

受理号：CSZ1900377

# 体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：胎儿染色体非整倍体（T21、T18、T13）  
检测试剂盒（半导体测序法）

产品管理类别：第三类 6840

申请人名称：东莞博奥木华基因科技有限公司

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
产品审评摘要.....	4
一、 产品概述.....	4
二、 临床前研究摘要.....	5
三、 临床评价摘要.....	11
四、 风险分析及说明书提示.....	12
综合评价意见.....	16

## 基本信息

### 一、申请人名称

东莞博奥木华基因科技有限公司

### 二、申请人住所

东莞松山湖高新技术产业开发区桃园路 1 号莞台生物技术  
合作育成中心 11 栋

### 三、生产地址

东莞松山湖高新技术产业开发区桃园路 1 号莞台生物技术  
合作育成中心 11 栋

## 产品审评摘要

### 一、产品概述

#### (一) 产品主要组成成分

试剂盒 A: 末端修复缓冲液、末端修复酶、DNA 连接酶、连接缓冲液、PCR 扩增试剂、PCR 扩增引物、定量扩增试剂、定量扩增引物、定量标准品 S1-S4、阳性对照品 PC、阴性对照品 NC、接头、标签 A01-A48; 试剂盒 B: 磁珠 1、磁珠 2、TE 缓冲液。(具体内容详见说明书)。

#### (二) 产品预期用途

本试剂盒用于定性检测孕周为 12+0 周及以上的孕妇外周血浆中胎儿游离脱氧核糖核酸 (DNA), 通过分析样本中的胎儿游离 DNA 的 21 号、18 号及 13 号染色体数量的差异, 对胎儿染色体非整倍体疾病 21-三体综合征、18-三体综合征和 13-三体综合征进行产前筛查。本试剂盒仅用于构建测序文库。

#### (三) 产品包装规格

160 测试/套

#### (四) 产品检验原理

孕妇母体血浆中存在胎儿游离 DNA (cell-free DNA, cfDNA), 长度约为 75bp—250bp, 几乎全部来源于胎盘的滋养层细胞, 其浓度和孕周密切相关并以一定比例 (2%—30%) 稳定存

在于母体外周血浆中。当胎儿的某条染色体数目发生异常时，该染色体的 cfDNA 比例就会超出正常范围。基于此原理，通过测序的方法统计每一条染色体的 DNA 片段在血浆中的比例，从而获得胎儿染色体数目的信息。试剂盒采用了上述原理，利用新一代高通量测序平台，在半导体芯片的微孔中固定 DNA 链，DNA 聚合酶以固定的单链 DNA 为模板，按碱基互补原理，合成互补的 DNA 链。DNA 链每延伸一个碱基时，就会释放一个质子，导致局部 pH 变化，感知层检测 pH 变化，并将化学信号转换成数字信号，达到实时判读碱基。最终，通过对所有测序信号的分析，实现对 DNA 序列各个位点不同碱基的相对定量及 DNA 片段的序列判定；并结合生物信息学分析方法，对 21、18 和 13 号染色体所属的 DNA 片段数量进行统计，将统计的结果与大量正常样本构成的参考集合相比较，即可获得检测样品中所含的 DNA 片段数量是否存在异常，从而实现对 21-三体综合征、18-三体综合征和 13-三体综合征的产前筛查。

## 二、临床前研究摘要

### （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末端修复缓冲液、末端修复酶、连接缓冲液、DNA 连接酶、PCR 扩增试剂、扩增引物、接头、标签

和磁珠等。

主要原材料均为外购。申请人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设置情况

申请人设计了企业参考品，包括阳性参考品、阴性参考品、检测限参考品、微缺失微重复参考品、嵌合体参考品和重复性参考品。参考品采用正常女性血浆样本与对应的阳性/阴性 DNA 制备而成。阳性 DNA 样本（5 号染色体微缺失 DNA、13-三体阳性 DNA、15-三体阳性 DNA、16-三体阳性 DNA、18-三体阳性 DNA、21-三体阳性 DNA、XXY 阳性 DNA、XO 阳性 DNA、18 号染色体微重复 DNA）和阴性 DNA 测序验证为对应核型；血浆样本经检测为染色体数目正常女性样本。各项企业参考品综合用于产品检测最低检出限、特异性、重复性以及微缺失微重复和嵌合体的检出能力评价。

本试剂盒设置了阳性对照和阴性对照，用于检测过程中试剂和仪器的质量控制。阳性对照品为含有 T21、T18、T13 阳性基因组核苷酸序列的血浆，阴性对照品为血浆。

## （二）生产工艺及反应体系研究

申请人通过对有核型结果的临床样本检测、DNA 浓度、文库浓度等功能性试验确定生产工艺及反应体系，包括：试剂配置、

DNA 提取试剂盒的选择、反应体系组成和用量、扩增程序、纯化方法和用量、文库定量方法以及胎儿 DNA 浓度的计算方法；同时通过对不同 DNA 文库浓度和有效数据量进行研究，以确定文库浓度质量指标确定文库质量要求及有效数据量要求等。

### （三）分析性能评估

本产品分析性能包括最低检出限、企业参考品符合率、精密度、干扰试验、特异性研究、微缺失/微重复和嵌合体。申请人提交了三批产品（170201，170202，170203）在适用机型上的性能评估资料。

最低检出限评估中，申请人采用对阳性企业参考品分别稀释，对稀释样品重复检测 20 次，将检出率达 95% 的最低浓度作为最低检出限检测，最终确定 T21、T18、T13 的最低阳性 DNA 浓度为 3.5%。对阳性 DNA 浓度为 3.5% 的样本进行不同投入量检测，最终确定在阳性 DNA 浓度为 3.5% 的条件下，当 DNA 量  $\geq 0.5\text{ng}$  时可检出对应阳性。

采用 3 套企业参考品对本产品进行检验，检测结果均符合要求。

在精密度研究中，申请人采用三批产品在适用机型上对企业参考品和临床样本（均包含阴性样品、临界阳性样品、强阳性样品）分别评价了本产品批内/批间、日内/日间、室间以及

不同操作者精密度，结果显示阳性样本符合率为 100%，阴性样本符合率为 100%，批内、批间、日内、日间精密度及不同操作者之间的精密度均较好，试剂性能稳定。

在干扰试验研究中，申请人对内源性干扰物和外源性干扰物进行检测评价，结果显示：当血液中游离血红蛋白浓度  $\leq 500$  mg/dL、甘油三酯浓度  $\leq 1000$  mg/dL，胆红素浓度  $\leq 40$  mg/dL 时，对本试剂盒检测结果无显著影响；当血浆中含有肝素抗凝剂时，肝素抑制酶的活性，导致文库构建失败，肝素抗凝剂对本试剂盒检测结果有影响，因此不建议采用肝素抗凝采血管；而使用 EDTA、柠檬酸钠抗凝剂的样本检测结果与理论基因型相符，因此 EDTA、柠檬酸钠抗凝剂对本试剂检测结果无显著影响。

在特异性研究中，申请人对部分阳性、阴性企业参考品和加入其他染色体异常干扰的样本进行检测，检测结果为阳性参考品样本的检测结果显示全为相应型别的阳性，阴性企业参考品及 9 例其他染色体异常干扰样本的检测结果显示全为阴性，表明其他染色体非整倍体（T6、T9、T15、T16、T22、X0、XXY、XXX 和 XXYY）对于本试剂盒检测 21、18、13 号染色体非整倍体无显著影响。

在微缺失微重复研究中，申请人对微缺失微重复参考品和加入其他染色体微缺失微重复阳性 DNA 的样本进行检测，结果

显示：1 号染色体、4 号染色体、5 号染色体、8 号染色体、15 号染色体、16 号染色体和 X 染色体微缺失微重复对本试剂盒检测 21-18、13 号染色体非整倍体无显著影响；本试剂盒检测 18 号染色体上微重复 20M 以上可以检出 18 三体阳性。

在嵌合体研究中，申请人对嵌合体参考品进行检测，检测结果为试剂盒对于 70%异常嵌合体全部检出，30%异常嵌合体为检出或未检出。

#### **(四) 阳性判断值**

申请人对来源于临床的 2453 例阴性样本、94 例 21-三体阳性样本、33 例 18-三体阳性样本、20 例 13-三体阳性样本和 34 例首次采血样本及其重采血样本进行检测，数据分析采用 Z 值算法，胎儿 DNA 浓度使用 Y 染色体比例的线性回归模型和基于游离 DNA 长度分布信息的线性回归模型计算所得，建立和验证阳性判断值，与样本的核型结果进行比较，显示建立的阳性判断值可准确判断阴性和阳性。研究结论为：确定本产品检测 Z 值 $>3$ 的样本，判定为三体阳性样本；Z 值在 $(1.96, 3]$ 的样本，判定为灰区样本；Z 值 $\leq 1.96$ 的样本，判定为阴性样本。对于灰区样本，需结合胎儿 DNA 浓度进行进一步的结果判读，如胎儿 DNA 浓度 $\geq 4\%$ ，则判定为阴性；如胎儿 DNA 浓度 $<4\%$ ，则建议重新抽血取样后复检。对位于灰区内且胎儿 DNA 浓度 $<4\%$ 的样本

进行重采血复检，能降低由于胎儿 DNA 浓度过低而导致假阴性的概率，如复检结果仍为灰区且胎儿 DNA 浓度 $<4\%$ ，则建议结合临床信息做进一步检查。

### **(五) 稳定性研究**

申请人对本产品在实际储存条件下保存至成品有效期后的实时稳定性研究、开瓶稳定性研究、运输稳定性研究、反复冻融稳定性研究和样本稳定性进行了系统的研究，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：试剂在第 1、2、3、6、9、10、12 个月用企业参考品进行考核检测，最终确定试剂在对应的储存条件（试剂盒 A 部分置于 $-30^{\circ}\text{C} \sim -10^{\circ}\text{C}$  储存，试剂盒 B 部分试剂于 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ ）下，试剂盒有效期定为 9 个月。

开瓶稳定性研究：试剂在开瓶后第 1 个月、第 2 个月、第 3 个月和第 4 个月使用企业参考品进行考核检测，结果表明在开瓶后在储存温度下保存 4 个月后检测结果仍能达到性能指标要求，申请人建议开瓶后的试剂盒在 3 个月内使用。

运输稳定性研究：试剂在采用冷链运输后，用企业参考品进行考核检测，将试剂继续在存储温度下继续存储至第 6 个月和第 9 个月进行考核检测，结果表明经过运输后保存至 9 个月检测结果仍能达到性能指标要求。

反复冻融稳定性研究：试剂在反复冻融 6 次、8 次、10 次、12 次后用企业参考品进行考核检测，结果表明试剂盒反复冻融次数 6~12 次的检测结果稳定。综合考虑建议试剂盒反复冻融次数  $\leq 10$  次。

样本稳定性研究：申请人对样本稳定性研究，最终确定如下：外周血样本稳定性：结果表明本产品对采集至 EDTA 抗凝管保存 8 小时以内的孕妇外周血，及采集至游离核酸常温运输保存管保存 96 小时以内的孕妇外周血的检测结果稳定。血浆稳定性：结果表明本产品对  $-70^{\circ}\text{C}$  以下保存 2 年以内的孕妇血浆的检测结果稳定。考虑到孕妇进行该项检测后到分娩的时间间隔，以及部分 21 三体综合征患儿可能在一年后方表现出来，本产品拟定孕妇血浆  $-70^{\circ}\text{C}$  保存  $\leq 2$  年。血浆游离 DNA 稳定性：结果表明本产品对  $-30^{\circ}\text{C} \sim -10^{\circ}\text{C}$  保存  $\leq 30$  天血浆游离 DNA 检测结果稳定。

### 三、临床评价摘要

申请人在广东省妇幼保健院、南京市妇幼保健院、浙江大学医学院附属妇产科医院和郑州大学第三附属医院共四家临床试验机构开展了临床试验。本次临床试验采用考核试剂与染色体核型分析/出生后随访结果进行比较研究，验证考核试剂的临床性能。

本次临床试验采集孕周 12+0 周及以上的孕妇血浆样本作为临床样本，共前瞻性入组 11344 例孕妇的血浆样本，最终符合研究方案纳入统计分析的样本共 10818 例，阴性样本 10778 例，阳性样本 40 例。35 岁及以上孕妇占 12.08%。高危孕妇样本失访率为 1.12% 和低危孕妇样本失访率为 3.41%。

采用四格表总结考核试剂和临床参考标准的检测结果，计算临床灵敏度、临床特异度、阳性预测值和阴性预测值，并计算其 95% 置信区间。临床试验结果显示：所有有效病例的临床灵敏度为 100% (95% CI: 88.65%, 100%)，临床特异度为 99.91% (95% CI: 99.83%, 99.95%)，阳性预测值为 75% (95% CI: 59.81%, 85.81%)，阴性预测值为 100% (95% CI: 99.96%, 100%)。另外，对 21-三体综合征、18-三体综合征和 13-三体综合征分别进行统计分析，结果显示：21-三体综合征的临床灵敏度为 100%，临床特异度为 99.97%；18-三体综合征的临床灵敏度为 100%，临床特异度为 99.98%；13-三体综合征的临床灵敏度为 100%，临床特异度为 99.95%。

综上所述，本次临床试验对考核试剂的临床性能进行了全面研究，结果符合胎儿染色体非整倍体 (T21、T18、T13) 检测试剂盒 (高通量测序法) 指导原则的相关要求。

#### 四、风险分析及说明书提示

参照“YY/T 0316-2016 医疗器械风险管理对医疗器械的应用”标准，对本产品进行风险分析。经综合评价，本产品的受益和风险总结如下：

本产品检测结果会受到样本来源、样本采集过程、样本质量、样本运输条件、样本处理等因素影响，同时也受到实验操作、实验环境等限制，导致可能得出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风险及检测的局限性。

本试剂盒用于定性检测孕周为12+0周及以上的孕妇外周血血浆中胎儿游离脱氧核糖核酸（DNA），通过分析样本中的胎儿游离DNA的21号、18号及13号染色体数量的差异，对胎儿染色体非整倍体疾病21-三体综合征、18-三体综合征和13-三体综合征进行产前筛查。本试剂盒仅用于构建测序文库。不合理的样本类型、样本采集、样本运输以及用不满足说明书中【样本要求】的样本进行检测，会导致假阳性或假阴性结果，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。

本试剂盒作为胎儿染色体非整倍体筛查检测，其结果仅供临床参考，不能作为诊断的唯一依据。对患者的临床诊断应采用金标准方法（染色体核型分析）并结合其症状/体征、病史及其他实验室检查等情况综合进行。

本试剂盒适用于孕妇外周血血浆样本检测，不适用于其它样本检测。

胎儿游离 DNA 浓度在孕妇外周血中存在较大个体差异，变化范围从 2%到 30%不等且和孕周密切相关，因此若因胎儿游离 DNA 浓度较低造成检验失败时，可待孕周较大时再次抽血检测。

某些特殊孕妇样品可能会出现假阳性或假阴性结果，需要结合其他检测结果进行综合判断。

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，对该产品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验收准则规定的可接受范围内，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：

1. 适用范围：本试剂盒用于定性检测孕周为 12+0 周及以上的孕妇外周血血浆中胎儿游离脱氧核糖核酸（DNA），通过分析样本中的胎儿游离 DNA 的 21 号、18 号及 13 号染色体数量的差异，对胎儿染色体非整倍体疾病 21-三体综合征、18-三体综合征和 13-三体综合征进行产前筛查。本试剂盒仅用于构建测序文库。

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

本申报项目为境内第三类医疗器械产品注册，属于优先审评项目（编号：2020004）。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。上市后需继续搜集至少10家临床机构、总数不少于10万例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，并使用该试剂检测的全部结果（包括阴性、阳性）与卫生主管部门关于胎儿染色体产前诊断技术标准以羊水穿刺核型分析或出生随访结果作为金标准进行对照。对于出现在灰区（如适用）的样本（Z值临界值区域）应进行分析总结。该项临床资料应当由出具数据各临床机构主管部门签章。此外，注册人还应总结上市期间假阳性和假阴性的例数并详细分析产生原因。在延续注册时，注册人应依据上市后的临床使用数据进一步修订说明书临床性能相关内容。

2020年08月17日

附件：产品说明书

# 胎儿染色体非整倍体（T21、T18、T13）检测试剂盒（半导体测序法） 产品说明书

## 【产品名称】

通用名称：胎儿染色体非整倍体（T21、T18、T13）检测试剂盒（半导体测序法）

## 【包装规格】

160 测试/套

## 【预期用途】

本试剂盒用于定性检测孕周为 12<sup>+0</sup> 周及以上的孕妇外周血血浆中胎儿游离脱氧核糖核酸（DNA），通过分析样本中的胎儿游离 DNA 的 21 号、18 号及 13 号染色体数量的差异，对胎儿染色体非整倍体疾病 21-三体综合征、18-三体综合征和 13-三体综合征进行产前筛查。本试剂盒仅用于构建测序文库。

染色体非整倍体是指相对于人的正常的 46 条染色体而言，细胞中的某一条或几条染色体数目增加或减少，与婴幼儿期显著的发病率和死亡率有着密切的关系。我国新生儿中染色体异常的发病率为 1/60，其中 21-三体综合征（唐氏综合征）、18-三体综合征（爱德华氏综合征）和 13-三体综合征（帕陶氏综合征）是三种最常见的常染色体非整倍体疾病，在新生儿中发病率分别为 1/（600-800）、1/（3500-8000）和 1/（7000-20000）。产前筛查和产前诊断是降低遗传缺陷发生率的有效方法。本试剂盒适用于孕周为 12<sup>+0</sup> 周及以上的孕妇对胎儿染色体非整倍体疾病 21-三体综合征、18-三体综合征和 13-三体综合征进行产前筛查。目前常规的产前筛查方法包括：早孕期的超声与血清学联合筛查和中孕期母体血清学筛查。筛查结果为高风险的孕妇经建议经产前诊断进行最终确认，由孕妇知情选择。胎儿染色体异常的产前诊断金标准为介入产前诊断手术，是指通过绒毛取材术/羊膜腔穿刺术/经皮脐血管穿刺术，取相应细胞采用细胞生物学方法对胎儿染色体进行核型分析。

本试剂盒仅作为 21 号、18 号及 13 号染色体的产前筛查用途，其结果要由产前诊断金标准进行确认并遵守相关法律法规及行业规范。

## 【检测原理】

孕妇母体血浆中存在胎儿游离 DNA（cell-free DNA，cfDNA），长度约为 75bp—250bp，几乎全部来源于胎盘的滋养层细胞，其浓度和孕周密切相关并以一定比例（2%—30%）稳定存在于母体外周血浆中。当胎儿的某条染色体数目发生异常时，该染色体的 cfDNA 比例就会超出正常范围。基于此原理，通过测序的方法统计每一条染色体的 DNA 片段在血浆中的比例，从而获得胎儿染色体数目的信息<sup>[1-2]</sup>。

本试剂盒正是采用了上述原理，利用新一代高通量测序平台，在半导体芯片的微孔中固定 DNA 链，DNA 聚合酶以固定的单链 DNA 为模板，按碱基互补原理，合成互补的 DNA 链。DNA 链每延伸一个碱基时，就会释放一个质子，导致局部 pH 变化，感知层检测 pH 变化，并将化学信号转换成数字信号，达到实时判读碱基。最终，通过对所有测序信号的分析，实现对 DNA 序列各个位点不同碱基的相对定量及 DNA 片段的序列判定；并结合生物信息学分析方法，对 21、18 和 13 号染色体所属的 DNA 片段数量进行统计，将统计的结果与大量正常样本构成的参考集合相比较，即可获得检测样品中所含的 DNA 片段数量是否存在异常，从而实现 21-三体综合征、18-三体综合征和 13-三体综合征的产前筛查。

## 【主要组成成分】

表 1 试剂盒组成（160 测试/套，产品货号：S30030）

试剂盒组成	组分名称	主要组成成分	160 测试/套	
			标示装量	数量
试剂盒 A	末端修复缓冲液	Tris-HCl、MgCl <sub>2</sub> 、KCl、dNTP	800 μL/管	1 管
	末端修复酶	T4 多聚核苷酸激酶、T4 DNA 聚合酶、甘油	240 μL/管	1 管
	DNA 连接酶	T4 DNA 连接酶、甘油	160 μL/管	1 管
	连接缓冲液	Tris-HCl、MgSO <sub>4</sub> 、聚乙二醇	800 μL/管	1 管
	PCR 扩增试剂	Tris-HCl、MgCl <sub>2</sub> 、KCl、dNTP、DNA 聚合酶	1150 μL/管	3 管
	PCR 扩增引物	核苷酸序列	288 μL/管	1 管
	定量扩增试剂	荧光染料、dNTP、MgCl <sub>2</sub> 、DNA 聚合酶	1000 μL/管	5 管
	定量扩增引物	核苷酸序列	500 μL/管	1 管
	定量标准品 S1~S4	核苷酸序列	60 μL/管	4 管
	阳性对照品 PC	T21、T18、T13 阳性基因组核苷酸序列、血浆	400 μL/管	1 管
	阴性对照品 NC	血浆	400 μL/管	1 管
	接头	核苷酸序列	288 μL/管	1 管
标签 A01-A48	核苷酸序列	6 μL/管	48 管	
试剂盒 B	磁珠 1	磁珠	12 mL/瓶	1 瓶
	磁珠 2	磁珠	36 mL/瓶	1 瓶
	TE 缓冲液	Tris-HCl、EDTA	22 mL/瓶	1 瓶

注：不同批号试剂盒中各组分不可互换

需要但未提供：

1. 核酸提取试剂盒：使用东莞博奥木华基因科技有限公司的核酸提取或纯化试剂盒（产品货号：S10020；备案号：粤东械备 20170019 号）；
2. 测序反应通用试剂盒：使用东莞博奥木华基因科技有限公司的测序反应通用试剂盒（半导体法）（产品货号：S10010；备案号：粤东械备 20170021 号）。
3. 18 MΩ 纯水；
4. 无核酸酶水；
5. 无水乙醇（分析纯）；
6. 异丙醇（分析纯）；
7. 氢氧化钠溶液（10 M）。

#### 【储存条件及有效期】

试剂盒 A 于 -30℃ ~ -10℃ 储存；试剂盒 B 于 2℃ ~ 8℃ 储存。产品有效期为 9 个月。

建议开瓶后的试剂盒在 3 个月内使用完成。

冻融影响：在正常使用条件下，试剂盒冻融 10 次对性能无影响。

生产日期和失效日期见试剂盒包装标签。

#### 【适用仪器】

晶芯® BioelectronSeq 4000 基因测序仪。

#### 【样本要求】

1. 样本采集：本试剂盒适用的样本为孕 12<sup>+0</sup>周及以上孕妇外周静脉全血，受检孕妇需 B 超检测，确认胎儿为单活胎。根据采血管的类型选择以下操作步骤：

- 1) 采血管（EDTA 抗凝，紫头）采取 5 mL 孕妇外周血。采集完毕后，轻柔颠倒采血管 3~5 次并及时将采血管放置于 2℃~8℃下保存，须在 8 小时内进行血浆分离。
- 2) 采血管（游离核酸常温运输保存管）采取 5 mL~10 mL 孕妇外周血。采集完毕后，轻柔颠倒采血管 8~10 次并常温保存（4℃~30℃），采集后的样品须在 96 小时内进行血浆分离。

**注意事项：① 颠倒动作轻柔，避免样品剧烈振荡，防止因溶血而影响检测结果的准确性。**

**② 如样本发生中度及以上溶血（血红色）须重新采集全血。**

2. 血浆分离：通过两步离心法实现血浆的分离，具体步骤如下：

- 1) 预冷低速离心机，温度设置为 4℃，待温度稳定后，放入采血管，1600 g 离心 10 分钟（如为常温运输保存管离心时间为 15 分钟），吸取上清血浆，转移至置于冰盒上的 2.0 mL 离心管中（1~2 管），标记相应的样品编号。

**注意事项：为避免吸到中间层的白细胞及红细胞，采血管内剩余血浆高度应为 5 mm~8 mm。**

- 2) 预冷高速离心机，温度设置为 4℃，待温度稳定后，放入上步所得 2.0 mL 离心管，16000 g 离心 10 分钟，枪头对着非白细胞沉淀处，在冰盒上吸取上清血浆，分装至置于冰盒上的 2 mL 离心管中，每管转入 400 μL 血浆，标记好样品编号和血浆管数，立即放入 -30℃~-10℃或 -70℃以下保存。

3. 保存与运输：

- 1) 全血样本：EDTA 抗凝管的外周血在生物冰袋或 2℃~8℃条件下运输保存送检；常温运输保存管的外周血常温（4℃~30℃）运输；运输过程中须采取防震装置，避免全血样本运输过程中出现大幅度摇晃。为保持检测样本中胎儿游离 DNA 比例，如选择使用 EDTA 抗凝管采集孕妇外周血，则其血管全血样本采集后置于 2℃~8℃存放，须在 8h 内完成血浆分离；如选择常温运输保存管的全血样本，要求采集后置于 4℃~30℃，并且须在 96 小时内完成血浆分离。
- 2) 血浆样本：干冰条件下运输；运输过程中需放置缓冲装置，避免样本管在运输过程中被干冰冰块挤破。样本到达后及时存放于 -30℃~-10℃冰箱中；为确保血浆样本质量和检测灵敏度，血浆样本反复冻融次数应≤3 次；血浆样本在 -30℃~-10℃条件下短暂保存时间须≤7 天；在 -70℃以下可储存 2 年。

#### 【检验方法】

##### 1. DNA 提取

按照核酸提取或纯化试剂盒（产品货号：S10020）操作说明书进行血浆样品中游离核酸的提取。提取后的 DNA 溶液立即进行下一步操作或低温冷冻保存。

###### 1.1 试剂配制

- 1) 蛋白酶 K 溶解：首次使用该试剂时，根据干粉状蛋白酶 K 试剂瓶标示量加入相应的蛋白酶 K 溶解液，轻轻颠倒使蛋白酶 K 充分溶解，混匀后于 -30℃~-10℃条件下保存。
- 2) 配制洗涤液 2：首次使用该试剂时，根据洗涤液 2 试剂瓶的标示量加入相应的无水乙醇，颠倒混匀 5 次，室温保存。
- 3) 磁珠 G 准备：每次使用前，充分震荡混匀磁珠 5 分钟。
- 4) 提前预热恒温震荡混匀仪，温度设置为 40℃。

## 1.2 操作步骤

- 1) 往 2 mL 离心管中加入 20  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K 溶液、30  $\mu\text{L}$  磁珠 G 与 400  $\mu\text{L}$  液体样本，涡旋混匀 5 秒。
- 2) 往混匀的样本中加入 500  $\mu\text{L}$  裂解液 MLK，涡旋混匀 5 秒。
- 3) 将上述步骤 2) 的混合液置于 40 $^{\circ}\text{C}$  振荡混匀 10 分钟；若无恒温振荡混匀仪，则将上述步骤 2) 的混合液室温放置 15 分钟同时每隔 3 分钟涡旋震荡 1 次。
- 4) 离心 5 秒，将离心管置于磁力架上 3 分钟，待澄清，弃上清。
- 5) 加入 500  $\mu\text{L}$  洗涤液 1，取下离心管，震荡 15 秒，离心 5 秒，将离心管置于磁力架上 1 分钟，待澄清，弃上清。
- 6) 加入 500  $\mu\text{L}$  洗涤液 2，取下离心管，震荡 15 秒，离心 5 秒，将离心管置于磁力架上 1 分钟，待澄清，弃上清。

**注意：洗涤液 2 加入前确定已加入无水乙醇。**

- 7) 重复一次步骤 6)。
- 8) 取下离心管，离心 5 秒，将离心管置于磁力架上 1 分钟，待澄清，弃残留液，室温晾干 5 分钟。  
注意：乙醇残留会抑制后续的酶反应，晾干时须确保乙醇挥发完全，同时避免磁珠过于干燥。
- 9) 加入 45  $\mu\text{L}$ （可根据实际损耗调整洗脱液的体积）洗脱液 AE，震荡 1 分钟打散磁珠，离心管置于 40 $^{\circ}\text{C}$  振荡 5 分钟；若无恒温振荡混匀仪，则加入 45  $\mu\text{L}$  提前 40 $^{\circ}\text{C}$  预热洗脱液 AE，震荡 1 分钟打散磁珠，离心管置于室温静置 5 分钟，期间涡旋震荡 1~2 次。
- 10) 将离心管移至磁力架上，吸附 1 分钟，待澄清，移取上清液（DNA 溶液）至新标记好的低吸附离心管，并于 -30 $^{\circ}\text{C}$ ~-10 $^{\circ}\text{C}$  留存备用。

## 2. 文库构建

### 2.1 实验前准备

- 1) 将 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$  保存的磁珠 1 和磁珠 2 取出，充分振荡均匀，室温平衡 30 分钟，备用。
- 2) 取出步骤 1.2 10) 中的 DNA 备用（若为置于 0 $^{\circ}\text{C}$  以下保存的 DNA 样品，需提前取出融化，瞬时离心后备用）。

### 2.2 末端修复

- 1) 预先取出末端修复缓冲液，融化后充分混匀，将其置于冰盒上；取出末端修复酶，将其置于冰盒上。
- 2) 根据下表，将步骤 2.1.2) 的 DNA 与反应试剂在 1.5 mL 低吸附离心管或 1.2 mL 浅孔板中进行混合，并使用移液器反复吹打混匀。

组分	反应体积 ( $\mu\text{L}$ )
DNA	43.5
末端修复缓冲液	5
末端修复酶	1.5
反应体系总量	50

- 3) 将反应液振荡混匀 1 秒，瞬时离心，置于室温或恒温水浴仪（25 $^{\circ}\text{C}$ ）反应 30 分钟。
- 4) 磁珠 1 振荡 1 分钟，充分混匀，往上步溶液加入 65  $\mu\text{L}$  磁珠 1。磁珠 1 使用完毕后置于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$  保存。请根据操作情况选择以下 A) 或 B) 的适用操作方法：

#### A) 离心管单管操作

- a) 将步骤 4) 中的混合液振荡 3 秒，静置 5 分钟，瞬时离心，放置 16 孔磁力架上静置 3 分钟。
- b) 根据样本量取出对应数量的 1.5 mL 低吸附离心管，在管盖标记样本编号。将已室温平衡 30 分钟的磁珠 2 振荡 1 分钟，充分混匀，往每个 1.5 mL 低吸附离心管中加入 100  $\mu$ L 磁珠 2。
- c) 将步骤 a) 中的上清全部转移到对应编号的磁珠 2 管中。将磁珠 2 涡旋振荡 3 秒，静置 5 分钟，瞬时离心后置于磁力架上静置 3 分钟，弃上清。

**注意事项：转移上清时避免吸到磁珠。**

- d) 按样本量配制 75% 的乙醇（75% 乙醇须新配制，配制量为 1 mL/样本），颠倒混匀。
- e) 加入 500  $\mu$ L 新配制的 75% 乙醇，盖上管盖，将磁力架从后往前 90 度转动 5 次，静置 5 秒，弃上清。
- f) 重复步骤 e)，进行第二次乙醇洗涤。接着按步骤 5) 和 6) 进行操作。

#### B) 浅孔板排枪操作

- a) 将步骤 4) 中的混合液使用移液器反复吹打混匀或震荡混匀，静置 8 分钟，置于 24 孔磁力架上静置 8 分钟至澄清。
- b) 取出新的 1.2 mL 浅孔板。将已室温平衡 30 分钟的磁珠 2 振荡 1 分钟，充分混匀，往浅孔板孔加入 100  $\mu$ L 磁珠 2。
- c) 将 a) 中的上清全部转移到对应的装有磁珠 2 孔中，使用移液器反复吹打混匀或震荡混匀，静置 8 分钟，置于 24 孔磁力架上静置 8 分钟至澄清，弃上清。
- d) 按样本量配制 75% 的乙醇（75% 乙醇须新配制，配制量为 0.4 mL/样本），颠倒混匀。
- e) 加入 180  $\mu$ L 新配制的 75% 乙醇，对着非磁珠沉淀处吹打 6 次，置于 24 孔磁力架上静置至澄清，弃上清液。
- f) 重复步骤 e)，进行第二次乙醇洗涤。接着按步骤 5) 和 6) 进行操作。
- 5) 将残余的乙醇吸走，室温晾干至磁珠干裂。

**注意事项：①如磁珠过湿，可置于数显干式加热器中 40 $^{\circ}$ C 烘至磁珠干裂。**

**②避免磁珠过度干燥；如磁珠有裂纹出现则及时进行下步实验操作。**

- 6) 加入 28  $\mu$ L TE 缓冲液，充分溶解，静置 5 分钟。置于磁力架上至液体澄清把离心管置于磁力架上静置至液体澄清，将上清全转移到已标记的 1.5 mL 低吸附离心管或 1.2 mL 浅孔板中，即为纯化好的平末端 DNA。

#### 2.3 接头连接

- 1) 预先取出连接缓冲液、接头、标签，融化后充分混匀，将其置于冰盒上；取出 DNA 连接酶，将其置于冰盒上。
- 2) 根据下表在步骤 2.2.6) 中依次加入试剂，并用移液器反复吹吸混匀。

组分	反应体积 ( $\mu$ L)
平末端 DNA	28
无核酸酶水	13
连接缓冲液	5
DNA 连接酶	1
接头	1.5
标签	1.5
反应体系总量	50

- 3) 将反应液振荡混匀 1 秒，短暂离心 2 秒，在恒温水浴仪上按以下条件进行反应：25℃，30 分钟。

**注意事项：加入标签时须反复核对，谨防标签交叉污染。**

- 4) 将已室温平衡 30 分钟的磁珠 2 振荡 1 分钟，充分混匀，往上步溶液加入 75  $\mu\text{L}$  磁珠 2。请根据操作情况选择以下 A) 或 B) 的适用操作方法：

**A) 离心管单管操作**

- a) 将步骤 4) 中的混合液振荡 3 秒，静置 5 分钟，瞬时离心，放置 16 孔磁力架上静置 3 分钟，弃上清。  
b) 按样本量配制 75% 的乙醇（75% 乙醇须新配制，配制量为 1 mL/样本），颠倒混匀。  
c) 加入 500  $\mu\text{L}$  新配制的 75% 乙醇，盖上管盖，将磁力架从后往前 90 度转动 5 次，静置 5 秒，弃上清。  
d) 重复步骤 c)，进行第二次乙醇洗涤。接着按步骤 5) 和 6) 进行操作。

**B) 浅孔板排枪操作**

- a) 将步骤 4) 中的混合液使用移液器反复吹打混匀或震荡混匀，静置 8 分钟，置于 24 孔磁力架上静置 8 分钟至澄清，弃上清。  
b) 按样本量配制 75% 的乙醇（75% 乙醇须新配制，配制量为 0.4 mL/样本），颠倒混匀。  
c) 加入 180  $\mu\text{L}$  新配制的 75% 乙醇，对着非磁珠沉淀处吹打 6 次，置于 24 孔磁力架上静置至澄清，弃上清液。  
d) 重复步骤 c)，进行第二次乙醇洗涤。接着按步骤 5) 和 6) 进行操作。  
e) 将残余的乙醇吸走，室温晾干至磁珠干裂。

**注意事项：① 如磁珠过湿，可置于数显干式加热器中 40℃ 烘至磁珠干裂。**

**② 避免磁珠过度干燥；如磁珠有裂纹出现则及时进行下步实验操作。**

- 6) 加入 18.2  $\mu\text{L}$  TE 缓冲液，充分溶解，静置 5 分钟，将离心管或浅孔板放置于磁力架上静置至澄清，吸取 18.2  $\mu\text{L}$  上清转移到 0.2 mL PCR 管或 0.2 mL PCR 板中，即为纯化好的连接接头的 DNA。

**2.4 PCR 扩增**

- 1) 预先取出 PCR 扩增试剂和 PCR 扩增引物，将其置于冰盒上，融化后充分振荡混匀。  
2) 根据下表在 0.2 mL PCR 管或 0.2 mL PCR 板中依次加入试剂，并用移液器反复吹吸混匀。

组分	反应体积 ( $\mu\text{L}$ )
连接接头的 DNA	18.2
PCR 扩增试剂	20
PCR 扩增引物	1.8
反应体系总量	40

- 3) 将反应液振荡混匀 1 秒，瞬时离心。在 PCR 仪上按以下条件进行反应：72℃ 10 分钟；95℃ 2 分钟；(98℃ 20 秒；65℃ 30 秒，72℃ 30 秒) 13 个循环；72℃ 2 分钟；4℃ 保持

- 4) 根据样本量取出对应数量的 1.5 mL 低吸附离心管或取出 1.2 mL 浅孔板。将已室温平衡 30 分钟的磁珠 2 涡旋振荡 1 分钟，充分混匀，往每个 1.5 mL 低吸附离心管或 1.2 mL 浅孔板孔中加入 45  $\mu\text{L}$  磁珠 2。

- 5) PCR 结束后，取下 PCR 管，离心 2 秒。将 PCR 产物转移至步骤 4) 中装有磁珠 2 的 1.5 mL 低吸附离心管中或 1.2 mL 浅孔板孔中。请根据操作情况选择以下 A) 或 B) 的适用操作方法：

**A) 离心管单管操作**

- a) 将步骤 5) 中的混合液振荡 3 秒，静置 5 分钟，瞬时离心，放置 16 孔磁力架上静置 3 分钟，弃上清。  
b) 按样本量配制 75% 的乙醇（75% 乙醇须新配制，配制量为 1 mL/样本），颠倒混匀。

- c) 加入 500  $\mu\text{L}$  新配制的 75%乙醇，盖上管盖，将磁力架从后往前 90 度转动 5 次，静置 5 秒，弃上清。
- d) 重复步骤 c)，进行第二次乙醇洗涤。接着按步骤 6) 和 7) 进行操作。

#### B) 浅孔板排枪操作

- a) 将步骤 5) 中的混合液使用移液器反复吹打混匀或震荡混匀，静置 8 分钟，置于 24 孔磁力架上静置 8 分钟至澄清，弃上清。
- b) 按样本量配制 75%的乙醇（75%乙醇须新配制，配制量为 0.4 mL/样本），颠倒混匀。
- c) 加入 180  $\mu\text{L}$  新配制的 75%乙醇，对着非磁珠沉淀处吹打 6 次，置于 24 孔磁力架上静置至澄清，弃上清液。
- d) 重复步骤 c)，进行第二次乙醇洗涤。接着按步骤 6) 和 7) 进行操作。
- 6) 将残余的乙醇吸走，敞开管盖，室温晾干至磁珠干裂。

**注意事项：① 如磁珠过湿，可置于数显干式加热器中 40℃ 烘至磁珠干裂。**

**② 避免磁珠过度干燥；如磁珠有裂纹出现则及时进行下步实验操作。**

- 7) 加入 50  $\mu\text{L}$  TE 缓冲液，充分溶解，静置 5 分钟，将离心管或浅孔板放置于磁力架上静置至澄清，将上清全部转移到新的 1.5 mL 离心管中，即为最终的 DNA 文库。制备好的 DNA 文库可置于 -30℃~-10℃ 保存。

### 3. 文库定量

#### 3.1 准备定量标准品 S1~S4

取出定量标准品 S1、定量标准品 S2、定量标准品 S3、定量标准品 S4，融化后充分振荡混匀，置于冰盒上备用。

#### 3.2 稀释待测 DNA 文库

- 1) 根据步骤 2.4.7) 中待测的 DNA 文库样本数量，取一定数量的 1.5 mL 离心管，标记样本编号。
- 2) 分别吸取 399  $\mu\text{L}$  18 M $\Omega$  纯水至每个离心管中。
- 3) 将待测文库的样品原管涡旋振荡 5 秒混匀，瞬时离心后，分别移取 1  $\mu\text{L}$  样品溶液至相对应的装有 399  $\mu\text{L}$  18 M $\Omega$  纯水的离心管中，涡旋振荡 10 秒，瞬时离心至管底，置于冰盒上备用。

**注意事项：① 吸取 18 M $\Omega$  纯水时需润洗枪头 2~3 次。**

**② 准确吸液，且稀释液需充分振荡混匀。**

#### 3.3 配制反应液

- 1) 取 1.5 mL 或 2 mL 离心管，在管盖上做好标记，套上锡箔纸避光。
- 2) 按照下表中的反应体系配制反应混合液，配制时按照每个定量标准品重复 3 次、每个样品做 2 次重复反应所需的量配制体系。

组分	单次反应所需用量 ( $\mu\text{L}$ )
无核酸酶水	7.2
定量扩增试剂	10
定量扩增引物	0.8
反应体系总量	18

- 3) 配制完成后，将反应混合液振荡 5 秒，瞬时离心，将反应混合液置于冰盒上。

#### 3.4 加样

- 1) 取出反应板。

- 2) 将预先配好的反应混合液加到各反应管孔中，每孔加入 18  $\mu\text{L}$  反应混合液。按照顺序分别向反应孔中加入 2  $\mu\text{L}$  定量标准品、待测稀释样品：加入定量标准品时，向标准品反应孔中分别加入 2  $\mu\text{L}$  定量标准品 S1~S4，每个梯度的定量标准品重复三孔；向样品反应孔中加入 2  $\mu\text{L}$  已稀释好的样品，每个样品重复两孔。
- 3) 使用封膜工具和光学粘性膜密封反应板。
- 4) 使用离心机离心反应板，转速为 2000 rpm，离心时间 1 分钟，将反应板装载到荧光定量 PCR 扩增仪以准备运行。

### 3.5 设置程序（以 ABI 公司 StepOnePlus 为例）

- 1) 在程序界面，在 block 项选择：96 孔板（0.2 mL）；在类型项选择：Standard Curve。
- 2) 在试剂项选择：SYBR Green Reagent；在方式项选择：Standard。默认选择包括 Melt Curve。

**注意事项：可根据仪器的程序界面和实验的实际情况选择以上各选项。**

- 3) 在 Plate Setup 界面，选好标准品孔，重复系数均为 3；选好样品孔，重复系数为 2。设置输入标准品 1 浓度为：0.135，稀释梯度为：1:10。
- 4) 在荧光定量 PCR 扩增仪上设置程序：  
95 $^{\circ}\text{C}$  1 分钟；（95 $^{\circ}\text{C}$  15 秒，65 $^{\circ}\text{C}$  15 秒，72 $^{\circ}\text{C}$  30 秒）30 个循环；95 $^{\circ}\text{C}$  15 秒，65 $^{\circ}\text{C}$  1 分钟，95 $^{\circ}\text{C}$  15 秒；同时设置在 72 $^{\circ}\text{C}$  30 秒这个阶段收集荧光信号。
- 5) 设置反应体系为 20  $\mu\text{L}$ ，单击 RUN 开始进行 qPCR 反应。

### 3.6 数据分析

- 1) 反应结束，进行数据分析，判断结果可信度。模型与样本质检的拟合度（ $R^2$ ）在 0.98~1 范围内，扩增效率（Eff%）在 85~100%范围内的数据结果为佳。如数据偏差太大，须重新进行定量。
- 2) 如数据可信，则导出数据，数据处理表中选择重复阈值（CT 值）相差小于 0.5 的浓度，取平均数，平均数乘以 400（推荐稀释倍数）后的数据为文库定量浓度，记录文库浓度。具体的稀释倍数可以根据各实验室验证操作情况自行规定。
- 3) 为了更好的保证检测结果，当文库浓度小于 1 nmol/L 时，应重新建库进行测序。

## 4. 测序模板制备

**按照测序反应通用试剂盒（半导体法）（产品货号：S10010）说明书操作。**

### 4.1 混合文库及其稀释

- 1) 根据样本 DNA 文库浓度和特异性标签编制上机记录表，注意勿将加有相同标签的文库安排在同一次测序 RUN。文库上机浓度推荐范围为：20 pmol/L~30 pmol/L，优选 25 pmol/L，具体可根据情况作调整。按照如下公式（1）计算样本文库的稀释倍数。

公式（1）：稀释倍数=混合文库浓度（nM） $\times$ 1000 $\div$ 上机浓度（pM）

- 2) 将样本文库振荡 2 秒，瞬时离心至管底，根据记录表对处理好的样本文库进行排序；按照计算好的取样体积，逐一将文库混合到新的已标记的 1.5 mL 离心管中，混合完毕后，振荡 5 秒，瞬时离心至管底。取另一新的 1.5 mL 离心管，用无核酸酶水将混合文库稀释至所需上机浓度，稀释后振荡 2 秒，瞬时离心至管底，置于冰盒上备用。

### 4.2 扩增

注：该步骤也可选择其它合适的机型进行，以下为采用 One Touch2 进行操作时的方法，若选择其它型号的仪器，请参照仪器操作说明书进行。

- 1) 开启 One Touch2 仪器，选择“Clean Instrument”程序；确保试剂管中至少有 10 mL 反应油、3 mL 复苏液；确保旧扩增板和清洗接头安装正确；清空废液瓶，在针头下放置一个瓶盖或其他废液收集容器，收集废液；在屏幕上再次确认每个步骤，点击“Next”至清洗程序开始运行，清洗时间为 14 分钟。
- 2) One Touch2 清洗结束，卸下旧扩增板；装上新扩增板、收集管和收集桥；往每个收集管里面各加入 150  $\mu$ L 的破乳液，将反应油和复苏液瓶中的溶液颠倒 3 次混匀，补充反应油到试剂管 1/2 的位置，补充复苏液到试剂管 1/4 的位置。
- 3) 试剂准备：乳液 PCR 缓冲液室温融化，涡旋振荡 30 秒，瞬时离心至管底，置于室温备用；乳液 PCR 酶混合液瞬时离心，置于冰盒上备用；微珠溶液置于室温，使用前振荡 1 分钟，充分混匀，瞬时离心至管底。

**注意事项：**如乳液 PCR 缓冲液冻融后当天不进行使用则需置于 4℃ 保存。

- 4) 根据下表在室温条件下往乳液 PCR 缓冲液管中依次加入试剂，涡旋振荡 5 秒混匀。

**注意事项：**①在室温（15℃~30℃）配制该反应液。

②配制好的扩增反应液须在 15 分钟内在 One Touch2 仪器上进行反应。

组分	体积 ( $\mu$ L)
乳液 PCR 缓冲液	2000
无核酸酶水	80
乳液 PCR 酶混合液	120
微珠溶液	100
混合文库	100
体系总体积	2400

- 5) 取一个新的反应过滤器，加样孔朝上放置于架子上。将扩增反应溶液涡旋振荡 5 秒，瞬时离心至管底，立刻用 1000  $\mu$ L 移液器调至 800  $\mu$ L 吹吸混匀 3 次，分三次将扩增反应溶液从加样孔全部缓慢垂直加入过滤器中。吸取 200  $\mu$ L 的隔离油，从加样孔全部缓慢垂直加入过滤器中。
- 6) 取下 One Touch2 上的清洗接头，将上步中的反应过滤器缓慢翻转至加样孔朝下，装在 One Touch2 上。
- 7) 在 One Touch2 屏幕上点击“Run”，选择对应程序：Ion PI™ Hi-Q OT2 200 Kit，选择“Assisted”再次确定每一步骤，点击“Next”至程序运行，程序运行时间约为 5 小时。

**注意事项：**在程序开始 RUN 前先确认每个收集管里已加入 150  $\mu$ L 的破乳液。

- 8) 程序运行结束，在屏幕上单击“Final spin”，进行收集管离心 10 分钟。离心完后要立刻进行以下步骤的处理。

**注意事项：**程序运行开始至离心完成，时间不得超过 16 小时。

- 9) One Touch2 离心结束，在屏幕上单击“open lid”，盖子打开。取下转子上的收集桥，取出两个收集管，用 1000  $\mu$ L 的移液器，枪头对着非沉淀处，贴着液面小心吸走上清，各管中保留约 150  $\mu$ L 溶液。
- 10) 用移液器反复吹吸管中剩余溶液，充分混匀，将两个收集管中的液体全部转移到新的 1.5 mL 低吸附离心管中。
- 11) 往每个收集管加入 200  $\mu$ L 无核酸酶水吹吸混匀，将无核酸酶水全部转移至上步的 1.5 mL 低吸附离心管中。
- 12) 重复步骤 11) 一次。
- 13) 将步骤 12) 得到的溶液涡旋振荡 30 秒，15500 g 离心 8 分钟。枪头对着非沉淀处小心吸走上清，在管中保留约 100  $\mu$ L 溶液。

14) 往上步的 1.5 mL 低吸附离心管中加入 900 $\mu$ L 无核酸酶水至总体积达 1000  $\mu$ L。

**注意事项:** ① 本步骤中完成乳液 PCR 扩增的样本微珠溶液在 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 最多可保存 3 天

② 如果样本微珠溶液曾在 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 保存, 则接着进行步骤 15)

15) 将步骤 14) 的样本微珠溶液涡旋振荡 30 秒, 15500g 离心 8 分钟。枪头对着非沉淀处, 小心吸走上清, 在管中保留约 20  $\mu$ L 溶液。

16) 往上步的样本微珠溶液加入 80  $\mu$ L 模板重悬液, 使管中总体积达 100  $\mu$ L, 涡旋振荡 30 秒, 瞬时离心至管底。

**注意事项:** 本步骤获得的样本微珠溶液须当天进行 ES 操作。

17) 清洗 One Touch2 仪器, 如长期不使用则关闭电源。

#### 4.3 模板序列富集

1) 将链霉亲和素 C1 磁珠室温平衡 30 分钟。

2) 在 1.5 mL 离心管中配制 1M NaOH (配制方法: 0.1 mL 的 10M NaOH 和 0.9 mL 无核酸酶水混匀)。

**注意事项:** 1M NaOH 溶液需在 7 天内使用, 如超过 7 天, 须重新配制。

3) 根据下表在 1.5 mL 离心管中依次加入试剂, 配制洗脱液, 涡旋振荡 10 秒, 瞬时离心。洗脱液须当天使用。

组分	体积 ( $\mu$ L)
吐温溶液	280
1M NaOH	40
总体积	320

4) 链霉亲和素 C1 磁珠涡旋振荡 2 分钟, 充分混匀。取 100  $\mu$ L 加入到新 1.5 mL 低吸附离心管中; 将低吸附离心管置于磁力架上, 静置吸附 2 分钟, 小心吸走上清。

5) 往低吸附离心管中加入 1000  $\mu$ L C1 磁珠清洗液, 涡旋振荡 30 秒, 瞬时离心; 将低吸附离心管置于磁力架上, 静置吸附 2 分钟, 小心吸走上清。

6) 往低吸附离心管中加入 130  $\mu$ L C1 磁珠捕获液, 涡旋振荡 30 秒, 瞬时离心。

7) 取一条 8 孔反应条, 以左方右圆的方向摆放在实验桌上, 按下表中的顺序加入反应液。

顺序	试剂
孔 1	100 $\mu$ L 样本微珠溶液 (步骤 4.2.16) 中获得) + 130 $\mu$ L 链霉亲和素 C1 磁珠 (上述步骤 6 获得)
孔 2	空
孔 3	300 $\mu$ L 纯化清洗液
孔 4	300 $\mu$ L 纯化清洗液
孔 5	300 $\mu$ L 纯化清洗液
孔 6	空
孔 7	300 $\mu$ L 洗脱液 (上述步骤 3 获得)
孔 8	空

**注意事项:** 样本微珠溶液加入反应孔前须振荡 30 秒, 瞬时离心至管底后加样。

8) 将反应条置于 ES 的卡槽中, 在机械臂上装上 ES 吸头, 在收集孔处放置新的 0.2 mL PCR 管, 按下“Start/Stop”按钮, 运行机器, 机器运行约 40 分钟。

9) ES 运行结束后, 检查 PCR 管内的液体体积, 如液体大于 250  $\mu$ L 或明显小于 200  $\mu$ L, 则须重新进行模板扩增; 如液体体积不少于 200  $\mu$ L, 则继续下一步实验。ES 运行结束后, 样本放置时间不可超过 15 分钟。

10) 将收集有样本微珠溶液的 0.2 mL PCR 管从 ES 上取下, 在管盖标记样本信息, 15500 g 离心 5 分钟, 枪头对着非沉淀处, 小心吸走上清, 管中保留 10  $\mu$ L 溶液。

11) 加入 200  $\mu$ L 无核酸酶水, 涡旋振荡 60 秒, 15500 g 离心 5 分钟, 检查 0.2 mL PCR 管管底是否有棕色的残留磁珠。

① 如果 0.2 mL PCR 管管底没有棕色的残留磁珠: 接着进行以下步骤 12)。

② 如果 0.2 mL PCR 管管底有棕色的残留磁珠: 吸走 20  $\mu$ L 上清后, 移液器吹吸 10 次混匀样本微珠溶液, 将 PCR 管置于磁力架上静置 4 分钟, 将上清全部转移至新的 0.2 mL PCR 管。往原 PCR 管加入 20  $\mu$ L 无核酸酶水, 用移液器吹打 10 次混匀, 待磁珠澄清后, 将上清全部转移至前面的新 0.2 mL PCR 管中, 15500 g 离心 5 分钟。

12) 枪头对着非沉淀处, 小心吸走上清, 管中保留 10  $\mu$ L 液体, 加入 90  $\mu$ L 无核酸酶水, 涡旋振荡 60 秒, 瞬时离心, 备用。

**注意事项: 样本微珠溶液可在 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 保存不超过 3 天。**

## 5. 上机测序

按照使用东莞博奥木华基因科技有限公司生产的测序反应通用试剂盒(半导体法)(货号: S10010, 粤东械备 20170021 号)说明书操作。**注: 上机测序采用 BioelectronSeq 4000 基因测序仪。**

### 5.1 仪器清洗

开启氮气瓶, 调节压力为 30psi。开启测序仪, 进入主界面单击“清洗”, 根据测序仪的使用情况选择水洗或氯洗程序: 机器停用 72 小时以内, 选择水洗; 机器停用超过 72 小时, 选择氯洗。

1) 水洗: 清空 C1 和 C2 清洗瓶, 用 18 M $\Omega$  纯水洗两次。向 C1 和 C2 清洗瓶各加入 100 mL 18 M $\Omega$  纯水, 安装在 C1 和 C2 位置上。在测序仪屏幕上选择“清洗”选项, 装上芯片, 根据屏幕提示单击“下一步”直至水洗程序开始运行, 清洗时间约 18 分钟。

2) 氯洗: 清空两个氯洗瓶, 用 18 M $\Omega$  纯水洗两次氯洗瓶和玻璃氯瓶。向装有 1 L 18 M $\Omega$  纯水的玻璃氯瓶中加入氯片, 溶解 10 分钟, 加入 1 mL 1M NaOH, 颠倒混匀。用 0.45  $\mu$ m 滤头分别过滤 100 mL 洗液到氯洗瓶中, 将两个氯洗瓶安装在 C1 和 C2 位置上, 在测序仪屏幕上选择“清洗”选项, 装上芯片, 根据屏幕提示单击“下一步”直至氯洗程序开始运行, 清洗时间约 18 分钟。氯洗完成后, 更换芯片, 进行一次水洗。

### 5.2 仪器初始化(请根据测序试剂盒规格选择以下步骤 1) 或 2) 的适用方法)

1) 适用于试剂盒规格为 4C4R/套、8C8R/套

(1) 清空 W2 试剂瓶, 用 18 M $\Omega$  纯水洗三次。加入 1920 mL 的 18 M $\Omega$  纯水, 并加入整瓶的测序溶液 2 (125 mL/瓶), 盖好瓶盖, 颠倒混匀 4~8 次。取出两个新的 140 mL 试剂管, 分别标记为 W1 瓶和 W3 瓶。向 W1 瓶中加入 32  $\mu$ L 1 M NaOH, 往 W3 瓶中加入 40 mL~50 mL 测序溶液 3, 盖好瓶盖。

**注意事项: 测序溶液 2 避光保存。**

(2) 在测序仪屏幕上选择“初始化”和“Ion P1 Hi-Q Sequencing 200 Kit”, 更换 W1、W2、W3 位置的吸管, 将试剂瓶安装到对应的位置, 拧紧接口盖。装好用于初始化的芯片, 根据屏幕提示确定仪器状态, 点击“下一步”直至程序开始运行, 第一阶段约需 40 分钟。

**注意事项: ① 更换新吸管时须换新手套, 安装时手套不可触碰到吸管身。**

② 除氯洗芯片外, 水洗芯片和做过初始化的芯片均可用于做初始化芯片。

- (3) 预先取出 dGTP、dCTP、dATP 和 dTTP，将其置于冰盒上，融化后振荡 10 秒，离心 2 秒。
- (4) 第一阶段初始化完成后，取 4 个新的 140 mL 试剂管，分别做好“G、C、A、T”标记，并加入 70 μL 对应的 dNTP 溶液。更换 dNTP 位置的吸管，将试剂管安装到对应的位置并拧紧。根据屏幕提示，继续完成初始化，约需 40 分钟。初始化完成后回到主界面。

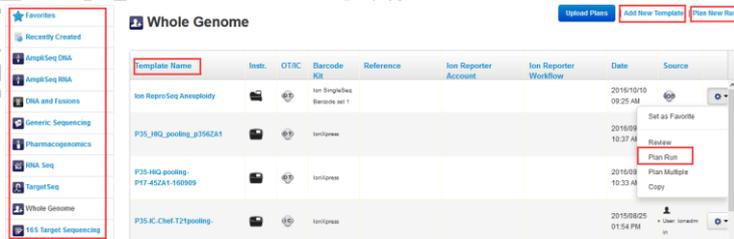
**注意事项：更新新吸管时须换新手套，安装时手套不可触碰到吸管身。**

2) 适用于试剂盒规格为 4C8R/套

- (1) 按步骤 1) 完成一次初始化，可连续进行两次测序。即第二个 RUN 的运行之前，不进行仪器初始化步骤，待第一个 RUN 完成测序后可直接对二个 RUN 进行以下的操作。

### 5.3 设置 Plan

- 1) 登陆测序仪服务器，单击选择“Plan”-“Templates”。
- 2) 在左侧栏“Favorites”中选择“Whole Genome”，单击右上角“Plan new run”或者“Add New Template”新建模板。（如已有模板，直接在“Template Name”列表中选择，点击下拉列表的“Plan Run”。）



- 3) 进入 Run 设置界面，有 6 个选项卡：
- 4) 在“Application”中选中“DNA”和“Whole Genome”，单击“Next”。
- 5) 按照下表选择 Kits 信息，其余的留空，然后点击“Next”。

选项	选择类型
Library Kit Type	Ion Plus Fragment Library Kit

Create Plan	
IonReporter	Application
Templating Kit	Ion PI Hi-Q OT2 200 Kit
Sequence Kit	Ion PI Hi-Q 200 Sequence Kit
chip Type	Ion PI Chip
Barcode Set	IonXpress
Base Calibration Mode	Default Calibration
Flow	320

- 6) Plugins 插件：按实际测序需求勾选相应的选项，单击“Next”。
- 7) Projects 数据形式选项为默认值，不做修改；或新建一个文件夹并选择该文件夹，单击“Next”。
- 8) 在 Plan 界面，在 Run Plan Name 输入 run 名称，在 Number of Barcodes 后输入 barcode 数量，单击后面的按钮。在 Sample Name 一栏输入样品编号，从下拉菜单中选择对应的 barcode 号。输入后须核对样本编号和 Barcode 号是否正确。

9) 单击“Plan Run”，完成设置 Plan。

#### 5.4 准备上机文库

1) 预先取出质控微珠溶液、测序引物、测序聚合酶置于冰盒上。

2) 在仪器初始化快结束时进行文库的上机准备。将质控微珠溶液振荡 30 秒混匀，瞬时离心；取 5  $\mu\text{L}$  加入样本微珠溶液中，涡旋振荡 30 秒，15500 g 离心 5 分钟；枪头对着非沉淀处，小心吸走上清，保留 10  $\mu\text{L}$  溶液。

3) 往上步样本微珠溶液加入 15  $\mu\text{L}$  退火缓冲液，总体积为 25  $\mu\text{L}$ 。

4) 测序引物在冰上融化后，涡旋振荡 10 秒，混匀，离心 2 秒。往上步微珠样本溶液加入 20  $\mu\text{L}$  测序引物，确保总体积是 45  $\mu\text{L}$ 。将样本微珠溶液涡旋振荡 60 秒，混匀，瞬时离心。

5) 在 PCR 仪上按以下程序对样本微珠溶液进行退火：95 $^{\circ}\text{C}$  2 分钟，37 $^{\circ}\text{C}$  2 分钟，20 $^{\circ}\text{C}$  保持。

6) 退火完毕后，往上步样本微珠溶液加入 10  $\mu\text{L}$  上样缓冲液，涡旋振荡 10 秒，混匀，瞬时离心，室温条件放置。

#### 5.5 上样和测序

1) 将芯片拆包装取出置于吊篮中，芯片的缺口与吊篮弧度较大的缺口在同一侧。吸取 55  $\mu\text{L}$  上一步中得到的样本微珠溶液，注入到芯片的进样孔中。

2) 将芯片放置在离心机上，芯片的缺口朝外，与旧芯片配平。离心 10 分钟。

3) 离心过程中，准备以下试剂：

① 在 1.5 mL 离心管中，分别加入 0.5 mL 的退火缓冲液和 0.5 mL 无核酸酶水混匀，配制成 50% 退火缓冲液。该溶液配制后，在 7 天内可使用。

② 在 1.5 mL 离心管中，分别加入 0.5 mL 的 100% 异丙醇溶液和 0.5 mL 退火缓冲液混匀，配制成 50% 冲洗液。该溶液当天使用当天配制。

③ 在 1.5 mL 离心管中，分别加入 60  $\mu\text{L}$  50% 的退火缓冲液和 6  $\mu\text{L}$  的测序聚合酶混匀，配制成酶反应液。该溶液配制后置于冰盒上。

④ 在 1.5 mL 离心管中，分别加入 49  $\mu\text{L}$  50% 的退火缓冲液和 1  $\mu\text{L}$  发泡液混匀，配制成发泡剂。

**注意事项：**可在 5 mL 管中分别加入 4.9 mL 50% 退火缓冲液和 100  $\mu\text{L}$  发泡液混匀，放在 4 $^{\circ}\text{C}$  保存，6 个月内可重复使用。

4) 用 100  $\mu\text{L}$  移液器打入 100  $\mu\text{L}$  空气进入发泡剂中，快速反复吹打液体 5 秒钟，使大气泡变成小泡。

5) 重复一次操作 4) 的操作，使发泡剂成为密致的小泡。

**注意事项：**泡沫体积在 250  $\mu\text{L}$  左右，避免注入过量的空气。

6) 离心完毕后取出芯片，匀速将 100  $\mu\text{L}$  细小的泡泡注入加样孔中，并将出样槽中溢出的液体吸走；往进样槽加入 55  $\mu\text{L}$  50% 的退火缓冲液，将芯片放回离心机，离心 30 秒。

7) 重复一次步骤 6) 的操作。

8) 往芯片的进样孔垂直缓慢加入 100  $\mu\text{L}$  冲洗液，在另一个孔吸走排出来的液体。再次重复本操作一次。

9) 往芯片的进样孔垂直缓慢加入 100  $\mu\text{L}$  50% 的退火缓冲液，避免产生气泡，在另一个孔吸走排出来的液体。再次重复操作一次。

10) 往芯片的进样孔垂直缓慢加入 65  $\mu\text{L}$  酶反应液，避免产生气泡。在另一个孔吸走排出来的液体。

- 11) 室温避光孵育 5 分钟后，将芯片安装到测序仪芯片槽上，运行程序，选择提前设置好的 Plan，核对无误后，开始测序，运行时间约为 2.5 小时。
- 12) 程序运行结束后 72 小时内，返回主菜单，进行水洗。如超过 72 小时，则对仪器进行氯洗再进行水洗。水洗完毕，在主菜单上关闭仪器，在 4 个 dNTP 孔上套上管子防尘。如长时间不使用，关闭氮气瓶气阀。

## 6. 测序数据分析

测序结束后，对测序数据进行分析，得到样本 21 号染色体、18 号染色体和 13 号染色体的 Z 值（Z-score），根据每个样本的 Z 值判断样本的检测结果。

数据分析的核心算法采用通用函数计算 Z 值。将测序产生的读长（Reads）比对到人类参考基因组，并过滤低质量比对结果和重复序列，获得每个样本的唯一匹配读长数据集合(unique reads)。随后计算每个样本每条染色体的 unique reads 数占该样本所有常染色体 unique reads 数的百分比%chrN，即 Reads ratio 值。%chrN 的计算公式如下：

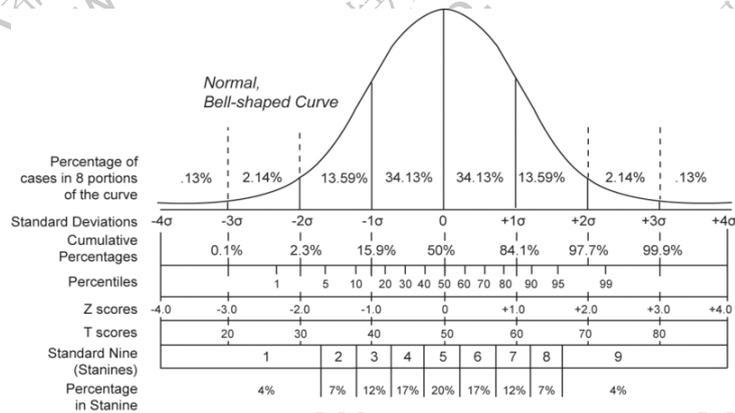
$$\%chrN = \frac{\text{染色体 N 上 unique reads 的总数}}{\text{全部常染色体上 unique reads 的总数}} \times 100\% \quad (N=1, 2, 3...22, X, Y)$$

最后，计算待测样本染色体的 Z-score，根据 Z-score 值大小从而判断该染色体是否存在异常。Z-score 的计算公式如下：

$$z\text{-score} = \frac{\text{样本的}\%chrN - \text{参考样本的}\%chrN\text{的平均值}}{\text{参考样本的}\%chrN\text{的标准差}} \quad (N=1, 2, 3...22, X, Y)$$

### 【阳性判断值】

对 1910 例阴性样本和 90 例阳性样本进行测序和数据分析。对 1910 例阴性样本的 unique reads 百分比采用 Kolmogorov-Smirnov 检验和 shapiro 检验进行正态检验分析，结果表明 21、18、13 号染色体的 unique reads 百分比满足标准正态分布（如图 1 所示），因此可使用 Z 检验来验证阳性样本与阴性样本是否存在显著性差异，并以 Z 值大于 3 判断为阳性。通过 543 例阴性样本和 57 例阳性样本的验证结果显示建立的阳性判断值可准确判断阴



性和阳性。

图 1 Z 值的标准正态分布图

根据 2453 例阴性样本的 chr13、chr18 和 chr21 的 Z 值，分别拟合各染色体 Z 值的概率密度分布，并计算 Z 值落在不同区间的概率。如表 3-7 所示，阴性样本的 Z 值≤1.96 的概率在 97.49%~97.96%；Z 值在(1.96, 3]的概率

在 1.95%~2.37%之间；Z>3 的概率为 0.09%~0.14%。在标准正态分布下，Z 值≤1.96 的概率是 97.50%，Z 值在(1.96, 3]之间概率为 2.36%；Z 值>3 的概率为 0.14%。因此，阴性样本的 Z 值分布与标准正态分布基本一致。

表 3-7 阴性样本的 Z-score 落在不同区间的概率

类别	Z≤1.96	1.96<Z≤3	Z>3
标准正态分布 Z-score	97.50%	2.36%	0.13%
阴性样本 chr13 Z-score	97.66%	2.23%	0.11%
阴性样本 chr18 Z-score	97.49%	2.37%	0.14%
阴性样本 chr21 Z-score	97.96%	1.95%	0.09%

考虑到在胎儿 DNA 浓度较低的情况下（胎儿 DNA 浓度<4%），阳性样本的 Z 值有可能小于 3。在这种情况下，将 Z 值<3 的样本直接判为阴性将会造成漏检。为保证检测结果的准确性，将 Z 值在(1.96, 3]内定义为灰区，认为落在灰区中的样本不能确定为阴性或者阳性样本，需要重抽血进行验证。

因此，本研究对胎儿染色体非整倍体（T21、T18、T13）的阳性判断值及参考区间设置如下：

Z 值	判定
≤1.96	阴性
(1.96, 3]	灰区
>3	三体阳性

① Z 值≤1.96 的样本，判定为阴性样本。根据标准正态分布，约 97.5%的正常样本都能得到阴性的检测结果。

② Z 值在(1.96, 3]的样本，判定为灰区样本。如胎儿 DNA 浓度≥4%，则判定为阴性；如胎儿 DNA 浓度<4%，则建议重新抽血取样后复检。对位于灰区内且胎儿 DNA 浓度<4%的样本进行重采血复检，能降低由于胎儿 DNA 浓度过低而导致假阴性的概率，如复检结果仍为灰区且胎儿 DNA 浓度<4%，则建议结合临床信息做进一步检查。其中胎儿 DNA 浓度使用 Y 染色体比例的线性回归模型和基于游离 DNA 长度分布信息的线性回归模型计算所得。

③ Z 值>3 的样本，判定为三体阳性样本。由于正常样本 Z 值>3 的概率约为 0.1%，采用 Z 值>3 作为判定三体阳性的标准，其对应的假阳性率约为 0.1%。

#### 【检验结果的解释】

- 文库浓度：**当文库浓度小于 1 nmol/L 时，应重新建库。
- 数据量控制：**测序有效数据量≥3.5M，如数据量不足，应重新测序。
- 质量控制：**试剂盒内的阳性对照品的检测结果为 21-三体、18-三体和 13-三体均为阳性；阴性对照品的检测结果为 21-三体、18-三体和 13-三体均为阴性，否则试验结果视为无效。
- 判定阴性样本：**当 21 号染色体、18 号染色体或 13 号染色体的 Z 值≤1.96 时，表明检测样本的 21 号染色体、18 号染色体或 13 号染色体与参考数据库中正常的号染色体无显著差异，即 21 号染色体、18 号染色体或 13 号染色体染色体数目正常；
- 判断灰区样本：**当 21 号染色体、18 号染色体或 13 号染色体的 Z 值落于灰区(1.96, 3]范围内时，若无法排除由于胎儿 DNA 浓度过低 (<4%) 而导致假阴性的可能，则建议重新抽血取样后复检；如复检结果仍为灰区且胎儿 DNA 浓度<4%，则建议结合临床信息做进一步检查。
- 判断阳性样本：**当 21 号染色体、18 号染色体或 13 号染色体的 Z 值>3 时，表明检测样本的 21 号染色体、18 号染色体或 13 号染色体与参考数据库中正常的染色体存在显著差异，即检测样本的 21 号染色

体、18号染色体或13号染色体的数目存在异常，预测患有21-三体综合征、18-三体综合征或13-三体综合征；

分别以1例21-三体综合征、1例18-三体综合征和1例13-三体综合征的样本为例，对测序数据进行分析得到样本每条染色体的Z值，如图2所示：



图2 16例样本的检测结果

如图2所示，序号为1的样本的21号染色体Z值为11.327，绝对值大于3，故该样本21号染色体存在异常，而其他染色体的绝对值都小于1.96，故判定该样本为21-三体。

如图2所示，序号为4的样本的18号染色体Z值为12.497，绝对值大于3，故该样本18号染色体存在异常，而其他染色体的绝对值都小于1.96，故判定该样本为18-三体。

如图2所示，序号为11的样本13号染色体Z值为8.729，绝对值大于3，故该样本13号染色体存在异常，而其他染色体的绝对值都小于1.96，故判定该样本为13-三体。

**【检验方法的局限性】**

1. 本试剂盒作为胎儿染色体非整倍体筛查检测，其结果仅供临床参考，不能作为诊断的唯一依据。对患者的临床诊断应采用金标准方法（染色体核型分析）并结合其症状/体征、病史及其他实验室检查等情况综合进行。
2. 本试剂盒适用于孕妇外周血浆样本检测，不适用于其它样本检测。
3. 胎儿游离DNA浓度在孕妇外周血中存在较大个体差异，变化范围从2%到30%不等且和孕周密切相关，因此若因胎儿游离DNA浓度较低造成检验失败时，可待孕周较大时再次抽血检测。
4. 以下几种情况的孕妇样品可能会出现假阳性或假阴性结果，需要结合其他检测结果进行综合判断：
  - ◇ 孕妇本人为染色体非整倍体疾病患者、其他染色体疾病患者或携带者；
  - ◇ 胎儿染色体异常中的平衡易位、嵌合型三体异常；
  - ◇ 怀有双胞胎或者多胎（三胎及三胎以上）的孕妇；
  - ◇ 近期接受过移植手术、干细胞治疗；近期接受过免疫治疗或输注过异体血制品；

- ◇ 孕妇本人为肿瘤患者；
- ◇ 通过体外受精—胚胎移植（IVF-ET）方式受孕的孕妇；
- ◇ 体重严重超重的孕妇。

5. 样本采集、运输及处理不当、未按说明书操作均有可能导致假阳性或假阴性结果；在样本采集，保存、运输中需遵循的原则及注意事项，如：

- ◇ 检测样本仅适用于 EDTA 抗凝采血管及游离核酸常温运输保存管；
- ◇ 颠倒混匀时动作应轻柔，防止溶血；
- ◇ 如选择使用 EDTA 抗凝管采集孕妇外周血，则其血管全血样本采集后置于 2℃~8℃ 存放，须在 8h 内完成血浆分离；如选择常温运输保存管的全血样本，要求为采集后置于 4℃~30℃，并且须在 96 小时内完成血浆分离。
- ◇ 血浆分离过程中注意不要吸到中间层的白细胞；
- ◇ 血浆样本反复冻融次数应≤3 次；
- ◇ 干冰条件下运输：运输过程中需放置缓冲装置，避免样本管在运输过程中被干冰冰块挤破。

#### 【产品性能指标】

#### 1. 企业参考品检测

- 1) 阳性符合率：采用本试剂盒对 10%浓度的 T21、T18、T13 样本共 7 例进行检测，阳性符合率为 100%；
- 2) 阴性符合率：采用本试剂盒对染色体核型正常的阴性样本共 7 例进行检测，阴性符合率均为 100%。
- 3) 检测限：采用企业检测限参考品进行检测时，试剂盒的检测结果均为对应阳性。
- 4) 微缺失微重复参考品符合率：采用本试剂盒对微缺失微重复参考品中 18 号染色体中 20 Mb 以上微重复样本全部检出 T18 阳性，其余微缺失微重复参考品检测结果应为 T21、T18、T13 阴性，表明其他染色体微缺失微重复对 13、18、21 号染色体的检测准确性无明显影响。
- 5) 嵌合体参考品符合率：采用本试剂盒对 10%浓度的嵌合比例为 70%的 T21、T18、T13 样本进行检测，检测结果均为对应核型阳性；对 10%浓度的嵌合比例为 30%的 T21、T18、T13 样本进行检测，部分样本检出阳性。
- 6) 重复性：采用三批试剂盒对企业参考品中重复性参考品进行 10 次重复检测，检测结果全部为对应阳性。

#### 2. 抗干扰性能分析

本试剂盒检测孕妇外周血中的游离核酸，样本中可能存在的血细胞成分残留对检测结果可能造成影响。通过向血浆样品中添加不同浓度的血红蛋白、甘油三酯、胆红素进行抗干扰性能分析。研究显示，当血液中血红蛋白的添加量≤500 mg/dL、甘油三酯的添加量≤1000 mg/dL、胆红素的添加量≤40 mg/dL 对本试剂盒检测结果无影响。

使用 EDTA 采血管和柠檬酸钠采血管采集外周血，对本试剂盒检测结果无影响；使用含有肝素抗凝剂采集外周血，对本试剂检测结果有影响。

#### 3. 检测限

本试剂盒检测 T21、T18、T13 的最低阳性 DNA 浓度为 3.5%；在阳性 DNA 浓度为 3.5%的条件下，当 DNA 量≥0.5ng 时可检出对应阳性。

#### 4. 精密度

- 1) 批内/批间精密度：由 2 人为一组，两组实验操作人员分别使用 3 个批次试剂盒对阴性样品、临界阳性样品、强阳性样品进行连续 3 轮检测，每批进行 2 次重复检测，3 个批次内以及批间的文库浓度 CV

(变异系数)均 $<15\%$ ，阳性样本符合率为 $100\%$ ，阴性样本符合率为 $100\%$ ，表明试剂盒批内/批间精密度良好。

2) 室内/室间精密度：两组实验操作人员在不同实验室分别采用3批试剂盒和不同测序仪对阴性样品、临界阳性样品、强阳性样品进行检测，每个样本重复检测2次，连续3轮检测，室内/室间的文库浓度CV均 $<15\%$ ，阳性样本符合率为 $100\%$ ，阴性样本符合率为 $100\%$ ，表明试剂盒室内/室间精密度良好。

3) 不同操作人员精密度：由2组不同的操作人员使用3批试剂盒对阴性样品、临界阳性样品、强阳性样品进行连续3轮检测，不同操作人的文库浓度CV均 $<15\%$ ，阳性样本符合率为 $100\%$ ，阴性样本符合率为 $100\%$ ，表明试剂盒不同操作人员检测的精密度良好。

5. **特异性**：使用试剂盒对部分阳性和阴性企业参考品进行检测，3例阳性参考品样本的检测结果全为对应三体阳性，3例阴性样本及9例其他染色体异常干扰样本的检测结果全为阴性，表明其他染色体非整倍体(T6、T9、T15、T16、T22、XO、XXY、XXX和XXYY)对于本试剂盒检测21、18、13号染色体非整倍体无显著影响。

6. **微缺失微重复**：1号染色体、4号染色体、5号染色体、8号染色体、15号染色体、16号染色体和X染色体微缺失微重复对本试剂盒检测21、18、13号染色体非整倍体无显著影响；本试剂盒检测18号染色体上微重复20M以上可以检出18三体阳性。

7. **嵌合体**：本试剂盒对于70%异常嵌合体全部检出，30%异常嵌合体为检出或未检出。

#### 8. 临床试验

本产品在三家临床试验机构开展，以染色体核型分析/出生后随访结果为临床参考标准进行对比，共计检测有效样本10818例，临床灵敏度为 $100\%$  (95% CI: 88.65%, 100%)，临床特异度为 $99.91\%$  (95% CI: 99.83%, 99.95%)。高危孕妇样本失访率为 $1.12\%$ ，低危孕妇样本失访率为 $3.41\%$ 。

#### 【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外诊断。
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、临床基因扩增实验室的管理规范执行。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(试剂准备区、标本制备区、扩增和产物分析区)，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。
3. 阴、阳性对照品内含血浆，为人源性物质，可能具有潜在感染性。
4. 操作注意安全防护。阴、阳性对照品和样品提取应在规定的实验场所进行，穿戴防护衣物、一次性手套、口罩；所有直接接触过样品的物品应进行消毒后丢弃或再次使用。
5. 所使用的接触试剂的材料均要求干燥、洁净，以防止污染。实验过程中涉及的耗材为一次性使用，不得重复使用。
6. 检测前必须仔细检查所有样品，应排除母血细胞污染的样品及溶血样品。如果出现母血污染或溶血情况，建议废弃该样品，应重新获取新的样品。
7. 使用前，液体试剂应混合均匀。尽量避免反复冻融。
8. 操作过程中，尽量减少荧光试剂的曝光时间。

9. 本试剂一次性使用，不同批号试剂禁止交叉使用，请勿使用过期试剂。

**【标识的解释】**

标签上“**IVD**”标识代表体外诊断医疗器械。

**【参考文献】**

1. Chiu RW, Chan KA, Gao Y, Lau VY, Zheng W, Leung TY, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008;105 (51) :20458-63.

2. Fan HC, Quake SR. Sensitivity of noninvasive prenatal detection of fetal aneuploidy from maternal plasma using shotgun sequencing is limited only by counting statistics. PloS one. 2010;5 (5) :e10439.

**【基本信息】**

注册人/生产企业名称：东莞博奥木华基因科技有限公司

住所：东莞松山湖高新技术产业开发区桃园路1号莞台生物技术合作育成中心11栋

联系方式：

网址：

售后服务单位名称：

联系方式：

网址：

生产地址：东莞松山湖高新技术产业开发区桃园路1号莞台生物技术合作育成中心11栋

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】**