

受理号：CSZ2200239

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：人类 FMR1 基因检测试剂盒（荧光 PCR-毛细管电泳法）

产品管理类别：第三类

申请人名称：厦门百欧迅生物科技有限公司

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.....	15
四、 产品受益风险判定.....	17
综合评价意见.....	19

基本信息

一、申请人名称

厦门百欧迅生物科技有限公司

二、申请人住所

厦门市海沧区翁角西路 2032 号厦门生物医药产业园

A17 号楼 4 层之二

三、生产地址

厦门市海沧区翁角西路 2032 号厦门生物医药产业园

A17 号楼

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

本试剂盒含有 FMR1 反应液、FMR1 引物混合液、酶 A、FMR1 阳性对照和 FMR1 空白对照，详见表 1，具体内容详见产品说明书。

表 1 产品主要组成成分

组分名称	主要成分	规格 (48 测试/盒)	规格 (96 测试/盒)	数量 (管)
FMR1 反应液	脱氧核糖核苷酸、氯化镁、缓冲液	600 μ L	1200 μ L	1
FMR1 引物混合液	FMR1 特异性引物溶液	50 μ L	100 μ L	1
酶 A	热启动核酸聚合酶	5 μ L	10 μ L	1
FMR1 阳性对照	FMR1 基因 CGG 重复数 10、19、29、32、54、74、118、>200 之质粒	20 μ L	20 μ L	1
FMR1 空白对照	1 \times TE 缓冲液	1200 μ L	1200 μ L	1

注：不同批号试剂盒各组分不可以混用。具体内容详见产品说明书

(二) 产品预期用途

本试剂盒用于体外定性检测人 EDTA 抗凝外周全血样本提取基因组 DNA 中 FMR1 基因 5'非转译区的 CGG 重复数。

检测结果用于确定 FMR1 基因是否为全突变型，用于脆性 X 综合症的辅助诊断，检测结果仅供临床参考。

脆性 X 综合症为常见的遗传性智能障碍疾病之一，发病率仅次于唐氏综合症，根据统计，此症男性罹病率约 1/4,000，女性罹病率约 1/5,000-1/8,000。患者会有严重的智力低下、发育迟缓、语言障碍和行为问题，包括多动症、自闭症、注意力不集中或伴有癫痫等。致病原因是 X 染色体上 FMR1 基因 5'非转译区内发生 CGG 重复次数异常增加，导致维持脑部正常神经传导的 FMRP 蛋白缺乏或减少。美国医学遗传学会 (ACMG) 依据 FMR1 基因 CGG 重复次数，定义出 CGG 重复次数小于 45 为正常型、CGG 重复次数 45-54 为中间型、CGG 重复次 55-200 为前突变型及 CGG 重复次数大于 200 为全突变型，正常型和中间型不会有临床症状，前突变型称之为携带者，全突变型就会成为患者。

(三) 产品包装规格

48 测试/盒，96 测试/盒。

(四) 产品检验原理

本试剂盒采用荧光 PCR-毛细管电泳法，针对人类 FMR1 基因 5'非转译区设计带有 FAM 荧光修饰的特异性引物进行一管 PCR 扩增反应，同时产生 CGG 重复区域扩增产物与 FMR1 基因扩增产物。

FMR1 基因扩增产物：针对 CGG 重复区域外的序列，设计特异性引物，所扩增出的片段，包含完整的 CGG 重复序列，透过检测峰的挑选，同时利用 FMR1 阳性对照建立标准曲线，计算出检测样本 CGG 重复数，从而检测 FMR1 基因属于正常型、中间型、前突变型或全突变型。

CGG 重复区域扩增产物：针对 CGG 重复区域进行扩增，上游引物黏合 CGG 重复区域内，与标记有荧光基团的下游引物进行 PCR 扩增，由于此上游引物可以结合在 CGG 重复区域各个位置，故会产生多种大小的扩增产物，每个扩增产物相差 3bp。PCR 效率随着片段长度增加，效率会降低，所以当扩增

的 CGG 重复区域越长时，其 CGG 扩增产物峰的峰值会越低，而形成每个峰连续相差 3bp 的影子峰（stutter peaks），即为 CGG 重复区域扩增产物，作为前突变型或全突变型的辅助判断依据，若影子峰（stutter peaks）延伸超过第一个检测峰群的 FMR1 基因扩增产物，代表有更大片段的第二个检测峰的 FMR1 基因扩增产物。

二、临床前研究概述

（一）主要原材料

1. 主要原材料的选择

本产品的主要原材料包括引物、dATP、dCTP、dGTP、dTTP、热启动核酸聚合酶，均为外购的方式获得。

自行设计的引物委托专业的合成公司合成；dATP、dCTP、dGTP、dTTP、热启动核酸聚合酶等均由有资质的原料供应商提供。通过功能性试验，申请人筛选出最佳原材料和供应商，同时制定了各主要原材料质量标准并经检验合格。

2. 企业参考品和质控品设置情况

本产品的企业参考品包括阳性参考品、阴性参考品、重复

性参考品及检测限参考品。

阳性参考品共 12 份，涵盖本试剂盒可检出的不同突变的基因型，其中中间型 2 例、前突变型 4 例及全突变型 6 例；阴性参考品 9 份，均为正常型基因样本；最低检测限参考品 12 份，涵盖本试剂盒可检出的不同突变的基因型；重复性参考品 3 份，中间型、前突变型及全突变型各 1 例。上述企业参考品均采用细胞系进行提取的基因组 DNA 制备并确认。

试剂盒设置有 FMR1 阳性对照与 FMR1 空白对照，FMR1 阳性对照主要原料为质粒 DNA，含 CGG 重复数为 10、19、29、32、54、74、118、>200 的 FMR1 基因，FMR1 空白对照主要原料为 1×TE 溶液，并按照相应的质量标准进行检测合格后使用。

(二) 生产工艺及反应体系研究

本试剂盒的反应体系的研究包括 PCR 反应液中各组份配方与用量的调整、引物比例的优化、热启动核酸聚合酶用量的确定；对 PCR 反应条件的研究包括扩增循环数、扩增循环数中各阶段时间的优化；毛细管电泳的上机程序；确认 PCR 过

程的质量控制；提取试剂与样本提取的研究包含反应投入量、样本保存时间、冻融次数、提取重复性及样本加样量的测试，并对产品适配的两种机型进行研究。

通过功能性实验，最终确定了最佳的反应体系。根据试剂盒中试剂及组见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

本产品分析性能评估内容包括准确度、精密度、最低检测限、分析特异性、适用机型与提取试剂性能的研究。

1. 准确度

准确度评估样本使用覆盖 FMR1 基因各不同重复数与基因型的脆性 X 核酸检测国家参考品、企业参考品与临床样本，分别采用三批次的试剂盒进行检测，并与国外上市试剂盒进行对比研究，均能检出相应的重复数与基因型，检测符合率 100%，试剂盒的准确性符合设计要求。

2. 精密度

精密度研究使用不同基因型的企业参考品以及临床样本，

将上述样本提取后 DNA 稀释至两个浓度水平进行室内精密度、试剂盒批内和批间不精密度、操作人员间精密度、实验室间精密度考察。结果显示同一批试剂盒对不同参考品检测 CGG 重复数的室内精密度与操作人员间精密度、实验室间精密度，及三批试剂盒检测不同参考品批内和批间不精密度变异系数 CV 皆不大于 10%，试剂盒检测精密度良好，符合设计要求。

3. 检测限

在检测限的研究中，使用三批试剂盒对 15 份阳性及阴性企业参考品进行检测限考察及验证。检测限考察将各企业参考品浓度稀释至不同浓度水平，使用三批试剂盒分别对每个参考品的梯度浓度平行检测 3 次，初步考察最低检测限浓度为 2.5ng/μL，进一步采用包含不同型别的临床 EDTA 抗凝全血样本进行考察，提取后的 DNA 样本分别稀释至不同浓度水平，每个样本的每一浓度均平行检测 20 次，三批试剂盒皆可检出对应基因型，故进一步以 2.5ng/μL 进行检测限验证。

选择一组临床 EDTA 抗凝全血样本进行检测限验证，将临

床样本提取后的 DNA 和所有企业参考品稀释至 2.5ng/μL，每个参考品检测 20 次，验证结果表明采用 2.5ng/μL 的人基因组 DNA 样本及企业参考品，皆可检出 CGG 重复数及基因型结果，且三批次符合率均为 100%。

4. 分析特异性

在干扰试验中，申请人对于扰物质研究包含三酸甘油酯、胆红素、血红素、胆固醇、常见治疗药物进行评价。结果显示：人 EDTA 抗凝全血样本中常见的干扰物质，如三酸甘油酯（500mg/dL）、胆红素（15mg/dL）、血红素（20g/dL）、胆固醇（400mg/dL），与常见治疗药物，如西酞普兰（140mg/ml）与二甲双胍（3μg/ml）对本试剂盒不产生干扰。

交叉反应评价中，申请人针对与 FMR1 基因相似的 CGG 三核苷酸重复序列基因，如由 FMR2 基因突变引起的脆性 XE 综合症（Fragile XE syndrome, FRAXE）、ATXN3 中杂合的异常 CAG 三核苷酸重复扩增引起的脊髓小脑性共济失调三型（SCA3）、HTT 基因的 CAG 重复的亨廷顿舞蹈症（HTT），与相似症状的唐氏综合征及同位于 X 染色体上的 DMD 基因(杜

氏肌营养不良症)的疾病样本等进行交叉反应评价。结果显示上述疾病样本均不产生交叉反应。

5. 适用机型

Life Veriti PCR 扩增仪、BIO-RAD T100 PCR 仪与 3500xL Dx、3500 Dx 机型为研究对象,对试剂盒的检测限验证、室内精密度、批内和批间不精密度以及操作人员间精密度等进行评估,实验结果表明:本试剂盒使用上述各组合的毛细管电泳仪及 PCR 扩增仪,检测结果均符合试剂盒研制设计的要求,能够满足临床实际需要。

6. 提取试剂性能研究

采用临床样本进行了核酸提取试剂盒性能的研究,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需求。

(四) 阳性判断值研究

阳性判断值研究首先采用重复检测空白对照的方法对背景噪音进行考察,并采用正常型、中间型、前突变型、全突变型的样本配制成高、中、低不同浓度的样本进行检测,分别统计

不同片段长度区间产生的峰形与空白对照的背景噪音值进行检测峰阈值初步研究，对实验数据进行 ROC 曲线分析绘制 ROC 曲线，设定各片段长度范围的最佳判断值，片段长度小于 350bp 且其检测峰峰高大于 200 时即视为可选取之检测峰，并将检测峰片段大小用于计算 CGG 重复次数；若检测峰片段长度大于 350bp 且其检测峰峰高大于 45 时视为可选取之检测峰，进一步结合检测峰选择依据，将目标检测峰片段大小用于计算 CGG 重复次数，进而判断样本基因型。FMR1 空白对照应无扩增产物峰或检测峰低于判断值。

申请人进一步采用临床样本对阳性判断值进行验证，根据检测峰挑选原则、阳性判断值研究结果并结合重复数计算公式，并以已知 FMR1 阳性对照 CGG 重复数与所得检测片段长度结果建立标准曲线计算未知样本重复数，结果显示所有样本 CGG 重复数和基因型均与国外上市试剂确认结果一致，基本符合要求。

(五) 稳定性研究

申请人对本产品在实际储存条件下保存至成品有效期后的

实时稳定性、使用稳定性、运输稳定性等进行了系统的研究，确定了在各种条件下试剂的有效保存时间。

1. 实时稳定性

连续三批试剂放置于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存，依次考察每批试剂盒在第 3、6、9、12、14、18、19 个月的性能，结果显示：外观符合产品标准要求，阳性参考品、阴性参考品、检测限参考品与重复性参考品符合相对应的型别。试剂盒在 19 个月内稳定性良好，为确保产品检测性能，把试剂盒效期定为 18 个月。

2. 使用稳定性

考察试剂开瓶后在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 5 天内、 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 在试剂盒效期内及反复冻融 7 次的性能，结果显示：产品外观符合要求，阳性参考品、阴性参考品、检测限参考品与重复性参考品符合相对应的型别。为确保产品性能稳定，要求本试剂盒在首次使用后，应尽快用完，如需长期保存，再次放置于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 可保存至有效期产品性能稳定，但应避免反复冻融（不超过 6 次）。

3. 运输稳定性

试剂盒按正常发货添加适量的 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 预冷冰袋、用泡沫

填充剩余空间后冰袋体积不低于包装总体积的 20%，委托快递公司发送到三个不同地方的办事处后立即返样并保存至规定条件，收到返样后、生产后第 13 个月、19 个月分别取样检测，结果显示：运输时间 1 周内试剂仍可正常使用且运输后于效期内亦可正常使用。

此外，申请人对产品的样本稳定性进行了研究。结果显示，产品性能均能满足产品说明书声称要求。

三、临床评价概述

申请人分别在浙江大学医学院附属儿童医院、复旦大学附属儿科医院、湖南省儿童医院、浙江大学医学院附属妇产科医院、济南市妇幼保健院、柳州市妇幼保健院 6 家临床试验机构开展临床试验。采用试验体外诊断试剂分别与临床公认的检测技术 AmplideX PCR/CE FMR1 Reagents、实验室参考方法 Southern blot 分析以及脆性 X 综合征临床诊断结果进行比较研究，评价试验体外诊断试剂临床性能。入组病例以有智力低下、发育迟缓、语言障碍、注意缺陷多动障碍以及儿童孤独症等相关症状的男性儿童为主，样本类型为 EDTA 抗凝外周全

血。临床试验共入组受试者 763 例，其中全突变型 79 例，非全突变型 684 例。

试验结果显示，试验体外诊断试剂与 AmplideX PCR/CE FMR1 Reagents 对比阳性符合率 100%（95%CI: 95.36%，100%），阴性符合率 100%（95%CI: 99.44%，100%）；与 Southern blot 分析对比阳性符合率 100%（95%CI: 95.36%，100%），阴性符合率 100%（95%CI: 91.80%，100%）；与脆性 X 综合征临床诊断结果对比，对于确诊脆性 X 综合征的 50 例患者本产品检出率 98%，一例假阴性为罕见的 FMR1 基因点突变导致的脆性 X 综合征，不属于试验体外诊断试剂检测范围。

此外临床试验共计入组 25 个脆性 X 综合征家系共计 122 名成员，进行脆性 X 综合征家系研究。结果显示，所有家系中携带致病基因（全突变型）的男性成员 38 名，均表现为脆性 X 综合征，外显率 100%，未携带致病基因的男性成员未见脆性 X 综合征相关表现。

综上所述，该产品临床试验设计符合《体外诊断试剂临

床试验技术指导原则》的相关要求。临床试验结果显示该产品与已上市同类产品一致性较好。

四、产品受益风险判定

依据“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。

（一）受益评估

本试剂盒用于体外定性检测人 EDTA 抗凝外周全血样本提取基因组 DNA 中 FMR1 基因 5'非转译区的 CGG 重复数。检测结果用于确定 FMR1 基因是否为全突变型，用于脆性 X 综合症的辅助诊断，检测结果仅供临床参考，具体临床应用时，临床医生必须结合病例实际情况判读。本产品临床应用的主要受益在于：可作为脆性 X 综合症的辅助诊断，对于智力障碍、行为问题或者部份合并有癫痫的患儿，能准确诊断同时采用特殊教育，可加强患儿的学习能力，提高预后。依据现有的临床试验结果，其对阳性和阴性样本检测临床灵敏度和特异度良好。

（二）风险评估

申请人对已知危险（源）进行风险评价，按照风险可接受

准则判断每个危险（源）的风险是否达到可接受水平，对合理可行降低的风险、不经过风险/收益分析即判定为不可接受的风险采取控制措施，并对具体措施进行实施验证，同时重新对采取措施后的风险进行估计，确认其风险水平是否可接受。但为保证用械安全，基于对主要剩余风险的规避，需要在说明书中提示以下信息：

1. 预期用途：用于体外定性检测人 EDTA 抗凝外周全血样本提取基因组 DNA 中 FMR1 基因 5'非转译区的 CGG 重复数。检测结果用于确定 FMR1 基因是否为全突变型，用于脆性 X 综合症的辅助诊断，检测结果仅供临床参考。

2. 警示及注意事项：产品说明中明确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。

2024 年 1 月 11 日

附件：产品说明书

人类 FMR1 基因检测试剂盒（荧光 PCR-毛细管电泳法）

【产品名称】

人类 FMR1 基因检测试剂盒（荧光 PCR-毛细管电泳法）

【包装规格】

48 测试/盒；96 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人 EDTA 抗凝外周全血样本提取基因组 DNA 中 FMR1 基因 5'非转译区的 CGG 重复数。

检测结果用于确定 FMR1 基因是否为全突变型，用于脆性 X 综合症的辅助诊断，检测结果仅供临床参考。

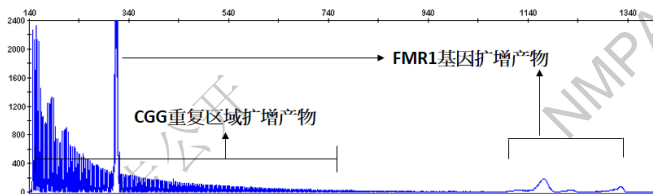
脆性 X 综合症为常见的遗传性智能障碍疾病之一，发病率仅次于唐氏综合症，根据统计，此症男性罹病率约 1/4,000，女性罹病率约 1/5,000-1/8,000^[1-2]。患者会有严重的智力低下、发育迟缓、语言障碍和行为问题，包括多动症、自闭症、注意力不集中或伴有癫痫等。致病原因是 X 染色体上 FMR1 基因 5'非转译区内发生 CGG 重复次数异常增加，导致维持脑部正常神经传导的 FMRP 蛋白缺乏或减少。美国医学遗传学会（ACMG）依据 FMR1 基因 CGG 重复次数，定义出 CGG 重复次数小于 45 为正常型，CGG 重复次数 45-54 为中间型，CGG 重复次 55-200 为前突变型及 CGG 重复次数大于 200 为全突变型，正常型和中间型不会有临床症状，前突变型称之为携带者，全突变型就会成为患者^[2]。

【检验原理】

本试剂盒采用荧光 PCR-毛细管电泳法，针对人类 FMR1 基因 5'非转译区设计带有 FAM 荧光修饰的特异性引物进行一管 PCR 扩增反应，同时产生 CGG 重复区域扩增产物与 FMR1 基因扩增产物。

● **FMR1 基因扩增产物：**针对 CGG 重复区域外的序列，设计特异性引物，所扩增出的片段，包含完整的 CGG 重复序列，透过检测峰的挑选，同时利用 FMR1 阳性对照建立标准曲线，计算出检测样本 CGG 重复数，从而检测 FMR1 基因属于正常型、中间型、前突变型或全突变型，下图为 FMR1 基因全突变型(29/>200)样本结果图。

● **CGG 重复区域扩增产物：**针对 CGG 重复区域进行扩增，上游引物黏合 CGG 重复区域内，与标记有荧光基团的下游引物进行 PCR 扩增，由于此上游引物可以结合在 CGG 重复区域各个位置，故会产生多种大小的扩增产物，每个扩增产物相差 3bp。PCR 效率随着片段长度增加，效率会降低，所以当扩增的 CGG 重复区域越长时，其 CGG 扩增产物峰的峰值会降低，而形成每个峰连续相差 3bp 的影子峰（stutter peaks），如下图所示，即为 CGG 重复区域扩增产物，作为前突变型或全突变型的辅助判断依据，若影子峰（stutter peaks）延伸超过第一个检测峰群的 FMR1 基因扩增产物，代表有更大片段的第二个检测峰的 FMR1 基因扩增产物。



【主要组成成分】

组分名称	主要成分	规格 (48 测试/盒)	规格 (96 测试/盒)	数量 (管)
FMR1 反应液	脱氧核糖核苷酸、氯化镁、缓冲液	600μL	1200μL	1
FMR1 引物混合液	FMR1 特异性引物溶液	50μL	100μL	1
酶 A	热启动核酸聚合酶	5μL	10μL	1
FMR1 阳性对照	FMR1 基因 CGG 重复数 10、19、29、32、54、74、118、>200 之腐粒	20μL	20μL	1
FMR1 空白对照	1×TE 缓冲液	1200μL	1200μL	1

注 1：不同批次试剂盒各组分不可以混用。

注 2：需自备厦门百欧迅生物科技有限公司生产的核酸提取试剂（离心柱法）备案号：闽厦械备 20200355 号、GeneScan 1200 LIZ 染料分子量标准品（Applied Biosystems，货号 4379950）、高度去离子甲酰胺（Applied Biosystems，货号 4311320、4440753）

【储存条件及有效期】

本试剂盒于 -20±5℃ 下避光保存，有效期为 18 个月；开瓶后使用不影响产品有效期，使用完毕后于 -20±5℃ 保存。应尽量避免反复冻融，冻融次数不可超过 6 次。采用泡沫箱添加适量的 -20±5℃ 预冷冰袋、用泡沫填充剩余空间后冰袋体积不低于包装总体积的 20% 密封运输，运输时间不超过一周，运输温度不高于室温，运输后不影响产品有效期。生产日期及有效期至见标签。

【适用仪器】

本试剂盒采用毛细管电泳仪进行 PCR 产物分析，经验证可用的 PCR 扩增仪机型为：Life Veriti PCR 扩增仪与 BIO-RAD T100 PCR 仪；经验证可用的毛细管电泳仪机型为：Applied Biosystems® 3500 Dx/3500xL Dx Genetic Analyzers。

【样本要求】

1. 样本采集

样本类型为 EDTA 抗凝全血，体积应不低于 200μL。

2. 样本保存和运送

样本采集后应及时检测，全血可于 2~8℃ 保存，并于 2 周内完成检测。于 -20±5℃ 保存不超过 2 年，于 -70℃ 以下保存不超过 5 年。样本避免反复冻融，冻融次数不超过 4 次。

【检验方法】

1. 样本处理（在样本处理区进行）

1.1 取 200μL 全血样本，厦门百欧迅生物科技有限公司生产的核酸提取试剂（离心柱法），备案号：闽厦械备 20200355 号进行人类基因组 DNA 提取。

1.2 提取完的 DNA 样本建议立即进行检测，否则应保存于 -20±5℃ 不超过 2 年，避免反复冻融。

1.3 经核酸提取试剂（离心柱法）提取完的人类基因组 DNA，进行 PCR 扩增的 DNA 模板要求：OD260nm/OD280nm 的比值应在 1.6-2.0 之间，建议 DNA 浓度为 2.5-50ng/μL，若浓度过高可用 FMR1 空白对照进行稀释。

1.4 如提取完的 DNA 浓度未达要求，增加全血样本量提取。

2. 扩增试剂配制（在试剂配制区进行）

2.1 取出 FMR1 反应液与 FMR1 引物混合液，于室温解冻，用震荡器震荡均匀，以微量离心机短暂离心，使所有液体沉降于管底。

2.2 扩增试剂配制：按下表配制扩增试剂。

组分	每反应体积
FMR1 反应液	12μL
FMR1 引物混合液	0.9μL
酶 A	0.1μL
总体积*	13μL

*为了减少分液误差，建议在配制扩增试剂时根据样本数量（n）分别取（n+1）人份的反应液和混合酶。n=待测样本数 + FMR1 空白对照 1 份 + FMR1 阳性对照 1 份。

2.3 将配制好的试剂用震荡器震荡均匀，用微量离心机短暂离心，使液体沉降于管底。

2.4 在 PCR 反应管中分别加入 13μL 配制好的扩增试剂，转移到样本处理区加样。

3. 加样（在样本处理区进行）

3.1 在对应的 PCR 反应管中分别加入 2μL 待测样本、FMR1 空白对照、FMR1 阳性对照，盖上 PCR 反应管盖后，短暂离心。

3.2 转移至核酸扩增区。

4. PCR 扩增（在核酸扩增区进行）

4.1 将 PCR 反应管放入 PCR 扩增仪，按如下方法设定反应程序进行 PCR 扩增。反应体积设定：15 μL，建议立即进行毛细管电泳分析，否则应将 PCR 扩增产物保存于 -20±5℃，不超过 1 周。

步骤	循环数	温度	时间
1	1	95℃	5 min
		95℃	35sec
		62℃	35sec
2	10	68℃	2min
		95℃	35sec
		62℃	35sec
		68℃	2min + 20sec/循环
3	20	95℃	35sec
		62℃	35sec
		68℃	2min + 20sec/循环
4	1	72℃	10min
5	1	4℃	∞

5. PCR 产物分析（在产物分析区进行）

5.1 毛细管电泳仪分析

取 0.5 μ L PCR 扩增产物、10 μ L 3% GeneScan 1200 LIZ Size Standard (以 30 μ L GeneScan 1200 LIZ Size Standard 加 970 μ L Hi-Di Formamide 配制, 即为 3% GeneScan 1200 LIZ Size Standard), 混匀后 95 $^{\circ}$ C 变性 3min, 立即放冰上 2min, 上机检测, 按如下方法设定反应程序。

仪器	电泳胶	毛细管长度	Injection time (sec)	Injection voltage (kV)	Run time (sec)	Run voltage (kV)
3500Dx/3500xl Dx	POP-7	50cm	20	1.6	2700	15

5.2 软件分析: 反应程序结束后, 以 GeneMapper 软件对 PCR 扩增产物进行片段大小分析, 分析参数设置和结果分析具体信息请参考制造商提供的软件操作说明。

【阳性判断值】

1.1 根据下表不同毛细管电泳片段的阈值以及 1.2 所列检测峰选择的准则, 选择每个区域的 FMR1 基因扩增产物的检测峰。

仪器	毛细管电泳片段 140bp-350bp	毛细管电泳片段 大于 350bp
3500Dx/3500xl Dx	200rfu	45rfu

1.2 FMR1 基因扩增产物会根据不同的片段大小呈现不同的峰型, 高于设定阈值的峰根据下表进行 FMR1 基因扩增产物峰筛选。

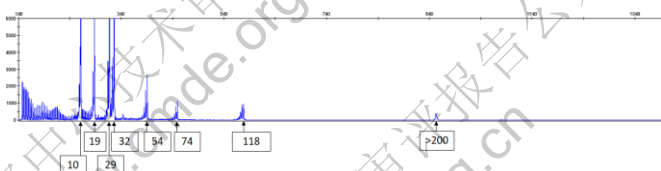
毛细管电泳片段大小	FMR1 基因扩增产物范例图	检测峰选择
<350bp		若<350bp 片段内只有一个分叉的 FMR1 基因扩增产物, 且最高峰为最右边峰, 选择相应的最高检测峰。
		若<350bp 片段内只有 1 个或 1 个以上间隔 3bp 的检测峰, 且最高峰高于右侧峰 2 倍以上, 选择相应的最高检测峰。
		若<350bp 片段内有多多个分叉的 FMR1 基因扩增产物, 选择所有分叉峰中最高的检测峰。
		若最高峰为最右边两个相邻的峰, 且左边峰不高于右边峰的 2 倍, 则选择这两个相邻的最高检测峰。
350-820bp		若有多个检测峰形成一个检测峰群, 选择最高的检测峰。若高度相同, 选择靠近右侧的检测峰。
		若有多个检测峰群, 选择每群中最高检测峰。
>820bp		选择最高的检测峰。

【检验结果的解释】

1. 质量控制

1.1 FMR1 空白对照: 均无检测峰或峰值低于阳性判断值。

1.2 FMR1 阳性对照: 具 FMR1 基因, CGG 重复数 10、19、29、32、54、74、118、>200, 共 8 个检测峰, 如下图。



1.3 FMR1 阳性对照的每个检测峰群选择最高的检测峰, 该检测峰的片段大小应符合下表。因不同毛细管电泳仪与环境条件影响, 扩增产物毛细管电泳片段长度可能会有些微差异。

CGG 重复数	毛细管电泳片段	CGG 重复数	毛细管电泳片段
10	259.43 \pm 6.52bp	54	388.67 \pm 7.47bp
19	286.19 \pm 7.14bp	74	447.38 \pm 7.41bp
29	315.56 \pm 7.37bp	118	575.79 \pm 7.65bp
32	324.7 \pm 7.06bp	>200	950.73 \pm 4.87bp

1.4 使用 GeneMapper 软件进行结果分析, 根据已知 FMR1 阳性对照 CGG 重复数 10、19、29、32、54、74、118 和所得检测片段长度结果建立标准曲线, 可得公式为 $y=ax+b$, 其中 y 代表检测得到的片段长度, x 代表 CGG 重复数, 相关系数 R^2 应大于 0.98。

1.5 应同时满足以上要求, 此次实验视为有效。

2. FMR1 基因 CGG 重复数计算

2.1 根据当次实验 1.4 中所得的公式, 将待测样本经 GeneMapper 软件所得片段大小, 与 a 值、 b 值, 套入公式可得 CGG 重复数。

3. 结果判读

3.1 根据样本最大重复数按下表进行基因型判断:

FMR1 基因 CGG 重复数	结果判读
<45	正常型
45-54	中间型
55-200	前突变型
>200	全突变型

- 若 FMR1 基因 CGG 重复数为负数, 代表可能 FMR1 发生缺失, 建议以其他检测方法再做确认。
- 若影子峰 (stutter peaks) 延伸超过第一个检测峰群并且无明显的第二个检测峰群, 提示有更大片段的 FMR1 基因扩增产物, 建议进行第二次检测, 可增加 PCR 扩增产物体积进行毛细管电泳分析; 或增加 DNA 浓度进行 PCR; 或增加全血样本量进行提取。
- 若检测峰讯号强度过强导致无法选择较高的检测峰, 需将 PCR 扩增产物稀释后再进行毛细管电泳仪分析。
- GeneScan 1200 LIZ Size Standard 使用浓度或者毛细管电泳仪的上机条件可依毛细管电泳仪性能与环境条件进行调整。

【检验方法的局限性】

- 本试剂盒检测结果仅用于疾病的辅助诊断用途, 不作为疾病诊断的唯一依据。对于本试剂盒检测结果, 应综合患者临床诊疗及其它实验室检查手段综合判断。
- 本试剂盒以染色体上特定的 DNA 序列为检测目标, 若引物黏合区出现罕见的基因突变, 可能会影响检测结果判读。
- 正常情况下, 男性只有一个 X 染色体, 只会出现 1 个检测峰, 女性有两条 X 染色体, 会出现 2 个检测峰, 当男性样本出现 2 个以上检测峰或女性样本出现 3 个以上的检测峰时, 个体基因型可能存在嵌合现象。
- 不合理的样本采集、转运及处理、以及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。

【产品性能指标】

- 阳性参考品符合率: 检测经标化的 12 份阳性参考品, 检测结果符合要求, 其中 2 份为中间型, 4 份为前突变型, 4 份为全突变型, 1 份为前突变和全突变嵌合型, 1 份为正常型和全突变嵌合型。
- 阴性参考品符合率: 检测经标化的 9 份阴性参考品, 检测结果皆符合要求, 其中 6 份为 FMR1 基因正常型样本, 3 份为 FMR1 基因阴性样本。
- 重复性: 检测 FMR1 基因中间型、前突变型、全突变型企业参考品, 进行 10 重复检测, 结果皆符合要求。
- 最低检测限: 2.5ng/ μ L。
- 病原体交叉反应: 乙肝病毒、丙肝病毒、巨细胞病毒、肠道病毒 71 型对本试剂盒检测结果无影响。
- 内源性物质干扰: 高三酸甘油酯样本 (500mg/dL)、高总胆红素样本 (15mg/dL)、高血红素样本 (20g/dL), 不会影响本试剂盒检测结果。
- 临床试验总结: 本产品的临床试验在六家临床试验单位共检测 763 例临床样本, 其中阳性 (FMR1 基因全突变型, CGG 重复数 >200) 79 例, 阴性共计 684 例; 结果表明, 本产品检测样阳性

X 综合征相关的 FMR1 基因与临床公认检测技术和实验室参考方法 Southern Blot 方法完全一致。

【注意事项】

1. 严格遵守本说明书操作要求所得结果才能被认为是有效测试。
2. 建议本试剂盒所有使用的仪器设备包括 PCR 扩增仪、毛细管电泳及微量移液器等均在使用前完成校正。
3. 实验室应严格按 PCR 基因扩增实验室管理规范进行管理，实验人员必须经过专业培训，实验过程严格分区进行，各区实验用品不得交叉使用。
4. 对所有的检测样本视为潜在的传染源，样本操作及废弃物处理均须符合相关法规要求：卫生部《微生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。

【参考文献】

[1] Monaghan KG, Lyon E, Spector EB, et al. : ACMG Standards and Guidelines for fragile X testing: a revision to the disease-specific supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics and Genomics. Genet Med. 2013;15(7):575-586. 10.1038/gim.2013.61

[2] Sherman, S., B.A. Pletcher, and D.A. Driscoll, Fragile X syndrome: diagnostic and carrier testing. Genet Med, 2005. 7(8): p. 584-7

【基本信息】

注册人/生产企业名称：厦门百欧迅生物科技有限公司
住所：厦门市海沧区翁角西路 2032 号厦门生物医药产业园 A17 号楼 4 层之二
联系方式：
售后服务单位名称：
联系方式：
生产地址：厦门市海沧区翁角西路 2032 号厦门生物医药产业园 A17 号楼
生产企业许可证编号：

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】

【说明书批准及修改日期】