

受理号：CSZ2200093

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：FMR1 基因突变(CGG 重复数)检测试剂盒
(荧光 PCR 毛细电泳片段分析法)

产品管理类别：第三类

申请人名称：北京华瑞康源生物科技发展有限公司

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.....	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

北京华瑞康源生物科技发展有限公司

二、申请人住所

北京市昌平区科技园区超前路甲 1 号 13 号楼 1 层 108 室

三、生产地址

北京市昌平区科技园区超前路甲 1 号 6 号楼 102、103 室，
7 号楼 102 室，13 号楼 107 室

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

本试剂盒含有引物溶液、主反应混合液、Taq 酶、ROX 标记、正常对照品、阳性对照品 1、阳性对照品 2、阳性对照品 3、去离子水，详见表 1。

表 1 产品主要组成成分

组分名称	规格 (50 人份/盒)	规格 (100 人份/盒)	主要成分
引物溶液	60 μ L/管 \times 1	120 μ L/管 \times 1	特异性荧光引物
主反应混合液	1.2mL/管 \times 1	1.2mL/管 \times 2	dNTPs 混合液、Mg ²⁺ 等
Taq 酶	20 μ L/管 \times 1	40 μ L/管 \times 1	酶
ROX 标记	50 μ L/管 \times 1	100 μ L/管 \times 1	在测序仪进行片段分析用的荧光分子量标记物
正常对照品	5 μ L/管 \times 1	10 μ L/管 \times 1	CGG 重复数小于 45 质粒 DNA
阳性对照品 1	5 μ L/管 \times 1	10 μ L/管 \times 1	CGG 重复数 45-54 质粒 DNA

阳性对照品 2	5 μ L/管 \times 1	10 μ L/管 \times 1	CGG 重复数 55-200 质粒 DNA
阳性对照品 3	5 μ L/管 \times 1	10 μ L/管 \times 1	CGG 重复数 >200 质粒 DNA
去离子水	200 μ L/管 \times 1	200 μ L/管 \times 1	无 DNA 酶/RNA 酶的去离 子水

注：本产品为多组分试剂盒，不同批号试剂盒中各组分不可互换。试剂盒具体组成成分、配套试剂详见产品说明书。

（二）产品预期用途

该产品用于体外人 EDTA-K₂ 抗凝全血样本中 *FMR1* 基因突变（CGG 重复数）重复序列多态性的检测。

目前我国 2022 年 11 月发布的《脆性 X 综合症的临床实践指南》和美国医学与遗传学会（American College of Medical Genetics, ACMG）的指南均按照 CGG 重复次数将 *FMR1* 基因分为四种基因型：CGG 重复数 ≤ 44 为“正常型”或“野生型”；45-54 之间为“中间型”或者“灰区”；55-200 之间为“前突变型”；200 以上时为“全突变型”。*FMR1* 基因全突变导致脆性 X 综合征。

脆性 X 综合征是一种 X 染色体连锁的单基因遗传病，发病率在 1/8000 ~ 1/4000 之间。临床主要表现是重度智力低下，60% ~ 80% 的男性患者还表现出多动症或自闭症。其致病基因是

位于 Xq27.3 的 *FMR1* (Fragile X Mental Retardation 1) 基因, 该基因编码脆性 X 智力低下蛋白 (Fragile X Mental Retardation Protein, FMRP), FMRP 在大脑神经细胞的发育中起到至关重要的作用。当 *FMR1* 基因非编码区的 CGG 重复数 > 200 发生全突变时, 导致 *FMR1* 基因沉默, FMRP 表达量减少或缺失, 造成大脑神经细胞发育异常, 临床表现出重度的智力低下、发育迟缓等症状。

试剂盒检测结果用于男性脆性 X 综合症的辅助诊断, 不用于胎儿、新生儿筛查, 不能采用该单一指标进行诊断。

(三) 产品包装规格

50 人份/盒、100 人份/盒。

(四) 产品检验原理

本试剂盒以人的基因组 DNA 为模板, 采用独特的反应混合液和 FAM 荧光标记的引物, 对 *FMR1* 基因的 CGG 重复序列进行 PCR 扩增。带有荧光信号的扩增产物可以被毛细管电泳仪精确识别和定位, 通过与 ROX 标记进行对比, 可判定扩增产物片段的长度, 进而换算出检测样本的 CGG 重复数。

二、临床前研究概述

(一) 主要原材料

1. 主要原材料的选择

本产品的主要原材料包括引物、Taq 酶、dNTPs 混合液、PCR 反应缓冲液和不同大小 ROX 标记 DNA 片段，主要原材料均为外购。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. 参考品和对照品的设置情况

本产品企业参考品包括阴性参考品、阳性参考品、最低检出限参考品、精密度参考品。

阳性参考品 9 份，涵盖本试剂盒可检出的 *FMR1* 基因的不同突变型，由 2 份中间型、3 份前突变型、2 份全突变型，以及 1 份 *FMR1* 基因野生型和全突变型嵌合体样本、1 份 *FMR1* 基因前突变型和全突变型嵌合体样本。阴性参考品 6 份，均为 *FMR1* 基因野生型。最低检测限参考品 9 份，涵盖本试剂盒可检出的 *FMR1* 基因的不同突变型，由 2 份中间型、3 份前突变型、2 份全突变型，以及 1 份 *FMR1* 基因野生型和全突变型嵌合体样本、1 份 *FMR1* 基因前突变型和全突变型嵌合体样本。精密度参考品 3 份，*FMR1* 基因的中间型、前突变型及全突变型各 1 份。企业参考品来源于临床样本和细胞系，通过提取的基因组 DNA 制备并确认。

本试剂盒还同时设置了阳性对照与阴性对照，对照品由质粒 DNA 构成，用于检测过程中试剂和仪器的质量控制。其中阳

性对照由阳性对照品 1、阳性对照品 2、阳性对照品 3，合计三管，分别由 CGG 重复数为 46 ± 1 的中间型、CGG 重复数为 118 ± 1 的前突变型、CGG 重复数为 > 200 的全突变型构成。其中阴性对照由正常对照品，CGG 重复数为 29 ± 1 的野生型构成。

(二) 生产工艺及反应体系研究

申请人对试剂盒反应体系的研究包括：对所用样本进行了：样品采集及提取方法研究、全血用量及提取效果的研究、DNA 的用量研究、样本保存时间及冻融次数、DNA 的提取效率和纯度的研究。对 PCR 反应液中各成分的用量方面进行了：引物浓度研究、dNTPs 浓度研究、Taq 酶用量研究、ROX 标记的研究等。对 PCR 扩增参数的研究进行了：退火温度、退火时间、延伸的温度、延伸的时间、循环数等。对毛细管电泳的研究进行了：PCR 扩增产物上机量、PCR 产物纯化研究、毛细管电泳上机前的变性条件优化研究、毛细管电泳实验条件的研究、毛细管电泳实验电泳程序设置研究等。并对产品适配的两种机型进行了研究。

通过功能性实验，最终确定了最佳的反应体系。申请人根据试剂盒中试剂及组件的主要生产工艺的研究结果，确定了最佳的生产工艺。

(三) 分析性能评估

本产品分析性能评估内容包括准确度、精密度、最低检测限、分析特异性、适用机型与核酸提取试剂性能的研究。

准确度研究中，申请人使用三批成品试剂盒在所有适用机型上，分别对阴性企业参考品和阳性企业参考品进行检测，检测结果显示阴性企业参考品、阳性企业参考品符合率 100%。同时使用非人类基因组样本、47, XXX（超雌综合征）样本及 *FMR1* 基因缺失样本进一步对试剂盒准确性进行了研究，并与国外上市试剂盒进行对比研究，研究结果显示本试剂盒检测结果的阳性符合率、阴性符合率均为 100%，试剂盒的准确性符合设计要求。

精密度研究中，申请人对覆盖 3 个基因型（中间型、前突变型、全突变型）阈值附近的临床样本，在两个实验室，由不同操作者所有适用机型上，使用三批次的试剂，设置 2 个不同 DNA 浓度水平，每个浓度重复 3 次，上午和下午各做一次，进行 20 天检测，分别对日内/日间、批内/批间、室间（不同地点）、人员间、不同仪器之间的检测结果进行分析。同时申请人还对野生型，中间型，前突变型，全突变型相互间不同比例的 12 个嵌合组合的临床样本，在两个实验室，由不同操作者所有适用机型上，使用三批次的试剂，设置 2 个不同 DNA 浓度水平，每个浓度重复 3 次，上午和下午各做一次，进行 4 天检测，

分别对日内/日间、批内/批间、室间(不同地点)、人员间、不同仪器之间的检测结果进行分析。结果显示本产品对精密度参考品的日内/日间、批内/批间、人员间、仪器间和室间的检测变异系数均不大于 5%。

最低检测限研究中, 申请人使用三批成品试剂盒在所有适用机型上, 分别对企业参考品和临床的样本进行检测限的考察及验证, 对四个基因型(野生型、中间型、前突变型、全突变型)的不同 DNA 浓度的临床样本进行检测, 确定产品最低检测限为 10ng/μL。进一步对包含四个基因型的最低检测限参考品在所有适用机型上分别进行验证, 结果显示 10ng/μL 的 DNA 浓度设置合理。在嵌合体的最低检测限研究中, 申请人使用三批试剂盒对两种基因型为阳性(前突变型、全突变型)的嵌合型样本, 在 10ng/μL 的总核酸添加量时进行验证, 确定嵌合型最低检测限占比为 15%。进一步对包含不同基因型别的另外 10 个不同嵌合比例的嵌合体样本在 10ng/μL 的总核酸添加量时进行验证, 最终确认试剂盒最低检测限为 10ng/μL; 嵌合型样本的嵌合比例最低为 15%。

分析特异性研究中, 申请人进行了干扰研究和交叉反应研究。在干扰研究中, 对常见的干扰物质(如总胆红素、甘油三酯、胆固醇、溶血样本、血红蛋白、白蛋白)以及常见治疗性

药物（如雌激素、孕激素类药物），对本试剂盒可能存在的干扰物质进行了研究，结果显示血液中 50g/L 白蛋白、200g/L 血红蛋白、1040nmol/L 雌三醇、64nmol/L 孕酮，513umol/L 总胆红素，37mmol/L 甘油三酯，13mmol/L 胆固醇对试剂盒的检测结果显示无明显影响。在交叉反应研究中，申请人通过检测唐氏综合征、47,XXX 超雌综合征以及亨廷顿舞蹈症的临床样本，对本试剂盒可能存在的交叉反应进行研究，结果显示对本试剂盒的检测结果显示均不造成影响。

适用机型的研究中，G1000 基因扩增仪（型号：TC-96/G/H(b)B，杭州博日科技股份有限公司）；基因分析仪 Genetic Analyzer（型号：3500xL Dx、3500Dx, Life Technologies Holdings Pte Ltd）作为研究对象，申请人对试剂盒的阴阳性企业参考品符合率、最低检测限、批内/批间精密度、人员间精密度以及室内精密度进行评估，检测结果均符合试剂盒的设计要求，同时也满足临床的实际需求。

核酸提取试剂性能的研究中，申请人对配套使用的核酸提取试剂盒提取的 DNA 的提取效率、提取后核酸纯度和浓度进行研究，结果显示核酸提取试剂性能满足检测系统的要求。

（四）阳性判断值或参考区间研究

申请人首先采用 ROC 曲线的方式建立试剂盒的阳性判断值，

收集包括野生型、中间型、前突变型、全突变型的临床样本进行检测，对数据进行 ROC 曲线分析，与临床诊断结果比较，确定 $CGG > 200$ 为试剂盒的阳性判断值。另外，对试剂盒的 CGG 重复数计算公式及各参数进行了研究，确认了最佳的 CGG 重复数计算公式以及公式内各参数的取值。

申请人然后使用临床样本对 *FMR1* 基因型的阳性判断值进行了验证，研究结果显示所有样本的 CGG 重复数以及基因型检测结果均与临床检验结果一致。

(五) 稳定性研究

申请人对产品的实时稳定性、运输稳定性和使用稳定性进行了研究，确定了在各种条件下试剂的有效保存时间。

实时稳定性研究：分别使用三批试剂盒，按规定贮存温度进行贮存，分别于第 0、3、6、9、12、13 个月取出，对试剂盒性能指标进行检测各项性能指标均符合要求，确定产品在 $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 条件下，可稳定保存 12 个月。

运输稳定性研究：分别使用三批试剂盒，按规定贮存温度进行模拟运输，模拟冷链运输 8 天，分别在运输前、运输后、过效期，对试剂盒性能指标进行检测确定产品在规定的贮存温度下的运输对试剂盒性能无影响，运输后可以在规定有效期内正常使用。

使用稳定性研究：通过开盖模拟操作后 4 次检测，证明试剂盒在开盖后 5 个月内可以保证性能稳定，最终建议在开盖后 4 个月内使用。通过模拟冻融操作进行 6 次检测，确认试剂盒反复冻融次数 5 次以内可以正常使用。

此外，申请人对样本稳定性进行了研究，结果显示产品性能均能满足产品说明书要求。

三、临床评价概述

申请人在首都医科大学附属北京儿童医院、北京大学第一医院、首都儿科研究所附属儿童医院共三家临床机构完成了临床试验。采用试验用体外诊断试剂分别与脆性 X 综合征临床诊断结果及临床公认的检测技术 AmplideX FMR1 PCR Kit 进行比较研究，评价试验体外诊断试剂临床性能。入组病例以有不明原因智力障碍/发育迟缓，不明原因癫痫，多动症，孤独谱系障碍，语言发育迟缓，特殊面容（如大头、脸瘦长、前额突出、嘴大唇厚、大下颌、招风耳、大耳朵），特殊体征（如巨睾、第三指间类型比例大）等相关症状的男性儿童为主，样本类型为 EDTA 抗凝外周全血。临床试验共入组受试者 1040 例，其中全突变型 111 例，非全突变型 927 例。

试验结果显示，试验体外诊断试剂与脆性 X 综合征临床诊断结果对比，灵敏度 98.21%（95%CI：93.72%，99.51%），特

异度 99.89% (99.39%, 99.98%); 试验体外诊断试剂与 AmplideX FMR1 PCR Kit 对比, 经统计核验阳性符合率 100% (95%CI: 96.65%, 100%), 阴性符合率 100% (95%CI: 99.59%, 100%)。

此外临床试验共计入组 50 个脆性 X 综合征家系, 进行脆性 X 综合征家系研究。结果显示, 所有家系中母亲携带致病基因(全突变型)的男性成员 7 名, 均表现为脆性 X 综合征, 外显率 100%; 母亲未携带致病基因家系 2 个, 其中 2 个的男性成员未见脆性 X 综合征相关表现。

综上所述, 该产品临床试验设计符合《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》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、产品受益风险判定

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

(一) 受益评估

产品用于体外人 EDTA-K₂ 抗凝全血样本中 *FMR1* 基因突变 (CGG 重复数) 重复序列多态性的检测, 以最大 CGG 数为最终基因型判定, 最终确定 *FMR1* 基因是否为全突变型用于男性脆性 X 综合征的辅助诊断, 检测结果仅供临床参考。具体临床应用时, 对患者的临床诊断应结合其症状、体征、其它实验室检查及治

疗反应等情况结合考虑。

本产品临床应用的主要受益在于：对于不明原因智力障碍、孤独谱系障碍、多动症、行为异常及癫痫的患儿进行检测，以辅助临床对脆性 X 综合征的诊断。临床试验结果与疾病临床诊断进行对比分析，本试剂盒灵敏度与特异性良好。

（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/收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. 预期用途：该产品用于体外人 EDTA-K₂ 抗凝全血样本中 *FMR1* 基因突变（CGG 重复数）重复序列多态性的检测。

试剂盒检测结果用于男性脆性 X 综合征的辅助诊断，不用于胎儿、新生儿筛查，不能采用该单一指标进行诊断。

2. 警示及注意事项：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 3 月 15 日

附件:产品说明书

***FMRI* 基因突变(CGG 重复数)检测试剂盒（荧光 PCR 毛细电泳片段分析法）说明书**

【产品名称】

FMRI 基因突变（CGG 重复数）检测试剂盒（荧光 PCR 毛细电泳片段分析法）

【包装规格】

50 人份/盒、100 人份/盒。

【预期用途】

该产品用于体外人 EDTA-K₂ 抗凝全血样本中 *FMRI* 基因突变（CGG 重复数）重复序列多态性的检测。

目前我国 2022 年 11 月发布的《脆性 X 综合症的临床实践指南》^[1] 和美国医学与遗传学会（American College of Medical Genetics, ACMG）的指南均按照 CGG 重复次数将 *FMRI* 基因分为四种基因型：CGG 重复数≤44 为“正常型”或“野生型”；45-54 之间为“中间型”或者“灰区”；55-200 之间为“前突变型”；200 以上时为“全突变型”。*FMRI* 基因全突变导致脆性 X 综合征。

脆性 X 综合征是一种 X 染色体连锁的单基因遗传病，发病率在 1/4000~1/8000 之间^[2]。临床主要表现是重度智力低下，60-80% 的男性患者还表现出多动症或自闭症^[3]。其致病基因是位于 Xq27.3 的 *FMRI*

(Fragile X Mental Retardation 1) 基因, 该基因编码脆性 X 智力低下蛋白 (Fragile X Mental Retardation Protein, FMRP), FMRP 在大脑神经细胞的发育中起到至关重要的作用^[4]。当 *FMR1* 基因非编码区的 CGG 重复数 > 200 发生全突变时, 导致 *FMR1* 基因沉默, FMRP 表达量减少或缺失, 造成大脑神经细胞发育异常, 临床表现出重度的智力低下、发育迟缓等症状^[5, 6]。

试剂盒检测结果用于男性脆性 X 综合症的辅助诊断, 不用于胎儿、新生儿筛查, 不能采用该单一指标进行诊断。

【检测原理】

本试剂盒以人的基因组 DNA 为模板, 采用独特的反应混合液和 FAM 荧光标记的引物, 对 *FMR1* 基因的 CGG 重复序列进行 PCR 扩增。带有荧光信号的扩增产物可以被毛细管电泳仪精确识别和定位, 通过与 ROX 标记进行对比, 可判定扩增产物片段的长度, 进而换算出检测样本的 CGG 重复数。

【主要组成成分】

组分名称	规格 (50 人份/盒)	规格 (100 人份/盒)	主要成分
引物溶液	60 μ L/管 \times 1	120 μ L/管 \times 1	特异性荧光引物
主反应混合液	1.2mL/管 \times 1	1.2mL/管 \times 2	dNTPs 混合液、Mg ²⁺ 等
Taq 酶	20 μ L/管 \times 1	40 μ L/管 \times 1	酶
ROX 标记	50 μ L/管 \times 1	100 μ L/管 \times 1	在测序仪进行片段分析用的荧光分子量标记物
正常对照品	5 μ L/管 \times 1	10 μ L/管 \times 1	CGG 重复数小于 45 质粒 DNA

阳性对照品 1	5 μ L/管 \times 1	10 μ L/管 \times 1	CGG 重复数 45-54 质粒 DNA
阳性对照品 2	5 μ L/管 \times 1	10 μ L/管 \times 1	CGG 重复数 55-200 质粒 DNA
阳性对照品 3	5 μ L/管 \times 1	10 μ L/管 \times 1	CGG 重复数 $>$ 200 质粒 DNA
去离子水	200 μ L/管 \times 1	200 μ L/管 \times 1	无 DNA 酶/RNA 酶的去离子水

注：本产品为多组分试剂盒，不同批号试剂盒中各组分不可互换。核酸提取试剂盒需自备，使用天根生化科技（北京）有限公司生产的核酸提取或纯化试剂试剂盒（京海械备 20150135 号）、天根生化科技（北京）有限公司生产的核酸提取或纯化试剂试剂盒（京昌械备 20200001 号）。

【储存条件及有效期】

1. $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 避光保存，有效期为 12 个月。
2. 试剂盒反复冻融不超过 5 次。试剂开瓶使用后，剩余试剂密封 $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 避光保存 4 个月。
3. 生产日期、有效期见标签。

【适用仪器】

G1000 基因扩增仪（型号：TC-96/G/H(b)B，杭州博日科技股份有限公司）；基因分析仪 Genetic Analyzer（型号：3500xL Dx、3500Dx，Life Technologies Holdings Pte Ltd）

【样本要求】

1. 推荐使用新鲜 EDTA- K_2 抗凝全血样本。
2. 全血样本保存
 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 下保存 5 天； $-25^{\circ}\text{C}\sim -15^{\circ}\text{C}$ 保存 3 个月； $-80^{\circ}\text{C}\sim -60^{\circ}\text{C}$ 保存 52

个月。全血样本反复冻融次数不超过 3 次。

3.DNA 样本保存

新提取出的 DNA 样本 2℃~8℃ 保存 3 天，-25℃~-15℃ 保存 6 个月，-80℃~-60℃ 保存 52 个月。DNA 样本反复冻融次数不超过 5 次。

【检验方法】

1.样本制备

1.1 将 EDTA-K₂ 抗凝全血样本使用核酸提取或纯化试剂试剂盒进行提取，提取过程严格按照说明书进行。

1.2 提取后的 DNA 样本，其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值应在 1.8~2.0 之间；稀释后的 DNA 浓度范围应在 10~25ng/μL。建议每次实验包含一个空白对照，空白对照通常为无 DNA 酶/RNA 酶的去离子水或灭菌的纯水，参与核酸平行提取。

2.试剂配制

2.1 取出试剂盒，将除 Taq 酶和 ROX 标记以外的试剂盒组份放置于室温，使其缓慢融化至室温，充分震荡混匀；Taq 酶用前需移液器轻微吹打混匀 5~8 次。

2.2 根据本次实验所需的反应数计算并移取相应量的反应试剂，反应试剂人份数【n=样本数+4（对照品数）+1（空白对照）】，剩余试剂放回-15℃~-25℃避光保存。

2.3 PCR 反应体系如下所示

加入组分	1 个反应 (μL)
主反应混合液	21.4
引物	1.2
Taq 酶	0.4
DNA 样本 ($10\sim 25\text{ng}/\mu\text{L}$)	2.0

注：DNA 样本在加样区/样本制备区进行。

3. 加样

3.1 处理好的待测 DNA 样本、空白对照各 $2\mu\text{L}$ ，正常对照品、阳性对照品 1、阳性对照品 2、阳性对照品 3 各 $1\mu\text{L}$ 分别加入准备好的 PCR 反应液管/96 孔板中。

3.2 DNA 样本的加入量可以根据浓度进行调整，如若反应体系不足 $25\mu\text{L}$ ，用去离子水补齐。

4. PCR 扩增

将 PCR 反应液管/96 孔板按一定顺序放入 PCR 扩增仪上，设置反应程序：

循环数	温度	时间
1 次	98°C	5 分钟
30 次	97°C	35 秒
	57°C	35 秒
	68°C	4 分钟
1 次	72°C	10 分钟
1 次	4°C	恒定

注：扩增结束后的 PCR 产物，在进行毛细管电泳前，可在 $-25^{\circ}\text{C}\sim -15^{\circ}\text{C}$ 保存 7 天。

5.毛细管电泳实验

5.1 将 ROX 标记放置于室温下融化，使用前需充分震荡混匀。

5.2 每份 PCR 产物按照下表配制片段分析体系，加入毛细管电泳专用的 96 孔板内：

组份名称	加入量 (μL)
Hi-Di 甲酰胺	11.5
ROX 标记	1
PCR 产物	1.5
共计	14

注：以上体系需用移液器充分混匀，为配合毛细管电泳仪的通道数量，没有 PCR 产物的样本孔应加入 11.5μL 的 Hi-Di 甲酰胺，避免空气进入毛细管当中。

5.3 将 96 孔板贴上封膜震荡后离心，放置于基因扩增仪准备变性。

5.4 在 95℃ 变性 5 分钟后，温度快速降至 -20℃ 并持续 5 分钟。

5.5 将 96 孔板装入基因分析仪的卡槽当中，经毛细管电泳后，进行片段分析，并保存数据。

6.基因分析仪程序设置

使用基因分析仪(3500xL Dx、3500Dx)自带的 Data Collection 软件进行数据收集，基因分析仪的操作及设置需遵循厂家提供的标准流程进行。

7.基因分析仪下机数据的结果分析

应用 GeneMapper®V6.0 软件对基因分析仪所收集到原始下机数据进行分析。

7.1 导入数据

导入原始下机数据(.fsa 的后缀文件)到 GeneMapper®V6.0 软件, 利用分子内标信息对每个样本的扩增产物峰的电泳位置进行确定。

7.2 导入通用分析参数文件

对于第一次使用 GeneMapper®V6.0 软件来分析本公司产品的原始下机数据前, 需要导入一些通用分析参数文件。如果不是第一次使用, 请直接进入 7.3。

7.2.1 在 GeneMapper Manager 选项卡里导入

进入 GeneMapper®V6.0 软件后, 点击 Tools 菜单, 选择 GeneMapper Manager, 在该对话框中选择 Analysis Method 选项卡, 并点击 Import, 导入本公司提供的 Analysis Method 文件。并按照同样的方法, 导入 Table Setting、Plot Setting、Size Standard 文件。

7.2.2 在 Panel Manager 选项卡里导入

进入 GeneMapper®V6.0 软件后, 点击 Tools 菜单, 选择 Panel Manager, 点击 Import Panels, 导入本公司提供的 Panel 文件。点击 Import Bin Set, 导入本公司提供的 Bin 文件。

7.3 数据分析

7.3.1 在 GeneMapper®V6.0 软件界面, 点击 file 菜单, 选择 Add Sample to Project, 选中待分析样本, 点击 Add To List, 点击 Add, 样本文件将会显示在窗口的右侧。

7.3.2 在 GeneMapper®V6.0 软件界面的 Samples 页面，选择对应的 Table Setting、Analysis Method、Panel、Size Standard。然后从 Analysis 菜单选择 Analyze(或者菜单栏下方的绿色三角)，输入文件名并点击 ok，软件就开始了自动处理数据。

7.3.3 GeneMapper®V6.0 软件处理数据完毕后，选中所有文件，点击 Size Match Editor 查看所有样本的 ROX 标记是否都被正确标记上。

7.3.3.1 如果有 ROX 标记峰漏标时，请在该峰上，右键点击 Add，标记该峰。

7.3.3.2 如果出现无法正确标记部分或全部 ROX 标记峰时，需重新进行片段分析。

7.3.4 确认所有 ROX 标记峰均被正确标记上后，点击 Display Plots。进入 Plot Setting 界面。

7.4 目标峰判断

7.4.1 扩增产物峰值会自动标记出，判读目标峰的标准如下：

基因型	判读标准
<i>FMRI</i> 基因野生型及中间型区域	此区域的峰形常呈现锐利峰形，需选择最高峰为目标峰（主峰）。如遇两个或两个以上相邻的锐利峰，目标峰判读标准取决于左侧峰值的高低：当左侧的峰值低于右侧峰值的，判读右侧峰为目标峰；当左侧的峰值高于右侧峰值的，左右峰均判读为目标峰。
<i>FMRI</i> 基因前突变型及全突变型	此区域的峰形常呈现连续不断的形态，需选择区域内峰值最高的1个主峰，为目标峰。

7.4.2 读取峰值时，在目标峰以外，会有一些杂峰，杂峰不参与数据读取及计算：如在单一且锐利的最高峰(目标峰)旁，可以看到相邻处有低峰值

的，此为杂峰。

7.4.3 进入 Genotypes 界面，点击 Export Table 按钮导出 Genotypes Table 的 TXT 文件。该文件里的 Sample File 就是指样本名称；Size 就是指目标峰的 bp 数，即 $Peak_i$ 。

7.4.4 将所有目标峰的分子大小标记为 $Peak_i$ 。将 $Peak_i$ 代入以下公式进行计算，得出 CGG_i 的值。

$$CGG_i = \frac{Peak_i - c_0}{m_0}$$

注：理论上， c_0 取值 264.1， m_0 取值 2.962。

8. 质量控制

8.1 正常对照品

选择目标峰，将其分子大小标记为 $Peak_i$ ，进行计算， CGG_i 为 29 ± 1 。

8.2 阳性对照品 1

选择目标峰，将其分子大小标记为 $Peak_i$ ，进行计算， CGG_i 为 46 ± 1 。

8.3 阳性对照品 2

选择目标峰，将其分子大小标记为 $Peak_i$ ，进行计算， CGG_i 为 118 ± 1 。

8.4 阳性对照品 3

选择目标峰，将其分子大小标记为 $Peak_i$ ，进行计算， $CGG_i > 200$ 。

【阳性判断值】

基因型阳性判断值判读依据国内外指南^{[1][10]}，*FMR1* 基因各种 CGG

重复序列长度的基因型临界值:

CGG 重复数	判定
$CGG_i > 200$	<i>FMRI</i> 基因全突变型
$55 \leq CGG_i \leq 200$	<i>FMRI</i> 基因前突变型
$45 \leq CGG_i \leq 54$	<i>FMRI</i> 基因中间型

【检验结果的解释】

1. 判断依据

本试剂盒使用毛细电泳片段分析法, 对目标峰(峰高)的 bp 值计算得到的 CGG 重复数, 以最大 CGG 数为最终基因型判定。

表 1 检测结果判读表

CGG 重复数	峰	判读方法	基因型判定
$CGG_i \leq 44$	1 个或者 2 个以上的目标峰	以最大 CGG 数为最终基因型判定	<i>FMRI</i> 基因野生型
$45 \leq CGG_i \leq 54$	1 个或者 2 个以上的目标峰		<i>FMRI</i> 基因中间型
$55 \leq CGG_i \leq 200$	1 个或者 2 个以上的目标峰		<i>FMRI</i> 基因前突变型
$CGG_i > 200$	1 个或者 2 个以上的目标峰		<i>FMRI</i> 基因全突变型

2. 由于 *FMRI* 基因位于 X 染色体, 因此目标峰的数量会随性别变化:

样本性别	目标峰数量	备注
男	1 个	一般男性样本
	≥ 2 个	男性嵌合体样本
女	1 个(两条 X 染色体上的 <i>FMRI</i> 基因 CGG 重复数相同)	一般女性样本
	2 个(若两条 X 染色体上的 <i>FMRI</i> 基因 CGG 重复数不同)	
	≥ 3 个	女性嵌合体样本

3. 报告检测结果时, 多个目标峰值用“/”隔开每个 CGG 重复数。

4. 对于检测结果 CGG 重复数目在 195~200 范围内的受检者, 需要结合临床症状综合分析。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒的检测结果会受到 DNA 模板质和量的影响, 而 DNA 模板的

质和量可能受到样本特性、采集过程、运输条件、样本处理、DNA 提取试剂质量、Genetic Analyzer 仪器状况等因素的影响，使实验结果无法分析。使用者必须了解检测过程中可能存在的潜在风险。

2.本试剂盒仅能检测由于 *FMRI* 基因 CGG 扩增为全突变导致的脆性 X 综合征。无法检测由于 *FMRI* 基因内部其它突变造成的脆性 X 综合征。

3.本试剂盒在 CGG 重复数大于 200 时仅给出定性结果，不计算具体重复数。

【产品性能指标】

1.嵌合体检出限

本试剂盒的检测能力经过了实验室验证，能够特异性的检测下述 12 种嵌合体组合，每个组合中嵌合型的最低检测限均占比为 15%。

表 2 主要基因型和嵌合基因型样本 DNA 的不同检出限

嵌合基因型 主要基因型	野生型	中间型	前突变型	全突变型
野生型	/	√	√	√
中间型	√	/	√	√
前突变型	√	√	/	√
全突变型	√	√	√	/

2.企业参考品检测

2.1 阴性参考品符合率

阴性符合率（基因型/基因型）为 6/6；

2.2 阳性参考品符合率

阳性符合率（基因型/基因型）为 9/9；

2.3 最低检出限

最低检出限参考品稀释至 10ng/μL 时检测 9 份阳性参考品，结果均符合要求；

2.4 精密度

使用同一批次试剂盒检测 3 种精密度企业参考品，每种参考品检测 10 次，批内精密度： $CV \leq 5\%$ ；使用连续三批试剂盒检测 3 种精密度企业参考品，每份参考品检测 10 次，批间精密度： $CV \leq 10\%$ 。

2.5 干扰物质

50g/L 白蛋白、200g/L 血红蛋白、1040nmol/L 雌三醇、64nmol/L 孕酮，513umol/L 总胆红素，37mmol/L 甘油三酯，13mmol/L 胆固醇对结果无明显影响。

2.6 交叉反应

21-三体综合征、亨廷顿舞蹈症致病基因的 CAG 重复区域以及 47,XXX（超雌综合征）的样本对本试剂盒的检测结果均不造成影响。

3.国家参考品检测

使用“脆性 X 核酸检测国家参考品”，按国家参考品说明书进行全项目检测，阳性符合率（基因型/基因型）为 12/12；阴性符合率（基因型/基因型）为 9/9；最低检出限参考品稀释至 10ng/μL 时检测 12 份阳性参考品，结果均符合要求；精密度 3 份阳性参考品各重复检测 10 次结果均符合要求。

4.临床检测性能

临床试验结果与疾病临床诊断进行对比分析，本试剂盒灵敏度为 98.33%，特异性 99.84%，总符合率 98.79%，和临床诊断结果的一致性 好。采用本试剂盒与参比试剂盒进行临床试验验证，总符合率为 100.00%，两种试剂间检测结果一致性好。

【注意事项】

- 1.受检者所有样本均应视为潜在的传染源，检测完毕的样本、试剂、耗材均须作为医疗废物处理，避免污染环境。
- 2.试剂盒检测时与患者无接触，但产品使用过程中操作者由于接触血液，可能有感染的风险。
- 3.本试剂盒为体外诊断试剂，检测结果仅用于脆性 X 综合症的辅助诊断，检测结果仅供临床参考。对患者的临床诊断应结合其症状、体征、其它实验室检查及治疗反应等情况结合考虑。
- 4.在处理具有潜在感染性的样品，如肝炎、HIV 等时，操作应按实验室安全管理条例执行。
- 5.进行过骨髓移植或者近期接受过外源性输血的患者，不应使用本试剂盒进行辅助诊断。
- 6.本试剂盒仅限经过专业培训或具有专业资质的人员使用。
- 7.使用前应详细阅读说明书，充分了解风险，并严格执行说明书规定进行操作，否则可能造成错误结果。

【参考文献】

- [1] 中国医师协会医学遗传医师分会临床遗传学组, 中华医学会医学遗传学分会临床遗传学组, 中华预防医学会出生缺陷预防与控制专业委员会遗传病防控学组, 等.脆性 X 综合症的临床实践指南[J].中华医学遗传学杂志,2022,39(11):1181-1186.
- [2] Song FJ, Barton P, Sleightholme V, Yao GL, Fry-Smith A. Screening for fragile X syndrome: a literature review and modelling study. Health Technol Assess. 2003;7(16):1-106.
- [3] Garber KB, Visootsak J, Warren ST. Fragile X syndrome. Eur J Hum Genet. 2008 Jun;16(6):666-72.
- [4] Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP, Mandel JL. The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. Nat Genet. 1993 Aug;4(4):335-40.
- [5] Verheij C, Bakker CE, de Graaff E, KeijLemans J, Willemsen R, Verkerk AJ, Galjaard H, Reuser AJ, Hoogeveen AT, Oostra BA. Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. Nature. 1993 Jun 24;363(6431):722-4.
- [6] Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, Nelson DL. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome.

Cell. 1991 Aug 23;66(4):817-22.

[7] Sitzmann AF, Hagelstrom RT, Tassone F, Hagerman RJ, Butler MG. Rare *FMR1* gene mutations causing fragile X syndrome: A review. *Am J Med Genet A*. 2018 Jan;176(1):11-18.

[8] de Vries BB, van den Ouweland AM, Mohkamsing S, Duivenvoorden HJ, Mol E, Gelsema K, van Rijn M, Halley DJ, Sandkuijl LA, Oostra BA, Tibben A, Niermeijer MF. Screening and diagnosis for the fragile X syndrome among the mentally retarded: an epidemiological and psychological survey. Collaborative Fragile X Study Group. *Am J Hum Genet*. 1997 Sep;61(3):660-7.

[9] Hunter J, Rivero-Arias O, Angelov A, Kim E, Fotheringham I, Leal J. Epidemiology of fragile X syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Am J Med Genet A*. 2014 Jul;164A(7):1648-58.

[10] Spector E, Behlmann A, Kronquist K, Rose NC, Lyon E, Reddi HV; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Laboratory testing for fragile X, 2021 revision: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med*. 2021 May;23(5):799-812.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：北京华瑞康源生物科技发展有限公司

住所：北京市昌平区科技园区超前路甲 1 号 13 号楼 1 层 108 室

联系方式：

售后服务单位名称：北京华瑞康源生物科技发展有限公司

联系方式：

生产地址：北京市昌平区科技园区超前路甲 1 号 6 号楼 102、103 室，7 号楼 102 室，13 号楼 107 室

【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】