

受理号：CSZ2400493

# 体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：人 BRAF/TERT/RET/NTRK3 基因突变检测试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）

产品管理类别：第三类

申请人名称：上海睿璟生物科技有限公司

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.....  | 6  |
| 三、 临床评价概述.....   | 10 |
| 四、 产品受益风险判定..... | 12 |

## 基本信息

### 一、申请人名称

上海睿璟生物科技有限公司

### 二、申请人住所

上海市闵行区召楼路 3632 号 2 幢 5 层

### 三、生产地址

上海市闵行区召楼路 3632 号 2 幢 5 层

## 技术审评概述

## 一、产品概述

### (一) 产品主要组成成分

产品包含试剂盒一、试剂盒二和试剂盒三，具体见表 1:

表1 人 BRAF/TERT/RET/NTRK3 基因突变检测试剂盒组成

| 编号 | 包装盒编号 | 组分名称     | 主要成分                                                      | 数量                            | 用途   |
|----|-------|----------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------|------|
| 1  | 试剂盒一  | 磁珠       | 磁珠                                                        | 3680 $\mu\text{L} \times 1$ 管 | 纯化   |
| 2  |       | TE 缓冲液   | Tris、EDTA                                                 | 1200 $\mu\text{L} \times 1$ 管 |      |
| 3  | 试剂盒二  | DNA 消化液  | DNase I、Buffer                                            | 80 $\mu\text{L} \times 1$ 管   | 逆转录  |
| 4  |       | 逆转录反应液   | RT Buffer、dNTP in RT Buffer、镁离子缓冲液 1                      | 200 $\mu\text{L} \times 1$ 管  |      |
| 5  |       | 逆转录引物    | 随机引物                                                      | 40 $\mu\text{L} \times 1$ 管   |      |
| 6  |       | 逆转录酶反应液  | 逆转录酶、RNA 酶抑制剂                                             | 120 $\mu\text{L} \times 1$ 管  |      |
| 7  |       | DNA 扩增引物 | DNA 扩增引物                                                  | 180 $\mu\text{L} \times 1$ 管  | 文库构建 |
| 8  |       | RNA 扩增引物 | RNA 扩增引物                                                  | 180 $\mu\text{L} \times 1$ 管  |      |
| 9  |       | 扩增反应液    | DNA 聚合酶、高保真 DNA 聚合酶、dNTP in AmpSeq Buffer、镁离子缓冲液 2、Buffer | 440 $\mu\text{L} \times 2$ 管  |      |
| 10 |       | DNA 阴性对照 | 野生型人基因组 DNA                                               | 20 $\mu\text{L} \times 1$ 管   |      |
| 11 |       | RNA 阴性对照 | 野生型人总 RNA                                                 | 24 $\mu\text{L} \times 1$ 管   | 对照品  |
| 12 |       | DNA 阳性对照 | BRAF V600E、TERT C228T 突变型 DNA                             | 20 $\mu\text{L} \times 1$ 管   |      |
| 13 |       | RNA 阳性对照 | CCDC6-RET 融合型总 RNA                                        | 24 $\mu\text{L} \times 1$ 管   |      |
| 14 |       | 单标签平衡文库  | 单标签平衡文库                                                   | 10 $\mu\text{L} \times 1$ 管   | 测序   |
| 15 | 试剂盒三  | 标签接头     | 标签接头                                                      | 4 $\mu\text{L} \times 80$ 管   | 文库构建 |

备注：不同批号试剂盒中各组分不得互换使用。

## **(二) 产品预期用途**

本试剂盒用于体外定性检测细针穿刺活检不能确定良恶性的甲状腺结节样本中 BRAF 基因的 V600E 突变、TERT 基因的 C228T 和 C250T 突变以及 CCDC6-RET、NCOA4-RET、ETV6-NTRK3 融合。

本产品用于细针穿刺活检不能确定良恶性的 Bethesda 报告 III 类和 V 类人群的甲状腺癌的辅助诊断。

本产品其检测结果仅供临床参考，不应作为患者诊断或治疗的唯一依据，临床医生应结合患者临床表现及其他检查检验结果进行综合判断。

## **(三) 产品包装规格**

40 人份/盒。

## **(四) 产品检验原理**

本试剂盒基于联合探针锚定聚合测序技术，以甲状腺结节穿刺活检样本提取的 DNA 和 RNA 为模板，采用多重 PCR 技术对靶序列进行 PCR 扩增。扩增产物经磁珠纯化富集后进行第二轮 PCR 扩增，从而引入用于样本识别的标签序列，扩增产物经磁珠纯化后得到文库。将适量文库按照等物质的量混合为一个混合文库，混合文库经变性、单链环化、酶切消化、环化产物纯化制备成高通量测序专用的单链环状 DNA 文库。然后使用测序试剂盒的试剂制备 DNB：以单链环状 DNA 为模板，在 DNA 聚合酶作用下进行滚环扩增，将

单链环状 DNA 扩增到约 500 拷贝，扩增产物为 DNB，即为测序文库。测序文库通过基因测序仪上机检测得到测序数据，采用生物信息学软件对测序数据分析得到基因变异信息。

## 二、临床前研究概述

### （一）主要原材料

#### 1. 主要原材料的选择

该产品的主要原材料包括引物、dNTPs、DNA 聚合酶、逆转录酶、标签接头、磁珠、RNA 酶抑制剂，以及单标签平衡文库等。单标签平衡文库由申请人自制，其他原材料均为外购方式获得。

其中引物为申请人自行设计，委托专业的合成公司合成；标签接头序列由华大智造设计公布，委托专业的合成公司合成。

dNTPs、DNA 聚合酶、逆转录酶、磁珠、RNA 酶抑制剂等均由有资质的原料供应商提供。通过功能性试验，申请人筛选确定了原材料和供应商，同时制定了各主要原材料质量标准并检验合格。

#### 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、检测限参考品和精密度参考品：阳性参考品共 10 份，包括不同突变种类、不同突变频率/融合拷贝数的阳性参考品；阴性参考品共 4 份，2 份为野生型临床样本 DNA/RNA，2 份为含试剂盒检测靶标序列相近的常见突变的临床样本 DNA/RNA；检测限参考品共 6 份，包括试剂盒

可检出的所有检测靶标；精密度参考品共 6 份，包括 2 份阴性精密度、2 份不同突变种类和不同突变频率的阳性精密度参考品，2 份不同种类和不同融合拷贝数的阳性精密度参考品。

产品同时设置了阳性对照和阴性对照，用于监控检测过程，以确保试剂盒检测结果的准确性。

## **（二）生产工艺及反应体系研究**

申请人对产品反应体系的研究包括试剂用量（引物、DNA 聚合酶、标签接头及纯化磁珠）、模板用量、文库构建条件、文库环化条件、测序反应条件、测序数据量等。通过功能性实验，确定了该产品的最佳反应体系。

申请人根据试剂盒中各组分的主要生产工艺的研究结果，确定了该产品的最佳生产工艺。

## **（三）分析性能评估**

分析性能评估内容包括：准确度、检测限、精密度和分析特异性。申请人对该产品配套的核酸提取试剂和样本保存液也分别进行了性能研究。

### **1. 准确度**

使用 3 批试剂盒分别在 3 种适用机型上对多例临床样本，企业阳性参考品和企业阴性参考品进行检测，检测结果为试剂盒各变异类型阳性符合率 100%，阴性符合率 100%，符合产品性能要求。

## 2. 检测限

检测限研究中，使用 3 批试剂盒检测不同核酸浓度和不同突变频率/融合拷贝数的多例临床样本，每个浓度或突变频率/融合拷贝数的样本检测 20 次，将检出率  $\geq 95\%$  的最低核酸浓度或最低突变频率/融合拷贝数确定为最低检测限。经验证最终确定该产品的最低检测限为：本试剂盒可检出  $1\text{ng}/\mu\text{L}$  DNA 样本中突变丰度为 2% 的 BRAF V600E、TERT C228T 和 TERT C250T 基因突变，以及  $1\text{ng}/\mu\text{L}$  RNA 样本中含量为 100 拷贝/ng 的 CCDC6-RET、NCOA4-RET 和 ETV6-NTRK3 融合基因变异。

## 3. 精密度

精密度研究使用 3 批试剂盒分别在 3 种适用机型上对多例临床样本和企业精密度参考品进行检测，并对批次内/批次间、日内/日间、实验室间、仪器间和不同操作者间的精密度进行评价。研究结果显示，上述所有精密度研究的符合率和 CV 均符合产品性能要求。

## 4. 分析特异性

分析特异性研究包含交叉反应研究和干扰研究，交叉反应研究包括序列相近和具有一定同源性的其他常见突变/融合变异，以及野生型基因序列。分别在 3 种适用机型上对多例交叉反应样本进行检测，结果显示均无交叉反应。干扰研究结果表明，样本中含

有以下干扰物时：2g/L 的血红蛋白、2%的乙醇和 2%样本保存液，对该产品的检测结果无影响。

#### （四）阳性判断值研究

阳性判断值的研究包括建立和验证两部分。使用 379 例临床样本通过受试者工作特征（ROC）曲线建立试剂盒的阳性判断值；使用 183 例临床样本进行阳性判断值验证，最终确定试剂盒阳性判断值如下：

BRAF V600E：突变丰度  $\geq 0.6\%$  时判断为阳性；反之，则判断为阴性；

TERT C228T：突变丰度  $\geq 0.8\%$  时判断为阳性；反之，则判断为阴性；

TERT C250T：突变丰度  $\geq 0.7\%$  时判断为阳性；反之，则判断为阴性；

CCDC6-RET：标准化后支持融合变异的 reads 数  $\geq 200$  条时，判断为阳性；反之，则判断为阴性；

NCOA4-RET：标准化后支持融合变异的 reads 数  $\geq 200$  条时，判断为阳性；反之，则判断为阴性；

ETV6-NTRK3：标准化后支持融合变异的 reads 数  $\geq 200$  条时，判断为阳性；反之，则判断为阴性。

上述任一检测靶标判为阳性时，则判定该样本的试剂盒检测

结果为阳性；

上述所有检测靶标均判为阴性时，则判定该样本的试剂盒检测结果为阴性。

### **(五) 稳定性研究**

申请人对产品的实时稳定性、使用稳定性、运输稳定性及样本稳定性进行了研究。

实时稳定性：采用 3 批试剂盒置于规定储存条件下放置，在各时间点对试剂盒的外观、阳性参考品符合率、阴性参考品符合率、检测限参考品符合率、精密度参考品符合率进行考察，结果显示各项性能指标均符合要求。确定试剂盒在储存条件保存，有效期为 18 个月。

申请人对产品的使用稳定性（开瓶稳定性、冻融稳定性）、运输稳定性和样本稳定性分别进行了研究。结果显示，产品性能均能满足产品说明书声称。

## **三、临床评价概述**

申请人在上海市第六人民医院、上海交通大学医学院附属仁济医院、河南省肿瘤医院、蚌埠医学院第一附属医院、常州市第一人民医院、浙江大学医学院附属第一医院、哈尔滨医科大学附属肿瘤医院、杭州市第一人民医院共 8 家机构完成了临床试验。

第一部分：试验体外诊断试剂与甲状腺癌临床参考标准的比

## 较研究

采用试验用体外诊断试剂与甲状腺癌临床参考标准进行比较研究,验证本产品的临床意义。入组患者为细胞学分类 Bethesda III和V类的甲状腺癌疑似患者,共计纳入细针穿刺活检不能确定良恶性的甲状腺结节样本共 1471 例。申报产品的临床灵敏度为 85.64%(95%CI: 83.63%~87.44%),临床特异度为 99.41%(95%CI: 96.72%~99.90%)。

第二部分,试验体外诊断试剂与基因检测的临床参考方法的比较研究

采用试验用体外诊断试剂与数字 PCR 方法进行比较研究试验,验证本产品的临床检测性能。临床试验共入组病例 1876 例,针对 BRAF V600E 基因变异,申报产品与对比方法的阳性符合率为 99.59% (95%CI: 98.95%~99.84%),阴性符合率为 99.89% (95%CI: 99.37%~99.98%); 针对 TERT C228T 基因变异,申报产品与对比方法的阳性符合率为 100% (95%CI: 95.72%~100%),阴性符合率为 99.94%(95%CI: 99.68%~99.99%); 针对 TERT C250T 基因变异,申报产品与对比方法的阳性符合率为 100%(95%CI: 93.98%~100%),阴性符合率为 99.94%(95%CI: 99.69%~99.99%); 针对 CCDC6-RET 基因变异,申报产品与对比试剂的阳性符合率为 100% (95%CI: 95.72%~100%),阴性符合率为 99.89%(95%CI: 99.59%~99.97%);

针对 NCOA4-RET 基因变异，申报产品与对比方法的阳性符合率为 100%( 95%CI: 92. 29% ~ 100% )，阴性符合率为 100%( 95%CI: 99. 79% ~ 100% )；针对 ETV6-NTRK3 基因变异，申报产品与对比方法的阳性符合率为 100%( 95%CI: 93. 58% ~ 100% )，阴性符合率为 100%( 95%CI: 99. 79% ~ 100% )。

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

依据 GB/T 42062-2022 《医疗器械－风险管理对医疗器械的应用》对产品进行风险分析。

##### (一) 受益评估

本产品适用于细针穿刺活检不能确定良恶性的 Bethesda 报告 III 类和 V 类人群的甲状腺癌的辅助诊断，本产品检测结果仅供临床参考，不应作为临床诊断的唯一依据，临床医生应结合临床表现及实验室检测指标等因素进行综合判断。其临床应用的主要受益在于：该产品为不能确定良恶性的甲状腺结节人群提供一种辅助诊断选择。该试剂盒的临床灵敏度 85. 64%，临床特异度为 99. 41%。

##### (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/受益分析既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. 甲状腺结节细针穿刺活检样本由于取样量的限制，一般提取的核酸浓度较低，用量不宜低于 200  $\mu$ L/反应，同时明确了样本投入量范围。

2. 本试剂盒试剂均经过特别配制，随意替换试剂盒中的任何试剂，都可能导致实验失败。不同批号试剂盒组分不可相互混用。

3. 本试剂盒检测标本为甲状腺结节细针穿刺活检样本提取的 DNA 和 RNA，操作者应将其视为有感染性物质，样本操作和处理需符合相应法规要求，使用过的试剂盒为临床废弃物，应妥善处理。

附件：产品说明书

**人 BRAF/TERT/RET/NTRK3 基因突变检测试剂盒**

## （联合探针锚定聚合测序法）说明书

### 【产品名称】

人 BRAF/TERT/RET/NTRK3 基因突变检测试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）

### 【包装规格】

40 人份/盒

### 【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测细针穿刺活检不能确定良恶性的甲状腺结节样本中 BRAF 基因的 V600E 突变、TERT 基因的 C228T 和 C250T 突变以及 CCDC6-RET、NCOA4-RET、ETV6-NTRK3 融合。具体检测变异位点类型见下表 1。

表1：检测变异位点类型

| 基因名称  | 变异类型              | COSMIC ID   |
|-------|-------------------|-------------|
| BRAF  | V600E             | COSM476     |
| TERT  | C228T             | COSM1716558 |
|       | C250T             | COSM1716559 |
| RET   | CCDC6-RET.C1:R12  | COSF1271    |
|       | NCOA4-RET.N8:R12  | COSF1491    |
| NTRK3 | ETV6-NTRK3.E4:N14 | COSF1534    |

本产品用于细针穿刺活检不能确定良恶性的 Bethesda 报告 III 类和 V 类人群的甲状腺癌的辅助诊断。

本产品其检测结果仅供临床参考，不应作为患者诊断或治疗的唯一依据，临床医生应结合患者临床表现及其他检查检验结果进行综合判断。

BRAF 基因编码 MAPK 通路中的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，主要突变类型为 V600E。

BRAF V600E 基因是甲状腺乳头状癌中最常见的驱动突变，发生率为 58.5%-72%。

TERT 基因启动子区有 2 个突变位点，分别为转录起始点上游的 -124（Chr5:1295228C>T，又称 C228T）和 -146（Chr5:1295250C>T，又称 C250T），在甲状腺滤泡癌及甲状腺乳头状癌发生率为 10-15%。

RET 融合基因通过信号传导，促使细胞发生恶性转化。其中 CCDC6-RET 融合方式最常见。RET 融合与放射暴露有关，在无放射暴露史和有放射暴露史的甲状腺乳头状癌中发生率分别为 35-40%和 50-80%<sup>[1]</sup>。

NTRK 基因通过激活 RAS 和 PI3K 等几种靶蛋白的结合位点，从而激活 MAPK/RAS/ERK 和 PI3K/AKT 信号传导级联，控制细胞周期的进程、增殖、凋亡和存活。NTRK 是甲状腺癌继 RET 之后第二大融合基因，其中 NTRK3 占 90%；最常见形式就是 ETV6-NTRK3<sup>[2]</sup>。

### 【检验原理】

本试剂盒基于联合探针锚定聚合测序技术，以甲状腺结节穿刺活检样本提取的 DNA 和 RNA 为模板，采用多重 PCR 技术对靶序列进行 PCR 扩增。扩增产物经磁珠纯化富集后进行第二轮 PCR 扩增，从而引入用于样本识别的标签序列，扩增产物经磁珠纯化后得到文库。将适量文库按照等物质的量混合为一个混合文库，混合文库经变性、单链环化、酶切消化、环化产物纯化制备成高通量测序专用的单链环状 DNA 文库。然后使用测序试剂盒的试剂制备 DNB：以单链环状 DNA 为模板，在 DNA 聚合酶作用下进行滚环扩增，将单链环状 DNA 扩增到约 500 拷贝，扩增产物为 DNB，即为测序文库。测序文库通过基因测序仪上机检测得到测序数据，采用生物信息学软件对测序数据分析得到基因变异信息。

### 【主要组成成分】

表2：试剂盒主要组成成分

| 编号 | 包装盒编号 | 组分名称     | 主要成分                                 | 数量          | 用途  |
|----|-------|----------|--------------------------------------|-------------|-----|
| 1  | 试剂盒一  | 磁珠       | 磁珠                                   | 3680μL×1 管  | 纯化  |
| 2  |       | TE 缓冲液   | Tris、EDTA                            | 1200 μL×1 管 |     |
| 3  | 试剂盒二  | DNA 消化液  | DNase I、Buffer                       | 80 μL×1 管   | 逆转录 |
| 4  |       | 逆转录反应液   | RT Buffer、dNTP in RT Buffer、镁离子缓冲液 1 | 200 μL×1 管  |     |
| 5  |       | 逆转录引物    | 随机引物                                 | 40 μL×1 管   |     |
| 6  |       | 逆转录酶反应液  | 逆转录酶、RNA 酶抑制剂                        | 120 μL×1 管  |     |
| 7  |       | DNA 扩增引物 | DNA 扩增引物                             | 180 μL×1 管  | 文库  |

| 编号 | 包装盒编号 | 组分名称     | 主要成分                                                      | 数量                           | 用途   |
|----|-------|----------|-----------------------------------------------------------|------------------------------|------|
| 8  |       | RNA 扩增引物 | RNA 扩增引物                                                  | 180 $\mu\text{L} \times 1$ 管 | 构建   |
| 9  |       | 扩增反应液    | DNA 聚合酶、高保真 DNA 聚合酶、dNTP in AmpSeq Buffer、镁离子缓冲液 2、Buffer | 440 $\mu\text{L} \times 2$ 管 |      |
| 10 |       | DNA 阴性对照 | 野生型人基因组 DNA                                               | 20 $\mu\text{L} \times 1$ 管  | 对照品  |
| 11 |       | RNA 阴性对照 | 野生型人总 RNA                                                 | 24 $\mu\text{L} \times 1$ 管  |      |
| 12 |       | DNA 阳性对照 | BRAF V600E、TERT C228T 突变型 DNA                             | 20 $\mu\text{L} \times 1$ 管  |      |
| 13 |       | RNA 阳性对照 | CCDC6-RET 融合型总 RNA                                        | 24 $\mu\text{L} \times 1$ 管  |      |
| 14 |       | 单标签平衡文库  | 单标签平衡文库                                                   | 10 $\mu\text{L} \times 1$ 管  | 测序   |
| 15 | 试剂盒三  | 标签接头     | 标签接头                                                      | 4 $\mu\text{L} \times 80$ 管  | 文库构建 |

备注：不同批号试剂盒中各组分不得互换使用。

本试剂盒不包含，但需配套使用的试剂和软件如下：

表3：主要配套试剂盒及其它

| 序号 | 名称                         | 注册/备案证号/货号      | 生产企业                         | 备注                       |
|----|----------------------------|-----------------|------------------------------|--------------------------|
| 1  | 核酸提取试剂                     | 沪闵械备 20200098 号 | 上海睿璟生物科技有限公司                 | /                        |
| 2  | 环化反应通用试剂盒                  | 沪闵械备 20210081 号 | 上海睿璟生物科技有限公司                 | /                        |
| 3  | 测序反应通用试剂盒<br>(联合探针锚定聚合测序法) | 鄂汉械备 20190039 号 | 武汉华大智造科技有限公司                 | 依据不同的测序仪，需选择适配的测序反应通用试剂盒 |
| 4  | 测序反应通用试剂盒<br>(测序法)         | 苏苏械备 20190424 号 | 苏州吉因加生物医药工程有<br>限公司          |                          |
| 5  | 人类 4 基因突变分析软件              |                 | 上海睿璟生物科技有限公司                 | /                        |
| 6  | Qubit™ dsDNA HS Assay Kit  | Q32851/Q32854   | Thermo Fisher Scientific Inc | /                        |
| 7  | Qubit™ RNA HS Assay Kit    | Q32852/Q32855   | Thermo Fisher Scientific Inc | /                        |
| 8  | Qubit™ ssDNA Assay Kit     | Q10212          | Thermo Fisher Scientific Inc | /                        |

#### 【储存条件及有效期】

试剂盒一置于 2~8℃ 条件下保存，试剂盒二和三置于 -20±5℃ 条件下保存，试剂盒有效期为 18 个月。

试剂盒开封后在规定的保存条件下保存应不超过 15 个月。试剂盒二和试剂盒三反复冻融次数不超过 5 次。

生产日期，使用期限或者失效日期：见标签。

### 【适用仪器】

适用于武汉华大智造科技有限公司的 MGISEQ -200 基因测序仪（国械注准 20183220258）和 MGISEQ -2000 基因测序仪（国械注准 20183220257）；苏州吉因加生物医学工程有限公司的 Gene<sup>+</sup>Seq-2000 基因测序仪（国械注准 20193220614）。

### 【样本要求】

1) 样本类型：甲状腺结节细针穿刺活检样本。

2) 样本收集：样本采集完成后，应尽快保存在配套的样本保存液中\*，样本用量不少于 200μL。如不及时进行核酸提取，建议在 2~8℃ 保存，保存时间不超过 1 个月；样本保存于艾德样本保存液中可于 -20±5℃ 条件下保存 22 个月，可反复冻融 3 次；样本保存于睿璟样本保存液中可于 -20±5℃ 条件下保存 24 个月，可反复冻融 3 次；样本保存于南京东大迪艾细胞保存液中可于 -20±5℃ 条件下保存 14 个月，可反复冻融 3 次；样本保存于复安样本保存液、安必平样本保存液、豪洛捷样本保存液和 BD 样本保存液中可于 -20±5℃ 条件下保存 15 个月，可反复冻融 3 次。

\*样本保存液：

厦门艾德生物医药科技股份有限公司，备案号：闽厦械备 20190183 号；

上海睿璟生物科技有限公司，备案号：沪闵械备 20220062 号；

南京东大迪艾基因技术有限公司，备案号：苏宁械备 20140025 号；

广州复安生物科技有限公司，备案号：粤穗械备 20170015 号；

杭州安必平医药科技有限公司，备案号：浙杭械备 20190015 号；

Hologic, Inc.，备案号：国械备 20140367；

碧迪公司 Becton, Dickinson and Company，备案号：国械备 20181285 号。

3) 样本投入量：DNA 投入量范围建议为 4ng~1000ng；RNA 投入量范围建议为 8ng~1200ng；cDNA 投入量范围建议为 1.6ng~600ng。

### 【检验方法】

#### 1 样本准备

### 1.1 样本预处理

1) 根据需要处理的样本量,取配套“核酸提取试剂(沪闵械备 20200098 号)”中的 Buffer RL 适量,加入 1M 的 DTT 溶液至终体积为 2% (如 350 $\mu$ L 的 Buffer RL 中需加入 7 $\mu$ L 的 1M DTT),新鲜配制成“含 DTT 的裂解液”。

2) 在含穿刺样本的样本保存液中加入等体积的 DPBS, 8000 rcf 离心 5min 后去上清,然后在每份样本中加入 350 $\mu$ L 的“含 DTT 的裂解液”和约 100 $\mu$ L 的玻璃珠(0.4~0.6mm 酸洗玻璃珠),吹散细胞沉淀,在振荡混匀仪上(3000 rcf)高速涡旋 15min。

### 1.2 核酸提取

按照“核酸提取试剂(沪闵械备 20200098 号)”说明书中“实验步骤”要求,进行 DNA 和 RNA 核酸的共提取。建议核酸提取步骤的洗脱体积为 30 $\mu$ L。

提取的 DNA 和 RNA 浓度若均 $\geq 1$ ng/ $\mu$ L,可立即进行下一步检测;如不及时进行检测,建议将提取的 DNA 和 RNA 核酸于-20 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C 条件下保存,可反复冻融 3 次,保存时间建议不超过 12 个月。

### 1.3 DNA 和 RNA 定量

使用 Qubit<sup>TM</sup> dsDNA HS Assay Kit,吸取 1 $\mu$ L 或 2 $\mu$ L 提取的 DNA 进行浓度测定。

使用 Qubit<sup>TM</sup> RNA HS Assay Kit,吸取 1 $\mu$ L 或 2 $\mu$ L 提取的 RNA 进行浓度测定。

根据核酸浓度测定结果,进行如下不同的处理(表 4)。

表4: 样本提取核酸 DNA 和 RNA 浓度结果及处理方式

| 情况描述 | DNA 浓度                      | RNA 浓度                      | 后续处理                                                                                                             |
|------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 情况 1 | $\geq 1$ ng/ $\mu$ L        | $\geq 1$ ng/ $\mu$ L        | 继续后续检测                                                                                                           |
| 情况 2 | $\geq 1$ ng/ $\mu$ L        | $< 1$ ng/ $\mu$ L 或 too low | 按下述步骤 1)~6) 重新进行 RNA 定量:<br>如定量结果为 $\geq 1$ ng/ $\mu$ L,则继续后续检测;<br>如定量结果为 $< 1$ ng/ $\mu$ L 或 too low,建议重新采集样本。 |
| 情况 3 | $< 1$ ng/ $\mu$ L 或 too low | 不限                          | 建议重新采集样本                                                                                                         |

1) 将 Component D (RNA HS Standard #2) 用无核酸酶水稀释为 5 ng/ $\mu$ L (原浓度为 10 ng/ $\mu$ L) 标记为“S2 标准品”,根据样本个数配制 N+2 个,共 2 $\times$  (N+2)  $\mu$ L,混匀备用;

2) 按照 199 $\mu$ L Component B (RNA HS Buffer) +1 $\mu$ L Component A (RNA HS Reagent) 的比例配制 N+4 个“工作液”,混匀避光备用;

3) 标准液的配制：先取 2 个 Qubit 定量管，标记为 S1 和 S2，“S1”中加入 180 $\mu$ L “工作液”、10 $\mu$ L 无核酸酶水和 10 $\mu$ L 的 Component C (RNA HS Standard #1)；“S2”中加入 180 $\mu$ L “工作液”、10 $\mu$ L 无核酸酶水和 10 $\mu$ L 的 Component D (RNA HS Standard #2)。此时每管液体体积为 200 $\mu$ L，混匀、离心后避光孵育 2 min。

4) 样本液的配制：取 N+1 个 Qubit 定量管，逐一标记，依次加入 180 $\mu$ L “工作液”、2  $\mu$ L 稀释好的“S2 标准品”、16 $\mu$ L 无核酸酶水和 2 $\mu$ L 待测样本；最后一个定量管标记为“S 空白”，加入 180 $\mu$ L “工作液”、2  $\mu$ L 稀释好的“S2 标准品”、18 $\mu$ L 无核酸酶水。此时每管液体体积为 200 $\mu$ L，混匀、离心后避光孵育 2 min。

5) 打开 Qubit 荧光仪，选择“RNA”，放入“S1”读取数值，再放入“S2”读取数值，选择读取体积为 2 $\mu$ L；然后依次放入已完成孵育的 N+1 个定量管，读取数值；

6) RNA 浓度的计算：每个样本读取数值减去“S 空白”读取数值即为每个样本的浓度。

## 2 RNA 逆转录反应

1) RNA 变性：取 RNA 阴性对照、RNA 阳性对照及样本 RNA 各 8 $\mu$ L，在 PCR 扩增仪上运行：65 $^{\circ}$ C，5 min；反应结束后迅速置于冰上骤冷，并在冰上静置 2 min。

2) 去除基因组 DNA：上一步变性的样本中分别加入 2 $\mu$ L 的 DNA 消化液，涡旋混匀，短暂离心后置于 PCR 扩增仪上运行：42 $^{\circ}$ C，2 min。

3) 第一链 cDNA 合成：在上述每个反应管中加入 10 $\mu$ L “逆转录反应混合液（表 5）”；

表5：逆转录反应混合液的配制

| 试剂名称    | 体积 (1 $\times$ ) |
|---------|------------------|
| 逆转录反应液  | 5 $\mu$ L        |
| 逆转录引物   | 1 $\mu$ L        |
| 逆转录酶反应液 | 3 $\mu$ L        |
| 无核酸酶水   | 1 $\mu$ L        |

|    |            |
|----|------------|
| 合计 | 10 $\mu$ L |
|----|------------|

4) 混匀, 短暂离心, 放置于 PCR 扩增仪上运行逆转录反应程序 (表 6)。

表6：逆转录反应程序

| 温度  | 时间    | 循环数 |
|-----|-------|-----|
| 25℃ | 5min  | 1   |
| 42℃ | 45min | 1   |
| 85℃ | 5s    | 1   |
| 4℃  | Hold  | 1   |

5) 反应结束后, 逆转录产物“第一链 cDNA”如不及时检测, 建议在-20 $\pm$ 5℃条件下保存, 保存时间不超过 1 个月, 可反复冻融 2 次。

### 3 文库构建

#### 3.1 扩增目标片段

1) 取 DNA 阴性对照、DNA 阳性对照及样本 DNA、上述“第一链 cDNA”、无核酸酶水以及表 7 中试剂盒组分, 置于冰盒上, 混匀离心后按照表 7 进行扩增目标片段的反应体系配制:

表7：扩增目标片段反应液的配制

| 试剂名称            | DNA 扩增反应体系  | cDNA 扩增反应体系 |
|-----------------|-------------|-------------|
| DNA 扩增引物        | 4.5 $\mu$ L | /           |
| RNA 扩增引物        | /           | 4.5 $\mu$ L |
| 扩增反应液           | 5.5 $\mu$ L | 5.5 $\mu$ L |
| 样本 DNA/第一链 cDNA | 4 $\mu$ L   | 4 $\mu$ L   |
| 无核酸酶水           | 6 $\mu$ L   | 6 $\mu$ L   |
| 合计              | 20 $\mu$ L  | 20 $\mu$ L  |

2) 混匀、短暂离心后运行表 8 的 PCR 扩增反应程序:

表8：扩增目标片段的反应程序

| 温度  | 时间   | 循环数 |
|-----|------|-----|
| 99℃ | 2min | 1   |
| 99℃ | 15s  | 22  |
| 60℃ | 4min |     |

| 温度  | 时间    | 循环数 |
|-----|-------|-----|
| 72℃ | 10min | 1   |
| 4℃  | Hold  | 1   |

3) 反应结束后，取出 PCR 产物，短暂离心，立即进行下一步操作。

### 3.2 扩增目标产物纯化

1) 取出试剂盒一中的磁珠，平衡至室温，充分混匀后取 16 $\mu$ L 加入上述 PCR 产物中，混匀，室温孵育 5min；

2) 取出新的相同数量的 PCR 管，每管加入 10 $\mu$ L 磁珠备用；

3) 上述步骤 1) 孵育完成后的样本短暂离心，放置磁力架上孵育 2min，待溶液澄清后，将上清转移至上述步骤 2) 已加入 10  $\mu$ L 磁珠的 PCR 管中，混匀，室温孵育 5min；

4) 短暂离心，放置磁力架上孵育 2min，待溶液澄清后，弃上清；

5) 加入 150 $\mu$ L 新鲜配制的 80%乙醇，在磁力架上来回移动 5 次，30s 后，弃上清；重复此步骤 1 次；

6) PCR 管置于磁力架上室温开盖 1~3min 至残留乙醇完全挥发（干燥至磁珠暗沉不反光即可）；

7) 加入 12.5 $\mu$ L 已平衡至室温的无核酸酶水，涡旋混匀，短暂离心，即为纯化好的 PCR 产物。

### 3.3 文库制备

1) 注意事项：

a.)使用不同编号的标签接头进行样本 DNA 及 RNA (cDNA) 的文库制备。

b.)同 1 批样本上机测序时，需使用不同编号的标签接头。

2) 取出表 9 中试剂组分置于冰盒上，混匀离心后按照表 9 分别在每个样本中加入扩增反应液及对应的标签接头：

表9：文库制备反应液的配制

| 试剂名称  | 1 个反应       |
|-------|-------------|
| 扩增反应液 | 5.5 $\mu$ L |
| 标签接头  | 2 $\mu$ L   |

| 试剂名称           | 1 个反应        |
|----------------|--------------|
| 上一步含有磁珠 PCR 产物 | 12.5 $\mu$ L |
| 合计             | 20 $\mu$ L   |

3) 混匀，短暂离心后运行表 10 的 PCR 反应程序进行文库制备：

表10：文库制备的反应程序

| 温度  | 时间   | 循环数 |
|-----|------|-----|
| 95℃ | 3min | 1   |
| 98℃ | 20s  | 10  |
| 60℃ | 15s  |     |
| 72℃ | 30s  |     |
| 72℃ | 5min | 1   |
| 4℃  | Hold | 1   |

4) 反应结束后，取出文库产物，短暂离心，立即进行下一步操作。

### 3.4 文库产物纯化

- 1) 取 20  $\mu$ L 已平衡至室温的磁珠加入上述文库产物中，混匀，室温孵育 5min；
- 2) 短暂离心，放置磁力架上孵育 2min，待溶液澄清后，弃上清；
- 3) 加入 150  $\mu$ L 新鲜配制的 80%乙醇，在磁力架上来回移动 5 次，30s 后，弃上清；重复此步骤 1 次；
- 4) PCR 反应管留于磁力架上，室温开盖 1~3min 至残留乙醇完全挥发（干燥至磁珠暗沉不反光即可）；
- 5) 加入 15  $\mu$ L 已平衡至室温的 TE 缓冲液，涡旋混匀，短暂离心，室温孵育 5min；
- 6) 将 PCR 反应管置于磁力架上 2 min，直至溶液澄清，吸取上清至 PCR 管中，即为纯化好的文库。
- 7) 若不立即进行下一步实验，建议文库于  $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$  条件下保存，保存时间不超过 15 个月，可反复冻融 3 次。

### 3.5 文库质控

- 1) 文库质控要求：

文库浓度：使用 Qubit™ dsDNA HS Assay Kits 对上述纯化好的文库进行浓度测定，要求文库浓度  $\geq 5\text{ng}/\mu\text{L}$ 。

2) 文库浓度须符合要求，否则认为建库失败，需要重新进行“文库构建”或“样本核酸提取”；如文库浓度再次不通过，则终止检测。

#### 4 文库环化、测序

##### 4.1 文库环化

1) 按照表 11 要求对文库进行等量混合，混合的文库按照配套的“环化反应通用试剂盒（沪闵械备 20210081 号）”说明书要求进行文库环化。

2) 环化产物使用 Qubit™ ssDNA Assay Kit 进行浓度测定，然后根据下列公式换算成

$$\text{“C (fmol}/\mu\text{L)}\text{”} : \text{C (fmol}/\mu\text{L)} = \frac{3030 \times \text{环化产物浓度 (ng}/\mu\text{L)}}{230}$$

表11：文库混样环化表

| 文库个数                      | 环化反应个数 | 环化总投入量/反应     |
|---------------------------|--------|---------------|
| $\leq 40$                 | 1      | 304ng (2pmol) |
| $40 < \text{文库数} \leq 80$ | 2      | 304ng (2pmol) |

3) 注意事项：

环化总投入量为 304 ng (2 pmol)：若环化文库为 40 个，每个文库投入量为 7.6 ng，若样本数少于 40 个，则根据文库数量等量混合。

##### 4.2 上机测序

推荐使用武汉华大智造科技有限公司生产的“测序反应通用试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）”（鄂汉械备 20190039 号）于相应基因测序仪（MGISEQ-200/2000）上进行测序反应；或使用苏州吉因加生物医学工程有限公司生产的“测序反应通用试剂盒（测序法）”（苏苏械备 20190424 号）于基因测序仪（Gene<sup>+</sup>Seq-2000）上进行测序反应。

每个 DNA 测序文库的最低数据量不低于 70M；每个 RNA 测序文库的最低数据量不低于 50M。

##### 4.3 MGISEQ-200 平台

#### 4.3.1 DNB 制备

1) 主要注意事项:

a.)根据文库数计算投入量时, 每个文库等量投入。

b.)ssDNA 的浓度为 C (fmol/μL), 每个 DNB 制备体系所需的文库投入量为:

$$\text{ssDNA 文库量} (\mu\text{L}) = \frac{60 \text{ fmol}}{C (\text{fmol}/\mu\text{L})}$$

2) 取出 TE 缓冲液、DNB 制备缓冲液、DNB 聚合酶混合液 I 置于冰盒上, 待融化后用漩涡振荡器震荡混匀 5 s 后, 短暂离心置于冰盒上备用。

3) 取出 1 个 0.2mL 的 PCR 管, 根据上述测得的 ssDNA 文库的浓度及文库 fmol 量, 计算每个 DNB 制备体系所需投入的 ssDNA 文库体积 (表 12)。

表12：DNB 制备表

| 文库个数      | 环化反应个数 | ssDNA 总投入量 |
|-----------|--------|------------|
| ≤40       | 1      | 60 fmol    |
| 40<文库数≤80 | 2      | 60 fmol    |

4) 每个 DNB 制备体系加入计算所需的 ssDNA 文库量, 再用 TE 缓冲液补足至 20μL, 同时再加入 20μL 的 DNB 制备缓冲液, 涡旋混匀, 短暂离心。

5) 取出单标签平衡文库, 置于冰盒上, 短暂离心后取 3μL 置于 1 个新的 0.2mLPCR 管中, 再加入 17μL 的 TE 缓冲液和 20μL 的 DNB 制备缓冲液, 涡旋混匀, 短暂离心。

6) 将上述第 4) 步和第 5) 步的 PCR 管置于 PCR 仪上运行以下程序 (表 13) :

表13：引物结合反应程序

| 温度  | 时间   | 循环数 |
|-----|------|-----|
| 95℃ | 1min | 1   |
| 65℃ | 1min | 1   |
| 40℃ | 1min | 1   |
| 4℃  | Hold | 1   |

7) 反应结束后, 短暂离心, 在冰盒上加入 40 $\mu$ L 的 DNB 聚合酶混合液 I 和 4 $\mu$ L 的 DNB 聚合酶 II, 涡旋混匀, 短暂离心后即刻置于 PCR 仪中开始反应 (表 14) :

表14: DNB 制备反应程序

| 温度  | 时间        | 循环数 |
|-----|-----------|-----|
| 30℃ | 25min     | 1   |
| 4℃  | Hold      | 1   |
| 备注  | 热盖设置为 35℃ |     |

因 PCR 仪降温时间比较长, 建议 PCR 热盖温度降为 35℃后, 暂停程序, 加入试剂后再启动反应程序。另 DNB 聚合酶混合液 II (LC) 使用前从冷冻冰箱中取出, 不要用手长时间触碰管壁。

8) 当温度达到 4℃后立即取出 PCR 管 (切勿离心), 置于冰盒上, 即刻加入 20 $\mu$ L 的 DNB 终止缓冲液, 用移液器和阔口吸头缓慢地吹打混匀 5~8 次, 切勿震荡及剧烈吹打, 置于 2~8℃条件下保存备用。

9) DNB 浓度测定: 取 2 $\mu$ L 上一步产物, 用 Qubit™ ssDNA Assay Kit 和 Qubit 荧光仪进行浓度测定。

10) 以 DNB 浓度 $\geq 8$  ng/ $\mu$ L 为合格标准, 对浓度低于 8ng/ $\mu$ L 的需按照 “4.3.1. 步骤” 重新制备 DNB; 对浓度高于 40ng/ $\mu$ L 的 DNB 建议用 DNB 加载缓冲液 I 稀释到 20ng/ $\mu$ L 左右。

11) DNB 应保存于 2~8℃条件下, 保存时间不超过 48h。

#### 4.3.2 DNB 加载的准备

注意: 若样本较少可根据样本数调整上机数据量, 建议平衡文库数据量不低于总数据量的 60%, 适用于所有机型芯片。

1) 根据定量结果, 待测样本数据量占总数据量的 40%, 计算待测样本和平衡文库的 DNB 投入量, 待测样本 DNB 和平衡文库 DNB 的加样体积总和为 100 $\mu$ L 。

2) 根据计算体积用阔口吸头吸取待测样本 DNB 和平衡文库 DNB 至 1 个新的 0.5 mL 冻存管中, 再加入 50 $\mu$ L 的 DNB 加载缓冲液 I、50 $\mu$ L 的 DNB 加载缓冲液

II、1μL 的 DNB 聚合酶混合液 II（LC），用阔口吸头温和混匀 5~8 次（切勿离心、震荡或剧烈吹打）。混匀后立即使用。

### 4.3.3 准备测序试剂及上机

严格按照“测序反应通用试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）”试剂盒说明书进行测序试剂准备及上机。

## 4.4 MGISEQ-2000 平台

### 4.4.1 DNB 制备

1) 主要注意事项：

a.)根据文库数计算投入量时，每个文库等量投入。

b.)ssDNA 的浓度为 C (fmol/μL)，每个 DNB 制备体系所需的文库投入量为：

$$\text{ssDNA 文库量 (}\mu\text{L)} = \frac{60 \text{ fmol}}{C \text{ (fmol/}\mu\text{L)}}$$

2) 取出 TE 缓冲液、DNB 制备缓冲液、DNB 聚合酶混合液 I 置于冰盒上，待融化后用漩涡振荡器震荡混匀 5 s 后，短暂离心置于冰盒上备用。

3) 取出 1 个 0.2mL 的 PCR 管，根据上述测得的 ssDNA 文库的浓度及文库 fmol 量，计算每个 DNB 制备体系所需投入的 ssDNA 文库体积（表 15）。

表15：DNB 制备表

| 文库个数      | 环化反应个数 | ssDNA 总投入量 |
|-----------|--------|------------|
| ≤40       | 1      | 60 fmol    |
| 40<文库数≤80 | 2      | 60 fmol    |

4) 每个 DNB 制备体系加入计算所需的 ssDNA 文库量，再用 TE 缓冲液补足至 20μL，同时再加入 20μL 的 DNB 制备缓冲液，涡旋混匀，短暂离心。

5) 取出单标签平衡文库，置于冰盒上，短暂离心后取 3μL 置于 1 个新的 0.2mLPCR 管中，再加入 17μL 的 TE 缓冲液和 20μL 的 DNB 制备缓冲液，涡旋混匀，短暂离心。

6) 将上述第 4) 步和第 5) 步的 PCR 管置于 PCR 仪上运行以下程序（表 16）。

表16：引物结合反应程序

| 温度  | 时间   | 循环数 |
|-----|------|-----|
| 95℃ | 1min | 1   |
| 65℃ | 1min | 1   |
| 40℃ | 1min | 1   |
| 4℃  | Hold | 1   |

7) 反应结束后，短暂离心，在冰盒上加入 40 $\mu$ L 的 DNB 聚合酶混合液 I 和 4 $\mu$ L 的 DNB 聚合酶混合液 II (LC)，涡旋混匀，短暂离心后即刻置于 PCR 仪中开始反应（表 17）：

表17：DNB 制备反应程序

| 温度  | 时间        | 循环数 |
|-----|-----------|-----|
| 30℃ | 25min     | 1   |
| 4℃  | Hold      | 1   |
| 备注  | 热盖设置为 35℃ |     |

8) 因 PCR 仪降温时间比较长，建议 PCR 热盖温度降为 35℃后，暂停程序，加入试剂后再启动反应程序。另 DNB 聚合酶混合液 II (LC) 使用前从冷冻冰箱中取出，不要用手长时间触碰管壁。

9) 当温度达到 4℃后立即取出 PCR 管（切勿离心），置于冰盒上，即刻加入 20 $\mu$ L 的 DNB 终止缓冲液，用移液器和阔口吸头缓慢地吹打混匀 5~8 次，切勿震荡及剧烈吹打，置于 2~8℃条件下保存备用。

10) DNB 浓度测定：取 2 $\mu$ L 上一步产物，用 Qubit™ ssDNA Assay Kit 和 Qubit 荧光仪进行浓度测定。

11) 以 DNB 浓度 $\geq$ 8 ng/ $\mu$ L 为合格标准，对浓度低于 8ng/ $\mu$ L 的需按照“4.4.1. 步骤”重新制备 DNB；对浓度高于 40ng/ $\mu$ L 的 DNB 建议用 DNB 加载缓冲液 I 稀释到 20ng/ $\mu$ L 左右。

12) DNB 应保存于 2~8℃条件下，保存时间不超过 48h。

#### 4.4.2 DNB 加载的准备

**注意：**若样本较少可根据样本数调整上机数据量，建议平衡文库数据量不低于总数据量的 60%，适用于所有机型芯片。

#### 4.4.2.1 不同的 lane 上机相同的文库

1) 根据定量结果，待测样本数据量占总数据量的 40%，计算待测样本和平衡文库的 DNB 投入量。若使用 FCS 芯片，加样体积总和为 100 $\mu$ L；若使用 FCL 芯片，加样体积总和为 200  $\mu$ L。

2) 根据计算体积用阔口吸头吸取待测样本 DNB 和平衡文库 DNB 至一个新的 0.5 mL 冻存管中，再根据芯片大小加入不同体积的 DNB 加载缓冲液 II 和 DNB 聚合酶混合液 II (LC)，见表 18，用阔口吸头温和混匀 5~8 次（切勿离心、震荡或剧烈吹打）。混匀后立即使用。

表18：DNB 加载体系 1

| 组分                 | FCL 加入量     | FCS 加入量     |
|--------------------|-------------|-------------|
| DNB 加载缓冲液 II       | 64 $\mu$ L  | 32 $\mu$ L  |
| DNB 聚合酶混合液 II (LC) | 2 $\mu$ L   | 1 $\mu$ L   |
| DNB                | 200 $\mu$ L | 100 $\mu$ L |
| 总体积                | 266 $\mu$ L | 133 $\mu$ L |

#### 4.4.2.2 不同的 lane 上机不同的文库

提示：1、详细 DNB 加载操作请参考 MGIDL-200H 便携式加样器快速操作指南，加载前需按照该说明书进行清洁操作。

2、选择 MGIDL-200H 便携式加样器加载 DNB，测序开始位置请选择 **Post Loading**。

1) 根据定量结果，待测样本数据量占总数据量的 40%，计算待测样本和平衡文库的 DNB 投入量，每条 lane 的 DNB 加样体积为 25 $\mu$ L。

2) 根据计算体积用阔口吸头吸取待测样本 DNB 和平衡文库 DNB 至 1 个新的 0.5 mL 冻存管中，再根据芯片大小加入不同体积的 DNB 加载缓冲液 II 和 DNB 聚合酶混合液 II (LC)，见表 19，用阔口吸头温和混匀 5~8 次（切勿离心、震荡或剧烈吹打）。混匀后立即使用。

表19：DNB 加载体系 2

| 组分           | FCL 加入量   | FCS 加入量   |
|--------------|-----------|-----------|
| DNB 加载缓冲液 II | 8 $\mu$ L | 8 $\mu$ L |

|                    |         |         |
|--------------------|---------|---------|
| DNB 聚合酶混合液 II (LC) | 0.25μL  | 0.25μL  |
| DNB                | 25μL    | 25μL    |
| 总体积                | 33.25μL | 33.25μL |

3) 将载片放置在加样器中，用移液器吸取 30μL 混匀后的 DNB 加载体系，将阔口吸头插入流路入口中，按下移液器上的吸头脱卸按钮，样本自动流入载片中；加载完成后，逆时针旋转拔出吸头。加样器正面（此面可见芯片序列号）向上，室温水平放置 30min 后，立即转移到测序仪上使用。

#### 4.4.3 准备测序试剂及上机

严格按照“测序反应通用试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）”试剂盒说明书进行测序试剂准备及上机。

#### 4.5 Gene+Seq-2000 平台

##### 4.5.1 DNB 制备

1) 主要注意事项：

a.)根据文库数计算投入量时，每个文库等量投入。

b.)ssDNA 的浓度为 C (fmol/μL)，每个 DNB 制备体系所需的文库投入量为：

$$\text{ssDNA 文库量 (}\mu\text{L)} = \frac{60 \text{ fmol}}{C \text{ (fmol/}\mu\text{L)}}$$

2) 取出 TE 缓冲液、DNB 制备缓冲液、DNB 聚合酶 I 置于冰盒上，待融化后用漩涡振荡器震荡混匀 5 s 后，短暂离心置于冰盒上备用。

3) 取出 1 个 0.2mL 的 PCR 管，根据上述测得的 ssDNA 文库的浓度及文库 fmol 量，计算每个 DNB 制备体系所需投入的 ssDNA 文库体积（表 20）。

表20：DNB 制备表

| 文库个数      | 环化反应个数 | ssDNA 总投入量 |
|-----------|--------|------------|
| ≤40       | 1      | 60 fmol    |
| 40<文库数≤80 | 2      | 60 fmol    |

4) 每个 DNB 制备体系加入计算所需的 ssDNA 文库量，再用 TE 缓冲液补足至 20μL，同时再加入 20μL 的 DNB 制备缓冲液，涡旋混匀，短暂离心。

5) 取出单标签平衡文库，置于冰盒上，短暂离心后取 3 $\mu$ L 置于 1 个新的 0.2mL PCR 管中，再加入 17 $\mu$ L 的 TE 缓冲液和 20 $\mu$ L 的 DNB 制备缓冲液，涡旋混匀，短暂离心。

6) 将上述第 4) 步和第 5) 步的 PCR 管置于 PCR 仪上运行以下程序（表 21）：

表21：引物结合反应程序

| 温度  | 时间   | 循环数 |
|-----|------|-----|
| 95℃ | 1min | 1   |
| 65℃ | 1min | 1   |
| 40℃ | 1min | 1   |
| 4℃  | Hold | 1   |

7) 反应结束后，短暂离心，在冰盒上加入 40 $\mu$ L 的 DNB 聚合酶混合液 I 和 4 $\mu$ L 的 DNB 聚合酶 II，涡旋混匀，短暂离心后即刻置于 PCR 仪中开始反应（表 22）：

表22：DNB 制备反应程序

| 温度  | 时间        | 循环数 |
|-----|-----------|-----|
| 30℃ | 25min     | 1   |
| 4℃  | Hold      | 1   |
| 备注  | 热盖设置为 35℃ |     |

8) 因 PCR 仪降温时间比较长，建议 PCR 热盖温度降为 35℃后，暂停程序，加入试剂后再启动反应程序。另 DNB 聚合酶 II 使用前从冷冻冰箱中取出，不要用手长时间触碰管壁。

9) 当温度达到 4℃后立即取出 PCR 管（切勿离心），置于冰盒上，即刻加入 20 $\mu$ L 的 DNB 终止缓冲液，用移液器和润口吸头缓慢地吹打混匀，切勿震荡及剧烈吹打，置于 2~8℃条件下保存备用。

10) DNB 浓度测定：取 2 $\mu$ L 上一步产物，用 Qubit<sup>TM</sup> ssDNA Assay Kit 和 Qubit 荧光仪进行浓度测定。

11) 以 DNB 浓度 $\geq 8 \text{ ng}/\mu\text{L}$  为合格标准, 对浓度低于  $8 \text{ ng}/\mu\text{L}$  的需按照“4.5.1. 步骤”重新制备 DNB; 对浓度高于  $40 \text{ ng}/\mu\text{L}$  的 DNB 建议用 DNB 加载缓冲液 I 稀释到  $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$  左右。

12) DNB 应保存于  $2\sim 8^{\circ}\text{C}$  条件下, 保存时间不超过 48h。

#### 4.5.2 DNB 加载的准备

**注意:** 若样本较少可根据样本数调整上机数据量, 建议平衡文库数据量不低于总数据量的 60%, 适用于所有机型芯片。

##### 4.5.2.1 不同的 lane 上机相同的文库

1) 根据定量结果, 待测样本数据量占总数据量的 40%, 计算待测样本和平衡文库的 DNB 投入量, FCS 加样体积总和为  $100 \mu\text{L}$ , FCL 加样体积总和为  $200 \mu\text{L}$ 。

2) 根据计算体积用阔口吸头吸取待测样本 DNB 和平衡文库 DNB 至一个新的  $0.5 \text{ mL}$  冻存管中, 再根据芯片大小加入不同体积的 DNB 加载缓冲液 II 和 DNB 聚合酶 II (LC), 见表 23, 用阔口吸头温和混匀 5~8 次 (切勿离心、震荡或剧烈吹打)。混匀后立即使用。

表23: DNB 加载体系 1

| 组分           | FCL 加入量           | FCS 加入量           |
|--------------|-------------------|-------------------|
| DNB 加载缓冲液 II | $64 \mu\text{L}$  | $32 \mu\text{L}$  |
| DNB 聚合酶 II   | $2 \mu\text{L}$   | $1 \mu\text{L}$   |
| DNB          | $200 \mu\text{L}$ | $100 \mu\text{L}$ |
| 总体积          | $266 \mu\text{L}$ | $133 \mu\text{L}$ |

##### 4.5.2.2 不同的 lane 上机不同的文库

1) 根据定量结果, 待测样本数据量占总数据量的 40%, 计算待测样本和平衡文库的 DNB 投入量, 每条 lane 的 DNB 加样体积为  $25 \mu\text{L}$ 。

2) 根据计算体积用阔口吸头吸取待测样本 DNB 和平衡文库 DNB 至 1 个新的  $0.5 \text{ mL}$  冻存管中, 再根据芯片大小加入不同体积的 DNB 加载缓冲液 II 和 DNB 聚合酶 II, 见表 24, 用阔口吸头温和混匀 5~8 次 (切勿离心、震荡或剧烈吹打)。混匀后立即使用。

表24: DNB 加载体系 2

| 组分           | FCL 加入量            | FCS 加入量            |
|--------------|--------------------|--------------------|
| DNB 加载缓冲液 II | $8 \mu\text{L}$    | $8 \mu\text{L}$    |
| DNB 聚合酶 II   | $0.25 \mu\text{L}$ | $0.25 \mu\text{L}$ |

|     |               |               |
|-----|---------------|---------------|
| DNB | 25 $\mu$ L    | 25 $\mu$ L    |
| 总体积 | 33.25 $\mu$ L | 33.25 $\mu$ L |

3) 将载片放置在加样器中，用移液器吸取 30 $\mu$ L 混匀后的 DNB 加载体系，将阔口吸头插入流路入口中，按下移液器上的吸头脱卸按钮，样本自动流入载片中，加载完成后，逆时针旋转拔出吸头。加样器正面（此面可见芯片序列号）向上，室温水平放置 30min 后，立即转移到测序仪上使用。

#### 4.5.3 准备试剂槽及测序

严格按照“测序反应通用试剂盒（测序法）”试剂盒说明书进行测序试剂槽准备及上机。

### 5 生物信息分析

本产品结果分析采用配套的“人类 4 基因突变分析软件”（以下简称分析系统，生产商：上海睿璟生物科技有限公司；注册证号：；发布版本号：V1），可以实现从下机原始数据到报告的数据分析。

测序结束后，在分析系统上传样本信息，选择需要分析样本的批次号及相应的测序仪序列号，样本选择完成后，进入“待分析页面”点击“开始分析”按钮即启动自动化分析流程。分析流程开始后，分析系统通过以下步骤完成数据分析过程：

#### 5.1 数据预处理

使用 Trimmomatic (v0.36) 软件去除建库过程中引入的接头序列以及低质量碱基片段，切除 reads 5'端和 3'端碱基质量低于 15 的碱基。以 30 个碱基为窗口进行滑动，切除窗口内碱基平均质量小于 25 的碱基，然后过滤掉经过以上步骤处理后序列长度小于 50bp 的 reads。

#### 5.2 序列比对

使用序列比对软件 bwa (v0.7.17) 将 fastq 文件比对到相应的参考基因组（hg19 人类参考基因组和融合参考基因），生成 bam 文件。根据基因组坐标，对生成的 bam 文件进行排序。

#### 5.3 数据质控

计算每个样本的 Q30 碱基占比、序列比对至参考基因组比例、目标区域的平均测序深度、均一性等参数。

#### 5.4 突变分析

使用 VarScan (v2.3.9) 分析样本中的点突变, 通过比对融合参考基因序列分析样本中的重排 (融合)。

### 5.5 突变过滤

对突变分析得到的变异进行过滤, 结果保留 DNA 模块中频率不小于 0.01% 的点突变, RNA 模块则会展示不小于 0 条支持 read 数的融合变异。

### 5.6 突变注释

对鉴定出的突变位点进行 COSMIC 数据库 (v92)、dbSNP 数据库 (v154) 注释并按照人类基因组变异学会 (HGVS) 基因突变命名规则进行命名。

## 6 结果分析

### 6.1 数据质控要求

1) DNA 样本质控合格要求: Q30 碱基占比 (Raw\_Q30)  $\geq 80\%$ , 序列比对至参考基因组比例 (Mapped ratio)  $\geq 90\%$ , 平均测序深度 (Mean\_Depth)  $\geq 20000\times$ , 均一性 (Greater\_20Pct(%))  $\geq 70\%$ 。

2) RNA 样本质控合格要求: Q30 碱基占比 (Raw\_Q30)  $\geq 80\%$ , 序列比对至参考基因组比例 (Mapped ratio)  $\geq 90\%$ , 5 个内参基因 (Internal\_Control 1~Internal Control 5) 中至少有 2 个基因的比对序列 Reads 均  $\geq 500$ 。

3) 如数据质控不通过, 则认为实验失败, 需要重新上机测序, 或重新文库构建, 或重新样本核酸提取。

### 6.2 阴阳性对照

1) DNA 阴性对照的检测结果应为对应基因突变阴性; DNA 阳性对照的检测结果应为 BRAF V600E 和 TERT C228T 阳性。

2) RNA 阴性对照的检测结果应为对应基因突变阴性; RNA 阳性对照的检测结果应为 CCDC6-RET.C1:R12 阳性。

如阴阳性对照结果均符合要求, 则可进行样本的结果判读; 如阴阳性对照结果不符合要求, 则判定实验失败, 需要重新实验。

### 【阳性判断值】

试剂盒各检测靶标阳性判断值结果如下:

1) BRAF V600E: 突变丰度  $\geq 0.6\%$  时判断为阳性; 反之, 则判断为阴性。

2) TERT C228T: 突变丰度 $\geq 0.8\%$ 时判断为阳性; 反之, 则判断为阴性。

3) TERT C250T: 突变丰度 $\geq 0.7\%$ 时判断为阳性; 反之, 则判断为阴性。

4) CCDC6-RET: 标准化后支持融合变异的 reads 数 $\geq 200$  条时, 判断为阳性; 反之, 则判断为阴性。

5) NCOA4-RET: 标准化后支持融合变异的 reads 数 $\geq 200$  条时, 判断为阳性; 反之, 则判断为阴性。

6) ETV6-NTRK3: 标准化后支持融合变异的 reads 数 $\geq 200$  条时, 判断为阳性; 反之, 则判断为阴性。

上述任一检测靶标判为阳性时, 则判定该样本检测结果为阳性;

上述所有检测靶标均判为阴性时, 则判定该样本检测结果为阴性。

#### 【检验结果的解释】

阴性结果不能完全排除靶基因突变或融合的存在, 样本中目标片段过少、核酸过度降解、样本中存在过量干扰物质、基因变异低于试剂盒最低检测限等因素亦可造成阴性结果。

甲状腺结节组织可能存在较大异质性, 不同部位取样可能会得到不同的检测结果。

不规范的样本采集、保存、转运及处理, 以及不当的技术操作和实验环境均有可能导致假阴性或假阳性结果。

#### 【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考, 不能单独作为诊断或鉴别诊断的依据。为了达到诊断目的, 此检测结果应结合临床检测、病史和其他的检查结果综合考虑。

2. 本试剂盒仅对目标区域中人类 BRAF、TERT 基因位点突变和 RET、NTRK3 融合变异进行检测 (详见表 1), 若检测结果为阴性, 不排除检测者带有这些基因的其他变异类型。

3. 该检测仅限于规定的样本类型及检测系统, 且对于突变丰度或拷贝数低于检测限的样本, 可能无法检出, 存在漏检的可能。

#### 【产品性能指标】

### 1.阳性参考品符合率

对试剂盒范围内的国家阳性参考品 1 支进行检测, 每支参考品检测 1 次, 检测结果应为 BRAF V600E 变异阳性;

或对 10 支企业阳性参考品进行检测, 每支参考品检测 1 次, 检测结果应为对应基因变异阳性;

阳性符合率应为 100%。

### 2.阴性参考品符合率

对国家阴性参考品 5 支进行检测, 每支参考品检测 1 次, 检测结果应为对应基因变异阴性; 对试剂盒范围外的国家阳性参考品 20 支进行检测, 每支参考品检测 1 次, 检测结果均为 BRAF V600E 变异阴性;

或对 4 支企业阴性参考品进行检测, 检测结果应为对应基因变异阴性;

阴性符合率应为 100%。

### 3.精密度

对 6 支企业精密度参考品进行检测, 每支参考品检测 10 次, 检测结果应满足下列要求:

1) 阳性精密度参考品检测结果均为对应基因变异阳性。

2) 阴性精密度参考品检测结果均为对应基因变异阴性。

### 4.检测限

对试剂盒范围内的国家检测限参考品 2 支进行检测, 每支参考品检测 1 次, 检测结果应为 BRAF V600E 变异阳性。

或对 6 支企业检测限参考品进行检测, 每支参考品检测 1 次, 检测结果应为对应基因变异阳性。

本试剂盒检测限为: 1ng/μL DNA 中 BRAF V600E 2%、TERT C228T 2%、TERT C250T 2%、1ng/μL RNA 中 CCDC6-RET 100 拷贝/ng、NCOA4-RET 100 拷贝/ng 和 ETV6-NTRK3 100 拷贝/ng。

### 5.分析特异性

#### 5.1.交叉反应

试剂盒与核酸序列相近或具有一定同源性的其他常见突变/融合变异, 包括 15%突变丰度的 BRAF V600M、BRAF K601E、BRAF G469A、NRAS Q61R、HRAS Q61R、

KRAS Q61R、PIK3CA H1047L、PIK3CA H1047Y、PIK3CA E545K、PIK3CA E542K、RET M918T、TP53 R273H 常见突变序列；400 拷贝/ng 的 BTBD1-NTRK3.B4:N14、KIF5B-RET.K5-R12 融合变异序列；2256 拷贝/ng 的 CCDC6-RET.C8:R12 融合变异序列、2278 拷贝/ng 的 ERC1-RET.E7:R12 融合变异序列、3030 拷贝/ng 的 NCOA4-RET.N7:R12 融合变异序列、1554 拷贝/ng 的 RASAL2 -RET.R17:R12 融合变异序列、4478 拷贝/ng 的 TRIM24-RET.T10:R12 融合变异序列、2290 拷贝/ng 的 EML4-NTRK3.E2:N14 融合变异序列、2128 拷贝/ng 的 ETV6-NTRK3.E5:N13 融合变异序列、2542 拷贝/ng 的 RBPMS-NTRK3.R5:N14 融合变异序列、2362 拷贝/ng 的 SQSTM1-NTRK3.S4:N14 融合变异序列和 1657 拷贝/ng 的 SQSTM-NTRK3.S5:N14 融合变异序列均无交叉反应。

## 5.2. 抗干扰性

当样本中血红蛋白 $\leq 2\text{g/L}$ 时，试剂盒检测性能不受影响。

在样本反应体系中，加入浓度 $\leq 2\%$ 的乙醇或 $\leq 2\%$ 的样本保存液时，检测体系不受影响。

## 6. 临床试验结果

临床试验在 8 家临床试验机构共同开展，入组病例为细胞学分类 Bethesda III 和 V 类的甲状腺癌疑似患者。以临床参考标准作为对比方法，试验结果显示：本产品的临床灵敏度为 85.64%，特异度为 99.41%。

### 【注意事项】

1. 本产品仅用于体外诊断，实验前请仔细阅读本说明书。
2. 本产品仅供专业人员在标准的实验室环境下做体外诊断使用，操作人员需经过专业培训。
3. 本试剂盒结果会受到样品来源、样品采集过程、样本质量、样本运输条件、样本预处理等因素影响，同时也受到 DNA/RNA 提取质量、高通量测序仪型号、操作环境以及当前分子生物学技术局限性等限制，可能导致假阳性或假阴性的检测结果。使用者须了解检测过程中可能存在的潜在错误、准确性的局限性。
4. 遵循实验室管理规范，以尽可能减少样本及试剂交叉污染；如有条件，应对配制 PCR 反应体系、样本处理、PCR 反应的区域或房间及后续的操作区域进行分区规划。

5. 注意防止外源核酸对试剂的污染，建议在操作 DNA 和 RNA 样本时，使用单独、专用的移液器及带滤芯吸头。

6. 所有化学试剂都存在潜在危险性，操作时需严格按照实验室管理要求，穿着合适的实验室工作服，佩戴一次性手套等防护措施。

7. 避免在不必要的情况下冻融试剂盒中的试剂，冻融次数不超过 5 次。

8. 同一批上机测序的样本文库之间的样本标签接头编号不能相同。

9. 本试剂盒所有试剂均经过特殊配制，随意替换其中任何试剂均可能影响使用效果，不同批号试剂盒成分不可相互混用。

10. 所有检测样本及试剂盒中的阳性对照应视为有感染性物质，样本操作和处理需符合相应法规要求，使用过的试剂盒为临床废弃物，应妥善处理。

11. 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。

#### 【参考文献】

[1]Santoro M, Moccia M, Federico G, et al.. RET Gene Fusions in Malignancies of the Thyroid and Other Tissues. Genes (Basel). 2020 Apr 15;11(4):424.

[2]Seethala RR, Chiosea SI, Liu CZ, et al.. Clinical and Morphologic Features of ETV6-NTRK3 Translocated Papillary Thyroid Carcinoma in an Adult Population Without Radiation Exposure. Am J Surg Pathol. 2017 Apr;41(4):446-457.

#### 【基本信息】

注册人/生产企业名称：上海睿璟生物科技有限公司

住所：上海市闵行区召楼路 3632 号 2 幢 5 层

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

生产地址：上海市闵行区召楼路 3632 号 2 幢 5 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】

【说明书批准日期/生效日期及修改日期】

附表 1：80 个不同的标签接头识别序列信息

| 标签接头编号 | 序列         | 标签接头编号 | 序列         | 标签接头编号 | 序列         | 标签接头编号 | 序列         |
|--------|------------|--------|------------|--------|------------|--------|------------|
| A1     | TAGGTCCGAT | C5     | AAGGATCATC | F1     | CCGATGTCGC | H5     | TGCACTGTAA |
| A2     | GGACGGAATC | C6     | TTAGATGCAT | F2     | ACTTAGAATG | H6     | GCCTAGGCAA |
| A3     | CTTACTGCCG | C7     | GTCCAGAGCT | F3     | TCCAAGCCTG | H7     | CCATCATAGC |
| A4     | ACCTAATTGA | C8     | CACGTGATAG | F4     | AGACGATGAT | H8     | CATGGTAATT |
| A5     | CGGCAATCCG | D1     | CCACTAGTCC | F5     | CTCACAAGAC | I1     | CACCATGTCT |
| A6     | ATCAGGATTC | D2     | TGGACTTGGC | F6     | CGTTCCTACT | I2     | ATATGTCTGG |
| A7     | TCATTCCAGA | D3     | AGTTGCCATA | F7     | GTGGTTGTGA | I3     | TTCACGTAAG |
| A8     | GATGCTGGAT | D4     | ATGTACGCAG | F8     | GAAGGCCTGC | I4     | GGTTCCACAC |
| B1     | TAGAGGACAA | D5     | TTAATGAGAT | G1     | TAGCTTGCCA | I5     | CCAGAGTCAG |
| B2     | CCTAGCGAAT | D6     | TGCGCCACTT | G2     | GACAATGCTC | I6     | AACAGGCAGT |
| B3     | GCTGAGCTGT | D7     | CATTAAGGCC | G3     | GCTAATCACA | I7     | GCTCCATGAC |
| B4     | AACCTAGATA | D8     | CCGCCTCAGA | G4     | AGTCCATAGG | I8     | ATGTCTATCC |
| B5     | TTGCCATCTC | E1     | GCCGGTTATC | G5     | CTATCGCCTA | J1     | CCTTGATCAA |
| B6     | CGCTATCGGC | E2     | GGAATATTGA | G6     | ATCGTGGTCT | J2     | GGAAGTGGCA |
| B7     | GCAACGATGG | E3     | AACGTGACTG | G7     | TGGCTAATAC | J3     | AACATTCTAC |
| B8     | TAATCGTTCA | E4     | GTACCTCAAT | G8     | CAGTGCAGAG | J4     | GACGCGAGTC |
| C1     | GTTCGCTCTA | E5     | GACTTCTAAT | H1     | TCAGGCTGGT | J5     | CTATAACACT |
| C2     | TCTCACACAT | E6     | TGAAGCGTTG | H2     | ATACTCACGC | J6     | AGTCTCGTGT |
| C3     | CTGTTAGGAT | E7     | CGTGCGATCC | H3     | ATGCTCCGCG | J7     | TCGGCCTATG |
| C4     | CGCAGACGCG | E8     | TCGGAAGGCA | H4     | TGTGAAGTTG | J8     | TTGCAGACGG |