

受理号：CSZ2400132

# 体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称： $\alpha$  和  $\beta$  地中海贫血基因检测试剂盒(单分子测序法)

产品管理类别：第三类

申请人名称：杭州贝瑞和康基因诊断技术有限公司

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.....	8
三、临床评价概述.....	12
四、产品受益风险判定.....	13
综合评价意见.....	14

## 基本信息

### 一、申请人名称

杭州贝瑞和康基因诊断技术有限公司

### 二、申请人住所

浙江省杭州经济技术开发区白杨街道6号大街260号9幢，  
16幢一层、二层

### 三、生产地址

杭州经济技术开发区白杨街道6号大街260号9幢，16幢  
一层、二层，18幢二层

## 技术审评概述

### 一、产品概述

#### (一) 产品主要组成成分

建库试剂的主要组成成分如下：

试剂名称	组分名称	主要成分	规格及数量
$\alpha$ 和 $\beta$ 地中海贫血基因检测试剂盒（单分子测序法）	扩增酶	DNA 聚合酶	48 $\mu$ L/管 $\times$ 1 管
	扩增液	dNTP; $Mg^{2+}$	1.2 mL/管 $\times$ 1 管
	引物 A	引物混合物	30 $\mu$ L/管 $\times$ 1 管
	引物 B	引物混合物	30 $\mu$ L/管 $\times$ 1 管
	引物 C	引物混合物	30 $\mu$ L/管 $\times$ 1 管
	引物 D	引物混合物	30 $\mu$ L/管 $\times$ 1 管
	引物 E	引物混合物	30 $\mu$ L/管 $\times$ 1 管
	引物 F	引物混合物	30 $\mu$ L/管 $\times$ 1 管
	引物 G	引物混合物	30 $\mu$ L/管 $\times$ 1 管
	引物 H	引物混合物	30 $\mu$ L/管 $\times$ 1 管
	连接酶	DNA ligase	88 $\mu$ L/管 $\times$ 1 管
	连接液	DNA ligase buffer	132 $\mu$ L/管 $\times$ 1 管
	消化酶 1	外切酶	120 $\mu$ L/管 $\times$ 1 管
	消化酶 2	外切酶	120 $\mu$ L/管 $\times$ 1 管
	阴性质控品	人细胞系基因组 DNA, 20 ng/ $\mu$ L, 基因型为 $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ; N	10 $\mu$ L/管 $\times$ 1 管
阳性质控品 1	人细胞系基因组 DNA, 20 ng/ $\mu$ L, 基因型为 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ; IVS-II-654(C>T)杂合, CD71/72(+A)杂合	10 $\mu$ L/管 $\times$ 1 管	
阳性质控品 2	人细胞系基因组 DNA, 20 ng/ $\mu$ L, 基因型为 $\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$ ; N	10 $\mu$ L/管 $\times$ 1 管	
接头(TA 01-TA48)	DNA 溶液	6 $\mu$ L/管 $\times$ 48 管	

测序试剂的主要组成成分如下：

试剂名称	组分名称	英文名称	主要成分	规格及数量	
测序反应通用试剂盒 (测序法)	测序试剂 A	测序引物 v4	Sequencing Primer v4	引物 DNA	3 μL/管×1 管
		引物缓冲液 v2	10X Primer Buffer v2	Tris-Buffer	70 μL/管×1 管
		DNA 文库对照品 1.0	Sequel <sup>®</sup> II DNA Internal Control Complex 1.0	2kbDNA-聚合酶复合物	24 μL/管×1 管
		DNA 聚合酶 2.1	Sequel <sup>®</sup> II DNA polymerase 2.1	聚合酶	40 μL/管×1 管
		稀释缓冲液	Sequel <sup>®</sup> Complex Dilution Buffer	Tris-Buffer	1600 μL/管×1 管
		DTT	DTT	二硫苏糖醇	450 μL/管×1 管
		结合缓冲液	Sequel <sup>®</sup> Binding Buffer	Tris-Buffer	1500 μL/管×1 管
		dNTP	Sequel <sup>®</sup> dNTP	dNTPs	200 μL/管×1 管
		添加剂	Sequel <sup>®</sup> Additive	添加剂	700 μL/管×1 管
	测序试剂 B	洗脱液	Elution Buffer	Tris-Buffer	70 μL/管×1 管
		磁珠	AMPure <sup>®</sup> PB beads	四氧化三铁磁性微球（包被羧基）	440 μL/管×1 管
	测序试剂 C	测序试剂 C 2.0	Sequel <sup>®</sup> II Sequencing Plate 2.0 (1rxn)	金属离子、dNTP、荧光物质、DTT、镁	1 次反应/盒×1 盒
	测序试剂 D	测序芯片	SMRT <sup>®</sup> Cell 8M (1-Cell Tray)	/	1 芯片/盒×1 盒
		矿物油	Sequel <sup>®</sup> SMRT <sup>®</sup> Cell Oil	/	1600 μL/管×1 管
		管塞	Tube Septa	/	2 个/袋×1 袋
		一次性吸头 v2	Sequel <sup>®</sup> Pipet Tips v2	/	96 个/盒×3 盒
铝箔		Sequel <sup>®</sup> Sample Plate Foil	/	2 片/袋×1 袋	
96 孔样品板		Sample Plate	/	1 个/袋×2 袋	

	96 孔混匀板	Sequel® Mixing Plate	/	1 个/袋×2 袋
--	---------	----------------------	---	-----------

注：不同批号试剂盒中各组分不能互换。

## (二) 产品预期用途

本产品用于体外定性检测人外周静脉全血样本中的地中海贫血基因突变，包括  $\alpha$ -珠蛋白基因的 4 种缺失： $--_{SEA}$ 、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$  和  $--_{THAI}$ ；3 种点突变： $\alpha^{CS}\alpha$ (Hb CS)、 $\alpha^{QS}\alpha$ (Hb QS) 和  $\alpha^{WS}\alpha$ (Hb Westmead) 及  $\beta$ -珠蛋白基因的 16 种点突变： $-30(T>C)$ 、 $-32(C>A)$ 、 $-28(A>G)$ 、 $-29(A>G)$ 、 $Cap+40-43(-AAAC)$ 、 $Initiation\ codon(ATG>AGG)$ 、 $CD14/15(+G)$ 、 $CD17(AAG>TAG)$ 、 $CD26(GAG>AAG)$ 、 $CD27/28(+C)$ 、 $CD41/42(-TTCT)$ 、 $CD43(GAG>TAG)$ 、 $CD71/72(+A)$ 、 $IVS-I-1(G>T)$ 、 $IVS-I-5(G>C)$ 、 $IVS-II-654(C>T)$ 。其对应的 HGVS 命名见下表。

表 1. 试剂盒范围内的 23 种突变与 HGVS 命名对应表

基因	突变类型	HGVS 命名
$\alpha$ -珠蛋白基因	$--_{SEA}$	/
	$-\alpha^{3.7}$	/
	$-\alpha^{4.2}$	/
	$--_{THAI}$	/
	$\alpha^{CS}\alpha$ (Hb CS)	HBA2:c.427T>C
	$\alpha^{QS}\alpha$ (Hb QS)	HBA2:c.377T>C
	$\alpha^{WS}\alpha$ (Hb Westmead)	HBA2:c.369C>G
$\beta$ -珠蛋白	$-30(T>C)$	HBB:c.-80T>C
	$-32(C>A)$	HBB:c.-82C>A
	$-28(A>G)$	HBB:c.-78A>G
	$-29(A>G)$	HBB:c.-79A>G
	$Cap+40-43(-AAAC)$	HBB:c.-11_-8delAAAC
	$Initiation\ codon(ATG>AGG)$	HBB:c.2T>G

基因	CD14/15(+G)	HBB:c.45_46insG
	CD17(AAG>TAG)	HBB:c.52A>T
	CD26(GAG>AAG)	HBB:c.79G>A
	CD27/28(+C)	HBB:c.84_85insC
	CD41/42(-TTCT)	HBB:c.126_129delCTTT
	CD43(GAG>TAG)	HBB:c.130G>T
	CD71/72(+A)	HBB: c.216_217insA
	IVS-I-1(G>T)	HBB:c.92+1G>T
	IVS-I-5(G>C)	HBB:c.92+5G>C
	IVS-II-654(C>T)	HBB:c.316-197C>T

本试剂盒用于  $\alpha$ -和  $\beta$ -地贫的辅助诊断(遗传诊断), 检测结果不作为患者临床诊断的唯一依据, 仅供临床参考。

### (三) 产品包装规格

建库试剂: 产品编号 R1010, 规格: 96 人份/盒。

测序试剂: 产品编号 R4001, 规格: 1 次反应/测试, 1 测试/盒。

### (四) 产品检验原理

本试剂盒是基于第三代测序技术平台, 利用单分子实时 DNA 测序技术(Single Molecule Real-Time(SMRT))。针对人全血样本, 通过在各突变位点附近设计引物, 直接从全血样本中对目标 DNA 区域进行长片段扩增, 在目标 DNA 长片段扩增产物两端连接接头, 使用消化酶去除非环状片段, 最终获得哑铃状文库。试剂盒配套使用基因测序仪 Sequel<sup>®</sup> II CNDx, 构建好的哑铃状文库结合测序引物和酶, 在 SMRTCell 的纳米小孔(ZMW) 中进行单分子测序。测序后的基因序列对比到参考基因序列上,

通过生物信息软件分析，可以准确识别携带基因突变的 DNA 序列，获得相关基因突变信息。

## 二、临床前研究概述

### (一) 主要原材料

#### 1. 主要原材料的选择

本试剂盒的主要原材料包括反应酶、接头、引物以及测序反应通用试剂原料等，以上原材料均为外购。

申请人对主要原材料进行了供应商的选择，制定了各主要原材料的质量要求并经检验合格。

#### 2. 企业参考品和质控品的设置情况

企业参考品包括：企业阴性参考品、企业阳性参考品和企业检测限参考品。

其中企业阴性参考品共 12 个，包括野生型及检测范围外的突变类型；企业阳性参考品共 26 份，涵盖该产品可检测出的所有突变类型；企业检测限参考品共 26 份，涵盖该产品可检测出的所有突变类型。

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。阴、阳性质控品均为人细胞系基因组 DNA 样本，阳性质控品包含该产品检测范围内的各种突变类型，即： $\alpha$ -珠蛋白基因缺失、 $\alpha$ -珠蛋白基因点突变，以及  $\beta$ -珠蛋白基因点

突变；阴性质控品为野生型人细胞系基因组 DNA。

## （二）生产工艺及反应体系研究

申请人通过研究确定最佳的生产工艺及反应体系，包括：连接酶和连接液的配液工序、分装工序、组装工序等。

申请人对样本用量、试剂用量、反应条件、质控标准、测序反应条件等进行研究。

## （三）分析性能评估

分析性能评估内容主要包括：准确度、精密度、检出限、分析特异性等。申请人提交了有效运行的质量管理体系下生产的三批产品，在适用机型上进行的分析性能评估资料。

在准确度性能评估中，申请人采用临床外周静脉全血样本、细胞系基因组 DNA、质粒等进行研究，样本涵盖野生型、检测范围内所有检测位点的杂合突变型，同时纳入了部分纯合突变型。各样本检测结果均与已上市检测试剂检测结果一致。

在精密度性能评估中，申请人使用临床样本，在正常浓度以及检出限浓度两个梯度下进行研究，通过对批次内/间、试验日内/间、不同操作者间、不同仪器间、不同实验室间精密度进行评价，结果表明试剂盒精密度性能良好。

在交叉反应性能评估中，申请人使用涵盖同源序列、假基因、其他类型交叉反应序列或检测范围外基因和位点等样本进

行研究，检测结果均未检出试剂盒检测范围内的变异类型，表明该试剂盒与上述变异类型不产生交叉反应。

在干扰试验中，申请人使用代表性  $\alpha$  缺失型突变、代表性  $\alpha$  点突变、代表性  $\beta$  点突变和野生型(阴性)样本在弱阳性 DNA 水平进行抗干扰能力评估。通过对样本添加干扰物质并进行检测，结果表明胆红素浓度 $\leq 684 \mu\text{mol/L}$ 、甘油三酯浓度 $\leq 37 \text{ mmol/L}$ 、血红蛋白浓度 $\leq 200 \text{ g/L}$ 、白蛋白浓度 $\leq 60 \text{ g/L}$ 、EDTA $\cdot\text{K}_2$  浓度 $\leq 2.5 \text{ mg/mL}$ 、甲磺酸去铁胺浓度 $\leq 1.6 \text{ mg/mL}$  时，对本产品检测结果无干扰。

在检出限性能评估中，申请人使用包含检测范围内全部突变位点的杂合型样本，对最低检出限和最高检出限进行研究。确定 DNA 上样量最低检出限为 3 ng，最高检出限为 300 ng。申请人使用人基因组 DNA 混合模拟样本，对嵌合体检出能力进行研究，结果显示本产品可检测的最低嵌合比例为 30%。

#### (四) 阳性判断值研究

申请人选取了 480 例外周静脉全血样本进行阳性判断值确定研究，研究使用二分类统计模型对检测值进行分析，进而确定点突变及缺失型变异的阳性判断值。

采用 235 例外周静脉全血样本进行阳性判断值的验证，依据阳性判断值判断的检测结果与已上市试剂检测结果一致率为

100%，说明确定的阳性判断值设置合理，适用于试剂盒检测范围内突变类型的结果判断。

研究确定的阳性判断值为：

1.  $\alpha$  缺失型--SEA、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$  和--THAI 四者之一判断值 $\geq 5\%$ ，其他三者 $< 5\%$ ，同时 WT(野生型或非缺失)判断值 $\geq 5\%$ ，判定为对应  $\alpha$  缺失型杂合突变。

2.  $\alpha$  缺失型--SEA、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$  和--THAI 四者之一判断值 $\geq 5\%$ ，其他三者 $< 5\%$ ，同时 WT 判断值 $< 5\%$ ，判定为对应的  $\alpha$  缺失型纯合突变。

3.  $\alpha$  缺失型--SEA、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$  和--THAI 四者之二判断值 $\geq 5\%$ ，四者剩余的两个判断值 $< 5\%$ ，同时 WT 判断值 $< 5\%$ ，判定为对应四者之二的  $\alpha$  缺失型双杂合突变。

4.  $\alpha$  缺失型--SEA、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$  和--THAI 四者同时判断值 $< 5\%$ ，同时 WT 判断值 $\geq 5\%$ ，判定为  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ，未检出  $\alpha$  缺失型。

5. Mutation ratio $\geq 20\%$ ，且 $\leq 80\%$ ，判定为对应杂合点突变；

6. Mutation ratio  $> 80\%$ ，判定为对应纯合点突变；

7. Mutation ratio  $< 20\%$  时，判定为 N，表示未检出检测范围内的突变。

### (五) 稳定性研究

申请人进行的稳定性研究，包括实时稳定性、开瓶和冻融稳

定性、运输稳定性等。

研究结果表明：建库试剂于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 密闭保存，有效期12个月。

测序试剂 A 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存，测序试剂 B 于 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存，测序试剂 C 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存，测序试剂 D 于 $15\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存；有效期6个月。

样本稳定性和试剂运输及冻融研究结果支持说明书声称。

### 三、临床评价概述

申请人在广东省妇幼保健院、柳州市妇幼保健院、广州医科大学附属第三医院共三家临床试验机构开展了临床试验。临床试验设计为试验体外诊断试剂与其他方法学的已上市同类产品进行比对。临床试验入组受试者为具有地贫症状和/或体征，或血液学表现为小细胞低色素、血红蛋白分析异常的疑似地贫患者和携带者；需与地贫进行鉴别诊断的其他疾病患者，如：缺铁性贫血、铁粒细胞性贫血或先天性红细胞生成异常性贫血等。样本类型为外周静脉全血样本。临床试验共入组1588例受试者，阳性病例1444例，其中包括 $\alpha$ -珠蛋白基因突变型231例， $\alpha$ -珠蛋白基因缺失型743例， $\beta$ -珠蛋白基因突变型602例，对于常见突变位点，病例数满足统计学要求。

临床试验结果显示：针对 $\alpha$ -珠蛋白基因突变，试验体外诊

断试剂与对比试剂对比,阳性符合率为 100%(95%CI: 98.36%, 100%)、阴性符合率为 100% (95%CI: 99.72%, 100%); 针对 $\alpha$ -珠蛋白基因缺失,试验体外诊断试剂与对比试剂对比,阳性符合率为 100% (95%CI: 99.49%, 100%)、阴性符合率为 100% (95%CI: 99.55%, 100%); 针对 $\beta$ -珠蛋白基因突变,试验体外诊断试剂与对比试剂对比,阳性符合率为 100%(95%CI: 99.37%, 100%)、阴性符合率为 100% (95%CI: 99.61%, 100%)。结果表明试验体外诊断试剂与对比试剂具有良好的检测一致性。

综上所述, 临床试验结果显示该产品临床性能满足技术审评要求。

#### 四、产品受益风险判定

根据申请人提供的申报资料,经综合评价,在目前认知水平上,认为该产品的上市为适用人群带来的受益大于风险。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规避,需要在说明书中提示以下信息:

- 1.该检测结果仅供参考,不单独作为确诊或排除病例的依据。阴性结果不能排除检测范围外的其他变异或未知变异,其结果的确认应结合临床进行综合判断。
- 2.警示及注意事项:该试剂盒说明书中明确了该试剂盒检测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，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。

2025年9月22日

附件：产品说明书

## α 和 β 地中海贫血基因检测试剂盒(单分子测序法)说明书

### 【产品名称】

通用名称: α 和 β 地中海贫血基因检测试剂盒(单分子测序法)

### 【包装规格】

建库试剂: 产品编号 R1010, 规格: 96 人份/盒

测序试剂: 产品编号 R4001, 规格: 1 次反应/测试, 1 测试/盒。

### 【预期用途】

本产品用于体外定性检测人外周静脉全血样本中的地中海贫血基因突变, 包括 α-珠蛋白基因的 4 种缺失:  $-\text{SEA}$ 、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$  和  $-\text{THAI}$ ; 3 种点突变:  $\alpha^{\text{CS}}\alpha$ (Hb CS)、 $\alpha^{\text{QS}}\alpha$ (Hb QS) 和  $\alpha^{\text{WS}}\alpha$ (Hb Westmead) 及 β-珠蛋白基因的 16 种点突变: -30(T>C)、-32(C>A)、-28(A>G)、-29(A>G)、Cap+40-43(-AAAC)、Initiation codon(ATG>AGG)、CD14/15(+G)、CD17(AAG>TAG)、CD26(GAG>AAG)、CD27/28(+C)、CD41/42(-TTCT)、CD43(GAG>TAG)、CD71/72(+A)、IVS-I-1(G>T)、IVS-I-5(G>C)、IVS-II-654(C>T)。其对应的 HGVS 命名见下表。

表 1. 试剂盒范围内的 23 种突变与 HGVS 命名对应表

基因	突变类型	HGVS 命名
α-珠蛋白基因	$-\text{SEA}$	/
	$-\alpha^{3.7}$	/
	$-\alpha^{4.2}$	/
	$-\text{THAI}$	/
	$\alpha^{\text{CS}}\alpha$ (Hb CS)	HBA2:c.427T>C
	$\alpha^{\text{QS}}\alpha$ (Hb QS)	HBA2:c.377T>C
	$\alpha^{\text{WS}}\alpha$ (Hb Westmead)	HBA2:c.369C>G
β-珠蛋白基因	-30(T>C)	HBB:c.-80T>C
	-32(C>A)	HBB:c.-82C>A
	-28(A>G)	HBB:c.-78A>G
	-29(A>G)	HBB:c.-79A>G
	Cap+40-43(-AAAC)	HBB:c.-11_8delAAAC
	Initiation codon(ATG>AGG)	HBB:c.2T>G
	CD14/15(+G)	HBB:c.45_46insG
	CD17(AAG>TAG)	HBB:c.52A>T
	CD26(GAG>AAG)	HBB:c.79G>A
	CD27/28(+C)	HBB:c.84_85insC
	CD41/42(-TTCT)	HBB:c.126_129delCTTT
	CD43(GAG>TAG)	HBB:c.130G>T
	CD71/72(+A)	HBB:c.216_217insA
	IVS-I-1(G>T)	HBB:c.92+1G>T
	IVS-I-5(G>C)	HBB:c.92+5G>C
	IVS-II-654(C>T)	HBB:c.316-197C>T

本试剂盒用于 α 和 β 地贫的辅助诊断(遗传诊断), 检测结果不作为患者临床诊断的唯一依据, 仅供临床参考。

地中海贫血(简称地贫)是一种常染色体隐性遗传病, 是由于珠蛋白基因发生突变(包括点突变和缺失等), 致使珠蛋白链合成减少或完全不能合成而导致的一组单基因遗传性溶血性疾病<sup>[1]</sup>, 轻者可无临床表现, 重者以进行性溶血性贫血为主要特征。根据珠蛋白链合成受到抑制的类型, 地贫分为 α-、β-和 γ-地贫等。临床上最常见的是 α 和 β 地贫。地贫主要分布在地中海沿岸、东南亚和少数非洲地区, 具有明显的种族特性和地域分布差异。地贫是我国南方地区最常见、危害最大的遗传病之一, 尤以广西、云南、广东、海南、四川和贵州等省份为甚, 云南、海南和广东的地贫基因人群携带率可达 10% 以上, 广西更是达到了 20% 以上。α 地贫又分为 α<sup>+</sup>(单条染色体上 1 个 α 基因发生缺失)和 α<sup>0</sup>(单条染色体上两个 α 基因均缺失)地贫<sup>[1,2]</sup>, β 地贫分为 β<sup>0</sup>、β<sup>+</sup>和 β<sup>+</sup>地贫。α 地中海贫血是由于 α 珠蛋白基因缺失或缺陷导致 α 珠蛋白链的合成受到部分或完全抑制而引起的遗传性溶血性贫血, 编码 α 珠蛋白链的基因是 16 号染色体短臂末端的 α 珠蛋白基因簇。就人类正常基因组而言, 正

常个体 16 号染色体上均有 2 个 α 珠蛋白基因(α<sup>2</sup> 基因和 α<sup>1</sup> 基因), 1 个 α 基因缺失者为 α<sup>+</sup> 地贫(-α/α), 2 个 α 基因缺失者为 α<sup>0</sup> 地贫(-α/α)。根据造成 α 地贫的分子基础可将 α 地贫分为缺失型和非缺失型, 其中 95% 以上是由于 α 珠蛋白基因大片段缺失所致, 为缺失型。目前全球至少发现了 35 种 α 基因缺失, 我国最常见的为  $-\text{SEA}$ 、 $-\alpha^{3.7}$  和  $-\alpha^{4.2}$  缺失型突变和非缺失型 α 地贫 [ $\alpha^{\text{WS}}$ (CD122),  $\text{GAC}>\text{CAG}$ ;  $\alpha^{\text{QS}}$ (CD125),  $\text{CTG}>\text{CCG}$ ;  $\alpha^{\text{CS}}$ (CD142),  $\text{TAA}>\text{CAA}$ ] <sup>[2,3]</sup>, 其中,  $-\text{SEA}$  突变类型最常见。另外, 泰国型( $-\text{THAI}$ ) 缺失也是我国南方人群存在的缺失类型, 在台湾、广东、广西、云南及福建等地均有报道<sup>[4,5]</sup>, 且部分地区该型缺失的携带率较高(如广西地区携带率为 0.6%)<sup>[6]</sup>。β 地中海贫血是最常见的单基因遗传病之一, β 珠蛋白基因簇位于人体 11 号染色体的短臂上, β 珠蛋白链由 β 珠蛋白基因所编码的 146 个氨基酸组成。β 地中海贫血的主要分子病理学基础是 β 珠蛋白基因的点突变及小的插入或缺失, 导致 β 珠蛋白基因转录、hnRNA 加工或 mRNA 翻译异常, 相对过剩的 α 珠蛋白肽链是 β 地中海贫血发生溶血、贫血和无效造血的根本原因。中国人群中 β 地中海贫血以突变型地贫为主, 其基因型主要有 CD41/42、IVS-II-654、-28、CD71/72、CD17、CD26、CD27/28、IVS-I-1、-1、CD43、-32、-29、-30、-CD14/15、Cap + 40 - 43、Int CD 和 IVS-I-5<sup>[7]</sup>。现在对地贫筛查方法有红细胞渗透脆性试验、血常规参数检测分析、血红蛋白电泳试验等。地中海贫血的分子诊断方法中, 缺失类型检测方法主要是跨越断裂点 PCR (GAP-PCR)、实时 PCR、多重连接探针扩增 (MLPA) 和微阵列比较基因组杂交 (comparative genomic hybridization, array-CGH) <sup>[8]</sup>。非缺失检测方法主要是反向点杂交 (RDB) <sup>[9]</sup>。基于实时 PCR 的荧光标记探针的熔解曲线分析法 (PCR melting curve analysis, PMCA) 和 Sanger 测序<sup>[9]</sup>。

### 【检验原理】

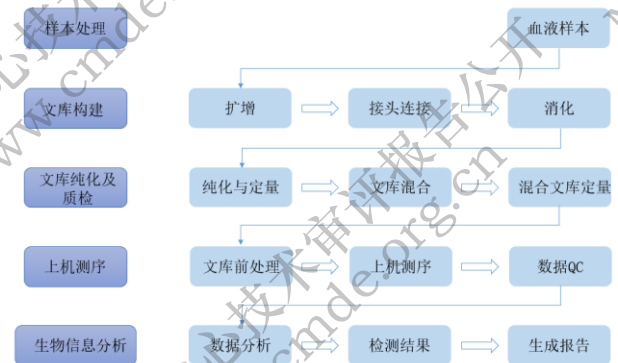


图 1. 技术原理图

本试剂盒是基于第三代测序技术平台, 利用单分子实时 DNA 测序技术(Single Molecule Real-Time(SMRT)). 针对人全血样本, 通过在各突变位点附近设计引物, 直接从全血样本中对目标 DNA 区域进行长片段扩增, 在目标 DNA 长片段扩增产物两端连接接头, 使用消化酶去除非环状片段, 最终获得哑铃状文库。试剂盒配套使用基因测序仪 Sequel<sup>®</sup> II CNDx, 构建好的哑铃状文库结合测序引物和酶, 在 SMRTCell 的纳米小孔(ZMW)中进行单分子测序。测序后的基因序列对比到参考基因序列上, 通过生物信息软件分析, 可以准确识别携带基因突变的 DNA 序列, 获得相关基因突变信息。

### 【主要组成成分】

建库试剂的主要组成成分如下:

试剂名称	组分名称	主要成分	规格及数量
α 和 β 地中海贫血基因检测试剂盒(单分子测序法)	扩增酶	DNA 聚合酶	48 μL/管×1 管
	扩增液	dNTP; Mg <sup>2+</sup>	1.2 mL/管×1 管
	引物 A	引物混合物	30 μL/管×1 管
	引物 B	引物混合物	30 μL/管×1 管
	引物 C	引物混合物	30 μL/管×1 管
	引物 D	引物混合物	30 μL/管×1 管
	引物 E	引物混合物	30 μL/管×1 管

引物 F	引物混合物	30 μL/管×1 管
引物 G	引物混合物	30 μL/管×1 管
引物 H	引物混合物	30 μL/管×1 管
连接酶	DNA ligase	88 μL/管×1 管
连接液	DNA ligase buffer	132 μL/管×1 管
消化酶 1	外切酶	120 μL/管×1 管
消化酶 2	外切酶	120 μL/管×1 管
阴性质控品	人细胞系基因组 DNA, 20 ng/μL, 基因型为 aa/aa; N	10 μL/管×1 管
阳性质控品 1	人细胞系基因组 DNA, 20 ng/μL, 基因型为 α <sup>3,7</sup> /αα; IVS-II-654(C>T)杂合, CD71/72(+A)杂合	10 μL/管×1 管
阳性质控品 2	人细胞系基因组 DNA, 20 ng/μL, 基因型为 α <sup>CS</sup> α/αα; N	10 μL/管×1 管
接头 (TA 01~TA48)	DNA 溶液	6 μL/管×48 管

- 注意:** 1、建库试剂不同批次间的试剂盒组分不可以相互替换使用。  
 2、8 管引物, 每管能配制 12 个反应, 搭配不同的接头使用, 共 96 个反应。  
 3、每管接头可使用 2 次, 不同引物可搭配使用相同接头。  
 4、试剂盒规格为 96 人份, 8 个引物与 48 个接头最多可组成 8\*48=384 种组合, 建议使用组合如下:

引物与接头组合	试剂盒 1 (96 rxn)	试剂盒 2 (96 rxn)	试剂盒 3 (96 rxn)	试剂盒 4 (96 rxn)
引物 A	01-12	13-24	25-36	37-48
引物 B	13-24	25-36	37-48	01-12
引物 C	25-36	37-48	01-12	13-24
引物 D	37-48	01-12	13-24	25-36
引物 E	01-12	13-24	25-36	37-48
引物 F	13-24	25-36	37-48	01-12
引物 G	25-36	37-48	01-12	13-24
引物 H	37-48	01-12	13-24	25-36

- 5、阴性质控品, 阳性质控品 1、阳性质控品 2、空白对照 NTC 至少会占用 4 个引物与接头组合。

测序试剂的主要组成成分如下:

试剂名称	组分名称	英文名称	主要成分	规格及数量
测序反应通用试剂盒 (测序法)	测序引物 v4	Sequencing Primer v4	引物 DNA	3 μL/管 ×1 管
	引物缓冲液 v2	10X Primer Buffer v2	Tris-Buffer	70 μL/管 ×1 管
	DNA 文库对照品 1.0	Sequel® II DNA Internal Control Complex 1.0	2kb DNA-聚合酶复合物	24 μL/管 ×1 管
	DNA 聚合酶 2.1	Sequel® II DNA polymerase 2.1	聚合酶	40 μL/管 ×1 管
	稀释缓冲液	Sequel® Complex Dilution Buffer	Tris-Buffer	1600 μL/管 ×1 管

	DTT	DTT	二硫苏糖醇	450 μL/管 ×1 管
	结合缓冲液	Sequel® Binding Buffer	Tris-Buffer	1500 μL/管 ×1 管
dNTP	Sequel® dNTP	dNTPs	200 μL/管 ×1 管	
添加剂	Sequel® Additive	添加剂	700 μL/管 ×1 管	
测序试剂 B	洗脱液	Elution Buffer	Tris-Buffer	70 μL/管 ×1 管
	磁珠	AMPure® PB beads	四氧化三铁磁性微球 (包被羧基)	440 μL/管 ×1 管
测序试剂 C	测序试剂 C 2.0 (1rxn)	Sequel® II Sequencing Plate 2.0 (1rxn)	金属离子、dNTP、荧光物质、DTT、镁	1 次反应/盒 ×1 盒
测序芯片	SMRT® Cell 8M (1-Cell Tray)			1 芯片/盒 ×1 盒
矿物油	Sequel® SMRT® Cell Oil			1600 μL/管 ×1 管
管塞	Tube Septa			2 个/袋 ×1 袋
一次性吸头 v2	Sequel® Pipet Tips v2			96 个/盒 ×3 盒
铝箔	Sequel® Sample Plate Foil			2 片/袋 ×1 袋
96 孔样品板	Sample Plate			1 个/袋 ×2 袋
96 孔混匀板	Sequel® Mixing Plate			1 个/袋 ×2 袋

- 注:** 1、测序试剂不同批号试剂盒的以上组分不能互换使用。  
 2、管塞、一次性吸头 v2、铝箔、96 孔样品板和 96 孔混匀板为试剂盒自带耗材。

自备试剂、耗材和仪器

不包含, 但需要配套使用的耗材、试剂及仪器:

用途	试剂/仪器名称	货号	注册/备案证号
文库纯化	核酸纯化试剂 (杭州贝瑞和康基因诊断技术有限公司生产)	R0048	浙杭械备 20220777
文库定量	Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific 公司生产)	Q32854	/
数据分析	地中海贫血基因检测数据分析软件 (完整版本号: )	A0013	浙械注准 20252211275

	V3.0.0.20250908, 杭州贝瑞和康基因诊断技术有限公司生产)		
其他仪器	Qubit 荧光计: Qubit2.0 及其以上版本(Thermo Fisher Scientific 公司生产)	Q32866 或 Q33216 或 Q33238	/
	移液器、涡旋震荡仪、离心机、磁力架、PCR 仪、96 孔板涡旋仪、96 孔板热封机等	/	/
空白对照 (NTC)	DNase/RNase-Free 去离子水	/	/
其他试剂	无水乙醇 (分析纯)	/	/
	DNase/RNase-Free 去离子水	/	/
其他耗材	无核酸酶 PCR 管	/	/
	无核酸酶吸头	/	/

#### 【储存条件及有效期】

建库试剂:

-20 °C ± 5 °C 密闭保存, 有效期 12 个月。

有效期内反复冻融次数不超过 4 次; -20 °C ± 5 °C 运输, 运输时间不超过 142h。

测序试剂:

测序试剂 A 于 -20 °C ± 5 °C 保存, 测序试剂 B 于 2 °C ~ 8 °C 保存, 测序试剂 C 于 -20 °C ± 5 °C 保存, 测序试剂 D 于 15 °C ~ 30 °C 保存; 有效期 6 个月。

效期内避免反复冻融; 储存条件即为运输条件, 运输时间不超过 142 h。

生产日期、使用期限见试剂盒标签。

#### 【适用仪器】

基因测序仪: 型号 Sequel<sup>®</sup> II CNDx (医疗器械注册证号: , 杭州贝瑞和康基因诊断技术有限公司生产)

#### 【样本要求】

1. 检测样本类型: 人外周静脉全血, 所用抗凝剂为 EDTA。

2. 样本采集及处理:

2.1 样本采集: 使用已批准的 EDTA 抗凝采血管收集人全血样本, 应无明显溶血或凝血现象。

2.2 样本处理: 采集后轻柔颠倒混匀 3 次。

3. 样本运输: 于 2 °C ~ 8 °C 条件下运输不超过 72 小时。

4. 样本保存: 于 2 °C ~ 8 °C 保存并于 14 天内进行检测, -20 °C ± 5 °C 条件下可保存 2 年, 冷冻保存时反复冻融不超过 5 次。

#### 【检验方法】

##### 1. 文库构建

试剂于 -20 °C ± 5 °C 保存, 使用前将试剂取出于冰上解冻, 并充分混匀。操作过程中各反应组分均需放置于冰上。实验需同时检测空白质控 (NTC)、阴性质控品 (NC)、阳性质控品 1 (PC1)、阳性质控品 2 (PC2)。

引物 A/B/C/D/E/F/G/H 每个反应使用 2 μL, 引物变性考虑挥发损耗, 建议每种引物多吸取 2 个反应用量。引物使用前, 按如下程序单独进行预变性处理 (热盖温度 105 °C), PCR 程序结束立即取出, 置于冰上。

引物预变性处理	温度	时间
---------	----	----

引物 A/B/C/D/E/F/G/H	98 °C	30min
--------------------	-------	-------

##### 1.1 扩增

1.1.1 扩增 MIX 配制: 考虑到试剂损耗, 建议多配制 1 个反应用量, 按下表比例计算扩增酶、扩增液和引物 (8 管引物, 每管能配制 12 个反应, 共 96 个反应) 的用量, 并进行配制。若使用引物不同, 则将其配成含有不同引物的扩增 MIX, 充分混匀, 瞬时离心 5 秒, 放置冰上待用。

组分	单个反应加入量 (μL)
扩增液	10.0
扩增酶	0.4
引物 A 或 B/C.../H (其中之一)	2.0
DNase/RNase-Free 去离子水	6.6

1.1.2 准备 0.2 mL 无核酸酶 PCR 管, 按下表加样量, 在每个 PCR 管中加入 19 μL 扩增 MIX; 再分别在每管中加入 NTC / NC / PC1 / PC2 / 样本, 建议按照引物加接头序号标记 PCR 管。充分混匀, 瞬时离心 5 秒钟, 轻弹去除气泡, 放置于冰盒中。

组分	单个反应加入量 (μL)
扩增 MIX	19.0
NTC / NC / PC1 / PC2 / 样本	1.0
反应终体积	20.0

1.1.3 将步骤 1.1.2 中的 PCR 管放入预先设置好的 PCR 仪中, 开始下列程序进行反应 (热盖温度 105 °C, 反应体积 20 μL):

温度	时间	循环数
98 °C	2 min	1
98 °C	10 s	32
63 °C	15 s	
68 °C	3 min	1
68 °C	5 min	
4 °C	∞	/

1.1.4 程序结束后取出 PCR 管, 离心扩增产物, 取 4 μL 扩增产物上清液加入新的 0.2 mL 无核酸酶 PCR 管内, 置于冰上待用。

##### 1.2 接头连接

1.2.1 按下表比例计算连接液、连接酶和 DNase/RNase-Free 去离子水的用量, 配成连接 MIX。

组分	单个反应加入量 (μL)
连接液	1.2
连接酶	0.8
DNase/RNase-Free 去离子水	1.5

1.2.2 将步骤 1.1.4 中 PCR 管瞬时离心 5 秒。分别加入 2.5 μL 接头 (每管接头可使用 2 次, 不同引物可搭配使用相同接头) 于 PCR 管壁上, 按照引物和接头顺序标记 PCR 管, 瞬时离心 5 秒钟。再将 3.5 μL 连接 MIX 分别加入 PCR 管中, 见下表, 瞬时离心 5 秒钟, 然后快速混匀, 瞬时离心 5 秒钟并轻弹去除气泡, 再瞬时离心 5 秒钟, 放置于冰盒中。

组分	单个反应加入量 (μL)
扩增产物上清液	4.0
接头	2.5
连接 MIX	3.5
反应终体积	10.0

1.2.3 将步骤 1.2.2 中的 PCR 管放入预先设置好的 PCR 仪中, 开始运行下列程序 (热盖温度 75 °C, 反应体积 10 μL):

温度	时间
----	----

37℃	20 min
25℃	15 min
65℃	10 min
4℃	∞

1.2.4 程序结束后取出 PCR 管，置于冰上待用。

### 1.3 消化反应

1.3.1 按下表比例计算消化酶 1 和消化酶 2 的用量，配成消化酶 MIX。

组分	单个反应加入量(μL)
消化酶 1	1.0
消化酶 2	1.0

1.3.2 充分混匀，瞬时离心 5 秒。在步骤 1.2.4 的 PCR 管中分别加入 2 μL 配制好的消化酶 MIX，反应终体系见下表。扣上管盖，瞬时离心 5 秒钟，然后快速混匀，瞬时离心 5 秒钟并轻弹去除气泡，再瞬时离心 5 秒钟，放置于冰盒中。

组分	单个反应加入量(μL)
连接产物	10.0
消化 MIX	2.0
反应终体积	12.0

1.3.3 将步骤 1.3.2 中的 PCR 管放入预先设置好的 PCR 仪中，开始运行下列程序(热盖温度 45℃，反应体积 12μL)：

温度	时间
37℃	60 min
4℃	∞

1.3.4 程序结束后取出 PCR 管，置于冰上，需立即进行下一步的文库纯化反应。

## 2. 文库纯化

以上反应完成后，应立即使用配套的 DNA 纯化试剂盒纯化处理，按照以下步骤进行操作。

### 2.1 第一次纯化

2.1.1 在消化产物 PCR 管中加入 7.2 μL 磁珠，中速涡旋混匀，瞬时离心 5s，室温孵育 10 min；

2.1.2 将上述 PCR 管瞬时离心 5s 后放置于磁力架上，吸附至清澈即可；

2.1.3 沿吸附磁珠的对侧管壁加入 200 μL 70%乙醇，加入后立即用移液器吸取上清丢弃；再次加入 200 μL 70%乙醇，加入后立即用移液器吸取上清丢弃，尽可能减少磁珠在空气中暴露的时间；

2.1.4 将 PCR 管从磁力架上取下，瞬时离心 5 秒，再次将 PCR 管放置到磁力架上，用 10μL 移液器吸弃所有废液；

2.1.5 立即加入 22 μL 洗脱液后振荡悬浮磁珠，室温孵育 10min；

2.1.6 将上述 PCR 管瞬时离心 5s，然后放置于磁力架上，吸附至清澈即可，吸取 20 μL 上清转移至新的 0.2 mL PCR 管中，随后进行第二次纯化。

### 2.2 第二次纯化

2.2.1 在第一次纯化产物中加入 12 μL 磁珠，中速涡旋混匀，瞬时离心 5s，室温孵育 10min；

2.2.2 将上述 PCR 管瞬时离心 5s 后放置于磁力架上，吸附至清澈即可；

2.2.3 沿吸附磁珠的对侧管壁加入 200 μL 70%乙醇，加入后立即用移液器吸取上清丢弃；再次加入 200 μL 70%乙醇，加入后立即用移液器吸取；

2.2.4 将 PCR 管从磁力架上取下，瞬时离心 5 秒，再次将 PCR 管放置到磁力架上，用 10μL 移液器吸弃所有废液；

2.2.5 待磁珠不反光(约 20s)立即加入 8 μL 洗脱液后振荡悬浮磁珠，磁珠不能过于干燥，室温孵育 10min；

2.2.6 将上述 PCR 管瞬时离心 5s，然后放置于磁力架上，吸附至清澈即可，吸取 7.5 μL 上清转移至新的 0.2 mL PCR 管中。纯化后的文库于 20℃±5℃保存。

### 2.3 注意事项

2.3.1 70%乙醇建议现配现用，避免污染。

2.3.2 磁珠在使用前应充分旋涡震荡混匀。

2.3.3 第一次文库纯化洗脱时，尽可能快的加入洗脱液，避免磁珠过于干燥，影响出库浓度。

2.3.4 文库纯化过程中所有室温孵育步骤时间为 10 min，期间振荡混匀 2 次，确保 DNA 与磁珠充分结合。

2.3.5 加入 70%乙醇后，立即直接吸出，无需晃动磁力架，可节约纯化时间，提高纯化回收效率。

2.3.6 纯化过程中的室温孵育温度为 10℃~30℃。

## 3. 文库质检

3.1 纯化所得文库使用 Qubit 荧光计检测，应满足以下条件方可进行下一步的上机测序：

3.1.1 单个文库浓度≥3 ng/μL； NTC 文库浓度≤1 ng/μL (无需上机测序)。

3.1.2 按照等质量混合后的混合文库浓度≥3 ng/μL。

3.2 如不能立即上机测序，可将纯化后文库置于 -20℃±5℃条件下保存，须在 90 天内上机测序，期间反复冻融不超过 3 次。

## 4. 上机测序

### 4.1 操作前准备

4.1.1 除聚合酶和文库对照品必须现取现用外，所有于 -20℃±5℃保存的试剂使用前于 2℃~8℃或冰上充分解冻，避免反复冻融。

4.1.2 准备冰盒，除纯化步骤需在室温下进行外，所有反应组分的使用和配制过程均需在冰上进行。

4.1.3 准备无核酸酶吸头进行移液操作。

4.1.4 准备宽口吸头，所有含 DNA 样本、DNA 聚合酶 2.1 或 DNA 文库对照品 1.0 的试剂或反应体系均使用宽口吸头缓慢吹吸 10~20 次进行混匀(其余试剂或反应体系可涡旋混匀)。

4.1.5 磁珠和缓冲液试剂使用前需混匀。

### 4.2 样品信息设置

4.2.1 打开基因测序仪的软件组件 SMRT® Link Berry Genomics 服务器软件(以下简称“软件”)，点击“Sample Setup”进入设置界面。

4.2.2 点击“New Calculation”，在页面中输入相应信息。

4.2.2.1 Sample Name: 输入样本名称。

4.2.2.2 Available Volume & Concentration & Insert Size: 输入样本的有效体积、浓度和插入片段大小。

4.2.2.3 Sequencing Primer & Binding Kit: 分别选择“Sequencing Primer v4”和“Sequel® II Binding Kit 2.1”。

4.2.2.4 Sequencing Mode: 默认模式。

4.2.2.5 Internal Control: 选择“Sequel® II DNA Internal Control 1.0”。

4.2.2.6 Use Cleanup Step & Cleanup Anticipated Yield: 选择“YES”进行纯化；设置纯化回收率为“50%”。

4.2.2.7 Specify Concentration on Plate: 文库最终上机测序时浓度建议在 180~220pM。

4.2.2.8 Cells to Bind: 输入“1”。

4.2.2.9 Prepare Entire Sample: 选择是否将所有样本体积都用于后续流程。无特殊情况，不对软件默认选项进行更改。

4.2.2.10 Advanced Options: 高级设置，不建议更改。

4.2.3 设置完成后，软件输出样本信息表，并指导步骤 4.3~4.6 的进行。

### 4.3 引物退火

#### 4.3.1 引物预处理

4.3.1.1 按下表设置 PCR 反应程序，热盖温度为 105℃，反应体积为 30μL，运行并暂停：

反应温度	反应时间
80℃	2min
4℃	Hold

4.3.1.2 按下表加样。

组分	加样量(μL)
测序引物 v4	1
洗脱液	29
总体积	30

4.3.1.3 混匀并瞬时离心，放入暂停的 PCR 仪中，运行 4.3.1.1 程序。反应结束后转移到冰上立即使用或保存在  $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ ，1 个月内使用。

#### 4.3.2 退火

4.3.2.1 按下表设置 PCR 反应程序，无热盖，反应体积为  $100\mu\text{L}$ ，运行并暂停：

反应温度	反应时间
$20^{\circ}\text{C}$	60min
$4^{\circ}\text{C}$	Hold

4.3.2.2 根据软件 (Annealing Primer) 给定的体积指导下表加样。

组分	加样量( $\mu\text{L}$ )
水	补水至总体积
引物缓冲液 v2	总体积 $\times 0.2$
样品	处理芯片数量 $\times$ 上机浓度 $\div$ 文库摩尔浓度 $\times 0.253$
预处理测序引物 v4	总体积 $\times 0.12$
总体积	样品体积 $\times$ 文库摩尔浓度

4.3.2.3 混匀并瞬时离心，放入暂停的 PCR 仪中，运行 4.3.2.1 程序。反应结束后转移到冰上立即使用或保存在  $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ ，1 个月内使用。

#### 4.4 聚合酶连接

##### 4.4.1 聚合酶稀释

4.4.1.1 使用结合缓冲液将 DNA 聚合酶 2.1 进行 10 倍稀释。

4.4.1.2 混匀并瞬时离心，稀释后的聚合酶立即使用。如有残余，则需遗弃。

##### 4.4.2 连接

4.4.2.1 按下表设置 PCR 反应程序，无热盖，反应体积为  $100\mu\text{L}$ ，运行并暂停：

反应温度	反应时间
$30^{\circ}\text{C}$	60min
$4^{\circ}\text{C}$	Hold

4.4.2.2 根据软件 (Binding) 给定的体积指导下表加样。

组分	加样量( $\mu\text{L}$ )
结合缓冲液	退火后样品体积 $\times 0.22$
水	补水至总体积
DTT	退火后样品体积 $\times 0.2$
dNTP	退火后样品体积 $\times 0.2$
退火后样品	上一步骤中的总体积 $\div 1.1$
稀释后 DNA 聚合酶 2.1	退火后样品体积 $\times 0.2$
总体积	MAX (退火后样品体积 $\div$ (1-结合体系系数)，退火后样品体积 $\times$ 退火体系样品终浓度 $\div$ 结合体系样品浓度)

4.4.2.3 混匀并瞬时离心，放入暂停的 PCR 仪中，运行 4.4.2.1 程序。反应结束后转移到冰上立即使用或保存在  $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ ，7 天内使用。

#### 4.5 纯化

4.5.1 纯化前，室温平衡磁珠和稀释缓冲液 30min。

4.5.2 根据软件 (AMPure<sup>®</sup> PB Purification of Polymerase Bound SMRTbell<sup>®</sup> Complexes 步骤 2) 给定的体积指导下表加样。

组分	加样量( $\mu\text{L}$ )
聚合酶-模板复合物	上一步骤中的总体积
稀释缓冲液	总体积 $\times 0.7$
总体积	上一步骤中的总体积 $\div 0.3$

4.5.3 混匀并瞬时离心。

4.5.4 使用 Qubit 荧光计及其配套试剂测定其浓度，并在软件 (AMPure<sup>®</sup> PB Purification of Polymerase Bound SMRTbell<sup>®</sup> Complexes 步骤 3) 中填写稀释后的聚合酶-模板复合物的体积和浓度。

4.5.5 在稀释后的聚合酶-模板复合物中加入软件 (AMPure<sup>®</sup> PB Purification of Polymerase Bound SMRTbell<sup>®</sup> Complexes 步骤 4) 给定体积

的磁珠 (上一步骤中的总体积 $\times 1.2$ )，混匀。室温静置 5min。

注：严格控制在 5min，否则会影响纯化回收率。

4.5.6 将样品放置于磁力架上，直到磁珠聚集到试管的一侧，溶液变得澄清，吸弃上清。

注：不要用乙醇清洗收集的磁珠。

4.5.7 将样品从磁力架上取下，立即加入  $105\sim 120\mu\text{L}$  稀释缓冲液，混匀重新悬浮磁珠。

4.5.8 将样品在室温下静置 15min，以洗脱聚合酶-模板复合物。

4.5.9 将试管放置于磁力架上，至溶液澄清。

4.5.10 将洗脱液转移至新的离心管中，转移到冰上待用或保存在  $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ ，7 天内使用。

4.5.11 使用 Qubit 荧光计及其配套试剂测定其浓度，并在软件 (AMPure<sup>®</sup> PB Purification of Polymerase Bound SMRTbell<sup>®</sup> Complexes 步骤 11) 中填写纯化后的聚合酶-模板复合物的体积和浓度。软件自动生成纯化后复合物的摩尔浓度和纯化回收率。

#### 4.6 上机前文库稀释

##### 4.6.1 DNA 文库对照品 1.0 稀释

4.6.1.1 按下表加样进行百倍稀释，混匀并瞬时离心。

组分	加样量( $\mu\text{L}$ )
稀释的缓冲液	99
DNA 文库对照品 1.0	1
总体积	100

4.6.1.2 按下表加样，对上一步完成的百倍稀释文库对照品进行万倍稀释，混匀并瞬时离心。

组分	加样量( $\mu\text{L}$ )
稀释的缓冲液	99
百倍稀释 DNA 文库对照品 1.0	1
总体积	100

##### 4.6.2 上机前文库最终稀释

4.6.2.1 根据软件 (Final Loading Dilution) 给定的体积指导下表加样。

组分	加样量( $\mu\text{L}$ )
稀释缓冲液	$98.5 - \text{纯化后的聚合酶-模板复合物体积}$
纯化后的聚合酶-模板复合物	上机浓度 $\div$ 纯化后复合物摩尔浓度 $\times 115$
万倍稀释 DNA 文库对照品 1.0	3.8
DTT	11.5
添加剂	1.2
总体积	115

注：可在离心管中进行加样，也可以直接在 96 孔样品板中进行加样。

4.6.2.2 瞬时离心，转移到冰上立即使用或保存在  $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ ，24h 内使用。

#### 4.7 准备样品板

4.7.1 将  $115\mu\text{L}$  最终稀释的文库全部转移到 96 孔样品板上，并在  $190^{\circ}\text{C}$  下用铝箔将板密封 2.5s。

注：不同型号热封机使用时，热封温度和时间存在差异，需自行测试；若步骤 4.6.2 直接在 96 孔样品板中进行，则直接热封。

4.7.2 将样品板  $150\text{ rcf}$  离心 1min。

4.7.3 将样品板放置于冰上，直至装载到仪器上。

#### 4.8 准备试剂

4.8.1 在 5s 内将矿物油管的盖子旋下，并更换为管塞。

4.8.2 准备测序试剂 C2.0。

4.8.2.1 将测序试剂 C2.0 包装撕开排出内部气体，用防水胶将开口重新密封。

4.8.2.2 将测序试剂 C2.0 在室温 ( $\sim 22^{\circ}\text{C}$ ) 下避光水浴  $30\sim 60\text{min}$ 。解冻过程中，可将测序试剂 C2.0 从水浴中取出，倒置、轻敲并观察板，看是否有任何残留的冷冻或沉淀物。重复以上操作 5 次以确保观察无

误，若板内试剂未完全融化，则将包装袋重新密封后继续水浴解冻。

4.8.2.3 解冻后，将测序试剂 C2.0 1000 rpm 涡旋混匀 1min。

注：具体使用参数可自行测试调整，但振荡强度不能超过 1200rpm，振荡时间不能超过 1min。

4.8.2.4 将测序试剂 C2.0 150 rcf 离心 1min，以确保试剂位于板底部。

4.8.2.5 装载到仪器前，擦去测序试剂 C2.0 上所有水分或污染物。

4.9 装载试剂、混匀板和样品板

4.9.1 点击 Sequel® II CNDx 基因测序仪屏幕底部的“LOCKED”按钮，待其显示为“UNLOCKED”后，打开仪器门。

4.9.2 将测序试剂 C2.0(不要将铝箔从测序试剂 C2.0 上取下)放入标有“REAGENT”的试剂槽中。可选择“REAGENT 1”或者“REAGENT 2”装载，装载前如果试剂槽上积聚冷凝水，请先用纸巾吸干水分。如果在运行期间不使用第二个试剂板冷块，不要将其留空，请在此位置放置一个密封的空板，用于隔离冷块，可重复使用。

注：试剂板上有 NFC 标签，用于提示效期和跟踪库存。

4.9.3 将矿物油放入位于试剂槽左侧的插槽中。插槽上序号需要与试剂槽上序号对应，其中“1”对应“REAGENT 1”、“3”对应“REAGENT 2”。确保管和插槽中的红线对齐。通过向下推试剂管，以确保试剂管放入正确位置。

注：试剂管有 NFC 标签，用于提示效期和跟踪库存。

4.9.4 将 96 孔样品板放入标有“SAMPLE”的样品槽中。装载前如果样品槽上积聚冷凝水，请先用纸巾吸干水分。

注：装载测序试剂 C2.0、96 孔样品板时应紧贴并与试剂槽或样品槽平齐。如果板在放置时有碰撞，取出板重新离心，以确保所有试剂或样品都在孔底部。

4.9.5 将空的未密封的 96 孔混匀板放入标有“MIXING”的槽中。

4.10 装载测序芯片和吸头

4.10.1 将测序芯片放入标有“CELL”的芯片槽中。芯片托盘轻轻滑入并卡入到位。可选择“CELL 1”或者“CELL 2”装载。

注：托盘带有 NFC 标签，用于提示效期和跟踪库存。

4.10.2 取下吸头盒（一次性吸头 v2）的盖子，将 3 盒吸头盒依次放入标有“TIP BOX”的槽中。确保吸头盒摆放正确并与工作台齐平。

注：该软件会记住使用吸头的最后位置，因此不要卸下或移动吸头盒。但是，如果关闭设备电源并重新启动，则最后一个已知的吸头位置将丢失。该单元应重新装满 3 个完整的吸头盒。请在开始新运行之前，将所有空的吸头盒替换为满的吸头盒。

4.11 测序运行设置

4.11.1 打开软件，点击“Run Design”进入设置界面。

4.11.2 点击“Create New Design”，在页面中输入相应信息，详细操作步骤参见《基因测序仪（Sequel® II CNDx）使用说明书》。

4.11.2.1 Binding Kit: 选择“Sequel® II Binding Kit 2.1”

4.11.2.2 Sequencing Kit: 选择“Sequel® II Sequencing Plate 2.0 (1rxn)”

4.11.2.3 DNA Control Complex: 选择“Sequel® II DNA Internal Control 1.0”。

4.11.2.4 Sequencing Mode: 选择 CCS READS。

4.11.2.5 Insert Size: 2535bp。

4.11.2.6 Movie Time per SMRT Cell : 15h。

## 5. 数据分析

使用地中海贫血基因检测数据分析软件，按照软件说明书进行操作，具体数据分析方法：

5.1 一致性序列分析（Circular Consensus Sequencing，简称 CCS）

CCS 模式数据处理过程包括去除接头序列、初始过滤、生成共识草图序列、比对、划窗口、校正、拼接等过程。

5.2 样本拆分

通过识别测序数据两端的 barcode 序列和引物标签序列，进行样本拆分。

5.3 序列比对

将样本拆分后获得的测序数据序列比对至人类参考基因组（NCBI GRCh38），再将包含成对引物的测序数据序列比对到目标基因区域，筛选得到目标序列（包括 5 种 HBA 序列：SEA\_reads、4.2\_reads、3.7\_reads、

THAI\_reads、WT\_reads，统称为 HBA\_reads；以及 1 种 HBB\_reads）。

5.4 数据质控

测序数据质控标准：单个文库数据产出 HBA reads  $\geq 1000$ ；HBB reads  $\geq 100$ 。

5.5 数据分析

5.5.1  $\alpha$  缺失

各缺失突变类型的检测值计算公式如下：

$$SEA\_ratio = SEA\_reads / HBA\_reads$$

$$4.2\_ratio = 4.2\_reads / HBA\_reads$$

$$3.7\_ratio = 3.7\_reads / HBA\_reads$$

$$THAI\_ratio = THAI\_reads / HBA\_reads$$

$$WT\_ratio = WT\_reads / HBA\_reads$$

5.5.2 点突变

根据各位点测到的所有序列数 depth 和突变序列数 alt\_depth，计算点突变比例检测值 Mutation ratio，公式如下：

$$Mutation\ ratio = alt\_depth / depth$$

### 【阳性判断值】

#### 1. $\alpha$ 缺失型阳性判断值

1.1  $\alpha$  缺失型--SEA、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$  和--THAI 四者之一判断值 $\geq 5\%$ ，其他三者 $< 5\%$ ，同时 WT(野生型或非缺失)判断值 $\geq 5\%$ ，判定为对应  $\alpha$  缺失型杂合突变。

1.2  $\alpha$  缺失型--SEA、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$  和--THAI 四者之一判断值 $\geq 5\%$ ，其他三者 $< 5\%$ ，同时 WT 判断值 $< 5\%$ ，判定为对应的  $\alpha$  缺失型纯合突变。

1.3  $\alpha$  缺失型--SEA、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$  和--THAI 四者之二判断值 $\geq 5\%$ ，四者剩余的两个判断值 $< 5\%$ ，同时 WT 判断值 $< 5\%$ ，判定为对应四者之二的  $\alpha$  缺失型双杂合突变。

1.4  $\alpha$  缺失型--SEA、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$  和--THAI 四者同时判断值 $< 5\%$ ，同时 WT 判断值 $\geq 5\%$ ，判定为  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ，未检出  $\alpha$  缺失型。

判断值下文以 SEA\_ratio、4.2\_ratio、3.7\_ratio、THAI\_ratio、WT\_ratio(HBA 野生型)表示，具体判定规则参见下表(下表为常见的基因型)：

SEA_ratio	4.2_ratio	3.7_ratio	THAI_ratio	WT_ratio	检测结果
$\geq 5\%$	$< 5\%$	$< 5\%$	$< 5\%$	$\geq 5\%$	--SEA/ $\alpha\alpha$
$< 5\%$	$\geq 5\%$	$< 5\%$	$< 5\%$	$\geq 5\%$	-- $\alpha^{4.2}$ / $\alpha\alpha$
$< 5\%$	$< 5\%$	$\geq 5\%$	$< 5\%$	$\geq 5\%$	-- $\alpha^{3.7}$ / $\alpha\alpha$
$< 5\%$	$< 5\%$	$< 5\%$	$\geq 5\%$	$\geq 5\%$	--THAI/ $\alpha\alpha$
$\geq 5\%$	$< 5\%$	$\geq 5\%$	$< 5\%$	$< 5\%$	--SEA/ $-\alpha^{3.7}$
$\geq 5\%$	$\geq 5\%$	$< 5\%$	$< 5\%$	$< 5\%$	--SEA/ $-\alpha^{4.2}$
$< 5\%$	$\geq 5\%$	$\geq 5\%$	$< 5\%$	$< 5\%$	-- $\alpha^{3.7}$ / $-\alpha^{4.2}$
$< 5\%$	$\geq 5\%$	$< 5\%$	$< 5\%$	$< 5\%$	-- $\alpha^{4.2}$ / $-\alpha^{3.7}$
$< 5\%$	$< 5\%$	$< 5\%$	$< 5\%$	$\geq 5\%$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$

#### 2. $\alpha$ 和 $\beta$ 点突变阳性判断值

2.1 Mutation ratio $\geq 20\%$ ，且 $\leq 80\%$ ，判定为对应杂合点突变；

2.2 Mutation ratio $> 80\%$ ，判定为对应纯合点突变；

2.3 Mutation ratio $< 20\%$  时，判定为 N，表示未检出检测范围内的突变。

### 【检验结果的解释】

1. 阴阳性质控结果：阴阳性质控品检测结果为未检出突变，基因型为  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ；N；阳性质控品 1 检测结果为阳性，基因型为  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ；IVS-II-654(C>T) 杂合，CD71/72(+A) 杂合；阳性质控品 2 检测结果为阳性，基因型为  $\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$ ；N。

2. 结果判断：阴阳性质控结果正确是实验结果有效性的前提，否则实验结果不可信。

3. 结果解读： $\alpha$  缺失型阳性报出对应基因型(--SEA/ $\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 、--THAI/ $\alpha\alpha$ 、--SEA/ $-\alpha^{3.7}$ 、--SEA/ $-\alpha^{4.2}$ 、 $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$ 、 $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}/-\alpha^{4.2}$ 等)，未检出缺失时报出基因型  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ，表示未检出  $\alpha$  缺失； $\alpha$  点突变阳性报出  $\alpha^{WS}\alpha$ (Hb Westmead)、 $\alpha^{CS}\alpha$ (Hb CS)、 $\alpha^{QS}\alpha$ (Hb QS)对应的杂合或纯合；

$\beta$  点突变阳性报出对应位点突变杂合或纯合。 $\alpha$  和  $\beta$  点突变未检出突变信息时报“N”。

4. 无应答检测情形：软件界面检测结果为“-”，表示样本检测出 3 种及以上缺失的组合，或数据质控不合格，建议从全血开始复测。

#### 【检验方法的局限性】

1. 本产品仅适用于基因测序仪 Sequel® II CNDx（杭州贝瑞和康基因诊断技术有限公司生产），不适用于其他品牌或型号的机型。

2. 本产品仅对预期用途中检测范围内的变异类型进行了分析性能验证，对于未包含在检测范围内的其他变异或未知变异，存在漏检风险。

3. 有关假阴性结果的可能性分析：

3.1 不合理的样本采集、运送有可能导致假阴性结果。

3.2 未经验证的其他干扰或 PCR 抑制因子等可能会导致假阴性结果。

3.3 试剂过期、未按软件以及说明书指导进行操作、样本受损或污染、测序系统故障等，可能会影响试验结果。

#### 【产品性能指标】

1. 建库试剂外观：试剂盒应清洁、标识清晰无破损、各组分标签无错误或脱落；各组分封存无漏液。试剂均为无色透明状液体，无肉眼可见的固体悬浮物或沉淀物。

测序试剂外观：试剂盒应清洁、标识清晰无破损、各组分标签无错误或脱落；各组分封存良好无漏液；耗材组分以及测序芯片无破损；测序试剂 C 包装袋无漏气。

2. 准确性：采用试剂盒检测范围内的地中海贫血核酸检测国家阳性参考品和/或企业阳性参考品进行检测，应检出对应的突变类型。参考品应涵盖试剂盒检测范围内的所有变异类型。

3. 特异性：采用地中海贫血核酸检测国家阴性参考品和试剂盒检测范围外的国家阳性参考品进行检测，或采用企业阴性参考品进行检测，结果均应为阴性。

4. 检测限：采用试剂盒检测范围内的地中海贫血核酸检测国家阳性参考品和/或企业检测限参考品进行检测，不高于 3 ng 或 1000 拷贝的上样量条件下，应检出对应的突变类型。参考品应涵盖试剂盒检测范围内的所有变异类型。

5. 重复性：采用企业参考品进行重复检测，各参考品的结果均一致，且应检出对应的突变类型。

6. 临床试验：本产品在临床试验机构一共完成 1588 例临床样本的检测，与已上市产品进行对比研究，阳性符合率、阴性符合率和总符合率均为 100%，Kappa 系数为 1。

#### 【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外诊断。请在使用前仔细阅读此说明书，并确认按说明书要求已准备相应试剂、耗材和仪器。如发生和试剂盒描述不一致请立即停止使用。

2. 使用时注意：

2.1 不要使用超过有效期的试剂。

2.2 不要混用不同批号和试剂盒之间的其它试剂。

2.3 按说明书的保存条件进行试剂保存。

2.4 使用前对试剂盒的外观进行观察，确保试剂盒外观整洁，标记清晰，无漏液，标签无破损或脱落方可使用。如有异常，请停止使用。

2.5 收样人员要做好样本的核对工作，避免样本编号重复，并确认样本信息正确。

3. 操作时注意：

3.1 试剂盒使用环境应符合 PCR 标准实验室要求。

3.2 实验应由具备专业背景和技能的、熟悉操作流程的人员进行操作，需严格按照操作步骤进行实验，不得私自改动或简化，必要时需进行培训。

3.3 使用适用机型及配套软件版本，严格按照仪器标准操作规程操作及软件说明书操作，测序仪及分析软件需按照相应要求进行定期维护。

3.4 使用前将试剂盒及盒内所有组分应充分解冻。用过的冻存管必须仔细盖紧后保存。

3.5 为了避免潜在组分污染，未使用完的试剂不应转移回原瓶。

3.6 所有操作步骤中，NTC（水）、阴性质控品、阳性质控品 1 和阳性质

控品 2 在同一批操作中最先加样。

3.7 由于磁珠溶液粘稠，移取操作时需缓慢以确保其全部打入离心管。

3.8 上机测序步骤中，所有反应体系配制后，请用宽口吸头缓慢吹吸 10~20 次的方式进行混匀操作；需要进行移液操作前，如试剂有挂壁现象，请使用迷你离心机短暂离心 2~3s。

3.9 相同引物和接头组合编号的样本不得在同一芯片中测序。

3.10 装载到仪器前，96 孔样板必须热封。必须用试剂盒配套的铝箔进行密封，否则可能导致运行失败。另外，由于热密封必然会损害样板板的某些结构，因此不建议重复使用样板板。装载到仪器前，96 孔混匀板无需热封。

3.11 试剂盒所提供的试剂使用完毕，需及时盖紧管盖，按实验室生物废料（废液）处理。

3.12 实验结束后应立即清洁工作台，并定期对工作台及各种实验用品进行消毒。

4. 安全注意事项：

4.1 所有检测样本和质控品污染的材料（含废液）必须根据适用的规定经有效程序（高压灭菌或化学处理）灭活。本试剂盒内试剂废弃物及实验过程中的废弃物应按医疗废弃物进行处理，实验废弃的 PCR 反应管应按照实验室相关规定进行处理以防止污染。

4.2 操作过程应工作服、帽、鞋、手套等穿戴齐全，各区物品均为专用，不得交叉使用，避免污染。试剂可能刺激眼睛、皮肤和黏膜；一旦接触，应立即用大量清水冲洗并咨询医生。

4.3 本试剂盒内所配对照品经检测不具有传染性，但在使用时建议将其视为具有潜在传染性物质进行处理。

#### 【标识的解释】

1-Cat：组分编号

2-Lot：生产批号

#### 【参考文献】

[1] Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited hemoglobin disorders: an increasing global health problem[J]. Bulletin World Health Organ, 2001,(79): 704-712.

[2] 杨阳, 张杰. 中国南方地区地中海贫血研究进展[J]. 中国实验血液学杂志, 2017, 25(1):276-280.

[3] 徐湘民.地中海贫血预防控制操作指南[M].北京:人民军医出版社, 2011.

[4] 林娜,黄海龙,王燕,等.泰国缺失型  $\alpha$  地中海贫血 1 的基因诊断和临床血液学表型分析[J].中国实验血液学杂志,2016,24(4):1116-1120.

[5] 陈萍,李树全,李敏清,等.泰国缺失型  $\alpha$  地中海贫血 1 的产前基因诊断.中华医学遗传学杂志,2007,24(3):247-250.

[6] 阙婷,张强,唐燕青,等.广西地区泰国缺失型  $\alpha$ -地中海贫血的调查研究[J].国际检验医学杂志,2013,34(13):1703-1706.

[7] XM Xu, YQ Zhou, GX Luo, et al. The prevalence and spectrum of  $\alpha$  and  $\beta$  thalassaemia in Guangdong Province: implications for the future health burden and population screening[J]. J Clin Pathol, 2004, 57(5): 517-522.

[8] Traeger-Synodinos J, Harteveld CL, Old JM, et al. EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies[J]. Eur J Hum Genet, 2015, 23(4): 426-437. DOI: 10.1038/ejhg.2014.131.

[9] Brancaleoni V, Di Piero E, Motta I, et al. Laboratory diagnosis of thalassaemia[J]. Int J Lab Hematol, 2016, 38 (Suppl 1): 32-40. DOI: 10.1111/ijlh.12527.

#### 【基本信息】

注册人/生产企业/售后服务单位：杭州贝瑞和康基因诊断技术有限公司  
住所：浙江省杭州经济技术开发区白杨街道 6 号大街 260 号 9 幢，16 幢一层、二层

电话：

网址：

E-mail：

生产地址：杭州经济技术开发区白杨街道 6 号大街 260 号 9 幢，16 幢一层、二层，18 幢二层

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】

核准日期:

修改日期: