

受理号：CSZ2200011

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称： α 和 β 地中海贫血基因检测试剂盒
(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：华大生物科技(武汉)有限公司

国家药品监督管理局

医疗器械技术审评中心

目 录

基本信息.....	3
一、 申请人名称.....	3
二、 申请人住所.....	3
三、 生产地址.....	3
技术审评概述.....	4
一、 产品概述.....	4
二、 临床前研究概述.....	7
三、 临床评价概述.....	13
四、 产品受益风险判定.....	14
综合评价意见.....	16

基本信息

一、申请人名称

华大生物科技（武汉）有限公司

二、申请人住所

武汉市东湖新技术开发区高新大道 666 号武汉国家生物
产业基地项目 B、C、D 区研发楼 B2 栋

三、生产地址

武汉市东湖新技术开发区高新大道 666 号武汉国家生物产
业基地项目 B、C、D 区研发楼 B2 栋五楼、B1 栋一楼

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

表 1 主要组成成分

包装盒	试剂	主要组分
	PCR 反应液	硫酸铵、氯化镁、二硫苏糖醇、三羟甲基氨基甲烷
	PCR 反应酶	Taq 酶
	末端修复缓冲液	氯化镁、二硫苏糖醇、三羟甲基氨基甲烷、三磷酸脱氧核糖核苷
	末端修复酶	T4 多聚核苷酸磷酸激酶、Klenow 片段、rTaq 聚合酶
包装盒 1	加“A”缓冲液	氯化钠、氯化镁、二硫苏糖醇、三磷酸脱氧核糖核苷
	加“A”酶	Klenow (3'-5' exo-)
	连接缓冲液	氯化镁、二硫苏糖醇、三羟甲基氨基甲烷、三磷酸腺苷
	连接酶	连接酶
	阳性对照品 1	中国型 Gy+(Aγδβ)0 缺失杂合 DNA

	阳性对照品 2	$\alpha\alpha/\alpha^{3.7}$ 缺失型 DNA
	阳性对照品 3	Hb Constant Spring 杂合突变型 DNA
	阳性对照品 4	Codons 41/42 (-TTCT) beta0 杂合突变型 DNA
	阴性对照品	地贫阴性 DNA
	测序接头 1-20	寡聚脱氧核苷酸
	平衡文库	DNA 文库 (2ng/ μ L)
包装盒 2	PCR 引物 1	寡聚脱氧核苷酸
	PCR 引物 2	寡聚脱氧核苷酸
	PCR 引物 3	寡聚脱氧核苷酸
	PCR 引物 4	寡聚脱氧核苷酸
包装盒 3	磁珠 1	纳米磁珠
	磁珠 2	纳米磁珠
	洗脱缓冲液	Tris-HCl 缓冲液、EDTA

其他内容详见产品说明书

(二) 产品预期用途

本试剂盒用于文库构建,采用高通量测序技术(联合探针锚定聚合测序法)定性检测人外周血样本中基因组 DNA 的 4 种 α -地贫缺失型、2 种 β -地贫缺失型、3 种 α -地贫非缺失型和 16 种 β -地贫非缺失型。用于 α 和/或 β 地贫的辅助诊断

(遗传诊断)。本试剂盒检测结果不作为地中海贫血临床诊断的唯一依据，仅供临床参考。

表 2 试剂盒检测的地中海贫血基因变异信息

α-地贫 缺失型	--SEA	β-地贫 非缺失 型	Initiation codon (ATG>AGG) beta0
	-α ^{3.7}		Codons 14/15 (+G) beta0
	-α ^{4.2}		Codon 17 (A>T) beta0
	--THAI		Hb E beta+
β-地贫 缺失型	SEA-HPFH		Codons 27/28 (+C) beta0
	中国型 Gγ+(Aγδβ)0		IVS-I-1 (G>T) beta0
α-地贫 非缺失 型	Hb Constant Spring		Codon37 (TGG>TAG) beta0
	Hb Quang Sze		Codons 41/42 (-TTCT) beta0
	Hb Westmead		Codon 43 (G>T) beta0
β-地贫 非缺失 型	-90 (C>T) beta+		Codons 71/72 (+A) beta0
	-29 (A>G) beta+		IVS-II-5 (G>C) beta+
	-28 (A>G) beta+		-50 (G>A) beta+
			IVS-II-654 (C>T) beta+

(三) 产品包装规格

1152 人份/盒

(四) 产品检验原理

根据 α-地贫和 β-地贫发生相关的 HBA1、HBA2 和 HBB 三个基因的特点设计一系列引物，以实现基因的有效扩增。利用多重 PCR 技术将样本中的 HBA1、HBA2 和 HBB 基因扩增富集并同时引入用于样本识别的标签序列。将多例 (≤

96 例) 样本的 PCR 产物按一定比例混合成一个文库, 经过一系列的文库制备过程, 每个文库中的样本 DNA 序列都加上了用于测序及文库识别的接头序列。将制备好的文库等质量比例上机测序, 使用基因测序仪通过联合探针锚定聚合测序技术对各文库中的样本 DNA 进行序列信息读取。每一条 DNA 的测序结果经过文库接头序列、样本标签序列和引物序列比对拆分后将被精确定位到每一个样本的每一个扩增区域中。将每个样本的目标区域的测序结果与以 GRCh37 基因组序列为参考构建的目标参考序列进行比对分析, 再通过变异检测、阳性判断值以及来自于 HbVar (2017 年 10 月版) 和 Ithamet 数据库 (2017 年 10 月版) 的变异坐标信息与变异名称信息, 判断样本中是否存在地贫基因变异以及何种变异。

二、临床前研究概述

(一) 主要原材料

1. 主要原材料的选择

试剂盒主要原材料包括: PCR 标签引物、PCR 反应液、PCR 反应热启动酶、测序接头、末端修复缓冲液、T4 多聚核苷酸磷酸激酶、T4 DNA 聚合酶 (rTaq 聚合酶)、Klenow Fragment、加“A”酶、连接酶、磁珠、阳性对照品、阴性对照品等。主要原材料均为外购方式获得。PCR 标签引物和测序接头为申请人自行设计后由专业的合成公司合成。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标准并经检验合格。

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、重复性参考品、精密度参考品、检测限参考品。阳性参考品 37 份，由外周血样本和细胞系样本组成，样本涵盖该产品可检出的所有变异类型的杂合型；阴性参考品 14 份，由外周血样本和细胞系样本组成，包含无变异样本、产品检测范围外的地贫变异类型样本及同源序列变异样本；重复性参考品 5 份，均为细胞系样本，涵盖产品可检出的 4 种代表性变异类型和 1 份无变异的阴性样本；精密度参考品 5 份，为包含弱阳性浓度水平在内不同浓度水平和无变异的外周血样本；检测限参考品 4 份，均为细胞系样本，每份检测限参考品做高、中、低 3 个水平的梯度稀释，涵盖该产品可检出的 4 种代表性变异类型；检测限参考品 37 份，由细胞系样本和外周血样本组成，包含产品可检出的所有变异类型的最低检出限水平。

试剂盒包含 4 份阳性对照品和 1 份阴性对照品，用于检测过程的质量控制。阴阳性对照品均为细胞系样本，阳性对照品涵盖该产品可检出的 4 种代表性变异类型，阴性对照品为无变异样本。

(二) 生产工艺及反应体系研究

申请人通过对多重 PCR 反应引物配比、PCR 反应标签引物用量、PCR 反应体系和反应条件、PCR 产物混合比例、阳性对照检测方式、文库制备起始量、纯化磁珠用量、打断参数、末端修复反应体系、末端修复反应时间、加 A 反应体系、连接反应体系、筛选磁珠用量、样本有效序列数、上机文库数等条件进行筛选和优化，通过功能性试验，最终确定了最佳的生产工艺与反应体系。

（三）分析性能评估

分析性能评估包括核酸提取试剂性能研究、准确度、重复性、精密度、分析特异性、分析灵敏度等性能评估。

针对核酸提取试剂性能研究，申请人采用临床样本平行比较了核酸纯化试剂和核酸提取试剂的提取性能，通过对比提取所得 DNA 的浓度和纯度，确定核酸提取试剂为该产品的配套提取试剂。

准确度评估中，申请人分别在两种适配机型（基因测序仪（MGISEQ-2000）和基因测序仪（MGISEQ-200））上使用三批试剂盒对企业参考品盘中的 37 份阳性参考品进行检测，阳性符合率为 100%。另外，申请人分别在两种适配机型（基因测序仪（MGISEQ-2000）和基因测序仪（MGISEQ-200））上使用一批试剂盒对已知临床检测结果的临床样本进行检测，试剂盒检测范围内各变异类型的阳性符合率、阴性符合

率和总符合率均为 100%。

精密度评估中，申请人使用三批试剂盒对临界浓度 10 ng/ μ L 和中高浓度 15 ng/ μ L 的 5 份外周血样本和 1 份细胞系样本在两个实验室由两组操作者在不同适配机型（基因测序仪（MGISEQ-2000）和基因测序仪（MGISEQ-200））的不同仪器上进行检测，每个浓度的每个样本重复检测 3 次，连续检测 20 天。检测结果均与已知结果一致。

分析特异性评估中，申请人分别在两种适配机型（基因测序仪（MGISEQ-2000）和基因测序仪（MGISEQ-200））上使用三批试剂盒对企业参考品盘中的 14 份阴性参考品进行检测，阴性符合率为 100%；对 Hb Q-Thailand、Hb New York、Hb J-Bangkok 等具有同源性序列的血红蛋白异常样本和--FIL、- α 21.9、Hb Lepore-Boston-Washington 等检测范围外的地贫变异阳性样本进行检测，检测结果均为未检出检测范围内的基因变异；对梯度稀释的血红素、甘油三酯、胆红素、肝素钠、EDTA•K2、甲磺酸去铁胺、地拉罗司分散片、叶酸片和爱乐维（复合维生素片）、布洛芬、盐酸氨溴索、蒲地蓝消炎胶囊、头孢克肟干扰样本进行检测，检测结果表明，当 DNA 样本中血红素浓度 \leq 200g/L、甘油三酯浓度 \leq 1000 mg/dL、胆红素浓度 \leq 2 mg/dL、EDTA•K2 浓度 \leq 2.5 mg/mL、甲磺酸去铁胺浓度 \leq 1.6 mg/mL、地拉罗司浓度 \leq 1.6 mg/mL、

叶酸浓度 ≤ 0.38 mg/L、爱乐维(复合维生素)平均浓度 ≤ 35.6 mg/L、布洛芬浓度 ≤ 0.143 mg/mL、盐酸氨溴索浓度 ≤ 0.12 mg/mL、头孢克肟浓度 ≤ 0.286 mg/mL、蒲地蓝消炎胶囊浓度 ≤ 2.86 mg/mL时，干扰物质对试剂盒检测结果无明显影响，试剂盒具有较好的抗干扰能力。当样本中的肝素钠浓度在 2IU/mL 以上时，试剂盒检测失败率高，试剂盒不适用于检测肝素钠抗凝采血管采集的样本，样本采集应选用 EDTA·K2 抗凝采血管。

最低检测限研究中，申请人分别在两种适配机型（基因测序仪（MGISEQ-2000）和基因测序仪（MGISEQ-200））上进行了研究。首先选择产品可检出的 4 种代表性变异类型的细胞系样本进行梯度稀释，每个浓度梯度样本重复检测 3 次，将具有 100%检出率的最低浓度设定为预估最低检测限。之后，将包含所有申报位点的杂合型样本稀释至预估最低检测限浓度，每个样本重复检测 20 次，将检测结果为相应的基因型别且每个型别的检出率均 $\geq 95\%$ 时浓度，设定为最低检测限浓度。最后，申请人使用三批试剂盒对各个申报位点的杂合型样本进行重复检测 20 次，验证了最低检测限。

（四）阳性判断值

申请人使用该产品对 329 例已有地贫基因检测结果的临床样本进行检测，对非缺失型的阳性样本进行突变频率的统

计分析，基于理论杂合突变频率和纯合突变频率，利用 Tukey's 检验确定非缺失型的阳性判断值；对缺失型阳性样本和阴性样本进行归一化序列的统计分析，利用 k-medians 聚类算法确定缺失型的阳性判断值。

申请人使用该产品对 428 例已有地贫基因检测结果的临床样本进行阳性判断值的验证。结果显示阳性符合率、阴性符合率和总符合率均为 100%，Kappa 系数均为 1。建立的阳性判断值能准确判断检测范围内的 25 种地贫变异类型的阴、阳性。

（五）稳定性研究

为考核该产品在不同条件下性能的稳定性状况，为试剂盒的包装、运输、使用和保存条件的确定和有效期的建立提供依据，申请人进行了稳定性研究，包括效期稳定性、冻融稳定性等。研究结果表明：包装盒 1 与包装盒 2 置于 -18°C 以下保存，包装盒 3 置于 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存，有效期为 12 个月；包装盒 1、包装盒 2 冻融 6 次仍可有效检测；试剂盒每天开瓶 1 次连续开瓶 7 天、每 2 天开瓶 1 次连续 2 周、每周开瓶 1 次连续 4 周、每月开瓶 1 次 4 个月内开瓶小于 4 次仍可有效检测。

适用样本稳定性研究：为考察该产品对不同条件下储存不同时间的样本的检出性能，申请人使用该产品分别对短期

储存、长期储存的样本进行测试，最终确定外周血样本在室温下储存 9 天、在 2℃ ~ 8℃ 储存 14 天、在 -18℃ 以下储存 9 个月仍可有效检测；样本反复冻融次数应不超过 6 次；样本在 2℃ ~ 8℃ 运输时，运输时间不超过 8 天。

三、临床评价概述

申请人在郴州市第一人民医院、珠海市妇幼保健院、云南省第一人民医院共三家临床机构完成了临床试验。针对已有同类产品上市的基因型，采用试验体外诊断试剂与已上市同类产品进行比较研究；针对尚无同类产品上市的基因型，采用试验体外诊断试剂与 Sanger 测序法进行比较研究。临床试验的样本类型为外周血。入组病例包括具有地贫症状和/或体征的疑似地贫患者、血液学表现为小细胞低色素的疑似地贫患者、临床考虑为地贫携带者、需与地贫进行鉴别诊断的其他疾病患者等。对于尚无同类产品上市的基因型，提交了支持该基因型临床意义的临床试验资料及相关文献。

临床试验共入组受试者 1108 例。有效样本中阳性样本 1034 例。各基因型别的阳性样本情况如下： α -地贫缺失型 434 例， β -地贫缺失型 7 例， α -地贫非缺失型 252 例， β -地贫非缺失型 723 例。

临床试验结果显示，该产品检测范围内的 25 个基因型别的检测结果与对比试剂/Sanger 测序法相比的阳性符合率

均为 100%、阴性符合率均为 100%、总符合率均为 100%。

综上所述，该产品临床试验试剂符合《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》和《地中海贫血相关基因检测试剂注册技术审查指导原则》的相关要求。临床试验结果显示该产品与已上市同类产品一致性较好。

四、产品收益风险判定

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。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.本试剂盒的检测结果仅供临床参考，不能作为诊断的唯一依据。对患者的临床诊断应结合临床症状/体征、病史、其他实验室检查等情况综合考虑；

2.本试剂盒适用于人的外周血样本检测，不适用于其它样本检测；

3.本试剂盒可以对 4 种缺失型 α -地中海贫血、2 种缺失型 β -地中海贫血、3 种非缺失型 α -地中海贫血和 16 种非缺失型 β -地中海贫血进行检测，但仍有检测范围之外的变异，可能造成漏检，这类样本可用其他方法进一步验证。

4.不合理的样本采集、运送、处理、核酸过度降解以及未经验证的其他干扰或 PCR 抑制因子等均有可能导致假阴性或假阳性结果。

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，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 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，经系统评价后，建议准予注册。

2022 年 3 月 31 日

附件：产品说明书

α 和 β 地中海贫血基因检测试剂盒

（联合探针锚定聚合测序法）说明书

【产品名称】

α 和 β 地中海贫血基因检测试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）

【包装规格】

1152人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于文库构建，采用高通量测序技术（联合探针锚定聚合测序法）定性检测人外周血样本中基因组 DNA 的 4 种 α -地贫缺失型、2 种 β -地贫缺失型、3 种 α -地贫非缺失型和 16 种 β -地贫非缺失型。

用于 α 和/或 β 地贫的辅助诊断（遗传诊断）。本试剂盒检测结果不作为地中海贫血临床诊断的唯一依据，仅供临床参考。

表 1 试剂盒检测的地中海贫血基因变异信息

α -地贫 缺失型	--SEA	β -地贫 非缺失型	Initiation codon (ATG>AGG) beta0
	$-\alpha^{3.7}$		Codons 14/15 (+G) beta0
	$-\alpha^{4.2}$		Codon 17 (A>T) beta0
	--THAI		Hb E beta+
β -地贫 缺失型	SEA-HPFH		Codons 27/28 (+C) beta0
	中国型 $G\gamma+(A\gamma\delta\beta)0$		IVS-I-1 (G>T) beta0
α -地贫 非缺失型	Hb Constant Spring		Codon37 (TGG>TAG) beta0
	Hb Quong Sze		Codons 41/42 (-TTCT) beta0
	Hb Westmead		Codon 43 (G>T) beta0
β -地贫 非缺失型	-90 (C>T) beta+		Codons 71/72 (+A) beta0
	-29 (A>G) beta+		IVS-II-5 (G>C) beta+
	-28 (A>G) beta+		-50 (G>A) beta+
			IVS-II-654 (C>T) beta+

地中海贫血（以下简称“地贫”）是由珠蛋白基因缺陷引起的遗传性溶血性贫血，是全球分布最广、累积人群最多的一种单基因遗传病。据统计，全球地贫基因携带者约为总人口的 1.67%^[1]。在中国，地贫也是南方地区最为高发的遗传病之一，主要分布在长江以南的广东、广西、海南、云南、贵州、四川、重庆、湖南、江西、福建等 10 个省（市、自治区）。据 2016 年《中国地中海贫血蓝皮书》数据显示，我国南方地区地贫基因携带者达 3000 万人，其中重型和中间型地贫患者约 30 万人^[2]。地贫人口的出生尤其是中重度地贫患儿的出生给家庭

和社会医疗卫生事业带来沉重的负担。

地贫是一种基因病，基因检测是诊断地贫的金标准。据人类珠蛋白数据库（HbVar）和 Ithanel 数据库统计，目前全球已报道的 α 和 β 地贫变异类型超过 700 种^[34]。常见的地贫基因检测技术包括 Gap-PCR（裂口 PCR）、PCR-RDB（反向点杂交）、qPCR（实时荧光定量 PCR）、基因芯片、MLPA（多重连接探针扩增）、测序等。国内已通过食品药品监督管理局获批上市的试剂盒涉及的技术主要为 Gap-PCR、PCR-RDB、荧光 PCR 熔解曲线法和基因芯片。

【检测原理】

根据 α -地贫和 β -地贫发生相关的HBA1、HBA2和HBB三个基因的特点设计一系列引物，以实现基因的有效扩增。利用多重PCR技术将样本中的HBA1、HBA2和HBB基因扩增富集并同时引入用于样本识别的标签序列。将多例（ ≤ 96 例）样本的PCR产物按一定比例混合成一个文库，经过一系列的文库制备过程，每个文库中的样本DNA序列都加上了用于测序及文库识别的接头序列。将制备好的文库等质量比例上机测序，使用基因测序仪通过联合探针锚定聚合测序技术对各文库中的样本DNA进行序列信息读取。每一条DNA的测序结果经过文库接头序列、样本标签序列和引物序列比对拆分后将被精确定位到每一个样本的每一个扩增区域中。将每个样本的目标区域的测序结果与以GRCh37基因组序列为参考构建的目标参考序列进行比对分析，再通过变异检测、阳性判断值以及来自于HbVar（2017年10月版）和Ithanel数据库（2017年10月版）的变异坐标信息与变异名称信息，判断样本中是否存在地贫基因变异以及何种变异。

【主要组成成分】

表2 主要组成成分

包装盒	试剂	主要组分	装量
包装盒 1	PCR 反应液	硫酸铵、氯化镁、二硫苏糖醇、三羟甲基氨基甲烷	22mL/瓶×6 瓶
	PCR 反应酶	Taq 酶	135 μ L/管×6 管
	末端修复缓冲液	氯化镁、二硫苏糖醇、三羟甲基氨基甲烷、三磷酸脱氧核糖核苷	50 μ L/管×2 管
	末端修复酶	T4 多聚核苷酸磷酸激酶、Klenow 片段、rTaq 聚合酶	40 μ L/管×2 管
	加“A”缓冲液	氯化钠、氯化镁、二硫苏糖醇、三磷酸脱氧核糖核苷	110 μ L/管×2 管
	加“A”酶	Klenow (3'-5' exo-)	22 μ L/管×2 管
	连接缓冲液	氯化镁、二硫苏糖醇、三羟甲基氨基甲烷、三磷酸腺苷	35 μ L/管×2 管

	连接酶	连接酶	35μL/管×2 管
	阳性对照品 1	中国型 Gγ+(Aγδβ)0 缺失杂合 DNA	15μL/管×2 管
	阳性对照品 2	αα/-α ^{3.7} 缺失型 DNA	15μL/管×2 管
	阳性对照品 3	Hb Constant Spring 杂合突变型 DNA	15μL/管×2 管
	阳性对照品 4	Codons 41/42 (-TTCT) beta0 杂合突变型 DNA	15μL/管×2 管
	阴性对照品	地贫阴性 DNA	70μL/管×2 管
	测序接头 1-20	寡聚脱氧核苷酸	5μL/管×20 管
	平衡文库	DNA 文库 (2ng/μL)	250μL/管×2 管
包装盒 2	PCR 引物 1	寡聚脱氧核苷酸	15μL/孔×96 孔×2
	PCR 引物 2	寡聚脱氧核苷酸	15μL/孔×96 孔×2
	PCR 引物 3	寡聚脱氧核苷酸	15μL/孔×96 孔×2
	PCR 引物 4	寡聚脱氧核苷酸	15μL/孔×96 孔×2
包装盒 3	磁珠 1	纳米磁珠	4.5mL/管×2 管
	磁珠 2	纳米磁珠	450μL/管×2 管
	洗脱缓冲液	Tris-HCl 缓冲液、EDTA	1.8 mL/管×2 管

检测所需但未提供的主要设备和材料:

设备: 封膜机、打断仪 (推荐Covaris LE220)、离心机 (台式、板式或掌式离心机)、磁力架、PCR仪、酶标仪或其他同等功能的仪器、安捷伦生物分析仪2100或同等功能的仪器。

材料: 无水乙醇 (分析纯) 和分子级水 (无DNase活性水)、聚四氟乙烯线 (打断棒)、96孔PCR反应板或PCR管以及离心管、核酸提取试剂 (医疗器械备案凭证编号: 鄂汉械备20190530号)、测序反应通用试剂盒 (联合探针锚定聚合测序法) (医疗器械备案凭证编号: 鄂汉械备20190039)、地中海贫血基因检测软件 (医疗器械注册证编号:)。

【储存条件及有效期】

包装盒1与包装盒2置于-18℃以下保存, 包装盒3置于2℃~8℃保存, 有效期为12个月;

包装盒1、包装盒2冻融6次仍可有效检测;

每天开瓶1次连续开瓶7天、每2天开瓶1次连续2周、每周开瓶1次连续4周、每月开瓶1次4个月内开瓶小于4次仍可有效检测;

生产日期、失效日期: 见标签。

【适用仪器】

基因测序仪 (MGISEQ-2000)、基因测序仪 (MGISEQ-200)

【样本要求】

1. 样本采集: 适用样本为人外周血样本, 使用 EDTA 抗凝采血管, 无明显溶血或凝血现

象，样本量不少于 2mL。

2. 样本保存：室温可保存 9 天，2°C~8°C可保存 14 天，-18°C以下保存 9 个月。反复冻融次数应不超过 6 次。
3. 样本运输：2°C~8°C运输，运输时间不超过 8 天。
4. 样本安全性：所有样本均视为有潜在的感染性，操作时按国家相关标准执行。

【检验方法】

一、试剂准备

将包装盒中的试剂从试剂盒中取出，酶类试剂需短暂离心，置于冰上备用；其他试剂室温融化，振荡混匀，短暂离心备用。磁珠使用前应置于室温平衡30min，加入前充分混匀。采用无水乙醇及纯水配制75%乙醇，现配现用。

二、检测程序

1. 基因组 DNA 提取

推荐使用华大生物科技(武汉)有限公司生产的核酸提取试剂(医疗器械备案凭证编号：鄂汉械备20190530号)进行DNA提取。提取应严格按照说明书进行操作。提取时使用无核酸酶水作为空白对照，与样本进行同步提取。

2. PCR 扩增

本试剂盒的 PCR 反应分成以下 4 组：

反应组 1 针对 α -地贫缺失型变异 ($--^{SEA}$ 和 $--^{THAI}$) 和 β -地贫缺失型变异 (中国型 $G\gamma+(A\gamma\delta\beta)0$ 、 $SEA-HPFH$) 进行检测；

反应组 2 针对 α -地贫缺失型变异 ($-\alpha^{3.7}$ 和 $-\alpha^{4.2}$) 进行检测；

反应组 3 针对 α 珠蛋白基因 HBA2 非缺失型变异 (Hb Constant Spring、Hb Quong Sze、Hb Westmead) 进行检测；

反应组 4 针对 β 珠蛋白基因 HBB 非缺失型变异 ($-90 (C>T) \beta^{+}$ 、 $-29 (A>G) \beta^{+}$ 、 $-28 (A>G) \beta^{+}$ 、Initiation codon (ATG>AGG) β^{0} 、Codons 14/15 (+G) β^{0} 、Codon 17 (A>T) β^{0} 、Hb E β^{+} 、Codons 27/28 (+C) β^{0} 、IVS-I-1 (G>T) β^{0} 、Codon37 (TGG>TAG) β^{0} 、Codons 41/42 (-TTCT) β^{0} 、Codon 43 (G>T) β^{0} 、Codons 71/72 (+A) β^{0} 、IVS-II-5 (G>C) β^{+} 、 $-50 (G>A) \beta^{+}$ 和 IVS-II-654 (C>T) β^{+}) 进行检测。

(1) 提前取出 PCR 引物 1~4、PCR 反应液，室温融化；

- (2) 取合适的离心管，按照表 3 比例配制 PCR 反应混合液，混匀后按照 21 μ L/孔在冰上分装到 96 孔 PCR 反应板中；

表 3 PCR 反应混合液

试剂名称	一个反应标准量
PCR 反应液	20.87 μ L
PCR 反应酶	0.13 μ L
总体积	21 μ L

- (3) 使用八道移液器或自动化移液工作站，按顺序吸取 2 μ L 储存于 96 孔 PCR 反应板中的 PCR 反应引物 1~4 分别加入到步骤 (2) 的 4 块 PCR 反应板对应孔中，贴上封口膜，分别标记为 PCR 反应 1、PCR 反应 2、PCR 反应 3、PCR 反应 4。将反应板置于板式离心机中 4000rpm 离心 1 分钟，取出置于冰上待用；

- (4) 向 (3) 的 PCR 反应板中分别加入 2 μ L 的阳性对照品、阴性对照品、空白对照及待测 DNA 样本。每个反应板所加的阳性对照、阴性对照品、空白对照及待测 DNA 样本须在 96 孔板的同一孔位。其中阳性对照品 1 加入 PCR 反应 1，阳性对照品 2 加入 PCR 反应 2，阳性对照品 3 加入 PCR 反应 3，阳性对照品 4 加入 PCR 反应 4。加完样后在 PCR 反应板上贴上封口膜，置于板式离心机中 4000rpm 离心 1 分钟；

- (5) 将 PCR 反应板 1~4 分别置于 PCR 仪中，PCR 反应板 1 运行 PCR 反应程序一（表 4），PCR 反应板 2 运行 PCR 反应程序二（表 5），PCR 反应板 3 运行 PCR 反应程序三（表 6），PCR 反应板 4 运行 PCR 反应程序四（表 7）；

表 4 PCR 反应程序一

温度	时间	循环数
95 $^{\circ}$ C	3 分钟	1
95 $^{\circ}$ C	30 秒	
62 $^{\circ}$ C	60 秒	32
72 $^{\circ}$ C	15 秒	
15 $^{\circ}$ C	保持	1

表 5 PCR 反应程序二

温度	时间	循环数
95 $^{\circ}$ C	3 分钟	1
95 $^{\circ}$ C	30 秒	
61 $^{\circ}$ C	30 秒	32

72°C	135 秒	
72°C	5 分钟	1
15°C	保持	1

表 6 PCR 反应程序三

温度	时间	循环数
95°C	3 分钟	1
95°C	30 秒	
63°C	30 秒	32
72°C	50 秒	
72°C	5 分钟	1
15°C	保持	1

表 7 PCR 反应程序四

温度	时间	循环数
95°C	3 分钟	1
95°C	30 秒	
58°C	30 秒	32
72°C	50 秒	
72°C	5 分钟	1
15°C	保持	1

PCR 反应结束后将 PCR 反应板取出，置于板式离心机中 4000rpm 离心 1 分钟；

- (6) 取相同体积 (10~20 μ L) 的 PCR 反应产物进行混合：同一 PCR 反应板中的 PCR 产物混合到同一离心管（建议使用 2mL 离心管）中，不同 PCR 反应板中的产物不可进行混合。将装有 PCR 反应产物混合物的离心管振荡混匀，然后置于掌式离心机离心 5 秒；
- (7) 将 (6) 的反应 1~4 的 PCR 产物混合物按表 8 比例进行 pooling，并补充超纯水至 200 μ L。

表 8 PCR 产物 Pooling

PCR 产物	加入体积(μ L)
PCR 反应 1	20
PCR 反应 2	30
PCR 反应 3	60
PCR 反应 4	30
补超纯水至	200

3. 磁珠纯化

- (1) 取 200 μ L 上一步骤的 PCR pooling 产物，加入 360 μ L 磁珠 1 充分混合，室温静置

5min, 然后置于磁力架 3min 以上至溶液澄清, 弃上清液;

- (2) 加入 500 μ L 75%乙醇, 吹打 3 次, 弃上清液;
- (3) 重复 (2) 一次, 在 40 $^{\circ}$ C 的恒温混匀仪中静置 2~5min 使乙醇晾干, 取下离心管;
- (4) 加入 82 μ L 洗脱缓冲液, 充分混匀, 室温静置 5min, 然后置于磁力架 3min 至溶液澄清, 取 80 μ L 上清液于新的 96 孔 PCR 板中。

4. 超声打断

- (1) 向 96 孔 PCR 板每个孔中加入 2 根打断棒, 推荐采用 Covaris LE220 打断仪按照表 9 的条件参数对上一步骤的文库进行打断(其他型号打断仪需自行调整打断参数, 使打断片段在 150bp~700bp 范围内, 主带在 300~500bp 范围内), 打断完成后 4000rpm 离心 1 分钟, 将产物转至新的 1.5mL 离心管中;

表 9 打断参数

Duty Factor	Peak Incident Power(W)	Cycles/Burst	Time(Seconds)
21%	500	500	20s \times 6cycle

- (2) 向 (1) 产物中加入 144 μ L 磁珠 1 充分混合, 室温静置 5min, 然后置于磁力架 3min 至溶液澄清, 弃上清液;
- (3) 加入 500 μ L 75%乙醇, 吹打 3 次, 弃上清液;
- (4) 重复 (3) 一次, 在 40 $^{\circ}$ C 的恒温混匀仪中静置 2~5min 使乙醇晾干, 从磁力架上取下离心管;
- (5) 加入 39 μ L 洗脱缓冲液, 充分混匀, 室温静置 5min, 然后置于磁力架 3min 至溶液澄清, 取 37.5 μ L 上清液于新的 1.5mL 离心管中。

5. 末端修复

- (1) 根据表 10 的比例在新离心管中配制检测所需量的末端修复反应混合液;

表 10 末端修复反应混合液

试剂名称	一个反应标准量
末端修复缓冲液	7 μ L
末端修复酶	5.5 μ L
总体积	12.5 μ L

- (2) 向上一步骤的文库中加入 12.5 μ L 末端修复反应混合液, 充分混匀, 瞬时离心, 置于恒温混匀仪上 20 $^{\circ}$ C 孵育 30min。反应结束后取出离心管, 瞬时离心;
- (3) 向 (2) 产物中加入 90 μ L 磁珠 1, 充分混合, 室温静置 5min, 置于磁力架 3min

至溶液澄清，弃上清液；

- (4) 加入 500 μ L 75%乙醇，吹打 3 次，弃上清液；
- (5) 重复 (4) 一次，在 40 $^{\circ}$ C 的恒温混匀仪中静置 2~5min 使乙醇晾干，取下离心管；
- (6) 加入 34 μ L 洗脱缓冲液，充分混匀，室温静置 5min，置于磁力架 3min 至溶液澄清，取 32 μ L 上清液于新的 1.5mL 离心管中。

6. 加“A”

- (1) 根据表 11 的比例在新离心管中配制检测所需量的加“A”反应混合液；

表 11 加“A”反应混合液

试剂名称	一个反应标准量
加“A”缓冲液	15 μ L
加“A”酶	3 μ L
总体积	18 μ L

- (2) 向上一步骤的末端修复纯化产物中加入 18 μ L 的加“A”反应混合液，充分混匀，瞬时离心，置于恒温混匀仪上 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。反应结束后取出离心管，瞬时离心；
- (3) 向 (2) 产物中加入 90 μ L 磁珠 1，充分混合，室温静置 5min，置于磁力架 3min 至溶液澄清，弃上清液；
- (4) 加入 500 μ L 75%乙醇，吹打 3 次，弃上清液；
- (5) 重复 (4) 一次，在 40 $^{\circ}$ C 的恒温混匀仪中静置 2~5min 使乙醇晾干，取下离心管；
- (6) 加入 40 μ L 洗脱缓冲液，充分混匀，室温静置 5min，然后置于磁力架 3min 至溶液澄清，取 38 μ L 上清液于新的 1.5mL 离心管中。

7. 接头连接

- (1) 根据表 12 的比例在新离心管中配制检测所需量的连接反应混合液；

表 12 连接反应混合液

试剂	一个反应标准量
连接缓冲液	5 μ L
连接酶	5 μ L
测序接头 1-20 (每个文库一个接头*)	2 μ L
总体积	12 μ L

注：*连续 20 个文库不能重复使用同一测序接头。

- (2) 向上一步骤的加“A”纯化产物中加入 12 μ L 连接反应混合液，充分混匀后瞬时离

心，置于恒温混匀仪上 16°C 孵育 12~16h。

8. 片段筛选

- (1) 向上一步骤的文库中加入 10 μ L 磁珠 2，充分混合，室温静置 5min，置于磁力架 3min 至溶液澄清；
- (2) 将 (1) 中的上清液转至 20 μ L 磁珠 2 中，充分混合，室温静置 4min，置于磁力架 3min 至溶液澄清，将上清液转至新的 1.5mL 离心管中，剩下的磁珠标记为 A；
- (3) 将 (2) 中的上清液中加入 40 μ L 磁珠 2，充分混合，室温静置 5min，置于磁力架上 3min 至溶液澄清，丢弃上清液，剩下的磁珠标记为 B；
- (4) 向磁珠 A 和磁珠 B 中分别加入 500 μ L 75%乙醇，吹打 3 次，弃上清液；
- (5) 重复 (4) 一次，在 40°C 的恒温混匀仪中静置 2~5min 使乙醇晾干，取下离心管；
- (6) 分别加入 32 μ L 洗脱缓冲液，充分混匀，室温静置 5min，置于磁力架 3min 至溶液澄清，各取 30 μ L 上清液分别转入新 1.5mL 离心管中，标记为文库 A 和文库 B。

9. 测序反应

(1) DNB 制备

使用测序反应通用试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）进行 DNB 制备。

① 文库定量与混合

使用酶标仪或者 Qubit 荧光定量仪对各文库 A 和各文库 B 进行定量（浓度 $\geq 3.5\text{ng}/\mu\text{L}$ 合格，浓度低于 $3.5\text{ng}/\mu\text{L}$ 的文库需重新建库）。根据定量结果，将不同的文库 A 等质量混合，确保混合后文库中的 DNA 总质量为 168ng，混合后使用 TE 缓冲液或无核酸酶水将混合文库体积补至 48 μ L，得混合文库 A；同样的操作得混合文库 B。

② 环化反应

将混合文库 A、混合文库 B 与平衡文库各 48 μ L 分别转移至 PCR 管中，充分混匀后短暂离心，置于 PCR 仪上 95°C 孵育 5min，孵育完毕即刻取出放置在冰上冷却。每个 PCR 管分别加入 11.6 μ L 环化缓冲液、0.5 μ L 连接酶，充分混匀后短暂离心，置于 PCR 仪上 37°C 孵育 30min。反应产物可进入下一步反应或放置于 -18°C 以下冻存。

③ DNB 制备

将上述环化产物分别取 20 μ L 到新的 PCR 管。分别加入 20 μ L DNB 制备缓冲液，充分混匀后短暂离心，置于 PCR 仪中反应。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 1min，65 $^{\circ}$ C 1min，40 $^{\circ}$ C 1min，4 $^{\circ}$ C 保持。反应结束取出 PCR 管，短暂离心后各加入 40 μ L DNB 聚合酶混合液I和 4 μ L DNB 聚合酶混合液II，充分混匀后短暂离心，置于 PCR 仪中反应，反应条件：混合文库 A：30 $^{\circ}$ C 40min，4 $^{\circ}$ C保持；混合文库 B 与平衡文库：30 $^{\circ}$ C 25min，4 $^{\circ}$ C保持。当温度达到 4 $^{\circ}$ C后立即取出 PCR 管，置于冰盒上，即刻加入 20 μ L DNB 终止缓冲液，用移液器和阔口吸头缓慢地吹打混匀，切勿震荡及剧烈吹打，放于 4 $^{\circ}$ C备用。

④ DNB 产物混合

使用 QubitTM ssDNA Assay Kit 与 Qubit 荧光定量仪对 9.1.3 中的产物进行定量(浓度 \geq 8ng/ μ L 合格，浓度低于 8ng/ μ L 的 DNB 需重新制备)。根据定量结果，将混合文库 A、混合文库 B 与平衡文库按质量比进行混合（其中混合文库 A 和混合文库 B 的混合比例固定为 4: 1，再根据文库 A 的混合个数加入不同量的平衡文库。如混合了 1 个文库 A，则加入质量比为 90%的平衡文库；如混合了 2~4 个文库 A，则加入质量比为 70%的平衡文库；如混合了 5~7 个文库 A，则加入质量比为 45%的平衡文库；如混合了 8~12 个文库 A，则加入质量比为 20%的平衡文库），确保混合后文库的体积不低于 104 μ L。测定混合后的 DNB 浓度，如浓度 \geq 40 ng/ μ L，需取部分 DNB 用加载缓冲液 I 稀释至 20 ng/ μ L 左右，使稀释后体积为 104 μ L，再定量确定最终上机浓度；如浓度低于 40ng/ μ L，则直接定量确定最终上机浓度（上机浓度需 \geq 8ng/ μ L，低于 8ng/ μ L 需重新制备 DNB）。

(2) DNB 加载

使用测序反应通用试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）进行 DNB 加载，严格按照说明书操作。

(3) 测序

使用测序反应通用试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）进行测序反应，严格按照说明书操作。

10. 数据分析

使用“地中海贫血基因检测软件”（发布版本号：V1，医疗器械注册证编号：）进行分析。

【阳性判断值】

1. 质量控制

每次检测结果应同时满足：阴性对照品检测结果为未检出检测范围内的基因变异，阳性对照品检测结果为中国型 $G\gamma+(A\gamma\delta\beta)0$ 缺失杂合， $\alpha\alpha/\alpha^{-3,7}$ ，Hb Constant Spring杂合，Condons 41/42 (-TTCT)beta0杂合，否则检测结果视为无效。

2. 数据量要求

单个样本的非缺失型变异在目标区域内的位点测序深度不低于 $50\times$ ，且单个样本反应1的缺失型测序有效数据量不少于650条DNA序列，单个样本反应2的缺失型测序有效数据量不少于300条DNA序列。有效数据量不足时应进行重新测序，若重测后依然数据量不足则判定检测失败。

3. 结果判定

非缺失型（包括点突变和小片段插入或缺失）采用突变频率进行阳性的判定。由于点突变和小片段插入或缺失的频率波动范围一致，所以阳性判定值使用同一标准。

缺失型采用归一化之后的序列数（NRN）进行阳性的判定。由于不同缺失型的PCR扩增效率之间存在显著差异，所以，不同缺失型的阳性判定值分别确定。

(1) 阳性判定阈值

判定条件	判定结果
$0.3 \leq \text{突变频率} \leq 0.7$	相应非缺失型的杂合变异
$0.8 \leq \text{突变频率} \leq 1$	相应非缺失型的纯合变异
$-\alpha^{3,7}$ 的NRN ≥ 500	$-\alpha^{3,7}$ 缺失型
$-\alpha^{4,2}$ 缺失型阳性且 $-\alpha^{3,7}$ 的NRN ≥ 200	$-\alpha^{3,7}$ 缺失型
$-\alpha^{4,2}$ 的NRN ≥ 2000	$-\alpha^{4,2}$ 缺失型
--SEA的NRN ≥ 1000	--SEA缺失型
--THAI的NRN ≥ 1000	--THAI缺失型
$\alpha 2$ 的NRN ≥ 500	$\alpha 2$ 存在
$-\alpha^{4,2}$ 缺失型阳性且 $\alpha 2$ 的NRN ≥ 200	$\alpha 2$ 存在
HBB*区域内每个位点测序深度均 $\geq 50\times$	HBB存在
中国型 $G\gamma+(A\gamma\delta\beta)0$ 的NRN ≥ 1000	中国型 $G\gamma+(A\gamma\delta\beta)0$ 缺失型
SEA-HPFH的NRN ≥ 2000	SEA-HPFH缺失型

注：*为反应4中785bp的大片段。

(2) α 地贫缺失型变异的综合判定

$\alpha 2$ 存在	$-\alpha^{3.7}$ 阳性	$-\alpha^{4.2}$ 阳性	$--SEA$ 阳性	$--THAI$ 阳性	检测结果
是	否	否	否	否	未检出检测范围内的基因变异
是	是	否	否	否	$\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$
是	否	是	否	否	$\alpha\alpha/-\alpha^{4.2}$
是	否	否	是	否	$\alpha\alpha/--SEA$
是	否	否	否	是	$\alpha\alpha/--THAI$
否	是	否	否	否	$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$
否	否	是	否	否	$-\alpha^{4.2}/-\alpha^{4.2}$
否	是	是	否	否	$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$
否	是	否	是	否	$-\alpha^{3.7}/--SEA$
否	是	否	否	是	$-\alpha^{3.7}/--THAI$
否	否	是	是	否	$-\alpha^{4.2}/--SEA$
否	否	是	否	是	$-\alpha^{4.2}/--THAI$
否	否	否	是	否	$--SEA/--SEA$
否	否	否	否	是	$--THAI/--THAI$
否	否	否	是	是	$--SEA/--THAI$

(3) β 地贫缺失型变异的综合判定

HBB 存在	SEA-HPFH 阳性	中国型 $G\gamma+(A\gamma\delta\beta)0$ 阳性	基因型	检测结果
是	否	否	β^N/β^N	未检出检测范围内的基因变异
是	是	否	$\beta^{SEA-HPFH}/\beta^N$	SEA-HPFH缺失杂合
是	否	是	$\beta^{中国型G\gamma+(A\gamma\delta\beta)0}/\beta^N$	中国型 $G\gamma+(A\gamma\delta\beta)0$ 缺失杂合
否	是	否	$\beta^{SEA-HPFH}/\beta^{SEA-HPFH}$	SEA-HPFH缺失纯合
否	否	是	$\beta^{中国型G\gamma+(A\gamma\delta\beta)0}/\beta^{中国型G\gamma+(A\gamma\delta\beta)0}$	中国型 $G\gamma+(A\gamma\delta\beta)0$ 缺失纯合
否	是	是	$\beta^{SEA-HPFH}/\beta^{中国型G\gamma+(A\gamma\delta\beta)0}$	SEA-HPFH缺失复合中国型 $G\gamma+(A\gamma\delta\beta)0$ 缺失双重杂合

【检验结果的解释】

1. $0.7 < \text{突变频率} < 0.8$ 时,判定为检测失败,需重新提取 DNA 进行检测。重提检测依然失败,建议用其他方法验证。
2. 缺失杂合子: α 地贫结果中 $\alpha 2$ 存在且同时存在一种缺失型阳性,结果为相应缺失型杂合子; β 地贫结果中 HBB 存在且同时存在一种缺失型阳性,结果为相应缺失型杂合子。
3. 缺失纯合子: α 地贫结果中 $\alpha 2$ 不存在且同时仅存在一种缺失型阳性,结果为相应 α 地贫缺失型纯合子; β 地贫结果中 HBB 不存在且同时仅存在一种缺失型阳性,结果为相

应 β 地贫缺失型纯合子。

4. 双重缺失杂合子： α 地贫结果中 $\alpha 2$ 不存在且同时存在两种缺失型阳性，结果为该两种 α 地贫缺失型双重杂合子； β 地贫结果中 HBB 不存在且同时存在两种缺失型阳性，结果为该两种 β 地贫缺失型双重杂合子。
5. 结果未检出的可能原因如下：
 - (1) 样本采集及处理不当；
 - (2) 实验操作不当等导致扩增失败

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，不能作为诊断的唯一依据。对患者的临床诊断应结合临床症状/体征、病史、其他实验室检查等情况综合考虑；
2. 本试剂盒适用于人的外周血样本检测，不适用于其它样本检测；
3. 本试剂盒可以对 4 种缺失型 α -地中海贫血、2 种缺失型 β -地中海贫血、3 种非缺失型 α -地中海贫血和 16 种非缺失型 β -地中海贫血进行检测，但仍有检测范围之外的变异，可能造成漏检，这类样本可用其他方法进一步验证。
4. 不合理的样本采集、运送、处理、核酸过度降解以及未经验证的其他干扰或 PCR 抑制因子等均有可能导致假阴性或假阳性结果。
5. 本试剂盒检测- $\alpha^{3.7}$ 缺失型和- $\alpha^{4.2}$ 缺失型时，不对- $\alpha^{3.7}$ 和- $\alpha^{4.2}$ 各自的亚型进行进一步分型。

【产品性能指标】

用于本试剂盒分析性能研究的企业参考品包括：细胞系来源的以及临床剩余外周血样本来源的阳性参考品、阴性参考品、重复性参考品、精密度参考品和检测限参考品。研究结果表明产品具备如下性能。

1. 阳性对照品有效性

检测阳性对照品，结果为中国型 $G\gamma+(A\gamma\delta\beta)0$ 缺失杂合， $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ ，Hb Constant Spring 杂合，Condons 41/42 (-TTCT)beta0 杂合。

2. 阴性对照品有效性

检测阴性对照品，结果为未检出检测范围内的基因变异。

3. 准确性

检测企业阳性参考品 P1~P23、P31、P32、LcP1~LcP5、LcP7~LcP9、LcP13~LcP14、LcP16~LcP17，结果为相应的基因型别阳性。

4. 特异性

- (1) 检测企业阴性参考品 N1~N3、LcN1、N5~N14, 结果为未检出检测范围内的基因变异。
- (2) 交叉反应验证: 交叉反应结果表明本试剂盒与 Hb Q-Thailand, Hb New York, Hb J-Bangkok 等具有同源性序列的血红蛋白异常样本无交叉反应; 与--^{FIL}、- $\alpha^{21.9}$ 、Hb Lepore-Boston-Washington 等检测范围外的地贫变异阳性样本无交叉反应。
- (3) 干扰物质研究: 干扰物质研究实验结果表明样本中内源性血红素浓度 $\leq 200\text{g/L}$, 干扰物质甘油三酯浓度 $\leq 1000\text{mg/dL}$ 、胆红素浓度 $\leq 2\text{mg/dL}$; 外源性干扰物质 EDTA $\cdot\text{K}_2$ 浓度 $\leq 2.5\text{mg/mL}$ 、甲磺酸去铁胺浓度 $\leq 1.6\text{mg/mL}$ 、地拉罗司分散片浓度 $\leq 1.6\text{mg/mL}$ 、叶酸浓度 $\leq 0.38\text{mg/L}$ 、爱乐维(复合维生素)平均浓度 $\leq 35.6\text{mg/L}$ 、布洛芬浓度 $\leq 0.143\text{mg/mL}$ 、盐酸氨溴索浓度 $\leq 0.12\text{mg/mL}$ 、蒲地蓝消炎胶囊浓度 $\leq 2.86\text{mg/mL}$ 、头孢克肟浓度 $\leq 0.286\text{mg/mL}$ 时, 对试剂盒检测性能无影响, 试剂盒具有较好的抗干扰能力。当样本中的肝素钠浓度在 2IU/mL 及以上时, 试剂盒检测性能受影响, 易检测失败。因此, 使用本试剂盒进行检测时, 不可采用肝素钠抗凝采血管采集样本, 推荐使用 EDTA 抗凝采血管。

5. 重复性

重复检测经标化的企业阳性参考品P5、P13、P16和P19各10次, 结果均为相应的基因型别阳性。

重复检测经标化的企业阴性参考品N1 10次, 结果均为未检出检测范围内的基因变异。

6. 精密度

使用连续生产的三批试剂盒对浓度分别为 $10\text{ng}/\mu\text{L}$ 和 $15\text{ng}/\mu\text{L}$ 的精密度参考品LcP19、LcP5、LcP13、LcP16和LcN1在两个实验室由两组操作者在不同的仪器上分别进行检测, 每个浓度的每个参考品重复检测多次, 连续检测20天。结果均为相应的基因型。

7. 最低检测限

采用 L1~L12 进行最低检测限的探索研究。对研究确定的检测限浓度进行重复多次检测, 结果为相应基因型别且检出率 $\geq 95\%$ 时即确定为最低检测限。对稀释至最低检测限浓度 ($10\text{ng}/\mu\text{L}$)的阳性参考品 P1~P23、P31、P32、LcP1~LcP5、LcP7~LcP9、LcP13~LcP14、LcP16~LcP17 进行最低检测限验证, 检测结果均为相应的基因型别阳性。

8. 与已有的临床检测结果比较

使用本试剂盒对 345 例已有临床结果的样本进行检测，检测结果与已有的 Sanger 测序法以及 Gap-PCR 法检测结果进行对比。结果显示试剂盒检测 25 种地贫变异的灵敏度、特异性和总符合率均为 100%，Kappa 系数均为 1.00，检测结果与临床检测结果有很好的一致性，符合试剂盒性能要求。

9. 注册检验

- (1) **外观：**试剂盒内各组分包装应完整，无污渍，字迹清晰。试剂盒内各组分应为透明溶液，无沉淀及絮状物，无肉眼可见颗粒。磁珠试剂应为棕色颗粒悬液。
- (2) **阳性对照品有效性：**检测阳性对照品，结果应为中国型 $G\gamma+(A\gamma\delta\beta)0$ 缺失杂合， $\alpha\alpha/\alpha^{3.7}$ ，HbConstant Spring 杂合，Condons 41/42 (-TTCT)beta0 杂合。
- (3) **阴性对照品有效性：**检测阴性对照品，结果应为未检出检测范围内的基因变异。
- (4) **准确性：**检测试剂盒范围内的国家阳性参考品和编号为 P31、P32 的经标化的企业阳性参考品，结果应为相应的基因型别阳性。
- (5) **特异性：**检测国家阴性参考品或经标化的企业阴性参考品 N1~N2，结果应为未检出检测范围内的基因变异。检测试剂盒范围外的国家阳性参考品或经标化的企业阴性参考品 N3、N8~N14，结果应为未检出检测范围内的基因变异。
- (6) **重复性：**重复检测经标化的企业阳性参考品 P5、P13、P16、P19 各 10 次，结果应均为相应的基因型别阳性。重复检测经标化的企业阴性参考品 N1 10 次，结果应均为未检出检测范围内的基因变异。
- (7) **检测限：**检测限应不高于 10 ng/ μ L。

10. 临床试验

在三家临床试验机构对华大生物科技（武汉）有限公司生产的 α 和 β 地中海贫血基因检测试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）进行 α 和/或 β 地贫遗传诊断用途的临床试验，符合临床试验方案入排标准的有效样本 1108 例。其中， α 和 β 地中海贫血基因检测试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）检出 25 种变异阳性样本 1034 例，阴性样本 74 例。对比方法检出 25 种变异阳性样本 1034 例，阴性样本 74 例。灵敏度、特异性和总符合率均为 100%，Kappa 系数均为 1.00。临床试验结果表明 α 和 β 地中海贫血基因检测试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）对于 25 种地贫变异的检测具有较高准确性和有效性，可在临床检验中应用。

【注意事项】

1. 本产品仅用于体外诊断；
2. 临床实验室应严格按照《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》（卫办医政发〔2010〕194号）等有关分子生物学实验室、临床基因扩增检验实验室的管理规范执行；
3. 不同批次组分严禁混用；
4. 该试剂盒预期与说明书所推荐的仪器和材料一起使用，其他仪器和材料与本试剂盒一起使用的情况尚未得到验证；
5. 所有试剂从规定的存储环境中取出时，按照要求使用，使用前试剂应摇匀；
6. 样本转移至新离心管时应检查确认标记名称一致；
7. 所有样本及试剂应避免直接接触皮肤和眼睛，切勿吞咽，一旦发生这种情况立即用大量清水冲洗并及时到医院就诊；
8. 检测中所用的离心管、移液器吸头必须保证无 DNase 活性；所有样本和各种废弃物均视为有潜在的污染，应按污染物进行处理；
9. 检验步骤中配制表均为标准用量，在配制时须考虑损耗。

【参考文献】

- [1] Rund D, Rachmilewitz E. Beta-thalassemia. N Engl J Med.2005;353(11):1135-1146
- [2] 中国地中海贫血蓝皮书
- [3] <http://globin.cse.psu.edu>
- [4] www.ithanet.eu

【基本信息】

注册人/生产企业名称：华大生物科技（武汉）有限公司

住所：武汉市东湖新技术开发区高新大道 666 号武汉国家生物产业基地项目 B、C、D 区研发楼 B2 栋

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

生产地址：武汉市东湖新技术开发区高新大道 666 号武汉国家生物产业基地项目 B、C、D 区研发楼 B2 栋五楼、B1 栋一楼

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】