

受理号：CSZ1900093

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：三类 6840

申请人名称：苏州贝康医疗器械有限公司

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.....	7
三、 风险分析及说明书提示	13
综合评价意见.....	17

基本信息

一、申请人名称

苏州贝康医疗器械有限公司

二、申请人住所

苏州工业园星湖街 218 号生物纳米园 A3 楼 101 单元

三、生产地址

申请人生产地址：苏州工业园星湖街 218 号生物纳米园
B3 楼 201 单元；A3 楼 101 单元

受托生产企业生产地址：广州高新技术产业开发区荔枝
山路 6 号，1 号楼 4 楼 401-408 室；2 号楼 1 楼、4 楼

产品审评摘要

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

表 1 试剂盒主要组成成分

编号	试剂名称	数量
1	细胞提取缓冲液	310 μ L $\times$ 1 管
2	细胞裂解缓冲液	310 μ L $\times$ 1 管
3	细胞裂解酶	20 μ L $\times$ 1 管
4	预扩增缓冲液	300 μ L $\times$ 1 管
5	预扩增酶	20 μ L $\times$ 1 管
6	扩增缓冲液	1.5mL $\times$ 1 管
7	扩增酶	60 μ L $\times$ 1 管
8	片段化缓冲液	120 μ L $\times$ 1 管
9	片段化酶	120 μ L $\times$ 1 管
10	终止反应缓冲液	300 μ L $\times$ 1 管
11	末端修复缓冲液	550 μ L $\times$ 1 管
12	末端修复酶	27 μ L $\times$ 1 管
13	DNA 连接酶	55 μ L $\times$ 1 管
14	连接缓冲液	275 μ L $\times$ 1 管
15	PCR 酶混合液	1.3mL $\times$ 2 管
16	PCR 引物混合液	137 μ L $\times$ 1 管
17	P1 接头	60 μ L $\times$ 1 管
18	特异性接头 1	8 μ L $\times$ 1 管
19	特异性接头 2	8 μ L $\times$ 1 管
20	特异性接头 3	8 μ L $\times$ 1 管
21	特异性接头 4	8 μ L $\times$ 1 管
22	特异性接头 5	8 μ L $\times$ 1 管
23	特异性接头 6	8 μ L $\times$ 1 管
24	特异性接头 7	8 μ L $\times$ 1 管
25	特异性接头 8	8 μ L $\times$ 1 管

编号	试剂名称	数量
26	特异性接头 9	8 μ L $\times$ 1 管
27	特异性接头 10	8 μ L $\times$ 1 管
28	特异性接头 11	8 μ L $\times$ 1 管
29	特异性接头 12	8 μ L $\times$ 1 管
30	特异性接头 13	8 μ L $\times$ 1 管
31	特异性接头 14	8 μ L $\times$ 1 管
32	特异性接头 15	8 μ L $\times$ 1 管
33	特异性接头 16	8 μ L $\times$ 1 管
34	特异性接头 17	8 μ L $\times$ 1 管
35	特异性接头 18	8 μ L $\times$ 1 管
36	特异性接头 19	8 μ L $\times$ 1 管
37	特异性接头 20	8 μ L $\times$ 1 管
38	特异性接头 21	8 μ L $\times$ 1 管
39	特异性接头 22	8 μ L $\times$ 1 管
40	特异性接头 23	8 μ L $\times$ 1 管
41	特异性接头 24	8 μ L $\times$ 1 管
42	特异性接头 25	8 μ L $\times$ 1 管
43	DNA 洗脱液	1.9mL $\times$ 4 管
44	无核酸酶水	1.9mL $\times$ 2 管
45	DNA 纯化磁珠	21mL $\times$ 1 瓶
46	PGS 阳性质控品 1	2 μ L $\times$ 1 管
47	PGS 阳性质控品 2	2 μ L $\times$ 1 管
48	PGS 阴性质控品	2 μ L $\times$ 1 管

试剂盒具体组成成分、配套试剂见说明书。

(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)，通过对胚胎部分细胞的 DNA 进行检测，分析胚胎染色体是否存在非整倍体数量异常，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。

本产品适用于女性年龄 35 岁及以上进行试管婴儿的患者；夫妻双方或一方存在染色体异常的患者；三次以上的试管婴儿植入失败者；三次以上自然流产患者；生育过染色体异常患儿的夫妇。

检测结果仅供参考，不单独作为确诊的依据，本产品不用于拷贝数变异的检测。

（三）产品包装规格

50 人份/盒

（四）产品检验原理

该试剂盒是利用单细胞全基因组扩增技术对从囊胚期胚胎获得的细胞进行扩增，利用半导体高通量测序技术对扩增产物进行全基因组测序，通过生物信息软件对测序结果进行分析，判断胚胎是否存在染色体非整倍体异常。

对囊胚期胚胎进行活检，采用优化的简并寡核苷酸引物 PCR 技术对活检细胞进行全基因组扩增，将扩增产物随机打断为 200bp 左右的 DNA 片段，在 DNA 片段两端加上测序接头，构建测序文库。通过基于半导体高通量测序技术的 DA8600 基因测序仪进行全基因组测序，利用生物信息学软件对测序结果进行分析，得到匹配到每条染色体上的有效序列数量，计算有效序列数量与参考数据库中相应染色体序列数量的比值，若该比值过高，则该染色体可判断为三体或重复；若

该比值过低，则该染色体可判断为单体或缺失，实现对染色体非整倍体异常的检测。

二、临床前研究摘要

（一）主要原材料

1. 主要原材料的选择

该试剂盒主要原材料包括：细胞裂解酶、预扩增酶、扩增酶、片段化酶、末端修复酶、DNA 连接酶、PCR 酶混合液、PCR 引物混合液、P1 接头及特异性接头 1-25 和质控品等，这些原材料均为外购方式获得，质控品由细胞系供应商提供，并由申请人分离细胞后制备获得。申请人对主要原材料进行了供应商选择，通过功能性试验，筛选出最佳的原材料供应商，制定了主要原材料质量要求并经检验合格。

2. 企业参考品和质控品设置情况

企业参考品包括阳性参考品、阴性参考品、嵌合体参考品、数据量控制参考品。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 5 份，是由染色体非整倍体阴性细胞样本组成；嵌合体参考品 6 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，由 YH 细胞样本组成。

质控品是由 2 份阳性质控品和 1 份阴性质控品组成，用于检测过程中试剂和仪器的质量控制。其中阳性质控品是由染色体非整倍体阳性细胞样本（21 三体和 X0）组成；阴性

质控品是由染色体非整倍体阴性细胞样本组成。

（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，对反应体系中细胞裂解酶、预扩增酶、扩增酶、片段化酶、末端修复酶、连接酶、PCR 酶等进行筛选和优化，通过功能性试验和生产工艺研究，确定了最佳的生产工艺和反应体系。

（三）分析性能评估

分析性能评估内容包括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、不同实验室间精密度、高通量测序配套试剂验证、分析特异性。

1. 染色体非整倍体阳性检测符合率：对连续三批生产的试剂盒采用 13 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%；使用国家参考品中的非整倍体阳性参考品检测，符合率 100%。

2. 微缺失微重复检测符合率：该产品对微缺失微重复的检出情况进行了分析性能评估；使用国家参考品中的微缺失微重复参考品检测，符合该指标。

3. 阴性检测符合率：对连续三批生产的试剂盒采用 10 份阴性样本进行检测，检测结果表明阴性符合率为 100%；使用国家参考品中的阴性参考品检测，符合率 100%。

4. 嵌合体检测符合率：对连续三批生产的试剂盒采用 6

份嵌合样本进行检测，检测结果表明对 30%嵌合的嵌合体样本符合率达到 30%以上；70%嵌合体符合率达到 60%以上；使用国家参考品中的嵌合体参考品检测，符合该指标。

5. 数据量控制检测：对连续三批生产的试剂盒采用 1 份企业数据量控制参考品进行检测，检测结果表明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%；使用国家参考品中的数据量控制参考品检测，符合该指标。

6. 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实验、微缺失微重复检测符合率实验、阴性检测符合率实验、嵌合体检测符合率实验、数据量控制检测实验，检测结果表明重复性均满足技术要求规定的性能指标。

7. 不同实验室间精密度：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检测均满足技术要求规定的性能指标。

8. 高通量测序配套试剂的验证：使用广州市达瑞生物科技股份有限公司的测序反应通用试剂盒（半导体法）（备案号粤穗械备 20160061），对企业参考品进行三次重复检测，检测结果表明该测序反应通用试剂盒可以作为该试剂盒的配套测序试剂。

9. 分析特异性：对连续三批生产的试剂盒采用 57 份染色体微缺失微重复样本进行检测，均未检测出非整倍体，检测结果表明分析特异性达到 100%。

（四）阳性判断值或参考区间研究

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，最终确定的染色体非整倍体阴性样本的参考区间为 $[-0.51, 0.37]$ ，染色体非整倍体阳性样本的参考区间大于 0.37、小于 -0.51。具体过程如下，通过 240 例染色体非整倍体阴性样本的检测结果构建参考数据库，使用该试剂盒对 234 例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检测，分析这些样本每条染色体上检测到的序列数目，并计算该序列数目与参考数据中对应染色体的序列数目的比值，即 CNV 值，通过对不同 CNV 值（拷贝数变异 Copy Number Variation, CNV）区间的划分，统计分析真阳性率、假阳性率、真阴性率以及假阴性率，从而最终确定该试剂盒的参考区间。

（五）稳定性研究

申请人对该试剂盒的加速稳定性、长期稳定性、冻融稳定性、开瓶稳定性、运输稳定性进行了研究，确定了在各种条件下该试剂盒的有效保存时间。另外对临床样本进行了稳定性、冻融次数研究，确定了临床样本的有效保存时间。

加速稳定性实验：取连续三批生产的试剂盒，将除片段化酶、末端修复酶、DNA 连接酶及质控品以外的试剂解冻后置于 37℃ 恒温培养箱中，分别存放 1 天、2 天、3 天、4 天后取出，对试剂盒的性能指标进行检测，确定该试剂盒在不超过 37℃ 条件下可稳定存放 3 天。

长期稳定性实验：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、2、4、6、8 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 6 个月。

冻融稳定性实验：取连续三批生产的试剂盒，将试剂盒由储存环境中取出，在室温条件下充分溶解后继续置于储存环境下。如此反复冻融 4、6、8、10、12、14 次，对试剂盒的性能指标进行检测，确定该试剂盒可以反复冻融 12 次。

开瓶稳定性实验：取连续三批生产的试剂盒，将试剂盒开瓶后置于储存环境中，于 2、4、5、6 个月对试剂盒的性能指标进行检测，确定该试剂盒开瓶后可以稳定存放 5 个月。

运输稳定性实验：取连续三批生产的试剂盒，将试剂盒按照储存温度要求采用冷链运输，运输时长为 5 天，分别于运输结束后及有效期末对试剂盒的性能指标进行检测，确定该试剂盒运输时限为 5 天。

样本稳定性的研究：申请人对胚胎细胞样本的稳定性、冻融次数进行了研究，确定样本的长期保存条件为 -80℃ 冰

箱，保存时间不超过 18 个月，冻融次数不超过 5 次。

（六）临床评价摘要

申请人在山东大学附属生殖医院、中信湘雅生殖与遗传专科医院、中国医科大学附属盛京医院、第四军医大学唐都医院、兰州大学第一医院、南京市妇幼保健院共六家临床试验机构开展了临床试验。临床试验采用考核试剂与金标准进行比较研究的试验方法，验证考核试剂的临床有效性。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、流产组织核型分析或新生儿脐带血核型分析。每例纳入统计的样本均采用考核试剂和金标准对比验证方法进行检测。

考核试剂临床试验共入组 1482 对符合适应症的受试者，检测 6282 例胚胎样本，检测出染色体非整倍体阳性胚胎样本 1672 例，染色体非整倍体阴性胚胎样本 4483 例。阳性样本进行了全部 23 对染色体非整倍体异常的 FISH 验证，共 381 例，FISH 验证结果与本试剂盒检测结果一致，其中，Chr13、Chr16、Chr18、Chr21 以及性染色体阳性验证例数为：Chr13 (35 例)、Chr16 (36 例)、Chr18 (26 例)、Chr21 (46 例)、性染色体 (29 例)；阴性胚胎样本有 1162 例进行了移植，750 例已经确定妊娠，获得 291 例核型分析检查结果（其中羊水穿刺核型分析 273 例，新生儿脐带血核型分析 14 例，流产

组织核型分析 4 例), 核型分析结果与待考评试剂盒检测结果一致。

通过对 381 例 FISH 验证确认的阳性样本以及 291 例核型分析验证确认的阴性样本统计分析, 待考评试剂盒的灵敏性为 100% (95%CI: 99.00%~100%), 特异性为 100% (95%CI: 98.70%~100%)。进行 Kappa 一致性检验, $Kappa=1$ ($P < 0.001$), 显示已检测样本中, 考核试剂与金标准对照方法具有良好的检测一致性。

利用基于二项分布的统计学算法对所有检测样本进行阳性预测值和阴性预测值统计分析, 本临床试验的阳性预测值为 100.00% (95%CI: 98.88%~100.00%), 阴性预测值为 100.00% (95%CI: 98.46%~100.00%)。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, 受试者基线和入组胚胎基线在已验证与未验证样本中均无具有临床意义的显著差异, 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。

临床可接受的准确性下限估计: 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%, 因此认为, 如本类产品准确性达到 98%, 则可以认为该产品达到了临床诊断的准确性要求。经计算, 在准确度下限设置为 98% 时, 仍允许阳性和阴性样本中出现验

证失败样本，但在已完成验证的样本中，未出现 1 例验证失败，即可以认为即使完成所有样本验证，本临床试验仍能满足准确性要求。

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金标准检测结果（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。

三、风险分析及说明书提示

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

（一）受益评估

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），通过对胚胎部分细胞的 DNA 进行检测，分析胚胎染色体是否存在非整倍体数量异常，辅助临床医生判断胚胎是否植入。本产品适用于女性年龄 35 岁及以上进行试管婴儿的患者；夫妻双方或一方存在染色体异常的患者；三次以上的试管婴儿植入失败者；三

次以上自然流产患者；生育过染色体异常患儿的夫妇。上述人群是胚胎染色体非整倍体高发人群，通过检测结果来辅助判断胚胎是否植入，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，减少患者生理、心理伤害及社会经济负担。

（二）风险评估

该试剂盒检测结果会受到样本来源、样本采集过程、样本运输条件等样本因素的影响，同时也受到实验操作、实验环境、试剂储存等试验因素的影响，可能导致数据质量降低或检测失败。使用者须了解检测过程中可能存在的潜在风险及检测的局限性，详见产品说明书中【检验方法的局限性】。

不符合该试剂盒说明书中【样本要求】的样本或不恰当的实验操作会导致数据质量降低或检测失败，请严格按照产品说明书中【样本要求】及【检验方法】的要求操作和进行实验过程质控。

该试剂盒在检测过程中涉及基因扩增，在非可控的实验室操作可能由于环境中气溶胶的存在导致结果不可靠，同时PCR 操作过程中气溶胶的泄露可能会导致设备甚至实验室的污染。因此，请在可控的实验室进行检测操作，操作人员必须进行专业培训，严格按照说明书操作。

在现有技术条件下，该产品检测结果仅辅助医生判断胚胎是否植入，胚胎植入后还将按照体外辅助生殖相关诊疗规

程对植入胚胎的情况进行产前检测和产前诊断等。

（三）受益-风险的确定

通过环境控制、生产监控、成品检验和增加说明书警示内容等防范措施，对该试剂盒的已知和可预见的安全风险进行控制和降低，剩余风险可以被控制在可接受范围内，同时没有带来新的危害与安全风险。在目前认知水平上，认为该试剂盒上市带来的受益大于风险。

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：该试剂盒适用于女性年龄 35 岁及以上进行试管婴儿的患者；夫妻双方或一方存在染色体异常的患者；三次以上的试管婴儿植入失败者；三次以上自然流产患者；生育过染色体异常患儿的夫妇。

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，属于创新审批项目（编号：2015168）。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》（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金标准检测结果（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。

2019 年 12 月 02 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】

50 人份/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），通过对胚胎部分细胞的 DNA 进行检测，分析胚胎染色体是否存在非整倍体数量异常，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。本产品适用于女性年龄 35 岁及以上进行试管婴儿的患者；夫妻双方或一方存在染色体异常的患者；三次以上的试管婴儿植入失败者；三次以上自然流产患者；生育过染色体异常患儿的夫妇。

染色体非整倍体是指单个染色体或多个染色体数目的增加或减少，是临床上最常见的染色体数目异常。试管婴儿体外受精的胚胎中容易发生染色体非整倍体异常，异常胚胎植入女性子宫可导致种植失败、流产、出生缺陷等问题，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数目异常的胚胎，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。临床常见的染色体非整倍体检测技术包括荧光原位杂交技术（Fluorescence In Situ Hybridization, FISH），微阵列比较基因组杂交技术（Comparative Genomic Hybridization, Array-CGH），单核苷酸多态性芯片检测技术（Single Nucleotide Polymorphism, SNP-Array）。

检测结果仅供参考，不单独作为确诊的依据，本产品不用于拷贝数变异的检测。

【检验原理】

本试剂盒是利用单细胞全基因组扩增技术对从囊胚期胚胎获得的细胞进行扩增，利用半导体高通量测序技术对扩增产物进行全基因组测序，通过生物信息软件对测序结果进行数据分析，判断胚胎是否存在染色体非整倍体异常。

对囊胚期胚胎进行活检，采用优化的简并寡核苷酸引物 PCR 技术对活检细胞进行全基因组扩增，将扩增产物随机打断为 200bp 左右的 DNA 片段，在 DNA 片段两端加上测序接头，构建测序文库。通过基于半导体高通量测序技术的 DA8600 基因测序仪进行全基因组测序，利用生物信息学软件对测序结果进行分析，得到匹配到每条染色体上的有效序列数量，计算有效序列数量与参考数据库中相应染色体序列数量的比值，若该比值过高，则该染色体可判断为三体或重复；若该比值过低，则该染色体可判断为单体或缺失，实现对染色体非整

倍体异常的检测。

【主要组成成分】

试剂名称	规格	数量	试剂组分
细胞提取缓冲液	310μL/管	1 管	磷酸二氢钠、氯化钠、磷酸氢二钠、氯化钾
细胞裂解缓冲液	310μL/管	1 管	三羟甲基氨基甲烷、乙二胺四乙酸、二硫苏糖醇
细胞裂解酶	20μL/管	1 管	细胞裂解酶、乙二胺四乙酸、氯化钾、二硫苏糖醇和甘油
预扩增缓冲液	300μL/管	1 管	氯化镁、氯化钠、三羟甲基氨基甲烷、二硫苏糖醇
预扩增酶	20μL/管	1 管	DNA 聚合酶、三羟甲基氨基甲烷、乙二胺四乙酸、氯化钾、二硫苏糖醇和甘油
扩增缓冲液	1.5mL/管	1 管	三羟甲基氨基甲烷、氯化钾、二硫苏糖醇
扩增酶	60μL/管	1 管	DNA 聚合酶、乙二胺四乙酸、氯化钾、二硫苏糖醇和甘油
片段化缓冲液	120μL/管	1 管	三羟甲基氨基甲烷、氯化钾、氯化镁、吐温 100、牛血清白蛋白
片段化酶	120μL/管	1 管	片段化酶、乙二胺四乙酸、氯化钾、二硫苏糖醇和甘油
终止反应缓冲液	300μL/管	1 管	乙二胺四乙酸
末端修复缓冲液	550μL /管	1 管	三羟甲基氨基甲烷、氯化钾、二硫苏糖醇、腺嘌呤核苷三磷酸、三磷酸脱氧核糖核苷
末端修复酶	27μL/管	1 管	末端修复酶、三羟甲基氨基甲烷、乙二胺四乙酸、氯化钾、二硫苏糖醇、甘油、聚乙二醇辛基苯基醚
DNA 连接酶	55μL/管	1 管	三羟甲基氨基甲烷、乙二胺四乙酸、氯化钾、二硫苏糖醇和甘油
连接缓冲液	275μL/管	1 管	三羟甲基氨基甲烷、氯化镁、二硫苏糖醇、

试剂名称	规格	数量	试剂组分
			腺嘌呤核苷三磷酸
PCR 酶混合液	1.3mL/管	2 管	三羟甲基氨基甲烷硫酸盐 (pH 8.9)、硫酸铵、硫酸镁、三磷酸脱氧核糖核苷、DNA 聚合酶、GB-D 耐热聚合酶、DNA 聚合酶抗体
PCR 引物混合液	137μL/管	1 管	氯化钠、氯化镁、牛血清白蛋白、脱氧核糖核苷三磷酸、寡核苷酸序列
P1 接头	60μL/管	1 管	寡核苷酸序列
特异性接头 1	8μL/管	1 管	寡核苷酸序列
特异性接头 2	8μL/管	1 管	寡核苷酸序列
特异性接头 3	8μL/管	1 管	寡核苷酸序列
特异性接头 4	8μL/管	1 管	寡核苷酸序列
特异性接头 5	8μL/管	1 管	寡核苷酸序列
特异性接头 6	8μL/管	1 管	寡核苷酸序列
特异性接头 7	8μL/管	1 管	寡核苷酸序列
特异性接头 8	8μL/管	1 管	寡核苷酸序列
特异性接头 9	8μL/管	1 管	寡核苷酸序列
特异性接头 10	8μL/管	1 管	寡核苷酸序列
特异性接头 11	8μL/管	1 管	寡核苷酸序列
特异性接头 12	8μL/管	1 管	寡核苷酸序列
特异性接头 13	8μL/管	1 管	寡核苷酸序列
特异性接头 14	8μL/管	1 管	寡核苷酸序列
特异性接头 15	8μL/管	1 管	寡核苷酸序列
特异性接头 16	8μL/管	1 管	寡核苷酸序列
特异性接头 17	8μL/管	1 管	寡核苷酸序列
特异性接头 18	8μL/管	1 管	寡核苷酸序列
特异性接头 19	8μL/管	1 管	寡核苷酸序列
特异性接头 20	8μL/管	1 管	寡核苷酸序列

试剂名称	规格	数量	试剂组分
特异性接头 21	8 μ L/管	1 管	寡核苷酸序列
特异性接头 22	8 μ L/管	1 管	寡核苷酸序列
特异性接头 23	8 μ L/管	1 管	寡核苷酸序列
特异性接头 24	8 μ L/管	1 管	寡核苷酸序列
特异性接头 25	8 μ L/管	1 管	寡核苷酸序列
DNA 洗脱液	1.9mL/管	4 管	乙二醇四乙酸、三羟甲基氨基甲烷
无核酸酶水	1.9mL/管	2 管	不含 DNase、RNase 和其他核酸酶的去离子 纯水
DNA 纯化磁珠	21mL/瓶	1 瓶	纳米磁珠、聚苯乙烯、四氧化三铁、聚乙 二醇 6000、氯化钠
PGS 阳性质控品 1	2 μ L /管	1 管	21 号染色体三体细胞
PGS 阳性质控品 2	2 μ L /管	1 管	XO 染色体异常细胞
PGS 阴性质控品	2 μ L /管	1 管	染色体正常的细胞

注：不同批次间试剂盒各组分在有效期内不可替换使用。

自备试剂：

1. 无水乙醇（分析纯）
2. 文库质检试剂盒（上海英潍捷基贸易有限公司：Qubit dsDNA HS Assay kit, 货号 Q32854）
3. 测序反应通用试剂盒（半导体法）（广州市达瑞生物技术股份有限公司，备案凭证号：粤穗械备 20160061 号）

【储存条件及有效期】

DNA 纯化磁珠储存于 2~8℃；其余所有试剂均储存于-20±5℃；试剂盒有效期为 6 个月。

开瓶稳定期为 5 个月，反复冻融次数不超过 12 次，运输采用冷链运输，DNA 纯化磁珠运输温度及开箱温度要求为 2~8℃，其余所有试剂运输温度及开箱温度要求为-20±5℃，时间不应超过 5 天。

生产日期和失效日期见包装标签。

【适用仪器】

基因测序仪，型号 DA8600。

【样本要求】

1. 样本类型：

胚胎体外受精培养至第 3~6 天，发育至囊胚期，从囊胚滋养层分离至少 5 个细胞作为待检样本。

2. 样本采集:

按照常规胚胎活检技术对囊胚期胚胎进行取样，取出的细胞用 1×PBS (不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 清洗 3 遍，放置于 0.2mL 的 PCR 管中，体积不超过 2.5μL。

3. 保存与运输:

- 1) 采用干冰运输，运输时间不超过 3 天，如超出，需重新投放冷冻品（干冰）。
- 2) 采集的细胞样本应保存于 -80℃ 冰箱中，保存时间不超过 18 个月，冻融次数不超过 5 次。

【检验方法】

1. 单细胞全基因组扩增

1.1 细胞裂解

1) 从冰箱中取出样本后，将装有细胞样本的 0.2mL PCR 管短暂离心 10 秒，放置于冰上。在装有细胞样本的 0.2mL PCR 管中依次加入下表中的试剂，涡旋 5 秒，使溶液混匀，用离心机低速离心 10 秒，使管壁和盖子上无明显液滴。

组分	反应体积 (μL)
细胞样本	X (X≤2.5)
细胞提取缓冲液	5-X
细胞裂解缓冲液	4.8
细胞裂解酶	0.2
反应体系总量	10

2) 设置 PCR 仪反应程序，按照如下条件进行孵育:

循环	温度	时间
1	75℃	10min
	95℃	4min
	25℃	保存

1.2 预扩增

1) 从 PCR 仪中取出反应结束的样本，室温放置，依次加入下表中的试剂，涡旋 5 秒，使溶液混匀，用离心机低速离心 10 秒，使管壁和盖子上无明显液滴。

组分	反应体积 (μL)
裂解后的样本	10
预扩增缓冲液	4.8
预扩增酶	0.2

反应体系总量	15
--------	----

2) 设置 PCR 仪反应程序，按照如下条件进行孵育：

循环	温度	时间
1	95℃	2min
12	95℃	15s
	15℃	50s
	25℃	40s
	35℃	30s
	65℃	40s
	75℃	40s
1	4℃	保存

1.3 指数扩增

1) 从 PCR 仪中取出反应结束的样本，放置于冰上，依次加入下表中的试剂，涡旋 5 秒，使溶液混匀，用离心机低速离心 10 秒，使管壁和盖子上无明显液滴。

组分	反应体积 (μL)
预扩增样本	15
扩增缓冲液	25
扩增酶	0.8
无核酸酶水	34.2
反应体系总量	75

2) 设置 PCR 仪反应程序，按照如下条件进行孵育：

循环	温度	时间
1	95℃	2min
14	95℃	15s
	65℃	1min
	75℃	1min
1	4℃	保存

1.4 扩增产物纯化

1) 将扩增产物转移到 1.5mL 的 EP 管中，涡旋或颠倒混匀 DNA 纯化磁珠 10 次，向 EP 管中加入 DNA 纯化磁珠：112μL。混匀后，室温反应 5 分钟。

2) 将 EP 管插入磁力架的管孔里，待磁珠吸附完全，溶液变澄清之后，吸去溶液，注意不要吸到磁珠（可留约 5μL 溶液），EP 管留在磁力架上。

3) 缓慢吸取 300 μ L 70%的乙醇于 EP 管中, 轻轻旋动 EP 管两圈, 使磁珠在管壁上移动。吸去溶液, 注意不要吸到磁珠, 70%乙醇应当天配制!

4) 重复上一步。

5) 取下 EP 管, 用离心机离心 5 秒。将 EP 管再次插入磁力架的管孔里, 待磁珠吸附完全之后, 用移液器吸去残留溶液, 注意管壁上不能有残留。将 EP 管盖打开, 晾 3 分钟。

注意事项: 晾干时须常观察磁珠干湿程度, 如磁珠过湿须延长空气烘干时间; 避免磁珠过度干燥, 磁珠干燥后表面无水渍, 如磁珠有裂纹出现须盖好管盖, 并立即进行下步实验操作。

6) 吸取 33 μ L DNA 洗脱液于 EP 管内, 吹打混匀使磁珠重悬或涡旋混匀 10 秒, 低速离心 5 秒, 使液体处于管底, 室温反应 5 分钟。期间用指尖轻弹管底, 注意不要将液体弹到管壁上, 若液体弹到管壁上, 轻轻甩动离心管, 使液体处于管底。

7) 将 EP 管插入磁力架的管孔里, 待磁珠吸附完全, 溶液变澄清之后, 用移液枪吸取溶液于新的相应编号的 EP 管中, 注意不能吸到磁珠。

1.5 扩增产物定量

使用 Qubit 荧光计进行定量。

2. 基因组 DNA 片段化

2.1 DNA 片段化

1) 将 DNA 片段化酶短暂离心 3s, 放置于冰盒上, 在 1.5mL 的 EP 管中配制如下体系。

组分	反应体积 (μ L)
纯化后的 DNA 样本	X (300ng)
片段化缓冲液	2
无核酸酶水	16-X
片段化酶	2
反应体系总量	20

2) 将 EP 管放置在恒温金属浴中 37 $^{\circ}$ C 反应 25min。反应结束后加入 5 μ L 终止反应缓冲液。

2.2 片段化后的 DNA 纯化

1) 涡旋混匀或颠倒混匀 DNA 纯化磁珠 10 次, 向 EP 管中加入 DNA 纯化磁珠: 37.5 μ L。混匀后, 室温反应 5 分钟。

2) 将 EP 管插入磁力架的管孔里, 待磁珠吸附完全, 溶液变澄清之后, 吸去溶液, 注意不要吸到磁珠 (可留约 5 μ L 溶液), EP 管留在磁力架上。

3) 吸取 300 μ L 70%的乙醇于 EP 管, 轻轻旋动 EP 管两圈, 使磁珠在管壁上移动。吸去溶液, 注意不要吸到磁珠。

4) 重复上一步。

5) 取下 EP 管，离心机离心 5 秒。将 EP 管再次插入磁力架的管孔里，待磁珠吸附完全之后，用移液器吸去残留溶液，注意管壁上不能有残留。将 EP 管盖打开，晾 3 分钟。

注意事项：晾干时须常观察磁珠干湿程度，如磁珠过湿须延长空气烘干时间；避免磁珠过度干燥，磁珠干燥后表面无水渍，如磁珠有裂纹出现须盖好管盖，并立即进行下步实验操作。

6) 吸取 33 μ L DNA 洗脱液于 EP 管内，吹打混匀使磁珠重悬或涡旋混匀 10 秒，低速离心 5 秒，室温反应 5 分钟。期间用指尖轻弹管底，注意不要将液体弹到管壁上，若液体弹到管壁上，轻轻甩动离心管，使液体处于管底。

7) 将 EP 管插入磁力架的管孔里，待磁珠吸附完全，溶液变澄清之后，用移液器吸取溶液于新的相应编号的 EP 管中，注意不能吸到磁珠。

3. 文库构建

3.1 实验前准备

1) 打开超净工作台内的紫外灯，灭菌 30 分钟，关闭紫外灯，打开风机，通风 10 分钟。

2) 取出 4℃ 保存的 DNA 纯化磁珠，室温平衡 30 分钟。

3) 从 -20℃ 冰箱中取出 DNA，核对并记录各标号所对应的样品 ID、DNA 条码及分配给该样品的特异性标签编号，核对无误后置于离心管架上室温溶解，短暂离心备用。

4) 配制 70% 的乙醇备用。

3.2 末端修复

1) 将末端补平试剂置于冰上溶解。

2) 准备一个 1.5mL EP 管，根据下表在管中依次加入试剂，涡旋混匀 5 秒，使溶液混匀，离心机低速离心数秒，使管壁和盖子上无明显液滴。

组分	反应体积 (μ L)
DNA	30
末端修复缓冲液	10
末端修复酶	0.5
无核酸酶水	9.5
反应体系总量	50

3) 将 EP 管置于室温反应 30 分钟。

4) 涡旋或颠倒混匀 DNA 纯化磁珠 10 次，按 1: 1 体积（原反应体系的量），加入 DNA 纯化磁珠：50 μ L。混匀后，室温反应 5 分钟。

5) 将 EP 管插入磁力架管孔里，待磁珠吸附完全溶液变澄清之后，将上清液转移到另一相应标号的新的 EP 管中。

注意事项：转移上清时避免吸到磁珠；转管前需核对样本编号，谨防样本混淆。

6) 按 1: 0.5 体积（原反应体系的量）加入 25 μ L DNA 纯化磁珠，吹打混匀或低速涡旋混匀，低速离心甩掉管壁和盖子上的液滴使磁珠均匀分散在溶液中，室温反应 5 分钟，期间可轻弹管底使磁珠均匀分布，若液体弹到管壁上，轻轻甩动离心管或低速离心，使液体处于管底。

7) 将 EP 管插入磁力架的管孔里，待磁珠吸附完全，溶液变澄清之后，吸去溶液，注意不要吸到磁珠（可留约 5 μ L 溶液），EP 管留在磁力架上。

8) 吸取 300 μ L 70%的乙醇于 EP 管，轻轻旋动 EP 管两圈，使磁珠在管壁上移动。吸去溶液，注意不要吸到磁珠。

9) 重复上一步。

10) 取下 EP 管，用离心机离心 5 秒。将 EP 管再次插入磁力架的管孔里，待磁珠吸附完全之后，用移液器吸去残留溶液，注意管壁上不能有残留。将 EP 管盖打开，晾 3 分钟。

注意事项：晾干时须常观察磁珠干湿程度，如磁珠过湿须延长空气烘干时间；避免磁珠过度干燥，磁珠干燥后表面无水渍，如磁珠有裂纹出现须盖好管盖，并立即进行下步实验操作。

11) 吸取 33 μ L DNA 洗脱液于 EP 管内，吹打混匀使磁珠重悬或涡旋混匀 10 秒，低速离心 5 秒，室温反应 5 分钟。期间用指尖轻弹管底，注意不要将液体弹到管壁上，若液体弹到管壁上，轻轻甩动离心管，使液体处于管底。

12) 将 EP 管插入磁力架的管孔里，待磁珠吸附完全，溶液变澄清之后，用移液器吸取溶液于新的相应编号的 EP 管中，注意不能吸到磁珠。

3.3 DNA 片段末端加接头

1) 将接头连接试剂置于冰上溶解。

2) 准备一个 1.5mL EP 管，根据下表在管中依次加入试剂，涡旋 5 秒，使溶液混匀，离心机低速离心数秒，使管壁和盖子上无明显液滴。

注意事项：加入特异性接头 X 时须反复核对；每次只开一个管盖，谨防特异性接头之间交叉污染。

组分	反应体积 (μ L)
平末端 DNA	32
无核酸酶水	10
连接缓冲液	5
DNA 连接酶	1
P1 接头	1
特异性接头 X	1
反应体系总量	50

3) 将 EP 管置于室温反应 20 分钟。

4) 反应结束后按 1:1.5 体积加入 75 μ L DNA 磁珠，吹打混匀或低速涡旋混匀，低速离心甩掉管壁和盖子上的液滴使磁珠均匀分散在溶液中，室温反应 5 分钟，期间可轻弹管底使磁珠均匀分布，若液体弹到管壁上，轻轻甩动离心管或低速离心，使液体处于管底。

5) 将 EP 管插入磁力架的管孔里，待磁珠吸附完全，溶液变澄清之后，吸去溶液，注意不要吸到磁珠，EP 管留在磁力架上。

6) 吸取 300 μ L 70%的乙醇于 EP 管，轻轻旋动 EP 管一圈，使磁珠在管壁上移动。吸去溶液，注意不要吸到磁珠。

7) 重复上一步。

8) 快速离心数秒，将管壁液体甩到管底。将 EP 管放回磁架管孔里，待磁珠吸附完全后，用移液器吸去溶液。

9) 室温 3 分钟，让残留乙醇蒸发。

注意事项：晾干时须常观察磁珠干湿程度，如磁珠过湿须延长空气烘干时间；避免磁珠过度干燥，磁珠干燥后表面无水渍，如磁珠有裂纹出现须盖好管盖，并立即进行下步实验操作。

10) 吸取 16 μ L DNA 洗脱液：从 EP 有磁珠一侧加入，将磁珠冲入管底；然后反复吹打将磁珠混匀重悬，室温反应 5 分钟。

11) 将 EP 管插入磁力架的管孔里，待磁珠吸附完全，溶液变澄清之后，用移液器吸取溶液于新的相应编号的 PCR 管中，注意不能吸到磁珠。

3.4 PCR 扩增 DNA 片段

1) 将 PCR 相关试剂置于冰上溶解。

2) 根据下表在 PCR 管中依次加入试剂，涡旋振荡 5 秒，使溶液混匀，用离心机低速离心数秒，使管壁和盖子上无明显液滴。

组分	反应体积 (μ L)
连接接头的 DNA	15
PCR 酶混合液	47.5
PCR 引物混合液	2.5
反应体系总量	65

3) 将 PCR 管放入 PCR 仪按以下条件进行反应：
72 $^{\circ}$ C，20 分钟；95 $^{\circ}$ C，5 分钟；（95 $^{\circ}$ C 15 秒，62 $^{\circ}$ C 15 秒，70 $^{\circ}$ C 1 分钟）10 个循环；70 $^{\circ}$ C，5 分钟；4 $^{\circ}$ C 保存。

4) 根据样品数准备 1.5mL EP 管，编好相应的编号，PCR 结束之后，取下 PCR 管，离心 2 秒，将 PCR 管中样品转移到对应编号的 EP 管中。

5) 按照 1:1.5 体积加入 97.5 μ L DNA 纯化磁珠，吹打混匀或低速涡旋混匀，低速离心甩掉管壁和盖子上的液滴使磁珠均匀分散在溶液中，室温反应 5 分钟，期间可轻弹管底使磁珠均匀分布，若液体弹到管壁上，轻轻甩动离心管或低速离心，使液体处于管底。

6) 将 EP 管插入磁力架的管孔里，待磁珠吸附完全，溶液变澄清之后，吸去溶液，注意不要吸到磁珠，EP 管留在磁力架上。

7) 吸取 300 μ L 70%的乙醇于 EP 管，轻轻左右旋动 EP 管两圈，使磁珠在管壁上移动。吸去溶液，注意不要吸到磁珠。

8) 重复上一步。

9) 取下 EP 管，放入离心机 1000rpm 离心 1 分钟。将 EP 管再次插入磁力架的管孔里，待磁珠吸附完全之后，用 10 或 20 μ L 滤芯吸头吸去残留溶液，注意管壁上不能有残留。将 EP 管盖打开，晾 3 分钟。

注意事项：晾干时须常观察磁珠干湿程度，如磁珠过湿须延长空气烘干时间；避免磁珠过度干燥，磁珠干燥后表面无水渍，如磁珠有裂纹出现须盖好管盖，并立即进行下步实验操作。

10) 吸取 22 μ L DNA 洗脱液于 EP 管内，用移液器吹打混匀或涡旋混匀 10 秒使管内磁珠重悬，盖上管盖，低速离心 5 秒甩掉管壁和盖子上的液体，室温放置 5 分钟，期间用指尖轻弹管底，注意不要将液体弹到管壁上，若液体弹到管壁上，轻轻甩动离心管，使液体处于管底。

11) 将 EP 管插入磁力架的管孔里，待磁珠吸附完全，溶液变澄清之后，用移液器吸取溶液于新的相应编号的 EP 管中，注意不能吸到磁珠。

12) 将建好的文库样品暂存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中，等待文库定量。

4. 文库定量

使用 Qubit 荧光计进行文库定量。

5. 上机测序

5.1 文库稀释：根据 Qubit 检测结果，将样本进行稀释到 100pM，稀释倍数=Qubit 浓度*10⁷/660/300

5.2 文库混合：稀释好的样本按照每个样本 5 μ L 等体积混合，注意混合样本的特异性接头不能重复。

5.3 推荐取 8 μ L 的混合文库样本进行上机测序，根据测序反应通用试剂盒（半导体法）操作说明书进行操作。

备注：100pM 取 8 μ L 的上机量为推荐量，可根据测序仪的具体表现进行微调。

6. 质控标准

6.1 PGS 阳性质控品 1:

以 PGS 阳性质控品 1 作为待检品,按照试剂盒说明书进行检测,检测结果应为 21 三体样本。

6.2 PGS 阳性质控品 2:

以 PGS 阳性质控品 2 作为待检品,按照试剂盒说明书进行检测,检测结果应为 XO 样本。

6.3 PGS 阴性质控品:

以 PGS 阴性质控品作为待检品,按照试剂盒说明书进行检测,检测结果应为阴性。

以上 6.1、6.2、6.3 需要同时满足,否则需要重新实验。

说明:PGS 阴/阳性质控品经过全基因组扩增后,取 300ng 扩增产物进行 DNA 片段化,剩余质控品可于-20℃保存 6 个月,全基因组扩增后的质控品 DNA 可用于多次质控。

7. 结果分析

利用胚胎染色体非整倍体检测数据分析系统进行数据分析,得到每个测序样本每条染色体的拷贝数(Copy Number Variation, 简称 CNV)数值,根据参考区间的参考范围进行结果判断。

胚胎植入前染色体非整倍体检测数据分析管理系统软件(V1.0)医疗器械注册证书编号:

【阳性判断值或者参考区间】

环状二元分割(Circular Binary Segmentation, CBS)算法是一种常用的拷贝数变异(Copy Number Variation, CNV)检测的方法。在本方法中,使用比值法来确定染色体的拷贝数值(CNV 值)是否存在显著异常。本试剂盒采用 CNV 值检验判定检测样本与参考数据库中正常样本是否有显著差别。首先利用本试剂盒对 240 例正常细胞的单细胞扩增结果进行检测,构建参考数据库。

1.参考数据库构建

采用 240 例确定正常的细胞样本构建参考库,通过软件将单细胞扩增后经 DNA 测序得到的碱基序列与人类基因组标准序列进行比对,确定测序获得的每条碱基序列在染色体上的确切位置。去除低质量的、多匹配和非完全匹配到染色体上的碱基序列,确保测序数据的准确性以及每条碱基序列定位的唯一性。而后将整个染色体划分成 200kb 片段大小的窗口,进而计算每个 200kb 窗口上得到的唯一匹配序列数目,确定参考数据库中每个窗口的数值。

由于测序过程中会存在一定的 GC 偏好性,需对 GC 含量偏差进行校正,其原理为基于局部基因组 GC 含量对每个 GC 密度给予权重以去除 GC 偏差。首先将整个染色体划分为 200kb 片段大小的窗口,进而计算每个区域内染色体序列的 GC 含量;根据不同的 GC 含量,以 0.1%为单位,对染色体全部的窗口取其平均读数 $\bar{M}$ 和所有具有相同 GC 含量的窗口取其平均读数 M_i ,其中忽略没有序列数目、GC 含量为 0 的窗口,同时对每个 GC 含量所对应的窗口

给予一个权重 $W = \frac{\bar{M}}{M_i}$,最后对每个窗口乘以相应的权重以校正比对到每个窗口的序列数

目。

2.参考范围的确定

使用本试剂盒对 234 例阳性样本和阴性样本，应用半导体测序系统进行检测，主要通过分析得到每条染色体上检测到的序列数目，并计算该序列数目与参考数据中对应染色体的序列数目的比值即 CNV 值，来确定该检测样本的染色体数目是否存在异常，通过不同 CNV 值区间的划分，统计分析真阳性率、假阳性率、真阴性率以及假阴性率，最终确定参考值的范围为[-0.51, 0.37]，染色体非整倍体阳性的参考区间为大于 0.37，小于-0.51。

利用如下公式进行染色体的 CNV 值计算：

$$CNV_i = \log_2 \frac{TR_i}{RR_i}$$

i: 染色体编号

TR_i: 检测样本经分析得到的染色体 i 的序列数目；

RR_i: 参考数据库中经分析得到的染色体 i 的序列数目；

3.临界值确定

通过对 30 例不同嵌合比例（最低嵌合比例为 30%）的细胞样本和 30 例阴性细胞样本的 CNV 值分布进行统计分析，本项目在考虑嵌合分析时的染色体三体的 CNV 数值的临界值范围为[0.20, 0.37]，染色体单体的 CNV 数值的临界值范围为[-0.51, -0.23]。

【检验结果的解释】

1. 若单细胞扩增失败，可能是在取样过程中没有取到细胞或者细胞丢失，由于无法再次取样，因此对于此类胚胎样本，需要临床医生结合其他指征决定是否植入。
2. 若检测样本中的某条染色体的 CNV 数值 > 0.37 或者 < -0.51，则提示该样本存在该染色体非整倍体，不宜植入。若胚胎的所有染色体正常，在胚胎其他临床指征都正常的情况下可以植入。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒只用于体外诊断。
2. 本试剂盒不能检测单倍体、三倍体、多倍体等全部染色体成倍增加或减少的异常。
3. 本试剂盒不能检测染色体易位、倒位等染色体异常。
4. 本试剂盒只是针对胚胎植入前染色体非整倍体的检测，不用于进行胚胎单基因遗传病的检测。
5. 由于本试剂盒对嵌合型染色体异常的检测有一定的错误率，如果胚胎存在嵌合现象，本试剂盒检测结果仅供参考，如果有其他正常的胚胎可以植入，可以优先选择其他胚胎，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。
6. 检出结果仅供临床参考，不能单独作为临床植入的最终依据。

7. 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. 非整倍体阳性符合率：本试剂盒对于非整倍体阳性均能检出，使用国家参考品中的非整倍体阳性参考品检测，符合率 100%。

2. 微缺失微重复检测符合率：本试剂盒对于微缺失微重复样本进行了分析性能评估；使用国家参考品中的微缺失微重复参考品检测，符合本试剂盒的性能指标。

3. 阴性符合率：本试剂盒对于整倍体阴性样本检测结果均为阴性，使用国家参考品中的阴性参考品检测，符合率 100%。

4. 嵌合体符合率：本试剂盒对 30%嵌合的嵌合体样本检出率达到 30%以上，相对应的 70%嵌合体样本检出率达到 60%以上，使用国家参考品中的嵌合体参考品检测，符合该指标。

5. 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%，使用国家参考品中的数据量控制参考品检测，符合该指标。

6. 重复性：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非整倍体阳性符合率、微缺失微重复检测符合率、阴性符合率、嵌合体符合率、数据量控制的要求。

7. 不同实验室间精密度：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：本试剂盒配套广州市达瑞生物股份有限公司生产的测序反应通用试剂盒（半导体法）（备案凭证号：粤穗械备 20160061 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：本试剂盒检测 57 份微缺失微重复样本，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、流产组织核型分析或新生儿脐带血核型分析。

本试剂盒临床试验共招募了 2590 对符合适应症的受试者夫妻，其中 1482 对受试者夫妻入组并完成检测，在 1482 对受试者夫妻的 6282 例胚胎样本中，检测出染色体非整倍体阳性 1672 例，染色体非整倍体阴性 4483 例。阳性样本 FISH 验证 381 例，FISH 验证结果与本试剂盒检测结果一致，阴性样本随访到核型分析检查结果 291 例，核型分析结果与本试剂盒检

测结果一致。通过对受试者和胚胎的基线特征分析,表明本临床试验的受试者及胚胎能够代表临床的实际情况,本试剂盒已验证样本的统计分析结果具有临床意义。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性为 100% (95%CI: 99.00%-100%), 特异性为 100% (95%CI: 98.70%-100%), 准确性为 100% (95%CI: 99.43%-100%); 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: 98.88%-100.00%), 阴性预测值为 100.00%(95%CI: 98.46%-100.00%); 进行 Kappa 一致性检验, Kappa 值=1 ($P<0.001$), 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. 所有样本必须仔细核查, 全程跟踪记录直到实验完成, 避免样本混淆。
2. 本试剂为一次性使用, 并且所有相关耗材请使用一次性的, 以防止污染。
3. 本试剂盒使用过程中的所有移液器吸头建议使用带滤芯的吸头。
4. 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, 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。
5. 按要求进行防护措施, 如手套、工作服、废弃物等处理需要符合国家相关规定。
6. 请在有效期内使用本试剂盒。
7. 使用本试剂盒用于辅助生殖过程中胚胎植入前的染色体非整倍体异常检测时, 需遵循《人类辅助生殖技术和人类精子库伦理原则》
8. 临床医生得到检测报告后, 应与患者做好遗传咨询, 同时综合各种临床指征选择植入的胚胎。

【标识的解释】

无

【参考文献】

- [1] Handyside A.H, Kontogianni E, *et al.* Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*. 1990, 344(19):768-770.
- [2] Wells D, Kaur K, Jamie G, *et al.* Clinical utilisation of a rapid low-pass whole genome sequencing technique for the diagnosis of aneuploidy in human embryos prior to implantation. *Med Genet*. 2014;51:553-562.
- [3] Francesco F, Anil M, Sara B, *et al.* Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. *Genetics*. 2014:1-8.
- [4] Nathan R., Fedick A, Tao X, *et al.* Evaluation of targeted next-generation sequencing-based preimplantation genetic diagnosis of monogenic disease. 2013, 99(5).
- [5] Martín J, Cervero A., *et al.* The impact of next-generation sequencing technology on preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertility and Sterility*. 2013, 99(4).

- [6] D W, K K, J G, *et al.* Clinical utilisation of a rapid low-pass whole genome sequencing technique for the diagnosis of aneuploidy in human embryos prior to implantation. *J Med Genet*, 2014, 51(8):553-562.
- [7] F F, A B, S B, *et al.* Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. *FERTILITY AND STERILITY*, 2014, 101(5):1375-1382.
- [8] Chen M, Wei S, Hu J. Can Comprehensive Chromosome Screening Technology Improve IVF/ICSI Outcomes? A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015, 10(10).
- [9] SOGC. Technical Update: Preimplantation Genetic Diagnosis and Screening. 2015, 3 (323).
- [10] Harton G, Braude P, Lashwood A, *et al.* ESHRE PGD consortium best practice guidelines for organization of a PGD centre for PGD/preimplantation genetic screening. *Hum Reprod*. 2011, 26(1):14-24.
- [11] Tan Y, Yin X, Zhang S. Clinical outcome of preimplantation genetic diagnosis and screening using next generation sequencing. *GigaScience*. 2014, 3(1):30.
- [12] F F, S B, A B, *et al.* Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Hum Reprod*. 2014.
- [13] Krzysztof qukaszuk, M.D, Ph.D, *et al.* Routine use of next-generation sequencing for preimplantation genetic diagnosis of blastomeres obtained from embryos on day 3 in fresh in vitro fertilization cycles. *GigaScience*. 2014, 3(1):30.

【基本信息】（委托达瑞生产）

注册人/生产企业名称：苏州贝康医疗器械有限公司

住所：苏州工业园星湖街 218 号生物纳米园 A3 楼 101 单元

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

受托企业的名称：广州市达瑞生物技术股份有限公司

住所：广州市高新技术产业开发区荔枝山路 6 号自编 2 号 404

生产地址：广州高新技术产业开发区荔枝山路 6 号，1 号楼 4 楼 401-408 室；2 号楼 1 楼、4 楼

生产许可证编号：

【基本信息】（贝康生产）

注册人/生产企业名称：苏州贝康医疗器械有限公司

住所：苏州工业园星湖街 218 号生物纳米园 A3 楼 101 单元

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

生产地址：苏州工业园星湖街 218 号生物纳米园 B3 楼 201 单元；A3 楼 101 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】