

受理号：CSZ2200210

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：人 CYP2C19、ALDH2、ApoE 和 SLC01B1 基因检测试剂盒（PCR-飞行时间质谱法）

产品管理类别：第三类

申请人名称：浙江迪谱诊断技术有限公司

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	6
三、临床评价概述.....	10
四、产品受益风险判定.....	12
综合评价意见.....	14

基本信息

一、申请人名称

浙江迪谱诊断技术有限公司

二、申请人住所

浙江省余杭经济技术开发区兴中路 355 号 9 号楼二楼

三、生产地址

浙江省余杭经济技术开发区兴中路 355 号 9 号楼二楼

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

产品主要组成成分见下表:

组分名称	规格	数量	主要成分
C8 PCR 反应混合液	257μL/管	1 管	10% 1,3 -丙二醇, 1%硫酸铵, 脱氧胸腺嘧啶核苷, 脱氧胞嘧啶核苷, 脱氧腺嘌呤核苷, 脱氧鸟苷, 脱氧尿嘧啶核苷, PCR 引物
PCR 酶混合液	32μL/管	1 管	Taq 酶, UNG 酶
SAP 反应混合液	164μL/管	1 管	1%三羟甲基氨基甲烷盐酸盐, 1%氯化镁
SAP 酶混合液	29μL/管	1 管	虾碱性磷酸酶
C8 延伸反应混合液	160μL/管	1 管	1%三羟甲基氨基甲烷盐酸盐, 1%硫酸铵, 1%氯化钾, 双脱氧核苷, 延伸引物
延伸酶混合液	33μL/管	1 管	延伸酶, 50%甘油
C8 野生型质控品 A	15μL/管	1 管	c.521T>C、c.1510G>A、c.636G>A、c.681G>A 野生型人细胞系 DNA
C8 野生型质控品 B	15μL/管	1 管	c.388A>G、c.388T>C、c.-806C>T、c.526C>T 野生型人细胞系 DNA
C8 杂合型质控品	15μL/管	1 管	c.521T>C 、 c.1510G>A 、 c.636G>A 、 c.681G>A、c.388A>G、c.388T>C、c.-806C>T、c.526C>T 野生型大肠杆菌质粒与 c.521T>C、c.1510G>A 、 c.636G>A 、 c.681G>A 、 c.388A>G、c.388T>C、c.-806C>T、c.526C>T 纯合突变型大肠杆菌质粒混合液
空白对照	15μL/管	1 管	TE 缓冲液

不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。

（二）产品预期用途

本产品用于体外定性检测人体外周血样本中的 CYP2C19、ALDH2、ApoE 和 SLC01B1 基因多态性，可检测的多态性类型包括 CYP2C19（c. 681G>A、c. 636G>A、c. -806C>T）、ALDH2（c. 1510G>A）、ApoE（c. 388T>C、c. 526C>T）和 SLC01B1（c. 388A>G、c. 521T>C）。

本产品用于有合并使用氯吡格雷、硝酸甘油和他汀类药物需求的冠心病患者的用药指导。

本产品不能预测患者对氯吡格雷、硝酸甘油和他汀类药物的应答情况，仅能辅助医生确定氯吡格雷、硝酸甘油和他汀类药物治疗策略。本产品检测结果仅供临床参考，不应作为患者是否用药的唯一依据，临床医生应结合患者病情、疗效及其他实验室检测指标等对本产品的检测结果进行综合判断。

（三）产品包装规格

96 人份/盒。

（四）产品检验原理

本试剂盒针对 CYP2C19、ALDH2、ApoE 和 SLC01B1 四个基因八个位点的多态性检测，设计特异性多重 PCR 引物和多重延伸引物，以人基因组 DNA 为模板，在一个反应体系内对多重 PCR 引物所在区域进行同时扩增，扩增产物以 SAP 酶去除多余 dNTPs，然后对待检位点同时进行单碱基延伸，位点特

异性的延伸引物将在突变位点处延伸一个碱基并终止。延伸引物将根据突变类型的差异而连接上不同的 ddNTPs，形成分子量差异。

再选用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 技术将样品分散在基质分子中并形成晶体。当用激光照射晶体时，基质从激光中吸收能量，样品解吸附，基质-样品之间发生电荷转移使得样品分子电离，电离的样品在电场作用下飞过真空的飞行管，根据到达检测器的飞行时间不同而被检测，即通过离子的质量电荷之比 (M/Z) 与离子的飞行时间成正比来分析离子，并测得样品分子的分子量。例如，检测 DNA 样品时，DNA 离子按其质量大小先后通过检测器，DNA 片段越短，越早到达检测器。

二、临床前研究概述

(一) 主要原材料

1. 主要原材料的选择

本产品主要原材料包括 PCR 酶、dNTP Mix、虾碱性磷酸酶、iPLEX pro 酶、iPLEX Termination Mix、UNG 酶、25mM dN(U)TP Mix、CYP2C19 基因 (gDNA) 检测质控品、C8-NC、C8-PC、上游 PCR 引物、下游 PCR 引物、延伸引物。

PCR 引物、延伸引物为申请人自行设计后由专业合成公司合成；其余主要原材料均为外购方式获得。申请人选择有资质的供应商提供原料，通过功能性试验筛选出最佳原材料和

供应商，制定了各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的设置情况

企业参考品包括准确性参考品、特异性参考品、检测限参考品和重复性参考品。其中准确性参考品 22 份，特异性参考品 8 份，检测限参考品 22 份，重复性参考品 5 份。参考品采用临床样本、外购的细胞系 DNA 和菌株制备而成，涵盖了本产品声称的所有位点。所有参考品均采用 Sanger 测序法或已上市产品进行确认。

试剂盒包含 1 份野生型质控品 A、1 份野生型质控品 B 和 1 份杂合型质控品，用于检测过程的质量控制。其中野生型质控品 A 由 c. 521T>C、c. 1510G>A、c. 636G>A、c. 681G>A 野生型人细胞系 DNA 组成，野生型质控品 B 由 c. 388A>G、c. 388T>C、c. -806C>T、c. 526C>T 野生型人细胞系 DNA 组成，杂合型质控品由 c. 521T>C、c. 1510G>A、c. 636G>A、c. 681G>A、c. 388A>G、c. 388T>C、c. -806C>T、c. 526C>T 野生型大肠杆菌质粒与 c. 521T>C、c. 1510G>A、c. 636G>A、c. 681G>A、c. 388A>G、c. 388T>C、c. -806C>T、c. 526C>T 纯合突变型大肠杆菌质粒组成。

（二）生产工艺及反应体系研究

申请人通过功能性试验确定最佳的生产工艺及反应体系，包括 DNA 聚合酶用量、多重 PCR 引物浓度、SAP 反应酶用量、延伸反应中酶用量、延伸引物用量、ddNTP 用量、PCR 退

火温度、PCR 反应循环数和延伸反应循环数、SAP 酶的用量和反应时间、PCR 产物保存时间、延伸产物保存时间。同时通过临床样本确定了最优提取试剂盒、最佳核酸模板用量和核酸纯度，确定了配套的树脂芯片，确定了飞行时间质谱检测系统最佳的检测参数。

（三）分析性能评估

本产品分析性能包括准确度、精密度、检出限、分析特异性（干扰研究、交叉反应）、上样板孔间芯片交叉污染及芯片基质间交叉污染研究、核酸提取纯化试剂研究。

1. 准确度

申请人使用三批产品检测 218 份临床样本，各位点的检测结果均与 Sanger 测序结果一致，阴阳性符合率均为 100%。

2. 精密度

申请人采用 5 例临床样本（包含所有位点野生型和杂合突变型）分别稀释为中浓度和低浓度，使用三批产品进行检测，结果显示本产品的批内、批间、日内、日间精密度，不同操作者、不同地点、不同仪器之间的精密度均较好。

3. 检出限

申请人使用三批试剂盒进行研究。采用 5 例临床样本，分别稀释至 $1\text{ng}/\mu\text{L}$ 、 $0.8\text{ng}/\mu\text{L}$ 和 $0.5\text{ng}/\mu\text{L}$ ，对此浓度样本分别进行 20 次重复检测，以阳性检出率 $\geq 95\%$ 的最低基因组浓度作为检出限，最终确定该产品的检出限为 $1\text{ng}/\mu\text{L}$ 。

4. 分析特异性

在交叉反应研究中，申请人分别对 CYP2C19、ALDH2、ApoE 和 SLC01B1 同源序列及其他等位基因进行检测，结果显示检测靶点之间不产生交叉反应。

在干扰研究中，申请人对各种可能的内源性 & 外源性干扰物质进行评价。结果显示内源性干扰物质 6. 2g/L 血红蛋白、342 μM 胆红素、37mM 甘油三酯对本试剂盒不产生干扰。外源性干扰物质阿莫西林、快克复方氨酚烷胺胶囊、氯吡格雷、硝酸甘油、辛伐他汀、普伐他汀对本试剂盒不产生干扰。

5. 上样板孔间芯片交叉污染及芯片基质间交叉污染研究

芯片孔间交叉污染评估中，申请人在一个空白对照周围设置了不同基因型的阳性质控，使用三批试剂盒进行检测，检测结果显示 NTC 检测结果均为 NA，相邻孔位间的样本质谱检测结果均为相应型别，上样孔板相邻孔位间及质谱芯片相邻基质间不会发生交叉污染。

6. 核酸提取纯化试剂研究

针对核酸提取试剂性能研究，申请人评价了不同厂家核酸提取或纯化试剂的提取性能，最终确定江苏康为世纪生物科技股份有限公司生产的核酸提取或纯化试剂（苏泰械备 20190215 号，货号 CWY049S 与苏泰械备 20200578 号，货号 CWY091S）可为该产品的配套核酸提取纯化试剂。

（四）阳性判断值研究

申请人使用了 346 例临床样本，采用 ROC 曲线进行阳性判断值研究，确定了各位点不同基因型的参数设置。然后使用了 853 例临床样本进行阳性判断值验证，结果显示阳性判断值设置合理。

(五) 稳定性研究

申请人使用多批试剂进行货架有效期内稳定性、试剂冻融稳定性、开瓶稳定性及运输稳定性的研究，确定了试剂的储存条件及有效期。其中货架有效期内稳定性：采用三批试剂储存于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 条件下，分别在 0、3、6、9、12、13 个月对企业参考品检测，确定试剂在 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下可稳定保存 12 个月。此外，申请人还对样本稳定性进行了系统的研究。

三、临床评价概述

申请人在中南大学湘雅医院、杭州市第一人民医院、南昌大学第一附属医院、新疆医科大学第一附属医院共 4 家机构完成了临床试验。采用试验用体外诊断试剂与已上市同类产品进行比较研究试验，验证本产品的临床性能。入组样本为有合并使用氯吡格雷、他汀类药物和硝酸甘油需求的冠心病患者，共计 1308 例。

针对 CYP2C19 的 c. 681G>A 位点，共纳入 607 例突变样本和 701 例野生型样本。试验结果显示，本产品与对比试剂针对突变型的符合率为 100% (95%CI: 99.4%, 100%)，针对野生型的符合率为 100% (95%CI: 99.5%, 100%)，总符合率为 100%

(95%CI: 99.7%, 100%)。

针对 CYP2C19 的 c. 636G>A 位点, 共纳入 151 例突变样本和 1157 例野生型样本。试验结果显示, 本产品与对比试剂针对突变型的符合率为 100% (95%CI: 97.5%, 100%), 针对野生型的符合率为 100% (95%CI: 99.7%, 100%), 总符合率为 100% (95%CI: 99.7%, 100%)。

针对 CYP2C19 的 c. -806C>T 位点, 共纳入 131 例突变样本和 1177 例野生型样本。试验结果显示, 本产品与对比试剂针对突变型的符合率为 100% (95%CI: 97.2%, 100%), 针对野生型的符合率为 100% (95%CI: 99.7%, 100%), 总符合率为 100% (95%CI: 99.7%, 100%)。

针对 ALDH2 的 c. 1510 G>A 位点, 共纳入 413 例突变样本和 895 例野生型样本。试验结果显示, 本产品与对比试剂针对突变型的符合率为 100% (95%CI: 99.1%, 100%), 针对野生型的符合率为 100% (95%CI: 99.6%, 100%), 总符合率为 100% (95%CI: 99.7%, 100%)。

针对 Ap0E 的 c. 526 C>T 位点, 共纳入 182 例突变样本和 1126 例野生型样本。试验结果显示, 本产品与对比试剂针对突变型的符合率为 100% (95%CI: 97.9%, 100%), 针对野生型的符合率为 100% (95%CI: 99.7%, 100%), 总符合率为 100% (95%CI: 99.7%, 100%)。

针对 Ap0E 的 c. 388 T>C 位点, 共纳入 278 例突变样本和

1030 例野生型样本。试验结果显示，本产品与对比试剂针对突变型的符合率为 100% (95%CI: 98.6%, 100%)，针对野生型的符合率为 100% (95%CI: 99.6%, 100%)，总符合率为 100% (95%CI: 99.7%, 100%)。

针对 SLC01B1 的 c. 521 T>C 位点，共纳入 236 例突变样本和 1072 例野生型样本。试验结果显示，本产品与对比试剂针对突变型的符合率为 100% (95%CI: 98.4%, 100%)，针对野生型的符合率为 100% (95%CI: 99.5%, 100%)，总符合率为 100% (95%CI: 99.7%, 100%)。

针对 SLC01B1 的 c. 388 A>G 位点，共纳入 1136 例突变样本和 172 例野生型样本。试验结果显示，本产品与对比试剂针对突变型的符合率为 100% (95%CI: 99.7%, 100%)，针对野生型的符合率为 100% (95%CI: 97.8%, 100%)，总符合率为 100% (95%CI: 99.7%, 100%)。

综上所述，临床试验结果显示本产品与已上市同类产品的一致性较好，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，在目前认知水平上，认为该产品上市带来的获益/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防控，已在产品说明书中提示以下信息：

(一) 适用范围：本产品用于体外定性检测人体外周血

样本中的 CYP2C19、ALDH2、ApoE 和 SLC01B1 基因多态性，可检测的多态性类型包括 CYP2C19（c. 681G>A、c. 636G>A、c. -806C>T）、ALDH2（c. 1510G>A）、ApoE（c. 388T>C、c. 526C>T）和 SLC01B1（c. 388A>G、c. 521T>C）。

本产品用于有合并使用氯吡格雷、硝酸甘油和他汀类药物需求的冠心病患者的用药指导。

本产品不能预测患者对氯吡格雷、硝酸甘油和他汀类药物的应答情况，仅能辅助医生确定氯吡格雷、硝酸甘油和他汀类药物治疗策略。本产品检测结果仅供临床参考，不应作为患者是否用药的唯一依据，临床医生应结合患者病情、疗效及其他实验室检测指标等对本产品的检测结果进行综合判断。

（二）检验方法的局限性及注意事项：产品说明书中介绍了该产品检验方法的局限性及使用中的注意事项。

综合评价意见

依据《医疗器械监督管理条例》(国务院令第 739 号)、《体外诊断试剂注册与备案管理办法》(国家市场监督管理总局令第 48 号)等相关医疗器械法规与配套规章,经对申请人提交的注册申报资料进行系统评价,申报产品符合安全性、有效性的要求,符合现有认知水平,建议准予注册。

2024 年 7 月 3 日

附件:产品说明书

人 CYP2C19、ALDH2、ApoE 和 SLC01B1 基因检测试剂盒 (PCR-飞行时间质谱法) 说明书

【产品名称】

通用名称：人 CYP2C19、ALDH2、ApoE 和 SLC01B1 基因检测试剂盒 (PCR-飞行时间质谱法)

【包装规格】

96 人份/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测人体外周血样本中的 CYP2C19、ALDH2、ApoE 和 SLC01B1 基因多态性，可检测的多态性类型包括 CYP2C19 (c. 681G>A、c. 636G>A、c. -806C>T)、ALDH2 (c. 1510G>A)、ApoE (c. 388T>C、c. 526C>T) 和 SLC01B1 (c. 388A>G、c. 521T>C)。

本产品用于有合并使用氯吡格雷、硝酸甘油和他汀类药物需求的冠心病患者的用药指导。

本产品不能预测患者对氯吡格雷、硝酸甘油和他汀类药物的应答情况，仅能辅助医生确定氯吡格雷、硝酸甘油和他汀类药物治疗策略。本产品检测结果仅供临床参考，不应作为患者是否用药的唯一依据，临床医生应结合患者病情、疗效及其他实验室检测指标等对本产品的检测结果进行综合判断。

氯吡格雷在 1997 年被美国 FDA 认证为脑卒中、心肌梗死、外周动脉疾病的二级预防用药，广泛用于急性冠脉综合征、缺血性脑血栓、闭塞性脉管炎和动脉硬化及血栓栓塞引起的并发症。研究发现 CYP2C19 可影响到氯吡格雷、奥美拉唑、地西泮、苯妥英钠等重要临床药物的代谢，中国人群中常见单倍型是 CYP2C19*1、CYP2C19*2、CYP2C19*3、CYP2C19*17。其中 CYP2C19*1 为野生型，编码酶活性正常，CYP2C19*2 (rs4244285, c. 681G>A) 和 CYP2C19*3 (rs4986893, c. 636G>A) 编码的 CYP2C19 酶活性降低，是中国人群中存在的 2 种主要的等位基因，在中国人群的发生频率分别为 23.1% ~ 35% 和 2% ~ 7%。CYP2C19*17 (rs12248560, c. -806C>T) 编码的 CYP2C19 酶活性增强，在中国人群的发生频率约为 0.5%~4%。；CYP2C19*2 和 CYP2C19*3 可引起 CYP2C19 编码酶活性减弱，导致氯吡格雷抵抗；CYP2C19*17 可引起 CYP2C19 编码酶活性增强。

硝酸甘油作为血管扩张剂，用于治疗冠状动脉狭窄引起的急性心绞痛。研究发现，ALDH2 基因是硝酸甘油有效代谢物形成的关键，ALDH2*2 (Glu504Lys, rs671, c. 1510G>A)，发生突变时导致所编码蛋白质 504 位谷氨酸被赖氨酸所取代，携带突变等位基因 (ALDH2*2) 的个体 ALDH2 酶活性下降，杂合子个体酶活性仅为野生型个体的 10%，突变纯合子个体酶活性缺失。在中国人群中，ALDH2 *1/*1 基因型人群占比约 49.6%~68.5%，*1/*2 基因型人群占比约 24.9%~28.9%，*2/*2 基因型占比约 1.9%~7.1%。ALDH2*1 基因型患者硝酸甘油治疗心绞痛的疗效明显优于 ALDH2*2 患者，ALDH2*2 突变型患者无效率达 42.4%，大约为 ALDH2 野生型的 3 倍。

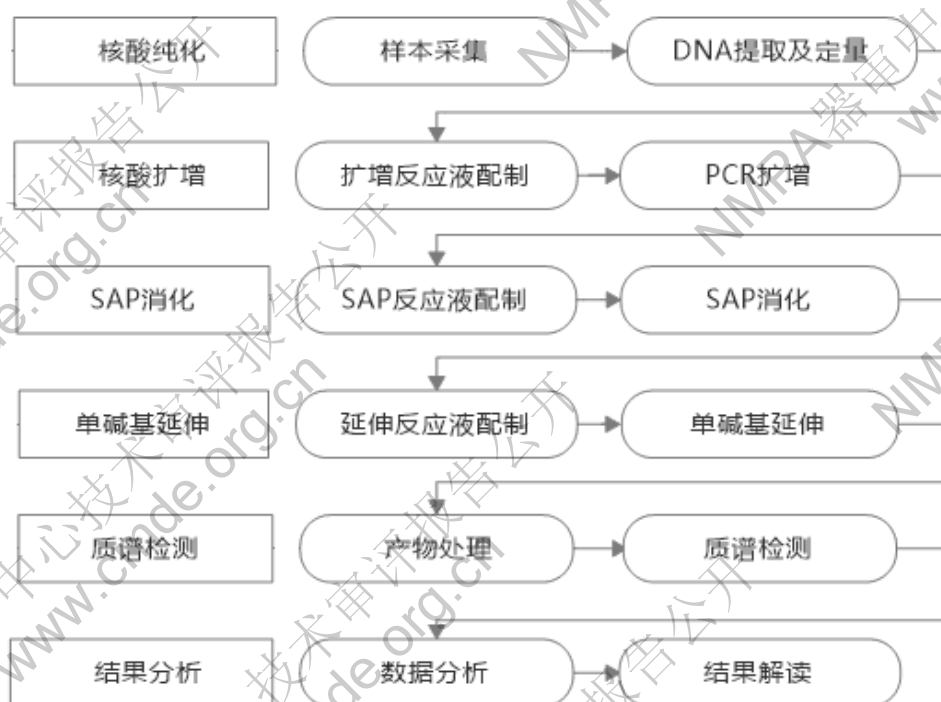
他汀类药物作为临床使用最广泛的降脂药，对抑制心脑血管疾病也有显著作用。ApoE 基因被认为是高脂蛋白血症及动脉粥样硬化性血管病的易感候选基因，主要有 c. 388T>C (rs429358) 和 c. 526C>T (rs7412) 两种多态性类型，可以形成 3 种单倍型。分别是 E2 (rs429358T-rs7412T)、E3 (rs429358T-rs7412C)、E4 (rs429358C-rs7412C)。由三种单倍型构成 6 种不同的基因型 (E2/E2、E3/E3、E4/E4、E2/E3、E2/E4 和 E3/E4)。在中国人中，E2/E2 基因型占 0.4%~1.1%，E3/E3 基因型占 65.43%~70.4%，E4/E4 基因型占 0.7%~1.17%，E2/E3 基因型占 12.28%~16%，E2/E4 基因型占 0.58%~3.1%，E3/E4 基因型占 12.8%~16.34%。研究表明，ApoE4 携带者患冠心病的风险高达 40%，并且他汀类药物对 ApoE4 携带者往往疗效不佳或无疗效，而对 ApoE2 携带者的降脂作用最强。SLC01B1 基因编码的有机阴离子转运多肽 (OATP1B1) 在他汀类药物代谢中负责将血液中药物转移至肝脏，直接发挥药效或代谢转化为有活性的物质。研究表明，c. 388A>G 和 c. 521T>C 是 SLC01B1 基因常见的两种多态性类型，可以形成 4 种单倍型。c. 388A>G 和 c. 521T>C 的突变型可引起 OATP1B1 转运蛋白活力减弱，表现为肝脏摄取药物能力降低，引起他汀类药物血药浓度上升，增加横纹肌溶解症或肌病的发生风险。研究显示，中国人中，SLC01B1 *1a/*1a 基因型占 5.7%~9.0%，*1a/*1b 基因型占 27.9%~32.56%，*1b/*1b 基因型占 36.9%~48.1%，*1a/*5 占比约 0.1%，*1b/*5 占比约 1.9%，*1a/*15 占 2.8%~6.3%，*1b/*15 占比约 10.4%~18%，*5/*15 占约 0.2%，*15/*15 占约 0.9%~1.8%。

【检验原理】

本试剂盒针对 CYP2C19、ALDH2、ApoE 和 SLC01B1 四个基因八个位点的多态性检测，设计特异性多重 PCR 引物和多重延伸引物，以人基因组 DNA 为模板，在一个反应体系内对多重 PCR 引物所在区域进行同时扩增，扩增产物以 SAP 酶去除多余 dNTPs，然后对待检位点同时进行单碱基延伸，位点特异性的延伸引物将在突变位点处延伸一个碱基并终止。延伸引物将根据突变类型的差异而连接上不同的 ddNTPs，形成分子量差异。

再选用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）技术将样品分散在基质分子中并形成晶体。当用激光照射晶体时，基质从激光中吸收能量，样品解吸附，基质-样品之间发生电荷转移使得样品分子电离，电离的样品在电场作用下飞过真空的飞行管，根据到达检测器的飞行时间不同而被检测，即通过离子的质量电荷之比（M/Z）与离子的飞行时间成正比来分析离子，并测得样品分子的分子量。例如，检测 DNA 样品时，DNA 离子按其质量大小先后通过检测器，DNA 片段越短，越早到达检测器。

下图为本试剂盒的检测步骤简图。本试剂盒包含 C8 野生型质控品 A、C8 野生型质控品 B、C8 杂合型质控品及空白对照，用来监测试验环节及数据分析环节的随机误差和系统误差。



【主要组成成分】

组分名称	规格	数量	主要成分
C8 PCR 反应混合液	257 μ L/管	1 管	10% 1, 3 - 丙二醇, 1%硫酸铵, 脱氧胸腺嘧啶核苷, 脱氧胞嘧啶核苷, 脱氧腺嘌呤核苷, 脱氧鸟苷, 脱氧尿嘧啶核苷, PCR 引物
PCR 酶混合液	32 μ L/管	1 管	Taq 酶, UNG 酶
SAP 反应混合液	164 μ L/管	1 管	1%三羟甲基氨基甲烷盐酸盐, 1%氯化镁
SAP 酶混合液	29 μ L/管	1 管	虾碱性磷酸酶
C8 延伸反应混合液	160 μ L/管	1 管	1%三羟甲基氨基甲烷盐酸盐, 1%硫酸铵, 1%氯化钾, 双脱氧核苷, 延伸引物
延伸酶混合液	33 μ L/管	1 管	延伸酶, 50%甘油
C8 野生型质控品 A	15 μ L/管	1 管	c. 521T>C、c. 1510G>A、c. 636G>A、c. 681G>A 野生型人细胞系 DNA
C8 野生型质控品 B	15 μ L/管	1 管	c. 388A>G、c. 388T>C、c. -806C>T、c. 526C>T 野生型人细胞系 DNA

C8 杂合型质控品	15 μL/管	1 管	c. 521T>C、c. 1510G>A、c. 636G>A、c. 681G>A、 c. 388A>G、c. 388T>C、c. -806C>T、c. 526C>T 野生型大肠杆菌质粒与 c. 521T>C、c. 1510G>A、 c. 636G>A、c. 681G>A、c. 388A>G、c. 388T>C、 c. -806C>T、c. 526C>T 纯合突变型大肠杆菌质粒 混合液
空白对照	15 μL/管	1 管	TE 缓冲液

不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。

配套软件：DP-TOF 随机软件（浙江迪谱诊断技术有限公司，版本号：V1）

检测必须但试剂盒中不包含的组分及耗材：

1. 1.5mL 离心管或 0.6mL 离心管（用于配制 PCR 反应液和 DNA 提取）；
2. 8 联 PCR 管或 96 孔 PCR 板；
3. 384 孔 PCR 反应板、带滤塞的吸头（1mL、200 μL 和 10 μL）；
4. 全血基因组 DNA 提取试剂盒：推荐使用江苏康为世纪生物股份有限公司生产的核酸提取或纯化试剂（备案号：苏泰械备 20190215 号，货号：CWY049S）或江苏康为世纪生物股份有限公司生产的核酸提取或纯化试剂（备案号：苏泰械备 20200578 号，货号：CWY091S）；
5. 纯化水（高浓度样本稀释用、延伸产物稀释）。
6. 脱盐树脂（生产企业：Agena Bioscience, Inc., 货号：08060）
7. 质谱芯片（生产企业：Agena Bioscience, Inc., 货号：10500D）

【储存条件及有效期】

1. 试剂盒于 -20℃ ± 5℃ 保存，有效期 12 个月。

检测试剂盒反复冻融次数不得超过 5 次。开瓶后半年内稳定。

2. 生产日期和失效日期见产品标签。

【适用仪器】

飞行时间质谱检测系统（生产厂家：浙江迪谱诊断技术有限公司，型号：DP-TOF，浙械注准 20202220910）

PCR 扩增仪（生产厂家：Life Technologies Holdings Pte Ltd，型号：Veriti™ Dx 96 well Thermal Cycler）

【样本要求】

1. 标本：静脉全血
2. 采集：采集受检者静脉血不小于 1mL，注入含 EDTA 抗凝剂的采血管，使抗凝剂与静脉血充分混匀。
3. 保存：经上述处理后的待测样本可立即用于检测；10~30℃放置不超过 24 小时，2~8℃放置不超过一周；-20±5℃以下保存不超过 6 个月。具体要求参照核酸提取试剂说明书。
4. 运输：样本运送采用冰壶加冰或泡沫箱加冰袋密封进行运输。

【检验方法】

1. 样本准备（样本处理区）

使用核酸提取或纯化试剂提取全血样本基因组 DNA 和空白对照，具体操作可根据核酸提取试剂盒说明书进行，所提取 DNA 需用紫外分光光度计测定浓度和纯度，DNA 的 A260/280 要求在 1.6-2.1 之间，样本 DNA 浓度范围要求为 1ng/μL~100ng/μL。

DNA 保存期限：提取后的 DNA 样本-20±5℃以下保存不超过两年，避免反复冻融，浓度和纯度均满足以上要求后可使用。

2. PCR 试剂配制（试剂准备区）

从试剂盒中取出 PCR 反应混合液和 PCR 酶混合液，在室温下融化并振荡混匀后，2000rpm 离心 10sec。计算需准备反应试剂人份数[n=样本数+4（3 个质控品+1 个空白对照）]。

每个测试反应体系配制如下：

试 剂	PCR 反应混合液	PCR 酶混合液
用 量	2.675 μL	0.325 μL

计算上述各试剂的使用量，充分混匀后，按 3 μL 量分装到 PCR 反应管中，转移至样本处理区。

3. 上样（样本处理区）

分别加入 2 μL 的 C8 野生型质控品 A，C8 野生型质控品 B，C8 杂合型质控品，空白对照（若空白对照参与样本平行提取则加入空白对照提取物），样品 DNA 溶液，盖紧反应管，转移至检测区。

4. PCR 扩增（核酸扩增区）

将各反应管按一定顺序放入 PCR 仪上，按以下程序进行 PCR 扩增：

步 骤	温 度	时 间	循 环 数
1	30℃	10min	1
2	95℃	2min	1
3	95℃	30sec	45
	60℃	30sec	
	72℃	1min	
4	72℃	5min	1
4℃保温*			

*注：PCR 产物暂时不进行下一步实验操作，可 4℃ 保存不超过 12h。

5. SAP 试剂配制（试剂准备区）

从试剂盒中取出 SAP 反应混合液和 SAP 酶混合液，在室温下融化并振荡混匀后，2000rpm 离心 10sec。计算需准备反应试剂人份数 $[n = \text{样本数} + 4 \text{（3 个质控品} + 1 \text{ 个空白对照）}]$ 。

每个测试反应体系配制如下：

试 剂	SAP 反应混合液	SAP 酶混合液
用 量	1.7 μ L	0.3 μ L

6. 加样（核酸扩增区）

向 4 的 PCR 产物中分别加入 2 μ L 的上述 SAP 反应液，盖紧反应管。

将各反应管按一定顺序放入 PCR 仪上，按以下程序进行 SAP 消化：

步骤	温度	时间	循环数
1	37℃	40 min	1
2	85℃	5 min	1
4℃保温*			

*注：SAP 产物应立即进行下一步操作。

7. 延伸试剂配制（试剂准备区）

从试剂盒中取出延伸反应混合液和延伸酶混合液，在室温下融化并振荡混匀

后，2000rpm 离心 10sec。计算需准备反应试剂人份数 $[n=样本数+4(3个质控品+1个空白对照)]$ 。

每个测试反应体系配制如下：

试 剂	延伸反应混合液	延伸酶混合液
用 量	1.66 μ L	0.34 μ L

8. 加样（核酸扩增区）

按一定顺序向 6 的 SAP 产物中分别加入 2 μ L 的上述延伸反应液，盖紧反应管。将各反应管按一定顺序放入 PCR 仪上，按以下程序进行延伸扩增：

步骤	温度	时间	循环数
1	95℃	30 sec	1
2	95℃	5 sec	1 5 1
	52℃	5 sec	
	80℃	5 sec	
3	72℃	3 min	1
4℃保温*			

*注：延伸产物暂不进行下一步实验操作，可 4℃保存不超过 12h。

9. 质谱检测

■ 飞行时间质谱检测系统随机软件参数设置：

打开 DP-TOF 随机软件（版本号 V1）。

1) 打开 Assay Editor 软件新建 Assay 项目，并将 C8-assay 文件（见附录 1）导入到项目，最后保存到系统中；

2) 打开 SpectroACQUIRE 界面，进行程序设置：

参数	设置	参数	设置	参数	设置
启动点样状态	400	树脂体积	10	激光脉冲次数	30
最大采集次数	9	最少优质光谱次数	5	最多优质光谱次数	5
质谱分析结束后自动关闭电源	√（选择）	滤波器饱和拍摄	√（选择）	芯片类型	SpectroCHIP CPM-384
添加树脂到板 1	根据需要选择	添加树脂到板 2	根据需要选择	转移样本到芯片上	√（选择）
转移芯片到	√（选择）	分析芯片	√（选择）	冷却板	√（选择）

分析仪					设置值 14
芯片加热	√ (选择) 设置值 30	化学	iPLEX		

3) 打开 GTReport: 角度参数设置, 其中 c. 681G>A、c. 636G>A、c. -806C>T、c. 521T>C 的分型参数使用默认参数, 默认参数为 HighMass (0-0.2)、Hetero (0.5-0.2)、LowMass (1.0-0.2), 其他位点 c. 1510G>A、c. 388T>C、c. 526C>T、c. 388A>G 使用 C8-GT_Assay_Angles.csv (见附录 2) 的参数, 复制 C8-GT_Assay_Angles.csv 文件中全部内容, 将文件 (Plate Manager\bin\Reports\GT Report\Assay Angle Files 中 GT_Assay_Angles.csv) 中内容全部进行替换; 峰高与延伸率判断使用 C8-GTReport_default_settings.txt (见附录 3) 的参数, 复制 C8-GTReport_default_settings.txt 文件中全部内容, 将文件 (Plate Manager\bin\Reports\GT Report 中 GTReport_default_settings.txt) 中内容全部替换。

以上参数设置具体原则如下:

当等位基因的峰高>1.5, 延伸率>0.15 (等位基因延伸率=两种等位基因峰高的总和/(延伸引物 UEP 峰高+两种等位基因峰高的总和)), 且等位基因频率满足下列要求即判断为相应的检测结果(等位基因频率=低分子量的等位基因峰高/两种等位基因峰高的总和), 否则检测结果为 NA, 即未检测到基因型结果:

编号	基因多态性	基因型	低分子量等位基因	DP-TOF 频率范围	检测结果判断
1	c. 681G>A	野生型	G	0.80-1.00	G
		杂合突变型		0.30-0.70	G/A
		纯合突变型		0-0.20	A
2	c. 636G>A	野生型	G	0.80-1.00	G
		杂合突变型		0.30-0.70	G/A
		纯合突变型		0-0.20	A
3	c. -806C>T	野生型	C	0.80-1.00	C
		杂合突变型		0.30-0.70	C/T
		纯合突变型		0-0.20	T

4	c. 1510G>A	野生型	G	0.85-1.00	G
		杂合突变型		0.25-0.75	G/A
		纯合突变型		0-0.15	A
5	c. 388T>C	野生型	C	0-0.08	T
		杂合突变型		0.10-0.70	C/T
		纯合突变型		0.90-1.00	C
6	c. 526C>T	野生型	C	0.90-1.00	C
		杂合突变型		0.15-0.85	C/T
		纯合突变型		0-0.10	T
7	c. 521T>C	野生型	C	0-0.20	T
		杂合突变型		0.30-0.70	C/T
		纯合突变型		0.80-1.00	C
8	c. 388A>G	野生型	G	0-0.15	A
		杂合突变型		0.20-0.80	G/A
		纯合突变型		0.85-1.00	G

注：以上判断标准已通过质谱检测参数进行相应设置，使用人员不需进行额外分析判断。

■ 质谱检测操作：按照飞行时间质谱检测系统操作说明书进行标准操作（扩增分析区），将 8 的产物每孔加入 16 μ L 纯化水后，转移至 384 孔 PCR 反应板中，进行质谱检测。

■ 检测结果查看：根据飞行时间质谱检测系统随机软件分析结果，在 PlateManager 中选择“文件”>“报告”>“指定报告”，将出现过去一年运行该指定报告的所有板，勾选要生成报告的板，点击“确定”，报告生成在 PlateManager/bin/PMReports/PanelName 文件夹下，生成的报告如下。

Report Date	2020/4/10								
Report Time	17-14-39								
Plate Names	2020041002								
Results									
Sample Id	Location	ALDH2_c.1510	ApoE_c.388	ApoE_c.526	CYP2C19_c.-806	CYP2C19_c.636	CYP2C19_c.681	SLCO1B1_c.388	SLCO1B1_c.521
NEGA	2020041002-N21	G	C/T	C	T	G	G	G/A	T
NEGB	2020041002-O21	G	T	C	C	G	G/A	A	T
NTC	2020041002-M22	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
POS	2020041002-P21	G/A	C/T	C/T	C/T	G/A	G/A	G/A	C/T

【阳性判断值】

每次试验应同时满足 C8 杂合型质控品、C8 野生型质控品 A、C8 野生型质控品 B 检测结果与以下位点信息一致，空白对照 8 个位点检测结果均为 NA。否则试验结果视为无效，需重新检测。

1) C8 杂合型质控品位点信息：

编号	基因多态性	位点信息
1	c. 681G>A	G/A
2	c. 636G>A	G/A
3	c. -806C>T	C/T
4	c. 1510G>A	G/A
5	c. 388T>C	C/T
6	c. 526C>T	C/T
7	c. 521T>C	C/T
8	c. 388A>G	G/A

2) C8 野生型质控品 A 位点信息：

编号	基因多态性	位点信息
1	c. 681G>A	G
2	c. 636G>A	G
3	c. 1510G>A	G
4	c. 521T>C	T

3) C8 野生型质控品 B 位点信息：

编号	基因多态性	位点信息
1	c. -806C>T	C
2	c. 388T>C	T
3	c. 526C>T	C
4	c. 388A>G	A

【检验结果的解释】

按照下表对样本检测结果进行判定，确定基因多态性，若样本检测结果为 NA，则该样本需重新进行检测，必要时重新提取基因组 DNA 进行检测。

编号	基因	位点	质谱检测结果		
			野生型	杂合突变型	纯合突变型
1	CYP2C19	c. 681G>A	G	G/A	A
2		c. 636G>A	G	G/A	A
3		c. -806C>T	C	C/T	T
4	ALDH2	c. 1510G>A	G	G/A	A
5	APOE	c. 526C>T	C	C/T	T
6		c. 388T>C	T	C/T	C
7	SLC01B1	c. 521T>C	T	C/T	C
8		c. 388A>G	A	G/A	G

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考,对测试者的临床诊治应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
2. 不合理的样本采集、转运、储存及处理过程均有可能导致错误的检测结果。
3. 未经验证的其他干扰或 PCR 抑制因子可能会导致假阴性结果。

【产品性能指标】

1. 本试剂盒应包装完整、组分齐全。组分标识清楚明确,离心管内试剂融化后,液体组分应澄清透明,无絮状物。
2. 准确性:对 10 份 C8 准确性参考品 P1-P10 进行检测,检测结果均应为相应基因型别。
3. 特异性:对 8 份 C8 特异性参考品 N1-N8 进行检测,N1-N6 检测结果均应为相应基因型别,N7-N8 检测结果均应为无结果。
4. 检测限:对浓度不高于 1ng/μL 的 10 份 C8 检测限参考品 S1-S10 进行检测,结果均应为阳性且符合相应基因型别。
5. 重复性:对 5 份 C8 重复性参考品 J1-J5 各测定 10 次,10 次检测结果应一致且符合相应基因型别。
6. 2g/L 血红蛋白、342 μM 胆红素、37mM 脂类(甘油三酯)干扰物质,对检测结果未见有干扰。
7. 阿莫西林、快克复方氨酚烷胺胶囊、氯吡格雷、硝酸甘油、辛伐他汀、普伐他

汀药物，对检测结果未见有干扰。

8. 临床试验结果:

申请人在中南大学湘雅医院、杭州市第一人民医院、南昌大学第一附属医院、新疆医科大学第一附属医院共 4 家机构完成了临床试验。采用试验用体外诊断试剂与已上市同类产品进行比较研究试验，验证本产品的临床性能。入组样本为有合并使用氯吡格雷、他汀类药物和硝酸甘油需求的冠心病患者，共计 1308 例。

针对 CYP2C19 的 c. 681G>A 位点，共纳入 607 例突变样本和 701 例野生型样本。试验结果显示，本产品与对比试剂针对突变型的符合率为 100% (95%CI: 99.4%, 100%)，针对野生型的符合率为 100% (95%CI: 99.5%, 100%)，总符合率为 100% (95%CI: 99.7%, 100%)。对 CYP2C19 的 c. 636G>A 位点，共纳入 151 例突变样本和 1157 例野生型样本。试验结果显示，本产品与对比试剂针对突变型的符合率为 100% (95%CI: 97.5%, 100%)，针对野生型的符合率为 100% (95%CI: 99.7%, 100%)，总符合率为 100% (95%CI: 99.7%, 100%)。

针对 CYP2C19 的 c. -806C>T 位点，共纳入 131 例突变样本和 1177 例野生型样本。试验结果显示，本产品与对比试剂针对突变型的符合率为 100% (95%CI: 97.2%, 100%)，针对野生型的符合率为 100% (95%CI: 99.7%, 100%)，总符合率为 100% (95%CI: 99.7%, 100%)。

针对 ALDH2 的 c. 1510 G>A 位点，共纳入 413 例突变样本和 895 例野生型样本。试验结果显示，本产品与对比试剂针对突变型的符合率为 100% (95%CI: 99.1%, 100%)，针对野生型的符合率为 100% (95%CI: 99.6%, 100%)，总符合率为 100% (95%CI: 99.7%, 100%)。

针对 ApOE 的 c. 526 C>T 位点，共纳入 182 例突变样本和 1126 例野生型样本。试验结果显示，本产品与对比试剂针对突变型的符合率为 100% (95%CI: 97.9%, 100%)，针对野生型的符合率为 100% (95%CI: 99.7%, 100%)，总符合率为 100% (95%CI: 99.7%, 100%)。

针对 ApOE 的 c. 388 T>C 位点，共纳入 278 例突变样本和 1030 例野生型样本。试验结果显示，本产品与对比试剂针对突变型的符合率为 100% (95%CI: 98.6%, 100%)，针对野生型的符合率为 100% (95%CI: 99.6%, 100%)，总符合率为 100% (95%CI: 99.7%, 100%)。

针对 SLC01B1 的 c. 521 T>C 位点, 共纳入 236 例突变样本和 1072 例野生型样本。试验结果显示, 本产品与对比试剂针对突变型的符合率为 100% (95%CI: 98.4%, 100%), 针对野生型的符合率为 100% (95%CI: 99.5%, 100%), 总符合率为 100% (95%CI: 99.7%, 100%)。

针对 SLC01B1 的 c. 388 A>G 位点, 共纳入 1136 例突变样本和 172 例野生型样本。试验结果显示, 本产品与对比试剂针对突变型的符合率为 100% (95%CI: 99.7%, 100%), 针对野生型的符合率为 100% (95%CI: 97.8%, 100%), 总符合率为 100% (95%CI: 99.7%, 100%)。

【注意事项】

1. 有关实验室管理规范请严格按照行业行政主管部门颁布的有关基因扩增检验实验室的管理规范执行。
2. 本试剂盒仅用于体外检测。
3. 实验室严格分区操作:
 - 第一区: 试剂准备区-准备扩增所需试剂
 - 第二区: 样本处理区-待检测样本的处理
 - 第三区: 核酸扩增区-核酸扩增、SAP 消化、延伸反应和产物转板
 - 第四区: 扩增分析区-待测样本质谱检测与分析
4. 各区物品均为专用, 不得交换使用, 避免污染, 每次实验完后立即清洁工作台。
5. 使用一次性手套、一次性专用离心管、自卸式移液枪和带滤芯吸头。
6. 反应液分装时应尽量避免产生气泡, 上机前注意检查各反应管是否盖紧, 以免物质泄露污染仪器
7. 加样时应使样品完全加入反应液中, 不应有样品粘附于管壁上, 加样后应尽快盖紧管盖。
8. 扩增完毕请立即取出反应管, 密闭在专用塑料袋中, 放于指定地点, 等待统一处理。
9. 实验中用过的吸头请直接打入盛有 1% 的次氯酸钠的废物缸内, 并与其他废弃物一同灭菌后丢弃。
10. 工作台及各种实验用品应定期用 1% 的次氯酸钠、75% 酒精或紫外灯进行消毒。

【参考文献】

- [1] 冠心病合理用药指南（第2版）
- [2] 急性冠脉综合征急诊快速诊治指南（2019）
- [3] Chen, Lingling, et al. "Genetic polymorphism analysis of CYP2C19 in Chinese Han populations from different geographic areas of mainland China." (2008): 691-702.
- [4] Hu, Li-Ming, et al. "Genetic polymorphisms and novel allelic variants of CYP2C19 in the Chinese Han population." *Pharmacogenomics* 13.14 (2012): 1571-1581.
- [5] Wang, Shu-Mei, et al. "Frequencies of genotypes and alleles of the functional SNPs in CYP2C19 and CYP2E1 in mainland Chinese Kazakh, Uygur and Han populations." *Journal of human genetics* 54.6 (2009): 372.
- [6] Zhou, Q., et al. "Genetic polymorphism, linkage disequilibrium, haplotype structure and novel allele analysis of CYP2C19 and CYP2D6 in Han Chinese." *The pharmacogenomics journal* 9.6 (2009): 380.
- [7] Zhong, Zhixiong, et al. "Genetic polymorphisms of the mitochondrial aldehyde dehydrogenase ALDH2 gene in a large ethnic Hakka population in Southern China." *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* 24 (2018): 2038.
- [8] Xu, Lin-yong, et al. "Organic anion transporting polypeptide-1B1 haplotypes in Chinese patients." *Acta Pharmacologica Sinica* 28.10 (2007): 1693.
- [9] Kim, Eun-Young, et al. "Duplex pyrosequencing assay of the 388A>G and 521T>C SLCO1B1 polymorphisms in three Asian populations." *Clinica Chimica Acta* 388.1-2 (2008): 68-72.
- [10] Ban, Chun-xia, et al. "Enhanced diabetes susceptibility in community dwelling Han elders carrying the Apolipoprotein E 3/3 genotype." *PloS one* 11.3 (2016): e0151336.
- [11] Han, ShuYi, et al. "Serum apolipoprotein E concentration and polymorphism influence serum lipid levels in Chinese Shandong Han population." *Medicine* 95.50 (2016).

【基本信息】

注册人/生产企业名称：浙江迪谱诊断技术有限公司

住所：浙江省余杭经济技术开发区兴中路 355 号 9 号楼二楼

联系方式：

售后服务单位名称：浙江迪谱诊断技术有限公司

联系方式：

生产地址：浙江省余杭经济技术开发区兴中路 355 号 9 号楼二楼

生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准日期及修改日期】

附录 1: C8-Assay

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
WELL	TERM	SNP_ID	2nd-PCR	1st-PCR	AMP_LEN	UP_CONF	MP_CONF	Tm	PcGC	PWARN	UEP_DIR	UEP_MASS	UEP_SEQ	EXT1_CALL
W1	iPLEX	ApoE_c.388	PGX8	PGX8	122	75.1	66.5	45.7	60	D	F	5564.6	PGX8	C
W1	iPLEX	ALDH2_c.1510	PGX8	PGX8	112	97.5	66.5	47.4	36.8		R	5697.7	PGX8	G
W1	iPLEX	CYP2C19_c.681	PGX8	PGX8	172	83.7	66.5	45.7	35	d	R	6153	PGX8	G
W1	iPLEX	CYP2C19_c.636	PGX8	PGX8	95	93	66.5	51.1	50		R	6357.1	PGX8	G
W1	iPLEX	CYP2C19_c.-806	PGX8	PGX8	106	79.5	66.5	45.8	42.1		F	6652.3	PGX8	C
W1	iPLEX	SLCO1B1_c.388	PGX8	PGX8	105	75	66.5	45.5	27.3		R	6794.4	PGX8	G
W1	iPLEX	ApoE_c.526	PGX8	PGX8	91	70.9	66.5	49.5	66.7	dSH	F	7098.7	PGX8	C
W1	iPLEX	SLCO1B1_c.521	PGX8	PGX8	91	98.6	66.5	45.6	38.1	H	F	7397.8	PGX8	C

	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
WELL	EXT1_MASS	EXT1_SEQ	EXT2_CALL	EXT2_MASS	EXT2_SEQ	EXT3_CALL	EXT3_MASS	EXT3_SEQ	EXT4_CALL	EXT4_MASS	EXT4_SEQ	1stPAUSE
W1	5811.8	PGX8	T	5891.7	PGX8							
W1	5944.9	PGX8	A	6024.8	PGX8							
W1	6400.2	PGX8	A	6480.1	PGX8							
W1	6604.3	PGX8	A	6684.2	PGX8							
W1	6899.5	PGX8	T	6979.4	PGX8							
W1	7041.6	PGX8	A	7121.5	PGX8							
W1	7345.9	PGX8	T	7425.8	PGX8							
W1	7645	PGX8	T	7724.9	PGX8							

附录 2: C8-GT_Assay_Angles.csv

Assay	HighMass	Hetero	LowMass
ApoE_c. 388	T (0-0.08)	C/T (0.4-0.3)	C (1.0-0.1)
ALDH2_c. 1510	A (0-0.15)	G/A (0.5-0.25)	G (1.0-0.15)
ApoE_c. 526	T (0-0.1)	C/T (0.5-0.35)	C (1.0-0.1)
SLC01B1_c. 388	A (0-0.15)	G/A (0.5-0.3)	G (1.0-0.15)

备注：其他位点为默认。

附录 3: C8- GTReport_default_settings.txt

peak_intensity_type, 0

min_allele_int, 1.5

min_allele_prob, 0.8

min_product_int, 0.4

min_ext_rate, 0.15

max_call_penalty, 1.0

assay_angles_file path, ./Assay Angle Files/GT_Assay_Angles.csv

customized_calling, 1