滋养层细胞的脱氧核糖核酸 (DNA)，通过对囊胚滋养层细胞的 DNA

进行检测，分析胚胎是否存在染色体非整倍体，辅助临床医生判断胚胎是否植入。

本产品用途为构建测序文库。本产品适用于进行试管婴儿且符合以下任一条件的患者：夫妻双方或一方存在染色体异常；生育过染色体异常患儿或流产后绒毛组织提示有染色体异常； ≥ 3 次体外受精-胚胎移植失败； ≥ 3 次自然流产史；女性年龄 ≥ 38 岁；严重畸精子症。

非整倍体胚胎很难自然发育到成熟，一般常见的情况是会在第5、6个月停育流产。即便胚胎能够存活到自然生产，生育的婴儿也极有可能发生健康问题。通过胚胎植入前染色体非整倍体异常检测可以减少植入染色体异常的胚胎，减少因植入异常胚胎而造成的反复种植失败、反复流产、出生缺陷等。临床常见的诊断方法包括荧光原位杂交技术和微阵列比较基因组杂交技术。

检测结果仅供参考，不能单独作为确诊依据，不用于拷贝数变异的检测。

(三) 产品包装规格

48 测试/盒

(四) 产品检验原理

本试剂盒利用单细胞全基因组扩增技术对从囊胚期胚胎获得的活检细胞的DNA进行扩增及文库构建，利用半导体高通量测序技术对扩增文库进行测序，通过生物信息分析统计匹配到每一条染色体DNA上的有效序列数量，将统计结果与大量正常样本构成的

参考集对比，获得染色体拷贝数的信息，从而判断胚胎是否存在染色体非整倍体。

全基因组扩增分为两个阶段：预扩增阶段，预扩增产物不作为模板进行下一轮扩增，扩增产物仅来源于原始细胞 DNA，从而减少序列依赖的扩增偏倚性。扩增阶段，扩增引物 5'端拥有与测序平台一致的序列，3'端序列与全扩增子通用序列一致，扩增完成即完成文库构建。

半导体高通量测序是将获得的测序文库与引物、dNTPs、酶、ISP 珠子等构建“油包水”PCR 反应单元，获得的 PCR 产物纯化后载入半导体芯片，被固定后，依次掺入 A/C/G/T 脱氧核苷酸，DNA 聚合酶按照碱基互补原理，合成互补 DNA 链。碱基的插入会释放氢离子，引起电势差，检测电信号即可实现碱基判读。收集所有碱基信息结合生物信息学分析，可完成对匹配到染色体 DNA 上的有效序列数量的统计。

二、临床前研究概述

(一) 主要原材料

1. 主要原材料的选择

试剂盒的主要原材料包括蛋白酶、DNA 聚合酶、预扩增引物、标签引物、dNTPs、磁珠、DNA 聚合酶反应缓冲液及对照品等。这些原材料均是通过外购的方式获得。申请人通过功能性实验筛选出最佳原材料供应商，制定了各主要原材料的质量标准并经检验合格。

2. 企业参考品和对照品设置情况

企业参考品包括非整倍体阳性参考品、阴性参考品、微缺失微重复参考品、嵌合参考品以及数据量控制参考品。非整倍体阳性参考品 18 份，是由多种染色体非整倍体阳性细胞样本组成；阴性参考品 4 份，是由染色体非整倍体阴性细胞样本组成；微缺失微重复参考品 17 份，是由多种染色体微缺失微重复细胞样本组成；嵌合参考品 4 份，是由两种不同染色体拷贝数变异样本混合制备的细胞样本组成；数据量控制参考品 1 份，是由成纤维细胞组成。

对照品是由 2 份阳性对照品、1 份阴性对照品和 1 份空白对照品组成，用于检测过程中试剂和仪器的质量控制。其中阳性对照品为 21 号染色体三体和 XO 染色体异常样本，阴性对照品为染色体整倍体样本；空白对照品为无核酸酶水。

(二) 生产工艺及反应体系研究

申请人通过使用初步确定的配方进行反应体系配制，对预扩增酶浓度、预扩增引物浓度、预扩增缓冲液中 dNTPs 浓度、预扩增缓冲液中 Mg^{2+} 浓度、扩增酶浓度、扩增缓冲液中 dNTPs 浓度、扩增缓冲液中 Mg^{2+} 浓度、样本加样量、反应体积、反应条件、预扩增循环数、扩增循环数、上机文库浓度进行了优化，确定了最佳的反应体系；通过生产工艺研究，申请人对生产过程中组分浓度、试剂配制及分装工艺参数进行了研究，确认了最佳的生产工艺。

(三) 分析性能评估

分析性能评估内容包括样本稳定性、染色体非整倍体阳性符合率、微缺失微重复符合率、阴性符合率、嵌合体符合率，数据量控

制、重复性、精密度、分析特异性。

1.样本稳定性研究：申请人对胚胎细胞样本的运输稳定性、储存稳定性、冻融次数进行了研究，最终确定胚胎细胞样本在干冰条件下运输不超过 5 天； $-85^{\circ}\text{C}\sim-70^{\circ}\text{C}$ 条件下储存不超过 12 个月，冻融次数不超过 3 次； $-25^{\circ}\text{C}\sim-15^{\circ}\text{C}$ 条件下储存不超过 1 个月，冻融次数不超过 3 次。

申请人对细胞样本的全基因组扩增产物储存稳定性、冻融次数进行了研究，最终确定全基因组扩增产物在 $-25^{\circ}\text{C}\sim-15^{\circ}\text{C}$ 条件下储存不超过 1 个月，冻融次数不超过 3 次。

2.染色体非整倍体阳性符合率：对连续三批生产的试剂盒采用 102 份染色体非整倍体阳性样本进行检测，检测结果表明染色体非整倍体阳性符合率为 100%；使用企业参考品中的非整倍体阳性参考品检测，符合率 100%。

3.微缺失微重复符合率：该产品对微缺失微重复的检出情况进行了分析性能评估；使用企业参考品中的微缺失微重复参考品检测，符合该指标。

4.阴性检测符合率：对连续三批生产的试剂盒采用 33 份阴性样本进行检测，检测结果表明阴性符合率为 100%；使用企业参考品中的阴性参考品检测，符合率 100%。

5.嵌合体检测符合率：该产品对嵌合体样本的检出情况进行了分析性能评估，结果表明试剂盒对 30%嵌合的嵌合体样本检出率应达到 30%以上，70%嵌合体样本检出率应达到 60%以上。使用企业

参考品中的嵌合体参考品检测，符合该指标。

6.数据量控制检测：该产品对数据量控制情况进行了分析性能评估，使用企业参考品中的数据量控制参考品检测，符合有效数据量不低于 1M，基因组覆盖率不低于 4%的指标。

7.重复性：对连续三批生产的试剂盒分别进行三次上述的染色体非整倍体阳性检测符合率试验、微缺失微重复符合率试验、阴性检测符合率试验、嵌合体检测符合率试验、数据量控制检测试验，检测结果表明重复性均满足技术要求规定的性能指标。

8.精密度：对连续三批生产的试剂盒采用企业参考品分别在两个不同的实验室、分别选用两位不同的操作者在两台不同的测序仪进行检测，每批试剂盒检测三次，检测结果表明不同实验室间重复性、不同操作者间重复性、不同测序仪间重复性的检测均满足技术要求规定的性能指标。

9.分析特异性：对连续三批生产的试剂盒采用 29 份染色体微缺失微重复样本，6 份结构异常样本，6 份全三体样本，6 份单亲二倍体样本，共 47 份不适用类型样本进行检测，均未检出非整倍体，检测结果表明分析特异性达到 100%。

(四) 阳性判断值

申请人采用已知染色体非整倍体阴性样本构建参考数据库，然后采用已知的染色体非整倍体阴性样本和染色体非整倍体阳性样本进行参考区间的确定，最终确定的参考区间如下：

常染色体参考区间为：

参考值范围	判定
拷贝数值 ≥ 2.55	三体及以上
$2.25 < \text{拷贝数值} < 2.55$	重复临界区间
$1.75 \leq \text{拷贝数值} \leq 2.25$	二体
$1.45 < \text{拷贝数值} < 1.75$	缺失临界区间
拷贝数值 ≤ 1.45	单体及以下

性染色体参考区间为:

性染色体	参考值范围	判定
X 染色体	拷贝数值 ≥ 2.4	三体及以上
	$1.6 < \text{拷贝数值} < 2.4$	二体
	$1.4 \leq \text{拷贝数值} \leq 1.6$	临界区间
	$0.6 < \text{拷贝数值} < 1.4$	单体
	拷贝数值 ≤ 0.6	单体以下
Y 染色体	拷贝数值 ≥ 1.6	二体及以上
	$1.4 < \text{拷贝数值} < 1.6$	重复临界区间
	$0.6 \leq \text{拷贝数值} \leq 1.4$	单体
	$0.4 < \text{拷贝数值} < 0.6$	缺失临界区间
	拷贝数值 ≤ 0.4	单体以下

具体过程如下,通过 200 例染色体非整倍体阴性样本的检测结果构建参考数据库,通过 113 例染色体非整倍体阴性样本、296 例染色体非整倍体阳性样本和 166 例染色体嵌合样本的检测结果进行参考区间研究。

对于常染色体参考区间,通过不同拷贝数值区间的划分,对 218 例阳性样本与 113 例阴性样本常染色体拷贝数值进行统计,计算敏感度、特异性、阳性预示值以及阴性预示值,确定常染色体非

整倍体阳性的参考值范围。通过分析 100 例阴性细胞样本与 96 例不同嵌合比例的细胞样本常染色体拷贝数值，得到常染色体整倍体区间及临界区间。

对于性染色体参考区间，通过对 79 例性染色异常样本、330 例性染色体正常样本的性染色体拷贝数值进行分析，分别计算不同倍性的性染色体拷贝数 99% 置信区间，确定不同倍性的性染色体的参考值范围及临界区间，并用 70 例性染色体嵌合细胞样本对临界区间进行验证。

最后，通过 30 例非整倍体阴性样本、80 例非整倍体阳性样本和 40 例非整倍体嵌合样本对研究得到的参考区间进行验证，最终确定参考值的范围。

(五) 稳定性研究

申请人对试剂盒的长期稳定性、运输稳定性、开瓶稳定性和冻融稳定性进行了研究，确定了在各种条件下该试剂盒的有效保存时间。

长期稳定性试验：取连续三批生产的试剂盒，将试剂盒置于储存环境中，分别于第 0、6、9、12、13、14 个月取出，对试剂盒的性能指标进行检测，确定该试剂盒在其储存环境下的有效期为 12 个月。

此外，申请人对产品的运输稳定性、开瓶稳定性和冻融稳定性分别进行了研究。结果显示，产品的性能均满足产品说明书的声称。

三、临床评价概述

申请人在郑州大学第一附属医院、重庆市妇幼保健院、广东省妇幼保健院、华中科技大学同济医学院附属同济医院、西北妇女儿童医院（陕西省妇幼保健院）共 5 家临床机构开展了临床试验。临床试验采用考核试剂与临床参考方法进行比较研究的试验方法，确认考核试剂的临床性能。考核试剂检测阳性的胚胎，对比确认方法为 FISH；考核试剂检测阴性的胚胎，对比确认方法为染色体核型分析，包括产前诊断羊水、婴儿外周血和新生儿脐带血的核型分析。

临床试验共入组 1150 对符合适应症的受试者，考核试剂共检测 5780 枚胚胎，检测出阳性胚胎样本 1197 例，阴性胚胎样本 4540 例，43 例未获得有效检测结果。其中阳性样本共完成 508 例 FISH 验证，Chr13、Chr16、Chr18、Chr21 以及性染色体阳性验证例数分别为：62 例、83 例、24 例、69 例和 38 例；获得 317 例核型分析检查结果（其中羊水穿刺核型分析 267 例，脐带血核型分析 16 例，婴儿外周血核型分析 34 例）。

通过对以上共 508 例 FISH 确认的阳性样本以及 317 例核型分析确认的阴性样本统计分析，待考评试剂盒的灵敏性为 99.80%（95%CI:98.90%，99.97%），特异性为 100%（95%CI:98.80%，100%），阳性预测值 100%（95%CI:99.25%，100%），阴性预测值 99.68%（95%CI:98.24%，99.94%）。由于本临床试验无法对所有阴性样本以及阳性样本全部进行验证的特点，通过对受试者的基线特征和入组胚胎的基线特征进行分析，发现受试者基线和入组胚胎基线在已验证与未验证样本中均不具有显著差异，可以认为在本产品检测

结果的统计中，完成验证的样本能够代表总体样本。

根据 2002 年卫生部颁发的《胎儿染色体核型分析技术规范》要求核型分析的准确率不低于 98%。对已完成验证的样本进行统计分析，得出本产品总符合率为 99.88%；利用基于二项分析的统计算法得出所有样本的阳性预测值为 100%，阴性预测值为 99.68%，因此参考上述规范的要求，可认为该产品达到了临床诊断的准确性要求。

综上所述，该产品临床试验资料对产品的临床性能进行了全面研究，临床试验结果基本符合临床应用要求。申请人需在该产品上市后进一步完成以下工作：上市后需继续搜集至少 10 家临床机构、全部临床使用数据作为临床补充资料在产品下一次延续注册时提交，继续收集各染色体检测异常情况（本试剂检测阳性）及植入后（本试剂检测阴性）结果情况，植入后的胚胎继续追踪其与临床参考方法的检测结果（核型分析/出生随访）的对比情况。该项临床资料应当由出具数据各临床机构签章。

四、产品受益风险判定

根据 YY/T 0316-2016《医疗器械风险管理对医疗器械的应用》对该产品进行风险分析。

对于进行体外辅助生殖的夫妇，需要进行该检测。检测结果为阳性的胚胎，可避免植入母体，从而避免植入的胚胎因染色体非整倍体而导致的移植失败、流产、出生缺陷等问题。

本产品检测可能存在假阳性风险，该检测结果可能导致染色体

正常的胚胎未被选择植入，在进行体外辅助生殖过程中一般会产生多个胚胎，即使出现假阳性，临床应仍有胚胎可以选择。

本产品检测过程中可能存在假阴性风险，该部分胚胎可能在体外辅助生殖过程中被植入母体，导致胚胎移植失败、流产或新生儿出生缺陷。但进行体外辅助生殖的病例，按照临床诊疗规范在孕期需进行产前诊断，可以减少因检测试剂假阴性而导致的新生儿出生缺陷的风险。

通过风险/受益综合评价，合理地定义了受益和风险的种类和可能性。提出了针对风险的控制措施和适应症限制。能较大程度的满足医疗需求，预期受益大于风险，建议批准注册。

尽管目前认为该试剂盒的受益大于风险，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：本产品适用于进行试管婴儿且符合以下任一条件的患者：夫妻双方或一方存在染色体异常；生育过染色体异常患儿或流产后绒毛组织提示有染色体异常； ≥ 3 次体外受精-胚胎移植失败； ≥ 3 次自然流产史；女性年龄 ≥ 38 岁；严重畸精子症。

2.警示及注意事项：该试剂盒说明书中明确了该试剂盒【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，属于优先审批项目。申请人的注册申报资料符合现行要求，依据《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》（原国家食品药品监督管理总局令 2014 年第 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。申请人在该产品上市后需继续搜集至少 10 家临床机构、全部临床使用数据作为临床补充资料在产品下一次延续注册时提交，继续收集各染色体检测异常情况（本试剂检测阳性）及植入后（本试剂检测阴性）结果情况，植入后的胚胎继续追踪其与临床参考方法的检测结果（核型分析/出生随访）的对比情况。该项临床资料应当由出具数据各临床机构签章。

2022 年 5 月 11 日

附件：产品说明书

胚胎植入前染色体非整倍体检测试剂盒 (半导体测序法) 说明书

【产品名称】

通用名称：胚胎植入前染色体非整倍体检测试剂盒（半导体测序法）

【包装规格】

48 测试/盒

【预期用途】

本产品用于定性检测试管婴儿过程中体外培养胚胎的囊胚滋养层细胞的脱氧核糖核酸（DNA），通过对囊胚滋养层细胞的 DNA 进行检测，分析胚胎是否存在染色体非整倍体，辅助临床医生判断胚胎是否植入。

本产品用途为构建测序文库。本产品适用于进行试管婴儿且符合以下任一条件的患者：夫妻双方或一方存在染色体异常；生育过染色体异常患儿或流产后绒毛组织提示有染色体异常； ≥ 3 次体外受精-胚胎移植失败； ≥ 3 次自然流产史；女性年龄 ≥ 38 岁；严重畸精子症。

非整倍体胚胎很难自然发育到成熟，一般常见的情况是会在第 5、6 个月停育流产。即便胚胎能够存活到自然生产，生育的婴儿也极有可能发生健康问题。通过胚胎植入前染色体非整倍体异常检测（Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidies, PGT-A）可以减少植入染色体异常的胚胎，减少因植入异常胚胎而造成的反复种植失败、反复流产、出生缺陷等。临床常见的诊断方法包括荧光原位杂交技术（Fluorescence In Situ Hybridization, FISH）和微阵列比较基因组杂交技术（Comparative Genomic Hybridization, Array-CGH）。

检测结果仅供参考，不能单独作为确诊依据，不用于拷贝数变异的检测。

【检验原理】

本试剂盒利用单细胞全基因组扩增技术对从囊胚期胚胎获得的活检细胞的 DNA 进行扩增及文库构建，利用半导体高通量测序技术对扩增文库进行测序，通过生物信息分析统计匹配到每一条染色体 DNA 上的有效序列数量，将统计结果与大量正常样本构成的参考集对比，获得染色体拷贝数的信息，从而判断胚胎是否存在染色体非整倍体。

全基因组扩增分为两个阶段（参见图 1）：预扩增阶段，预扩增产物不作为模板进行下一轮扩增，扩增产物仅来源于原始细胞 DNA，从而减少序列依赖的扩增偏倚性。扩增阶段，扩增引物 5'端拥有与测序平台一致的序列，3'端序列与全扩增子通用序列一致，扩增完成即完成文库构建。

半导体高通量测序是将获得的测序文库与引物、dNTPs、酶、ISP 珠子等构建“油包水”PCR 反

应单元，获得的 PCR 产物纯化后载入半导体芯片，被固定后，依次掺入 A/C/G/T 脱氧核苷酸，DNA 聚合酶按照碱基互补原理，合成互补 DNA 链。碱基的插入会释放氢离子，引起电势差，检测电信号即可实现碱基判读。收集所有碱基信息结合生物信息学分析，可完成对匹配到染色体 DNA 上的有效序列数量的统计。

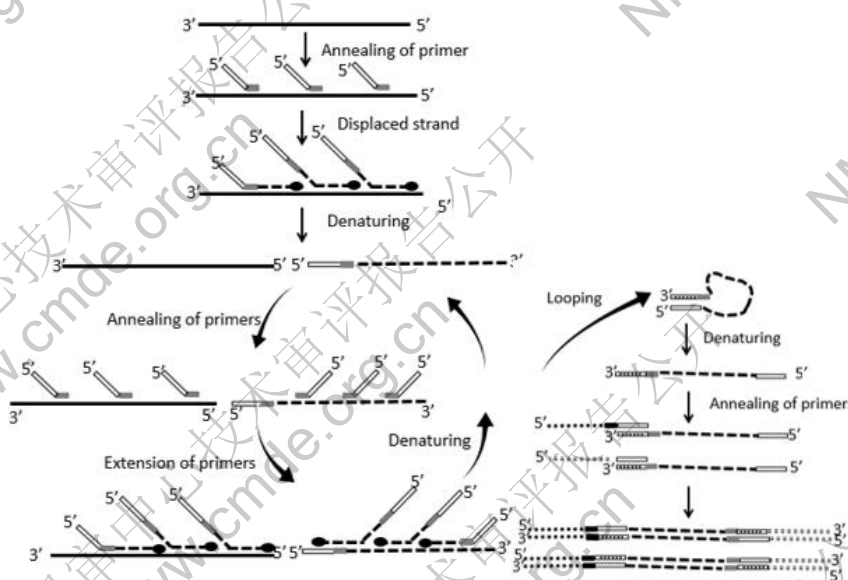


图 1:全基因组扩增原理

【主要组成成分】

试剂盒	试剂名称	规格	数量	成分
A 部分	细胞裂解液	240μL/管	1 管	三羟甲基氨基甲烷盐酸盐, 乙二醇四乙酸二钠, 氯化钾, 二硫苏糖醇
	细胞裂解酶	24μL/管	1 管	蛋白酶, 甘油, 二硫苏糖醇
	预扩增缓冲液	1440μL/管	1 管	三羟甲基氨基甲烷盐酸盐, 氯化钾, 硫酸镁, 硫酸铵, 聚乙二醇辛基苯基醚, 寡核苷酸序列, 脱氧核糖核酸, 无核酸酶水
	预扩增酶	48μL/管	1 管	DNA 聚合酶, 甘油, 二硫苏糖醇
	扩增缓冲液	1440μL/管	1 管	三羟甲基氨基甲烷盐酸盐, 氯化钾, 硫酸镁, 硫酸铵, 聚乙二醇辛基苯基醚, 脱氧核糖核酸, 无核酸酶水
	扩增酶	40μL/管	1 管	DNA 聚合酶, 甘油, 二硫苏糖醇
	洗脱液	1mL/管	1 管	无核酸酶水
B 部分	阴性对照品	5μL/管	1 管	染色体正常的成纤维细胞
	阳性对照品 1	5μL/管	1 管	21 号染色体三体的成纤维细胞
	阳性对照品 2	5μL/管	1 管	XO 染色体异常的成纤维细胞

	空白对照品	5 μ L/管	1 管	无核酸酶水
C 部分	标签引物 1~48	5 μ L/管	48 管	寡核苷酸序列
D 部分	磁珠	1mL/管	4 管	磁珠、聚乙二醇 6000、氯化钠

注：（1）不同批号试剂盒中各组分不可互换（对照品除外）。（2）所有组分使用前，融解后需平衡至室温。

自备试剂：

1.文库纯化自备试剂：80%乙醇（分析纯）

2.文库定量及质检试剂（Thermo Fisher Scientific Inc.：Qubit® 双链DNA定量试剂盒，货号Q32854或Q33231）

3.基因测序通用试剂盒（半导体测序法）（序康医疗科技（苏州）有限公司，备案号：苏苏械备20170682号，货号XK-015、XK-016）

数据分析软件：胚胎植入前染色体非整倍体分析软件（v1），医疗器械注册证编号：

【储存条件及有效期】

试剂盒 A 部分、B 部分与 C 部分于-25~-15 $^{\circ}$ C 保存；试剂盒 D 部分于 2~8 $^{\circ}$ C 保存；未拆封试剂盒在上述储存条件下有效期为 12 个月。

建议开封后的试剂盒在三个月内使用，冻融不超过 10 次。

产品运输：试剂盒 A 部分、B 部分与 C 部分采用干冰运输(-75 $^{\circ}$ C~0 $^{\circ}$ C)，试剂盒 D 部分采用冰袋运输（0 $^{\circ}$ C~15 $^{\circ}$ C），为防止试剂盒外包装受潮损坏，运输时干冰、冰袋均不能直接接触产品，需包裹后置入，运输时长不超过 5 天。

【适用仪器】

DA8600 基因测序仪（中山大学达安基因股份有限公司）

【样本要求】

样本采集：将受精卵体外培养至囊胚期，至少取3个囊胚滋养层细胞作为待测样本。首先根据待测样本数N，将细胞裂解液分装至0.2mL PCR管中，5 μ L/管，共N管。在显微镜下取至少3个囊胚滋养层细胞放入含有5 μ L细胞裂解液的0.2mL PCR管底部。细胞附着培养液需低于2 μ L。

注意：避免操作过程中产生气泡，以免样本丢失。

样本运输与保存：配备缓冲装置，干冰条件下运输，运输时长不超过5天，避免剧烈震荡。样本到达后可及时存放于-85 $^{\circ}$ C~-70 $^{\circ}$ C冰箱，保存时间不超过12个月，冻融次数不超过3次；也可存放于-25~-15 $^{\circ}$ C冰箱，保存时间不超过1个月，冻融次数不超过3次。

【检验方法】

1. 文库构建

(1) 将装有阳性对照、阴性对照、空白对照的 0.2mL PCR 管，瞬时离心 3~5sec。在每个 PCR 管中分别加入 5 μ L 细胞裂解液。

(2) 向待测样本与三种对照品的 PCR 管中分别加入 0.5 μ L 细胞裂解酶，共 (N+3) 管。

(3) 将 PCR 管放置于 PCR 仪上，按照下表设置反应参数并运行程序：

循环	温度	时间
1	75 $^{\circ}$ C	10min
	95 $^{\circ}$ C	4min
	22 $^{\circ}$ C	保持

(4) 按照下表制备预扩增混合液：

试剂名称	体积
预扩增缓冲液	30 μ L \times (N+4)
预扩增酶	1 μ L \times (N+4)
总体积	31 μ L \times (N+4)

(5) 待步骤 3) 裂解后，向每管样品加入 30 μ L 预扩增混合液（此时反应总体积约为 36 μ L），涡旋震荡，瞬时离心 3~5sec。

(6) 将 PCR 管放置于 PCR 仪上，按照下表设置反应参数并运行程序：

循环	温度	时间
1	95 $^{\circ}$ C	2min
12	95 $^{\circ}$ C	15sec
	15 $^{\circ}$ C	50sec
	25 $^{\circ}$ C	40sec
	35 $^{\circ}$ C	30sec
	65 $^{\circ}$ C	40sec
	75 $^{\circ}$ C	40sec
1	4 $^{\circ}$ C	保持

(7) 按照下表制备扩增混合液：

试剂名称	体积
扩增缓冲液	30 μ L \times (N+4)
扩增酶	0.8 μ L \times (N+4)
总体积	30.8 μ L \times (N+4)

(8) 在步骤 6) 获得的 PCR 管中每管加入 30 μ L 扩增混合液和 1 μ L 标签引物，涡旋震荡，瞬时离心 3~5sec。

注意：此处标签引物共有 48 种，每个样本加入一种即可。

(9) 将 PCR 管放置于 PCR 仪上，按照下表设置反应参数并运行程序：

循环	温度	时间
1	94℃	30sec
17	94℃	20sec
	63℃	30sec
	72℃	40sec
1	4℃	保持

2. 文库纯化

(1) 涡旋震荡构建的文库，使其充分混匀，瞬时离心 3~5sec，取 60 μ L 扩增产物，分别放入编号对应的新的 1.5mL 离心管中。

(2) 涡旋振荡文库纯化磁珠 20sec，使其充分混匀。

(3) 待纯化的文库中分别加入 0.75 \times 文库纯化磁珠（例如：起始样本量为 60 μ L，加入 45 μ L 磁珠），涡旋震荡混匀，瞬时离心 3~5sec，室温静置 5min。

(4) 将离心管放于磁力架上约 5min，使磁珠与液体分离。

(5) 将上清液转移至编号对应的新的 1.5mL 离心管中，并弃去磁珠。

注意：千万不要吹打含有目的片段的磁珠。

(6) 向上清中加入 0.15 \times 文库纯化磁珠（例如：起始样本量为 60 μ L，加入 9 μ L 磁珠），混合均匀，室温静置 5min。

(7) 瞬时离心 3~5sec，将离心管放于磁力架上约 5min，使磁珠与液体分离，弃上清液，保留磁珠。

注意：千万不要吹打含有目的片段的磁珠。

(8) 保持离心管固定于磁力架上，向离心管中加入 200 μ L 新鲜配置的 80% 乙醇，室温放置 30sec，小心弃除上清液。

(9) 重复步骤 8) 一次。

(10) 保持离心管固定于磁力架上开盖静置放置 10min，使乙醇完全挥发干净。

(11) 将离心管从磁力架上取下，加入 17.5 μ L 洗脱液，涡旋振荡使磁珠完全重悬，室温放置 5min。

(12) 将离心管短暂离心并置于磁力架上约 5min，使磁珠与上清液分离，吸取 15 μ L 上清至编号对应的新的离心管中，取部分纯化后的文库进行后续定量与模板制备，剩余文库于 -25℃~-15℃ 保存，1 个月内可用于上机测序，冻融次数不超过 3 次。

3. 文库定量

纯化后的文库使用 Qubit 荧光计进行文库定量。

4. 文库混合

根据 Qubit 的定量结果，每个样本取等质量（如 10ng）文库进行混合，若有空白对照，则空白对照混合量为样本取样体积的平均值。

5. 上机测序

(1) 混合文库定量：混合后的文库使用 Qubit 荧光计进行文库定量；

(2) 混合文库浓度换算：按照 Qubit 定量结果（计为 $X\text{ng}/\mu\text{L}$ ），按照 $X \times 3 = Y$ （nM）进行质量浓度与物质的量浓度的换算；

(3) 混合文库稀释：根据换算后的浓度结果（YnM），将混合文库稀释到 100pM。取 10 μL 稀释后的文库进行上机测序，根据基因测序通用试剂盒（半导体测序法）说明书进行操作。

6. 测序数据分析

测序结束后，使用胚胎植入前染色体非整倍体分析软件对数据进行分析，得到测序样本每条染色体的拷贝数值。

7. 质量控制

建议每次检测都要进行对照品的检测。阳性对照品、阴性对照品、空白对照品检测结果应同时满足以下要求，否则重新实验：

名称	阳性对照品 1	阳性对照品 2	阴性对照品	空白对照品
检测结果	21 号染色体三体	性染色体非整倍体阳性	阴性	无法检测

【参考区间】

数据分析采用配套的分析流程，包括数据清洗、序列比对、窗口划分、GC 校正、扩增偏好性校正（构建参考数据库）以及窗口片段化（拷贝数变异区域的确定），通过以上分析步骤的分析最终确定染色体的拷贝数，从而判断待检测样本的染色体是否存在异常。

1. 参考数据库构建

采用 200 例确认正常的细胞样本，进行文库构建及半导体测序。原始测序数据进行数据清洗，去除接头及低质量序列，保留高质量的碱基序列。将高质量序列比对到人类基因组标准序列（hg19），确定每条碱基序列在染色体上的位置，保留唯一比对到基因组的序列。随后将整个基因组划分成 100kbp 片段大小的窗口，计算每个窗口上得到的唯一匹配序列数目。

由于测序过程中会存在一定的 GC 偏好性，需对 GC 偏好性引起的偏差进行校正。其原理为给予不同 GC 含量的窗口不同的权重，每个窗口的相对序列数目乘以 GC 权重，去除 GC 偏差。具体地：

计算每个窗口的 GC 含量，以 0.1% 为单位，计算 (0,100%) 不同 GC 含量的窗口数。每个 GC 含量的窗口数目记为 W_i ，所有 GC 含量的平均窗口数目记为 W ，每个窗口 GC 校正后的相对序列数目为

$$RiGC = Ri \times \frac{W}{W_i}$$

根据 200 个参考样本的各窗口 GC 校正后相对序列数目，计算出每个窗口的 GC 校正后相对序列数目的平均值，即为该窗口在参考数据库的平均相对序列数 $RiGC_{ref}$ 。

2. 参考区间的确定

使用本试剂盒对 575 例阳性样本和阴性样本进行文库构建及半导体测序，原始测序数据通过数据清洗、序列比对、窗口划分、GC 校正后得到每个窗口的相对序列数目，再通过参考数据库进行扩增偏好性校正，具体为：每个窗口 GC 校正后的相对序列数目为 $RiGC$ ，该窗口在参考数据库的平均相对序列数为 $RiGC_{ref}$ ，最终每个窗口的相对序列数目 $Rifinal = \frac{RiGC}{RiGC_{ref}}$ 。最后采用 CBS (Circular Binary Segmentation, 环状二元分割) 算法进行拷贝数变异区域的确定。该算法是一种常用的拷贝数变异检测的方法，适用于高通量测序数据的片段化分割。原理为通过 Z 检验找到断裂点，然后将染色体按不同的区域分割。得到染色体分割后的区域，通过计算异常区域的 CNV 值，来确定该检测样本的染色体是否存在异常。

利用如下公式进行染色体区域的拷贝数计算：

$$\text{拷贝数值} = 2 * (SEGjmean)$$

$SEGjmean$ ：检测样本染色体区域编号 j 的相对序列数目的均值；

(1) 常染色体参考区间确定

通过不同 拷贝数值区间的划分，对 218 例阳性样本与 113 例阴性样本常染色体拷贝数值进行统计，计算敏感度、特异性、阳性预示值以及阴性预示值，最终确定常染色体非整倍体阳性的参考值范围。通过对 96 例不同嵌合比例的细胞系样本（嵌合比例分别为 10%，20%，30%，40%，50%，60%，70%），以及 100 例阴性细胞样本的染色体拷贝数值进行分析。得到常染色体非整倍体的临界值范围。具体如下表所示：

参考值范围	判定
拷贝数值 ≥ 2.55	三体及以上
$2.25 < \text{拷贝数值} < 2.55$	重复临界区间
$1.75 \leq \text{拷贝数值} \leq 2.25$	二体
$1.45 < \text{拷贝数值} < 1.75$	缺失临界区间
拷贝数值 ≤ 1.45	单体及以下

(2) 性染色体参考区间确定

通过对 79 例性染色异常样本，330 例性染色体正常样本以及 70 例性染色体嵌合异常样本（嵌合比例为 30%，40%）的拷贝数值进行分析，最终确定性染色体不同倍性的参考值范围。具体如下表所示：

性染色体	参考值范围	判定
X 染色体	拷贝数值 ≥ 2.4	三体及以上
	$1.6 < \text{拷贝数值} < 2.4$	二体
	$1.4 \leq \text{拷贝数值} \leq 1.6$	临界区间
	$0.6 < \text{拷贝数值} < 1.4$	单体
	拷贝数值 ≤ 0.6	单体以下
Y 染色体	拷贝数值 ≥ 1.6	二体及以上
	$1.4 < \text{拷贝数值} < 1.6$	重复临界区间
	$0.6 \leq \text{拷贝数值} \leq 1.4$	单体
	$0.4 < \text{拷贝数值} < 0.6$	缺失临界区间
	拷贝数值 ≤ 0.4	单体以下

【检验结果的解释】

1. 若单细胞扩增失败，有可能是在活检过程中没有取到细胞或起始样本丢失，由于活检样本无法重复取样，无法进行重复验证，需要临床医生结合其他指征确定胚胎是否可以植入。
2. 当某染色体的拷贝数值报告为“NA*”，提示该染色体可能存在染色体片段异常或嵌合风险，可结合其他临床指征处理。其它情况则按以下解释进行判断：

2.1 常染色体：当某染色体拷贝数值 ≤ 1.45 或者 ≥ 2.55 时，分别表明检测样本的该染色体为单体或三体，即该染色体存在非整倍体异常；当某染色体拷贝数值为“ $1.75 \leq \text{拷贝数值} \leq 2.25$ ”时，表明该染色体为二体，未见非整倍体异常；当某染色体拷贝数值为“ $1.45 < \text{拷贝数值} < 1.75$ ”或“ $2.25 < \text{拷贝数值} < 2.55$ ”时，则提示该染色体可能存在染色体嵌合风险，可结合其他临床指征处理。

2.2 性染色体：a. 当X染色体拷贝数值 ≥ 2.4 或 ≤ 0.6 ，或 Y染色体拷贝数值 ≥ 1.6 ；b. 当X染色体拷贝数值 > 1.6 ，且Y染色体拷贝数值 > 0.4 ；c. 当X染色体拷贝数值 < 1.4 ，且Y染色体拷贝数值 ≤ 0.4 ，上述3种情况表明性染色体存在非整倍体异常，不宜植入。当X染色体拷贝数值为“ $1.6 < \text{拷贝数值} < 2.4$ ”，且Y染色体拷贝数值 ≤ 0.4 ；或X染色体拷贝数值为“ $0.6 < \text{拷贝数值} < 1.4$ ”，且Y染色体拷贝数值为“ $0.6 \leq \text{拷贝数值} \leq 1.4$ ”时，表明性染色体为二体，未见非整倍体异常。当X染色体拷贝数值为“ $1.4 \leq \text{拷贝数值} \leq 1.6$ ”，且Y染色体拷贝数值 < 1.6 ；或X染色体拷贝数值为“ $0.6 < \text{拷贝数值} < 1.4$ ”，且Y染色体拷贝数值为“ $1.4 < \text{拷贝数值} < 1.6$ ”或“ $0.4 < \text{拷贝数值} \leq 0.6$ ”时，则提示性染色体可能存在染色体嵌合风险，可结合其他临床指征处理。

3. 本检测结果仅供临床医生参考，不作为胚胎是否植入的唯一标准。需临床医生结合其他指征确定胚胎是否可以植入。

【检验方法的局限性】

1. 本产品检测仅限于检测染色体数目异常，对于染色体数目不变的结构异常、染色体片段的缺失和重复不包含在内；
2. 本产品检测不适用于整套染色体三倍体或多倍体的胚胎检测，如69,XXX；
3. 本产品检测不适用于单亲二倍体或部分单亲二倍体检测；
4. 本产品检测不适用于多原核细胞、细胞分裂异常及其他原因引起的染色体倍数无法确定的胚胎检测；
5. 本产品检测不适用于高度重复序列区域，例如近着丝粒、端粒、异染色质等区域，检测结果不包含涉及这些区域的异常；
6. 本产品对嵌合型样本的检测存在一定的错误率，如果胚胎存在嵌合现象，本试剂盒检测结果仅供参考，在没有其他正常胚胎可供选择的情况下，此类结果胚胎需要临床医生结合其他临床指征进行处理。
7. 本产品检测结果仅供医生参考，不直接作为临床诊断依据。
8. 本试剂盒不报告微缺失微重复检测结果，不用于拷贝数变异的检测。

【产品性能指标】

1. 数据量控制：本试剂盒对于数据量控制参考品的检测有效数据量不低于1M，基因组覆盖率不低于4%，使用经标化的企业参考品中的数据量控制参考品进行检测，符合该指标。
2. 非整倍体阳性检测符合率：本试剂盒对非整倍体阳性均能检出，使用经标准化的企业参考品的非整倍体阳性样本进行检测，符合率为100%。
3. 微缺失微重复检测符合率：本试剂盒对微缺失微重复样本进行了分析性能评估；使用经标化的企业参考品中的微缺失微重复样本进行检测，符合本试剂盒的性能指标。
4. 阴性检测符合率：本试剂盒对阴性样本检测结果均为阴性，使用经标化的企业参考品中的阴性样本进行检测，均未检出染色体异常，符合率为100%。
5. 嵌合体检测符合率：本试剂盒对30%嵌合的嵌合体样本检出率应达到30%以上，70%嵌合体样本检出率应达到60%以上，使用经标化的企业参考品中的嵌合体样本进行检测，符合该指标。
6. 重复性：使用同一批次试剂盒进行三次重复实验，要求三次实验结果每次均满足1-5的检测要求。
7. 精密度：分别在两个不同的实验室进行检测，不同实验室间检测结果均满足本试剂盒的性能指标。
8. 高通量测序配套试剂验证：本试剂盒配套序康医疗科技（苏州）有限公司生产的基因测序通用试剂盒（半导体测序法）（备案号：苏苏械备20170682号）进行检测，检测结果可满足本试剂盒的性能要求。
9. 分析特异性：使用本试剂盒检测企业参考品中的微缺失微重复阳性样本，均未检测出非整倍体，检测特异性达到100%。

10. 临床试验情况:

临床试验采用对比验证试验设计, 每例纳入统计的样本均采用本试剂盒和金标准对比验证方法进行检测。染色体非整倍体阳性金标准对比验证方法为荧光原位杂交(FISH); 染色体非整倍体阴性金标准对比验证方法为染色体核型分析, 包括产前诊断羊水穿刺核型分析、新生儿脐带血核型分析及婴儿外周血核型分析。

本试剂盒临床试验入组受试者 1150 例。共入组胚胎 5787 枚, 其中 5780 枚胚胎完成检测, 检测出染色体非整倍体阳性 1197 枚, 染色体非整倍体阴性 4540 枚。阳性样本 FISH 验证 508 例, 阴性样本随访到核型分析检查结果 317 例。统计分析结果显示, 与金标准对照方法相比, 本试剂盒检测胚胎染色体非整倍体的灵敏度为 99.80% (95%CI: 98.90%~99.97%), 特异性为 100.00% (95%CI: 98.80%~100.00%), 总符合率为 99.88% (95%CI: 99.32%~99.98%); 本试剂盒检测胚胎染色体非整倍体的阳性预测值为 100.00%(95%CI: 99.25%~100.00%), 阴性预测值为 99.68%(95%CI: 98.24%~99.94%); 进行 Kappa 一致性检验, Kappa=1.00 ($p < 0.001$), 显示本试剂盒与金标准对照方法具有良好的检测一致性。

【注意事项】

1. 检测前必须仔细检查所有样品, 应排除污染的样品。
2. 操作注意安全防护。穿戴防护衣物、一次性手套、口罩; 所有直接接触过样品的物品应进行消毒后丢弃或再次使用。同时防止操作者脱落细胞的污染。
3. 使用前, 液体试剂应混合均匀。尽量避免反复冻融。
4. 所使用的接触试剂的材料均要求干燥、洁净, 以防止污染。实验过程中涉及的耗材为一次性使用, 不得重复使用。
5. 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(包括样品处理区、试剂配制区、全基因组扩增区、文库构建及检测区、测序区和产物分析区等), 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。
6. 本试剂一次性使用, 仅用于体外诊断, 不同批号试剂禁止交叉使用, 请勿使用过期试剂。
7. 样本应视为存在潜在的生物危害, 实验结束后作为潜在传染源处理。
8. 为减少细胞准备过程中 DNA 的污染、聚合酶抑制剂的影响, 实验前需使用 PBS 溶液清洗细胞, 同时保证附着于细胞的 PBS 溶液不超过 2 μ L。
9. 避免细胞因储存方法或准备方法不当造成 DNA 的降解。
10. 请将 DNA 扩增产物与预扩增试剂分区域储存。
11. 添加规定体积的液体时, 需沿管壁小心添加, 请勿吹打 PCR 管中液体。

【参考文献】

[1] Keltz M D, Vega M, Sirota I, et al. Preimplantation Genetic Screening (PGS) with Comparative Genomic Hybridization (CGH) following day 3 single cell blastomere biopsy markedly improves IVF outcomes while lowering multiple pregnancies and miscarriages[J]. Journal of Assisted Reproduction & Genetics, 2013, 30(10):1333-9.

[2] Lee H L, McCulloh D H, Hodes-Wertz B, et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening improves implantation and live birth in women age 40 through 43[J]. Journal of Assisted Reproduction & Genetics, 2015, 32(3):435-44.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：序康医疗科技（苏州）有限公司

住所：中国（江苏）自由贸易试验区苏州片区星湖街 218 号生物医药产业园一期项目 B7 楼 201 单元。

联系方式：

售后服务单位地址：中国（江苏）自由贸易试验区苏州片区星湖街 218 号生物医药产业园一期项目 B7 楼 201 单元。

联系方式：

生产地址：中国（江苏）自由贸易试验区苏州片区星湖街 218 号生物医药产业园一期项目 B7 楼 201 单元；A2 楼 326 单元。

【生产许可证编号】

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准及修改日期】

说明书核准日期：

说明书修改日期：